



BIULETYN
Wydziału Farmaceutycznego
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Biul. Wydz. Farm. WUM, 2013, 8, 56-64
<http://biuletynfarmacji.wum.edu.pl/>

WARTOŚĆ DIAGNOSTYCZNA WŁOSÓW

Izabela Łuczak-Zielkiewicz*, Mirosław M. Szutowski

Zakład Toksykologii, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa

* autorka korespondująca, tel. +(48) 22 5720 760, e-mail: i.zielkiewicz@gmail.com

Otrzymano 29.05.2013, zaakceptowany 10.07.2013, zamieszczony 12.09.2013

STRESZCZENIE

Analiza włosów odgrywa obecnie coraz większą rolę w oznaczeniach toksykologicznych. Stosowana jest w medycynie sądowej, medycynie klinicznej, testach kierowców, monitoringu pracowników. W porównaniu do najczęściej stosowanych materiałów analitycznych, jak krew czy mocz, długi czas obecności substancji we włosach pozwala na oznaczenie jej po kilku, a nawet kilkunastu miesiącach od ekspozycji na dany czynnik. Analiza retrospektywna umożliwia poznanie historii pacjenta, stosowanych leków, rozpoznanie przypadków nadużywania substancji pobudzających, nieprzestrzegania abstynencji od alkoholu i innych środków uzależniających oraz pozwala zidentyfikować przyczynę zatrucia. Szybki rozwój techniki sprawił, że dysponujemy coraz doskonalszymi metodami analitycznymi. Czulość współczesnych metod daje możliwość oznaczeń śladowych ilości (rzędu pikogramów) ksenobiotyków i ich metabolitów we włosach.

SŁOWA KLUCZOWE: analiza włosów, ksenobiotyki, toksykologia, medycyna sądowa

ABSTRACT

DIAGNOSTIC VALUE OF HAIR ANALYSIS

Hair analysis plays an increasingly significant role in toxicological and forensic sciences. Hair analysis is used in criminal investigations, in clinical medicine, testing of drivers for drugs and in workplace drug testing. In comparison with widely used analytic materials such as blood or urine, the persistence of substances in hair makes detection possible for many months after exposure. Retrospective analysis affords possibilities for establishing patient history, the course of previous medications, drug abuse, lack of compliance with alcohol or drug restrictions, and helps to establish the cause of poisonings. Rapid progress in relevant technologies has led to increasingly sophisticated analytical methods. The sensitivity of modern methods permits the determination of trace amounts (on the order of picograms) of xenobiotics and their metabolites in hair.

KEYWORDS: hair analysis, xenobiotics, toxicology, forensic medicine

Wstęp

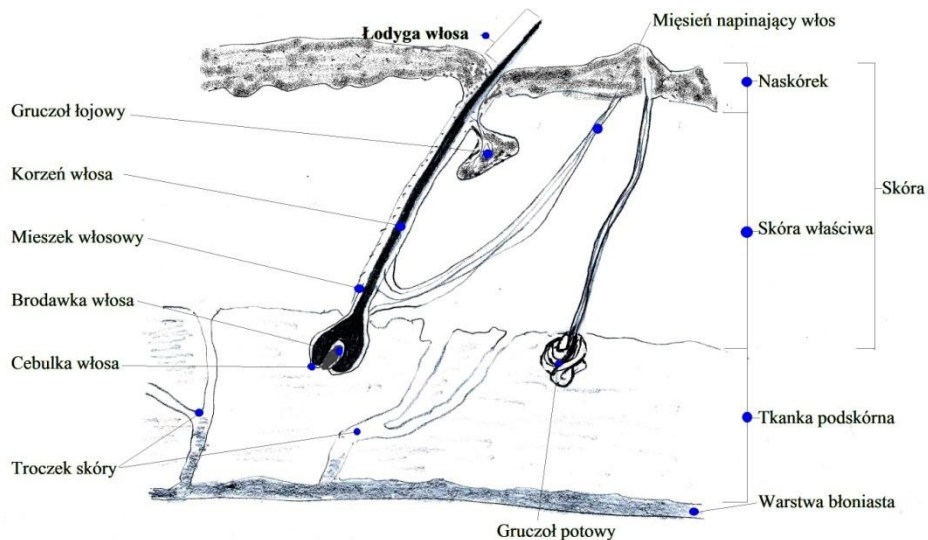
Badania w kierunku analizy włosów prowadzono już od lat 40' XX wieku, zaś szybki rozwój przypadł na lata 70'-80'. Dotychczas ukazało się około tysiąca publikacji dotyczących włosów jako materiału analitycznego. Początkowo oznaczano we włosach zawartość pierwiastków metalicznych, ze szczególnym uwzględnieniem ołowiu, arsenu, rtęci i kadmu. Wkrótce zainteresowanie wzbudziła możliwość analizy różnych ksenobiotyków, w tym leków, trucizn organicznych oraz substancji uzależniających [1].

Budowa włosa

Włosy powstające z komórek naskórka są zrogowaciałymi włóknami (*pili*) i są charakterystyczne dla ssaków. Tylko niewielkie rejony ciała pozostają nieowłosione. U większości zwierząt owłosienie tworzy gęstą okrywę i tylko u ludzi jest zredukowane, występując w większym zagęszczeniu na głowie, pod pachami oraz w okolicach intymnych. U płodu włosy zawiązują się od trzeciego miesiąca, a w siódmym pokryta jest już prawie cała skóra. Narząd włosowy składa się z mieszkła włosowego, gruczołu łojowego, gruczołu apokrynowego (niektóre rejony) i mięśnia przy-

włosowego. Sam włos zbudowany jest z łodygi, korzenia włosa, cebulki i brodawki włosowej (Ryc. 1). Rozwój włosa dzieli się na trzy fazy: wzrost (anagen), inwolucja (katagen) i spoczynek (telogen). Czas trwania poszczególnych faz jest zależny od rejonu ciała. W obrębie głowy około 90% włosów jest w fazie anagenu, który trwa od 2 do 6 lat, następną fazą, katagen, trwa 2-3 tygodnie, a faza telogen (*dormancy*) kilka miesięcy. Po tym czasie włos wypada. W przybliżeniu 15% włosów głowy jest w fazie uśpienia (*dormant hair*).

Przyjmuje się, że włosy rosną $1\text{cm} \pm 0,2\text{cm}$ w ciągu miesiąca. Analizując segmenty włosa o długości 1 cm, odpowiadające kolejnym miesiącom, można wykryć obecność substancji, pomimo że pacjent w tym czasie jej nie zażywał. Jest to tzw. echo, czyli pozostałość substancji, która została wbudowana do włosa w trakcie gdy pacjent spożywał dany związek, po czym włos przeszedł w fazę uśpienia, czyli przestał rosnąć. Efekt ten ma wpływ na wynik analizy. Sformułowano zasadę, że zawartość substancji w segmencie musi być większa niż 15% zawartości tej substancji w segmencie z poprzedzającego miesiąca [1-2].



Ryc. 1. Budowa włosa.

Wokół mieszka włosowego znajduje się sieć naczyń włosowatych, najbardziej rozwinięta w jego dolnym odcinku. W fazie anagenu są one bardzo rozwinięte, zaś w katabenie częściowo zanikają [3]. Włos zbudowany jest z 65-95% z białka (głównie keratyna), w 1-9% z tłuszczów, w 0,1-5% z pigmentów (melaniny), pozostałą część stanowią pierwiastki śladowe, polisacharydy i woda. Ważnym składnikiem włosa jest melanina, produkowana przez melanocyty, która w trakcie wzrostu włosa przechodzi z cebulki do łodygi. Są dwa rodzaje melaniny: eumelanina i feomelanina. Kolor włosów jest zależny od zawartości tych składników. Im ciemniejsze włosy, tym więcej zawierają eumelaniny, feomelaniny jest zaś dużo w rudych włosach. Siwe włosy nie zawierają melaniny w ogóle. Podejrzewa się, że melanina jest jednym z miejsc wiązania ksenobiotyków we włosach, a oddziaływanie zachodzi na drodze przyciągania van der Waalsa pomiędzy pierścieniami aromatycznymi melaniny i wbudowywanego związku [5]. Zawartość ksenobiotyków we włosach, jak wykazało wielu autorów, zależy także od ich barwy. Włosy czarne mają większe stężenia melaniny niż brązowe, mniejsze wykazują włosy blond, a najmniejsze ilości są obserwowane w siwych włosach. Różnice są także obserwowane dla grup etnicznych. Włosy mongoidalne czy afrykoidalne wiążą większe ilości związków niż włosy kaukazoidalne jasne lub brązowe. Melanina lepiej wiąże się ze związkami o charakterze zasadowym, gdyż pH melanocytów wynosi od 3 do 5.

Kolejnym składnikiem włosów - keratyna, zbudowana z aminokwasów, wydaje się mieć większe powinowactwo do związków zasadowych np. kokainy, nikotyny i morfiny, a mniejsze do związków o charakterze kwaśnym np. Δ^9 -tetrahydrokanabinolu (THC) czy kwasu acetylosalicylowego. Tłuszcze, będące składnikiem błony komórkowej włosa, mogą wiązać się niespecyficznie z niektórymi związkami, np. kokainą.

Przyjmuje się, że inkorporacja związków do włosów zachodzi na trzy sposoby:

- z krwi (poprzez sieć naczyń włosowatych są wbudowywane w strukturę włosa);
- z wydzieliny gruczołów łojowych i potowych (przenikają przez strukturę włosa);

- ze środowiska (przechodzą przez łuskę włosa do wnętrza korzenia).

Nie zawsze można zidentyfikować jaką drogą oznaczona substancja dostała się do wnętrza włosa. Niemożliwa jest także całkowita dekontaminacja włosów z niektórych substancji, jak na przykład z kokainy.

Na proces odkładania się substancji we włosach istotny wpływ mają następujące czynniki:

- zawartość melaniny we włosach;
- polarność związku wbudowywanego;
- charakter kwasowy lub zasadowy związku.

Związki bardziej lipofilne, jak kokaina czy metamfetamina, są lepiej wbudowywane w strukturę włosa niż związki bardziej polarne, jak morfina czy amfetamina. Związki zasadowe lepiej przechodzą do włosów, gdyż macierz włosa jest bardziej kwasowa od krwi (pH-7,4).

Kierunki analizy włosów

Najwcześniej zaczęto analizować włosy na zawartość antymonu pod kątem potrzeb analizy toksykologiczno-śladowej. W wielu publikacjach stwierdzono występowanie korelacji między zawartością pierwiastków metalicznych we włosach a przebytymi chorobami, nieprawidłowościami metabolicznymi, statusem odżywiania, skażeniem środowiska. Bada się także zależność składu stabilnych izotopów we włosach od niedożywienia i głodu [6]. Porównując stosunek izotopów ciężkich do lekkich u badanych osób, ze standardowym stosunkiem tych izotopów u osób zdrowych, można monitorować nawet krótkie zmiany w żywieniu, a także wykryć niedożywienie np. jako domniemany powód śmierci (zastosowanie w medycynie sądowej).

Obecnie można już standardowo analizować skład pierwiastkowy włosa [7]. Badając zawartość poszczególnych składników można dopasować odpowiednią dietę w celu polepszenia kondycji całego organizmu. Jednak ze względu na różnice w ocenach, należałoby ustalić ogólnie obowiązujące normy, których obecnie brak. Powinno się wtedy uwzględnić wszelkie odchylenia związane m. in. z budową włosów, zabiegami chemicznymi i fizycznymi. Na pewno kierunek ten wymaga jeszcze wielu badań, aby metody były odpowiednio wystandaryzowane [6-9]. W literaturze powtarza się teza, że zawartość metali we włosach

ma związek z niektórymi chorobami. Zbadano zawartości różnych pierwiastków u osób chorych w porównaniu z podobną grupą osób zdrowych. Stwierdzono niedobór żelaza u pacjentów z chorobą Parkinsona, a na jego zawartość nie miały wpływu ostrość czy czas trwania choroby ani rodzaj podjętej farmakoterapii [10]. Zauważono wielokrotnie wyższy poziom ołowiu, glinu, chromu, molibdenu, wanadu, kadmu, kobaltu i niklu u dzieci z autyzmem [11], podwyższoną zawartość antymonu u osób z rakiem, większą ilość kadmu a mniejszą żelaza u osób z nadciśnieniem, mniejszą zawartość miedzi u osób opóźnionych psychicznie [12]. W przypadku badań nad związkiem pomiędzy zawartościami poszczególnych pierwiastków we włosach a chorobami, należałoby przeprowadzić testy w obrębie większych grup spotecznych, najlepiej międzynarodowych, aby uniknąć zafałszowania wyników np. z powodu koloru włosów czy ich budowy, różnej u poszczególnych ras.

Badano także zawartość toksycznych metali we włosach mieszkańców prowincji Guizhou w Chinach, w której produkuje się ponad 70% całej ilości rtęci w tym kraju. Zauważono, że metylowana rtęć jest dobrym wskaźnikiem narażenia populacji na oddziaływanie tego metalu, gdyż prawie nie istnieją naturalne zewnętrzne źródła zanieczyszczenia metylortęcią, odkładającą się we włosach [13].

Wykorzystanie włosów jako materiału analitycznego umożliwia wiele praktycznych zastosowań. Obecnie w niektórych krajach badania włosów są stosowane na szeroką skalę, w innych planuje się ich wprowadzenie. W Niemczech wymagana jest abstynencja od środków odurzających i marihuany w okresie 1 roku przed ubieganiem się o prawo jazdy. Przyjmuje się, że nie powinno być śladów zakazanych substancji w części włosów o długości 12 cm [1]. Podobne wytyczne są stosowane w stosunku do osób ubiegających się o powtórny egzamin na prawo jazdy, po jego utracie ze względu na prowadzenie „pod wpływem” [14-15]. We Włoszech są badane dwie próbki włosów o długości 4-5 cm na obecność opiatów i kokainy.

Badania włosów na zawartość substancji zakazanych są szeroko stosowane w postaci testów skriningowych w szkołach, więzieniach, a także w badaniach przedstawicieli zawodów zaufania publicznego jak: lekarz, pielęgniarka, wojskowy, policjant, pilot [16]. Najczęściej są one stosowane w Stanach Zjednoczonych, gdzie pracodawcy w ofercie zatrudnienia mogą postawić warunek dotyczący zbadania włosów na obecność związków zakazanych, jeśli praca dotyczyć będzie sektora publicznego bezpieczeństwa lub pracodawca związany jest umową z rządem.

Analiza włosów zawsze zajmowała ważną pozycję w medycynie sądowej. Często włosy stanowią jedyny materiał biologiczny, gdyż inne standardowo stosowane próbki biologiczne nie są dostępne na miejscu przestępstwa. Zatrucie niektórymi substancjami może zostać odkryte dopiero jakiś czas po śmierci, kiedy już nie można poddać analizie ani krwi, ani moczu. Są także związki, które w organizmie są bardzo szybko metabolizowane (flunitrazepam - „tabletką gwałtu”), stąd zastosowanie próbki krwi, moczu lub treści żołądkowej nie daje pozytywnych wyników. Wtedy pozostaje analiza włosa, która umożliwia badanie retrospektywne. Podobnie jest w przypadku ekshumowanych zwłok, przy zaawansowanym stopniu ich rozkładu.

Badania włosów mają też zastosowanie w orzecznictwie sądowym, w sprawach rozwodowych i o opiekę nad dzieckiem, w uzasadnionych przypadkach analizuje się włosy małżonków i rodziców w celu wykluczenia nadużywania

substancji zakazanych czy alkoholu. Podobne testy wykonuje się przy sprawdzeniu wiarygodności zeznań świadków.

Badania moczu są standardowym postępowaniem stosowanym w monitorowaniu terapii odwykowej, ale pozwalają one na wykrycie nadużywania zabronionych substancji tylko w przeciągu ostatnich kilku dni (2 do 3 dni). Osoby uzależnione znają możliwości diagnostyczne testów na zawartość kokainy, THC lub amfetaminy w moczu, i wiedzą do kiedy można przyjąć daną substancję aby nie została wykryta i jak ewentualnie można próbować ją maskować. Analiza włosów i limity oznaczalności związków nie są jeszcze powszechnie znane, a zafałszowanie wyniku jest trudniejsze. Substancje są wbudowywane w strukturę włosa po pewnym czasie od przyjęcia, a ich oznaczenie jest możliwe dopiero po około jednym tygodniu. Jak donosi Moeller et al., na 95% pozytywnych wyników na metadon aż 69% dało wynik pozytywny na opiaty i 43% na kokainę, co oznacza, że w trakcie kuracji metadonowej osoby te przyjmowały substancje zakazane, które mogły nie zostać wykryte przy standardowych testach moczu [17]. Analiza włosów pozwala więc sprawdzać wiarygodność kuracji odwykowej.

Analiza włosów znalazła także zastosowanie w antropologii. Zbadano włosy 500-letniej mumii, w których wykryto obecność kokainy. Może to wskazywać na osobę, która zażywała kokainę lub przebywała w środowisku nią zanieczyszczonym [18]. We włosach mumii egipskich także stwierdzono obecność kokainy, nikotyny i kotyniny. Zawartość dwóch ostatnich może być związana z procesem odymiania lub balsamowania zwłok, ale nie jest do końca wyjaśniona. Ze względu na dużą porowatość próbek zwykłe metody stosowane do dekontaminacji okazały się niewystarczające. W tych przypadkach trzeba także wziąć pod uwagę możliwość zanieczyszczenia zewnętrznego - niektóre mumie, np. Ramzesa II, były przenoszone do innego grobowca nawet kilkakrotnie. Konieczne więc wydaje się opracowanie specjalnych procedur oczyszczania próbek „historycznych” włosów [19-20]. Interesujący jest także przypadek poety Johna Keatsa, który ze względu na to iż chorował na gruźlicę, sam sobie przepisywał i ordynował morfinę. W 167 lat po jego śmierci zanalizowano jego włosy i wykryto w nich morfinę [21].

Włosy mogą też być cennym materiałem w badaniach epidemiologicznych monitorujących skażenie środowiska i narażenie pracowników. Badano np. zawartość hydroksylowych pochodnych policyklicznych węglowodorów aromatycznych (OH-PAH) we włosach jako wskaźnik długotrwałej ekspozycji na te związki, np. przy produkcji aluminium, kładzeniu nawierzchni dróg, spalaniu paliw kopalnych, w transporcie [22]. Oznaczano zawartość arsenu we włosach osób zamieszkujących rejon jeziora zawierającego dużą ilość tego pierwiastka [23], a także zawartość pestycydów jak 1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorofenylo)etan (DDT) i jego pochodne, heksachlorocykloheksan (HCH), heksachlorobenzen (HCB), heptachlor, dioksyny w tym polichlorowane dibenzodioxyny (PCDD), polichlorowane dibenzofurany (PCDF) oraz polichlorowane bifenyle (PCB) [24].

W badaniach antydotyngowych analizuje się substancje, które mają bezpośredni wpływ na wyniki uzyskiwane w trakcie zawodów sportowych. Lista takich związków jest ściśle określona, łącznie z limitami ich zawartości. Substancje farmakologiczne nie ujęte na liście, ale nie będące zarejestrowanymi lekami dla ludzi, także są zakazane. Analiza włosów mogłaby znaleźć zastosowanie dla substancji, których efekt jest długotrwały i może wpływać na wy-

niki sportowców, np. steroidy anaboliczne (wpływają na przyrost masy mięśniowej), a szczególnie ich prekursorzy, które nie występują w organizmie. Badanie i interpretacja zawartości endogennych steroidów są bardziej skomplikowane, wymagają szczegółowej analizy procesów biotransformacji, obecności metabolitów oraz dokładnej charakterystyki pacjenta. Analiza dopingu jest bardzo trudna, gdyż w przypadku wielu substancji wymaga opracowania limitów dozwolonych wyłącznie dla celów terapeutycznych (TUE), np. u osób chorych, po zabiegach etc. Wiele związków jest zakazanych tylko w okresie trwania zawodów, co też musi być uwzględnione w badaniach. Zastosowanie analizy włosów w dopingu nie jest jeszcze stosowane, wyjątek stanowi Francja, ale nawet w tym kraju nie jest to do końca usankcjonowane prawnie. Testy substancji dopingujących we włosach wymagają jeszcze szerszych badań oraz określenia zasad ich stosowania w badaniu antydopingowym przeprowadzonym przez agencje odpowiedzialne za badanie sportowców [25-26].

We włosach można także oznaczać substancje endogenne jak kortyzol, który produkowany jest w organizmie w odpowiedzi na stres. Analiza kortyzolu we włosach jako potencjalnego biomarkera narażenia na chroniczny stres może pomóc w zrozumieniu roli tego czynnika w przebiegu wielu chorób, np. zawału mięśnia sercowego [28-29].

Można także oznaczać inne hormony steroidowe, jak estradiol, progesteron i testosteron, w przypadku których wykryto istnienie silnej zależności pomiędzy stężeniem w osoczu a stężeniem we włosach [30]. Są także prace, w których oznaczano profil lipidowy we włosach, odzwierciedlający zawartość lipidów we krwi. Otrzymano pełny profil lipidów we włosach, przy zastosowaniu tylko 20 mg próbki. Scharakteryzowano skład lipidowy włosa od proksymalnej części aż po zakończenie łodygi. Zastosowanie tej metody pozwala na zbadanie zmiany indywidualnego składu włosów w odpowiedzi na różne czynniki zewnętrzne [31].

Kliniczne zastosowania analizy włosów

Na oddziałach psychiatrycznych nie zawsze jest możliwe przeprowadzenie wiarygodnego wywiadu dotyczącego przyjmowanych przez pacjenta leków. Autorzy kilku prac badawczych zalecają przeprowadzenie analizy włosów przed przyjęciem do szpitala, gdyż objawy psychotyczne mogą być spowodowane środkami psychostymulującymi, a nie chorobą o podłożu psychicznym, co wymaga innego leczenia. Odpowiednia diagnostyka w tych przypadkach daje możliwość zastosowania indywidualnej terapii [28].

Badano także włosy w przebiegu farmakoterapii pacydaczki, gdzie stwierdzono korelację pomiędzy wielkością dziennej dawki karbamazepiny czy fenobarbitalu a zawartością tych leków w jednocentymetrowych segmentach włosów odpowiadających jednemu miesiącowi. Taka analiza daje możliwość bieżącej obserwacji terapii pacjenta [32].

Włosy noworodków i matek stosowane są także w analizie toksykologicznej, gdzie istnieje podejrzenie o nadużycie różnych substancji farmakologicznych niewskazanych w okresie ciąży. Często wywiad przeprowadzany z matkami nie jest wiarygodny, gdyż kobiety mimo zagrożenia życia ich dzieci nie przyznają się do nadużywania tych substancji. Symptomy występujące u noworodków nie zawsze są swoiste dla zatrucia narkotykowego, a analiza toksykologiczna włosa dziecka, często też matki, pozwala poznać substancje, które były nadużywane i zastosować skuteczną

terapię odtruającą. Niektóre szpitale, np. akademicki Szpital dla Chorych Dzieci w Toronto, prowadzą The Motherisk Program, w którym poddają rutynowej kontroli włosy matek i noworodków. Próbkę są pobierane od osób wybranych przez system z bazy Motherisk, czyli z grup ryzyka. Włosy badane są na obecność amfetaminy i kokainy. W wyniku tego programu zaobserwowano, że metamfetamina także przechodzi przez łożysko oraz że nie u wszystkich matek biorących kokainę przeszła ona przez łożysko do dziecka [33]. Zbadano także zawartość metamfetaminy i amfetaminy w smółce i włosach [34]. Te wyniki traktowane kompleksowo stanowią dowód zażywania w ciąży narkotyków. Przy analizie włosów noworodków ilość pobranej próbki jest krytyczna, gdyż wiele noworodków ma bardzo mało włosów lub wręcz nie ma ich wcale. Są doniesienia, że 5 mg próbki daje już bardzo dobre wyniki [35].

We włosach nowonarodzonych dzieci oznaczano także tyroksynę, czym potwierdzono przechodzenie hormonów matki przez łożysko [37].

W badaniach zdrowia publicznego ważne miejsce zajmują analizy w przypadku osób palących tytoń. Ze względu na działanie toksyczne nikotyny (powiązane z rakiem, chorobami serca, nadciśnieniem etc.) ważne są nieinwazyjne metody rozpoznawania ryzyka u biernych palaczy. Oznaczanie nikotyny (czasami też jej metabolitu - kotyniny) we włosach jest wiarygodnym markerem pasywnej ekspozycji na tytoń [36].

Coraz częściej oznacza się także we włosach glukuronid etylu (EtG) i estry etylowe kwasów tłuszczowych (mirystynowego, palmitynowego, oleinowego, stearynowego), czyli FAEE, jako markery konsumpcji alkoholu. Mają one zastosowanie w monitoringu abstynencji od alkoholu (sprawdzanie: pacjentów, pracowników, osób ubiegających się o ponowne wydanie prawa jazdy) [37]. Zaobserwowano, że możliwe jest wykrycie EtG we włosach z brody nawet po jednokrotnym podaniu doustnym 153-200 g etanolu w czasie 5.5 godziny. Maksimum stężenia metabolitu wykryto po 2-4 dniach od spożycia, ale jest on już oznaczalny po 14 godzinach w stężeniu 6,7- 46 pg/mg [39]. Limity zaproponowane przez Society of Hair Testing (SoHT) wynoszą dla EtG ≥ 7 pg/mg w segmentach proksymalnych 0-3 cm aż do 0-6 cm, dla FAEE (suma wszystkich czterech) ≥ 200 pg/mg dla 0-3cm i ≥ 400 pg/mg dla 0-6 cm włosów. Wartości powyżej tych limitów wskazują na nadużywanie alkoholu [40].

Oznaczanie ksenobiotyków we włosach z innych części ciała

Jak zostało wcześniej wspomniane, do oznaczeń można także używać włosów z innych regionów ciała niż z głowy: z pach, łona, z brody, z rąk. Takie próbki wymagają szczególnej interpretacji, gdyż włosy zlokalizowane w różnych częściach ciała rosną inaczej i mogą być w odmiennych fazach wzrostu. Porównania dostępne w literaturze wskazują na to, że substancje można wykryć we wszystkich rodzajach włosów i często zawartości są porównywalne (czasami wyższe we włosach łonowych), a ilość substancji oryginalnej jest zawsze większa niż jej metabolitu. Ze względu na dobrą korelację pomiędzy włosami z głowy a z pach i łonowymi, mogą być one alternatywą, gdy nie jest możliwe pobranie próbki z głowy [1].

Związki oznaczane we włosach

Związki, oznaczane obecnie we włosach, wyszczególniono w Tabeli 1.

Tabela 1. Substancje oznaczane we włosach.

Podział	Oznaczone związki		Bibliografia
	Macierzysty	Metabolit	
Narkotyki	kokaina	benzoiloekgonina	Garcia-Bournissen et al. [33, 54], Kronstrand et al. [49], Pichini et al. [50], Vogliardi et al. [58], Lendoiro et al. [62]
	amfetamina, metamfetamina		Garcia-Bournissen et al. [33, 54], Kronstrand et al. [49], Lendoiro et al. [62]
	tetrahydrokanabinole		Kronstrand et al. [49], Pichini et al. [50], Lendoiro et al. [62]
	morfina	6-acetylmorfina	Lendoiro et al. [62]
Leki	kortykosteroidy np. beklometazon, prednizon, kortyzon, kortyzol		Cirimele et al. [42]
	nandrolon		Anielski et al. [27]
	ketamina	norketamina	Favretto et al. [48]
	benzodiazepiny np. diazepam, lorazepam, lormetazepam, oxazepam, terazepam,		Kronstrand et al. [49], Lendoiro et al. [62]
	tramadol	N-desmetylotramadol, O-desmetylotramadol	Madry et al. [53]
	metadon, fentanyl, skopolamina, citalopram, fluoksetyna		Lendoiro et al. [62]
Związki endogenne	kortyzol		Gow et al. [28]
	testosteron, epitestosteron		Anielski et al. [27], Deshmukh et al. [47]
	tyroksyna (T ₄)		Tagliaro et al. [37]
	lipidy		Masukawa et al. [31]
Pierwiastki śladowe	chrom		Goullé et al. [45]
	rtęć		Li et al. [13]
	arsen		Shah et al. [23]
Alkohole, rozpuszczalniki	etanol	glukuronid etylu, estry etylowe kwasów tłuszczowych	Schräder et al. [39], Agius et al. [38], Sporkert et al. [55], Suesse et al. [56]
Dym tytoniowy	nikotyna, kotynina		Pellegrini et al. [46]
Pestycydy	DDT i jego pochodne, PCB		Apenzeller et al. [24]

Etapy przygotowania próbek i oznaczanie

Materiał biologiczny, jakim są włosy, wymaga odpowiedniego przygotowania. Analiza składa się z kilku etapów, w których jednym z najważniejszych jest dekontaminacja próbki z zanieczyszczeń zewnętrznych. Później po wysuszeniu i homogenizacji włosów należy wyekstrahować oznaczane substancje z matrycy włosa. Wymagane jest zastosowanie odpowiedniego procesu izolacji w zależności od rodzaju związku. W zależności od przyjętej metody oznaczania, próbki można poddać oczyszczaniu i derywatywacji. Przegląd metod stosowanych do analizy włosów przedstawia Tabela 2.

Możliwości i ograniczenia analizy włosów

Przyjmuje się, że włosy rosną ok. 1cm ± 0,2cm na miesiąc, tak więc zastosowanie ich jako materiału analitycznego

go daje możliwość obserwacji kilku lub nawet kilkunastu miesięcy terapii lub intoksykacji. Jest to jeden z nielicznych materiałów o tak dużym oknie czasowym.

Pobranie próbki jest bardzo łatwe, wystarczy odpowiednio poinstruować osoby odpowiedzialne. Nie jest krępujące jak pobranie moczu, ani inwazyjne jak pobranie krwi. Po związaniu odcina się próbkę włosów, grubości ołówka, z tylnej części głowy lub ze środka jak najbliższej skóry. Należy także zaznaczyć korzeń włosa.

Próbkę można przechowywać praktycznie bez ograniczeń czasowych w temperaturze pokojowej, odpowiednio zabezpieczoną, np. w folii aluminiowej, bez dostępu światła.

Oznaczenia w warunkach laboratoryjnych na zwierzętach doświadczalnych dają wiele możliwości i pozwalają uniknąć skażenia zewnętrznego. Szczury posiadają gruczoły potowe tylko na łapach. Sierść pobierana jest z tylnej czę-

ści bocznej, więc istnieje tylko niewielkie prawdopodobieństwo przeniesienia przez szczura podawanej substancji na oznaczaną sierść.

Badanie próbki nie jest możliwe bezpośrednio po podaniu (spożyciu) oznaczanego związku. Najwcześniej, jak

wspomniano, jest to możliwe w przypadku włosów z brody, np. po ok. 14 godzinach od spożycia alkoholu.

Powszechne skażenie środowiska niektórymi substancjami, np. nikotyną ze względu na obecność dymu tytonio-

Tabela 2. Etapy analizy włosów.

Etap analizy	Czynność/metoda	Bibliografia
Dekontaminacja próbki - oczyszczenie włosów z zanieczyszczeń zewnętrznych	Przemycie rozpuszczalnikiem organicznym i wodnym roztworem naprzemiennie	Shah et al. [23], Anielski et al. [27], Agius et al. [38], Madry et al. [53], Sporkert et al. [55], Suesse et al. [56], Miki et al. [57], Vogliardi et al. [58]
	Przemycie rozpuszczalnikiem organicznym	Deshmukh et al. [47], Favretto et al. [48], Tagliaro et al. [37], Shröder et al. [39], Lendoiro et al. [62]
Homogenizacja - uzyskanie jednorodnej próbki (10-50mg)	Pulweryzacja w młynku kulowym	Favretto et al. [48], Agius et al. [38], Sporkert et al. [55], Vogliardi et al. [58], Favretto et al. [59], Lendoiro et al. [62]
	Pocięcie	Masukawa et al. [31], Yang et al. [30], Garcia-Bournissen et al. [33, 54], Thieme et al. [26], Tagliaro et al. [37], Madry et al. [53], Suesse et al. [56]
Ekstrakcja- wyizolowanie substancji oznaczanej z matrycy włosa	Inkubacja z rozpuszczalnikami organicznymi np. metanolem, acetonitrylem	Masukawa et al. [31], Thieme et al. [26], Yang et al. [30], Garcia-Bournissen et al. [33, 54], Thieme et al. [26], Tagliaro et al. [37], Madry et al. [53], Lendoiro et al. [62]
	Inkubacja kwaśna	Kronstrand et al. [49], Suesse et al. [56]
	Inkubacja alkaliczna	Anielski et al. [26] Deshmukh et al. [47]
	Inkubacja z buforem	Moeller et al. [61]
	Inkubacja enzymatyczna	Pragst et al. [60]
	Inkubacja z wodą	Schröder et al. [39], Agius et al. [38], Sporkert et al. [55]
Oczyszczanie izolatu - nie zawsze jest konieczne	Ekstrakcja ciecz:ciecz (LLE)	Masukawa et al. [31], Anielski et al. [27], Deshmukh et al. [47], Kronstrand et al. [49], Lendoiro et al. [62]
	Wysokosprawna chromatografia cieczowa	Anielski et al. [27],
	Ekstrakcja do fazy stałej (SPE)	Agius et al. [38], Sporkert et al. [55], Suesse et al. [56], Lendoiro et al. [62]
Derywatywacja- nie zawsze jest konieczna	Najczęściej używane związki: MSTFA i BSTFA, z dodatkiem TMS lub TMCS, TFA, PFPA,	Anielski et al. [26], Kronstrand et al. [49], Sporkert et al. [55], Vogliardi et al. [58]
Oznaczenie	Chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (GC-MS)	Gow et al. [28], Masukawa et al. [31], Kronstrand et al. [49], Pichini et al. [50], Garcia-Bournissen et al. [54], Favretto et al. [59], Moeller et al. [61]
	Chromatografia gazowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas (GC-MS-MS)	Anielski et al. [26], Sporkert et al. [55]
	Chromatografia gazowa sprzężona z wysokorozdzielczą spektrometrią mas	Thieme et al. [26]
	Analiza fazy nadpowierzchniowej (head-space) za pomocą mikroekstrakcji do fazy stałej i analizy na drodze chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (HS-SPME-GC-MS-MS)	Suesse et al. [56]
	Analiza fazy nadpowierzchniowej (head-space HS) za pomocą mikroekstrakcji do fazy stałej (SPME) i analizy na drodze chromatografii gazowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (HS-SPME-GC-MS-MS)	Agius et al. [38]
	Jonizacja przez desorpcję laserową wspomaganą matrycą ze spektrometrią mas (MALDI-MS)	Vogliardi et al. [58]
	Jonizacja przez desorpcję laserową wspomaganą matrycą z analizatorem czasu przelotu (MALDI-TOF)	Miki et al. [57]
	Wysokosprawna chromatografia cieczowa połączona z techniką radioimmunologiczną (HPLC-RIA)	Tagliaro et al. [37]
	Wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (HPLC-MS)	Cirimele et al. [42]

	Wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas (HPLC-MS-MS)	Gaillard et al. [44]
	Wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona z wysokosprawną spektrometrią mas	Favretto et al. [59]
	Chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (LC-MS)	Raul et al. [43], Masukawa et al. [31], Pellegrini [46], Gow et al. [28]
	Chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas (LC-MS-MS)	Deshmukh et al. [47], Schröder et al. [39], Kronstrand et al. [49], Mandry et al. [53], Suesse et al. [56], Lendoiro et al. [62]
	Chromatografia cieczowa sprzężona z wysokosprawną spektrometrią mas (LC-MS)	Favretto et al. [48, 59]
	Chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową wysokosprawną spektrometrią mas	Favretto et al. [48]
	Test immunoenzymatyczny (ELISA)	Gow et al. [28], Garcia-Bournissen et al. [54]
	Metoda radioimmunologiczna (RIA)	Gow et al. [28], Yang et al. [30]
	Spektrometria absorpcyjna z atomizacją elektrotermiczną (ET-AAS)	Shah et al. [23]
	Spektrometria masowa z użyciem jonizacji w plazmie wzbudzonej indukcyjnie z komorą kolizyjno-reakcyjną (ICP-MS-CRC)	Goullé et al. [45]
	Spektrometria masowa z użyciem jonizacji w plazmie wzbudzonej indukcyjnie (ICP-MS)	Li et al. [13]

wego w powietrzu, lub kokainą z powodu obecności trudnych do usunięcia śladów tego związku z włókien ubrań i banknotów powoduje, że analiza włosów i interpretacja jej wyników jest utrudniona. Trzeba uwzględnić stopień skażenia środowiska i jego wpływ na zanieczyszczenie włosów.

Stosowanie kosmetyków, w których zawarte są substancje oznaczane, może powodować zafalszowanie wyników analizy. Tu godna uwagi jest publikacja Sporkert et al. [55], w której autorzy donoszą o zewnętrznym zanieczyszczeniu etyloglukuronidem z preparatów stosowanych na włosy.

Zabiegi kosmetyczne mają także istotny wpływ na wartość oznaczanych we włosach związków. Podczas farbowania włosów, a szczególnie rozjaśniania, stężenie EtG we włosach zmniejsza się aż o 80 % [56].

Stosowane skróty

BSTFA	N,O-bis(trimetylosilylo)trifluoroacetamid
DDT	1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorofenylo)etan
ELISA	test immunoenzymatyczny
ET-AAS	spektrometria absorpcyjna z atomizacją elektrotermiczną
EtG	glukuronid etylu
FAEE	estry etylowe kwasów tłuszczowych
GC-MS	chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas
GC-MS-MS	chromatografia gazowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas
HCB	heksachlorobenzen
HCH	heksachlorocykloheksan
HPLC-MS	wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas
HPLC-MS-MS	wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas

HPLC-RIA	wysokosprawna chromatografia cieczowa połączona z techniką radioimmunologiczną
HS-SPME-GC-MS-MS	analiza fazy nadpowierzchniowej (head-space) za pomocą mikroekstrakcji do fazy stałej i analizy na drodze chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas
ICP-MS	spektrometria masowa z użyciem jonizacji w plazmie wzbudzonej indukcyjnie
ICP-MS-CRC	spektrometria masowa z użyciem jonizacji w plazmie wzbudzonej indukcyjnie z komorą kolizyjno-reakcyjną
LC-MS	chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas
LC-MS-MS	chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas
LLE	ekstrakcja ciecz:ciecz
MALDI-MS	jonizacja przez desorpcję laserową wspomaganą matrycą ze spektrometria mas
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption-Ionization Time of Flight</i> , jonizacja przez desorpcję laserową wspomaganą matrycą z analizatorem czasu przelotu
MSTFA	N-trimetylosilylo-N-metylo-trifluoroacetamid
OH-PAH	hydroksylowe pochodne policyklicznych węglowodorów aromatycznych
PAH	policykliczne węglowodory aromatyczne
PCB	polichlorowane bifenyle
PCDD	polichlorowane dibenzodioksyny
PCDF	polichlorowane dibenzofurany
PFPA	bezwodnik pentafluoropropionowy
RIA	<i>Radio Immuno Assay</i> , metoda radioimmunologiczna
SPE	ekstrakcja do fazy stałej

SOHT	<i>Society of Hair Testing</i>
T ₄	tyroksyna, hormon wytwarzany przez tarczycę
TFA	kwasy trifluorooctowe
THC	Δ ⁹ -tetrahydrokanabinol
TMCS	trimetylochlorosilan
TMS	tetrametylosilan
TUE	<i>Therapeutic Use Exemptions</i> , lista substancji dozwolonych do stosowania u sportowców tyłkow w celach terapeutycznych

Bibliografia

- P. Kintz & Co, Drug testing in hair, 1996.
- H. Sachs, Theoretical limits of the evaluation of drug concentrations in hair due to irregular hair growth, *Forensic Sci. Int.*, 1995, 70, 53-61.
- A. Bochenek, M. Reicher, *Anatomia człowieka*, 2008.
- O. Narkiewicz, J. Moryś, *Anatomia człowieka*, 2010.
- B. Larsson, H. Tjalve, Studies in the melanin-affinity of metal ions, *Acta Physiol. Scand.*, 1978, 104, 479.
- F. M. Neuberger, E. Jopp, M. Graw, K. Püschel, G. Grupe, Signs of malnutrition and starvation—Reconstruction of nutritional life histories by serial isotopic analyses of hair, *Forensic Sci. Int.*, 2013, 226, 22-32.
- <http://www.biomol.pl/>
- S. Namkoong, S. P. Hong, M. H. Kim, B. C. Park, Reliability on Intra-Laboratory and Inter-Laboratory Data of Hair Mineral Analysis Comparing with Blood Analysis, *Ann. Dermatol.*, 2013, 25, 67-72.
- S. J. Steindel, P. J. Howanitz, The uncertainty of hair analysis for trace metals. *JAMA* 2001, 285, 83-85.
- G. Forte, A. Alimonti, N. Violante et al., Calcium, copper, iron, magnesium, silicon and zinc content of hair in Parkinson's disease. *J. Trace Elem Biol*, 2005, 19, 195-201.
- Y.M. Al-Farsi, M. I. Waly, M.M. Al-Sharbaty et al., Levels of Heavy Metals and Essential Minerals in Hair Samples of Children with Autism in Oman: a Case Control Study, *Biol. Trace Elem. Res.*, 2013, 151, 181-186.
- P. Wołowicz, I. Michalak, K. Chojnacka, M. Mikulewicz, Hair analysis in health assessment, *Clinica Chimica Acta*, 2013, 419, 139-171.
- Y.F. Li, C. Chen, B. Li, J. Wang, Y. Gao, Y. Zhao, Z. Chai, Scalp hair as a biomarker in environmental and occupational Mercury exposed populations: Suitable or not?, *Environmental Research*, 2008, 107, 39-44.
- T. Mieczkowski, Urinalysis and hair analysis for illicit drugs of driver applicants and drivers in the trucking industry, *J. Forensic Leg. Med.*, 2010, 17, 254-260.
- M. Montagna, C. Stramesi, C. Vignali, A. Groppi, A. Poletti, Simultaneous hair testing for opiates, cocaine, and metabolites by GC-MS: a survey of applicants for driving licenses with a history of drug use, *Forensic Sci. Int.*, 2000, 107, 157-167.
- D. Di Corcia, F. D'Urso, E. Gerace, A. Salomone, M. Vincenti, Simultaneous determination in hair of multiclass drugs of abuse (including THC) by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B*, 2012, 899, 154-159.
- M. R. Moeller, P. Fey, R. Wennig, Simultaneous determination of drugs of abuse (opiates, cocaine and amphetamine) in human hair by GC/MS and its application to methadone treatment program, *Forensic Sci. Int.*, 1993, 63, 185.
- L. W. Cartmell, A. Aufderhide, C. Weems, Cocaine metabolism in pre-Columbian mummy hair, *J. Okla. State Med. Assoc.*, 1991, 84, 11.
- S. Balabanova, F. Parsche, W. Pirsig, First identification of drugs in Egyptian mummies, *Naturwissenschaften*, 1992, 79, 358.
- P.C. Buckland, E. Panagiotakopulu, Rameses II and the tobacco beetle, *Antiquity*, 2001, 75, 549-556.
- W. A. Baumgartner, V. A. Hill, Hair analysis for drug of abuse: clinical, epidemiological and criminal justice field studies, in *Proceedings of the 2nd International Meeting on Clinical and Forensic Aspects of hair analysis*, Genoa, Italy, 1994.
- B. M.R. Appenzeller, C. Mathon, C. Schummer A. Alkerwi, M. Lair, Simultaneous determination of nicotine and PAH metabolites in human hair specimen: A potential methodology to assess tobacco smoke contribution in PAH exposure, *Toxicol. Lett.*, 2012, 210, 211-219.
- A. Q. Shah, T. G. Kazi, J. A. Baig, H. I. Afridi, Correlation between arsenic concentration in fish and human scalp hair of people living in arsenic Contaminated and noncontaminated areas of Pakistan. *Biol Trace Elem Res*, 2011, 144, 197-
- B.M.R. Appenzeller, A.M. Tsatsakis, Hair analysis for biomonitoring of environmental and occupational exposure to organic pollutants: State of the art, critical review and future needs, *Toxicol. Lett.*, 2012, 210, 119-140.
- L. Rivier, Is there a place for hair analysis in doping controls? *Forensic Sci. Int.*, 2000, 107, 309-323.
- D. Thieme, J. Grosse, H. Sachs, R.K. Mueller, Analytical strategy for detecting doping agents in hair, *Forensic Sci. Int.*, 2000, 107, 335-345.
- P. Anielski, D. Thieme, A. Schlupp, J. Grosse, F. Ellendorff, R. K. Mueller, Detection of testosterone, nandrolone and precursors in horse hair, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2005, 383, 903-908.
- R. Gow, S. Thomson, M. Rieder, S. Van Uum, G. Koren, An assessment of cortisol analysis in hair and its clinical applications, *Forensic Sci. Int.*, 2010, 196, 32-37.
- T. Stalder, C. Kirschbaum, Analysis of cortisol in hair - State of the art and future directions, *Brain, Behavior, and Immunity*, 2012, 26, 1019-1029.
- H. Z. Yang, J. Lan, Y. J. Meng, X. J. Wa, D. W. Han, A Preliminary Study of Steroid Reproductive Hormones in Human Hair, *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.*, 1998, 67, 447-450.
- Y. Masukawa, H. Tsujimura, G. Imokawa, A systematic method for the sensitive and specific determination of hair lipids in combination with chromatography, *J. Chrom. B*, 2005, 823, 131-142.
- M. Wada, Y. Sugimoto, B. L. Crabtree, C. Evans, J. H. Montgomery, R. Ikeda, N. Kuroda, K. Nakashima, Simultaneous determination of amphetamine-type stimulants in abusers' hair: clinical usefulness of hair analysis in prehospitalization for abusers, *Forensic Toxicol.*, 2013, 31, 2-8.
- F. Garcia-Bournissen, B. Rokach, T. Karaskov, J. Gareri, G. Koren, Detection of stimulant drugs of abuse in maternal and neonatal hair, *Forensic Sci. Med. Pathol.*, 2007, 3, 115-118.
- M. Wada, Y. Sugimoto, R. Ikeda, K. Isono, N. Kuroda, K. Nakashima, Determination of methamphetamine in neonatal hair and meconium samples: estimation of fetal drug abuse during pregnancy, *Forensic. Toxicol*, 2012, 30, 80-83.
- K. Aleksa, P. Walasek, N. Fulga, B. Kapur, J. Gareri, G. Koren, Simultaneous detection of seventeen drugs of abuse and metabolites in hair using solid phase micro extraction (SPME) with GC/MS, *Forensic Sci. Int.*, 2012, 218, 31-36.
- P. Kintz, B. Ludes, P. Mangin, Evaluation of nicotine and cotinine in human hair, *J. Forensic Sci.*, 1992, 37, 72.
- F. Tagliaro, M. Camilot, R. Valentini, F. Mengarda, F. Antoniazzi, L. Tatò, Determination of thyroxine in the hair of newborns by radioimmunoassay with high-performance liquid chromatographic confirmation, *J. Chrom. B*, 1998, 716, 77-82.
- R. Agius, T. Nadulski, H. Kahl, B. Dufaux, Ethyl glucuronide in hair - A highly effective test for the monitoring of alcohol consumption, *Forensic Sci. Int*, 2012, 218, 10-14.
- J. Schröder, M. Rothe, F. Pragst, Ethyl glucuronide concentrations in beard hair after a single alcohol dose: evidence for incorporation in hair root, *Int. J. Legal Med.*, 2012, 126, 791-799.
- Use of Alcohol Markers in Hair for Abstinence Assessment 2012, SoHT
- <http://www.sohht.org/pdf/Use%20of%20Alcohol%20Markers%20in%20Hair%20for%20Abstinence%20Assessment%202012.pdf>
- V. Cirimele, P. Kintz, V. Dumestre, J.P. Goulle, B. Ludes, Identification of ten corticosteroids in human hair by liquid chromatography

- phy-ionspray mass spectrometry *Forensic Sci. Int.* 2000, 107,381-388.
43. J.S. Raul, V. Cirimele, B. Ludes, P. Kintz, Detection of physiological concentrations of cortisol and cortisone in human hair, *Clin. Biochem.*, 2004, 37, 1105-1111.
 44. Y. Gaillard, F. Vayssette, G. Pe´ pin, Compared interest between hair analysis and urinalysis in doping controls. Results for amphetamines, corticosteroids and anabolic steroids in racing cyclists, *Forensic Sci. Int.*, 2000, 107, 361-379.
 45. J.P. Goullé, E. Sausse, J. Grosjean, C. Doche, L. Mahieu, J.M. Thouret, M. Guerbet, C. Lacroix, Accidental potassium dichromate poisoning. Toxicokinetics of chromium by ICP-MS-CRC in biological fluids and in hair, *Forensic Sci. Int.*, 2012, 217, e8-e12.
 46. M. Pellegrini, M.C. Rotolo, S. La Grutta, F. Cibella, O. Garcia-Algar, A. Bacosi, G. Cuttitta, R. Pacifici, S. Pichini, Assessment of exposure to environmental tobacco smoke in young adolescents following implementation of smoke-free policy in Italy, *Forensic Sci. Int.*, 2010, 196, 97-100.
 47. N. I.K. Deshmukh, J. Barker, A. Petroczi, D. P. Naughton, Detection of testosterone and epitestosterone in human hair using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2012, 67-68, 154-158.
 48. D. Favretto, S. Vogliardi, G. Stocchero, A. Nalesso, M. Tucci, C. Terranova, S. D. Ferrara, Determination of ketamine and norketamine in hair by micropulverized extraction and liquid chromatography-high resolution mass spectrometry, *Forensic Sci. Int.*, 2013, 226, 88-93.
 49. R. Kronstrand, I. Nyström, M. Forsman, K. Käll, Hair analysis for drugs in driver's license granting. A Swedish pilot study, *Forensic Sci. Int.*, 2010, 196, 55-58.
 50. S. Pichini, R. De Luca, M. Pellegrini, E. Marchei, M.C. Rotolo, R. Spolletini, P. D'Aloja, R. Pacifici, C. Mortali, G. Scaravelli, Hair and urine testing to assess drugs of abuse consumption in couples undergoing assisted reproductive technology (ART), *Forensic Sci. Int.*, 2012, 218, 57-61.
 51. Lista zabroniona 2013, standard międzynarodowy, WADA.
 52. http://www.antydoping.pl/upload/2013/Lista%20zabroniona%20WADA%202013_PL.pdf
 53. M. M. Madry, K.Y. Rust, R. Guglielmello, M. R. Baumgartner, T. Kraemer, Metabolite to parent drug concentration ratios in hair for the differentiation of tramadol intake from external contamination and passive exposure, *Forensic Sci. Int.*, 2012, 223, 330-334.
 54. F. Garcia-Bournissen, M. Moller, M. Nesterenko, T. Karaskov, G. Koren, Pharmacokinetics of disappearance of cocaine from hair after discontinuation of drug use, *Forensic Sci. Int.*, 2009, 189, 24-27.
 55. F. Sporkert, H. Kharbouche, M. P. Augsburg, C. Klemm, M. R. Baumgartner, Positive EtG findings in hair as a result of a cosmetic treatment, *Forensic Sci. Int.*, 2012, 218, 97-100.
 56. S. Suesse, F. Pragst, T. Mieczkowski, C.M. Selavka, A. Elian, H. Sachs, M. Hastedt, M. Rothe, J. Campbell, Practical experiences in application of hair fatty acid ethyl esters and ethyl glucuronide for detection of chronic alcohol abuse in forensic cases, *Forensic Sci. Int.*, 2012, 218, 82-91.
 57. A. Miki, M. Katagi, N. Shima, H. Kamata, M. Tatsuno, T. Nakanishi, H. Tsuchihashi, T. Takubo, K. Suzuki, Imaging of methamphetamine incorporated into hair by MALDI-TOF mass spectrometry, *Forensic Toxicol.*, 2011, 29, 111-116.
 58. S. Vogliardi, D. Favretto, G. Frison, S. Maietti, G. Viel, R. Seraglia, P. Traldi, S.D. Ferrara, Validation of a fast screening method for the detection of cocaine in hair by MALDI-MS, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010, 396, 2435-2440.
 59. D. Favretto, S. Vogliardi, G. Stocchero, A.o Nalesso, M. Tuccia, S. D. Ferrara, High performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry and micropulverized extraction for the quantification of amphetamines, cocaine, opioids, benzodiazepines, antidepressants and hallucinogens in 2.5mg hairsamples, *J. Chrom. A*, 2011, 1218, 6583-6595.
 60. F. Pragst, M. A. Balikova, State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse, *Clinica Chimica Acta*, 2006, 370, 17-49.
 61. M. R. Moeller, P. Fey, R. Wennig, Simultaneous determination of drugs of abuse (opiates, cocaine and amphetamine) in human hair by GC/MS and its application to a methadone treatment program. *Forensic Sci Int.*, 1993, 63, 185-206.
 62. E. Lendoiro, Ó. Quintela, A. de Castro, A. Cruz, M. López-Rivadullam, M. Concheiro, Target screening and confirmation of 35 licit and illicit drugs and metabolites in hair by LC-MS-MS, *Forensic Sci Int.*, 2012, 217, 207-215.