

Analisi comparativa di capelli, peli ed unghie per la ricerca delle droghe d'abuso in soggetti afferenti ad un Ser.T. della Toscana

Comparative analysis of hair and nails for the detection of substances of abuse in subjects under treatment at a public Drug Addiction Service in Tuscany

VALERIO CELLESI¹, ELISABETTA BERTOL², MARIA GRAZIA DI MILIA², MILO MEINI¹, CLAUDIA TRIGNANO², FRANCESCO MARI²

¹ Dipartimento delle Dipendenze Azienda USL 5 di Pisa; U.F. Ser.T. Zona Alta Val di Cecina - Borgo S. Lazzero 5 - 56048 Volterra. e-mail: v.cellesi@usl5.toscana.it

² U.O. Tossicologia Forense, Azienda Ospedaliera Universitaria Careggi-Dipartimento di Anatomia Istologia e Medicina Legale, Università degli Studi di Firenze. e-mail: elisabetta.bertol@unifi.it.

Riassunto

Gli Autori, sulla scorta dell'ampia letteratura sull'uso delle "matrici non convenzionali" nella ricerca tossicologica delle sostanze d'abuso, specie a scopo forense, ma anche per altre applicazioni, hanno condotto uno studio sperimentale su soggetti afferenti ad un servizio per le tossicodipendenze, avendo così l'opportunità di comparare i risultati analitici relativi alle concentrazioni di oppiacei, cocainici, e loro metaboliti su vari tipi di matrici cheratiniche (capelli, peli pubici, peli ascellari, unghie) prelevate in contemporanea sui medesimi soggetti in vari casi. Sono così stati confermati alcuni dati già noti, ma soprattutto è stato possibile accertare come certe matrici, in assenza del capello o per impossibilità tecnica del suo uso, costituiscano una valida alternativa, ed anzi, sotto certi aspetti, migliore.

Parole chiave: Sostanze d'abuso, Matrici non convenzionali, Tossicologia forense

Abstract

Using as background the ample literature on the use of "non-conventional matrices" in the toxicological testing for detection of drugs of abuse, not only for forensic purposes but also for other applications, the authors conducted an experimental study on subjects under treatment at the public Drug Addiction Service in Tuscany. The study presents the comparison of analytical results on the concentration of opium and cocaine derivatives and metabolites in various keratinous matrices (head, pubic and armpit hair, nails) mainly collected from the same subjects. The study confirms many already established results in the related literature. However, the study ascertained other matrices (in the absence of the availability of hair) could well be used as an alternative test and, under certain circumstances, could give even better results.

Keywords: Drugs of abuse, Non conventional matrices, Forensic toxicology

Introduzione

Il notevole sviluppo delle tecniche analitiche in tossicologia forense ha da tempo permesso l'utilizzo di "matrici alternative" (unghie, saliva, sudore, capelli e peli), a quelle tradizionalmente impiegate (sangue, urina e organi). Un vantaggio consiste, come è noto, nella maggiore facilità di prelievo e nella sua non invasività, nel fatto che al loro interno gli analiti anche di interesse tossicologico vi permangono stabilmente con possibilità della loro ricerca cronologicamente retroattiva, anche a scopi forensi. L'analisi sui capelli come matrice per la ricerca di stupefacenti è iniziata nel 1979 da Baumgartner e Coll per i metaboliti dell'eroina (1,2,3,4, 5,6,7) e quella sulle unghie, utilizzate all'inizio per la loro capacità a fissare elementi (As, Pb, Cu, Zn) (8,9,10, 11,12) hanno dimostrato, nel corso degli anni e con il raggiungimento di livelli tecnico-analitici avanzati, di essere di notevole utilità per verificare la storia d'uso e abuso di sostanze stupefacenti; per confermare o meno risultati ottenuti con metodi di screening di primo livello

lo su urine; per controllare la "compliance" a trattamenti farmacologici o ancora per controllare l'eventuale presenza di sostanze d'abuso sul luogo di lavoro, o per il rilascio di patenti di guida o di autorizzazioni per il porto d'armi (14). Inoltre possono trovare applicazione come valido strumento di follow up a lungo termine in pazienti dimessi da Servizi per le Tossicodipendenze e/o Comunità terapeutica (6,13).

Ritenendo opportuno dare come acquisita la conoscenza dei meccanismi di incorporazione delle molecole stupefacenti in capelli, peli ed unghie, del resto ampiamente descritti in letteratura, (15,16,17,18,19,20, 21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37) resta da ricordare, invece, come esistano alcuni fattori capaci di influire sull'incorporazione stessa e conseguentemente sulle concentrazioni delle sostanze stupefacenti eventualmente osservabili nelle matrici cheratiniche, che possono complicare l'interpretazione dei risultati analitici. Fondamentalmente tali fattori sono imputabili alla razza [la melanina mostra una notevole capacità di fissare molecole di nostro interesse (38,39)],

alla contaminazione esterna [solo parzialmente ovviabile con accurato lavaggio (40,41,42)] ad eventuali trattamenti cosmetici (39).

Scopo ed impostazione della ricerca

Scopo della presente ricerca è quello di effettuare una comparazione analitica tra varie matrici cheratiniche (capelli, pilizio, unghie) onde fornire una guida nella scelta della matrice da usare nei casi in cui il capello, la "tradizionale" tra le matrici non convenzionali, sia inaccessibile per rasatura del cranio, decolorazione del capello stesso o per altri motivi.

Premesso che la letteratura riporta numerose tecniche analitiche in grado di rilevare la presenza di droghe d'abuso nei capelli, peli ed unghie, che comprendono per la fase preliminare di screening l'impiego di tecniche immunochimiche (in particolare RIA), e per la conferma strumentale l'impiego della cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC), della gascromatografia associata alla spettrometria di massa (GC/MS) ed anche della più sofisticata GC/MS/MS e ribadendo come l'ambito e la metodologia forensi richiedono l'adozione di un procedimento d'analisi in grado di correlare la positività del campione unicamente con l'assunzione dello stupefacente, scartando i campioni positivi per effetto di una contaminazione esterna o per assorbimento passivo, è stato vagliato il valore di cut-off da adottarsi nella presente sperimentazione, sempre in accordo, comunque, con i limiti proposti come accettabili dalla letteratura. L'applicazione di una metodica standardizzata, su matrici diverse prelevate nello stesso momento in ciascuno dei diversi soggetti, permette di poter confrontare i dati ottenuti pur sapendo che molti fattori come l'età, il sesso, la razza, la stagione, le abitudini cosmetiche ecc. influenzano la stabilità delle sostanze stupefacenti nel capello ovvero possono influenzare la crescita delle unghie determinando una inevitabile inaccuratezza dei dati. Permette inoltre di definire quale potrebbe considerarsi, allo scopo, la matrice ideale o comunque la più idonea sia da un punto di vista strettamente analitico che per maggiore capacità di concentrare le sostanze.

Il campione sperimentato e sue caratteristiche

La nostra sperimentazione è stata condotta su unghie delle mani, capelli, peli ascellari e peli pubici di undici utenti in trattamento presso un Ser.T. dell'Azienda USL 5 di Pisa, previa autorizzazione al Direttore Sanitario ed al Direttore del Dipartimento delle Dipendenze, con consenso informato ai pazienti e garanzia della riservatezza.

CASO A = Femmina, utilizzo di cocaina dal 1986, utilizzo di oppiacei dal 1990 per via inalatoria, al momento del prelievo è da circa un mese in carico al

Ser.T. ed in trattamento con Buprenorfina compresse sublinguali; astinente dall'uso di oppiacei e cocaina da circa venti giorni, al momento della presa in carico riferiva uso di oppiacei e cocaina 3-4 volte alla settimana. La paziente presenta inoltre capelli trattati cosmeticamente (uso di coloranti), non è stato effettuato il prelievo dei peli pubici.

CASO B = Maschio, tossicodipendente da oppiacei e cocaina per via inalatoria, al momento del prelievo è da circa un mese in carico al Ser.T. ed in trattamento con Buprenorfina compresse sublinguali; astinente dall'uso di oppiacei da circa venti giorni, al momento della presa in carico riferiva uso di oppiacei e cocaina 3 - 4 volte alla settimana.

CASO C = Maschio tossicodipendente da oppiacei e cocaina per via endovenosa dal 1991, in trattamento con metadone cloridrato sciroppo ed in remissione da circa 1 anno, gli esami urine condotti con cadenza bisettimanale hanno dato esito sempre negativo per la ricerca degli oppiacei. Uso di cocaina fino a circa un anno fa. (ciocca di capelli lunga circa 20 cm).

CASO D = Maschio tossicodipendente da oppiacei e cocaina per via endovenosa dal 1987, in trattamento con Buprenorfina compresse sublinguali, gli esami urine effettuati con cadenza bisettimanale, da circa un anno, hanno dato esito sempre negativo per la ricerca degli oppiacei e positivo alla ricerca della cocaina

CASO E = Maschio tossicodipendente da oppiacei per via inalatoria dal 1995, in carico al Ser.T. da circa venti giorni, in trattamento con Buprenorfina compresse sublinguali, prima della presa in carico riferisce uso quotidiano di oppiacei.

CASO F = Maschio tossicodipendente da oppiacei per via endovenosa dal 1990, in carico al Ser.T. da circa due anni, attualmente in trattamento con Buprenorfina compresse sublinguali, l'esame delle urine effettuato con cadenza bisettimanale per la ricerca di oppiacei e cocaina, dimostra un uso di oppiacei (eroina) una volta a settimana (fumata) mentre il reperto di positività per cocaina è, non sempre costantemente, di circa 1 volta al mese e sempre fumata.

CASO G = Maschio tossicodipendente da oppiacei per via ev dal 1978, cocaina per via nasale dal 1980 in carico al Ser.T. dal 1986 attualmente in trattamento con Buprenorfina compresse sublinguali, l'esame delle urine condotto con frequenza bisettimanale nell'ultimo anno dimostra lunghi periodi di astensione dall'uso di oppiacei e brevi periodi in cui vi è un uso di oppiacei di circa una volta a settimana, sporadico utilizzo di cocaina.

CASO H = Maschio tossicodipendente da oppiacei e cocaina per via nasale dal 1990 in carico al Ser.T. da circa un mese, in trattamento con metadone cloridrato sciroppo a breve termine (tapering), astinente dall'uso di oppiacei da circa 20 giorni, prima della presa in carico riferisce uso di eroina 2-3 volte a settimana ed un uso più massiccio di cocaina, ha utilizzato anche metadone illegale.

CASO I = Maschio tossicodipendente da oppiacei e cocaina per via endovenosa dal 1992, in carico al Ser.T. dal 1994, attualmente in trattamento con Buprenorfina compresse sublinguali, all'esame delle urine effettuato con cadenza bisettimanale presenta uso di cocaina 2-3 volte a settimana ed un unico utilizzo di oppiacei negli ultimi sei mesi (da considerare la ciocca di capelli di circa 20 cm).

CASO L = Maschio tossicodipendente da oppiacei e cocaina per via endovenosa dal 2000, in carico al Ser.T. da circa un anno, attualmente in trattamento con metadone cloridrato sciroppo, all'esame delle urine effettuato con cadenza bisettimanale presenta lunghi periodi di astensione dall'uso di oppiacei e brevi periodi della durata di circa 20 giorni in cui vi è utilizzo di oppiacei circa 2 volte a settimana, uso di cocaina 2-3 volte a settimana per via nasale.

CASO M = Femmina tossicodipendente da oppiacei e cocaina per via endovenosa dal 1998, in carico al Ser.T. dal 2000, attualmente in trattamento con metadone cloridrato sciroppo all'esame delle urine effettuato con cadenza bisettimanale presenta negatività alla ricerca degli oppiacei uso di cocaina 1-2 volte a settimana (ciocca di capelli non decolorati di circa 10 cm).

Materiali e reattivi

Soluzione HCl 0,1 N.

Soluzione NaOH 2 N.

Tampone fosfato 0,1 M, pH 6-7.

Miscela di diclorometano - isopropanolo (8:2) al 2% di NH_4OH .

Nalorfina (standard interno), morfina, cocaina, benzoilecgonina (BZE), metadone sotto forma di soluzioni a titolo noto (1 mcg/ml) di sostanze pure ottenute dalla Nova Chimica - Cinisello Balsamo (MI, Italia) e facenti parte del patrimonio di "standards" del Laboratorio della U.O. di Tossicologia forense dell'Università di Firenze.

N-metil, N-trimetilsilil, N-trifluoroacetamide (MSTFA della SIGMA-ALDRICH Chemie Steinheim- Germania).

Cartucce BondElut Certify per estrazione rapida su fase solida delle droghe d'abuso (Varian, Harbor City-California USA).

a) allestimento delle curve di calibrazione:

50 mg di unghie, di capelli, di peli "blank" sono stati addizionati di 50 μl , 100 μl , 200 μl , 400 μl e 800 μl , delle soluzioni standard di metadone, di morfina, di cocaina e di BZE corrispondenti rispettivamente a 50 ng, 100 ng, 200 ng, 400 ng totali delle stesse sostanze, nonché 400 μl (corrispondenti a 400 ng totali) della soluzione di standard interno di nalorfina. Un campione di matrice "blank" non addizionato viene utilizzato in contemporanea. Per valutare la confidenza statistica di ogni punto della curva dei valori di concentrazione, la tecnica è stata eseguita 5 volte con calcolo della media e deviazione standard e della retta di regressione lineare ottenendosi per ogni sostanza un valore di $R^2 =$

0,9996 - 0,9997 - 0,9996 e 0,9989 rispettivamente. Riferendoci al punto della curva di calibrazione che corrisponde alla concentrazione minore di standard aggiunto, per ogni analita è stato ricavato il valore di cut-off, come limite inferiore di concentrazione di sostanza sperimentalmente rilevabile e quindi come limite inferiore della positività dell'analisi ottenendosi: morfina = 0,1 ng/mg; metadone = 0,5 ng/mg; cocaina = 0,3 ng/mg e benzoilecgonina (BZE) = 0,3 ng/mg.

b) estrazione in fase solida (SPE)

pretrattamento del campione: le matrici in esame (campioni e "blank") sono state sottoposte ad accurato lavaggio ripetuto con metanolo, asciugate, finemente sminuzzate, esattamente pesate in quantità di 50 mg per campione e addizionate di standard interno.

Capelli: acidificazione con HCl, incubazione su b.m. a 45°C per 18 ore; raffreddamento, neutralizzazione con NaOH, centrifugazione.

Unghie: aggiunta di tampone fosfato, sonicazione (1h in bagnetto ultrasuoni), incubazione su b.m. a 45°C per 72 ore; raffreddamento, centrifugazione

Solvatazione della cartuccia Certify: 2 ml di metanolo e successivamente 2 ml di tampone fosfato.

Applicazione del campione (sovrantante): al flusso di 1 ml/min

Eluizione delle interferenze: 2 ml di acqua bidistillata, 3 ml di HCl, 5 ml di metanolo; la colonna viene asciugata per 5 min.

Eluizione degli analiti: 3 ml della miscela clorometano/isopropanolo; raccolta dell'estratto in provetta spinata.

Derivatizzazione: l'estratto portato a secco in corrente d'azoto viene addizionato con 50 μl di MSTFA e mantenuto in stufa a 75°C per 15 min e successivamente raffreddato.

c) analisi GC/MS:

Gascromatografo-Spettrometro di massa: GC Thermoquest TRACE GC; Spettrometro di Massa Finningan POLARIS Q equipaggiato con colonna DB-5 MS al 5% fenilmetilsilicone; lunghezza 12 m, ID 0,2 mm; spessore del film 0,33 μm .

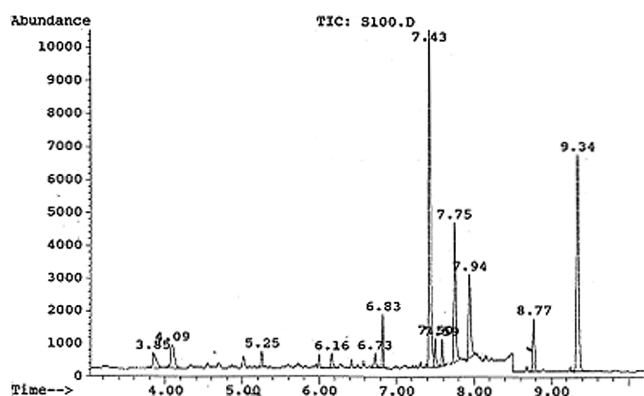
Condizioni operative: iniettore 300°C; MS detector 300°C; esercizio: prog da 100°C (1 min) a 300°C (2 min); incr 30°C/min; gas vettore Elio 1,5 ml/min

Acquisizione: Selective Ion Monitoring (SIM) per gli ioni caratteristici:

Tempi di ritenzione e frammenti ionici (m/z) caratteristici delle diverse sostanze

Sostanza	T.R.	Frammenti ionici			
Metadone	7,43	72	223	294	309
Cocaina	7,75	182	82	303	272
BZE	7,94	82	240	361	346
Morfina	8,77	429	414	401	324
Nalorfina	9,34	455	414	440	324

Il cromatogramma rappresenta una miscela standard degli analiti oggetto dell'indagine.



7.43 = Metadone; 8.77 = Morfina; 7.75 = Cocaina; 7.94 = BZE; 34 = Nalorfina (S.I.)

Risultati

I valori ottenuti sono schematizzati nelle successive tabelle:

CASO A	Metadone (ng/mg)	Cocaina (ng/mg)	BZE (ng/mg)	Morfina (ng/mg)
capelli	Neg.	0,45	0,13	1,29
peli ascellari	Neg.	2,54	0,08	0,59
peli pubici	Non prelevati			
unghia	Neg.	6,26	0,41	0,34

CASO B	Metadone (ng/mg)	Cocaina (ng/mg)	BZE (ng/mg)	Morfina (ng/mg)
capelli	Neg.	0,73	0,08	1,15
peli ascellari	Neg.	0,68	0,22	0,46
peli pubici	Non prelevati			
unghia	Neg.	5,23	0,25	1,01

CASO C	Metadone (ng/mg)	Cocaina (ng/mg)	BZE (ng/mg)	Morfina (ng/mg)
capelli	5,64	4,19	1,35	Neg.
peli ascellari	9,85	3,14	0,67	Neg.
peli pubici	17,43	3,06	1,04	Neg.
unghia	2,87	0,72	0,47	Neg.

CASO D	Metadone (ng/mg)	Cocaina (ng/mg)	BZE (ng/mg)	Morfina (ng/mg)
capelli	Neg.	12,36	2,18	Neg.
peli ascellari	Neg.	11,22	1,77	Neg.
peli pubici	Neg.	19,62	13,03	Neg.
unghia	Neg.	338,98	261,03	Neg.

CASO E	Metadone (ng/mg)	Cocaina (ng/mg)	BZE (ng/mg)	Morfina (ng/mg)
capelli	Neg.	Neg.	Neg.	2,14
peli ascellari	Neg.	Neg.	Neg.	0,87
peli pubici	Neg.	Neg.	Neg.	1,43
unghia	Neg.	Neg.	Neg.	1,28

CASO F	Metadone (ng/mg)	Cocaina (ng/mg)	BZE (ng/mg)	Morfina (ng/mg)
capelli	Neg.	Neg.	Neg.	0,31
peli ascellari	Neg.	Neg.	Neg.	0,25
peli pubici	Neg.	Neg.	Neg.	0,61
unghia	Neg.	Neg.	Neg.	0,30

CASO G	Metadone (ng/mg)	Cocaina (ng/mg)	BZE (ng/mg)	Morfina (ng/mg)
capelli	Neg.	0,85	0,26	0,65
peli ascellari	Neg.	0,67	0,06	0,41
peli pubici	Neg.	0,79	0,07	0,48
unghia	Neg.	0,97	0,33	1,26

CASO H	Metadone (ng/mg)	Cocaina (ng/mg)	BZE (ng/mg)	Morfina (ng/mg)
capelli	0,69	4,93	0,19	0,18
peli ascellari	0,19	5,29	0,05	0,26
peli pubici	4,42	2,03	0,67	1,40
unghia	0,14	5,49	0,59	0,24

CASO I	Metadone (ng/mg)	Cocaina (ng/mg)	BZE (ng/mg)	Morfina (ng/mg)
capelli	Neg.	1,46	0,14	0,44
peli ascellari	Neg.	0,32	0,14	0,23
peli pubici	Neg.	3,29	1,11	0,11
unghia	Neg.	3,97	1,84	0,21

CASO L	Metadone (ng/mg)	Cocaina (ng/mg)	BZE (ng/mg)	Morfina (ng/mg)
capelli	3,94	1,16	0,10	0,55
peli ascellari	7,65	0,30	0,10	0,35
peli pubici	15,21	1,92	0,89	0,39
unghia	1,27	2,52	1,15	1,12

CASO M	Metadone (ng/mg)	Cocaina (ng/mg)	BZE (ng/mg)	Morfina (ng/mg)
capelli	4,02	1,25	0,11	Neg.
peli ascellari	6,91	0,22	0,12	Neg.
peli pubici	14,15	2,98	0,78	Neg.
unghia	1,72	3,02	1,01	Neg.

Conclusioni

Poiché la maggior parte degli studi consegnatici dalla letteratura sull'impiego delle cosiddette "matrici alternative" hanno riguardato individui deceduti e le matrici cheratiniche in tali studi erano utilizzate sia per effettuare la cronologia dell'abuso delle sostanze note, sia per avere utili informazioni sulle abitudini drogastiche non note al fine di poter ricostruire nel tempo lo stile di vita dell'individuo e riuscire a capire il determinismo della morte, risulta di grande importanza ed originalità l'applicazione di queste metodiche sul vivente.

Ciò è stato l'oggetto del presente studio la cui particolarità è, inoltre, quella di aver comparato nello stesso soggetto, tossicodipendente attivo in trattamento farmacologico presso un Ser.T., capelli, peli ascellari, peli pubici ed unghie prelevati nel medesimo momento. Proprio per questo una analisi comparativa eseguita contestualmente nello stesso soggetto, di cui peraltro è nota la storia del rapporto con la o le sostanze psicoattive e stupefacenti, rappresenta un prezioso contributo casistico nelle indagini su matrici alternative, in quanto raramente si possono presentare nel mondo reale situazioni favorevoli per uno studio comparativo così impostato. La pur ampia letteratura da noi consultata presenta solo alcuni studi di simile impostazione (4,29,43) ed in particolare, ad esempio per quello di Kintz e Coll. (4) solo limitatamente ad alcuni metaboliti e ad alcune matrici rispetto ad un panorama più ampio e completo quale quello della presente sperimentazione.

Tutte le indagini tossicologiche sono state condotte ovviamente con metodologie validate ed ampiamente standardizzate in relazione all'ottenimento della qualità del dato; sensibilità, precisione ed accuratezza sono state verificate nella creazione delle curve di calibrazio-

ne, come descritto nella sezione sperimentale del presente studio.

L'utilizzo dei peli ascellari e pubici si è rivelato di estremo interesse in quanto una positività riscontrata nei capelli ha sempre dato risultato positivo anche nel pilizio (peli ascellari e/o pubici) tanto da poter affermare con una certa sicurezza che le indagini delle sostanze stupefacenti sul pilizio possono sostituire validamente la ricerca nei capelli quando questi siano assenti ad esempio per rasatura del capo o per forti decolorazioni (nel caso A si nota come l'uso di coloranti dei capelli ha fornito per la cocaina una bassa risposta in questa matrice, mentre una contemporanea elevata concentrazione di questa sostanza è stata rilevata nei peli ascellari e nelle unghie). Il presente studio ha confermato inoltre una maggior concentrazione della sostanza stupefacente soprattutto nei peli del pube che risultano essere pertanto il campione migliore da utilizzare in alternativa ai capelli. Viene inoltre comprovato che nelle matrici cheratiniche la cocaina si ritrova sempre in concentrazioni molto maggiori rispetto al suo metabolita benzoilecgonina.

Viene confermato, di contro, che il substrato delle matrici cheratiniche non può fornire informazioni se l'uso di stupefacenti è del tutto occasionale e troppo sporadico (come nel caso F), ma che comunque una abitudine d'uso anche solo settimanale è invece sempre rilevabile (caso G).

Per quanto riguarda le unghie, la rilevazione di una droga d'abuso in questo tipo di matrice, indica una sua assunzione da parte del soggetto in un periodo antecedente che può variare da alcune settimane fino a molti mesi (in uno dei casi in esame - C - è raccontata dall'utente un'astinenza da circa un anno) anche se la determinazione temporale dell'assunzione resta imprecisa a causa della doppia via di irrorazione ematica delle unghie, dalla radice e dal letto e a causa del duplice meccanismo di crescita. D'altro canto le unghie possono costituire comunque una valida alternativa ai capelli, per di più se si considerano alcune caratteristiche come l'assenza di differenze etniche nella composizione dell'unghia e la maggiore difficoltà di alterazione dei campioni rispetto ai capelli. Dal nostro studio viene comunque confermata la predilezione della morfina a localizzarsi, invece, più nei capelli e nei peli rispetto alle unghie, forse a causa di un'alta affinità di legame con la melanina assente nelle unghie.

Bibliografia

- 1) A.M. Baumgartner, P.F. Jones, W.A. Baumgartner, C.T. Black. Radioimmunoassay of hair for determining opiate-abuse histories. *J. Nucl. Med.* 20: 748-752 (1979).
- 2) S. Pichini, I. Altieri, P. Zuccaio, R. Pacifici. Drug monitoring in nonconventional biological fluids and matrices. *Clin. Pharmacokinet* 30 (3); 211-28 (1996).
- 3) P. Kintz, A. Tracqui, P. Mangin. Detection of drugs in human hair for clinical and forensic applications. *Int. J. Leg. Med.* 105: 1-4 (1992).

- 4) P. Kintz, A. Tracqui, P. Mangin. Opiate concentrations in human head, axillary and pubic hair. *Journal of forensic sciences*. Vol. 38, No. 3. 657-662. May (1993).
- 5) A.H. Stead, A.C. Moffat. A collection of therapeutic, toxic and fatal blood drug concentrations in man. *Hum. Toxicol.* 3 437-464. (1983).
- 6) F. Tagliaro, Z. De Battisti, F.P. Smith, M. Marigo. Death from heroin overdose: findings from hair analysis. *The Lancet*. Vol. 351.: 1923-25. June 27, (1998).
- 7) T. Inoue, S. Seto, B.A. Goldberg. Analysis of drugs in unconventional samples. *Forensic Sci Rev.* 4:89; 131-158. (1992)
- 8) L. Gerhardsson, V. Englyst, N.G. Lundstorm et al. Lead in tissues of deceased lead smelter workers. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 1995; 9;136-43.
- 9) L. Gerhardsson, D. Brune, N.G. Lundstorm. et al. Biological specimen bank for smelter workers. *Sci. Total Environ.* 1993; 139-40; 157-73.
- 10) M. Wilhelm, D. Hafner, I. Lomberg, et al. Monitoring of cadmium, copper, lead and zinc status in young children using toenails: comparison with scalp hair. *Sci Total Environ.* 1991; 103; 199-207.
- 11) D. Alexious, A. Koutselinis, C. Manolidilis, et al.. The content of trace elements (Cu, Zn, Fe, Mg) in fingernails of children. *Dermatologica.* 160; 380-82. (1980).
- 12) K. Kasperek, G.V. Iyengar, L.E. Feinendegen, et al.. Multielement analysis of fingernail, scalp hair and water samples from Egypt (a preliminary study). *Sci. Total environ;* 22; 149-68. (1982).
- 13) M.R. Harkey, G.L. Henderson. Hair analysis for drugs of abuse. In: *Advances in analytical toxicology*. Vol. II, R.C. Baselt eds. (1989).
- 14) F. Tagliaro, Z. De Battisti, G. Lubli et al. Integrated use of hair analysis to investigate the physical fitness to obtain the driving licence.: a case-work study. *Forensic Sci. Int.* 84: 129-135 (1997).
- 15) G. Pepin, Y. Gaillard. Concordance between self-reported drug use and findings in hair about cocaine and heroine. *Forensic Sci. Int.* 84: 37-41 (1997).
- 16) W.L. Wang, E.J. Cone. Testing human hair for drugs of abuse. IV. Environmental cocaine contamination and washing effects. *Forensic Sci. Int.* 70: 39-51 (1995).
- 17) G.L. Henderson. Mechanisms of drug incorporation into hair. *Forensic Sci. Int.* 63: 19-29 (1993).
- 18) M.M. Breuer. The binding of small molecules and polymers to keratin and their effects on the physicochemical and surface properties of hair fibers. In *Hair research: status and future aspects* (C.E. Orphanos, W. Montagna, G. Stuttgen, eds.), Springer-Verlag, New-York, pp. 96-115 (1981).
- 19) G.L. Henderson, M.R. Harkey, R.T. Jones. Hair analysis for drug of abuse. Contract number NIJ90-NIJ-CX-0012, National Institute on Drug abuse and the National Institute on Justice: (1993).
- 20) E.J. Cone, M.J. Hillsgrove, A.J. Jenkins, R.M. Keenan, W.D. Darwin. Sweet Testing for heroin, cocaine, and metabolites. *J. Anal. Toxicol.* 18: 337-41 (1994).
- 21) G.L. Henderson, M.R. Harkey, C. Zhou, R.T. Jones, P. Jacob III. Incorporation of isotopically labelled cocaine into human hair: race as a factor. *J. Anal. Toxicol.* 22: 156-64 (1998).
- 22) W.H. Harrison, R.M. Gray, L.M. Solomon. Incorporation of D-amphetamine into pigmented Guinea pig hair. *Brit. J. Dermatol.* 91: 415-418 (1974).
- 23) W.H. Harrison, R.M. Gray, L.M. Solomon. Incorporation of L-DOPA, L-alpha-methyl dopa and D,L-isoproterenol into Guinea pig hair. *Acta Dermatovener.* 54: 249-253 (1974).
- 24) S.F. DeLauder, D.A. Kidwell. The incorporation of dyes into hair as a model for drug binding. *Forensic Sci. Int.* 107: 93-104 (2000).
- 25) L. Potsch, G. Skopp, G. Rippin. A comparison of 3H-cocaine binding on melanin granules and human hair in vitro. *Int. J. Legal Med.* 110: 55-62 (1997).
- 26) D.A. Kidwell, D.L. Blank. Mechanisms of incorporation of drugs into hair and the interpretation of hair analysis data, in E.J. Cone, M.J. Welch, M.B.G. Babecki (eds). *Hair testing for drugs of abuse: international research on standards and technology*, National Institute on Drug Abuse, NIH Publication No. 95-3727, pp. 19-90 (1995).
- 27) I. Ishiyama, T. Nagai, S. Toshida. Detection of basic drugs (metamphetamine, antidepressants and nicotine) from human hair. *J. For. Sci.* 28: 380-385 (1983).
- 28) M.H. Slawson, D.G. Wilkins, D.E. Rollins. The incorporation of drugs into hair: relationship of hair color and melanin concentration to phencyclidine incorporation. *J. Anal. Toxicol.* 22: 406-413 (1998).
- 29) C. Offidani, S. Strano Rossi, M. Chiarotti. Drug distribution in the head, axillary and pubic hair of chronic addicts. *Forensic Sci. Int.* 63: 143-56 (1997).
- 30) L. Potsch. A discourse on human hair fibers and reflections on the conservation of drug molecules. *Int. J. Legal. Med.* 108: 285-293 (1996).
- 31) E. Overtone. Beitrage zur allgemeinen Muskel- und Nervenphysiologie. *Pflugers. Arch. Ges. Physiol. Menschen. Tiere.* 92: 115-121 (1902).
- 32) C.R. Robbins. *Chemical and physical behaviour of human hair*. Springer, Berlin Heidelberg New York (1988).
- 33) C.S. Munro, J.L. Rees, S. Shuster. Short duration terbinafine therapy penetrates diseased distal nail via the ventral nail bed and is effective in onychomycosis. *Br. J. Dermatol.* 123:825 (abstract). 1990.
- 34) C.S. Munro, J.L. Rees, S. Shuster. The unexpectedly rapid response of fungal nail infection to short duration therapy. *Acta Derm. Venerol. (Stockh).* 72: 131-3. (1992).
- 35) P.J. Dykes, R. Thomas, A.Y. Finlay. Determination of terbinafine in nail samples during systemic treatment for onychomycosis. *Clin. Exp. Dermatol.* 16; 374-6 (1991).
- 36) L. Matthieu, P. De Donker, G. Cauwenbergh et al. Itraconazole penetrates the nail via the nail matrix and the nail bed an investigation in onychomycosis. *Clin. Exp. Dermatol.* 16; 374-6 (1991).
- 37) S. Shuster, C.S. Munro. Single dose treatment of fungal nail disease. *Lancet* 339; 1066 (1992).
- 38) R.E. Joseph Jr., T. Su, E.J. Cone. In vitro binding studies of drugs to hair: influence of melanin and lipids on cocaine binding to caucasoid and africanoid hair. *J. Anal. Toxicol.* 20: 338-344 (1996).
- 39) M.R. Moeller, P. Fey, H. Sachs. Hair analysis as evidence in forensic cases. *Forensic Sci. Int.* 63: 43-53 (1993).
- 40) C. Staub. Hair analysis: its importance for the diagnosis of poisoning associated with opiate addiction. *Forensic Sci. Int.* 63: 69-75 (1993).
- 41) M. Marigo, R. Tagliaro, C. Polesi et al. Determination of morphine in the hair of heroin addicts by high performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *J. Anal. Toxicol.* 10: 158-161 (1986).
- 42) N.J. Haley, D.H. Offman. Analysis for nicotine and cotinine in hair to determine cigarette smoker status. *Clin. Chem.* 31: 1598-1600 (1985)
- 43) C. Offidani, S. Strano Rossi, M. Chiarotti. Drug distribution in the head, axillary and pubic hair of chronic addicts. *Forensic Sci. Int.* 63: 105-108 (1997).
- 44) K. Puschel, P. Thomasch, W. Arnold. Opiate levels in hair. *Forensic Sci. Int.* 21: 181-186 (1983).
- 45) P. Kintz, P. Mangin. What constitutes a positive result in hair analysis. Proposal for the establishment of Cut-off Values. *Forensic sci. Int.* 70: 3-11 (1995).
- 46) R. Wennig. Potential problems with the interpretation of hair, analysis results. *Forensic sci. Int.* 107: 5-12 (2000).