

Analisi tossicologica dei capelli: stato dell'arte e considerazioni operative

Federica Umani Ronchi

Dipartimento di Medicina Legale Università di Roma "La Sapienza"

ABSTRACT

Toxicological hair assay: state of the art and considerations. A review of the literature concerning toxicological hair assay has been performed, by carefully examining the contents of 48 reports published in the relevant national and international bibliography

INTRODUZIONE

L'utilizzo delle matrici cheratiniche come strumento per individuare l'uso pregresso di sostanze di abuso, è ormai una pratica utilizzata in tutti i laboratori di tossicologia forense; da molti anni, infatti, il ruolo del "drug testing" nella matrice cheratinica ha ottenuto consensi favorevoli da tutta la comunità scientifica.

Molta strada è stata fatta dal 1979, anno in cui Baumgartner descrisse per la prima volta la presenza degli oppiacei nei capelli con metodo immunochimico, da quel momento le pubblicazioni in questo ambito sono numerose e continue.¹

L'analisi del capello per la ricerca di farmaci e di sostanze di abuso permette di valutare l'uso pregresso nel tempo e di stimare il periodo di tale utilizzo in relazione alla lunghezza dei capelli. Questo tipo di metodica aumenta pertanto la finestra temporale rispetto alle consuete analisi sulle più classiche matrici biologiche.

Confrontando le concentrazioni urinarie con quelle rinvenute nei capelli e in altre matrici cheratiniche (peli pubici, peli ascellari, unghie), si è potuto verificare l'attendibilità della metodologia oltre ad evidenziare la positività di campioni che con il solo dato urinario sarebbero magari risultati negativi.²⁻⁵

Altri vantaggi risultati subito evidenti sono stati la non invasività del prelievo, ma anche una analisi comunque ripetibile; infatti le concentrazioni nello stesso campione, non mutano in maniera rilevante nel tempo; inoltre, per quel che riguarda la conservazione del campione, non sono necessarie speciali misure perché non c'è significativo deterioramento in vitro.

Dall'esame della letteratura risulta che ci sia uniformità di pensiero circa i problemi ancora esistenti e che riguardano essenzialmente la possibilità di contaminazione esterna, a cui solo in una certa misura si può ovviare con un accurato lavaggio, oltre ad eventuali trattamenti cosmetici, tipologia del capello (razza, colore) ma anche le modalità di incorporazione della droga.

L'analisi del capello e delle matrici cheratiniche in genere, è un fondamentale strumento in ambito forense per tutti quei casi in cui sia necessario escludere uno stato di tossicodipendenza o al contrario di dimostrarlo, fornendo dati analitici con valore medico-legale.⁶

La Society of Forensic Toxicologist (SOFT) e la Society of Hair Testing (SOHT, www.soht.org), aggiornano continuamente i loro contributi in materia, attuando programmi che coinvolgono vari gruppi di ricerca di diversi laboratori al fine di migliorare e rendere omogenee, le diverse metodologie⁷; importante è cercare di chiarire gli aspetti che riguardano l'interpretazione del dato delle analisi, ma anche tutti quei criteri che permettono di ottenere un risultato corretto e con valore medico legale.⁸⁻¹⁰

MECCANISMI DI ACCUMULO E FATTORI DI VARIABILITÀ

Le sostanze d'abuso si depositano nel capello in crescita, non diffondono passivamente all'interno di tale struttura in modo significativo, e non vengono ulteriormente metabolizzate dopo il deposito nella struttura cheratinica.

È infatti sperimentato che le droghe si possono rinvenire nei capelli già dopo pochi giorni dall'assunzione, e vi rimangono incorporate senza subire ulteriori processi metabolici. Considerando che il capello cresce all'incirca un centimetro al mese, se ne analizziamo una porzione di tre centimetri, possiamo risalire all'abuso di stupefacenti per circa 2-3 mesi antecedenti la raccolta e l'analisi del campione.

Il vantaggio, pertanto, come già accennato, rispetto agli abituali campioni di sangue e urina, è quello di avere la possibilità di risalire ad un intervallo di tempo maggiore rispetto al momento dell'esame.

Inoltre si possono effettuare analisi di porzioni di capelli (porzioni seriate) e poiché una volta che le

sostanze d'abuso sono incluse nella matrice cheratinica, non diffondono attraverso di essa, è quindi possibile osservare zone di positività ed altre contigue ove non sia presente lo stupefacente, tutto ciò, a dimostrazione del fatto che, il soggetto sottoposto a prelievo, ha alternato momenti di abuso di una certa sostanza a periodi di astinenza.

Pertanto con l'esame segmentale dei capelli oltre a stabilire l'uso o l'abuso progressivo nel tempo, può essere fatta una sorta di cronistoria delle sostanze stupefacenti assunte nell'arco di un determinato periodo.¹¹ L'analisi segmentale dei capelli ha permesso di dimostrare che, anche dopo astinenza di un anno da assunzione di cocaina (monitorata mediante analisi delle urine), è stato possibile ritrovare l'analita nella matrice cheratinica per i successivi 3 mesi dall'ultima assunzione, la concentrazione era però diminuita del 32% fino a scomparire nei mesi successivi¹². Inoltre questo esame segmentale dei capelli si è rivelato molto importante nei follow-up a lungo termine in quei pazienti dimessi dai Servizi di Tossicodipendenza o dalle comunità terapeutiche.

I meccanismi di incorporazione degli stupefacenti nei capelli già ampiamente descritti in letteratura possono essere riassunti in due modelli.^{13,14}

Una prima ipotesi riguarda l'incorporazione mediante il contatto con i capillari sanguigni a livello del bulbo pilifero durante l'istogenesi del capello, man mano che il capello cresce, queste regioni cheratinizzano intrappolando le sostanze, diventando quindi, inaccessibili all'ambiente esterno.¹⁵

Un altro modello suggerisce una minima incorporazione delle sostanze dal circolo sanguigno a regioni del bulbo pilifero durante la formazione del capello accanto ad una massima diffusione dalle secrezioni corporee (sudore, ghiandole sebacee), e quindi non esisterebbero zone inaccessibili all'ambiente esterno.

Fondamentale è la natura acida e basica degli xenobiotici, se infatti si ipotizza un meccanismo di tipo "scambio ionico", l'accumulo di sostanze basiche sarebbe favorito rispetto a quelle a comportamento acido.

Molto importanti sono i fattori di variabilità legati alla natura della matrice cheratinica che sicuramente contribuiscono all'accumulo delle varie sostanze nella stessa.

In primo luogo possiamo ricordare la deposizione passiva, infatti la deposizione e la successiva penetrazione di droghe provenienti dall'esterno attraverso fumo, polveri, aerosol, possono contaminare i capelli di persone che non fanno uso di sostanze stupefacenti e quindi creare falsi positivi. Un esempio evidente è l'interpretazione del dato per la cocaina negli Stati Uniti, in questo paese, infatti il crack viene fumato e la contaminazione esterna di soggetti non fumatori è risultata altamente probabile.¹⁵ Un altro esempio di contaminazione passiva può essere dovuto alla manipolazione di banconote inquinate perché utilizzate in larga misura per l'abitudine

di inalare cocaina in tal modo.

D'altronde anche studi recenti dimostrano una contaminazione esterna sia da cocaina che da eroina, contaminazione avvenuta facendo manipolare polvere delle diverse sostanze separatamente e poi passando le mani sui capelli. I risultati hanno dimostrato che la positività dei soggetti così contaminati perdura per diversi mesi e con elevate concentrazioni.^{16,17}

Inoltre la contaminazione passiva può avvenire anche nel laboratorio stesso qualora il prelievo e/o l'analisi dei capelli dovesse essere effettuato negli stessi ambienti in cui si eseguono analisi su materiale biologico o quelle su stupefacenti in sequestro.

Un altro fattore di notevole importanza è la razza e di conseguenza la pigmentazione del capello. Alcuni studi su soggetti di diversa etnia, hanno dimostrato una incorporazione di cocaina differenziale secondo una scala che vede al primo posto i capelli di asiatici seguiti da quelli di africani e di caucasici¹⁵. Uno studio più recente non ha invece evidenziato questa differenza di incorporazione.¹⁸

La melanina influisce su una maggiore incorporazione delle sostanze d'abuso nella matrice cheratinica, sembra infatti che abbia una notevole capacità nel fissare queste molecole. Sono state evidenziate differenze nell'accumulo di droga nei capelli di colore nero, castano o biondo, l'accumulo avviene in misura notevolmente maggiore in quelli di colore nero.¹⁹⁻²²

Non tutti però sono d'accordo sul ruolo della melanina, infatti una ricerca su di un campione molto ampio, ha dimostrato che il colore dei capelli non è un elemento significativo almeno per quel che riguarda la ricerca dei cannabinoidi.²³

Anche l'età è un fattore importante, infatti è stato osservato che alle diverse fasi della vita corrisponde un differente rapporto tra i vari stadi di crescita del capello, per esempio nei primi anni di vita ci sarebbe un maggior accumulo di sostanze dovuto ad un periodo di crescita del capello rallentato. Nell'età più avanzata, se si tiene conto del ruolo svolto dalla melanina, anche la presenza di capelli bianchi (cioè capelli privi di melanina) può andare ad incidere sul risultato finale e quindi sull'interpretazione del dato.²⁴

Conoscere come avviene il ciclo di crescita del capello è quindi fondamentale per comprendere l'accumulo delle varie sostanze in questa matrice.

Ogni capello ha, un proprio ciclo di crescita che può variare dai 4 ai 6 anni e consta di più stadi: un primo stadio anagen, fase attiva di crescita infatti l'attività mitotica delle cellule è molto frequente, questo periodo può durare dai 4 ai 6 anni e sembra che sia l'unico stadio in cui avverrebbe l'incorporazione dei farmaci.

Segue poi uno stadio detto catagen, di quiescenza o fase intermedia involutiva, dove l'attività mitotica diminuisce fino a scomparire. Questo periodo può durare alcu-

ne settimane. Ed infine un ultimo stadio, telogen di riposo.²⁵

Quindi i capelli hanno una crescita media irregolare, infatti, la porzione che viene utilizzata per l'analisi può trovarsi in stadi diversi di crescita, questo comporta delle limitazioni teoriche nel significato della presenza di uno xenobiotico in un certo punto del capello. Perciò sarebbe più corretto che, per escludere il consumo di una determinata sostanza nell'ultimo anno, venisse analizzata una sezione di capelli di 6 cm prossimali alla radice.²⁶

Inoltre, per lo stesso motivo, una concentrazione di pochi nanogrammi in una sezione di uno o pochi centimetri prossimale alla radice non è obbligatoriamente indicativa di una assunzione recente di una bassa dose, ma potrebbe essere dovuta invece ad una assunzione passata di una dose elevata ancora rintracciabile in una parte del capello fino ad allora all'interno del cuoio capelluto.

È necessario anche ricordare che hanno una notevole importanza nell'accumulo delle sostanze ma in una successiva fase di accrescimento, le secrezioni sebacee e sudoripare.

Certamente hanno un effetto sia sull'incorporazione che sulla loro stabilità anche le normali cure igieniche ed i trattamenti cosmetici (decolorazione, tintura o permanente). Per quel che concerne le cure igieniche, l'uso di shampoo alcalini può danneggiare il capello e quindi influire sull'incorporazione delle sostanze d'abuso.

I trattamenti cosmetici sono solitamente molto stressanti, si tratta infatti di basi forti che tendono a danneggiare e/o alterare la struttura del capello che, diventando maggiormente sfibrato, può consentire una più elevata possibilità di contaminazione esterna (falsi positivi) o un più importante rilascio delle sostanze accumulate nella matrice cheratinica durante le normali pratiche igieniche dando quindi luogo a falsi negativi.^{27,28}

Studi in tal senso hanno dimostrato che nei capelli trattati si ha una diminuzione anche consistente della concentrazione delle sostanze in essi accumulate, infatti per quel che riguarda il THC e la nicotina è stata dimostrata una perdita del 30%; per la cocaina, per il suo principale metabolita, per la codeina, per la 6-monoacetilmorfina e per il THC-COOH la riduzione può variare dal 40 al 60%; quando la sostanza ricercata è la morfina si arriva addirittura ad una perdita maggiore del 60%.

Pertanto quando le concentrazioni iniziali sono già di per sé basse nei capelli rovinati e sfibrati dai trattamenti, si rischia di arrivare al disotto del limite di sensibilità e quindi riferire risultati falsi negativi.²⁹

LE FASI DELL'ANALISI

L'analisi tossicologica dei capelli consta essenzialmente di tre fasi:

- raccolta e conservazione del campione;

- decontaminazione;
- estrazione degli analiti dalla matrice cheratinica a cui segue la valutazione e l'interpretazione del risultato analitico.

La raccolta del campione (dai 20 ai 100 mg di capelli) deve essere effettuata in un luogo non contaminato, da personale qualificato, deve essere tagliato il più vicino possibile alla radice preferibilmente nella zona nucale, con forbici pulite con una piccola quantità di alcool e ben asciutte.

È necessario identificare la porzione prossimale al cuoio capelluto e quella distale.

La quantità di campione può variare da un minimo di 50 mg ad un massimo di 200 mg da suddividere in più aliquote, inoltre, la lunghezza va sempre misurata.

La conservazione, al contrario dei liquidi biologici normalmente utilizzati, non ha necessità di particolari accorgimenti; il campione può essere infatti conservato in involucri di carta, plastica, alluminio o in provette di vetro; va riportato su di essi la data del prelievo e l'identificazione del campione, il reperto può essere conservato a temperatura ambiente. È necessaria la compilazione di una scheda con tutti i dati del soggetto incluse le abitudini igieniche e gli eventuali trattamenti cosmetici subiti.

DECONTAMINAZIONE

Per una corretta valutazione del risultato analitico finale, la fase di decontaminazione è una delle più importanti, abbiamo già riferito, infatti sulla possibilità di contaminazione esterna di vario tipo. Sarà quindi indispensabile al fine di una corretta interpretazione del risultato la distinzione fra contaminazione esterna e assunzione attiva di droga.

Durante la decontaminazione, il tempo di contatto con il campione non deve essere molto lungo, infatti è necessario sì eliminare le sostanze esogene che possono trovarsi sulla superficie del capello, ma bisogna fare attenzione a non cominciare ad estrarre la sostanza contenuta al suo interno (assunzione attiva); tale eventualità è possibile soprattutto in capelli molto rovinati o che comunque abbiano subito trattamenti cosmetici.

Varie sono le sostanze utilizzate per la decontaminazione e queste possono differenziarsi a seconda dell'analisi da ricercare.

Tali sostanze avranno quindi essenzialmente proprietà detergenti e tra queste distinguiamo: solventi (metanolo, cloruro di metilene, etanolo, acetone, etere etilico, etere di petrolio, isopropanolo), tensioattivi (sodio dodecil solfato -SDS- o tweens) o soluzioni acquose (tamponi, soluzioni di acidi diluiti o semplice acqua distillata).

I lavaggi possono essere più di uno ed è buona norma esaminare l'ultima soluzione di lavaggio ridotta di

volume (Society of Hair Testing) e, se negativa, procedere all'asciugatura del campione in stufa, con carta bibula, o sotto corrente di azoto.

Una volta asciutto, il campione va tagliato o con forbici ben pulite riducendo i capelli in segmenti di 1-2 mm; o polverizzato mediante mulino a palle che rende massima la superficie di penetrazione del solvente durante la successiva digestione.

In qualsiasi caso i capelli, dopo essere stati tagliati o polverizzati, vanno pesati e trasferiti in provette di vetro con tappo a vite della capacità di circa 10 ml pronti per la successiva digestione.

DIGESTIONE

L'estrazione degli analiti dalla matrice cheratinica, si può ottenere con varie metodiche che differiscono per il tipo di analita da ricercare, ma anche per il successivo metodo analitico strumentale che si utilizzerà; fondamentale è quindi ottenere una buona resa senza degradare chimicamente l'analita ricercato e i suoi metaboliti.^{30,31}

Distinguiamo tre diversi tipi di digestione:

- idrolisi chimica (acida o alcalina);
- digestione enzimatica;
- digestione con solventi.

Idrolisi chimica

Nell'idrolisi chimica vengono utilizzati sia acidi che basi.

L'acido utilizzato è solitamente l'acido cloridrico ad opportune concentrazioni variabili da 0,1 a 2 M.

Questo tipo di digestione non è indicata per la monacetilmorfina e l'eroina in quanto si verifica l'idrolisi parziale o completa a seconda del tempo di esposizione e della temperatura.

La cocaina può essere estratta con tale metodica se la diluizione dell'acido cloridrico si trova tra 0,1 e 0,5 e ad una temperatura compresa tra i 40 e 60°C.

Nel caso di digestione basica, viene utilizzato l'idrossido di sodio ad una molarità generalmente di 1M, in questo caso si ha una completa dissoluzione della matrice cheratinica che provoca però l'idrolisi sia di monoacetilmorfina, che di eroina e di cocaina.

Tale metodica può essere invece utilizzata per l'estrazione di altre sostanze quali cannabinoidi, benzodiazepine, nicotina e cotinina.

Dopo la digestione sia acida che basica gli analiti liberati dalla matrice, necessitano di un'ulteriore successiva estrazione.

Digestione enzimatica

Tale metodica è ampiamente utilizzata per l'estrazio-

ne delle droghe dalla matrice cheratinica. Si utilizzano soluzioni enzimatiche tamponate a pH ottimali per l'attività idrolitica dell'enzima, il campione viene incubato per una notte a temperature comprese tra i 25 e i 45°C.

Gli enzimi più comunemente utilizzati sono la β -glucuronidasi-arilsulfatasi e pronasi, talvolta anche in associazione con altre sostanze (ad esempio il ditiotreitolo) che ne facilitano il rilascio delle droghe dalle fibre cheratiniche.³²

I principali vantaggi sono l'alta resa e la possibilità di analizzare direttamente le soluzioni ottenute con metodo immunochimico, dopo semplice inattivazione termica dell'enzima. Nel caso di analisi in gas cromatografia è invece necessaria una successiva estrazione.

Digestione con solventi

L'estrazione degli analiti dalla matrice cheratinica può essere effettuata direttamente con dei solventi; quello di elezione è il metanolo che deve rimanere a contatto con i capelli per una notte a circa 60°C.

In questo caso non avviene la completa dissoluzione della matrice cheratinica, infatti il potere estraente dell'alcool metilico è ridotto rispetto alla digestione chimica ed enzimatica, i processi di idrolisi ed alterazione in vitro sono però completamente assenti.

Sia che la successiva analisi strumentale sia di tipo immunochimico che gascromatografico, la soluzione finale dell'estratto deve essere, nel primo caso, portata a secco e ripresa con tampone o acqua al fine di evitare la denaturazione degli anticorpi utilizzati in questo metodo di analisi.

Nel caso di analisi gascromatografica, l'estratto deve essere purificato per evitare di avere eccessive quantità di coeluenti che possono limitare il potere di risoluzione delle colonne cromatografiche.

Non sono comunque necessarie estrazioni successive degli analiti liberati dalla matrice cheratinica.

Ad eccezione della digestione con solventi (alcool metilico), i prodotti di questi processi vanno ulteriormente sottoposti ad metodiche di estrazione al fine di eliminare la presenza di analiti che possono interferire con l'analisi e con l'interpretazione del risultato finale.

Le tecniche applicate con maggior frequenza sono:

- estrazione liquido/liquido (LEE) mediante quindi solventi o miscele di solventi quali ad esempio toluene - alcol butilico, cloroformio - isopropanolo, cloruro di metilene - isopropanolo in diversi rapporti.
- Estrazione in fase solida (SPE) mediante colonnine riempite con fase stazionaria apolare (C18, Blond-Elut Certify, Isolute HC) o con fase adsorbente (Extrelut).
- Microestrazione in fase solida (SPME) per la ricerca di cocaina e coaetilene più semplice e veloce rispetto a metodi tradizionali,³³ ma anche per la

ricerca dei cannabinoidi, metadone e cocaetilene.³⁴ L'estratto organico contenente gli analiti viene evaporato a secco e derivatizzato per l'analisi cromatografica.

Tra le analisi strumentali distinguiamo test di screening e metodi di conferma.

ANALISI STRUMENTALI

Test di screening

Il test di screening dovrà essere altamente specifico e ad elevata cross reattività, infatti, naturalmente, la quantità di analita che può rinvenirsi nella matrice cheratinica è molto più bassa rispetto a quella presente negli altri fluidi biologici.

Metodi immunochimici già validati per sangue ed urine, sono stati adattati per lo screening per la matrice cheratinica, non esistono infatti in commercio test specifici per i capelli.³⁵⁻³⁷ Le metodiche che possono essere applicate a questo tipo di analisi sono radioimmunochemiche, immunoenzimatiche, ad immunofluorescenza o ad inibizione dell'agglutinazione con anticorpo policlonale o monoclonale.

Tuttavia pur non esistendo cut-off ufficiali per la definizione di un campione positivo o negativo per la presenza di una sostanza nella matrice cheratinica, la Society of Hair Testing (2004) ha proposto delle concentrazioni delle varie sostanze d'abuso al di sopra delle quali si producono risultati positivi. Per la morfina, la 6-acetilmorfina e le anfetamine tale concentrazione è di 0,2 ng/mg, per la cocaina di 0,5 ng/mg; e per i cannabinoidi 0,1 ng/mg.

Questi valori coincidono anche con quelli proposti dalla Substance Abuse and Mental Health Service Administration (SAMHSA).

Bisogna comunque ricordare che i test di screening sono da utilizzare essenzialmente per un risultato orientativo o come indicazione per la successiva analisi di conferma.

Negli ultimi anni sono state proposte metodiche di screening alternative ai test immunochimici.

Una riguarda l'utilizzo della LC-MS-MS mediante un interfaccia elettrospray. È risultato che tale metodica abbia un'alta sensibilità, oltre ad un semplice ed appropriato impiego per finalità di screening.³⁸

Inoltre nella più recente letteratura è stata sperimentata una microestrazione in fase solida con spazio di testa e gas cromatografia associata allo spettrometro di massa (HS-SPME-GC/MS), in questo studio preliminare è stata determinata la simultanea presenza di cocaina, e delle varie classi di anfetamina. Tale procedura è risultata essere rapida, di semplice utilizzo, non necessita di una eccessiva quantità di campione né di derivatizzazione.³⁹

Inoltre lo screening qualitativo può essere effettuato

anche direttamente in GC/MS dopo che il campione è estratto con metanolo e successivamente derivatizzato con MBTFA (per le anfetamine), e MTBSTFA per le rimanenti droghe d'abuso.⁴⁰

Analisi di conferma

La SOHT,⁸ raccomanda come analisi strumentale l'utilizzo della gascromatografia associata alla spettrometria di massa (GC/MS) o quanto altro abbia specificità e selettività uguali o maggiori.

Per questo tipo di analisi, l'estratto organico contenente gli analiti, deve essere evaporato a secco e derivatizzato al fine di aumentare la specificità e la sensibilità del metodo. Di fondamentale importanza è, quindi, la scelta del derivatizzante, generalmente vengono utilizzati i sililderivati e i pentafluoropropilderivati che permettono la valutazione dell'intero pattern dei vari metaboliti, migliorandone le caratteristiche cromatografiche.

Per gli oppiacei e la cocaina

- il-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamide con l'1% trimetilclorosilano, (BSTFA + 1% TMCS);
- il metil (trimetilsilil) trifluoroacetamide (MSTFA)
- la anidride pentafluoropropionica con aggiunta di alcool pentafluoropropionico (PFPA + PFPOH).

Per i cannabinoidi invece il derivatizzante maggiormente utilizzato è

- l' anidride pentafluoropropionica + 1,1,1,3,3,3, esafluoro, 2-propanolo (PFPA + HFIP).

Per la ricerca di amfetamine, metamfetamine e derivati sono consigliati:

- anidride trifluoroacetica (TFA)
- anidride pentafluoropropionica (PFPA) + acetato di etile
- anidride eptafluorobutirrica (HFBA) + acetato di etile;

per le benzodiazepine

- anidride eptafluorobutirrica (HFBA) + acetato di etile;

per gli antidepressivi triciclici

- anidride pentafluoropropionica (PFPA);

per la ricerca di nicotina, cotinina, e carbamazepina non è necessario derivatizzare.

La spettrometria di massa è condotta generalmente con la metodica dello standard interno e in selezione di ioni prodotti per impatto elettronico a 70 eV mentre, in alcuni casi, viene preferita la ionizzazione chimica con selezione di ioni positivi e negativi.

Viene utilizzata anche la cromatografia liquida sempre associata alla spettrometria di massa (LC/MS/MS)⁷, oltre all'applicazione della GC/MS/MS che produce ottimi risultati.⁴¹

Negli ultimi anni sono stati condotti numerosi studi che hanno permesso proposte strumentali alternative.

Con l'utilizzo della GC/IT/CI/MS dopo estrazione solida si ottengono buoni risultati e sembra che diminuiscono i falsi positivi.⁴² Una metodica che associa l'utilizzo di

spazio di testa e gas massa-massa (HS-SPDE-GC/MS/MS) dopo microestrazione in fase solida (SPME) è stata confrontata con la metodica tradizionale ed è risultata più semplice, sostanzialmente più veloce e con una sensibilità e riproducibilità sia per la tossicologia clinica che forense.⁴³

L'INTERPRETAZIONE DEL RISULTATO

Una adeguata risposta dell'indagine sulla matrice cheratinica per la ricerca di sostanze d'abuso, deve essere espressa in nanogrammi di sostanza ricercata per milligrammo di capelli, inoltre va riportata la lunghezza in centimetri del campione esaminato e la sua distanza dal cuoio capelluto.

Pur essendo ormai l'analisi del capello una metodica ampiamente diffusa ed utilizzata nei vari Laboratori di Tossicologia Forense, non esistono ancora dei valori di cut-off ufficiali. Sono state formulate delle proposte di interpretazione del risultato a cui è possibile attenersi e che riguardano il consumo di cocaina e oppiacei.

Al disotto di una concentrazione di 0,5 ng/mg di capelli per gli oppiacei e di 1 ng/mg di capelli per la cocaina sarebbe escluso il consumo. Inoltre, tali Autori, hanno anche suggerito e diversificato per queste due sostanze, il tipo di consumo basso, medio e alto.

Nel caso della cocaina, una concentrazione inferiore a 4,0 ng/mg di capelli, sarebbe indicatrice di un basso consumo di tale sostanza; un valore tra 4,0 e 20,0 ng/mg di capelli determinerebbe un consumo medio; e una concentrazione maggiore di 20 ng/mg orienterebbe per un consumo elevato.

Per quel che riguarda gli oppiacei invece i valori che testimoniano un basso consumo dovrebbero essere inferiori a 2 ng/mg di capelli; il consumo medio tra 2,0 e 10,0 ng/mg di capelli; ed infine un elevato consumatore di oppiacei dovrebbe avere una concentrazione di 6-monoacetilmorfina superiore a 10,0 mg/ng.⁴⁴

La SAMHSA in un documento disponibile solo su internet, ha proposto dei valori di cut-off per i test di conferma sui capelli; tali valori per gli oppiacei (morfina, 6-acetilmorfina e codeina) corrispondono a 200 pg/mg; per la cocaina 1000 pg/mg e per la benzoilecgonina 100 pg/mg, il rapporto Be/Coc deve essere maggiore o uguale a 0,1; il Δ -9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid viene considerato positivo al disopra di 1 pg/mg di capelli, mentre le anfetamine, al disopra di 300 pg/mg.⁴⁵

CONCLUSIONI

L'analisi dei capelli è senz'altro il mezzo più adeguato per verificare l'uso pregresso nel tempo di sostanze stupefacenti e farmaci; permette infatti di stabilire il periodo di tale utilizzo sulla base della lunghezza del campione rispetto al cuoio capelluto andando così a

creare una sorta di cronistoria.

Tale esame è anche infatti utilizzato per l'idoneità alla guida, per l'affidamento della custodia di minori, per il rilascio di porto d'armi, per responsabilità criminale, per morti correlate all'uso di farmaci e droghe, per controllare l'esposizione prenatale a farmaci e sostanze d'abuso, come valido follow-up a lungo termine in pazienti con terapie sostitutive e dimessi da SerT e comunità.

L'analisi dei capelli è una metodica molto delicata e difficoltosa con numerosi fattori di variabilità che possono andare ad invalidare il risultato finale. Questo molto spesso ha implicazioni in ambito forense e deve quindi rispondere a determinati requisiti di sensibilità, precisione ed accuratezza.

È necessario quindi che questo tipo di analisi sia effettuato in laboratori che abbiano maturato una specifica esperienza, che siano altamente qualificati e dove le metodiche siano validate, standardizzate, ed, inoltre, che si avvalgano di controlli di qualità sia interni (CQ) che esterni (VEQ), partecipando anche a programmi di valutazione della qualità.^{7,46}

L'importanza della matrice cheratinica come strumento che può fornire una finestra temporale molto più ampia rispetto alle matrici tradizionali (sangue e urina), ha spinto la ricerca a provare ad impiegare tale matrice per la determinazione di altre sostanze.

Recentemente, infatti, si sta studiando la possibilità di utilizzare la matrice cheratinica per determinare un consumo cronico di alcol a lungo termine, tra l'altro con risultati, seppur preliminari, decisamente incoraggianti.⁴⁷

Infine non va dimenticato l'utilizzo di altre matrici cheratiniche alternative che sono oggetto di numerosi studi e che dimostrano come, in assenza del capello, possano esserci valide alternative.^{2,5,48}

BIBLIOGRAFIA

1. Baumgartner AM, Jones PF, Baumgartner WA, Black CT. Radioimmunoassay of hair for determining opiate-abuse histories. *J Nucl Med.* 1979; 20: 748-52
2. Cellesi V, Bertol E, Di Milia MG, Meini M, Trignano C, Mari F. Analisi comparativa di capelli, peli ed unghie per la ricerca delle droghe d'abuso in soggetti afferenti ad un Ser.T. della Toscana. *Boll Farmacodip. Alcool.* 2004; XXVII (3-4): 31-36
3. Musshoff F, Driever F, Lachenmeier K, Lachenmeier DW, Banger M, Madea B. Results of hair analyses for drugs of abuse and comparison with self-reports and urine test. *Forensic Sci. Int.* 2006; 156: 118-123
4. Kinz P. Opiate concentrations in human head, axillary and pubic hair. *Journal of forensic sciences.* 1993; 38(3): 657-662
5. Offidani C, Strano Rossi S, Chiarotti M. Drugs distribution in the head, axillary and pubic hair of chronic addicts. *Forensic Sci Int.* 1997; 63:143-56
6. Huestis MA. Judicial acceptance of hair tests for substances of abuse in the US court: scientific, forensic and ethical aspects. *Ther Drug Monit.* 1996; 18: 456-59
7. Jurado C, Sachs H. Proficiency test for the analysis of hair for drugs of abuse, organized by the Society of Hair

8. Testing. *Forensic Sci Int.* 2003; 133(1-2):175-178
9. Society of hair Testing. Statement of the society of hair testing concernine the examination of drugs in human hair. *Forensic Sci Int.* 1997; 84 3-6
10. Society of hair Testing. Recommendations for hair testing in forensic cases. *Forensic Sci Int.* 2004; 145: 83-84
11. Bost RO. Consensus opinion summarizing the current applicability of hair analysis to testing for drugs of abuse. *SOFT ToxTalk.* 1990; 14
12. Strano-Rossi S, Bermejeo-Barrera A, Chiarotti M. Segmental hair analysis for cocaine and heroin abuse determination. *Forensic Sci Int.* 1995; 70(1-3): 211-6
13. Felli M, Martello S, Marsili R, Chiarotti M. Disappearance of cocaina from human hair after abstinence. *Forensic Sci Int.* 2005; 154: 96-98
14. Henderson GL. Mechanisms of drug incorporation into hair. *Forensic Sci. Int.* 1995; 70:39-51
15. Cone EJ. Mechanism of drug incorporation into hair. *Ther. Drug Monit.* 1996; 148:438-443
16. Kindwell DA, Balnck DL. Mechanisms of incorporation of drugs into hair and the interpretation of hair analysis data. In: *Hair testing for drugs of abuse. International research on standards and technology.* National institute on drug abuse, Rockville, MD. 1995; (NIDA Research Monograph, NIH Publication, no, 95-3727): 19-90
17. Romano G, Barbera N, Lombardo I. Hair testing for drugs of abuse: evaluation of external cocaine contamination and risk of false positives. *Forensic Sci Int.* 2001; 123(2-3): 119-29
18. Romano G, Barbera N, Spadaio G, Valenti V. Determination of drugs of abuse in hair: evaluation of external heroin contamination and risk of false positives. *Forensic Sci Int.* 2003; 131(2-3): 98-102
19. Kelly RC, Mieczkowski T, Sweeney SA, Bourland JA. Hair analysis for drugs of abuse. Hair color and race differential or systematic differences in drug preferences? *Forensic Sci Int.* 2000;107 (1-3): 63-86
20. Moeller MR. Hair analysis as evidence in forensic cases. *Forensic Sc Int.* 1993; 63: 43-53
21. Joseph RE, Su T, Cone E J. In vitro binding studies of drugs to hair: influence of melanin and lipids on cocaine binding to Caucasoid and africoid hair. *J Anal Toxicol.* 1996; 20: 338-344
22. Potsch L, Skopp G, Ripplin G. A comprehension of 3H-cocaine binding on melanin granules and human hair in vitro. *Int J Legal Med.* 1997; 110: 55-62
23. Slawson MH. The incorporation of drugs into hair: relationship of hair color and melanin concentration to phencyclidine incorporation. *J Anal Toxicol.* 1998; 22: 406-413
24. Mieczkowski T. Assessing the potential of a "color effect" for hair analysis of 11-nor-9-carboxy- delta(9)-tetrahydrocannabinol: analysis of a large sample of hair specimens. *Life Sci.* 2003; 74 (4): 463-469
25. Rothe M, Pragst F, Thor S, hunger J. Effect of pigmentation on the drug deposition in hair of grey-haired subjects. *Forensic Sci Int.* 1997; 84:53-60
26. Pichini s, Zuccaro P, Pellegrini M, Lopez A, Pacifici R. l'analisi dei farmaci e sostanze d'abuso nella matrice cheratinica. *Ann. Ist. Super. Sanità.* 2000; 36 (1): 17-27
27. Sachs H. Theoretical limits of the evaluation of drug concentrations in hair due to irregular hair growth. *Forensic Sci Int.* 1995; 70 (1-3): 53-61
28. Skopp G, Potsch L, Moeller MR. On cosmetically treated hair-aspects and pitfalls of interpretation. *Forensic Sci Int.* 1997; 84: 43-52
29. De Lauder SF, Kidwell DA. The incorporation of dyes in to hair as a model for drug binding. *Forensic Sci Int.* 2000; 107: 93-104
30. Jurado C, Kintz P, Menendez M, Repetto M. Influence of the cosmetic treatment of hair on drug testing. *Int. J Legal Med.* 1997; 110 (3): 159-63
31. Chiarotti M. Overview on extraction procedures. *Forensic Sci Int.* 1993; 63:161-170
32. Chiarotti M, Strano Rossi S. Preparation of hair samples for drug Analysis. *Forensic Sci Review.* 1996; 8 (2): 112-128
33. Offidani C, Strano Rossi S, chiaraetti M. Improved enzymatic hydrolysis of hair. *Forensic Sci Int.* 1993; 63: 171-174
34. Bermejo AM, Lòpez P, Alvarez I, Tabernero MJ, Fernandez P. Solid-phase microextraction for the determination of cocaina and cocaethylene in human by gas chromatography- mass spectrometry. *Forensic Sci Int.* 2006; 156: 2-8
35. Strano Rossi S, Chiarotti M. Solid-phase microextraction for cannabinoids analylis in hair and its possibile application to other drugs. *J Anal Toxicol.* 1999; 23 (1): 7-10
36. Cassani M, Spiehler V. Analytical requirements, perspectives and limits of immunological methods for drugs in hair. *Forensic Sci Int.* 1993; 63:175-184-
37. Segura J,Stramesi J, Redon, Ventura M, Sanchez CJ, Gonzales G, San L, Montagna M. Immunological screening of drugs of abuse and gascromatographic-mass spectrometric confirmation of opiates and cocaina in hair. *J Chromatogr. B* 1999; 724: 9-21
38. Spiehler V. Hair analysis by immunological methods from the beginning to 2000. *Forensic Sci Int.* 2000; 107 (1-3): 249-59
39. Kronstrand R, Nystrom I, Strandlberg J, Druid H. Screening for drugs of abuse in hair whit ion spray LC-MS-MS. *Forensic Sci Int.*2004; 145 (2-3): 183-90
40. Gentili S, Cornetta M, Macchia T. Rapid screening procedure based on headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry for the detection of many recreational drugs in hair. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2004; 801 (2): 289-96.
41. Paterson S, McLachlan-Troup N, Corsero R, Dohnal M, Barman S. Qualitative screening for drugs of abuse in hair using GC-MS. *J Anal Toxicol.* 2001; 25 (3): 203-208
42. Uhl M. Determination of drugs in hair using GC/MS/MS. *Forensic Sci Int* 1997; 84 (1-3): 281-94
43. Girod C, Staub C. Analysis of drugs of abuse in hair by automated solid-phase extraction, GC/EI/MS and GC ion trap/CI/MS. *Forensic Sci Int.* 2000; 107 (1-3): 261-71
44. Lachenmeier DW, Kroener L, Mousshoff F, Madea B. Application of tandem mass spectrometry whit gas chromatography and headspace solid-phase dynamic extraction for the determination of drugs of abuse in hair samples. *Rapid Commun Mass Spectrom;* 2003; 17(5): 472-478
45. Pépin G, Gaillard Y. Cocordance between self-reported drug use and findings in hair about cocaina and heroin. *Forensic Sci Int.* 1997 84: 37-41
46. WWW.workplace.samsha.gov
47. Pichini S, Ventura M, Pujadas M, Ventura R, Pellegrini M, Zuccaro P, Pacifici R, de la Torre R. Hairveq: an external quality control scheme for drugs of abuse analysis in hair. *Forensic Sci Int.* 2004; 145 (2-3): 109-15
48. De Giovanni N. Utilizzo della matrice cheratinica nella diagnosi di abuso alcolico. *Ann. Ist. Super. Sanità.* 2003; XXVI (4): 7-16
49. Palmeri A, Pichini S, pacifici R, Zuccaro P, Lopez A. Drugs in nails. *Clin pharmacokinet* 2000; 38(2): 95-110