



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Διπλωματική Εργασία

«ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΑΕΡΙΑΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ  
ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΗ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟ  
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΜΕΘΑΔΟΝΗΣ ΣΕ ΜΕΤΑΘΑΝΑΤΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ»

“DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A GAS CHROMATOGRAPHY-MASS  
SPECTROMETRY METHOD FOR THE QUANTIFICATION OF METHADONE IN  
HUMAN POST-MORTEM SAMPLES”

Καλαμπόκη Θεοδώρα του Ηρακλή

Λάρισα, 2023

Η παρούσα διπλωματική εκπονήθηκε στο εργαστήριο Ιατροδικαστικής  
και Τοξικολογίας, του τμήματος Ιατρικής, του Αριστοτέλειου  
Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Επιβλέπων καθηγητής: ΡΑΪΚΟΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ

Καθηγητής, τμήμα Ιατρικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Συνεπιβλέπων καθηγητής: ΣΤΑΓΚΟΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

Καθηγητής, τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο  
Θεσσαλίας

Μέλος εξεταστικής επιτροπής: ΒΕΣΚΟΥΚΗΣ ΑΡΙΣΤΕΙΔΗΣ

Επίκουρος καθηγητής, τμήμα Διαιτολογίας και Διατροφολογίας,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ:

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας, του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης στα πλαίσια που ορίζει το πρόγραμμα σπουδών του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Τόσο η απόδοση του θέματος της εργασίας όσο και η υλοποίηση του πραγματοποιήθηκε υπο την καθοδήγηση του καθηγητή κ. Νικόλαου Ράικου, στον οποίο οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη και τον χρόνο που μου αφιέρωσε καθώς και τα μέσα που μου παραχώρησε (π.χ εργαστήριο, αναλώσιμα, αντιδραστήρια). Χωρίς την συμμετοχή του δεν θα είχα την ευκαιρία να ολοκληρώσω την παρούσα εργασία.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Δημήτριο Στάγκο, ο οποίος ανέλαβε τον ρόλο του συνεπιβλέποντα αλλά και τον κ. Αριστείδη Βεσκούκη που αποτέλεσε το τρίτο μέλος στην τριμελή επιτροπή.

Τέλος στην αξιαγάπητη Φωτεινή Μίτσα χρωστάω το πιο μεγάλο ευχαριστώ, ο ρόλος της οποίας ήταν και θα είναι καθοριστικός στην ακαδημαϊκή μου πορεία. Η συμμετοχή της ήταν απαραίτητη για την εκπόνηση της συγκεκριμένης εργασίας τόσο σε επιστημονικό επίπεδο όσο και σε ανθρώπινο. Ήταν πάντοτε διαθέσιμη για οποιαδήποτε απορία ή δυσκολία αντιμετώπισα, έτοιμη να ανταποκριθεί σε κάθε ζήτημα μου και να με κατευθύνει. Ο λόγος της ήταν πάντα κατανοητός βοηθώντας με να κατανοήσω σε βάθος κάθε βήμα της εργασίας.

Ένα ευχαριστώ οφείλω και σε όλη την ομάδα του εργαστηρίου για τον χρόνο και τον χώρο που μου παραχώρησαν ακόμα και σε ημέρες με μεγάλο φόρτο εργασίας.

<b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ:</b> .....	<b>3</b>
<b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ:</b> .....	<b>4</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	<b>6</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>7</b>
<b>A.ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	<b>8</b>
<b>1. Μεθαδόνη</b> .....	<b>8</b>
1.1 Εισαγωγή.....	8
1.2 Ταξινόμηση και Φαρμακοκινητική.....	9
1.3 Μηχανισμός δράσης.....	10
1.4 Τοξικότητα.....	11
1.5 Θεραπευτικά, τοξικά και κομματώδη επίπεδα.....	12
<b>2. Αέρια Χρωματογραφία</b> .....	<b>12</b>
2.1 Αρχή της μεθόδου.....	13
2.2 Κύρια συστατικά.....	13
2.2.1 Κινητή φάση: φέρον αέριο.....	14
2.2.2 Σύστημα εισαγωγής δείγματος.....	14
2.2.3 Αναλυτική στήλη.....	15
2.2.4 Ανιχνευτής.....	16
<b>3. Φασματομετρία μάζας ( Mass Spectrometry)</b> .....	<b>17</b>
3.1 Αρχή λειτουργίας.....	17
3.2 Οργανολογία φασματόμετρου μαζών.....	17
3.2.1 Τμήμα εισαγωγής δείγματος.....	18
3.2.2 Πηγή ιόντων.....	18
3.2.3 Αναλυτής μαζών.....	19
3.2.4 Ανιχνευτής.....	20
<b>4.Αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας</b> .....	<b>21</b>
<b>5.Προκατεργασία δείγματος</b> .....	<b>22</b>
5.1 Υγρό-υγρό εκχύλιση.....	23
<b>6. Βιβλιογραφική Ανασκόπηση</b> .....	<b>24</b>
<b>B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	<b>25</b>

<b>1. Σκοπός της εργασίας.....</b>	<b>26</b>
<b>2. Οργανολογία, Αντιδραστήρια και Διαλύτες.....</b>	<b>27</b>
2.1 Πρότυπα διαλύματα, Αντιδραστήρια και Διαλύτες.....	27
2.2 Όργανα, συσκευές και λοιπός εξοπλισμός.....	27
2.3 Σύστημα GC–MS.....	28
2.4 Βιολογικά δείγματα .....	29
<b>3. Ανάπτυξη αναλυτικής μεθόδου GC-MS.....</b>	<b>29</b>
3.1 Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων.....	29
3.2 Παράμετροι GC-MS.....	30
3.3 Θερμοκρασιακό Πρόγραμμα.....	31
<b>4. Βελτιστοποίηση αναλυτικής μεθόδου.....</b>	<b>34</b>
4.1 Διαλύτης εκχύλισης.....	34
4.2 Επιλογή pH.....	36
<b>5. Τελική βέλτιστη μέθοδος.....</b>	<b>38</b>
5.1 Παρασκευή επιμολυσμένων (spiked) δειγμάτων.....	38
5.2 Προκατεργασία δείγματος.....	38
<b>6. Επικύρωση αναλυτικής μεθόδου.....</b>	<b>39</b>
6.1 Εκλεκτικότητα.....	39
6.2 Γραμμικότητα.....	39
6.3 Όρια ανίχνευσης – ποσοτικοποίησης.....	40
6.4 Πιστότητα.....	40
6.5 Ορθότητα.....	42
<b>7. Εφαρμογή σε πραγματικά μεταθανάτια δείγματα.....</b>	<b>43</b>
<b>8. Συμπεράσματα.....</b>	<b>46</b>
<b>9. Βιβλιογραφία.....</b>	<b>47</b>

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μεθαδόνη ανήκει στα συνθετικά οπιοειδή, δρα κατασταλτικά στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα καθώς επιβραδύνει τη λειτουργία του και χρησιμοποιείται για τη θεραπεία αποκατάστασης εξαρτημένων ατόμων στα οπιοειδή (ηρωίνη) αλλά και για τις αναλγητικές ιδιότητές της. Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η ανάπτυξη και η επικύρωση μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού της μεθαδόνης με γνώμονα την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων και την εξοικονόμηση χρόνου. Η μέθοδος αναπτύχθηκε με τη χρήση του αέριου χρωματογράφου συζευγμένου με τη φασματομετρία μάζας (GC-MS).

Η προκατεργασία των δειγμάτων έγινε με τη μέθοδο ανάλυσης «εκχύλιση υγρού – υγρού» ενός σταδίου, μειώνοντας έτσι το συνολικό χρόνο ανάλυσης. Ακολούθησε η επιλογή του κατάλληλου διαλύτη για την βελτιστοποίηση της αναλυτικής μεθόδου. Ο διαλύτης που επιλέχθηκε, καθώς επιτυγχάνει το βέλτιστο διαχωρισμό των δύο φάσεων, ήταν ο οξικός αιθυλεστέρας. Το pH ρυθμίστηκε σύμφωνα με την  $pK_a$  στην περιοχή 11,5 με ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικού καλίου. Τέλος, χρησιμοποιήθηκε εσωτερικό πρότυπο νορδιαζεπάμης-d5 για τους ποσοτικούς υπολογισμούς.

Μετά από δοκιμές διαφόρων παραμέτρων δημιουργήθηκε η τελική βέλτιστη και αξιόπιστη μέθοδος ποσοτικοποίησης συνολικής διάρκειας 7,5 λεπτών με τη χρήση του οργάνου GC-MS.

Για την επικύρωση της μεθόδου προσδιορίσθηκαν η γραμμικότητα, η ακρίβεια και η ορθότητα σύμφωνα με τις τιμές των οποίων η μέθοδος κρίνεται κατάλληλη. Επιπλέον, προσδιορίσθηκαν τα όρια ανίχνευσης της μεθαδόνης σε ορό αίματος ως  $LOD = 0,0165 \mu\text{g}/\text{mL}$  ενώ τα όρια ποσοτικού προσδιορισμού ως  $LOQ = 0,05 \mu\text{g}/\text{mL}$ .

Έπειτα από την επιτυχή επικύρωση της μεθόδου, έγινε προσδιορισμός της συγκέντρωσης της μεθαδόνης σε πραγματικά δείγματα που προέρχονταν από θανούντες.

## ABSTRACT

Methadone belongs to the synthetic opioids, acts as a suppressor on the Central Nervous System as it slows down its function and is used for the rehabilitation treatment of people addicted to opioids (heroin) as well as for its analgesic properties. The purpose of this study is the development and validation of a method for quantitative determination of methadone based on the reliability of the results and the saving of time. The method was developed using gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS).

Samples were pre-treated using a one-step liquid-liquid extraction method, thus reducing the overall analysis time. This was followed by the selection of the appropriate solvent to optimize the analytical method. The solvent chosen, as it achieves the optimal separation of the two phases, was ethyl acetate. The pH was adjusted at 11,50 according to the pKa (9,2) in the region with potassium carbonate buffer. Finally, nordiazepam-d5 internal standard was used for quantitative calculations.

After testing various parameters, the final optimal and reliable quantification method was established with a total duration of 7.5 minutes using the GC-MS instrument.

For the validation of the method, the linearity, precision and correctness were determined according to the values of which the method is deemed suitable. In addition, the detection limits of methadone in blood serum were determined as LOD = 0.0165µg/mL while the limits of quantification as LOQ = 0.05µg/mL.

After the successful validation of the method, the methadone concentration was determined in real human post-mortem samples.

## **A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **1. Μεθαδόνη**

#### **1.1 Εισαγωγή**

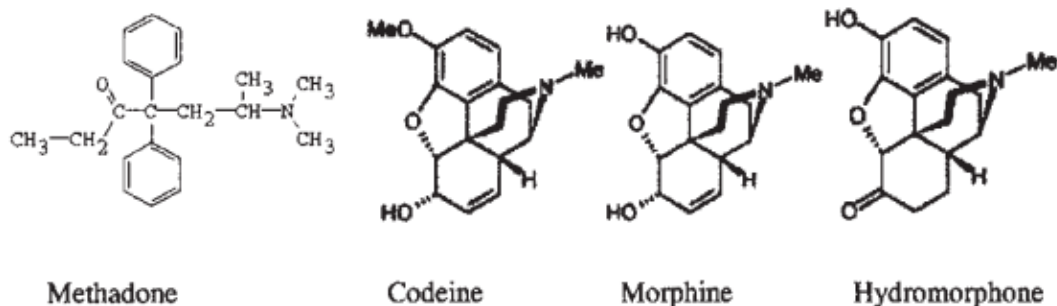
Η μεθαδόνη αναπτύχθηκε ως αναλγητικό από Γερμανούς επιστήμονες, ξεκίνησε τις κλινικές δοκιμές ως «αμιδόνη» και ανήκει στην κατηγορία των συνθετικών οπιοειδών και δρα κατασταλτικά στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ). Χημικά είναι γνωστή ως 6-διμεθυλαμινο- 4,4- διφαινυλεπταν-3-ονη και χορηγείται κυρίως για την απεξάρτηση εξαρτημένων ατόμων στα οπιοειδή καθώς και λόγω των αναλγητικών ιδιοτήτων της, ιδίως σε καρκινοπαθείς.[1] Διατίθεται ως λιπόφιλο υδροχλωρικό άλας και μπορεί να χορηγηθεί : από το στόμα, ενδομυικά, ενδοφλέβια, υποδόρια, επισκληρίδια και ενδοραχιαία. [2]

Κατά τη χρήση της ως υποκατάστατο οπιοειδών μειώνει τα συμπτώματα στέρησης και την επιθυμία για περαιτέρω χρήση αυτών χωρίς να γίνεται σημαντικά εθιστική. Την χορήγησή της αναλαμβάνουν μόνο εγκεκριμένα προγράμματα απεξάρτησης που θέτουν υπό παρακολούθηση τους χρήστες. Ως αναλγητικό χορηγείται μόνο σε μη υποφερτές συνθήκες πόνου. [3]

Η πολυπλοκότητα της φαρμακολογίας της μεθαδόνης χαρακτηρίζεται από υψηλή μεταβλητότητα μεταξύ των ατόμων, πιθανότητα αλληλεπίδρασης με άλλα φάρμακα και μεγάλο χρόνο ημιζωής.[4]

#### **1.2 Ταξινόμηση και Φαρμακοκινητική**

Η μεθαδόνη σε αντίθεση με τους περισσότερους αγωνιστές οπιοειδών έχει δομή διφαινυλοεπτανίου και όχι φαινανθρενίου (εικόνα 1).[5] Είναι λιπόφιλη συνθετική διφαινυλοπροπυλαμίνη, με μοριακό βάρος 309.4 g/mol με pKa 9,2, πολύ ισχυρή αγωνιστική δράση στους μ υποδοχείς οπιοειδών και λιγότερη στους κ και δ. Αποτελεί εξαιρετική επιλογή λόγω της υψηλής βιοδιαθεσιμότητάς της από το στόμα (67–95%), των πολλαπλών σκευασμάτων (από του στόματος, του ορθού και της παρεντερικής), της έλλειψης ενεργών μεταβολιτών, του μακρού χρόνου ημίσειας ζωής και του χαμηλού κόστους. Η συνταγογράφηση της χρήζει πολύ προσοχή εξαιτίας των πολύπλοκων φαρμακοκινητικών και φαρμακοδυναμικών ιδιοτήτων της.[6]



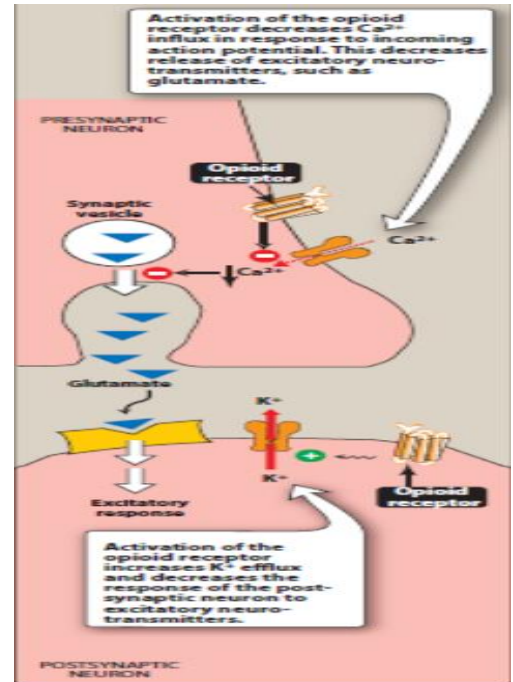
Εικόνα 1: Χημική δομή Μεθαδόνης και άλλων οπιοειδών[1a]

Η χορήγησή της γίνεται κυρίως από το στόμα με τη μορφή διαλύματος ή δισκίων και διατίθεται ως ρακεμικό μείγμα δύο εναντιομερών R και S. Η R-μεθαδόνη έχει δείχθει ότι έχει 10x μεγαλύτερη συγγένεια με τους μ και δ υποδοχείς οπιοειδών σε σύγκριση με την S-μεθαδόνη και έως 50 φορές πιο ισχυρή δράση. Επιπλέον, η πρώτη επιτυγχάνει μεγαλύτερο όγκο κατανομής και μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής.[5] Ο μέσος χρόνος για την επίτευξη μέγιστης συγκέντρωσης στο πλάσμα κυμαίνεται από 2,5(ως διάλυμα) έως 3 ώρες(ως δισκίο). Το εύρος βιοδιαθεσιμότητας της μεθαδόνης από το στόμα είναι 41-99%, απορροφάται πλήρως σχεδόν από το στομάχι και λόγω της υψηλής διαλυτότητας στα λιπίδια έχει μεγάλο όγκο κατανομής στους ιστούς. Σε φυσιολογικό pH δεσμεύεται από πρωτεΐνες του πλάσματος κατά 86-89%, κυρίως από την άλφα-1-όξινη γλυκοπρωτεΐνη (AAG) λόγω των βασικών ιδιοτήτων της. Η AAG παρουσιάζει διακυμάνσεις στην συγκέντρωση της δεδομένου των φυσιολογικών ή παθολογικών καταστάσεων. [7]

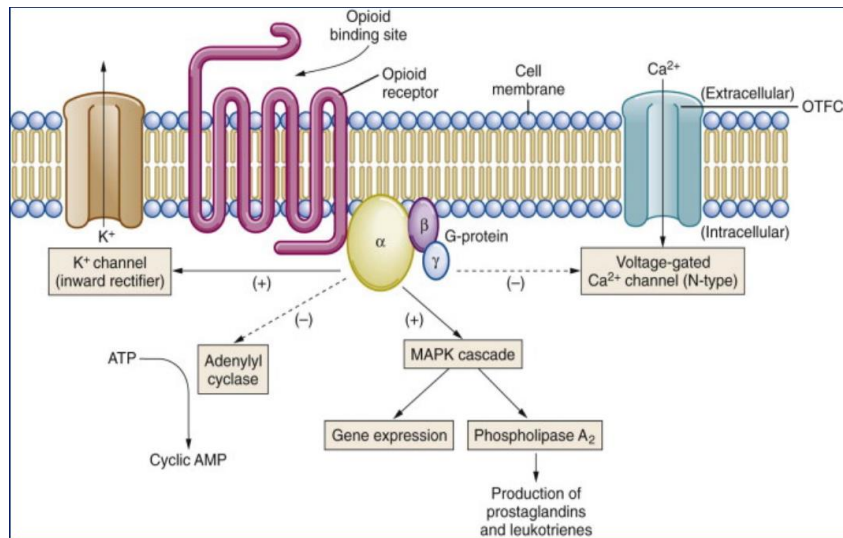
Η μεθαδόνη υπόκειται σε ηπατικό μεταβολισμό από τα ένζυμα του κυτοχρώματος p450 (CYP2B6,CYP2D6,CYP3A4,CYP2C19 ) και στη συνέχεια σε νεφρική απέκκριση. Λόγω της βασικής φύσης της και των λιπόφιλων ιδιοτήτων της, η αποβολή της από τον οργανισμό εξαρτάται κατά πολύ από το pH του ουροποιητικού συστήματος. [7]. Σε βασικό pH φαίνεται οι μεταβολίτες που προκύπτουν από τον ηπατικό μεταβολισμό είναι η 2-αιθυλιδENO-1,5-διμεθυλ-3,3-διφαινυλοπυρρολιδίνη ( EDDP) και η 2-αιθυλο 5-μεθυλ-3,3-διφαινυλ-1-πυρρολίνης (EMDP) , είναι ανενεργοί και προκύπτουν από N-απομεθυλίωση. Σε ασήμαντο ποσοστό παράγεται επίσης μεθαδόλη και νορμεθαδόλη, οι οποίες έχουν παρόμοια φαρμακολογική δράση με την μεθαδόνη. Η αποβολή της πραγματοποιείται σε δύο φάσεις: α ( αργή κατανομή-α φάση αποβολής) και β φάση αποβολής. Η πρώτη έχει διάρκεια 8 έως 12 ώρες και συσχετίζεται με την αναλγησία ενώ η β φάση είναι υποαναλγητική αλλά επαρκής για την πρόληψη των στερητικών συμπτωμάτων. [4]

### 1.3 Μηχανισμός δράσης

Ο πρωταρχικός μηχανισμός δράσης της μεθαδόνης είναι ως αγωνιστής των  $\mu$  υποδοχέων των οπιοειδών ενώ δευτερευόντως δρα στους  $\kappa$  και  $\delta$  υποδοχείς στο περιφερικό και κεντρικό νευρικό σύστημα. Οι παραπάνω κατηγορίες υποδοχέων συζευγνύονται με την G-πρωτεΐνη και αναστέλλουν την αδενυλική κυκλάση. Επιπλέον, συνδέονται με διαύλους ιόντων προκαλώντας υπερπόλωση του νευρώνα (μετασυναπτική εκροή  $K^+$ ) ή μειώνοντας την προσυναπτική εισροή ιόντων ασβεστίου, εμποδίζοντας έτσι την πυροδότηση του νευρώνα και την απελευθέρωση του νευροδιαβιβαστή, εξού και οι κατασταλτικές ιδιότητες. Συγκεκριμένα, οι υποδοχείς  $\mu$  ρυθμίζουν την ανταπόκριση στη θερμική, χημική και μηχανική αλγαισθησία. [8] Η ενεργοποίησή τους προκαλεί αναλγησία, αναπνευστική καταστολή, φυσιολογική εξάρτηση και ανοχή. [7] Η μεθαδόνη μιμείται την δράση ενδογενών οπιοειδών πεπτιδίων όπως είναι οι εγκεφαλίνες, ενδορφίνες και ενδομορφίνες καθώς επίσης επηρεάζει την απελευθέρωση άλλων νευροδιαβιβαστών όπως: ακετυλοχολίνη, νορεπινεφρίνη, ντοπαμίνη. Με την σύνδεση της μεθαδόνης στον  $\mu$ - υποδοχέα προκαλείται ελάττωση της εισόδου ιόντων ασβεστίου στον νευρώνα, έτσι μειώνεται η απελευθέρωση γλουταμινικού στην συναπτική σχισμή και δεν υπάρχει συνέχεια στη μετάδοση του σήματος «πόνου». Επιπλέον, στον μετασυναπτικό νευρώνα ενεργοποιεί διαύλους καλίου οδηγώντας σε υπερπόλωση την μετασυναπτική μεμβράνη και συνεπώς μείωση της δραστηριότητας του μετασυναπτικού νευρώνα. [8] (εικόνα 2,3)



Εικόνα 2: Μηχανισμός δράσης της μεθαδόνης σε  $\mu$ -υποδοχείς οπιοειδών [8]



Εικόνα 3: Μηχανισμός δράσης μεθαδόνης σε μοριακό επίπεδο [3<sup>α</sup>]

Επιπρόσθετα, η μεθαδόνη διαφέρει από άλλα οπιοειδή εξαιτίας της ανταγωνιστικότητας προς τον υποδοχέα NMDA (N-μεθυλο-D-ασπαρτικού) ως προς το γλουταμινικό και την ισχυρή ανασταλτική δράση στην επαναπρόσληψη σεροτονίνης και νορεπινεφρίνης. Οι υποδοχείς NMDA εμπλέκονται στην επεξεργασία σημάτων πόνου (9) και οι ανταγωνιστές των υποδοχέων NMDA μπορούν να αποτρέψουν την ανάπτυξη ανοχής της μορφίνης χωρίς να μεταβάλλουν τις αναλγητικές ιδιότητες. Με την αναστολή επαναπρόσληψης σεροτονίνης και νορεπινεφρίνης μέσω επίδρασης στους μεταφορείς που βρίσκονται στους προσυναπτικούς νευρώνες επιτυγχάνεται συσσώρευση των νευροδιαβιβαστών. [8]

#### 1.4 Τοξικότητα Μεθαδόνης

Η μεθαδόνη αν και μπορεί να οδηγήσει σε φυσική εξάρτηση προκαλεί λιγότερη νευροτοξικότητα συγκριτικά με την μορφίνη λόγω των ανενεργών μεταβολιτών της. [8] Οι γενικές ανεπιθύμητες ενέργειες που προκαλούνται μετά την χορήγηση της μεθαδόνης οφείλονται στην υπερδραστηριότητα των υποδοχέων των οπιοειδών και περιλαμβάνουν: εφίδρωση, κνησμό, ναυτία, ξηροστομία, δυσκοιλιότητα, νάρκωση, λήθαργο, αναπνευστική καταστολή. Επίσης, σχετίζεται με την παράταση του διαστήματος QT καθώς αναστέλλει τους καρδιακούς διαύλους καλίου και μπορεί να προκαλέσει σοβαρή αρρυθμία (torsades de pointes). Σε περίπτωση υπερβολικής χορήγησης μεθαδόνης ο ασθενής λαμβάνει θεραπεία ναλοξόνης. [10] Επιπρόσθετα, με τη χρήση μεθαδόνης μπορεί να προκληθεί το σεροτονινεργικό σύνδρομο ως αποτέλεσμα υπερσυσσώρευσης σεροτονίνης.

## 1.5 Θεραπευτικά, τοξικά και θανατηφόρα επίπεδα

Οι δόσεις χορήγησης μεθαδόνης διαφέρουν μεταξύ των ατόμων που την λαμβάνουν ως αναλγητικό και αυτών που είναι χρήστες ουσιών.

Ως αναλγητικό η θεραπευτική δόση είναι 2,5 έως 10 mg κάθε 3 έως 6 ώρες.

Σε προγράμματα αποκατάστασης συνήθως χορηγούνται 40 έως 60 mg μεθαδόνης ημερησίως. Η χορηγούμενη δόση μπορεί να φθάσει τα 180 mg και σε σπάνιες περιπτώσεις ακόμη υψηλότερα. Οι δόσεις αυτές είναι θανατηφόρες αν χορηγηθούν σε άτομα που δεν έχουν αναπτύξει ανοχή σε οπιοειδή. Να σημειωθεί ότι ανοχή που έχει αναπτυχθεί π.χ. ως προς την ηρωίνη μεταφέρεται και στη μεθαδόνη.

Το θεραπευτικό εύρος της κυμαίνεται από 0,1-0,5 mg/L, το τοξικό >0,2 mg/L ενώ το κομματώδες >0,4mg/L

Ένωση	Επίπεδα σε ορό αίματος (mg/L)		
	Θεραπευτικά	Τοξικά	Κομματώδη
Μεθαδόνη	(0,05)0,1-0,5	>0,2	>0,4

Πίνακας 1: Θεραπευτικά, τοξικά και κομματώδη επίπεδα μεθαδόνης στον ορό.

## 2. Αέρια χρωματογραφία

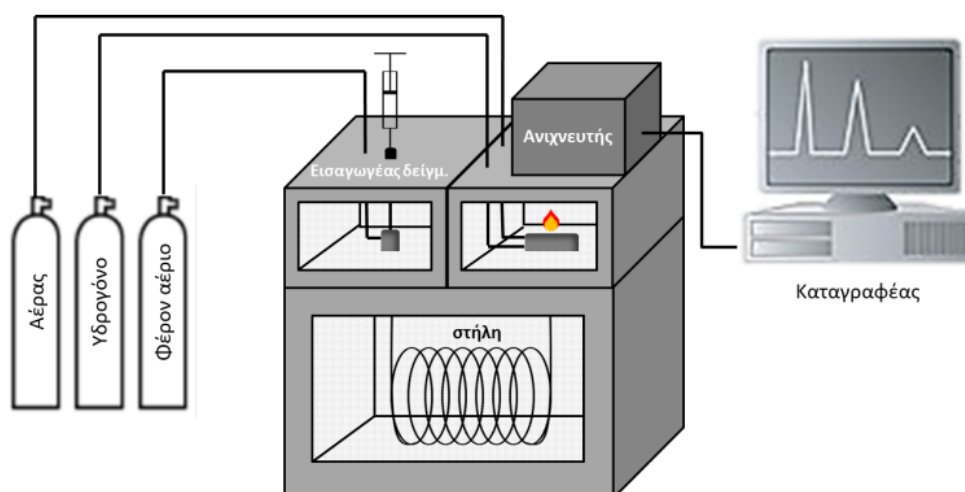
Η αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography) είναι μια ευρέως αναλυτική τεχνική που έχει ως σκοπό τον διαχωρισμό των πτητικών και ημιπτητικών συστατικών ενός μείγματος. Εκτός από ποιοτική ανάλυση συνδυάζεται και με την ποσοτική ανάλυση σε περίπτωση που ανιχνευτεί η ύπαρξη μιας ουσίας. Τα συστατικά που προσδιορίζονται συνήθως είναι οργανικά μόρια ή αέρια με μοριακό βάρος έως 1250 Da και δεν θα πρέπει να επηρεάζονται από τη θερμοκρασία που αναπτύσσεται. Σαν μέθοδος χρησιμοποιείται σε πάρα πολλούς τομείς όπως: ποιοτικό έλεγχο στην παρασκευή προϊόντων, περιβαλλοντικές αναλύσεις αλλά και στην εγκληματολογία. Η αέρια χρωματογραφία συνήθως συνδυάζεται με την τεχνική της φασματομετρίας μάζας ώστε να αναγνωριστεί χημικό συστατικό ( on-line σύζευξη).[11]

## 2.1 Αρχή λειτουργίας

Μικρή ποσότητα δείγματος τοποθετείται στον εισαγωγέα, εξατμίζεται ταχύτατα, παρασύρεται από την κινητή φάση, το φέρον αέριο, και εγχέεται στην στατική φάση, την χρωματογραφική στήλη. Η στήλη περιέχει κατάλληλο υλικό που μπορεί να επιβραδύνει τη ροή με διαφορετικό ποσοστό για κάθε συστατικό του αναλυόμενου δείγματος με τελικό αποτέλεσμα τον διαχωρισμό τους. Μετά τον διαχωρισμό τους τα συστατικά εξέρχονται από την στήλη, σε διαφορετικό, χαρακτηριστικό χρόνο το κάθε ένα και διαπερνάνε τον ανιχνευτή ο οποίος συνδέεται με το καταγραφικό. Στο καταγραφικό εμφανίζεται το σήμα που εκπέμπει κάθε ουσία σε μορφή καμπύλης. Η θέση που βρίσκεται κάθε καμπύλη εξαρτάται από το συστατικό ενώ το εμβαδό της καμπύλης είναι ανάλογο της συγκέντρωσης κάθε ουσίας. [12]

## 2.2 Κύρια συστατικά

1. Κινητή φάση: φέρον αέριο
2. Σύστημα εισαγωγής δείγματος (injector)
3. Αναλυτική στήλη
4. Ανιχνευτής
5. Καταγραφικό



Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση αέριου χρωματογράφου [15]

### 2.2.1 Κινητή φάση: φέρον αέριο

Το φέρον αέριο βρίσκεται σε φιάλη υψηλής πίεσης και είναι αυτό που παρασύρει τις διάφορες ουσίες να διαπεράσουν την στήλη. Ως φέρον αέριο χρησιμοποιείται συνήθως το ήλιο, το άζωτο, το αργό ή το υδρογόνο. Απαιτείται να είναι αδρανές για να μην αλληλοεπιδρά με τα μόρια του αναλυτή και να έχει υψηλή καθαρότητα ώστε να προστατεύεται ο χρωματογράφος και να «δοθεί» καλύτερο σήμα. Επίσης, δεν πρέπει να περιέχει οξυγόνο ή υγρασία γιατί μπορεί να οξειδωθεί ή να καταστραφεί η στήλη αντίστοιχα.[13]

### 2.2.2 Σύστημα εισαγωγής δείγματος

Το δείγμα σε υγρή μορφή εισάγεται σε έναν εισαγωγέα σε υψηλή θερμοκρασία με σκοπό να εξατμιστεί και τελικά να παρασυρθεί από το φέρον αέριο στην στήλη. Η παραλαβή του δείγματος πραγματοποιείται με σύριγγα ενώ αυτό φράζεται με ένα παχύ στρώμα θερμοανθετικού ελαστικού (septum). Το septum μπορεί να επανατρυπηθεί αρκετές φορές και να κλείσει ξανά αεροστεγώς για την αποφυγή διαρροής του δείγματος. Στην αέρια χρωματογραφία υπάρχουν δύο είδη εισαγωγέων:[13]

- Εισαγωγέας διαμοιρασμού ( Split-splitless)
- Εισαγωγέας στην κορυφή της στήλης (on-column injection)

#### Εισαγωγέας διαμοιρασμού

Split: το δείγμα εισέρχεται σε έναν θάλαμο όπου μόνο ένα τμήμα του θα περάσει τελικά στην στήλη ενώ το υπόλοιπο θα αποβληθεί. Εισέρχεται στον εισαγωγέα , θερμαίνεται, ατμοποιείται και προκαθορισμένη ποσότητα εισέρχεται στη στήλη. Η υπόλοιπη ποσότητα απορρίπτεται μέσω της βαλβίδας διαμοιρασμού.

Splitless : Στη λειτουργία μη διαμοιρασμού η βαλβίδα είναι κλειστή. Το δείγμα ακολουθεί την ίδια πορεία με το split mode με τη διαφορά ότι εισάγεται όλο στη στήλη χωρίς να απορριφθεί τμήμα του.

## Εισαγωγέας στην κορυφή της στήλης

Το δείγμα εισάγεται με σύριγγα απευθείας πάνω στην στήλη. Χρησιμοποιείται για δείγματα που φέρουν υψηλό σημείο ζέσεως και είναι θερμό-ασταθείς καθώς δεν εκτίθενται αρκετή ώρα σε υψηλές θερμοκρασίες.

### 2.2.3 Αναλυτική στήλη

Ανάλογα με το είδος των αναλύσεων αλλά και τον ανιχνευτών χρησιμοποιούνται διαφορετικές στατικές φάσεις. Κατασκευάζονται συνήθως από ανοξείδωτο χάλυβα, αλουμίνιο ή γυαλί και το μήκος τους έχει μέγεθος από 1-100m. Η στήλη είναι τοποθετημένη σε θερμαινόμενο φούρνο, η θερμοκρασία του οποίου μπορεί να μεταβάλλεται σε περίπτωση που τα αναλυόμενα συστατικά έχουν διαφορετικά σημεία ζέσεως ή μπορεί να μένει σταθερή.

Υπάρχουν δυο είδη: στήλη πλήρωσης , τριχοειδής στήλη

Στήλες πλήρωσης: Συνήθως κατασκευάζονται από ανοξείδωτο χάλυβα ή γυαλί και περιέχουν λεπτά σωματίδια στερεού υλικού που επικαλύπτονται από μη πτητική υγρή ουσία. Έχουν μεγαλύτερη χωρητικότητα δείγματος σε σύγκριση με τις τριχοειδείς στήλες, μεγαλύτερο χρόνο κατακράτησης των συστατικών αλλά μικρότερη χωρητικότητα.

Τριχοειδείς στήλες: Συνήθως κατασκευάζονται από τηγμένη πυρίτια ή ατσάλι, έχει μικρή διάμετρο και ανοιχτές άκρες. Έχουν μεγάλο μήκος με αποτέλεσμα να διαθέτουν περισσότερες θεωρητικές πλάκες και άρα να πετυχαίνουν καλύτερο διαχωρισμό σε σύγκριση με τις στήλες πλήρωσης. Διακρίνονται σε τρεις διαφορετικούς τύπους: WCOT, PLOT, SCOT ανάλογα με την επικάλυψη των εσωτερικών τοιχωμάτων.



Εικόνα 5: Απεικόνιση των τριών ειδών τριχοειδών στήλων[13a]

### 2.2.4 Ανιχνευτής

Σε αυτόν περνούν οι ενώσεις που εξέρχονται από την στήλη. Αναγνωρίζει μόνο τις ενώσεις και όχι το φέρον αέριο. Οι πιο συνήθεις ανιχνευτές είναι: Θερμικής αγωγιμότητας, ιονισμού φλόγας, σύλληψης ηλεκτρονίων, φασματομέτρο μάζας. [15],[16]

Για να θεωρηθεί ένας ανιχνευτής κατάλληλος θα πρέπει να τηρούνται τα παρακάτω χαρακτηριστικά [17]:

- Υψηλή ευαισθησία
- Σταθερότητα-επαναληψιμότητα
- Γραμμική απόκριση
- Θερμοκρασία λειτουργίας έως 400 βαθμούς κελσίου
- Σύντομο χρόνο απόκρισης
- Παρόμοια απόκριση για όλα τα συστατικά ή εξειδίκευση προς συγκεκριμένα
- Αξιοπιστία
- Να διατηρεί το δείγμα

## 3. Φασματομετρία μάζας ( Mass Spectrometry)

Η φασματομετρία μάζας είναι μια αναλυτική τεχνική αναγνώρισης αγνώστων ενώσεων, ποσοτικοποίησης γνωστών ενώσεων και καθορισμός της δομής τους. Με

τη βοήθεια της τεχνικής μπορεί να ταυτοποιηθεί το μοριακό βάρος και να συγκεντρωθούν πληροφορίες για τον μοριακό τύπο των αναλυόμενων ουσιών. Για την επίτευξη των παραπάνω απαιτείται πολύ μικρή ποσότητα δείγματος. Επίσης, σε αντίθεση με την φασματοσκοπία που χρησιμοποιεί την εκπομπή φωτός σε καθορισμένο διάστημα μηκών κύματος, η φασματομετρία μάζας χρησιμοποιεί ηλεκτρόνια. Γενικότερα, η φασματομετρία μαζών προσφέρει πληροφορίες σχετικά με[18]:

- Την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση άγνωστων μειγμάτων
- Την χημική δομή αρκετά μεγάλου αριθμού ενώσεων
- Την παρουσία και το ποσοστό ισοτόπων
- Τη δομή και τη σύσταση επιφανειών με μορφή απεικόνισης

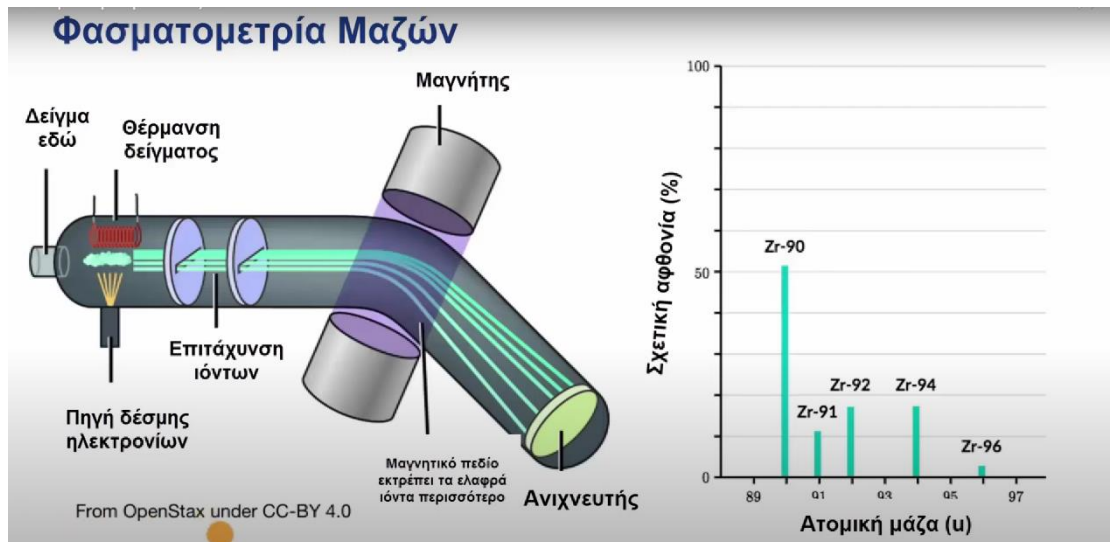
### **3.1 Αρχή λειτουργίας**

Το φασματόμετρο μάζας προκαλεί ιοντισμό των μορίων σε υψηλό κενό, ηλεκτρόνια υψηλής ενέργειας βομβαρδίζουν το αναλυόμενο δείγμα προκαλώντας την διάσπαση των μορίων του. Στη συνέχεια καταγράφονται οι μάζες των τμημάτων που έχουν προκύψει, ομαδοποιούνται τα ιόντα σύμφωνα με τις μάζες τους και τέλος οι πληροφορίες που έχουν εκμαιευτεί χρησιμοποιούνται για την ανακατασκευή το μορίου. Σε αυτήν την τεχνική περιλαμβάνεται και το φάσμα μάζας , το οποίο αποτυπώνει το φασματόμετρο σε μορφή γραφήματος. [19]

### **3.2 Οργανολογία φασματόμετρου μαζών**

Το βασικό όργανο φασματομετρίας μάζας αποτελείται από πέντε τμήματα που απεικονίζονται στην εικόνα:

1. Τμήμα εισαγωγής δείγματος
2. Πηγή ιόντων
3. Αναλυτής μαζών
4. Ανιχνευτής
5. Καταγραφικό σύστημα δεδομένων



Εικόνα 6: Βασική οργανολογία φασματομέτρου μάζας[19a]

### 3.2.1 Τμήμα εισαγωγής δείγματος

Για να γίνει η ανάλυση των ιόντων θα πρέπει να τοποθετηθεί στην πηγή ιόντων (θάλαμος ιοντισμού) μια ποσότητα μορίων του δείγματος προς ανάλυση και να ακολουθήσει ο ιοντισμός. Το δείγμα μπορεί να είναι υγρό, στερεό ή αέριο και η περισσότερη ποσότητά του θα πρέπει να βρίσκεται ή να μεταβεί σε αέρια φάση. Στη συνέχεια το δείγμα μεταφέρεται σε μεγαλύτερο θάλαμο όπου τα μόρια αερίου οδηγούνται στον θάλαμο ιοντισμού, χαμηλότερης πίεσης. Για να είναι σταθερός ο ρυθμός διαπέρασης των μορίων, το δείγμα εισέρχεται μέσω μιας μοριακής οπής. Εάν η ουσία είναι λιγότερο πτητική το σύστημα συνδέεται με έναν φούρνο που θερμαίνει το δείγμα.

### 3.2.2 Πηγή ιόντων

Στην πηγή ιόντων, το αναλυόμενο δείγμα βάλλεται από δέσμη ηλεκτρονίων ώστε τα μόρια του δείγματος να μετατραπούν σε φορτισμένα σωματίδια, να αναλυθούν και να ταυτοποιηθούν. Η παραπάνω τεχνική είναι η πιο συνηθισμένη. Άλλες τεχνικές ιοντισμού είναι οι εξής:

- ❖ Χημικός ιοντισμός

- ❖ Ιοντισμός με εκρόφηση, που χρησιμοποιείται για την ανάλυση μη πτητικών και μεγάλων μοριακού βάρους μορίων
  - i) Φασματομετρία μαζών δευτερογενών ιόντων (secondary ion mass spectrometry, SIMS)
  - ii) Βομβαρδισμός με άτομα υψηλής ταχύτητας (fast atom bombardment, FAB)
  - iii) Ιοντισμός εκρόφησης με laser υποβοηθούμενος από μήτρα (matrix-assisted laser desorption ionization, MALDI)
  - iv) Ιοντισμός με Ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization, ESI)
  - v) Ιοντισμός με θερμοψεκασμό (thermospray ionization, TSI)

### 3.2.3 Αναλυτής μαζών

Μετά τον ιοντισμό του δείγματος, ακολουθεί το τμήμα του αναλυτή όπου τα διασπασμένα πια ιόντα διαχωρίζονται ανάλογα με το κλάσμα της μάζας τους προς το φορτίο ( $m/z$ ). Ο κατάλληλος αναλυτής μαζών θα πρέπει να έχει υψηλή διακριτική ικανότητα, δηλαδή να διαχωρίζει μάζες που διαφέρουν ελάχιστα καθώς επίσης θα πρέπει να επιτρέπει την διέλευση πολλών ιόντων, ώστε να το ρεύμα ιόντων που θα περάσει να είναι ικανοποιητικά μετρήσιμο.[12]

Η διακριτική ικανότητα των αναλυτών δίνεται από τη σχέση:

$$R=m/\Delta m \text{ (1)}$$

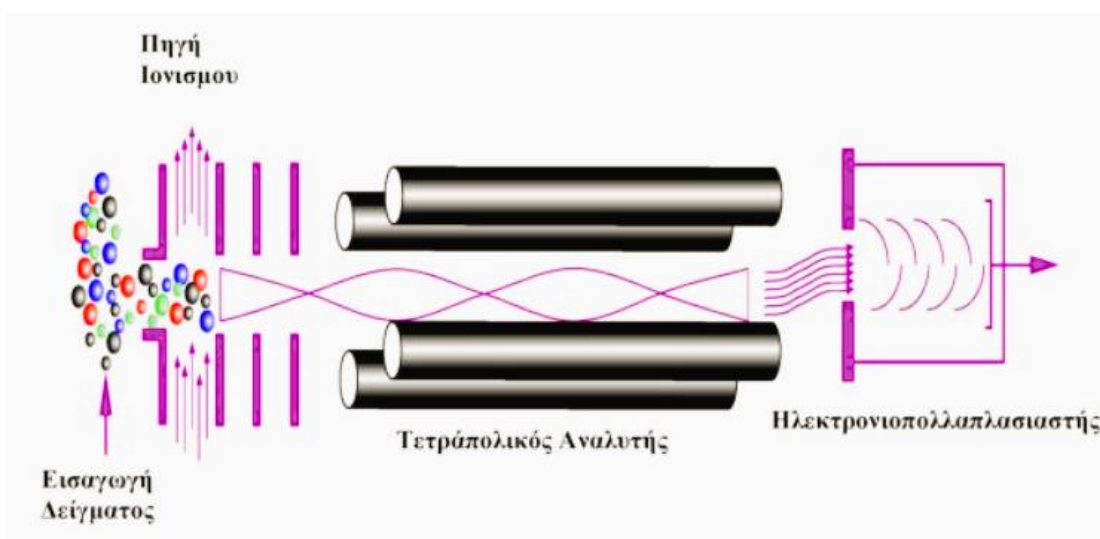
Όπου,  $\Delta m$  είναι η διαφορά μεταξύ δυο διαχωριζόμενων κορυφών και  $m$  είναι η μάζα της πρώτης κορυφής ή ο μέσος όρος και των δύο μαζών.

Ανάλογα με τη μάζα των ιόντων που εξετάζονται απαιτείται και διαφορετική διακριτική ικανότητα. Ιόντα που οι μάζες τους διαφέρουν σε κάποια δεκαδικά απαιτούν υψηλή διακριτική ικανότητα, κάποιες χιλιάδες ενώ εκείνα που διαφέρουν κατά μια μονάδα μπορούν να διακριθούν και από αναλυτή με ικανότητα μόλις 50. Το εύρος των διακριτικών ικανοτήτων είναι 500-500.000.

Οι πιο συνήθεις τύποι αναλυτών παρατίθενται παρακάτω:

- a. Μαγνητικού πεδίου, περιέχουν έναν μαγνήτη που αναγκάζει τα ιόντα που εξέρχονται από την πηγή να κινηθούν σε κυκλική τροχιά. Έτσι το κάθε ιόν με διαφορετική μάζα, θα εκτελεί διαφορετική τροχιά με ξεχωριστή ακτίνα και κεντρομόλο δύναμη
- b. Χρόνου πτήσης (time of flight), τα σωματίδια περνούν σε έναν σωλήνα χωρίς εφαρμοσμένα πεδία, με την ίδια κινητική ενέργεια. Στο τέλος του σωλήνα βρίσκεται ο ανιχνευτής στον οποίο καταφτάνουν πρώτα τα σωματίδια με την μικρότερη μάζα.

- c. Τετραπολικός αναλυτής μαζών, έχει μικρό μέγεθος, το χαμηλότερο κόστος, υψηλή ταχύτητα σάρωσης και είναι ανθεκτικός. Είναι ο συνηθέστερος αναλυτής που χρησιμοποιείται. Αποτελείται από 4 ηλεκτρικά αγωγίμους κυλίνδρους στους οποίους εφαρμόζεται συνεχώς τάση ρεύματος. Με εναλλασσόμενη ραδιοσυχνότητα τα ιόντα αναγκάζονται να μεταπηδούν και τελικά να φτάνουν στον ανιχνευτή μόνο τα ιόντα με συγκεκριμένο λόγο  $m/z$  που έχει επιλεγεί. Τα υπόλοιπα λόγω σύγκρουσης χάνουν το φορτίο τους.



Εικόνα 7: Σχηματική αναπαράσταση του τετραπολικού φασματογράφου μάζας[12]

### 3.2.4 Ανιχνευτής

Παράγει το τελικό σήμα λόγω της διέλευσης των ιόντων. Το ηλεκτρικό σήμα είναι ανάλογο του αριθμού των ιόντων και του φορτίου τους που φτάνουν στον ανιχνευτή σε συγκεκριμένη μονάδα χρόνου.

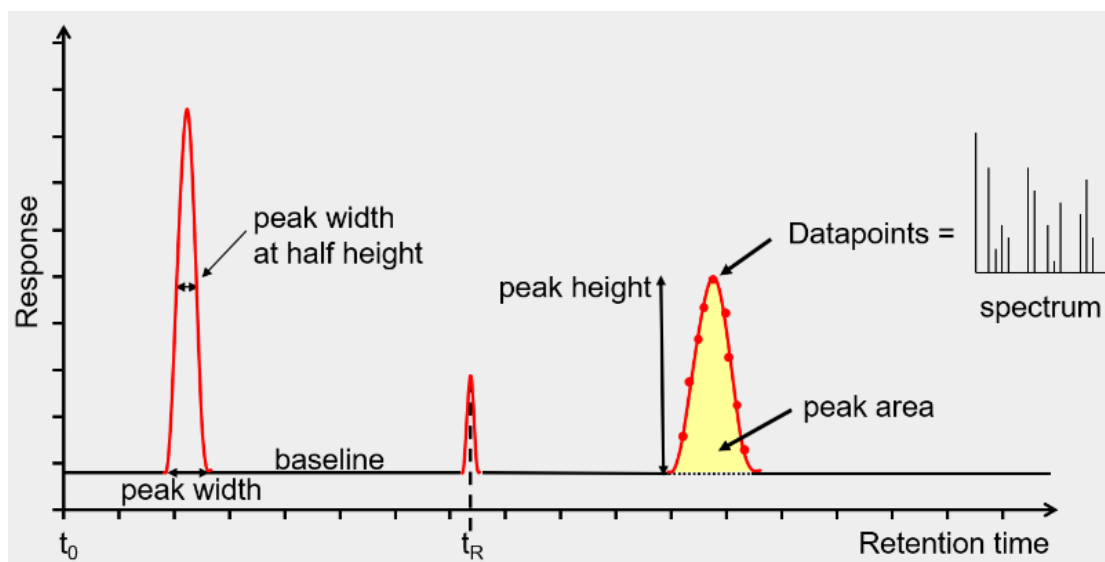
Τα είδη των ανιχνευτών που χρησιμοποιούνται είναι:

- ❖ Ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής (electron multiplier)
- ❖ Φαρανταικό κύπελλο (faradaic cup)
- ❖ Μεταλλάκτης τύπου σπινθηριστή
- ❖ Φωτογραφική πλάκα

Ο πιο αξιόπιστος και ανθεκτικός ανιχνευτής είναι ο ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής. Σε αυτόν τα ιόντα προσπίπτουν σε μία δύνοδο, παράγονται δευτερογενή ιόντα τα οποία προσπίπτουν σε μια επόμενη δύνοδο με αποτέλεσμα να ενισχύεται το ρεύμα.[18]

#### 4.Αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας

Σε αναλύσεις ρουτίνας, όπως τα μίγματα περιβαλλοντικών δειγμάτων χρησιμοποιείται ο συνδυασμός της αέριας χρωματογραφίας με την φασματομετρία μάζας. Παρέχει σημαντική ικανότητα ταυτοποίησης αγνώστων πτητικών ή ημιπτητικών συστατικών ενώ ταυτόχρονα πραγματοποιείται και η ποσοτικοποίηση μιγμάτων ενώσεων. Η ταχύτητα ροής μέσω της τριχοειδούς στήλης είναι σχετικά μικρή οπότε το αναλυόμενο συστατικό μπορεί να περνάει απευθείας στον θάλαμο ιοντισμού του φασματόμετρου. Έτσι, προκύπτει έγκυρο αποτέλεσμα ελεγμένο από δυο τεχνικές γεγονός που οδηγεί στην εξοικονόμηση χρόνου αλλά και σε αξιοπιστία.



Εικόνα 8: Χρωματογράφημα από Αέριο χρωματογράφο συζευγμένο με φασματομετρία μάζας [17a]

Παρακάτω παρουσιάζονται τα πλεονεκτήματα και των δύο τεχνικών αναλύσεων στη συνδυαστική δράση τους και είναι η απόδειξη για την μεγάλη συνεισφορά τους στον τομέα της Αναλυτικής Χημείας. [18]

Για την αέρια χρωματογραφία ισχύουν τα εξής:

- Η εφαρμογή ενός ολικού ανιχνευτή (universal detector)
- Η μεγάλη ευαισθησία της τεχνικής σε χαμηλά επίπεδα συγκεντρώσεων δειγμάτων (ppm, ppb, ppt)
- Η μεγάλη εκλεκτικότητα της μεθόδου (απόλυτη ταυτοποίηση)

- Η δυνατότητα ταυτοποίησης άγνωστων ενώσεων σε άγνωστα δείγματα
- Η παρουσία μεγάλης διακριτικής ικανότητας
- Η υψηλή ακρίβεια ποσοτικής ανάλυσης

Ενώ για την φασματομετρία μάζας:

- Η άμεση εισαγωγή μη πτητικών ενώσεων χωρίς την ανάγκη τροποποίησης του μορίου της προσδιοριζόμενης ένωσης
- Η εκμετάλλευση της υψηλής διαχωριστικής ικανότητας
- Ο περιορισμός ανεπιθύμητων φαινομένων (λ.χ. μείωση της απόδοσης ιοντισμού λόγω της επίδρασης υποστρώματος) λόγω της κλασματοποίησης περίπλοκων δειγμάτων
- Υψηλή ακρίβεια (μοριακά βάρη με ακρίβεια τέταρτου δεκαδικού ψηφίου)

## 5. Προκατεργασία δείγματος

Η προκατεργασία του δείγματος είναι από τα πιο σημαντικά στάδια της ανάλυσης στην τεχνική GC-MS και αποσκοπεί στην παρασκευή ενός ομογενούς και αναπαραγωγίμου διαλύματος το οποίο στο τέλος θα τοποθετηθεί στην χρωματογραφική στήλη χωρίς να διακινδυνεύεται η ακεραιότητά της. Αποτελεί το πιο χρονοβόρο στάδιο της ανάλυσης τόσο για την ανάπτυξή της όσο και για την εκτέλεσή της. [20]

Στόχος της προκατεργασίας είναι η λήψη μιας ποσότητας του δείγματος προς μελέτη η οποία θα είναι σχετικά καθαρή, χωρίς προσμείξεις από άλλες παρεμποδίζουσες ουσίες, θα είναι ακίνδυνη για τη στήλη και κυρίως θα είναι συμβατή με τη μέθοδο GC-MS.

Η διαδικασία της προκατεργασίας έχει ως πρώτο στάδιο την λήψη του δείγματος και τελικό την έγχυση αυτού στον χρωματογράφο. [20]

Υπάρχουν διάφορες προσεγγίσεις στην προκατεργασία δειγμάτων οι οποίες εξαρτώνται από τη φάση των αναλυόμενων δειγμάτων.

- ❖ πτητικές οργανικές ουσίες και αέρια, γίνεται εγκλωβισμός σε στερεό ή υγρό υπόστρωμα
- ❖ υγρά δείγματα, εκχύλιση στερεής φάσης, υγρό- υγρό εκχύλιση, αραιώση, εξάτμιση, απόσταξη, μικροδιάλυση, λυοφιλίωση
- ❖ εναιωρήματα: διήθηση, φυγοκέντρηση, κατακρήμνιση [20]

## 5.1 Υγρό-υγρό εκχύλιση

Η εκχύλιση υγρού- υγρού στηρίζεται στην κατανομή μιας διαλυμένης ουσίας μεταξύ δύο υγρών τα οποία πρακτικά δεν αναμειγνύονται μεταξύ τους. Συνήθως το μίγμα περιλαμβάνει έναν υδατικό και έναν οργανικό μη αναμίξιμο διαλύτη. Οι δύο διαλύτες αφήνεται να αλληλεπιδράσουν με τις ενώσεις του δείγματος προκειμένου να επιτευχθεί η εκχύλιση τους από τον υδατικό διαλύτη στον οργανικό, με τον οποίο έχουν μεγαλύτερη συγγένεια. Η ουσία κατανέμεται μεταξύ των δύο υγρών σε συγκεκριμένη αναλογία και αποκαθίσταται ισορροπία. Έπειτα η οργανική φάση, η οποία περιέχει τις επιθυμητές ενώσεις, εξατμίζεται μέχρι ξηρού και στη συνέχεια επαναδιαλύεται σε ένα συμβατό με το αναλυτικό σύστημα διαλύτη. [21]

Η αποτελεσματικότητα της συγκεκριμένης προκατεργασίας εξαρτάται από τον διαλύτη εκχύλισης, την ιονική ισχύ του δείγματος καθώς και του pH. Ένας ορθός διαλύτης δεν αντιδρά με την προς εκχύλιση ουσία, δεν είναι τοξικός και θα πρέπει να διαλύει σε υψηλό ποσοστό την αναλυόμενη ουσία και σε χαμηλό τις παρεμποδίζουσες. Επιπλέον, η ουσία που εκχυλίζεται θα πρέπει να μπορεί να ανακτηθεί εύκολα από τον διαλύτη εκχύλισης, είτε με απομάκρυνση του διαλύτη είτε με επανεκχύλιση της ουσίας σε νερό. [21]

Συγκεκριμένα, στην εκχύλιση υγρού-υγρού στο δείγμα αίματος προστίθεται ένα ρυθμιστικό διάλυμα για την ρύθμιση του pH, ακολουθεί η προσθήκη διαλύτη ή συστήματος διαλυτών για να παραλάβει το φάρμακο από το την υδατική φάση.[22]

## **6. Βιβλιογραφική Ανασκόπηση**

Ανατρέχοντας στην βιβλιογραφική βιβλιοθήκη διαπιστώθηκε σημαντικός αριθμός άρθρων επισκόπησης και μεθοδολογίας αναφερόμενοι στη μεθαδόνη σε δείγματα χρηστών αλλά και στις αναλυτικές διαδικασίες που εκτελέστηκαν. Στον παρακάτω πίνακα συμπεριλαμβάνεται ένα μέρος αυτών που πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση GC-MS.

Προκατεργασία	Εσωτερικό πρότυπο	Κινητή φάση	Στήλη	Ταχύτητα ροής	Βιβλιογραφία
Buffer: KOH (pH 10) Διαλύτης: n-hexane-2-propanol  Φυγοκέντρηση και εξάτμιση σε άζωτο του υπερκείμενου  Επαναδιάλυση σε μεθανόλη	διφαινυλαμίνη	Ήλιο	TR-5MS, 5% phenyl polysilphenylene siloxane, 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm film thickness	1 mL/min	[23]
Buffer: Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (pH 6.9)  Διαλύτης: οξικός αιθυλεστέρας-διχλωρομεθάνιο  Μεταφορά οργανικής φάσης σε ακετονιτρίλιο – ισοπροπανόλη  Φυγοκέντρηση και εξάτμιση σε απαγωγέα καπνού  Επαναδιάλυση σε χλωροφόρμιο	άγνωστο	Ήλιο	RTX-5MS (5 % diphenyl-95 % dimethyl polysiloxane, 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm film thickness	1,5 mL/min	[24]
Buffer: KOH (pH 10)  Διαλύτης: hexane-2-propanol  Φυγοκέντρηση και εξάτμιση σε μεθανόλη	διφαινυλαμίνη	Ήλιο	TR-5MS, 15m×0.25mm, 0.25 μm film thickness	1 mL/min	[25]
Buffer: KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 9,5 ) Διαλύτης: Ακετόνη	Methadone D-9	Ήλιο	5% phenyl)-methylpolysiloxane, 30 m × 0.25 mm, 0.25 μm	1 mL/min	[26]

Πίνακας 2: Βιβλιογραφική αναφορά μεθόδων ποσοτικοποίησης μεθαδόνης σε δείγματα ορού αίματος με τη χρήση GC-MS.

Συγκρίνοντας τις παραπάνω αναφορές με την πειραματική διαδικασία της παρούσας πτυχιακής παρατηρείται κοινή μεθοδολογία στα στάδια της προκατεργασίας. Το πλεονέκτημα που προσφέρει η μέθοδος που προτείνεται έγκειται στην εξοικονόμηση χρόνου, καθώς εξάγεται αποτέλεσμα πιο σύντομα από τους χρόνους που απαιτούνται στις αναφορές, καθώς επίσης και στην εξοικονόμηση υλικών και αναλώσιμων. Η μείωση του χρόνου οδηγεί σε μέθοδο πιο φιλική για το περιβάλλον.

## **B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **1. Σκοπός της εργασίας**

Ο σκοπός της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας ήταν η δημιουργία και η επικύρωση μεθόδου ταυτοποίησης και ποσοτικοποίησης της μεθαδόνης με βασικά χαρακτηριστικά την αξιοπιστία της και την γρήγορη περάτωσή της. Για την επίτευξη αυτού ήταν απαραίτητη η χρήση Αέριου χρωματογράφου συζευγμένο με Φασματομετρία μάζας ( GC-MS).

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της μεθαδόνης είναι απαραίτητος λόγω της πολυπλοκότητας της φαρμακολογίας της, καθώς χαρακτηρίζεται από μεγάλο εύρος φαρμακοκινητικών και φαρμακοδυναμικών ιδιοτήτων.

Σε όλα τα στάδια ανάπτυξης της μεθόδου, δοκιμάστηκε ένα πλήθος παραμέτρων ώστε να επιλεγεί τελικά η κατάλληλη όσον αφορά το θερμοκρασιακό πρόγραμμα, τον διαλύτη εκχύλισης και επαναδιάλυσης και το pH. Ακολούθησε η επικύρωση της μεθόδου σύμφωνα με τις παραμέτρους που χρησιμοποιούνται στην αναλυτική χημεία ώστε να αποδειχθεί πως η μέθοδος οδηγεί σε αξιόπιστα αποτελέσματα και τέλος η μέθοδος αξιοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό της μεθαδόνης σε πραγματικά μεταθανάτια δείγματα ορού.

## 2. Οργανολογία, Αντιδραστήρια και Διαλύτες

### 2.1 Πρότυπα διαλύματα, Αντιδραστήρια και Διαλύτες

Για την πραγματοποίηση της εργασίας χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω πρότυπα διαλύματα, αντιδραστήρια και διαλύτες:

- ▪ Μεθανόλη, LC–MS Grade, PanReac AppliChem ITW Reagents
- ▪ Οξικός βουτυλεστέρας, 99+%, Alfa Aesar
- ▪ Οξικός αιθυλεστέρας, HPLC grade, 99.8+%, CHEM-LAB
- ▪ Ανθρακικό κάλιο (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), PRS Panreac
- ▪ Πρότυπο αντιδραστήριο νορδιαζεπάμης-d<sub>5</sub>, Lipomed Inc.
- ▪ Methadone, working standard, ASTRA Sodertalje, Sweden

### 2.2 Όργανα, συσκευές και λοιπός εξοπλισμός

- ▪ Πιπέτα των 2 – 20 μL, erpendorf Research plus
- ▪ Πιπέτα των 20 – 200 μL, erpendorf Research plus
- ▪ Πιπέτα των 100 – 1000 μL, erpendorf Research plus
- ▪ Πλαστικά φιαλίδια (erpendorf), 2mL, Sarstedt (Germany)
- ▪ Γυάλινο φιαλίδιο 4 mL Screw Neck Vial, 45 x 14.7 mm, amber glass, 1<sup>st</sup> hydrolytic class, Lab Logistics Group GmbH
- ▪ GC/MS γυάλινα φιαλίδια (vials), 1,5 mL, Short Thread Vial, 32 X 11.6 mm, clear glass, 1st hydrolytic class, wide opening, Lab Logistics Group GmbH
- ▪ 13mm Combination Seal: PP Screw Cap, black, closed top: RedRubber / PTFE beige, 45o shore A, 1,0 mm, Lab Logistics Group GmbH

- ▪ 9mm Combination Seal: PP Short Thread Cap, blue, centre hole: Natural Rubber red – orange / TEF transparent 60o shore A, 1mm, Lab Logistics Group GmbH
- ▪ Εισαγωγέας δείγματος, 0,1 mL Micro Insert, 31 x 6 mm, clear glass, 1st hydrolytic class, 1mm top, Lab Logistics Group GmbH
- ▪ Αναδευτήρας, Classic Advanced Vortex Mixer, Velp Scientifica
- ▪ Αναδευτήρας, lbx instruments, VOS series
- ▪ Φυγόκεντρος, SIGMA 2 - 16P
- ▪ MILLIPORE, Direct-Q® 3 UV with Pump
- ▪ Αναλυτικός ζυγός ακριβείας, (Electronic Balance), CHAUS®, PR series

### 2.3 Σύστημα GC–MS

Το αναλυτικό σύστημα της αέριας χρωματογραφίας συζευγμένη με φασματογράφο μάζας που χρησιμοποιήθηκε για τις αναλύσεις αποτελείται από:

- Σύστημα αέριου χρωματογράφου 7890A (GC), AgilentTechnologies
- Φασματογράφο μαζών MS 5975C inertXL EI/CI MSD with Triple-Axis Detector, Agilent Technologies
- Αυτόματο δειγματολήπτη CTCpal (CTC –CH 4222, AnalyticalSwitzerland)
- Εισαγωγή δείγματος PVT inlet, Agilent Technologies

- Μικροσύριγγα, CTC 10 ul, pt 2 Combi/GC-Pal, Agilent Technologies

## **2.4 Βιολογικά δείγματα**

Για όλα τα πειράματα (για την ανάπτυξη και για την επικύρωση της μεθόδου) χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ορού αίματος χωρίς την ύπαρξη φαρμάκων και άλλων ουσιών (blank serum). Η μέθοδος που αναπτύχθηκε στη συνέχεια εφαρμόστηκε σε πραγματικά ανθρώπινα νεκροτομικά δείγματα.

## **3. Ανάπτυξη αναλυτικής μεθόδου GC-MS**

### **3.1 Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων**

Για την ανάπτυξη της αναλυτικής μεθόδου παρασκευάστηκε πυκνό πρότυπο διάλυμα μεθαδόνης 1000 ppm (mg/L). Αρχικά ζυγίστηκε η σκόνη μεθαδόνης σε αναλυτικό ζυγό ακριβείας για την παραλαβή κατάλληλης ποσότητας που χρειάστηκε και έπειτα έγινε ανάμειξη με διαλύτη ( μεθανόλη) ώστε να προκύψει η επιθυμητή συγκέντρωση. Ακολούθησε ανάδευση του διαλύματος στη συσκευή vortex για την βέβαιη διάλυση της μεθαδόνης.

Έπειτα, χρειάστηκε να δημιουργηθεί διάλυμα συγκέντρωσης 1 ppm οπότε με διαδοχικές αραιώσεις παράχθηκαν 4 πρότυπα διαλύματα τελικού όγκου 200μl με βαθμίδωση συγκέντρωσης ανά δεκάδα (1000ppm, 100ppm, 10ppm, 1ppm) 20μl μεθαδόνης το καθένα και συμπλήρωση με μεθανόλη έως ότου επιτευχθεί ο τελικός όγκος.

Στη συνέχεια με κριτήριο την βιβλιογραφική ανασκόπηση σχετικά με τα τοξικά και τα θεραπευτικά επίπεδα μεθαδόνης στο αίμα παρασκευάστηκαν 6 διαλύματα για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης στην οποία συμπεριλήφθηκαν τα ανώτερα θεραπευτικά επίπεδα και τα κατώτερα τοξικά. Βάση της καμπύλης που παράχθηκε πραγματοποιήθηκαν οι υπολογισμοί συγκεντρώσεων στα πραγματικά μεταθανάτια δείγματα.

### 3.2 Παράμετροι GC-MS

Παράμετροι GC-MS	
Ένεση	Splitless
Στήλη	J&W 19091S-433UI: 325οC: 29,95 m x 250 μm x 0,25 μm
Πίεση	18,9 psi

Πίνακας 3α: παράμετροι εισαγωγή

	Φούρνος	
Ροή Φέροντος Αερίου	1,2mL/min	
Χρόνος ανάλυσης	17,5 min	
Θερμοκρασιακό πρόγραμμα	Αρχική Θερμοκρασία 120°C	Χρόνος παραμονής 4 min
	Αύξηση στους 300 °C με ρυθμό 35°C/min	Χρόνος παραμονής 4 min
	Αντίθετη ροή στους 300 °C	10 min

Πίνακας 3β: Παράμετροι εισαγωγή

### 3.3 Θερμοκρασιακό πρόγραμμα

Ακολουθήσε επιλογή του κατάλληλου θερμοκρασιακού προγράμματος κάνοντας μικροαλλαγές στις παραμέτρους για κάποιες αναλύσεις με στόχο την μείωση του συνολικού χρόνου.

Αρχική δοκιμή:

Solvent delay (min)	Temperature (°C)		Rate °C/min	Hold (min)	Run time (min)
	Αρχική	Τελική			
3.50	120	300	20	10	12

Πίνακας 4: Αρχικές συνθήκες GC-MS

Τελική δοκιμή:

Solvent delay (min)	Temperature (°C)		Rate °C/min	Hold (min)	Run time (min)
	Αρχική	Τελική			
3.50	120	300	20	3	7,5

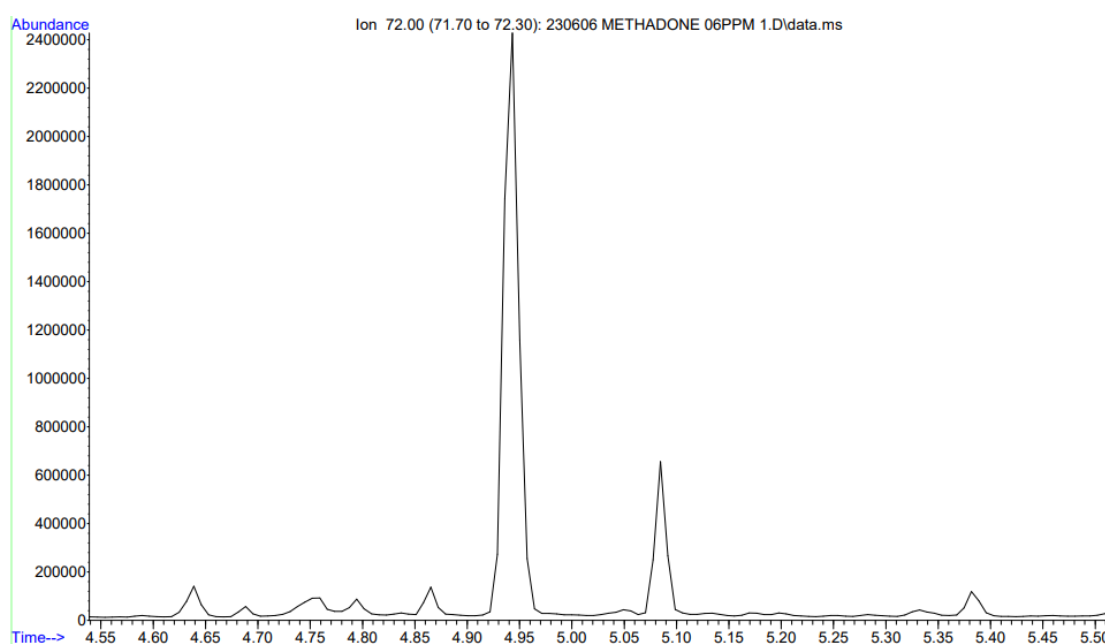
Πίνακας 5: Τελικές συνθήκες GC-MS

Για τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της επιλεκτικής παρακολούθησης ιόντων (SIM) για την ανίχνευση και την ταυτοποίηση της μεθαδόνης. Στον παρακάτω πίνακα αποτυπώνεται ο χρόνος έκλουσης (Rt) και τα πραγματικά ιόντα της μεθαδόνης.

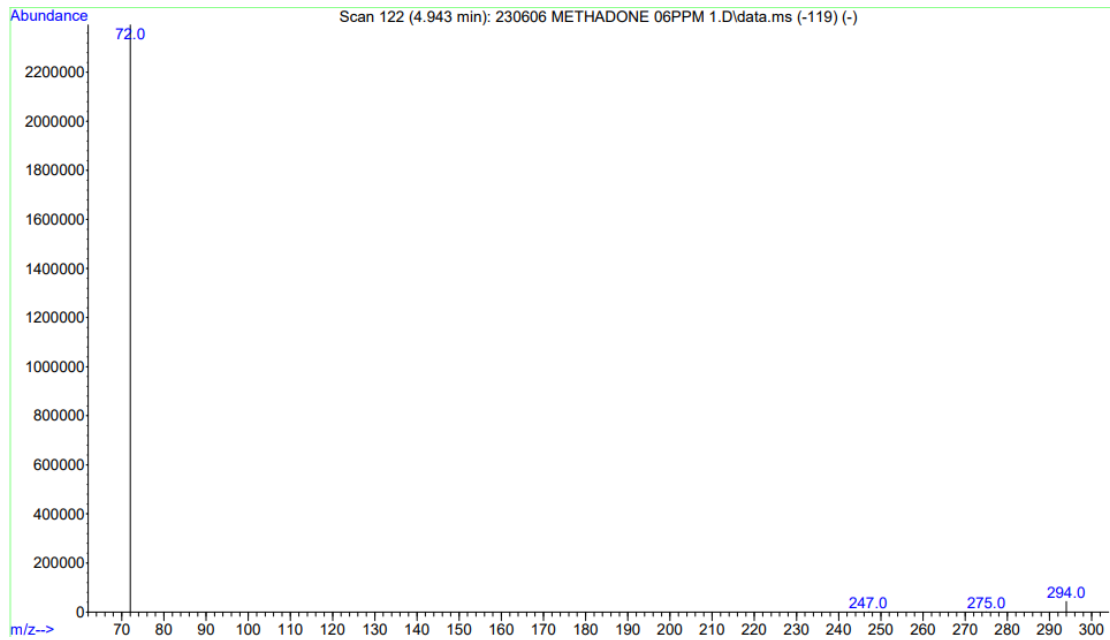
Ένωση	Χρόνος Έκλουσης (Rt) (min)	Ιόν Ποσοτικοποίησης	Ιόν Ταυτοποίησης
Μεθαδόνη	4,943	72	72

Πίνακας 6: Χαρακτηριστικά ιόντα της μεθαδόνης και χρόνος έκλουσης αυτής

Για την μεθαδόνη, το ιόν ποσοτικοποίησης και το ιόν ταυτοποίησης είναι κοινό, το 72. Παρακάτω απεικονίζεται το χρωματογράφημα της ένωσης της μεθαδόνης καθώς και το φάσμα.

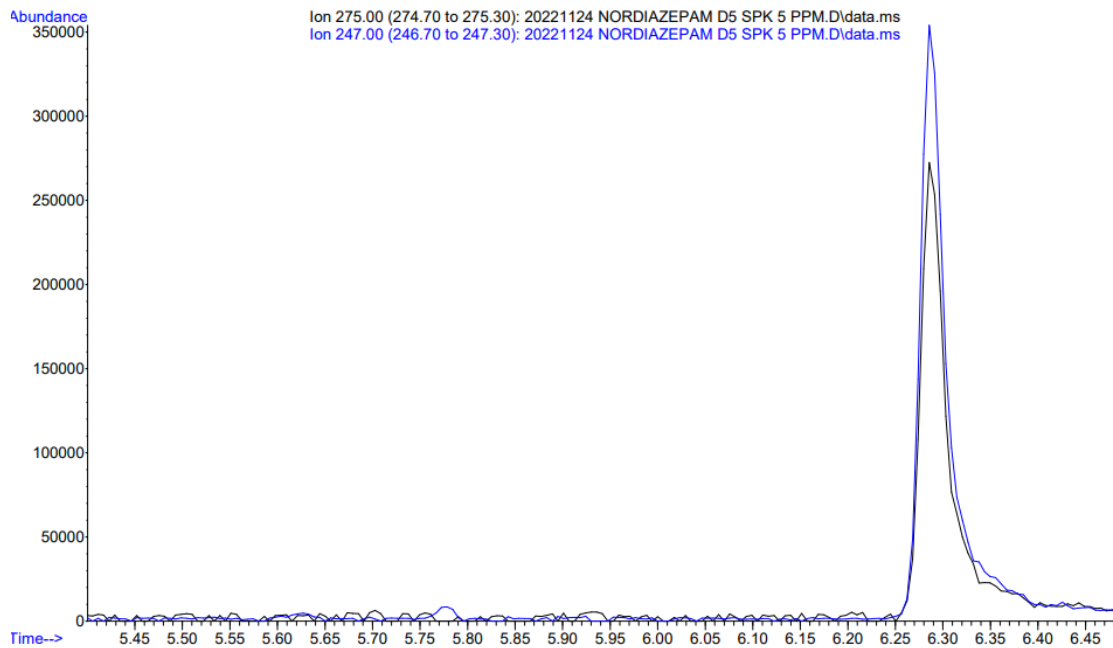


Εικόνα 9: Χρωματογράφημα μεθαδόνης σε επιμολυσμένο λευκό δείγμα ορού αίματος σε συγκέντρωση 0,6 mg/L με πρόγραμμα SIM.

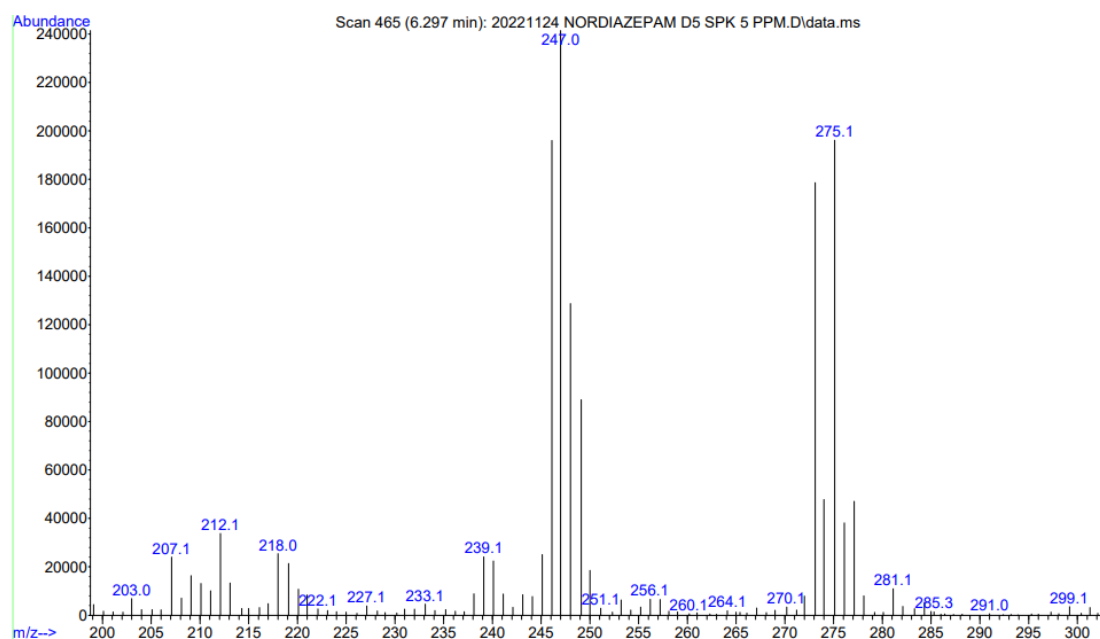


Εικόνα 10: Φάσμα μαζών μεθαδόνης σε επιμολυσμένο λευκό δείγμα ορού αίματος σε συγκέντρωση 0,6 mg/L με πρόγραμμα SIM

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της μεθαδόνης χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο η νορδιαζεπάμη D-5 με χαρακτηριστικά ιόντα το 275 και το 247. Ο χρόνος έκλυσης της νορδιαζεπάμης ήταν 6,297 min.



Εικόνα 11: Χρωματογράφημα εσωτερικού προτύπου νορδιαζεπάμης συγκέντρωσης 5 mg/L σε λευκό δείγμα ορού αίματος.



Εικόνα 12: Φάσμα μαζών εσωτερικού προτύπου νορδιαζεπάμης d-5

## 4. Βελτιστοποίηση αναλυτικής μεθόδου

### 4.1 Διαλύτης εκχύλισης

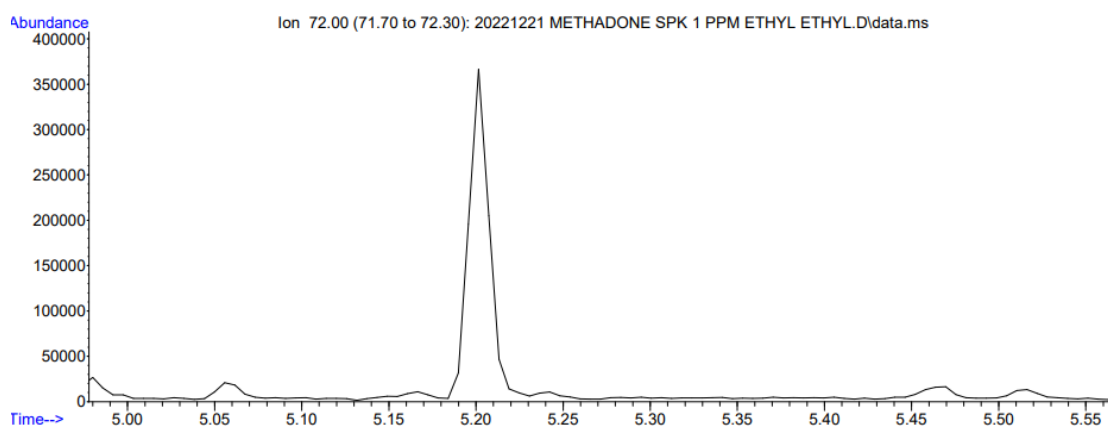
Για να εξάγουμε τα βέλτιστα αποτελέσματα από την ανάλυση έγιναν διάφορες δοκιμές στο στάδιο της προκατεργασίας με στόχο την επιλογή του διαλύτη στον οποίο θα έχουμε την μέγιστη διάλυση της μεθαδόνης. Ως διαλύτης εκχύλισης χρησιμοποιήθηκε ο οξικός αιθυλεστέρας καθώς η μεθανόλη είναι αναμείξιμη με το νερό οπότε δεν θα μπορούσε να προκύψει πλήρης διαχωρισμός φάσεων με αποτέλεσμα να μην γίνεται παραλαβή της οργανικής φάσης και άρα χρήση του αναλυτή GC-MS. Στην επαναδιάλυση χρησιμοποιήθηκαν ως διαλύτες ο οξικός αιθυλεστέρας, ο οξικός βουτυλεστέρας και η μεθανόλη. Ο βέλτιστος διαλύτης πρέπει να είναι αρκετά πτητικός ώστε να εξατμιστεί πλήρως στο στάδιο της εξάτμισης, μειώνοντας έτσι τον συνολικό χρόνο ανάλυσης. Αρχικά, σε 400μL καθαρού ορού αίματος προστέθηκαν 10μL IS, επιμόλυνση 10μL 1mg/L, 200μL buffer  $K_2CO_3$  και 1000μL οξικός αιθυλεστέρας. Αφού ανακινήθηκαν στο Vortex, φυγοκεντρήθηκαν για δέκα λεπτά στις 10.000 στροφές.

Έπειτα παραλήφθηκε η οργανική φάση και εξατμίστηκε υπο ρεύμα αζώτου. Στη συνέχεια έγιναν οι δοκιμές επαναδιάλυσης :

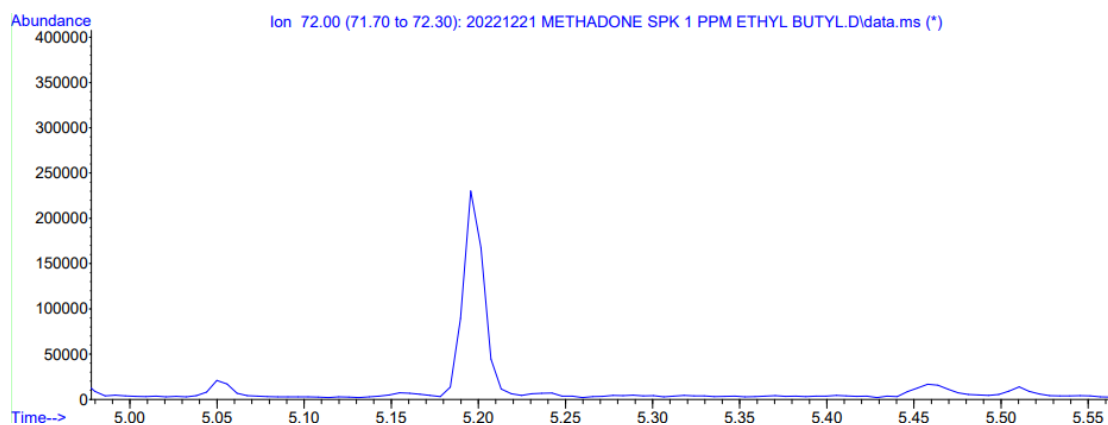
- Διάλυμα 1: Διαλύτης εκχύλισης , οξικός αιθυλεστέρας και επαναδιάλυση σε 50μL οξικού αιθυλεστέρα
- Διάλυμα 2: Διαλύτης εκχύλισης, οξικός αιθυλεστέρας και επαναδιάλυση σε 50μL οξικού βουτυλεστέρα
- Διάλυμα 3: Διαλύτης εκχύλισης, οξικός αιθυλεστέρας και επαναδιάλυση σε 50μL μεθανόλης.

Έπειτα, τα δείγματα αναλύθηκαν στο GC-MS.

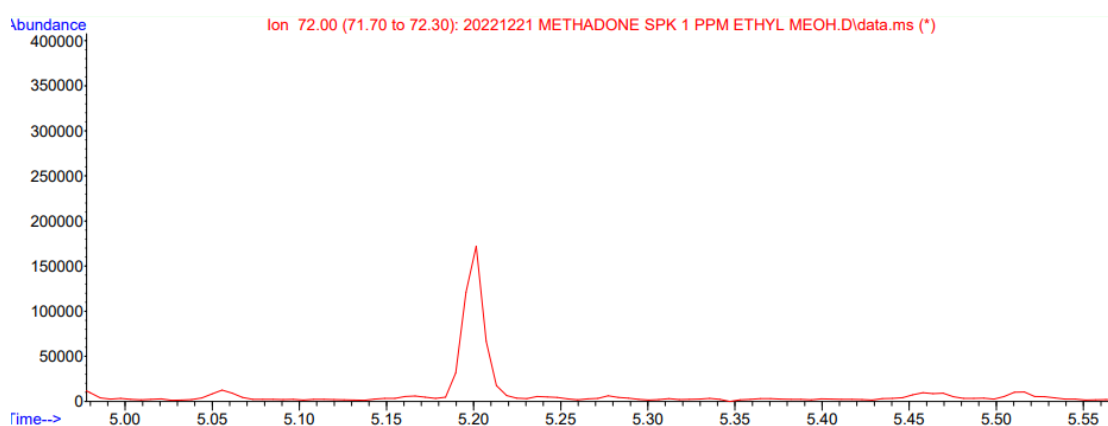
Βάσει όσων έχουν αναφερθεί για τις ιδιότητες των διαλυτών αλλά και των αποτελεσμάτων που παρουσιάζονται παρακάτω καταλληλότερος κρίθηκε ο οξικός αιθυλεστέρας και ως διαλύτης εκχύλισης και επαναδιάλυσης . Στην επαναδιάλυση με οξικό βουτυλεστέρα δεν πραγματοποιήθηκε πλήρης διάλυση και χρειάστηκε αρκετός χρόνος αναμονής ενώ η μεθανόλη έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα, όμως όχι τόσο υψηλή κορυφή στο GC-MS όσο ο οξικός αιθυλεστέρας.



Εικόνα 13: Χρωματογράφημα με το χαρακτηριστικό ιόν της μεθαδόνης ( $m/z$  72) στην επαναδιάλυση με οξικό αιθυλεστέρα



Εικόνα 14: Χρωματογράφημα με το χαρακτηριστικό ιόν της μεθαδόνης ( $m/z$  72) στην επαναδιάλυση με οξικό βουτυλεστέρα

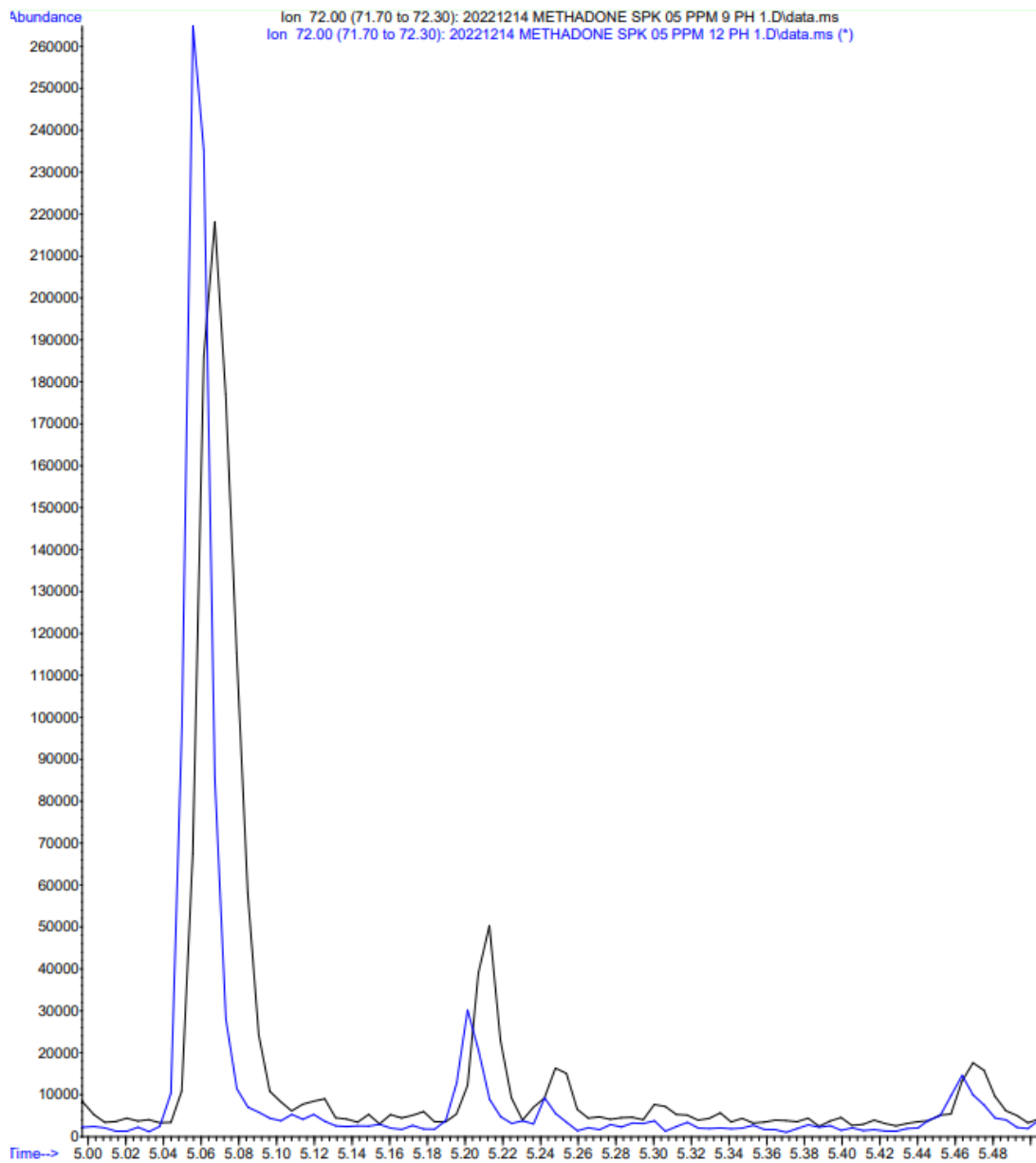


Εικόνα 15: Χρωματογράφημα με το χαρακτηριστικό ιόν της μεθαδόνης ( $m/z$  72) στην επαναδιάλυση με μεθανόλη

## 4.2 Επιλογή pH

Για την ορθότερη επιλογή του pH έγινε παρασκευή επιμολυσμένων (spiked) δειγμάτων συγκέντρωσης 0,5 mg/L. Σε 400ml ορού αίματος προστέθηκαν 20μl νορδιαζεπάμης (IS) 1ppm, έγινε επιμόλυνση 20μl 0,5ppm. Στη συνέχεια σε κάθε φιαλίδιο προστέθηκαν 250μl buffer ( $K_2CO_3$ ) pH 9 και pH 12 αντίστοιχα. Έπειτα τα δείγματα ανακινήθηκαν με τη χρήση Vortex για δέκα λεπτά και φυγοκεντρήθηκαν για ακόμα δέκα λεπτά στις 10.000 στροφές. Με το πέρας της φυγόκεντρου παραλήφθηκε η οργανική φάση, τοποθετήθηκε σε γυάλινο φιαλίδιο και ακολούθησε εξάτμιση υπο ρεύμα αζώτου. Μετά την εξάτμιση έγινε επαναδιάλυση σε 50μL οξικού αιθυλεστέρα και τα δείγματα αναλύθηκαν στο GC-MS.

Από τα αποτελέσματα, διεξάχθηκε το συμπέρασμα ότι το κατάλληλο pH είναι το 12 καθώς σε pH 9 παρατηρήθηκε πλατό.



Εικόνα 16: Χρωματογράφημα μεθαδόνης σε pH9 και pH 12, μάρκο και μπλέ αντίστοιχα

## 5. Τελική βέλτιστη μέθοδος

### 5.1 Παρασκευή επιμολυσμένων (spiked) δειγμάτων

Η παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα βήματα στην ανάπτυξη μιας αναλυτικής μεθόδου καθώς βάσει αυτών θα σχηματιστεί η πρότυπη καμπύλη που αργότερα θα χρησιμοποιηθεί ως μέσο για την ποσοτικοποίηση πραγματικών δειγμάτων.

Σε ένα πλαστικό φιαλίδιο Eppendorf μεταφέρονται 400μL λευκού δείγματος αίματος στο οποίο δεν περιλαμβάνεται η ουσία που πρόκειται να ανιχνευτεί, προστίθενται 10μL εσωτερικού προτύπου νορδιαζεπάμης 10mg/L και γίνεται επιμόλυνση με 20μL πρότυπων διαλυμάτων μεθαδόνης γνωστών διαφορετικών συγκεντρώσεων ώστε στον τελικό όγκο (400μL) του κάθε δείγματος να έχουμε την επιθυμητή συγκέντρωση μεθαδόνης. Στη συνέχεια, προστίθενται 200μL buffer K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH 12 και 1000μL οξικού αιθυλεστέρα. Τα δείγματα αναδεύονται για 10 λεπτά στο Vortex και έπειτα φυγοκεντρούνται για δέκα λεπτά στις 10.000 στροφές. Έπειτα, παραλαμβάνονται 800μL οργανικής φάσης, τοποθετούνται σε γυάλινο φιαλίδιο και εξατμίζονται υπο ρεύμα αζώτου. Ακολουθεί επαναδιάλυση σε 50μL οξικού αιθυλεστέρα, παραλαβή του διαλύματος, εισαγωγή σε γυάλινο εισαγωγέα δείγματος και ξανα τοποθέτηση στο γυάλινο φιαλίδιο. Τέλος, τα φιαλίδιο εισάγεται στο GC-MS και είναι έτοιμο για ανάλυση.

### 5.2 Προκατεργασία δείγματος

Σε ένα πλαστικό φιαλίδιο Eppendorf μεταφέρονται 400μL λευκού δείγματος αίματος στο οποίο δεν περιλαμβάνεται η ουσία που πρόκειται να ανιχνευτεί, προστίθενται 10μL εσωτερικού προτύπου νορδιαζεπάμης 10mg/L και γίνεται επιμόλυνση με 20μL πρότυπων διαλυμάτων μεθαδόνης γνωστών διαφορετικών συγκεντρώσεων ώστε στον τελικό όγκο (400μL) του κάθε δείγματος να έχουμε την επιθυμητή συγκέντρωση μεθαδόνης. Στη συνέχεια, προστίθενται 200μL buffer K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH 12 και 1000μL οξικού αιθυλεστέρα. Τα δείγματα αναδεύονται για 10 λεπτά στο Vortex και έπειτα φυγοκεντρούνται για δέκα λεπτά στις 10.000 στροφές. Έπειτα, παραλαμβάνονται 800μL οργανικής φάσης, τοποθετούνται σε γυάλινο φιαλίδιο και εξατμίζονται υπο ρεύμα αζώτου. Ακολουθεί επαναδιάλυση σε 50μL οξικού αιθυλεστέρα, παραλαβή του διαλύματος, εισαγωγή σε γυάλινο εισαγωγέα δείγματος και ξανα τοποθέτηση στο γυάλινο φιαλίδιο. Τέλος, τα φιαλίδιο εισάγεται στο GC-MS και είναι έτοιμο για ανάλυση.

## 6. Επικύρωση αναλυτικής μεθόδου

Ο βασικότερος στόχος της επικύρωσης μιας αναλυτικής μεθόδου είναι η απόδειξη πως η μέθοδος ενδείκνυται για τον σκοπό που δημιουργείται, είναι αξιόπιστη και ποιοτική. Οι παράμετροι επικύρωσης που θα μελετηθούν για τη συγκεκριμένη αναλυτική μέθοδο είναι οι εξής:[20]

- Εκλεκτικότητα (Selectivity)
- Γραμμικότητα (Linearity)
- Όριο ανίχνευσης (Limit of detection, LOD)
- Όριο ποσοτικοποίησης (Limit of quantification, LOQ)
- Ακρίβεια - πιστότητα (Precision)
- Ορθότητα (Trueness)

### 6.1 Εκλεκτικότητα

Η εκλεκτικότητα είναι η ικανότητα της μεθόδου να προσδιορίζει αποκλειστικά και επιλεκτικά μόνο την ουσία που προορίζεται να ταυτοποιηθεί ανάμεσα σε άλλες παρόμοιας δομής ή στα συστατικά του δείγματος. Δεν θα πρέπει να επηρεάζεται από παρεμβαλόμενες ουσίες. [20]

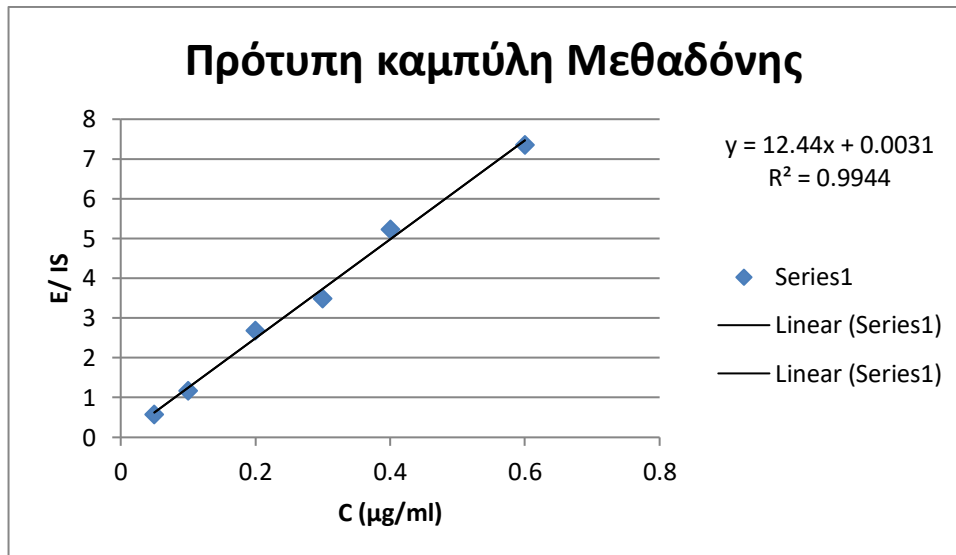
Για τον έλεγχο της εκλεκτικότητας πραγματοποιήθηκε προετοιμασία τόσο επιμολυσμένων αλλά και blank δειγμάτων με τη χρήση κοινού ορού αίματος για να διαπιστωθεί εάν κάποιο συστατικό του ορού μπορεί να παρεμποδίσει τον σωστό διαχωρισμό της μεθαδόνης. Το αποτέλεσμα ήταν αρνητικό όπως παρουσιάζεται παρακάτω, οπότε η μέθοδος διαθέτει εκλεκτικότητα.

### 6.2 Γραμμικότητα

Ως γραμμικότητα ορίζεται η ικανότητα μιας μεθόδου να εξάγει αποτελέσματα ανάλογα των συγκεντρώσεων. Για τον λόγο αυτό κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη με συγκεντρώσεις τουλάχιστον 6 δειγμάτων για να είναι πιο έμπιστα τα συμπεράσματα με προσθήκη 10μL νορδιαζεπάμης d-5 συγκέντρωσης 10mg/L. Επιπλέον, δημιουργήθηκαν δύο δείγματα blank με και χωρίς προσθήκη εσωτερικού προτύπου. Η ποσότητα που έλειπε συμπληρώθηκε με ίσα μL μεθανόλης (20μL και 30μL MeOH αντίστοιχα).

Οι συγκεντρώσεις που επιλέχθηκαν είναι: 0,05mg/L, 0,1mg/L, 0,2mg/L, 0,3mg/L, 0,5mg/L, 0,6mg/L. Η καμπύλη που παρουσιάζεται παρακάτω κατασκευάστηκε

τοποθετώντας στον άξονα γ'γ το λόγο του εμβαδού της μεθαδόνης προς το εμβαδό του εσωτερικού προτύπου για κάθε συγκέντρωση μεθαδόνης. Ο συντελεστής προσδιορισμού της καμπύλης που εξάχθηκε είναι ( $R^2$ ) 0,9944.



Εικόνα 17: Γραφική αναπαράσταση της πρότυπης καμπύλης μεθαδόνης συγκεντρώσεων: 0,05mg/L, 0,1mg/L, 0,2mg/L, 0,3mg/L, 0,5mg/L, 0,6mg/L

### 6.3 Όρια ανίχνευσης – ποσοτικοποίησης

Ως όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) ορίζεται η χαμηλότερη συγκέντρωση που είναι ανιχνεύσιμη και υπολογίσιμη και θα πρέπει ο λόγος του σήματος προς τον θόρυβο να ισούται με 10 ενώ ως όριο ανίχνευσης (LOD) ορίζεται η χαμηλότερη συγκέντρωση που μπορεί να ανιχνευτεί σε ένα δείγμα χωρίς να μπορεί να υπολογισθεί. Εδώ θα πρέπει ο λόγος σήματος/θόρυβο να ισούται με 3.[12]

### 6.4 Πιστότητα – Ακρίβεια

Η πιστότητα μιας μεθόδου ορίζεται ως ο βαθμός συμφωνίας μεταξύ των μεμονωμένων αποτελεσμάτων των δοκιμών όταν η ανάλυση πραγματοποιείται επανειλημμένα σε πολλαπλές δειγματοληψίες.[20]

Για την απόδειξη της ακρίβειας έγιναν 3 μετρήσεις για 3 συνεχόμενες ημέρες. Έγινε επιμόλυνση λευκών δειγμάτων ορού με την πιο χαμηλή ανιχνεύσιμη συγκέντρωση

( 0,05μg/ml), μια ενδιάμεση( 0,3μg/ml) και την υψηλότερη( 0,6μg/ml). Για κάθε ημέρα έγιναν οι9 απαραίτητες μετρήσεις όπως παρατίθενται στους παρακάτω πίνακες. Για να γίνουν αποδεκτά τα αποτελέσματα θα πρέπει η τυπική απόκλιση  $\leq 15\%$  από την πραγματική τιμή ενώ η σχετική τυπική απόκλιση να είναι  $\leq 20\%$ .

Intra day:

Συγκέντρωση(μg/mL)	Μέσος όρος συγκεντρωσης(μg/mL)	Τυπική Απόκλιση (SD)	Σχετική Τυπική Απόκλιση (RSD)
0,05	0,051198	0,04465	4,947681
0,3	0,372344	0,023517	7,845434
0,6	0,557752	0,05539	9,677544

Πίνακας 7: Πειραματικά αποτελέσματα ακρίβειας της μεθαδόνης κατά τη διάρκεια της ημέρας

Interday

Συγκέντρωση(μg/mL )	Μέσος όρος συγκεντρωσης(μg/mL )	Τυπική Απόκλιση (SD)	Σχετική Τυπική Απόκλιση (RSD)
<b>days 1-3</b>	<b>MO</b>	<b>MO</b>	<b>MO</b>
0,05	0,047164	0,002957	4,322665
0,3	0,392851	0,019175	4,838842
0,6	0,583042	0,020157	2,402932

Πίνακας 8: Πειραματικά αποτελέσματα ακρίβειας της μεθαδόνης κατά τη διάρκεια τριών ημερών

## 6.5 Ορθότητα

Η ορθότητα υπολογίστηκε βάσει της εκατοστιαίας ανάκτησης, όπως παρουσιάζεται παρακάτω. Οι αποδεκτές τιμές της ανάκτησης ορίζονται από 80-120%. Όπως παρατηρείται οι τιμές που πάρθηκαν τόσο κατά τη διάρκεια της ημέρας όσο και στη διάρκεια τριών ημερών βρίσκονται στο επιτρεπτό διάστημα συνεπώς η μέθοδος εξάγει έγκυρα αποτελέσματα. [20]

Intraday:

Συγκέντρωση(μg/mL)	Μέσος όρος συγκέντρωσης(μg/mL)	Εκατοστιαία ανάκτηση %
0,05	0,051198	120,5524
0,3	0,372344	118,7971
0,6	0,557752	120,4676

Πίνακας 9: Πειραματικά αποτελέσματα ορθότητας της μεθαδόνης κατά τη διάρκεια της ημέρας

Inter day:

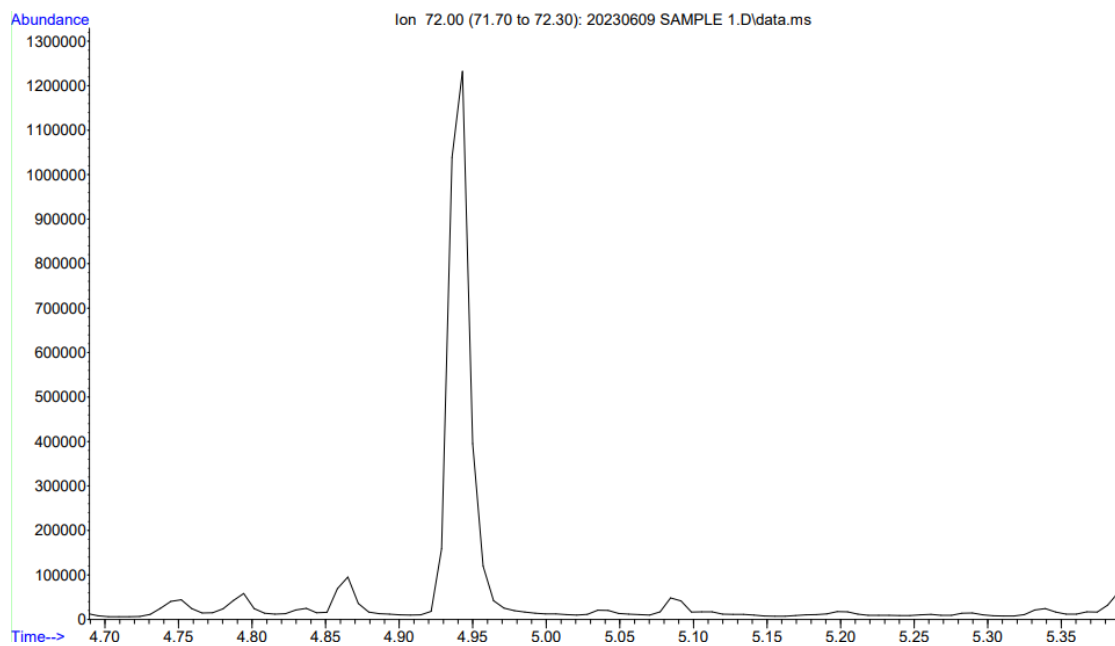
Συγκέντρωση(μg/mL)	Μέσος όρος συγκέντρωσης(μg/mL)	Εκατοστιαία ανάκτηση %
<b>days 1-3</b>	<b>MO</b>	<b>MO</b>
0,05	0,047164	94,32794
0,3	0,392851	120,6173
0,6	0,583042	97,17363

Πίνακας 10: Πειραματικά αποτελέσματα ορθότητας της μεθαδόνης κατά τη διάρκεια τριών ημερών

## 7. Εφαρμογή σε πραγματικά μεταθανάτια δείγματα

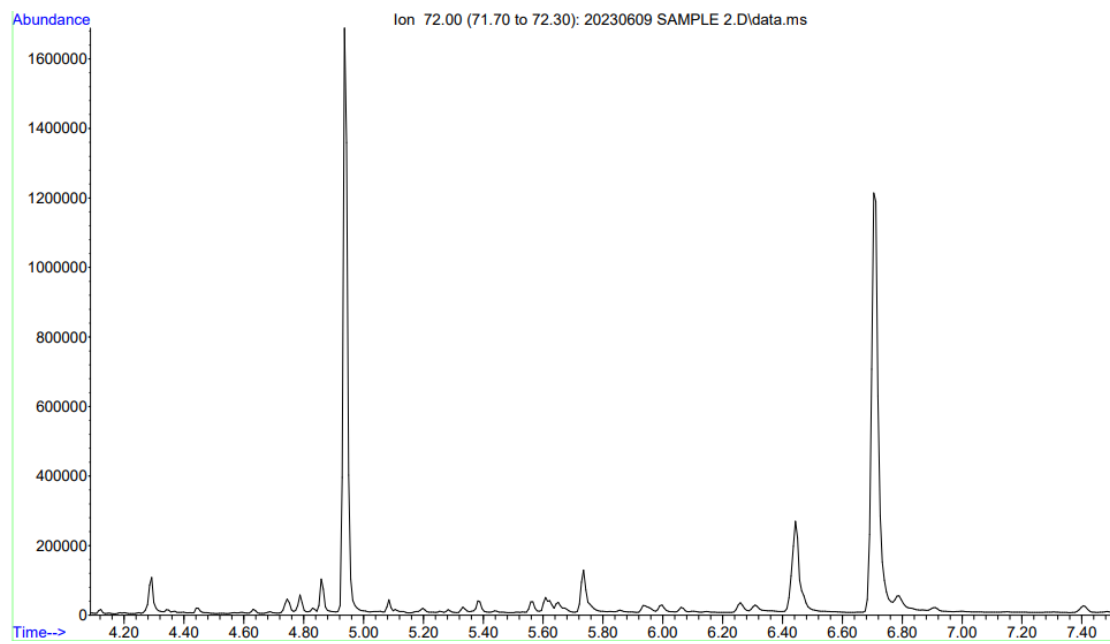
Αφού ολοκληρώθηκε η επικύρωση της αναλυτικής μεθόδου ακολούθησε εφαρμογή αυτής σε 3 πραγματικά μεταθανάτια δείγματα για τον ποσοτικό προσδιορισμό της μεθαδόνης. Και τα τρία περιστατικά είχαν κάνει χρήση μεθαδόνης.

Πρώτο δείγμα:



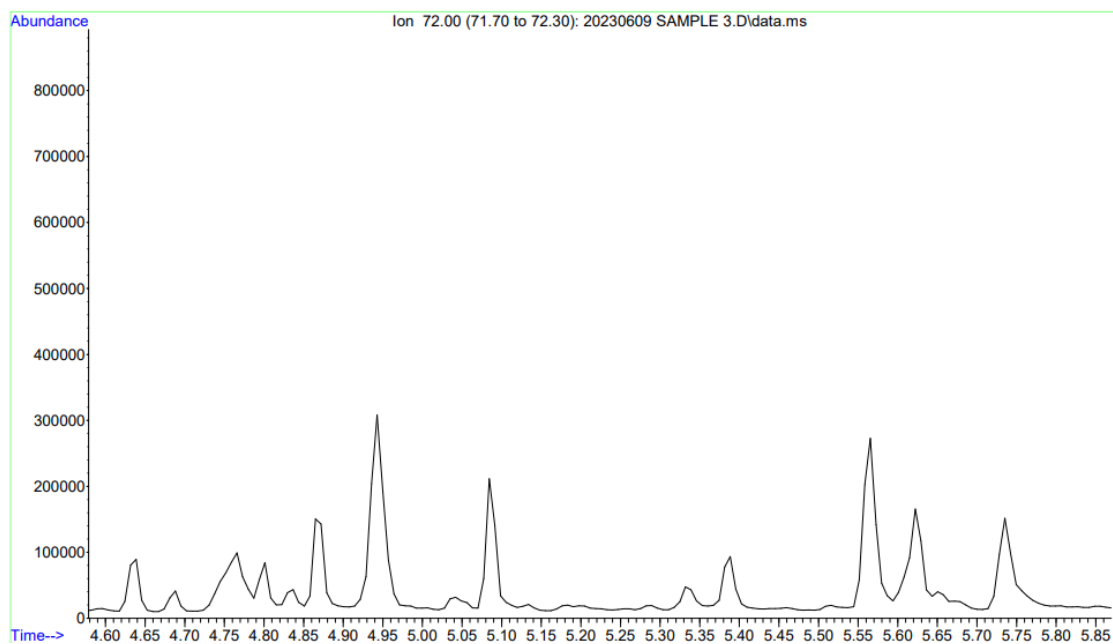
Χρωματογράφημα με το χαρακτηριστικό ιόν της μεθαδόνης ( $m/z$  72) στο δείγμα 1.

Δεύτερο δείγμα:



Χρωματογράφημα με το χαρακτηριστικό ιόν της μεθαδόνης ( $m/z$  72) στο δείγμα 2

Τρίτο δείγμα:



Χρωματογράφημα με το χαρακτηριστικό ιόν της μεθαδόνης ( $m/z$  72) στο δείγμα 3.

Με τη μέθοδο που σχεδιάστηκε εξάχθηκαν τα παρακάτω αποτελέσματα. Παρατηρείται ότι τα δείγματα 1 και 2 περιέχουν αρκετά υψηλότερη συγκέντρωση μεθαδόνης συγκριτικά με το δείγμα 3, σε όρια πάνω από τα θεραπευτικά. Στο δείγμα 3 η συγκέντρωση κυμαίνεται σε θεραπευτικά επίπεδα.

Αριθμός δείγματος	Συγκέντρωση Μεθαδόνης ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
1	0,602627
2	0,706136
3	0,084048

## 8. Συμπεράσματα

Στην συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία, ολοκληρώθηκε με επιτυχία ο σχηματισμός και η επικύρωση μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού μεθαδόνης σε ορό αίματος, με τη χρήση του οργάνου αέριας χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μάζας(GC-MS).

Πρώτος σκοπός ήταν η δημιουργία των κατάλληλων συνθηκών για το στάδιο της προκατεργασίας, η οποία ήταν η εκχύλιση υγρού-υγρού. Περιλάμβανε την επιλογή του οξικού αιθυλεστέρα ως τον κατάλληλο διαλύτη εκχύλισης αλλά και ως διαλύτη επαναδιάλυσης σε σύγκριση με τον οξικό βουτυλεστέρα και την μεθανόλη, την ρύθμιση του pH στο 11,5 με τη χρήση του ρυθμιστικού διαλύματος  $K_2CO_3$ . Επίσης, ορίστηκε η εξάτμιση ως βασικό στάδιο της προκατεργασίας για την ποσοτικοποίηση χαμηλών συγκεντρώσεων.

Εν συνεχεία, ακολούθησε η επικύρωση της μεθόδου που αναπτύχθηκε και έγινε έλεγχος των παραμέτρων της εκλεκτικότητας, της γραμμικότητας, των ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης, της πιστότητας-ακρίβειας και της ορθότητας.

Για τον έλεγχο της εκλεκτικότητας, αναλύθηκαν τόσο επιμολυσμένα όσο και λευκών δειγμάτων ορού για να ελεγχθεί εάν υπάρχει κάποια ουσία που μπορεί να παρεμποδίζει τη μεθαδόνη. Το αποτέλεσμα ήταν αρνητικό

Για την γραμμικότητα δημιουργήθηκε καμπύλη με πρότυπες συγκεντρώσεις και με συντελεστή συσχέτισης  $R^2 = 0,9944$

Τα όρια LOD και LOQ προσδιορίστηκαν στα 0,0165  $\mu\text{g/mL}$  και 0,05  $\mu\text{g/mL}$ , αντίστοιχα.

## 9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

[1] Christine M Ball, Peter J Featherstone, “Methadone and buprenorphine: The search for a non-addictive opioid”, 2022; 50: 1-2.

[1a] Philip W. H. Peng, Paul S. Tumber, Douglas Gourlay,” Review article: Perioperative pain management of patients on methadone therapy”, 2005 / 52: 5 / pp 513–523

[2] Mehnour Durrani; Kamna Bansal, “Methadone”,2023

[3] Drugs (online) Available at:  
(<https://www.drugs.com/methadone.html>)

[3a] Takahiro Ogura, Talmage D. Egan,” 17- Intravenous Opioid Agonists and Antagonists”, Foundations and Clinical Application ,2019, Pages 332-353

[4] Philip W H Peng 1, Paul S Tumber, Douglas Gourlay, “Perioperative pain management of patients on methadone therapy [Exposé de synthèse : Traitement de la douleur périopératoire chez les patients sous thérapie à la methadone]”, 2005 May;52(5):513-23

[5] Denise Kreuzwiser · Qutaiba A. Tawfc, “Methadone for Pain Management: A Pharmacotherapeutic Review”, June 2020

[6] Yvonne Heung, Akhila Reddy, “How to Use Methadone in an Era of an Opioid Epidemic”, March 2020

[7] María J. Garrido, Iñaki F. Trocóniz ,” Methadone: a review of its pharmacokinetic/pharmacodynamic properties”, J Pharmacol Toxicol 42 (1999) 61–66

[8] RICHARD A. HARVEY , KAREN WHALEN , RICHARD FINKEL , THOMAS A. PANAVELIL, Φαρμακολογία, LIPPINCOTT, 6η έκδοση, εκδόσεις ΠΑΡΙΣΙΑΝΟΥ

[9] A L Gorman, K J Elliott, C E Inturrisi, “The d- and l-isomers of methadone bind to the non-competitive site on the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor in rat forebrain and spinal cord”, 1997 Feb 14;223(1):5-8

[10] Brian A. Baldo, ” Opioid analgesic drugs and serotonin toxicity (syndrome): mechanisms, animal models, and links to clinical effects”, 2018, 92, pages2457–2473

[11] Atiqah Zaid, Norfarizah Hanim Hassan, Philip J Marriott, Yong Foo Wong, “Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography as a Bioanalytical Platform for Drug Discovery and Analysis”, 2023 Mar 31;15(4):1121

[12] Παρασκευή Μαγνήσαλη, Διδακτορική διατριβή, «Ανάπτυξη μεθοδολογίας αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας (GC-MS) για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό στεροειδών ορμονών στον ορό- Εφαρμογή στη διάγνωση ενδοκρinoπαθειών», Αθήνα 2009

- [13] . Χρήστος Κόκκινος, «Αέρια Χρωματογραφία- Φασματομετρία μαζών (MS)», online available [[ΧΗΜΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ: Αέριο Χρωματογραφία- Φασματομετρία μαζών \(MS\) \(chimikoergastirio.blogspot.com\)](http://chimikoergastirio.blogspot.com)]
- [13a]. D.L Dhanlal, "Analysis by Capillary column Gas Chromatography." Chem. Dept, The University of The West Indies, St. Augustine campus The Republic of Trinidad and Tobago, 2000. [Online]. Available: <http://delloyd.50megs.com/moreinfo/gaschrom.html>
- [14]. Gas Chromatography: What You Need to Know About Its Principles, Types and Working, online, available [<https://lab-training.com/gas-chromatography/>]
- [15]. Εργαστηριακές Ασκήσεις Ενόργανης Ανάλυσης Τροφίμων, «Αέρια Χρωματογραφία (GC)» άσκηση 9
- [16]. Frank L. Dorman, Joshua J. Whiting, Jack W. Cochran, Jorge Gardea-Torresdey, « Gas Chromatography», 2010, 82, 4775–4785
- [17]. Βασιλειάδης, «ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ», ιατρικές εκδόσεις (online), Available: <https://www.vasiliadis-books.gr/Vasiliadis-books/wp-content/uploads/2020/06/%CE%94%CE%B5%CE%AF%CF%84%CE%B5-%CE%91%CF%80%CF%8C%CF%83%CF%80%CE%B1%CF%83%CE%BC%CE%B1-%CF%84%CE%BF%CF%85-%CE%92%CE%B9%CE%B2%CE%BB%CE%AF%CE%BF%CF%85-18.pdf>
- [17a] Diane Turner," How a Gas Chromatography Machine Works and How To Read a Chromatograph" online available: <https://www.analyticalcannabis.com/articles/gas-chromatography-how-a-gas-chromatography-machine-works-how-to-read-a-chromatograph-and-gcxcg-312833>
- [18]. Καρούσου Μαριάννα, διπλωματική εργασία, «Αναλυτικός χαρακτηρισμός μεσαίων κλασμάτων πετρελαίου με φασματοσκοπικές μεθόδους, 2019, Χανιά
- [19]. Wade Leroy G., Οργανική Χημεία, 9η έκδοση, Εκδόσεις Τζιόλα
- [19a]. Rob ten Haaft," Mass Spectrometry and Mass Flow Control; A closer ion them", August 2021
- [20]. Β. Σαμανίδου, "Τεχνικές Προκατεργασίας Βιολογικών Δειγμάτων" στο Βιοαναλυτική Χημεία. Αθήνα, Ελλάδα:Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών, 2015. [Online]. Available: <http://hdl.handle.net/11419/3667>
- [21]. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, «Μέθοδοι διαχωρισμού»,online available: <http://archive.eclass.uth.gr/eclass/modules/document/file.php/SEYC123/%CE%94%CE%99%CE%91%CE%9B%CE%95%CE%9E%CE%95%CE%99%CE%A3/13.%20%CE%95%CE%99%CE%A3%CE%91%CE%93%CE%A9%CE%93%CE%97%20%CE%A3%CE%A4%CE%9F%CE%9D%20%CE%94%CE%99%CE%91%CE%A7%CE%A9%CE%A1%CE%99%CE%A3%CE%9C%CE%9F-%CE%95%CE%9A%CE%A7%CE%A5%CE%9B%CE%99%CE%A3%CE%97.pdf>
- [22]. Γρηγόριος-Παναγιώτης Γεωργίου Αναστασιάδης,πτυχιακή εργασία, «ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΑΙΣΘΗΤΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΙΜΑΤΟΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΑΕΡΙΑΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΣΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ (GC-MS)»,Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας,2021

- [23]. Daniela-Mădălina Ciucă Anghel, Anne-Marie Ciobanu, et al., "GC-MS Analysis of Methadone and EDDP in Addicted Patients under Methadone Substitution Treatment: Comparison of Urine and Plasma as Biological Samples", 2022 Dec; 27(23): 8360.
- [24]. Maja Veršić Bratinčević, Tanja Visković, Davorka Sutlović, "Comparison of the solid phase and liquid-liquid extraction methods for methadone determination in human serum and whole blood samples using gas chromatography/mass spectrometry", Jan 2018; 68:4
- [25]. ROBERT DANIEL VASILE<sup>1</sup>, DANIELA BACONI<sup>1\*</sup>, CRISTINA HUDIȚĂ<sup>2</sup>, MARIA BÂRCĂ<sup>1</sup>, CRISTIAN BĂLĂLĂU<sup>3</sup>, ANNE-MARIE CIOBANU, "METHADONE PLASMA LEVELS IN HEROIN ADDICT PATIENTS DURING SUBSTITUTION THERAPY", 2014, Vol. 62, 6
- [26]. S. Iwersen-Bergmann, S. Plattner,<sup>2</sup> S. Hischke, A. Müller, H. Andresen-Streichert,<sup>4</sup> H. Jungen,<sup>R. Erb,</sup> and B. Beer-Sandner, "Brain/blood ratios of methadone and ABCB1 polymorphisms in methadone-related deaths", 2021; 135(2): 473–482
- [27]. Ε. Μπακέας, «Αεριοχρωματογραφία – Φασματομετρία μαζών», 2020, Εθνικών και Καποδιστριακών Πανεπιστημίων Αθηνών, [Online]. Available: <https://eclass.uoa.gr>