



ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΑΕΡΙΑΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ
ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΗ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ (GC - MS) ΓΙΑ ΤΟΝ
ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΘΕΙΟΠΕΝΤΑΛΗΣ ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ»**

**«DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A GAS CHROMATOGRAPHY-
MASS SPECTROMETRY METHOD FOR THE QUANTIFICATION OF
THIOPENTAL IN HUMAN BLOOD CLINICAL SAMPLES»**

Χατζηπατέρας Αναστάσιος του Σταυρού
Λάρισα 2025

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Τοξικολογίας και Ιατροδικαστικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

Επιβλέπων καθηγητής: ΡΑΪΚΟΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής,
Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Συνεπιβλέπων καθηγητής: ΣΤΑΓΚΟΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ Επίκουρος Καθηγητής,
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μέλος εξεταστικής επιτροπής: ΛΙΑΔΑΚΗ ΚΑΛΛΙΟΠΗ Επίκουρος
Καθηγήτρια, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

Χατζηπατέρας Αναστάσιος του Σταυρού
Λάρισα 2025

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του προπτυχιακού προγράμματος σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Το πειραματικό σκέλος της εργασίας πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης. Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Νικόλαο Ράικο για την εξαιρετική συνεργασία που είχαμε, την άμεση βοήθεια σε οποιοδήποτε σκέλος της πτυχιακής εργασίας, την παραχώρηση όλου του εξοπλισμού του εργαστηρίου και τέλος την βοήθεια και καθοδήγηση του στην κατανόηση της επιστήμης της κλινικής τοξικολογίας.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω για την συνεργασία και βοήθεια που είχα από τον κ. Δημήτρη Στάγκο που ανέλαβε ως συνεπιβλέπων στην πτυχιακή εργασία και επίσης την κ. Καλλιόπη Λιαδάκη που ανέλαβε ως μέλος της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής.

Ένα τεράστιο ευχαριστώ στην Χριστίνα Ματιάκη η οποία με βοήθησε σε κάθε βήμα και σκέλος της πτυχιακής εργασίας καθώς με συμβούλευε και επέβλεπε σε καθ' όλη την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας. Ήταν πάντα άμεσα διαθέσιμη σε οποιαδήποτε απορία και πρόβλημα που υπήρξε και με βοήθησε στην κατανόηση του θεωρητικού και πειραματικού σκέλους της εργασίας. Χωρίς την βοήθεια της αυτή η εργασία δεν θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	3
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ABSTRACT.....	7
A.ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	8
1. Θειοπεντάλη.....	8
1.1 Εισαγωγή.....	8
1.2 Ταξινόμηση και Φαρμακοκινητική.....	9
1.3 Μοριακός μηχανισμός δράσης.....	11
1.4 Χρήση σε Ανθεκτική επιληπτική κρίση και παιδιά.....	14
1.5 Τοξικότητα θειοπεντάλης	15
1.6 Θεραπευτικά, τοξικά και θανατηφόρα επίπεδα.....	16
2. Αέρια χρωματογραφία (GC).....	16
2.1 Αρχή λειτουργίας μεθόδου αέριας χρωματογραφίας.....	16
2.2 Οργανολογία αέριας χρωματογραφίας.....	17
2.2.1 Φέρον αέριο.....	17
2.2.2 Σύστημα εισαγωγής δείγματος.....	17
2.2.3 Αναλυτική στήλη.....	21
2.2.4 Ανιχνευτής.....	23
3. Φασματομετρία μάζας (MS).....	25
3.1 Αρχή λειτουργίας φασματογράφου μάζας.....	25
3.2 Οργανολογία φασματογράφου μάζας.....	25
3.2.1 Σύστημα εισαγωγής δείγματος.....	26
3.2.2 Πηγή ιόντων.....	28
3.2.3 Αναλυτής μαζών.....	31
3.2.4 Ανιχνευτής.....	32

B.ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	38
1. Σκοπός της εργασίας.....	38
2. Οργανολογία , Αντιδραστήρια και Διαλυτές.....	39
2.1 Πρότυπα διαλύματα , Αντιδραστήρια και Διαλύτες.....	39
2.2 Όργανα, συσκευές και λοιπός εξοπλισμός.....	39
2.3 Σύστημα GC-MS.....	41
2.4 Βιολογικά δείγματα.....	42
3. Ανάπτυξη της αναλυτικής μεθόδου.....	43
3.1 Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων.....	43
3.2 Παράμετροι GC-MS.....	44
4. Βελτιστοποίηση της μεθόδου.....	48
4.1 Επιλογή όγκου διαλύτη.....	48
4.2 Επιλογή pH.....	51
5. Τελική βέλτιστη μέθοδος.....	51
5.1 Παρασκευή επιμολυσμένων δειγμάτων (spiked).....	51
5.2 Προκατεργασία δείγματος.....	51
6. Επικύρωση αναλυτικής μεθόδου.....	52
6.1 Εκλεκτικότητα (Selectivity).....	53
6.2 Γραμμικότητα (Linearity).....	54
6.3 Όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ).....	55
6.4 Ακρίβεια (Accuracy) – Επαναληψιμότητα (Repeatability).....	56
7. Εφαρμογή σε πραγματικά κλινικά δείγματα.....	57
8. Συζήτηση-Συμπεράσματα.....	59
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η θειοπεντάλη ανήκει στην κατηγορία των βαρβιτουρικών ταχείας δράσης. Δρα κυρίως στο ΚΝΣ και συγκεκριμένα στους υποδοχείς του γ-αμινοβουτυρικού οξέως. Η κύρια χρήση της εστιάζει στην εισαγωγή στην αναισθησία ή πλήρης αναισθησία σε επεμβάσεις μικρής χρονικής διάρκειας. Ο σκοπός της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας είναι η ανάπτυξη και η επικύρωση μιας αναλυτικής μεθόδου για τον ποσοτικό προσδιορισμό της θειοπεντάλης η οποία να είναι αξιόπιστη, γρήγορη, οικονομική και φιλική προς το περιβάλλον. Η ανάπτυξη της μεθόδου πραγματοποιήθηκε με την χρήση αέριας χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μάζας .

Η προκατεργασία των δειγμάτων έγινε με φυγοκέντρηση και εκχύλιση υγρού- υγρού , αποφεύγοντάς την εξάτμισή και την παραγωγοποίηση μειώνοντας με αυτό τον τρόπο το κόστος και τον χρόνο ανάλυσης. Στην βελτιστοποίηση της μεθόδου έγινε επιλογή κατάλληλου όγκου διαλύτη(400μl οξικού βουτυλεστέρα) προκειμένου να αποφευχθεί η εμφάνιση plateau στο χρωματογράφημα. Επίσης έγινε επιλογή κατάλληλου pH 4,5 σύμφωνα με την pka της θειοπεντάλης. Ως εσωτερικό πρότυπο χρησιμοποιήθηκε η φαινυτοΐνη.

Για την επικύρωση της μεθόδου έγινε προσδιορισμός της γραμμικότητας, εκλεκτικότητας, επαναληψιμότητας και ακρίβειας. Επιπλέον προσδιορίστηκαν τα όρια ανίχνευσης LOD=3,3μg/mL και ποσοτικοποίησης LOQ= 10μg/mL στον ορό του αίματος.

Τέλος, εφόσον επικυρώθηκε η μέθοδος, έγινε εφαρμογή της σε πραγματικά κλινικά δείγματα τα οποία προέρχονταν από το ίδιο περιστατικό.

ABSTRACT

Thiopental belongs to the category of fast-acting barbiturates. It primarily acts on the central nervous system (CNS), specifically targeting gamma-aminobutyric acid (GABA) receptors. Its main use is for the induction of anesthesia or as complete anesthesia in short-duration surgical procedures. The aim of this thesis is to develop and validate an analytical method for the quantitative determination of thiopental that is reliable, fast, cost-effective, and environmentally friendly. The method was developed using gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). Sample preparation was performed using centrifugation and liquid-liquid extraction, avoiding evaporation and derivatization, thereby reducing both cost and analysis time. During method optimization, an appropriate solvent volume (400 μ L of butyl acetate) was selected to prevent the appearance of a plateau in the chromatogram. Additionally, the optimal pH of 4.5 was chosen according to the pKa of thiopental. Phenytoin was used as an internal standard. For method validation, linearity, selectivity, repeatability, and accuracy were assessed. Furthermore, the limits of detection (LOD = 3.3 μ g/mL) and quantification (LOQ = 10 μ g/mL) in blood serum were determined. Finally, after validation, the method was applied to real clinical samples derived from the same case.

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.Θειοπεντάλη

1.1 Εισαγωγή

Η θειοπεντάλη συντέθηκε για πρώτη φορά την δεκαετία του 1930 από ερευνητές στα εργαστήρια Abbott. Από το 1934 ο γιατρός John S. Lundy ξεκίνησε της κλινικές δοκιμές του φαρμάκου στην Mayo Clinic, με αποτέλεσμα η θειοπεντάλη να γίνει ευρέως γνωστή ως ενδοφλέβιο αναισθητικό για χρήση σε χειρουργικές επεμβάσεις. Τα τελευταία χρόνια η χρήση της ως αναισθητικό έχει αντικατασταθεί σε μεγάλο βαθμό από το φάρμακο propofol [1]. Επίσης συγκαταλέγεται στην λίστα για τα βασικά φάρμακα του Παγκόσμιου οργανισμού υγείας [2].

Η θειοπεντάλη ανήκει στην κατηγορία των βαρβιτουρικών και ειδικά στα ταχείας δράσης βαρβιτουρικά. Η κύρια χρήση της φαρμακευτικής ουσίας είναι για την εισαγωγή στην αναισθησία για χειρουργικές επεμβάσεις ή πλήρη αναισθησία σε επεμβάσεις μικρής χρονικής διάρκειας. Επιπλέον χρησιμοποιείται ως αναισθητικό και σε επεμβάσεις παιδιών. Εκτός από την χρήση της ως αναισθητικό η θειοπεντάλη χρησιμοποιείται και για θεραπεία σε υποξικές-ισχαιμικές εγκεφαλικές βλάβες καθώς και σε μείωση της ενδοκρανιακής πίεσης (ICP) [3]. Τέλος χορήγηση υψηλής δόσης του φαρμάκου ενδείκνυται και στην αντιμετώπιση της ανθεκτικής επιληπτικής κρίσης (Refractory status epilepticus) [4].

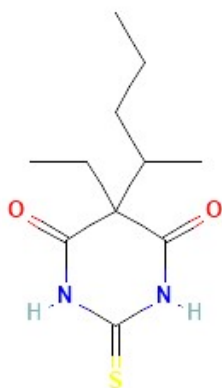
Οι εμπορικές ονομασίες της θειοπεντάλης είναι : Pentothal που είναι η κύρια εμπορική ονομασία του, Thiopentone και ως Trapanal [5].

Οι κύριοι και πιο διαδεδομένοι τρόποι ανίχνευσης αυτή της φαρμακευτικής ουσίας είναι : Αέρια χρωματογραφία (GC), HPLC και GC/MS. Ο λόγος που

γίνεται η μελέτη της θειοπεντάλης είναι επειδή αποτελεί το κύριο αναισθητικό που χρησιμοποιείται στα χειρουργεία και λόγω του γεγονότος ότι είναι φάρμακο υπόδειγμα για την μελέτη άλλων ταχείας δράσης βαρβιτουρικών[3].

1.2 Ταξινόμηση και Φαρμακοκινητική

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω ανήκει στην κατηγορία των βαρβιτουρικών με μοριακό τύπο $C_{11}H_{18}N_2O_2S$ και στην φυσική της μορφή είναι σκόνη με κίτρινο χρώμα. Όλα τα βαρβιτουρικά είναι παράγωγα του βαρβιτουρικού οξέος [6]. Στην περίπτωση της θειοπεντάλης έχουμε ως αρχική ένωση το 2-θειοβαρβιτουρικό οξύ στο οποίο γίνεται αντικατάσταση του C-5 με μια αιθυλομάδα και ένα δευτεροταγές πεντύλιο [7].



Εικόνα 1. Χημική δομή θειοπεντάλης [7]

Η θειοπεντάλη είναι ένα μια αρκετά λιπόφιλη δραστική ουσία με μοριακό βάρος 242,34 g/mol. Η pka του φαρμάκου είναι 7,55 στους 25°C και. Ο χρόνος ημισείας ζωής (half-life) είναι 3-8 ώρες και ο όγκος κατανομής (Vd) εξαρτάται από το τρόπο χορήγησής (ενδοφλέβια χορήγηση ή συνεχής

έγχυση) και την κλινική κατάσταση του ασθενή. Η θειοπεντάλη δεσμεύεται στις πρωτεΐνες του πλάσματος σε 80% ποσοστό [8] [3].

Η χορήγηση γίνεται κυρίως με ενδοφλέβια ένεση(μείγμα R-(+)- και S-(–)-εναντιομερών θειοπεντάλης) και απορροφάτε σε μεγάλο βαθμό από όργανα με αυξημένη αιμάτωση όπως ο εγκέφαλος και το ήπαρ. Έπειτα γίνεται ανακατανομή του φαρμάκου και απορροφάτε από όργανα με μικρότερη αιμάτωση όπως ο μυϊκός και ο λιπώδης ιστός [3]. Στη περίπτωση που γίνεται συνεχής χορήγηση του φαρμάκου, έχει ως αποτέλεσμα την συσσώρευση στο λιπώδη ιστό οδηγώντας σε αυξημένο χρόνο ανάρρωσης .[8] Άλλοι τρόποι χορήγησής περιλαμβάνουν και χορήγηση από το ορθό αλλά έχει αργή δράση μέσω αυτής της οδού [9].

Ο κύριος στόχος του φαρμάκου είναι οι υποδοχείς του γ-αμινοβουτυρικού οξέως (GABA) και πιο συγκεκριμένα η υποκατηγορία A , οι οποίοι βρίσκονται κυρίως στον εγκέφαλο και αποτελούν ανασταλτικούς υποδοχείς [7].

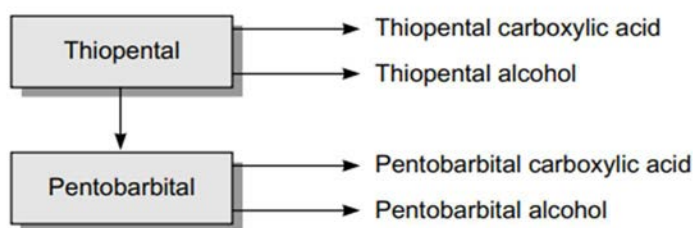
Όσον αφορά το μεταβολισμό της θειοπεντάλης η διαδικασία αυτή γίνεται στο ήπαρ, όμως τα ακριβή ηπατικά ένζυμα που συμμετέχουν δεν έχουν διευκρινιστεί. Τα βαρβιτουρικά όμως σε γενικό πλαίσιο αποτελούν υπόστρωμα του κυτοχρώματος P450(CYP). Υπάρχουν δυο μεταβολικές οδοί στις οποίες συμμετέχει η θειοπεντάλη[3]:

1^η μεταβολική οδός: Γίνεται αποθείωση του δακτυλίου με προϊόν αυτής της αντίδρασης την πεντοβαρβιτάλη, η οποία παραμένει φαρμακολογικά ενεργή. Ο ενεργός αυτός μεταβολίτης αποτελεί το 3,3-3,6% της αναισθητικής δόσης και το 10% της μητρικής ένωσης στο αίμα. Έπειτα η θειοπεντάλη και η πεντοβαρβιτάλη υφίσταται οξείδωση στο τελικό άνθρακα της 1-μεθυλ-βουτυλ πλευρικής αλυσίδας παράγοντας καρβοξυλικό οξύ

θειοπεντάλης και καρβοξυλικό οξύ πεντοβαρβιτάλης, και οι δυο αυτές ενώσεις είναι φαρμακολογικά ανενεργές.

2^η μεταβολική οδός: Πραγματοποιείται υδροξυλίωση στην θέση 3 της μεθυλ-βουτυλ πλευρικής αλυσίδας και παράγεται θειοπενταλική αλκοόλη και πεντοβαρβιτολική αλκοόλη, μεταβολίτες μη φαρμακολογικά ενεργοί.

Η οξειδωση της θειοπεντάλης σε καρβοξυλικό οξύ αποτελεί κύριο βήμα της αποτοξίνωσης στον άνθρωπο καθώς η συγκέντρωση του προϊόντος της αντίδρασης στα ούρα αποτελεί το 10-25% της χορηγούμενης δόσης.



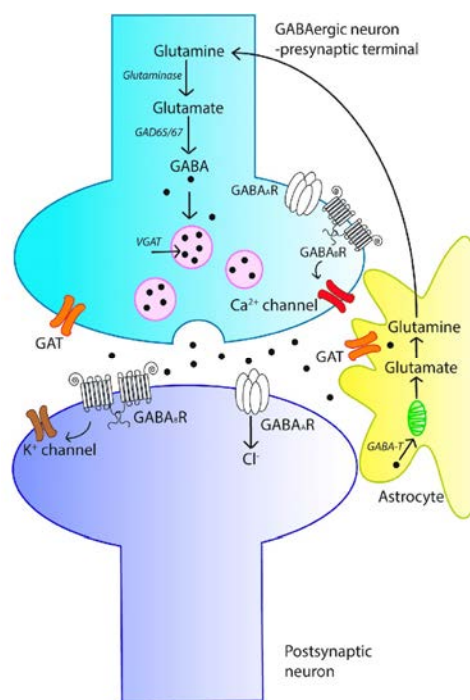
Εικόνα 2 Μεταβολική οδοί θειοπεντάλης[3]

1.3 Μοριακός μηχανισμός δράσης και δράση σε άλλα συστήματα

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω ο κύριος στόχος της θειοπεντάλης είναι το ΚΝΣ πιο συγκεκριμένα οι υποδοχείς του γ-αμινοβουτυρικού οξέως (GABA_A) οι οποίοι αποτελούνται από 14 διαφορετικές γλυκοπρωτεϊνικές ομάδες (α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , δ και ϵ) [10].

Γενικός μηχανισμός δράσης GABA_A:

Οι υποδοχείς GABA_A είναι ιοντοτροπικοί υποδοχείς καναλιών Cl⁻. Είναι υπεύθυνοι για την αύξηση της αγωγιμότητας της μεμβράνης με δυναμικό ισορροπίας στο επίπεδο των -70mV. Όταν το γ-αμινοβουτυρικό οξύ συνδέεται στο υποδοχέα του οδηγεί σε άνοιγμα του καναλιού Cl, επομένως γίνεται εισροή ιόντων Cl μέσα στο κύτταρο. Έχουμε υπερπόλωση νευρικού κυττάρου κάνοντας το λιγότερο ενεργό σε σήματα από διεγερτικούς νευροδιαβιβαστές [11].

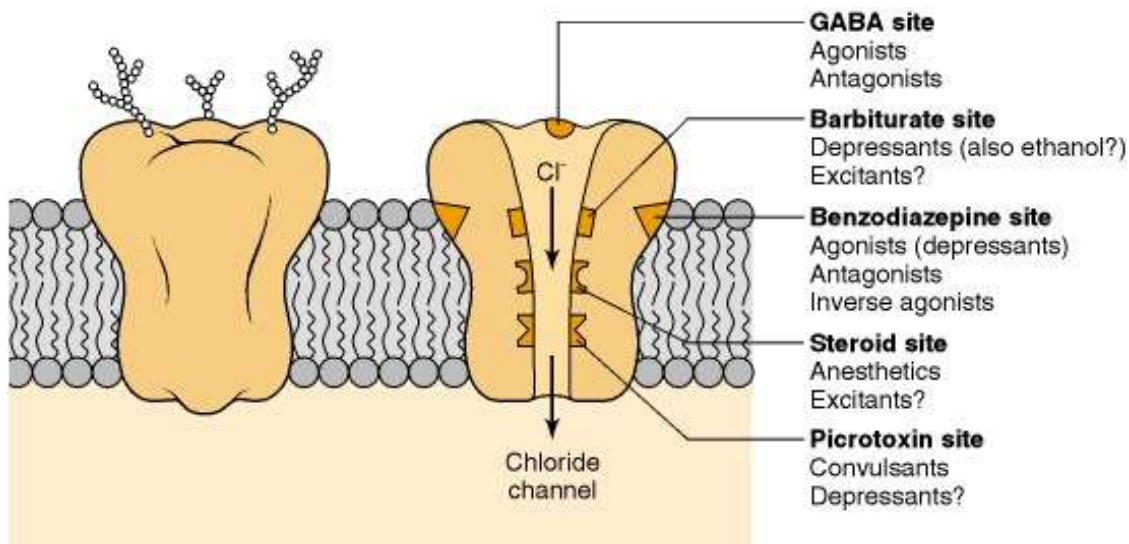


Εικόνα 3 Μοριακός μηχανισμός γ-αμινοβουτυρικού οξέως [41]

Μηχανισμός δράσης βαρβιτουρικών

Τα βαρβιτουρικά στα οποία ανήκει και η θειοπεντάλη συνδέονται αλλοστερικά στο υποδοχέα GABA_A με αποτέλεσμα να αυξάνουν την συγγένεια του γ-αμινοβουτυρικού οξέως με τον υποδοχέα του. Άρα η

αύξηση της συγγένειας οδηγεί σε αύξηση του ποσοστού των δίαυλων που βρίσκονται στην μεγαλύτερη σε χρονική διάρκεια ανοικτή δομή τους (9msec) ενώ μειώνει το ποσοστό των δίαυλων που βρίσκονται στην μικρότερη σε χρονική διάρκεια ανοικτή δομή τους (3msec), επομένως προκαλεί αύξηση της χρονικής διάρκειας που το κανάλι είναι ανοιχτό και της ποσότητας του Cl^- που εισέρχεται στο κύτταρο, οδηγώντας σε υπερπόλωση του κυττάρου [12].



Εικόνα 4 Υποδοχέας γ-αμινοβουτυρικού οξέως [12]

Δράση σε άλλα συστήματα

1. Κεντρικό νευρικό σύστημα: Τα βαρβιτουρικά προκαλούν δόσο-εξαρτώμενη καταστολή από νάρκωση μέχρι γενική αναισθησία, στην περίπτωση της θειοπεντάλης όπως αναφέρθηκε στο κεφ.1 χρησιμοποιείται

κυρίως για εισαγωγή στην αναισθησία και δεν προκαλεί αναλγησία. Έχουν ισχυρή αγγειοσυσταλτική δράση στα εγκεφαλικά αγγεία και προκαλούν μείωση της εγκεφαλικής αιματικής ροής, του όγκου του εγκεφάλου και της ICP (ενδοκρανιακή πίεση), η ικανότητα αυτή τα κάνει χρήσιμα για αντιμετώπιση χωρο-κατακτικών βλαβών. Τέλος μειώνουν την ηλεκτρική δραστηριότητα στο ΗΕΓ (Ηλεκτροεγκεφαλογράφημα) το οποίο τα καθιστά χρήσιμα για την αντιμετώπιση της επιληψίας [9].

2. Καρδιαγγειακό σύστημα: Μείωση της αρτηριακής πίεσης λόγω της περιφερικής αγγειοδιαστολής που προκαλούν. Χρήση χαμηλών δόσεων δεν προκαλούν συχνά υπόταση. Οδηγούν και σε αρνητική ιονοτρόπο δράση του μυοκαρδίου [9].

3. Αναπνευστικό σύστημα: Καταστολή του αναπνευστικού συστήματος και συγκεκριμένα η θειοπεντάλη προκαλεί παροδική άπνοια. Μείωση αναπνεόμενου όγκου και αναπνευστικής συχνότητας και τέλος δεν προκαλούν έντονη καταστολή των λαρυγγικών αντανακλαστικά επομένως δεν ενδείκνυται για χρήση στην διασωλήνωσή της τραχείας [9].

1.4 Χορήγηση σε Ανθεκτική επιληπτική κρίση και σε παιδιά

Ανθεκτική επιληπτική κρίση (Refractory status epilepticus) :

Χαρακτηρίζεται από ανθεκτικότητα σε χρήση βενζοδιαζεπίνων ως πρώτο τρόπο αντιμετώπισης και σε χρήση αντιεπιληπτικών φαρμάκων σε δεύτερο στάδιο. Μια από τις κυρίαρχες οδηγίες για την αντιμετώπιση του είναι η συνεχής ενδοφλέβια χορήγηση αναισθητικών, αλλά υπάρχουν λίγα στοιχεία για το πιο φάρμακο είναι το πιο αποτελεσματικό. Ορισμένες μελέτες έχουν εστιάσει στην χρήση της θειοπεντάλης για την θεραπεία και διαχείριση της

RSE (Refractory status epilepticus). Όπως αναφέρθηκε παραπάνω μια από τις δράσεις της θειοπεντάλης είναι ότι μειώνει την ηλεκτρική δραστηριότητα στο ΗΕΓ (ηλεκτροεγκεφαλογράφημα). Η χορήγηση αυξημένης δόσης θειοπεντάλης τερματίζει τα κλινικά και τα ηλεκτροφυσιολογικά συμπτώματα της επιληπτικής κρίσης όμως η χρήση της σε υψηλές συγκεντρώσεις έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση αρκετών παρενεργειών όπως μείωση της αρτηριακής πίεσης, αύξηση του χρόνου ανάρρωσης καθώς η υψηλή δόση οδηγεί σε συσσώρευση στους ιστούς αυξάνοντας τον χρόνο δράσης του φαρμάκου και τέλος καταστέλλει το ανοσοποιητικό σύστημα αυξάνοντας τον αριθμό των λοιμώξεων [4] [13].

Χορήγηση σε παιδιά : Τα παιδιά παρουσιάζουν διαφορετική φαρμακοκινητική σε σχέση με τους ενήλικες. Ειδικότερα έχουν διαφορετική σύνδεση με πρωτεΐνες, μεγαλύτερο όγκο κατανομής V_d , μικρότερα ποσοστά λίπους και ένα μη ώριμο ηπατικό και νεφρικό σύστημα. Επομένως υπάρχουν διαφορετικά πρότυπα δοσολογίας και χρήσης της θειοπεντάλης στα παιδιά. Για την εισαγωγή στην αναισθησία γίνεται χρήση ενδοφλέβιας θειοπεντάλης με δόση 5-6 mg/kg. Τα παιδιά ηλικίας 5-13 μεταβολίζουν την θειοπεντάλη με διπλάσιο ρυθμό σε σύγκριση με τους ενήλικες. Ενδοφλέβια δόση 10 mg/kg είναι το ανώτατο επιτρεπτό όριο. Επίσης χρήση θειοπεντάλης 10% (20 με 30 mg/kg) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για αναισθησία με χορήγηση από το ορθό. Τέλος χορηγείται και στις μονάδες εντατικής θεραπείας (ΜΕΘ) παιδών με συνεχής χορήγηση (2 με 4 mg/kg/hr) με σκοπό να αντιμετωπιστεί η αυξημένη ενδοκρανιακή πίεση [14].

1.5 Τοξικότητα θειοπεντάλης

Οι γενικές ανεπιθύμητες δράσεις της θειοπεντάλης είναι η αναπνευστική καταστολή, η μπερδεμένη ομιλία, σιελόρροια, λαρυγγειοσπασμοί και πτώση της αρτηριακής πίεσης. Στην περίπτωση της αναπνευστικής καταστολής καθώς αποτελεί κύριο μηχανισμό δράσης του φαρμάκου πρέπει να γίνεται προσεκτική παρακολούθηση της αναπνευστικής λειτουργίας. Αλλεργικές αντιδράσεις επικίνδυνες για την ζωή είναι σπάνιες. Υπερδοσολογία μπορεί να προκληθεί από ταχύς και συνεχής χορηγήσεις με αποτέλεσμα την πτώση της αρτηριακής πίεσης σε επικίνδυνο βαθμό. Επίσης από τέτοια χορήγηση μπορεί να προκληθεί άπνοια και βήχας. Τέλος, μειώνει την δράση των αντιπηκτικών και ενισχύει την δράση των ηρεμιστικών οπιούχων και οιοπνεύματος[15] [16] [17].

1.6 Θεραπευτικά, τοξικά θανατηφόρα επίπεδα

Δραστική ουσία	Επίπεδα σε ορό σε mg/L		
Θειοπεντάλη	Θεραπευτικά	Τοξικά	Θανατηφόρα
-	1-5	>7	>10-15

Πίνακας 1. Θεραπευτικά, τοξικά και κωματώδη-θανατηφόρα επίπεδα θειοπεντάλης στο ορό του αίματος. [18]

2. Αέρια Χρωματογραφία (GC)

2.1 Αρχή λειτουργίας μεθόδου αέριας χρωματογραφίας

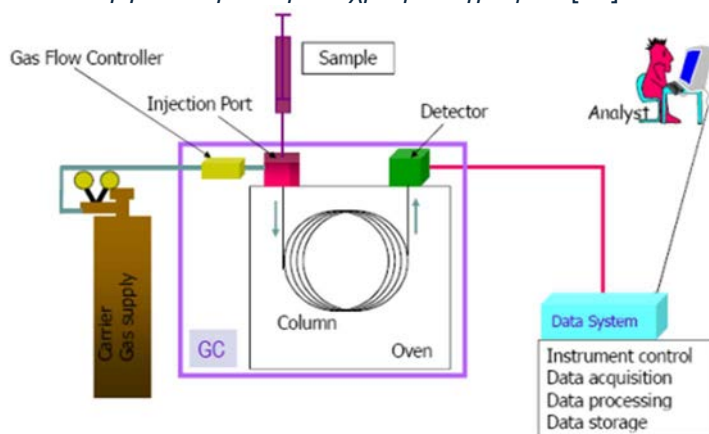
Η αέρια χρωματογραφία χαρακτηρίζεται από δύο φάσεις:

Στατική φάση: Εσωτερικό τριχοειδούς αναλυτικής στήλης.

Κινητή φάση: Φέρον αέριο που κινείται μέσα στην αναλυτική στήλη.

Η βασική αρχή στην οποία βασίζεται η αέρια χρωματογραφία είναι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συστατικών του δείγματος και της αναλυτικής στήλης (στατική φάση). Η διαδικασία περιλαμβάνει την εισαγωγή του δείγματος με ένεση στον θερμαινόμενο εισαγωγέα, έπειτα ένα ήπιο ρεύμα ηλίου ή αζώτου το παρασύρει στο εσωτερικό της αναλυτικής στήλης. Καθώς το δείγμα περνά μέσω της στήλης τα πτητικότερα συστατικά, τα οποία αλληλοεπιδρούν λιγότερο με την στατική φάση θα κινηθούν γρηγορότερα εντός της στήλης σε σχέση τα λιγότερο πτητικά συστατικά οπότε θα εξέλθουν σε μικρότερο χρονικό διάστημα και θα εισέλθουν στον ανιχνευτή. Επομένως τα συστατικά που διαχωρίζονται τα εξέλθουν σε διαφορετικούς χρόνους. Η χρονική διάρκεια από την στιγμή της εισαγωγής μέχρι την είσοδο στον ανιχνευτή ονομάζεται χρόνος έκλουσης (R_t) και είναι χαρακτηριστική για κάθε χημική ουσία. [19]

Εικόνα 4 Οργανολογία αέριου χρωματογράφου.[19]



2.2 Οργανολογία αέριας χρωματογραφίας

2.2.1 Φέρον αέριο

Το φέρον αέριο είναι απαραίτητο για την λειτουργία του οργάνου καθώς ο ρόλος του είναι να μεταφέρει το δείγμα μέσα από το την αναλυτική στήλη. Τα κύρια αέρια που χρησιμοποιούνται είναι το ήλιο, υδρογόνο και το άζωτο. Επομένως λόγω της κύριας λειτουργίας που έχει υπάρχουν ορισμένοι παράγοντες που πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν. Αρχικά πρέπει να είναι αδρανές και να μην αλληλοεπιδρά ούτε με την στήλη και το δείγμα. Δεύτερον πρέπει να είναι σε υπερκαθάρη κατάσταση και χωρίς κανένα ίχνος υγρασίας προκειμένου να αποφευχθούν ανεπιθύμητες αλληλεπιδράσεις η οποίες απενεργοποιούν τη στατική φάση. Τρίτον το κόστος η ασφάλεια και η διαθεσιμότητα είναι σημαντική παράγοντες για την επιλογή του [19].

Ήλιο: Χρησιμοποιείται σε αρκετά μεγάλο βαθμό λόγω της αδράνειας του και της ταχύτητας ροής. Προσφέρει ισορροπία μεταξύ χρόνου ανάλυσης και ακρίβεια ανάλυσης.

Υδρογόνο: Υψηλή αποτελεσματικότητα καθώς έχει τον μικρότερο χρόνο ανάλυσης με πολύ υψηλή ακρίβεια. Λόγω της ευφλεκτότητας του αποτελεί κίνδυνο ασφαλείας.

Άζωτο: Πιο οικονομική επιλογή σε σχέση με τα άλλα δυο αλλά αυξάνει τους χρόνους κατακράτησης.

Τέλος για την επιλογή του αερίου πρέπει να υπάρχει συμβατότητα με τους ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται σε κάθε σύστημα. [19]

2.2.2 Σύστημα εισαγωγής δείγματος (injection system)

Η διαδικασία της χρωματογραφικής ανάλυσης ξεκινάει με την εισαγωγή του δείγματος στην αναλυτική στήλη. Και σε αυτό το στάδιο υπάρχουν αρκετές προϋποθέσεις προκειμένου να λειτουργήσει σωστά το σύστημα. Αρχικά πρέπει να οδηγεί σε επίτευξη μέγιστης διαχωριστικής ικανότητας της

στήλης. Δεύτερον πρέπει να επιτρέπει ακριβείς και αναπαραγωγικές εγχύσεις μικρών ποσοτήτων από πρότυπα διαλύματα. Τέλος δεν πρέπει να προκαλεί καμία αλλαγή στην σύσταση του δείγματος ανεξαρτήτως σημείου βρασμού, πολικότητας και συγκέντρωσης [20].

Υπάρχουν τρεις κύριες τεχνικές εισαγωγής δείγματος:

1. Εισαγωγή με διαχωρισμό (split injection).

Το δείγμα βρίσκεται σε υγρή κατάσταση και εισέρχεται σε ένα θερμαινόμενο liner, το οποίο αποτελεί μέρος του συστήματος εισαγωγής, και πραγματοποιείται στιγμιαία εξάτμιση. Έπειτα τυρβώδης ροή από το φέρον αέριο δημιουργεί ένα μίγμα μεταξύ του δείγματος και του αερίου. Το liner είναι σχεδιασμένο ώστε να επιτρέπει μόνο ένα μικρό μέρος του δείγματος να εισέλθει στην αναλυτική στήλη. Το υπόλοιπο δείγμα εξέρχεται το σύστημα μέσω της εξόδου διαχωρισμού (split outlet). Η ποσότητα του δείγματος που εισέρχεται στην αναλυτική στήλη καθορίζεται από την αναλογία διαχωρισμού (split ratio) [20].

Πλεονεκτήματα

Επιτρέπει συγκεκριμένη ποσότητα δείγματος να εισέλθει στην στήλη αποτρέποντας την υπερφόρτωση της.

Μπορεί να γίνει ανάλυση δείγματος με υψηλή συγκέντρωση αναλυτών χωρίς να προκληθεί φθορά στην στήλη.

Περιορισμοί

Υπάρχει μεγάλη απώλεια οπότε δεν είναι ιδανική για trace analysis.

Δεν είναι ιδανική για πτητικά συστατικά.

Μπορεί να οδηγήσει σε θερμική αποσύνθεση[20].

2. Εισαγωγή χωρίς διαχωρισμό (splitless injection)

Αυτή η τεχνική έχει αρκετές ομοιότητες με την προηγούμενη, καθώς τα αρχικά στάδια κατεργασίας του δείγματος είναι παρόμοια. Κατά την διάρκεια της εγχύσεως η βαλβίδα διαχωρισμού παραμένει σταθερή προκειμένου το δείγμα να μην μπορεί να εξέλθει από την έξοδο διαχωρισμού. Επομένως διοχετεύεται όλο μέσα στην αναλυτική στήλη μέσω της ροής του φέρον αερίου. Η βαλβίδα παραμένει κλειστές για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα το οποίο ονομάζεται splitless time προκειμένου όλο το δείγμα να εισέλθει στην στήλη. Αφού παρέλθει η χρονική διάρκεια του splitless time η βαλβίδα ανοίγει προκειμένου να εξέλθουν δευτερογενή αέρια από το liner και να αποφευχθεί οποιαδήποτε επιμόλυνση ή carryover από προηγούμενο δείγμα [20].

Πλεονεκτήματα

Έχει υψηλή ευαισθησία για χαμηλές συγκεντρώσεις
Κατάλληλο για συστατικά με υψηλό σημείο βρασμού

Περιορισμοί

Χρειάζεται πολύπλοκη ρύθμιση (χρόνος splitless και θερμοκρασιακό πρόγραμμα)
Λόγω παρατεταμένης θέρμανσης μπορεί να προκαλέσει θερμική αποσύνθεση[20].

3. Εισαγωγή επί της στήλης (On-Column Injection)

Με αυτή την μέθοδο εισαγωγής το δείγμα εισάγεται κατευθείαν στην αναλυτική στήλη σε υγρή μορφή μέσω μιας λεπτής σύριγγας. Σε αυτή την μέθοδο προκατεργασία με εξάτμισή δεν πραγματοποιείται. Χρησιμοποιώντας μια αρχική θερμοκρασία μικρότερη από σημείο βρασμού του διαλύτη αποτρέπεται η επιλεκτική εξάτμιση με αποτέλεσμα όλα τα συστατικά του δείγματος να βρίσκονται στην υγρή μορφή και να εισάγονται όλα μαζί στην αναλυτική στήλη. Επομένως αυτή η τεχνική είναι ιδανική για δείγματα που περιέχουν συστατικά με υψηλό σημείο βρασμού τα οποία δεν θα μπορούσαν να μεταφερθούνε στην στήλη με τις προηγούμενες τεχνικές [20].

Πλεονεκτήματα

Ελαχιστοποίηση θερμικής αποσύνθεσης

Υψηλή επαναληψιμότητα και ακρίβεια ποσοτικοποίησης

Περιορισμοί

Τεχνικά απαιτητική και λιγότερο ανθεκτική

Κίνδυνος επιμόλυνσης της στήλης

Δύσκολη αυτοματοποίηση[20].

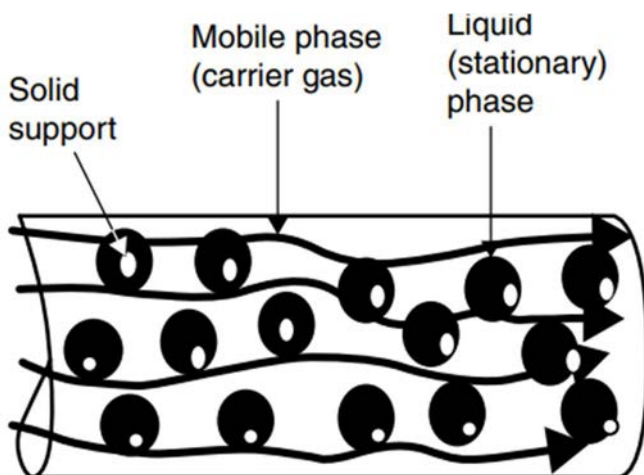
2.2.3 Αναλυτική στήλη

Η αναλυτική στήλη αποτελεί το κεντρικό στοιχείο του συστήματος αέριας χρωματογραφίας καθώς έχει καθοριστικό ρόλο στην αποδοτικότητα, την ακρίβεια και το βάθος του διαχωρισμού που πραγματοποιείται. Σε αυτή λαμβάνει χώρα ο διαχωρισμός των αναλυτών μέσω των αλληλεπιδράσεων τους με την στατική φάση και ανάλογα την πτητικότητα τους[21].

Υπάρχουν δυο κατηγορίες αναλυτικής στήλης που χρησιμοποιούνται:

1. Πλήρης (packed)

Είναι κατασκευασμένες κυρίως από γυαλί, ανοξείδωτο ατσάλι και αλουμίνιο. Η πλήρης στήλη δεν έχει κενό εσωτερικό, καθώς στο εσωτερικό τοποθετούνται στερεή φορείς(διατομίτης ή άνθρακα) οι οποίοι είναι επικαλυμμένοι με την στατική φάση. Για μη πολικά υλικά χρησιμοποιούνται οι πολυσιλοξάνες και για πολικά υλικά η πολυαιθυλενογλυκόλη. Έχουν μήκος 1-5m και διάμετρο 2-5mm [21].



Εικόνα 5 Πλήρης αναλυτική στήλη [22]

Πλεονεκτήματα

Έχουν μεγάλη χωρητικότητα δείγματος

Χρήση σε αέρια και υγρά δείγματα με διαφορετικά υλικά προσρόφησης και στατική φάση

Αρκετά ανθεκτικές

Οικονομικότερη επιλογή σε σχέση με άλλα είδη

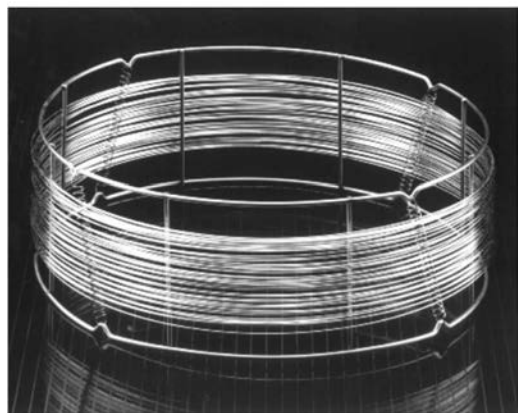
Περιορισμοί

Μεγάλοι χρόνοι ανάλυσης

Χαμηλή αποτελεσματικότητά και βάθος ανάλυσης.

Τριχοειδής (capillary)

Κατασκευάζονται από τηγμένο πυρίτιο και έχουν ένα εξωτερικό προστατευτικό στρώμα (πολυιμίδιο). Το εσωτερικό είναι κενό και η στατική φάση είναι χημικά ενωμένη με το εσωτερικό τοίχωμα της στήλης. Για την στατική φάση χρησιμοποιούνται πολυμερή από σιλικόνη τα οποία είναι συνήθως χημικά τροποποιημένα προκειμένου να εισάγουν μια λειτουργική ομάδα όπως μεθυλική ομάδα ή μια φαινυλική ομάδα ανάλογα την πολικότητα. Επίσης γίνεται και χρήση πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG). Έχουν μήκος 10-60m και διάμετρο 0,20-0,53mm [21].



Εικόνα 6 Τριχοειδής (capillary) στήλη [22]

Πλεονεκτήματα

Υψηλό βάθος ανάλυσης

Χαμηλό χρόνο ανάλυσης

Υψηλή ευαισθησία και εκλεκτικότητα

Μικρό όγκο δείγματος

Περιορισμοί

Εύθραυστες και με υψηλό κόστος

Ευαισθησία σε επιμολύνσεις

Στις σύγχρονες αναλύσεις αέριας χρωματογραφίας η τριχοειδής στήλη είναι αυτή που χρησιμοποιείται λόγω της υψηλής ακρίβειας που προσφέρει [21].

2.2.4 Ανιχνευτές

Ο σκοπός ενός ανιχνευτή είναι να μας δίνει μια απόκριση, η οποία να είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση ή την ποσότητα ενός συστατικού που περνά μέσα από αυτόν και η απόκριση αυτή να έχει τη μορφή ενός σήματος, το οποίο μπορεί να μετρηθεί. Για να χρησιμοποιηθεί ένας ανιχνευτής πρέπει να πληροί κάποιες προϋποθέσεις[23]:

- Υψηλή Ευαισθησία (χαμηλά όρια ανίχνευσης)
- Σταθερότητα και επαναληψιμότητα
- Ευρεία γραμμική περιοχή
- Χαμηλό θόρυβο
- Αξιοπιστία
- Γρήγορους χρόνους απόκρισης
- Ευκολία στο χειρισμό
- Παρόμοια απόκριση σε όλες τις διαχωριζόμενες ουσίες
- Να μην καταστρέφει το δείγμα

Υπάρχουν αρκετά είδη ανιχνευτών που χρησιμοποιούνται σε σύζευξη με αέρια χρωματογραφία. Οι πιο δημοφιλείς είναι[23]:

1. Ανιχνευτής Ιονισμού Φλόγας (FID)
2. Ανιχνευτής θερμικής αγωγιμότητας (TCD)
3. Ανιχνευτής δέσμμευσης ηλεκτρονίων (ECD)
4. Ανιχνευτής ιονισμού αζώτου φωσφόρου (NPD)

3. Φασματομετρία μάζας (MS)

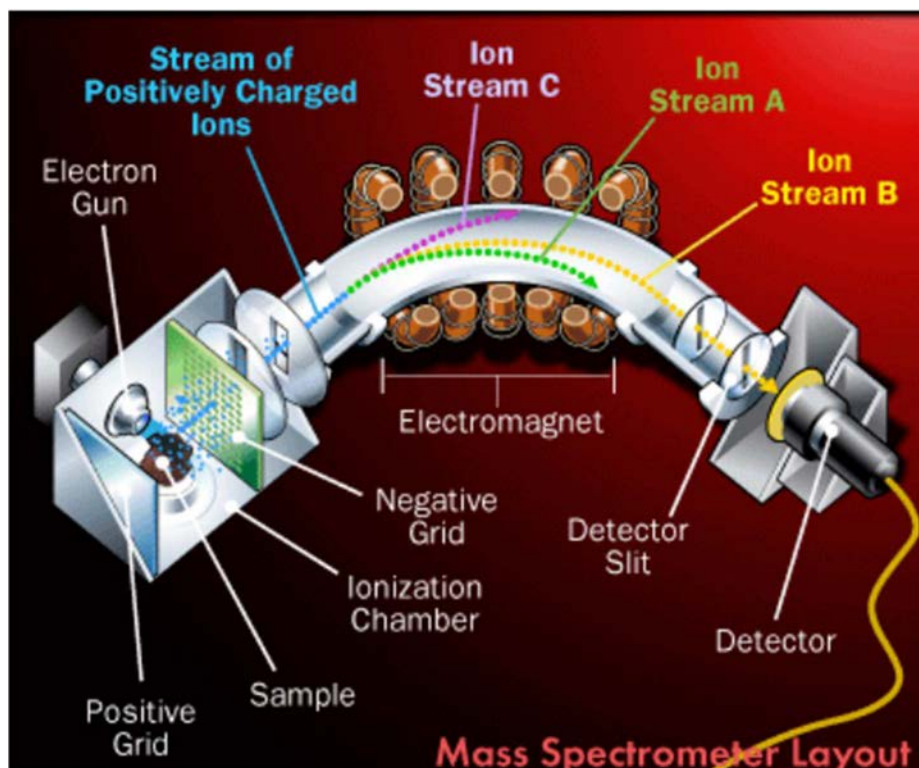
3.1 Αρχή λειτουργίας φασματογράφου μάζας

Η βασική αρχή στην οποία βασίζεται η φασματομετρία μάζας είναι ο ιοντισμός των μορίων. Στην φασματομετρία ηλεκτρόνια υψηλής ενέργειας χτυπούν το δείγμα, στο εσωτερικό του φασματομέτρου μάζας, διασπώντας τα μόρια και στην συνέχεια υπολογίζονται οι μάζες των θραυσμάτων και οι πληροφορίες αυτές χρησιμοποιούνται για την ανακατασκευή του μορίου. Ο φασματογράφος μάζας δηλαδή έχει ως κύριο ρόλο τον ιοντισμό των μορίων σε υψηλό κενό, την ταξινόμηση των μορίων σύμφωνα με την μάζα τους και την καταγραφή της αφθονίας των ιόντων κάθε μάζας. [24]

3.2 Οργανολογία φασματογράφου μάζας

Στην απλούστερη μορφή του ένα φασματοφωτόμετρο αποτελείται από 5 τμήματα [25]:

1. Εισαγωγέας δείγματος
2. Πηγή ιόντων
3. Αναλυτής μαζών
4. Ανιχνευτής
5. Σύστημα δεδομένων [25]



Εικόνα 7 Οργανολογία Φασματογράφου μάζας [42]

3.2.1 Σύστημα εισαγωγής δείγματος(injection system)

Ένα δείγμα που μελετάται στο φασματομέτρο μαζών μπορεί να είναι αέριο, υγρό ή στερεό. Για να εισέλθει το δείγμα στον θάλαμο ιοντισμού πρέπει να μεταβεί στην αέρια κατάσταση. Ανάλογα με την πτητικότητα κάθε δείγματος χρησιμοποιούνται διαφορετικά συστήματα εισαγωγής [25]:

Για πτητικά δείγματα

Σε δείγμα αερίων χρησιμοποιείται ένα απλό σύστημα εισαγωγής. Σε αυτό το σύστημα η πίεση είναι χαμηλή όχι όμως σε ίδιο βαθμό όπως στο θάλαμο ιοντισμού. Ο θάλαμος ιοντισμού βρίσκεται σε συνθήκες χαμηλής πίεσης. Για να διασφαλιστεί ότι στο εσωτερικό του θαλάμου ιοντισμού διέρχεται ένα σταθερό ρεύμα μορίων το δείγμα διοχετεύεται μέσα από την μοριακή σπή,

πριν εισέλθει στον θάλαμο. Το ίδιο σύστημα μπορεί να εφαρμοστεί και σε πτητικά υγρά ή στερεά. Στην περίπτωση που ορισμένες ουσίες παρουσιάζουν χαμηλή πτητικότητα το σύστημα εισαγωγής πρέπει να συνδυαστεί με ένα φούρνο προκειμένου να αυξηθεί η τάση ατμών του δείγματος. Σε αυτή την περίπτωση πρέπει να υπάρχει κατάλληλη ρύθμιση του θερμοκρασιακού προγράμματος του φούρνου προκειμένου να αποφευχθεί οποιαδήποτε θερμική αποσύνθεση [25].

Για μη πτητικά δείγματα

Σε αυτές τις περιπτώσεις πρέπει να χρησιμοποιηθούν αλλά συστήματα εισαγωγής. Το πιο σύνηθες είναι η μέθοδος με απευθείας εισαγωγή δείγματος (direct probe). Πιο συγκεκριμένα το δείγμα τοποθετείται σε ένα βρόγχο ή ακίδα λεπτού σύρματος και έπειτα εισέρχεται στον θάλαμο ιοντισμού μέσω θύρας κενού. Το σύρμα έχει την δυνατότητα να θερμαίνεται προκειμένου οι ατμοί από το δείγμα να αναπτύσσονται κοντά στην δέσμη των ηλεκτρονίων [25].

Την τελευταία δεκαετία έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι που δεν απαιτούν την προεργασία που αναφέρεται παραπάνω. Σε διάφορες τεχνικές χημικού ιοντισμού υπό ατμοσφαιρική πίεση το δείγμα τοποθετείται σε ένα ρεύμα ιοντισμένου αερίου ή εκνέφωμα διαλύτη, μεταξύ της πηγής ιοντισμού και της εισόδου στον αναλυτή μαζών[25].

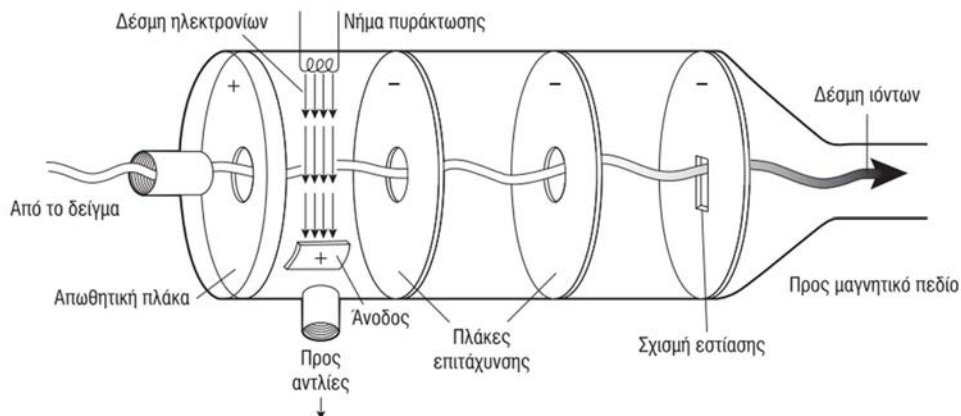
3.2.2 Πηγή ιόντων

Ο ρόλος της πηγής ιόντων είναι η μετατροπή των μορίων του δείγματος σε φορτισμένα σωματίδια. Οι δυο πιο συνηθισμένες μέθοδοι ιοντισμού είναι[25]:

- Ιοντισμός με δέσμη ηλεκτρονίων (Electron Ionization, EI)
- Χημικός Ιοντισμός (CI)

Ιοντισμός με δέσμη ηλεκτρονίων (Electron Ionization, EI)

Αποτελεί μια από τις πιο κλασικές και διαδεδομένες μεθόδους ιοντισμού στην φασματομετρία μαζών. Ειδικότερα, μια δέσμη ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας εκπέμπεται από ένα νήμα πυράκτωσης, το οποίο έχει θερμανθεί σε θερμοκρασίες χιλιάδων βαθμών Κελσίου. Τα ηλεκτρόνια στην συνέχεια προσκρούονται στα μόρια της προς ανάλυση ουσίας. Κατά την σύγκρουση, απομακρύνεται ένα ηλεκτρόνιο από το μόριο δείγματος, με αυτό τον τρόπο σχηματίζεται ένα κατιόν. Τα φορτισμένα μόρια καθοδηγούνται μέσω μιας θετικά φορτισμένης απωθητικής πλάκας προς μια σειρά πλακών επιτάχυνσης. Η υψηλή διαφορά δυναμικού στις πλάκες επιταχύνει τα ιόντα σχηματίζοντας μια δέσμη που κινείται με μεγάλη ταχύτητα. Για να ληφθούν αναπαραγόμενα φάσματα εφαρμόζεται μια σταθερή δέσμη ηλεκτρονίων -70eV[25].



Εικόνα 8 Θάλαμος με τεχνική EI [25]

Τα κυρία πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου [25]:

Προκύπτουν αναπαραγόμενα φάσματα

Ισχυρή τεχνική για μικρά, πτητικά και σταθερά οργανικά μόρια

Οικονομική και αξιόπιστη

Περιορισμοί

Εκτεταμένη θραυσματοποίηση

Δύσκολη ανάλυση μεγάλων και θερμικά ασταθών μορίων λόγω της εξάχνωσης

Χημικός Ιοντισμός (CI)

Ο μηχανισμός δράσης αυτής της μεθόδου είναι:

Τα μόρια του δείγματος ενώνονται σε ένα ρεύμα ιοντισμένου αερίου αντιδραστηρίου το οποίο είναι σε μεγάλη περίσσεια σε σχέση με το δείγμα. Η σύγκρουση των μορίων του δείγματος με το προϊόντισμένο αέριο αντιδραστήριο οδηγεί σε ιοντισμό ορισμένων μορίων του δείγματος μέσω διάφορων μηχανισμών (μεταφοράς πρωτονίου, μεταφοράς ηλεκτρονίου και σχηματισμού προϊόντος προσθήκης). Τα πιο συνηθισμένα αέρια αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται σε αυτή την τεχνική είναι: μεθάνιο, αμμωνία, ισοβουτάνιο και μεθανόλη. Για την επιλογή του αερίου πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η αποτελεσματικότητα της πρωτονίωσης των μορίων καθώς δεν πρέπει να λαμβάνει χώρα υπερβολική θραυσματοποίηση του δείγματος το οποίο επηρεάζει τα αποτελέσματα της ανάλυσης[25].

Πλεονεκτήματα

Ήπιος ιοντισμός

Λιγότερη θραυσματοποίηση σε σχέση με τον EI-MS

Δυνατότητα επιλογής αερίου αντιδραστηρίου για ρύθμιση του βαθμού ιοντισμού και θραυσματοποίησης.

Περιορισμοί

Εφαρμόζεται κυρίως σε πτητικές ή ημι-πτητικές ενώσεις, αλλά δεν είναι κατάλληλη για εξαιρετικά μεγάλα ή πολύπλοκα μόρια

3.2.3 Αναλυτής μαζών

Αφού ιοντιστεί ένα δείγμα και εισέρχεται στον αναλυτή μαζών, ο ποιος διαχωρίζει τα ιόντα ανάλογα με τον λόγο μάζας τους προς το φορτίο (m/z)

Είδη αναλυτών μάζας[23]:

Απλής εστίασης (μαγνητικός)

Διπλής εστίασης (Μαγνητικός και ηλεκτροστατικός)

Τετραπολικός με φίλτρο μαζών

Τετραπολικός με παγίδα ιόντων

Χρόνου πτήσεως (TOF-MS)

Τετράπολα φασματομέτρα

Αποτελείται από 4 μεταλλικές ράβδους. Μια RF/DC τάση που μεταβάλλεται από χαμηλή προς υψηλότερη τιμή, με σταθερό το λόγο RF/DC, επιδρά στην τροχιά των ιόντων, τα διαχωρίζει ανάλογα με το λόγο m/z και τα οδηγεί στον ανιχνευτή. Επομένως αυτές οι συνέχεις μεταβολές επιτρέπουν την ανάλυση ιόντων με διαφορετικές τιμές m/z [23].

Χαρακτηριστικά τετραπόλου[23]:

- Είναι μικρό όργανο και ελαφρύ
- Έχει διαχωριστική ικανότητα 1 (μονάδα)
- Περιοχή μάζας από 2 μέχρι 2000
- Χαμηλό κόστος.

3.2.4 Ανιχνευτής

Στο τέλος του αναλυτή βρίσκεται μια σχισμή από την οποία διέρχονται τα ιόντα και έπειτα ακολουθεί ο ανιχνευτής ο οποίος συνδέεται με ένα πολλαπλασιαστή. Τα ιόντα προσπίπτουν σε μία επιφάνεια του ανιχνευτή από την οποία εκπέμπονται ηλεκτρόνια, τα οποία πολλαπλασιαζόμενα κινούνται προς την άνοδο, όπου και συλλέγονται. Το σήμα του ανιχνευτή είναι ανάλογο με τον αριθμό των ιόντων που χτυπούν σε αυτόν. Τέλος το σύστημα του ανιχνευτή παράγει ένα γράφημα που δείχνει την αφθονία των ιόντων σε σχέση με τον λόγο μάζας προς φορτίο (m/z), το φάσμα μάζας. [24]

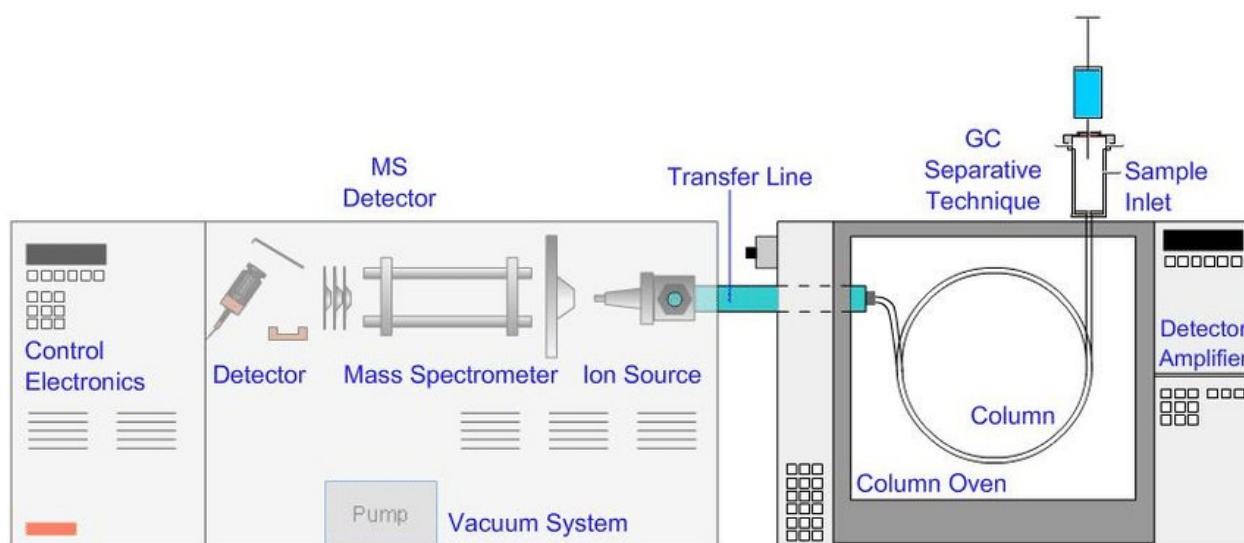
4. Αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (GC-MS)

Το GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectrometry) είναι ένα συνδυασμένο σύστημα που ενσωματώνει την αέρια χρωματογραφία (GC) για τον διαχωρισμό των συστατικών ενός μείγματος και τη φασματομετρία μάζας (MS) για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίησή τους. Αποτελεί μία από τις πιο ισχυρές αναλυτικές τεχνικές για την ανίχνευση οργανικών ενώσεων σε διάφορους τομείς όπως η φαρμακευτική, η εγκληματολογία, η περιβαλλοντική ανάλυση και η επιστήμη τροφίμων. Τα κυρία μέρη του συστήματος περιλαμβάνουν το σύστημα εισαγωγής, το σύστημα φέροντος αερίου, την χρωματογραφική στήλη, την μονάδα διασύνδεσης που διασφαλίζει την ομαλή μεταφορά των διερχόμενων συστατικών από την στήλη του GC στο φασματογράφο μάζας και τέλος είναι το σύστημα του φασματογράφου μάζας του οποίου η οργανολογία αναλύεται στο κεφ. 3.2 [26].

Η GC-MS παρέχει τη δυνατότητα[26]:

- ταυτοποίησης και ποσοτικού προσδιορισμού πτητικών και ημι-πτητικών οργανικών ενώσεων σε πολύπλοκα μίγματα.

- προσδιορισμού του μοριακού βάρους και μερικές φορές τον προσδιορισμό της στοιχειακής σύνθεσης άγνωστων οργανικών ενώσεων σε πολύπλοκα μίγματα.
- τον συντακτικό προσδιορισμό άγνωστων οργανικών ενώσεων σε πολύπλοκα μίγματα με την δυνατότητα αντιστοίχισης με τα φάσματα αναφοράς.



Εικόνα 9 Οργανολογία συστήματος GC-MS [27]

5. Προκατεργασία δείγματος

Η προετοιμασία των βιολογικών δειγμάτων έχει ως κύριους στόχους τη διαλυτοποίηση και την ομογενοποίηση των αναλυτών, τη διάσπαση των πρωτεϊνικών δεσμών, την προσθήκη εσωτερικού προτύπου και την απομάκρυνση παρεμβολών που προέρχονται από το υπόστρωμα. Επιπλέον, η συγκέντρωση του αναλύτη μπορεί να τροποποιηθεί είτε μέσω προσυγκέντρωσης (για αύξηση της ευαισθησίας) είτε μέσω αραίωσης (για προσαρμογή στις συνθήκες ανάλυσης), επιτρέποντας την επίτευξη χαμηλότερων ορίων ανίχνευσης. Παράλληλα, η σταθεροποίηση, η

αποικοδόμηση ή η παραγωγοποίηση του αναλύτη παίζουν κρίσιμο ρόλο κατά τη διαδικασία εκχύλισης, τον χρωματογραφικό διαχωρισμό και την ανίχνευσή του. [28]

Η προκατεργασία του δείγματος επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από της φυσικοχημικές ιδιότητες του αναλύτη όπως η πολικότητα, το φορτίο, η θερμική σταθερότητα, το μοριακό βάρος. [29]

5.1 Υγρό-υγρό εκχύλιση (LLE)

Η υγρή-υγρή εκχύλιση (Liquid-Liquid Extraction, LLE) αποτελεί μια διαδεδομένη τεχνική εκχύλισης αναλυτών από βιολογικά δείγματα, όπως το ολικό αίμα, το πλάσμα, τον ορό και τα ούρα. Η αρχή της τεχνικής βασίζεται στην κατανομή των συστατικών του δείγματος μεταξύ δύο μη αναμίξιμων υγρών φάσεων, σύμφωνα με τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες: (α) την υδατική φάση, που περιλαμβάνει το βιολογικό δείγμα, και (β) έναν οργανικό διαλύτη, ο οποίος επιλέγεται ώστε να μεγιστοποιείται η εκλεκτική εκχύλιση του επιθυμητού αναλύτη. [30]

Οι κύριοι παράμετροι που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα μιας εκχύλισης υγρού-υγρού [30]:

- Η επιλογή του διαλυτή εκχύλισης
- Η ιονική ισχύς του δείγματος
- Το pH του δείγματος

Επιλογή του διαλύτη εκχύλισης [31]

- Δεν θα πρέπει να αντιδρά με την προς εκχύλιση ουσία
- Δεν θα πρέπει να είναι τοξικός και εύφλεκτος
- Θα πρέπει να είναι οπτικά διαφανής ώστε να είναι δυνατές οι φασματοφωτομετρικές μετρήσεις σε επόμενα στάδια

- Η διαλυτότητα της εκχυλιζόμενης ουσίας στο διαλύτη εκχύλισης πρέπει να είναι όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ενώ η διαλυτότητα των συνυπαρχουσών ανεπιθύμητων ουσιών πρέπει να είναι όσο το δυνατόν μικρότερη

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΘΕΙΟΠΕΝΤΑΛΗΣ ΜΕ GC-MS

1^η Βιβλιογραφική αναφορά [32]

Προκατεργασία δείγματος για GC:

- 200 μ L δείγματος ορού
- 100 μ L διαλύματος 0.5 N υδροχλωρικού οξέος (HCl)
- 15 μ L εσωτερικού προτύπου
- Εκχύλιση με τη χρήση στήλης Extralut
- Φυγοκέντρωση στις 5.000 g για 5 λεπτά
- 2 μ L από το υπερκείμενο διάλυμα εγχύθηκαν στο σύστημα GC

Φέρον Αέριο (Carrier Gas - Ferron Gas):

- Χρησιμοποιήθηκε ήλιο (Helium) ως φέρον αέριο.
- Ροή: 2.0 mL/min στους 32 psi.

Χρωματογραφική Στήλη (GC Column):

- **Στήλη:** Phenomenex Zebron ZB-5ms (30m $\times$ 0.32mm, 0.25 μ m πάχος φιλμ)

Πρόγραμμα Θερμοκρασίας:

1. Θερμοκρασία έγχυσης: 200°C
2. Στάδιο 1: Διατήρηση για 1 λεπτό

3. Αύξηση 10°C/min μέχρι τους 260°C (κράτημα για 2 λεπτά)
4. **Αύξηση 30°C/min μέχρι τους 300°C** (κράτημα για 0.5 λεπτό)

2^η Βιβλιογραφική αναφορά [33]

Προκατεργασία δείγματος

- Χρησιμοποιήθηκε 1 mL ορού για την ανάλυση.
- Προστέθηκαν 30 µL υδατικού διαλύματος κυκλοβαρβιτάλης (εσωτερικό πρότυπο).
- Προστέθηκαν 2 mL κορεσμένου διαλύματος θειικού αμμωνίου.
- Το μείγμα εκχυλίστηκε με 5 mL χλωροφορμίου.
- Φυγοκέντρωση στις 3.000 g για 10 λεπτά.
- Η οργανική φάση αποξηράνθηκε με τη χρήση θειικού νατρίου.
- Το εκχύλισμα συμπυκνώθηκε και εγχύθηκε στον αέριο χρωματογράφο.

Φέρον Αέριο (Carrier Gas - Ferron Gas)

- Χρησιμοποιήθηκε καθαρό άζωτο ως φέρον αέριο.
- Ρυθμός ροής: 30 mL/min.

Χρωματογραφική Στήλη (GC Column)

- Γυάλινη στήλη: Μήκος 1.8 m, εσωτερική διάμετρος 2 mm.
- Στατική φάση: GP 2% SP 2510 DA σε Supelcoport (100/120 mesh).
- Σύστημα GC: Hewlett Packard 5880A με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (FID)

Θερμοκρασίες:

- Φούρνος: 210°C
- Θερμοκρασία έγχυσης: 230°C
- Θερμοκρασία ανιχνευτή: 240°C

3^η Βιβλιογραφική αναφορά. [34]

Προκατεργασία δείγματος

- 1 mL δείγματος
- 40 μ L μίγματος εσωτερικού προτύπου (Phenobarbital-d5)
- 1 g NaCl
- 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικού/ Na_2HPO_4

SPME Εκχύλιση

- Χρόνος εκχύλισης: 30 λεπτά
- Θερμοκρασία εκχύλισης: 150°C

Φέρον Αέριο (Carrier Gas - Ferron Gas):

Χρησιμοποιήθηκε ήλιο (helium) ως φέρον αέριο.

Ροή : 1 mL/min.

Χρωματογραφική Στήλη (GC Column):

Χρησιμοποιήθηκε στήλη HP-5MS GC (30m x 0.25mm x 0.25 μ m, Agilent).

Πρόγραμμα Θερμοκρασίας:

1. 1 λεπτό στους 120°C
2. Αύξηση 10°C/min έως 190°C (3 λεπτά)
3. Αύξηση 10°C/min έως 250°C (4 λεπτά)
4. Αύξηση 10°C/min έως 300°C (6 λεπτά)

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Σκοπός της εργασίας

Ο σκοπός της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας είναι η ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση της θειοπεντάλης με την χρήση αέριας χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρίας μάζας, η οποία να είναι αξιόπιστη, γρήγορη και οικονομική.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της θειοπεντάλης είναι σημαντικός καθώς χορηγείται και σε ενήλικες και σε παιδιά επομένως παρουσιάζει διαφορετική φαρμακοκινητική. Επίσης λόγω της χρήσης της στην αναισθησία τα επίπεδα της πρέπει να ελέγχονται διαρκώς και τέλος οι διαφορετικές εφαρμογές της όπως στην αναισθησία που αναφέρεται παραπάνω και στην αντιμετώπιση του RSE (Refractory status epilepticus). Επομένως, ο ποσοτικό προσδιορισμός της είναι απαραίτητος προκειμένου να αποφευχθούν οι παρενέργειες που προκαλεί.

Στα αρχικά στάδια ανάπτυξης της μεθόδου έγινε προσδιορισμός των παραμέτρων της πειραματικής διαδικασίας όπως ο όγκος διαλύτη προκειμένου να γίνει βελτιστοποίηση της μεθόδου, η επιλογή pH και οι παράμετροι λειτουργίας του GC-MS. Τέλος πραγματοποιήθηκε υπολογισμός των παραμέτρων επικύρωσης της μεθόδου και εφαρμογή σε πραγματικά κλινικά περιστατικά.

2. Οργανολογία, Αντιδραστήρια και Διαλύτες

2.1 Πρότυπα διαλύματα, Αντιδραστήρια και διαλύτες

Υπερκάθαρο νερό(type 3) συσκευή Merk direct 3Q UV.

Ανθρακικό κάλιο (Potassium Carbonate) for analysis, PRS Panreac

Μεθανόλη (methanol) Chromasolv® LC-MS grade, Fluka

Οξικός βουτυλεστέρας (butyl acetate acetate) Chromasolv® Plus for HPLC 99,7%, Sigma-Aldrich

Η θειοπεντάλη ήταν σε σκόνη υψηλής αναλυτικής καθαρότητας (THIOPENTAL VUAB INJ.SOL.1GR)

Φαινυτοΐνη χάπι (phenytoin 100 mg, Zotoin – 100)

2.2 Όργανα, συσκευές και λοιπός εξοπλισμός

Πιπέτες των 100-1000μL, 20-200μL, 2-20μL, eppendorf Research plus Tips, Gilson

Πλαστικά φυαλίδια (eppendorf), 2ml, Sarstedt (Germany)

GC/MS γυάλινα φυαλίδια (vials), Agilent Technologies

Γυάλινο φυαλίδιο 4 mL Screw Neck Vial, 45 x 14.7 mm, amber glass, 1st hydrolytic class, 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

Αναλυτικός ζυγός ακριβείας, (Electronic Balance), CHAUS®, PR series

Αναδευτήρας CLASSIC Vortex Mixer, Velp Scientifica

Αναδευτήρας, LBX V05 series

Φυγόκεντρος, Sigma 2-16P, Sigma-entrifugen



Εικόνα 10 Αναλυτικός ζυγός [37]



Εικόνα 11 Αναδευτήρας Eppendorf [36]



Εικόνα 12 Φυγόκεντρος [38]



Εικόνα 13 Αναδευτήρας [35]

2.3 Σύστημα GC/MS

Το σύστημα αέριας χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μάζας που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη της μεθόδου αποτελείται από:

- Μικροσύριγγα, CTC 10 ul, pt 2 Combi/GC-Pal, Agilent Technologies
- Αυτόματος δειγματολήπτης CTC Pal (CTC –CH 4222, Analytical Switzerland)
- Εισαγωγέας δείγματος PVT inlet, Agilent Technologies
- Σύστημα αέριου χρωματογράφου (GC), Agilent Technologies 7890A, (Wilmington, USA)
- Φασματογράφος μαζών MS 5975C inrtXL EI/CI MSD with Triple-Axis Detector, Agilent Technologies



Εικόνα 14 Σύστημα αέριου χρωματογράφου συζευγμένο με φασματογράφο μάζας.

2.4 Βιολογικά δείγματα

Για την ανάπτυξη της και την επικύρωση της μεθόδου έγινε χρήση δείγματος όρου αίματος ως υπόστρωμα. Τα δείγματα του ορού αίματος δεν περιείχαν φαρμακευτικές ουσίες ή άλλες ουσίες (blank serum). Η μέθοδος στην συνέχεια εφαρμόστηκε σε πραγματικά κλινικά δείγματα.

3. Ανάπτυξη της αναλυτικής μεθόδου GC-MS

3.1 Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων

Αρχικά για την ανάπτυξη της αναλυτικής μεθόδου παρασκευάστηκε ένα πυκνό πρότυπο διάλυμα θειοπεντάλης (stock solution) με συγκέντρωση 1000ppm (mg/L). Σε πρώτο στάδιο ζυγίστηκε σκόνη θειοπεντάλης στο αναλυτικό ζυγό ακριβείας και στην συνέχεια προστέθηκε σε κατάλληλο όγκο διαλυτή (μεθανόλη, MeOH). Το διάλυμα αναδεύτηκε για μερικά λεπτά στην συσκευή vortex και έπειτα τοποθετήθηκε στην συσκευή υπερήχων στους 30 °C για 20 λεπτά προκειμένου να γίνει πλήρης διάλυση της θειοπεντάλης στην μεθανόλη. Τέλος το διάλυμα αποθηκεύτηκε στην κατάψυξη στους -20°C.

Το stock solution χρησιμοποιήθηκε στην συνέχεια για την παρασκευή των υπόλοιπων διαλυμάτων (calibrators). Με βάση την βιβλιογραφία για τα θεραπευτικά και θανατηφόρα επίπεδα θειοπεντάλης παρασκευάστηκαν 6 διαλύματα συνολικά. Από το αρχικά διάλυμα με κατάλληλές αραιώσεις με προσθήκη μεθανόλης παρασκευάστηκαν διαλύματά με συγκεντρώσεις:

Cal.1: 100ppm (mg/L) με τελικό όγκο 2ml

200μl από stock solution (1000ppm) + 1800 μl από μεθανόλη

Cal.2: 200ppm (mg/L) με τελικό όγκο 2ml

400μl από stock solution (1000ppm) + 1600 μl από μεθανόλη

Cal.3: 400ppm (mg/L) με τελικό όγκο 2ml

800μl από stock solution (1000ppm) + 1200 μl από μεθανόλη

Cal.4: 600ppm (mg/L) με τελικό όγκο 2ml

1200μl από stock solution (1000ppm) + 800 μl από μεθανόλη

Cal.5: 800ppm (mg/L) με τελικό όγκο 2ml

1600μl από stock solution (1000ppm) + 400 μl από μεθανόλη

Cal.6: 1000ppm (mg/L), αποτελεί το stock solution

Οι συγκεντρώσεις αυτές στην συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή των σημείων της πρότυπης καμπύλης. Με βάση την καμπύλη έγινε ο ποσοτικός προσδιορισμός θειοπεντάλης στα πραγματικά κλινικά δείγματα.

3.2 Παράμετροι λειτουργίας GC-MS

ΕΙΣΑΓΩΓΕΑΣ	
Διαίρεση Δείγματος	splitless
Στήλη	J&W 19091S-433UI: 325°C: 29,95 m x 250 μm x 0,25 μm
Θερμοκρασία	Αρχική 200°C, Αύξηση στους 320 °C με ρυθμό 320 °C/min και παραμονή για 5 min
Πίεση	18,9 psi

Πίνακας 2 Παράμετροι εισαγωγή

ΦΟΥΡΝΟΣ		
Ροή	2,1 ml/min	
Χρόνος	21 min	
Θερμοκρασιακό πρόγραμμα	Αρχική 120°C	Παραμονή 1min
	Αύξηση στους 300°C με ρυθμό 15°C/min.	Παραμονή 8 min
	Εφαρμογή αντίθετης ροής στους 300°C (backflash).	13 min

Πίνακας 3 Παράμετροι Φούρνου GC

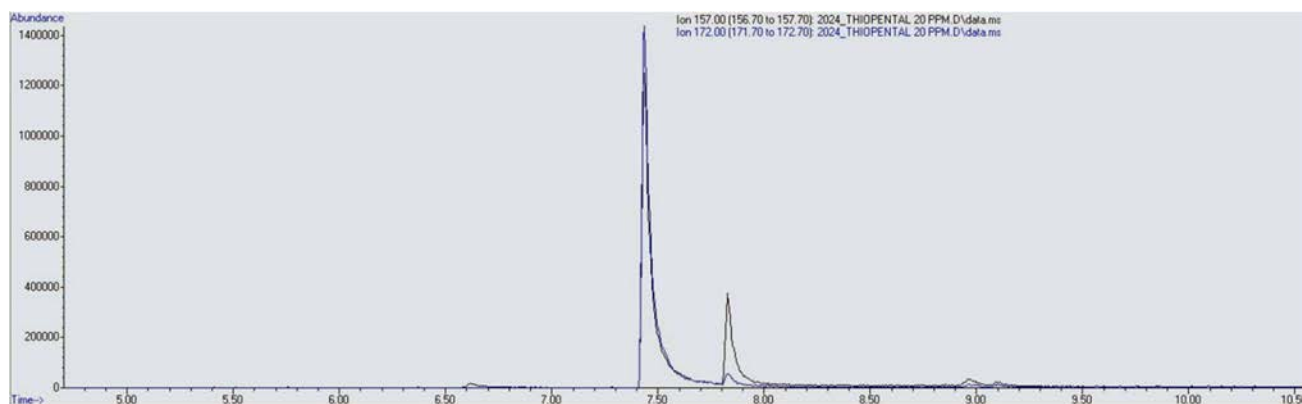
Ο χρόνος που χρειάζεται το πρόγραμμα για να ολοκληρωθεί είναι 21 min και απαιτούνται αλλά 13min στους 300 °C προκειμένου να ολοκληρωθεί το πρόγραμμα καθαρισμού της στήλης με αντίθετη ροή του φέροντος αερίου. Ο ανιχνευτής είναι ανοικτός από τα 3 min μέχρι τα 16,2 min, έπειτα παραμένει κλειστός από τα 16,2 min έως 17,1 min γιατί σε εκείνο το διάστημα εκλούεται η χοληστερόλη η οποία μειώνει τον χρόνο ζωής του ανιχνευτή και την απόκριση του, τέλος ξανά ανοίγει μέχρι το τέλος του προγράμματος στα 21 λεπτά.

Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με την τεχνική της επιλεκτικής παρακολούθησης ιόντων (SIM) για την ανίχνευση και ταυτοποίηση της θειοπεντάλης.

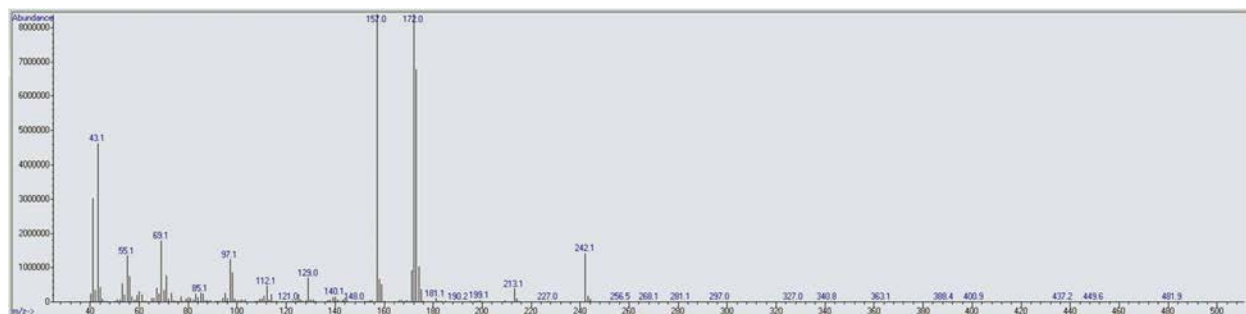
Ένωση	Χρόνος Έκλουσης (Rt) (min)	Ιόν ποσοτικοποίησης	Ιόν ταυτοποίησης
Θειοπεντάλη	8	172	157

Πίνακας 4: Χαρακτηριστικά ιόντα θειοπεντάλης και χρόνος έκλουσης της

Για την θειοπεντάλη το ιόν 172 χρησιμοποιήθηκε για ποσοτικό προσδιορισμό ενώ το 157 για ταυτοποίηση. Το κύριο ιόν της είναι το 157 αλλά στην συγκεκριμένη εργασία έγινε χρήση του 172 για τον ποσοτικό προσδιορισμό. Στο παρακάτω χρωματογράφημα απεικονίζονται τα χαρακτηριστικά αυτά ιόντα:

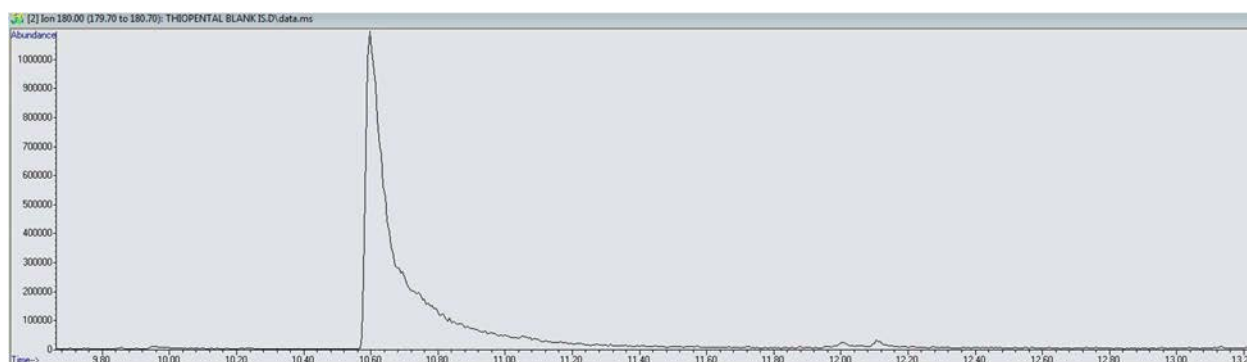


Εικόνα 15.Χρωματογράφημα θειοπεντάλης σε επιμολυσμένο δείγμα ορού αίματος με συγκέντρωση 20mg/L με πρόγραμμα SIM.

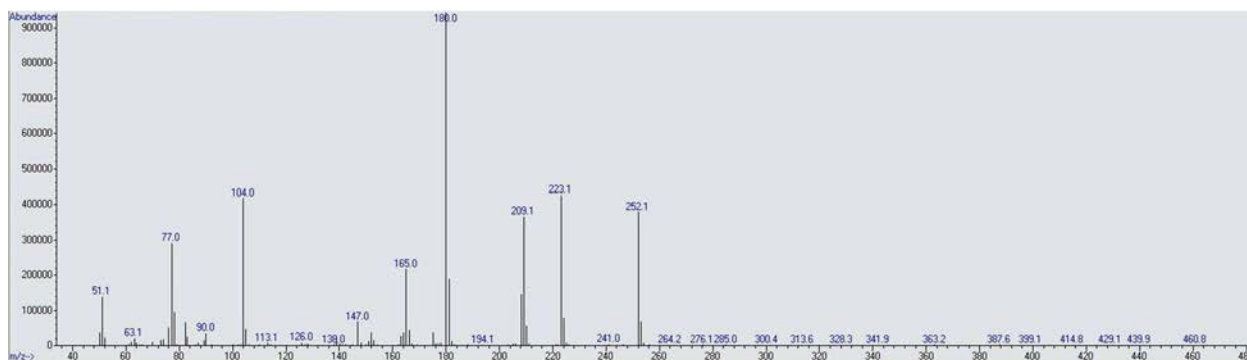


Εικόνα 16. Φάσμα μαζών θειοπεντάλης.

Στην ανάπτυξη της μεθόδου προσδιορισμού της θειοπεντάλης χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο η φαινυτοΐνη, με χαρακτηριστικά ιόντα το 180 και το 104. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό χρησιμοποιήθηκε το 180. Η R_t της φαινυτοΐνης είναι 11,6min στην βιβλιογραφία αλλά στο πειραματικό κομμάτι ο χρόνος έκλουσης ήταν περίπου στα 10,6 min.



Εικόνα 17. Χρωματογράφημα εσωτερικού προτύπου φαινυτοΐνης 10mg/L (10ppm) σε λευκό (blank) δείγμα ορού αίματος.



Εικόνα 18. Φάσμα μαζών εσωτερικού προτύπου φαινυτοΐνης.

4. Βελτιστοποίηση αναλυτικής μεθόδου

4.1 Επιλογή όγκου διαλύτη εκχύλισης

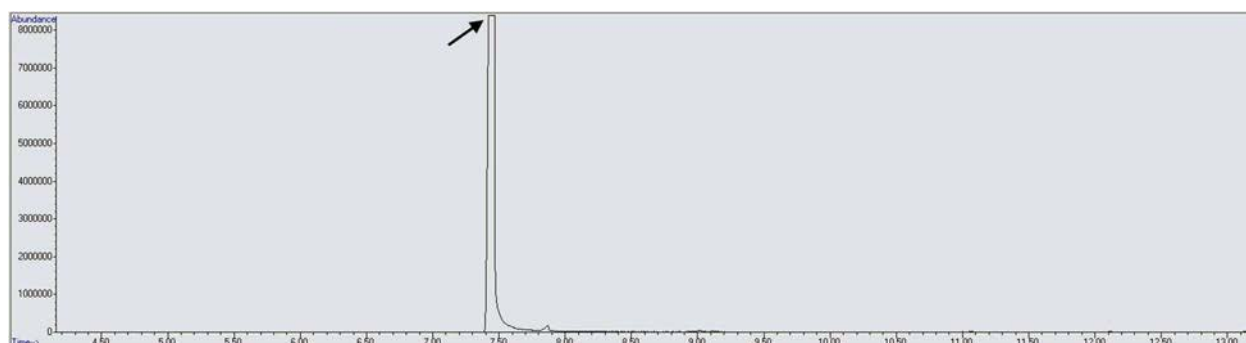
Για την ανάπτυξη της μεθόδου έγινε χρήση του οξικού βουτυλεστέρας (butyl acetate), τα χαρακτηριστικά του οποίου είναι ιδανικά για την μέθοδο καθώς:

- Δεν είναι τοξικός
- Δεν είναι πολύ πτητικός
- Δεν επιβαρύνει το χρωματογράφημα
- Δεν δημιουργεί γαλακτώματα

Όσον αφορά το όγκο του διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε έγινες δοκιμές με 3 διαφορετικές τιμές καθώς λόγω της υψηλής συγκέντρωσης που έχουν ορισμένα από τα πρότυπα διαλύματα στο χρωματογράφημα εμφανίζονταν plateau. Επομένως έγιναν δοκιμές με όγκους διαλύτη: 200μl, 300μl και 400μl με συγκέντρωση θειοπεντάλης στα 60ppm.

Δοκιμή 1 με όγκο διαλύτη 200μl

Αρχικά έγινε η πρώτη δοκιμή με όγκο διαλύτη 200μl. Παρακάτω απεικονίζεται το χρωματογράφημα:

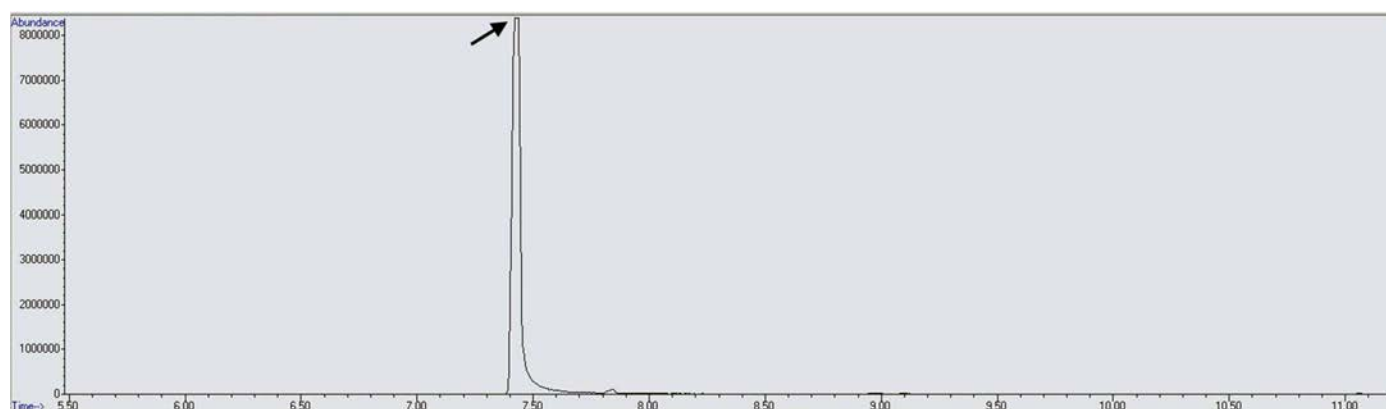


Εικόνα 19. Χρωματογράφημα θειοπεντάλης 60ppm με 200μl διαλύτη.

Σε αυτές η συνθήκη εμφανίζεται plateau στις κορυφές στο χρωματογράφημα.

Δοκιμή 2 με όγκο διαλύτη 300μl

Η δεύτερη δοκιμή έγινε με όγκο διαλύτη 300μl. Παρακάτω απεικονίζεται το χρωματογράφημα:

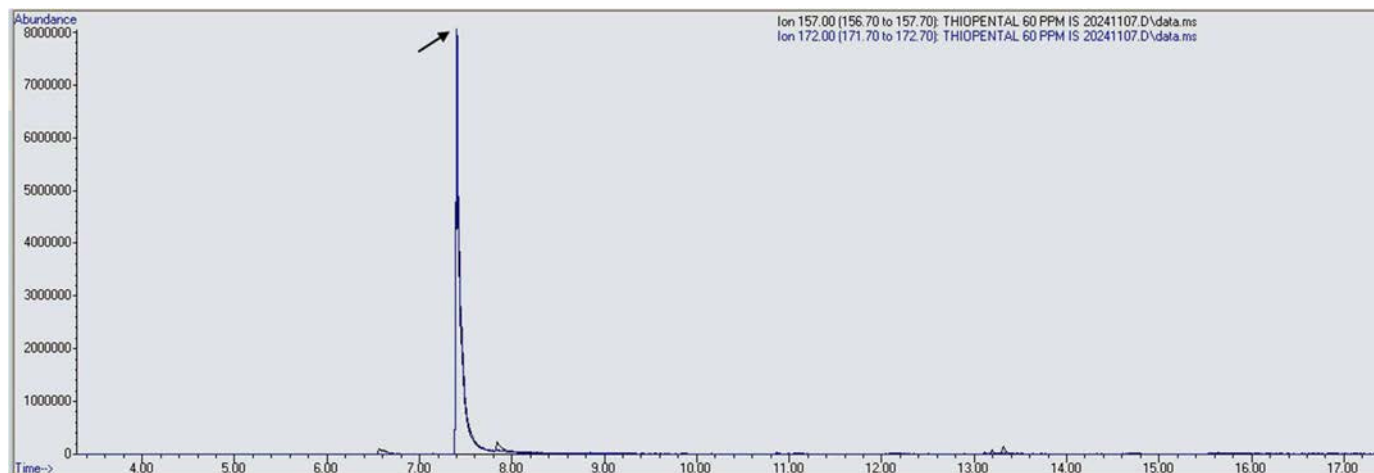


Εικόνα 20. Χρωματογράφημα θειοπεντάλης 60ppm με 300μl διαλύτη.

Σε αυτή την συνθήκη υπάρχει βελτίωση σε σχέση με τα 200μl αλλά και εδώ εμφανίζεται plateau στις κορυφές στο χρωματογράφημα.

Δοκιμή 3 με όγκο διαλύτη 400μl

Η 3 δοκιμή πραγματοποιήθηκε σε όγκο διαλύτη 400μl. Παρακάτω απεικονίζεται το χρωματογράφημα:



Εικόνα 21. Χρωματογράφημα θειοπεντάλης 60ppm με 400μl διαλύτη.

Σε αυτή την συνθήκη σχηματίζεται η πιο οξεία κορυφή σε σύγκριση με τις άλλες συνθήκες και δεν εμφανίζεται plateau. Επομένως για την ανάπτυξη της μεθόδου επιλέχθηκαν τα 400μl για τον όγκο του οξικού βουτυλεστέρα.

4.2 Επιλογή pH

Σύμφωνα με την pK_a της θειοπεντάλης έγινε η επιλογή να χρησιμοποιηθεί ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) με pH 4,5 καθώς σε αυτήν την τιμή η θειοπεντάλη θα βρίσκεται σε μεγάλο βαθμό σε μη ιονισμένη μορφή. Επομένως θα γίνει πιο αποτελεσματική εκχύλιση στον διαλυτή και η μη ιονισμένη μορφή βοηθάει στην ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο.

5. Τελική βέλτιστη μέθοδος

5.1 Παρασκευή επιμολυσμένων δειγμάτων (spiked)

Αρχικά σε errendorf 2ml έγινε προσθήκη 500μl από ορό αίματος ο οποίος ήταν καθαρός από φαρμακευτικές ουσίες που θα επηρέαζαν την ανάπτυξη της μεθόδου προσδιορισμού της θειοπεντάλης, καθώς και από την ίδια την θειοπεντάλη. Έπειτα έγινε προσθήκη 400μl από το οξικό βουτυλεστέρα, 250μl από το ρυθμιστικό διάλυμα PO_4^{4-} (4,5), 50μl από τα πρότυπα διαλύματα θειοπεντάλης με συγκεντρώσεις (100ppm, 200ppm, 400ppm, 600ppm, 800ppm, 1000ppm) και τέλος 20μl από το εσωτερικό πρότυπο φαινυτοΐνης (250ppm). Επομένως παρασκευάστηκαν 6 διαλύματα με τελικό όγκο 500μl, συγκέντρωση θειοπεντάλης 10ppm, 20ppm, 40ppm, 60ppm, 80ppm, 100ppm αντίστοιχα και με συγκέντρωση φαινυτοΐνης 10ppm.

Στην συνέχεια τα διαλύματα τοποθετήθηκαν στο vortex για 10 λεπτά. Έπειτα έγινε φυγοκέντρωση στα 10.000rpm για 10min. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης έγινε παραλαβή 125μl από το υπερκείμενο μέρος του διαλύματος και προστέθηκε σε γυάλινο εισαγωγέα δείγματος (insert) ο οποίος με την σειρά του τοποθετήθηκε σε γυάλινο φιαλίδιο και το δείγμα είναι έτοιμο για έγχυση στο GC.

5.2 Προκατεργασία δείγματος

Η διαδικασία της προκατεργασία δείγματος είναι ίδια με την εκείνη επιμολυσμένων δειγμάτων. Σε αυτή την περίπτωση παρασκευαστήκαν ένα τυφλό διάλυμα (blank) και ένα blank που περιέχει το εσωτερικό πρότυπο (φαινυτοΐνη).

Για το blank διάλυμα: Σε ένα errendorf των 2ml προστέθηκαν 500μl από καθαρό ορό αίματος, 400μl από οξικό βουτυλεστέρα, 250μl από το ρυθμιστικό διάλυμα PO^{4-} (4,5), 70μl MeOH για να αντικατασταθεί ο όγκος από το εσωτερικό πρότυπο (20μl) και από το πρότυπο διάλυμα της θειοπεντάλης (50μl).

Για το blank διάλυμα με εσωτερικό πρότυπο: Σε ένα errendorf των 2ml προστέθηκαν 500μl από καθαρό ορό αίματος, 400μl από οξικό βουτυλεστέρα, 250μl από το ρυθμιστικό διάλυμα PO^{4-} (4,5), 50μl MeOH για να αντικατασταθεί ο όγκος από το πρότυπο διάλυμα της θειοπεντάλης και 20μl από το εσωτερικό πρότυπο φαινοτοΐνης (250ppm).

Στην συνέχεια τα διαλύματα τοποθετήθηκαν στο vortex για 10 λεπτά. Έπειτα έγινε φυγοκέντρηση στα 10.000rpm για 10min. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης έγινε παραλαβή 125μl από το υπερκείμενο μέρος του διαλύματος και προστέθηκε σε γυάλινο εισαγωγέα δείγματος (insert) ο οποίος με την σειρά του τοποθετήθηκε σε γυάλινο φιαλίδιο και το δείγμα είναι έτοιμο για έγχυση στο GC.

6. Επικύρωση αναλυτικής μεθόδου

Ο βασικός στόχος της επικύρωσης είναι να διασφαλίσει ότι οι μέθοδοι παράγουν αξιόπιστα δεδομένα, απαραίτητα για την τήρηση των κανονισμών και την αξιοπιστία αποτελεσμάτων. Τα κυρία χαρακτηριστικά της επικύρωσης μεθόδου είναι [39] [40]:

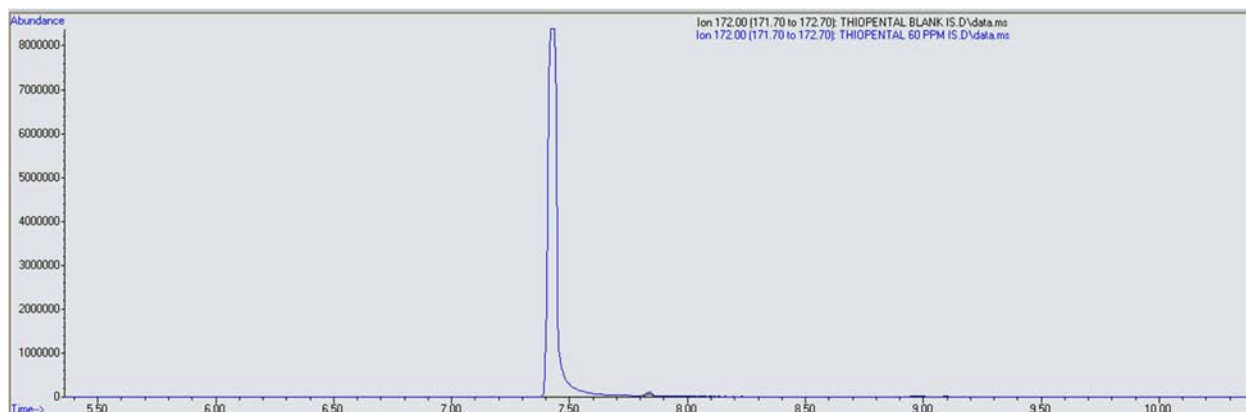
- Η εκλεκτικότητα (Selectivity)
- Η γραμμικότητα (Linearity)
- Το όριο ανίχνευσης (Limit of detection, LOD)
- Το όριο ποσοτικοποίησης (Limit of quantification, LOQ)
- Η πιστότητα (Precision)
 - Επαναληψιμότητα (Repeatability)
 - Ενδιάμεση πιστότητα (Intermediate Precision)
- Ορθότητα (Trueness)

6.1 Εκλεκτικότητα

Η εκλεκτικότητα αφορά τον βαθμό όπου μια αναλυτική μέθοδος μπορεί να προσδιορίσει τον αναλυτή υπό μελέτη στην παρουσία άλλων συστατικών του δείγματος ή του διαλύματος. Μια μέθοδος είναι εκλεκτική όταν δίνει ορθά αναλυτικά αποτελέσματα για τις επιμέρους ουσίες του δείγματος χωρίς να υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ τους [39] [38] [23]. Για να διαπιστωθεί η εκλεκτικότητα στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε σύγκριση μεταξύ spiked δειγμάτων και blank δειγμάτων στα οποία εφαρμόστηκε η προκατεργασία που αναφέρθηκε παραπάνω.

Το αποτελέσματα αυτής της σύγκρισης αποτυπώνονται στο παρακάτω χρωματογράφημα:

Αρχικά έγινε σύγκρισή spiked δείγματος θειοπεντάλης 60ppm με blank δείγμα με overlay των δυο χρωματογραφήματων.



Εικόνα 22. Χρωματογράφημα θειοπεντάλης 60ppm (μπλε) και χρωματογράφημα blank δείγματος (μαύρο).

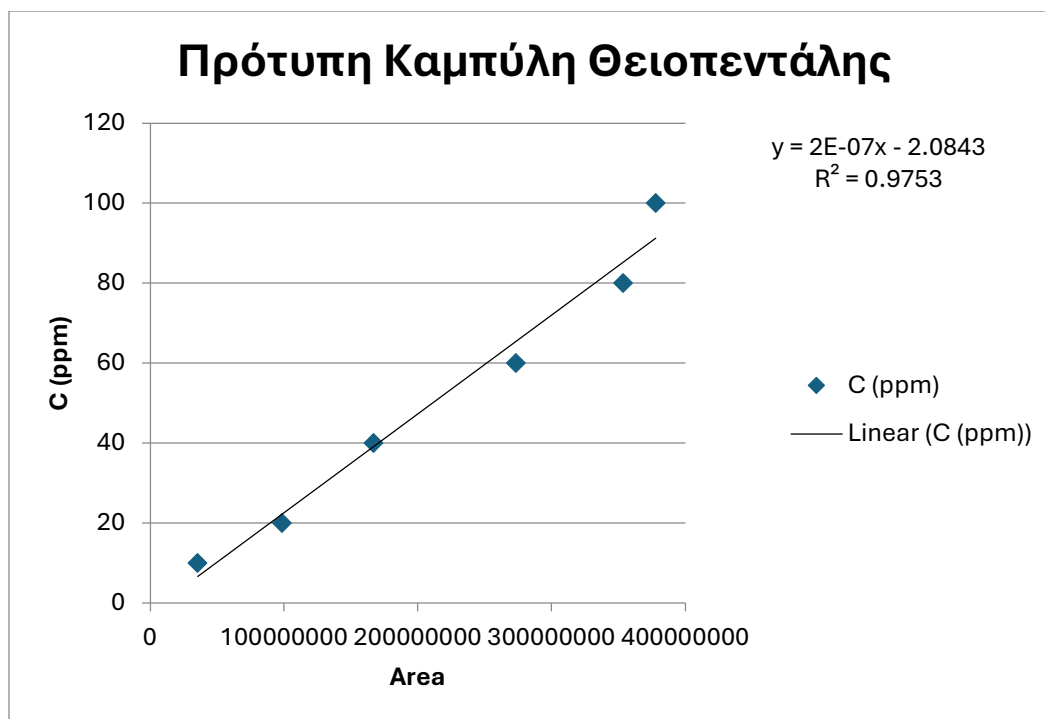
Επομένως δεν παρατηρείται καμία αλληλεπίδραση, μεταξύ των συστατικών του υποστρώματος και της θειοπεντάλης, η οποία να επηρεάζει την αναλυτική μέθοδο. Άρα η μέθοδος είναι εκλεκτική.

6.2 Γραμμικότητα (Linearity)

Η γραμμικότητα εστιάζει στην ικανότητα της μεθόδου να παράγει αποτελέσματα τα οποία είναι ανάλογα της συγκέντρωσης του αναλυτή σε ένα συγκεκριμένο εύρος τιμών. Είναι αναγκαία προκειμένου να υπάρχει ακρίβεια στην ποσοτικοποίηση των αναλυτικών μετρήσεων. Στο πεισματικό κομμάτι πρέπει να γίνει χρήση τουλάχιστον 5 συγκεντρώσεων για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης. Επίσης η επιλογή του κατάλληλου μέτρου βαθμονόμησης είναι απαραίτητο για να παραχθούν αξιόπιστα δεδομένα. [39] [40]

Για την επικύρωση της αναλυτικής μεθόδου της συγκεκριμένης εργασίας κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη με τουλάχιστον 6 συγκεντρώσεις οι οποίες ήταν βασισμένες στα θεραπευτικά και τοξικά επίπεδα της θειοπεντάλης. Τα 6 δείγματα (calibrators) παρασκευαστήκαν με την προκατεργασία που αναφέρεται στο κεφ. 5.1, οπότε το υπόστρωμα ήταν ορός αίματος και προστέθηκαν 20μl εσωτερικού προτύπου φαινοτοΐνης (10ppm). Οι συγκεντρώσεις ήταν 10mg/L, 20mg/L, 40mg/L, 60mg/L, 80mg/L, 100mg/L. Παρακάτω παρουσιάζεται η πρότυπη καμπύλη:

Στο άξονα y'g αναγράφονται οι τιμές από την συγκέντρωση της θειοπεντάλης στα 6 δείγματα και στο x'x είναι οι τιμές από το εμβαδό της κάθε κορυφής από το χρωματογράφημα. Επίσης αναγράφεται και η εξίσωση της γραφικής παράστασης $y = 2E-07x - 2.0843$ και συντελεστής συσχέτισης (R^2) 0.9753.



Εικόνα 23 : Γραφική αναπαράσταση της πρότυπης καμπύλης Θειοπεντάλης συγκεντρώσεων: 10mg/L, 20mg/L, 40mg/L, 60mg/L, 80mg/L, 100mg/L

6.3 Όριο ανίχνευσης (LOD) και Όριο ποσοτικοποίησης (LOQ)

Το όριο ανίχνευσης (Limit of Detection) αναφέρεται στην ελάχιστη ποσότητα ή συγκέντρωση του αναλύτη στο δείγμα που μπορεί να διακριθεί με αξιοπιστία από το μηδέν. Το LOD υπολογίστηκε και αυτό πειραματικά από τον λόγο 3/1 του σήματος της προσδιοριζόμενης ένωσης προς τον θόρυβο του οργάνου. [23]

Το όριο ποσοτικοποίησής (Limit of Quantification) είναι το κατώτατο όριο μιας ένωσης που μπορεί να ανιχνευτεί και να προσδιοριστεί ποσοτικά [23]. Το LOQ ορίστηκε ως η κατωτάτη τιμή για τον προσδιορισμό της θειοπεντάλης στην πρότυπη καμπύλη.

Παρακάτω παρουσιάζεται ο πίνακας με αυτές τιμές:

Όριο ανίχνευσης (LOD)	Όριο ποσοτικοποίησης (LOQ)
3,3μg/mL	10μg/mL

Πίνακας 5. Τιμές LOD και LOQ

6.4 Επαναληψιμότητα (Repeatability) και Ακρίβεια (Accuracy)

Για τον προσδιορισμό της ακρίβειας και της επαναληψιμότητας παρασκευαστήκαν δυο spiked διαλύματα , ένα με χαμηλή (30ppm) και ένα με μεσαία (50ppm) συγκέντρωση θειοπεντάλης και προστέθηκαν σε αυτά 20μl από εσωτερικό πρωτότυπο φαινυτοΐνης(10ppm). Έπειτα η ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε ανά 48ωρες κατά την διάρκεια 5 ημέρων. Παρακάτω παρουσιάζεται ο πίνακας με τις τιμές για αυτές τις παραμέτρους.

ΕΠΙΠΕΔΟ ΣΥΓΚΕΝΤΩΣΗΣ ΘΕΙΟΠΕΝΤΑΛΗΣ	ΜΕΣΑ ΣΤΗΝ ΕΒΔΟΜΑΔΑ (inter-assay)			
	Μέσος ορός mg/L	Επαναληψιμότητα %	Τυπική απόκλιση	Ακρίβεια%
30 ppm	25	48,7	12,2	83,3
50 ppm	41	24,7	10	82,7

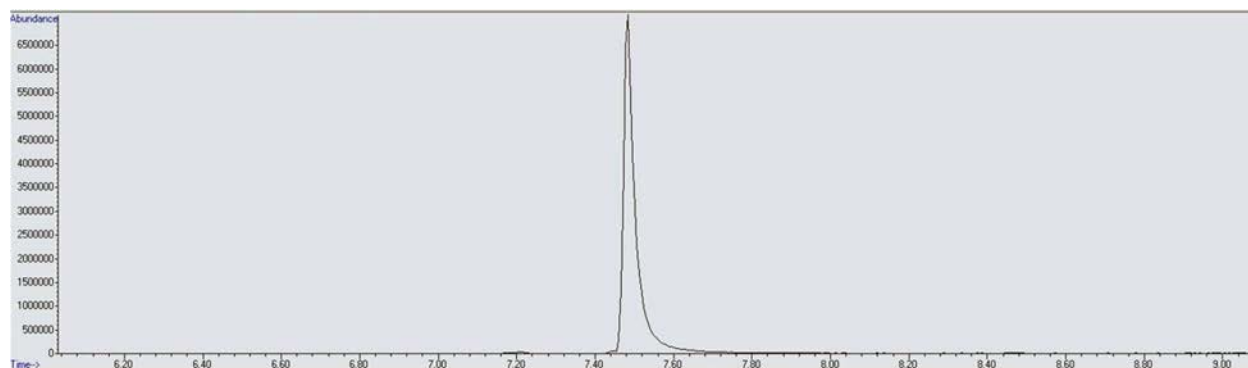
Πίνακας 6. Τιμές για Επαναληψιμότητα SD και ακρίβεια.

7. Εφαρμογή σε πραγματικά κλινικά δείγματα

Εφόσον έγινε ο υπολογισμός για τις παραμέτρους της επικύρωσης μεθόδου, πραγματοποιήθηκε εφαρμογή της αναλυτικής μεθόδου σε δυο πραγματικά κλινικά δείγματα. Και τα δυο δείγματα προήλθαν από το ίδιο περιστατικό. Σύμφωνα με το παραπεμπτικό πρόκειται για ένα παιδί το οποίο εμφανίζει έντονες επιληπτικές κρίσεις, επομένως ένας από τους τρόπους αντιμετώπισης είναι (όπως αναφέρεται και στο κεφ. 1.4) η εισαγωγή σε βαρβιτουρικό κόμμα με την χορήγηση θειοπεντάλης. Οπότε πραγματοποιήθηκε ανάλυση με την χρήση της μέθοδου σε δυο δείγματα τα οποία ληφθήκαν σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα προκειμένου να γίνει παρακολούθηση των επιπέδων θειοπεντάλης, διότι σε τέτοια περιστατικά η συγκέντρωση της θειοπεντάλης είναι αρκετά υψηλή σε σχέση με την συνηθισμένη χορηγούμενη δόση.

1^ο Δείγμα

Παρακάτω απεικονίζεται το χρωματογράφημα της ανάλυσης του 1^{ου} δείγματος:

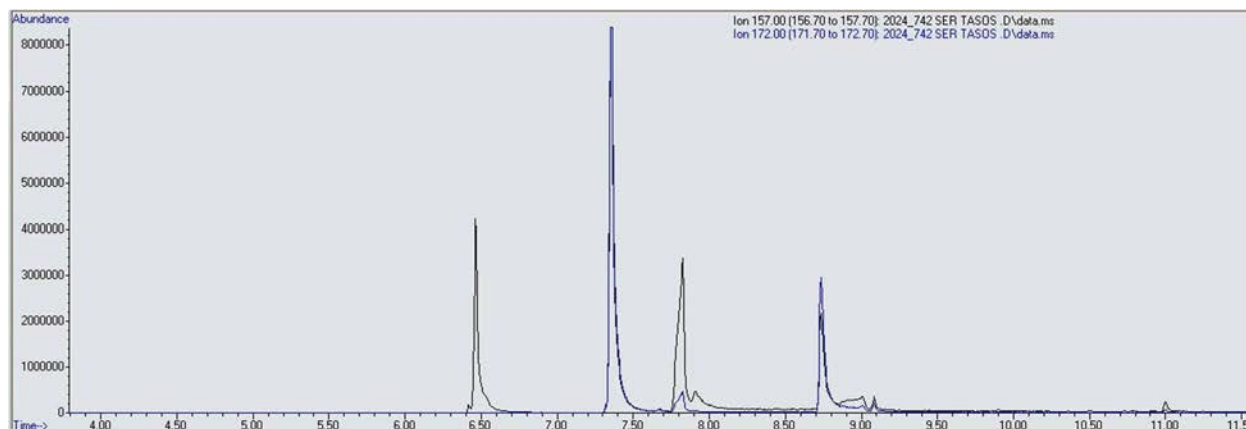


Εικόνα 24. Χρωματογράφημα θειοπεντάλης με το χαρακτηριστικό ιόν 172.

Έπειτα με βάση την πρότυπη καμπύλη έγινε ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της θειοπεντάλης, η οποία ήταν **28mg/L**.

2^ο Δείγμα

Παρακάτω απεικονίζεται το χρωματογράφημα της ανάλυσης του 2^{ου} δείγματος:



Εικόνα 25. Χρωματογράφημα θειοπεντάλης με το χαρακτηριστικό ιόν 172 και το ιόν 157.

Έπειτα με βάση την πρότυπη καμπύλη έγινε ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της θειοπεντάλης, η οποία ήταν **42mg/L**.

Με βάση την βιβλιογραφία τα 28mg/L και τα 42mg/L θεωρούνται τοξικά έως θανατηφόρα επίπεδα σε συνηθισμένες χορηγήσεις. Σε αυτή την περίπτωση λόγω της συγκεκριμένης κλινικής εικόνας αυτές οι συγκεντρώσεις είναι στο πλαίσιο της θεραπείας αλλά πρέπει να γίνει προσεκτική παρακολούθηση προκειμένου να μην προκύψουν σοβαρές παρενέργειες από την υψηλή συγκέντρωση της θειοπεντάλης.

8. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία έγινε ανάπτυξη και επικύρωση της αναλυτικής μεθόδου για τον ποσοτικό προσδιορισμό της θειοπεντάλης σε κλινικά δείγματα με την χρήση αέριας χρωματογραφίας – φασματομετρίας μάζας (GC-MS). Η μέθοδος παρουσιάζει αξιοπιστία, υψηλή εκλεκτικότητα και ευαισθησία, επιτρέποντας την ανίχνευση της θειοπεντάλης και σε μικρές συγκεντρώσεις.

Αρχικά το κομμάτι της προκατεργασίας του δείγματος ήταν από τα βασικά σημεία για να επιτευχθεί αποτελεσματικότητα στην ανάλυση. Οι κύριες μέθοδοι που εφαρμοστήκαν ήταν η φυγοκέντρηση (10min στα 10.000rpm) και η εκχύλιση υγρού-υγρού. Στο κομμάτι της εκχύλισης πραγματοποιήθηκαν δόκιμες με 3 διαφορετικούς όγκους (200μl, 300μl, 400μl). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανάλυσης το χρωματογράφημα στα 400μl ήταν το μόνο που παρουσιάζει την πιο οξεία κορυφή, επομένως ο όγκος του διαλύτη ορίστηκε στα 400μl. Ο διαλύτης εκχύλισης που επιλέχθηκε ήταν ο οξικός βουτυλεστέρας καθώς δεν είναι τοξικός , δεν επιβαρύνει το χρωματογράφημα , δεν παρουσιάζει γαλακτώματα και έχει χαμηλή πτητικότητα. Το pH του διαλύματος ορίστηκε στο 4,5 με βάση την pKa της θειοπεντάλης καθώς σε αυτή την τιμή pH η δραστική ουσία θα βρίσκεται κυρίως σε μη ιονισμένη μορφή , αυξάνοντας έτσι την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης και την ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο.

Στο στάδιο της επικύρωσης:

Η μέθοδος είναι εκλεκτική καθώς η σύγκριση blank και επιμολυσμένων δειγμάτων απέδειξε πως κανένα από τα συστατικά του υποστρώματος δεν επηρεάζει την κορυφή της θειοπεντάλης .

Εμφανίζει γραμμικότητα με συντελεστής συσχέτισης $R^2 = 0.9753$

Τα όρια ανίχνευσής (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ) προσδιορίστηκαν στα 3,3μg/mL και 10μg/mL αντίστοιχα

Η επαναληψιμότητα και η ακρίβεια προσδιορίστηκαν από την ανάλυση δυο επιμολυσμένων διαλυμάτων με συγκεντρώσεις 30ppm και 50ppm. Για τα 30ppm η επαναληψιμότητα και η ακρίβεια προσδιορίστηκαν στα 48,7% και 83,3% αντίστοιχα. Για τα 50ppm οι αντίστοιχες τιμές είναι 24,7% και 82,7%. Οι τιμές είναι αποδέκτες, οι διακυμάνσεις που καταγράφηκαν οφείλονται στην μειωμένη ευαισθησία που παρουσίασε το σύστημα GS-MS κατά την διάρκεια του πειραματικού σκέλους της εργασίας.

Έπειτα έγινε εφαρμογή της αναλυτικής μεθόδου σε πραγματικά κλινικά δείγματα στα οποία η συγκέντρωση στο 1^ο δείγμα ήταν 28ml/L και στο 2^ο δείγμα ήταν 42mg/L.

Επομένως η μέθοδος που αναπτύχθηκε σε αυτή την εργασία παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα.

Είναι γρήγορη και οικονομική καθώς περιλαμβάνει μόνο εκχύλιση υγρού-υγρού, φυγοκέντρωση και δεν εφαρμόζεται εξάτμιση, επαναδιάλυση και παραγωγοποίηση.

Γίνεται χρήση μη τοξικού διαλύτη που την καθιστά πιο ασφαλή και φιλική για το περιβάλλον.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Wood library museum thiopental (Online). (τελευταία επίσκεψη 25-01-2025)
Available: <https://www.woodlibrarymuseum.org/museum/thiopental/>
2. World Health Organization. (2023). World Health Organization Model List of Essential Medicines – 23rd List, 2023. Geneva: World Health Organization.
3. Russo, H., & Bressolle, F. (1998). Pharmacodynamics and Pharmacokinetics of Thiopental. *Clinical Pharmacokinetics*, 35(2), 95-134.
4. Bellante, F., Legros, B., Depondt, C., Créteur, J., Taccone, F. S., & Gaspard, N. (2016). Midazolam and thiopental for the treatment of refractory status epilepticus: a retrospective comparison of efficacy and safety. *Journal of Neurology*, 263(4), 799–806.
<https://doi.org/10.1007/s00415-016-8074-7>
5. OpenAnesthesia. Thiopental. (τελευταία επίσκεψη 27-01-2025)
Available: <https://www.openanesthesia.org/keywords/thiopental/>
6. Garrett, E. R., Bojarski, J. T., & Yakatan, G. J. (1971). Kinetics of hydrolysis of barbituric acid derivatives. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 60(8), 1145–1154. <https://doi.org/10.1002/jps.2600600807>
7. National Center for Biotechnology Information. (2025). PubChem Compound Summary for CID 3000715, Thiopental. Retrieved February 4, 2025, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Thiopental>.
8. DrugBank. Thiopental (τελευταία επίσκεψη 27-01-2025)
Available: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00599>
9. Katzung, B. G., Masters, S. B., & Trevor, A. J. (2015). *Basic & Clinical Pharmacology* (13th ed.). McGraw-Hill Education.
10. Cordato, D. J., Chebib, M., Mather, L. E., Herkes, G. K., & Johnston, G. A. R. (1999). Stereoselective interaction of thiopentone enantiomers with

the GABAA receptor. *British Journal of Pharmacology*, 128(1), 77–82.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702744>

11.Watanabe, M., Maemura, K., Kanbara, K., Tamayama, T., & Hayasaki, H. (2002). GABA and GABA Receptors in the Central Nervous System and Other Organs. *A Survey of Cell Biology*, 1–47.
[https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(02\)13011-7](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(02)13011-7)

12.Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. 6th edition.

13.Parviainen, I., Uusaro, A., Kälviäinen, R., Kaukanen, E., Mervaala, E., & Ruokonen, E. (2002). High-dose thiopental in the treatment of refractory status epilepticus in intensive care unit. *Neurology*, 59(8), 1249–1251.
<https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000032253.88378.d7>

14.Coté, C. J., Lerman, J., Ward, R. M., Lugo, R. A., & Goudsouzian, N. (2009). Pharmacokinetics and pharmacology of drugs used in children. *Elsevier eBooks*, pp. 89–146. <https://doi.org/10.1016/b978-141603134-5.50010-x>

15.Γαληνός Θειοπεντάλη (τελευταία επίσκεψη 31-01-2025)

Available: <https://www.galinos.gr/web/drugs/main/nomcodes/15.02.01.02>

16.Toxin and Toxin Target Database (T3DB) (τελευταία επίσκεψη 04-02-2025)

Available: https://www.t3db.ca/toxins/T3D2835#toxicity_profile

17.Peck, T. E., & Hill, S. (2008). *Pharmacology for Anaesthesia and Intensive Care*. Cambridge University Press.

18.Schulz, M., Iwersen-Bergmann, S., Andresen, H., & Schmoldt, A. (2012). Therapeutic and toxic blood concentrations of nearly 1,000 drugs and other xenobiotics. *Critical Care*, 16(4). <https://doi.org/10.1186/cc11441>

19.Al-Bukhaiti, Wedad & Al-Farga, Ammar. (2017). Gas Chromatography: Principles, Advantages and Applications in Food Analysis. *International Journal of Science Innovations and Discoveries*.

20.GL Sciences B.V. (n.d.). Injection techniques for gas chromatography.

- 21.** Grob, R. L., & Barry, E. F. (2004). Modern practice of gas chromatography (4th ed.). John Wiley & Sons.
- 22.** McNair, H. M., Miller, J. M., & Snow, N. H. (2019). *Basic Gas Chromatography*. John Wiley & Sons.
- 23.** Κρόκος, Α. (2016). Ανάπτυξη ταχείας μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού 41 ναρκωτικών και φαρμάκων σε αίμα με αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας μετά από εκχύλιση υγρού-υγρού (Διπλωματική εργασία). Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Χημείας.
- 24.** Wade Leroy G. *Οργανική Χημεία*, 9η έκδοση, Εκδόσεις Τζιόλα.
- 25.** Βασιλειάδης, «ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ», ιατρικές εκδόσεις (online) (τελευταία επίσκεψη 01-02-2025)
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>
- 26.** Hites, R.A. *Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry*, pp. 609-626.
- 27.** Żymankowska-Kumon, Sylwia. (2016). Ecological assessment of foundry binders by gas chromatography method.
- 28.** Flanagan, R. J., Taylor, A., Watson, I. D., & Whelpton, R. (2008). *Fundamentals of Analytical Toxicology*.
- 29.** Shen, S., An, B., & Qu, J. (2017). Sample Preparation Methods for Targeted Biomarker Quantification by LC-MS.
<https://doi.org/10.1002/9781119413073.ch6>
- 30.** Li, W., Jian, W., & Fu, Y. (2019). *Basic Sample Preparation Techniques in LC-MS Bioanalysis*. <https://doi.org/10.1002/9781119274315.ch1>
- 31.** Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. *Μέθοδοι διαχωρισμού*. τελευταία επίσκεψη 02-05-2025

<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>

32. Colatutto, A. et al. (2012). *Comparison of chromatographic methods for serum thiopental quantification*. <https://doi.org/10.1007/s13631-012-0060-1>

33. Külpmann, W. R. et al. (1983). *Thiopental monitoring by Gas-Chromatography*. <https://doi.org/10.1515/cclm.1983.21.3.181>

34. Kuepper, Uta & Birgel, Alexander & Musshoff, Frank & Madea, Burkhard. (2007). Detection of benzodiazepines and barbiturates using a validated HS SPME/GC-MS method

35. <https://labbox.eu/product/vortex-stirrer-lbx-v05-series-with-speed-control/>

(τελευταία επίσκεψη 07-02-2025)

36. <https://www.velp.com/en-ww/classic-vortex-mixer.aspx>

(τελευταία επίσκεψη 07-02-2025)

37. [https://asiapacific.ohaus.com/en-ap/products/balances-scales/precision-balances/pr-series-precision/electronic-balance-pr423-e-\(1\)](https://asiapacific.ohaus.com/en-ap/products/balances-scales/precision-balances/pr-series-precision/electronic-balance-pr423-e-(1))

(τελευταία επίσκεψη 07-02-2025)

38. <https://www.sigma-zentrifugen.de/en/products/centrifuges/details/sigma-2-16p>

(τελευταία επίσκεψη 07-02-2025)

39. Thompson, M., Ellison, S. L. R., & Wood, R. (2002). Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC

Technical Report). Pure and Applied Chemistry, 74(5), 835–855.

<https://doi.org/10.1351/pac200274050835>

40. European Medicines Agency. (2023, December 14). ICH Q2(R2) guideline on validation of analytical procedures (EMA/CHMP/ICH/82072/2006). Committee for Medicinal Products for Human Use. Retrieved from <https://www.ema.europa.eu>

41. Govindpani, Karan & Calvo-Flores Guzman, Beatriz & Vinnakota, Chitra & Waldvogel, Henry & Faull, Richard & Kwakowsky, Andrea. (2017). Towards a Better Understanding of GABAergic Remodeling in Alzheimer's Disease. International Journal of Molecular Sciences. 18. 10.3390/ijms18081813.

42. Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Αθηνών (τελευταία επίσκεψη 05-02-2025

<https://eclass.uoa.gr/modules/document/file.php/PHARM100/Lab%206.pdf>