



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Scuola di Medicina e Chirurgia - Dipartimento di Medicina - DIMED

Corso di Laurea in

Tecniche di Laboratorio Biomedico

Presidente: Chiarissimo Prof. Matteo Fassan

TESI DI LAUREA SPERIMENTALE

**Validazione di un metodo di estrazione simultanea di
sostanze stupefacenti, farmaci e metaboliti da
matrici cheratiniche**

Relatrice: Chiar.ma Prof.ssa Donata Favretto

Correlatrice: Raffaella Stimamiglio

Laureanda/Laureando: Aurora Casa

Matricola: 1227818

Anno Accademico 2021 – 2022

Dedicata alla mia famiglia

Indice

Abstract.....	7
1. Introduzione.....	9
1.1 Anatomia dei peli.....	9
1.2 Fisiologia dei peli.....	11
1.3 Meccanismo di incorporazione delle sostanze.....	11
1.4 Le sostanze ricercate.....	12
2. Fase preanalitica.....	17
2.1 Campionamento e decontaminazione.....	17
3. Tecniche analitiche.....	18
3.1 Cromatografia.....	18
3.2 Cromatografia liquida ad alta pressione.....	19
3.3 Spettrometria di massa.....	21
3.4 Sistema UHPLC-MS/MS Xevo TQ-S micro.....	23
4. Parametri di validazione di una metodica analitica.....	24
4.1 Selettività.....	24
4.2 Limite di rilevabilità e limite di quantificazione.....	24
4.3 Intervallo di misura.....	25
4.4 Incertezza di misura.....	25
4.5 Precisione.....	25
4.6 Robustezza.....	26
4.7 Esattezza.....	26
4.8 Sensibilità.....	27
4.9 Effetto matrice.....	27
4.10 Recupero.....	27
5. Scopo.....	28
 PARTE SPERIMENTALE	
6. Materiali e metodi.....	29
6.1 Vetreria.....	29
6.2 Strumentazione.....	29
6.3 Reagenti.....	29
6.4 Soluzioni standard e calibratori.....	29
7. Analisi.....	32
7.1 Lavaggio ed Estrazione.....	32
7.2 Cromatografia liquida.....	35
7.3 Spettrometria di massa.....	36
8. Curva di calibrazione.....	39
9. Parametri di validazione	40
9.1 Sensibilità e Specificità.....	40
9.2 Accuratezza.....	40
9.3 Precisione.....	40
9.4 Limite di rilevabilità e limite di quantificazione.....	40
9.5 Linearità e robustezza.....	41
9.6 Recupero ed effetto matrice.....	41

10. Risultati	42
10.1 Sensibilità e Specificità.....	42
10.2 Accuratezza.....	42
10.3 Precisione.....	43
10.4 Limite di rilevabilità e limite di quantificazione.....	45
10.5 Linearità e robustezza.....	47
10.6 Recupero ed effetto matrice.....	48
11. Discussione	51
12. Conclusioni	52
13. Bibliografia	53

Abstract

Nelle indagini forensi le formazioni pilifere (capelli, peli) vengono utilizzati per determinare l'uso acuto e/o cronico di sostanze stupefacenti e farmaci, con possibilità di indagine retrospettiva.

Con l'aumento del consumo di droghe e conseguente aumento delle richieste di analisi sia in ambito medico-legale che clinico (idoneità alla guida, al lavoro, al porto d'armi, al trapianto), il laboratorio di Tossicologia ha la necessità di processare un numero sempre maggiore di campioni in breve tempo, per un sempre maggior numero di analiti.

Si è quindi proposto l'uso di una metodica omnicomprensiva per la preparazione e l'analisi delle formazioni pilifere per diverse classi di sostanze (basiche, acide, neutre) e/o metaboliti.

L'obiettivo era di ottimizzare i tempi, il consumo di reagenti, la quantità di campione necessari per l'analisi.

In questo modo anche se il campione è scarso, come accade spesso per i pazienti pediatrici, si possono eseguire diverse analisi con una quantità molto limitata di campione.

Il metodo è stato validato con strumentazione UHPLC-MS/MS Xevo TQ-S micro, dotato di alta sensibilità e specificità.

Sono stati valutati diversi parametri che hanno dimostrato l'affidabilità e l'adeguatezza della metodica allo scopo.

I diversi test eseguiti hanno dimostrato la concordanza dei risultati tra la metodica precedentemente in uso e quella appena validata.

Introduzione

Nelle indagini forensi l'analisi dei capelli viene utilizzata per determinare l'uso e l'abuso di farmaci e sostanze stupefacenti.

Il vantaggio principale di questa matrice è la possibilità di ricavare informazioni storiche sull'assunzione e sull'esposizione di un individuo ad una determinata sostanza anche dopo una singola esposizione¹.

Gli xenobiotici incorporati nei capelli restano stabili per mesi e a volte anni, cosa che non avviene in altre matrici quali sangue e urina.

Tale caratteristica varia a seconda della molecola in base alla sua struttura e alle sue caratteristiche chimico-fisiche². Altri fattori che possono incidere sulla permanenza di una sostanza nei capelli sono la luce solare, gli agenti atmosferici e l'acqua che possono ridurre la concentrazione di farmaci e di sostanze come i cannabinoidi, la cocaina e i loro metaboliti.³

Anche trattamenti aggressivi ai capelli come asciugare o arricciare i capelli con il calore possono danneggiare il follicolo pilifero portando la matrice ad essere inutilizzabile.

L'analisi di matrici cheratiniche trova impiego sia in campo forense che clinico come il monitoraggio dell'abuso di droga nel luogo di lavoro, doping, decessi dovuti alla droga, incidenti stradali; per monitorare l'uso di sostanze d'abuso nei programmi di disintossicazione; per monitorare l'esposizione di bambini e neonati a sostanze stupefacenti, che possono essere avvenuti anche durante la gravidanza.⁴

1.1 ANATOMIA DEI PELI

I peli sono annessi cutanei che ricoprono quasi completamente la superficie corporea dell'uomo. Le loro principali funzioni sono di protezione e contribuiscono a mantenere l'omotermia. I capelli ad esempio prevengono i danni alla testa e al collo dovuti al freddo e alla luce solare.

Ci sono tre diversi tipi di peli: .

- I peli di vellus che coprono l'intera superficie corporea ad eccezione dei palmi delle mani, della pianta dei piedi, delle labbra e dei genitali. Sono peli fini, corti e incolori.
- I peli terminali che si trovano su ciglia e sopracciglia, barba e cuoio capelluto, ascelle e aree pubiche. Sono più spessi e pigmentati dei peli vellus.
- I peli intermedi sono presenti su braccia e gambe degli adulti e hanno caratteristiche intermedie tra i peli vellus e quelli terminali.

I capelli possono essere classificati in base all'etnia, ovvero in africani, asiatici ed europei. Oppure attraverso la misurazione di tre parametri: il diametro della curva, il numero di onde e l'indice di curvatura. Questa classificazione è più attendibile perché si basa su parametri oggettivi.

I peli sono composti da due strutture separate: il fusto che è visibile sopra l'epidermide e il follicolo nella parte intradermica.

Il fusto è composto da cellule completamente cheratinizzate che non avendo un metabolismo impediscono la degradazione del pelo e la perdita delle sostanze incorporate. Il fusto si divide in:

- Cuticola, è la parte più esterna e ricopre interamente il pelo dalla radice alla punta. Ha la funzione di proteggere la corteccia da danni fisici e chimici.
- Corteccia, è la parte centrale e più spessa del fusto.
- Midollo, è la regione più interna del fusto, può essere presente o assente.⁵

Il follicolo si trova 3-4 mm sotto l'epidermide ed è responsabile della crescita del pelo. Si divide in:

- Guaina della radice esterna, contenente le cellule staminali necessarie allo sviluppo del pelo.
- Guaina della radice interna, dove vengono sintetizzate molecole necessarie a garantire la corretta struttura del pelo.
- Bulbo della radice, composto da una parte inferiore che contiene cellule in grado di replicarsi, e la parte superiore contenente i cheratinociti che producono cheratina.

In corrispondenza del follicolo pilifero ci sono le ghiandole sebacee che secernono il loro secreto direttamente nel follicolo. Nel caso di ascelle e inguine vi sono anche ghiandole apocrine.⁶

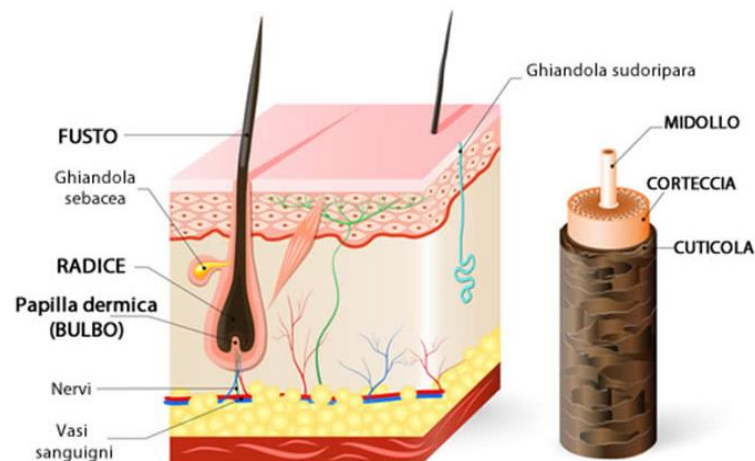


Figura 1: Struttura del pelo e del fusto

1.2 FISIOLOGIA DEI PELI

La crescita del capello è un processo dinamico e ciclico in cui la durata delle fasi di crescita è coordinata da molti ormoni e citochine e dipende non solo dal luogo di crescita del capello ma anche da altri fattori, come l'età e, le abitudini alimentari o i cambiamenti ambientali come la lunghezza del giorno.

Le citochine coordinano la crescita dei capelli facendo in modo che ogni capello si trovi in una fase di crescita diversa da quelli adiacenti.

Il ciclo di vita dei capelli può essere diviso in tre fasi:⁷

- Fase anagen: è la fase di crescita durante la quale si forma il fusto del pelo. È la fase più lunga della vita del capello, durante la quale vengono incorporate la maggior parte delle sostanze. Circa l'85% dei peli sono in questa fase.
- Fase catogen: è la fase di transizione che determina la fine della fase di crescita. Durante queste quattro settimane il fusto si cheratinizza e il bulbo si degrada.
- Fase telogen: è la fase terminale del ciclo di crescita del pelo. Durante questa fase il pelo si stacca anche per effetto del pelo sottostante in fase anagen. In telogen di fatto non c'è crescita. Circa il 15% dei peli sono in questa fase.⁵⁻⁶

A differenza degli altri peli del corpo la cui crescita è più irregolare, la crescita dei capelli varia solo da 0,6 cm a 1,5 cm al mese, portando la media a circa 1 cm al mese. Anche la Society of Hair Testing raccomanda di usare 1 cm/mese come crescita media dei capelli.⁸⁻⁹

Per le analisi forensi i capelli rappresentano la matrice cheratinica più idonea perché hanno il maggior numero di follicoli nella fase di crescita e sono i peli che crescono più velocemente.

Nel caso in cui non sia possibile utilizzare i capelli, i peli pubici rappresentano una buona alternativa. Tuttavia è necessario ricordare che data la loro locazione è possibile la contaminazione con l'urina che può determinare un aumento della concentrazione di xenobiotici. Altre alternative ma meno consigliate sono i peli toracici o ascellari.

Può essere utilizzata anche la barba, ma deve essere considerato che questi peli sono più spessi e crescono meno velocemente.¹⁰⁻¹¹

1.3 MECCANISMO DI INCORPORAZIONE DELLE SOSTANZE

Il meccanismo effettivo che permette l'incorporazione degli xenobiotici nelle matrici cheratiniche non è ancora chiaro. Le teorie più diffuse prevedono l'incorporazione mediante diffusione passiva dal circolo sanguigno, l'incorporazione dal sebo e dal sudore e l'esposizione alla contaminazione esterna¹².

Secondo la prima teoria gli xenobiotici passano dal circolo sanguigno alle cellule del follicolo pilifero. Tuttavia ciò comporterebbe un equilibrio degli analiti tra sangue e pelo che non avviene. Infatti la concentrazione dei metaboliti nel sangue è più alta rispetto a quanto riscontrato nel capello dove è nettamente inferiore la concentrazione della sostanza originale.¹³⁻¹⁴

Altri studi hanno dimostrato che la maggior parte delle molecole derivano dal sudore e dal sebo.

Vanno inoltre considerati fattori esterni alla persona che possono permettere l'incorporazione di sostanze nei capelli. Ad esempio l'esposizione passiva che si verifica stando nelle vicinanze di chi fuma o manipola droghe che dopo può toccare i propri capelli o quelli di altri. Particolarmente esposti sono i bambini e i neonati che vivono in una famiglia in cui si abusa di droghe. Situazione più particolare è quella delle donne che continuano a fare uso di sostanze stupefacenti durante la gravidanza, infatti è possibile riscontrare tracce di tali sostanze sia nel sangue che nei capelli del neonato. È stato dimostrato che se si immergono i capelli in soluzioni acquose contaminate ad esempio con cocaina o morfina questi risultano "positivi" anche se sottoposti ai protocolli previsti per la decontaminazione.¹⁵

Le procedure di decontaminazione sono previste in tutte le analisi tuttavia la loro efficacia è controversa. Organizzazioni come la Society of Hair Testing raccomandano che tali procedure includano sia una fase di lavaggio organico che acquoso⁸, questo perché è stato dimostrato che sostanze come il Δ -9-tetraidrocannabinolo vengono rimossi più efficacemente da solventi organici, mentre le droghe ionizzabili vengono eliminate meglio con lavaggi acquosi.¹⁶

I fattori che influenzano la quantità di sostanza che viene incorporata sono:

- La lipofilia della molecola: le molecole lipofile e prive di carica possono attraversare facilmente la membrana plasmatica ed entrare nelle cellule del bulbo pilifero
- La basicità della molecola: i composti relativamente basici possono attraversare più facilmente la membrana plasmatica a causa dei processi di protonazione e deprotonazione che avvengono all'interno della cellula.¹⁷
- La struttura e la dimensione della molecola influenzano il passaggio della membrana plasmatica.
- La capacità di legame con le proteine plasmatiche.
- La frequenza e le dosi assunte¹⁸.
- Il legame con la melanina. La melanina è un pigmento colorato responsabile del colore dei capelli, più sono scuri più melanina contengono. Diversi studi effettuati su animali hanno dimostrato che c'è una maggiore incorporazione di xenobiotici basici rispetto ad altri acidi o neutri. Va ricordato che ci sono differenze importanti tra i peli degli animali e i capelli umani che riguardano i cicli di crescita dei capelli e la loro struttura e vanno tenute in considerazione al momento dell'interpretazione dei risultati.¹⁹⁻²⁰

1.4 LE SOSTANZE RICERCATE

Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità "sono da considerare sostanze stupefacenti tutte quelle sostanze di origine vegetale o sintetica che agendo sul sistema nervoso centrale provocano stati di dipendenza fisica e/o psichica, dando luogo in alcuni casi ad effetti di tolleranza (bisogno di incrementare le dosi con l'avanzare dell'abuso) ed in altri casi a dipendenza a doppio filo e cioè dipendenza dello stesso soggetto da più droghe".

Nel 2020, la Sezione Indagini sulle Droghe del Servizio Polizia Scientifica della Direzione Centrale Anticrimine della Polizia di Stato e dai Gabinetti Regionali e Interregionali di Polizia Scientifica ha effettuato analisi di laboratorio su 9.514 campioni di sostanze stupefacenti. La maggioranza dei campioni analizzati ha riguardato derivati della cannabis (51%, di cui marijuana 27% e hashish 24%), cocaina e crack (35%) ed eroina (7,6%), mentre la restante parte è relativa ad amfetamine e metamfetamine (1,6%), MDMA ed ecstasy (1,2%) e sostanze stupefacenti di diversa natura (3,6%). Le analisi di laboratorio evidenziano una variabilità molto elevata, che deriva anche dalle diverse tipologie dei sequestri, grandi partite o sequestri al dettaglio: da 0,6% a 78% per hashish e 39% per marijuana, da 0,1% a Relazione al Parlamento – Parte I 30 63% per eroina, da 0,3% a 88% per cocaina e da 19% a 98% per crack, da 3% a 33% per amfetamina, da 2% a 80% per metamfetamina, da 8% al 84% per MDMA.²¹

Esistono diverse classificazioni delle droghe, ad esempio in base alla loro origine: naturali o sintetiche.

È possibile classificare le droghe anche in base all'effetto farmacologico: droghe deprimenti (es: gli oppiacei), droghe stimolanti (es: al cocaina e le anfetamine) e droghe allucinogene (es: i cannabinoidi).

Le principali sostanze ricercate sono:

La **morfina** è il principale alcaloide contenuto dell'oppio e si ottiene attraverso trattamenti chimici o a caldo mediante l'uso di acqua, calce e ammoniaca.

È importante distinguere tra "morfina cloridrato" e la "morfina base o grezza".

La morfina cloridrato viene utilizzata a scopo terapeutico. Si presenta come polvere bianca cristallina che non riflette la luce, inodore, di sapore amaro, oppure sottoforma di liquido incolore o giallastro.

La morfina base o grezza è un prodotto intermedio della lavorazione dell'oppio che può essere assunta per via orale, con un'iniezione intramuscolare o endovenosa. Se assunta in piccole dosi causa benessere e euforia, se assunta in dosi più elevate causa un annullamento del dolore e sonno profondo. L'abuso provoca dipendenza fisica e psichica.

L'**eroina** si ottiene dalla trasformazione chimica della morfina. Si presenta come polvere bianca o marrone, granulosa, amara, molto solubile in acqua, con odore di acido. Può essere assunta per inalazione, per via endovenosa oppure fumata.

Gli effetti variano a seconda del consumatore, ma in tutti i casi ci sono momenti di euforia ed eccitazione alternati a momenti di depressione e passività.

L'uso abituale dell'eroina porta ad apatia, trascuratezza, scarsa alimentazione e mancanza d'igiene. L'assuefazione insorge rapidamente e la dipendenza sia fisica che psichica è fortissima. L'astinenza è particolarmente dolorosa e predispone il tossicodipendente ad atti insoliti e violenti.²²

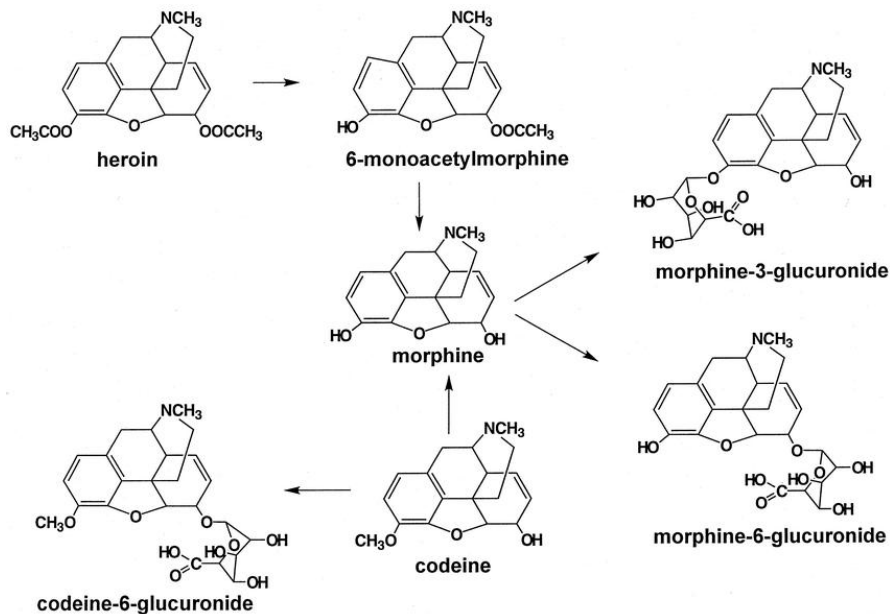


Figura 2. Metabolismo degli oppiacei.

Il **metadone** è un oppioide (una molecola strutturalmente simile alla morfina ma che non si ottiene dall'oppio) usato nella terapia dei dipendenti da eroina. Comunque il metadone è in grado di creare uno stato di specifica tossicodipendenza, pertanto il Consiglio Superiore di Sanità ha ribadito che questa terapia deve essere effettuata in luoghi idonei che possano offrire assistenza medica adeguata e devono essere approvati dall'Autorità sanitaria. Può essere assunto per via orale o anche per iniezione intramuscolare o sottocutanea. Il metadone è un potente analgesico ma può avere diversi effetti secondari tra cui sonnolenza, vertigini e vomito. In ambito medico-legale il metadone viene ricercato insieme al suo principale metabolita: l'EDDP (2-etilidina-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina).

Anche la **buprenorfina** viene utilizzata in medicina per la terapia dei dipendenti da oppiacei, perché oltre ad essere particolarmente efficace e sicura possiede anche un'emivita lunga, quindi è possibile effettuare terapie giornaliere o anche di più giorni. Ha effetti simili a quelli della morfina compresi il senso di nausea e depressione respiratoria, tuttavia la sensazione di euforia è nettamente inferiore a quella data dall'assunzione di eroina. Viene ricercata nei capelli insieme al suo metabolita principale, la norbuprenorfina.²³⁻²⁴

Il **fentanil** è un potente oppioide liposolubile sintetizzato per la prima volta più di 40 anni fa e viene utilizzato ancora oggi come anestetico preoperatorio. Viene utilizzato per il trattamento del dolore sia acuto che cronico. Il fentanil può essere somministrato per via orale, transdermica (cerotto), iniezione endovenosa o per inalazione.²⁴

La cocaina nasce dalla raffinazione delle foglie della pianta di coca. Si presenta generalmente come una polvere bianca e cristallina.²²

Viene assunta per inalazione, ingestione o per iniezione endovenosa.

L'assunzione provoca inizialmente una sensazione di forza ed euforia con riduzione della fatica e con minore sensibilità al dolore e alla fame.

Successivamente compaiono sintomi come stanchezza e depressione. La cocaina causa un'elevata dipendenza psichica associata ad una minore dipendenza fisica, quindi non si manifesta la "sindrome d'astinenza".

La cocaina viene ricercata insieme ai suoi principali metaboliti: benzoilecgonina, norcocaina, ecgonina metilestere e cocaetilene, un metabolita che si forma quando la cocaina e l'alcol etilico si trovano contemporaneamente nel fegato.²²

Le **anfetamine** sono potenti psicostimolanti la cui assunzione causa ipervigilanza, insonnia, diminuzione dell'appetito e della stanchezza e una sensazione di benessere ed euforia. In medicina vengono usate nella terapia di molte malattie nervose e per il trattamento dell'anoressia. Si trovano sottoforma di polveri cristalline e biancastre, in fiale, o pasticche. L'assunzione avviene generalmente per via orale o endovenosa²². La sindrome d'astinenza può essere trattata con sostanze antagoniste delle anfetamine, ad esempio gli oppiacei.²⁶

Le **metanfetamine** sono analoghi delle anfetamine. Danno una forte dipendenza e agiscono principalmente come stimolanti del sistema nervoso centrale (SNC).²⁷

Le anfetamine e le metanfetamine vengono ricercate insieme ai loro principali metaboliti: MDA (3,4-metilendiossoanfetamina), MDMA (3,4-metilendiossietilmetanfetamina) e MDEA (3,4-metilendiossietilanfetamina).

I **cannabinoidi** sono sostanze naturali estratte dalla canapa indiana. Tra i diversi composti contenuti nella Cannabis il Δ -9-tetraidrocannabinolo (THC) è il più attivo a livello dei recettori dei cannabinoidi associati a proteine G presenti sulle cellule nervose.

Solitamente vengono assunti per via orale, sublinguale, rettale, per iniezione transdermica e per inalazione a seconda della forma farmaceutica.²²

La marijuana viene ricavata dalle foglie e dalle inflorescenze della "Cannabis sativa", appare come una mistura simile al tabacco di colore verde o marrone.

Generalmente viene inalata mediante il fumo di sigarette e provoca euforia, aumento della sensibilità visiva ed uditiva, sensazione di benessere e rilassamento. Può dare dipendenza.

L'hashish viene prodotta a partire dalla resina della cannabis. Si presenta come un solido marrone, emana un forte odore caratteristico e viene assunta per inalazione. Se assunta a piccole dosi provoca euforia, aumento dell'appetito, disinibizione e rilassamento. A dosi più elevate l'assunzione comporta deliri, allucinazioni, disorientamento e attacchi di panico. Anche l'hashish dà dipendenza.

La cannabis può essere utilizzata anche a scopo terapeutico come analgesico, per il miglioramento dell'umore, può essere usata per l'immunosoppressione e per indurre l'apoptosi delle cellule tumorali e per dilatare i bronchi.²⁸

I cannabinoidi che vengono dosati sono: il THC (Δ -9-tetraidrocannabinolo), il CBN (cannabinolo) e il CBD (cannabidiolo).

La **ketamina** è un farmaco anestetico ideale per le vittime di traumi, i pazienti con shock ipovolemico e settico e i pazienti con malattie polmonari.²⁹

È stato inoltre dimostrato che la ketamina può essere utilizzata come antidepressivo grazie al suo effetto rapido e prolungato nel tempo.³⁰

La ketamina è solubile sia in acqua che nei lipidi, quindi è possibile utilizzare diverse vie di somministrazione, tra cui la via endovenosa, intramuscolare, intranasale o direttamente nell'osso.³¹

Lo **zolpidem** è un farmaco ipnotico non benzodiazepinico, utilizzato per trattare l'insonnia.³²

Gli effetti collaterali correlati all'uso di zolpidem comprendono incidenti, cadute, overdose, deliri e infezioni. I rischi per gli altri utenti comprendono aggressioni, incidenti stradali e altri reati che possono essere commessi durante il delirio o la sindrome d'astinenza. Un grande problema associato all'abuso dello zolpidem è che i problemi sanitari e sociali si verificano anche quando questo farmaco viene assunto all'interno di un range terapeutico prescritto legalmente (10-30 mg).³³

L'**etilglucoronide** (EtG) è un biomarcatore utilizzato per la diagnosi di abuso di alcol (oltre 60 grammi al giorno) e secondo le linee guida della Society of Hair Testing (SoHT), si utilizza un cut-off di 30 pg/mg di EtG nel capello.

L'EtG si forma dalla coniugazione dell'etanolo con l'acido glucuronico catalizzato dall'enzima uridina 5'-difosfo-glucuronosil transferasi, è un metabolita minore nella via metabolica dell'etanolo, che rappresenta meno dello 0,1% dell'etanolo ingerito.

L'EtG è a carica negativa a pH fisiologico, invece i cheratinociti e i melanociti hanno un pH più acido del plasma quindi l'incorporazione dell'EtG nei capelli è sfavorita rispetto ad altre sostanze quindi ha un cut-off molto più basso.

Nei casi in cui vi è stata una recente assunzione di etanolo, i risultati dell'EtG possono anche riflettere la contaminazione da parte dei fluidi corporei e quindi non essere indicativi di un abuso cronico.

Va ricordato che trattamenti ai capelli come la colorazione o la permanente possono rimuovere una quantità significativa dell'EtG incorporato.³⁴

Fase preanalitica

2.1 CAMPIONAMENTO e DECONTAMINAZIONE

Le linee guida della SoHT per il campionamento , la spedizione e la conservazione prevedono che:

- Il campione deve essere prelevato dalla regione posteriore della testa vicino al vortice, perché in questa zona si ha il minor tasso di variabilità nella crescita dei capelli. Il taglio deve essere effettuato il più vicino possibile al cuoio capelluto e i capelli vanno allineati indicando anche la parte prossimale e quella distale.
- Il campionamento non deve essere svolto necessariamente da un medico
- È necessario indicare il colore e la lunghezza dei capelli campionati ed eventuali trattamenti evidenti nel campione.
- Il campione ideale sono i capelli, nel caso non fossero disponibili si possono utilizzare i peli pubici, i peli toracici o peli ascellari.
- I capelli devono essere manipolati e conservati in modo tale da ridurre le possibili contaminazioni.
- I capelli vanno conservati al buio a temperatura ambiente.
- Il campione deve essere prelevato in quantità sufficiente in modo da poter garantire sia la prova di screening che l'eventuale analisi di conferma.
- Nel caso di analisi post-mortem i capelli vanno prelevati all'inizio dell'autopsia.

Dopo il prelievo il campione deve essere sigillato in un barattolo di plastica o avvolto in un foglio di alluminio e posto in una busta di plastica sigillata, in entrambi i casi deve avere la propria etichetta. Ogni campione deve essere sempre accompagnato dal modulo della catena di custodia e dal foglio con i dati del paziente. Nel caso in cui il paziente sia un lavoratore la legge garantisce l'anonimato e in questo caso è necessario un modulo dedicato.

La decontaminazione è un passaggio importante per essere certi che i risultati delle analisi siano corretti. È necessario procedere con diversi lavaggi mediante solventi organici e acquosi in modo da eliminare tutti i contaminanti.

Se necessario i lavaggi devono essere conservati per ulteriori analisi.³⁵⁻³⁶

Tecniche analitiche

3.1 CROMATOGRAFIA

La cromatografia è una tecnica analitica per la separazione e l'identificazione di sostanze chimiche in miscele complesse.

La cromatografia sfrutta la diversa affinità dovuta alle proprietà chimico-fisiche dei composti che compongono la miscela per separarli attraverso l'ausilio di due fasi, una mobile e una stazionaria, immiscibili tra di loro.

La cromatografia può essere suddivisa in varie tipologie in base al metodo con cui la fase mobile riesce a trattenere l'analita:

- **Adsorbimento:** La fase mobile interagisce con l'analita attraverso interazioni deboli (forze di Van der-Waals).
- **Ripartizione:** La fase mobile è un liquido che impregna un solido, il campione viene solubilizzato nella fase mobile e eluito.
- **Esclusione:** In base alle diverse dimensioni delle molecole alcune passeranno più velocemente e altre più lentamente.
- **Scambio ionico:** Si formano delle interazioni di tipo elettronico tra l'analita e gli ioni presenti nelle resine che compongono la fase mobile.

In alternativa si può suddividere questa tecnica sulla base dello stato fisico della fase mobile, da cui si ottengono la cromatografia liquida, la gas cromatografia e la cromatografia a fluidi supercritici.

I campioni vengono disciolti o vaporizzati nella fase mobile, questa attraversa la colonna o la lastra dove si trova la fase stazionaria e i composti che sono più affini ad essa vengono trattenuti, quindi impiegheranno più tempo ad uscire dalla colonna.

Alla colonna sono associati un rivelatore e dei raccoglitori per i liquidi per separare i vari composti.³⁷

L'output è il cromatogramma, un grafico con una serie di picchi e le relative informazioni in termini di tempo, altezza e area del picco.

La cromatografia è descritta dai seguenti parametri:

- Il **tempo di ritenzione** è il tempo che intercorre dall'iniezione della sostanza al suo arrivo al rivelatore. Esso dipende dal rapporto tra la concentrazione dell'analita nella fase stazionaria e nella fase mobile. All'interno della colonna si formano molteplici equilibri dinamici per ogni piccola area della colonna, equilibri caratterizzati da una costante detta costante di distribuzione (K_d)

$$K_d = C_s / C_m$$

Maggiore è la quantità di analita trattenuta dalla fase stazionaria, più è alta la costante, quindi l'analita impiega più tempo ad attraversare la colonna.

- Il **fattore di ritenzione** è un parametro che mette in relazione il tempo di ritenzione dell'analita con il tempo morto, ovvero il tempo che impiegherebbe l'analita ad attraversare la colonna se non avesse nessuna affinità con la fase stazionaria (ovvero è il tempo che la fase stazionaria impiega per attraversare la colonna).

- La **selettività** di un parametro che permette di separare due analiti diversi che appunto dovranno avere tempi di ritenzione diversi. La selettività dipende dalle interazioni dell'analita con le due fasi, stazionaria e mobile. Si può verificare la selettività guardando i picchi del cromatogramma, se infatti questi non si sovrappongono la selettività è buona.
- L'**efficienza** è la capacità del sistema cromatografico di eluire nello stesso tempo tutte le molecole dello stesso analita. Questo si traduce a livello grafico con picchi o bande i più stretti possibile.
- La **risoluzione** è un parametro che consente di distinguere due sostanze con tempo di ritenzione simile.

Per questa validazione è stato utilizzata una strumentazione che utilizza la cromatografia liquida ad alta prestazione.

3.2 CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTA PRESSIONE (HPLC)

L'HPLC è una tecnica cromatografica utilizzata per separare, identificare e quantificare i componenti di miscele complesse.

L'HPLC necessita di strumenti complessi in grado di sopportare l'alta pressione come illustrato di seguito nella Figura 3.

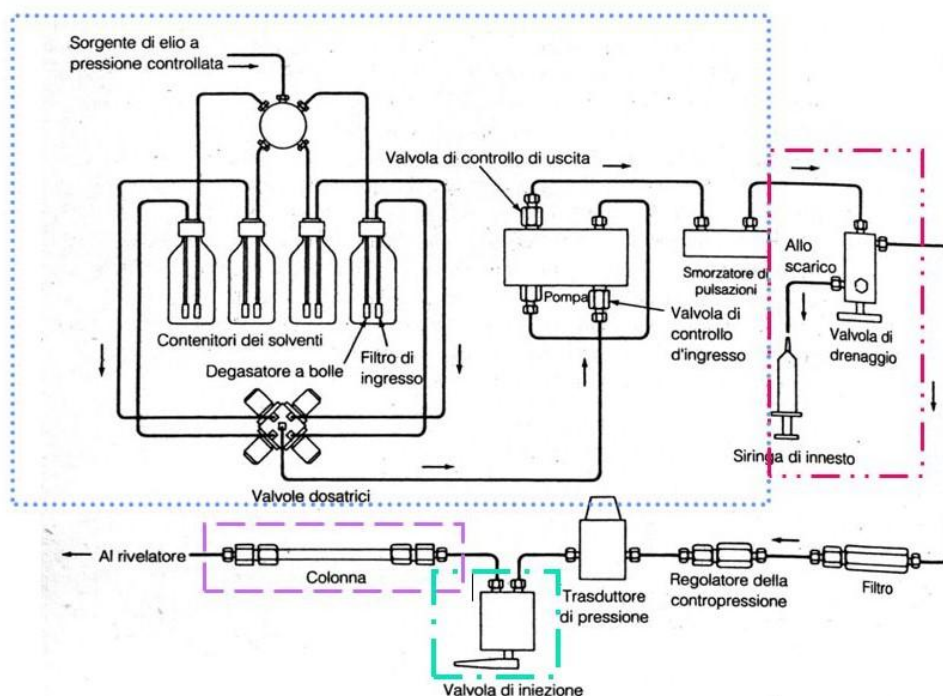


Figura 3. Rappresentazione grafica dei principali componenti di un sistema HPLC.

La fase mobile, contenuta in bottiglie di vetro (materiale inerte), deve essere priva di impurità, compresi i gas atmosferici che potrebbero inficiare l'analisi.

Per questo motivo tali contenitori sono spesso associati a degasatori o sistemi di filtraggio.

L'eluizione in HPLC può essere isocratica, nel caso la natura dell'eluente non cambi durante l'analisi, oppure a gradiente, se la natura dell'eluente varia in maniera continua durante la corsa.

L'eluizione a gradiente è da preferirsi perchè migliora la risoluzione e diminuisce i tempi dell'analisi, ma necessita di una camera di miscelazione dove i solventi possano mischiarsi in diverse percentuali. È importante che i solventi non reagiscano tra di loro, né con la fase stazionaria e neanche con gli analiti.

La pompa ad alta pressione genera un flusso di fase mobile che varia da 0,1 a 10 mL/min lungo tutta la colonna fino al rivelatore e devono sostenere pressioni fino a 430 atm. Le pompe devono garantire la stabilità della pressione prodotta e quindi devono essere resistenti alla corrosione.

L'iniettore consente di introdurre il campione nella colonna, può essere effettuato con l'ausilio di una siringa.

La riproducibilità del volume di iniezione dipende dall'iniettore. I sistemi in uso consentono di variare i volumi di campione da 5 a 500 µL. Nel caso fosse necessario iniettare volumi più piccoli è necessario ricorrere a delle valvole di iniezione che permettono di inserire da 0,5 a 5 µL.

Le colonne in cui viene iniettato il campione sono in acciaio inossidabile levigato con una lunghezza che varia da 10 a 30 cm e un diametro compreso tra 4 e 10 mm. Le particelle di fase stazionaria impaccate all'interno della colonna hanno un diametro compreso fra i 5 e i 10 µm.

Esistono anche microcolonne lunghe 5 cm, con un diametro interno che varia tra 1 e 4,6 mm e sono impaccate con particelle di 4 µm. Consentono di ridurre i tempi di analisi e il consumo della fase mobile.

Il materiale più usato per impaccare le colonne è il silice, le cui particelle, di diametro generalmente inferiore al micron, vengono agglomerate per formare particelle più grandi e più uniformi. Comunque il materiale scelto per la fase stazionaria dipende dalle sostanze che si devono separare.

Per mantenere ottimali le prestazioni delle colonne nel tempo spesso vengono utilizzate delle colonne di protezione che filtrano l'eluente, e che consentono anche una migliore miscelazione della fase mobile con la fase stazionaria in modo da ridurre le perdite di quest'ultima dalla colonna.

Gli analiti separati vengono identificati attraverso un rivelatore dal quale si ottiene poi il cromatogramma.

Anche se non esiste un rivelatore universale per tutti i sistemi HPLC, i rilevatori utilizzati dovrebbero soddisfare le seguenti caratteristiche:

- Tempi di risposta brevi.
- Essere in grado di separare tutti i composti.
- Buona stabilità e riproducibilità
- Sensibilità adeguata alle analisi richieste.

I rilevatori si distinguono in:

- Bulk property : Rilevatori che misurano variazioni nei parametri della fase mobile (es: indice di rifrazione).
 - Solute property: Rilevatori che misurano le variazioni chimico-fisiche del soluto.
- Spesso l'HPLC usa lo spettrometro di massa come rivelatore, anche per il fatto che è stata creata un interfaccia tra questi due strumenti.

3.3 SPETTROMETRIA DI MASSA

La spettrometria di massa è una tecnica analitica che viene utilizzata per identificare e quantificare sostanze incognite, per chiarire la struttura molecolare degli analiti e per dare informazioni qualitative e quantitative di miscele complesse. Questa tecnica consente di distinguere i componenti di una miscela in base al loro rapporto massa/carica.

La spettrometria di massa è caratterizzata da un'elevata sensibilità, specificità e selettività che consentono l'impiego di piccole quantità di campione.

Per essere analizzati gli analiti vengono ionizzati, cioè acquisiscono una carica elettrica, e successivamente vengono frammentati in ioni con diversi rapporti massa/carica (m/z). Questo procedimento comporta la distruzione del campione. Dal rapporto massa/carica è possibile calcolare la massa dell'analita e risalire indirettamente alla massa molecolare degli ioni.

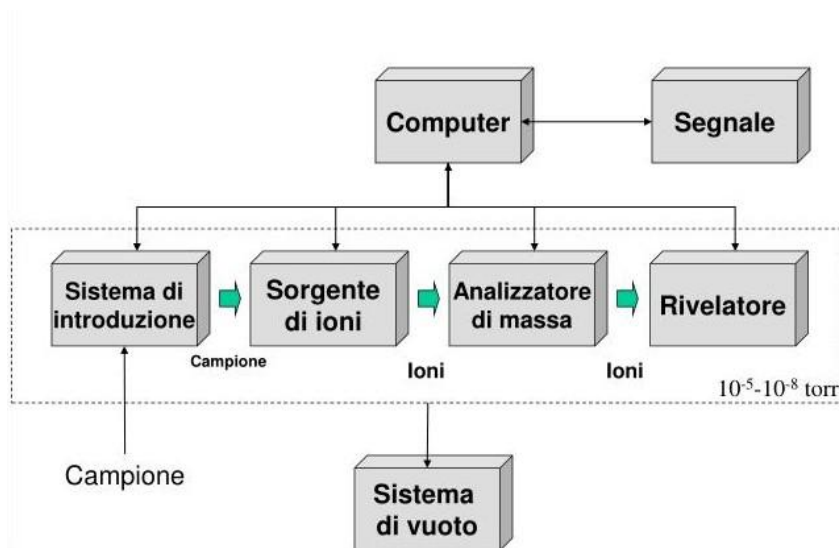


Figura 4. schema a blocchi dei principali componenti di uno spettrometro di massa.

Lo spettrometro di massa lavora in condizioni di vuoto, quindi a bassissime pressioni. È necessario mantenere questa condizione, poiché se ci fossero contaminazioni da gas atmosferici questi potrebbero andare ad interferire con gli ioni dell'analita andando ad inficiare l'analisi.

Per questo motivo viene utilizzato un sistema di introduzione, che consente l'inserimento del campione senza causare perdite significative di vuoto.

Successivamente l'analita viene iniettato nella sorgente di ionizzazione dove viene convertito in ioni gassosi attraverso il bombardamento con elettroni, atomi, molecole o fotoni.

Le tecniche di ionizzazione più utilizzate sono:

- La **ionizzazione elettronica** che sfrutta il bombardamento con elettroni accelerati per ottenere la frammentazione (hard ionization).
- La **ionizzazione chimica** prevede l'utilizzo di gas a basso peso molecolare per frammentare l'analita (soft ionization).

Nel caso della metodica in esame il campione separato grazie all'HPLC viene elettronebulizzato. L'elettronebulizzazione, una tecnica di ionizzazione che comporta l'evaporizzazione dell'analita.

Il campione viene fatto passare attraverso un capillare a cui viene applicato un campo elettrico dove viene nebulizzato portando alla formazione di goccioline, sulla superficie del liquido, che contengono gli ioni con cariche diverse. Successivamente il solvente viene fatto evaporare grazie ad un flusso di azoto e le goccioline si contraggono aumentando le forze di repulsione tra gli ioni. Quando queste forze superano l'energia di coesione dovuta alla tensione superficiale della gocciolina, questa esplosione formando goccioline più piccole e caricate elettronicamente.

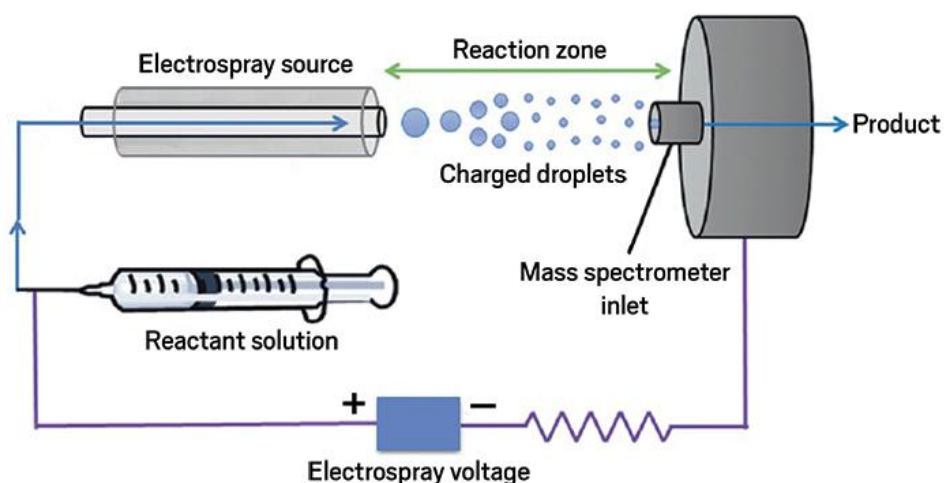


Figura 5. Schema grafico di uno spettrometro di massa dall'iniezione all'elettronebulizzazione.

Gli ioni che si sono formati nella sorgente ionica vengono introdotti nell'analizzatore di massa dove vengono separati in base al loro rapporto massa/carica (m/z).

Il rivelatore deve avere:

- Una buona risoluzione, ovvero essere in grado di distinguere due ioni con masse simili.
- Una buona trasmissione ionica, ovvero essere in grado di far arrivare al rivelatore tutti gli ioni d'interesse.

Durante l'esperimento è stato utilizzato un analizzatore di massa a quadrupolo. Gli analizzatori sono praticamente dei filtri in grado di far arrivare al rivelatore solo gli ioni con un rapporto massa /carica specifico.

Un quadrupolo è formato da quattro barre cilindriche e parallele, posti due sopra e due sotto a formare un quadrato nell'asse z . Alle barre adiacenti vengono applicati campi elettrici opposti generando una tensione continua sovrapposta ad una alternata.

Il campo elettrico risultante costringe gli ioni a seguire una traiettoria diversa in base al loro rapporto massa/carica (m/z). Modulando questo campo è possibile permettere il passaggio solo di alcuni ioni. Quelli che invece hanno un rapporto m/z superiore o inferiore saranno costretti ad intraprendere traiettorie che gli impediranno di raggiungere il rivelatore.

Operando appropriate oscillazioni del campo elettrico è possibile far attraversare gli ioni in ordine crescente in base alla loro massa molecolare.

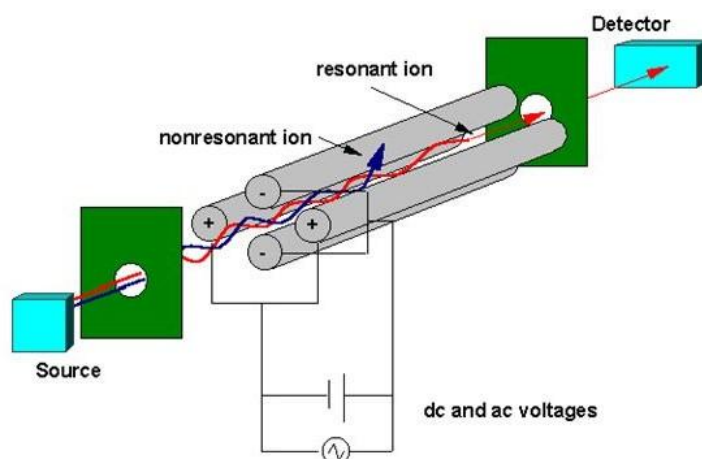


Figura 6. Schema grafico di un quadrupolo.

I rivelatori sono sostanzialmente dei moltiplicatori elettronici che amplificano la corrente prodotta dagli ioni che attraversano l'analizzatore affinché sia rilevabile.

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

Questo progetto è stato eseguito utilizzando un sistema UHPLC interfacciato con uno spettrometro di massa a ionizzazione elettrospray (ESI) e che utilizza un triplo quadrupolo come analizzatore.

Questa strumentazione consente di identificare e quantificare tutti gli analiti presenti in miscele complesse.

L'UHPLC consente di ridurre i tempi di analisi e il consumo di fase mobile grazie alla capacità dello strumento di sopportare pressioni maggiori.

In questo modo è possibile usare colonne più corte che sono impaccate con una fase stazionaria di 1,5 μm , ciò consente un aumento della risoluzione e della capacità di separare gli analiti.

Il triplo quadrupolo è una configurazione in cui il primo e il terzo quadrupolo da filtri di massa, ovvero selezionano gli ioni con i rapporti massa/ carica d'interesse, mentre il quadrupolo centrale viene usato come cella di collisione in cui gas inerti (argon) frammentano le molecole.

È possibile utilizzare lo spettrometro di massa in 3 modalità:

- **Full scan MS:** Vengono inviati al rivelatore le masse di tutte le molecole riscontrate. È utile nel caso in cui non si abbiano informazioni circa l'analita contenuto nel campione.
- **Single Reaction Monitoring (SRM):** Viene utilizzata per fare un'analisi quantitativa nel caso in cui si conosca già l'analita. Il primo quadrupolo viene impostato su un valore preciso in base al rapporto massa/carica, mentre il terzo è impostato per riconoscere uno ione specifico. Questa modalità è più sensibile e specifica rispetto al Full Scan MS.

- **Multiple Reaction Monitoring (MRM):** Ha un funzionamento analogo a quello del SRM, ma in questo caso, nel terzo quadrupolo vengono selezionati più ioni/frammenti di uno stesso analita che verranno riconosciuti.

4. Parametri di validazione di una metodica analitica

4.1 SELETTIVITA`

La selettività analitica è la capacità dello strumento di identificare e quantificare un analita in presenza di altre sostanze simili, quali metaboliti, farmaci ecc. Nel caso in cui analizzino più sostanze è necessario verificare la selettività di ognuna singolarmente, in modo da evitare alterazioni del risultato finale dovute dell'interferenza di molecole simili.

4.2 LIMITE DI RILEVABILTA' E LIMITE DI QUANTIFICAZIONE

Il limite di rilevabilità o limit of detection (LOD) è la più piccola quantità di analita che può essere rilevata in modo affidabile da una procedura analitica. E' un parametro che dipende dall'analita, dalla matrice e dal metodo che si intende validare.

Il limite di quantificazione (LOQ) è la più piccola quantità di analita che si può misurare con precisione, accuratezza e ripetibilità accettabili.

Per calcolare il LOD si possono eseguire almeno 10 misurazioni del bianco (matrice senza analita), si fa la media dei valori ottenuti (μ) e si aggiungono 3 deviazioni standard (σ) del bianco.

Il LOD si calcola quindi con le seguenti equazioni:

$$S_R = \mu_B + 3\sigma_B$$

$$LOD = 3\sigma_B / b$$

$$S_R = \mu_B + \sigma_B = b \cdot LOD + a$$

Dove S rappresenta il minimo segnale significativo che indica la presenza dell'analita, b rappresenta l'inclinazione della retta di calibrazione e a è l'intercetta.

Nel caso in cui sia necessaria un'analisi quantitativa, oltre a quella qualitativa, si ritiene significativo un segnale ottenuto che sia almeno 10 volte la deviazione standard del bianco.

Quindi il LOQ si calcola con la seguente equazione.

$$LOQ = 10\sigma_B / b$$

In alternativa si può utilizzare il rapporto segnale/rumore (S/N) che viene valutato direttamente dallo strumento.

In questo caso il LOD corrisponde alla concentrazione di analita quando il rapporto S/N è uguale a 3, mentre se poniamo tale rapporto pari a 10 otteniamo il LOQ.

4.3 INTERVALLO DI MISURA

L'intervallo di misura è l'intervallo all'interno del quale il metodo fornisce i dati con un'incertezza accettabile. Il limite inferiore è dato dal LOQ, invece il limite superiore è la concentrazione a cui si osservano variazioni significative nella sensibilità analitica. Per valutare questo parametro è necessario tenere conto della taratura degli strumenti e della linearità del metodo.

Per individuare l'intervallo di misura si utilizzano da 5 a 8 calibratori che devono coprire l'intero intervallo.¹⁹

Esistono due tipi di intervallo di misura:

- L'intervallo di misura dello strumento che prende in considerazione la concentrazione di un campione di sostanza pura in soluzione.
- L'intervallo di misura del metodo che prende in considerazione la concentrazione del campione in matrice. Per valutarlo si devono usare campioni bianchi e campioni a concentrazione nota che devono seguire la stessa procedura.

4.4 INCERTEZZA DI MISURA

L'incertezza di misura è la dispersione dei valori attribuibili al misurando. Le misure sono sempre affette da errori che si traducono in un'incertezza sul risultato di misura. Misure ripetute di un parametro non danno mai lo stesso risultato ma si ottiene un intervallo di valori possibili entro il quale il valore ottenuto (misurando) può trovarsi con una data probabilità.

L'incertezza è importante perché esprime l'affidabilità intrinseca del risultato.

4.5 PRECISIONE

La precisione è un parametro che indica la concordanza dei risultati ottenuti a seguito di ripetute misurazioni effettuate nelle stesse condizioni.

Esistono 3 tipi di precisione:

- Ripetibilità: È la differenza dei valori ottenuti effettuando misurazione sugli stessi strumenti, eseguita dallo stesso operatore e nelle stesse condizioni (ad esempio stesso giorno)
- Precisione intermedia: Indica la dispersione dei valori ottenuti effettuando le misurazioni con gli stessi strumenti e lo stesso operatore ma in tempi diversi (ad esempio giorni diversi). Si considera importante per le analisi effettuate nello stesso laboratorio.

- Riproducibilità: È la dispersione ottenuta effettuando le misurazioni con strumenti e operatori diversi in un tempo relativamente lungo. Si considera importante per analisi effettuate in laboratori diversi.

Per valutare la precisione è necessario effettuare n misurazioni ripetute dei campioni a 3 concentrazioni diverse (3 x n).

Per ottenere la precisione si può calcolare la deviazione standard relativa (RSD).

$$RSD = \sigma \cdot 100 / x$$

Dove σ è la deviazione standard dei valori ottenuti e x è la media dei dati.

Per la quantificazione, il limite di accettabilità della precisione è pari al 20% della RSD al più basso limite di quantificazione (Quantification, LLOQ) e al 15 % della RSD negli altri calibratori.

4.6 ROBUSTEZZA

La robustezza è la capacità di un metodo di non essere significativamente influenzato da possibili variabili durante il processo, ad esempio l'ambiente, la temperatura, il personale diverso, lo strumento diverso etc.

Per valutare la robustezza bisogna individuare parametri che possono significativamente incidere sul risultato finale. A livello pratico la robustezza si verifica effettuando delle variazioni deliberate dei parametri individuati.

Ogni variabile identificata deve essere valutata singolarmente.

4.7 ESATTEZZA

È l'oscillazione tra il valore ottenuto e il valore vero ed è influenzata da errori sistematici (dovuti alla strumentazione).

La valutazione viene eseguita sui materiali di riferimento che devono avere la composizione più possibile vicina a quella dei campioni reali.

La stima dell'esattezza si ha attraverso il calcolo del BIAS (o scostamento di misura) grazie alle seguenti equazioni:

$$\begin{aligned} \text{BIAS} &= x - x_{\text{ref}} \\ \text{BIAS (\%)} &= (x - x_{\text{ref}}) \cdot 100 / x_{\text{ref}} \end{aligned}$$

La prima equazione consente di ricavare l'esattezza assoluta, la seconda l'esattezza percentuale.

Il calcolo viene eseguito utilizzando i valori degli estremi dell'intervallo di misura con almeno 10 ripetizioni per ogni livello di concentrazione.

Il criterio di accettazione dell'esattezza è, generalmente: BIAS compreso tra +/- 15% del valore di riferimento.

4.8 SENSIBILITÀ

La sensibilità è la capacità dello strumento di riconoscere un campione positivo come tale.

La sensibilità di un metodo analitico è data dalla pendenza della curva di calibrazione.

4.9 EFFETTO MATRICE

Le matrici biologiche utilizzate possono contenere interferenti in grado di ridurre la capacità dello strumento di identificare e quantificare l'analita d'interesse. Per valutare questo grado d'interferenza è necessario procedere alla determinazione dell'analita con e senza matrice.

Per valutare l'effetto della matrice si aggiunge l'analita dopo l'estrazione su tre livelli: basso, medio e alto. Per ognuno dei tre livelli si preparano tre set di campioni: uno con lo standard dell'analita in solvente, uno con la matrice blank (negativo) a cui viene aggiunto l'analita prima dell'estrazione e uno con la matrice blank dove l'analita viene aggiunto dopo l'estrazione.

L'effetto della matrice viene determinato con la seguente equazione:

$$ME(\%) = B/C \cdot 100$$

Dove B è l'area del picco del campione in cui l'analita è stato aggiunto dopo l'estrazione (post extraction) e C è l'area del picco dello standard puro.

4.10 RECUPERO

Il recupero è un parametro che indica la quantità di analita in un campione rilevata rispetto alla quantità totale.

Tale quantità non sarà mai il 100%, tuttavia è possibile mantenere questo parametro stabile e riproducibile.

Nella pratica si confronta il risultato di un'analisi in cui l'aggiunta dell'analita è avvenuta pre-estrazione con i risultati ottenuti con l'aggiunta post-estrazione.

L'analita deve essere aggiunto in almeno tre concentrazioni: basso, medio e alto. È importante aggiungere anche lo standard interno affinché i risultati siano riproducibili.

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

Scopo

Nel 2020, la Sezione Indagini sulle Droghe del Servizio Polizia Scientifica della Direzione Centrale Anticrimine della Polizia di Stato e dai Gabinetti Regionali e Interregionali di Polizia Scientifica ha effettuato analisi di laboratorio su 9.514 campioni di sostanze stupefacenti. La maggioranza dei campioni analizzati ha riguardato derivati della cannabis (51%, di cui marijuana 27% e hashish 24%), cocaina e crack (35%) ed eroina (7,6%), mentre la restante parte è relativa ad amfetamine e metamfetamine (1,6%), MDMA ed ecstasy (1,2%) e sostanze stupefacenti di diversa natura (3,6%).

Questi dati allarmanti comportano un conseguente aumento di richieste di analisi sia in ambito medico-legale che clinico. Il laboratorio di Tossicologia, pertanto, deve processare un numero sempre maggiore di campioni in breve tempo, per un numero sempre maggiore di analiti.

Per agevolare questo lavoro, si è pensato di adottare una metodica unica per la preparazione e l'analisi delle principali sostanze ricercate e i loro metaboliti.

L'obbiettivo era giungere all'ottimizzazione dei tempi sia di analisi che dei tempi di attesa per avere i referti, dei reattivi impiegati ed ad un minore utilizzo di campione. Era indispensabile riuscire a ridurre la quantità di campione utilizzato per le analisi, poichè in diversi casi, soprattutto con pazienti pediatrici, la quantità di matrice prelevata non era sufficiente per svolgere tutte le analisi richieste.

Grazie a questa metodica omnicomprensiva è stato possibile ridurre la quantità di campione necessaria da 75 mg per analisi di sostanze basiche (25 mg), etilglucuronide (25 mg), cannabinoidi (25 mg) a 25 mg totali.

Parte sperimentale

6. Materiali e metodi

6.1 Vetreria

- Vials per Precellys Evolution in polipropilene da 2 mL.
- Palline in acciaio per sminuzzare ed omogenizzare le matrici.
- Pipette Eppendorf® a volume variabile.
- Puntali per pipette Eppendorf.
- Provette in vetro con bordo dritto, dimensioni 12x75 mm e diametro di 0,8 mm.
- Vials in polipropilene con insert in vetro e tappo a pressione in polipropilene.
- Provette in vetro con tappo a vite.

6.2 Strumentazione

- Precellys Evolution (Bertin Technologies, Alfa Tech): utilizzato in modalità “sminuzza” per sminuzzare ed omogenizzare le matrici.
- Agitatore a vortice (Vortex).
- Agitatore orbitale.
- Bilancia analitica AG 245 Dual Range.
- Centrifuga Allegra 6KR, Bech.
- Stufa a 100°C.
- WATERS ACQUITY UHPLC®-MS/MS Xevo® TQ-S micro Waters: cromatografo liquido ad alta pressione interfacciato con uno spettrometro di massa.

6.3 Reagenti

- Acqua Milliq, 18mΩ, Millipore, Bedford, MA, USA.
- Metanolo per HPLC ultrapuro, Carlo Erba Reagent, Milano, Italia.
- Etanolo, Carlo Erba Reagent, Milano, Italia.
- Ammonio formiato, Carlo Erba Reagent, Milano, Italia
- Acido formico, Carlo Erba Reagent. Milano, Italia
- M3 Reagent, Comedical®: Utilizzato per l'estrazione.

6.4 Soluzioni standard e Calibratori

- IS sostanze: La soluzione viene preparata a partire da diverse soluzioni, ciascuna contenete un analita alla concentrazione di 100 µg/mL. Si preleva 1 mL per soluzione formando così una soluzione standard di 20 mL alla concentrazione di 5 µg/mL. Come solvente viene utilizzato metanolo puro. I deulterati contenuti sono : cocaina-D3, benzoilecgoneina-D3, codeina-D3, morfina-D3, 6-monoacetilmorfina-D3, anfetamina-D5, metanfetamina-D5, MDMA-D5, MDA-D5, MDEA-D5, ketamina-D4, buprenorfina-D4, metadone-D3.
- IS EtG: Soluzione di metanolo e EtG -D5 alla concentrazione 2 µg/mL.
- IS THC: Soluzione di THC-D3 e metanolo alla concentrazione di 200 ng/mL.

- STD MIX CANNABINOIDI: Vengono preparate due soluzioni standard di THC e metanolo alle concentrazioni di 25 ng/mL e 250 ng/mL.
- STD EtG: Sono state preparate tre soluzioni di EtG e metanolo a concentrazioni di 5 pg/mL, 50 pg/mL e 500 pg/mL.
- STD MIX 1: La soluzione viene preparata utilizzando il metanolo e le soluzioni dei seguenti analiti in diverse concentrazioni (riassunti in tabella 1), in modo da ottenere le soluzioni a 25 ng/mL, 250 ng/mL, 500 ng/mL. Il volume finale delle tre soluzioni è di 10 mL ciascuna.

ANALITA	CONCENTRAZIONE SOLUZIONE INIZIALE	Working solution 1 25 ng/mL μL	Working solution 2 250 ng/mL μL	Working solution 3 500 ng/mL μL
Morfina	10 μ g/mL	25	250	500
Codeina	10 μ g/mL	25	250	500
6-O-MAM	100 μ g/mL	2.5	25	50
Diidrocodeina	100 μ g/mL	2.5	25	50
Ossicodone	100 μ g/mL	2.5	25	50
Tramadol	100 μ g/mL	2.5	25	50
Cocaina	100 μ g/mL	2.5	25	50
Benzoilecgonina	100 μ g/mL	2.5	25	50
Norcocaina	100 μ g/mL	2.5	25	50
Cocaetilene	40 μ g/mL	6.25	62.5	125
Metadone	100 μ g/mL	2.5	25	50
EDDP	100 μ g/mL	2.5	25	50
Buprenorfina	100 μ g/mL	2.5	25	50
Norbuprenorfina	10 μ g/mL	25	250	500
Ketamina	200 μ g/mL	1.25	12.5	25
Norketamina	100 μ g/mL	2.5	25	50
Zolpidem	200 μ g/mL	1.25	12,5	25

Tabella 1: Nella tabella vengono riassunti i volumi in μ L che devono essere prelevati dalla soluzione iniziale per ottenere le soluzioni alle concentrazioni di 25 ng/mL, 250 ng/mL e 500 ng/mL tutte con un volume finale di 10 mL.

- STD MIX 2: Le soluzioni vengono preparate utilizzando metanolo e le soluzioni dei seguenti analiti in diverse concentrazioni (riassunti in tabella 2), in modo da ottenere le soluzioni a 25 ng/mL, 250 ng/mL, 500 ng/mL. Il volume finale delle tre soluzioni è di 10 mL ciascuna.

ANALITA	CONCENTRAZIONE SOLUZIONE INIZIALE	Working solution 1 25 ng/mL µL	Working solution 2 250 ng/mL µL	Working solution 3 500 ng/mL µL
Anfetamina	100 µg/mL	2,5	25	50
Metanfetamina	100 µg/mL	2,5	25	50
MDA	100 µg/mL	2,5	25	50
MDMA	100 µg/mL	2,5	25	50
MDEA	100 µg/mL	2,5	25	50

Tabella 2: Nella tabella vengono riassunti i volumi in µL che devono essere prelevati dalla soluzione iniziale per ottenere le soluzioni alle concentrazioni di 25 ng/mL, 250 ng/mL e 500 ng/mL tutte con un volume finale di 10 mL.

Tutte le soluzioni devono essere conservate a -20°C.

7. Analisi

7.1 LAVAGGIO ed ESTRAZIONE

I capelli (generalmente sono analizzati i 3 cm prossimali) sono inseriti nelle vials in propilene da 2 mL. Procedere al lavaggio con 3 mL di metanolo e agitare con vortex per 20-30 secondi, eliminare il surnatante e aggiungere 3 mL di acqua Milliq, agitare per 20-30 secondi ed eliminare il surnatante. Procedere ad un ulteriore lavaggio con metanolo, agitare con vortex per 30 secondi ed eliminare il residuo organico. Al termine porre i campioni in stufa a 65°C per 1h.

Successivamente aggiungere circa 8 palline in acciaio e procedere allo sminuzzamento mediante Precellys Evolution mediante metodo "sminuzza".

Pesare nelle provette di vetro con tappo a vite 25 mg di capelli blank e 25 mg dei campioni e procedere all'aggiunta degli standard come segue.

SIGLA	MATRICE	NOME CAMPIONE	QUANTITA` CAMPIONE	INDICAZIONI
1	CPL	BLK	25 mg	+ 20 µL IS sostanze + 50 µL IS THC + 10 µL IS EtG
2	CPL	SPK sostanze 0.01 ng/mg	25 mg	+ 20 µL IS sostanze +10 µL STD MIX 1 25 ng/mL +10 µL STD MIX 2 25 ng/mL
		SPK cannabinoidi 0,01 ng/mg		+ 50 µL IS THC + 10 µL STD MIX CANNABINOIDI 25 ng/mL
		SPK EtG 5 pg/mg		+ 10 µL IS EtG-d5 + 25 µL STD EtG (5 ng/mL)
3	CPL	SPK sostanze 0,02 ng/mg	25 mg	+20 µL IS sostanze +20 µL STD MIX 1 25 ng/mL +20 µL STD MIX 2 25 ng/mL
		SPK cannabinoidi 0,02 ng/mg		+ 50 µL IS THC + 20 µL STD MIX CANNABINOIDI 25 ng/mL
		SPK EtG 7 pg/mg		+ 10 µL IS EtG-d5 + 35 µLSTD EtG (5 ng/mL)

4	CPL	SPK sostanze 0,05 ng/mg	25 mg	+ 20 µL IS sostanze +50 µL STD MIX 1 25 ng/mL +50 µL STD MIX 2 25 ng/mL
		SPK cannabinoidi 0,03		+ 50 µL IS THC + 30 µL STD MIX CANNABINOIDI 25 ng/mL
		SPK EtG 20 pg/ng		+ 10 µL IS EtG-d5 + 10 µL STD EtG (50 ng/mL)
5	CPL	SPK sostanze 0.1 ng/mg	25 mg	+ 20 µL IS sostanze +10 µL STD MIX 1 250 ng/mL +10 µL STD MIX 2 250 ng/mL
		SPK cannabinoidi 0,05 ng/mg		+ 50 µL IS THC + 50 µL STD MIX CANNABINOIDI 25 ng/mL
		SPK EtG 30 pg/mg		+ 10 µL IS EtG-d5 + 15 µL STD EtG (50 ng/mL)
6	CPL	SPK sostanze 0.2 ng/mg	25 mg	+ 20 µL IS sostanze +20 µL STD MIX 1 250 ng/mL +20 µL STD MIX 2 25 ng/mL
		SPK cannabinoidi 0,1 ng/mg		+50 µL IS THC +10 µL STD MIX CANNABINODI 250 ng/mL
		SPK EtG 50 pg/mg		+ 10 µL IS EtG-d5 + 25 µL STD EtG (50 ng/mL)
7	CPL	SPK sostanze 0.5 ng/mg	25 mg	+ 20 µL IS sostanze +25 µL STD MIX 1 500 ng/mL +25 µL STD MIX 2 500 ng/mL
		SPK cannabinoidi 0,2 ng/mg		+50 µL IS THC +20 µL STD MIX CANNABINODI 250 ng/mL
		SPK EtG		+ 10 µL IS EtG-d5

		100 pg/mg		+ 50 µL STD EtG (50 ng/mL)
8	CPL	SPK sostanze 1 ng/mg	25 mg	+ 20 µL IS sostanze +50 µL STD MIX 1 500 ng/mL +50 µL STD MIX 2 500 ng/mL
		SPK cannabinoidi 0,5 ng/mg		+ 50 µL IS THC +50 µL STD MIX CANNABINOIDI 250 ng/mL
		SPK EtG 300 pg/mg		+ 10 µL IS EtG-d5 + 15 µL STD EtG (500 ng/mL)

CP = Capelli

PP= Pelo pubico

PA= Pelo ascellare

PT= Pelo toracico

SPK= Calibratori

Per in campioni si utilizzano sempre provette in vetro con tappo a vite, dove si pesano 25 mg e si aggiungono gli SI nelle stesse quantità previste nel BLANK presente in tabella.

ESTRAZIONE ed ANALISI dei campioni

FASE	DESCRIZIONE
Digestione	Aggiungere 500 µL di Reattivo M3
	Mescolare e porre in stufa a 100°C per 1 h, ogni 20-30 min agitare le provette
Raffreddamento ed Estrazione	Raffreddare velocemente
	Centrifugare a 3000 giri per 15 minuti a 10°C
	Prelevare il surnatante (pH 3) e trasferire in provette di vetro
	Centrifugare a 3000 giri per 15 minuti a 10°C
	Diluire il surnatante con Acqua MilliQ 1:1 nelle vial con insert in vetro
Analisi	Analisi mediante sistema UHPLC-MS/MS Xevo TQ-S micro

7.2 CROMATOGRAFIA LIQUIDA

La separazione è stata effettuata mediante un cromatografo UHPLC che si serve di una colonna BEH C18 Premier 2.5 μm , VanGuard™ FIT, 2.1 x 100 mm, utilizzata ad una temperatura di $50.0 \pm 2.0^\circ\text{C}$.

L'eluizione per EtG prevede l'impiego di due fasi mobili:

- Fase A2: Soluzione acquosa contenete ammonio formiato (5 mM, pH 3).
- Fase B2: Soluzione di aceto nitrile e acido formico 0.01%.

Il flusso viene impostato a 0.400 mL/min, con un volume di iniezione di 2 μL e una durata totale della corsa di 7 min. Il rapporto tra le fasi rimane costante per tutta la durata dell'analisi.

Anche l'eluizione prevede l'utilizzo di due fasi mobili:

- Fase A2: Soluzione acquosa contenete ammonio formiato (5 mM, pH 3).
- Fase B1: Metanolo puro

Il flusso è stato impostato a 0.400 mL/min, con un volume di iniezione di 2 μL e una durata totale della corsa di 11 min.

Nella seguente tabella verranno riportate le fasi utilizzate per la cromatografia

TEMPO (min)	A2 (%)	B1 (%)	FLOW (mL/min)
0	90	10	0.400
1	80	20	0.400
2	70	30	0.400
3	60	40	0.400
4	40	60	0.400
5	15	85	0.400
6	10	90	0.400
7	0	100	0.400
8	90	10	0.400
9	90	10	0,400
10	90	10	0,400
11	90	10	0,400

Tabella 3. Tabella riassuntiva dei parametri utilizzati per la cromatografia liquida, compresi la durata del processo, la percentuale di fasi impiegate e la velocità di flusso (flow).

7.3 SPETTROMETRIA DI MASSA

Lo spettrometro utilizzato prevede l'impiego di un analizzatore a triplo quadrupolo con un sistema di ionizzazione ESI.

L'analisi viene effettuata in modalità MRM utilizzando argon come gas di collisione. Quando l'argon colpisce la molecola "madre" questa si frantuma in diversi ioni, i due principali vengono riconosciuti dal rilevatore sulla base del rapporto massa/carica (m/z). Per riconoscere in modo univoco le molecole si impostano parametri differenti in modo che solo lo ione d'interesse possa raggiungere il rilevatore. Nella seguente tabella vengono riassunti i principali parametri utilizzati.

Analita	Parent (m/z)	Transizione 1 (m/z)	Transizione 2 (m/z)	Dwell (s)	Cone (V)	Collision 1 (V)	Collision 2 (V)
Anfetamina	136.1	91.1	119.1	0.006	20	15	8
Anfetamina -D6	142	93	/	0.006	20	16	/
MA	150.1	133.1	163	0.006	20	12	10
MA-D6	154	91.8	121.1	0.006	20	12	10
MDA	180.1	133.1	163.1	0.006	20	18	10
MDA-D6	185.1	110	137.1	0.006	20	20	26
MDMA	194.1	133,1	163	0.006	20	20	14
MDMA-D5	199.1	135.25	165.1	0.006	20	20	12
MDEA	208.1	135.1	163.2	0.006	20	14	14
MDEA-D5	213.1	105.1	163.1	0.006	20	26	14
Norketamina	224,1	125	207.1	0.006	20	25	10
Norketamina-D4	228.2	120	129.1	0.006	20	38	22
Ketamina	238.2	125.1	220.2	0.006	20	25	15
Ketamina-D4	242.2	129.1	211.1	0.006	20	25	15
Tramadololo	264.1	58.1	/	0.006	25	15	/
EDDP	278.2	186.2	234.2	0.007	45	35	26

EDDP-D3	281.3	235.15	250.2	0.007	30	30	22
Metadone	310.3	105.1	265.2	0.012	30	32	14
Metadone-D3	313.3	268.2	/	0.012	30	14	/
Benzoilecgonina	290.1	105.1	168.1	0.007	30	33	20
Benzoilecgonina-D3	293	105.1	171.1	0.007	30	32	20
Norcocaina	290.2	136.1	168.1	0.007	30	20	14
Norcocaina-D3	293.2	136.1	171.2	0.007	35	24	16
Cocaina	304.2	82.3	182.26	0.006	30	28	20
Cocaina-D3	307	84.4	184.7	0.006	30	30	20
Cocaetilene	318.1	82.1	196.1	0.007	30	30	20
Cocaetilene-D3	321.1	85	199.1	0.007	30	30	20
EME	200.2	82.1	182.1	0.017	33	23	17
EME-D3	213.1	105.1	163.1	0.017	33	17	17
Morfina	286	153	165.1	0.017	35	40	40
Morfina-D3	289.2	61	201	0.017	35	28	26
6-O-MAM	328.1	165.1	181.2	0.006	30	40	40
6-O-MAM-D3	331	61.1	195.1	0.006	30	30	36
Diidrocodeina	302.1	199.1	201.1	0.006	35	34	30
Diidrocodeina-D6	308.3	128.2	202.2	0.006	40	50	36
Codeina	300.1	199.2	215.1	0.006	30	27	25
Codeina-D3	303	61.1	215.1	0.006	30	27	25
Fentanil	337.2	105.2	108.2	0.007	35	38	30
Fentanil-D5	342.2	105.2	188.2	0.007	35	38	30

Zolpidem	308.1	235.2	263.1	0.007	45	34	28
Zolpidem-D6	314.3	92.2	235.2	0.007	30	50	34
THC	315.21	123	193.1	0.030	35	34	22
THC-D3	318.2	123	196.1	0.030	35	34	22
CBD	315.5	123.1	193.15	0.030	35	32	20
CBD-3	318.3	123.2	196.2	0.030	40	32	22
CBN	311.2	223	241	0.030	30	20	20
CBN-D3	314.3	223.2	241.2	0.030	40	18	16
Norbuprenorfin	414.2	57.1	83.1	0.007	55	55	46
Norbuprenorfin-D3	417.2	57.1	83.1	0.007	55	50	54
Buprenorfin	468.2	55.1	83.1	0.012	55	52	48
Buprenorfin-D3	472.2	59.2	88.2	0.012	55	52	48
EtG	221	75	85	0.099	25	14	16
EtG-D	226	85	/	0.099	25	16	/

Tabella 4. Tabella riassuntiva delle transizioni e dei parametri utilizzati per la rivelazione di sostanze e dei loro deuterati in spettrometria di massa

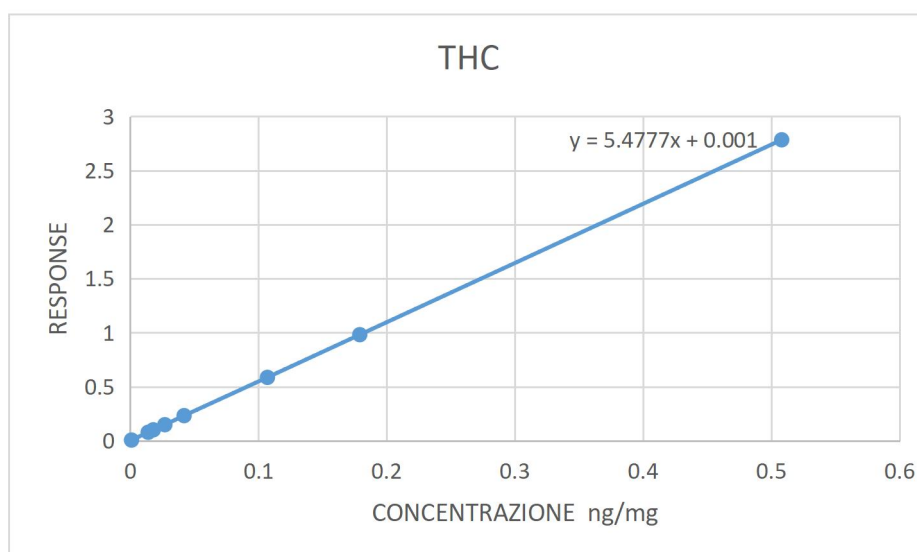
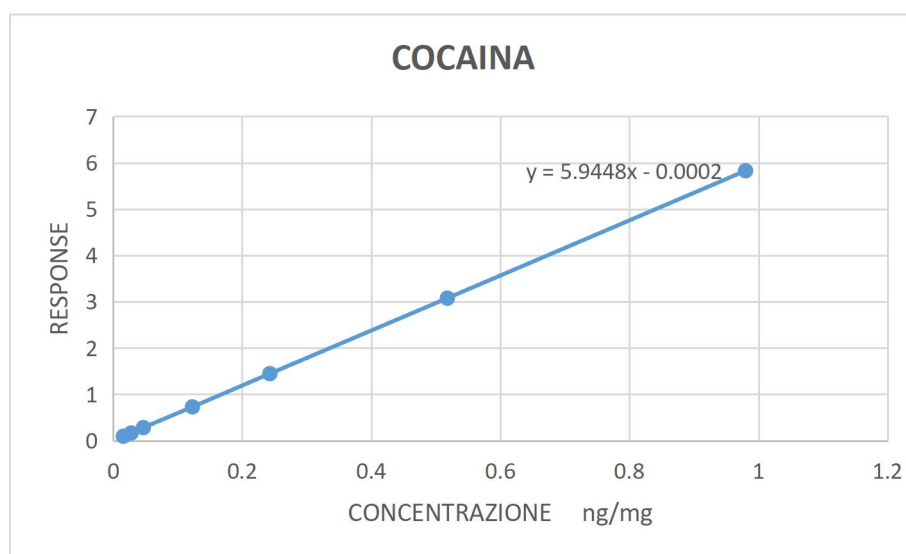
Lo spettrofotografo e il cromatografo sono interfacciati con un software, MassLynx, che consente l'elaborazione dei dati.

8. Curva di calibrazione

Ogni sostanza ricercata e i suoi metaboliti necessitano di una curva di calibrazione per essere quantificate.

Tutte le curve sono state costruite su sette livelli di concentrazione diversi per sostanze basiche (0,01; 0,02; 0,005; 0,1; 0,2; 0,5; 1 ng/mg), cannabinoidi (0,01; 0,02; 0,03; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 ng/mg), ed EtG (5; 7; 20; 30; 50; 100; 300 pg/mg). Tali valori sono stati ottenuti aggiungendo diversi volumi di calibratori a 25 mg di capelli blank. Le tre mix di standard interni sono stati aggiunti a tutti i punti di tutte le curve e in tutti i campioni alle concentrazioni riportate in Tabella 3.

Di seguito verranno riportati alcuni esempi delle rette di calibrazione utilizzate.



E` stata preparata una curva per ogni analita ricercato e tutti i coefficienti di determinazione R^2 erano compresi tra 0.989 e 0.999, permettendo in questo modo quantificazioni affidabili.

9. Parametri di validazione

9.1 SENSIBILITÀ E SPECIFICITÀ

Per valutare la sensibilità sono stati preparati 60 campioni negativi (blank) e 50 campioni positivi, in entrambi i casi già analizzati in precedenza con SPE.

La specificità è garantita dalla modalità in cui è impostato lo spettrometro di massa, ossia MRM. Praticamente sono stati preparati 20 campioni negativi (blank) che sono stati estratti ed analizzati per valutare eventuali interferenze.

9.2 ACCURATEZZA

L'accuratezza è stata verificata mediante un Proficiency Test (o VEQ), ovvero attraverso l'analisi di campioni che sono stati inviati da un ente terzo e i cui risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti da altri laboratori. Questo consente di conoscere quanto il risultato fornito dal laboratorio si avvicina al valore presumibilmente vero.

9.3 PRECISIONE

Per valutare la precisione sono stati analizzati ripetutamente tre QC (campioni addizionati diversi dai calibratori): uno basso (sostanze 0.020 ng/mg; cannabinoidi 0.010 ng/mg; EtG 5 pg/mg), uno medio (sostanze 0.200 ng/mg; cannabinoidi 0.020 ng/mg; EtG 7 pg/mg) e uno alto (sostanze 0.500 ng/mg; cannabinoidi 0.050 ng/mg; EtG 30 pg/mg) e sono stati analizzati tre volte in un giorno per valutare la precisione intraday e successivamente una volta per tre giorni consecutivi.

9.4 LOQ E LOD

I parametri di LOQ e LOD sono stati verificati preparando delle diluizioni 1:1, 1:2 e 1:4 a partire dalle soluzioni STD MIX 1 25 ng/mL, STD MIX 2 25 ng/mL, STD MIX CANNABINOIDI 25 ng/mL e STD EtG 5 ng/mL, diluite in metanolo, che sono state aggiunte alla matrice blank.

Successivamente è stata estratta ed analizzata la sequenza a cinque punti alle seguenti concentrazioni:

- Sostanze: 0.02 ng/mL; 0.01 ng/mL; 0.005 ng/mL; 0.0025 ng/mL e 0.00125 ng/mL.
- Cannabinoidi: 0.02 ng/mL; 0.01 ng/mL; 0.005 ng/mL; 0.0025 ng/mL e 0.00125 ng/mL.
- EtG: 7 pg/mL; 5 pg/mL; 2.5 pg/mL; 1.25 pg/mL e 0.625 pg/mL.

Nei risultati si è verificata la deviazione percentuale (DV%) che dimostra quanto il risultato atteso si discosti da quello ottenuto. Il LOQ non deve avere un DV% superiore al 20%, come LOD si è considerata la diluizione successiva.

9.5 LINEARITÀ E ROBUSTEZZA

La linearità è stata verificata preparando curve di calibrazione a sette punti per sostanze (0,01; 0,02; 0,005; 0,1; 0,2; 0,5; 1 ng/mg), cannabinoidi (0,01; 0,02; 0,03; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 ng/mg), ed EtG (5; 7; 20; 30; 50; 100; 300 pg/mg).

La robustezza del metodo rispetto alla quantità di matrice è stata verificata partendo da diversi campioni positivi, in modo da comprendere tutte le sostanze ricercate, successivamente omogeneizzati (pool). Da questo pool sono state prelevate quantità crescenti di campione (5.1 mg; 10.6 mg; 13.8 mg; 17.2 mg) analizzate con la metodica in esame.

I risultati ottenuti sono stati rapportati a 25 mg mediante la seguente equazione:

$$a : b = x : 25$$

In cui a è la concentrazione rilevata dallo strumento, b sono i mg di campione prelevato e x è la concentrazione di analita in 25 mg di campione.

9.6 RECUPERO ED EFFETTO MATRICE

Il recupero e l'effetto matrice sono stati verificati preparando tre QC a tre punti ciascuna: uno basso (sostanze 0.020 ng/mg; THC 0.010 ng/mg; EtG 5 pg/mg), uno medio (sostanze 0.20 ng/mg; THC 0.020 ng/mg; EtG 7 pg/mg) e uno alto (sostanze 0.50 ng/mg; THC 0.050 ng/mg; EtG 30 pg/mg).

Nella prima sequenza i calibratori sono stati aggiunti prima dell'estrazione, all'inizio del processo. Nella seconda sequenza i calibratori sono stati aggiunti dopo l'estrazione, subito prima della diluizione nelle vial. La terza sequenza è stata preparata aggiungendo i calibratori prima dell'estrazione ma senza aggiungere la matrice (spk puri).

Dai risultati ottenuti si possono ricavare il recupero (RE%) e l'effetto matrice (ME%) mediante le seguenti equazioni:

$$ME\% = B/C * 100$$

$$RE\% = A/B * 100$$

Dove A è l'area del picco aggiunto prima dell'estrazione (before extraction) , B è l'area del picco in cui l'analita è stato aggiunto dopo l'estrazione (after extraction) e C è l'area del picco dello standard puro.

10. RISULTATI

10.1 SENSIBILITA' E SPECIFICITA'

Il metodo è sensibile dal punto di vista clinico perché discrimina con accuratezza un campione positivo da uno negativo a livelli di 0.01-0.02 ng/mg senza falsi positivi. Dal punto di vista analitico la pendenza delle rette va da 1 a 29.

I risultati dei 50 campioni positivi e dei 60 campioni negativi hanno dimostrato una concordanza assoluta.

La specificità viene garantita impostando lo spettrometro di massa in modalità MRM. Tale modalità consente il passaggio di un solo analita nel primo quadrupolo e il passaggio di due ioni nel terzo quadrupolo, in questo modo si ha la certezza di non scambiare un analita con un altro.

10.2 ACCURATEZZA

L'accuratezza è stata confermata dai risultati ottimali del Proficiency Test. Di seguito vengono riportati alcuni esempi di risultati ottenuti.

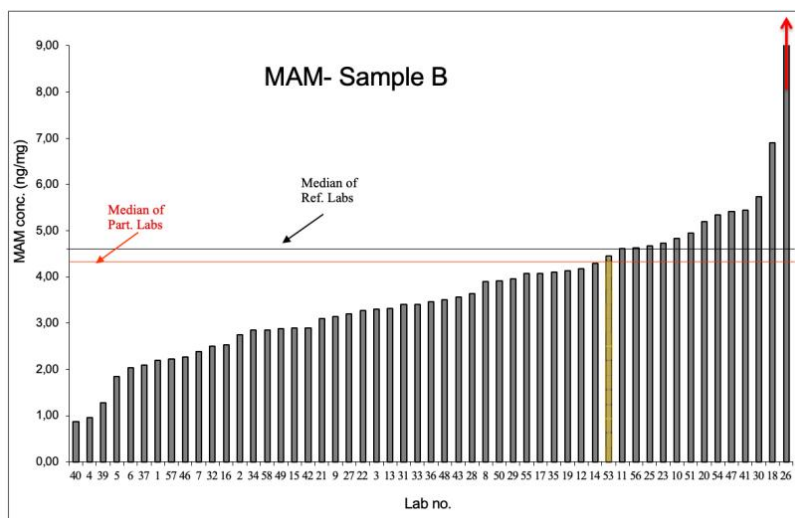
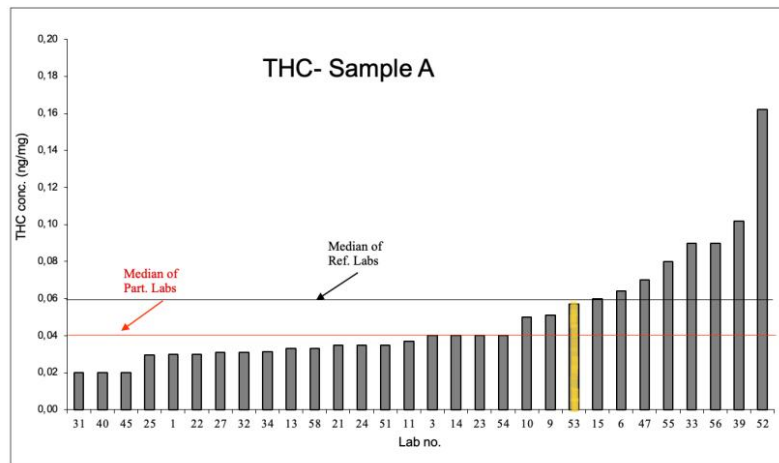


Figure 7 e 8 rappresentano i risultati ottenuti nel Proficiency Test. I risultati ottenuti dal nostro laboratorio sono i numeri 53 segnati in giallo.

10.3 PRECISIONE

La precisione è stata verificata confrontando i risultati ottenuti dall'analisi di un'intera sequenza con QC tre volte lo stesso giorno e una volta per tre giorni consecutivi. I risultati ottenuti sono congrui con quanto atteso e la deviazione standard relativa rientra nel 15% previsto dalla normativa.

Nelle seguenti tabelle sono riassunti i risultati della precisione intraday e della precisione interday.

PRECISIONE INTRADAY						
Analita	Basso		Medio		Alto	
	MEDIA ± DS	RDS%	MEDIA ± DS	RDS%	MEDIA ± DS	RDS%
Anfetamina	0.019 ± 0.004	12.0	0.186 ± 0.07	4.2	0.503 ± 0.005	1.0
MDA	0.023 ± 0.002	8.8	0.216 ± 0.003	1.4	0.495 ± 0.013	2.6
MDMA	0.026 ± 0.001	4.5	0.220 ± 0.003	1.2	0.509 ± 0.001	0.41
Metanfeta mi na	0.02 ± 0.001	5.0	0.213 ± 0.006	2.8	0.512 ± 0.012	2.4
MDEA	0.019 ± 0.001	3.0	0.257 ± 0.009	3.5	0.489 ± 0.007	1.4
Ketamina	0.021 ± 0.001	4.7	0.196 ± 0.003	1.3	0.516 ± 0.006	1.1
Norketamina	0.027 ± 0.004	14.0	0.196 ± 0.003	1.5	0.514 ± 0.001	0.11
Ecgonina metilestere	0.024 ± 0.002	8.0	0.223 ± 0.004	2.0	0.507 ± 0.014	2.8
Benzoilecgon ina	0.022 ± 0.005	2.6	0.194 ± 0.005	2.8	0.530 ± 0.02	4.4
Cocaina	0.022 ± 0.002	9.0	0.188 ± 0.009	4.8	0.513 ± 0.006	1.3
Cocaetilene	0.019 ± 0.001	5.0	0.196 ± 0.007	3.7	0.515 ± 0.022	4.4
Norcocaina	0.021 ± 0.001	2.7	0.193 ± 0.009	4.7	0.493 ± 0.025	5.0
Morfina	0.023 ± 0.002	8.0	0.200 ± 0.004	2.3	0.513 ± 0.014	2.8
Codeina	0.019 ± 0.001	8.0	0.195 ± 0.011	5.5	0.509 ± 0.011	2.2
Diidrocodein a	0.023 ± 0.001	2.5	0.192 ± 0.008	4.0	0.519 ± 0.004	0.7
6-O-MAM	0.021 ± 0.002	9.0	0.218 ± 0.010	4.5	0.520 ± 0.017	3.2
Metadone	0.022 ± 0	0	0.194 ± 0.017	8.8	0.505 ± 0.001	0.2
EDDP	0.019 ± 0.001	6.1	0.191 ± 0.005	2.5	0.520 ± 0.009	1.7

Tramadol	0.021 ± 0.001	7.5	0.197 ± 0.005	2.5	0.513 ± 0.013	2.5
Norbuprenor fina	0.019 ± 0.002	11.0	0,205 ± 0.031	15.0	0.489 ± 0.07	11.0
Buprenorfin a	0.021 ± 0.001	5.6	0.204 ± 0.013	6.0	0.504 ± 0.013	2.6
THC	0.012 ± 0.001	12.0	0.022 ± 0.003	14.0	0,046 ± 0.007	14.5
CBD	0.011 ± 0.001	9.0	0.018 ± 0.001	6.5	0.042 ± 0.001	3.6
CBN	0.013 ± 0.001	11.0	0.02 ± 0.001	8.0	0.046 ± 0.001	2.1
Zolpidem	0.019 ± 0.001	5.5	0.210 ± 0.012	5.9	0.499 ± 0.019	3.9
Fentanil	0.016 ± 0.002	12.0	0.179 ± 0.10	6.0	0.456 ± 0.03	6.6
EtG	5.7 ± 0.208	3.7	7.14 ± 0.81	11	29 ± 0.23	0.8

Precisione Interday						
Analita	Basso		Medio		Alto	
	MEDIA ± DS	RDS%	MEDIA ± DS	RDS%	MEDIA ± DS	RDS%
Anfetamina	0.024 ± 0.001	4.1	0.221 ± 0.013	5.9	0.489 ± 0.026	5.2
MDA	0.024 ± 0.001	4.1	0.211 ± 0.006	2.9	0.508 ± 0.014	2.7
MDMA	0.025 ± 0	0	0.213 ± 0.008	3.8	0.509 ± 0.003	0.5
Metanfetami na	0.021 ± 0.001	2.7	0.215 ± 0.007	3.2	0.512 ± 0.017	3.4
MDEA	0.019 ± 0.001	3.0	0.250 ± 0.10	4.0	0.492 ± 0.003	1.0
Ketamina	0.021 ± 0.001	2.7	0.198 ± 0.002	1.1	0.517 ± 0.005	1.0
Norketamina	0.028 ± 0.002	7.1	0.198 ± 0.002	1.2	0.500 ± 0.022	4.5
Ecgonina metilestere	0.023 ± 0.002	8.7	0.242 ± 0.022	9.1	0.472 ± 0.028	5.9
Benzoilecgon ina	0.020 ± 0.002	12.4	0.199 ± 0.010	4.8	0.511 ± 0.004	1.0
Cocaina	0.021 ± 0,003	14.3	0.199 ± 0.013	6.6	0.484 ± 0.030	6.3
Cocaetilene	0.020 ± 0.001	2.8	0.197 ± 0.003	1.4	0.498 ± 0.019	3.8
Norcocaina	0.020 ± 0.001	2.8	0.193 ± 0.011	6.1	0.497 ± 0.024	4.9

Morfina	0.024 ± 0.001	2.4	0.199 ± 0.008	4.0	0.515 ± 0.009	1.8
Codeina	0.018 ± 0.002	11	0.195 ± 0.024	12	0.502 ± 0.017	3.9
Diidrocodeina	0.022 ± 0.001	5.2	0.183 ± 0.011	5.9	0.492 ± 0.021	4.3
6-O-MAM	0.021 ± 0.002	9.5	0.197 ± 0.017	8.6	0.502 ± 0.014	2.7
Metadone	0.022 ± 0.001	2.6	0.208 ± 0.003	1.4	0.503 ± 0.006	1.4
EDDP	0.020 ± 0.001	2.9	0.188 ± 0.003	1.5	0.511 ± 0.003	1.0
Tramadolo	0.021 ± 0.001	4.7	0.192 ± 0.006	3.1	0.505 ± 0.003	0.7
Norbuprenorfin	0.021 ± 0.001	4.7	0.201 ± 0.024	11.0	0.496 ± 0.017	3.5
Buprenorfina	0.021 ± 0.001	5.6	0.195 ± 0.003	1.5	0.507 ± 0.002	0.3
THC	0.009 ± 0.002	10.0	0.017 ± 0.001	3.2	0.042 ± 0.001	2.8
CBD	0.011 ± 0.001	13.0	0.020 ± 0.002	8.6	0.043 ± 0.003	6.2
CBN	0.010 ± 0.001	12.0	0.021 ± 0.001	12.0	0.046 ± 0.002	3.3
Zolpidem	0.019 ± 0.001	3.1	0.194 ± 0.011	5.7	0.510 ± 0.013	2.5
Fentanil	0.017 ± 0.001	5.9	0.184 ± 0.009	5.0	0.454 ± 0.054	12.0
EtG	5.4 ± 0.172	3.2	7.5 ± 0.265	3.5	29.03 ± 0,231	0.8

10.4 LOQ E LOD

LOQ e LOD sono stati verificati preparando una curva con delle diluizioni scalari dei nostri calibratori.

I risultati sono stati ottenuti guardando la differenza percentuale tra il valore atteso e quello ottenuto. Nel caso del LOQ tale differenza deve essere inferiore al 20% e il LOD è la diluizione subito inferiore.

Tutti i risultati hanno ottenuto una netta differenza dei valori percentuali quindi l'individuazione di questi parametri è stata inequivocabile.

Le rette di calibrazione hanno un coefficiente di determinazione (R^2) superiori a $R^2 = 0.95$ per le sostanze basiche.

Nella seguente tabella sono riportati i valori di LOQ e LOD ottenuti dalla calibrazione su punti bassi e i coefficienti di determinazioni di ciascuna retta.

ANALITA	LOQ	LOD	R²
Anfetamine	0.01 ng/mg	0.005 ng/mg	0.997
MDA	0.01 ng/mg	0.005 ng/mg	0.986
Metanfetamine	0.0025 ng/mg	0.00125 ng/mg	0.992
MDMA	0.01 ng/mg	0.005 ng/mg	0.975
MDEA	0.01 ng/mg	0.005 ng/mg	0.970
Ketamina	0.0025 ng/mg	0.00125 ng/mg	0.975
Norketamina	0.02 ng/mg	0.01 ng/mg	0.973
Ecgonina metilestere	0.01 ng/mg	0.005 ng/mg	0.998
Benzoilecgonina	0.01 ng/mg	0.005 ng/mg	0.992
Cocaina	0.01 ng/mg	0.005 ng/mg	0.978
Cocaetilene	0.0025 ng/mg	0.00125 ng/mg	0.995
Norcocaina	0.0025 ng/mg	0.00125 ng/mg	0.991
Morfina	0.02 ng/mg	0.01 ng/mg	0.979
Codeina	0.005 ng/mg	0.0025 ng/mg	0.988
Diidrocodeina	0.02 ng/mg	0.01 ng/mg	0.964
6-O-MAM	0.02 ng/mg	0.01 ng/mg	0.995
Metadone	0.01 ng/mg	0.005 ng/mg	0.984
EDDP	0.0025 ng/mg	0.00125 ng/mg	0.982
Tramadolo	0.005 ng/mg	0.0025 ng/mg	0.993
Norbuprenorfina	0.02 ng/mg	0.01 ng/mg	0.963
Buprenorfina	0.02 ng/mg	0.01 ng/mg	0.969
THC	0.005 ng/mg	0.0025 ng/mg	0.959
CBD	0.01 ng/mg	0.005 ng/mg	0.988
CBN	0.01 ng/mg	0.005 ng/mg	0.953
Zolpidem	0.02 ng/mg	0.01 ng/mg	0.958
Fentanil	0.02 ng/mg	0.01 ng/mg	0.952
EtG	7 pg/ng	5 pg/ng	0.975

10.5 LINEARITA ` E ROBUSTEZZA

La robustezza è stata verificata prelevando da un pool di capelli positivi omogenizzati quantità scalari di matrice e rapportandoli dopo su 25 mg.

Le concentrazioni ottenute in 25 mg sono compatibili per ogni sostanza, pertanto si può affermare che il metodo è in grado di determinare in modo affidabile la concentrazione degli analiti ricercati anche partendo da basse quantità di campione.

La linearità è stata verificata preparando una curva di calibrazione a sette punti per sostanze (0,01; 0,02; 0,005; 0,1; 0,2; 0,5; 1 ng/mg), i cannabinoidi (0,01; 0,02; 0,03; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 ng/mg), ed EtG (5; 7; 20; 30; 50; 100; 300 pg/mg).

La linearità è stata dimostrata da 0.01 ng/mg a 10 ng/mg per le sostanze basiche, da 0.01 ng/mg a 2 ng/mg per i cannabinoidi e da 5 pg/mg a 300 pg/mg per EtG.

Nella seguente tabella sono elencati gli R² ottenuti nella curva di calibrazione per determinare la linearità.

ANALITA	R²	ANALITA	R²
Anfetamine	0.996	Diidrocodeina	0.998
MDA	0.994	6-O-MAM	0.996
Metanfetamine	0.996	Metadone	0.996
MDMA	0.993	EDDP	0.999
MDEA	0.996	Tramadol	0.997
Ketamina	0.996	Norbuprenorfina	0.996
Norketamina	0.992	Buprenorfina	0.997
Ecgonina metilestere	0.989	THC	0.999
Benzoilecgonina	0.998	CBD	0.998
Cocaina	0.998	CBN	0.996
Cocaetilene	0.994	Zolpidem	0.999
Norcocaina	0.994	Fentanil	0.997
Morfina	0.999	EtG	0.999
Codeina	0.996		

10.6 RECUPERO ED EFFETTO MATRICE

Il recupero e l'effetto matrice sono stati verificati preparando tre sequenze a sette punti ciascuna: nella prima sequenza i calibratori sono stati aggiunti before extraction, nella seconda after extraction e nella terza sono stati aggiunti before extraction ma senza matrice.

I risultati dell'effetto matrice e del recupero rientrano nei criteri di accettabilità stabiliti dalla Food and Drugs Administration (FDA), ovvero il recupero deve essere superiore all'80% e l'effetto matrice deve essere pari al 100% \pm 20%.

Nelle seguenti tabelle sono riassunti i risultati del recupero % e dell'effetto matrice %.

EFFETTO MATRICE %			
ANALITA	LIVELLO BASSO	LIVELLO MEDIO	LIVELLO ALTO
Anfetamine	98.6	95.9	89.6
MDA	96.4	94.8	86.2
MDMA	91.2	90.8	74.0
Metanfetamina	96.5	94.1	81.5
MDEA	82.8	91.2	89.4
Ketamina	92.9	87.1	94.7
Norketamina	95.1	88.6	95.1
Ecgonina metilestere	80.0	85.2	84.5
Benzoilecgonina	94.9	91.2	96.6
Cocaina	82.6	94	97.2
Cocaetilene	96.9	99.1	99.7
Norcocaina	91.4	85.6	99.7
Morfina	94.7	82.2	91.3
Codeina	97.3	87.8	92.1
Diidrocodeina	97.2	86.7	96.9
6-O-MAM	98.0	86.7	91.2
Metadone	95.5	89.5	92.9
EDDP	85.0	86.5	87.7

Tramadolo	87.7	85.6	96.4
Norbuprenorfina	96.8	95.8	93.1
Buprenorfina	99.1	89.2	96.5
THC	93.5	96.7	88.9
CBD	99.9	87.4	97.7
CBN	98.2	99.5	97.1
Zolpidem	98.8	89.7	87.5
EtG	99.9	92.3	90.6

RECUPERO %			
ANALITA	LIVELLO BASSO	LIVELLO MEDIO	LIVELLO ALTO
Anfetamine	115.3	108	104.5
MDA	112.2	102.4	120.3
MDMA	104.6	114	115.1
Metanfetamina	89.3	105	110.7
MDEA	113.4	104.8	118.7
Ketamina	104.6	111.1	106.9
Norketamina	106.3	108.7	99.3
Ecgonina metilestere	101.4	96.8	90.6
Benzoilecgonina	105.1	110	111.6
Cocaina	116.2	100.4	114.3
Cocaetilene	95.2	102.4	100.9
Norcocaina	104.9	114.6	101.6
Morfina	106.5	124	104.8
Codeina	88.8	112.9	112.8
Diidrocodeina	99.7	120	113.7
6-O-MAM	91.8	112.3	110.5
Metadone	97.7	109.4	108.7
EDDP	102	114.3	106.1

Tramadolo	105.1	111.3	104
Norbuprenorfina	90	105.3	110
Buprenorfina	105.4	105.7	102.7
THC	108.6	115.3	111.3
CBD	120.2	117.2	120
CBN	107.4	115.7	110.1
Zolpidem	86.6	108.4	92
EtG	110	105.3	93.7

DISCUSSIONE

I parametri di validazione presi in considerazione hanno dimostrato che questa metodica è affidabile sia ad alte che a basse concentrazioni nell'intervallo di misura 0.01-1 ng/mg per le sostanze basiche, 0.01-0.5 ng/mg per i cannabinoidi e 5-300 pg/mg, rendendola molto utile allo scopo di identificare sostanze stupefacenti e loro metaboliti nelle matrici pilifere, in cui sono contenute a ng/mg o pg/mg (ppm e ppt). In generale, si può dire che tutti i parametri presi in considerazione rientrano nelle indicazioni fornite dalla FDA per la validazione di metodi analitici.

Il metodo può essere utilizzato in routine ed è stato applicato a campioni reali e ad un proficiency test con risultati ottimali.

La sostituzione delle tre metodiche precedenti con quella in esame ha portato molti vantaggi.

Primo fra tutti l'ottimizzazione del tempo e delle risorse, in quanto in precedenza si utilizzavano tre metodiche differenti che richiedevano 25 mg di campione ciascuna con i rispettivi reagenti, e consumo di materiale. Inoltre lo strumento doveva analizzare tre sequenze diverse, ciò comportava che si ottenevano i risultati di uno stesso paziente in momenti diversi allungando in questo modo il tempo di attesa per il referto.

CONCLUSIONI

La metodica in esame si è dimostrata idonea alle necessità del laboratorio; i risultati del protocollo di validazione rientrano nei limiti stabiliti dalla normativa FDA e dalle linee guida Eurachem, pertanto il metodo può essere utilizzato in routine.

Inoltre, l'utilizzo di un'unica metodica preparativa omnicomprensiva come è quella in esame, permette di dimezzare il consumo di materiali e reagenti e di ridurre la quantità di campione necessaria di 2/3, da 75 mg a 25 mg, aspetto molto importante per un laboratorio in cui giungono anche campioni pediatrici o scarsi.

Dovendo preparare una sola sequenza preparativa e due sequenze analitiche anche i tempi di analisi si riducono da 37 minuti a 22, in questo modo viene ridotta anche la quantità di fasi mobili utilizzate e l'usura della colonna.

Riducendo i tempi di preparazione del campione e di analisi è possibile ridurre anche il tempo di refertazione.

La metodica in esame è già entrata nella routine portando molte agevolazioni.

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 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.
- ³ 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>.
- ⁴ «Current status of accreditation for drug testing in hair - PubMed», consultato 12 aprile 2022, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18024039/>.
- ⁵ 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>.
- ⁶ 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).
- ⁷ 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>.
- ⁸ 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>.
- ⁹ Y Nakahara «Hair analysis for abused and therapeutic drugs», *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1999 Oct 15;733 (1-2): 161-80. doi:10.1016/s0378-4347(99)0059-6 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10572981/>
- ¹⁰ Harkey, «Anatomy and Physiology of Hair».
- ¹¹ R Paus «Principles of hair cycle control», *J Dermatol.* 1998 Dec;25(12) :793-802. doi:10.1111/j.1346-8138.1998.tb02507.x.
- ¹² Hyermin Yu, Won-Jun Jang, Jung-hee Jang, Byoungduck Park, Young Ho Seo, Chul-Ho Jeong, Sooyeon Lee «Role of hair pigmentation in drug incorporation into hair», *Forensic Sci Int.* 2017 dec;281:171-175. doi:10.1016/J.forsciint.2017.11.04. Epub 2017 Nov 11.
- ¹³ «Hair Analysis for Drugs of Abuse», consultato 17 aprile 2022, <https://www.astm.org/jfs12787j.html>.
- ¹⁴ «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_.
- ¹⁵ Simona Pichini, Piergiorgio Zuccaro, Manuela Pellegrini, Annunziata Lopez e Roberta Pacifici «L'analisi di farmaci e sostanze d'abuso nella matrice cheratinica», *Ann. Ist. Super. Sanità.* Vol. 36, n.1 (2000), pp 17-27.
- ¹⁶ Dylan Mantinieks, Dimitri Gerostamoulos, Paul Wright, Olaf Drummer «The effectiveness of decontamination procedures used in forensic hair analysis», *Forensic Sci Med Pathol.* 2018 Sep; 14(3):349-357. doi: 10.1007/s12024-018-9994-6.

- ¹⁷ Hui Yan, Ping Xiang, Min Shen «Current status of hair analysis in forensic toxicology in China», *Forensi Sci Res.* 2021 Jul 9,6(3):240-249. doi: 10.1080/20961790.2021.1921945.
- ¹⁸ 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>.
- ¹⁹ 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>. 95.
- ²⁰ 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>.
- ²¹ Presidelnza del Consiglio dei Ministri «Relazione annuale al Parlamento sul fenomeno delle tossico dipendenze in Italia», anno 2021. <https://www.politicheantidroga.gov.it/media/3070/relazione-annuale-al-parlamento-2021.pdf>.
- ²² Sito ufficiale dell'Arma dei Carabinieri; Le principali droghe. <https://www.carabinieri.it/in-vostro-aiuto/consigli/questioni-di-vita/tossicodipendenza-da-sostanze-stupefacenti/le-principali-droghe> .
- ²³ Matisyahu Shulman, Jonathan M Wai, Edward V Nunes «Buprenorphine Treatment for Opioid Use Disorder: An Overview», *CNS Drugs.* 2019 Jun;33(6):567-580. doi: 10.1007/s40263-019-00637-z.
- ²⁴ Marion A Coe, Michelle R Lofwall, Sharon L Walsh «Buprenorphine Pharmacology Review: Update on Transmucosal and Long-acting Formulations», *J Addict Med.* 2019 Mar/Apr;13(2)93-103. doi: 10.1097/ADM.0000000000000457.
- ²⁵ Theodore H Stanley «Fentanyl», *J Pain Symptom Manage.* 2005 May;29(5 Suppl):S67-71. doi: 10.1016/j.jpainsymman.2005.01.009.
- ²⁶ Rafael de la Torre, Magi Farré, Mònica Navarro, Roberta Pacifici, Piergiorgio Zuccaro, Simona Pichini «Clinical pharmacokinetics of amphetamine and related substances: monitoring in conventional and non-conventional matrices», *Clin Pharmacokinet.* 2004;43(3):157-85. doi: 10.2165/00003088-200443030-00002.
- ²⁷ Leo J Schep, Robin J Slaughter, D Michael G Beasley «The clinical toxicology of metamphetamine», *Clin Toxicol (Phila)*, 2010 Aug;48(7): 675-94 doi: 10.3109/15563650.2010.516752.
- ²⁸ Franjo Grotenhermen «Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids», *Clin Pharmacokinet.* 2003;42(4):327-60. doi: 10.2165/00003088-200342040-00003.
- ²⁹ B Sinner, B M Graf «Ketamine», *Handb Exp Pharmacol.* 2008;(182):313-33. doi: 10.1007/978-3-540-74806-9_15.
- ³⁰ Joydip Das «Repurposing of Drugs-The Ketamine Story», *J Med Chem.* 2020Nov 25;63(22):13514-13525. doi:10.1021/acs.jmedchem.0c01193.
- ³¹ Mei Gao, Damon Rejaei, Hong Liu «Ketamine use in current clinical practice», *Acta Pharmacol Sin.* 2016 Jul;37(7):865-72. doi: 10.1038/aps.2016.5.Epub 2016 Mar 28.
- ³² Giacomo Chiaro, Anna Castelnovo, Giovanni Bianco, Piermario Mffei, Mauro Manconi «Severe chronic Abuse of Zolpidem in Refractory Insomnia», *J Clin Sleep Med.* 2018 Jul 15;14(7):1257-1269. doi: 10.5664/jcsm.7240.

- ³³ Joseph Westermeyer, Tegan M Carr «Zolpidem-Associated Consequences: An Updated Literature Review With Case Reports», J Nerv Ment Dis. 2020 Jan ;208(1):28-32. doi: 10.1097/NMD.0000000000001074.
- ³⁴ Jan Toralf Fosen, Gudrun hoiseth, Cristina Sempio, Nefele Giarratana, Asle Enger, Jorg Morlanf, Luca Morini «Hair EtG: Alterations in segment levels accompanying hair growth», Drug Test Anal. 2019 Jan;11(1):112-118. doi: 10.10027data.2474. Epub 2018 Sep 11.
- ³⁵ Simona Pichini, Roberta Pacifici «Linee guida per la determinazione di sostanze d'abuso nella matrice pilifera», https://www.iss.it/documents/20126/1915304/Linee_Guida_Capelli_xweb.pdf/88ffd26a-f665-6eab-2742-fb6f63617161?t=1576442092472 .
- ³⁶ SoHt «Recommendations for Hair Testing in Forensic Cases Society of Hair Testing», https://www.soht.org/images/pdf/Consensus_on_Hair_Analysis.pdf.
- ³⁷ Manuele sergi «Chimica analitica, rilevatori GC/HPLC», XII LEZIONE - RIVELATORI GC-HPLC.pdf.
- ³⁸ N. Bottanzini, L. Cavalli «Guida al calcolo della ripetibilità di un metodo di prova ed alla sua verifica nel tempo», 258 ripetibilita.pdf.
- ³⁹ Aldo Poletti «Sostanze d'abuso, diagnosi di abuso di droghe e alcool: Il ruolo del laboratorio», Dossier n.16, Settembre 2012 sostanze dabuso - ruolo del laboratorio.pdf.
- ⁴⁰ Incertezza di misura, Incertezza di misura - slide.pdf.
- ⁴¹ E. Gregori, M. Patriarca, m. Segà «Idoneità per lo scopo dei metodi analitici, Guida per i laboratori sulla validazione di metodi e argomenti correlati», seconda edizione 2014, Guida Eurachem, Rapporti Istisan 16/39, ISSN 1223-3117 e 2384-8936 (online). MV guide 2nd ed IT.pdf
- ⁴² Spettrometria di massa, spettrometria massa.pdf.
- ⁴³ Ambra Baloschi «Sviluppo di una nuova metodologia per la determinazione di corticosteroidi in matrici pilifere», anno 2021-2022.
- ⁴⁴ Adele Salvetta «Determinazione quantitativa di farmaci barbiturici in matrici biologiche», anno 2020-2021.
- ⁴⁵ Simona Pichini, Piergiorgio Zuccaro, Manuela Pellegrini, Annunziata Lopez e Roberta Pacifici «L'analisi di farmaci e sostanze d'abuso nella matrice cheratinica», Ann. Ist. Super. Sanità, vol 36, n.1 (2000), pp 17-27. https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&url=https://www.iss.it/documents/20126/45616/Pag._17_27_Vol._36_N._1_2000_Annali.pdf/d52e7ea5-16cd-d51e-0d07-20e857c09a0e%3Ft%3D1581101236543&ved=2ahUKEwjZ-aWa2475AhWuVPEDHS3RAQoQFnoECAUQAQ&usg=AOvVaw1Ly2p3ZrLutDCCV3KNK1fQ.
- ⁴⁶ Frank Musshoff, Murkhard Madea «New trends in hair analysis and scientific demands on validation and technical notes», volume 165, issues 2-3, 17 January 2007, pages 204-215; New trends in hair analysis and scientific demands on validation and technical notes - ScienceDirect