



ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Proposta di linee guida per l'analisi
di farmaci e sostanze d'abuso nei capelli**

S. Pichini, A. Palmeri,
M. Pellegrini, P. Zuccaro e R. Pacifici

ISSN 1123-3117

Rapporti ISTISAN

99/24

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Proposta di linee guida per l'analisi
di farmaci e sostanze d'abuso nei capelli**

Simona Pichini, Alessandro Palmeri,
Manuela Pellegrini, Piergiorgio Zuccaro e Roberta Pacifici
Laboratorio di Biochimica Clinica

ISSN 1123-3117

Rapporti ISTISAN
99/24

Istituto Superiore di Sanità

Proposta di linee guida per l'analisi di farmaci e sostanze d'abuso nei capelli.

Simona Pichini, Alessandro Palmeri, Manuela Pellegrini, Piergiorgio Zuccaro e Roberta Pacifici
1999, iv, 34 p. Rapporti ISTISAN 99/24

L'analisi di farmaci e sostanze d'abuso nella matrice cheratinica è un *addendum* ideale all'analisi del sangue o delle urine in quanto fornisce informazioni riguardanti una finestra di tempo precedente a quella delle altre due matrici biologiche e si riferisce ad uno spazio temporale più ampio (uno- più mesi). D'altra parte, esistono ancora parecchi punti da chiarire, tra i quali principalmente l'armonizzazione delle metodologie analitiche e l'interpretazione dei dati quantitativi, affinché questa analisi possa essere accettata in ambito medico-legale per quantificare il consumo di una determinata sostanza o l'esposizione ad essa. A tale scopo è stata approntata una proposta di linee guida per l'analisi di farmaci e sostanze d'abuso nella matrice cheratinica, al fine di uniformare e standardizzare per quanto possibile le procedure di prelievo, estrazione e analisi della matrice. Le presenti linee guida illustrano le diverse fasi dell'analisi del capello dal momento della raccolta al momento della quantificazione degli analiti estratti dall'interno del capello con esempi di diagrammi di flusso per la determinazione analitica di varie classi di sostanze.

Parole chiave: Capelli, Farmaci, Sostanze d'abuso, Tossicologia analitica

Istituto Superiore di Sanità

A guideline proposal for hair analysis of drugs and drugs of abuse.

Simona Pichini, Alessandro Palmeri, Manuela Pellegrini, Piergiorgio Zuccaro and Roberta Pacifici
1999, iv, 34 p. Rapporti ISTISAN 99/24 (in Italian)

Hair analysis for drugs and drugs of abuse is an ideal *addendum* to blood and urine analysis as it supplies information on a time-window antecedent to that of the other two matrices and which refers to a wider time space (one- several months). On the other hand, some points are still to be clarified regarding harmonisation of analytical methodology and data interpretation as for medico-legal acceptance of hair analysis for quantification of drug consumption or exposure. For this reason, a proposal of guidelines for hair analysis of drugs and drugs of abuse is reported with the aim of standardisation of procedures for hair collection, extraction and analysis. The present guidelines illustrate different moments of hair analysis, from hair collection to quantification of analytes extracted from the matrix, with some examples of flow diagrams for analytical determination of different classes of substances.

Key words: Analytical toxicology, Drugs, Drugs of abuse, Hair analysis

L'editing del volume è stato curato dalla Dr. Claudia Mortali.

INDICE

	pag.
Premessa	iii
1. La determinazione di xenobiotici nella matrice cheratinica	1
1.1 Prelievo dei capelli	1
1.2 Lavaggio e preparazione del campione	1
1.3 Digestione della matrice cheratinica	3
1.4 Estrazione degli analiti	4
1.5 Metodi immunochimici	4
1.6 Metodi cromatografici	6
1.7 Presentazione dei dati	6
1.8 Interpretazione dei risultati	7
2. Identificazione e quantificazione dei singoli analiti	9
2.1 Oppiacei	9
2.2 Cocaina e metaboliti	9
2.3 Cannabinoidi	10
2.4 Amfetamine	10
2.5 Benzodiazepine	10
2.6 Nicotina e metaboliti	11
2.7 Antidepressivi triciclici	11
2.8 Carbamazepina	11
3. Diagrammi di flusso per la determinazione di farmaci e sostanze d'abuso nei capelli	13
3.1 Validazione delle metodologie analitiche presentate nei diagrammi di flusso	13
3.1.1 <i>Recupero analitico</i>	13
3.1.2 <i>Risposta analitica</i>	14

3.1.3	<i>Sensibilità</i>	14
3.1.4	<i>Precisione</i>	14
3.1.5	<i>Accuratezza</i>	15
3.1.6	<i>Specificità</i>	15
3.1.7	<i>Stabilità</i>	15
	Allegato	
	Diagrammi di flusso dei singoli analiti nei capelli	17
	<i>Determinazione degli oppiacei -1</i>	18
	<i>Determinazione degli oppiacei -2</i>	19
	<i>Determinazione di cocaina e metaboliti -1</i>	20
	<i>Determinazione di cocaina e metaboliti -2</i>	21
	<i>Determinazione del carbossi-THC</i>	22
	<i>Determinazione delle amfetamine -1</i>	23
	<i>Determinazione delle amfetamine -2</i>	24
	<i>Determinazione delle amfetamine -3</i>	25
	<i>Determinazione delle benzodiazepine -1</i>	26
	<i>Determinazione delle benzodiazepine -2</i>	27
	<i>Determinazione di nicotina e cotinina</i>	28
	<i>Determinazione di antidepressivi triciclici</i>	29
	<i>Determinazione della carbamazepina</i>	30
	Glossario	31
	Bibliografia	32

PREMESSA

La possibilità di utilizzare i capelli come matrice biologica in tossicologia clinica venne ipotizzata e quindi sperimentata agli inizi del secolo per la ricerca di metalli pesanti (es. piombo e mercurio) in caso di intossicazioni in lavoratori esposti a questi xenobiotici, in quanto la matrice cheratinica venne ritenuta l'unica in grado di provare una esposizione cronica, protratta nel tempo.

Nei primi anni ottanta iniziarono una serie di studi sulla possibilità di determinare farmaci e sostanze d'abuso nella matrice cheratinica e quindi di utilizzare l'analisi dei capelli come strumento per individuare l'uso pregresso di farmaci, sostanze d'abuso e più in generale di xenobiotici in tossicologia clinica, tossicologia forense e medicina sociale (1-5).

Sono stati proposti due principali modelli teorici per spiegare l'incorporazione di xenobiotici nei capelli, sebbene quale sia il vero meccanismo non sia stato ancora provato (6).

Un primo modello ipotizza che farmaci e sostanze d'abuso siano incorporati all'interno di "regioni" del capello direttamente a contatto con i capillari sanguigni a livello del bulbo pilifero durante l'istogenesi del capello. Quando poi il capello cresce, queste regioni diventerebbero inaccessibili all'ambiente esterno. Un modello alternativo, che trova maggior consenso dalla gran parte del mondo scientifico, si basa sulla teoria di una minima incorporazione di xenobiotici dal circolo sanguigno a regioni del bulbo pilifero durante la formazione del capello. La maggior fonte di incorporazione proverrebbe dal contatto con xenobiotici contenuti nel sudore, ghiandole sebacee e dalla escrezione transdermica via strato corneo sia durante il processo di formazione del capello nella cute sia quando il capello si trovi fuori la cute. Secondo questo ultimo modello non esisterebbero "regioni" inaccessibili all'ambiente esterno.

L'analisi dei capelli per la determinazione di xenobiotici è un addendum ideale all'analisi del sangue o delle urine, le quali possono far riferimento, riguardo all'esposizione ad uno xenobiotico o al suo consumo, ad un intervallo di tempo vicino e ristretto (ore-giorni). L'analisi della matrice cheratinica fornisce informazioni riguardanti una finestra di tempo precedente a quella di sangue ed urina e che si riferisce ad uno spazio temporale più ampio (uno- più mesi).

La ricerca di farmaci e sostanze stupefacenti nei capelli può essere utilizzata per provare un uso, un abuso o un misuso protratto nel tempo e per caratterizzarne l'intensità e la sua storia e fornire quindi dati analitici con valore medico-legale. Per questo motivo la determinazione nei capelli può essere richiesta in caso di: morti correlate all'uso di farmaci e/o sostanze d'abuso, valutazione della inidoneità alla guida, responsabilità criminale, affidamento custodia minori, esposizione prenatale a farmaci e sostanze d'abuso.

D'altra parte, esistono ancora parecchi punti da chiarire, tra i quali principalmente la standardizzazione e la validazione delle metodologie analitiche, affinché queste analisi possano essere accettate routinariamente come prova per quantificare il consumo di una determinata sostanza o l'esposizione ad essa (7-9).

Nell'ambito del primo meeting europeo sull'analisi dei capelli, tenutosi a Genova nel giugno 1996, la nascente "Society of Hair Testing" ha redatto un documento di consenso, successivamente pubblicato, riguardante gli aspetti interpretativi dell'analisi dei capelli e i criteri per ottenere un risultato corretto e con valore medico-legale (10). Questo documento teneva conto del punto di vista dei vari studiosi presenti al meeting e delle legislazioni vigenti negli Stati Europei si prefiggeva lo scopo di una armonizzazione di procedure sui temi sopra menzionati. Non è stato invece preso in esame il problema della standardizzazione delle procedure analitiche da adottarsi da parte dei laboratori di analisi di una stessa regione, di uno stesso stato e nell'Unione Europea al fine di ottenere un risultato quanto più possibile omogeneo e confrontabile.

E' nata così l'esigenza di una proposta di linee guida per l'analisi di farmaci e sostanze d'abuso nella matrice cheratinica, allo scopo di suscitare nella comunità scientifica e negli addetti ai lavori un dibattito che consenta di uniformare e standardizzare per quanto possibile le procedure di prelievo, estrazione ed analisi della matrice.

Tale proposta tiene conto di una precedente proposta di linee guida per l'analisi delle sostanze d'abuso nelle matrici biologiche, di tutti i documenti (validazione di metodi analitici, controllo di qualità in Biochimica Clinica) e raccomandazioni (Federal workplace drug testing Programs) in essa citati e di quanto riportato nei capitoli: Organizzazione di un Sistema Qualità e Tipologia del Laboratorio (11).

Le presenti linee guida descrivono le procedure da seguire dal momento della raccolta al momento della analisi degli analiti estratti dall'interno del capello riportando i diversi metodi di lavaggio, digestione ed estrazione. Vengono inoltre illustrate le metodiche relative alla loro determinazione e quantificazione, ed inoltre vengono proposti dei diagrammi di flusso che illustrano le varie fasi per l'analisi delle singole sostanze in GC/MS con le metodiche che sono considerate "più robuste" da parte dei laboratori di analisi più qualificati.

Gli autori del presente lavoro si augurano che si giunga al più presto ad un consenso basato sull'evidenza scientifica sia sulle procedure che sui metodi proposti anche attraverso studi collaborativi tra più laboratori e che le maggiori società scientifiche del settore diano il loro fattivo e costruttivo contributo per la stesura finale delle linee guida.

1. DETERMINAZIONE DI XENOBIOTICI NELLA MATRICE CHERATINICA

1.1 Prelievo dei capelli

Il prelievo dei capelli deve essere effettuato nel rispetto dei diritti legali, etici ed umani della persona da personale adeguatamente addestrato.

I capelli devono essere prelevati nella zona nucale, avendo cura di operare il taglio a partire dall'attaccatura al cuoio capelluto.

Il taglio deve essere eseguito con forbici pulite con una piccola quantità di alcol e ben asciutte.

E' necessario prelevare una quantità di capelli di almeno 200 mg, al fine di poter eventualmente effettuare più di un'analisi su uno stesso campione.

Una volta tagliati i capelli, se lunghi possono essere fissati con uno spago annodato il più vicino possibile alla parte dei capelli prossimale al cuoio capelluto, in modo da evidenziare il segmento iniziale. Se corti, i capelli devono essere fissati ad un foglio di carta tramite pinze di metallo apposite anche in questo caso evidenziando il segmento iniziale dei capelli.

In ogni caso, i capelli vanno conservati in busta di carta, riportando su di essa la data del prelievo e il numero di identificazione del campione. La busta va conservata a temperatura ambiente.

Al momento del prelievo è necessario riempire una scheda che riporti tutti i dati del soggetto inclusi gli eventuali trattamenti cosmetici subiti di capelli (permanente, tinture, decolorazioni) poiché è noto che tali trattamenti potrebbero creare interferenze analitiche e modificare attraverso reazioni chimiche gli analiti in esame modificandone quindi il quantitativo presente inizialmente nella matrice cheratinica (12-14).

1.2 Lavaggio e preparazione del campione

E' necessario operare un lavaggio dei capelli per eliminare i grassi e contaminanti ambientali di diversa natura che potrebbero creare interferenze a livello analitico ed infine escludere una contaminazione esterna da parte degli analiti in esame. D'altra parte, i solventi utilizzati nel lavaggio devono essere tali da poter eliminare per quanto più possibile le sostanze esogene (depositate nella parte esterna del capello) senza di fatto estrarre le sostanze contenute all'interno del capello. In questo senso, è anche importante il tempo di contatto tra liquido di lavaggio e superficie da lavare. In realtà, dagli studi effettuati in questi ultimi anni si è evidenziato che non è possibile indicare un solvente o una serie di solventi che possano decontaminare in maniera quantitativa la parte esterna del capello, senza intervenire sulle sostanze contenute nella parte interna (6).

Dei vari metodi riportati nella letteratura internazionale, i più comunemente utilizzati sono i seguenti:

- 1) due lavaggi successivi con diclorometano, ognuno della durata di 5 minuti,
- 2) tre lavaggi della durata di cinque minuti con acqua distillata, acetone ed etere di petrolio rispettivamente,
- 3) un lavaggio a 37° C per 15 minuti con alcool etilico o metilico,
- 4) un lavaggio di 15 minuti con alcool etilico anidro seguito da tre lavaggi di 30 minuti con tampone fosfato (0.01 M, pH 5,5).

Per circa 100-200 mg di capelli è necessario utilizzare almeno 5-10 ml di solvente.

L'ultimo lavaggio, raccomandato dalla Society of Hair Testing, è particolarmente indicato qualora ci sia sospetto di contaminazione esterna da fumo di cannabinoidi o di cocaina.

In generale, comunque, al fine di poter valutare la possibilità di contaminazione passiva si raccomanda:

- l'identificazione dei metaboliti delle sostanze parenti,
- il calcolo del rapporto metabolita/sostanza parente,
- l'esame dei solventi di lavaggio al fine di individuare l'eventuale presenza della sostanza,
- l'identificazione di concentrazioni soglia (cut-off) per i vari analiti.

Al termine del lavaggio, il campione può essere asciugato a temperatura ambiente con carta bibula o in corrente d'azoto per eliminare più velocemente i residui di solvente.

Una volta asciutti, i capelli possono essere tagliati con forbici ben pulite in modo da ottenere segmenti di circa 0,1-0,3 cm di lunghezza o meglio possono essere polverizzati tramite mulino a palle. Quest'ultima procedura è da ritenersi di elezione, in quanto facilita la successiva digestione della matrice cheratinica rendendo massima la superficie di penetrazione del solvente.

Nel caso si voglia eseguire un esame segmentale dei capelli, sarà necessario innanzitutto poter disporre di una quantità iniziale maggiore di campione al fine di avere per ogni segmento una quantità di almeno 20 mg. Quindi, la ciocca di capelli in esame andrà distribuita su carta bibula fissando le due estremità con pinze di metallo e quindi si procederà al taglio dei vari segmenti (di solito di 1 cm) a partire dalla punta fino alla estremità vicina all'attaccatura al cuoio capelluto. Tali segmenti, riconoscibili con un numero progressivo che verrà attribuito a ciascuno di essi, andranno poi ulteriormente tagliati o polverizzati.

I capelli tagliati o polverizzati verranno infine trasferiti e pesati in contenitori in vetro (5 ml) con tappo a vite dove verranno trattati con un solvente opportuno al fine di estrarre dall'interno della matrice gli analiti di interesse.

1.3 Digestione della matrice cheratinica

Scopo delle procedure di digestione è quello di estrarre in maniera elettiva e quantitativa gli analiti di interesse dall'interno della matrice cheratinica, senza modificare chimicamente gli analiti stessi (15).

La completa dissoluzione del capello assicura il rilascio quantitativo degli analiti contenuti all'interno, però le severe condizioni chimiche spesso utilizzate per ottenere la digestione totale del capello possono sia distruggere analiti di interesse, sia estrarre sostanze aspecifiche interferenti al momento dell'analisi. Per questo esistono una serie di procedure applicabili a più analiti e talune specifiche per le varie classi di sostanze (16-20).

In generale si possono distinguere quattro tipi principali di digestione della matrice cheratinica:

- **Digestione enzimatica:** consiste nella digestione del capello a caldo (37°C-45°C) per periodi di tempo che vanno da tre ore a tutta la notte in soluzioni tampone specifiche contenenti enzimi. Gli enzimi più comunemente utilizzati sono: β -glucuronidasi-arilsulfatasi e pronasi. Questo tipo di digestione richiede lo stretto controllo di una serie di variabili quali: temperatura, pH, attività enzimatica e perciò la ripetibilità del processo può rivelarsi non ottimale. E' da tener presente inoltre che la β -glucuronidasi-arilsulfatasi nel caso degli oppiacei causa la trasformazione in morfina della monoacetilmorfina, considerata quest'ultima il marker reale del consumo di eroina. Questo tipo di digestione necessita di una estrazione successiva degli analiti liberati dalla matrice.
- **Digestione basica:** consiste nella digestione del capello a temperatura ambiente o a caldo (fino a 100°C) per periodi di tempo da una ora a tutta la notte con soluzioni di idrossido di sodio a diversa molarità (la più usata è solitamente 1M). La digestione basica assicura la completa dissoluzione della matrice cheratinica, ma provoca l'idrolisi di alcuni analiti di interesse quali ad esempio eroina, monoacetilmorfina, cocaina. E' quindi sconsigliata nella ricerca di queste sostanze, mentre viene comunemente utilizzata nella ricerca di cannabinoidi, benzodiazepine e nicotina. Questo tipo di digestione necessita di una estrazione successiva degli analiti liberati dalla matrice.
- **Digestione acida:** consiste nella digestione del capello a temperatura ambiente o a caldo (fino a 100°C) per periodi di tempo da una ora a tutta la notte con soluzioni di acido cloridrico a diversa molarità (la più usata è solitamente 0,1M). La digestione acida non assicura la completa dissoluzione della matrice cheratinica, e d'altra parte provoca idrolisi parziale o totale (in funzione del tempo e della temperatura di digestione) di sostanze quali ad esempio eroina e monoacetilmorfina. E' quindi generalmente sconsigliata nella ricerca di oppiacei, a meno che non si sia valutato in precedenza il processo di idrolisi su soluzioni di standard di riferimento. Questo tipo di digestione necessita di una estrazione successiva degli analiti liberati dalla matrice.
- **Digestione in alcol metilico:** consiste nella digestione del capello a temperatura ambiente o a caldo (fino a 56°C) per periodi di tempo da alcune ore a tutta la

notte. La digestione in alcol metilico non assicura la completa dissoluzione della matrice cheratinica, e il suo potere estrattivo è estremamente ridotto rispetto alle digestioni precedentemente citate. D'altra parte, con questo tipo di digestione i processi di idrolisi sono del tutto assenti. Si tratta di una digestione della matrice cheratinica applicabile quando si hanno a disposizione metodi di analisi specifici e sensibili. Non necessita di una estrazione successiva degli analiti liberati dalla matrice.

1.4 Estrazione degli analiti

Ad esclusione del trattamento con alcol metilico, i processi di digestione richiedono una successiva estrazione degli analiti di interesse dalla matrice complessa, principalmente per eliminare la presenza di interferenti analitici. I processi estrattivi principalmente utilizzati sono: l'estrazione con solventi o miscele di solventi non miscibili con la fase acquosa utilizzata nella digestione (estrazione liquido-liquido) e l'estrazione della fase acquosa sopra menzionata per ripartizione tra una fase solida inserita in una cartuccia di plastica o vetro e un solvente di eluizione non miscibile appunto con la fase solida (estrazione in fase solida, SPE). Le miscele di solventi utilizzati nella estrazione liquido-liquido sono generalmente toluene-alcol butilico, cloroformio-isopropanolo, cloruro di metilene-isopropanolo in diverse proporzioni. Per l'estrazione in fase solida, si utilizzano colonnine riempite con fase stazionaria apolare (C18, Bond- Elut Certify, Isolute HC) o con fase adsorbente (Extrelut).

Esiste infine la possibilità di evitare la digestione del capello e la successiva estrazione degli analiti utilizzando l'estrazione con fluidi supercritici (SPE) (21, 22). Si tratta di fluidi che si trovano ad una pressione ed ad una temperatura superiori a quelle dello stato critico, definito come uno stato intermedio tra il liquido e il gas. Il fluido più utilizzato, grazie alla facilità di impiego, miscibilità con molti solventi, mancanza di tossicità e di costo moderato, è il biossido di carbonio, che essendo però solo debolmente polare necessita di aggiunta di modificatori organici (alcol metilico, trietilammina, acqua) per l'estrazione di analiti dalla matrice cheratinica. L'estrazione con fluidi supercritici necessita di una apparecchiatura particolare, con una camera di estrazione che possa creare le condizioni di pressione e temperatura necessarie per ottenere il fluido supercritico e nella quale avviene il contatto con la matrice cheratinica polverizzata. Al termine del tempo di contatto, la camera viene depressurizzata e il fluido supercritico viene intrappolato in una fase solida o in un solvente. Questa metodica, sebbene promettente nel senso di rapidità, efficienza e specificità, risulta però ancora costosa e di difficile operatività.

1.5 Metodi immunochimici

I Test immunochimici possono essere utilizzati come metodi iniziali, al fine di analizzare in poco tempo un gran numero di campioni in maniera economica, efficace e standardizzata e di escludere i campioni che risultano negativi, ossia i campioni che non

contengono la sostanza o la classe di sostanze oppure quelli in cui la concentrazione è al disotto di un valore soglia (cut-off).

Negli ultimi anni vari ricercatori hanno verificato la possibilità di adattare kit validati per l'analisi di farmaci e sostanze d'abuso nel sangue o nelle urine all'analisi del capello (23-25) in quanto, a tutt'oggi, non esistono in commercio test di screening per la matrice cheratinica.

Tuttavia, qualora ci sia l'esigenza di effettuare analisi su un largo numero di campioni con bassa probabilità di risultati positivi, è possibile utilizzare uno screening iniziale. Le metodiche che si possono usare sono tutte immunochimiche: radioimmunologiche (RIA), immunoenzimatiche (EIA), ad immunofluorescenza a luce polarizzata (FPIA) o ad inibizione dell'agglutinazione (HI) con anticorpo policlonale o monoclonale. Un primo problema nasce dal fatto che nei capelli le sostanze maggiormente presenti non sono sempre le stesse che si trovano ad elevate concentrazioni nell'urina (come per esempio l'eroina e 6 monoacetilmorfina nei capelli di assuntori di eroina o cocaina nei capelli di assuntori di cocaina). Quindi nasce l'esigenza di scegliere test immunochimici altamente specifici per queste sostanze o con alta cross reattività. Inoltre, poiché varia il tipo di matrice biologica a cui il test è applicato, è necessario procedere ad una validazione della metodica secondo linee guida per la convalida di metodi immunochimici. Tale convalida consiste in linea generale nella verifica della linearità della curva di taratura in matrice cheratinica, correggendo in questo modo il possibile effetto matrice. In breve, si costruisce una curva su capelli di controllo (nei quali dopo analisi in gas cromatografia/spettrometria di massa è risultata assente la presenza degli analiti in esame) addizionati con concentrazioni scalari di analiti (quelle per cui esiste una linearità nelle condizioni standard) e si controlla se le differenze tra i vari punti siano statisticamente significative a meno di una o due deviazioni standard. Ciò esprime la possibilità di differenziare statisticamente campioni con concentrazioni diverse di analiti. Una volta individuato un range di concentrazioni in cui la curva risulta lineare, è necessario testare la sensibilità (percentuale di veri positivi) e la specificità (percentuale di falsi positivi) diagnostica del metodo per costruire la curva ROC (relative operating curve) che permette l'eventuale calcolo del cut-off con la massima efficienza. Al momento come non esistono test iniziali specifici per i capelli, non esistono valori soglia ufficiali, secondo i quali giudicare un campione positivo o negativo per il consumo di una determinata sostanza.

Riguardo al cosiddetto "effetto matrice", molto dipende dal tipo di digestione che si è operata. La digestione in HCl, o in alcol metilico portano ad avere campioni in cui oltre agli analiti in esame sono presenti costituenti della matrice cheratinica, che interferiscono aspecificamente nella reazione antigene-anticorpo. Inoltre è necessario che il campione da analizzare, se digerito con acidi o alcali, venga neutralizzato affinché non si denaturino le proteine anticorpali, o che una eventuale digestione enzimatica sia fatta con un enzima che non attacchi le stesse proteine.

Quindi, il risultato di questi test iniziali, sempre qualitativo, può orientare l'analizzatore nell'esecuzione di analisi successivi. Inoltre, poiché al momento non esistono valori soglia ufficiali per la definizione di un campione positivo o negativo per la presenza di una sostanza nella matrice cheratinica, al disotto dei quali il campione

venga considerato negativo, la scelta di considerare un campione negativo senza averlo esaminato con metodiche cromatografiche è del tutto personale.

1.6 Metodi cromatografici

Le analisi di conferma sono definite come quelle analisi che servono a verificare che non ci siano stati risultati falsi positivi dovuti alla non specificità dei test iniziali. Devono essere specifiche per i singoli analiti, e con una sensibilità uguale o maggiore al valore soglia stabilito nei test preliminari, e devono fornire un dato quantitativo. Nel caso della matrice cheratinica, poiché non esistono veri e propri test di screening neanche si può parlare di vere e proprie "analisi di conferma". Ciò nonostante, la Society of Hair Testing raccomanda, a prescindere dalla esecuzione o meno di una analisi di screening, l'utilizzo di metodologie di analisi quali gas-cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa o "ogni altra tecnologia di specificità e selettività uguali o maggiori (10). Come tecnica separativa è possibile utilizzare anche la cromatografia liquida a patto che il rivelatore sia sempre uno spettrometro di massa. Questa esigenza di un rivelatore "assoluto" è dovuta sia alla complessità della matrice cheratinica e quindi della possibile presenza di interferenti analitici, sia al fatto che nella maggior parte dei casi i risultati delle analisi assumono valore medico-legale. Ciò non esclude che per la esecuzione di studi clinici su pazienti in trattamento con una determinata sostanza si possa utilizzare la cromatografia liquida con un rivelatore convenzionale: ad assorbimento di luce ultravioletta, a serie di fotiododi, ecc (26). Come già riportato nelle Linee Guida per l'analisi di sostanze d'abuso nei liquidi biologici (11), le metodiche cromatografiche vanno validate, in questo caso nella matrice cheratinica, prima di esser applicate per l'analisi di campioni reali.

1.7 Presentazione dei dati

La concentrazione di farmaci e sostanze d'abuso nei capelli è nello stesso range di quella presente nelle urine. Però, la quantità di campione utilizzato nell'analisi dei capelli è approssimativamente una volta su mille di quella utilizzata nel caso delle urine (se consideriamo per le urine una densità teorica di 1,000 , 1 ml=1g) (7). Questo vuol dire che la quantità di xenobiotico da determinare è nell'ordine dei picogrammi-nanogrammi.

Solitamente si utilizza per ogni singola analisi un quantitativo minimo di capelli dai 50 ai 100 mg, sebbene nel caso di analisi segmentali del capello (quando si utilizza 1 cm o 2 cm per ogni analisi) e nel caso di capelli di neonati difficilmente si riesce ad ottenere questo quantitativo. Bisogna comunque tenere presente che il metodo di analisi non dovrebbe operare routinariamente al limite di quantificazione (LOQ) affinché il risultato della determinazione analitica possieda una certa precisione ed accuratezza.

Il risultato finale delle analisi va espresso in ng di xenobiotico/mg di capelli. Accanto al risultato quantitativo andrà sempre espressa la lunghezza in cm del segmento analizzato e la sua distanza dalla base del cuoio capelluto.

1.8 Interpretazione dei risultati

Il meccanismo di incorporazione di farmaci e sostanze d'abuso nel capello è un processo complesso influenzato, come è stato illustrato, da molte variabili.

Non sono state stabilite concentrazioni "soglia" (cut-off) ufficiali dei vari xenobiotici nel capello che permettano di dichiarare la positività o la negatività rispetto all'utilizzo o meno di una certa sostanza. Esiste una unica proposta riguardante gli oppiacei e cocaina secondo cui concentrazioni di 6-monoacetilmorfina inferiori a 0,5 ng/mg di capello e di cocaina inferiori a 1 ng/mg di capello escluderebbero il consumo; valori di 6-monoacetilmorfina inferiori a 2 ng/mg di capello e di cocaina inferiori a 4 ng/mg di capello indicherebbero un consumo basso; valori di 6-monoacetilmorfina tra 2 e 10 ng/mg di capello e di cocaina tra 4 e 20 ng/mg di capello indicherebbero un consumo medio e valori di 6-monoacetilmorfina superiori a 10 ng/mg di capello e di cocaina superiori a 20 ng/mg di capello indicherebbero un consumo elevato (27).

Alcuni autori sostengono che una contaminazione esterna del capello non possa a priori essere esclusa (6). In effetti, mentre per alcuni analiti (oppiacei, amfetamine, benzodiazepine, antidepressivi triciclici, antiepilettici) la presenza nella matrice cheratinica implica con una certa sicurezza il consumo, in altri casi (cocaina, cannabinoidi, nicotina) l'effetto di una contaminazione esterna può essere presente. Inoltre, sostanze incorporate nel capello non sono protette né fisicamente, né chimicamente da cambiamenti e che il dato della matrice cheratinica debba sempre essere accoppiato ad un altro dato di positività dell'analita in una differente matrice biologica.

E' necessario inoltre ricordare che nell'analisi della matrice cheratinica è importante:

- considerare la eventuale possibilità di una contaminazione esterna,
- stabilire una definizione precisa di risultato positivo,
- l'identificare e quantificare gli analiti in laboratori qualificati con una metodologia analitica standardizzata,
- effettuare un controllo interno di qualità e partecipare a programmi di valutazione esterna di qualità.

Tutto ciò assume una importanza particolare considerando il fatto che non esiste al momento un materiale di riferimento vero e proprio se non un materiale "certificato" consistente o in matrice cheratinica validata per la presenza di alcuni analiti da parte di laboratori di riferimento, o in matrice cheratinica con quantità certificata di analiti depositati sulla superficie esterna della matrice stessa.

2. IDENTIFICAZIONE E QUANTIFICAZIONE DEI SINGOLI ANALITI

2.1 Oppiacei

Nei capelli di assuntori di eroina, l'analita presente in concentrazioni maggiori è la 6-monoacetilmorfina, metabolita diretto della sostanza parente (28). Altri analiti quantificabili sono la morfina, proveniente dalla deacetilazione della 6-monoacetilmorfina, la codeina come impurezza presente nelle preparazioni "da strada", e non sempre osservabili l'acetilcodeina, la diidrocodeina, l'etilcodeina e l'eroina (28-30). La Society of hair testing ha proposto come criterio di risultato positivo di assunzione di eroina che il rapporto: concentrazione di 6-monoacetilmorfina nel capello/ concentrazione di morfina nel capello sia superiore a 1,3, nel caso di una digestione che non preveda idrolisi del primo analita (es. digestione con alcol metilico) (10). Comunque, la sola presenza di 6-monoacetilmorfina è già indice di assunzione di eroina, a meno che quantità paragonabili di eroina e 6-monoacetilmorfina non siano presenti nei lavaggi del capello, il che farebbe dedurre una contaminazione esterna del capello.

Negli ultimi anni sono stati pubblicati diversi metodi di digestione e seguente estrazione degli oppiacei dalla matrice cheratina tra i quali ricorderemo: digestione in ambiente alcalino (NaOH 0.1 M), digestione in ambiente acido (HCl 0.1 M), digestione enzimatica e digestione in alcol metilico (31). La digestione in ambiente alcalino, sebbene quantitativa, idrolizza completamente la 6-monoacetilmorfina, marker primario dell'uso di eroina (ed anche l'eroina o l'acetilcodeina eventualmente presenti). Anche nel caso di digestione con HCl 0.1 M, la 6-monoacetilmorfina (e gli altri oppiacei acetilati) viene idrolizzata, ma l'idrolisi non è totale e questo permette la sua determinazione con metodiche ad elevata sensibilità. L'unica procedura di digestione esente da fenomeni di idrolisi è quella con alcol metilico, il cui potere estrattivo nei confronti degli analiti presenti all'interno del capello però è molto più basso. Questo significa che in questo ultimo caso è necessario un metodo di analisi molto sensibile e selettivo.

2.2 Cocaina e metaboliti

Nei capelli di assuntori di cocaina, l'analita presente in concentrazioni maggiori è la cocaina stessa. Altro analita quantificabile è la benzoilecgonina, mentre non sempre osservabili sono l'ecgonina metil estere, la norcocaina e il cocaetilene, questo ultimo presente nel caso di assunzione contemporanea di cocaina e alcol (30-33). La Society of hair testing ha proposto come criterio di risultato positivo di assunzione di cocaina che il rapporto: concentrazione di benzoilecgonina nel capello/ concentrazione di cocaina nel capello sia superiore a 0,05, inoltre poiché la benzoilecgonina non sempre è presente, è consigliabile utilizzare delle soluzioni standard in cui verificare la percentuale di una eventuale idrolisi (10). Per quanto riguarda la digestione della matrice cheratinica, la

digestione in ambiente basico idrolizza completamente la cocaina a benzoilecgonina, per cui il trattamento più comunemente utilizzato è quello in acido diluito o in alcol metilico a caldo.

2.3 Cannabinoidi

Il maggior composto psicoattivo presente nella marijuana e nell'hashish è il delta-9-tetraidrocannabinolo (THC). Quando il THC viene ingerito, il metabolita che viene ricercato nelle matrici biologiche è l'acido 11-nor-delta-9-tetraidrocannabinol-9-carbossilico. La determinazione e la quantificazione di questa sostanza nei capelli è molto complessa a causa del fatto che la concentrazione nella matrice cheratinica è nell'ordine dei picogrammi. E' necessario quindi disporre di una metodologia e di una strumentazione che permettano di operare in questo range di concentrazioni (34). Per ovviare a questo problema, alcuni autori suggeriscono la determinazione nel capello del THC, cannabinolo e cannabidiolo. Il THC però è presente nel fumo della cannabis e per questo motivo non si può escludere la contaminazione esterna. Per questo motivo, volendo utilizzare la matrice cheratinica, la prova definitiva di consumo di cannabinoidi è la determinazione dell'acido 11-nor-delta-9-tetraidrocannabinol-9-carbossilico (35, 36).

2.4 Amfetamine

Nei capelli di assuntori di amfetamina o di derivati amfetaminici (tipo "ecstasy": 3,4 metilendiossimetamfetamina o MDMA, "eve": 3,4 metilendiossietilamfetamina o MDE, "adam": N-metil-1-(3,4 metilendiossifenil) 2-butanamina o MBDB) l'analita presente in concentrazioni maggiori è la sostanza consumata (37, 38). Inoltre nel caso dell'MDMA, insieme alla sostanza parente è possibile determinare la metilendiossiamfetamina (MDA) e l'amfetamina in quantità 5-10 volte minore, così come anche nel caso dell'MDE è possibile determinare l'MDA, suo metabolita. Diversamente, nel caso dell'MBDB, insieme alla sostanza parente nel capello è possibile identificare il BDB, (3,4 metilendiossifenil) 2-butanamina; suo principale metabolita (39). Per quanto riguarda la digestione della matrice cheratinica, è possibile operare in ambiente sia alcalino che acido o in alcol metilico, ottenendo in generale risultati quali-quantitativi simili (nel range dei ng/mg capelli).

2.5 Benzodiazepine

Risultati di ricerche internazionali evidenziano la possibilità di identificare sostanze parenti e anche metaboliti sia in soggetti in trattamento con benzodiazepine che in tossicodipendenti, che le utilizzano illecitamente per ridurre gli effetti secondari di alcune droghe (40, 41). Le benzodiazepine più frequentemente incontrate sono il diazepam, il nordiazepam, il lorazepam, l'oxazepam, il flunitrazepam e il 7-

aminoflunitrazepam, questi ultimi due particolarmente nel caso di assuntori di eroina. Alcuni studi hanno messo in evidenza l'inappropriatezza sia della digestione acida che di quella alcalina per estrarre le benzodazepine dalla matrice cheratinica a causa della formazione di prodotti di decomposizione, per cui al momento i trattamenti più comunemente utilizzati sono quelli con tamponi a pH debolmente acido (pH 6) o con enzimi (β -glucuronidasi-arilsulfatasi). Le concentrazioni trovate sono nell'ordine 0.01-10 ng/mg capelli.

2.6 Nicotina e metaboliti

Il biomarcatore di elezione per il fumo attivo e passivo nella matrice cheratinica è la nicotina (c.a. 0.1-100 ng/mg capelli). La cotinina, suo metabolita epatico principale, è presente in concentrazioni molto minori (da 10 a 90 volte). Nella determinazione della nicotina, l'operazione di lavaggio è molto importante in quanto la sua concentrazione nel capello potrebbe essere sopraestimata a causa di contaminazione esterna, molto frequente nel caso del fumo di tabacco (20, 42). La misura dei livelli di cotinina, soprattutto nei non fumatori, è sicuramente più indicativa dell'esposizione al fumo ambientale. Il trattamento comunemente utilizzato per la digestione della matrice è con NaOH 0,5M. Nel caso di fumatori attivi la concentrazione di nicotina può variare da 5 a 200 ng/mg capelli, mentre quella di cotinina da 0,5 a 5 ng/mg capelli. Nel caso di fumatori passivi la nicotina è presente in concentrazioni da 0,1 ng/mg di capelli a 30 ng/mg (43, 44)

2.7 Antidepressivi triciclici

Risultati di ricerche internazionali evidenziano la possibilità di identificare sostanze parenti e anche metaboliti in soggetti in trattamento con antidepressivi triciclici (45). In particolare, sono stati identificati amitriptilina, clomipramina, doxepina, imipramina e i loro metaboliti demetilati nortriptilina, desmetilclomipramina, nordoxepina e desipramina in un range di concentrazioni 0,4-10 ng/mg capelli nel caso del farmaco parente con un rapporto nor-metabolita/sostanza parente inferiore all'unità (0,2-0,8 nella maggior parte dei casi).

2.8 Carbamazepina

Il significato della determinazione della carbamazepina nei capelli di pazienti in trattamento con questo farmaco non è tanto la verifica della compliance assoluta poiché questo, come già detto in precedenza nella parte generale, non è possibile nella matrice cheratinica a causa di molti fattori di variabilità intra- e interindividuale. Ciò che è possibile è l'identificazione di una compliance errata o della totale non-compliance dei pazienti in maniera retrospettiva. Questo può assumere particolare significato in situazioni in cui il paziente sperimenta ricadute (46). La concentrazione di

carbamazepina nei capelli di pazienti trattati con dosi terapeutiche di farmaco (0,6-2,2 g/dia) varia circa tra 25 e 170 ng/mg capelli.

3. DIAGRAMMI DI FLUSSO PER LA DETERMINAZIONE DI FARMACI E SOSTANZE D'ABUSO NEI CAPELLI

3. 1 Validazione delle metodologie analitiche proposte nei diagrammi di flusso

La validazione di un metodo bioanalitico è il processo utilizzato per stabilire che i parametri di performance analitica sono adeguati per l'uso a cui sono destinati (47). Nel caso di metodi cromatografici utilizzati per applicazioni biomediche i parametri analitici che vanno sottoposti alla validazione sono essenzialmente i seguenti:

1. Recupero analitico
2. Risposta analitica
3. Sensibilità
4. Precisione
5. Accuratezza
6. Specificità
7. Stabilità

Tutti questi parametri vanno validati come di seguito riportato ogni volta che si sviluppa una nuova metodologia analitica o si applica nella propria realtà di laboratorio una metodologia analitica riportata nella letteratura.

3.1.1 Recupero analitico. - Il recupero assoluto di un metodo bioanalitico è misurato dalla risposta analitica di una matrice di controllo addizionata con l'analita in esame e trattata secondo la metodologia di estrazione espressa come percentuale della risposta analitica di uno standard puro con la stessa concentrazione di analita che non abbia subito nessun trattamento di estrazione. E' un parametro che indica se il metodo fornisce una risposta per l'intera quantità di analita presente nel campione. Si ottiene paragonando le risposte analitiche di estratti di matrici biologiche di controllo contenenti l'analita a bassa, media ed alta concentrazione in replicati di almeno 6 con quelle di standard non estratti che rappresentano il 100% del recupero.

Recupero assoluto = $(\text{risposta dell'analita addizionato alla matrice biologica processata} / \text{risposta dell'analita in uno standard puro non processato}) \times 100$.

Inoltre dovrebbe essere studiato l'effetto del materiale biologico co-estratto paragonando la risposta di campioni estratti addizionati con l'analita prima e dopo l'estrazione. Se viene utilizzato uno standard interno il suo recupero dovrebbe essere determinato indipendentemente alla concentrazione utilizzata nel metodo analitico. Il recupero dello standard interno dovrebbe essere entro il 15% di quello determinato per l'analita in esame. Sebbene sia desiderabile un recupero analitico il più vicino possibile al 100% al fine di massimizzare la sensibilità del metodo, è improbabile che recuperi del 50% o maggiori compromettano l'integrità del metodo. Una buona precisione ed accuratezza possono essere ottenute con metodi che presentino recuperi moderati, qualora abbiano una sensibilità adeguata. E' sempre consigliabile sacrificare intenzionalmente un elevato recupero per ottenere una specificità migliore ottimizzando le procedure di estrazione del campione.

3.1.2 Risposta analitica. - Nei metodi cromatografici, l'area del picco cromatografico o la sua altezza possono essere utilizzate come risposta analitica per definire la relazione lineare con la concentrazione conosciuta come modello di calibrazione. E' essenziale verificare che il modello di calibrazione scelto descriva adeguatamente la relazione tra la risposta analitica (y) e la concentrazione (x). La differenza tra i valori osservati della variabile y e quelli teorici o residuale dovrebbero essere esaminati per un minimo di 6 curve standard ognuna costruita da 6 diverse concentrazioni. La curva del rapporto tra il residuale studentizzato (residuale grezzo/errore standard) e il logaritmo della concentrazione mostrerà quindi in che misura il modello descriva i dati. L'evento più comune è un aumento della varianza con l'aumento della concentrazione ossia l'eterocedasticità e questo fenomeno si controlla meglio con l'uso della regressione pesata. Il peso di $1/x$, $1/y$ e $1/y^2$, calcolabili mediante programmi informatici presenti anche nei software di gestione di apparecchiature cromatografiche, sono approssimazioni adeguate di questa varianza e dovrebbero essere selezionate attraverso l'esame delle curve del residuale contro la concentrazione, utilizzando tutti i fattori di pesata.

3.1.3 Sensibilità. - La sensibilità di un metodo analitico è determinata dalla pendenza della curva di calibrazione. Si definisce sensibile un metodo se piccole variazioni di concentrazione causano variazioni di maggiore entità nella risposta analitica. I limiti di quantificazione sono definiti come la più alta e la più bassa concentrazione che possono essere determinate con accuratezza e precisione accettabili, che siano cioè entro $\pm 15\%$ nel caso del limite di quantificazione superiore ed inferiore (upper limit of quantitation, ULOQ e lower limit of quantitation, LLOQ). I limiti determinati con questi criteri di accettazione diventeranno gli standard di calibrazione inferiore e superiore del metodo in uso. Ogni concentrazione del campione che cada fuori del range di calibrazione non può essere interpolata dalla retta di calibrazione e l'estrapolazione della medesima retta è sconsigliata. Se la concentrazione di un campione è fuori del range dovrebbe essere diluito in matrice biologica di controllo e rianalizzato. Se nella diluizione si utilizza non la matrice biologica ma ad esempio un tampone è necessario provare la linearità di questo tipo di diluizione, con almeno due concentrazioni di analita che rappresentino le regioni superiore ed inferiore della curva di calibrazione dopo appropriata diluizione, da due a dieci volte. Si consiglia che i controlli di diluizione lineare siano analizzati in replicati di sei.

3.1.4 Precisione. - La precisione di un metodo analitico è la misura dell'errore casuale e viene definita come l'accordo tra le misure ripetute di uno stesso campione. Si esprime come coefficiente di variazione percentuale (%C.V.) o deviazione standard relativa (relative standard deviation: R.D.S.) delle misure ripetute.

$$\%C.V. = (\text{Deviazione Standard}/\text{Media}) \times 100$$

La precisione intra-saggio (intra-assay) o ripetibilità è definita come l'abilità di ripetere la stessa metodica con lo stesso analista, utilizzando la stessa strumentazione e gli stessi reagenti in un intervallo di tempo breve, ad esempio in uno stesso giorno. L'abilità di ripetere la stessa metodica in condizioni differenti, ad esempio con un

diverso analista, diversi reagenti e strumentazione in diverse settimane o mesi è la riproducibilità o precisione inter-saggio (inter-assay). La riproducibilità di un metodo è il parametro di maggior interesse in quanto fornisce una rappresentazione migliore della precisione includendo la variabilità di un maggior numero di fonti. La precisione dovrebbe essere stimata a quattro diverse concentrazioni, in sei replicati e in quattro momenti diversi cioè 4x6x4 replicati. Questo approccio permetterà che i dati per ogni singolo analita possano essere analizzati mediante analisi della varianza (one-way analysis of variance = ANOVA) che fornisce la stima della precisione intra ed inter-saggio per ogni concentrazione analizzata. Per essere accettabili, entrambi le misure devono essere all'interno del $\pm 15\%$ di tutte le concentrazioni esaminate.

3.1.5 Accuratezza. - L'accuratezza di un metodo bioanalitico è la misura dell'errore sistematico o bias che si definisce come l'accordo tra un valore misurato ed un valore vero. L'accuratezza viene meglio definita come la percentuale di bias calcolata dalla seguente espressione:

$$\% \text{ Bias} = [(\text{valore misurato} - \text{valore vero})] \times 100$$

Poiché nei campioni reali il valore vero è sconosciuto si può ottenere una approssimazione con una matrice biologica di controllo addizionata con una quantità nota di analita in esame o con l'utilizzo di materiale biologico di riferimento contenente quantità note di analita. Nel caso della matrice cheratinica l'unico materiale di riferimento a disposizione è quello del National Institute of Standard and Technology (NIST, U.S.A.). Si tratta di capelli di controllo, nella cui parte esterna è depositata una quantità nota e misurata di alcune sostanze di abuso (morfina, codeina, ecc). L'accuratezza viene quindi determinata alle stesse concentrazioni dell'analita che vengono utilizzate nella stima della precisione (cioè 4x6x4 replicati). L'accuratezza del metodo dovrebbe essere all'interno del $\pm 15\%$ in tutto l'intervallo di concentrazioni esaminate.

3.1.6 Specificità. - La specificità analitica è definita come l'abilità di un metodo di distinguere l'analita da tutte le altre sostanze presenti nel campione. Ciò può essere stabilito paragonando il tempo di ritenzione cromatografico dell'analita nell'estratto del campione con il suo tempo di ritenzione nelle soluzioni di riferimento o con una determinazione in spettrometria di massa una volta avvenuta la separazione cromatografica dell'analita. La specificità può anche essere determinata analizzando almeno 6 campioni differenti della matrice da analizzare in cui l'analita sia assente e individuare eventuali interferenze cromatografiche. Qualsiasi interferenza dovrebbe essere al disotto del 20% della risposta del rivelatore al limite inferiore di quantificazione (LLOQ). Inoltre dovrebbero essere addizionati alla matrice biologica in esame ed analizzati per escludere potenziali interferenze metaboliti della sostanza parente conosciuti e potenziali, prodotti di degradazione, medicazioni concomitanti e i loro principali metaboliti e comuni farmaci da banco o sostanze quali la nicotina, il suo metabolita principale, la cotinina e la caffeina.

3.1.7 Stabilità. - Le prove di stabilità sono necessarie per attestare che la concentrazione di un analita nel campione al momento dell'analisi corrisponde alla

concentrazione dell'analita al momento del campionamento. E' necessario verificare la stabilità di un analita nelle soluzioni di riferimento, nella matrice biologica e nei campioni processati, cioè gli estratti. La stabilità di un'analita nelle soluzioni di riferimento si verifica durante la validazione del metodo, mediante soluzioni che contengano l'analita preparate immediatamente prima che cominci il processo di validazione, conservate ad una appropriata temperatura, ed analizzate ad intervalli di tempo opportuni (esempio 7, 15 o 30 giorni). La stabilità di un analita nella matrice cheratinica va valutata solitamente a temperatura ambiente che è quella in cui si conservano normalmente i campioni, rianalizzando uno stesso campione ad intervalli regolari di tempo opportuni (3 mesi, 6 mesi, un anno). La stabilità di un'analita nel campione processato viene verificata ad intervalli di tempo di 24-48 ore. Ciò si ottiene iniettando nuovamente gli estratti all'interno di una nuova corsa di validazione. La stabilità dovrebbe essere stimata ad un minimo di due concentrazioni differenti dell'analita che riflettono le concentrazioni aspettate nei campioni in esame o se questo dato non è a disposizione, nei punti di bassa ed alta concentrazione della curva di calibrazione. I campioni utilizzati nei test di stabilità vanno comparati con campioni di controllo preparati al momento dell'analisi ed analizzati nella stessa sequenza analitica, preferibilmente in sei replicati. Variazioni superiori al 10% rispetto ai controlli potrebbero compromettere l'integrità dei dati, sebbene variazioni fino ad un 20% possono essere accettate in alcune condizioni. Quando viene accertata una instabilità è necessario minimizzare la degradazione dell'analita o perdite dovute ad adsorbimento mediante l'utilizzo di additivi quali tamponi, antiossidanti, inibitori di enzimi.

APPENDICE

DIAGRAMMI DI FLUSSO DEI SINGOLI ANALITI NEL CAPELLO

DETERMINAZIONE DEGLI OPIACEI -1**A. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE**

1. Tagliare 50 mg di capelli in segmenti di 1-2 cm
2. Lavare 2 volte (5 min.) con 2 ml di diclorometano
3. Asciugare
4. Polverizzare nel mulino a palle

Preparare portaprovette con provette in vetro numerate con tappo in cui introdurre i campioni da analizzare

5. aggiungere provetta con 50 mg di capello di controllo (identificare come **BKN1**) e due provette per ognuna delle concentrazioni: 0.1ng/mg di capello (5 µl di soluzione 1 µg/ml degli oppiacei da quantificare in 50 mg capello di controllo e identificare come **C1** e **C11**), 1 ng/mg di capello (50 µl di soluzione 1 µg/ml degli oppiacei da quantificare in 50 mg capello di controllo e identificare come **C2** e **C21**) e 10 ng/mg di capello (500 µl di soluzione 1 µg/ml degli oppiacei da quantificare in 50 mg capello di controllo e identificare come **C3** e **C31**)
6. aggiungere 50 µl di standard interno deuterato (è consigliabile utilizzare il deuterato di tutti gli oppiacei da determinare) o nalorfina (1 µg/ml) in tutte le provette
7. vortexare 10 sec.
8. aggiungere 2 ml di alcol metilico in tutte le provette
9. porre le provette in bagno ad acqua a 56°C tutta la notte
10. centrifugare a 3500 rpm per 5 min e filtrare

Preparare portaprovette con provette con numero di identificazione uguale alle precedenti

11. trasferire la fase organica nelle provette
12. evaporare sotto azoto

ESTRATTI SECCHI

13. aggiungere 100 µl di PFPA e 70 µl di PFPOH a tutte le provette
14. vortexare 10 sec.
15. riscaldare in bagno secco a 60°C, 30 min
16. evaporare sotto azoto
17. ricostituire in 30 µl di acetato di etile

B. ANALISI STRUMENTALE (GAS CROMATOGRAFIA/SPETTROMETRIA DI MASSA)

18. COLONNA: Capillare (5% fenile-95% metilsilicone, 12m x 0,20mm)
19. PROGRAMMA DI TEMPERATURA: 70°C-160°C, 30°C/min, 160°C-240°C, 10°C/min, 240°C-300°C, 30°C/min, iniettore a 260°C
20. IONI SELEZIONATI:

	IONI	STANDARD INTERNO DEUTERATO
6-MONOACETILMORFINA-PFP	414, 473	417, 476
MORFINA-PFP	414, 577	417, 580
CODEINA-PFP	445, 282	448, 285
DIDROCODEINA-PFP	447, 284	

Per ulteriori approfondimenti sulla metodica si rimanda alla letteratura (29)

DETERMINAZIONE DEGLI OPIACEI -2

A. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

1. Tagliare 50 mg di capelli in segmenti di 1-2 cm
2. Lavare 2 volte (5 min.) con 2 ml di diclorometano
3. Asciugare
4. Polverizzare nel mulino a palle

Preparare portaprovette con provette in vetro numerate con tappo in cui introdurre i campioni da analizzare

5. aggiungere provetta con 50 mg di capello di controllo (identificare come **BKN1**) e due provette per ognuna delle concentrazioni: 0.1ng/mg di capello (5 µl di soluzione 1 µg/ml degli oppiacei da quantificare in 50 mg capello di controllo e identificare come **C1** e **C11**), 1 ng/mg di capello (50 µl di soluzione 1 µg/ml degli oppiacei da quantificare in 50 mg capello di controllo e identificare come **C2** e **C21**) e 10 ng/mg di capello (500 µl di soluzione 1 µg/ml degli oppiacei da quantificare in 50 mg capello di controllo e identificare come **C3** e **C31**)
6. aggiungere 50 µl di standard interno deuterato (è consigliabile utilizzare il deuterato di tutti gli oppiacei da determinare) o nalorfina (1 µg/ml) in tutte le provette
7. vortexare 10 sec.
8. aggiungere 2 ml di alcol metilico in tutte le provette
9. porre le provette in bagno ad acqua a 56°C tutta la notte
10. centrifugare a 3500 rpm per 5 min e filtrare

Preparare portaprovette con provette con numero di identificazione uguale alle precedenti

11. trasferire la fase organica nelle provette
12. evaporare sotto azoto

ESTRATTI SECCHI

13. aggiungere 50 µl di BSTFA-1%TMCS a tutte le provette
14. vortexare 10 sec.
15. riscaldare in bagno secco a 70°C, 30 min

B. ANALISI STRUMENTALE (GAS CROMATOGRAFIA/SPETTROMETRIA DI MASSA)

16. COLONNA: Capillare (5% fenile-95% metilsilicone, 30m x 0,25mm)
17. PROGRAMMA DI TEMPERATURA: 100°C-290°C, 25°C/min, iniettore a 260°C
18. IONI SELEZIONATI:

	IONI	STANDARD INTERNO DEUTERATO
EROINA	369, 327	
6-MONOACETILMORFINA-TMS	399, 340	402, 343
MORFINA-TMS	499, 401	432, 404
CODEINA-TMS	371, 282	374, 285
ACETILCODEINA	341, 285	

Per ulteriori approfondimenti sulla metodica si rimanda alla letteratura (30)

DETERMINAZIONE DI COCAINA E METABOLITI - 1

A. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

1. Tagliare 50 mg di capelli in segmenti di 1-2 cm
2. Lavare 2 volte (5 min.) con 2 ml di diclorometano
3. Asciugare
4. Polverizzare nel mulino a palle

Preparare portaprovette con provette in vetro numerate con tappo in cui introdurre i campioni da analizzare

5. aggiungere provetta con 50 mg di capello di controllo (identificare come **BKN1**) e due provette per ognuna delle concentrazioni: 0.1ng/mg di capello (5 µl di soluzione 1 µg/ml di cocaina e metaboliti da quantificare in 50 mg capello di controllo e identificare come **C1** e **C11**), 1 ng/mg di capello (50 µl di soluzione 1 µg/ml di cocaina e metaboliti da quantificare in 50 mg capello di controllo e identificare come **C2** e **C21**) e 10 ng/mg di capello (500 µl di soluzione 1 µg/ml di cocaina e metaboliti da quantificare in 50 mg capello di controllo e identificare come **C3** e **C31**)
6. aggiungere 50 µl di standard interno deuterato (è consigliabile utilizzare il deuterato di tutti gli analiti da determinare, 1 µg/ml) in tutte le provette
7. vortexare 10 sec
8. aggiungere 2 ml di alcol metilico in tutte le provette
9. porre le provette in bagno ad acqua a 56°C tutta la notte
10. centrifugare a 3500 rpm per 5 min e filtrare

Preparare portaprovette con provette con numero di identificazione uguale alle precedenti

11. trasferire la fase organica nelle provette
12. evaporare sotto azoto

ESTRATTI SECCHI

13. aggiungere 50 µl di BSTFA-1%TMCS a tutte le provette
14. vortexare 10 sec.
15. riscaldare in bagno secco a 70°C, 1 h

B. ANALISI STRUMENTALE (GAS CROMATOGRAFIA/SPETTROMETRIA DI MASSA)

16. COLONNA: Capillare (5% fenile-95% metilsilicone, 30m x 0,25mm)
17. PROGRAMMA DI TEMPERATURA: 100°C-290°C, 25°C/min, iniettore a 260°C
18. IONI SELEZIONATI:

	IONI	STANDARD INTERNO DEUTERATO
COCAINA	182, 303	185, 306
BENZOILECGONINA-TMS	240, 361	243, 364
COCAETILENE	196, 82	199, 85
ECGONINA METIL ESTERE-TMS	96, 82	

Per ulteriori approfondimenti sulla metodica si rimanda alla letteratura (31)

DETERMINAZIONE DI COCAINA E METABOLITI - 2

A. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

1. Tagliare 50 mg di capelli in segmenti di 1-2 cm
2. Lavare 2 volte (5 min.) con 2 ml di diclorometano
3. Asciugare
4. Polverizzare nel mulino a palle

Preparare portaprovette con provette in vetro numerate con tappo in cui introdurre i campioni da analizzare

5. aggiungere provetta con 50 mg di capello di controllo (identificare come **BKN1**) e due provette per ognuna delle concentrazioni: 0.1ng/mg di capello (5 µl di soluzione 1 µg/ml di cocaina e metaboliti da quantificare in 50 mg capello di controllo e identificare come **C1** e **C11**), 1 ng/mg di capello (50 µl di soluzione 1 µg/ml di cocaina e metaboliti da quantificare in 50 mg capello di controllo e identificare come **C2** e **C21**) e 10 ng/mg di capello (500 µl di soluzione 1 µg/ml di carbossi-THC in 50 mg capello di controllo e identificare come **C3** e **C31**)
6. aggiungere 50µl di standard interno deuterato (è consigliabile utilizzare il deuterato di tutti gli analiti da determinare, 1 µg/ml) in tutte le provette
7. vortexare 10 sec
8. aggiungere 2 ml di alcol metilico in tutte le provette
9. porre le provette in bagno ad acqua a 56°C tutta la notte
10. centrifugare a 3500 rpm per 5 min e filtrare

Preparare portaprovette con provette con numero di identificazione uguale alle precedenti

11. trasferire la fase organica nelle provette
12. evaporare sotto azoto

ESTRATTI SECCHI

13. aggiungere 100 µl di PFPA e 70 µl di PFPOH a tutte le provette
14. vortexare 10 sec.
15. riscaldare in bagno secco a 60°C, 30 min
16. evaporare sotto azoto
17. ricostituire in 30 µl di acetato di etile

B. ANALISI STRUMENTALE (GAS CROMATOGRAFIA/SPETTROMETRIA DI MASSA)

18. COLONNA: Capillare (metilsilicone, 12m x 0,2mm)
19. PROGRAMMA DI TEMPERATURA: 70°C-300°C, 30°C/min, iniettore a 260°C
20. IONI SELEZIONATI:

	IONI	STANDARD INTERNO DEUTERATO
COCAINA	182, 303	185, 306
BENZOILECGONINA-PFP	300, 421	303, 424
ECGONINA METIL ESTERE-PFP	314, 345	317, 348

Per ulteriori approfondimenti sulla metodica si rimanda alla letteratura (32)

DETERMINAZIONE DEL CARBOSSI-THC

A. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

1. Tagliare 50 mg di capelli in segmenti di 1-2 cm
2. Lavare 2 volte (5 min.) con 2 ml di diclorometano
3. Asciugare
4. Polverizzare nel mulino a palle

Preparare portaprovette con provette in vetro numerate con tappo in cui introdurre i campioni da analizzare

5. aggiungere provetta con 50 mg di capello di controllo (identificare come **BKN1**) e due provette per ognuna delle concentrazioni: 0.01 ng/mg di capello (5 µl di soluzione 0.1 µg/ml di carbossi-THC in 50 mg capello di controllo e identificare come **C1** e **C11**), 0.1 ng/mg di capello (50 µl di soluzione 0.1 µg/ml di carbossi-THC in 50 mg capello di controllo e identificare come **C2** e **C21**) e 1 ng/mg di capello (500 µl di soluzione 0.1 µg/ml di carbossi-THC in 50 mg capello di controllo e identificare come **C3** e **C31**)
6. aggiungere 50 µl di standard interno deuterato (1µg/ml) in tutte le provette
7. vortexare 10 sec
8. aggiungere 1 ml di NaOH 1M in tutte le provette
9. porre le provette in bagno ad acqua a 70°C per 30 min

Preparare colonnine Bond Elut Certify per estrazione in fase solida con numero di identificazione uguale a quello delle provette

10. condizionare le colonnine secondo le istruzioni riportate dalla casa produttrice
11. trasferire la fase acquosa portata a pH 4-5 nelle colonnine e procedere alla estrazione in fase solida secondo le istruzioni riportate dalla casa produttrice per l'estrazione del carbossi-THC
12. evaporare sotto azoto l'eluente organico

ESTRATTI SECCHI

13. aggiungere 100 µl di PFPA and 25 µl HFIPµl a tutte le provette
14. vortexare 10 sec.
15. riscaldare in bagno secco a 70°C, 30 min
16. evaporare sotto azoto
17. ricostituire in 30 µl di acetato di etile

B. ANALISI STRUMENTALE (GAS CROMATOGRAFIA/SPETTROMETRIA DI MASSA)

18. COLONNA: Capillare (5% fenile-95% metilsilicone, 30 m x 0,25mm)
19. PROGRAMMA DI TEMPERATURA: 120°C-280°C, 20°C/min, iniettore a 260°C
20. MODALITA' DI IONIZZAZIONE: ionizzazione chimica negativa con metano
21. IONI SELEZIONATI:

	IONI	STANDARD INTERNO DEUTERATO
Carbossi-THC-PFP	472, 620	475, 623

Per ulteriori approfondimenti sulla metodica si rimanda alla letteratura (36)

DETERMINAZIONE DELLE AMFETAMINE - 1

A. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

1. Tagliare 50 mg di capelli in segmenti di 1-2 cm
2. Lavare 2 volte (5 min.) con 2 ml di diclorometano
3. Asciugare
4. Polverizzare nel mulino a palle

Preparare portaprovette con provette in vetro numerate con tappo in cui introdurre i campioni da analizzare

5. aggiungere provetta con 50 mg di capello di controllo (identificare come **BKN1**) e due provette per ognuna delle concentrazioni: 0.1ng/mg di capello (5 µl di soluzione 1 µg/ml delle amfetamine da quantificare in 50 mg capello di controllo e identificare come **C1** e **C11**), 1 ng/mg di capello (50 µl di soluzione 1 µg/ml delle amfetamine da quantificare in 50 mg capello di controllo e identificare come **C2** e **C21**) e 10 ng/mg di capello (500 µl di soluzione 1 µg/ml delle amfetamine da quantificare in 50 mg capello di controllo e identificare come **C3** e **C31**)
6. aggiungere 50µl di standard interno deuterato (MDMA-d₄, o se disponibile, il deuterato di tutti gli analiti da determinare, 1 µg/ml) in tutte le provette
7. vortexare 10 sec
8. aggiungere 2 ml di alcol metilico in tutte le provette
9. porre le provette in bagno ad ultrasuoni a 56°C, 5 ore
10. centrifugare a 3500 rpm per 5 min e filtrare

Preparare portaprovette con provette con numero di identificazione uguale alle precedenti

11. trasferire la fase organica nelle provette
12. evaporare sotto azoto

ESTRATTI SECCHI

13. aggiungere 50 µl di TFA a tutte le provette
14. vortexare 10 sec.
16. riscaldare in bagno secco a 40°C, 30 min
17. evaporare sotto azoto e riprendere con 50 µl di acetato di etile anidro con 1% TFA

B. ANALISI STRUMENTALE (GAS CROMATOGRAFIA/SPETTROMETRIA DI MASSA)

17. COLONNA: Capillare (5% fenile-95% metilsilicone, 30m x 0,25 mm)
18. PROGRAMMA DI TEMPERATURA: 60°C-170°C, 40°C/min, 170°C-270°C, 8°C/min, iniettore a 250°C
19. IONI SELEZIONATI:

	IONI	STANDARD INTERNO DEUTERATO
AMFETAMINA-TFA	118, 140, 231	
MDA-TFA	135, 162, 275	
MDMA-TFA	135, 154, 289	158 (MDMA-d ₄)
MDEA-TFA	135, 162, 303	

Per ulteriori approfondimenti sulla metodica si rimanda alla letteratura (37)

DETERMINAZIONE DELLE AMFETAMINE -2

A. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

1. Tagliare 50 mg di capelli in segmenti di 1-2 cm
2. Lavare 2 volte (5 min.) con 2 ml di diclorometano
3. Asciugare
4. Polverizzare nel mulino a palle

Preparare portaprovette con provette in vetro numerate con tappo in cui introdurre i campioni da analizzare

5. aggiungere provetta con 50 mg di capello di controllo (identificare come **BKN1**) e due provette per ognuna delle concentrazioni: 0.1ng/mg di capello (5 µl di soluzione 1 µg/ml delle amfetamine da quantificare in 50 mg capello di controllo e identificare come **C1** e **C11**), 1 ng/mg di capello (50 µl di soluzione 1 µg/ml delle amfetamine da quantificare in 50 mg capello di controllo e identificare come **C2** e **C21**) e 10 ng/mg di capello (500 µl di soluzione 1 µg/ml delle amfetamine da quantificare in 50 mg capello di controllo e identificare come **C3** e **C31**)
6. aggiungere 50µl di standard interno deuterato (MDMA-d₄, o se disponibile, il deuterato di tutti gli analiti da determinare, 1 µg/ml) in tutte le provette
7. vortexare 10 sec
8. aggiungere 2 ml di alcol metilico-HCl 5M (20:1 v/v) in tutte le provette
9. porre le provette in bagno ad ultrasuoni una ora e incubare tutta la notte
10. centrifugare a 3500 rpm per 5 min e filtrare
11. evaporare la fase organica e riprendere con 1ml di tampone fosfato a pH 6

Preparare colonnine Bond Elut Certify per estrazione in fase solida con numero di identificazione uguale a quello delle provette

12. condizionare le colonnine secondo le istruzioni riportate dalla casa produttrice
13. trasferire la fase acquosa a pH 6 nelle colonnine e procedere alla estrazione in fase solida con 3ml di alcol metilico-HCl 5M (20:1 v/v) dopo lavaggio con 1ml di acqua, 1 ml di acido acetico 0,1M e 1ml di acqua
14. evaporare sotto azoto l'eluente organico

ESTRATTI SECCHI

15. aggiungere 200 µl PFPA-acetato di etile 1:1 a tutte le provette
16. vortexare 10 sec e riscaldare in bagno a secco a 60°C, 20 min
17. evaporare sotto azoto e riprendere con 50 µl di acetato di etile

B. ANALISI STRUMENTALE (GAS CROMATOGRAFIA/SPETTROMETRIA DI MASSA)

18. COLONNA: Capillare (metilsilicone, 20m x 0,25 mm)
19. PROGRAMMA DI TEMPERATURA: 60°C-280°C, 20°C/min, iniettore a 200°C
20. IONI SELEZIONATI:

	IONI	STANDARD INTERNO DEUTERATO
MDA-PFP	135, 162, 325	
MDMA-PFP	135, 204, 339	208 (MDMA-d ₄)
MDEA-PFP	135, 162, 353	

Per ulteriori approfondimenti sulla metodica si rimanda alla letteratura (38)

DETERMINAZIONE DELLE AMFETAMINE – 3**A. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE**

1. Tagliare 50 mg di capelli in segmenti di 1-2 cm
2. Lavare 2 volte (5 min.) con 2 ml di diclorometano
3. Asciugare
4. Polverizzare nel mulino a palle

Preparare portaprovette con provette in vetro numerate con tappo in cui introdurre i campioni da analizzare

5. aggiungere provetta con 50 mg di capello di controllo (identificare come **BKN1**) e due provette per ognuna delle concentrazioni: 0.1ng/mg di capello (5 µl di soluzione 1 µg/ml delle amfetamine da quantificare in 50 mg capello di controllo e identificare come **C1** e **C11**), 1 ng/mg di capello (50 µl di soluzione 1 µg/ml delle amfetamine da quantificare in 50 mg capello di controllo e identificare come **C2** e **C21**) e 10 ng/mg di capello (500 µl di soluzione 1 µg/ml delle amfetamine da quantificare in 50 mg capello di controllo e identificare come **C3** e **C31**)
6. aggiungere 50µl di standard interno deuterato (MDEA-d₅, 1 µg/ml) in tutte le provette
7. vortexare 10 sec
8. aggiungere 2 ml di alcol metilico in tutte le provette
9. porre le provette in bagno ad ultrasuoni a 56°C, 5 ore
10. centrifugare a 3500 rpm per 5 min e filtrare

Preparare portaprovette con provette con numero di identificazione uguale alle precedenti

11. trasferire la fase organica nelle provette
12. evaporare sotto azoto

ESTRATTI SECCHI

13. aggiungere 80 µl di HFBA-40 µl acetato di etile a tutte le provette
14. vortexare 10 sec.
16. riscaldare in bagno secco a 70°C, 20 min
17. evaporare sotto azoto e riprendere con 30 µl di acetato di etile

B. ANALISI STRUMENTALE (GAS CROMATOGRAFIA/SPETTROMETRIA DI MASSA)

17. COLONNA: Capillare (5% fenile-95% metilsilicone, 30m x 0,25 mm)
18. PROGRAMMA DI TEMPERATURA: 100-280°C, 20°C/min, iniettore a 240°C
19. IONI SELEZIONATI:

	IONI	STANDARD INTERNO DEUTERATO
MBDB-HFB	176, 268, 403	
BDB-HFB	135, 176, 389	
		273 (MDEA-d ₅)

Per ulteriori approfondimenti sulla metodica si rimanda alla letteratura (39)

DETERMINAZIONE DELLE BENZODIAZEPINE -1

A. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

1. Tagliare 50 mg di capelli in segmenti di 1-2 cm
2. Lavare 2 volte (5 min.) con 2 ml di diclorometano
3. Asciugare
4. Polverizzare nel mulino a palle

Preparare portaprovette con provette in vetro numerate con tappo in cui introdurre i campioni da analizzare

5. aggiungere provetta con 50 mg di capello di controllo (identificare come BKN1) e due provette per ognuna delle concentrazioni: 0.1ng/mg di capello (5µl di soluzione 1µg/ml delle benzodiazepine da quantificare in 50 mg capello di controllo e identificare come C1 e C11), 1 ng/mg di capello (50 µl di soluzione 1 µg/ml delle benzodiazepine da quantificare in 50 mg capello di controllo e identificare come C2 e C21) e 10 ng/mg di capello (500 µl di soluzione 1µg/ml delle benzodiazepine da quantificare in 50 mg capello di controllo e identificare come C3 e C31)
6. aggiungere 50 µl di standard interno deuterato (è consigliabile utilizzare il deuterato di tutti gli analiti da determinare, 1 µg/ml) in tutte le provette
7. vortexare 10 sec.
8. aggiungere 2 ml di tampone acetato a pH 4, 70µl di β-glucuronidasi-arilsulfatasi in tutte le provette
9. porre le provette in bagno ad acqua a 40°C, 2 ore
10. centrifugare a 3500 rpm per 5 min e filtrare

Preparare colonnine Bond Elut C₁₈ per estrazione in fase solida con numero di identificazione uguale a quello delle provette

11. condizionare le colonnine con 6 ml di alcol metilico e 3 ml di acqua
12. trasferire la fase acquosa a pH 4 nelle colonnine e procedere alla estrazione in fase solida con 3ml di acetone-diclorometano (3:1 v/v) dopo lavaggio con 3ml di acqua, 3 ml di NaHCO₃ 0,6 M e 3ml di acqua
13. evaporare sotto azoto l'eluente organico

ESTRATTI SECCHI

14. aggiungere 50 µl di acetato di etile a tutte le provette e vortexare 10 sec

B. ANALISI STRUMENTALE (GAS CROMATOGRAFIA/SPETTROMETRIA DI MASSA)

15. COLONNA: Capillare (5% difenil-95% dimetilsiloxano, 12m x 0,2 mm)
16. PROGRAMMA DI TEMPERATURA: 70°C-220°C, 25°C/min, 220°C-300°C, 5°C/min iniettore a 260°C
17. IONI SELEZIONATI:

	IONI	STANDARD INTERNO DEUTERATO
DIAZEPAM	256, 283	261, 289 (DIAZEPAM-d ₅)
NORDIAZEPAM	242, 270	247, 275 (NORDIAZEPAM-d ₅)
OXAZEPAM	230, 231	235, 236 (OXAZEPAM- d ₅)
AMINOFLUNITRAZEPAM	255, 283	
LORAZEPAM	239, 274	

Per ulteriori approfondimenti sulla metodica si rimanda alla letteratura (40)

DETERMINAZIONE DELLE BENZODIAZEPINE -2

A. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

1. Tagliare 50 mg di capelli in segmenti di 1-2 cm
2. Lavare 2 volte (5 min.) con 2 ml di diclorometano
3. Asciugare
4. Polverizzare nel mulino a palle

Preparare portaprovette con provette in vetro numerate con tappo in cui introdurre i campioni da analizzare

5. aggiungere provetta con 50 mg di capello di controllo (identificare come **BKN1**) e due provette per ognuna delle concentrazioni: 0.1ng/mg di capello (5 µl di soluzione 1 µg/ml degli analiti da quantificare in 50 mg capello di controllo e identificare come **C1** e **C11**), 1 ng/mg di capello (50 µl di soluzione 1 µg/ml degli analiti da quantificare in 50 mg capello di controllo e identificare come **C2** e **C21**) e 10 ng/mg di capello (500 µl di soluzione 1 µg/ml degli analiti da quantificare in 50 mg capello di controllo e identificare come **C3** e **C31**)
6. aggiungere 50 µl di standard interno deuterato (diazepam-d₅, o se disponibile, il deuterato di tutti gli analiti da determinare, 1 µg/ml) in tutte le provette
7. vortexare 10 sec.
8. aggiungere 2 ml di tampone fosfato (tampone di Soerensen) a pH 7,6 in tutte le provette
9. porre le provette in bagno ad acqua a 40°C, 2 ore
10. centrifugare a 3500 rpm per 5 min e filtrare
11. trasferire la fase acquosa nelle provette
12. aggiungere 3 ml di etere etilico-cloroformio (80:20 v/v) e vortexare 10 sec

Preparare portaprovette con provette con numero di identificazione uguale alle precedenti

13. trasferire la fase organica nelle provette
14. ripetere la estrazione con 2 ml di etere etilico-cloroformio (80:20 v/v)
15. evaporare sotto azoto le fasi organiche riunite

ESTRATTI SECCHI

16. aggiungere 150 µl di HFBA-acetato di etile (2:1 v/v) a tutte le provette
17. vortexare 10 sec.
18. riscaldare in bagno secco a 60°C, 30 min
19. evaporare sotto azoto e riprendere con 50 µl di acetato di etile

B. ANALISI STRUMENTALE (GAS CROMATOGRAFIA/SPETTROMETRIA DI MASSA)

20. COLONNA: Capillare (5% fenile-95% metilsilicone, 30 m x 0,25 mm)
21. PROGRAMMA DI TEMPERATURA: 60°C-295°C, 30°C/min, iniettore a 240°C
22. MODALITA' DI IONIZZAZIONE: ionizzazione chimica negativa con metano
23. IONI SELEZIONATI:

	IONI	STANDARD INTERNO DEUTERATO
FLUNITRAZEPAM	297, 313	
7-AMINOFUNITRAZEPAM-HFB	459, 478	
		289 (DIAZEPAM-d ₅)

Per ulteriori approfondimenti sulla metodica si rimanda alla letteratura (41)

DETERMINAZIONE DI NICOTINA E COTININA

A. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

1. Tagliare 50 mg di capelli in segmenti di 1-2 cm
2. Lavare 2 volte (5 min.) con 2 ml di diclorometano
3. Asciugare
4. Polverizzare nel mulino a palle

Preparare portaprovette con provette in vetro numerate con tappo in cui introdurre i campioni da analizzare

5. aggiungere provetta con 50 mg di capello di controllo (identificare come BKN1) e due provette per ognuna delle concentrazioni: 0.1ng/mg di capello (5 µl di soluzione 1 µg/ml degli analiti da quantificare in 50 mg capello di controllo e identificare come C1 e C11), 1 ng/mg di capello (50 µl di soluzione 1 µg/ml degli analiti da quantificare in 50 mg capello di controllo e identificare come C2 e C21) e 10 ng/mg di capello (500 µl di soluzione 1 µg/ml degli analiti da quantificare in 50 mg capello di controllo e identificare come C3 e C31)
6. aggiungere 50 µl di standard interno deuterato (nicotina-d₃, 1 µg/ml) in tutte le provette
7. vortexare 10 sec.
8. aggiungere 2 ml di NaOH 0,5 M in tutte le provette
9. porre le provette a temperatura ambiente 4 ore

Preparare colonnine Extrelut-3 per estrazione in fase solida con numero di identificazione uguale a quello delle provette

10. condizionare le colonnine con 10 ml di diclorometano
11. trasferire la fase acquosa basica nelle colonnine e procedere alla estrazione in fase solida con 8 ml di diclorometano-alcòl isopropilico (9:1 v/v)
12. aggiungere 0,5 ml di HCl metanolico 25 mM all' eluente organico in tutte le provette
13. evaporare sotto azoto

ESTRATTI SECCHI

14. aggiungere 50 µl di diclorometano a tutte le provette e vortexare 10 sec

B. ANALISI STRUMENTALE (GAS CROMATOGRAFIA/SPETTROMETRIA DI MASSA)

15. COLONNA: Capillare (metilsilicone, 12 m x 0,2 mm)
16. PROGRAMMA DI TEMPERATURA: 60°C-280°C, 30°C/min, iniettore a 250°C
17. IONI SELEZIONATI:

	IONI	STANDARD INTERNO DEUTERATO
NICOTINA	84, 133, 162	87, 136, 165
COTININA	98, 147, 176	

Per ulteriori approfondimenti sulla metodica si rimanda alla letteratura (42-44)

DETERMINAZIONE DI ANTIDEPRESSIVI TRICICLICI

A. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

1. Tagliare 50 mg di capelli in segmenti di 1-2 cm
2. Lavare 2 volte (5 min.) con 2 ml di diclorometano
3. Asciugare
4. Polverizzare nel mulino a palle

Preparare portaprovette con provette in vetro numerate con tappo in cui introdurre i campioni da analizzare

5. aggiungere provetta con 50 mg di capello di controllo (identificare come **BKN1**) e due provette per ognuna delle concentrazioni: 0.1ng/mg di capello (5 µl di soluzione 1 µg/ml degli analiti da quantificare in 50 mg capello di controllo e identificare come **C1** e **C11**), 1 ng/mg di capello (50 µl di soluzione 1 µg/ml degli analiti da quantificare in 50 mg capello di controllo e identificare come **C2** e **C21**) e 10 ng/mg di capello (500 µl di soluzione 1 µg/ml degli analiti da quantificare in 50 mg capello di controllo e identificare come **C3** e **C31**)
6. aggiungere 50 µl di standard interno deuterato (imipramina-d₃, o se disponibile, il deuterato di tutti gli analiti da determinare, 1 µg/ml) in tutte le provette
7. vortexare 10 sec.
8. aggiungere 2 ml di NaOH 1M in tutte le provette
9. porre le provette in bagno ad acqua a 80°C, 30 min

Preparare colonnine Extrelut-3 per estrazione in fase solida con numero di identificazione uguale a quello delle provette

10. condizionare le colonnine con 10 ml di diclorometano
11. trasferire la fase acquosa basica nelle colonnine e procedere alla estrazione in fase solida con 8 ml di acetato di etile-etero etilico (1:1 v/v)
12. evaporare sotto azoto

ESTRATTI SECCHI

13. aggiungere 100 µl di PFPA a tutte le provette e vortexare 10 sec
14. riscaldare in bagno secco a 60°C, 30 min
15. evaporare sotto azoto e riprendere con 50 µl di acetato di etile

B. ANALISI STRUMENTALE (GAS CROMATOGRAFIA/SPETTROMETRIA DI MASSA)

16. COLONNA: Capillare (metilsilicone, 30 m x 0,25 mm)
17. PROGRAMMA DI TEMPERATURA: 100°C-295°C, 30°C/min, iniettore a 240°C
18. IONI SELEZIONATI:

	IONI	STANDARD INTERNO DEUTERATO
AMITRIPTILINA	58, 202	
NORTRIPTILINA-PFP	217, 232	
CLOMIPRAMINA	58, 268	
NORCLOMIPRAMINA-PFP	266, 294	
IMIPRAMINA	58, 234	61, 237
DESIPRAMINA-PFP	208, 412	
DOXEPINA	58, 178	
NORDOXEPINA-PFP	178, 234	

Per ulteriori approfondimenti sulla metodica si rimanda alla letteratura (45)

DETERMINAZIONE DELLA CARBAMAZEPINA

A. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

1. Tagliare 50 mg di capelli in segmenti di 1-2 cm
2. Lavare 2 volte (5 min.) con 2 ml di diclorometano
3. Asciugare
4. Polverizzare nel mulino a palle

Preparare portaprovette con provette in vetro numerate con tappo in cui introdurre i campioni da analizzare

5. aggiungere provetta con 50 mg di capello di controllo (identificare come **BKN1**) e due provette per ognuna delle concentrazioni: 0.1ng/mg di capello (5 µl di soluzione 1 µg/ml degli analiti da quantificare in 50 mg capello di controllo e identificare come **C1** e **C11**), 1 ng/mg di capello (50 µl di soluzione 1 µg/ml degli analiti da quantificare in 50 mg capello di controllo e identificare come **C2** e **C21**) e 10 ng/mg di capello (500 µl di soluzione 1 µg/ml degli analiti da quantificare in 50 mg capello di controllo e identificare come **C3** e **C31**)
6. aggiungere 50 µl di standard interno deuterato (diazepam-d₅, o se disponibile, il deuterato della carbamazepina, 1 µg/ml) in tutte le provette
7. vortexare 10 sec.
8. aggiungere 2 ml di tampone acetato a pH 4, 70µl di β-glucuronidasi-arilsulfatasi in tutte le provette
9. porre le provette in bagno ad acqua a 40°C, 2 ore
10. centrifugare a 3500 rpm per 5 min e filtrare

Preparare colonnine Bond Elut C₁₈ per estrazione in fase solida con numero di identificazione uguale a quello delle provette

11. condizionare le colonnine con 6 ml di alcol metilico e 3 ml di acqua
11. trasferire la fase acquosa a pH 4 nelle colonnine e procedere alla estrazione in fase solida con 3ml di acetone-diclorometano (3:1 v/v) dopo lavaggio con 3ml di acqua, 3 ml di NaHCO₃ 0,6 M e 3ml di acqua
13. evaporare sotto azoto l'eluente organico

ESTRATTI SECCHI

14. aggiungere 50 µl di acetato di etile a tutte le provette e vortexare 10 sec

B. ANALISI STRUMENTALE (GAS CROMATOGRAFIA/SPETTROMETRIA DI MASSA)

15. COLONNA: Capillare (5% difenil-95% dimetilsiloxano, 12m x 0,2 mm)
16. PROGRAMMA DI TEMPERATURA: 70°C-220°C, 25°C/min, 220°C-300°C, 5°C/min iniettore a 260°C
17. IONI SELEZIONATI:

	IONI	STANDARD INTERNO DEUTERATO
CARBAMAZEPINA	165, 193	289 (DIAZEPAM-d ₅)

Per ulteriori approfondimenti sulla metodica si rimanda alla letteratura (46)

GLOSSARIO

BSTFA: bis(trimetilsilil)trifluoroacetammide

HFBA: anidride eptafluorobutirrica

HFIP: 1,1,1,3,3,3, esafluoro, 2 propanolo

PFPA: anidride pentafluoropropionica

PFPOH: alcol pentafluoropropionico

TFA: anidride trifluoroacetica

TMCS: trimetilclorosilano

BIBLIOGRAFIA

- 1) VALENTE, D., CASSANI, M., PIGLIAPOCHI, M., VANSETTI, G. Hair as the sample in assessing morphine and cocaine addiction. *Clin Chem.* 1981, 27: 1952-1953.
- 2) KINTZ P. *Drug Testing in hair.* Ed. CRC Editions, London 1997.
- 3) SACHS, H., History of hair analysis. *Forensic Sci. Int.* 1997, 84: 7-16.
- 4) GROPPER, B.A. Research and development on drug testing by hair analysis. In *NIDA Research Monograph "Hair testing for drugs of abuse: International Research on Standards and Technology"* NIH Publication, 1995. p. 7-18.
- 5) UEMATSU, T. Therapeutic drug monitoring in hair samples. *Clin. Pharmacokinet.*, 1993, 25: 83-87.
- 6) KIDWELL, D.A., BLANK D.L., Mechanisms of incorporation of drugs into hair and the interpretation of hair analysis data. In *NIDA Research Monograph "Hair testing for drugs of abuse: International Research on Standards and Technology"* NIH Publication, 1995. p. 19-90.
- 7) MOELLER, M. R. Hair analysis as evidence in forensic cases. *Ther. Drug Monit.* 1996, 18: 444-449.
- 8) HUESTIS, M.A. Judicial acceptance of hair tests for substances of abuse in the united states courts scientific, forensic and ethical aspects. *Ther. Drug Monit.* 1996, 18: 456-459.
- 9) NIDA Research Monograph "Hair testing for drugs of abuse: International Research on Standards and Technology" NIH Publication, 1995.
- 10) Society of Hair Testing, *Forensic Sci. Int.* 1997, 84: 3-6.
- 11) ZUCCARO, P., PICHINI, S., ALTIERI, I., PACIFICI, P. Proposta di linee guida per l'analisi delle sostanze d'abuso nei liquidi biologici. *Rapporti ISTISAN 96/29.*
- 12) PÖTSCH, L., SKOPP, G., MOELLER, M.R. Biochemical approach on the conservation of drug molecules during hair fiber formation. *Forensic Sci. Int.* 1997, 84:25-35.
- 13) JURADO, C., KINTZ, P., MENEDEZ, M., REPETTO, M. Influence of the cosmetic treatment of hair on drug testing. *Int. J. Legal Med.* 1997, 110: 159-163.
- 14) SKOPP, G., PÖTSCH, L., MOELLER, M.R. On cosmetically treated hair-aspects and pitfalls of interpretation. *Forensic Sci. Int.* 1997, 84:43-52.
- 15) CHIAROTTI, M. Overview of extraction methods. *Forensic Sci. Int.* 1993, 63: 161-170.
- 16) CIRIMELE, V., KINTZ, P., MANGIN, P. Comparison of different extraction procedures for drugs in hair of drug addicts. In *NIDA Research Monograph "Hair testing for drugs of abuse: International Research on Standards and Technology"* NIH Publication, 1995. p.277-288.
- 17) SACHS, H., MOELLER, M.R. Quantitative results of drugs in hair using different extraction methods. In *NIDA Research Monograph "Hair testing for drugs of abuse: International Research on Standards and Technology"* NIH Publication, 1995. p. 196-211.

- 18) POLETTINI, A., C. STRAMESI, C. VIGNALI, M. MONTAGNA. Determination of opiates in hair. Effects of extraction methods on recovery and stability of analytes. *Forensic Sci. Int.* 1997, 84: 259-269.
- 19) ROTHE, M., PRAGST, F. Solvent optimization for the direct extraction of opiates from hair samples. *J. Anal. Toxicol.* 1995, 19: 236-40.
- 20) PICHINI, S., ALTIERI, I., PELLEGRINI, M., PACIFICI, R., ZUCCARO P. The analysis of nicotine and cotinine: evaluation of extraction procedures, hair treatments, and development of reference material. *Forensic Sci. Int.* 1997, 84: 243-252.
- 21) EDDER, P., STAUB, C., VEUTHEY, J.L., PIERROZ, I., HAERDI, W.. Subcritical fluid extraction of opiates in hair of drug addicts. *J. Chromatogr. B* 1994, 658: 75-86.
- 22) STAUB, C. Supercritical fluid extraction and hair analysis: the situation in 1996. *Forensic Sci. Int.* 1997, 84: 295-304.
- 23) CASSANI, M., SPIEHLER, V. Analytical requirements, perspectives and limits of immunological methods for drugs in hair. *Forensic Sci. Int.* 1993, 63: 175-184.
- 24) SEGURA, J. Possibilities of ELISA methodologies for hair analysis, in: R.A. de Zeeuw, I. Al Hosani, S. Al Munthiri and A. Maqbool (Eds.), *Hair Analysis in Forensic Toxicology*, Proc. Of the 1995 Int. Conf. and Workshop, Abu Dhabi, Nov. 19-23, 1995. pp 351-369.
- 25) SEGURA, J., STRAMESI, C., REDÓN, VENTURA, M., SANCHEZ, C. J., GONZÁLEZ, G., SAN, L., MONTAGNA, M. Immunological screening of drugs of abuse and gas-chromatographic-mass spectrometric confirmation of opiates and cocaine in hair. *J. Chromatogr. B* 1999, 724: 9-21.
- 26) PICHINI, S., ALTIERI, I., PELLEGRINI, M., PACIFICI, R., ZUCCARO, P. Analysis of opiates in human hair by high-performance liquid chromatography. *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.* 1999, 22: 873-884.
- 27) PÉPIN, G., GAILLARD, Y. Concordance between self-reported drug use and findings in hair about cocaine and heroin. *Forensic Sci. Int.* 1997, 84: 37-41.
- 28) GOLDBERGER, B.A., CAPLAN, Y.H., MAGUIRE, CONE, E.J. Testing human hair for drugs of abuse. III. Identification of heroin and 6-monoacetylmorphine as indicators of heroin use. *J. Anal. Toxicol.* 1991, 15: 226-231.
- 29) MOELLER, M. R., FEY, P., SACHS, H. Hair analysis for opiates in forensic cases. In *NIDA Research Monograph "Hair testing for drugs of abuse: International Research on Standards and Technology"* NIH Publication, 1995. 312-332 p.
- 30) PICHINI, S., PACIFICI, R., ALTIERI, I., PELLEGRINI, M., ZUCCARO, P. Determination of Opiates and Cocaine in Hair as Trimethylsilyl Derivatives Using Gas-Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* 1999, 23(5): 343-348.
- 31) KINTZ, P. Testing human hair for opiates and cocaine by gas chromatography/mass spectrometry after acid or enzyme hydrolysis. In *NIDA Research Monograph "Hair testing for drugs of abuse: International Research on Standards and Technology"* NIH Publication, 1995. 186-195 p.
- 32) HARKEY, M.R., HENDERSON, G.L., ZHOU, C.. Simultaneous quantitation of cocaine and its major metabolites in human hair by gas chromatography/chemical ionization mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* 1991, 15: 260-265.

- 33) HENDERSON, G. L., HARKEY, M.R., JONES, R.T.. Analysis of hair for cocaine. In *NIDA Research Monograph "Hair testing for drugs of abuse: International Research on Standards and Technology"* NIH Publication, 1995. p. 91-120.
- 34) UHL, M. Determination of drugs in hair using GC/MS/MS. *Forensic Sci. Int.* 1997, 84: 281-294.
- 35) KINTZ, P., CIRIMELE, V., MANGIN, R. Testing human hair for cannabis II. Identification of THC-COOH by GC-MS-NCI as a unique proof. *J. Forensic Sci.* 1995, 40: 619-622.
- 36) WILKINS, D., HAUGHEY, H., CONE, E.J., HUESTIS, M., FOLTZ, R., ROLLINS, D. Quantitative analysis of THC, 11-OH-THC, and THC-COOH in human hair by negative ion chemical-ionization mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* 1995, 19: 483-91.
- 37) RÖHRICH, J., KAURT, G. Determination of amphetamine and methylenedioxy-amphetamine-derivatives in hair. *Forensic Sci. Int.* 1997, 84: 179-188.
- 38) KIKURA, R., NAKAHARA, Y., MIECZKOWSKI, T., TAGLIARO, F. Hair analysis for drugs of abuse XV: Disposition of 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA) and its related compounds into rat hair and application to hair analysis for MDMA abuse *Forensic Sci. Int.* 1997, 84: 165-177.
- 39) KINTZ, P., GIROUD, G. Immunoassay responses of MBDB. *J. Anal. Toxicol.* 1997, 21: 589-590.
- 40) YEGLES, M., MERSCH, F., WENNIG, R. Detection of benzodiazepines and other psychotropic drugs in human hair by GC/MS. *Forensic Sci. Int.* 1997, 84: 211-218.
- 41) CIRIMELE, V., KINTZ, P., STAUB, C., MANGIN, P. Testing human hair for flunitrazepam and 7-amino-flunitrazepam by GC/MS-NCI. *Forensic Sci. Int.* 1997, 84: 189-200.
- 42) PICHINI, S., PACIFICI, R., ALTIERI, I., PASSA, A.R., ROSA, M., ZUCCARO, P. Analysis of nicotine and cotinine in human hair by high-performance liquid chromatography and comparative determination with radioimmunoassay. In *NIDA Research Monograph "Hair testing for drugs of abuse: International Research on Standards and Technology"* NIH Publication, 1995. p.212-224.
- 43) KLEIN, J., KOREON, G. Neonatal hair analysis: a tool for the assessment of in utero exposure to drugs. In *NIDA Research Monograph "Hair testing for drugs of abuse: International Research on Standards and Technology"* NIH Publication, 1995. p.347-361.
- 44) PICHINI, S., ALTIERI, I., PELLEGRINI, M., PACIFICI, R., ZUCCARO P. the analysis of nicotine in infants' hair for measuring exposure to environmental tobacco smoke. *Forensic Sci. Int.* 1997, 84: 253-258.
- 45) PRAGST, F., ROTHE, M., HUNGER, J., THOR, S. Structural and concentration effects on the deposition of tricyclic antidepressants in human hair. *Forensic Sci. Int.* 1997, 84: 225-236.
- 46) WILLIAMS, J., PATSALOS, P.N., WILSON, J.F. Hair analysis as a potential index of therapeutic compliance in the treatment of epilepsy. *Forensic Sci. Int.* 1997, 84: 113-122.
- 47) CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis Viewpoint and Discussion. *J. Chromatogr. B* 1997, 689: 175-180.

*Direttore dell'Istituto Superiore di Sanità
e Responsabile scientifico: Giuseppe Benagiano*

Direttore responsabile: Vilma Alberani

*Stampato dal Servizio per le attività editoriali
dell'Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena, 299 - 00161 ROMA*

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN
deve essere preventivamente autorizzata.*

Reg. Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Roma, dicembre 1999 (n. 4) 4° Suppl.

*La responsabilità dei dati scientifici e tecnici
pubblicati nei Rapporti e Congressi ISTISAN è dei singoli autori*