

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN FARMACIA

Tesi di Laurea Sperimentale

Sviluppo di una nuova metodologia per la determinazione di corticosteroidi in matrici pilifere

RELATORE: Chiar.ma Prof.ssa Giorgia Miolo

CORRELATORE: Chiar.ma Prof.ssa Donata Favretto

LAUREANDA: Ambra Baloshi

MATRICOLA: 1128828

Anno Accademico 2021-2022

INDICE

<i>INTRODUZIONE</i>	8
1.1 ANATOMIA E FISIOLOGIA DEI PELI	10
1.1.1 CLASSIFICAZIONE DEI PELI	12
1.1.2 LA CRESCITA DEI CAPELLI	13
1.1.3 IL COLORE DEI CAPELLI	16
1.2 MECCANISMO DI INCORPORAZIONE DELLE SOSTANZE	17
1.2.1 INCORPORAZIONE DAL CIRCOLO SANGUIGNO, SEBO E SUDORE	19
1.2.2 INCORPORAZIONE DA CONTAMINANTI ESTERNI	20
1.2.3 CORRELAZIONE TRA DOSE E RISPOSTA	22
1.2.4 LEGAME DELLA MELANINA.....	23
1.3 PROTOCOLLO DI CAMPIONAMENTO	25
1.3.1 PROCEDURA DI CAMPIONAMENTO	27
1.3.2 CRIMINALITÀ DROGA-CORRELATA.....	29
1.3.3 INDAGINI POST-MORTEM.....	30
1.4 DETERMINAZIONE DI SOSTANZE ENDOGENE	32
1.4.1 DETERMINAZIONE DELLO STRESS CRONICO	32
1.4.2 STRESS E INFARTO ACUTO DEL MIOCARDIO	34
1.4.3 ANALISI DEL CORTISOLO NEI CAPELLI	35
1.4.4 FUTURE APPLICAZIONI CLINICHE DELL'ANALISI DEI CAPELLI.....	36
1.5 TECNICHE ANALITICHE	37
1.5.1 TECNICHE CROMATOGRAFICHE	37
1.5.2 SPETTROMETRIA DI MASSA.....	48
1.5.3 SISTEMA UHPLC-MS/MS XEVO TQ-S MICRO.....	57
1.5.4 SELETTIVITÀ	58
1.5.5 LIMITE DI RILEVABILITÀ E LIMITE DI QUANTIFICAZIONE	59
1.5.6 INTERVALLO DI MISURA	62
1.5.7 SENSIBILITÀ	63
1.5.8 ESATTEZZA	64
1.5.9 PRECISIONE	65
1.5.10 INCERTEZZA DI MISURA	67

1.5.11	ROBUSTEZZA.....	68
1.5.12	EFFETTO MATRICE, RECUPERO ED EFFICIENZA DEL PROCESSO	68
2	<u>SCOPO DELLA TESI.....</u>	72
3	<u>PARTE SPERIMENTALE</u>	74
3.1	MATERIALI E METODI	74
3.1.1	VETRERIA.....	74
3.1.2	PICCOLA STRUMENTAZIONE	74
3.1.3	STRUMENTAZIONE	75
3.1.4	REAGENTI, SOLVENTI E ANALITI	75
3.1.5	SOLUZIONI STANDARD E CALBRATORI.....	75
3.1.6	PREPARAZIONE DEI CAMPIONI	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
3.1.7	CROMATOGRAFIA LIQUIDA	81
3.1.8	SPETTROMETRIA DI MASSA.....	81
3.2	CURVA DI CALIBRAZIONE DEL CORTISOLO	83
3.3	PARAMETRI DI VALIDAZIONE DEL METODO	84
3.3.1	SELETTIVITÀ	84
3.3.2	LOD E LOQ	84
	85
3.3.3	PRECISIONE, EFFETTO MATRICE E RECUPERO	85
4.	<u>RISULTATI</u>	86
4.1	LINEARITÀ, LOD E LOQ.....	88
4.2	RECUPERO ED EFFETTO MATRICE.....	89
4.3	PRECISIONE ED ACCURATEZZA	90
5.	<u>BIBLIOGRAFIA.....</u>	93

dedica

Alla mia famiglia

INTRODUZIONE

Il principale vantaggio del capello come matrice nelle analisi tossicologiche è la sua capacità di fornire dettagli storici sull'esposizione di un individuo a farmaci e sostanze in seguito ad uso cronico delle stesse. Inoltre, è possibile rilevare sostanze nel capello anche dopo una singola esposizione ¹. A differenza di quanto avviene con molti campioni biologici tradizionali raccolti per indagini tossicologiche, quali sangue, urina o liquido orale, i farmaci incorporati nella matrice del capello rimangono relativamente stabili per molti mesi o addirittura anni. In virtù di questi vantaggi, i campioni di capelli vengono regolarmente raccolti e analizzati nell'ambito di indagini penali (quali decessi correlati alla droga, reati facilitati dalla droga (DFC), protezione dei minori) e per il monitoraggio dell'abuso di droghe (programmi di riabilitazione della droga, test d'abuso di droga sul posto di lavoro) ².

Il limite di tale metodo è dovuto alla sensibilità e alla precisione del rilevamento della concentrazione dei farmaci e delle sostanze. Entrambi gli svantaggi fanno riferimento ad una mancanza di conoscenza dei fattori che influenzano la presenza di sostanze nei capelli, alla differente modalità di incorporazione di queste ultime (circolo sanguigno, sebo, sudore o incorporazione da contaminanti esterni) e alla degradazione dei farmaci presenti nel capello stesso con il passare del tempo.

Sebbene i ricercatori abbiano riportato di avere trovato arsenico nei capelli dell'imperatore Napoleone Bonaparte ³ e cocaina nei capelli delle mummie peruviane ⁴, secoli dopo la loro morte, è noto che le

concentrazioni di droga nei capelli diminuiscono nel tempo a causa del naturale dilavamento ⁵. La stabilità dei farmaci nei capelli dipende sia dalla loro morfologia che dalle proprietà chimico-fisiche ⁶. Quotidianamente i capelli sono soggetti all'esposizione alla luce solare e ad agenti atmosferici che hanno dimostrato di ridurre le concentrazioni di varie sostanze, quali cannabinoidi ⁷, metadone, cocaina, eroina e loro metaboliti ⁸. Inoltre, la contaminazione esterna e la diminuzione di concentrazione di farmaci dai capelli, è facilitata dalla diffusione, di questi ultimi, in presenza di acqua ⁹. Nonostante lo shampoo quotidiano non influisca in modo significativo sulle concentrazioni di farmaci, altresì asciugare, arricciare o lisciare i capelli con il calore può danneggiare o distruggere la cuticola fornendo percorsi per la contaminazione e la perdita delle sostanze incorporate. Ulteriori danni sono evidenti quando i capelli vengono sottoposti a trattamenti cosmetici più aggressivi ¹⁰. Gli studi riportati in letteratura sono vari, sia rispetto ai farmaci che ai trattamenti cosmetici studiati, e sono tutti concordi nel constatare che tinture, permanenti, rilassanti e decoloranti possiedono un effetto deleterio sulla concentrazione di farmaco rilevata nei capelli. Le diminuzioni delle concentrazioni di farmaci sono più evidenti per i capelli decolorati rispetto a quelli tinti. I capelli danneggiati mostrano, invece, concentrazioni significativamente più basse.

Per comprendere e interpretare appieno i risultati dei test sui capelli, è essenziale che il Tossicologo Forense abbia una panoramica di quali fattori influenzano l'incorporazione di farmaci nel fusto del capello, inclusa la contaminazione esterna, ma deve soprattutto considerare i fattori che influenzano la perdita del farmaco incorporato.

1.1 Anatomia e fisiologia dei peli

I peli coprono la maggior parte della superficie corporea dell'uomo, ad eccezione delle labbra, palmi delle mani, la suola dei piedi e alcune parti dei genitali esterni ¹¹. I peli hanno lo scopo di proteggere la pelle da lesioni e di regolare la temperatura corporea. Il loro aspetto varia da peli fini quasi incolori, che si trovano sulla maggior parte della superficie corporea, a peli più spessi e più lunghi sul cuoio capelluto.

Il fusto del pelo, visibile sopra la superficie della pelle,

è costituito da cellule completamente cheratinizzate e strettamente impacchettate con la cuticola, formando uno strato protettivo esterno ¹². La cuticola è suscettibile ai danni da una serie di fonti, tra cui esposizione alla luce o al calore; trattamenti chimici, tra cui sbiancamento, permanente e danni fisici. Di conseguenza, nel tempo, la superficie del pelo può essere compromessa, esponendo gli strati

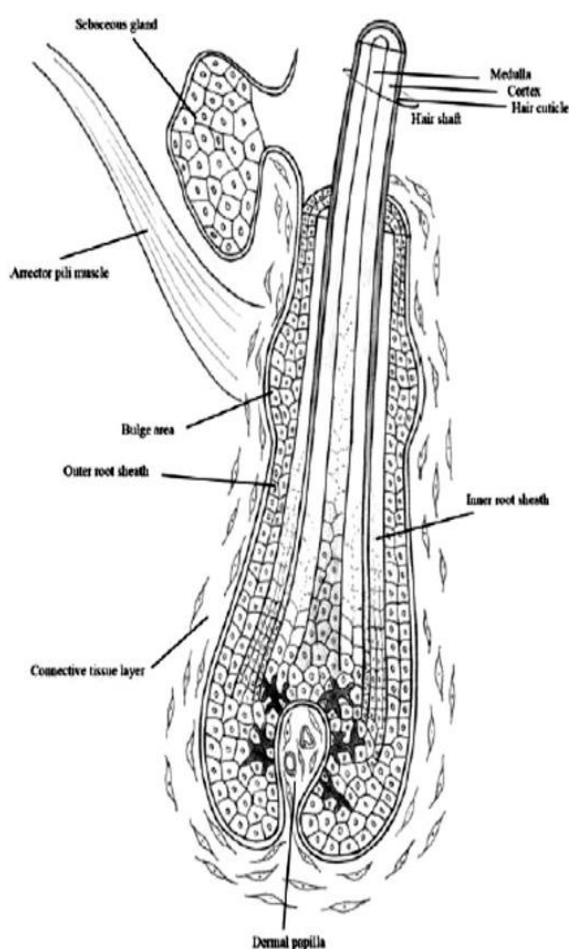


Figura 1: Struttura del follicolo pilifero

interni: questo è particolarmente evidente nelle estremità distali del pelo.

La struttura interna del fusto del pelo contiene cellule corticali che costituiscono la corteccia. Quest'ultima racchiude la maggior parte del fusto e contiene anche cellule della cuticola dove si trova la melanina, il pigmento principale nei peli. La regione più interna del pelo, il midollo, può essere continua lungo la lunghezza dell'asta, discontinua o completamente assente. Il follicolo pilifero è incorporato 3-4 mm sotto la superficie della pelle ed è la struttura responsabile della crescita dei peli. La struttura del follicolo pilifero è illustrata nella figura 1.

Le strutture principali del follicolo pilifero includono la guaina della radice esterna, *Outer Root Sheath*, (ORS), la guaina della radice interna, *Inner Root Sheath*, (IRS), e il bulbo della radice. L'ORS forma un'area rigonfia alla base del muscolo erettore del pelo, vicino alla ghiandola sebacea, e si ritiene sia la fonte di cellule staminali fondamentali per lo sviluppo e la pigmentazione del follicolo pilifero ¹³.

L'IRS, invece, fornisce supporto per la crescita dei peli producendo materiale di legame intracellulare e dirigendo il fusto in crescita verso l'alto ¹⁴. Le cellule situate all'interno della regione inferiore del bulbo radicale, la matrice, sono mitoticamente attive, mentre la sezione superiore del bulbo radicale contiene la regione cheratogena. Alla base del bulbo radicale si trova la papilla dermica che contiene l'afflusso di sangue. L'IRS si degrada man mano che i capelli in crescita si disidratano: così si verifica la cheratinizzazione.

Vicino al follicolo pilifero vi sono le ghiandole sebacee e apocrine che secernono entrambe direttamente nel follicolo. Le ghiandole apocrine, a differenza delle ghiandole sebacee, non sono presenti su tutta la

superficie del corpo ma sono localizzate nelle regioni ascellari e pubiche. Le ghiandole sudoripare eccrine si trovano vicino al follicolo ma secernono in prossimità del follicolo pilifero, quindi non direttamente in esso.

1.1.1 Classificazione dei peli

I tre tipi fondamentali di peli sul corpo umano sono classificati come vellus, intermedi e terminali. I peli di vellus coprono la maggior parte della superficie corporea di bambini e adulti, sono fini, corti e non pigmentati. Li troviamo anche su palpebre e sulla fronte. Laddove i peli di vellus sono prodotti da follicoli piliferi non sessuali e non influenzati dagli ormoni, i peli intermedi e terminali sono influenzati dagli ormoni e dai cambiamenti durante la pubertà. I peli terminali si trovano sul cuoio capelluto, sulla barba, sulle sopracciglia, sulle ciglia, sulle ascelle, sulle aree pubiche e, contrariamente ai peli di vellus, sono grossolani, lunghi e pigmentati con un'ampia area trasversale. I peli intermedi hanno caratteristiche sia dei vellus che dei peli terminali e si trovano sulle braccia e sulle gambe degli adulti.

I capelli vengono anche classificati in base all'etnia in africani, asiatici o europei. Un altro sistema di classificazione propone otto differenti sottogruppi, basati sul fatto che i capelli siano ricci, lisci, mossi etc. questa classificazione fornisce un approccio più oggettivo rispetto a un approccio soggettivo basato sull'etnia ¹⁵. Il sistema di classificazione prevede la misurazione di tre parametri: il diametro della curva, l'indice di curvatura e il numero di onde.

1.1.2 La crescita dei capelli

Sono numerosi i fattori che possono influire sulla crescita dei capelli: età, stadio dello sviluppo, genere, gravidanza, metabolismo e disordini genetici, nutrizione e cambiamenti stagionali ^{16,17}. La crescita dei capelli è un processo ciclico, guidato dai cambiamenti d'attività delle citochine (ormonali) in ogni soggetto e in ogni stadio della crescita ¹⁸. I tre stadi di crescita dei capelli riconosciuti sono: Anagen, Catagen e Telogen. La fase Anagen, o “stadio di crescita”, può durare molti anni ed è caratterizzata dalla formazione del fusto del pelo che sporge sulla superficie della pelle. È stimato che l'85% dei peli siano in questa fase. La fase Catagen, o “di transizione”, segue questo periodo di crescita attiva. Durante essa la divisione cellulare si arresta, il fusto diventa completamente cheratinizzato, il bulbo inizia a degenerare e la lunghezza varia in base al tipo di pelo. La fase Telogen, o “fase di riposo”, rappresenta la conclusione del ciclo di crescita del pelo: non c'è crescita ma la papilla dermica rimane nella fase di riposo. E' stimato che il 10-15% di tutti i peli sia in fase Telogen in un dato momento. I peli vengono facilmente rimossi durante questa fase e spesso sono definiti “caduti”. Poco tempo dopo riprende la fase di crescita stimolando le cellule staminali dell'area di rigonfiamento ORS ¹⁹. La Society of Hair Testing (SoHT) raccomanda di utilizzare 1cm/mese come tasso di crescita medio dei capelli ²⁰. La variazione nei tassi di crescita riportata per i capelli del cuoio capelluto è considerevole, ed è ulteriormente aggravata dalla variabilità di sviluppo per le diverse tipologie di peli come riportato nella seguente tabella ^{21,22}.

Hair Type	Mean/Range
Head	0.60–3.36
	0.75–1.35
	1.05
	0.6–1.5
	0.84–1.41
	1.1 (0.6–1.5)
Pubic	0.60–0.90
	0.75 (0.6–0.9)
Axillary	0.87–1.00
	0.9
	0.9 (0.87–1.0)
Beard	0.75–0.87
	1.2
	0.75–0.81
Body	0.30
Chest	0.66–0.96
Arm hair	1.05
Leg hair	0.81
	1.0 (0.81–1.05)
	0.9
	0.63
	0.6 (0.39–0.75)
	0.6

Tabella 1: Tassi di crescita medi dei peli

Come campione d'analisi è preferito il capello poiché ha il maggiore fattore di crescita e la più alta percentuale di follicoli in fase Anagen. In confronto, il pelo pubico ha una crescita molto lenta e una fase di riposo più lunga; mentre i peli della barba sono più spessi e possiedono la più lenta velocità di crescita. Quando vien effettuata un'analisi di campioni piliferi non provenienti dalla testa, è importante tenere in considerazione non solo le varie velocità di crescita, ma anche la variazione nella proporzione

di capelli in crescita attiva o in fase di riposo ²³. Se i capelli non sono disponibili, i peli pubici sono considerati una buona alternativa, però con delle aggiuntive considerazioni da fare sulla possibile contaminazione con le urine.

La maggior parte dei tassi di crescita per i capelli del cuoio capelluto varia da 0.6 a 1.5 cm ogni mese, supportando un tasso di crescita medio

di 1cm/mese. Tuttavia, è una semplificazione eccessiva, in quanto è stato riportato un tasso di crescita fino a 3.36 cm/mese ²⁴. Questi valori riguardano unicamente la velocità di crescita dei capelli negli adulti. Vi è una mancanza significativa di informazioni relative alla variazione dei tassi di crescita per bambini più piccoli o per gli adolescenti. I tassi di crescita nei bambini sono stati riportati in un piccolo studio pubblicato nel 1964 ²⁵ con 13 femmine e 7 maschi, la cui età variava da 3 a 9 anni. I tassi di crescita dei capelli erano più veloci per i maschi in tutte le regioni del cuoio capelluto e il range di crescita arrivava da 0.300 a 0.355 mm/giorno per i maschi e da 0.273 a 0.331 mm/giorno per le femmine.

È noto che nella prima infanzia molti bambini nascono con una chioma folta, mentre altri hanno pochi o nessun capello per molti mesi. I nati con capelli possono perderne alcuni o tutti nel primo anno di vita. Barth ²⁶ ha descritto come la comparsa di peli sul corpo fetale compaia a 9 settimane, divenendo follicoli piliferi in crescita attiva con radici che coprono la superficie del cuoio capelluto a 20 settimane di gestazione. I follicoli piliferi passano dalla fase anagen alla fase catagen durante il periodo di gestazione dalla 26° alla 28° settimana e poi alla fase telogen in quella che viene descritta come un'onda progressiva dalla regione frontale a quella parietale del cuoio capelluto. Molti dei capelli telogen vengono persi in utero, mentre altri capelli continuano a crescere fino alla nascita, prima di entrare anch'essi in fase telogen.

Quando si interpretano i tempi di crescita di un campione, è sempre necessario tenere in considerazione non solo la variazione dei tassi di allungamento riconosciuti, ma anche la velocità di crescita dovuta all'età del soggetto. Inoltre, poiché è stato stimato che occorrono circa

7-10 giorni affinché i capelli in crescita raggiungano la superficie del cuoio capelluto, i capelli tagliati dal cuoio capelluto non rappresentano il periodo più recente di crescita di questi ultimi.

1.1.3 Il colore dei capelli

La pigmentazione all'interno del fusto del capello rappresenta appena lo 0.1-5% della massa del capello, con proteine e lipidi che rappresentano rispettivamente il 65-95 % e 1-9% ²⁷. Le differenze nel colore dei capelli sono una conseguenza della variazione del tipo e della quantità di melanina presente. La melanogenesi follicolare, o la formazione di pigmenti, avviene all'interno di organelli chiamati melanosomi che sono presenti all'interno di cellule specializzate chiamate melanociti ²⁸. Questo processo avviene esclusivamente all'interno del follicolo pilifero ed è regolato da enzimi, recettori e proteine durante la fase anagen della crescita attiva dei capelli ²⁹. Si pensa che quattro tipi di melanina determinino il colore dei capelli: eumelanina, feomelanina e i loro prodotti ossidativi, ossieumelanina e ossifeomelanina ³⁰. Generalmente nei capelli scuri (neri e castani) c'è predominanza di eumelanina; nei capelli più chiari abbiamo incremento della ossieumelanina. Feomelanina si trova nei capelli rossi, mentre nelle varianti più chiare del rosso c'è un aumento della forma ossidata.

1.2 Meccanismo di incorporazione delle sostanze

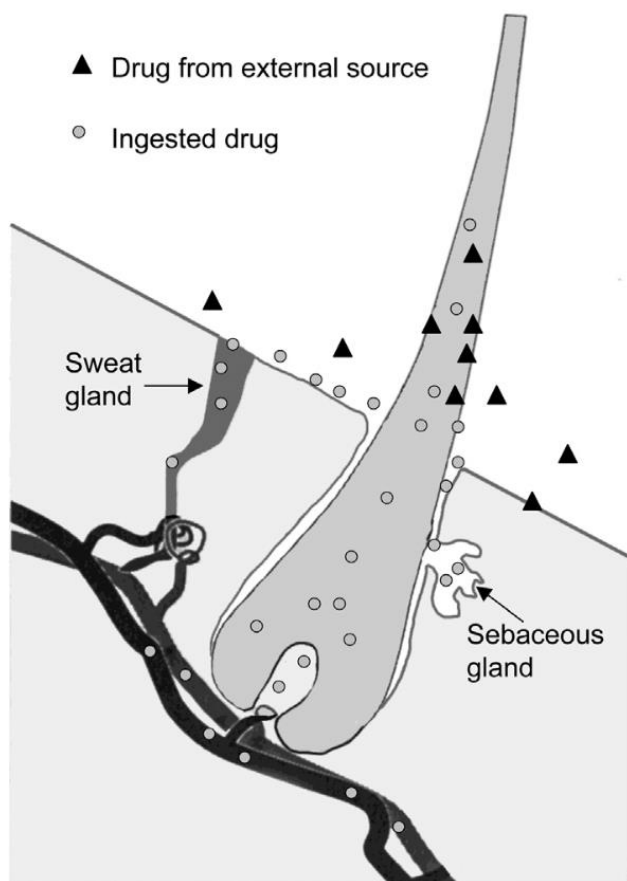


Figura 2: vie di incorporazione delle sostanze nei capelli

L'esatto meccanismo con cui le sostanze e gli analiti di interesse vengono incorporati nel capello, e i fattori che influenzano la loro stabilità, non sono del tutto chiari. Si crede che le sostanze, e le tracce di questi elementi circolanti nel sangue, vengano incorporate nel capello durante periodi di incremento dell'attività metabolica e della divisione cellulare, sinonimo della fase anagen, "stadio di crescita"³¹. Tuttavia,

sono riconosciuti tre meccanismi di incorporazione delle sostanze nel capello, inclusa l'incorporazione diretta dal torrente circolatorio, dal sebo, dal sudore (che bagna i capelli) e dai contaminanti esogeni. (In figura sono illustrati questi tre meccanismi di incorporazione nel capello.) La misura in cui ciascuna di queste vie contribuisce all'incorporazione del farmaco non è chiara, o addirittura in che misura

ciascuna di esse la influenzano, ma ciò che risulta chiaro è la differenza da sostanza a sostanza ³².

Ci sono diversi modelli di incorporazione proposti che tentano di spiegare i profili farmacologici osservati nei capelli. Il modello più semplicistico prevede la **diffusione passiva** di sostanze o farmaci direttamente dal sangue che irrorava il follicolo pilifero. Con la diffusione passiva ci si aspetterebbe che la concentrazione della sostanza nel capello sia correlata alla concentrazione nel sangue al momento della sintesi dei capelli ^{33,34}.

Questo modello non spiega però i diversi profili metabolici osservati nei capelli e nel sangue. Nel sangue sono perlopiù rilevabili i metaboliti dei farmaci o delle sostanze, mentre nel capello è più comune la presenza del *farmaco, o sostanza, originale*. Ad esempio: cocaina e 6-monoacetilmorfina (6-MAM), il metabolita primario dell'eroina, si trovano generalmente in concentrazioni più elevate nei capelli rispetto ai loro metaboliti, rispettivamente benzoilecgonina e morfina.

Il “concetto biochimico” è stato proposto per spiegare l'incorporazione endogena di molecole di farmaci o sostanze nei capelli in crescita ³⁵. Questo concetto spiega provvisoriamente l'alto rapporto tra farmaco progenitore e metabolita nei capelli, la dipendenza dell'incorporazione dalle proprietà fisico-chimiche del farmaco, l'incorporazione di farmaci nei capelli non pigmentati e la dipendenza del contenuto del farmaco dalla pigmentazione dei capelli. I capelli hanno diverse affinità e capacità di legame per diversi farmaci con meccanismi di legame unici per ciascuna molecola ³⁶. Il pKa del farmaco, la struttura, le dimensioni, la lipofilia, la capacità di legame alle proteine e l'affinità alla melanina sono i fattori noti per influenzare l'incorporazione e il legame dei

farmaci ³⁶. I farmaci basici, come le amfetamine e cocaina, si incorporano in misura maggiore rispetto ai farmaci neutri o acidi e di conseguenza sono presenti in concentrazioni più elevate nei capelli rispetto alle benzodiazepine e ai cannabinoidi.

1.2.1 Incorporazione dal circolo sanguigno, sebo e sudore

La solubilità lipidica di un farmaco è un fattore critico nel determinare la velocità di trasporto dal flusso sanguigno, alla membrana cellulare e infine al bulbo radicale in crescita. Il gradiente di pH dal plasma, pH 7.3, a condizioni più acide all'interno dei melanociti/cheratinociti (pH 3-6), fornisce condizioni vantaggiose per i farmaci di carattere basico da incorporare preferenzialmente ai farmaci acidi. Questo è stato chiaramente dimostrato utilizzando composti strutturalmente correlati, rodamina (catione) e fluoresceina (anione), somministrati per via intraperitoneale risultando poi in bande fluorescenti distinte di rodamina, corrispondenti a ciascuna dose giornaliera ³⁷. Anche la fluoresceina è stata identificata nella matrice cellulare durante la sua formazione, ma non è stata rilevata nel capello cheratinizzato. Vanno considerate anche altre vie per aiutare a spiegare il profilo farmacologico osservato nei capelli. Sono stati identificati farmaci sia nel sudore che nel sebo e, poiché entrambe queste secrezioni bagnano il follicolo e il fusto del capello mentre crescono, ci sarà un contributo ai farmaci incorporati nei capelli ^{38,39}.

Sono state riportate prove a sostegno del ruolo dell'incorporazione nel sudore dell'etilglucuronide (EtG) nei capelli in seguito al rilevamento di EtG nei peli della barba 9 ore dopo una singola dose di alcol (etanolo). Tuttavia, la via predominante rimane l'incorporazione dal flusso sanguigno direttamente nel bulbo radicale ⁴⁰. Le concentrazioni di EtG sono aumentate fino a un massimo di 72-242 pg/mg entro 2-4 giorni dopo la dose e sono diminuite gradualmente al di sotto del limite di quantificazione entro il giorno 8-10, man mano che il bulbo della radice cresceva ed emergeva dalla superficie della pelle.

1.2.2 Incorporazione da contaminanti esterni

Merita di essere considerata anche la contaminazione da droghe provenienti dall'ambiente, inclusa l'esposizione passiva dalla vicinanza a persone che fumano droghe (ad es. eroina, crack, cocaina, cannabis), attraverso la manipolazione diretta delle droghe e quindi toccando i capelli propri o di qualcun altro. In particolare, i bambini, e in misura maggiore i neonati, sono ad alto rischio di esposizione se vivono in una famiglia in cui è prevalente l'abuso di droghe ^{41,42,43}. Si dovrebbe anche prendere in considerazione il feto che sarà esposto a farmaci o sostanze se la madre continua ad abusarne durante la gravidanza ^{44,45,46}.

La contaminazione esterna e il ruolo che essa svolge nell'incorporazione dei farmaci è stata ampiamente studiata dai ricercatori, con la sfida di ricercare scenari di contaminazione realistici. È bene considerare la condizione del campione di capelli, che può

essere danneggiato dall'usura naturale o dal trattamento chimico, ed influenzeranno l'incorporazione di farmaci da contaminazione esterna. Gli studi hanno dimostrato una contaminazione significativa dei capelli esposti a fumo contenente cannabis ⁴⁷, sangue contenente cocaina ⁴⁸ e metaboliti dell'eroina ⁴⁹ e dall'applicazione diretta di cocaina sui capelli ⁵⁰.

Va considerata anche la contaminazione specifica del sito, compreso il potenziale per le secrezioni di urina e ghiandole che contaminano i peli pubici e pezzi di epidermide che contaminano i peli della barba quando raccolti con la rasatura. Secondo alcuni studi le concentrazioni di EtG misurate in diversi tipi di campione di capelli variano significativamente e sollevano preoccupazione sull'uso di campioni di peli pubici o ascellari come campioni alternativi ai capelli della testa nella valutazione dell'uso cronico di alcol a causa di pregiudizi positivi e negativi, rispettivamente ⁵¹.

Il SoHT fornisce linee guida per il lavaggio di rimozione della contaminazione grossolana dalla superficie dei capelli; tuttavia, la rimozione selettiva dei farmaci sulla superficie, preservando i farmaci incorporati nella matrice del capello, è un risultato improbabile quando si utilizzano sia solventi organici che soluzioni acquose. In uno studio effettuato, la decontaminazione completa non è stata ottenuta dai laboratori partecipanti a cui sono stati inviati campioni di capelli privi di droga contaminati da cocaina. Tutti i laboratori hanno utilizzato diversi protocolli di lavaggio ma nessuno di loro è stato in grado di decontaminare i capelli ⁵².

Sono state suggerite delle proposte per discriminare tra contaminazione e incorporazione ⁵³, e possono fornire sufficiente fiducia in futuro per

essere accettati come un approccio standardizzato, ma fino a quel momento, il ruolo potenziale della contaminazione esterna deve essere sempre considerato quando si interpretano i capelli positivi ai test.

1.2.3 Correlazione tra dose e risposta

Sebbene studi a dosaggio controllato, sia su animali che su esseri umani, abbiano supportato una relazione lineare tra la dose e le concentrazioni di sostanze/farmaci presenti nei capelli per alcune tipologie di esse ^{54,55,56}, la stragrande maggioranza degli studi ha dimostrato che non esiste una relazione lineare ^{57,58,59,60}. Ciò è dovuta alla variazione intersoggetto con una serie di fattori mutevoli, tra cui il colore dei capelli e i trattamenti cosmetici particolarmente aggressivi.

A seguito di regimi controllati, a basso e alto dosaggio di metanfetamina, è stata osservata una buona correlazione intra-individuale con le concentrazioni di metanfetamina e anfetamina misurate nei capelli ⁶¹.

In questo studio è stata riportata anche un'ampia variazione interindividuale. Tuttavia, una volta effettuate le correzioni dovute al contenuto di melanina, ha dimostrato una buona correlazione, supportando una relazione lineare dose-correlata per l'incorporazione di metanfetamina, il suo metabolita anfetamina e le concentrazioni risultanti misurate nei capelli.

In ogni caso le condizioni controllate non sono rappresentative dell'esposizione nella vita reale e deve essere considerato anche il ruolo

della contaminazione. È stato riportato che i bambini esposti alla metanfetamina, avevano concentrazioni di metanfetamina/anfetamina nei capelli di entità simile a quella misurata negli adulti che abusavano di metanfetamina ^{62,63}

1.2.4 Legame della Melanina

Numerosi studi scientifici si sono occupati dell'incorporazione di diversi farmaci nei capelli che coinvolgono modelli animali, fornendo informazioni utili sul ruolo della melanina ^{64,65,66,67}.

I capelli più scuri contengono una maggiore pigmentazione (melanina) rispetto a capelli di colore chiaro; perciò, agli animali con capelli sia pigmentati che non pigmentati sono stati somministrati farmaci di diversa basicità. I risultati hanno supportato una maggiore affinità di legame dei farmaci basici con la melanina, poiché erano presenti in concentrazioni più elevate nei capelli pigmentati. I farmaci neutri e acidi non hanno dimostrato una maggiore affinità con i capelli pigmentati o non pigmentati.

È importante ricordare, quando si mettono in relazione questi risultati, che i capelli umani e animali differiscono per quanto riguarda i cicli di crescita e la struttura, le quali possono comportare una diversa distribuzione del farmaco.

Sono stati riportati diversi profili di variabilità nell'incorporazione degli esteri etilici degli acidi grassi nei capelli di ratto rispetto ai capelli umani ⁶⁸; questo è stato osservato anche per farmaci utilizzati per il trattamento della disfunzione erettile e i loro metaboliti ⁶⁹. Il sildenafil

e il suo metabolita principale, desmetil sildenafil, sono stati rilevati in peli di ratto pigmentati e non pigmentati e in due campioni di capelli umani raccolti da individui sospettati di utilizzare forniture illegali di sildenafil. Le concentrazioni nei capelli pigmentati erano superiori a quelle misurate nei capelli non pigmentati, supportando il ruolo della melanina nell'incorporazione del farmaco. La concentrazione del metabolita (desmetil sildenafil) era significativamente più alta del farmaco originario nei capelli di ratto con un rapporto medio tra farmaco e metabolita di 0,1 (nessun intervallo riportato) ed era in diretto contrasto con il rapporto osservato nei due campioni di capelli umani di 0,83 e 3,6. Gli autori, infine, hanno riconosciuto ufficialmente una ricerca pubblicata in precedenza che ha osservato anche concentrazioni di metaboliti più elevati nei capelli di ratto per il sildenafil, ma hanno anche riportato un profilo simile per i campioni di capelli umani analizzati, non coerente con i loro risultati ⁷⁰.

In entrambi gli studi il numero di campioni di capelli umani testati era piccolo; è quindi necessario uno studio molto più ampio per studiare i profili farmaco-metaboliti nei capelli umani. Anche l'effetto delle condizioni di preparazione del campione di capelli utilizzate per estrarre i farmaci dalla matrice è stato riportato come influente sui rapporti apparenti misurati. Inoltre, sia le concentrazioni misurate che il rapporto tra farmaco progenitore e metabolita, variavano per gli altri farmaci per la disfunzione erettile studiati (mirodenafil e vardenafil). Sebbene siano composti strutturalmente correlati, altri fattori influenzano la loro incorporazione in aggiunta alla melanina.

Kim ⁷¹ e il suo gruppo si sono occupati del ruolo della melanina rispetto all'incorporazione di cannabinoidi sintetici nei capelli e hanno scoperto

che la melanina non era un fattore significativo nella loro incorporazione nei capelli. Ulteriori fattori influenzano l'incorporazione dei farmaci nei capelli, inclusa la quantità e il tipo di melanina presente e il legame con la cheratina.⁷²

1.3 Protocollo di campionamento

Per un corretto campionamento sono disponibili delle linee guida sulle migliori pratiche da seguire per la raccolta di campioni di capelli, comprese raccomandazioni specifiche per il campionamento di capelli post mortem, test antidroga sul posto di lavoro e DFC⁷³. La maggior parte delle fasi coinvolte nel processo di raccolta sono le stesse, indipendentemente dal tipo di caso, ma vi sono anche protocolli specifici.

Il SoHT raccomanda di tagliare i capelli più vicino possibile al cuoio capelluto dalla regione del vertice della testa, come illustrato in figura 74.



È preferibile la raccolta di un campione dalla regione del vertice in quanto questa è il sito in cui vi è la minima variazione nei tassi di crescita rispetto ad altre regioni del cuoio capelluto o rispetto ad altri tipi di peli del corpo. Inoltre, i capelli che crescono sul cuoio capelluto hanno la più alta percentuale di follicoli in crescita attiva e non in fase di riposo. Il volume dei capelli richiesto per l'analisi è una ciocca di capelli proporzionata allo spessore di una matita. La raccolta di un volume sufficiente di capelli è

fondamentale per garantire il completamento di tutti i test necessari. La preoccupazione più comune, dei collezionisti e del donatore, è che la quantità di capelli campionati non lasci una “chiazza calva” visibile. Ciò è particolarmente preoccupante per i genitori di bambini piccoli o persone che soffrono di calvizie o diradamento dei capelli.

Per evitare angoscia alle persone, è possibile anche la raccolta di campioni di capelli più piccoli da più siti all’interno della regione del vertice. Le singole ciocche più piccole dovrebbero quindi essere combinate in una ciocca di capelli più grande e allineata con l’estremità della radice identificata.

Per ottenere un’analisi accurata è molto importante la circostanza in cui si esegue l’analisi segmentale dei capelli. Tagliare i capelli in segmenti più piccoli di lunghezza, più comunemente 0,5 – 3 cm, fornisce un profilo storico più dettagliato dell’esposizione di un individuo e può anche fornire un mezzo per determinare la contaminazione esterna nei casi post mortem ⁷⁵. Quando i capelli della testa non sono disponibili, dovrebbero essere presi in considerazione siti di raccolta alternativi che comprendano campioni intimi (ad esempio i peli pubici). In queste circostanze, la privacy del donatore deve avere la priorità assicurando l’integrità del processo di raccolta. La raccolta dei campioni di capelli deve essere effettuata solo da un collezionista competente che deve riconoscere e aderire alle linee guida di buona pratica per la raccolta dei campioni, in modo da eliminare la potenziale contaminazione del campione e garantire che la catena di custodia sia mantenuta durante tutto il processo. Le Beau ⁷⁶ ha inoltre evidenziato l’importanza di garantire che il campione sia raccolto il più vicino possibile al cuoio capelluto. Infatti, la lunghezza dei capelli rimasti sul cuoio capelluto

dopo il taglio era di 0,8 +/- 0,1 cm, con un impatto significativo sulla scala temporale dei segmenti corrispondenti dei campioni raccolti e sulla successiva interpretazione dei risultati.

I campioni di capelli vengono regolarmente raccolti dal personale medico ma il collezionatore non richiede qualifiche mediche; egli può tuttavia essere tenuto a fornire prove in tribunale e dovrebbe quindi essere preparato a dimostrare la propria competenza attraverso l'esperienza e un'adeguata documentazione di formazione.

1.3.1 Procedura di campionamento

Per la procedura di campionamento le istruzioni devono essere chiare e vengono fornite insieme al kit di raccolta dei capelli. Il kit deve essere sigillato, in modo che il raccoglitore possa verificare che i sigilli non siano stati manomessi prima di aprirlo per il primo utilizzo, e per controllarne il contenuto. Le forbici, utilizzate per tagliare il campione di capelli, devono essere pulite con un panno privo di alcol o sterilizzate prima dell'uso. Il contenuto standard di un kit per la raccolta dei capelli dovrebbe includere quanto segue:

- Modulo per la catena di custodia
- Foglio e busta di raccolta
- Sigilli di sicurezza
- Busta per il trasporto
- Istruzioni per la raccolta di un campione di capelli

Lo scopo principale del modulo della catena di custodia è di documentare i dettagli relativi alla raccolta e alla manipolazione del campione e facilitare l'identificazione del campione. In caso di test antidroga sul posto di lavoro, deve essere mantenuto l'anonimato del donatore. Pertanto, sono richieste copie anonime del modulo da inviare con il campione al laboratorio per l'analisi. Si raccomanda un servizio di consegna campioni sicuro in modo da garantire il mantenimento della catena di custodia; sono disponibili servizi di corriere specializzati con sistemi di tracciabilità e trasporto sicuro per consentire la completa tracciabilità dei campioni dalla raccolta al laboratorio.

La seguente guida passo dopo passo riassume il processo di raccolta:

- 1.** Fase uno: tagliare una ciocca di capelli vicino al cuoio capelluto dalla regione del vertice e allineare i capelli identificando l'estremità della radice (figura)
- 2.** Fase due: piegare la pellicola nel senso della lunghezza ed evitare di piegarla al centro in quanto ciò potrebbe piegare i capelli rendendoli difficili da maneggiare (figura)
- 3.** Fase tre: posizionare il campione di capelli avvolto nella pellicolare all'interno della busta di raccolta. Sigillarlo, annotare iniziali e data.
- 4.** Fase quattro: inserire il modulo della catena di custodia compilato e la busta di raccolta sigillata nella busta delle prove e nella busta di trasporto e inviarla al laboratorio per l'analisi.

Per la conservazione a lungo termine, i campioni di capelli devono essere conservati a temperatura ambiente, asciutti e al riparo dalla luce solare diretta.

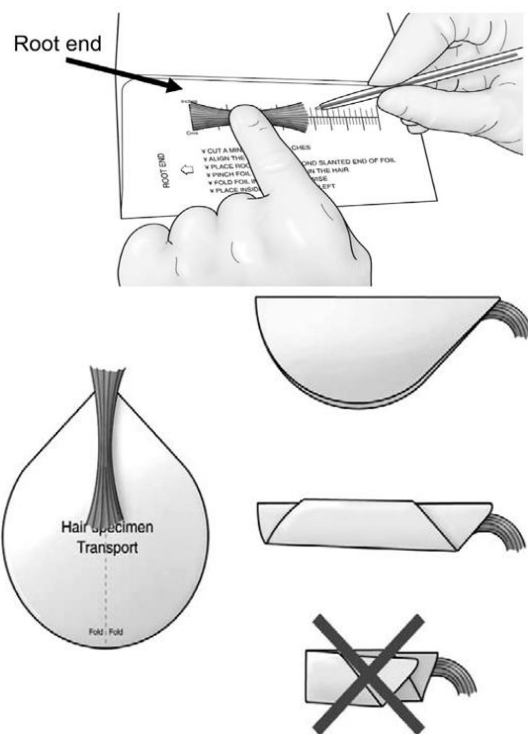


Figura 3: procedura di raccolta capelli secondo le linee guida

1.3.2 Criminalità droga-correlata

La maggior parte dei casi che coinvolgono DFC comporta la somministrazione di una singola dose di un farmaco e, di conseguenza, la raccolta del campione di capelli è critica in termini di tempo e dipende dal periodo trascorso da quando si è verificato l'incidente⁷⁷. Il SoHT raccomanda di raccogliere un campione di capelli almeno 4-6 settimane dopo l'incidente e un secondo campione 1 mese dopo, ma solo se il primo campione è positivo⁷⁸. Il secondo campione viene raccolto per fungere da controllo per corroborare i risultati del primo

campione. Per evitare di compromettere l'indagine, il denunciante non deve sottoporsi a trattamenti chimici sui capelli, ad esempio candeggina, tinture, lozioni permanenti, e non deve tagliarsi i capelli fino alla conclusione dell'indagine. Ciò è particolarmente importante se i capelli del denunciante sono corti.

Il volume del campione è particolarmente critico quando si tratta di casi DFC per le basse concentrazioni nei capelli dopo una singola dose e per la gamma di farmaci che avrebbero potuti essere somministrati. Una raccomandazione comprende di raccogliere quattro ciocche di circa 100 capelli da utilizzare per lo screening dei farmaci più comunemente associati al DFC: una ciocca per le droghe d'abuso, una per il test specifico per il γ -idrossibutirrato e la quarta da conservare per ulteriori analisi ⁷⁹. Sebbene l'ideale sia presentare grandi volumi di capelli, la realtà è che una singola ciocca di capelli viene sottoposta all'analisi e i test devono avere la priorità in base alla sintomatologia descritta dal denunciante.

1.3.3 Indagini post-mortem

La raccolta di campioni di capelli post mortem può rappresentare una sfida a seconda delle condizioni dei capelli del defunto. Idealmente, i campioni di capelli dovrebbero essere asciutti e raccolti con l'estremità della radice dei capelli identificata, ma ciò non è sempre possibile. I capelli sporchi sono comuni a seguito di incidenti stradali o aggressioni violente e in caso di decomposizione si riscontrano regolarmente anche forti sporchi di liquidi corporei. In queste circostanze, il foglio e la

busta standard del kit per la raccolta dei capelli potrebbero essere inappropriati e potrebbe essere necessario un recipiente di raccolta alternativo più robusto. I campioni di capelli molto sporchi di materiale biologico richiederanno procedure di pulizia estese rispetto ai protocolli di lavaggio standard.

Sebbene la raccolta dei capelli tagliati fornisca informazioni relative all'uso storico di droghe nei mesi precedenti la morte, la raccolta e l'analisi delle radici dei capelli possono fornire ulteriori informazioni relative al recente consumo di droghe prima della morte. In circostanze in cui sono richieste informazioni relative all'uso recente, si raccomanda anche la raccolta sia di un campione di capelli tagliati che di un campione di capelli strappati con le radici intatte ⁸⁰. La manipolazione delle radici dei capelli richiede notevole abilità e pazienza, ma poiché le informazioni fornite dalla loro analisi possono essere cruciali per l'esito di un caso, ad esempio nei casi di decomposizione avanzata, lo sforzo aggiuntivo richiesto sarebbe giustificato.

1.4 Determinazione di sostanze endogene

Durante l'ultima decade, tra le possibili analisi di sostanze endogene, è emerso il rilevamento del cortisolo nei capelli come marcatore biologico di stress e per la sindrome di Cushing. A differenza delle sostanze d'abuso e dell'alcol che sono xenobiotici, nel caso del cortisolo si tratta di un metabolita.

1.4.1 Determinazione dello stress cronico

I biomarcatori dello stress *acuto* sono stati ben stabiliti e valutano principalmente il rilascio di catecolamine ⁸¹. Al contrario, trovare un biomcatore per lo stress *cronico*, si è rivelato difficile data la sua complessa eziologia e le manifestazioni altamente individuali.

I glucocorticoidi sono spesso usati come biomarcatori di stress. Infatti, negli esseri umani, nei primati e in molti altri mammiferi, il cortisolo è il glucocorticoide più comune, mentre in altri vertebrati, includendo i roditori, il corticosterone è il principale ormone dello stress.

Durante i periodi in cui un organismo è sottoposto a costrizione fisiologica, il cortisolo agisce per mobilitare le riserve di energia e per modulare il sistema immunitario. Esso è un ormone steroideo prodotto dalle cortecce delle ghiandole surrenali in risposta allo stress (fisiologico o psicologico). Il segnale per la produzione di cortisolo nasce nell'ipotalamo che secerne l'ormone di rilascio della corticotropina (CRH) sull'ipofisi anteriore, che, a sua volta, rilascia

l'ormone adrenocorticotropo (ACTH) in circolazione per agire sulle ghiandole surrenali ⁸². Una volta rilasciato, il 90% del cortisolo circola nel sangue in una frazione inattiva legata alle proteine, e il restante 10% del cortisolo libero è fisiologicamente attivo. Questo sistema è regolato dal feedback negativo: quando sono sufficientemente elevati, i livelli di cortisolo agiscono inibendo il sistema sia a livello dell'ipofisi anteriore che dell'ipotalamo ⁸³.

Il cortisolo è un derivato di una sequenza di reazioni biochimiche che modificano il colesterolo. Questo ultimo viene convertito nel suo metabolita inattivo, il cortisone, tramite l'11- β -idrossisteroide deidrogenasi 2 (11- β -HSD2). Il cortisone può quindi essere coniugato nel fegato, divenendo solubile e in grado di essere escreto attraverso i reni. Va notato che l'11- β -idrossisteroide deidrogenasi 1 (11- β -HSD1) si oppone all'azione dell'11- β -HSD2, e quindi una parte significativa del cortisone prodotto viene riconvertito in cortisolo.

La capacità dei capelli di rilevare efficacemente i cambiamenti nelle concentrazioni di cortisolo è stata dimostrata in modo convincente in diversi studi sull'uomo. In uno di questi studi di sono stati coinvolti pazienti con la sindrome di Cushing ⁸⁴.

In questo studio, i campioni di capelli sono stati ottenuti dai pazienti al momento della prima presentazione in clinica. Quando analizzato mese per mese, è stato osservato un aumento costante della concentrazione di cortisolo, coerente con i sintomi clinici dovuti all'esposizione di questo ultimo. Dopo un intervento chirurgico di successo per correggere la condizione, è stato ottenuto un altro campione di capelli e il contenuto di cortisolo di quei campioni è stato significativamente ridotto. Ciò è stato confermato da Manenschijn e colleghi, che hanno prelevato

campioni di capelli durante il decorso clinico di un paziente con malattia di Cushing (ipercortisolismo causato da un adenoma ipofisario che produce ACTH). Le concentrazioni di cortisolo nei capelli erano inizialmente elevate e mostravano un marcato declino a seguito di un intervento chirurgico correttivo ⁸⁵. Nel complesso, questi studi supportano l'idea che il cortisolo nei capelli fornisca un riflesso dell'esposizione sistemica al cortisolo a lungo termine.

1.4.2 Stress e infarto acuto del miocardio

Recentemente, Pereg ha studiato il ruolo dello stress cronico, misurato tramite i livelli di cortisolo nei capelli, nello sviluppo di un infarto miocardico acuto (IMA) ⁸⁶. Poiché i fattori di stress psicosociali cronici (ad es. finanziari, stress coniugale, stress lavorativo) sono spesso elencati come fattori di rischio per gli IMA, gli autori hanno ipotizzato che l'analisi del cortisolo dei capelli potrebbe potenzialmente essere uno strumento utile per quantificare questi fattori di stress. I campioni di capelli, che rappresentano gli ultimi tre mesi di produzione di cortisolo, sono stati ottenuti da pazienti entro due giorni dal ricovero in ospedale per dolore toracico. Il gruppo di studio era composto da 56 pazienti con infarto miocardico acuto confermato, con un gruppo di controllo composto da 56 pazienti in cui il dolore toracico era attribuito ad altre cause. La concentrazione mediana di cortisolo del gruppo AMI era significativamente superiore a quella del gruppo di controllo (295,3 vs 224,9 ng/g; $P=0,006$). Nella regressione logistica, tenendo conto

dell'età, dello stato lipidico, del fumo e di altri fattori predittivi, il cortisolo dei capelli era il più forte predittore di IMA, seguito dall'IMC (*Indice di Massa Corporea*). Pertanto, ciò suggerisce che lo stress cronico gioca un ruolo casuale nella fisiopatologia dell'IMA. Questo tipo di informazioni di solito non può essere ottenuto utilizzando altre matrici, se non come parte di uno studio prospettico, come illustrato dall'effetto predittivo dell'escrezione urinaria di cortisolo sulla morbilità e mortalità cardiovascolare ⁸⁷.

Nonostante siano necessari ulteriori studi, questo lavoro delinea un forte potenziale per applicare clinicamente l'analisi del cortisolo dei capelli nell'identificazione dei pazienti ad elevato rischio di infarto miocardico acuto.

1.4.3 Analisi del cortisolo nei capelli

Nel complesso, i metodi utilizzati per la misurazione del cortisolo nei capelli sono molto simili, con alcune variazioni nelle procedure tra i laboratori. In breve, per estrarre il cortisolo dai capelli, il campione viene accuratamente sezionato in segmenti di lunghezza che si avvicineranno al periodo di tempo di interesse (ad es. i 3 cm più prossimali negli ultimi tre mesi di produzione di cortisolo). Quindi, i capelli vengono tritati finemente con le forbici o macinati con mulino a palle e incubati in metanolo. La soluzione risultante viene evaporata a secco e quindi ricostituita in una soluzione salina tamponata ⁸⁸. Dopo

l'estrazione, per la quantificazione del cortisolo sono stati utilizzati test Elisa, Ria o LC-MS/MS ⁸⁹.

1.4.4 Future applicazioni cliniche dell'analisi dei capelli

Una delle sfide più difficili nella medicina clinica è accertare l'aderenza dei pazienti ai loro farmaci e la mancanza di risposta terapeutica ad essi è spesso dovuto al fatto che i pazienti non assumono i loro medicinali. Allo stesso modo in cui l'analisi dei capelli viene utilizzata nell'aderenza per il trattamento della dipendenza, può essere molto efficace nello stabilire l'aderenza alla terapia di condizioni croniche come malattie psichiatriche, HIV e condizioni cardiovascolari per citarne alcune ⁹⁰.

Sebbene attualmente l'analisi dei capelli sia percepita come un metodo costoso, non disponibile nella maggior parte dei contesti clinici, l'enorme costo della non aderenza in termini di esacerbazione della malattia, morbilità e mortalità potrebbe cambiare questo approccio nei prossimi decenni.

1.5 Tecniche Analitiche

1.5.1 Tecniche Cromatografiche

La cromatografia è una tecnica analitica di separazione basata sulle caratteristiche chimico-fisiche di composti chimici in una miscela complessa, che si distribuiscono in modi differenti tra due fasi immiscibili, una fissa (stazionaria) ed una che scorre (mobile). Venne inventata dal botanico russo, Mikhail Tswett, nei primi anni del 1900, per poter separare i pigmenti come xantofille e clorofille attraverso una colonna riempita con carbonato di calcio finemente suddiviso.

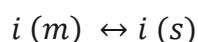
I fenomeni chimico-fisici alla base del processo di separazione permettono di suddividere questa tecnica in varie tipologie, quali cromatografia di adsorbimento, di ripartizione, a scambio ionico e di esclusione molecolare; tutte hanno in comune la presenza di una fase stazionaria fissa (in colonna o su lastra) e di una fase mobile che fluisce attraverso la precedente trasportando i composti chimici da separare. Entrambe le fasi hanno altre caratteristiche che possono portare ad una ulteriore e più precisa suddivisione di questa metodica, in particolare lo stato fisico della fase mobile (liquido, gassoso, fluido), originando la cromatografia liquida, gascromatografia e la cromatografia con fluidi supercritici.

I campioni solitamente vengono disciolti nella fase mobile e non in quella stazionaria e la loro scelta influisce anche sulla distribuzione dei composti presenti tra una fase e l'altra, in modo da avere la loro separazione poiché quelli che verranno trattenuti dalla fase stazionaria

si muoveranno più lentamente con il flusso della fase mobile, rispetto a quelli che non vengono trattenuti.

Alla colonna cromatografica è accoppiato un rivelatore o un raccogliatore di liquidi, per evidenziare la presenza dei vari analiti eluiti. Il loro segnale è riportato in un grafico in funzione del tempo (o del volume di fase mobile), chiamato cromatogramma; quest'ultimo mostra una serie di picchi, ognuno dei quali presenta degli elementi caratteristici quali tempo, altezza picco e area picco.

Il processo di separazione cromatografica è descritto da parametri, quali il tempo di ritenzione, il fattore di capacità, la selettività, la risoluzione e l'efficienza. Ogni specie chimica resta per un determinato tempo all'interno della colonna di separazione in base alla sua affinità per la fase stazionaria. Questo tempo, dal momento dell'iniezione fino all'arrivo al rivelatore, viene chiamato *tempo di ritenzione*, t_r e dipende dalla costante di distribuzione tra le due fasi, cioè dal rapporto tra la concentrazione di analita nella fase stazionaria e quella nella fase mobile. La distribuzione di una sostanza tra le due fasi segue un equilibrio



cioè si instaurano, in ogni piccolo volume di colonna, degli equilibri dinamici ai quali corrisponde una costante di equilibrio, che prende il nome di *costante di distribuzione*

$$K_d = \frac{C_s}{C_m}$$

tanto più sarà elevata la concentrazione nella fase stazionaria, tanto più elevato sarà il valore della costante e di conseguenza l'analita sarà eluito con un tempo di ritenzione maggiore. Un altro fattore molto importante è il *fattore di capacità* o di ritenzione, il quale descrive l'affinità di una specie chimica per la fase stazionaria, tramite la seguente equazione:

$$k = \frac{n_s}{n_m} = \frac{C_s \cdot V_s}{C_m \cdot V_m} = \frac{V_s}{V_m} \cdot K_d$$

dove n indica il numero di moli nella fase stazionaria e in quella mobile e V rappresenta il volume di fase mobile disponibile per le interazioni chimico-fisiche tra sostanza e fasi; questo fattore può essere espresso anche in funzione del tempo di ritenzione, come mostrato di seguito

$$k = \frac{t_r - t_m}{t_m}$$

dove t_r indica il tempo di ritenzione e t_m rappresenta il tempo morto, tempo impiegato dalla fase mobile per percorrere la fase stazionaria. All'aumentare del tempo di ritenzione aumenta k, che esprime meglio il concetto di ritenzione di un composto rispetto al tempo di ritenzione stesso, in quanto indipendente dalle condizioni di analisi (lunghezza della colonna, velocità di flusso della fase mobile) e quindi utilizzabile per confrontare le prestazioni di colonne diverse. Per concludere il fattore di capacità deve essere maggiore di 1 per avere una buona separazione dei composti, minimizzando la loro possibile co-eluzione.

La capacità di un sistema cromatografico di separare due specie A e B in funzione di k , cioè di eluire le due specie a diversa velocità, è descritta dalla *selettività* α , espressa secondo l'equazione che segue come ritenzione relativa

$$\alpha = \frac{k_B}{k_A}$$

dove k_B indica la costante di distribuzione per la specie B, più fortemente trattenuta, mentre k_A indica la costante di distribuzione per la specie A, meno trattenuta. La selettività dipende dal tipo di interazione tra analita e le due fasi e può essere considerata buona se è maggiore di 1. Tuttavia, per avere una buona separazione è importante che i picchi e le bande non si sovrappongano tra loro, a causa di dispersione in situ degli analiti.

La capacità di un sistema cromatografico di ottenere picchi stretti viene definita come *efficienza*, che correla l'altezza di un piatto teorico H , il numero di piatti teorici N e la lunghezza della colonna L , secondo

$$N = \frac{L}{H}$$

all'aumentare di N si ha l'aumento dell'efficienza di separazione.

Secondo la teoria dei piatti teorici, un sistema cromatografico (colonna) è costituito da un numero di strati sottili contigui ma discreti chiamati piatti teorici ^[23], dove si instaurano gli equilibri dinamici tra soluto, fase stazionaria e fase mobile. Il movimento del soluto viene,

quindi, visto come un trasferimento discontinuo della fase mobile in equilibrio da un piatto al successivo. Pertanto, maggiore sarà il numero degli equilibri che si instaurano durante il passaggio dell'analita tra le due fasi, più alti saranno il numero dei piatti teorici e l'efficienza cromatografica. L'altezza di un piatto teorico può essere espressa anche come HEPT, altezza equivalente ad un piatto teorico, ossia il rapporto tra la lunghezza della colonna e il numero di piatti teorici

$$HEPT = \frac{L}{N}$$

si deduce che minore è la distanza tra due piatti, maggiore è il numero di piatti per metro di fase stazionaria e quindi maggiore è il potere separativo della colonna stessa. L'altezza equivalente di un piatto teorico è determinata da numerosi fattori, tra cui il diametro delle particelle e la velocità di flusso della fase mobile.

La capacità, la selettività e l'efficienza cromatografiche definiscono un ultimo importante parametro analitico: la *risoluzione*, che indica la capacità del sistema di separare due specie A e B (picchi separati e stretti) e viene definita come la differenza tra i tempi di ritenzione delle due specie divisa per la semisomma delle larghezze dei picchi a metà altezza

$$R = \frac{t_{rB} - t_{rA}}{\frac{W_1 + W_2}{2}}$$

Di conseguenza, un'alta risoluzione permette di separare specie chimiche con tempi di ritenzione molto simili.

Nel corso di questa tesi è stata utilizzata la cromatografia in fase liquida, per cui questa tecnica sarà descritta in maniera particolare.

1.5.1.1 Cromatografia Liquida ad Alta Prestazione

La cromatografia liquida consente di separare, caratterizzare e quantificare composti chimici di miscele in tempi brevi con elevata efficienza e risoluzione. La sua principale applicazione si ritrova attualmente nella cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC – High Pressure Liquid Chromatography), sfruttata soprattutto per sostanze non volatili e termolabili, ma anche per sostanze di primaria importanza industriale, quali amminoacidi, proteine, acidi nucleici, prodotti farmaceutici e molte altre.

La strumentazione richiesta per questa tipologia di cromatografia deve essere adeguata a sopportare pressioni elevate, dovute alla compressione della fase mobile su colonne impaccate con una fase stazionaria finemente suddivisa. Le alte pressioni che si generano rendono possibili le alte prestazioni proprie della cromatografia liquida rispetto a quella convenzionale, poiché permettono di ottenere una diminuzione della sensibilità strumentale (fino a nano-picomoli), picchi di sostanze simili ben separati e un aumento della risoluzione. Infine, la cromatografia ad alta pressione consente di lavorare con quantità di campione estremamente piccole che possono anche essere recuperate alla fine dell'analisi. In base al meccanismo di separazione o al tipo di fase stazionaria si possono classificare varie tipologie di cromatografia liquida, tra i quali troviamo:

- Cromatografia di adsorbimento;
- Cromatografia di ripartizione;
- Cromatografia a scambio ionico;
- Cromatografia di affinità;
- Cromatografia ad esclusione molecolare.

L'apparecchiatura per HPLC risulta essere molto complessa con un sofisticato sistema di pompaggio per tener fronte alle alte pressioni che si generano durante la corsa cromatografica. I componenti principali sono mostrati in figura e successivamente presentati singolarmente.

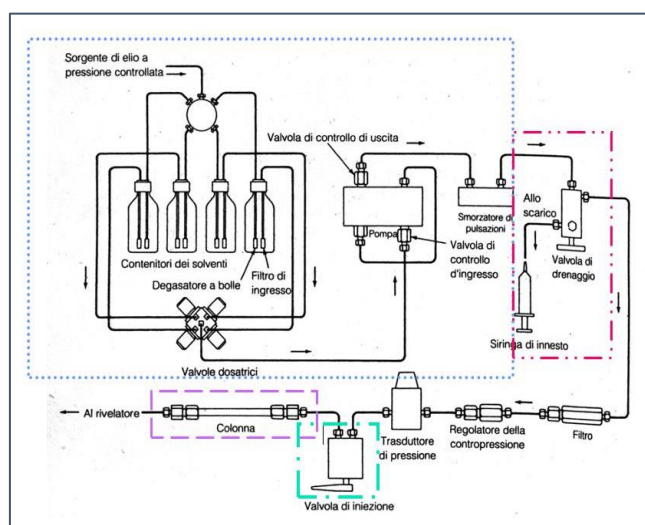


Figura 4. Schema riassuntivo di un sistema cromatografico liquido ad alta pressione (HPLC).

I solventi, utilizzati come fase mobile, sono posti in contenitori di vetro inerte, spesso equipaggiati con un sistema di allontanamento di

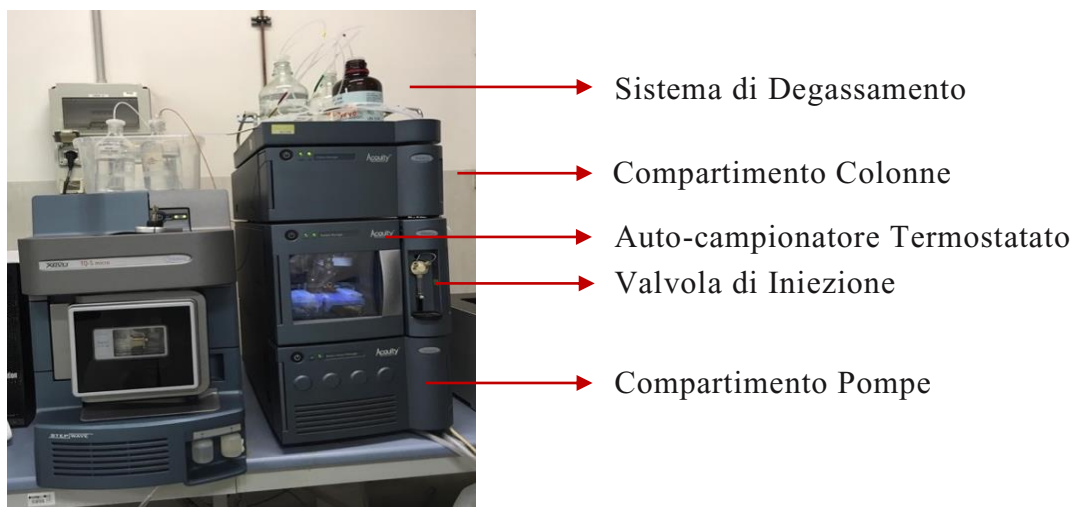


Figura 5. Xevo TQ-S micro. Elementi principali di un cromatografo liquido ad alta pressione.

gas disciolti, ossigeno ed azoto, poiché potrebbero interferire nell'analisi (allargamento di banda, interferenze nel rivelatore) a causa della formazione di bolle; il sistema di degassamento consiste in una pompa da vuoto o in un sistema di gorgogliamento, attraverso cui i gas disciolti vengono eliminati da un flusso di piccole bolle di gas inerte non solubile nella fase mobile. L'eluente utilizzato per la separazione può avere composizione costante (eluizione isocratica), ma in un sistema di cromatografia liquida è preferibile usare una miscela di solventi, avendo un'eluizione a gradiente che determina un aumento di efficienza e separazione; i solventi prelevati vengono miscelati nella camera di miscelazione con diverse velocità ed in continuo. I solventi non devono reagire né con la fase stazionaria né con i composti da analizzare e devono avere un basso punto di ebollizione per poter recuperare gli analiti per semplice evaporazione.

La parte fondamentale del sistema è costituita dalle pompe che consentono il passaggio della fase mobile con flusso costante attraverso

la colonna e il rivelatore. Le pompe devono creare pressioni fino a 430 atm e avere una variazione della velocità di flusso tra 0,1 e 10 mL/min, oltre ad essere costituite da materiali resistenti alla corrosione (acciaio inossidabile o Teflon) da parte dei solventi e generare flussi molto precisi per evitare variazioni dei tempi di ritenzione.

I campioni vengono introdotti nello strumento tramite un sistema di iniezione a valvole, il cui principio operativo si basa su due fasi successive tra loro: la prima consiste nel caricamento del campione attraverso una siringa con ago da una zona a pressione atmosferica al *loop* a pressione dello strumento; la successiva, nell'iniezione vera e propria grazie alla rotazione di una valvola che devia il flusso della fase mobile nel *loop* per trasportare il campione in colonna. Il *loop* è formato da un tubo calibro a volume noto che determina il volume di campione che viene iniettato, nell'ordine dei μL . Questo sistema di introduzione del campione permette di aumentare la riproducibilità delle iniezioni con precisioni di circa 0,1%, eliminando il problema dell'allargamento delle bande dovuto ad una quantità eccessiva di campione in colonna.

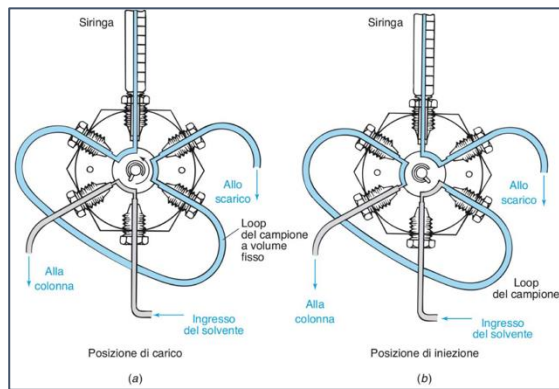


Figura 6. Valvola di iniezione a sei vie.

Un'altra parte fondamentale di un cromatografo è la colonna analitica, generalmente costruita in acciaio inossidabile levigato e differenziata in base a lunghezza (variabile tra 10 e 30 cm), diametro interno (variabile tra 2 e 5 mm), tipo di fase stazionaria e suo impaccamento (diametro particelle variabile tra 2 e 10 μm). Queste colonne presentano un'efficienza di 40 000-60 000 piatti per metro. Di recente sono state prodotte anche micro-colonne con dimensioni inferiori che variano tra 3-8 cm (lunghezza), 1-4,6 mm (diametro interno) e 3-5 μm (diametro particelle); presentano un'efficienza di circa 100 000 piatti per metro, con aumento della velocità di analisi e riduzione del consumo di solvente. Spesso vengono aggiunte pre-colonne di protezione utili a trattenere eventuali contaminanti del solvente e a saturare la fase mobile con la fase stazionaria, limitandone la veloce diffusione nella fase fissa.



Figura 7. Colonne Cromatografiche per Cromatografia Liquida ad Alta Pressione.

È importante che la colonna sia mantenuta ad una temperatura costante, per questo la strumentazione è dotata di fornetti termostatici.

Per aumentare l'efficienza della colonna ne si potrebbe aumentare la lunghezza, ma questo porterebbe ad avere contropressioni troppo elevate, per cui si può intervenire sulla dimensione delle particelle della fase stazionaria, diminuendone il diametro. Il riempimento maggiormente utilizzato in cromatografia liquida è a base di granuli porosi di silice con diametro variabile tra 3-10 μm e forma il più possibile omogenea; le particelle di silice vengono sintetizzate agglomerando particelle di silice sub-micron. La scelta della fase stazionaria da utilizzare dipende dalle caratteristiche chimiche dei composti da analizzare e deve essere inerte sia verso gli analiti che verso la fase mobile.

Ad esempio, nella cromatografia di adsorbimento viene usato un solido adsorbente polare con affinità o meno per l'analita, che viene separato in base alla forza di interazione con la matrice. In cromatografia di ripartizione, invece, la fase stazionaria è formata da

un sottile fil liquido legato chimicamente o fisicamente alle particelle impaccate e i composti vengono separati in base alla loro ripartizione tra fase stazionaria e fase mobile; il film liquido può essere polare o apolare e si parla rispettivamente di cromatografia in fase diretta (NP-HPLC) o in fase inversa (RP-HPLC).

I composti in uscita, in tempi diversi, dalla colonna cromatografica vengono identificati attraverso un rivelatore che acquisisce i dati, li elabora e permette di visualizzarli sotto forma di cromatogramma. I rivelatori possono essere suddivisi in due macro-categorie, quelli che misurano variazioni delle caratteristiche della fase mobile o proprietà di massa (indice di rifrazione, costante dielettrica) e quelli che misurano la variazione di proprietà chimico-fisiche del soluto (assorbanza UV, fluorescenza). Un rivelatore ideale deve avere un'elevata sensibilità, una buona riproducibilità, una risposta lineare alla quantità di analita e un basso livello di rumore di fondo. Il rivelatore più usato nella cromatografia liquida è lo spettrometro di massa, a seguito dello sviluppo dell'interfaccia tra i due strumenti, diminuendo le problematiche legate ai grandi volumi prodotti dal cromatografo e alla presenza di vuoto nella massa.

1.5.2 Spettrometria di Massa

La spettrometria di massa è una tecnica analitica in grado di dare informazioni sulla struttura di specie molecolari complesse, sui rapporti isotopici degli atomi nei campioni, sulle proprietà strutturali e chimiche delle molecole, sull'identità di sostanze incognite e sulla composizione quali- e quantitativa di analiti in miscele complesse.

Le molecole, per essere analizzate, vengono dapprima ionizzate, cioè viene loro conferita una carica elettrica, e successivamente vengono frammentate in ioni con diverso rapporto *massa/carica* (m/z); è quindi un metodo di analisi distruttivo, poiché la molecola non rimane intatta dopo l'analisi. Dal rapporto m/z viene misurata indirettamente la massa dello ione in esame.

La massa molecolare è espressa in Dalton, pari a 1/12 della massa di un atomo neutro di ^{12}C ; la massa dell'isotopo 12 del carbonio è usata come riferimento per calcolare i pesi atomici relativi ad isotopi di altri elementi. La carica degli ioni generati viene espressa dal numero z , cioè come carica elementare posseduta da un elettrone (negativa) o da un protone (positiva), e il rapporto m/z viene quindi misurato in Dalton per unità di cariche elementari.

I risultati ottenuti alla fine dell'analisi vengono riportati in grafico, chiamato spettro di massa, caratterizzato dai valori di m/z sull'asse delle x e dalle abbondanze relative delle specie di ioni in ascissa.

Lo spettrometro di massa ad alta risoluzione è formato da una serie di elementi principali: sistema di inserimento del campione, sorgente di ionizzazione, analizzatore, rivelatore, sistema di elaborazione del segnale ed un sistema di pompaggio.

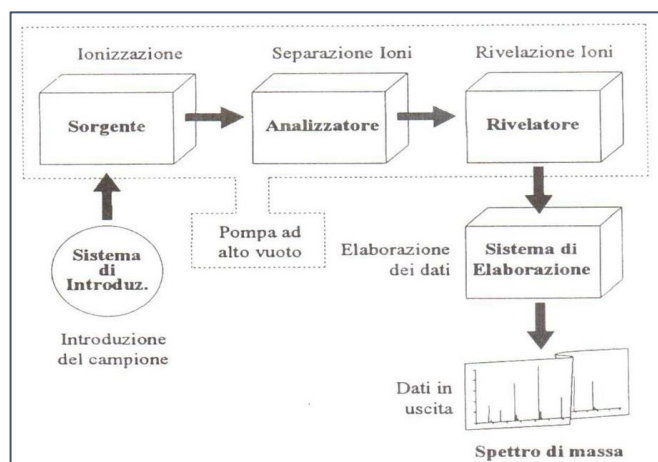


Figura 8. Struttura di uno spettrometro di massa.

Il sistema di inserimento del campione all'interno della sorgente permette di introdurre una quantità di campione estremamente piccola (fino ad un picogrammo, ossia 10^{-12} grammi), senza causare perdite significative di vuoto; esso viene adattato in base al tipo di campione da analizzare e può essere a riserva di gas (per sostanze gassose o con punto di ebollizione fino a 500°C), a sonda diretta (per solidi e liquidi non volatili) oppure cromatografico (gas o liquidi provenienti da corsa cromatografica).

La sorgente di ionizzazione converte i componenti del campione in ioni gassosi tramite bombardamento con elettroni, ioni, molecole o fotoni. Le tecniche di ionizzazione possono essere divise in "hard", che portano alla frammentazione della molecola, e in "soft", poiché adoperano basse energie di frammentazione del campione e ionizzano esclusivamente le molecole.

Negli ultimi anni sono state introdotte delle sorgenti in grado di operare a pressione atmosferica (Atmospheric Pressure Ionization,

API), in cui la ionizzazione si ha per elettro-nebulizzazione. Le più comuni sorgenti utilizzate sono la ionizzazione chimica a pressione atmosferica (Atmospheric Pressure CI, APCI) e il sistema elettrospray (ElectroSpray Ionization, ESI), usato nel nostro caso e spiegato di seguito.

L'Electrospray Ionization porta alla formazione di ioni partendo da una soluzione di analita grazie a fine nebulizzazione ad opera di un capillare tenuto ad alto potenziale elettrico; questo conferisce un'ampia applicabilità della tecnica, soprattutto in campo biochimico, grazie alla possibilità di trasferire gli ioni in soluzione alla fase gas e renderli così idonei all'analisi in massa.

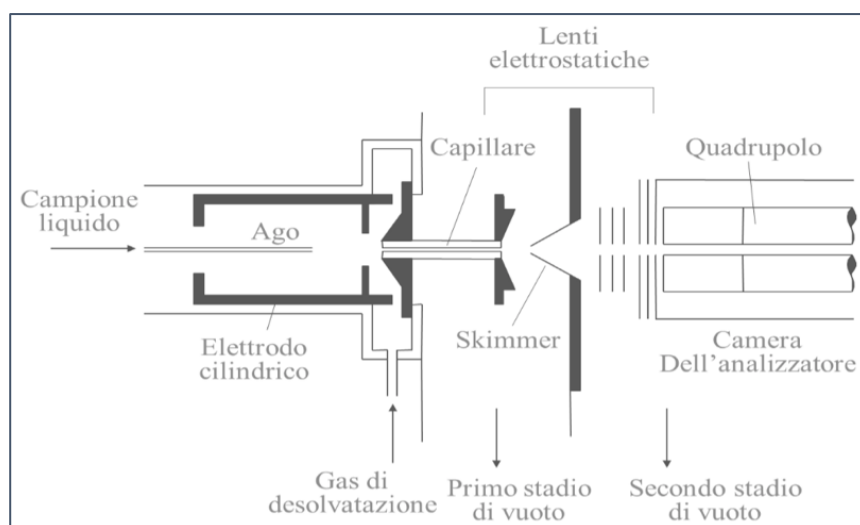


Figura 9. Schema della struttura di una sorgente a ionizzazione per elettrospray (ESI).

Essendo una tecnica “soft”, è possibile analizzare molecole di grandi dimensioni, non volatili, generando ioni molecolari monocarica $[M+H]^+$ o multicarica $[M+nH]^+$, in quattro passaggi principali:

- Nebulizzazione: la soluzione di analita, passando attraverso il capillare metallico ad un potenziale di $\pm 4\text{kV}$, incontra un flusso di azoto che permette la formazione di un aerosol di goccioline di solvente contenenti l'analita ionizzato;

- Desolvatazione: se il potenziale applicato è positivo, allora tutti gli ioni positivi si allontaneranno dal capillare, accumulandosi sulla superficie del liquido (sulla punta del capillare), mentre gli ioni negativi resteranno all'interno del capillare. A causa della repulsione tra gli ioni positivi e la forza del campo elettrico applicata su di essi, gli ioni vincono la tensione superficiale del liquido, con sua conseguente espansione (nel verso del campo applicato) in un cono, chiamato cono di Taylor; la punta di questo cono è instabile e allungandosi forma uno spray di goccioline.

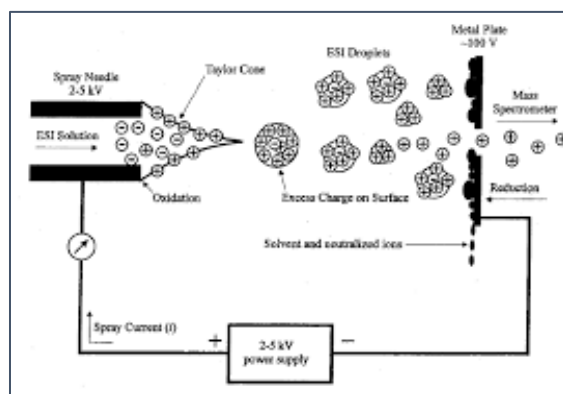


Figura 10. Formazione del cono di Taylor e ionizzazione del campione.

- Evaporazione del solvente: le goccioline cariche positivamente vengono attratte da un secondo capillare sottovuoto ad un potenziale negativo, trasportate da un flusso di gas ausiliario (azoto), coassiale rispetto al flusso della soluzione, che permette anche l'evaporazione del solvente rimasto. All'aumentare dell'evaporazione del solvente diminuisce il raggio delle goccioline, con aumento della densità di carica.

- Formazione di ioni: il raggio della gocciolina diminuisce fino a raggiungere un valore limite, detto limite di Rayleigh, in corrispondenza del quale la repulsione tra cariche supera la tensione superficiale della gocciolina causando un'esplosione coulombiana con formazione di molte goccioline cariche; la formazione di ioni mono- e multicarica avviene in più passaggi, ancora oggetto di discussione, anche se sono stati proposti due meccanismi di formazione, riportati in figura 16.

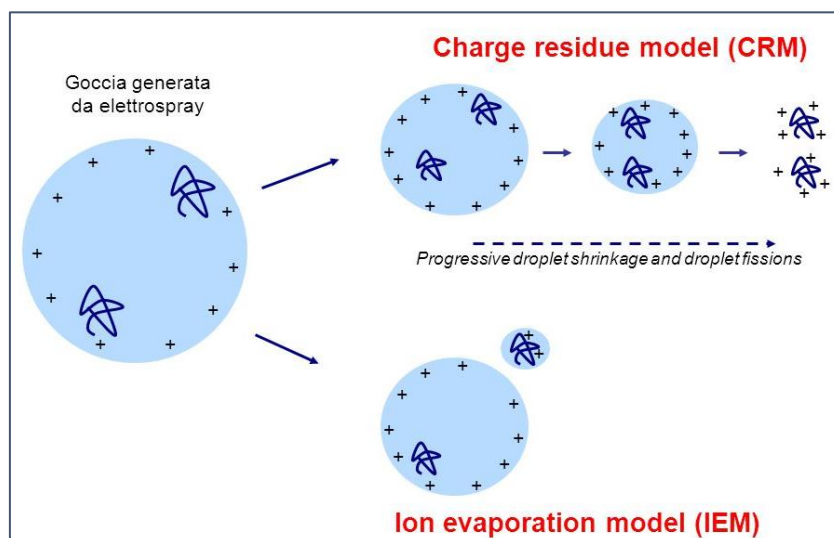


Figura 11. Meccanismi di formazione di ioni molecolari. Modello della carica residua, proposto da Dole: le frammentazioni successive delle goccioline generate portano alla formazione di piccole goccioline di solo analita che trasportano una o più cariche in eccesso; dopo l'evaporazione del solvente le cariche si ridistribuiscono per dare lo ione più stabile in fase gas. Modello della Ion Evaporation, proposto da Iribarne e Thompson: lo ione viene emesso direttamente dalla gocciolina quando raggiunge determinate dimensioni; questo meccanismo diventa predominante sulla fissione coulombiana quando il raggio R è minore di 10 nm.

In seguito, gli ioni vengono accelerati verso l'analizzatore tramite un sistema complesso di lenti elettrostatiche, con riduzione progressiva della pressione.

L'analizzatore separa gli ioni generati in base al loro rapporto m/z grazie all'interazione tra ioni e campi elettrici e magnetici. La capacità di distinguere ioni con valori di massa molto simili tra loro determina un'alta capacità risolutiva, R , della tecnica, data dalla seguente equazione:

$$R = \frac{m_2}{m_2 - m_1} = \frac{m_2}{\Delta m}$$

Valori elevati di R permettono di calcolare la massa esatta di uno ione e risalire alla sua composizione elementare.

L'analizzatore utilizzato nell'analisi sperimentale dei campioni è basato sull'interazione degli ioni con campi elettrici alternati quadrupolari, detto analizzatore a quadrupolo. Questi passano attraverso quattro barre metalliche piene con sezione iperbolica (per ottenere campi elettrici omogenei) parallele tra loro. Solo ioni con un determinato rapporto m/z attraversano l'analizzatore senza scaricarsi sulle quattro barre metalliche, in base al valore scelto per due grandezze caratteristiche del potenziale, U e V, che variano con una certa frequenza ω .

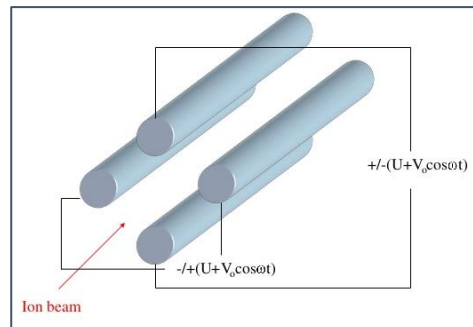


Figura 12. Struttura di un analizzatore quadrupolare; le barre cilindriche sono caricate a due a due con un diverso potenziale.

Infine, gli ioni separati arrivano ad un collettore dove avviene la loro rivelazione, solitamente tramite un dinodo di conversione ed un moltiplicatore di elettroni a dinodo continuo. Elettroni secondari (positivi, negativi o neutri) vengono emessi come conseguenza dell'urto degli ioni con una serie di dinodi (elettrodi) posti ad un potenziale crescente negativo; questi consistono in superfici metalliche concave poste ad angolo retto rispetto al fascio di ioni uscente dall'analizzatore. Il moltiplicatore è formato da un resistore di vetro drogato con piombo a forma di imbuto e caricato positivamente (catodo) con una superficie metallica nella parte terminale. Le particelle secondarie colpendo la sua superficie emettono elettroni che vengono accelerati dal gradiente di potenziale, generando una corrente di elettroni misurabile: la corrente è proporzionale al numero di particelle secondarie che colpiscono il catodo.

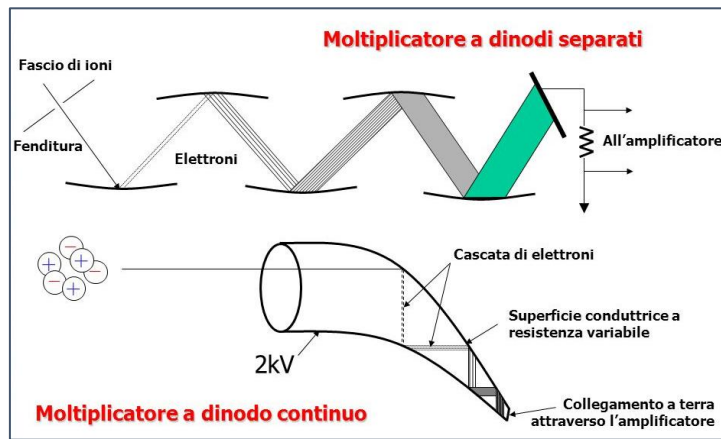


Figura 13. Moltiplicatore a dinodi separati e a dinodi continui.

1.5.3 Sistema UHPLC-MS/MS Xevo TQ-S micro

Nel progetto seguito in questa tesi è stato utilizzato un cromatografo UHPLC accoppiato ad un rivelatore a spettrometria di massa con una sorgente di tipo ESI (Electrospray Ionization) ed un analizzatore a triplo quadrupolo. Questo accoppiamento permette l'analisi di miscele complesse, ottenendo spettri di massa per ogni molecola presente. Inoltre, l'accoppiamento di più spettrometri di massa (Tandem MS) consente di avere informazioni molecolari più specifiche.

L'utilizzo di un UHPLC rispetto ad un normale HPLC risulta vantaggioso grazie alla possibilità di ridurre i tempi di analisi e la quantità di solventi impiegata, nonché alla capacità del sistema di sopportare contro-pressioni maggiori (12000 psi). Di conseguenza vengono utilizzate colonne con minori dimensioni di fase stazionaria, 1.8 μm di diametro, con aumento dell'efficienza di separazione dei composti e della risoluzione del sistema.

L'analizzatore a triplo quadrupolo è formato da tre quadrupoli, di cui il primo e il terzo fungono da filtri per la selezione dei rapporti m/z desiderati, mentre in quello centrale (riempito con gas inerte) avviene la frammentazione dello ione molecolare, chiamato per questo camera di collisione. Le modalità operative che possono essere usate con il triplo quadrupolo sono la Single Reaction Monitoring (SRM) e la Multiple Reaction Monitoring (MRM – utilizzata soprattutto per analisi quantitative). L'identità della molecola solitamente è conosciuta a priori e il primo quadrupolo, Q1, viene fissato ad un preciso valore di m/z ; il terzo quadrupolo, Q3, viene invece impostato su un solo rapporto m/z , nel caso del SRM, oppure su più rapporti m/z , nel caso del MRM.

Tuttavia, se non si conoscono le precise transizioni della molecola da analizzare, è conveniente lavorare in Full Scan.

La sorgente ha geometria ZSpray™ e consente di rimuovere in maniera efficiente le molecole neutre convogliando i soli ioni verso l'analizzatore; in più, la veloce inversione di polarità assicura la copertura dei composti ionizzati a carica positiva e negativa in una sola corsa analitica.

1.5.4 Selettività

La selettività analitica è la misura in cui un metodo può essere usato per determinare particolari analiti in miscele o matrici senza interferenze da parte di altri componenti con comportamento simile [25]. In altre parole, è la capacità di un metodo analitico di differenziare e quantificare l'analita in presenza di altri componenti della matrice, quali componenti endogeni della matrice stessa, metaboliti, prodotti di decomposizione e in aggiunta, per studi su campioni reali, anche farmaci e prodotti esogeni [21]. Se il metodo da validare è messo a punto per quantificare più di un analita, ognuno deve essere valutato per escludere ogni possibile interferenza. È necessario sapere che la proprietà misurata sia solo dell'analita e non di altre sostanze chimicamente simili, poiché potrebbero aumentare o diminuire il segnale proprio dell'analita, provocando uno scostamento dal valore reale; l'effetto dato dagli interferenti resta indipendente dalla concentrazione di analita presente e il segnale che si osserva viene

definito 'interferenza della linea di base' o 'interferenza di fondo', e può modificare l'intercetta della retta di taratura.

Un approccio per stabilire la selettività di un metodo è provare l'assenza di risposta in una matrice blank, cioè verificare che non ci sia nessun segnale che vada ad interferire con quello dell'analita o dell'internal standard ^[30]. In alternativa, si analizzano i campioni prima e dopo l'aggiunta di possibili interferenti attraverso lo stesso metodo analitico.

Sperimentalmente vengono dapprima analizzati campioni di prova o materiali di riferimento tramite il metodo in esame e altri metodi indipendenti per valutare la capacità del metodo di isolare l'analita di interesse (si usano almeno 6 diverse matrici blank, assicurando anche la selettività fino al limite di quantificazione); successivamente si analizzano campioni ai quali sono stati aggiunti gli interferenti, osservando il loro effetto sull'individuazione e la quantificazione dell'analita.

1.5.5 Limite di Rilevabilità e Limite di Quantificazione

Il limite di rilevabilità (Limit of Detection, LOD) è la più bassa concentrazione che può essere rilevata con un certo grado di sicurezza, cioè con una data probabilità di commettere un errore ^[26], è quindi la minima concentrazione netta rilevabile che non necessariamente viene quantificata come valore esatto. È un valore che dipende dall'analita, dalla matrice e dal metodo utilizzato.

Il limite di quantificazione (Limit of Quantification, LOQ) è il più basso livello di analita che può essere determinato con una prestazione

accettabile ^[25], dove per prestazione si intendono una certa precisione, accuratezza e ripetibilità di analisi. Esso permette di stabilire la potenza di un metodo analitico ed è quindi di fondamentale importanza la scelta delle condizioni di analisi, del protocollo adottato e della strumentazione. A questa concentrazione limite il grado di incertezza è più alto e di conseguenza la variabilità è tale da poter paragonare il valore di concentrazione ottenuto sperimentalmente con quello dell'incertezza misurato; per ogni metodo chimico quantitativo il valore del LOQ deve essere calcolato attraverso verifiche di precisione.

Il LOD viene valutato attraverso diversi approcci, il primo dei quali si basa sulla valutazione del segnale del bianco attraverso più repliche di misura (10) e calcolando in un secondo momento la media dei segnali ottenuti e lo scarto tipo; per ottenere il valore del LOD si moltiplica lo scarto tipo del bianco per un fattore, secondo le seguenti equazioni:

$$S' = \mu_B + k\sigma_B$$

dove S' è il limite di decisione o livello critico, μ_B è il segnale medio del bianco, σ_B è la deviazione standard del bianco e k è un fattore moltiplicativo che permette di limitare gli errori e ha un valore statistico pari a 3,3. S' rappresenta anche il minimo segnale significativo indicante la presenza di analita e nel calcolo del LOD si interpola il suo valore con la retta di calibrazione, ottenendo l'equazione:

$$S' = S_s = \mu_B + k\sigma_B = b \cdot LOD + a$$

dove a è l'intercetta e b è la pendenza della retta di calibrazione; questi parametri devono necessariamente essere conosciuti con una buona precisione e l'intercetta non deve essere significativamente diversa dal valore del segnale del bianco, μ_B . Di conseguenza il valore del LOD è espresso come:

$$LOD = 3.3 \frac{\sigma_B}{b}$$

Le analisi quantitative necessitano però di un valore minimo reale e non di una valutazione di presenza/assenza di analita. Un'analisi risulta essere quantitativa quando il segnale ottenuto è almeno (5)10-20 volte la deviazione standard del bianco e quindi il LOQ può essere descritto dall'equazione seguente:

$$LOQ = 10 \frac{\sigma_B}{b}$$

esso indica alternativamente il minimo contenuto di analita che si può rilevare nella matrice con una certa probabilità, generalmente la più alta possibile (95 – 99%) [26].

Nel calcolo del LOD e del LOQ bisogna tener conto di eventuali fattori di diluizione o di concentrazione del campione.

Esistono altri due approcci usati nella valutazione del LOD e del LOQ. Il primo si basa sulla regressione lineare e il secondo sulla valutazione del rapporto segnale/rumore. La regressione lineare prende in considerazione, al posto di σ_B , la deviazione standard dei residui (o della regressione), $S_{y/x}$, o la deviazione standard dell'intercetta, S_a , che

rappresentano anch'esse una stima della deviazione standard del bianco.

Il rapporto segnale/rumore viene valutato direttamente dalla strumentazione usata e su di esso si possono calcolare il LOD, come concentrazione di analita alla quale corrisponde un valore di S/N pari a 3, e il LOQ, come concentrazione di analita alla quale corrisponde un valore di S/N pari a 10.

1.5.6 Intervallo di Misura

L'intervallo di misura è l'intervallo all'interno del quale il metodo fornisce risultati con un'incertezza accettabile [25]. L'estremo inferiore è generalmente il limite di quantificazione (LOQ) o il limite di rilevabilità (LOD), mentre l'estremo superiore è dato dalla concentrazione alla quale si notano degli scostamenti dalla linearità tra il segnale misurato e la concentrazione di analita, cioè alterazioni della sensibilità dello strumento. La valutazione di questo parametro, soprattutto per metodi quantitativi, deve tenere in considerazione sia la linearità del metodo che il procedimento di taratura, attraverso strumenti statistici significativi, quali l'analisi dei residui della regressione lineare o il test F di significatività della regressione.

I calibratori impiegati nella costruzione e nell'individuazione dell'intervallo di misura devono essere costituiti da matrice blank alla quale l'analita di interesse viene aggiunto in concentrazioni tali da coprire tutto l'intervallo desiderato, con minimo 5-8 livelli di concentrazione, ognuno ripetuto 2-6 volte. Per descrivere la relazione tra la concentrazione di analita e la risposta strumentale, è preferibile

usare modelli lineari, ma in alcuni casi sono accettabili anche modelli curvilinei, logaritmici, ecc.; questa relazione deve essere confermata dalle prove sperimentali e deve essere dimostrato che l'intervallo preso in considerazione sia compatibile con quello teorico. Infine, la taratura strumentale deve essere adeguata al tipo di analisi proposta.

L'intervallo di misura può essere di due tipologie: intervallo del metodo, che prende in considerazione la concentrazione del campione e viene espresso nelle stesse unità (es. per campioni solidi, mg g^{-1}), e l'intervallo di misura strumentale, che si riferisce alla concentrazione del campione nella soluzione che viene presentata allo strumento per l'analisi (es. mg mL^{-1}).

Durante questa procedura devono essere utilizzati campioni di prova con concentrazioni minori o maggiori di quelle che definiscono l'intervallo di misura (di circa il ± 10 o 20 %), distribuite in maniera più o meno equidistante in termini di ordini di grandezza.

1.5.7 Sensibilità

La sensibilità indica la variazione della risposta strumentale in corrispondenza di quella della grandezza misurata, cioè il gradiente della curva di taratura. Il calcolo di questo parametro è molto semplice poiché viene derivato direttamente dalla pendenza della retta di taratura.

La validazione del metodo si propone di quantificare l'accuratezza dei risultati valutando sia gli effetti sistematici che quelli casuali. A queste due componenti vengono associate le grandezze chiamate rispettivamente esattezza e precisione ^[26]

1.5.8 Esattezza

L'esattezza esprime la vicinanza della media di una serie di misure al valore di riferimento accettato e risulta essere influenzata da errori sistematici (BIAS), cioè derivanti dall'operazione di misura. L'errore sistematico può essere riferito al metodo, cioè indipendente dall'ambiente di laboratorio, o riferito al laboratorio e all'interpretazione dei risultati; in ogni caso un singolo laboratorio è in grado di stimare solo lo scostamento totale derivato da entrambe le tipologie di errore. Se il materiale certificato non è disponibile, la stima dell'esattezza deve tener conto delle differenze che ci possono essere nei vari metodi di analisi. Possono essere inclusi anche test di significatività statistica, quali t-test e F-test.

La valutazione viene eseguita su uno o più materiali di riferimento certificati con composizione il più possibile vicina a quella dei campioni reali e la stima dell'esattezza si ha attraverso il calcolo del BIAS o 'scostamento di misura', secondo le seguenti equazioni:

$$BIAS = \bar{x} - x_{ref}$$

$$BIAS (\%) = \frac{\bar{x} - x_{ref}}{x_{ref}} \cdot 100$$

$$R'(\%) = \frac{\bar{x}' - \bar{x}}{x_{spike}} \cdot 100$$

dove \bar{x}' è il valore medio del campione fortificato e x_{spike} è la quantità di analita aggiunta; la prima equazione definisce l'esattezza in termini assoluti, la seconda in percentuale, mentre la terza esprime il recupero (R') relativo alla fortificazione del campione. Il calcolo viene eseguito su valori di concentrazioni vicini agli estremi e al valore mediano dell'intervallo di misura con almeno 10 ripetizioni per livello di concentrazione, sia per il materiale di riferimento che per campioni blank e fortificati. Infine, si confrontano i risultati ottenuti del BIAS e del recupero. Il criterio di accettazione per l'accuratezza, BIAS compreso tra $\pm 15\%$ del valore di riferimento e tra $\pm 20\%$ vicino al LLOQ (Lower Limit of Quantification), è specificato nel Conference Report ed è largamente accettato dai bioanalisti.

1.5.9 Precisione

La precisione è una caratteristica di prestazione di un metodo che esprime la vicinanza tra i risultati ottenuti sperimentalmente dopo misurazioni ripetute di uno stesso campione omogeneo nelle stesse condizioni di lavoro. Viene espressa attraverso due parametri, quali ripetibilità e riproducibilità, oppure in termini di imprecisione come deviazione standard assoluta o relativa.

La ripetibilità è una misura della variabilità nei risultati quando una misurazione è condotta da un singolo analista utilizzando la stessa strumentazione in un breve intervallo di tempo ^[25]. La ripetibilità stretta viene utilizzata nelle analisi in duplicato, dal cui scarto tipo si ricava il limite di ripetibilità 'r', in base al quale la differenza tra due misure eseguite in doppio su uno stesso campione può essere definita

significativa o meno (Precisione intra-assay). La ripetibilità intermedia, invece, consente di valutare la concordanza dei risultati su lunghi periodi, attraverso misure eseguite dallo stesso analista, con la stessa strumentazione e nello stesso laboratorio (Precisione intra-day). Nel momento in cui misure ripetute vengono eseguite da più laboratori, non è più possibile parlare di ripetibilità, ma si deve introdurre il concetto di riproducibilità. Questa è una misura più significativa e dal calcolo dello scarto tipo si ottiene il limite di riproducibilità 'R'. Entrambi i parametri dipendono dalla concentrazione di analita ed è necessario fare una valutazione su più livelli di concentrazione all'interno dell'intervallo di misura; inoltre, se la concentrazione misurata è al disopra del LOD, la precisione risulterà essere proporzionale alla concentrazione di analita [25].

La valutazione della precisione viene eseguita con misure replicate in numero sufficiente, minimo 6 - 15 volte, per ogni matrice e per tre livelli di concentrazione, per poter stimare in modo adeguato lo scarto tipo derivante. Un primo approccio è quello di calcolare la deviazione standard relativa (R.S.D.), il secondo approccio è basato sul calcolo dei due parametri attraverso l'analisi della varianza (ANOVA) in cui il fattore variabile (giorno, corsa) viene raggruppato in una serie di dati ottenuti da misurazioni ripetute; la variabilità complessiva dell'intera serie di dati può essere rappresentata attraverso la combinazione delle varianze (s^2) tra i gruppi e interna ai gruppi [25]. Lo scarto tipo della ripetibilità, s_r , viene calcolato attraverso la radice quadrata della varianza, secondo la seguente equazione:

$$s_r = \sqrt{MS_W}$$

Il contributo alla variabilità totale da parte del fattore di raggruppamento è dato dall'equazione:

$$s_{between} = \sqrt{\frac{MS_b - MS_w}{n}}$$

La ripetibilità intermedia, s_I , si ottiene dalla combinazione della varianza tra gruppi e quella all'interno dei gruppi, secondo la seguente equazione:

$$s_I = \sqrt{s_r^2 + s_{between}^2}$$

Il criterio di accettazione per la precisione, 15% della deviazione standard relativa e 20% della deviazione standard relativa vicino al LLOQ (Lower Limit of Quantification), è specificato nel Conference Report ed è largamente accettato dai bioanalisti.

1.5.10 Incertezza di misura

L'incertezza di misura è un intervallo associato ad un risultato di misura che esprime l'intervallo di valori che può essere ragionevolmente attribuito alla grandezza sottoposta a misura [25]. La valutazione di questo parametro dovrebbe prendere in considerazione tutti gli effetti che influenzano il risultato e proprio per questo richiede

tempi di calcolo molto lunghi, soprattutto nel sistema del controllo qualità.

1.5.11 Robustezza

La robustezza di una procedura analitica è ‘una misura della sua capacità di non essere influenzata da piccole, ma deliberate, variazioni ai parametri del metodo. La robustezza fornisce un’indicazione dell’affidabilità del metodo durante il normale utilizzo’ [28]. Viene valutata attraverso test che seguono il disegno sperimentale di Plackett-Burman [29], il quale prevede l’introduzione di modifiche nel metodo per valutarne gli effetti sulle prestazioni, lavorando su variabili molto significative per assicurarsi la loro correttezza all’interno del metodo. Le variabili vengono dapprima individuate e poi vengono stabilite le prove per il monitoraggio degli effetti sui risultati di eventuali variazioni sistemiche. Si determina, quindi, il cambiamento di ogni variabile sui risultati ottenuti e si classificano in ordine decrescente di entità di effetto sulle prestazioni del metodo. Infine, si eseguono dei test per determinare la significatività degli effetti osservati.

1.5.12 Effetto Matrice, Recupero ed Efficienza del Processo

L’analisi chimica di matrici biologiche è spesso influenzata da sostanze interferenti in esse presenti, che non sono oggetto di ricerca, ma che possono portare ad una minor accuratezza nella determinazione della concentrazione dell’analita di interesse. Questo effetto si osserva dalla diversa risposta strumentale dell’analita iniettato in solvente

rispetto all'analita iniettato in matrice. Solitamente l'effetto matrice viene valutato in metodi basati su tecniche cromatografiche e di spettrometria di massa, in cui possono essere evidenti due fenomeni: ion suppression e ion enhancement, a causa della coeluizione di interferenti con l'analita. La ionizzazione dell'analita dipende anche dalla procedura di preparazione del campione, dalla qualità della separazione cromatografica, dalle fasi mobili e dal tipo di ionizzazione adottata. In metodi di screening la ion suppression può alterare il valore del LOD e del LOQ, aumentando così il rischio di ottenere falsi negativi, mentre in metodi quantitativi la ion suppression/enhancement può influenzare negativamente la precisione e l'accuratezza con aumento dell'incertezza di misura. Per minimizzare l'effetto della matrice sull'analita è utile avere metodi molto selettivi, sorgenti APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation), standard interni (IS Internal Standard) deuterati ed eseguire test durante lo sviluppo di un nuovo metodo analitico per valutare questa variabile.

Esistono due diversi approcci per valutare ion suppression/enhancement. Il primo si basa sull'infusione post-colonna in continuum di una soluzione di analita (si tratta di matrice bianca estratta) nell'eluato proveniente dalla corsa cromatografica; al detector arriva un segnale costante tranne nel caso in cui si verifichi uno dei due fenomeni sopracitati. Il secondo, invece, è caratterizzato dall'addizione post-estrazione dell'analita e si articola su tre livelli di concentrazioni, basso, medio e alto, e su tre *set* di campioni: uno è lo standard puro (5 replicati), uno viene preparato in matrice bianca e l'analita viene aggiunto post-estrazione e l'ultimo viene preparato sempre in matrice

bianca e l'analita viene però aggiunto prima dell'estrazione. L'effetto matrice viene determinato attraverso questa equazione [27]:

$$ME (\%) = \frac{B}{A} \cdot 100$$

dove A è l'area del picco dello standard puro e B è l'area del picco dell'analita aggiunto post-estrazione.

Il recupero di analita corrisponde alla risposta strumentale che si ottiene da una quantità di analita, addizionata e successivamente estratta dalla matrice biologica, rispetto a quella che si ottiene dalla quantità reale dello standard puro dell'analita [21]. La quantità di analita recuperata difficilmente raggiunge il 100%, ma può essere mantenuta costante, precisa e riproducibile. I risultati analitici di soluzioni standard (corrispondenti al 100% di recupero) vengono solitamente confrontati con quelli dei campioni biologici analizzati, addizionati con minimo tre livelli di concentrazioni (basso, medio, alto) ed estratti. Nella pratica di laboratorio vengono aggiunti anche standard interni per avere un valore di recupero riproducibile.

Il recupero viene stimato attraverso la seguente equazione:

$$RE (\%) = \frac{C}{B} \cdot 10$$

dove B è l'area del picco dell'analita aggiunto post-estrazione e C è l'area del picco dell'analita aggiunto prima dell'estrazione.

La valutazione dell'efficienza del metodo è necessaria al fine di determinare tutto l'analita presente e ottenere il valore dell'esattezza del metodo utilizzato. Si lavora su tre livelli di concentrazioni ripetendo più volte l'analisi per ogni matrice. Una delle problematiche evidenziate è il fatto che l'analita aggiunto non sarà trattenuto dalla matrice allo stesso modo di quello presente naturalmente, per cui si potrebbero ottenere delle sovrastime dell'efficienza di estrazione. L'efficienza del processo viene determinata attraverso la seguente equazione:

$$PE (\%) = \frac{C}{A} \cdot 100 = \frac{ME \cdot RE}{100}$$

dove A è l'area del picco dello standard puro e C è l'area del picco dell'analita aggiunto prima dell'estrazione.

2 SCOPO DELLA TESI

Il cortisolo e il cortisone sono glucocorticoidi importanti nell'uomo. Entrambi vengono prodotti dalla corteccia surrenale e sono regolati dall'asse ipotalamo-ipofisi-surrene. Questo asse è noto per la sua risposta adattogena allo stress mediante produzione di cortisolo ⁹¹. È comprovato che lo stress sia associato a varie patologie; quindi, la misurazione delle concentrazioni di cortisolo a lungo termine potrebbe essere uno strumento utile sotto molti aspetti ⁹². Il monitoraggio dei livelli di cortisolo a lungo termine nel sangue, nelle urine e nella saliva è complesso perché queste matrici sono alla base dei cambiamenti circadiani e mostrano fluttuazioni giornaliere ⁹³. Pertanto, l'analisi dei capelli ha riscontrato sempre più interesse come strumento per il monitoraggio a lungo termine del cortisolo.

Il cortisolo è incorporato nel fusto del capello durante la crescita dei capelli. Stalder ⁹⁴ ha postulato, secondo l'ipotesi dell'ormone libero nota, che solo la frazione libera dovrebbe essere incorporata nei capelli ⁹⁵.

L'analisi delle concentrazioni di cortisolo in uno specifico segmento del capello fornisce una misura retrospettiva della secrezione sistemica di cortisolo nel corrispondente periodo di crescita del capello. Assumendo un tasso medio di crescita di circa 1 cm/mese, l'analisi di un segmento di 3 cm consente di valutare i livelli cumulativi di cortisolo in un periodo di 3 mesi nota.

La determinazione quantitativa di composti endogeni come il cortisolo in una matrice biologica (es. capelli) è generalmente più difficile della determinazione quantitativa di composti xenobiotici ⁹⁶. Per composti

endogeni è spesso difficile o addirittura impossibile ottenere una matrice autentica priva di analiti. Tipicamente, l'autentica matrice biologica contiene quantità sconosciute dell'analita che la rende inadatta alla preparazione del campione di riferimento. In questo studio si è cercato di aggirare il problema utilizzando la matrice autentica e l'analita surrogato. L'analita surrogato di scelta è una forma marcata con isotopi stabili dell'analita che si presume mostri le stesse proprietà chimico-fisiche dell'analita autentico. Questo è l'approccio alla base del seguente studio. Per la validazione del metodo sono state utilizzate le punte dei capelli di donne con capelli lunghi assumendo che i livelli di cortisolo siano minori a causa di un effetto di lavaggio generale ⁹⁷. A tale scopo, le punte dei capelli sono state tagliate in frammenti, omogeneizzate e utilizzate come pool di campioni negativi ("blank pool").

In sintesi, questo progetto di tesi ha avuto come obiettivo quello di sviluppare una metodologia di ricerca quantitativa del cortisolo nei capelli, ottimizzando sia la parte estrattiva dell'analita che quella di analisi strumentale, attraverso un sistema di cromatografia liquida ad alta pressione accoppiato ad uno spettrometro di massa tandem, dotato di elevata sensibilità e selettività.

3 PARTE SPERIMENTALE

3.1 Materiali e Metodi

3.1.1 Vetreria

- Micro-tubi da 2 mL in polipropilene (PP);
- Palline di acciaio per l'omogeneizzazione di matrici;
- Provette per batteriologia in vetro sodo-calcico (AR) con bordo dritto, diametro 12x75 mm e spessore 0,8 mm;
- Pipette automatiche a volume variabile, Eppendorf®;
- Puntali per pipette automatiche;
- Vials con insert conico in polipropilene (PP).

3.1.2 Piccola Strumentazione

- Precellys Evolution (Bertin Technologies, AlfaTech): usato per l'omogeneizzazione dei campioni;
- Agitatore a vibrazione Velp scientifica (Vortex);
- Bilancia AG 245 Dual Range (Mettler Toledo, Zurigo, CH): bilancia analitica doppia scala (mg e g);
- Pierce Reach Therm III (Rockford, IL, USA): evaporatore sotto flusso di azoto utilizzato per evaporazione e riscaldamento durante la preparazione dei campioni da iniettare in LC-MS/MS;
- Centrifuga Allegra 6KR, Bech

3.1.3 Strumentazione

- WATERS ACQUITY UPLC[®]-MS/MS Xevo[®] TQ-S micro Waters: cromatografo liquido ad alta pressione per la separazione e quantificazione dell'analita di interesse.

3.1.4 Reagenti, Solventi e Analiti

- Metanolo per HPLC ultrapuro, Carlo Erba, Milano, Italia;
- Ammonio formiato, titolo min. 98 %, Carlo Erba, Milano, Italia;
- Acqua MilliQ, 18mΩ, Millipore, Bedford, MA, USA;
- Acido Formico 99% purezza, per analisi, Carlo Erba, Milano, Italia;
- ¹³C₃-Idrocortisone (2,3,4-¹³C₃), soluzione 100 µg/mL in metanolo, Sigma-Aldrich, USA;
- D₈-Cortisone (2,2,4,6,6,9,12,12-D₈), SI, 1 mg polvere, purezza ≥ 98.0%, Sigma-Aldrich, USA.

3.1.5 Soluzioni Standard e Calibratori

La soluzione concentrata a 100 µg/mL di Cortisone-D₈, lo Standard Interno (IS), è stata preparata dissolvendo la polvere dello standard primario, 1 mg in 10 mL di metanolo; mentre l'Idrocortisone ¹³C₃ era già presente in forma di soluzione. Si è poi passati a diluire entrambe le soluzioni concentrate: il Cortisone-D₈ è stato ulteriormente diluito per ottenere due soluzioni di lavoro ad una concentrazione finale di 40 ng/mL e 400 ng/mL rispettivamente, mentre la soluzione concentrata di

Idrocortisone $^{13}\text{C}_3$ è stata diluita a diverse concentrazioni: 2 ng/mL, 10 ng/mL, 100 ng/mL, 200 ng/mL e 1 $\mu\text{g/mL}$.

Per la calibrazione del metodo sono state preparate altre tre diluizioni dell'Idrocortisone $^{13}\text{C}_3$: 2 pg/ μL , 10 pg/ μL e 100 pg/ μL .

Tutte queste soluzioni sono conservate in freezer a temperatura $< -20^\circ\text{C}$.

3.1.6 Preparazione estrattiva

Sono stati tagliati i 3 cm prossimali e poi sottoposti a lavaggio con 15 mL di acqua per 3 minuti, dopodiché 10 mL di acetone per 2 minuti. Infine, sono stati fatti asciugare a temperatura ambiente.

Nelle vials del sistema Precellys Evolution si aggiungono le palline di acciaio, utili all'omogeneizzazione dei campioni, eseguita ad una velocità di 6000 rpm per 10 minuti.

Si pesano esattamente 20 mg di capelli nelle provette per batteriologia, eliminando le palline di acciaio.

Segue la fase di estrazione: vengono aggiunti 5 mL di metanolo e 50 μL di IS a ciascun campione. Si pongono i campioni in stufa per 16 h ad una temperatura di 55°C .

Trascorso questo tempo, le provette vengono trasferite in bagno ultrasonico per 2 h. Il surnatante viene prelevato e trasferito in nuove provette per batteriologia, dopodiché evaporato sotto flusso di azoto a 35°C . Il residuo (può essere colorato) viene ricostituito in 150 μL di metanolo e 350 μL di soluzione ricostituente (ammonio formiato 1 M, 0.1 % acido formico). I campioni vengono nuovamente centrifugati per 13 minuti a 3000 giri a 10°C e il surnatante trasferito nelle vials con insert conico in polipropilene per successiva analisi all'LC-MS/MS.

	MATRICE	CAMPIONE	QUANTITA ,	AGGIUNTE	CONCENTRAZIONE TOTALE DI ¹³ C ₃ IDROCORTISON E	CONCENTRAZION E INIETTATA TEORICA
1	CAPELLI	BLK	20 mg	+50 µL IS Cortisone-D8 (40 pg/µL) + 450 µL soluzione ricostituente		
2	CAPELLI	SPK 1 pg/mg	20 mg	+ 50 µL IS Cortisone-D8 (40 pg/µL) + 10 µL ¹³ C ₃ - Idrocortisone (2 pg/µL) + 440 µL soluzione ricostituente	20 pg	0.2 pg (20 pg : 500 µL = x : 5 µL)
3	CAPELLI	SPK 2.5 pg/mg	20 mg	+ 50 µL IS Cortisone-D8 (40 pg/µL) + 25 µL ¹³ C ₃ - Idrocortisone (2 pg/µL) + 425 µL soluzione ricostituente	50 pg	0.5 pg

4	CAPELLI	SPK 5 pg/mg	20 mg	+ 50 µL IS Cortisone-D8 (40 pg/µL) + 50 µL ¹³ C ₃ - Idrocortisone (2 pg/µL) + 400 µL soluzione ricostituente	100 ng	1 pg
5	CAPELLI	SPK 10 pg/mg	20 mg	+ 50 µL IS Cortisone-D8 (40 pg/µL) + 20 µL ¹³ C ₃ - Idrocortisone (10 pg/µL) + 430 µL soluzione ricostituente	200 pg	2 pg
6	CAPELLI	SPK 25 pg/mg	20 mg	+ 50 µL IS Cortisone-D8 (40 pg/µL) + 25 µL ¹³ C ₃ - Idrocortisone (10 pg/µL) + 425 µL soluzione ricostituente	250 pg	2.5 pg
7	CAPELLI	SPK 50 pg/mg	20 mg	+ 50 µL IS Cortisone-D8 (40 pg/µL) + 10 µL ¹³ C ₃ - Idrocortisone (100 pg/µL)	1 ng	10 pg

				+ 440 µL soluzione ricostituente		
8	CAPELLI	SPK 100 pg/mg	20 mg	+ 50 µL IS Cortisone-D8 (40 pg/µL) + 20 µL ¹³ C ₃ - Idrocortisone (100 pg/µL) + 430 µL soluzione ricostituente	2 ng	20 pg
9	CAPELLI	SPK 250 pg/mg	20 mg	+ 50 µL IS Cortisone-D8 (40 pg/µL) + 50 µL ¹³ C ₃ - Idrocortisone (100 pg/µL) + 400 µL soluzione ricostituente	5 ng	50 pg
10	CAPELLI	SPK 500 pg/mg	20 mg	+ 50 µL IS Cortisone-D8 (40 pg/µL) + 100 µL ¹³ C ₃ - Idrocortisone (100 pg/µL) + 350 µL soluzione ricostituente	10 ng	100 pg

Tabella 1. Foglio di Lavoro per l'estrazione del cortisolo, prima di eseguire l'analisi strumentale all'UHPLC-MS/MS.

3.1.7 Cromatografia Liquida

La separazione cromatografica è stata condotta con un sistema UHPLC equipaggiato con una colonna BEH C18 1,8 μm 10x50 mm (Waters, Agilent), tenuta ad una temperatura di 40.0 ± 5.0 °C. L'eluizione viene eseguita a gradiente usando una soluzione acquosa di ammonio formiato (200mM) e 0.1% di acido formico (fase mobile A) e ammonio formiato (200mM) in metanolo (fase mobile B), secondo gradiente, riportato in tabella. Il flusso è stato settato a 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ con un volume di iniezione pari a 5 μL e un totale di 15 minuti di corsa cromatografica.

Min.	Flow (mL/min)	%A	%B
0.00	0.300	100.0	0.0
0.10	0.300	70.0	30.0
10.0	0.300	30.0	70.0
14.00	0.300	10.0	90.0
15.00	0.300	10.0	90.0
16.00	0.300	100.0	0.0

Tabella 4: Fasi utilizzate per la ricerca dei corticosteroidi

3.1.8 Spettrometria di Massa

Lo spettrometro di massa utilizzato è dotato di un analizzatore a triplo quadrupolo con sistema di ionizzazione ESI, settato in negativo per il nostro analita. La scansione viene eseguita in modalità MRM (Multiple Reaction Monitoring) usando azoto come gas di collisione.

Le transizioni, l'energia di collisione e il voltaggio del cono sono riportate in tabella 5.

Analita	Parent (m/z)	Daughter (m/z)	Dwell (s)	Cone (V)	Collision (V)
Cortisolo	407.1000	297.1000	0.025	24	22
Cortisolo	407.1000	331.1000	0.025	24	14
¹³C₃- Cortisolo	410.2165	285.2004	0.025	32	38
¹³C₃- Cortisolo	410.2165	334.2681	0.025	32	14
D₈-Cortisone	413.2200	309.2900	0.025	24	20
D₈-Cortisone	413.2200	337.2800	0.025	24	12

Tabella 2. Transizioni e parametri strumentali per la rivelazione del Cortisolo, del corrispondente deuterato e dell'isotopo cortisolo-¹³C₃, tramite spettrometria di massa.

Di seguito, vengono riportati tutti i parametri strumentali caratteristici con i quali è stata eseguita l'analisi dei campioni.

L'acquisizione e l'elaborazione dei dati sono state realizzate tramite un apposito software, MassLynx, che permette di controllare contemporaneamente sia il cromatografo che lo spettrometro di massa.

3.2 Curva di Calibrazione

La curva di calibrazione del cortisolo è stata costruita su 9 livelli di concentrazione (1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 pg/mg), come riportato nello studio di *Binz et al.*⁹⁸, aggiungendo specifici volumi di soluzione standard di $^{13}\text{C}_3$ -Idrocortisone a 20 mg di capelli. Lo standard interno, Cortisone-D₈, è stato aggiunto in tutti i campioni ad una concentrazione costante (50 μL).

Le punte di capelli utilizzate per allestire la curva di calibrazione non erano totalmente prive di cortisolo poiché come matrice bianca sono stati utilizzati i campioni a disposizione. La quantità di cortisolo, non pari a zero, del campione non ha consentito di ottenere una retta passante per l'origine e quindi tramite il metodo delle aggiunte standard è stato possibile traslare la retta e consentirne il passaggio per il punto (0;0).

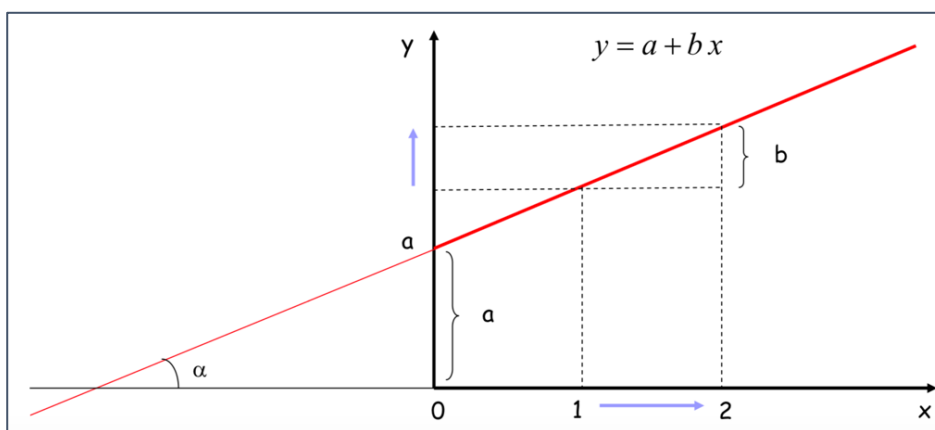


Figura 14. Metodo delle aggiunte. Vengono preparate n vials con lo stesso campione incognito e dalla 2 alla n si aggiungono quantità note e crescenti di analita puro. Si procede al trattamento dei campioni con il metodo analitico scelto fino all'analisi strumentale. In grafico vengono riportati i punti sperimentali e ad essi si applica un metodo statistico (regressione lineare, metodo dei minimi quadrati) per determinare la retta che meglio interpola i punti. La retta ottenuta viene prolungata fino ad intersecare l'asse delle ascisse, ottenendo il valore della concentrazione incognita.

3.3 Parametri di validazione del metodo

La procedura di estrazione e di analisi strumentale del cortisolo dai capelli è stata valutata attraverso specifici parametri, in accordo con le linee guida. Per la validazione sono stati utilizzati 20 mg di punte di capelli e testati i seguenti parametri con il $^{13}\text{C}_3$ -Idrocortisone.

3.3.1 Selettività

Poiché il cortisolo è un composto endogeno, è sempre presente nei capelli. Pertanto, gli esperimenti di selettività classici non possono essere eseguiti. La selettività per $^{13}\text{C}_3$ -Idrocortisone è stata testata in sei campioni di capelli casuali. I sei campioni sono stati prelevati da sei individui con diversa struttura e colore dei capelli.

3.3.2 LOD e LOQ

Il limite di rilevabilità e il limite di quantificazione sono stati determinati attraverso una calibrazione che comprende come concentrazioni: 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8 e 1 pg/mg.

	CORTISOLO	$^{13}\text{C}_3$-IDROCORTISONE
R²	0.9995	0.9992
LOD	0.2 pg/mg	0.1 pg/mg
LOQ	1 pg/mg	0.5 pg/mg

Il secondo approccio, utilizzato per determinare i due parametri, è stato quello basato sui parametri della regressione che prende in considerazione la deviazione standard dei residui ($S_{y/x}$) o dell'intercetta

(S_a); LOD e LOQ vengono, quindi, espressi tramite le seguenti equazioni [26]:

$$LOD = \frac{3 \cdot S_{y/x}}{b} \quad LOQ = \frac{10 \cdot S_{y/x}}{b}$$

$$LOD = \frac{3 \cdot S_a}{b} \quad LOQ = \frac{10 \cdot S_a}{b}$$

La curva di calibrazione usata per calcolare la deviazione standard è stata analizzata ripetutamente, 3 volte in 3 giorni diversi, ed in seguito si è potuta ricavare la relazione segnale/concentrazione ed i valori di pendenza (b) ed intercetta (a).

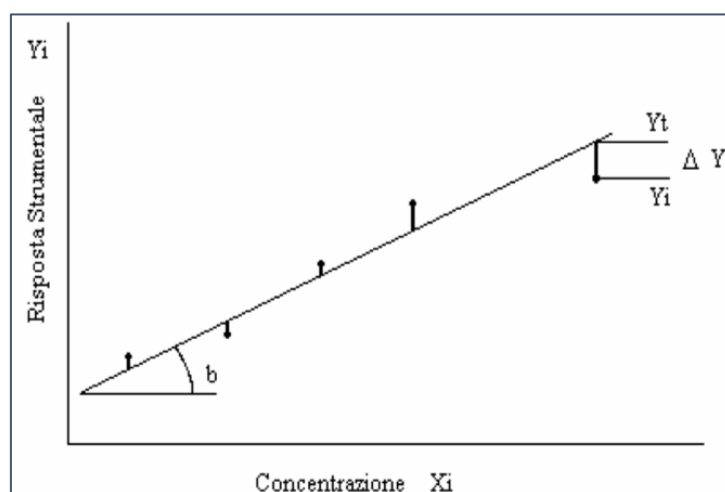


Figura 15. Retta di calibrazione e deviazione standard.

3.3.3 Precisione, effetto matrice e recupero

L'accuratezza e la precisione del metodo sono state valutate misurando due replicati di un campione QC a tre diversi livelli di concentrazione

(basso 2.5 pg/mg, medio 25 pg/mg, alto 400 pg/mg) per cinque giorni consecutivi. L'effetto matrice è stato misurato confrontando le aree sotto i picchi degli spike dopo l'estrazione con il solvente addizionato alla stessa concentrazione.

4. RISULTATI

La determinazione quantitativa dei composti endogeni nei capelli è stata una sfida per la ricerca sperimentale effettuata per questa tesi. Diversi approcci sono stati adottati in passato per aggirare questo problema. Le metodologie derivano dall'uso di addizione dello standard rispetto all'uso di matrici surrogate. Se viene scelta una matrice surrogata, è necessario prendere in considerazione alcuni aspetti come la solubilità e l'estraibilità dell'analita, che possono essere diverse nella matrice autentica e surrogata. Molto comune è anche l'uso di una matrice autentica con concentrazioni di analiti sufficientemente basse, come le punte dei capelli lunghi. In questo caso si deve tenere conto che, dopo avere modificato la matrice autentica, la solubilità e l'estraibilità dell'analita possono differire. Poiché tutti questi metodi hanno dei limiti, ci siamo concentrati sull'approccio relativamente nuovo dell'utilizzo di un analita surrogato nella matrice autentica. Pertanto, è stato sviluppato un metodo LC-MS/MS per la determinazione del cortisolo e dell'analita surrogato.

Esistono diverse tecniche di ionizzazione utilizzate per l'analisi degli steroidi sui capelli, basate su tecniche LC-MS/MS, in particolare la ionizzazione elettrospray (ESI) e la ionizzazione chimica a pressione atmosferica (APCI) ⁹⁹. La maggior parte dei metodi pubblicati in

precedenza utilizzava la modalità ESI positiva, ma è stato segnalato anche l'uso della modalità negativa. Chen et al.¹⁰⁰ ha dimostrato che, misurando l'addotto *cortisolo-formiato* in ESI negativo [(M-H) + 46]⁻, il risultato era migliore a causa di una riduzione del rumore di fondo e di un sostanziale miglioramento della sensibilità. Inoltre, è stato dimostrato da Henriksen et al.¹⁰¹ che l'ESI in modalità negativa è adatto per analiti con un carattere non polare significativo, poiché essi sono più reattivi a causa della loro maggiore affinità per le superfici delle goccioline di elettrospray.

Sulla base di questi studi è stato applicato lo stesso approccio e il cortisolo, il ¹³C₃-cortisolo, e il D₈-cortisone possono essere rilevati in modo coerente e affidabile con il metodo LC-MS/MS sviluppato come addotti formiati. Condizioni cromatografiche e sorgente stabili sono state raggiunte da una concentrazione di formiato relativamente costante (in eccesso) nell'eluente. Due diversi analiti marcati con isotopi stabili sono stati testati come analiti surrogati: il ¹³C₃-Idrocortisone e il D₈-cortisone. È stato scelto il ¹³C₃-idrocortisone poiché ha dimostrato di avere lo stesso tempo di ritenzione del cortisolo, il D₈-cortisone invece presentava un tempo di ritenzione traslato. Pertanto, il ¹³C₃-idrocortisone sembrava essere più adatto come analita surrogato, imitando meglio le proprietà cromatografiche e spettrometriche di massa del cortisolo endogeno. Il fenomeno dello spostamento del tempo di ritenzione con analiti marcati con deuterio è noto, soprattutto quando il numero di atomi di deuterio aumenta, mentre gli analiti marcati con ¹³C₃ non sembrano avere questo problema. Il D₈-cortisone è stato utilizzato come Standard Interno.

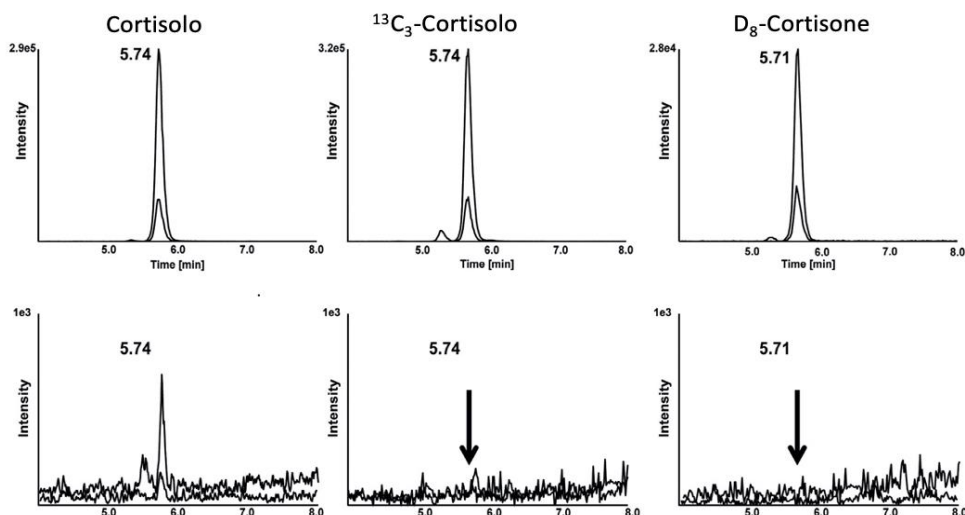


Figura 16: Cromatogramma di un campione reale addizionato con D8-cortisone e $^{13}\text{C}_3$ -idro cortisone

Un cromatogramma rappresentativo di un campione di capelli autentico addizionato con D8-cortisone e $^{13}\text{C}_3$ -idro cortisone (25 pg/mg) è mostrato in figura 16, dove si può apprezzare anche il cortisolo endogeno. Il fattore di risposta (rapporto di risposta per l'analita surrogato e l'analita autentico) è stato di 0.93, il che dimostra che gli analiti si comportano allo stesso modo.

4.1 Linearità, LOD e LOQ

La calibrazione è stata effettuata con il $^{13}\text{C}_3$ -Idrocortisone. La curva di calibrazione, per entrambe le transizioni MRM, ha mostrato una linearità fino a 500 pg/mg. Il quadrato del coefficiente di correlazione (R^2) è stato di 0.9992.

Per determinare LOD e LOQ è stata effettuata una seconda curva di calibrazione a concentrazione tra 0.1 e 1 pg/mg. Il LOD e il LOQ hanno dato esito di 0.1 pg/mg e 0.5 pg/mg con un rapporto segnale/rumore di 3:1 (LOD) e 10:1 (LOQ).

Nel complesso, si può affermare che l'analita ha mostrato linearità. Per applicazioni pratiche è stata utilizzata una curva di calibrazione da 0.5 a 500 pg/mg per la determinazione dei livelli di cortisolo in campioni di capelli autentici poiché le concentrazioni di cortisolo nei capelli normalmente superano 1 pg/mg.

4.2 Recupero ed effetto matrice

I dati per il recupero e l'effetto matrice sono riassunti in tabella 6. Il recupero è stato buono (78.57 %) per la bassa concentrazione e 73.89 % per l'alta concentrazione, con deviazione standard relativa (RDS) inferiore al 25 %. Gli effetti della matrice non sono stati osservati per il $^{13}\text{C}_3$ -Idrocortisone.

	CORTISOLO Livelli bassi (2.5 pg/mg)	CORTISOLO Livelli alti (400 pg/mg)	$^{13}\text{C}_3$ - IDROCORTISONE Livelli bassi (2.5 pg/mg)	$^{13}\text{C}_3$ - IDROCORTISONE Livelli alti (400 pg/mg)
RECUPERO (%)	83.4	92.07	78.57	73.89
RSD (%)	8.91	5.2	5.6	11.3
EFFETTO MATRICE (%)	113.9	70.2	71.4	68.7
RSD (%)	31.9	3.33	5.9	6.4

Tabella 6. Recupero ed effetto matrice ($N=6$)

4.3 Precisione ed accuratezza

I risultati per l'accuratezza e la precisione sono riassunti nella tabella n.7. La precisione e l'accuratezza per $^{13}\text{C}_3$ -Idrocortisone ha soddisfatto i criteri richiesti.

Calibrazione: $^{13}\text{C}_3$ -Idrocortisone
Analita: cortisolo

Calibrazione: Cortisolo
Analita: $^{13}\text{C}_3$ -Idrocortisone

		BASSO (2.5 pg/mg)	MEDIO (25 pg/mg)	ALTO (400 pg/mg)	BASSO (2.5 pg/mg)	MEDIO (25 pg/mg)	ALTO (400 pg/mg)
CARATTERISTICHE	MEDIA (pg/mg)	2.9	21.6	342	2.3	21.6	343
	SD (pg/mg)	0.3	1.9	19.8	0.2	2.0	19
	RSD (%)	7.5	7.5	5.6	9.3	8.5	5.2
ACCURATEZZA	VARIANZA (pg/mg)	0.6	-0.7	-18.1	-0.1	-0.8	-10.1
	BIAS (%)	23.5	-3.3	-4.4	-3.4	-3.6	-2.6
PRECISIONE INTRADAY	SD (PG/MG)	0.2	1.0	11.8	0.2	0.9	5.3
	RSD (%)	6.8	4.1	3.0	9.7	3.7	1.3
PRECISIONE INTERDAY	SD (PG/MG)	0.3	2.0	19.8	0.2	1.2	1.0
	RSD (%)	8.4	8.1	5.8	9	4.8	2.5

Tabella 7. Accuratezza e precisione, (N=2), per cinque giorni consecutivi

Per verificare se la quantità di capelli utilizzata per l'estrazione potesse avere un'influenza sulla determinazione dei livelli di cortisolo, sono state pesate quantità crescenti di capelli (5.6 mg, 7.0 mg, 10.31 mg, 12.28 mg e 17.0 mg) da un pool di capelli omogeneizzato, dopodiché quest'ultimo è stato estratto e analizzato all' LC-MS/MS. anche con una quantità bassa di soli 5.6 mg di capelli, la concentrazione di cortisolo potrebbe essere determinata in modo affidabile con il nuovo metodo (calibrazione con $^{13}\text{C}_3$ -idrocortisone). Con l'aumentare della quantità di capelli la concentrazione non è cambiata, il che ha dimostrato la robustezza del metodo.

Conclusioni

La convalida del metodo ha dimostrato che l'analita surrogato $^{13}\text{C}_3$ -Idrocortisone si comporta in modo identico all'autentico analita *cortisolo* per tutti i parametri di convalida.

Le applicazioni hanno dimostrato che questo metodo produce dati affidabili ed è particolarmente utile per determinare basse concentrazioni di cortisolo endogeno.

Pertanto, il metodo può essere utilizzato per studiare le condizioni associate alle alterazioni del cortisolo nei capelli e proposto in letteratura.

RINGRAZIAMENTI

Un ringraziamento speciale va alle mie relatrici, la prof.ssa Giorgia Miolo e la prof.ssa Donata Favretto. Grazie a entrambe per la vicinanza, grazie per avermi spronato costantemente, fino al raggiungimento di questo importante obiettivo.

5. BIBLIOGRAFIA

¹ Pascal Kintz, «Value of the Concept of Minimal Detectable Dosage in Human Hair», *Forensic Science International*, Proceedings of the Society of Hair Testing (SoHT) annual meeting in Chamonix (21-26 March 2011)., 218, n. 1 (10 maggio 2012): 28–30, <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2011.10.018>.

² «Current status of accreditation for drug testing in hair - PubMed», consultato 12 aprile 2022, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18024039/>.

³ B. Weider e J. H. Fournier, «Activation Analyses of Authenticated Hairs of Napoleon Bonaparte Confirm Arsenic Poisoning», *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology* 20, n. 4 (dicembre 1999): 378–82, <https://doi.org/10.1097/00000433-199912000-00013>.

⁴ A. C. Springfield et al., «Cocaine and Metabolites in the Hair of Ancient Peruvian Coca Leaf Chewers», *Forensic Science International* 63, n. 1–3 (dicembre 1993): 269–75, [https://doi.org/10.1016/0379-0738\(93\)90280-n](https://doi.org/10.1016/0379-0738(93)90280-n).

⁵ Craig Chatterton e Pascal Kintz, «Hair Analysis to Demonstrate Administration of Amitriptyline, Temazepam, Tramadol and Dihydrocodeine to a Child in a Case of Kidnap and False Imprisonment», *Journal of Forensic and Legal Medicine* 23 (marzo 2014): 26–31, <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2014.01.005>.

⁶ L. Pötsch e M. R. Moeller, «On Pathways for Small Molecules into and out of Human Hair Fibers», *Journal of Forensic Sciences* 41, n. 1 (gennaio 1996): 121–25.

⁷ G. Skopp, L. Pötsch, e M. Mauden, «Stability of Cannabinoids in Hair Samples Exposed to Sunlight», *Clinical Chemistry* 46, n. 11 (novembre 2000): 1846–48.

⁸ Donata Favretto et al., «A Study on Photodegradation of Methadone, EDDP, and Other Drugs of Abuse in Hair Exposed to Controlled UVB Radiation», *Drug Testing and Analysis* 6 Suppl 1 (giugno 2014): 78–84, <https://doi.org/10.1002/dta.1607>.

⁹ «Experimental Investigations on Hair Fibers As Diffusion Bridges and Opiates As Solutes in Solution | Office of Justice Programs», consultato 12 aprile 2022, <https://www.ojp.gov/ncjrs/virtual-library/abstracts/experimental-investigations-hair-fibers-diffusion-bridges-and>.

¹⁰ J. Röhrich et al., «Effect of the Shampoo Ultra Clean on Drug Concentrations in Human Hair», *International Journal of Legal Medicine* 113, n. 2 (2000): 102–6, <https://doi.org/10.1007/p100007707>.

¹¹ Barbara Buffoli et al., «The Human Hair: From Anatomy to Physiology», *International Journal of Dermatology* 53, n. 3 (marzo 2014): 331–41, <https://doi.org/10.1111/ijd.12362>.

¹² M. R. Harkey, «Anatomy and Physiology of Hair», *Forensic Science International* 63, n. 1–3 (dicembre 1993): 9–18, [https://doi.org/10.1016/0379-0738\(93\)90255-9](https://doi.org/10.1016/0379-0738(93)90255-9).

¹³ Ralf Paus, Petra Arck, e Stephan Tiede, «(Neuro-)Endocrinology of Epithelial Hair Follicle Stem Cells», *Molecular and Cellular Endocrinology* 288, n. 1–2 (25 giugno 2008): 38–51, <https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.02.023>.

¹⁴ F. J. Ebling, «The Biology of Hair», *Dermatologic Clinics* 5, n. 3 (luglio 1987): 467–81.

¹⁵ Roland De la Mettrie et al., «Shape Variability and Classification of Human Hair: A Worldwide Approach», *Human Biology* 79, n. 3 (giugno 2007): 265–81, <https://doi.org/10.1353/hub.2007.0045>.

¹⁶ V. A. Randall e F. J. Ebling, «Seasonal Changes in Human Hair Growth», *The British Journal of Dermatology* 124, n. 2 (febbraio 1991): 146–51, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1991.tb00423.x>.

¹⁷ Leszek J. Wolfram, «Human Hair: A Unique Physicochemical Composite», *Journal of the American Academy of Dermatology* 48, n. 6 Suppl (giugno 2003): S106–114, <https://doi.org/10.1067/mjd.2003.276>.

¹⁸ R. Paus, «Principles of Hair Cycle Control», *The Journal of Dermatology* 25, n. 12 (dicembre 1998): 793–802, <https://doi.org/10.1111/j.1346-8138.1998.tb02507.x>.

¹⁹ Hanna Wosicka e Krzysztof Cal, «Targeting to the Hair Follicles: Current Status and Potential», *Journal of Dermatological Science* 57, n. 2 (febbraio 2010): 83–89, <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2009.12.005>.

²⁰ Society of Hair Testing, «Recommendations for Hair Testing in Forensic Cases», *Forensic Science International* 145, n. 2–3 (29 ottobre 2004): 83–84, <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.04.022>.

²¹ Harkey, «Anatomy and Physiology of Hair».

²² «A Discourse on Human Hair Fibers and Reflections on the Conservation of Drug Molecules - [PDF Document]», fdocuments.in, consultato 17 aprile 2022, <https://fdocuments.in/document/a-discourse-on-human-hair-fibers-and-reflections-on-the-conservation-of-drug.html>.

²³ Harkey, «Anatomy and Physiology of Hair».

²⁴ Harkey.

²⁵ V. Pecoraro et al., «THE NORMAL TRICHOGRAM IN THE CHILD BEFORE THE AGE OF PUBERTY», *The Journal of Investigative Dermatology* 42 (giugno 1964): 427–30, <https://doi.org/10.1038/jid.1964.92>.

²⁶ Julian H. Barth, «Normal Hair Growth in Children», *Pediatric Dermatology* 4, n. 3 (1987): 173–84, <https://doi.org/10.1111/j.1525-1470.1987.tb00775.x>.

²⁷ Harkey, «Anatomy and Physiology of Hair».

²⁸ G. Prota, «The Role of Peroxidase in Melanogenesis Revisited», *Pigment Cell Research Suppl* 2 (1992): 25–31, <https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.1990.tb00344.x>.

²⁹ Andrzej Slominski et al., «Hair Follicle Pigmentation», *The Journal of Investigative Dermatology* 124, n. 1 (gennaio 2005): 13–21, <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.23528.x>.

³⁰ G. Prota, «Melanins, Melanogenesis and Melanocytes: Looking at Their Functional Significance from the Chemist's Viewpoint», *Pigment Cell Research* 13, n. 4 (agosto 2000): 283–93, <https://doi.org/10.1034/j.1600-0749.2000.130412.x>.

³¹ «The Biology of Hair Growth - 1st Edition», Chapter 14. consultato 17 aprile 2022, <https://www.elsevier.com/books/the-biology-of-hair-growth/montagna/978-1-4832-3287-4>.

³² Pascal Kintz, *Analytical and Practical Aspects of Drug Testing in Hair* (CRC Press, 2006).

³³ «Hair Analysis for Drugs of Abuse», consultato 17 aprile 2022, <https://www.astm.org/jfs12787j.html>.

³⁴ «PRIME PubMed | Technical Issues Concerning Hair Analysis for Drugs of Abuse», consultato 17 aprile 2022, https://www.unboundmedicine.com/medline/citation/8606746/Technical_issues_concerning_hair_analysis_for_drugs_of_abuse_.

³⁵ L. Pötsch, G. Skopp, e M. R. Moeller, «Biochemical Approach on the Conservation of Drug Molecules during Hair Fiber Formation», *Forensic Science International* 84, n. 1–3 (17 gennaio 1997): 25–35, [https://doi.org/10.1016/s0379-0738\(96\)02045-2](https://doi.org/10.1016/s0379-0738(96)02045-2).

³⁶ Y. Nakahara e R. Kikura, «Hair Analysis for Drugs of Abuse. XIII. Effect of Structural Factors on Incorporation of Drugs into Hair: The Incorporation Rates of Amphetamine Analogs», *Archives of Toxicology* 70, n. 12 (1996): 841–49, <https://doi.org/10.1007/s002040050348>.

³⁷ P. R. Stout e J. A. Ruth, «Comparison of in Vivo and in Vitro Deposition of Rhodamine and Fluorescein in Hair», *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 26, n. 10 (ottobre 1998): 943–48.

³⁸ M. A. Huestis et al., «Sweat Testing for Cocaine, Codeine and Metabolites by Gas Chromatography-Mass Spectrometry», *Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications* 733, n. 1–2 (15 ottobre 1999): 247–64, [https://doi.org/10.1016/s0378-4347\(99\)00246-7](https://doi.org/10.1016/s0378-4347(99)00246-7).

³⁹ R. E. Joseph et al., «Drug Testing with Alternative Matrices I. Pharmacological Effects and Disposition of Cocaine and Codeine in Plasma, Sebum, and Stratum Corneum», *Journal of Analytical Toxicology* 22, n. 1 (febbraio 1998): 6–17, <https://doi.org/10.1093/jat/22.1.6>.

⁴⁰ Johannes Schröder, Michael Rothe, e Fritz Pragst, «Ethyl Glucuronide Concentrations in Beard Hair after a Single Alcohol Dose: Evidence for Incorporation in Hair Root», *International Journal of Legal Medicine* 126, n. 5 (settembre 2012): 791–99, <https://doi.org/10.1007/s00414-012-0729-z>.

⁴¹ Xavier Joya et al., «Unsuspected Exposure to Cocaine in Preschool Children from a Mediterranean City Detected by Hair Analysis», *Therapeutic Drug Monitoring* 31, n. 3 (giugno 2009): 391–95, <https://doi.org/10.1097/FTD.0b013e31819c3f2b>.

⁴² Facundo Garcia-Bournissen et al., «Passive Environmental Exposure to Cocaine in Canadian Children», *Paediatric Drugs* 11, n. 1 (2009): 30–32, <https://doi.org/10.2165/0148581-200911010-00011>.

⁴³ Simona Pichini et al., «Pediatric Exposure to Drugs of Abuse by Hair Testing: Monitoring 15 Years of Evolution in Spain», *International Journal of Environmental*

Research and Public Health 11, n. 8 (agosto 2014): 8267–75, <https://doi.org/10.3390/ijerph110808267>.

⁴⁴ S. Iwersen et al., «Evidence of Gestational Heroin Exposure by Comparative Analysis of Fetal and Maternal Body Fluids, Tissues, and Hair in a Heroin-Related Death», *Journal of Analytical Toxicology* 22, n. 4 (agosto 1998): 296–98, <https://doi.org/10.1093/jat/22.4.296>.

⁴⁵ Teresa Gray e Marilyn Huestis, «Bioanalytical Procedures for Monitoring in Utero Drug Exposure», *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 388, n. 7 (agosto 2007): 1455–65, <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1228-9>.

⁴⁶ Joey Gareri e Gideon Koren, «Prenatal Hair Development: Implications for Drug Exposure Determination», *Forensic Science International* 196, n. 1–3 (20 marzo 2010): 27–31, <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2009.12.024>.

⁴⁷ Jana Thorspecken, Gisela Skopp, e Lucia Pötsch, «In Vitro Contamination of Hair by Marijuana Smoke», *Clinical Chemistry* 50, n. 3 (marzo 2004): 596–602, <https://doi.org/10.1373/clinchem.2003.026120>.

⁴⁸ Sue Paterson, Sooyeon Lee, e Rosa Cordero, «Analysis of Hair after Contamination with Blood Containing Cocaine and Blood Containing Benzoylcegonine», *Forensic Science International* 194, n. 1–3 (30 gennaio 2010): 94–96, <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2009.10.018>.

⁴⁹ Paterson, Lee, e Cordero.

⁵⁰ G. Romano, N. Barbera, e I. Lombardo, «Hair Testing for Drugs of Abuse: Evaluation of External Cocaine Contamination and Risk of False Positives», *Forensic Science International* 123, n. 2–3 (1 dicembre 2001): 119–29, [https://doi.org/10.1016/s0379-0738\(01\)00539-4](https://doi.org/10.1016/s0379-0738(01)00539-4).

⁵¹ V. Pirro et al., «A Study of Distribution of Ethyl Glucuronide in Different Keratin Matrices», *Forensic Science International* 210, n. 1–3 (15 luglio 2011): 271–77, <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2011.03.026>.

⁵² Stout e Ruth, «Comparison of in Vivo and in Vitro Deposition of Rhodamine and Fluorescein in Hair».

⁵³ Cynthia L. Morris-Kukoski, Madeline A. Montgomery, e Rena L. Hammer, «Analysis of Extensively Washed Hair from Cocaine Users and Drug Chemists to Establish New Reporting Criteria», *Journal of Analytical Toxicology* 38, n. 9 (dicembre 2014): 628–36, <https://doi.org/10.1093/jat/bku099>.

⁵⁴ A. P. Ferko et al., «The Accumulation and Disappearance of Cocaine and Benzoylcegonine in Rat Hair Following Prolonged Administration of Cocaine», *Life Sciences* 51, n. 23 (1992): 1823–32, [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(92\)90054-s](https://doi.org/10.1016/0024-3205(92)90054-s).

⁵⁵ Karl B. Scheidweiler et al., «Dose-Related Distribution of Codeine, Cocaine, and Metabolites into Human Hair Following Controlled Oral Codeine and Subcutaneous Cocaine Administration», *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 313, n. 2 (maggio 2005): 909–15, <https://doi.org/10.1124/jpet.104.082388>.

⁵⁶ R. Forman et al., «Accumulation of Cocaine in Maternal and Fetal Hair; the Dose Response Curve», *Life Sciences* 50, n. 18 (1992): 1333–41, [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(92\)90284-v](https://doi.org/10.1016/0024-3205(92)90284-v).

⁵⁷ F. Pragst et al., «Structural and Concentration Effects on the Deposition of Tricyclic Antidepressants in Human Hair», *Forensic Science International* 84, n. 1–3 (17 gennaio 1997): 225–36, [https://doi.org/10.1016/s0379-0738\(96\)02066-x](https://doi.org/10.1016/s0379-0738(96)02066-x).

⁵⁸ C. Girod e C. Staub, «Methadone and EDDP in Hair from Human Subjects Following a Maintenance Program: Results of a Pilot Study», *Forensic Science International* 117, n. 3 (1 aprile 2001): 175–84, [https://doi.org/10.1016/s0379-0738\(00\)00403-5](https://doi.org/10.1016/s0379-0738(00)00403-5).

⁵⁹ Aldo Polettini et al., «Incorporation of methamphetamine and amphetamine in human hair following controlled oral methamphetamine administration», *Analytica Chimica Acta* 726 (13 maggio 2012): 35–43, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.01.042>.

⁶⁰ Sue Paterson et al., «Interindividual Dose/Concentration Relationship for Methadone in Hair», *Journal of Analytical Toxicology* 27, n. 1 (febbraio 2003): 20–23, <https://doi.org/10.1093/jat/27.1.20>.

⁶¹ Polettini et al., «Incorporation of methamphetamine and amphetamine in human hair following controlled oral methamphetamine administration».

⁶² Marisol S. Castaneto et al., «Identifying methamphetamine exposure in children», *Therapeutic drug monitoring* 35, n. 6 (dicembre 2013): 10.1097/FTD.0b013e31829685b2, <https://doi.org/10.1097/FTD.0b013e31829685b2>.

⁶³ T. Bassindale, «Quantitative Analysis of Methamphetamine in Hair of Children Removed from Clandestine Laboratories--Evidence of Passive Exposure?», *Forensic Science International* 219, n. 1–3 (10 giugno 2012): 179–82, <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2012.01.003>.

⁶⁴ L. Pötsch, G. Skopp, e M. R. Moeller, «Influence of Pigmentation on the Codeine Content of Hair Fibers in Guinea Pigs», *Journal of Forensic Sciences* 42, n. 6 (novembre 1997): 1095–98.

⁶⁵ M. H. Slawson, D. G. Wilkins, e D. E. Rollins, «The Incorporation of Drugs into Hair: Relationship of Hair Color and Melanin Concentration to Phencyclidine Incorporation», *Journal of Analytical Toxicology* 22, n. 6 (ottobre 1998): 406–13, <https://doi.org/10.1093/jat/22.6.406>.

⁶⁶ C. R. Borges, D. G. Wilkins, e D. E. Rollins, «Amphetamine and N-Acetylamphetamine Incorporation into Hair: An Investigation of the Potential Role of Drug Basicity in Hair Color Bias», *Journal of Analytical Toxicology* 25, n. 4 (giugno 2001): 221–27, <https://doi.org/10.1093/jat/25.4.221>.

⁶⁷ Ruri Kikura-Hanajiri et al., «The Disposition into Hair of New Designer Drugs; Methylone, MBDB and Methcathinone», *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 855, n. 2 (15 agosto 2007): 121–26, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.05.018>; Karen S. Scott e Yuji Nakahara, «A Study into the Rate of Incorporation of Eight Benzodiazepines into Rat Hair», *Forensic Science International* 133, n. 1–2 (23 aprile 2003): 47–56, [https://doi.org/10.1016/s0379-0738\(03\)00049-5](https://doi.org/10.1016/s0379-0738(03)00049-5); Sooyeun Lee et al., «Simultaneous Quantification of Opiates and Effect of Pigmentation on Its Deposition in Hair», *Archives of Pharmacal Research* 33, n. 11 (novembre 2010): 1805–11, <https://doi.org/10.1007/s12272-010-1113-5>.

⁶⁸ Vivian Kulaga et al., «The Effect of Hair Pigment on the Incorporation of Fatty Acid Ethyl Esters (FAEE)», *Alcohol and Alcoholism (Oxford, Oxfordshire)* 44, n. 3 (giugno 2009): 287–92, <https://doi.org/10.1093/alcalc/agn114>.

⁶⁹ Sooyeon Lee et al., «An LC-MS/MS Method for the Determination of Five Erectile Dysfunction Drugs and Their Selected Metabolites in Hair», *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 978–979 (26 gennaio 2015): 1–10, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.11.024>.

⁷⁰ K. Saisho et al., «Hair Analysis for Pharmaceutical Drugs. II. Effective Extraction and Determination of Sildenafil (Viagra) and Its N-Desmethyl Metabolite in Rat and Human Hair by GC-MS», *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 24, n. 12 (dicembre 2001): 1384–88, <https://doi.org/10.1248/bpb.24.1384>.

⁷¹ Jihyun Kim et al., «Simultaneous Determination of Five Naphthoylindole-Based Synthetic Cannabinoids and Metabolites and Their Deposition in Human and Rat Hair», *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 102 (gennaio 2015): 162–75, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.09.013>.

⁷² Robert Kronstrand et al., «Quantitative Analysis of Desmethylselegiline, Methamphetamine, and Amphetamine in Hair and Plasma from Parkinson Patients on Long-Term Selegiline Medication», *Journal of Analytical Toxicology* 27, n. 3 (aprile 2003): 135–41, <https://doi.org/10.1093/jat/27.3.135>.

⁷³ Ronald Agius, Pascal Kintz, e European Workplace Drug Testing Society, «Guidelines for European Workplace Drug and Alcohol Testing in Hair», *Drug Testing and Analysis* 2, n. 8 (agosto 2010): 367–76, <https://doi.org/10.1002/dta.147>; Karen S. Scott, «The Use of Hair as a Toxicological Tool in DFC Casework», *Science & Justice: Journal of the Forensic Science Society* 49, n. 4 (dicembre 2009): 250–53, <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2009.09.013>.

⁷⁴ Gail A. A. Cooper et al., «Society of Hair Testing Guidelines for Drug Testing in Hair», *Forensic Science International* 218, n. 1–3 (10 maggio 2012): 20–24, <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2011.10.024>.

⁷⁵ Pascal Kintz, «Segmental Hair Analysis Can Demonstrate External Contamination in Postmortem Cases», *Forensic Science International* 215, n. 1–3 (10 febbraio 2012): 73–76, <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2011.01.041>.

⁷⁶ Marc A. LeBeau, Madeline A. Montgomery, e Jason D. Brewer, «The Role of Variations in Growth Rate and Sample Collection on Interpreting Results of Segmental Analyses of Hair», *Forensic Science International* 210, n. 1–3 (15 luglio 2011): 110–16, <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2011.02.015>.

⁷⁷ M. K. S. Shbair et al., «Drugs Involved in Drug-Facilitated Crimes--Part II: Drugs of Abuse, Prescription and over-the-Counter Medications. A Review», *Annales Pharmaceutiques Françaises* 68, n. 6 (novembre 2010): 319–31, <https://doi.org/10.1016/j.pharma.2010.07.003>.

⁷⁸ Cooper et al., «Society of Hair Testing Guidelines for Drug Testing in Hair».

⁷⁹ Pascal Kintz, «Bioanalytical Procedures for Detection of Chemical Agents in Hair in the Case of Drug-Facilitated Crimes», *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 388, n. 7 (agosto 2007): 1467–74, <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1209-z>.

⁸⁰ Cooper et al., «Society of Hair Testing Guidelines for Drug Testing in Hair».

⁸¹ Linda Becker, Ursula Schade, e Nicolas Rohleder, «Activation of the hypothalamic-pituitary adrenal axis in response to a verbal fluency task and associations with task performance», *PLoS ONE* 15, n. 4 (16 aprile 2020): e0227721, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227721>.

⁸² «Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Activation in Obstructive Sleep Apnea: The Effect of Continuous Positive Airway Pressure Therapy | The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism | Oxford Academic», consultato 7 maggio 2022, <https://academic.oup.com/jcem/article/94/11/4234/2596342>.

⁸³ S. Thomson et al., «Hair Analysis Provides a Historical Record of Cortisol Levels in Cushing's Syndrome», *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association* 118, n. 2 (febbraio 2010): 133–38, <https://doi.org/10.1055/s-0029-1220771>.

⁸⁴ Thomson et al.

⁸⁵ Laura Manenschijn et al., «Evaluation of a Method to Measure Long Term Cortisol Levels», *Steroids* 76, n. 10–11 (ottobre 2011): 1032–36, <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2011.04.005>.

⁸⁶ David Pereg et al., «Hair Cortisol and the Risk for Acute Myocardial Infarction in Adult Men», *Stress (Amsterdam, Netherlands)* 14, n. 1 (gennaio 2011): 73–81, <https://doi.org/10.3109/10253890.2010.511352>.

⁸⁷ Nicole Vogelzangs et al., «Urinary Cortisol and Six-Year Risk of All-Cause and Cardiovascular Mortality», *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 95, n. 11 (novembre 2010): 4959–64, <https://doi.org/10.1210/jc.2010-0192>.

⁸⁸ R. Gow et al., «An Assessment of Cortisol Analysis in Hair and Its Clinical Applications», *Forensic Science International* 196, n. 1–3 (20 marzo 2010): 32–37, <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2009.12.040>.

⁸⁹ Rosalba Gatti et al., «Cortisol Assays and Diagnostic Laboratory Procedures in Human Biological Fluids», *Clinical Biochemistry* 42, n. 12 (agosto 2009): 1205–17, <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2009.04.011>.

⁹⁰ Sanjiv M. Baxi et al., «Comparing the Novel Method of Assessing PrEP Adherence/Exposure Using Hair Samples to Other Pharmacologic and Traditional Measures», *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999)* 68, n. 1 (1 gennaio 2015): 13–20, <https://doi.org/10.1097/QAI.0000000000000386>; Monica Gandhi et al., «Short Communication: A Low-Cost Method for Analyzing Nevirapine Levels in Hair as a Marker of Adherence in Resource-Limited Settings», *AIDS Research and Human Retroviruses* 30, n. 1 (1 gennaio 2014): 25–28, <https://doi.org/10.1089/aid.2013.0239>.

⁹¹ E. Ullmann et al., «Pilot Study of Adrenal Steroid Hormones in Hair as an Indicator of Chronic Mental and Physical Stress», *Scientific Reports* 6, n. 1 (settembre 2016): 25842, <https://doi.org/10.1038/srep25842>.

⁹² Evan Russell et al., «Hair Cortisol as a Biological Marker of Chronic Stress: Current Status, Future Directions and Unanswered Questions», *Psychoneuroendocrinology* 37, n. 5 (maggio 2012): 589–601, <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2011.09.009>.

⁹³ Sarah J. Short et al., «Correspondence between hair cortisol concentrations and 30-day integrated daily salivary and weekly urinary cortisol measures», *Psychoneuroendocrinology* 71 (settembre 2016): 12–18, <https://doi.org/10.1016/j.psychneuen.2016.05.007>.

⁹⁴ Tobias Stalder e Clemens Kirschbaum, «Analysis of Cortisol in Hair--State of the Art and Future Directions», *Brain, Behavior, and Immunity* 26, n. 7 (ottobre 2012): 1019–29, <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2012.02.002>.

⁹⁵ «C.M. Mendel, The free hormone hypothesis: a physiologically based mathematical model, *Endocr. Rev.* 10 (3) (1989) 232–274. - Cerca con Google», consultato 28 giugno 2022, [https://www.google.com/search?q=C.M.+Mendel%2C+The+free+hormone+hypothesis%3A+a+physiologically+based+mathematical+model%2C+Endocr.+Rev.+10+\(3\)+\(1989\)+232%E2%80%93274.&oq=C.M.+Mendel%2C+The+free+hormone+hypothesis%3A+a+physiologically+based+mathematical+model%2C+Endocr.+Rev.+10+\(3\)+\(1989\)+232%E2%80%93274.&aqs=chrome.69i57.617j0j4&sourceid=chrome&ie=UTF-8](https://www.google.com/search?q=C.M.+Mendel%2C+The+free+hormone+hypothesis%3A+a+physiologically+based+mathematical+model%2C+Endocr.+Rev.+10+(3)+(1989)+232%E2%80%93274.&oq=C.M.+Mendel%2C+The+free+hormone+hypothesis%3A+a+physiologically+based+mathematical+model%2C+Endocr.+Rev.+10+(3)+(1989)+232%E2%80%93274.&aqs=chrome.69i57.617j0j4&sourceid=chrome&ie=UTF-8).

⁹⁶ Anneli Kruve et al., «Tutorial Review on Validation of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Methods: Part I», *Analytica Chimica Acta* 870 (22 aprile 2015): 29–44, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.017>.

⁹⁷ Zheng Chen et al., «Simultaneous Determination of Hair Cortisol, Cortisone and DHEAS with Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry in Negative Mode», *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 929 (15 giugno 2013): 187–94, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.04.026>.

⁹⁸ Tina M. Binz et al., «Development of an LC-MS/MS Method for the Determination of Endogenous Cortisol in Hair Using ¹³C₃-Labeled Cortisol as Surrogate Analyte», *Journal of Chromatography B* 1033–1034 (15 ottobre 2016): 65–72, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.07.041>.

⁹⁹ Wei Gao et al., «LC-MS Based Analysis of Endogenous Steroid Hormones in Human Hair», *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 162 (settembre 2016): 92–99, <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.12.022>.

¹⁰⁰ Zheng Chen et al., «Simultaneous Determination of Hair Cortisol, Cortisone and DHEAS with Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry in Negative Mode», *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 929 (15 giugno 2013): 187–94, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.04.026>.

¹⁰¹ Trine Henriksen et al., «The Relative Influences of Acidity and Polarity on Responsiveness of Small Organic Molecules to Analysis with Negative Ion Electrospray Ionization Mass Spectrometry (ESI-MS)», *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 16, n. 4 (aprile 2005): 446–55, <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2004.11.021>.