

Contributi originali

L'elettroforesi capillare: una valida e moderna tecnica analitica nella ricerca tossicologica

Jennifer P. Pascali¹, Elisa Trapani¹, Catia Seri¹, Dario Raniero¹, Giovanni Serpelloni², Franco Tagliaro¹

¹ Dipartimento di Sanità Pubblica e Medicina di Comunità, sezione di Medicina Legale, Università di Verona, Verona

² Dipartimento Politiche Antidroga, Presidenza del Consiglio dei Ministri, Roma

Le origini dell'elettroforesi capillare (CE), conosciuta anche come "Elettroforesi Capillare ad Alta Performance (HPCE)", risalgono in realtà ai primi anni '80, quando in alcuni centri di ricerca negli USA e in Europa si puntò all'ottimizzazione della tecnica elettroforetica tradizionale su gel, attraverso l'applicazione di tecnologie strumentali evolute. È in realtà a partire dai primi anni '90 che la CE ha iniziato ad essere introdotta nel in alcuni settori applicativi della chimica analitica e da allora ha interessato una moltitudine di ricercatori afferenti ad aree diverse, dalla chimica alla biochimica, dalla farmacologia alle biotecnologie. Nata con l'intenzione di ottimizzare la separazione di proteine, sin dalle sue prime applicazioni, la CE è stata impiegata per l'analisi di farmaci, assumendo importanza gradualmente crescente nell'ambito della ricerca farmaceutica, soprattutto nel campo dei farmaci biotecnologici. La CE è oggi lo standard analitico nel sequenziamento degli acidi nucleici. Alquanto inspiegabilmente, la CE è stata per lungo tempo negletta nella tossicologia analitica e particolarmente nella tossicologia forense, ma nei tempi più recenti anche questo settore particolarmente conservativo si sta muovendo ad apprezzare questo nuovo e potente strumento di indagine per la sua grande versatilità e per la possibilità di integrarsi con le tecniche analitiche più tradizionali.

Il presente articolo vuole fornire una presentazione generale della tecnica nota come CE, con la descrizione del principio separativo e della più classica configurazione strumentale. Verranno anche descritte alcune delle applicazioni ritenute significative per la ricerca tossicologica.

Capillary electrophoresis: a modern research tool in analytical toxicology

Capillary Electrophoresis (CE) [known also as High-Performance Capillary Electrophoresis (HPCE)] originated, about 30 years ago, from the optimization of the traditional gel electrophoretic techniques, by implementation of modern instrumental technology. After more than a decade of development, at the beginning of 1990's, CE started being introduced in the application field and since then it has attracted the interest of a host of researchers in the most diverse areas of chemistry, biochemistry, biotechnology, pharmacology and pharmaceutical chemistry. Indeed, with the same instrumental hardware, separations based onto completely different physical-chemical mechanisms (electrophoretic and chromatography-like) can be performed. Because of this high versatility, the potential applications of CE are extremely vast, ranging from inorganic ions up to big biopolymers. Strangely enough, for many years CE has been overlooked in analytical toxicology, and particularly in forensic analysis, where its high versatility and complementarity to gas and liquid chromatography make it most promising. Only recently the attention of toxicologists has been focused on CE, mainly for its easy coupling with mass spectrometry. The present paper will introduce the reader into the basic concepts on which CE is grounded including the discussion of some fundamental applications to the toxicological research.

Parole chiave: elettroforesi capillare, droghe d'abuso, tossicologia, CDT, mobilità elettroforetica

Keywords: capillary electrophoresis, caffeine, smart drugs, energy drinks

Date: inviato: 29/04/2011 - accettato: 11/07/2011

Contatti: Prof. **Franco Tagliaro,**

Dipartimento di Sanità Pubblica e Medicina di Comunità, sezione di

Medicina Legale, Università di Verona, Verona

P.le Scuro 10, Policlinico GB Rossi 37134 Verona

e-mail: franco.tagliaro@univr.it

Introduzione

Una recente indagine condotta sul motore di ricerca Google, mostra oltre 17.000.000 pagine web contenenti le parole chiave “capillary electrophoresis”. La medesima ricerca condotta su Pubmed permette di identificare oltre 17.000 articoli scientifici. Invece, impiegando le parole chiave “capillary electrophoresis AND toxicology” si raccolgono, sempre su Pubmed, solo poco più di 170 lavori.

Per comprendere le origini di questa discrasia bisogna tornare alle origini dell'elettroforesi capillare (CE), che, conosciuta anche come Elettroforesi Capillare ad Alta Performance (HPCE), può essere fatta risalire ai primi anni '80, quando alcuni centri di ricerca statunitensi ed europei proposero l'ottimizzazione della tecnica elettroforetica tradizionale basata su gel, mediante l'applicazione di tecnologie strumentali evolute. E' a partire poi dai primi anni '90 che la CE ha iniziato ad essere introdotta nel campo delle applicazioni e da allora ha coinvolto numerosissimi ricercatori afferenti a discipline assai diverse, dalla biochimica alla genetica, dalla biomedicina alla chimica e dalla farmacologia alle biotecnologie. Sin dalle sue prime applicazioni, la CE è stata impiegata per l'analisi di farmaci, assumendo importanza gradualmente crescente nell'ambito della ricerca farmaceutica, particolarmente nell'ambito dei biofarmaci¹. Da questo ambito all'analisi di tossici e droghe illecite e dei loro metaboliti sia in preparazioni clandestine che in campioni biologici il passo sembrerebbe breve, ma in realtà ha richiesto vari decenni, come la ricerca bibliografica sopra esposta ha dimostrato.

In realtà, grazie alla sua versatilità, la CE può venir applicata ad un ampio spettro di sostanze, da ioni inorganici a biopolimeri di notevoli dimensioni quali proteine, DNA e persino particelle virali. Inoltre, in CE, servendosi dello stesso hardware strumentale è possibile eseguire separazioni basate su meccanismi chimico-fisici differenti (ad esempio il meccanismo elettroforetico e il cromatografico). Un'importante caratteristica della CE, oltre alla grande versatilità di applicazioni, riguarda l'elevata efficienza separativa (oltre un milione di piatti teorici), l'alta sensibilità (in termini di massa e, con specifiche procedure, anche di concentrazione), la richiesta di quantità di campione da caricare estremamente bassa (nL), tempi di analisi piuttosto brevi (in genere meno di 30 minuti), consumo minimo di solventi (pochi mL di buffer di corsa al giorno) e di altri consumabili (come i capillari), l'opportunità di accoppiamento con diversi sistemi di rivelazione, compresa la spettrometria di massa. Per quanto concerne quest'ultimo aspetto, proprio l'accoppiamento con la spettrometria di massa ha permesso all'elettroforesi capillare di rivestire una sempre più crescente importanza nella tossicologia analitica moderna², permettendo la non equivoca identificazione di composti in matrici biologiche complesse.

Principi separativi e strumentazione

Il termine “elettroforesi” indica un meccanismo di separazione molecolare basato sulla migrazione differenziale di molecole elettricamente cariche in un campo elettrico. Nell'elettroforesi “capillare” il potenziale è applicato appunto tra le due estremità di un capillare del diametro di poche decine di micrometri riempito di soluzione elettrolitica. Le cariche delle molecole derivano dai gruppi ionizzabili che le stesse contengono quando presenti in soluzione e che fanno di esse dei cationi (con carica positiva) o degli anioni (con carica negativa). La velocità di migrazione degli ioni in questione per effetto del campo elettrico varia in rapporto a due fattori:

- le forze di spinta generate dalla differenza di potenziale applicata;
- le forze frenanti tra ioni e mezzo circostante.

Uno ione in soluzione è quindi soggetto a due componenti:

→ una forza di spinta (F_s) ovvero $F_s = q \cdot E$

In cui:

q = carica elettrica della molecola o ione

E = campo elettrico (potenziale/distanza di applicazione)

→ una forza frenante $F_f = 6\pi\eta r \cdot v$

In cui:

$6\pi\eta r$ = legge di Stokes

r = raggio della particella

η = viscosità del mezzo

v = velocità di migrazione elettroforetica

In condizioni di equilibrio, eguagliandosi la F_s alla F_f si ha che:

$$q \cdot E = 6\pi\eta r \cdot v$$

Ricavando v (velocità di migrazione) dall'equazione si ottiene:

$$v = \frac{q \cdot E}{6\pi\eta r}$$

$$6\pi\eta r$$

da cui si deduce che la velocità di migrazione elettroforetica è direttamente proporzionale alla carica elettrica dello ione e al gradiente di potenziale, ma inversamente proporzionale al raggio r della molecola.

Poiché, però, per in una specifica corsa elettroforetica, le molecole sono immerse nello stesso mezzo, e su di esse viene applicato lo stesso campo elettrico, alcuni dei parametri visti risultano costanti, ovvero

$$E, 6\pi\eta = K$$

si evince che la velocità di migrazione delle specie ioniche dipende dal rapporto carica/ raggio:

$$v = q/R$$

Inoltre, dato che il raggio ionico di una molecola è correlato al suo peso molecolare, si dice, comunemente, che la migrazione dipende essenzialmente dal rapporto carica/massa.

La strumentazione

Un elettroferografo capillare è composto da un sistema di iniezione, da un capillare di silice di lunghezza e diametro variabili ($L = 20-100$ cm, $D = 20-100$ μm), da una sorgente di potenziale elettrico (10-30 kV) e da un "rivelatore". La separazione avviene all'interno del capillare successivamente alla fase di iniezione (Fig.1). I capillari maggiormente impiegati nella pratica moderna sono in silice fusa, rivestiti esternamente da un polimero opaco in grado di conferire resistenza e flessibilità al capillare. Tale materiale va rimosso in corrispondenza della finestra di rivelazione al fine di permettere una corretta rivelazione degli analiti. Per quanto riguarda le caratteristiche interne dei capillari, questi si possono suddividere in "uncoated" (ovvero non rivestiti) ed esporre la superficie interna di silice al buffer e ai soluti oppure in alternativa, "coated", ovvero rivestiti internamente da un sottile strato di polimeri (adsorbiti o legati chimicamente), che proteggono la silice dalle interazioni con i soluti, cambiandone le caratteristiche superficiali. I capillari possono anche essere riempiti con gel, in modo da simulare la gel elettroforesi, o con particelle contenenti una fase stazionaria, riproducendo così un sistema cromatografico.

Le tecniche di iniezione prevalentemente utilizzate in CE sono due: l'idrodinamica e l'elettrocinetica. La prima è condotta applicando una pressione positiva all'estremità di iniezione del capillare (oppure una pressione negativa all'estremità opposta) mentre l'iniezione elettrocinetica si esegue applicando una differenza di potenziale tra la vial del campione e quella dell'estremità opposta del capillare (pochi kV per pochi secondi), realizzando così una specie di mini-elettroforesi.

La principale differenza tra queste due modalità di iniezione consiste nel fatto che nell'iniezione idrodinamica (pressione-guidata) ciò che viene iniettato è rappresentativo della composizione del campione, mentre nell'iniezione elettrocinetica (potenziale-guidata) le sostanze presenti nel campione entrano nel capillare in base alla loro mobilità elettroforetica.

Affinché nel sistema venga mantenuta una elevata efficienza di separazione, il volume di iniezione non deve superare poche decine di nL (1-2% del volume totale), dal momento che il volume totale del capillare è minimo (dell'ordine del μL).

All'interno del capillare si verifica un fenomeno cruciale al fine della separazione elettroforetica, ovvero la generazione di un flusso elettrosmotico (EOF). Esso si forma in presenza di tamponi di separazione a $\text{pH} > 2$. In tali condizioni, la parete interna (in silice fusa) del capillare espone gruppi silanolicci ionizzati negativamente (SiO^-) in grado di interagire elettrostaticamente con gli ioni positivi presenti in soluzione. I cationi, essendo attratti dalle cariche negative dei gruppi silanolicci, si concentrano all'interfaccia con la parete del capillare e al momento dell'applicazione di una differenza di potenziale, essi migrano verso il catodo (elettrodo negativo) richiamando acqua per osmosi. Tale fenomeno genera un flusso di liquido all'interno del capillare chiamato appunto flusso elettroosmotico (EOF). Una caratteristica di questo flusso è il suo

profilo piatto (simile ad un pistone) in grado di limitare la diffusione delle bande di migrazione durante la separazione (Fig. 2). Tale flusso, in alcune speciali applicazioni, è propriamente responsabile della separazione. In conseguenza della sua natura, l'EOF è fortemente influenzato dal pH, dalla composizione del tampone e dalla forza ionica. Al fine di eliminare o di invertire l'EOF, la parete interna del capillare può essere rivestita di "agenti modificanti" che possono essere adsorbiti fisicamente alla parete stessa. I rivestimenti più comunemente usati sono in poliacrilammide, cellulosa, aminoacidi, surfattanti, polivinilacetato (PVA), ammine, composti aril-pentafluorurati, polietileneimine, poli(vinilpirrolidone) ecc.

L'elettroforesi capillare è stata accoppiata con successo a diverse modalità di rivelazione. La più comunemente impiegata con la moderna strumentazione è la rivelazione UV, la quale sfrutta la capacità dei vari composti di assorbire la radiazione luminosa. Per questo motivo, nella rivelazione "on-column", parte del rivestimento opaco viene rimossa in corrispondenza della finestra di rivelazione. Nel caso di analiti trasparenti alla radiazione luminosa, mediante l'aggiunta di un cromoforo al tampone di corsa, è possibile eseguire una rivelazione di tipo indiretto. In questo modo diventano rilevabili molti piccoli ioni inorganici, consentendo la loro determinazione in CE, anche senza un rivelatore specifico. Alla rivelazione UV si è recentemente affiancata la rivelazione con diodi array (DAD) in grado di registrare anche lo spettro di assorbimento UV degli analiti.

I limiti di sensibilità intrinseci alla CE (dovuti soprattutto alla minuscola quantità di campione iniettabile, dell'ordine dei nL) possono essere superati adottando tecniche di rivelazione più sensibili, ad esempio, la fluorescenza laser-indotta (sensibilità $> 10^{-12}$ M), la rivelazione elettrochimica (sensibilità $> 10^{-8}$ M), oppure più recentemente la spettrometria di massa. Al medesimo scopo possono essere impiegati anche metodi di pre-concentrazione del campione, come il field amplified sample stacking (FASS) che assicura miglioramenti nella sensibilità di 2-3 ordini di grandezza.

In realtà, i principali avanzamenti tecnologici ottenuti di recente in CE, coinvolgono l'accoppiamento con la spettrometria di massa tradizionale (MS) e ad alta risoluzione (HRMS). Questo è stato possibile grazie soprattutto alla diffusione commerciale di interfacce robuste e affidabili (principalmente elettrospray). L'elettroforesi capillare è stata così accoppiata a rivelatori di massa a trappola ionica (ITMS), a singolo e triplo quadrupolo, a settore magnetico, a trasformata di Fourier e a tempo di volo (TOF-MS).

Applicazioni in ambito tossicologico-forense

L'analisi tossicologica, è rivolta alla ricerca di sostanze o di classi di sostanze conosciute come farmaci, composti tossici e/o droghe d'abuso, o in senso più generico, può essere indirizzata alla rivelazione e identificazione di qualsivoglia composto "nocivo" (indagine generica sistematica). L'inda-

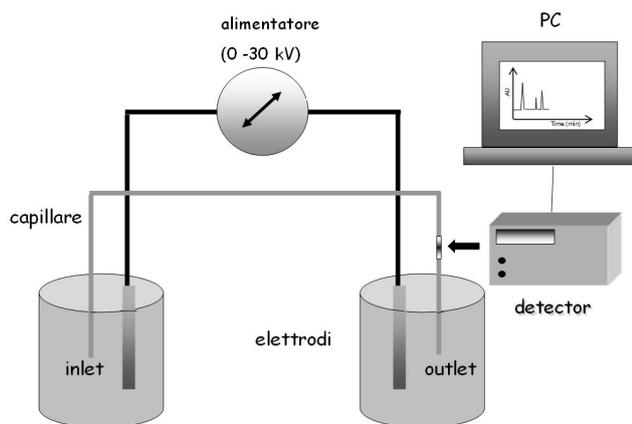


Fig. 1

gine “generica”, che mira a stabilire o escludere la presenza o meno di sostanze tossiche nei campioni biologici, necessita di una strategia di screening assai estesa, poiché il numero di possibili molecole da rilevare o da scartare è estremamente elevato.

In realtà, l'indagine tossicologica il più delle volte richiede una ricerca “mirata” ad alcune classi di composti, come per esempio le comuni droghe d'abuso e loro metaboliti, ovvero a una precisa molecola, quale ad esempio uno specifico veleno (es. cianuro).

In entrambi i casi, l'elettroforesi capillare si è rivelata un metodo d'analisi valido e robusto. Questo suo aspetto concorda con l'esigenza dell'operatore di ottenere un dato significativo e attendibile, soprattutto in vista delle conseguenze giudiziarie anche gravi che ne potrebbero derivare³. Sempre per lo stesso motivo è buona consuetudine di ogni laboratorio essere fedeli alle linee guida nazionali, internazionali e avvalersi di misure di verifica, di controlli di qualità e di forme di accreditamento esterne. Consolidate linee guida internazionali ribadiscono come l'analisi tossicologica debba procedere mediante due fasi analitiche, temporalmente contigue, basate però su principi chimico-fisici differenti, motivo per cui si è soliti definire le due procedure “ortogonali” tra loro. La prima delle due fasi analitiche prevede uno screening di primo approccio, generalmente eseguito con metodologie immunologiche, in grado di massimizzare la “sensibilità diagnostica” (vale a dire evitando “falsi negativi”, pur dovendo accettare alcuni “falsi positivi”) mentre la fase successiva consiste nella conferma del dato ottenuto sia dal punto di vista qualitativo che quantitativo, massimizzando la “specificità diagnostica” (vale a dire evitando i restanti “falsi positivi”).

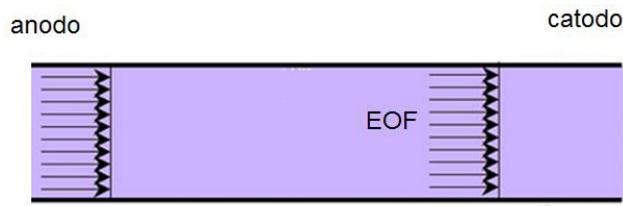
È necessario peraltro fornire una valutazione non solamente in termini di identificazione, ma anche in termini di concentrazione dei composti di interesse, al fine di accertare se le concentrazioni del composto misurate nei campioni analizzati, in base alla sua attività, farmacocinetica, farmacodinamica e metabolismo, sono compatibili con gli effetti biologici manifestati dal paziente.

A partire dagli anni '90, il pannello classico di sostanze d'abuso ricercate nei campioni biologici comprende la classe

degli oppiacei (morfina, normorfina, 6-monoacetilmorfina, morfina 3 glucuronato, codeina ecc.), il metadone (agonista del recettore degli oppioidi), sostanze stimolanti come le amfetamine e i loro derivati, la cocaina e relativi metaboliti (quali benzoilecgonina, norcocaina, cocaetilene, estere metilico della ecgonina), sostanze neurodepressive (come barbiturici, benzodiazepinici, alcool etilico), i cannabinoidi (THC-COOH). In ragione di difficoltà analitiche e di una supposta minore diffusione, minore attenzione è stata sempre dedicata agli allucinogeni, quali l'LSD, alla ketamina, alla fenciclidina. Nell'analisi di tali composti in matrici biologiche ed in preparazioni clandestine l'analitica tossicologica ha dispiegato il meglio della tecnologia disponibile, ma tuttora lo standard si basa su strumentazione ibrida che integra una fase di separazione cromatografia (in fase gassosa o liquida) ed una di determinazione in spettrometria di massa, a vario grado di sofisticazione.

Anche la CE è stata applicata a questo scopo dimostrando interessanti potenzialità nell'analisi di matrici biologiche quali sangue/siero, urina e matrice pilifera, ognuna in grado di fornire fondamentali informazioni con finestre diagnostiche distinte e specifiche.

La preparazione del campione in CE, come in ogni altra tec-



Sezione longitudinale del capillare. Profilo del flusso elettroosmotico (EOF)

Fig. 2

nica strumentale, riveste particolare importanza ed è in grado di influenzare l'esito delle fasi successive, essendo la matrice biologica di per sé estremamente complessa.

Le applicazioni della CE nella tossicologia forense in questo ambito sono svariate e in continua evoluzione. Tuttavia è interessante citare lavori in cui l'elettroforesi capillare è stata applicata all'analisi di oppiacei, cocaina e amfetaminici sia in matrice pilifera che su sangue con rivelazione tradizionale UV e in spettrometria di massa^{4,5,6}, con sensibilità e specificità paragonabili a quelle ottenute con tecniche analitiche più tradizionalmente applicate nel laboratorio di tossicologia (GC-MS e LC-MS).

La rivelazione e quantificazione della dietilammide dell'acido lisergico (LSD), uno dei più potenti allucinogeni, è per molti tossicologi una sfida in quanto è questo composto è attivo nell'organismo in basse concentrazioni e rapidamente metabolizzato. L'elettroforesi capillare è stata applicata con successo anche in questo ambito, utilizzando una rivelazione al laser He-Cd a 325 nm⁷.

Specifiche review sulle applicazioni tossicologiche della CE si

possono trovare nella recente letteratura^{8,9,10,11}.

In realtà, una dei campi in cui la CE è divenuta strumento analitico leader in ambito tossicologico è nella diagnosi oggettiva di abuso etilico cronico. Tradizionalmente i marcatori utilizzati in medicina clinica per valutare l'abuso alcolico cronico o subcronico sono gli enzimi epatici (GGT, AST), e il volume globulare medio (MCV), la cui sensibilità e specificità è del tutto carente. Altri marcatori proposti quali gli addotti dell'acetaldeide, le HDL, alcuni metaboliti minori dell'etanolo ecc., sono ancora in fase di studio. Ad oggi solamente un marker biochimico è vastamente accettato, dopo oltre un decennio di conferma nella pratica; trattasi della transferrina carboidrato-carente (CDT). La transferrina sierica è la principale glicoproteina trasportatrice del ferro e può contenere da 0 a 8 residui di acido sialico. L'isoforma maggiormente rappresentata nel genere umano è la tetrasialo transferrina (ovvero l'isoforma contenente quattro residui di acido sialico). Lo stato di glicosilazione della proteina varia in base al consumo alcolico, in quanto l'acetaldeide (metabolita formatosi per azione dell'aldeide deidrogenasi sull'etanolo) inibisce l'enzima glicosil transferasi, responsabile, a sua volta, dell'aggiunta di residui di acido sialico sulle catene laterali della proteina. In seguito ad abuso alcolico, dunque, le forme proteiche meno glicosilate, ovvero la disialo transferrina e la asialo transferrina (denominate collettivamente CDT) aumentano la loro concentrazione, a sfavore delle più glicosilate. I dati presenti in letteratura indicano che il livello di CDT incrementa se il soggetto ha assunto etanolo durante le ultime due settimane, con un consumo medio giornaliero almeno di 50 – 80 g/die, cioè di 4-7 unità alcoliche. L'emivita della CDT è di 15 giorni circa. La specificità del test è ottimale (90 - 100%), mentre la sensibilità si attesta nel range 50–90 %, a seconda dei criteri più o meno restrittivi usati per la classificazione di abusatore.

La CDT può essere determinata sia con metodi immunometrici e mediante HPLC, ma in questo ambito, per la sua produttività accoppiata a selettività, la CE gioca un ruolo primario, particolarmente a scopo di conferma dei dati dello screening immunometrico¹².

electrospray ionization-ion trap mass spectrometry, *J Chromatogr A*, 2007, 1159:185-189.

7. Frost M., Koehler H. Analysis of lysergic acid diethylamide: comparison of capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence (CE-LIF) with conventional techniques, *Forensic Sci. Int.*, 1998, 92: 213-218.

8. Simpson S.L. Jr, Quirino J.P., Terabe S., On-line sample preconcentration in capillary electrophoresis. *Fundamentals and applications*, *J Chromatogr A*, 2008, 1184: 504-541.

9. Tagliaro F., Pascali J., Fanigliulo A., Bortolotti F., Recent advances in the application of CE to forensic sciences: a update over years 2007-2009, *Electrophoresis*, 2010, 31: 251-259.

10. Tagliaro F., Bortolotti F., Pascali J.P. Current role of capillary electrophoretic/electrokinetic techniques in forensic toxicology, *Anal Bioanal Chem.*, 2007, 388: 1359-1364.

11. Thormann W., Progress of capillary electrophoresis in therapeutic drug monitoring and clinical and forensic toxicology, *Ther Drug Monit.*, 2002, 24: 222-231.

12. Bortolotti F., De Paoli G., Tagliaro F. Carbohydrate-deficient transferrin (CDT) as a marker of alcohol abuse: a critical review of the literature 2001-2005, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2006, 841:96-109.

Ulteriori letture

- K.D. Altria (Editor), *Capillary electrophoresis guidebook*, 1996, Humana Press Inc. Totowa, New Jersey
- P.G. Righetti (Editor), *Capillary Electrophoresis in Analytical Biotechnology*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 1996.
- J.R. Petersen and A. A. Mohammad (Editors), *Clinical and forensic applications of capillary electrophoresis*, 2001, Humana Press Inc., Totowa, New Jersey.
- R. Weinberg (Editor), *Practical Capillary Electrophoresis*, Second Ed., 2000, Elsevier.
- S. Ahuja and M. Jimidar (Editors), *Capillary electrophoresis methods for pharmaceutical analysis*, 2008, Academic Press
- P.Schmitt-Koplin (Editor), *Capillary electrophoresis: methods and protocols*, 2008, Humana Press, Totowa NJ, USA.

Bibliografia

1. Altria K.D. Capillary electrophoresis for pharmaceutical research and development, *LC-GC* 1993, 6:616-619.
2. Cai J., Henion J. Capillary electrophoresis-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1995, 703: 667-692.
3. Pascali J., Neri C., Tagliaro F.: La strategia analitica tossicologico-forense negli accertamenti sull'idoneità alla guida. In: Progetto Drugs On Street. Giovanni Serpelloni, Diana Candio, Claudia Rimondo, Verona, 2008; pp. 73 - 81.
4. Gottardo R., Fanigliulo A., Bortolotti F., De Paoli G., Pascali J.P., Tagliaro F. Broad-spectrum toxicological analysis of hair based on capillary zone electrophoresis-time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 2007, 1159:190-197.
5. Manetto G., Tagliaro F., Crivellente F., Pascali V.L., Marigo M. Field-amplified sample stacking capillary zone electrophoresis applied to the analysis of opiate drugs in hair, *Electrophoresis*, 2000, 21: 2891-2898.
6. Gottardo R., Bortolotti F., De Paoli G., Pascali J.P., Miksik I., Tagliaro F. Hair analysis for illicit drugs by using capillary zone electrophoresis-