



4th MS FORENSICS 2024

Roma, 21-22 marzo 2024
Ministero dell'Interno
Dipartimento della Pubblica Sicurezza
Polo Tuscolano - Sala "Palatucci"



Evento organizzato da:
Direzione Centrale Anticrimine della Polizia di Stato
Società Chimica Italiana



ATTI DI CONGRESSO

Comitati

Comitato Scientifico

Antonietta Lombardozi
Sabino Napoletano
Damiano Ricci

*Ministero dell'Interno – Dipartimento della Pubblica
Sicurezza- Direzione Centrale Anticrimine della Polizia di
Stato – Servizio Polizia Scientifica*

Giuliana Bianco
Marco Gaspari
Fulvio Magni
Fabiana Piscitelli
Flaminia Vincenti

Società Chimica Italiana - Divisione di Spettrometria di Massa

Federica Bianchi
Alessandro Giuffrida
Luigi Mondello
Alberto Salomone
Manuel Sergi

Società Chimica Italiana - Divisione di Chimica Analitica

Comitato Organizzatore

Barbara Ambu
Gabriele Casini

*Ministero dell'Interno – Dipartimento della Pubblica Sicurezza-
Direzione Centrale Anticrimine della Polizia di Stato – Servizio
Polizia Scientifica*

Maria Assunta Acquavia
Mauro Di Pasquale

Società Chimica Italiana - Divisione di Spettrometria di Massa

Ilenia Bracaglia
Federico Fanti

Società Chimica Italiana - Divisione di Chimica Analitica

Il workshop MS Forensics 2024 è supportato e sponsorizzato da:



Agenda

21 Marzo 2024

13:00	<i>Registrazione dei partecipanti</i>
	Saluti istituzionali
	D.G. della P. di S. Alessandro Giuliano - <i>Direttore Centrale Anticrimine della Polizia di Stato</i>
	Prof. Gianluca Maria Farinola - <i>Presidente della Società Chimica Italiana - SCI</i>
14:30	Prof.ssa Giuliana Bianco - <i>Presidente della Divisione di Spettrometria di Massa - SCI</i>
	Prof. Manuel Sergi - <i>Coordinatore del GL di Chimica Analitica Forense - DCA-SCI</i>
	Avvisi ai partecipanti
	Sessione 1 - Moderatori: D.T.S. della P. di S. Maria Cristina Pigo - Prof. Fulvio Magni
15:00	I - Prevenire l'errore nelle attività forensi. I contributi dei Sistemi di Qualità nella Polizia Scientifica
	D.S. della P. di S. Dr. Luigi Rinella - <i>Direttore Servizio Polizia Scientifica</i>
15:20	PL01 - SNAP: Sistema Nazionale di Allerta Precoce
	Simona Pichini - <i>Istituto Superiore di Sanità - Direttore Centro Nazionale Dipendenze e Doping</i>
16:05	OR01 - Dall'ottimizzazione di metodi di estrazione alla costruzione di un modello di pattern recognition per il profiling di metamfetamina da strada
	D.T.S. della P. di S. Serena Detti - <i>Servizio Polizia Scientifica - Direttore Sezione indagini Sostanze Stupefacenti e Psicotrope</i>
	Veronica Giamogante - <i>Dipartimento di Chimica e tecnologie del farmaco, Sapienza Università di Roma</i>
16:20	OR02 - L'importanza dell'effetto matrice nelle analisi LC-MS multi-analita
	Marta Massano - <i>Dipartimento di Chimica, Università degli Studi di Torino</i>
16:35	OR03 - Extractive-Liquid Sampling Electron Ionization-Mass Spectrometry (E-LEI-MS): analisi diretta di farmaci e droghe da stupro
	Giovanna Nevola - <i>Dipartimento di Scienze Pure e Applicate (DiSPeA), Università degli Studi di Urbino Carlo Bo</i>
16:50	OR04 - Determinazione di nuove sostanze psicoattive in campioni forensi mediante analisi UHPLC-MS/MS con approccio suspect screening
	Camilla Montesano - <i>Dipartimento di Chimica, Sapienza Università di Roma</i>
	Sessione 2 - Moderatori: D.T.S. della P. di S. Guido Persico - Dott.ssa Fabiana Piscitelli
17:05	OR05 - Aspetti tecnici e di governance sanitaria del primo programma VEQ nazionale per l'analisi di NPS su matrice ematica
	Francesca di Gaudio - <i>PROMISE, Università di Palermo; Azienda Ospedaliera Ospedali Riuniti Villa Sofia Cervello, Sezione di Cromatografia e Spettrometria di Massa, Controllo Qualità e Rischio Chimico (CQRC)</i>
17:20	OR06 - Studio delle alterazioni del profilo metabolomico in seguito alla somministrazione di oppioidi in modelli murini mediante UHPLC-HRMS
	Gaia Di Francesco - <i>Dipartimento di Chimica, Sapienza Università di Roma</i>

17:35	OR07 - Errore e sistemi biometrici D.T.S. della P. di S. Massimo Gneo - <i>Servizio Polizia Scientifica - Coordinatore di Attività Complesse</i>
17:50	OR08 - Screening forense di seconda generazione mediante spettrometria di massa accurata ad alta risoluzione Sophie Titat - <i>Agilent Technologies</i>
18:05	OR09 - Applicazione degli isotopi stabili di bioelementi a supporto dell'analisi forense Matteo Perini - <i>Fondazione Edmund Mach</i>
18:20	FL01 - Caratterizzazione spettroscopica di un preparato cosmetico a matrice gelatinosa Valentina Greco - <i>Dipartimento Scienze Chimiche, Università di Catania</i>
18:25	FL02 - Estrazione parallela con membrana liquida artificiale (PALME) per la determinazione di sostanze stupefacenti nel fluido Orale mediante analisi HPLC-MS/MS Martina Croce - <i>Dipartimento di Malattie Infettive, Microbiologia e Sanità Pubblica, Sapienza Università di Roma</i>
18:30	Chiusura lavori
18:40	<i>Aperitivo di benvenuto - buvette della Sala "Palatucci"</i>

22 Marzo 2024

Sessione 3 - Moderatori: D.T.S. della P. di S. Maria Valeria Picci - Prof. Alberto Salomone	
09:00	PL02 - Il fattore umano e la competenza nelle scienze forensi D.T.S. della P. di S. Alessandro Possi - <i>Servizio Polizia Scientifica - Responsabile Area 3 Gabinetto regionale Polizia Scientifica per la Toscana di Firenze</i> C.C.T. della P. di S. Elena Lucatelli - <i>Servizio Polizia Scientifica - Funzionario addetto Sezione Analisi Merceologiche Forensi</i> P.D.T. della P. di S. Stefano Loddo - <i>Vice consigliere Ministeriale</i>
09:45	PL03 – Evoluzione delle analisi antidoping: nuove matrici, nuovi biomarkers, nuove tecnologie Francesco Botrè - <i>Laboratorio Antidoping FMSI; ISSUL - Institute of Sport Science, University of Lausanne, Synathlon - Quartier Center</i>
10:30	IN01 - Applicazioni chemiometriche nell'analisi delle vernici per auto in campo forense Stima dell'errore di tipo 2 (falso negativo) Col. Sergio Schiavone; Lgt. Rosario Casamassima - <i>Raggruppamento Carabinieri Investigazioni Scientifiche - RIS Roma</i>
10:50	IN02 - I Vigili del Fuoco e la Spettrometria di Massa Quindici anni di ricerca ed esperienze al servizio del cittadino D.S. Vincenzo Bennardo; C.S.E. Fabrizio Malaspina - <i>Corpo Nazionale dei Vigili del Fuoco, Soccorso Pubblico e Difesa Civile. Comando dei Vigili del Fuoco di Torino</i>
11:10	OR10 - Sviluppo e validazione di un metodo per la determinazione del BPE tramite CGxGC-TOFMS Marco Pazzi - <i>Dipartimento di Chimica, Università degli Studi di Torino</i>

11:25	OR11 - Cross-contamination durante i procedimenti di conservazione dei campioni di detriti di incendio valutata mediante spettrometria di massa. Risultati preliminari V.E. Rocco Bochicchio - <i>Corpo Nazionale dei Vigili del Fuoco, Soccorso Pubblico e Difesa Civile. Comando dei Vigili del Fuoco di Potenza - Basilicata</i>
11:40	<i>Intervallo e sessione poster</i>
Sessione 4 - Moderatori: P.D.T. della P. di S. Damiano Ricci - Prof.ssa Federica Bianchi	
12:10	KN - Validazione dei metodi e incertezza di misura: le guide Eurachem Emanuela Gregori - <i>Istituto Superiore di Sanità; Eurachem Italia</i> Marina Patriarca - <i>Eurachem</i>
12:40	OR12 - MVA e SpectrApp: due dashboard open-source per la validazione dei metodi analitici e dei modelli chemiometrici Eugenio Alladio - <i>Dipartimento di Chimica, Università degli Studi di Torino</i>
12:55	OR13 - Analisi ICP-MS per la determinazione di residui inorganici da sparo (IGSR) in fluidi orali Flavia Pagano - <i>Delta APSService - Dipartimento di Malattie Infettive, Microbiologia e Sanità Pubblica, Sapienza Università di Roma</i>
13:10	OR14 - Il ruolo della chemiometria e della spettrometria di massa ad alta risoluzione abbinata alla cromatografia liquida a ultra-alte prestazioni nella identificazione di frodi alimentari: il caso della tracciabilità di latte per produzioni DOP Nicolò Riboni - <i>Dipartimento di Scienze Chimiche, della Vita e della Sostenibilità Ambientale, Università degli Studi di Parma</i>
13:25	OR15 - L'analisi molecolare come strumento d'indagine e prova giudiziaria: quando un rapporto madre-figlia, che apparentemente termina con un aiuto alla morte per soffocamento diventa omicidio premeditato Sergio Indelicato - <i>Azienda Ospedaliera Ospedali Riuniti Villa Sofia Cervello, Sezione di Cromatografia e Spettrometria di Massa, Controllo Qualità e Rischio Chimico (CQRC)</i>
13:40	FL03 - Indagini forensi di fuoriuscite di prodotti petroliferi: approcci avanzati utilizzando la Spettrometria di Massa Alice d'Angelo - <i>Isotope Tracer Technologies Europe S.r.l.</i>
13:45	FL04 - L'uso del TOF-SIMS IMAGING per la rilevazione di impronte digitali sovrapposte Paola Benedetta Castellino - <i>Dipartimento di Scienze Chimiche, Università degli Studi di Catania</i>
13:50	FL05 - I capelli come matrice per l'analisi di composti organici in tracce: una miniera di informazioni incerte Matteo Baglietto - <i>Dipartimento di Chimica e Chimica Industriale, Università degli Studi di Genova</i>
13:55	<i>Chiusura lavori e saluti</i>

Programma scientifico

Introduzione ai lavori	9
L- Prevenire l'errore nelle attività forensi. I contributi dei Sistemi di Qualità nella Polizia Scientifica	10
Presentazioni Plenarie	11
PL01- SNAP: Sistema Nazionale di Allerta Precoce.....	12
PL02- Il fattore umano e la competenza nelle scienze forensi.....	13
PL03- Evoluzione delle analisi antidoping: nuove matrici, nuovi biomarkers, nuove tecnologie... ..	14
Keynote	15
KN- Validazione dei metodi e incertezza di misura: le guide Eurachem Errore. Il segnalibro non è definito.	
Interventi su invito	17
IN01- Applicazioni chemiometriche nell'analisi delle vernici per auto in campo forense. Stima dell'errore di tipo 2 (falso negativo)	18
IN02- I Vigili del Fuoco e la Spettrometria di Massa. Quindici anni di ricerca ed esperienze al servizio del cittadino	19
Presentazioni orali	20
OR01- Dall'ottimizzazione di metodi di estrazione alla costruzione di un modello di pattern recognition per il profiling di metamfetamina da strada	21
OR02- L'importanza dell'effetto matrice nelle analisi LC-MS multi-analita.....	22
OR03- Extractive-Liquid Sampling Electron Ionization-Mass Spectrometry (E-LEI-MS): analisi diretta di farmaci e droghe da stupro	23
OR04- Determinazione di nuove sostanze psicoattive in campioni forensi mediante analisi UHPLC-MS/MS con approccio suspect screening	24
OR05- Aspetti tecnici e di governance sanitaria del primo programma VEQ nazionale per l'analisi di NPS su matrice ematica.	25
OR06- Studio delle alterazioni del profilo metabolomico in seguito alla somministrazione di oppioidi in modelli murini mediante UHPLC-HRMS	26
OR07- Errore e sistemi biometrici	27
OR08- 2nd Generation Forensic Screening using Accurate Mass High Resolution Mass Spectrometryi.....	28
OR09- Applicazione degli isotopi stabili di bioelementi a supporto dell'analisi forense	29
OR10- Sviluppo e validazione di un metodo per la determinazione del BPE tramite CGxGC-TOFMS	30
OR11- Cross-contamination durante i procedimenti di conservazione dei campioni di detriti di incendio valutata mediante spettrometria di massa. Risultati preliminari.	31
OR12- MVA e SpectrApp: due dashboard open-source e user-friendly per la validazione dei metodi analitici e dei modelli chemiometrici.....	32
OR13- Analisi ICP-MS per la determinazione di residui inorganici da sparo (IGSR) in fluidi orali	33

OR14- Il ruolo della chemiometria e della spettrometria di massa ad alta risoluzione abbinata alla cromatografia liquida a ultra-alte prestazioni nella identificazione di frodi alimentari: il caso della tracciabilità di latte per produzioni DOP.....	34
OR15- L'analisi molecolare come strumento d'indagine e prova giudiziaria: quando un rapporto madre-figlia, che apparentemente termina con un aiuto alla morte per soffocamento diventa omicidio premeditato	35
Presentazioni Flash.....	36
FL01- Caratterizzazione spettroscopica di un preparato cosmetico a matrice gelatinosa.....	37
FL02- Estrazione parallela con membrana liquida artificiale (PALME) per la determinazione di sostanze stupefacenti nel fluido orale mediante analisi HPLC-MS/MS	38
FL03- Indagini forensi di fuoriuscite di prodotti petroliferi: approcci avanzati utilizzando la Spettrometria di Massa.....	39
FL04- L'uso del TOF-SIMS IMAGING per la rilevazione di impronte digitali sovrapposte.....	40
FL05- I capelli come matrice per l'analisi di composti organici in tracce: una miniera di informazioni incerte	41
Presentazioni Poster	42
PO01- Sviluppo di strategie analitiche innovative per l'identificazione di Nuove Sostanze Psicoattive nei sequestri	43
PO02- Sviluppo di un metodo analitico per la determinazione, in matrice pilifera, del THC-COOH mediante analisi UPLC-ESI(-)-MS/MS.....	44
PO03- Approcci innovativi per comprendere la diffusione di nuove sostanze stupefacenti nella popolazione	45
PO04- Determinazione simultanea di 150 droghe d'abuso in sangue intero mediante Salting-out Assisted Liquid-Liquid Extraction (SALLE) ed analisi UHPLC-MS/MS.....	46
PO05- Sostanze stupefacenti e alterazione alla guida: analisi di screening e di conferma su strada tramite HPLC-MS/MS su laboratorio mobile	47
PO06- Estrazione magnetica in fase solida (m-SPE) come tecnica di clean-up del fluido orale per l'analisi multiclasse di sostanze psicoattive classiche ed NPS mediante HPLC-MS/MS.....	48
PO07- Sviluppo e validazione di un metodo analitico UHPLC-MS/MS per la quantificazione di 18 droghe d'abuso e metaboliti dopo microcampionamento con Dried Blood Spot	49
PO08- Analisi di inchiostri da penna e toner in matrici complesse: un approccio spettroscopico ...	50
PO09- L'arte pittorica svelata attraverso la Spettrometria di Massa	51
PO10- I capelli nell'analisi forense: validazione di un metodo per la determinazione di elementi in tracce.....	52
PO11- Comparison of Data-Independent and Data-Dependent Techniques for Forensic Toxicology Screening Analysis	53
PO12- I nuovi approcci di proteomica e metabolomica ai fini dell'identificazione personale e della stima del PMI	54

Introduzione ai lavori

Prevenire l'errore nelle attività forensi. I contributi dei Sistemi di Qualità nella Polizia Scientifica

Luigi Rinella

Direzione Centrale Anticrimine della Polizia di Stato, Servizio Polizia Scientifica, Direttore

Sono passati oltre 120 anni da quando, nel 1903, venne fondata la polizia scientifica e istituito il primo corso in materia, che faceva seguito a un ciclo di conferenze organizzato l'anno precedente e destinato a 35 funzionari di polizia. Da allora la polizia scientifica è profondamente cambiata, si è evoluta insieme alla società, è migliorata senza perdere mai di vista il suo obiettivo più profondo: essere di supporto alle indagini tradizionali per l'individuazione dei colpevoli di un reato.

Oggi per arrivare a questo risultato è fondamentale che il sopralluogo di polizia scientifica venga svolto nel rispetto di protocolli molto restrittivi, al fine di assicurare una corretta catena di custodia della singola traccia proveniente dalla scena del crimine.

A questo deve accompagnarsi il continuo aggiornamento degli operatori, delle tecniche analitiche e delle innovazioni tecnologiche che il mercato mette a disposizione. Tutto ciò necessita l'adozione di linee guida, procedure tecniche e istruzioni operative volte a minimizzare le possibili fonti di errore e a garantire un miglioramento continuo nelle diverse attività di intervento.

Per tali ragioni la Polizia scientifica è da tempo impegnata in un percorso di crescita che ha portato all'ottenimento della certificazione ISO 9001 oltreché all'accreditamento ISO/IEC 17025 di una serie di metodi di prova interni multi-sito per i laboratori sul territorio. Da ultimo l'istituzione di un Organismo di Certificazione della Polizia di Stato, accreditato dal 2022, che fornisce all'utenza processi di valutazione e certificazione professionale relativamente ai profili specifici propri della Polizia scientifica nel rispetto della Norma ISO/IEC 17024.

Riferimenti

1. Norma ISO 9001:2015 e ISO 9001:2018.
 2. Norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025.
 3. Norma UNI CEI EN ISO/IEC 17024.
-
1. F. Takens, D. Rand and L.S. Young editors, Dynamical Systems and Turbulence, Warwick 1980, pp 36-38.

Presentazioni Plenarie

SNAP: Sistema Nazionale di Allerta Precoce

Simona Pichini, Paolo Berretta, Michele Sciotti, Maria Rosaria Vari, Silvia Graziano

Centro Nazionale Dipendenze e Doping, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Il Sistema Nazionale di Allerta Precoce (SNAP) del Dipartimento per le Politiche Antidroga (DPA), il cui braccio operativo è il Centro Nazionale Dipendenze e Doping (CNDD) dell'Istituto Superiore di Sanità, monitora a livello nazionale ed europeo la presenza e diffusione delle nuove sostanze psicoattive (NPS) e la variazione o comparsa di nuovi trend di consumo delle sostanze di abuso classiche, promuovendo e realizzando attività di collaborazione con gli enti nazionali che si occupano di tutela della salute pubblica.

Per tale scopo, lo SNAP si avvale delle specifiche competenze di unità operative e di una rete di più di 200 Centri Collaborativi nazionali appartenenti in particolare alle Forze dell'Ordine, alle Tossicologie cliniche e forensi, all'Agenzia delle Dogane, agli Enti di ricerca, alle Aziende Sanitarie e ai Centri Antiveneni. A livello europeo lo SNAP rappresenta il punto di contatto con l'Osservatorio Europeo sulle Droghe e sulle Tossicodipendenze (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, EMCDDA) ed è coinvolta nella Global Coalition to Address Synthetic Drug Threats (Coalizione Globale per Affrontare le Minacce delle Droghe Sintetiche) lanciata nel luglio 2023 dal Segretario di Stato americano Antony Blinken.

La competenza dello SNAP ha permesso di intercettare in Italia già dal 2017 la comparsa di analoghi del fentanil e degli oppioidi nitazenici. Nel settembre 2023, la tempestiva emanazione a livello nazionale di un documento sulla diffusione del fentanil e della xilazina come adulterante di oppiacei ed oppioidi ha orientato il DPA nella progettazione del "Piano nazionale di prevenzione contro l'uso improprio di Fentanyl e di altri oppioidi sintetici" varato dal Governo nel marzo 2024.

Riferimenti

2. T. Eklov, P. Mårtensson, I. Lundstrom; *Analytica Chimica Acta*, 381 (1991), pp 221-232.
3. F. Takens, D. Rand and L.S. Young editors, *Dynamical Systems and Turbulence*, Warwick 1980, pp 36-38.

Il fattore umano e la competenza nelle scienze forensi

Stefano Loddo¹ – Alessandro Possi² – Elena Lucatelli¹

¹Direzione Centrale Anticrimine della Polizia di Stato, Servizio Polizia Scientifica

²Direzione Centrale Anticrimine della Polizia di Stato, Servizio Polizia Scientifica
Gabinetto Regionale Polizia Scientifica per la Toscana di Firenze

Nelle scienze forensi è importante assicurare che le figure professionali coinvolte nelle determinazioni e nelle prove possiedano, mantengano e migliorino nel tempo le competenze necessarie per l'espletamento dei compiti assegnati. Tale requisito è essenziale anche nelle attività di sopralluogo svolte sul teatro di un evento che devono portare all'individuazione dei responsabili e alla successiva condanna.

L'importanza dell'attività di polizia scientifica a sostegno delle indagini forensi pertanto non può prescindere da un'attenta formazione del personale. In tale contesto, la certificazione degli operatori è uno strumento organizzativo a disposizione dei fornitori di servizi forensi per assicurare, mediante un processo di valutazione di conformità, che la persona certificata soddisfi i requisiti previsti da uno schema di certificazione.

Un ruolo fondamentale è svolto dagli organismi di certificazione di persone, che applicano i requisiti previsti dalla norma ISO/IEC 17024, il cui elemento maggiormente connotativo è l'assicurazione dei necessari livelli di imparzialità in tutte le fasi del processo di valutazione e certificazione.

Riferimenti

1. Salvatore Ottolenghi; "Trattato di polizia scientifica. Vol. I - Identificazione fisica applicata alla medicina e alle funzioni della polizia", Cod. 22888 (Ed. SEL).
2. Salvatore Ottolenghi; "Polizia scientifica. Identificazione fisica e psichica. Investigazioni giudiziarie. Quadri sinottici delle Lezioni tenute nella Scuola di Polizia". Società Poligrafica Editrice 1907.
3. Andrea Giuliano; "Salvatore Ottolenghi. Le impronte digitali in polizia scientifica e medicina legale", ISBN 9788877119445 Minerva Medicina (Ed. 2018).
4. Norma UNI CEI EN ISO/IEC 17024.

Evoluzione delle analisi antidoping: nuove matrici, nuovi biomarkers, nuove tecnologie

Francesco Botrè

Laboratorio Antidoping FMSI – Roma
REDS-Research and Expertise in Antidoping Sciences, Università di Losanna

Le analisi antidoping sono un caso particolare di analisi tossicologico-forensi e sono volte a rilevare il ricorso illecito a sostanze e metodi vietati per doping nello sport. Negli ultimi sessant'anni, le strategie antidoping si sono evolute costantemente, spingendo i laboratori accreditati dall'Agenzia Mondiale Antidoping (WADA) a sviluppare procedure analitiche sempre più sensibili e selettive. In generale, l'evoluzione del doping è promossa da tre forze motrici concomitanti: sviluppare strategie più efficaci per il miglioramento illecito delle prestazioni sportive; rendere invisibili tali strategie (ad esempio, ricorrendo a nuovi agenti mascheranti e/o strategie di mascheramento) e ridurre gli effetti collaterali dell'uso/abuso di sostanze proibite.

Inizialmente, i metodi antidoping erano basati pressoché esclusivamente sulla determinazione di "marker di esposizione": la maggior parte dei metodi analitici seguiti dai laboratori accreditati WADA sono infatti ancora finalizzati ad identificare – e ove necessario a determinare quantitativamente – le sostanze proibite e/o i loro metaboliti diagnostici. L'introduzione del monitoraggio longitudinale dell'atleta, come nel quadro del passaporto biologico dell'atleta, ha aperto nuove prospettive per lo sviluppo di metodi indiretti, in cui i target analitici sono "marker di effetto". Sebbene meno selettivi dei metodi diretti - e in effetti affetti da diversi, potenziali "fattori di confondimento" - i metodi indiretti sono attualmente l'unico modo per individuare sostanze e strategie doping altrimenti non rilevabili. Nel caso dei metodi indiretti le tecniche analitiche basate sulla spettrometria di massa sono affiancate e integrate da tecniche di immuno-bio-analitiche, di biologia cellulare e molecolare.

Questa comunicazione presenta i risultati più recenti nel campo dell'analisi antidoping, delineando le analogie e le differenze con altri campi della tossicologia forense. Particolare attenzione viene dedicata alle diverse matrici biologiche (dall'urina al sangue intero, al siero, al sangue capillare e alle macchie di sangue secco), alla gamma in espansione di biomarcatori target (dagli isotopi del carbonio - come nella spettrometria di massa per rapporto isotopico - ai peptidi, alle proteine, alle membrane, microparticelle e popolazioni cellulari) e alle diverse piattaforme analitiche (non solo cromatografia - spettrometria di massa, ma anche immunodosaggi differenziali, elettroforesi su gel, citofluorimetria a flusso e imaging topografico, come nella microscopia a forza atomica) necessarie per ridurre il divario tra ciò che è vietato e ciò che è effettivamente rilevabile.

Viene infine presentata una panoramica generale su ulteriori sviluppi e prospettive future, con il fine ultimo di massimizzare l'efficacia delle strategie di controllo del doping basate sulle analisi di laboratorio.

Keynote

Validazione dei metodi e incertezza di misura: le guide Eurachem

Emanuela Gregori¹, Marina Patriarca²

¹Eurachem Italia, Dipartimento Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria, Istituto Superiore di Sanità

²Eurachem, già Istituto Superiore di Sanità

Milioni di prove, misurazioni ed esami sono effettuati ogni giorno, in migliaia di laboratori in tutto il mondo, per innumerevoli motivi, perché ogni aspetto della vita sociale è interessato, in qualche modo, dai risultati di indagini analitiche, ad esempio per fini commerciali, come supporto diagnostico per la salute umana ed animale e per analisi forensi, quali analisi di reperti delle scene del crimine e tracce di esplosivi. Affinché un risultato analitico sia adeguato per il suo scopo deve essere affidabile, in modo che ogni decisione basata su di esso possa essere presa con sicurezza. Per questo motivo le prestazioni del metodo devono essere validate e l'incertezza del risultato valutata con un determinato livello di fiducia.

Eurachem è una rete di organizzazioni europee, incluso l'Istituto Superiore di Sanità, che ha tra le sue attività la produzione di linee guida per la qualità dei risultati di misurazione. A questo scopo, nel corso degli anni sono state prodotte diverse guide (<https://www.eurachem.org/index.php/publications/guides>; per le traduzioni italiane <https://www.iss.it/en/eurachem-linee-guida-e-supplementi>) che si sono rivelate utili non solo a quanti si occupano direttamente di misurazioni analitiche in chimica, biologia e medicina di laboratorio, ma anche per facilitare la comunicazione tra tutti coloro che sono interessati alle misurazioni di tipo analitico (clienti, operatori di laboratorio a qualsiasi livello, enti di accreditamento e di controllo) e come strumento per la formazione, sia accademica sia professionale. Tutte le guide, concepite ed organizzate attraverso spiegazioni dei concetti teorici, indicazioni pratiche e riquadri di riferimento per la consultazione rapida, rappresentano un punto di riferimento per quanti sono coinvolti a qualsiasi titolo nell'assicurazione e nella valutazione della qualità dei risultati analitici.

Interventi su invito

Applicazioni chemiometriche nell'analisi delle vernici per auto in campo forense. Stima dell'errore di tipo 2 (falso negativo)

Col. Sergio Schiavone, Lgt Rosario Casamassima

Raggruppamento Carabinieri Investigazioni Scientifiche - RIS Roma

Contesto del caso:

In caso di incidente "Hit and run" è necessario stabilire il rapporto tra le tracce rinvenute sui veicoli coinvolti, ovvero tra le tracce di vernice presenti sul veicolo sequestrato all'indagato e la vernice della vettura rinvenuta sulla scena del crimine e vice versa.

Nelle vernici moderne la parte del clearcoat tende ad avere una composizione molto simile nonostante veicoli di marche diverse

Risoluzione del caso:

Per la risoluzione del caso sono state utilizzate tecniche spettroscopiche (micro FT IR) accoppiate a trattamenti chemiometrici dei dati ottenuti mediante metodi unsupervised (Principal Component Analysis (PCA)) e supervised (Partial Least Square Discriminant Analysis) PLSDA, quest'ultima ha consentito la stima dell'errore di tipo 2 (falso negativo).

Prospettive:

In futuro sarebbe auspicabile uniformare le procedure con la creazione di un lessico comune nell'espressione dei risultati da fornire al giudice

I Vigili del Fuoco e la Spettrometria di Massa. Quindici anni di ricerca ed esperienze al servizio del cittadino

**Fabrizio Malaspina¹, Marco Pazzi², Michele Lupoli¹, Federica D'Aloise¹,
Vincenzo Bennardo¹**

¹Comando dei Vigili del Fuoco di Torino.

Corpo Nazionale dei Vigili del Fuoco, Soccorso Pubblico e Difesa Civile.

²Dipartimento di Chimica, Università degli Studi di Torino, Italy

eMail: fabrizio.malaspina@vigilfuoco.it

La presentazione affronterà la cronistoria delle ricerche nel settore della Fire Investigation del laboratorio Forense del Comando dei Vigili del Fuoco di Torino.

Una struttura investigativa che impieghi intensivamente GC-MS e GC-TOF per la ricerca di acceleranti non è così comune, ed ancor meno all'interno delle sedi dei Vigili del Fuoco.

In Italia, presso il Comando dei Vigili del Fuoco di Torino nel corso di 16 anni di intensa attività, sono state portati a termine molteplici lavori di ricerca sulla determinazione della presenza di acceleranti di fiamma, e non solo, nei residui d'incendio.

Un'opera compiuta congiuntamente da Vigili del Fuoco ed Università degli Studi di Torino, rara nel suo genere in quanto effettuata partendo dal punto di vista di chi normalmente si occupa dell'estinzione degli incendi per poi passare alle indagini.

Durante questa presentazione saranno descritte le ricerche portate a termine e di come l'evoluzione strumentale abbia portato a risultati sempre più concreti.

Riferimenti

1. M. Mazza, Semiotica degli incendi, Nucleo investigativo Antincendio di Roma
2. Stauffer, J. A. Dolan, R. Newman, "Fire Debris Analysis", 2018, Ed. III, CRC Press, Boca Raton, Florida, Stati Uniti.,
3. ASTM, International E1618 – 14 Standard Test Method for Ignitable Liquid Residues in Extracts from Fire Debris Samples by Gas Chromatography-Mass Spectrometry, 2010.
4. ASTM International "E2154 – 15 Standard Practice for Separation and Concentration of Ignitable Liquid Residues from Fire Debris Samples by Passive Headspace Concentration with Solid Phase Microextraction (SPME).

Presentazioni orali

Dall'ottimizzazione di metodi di estrazione alla costruzione di un modello di pattern recognition per il profiling di metamfetamina da strada

Serena Detti¹, Claudio D'Alfonso¹, Chiara Nieri¹, Giorgia Camerlengo², Veronica Giamogante³, Eugenio Alladio², Alessia Ciogli³, Simone Manetto³, Salvatore Pani¹, Anna D'Orazio¹

¹ Servizio di Polizia Scientifica Sezione Sostanze Psicotrope e Stupefacenti Divisione III

² Dipartimento di Chimica, Università degli Studi di Torino

³ Dipartimento di Chimica e tecnologie del farmaco, Università Sapienza di Roma

Il *profiling*, secondo la definizione dell'ENFSI (*European Network of Forensic Science Institutes*), è descritto come "l'impiego di metodi volti a determinare le proprietà chimiche e fisiche di campioni di droga sequestrati a fini comparativi, di intelligence e processuali". Ogni processo di sintesi lascia una "firma chimica" sotto forma di impurezze, che possono essere utilizzate per identificare il precursore e la via sintetica. Questo studio si propone di ottimizzare le procedure di estrazione e di analisi delle impurezze della metamfetamina (MA) al fine di effettuare il profiling. In particolare, si è focalizzato sull'implementazione di due principali procedure estrattive [1-2], presenti in letteratura scientifica, al fine di ottenere un protocollo ottimizzato sia per la fase di estrazione che per la fase di identificazione delle impurezze. Queste metodologie sono state applicate a campioni reali, sequestrati dalle Forze di Polizia italiane sotto forma di cristalli e compresse. In particolare, la fase di ottimizzazione di uno dei due protocolli [2] ha riguardato l'aumento della quantità di campione da sottoporre ad analisi, l'aumento del tampone impiegato e l'aumento del solvente estraente. Le impurezze sono identificate via GC-MS e quantificate tramite GC-FID normalizzando le aree dei picchi delle impurezze per l'area del picco della MA. I risultati saranno utilizzati per sviluppare un modello di *Soft Independent Modeling of Class Analogy* (SIMCA) basato sulla definizione a priori delle variabili di appartenenza al gruppo. Lo stesso modello statistico può essere impiegato per valutare l'appartenenza allo stesso gruppo di campioni di qualsivoglia natura. Infine, con lo studio e l'approfondimento dell'analisi della metamfetamina è stato possibile validare il metodo quantitativo e certificare un campione sequestrato come standard analitico *in-house*. L'effetto immediato è primo fra tutti il risparmio nell'acquisto di standard di stupefacenti per la taratura degli strumenti dei laboratori di Polizia Scientifica.

Riferimenti

1. United Nations (2006). Recommended Methods for the Identification and Analysis of Amphetamine, Methamphetamine and their Ring-Substituted Analogues in Seized Materials, Manual for Use by National Drug Testing Laboratories, United Nations, New York;
2. Qi Y., Evans, I. D., & McCluskey, A. Australian Federal Police seizures of illicit crystalline methamphetamine ('ice') 1998-2002: impurity analysis. *Forensic science international*, 164(2-3), 201-210

L'importanza dell'effetto matrice nelle analisi LC-MS multi-analita

Marta Massano^{1*}, Eugenio Alladio¹, Enrico Gerace², Marco Vincenti^{1,2}, Alberto Salomone^{1,2}

¹Department of Chemistry, University of Turin, Italy

²Centro Regionale Antidoping, Orbassano (TO), Italy

Background e scopo: Procedure di screening multi-analita in LC-MS(/MS) vengono frequentemente sviluppate e validate per le applicazioni di routine nei laboratori di analisi a scopo forense. Tuttavia, non sempre è possibile garantire una separazione cromatografica ottimale degli analiti presenti nelle miscele standard utilizzate, con conseguente alterazione dell'efficienza di ionizzazione electrospray dovuta alla co-eluzione di alcune molecole target. Durante la validazione, l'effetto matrice (ME) viene generalmente calcolato come il rapporto tra i segnali ottenuti in un estratto della matrice reale rispetto al solvente, entrambi arricchiti con una miscela contenente tutti gli analiti oggetto dell'analisi [1,2]. Poiché questo approccio non riproduce realisticamente gli effetti dovuti al reale numero di molecole target co-eluenti presenti nei campioni reali né la loro effettiva concentrazione, abbiamo studiato le variazioni del ME in assenza di composti target co-eluenti, in confronto ad estratti del campione in cui invece si verificava tale co-eluzione. Come proof-of-concept, è stato selezionato un metodo di screening UHPLC-ESI-MS/MS per rilevare 95 composti di interesse tossicologico in campioni di acque reflue. Infine, viene presentato il tramadolo, come esempio dell'influenza dell'effetto matrice sulla quantificazione.

Metodi: Una serie di campioni di bianco è stata fortificata utilizzando alternativamente un'unica miscela contenente 95 analiti, per alcuni dei quali si è osservata una co-eluzione, e sei miscele differenti, ciascuna contenente solo analiti con tempi di ritenzione separati (± 0.3 sec.). Gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato a tre livelli di concentrazione. Successivamente, è stato calcolato il valore di ME confrontando i risultati delle due serie, valutandone inoltre l'impatto sulla quantificazione dei campioni reali.

Risultati: I risultati sperimentali hanno mostrato un sostanziale innalzamento del segnale ionico per 28 su 95 (30%) analiti co-eluiti, di cui 14 su 95 (15%) hanno mostrato un incremento maggiore del 100%. In particolare, brotizolam e OH-midazolam hanno mostrato un innalzamento del segnale di 1.000 volte a 50 ng/L e 125 ng/L, con conseguente soppressione del segnale dei composti co-eluenti, tadalafil e metadone. Solo in pochi casi, 4 su 95 (4%), è stato invece possibile osservare una significativa soppressione del segnale del -50%. Infine, il tramadolo, presente in sei campioni reali di acque reflue, è stato quantificato sia con la curva in presenza di co-eluzione (blu), sia in assenza di co-eluzione (rossa). I risultati hanno mostrato una sottostima del 31% quando la quantificazione è stata eseguita utilizzando la miscela contenente i 95 analiti.

Conclusioni: Il ME nei metodi di screening multi-analita deve essere valutato tenendo conto della co-eluzione di diversi composti, raramente presente nei campioni reali. Questo aspetto, spesso trascurato durante le fasi di validazione, può diventare particolarmente critico nella costruzione delle curve di calibrazione durante l'analisi di casi reali, soprattutto quando il risultato debba essere messo a confronto con valori di cut-off o limiti legali.

Riferimenti

1. M.L. Williams, A.A. Olomukoro, R.V. Emmons, N.H. Godage, E. Gionfriddo: Journal of Separation Science, 46 (2023) e2300571. <https://doi.org/10.1002/jssc.202300571>.
2. N.B. Cech, C.G. Enke: Mass Spectrometry Reviews, 20 (2001) 362–387. <https://doi.org/10.1002/mas.10008>.

Extractive-Liquid Sampling Electron Ionization-Mass Spectrometry (E-LEI-MS): analisi diretta di farmaci e droghe da stupro

**Giovanna Nevola¹, Adriana Arigò¹, Giorgio Famiglini¹, Pierangela Palma^{1,2},
Achille Cappiello^{1,2}**

¹Università degli Studi di Urbino Carlo Bo, Dipartimento di Scienze Pure e Applicate, Urbino (PU), Italia

²Vancouver Island University, Department of Chemistry, Nanaimo, BC, Canada

Ottenere risultati in modo rapido è di grande interesse per la comunità scientifica forense, obiettivo che può essere raggiunto tramite l'analisi diretta del campione. L'Extractive-Liquid Electron Ionization-Mass Spectrometry (E-LEI-MS) [1] è una tecnica *real-time* che si caratterizza per la rapida e diretta analisi di un campione non, o minimamente, pretrattato. L'aspetto innovativo del sistema E-LEI-MS è l'associazione del campionamento a pressione atmosferica, caratteristica delle tecniche *ambient* MS, con la ionizzazione elettronica, che consente il confronto dello spettro sperimentale con quelli contenuti nelle librerie elettroniche, garantendo un elevato potere identificativo rispetto alle tecniche *ambient*. L'E-LEI-MS è stato già utilizzato con successo per l'identificazione di varie tipologie di composti in diverse matrici: determinazione di pesticidi su alimenti, cocaina su banconote e identificazione di composti ignoti su dipinti [1]. Il sistema è composto da un dispositivo per il rilascio di solvente che consente la formazione di una microgoccia sulla superficie del campione, dove ha luogo l'estrazione degli analiti. Una valvola di apertura e chiusura regola la fase di campionamento che avviene per aspirazione diretta all'interno della camera di ionizzazione. La vaporizzazione degli analiti è consentita dalle alte temperature presenti all'ingresso dello spettrometro di massa che sono in grado di vaporizzare anche composti con elevato punto di ebollizione.

In questa ricerca l'E-LEI-MS è stato utilizzato per la determinazione di principi attivi ed eccipienti in diverse formulazioni farmaceutiche e per l'analisi di benzodiazepine (BDZ), spesso coinvolte in casi di cronaca a causa del loro utilizzo illecito come droghe da stupro.

Le analisi dei farmaci sono state realizzate con un MS a triplo quadrupolo (QqQ) 7010GC/MS (Agilent Technologies). Nove principi attivi sono stati riconosciuti in cinque diverse formulazioni farmaceutiche. L'identificazione inequivocabile del tadalafil, farmaco per la disfunzione erettile disponibile solo su prescrizione medica, conferma la capacità dell'E-LEI-MS di riconoscere principi attivi simili, spesso presenti in prodotti contraffatti venduti online. Soluzioni di sedici BDZ sono state pipettate su superficie di vetro ed analizzate con il sistema E-LEI-MS associato ad uno MS a tempo di volo 7250GC/Q-ToF (Agilent Technologies). Tutte le BDZ sono state identificate attraverso il confronto diretto dello spettro sperimentale con spettri contenuti in librerie elettroniche. Sei BDZ (Clobazam, Clonazepam, Diazepam, Flunitrazepam, Lorazepam, Oxazepam) sono state utilizzate per fortificare cocktail a concentrazioni di 20 e 100 mg/L. 20 µL di cocktail sono stati depositati su una superficie di vetro e fatti essiccare, così da simulare i residui nei bicchieri raccolti per test forensi. Le superfici sono state analizzate con l'E-LEI-MS che ha consentito l'identificazione di tutte le BDZ.

L'alto potere identificativo, i brevi tempi di analisi e la versatilità di questa tecnica confermano il suo utilizzo per interessanti applicazioni in ambito forense.

Riferimenti

1. A. Arigò, G. Famiglini, N. Marittimo, M. Agostini, C. Renzoni, P. Palma, A. Cappiello; *Scientific Reports*, 13 (2023) 6429.

Determinazione di nuove sostanze psicoattive in campioni forensi mediante analisi UHPLC-MS/MS con approccio suspect screening

Camilla Montesano

Dipartimento di Chimica, Sapienza Università di Roma, Roma, Italia

Le nuove sostanze psicoattive (NPS) sono un gruppo di sostanze, prevalentemente di origine sintetica, caratterizzate da proprietà tossicologiche potenzialmente pericolose [1]. La principale difficoltà nel riconoscere le NPS nei sequestri e nei campioni biologici risiede nella loro natura dinamica, correlata alla continua sintesi e introduzione sul mercato di nuove droghe, spesso con strutture molto simili a quelle esistenti. Lo scopo del lavoro è la creazione di un metodo di *suspect screening* per la determinazione di NPS tramite l'utilizzo della cromatografia liquida ad ultra alta prestazione (UHPLC) accoppiata con un'analisi in spettrometria di massa tandem (MS/MS) con l'utilizzo di uno spettrometro ibrido QTrap. Inizialmente si è creato un metodo target per il quale sono state considerate 65 sostanze stupefacenti appartenenti a diverse classi chimiche.

Successivamente il metodo è stato ampliato utilizzando la strategia del suspect screening, che consente la rilevazione di molecole di interesse senza l'utilizzo di standard di riferimento. Tale metodo è stato creato utilizzando le stesse condizioni cromatografiche ed aggiungendo 164 transizioni *multi reaction monitoring* (MRM) di NPS di ultima generazione, di cui non si disponeva di standard analitici, ottenute da databases ad accesso libero. I tempi di ritenzione (Rt), sono stati predetti utilizzando un modello QSRR (*Quantitative Structure Retention (Chromatographic) Relationship*) appositamente sviluppato. Il modello è stato validato attraverso la valutazione delle previsioni del training set, di un set di validazione esterno e di una strategia di "leave one out".

Per l'analisi di tipo suspect è stato utilizzato un esperimento MRM-IDA-EPI (*Information Dependent Acquisition-Enhanced Product Ion*) che ha permesso l'acquisizione degli spettri di frammentazione degli analiti rilevati.

Il metodo target è stato validato nel fluido orale, con risultati eccellenti in termini di recupero, accuratezza, precisione ed effetto matrice. Infine, le prestazioni del metodo suspect screening sono state valutate analizzando una miscela contenente 8 standards di riferimento non inclusi nel dataset iniziale, nonché dei sequestri e dei campioni reali di fluido orale. Nei campioni analizzati sono state identificate quattro NPS in maniera presunta.

Il vantaggio dell'approccio proposto è la possibilità di quantificare 65 droghe d'abuso classiche e NPS e, allo stesso tempo, rilevare e identificare presuntivamente 146 sostanze aggiuntive in una singola corsa LC-MS/MS. Considerando la dinamicità del mercato illecito, un punto di forza di questa strategia è che il metodo analitico può essere aggiornato attraverso l'aggiunta di nuovi composti in base alle ultime allerte senza la necessità di standard autentici.

Riferimenti

1. A.L.A. Mohr, B.K. Logan, M.F. Fogarty, A.J. Krotulski, D.M. Papsun, S.L. Kacinko, M.A. Huestis, J.D. Roper-Miller; *J. Anal. Toxicol.* 46 (2022), e116–e185.

Aspetti tecnici e di governance sanitaria del primo programma VEQ nazionale per l'analisi di NPS su matrice ematica.

Di Gaudio Francesca^{1,2}, Giaccone Vita², Cucina Annamaria², Indelicato Sergio², Raso Maria², Brunacci Giuseppina², Ornella Gasparro², Rotolo Maria Concetta³, Francesco Busardò⁴, Mario La Rocca⁵

¹PROMISE, Università di Palermo, Piazza delle Cliniche, 2, Palermo, 90127, Italia

²Azienda Ospedaliera Ospedali Riuniti Villa Sofia Cervello, Sezione di Cromatografia e Spettrometria di Massa, Controllo Qualità e Rischio Chimico (CQRC), Via del Vespro, 133, Palermo, 90127, Italia

³Centro Nazionale Dipendenze e Doping Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italia

⁴Dipartimento di Scienze Anatomiche, Istologiche Forensi e Ortopediche, Università la Sapienza, Roma, Italia

⁵Assessorato regionale della salute, Dipartimento per la pianificazione strategica, piazza Ottavio Ziino, 24, Palermo, 90145, Italia

Le nuove sostanze psicoattive (NPS) sono analoghi non controllati di droghe esistenti o sostanze chimiche sintetizzate di recente che mostrano effetti psicotropi. Le NPS presentano natura diversificata, e sono soggette a continui mutamenti e a una crescente diffusione. Per tali ragioni rappresentano una sfida significativa per il sistema sanitario per le politiche di controllo delle droghe.

Per far fronte a questa problematica, i laboratori del sistema sanitario hanno sviluppato metodi analitici per rilevare le NPS nei campioni biologici. Come Centro di Riferimento Regionale, il Laboratorio CRQ Siciliano (Laboratorio Regionale per il Controllo di Qualità) ha sviluppato e condotto un programma di Valutazione Esterna della Qualità (VEQ), in collaborazione con l'Istituto Superiore di Sanità (ISS), per valutare la capacità di diversi laboratori italiani di identificare le NPS e le tradizionali droghe d'abuso (DOA) nelle matrici biologiche.

Due campioni di sangue sono stati addizionati con sostanze d'abuso appartenenti a varie classi, incluse cannabinoidi sintetici, catinoni, oppioidi sintetici e benzodiazepine, a concentrazioni che vanno da 2 a 10 ng/mL. I campioni di sangue sono stati liofilizzati per garantire la stabilità delle DOA e delle NPS. Ventidue laboratori del sistema sanitario italiano hanno aderito a questo programma VEQ. Le informazioni fornite dai laboratori durante la registrazione in una piattaforma interna includevano una descrizione generale del laboratorio, la tecnica analitica e i pannelli di analisi scelti. La stessa piattaforma è stata impiegata per raccogliere e analizzare statisticamente i dati e registrare i feedback e i commenti dei laboratori.

La valutazione dei risultati ha rivelato che i laboratori partecipanti hanno impiegato tre diverse tecniche per analizzare i campioni: GC-MS, LC-MS e metodi immunoenzimatici. Circa il 90% dei laboratori ha utilizzato tecniche LC-MS. Si sono ottenuti circa il 40% di risultati falsi negativi, con i peggiori risultati riguardanti l'identificazione del 5-cloro AB PINACA. I risultati hanno mostrato che i laboratori che hanno utilizzato metodi LC-MS hanno ottenuto una migliore specificità e sensibilità rispetto ai laboratori che utilizzavano altre tecniche.

Questo primo esercizio VEQ ha messo in evidenza l'importanza degli schemi di controllo esterno di qualità nell'identificare le tecniche analitiche più efficaci per rilevare molecole presenti in basse concentrazioni nelle matrici biologiche. Poiché non sono stati ancora stabiliti valori di cut-off per le NPS, il programma VEQ consentirà ai laboratori partecipanti di condividere i loro metodi analitici e la loro esperienza, con l'obiettivo di stabilire criteri comuni e migliorare le performance per l'identificazione delle NPS.

Studio delle alterazioni del profilo metabolomico in seguito alla somministrazione di oppioidi in modelli murini mediante UHPLC-HRMS

Gaia Di Francesco¹, Martina Croce^{1,2}, Flaminia Vincenti¹, Camilla Montesano¹,
Matteo Marti³, Manuel Sergi¹, Roberta Curini¹

¹Dipartimento di Chimica, Sapienza Università di Roma, Roma, Italia

²Dipartimento di Salute Pubblica e Malattie Infettive, Sapienza Università di Roma, Roma, Italia

³Dipartimento di Medicina Traslazionale, Sezione di Medicina Legale e Centro LTTA, Università di Ferrara, Ferrara, Italia

La proliferazione delle Nuove Sostanze Psicoattive (NPS) e le sfide associate alla loro individuazione hanno spinto i tossicologi forensi a individuare strategie analitiche adeguate alla loro identificazione [1]; Tra queste metabolomica non mirata si è dimostrata un utile per identificare i marcatori endogeni dell'assunzione di NPS [2]. In questo lavoro, tale approccio è stato sfruttato per l'identificazione di biomarcatori che possono indicare la probabile assunzione di oppioidi di diverse classi chimiche, sfruttando uno studio in vivo con un modello murino e analisi HPLC-HRMS. Sono stati raccolti campioni di urina da topi CD-1, sia maschi (n=8) che femmine (n=8), inizialmente trattati con il veicolo contenente NaCl 0,9 M mediante iniezione intraperitoneale; le urine sono state raccolte cumulativamente per 24 ore. Successivamente, metà degli animali di entrambi i sessi è stata trattata con 30 mg/kg di morfina, mentre al resto degli animali sono stati somministrati 6 mg/kg di fentanyl; anche in questo caso sono state raccolte le urine per 24 ore. I campioni sono stati analizzati mediante UHPLC-HRMS, utilizzando uno spettrometro di massa Orbitrap Q-Exactive dotato di una sorgente *Heated Electrospray Ionization* (HESI); ogni campione è stato analizzato con cromatografia *Reverse Phase* (RP) e *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography* (HILIC) in entrambe le polarità. L'analisi statistica è stata effettuata sui dati ottenuti: la OPLS-DA ha permesso identificare le principali differenze, in termini di metaboliti, dopo la somministrazione della sostanza stupefacente. Ad esempio, l'acido 5-aminovalerico e la creatina, oltre che altri appartenenti alle principali vie di ossidazione dei lipidi e di degradazione degli aminoacidi, sono risultati tra i metaboliti più alterati. Successivamente, le aree dei picchi di ciascun composto ottenute dall'analisi delle urine derivanti dalla somministrazione del veicolo sono state sottratte dalle aree dei picchi del composto nello stesso topo dopo la somministrazione dello stupefacente, utilizzando ogni topo come controllo di sé stesso. Allo stesso modo, è stata eseguita un'analisi multivariata per chiarire le differenze legate al sesso degli animali. Lo studio ha analizzato le alterazioni delle vie metaboliche dei topi CD-1 trattati con oppiacei e ha evidenziato il potenziale della metabolomica nella tossicologia forense per le indagini relative alle NPS.

Riferimenti

1. Amante E. et al., *Molecole*, 2021, (26)4990
2. Steuer A. E. et al., *Metaboliti* 2020, (10)306S

Errore e sistemi biometrici

Massimo Gneo

Direzione Centrale Anticrimine della Polizia di Stato, Servizio Polizia Scientifica

Le biometrie sono caratteristiche fisiologiche o tratti comportamentali personali misurabili, utilizzati per il riconoscimento o la verifica dell'identità dichiarata da un individuo [1].

La biometria, inoltre, è la scienza e la tecnologia della misura e dell'analisi statistica dei dati biologici che, nell'*information technology*, si riferisce a tecnologie automatizzate per l'autenticazione e la verifica di caratteristiche fisiologiche [2].

Le forze di polizia sono interessate da sempre al riconoscimento di individui basato su rilievi antropometrici e, in particolare, sulle immagini del volto e le impronte digitali, delle quali hanno mantenuto archivi che, da molti anni, sono digitali.

Le biometrie e i sistemi informativi biometrici e le tecnologie di ricerca e di verifica automatizzata delle identità, quindi, sono divenuti strumento e patrimonio della Polizia di Stato e, in particolare, della Polizia Scientifica.

Il carattere statistico degli algoritmi e delle tecnologie biometriche, rende il risultato di ciascuna ricerca automatizzata prone agli inevitabili errori di Falsa Accettazione e Falso Rifiuto.

Tali tipologie di errore, nel settore forense, si declinano, rispettivamente, nell'attribuzione di una falsa identità, dichiarata fraudolentemente, o nel mancato riconoscimento delle tracce che un ignoto ha rilasciato sulla scena di un crimine.

Solo la corretta stima dell'entità di tali errori consente di dimensionare opportunamente i parametri dei sistemi biometrici e di definire il perimetro della loro migliore applicazione, tenendo conto della specificità del settore forense.

Riferimenti

1. M. Nieves, K. Dempsey, V. Yan Pillitteri; "An Introduction to Information Security", NIST Special Publication 800-12, Rev.1, p. 77.
2. V.C. Hu, D.F. Ferraiolo, D. R. Kuhn; "Assessment of Access Control Systems", NIST Interagency Report 7316, 1, p. 43.
3. F. Takens, D. Rand and L.S. Young editors, Dynamical Systems and Turbulence, Warwick 1980, pp 36-38.

2nd Generation Forensic Screening using Accurate Mass High Resolution Mass Spectrometry

⁵Bernhard Wüst, ⁴Daniel Passin, ⁴Petur Halsegaard, ¹Stefan Toennes, ¹Silvana Petzel Witt, ²Peter Stockham, ⁵Stefan Schaebler, ³Gerhard Wolber, ⁵Andrew Mceachran

1 Legal Medicine Frankfurt, 2 Police Forensic Adelaide, 3 FU-Berlin, 4 Forensic Laboratory Division San Francisco, 5 Agilent

Background and aim: The innovative HighResNPS project is offering not only consensus spectral information for a very large set of psychoactive substances but also partially measured and predicted retention times. Therefore, this is an ideal starting point for integrating the project's database into a screening method. For this, an import and export functionality was designed and added to Agilent's MassHunter software suite, in particular the Quant software. For compound handling a new tool (ChemVista) was developed that acts like a compound data and method documentation repository in the lab. The Agilent 6546 LC/Q-TOF is used for measuring samples in All Ions mode to enable the untargeted data acquisition of precursor and fragment ions. Within the MassHunter software the drug identification can be automatically achieved based on the large compound database using predefined quality control criteria for the data processing (i.e. retention time and co-eluting product ions).

Results: During the first stage of the project, the analytical system was set up and substance reference standards had been analyzed to evaluate the retention characteristics that allow for the estimation of retention times of the currently 2321 psychoactive drugs covered by the HighResNPS project. The resulting database was used to build up a suspect screening method ("LC Screener") that allows the detection and criteria-based identification of drugs in forensic routine samples. The software also allows simultaneous quantitation if calibration data are supplied (referred to as targets).

Conclusion: Integrating a high-resolution LC/Q-TOF System into a forensic laboratory for the screening of thousands of compounds was achieved. Data evaluation through criteria setting allowed a fast and safe identification of compounds. The availability of predicted retention times (community driven international collaboration project) allows the detection of a high number of compounds, even if not measured in the lab itself, without increasing the number of false positives.

Applicazione degli isotopi stabili di bioelementi a supporto dell'analisi forense

Perini Matteo, Pianezze Silvia

Fondazione Edmund Mach, Via E. Mach 2, 38098 San Michele all'Adige (TN), Italy

Nelle indagini forensi una delle domande centrali è: da dove proviene il campione esaminato? Un importante strumento analitico che può aiutarci nel rispondere al quesito è rappresentato dall'analisi dei rapporti di isotopi stabili di bioelementi (IRMS). Esaminando le minuscole variazioni nell'abbondanza relativa degli isotopi stabili degli elementi carbonio ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$), azoto ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$), zolfo ($^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$), idrogeno ($^2\text{H}/^1\text{H}$), e ossigeno ($^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$), misurata come rapporto ed espressa in delta (ad esempio $\delta^{13}\text{C}$) “per mil” (‰) o in milliurey (mUr), è possibile scoprire una firma unica e nascosta, rivelando informazioni sulla fonte e sulla storia di un campione. La composizione isotopica può essere misurata tramite spettrometro di massa isotopica (IRMS) su campioni talquali, dopo combustione con un analizzatore elementare o pirolisi tramite un pirolizzatore, o sui suoi singoli componenti volatili (es. vanillina) o resi volatili tramite derivatizzazione (es. amminoacidi) e separati tramite tecnica gascromatografica GC o separati tramite cromatografia liquida LC (es. zuccheri). Oggi questa analisi è uno strumento approvato nella scienza forense e viene utilizzata per un'ampia gamma di applicazioni. Essa può aiutare a determinare se campioni di sostanze chimicamente simili (farmaci, esplosivi, fibre, ecc.) condividono una fonte o una storia comune [1], viene utilizzata per distinguere i prodotti contraffatti (ad esempio prodotti farmaceutici, alimenti e aromi) da materiali autentici [2, 3], per determinare le fonti di tessuti animali come l'avorio, per indagare sui resti umani quando viene trovato un corpo non identificato [4] e per determinare se un atleta ha utilizzato farmaci per migliorare le sue prestazioni [5].

Riferimenti

1. W. Meier-Augenstein, Forensic stable isotope signatures: Comparing, geo-locating, detecting linkage, *WIREs Forensic Sci* 1 (2019) e1339.
2. F. Camin, M. Boner, L. Bontempo, C. Fauhl-Hassek, S.D. Kelly, J. Riedl, A. Rossmann, Stable isotope techniques for verifying the declared geographical origin of food in legal cases, *Trends Food Sci. Technol.* 61 (2017) 176–187.
3. J.F. Carter, L.A. Chesson, *Food Forensics: Stable Isotopes as a Guide to Authenticity and Origin*, CRC Press, 2017.
4. E.J. Bartelink, L.A. Chesson, Recent applications of isotope analysis to forensic anthropology, *Forensic Sci Res* 4 (2019) 29–44.
5. A.T. Cawley, U. Flenker, The application of carbon isotope ratio mass spectrometry to doping control, *J. Mass Spectrom.* 43 (2008) 854–864.

Sviluppo e validazione di un metodo per la determinazione del BPE tramite GCxGC-TOFMS

Marco Pazzi¹, Domenico Bazzacco², Diego Simoncelli², Mario Quinterno²

¹Dipartimento di Chimica, Università degli Studi di Torino, Italy.

²Corpo Nazionale dei Vigili del Fuoco.

Con decisione ufficiale della Commissione europea, a partire dal 18 gennaio 2024 il marcatore fiscale comune per il gasolio e il cherosene sarà ACCUTRACETM Plus di DOW.

Gli Stati membri dell'UE stanno elaborando regolamenti nazionali per i livelli di miscelazione del marcatore e per la metodologia di controllo delle frodi. DOW, in qualità di produttore di questo marcatore chimico (butossi-benzene (CAS #1126-79-0, un prodotto brevettato e incolore, noto anche come Butyl Phenyl Ether o BPE) consiglia l'uso di un metodo GC-MS.

I livelli di miscelazione di ACCUTRACETM Plus richiesti dalla legge per i carburanti che possono avere un livello di tassazione inferiore sono compresi tra 12,5 e 18,75 mg/litro (questo è il cosiddetto livello del 100%). Sul campo, l'effettiva miscelazione del marcatore è controllata da strumenti volumetrici e viene verificata di volta in volta presso la raffineria o il terminale. Verrà illustrata la messa a punto e la validazione di un metodo per la determinazione del BPE sviluppato presso il laboratorio dei VVF di Roma e Venezia utilizzando un sistema Leco Pegasus BT4D (GCxGC-TOFMS con Modulatore a Flusso). Per l'analisi statistica sono stati valutati i parametri di prestazione classici, quali modello di calibrazione, precisione, accuratezza, limite di rivelabilità (LOD), limite di quantificazione (LOQ), selettività, specificità e carry-over. Grazie ai dati ottenuti dalle analisi, è stato possibile valutare la varianza ai diversi livelli di concentrazione e quindi determinare il modello di calibrazione (lineare o quadratico) e il fattore di peso più appropriato per ogni caso. Il limite di rivelabilità (LOD) viene stimato tramite l'algoritmo di Hubaux-Vos, mentre per la precisione e l'accuratezza intra- e inter-day sono stati determinati rispettivamente il coefficiente di variazione (%CV) e il bias %. I risultati ottenuti dall'analisi statistica mostrano che i valori di %CV e bias % sono ottimali.

Riferimenti

1. Determination of ACCUTRACE Plus fuel marker using GC-FID
2. ADM prot. n. 390490/RU del 30/06/2023
3. MVA <https://methodvalidation.streamlit.app/>
4. [2] Alladio, E., Amante, E., Bozzolino, C., Seganti, F., Salomone, A., Vincenti, M., & Desharnais, B. (2020). Experimental and statistical protocol for the effective validation of chromatographic analytical methods. *MethodsX*, 7, 100919. doi.org/10.1016/j.mex.2020.100919

Cross-contamination durante i procedimenti di conservazione dei campioni di detriti di incendio valutata mediante spettrometria di massa. Risultati preliminari.

**Michele Vignola¹, Maria Assunta Acquavia², Rocco Bochicchio¹, Angela Di Capua²,
Laurenza Saverio¹, Emanuela Gregori³, Bianco Giuliana²**

¹ Comando Provinciale Vigili del Fuoco Potenza - Basilicata, Via Appia 321/b, 85100, Potenza

² Dipartimento di Scienze, Università degli Studi della Basilicata, Via dell'Ateneo Lucano 10, 85100, Potenza

³ Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria, Istituto Superiore di Sanità, viale Regina Elena, 299, 00161, Roma

A causa del crescente numero di incendi intenzionali, le ricerche relative alla cross-contamination di campioni provenienti da detriti di incendio sono recentemente aumentate. I campioni di detriti di incendio mostrano un elevato contenuto di composti organici e, se non adeguatamente raccolti o conservati, potrebbero assorbire residui di liquidi infiammabili dall'ambiente che potrebbero interferire con i risultati delle analisi durante i procedimenti giudiziari [1]. Sono stati condotti diversi studi per accertare le caratteristiche di assenza di contaminanti e di tenuta al vapore di diversi contenitori, inclusi barattoli per vernice, barattoli di vetro o sacchetti di polimeri nelle ricerche relative alla contaminazione [1–4]. Borusiewicz et al. [3] hanno dimostrato che i sacchetti di polietilene non sono adatti come materiali di conservazione poiché contengono quantità rilevabili di composti organici volatili che potrebbero essere confusi con tracce di liquidi infiammabili, contaminando i campioni. Ad oggi, non ci sono dati scientifici sufficienti circa l'effetto della cross-contamination durante lo stoccaggio dei campioni di detriti di incendio nel tempo anche rispetto alla temperatura di conservazione. Lo scopo di questo studio mira ad ottenere risposte preliminari sulla possibile cross-contamination valutata in funzione della temperatura di conservazione e a verificare la stabilità dei campioni in termini di profilo chimico in funzione del tempo di conservazione mediante GC-MS. Barattoli in vetro chiusi con tappo a vite metallico sono i principali contenitori impiegati in ambito forense per il campionamento di materiale solido da sottoporre ad analisi per la ricerca di tracce di liquidi infiammabili su detriti di incendio secondo gli standard di riferimento ASTM E2154-15a ed E1618-19. In questo studio è stata valutata la possibilità di cross-contamination tra campioni di controllo e campioni contenenti benzina commerciale durante la fase di trasporto dallo scenario incendiario al laboratorio di analisi e la successiva fase di conservazione in laboratorio. I primi risultati mostrano che gli attuali sistemi di conservazione dei campioni sono in linea con quanto osservato da Belchior et al. [4] e che a 29 giorni di conservazione non vi è cross-contamination tra campioni secondo lo standard di riferimento ASTM 1618-19. Tuttavia, è necessario valutare tempi di conservazione maggiore al fine di poter proporre delle linee guida per la conservazione dei campioni di detriti di incendio nel campo delle scienze forensi.

Riferimenti

1. Williams, M.R.; Sigman, M. Performance testing of commercial containers for collection and storage of fire debris evidence. *J. Forensic Sci.* 2007, 52, 579–585, doi:10.1111/j.1556-4029.2007.00435.x.
2. Lang, T. A study of contamination in fire debris containers. *J. Can. Soc. Forensic Sci.* 1999, 32, 75–83, doi:10.1080/00085030.1999.10757490.
3. Borusiewicz, R.; Kowalski, R. Volatile organic compounds in polyethylene bags—A forensic perspective. *Forensic Sci. Int.* 2016, 266, 462–468, doi:10.1016/j.forsciint.2016.07.010.
4. Belchior, F.; Andrews, S.P. Evaluation of Cross-contamination of Nylon Bags with Heavy-loaded Gasoline Fire Debris and with Automotive Paint Thinner. *J. Forensic Sci.* 2016, 61, 1622–1631, doi:10.1111/1556-4029.13185.

MVA e SpectrApp: due dashboard open-source e user-friendly per la validazione dei metodi analitici e dei modelli chemiometrici

Eugenio Alladio^{1,2}, Giovanni Solarino¹, Lorenzo Castellino¹, Rosario Casamassima³,
Claudio D'Alfonso⁴, Marco Pazzi¹, Alberto Salomone^{1,2}, Marco Vincenti^{1,2}

¹ Dipartimento di Chimica, Università di Torino;

² Centro Regionale Antidoping "A. Bertinaria" di Orbassano (Torino);

³ Sezione Microanalisi e Fotografia, Reparto Carabinieri Investigazioni Scientifiche (RIS) di Roma;

⁴ Sezione Sostanze Psicotrope e Stupefacenti della Divisione III del Servizio Polizia Scientifica

Nella chimica analitica forense, l'accesso a software open-source e user-friendly è cruciale per garantire l'affidabilità, la riproducibilità dei risultati e favorire la collaborazione tra esperti, analisti, ricercatori e i laboratori di analisi. Questa tipologia di software consente agli analisti di validare metodi con maggiore trasparenza e facilità, accelerando il processo di analisi e interpretazione dei dati, e migliorando complessivamente la qualità delle indagini forensi. Con queste motivazioni, il nostro gruppo di ricerca ha messo a punto due dashboard gratuite: Methods Validation App (MVA), per la validazione dei metodi analitici, e SpectrApp, per la costruzione e validazione di modelli chemiometrici. In particolare, MVA è una web-app open-source sviluppata in Python (disponibile in versione beta presso il sito <https://methodsvalidation.streamlit.app/>) che ha lo scopo di offrire un flusso di lavoro sistematico e automatizzato per la validazione di metodi analitici. Questa applicazione richiede la preparazione di nove curve di calibrazione ottenute da tre ripetizioni in tre giorni diversi e include strumenti automatizzati per la valutazione del range dinamico lineare, dei limiti di rilevabilità e di quantificazione (LOD e LOQ), e della precisione e accuratezza inter-day e intra-day¹. Gli approcci riportati nella dashboard permettono quindi di effettuare un robusto studio del modello di calibrazione attraverso test specifici, consentendo agli utenti di salvare e storicizzare i dati mediante la generazione automatica di un report in formato PDF. Analogamente, SpectrApp è un'applicazione open-source progettata in ambiente R Shiny (disponibile presso il sito <http://www.spectrapp.unito.it>), mirata alla messa a punto e validazione dei modelli chemiometrici nell'ambito dell'analisi dati in chimica forense. In particolare SpectrApp, inizialmente progettata per l'analisi di dati spettroscopici, offre un'interfaccia intuitiva per esplorare e analizzare dati di varia natura analitica, facilitando la creazione di modelli chemiometrici personalizzati e promuovendo la collaborazione tra gli esperti. Grazie alla sua natura open-source, SpectrApp consente di preprocessare tramite molteplici approcci i dati raccolti, e successivamente costruire e validare modelli chemiometrici di esplorazione (PCA, cluster analysis, t-SNE, UMAP), class-modelling (SIMCA), discriminazione (kNN, PLS-DA, SVM) e regressione (PCR, PLS-R). L'impiego di interfacce user-friendly e open-source accelera il processo di analisi e validazione dei dati e dei modelli, consentendo anche ad utenti non esperti di programmazione di concentrarsi maggiormente sull'interpretazione dei risultati e sull'applicazione pratica delle analisi nella risoluzione dei casi forensi, garantendo la trasparenza necessaria e richiesta per l'analisi dei dati stessi. Alcuni esempi di applicazione a casi reali verranno illustrati e discussi.

Riferimenti

1. E. Alladio, E. Amante, C. Bozzolino, F. Seganti, A. Salomone, M. Vincenti, B. Desharnais; *Talanta*, 215 (2020), 120867.

Analisi ICP-MS per la determinazione di residui inorganici da sparo (IGSR) in fluidi orali

Flavia Pagano^{1,2,3}, Manuel Masella³, Flaminia Vincenti¹, Camilla Montesano¹, Chiara Pompei³, Patrizia Verduchi³, Roberta Curini¹, Manuel Sergi¹

¹Dipartimento di Chimica, La Sapienza Università di Roma, Roma, Italia

²Dipartimento di Salute pubblica e malattie infettive, La Sapienza Università di Roma, Roma, Italia

³Delta APS Service S.r.L., Roma, Italia

La balistica forense ha come obiettivo principale mettere in relazione il sospetto con l'arma del delitto, il più delle volte attraverso le munizioni utilizzate.

I gas, i vapori e il particolato formati dallo scarico di munizioni in un'arma da fuoco sono noti come residui di sparo (GSR). Il particolato può essere rilevato su un sospetto, ma esiste anche la possibilità che i prodotti vaporizzati/gassosi vengano assorbiti sulla pelle o sulle superfici degli indumenti. I componenti inorganici (IGSR) sono tutti gli elementi di natura metallica che possono provenire dalla miscela degli inneschi, dal proiettile, dal bossolo e dallo sfregamento delle parti metalliche dell'arma stessa. Queste particelle possono presentare un diametro aerodinamico tale da introdursi nel sistema respiratorio e nella cavità orale 1,2. Ad oggi è ancora poco considerata la possibilità di utilizzo di fluidi orali come una valida alternativa per indagini di esposizione a breve termine, come ad esempio nel caso delle particelle metalliche originate dai residui da sparo, rispetto ai classici metodi di campionamento esterni.

In questo lavoro è stato sviluppato un metodo per la determinazione degli IGSR mediante ICP-MS nella matrice fluido orale. Quest'ultima è stata selezionata come matrice investigativa in quanto può essere raccolta in modo non invasivo ed inoltre può essere considerata una matrice meno soggetta a trasferimenti secondari, soprattutto se confrontata con mani, tessuti o superfici, generalmente campionate nei casi legati alla manipolazione di esplosivi.

I campioni di saliva utilizzati per la sperimentazione, raccolti in forma volontaria e anonima, sono stati ottenuti da tre differenti categorie di soggetti: bianchi, passivi e attivi. I dati ottenuti sono stati analizzati tramite la combinazione di un approccio statistico univariato e multivariato. Nel primo caso, tramite l'utilizzo di box plot, è stato possibile osservare come la maggior parte degli analiti siano stati riscontrati in concentrazioni maggiori nella saliva dei soggetti attivi e di individuare una maggior efficacia di estrazione dei metalli dalla matrice saliva con l'utilizzo della digestione in acqua regia assistita da microonde. A queste evidenze è stato possibile associare, tramite t-test, una significatività di tipo statistico. L'approccio multivariato, tramite un'analisi delle componenti principali (PCA), ha permesso di apprezzare come le informazioni ricavate dall'analisi permettano un'efficace separazione dei soggetti attivi rispetto ai bianchi e ai passivi. Inoltre, lo studio di diversi metalli in aggiunta alla sola triade (Pb, Ba, Sb) ha permesso di ottenere una discriminazione più accurata, suggerendo come una più ampia gamma di analiti potrebbe facilitare l'analisi anche nel caso siano state utilizzate munizioni con cartucce prive o a più basso contenuto di metalli della triade. In conclusione, si può quindi affermare che l'analisi di fluidi orali tramite ICP-MS si riveli promettente come supporto alle indagini forensi finalizzate all'individuazione di IGSR.

Riferimenti

1. K. Lach, B. Steer, B. Gorbunov, V. Mička, B.R. Muir; *The Annals of Occupational Hygiene*, 59 (2015), pp 307–323.
2. S. Berardi et al.; Istituto Nazionale per l'Assicurazione contro gli Infortuni sul Lavoro (INAIL), Dipartimento Innovazioni Tecnologiche e Sicurezza degli Impianti, Prodotti e Insediamenti Antropici, (2014)

Il ruolo della chemiometria e della spettrometria di massa ad alta risoluzione abbinata alla cromatografia liquida a ultra-alte prestazioni nella identificazione di frodi alimentari: il caso della tracciabilità di latte per produzioni DOP

Nicolò Riboni¹, Federica Bianchi¹, Monica Mattarozzi¹, Maurizio Piergiovanni¹,
Elisa Robotti², Claudio Cipolat Gotet³, Andrea Summer³, Maria Careri¹

¹ Università degli Studi di Parma, Dipartimento di Scienze Chimiche, della Vita e della Sostenibilità Ambientale, Parco Area delle Scienze 17/A, 43124, Parma, Italia

² Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica, Università del Piemonte Orientale, Viale Michel 11, 15121 Alessandria, Italia

³ Università degli Studi di Parma, Dipartimento di Veterinaria, Via del Taglio 10, 43126, Parma, Italia

Il tema delle frodi alimentari rappresenta un fenomeno globale in continua evoluzione. Ad oggi, la maggior parte delle metodologie analitiche applicate per il controllo di tale fenomeno si basa su approcci *targeted* in cui una o poche classi di composti noti a priori vengono analizzate. La sempre maggiore diffusione di metodologie basate sull'utilizzo della spettrometria di massa ad alta risoluzione (HRMS) abbinata a tecniche separative quali la gascromatografia o la cromatografia liquida ad ultra-alte prestazioni (UHPLC) rende di grande interesse lo sviluppo di approcci *untargeted* [1] che offrono la possibilità di condurre analisi retrospettive. Le potenzialità di questa tecnica trovano ulteriore sviluppo nell'utilizzo della mobilità ionica (IMS), in grado di fornire una dimensione di separazione aggiuntiva alle tecniche cromatografiche, restituendo informazioni supplementari utili all'identificazione di composti incogniti [2]. In questo contesto, lo sviluppo di modelli predittivi caratterizzati da elevata specificità e sensibilità rende l'elaborazione chemiometrica dei risultati uno step di fondamentale importanza per garantire la tracciabilità dei diversi prodotti.

In questo studio, lo spettrometro di massa ibrido quadrupolare – a tempo di volo dotato di cella a mobilità ionica, Synapt-G2-Si HDMS, è stato utilizzato per lo sviluppo di un approccio UHPLC-IMS-HRMS *untargeted* per la tracciabilità di latte destinato a produzioni DOP. L'acquisizione sia in modalità ioni positivi che negativi, operando in modalità MS^E [3], ha permesso di acquisire il profiling metabolomico dei diversi campioni ottenendo informazioni utili alla tracciabilità del singolo animale e consentendo l'identificazione di biomarker legati a latte utilizzato per la produzione di diversi formaggi DOP. La registrazione di spettri ad alta e bassa energia ha permesso l'acquisizione di oltre 10000 *features*, che, a seguito di opportuno pretrattamento, sono state elaborate mediante approcci chemiometrici *unsupervised* (analisi delle componenti principali) e *supervised* (partial least squares discriminant analysis). Sono state individuate 52 variabili responsabili della discriminazione relativa alla destinazione casearia dei campioni, mentre 153 variabili sono risultate utili alla discriminazione tra i diversi produttori, consentendo la corretta classificazione della totalità dei campioni, con ciò dimostrando le potenzialità dell'approccio per la tracciabilità alimentare.

Riferimenti

1. Z. Qin, J. Wang, D. Wang, H. Xiao, X. Lv, H. Chen, F. Wei; *Trends in Food Science & Technology*, 143 (2024), art.n. 104298
2. N. Riboni, F. Bianchi, M. Mattarozzi, M. Caldara, M. Gullì, S. Graziano, E. Maestri, N. Marmiroli, M. Careri; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71 (2023) pp. 15407–15416.
3. M. Mattarozzi, N. Riboni, M. Maffini, S. Scarpella, F. Bianchi, M. Careri; *Journal of Chromatography A*, 1648 (2021), art. n. 462209

L'analisi molecolare come strumento d'indagine e prova giudiziaria: quando un rapporto madre-figlia, che apparentemente termina con un aiuto alla morte per soffocamento diventa omicidio premeditato

**Sergio Indelicarto¹, Annamaria Cucina ¹, Vita Giaccone¹, Ornella Gasparro¹,
Roberta Cicala¹, Francesca Di Gaudio^{1,2}**

¹Azienda Ospedaliera Ospedali Riuniti Villa Sofia Cervello, Sezione di Cromatografia e Spettrometria di Massa,

²Controllo Qualità e Rischio Chimico (CQRC), Via del Vespro, 133, Palermo, 90127, Italia

³PROMISE, Università di Palermo, Piazza delle Cliniche, 2, Palermo, 90127, Italia

In questo report, presentiamo il caso di una donna deceduta apparentemente per asfissia con sospetto di suicidio per avvelenamento. L'indagine si è concentrata sulla figlia adolescente che ha inizialmente sostenuto che la madre si fosse avvelenata. Lo shock la avrebbe poi spinta a coprire, impulsivamente, con un cuscino il volto della madre rantolante, accompagnando di fatto il suicidio. La corretta interpretazione del caso è stata raggiunta attraverso un'osservazione meticolosa della scena del crimine, l'analisi chimica dei campioni raccolti e l'esame delle abitudini tossicologiche della figlia.

Sulla scena del crimine sono stati raccolti vari campioni, tra cui residui del piatto dove la madre aveva consumato del purè, residui dalla padella, residui da una tazza da caffè, farmaci antidepressivi ed ansiolitici. Tutti i campioni sono stati analizzati utilizzando LC/MS-MS.

L'analisi di screening mediante LC/MS-MS ad alta risoluzione ha consentito di rivelare che, sebbene il purè rimasto in padella fosse privo di aggiunta di farmaci, il piccolo residuo di purè sul piatto della vittima era contaminato di lorazepam e amitriptilina. La successiva analisi quantitativa ha permesso di determinare che circa cinquanta compresse di lorazepam (2,5 mg Tavor) e poche gocce di amitriptilina (40 mg/ml Laroxyl) erano state aggiunte al purè ingerito dalla vittima, nel cui sangue e contenuto gastrico sono state trovate quantità corrispondenti. Successivamente, le abitudini farmacologico-tossicologiche sia della vittima che della figlia sono state indagate attraverso un'analisi segmentale dei capelli. L'analisi dei capelli dell'imputata ha rivelato un consumo spot di cannabinoidi e cocaina. È interessante notare che il consumo di droghe coincideva temporalmente con un periodo di circa un semestre prima dell'omicidio, quando nel sangue della vittima, ricoverata a causa di un malessere inspiegabile, si era vista la presenza di benzodiazepine. La correlazione temporale tra il consumo di droghe della figlia e l'inspiegabile malessere della madre ha spinto la polizia a interrogare la figlia, la quale ha confessato non solo l'omicidio ma anche il fallito tentativo di omicidio circa un anno prima.

L'analisi molecolare, ed in particolar modo l'analisi di screening ha indirizzato le indagini ed ha rivelato, in combinazione con le informazioni temporali ottenute dall'analisi segmentale della matrice cheratinica, che una comune adolescente è stata capace di premeditare l'omicidio della madre.

Presentazioni Flash

Caratterizzazione spettroscopica di un preparato cosmetico a matrice gelatinosa

Valentina Greco, Alessandro Giuffrida

Dipartimento di Scienze Chimiche, Università di Catania

Nell'ambito di una procedura penale, attivata dopo la necessità di un accesso ospedaliero in Pronto Soccorso, è stato sottoposto a sequestro un preparato cosmetico a matrice gelatinosa indicante la dicitura "Sangue Spray".

Il prodotto, verosimilmente sviluppato per mascheramenti ed usi ludici, non riportava nell'etichetta alcuna specifica tecnica riguardante la composizione (Figura 1).



Prodotto cosmetico sottoposto a sequestro

Il campione è stato sottoposto, dopo opportuno pre-trattamento, ad una estensiva caratterizzazione spettroscopica tramite l'utilizzo di Risonanza Magnetica Nucleare (NMR), Spettrometria di Massa e spettroscopie UV-Vis e di Fluorescenza. I risultati hanno evidenziato la presenza di diversi composti a struttura polimerica [1] e di un colorante azoico, l'Allura Red (E129) [2].

L'Allura Red è stato oggetto di diversi studi in merito a potenziali effetti nocivi sulla salute e ne è stato concesso l'uso con restrizioni quantitative (concentrazione massima 7 mg/Kg) dall'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA). Nonostante siano stati riportati diversi episodi di reazioni allergiche (asma e/o orticaria), associate ad elevate concentrazioni del colorante E129 in prodotti cosmetici, il Regolamento CE n° 1223/2009 ne permette l'uso con limitazioni relative al solo grado di purezza.

Accertata la correlazione tra le potenziali risposte allergiche e la concentrazione del colorante nei cosmetici, si è reso necessario quantificare il contenuto nel campione sottoposto a sequestro. Il metodo analitico, sviluppato mediante HPLC-DAD, ha permesso di determinarne la concentrazione, che è risultata pari a 5,45 g/L.

Riferimenti

1. Jackson, A.T., Slade, S.E., Thalassinou, K. et al., *Anal Bioanal Chem* 392, (2008), pp 643–650.
2. Rovina K, Siddiquee S, Shaarani SM., *Front Microbiol.* 27(7), (2016), pp 798.

Estrazione parallela con membrana liquida artificiale (PALME) per la determinazione di sostanze stupefacenti nel fluido orale mediante analisi HPLC-MS/MS

**Martina Croce¹, Gaia Di Francesco², Flaminia Vincenti², Camilla Montesano²,
Marcello Mascini³, Roberta Curini², Dario Compagnone³, Manuel Sergi²**

¹ Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive, Sapienza Università di Roma

² Dipartimento di Chimica, Sapienza Università di Roma

³ Dipartimento di Bioscienze e tecnologie agro-alimentari e ambientali, Università di Teramo

Nell'ultimo decennio il numero crescente di sostanze rappresenta una sfida ancora maggiore per la prevenzione del consumo di droga. Per questi motivi, metodologie innovative per isolare le molecole e prevenirne la diffusione non controllata sono di notevole interesse [1]. Tra le numerose matrici biologiche, la saliva (o fluido orale (OF)) negli ultimi anni ha acquisito una notevole importanza come strumento d'indagine "alternativo" a sangue ed urina per lo screening di sostanze illecite, soprattutto nelle indagini di guida sotto l'effetto di sostanze stupefacenti e nelle applicazioni mediche. Questo perché la saliva presenta una serie di vantaggi, oltre ad essere considerato il miglior strumento di indagine sugli esseri umani dal punto di vista etico [2]. Lo scopo di questo lavoro è lo sviluppo di un metodo di microestrazione in fase liquida per la determinazione di droghe illecite appartenenti a classi farmacologiche differenti nella matrice biologica fluido orale. La simultanea identificazione e quantificazione degli analiti di interesse è avvenuta attraverso lo sviluppo di una metodica HPLC-MS/MS. L'estrazione parallela con membrana liquida artificiale (PALME) è stata descritta ed utilizzata per la prima volta nel 2013 da Gjelstad et al [3]: attraverso la creazione di un gradiente di pH, è possibile estrarre a partire da un campione prevalentemente acquoso, un analita basico o acido. L'intero processo può essere considerato una doppia estrazione: dal campione acquoso ad un solvente organico che viene immobilizzato su di una membrana di supporto in PVDF (polivinilidenefluoruro) e da tale solvente in una soluzione accettrice che è direttamente compatibile con la successiva analisi HPLC-MS/MS. Sono diversi i parametri che possono influenzare l'efficienza della PALME: il pH della soluzione donatrice, la presenza di NaCl, il tipo di solvente organico sulla membrana, il tempo di agitazione, l'aggiunta della TOA (triottilammina), la composizione della soluzione accettrice. Per tale motivo, è stato applicato un approccio di disegno sperimentale al fine di determinare le condizioni per ottenere un recupero ottimale per la maggior parte degli analiti in esame; la condizione individuata e successivamente scelta, infatti, rappresenta un compromesso per tutte le sostanze considerate, che hanno caratteristiche molto diverse. Il metodo è stato, quindi, validato seguendo le linee guida del gruppo di lavoro della scientifica per la tossicologia forense (SWGTOX); sono stati valutati parametri come il LOD, LOQ, precisione ed accuratezza, range dinamico lineare ed effetto matrice. Lo sviluppo di un metodo multiclasse come quello presentato permette di ridurre i tempi ed i costi dell'analisi; inoltre, la configurazione a 96 pozzetti della PALME permette di utilizzare piccole quantità di solvente organico e di poter analizzare fino a 96 campioni differenti, fornendo buoni risultati in termini di recupero e di pulizia del campione, essendo l'effetto matrice quasi nullo.

Riferimenti

1. Drug use and health consequences. *World Drug Report* (2020).
2. L. D'Orazio, A.L.A. Mohr, A. Chan-Hosokawa et al., *J. Anal. Toxicol.* 45 (2021), pp 529–536.
3. A. Gjelstad, TrAC; *Trends Anal. Chem.* 113 (2019), pp 25-31.

Indagini forensi di fuoriuscite di prodotti petroliferi: approcci avanzati utilizzando la Spettrometria di Massa

Alice D'Angelo¹, Claudio Meregalli¹, Massimo Marchesi²

¹Isotope Tracer Technologies Europe S.rl.

²Università degli Studi di Roma La Sapienza (Dipartimento di Scienze della terra)

Le fuoriuscite di petrolio e prodotti petroliferi rappresentano un grave problema ambientale e richiedono un'analisi forense accurata per determinarne cause, responsabilità e impatti. La spettrometria di massa emerge come uno strumento fondamentale in questo contesto, permettendo un'analisi dettagliata dei campioni contaminati e dei relativi residui ambientali attraverso l'uso di strumentazioni sofisticate e tecniche analitiche specifiche. In particolare, la metodologia utilizzata a tal fine è quella del fingerprinting composizionale, tecnica analitica, basata sulla norma EN 15522/2023, utilizzata per identificare e caratterizzare campioni provenienti da siti contaminati da prodotti idrocarburici, conferendo ad ogni diversa tipologia di prodotto una "impronta digitale" che riflette la sua composizione chimica. Questa "impronta digitale" permette quindi di identificare e confrontare campioni per determinare la tipologia del prodotto che ha causato lo sversamento (es. benzina, cherosene, gasolio, olio minerale, greggio, ...) ed individuare eventuali variazioni nella composizione nel tempo o nello spazio.

Il processo inizia con l'identificazione della fuoriuscita e con la raccolta e la preparazione dei campioni (oli, acque contaminate, campioni di suolo/terreno, ...) seguita da un'analisi in gascromatografia accoppiata a spettrometria di massa per separare e riconoscere i diversi composti che compongono i campioni contaminati ^[2]. Da tale analisi si ottengono cromatogrammi che permettono di identificare a quale prodotto/frazione petrolifera si possa attribuire l'origine della contaminazione, possedendo ogni prodotto/frazione petrolifera un'impronta caratteristica ^[1]. Elaborando i dati analitici si identifica la distribuzione relativa dei vari composti/isomeri all'interno delle famiglie omologhe più rappresentative (n-alcani, n-alchilcicloesani, naftaleni, BTEXs e alchilbenzeni ed isoprenoidi) mediante analisi per frammenti m/z caratteristici ^[3]. Pur non restituendo valori di concentrazione assoluti per quei composti ricercati, tale metodo consente sia di verificare la presenza o meno di composti target specifici, sia di determinare la distribuzione relativa di composti appartenenti a famiglie omologhe di interesse ^[3].

Successivamente si procede ad una stima del livello di degradazione/weathering e di una possibile datazione mediante l'utilizzo di diversi indicatori (stadi di Kaplan, rapporto n-C17/pristano ^[3], rapporto Rb (Benzene + Toluene/Etilbenzene + Xileni) ^[3] in modo da poter valutare e attribuire le responsabilità della fuoriuscita.

Costi sempre più elevati di caratterizzazione, messa in sicurezza e successiva bonifica dei siti contaminati stanno infatti mettendo in evidenza la necessità di una precisa e corretta attribuzione delle responsabilità, in particolar modo per casi complessi dove, ad esempio, la proprietà è mutata nel tempo, o piuttosto dove la presenza di possibili altri responsabili non sia da escludersi. Il fingerprinting composizionale si pone quindi come analisi di riferimento per far fronte a questa importante problematica ambientale.

Riferimenti

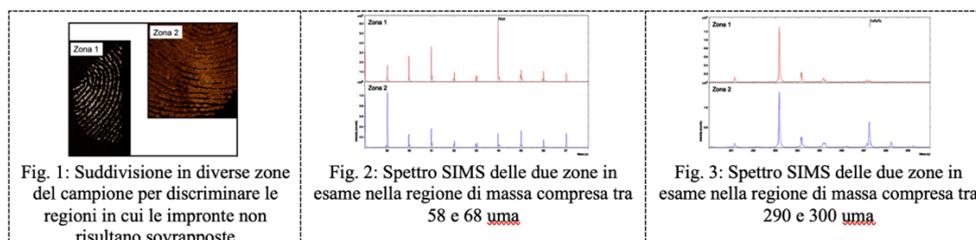
1. Alimi, H., Ertel, T. & Schug, B. Fingerprinting of hydrocarbon fuel contaminants: literature review. *Environmental Forensics*, 4 (2003), pp. 25-38.
2. EN 15522-2, Oil Spill Identification - Waterborne Petroleum and Petroleum Products - Part 2: Analytical Methodology and Interpretation of Results Based on GC-FID and GC-MS Low Resolution Analyses (2023).
3. Wang, Z. et al. Petroleum biomarker fingerprinting for oil spill characterization and source identification. *Standard handbook oil spill environmental forensics* (2016), pp. 131-254.

L'uso del TOF-SIMS IMAGING per la rilevazione di impronte digitali sovrapposte

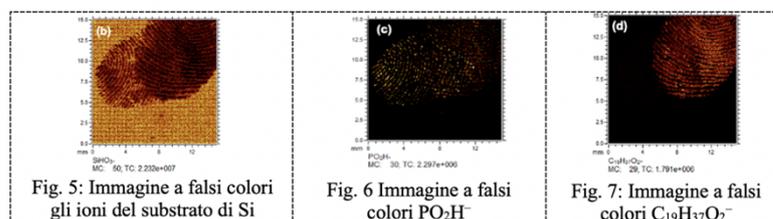
Paola Benedetta Castellino - Nunzio Tuccitto

Università degli Studi di Catania - Dipartimento di Scienze Chimiche – Viale A. Doria n° 6 – 95125 Catania

Il riconoscimento di impronte digitali ha un ruolo fondamentale per quanto riguarda aspetti di sicurezza, come l'accesso a determinate zone tramite porte regolate da serrature biometriche di qualunque tipologia, e aspetti forensi. Recenti sviluppi hanno dimostrato l'applicabilità della Spettrometria di Massa a Ioni Secondari con Analizzatore a Tempo di Volo per analizzare i composti chimici presenti in una porzione di impronta digitale [1]. Nel nostro studio, presentiamo i risultati relativi all'identificazione delle differenze negli spettri nelle diverse regioni del campione, con l'obiettivo di separare due impronte digitali parzialmente sovrapposte su una superficie di vetro (Fig. 1). Utilizzando la modalità di imaging spaziale ad alta risoluzione, abbiamo ottenuto immagini dettagliate. Le regioni con composizione molecolare diversa presentano spettri distinti, con picchi corrispondenti al rapporto m/z dei composti in questione (Figg. 2-3). Di conseguenza, siamo stati in grado di estrarre mappe chimiche in cui le regioni contenenti una specifica specie chimica sono evidenziate attraverso il contrasto cromatico.



Questi risultati indicano la possibilità di distinguere e analizzare dettagliatamente impronte digitali sovrapposte, offrendo potenziali applicazioni nell'ambito forense. Nel nostro caso a regione compresa tra 58 e 68 uma, è possibile osservare come nella Zona 1 è presente un picco ben distinguibile a maggiore intensità a 64 uma (indice della presenza di PO_2H^-), nella Zona 2 sia presente un picco a maggiore intensità per 297 uma (indice della presenza $\text{C}_{19}\text{H}_{37}\text{O}_2^-$). Le figure 4-5-6 mostrano le immagini a falsi colori a seguito di emissione di PO_2H^- e di $\text{C}_{19}\text{H}_{37}\text{O}_2^-$. [2]



La metodologia proposta, basata sulla spettrometria di massa, potrebbe rappresentare un avanzamento significativo nel campo del riconoscimento delle impronte digitali, aprendo nuove prospettive per la tecnologia di sicurezza e le indagini criminali.

Riferimenti

1. N. Tuccitto, A. Bombace, A. Auditore, A. Valenti, A. Torrisi, G. Capizzi, A. Licciardello; Revealing Contamination and Sequence of Overlapping Fingerprints by Unsupervised Treatment of a Hyperspectral Secondary Ion Mass Spectrometry Dataset, *Anal. Chem.* 2021, 93, p 14099.
2. P.B. Castellino; TOF-SIMS imaging: un utile mezzo per la rilevazione di impronte digitali sovrapposte, Università degli Studi di Catania, 2020, pp 23-34.

I capelli come matrice per l'analisi di composti organici in tracce: una miniera di informazioni incerte

Matteo Baglietto, Henry MacKeown, Barbara Benedetti, Marina Di Carro,
Emanuele Magi

Dipartimento di Chimica e Chimica Industriale, Università degli Studi di Genova

L'analisi del capello è estremamente informativa, complementare all'investigazione di matrici biologiche più tradizionali (urine, sangue...). La *Society of Hair Testing – SoHT* – definisce le linee guida sulle procedure da seguire manipolando questo tipo di matrice, inclusi i numerosi vantaggi e gli aspetti più critici [1]. La SoHT indica nel dettaglio le modalità di campionamento e conservazione, mentre rimane più vaga riguardo la decontaminazione (per rimuovere la frazione assorbita sulla superficie del capello dall'ambiente) e l'estrazione. Perciò, gli studi in letteratura (spesso focalizzati su un singolo composto o su un piccolo insieme di sostanze appartenenti alla stessa classe), utilizzano metodiche di estrazione (e purificazione) specifiche e ottimizzate al proprio scopo, che durano anche diverse ore [2,3]. In questo studio si propone invece un approccio più generico e 'multi-classe', procedendo con un'estrazione aspecifica e rapida. Dopo alcune prove preliminari eseguite su un campione composito costituito dai capelli provenienti da 7 donatori (su 38 volontari coinvolti), si è definita una metodica, applicata ad un totale di 42 campioni, più bianchi procedurali, che prevede: (i) tre step di decontaminazione (due con acqua e il terzo acetone) su aliquote da 10 mg di capelli e (ii) un'estrazione sequenziale in due passaggi con metanolo (0.5 mL tal quale per la prima, e 0.5 mL contenente l'1% di NH₃ per la seconda) da 20' ciascuna in bagno ad ultrasuoni. Dopodiché, (iii) i due estratti vengono evaporati sotto flusso d'azoto e ricostituiti, riuniti, in 400 µL di metanolo. Infine, (iv) in seguito a filtrazione e diluizione 1:1 con acqua, essi sono analizzati tramite LC-MS/MS alla ricerca di 39 composti, incluse sostanze legate alle abitudini alimentari e ricreative, farmaci e prodotti per la cura personale, così come alcuni additivi industriali riconosciuti come contaminanti ubiquitari. I risultati preliminari ottenuti sono molto interessanti, con la rivelazione di 20 composti caratterizzati da varie proprietà chimico-fisiche e diverso utilizzo (da sostanze polari come caffeina e nicotina, a composti più apolari quali filtri UV e triclosan) in almeno un campione, confermando quindi che il metodo applicato risulta sufficientemente efficace nonostante la sua genericità. Tuttavia, le informazioni ottenute vanno trattate con cautela, poiché vi sono numerose fonti di incertezza che possono influire sul dato ottenuto. Dal punto di vista qualitativo, se una sostanza viene rilevata in un campione, ma questa è assente sia nel bianco procedurale, sia nel solvente di decontaminazione (purché sia efficace, e che va comunque conservato e analizzato in situazioni dubbie [1]), è lecito considerare che questa derivi da un assorbimento nel capello dai vasi sanguigni che lo irrorano. Quantitativamente, invece, è complicato ottenere una stima accurata dell'efficienza di estrazione, data la difficoltà di riprodurre il legame che si instaura tra la matrice cheratinica e le sostanze che vi diffondono attraverso i vasi sanguigni. Questa fonte di incertezza, insieme con la variabilità biologica ed eventuali trattamenti chimico-fisici rende pressoché impossibile correlare in modo affidabile con la dose di somministrazione, ricorrendo spesso all'uso di valori soglia [1,3]. Se si conoscono le abitudini dei volontari, i quali hanno preventivamente compilato un questionario, tramite un'analisi multivariata è possibile osservare se e come queste possono influenzare il contenuto di specifiche sostanze all'interno dei loro capelli.

Riferimenti

1. D. Favretto, et al., *Drug Testing and Analysis*, 15 (2023) 1042–1046.
2. Y. Gaillard and G. Pépin, *Journal of Chromatography B*, 733 (1999) 231–246.
3. S. Vogliardi, et al., *Analytica Chimica Acta*, 857 (2015) 1–27.

Presentazioni Poster

Sviluppo di strategie analitiche innovative per l'identificazione di Nuove Sostanze Psicoattive nei sequestri

Ilenia Bracaglia^{1,2}, Martina Croce^{1,2}, Gaia Di Francesco¹, Francesco Bartolini¹, Gianmarco Pezzuti¹, Camilla Montesano¹, Manuel Sergi¹, Sabino Napoletano³, Antonietta Lombardozi³

¹Dipartimento di Chimica, La Sapienza- Università di Roma, 00185 Roma, Italia

²Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive, La Sapienza- Università di Roma, 00185 Roma, Italia

³Dipartimento Sicurezza Pubblica, Direzione Centrale Anticrimine Polizia Nazionale Italiana, Servizio Polizia Scientifica Forense (DAC-SPS), Sezione Sostanze Psicotrope e Stupefacenti, Roma, Italia

La rilevazione e il riconoscimento analitico delle NPS costituisce una delle principali sfide sul mercato globale in campo clinico e forense a causa del loro repentino sviluppo e della loro somiglianza strutturale alle sostanze illecite già ampiamente monitorate^{1,2}.

Tale situazione sottolinea la necessità di sviluppare nuove strategie analitiche per la loro identificazione, permettendone un incremento nel monitoraggio. A tale scopo, il presente studio, effettuato in collaborazione con il Servizio Polizia Scientifica, si concentra sulla comparazione dei principali approcci analitici utilizzati che prevedono la cromatografia liquida UPLC accoppiata alla spettrometria di massa HRMS/MS. L'iniziale sviluppo di un metodo target basato sull'identificazione di un set ampio di sostanze stupefacenti, incluse sia NPS di maggior diffusione (cannabinoidi e catinoni sintetici) che droghe classiche e successiva conferma con standard analitici di riferimento, ha permesso di ampliare il metodo ad un approccio suspect ed infine untarget, quindi puramente non mirato. Dopo un'adeguata separazione degli analiti attraverso un'analisi Full Scan, è stata impiegata la modalità MS^e in un range definito di energia di collisione, così da ottenere spettri di frammentazione quanto più informativi possibile. La robustezza del metodo target è stata dimostrata ampliando l'indagine a 10 campioni reali provenienti da sequestri di strada tramite un approccio suspect, con l'identificazione putativa di Triptamine (5-metossi DALT, 5-metossi DMT, 4-OH MET, 4-acetossi DIPT), Catinoni sintetici (Metilone, 3,4-MDPHP) e Cannabinoidi sintetici (AM-2201) tramite il confronto delle informazioni cromatografiche e di massa con la libreria interna del software di elaborazione (UNIFI). La sfida reale si è presentata con l'identificazione putativa dell'MDMB BUTINACA, un cannabinoide sintetico presente in un campione reale proveniente da sequestri di strada, che ci ha permesso di adottare un approccio puramente non mirato basandoci sulla sola presenza di informazioni provenienti dalla letteratura scientifica e l'utilizzo di software di predizione *open source* ed *user friendly*, in quanto tale sostanza non è presente in libreria UNIFI. Per un'identificazione più accurata, è stato scelto un metodo cromatografico opportuno e sono state utilizzate due modalità di analisi, quali MS^e e successivamente MS/MS. L'approccio untarget basato su strumentazioni UPLC-HRMS/MS risulta quindi essere fondamentale per la rilevazione di nuove NPS e può essere supportato da ulteriori metodi analitici quali NMR.

Riferimenti

1. J. Rubicondo, L. Scuffi, L. Pietrosevoli, M. Mineo, F. Terranova, M. Bartucca, C. Trignano, E. Bertol, F. Vaiano: *Journal of Analytical Toxicology*, 46 (2022), pp 262-273.
2. <https://www.politicheantidroga.gov.it/media/iadfrgci/sintesi-introductiva-alla-realzione-al-parlamento-2023-dati-2022.pdf>

Sviluppo di un metodo analitico per la determinazione, in matrice pilifera, del THC-COOH mediante analisi UPLC-ESI(-)-MS/MS

Francesco Della Valle¹, Alessia Pepe¹, Sara Palmieri¹, Eleonora Oliva¹, Fabiola Eugelio¹, Federico Fanti¹, Michele Del Carlo¹, Dario Compagnone¹, Manuel Sergi²

¹ Dipartimento di Bioscienze e Tecnologie Agroalimentari e Ambientali, Università degli Studi di Teramo, Via Renato Balzarini 1, 64100, TE

² Dipartimento di Chimica, Università di Roma La Sapienza, Piazzale Aldo Moro 5, 00185, Roma

Cannabis Sativa L. è una specie vegetale di Cannabis. Oltre al suo utilizzo ricreativo come droga d'abuso, la pianta ha ampi usi alternativi, tra cui la produzione di cibo, cosmetici (canapa), tessuti e applicazioni medicinali[1]. Nei primi anni '80 è iniziata una serie di studi sulla possibilità di determinare sostanze d'abuso nella matrice cheratinica in base alla loro lipofilità, peso molecolare, pKa e volume sterico in modo stabile nel tempo. L'analisi delle sostanze d'abuso nella matrice cheratinica è un'aggiunta ideale all'analisi del sangue o dell'urina. Quando i laboratori di tossicologia sono tenuti a investigare sull'esposizione passata al Cannabis, l'analisi dei capelli può fornire prove evidenti. In particolare, i composti target nell'analisi dei capelli sono: $\Delta(9)$ -tetraidrocannabinolo (THC), il principale composto psicoattivo del cannabis, e il metabolita non-psychoattivo 11-nor-9-carbossi- Δ^9 -THC (THC-COOH)[2]. Di solito, dopo l'ingestione, tracce di sostanze e loro metaboliti vengono depositati nei capelli attraverso il flusso sanguigno e nel follicolo in crescita. La garanzia di qualità è una questione importante nel drug testing che porta a nuove raccomandazioni, procedure di convalida o test interlaboratorio. Inoltre, sono discusse le tendenze recenti nella ricerca riguardante l'analisi dei capelli a causa della bassa concentrazione del limite legislativo di THC-COOH (2pg/mg) così come nuove procedure analitiche. Lo scopo di questo lavoro si concentra sugli aspetti di base dello sviluppo e della convalida del drug testing in matrice pilifera, in particolare è stato sviluppato un protocollo di clean-up tramite Solid Phase-Extraction (SPE) seguendo le linee guida della Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology (SWGTOX), al fine di eliminare eventuali composti interferenti e evitare l'effetto matrice nell'analisi delle campioni considerando il fattore di arricchimento necessario per raggiungere il limite minimo di quantificazione.

Riferimenti

1. A. Iftikhar, U. Zafar, W. Ahmed, MA. Shabbir, A. Sameen, A. Sahar, ZF. Bhat, PL. Kowalczewski, M Jarzëbski, RM Aadil; *Molecules* 26 (2021) 7699 doi: 10.3390/molecules26247699
2. C. Montesano, MC. Simeoni, G.Vannutelli, A. Gregori, L. Ripani, M. Sergi, D. Compagnone, R. Curini; *J Chromatogr A*. 1406 (2015), pp 192-200 doi: 10.1016/j.chroma.2015.06.021.

Approcci innovativi per comprendere la diffusione di nuove sostanze stupefacenti nella popolazione

Marta Massano^{1,2}, Martina Galletto^{1,2}, Christina Ververi^{1,2}, Alberto Salomone^{1,2}

¹ Dipartimento di Chimica, Università degli Studi di Torino

² Centro Regionale Antidoping "A. Bertinaria", Orbassano (TO)

Il mercato delle sostanze stupefacenti è dinamico e imprevedibile ed in costante crescita: in base ai dati dell'EMCDDA, nel 2023 sono state monitorate 930 sostanze, delle quali 41 sono comparse sul mercato nel 2022. Il *National Drug and Alcohol Research Center* propone una distinzione tra NPS (*new psychoactive substances*) e EPS (*emerging psychoactive substances*), considerando quest'ultime come sostanze psicoattive che sono solo relativamente nuove, non essendo di recente creazione, ma il cui uso è incrementato e si è diffuso solo negli ultimi 10-15 anni. Obiettivo di questa ricerca è stato fornire strumenti efficaci per il monitoraggio del consumo di sostanze d'abuso tradizionali e nuove, in particolare fentanyl e altri oppioidi, attualmente causa di un numero elevatissimo di decessi. Inoltre, l'identificazione delle sostanze nelle matrici biologiche è essenziale per avere a disposizione dati oggettivi sulla tipologia di sostanze assunte, e sulla loro diffusione.

Per constatare la consapevolezza o meno delle persone rispetto all'assunzione di NPS o oppioidi di sintesi, sono stati associati due diversi strumenti: l'analisi in laboratorio di campioni di matrice cheratinica e un questionario sociologico, per rilevare sia informazioni sulle sostanze consapevolmente assunte dalle persone e paragonarle con il risultato di laboratorio, sia per ottenere informazioni rispetto ai contesti di uso, alle motivazioni che sottendono questo comportamento e le fonti di approvvigionamento. Attraverso l'analisi dei campioni di matrice cheratinica si è verificata la presenza o meno delle sostanze dichiarate dalle persone in sede di compilazione di questionario sociologico e l'eventuale presenza di stupefacenti non dichiarati, considerando il dato come assunzione non consapevole.

La ricerca si è svolta da dicembre 2022 a luglio 2023 sul territorio della Regione Piemonte, in particolare: città di Torino e provincia, città di Alessandria, città di Biella, città di Asti. Sono stati raccolti 200 questionari e 200 campioni di matrice cheratinica, 100 di persone che frequentano i contesti del divertimento e 100 di persone che usufruiscono dei servizi di bassa soglia e dei servizi per le dipendenze.

Sulla base dell'analisi dei campioni di capelli, le sostanze più utilizzate nei due gruppi sono cocaina (68%), cannabis (50%), MDMA e ketamina (32% ciascuno) ed eroina (26%). Catinoni sintetici e oppioidi sintetici sono stati identificati con minor frequenza. Mefedrone, bufedrone ed eutilone sono stati riscontrati in soggetti che avevano dichiarato un uso recente (n=3) e un uso passato (n=9) di MDMA e anfetamine; due persone sono risultate positive al recente uso di mefedrone pur non avendolo dichiarato. Ketamina, MDMA e tramadolo sono stati spesso identificati in campioni raccolti da consumatori che non avevano dichiarato alcuna esposizione a tali sostanze.

Infine, interessante è il caso dell'eroina, il cui consumo è risultato prevalente tra i soggetti che usufruiscono dei servizi per le dipendenze (56%) rispetto ai soggetti che frequentano i contesti di divertimento (1%). Inoltre, in riferimento al primo gruppo è stata riscontrata un'alta percentuale di correlazione tra le assunzioni di eroina e di cocaina (69%) rispetto all'assunzione di altre droghe d'abuso tradizionali.

Determinazione simultanea di 150 droghe d'abuso in sangue intero mediante Salting-out Assisted Liquid-Liquid Extraction (SALLE) ed analisi UHPLC-MS/MS

**Gianmarco Pezzuti¹, Flaminia Vincenti¹, Gloria Fiorini¹, Francesco Bartolini¹,
Ilenia Bracaglia^{1,2}, Gaia Di Francesco¹, Martina Croce^{1,2}, Aldolfo Gregori³,
Camilla Montesano¹, Manuel Sergi¹**

¹Università di Roma "La Sapienza", Dipartimento di Chimica, Roma, Italia

²Università di Roma "La Sapienza", Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive, Roma, Italia

³Carabinieri, Dipartimento di Investigazioni Scientifiche (RIS), Viale Tor di Quinto 151, Roma, Italia

Le nuove sostanze psicoattive (NPS) sono sempre più utilizzate e il loro riconoscimento, sia in campioni provenienti da reperti, sia in campioni biologici, è un problema analitico molto attuale [1]. Lo scopo del lavoro proposto è stato lo sviluppo di una metodica basata su UHPLC-HRMS/MS per la determinazione di 150 tra droghe classiche e NPS in sangue intero. Uno degli obiettivi è stato realizzare una metodica di pretrattamento rapida, economica e versatile, adatta cioè alle diverse classi di molecole considerate. A tal proposito si è deciso di utilizzare la tecnica della Salting-out assisted liquid liquid extraction (SALLE) [2] e in una fase preliminare, è stato fondamentale trovare le condizioni più idonee per la messa a punto dei parametri operativi. In particolare, è stata inizialmente condotta l'analisi su campioni che contenessero un numero ridotto di analiti (47 su 150), e a tal scopo è stato utilizzato uno strumento di analisi a basso potere risolutivo (triplo quadrupolo). In un secondo momento, è stato esteso il lavoro a tutti gli analiti (150) sfruttando uno strumento di analisi ad alto potere risolutivo con analizzatore a trappola ionica orbitale messo a disposizione dal Reparto di Investigazioni Scientifiche di Roma. È stato così possibile validare l'intero metodo analitico HRMS per la determinazione multi-screening di droghe da sangue intero al fine di ottenere l'estrazione simultanea e la quantificazione nel sangue intero di 150 sostanze stupefacenti.

La procedura proposta rispetto a quelli presenti in letteratura gode di una semplificazione e velocizzazione della tecnica estrattiva SALLE: è stato ridotto il numero dei passaggi necessari e il volume di solvente organico, rendendo la procedura estrattiva più sostenibile su lunga scala in termini di costi e di salvaguardia dell'ambiente. È stato ridotto il fattore di diluizione della matrice in modo da preservare una più elevata concentrazione degli analiti nel campione, di migliorarne l'intensità dei segnali e di garantirne conseguentemente una più efficace rivelazione.

Un altro punto di forza del metodo presentato è stato l'applicabilità ad un campione esteso ed eterogeneo di droghe d'abuso e non limitato ad una specifica classe di sostanze psicotrope o ad un numero ristretto di analiti appartenenti a classi differenti. L'intera procedura analitica, una volta validata, si è rilevata precisa, accurata, sensibile, con un effetto matrice basso. Sia per quanto riguarda il metodo a bassa risoluzione sia per quello ad alta risoluzione. Per quanto il numero di droghe sia notevole, la prospettiva futura è quella di implementare ulteriormente il campo di applicazione della tecnica analitica e rendere il metodo sviluppato completamente untargeted, al fine di identificare composti incogniti presenti in campioni di sangue ed estendere così il numero di sostanze rilevabili.

Riferimenti

1. Peacock, A., et al. *The Lancet* (2019), 1668-1684.
2. Tang, Y. Q., and N. Weng. *Bioanalysis* 5 (2013),1583–1598.

Sostanze stupefacenti e alterazione alla guida: analisi di screening e di conferma su strada tramite HPLC-MS/MS su laboratorio mobile

Gianmarco Pezzuti^{1,3}, Flavia Pagano², Ilenia Bracaglia^{1,2}, Gaia Di Francesco¹, Martina Croce^{1,2}, Francesco Bartolini¹, Manuel Sergi¹, Camilla Montesano¹, Stefano Marchetti³

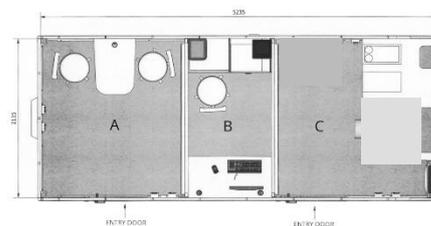
¹Università di Roma “La Sapienza”, Dipartimento di Chimica, Roma, Italia

²Università di Roma “La Sapienza”, Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive, Roma, Italia

³Forensic Lab Service S.r.l. , Rome, Italy

La guida sotto effetto di sostanze stupefacenti è causa di numerosissimi incidenti in Italia e all'estero. Il controllo stradale, insieme alle attività di prevenzione risultano essere i mezzi più efficaci per contrastare la guida sotto effetto di sostanze stupefacenti. L'art.187 del Codice della strada prevede che i conducenti fermati effettuino un'analisi di screening, un'analisi di conferma e una visita medica che attesti l'alterazione del soggetto. L'analisi di conferma e la relativa visita medica solitamente non vengono eseguiti in strada in quanto richiedono personale specializzato e strumentazioni non portatili (HPLC-MS o GC-MS). Normalmente la persona fermata, positiva al test di screening, viene accompagnata in ospedale per permettere l'esecuzione dell'analisi di conferma. Questa procedura richiede tempi generalmente lunghi comportando che la visita medica (utile all'accertamento dello stato di alterazione) venga effettuata anche a molte ore di distanza dal momento del fermo, risultando dunque falsata. Inoltre il risultato analitico viene fornito anche dopo giorni o settimane dal momento dell'arrivo del campione, comportando inevitabili rallentamenti nelle chiusure delle pratiche. Per queste ragioni nel 2019 è stato allestito un laboratorio mobile fornito di strumentazione per l'analisi di screening e di un HPLC-MS per l'analisi di conferma, permettendo di effettuare direttamente in loco tutte le analisi previste.

Fig. 1. Planimetria del laboratorio mobile. A= stanza per la visita medica, B=stanza preparazione del campione e analisi dati, C =sala strumento [1].



La durata dell'analisi di screening è di soli 5 minuti mentre per l'analisi di conferma è stato sviluppato un metodo che prevede 15 minuti di corsa cromatografica (per la separazione e rilevazione di 16 sostanze) e 10 minuti di sample preparation. In questo modo dopo solo 30 minuti è possibile fornire i risultati delle analisi di secondo livello (conferma).

L'analisi di conferma viene eseguita sui fluidi orali: tale matrice offre la possibilità di avere un campionamento rapido e non invasivo, caratteristiche desiderabili per un'analisi effettuata direttamente su strada. Inoltre la presenza di sostanze stupefacenti in saliva dà indice di assunzione a breve termine rendendo la saliva matrice d'elezione per questo tipo di analisi [2]. Sono stati raccolti migliaia di campioni su cui è stato effettuato uno studio statistico confermando che la guida sotto effetto di sostanze stupefacenti è un fenomeno ancora troppo ricorrente e che vede come protagonisti principalmente THC e cocaina.

Riferimenti

1. Ariana Soledad Poetto, Giulio Catesini et al.; Forensic Science International (2024) Volume 355.
2. Scendonì, Roberto. IntechOpen (2021).

Estrazione magnetica in fase solida (m-SPE) come tecnica di clean-up del fluido orale per l'analisi multiclasse di sostanze psicoattive classiche ed NPS mediante HPLC-MS/MS

**Martina Croce¹, Gaia Di Francesco², Federica Marcolini², Ilenia Bracaglia²,
Francesco Bartolini², Gianmarco Pezzuti², Flaminia Vincenti², Alessandro Ciccola²,
Camilla Montesano², Roberta Curini², Manuel Sergi²**

¹Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive, Sapienza Università di Roma

²Dipartimento di Chimica, Sapienza Università di Roma

La recente rapida diffusione delle nuove sostanze psicoattive (NPS) è diventata un argomento di interesse per ricercatori, operatori sanitari e forze dell'ordine. Le nuove sostanze psicoattive (NPS) sono definite come nuovi stupefacenti/psicotropi che non sono controllati dalle Convenzioni delle Nazioni Unite sugli stupefacenti (1961) o sulle sostanze psicotrope (1971), ma che possono rappresentare una minaccia comparabile per la salute pubblica [1]. Negli ultimi anni, l'interesse verso matrici cosiddette "alternative" a quelle convenzionali (plasma, sangue intero, siero, urina) utilizzate per le analisi tossicologiche in ambito clinico e forense, è in forte aumento. Tra queste, il fluido orale offre una serie di vantaggi che ne giustificano l'utilizzo in differenti campi di applicazione; infatti, essa rappresenta la matrice d'elezione per le indagini di guida sotto l'effetto di sostanze stupefacenti, viene utilizzata nel campo del monitoraggio terapeutico, per la diagnosi medica, l'analisi antidoping e per il controllo dei lavoratori che svolgono particolari mansioni. Il fluido orale è una matrice la cui raccolta è semplice, non invasiva, non sono richieste particolari abilità nel campionamento, che può essere supervisionato senza la violazione della privacy, riducendo allo stesso tempo la possibilità di adulterazione o sostituzione del campione.

Lo scopo del presente lavoro è quello di sviluppare un nuovo protocollo per la simultanea identificazione e quantificazione di sostanze d'abuso classiche ed NPS nella matrice biologica fluido orale. È stata applicata l'estrazione in fase solida magnetica (mSPE) come tecnica di *clean-up* del campione e successivamente è stata eseguita una analisi HPLC-MS/MS per la determinazione degli analiti di interesse. Le nanoparticelle magnetiche utilizzate (MNP) hanno una struttura core-shell di Fe₃O₄-SiO₂-C₁₈. [2]; sono state in seguito verificate le dimensioni e la funzionalizzazione delle stesse attraverso le tecniche FT-IR, DLS e SEM. È stato inoltre dimostrato che le nanoparticelle sintetizzate e precedentemente testate possono essere riutilizzate fino a sei volte prima di perdere efficienza. Il *clean-up* attraverso la mSPE viene eseguito alternando tre fasi: caricamento, lavaggio ed eluzione ed in ognuna di esse l'adsorbente magnetico viene isolato dall'eluente attraverso l'utilizzo di un campo magnetico esterno. L'estratto finale viene analizzato mediante HPLC-MS/MS in modalità sMRM con un metodo che include numerose transizioni MRM, due per ogni analita ed una per gli standard interni.

La procedura ha permesso di ottenere buoni risultati in termini di recuperi e di effetto matrice; i limiti di rivelazione e quantificazione sono dell'ordine dei pg/mL per quasi tutte gli analiti considerati. In conclusione, la mSPE permette di pretrattare il campione in modo semplice, con benefici sia in termini di tempo che di consumo di solventi, evitando fasi di centrifugazione e filtrazione e dando un'impronta "green".

Riferimenti

1. United Nations Office on Drugs and Crime. *World Drug Report* (2014)
2. Yu. X, C. Y. X. Lim, Dong. B, Hadinoto K; *LWT - Food Science and Technology* 127 (2020), 109410.

Sviluppo e validazione di un metodo analitico UHPLC-MS/MS per la quantificazione di 18 droghe d'abuso e metaboliti dopo microcampionamento con Dried Blood Spot

Christina Ververi^{1,2*}, Marta Massano^{1,2}, Martina Galletto^{1,2}, Marco Vincenti^{1,2}, Alberto Salomone^{1,2}

¹: Università di Torino, Dipartimento di Chimica

²: Centro Regionale Antidoping, Orbassano

I laboratori di tossicologia, per via dell'incremento del consumo di droghe d'abuso tradizionali, sono sempre più frequentemente chiamati a sviluppare metodi nuovi ed efficaci [1]. Al giorno d'oggi, vi è la necessità di tecniche di campionamento facili e veloci, che possano essere eseguite in situ, e di metodi semplici ma sensibili, che forniscano risultati accurati [2]. A questo scopo, il metodo proposto è stato sviluppato e validato per la rilevazione di 18 droghe d'abuso, inclusi i metaboliti, utilizzando come matrice una goccia di sangue capillare essiccata su carta da filtro (DBS). 30 μ L di sangue sono, quindi, stati depositati su uno specifico supporto cartaceo e lasciati asciugare per almeno 3 ore a temperatura ambiente. Quindi, lo spot è stato tagliato, trasferito in una provetta e dopo l'aggiunta di una miscela di standard interni deuterati, si è proceduto con l'estrazione mediante 1 mL di metanolo. A seguito di agitazione, sonicazione per 30 minuti ed essiccazione sotto azoto a temperatura ambiente, il surnatante è stato ricostituito con 100 μ L di acqua/acetonitrile 50/50 v/v e iniettato nel sistema UHPLC-MS/MS. La linearità è stata osservata nell'intervallo 0.1-25 ng/ml per 6-MAM, benzoilecgonina, cocaina, cocaetilene, codeina, EDDP, ketamina, MDA, MDMA, metadone, metamfetamina e norketamina, nell'intervallo 1-250 ng/ml per anfetamina, buprenorfina, morfina, norbuprenorfina e THC, e nell'intervallo 10-250 ng/mL per 11-OH-THC. I valori di LOD sono compresi tra 0.05 (benzoilecgonina) e 5 (OH-THC) ng/mL. L'accuratezza e la precisione sono state valutate in tutti i punti di calibrazione per tutti gli analiti e sono risultate entro i limiti di accettabilità. L'accuratezza, espressa come bias%, è risultata entro il 20% ad eccezione di cocaina, metadone e norketamina, che al primo punto di calibrazione hanno mostrato valori superiori al 20%, mentre la precisione (CV%) è risultata inferiore a \pm 20% per tutte le molecole. Tutti gli analiti, analizzati a bassi e alti livelli di concentrazione, hanno mostrato valori ottimali di recupero e di effetto matrice (entro l'85-115%). La stabilità è stata valutata rispetto al tempo (1, 3, 7, 20 giorni) e alla temperatura (-20°C, 4°C, 25°C). Per tutti gli analiti, ad eccezione di THC e il relativo metabolita, si è identificata come temperatura ottimale di conservazione 4°C poiché si è osservata una degradazione limitata ($<\pm$ 15%) nel tempo. Il sistema UHPLC-MS/MS si è dimostrato in grado di identificare in modo affidabile tutti gli analiti a bassa concentrazione anche a piccoli volumi di campione, come quelli ottenuti sui DBS, che a loro volta hanno confermato di essere dispositivi di microcampionamento efficaci e sostenibili per l'applicazione del metodo nei test antidroga sul posto di lavoro e su strada.

Riferimenti

1. European Monitoring Center for Drugs and Drug Addiction, "European Drug Report 2023: Trends and Developments," 2023, https://www.emcdda.europa.eu/publications/european-drug-report/2023_en
2. J. Watterson, New Sampling Strategies in Toxicology and Therapeutic Drug Monitoring, Oct. 2015, doi: 10.4155/fseb2013.14.395.

Analisi di inchiostri da penna e toner in matrici complesse: un approccio spettroscopico

Lucrezia Bellucci¹, Alessandro Ciccola², Gaia Marruncheddu³, Alessandro Nucara⁴, Paolo Postorino⁴, Camilla Montesano¹, Manuel Sergi¹

¹Dipartimento di Chimica, Sapienza Università di Roma

²Dipartimento di Biologia Ambientale, Sapienza Università di Roma

³Temide Srl

⁴Dipartimento di Fisica, Sapienza Università di Roma

In ambito forense, l'individuazione di manipolazioni fraudolente e falsificazioni di documenti di diversa tipologia -atti notarili, assegni, lasciti, ecc.- rappresenta un campo di vasto interesse, in continuo cambiamento anche per fattori tecnologici: la crescente raffinatezza nella manipolazione di firme e documenti è legata anche all'utilizzo di nuovi scanner, processi di post-produzione, software, che possono rendere estremamente complessa la verifica dell'autenticità di un documento [1].

Una problematica diffusa, da questo punto di vista, è la distinzione tra firme apposte su un documento pre-stampato e firme apposte precedentemente alla stampa del documento [2]. Attualmente, l'indagine su questa tipologia di matrici si avvale soprattutto di tecniche microscopiche e fotografiche (es. microscopia ottica, imaging SEM), che però possono essere prive o minime dell'informazione di tipo chimico. In questa prospettiva, gli approcci di tipo spettroscopico possono essere utili, se accoppiati all'analisi ottica, per massimizzare l'informazione ottenibile dall'indagine di un documento sospetto, in quanto generalmente garantiscono risultati performanti dal punto di vista del dato chimico, nel rispetto dei principi di non distruttività, non invasività e minimizzazione dei rischi [2, 3].

In questa cornice, il presente studio si focalizza sui risultati preliminari ottenuti dalla caratterizzazione di inchiostri da penna e di toner da stampa e dall'analisi di sistemi modello mediante spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier (*Fourier Transformed InfraRed, FTIR*) e spettroscopia Raman. In particolare, si sono analizzate diverse tipologie di *mock-up*, rappresentativi di casi diversi (inchiostro da penna, toner da stampante, penna su toner, toner su penna) su substrati plastici e cellulosici, con riferimento alle variazioni nello spazio degli spettri ottenuti. Tali risultati preliminari aprono nuove prospettive nello sviluppo di metodologie analitiche in ambito forense, che possono risultare efficienti e veloci da un punto di vista diagnostico.

Riferimenti

1. M. C. Joshi, R. S. Rana; *Problems of Forensic Sciences*, 107 (2016), pp. 582–590.
2. L.R. e Brito, A. Rocha Martins, A. Braz, A. Belém Chaves, J. Willian Braga, M. F. Pimentel; *Trends in Analytical Chemistry*, 94 (2017), pp. 54-69.
3. J. Zięba-Palus, A. Weselucha-Birczyńska, B. Trzcińska, R. Kowalski, P. Moskal; *Journal of Molecular Structure*, 1140 (2017), pp. 154-162.

L'arte pittorica svelata attraverso la Spettrometria di Massa

Filomena Mercorella*, Denise Boezio*, Chiara Mannoni, S.A. Bufo, Laura Scrano

Universita' della Basilicata, Via Lanera 10, Matera

L'analisi chimica da sempre ricopre un ruolo fondamentale nella conservazione del nostro patrimonio culturale. La caratterizzazione di manufatti artistici, pittorici e archeologici aiuta a rispondere a domande cruciali tipo quando e come una specifica opera è stata realizzata, nonché a comprenderne i processi degradativi ed, anche, eventuale contraffazione. E' necessario, tuttavia, che le analisi siano non invasive, non distruttive ma sensibili ed efficaci. Negli ultimi venti anni la chimica delle proteine e la spettrometria di massa si sono evolute e adattate per l'analisi di campioni nel campo dei beni culturali, tanto che è stato coniato il termine paleoproteomica, ad indicare la proteomica applicata al mondo delle proteine antiche [1-3]. Ad esempio tale analisi ha consentito l'identificazione dei materiali proteici presenti nello strato non originale del *Gruppo di quattro clarisse*, un frammento di un dipinto murale realizzato nella Sala Capitolare di San Francesco, a Siena, da Ambrogio Lorenzetti. Nello specifico, la spettrometria di massa tandem ha identificato la presenza di colla di pecora e mucca e proteine dell'albume d'uovo di gallina e anatra, ingredienti adoperati da artisti rinascimentali con l'intento di effettuare interventi di protezione o di restauro sull'affresco trecentesco. Risalendo alla tipologia di proteine animali impiegate e il danno da loro subito, è possibile effettuare interventi di restauro e di conservazione più mirati. Inoltre, dato che tale indagine può essere usata su dipinti, materiali e antichi strumenti musicali, una volta chiarito quali sono i materiali e le proteine usate da un determinato artista, si possono scovare eventuali falsi artistici e storici. Questo lavoro condotto da un team multidisciplinare di ricercatori (chimici, umanisti e restauratori) ha voluto sottolineare l'importanza della stretta collaborazione tra arte e scienza.

Riferimenti

1. S. Dallongeville, N. Garnier, C. Rolando, C. Tokarski, Chem. Rev. 116, (2015). pp 2–79
2. C. Warinner, K. Korzow Richter, M.J. Collins, Chem. Rev., 122, (2022), pp. 13401–13446
3. P. Cicatiello, G. Ntasi, M. Rossi, G. Marino, P. Giardina, L. Birolo. Anal. Chem., 90, (2018).pp 10128–10133

I capelli nell'analisi forense: validazione di un metodo per la determinazione di elementi in tracce

Flavia Conte^{1,2}, Claudia Cucolo², Alessandra Marano², Rosanna Topa²,
Maria Toscanesi², Antonella Giarra², Gabriella Di Natale³, Giovanni Pagano²,
Marco Trifuoggi^{2,3}

¹Scuola Superiore Meridionale, Largo San Marcellino 10, 80138, Napoli

²Dipartimento di Scienze Chimiche, Università degli Studi di Napoli Federico II, Via Cintia, 80126, Napoli

³CeSMA (Centro Servizi Metrologici e Tecnologici Avanzati), Università degli Studi di Napoli Federico II, 80146 Napoli

Il capello, quale tessuto, costituisce un registro dell'esposizione degli organismi ai contaminanti ambientali attraverso meccanismi come l'inalazione, l'ingestione e la deposizione di inquinanti atmosferici, i quali possono diffondersi nella sua struttura. La composizione dei capelli umani è fortemente influenzata dallo stato di salute e nutrizionale, nonché dall'assunzione o dall'esposizione a una vasta gamma di elementi e composti chimici provenienti dall'ambiente naturale o lavorativo [1].

La *matrice capello* rappresenta una risorsa di fondamentale importanza anche nell'analisi forense delle scene del crimine, offrendo spesso preziose informazioni utili all'identificazione di sospetti o vittime. L'analisi dei capelli ha ricevuto crescente attenzione negli ultimi anni, emergendo come la terza matrice biologica più significativa impiegata nei test di tossicologia forense, successivamente al sangue e all'urina.

In questo lavoro si riporta la validazione di un metodo analitico per la determinazione di elementi in traccia, quali As, Cd, Cu, Hg, Pb, Se e Zn, nei capelli umani.

I capelli sono stati lavati con acqua e acetone in un sistema ad ultrasuoni per 5 cicli da 5 minuti ciascuno [2]. Successivamente, i campioni di capelli lavati sono stati essiccati a 80°C per una notte, in seguito, sono stati tagliati in pezzi da circa 1 cm utilizzando apposite forbici in ceramica.

Il campione asciutto ha subito un processo di pretrattamento tramite digestione acida ossidativa assistita da microonde con HNO₃ u.p. 69%, v/v. Dopodiché l'analisi è stata condotta mediante spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS). Le prestazioni ottenute da quest'ultima soddisfano i requisiti necessari per la validazione del metodo, come definito dalle Linee Guida Eurachem [3].

Il metodo così validato si è dimostrato rapido ed efficiente ed è stato impiegato per l'analisi di campioni reali appartenenti a lavoratori di officine meccaniche e non esposti, al fine di correlare l'impatto ambientale di tali elementi sul corpo umano.

Riferimenti

1. Mussabekova, S. A.; Mkhitarian, X. E. Elemental Composition of Hair as a Marker for Forensic Human Identification. *Journal of Forensic and Legal Medicine* **2021**, *81*, 102182
2. Verrey, D.; Durand, S.; Thomas, O.; Lelévrier, V.; Quénel, P.; Le Bot, B. A New Washing Procedure for Inorganic Element Analysis of Hair. *J Expo Sci Environ Epidemiol*, **2019**, Vol. 29, pag. 706–717.
3. Gregori, E; Patriarca, M; Sega, M;_Guida Eurachem per i laboratori sulla validazione dei metodi e argomenti correlati, **2014**.

Comparison of Data-Independent and Data-Dependent Techniques for Forensic Toxicology Screening Analysis

Nayan S Mistry¹, Jane A Cooper¹, Michelle Wood¹, Fabio Piccione²

¹ Waters Corporation, Wilmslow, UK, ² Waters Corporation, Sesto San Giovanni, ITALIA

Premesse e Scopo

La spettrometria di massa ad alta risoluzione ha guadagnato popolarità nell'ambito dello screening tossicologico. Oltre al dato di massa accurata dello ione precursore, la pratica analitica comune prevede l'inclusione del tempo di ritenzione (RT) e di ulteriori dati di spettrometria di massa generati attraverso tecniche Data-Independent (DIA) o Data-Dependent (DDA) per avere informazioni in alta risoluzione sugli ioni frammento. Lo scopo di questo studio è quello di confrontare questi metodi rispetto ai dati generati, come ad esempio la ricchezza di informazioni e l'efficienza dello screening, l'accuratezza della rilevazione e la sensibilità analitica.

Metodi

I campioni di urina sono stati preparati mediante diluizione. L'analisi è stata eseguita con un ACQUITY™ UPLC™ I-Class combinato con un Xevo™ G3 QToF (Waters). Per tutte le tecniche è stato applicato lo stesso metodo cromatografico di 15 minuti. Per la DIA è stata applicata l'acquisizione MS^E; questa modalità ha facilitato la raccolta di spettri MS completi a due valori di frammentazione della cella di collisione (6eV e 10-40eV a rampa). Per la DDA sono stati valutati due approcci: il primo (DDA-1) utilizzava una soglia minima di risposta durante una scansione di indagine MS; il superamento di questa soglia attivava la MS/MS, il secondo (DDA-2), utilizzava la stessa soglia ma includeva anche un elenco di 25 masse precursore per indirizzare preferenzialmente gli analiti chiave per l'analisi MS/MS. I dati di tutte le tecniche sono stati confrontati con una libreria tossicologica consolidata, basata su RT e dati accurati sui frammenti di massa per >2000 analiti.

Risultati

L'acquisizione in bassa energia di MS^E (DIA) ha mostrato masse abbondanti di precursori, mentre l'acquisizione simultanea ad alta energia ha facilitato la frammentazione e l'identificazione dei precursori. Visivamente, gli spettri degli analiti in co-eluzione contenevano ioni frammento di ciascun componente. Gli spettri MS/MS generati dalla DDA erano meno complessi e contenevano solo gli ioni frammento derivanti dal precursore selezionato al quadrupolo. Per la DDA sono state valutate diverse soglie di attivazione; una soglia di 100.000 conteggi ha dato i risultati migliori. L'analisi di 20 campioni di urina autentica pre-caratterizzati mediante MS^E, DDA-1 e DDA-2 ha portato all'identificazione corretta rispettivamente del 94%, 86% e 82% degli analiti attesi.

Conclusioni

Il metodo DIA di MS^E è risultato più semplice da implementare, in quanto non è stata necessaria l'ottimizzazione delle soglie di attivazione. Nonostante gli spettri più complessi, questa modalità ha permesso di migliorare l'individuazione dei farmaci attesi. I pochi falsi negativi del metodo MS^E erano associati ad analiti a concentrazione molto bassa. I falsi negativi di entrambi i metodi DDA sembravano essere dovuti a conflitti di trigger, in particolare quando era evidente la co-eluzione.

I nuovi approcci di proteomica e metabolomica ai fini dell'identificazione personale e della stima del PMI

Noemi Procopio¹, Gabriele Rotter²

¹ School of Law and Policing, Research Center for Field Archaeology and Forensic Taphonomy, University of Central Lancashire, PR1 2HE Preston, UK

² Scuola di Specializzazione in Medicina Legale, Università degli Studi di Messina, Via Consolare Valeria 1, 98125 Messina, IT

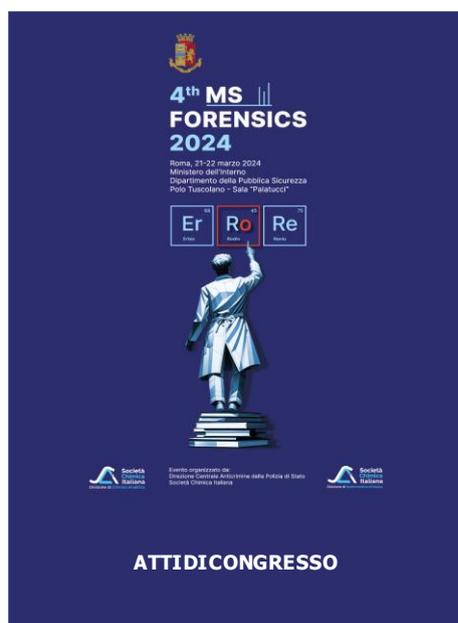
Nel corso dei rilievi tecnici, eseguiti sulla scena del crimine, gli operatori di polizia scientifica normalmente rinvencono e repertano diverse tipologie di tracce di natura biologica. La loro componente principale è rappresentata dalle proteine, le quali sono una fonte significativa di informazioni. Ai fini identificativi, lo studio dei polimorfismi del DNA rappresenta la metodica di analisi d'elezione di tali tracce [1]. Tuttavia, ci sono dei casi in cui l'analisi delle proteine in generale, e la proteomica in particolare, possono fornire agli investigatori delle informazioni che, attualmente, l'analisi del DNA non è in grado di fornire soprattutto nei campi dell'identificazione personale [2], dei tessuti e dei fluidi corporei [3] nonché nella stima dell'epoca della morte (PMI) [4]. Inoltre, l'analisi del proteoma si rileva molto utile in tutti quei casi in cui la traccia biologica, a causa di fattori endogeni ed ambientali, incorre in una significativa degradazione del DNA [5].

La metabolomica, considerata la più recente tra le varie discipline "omiche", si concentra invece sull'analisi delle molecole a basso peso molecolare (<1 kDa) presenti all'interno di singole cellule, tessuti o di interi organismi e derivate dal metabolismo endogeno e/o microbico. Poiché i metodi attualmente utilizzati per stimare il PMI dipendono, in buona parte, dall'esperienza professionale del patologo forense e il più delle volte non permettono di ottenere dei risultati affidabili a causa dei cambiamenti biologici che si verificano nell'organismo, l'approccio della metabolomica sta riscuotendo un notevole interesse tra i ricercatori per la stima del PMI [6, 7]. Lo scopo principale di questa revisione è quello di riassumere le più recenti applicazioni della proteomica e della metabolomica in ambito forense mediante l'impiego della spettrometria di massa, di sottolineare il loro potenziale e di condividere gli ultimi risultati ottenuti nell'applicazione delle discipline omiche in ambito forense con gli utenti finali per favorirne il loro uso in futuro.

Riferimenti

1. R.A. Van Oorschot, K.N. Ballantyne, R.J. Mitchell; *Investigative Genetics*, 1 (2010), pp 1-17.
2. G.J. Parker, T. Leppert, D.S. Anex, J.K. Hilmer, N. Matsunami, L. Baird, J. Stevens, K. Parsawar, B.P. Durbin-Johnson, D.M. Roche, C. Nelson, D.J. Fairbanks, A.S. Wilson, R.H. Rice, S.R. Woodward, B. Bothner, B.R. Hart, M. Leppert; *PLoS ONE*, 11 (2016), pp 1-26.
3. K.M. Legg, R. Powell, N. Reisdorph, R. Reisdorph, P.B. Danielson; *Electrophoresis*, 35 (2014), pp 3069-3078.
4. A. Bonicelli, H.L. Mickleburgh, A. Chighine, E. Locci, D.J. Wescott, N. Procopio; *eLife*, 11 (2022), pp 1-22.
5. C. Wilke; *ACS Central Science*, 7 (2021), pp 1595-1598.
6. J. Dawidowska, M. Krzyżanowska, M.J. Markuszewski, M. Kaliszan; *Metabolites*, 11 (2021), pp 1-20.
7. B.K. Pesko, S. Weidt, M. McLaughlin, D.J. Wescott, H. Torrance, K. Burgess, R. Burchmore; *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 24 (2020), pp 649-659.

*Il presente volume è costituito da 55 pagine e racchiude gli atti del congresso:
Le indagini forensi e il contributo della spettrometria di massa
4th MS Forensics 2024*



I contributi sono raccolti in un libro degli atti al quale è assegnato codice ISBN.

Il contributo può essere citato come segue:

N. Cognome, N. Cognome; <titolo abstract>, in Atti di Congresso 4th MS Forensics 2024; ISBN: 9788894952414, <pag>, 2024, Roma.

Edited by: M.A. Acquavia, E. Gregori, F. Vincenti

Copyright © 2024 Società Chimica Italiana, Viale Liegi 48C, 00198-Roma

