



**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ
ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ»**



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ»**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**«ΑΝΑΠΤΥΞΗ, ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ
ΜΕΘΟΔΩΝ ΜΕ ESI-HPLC/UHPLC-MS/MS-ORBITRAP ΓΙΑ ΤΗΝ
ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΝΑΡΚΩΤΙΚΩΝ, ΔΙΟΥΡΗΤΙΚΩΝ ΚΑΙ
ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΑΠΟΚΡΥΨΗΣ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΟΥΡΩΝ ΑΘΛΗΤΩΝ»**

**“DEVELOPMENT, OPTIMIZATION AND VALIDATION OF ANALYTICAL
METHODS VIA ESI-HPLC/UHPLC-MS/MS-ORBITRAP FOR
CONFIRMATION OF THE PRESENCE OF NARCOTICS, DIURETICS AND
MASKING AGENTS IN ATHLETES' URINE SAMPLES”.**

**ΚΑΤΕΡΙΝΑ ΔΗΜΟΥΛΑ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΛΑΡΙΣΑ 2025

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**«ΑΝΑΠΤΥΞΗ, ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ
ΜΕΘΟΔΩΝ ΜΕ ESI-HPLC/UHPLC-MS/MS-ORBITRAP ΓΙΑ ΤΗΝ
ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΝΑΡΚΩΤΙΚΩΝ, ΔΙΟΥΡΗΤΙΚΩΝ ΚΑΙ
ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΑΠΟΚΡΥΨΗΣ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΟΥΡΩΝ ΑΘΛΗΤΩΝ»**

**Η ΠΑΡΟΥΣΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΕΚΠΟΝΗΘΗΚΕ ΣΤΟ ΕΘΝΙΚΟ
ΚΕΝΤΡΟ ΕΡΕΥΝΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ»**

ΔΗΜΟΥΛΑ ΚΑΤΕΡΙΝΑ

A.M. 00232

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ : Δρ ΕΥΣΤΑΘΙΟΣ ΚΟΥΚΕΑΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Δρ ΕΥΣΤΑΘΙΟΣ ΚΟΥΚΕΑΣ

Δρ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΚΛΕΤΣΑΣ

Δρ ΧΡΙΣΤΟΦΟΡΟΣ ΧΡΙΣΤΟΦΟΡΙΔΗΣ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα ερευνητική διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ελέγχου Ντόπινγκ του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», στο πλαίσιο του μεταπτυχιακού προγράμματος «Τοξικολογία» του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Με την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στην πραγματοποίησή της. Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Δρ Ευστάθιο Κουκέα για την ευκαιρία που μου προσέφερε να εκπονήσω τη διπλωματική μου εργασία, για τη δυνατότητα εργασίας σε ένα άρτια εξοπλισμένο και σύγχρονο ερευνητικό περιβάλλον, καθώς και για τις πολύτιμες παρατηρήσεις και την καθοδήγησή του καθ' όλη τη διάρκεια της πορείας της.

Εξίσου, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Επιστημονικό Διευθυντή του Εργαστηρίου Ελέγχου Ντόπινγκ, Δρ Χριστόφορο Χριστοφορίδη, για τη φιλοξενία στον εργαστηριακό χώρο, τη συνεχή επίβλεψη και τις εύστοχες συμβουλές του, οι οποίες συνέβαλαν καθοριστικά στην επιτυχή ολοκλήρωση της εργασίας. Το ειλικρινές ενδιαφέρον και η ουσιαστική υποστήριξή του υπήρξαν πολύτιμο στήριγμα σε όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στον Δρ Δημήτριο Κλέτσα, Διευθυντή του Ινστιτούτου Βιοεπιστημών και Εφαρμογών του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», για την άμεση ανταπόκριση και τη θερμή υποδοχή στον χώρο του Ιδρύματος και την ουσιαστική συμβολή στην ομαλή έναρξη και διεξαγωγή της παρούσας εργασίας.

Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω την ειλικρινή μου ευγνωμοσύνη προς την κα. Στέλλα Λούη, η οποία εργαζόταν στο παρασκευαστήριο του Εργαστηρίου και με την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγησή της υποστήριξε ουσιαστικά όλες τις διαδικασίες που απαιτούσαν καθαρά χημική προσέγγιση.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στη συμφοιτήτρια και συνάδελφό μου, κα Δήμητρα Μαρία Παναγοπούλου, με την οποία γνωριστήκαμε κατά τη διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος και επιλέξαμε από κοινού να εκπονήσουμε τη διπλωματική μας εργασία στο Εργαστήριο Ελέγχου Ντόπινγκ. Η συνεχής αλληλοβοήθεια, η συνεργασία και η αμοιβαία υποστήριξη από την πρώτη ημέρα αποτέλεσαν σημαντικό μέρος της παρούσας προσπάθειας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά το σύνολο του προσωπικού του Εργαστηρίου Ελέγχου Ντόπινγκ για την άριστη συνεργασία, τη διαρκή προθυμία για βοήθεια και τη συμβολή τους στη δημιουργία ενός ευχάριστου και υποστηρικτικού κλίματος, που έκανε την παραμονή μου στον χώρο ιδιαίτερα δημιουργική και εποικοδομητική.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις εγκάρδιες ευχαριστίες μου στους δικούς μου ανθρώπους, για την αγάπη, τη στήριξη και την αδιάκοπη ενθάρρυνση που μου προσέφεραν καθ' όλη τη διάρκεια της διαδρομής αυτής.

Λάρισα, 2025

Κατερίνα Δημουλά

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διπλωματική εργασία επικεντρώνεται στην ανάπτυξη, βελτιστοποίηση και επικύρωση αναλυτικών μεθόδων με Ηλεκτροψεκασμό Ιοντισμού σε συνδυασμό με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής ή Υπερυψηλής Απόδοσης και Διπλή Φασματομετρία Μάζας με Αναλυτή Μάζας τύπου Orbitrap (ESI-HPLC/UHPLC-MS/MS-Orbitrap) για την επιβεβαιωτική ανάλυση ναρκωτικών, διουρητικών και παραγόντων απόκρυψης σε δείγματα ανθρώπινων ούρων, σύμφωνα με τα κριτήρια του Παγκόσμιου Οργανισμού Αντιντόπινγκ (World Anti-Doping Agency, WADA). Παράλληλα, αναπτύχθηκε μέθοδος εκχύλισης στερεάς φάσης σε απευθείας σύνδεση (On-line Solid Phase Extraction, On-line SPE) για την ανίχνευση Β2-αγωνιστών σε δείγματα ούρων αθλητών. Στόχος των μεθόδων αυτών είναι η αξιόπιστη και ταχεία ταυτοποίηση ουσιών του Καταλόγου Απαγορευμένων (Prohibited List) του WADA, ενισχύοντας την αποτελεσματικότητα του εργαστηρίου ελέγχου ντόπινγκ.

Η διαδικασία περιλάμβανε τη δημιουργία βάσης δεδομένων με συγκεντρώσεις, πρόδρομα ιόντα, χρόνους κατακράτησης, τιμές ενέργειας κρούσης και χαρακτηριστικά θραύσματα ιόντων. Ακολούθησε χρωματογραφική βελτιστοποίηση με τροποποιήσεις στη ροή, τη γραμμική αύξηση της αναλογίας της οργανικής φάσης και στους χρόνους έκλουσης, με σκοπό τον διαχωρισμό των ενώσεων και επιπλέον των ισοβαρών ενώσεων και μεταβολιτών τους. Η φασματομετρία μαζών εφαρμόστηκε με διαφορετικές τιμές ενέργειας κρούσης, ώστε να επιλεγούν μοναδικά και υψηλής έντασης θραύσματα, μειώνοντας τον κίνδυνο παρεμποδίσεων.

Οι μέθοδοι επικυρώθηκαν σε υδρολυμένα δείγματα ούρων, με κατάλληλες διαδικασίες εκχύλισης, συμπεριλαμβανομένης της εκχύλισης υγρού-υγρού και της εκχύλισης στερεάς φάσης σε απευθείας σύνδεση. Η ανάλυση και επεξεργασία των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με εξειδικευμένο λογισμικό, εξασφαλίζοντας ακρίβεια, αναπαραγωγιμότητα και συμμόρφωση με τις απαιτήσεις του WADA. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, καθιστώντας τις μεθόδους αξιόπιστα εργαλεία για τον εντοπισμό ουσιών δύσκολης ανίχνευσης λόγω ταχείας απέκκρισης ή μεταβολισμού.

Η επιτυχής ανάπτυξη και εφαρμογή των μεθοδολογιών αυτών ενισχύει ουσιαστικά τη δυνατότητα του Εργαστηρίου Ελέγχου Ντόπινγκ να παρέχει αξιόπιστες επιβεβαιωτικές αναλύσεις, συμβάλλοντας στην πρόληψη και καταστολή της αθέμιτης χρήσης απαγορευμένων ουσιών. Με αυτόν τον τρόπο, η εργασία αυτή υποστηρίζει την

προστασία της ακεραιότητας του αθλητισμού και την προώθηση ενός περιβάλλοντος καθαρού αθλητισμού και ευγενούς άμιλλας, προάγοντας τη διαφάνεια, την αξιοπιστία και τις ίσες ευκαιρίες στον αθλητικό ανταγωνισμό.

Λέξεις κλειδιά: Ντόпинγκ, S7: Ναρκωτικά, S5: Διουρητικά και Παράγοντες απόκρυψης, S3: B2–αγωνιστές, Ούρα, ESI-HPLC/UHPLC-MS/MS-Orbitrap, On-line Solid Phase Extraction (On-line SPE)

Abstract

This thesis focuses on the development, optimization, and validation of analytical methods using ESI-HPLC/UHPLC-MS/MS-Orbitrap for the confirmatory analysis of narcotics, diuretics and masking agents in human urine samples, in compliance with the criteria of the World Anti-Doping Agency (WADA). In parallel, an on-line solid-phase extraction (on-line SPE) method was developed for the detection of beta2-agonists in athletes' urine samples. The aim of these methods is to enable reliable and rapid identification of substances listed in the WADA Prohibited List, thereby enhancing the analytical capacity of the anti-doping control laboratory.

The procedure involved the creation of a database containing concentration values, precursor ions, retention times, collision energy settings, and characteristic fragment ions. Chromatographic optimization was subsequently performed by adjusting the flow rate, gradient slope of the organic phase, and elution times, with the objective of achieving efficient separation of compounds, including isobaric compounds and their metabolites. Mass spectrometry was applied under different collision energy conditions to select unique and high-intensity fragments, minimizing the risk of interferences.

The methods were validated in hydrolyzed urine samples, employing appropriate extraction techniques, including liquid-liquid extraction and on-line SPE. Data analysis and processing were performed with dedicated software directly connected to the analytical instrument, ensuring accuracy, reproducibility, and compliance with WADA performance requirements. Results demonstrated high sensitivity and specificity, confirming that the methods constitute robust tools for detecting substances that are otherwise challenging to identify due to rapid excretion or metabolism.

The successful development and application of these methodologies significantly strengthen the laboratory's capacity to provide reliable confirmatory analyses, contributing to the prevention and suppression of the illicit use of prohibited substances. This work supports the protection of sporting integrity and the promotion of an environment of clean sport and fair play, fostering transparency, credibility, and equal opportunities in athletic competition.

Keywords: Doping, S7: Narcotics, S5: Diuretics and Masking Agents, S3: Beta2-Agonists, Urine, ESI-HPLC/UHPLC-MS/MS-Orbitrap, On-line Solid Phase Extraction (On-line SPE)

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΟΝΥΜΙΑ

Συντμήσεις - Αρκτικόλεξα - Ακρονύμια			
Συντομογραφία	Επεξήγηση	Συντομογραφία	Επεξήγηση
AA	Area (peak area in chromatography)	MS	Mass Spectrometry – Φασματομετρία μάζας
AABG	Advanced Active Beam Guide- Προηγμένος Ενεργός Οδηγός Δέσμης	MS/MS	Tandem Mass Spectrometry – Διπλή Φασματομετρία Μάζας
ACN	Acetonitrile – Ακετονιτρίλιο	Na ₂ CO ₃	Ανθρακικό νάτριο
AQT	Quadrupole Mass Filter	Na ₂ SO ₄	Θεικό νάτριο
Atm	Atmosphere – Ατμόσφαιρα (μονάδα πίεσης)	NADOs	National Anti-Doping Organizations – Εθνικοί Οργανισμοί Αντιντόπινγκ
BLANK / WBLANK	Κενό δείγμα / White blank	NaHCO ₃	Διττανθρακικό νάτριο
CDS	Chromeleon Chromatography Data System (λογισμικό)	POSCON	Positive Control – Θετικός μάρτυρας
CH ₃ COOH	Οξικό οξύ	ppm	parts per million – μέρη στο εκατομμύριο
CP	Confirmation Procedure – Διαδικασία Επιβεβαίωσης	PRM	Parallel Reaction Monitoring
Da	Dalton – μονάδα μάζας	PSD	Post Source Decay – Αποσύνθεση μετά την πηγή
DBS	Dried Blood Spots – Αποξηραμένες κηλίδες αίματος	QC	Quality Control – Δείγμα/διαδικασία ελέγχου ποιότητας
DDA	Data Dependent Acquisition	Rel. AREA	Relative Area – Σχετική επιφάνεια
DIA	Data Independent Acquisition	ROBUSTNESS	Ανθεκτικότητα
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid – αντιπηκτικό σε δείγματα αίματος	ROBUSTNESS EVALUATION	Αξιολόγηση ανθεκτικότητας
EMA	European Medicines Agency – Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων	RRT	Relative Retention Time – Σχετικός χρόνος κατακράτησης
Eppendorf	Μικροσωληνίσκοι τύπου Eppendorf	RT	Retention Time – Χρόνος κατακράτησης
EQAS	External Quality Assessment Scheme – Σχήμα Εξωτερικής Αξιολόγησης Ποιότητας	SOPs	Standard Operating Procedures – Τυποποιημένες Διαδικασίες
ESI	Electrospray Ionization – Ιοντισμός με εκνεφωτή	SPE	Solid Phase Extraction – Εκχύλιση στερεάς φάσης
eV	electron Volt – μονάδα ενέργειας	SRM/MRM	Single/Multiple Reaction Monitoring – Παρακολούθηση συγκεκριμένων αντιδράσεων

FDA	Food and Drug Administration (ΗΠΑ)	TD	Technical Document – Τεχνικό Έγγραφο
FIAS	Flow Injection Analysis System	TL	Technical Letter – Τεχνική Επιστολή
FTMS	Fourier Transform Mass Spectrometry	Torr	μονάδα πίεσης (1 Torr $\approx$ 1/760 Atm)
HADA	Hellenic Anti-Doping Agency – Εθνική Αρχή Αντί-Ντόπινγκ	TUE	Therapeutic Use Exemption – Εξαίρεση λόγω Θεραπευτικής Χρήσης
HCD	Higher-Energy Collisional Dissociation – Κατακερματισμός υψηλής ενέργειας	UHPLC	Ultra-High-Performance Liquid Chromatography
HPLC-HR-MS/MS Orbitrap	High Performance Liquid Chromatography – High Resolution Tandem Mass Spectrometry με Orbitrap	UV-Vis	Υπεριώδης – Ορατή Φασματοσκοπία
HRAM	High Resolution Accurate Mass	vials	φιαλίδια
ICH	International Council for Harmonisation - Διεθνές Συμβούλιο Εναρμόνισης	WADA	World Anti-Doping Agency – Παγκόσμιος Οργανισμός Αντιντόπινγκ
ISD	In Source Decay – Αποσύνθεση στην πηγή	WADA EQAS	Educational External Quality Assessment Scheme – Εκπαιδευτικό Σχήμα Εξωτερικής Αξιολόγησης Ποιότητας
ISL	International Standard for Laboratories – Διεθνές Πρότυπο για Εργαστήρια	ΔΑΕ	Δυσμενές Αναλυτικό Εύρημα
ISO/IEC 17025	Διεθνές Πρότυπο Διαπίστευσης για Εργαστήρια	ΔΟΕ	Διεθνής Ολυμπιακή Επιτροπή (International Olympic Committee – IOC)
ISTI	International Standard for Testing and Investigation – Διεθνές Πρότυπο Ελέγχων και Ερευνών	Ε.Χ.Θ.Σ.	Εξαιρέσεις Χρήσης για Θεραπευτικούς Σκοπούς
m/z	mass-to-charge ratio – λόγος μάζας προς φορτίο	ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος	Εθνικό Κέντρο Έρευνας Φυσικών Επιστημών “Δημόκριτος”
MeOH	Methanol – Μεθανόλη	ΕΛΟΤ EN ISO/IEC 17025	Ελληνική έκδοση του προτύπου ISO/IEC 17025
mm / μ m	χιλιοστά / μικρόμετρα	ΕΣΥΔ	Εθνικό Σύστημα Διαπίστευσης

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ			
Όρος	Επεξήγηση	Όρος	Επεξήγηση
Accepted Methods	Μέθοδοι που γίνονται αποδεκτές βάσει αξιολόγησης.	Precision	Βαθμός συμφωνίας μεταξύ επαναλαμβανόμενων μετρήσεων.
Accuracy	Βαθμός προσέγγισης αποτελέσματος στην πραγματική τιμή.	Precursor ion	Μητρικό ιόν που υποβάλλεται σε κατακερματισμό στη φασματομετρία μάζας.
Alumina	Οξείδιο του αλουμινίου, χρησιμοποιείται ως στατικό μέσο σε χρωματογραφία.	Prime / Purge	Διαδικασίες προετοιμασίας αντλίας/συστήματος LC για σταθερή λειτουργία.
Athlete Biological Passport (ABP)	Πρόγραμμα παρακολούθησης βιολογικών δεικτών αθλητών για την έμμεση ανίχνευση ντόπινγκ.	Product ion	Ιόντα προϊόντα μετά τον κατακερματισμό του Precursor ion.
Batch / Sequence	Σειρά αναλύσεων σε ένα run.	Proficiency testing	Διαδικασία διασταυρωμένου ελέγχου μεταξύ εργαστηρίων.
Blind samples	Δείγματα με κρυφή ταυτότητα για εσωτερικό έλεγχο.	QC samples	Δείγματα ελέγχου για την παρακολούθηση ποιότητας ανάλυσης.
Blinded / Double-blinded samples	Δείγματα που εξετάζονται χωρίς να γνωρίζει ο αναλυτής την ταυτότητα ή την κατάσταση (για μείωση bias).	Quadrupole mass filter	Τετραπολικός αναλυτής μάζας που φιλτράρει ιόντα ανάλογα με m/z.
Bodybuilding	Άθλημα με έμφαση στη μυϊκή ανάπτυξη, συχνά συνδεδεμένο με κατάχρηση αναβολικών.	Qualification	Διαδικασία αξιολόγησης λειτουργικότητας εξοπλισμού.
Cannabis Sativa	Φυτό από το οποίο προέρχεται η κάνναβη· συχνά σχετίζεται με απαγορευμένες ουσίες.	Quality Control Charts	Γραφήματα παρακολούθησης ποιότητας με ανάλυση τάσεων.
Capillaries	Τριχοειδείς σωλήνες στη ροή δειγμάτων σε LC-MS.	Quantification	Μέτρηση συγκέντρωσης ουσίας.
Carryover	Φαινόμενο μεταφοράς ουσίας από προηγούμενο δείγμα στο επόμενο.	Range of acceptance	Επιτρεπτά όρια απόκλισης σε μέθοδο.

Chain of custody	Τεκμηριωμένη αλυσίδα ευθύνης για τη συλλογή, μεταφορά και αποθήκευση δειγμάτων.	Rayleigh limit	Όριο στο οποίο το φορτίο ενός σταγονιδίου υπερβαίνει τη σταθερότητά του και διασπάται.
Chromatographic criteria	Παράμετροι αξιολόγησης διαχωρισμού (π.χ. Resolution, Tailing).	Reference spectra / CRMs	Φάσματα αναφοράς / Πιστοποιημένα Υλικά Αναφοράς.
Confirmation Procedures	Εξειδικευμένες αναλυτικές διαδικασίες για επιβεβαίωση παρουσίας ουσίας.	Relative Retention Time (RRT)	Ο RT μιας ουσίας σε σχέση με άλλη αναφοράς.
Criterion	Καθορισμένο όριο αποδοχής.	Retention Time (RT)	Ο χρόνος που χρειάζεται μία ουσία να εξέλθει από τη στήλη.
Diagnostic ions	Ιόντα που χρησιμοποιούνται για επιβεβαίωση ταυτότητας ουσίας.	Reverse Phase LC (RPLC)	Μορφή HPLC όπου η στατική φάση είναι υδρόφοβη και η κινητή φάση πολική.
Differential pumping	Σύστημα αντλιών για διατήρηση διαφορετικών επιπέδων κενού σε MS.	RF lens	Εστιαστικό στοιχείο με ραδιοσυχνότητες για καθοδήγηση ιόντων στο MS.
Dope	Ουσία (συνήθως φάρμακο ή χημική ένωση) που χρησιμοποιείται για βελτίωση αθλητικών επιδόσεων, παράνομα ή μη.	Risk Assessment	Αξιολόγηση πιθανών κινδύνων σε διαδικασία ή μέθοδο.
Doping	Η χρήση απαγορευμένων ουσιών ή μεθόδων για ενίσχυση αθλητικών επιδόσεων.	Robustness	Ικανότητα μεθόδου να παραμένει αξιόπιστη σε μικρές αλλαγές συνθηκών.
Dried Blood Spots (DBS)	Δείγματα αίματος σε αποξηραμένη μορφή πάνω σε χαρτί, για εύκολη αποθήκευση και ανάλυση.	Screening Procedures	Αρχικές αναλυτικές διαδικασίες για ανίχνευση πιθανών απαγορευμένων ουσιών.
Fair play	Αθλητική αρχή που συνδέεται με την καταπολέμηση του ντόπινγκ.	Signal-to-noise ratio (S/N)	Λόγος έντασης σήματος προς θόρυβο – κριτήριο αξιοπιστίας σήματος.
Fourier Transform (FFT/FTMS)	Μαθηματική ανάλυση σήματος που χρησιμοποιείται στη φασματομετρία υψηλής ανάλυσης.	Silica gel	Διοξειδίο του πυριτίου σε πορώδη μορφή, ευρέως χρησιμοποιούμενο σε TLC και HPLC.

Gas Chromatography (GC)	Τεχνική διαχωρισμού μειγμάτων βασισμένη στη διαφορά πτητικότητας/διαλυτότητας συστατικών.	Six-port valve	Εξάρτημα LC για κατεύθυνση ροής μεταξύ καναλιών.
Gradient	Πρόγραμμα μεταβολής κινητής φάσης στη χρωματογραφία.	Specificity/Selectivity	Ικανότητα μεθόδου να διακρίνει συγκεκριμένη ουσία σε παρουσία άλλων.
Guidelines & Best Practices	Κατευθυντήριες οδηγίες για την εφαρμογή των διεθνών προτύπων και βέλτιστη πρακτική.	Spiking	Προσθήκη γνωστής ποσότητας ουσίας σε δείγμα για έλεγχο.
HCD cell	Θάλαμος κατακερματισμού υψηλής ενέργειας σε MS/MS.	Stability	Ικανότητα δείγματος να παραμένει αναλλοίωτο στο χρόνο.
High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	Προηγμένη μορφή LC με υψηλή απόδοση και ακρίβεια.	Standard Methods	Επίσημα αναγνωρισμένες μέθοδοι ανάλυσης.
In-house Methods	Εσωτερικές μέθοδοι που αναπτύσσονται από συγκεκριμένα εργαστήρια.	System Suitability Tests	Έλεγχοι για επιβεβαίωση σωστής λειτουργίας οργάνου πριν ανάλυση.
Intensity	Ένταση σήματος στο MS/χρωματογράφημα.	Target analytes	Οι ουσίες-στόχοι που αναζητούνται σε ανάλυση.
International Standards	Διεθνή πρότυπα που καθορίζουν διαδικασίες, κανόνες και τεχνικές απαιτήσεις για τον αντιντόпинγκ έλεγχο.	Taylor cone	Σχηματισμός σταγόνας σε ESI που οδηγεί στη δημιουργία ιόντων.
Ions for confirmation	Συγκεκριμένα ιόντα που επιβεβαιώνουν την ταυτότητα ουσίας.	Technical Documents	Έγγραφα WADA που παρέχουν τεχνικές λεπτομέρειες σε εξειδικευμένες διαδικασίες.
Linearity / Range	Σχέση απόκρισης μεθόδου με συγκέντρωση – περιοχή στην οποία ισχύει.	Technical Letters	Συμπληρωματικές επιστολές με οδηγίες ή διευκρινίσεις τεχνικής φύσης.
Liquid Chromatography (LC)	Χρωματογραφική τεχνική με υγρή κινητή φάση για διαχωρισμό ουσιών.	Template	Πρότυπο αρχείο ή διαδικασία.
Load / Inject / Ports / Loop / Auto sampler	Στάδια και εξαρτήματα για την εισαγωγή δείγματος στο χρωματογραφικό σύστημα.	Thin Layer Chromatography (TLC)	Χρωματογραφική τεχνική σε λεπτό στρώμα προσροφητικού υλικού (π.χ. silica gel) για ανάλυση δειγμάτων.

LOD / LOQ	Όριο ανίχνευσης / όριο ποσοτικοποίησης.	Trap column	Στήλη που συγκρατεί/συμπυκνώνει δείγμα πριν το κύριο διαχωρισμό.
Masking effect	Φαινόμενο όπου μία ουσία καλύπτει την ανίχνευση άλλης.	Validation	Διαδικασία πιστοποίησης της αξιοπιστίας μιας μεθόδου.
Master list	Λίστα αναφοράς ουσιών και μεταβολιτών.	Van der Waals / Δεσμοί υδρογόνου	Δευτερογενείς διαμοριακές δυνάμεις που παίζουν ρόλο στη χρωματογραφία.
Matrix effect	Παρεμβολές από το υπόστρωμα δείγματος.	Verification	Διαδικασία ελέγχου ότι μια μέθοδος λειτουργεί όπως προβλέπεται.
Neutral Loss Scan	MS/MS σάρωση για ανίχνευση ιόντων με συγκεκριμένη απώλεια μάζας.	World Anti-Doping Code	Το βασικό κανονιστικό έγγραφο του WADA για τον έλεγχο και την πρόληψη του ντόπινγκ.
Off-line	Αναλύσεις που γίνονται εκτός κύριας συσκευής ή διαδικασίας.	Χρήση για θεραπευτικούς σκοπούς	Χρήση φαρμάκων από αθλητές για πραγματικούς ιατρικούς λόγους με σχετική εξαίρεση (TUE).

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	1
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	3
Abstract.....	5
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΟΝΥΜΙΑ	6
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ	8
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΛΕΓΧΟΣ ΝΤΟΠΙΝΓΚ.....	16
1.1 ΝΤΟΠΙΝΓΚ.....	16
1.1.1 Ιστορική αναδρομή και εξέλιξη του Ντόπινγκ	16
1.1.2 Η εξέλιξη των μεθόδων αντιντόπινγκ και η δημιουργία οργανωμένων ελέγχων.	17
1.2 ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΑΠΑΓΟΡΕΥΜΕΝΩΝ	20
1.2.1 Κατηγορίες απαγορευμένων ουσιών και μεθόδων.	20
1.3 ΤΟ ΠΑΓΚΟΣΜΙΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΑΝΤΙ – ΝΤΟΠΙΝΓΚ.....	24
1.4 ΤΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΝΤΟΠΙΝΓΚ	25
1.5 Η ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ ΣΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΝΤΟΠΙΝΓΚ	26
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΝΤΟΠΙΝΓΚ	28
2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	28
2.2 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ	29
2.2.1 Αρχή τεχνικής υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης.....	29
2.2.2 Κατηγοριοποίηση Υγρής Χρωματογραφίας	29
2.2.3 Οργανολογία υγρής χρωματογραφίας.....	31
2.3 ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ.....	38
2.3.1 Εισαγωγή	38
2.3.2 Οργανολογία για την Φασματομετρία μάζας	39
2.3.3 Υψηλής Ανάλυσης Φασματομετρία Μάζας με Αναλυτή μαζών τύπου Orbitrap	40
2.4 ΑΝΑΛΥΤΗΣ ΜΑΖΩΝ ΤΥΠΟΥ ORBITRAP	45
2.4.1 Περιγραφή του αναλυτή μαζών τύπου Orbitrap.	45
2.5 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ ΣΕ ΑΠΕΥΘΕΙΑΣ ΣΥΝΔΕΣΗ (Online SPE)	46
2.5.1 Εκχύλιση Στερεάς Φάσης σε Απευθείας Σύνδεση (On-line SPE) στο Σύστημα LC – MS/MS.	46
2.5.2 Εκχύλιση Στερεάς Φάσης σε Απευθείας Σύνδεση (On-line SPE)	46
2.5.3 Περιγραφή της λειτουργίας του συστήματος Εκχύλιση Στερεάς Φάσης σε Απευθείας Σύνθεση (On-line SPE).	48
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ	51
3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	51

3.2. NARKΩΤΙΚΑ, S7: NARCOTICS	51
3.2.1 Ορισμός και κλινική σημασία των ναρκωτικών.	51
3.2.2. Κατάχρηση και απαγόρευση στον αθλητισμό.	52
3.3 ΔΙΟΥΡΗΤΙΚΑ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΑΠΟΚΡΥΨΗΣ, S5: DIURETICS AND MASKING AGENTS	53
3.3.1 Ορισμός Διουρητικών και Παραγόντων Απόκρυψης.	53
3.3.2 Χρήση και κατάχρηση στον αθλητισμό.....	54
3.4 ΣΧΕΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ.....	55
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗΣ – ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ	56
4.1 ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ	56
4.2 ΔΙΑΣΦΑΛΙΣΗ ΤΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.	57
4.3 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΠΑΓΟΡΕΥΜΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ.	58
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΚΟΠΟΣ.....	62
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ.....	64
6.1 ΟΥΣΙΕΣ ΚΑΙ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ.....	64
6.2 ΔΙΑΛΥΤΕΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	64
6.2.1 Διαλύτες.....	64
6.2.2 Αντιδραστήρια	64
6.3 ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ.....	65
6.4 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	65
6.4.1 Προετοιμασία πολυσυστατικού διαλύματος πρότυπων ουσιών.	65
6.4.2 Παρασκευαστική διαδικασία δειγμάτων ούρων.	66
6.4.3 Προετοιμασία δειγμάτων για την επικύρωση της μεθόδου (Ημέρα 1 – Ημέρα 2)	68
6.5 ΣΥΣΚΕΥΕΣ.....	69
6.6 ΑΝΑΛΥΤΙΚΑ ΟΡΓΑΝΑ	69
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΡΟΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ, ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΤΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΝΑΡΚΩΤΙΚΩΝ (S7), ΔΙΟΥΡΗΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΑΠΟΚΡΥΨΗΣ (S5) ΣΕ ΟΥΡΑ ΑΘΛΗΤΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ UHPLC-HRMS ORBITRAP.....	71
7.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΕΚΜΗΡΙΩΣΗΣ (PROHIBITED LIST 2025, CONFIRMATION PROCEDURE (CP), PRE-PROBATIONARY TEST (PPT), MONITORING.)	71
7.2 ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ ΠΙΝΑΚΑ ΟΥΣΙΩΝ (MASTER LIST) ΜΕ ΒΑΣΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΤΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ (M/Z, ADDUCTS, RT, FRAGMENTS, BEST NCE)	73
7.3 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΥ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ.....	74

7.3.1 Στόχοι και κριτήρια αξιολόγησης της μεθόδου.	74
7.3.2 Διαδικασία ανάπτυξης και αξιολόγησης της μεθόδου.....	76
7.4 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΗΣ ΚΑΤΑΚΕΡΜΑΤΙΣΗΣ ΤΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΤΗ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ.....	78
7.4.1 Στόχοι και κριτήρια αξιολόγησης της μεθόδου.	78
7.4.2 Διαδικασία ανάπτυξης και βελτιστοποίησης της μεθόδου.	79
7.4.3 Απόδοση του Best Collision Energy (Best CE).....	80
7.5 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΚΑΤΟΠΙΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΒΕΛΤΙΣΤΗΣ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ ΣΥΓΚΡΟΥΣΗΣ (COLLISION ENERGY).	80
7.5.1 Βελτιστοποίηση Χρωματογραφίας.	80
7.5.2 Βελτιστοποίηση Φασματομετρίας μάζας.....	81
7.5.3 Εφαρμογή στο βιολογικό υπόστρωμα.	81
7.5.4. Αντιμετώπιση προβλημάτων και αξιοπιστία του οργάνου (Troubleshooting).	83
7.6 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΚΑΤΑΓΡΑΦΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ.....	84
7.7 ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ.....	86
7.7.1 Παρασκευή δειγμάτων για την επικύρωση της μεθόδου.....	86
7.7.2 Διαδικασία ανάλυσης – Ημέρα 1.....	87
7.7.3 Διαδικασία Ανάλυσης – Ημέρα 2.....	88
7.8 ΑΝΑΦΟΡΑ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ – ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΑΠΟΔΟΧΗΣ ΒΑΣΕΙ ΤΟΥ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΟΥ ΑΡΧΕΙΟΥ (EXCEL) ΕΠΙΚΥΡΩΣΗΣ.	88
ΚΕΦ 8: ΔΟΚΙΜΑΣΤΙΚΗ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ON-LINE SPE ΓΙΑ ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΑΠΑΓΟΡΕΥΜΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ S3 BETA AGONISTS.....	90
8.1 ΣΤΟΧΟΙ ΤΩΝ ΔΟΚΙΜΩΝ.....	90
8.2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ.....	91
8.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	92
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	99
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	123
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α.....	125
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β.....	128
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β1 – ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ S7: ΝΑΡΚΩΤΙΚΑ	128
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β2 – ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ S5: ΔΙΟΥΡΗΤΙΚΑ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΑΠΟΚΡΥΨΗΣ.....	132
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ.....	134
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ1 – ΦΑΣΜΑΤΑ ΜΑΖΑΣ ΓΙΑ ΚΑΘΕ ΕΝΩΣΗ ΣΤΗ ΒΕΛΤΙΣΤΗ ΚΑΝΟΝΙΚΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΕΝΕΡΓΕΙΑ ΣΥΓΚΡΟΥΣΗΣ.....	134
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ2 – ΦΑΣΜΑΤΑ ΜΑΖΑΣ ΓΙΑ ΚΑΘΕ ΕΝΩΣΗ ΣΤΗ ΒΕΛΤΙΣΤΗ ΚΑΝΟΝΙΚΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΕΝΕΡΓΕΙΑ ΣΥΓΚΡΟΥΣΗΣ.....	142

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Δ.....	152
Βιβλιογραφία:	159

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΛΕΓΧΟΣ ΝΤΟΠΙΝΓΚ

1.1 ΝΤΟΠΙΝΓΚ

1.1.1 Ιστορική αναδρομή και εξέλιξη του Ντόπινγκ

Η πρακτική για την ενίσχυση της σωματικής απόδοσης με τη βοήθεια εξωτερικών παρεμβάσεων δεν είναι φαινόμενο της σύγχρονης εποχής. Η χρήση ουσιών για τη βελτίωση της αντοχής, της δύναμης ή της συγκέντρωσης έχει καταγραφεί ήδη από την αρχαιότητα. Σε αρκετές αναφορές στη μυθολογία και την αρχαία ιστορία αποτυπώνεται η επιθυμία του ανθρώπου να ξεπεράσει τα φυσικά του όρια. Στην αρχαία Ελλάδα, πριν τους Ολυμπιακούς αγώνες, οι αθλητές κατανάλωναν συγκεκριμένα είδη κρέατος καθώς και ζωμό αίματος. Στην αρχαία Ρώμη, οι μονομάχοι και οι αρματοδρόμοι κατανάλωναν μείγματα διεγερτικών ουσιών για την ενίσχυση της φυσικής τους κατάστασης και για την ανοχή στον πόνο και την κόπωση. (Vlad et al. 2018)

Η λέξη «dop» έχει τις ρίζες σε μια διάλεκτο της Νότιας Αφρικής και αρχικά αναφερόταν σε ένα υψηλής περιεκτικότητας αυτοσχέδιο αλκοολούχο ποτό, το οποίο χρησιμοποιούνταν ως διεγερτικό σε τελετουργίες. (Λυμπούση 2016, σ. 22) Η πρώτη καταγραφή της λέξης ντόπινγκ, «doping», βρέθηκε σε αγγλικό λεξικό το 1889, αναφερόμενη σε χορήγηση ναρκωτικών ουσιών σε άλογα ιπποδρομιών για να επηρεαστούν και βελτιωθούν οι επιδόσεις τους. (Σακελλαρίου 2020, σ. 29) (Vlad et al. 2018). Από τότε, ο όρος αυτός εξελίχθηκε και σήμερα περιγράφει συνολικά τη χρήση απαγορευμένων ουσιών ή μεθόδων από αθλητές με σκοπό την τεχνητή βελτίωση της απόδοσης τους. Στην ελληνική γλώσσα για την απόδοση του όρου «doping» συναντάμε τον όρο «φαρμακοδιέγερση», αν και στην πράξη ο αγγλικός όρος παραμένει κυρίαρχος στη διεθνή βιβλιογραφία και στον δημόσιο διάλογο. (Σακελλαρίου 2020, σ. 28)

Η πρώτη σύγχρονη αναφορά σε περίπτωση ντόπινγκ στον ανθρώπινο αθλητισμό, χρονολογείται στο 1865 σε κολυμβητικό αγώνα στο Άμστερνταμ. Μέχρι τα τέλη του 19^{ου} αιώνα, οι αθλητές χρησιμοποιούσαν μείγματα καφεΐνης, αιθέρα, νιτρογλυκερίνης και αλκοόλ για την βελτίωση της απόδοσης τους. Το 1896 καταγράφεται ο πρώτος θάνατος που φαίνεται να είναι σχετιζόμενος με το ντόπινγκ, αυτός του Άγγλου ποδηλάτη Άρθουρ Λίντον. (Σακελλαρίου 2020, σ. 28)

Κατά τον 20^ο αιώνα, το ντόπινγκ εξελίχθηκε από σποραδική πρακτική σε οργανωμένο φαινόμενο. Η βιομηχανοποίηση του αθλητισμού, σε συνδυασμό με τη κοινωνική και οικονομική πίεση για επιτυχία και ρεκόρ, ενίσχυσαν την συστηματική χρήση διαφόρων ουσιών. Μια από τις πιο γνωστές υποθέσεις ντόπινγκ των Ολυμπιακών Αγώνων

παραμένει ο τελικός των 100 μέτρων στη Σεούλ το 1988, όπου ο Καναδός Μπεν Τζόνσον βρέθηκε θετικός σε έλεγχο ντόπινγκ. Έκτοτε, έξι από τους οκτώ συμμετέχοντες εκείνου του αγώνα ενεπλάκησαν σε υποθέσεις ντόπινγκ. (Σακελλαρίου 2020, σ. 29)

Το φαινόμενο του ντόπινγκ εξακολουθεί να υπάρχει με αμείωτη ένταση και στον 21^ο αιώνα, με πολυάριθμες περιπτώσεις θετικών δειγμάτων, και με ανακλήσεις μεταλλίων από παλαιότερους αγώνες. Η πρόοδος της τεχνολογίας και της επιστήμης έχει καταστήσει δυνατή την ανίχνευση απαγορευμένων ουσιών και μεθόδων σε εξαιρετικά μικρές ποσότητες. Αυτό έχει οδηγήσει στην εκ νέου ανάλυση παλαιών αποθηκευμένων δειγμάτων, φέρνοντας στο φως περιπτώσεις ντόπινγκ όχι μόνο μέσω της χρήσης μιας ουσίας, αλλά και μέσω οργανωμένων πρακτικών συγκάλυψης ή μεθόδων που μεταβάλλουν τη φυσιολογική λειτουργία του οργανισμού, με σκοπό την ενίσχυση της αθλητικής απόδοσης. (Damjanovic et al. 2025)

1.1.2 Η εξέλιξη των μεθόδων αντιντόπινγκ και η δημιουργία οργανωμένων ελέγχων. Η επιστημονική αντιμετώπιση του φαινομένου του ντόπινγκ άρχισε ουσιαστικά στις αρχές του 20^{ου} αιώνα. Ο Ρώσος χημικός Bukowski, το 1910, προχώρησε στην απομόνωση αλκαλοειδών από σίελο αγωνιστικών αλόγων. Οι πρώτες μέθοδοι βασίζονταν σε χημικές αντιδράσεις για τη δημιουργία έγχρωμων ή αδιάλυτων ενώσεων, με στόχο την ταυτοποίηση ουσιών όπως η μορφίνη, η στρυχνίνη και η ηρωίνη.

Στις δεκαετίες που ακολούθησαν, η ανάπτυξη και εξάπλωση των διεγερτικών ουσιών οδήγησε στην ανάγκη για πιο ευαίσθητες τεχνικές ανάλυσης. Τη δεκαετία του 1930 εφαρμόστηκαν για πρώτη φορά μέθοδοι όπως η χρωματογραφία και η καθίζηση. Στη συνέχεια, οι τεχνολογικές εξελίξεις κατέστησαν εφικτή την εισαγωγή τεχνικών χρωματογραφίας χάρτου, λεπτής στιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC) και αέριας χρωματογραφίας (Gas Chromatography, GC), αυξάνοντας την ειδικότητα των αναλύσεων.

Ένα μεγάλο και καθοριστικό βήμα ήταν η θέσπιση νομοθεσίας. Το 1963 η Γαλλία έγινε η πρώτη χώρα που θεσμοθέτησε την απαγόρευση του ντόπινγκ, ενώ το 1967 η Διεθνής Ολυμπιακή επιτροπή (ΔΟΕ) ίδρυσε Ιατρική Επιτροπή και δημοσίευσε τον πρώτο επίσημο Κατάλογο Απαγορευμένων Ουσιών. Οι πρώτοι έλεγχοι πραγματοποιήθηκαν

στους Ολυμπιακούς αγώνες του Μεξικού το 1968, εγκαινιάζοντας μια νέα εποχή στην καταπολέμηση του ντόπινγκ.

Με την πρόοδο της τεχνολογίας, άρχισαν να χρησιμοποιούνται και περισσότερο προηγμένες τεχνικές, όπως οι ανοσοχημικοί και ραδιοανοσολογικοί προσδιορισμοί που επέτρεψαν την ανίχνευση ουσιών μεγάλης μοριακής μάζας. Σταδιακά, η πολυπλοκότητα των αναλύσεων αυξήθηκε, με την εισαγωγή συνδυασμένων τεχνικών για την ανάλυση των δειγμάτων.

Η ανάγκη για εναρμόνιση μεθόδων και των καταλόγων απαγορευμένων ουσιών ανάμεσα στις διάφορες αθλητικές ομοσπονδίες οδήγησε στην ενοποίηση των καταλόγων απαγορευμένων ουσιών και μεθόδων από τη ΔΟΕ, τις Διεθνείς Ομοσπονδίες και τις Εθνικές Ολυμπιακές Επιτροπές, το 1994.

Ωστόσο, η καθοριστική αλλαγή στον θεσμικό και οργανωτικό τομέα πραγματοποιήθηκε το 1999, με τη σύσταση του Παγκόσμιου Οργανισμού Αντιντόπινγκ (World Anti – Doping Agency, WADA) έπειτα από το Παγκόσμιο Συνέδριο για το Ντόπινγκ στη Λωζάνη. Η δημιουργία του WADA αποτέλεσε την αρχή ενός πιο συνεκτικού και παγκοσμιοποιημένου πλαισίου καταπολέμησης του ντόπινγκ και αποτέλεσε το νομικό θεμέλιο για την επιβολή ενιαίων κανόνων και κυρώσεων διεθνώς. (Σακελλαρίου 2020, σ. 30,31,32)

1.1.3 Ορισμός Ντόπινγκ

Όπως προαναφέρθηκε, ο όρος ντόπινγκ προέρχεται από τη λέξη «dop», μια λέξη αφρικανικής προέλευσης, η οποία περιέγραφε ένα φυσικό διεγερτικό με τελετουργική σημασία. (Christen et al. 2025, p. 220). Στα ελληνικά, αποδίδεται συχνά ως «φαρμακοδιέγερση», αν και στην πράξη ο αγγλικός όρος έχει επικρατήσει, δεδομένου ότι υπάρχουν μορφές ντόπινγκ εκτός της χορήγησης φαρμακευτικών ουσιών. Σήμερα, ο όρος περιγράφει οποιαδήποτε εξωτερική παρέμβαση που αποσκοπεί στην τεχνητή ενίσχυση της αθλητικής απόδοσης.

Ένας από τους πρώτους ορισμούς του ντόπινγκ δόθηκε από την Ιατρική Επιτροπή της Διεθνούς Ολυμπιακής Επιτροπής το 1967, ορίζοντας το Ντόπινγκ ως: *«Η χρήση ουσιών ή τεχνικών οποιασδήποτε μορφής ή ποιότητας, ξένης ή αφύσικης προς το σώμα, με αποκλειστικό σκοπό την απόκτηση μιας τεχνητής ή άδικης αύξησης της απόδοσης σε αγώνα»*

Η πρακτική αυτή έχει αποτελέσει αντικείμενο αυστηρών ελέγχων και ρυθμίσεων από

διεθνείς αθλητικούς οργανισμούς, με στόχο τη διατήρηση της αθλητικής ακεραιότητας και της δίκαιης ανταγωνιστικότητας. (Mottram & Chester 2022, σ. 27)

Η έννοια του ντόπινγκ έχει αποτελέσει αντικείμενο διαφόρων ορισμών, οι οποίοι επιχειρούν να περιγράψουν τόσο τη φύση του όσο και τις συνεχώς εξελισσόμενες μορφές του. Η συνεχόμενη εξέλιξη και εισαγωγή νέων μεθόδων και ουσιών καθιστά δύσκολη την απόδοση ενός σταθερού και καθολικά αποδεκτού ορισμού. Για τον λόγο αυτό, ο νομικά δεσμευτικός ορισμός παρέχεται από τον Παγκόσμιο Κώδικα Αντιντόπινγκ (World Anti-Doping Code, στο εξής «Κώδικας»), ο οποίος εκδίδεται από τον WADA) και βρίσκει καθολική εφαρμογή.

Ο Κώδικας ορίζει το ντόπινγκ ως τη διάπραξη μίας ή περισσότερων παραβάσεων των κανόνων αντιντόπινγκ, όπως αυτές ορίζονται στα άρθρα 2.1 έως 2.11 αυτού. (World Anti-Doping Code 2021a, Article 1, p. 19)

Ο Κώδικας δεν περιορίζεται μόνο στην παρουσία απαγορευμένων ουσιών σε δείγμα αθλητή, αλλά ενσωματώνει ένα ευρύ φάσμα συμπεριφορών που μπορούν να αλλοιώσουν την ισότιμη συμμετοχή σε αγώνες.

Για την καλύτερη κατανόηση της σύγχρονης έννοιας του ντόπινγκ παρατίθενται επιγραμματικά οι διατάξεις των άρθρων 2.1 έως 2.11 του Κώδικα:

- 2.1. Παρουσία απαγορευμένης ουσίας ή μεταβολιτών ή δεικτών της σε δείγμα αθλητή.
- 2.2 Χρήση ή απόπειρα χρήσης απαγορευμένης ουσίας ή απαγορευμένης μεθόδου από αθλητή.
- 2.3 Αποφυγή, άρνηση ή μη υποβολή σε δειγματοληψία από αθλητή.
- 2.4. Μη παροχή πληροφοριών εντοπισμού από αθλητή.
- 2.5. Παραποίηση ή απόπειρα παραποίησης οποιουδήποτε μέρους της διαδικασίας του ελέγχου ντόπινγκ από αθλητή ή άλλο πρόσωπο.
- 2.6. Κατοχή απαγορευμένης ουσίας ή απαγορευμένης μεθόδου από αθλητή ή από προσωπικό υποστήριξης αθλητή.
- 2.7. Η διακίνηση ή απόπειρα διακίνησης οποιασδήποτε απαγορευμένης ουσίας ή απαγορευμένης μεθόδου από αθλητή ή άλλο πρόσωπο.
- 2.8. Η εντός αγώνα χορήγηση ή η απόπειρα χορήγησης από αθλητή ή άλλο πρόσωπο προς αθλητή οποιασδήποτε απαγορευμένης ουσίας ή απαγορευμένης μεθόδου ή η εκτός αγώνα χορήγηση απαγορευμένης εκτός αγώνα ουσίας ή απαγορευμένης εκτός αγώνα μεθόδου.
- 2.9. Συνέργεια ή απόπειρα συνέργειας από έναν αθλητή ή άλλο πρόσωπο.

2.10 Απαγορευμένη σύμπραξη από αθλητή ή άλλο πρόσωπο.

2.11 Πράξεις αθλητή ή άλλου προσώπου που αποθαρρύνουν αναφοράς στις αρχές ή αποτελούν αντίποινα κατά τέτοιας αναφοράς.

Συμπερασματικά, είναι φανερό πώς ο ορισμός του ντόπινγκ με βάση τον Κώδικα αποτελεί ένα δυναμικό και εξελισσόμενο θεσμικό εργαλείο, το οποίο δεν αποσκοπεί μόνο στην ανίχνευση απαγορευμένων ουσιών, αλλά και στη διασφάλιση της διαφάνειας και της ηθικής ακεραιότητας στον αθλητισμό. Για τους επιστήμονες η κατανόηση αυτών των διατάξεων είναι ζωτικής σημασίας, καθώς καλούνται όχι μόνο να ανιχνεύουν τις ουσίες, αλλά και να λειτουργούν ως πυλώνες εμπιστοσύνης στο σύστημα ελέγχου και δικαιοσύνης των αθλητικών δεσμών.

1.2 ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΑΠΑΓΟΡΕΥΜΕΝΩΝ

Ο Κατάλογος Απαγορευμένων (Prohibited List) αποτελεί ένα υποχρεωτικό Διεθνές Πρότυπο το οποίο είναι ένα από τα μέρη του Παγκόσμιου Προγράμματος Αντιντόπινγκ. Ο Κατάλογος ανανεώνεται ετησίως κατόπιν μιας εκτεταμένης διαδικασίας διαβούλευσης του WADA. Ο ανανεωμένος Κατάλογος τίθεται σε εφαρμογή την 1^η Ιανουαρίου κάθε έτους. Ωστόσο, το περιεχόμενο του για το νέο έτος είναι γνωστό ήδη από τον Σεπτέμβριο του προηγούμενου, δίνοντας τη δυνατότητα στους Οργανισμούς Αντι-Ντόπινγκ, τα εργαστήρια και άλλες αρμόδιες αρχές να προετοιμαστούν κατάλληλα διασφαλίζοντας την ομαλή διεξαγωγή των ελέγχων των ουσιών που θα περιλαμβάνονται στον επικαιροποιημένο κατάλογο. Το επίσημο κείμενο του Καταλόγου Απαγορευμένων διατηρείται από τον WADA και δημοσιεύεται στην αγγλική και τη γαλλική γλώσσα. Σε οποιαδήποτε περίπτωση σύγκρουσης μεταξύ της αγγλικής και της γαλλικής εκδοχής υπερισχύει η αγγλική.

Η εξέλιξη του Καταλόγου Απαγορευμένων μέσα στα χρόνια φανερώνει την δυναμική του φύση και επιβεβαιώνει ότι το ντόπινγκ είναι ένα φαινόμενο εξελίσσεται συνεχώς. Δεν αρκεί η ύπαρξη ενός στατικού ρυθμιστικού πλαισίου αλλά απαιτείται διαρκής επιστημονική εγρήγορση, καθώς νέες ουσίες και μέθοδοι εμφανίζονται συνεχώς, με στόχο να παρακάμψουν τις υπάρχουσες μεθόδους ανίχνευσης.

1.2.1 Κατηγορίες απαγορευμένων ουσιών και μεθόδων.

Ο Κατάλογος Απαγορευμένων περιλαμβάνει τρία τμήματα:

- 1) Κατηγορίες απαγορευμένων ουσιών και μεθόδων εντός και εκτός αγώνων.

Το τμήμα αυτό περιλαμβάνει ουσίες και μεθόδους που είναι μονίμως απαγορευμένες, τόσο κατά την προπονητική περίοδο όσο και κατά τη διάρκεια των αγώνων. Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν:

S0 Μη εγκεκριμένες ουσίες: Πρόκειται για κάθε φαρμακολογική ουσία η οποία δεν καλύπτεται από καμία από τις επόμενες κατηγορίες του Καταλόγου και χωρίς ισχύουσα έγκριση από οποιαδήποτε κυβερνητική ρυθμιστική υγειονομική αρχή για ανθρώπινη θεραπευτική χρήση.

S1 Αναβολικοί παράγοντες: Χωρίζονται σε δύο υποκατηγορίες.

S1.1. Αναβολικά ανδρογόνα στεροειδή: Φυσικά ή συνθετικά στεροειδή που μπορούν να ενισχύσουν την αναβολική διεργασία στον οργανισμό, να διεγείρουν την πρωτεϊνσύνθεση, να αναστείλουν τη διάσπαση των πρωτεϊνών και να οδηγήσουν σε ανάπτυξη μυών και ανδρικών χαρακτηριστικών.

S1.2. Χημικώς τροποποιημένα στεροειδή που έχουν συντεθεί από τη φυσική δομή, στην προσπάθεια για μεγιστοποίηση των αναβολικών επιδράσεων και ελαχιστοποίηση των ανδρογόνων επιδράσεων των αναβολικών ανδρογόνων στεροειδών.

S2 Πεπτιδικές Ορμόνες, Αυξητικοί Παράγοντες, Συγγενείς Ουσίες και Μιμητές: Φυσικά ή συνθετικά πρωτεϊνικά μόρια που συνδέονται με τους υποδοχείς των κυττάρων στόχων επιδρώντας σε συγκεκριμένες λειτουργίες, οι οποίες κανονικά ελέγχονται από τις ενδογενείς ορμόνες/πρωτεΐνες.

S3 B2 Αγωνιστές: Φαρμακευτικά σκευάσματα που συνδέονται με τους β2-αδρενεργικούς υποδοχείς, δρώντας ως ανακουφιστικά του άσθματος ή βρογχοδιασταλτικά, αφού χαλαρώνουν και ανοίγουν τους αεραγωγούς (βρόγχους) στους πνεύμονες.

S4 Ορμονικοί και Μεταβολικοί Ρυθμιστές: Ανταγωνιστές και ρυθμιστές ορμονών που επηρεάζουν σωματικές λειτουργίες, όπως τα επίπεδα της γλυκόζης του αίματος ή τη μυϊκή ανάπτυξη, αναστέλλοντας ή διεγείροντας τους κυτταρικούς υποδοχείς και ρυθμίζοντας συγκεκριμένες αντιδράσεις.

S5 Διουρητικά και Παράγοντες Απόκρυψης: Οι παράγοντες κάλυψης (μάσκες) μπορούν να καλύψουν την παρουσία ή να μειώσουν τη συγκέντρωση μιας απαγορευμένης ουσίας κατά την ανάλυση ούρων, επομένως, και τα διουρητικά θεωρούνται μάσκες, καθώς αυξάνουν το ρυθμό της ούρησης, προκαλώντας αραίωση των ούρων.

Οι ουσίες στην κατηγορία αυτή δεν βελτιώνουν την απόδοση άμεσα αλλά λειτουργούν υποστηρικτικά στην απόκρυψη άλλων απαγορευμένων ουσιών. Η κατηγοριοποίηση τους είναι ξεκάθαρο παράδειγμα πως το σύστημα αντιντόπινγκ δεν ερευνά μόνο τη χρήση, αλλά και την πρόθεση συγκάλυψης.

Απαγορευμένες μέθοδοι:

M1: Χειρισμός του αίματος και των συστατικών του. Τεχνικές εισαγωγής αίματος και παραγώγων του στον οργανισμό, αύξηση της παροχής ή μεταφοράς οξυγόνου και ενδοαγγειακού χειρισμού του αίματος ή των συστατικών του με φυσικό ή χημικό τρόπο.

M2 : Χημικός και φυσικός χειρισμός. Χρήση ουσιών και/ή μεθόδων που αλλοιώνουν τα δείγματα που συλλέγονται κατά τη διάρκεια των ελέγχων ντόπινγκ, έτσι ώστε να μεταβάλλουν την ακεραιότητα και την εγκυρότητα τους.

M3 : Γονιδιακό ντόπινγκ. Μεταφορά πολυμερών νουκλεϊκών οξέων ή ανάλογων νουκλεϊκών οξέων και χρήση φυσιολογικών ή γενετικά τροποποιημένων κυττάρων.

2) Κατηγορίες απαγορευμένων ουσιών μόνο εντός αγώνων.

Η χρήση των ουσιών αυτών μπορεί να παρέχει άμεσο αγωνιστικό πλεονέκτημα, για αυτό το λόγο οι ουσίες αυτές είναι απαγορευμένες μόνο κατά τη διάρκεια των αγώνων.

Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν:

S6 Διεγερτικά: Ουσίες που ενεργοποιούν το κεντρικό νευρικό σύστημα αντίστοιχα με τη δράση της αδρεναλίνης και της νοραδρεναλίνης και βελτιώνουν τη διάθεση, μειώνουν το αίσθημα της κόπωσης και βελτιώνουν τη φυσική απόδοση.

S7 Ναρκωτικά: Ουσίες ικανές να μεταβάλουν τη ψυχική και φυσική κατάσταση ενός οργανισμού σε ένα ευρύ πεδίο από τον ύπνο και την πλήρη ακινητοποίηση έως την ευφορία και τη διέγερση.

S8 Κανναβινοειδή: Φυσικές ουσίες με ψυχομιμητική ή παραισθησιογόνα δράση που ανευρίσκονται στο φυτό *Cannabis Sativa*, καθώς επίσης και συνθετικά ανάλογα ή οι μεταβολίτες τους.

S9 Γλυκοκορτικοειδή: Φυσικά ή συνθετικά στεροειδή, που εμποδίζουν τη διαδικασία της φλεγμονής και συμμετέχουν στο μεταβολισμό της γλυκόζης και των λιπιδίων (καταβολική δράση).

3) Κατηγορίες ουσιών σε συγκεκριμένα αθλήματα.

Οι ουσίες του τμήματος αυτού δεν είναι γενικά απαγορευμένες αλλά η χρήση τους είναι απαγορευμένη σε συγκεκριμένα αθλήματα, καθώς προσφέρουν αθέμιτο πλεονέκτημα σε αυτά. Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν:

P1 Β-Αναστολείς: Ουσίες που επιβραδύνουν τους ρυθμούς της καρδιάς και χρησιμοποιούνται σε αθλήματα που στηρίζονται στην ηρεμία του αγωνιζόμενου για την εκτέλεση λεπτών και ακριβών κινήσεων, όπως η τοξοβολία, η σκοποβολή, το γκολφ, κ.α.

(Prohibited List, 2025)

Ο Κατάλογος Απαγορευμένων δεν αποτελεί απλά ένα τεχνικό εργαλείο αλλά καθρεπτίζει την πολυπλοκότητα και τη διαρκή εξέλιξη του φαινομένου ντόπινγκ. Η κατηγοριοποίηση ουσιών και μεθόδων βάσει του αθλήματος ή χρόνου, μαρτυρά ότι το ντόπινγκ δεν περιορίζεται πλέον στη χρήση κάποιου απλού διεγερτικού, αλλά επεκτείνεται σε ένα πλήρες φάσμα χημικών, ορμονικών και τεχνολογικών παρεμβάσεων. Η επιστημονική κοινότητα καλείται να κινηθεί ταυτόχρονα σε πολλά επίπεδα, όπως να ερμηνεύουν τους μηχανισμούς δράσης, να προβλέπουν πιθανούς μεταβολίτες ουσιών και να αναπτύσσουν εξελιγμένες μεθόδους ανίχνευσης. Μέσω της ιστορικής αναδρομής του ντόπινγκ βλέπουμε πως από την αρχαιότητα με τα αφεψήματα ζωμών αίματος, το ντόπινγκ εξελίχθηκε στον γονιδιακό χειρισμό του 21^{ου}

αιώνα, επομένως η απαγόρευση μόνο δεν επαρκεί, χρειάζεται συνδυασμός γνώσης, πρόληψης, ηθικής και τεχνολογικής επαγρύπνησης.

1.3 ΤΟ ΠΑΓΚΟΣΜΙΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΑΝΤΙ – ΝΤΟΠΙΝΓΚ

Το Παγκόσμιο Πρόγραμμα Αντιντόπινγκ συγκροτεί το οργανωτικό πλαίσιο που εξασφαλίζει την εναρμόνιση των εθνικών και διεθνών πολιτικών κατά του ντόπινγκ. Αποτελείται από τρία διακριτά επίπεδα:

- Παγκόσμιος Κώδικας Αντιντόπινγκ
- Διεθνή Πρότυπα (International Standards)
- Κατευθυντήριες Οδηγίες και Πρότυπα Βέλτιστης Πρακτικής (Guidelines and Models of Best Practices)

Ο Κώδικας είναι το βασικό, νομικά δεσμευτικό κείμενο και ορίζει τους κανόνες που πρέπει να εφαρμόζουν όλα τα συμβαλλόμενα μέρη (διεθνείς αθλητικές ομοσπονδίες, εθνικοί οργανισμοί αντιντόπινγκ). Τα Διεθνή Πρότυπα εξειδικεύουν τη λειτουργία του Κώδικα και είναι δεσμευτικά. Αντιθέτως, οι Κατευθυντήριες Οδηγίες και τα Πρότυπα Βέλτιστης Πρακτικής παρέχουν συστάσεις χωρίς δεσμευτικό χαρακτήρα, με στόχο την επιπλέον εναρμόνιση.

Ενδεικτικά Διεθνή Πρότυπα που εκδίδονται από τον WADA είναι:

- Κατάλογος Απαγορευμένων, ο οποίος προσδιορίζει τις ουσίες και τις μεθόδους που απαγορεύονται εντός και εκτός αγώνων.
- Διεθνές Πρότυπο Ελέγχου και Ερευνών (International Standard for Testing and Investigations), που περιγράφει, μεταξύ άλλων, τον σχεδιασμό και την εκτέλεση των ελέγχων ντόπινγκ σε αθλητές.
- Διεθνές Πρότυπο για τα Εργαστήρια (International Standard for Laboratories, ISL) το οποίο εξασφαλίζει την αξιοπιστία, τη διαπίστευση και τη λειτουργική ομοιομορφία των εργαστηρίων.
- Διεθνές Πρότυπο για τις Εξαιρέσεις Χρήσης για Θεραπευτικούς Σκοπούς (International Standard for Therapeutic Use Exemptions, ISTUE), έχει σκοπό την ισότιμη και εναρμονισμένη διαχείριση των εξαιρέσεων για φαρμακευτική χρήση.

(WADA 2021a)

Είναι φανερό πως το Παγκόσμιο Πρόγραμμα Αντιντόπινγκ είναι ένας ολοκληρωμένος μηχανισμός συντονισμού, ελέγχου και επιστημονικής επιτήρησης.

1.4 ΤΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΝΤΟΠΙΝΓΚ

Τα διαπιστευμένα από τη WADA Εργαστήρια Ελέγχου Ντόπινγκ αποτελούν θεμέλιο λίθο του παγκόσμιου συστήματος αντιντόπινγκ, λειτουργώντας ως τεχνικοί κόμβοι που διασφαλίζουν την αξιοπιστία και την επιστημονική εγκυρότητα των ελέγχων. Η δραστηριότητα και λειτουργία τους διέπεται από το ISL), το οποίο ορίζει αυστηρές απαιτήσεις όσον αφορά την ποιότητα των αναλύσεων, τη διαχείριση δειγμάτων, τη χρήση επικυρωμένων μεθόδων, την τυποποίηση των διαδικασιών και τη συμμόρφωση με τα Τεχνικά Έγγραφα (Technical Documents, TD) και τις Τεχνικές Επιστολές (Technical Letters, TL) της WADA. (WADA 2021b, §1)

Η διαπίστευση των εργαστηρίων είναι μια σύνθετη διαδικασία πολλαπλών σταδίων και απαιτεί την πλήρη συμμόρφωση του εργαστηρίου με το ISO/IEC 17025, επαρκείς και καλά συντηρημένες υποδομές, εξειδικευμένο προσωπικό και ενεργή συνεργασία με εθνικούς φορείς που δραστηριοποιούνται στο αντιντόπινγκ. (WADA 2021b, §4) Ο Εθνικός Οργανισμός Αντιντόπινγκ (National Anti – Doping Organization – NADO) στην Ελλάδα (είναι η Εθνικός Οργανισμός Καταπολέμησης Ντόπινγκ (EOKAN) (*Hellenic Anti-Doping Organization (EOKAN), n.d.*)

Για τα εργαστήρια που επιθυμούν να συμμετάσχουν στο Βιολογικό Διαβατήριο Αθλητή (Athlete Biological Passport, ABP) απαιτείται πρόσθετη και ειδική έγκριση από τον WADA.

Ένα εργαστήριο το οποίο είναι διαπιστευμένο από τον WADA υποχρεούται να εφαρμόζει αυστηρά πρωτόκολλα χειρισμού και ανάλυσης δειγμάτων, όπως αυτά ορίζονται στα άρθρα του ISL. Η ακεραιότητα των δειγμάτων από την παραλαβή έως και την εξέτασή τους, η εφαρμογή τυποποιημένων διαδικασιών (Standard Operation Procedures, SOPs), η χρήση επικυρωμένων μεθόδων καθώς και η διασφάλιση ποιότητας των αποτελεσμάτων είναι βασικές λειτουργικές απαιτήσεις για κάθε διαπιστευμένο εργαστήριο, όπως αυτές περιγράφονται στο ISL και στα αντίστοιχα Τεχνικά Έγγραφα και Τεχνικές Επιστολές της WADA. (WADA 2021b, §5)

Η ποιότητα του εργαστηρίου αξιολογείται συνεχώς από τη WADA μέσω Σχημάτων Εξωτερικού Ελέγχου Ποιότητας (External Quality Assurance Scheme, EQAS), τα οποία περιλαμβάνουν τύπους δοκιμών όπως blinded και double – blinded δείγματα. Η απόδοση του εργαστηρίου στις δοκιμές αυτές αποτελεί βασικό κριτήριο για τη συνεχή αξιοπιστία και τη συμμόρφωση του εργαστηρίου. (WADA 2021b, §6-7.1)

Επιπρόσθετα, τα εργαστήρια οφείλουν να λειτουργούν σύμφωνα με τον Κώδικα Δεοντολογίας της WADA (Annex A), ο οποίος προβλέπει αρχές όπως η αμεροληψία, η ανεξαρτησία και η αποφυγή σύγκρουσης συμφερόντων. Σε περιπτώσεις απόκλισης από τα προβλεπόμενα πρότυπα ή επαναλαμβανόμενης μη συμμόρφωσης, προβλέπεται η δυνατότητα εφαρμογής κυρώσεων από τη WADA, περιλαμβανομένων μέτρων όπως η προειδοποίηση, η αναστολή ή ανάκληση διαπίστευσης.

Επομένως, τα εργαστήρια που λειτουργούν με τις οδηγίες του ISL της WADA δεν είναι απλώς αναλυτικά κέντρα, αλλά πυλώνες αξιοπιστίας στο σύστημα του αντιντόπινγκ, το οποίο στοχεύει στην προστασία του «καθαρού» αθλητισμού.

1.5 Η ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ ΣΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΝΤΟΠΙΝΓΚ

Το Διεθνές Πρότυπο Ελέγχου και Ερευνών της WADA ρυθμίζει τη δειγματοληψία στον έλεγχο Ντόπινγκ, ορίζοντας λεπτομερώς τις αρχές, τα στάδια και τους εμπλεκόμενους ρόλους, έχοντας σκοπό να διασφαλίζεται η αξιοπιστία, η αμεροληψία και η νομική εγκυρότητα κάθε ελέγχου. Οι έλεγχοι πραγματοποιούνται εντός ή εκτός αγώνων, ακολουθώντας κοινές, αυστηρά τυποποιημένες διαδικασίες, ανεξαρτήτως του τύπου και του χρόνου διεξαγωγής τους. (WADA 2023, §1)

Η επιλογή των αθλητών προς έλεγχο ντόπινγκ μπορεί να είναι τυχαία, στοχευμένη ή σταθμισμένη σε συγκεκριμένες αθλητικές διοργανώσεις. Η διαδικασία ελέγχου περιλαμβάνει την επιλογή του αθλητή, την ανακοίνωση επιλογής του αθλητή, τη δειγματοληψία, τη μεταφορά των δειγμάτων σε διαπιστευμένο από τον WADA εργαστήριο και την εργαστηριακή ανάλυση. (WADA 2023, §4.5)

Οι συνηθισμένες επιλογές δειγμάτων είναι τα ούρα και το αίμα και σπανιότερα σάλιο ή τρίχες. Για την ανίχνευση ενός μεγάλου αριθμού απαγορευμένων ουσιών επιλέγεται το δείγμα ούρων, λόγω της ευκολίας στη λήψη του, το ότι δεν αποτελεί παρεμβατική μέθοδο για το σώμα του εξεταζόμενου ατόμου και παρέχει σχετικά μεγάλο λαμβανόμενο όγκο δείγματος. Η συλλογή δείγματος ούρων πραγματοποιείται υπό άμεση επίβλεψη, με χρήση τυποποιημένου εξοπλισμού. (WADA 2023, §7)

Η αιμοληψία γενικά εκτελείται από εξειδικευμένο προσωπικό. Ύστερα από την διαδικασία αιμοληψίας, το δείγμα συλλέγεται σε κατάλληλα σωληνάρια, υπό ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας και χρόνου. Η επιλογή του τύπου σωληναρίου εξαρτάται από την απαιτούμενη ανάλυση, με χρήση EDTA, gel ή άλλων αντιπηκτικών μέσων. (WADA 2023, §ANNEX J)

Τα τελευταία χρόνια έχουν κάνει την εμφάνιση τους και άλλα εναλλακτικά βιολογικά υποστρώματα, όπως οι αποξηραμένες κηλίδες αίματος (Dried Blood Spots, DBS).

Η αλληλουχία επίβλεψης (chain of custody) είναι θεμέλιο για την εγκυρότητα του ελέγχου. Αποτελείται από τις δράσεις: ταυτοποίηση, σφράγιση, επιτήρηση και ασφαλή αποστολή των δειγμάτων, με πλήρη τεκμηρίωση όλων των βημάτων και των προσώπων που τα χειρίστηκαν. Οποιαδήποτε παραβίαση της αλληλουχίας μπορεί να οδηγήσει σε νομικά προβλήματα ή ακύρωση των αποτελεσμάτων. (WADA 2023, §7.2, 8.3)

Η διαδικασία αυτή εντάσσεται και στο πλαίσιο του Athlete Biological Passport (ABP), όπου η χρονική σταθερότητα και η τυποποίηση της δειγματοληψίας είναι κρίσιμες για την αξιολόγηση βιολογικών παραμέτρων. Ταυτόχρονα το ISTI είναι αυτό που ρυθμίζει τις απαιτούμενες συνθήκες για την συλλογή πληροφοριών που είναι απαραίτητες για ερευνητικούς σκοπούς ή πιθανά παραπτώματα, χωρίς να θίγεται η ιδιωτικότητα του αθλητή. (WADA 2023, §ANNEX I)

Συνολικά, η εφαρμογή του ISTI διασφαλίζει τη διαφάνεια, τη νομική αξιοπιστία και την ισοτιμία στους ελέγχους ντόπινγκ. Η τυποποιημένη διαδικασία της δειγματοληψίας, η αλληλουχία φύλαξης και η τεχνική κατάρτιση του προσωπικού είναι κρίσιμες παράμετροι για την προστασία του «καθαρού» αθλητισμού και την εγκυρότητα των αποτελεσμάτων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΝΤΟΠΙΝΓΚ

2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το Εργαστήριο Ελέγχου Ντόπινγκ του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», διαθέτει διαπίστευση από τον Εθνικό Οργανισμό Διαπίστευσης (ΕΣΥΔ) σύμφωνα με το πρότυπο ΕΛΟΤ EN ISO/IEC 17025 (πιστοποιητικό αριθμός 1-7, σε ισχύ από τον Αύγουστο 2000) για χημικές δοκιμές σε ανθρώπινα και ζωικά δείγματα (ΕΣΥΔ 2022). Επιπλέον, λειτουργεί υπό τις απαιτήσεις του Διεθνούς Προτύπου Εργαστηρίων (International Standard for Laboratories, ISL) του WADA,. Τα δείγματα που λαμβάνονται για έλεγχο doping ακολουθούν δύο φάσεις ανάλυσης: αρχικά με προσανατολιστικές διαδικασίες (Screening Procedures) για τον εντοπισμό ενδείξεων πιθανών απαγορευμένων ουσιών, και στη συνέχεια, σε περίπτωση ευρήματος, με επιβεβαιωτικές διαδικασίες (Confirmation Procedures) για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση. Οι αναλυτικές τεχνικές, όπως για παράδειγμα υγρή ή αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών, επιλέγονται βάσει της κατηγορίας των απαγορευμένων ουσιών (οι οποίες συνήθως έχουν ομοιότητες στην δομή), της συγκέντρωσης στο δείγμα, του τύπου δείγματος (ούρα ή αίμα), της πηγής προέλευσης του δείγματος (άνθρωπος ή ίππος) και του πλήθους των πιθανών μεταβολιτών της απαγορευμένης ουσίας που απεκκρίνονται.

Η αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία είναι η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης συνδυασμένη με Υψηλής Ανάλυσης Δίδυμη Φασματομετρία Μάζας με Αναλυτή Orbitrap (HPLC-HR-MS/MS Orbitrap), της σειράς Q – Exactive της Thermo Scientific. Επιπλέον, στις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν στην απαγορευμένη κατηγορία ουσιών S7: Ναρκωτικά – Narcotics, χρησιμοποιήθηκε On-line στερεά φάση εκχύλισης (On-line Solid Phase Extraction, SPE), η οποία ενσωματώθηκε απευθείας στον αναλυτικό σωλήνα του HPLC-MS/MS συστήματος μέσω Vanquish platform. Αυτό το αυτοματοποιημένο σύστημα χρησιμοποιεί ειδικά σχεδιασμένες φύσιγγες On-line SPE για καθαρισμό και προκαταρκτική συγκέντρωση των δειγμάτων πριν την υγρή χρωματογραφία, βελτιστοποιώντας έτσι την ευαισθησία και την επαναληψιμότητα της ανάλυσης. Οι βασικές αρχές τόσο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης όσο και της φασματομετρίας μαζών παρουσιάζονται παρακάτω, καθώς και περιγραφές για τον αναλυτή μαζών Orbitrap και την καινοτόμο επεξεργασία δειγμάτων με On-line SPE.

2.2 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

2.2.1 Αρχή τεχνικής υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης.

Υγρή Χρωματογραφία (LC) είναι ο γενικός όρος για όλες τις τεχνικές χρωματογραφίας, οι οποίες χρησιμοποιούν υγρή κινητή φάση. Η στατική φάση αποτελείται είτε από ένα στερεό πορώδες υλικό είτε υγρό που συγκρατείται μηχανικά πάνω σε στερεό, αδρανές υπόστρωμα. Ο διαχωρισμός των συστατικών βασίζεται στην κατανομή των διαχωριζομένων ουσιών μεταξύ κινητής και στατικής φάσης. Το δείγμα εισάγεται στη κορυφή της στήλης και με τη βοήθεια της στατικής και της κινητής φάσης, τα συστατικά του μετακινούνται με τη μορφή ζωνών και τελικά εκκλύονται το ένα μετά το άλλο. Οι αναλυόμενες ουσίες κατανέμονται μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης, με αποτέλεσμα να μετακινούνται με διαφορετικές ταχύτητες κατά μήκος της στήλης.

Η σημαντικότερη εξέλιξη στην κλασσική υγρή χρωματογραφία είναι η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC). Σε αυτή, η κινητή φάση προωθείται μέσω του συστήματος με αντλίες υψηλής πίεσης, λόγω της χρήσης στατικής φάσης με πολύ μικρά σωματίδια που δημιουργούν υψηλή αντίσταση στη ροή. Αυτό επιτρέπει ταχύτερη και πιο αποτελεσματική διαχωριστική ικανότητα. Το δείγμα εγχέεται στην κινητή φάση και προωθείται υπό πίεση στην στήλη, όπου λαμβάνουν χώρα αλληλεπιδράσεις με τη στατική φάση. Ο διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος μεταξύ των δύο φάσεων βασίζεται σε διαφορές στις φυσικές (π.χ. μέγεθος, σχήμα, φορτίο) και στις χημικές ιδιότητες (π.χ. πολικότητα, ιοντισμός), οι οποίες καθορίζουν τον βαθμό συγγένειας κάθε ενώσεως με την κινητή ή τη στατική φάση. Όσο ασθενέστερη είναι η αλληλεπίδραση με τη στατική φάση, τόσο νωρίτερα εκκλύεται το συστατικό.

Σήμερα, η HPLC αποτελεί βασικό εργαλείο στην ενόργανη χημική ανάλυση και εφαρμόζεται ευρέως στην ποιοτική και ποσοτική ανάλυση φαρμάκων, βιταμινών, ορμονών, πεπτιδίων, πρωτεϊνών και άλλων μη πτητικών ή θερμικά ευαίσθητων ενώσεων.

2.2.2 Κατηγοριοποίηση Υγρής Χρωματογραφίας

Οι κυριότεροι μηχανισμοί διαχωρισμού στην υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) περιλαμβάνουν τις παρακάτω κατηγορίες. Κάθε είδος βασίζεται σε διαφορετική αρχή λειτουργίας και έχει άμεση σχέση με την χρωματογραφική στήλη που χρησιμοποιείται.

1. Χρωματογραφία προσρόφησης (Adsorption Chromatography)

Ο διαχωρισμός των συστατικών στην μέθοδο αυτή βασίζεται στη διαφορετική ικανότητα τους να προσροφώνται στη στατική φάση. Οι αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα μεταξύ της στατικής φάσης της στήλης και της αναλυόμενης ουσίας είναι κυρίως ασθενείς διαμοριακές δυνάμεις, όπως δυνάμεις Van der Waals, αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου και δεσμοί υδρογόνου. Η σειρά με την οποία εκλούνται τα συστατικά εξαρτάται από τη συγγένεια τους προς τη στατική φάση και τη διαλυτότητα τους στην κινητή φάση. Συνήθως, οι πολικές ενώσεις εκλούνται πιο αργά από τις μη πολικές, καθώς ως στατική φάση χρησιμοποιούνται συνήθως πολικά προσροφητικά υλικά, όπως το οξείδιο του αργιλίου (alumina) ή η πηκτή διοξειδίου του πυριτίου (silica gel).
2. Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (Size Exclusion Chromatography)

Αποτελεί τεχνική διαχωρισμού με βάση το μέγεθος και εν μέρει το σχήμα των μορίων. Εφαρμόζεται κυρίως στην ανάλυση και τον χαρακτηρισμό πολυμερών και βιομακρομορίων, όπως οι πρωτεΐνες, με μοριακή μάζα άνω των 10.000 Da. Τα μεγάλα μόρια δεν έχουν την δυνατότητα να διεισδύσουν στους πόρους της στατικής φάσης και εκλούνται πρώτα, ενώ τα μικρότερα εισέρχονται στους πόρους, καθυστερώντας την έξοδο τους από τη στήλη.
3. Χρωματογραφία ιοντανταλλαγής (Ion Exchange Chromatography)

Χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό ιοντικών ενώσεων και βασίζεται στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ιόντων του δείγματος και των φορτισμένων ομάδων της στατικής φάσης. Η επιλογή κατάλληλης ρητίνης (κατιοντοανταλλακτική ή ανιοντοανταλλακτική) εξαρτάται από το φορτίο των αναλυομένων ουσιών.
4. Χρωματογραφία συγγένειας (Affinity Chromatography)

Πρόκειται για μια εξαιρετικά εκλεκτική μέθοδο διαχωρισμού, η οποία βασίζεται στην ειδική και αναστρέψιμη δέσμευση της αναλυόμενης ουσίας με έναν βιολογικό υποδοχέα ή συγγενές μόριο, το οποίο είναι προσδεμένο στη στατική φάση. Η τεχνική χρωματογραφίας χημικής συγγένειας χρησιμοποιείται ευρέως στον καθαρισμό πρωτεϊνών και στον διαχωρισμό εναντιομερών.

5. Χρωματογραφία κατανομής (Partition Chromatography)

Η τεχνική αυτή βασίζεται στη διαφορετική κατανομή των συστατικών ενός μείγματος μεταξύ δύο υγρών φάσεων: της κινητής και της στατικής. Η στατική φάση αποτελείται από ένα αδρανές στερεό υπόστρωμα, στην επιφάνεια του οποίου έχει ακινητοποιηθεί λεπτό υγρό φιλμ. Η συγκεκριμένη μέθοδος εφαρμόζεται κυρίως στον διαχωρισμό μη ιοντικών, πολικών ενώσεων.

Στην παρούσα εργασία εφαρμόστηκε η χρωματογραφία κατανομής με στήλη αντίστροφης φάσης (Reversed Phase Partition Chromatography). Εν αντιθέσει με την κλασική μορφή της τεχνικής, όπου η στατική φάση είναι πολική και η κινητή φάση μη πολική, στην αντίστροφη φάση η στατική φάση είναι μη πολική (συνήθως πυρίτιο τροποποιημένο με αλκυλοαλυσίδες όπως C18), ενώ η κινητή φάση στην περίπτωση αυτή είναι πολική (μείγματα νερού με οργανικούς διαλύτες όπως μεθανόλη ή ακετονιτρίλιο). Ο διαχωρισμός βασίζεται στη διαφορετική συγγένεια των συστατικών του δείγματος προς τις δύο φάσεις, με τις πολικές ενώσεις να εκκλούνται πρώτες και τις μη πολικές τελευταίες λόγω ισχυρότερων υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων με τη στατική φάση της στήλης.

2.2.3 Οργανολογία υγρής χρωματογραφίας

Κύρια Τμήματα Συστήματος Υγρής Χρωματογραφίας

Ένα σύστημα υγρής χρωματογραφίας (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) αποτελείται από έξι βασικά τμήματα, καθένα από τα οποία διαδραματίζει ένα κρίσιμο ρόλο στην ομαλή λειτουργία και αποτελεσματικότητα της ανάλυσης:

1. Κινητή φάση (Mobile phase)

Αφορά το υγρό που μεταφέρει τα δείγματα μέσω του συστήματος. Επιλέγεται με βάση τη φύση και τα χαρακτηριστικά των προς ανάλυση ενώσεων και τη χρωματογραφική στήλη που χρησιμοποιείται.

2. Αντλία (Pump)

Η αντλία είναι υπεύθυνη για την προώθηση της κινητής φάσης με σταθερή και ελεγχόμενη ροή, ακόμα και υπό υψηλή πίεση, μέσω της χρωματογραφικής στήλης.

3. Σύστημα εισαγωγής δείγματος (Injector)

Το σύστημα αυτό επιτρέπει την ακριβή και επαναλήψιμη εισαγωγή του δείγματος στο ρεύμα της κινητής φάσης, χωρίς να διαταράσσεται η ροή.

4. Αναλυτική στήλη (Analytical column)

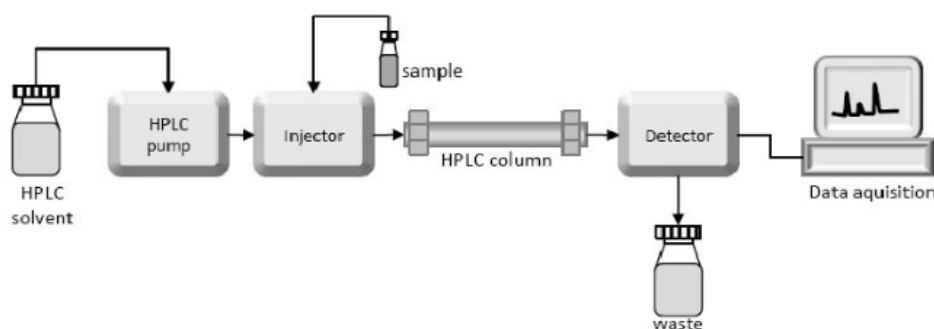
Η στήλη περιέχει τη στατική φάση και αποτελεί την « καρδιά » του συστήματος, καθώς σε αυτήν λαμβάνει χώρα ο διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος.

5. Ανιχνευτής (Detector)

Ο ανιχνευτής παρακολουθεί και καταγράφει τα συστατικά του δείγματος καθώς εξέρχονται από τη στήλη, παρέχοντας σήματα που αντιστοιχούν στην κάθε ένωση.

6. Καταγραφικό (Data system/ Recorder)

Το σύστημα αυτό λαμβάνει το σήμα του ανιχνευτή και το μετατρέπει σε ψηφιακό σήμα – χρωματογράφημα, επιτρέποντας την ποσοτική και ποιοτική ανάλυση των συστατικών του δείγματος.



Εικόνα 1: Σχηματικό διάγραμμα της οργάνωσης ενός συστήματος HPLC. (1) Δοχεία διαλυτών, (2) Αντλία (Pump), (3) Σύστημα εισαγωγής δείγματος (Injector), (4) Αναλυτική στήλη (Analytical column), (5) Ανιχνευτής (Detector), (6) Σύστημα καταγραφής δεδομένων (Data system/Recorder).

2.2.3.1 Κινητή φάση

Η κινητή φάση είναι ένα διάλυμα, του οποίου η σύσταση εξαρτάται από το είδος της χρωματογραφίας που εφαρμόζεται. Παραδείγματος χάριν στη χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής χρησιμοποιείται ένα υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα, ενώ στη χρωματογραφία κατανομής χρησιμοποιούνται μη πολικοί διαλύτες όπως το εξάνιο, και στην χρωματογραφία αντίστροφης φάσης μείγματα νερού με οργανικούς διαλύτες, όπως μεθανόλη ή ακετονιτρίλιο.

Η κινητή φάση μπορεί να είναι είτε σταθερής συγκέντρωσης καθ' όλη τη διάρκεια του χρωματογραφήματος (ισοκρατική έκλουση), είτε να μεταβάλλεται σταδιακά κατά τη διάρκεια της ανάλυσης (βαθμωτή έκλουση). Στη δεύτερη περίπτωση, η κινητή φάση αρχίζει με χαμηλή εκλεκτικότητα και αυξάνει προοδευτικά την ικανότητα της να εκλύει τα συστατικά του δείγματος, επιταχύνοντας τον διαχωρισμό και μειώνοντας

τον συνολικό χρόνο της ανάλυσης. Η ισοκρατική έκλυση βρίσκει εφαρμογή κυρίως σε περιπτώσεις όπου οι ενώσεις που πρέπει να διαχωριστούν έχουν παρόμοιες ιδιότητες, ενώ η βαθμιδωτή έκλυση προτιμάται όταν οι προς ανάλυση ενώσεις παρουσιάζουν διακριτές διαφορές στην κατακράτηση τους από τη στήλη.

Όσο αναφορά την επιλογή της κατάλληλης κινητής φάσης, εξαρτάται από το είδος της χρωματογραφίας, τις ιδιότητες των αναλυτών και τη φύση της στατικής φάσης. Σκοπός είναι να επιτυγχάνεται βέλτιστος διαχωρισμός σε εύλογο χρονικό διάστημα, χωρίς παρεμβολές στο σήμα.

Ένα από τα συχνότερα προβλήματα που μπορεί να προκύψουν κατά την προετοιμασία και χρήση της κινητής φάσης στη χρωματογραφία είναι ο σχηματισμός φυσαλίδων αέρα εντός αυτής. Οι φυσαλίδες, εάν δεν απομακρυνθούν, ενδέχεται να παρεμβληθούν στην αντλία προκαλώντας διακυμάνσεις πίεσης, να οδηγήσουν σε απώλεια ροής ή ακόμη και σε δημιουργία θορύβου στον ανιχνευτή, με αποτέλεσμα τη μείωση της ευαισθησίας και της ακρίβειας της ανάλυσης. Για το λόγο αυτό, η απαέρωση της κινητής φάσης θεωρείται ουσιώδης διαδικασία. Σε παλαιότερα συστήματα, η απαέρωση γινόταν χειροκίνητα μέσω διήθησης με αδρανή αέρια (N_2 ή He) ή με υπερηχητική επεξεργασία (λουτρό υπερήχων), που διασφαλίζουν την απομάκρυνση των διαλυμένων αερίων. Σήμερα, τα περισσότερα σύγχρονα συστήματα HPLC και Υγρή Χρωματογραφία Υπερυψηλής Απόδοσης (Ultra-High-Performance Liquid Chromatography, UHPLC) ενσωματώνουν αυτόματα συστήματα on-line απαέρωσης, τα οποία χρησιμοποιούν πολλαπλά κανάλια διήθησης και χημικά αδρανή υλικά, ελαχιστοποιώντας την παρουσία διαλυμένων αερίων χωρίς την ανάγκη εξωτερικής παρέμβασης. Τα συστήματα αυτά είναι σχεδιασμένα για συνεχή, σταθερή ροή χωρίς παλμούς ή φυσαλίδες, ακόμη και σε πολύωρες ή υψηλής ευαισθησίας αναλύσεις. Η αυτοματοποίηση της απαέρωσης συμβάλλει στη συνολική αξιοπιστία του συστήματος, περιορίζοντας τον χρόνο προετοιμασίας και μειώνει τον ανθρώπινο παράγοντα στην καθημερινή εργαστηριακή πρακτική (*Thermo Fisher Scientific, n.d.*).

2.2.3.2 Αντλία

Η αντλία είναι ένα βασικό εξάρτημα στο σύστημα της υγρής χρωματογραφίας, καθώς εξασφαλίζει τη συνεχή και σταθερή ροή της κινητής φάσης μέσα από τη στήλη και τα υπόλοιπα μέρη του συστήματος. Η ροή αυτή επιτυγχάνεται μέσω παλινδρομικής κίνησης ενός ή δύο εμβόλων, τα οποία μπορεί να είναι τοποθετημένα σε σειρά ή παράλληλα, ανάλογα με τον τύπο της αντλίας.

Η παλινδρομική λειτουργία προκαλεί συχνά μικρές διακυμάνσεις στη ροή, οι οποίες μπορούν να επηρεάσουν την ακρίβεια του διαχωρισμού και τη σταθερότητα του σήματος. Για να αποφευχθούν αυτές οι διαταραχές χρησιμοποιείται καταστολέας παλμών, ο οποίος εξομαλύνει τη ροή πριν η κινητή φάση φτάσει τελικά στη στήλη.

Η ρύθμιση της ροής και η παρακολούθηση της πίεσης πραγματοποιούνται μέσω συστήματος ελέγχου, είτε μέσω ενσωματωμένου πίνακα είτε αυτόματα μέσω ειδικού λογισμικού. Η αναπτυσσόμενη πίεση στο σύστημα εξαρτάται από έναν αριθμό παραγόντων, όπως τον τύπο της στήλης, τις φυσικοχημικές ιδιότητες της κινητής φάσης, την τιμή της ροής, τον τύπο του ανιχνευτή και την ύπαρξη πρόσθετων εξαρτημάτων. Η πίεση αποτελεί αξιόπιστο δείκτη της κατάστασης του συστήματος της υγρής χρωματογραφίας, καθώς απότομη αύξησή της ενδέχεται να υποδηλώνει απόφραξη, εισροή φυσαλίδων ή σφάλμα στην προετοιμασία της κινητής φάσης.

Πριν από την εκκίνηση της εκάστοτε ανάλυσης, είναι σημαντικό να διασφαλίζεται ότι δεν υπάρχουν φυσαλίδες αέρα στο σύστημα, διότι αυτές διαταράσσουν τη ροή και την ευστάθεια του συστήματος. Η διαδικασία prime/purge εφαρμόζεται με στόχο να απομακρύνεται ο αέρας και να αποκαθίσταται η πλήρης υδραυλική συνέχεια του συστήματος.

Στα σύγχρονα HPLC/ UHPLC συστήματα, πέρα από την κύρια αντλία, ενσωματώνονται προηγμένες αυτοματοποιήσεις που εξασφαλίζουν αξιοπιστία και σταθερότητα στην καθημερινή λειτουργία. Επίσης διαθέτουν απομακρυσμένο έλεγχο και παρακολούθηση μέσω λογισμικού που επιτρέπει απομακρυσμένο χειρισμό, παρακολούθηση και καταγραφή, συμβάλλοντας στην πρόληψη αστοχιών και στην αυξημένη ακρίβεια των αναλύσεων (*Thermo Fisher Scientific, n.d.*).

2.2.3.3 Σύστημα εισαγωγής δείγματος

Το σύστημα εισαγωγής δείγματος στην υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) αποτελεί κρίσιμο τμήμα της συνολικής λειτουργίας της συσκευής, καθώς διασφαλίζει την ορθή, επαναλήψιμη και ποσοτικά αξιόπιστη έγχυση του δείγματος στην κινητή φάση και κατ' επέκταση, στη χρωματογραφική στήλη. Το σύστημα αυτό βασίζεται σε μια ειδικά σχεδιασμένη περιστροφική βαλβίδα δύο θέσεων (Load και Inject), η οποία περιλαμβάνει έξι κύριες οπές (ports) και έναν βρόχο καθορισμένου όγκου (loop), όπου τοποθετείται προσωρινά το δείγμα πριν την ανάλυση.

Στην αρχική θέση Load, η κινητή φάση διοχετεύεται απευθείας προς τη στήλη χωρίς να διέρχεται από τον βρόχο, ενώ το δείγμα εγχέεται εξωτερικά και γεμίζει τον βρόχο μέσω συγκεκριμένων οπών εισόδου και εξόδου. Το πλεονάζον δείγμα απομακρύνεται στα απόβλητα, διασφαλίζοντας ότι ο βρόχος έχει πλήρως γεμίσει με ένα αντιπροσωπευτικό τμήμα του δείγματος. Μόλις ολοκληρωθεί η φόρτωση του δείγματος, η περιστροφή του μοχλού της βαλβίδας στη θέση Inject τροποποιεί εσωτερικά την σύνδεση μεταξύ των οπών, επιτρέποντας στην κινητή φάση να διαπεράσει τον βρόχο και να μεταφέρει το περιεχόμενο του απευθείας για ανάλυση στην χρωματογραφική στήλη.

Η συγκεκριμένη λειτουργία μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε χειροκίνητα, με χρήση ειδικής σύριγγας, είτε μέσω αυτοματοποιημένου συστήματος δειγματοληψίας (auto sampler), το οποίο προσφέρει ακρίβεια, ταχύτητα και υψηλό βαθμό επαναληψιμότητας, ιδίως σε περιβάλλοντα με μεγάλο αριθμό δειγμάτων μέσα στην ημέρα.

Καταληκτικά, το σύστημα εισαγωγής δείγματος στην HPLC είναι μια μηχανικά και λειτουργικά έξυπνη λύση, η οποία εξασφαλίζει την ομοιομορφία και την αναπαραγωγιμότητα της έγχυσης, παράγοντες θεμελιώδεις στην αξιοπιστία κάθε χρωματογραφικής ανάλυσης.

2.2.3.4 Χρωματογραφική στήλη

Η χρωματογραφική στήλη είναι η « καρδιά » του συστήματος υγρής χρωματογραφίας καθώς εκεί λαμβάνει χώρα ο διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος. Ο βαθμός της αποτελεσματικότητας και της εκλεκτικότητας του διαχωρισμού εξαρτώνται άμεσα από τις ιδιότητες τόσο της στατικής όσο και της κινητής φάσης. Στη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (Reverse Phase Liquid Chromatography – RPLC), η στατική φάση είναι υδρόφοβη, ενώ η κινητή φάση είναι πολική.

Μια από τις πιο διαδεδομένες μορφές στατικής φάσης αποτελείται από σωματίδια πυριτικής γέλης (silica gel), στα οποία έχουν προσδεθεί χημικά αλκυλοαλυσίδες 18 ανθράκων (C₁₈). Οι ομάδες αυτές προσδίδουν ισχυρά μη πολικό χαρακτήρα στη στατική φάση. Αντιθέτως, η κινητή φάση είναι πολική και συνηθώς αποτελείται από μείγματα οργανικών διαλυτών όπως μεθανόλη ή ακετονιτρίλιο σε συνδυασμό με απιοντισμένο νερό ή ρυθμιστικά διαλύματα.

Το υλικό πλήρωσης της στήλης παίζει κρίσιμο ρόλο. Στη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης κυριαρχούν οι στήλες με σφαιρικά μικροπορώδη σωματίδια διαμέτρου 3-5 μm . Αυτή η διαβάθμιση μεγέθους εξασφαλίζει ομοιογενή πλήρωση της στήλης και περιορίζει τον σχηματισμό κενών, τα οποία επηρεάζουν αρνητικά την ποιότητα του διαχωρισμού.

Συνήθως, για την προστασία και συντήρηση της στήλης μπορούν να χρησιμοποιηθούν προσθήκες, οι οποίες λειτουργούν προληπτικά φιλτράροντας προσμείξεις και παρατείνοντας την διάρκεια ζωής της κύριας στήλης.

Η χρωματογραφία αντίστροφης φάσης αποτελεί την ευρύτερα χρησιμοποιούμενη μέθοδο, ιδιαίτερα για τον διαχωρισμό μικρών οργανικών μορίων, λόγω της υψηλής εκλεκτικότητας, της ευκολίας προσαρμογής των συνθηκών και της συμβατότητας της με το πλήθος ανιχνευτών.

2.2.3.5 Ανιχνευτής

Ο ιδανικός ανιχνευτής σε ένα σύστημα υγρής χρωματογραφίας συνδυάζει υψηλή ευαισθησία, εξειδίκευση ως προς τις υπό μελέτη ενώσεις, χαμηλό ηλεκτρονικό και χημικό θόρυβο, σταθερή γραμμικότητα απόκρισης σε ευρύ φάσμα συγκεντρώσεων και αξιοπιστία στην καθημερινή χρήση. Επιπλέον, πρέπει να διακρίνεται για την ελάχιστη συμβολή του στη διεύρυνση των χρωματογραφικών κορυφών και τη δυνατότητα ταχείας και ακριβούς απόκρισης.

Οι κυριότεροι τύποι ανιχνευτών που χρησιμοποιούνται στην υγρή χρωματογραφία περιλαμβάνουν:

- Φασματομετρικούς ανιχνευτές υπεριώδους – ορατού (UV – Vis)
- Ανιχνευτές φθορισμού
- Ανιχνευτές δείκτη διάθλασης
- Ηλεκτροχημικούς ανιχνευτές
- Ανιχνευτές αγωγιμότητας
- Ανιχνευτές ραδιενέργειας
- Ανιχνευτές φασματομετρίας μαζών (MS ή MS/MS)

Στα σύγχρονα συστήματα ανιχνευτών, κυρίαρχη θέση κατέχουν οι ανιχνευτές φασματομετρίας μαζών με δυνατότητα δίδυμης ανάλυσης (MS/MS) για τον ακριβή

εντοπισμό και την ταυτοποίηση ουσιών, ακόμα και σε πολύ μικρές ποσότητες. Οι ανιχνευτές φασματομετρίας μαζών δίδυμης ανάλυσης (MS/MS) παρέχουν εξαιρετική ειδικότητα και ευαισθησία, δυνατότητα ανάλυσης πολύπλοκων μειγμάτων, ταυτόχρονη ποιοτική και ποσοτική αξιολόγηση των συστατικών, καθώς και ακρίβεια στη μαζική ταυτοποίηση, της τάξης του μέρους στο εκατομμύριο (ppm).

2.2.3.6 Καταγραφικό – Σύστημα λήψεως και επεξεργασίας δεδομένων

Το ηλεκτρονικό σήμα που παρέχει ο ανιχνευτής σχετίζεται άμεσα με τη συγκέντρωση του εκλούμενου συστατικού. Το σήμα αυτό καταγράφεται, επεξεργάζεται και μετατρέπεται σε χρωματογράφημα, το οποίο χρωματογράφημα παρουσιάζει την κατανομή των ενώσεων ως προς τον χρόνο έκλουσης. Μερικά από τα βασικά χαρακτηριστικά που πρέπει να παρουσιάζει ένα σύστημα καταγραφής και επεξεργασίας είναι ταχεία απόκριση, σταθερότητα σημάτων, ακρίβεια στην ολοκλήρωση των κορυφών και τη δυνατότητα διατήρησης και ανάλυσης των δεδομένων με αξιοπιστία.

Τα σύγχρονα συστήματα χρωματογραφίας είναι πλήρως αυτοματοποιημένα και συνδέονται με λογισμικά διαχείρισης δεδομένων που δίνουν την δυνατότητα για ηλεκτρονική καταγραφή και αρχειοθέτηση των αποτελεσμάτων, εφαρμογή στατιστικών εργαλείων για την αξιολόγηση της ακρίβειας και της επαναληψιμότητας. Επιπρόσθετα, προσφέρουν εξ' αποστάσεως έλεγχο του συστήματος και δημιουργία προγραμματιζόμενων μεθόδων για αυτοματοποιημένη εκτέλεση αναλύσεων.

Τέλος, υποστηρίζουν τη δυνατότητα παρακολούθησης της κατάστασης του οργάνου, παρέχουν δυνατότητα πρόγνωσης βλαβών και ρύθμισης παραμέτρων όπως η θερμοκρασία της στήλης, η πίεση που αναπτύσσει το σύστημα και η ταχύτητα της ροής. Συνολικά αυτά τα χαρακτηριστικά αυξάνουν τη σταθερότητα και την αναπαραγωγιμότητα των μετρήσεων και διευκολύνουν τον έλεγχο ποιότητας των αναλυτικών δεδομένων.

2.3 ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ

2.3.1 Εισαγωγή

Η Φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry, MS) αποτελεί μια προηγμένη και ευέλικτη αναλυτική τεχνική, με εφαρμογές που εκτείνονται από την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση οργανικών και ανόργανων ενώσεων έως την ανίχνευση ιχνών απαγορευμένων ουσιών σε βιολογικά δείγματα. Η βασική της αρχή στηρίζεται στον μετασχηματισμό των μορίων ενός δείγματος σε φορτισμένα σωματίδια – ιόντα, τον διαχωρισμό τους με βάση τον λόγο μάζας προς το φορτίο του σωματιδίου (m/z) και την καταγραφή της σχετικής αφθονίας τους μέσω κατάλληλου ανιχνευτή.

Γενικά, η διαδικασία περιλαμβάνει τα εξής βασικά στάδια:

- Εισαγωγή του δείγματος και ιοντισμός του με αποτέλεσμα τα ουδέτερα μόρια να μετατρέπονται σε ιόντα.
- Επιτάχυνση και εστίαση των ιόντων μέσω ηλεκτρικών ή μαγνητικών πεδίων σε μια λεπτή δέσμη με την βοήθεια κατάλληλων εξαρτημάτων στο εσωτερικό του αναλυτικού οργάνου.
- Διαχωρισμός των ιόντων με βάση το λόγο μάζας προς φορτίο (m/z) στον αναλυτή μάζας.
- Ανίχνευση και καταγραφή της έντασης του συστήματος για κάθε m/z , το οποίο αποτυπώνεται στο φάσμα μάζας (Mass Spectrum).

Το φάσμα μάζας για κάθε ουσία είναι μοναδικό, με χαρακτηριστική κατανομή κορυφών που αντανakλούν τα προϊόντα διάσπασης της ουσίας. Το μητρικό ιόν αντιστοιχεί στο μη θραυσματοποιημένο αρχικό μόριο, ενώ η κύρια κορυφή είναι αυτή με τη μεγαλύτερη σχετική ένταση (100%) στο φάσμα. Στις περισσότερες περιπτώσεις τα ιόντα φέρουν μοναδιαία φορτία ($z=1$), επομένως ο λόγος m/z ταυτίζεται με τη μάζα.

Η τεχνολογία φασματομετρίας μάζας έχει γνωρίσει ραγδαία εξέλιξη τις τελευταίες δεκαετίες, κυρίως λόγω της ανάπτυξης σύγχρονων υβριδικών οργάνων υψηλής ανάλυσης και ακρίβειας. Τα φασματόμετρα αυτά προσφέρουν δυνατότητες ταυτόχρονης ταυτοποίησης, ποσοτικοποίησης και επιβεβαίωσης των ουσιών, ακόμα και σε εξαιρετικά σύνθετες μήτρες, με ακρίβεια της τάξης των ppm.

Τα βασικά πλεονεκτήματα της τεχνικής περιλαμβάνουν:

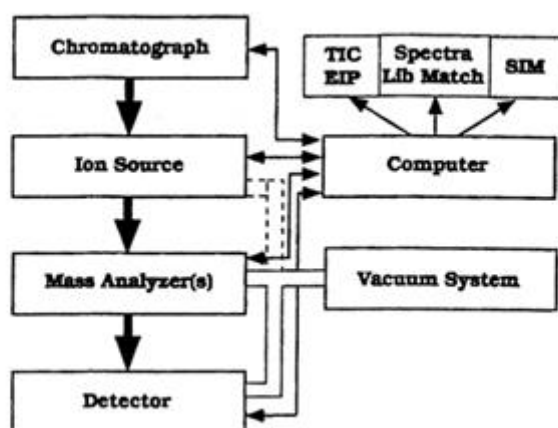
- Υψηλή ευαισθησία (ανίχνευση σε ιχνοποσότητες)

- Υψηλή εξειδίκευση (δυνατότητα διάκρισης μεταξύ παρόμοιων ενώσεων)
- Δυνατότητα ταυτόχρονης ποιοτικής και ποσοτικής ανάλυσης

2.3.2 Οργανολογία για την Φασματομετρία μάζας

Τα κυριότερα τμήματα ενός συστήματος φασματομετρίας μαζών, είναι:

- Σύστημα εισαγωγής δείγματος
- Πηγή ιοντισμού
- Σύστημα δημιουργίας κενού
- Αναλυτής μαζών
- Ανιχνευτής



Εικόνα 2: Σχηματικό διάγραμμα της οργανολογίας φασματομέτρου μαζών διασυνδεδεμένου με χρωματογραφία. Το σύστημα περιλαμβάνει: (1) Χρωματογράφο (Chromatograph), (2) Πηγή ιόντων (Ion Source), (3) Αναλυτή μαζών (Mass Analyzer), (4) Ανιχνευτή (Detector), (5) Σύστημα κενού (Vacuum System), και (6) Υπολογιστή για την απόκτηση και επεξεργασία δεδομένων (Data System/Computer)

Παραπάνω δόθηκε μια συνοπτική και περιεκτική περιγραφή της φασματομετρίας μάζας σε γενικό επίπεδο. Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε με το σύστημα Q Exactive Plus Orbitrap LC-MS/MS της Thermo Scientific, του οποίου η αρχή λειτουργίας καθώς και τα επιμέρους λειτουργικά του μέρη θα παρουσιαστούν αναλυτικά στη συνέχεια. Το σύστημα αυτό περιλαμβάνει ως βασικά εξαρτήματα την πηγή ιοντισμού τύπου Ηλεκτροψεκασμού (Electrospray Ionization, ESI) και τον αναλυόμενη ουσία μάζας τύπου Orbitrap υψηλής ανάλυσης, τα οποία συνεργάζονται

για την παραγωγή, διαχωρισμό και ανίχνευση ιόντων με υψηλή ακρίβεια και ευαισθησία.

2.3.3 Υψηλής Ανάλυσης Φασματομετρία Μάζας με Αναλυτή μαζών τύπου Orbitrap

2.3.3.1 Δίδυμη Φασματομετρία μάζας (Tandem Mass Spectrometry, MS/MS)

Η τεχνολογία της Φασματομετρίας μαζών εξελίχθηκε ραγδαία τα τελευταία χρόνια λόγω της ανάπτυξης προηγμένων συστημάτων, τα οποία συνδυάζουν περισσότερα του ενός στάδια φασματομετρικής ανάλυσης. Η πιο χαρακτηριστική περίπτωση αυτής της εξέλιξης είναι η δίδυμη φασματομετρία μάζας ή αλλιώς δίδυμη φασματομετρία μάζας (Tandem Mass Spectrometry, MS/MS).

Εν αντιθέσει με τη συμβατική Φασματομετρία μάζας (MS), όπου το φάσμα προκύπτει απευθείας από τον ιοντισμό και τον διαχωρισμό των μορίων, η Δίδυμη Φασματομετρία μάζας εισάγει ένα επιπλέον επίπεδο επιλεκτικότητας και πληροφορίας. Συγκεκριμένα, τα ιόντα – στόχοι ή αλλιώς πρόδρομα ιόντα επιλέγονται, υποβάλλονται σε θραυσματοποίηση σε ελεγχόμενες συνθήκες και τα προϊόντα διάσπασης τους, τα θυγατρικά ιόντα όπως ονομάζονται, αναλύονται ανεξάρτητα. Η προσέγγιση αυτή, επιτρέπει τη διερεύνηση της δομής και την ακριβή ταυτοποίηση ουσιών, ακόμη και σε εξαιρετικά πολύπλοκες μήτρες.

Η διαδικασία αποτελείται, γενικά, από τα εξής στάδια:

- Επιλογή συγκεκριμένου πρόδρομου ιόντος (Precursor ion) μέσω του αναλυτή.
- Θραυσματοποίηση του σε ειδικό θάλαμο (Collision Cell), μέσω συγκρούσεων με αδρανές αέριο (π.χ. N₂ ή He).
- Ανάλυση των παραγόμενων θραυσμάτων από δεύτερο αναλυτή.

Λαμβάνει χώρα διαχωρισμός των θραυσμάτων με βάση τον λόγο m/z και σχηματίζεται το φάσμα θυγατρικών ιόντων, το οποίο αποτελεί «αποτύπωμα» δομής της αρχικής ένωσης. Η θραυσματοποίηση των ιόντων μπορεί να διακριθεί σε:

- Θραυσματοποίηση εντός της πηγής (In Source Decay, ISD), η οποία συμβαίνει πριν την επιτάχυνση των ιόντων.
- Θραυσματοποίηση εκτός της πηγής (Post Source Decay, PSD), η οποία συμβαίνει εφόσον τα ιόντα έχουν απομακρυνθεί από την πηγή.

- Θραυσματοποίηση των μετασταθών ιόντων: το ιόν εγκαταλείπει την πηγή σε σταθερή κατάσταση, όμως με περίσσεια ενέργειας και για αυτό διασπάται καθ' οδόν προς τον ανιχνευτή.

Στα σύγχρονα συστήματα MS/MS, όπως το Q Exactive Plus της Thermo Scientific, η θραυσματοποίηση επιτυγχάνεται μέσω της τεχνικής HCD (Higher – Energy Collisional Dissociation), σε ένα ειδικό Collision Cell με άζωτο, ενώ η καταγραφή του φάσματος πραγματοποιείται με αναλυτή μαζών τύπου Orbitrap υψηλής ανάλυσης και ακρίβειας, όπως προαναφέρθηκε. Η ευελιξία της τεχνικής έγκειται στις πολλαπλές στρατηγικές σάρωσης και ανάλυσης, οι οποίες μπορούν να προσαρμοστούν ανάλογα με τις απαιτήσεις του εκάστοτε αναλυτικού στόχου. Οι κυριότερες είναι:

- Σάρωση Θυγατρικών ιόντων (Product Ion Scan): Επιλογή συγκεκριμένου πρόδρομου ιόντος στον πρώτο αναλυτή και υποβολή του σε θραυσματοποίηση. Το δεύτερο φάσμα θα περιλαμβάνει όλα τα θυγατρικά ιόντα του συγκεκριμένου πρόδρομου.
- Σάρωση Πρόδρομου ιόντος (Precursor Ion Scan): Ανιχνεύονται όλα τα ιόντα που παράγουν ένα συγκεκριμένο θυγατρικό ιόν. Εξαιρετικά χρήσιμο για τον εντοπισμό τάξεων ενώσεων με κοινά θραύσματα (π.χ. στεροειδή, αμφεταμίνες)
- Σάρωση Σταθερής Απώλειας (Neutral Loss Scan): Καταγραφή των πρόδρομων ιόντων που υφίστανται απώλεια συγκεκριμένης μάζας (π.χ. H_2O , NH_3), ιδιαίτερα χρήσιμο για την αναγνώριση λειτουργικών ομάδων.
- Single/ Multiple Reaction Monitoring (SRM/MRM): Τεχνική που παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία και επιλεκτικότητα για ποσοτικοποίηση γνωστών ενώσεων. Προεπιλέγεται ένα πρόδρομο ιόν (m/z_1) και ένα συγκεκριμένο θυγατρικό ιόν (m/z_2). Ο ανιχνευτής μετρά αποκλειστικά αυτή τη μετάβαση. Το όργανο Q Exactive Plus υποστηρίζει Parallel Reaction Monitoring (PRM) που αποτελεί μια προσέγγιση υψηλής ανάλυσης.
- Data Dependent Acquisition (DDA): Το όργανο εκτελεί Full Scan και επιλέγει αυτόματα ιόντα, τα οποία θα υποβληθούν σε MS/MS, βάσει της έντασης τους.
- Data Independent Acquisition (DIA): Όλο το φάσμα διαιρείται σε ευρείες περιοχές m/z και τα ιόντα εντός των περιοχών αυτών υφίστανται

θραυσματοποίηση. Προσφέρει μεγάλη ακρίβεια και πλήρη εικόνα του δείγματος.

Τα σύγχρονα φασματομέτρα μάζας ελέγχονται πλήρως μέσω υπολογιστικών συστημάτων, τα οποία επιτρέπουν την ακριβή ρύθμιση των παραμέτρων ιοντισμού, διαχωρισμού και ανίχνευσης, αλλά και την αυτόματη επεξεργασία και ερμηνεία των φασμάτων μάζας, με χρήση εξειδικευμένων αλγορίθμων και βιβλιοθηκών δεδομένων.

Το σύστημα Δίδυμης Φασματομετρίας Μάζας δεν αρκείται απλά στο να προσφέρει δομική πληροφόρηση αλλά μεταβάλλει ριζικά το επίπεδο εκλεκτικότητας, ευαισθησίας και διακριτικής ικανότητας για την φασματομετρική ανάλυση, καθιστώντας την αναπόσπαστο εργαλείο για τον προσδιορισμό και την επιβεβαίωση ενώσεων.

2.3.3.2 Σύστημα εισαγωγής δείγματος

Στα σύγχρονα φασματομέτρα μάζας, το σύστημα της εισαγωγής τους δείγματος είναι αναπόσπαστα συνδεδεμένο με την τεχνική που προηγείται του ιοντισμού, παραδείγματος χάριν την υγρή χρωματογραφία. Ο σκοπός είναι η σταθερή και αναπαραγώγιμη μεταφορά της αναλυόμενης ουσίας από το χρωματογραφικό σύστημα στον χώρο του ιοντισμού, υπό συνθήκες συνεχούς ροής και πλήρους αεριοποίησης.

Στα συστήματα LC-MS/MS, αρχικά λαμβάνει χώρα ο χρωματογραφικός διαχωρισμός του δείγματος και στη συνέχεια ο ιοντισμός των διαχωριζόμενων συστατικών στην πηγή ιοντισμού υπό πίεση περιβάλλοντος. Η μεταφορά αυτή, από το ένα όργανο στο άλλο πραγματοποιείται μέσω τριχοειδών σωληνώσεων (Capillaries) και συνήθως περιλαμβάνει νεφελοποίηση και εξάτμιση της κινητής φάσης, ώστε να παραχθούν σταγονίδια ή μόρια στην αέρια κατάσταση, τα οποία θα μπορούν να ιοντιστούν. Η διεργασία αυτή υποστηρίζεται με θέρμανση και ροή αδρανών αερίων, τα οποία διευκολύνουν την εξάτμιση και τη σταθερότητα του σήματος.

Η βαθμίδωση της πίεσης στους θαλάμους του οργάνου είναι κρίσιμη για τη σωστή λειτουργία του. Από την αρχική πίεση περίπου 1 atm στον χώρο εισαγωγής, η πίεση μειώνεται προοδευτικά μέσω συστημάτων differential pumping (10^{-2} έως 10^{-6} Torr), έως ότου φτάσει σε επίπεδα μικρότερα από 10^{-8} Torr στον αναλυτή μάζας, όπου εξασφαλίζεται η ελαχιστοποίηση συγκρούσεων των ιόντων με μόρια αέρα.

Αυτό το σύστημα μεταφοράς και απόσβεσης θορύβου επιτρέπει την αποτελεσματική και στοχευμένη μεταφορά των ιόντων στον αναλυτή, διατηρώντας την ευαισθησία και την ακρίβεια του φασματομέτρου σε υψηλά επίπεδα.

2.3.3.3 Πηγή Ιοντισμού – Ηλεκτροψεκασμός (Electrospray ionization, ESI)

Στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI). Πρόκειται για μια από τις πιο διαδεδομένες μορφές ήπιου ιοντισμού, δηλαδή δεν προκαλεί σημαντική θραυσματοποίηση του μορίου. Ο ηλεκτροψεκασμός είναι κατάλληλος για την ανάλυση ισχυρά πολικών, μη πτητικών και θερμικά ασταθών ενώσεων, μικρής και μεγάλης μοριακής μάζας.

Η τεχνική πραγματοποιείται σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης. Το υγρό δείγμα αντλείται μέσω μεταλλικής τριχοειδούς βελόνας, στην οποία εφαρμόζεται υψηλό ηλεκτρικό δυναμικό, οδηγώντας στο σχηματισμό φορτισμένων σταγονιδίων μέσω της δημιουργίας του λεγόμενου κώνου Taylor (Taylor cone). Καθώς οι σταγόνες κατευθύνονται προς την είσοδο του φασματομέτρου, ο διαλύτης εξατμίζεται με τη βοήθεια θερμαινόμενου αερίου (συνήθως αζώτου), αυξάνοντας την επιφανειακή πυκνότητα του φορτίου, όταν αυτή υπερβεί το όριο Rayleigh, τα ιόντα εκροφώνται στην αέρια φάση.

Ένα ιδιαίτερο πλεονέκτημα της τεχνικής είναι η δυνατότητα παραγωγής πολυσθενών ιόντων, έτσι μειώνονται σημαντικά οι τιμές m/z και επιτρέπεται η ανίχνευση τους ακόμη και με αναλυτές περιορισμένου φάσματος μαζών. Ο ηλεκτροψεκασμός είναι απόλυτα συμβατός με συστήματα υγρής χρωματογραφίας και υποστηρίζει τόσο θετικό όσο και αρνητικό ιοντισμό. Λόγω της ευελιξίας, της υψηλής ευαισθησίας και της δυνατότητας σύζευξης με τεχνικές διαχωρισμού, ο ηλεκτροψεκασμός αποτελεί τεχνική αναφοράς για φαρμακευτικές, τοξικολογικές και βιοαναλυτικές εφαρμογές.

2.3.3.4 Στο εσωτερικό του Q – Exactive Hybrid Quadrupole – Orbitrap

Τα υβριδικά φασματόμετρα μάζας τετραπόλου – Orbitrap επιτρέπουν τόσο στοχευμένο όσο και μη – στοχευμένο έλεγχο και χαρακτηρισμό. Λειτουργούν σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών δειγμάτων έτσι ώστε να είναι δυνατή η ανακάλυψη ενώσεων και στην συνέχεια η ποσοτικοποίηση τους χωρίς την συμβολή άλλων οργάνων και τεχνολογιών. Συνδυάζουν ταχύτητα σάρωσης, υψηλή διακριτική ικανότητα, ακρίβεια μάζας, ποιότητας φάσματος και ευαισθησίας.

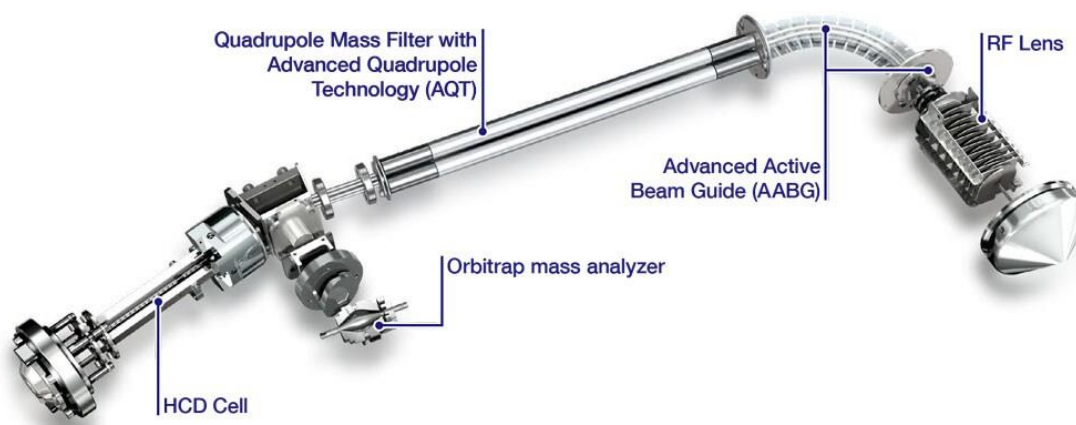
Το εσωτερικό του Q – Exactive Hybrid Quadrupole – Orbitrap αποτελείται από τις παρακάτω επιμέρους τεχνολογικές μονάδες:

- RF φακός: Ο φακός ραδιοσυχνότητας (Radiofrequency, RF) με στοιβαγμένους δακτυλίους καθοδηγεί τα ιόντα σε μια συμπαγή δέσμη μετά την έξοδό τους από την πηγή ιοντισμού, αυξάνοντας την ευαισθησία. Το

μεγάλο μεταβλητό διάκενο μεταξύ των ηλεκτροδίων επιτρέπει καλύτερη αποδοτικότητα άντλησης και βελτιωμένη ανθεκτικότητα. Ο κεκαμμένος επίπεδος πολυπολικός οδηγός (bent flatapole) μειώνει τον θόρυβο εμποδίζοντας ουδέτερα σωματίδια και συσσωματώματα υψηλής ταχύτητας να εισέλθουν στο τετράπολο.

- AABG: Ο Προηγμένος Ενεργός Οδηγός Δέσμης (Advanced Active Beam Guide, AABG) μειώνει τον θόρυβο και επιμηκύνει τα διαστήματα μεταξύ συντηρήσεων, επιτρέποντας έξυπνη διαχείριση της ιοντικής δέσμης για πηγές υψηλής ροής ιόντων.
- Φίλτρο μάζας τετραπόλου (Advanced Quadrupole Technology, AQT): Το φίλτρο μάζας βελτιώνει την επιλογή προδρόμων ιόντων και τη μεταφορά τους, προσφέροντας πιο ακριβή ποσοτικοποίηση αναλυομένων ουσιών χαμηλής αφθονίας σε σύνθετα δείγματα. Παρέχει επίσης δυνατότητα επιλογής μεταβλητού εύρους απομόνωσης ιόντων προδρόμων, από 0,4 Da έως το πλήρες εύρος μαζών.
- Αναλυτής μάζας Orbitrap: Ο αναλυτής μάζας Orbitrap προσφέρει εξαιρετική ανάλυση υψηλής διακριτικής ικανότητας και ακριβούς μάζας (High Resolution Accurate Mass, HRAM) των ιόντων ως συνάρτηση των συχνοτήτων περιστροφής τους. Τα δεδομένα αυτά μετατρέπονται σε φάσματα μάζας με χρήση ταχέων μετασχηματισμών Fourier (Fast Fourier Transform ,FFT).
- Κελί (Higher Energy Collisional Dissociation, HCD): Τα ιόντα διέρχονται από την παγίδα C γεμάτη με άζωτο σε αυτό το πολυπολικό κελί συγκρούσεων, όπου υφίστανται κατακερματισμό. Στη συνέχεια, η τάση HCD αυξάνεται και τα ιόντα μεταφέρονται ξανά στην παγίδα C, ώστε να εγχυθούν στον αναλυτή Orbitrap για ανίχνευση.

(Thermo Fisher Scientific, n.d.)



Εικόνα 3: Το εσωτερικό του Q-Exactive Hybrid Quadrupole-Orbitrap

2.4 ΑΝΑΛΥΤΗΣ ΜΑΖΩΝ ΤΥΠΟΥ ORBITRAP

2.4.1 Περιγραφή του αναλυτή μαζών τύπου Orbitrap.

Το Orbitrap είναι ένας σύγχρονος αναλυτής μαζών υψηλής ανάλυσης, του οποίου το χαρακτηριστικό είναι η παγίδευση ιόντων σε ηλεκτροστατικό πεδίο. Ανήκει στην κατηγορία αναλυτών Φασματομετρίας Μαζών Μετασχηματισμού Fourier (Fourier Transform Mass Spectrometry, FTMS) (Eliuk & Makarov 2015), (Zubarev & Makarov 2013). Η αρχή του ανάγεται στην ιδέα της τροχιακής παγίδευσης, η οποία παρουσιάστηκε πρώτη φορά το 1923, ενώ η σύγχρονη μορφή του Orbitrap σχεδιάστηκε και ολοκληρώθηκε στα τέλη της δεκαετίας του 1990 (FTMS) (Eliuk & Makarov 2015), (Zubarev & Makarov 2013). Ο αναλυτής μαζών Orbitrap αποτελείται από έναν κεντρικό άξονα σε σχήμα ατράκτου και δύο συμμετρικά εξωτερικά ηλεκτρόδια, τα οποία δημιουργούν ένα συγκεκριμένο ηλεκτροστατικό δυναμικό το οποίο δίνει την δυνατότητα για ταυτόχρονη κυκλική και αξονική κίνηση των ιόντων (Zubarev & Makarov 2013). Τα ιόντα εισέρχονται στην παγίδα μέσω μιας εγκοπής, ώστε να αποκτήσουν αρχική ταχύτητα κατάλληλη για να σχηματίσουν σταθερές τροχιές, ενώ κατά την έγχυση τους εφαρμόζεται αυξανόμενη τάση που συμπιέζει τις τροχιές και τις σταθεροποιεί (Eliuk & Makarov 2015), (Ruamaram 2021). Οι αξονικές ταλαντώσεις των ιόντων επάγουν εικόνα ρεύματος στα διαχωρισμένα εξωτερικά ηλεκτρόδια-ανιχνευτές. Το σήμα αυτό καταγράφεται στον χρόνο και μετατρέπεται σε φάσμα μάζας μέσω ταχέος μετασχηματισμού Fourier (FT) (Zubarev & Makarov 2013), (Ruamaram 2021).

Η τεχνολογία Orbitrap προσφέρει υψηλή διακριτική ικανότητα και ακρίβεια μάζας, ιδιότητες που επιτρέπουν το διαχωρισμό ισοβαρών ενώσεων και τον ακριβή προσδιορισμό της στοιχειομετρικής τους σύστασης (Ruamaram 2021). Ειδικά τα σύγχρονα συστήματα όπως είναι για παράδειγμα το Q – Exactive plus της Thermo Scientific, συνδυάζουν το Orbitrap με τετραπολικά φίλτρα για επιλογή ιόντων και υποστηρίζουν διάφορες λειτουργίες όπως είναι το Full Scan, SIM, PRM, DDA και DIA, καθιστώντας τα κατάλληλα για ποσοτικές και ποιοτικές αναλύσεις (Thermo Fisher Scientific, n.d.).

Το Orbitrap έχει πλέον καθιερωθεί ως τεχνολογία αναφοράς για ποιοτικές και ποσοτικές εφαρμογές υψηλών απαιτήσεων, όπως η τοξικολογική ανάλυση, ο έλεγχος ντόπινγκ και η φαρμακευτική ανάλυση. Ο συνδυασμός υψηλής διακριτικής ικανότητας, ακρίβειας, ευαισθησίας και επαναληψιμότητας, σε συνδυασμό με τις περιορισμένες απαιτήσεις συντήρησης συγκριτικά με άλλους αναλυτές, εξηγεί την επικράτησή του στην ανάλυση σύνθετων βιολογικών δειγμάτων.

2.5 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ ΣΕ ΑΠΕΥΘΕΙΑΣ ΣΥΝΔΕΣΗ (Online SPE)

2.5.1 Εκχύλιση Στερεάς Φάσης σε Απευθείας Σύνδεση (On-line SPE) στο Σύστημα LC – MS/MS.

Στις προηγούμενες ενότητες αυτού του κεφαλαίου πραγματοποιήθηκε μια εκτενής περιγραφή του συστήματος HPLC σε συνδυασμό με HRMS/MS με αναλυτή μαζών τύπου Orbitrap.

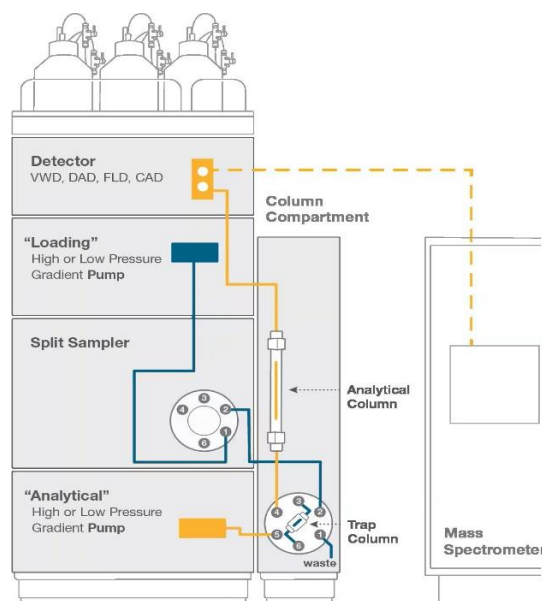
Η ανάπτυξη της μεθόδου βασίστηκε αρχικά σε παρασκευαστικά πρωτόκολλα ενζυμικής και μη ενζυμικής υδρόλυσης που πραγματοποιήθηκαν στο παρασκευαστήριο του εργαστηρίου, με στόχο τη βελτιστοποίηση της επεξεργασίας του δείγματος πριν την έγχυση του στο χρωματογραφικό σύστημα. Ωστόσο, σε επόμενο στάδιο, μελετήθηκε η εφαρμογή της μεθόδου στο αναλυτικό σύστημα χωρίς την κλασική παρασκευαστική διαδικασία, αλλά αξιοποιώντας την τεχνική εκχύλισης στερεάς φάσης σε απευθείας σύνδεση (On-line SPE), η οποία ενσωματώθηκε πλήρως στο σύστημα HPLC–HRMS/MS. Για τον λόγο αυτό παρακάτω παρουσιάζεται συνοπτικά η αρχή λειτουργίας και τα πλεονεκτήματα της τεχνικής On-line SPE.

2.5.2 Εκχύλιση Στερεάς Φάσης σε Απευθείας Σύνδεση (On-line SPE)

Η εκχύλιση στερεάς φάσης σε απευθείας σύνδεση (On-line SPE) αποτελεί μια αυτοματοποιημένη τεχνική καθαρισμού και προσυγκέντρωσης του δείγματος, η οποία

ενσωματώνεται άμεσα στο σύστημα HPLC ή UHPLC μέσω μιας βοηθητικής στήλης παγίδευσης (trap column) (Schuessel 2017). Στο πρώτο στάδιο, η παγίδευση της αναλυόμενης ουσίας επιτυγχάνεται με τη ροή του δείγματος μέσω της στήλης παγίδευσης, ενώ το ανεπιθύμητο υπόστρωμα απομακρύνεται. Στη συνέχεια, η βαλβίδα έξι θέσεων (six-port valve) ανακατευθύνει τη ροή, επιτρέποντας την έκλυση της εμπλουτισμένης αναλυόμενης ουσίας προς τη διαχωριστική στήλη για την κύρια ανάλυση (Ramirez et al. 2014). Το σύστημα Vanquish Online SPE λειτουργεί πλήρως αυτοματοποιημένα, ακολουθώντας προκαθορισμένα στάδια παγίδευσης και έκλυσης, χωρίς την ανάγκη off-line επεξεργασίας, διασφαλίζοντας επαναληψιμότητα και υψηλή αξιοπιστία ακόμα και σε πολύπλοκα δείγματα (Schuessel 2017).

Η ενσωμάτωση της τεχνολογίας On-line SPE στα αρθρωτά συστήματα Vanquish προσφέρει σημαντικά πλεονεκτήματα, τόσο σε επίπεδο ευελιξίας όσο και απόδοσης. Η διαδικασία καθαρισμού και προετοιμασίας του δείγματος πραγματοποιείται χωρίς επίβλεψη, ελαχιστοποιώντας το ανθρώπινο σφάλμα και εξοικονομώντας χρόνο και διαλύτες συγκριτικά με τις παραδοσιακές μεθόδους (Ramirez et al. 2014). Οι συνδέσεις της Viper Thermo Scientific εξασφαλίζουν μηδενικό σχεδόν νεκρό όγκο, ευκρινέστερες κορυφές και εύκολη εγκατάσταση (Schuessel 2017).. Επιπρόσθετα, η πλήρης ενσωμάτωση του συστήματος με το λογισμικό Chromeleon CDS επιτρέπει προηγμένες δυνατότητες αυτοματοποίησης και επεξεργασίας δεδομένων. Όλα τα παραπάνω καθιστούν την On-line SPE ιδανική επιλογή για εφαρμογές υψηλών απαιτήσεων, όπως η ανάλυση βιολογικών δειγμάτων που έχουν δεχτεί επεξεργασία και βρίσκονται στην υγρή μορφή και δειγμάτων που αποτελούνται από πολύπλοκες μήτρες (Ramirez et al. 2014).



Εικόνα 4: Αρχή λειτουργίας της εκχύλισης στερεάς φάσης σε απευθείας σύνδεση (On-line SPE) με χρήση βαλβίδας έξι θέσεων. Στο στάδιο φόρτωσης (Loading), η αναλυόμενη ουσία παγιδεύεται στη στήλη παγίδευσης (Trap Column), ενώ τα ανεπιθύμητα συστατικά απομακρύνονται προς τα απόβλητα. Στο στάδιο της έκλουσης (Elution), η εμπλουτισμένη αναλυόμενη ουσία κατευθύνεται προς την αναλυτική στήλη (Analytical Column) και στη συνέχεια στο φασματομέτρο μάζας.

2.5.3 Περιγραφή της λειτουργίας του συστήματος Εκχύλιση Στερεάς Φάσης σε Απευθείας Σύνθεση (On-line SPE).

Η λειτουργία του On-line SPE βασίζεται σε τέσσερα διαδοχικά βήματα, τα οποία επιτυγχάνονται μέσω της συνεργασίας δύο βαλβίδων έξι διαδρομών/οπών (A και B) που καθοδηγούν τη ροή του δείγματος, του διαλύτη έκπλυσης και των διαλυτών διαχωρισμού (Ramirez et al. 2014). (εικόνα ...)

Βήμα 1: Φόρτωση του δείγματος στην trap column.

Το δείγμα εισάγεται στο σύστημα μέσω της βαλβίδας A και καθοδηγείται από την αντλία SPE προς τη στήλη παγίδευσης, όπου αναλυόμενη ουσία παγιδεύεται και τα μη επιθυμητά συστατικά και ακαθαρσίες οδηγούνται προς τα απόβλητα μέσω της βαλβίδας B.

Βήμα 2: Καθαρισμός της στήλης παγίδευσης.

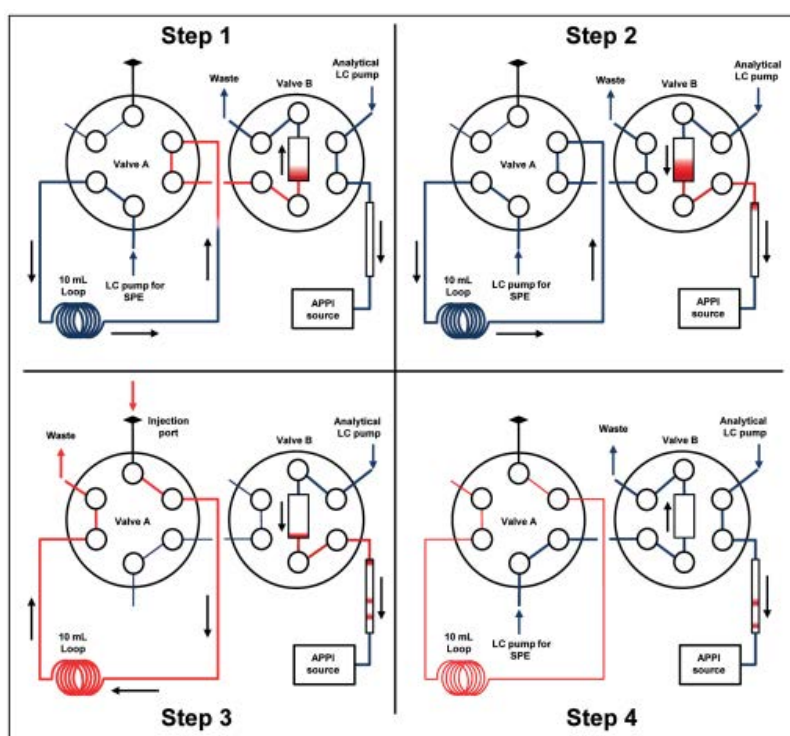
Διατηρώντας την ίδια κατεύθυνση ροής, ένα διάλυμα έκπλυσης περνά από τη trap column, απομακρύνοντας περαιτέρω ανεπιθύμητα συστατικά του υποβάθρου χωρίς να απομακρύνει την αναλυόμενη ουσία, η οποία παραμένει δεσμευμένη.

Βήμα 3: Έγχυση του δείγματος στον βρόχο.

Το σύστημα προετοιμάζεται για έκλουση. Η στήλη παγίδευσης παρακάμπτεται και η βαλβίδα A καθοδηγεί το διάλυμα έκλουσης να περάσει στον βρόχο έγχυσης, φορτίζοντας το σύστημα για το επόμενο βήμα.

Βήμα 4: Έκλουση προς την αναλυτική στήλη του συστήματος υγρής χρωματογραφίας.
(Ramirez et al. 2014)

Η ροή που προέρχεται από την αντλία της αναλυτικής υγρής χρωματογραφίας προωθεί το διάλυμα έκλουσης προς τη στήλη παγίδευσης, όπου βρίσκεται παγιδευμένη η αναλύομενη ουσία. Η αναλύομενη ουσία εκπλένεται και απομακρύνεται από τη στήλη παγίδευσης και οδηγείται προς τη διαχωριστική στήλη, όπου πραγματοποιείται ο χρωματογραφικός διαχωρισμός. Στην συνέχεια, τα προϊόντα που εξέρχονται από τη διαχωριστική στήλη, εισέρχονται στην πηγή ιοντισμού για την ανάλυση τους στο φασματομέτρο μάζας.



Εικόνα 5: Διαδοχικά στάδια λειτουργίας του συστήματος On-line SPE με χρήση δύο βαλβίδων έξι οπών (Valve A & Valve B). Τα στάδια περιλαμβάνουν: (1) Εισαγωγή δείγματος και παγίδευση του αναλύομενη ουσία στη στήλη παγίδευσης, (2) Καθαρισμός της στήλης παγίδευσης από ανεπιθύμητα συστατικά, (3) Προετοιμασία

για την έκλυση, και (4) Μεταφορά της εμπλουτισμένης αναλυόμενης ουσίας στην αναλυτική στήλη.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ

3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκαν δύο κατηγορίες του Καταλόγου Απαγορευμένων του WADA: τα Ναρκωτικά (S7), τα οποία απαγορεύονται μόνο εντός αγώνα και χαρακτηρίζονται ως ουσίες ειδικής αναφοράς, δηλαδή ουσίες οι οποίες πιαθνόν έχουν χρησιμοποιηθεί για σκοπούς πέραν της αύξησης της αθλητικής απόδοσης και τα Διουρητικά και Παράγοντες Απόκρυψης (S5), τα οποία είναι απαγορευμένα ανά πάσα στιγμή και, επίσης, χαρακτηρίζονται ως ουσίες ειδικής αναφοράς.

Τα ναρκωτικά χρησιμοποιούνται για την αναλγητική τους δράση, επιτρέποντας στον αθλητή να υπερβεί τα φυσιολογικά όρια αντοχής. Η χρήση τους απαγορεύεται στους αγώνες, καθώς μπορεί να αλλοιώσει άμεσα την απόδοση, .

Αντίθετα, τα Διουρητικά και οι Παράγοντες Απόκρυψης δεν έχουν άμεση επίδραση στην αθλητική απόδοση αλλά χρησιμοποιούνται για ταχεία απώλεια βάρους και απόκρυψη άλλων απαγορευμένων ουσιών. Είναι απαγορευμένα τόσο εντός όσο και εκτός αγώνα. (WADA 2025)

Επίσης κατά τη διάρκεια προκαταρκτικών δοκιμών online προκατεργασίας των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν ενώσεις της κατηγορίας εστ3 β αγωνιστές στην παρούσα εργασία παρουσιάζεται μόνο η μελέτη χρωματογραφικού διαχωρισμού ενώ η αντίστοιχες αναπτύξεις και επικυρώσεις θα αποτελέσουν μέρος μελλοντικής εργασίας. Για το λόγο αυτό δεν κρύφει και σκόπιμη η παράθεση περαιτέρω στοιχείων για τους B2- αγωνιστές.

3.2. NARKOTIKA, S7: NARCOTICS

3.2.1 Ορισμός και κλινική σημασία των ναρκωτικών.

Οι ναρκωτικές ουσίες αποτελούν ισχυρά αναλγητικά φάρμακα με πολυδιάστατη δράση. Η χρήση τους σχετίζεται κυρίως με την ανακούφιση του πόνου, ενώ παράλληλα έχουν υψηλό ποσοστό κατάχρησης τόσο στον αθλητισμό όσο και σε κοινωνικό επίπεδο. Ο όρος «ναρκωτικά» αναφέρεται σε χημικές ουσίες, οι οποίες προκαλούν νάρκωση και διαθέτουν ισχυρή αναλγητική δράση, εντάσσονται στα οπιοειδή αναλγητικά, με πιο χαρακτηριστικό εκπρόσωπο τη μορφίνη, η οποία απομονώθηκε το 1806 από το όπιο. Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει επίσης τη διαμορφίνη (ηρωίνη),

την κωδεΐνη και τη διυδροκωδεΐνη, καθεμία με ιδιαίτερο προφίλ, δραστηκότητας και απορρόφησης, από τον ανθρώπινο οργανισμό. (Mottram & Chester 2022, σ. 398-399) Επιπλέον, πέραν από την αναλγησία επηρεάζουν και άλλα πολλαπλά συστήματα. Πιο συγκεκριμένα, προκαλούν αναπνευστική καταστολή, εμετό, ευφορία και αλλοιώσεις στην αντίληψη. Η αναλγητική τους δράση συνδέεται όχι μόνο με τη φυσική μείωση του πόνου αλλά και με την τροποποίηση της ψυχολογικής εμπειρίας του πόνου. (Mottram & Chester 2022, σ. 400). Κλινικά, χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση μέτριου έως σοβαρού σπλαχνικού πόνου, όταν τα μη ναρκωτικά αναλγητικά δεν επαρκούν. Ωστόσο, οι παρενέργειες τους είναι σοβαρές, με χαρακτηριστικό, το έντονο σύνδρομο στέρησης. Για τους λόγους αυτούς, η κατοχή και χρήση των πιο ισχυρών ναρκωτικών ουσιών ελέγχεται νομοθετικά στις περισσότερες χώρες.

3.2.2. Κατάχρηση και απαγόρευση στον αθλητισμό.

Στον αθλητισμό, η χρήση ναρκωτικών συνδέεται στενά με την αντιμετώπιση του πόνου από τραυματισμούς. Ο πόνος, παρόλο που αποτελεί προστατευτικό μηχανισμό του οργανισμού και σημαντικό μέρος της ανάρρωσης, εμποδίζει την αθλητική δραστηριότητα με αποτέλεσμα οι αθλητές να επιθυμούν την καταστολή του ώστε να συνεχίσουν το πρόγραμμά τους, με πιθανό αποτέλεσμα την επιδείνωση του τραυματισμού. Η ανακούφιση από τον πόνο μπορεί να συνδυαστεί με αντιφλεγμονώδη φάρμακα, ενώ σε σοβαρές περιπτώσεις χρησιμοποιούνται ισχυρά ναρκωτικά αναλγητικά. (Mottram & Chester 2022, σ. 402-403)

Δεν υπάρχουν ειδικά δεδομένα ότι τα ναρκωτικά αυξάνουν την απόδοση ενός αθλητή, αλλά το λεγόμενο «masking effect» δίνει την δυνατότητα στους αθλητές να ξεπερνούν τους φυσικούς περιορισμούς, γεγονός που θέτει σε κίνδυνο την υγεία και αλλοιώνει το λεγόμενο «fair play». Ως απόρροια, ο WADA τα έχει εντάξει στην Κατηγορία Απαγορευμένων ουσιών S7 και τα απαγορεύει εντός αγώνα περιόδου.

Η ιστορία των ναρκωτικών στον αθλητισμό επίσης είναι μακρά. Τα ναρκωτικά περιλαμβάνονταν ήδη στον πρώτο Απαγορευμένο Κατάλογο της ΔΟΕ το 1967. Σήμερα, ο WADA έχει προσδιορίσει συγκεκριμένα όρια και κατατάσσει όλες τις ουσίες της κατηγορίας ως «Ουσίες Ειδικής Αναφοράς».

(Mottram & Chester 2022, σ. 403)

Η κατάχρηση μπορεί να είναι είτε σκόπιμη είτε ακούσια, υπάρχουν παραδείγματα όπως η ψυχαγωγική χρήση διαμορφίνης αλλά και θετικά δείγματα από κατανάλωση τροφών με σπόρους παπαρούνας, αντίστοιχα. Παρά τη γενικότερη ανησυχία, τα στατιστικά

στοιχεία δείχνουν ότι το πλήθος των Αντικανονικών Αναλυτικών Ευρημάτων (AAE) για ναρκωτικές ουσίες παραμένει σχετικά χαμηλό, με ορισμένες εξάρσεις σε αθλήματα όπως το ποδόσφαιρο και η πάλη (Mottram & Chester 2022, σ. 406). Παρά τον χαμηλό αριθμό AAE ετησίως, η φαρμακολογική τους ισχύς και η πιθανότητα εθισμού τα καθιστούν κρίσιμη κατηγορία στην πολιτική αντιντόπινγκ.

3.3 ΔΙΟΥΡΗΤΙΚΑ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΑΠΟΚΡΥΨΗΣ, S5: DIURETICS AND MASKING AGENTS

3.3.1 Ορισμός Διουρητικών και Παραγόντων Απόκρυψης.

Τα Διουρητικά αποτελούν άλλη μια κατηγορία φαρμάκων. Η δράση τους πραγματοποιείται στους νεφρούς αυξάνοντας τον ρυθμό παραγωγής των ούρων και, κατ' επέκταση, την αποβολή νερού και ηλεκτρολυτών από τον οργανισμό. Η δράση αυτή, τα καθιστά ιδιαίτερα χρήσιμα στην κλινική πρακτική, καθώς χρησιμοποιούνται στη θεραπεία καρδιαγγειακών διαταραχών, στην αντιμετώπιση οιδημάτων και σε καταστάσεις όπου απαιτείται η ρύθμιση του όγκου και της σύνθεσης των σωματικών υγρών (Mottram & Chester 2022, σ. 275-276). Ωστόσο, η ίδια φαρμακολογική δράση εξηγεί και τη θέση τους στον Κατάλογο Απαγορευμένων, καθώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη συγκαλύψη της χρήσης άλλων απαγορευμένων ουσιών, ελαττώνοντας σημαντικά την ανιχνευσιμότητα τους μέσω της αραίωσης των ούρων των αθλητών.

Στο ανθρώπινο σώμα, οι νεφροί είναι υπεύθυνοι για τη ρύθμιση του όγκου και της σύστασης των ηλεκτρολυτών, για την αποβολή προϊόντων μεταβολισμού και ξένων χημικών ουσιών από τον οργανισμό. Αν πραγματοποιηθεί λήψη διουρητικών από κάποιον αθλητή, αυτά παρεμβαίνουν στις παραπάνω λειτουργίες, ενισχύοντας την απέκκριση υγρών και αλάτων, γεγονός που μπορεί να έχει σημαντικές φυσιολογικές επιπτώσεις. (Mottram & Chester 2022, σ. 275-276)

Γίνεται κατανοητό ότι τα διουρητικά δεν σχετίζονται άμεσα με την αύξηση της αθλητικής απόδοσης, αλλά με έμμεσο αθέμιτο πλεονέκτημα: είτε μέσω της μείωσης βάρους είτε μέσω της απόκρυψης άλλων ουσιών. Αυτός ο διττός μηχανισμός είναι ο λόγος που τα καθιστά μια κρίσιμη κατηγορία απαγορευμένων ουσιών στην παρακολούθηση του Ντόπινγκ.

3.3.2 Χρήση και κατάχρηση στον αθλητισμό

Τα διουρητικά δεν έχουν άμεση εργογόνο δράση, παρόλα αυτά, η κατάχρησή τους είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη στον αθλητισμό, κυρίως για δύο βασικούς λόγους:

- Την ταχεία μείωση σωματικού βάρους σε αθλήματα με κατηγορίες σωματικού βάρους
- Την απόκρυψη άλλων απαγορευμένων ουσιών μέσω αραίωσης των ούρων ή μεταβολής της απέκκρισης και του pH των ούρων.

Στην ιατρική πράξη, τα διουρητικά χρησιμοποιούνται για την θεραπεία της υπέρτασης, της καρδιακής ανεπάρκειας και των νεφρικών παθήσεων.. Η χρήση διουρητικών παρατηρείται πιο συχνά σε αθλήματα όπου η επίτευξη συγκεκριμένου σωματικού βάρους αποτελεί καθοριστική προϋπόθεση συμμετοχής, όπως πάλι, τζούντο, πυγμαχία και άρση βαρών, με έρευνες να δείχνουν ότι σημαντικό ποσοστό αθλητών αυτών των κατηγοριών αλλά και αναβατών σε ιπποδρομίες καταφεύγουν σε διουρητικά για γρήγορη απώλεια κιλών. Παράλληλα, παρατηρείται χρήση τους και σε αθλήματα χωρίς τυπική κατηγοριοποίηση, όπως είναι το βόλεϊ και η ενόργανη γυμναστική, κυρίως για αισθητικούς λόγους. Οι παραπάνω πρακτικές ενέχουν σοβαρούς κινδύνους για την υγεία, όπως αφυδάτωση, ηλεκτρολυτικές διαταραχές, καρδιαγγειακή αστάθεια και εν τέλει μείωση της ίδιας της απόδοσης. (Mottram & Chester 2022, σ. 276-277)

Η δεύτερη σε σειρά σημαντική αφορμή χρήσης τους αφορά τον ρόλο τους ως Παράγοντες Απόκρυψης, καθώς μέσω αραίωσης ή μεταβολής του pH των ούρων έχουν την δυνατότητα να δυσχεράνουν την ανίχνευση άλλων απαγορευμένων ουσιών. Παράλληλα, εκτός από τα κλασικά διουρητικά, έχουν αναγνωριστεί και άλλοι μη διουρητικοί παράγοντες απόκρυψης, όπως είναι για παράδειγμα οι διαστολείς όγκου πλάσματος που καλύπτουν τεχνητές μεταβολές σε αιματολογικές τιμές. Στα γυμναστήρια και πιο συγκεκριμένα στο άθλημα της σωματικής διάπλασης (bodybuilding), τα διουρητικά χρησιμοποιούνται συχνά για να αντισταθμίσουν την κατακράτηση υγρών που προκαλούν τα αναβολικά στεροειδή και η αυξητική ορμόνη, επιτυγχάνοντας το χαρακτηριστικό «στεγνό» σώμα, με τη χρήση τους να συνυπάρχει σε ένα πλαίσιο έντονης φαρμακευτικής πρακτικής και συνεπακόλουθα αυξημένου κινδύνου σοβαρών ανεπιθύμητων ενεργειών. (Mottram & Chester 2022, σ. 279) Έχουν αναφερθεί, επίσης, πρακτικές υπερβολικής κατανάλωσης υγρών ως στρατηγική απόκρυψης, χωρίς ωστόσο να είναι αποδεδειγμένα τα αποτελέσματα. (Mottram & Chester 2022, σ. 281)

Τα στατιστικά δεδομένα των διαπιστευμένων από τον WADA Εργαστηρίων Ελέγχου Ντόпинγκ, καταδεικνύουν ότι τα διουρητικά και οι παράγοντες απόκρυψης ευθύνονται σταθερά για ένα σημαντικό ποσοστό ΑΑΕ, με πιο συχνά ανιχνεύσιμα τη φουροσεμίδη και την υδροχλωροθειαζίδη. Επιπλέον, το 2021 ο WADA εξέδωσε οδηγία σχετικά με την πιθανότητα επιμόλυνσης φαρμάκων και συμπληρωμάτων διατροφής με διουρητικές ουσίες, εισάγοντας σημαντικά κατώφλια διερεύνησης αλλά διατηρώντας την αρχή της αντικειμενικής ευθύνης του αθλητή.

3.4 ΣΧΕΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ

Η κατηγορία των Ναρκωτικών (S7) και η κατηγορία των Διουρητικών και Παραγόντων Απόκρυψης (S5) συνδέονται έμμεσα, καθώς τα διουρητικά και οι παράγοντες απόκρυψης χρησιμοποιούνται συχνά για να καλύψουν ή να αλλοιώσουν την ανίχνευση ουσιών όπως τα ναρκωτικά ή άλλων απαγορευμένων κατηγοριών. Ωστόσο, υπάρχει σαφής διαφορά ως προς τον χρονικό περιορισμό: τα ναρκωτικά όπως αναφέρθηκε, είναι απαγορευμένα μόνο εντός αγώνα, λόγω της αναλγητικής τους δράσης, η οποία έχει την δυνατότητα να προσφέρει άδικο πλεονέκτημα σε κρίσιμες συνθήκες, ενώ τα διουρητικά είναι απαγορευμένα εντός και εκτός αγώνα, καθώς η χρήση τους ως παράγοντες απόκρυψης μπορεί να αλλοιώσει την ανίχνευση άλλων απαγορευμένων ουσιών σε όλη τη διάρκεια της προετοιμασίας και των αγώνων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗΣ – ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

4.1 ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η επικύρωση αναλυτικών μεθόδων αποτελεί μια κρίσιμη διαδικασία για την αξιοπιστία και την αποδοχή των αποτελεσμάτων ενός εργαστηρίου. Σύμφωνα με το πρότυπο ISO/IEC 17025:2017 (, το οποίο ορίζει τις γενικές απαιτήσεις σχετικά με τις εργαστηριακές δοκιμές και διακριβώσεις, κάθε διαπιστευμένο εργαστήριο οφείλει να εφαρμόζει και να τεκμηριώνει την εγκυρότητα των μεθόδων του (ISO/IEC 17025:2017).

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται σε διαπιστευμένα εργαστήρια διακρίνονται στις εξής:

- Πρότυπες μέθοδοι (Standard Methods), όπως αυτές δημοσιεύονται σε διεθνή, περιφερειακά ή εθνικά πρότυπα.
- Αποδεκτές μέθοδοι (Accepted Methods), οι οποίες δημοσιεύονται από αναγνωρισμένους τεχνικούς οργανισμούς, διεθνείς οδηγίες, ή περιλαμβάνονται σε peer-reviewed επιστημονικά περιοδικά (EMA 2022).
- Εσωτερικές μέθοδοι (In-House Methods), οι οποίες αναπτύσσονται και επικυρώνονται από το ίδιο το εργαστήριο.
- Τροποποιημένες ή ενισχυμένες μέθοδοι, όπου απαιτείται επιβεβαίωση (Verification) ή νέα επικύρωση (Validation) για τη συγκεκριμένη χρήση.

Η επικύρωση ορίζεται ως η τεκμηριωμένη διαδικασία συστηματικής αξιολόγησης, η οποία αποδεικνύει ότι μια μέθοδος ανάλυσης είναι επιστημονικά ορθή και αποδίδει τα αναμενόμενα αποτελέσματα κάτω από τις συγκεκριμένες συνθήκες εφαρμογής της. Η διαδικασία περιλαμβάνει:

- Καθορισμό απαιτήσεων και κριτηρίων αποδοχής.
- Προσδιορισμό των αναλυτικών χαρακτηριστικών της μεθόδου.
- Έλεγχο ότι τα χαρακτηριστικά πληρούν τα απαιτούμενα κριτήρια.
- Έκδοση δήλωσης καταλληλότητας.

Σύμφωνα με τις τρέχουσες διεθνείς κατευθυντήριες οδηγίες, η επικύρωση πρέπει να περιλαμβάνει, ανάλογα με το είδος της μεθόδου, τις εξής παραμέτρους:

- Ειδικότητα (Specificity/Selectivity)
- Γραμμικότητα (Linearity) και Εύρος (Range)
- Ακρίβεια (Accuracy)

- Πιστότητα (Precision)
- Όρια ανίχνευσης (LOD: Limit Of Detection) και όριο ποσοτικοποίησης (LOQ: Limit Of Quantification)
- Ανθεκτικότητα (Robustness)
- Επιδράσεις του Υποστρώματος (Matrix Effect)
- Σταθερότητα (Stability)

(ISO/IEC 17025:2017)

Η έκταση της επικύρωσης πρέπει να είναι ανάλογη με το σκοπό της μεθόδου και τα αποτελέσματα τεκμηριώνονται πλήρως και αρχειοθετούνται, μαζί με το πρωτόκολλο επικύρωσης και τη σχετική αναφορά

4.2 ΔΙΑΣΦΑΛΙΣΗ ΤΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.

Η διασφάλιση ποιότητας είναι καθοριστικός παράγοντας για την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων στον έλεγχο Ντόπινγκ. Με γνώμονα το ISO/IEC 17025:2017 και το WADA ISL, τα διαπιστευμένα Εργαστήρια Ελέγχου Ντόπινγκ οφείλουν να εφαρμόζουν συνδυασμό εσωτερικών και εξωτερικών διαδικασιών ελέγχου ποιότητας. Στις αναλύσεις με υγρή χρωματογραφία και δίδυμη φασματομετρία μάζας όπου το πλήθος πιθανών σφαλμάτων είναι υψηλό, τα βασικά μέτρα διασφάλισης περιλαμβάνουν τα εξής:

- Δείγματα ελέγχου (QC samples): Θετικά και αρνητικά δείγματα, σε κάθε σειρά (batch), τοποθετημένα σε συγκεκριμένα σημεία στην ακολουθία αναπαραγωγής (sequence) ώστε να εντοπίζεται μεταφορά (carryover) ή πιθανές επιμολύνσεις.
- Εσωτερικά πρότυπα (ISTDs): Ισοτοπικά επισημασμένα πρότυπα προστίθενται σε κάθε δείγμα, εξασφαλίζοντας διορθώσεις στις επιδράσεις του υποστρώματος και σταθερότητα αναλύσεων.
- Reference spectra/ CRMs: τα ύποπτα δείγματα συγκρίνονται με πιστοποιημένα υλικά αναφοράς ή με βιβλιοθήκες φασμάτων, διασφαλίζοντας την ταυτοποίηση.
- Δείγματα Α και Β: η ανεξάρτητη ανάλυση του δείγματος Β είναι αναγκαία για την επιβεβαίωση.
- Quality Control Charts & Trend Analysis: Είναι απαραίτητα για στατιστική παρακολούθηση της μεθόδου και διερεύνηση αποκλίσεων.

- **Τυφλά δείγματα & Proficiency Testing:** Μέσω αυτών, αξιολογείται η συνολική διαδικασία με την βοήθεια τυφλών δειγμάτων αξιολόγησης ποιότητας (blind QCs) και υποχρεωτικής συμμετοχής σε EQAS του WADA.

(EMA 2022), (ISO/IEC 17025:2017), (WADA 2023)

Όσο αναφορά τον εξοπλισμό, εφαρμόζονται καθημερινοί έλεγχοι καταλληλότητας (System Suitability Tests), ενώ η διακρίβωση και συντήρηση γίνεται με βάση εκτίμηση κινδύνου (Risk Assessment). Επιπρόσθετα, η χρήση ηλεκτρονικών συστημάτων διαχείρισης δεδομένων διασφαλίζουν εγκυρότητα και την ανιχνευσιμότητα όλων των ενεργειών που πραγματοποιούνται προκειμένου να διασφαλιστεί η ποιότητα των αποτελεσμάτων (FDA 2018).

Στο σύνολο τους, η ποιότητα των αποτελεσμάτων στον έλεγχο ντόπινγκ εξασφαλίζεται μέσω ολοκληρωμένου πλαισίου που συνδυάζει διαφόρων ειδών εσωτερικούς ελέγχους, επομένως τα αποτελέσματα έχουν πλήρη επιστημονική και νομική ισχύ.

4.3 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΠΑΓΟΡΕΥΜΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ.

Η διαδικασία ελέγχου ντόπινγκ βασίζεται σε δύο βασικά διακριτά στάδια: Την σάρωση (Screening) και την επιβεβαίωση (Confirmation). Στο πρώτο στάδιο πραγματοποιείται η εφαρμογή ευαίσθητων μεθόδων, κυρίως LC-MS/MS υψηλής απόδοσης με στόχο τον εντοπισμό πιθανών ύποπτων δειγμάτων. Προχωρώντας στο δεύτερο στάδιο, τα ύποπτα δείγματα υποβάλλονται σε εξειδικευμένες επιβεβαιωτικές αναλύσεις, ώστε να εξασφαλιστεί η ταυτοποίηση με την απαραίτητη επιστημονική και νομική βεβαιότητα. Η αξιολόγηση της διαδικασίας προσδιορισμού στηρίζεται σε συγκεκριμένα κριτήρια ποιότητας, όπως:

- Χρωματογραφικά χαρακτηριστικά:
 - Λόγος σήματος προς θόρυβο (Signal-to-Noise ratio, S/N)
 - Χρόνος κατακράτησης (Retention Time, RT)
 - Σχετικός χρόνος κατακράτησης (Relative Retention Time, RRT)
- Ειδικότητα (Specificity/ Selectivity): Η ικανότητα της μεθόδου να αναγνωρίζει με ακρίβεια την αναλυόμενη ουσία, χωρίς να επηρεάζεται από παρόμοιες ενώσεις ή από συστατικά που βρίσκονται στο υπόστρωμα του δείγματος.
- Ελάχιστο Απαιτούμενο Όριο Απόδοσης (Minimum Required Performance Level, MRPL): Για την εναρμόνιση του τρόπου έκδοσης αποτελεσμάτων από

τα Εργαστήρια Ελέγχου Ντόпинγκ, ο WADA έχει καθορίσει MRPL για κάθε κατηγορία απαγορευμένων ουσιών. Αυτά τα επίπεδα είναι υποχρεωτικά για όλα τα εργαστήρια, δεν αποτελούν όρια ανίχνευσης ή ποσοτικοποίησης, αλλά αναλυτικές προδιαγραφές τεχνικής απόδοσης των εργαστηρίων κατά την πραγματοποίηση ελέγχων ρουτίνας.

- Ανθεκτικότητα (Robustness): Η μέθοδος να παραμένει αξιόπιστη όταν γίνονται μικρές, ελεγχόμενες αλλαγές στις συνθήκες, όπως για παράδειγμα μικρή απόκλιση στη θερμοκρασία στήλης, αλλαγές στο pH ή στην παρτίδα χημικών αντιδραστηρίων. Σκοπός είναι η μέθοδος να μην καταρρέει από μικρές αποκλίσεις.
- Φαινόμενο μεταφοράς (Carry Over): Το φαινόμενο κατά το οποίο υπολείμματα ουσίας από προηγούμενο δείγμα μεταφέρονται στο επόμενο, δημιουργώντας ψευδή θετικά ή παραμορφωμένα σήματα. Ελέγχεται κυρίως με την ανάλυση blank δειγμάτων μετά από δείγμα υψηλής συγκέντρωσης.
- Παρεμβολές από τη μήτρα του δείγματος (Matrix Effect): Ορίζεται η επίδραση που έχει το βιολογικό υπόστρωμα (ούρα, πλάσμα) στην ένταση σήματος του δείγματος.
- Διαγνωστικά Ιόντα (Diagnostic Ions/ MRM Transitions): Η ταυτοποίηση με τη φασματομετρία μαζών τύπου LC-MS/MS βασίζεται στην παρακολούθηση τουλάχιστον δύο χαρακτηριστικών θραυσμάτων που προέρχονται από το μητρικό ιόν (Multiple Reaction Monitoring, MRM). Τα θραύσματα αυτά αποτελούν διαγνωστικά ιόντα, τα οποία εξασφαλίζουν την επιλεκτικότητα και την αξιοπιστία της μεθόδου. Για να θεωρηθεί έγκυρη η ταυτοποίηση, απαιτείται:
 - Ο λόγος έντασης μεταξύ των παρακολουθούμενων θραυσμάτων να βρίσκεται εντός $\pm 20\text{--}30\%$ της τιμής που προκύπτει από το υλικό αναφοράς.
 - Ο χρόνος κατακράτησης της ουσίας στο δείγμα να συμφωνεί με εκείνον του υλικού αναφοράς, με μέγιστη απόκλιση $\pm 1\%$.

Σε αντίθεση με παλαιότερες πρακτικές, όπου αρκούσε η ανίχνευση τριών ιόντων με ένταση μεγαλύτερη του 5%, τα σύγχρονα κριτήρια είναι αυστηρότερα και ποσοτικοποιημένα, διασφαλίζοντας την ακρίβεια, την εγκυρότητα και τη νομική ισχύ των αποτελεσμάτων.

Η επιβεβαίωση της ταυτότητας μιας ουσίας πραγματοποιείται μέσω συνδυασμού αλληλοσυμπληρούμενων διαδικασιών, όπως:

- Σύγκριση φασμάτων του ύποπτου δείγματος με φάσματα αναφοράς προερχόμενα από πιστοποιημένα υλικά.
- Ανεξάρτητη ανάλυση των δειγμάτων Α και Β, με σκοπό την πλήρη επιβεβαίωση του αποτελέσματος σε δύο διακριτές διαδικασίες.
- Εφαρμογή των κριτηρίων απόδοσης που θέτει ο WADA, όπως τα MRPLs, οι κανόνες για τα διαγνωστικά ιόντα και οι αποδεκτές αποκλίσεις στον χρόνο κατακράτησης (RT tolerance).

(ISO/IEC 17025:2017), (WADA 2023)

Συνολικά, η διαδικασία αξιολόγησης βασίζεται πλέον σε ένα πλαίσιο επικύρωσης προσαρμοσμένο στον σκοπό της μεθόδου, το οποίο συνδυάζει τις γενικές αρχές του ISO/IEC 17025:2017, τα διεθνή πρότυπα για την επικύρωση βιοαναλυτικών μεθόδων από οργανισμούς όπως International Council for Harmonisation (ICH) ,European Medicines Agency (EMA) και US Food and Drug Administration (FDA) και τις εξειδικευμένες απαιτήσεις του WADA ISL (2021). Με αυτόν τον τρόπο διασφαλίζεται ότι κάθε ανάλυση πληροί ταυτόχρονα επιστημονικά και νομικά κριτήρια αξιοπιστίας.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΚΟΠΟΣ

Η παρούσα εργασία επικεντρώνεται στην ανάπτυξη, τη βελτιστοποίηση και την επικύρωση αναλυτικών μεθόδων με στόχο την επιβεβαίωση (Confirmation Procedure – CP) της παρουσίας απαγορευμένων ουσιών σε δείγματα ούρων αθλητών. Η διαδικασία αυτή ενεργοποιείται στο Εργαστήριο Ελέγχου Ντόпинγκ μετά την αρχική ανάλυση σάρωσης των δειγμάτων (Screening Procedure) και την εύρεση της παρουσίας απαγορευμένων ουσιών Ντόпинγκ σε ορισμένα δείγματα. Η μελέτη εστιάστηκε στις κατηγορίες S7 Ναρκωτικά και S5 Διουρητικά και Παράγοντες απόκρυψης των ουσιών που περιλαμβάνονται στον Κατάλογο Απαγορευμένων του WADA.

Στόχος ήταν η ανάπτυξη πολυπαραμετρικών επιβεβαιωτικών μεθόδων, που να περιλαμβάνουν το μέγιστο αριθμό ουσιών κάθε κατηγορίας, με τον ελάχιστο δυνατό αριθμό αναλύσεων. Η ανάπτυξη της μεθόδου συμπεριέλαβε στην ανάπτυξη παρασκευαστικών διαδικασιών για την αποτελεσματική παραλαβή των ουσιών αυτών αλλά και γνωστών μεταβολιτών και παραγώγων των ουσιών αυτών, όπως τα γλυκουρονίδια. Με γνώμονα αυτό, μελετήθηκαν παρασκευαστικές διαδικασίες τόσο σε υδρολυμένα όσο και σε μη υδρολυμένα δείγματα και συγκρίθηκαν μεταξύ τους.

Επιπλέον μελετήθηκε η χρωματογραφική βελτιστοποίηση, ώστε να επιτευχθεί αποτελεσματικός διαχωρισμός των ναρκωτικών και διουρητικών και παραγόντων απόκρυψης. Πιο συγκεκριμένα στην χρωματογραφία εφαρμόστηκαν τροποποιήσεις στην ροή, στους χρόνους έκλουσης και στην αναλογία της οργανικής φάσης, με στόχο τη βέλτιστη διαχωριστική ικανότητα, ειδικά για ισοβαρείς ενώσεις με παρόμοια φασματομετρικά χαρακτηριστικά. Το χρωματογραφικό σύστημα έπρεπε να προσφέρει σαφή διαχωρισμό των ουσιών, χωρίς επικαλύψεις, για να υποστηρίξει αξιόπιστα το φάσμα φασματομετρίας μαζών που ακολουθεί.

Στη συνέχεια, η φασματομετρία μαζών χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση των ουσιών με βάση τα χαρακτηριστικά ιόντα και μοναδικά θραύσματα επιβεβαίωσης. Για κάθε ένωση εφαρμόστηκαν διαφορετικές τιμές ενέργειας κρούσης (collision energy), ώστε να καθοριστεί η βέλτιστη ένταση και ειδικότητα των ιόντων θραυσμάτων. Η επιλογή μοναδικών θραυσμάτων για κάθε μητρική ουσία αποσκοπούσε στη διασφάλιση της ταυτοποίησης, ακόμη και σε δείγματα με σύνθετο υπόβαθρο, όπως τα ούρα. Η επεξεργασία των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με κατάλληλα λογισμικά προγράμματα που παρείχε το όργανο ανάλυσης και ήταν άμεσα συνδεδεμένα με αυτό,

έτσι ώστε τα αποτελέσματα να είναι ακριβή, αντιπροσωπευτικά και να ανταποκρίνονται στις απαιτήσεις του WADA για ευαισθησία, ειδικότητα και αναπαραγωγιμότητα.

Τέλος πραγματοποιήθηκε, όπου ήταν δυνατό, επικύρωση των μεθόδων με βάση τις οδηγίες του WADA.

Η ολοκλήρωση της ανάπτυξης για την αναλυτική μέθοδο αυτή, στοχεύει στην ενίσχυση της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων που θα παρέχει το Εργαστήριο Ελέγχου Ντόпинγκ του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» σε επιβεβαιωτικές αναλύσεις για Ναρκωτικά, Διουρητικά και Παράγοντες Απόκρυψης, ύστερα από τις αναλύσεις σάρωσης στους ελέγχους ντόпинγκ. Με την επιτυχή ανάπτυξη, βελτιστοποίηση και επικύρωση της συγκεκριμένης προσέγγισης, προσφέρεται ένα εργαλείο υψηλής ακρίβειας για την ανίχνευση ουσιών που παραμένουν δύσκολα ανιχνεύσιμες λόγω ταχείας απέκκρισης ή μεταβολισμού. Η εφαρμογή αυτής της μεθόδου ενισχύει τις δυνατότητες του εργαστηρίου να εντοπίζει την παραβίαση των κανόνων αντιντόпинγκ ακόμη και σε περιπτώσεις χαμηλών συγκεντρώσεων ή σύντομων παραθύρων ανίχνευσης, συμβάλλοντας ουσιαστικά στην προστασία της καθαρής αθλητικής άμιλλας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

6.1 ΟΥΣΙΕΣ ΚΑΙ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Για την ανάπτυξη και εφαρμογή των αναλυτικών μεθόδων χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα διαλύματα ουσιών του Καταλόγου Απαγορευμένων. Όλες οι ουσίες ήταν καθαρότητας > 99% και ποιότητας Analytical Grade Standard.

Στην παρούσα μελέτη αξιοποιήθηκαν ουσίες που εμπίπτουν στις ακόλουθες κατηγορίες του Καταλόγου Απαγορευμένων:

- Κατηγορία S7: Ναρκωτικά
- Κατηγορία S5: Διουρητικά και Παράγοντες Απόκρυψης

Ο πλήρης κατάλογος των ενώσεων παρατίθεται στους Πίνακες A1 και A2 του Παραρτήματος Α.

6.2 ΔΙΑΛΥΤΕΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

6.2.1 Διαλύτες

Για την παρασκευή διαλυμάτων και την εκτέλεση της υγρής χρωματογραφικής ανάλυσης χρησιμοποιήθηκαν διαλύτες υψηλής καθαρότητας (LC – MS grade):

- Milli Q H₂O
- Acetonitrile (ACN)
- Methanol (MeOH)
- Formic acid
- Ammonium formate

6.2.2 Αντιδραστήρια

Επιπλέον χρησιμοποιήθηκαν:

- Ένζυμο E.coli (Roche, Sigma)
- Στερεό Μείγμα NaHCO₃:Na₂CO₃ (10:1)
- Ethyl acetate
- Άνυδρο Na₂SO₄
- Διάλυμα CH₃COOH 3M
- Ρεύμα αζώτου (N₂)

6.3 ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ

Στα αναλώσιμα που χρησιμοποιήθηκαν περιλαμβάνονται:

Γυάλινα σκεύη: ογκομετρικοί κύλινδροι 1L, γυάλινες φιάλες 1L, ψηλοί γυάλινοι σωλήνες.

Πλαστικά αναλώσιμα: Κωνικά σωληνάριο τύπου Falcon 15 mL, κωνικοί σωλήνες, vials 2 mL με inserts.

Εργαλεία χειρισμού: Spatula, αυτόματες πιπέτες (20-200 μ L και 200 μ L), dispenser κουταλάκι AN25.

6.4 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

6.4.1 Προετοιμασία πολυσυστατικού διαλύματος πρότυπων ουσιών.

S7 Ναρκωτικά:

Για την ποιοτική και ποσοτική αξιολόγηση των ναρκωτικών ουσιών παρασκευάστηκε πολυσυστατικό διάλυμα πρότυπων ουσιών (mixed standard solution), το οποίο περιλάμβανε όλες τις διαθέσιμες ενώσεις της κατηγορίας S7. Το πρότυπο προετοιμάστηκε με τέτοιο τρόπο ώστε κάθε αναλυόμενη ουσία να βρίσκεται σε συγκέντρωση κατάλληλη για ανίχνευση στο σύστημα LC – MS/MS, Orbitrap και εντός των αναμενόμενων συγκεντρώσεων που παρατηρούνται στα ούρα.

Από τα επιμέρους πρότυπα διαλύματα λήφθηκαν ποσότητες με αυτόματες πιπέτες Eppendorf, ανάλογες με την επιθυμητή τελική συγκέντρωση κάθε ουσίας. Οι ποσότητες αυτές μεταφέρθηκαν σε vial (LC vial) και προστέθηκε κατάλληλο διάλυμα – φορέα μέχρι τον επιθυμητό τελικό όγκο. Ως διάλυμα – φορέας χρησιμοποιήθηκε διάλυμα ταυτόσημο με τις αρχικές χρωματογραφικές συνθήκες.

Μετά την προσθήκη των ποσοτήτων, το περιεχόμενο αναμείχθηκε σε vortex και υπέστη σύντομη φυγοκέντρωση για την απομάκρυνση φυσαλίδων ή υπολειμμάτων. Πριν από τη χρήση, το πρότυπο ελέγχθηκε για ορατά σωματίδια και ομοιογένεια, ενώ τα vials διατηρήθηκαν σε κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας και προστατεύτηκαν από το φως. Επιπλέον, καταγράφηκαν στοιχεία σχετικά με τη διάρκεια σταθερότητας και την ημερομηνία παρασκευής στα αρχεία του εργαστηρίου, όπως γίνεται για κάθε νέο διάλυμα που παρασκευάζεται.

S5 Διουρητικά και Παράγοντες απόκρυψης:

Ακριβώς η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για την κατηγορία S5 Διουρητικά και Παράγοντες Απόκρυψης. Χρησιμοποιήθηκε κατάλληλο διάλυμα – φορέας μέχρι τον

επιθυμητό όγκο. Ως διάλυμα – φορέας χρησιμοποιήθηκε διάλυμα ταυτόσημο με τις αρχικές χρωματογραφικές συνθήκες.

6.4.2 Παρασκευαστική διαδικασία δειγμάτων ούρων.

Για την ανάλυση των ουσιών – στόχων εκτελέστηκαν 3 διαφορετικές διαδικασίες:

- (α) δείγματα που δεν υπέστησαν υδρόλυση
- (β) δείγματα που υπέστησαν ενζυμική υδρόλυση και
- (γ) δείγματα με ανασύσταση του διαλύματος πρότυπων ουσιών

6.4.2.1 Δείγματα που δεν υπέστησαν υδρόλυση (No Hydrolysis)

Στο πολυσυστατικό διάλυμα πρότυπων ουσιών προστέθηκε μεθανόλη ώστε να δημιουργηθεί τελικό διάλυμα 1 mL, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των θετικών δειγμάτων ελέγχου (POSCON). Από το διάλυμα αυτό λήφθηκε ποσότητα 50 μ L και προστέθηκε σε 3 mL ούρων blank, τα οποία αναδεύτηκαν σε vortex. Παράλληλα παρασκευάστηκαν τυφλά δείγματα:

BLANK → 3 mL ούρων blank

WBLANK → 3 mL Υπερκάθαρο Milli – Q H₂O

καθώς και δείγματα προς ανάλυση, τα οποία περιείχαν 3 mL πραγματικών ούρων

Μετά την αρχική προετοιμασία, όλα τα δείγματα (POSCON, BLANK, WBLANK, δείγματα προς ανάλυση) υποβλήθηκαν σε διαδικασία υγρής – υγρής εκχύλισης με διαλύτη οξεϊκό αιθυλεστέρα παρουσία ρυθμιστικού μείγματος NaHCO₃:Na₂CO₃ (10:1) και άνυδρου Na₂SO₄. Ακολούθησε ανακίνηση, φυγοκέντρωση και συλλογή της οργανικής στιβάδας. Στη συνέχεια προστέθηκε διάλυμα CH₃COOH 3M και τα δείγματα εξατμίστηκαν υπό ρεύμα αζώτου (N₂) σε θερμοκρασία ≤ 50 °C. Το ξηρό υπόλειμμα επαναδιαλύθηκε με 100 μ L διαλύτη ανασύστασης, ανακινήθηκε σε vortex, φυγοκεντρήθηκε και μεταφέρθηκε σε vials LC – MS/MS για ανάλυση.

6.4.2.2 Δείγματα που υπέστησαν ενζυμική υδρόλυση (Hydrolysis)

Για τα δείγματα που υπέστησαν υδρόλυση, ακολουθήθηκε η ίδια αρχική διαδικασία με τα δείγματα που δεν υπέστησαν υδρόλυση, με την προσθήκη ενός επιπλέον σταδίου, της κατεργασίας με β – γλυκουρονιδάση. Συγκεκριμένα, μετά την προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (1 mL, pH 7) και του εσωτερικού προτύπου (50 μ L), προστέθηκε το ένζυμο (50 μ L υγρού παρασκευάσματος Roche E. Coli ή 100 μ L αραιωμένου διαλύματος Sigma E. Coli). Τα δείγματα ανακινήθηκαν, πωματίστηκαν και επωάστηκαν τους 50°C για 1,5 ώρα.

Μετά την υδρόλυση, τα δείγματα ακολούθησαν την ίδια ακριβώς διαδικασία εκχύλισης, εξάτμισης και ανασύστασης, η οποία περιγράφηκε για τα δείγματα που δεν υπέστησαν υδρόλυση. Το τελικό διάλυμα μεταφέρθηκε σε vials LC – MS/MS για ανάλυση.

6.4.2.3 Δείγματα με απευθείας ανασύσταση πρότυπου διαλύματος.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε διαδικασία ανασύστασης απευθείας στο πολυσυστατικό διάλυμα πρότυπων ουσιών (χωρίς την παρουσία ούρων). Το διάλυμα εξατμίστηκε υπό ρεύμα αζώτου (N₂) και στο ξηρό υπόλειμμα πραγματοποιήθηκε η ανασύσταση με προσθήκη του διαλύτη ανασύστασης, vortex, φυγοκέντρωση και μεταφορά σε vials LC – MS/MS για ανάλυση.

6.4.2.4 Σημειώσεις

- Τα δείγματα προς ανάλυση αντιστοιχούν σε πραγματικά δείγματα ούρων (3 mL από κάθε δείγμα), τα οποία αποτέλεσαν το κύριο αντικείμενο της μελέτης και υποβλήθηκαν είτε στη διαδικασία χωρίς υδρόλυση είτε σε εκείνη με υδρόλυση.
- Αντίθετα τα BLANK δείγματα (3 mL ούρων χωρίς παρουσία απαγορευμένων ουσιών) και τα WBLANK δείγματα (3 mL Milli-Q H₂O) χρησιμοποιήθηκαν αποκλειστικά για σκοπούς ποιοτικού ελέγχου: τα πρώτα ως αρνητικοί μάρτυρες για τον αποκλεισμό ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων και τα δεύτερα για την επιβεβαίωση της καθαρότητας των διαλυτών και της παρουσίας επιμολύνσεων κατά τη διαδικασία προετοιμασίας.
- Τα δείγματα ανασύστασης δεν περιλάμβαναν μήτρα ούρων, αλλά αφορούσαν αποκλειστικά τα πολυσυστατικό διάλυμα πρότυπων ουσιών – στόχων, το οποίο υποβλήθηκε σε εξάτμιση και ανασύσταση με σκοπό την αξιολόγηση της απόκρισης του οργάνου και τη χρήση του ως σημείο αναφοράς για τις αναλυτικές ενδείξεις.
- Η περιγραφόμενη παρασκευαστική διαδικασία εφαρμόστηκε με την ίδια λογική τόσο για τις ενώσεις της κατηγορίας S7: ναρκωτικά, όσο και για εκείνες της κατηγορίας S5: διουρητικά και παράγοντες απόκρυψης. Οι δύο κατηγορίες αντιμετωπίστηκαν με κοινό πρωτόκολλο προετοιμασίας δειγμάτων, με μόνη διαφοροποίηση επιμέρους παραμέτρους, όπως το διάλυμα των εσωτερικών προτύπων, ώστε να ανταποκρίνονται στις ιδιαιτερότητες κάθε ομάδας αναλυτών.

6.4.3 Προετοιμασία δειγμάτων για την επικύρωση της μεθόδου (Ημέρα 1 – Ημέρα 2)
Η επικύρωση της μεθόδου, η οποία αναπτύχθηκε για τις ουσίες της κατηγορίας S5: Διουρητικά και Παράγοντες απόκρυψης, απαιτούσε την παρασκευή δειγμάτων ούρων σε δύο διαδοχικές ημέρες. Όλα τα δείγματα είχαν όγκο 3mL και ακολουθήθηκε η ίδια βασική διαδικασία προετοιμασίας που περιλάμβανε σταδιακή επεξεργασία και εκχύλιση με σκοπό την καθαρή απομόνωση των στοχευμένων αναλυομένων ουσιών. Αρχικά, κάθε δείγμα τοποθετήθηκε σε κωνικούς σωλήνες και προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (pH 7) καθώς και το μείγμα εσωτερικών προτύπων. Για την υδρόλυση προστέθηκε ένζυμο β-γλυκουρονιδάση (Roche E. Coli ή αραιωμένο διάλυμα Sigma E. Coli) και ακολούθησε επώαση σε φούρνο στους 50°C για 1,5 ώρα. Ύστερα από αυτό το στάδιο επεξεργασίας, όλα τα δείγματα προχώρησαν στην ίδια πορεία προετοιμασίας.

Συγκεκριμένα, προστέθηκε στερεό μείγμα $\text{NaHCO}_3:\text{Na}_2\text{CO}_3$ (10:1) και πραγματοποιήθηκε εκχύλιση με οξεϊκό αιθυλεστέρα παρουσία άνυδρου Na_2SO_4 . Στην συνέχεια, τα δείγματα ανακινήθηκαν έντονα και φυγοκεντρήθηκαν, ώστε να διαχωριστεί η οργανική στιβάδα και η οργανική φάση συλλέχθηκε και οξινίστηκε με διάλυμα CH_3COOH 3M. Τα δείγματα υποβλήθηκαν σε εξάτμιση υπό ρεύμα αζώτου (N_2) σε θερμοκρασία $\leq 50^\circ\text{C}$, μέχρι την πλήρη απομάκρυνση των οργανικών διαλυτών.

Το ξηρό υπόλειμμα που προέκυψε ανασυστάθηκε με κατάλληλο διαλύτη, συμβατό με την τεχνική LC – MS/MS και αναδεύτηκε στο vortex ώστε να εξασφαλιστεί πλήρης διαλυτοποίηση. Μετά την σύντομη φυγοκέντρωση, το υπερκείμενο υγρό μεταφέρθηκε σε φιαλίδια με insert, τα οποία σφραγίστηκαν και παραδόθηκαν για ανάλυση στο σύστημα LC – MS/MS (Orbitrap)

Η επικύρωση περιλάμβανε διαφορετικές σειρές δειγμάτων, σχεδιασμένων για να πραγματοποιηθεί έλεγχος σε όλες τις απαιτούμενες παραμέτρους: εκλεκτικότητα (selectivity), όριο ανίχνευσης (LOD) σε διάφορα ποσοστά του MRPL (10%, 25%, 50%, 75% και 100%), αξιοπιστία ανίχνευσης σε MRPL, carryover, ειδικότητα (specificity), σταθερότητα εκχυλίσματος (με επανέλεγχο μετά από 7 ημέρες) και matrix effect (σε ούρα γυναικών και ανδρών). Για κάθε κατηγορία δείγματος πραγματοποιήθηκε εμπλουτισμός δείγματος μήτρας (ούρα) με γνωστή ποσότητα διαλύματος πρότυπων ουσιών, έτσι ώστε να καλυφθεί όλο το εύρος συγκεντρώσεων το οποίο απαιτείτε για την αξιολόγηση της μεθόδου.

Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε σε δύο ημέρες (DAY1 & DAY2), με σκοπό την εκτίμηση τόσο της ενδοημερήσιας επαναληψιμότητας όσο και της διαημερήσιας

αναπαραγωγιμότητας. Τέλος, με τον τρόπο αυτό, διασφαλίστηκε ότι η μέθοδος είναι ικανή να παρέχει αξιόπιστα και σταθερά αποτελέσματα υπό διαφορετικές συνθήκες προετοιμασίας και ανάλυσης.

6.5 ΣΥΣΚΕΥΕΣ

Για τις ανάγκες της πειραματικής διαδικασίας χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω συσκευές:

- ✚ Αναλυτικός ζυγός (Analytical balance): Ζυγός υψηλής ακρίβειας (A&D ER-60A, Japan), ο οποίος χρησιμοποιήθηκε για τη ζύγιση ουσιών και την παρασκευή διαλυμάτων με ακρίβεια.
- ✚ Μικροφυγόκεντρος (Microcentrifuge): Μικροφυγόκεντρος (Hettich Mikro 20, Germany), κατάλληλη για μικρούς όγκους δειγμάτων σε σωληνάρια τύπου Eppendorf.
- ✚ Φυγόκεντρος (Centrifuge): Επιτραπέζια φυγόκεντρος (Hermle Z 510, Germany), εξοπλισμένη με ρότορα κατάλληλο για σωληνάρια, ή οποία χρησιμοποιήθηκε για την καθίζηση σωματιδίων και την προετοιμασία δειγμάτων.
- ✚ Φούρνος ξήρανσης (Drying oven): Φούρνος ξήρανσης (EABEM, Ελλάδα) για την απομάκρυνση υπολειμμάτων υγρασίας από γυάλινα σκεύη και δείγματα.
- ✚ Συσκευή εξάτμισης με άζωτο (Nitrogen evaporator): Πολυθέσιο σύστημα εξάτμισης με άζωτο, σε συνδυασμό με θερμαντικό μπλοκ (Techne Dri-Block® DB-3, UK), το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την απομάκρυνση οργανικών διαλυτών υπό ρεύμα αζώτου σε ελεγχόμενη θερμοκρασία.
- ✚ Vortex μίξερ, χρησιμοποιήθηκε vortex μίξερ για την ομογενοποίηση των δειγμάτων πριν από την ανάλυση. Το όργανο επέτρεπε την ταχεία και αποτελεσματική ανάμειξη μικρών όγκων διαλυμάτων, εξασφαλίζοντας την πλήρη διάλυση και ομογενοποίηση των ουσιών

6.6 ΑΝΑΛΥΤΙΚΑ ΟΡΓΑΝΑ

Για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης συνδεδεμένο με φασματομετρία μάζας υψηλής ανάλυσης (UHPLC-HRMS):

- ✚ Σύστημα UHPLC: Thermo Scientific™ UltiMate™ 3000 (USA), το οποίο περιλαμβάνει αντλία, αυτόματο δειγματολήπτη, θερμοστατούμενη στήλη και ανιχνευτή, για τον διαχωρισμό των αναλυομένων ουσιών.
- ✚ Επιπλέον, στο σύστημα UHPLC χρησιμοποιήθηκε στήλη Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 (2.1 × 50 mm, 2.7μm), η οποία τοποθετήθηκε στη θερμοστατούμενη θήκη της χρωματογραφίας. Η συγκεκριμένη στήλη προσφέρει βελτιωμένη απόδοση στον διαχωρισμό των αναλυομένων ουσιών χάρη στη δομή με πορώδη σωματίδια κελύφους (porous shell), που επιτρέπει ταχύτερες αναλύσεις με αυξημένη διαχωριστική ικανότητα.
- ✚ Μονάδα Online εκχύλισης στερεάς φάσης (Online SPE): Thermo Scientific™ UltiMate™ 3000 SPE module, η οποία επέτρεπε τον αυτόματο καθαρισμό και προεμπλουτισμό των δειγμάτων πριν από τον χρωματογραφικό διαχωρισμό.
- ✚ Φασματομέτρο μάζας υψηλής ανάλυσης (HRMS): Thermo Scientific™ Q Exactive™ Plus Hybrid Quadrupole – Orbitrap™ (USA), εξοπλισμένο με πηγή ιοντισμού τύπου ESI (Electrospray Ionization). Το όργανο χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση απαγορευμένων ουσιών, συμπεριλαμβανομένων των ναρκωτικών (WADA S7) και των διουρητικών και παραγόντων απόκρυψης (WADA S5).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΡΟΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ, ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΤΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΝΑΡΚΩΤΙΚΩΝ (S7), ΔΙΟΥΡΗΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΑΠΟΚΡΥΨΗΣ (S5) ΣΕ ΟΥΡΑ ΑΘΛΗΤΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ UHPLC-HRMS ORBITRAP.

Το παρόν κεφάλαιο παρουσιάζει τη μεθοδολογική προσέγγιση, η οποία ακολουθήθηκε για την ανάπτυξη και επικύρωση των αναλυτικών μεθόδων, με στόχο την ανίχνευση απαγορευμένων ουσιών των κατηγοριών S7 Ναρκωτικά και S5 Διουρητικά και Παράγοντες Απόκρυψης, του Καταλόγου Απαγορευμένων. Η περιγραφή βασίζεται σε διεθνώς αποδεκτές πρακτικές, όπως ορίζονται από τον WADA, και είναι δομημένα έτσι ώστε να μπορεί να αποτελέσει οδηγό αναπαραγωγής για μελλοντικούς ερευνητές.

7.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΕΚΜΗΡΙΩΣΗΣ (PROHIBITED LIST 2025, CONFIRMATION PROCEDURE (CP), PRE-PROBATIONARY TEST (PPT), MONITORING.)

Η διαδικασία ξεκίνησε με την ανασκόπηση της πιο πρόσφατης έκδοσης του Καταλόγου Απαγορευμένων (2025) και του παραγομένου από αυτή καταλόγου αναλυομένων ουσιών του εργαστηρίου. Ο τελευταίος περιλαμβάνει για κάθε κατηγορία ουσιών, το κύριο μόριο (parent compound) μιας ουσίας καθώς και τους μεταβολίτες (metabolites), τα παράγωγα και τα ισομερή της, δηλαδή τις πραγματικές ουσίες – στόχοι (target analytes), οι οποίες εντοπίζονται στα βιολογικά υγρά. Η συγκέντρωση όλων των ουσιών – στόχων σε ένα ενιαίο φύλλο εργασίας (Master list) αποτέλεσε το πρώτο κρίσιμο βήμα, καθώς η πληρότητα αυτής της λίστας καθορίζει το εύρος εφαρμογής και την αξιοπιστία της αναλυτικής μεθόδου.

Για κάθε ουσία της Master list πραγματοποιήθηκε εκτενής έλεγχος διαθεσιμότητας προτύπων αναφοράς (reference standards) στο εργαστήριο. Η σύγκριση αυτή επέτρεψε τον εντοπισμό των ουσιών που μπορούσαν να αναλυθούν άμεσα, την καταγραφή των ελλείψεων, ώστε να δρομολογηθεί η προμήθειά τους και η δημιουργία μιας επικαιροποιημένης βάσης δεδομένων για την διαθεσιμότητα των προτύπων. Η τεκμηρίωση αυτή είναι απαραίτητη, καθώς επηρεάζει τόσο τον προγραμματισμό όσο και την χρονική διάρκεια για την ανάπτυξη της μεθόδου.

Στην συνέχεια, οι ουσίες της Master list ταξινομήθηκαν με κριτήριο ποιες από αυτές είχαν, κατά την τρέχουσα χρονική περίοδο, καθοριστεί από τον WADA ως ουσίες που απαιτούν επιβεβαιωτική διαδικασία (Confirmation Procedure – CP). Οι διαδικασίες αυτές αποτελούν το στάδιο που ακολουθεί την αρχική ανάλυση (Initial Testing

Procedure, ITP), η οποία στοχεύει στον εντοπισμό πιθανής παρουσίας απαγορευμένων ουσιών. Στο δεύτερο αυτό στάδιο, τα αρχικά αποτελέσματα υπόκεινται σε ανεξάρτητες και περισσότερο εξειδικευμένες μεθόδους, ώστε να διασφαλίζεται η ακρίβεια και η εγκυρότητα της ταυτοποίησης. Οι ουσίες της Master list που κατηγοριοποιήθηκαν ως CP, έλαβαν υψηλή προτεραιότητα στην ανάπτυξη και επικύρωση της μεθόδου, καθώς σύμφωνα με το ISL, η διενέργεια επιβεβαιωτικής ανάλυσης για αυτές είναι υποχρεωτική.

Ύστερα από την επισήμανση των ουσιών της Master list, οι οποίες είχαν οριστεί ως CP, ακολούθησε η αντίστοιχη επισήμανση των ουσιών οι οποίες περιλαμβάνονταν στη λίστα των προ-δοκιμαστικών δοκιμών, δοκιμαστικής περιόδου (Pre – Probationary Test, PPT), δεδομένου ότι το Εργαστήριο βρίσκεται στο στάδιο του υποψήφιου εργαστηρίου προς διαπίστευση από τον WADA (Candidate Laboratory). Το Pre – Probationary Test – PPT, αποτελεί μια διαδικασία αξιολόγησης υποψήφιων εργαστηρίων, στο πλαίσιο της οποίας αναλύονται τυφλά δείγματα EQAS, τα οποία αποστέλλονται από τον WADA. Η ύπαρξη επικυρωμένων μεθόδων για τις ουσίες της λίστας PPT αποτελεί βασική προϋπόθεση για την επιτυχή ολοκλήρωση της δοκιμασίας. Επιπλέον, οι ουσίες που είχαν χαρακτηριστεί ταυτόχρονα ως CP και PPT κατετάγησαν στην υψηλότερη βαθμίδα προτεραιότητας.

Παράλληλα με τον Κατάλογο Απαγορευμένων, ο WADA εκδίδει, επίσης σε ετήσια βάση, και κατάλογο ουσιών του Προγράμματος Παρακολούθησης (Monitoring Program), το οποίο περιλαμβάνει ουσίες που δεν οδηγούν σε αντικανονικά αναλυτικά ευρήματα αλλά παρακολουθούνται για πιθανή μελλοντική ένταξη στον Κατάλογο Απαγορευμένων. Η καταγραφή τους στη Master list ενίσχυσε την πληρότητα και την προσαρμοστικότητα της μεθόδου, αν και δεν απαιτούν επιβεβαιωτική διαδικασία ελέγχου.

Με βάση τα παραπάνω, καθορίστηκε ιεράρχηση τεσσάρων επιπέδων:

CP – PPT → Υψηλότερη προτεραιότητα

Μόνο CP → Μεσαία προτεραιότητα

Ουσίες στον Κατάλογο Απαγορευμένων του WADA για το 2025 → Χαμηλότερη Προτεραιότητα

Ουσίες του Προγράμματος Παρακολούθησης (Monitoring) → Ερευνητική/ στατιστική παρακολούθηση

Η ιεράρχηση αυτή αποτέλεσε το στρατηγικό πλαίσιο για τον σχεδιασμό της αναλυτικής μεθόδου. Έτσι η μέθοδος επικεντρώθηκε αρχικά στις ουσίες υψηλότερης

προτεραιότητας και επιλέχθηκαν και βελτιστοποιήθηκαν οι κατάλληλες συνθήκες ώστε να εξασφαλιστούν χαμηλά όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης, υψηλή εκλεκτικότητα και ευαισθησία καθώς και ορθογωνικότητα, με την έννοια της ενσωμάτωσης συμπληρωματικών και ανεξάρτητων αρχών διαχωρισμού και ανίχνευσης, στοιχείο που ενισχύει την αξιοπιστία και την αναλυτική ισχύ της μεθόδου. Στην συνέχεια, η επικύρωση πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές του ISL, καλύπτοντας παραμέτρους όπως είναι η ακρίβεια, η επαναληψιμότητα, η αναπαραγωγιμότητα εντός του εργαστηρίου και η εφαρμογή σε πραγματικά δείγματα. Όλα τα δεδομένα καταγράφηκαν σε πλήρη εργαστηριακή τεκμηρίωση.

Η μεθοδολογική αυτή προσέγγιση εξασφαλίζει την πλήρη συμμόρφωση με τις απαιτήσεις του WADA. Μέσα από μια συστηματική διαδικασία συλλογής δεδομένων, ελέγχου αποθέματος, φιλτραρίσματος βάσει CP/PPT/Monitoring, ιεράρχησης, ανάπτυξης και επικύρωσης, δημιουργείται μια αναλυτική μέθοδος, η οποία ανταποκρίνεται τόσο στις επιστημονικές όσο και στις κανονιστικές απαιτήσεις του πεδίου του Αντιντόπινγκ.

7.2 ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ ΠΙΝΑΚΑ ΟΥΣΙΩΝ (MASTER LIST) ΜΕ ΒΑΣΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΤΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ (M/Z, ADDUCTS, RT, FRAGMENTS, BEST NCE)

Το δεύτερο στάδιο της διαδικασίας περιλάμβανε τη δημιουργία μιας ολοκληρωμένης βάσης δεδομένων (σε μορφή Excel), όπου για κάθε ουσία της Master list, καταχωρίστηκαν οι κρίσιμες αναλυτικές παράμετροι που σχετίζονται με την ανίχνευση και ταυτοποίηση της μέσω χρωματογραφικού διαχωρισμού και φασματομετρίας μάζας. Η συγκέντρωση των δεδομένων αυτών αποτέλεσε σημαντική προϋπόθεση για την ανάπτυξη και βελτιστοποίηση της μεθόδου, καθώς προσφέρει συστηματική και τυποποιημένη καταγραφή όλων των χαρακτηριστικών που καθορίζουν την απόκριση του αναλυτικού συστήματος.

Συγκεκριμένα, η βάση δεδομένων, εκτός από την Master list, περιλαμβάνει:

m/z (mass-to-charge ratio): Ο θεωρητικός λόγος μάζας προς φορτίο κάθε ουσίας, ο οποίος χρησιμοποιήθηκε για την επιλογή του μητρικού ιόντος (precursor ion) και αποτελεί θεμελιώδη παράμετρο για την ταυτοποίηση.

MS Mode (Positive/Negative Ionization): Η λειτουργία φασματομετρίας μάζας που εφαρμόστηκε (MS/MS), με καθορισμό του ιοντισμού σε θετικό ή αρνητικό mode. Ο

συνδυασμός αυτός τεκμηριώνει τον βαθμό εκλεκτικότητας και τη στρατηγική ανάλυσης για κάθε ουσία.

Adducts ($[M+H]^+$, $[M+NH_4]^+$, $[2M+H]^+$): Οι πιθανές μορφές ιοντισμού, τις οποίες μπορεί να εμφανίσει η ένωση. Η καταγραφή τους διασφαλίζει την πληρότητα της μεθόδου, αποτρέποντας την απώλεια ουσιών λόγω μη αναμενόμενου adduct.

RT (Retention Time): Ο χρόνος κατακράτησης της ουσίας στη χρωματογραφική στήλη, ο οποίος, συνδυαστικά με το m/z, συνιστά καθοριστικό δείκτη ταυτοποίησης.

Best Collision Energies (CEs): Οι βέλτιστες τιμές ενέργειας κρούσης, οι οποίες οδηγούν στη σταθερή και αναπαραγωγή θραυσμάτων (fragments). Η ρύθμιση τους καθορίζει την ευαισθησία και εκλεκτικότητα της μεθόδου.

Fragments (Product Ions): Τα χαρακτηριστικά ιόντα διάσπασης που προκύπτουν σε MS/MS αναλύσεις. Η ύπαρξη τους αποτελεί προϋπόθεση για την εφαρμογή των επιβεβαιωτικών μεθόδων (CP), καθώς λειτουργούν ως μοναδικό μοριακό αποτύπωμα.

7.3 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΥ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ.

7.3.1 Στόχοι και κριτήρια αξιολόγησης της μεθόδου.

Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός και η ταυτοποίηση των ουσιών των κατηγοριών S7 Ναρκωτικά και S5 Διουρητικά και Παράγοντες απόκρυψης πραγματοποιήθηκε με χρήση χρωματογραφικής στήλης αντίστροφης φάσης C-18, σε συνδυασμό με κινητή φάση, η οποία αποτελούνταν από υδατικό διάλυμα μυρμηκικού οξέος/μυρμηκικού αμμωνίου και διάλυμα μυρμηκικού οξέος/μυρμηκικού αμμωνίου σε ACN/Milli Q H₂O 90/10% v/v

Η βελτιστοποίηση της μεθόδου εστίασε στις εξής βασικές παραμέτρους:

Τη διακριτική ικανότητα (Resolution, Rs), όπου σκοπός ήταν η επίτευξη επαρκούς διαχωρισμού μεταξύ γειτονικών κορυφών, ώστε να αποφεύγεται η αλληλοεπικάλυψη μεταξύ αυτών και να εξασφαλίζεται αξιόπιστη ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση. Για το σκοπό αυτό εφαρμόστηκαν βελτιστοποιήσεις στο πρόγραμμα βαθμίδωσης (gradient) και στη διάρκεια της ανάλυσης.

Την αποδοτικότητα της στήλης (Efficiency, N – αριθμός θεωρητικών πλακών), της οποίας η μεγιστοποίηση αποτέλεσε κρίσιμο στόχο, καθώς σχετίζεται με την παραγωγή στενών και καλά καθορισμένων κορυφών. Για την επίτευξη ικανοποιητικής αποδοτικότητας στήλης, εξετάστηκαν και ρυθμίστηκαν παράμετροι όπως η αναλογία

διαλυτών της κινητής φάσης, η θερμοκρασία της στήλης και η ταχύτητα ροής, ώστε να μειωθεί η διασπορά των κορυφών.

Τον παράγοντα ασυμμετρίας (Tailing factor). Η διατήρηση συμμετρικών κορυφών αποτέλεσε επίσης βασικό στόχο, καθώς ασυμμετρίες (tailing), οι οποίες προέρχονται από ανεπιθύμητες αλληλεπιδράσεις μεταξύ αναλυομένων ουσιών και της στατικής φάσης, μειώνουν την ακρίβεια της μεθόδου,

Ο θόρυβος της βασικής γραμμής ή αλλιώς Peak to Peak για την ελαχιστοποίηση του θορύβου της βασικής γραμμής, ώστε να επιτευχθεί υψηλός λόγος σήματος προς θόρυβο (S/N ratio). Η ελαχιστοποίηση του peak-to-peak θορύβου ήταν απαραίτητη, καθώς σχετίζεται με τον υπολογισμό του λόγου σήματος προς θόρυβο (S/N) και κατ' επέκταση με τον καθορισμό του ορίου ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης (LOD & LOQ, αντίστοιχα) .

Με την επίτευξη των παραπάνω στόχων διασφαλίστηκε ότι ο χρωματογραφικός διαχωρισμός ήταν επαρκής και αναπαραγώγιμος, επιτρέποντας την ακριβή ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των ουσιών ενδιαφέροντος.

Παράμετρος:	Μαθηματικός τύπος:	Τι εκφράζει:	Τιμή – στόχος:
Διακριτική ικανότητα (Resolution, R_s)	$R_s = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{w_1 + w_2}$	Βαθμός διαχωρισμού δύο γειτονικών κορυφών (χρόνοι κατακράτησης t_{R1} , t_{R2} , πλάτη κορυφών w_1, w_2)	≥ 1.5 για πλήρη διαχωρισμό
Αποδοτικότητα στήλης (Efficiency, N)	$N = 16 \left(\frac{t_R}{w_b} \right)^2 \text{ ή } N = 5.54 \left(\frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2$	Στενότητα/οξύτητα κορυφής, δείχνει απόδοση στήλης	Υψηλές τιμές N , καλύτερη αποδοτικότητα
Παράγοντας ασυμμετρίας (Tailing factor, T)	$T = \frac{w_{0.05}}{2f}$	Σχήμα κορυφής: $T \approx 1$ = συμμετρική, $T > 1$ = tailing $T < 1$ = fronting	0,9 – 1,3 (ιδανικά ≈ 1)

Peak-to-Peak Noise (S/N)	$S/N = \frac{h}{N_{p-p}}$	Σχέση σήματος προς θόρυβο, δείχνει την ευαισθησία ανίχνευσης.	S/N βοηθάει στον υπολογισμό (LOD), (LOQ)
--------------------------	---------------------------	---	--

Πίνακας 1: Κύριες χρωματογραφικές παράμετροι αξιολόγησης της ποιότητας διαχωρισμού και οι μαθηματικές τους σχέσεις.

Οι παραπάνω σχέσεις αποτελούν τις θεμελιώδεις μαθηματικές εκφράσεις για την αξιολόγηση της ποιότητας ενός χρωματογραφικού διαχωρισμού. Στην πράξη, όμως, η ανάλυση δεν πραγματοποιήθηκε με υπολογισμούς δια χειρός, αλλά με τη χρήση των λογισμικών Freestyle και TraceFinder από την Thermo Fisher Scientific. Τα εργαλεία αυτά επέτρεψαν τον αυτόματο υπολογισμό και την οπτική επιβεβαίωση όλων των κρίσιμων παραμέτρων (όπως, Resolution, Efficiency, Tailing factor και S/N) με υψηλή ακρίβεια, ταχύτητα και επαναληψιμότητα. Επίσης, τα λογισμικά αυτά προσέφεραν ολοκληρωμένη εικόνα όλων των παραμέτρων που χαρακτηρίζουν μια επιτυχημένη χρωματογραφία: τον χρόνο κατακράτησης (Retention time), την εκλεκτικότητα (Selectivity), δηλαδή την ικανότητα διαχωρισμού ενώσεων με παρόμοιες φυσικοχημικές ιδιότητες, την ευαισθησία και γραμμικότητα του ανιχνευτή, την επαναληψιμότητα των μετρήσεων, καθώς και τη σταθερότητα της βασικής γραμμής (Baseline). Έτσι, η αξιολόγηση και η βελτιστοποίηση της μεθόδου κατέστη δυνατή με τρόπο αποδοτικό, χωρίς χρονοβόρους χειροκίνητους υπολογισμούς, γεγονός που αναβαθμίζει σημαντικά την αξιοπιστία της συνολικής αναλυτικής διαδικασίας.

7.3.2 Διαδικασία ανάπτυξης και αξιολόγησης της μεθόδου.

Για την αρχική αξιολόγηση της μεθόδου παρασκευάστηκαν δύο πολυσυστατικά διαλύματα προτύπων ουσιών (mixed standard solutions), τα οποία περιλάμβαναν τις ενώσεις – στόχους των κατηγοριών S7 και S5. Τα διαλύματα αυτά αναλύθηκαν με την καθιερωμένη μέθοδο αναφοράς του εργαστηρίου, η οποία βασίζεται σε προκαθορισμένο χρωματογραφικό gradient.

Στην συνέχεια χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Freestyle από τη Thermo Scientific για τη δημιουργία template που περιείχε τις ενώσεις – στόχους, τους αντίστοιχους θεωρητικούς λόγους μάζας προς φορτίο (m/z), τον ιοντισμό σε θετικό ή αρνητικό mode

κάθε ουσίας και τις πιθανές μορφές ιοντισμού, τις οποίες μπορεί να εμφανίσει η ένωση, όπου αυτό κρινόταν απαραίτητο. Τα template ήταν δύο, ένα για κάθε κατηγορία απαγορευμένων ουσιών, S7: Ναρκωτικά και S5: Διουρητικά και Παράγοντες απόκρυψης. Το template για την κάθε κατηγορία, επέτρεψε την απεικόνιση και την αξιολόγηση των χρωματογραφικών κορυφών που προέκυψαν από την ανάλυση των πολυσυστατικών διαλυμάτων πρότυπων ουσιών. Με βάση αυτά τα πρώτα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν περιπτώσεις όπου:

- Αναμενόμενες κορυφές, βάσει της σύγκρισης τους με δεδομένα του εργαστηρίου και βιβλιογραφικές πηγές, εμφανίστηκαν στον εκτιμώμενο χρόνο.
- Ορισμένες αναμενόμενες κορυφές δεν εμφανίστηκαν.
- Ενώσεις παρουσίασαν αλληλοεπικάλυψη με γειτονικές κορυφές.
- Ενώσεις με παρόμοιο ή και ίδιο m/z εμφάνιζαν σήμα στο «χρονικό παράθυρο» άλλης ένωσης, προκαλώντας σύγχυση στην ταυτοποίηση.

Βάσει των παρατηρήσεων αυτών, κρίθηκε αναγκαία η δημιουργία ενός δεύτερου template στο λογισμικό Freestyle, στο οποίο οι ενώσεις κατατάχθηκαν σύμφωνα με τον εκτιμώμενο χρόνο έκλουσης, σε αύξουσα σειρά από την πρώτη έως την τελευταία εκλουόμενη ένωση. Η προσέγγιση αυτή επέτρεψε την καλύτερη εποπτεία της διάταξης των κορυφών και τον εντοπισμό αδύναμων σημείων στη μέθοδο. Η εκτίμηση του χρόνου έκλουσης για τις ενώσεις που παρουσίασαν δυσκολίες βασίστηκε τόσο σε βιβλιογραφικές πηγές όσο και σε αρχειακά δεδομένα του εργαστηρίου, όπου οι συγκεκριμένες ουσίες είχαν προηγουμένως αναλυθεί μεμονωμένα στην πρότυπη μορφή τους. Με τον τρόπο αυτό δημιουργήθηκε μία βιβλιοθήκη αναφοράς, η οποία παρείχε χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με τα χαρακτηριστικά και τα πιθανά προβλήματα κατά την ανάλυσή τους.

Έχοντας πλέον πλήρη εικόνα των κρίσιμων περιπτώσεων, όπως ενώσεις με παρόμοιο m/z ή μερική αλληλοεπικάλυψη κορυφών, κατέστη δυνατό να αναπτυχθεί μία πιο εξειδικευμένη και βελτιστοποιημένη μέθοδος. Η μέθοδος αυτή διασφάλιζε τον αξιόπιστο διαχωρισμό κάθε ουσίας, επιτρέποντας αρχικά την ταυτοποίηση (qualification) και, όπου ήταν αναγκαίο, την ποσοτικοποίηση (quantification).

7.4 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΗΣ ΚΑΤΑΚΕΡΜΑΤΙΣΗΣ ΤΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΤΗ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ.

7.4.1 Στόχοι και κριτήρια αξιολόγησης της μεθόδου.

Η βελτιστοποίηση της διαδικασίας κατακερμάτισης στη φασματομετρία μάζας με τη χρήση MS/MS σε συνδυασμό με αναλυτή μαζών τύπου Orbitrap, αποτέλεσε κρίσιμο στάδιο για την ενίσχυση της αξιοπιστίας της επιβεβαιωτικής μεθόδου. Η προσεκτική ρύθμιση παραμέτρων κατακερμάτισης επέτρεψε την απόκτηση φασμάτων υψηλής διακριτικής ικανότητας και αναπαραγωγιμότητας, τα οποία παρείχαν αδιαμφισβήτητα στοιχεία για την ταυτοποίηση των ουσιών – στόχων. Με τον τρόπο αυτό, εξασφαλίστηκε ότι τα δεδομένα της ανάλυσης ήταν σαφή, τεκμηριωμένα και επαρκή για να υποστηρίξουν την εγκυρότητα των αποτελεσμάτων. Η αξιοπιστία της επιβεβαίωσης οφείλεται κυρίως στην υψηλή διακριτική ικανότητα και στην εξαιρετική ακρίβεια μαζών, τα οποία παρέχει η τεχνολογία αυτή. Τα χαρακτηριστικά αυτά επιτρέπουν τον διαχωρισμό ιόντων με παρόμοιες μάζες, την αποφυγή ψευδώς θετικών ταυτοποιήσεων και την εξασφάλιση αδιαμφισβήτητων αποτελεσμάτων, έτσι ώστε κάθε ουσία – στόχος να μπορεί να ταυτοποιηθεί με σαφήνεια. Οι στόχοι της βελτιστοποίησης της μεθόδου ήταν συγκεκριμένοι και αφορούσαν τέσσερα βασικά επίπεδα:

Καθορισμός χαρακτηριστικών θραυσμάτων: Για κάθε ουσία – στόχο επιδιώχθηκε η εύρεση τουλάχιστον τριών χαρακτηριστικών θραυσμάτων, τα οποία να ανιχνεύονται σταθερά σε κάθε ανάλυση. Αν και η σχετική ένταση (intensity) των θραυσμάτων αυτών μεταβάλλεται εντός ενός εύρους, η παρουσία τους αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την ακριβή και επαναλήψιμη ταυτοποίηση. Εντοπισμός βέλτιστης ενέργειας κατακερμάτισης (Best Collision Energy – CE): Μέσα από μια σειρά δοκιμών αναζητήθηκε η τιμή ενέργειας κατακερματισμού για κάθε ουσία – στόχο που εξασφαλίζει τον σχηματισμό των τριών χαρακτηριστικών θραυσμάτων σε ικανοποιητική ένταση, χωρίς όμως να προκαλείται πλήρης αποδόμηση του μητρικού ιόντος (precursor ion). Σκοπός ήταν η ισορροπία μεταξύ επαρκούς κατακερματισμού και διατήρηση του μητρικού ιόντος σε χαμηλά επίπεδα στο φασματογράφημα μάζας, ώστε να υπάρχει ολοκληρωμένη εικόνα του μοριακού προφίλ.

Αξιολόγηση σε διαφορετικά επίπεδα συγκέντρωσης: Η συμπεριφορά των χαρακτηριστικών θραυσμάτων και του μητρικού ιόντος εξετάστηκε σε δείγματα ούρων με διαφορετικές συγκεντρώσεις ουσίας – στόχου (10%, 25%, 50%, 75% και 100% του MRPL). Με την τακτική αυτή αξιολογήθηκε η αξιοπιστία της μεθόδου σε

ευρύ φάσμα ποσοτήτων, ώστε να διασφαλιστεί η ταυτοποίηση ακόμη και σε περιπτώσεις όπου η πραγματική συγκέντρωση της ουσίας – στόχου στο βιολογικό δείγμα δεν είναι εξ αρχής γνωστή στην ανάλυση. Αυτό βοηθά στην διασφάλιση ότι τα φασματομετρικά χαρακτηριστικά παραμένουν αναλλοίωτα και δεν επηρεάζονται από παρεμβολές.

Η συστηματική αυτή προσέγγιση στη βελτιστοποίηση επέτρεψε την ανάπτυξη μιας μεθόδου, η οποία παρέχει αξιόπιστα, αναπαραγώγιμα και επιστημονικά τεκμηριωμένα αποτελέσματα, ακόμη και σε σύνθετα βιολογικά υποστρώματα.

7.4.2 Διαδικασία ανάπτυξης και βελτιστοποίησης της μεθόδου.

Παράλληλα με την ανάπτυξη της χρωματογραφικής μεθόδου, πραγματοποιήθηκε η αξιολόγηση της κατακερμάτισης των ουσιών – στόχων με τη χρήση φασματομέτρου μάζας τύπου Orbitrap. Η διαδικασία περιλάμβανε την εφαρμογή πολλαπλών τιμών ενέργειας (Collision Energy, CE) κατά την ανάπτυξη της μεθόδου φασματομετρίας μάζας. Συγκεκριμένα, για κάθε ουσία – στόχο εφαρμόστηκαν τέσσερις δοκιμαστικές τιμές CE (25, 35, 45 και 55 eV), ώστε να προκληθεί ο κατακερματισμός της και να αξιολογηθεί το φάσμα μάζας (MS/MS spectrum), το οποίο παρήγαγε σε κάθε περίπτωση. Με τον τρόπο αυτό, κατέστη δυνατός ο εντοπισμός της ενέργειας που προσέφερε τα πιο ικανοποιητικά αποτελέσματα.

Μετά την ανάλυση των δειγμάτων με την παράλληλη δοκιμαστική χρωματογραφία, δημιουργήθηκε μια λίστα συμπερίληψης (Inclusion list), για τη φασματομετρία μάζας, με σκοπό τον στοχευμένο έλεγχο των επιλεγμένων πρόδρομων ιόντων. Η επεξεργασία των δεδομένων πραγματοποιήθηκε στο λογισμικό Freestyle, όπου υπήρχαν προκαθορισμένα templates για κάθε κατηγορία ουσιών, ταξινομημένων σε αυξανόμενο χρόνο έκλυσης. Εστιάζοντας σε κάθε κορυφή του χρωματογραφήματος, το λογισμικό παρείχε τη δυνατότητα εμφάνισης του αντίστοιχου φασματογραφήματος (Spectra view) για κάθε ουσία και για κάθε τιμή ενέργειας κατακερμάτισης.

Στα φασματογραφήματα αυτά αξιολογήθηκε η παρουσία και η ένταση των θραυσμάτων, καθώς και η υπολειπόμενη ένταση του μητρικού ιόντος. Κριτήριο επιλογής της βέλτιστης ενέργειας (Best CE) αποτέλεσε η εμφάνιση τριών τουλάχιστον θραυσμάτων ικανοποιητικής έντασης, σε συνδυασμό με την ανίχνευση του μητρικού ιόντος σε χαμηλά επίπεδα. Ανάλογα με την τιμή CE, το μητρικό ιόν κατακερματιζόταν σε διαφορετικό βαθμό: σε χαμηλές τιμές (π.χ. 25 eV) συχνά υπερίσχυε το σήμα του μητρικού ιόντος, ενώ σε υψηλότερες (π.χ. 55 eV) το μητρικό ιόν υπέστη πλήρη

αποδόμηση και τα θραύσματα εμφανίζονταν με πολύ μεγάλη ένταση. Η αύξηση της ενέργειας γενικά οδήγησε σε αυξημένο βαθμό κατακερματισμού, ωστόσο η ιδανική τιμή διέφερε ανάλογα με τη χημική δομή κάθε ουσίας – στόχου.

Σε πολλές περιπτώσεις, τα θραύσματα που εμφανίζονται σε χαμηλότερες τιμές CE, σε σχέση με την Best CE, δεν ήταν επαρκή ή απουσίαζαν εντελώς, καθώς η ενέργεια δεν επαρκούσε για την αποδόμηση του μητρικού ιόντος. Αντίθετα, τα θραύσματα σε υψηλότερες τιμές CE, σε σχέση με την Best CE, εμφανίζονταν με μεγάλη ένταση και πλήρη κατακερματισμό του μητρικού ιόντος με αποτέλεσμα να μην υπάρχει στο φάσμα. Αυτό συνέβαινε, διότι για ορισμένες ουσίες, οι αρχικές δοκιμές με τις τέσσερις προκαθορισμένες τιμές CE οδήγησαν άμεσα στην επιλογή του Best CE, ενώ σε άλλες δεν προέκυψαν ικανοποιητικά αποτελέσματα και κρίθηκε αναγκαία ή δοκιμή επιπλέον τιμών. Έτσι, ανάλογα με τα φάσματα που προέκυπταν, δοκιμάστηκαν ενδιάμεσες τιμές (π.χ. 30 ή 40 eV) ή ακραίες (10, 15 ή 60, 65 eV).

Με τον τρόπο αυτόν, διασφαλίστηκε ότι για κάθε ουσία – στόχο επιλέχθηκε η ενέργεια κατακερμάτισης που παρείχε σαφή και αναπαραγώγιμα θραύσματα, ικανά να στηρίζουν την αξιόπιστη ταυτοποίηση της ουσίας σε επόμενες αναλύσεις. Η διαδικασία αυτή αποτέλεσε τη χρωματογραφική ανάλυση με τη λεπτομερή φασματομετρική αξιολόγηση.

7.4.3 Απόδοση του Best Collision Energy (Best CE)

Το Best Collision Energy (Best CE) ορίστηκε, ως η τιμή της ενέργειας σύγκρουσης στην οποία το μητρικό ιόν της ουσίας – στόχου κατακερματίζεται με τρόπο που εξασφαλίζει την εμφάνιση τουλάχιστον τριών χαρακτηριστικών θραυσμάτων υψηλής έντασης, ενώ παράλληλα διατηρείται ανιχνεύσιμο σε χαμηλά επίπεδα και το μητρικό ιόν. Η τιμή αυτή επιλέγεται έπειτα από εκτενή συγκριτική αξιολόγηση φασμάτων που προκύπτουν σε διαφορετικές τιμές CE και αποτελεί κρίσιμη παράμετρο για την αξιόπιστη και αναπαραγώγιμη ταυτοποίηση της ουσίας σε βιολογικά δείγματα.

7.5 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΚΑΤΟΠΙΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΒΕΛΤΙΣΤΗΣ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ ΣΥΓΚΡΟΥΣΗΣ (COLLISION ENERGY).

7.5.1 Βελτιστοποίηση Χρωματογραφίας.

Η χρωματογραφική ανάπτυξη, περιείχε διαδοχικές αναλύσεις (runs), όπου ύστερα από κάθε εκτέλεση γινόταν αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και επανασχεδιασμός του

προγράμματος έκλυσης (gradient) αν τα αποτελέσματα δεν ήταν ικανοποιητικά. Κάθε επόμενη ανάλυση στηριζόταν στην προηγούμενη, με συνεχή διαδικασία αντιμετώπισης κοινών χρωματογραφικών προβλημάτων (troubleshooting). Συχνά, η μη σωστή έκλυση των ουσιών – στόχων ή η εμφάνιση αλληλοεπικαλύψεων απαιτούσε αλλαγές στην αναλογία διαλυτών (gradient), προσαρμογές στη κλίση του ή στη χρονική διάρκεια της χρωματογραφικής ανάλυσης (βλ. Ενότητα 7.3). Οι διάφορες χρωματογραφικές μέθοδοι που δοκιμάστηκαν για την κατηγορία S7: Ναρκωτικά και S5 Διουρητικά και παράγοντες απόκρυψης παρατίθενται στο Παράρτημα Β (B1: Για την κατηγορία S7 Ναρκωτικά και B2: Για την κατηγορία S5 Διουρητικά και Παράγοντες απόκρυψης).

7.5.2 Βελτιστοποίηση Φασματομετρίας μάζας.

Ταυτόχρονα με την ανάπτυξη της χρωματογραφίας, πραγματοποιήθηκε και η βελτιστοποίηση της φασματομετρικής ανάλυσης μάζας. Εξετάστηκαν πολλαπλές τιμές ενέργειας σύγκρουσης (Collision Energy, CE) για τον καθορισμό της ενέργειας βέλτιστου κατακερματισμού των ουσιών – στόχων και την επιλογή των πιο χαρακτηριστικών θραυσμάτων (fragments) για κάθε ουσία. Οι δοκιμές διεξάγονταν με πολυσυστατικά διαλύματα πρότυπων ουσιών και η ανάλυση συγχρονίζονταν με τη χρωματογραφική ανάπτυξη, ώστε οι δύο διαδικασίες να εξελίσσονται παράλληλα (βλ. ενότητα 7.4). Τα φάσματα μάζας για κάθε ένωση στη βέλτιστη ενέργεια κατακερμάτισης περιλαμβάνονται στο Παράρτημα Γ (Γ1: Για την κατηγορία S7 Ναρκωτικά και Γ2: Για την κατηγορία S5 Διουρητικά και Παράγοντες απόκρυψης).

7.5.3 Εφαρμογή στο βιολογικό υπόστρωμα.

Με την ολοκλήρωση της βελτιστοποίησης της χρωματογραφικής μεθόδου (gradients διαλυτών κινητής φάσης και χρόνος χρωματογραφικής ανάλυσης) και της φασματομετρίας μάζας (ορισμός της Best CE, και χαρακτηριστικών θραυσμάτων για κάθε ουσία – στόχο), έγινε δοκιμή εφαρμογής των πολυσυστατικών διαλυμάτων πρότυπων ουσιών σε βιολογικά υποστρώματα, πιο συγκεκριμένα σε ούρα. Τα καθαρά δείγματα ούρων εμπλουτίστηκαν (spiking) με πολυσυστατικά διαλύματα πρότυπων ουσιών για κάθε κατηγορία που εξετάζουμε στην παρούσα εργασία, υπέστησαν χημική επεξεργασία και εξετάστηκαν σε δύο μορφές: (α) χωρίς υδρόλυση και με (β) υδρόλυση. (βλ. Ενότητα 6.3)

Ύστερα από μια σειρά αναλύσεων και αξιολογήσεων, η υδρόλυση αναδείχθηκε καταλληλότερη παρασκευαστική διαδικασία, καθώς:

- Ένα μεγάλο ποσοστό ουσιών αποβάλλεται με τη μορφή συζευγμένων μεταβολιτών (π.χ. γλυκουρονίδια, θειικά παράγωγα). Η υδρόλυση μετατρέπει αυτές τις μορφές σε ελεύθερες, αυξάνοντας την ανιχνεύσιμη ποσότητα και περιορίζοντας τον κίνδυνο ψευδώς αρνητικών σημάτων.
- Αντί να παρακολουθούνται πολλαπλές συζευγμένες μορφές, γίνεται στόχος η ίδια ελεύθερη χημική ένωση, η οποία παρέχει σταθερά θραύσματα (fragments) και αναλογίες ιόντων, βελτιώνοντας την αξιοπιστία της επιβεβαίωσης.
- Πολλά γλυκουρονίδια και θειικά παράγωγα ιονίζονται δυσκολότερα ή δίνουν ασταθή κατακερματισμό, οπότε η ελεύθερη μορφή μιας ουσίας προσφέρει υψηλότερη και πιο επαναλήψιμη ένταση σήματος.

Τα ζεύγη δειγμάτων με και χωρίς υδρόλυση έδειξαν συστηματικά μεγαλύτερη απόκριση στην ελεύθερη μορφή τους καθώς και καθαρότερες χρωματογραφικές κορυφές. Βέβαια υπήρξαν και επιπλοκές, όπως κάποιο καταγεγραμμένο θραύσμα μιας ουσίας να εξαφανιζόταν μετά την υδρόλυση ή η κορυφή της ένωσης αυτής να μετατοπιζόταν και να εμφανιζόταν σε μη αναμενόμενο χρόνο έκλουσης. Σε αυτές τις περιπτώσεις επαναλαμβάνονταν οι διαδικασίες των ενότητων 7.3 και 7.4 αλλά στα δείγματα που ήταν εφαρμοσμένα σε βιολογικά υποστρώματα. Έτσι γινόταν εύρεση νέων θραυσμάτων που εξακριβωνόταν ότι θα αποτελούσαν αποτύπωμα της ένωσης και διευρυνόταν το αναμενόμενο παράθυρο χρόνου έκλουσης της ένωσης, αντίστοιχα. Τέλος, για την αποφυγή απωλειών ή αλλοίωσης του δείγματος εφαρμόστηκαν επιπλέον δικλίδες ασφαλείας:

- Προσθήκη ισοτοπικών προτύπων πριν από την υδρόλυση για έλεγχο ανάκτησης, και
- Επαλήθευση με δείγματα ελέγχου (recovery controls) για επιβεβαίωση της απόδοσης υδρόλυσης.

Με βάση όλα τα παραπάνω, η υδρόλυση επιλέχθηκε ως βασικό βήμα παρασκευής, καθώς προσφέρει σαφή πλεονεκτήματα, όπως την ενοποίηση του προφίλ απέκκρισης, την μείωση κινδύνου ψευδώς αρνητικών σημάτων και την ενίσχυση της αξιοπιστίας της LC – MS/MS ανάλυσης σε πραγματικά βιολογικά δείγματα.

7.5.4. Αντιμετώπιση προβλημάτων και αξιοπιστία του οργάνου (Troubleshooting).

Στην ανάπτυξη της μεθόδου, η διαδικασία αντιμετώπισης καθημερινών προβλημάτων (troubleshooting) αποτέλεσε θεμελιώδες στοιχείο της ανάπτυξης, τόσο σε επίπεδο δείγματος όσο και σε επίπεδο αναλυτικού οργάνου. Σχετικά με τα δείγματα, συχνά παρατηρήθηκαν αποκλίσεις, οι οποίες απαιτούσαν διερεύνηση. Σε ορισμένες περιπτώσεις η απουσία ανίχνευσης μιας ουσίας – στόχου υποδείκνυε πιθανά σφάλματα στο στάδιο της παρασκευής, όπως λανθασμένη υδρόλυση, ατελή εμπλουτισμός (spiking) ή σφάλματα στους υπολογισμούς ποσοτήτων. Επιπλέον, υπήρξαν περιπτώσεις όπου ενώσεις με παρόμοιο ή ίδιο λόγο μάζας προς φορτίο (m/z) διαχωρίζονταν στο σύστημα χρωματογραφίας (LC) και εμφανίζονταν η κάθε μια στο δικό της χρονικό παράθυρο. Επομένως στην αναζήτηση συγκεκριμένων λόγων μάζας προς φορτίο λαμβανόταν ένας όγκος διαφορετικών πληροφοριών που απαιτούσαν διερεύνηση. Ευτυχώς, η επιτυχής χρωματογραφική διακριτότητα, σε συνδυασμό με την επιβεβαίωση μέσω των χαρακτηριστικών θραυσμάτων στο φασματομέτρο μάζας, επέτρεψε τον διαχωρισμό τους, την ασφαλή ταυτοποίηση των ενώσεων – στόχων, και την αποφυγή ψευδών αποτελεσμάτων.

Σε τεχνικό επίπεδο, προέκυψαν συχνά φαινόμενα μειωμένης έντασης ή απώλειας θραυσμάτων, τα οποία συχνότερα αποδίδονταν σε υπερφόρτωση του φασματομέτρου μάζας σε κάποια συγκεκριμένα χρονικά παράθυρα. Επίσης πολλές, φορές οι χρωματογραφικές κορυφές δεν πληρούσαν τις απαραίτητες προδιαγραφές όπως διακριτική ικανότητα, οξύτητα κορυφών, εμφάνιζαν tailing factor και ορισμένες φορές δεν εμφανίζονταν καθόλου. Εφόσον επιβεβαιωνόταν πως η παρασκευή και ανάλυση των δειγμάτων δεν ευθύνονταν για τα παραπάνω φαινόμενα, αυτά έπρεπε να αντιμετωπιστούν διαφορετικά. Για την αντιμετώπιση τέτοιων προβλημάτων εφαρμόστηκαν στοχευμένες διαδικασίες αντιμετώπισης προβλημάτων (instrumental troubleshooting), οι οποίες περιλάμβαναν:

- Έλεγχος της ποιότητας, και σωστής αναλογίας των διαλυτών,
- Επιθεώρηση και καθαρισμός της χρωματογραφικής στήλης,
- Παρακολούθηση και καταγραφή των τιμών πίεσης και θερμοκρασίας του συστήματος,
- Έλεγχος για παρουσία αέρα ή φυσαλίδων στο κύκλωμα της χρωματογραφίας,
- Διασφάλιση της ορθής λειτουργίας των τριχοειδών σωλήνων που συνδέουν το σύστημα της χρωματογραφίας (LC) με αυτό της φασματομετρίας μάζας (MS).

Οι διαδικασίες αυτές συνοδεύονταν από σχολαστική και καθημερινή βαθμονόμηση (calibration) του αναλυτικού συστήματος, απομάκρυνση αερίων και ρύπων (purge), προσεκτική και ακριβή προετοιμασία των διαλυτών, καθώς και χρήση εσωτερικού ελέγχου καταλληλότητας συστήματος (in – house system suitability test) πριν από την έναρξη των αναλύσεων κάθε ημέρα.

Η συνεχής εφαρμογή αυτών των διαδικασιών για την αντιμετώπιση προβλημάτων (troubleshooting), τόσο σε επίπεδο προετοιμασίας δειγμάτων όσο και στο όργανο, αποδείχθηκε κρίσιμη για την επιτυχή ανάπτυξη της μεθόδου. Με αυτόν τον τρόπο διασφαλίστηκε όχι μόνο η αξιοπιστία και η επαναληψιμότητα της ανάλυσης, αλλά και η δημιουργία σαφών δεικτών που επιτρέπουν την άμεση αναγνώριση και διόρθωση πιθανών σφαλμάτων. 7.5.5. Σύνοψη ανάπτυξης μεθόδου.

Η ανάπτυξη της μεθόδου κυρίως βασίστηκε στη συνδυασμένη βελτιστοποίηση των χρωματογραφικών συνθηκών και των παραμέτρων του φασματομέτρου μάζας, με συνεχή διαδικασία επίλυσης προβλημάτων (troubleshooting) τόσο στο στάδιο των προτύπων όσο και κατά την εφαρμογή σε βιολογικό υπόστρωμα. Η επιλογή υδρόλυσης ως παρασκευαστική διαδικασία και οι απαραίτητες προσαρμογές στις παραμέτρους LC – MS/MS οδήγησαν σε μια ολοκληρωμένη και αξιόπιστη μεθοδολογία, κατάλληλη για την ανίχνευση και ταυτοποίηση των ουσιών – στόχων σε δείγματα ούρων.

7.6 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΚΑΤΑΓΡΑΦΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ.

Η διαδικασία καταγραφής και αναφοράς της μεθόδου πραγματοποιήθηκε μέσω του λογισμικού TraceFinder, σε συνδυασμό με το περιβάλλον του λογισμικού Xcalibur (Thermo Scientific), με στόχο τη δημιουργία μιας ολοκληρωμένης και τεκμηριωμένης βάσης δεδομένων για την ανάλυση της κατηγορίας S7 Ναρκωτικά και S5 Διουρητικά και Παράγοντες απόκρυψης. Η χρήση εξειδικευμένων λογισμικών είναι κρίσιμη, καθώς δεν περιορίζεται απλώς στη συλλογή δεδομένων, αλλά δίνει την δυνατότητα της συστηματικής τεκμηρίωσης όλων των παραμέτρων που καθορίζουν την ταυτοποίηση μιας ουσίας, όπως:

- Τον χρόνο κατακράτησης (R/T)
- Τον λόγο μάζας προς φορτίο (m/z) και
- Τα χαρακτηριστικά θραύσματα (fragment ions).

Η καταγραφή και αποθήκευση αυτών των παραμέτρων αποτελεί σημαντική προϋπόθεση για την αναπαραγωγιμότητα της ανάλυσης και τη διασφάλιση της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων, τόσο σε διαλύματα πρότυπων ουσιών όσο και σε δοκιμές βιολογικών δειγμάτων.

Το εναρκτήριο στάδιο είναι η ανάπτυξη της μεθόδου (method development), κατά το οποίο εισάγονται οι ουσίες – στόχοι και ορίζονται τα χαρακτηριστικά τους. Για κάθε ουσία καταχωρείται το όνομα, ο προκαθορισμένος χρόνος κατακράτησης (RT expected), ο οποίος προκύπτει από τη μέτρηση διαλυμάτων πρότυπων ουσιών, καθώς και η μάζα του ιόντος της μητρικής ένωσης (m/z). Στη συνέχεια, καταχωρούνται τα επιλεγμένα θραύσματα που προκύπτουν από τη διάσπαση της ένωσης και συλλέχθηκαν από το φάσμα μάζας στην κατάλληλη ενέργεια διάσπασης (Best CE). Η ύπαρξη επιβεβαιωτικών θραυσμάτων είναι ένα απαραίτητο στοιχείο, διότι λειτουργεί ως παράμετρος ταυτοποίησης, μειώνοντας τον κίνδυνο ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων λόγω ισοβαρών ουσιών ή παρεμβολών. Καταληκτικά, δημιουργείται μια ηλεκτρονική «βιβλιοθήκη» των ουσιών – στόχων, που περιλαμβάνει τα μητρικά ιόντα και τα χαρακτηριστικά θραύσματα, η οποία χρησιμοποιείται ως σημείο αναφοράς για την ανάπτυξη της μεθόδου και την ανάλυση πραγματικών δειγμάτων στο μέλλον.

Στην ανάλυση των πολυσυστατικών διαλυμάτων πρότυπων ουσιών, οι τιμές του χρόνου κατακράτησης (RT) και της μάζας του ιόντος της μητρικής ένωσης (m/z), καταγράφονται και συγκρίνονται με τις θεωρητικές τιμές ή τις τιμές που είχαν καταγραφεί την τελευταία φορά και, όπου απαιτείται, εφαρμόζονται διορθώσεις. Η συνεχής αυτή αναπροσαρμογή είναι απαραίτητη, καθώς ο χρόνος κατακράτησης ενδέχεται να παρουσιάζει μικρές μεταβολές εξαιτίας αλλαγών στις πειραματικές συνθήκες, όπως για παράδειγμα οι συνθήκες της κινητής φάσης. Επιπλέον, ελέγχεται και η αναλογία της έντασης των θραυσμάτων ως προς το μητρικό ιόν, ώστε να διασφαλίζεται ότι η ταυτοποίηση βασίζεται σε σταθερά και επαναλήψιμα κριτήρια.

Με την ίδια μεθοδολογία αναλύονται και τα βιολογικά δείγματα που έχουν εμπλουτιστεί με τα πολυσυστατικά δείγματα των πρότυπων ουσιών, στα οποία η αναγνώριση των ουσιών βασίζεται στη συμφωνία των παραμέτρων με αυτές που έχουν καταγραφεί στα πρότυπα. Η διαδικασία αυτή διασφαλίζει ότι η ταυτοποίηση είναι αξιόπιστη, δεδομένου ότι στηρίζεται σε αντικειμενικά κριτήρια (RT, m/z , fragments) και όχι σε τυχαία ευρήματα. Επιπρόσθετα, η ενσωμάτωση δειγμάτων ποιότητας (QC) και τυφλών δειγμάτων στις ακολουθίες δειγμάτων λειτουργεί ως έλεγχος για πιθανές επιμολύνσεις ή σφάλματα στην ανάλυση.

Τέλος, όλα τα δεδομένα αρχειοθετούνται σε προκαθορισμένους φακέλους έργου (project folders), ώστε να εξασφαλίζεται η πλήρης ιχνηλασιμότητα και η οργάνωση της μεθόδου. Η πραγματοποίηση ελέγχων καταλληλότητας συστήματος (system suitability tests) στην αρχή κάθε ακολουθίας δειγμάτων επιβεβαιώνει ότι το σύστημα λειτουργεί

εντός αποδεκτών ορίων πριν την ανάλυση των δειγμάτων. Με αυτόν τον τρόπο, η διαδικασία καταγραφής και αναφοράς δεν αποτελεί απλώς τεχνικό στάδιο, αλλά θεμελιώδες στοιχείο για την εγκυρότητα, την επαναληψιμότητα και την αξιοπιστία της μεθόδου στο σύνολό της.

Στάδιο	Ενέργεια	Σκοπός
Method Development (για την δημιουργία Master Method)	Καταχώρηση targets (RT, m/z, fragments)	Δημιουργία βάσης δεδομένων
Calibration με πρότυπα	Επιβεβαίωση και διόρθωση RT	Ακρίβεια και αναπαραγωγικότητα
Ανάλυση δειγμάτων	Εφαρμογή καταγεγραμμένων παραμέτρων	Ταυτοποίηση ουσιών
Αναφορά (Reporting)	Αποθήκευση, εξαγωγή αναφορών	Ιχνηλασιμότητα, τεκμηρίωση

Πίνακας 2: Διαδοχικά στάδια της διαδικασίας καταγραφής και αναφοράς μεθόδου.

7.7 ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

7.7.1 Παρασκευή δειγμάτων για την επικύρωση της μεθόδου.

Η διαδικασία επικύρωσης μεθόδου ξεκίνησε με τον καθορισμό του MRPL για την κατηγορία απαγορευμένων ουσιών S5 Διουρητικά και Παράγοντες απόκρυψης, σύμφωνα με τις οδηγίες του WADA. Με βάση τις προδιαγραφές αυτές συντάχθηκε η παρασκευαστική μέθοδος, στηριζόμενη στον σκελετό μιας, SOP του Εργαστηρίου που αφορά την επικύρωση αναλυτικών μεθόδων. Η λεπτομερής περιγραφή της παρασκευαστικής διαδικασίας παρουσιάζεται στην ενότητα 6.4.4.

Η παρασκευαστική διαδικασία περιλάμβανε το στάδιο της ενζυμικής υδρόλυσης και η συνολική διάρκεια της ήταν περίπου 1-1,5 ημέρα. Στη συνέχεια, τα δείγματα που παρασκευάστηκαν αναλύθηκαν με τη βέλτιστη χρωματογραφική μέθοδο σε συνδυασμό με τη βέλτιστη μέθοδο φασματομετρίας μάζας. Ο συνολικός χρόνος ανάλυσης εξαρτήθηκε από τον αριθμό των δειγμάτων και τη διάρκεια της χρωματογραφικής μεθόδου, στη συγκεκριμένη περίπτωση η ανάλυση ολοκληρώθηκε σε διάστημα 1,5 ημέρας.

Για τον έλεγχο της επικύρωσης παρασκευάστηκαν τα ακόλουθα δείγματα, σύμφωνα με τις απαιτήσεις του WADA και τα διεθνή κριτήρια:

- Selectivity → Δείγματα ούρων (blank) από άνδρες και γυναίκες, στα οποία πραγματοποιήθηκε εμπλουτισμός (spiking) με τις υπό μελέτη ουσίες – στόχους, ώστε να εξεταστεί η δυνατότητα διάκρισης της ουσίας – στόχου από πιθανές παρεμβολές του υποστρώματος.
- Όρια ανίχνευσης (LOD) → σε διαφορετικά επίπεδα MRPL:
 - ο STD10: εμπλουτισμός 10% του MRPL
 - ο STD25: εμπλουτισμός 25% του MRPL
 - ο STD50: εμπλουτισμός 50% του MRPL
 - ο STD75: εμπλουτισμός 75% του MRPL

Αυτά τα δείγματα επιτρέπουν την αξιολόγηση της ευαισθησίας μεθόδου σε διαβαθμίσεις συγκέντρωσης, σύμφωνα με τα καθορισμένα επίπεδα του WADA.

- Αξιοπιστία Ανίχνευσης (Reliability of Detection): Δείγματα εμπλουτισμένα στο MRPL της κατηγορίας ουσιών S5, ή στο MRPL κάθε ουσίας, διότι μερικές ουσίες διαφέρουν ως προς το σύνολο, ώστε να αξιολογηθεί η ικανότητα της μεθόδου να ανιχνεύει αξιόπιστα την ουσία σε αυτό το κατώφλι.
- Carry – Over δείγμα: Δείγματα blank που αναλύονται αμέσως μετά από δείγματα υψηλής συγκέντρωσης, ώστε να ελεγχθεί πιθανή επιμόλυνση της χρωματογραφικής στήλης ή του συστήματος.
- Specificity (SP1): Δείγματα με στόχο την αξιολόγηση της ειδικότητας της μεθόδου, δηλαδή τη δυνατότητα να αναγνωρίζει μόνο την ουσία στόχο.
- Matrix Effect: Δείγματα εμπλουτισμένα με την συγκέντρωση του MRPL, τα οποία αξιοποιούνται για την αξιολόγηση πιθανών επιδράσεων της μήτρας (ούρα) στην ανάλυση.

Η επιλογή αυτών των δοκιμών αντισταθμίζει τις βασικές προϋποθέσεις, τις οποίες είναι ανάγκη να πληροί μια μέθοδος για να χαρακτηριστεί κατάλληλη σύμφωνα με τα διεθνή πρότυπα: ευαισθησία, αξιοπιστία, ειδικότητα, σταθερότητα και απουσία παρεμβολών.

7.7.2 Διαδικασία ανάλυσης – Ημέρα 1

Ύστερα από την παρασκευαστική διαδικασία των δειγμάτων, αυτά αναλύθηκαν με την υπό δοκιμή αναλυτική μέθοδο. Τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν με το λογισμικό TraceFinder, για το οποίο είχε δημιουργηθεί ειδικό φύλλο αναφοράς (report template),

που περιλάμβανε τα θραύσματα κάθε ένωσης και τα αντίστοιχα χρωματογραφικά στοιχεία. Ένα παράδειγμα αναφοράς για συγκεκριμένη ένωση παρατίθεται στο παράρτημα Δ.

Ακολούθως πραγματοποιήθηκε η ανάλυση δεδομένων της επικύρωσης για την πρώτη ημέρα. Τα αριθμητικά στοιχεία κάθε ένωσης και των θραυσμάτων της καταχωρίστηκαν σε ειδικά σχεδιασμένο αρχείο Excel (δημιουργία ενός αρχείου ανά ένωση – στόχο). Στα αρχεία Excel εισήχθηκαν οι τιμές RT και Area (AA) για κάθε θραύσμα και κάθε δείγμα. Με βάση τη δομή των υπολογιστικών φύλλων, η εισαγωγή των τιμών αυτών επέτρεπε την αυτόματη αξιολόγηση του κατά πόσο η ένωση περνά τα κριτήρια επικύρωσης. Έτσι πραγματοποιήθηκε η πρώτη εκτίμηση της απόδοσης της μεθόδου.

7.7.3 Διαδικασία Ανάλυσης – Ημέρα 2

Τη «δεύτερη ημέρα» ανάλυσης, ακολουθήθηκε ακριβώς η ίδια διαδικασία: Παρασκευή των δειγμάτων, ανάλυση με την ίδια μέθοδο, δημιουργία – εκτύπωση αναφοράς μέσω TraceFinder και συμπλήρωση των ίδιων φύλλων του προγράμματος Excel, όπου είχε συμπληρωθεί και η ημέρα 1.

Η στόχος της επανάληψης είναι η διασφάλιση αναπαραγωγιμότητας των αποτελεσμάτων και η σταθερότητα της μεθόδου σε διαφορετικές ημέρες.

Η τελική αξιολόγηση της επικύρωσης πραγματοποιήθηκε συνδυάζοντας τα δεδομένα των δύο ημερών. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέσος όρος των μετρήσεων, ώστε να ληφθούν υπόψη πιθανές μικροδιακυμάνσεις και να εξαχθεί μια συνολική εικόνα για την αξιοπιστία και την καταλληλότητα της μεθόδου.

7.8 ΑΝΑΦΟΡΑ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ – ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΑΠΟΔΟΧΗΣ ΒΑΣΕΙ ΤΟΥ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΟΥ ΑΡΧΕΙΟΥ (EXCEL) ΕΠΙΚΥΡΩΣΗΣ.

Η διαδικασία επικύρωσης της αναλυτικής μεθόδου που αναπτύχθηκε για την ανίχνευση των ουσιών της κατηγορίας S5, Διουρητικά και Παράγοντες απόκρυψης, πραγματοποιήθηκε μέσω επιπέδων ελέγχου. Τα επίπεδα αυτά, είναι ενσωματωμένα στο υπολογιστικό φύλλο excel υπό τον τίτλο: «Range of acceptance» και εφαρμόζονται αυτοματοποιημένα κατά την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

1. Ιοντικά κριτήρια (Ion Ratios/Relative Areas):

Η ταυτοποίηση της ουσίας – στόχου υποστηρίζεται από την παρακολούθηση της παραγωγής των χαρακτηριστικών θραυσμάτων για την κάθε ουσία – στόχο.

Για κάθε θραύσμα υπολογίζεται η σχετική επιφάνεια (Rel. AREA) σε σχέση με το μητρικό ιόν. Η αποδοχή βασίζεται στη σύγκριση με προκαθορισμένα όρια απόκλισης (Range of acceptance), τα οποία στο υπολογιστικό φύλλο Excel καθορίζονται ως εξής:

- ο Criterion 5% (absolute): αποδεκτή απόκλιση έως 5% σε απόλυτες τιμές.
- ο Criterion 10% (absolute): αποδεκτή απόκλιση έως 10% σε απόλυτες τιμές.
- ο Criterion 20% (relative): αποδεκτή απόκλιση έως 20% σε σχετικές τιμές.

2. Χρωματογραφικά κριτήρια (Retention Time/ Relative Retention Time):

Η χρωματογραφική αποδοχή βασίζεται στον χρόνο κατακράτησης (RT) και τον σχετικό χρόνο κατακράτησης (Relative Retention Time, RRT). Το υπολογιστικό φύλλο Excel συγκρίνει το RT του θραύσματος της ουσίας – στόχου με το RT του εσωτερικού προτύπου και υπολογίζει το RRT. Στη συνέχεια, η τιμή αντιπαραβάλλεται με το προκαθορισμένο εύρος αποδοχής, το οποίο ορίζεται ως Range of acceptance Chromatographic criteria. Εφόσον η διαφορά βρίσκεται εντός του επιτρεπτού παραθύρου, η χρωματογραφική συμπεριφορά της ουσίας – στόχου κρίνεται ικανοποιητική.

Συνολικά, μια ένωση θεωρείται επιτυχώς επικυρωμένη εφόσον πληροί ταυτόχρονα τα ιοντικά και τα χρωματογραφικά κριτήρια. Η μη συμμόρφωση σε οποιοδήποτε από τα παραπάνω οδηγεί σε απόρριψη της ένωσης για σκοπούς επιβεβαίωσης.

ΚΕΦ 8: ΔΟΚΙΜΑΣΤΙΚΗ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ON-LINE SPE ΓΙΑ ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΑΠΑΓΟΡΕΥΜΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ S3 BETA AGONISTS

8.1 ΣΤΟΧΟΙ ΤΩΝ ΔΟΚΙΜΩΝ

Η σύζευξη online στερεάς φάσης εκχύλισης (online-SPE) με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών υψηλής διακριτικής ικανότητας (LC-HRMS) αποτελεί μια από τις πλέον αποδοτικές τεχνικές για τον προσδιορισμό πολικών και βασικών οργανικών ενώσεων σε βιολογικές μήτρες, όπως τα ούρα. Σε αντίθεση με την παραδοσιακή offline SPE, όπου η εκχύλιση, η έκλουση και η ανάλυση αποτελούν διακριτά στάδια, η online διάταξη ενσωματώνει σε ένα πλήρως αυτοματοποιημένο σύστημα την προεκχύλιση, τον καθαρισμό της μήτρας και τον διαχωρισμό, μειώνοντας δραστικά τον χρόνο προετοιμασίας και την πιθανότητα σφαλμάτων.

Στην online-SPE, το δείγμα εγχέεται σε ένα μικρό φυσίγγιο (trap column), πολυμερικής αντίστροφης φάσης (Strata-X). Υπό υδατικές συνθήκες, οι στοχευμένες αναλυόμενες ουσίες προσροφώνται στην επιφάνεια του υλικού, ενώ τα υδατοδιαλυτά και μη δεσμευόμενα συστατικά της μήτρας απομακρύνονται προς τα απόβλητα. Το φυσίγγιο στη συνέχεια τίθεται “σε σειρά” με την αναλυτική στήλη μέσω βαλβίδας μεταγωγής, επιτρέποντας την back-flush έκλουση των αναλυτών απευθείας προς το σύστημα LC, χωρίς ενδιάμεση συλλογή ή χειροκίνητη μεταφορά του εκχυλίσματος.

Η προσέγγιση αυτή προσφέρει πολλαπλά πλεονεκτήματα:

- Αυτοματισμός και επαναληψιμότητα: Ελαχιστοποιούνται οι χειρισμοί του δείγματος, βελτιώνοντας τη μεταξύ-δειγμάτων ακρίβεια.
- Ελαχιστοποίηση απωλειών και επιμόλυνσης: Δεν απαιτείται μεταφορά του εκχυλίσματος, περιορίζοντας τον κίνδυνο carry-over ή απώλειας αναλυόμενης ουσίας.
- Μικρότερος χρόνος και κόστος ανά δείγμα: Ο συνολικός κύκλος (φόρτωση–έκλουση–επαναϊσορρόπηση) ολοκληρώνεται σε 10–15 λεπτά, επιτρέποντας υψηλό ρυθμό διεκπεραίωσης.

- Συμβατότητα με HRMS: Η απευθείας μεταγωγή στην αναλυτική στήλη επιτρέπει καλύτερη ευθυγράμμιση χρόνου ανάλυσης και σταθερότερη ευαισθησία στην πηγή ESI(+).

Ωστόσο, υπάρχουν και ορισμένοι περιορισμοί:

- Το φυσίγγιο έχει περιορισμένη χωρητικότητα, επομένως απαιτείται προσεκτική επιλογή συνθηκών φόρτωσης για να αποφευχθεί υπερφόρτωση (breakthrough)
- Οι πολύπλοκες μήτρες μπορεί να προκαλέσουν συσσώρευση ρύπων στην παγίδα, μειώνοντας τη διάρκεια ζωής της.
- Η βελτιστοποίηση των χρονισμών (φορτίο, χρόνος μεταγωγής, βαθμίδωση) είναι κρίσιμη για πλήρη ανάκτηση και σταθερή αναπαραγωγιμότητα.

Το σημείο καινοτομίας της παρούσας προσέγγισης έγκειται:

- στη χρήση ίδιου τροποποιητή (π.χ. μυρμηκικό οξύ ή μυρμηκικό αμμώνιο) και στις δύο φάσεις (Α και Β), ώστε να διατηρούνται σταθερά το pH και η ιοντική ισχύς καθ' όλη τη διάρκεια της βαθμίδωσης,
- στην επιλογή πολύ χαμηλών αρχικών ποσοστών οργανικού διαλύτη ($\leq 5\text{--}10\%$ Β) κατά τη φόρτωση και την έναρξη του διαχωρισμού, επιτρέποντας την περαιτέρω κατακράτηση των πολικών β2-αγωνιστών και αιχμές υψηλής συμμετρίας, και
- στην πλήρη τεκμηρίωση των παραμέτρων του run (χρονοί μεταγωγής, ποσοστά φάσης Β, παροχές και διάρκεια κύκλου), που εξασφαλίζει αναπαραγωγιμότητα και δυνατότητα μεταφοράς της μεθόδου.

8.2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Για τον προσδιορισμό των β2-αγωνιστών σε ούρα χρησιμοποιήθηκε σύστημα LC-HRMS εξοπλισμένο με διάταξη online-SPE και βαλβίδα μεταγωγής δύο θέσεων.

Οι κινητές φάσεις ήταν:

- Α: Υδατικό Διάλυμα μυρμηκικού οξέος 0,1% v/v ή υδατικό διάλυμα μυρμηκικού αμμωνίου 5 mM (pH ~3–4)
- Β: Αντίστοιχα διαλύματα μυρμηκικού οξέος/ μυρμηκικού αμμωνία με διαλύτη ακετονιτρίλιο ή μεθανόλη

- Το φυσίγγιο ήταν πολυμερικής αντίστροφης φάσης (π.χ. Oasis HLB ή Strata-X, 2,1×10 mm), σε back-flush διάταξη. Πριν από κάθε σειρά αναλύσεων, η κασέτα προεκλούστηκε με CAN και επανισορροπήθηκε με την κινητή φάση A. Η αναλυτική στήλη (C18, 2,1×100 mm) προϊσορροπήθηκε στις αρχικές συνθήκες της βαθμίδωσης.

Κάθε δείγμα ούρων ομογενοποιήθηκε, ενισχύθηκε με ισοτοπικά επισημασμένα εσωτερικά πρότυπα, αραιώθηκε με υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα και φυγοκεντρήθηκε. Η υπερκείμενη φάση τοποθετήθηκε στον αυτόματο δειγματολήπτη. Η φόρτωση στην παγίδα έγινε υπό υδατικές συνθήκες ($\leq 5-10\%$ B) με παροχή 0,5–1,0 mL/min για όγκο 200–800 μL .

Ακολούθησε σύντομη έκπλυση με φάση A ή χαμηλό ποσοστό B (έως 5–10%), ώστε να απομακρυνθούν ασθενώς δεσμευμένα συστατικά. Στη συνέχεια, η βαλβίδα μεταγωγής έθεσε την παγίδα «σε σειρά» με τη στήλη και ξεκίνησε η βαθμίδωση, με back-flush έκλυση των αναλυτών.

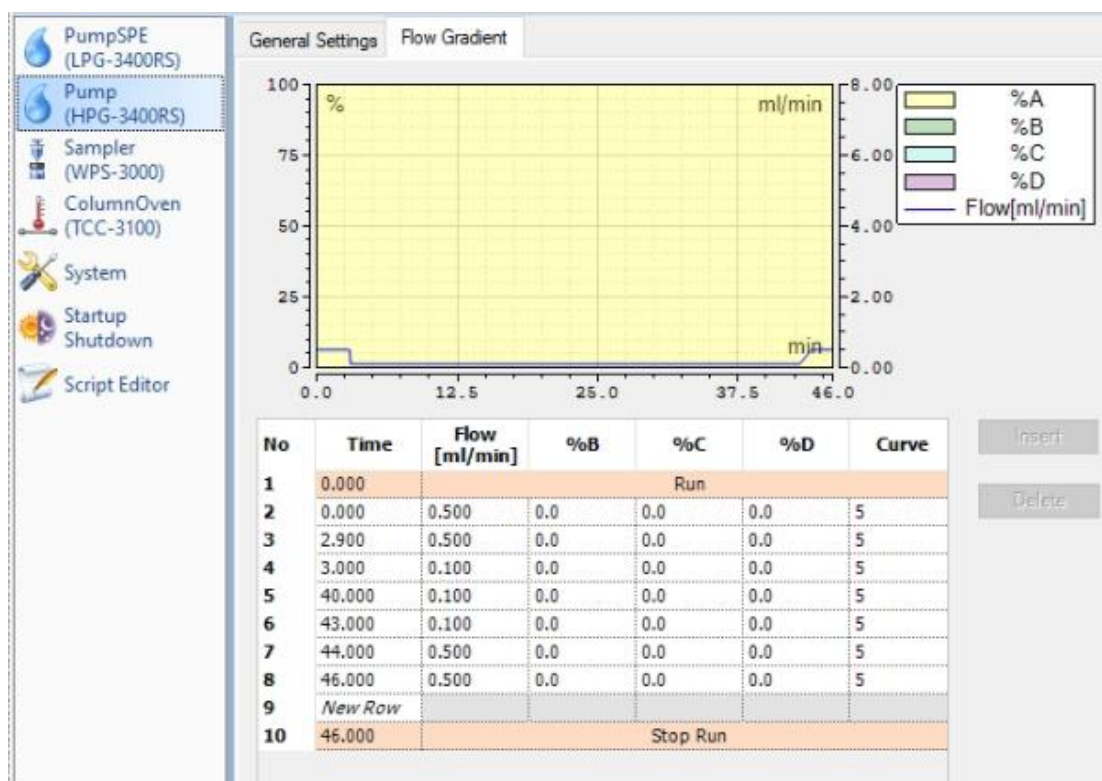
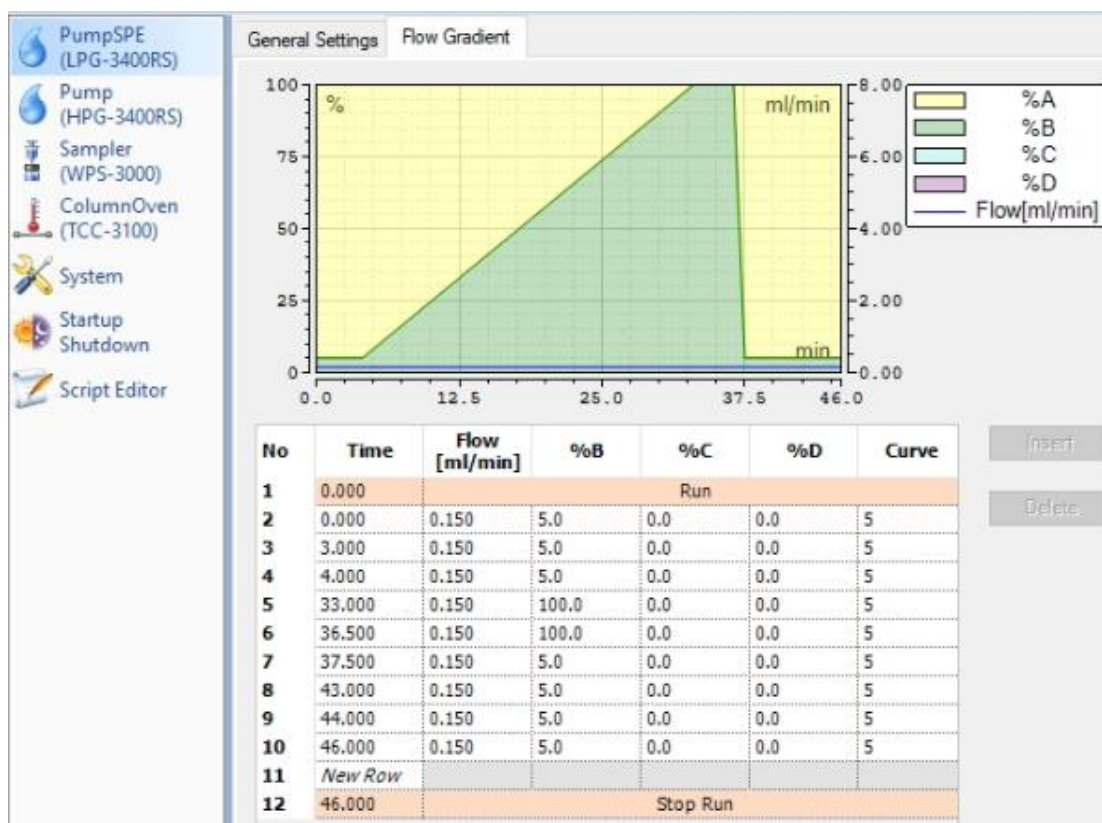
Το πρόγραμμα βαθμίδωσης περιγράφηκε ως ποσοστό της φάσης B έναντι του χρόνου (π.χ. 2% B αρχικά, γραμμική αύξηση έως 100%, έκπλυση στο 100% B και επαναϊσορρόπηση στο αρχικό ποσοστό). Για την αποφυγή μεταφοράς εφαρμόστηκε ενδιάμεση πλύση της βελόνας/βρόχου με οργανικό διαλύτη.

8.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

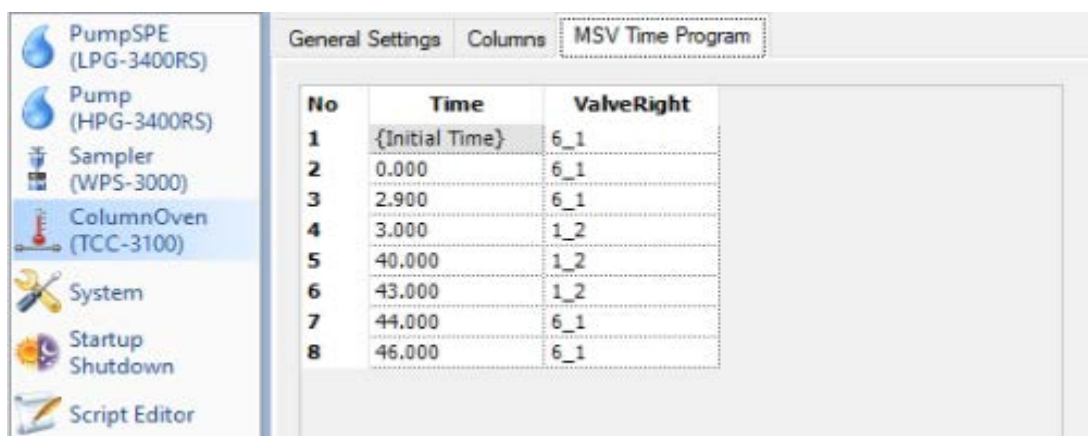
Η εφαρμογή της online-SPE/LC-HRMS διάταξης οδήγησε σε υψηλή αναπαραγωγιμότητα χρόνων κατακράτησης και βελτιωμένη ευαισθησία, λόγω της σταθερής ιοντικής ισχύος και του μειωμένου φαινομένου μήτρας. Οι β2-αγωνιστές ανιχνεύθηκαν με σαφείς, συμμετρικές αιχμές και σημαντική μείωση των παρεμβολών της μήτρας.

Στη συνέχεια παρατίθενται οι συνθήκες βαθμίδωσης του μείγματος αντλίας διαλυτών και οι μεταβολές που εφαρμόστηκαν για τη βελτιστοποίηση. Παρακάτω παρουσιάζονται τρεις χαρακτηριστικές περιπτώσεις: η αρχική μέθοδος, μια ενδιάμεση και αντιπροσωπευτική των περισσότερων δοκιμών, καθώς και η τελική μέθοδος, στην οποία καταλήξαμε μετά τη διαδικασία βελτιστοποίησης.

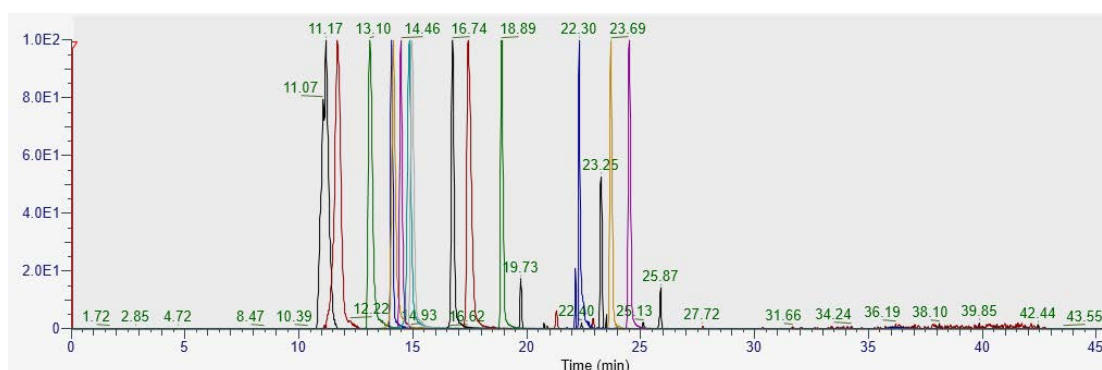
Αρχική μέθοδος δομικής (A):



Εικόνα 6 & 7: Πρόγραμμα βαθμίδωσης της αντλίας εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE)/ Πρόγραμμα βαθμίδωσης της αναλυτικής αντλίας. Αρχική μέθοδος δομικής (A).



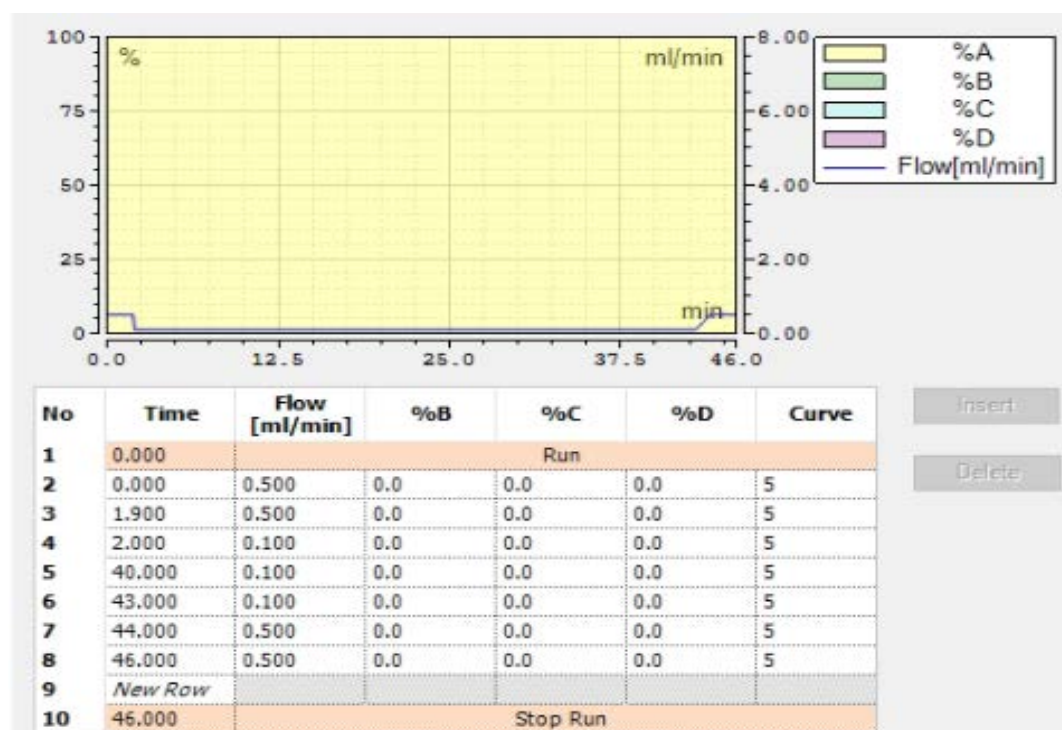
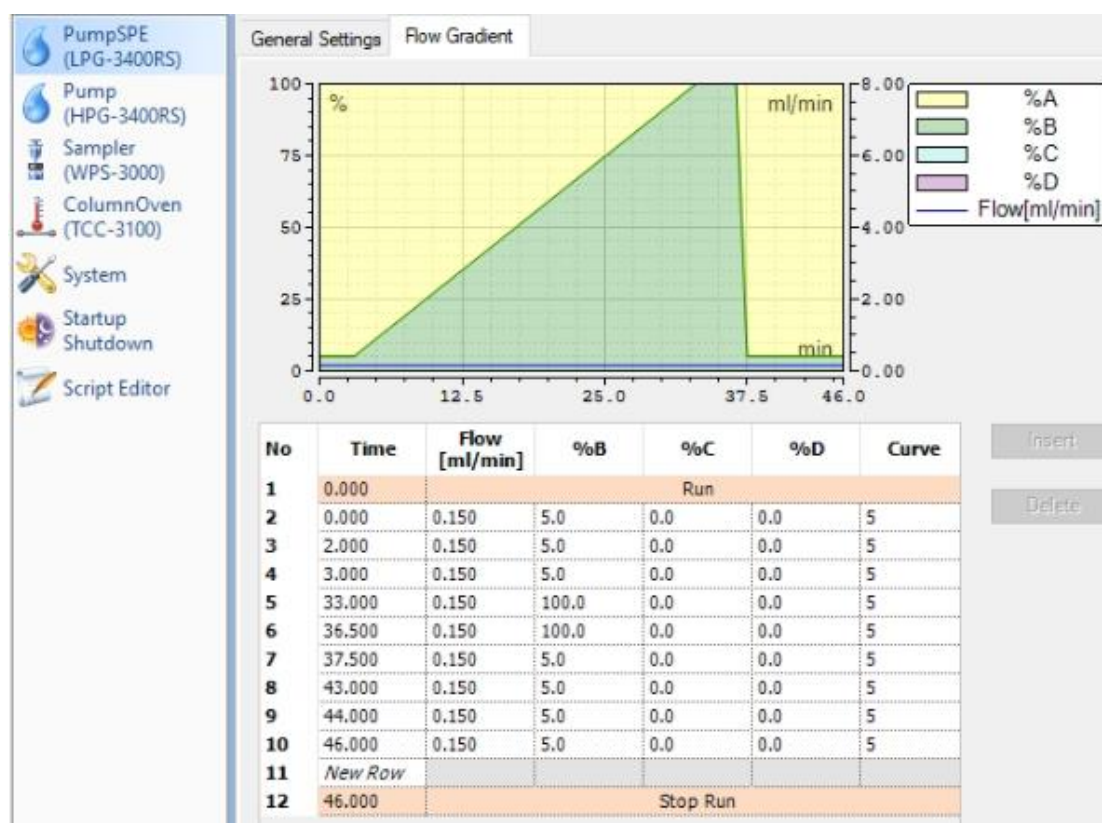
Εικόνα 8: Πρόγραμμα Εναλλαγής Βαλβίδων. Αρχική μέθοδος δομικής (Α).



Εικόνα 9: Χρωματογράφημα για την κατηγορία ουσιών S3 (B2 – Αγωνιστές) με την Αρχική μέθοδος δομικής (Α).

Στην αρχική μέθοδο δοκιμής (Α) , το δείγμα φορτώθηκε για 2,9 λεπτά σε υδατικό διαλύτη, με στόχο την παγίδευση των ενώσεων-στόχων στη στήλη στερεάς φάσης (SPE). Στη συνέχεια, από το 2,9ο έως το 43ο λεπτό, οι εγκλωβισμένες ενώσεις εκλύονται και μεταφέρονται προς την αναλυτική στήλη για τον διαχωρισμό τους. Κατά τα τελευταία 3 λεπτά, πραγματοποιήθηκε εξισορρόπηση των συνθηκών (95% A / 5% B) και στις δύο στήλες, ώστε να αποκατασταθεί η αρχική κατάσταση του συστήματος. Το αντίστοιχο χρωματογράφημα επιβεβαίωσε τη σωστή παγίδευση και μεταφορά των ενώσεων, παρουσιάζοντας σταθερούς χρόνους κατακράτησης. Ωστόσο, παρατηρήθηκε μερική επικάλυψη των κορυφών, γεγονός που υποδεικνύει ανεπαρκή χρωματογραφικό διαχωρισμό μεταξύ ορισμένων ενώσεων.

Ενδιάμεση μέθοδος δοκιμής (B):



Εικόνα 10 & 11 : Πρόγραμμα βαθμίδωσης της αντλίας εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE)/ Πρόγραμμα βαθμίδωσης της αναλυτικής αντλίας. Ενδιάμεση μέθοδος δοκιμής (B).

 PumpSPE
(LPG-3400RS)

 Pump
(HPG-3400RS)

 Sampler
(WPS-3000)

 ColumnOven
(TCC-3100)

 System

 Startup
Shutdown

 Script Editor

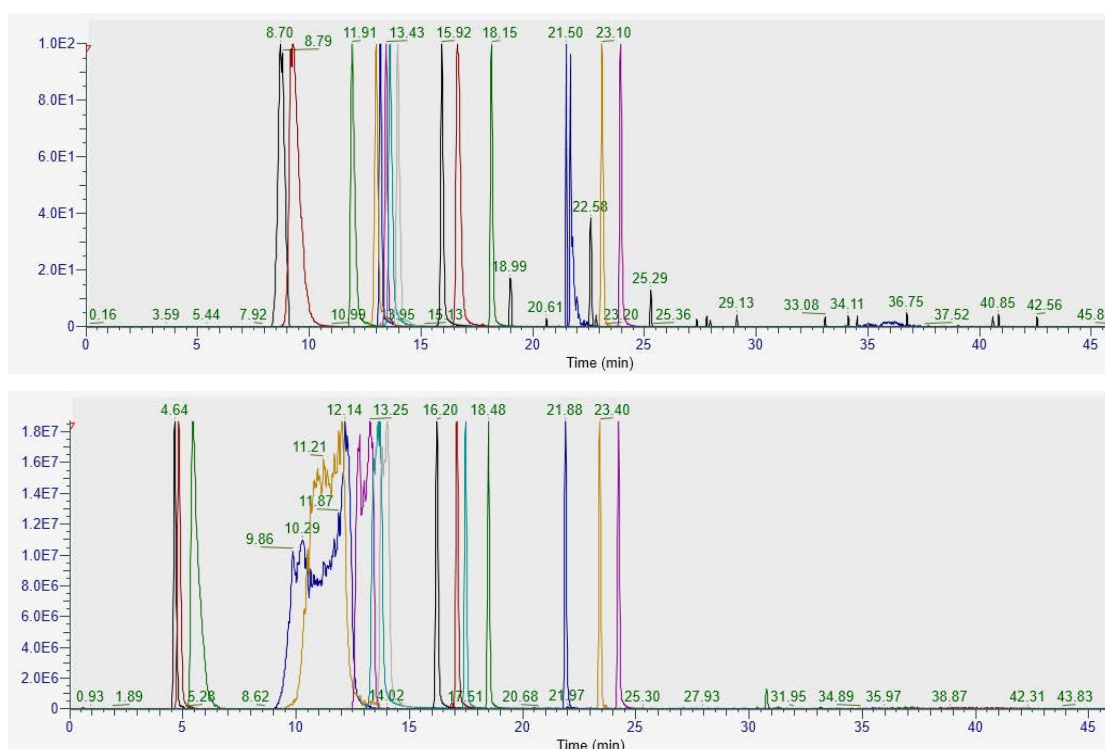
General Settings

Columns

MSV Time Program

No	Time	ValveRight
1	{Initial Time}	6_1
2	0.000	6_1
3	1.900	6_1
4	2.000	1_2
5	40.000	1_2
6	43.000	1_2
7	44.000	6_1
8	46.000	6_1

Εικόνα 12: Πρόγραμμα Εναλλαγής Βαλβίδων. Ενδιάμεση μέθοδος δοκιμής (B).

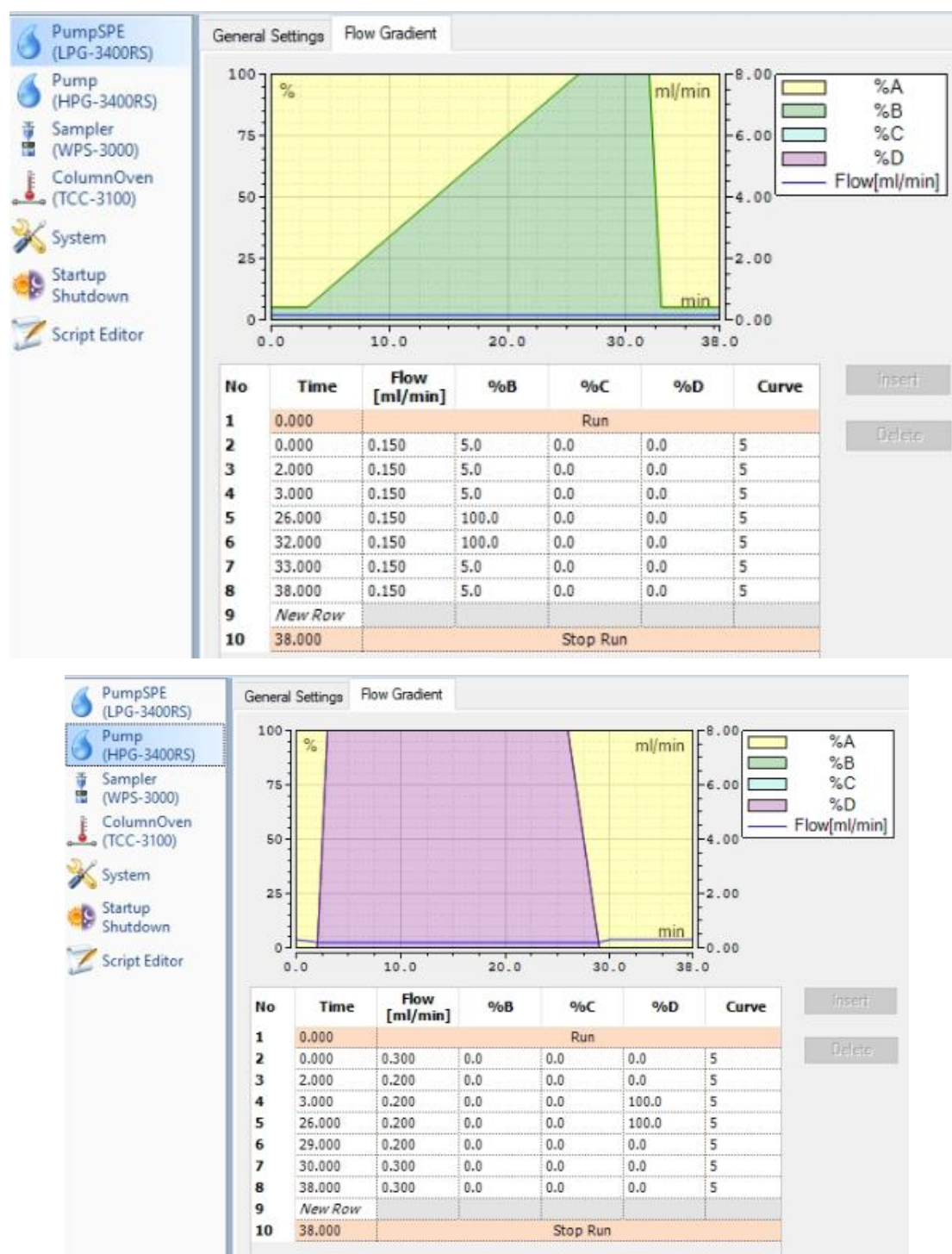


Εικόνες 13 & 14: Χρωματογραφήματα για την κατηγορία ουσιών S3 (B2 – Αγωνιστές) με την Ενδιάμεση μέθοδος δοκιμής (B).

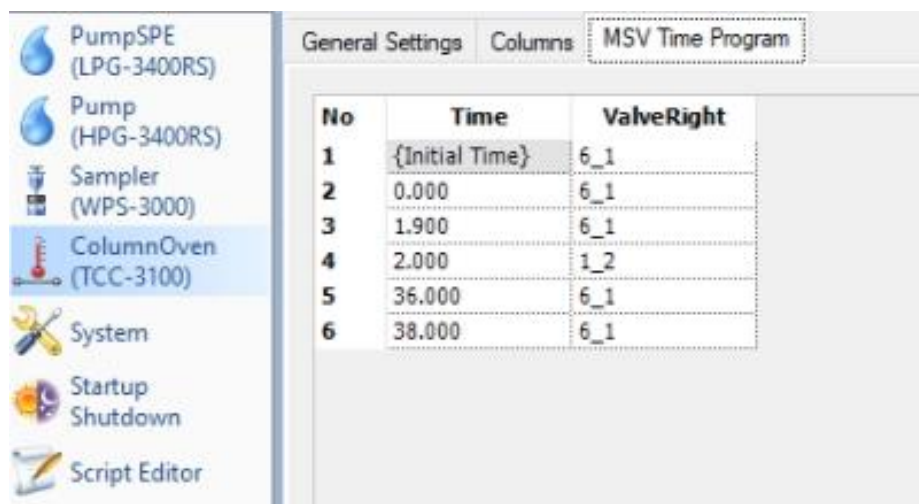
Στη δεύτερη δοκιμή εφαρμόστηκαν οι ίδιες βασικές παράμετροι φόρτωσης, έκλουσης και εξισορρόπησης (1,9 λεπτά φόρτωσης, 1,9–43 λεπτά έκλουσης, 95%A/5%B εξισορρόπηση). Παρότι το χρωματογράφημα έδειξε σωστή παγίδευση και μεταφορά των ενώσεων-στόχων, ο διαχωρισμός τους δεν ήταν ικανοποιητικός. Παρατηρήθηκε έντονη διεύρυνση και μερική επικάλυψη των κορυφών, όπως φαίνεται στα υποδειγματικά χρωματογραφήματα, καθώς και έλλειψη επαναληψιμότητας μεταξύ διαδοχικών ενέσεων. Η μη ικανοποιητική εικόνα του διαχωρισμού αποδόθηκε στο

ανεπαρκές καθάρισμα του φυσιγγίου SPE πριν από την ανάλυση, το οποίο πιθανότατα επηρέασε την απόδοση της στήλης και οδήγησε σε φαινόμενα συν-έκλουσης.

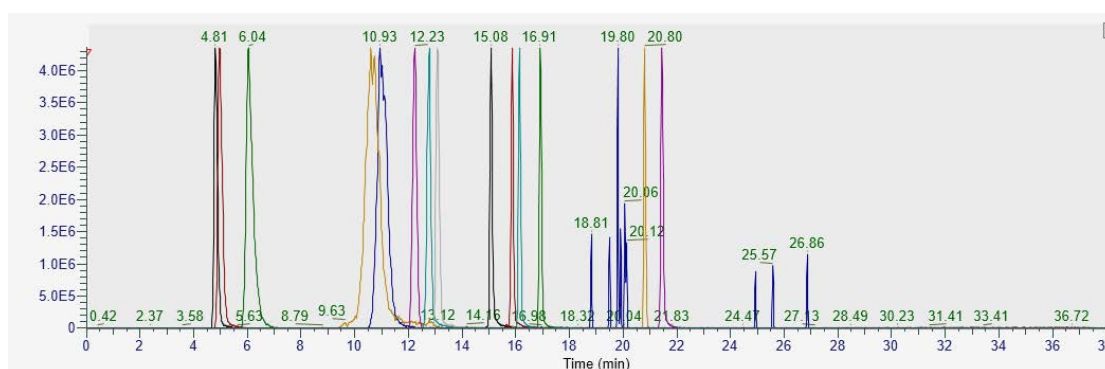
Τελική μέθοδος δοκιμής (Γ):



Εικόνα 15 & 16: Πρόγραμμα βαθμίδωσης της αντλίας εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE)/ Πρόγραμμα βαθμίδωσης της αναλυτικής αντλίας. Τελική μέθοδος δοκιμής (Γ).



Εικόνα 17: Πρόγραμμα Εναλλαγής Βαλβίδων. Τελική μέθοδος δοκιμής (Γ).



Εικόνα 18: Χρωματογράφημα για την κατηγορία ουσιών S3 (B2 – Αγωνιστές) με την Τελική μέθοδος δοκιμής (Γ).

Η τρίτη περίπτωση αντιστοιχεί στην τελική χρωματογραφική μέθοδο που αναπτύχθηκε για την ανάλυση των S3 β2-αγωνιστών με χρήση on-line SPE. το δείγμα φορτώθηκε για 1,9 λεπτά σε υδατικό διαλύτη, με στόχο την παγίδευση των ενώσεων-στόχων στη στήλη στερεάς φάσης (SPE). Στη συνέχεια, από το 2ο έως το 36ο λεπτό, οι εγκλωβισμένες ενώσεις εκλύονται και μεταφέρονται προς την αναλυτική στήλη για τον διαχωρισμό τους. Κατά τα τελευταία 2 λεπτά, πραγματοποιήθηκε εξισορρόπηση των συνθηκών (95% A / 5% B) και στις δύο στήλες, ώστε να αποκατασταθεί η αρχική κατάσταση του συστήματος. Η συνολική διάρκεια της ανάλυσης μειώθηκε στα 38 λεπτά, ενώ η ποιότητα του διαχωρισμού των κορυφών βελτιώθηκε σημαντικά. Οι κορυφές παρουσιάζουν σαφή διαχωρισμό και συμμετρικότητα, χωρίς επικαλύψεις, ενώ η μέθοδος απέδειξε υψηλό βαθμό επαναληψιμότητας και σταθερότητας. Συνεπώς, η τελική εκδοχή της μεθόδου θεωρήθηκε βέλτιστη για τον αξιόπιστο προσδιορισμό των β2-αγωνιστών.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Προκατεργασία δειγμάτων:

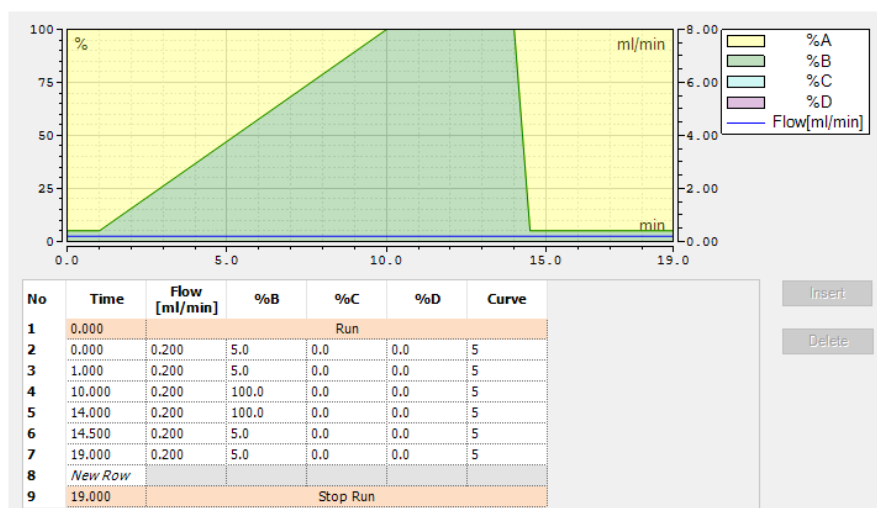
Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας, για την προκατεργασία των δειγμάτων, χρησιμοποιήθηκε και αξιολογήθηκε μια παρασκευαστική διαδικασία που ανήκει στις τυποποιημένες διαδικασίες λειτουργίας του Εργαστηρίου Ελέγχου Ντόпинγκ. Τα βασικά χαρακτηριστικά της περιλαμβάνουν:

- Εμπλουτισμό καθαρών ούρων με πολυσυστατικό διάλυμα πρότυπων ουσιών που ανήκουν στην ίδια κατηγορία απαγορευμένων ουσιών.
- Προετοιμασία των δειγμάτων με υγρή – υγρή εκχύλιση και ακολουθεί εξάτμιση και επανασύσταση.
- Εφαρμογή ενζυμικής υδρόλυσης

Η εφαρμογή ενζυμικής υδρόλυσης αποδείχθηκε κρίσιμο βήμα για την πλήρη αποδέσμευση των γλυκουρονιδίων και τη βελτιστοποίηση της ανίχνευσης των στοχευμένων ουσιών. Το στάδιο αυτό ενσωματώθηκε στην τυποποιημένη διαδικασία λειτουργίας και είναι η πλέον κατάλληλη για συνδυασμό με την αναπτυχθείσα και επικυρωμένη αναλυτική μέθοδο.

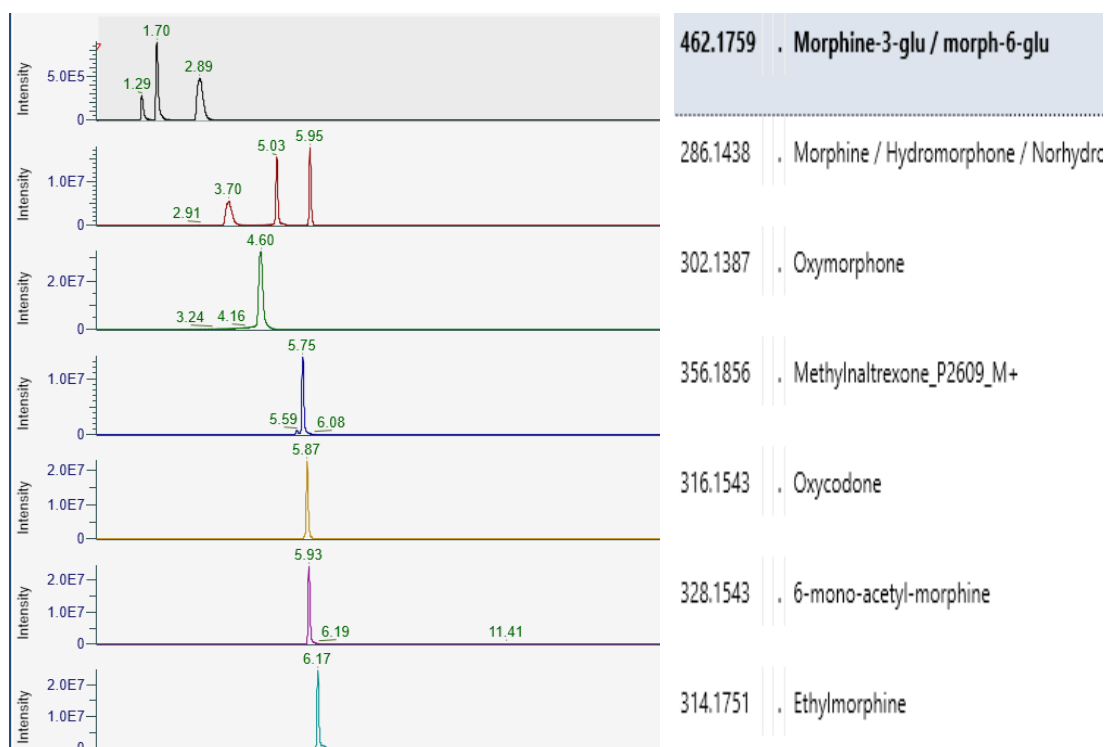
Χρωματογραφική ανάπτυξη:

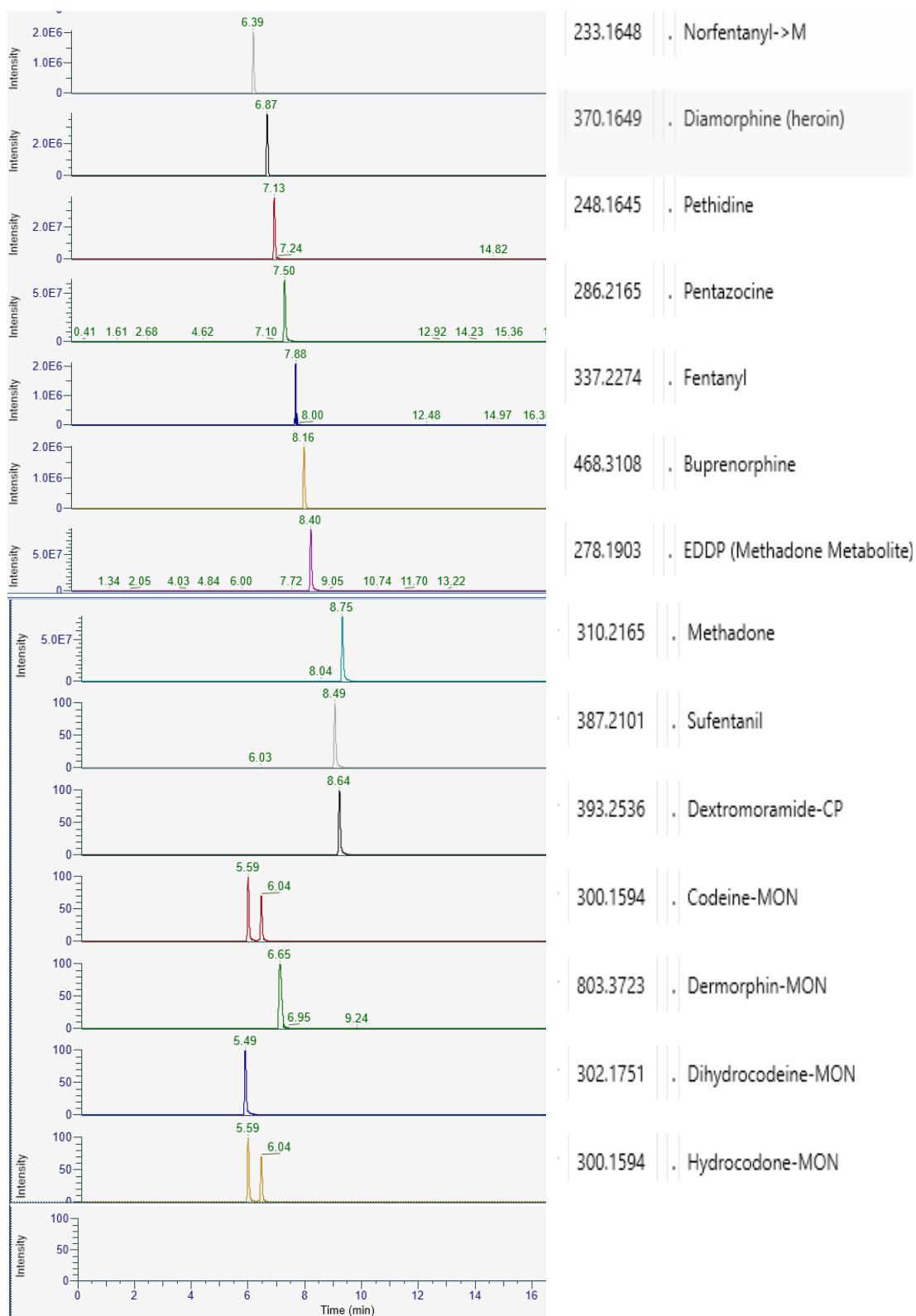
Η χρωματογραφική ανάπτυξη της μεθόδου για τις κατηγορίες απαγορευμένων ουσιών, S7 Ναρκωτικά και S5 Διουρητικά και Παράγοντες απόκρυψης, ξεκίνησε με αφετηρία τη καθιερωμένη μέθοδο του εργαστηρίου που ονομάζεται SOP_124_O και χρησιμοποιείται για την αρχική μέθοδο ανίχνευσης ουσιών (ITP). Το χρωματογραφικό πρόγραμμα στηρίζεται σε βαθμιαία αύξηση της οργανικής φάσης (gradient elution), όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 6. Η μέθοδος ξεκινά με χαμηλό ποσοστό οργανικού διαλύτη (5% B), το οποίο αυξάνεται γραμμικά έως και 100% σε χρονικό διάστημα περίπου 10 λεπτών. Στη συνέχεια, το ποσοστό παραμένει σταθερό για 4 λεπτά, πριν επιστρέψει στις αρχικές συνθήκες (5% B), επιτρέποντας την επιστροφή της ισορροπίας στη χρωματογραφική στήλη.



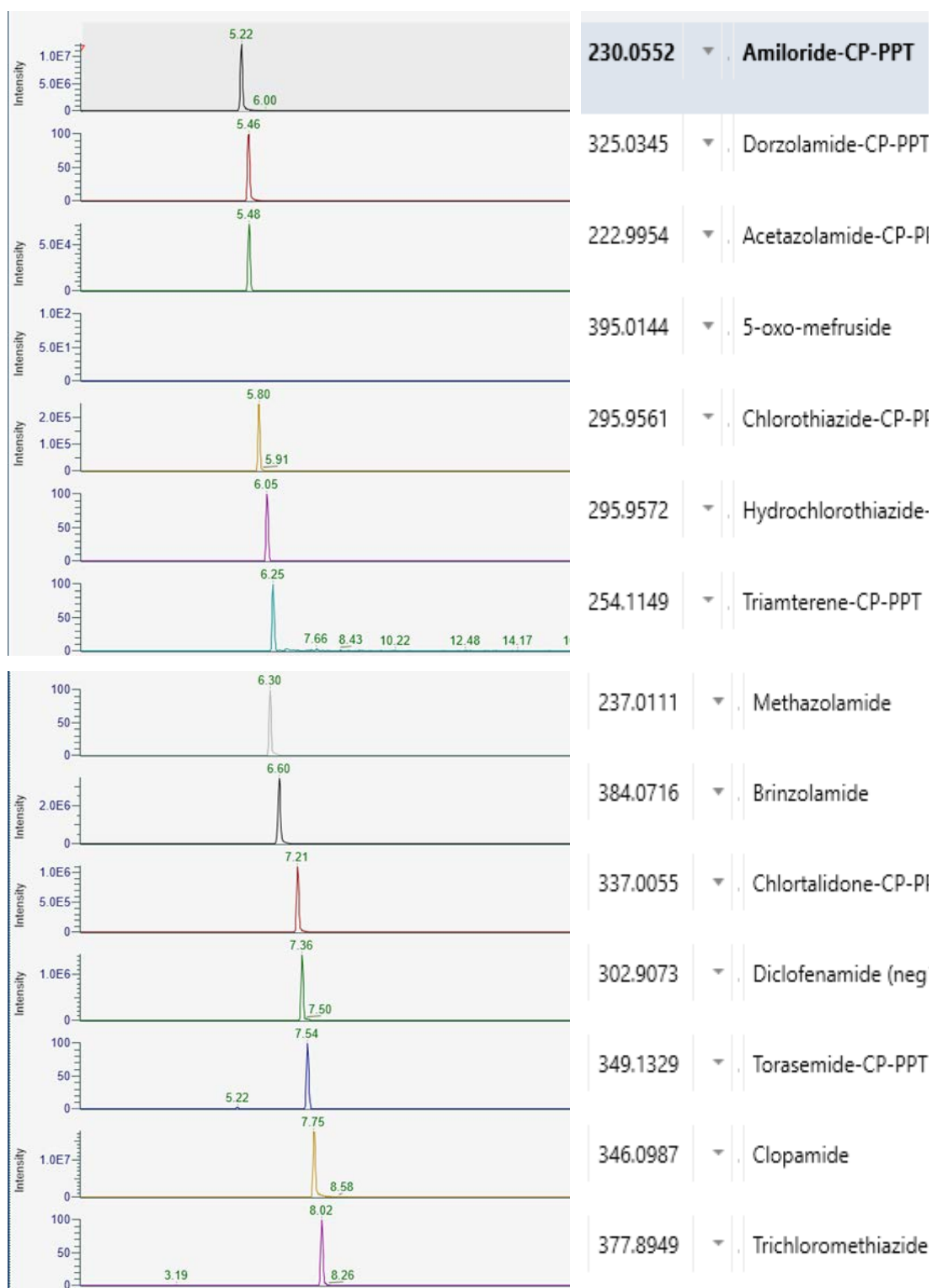
Εικόνα 19: Παράδειγμα προγράμματος βαθμίδωσης στην υγρή χρωματογραφία: μεταβολή της σύστασης της κινητής φάσης (%A, %B) σε συνάρτηση με τον χρόνο, όπως καταγράφεται στο λογισμικό οργάνου. Όνομα μεθόδου: SOP_124_O_ITP.

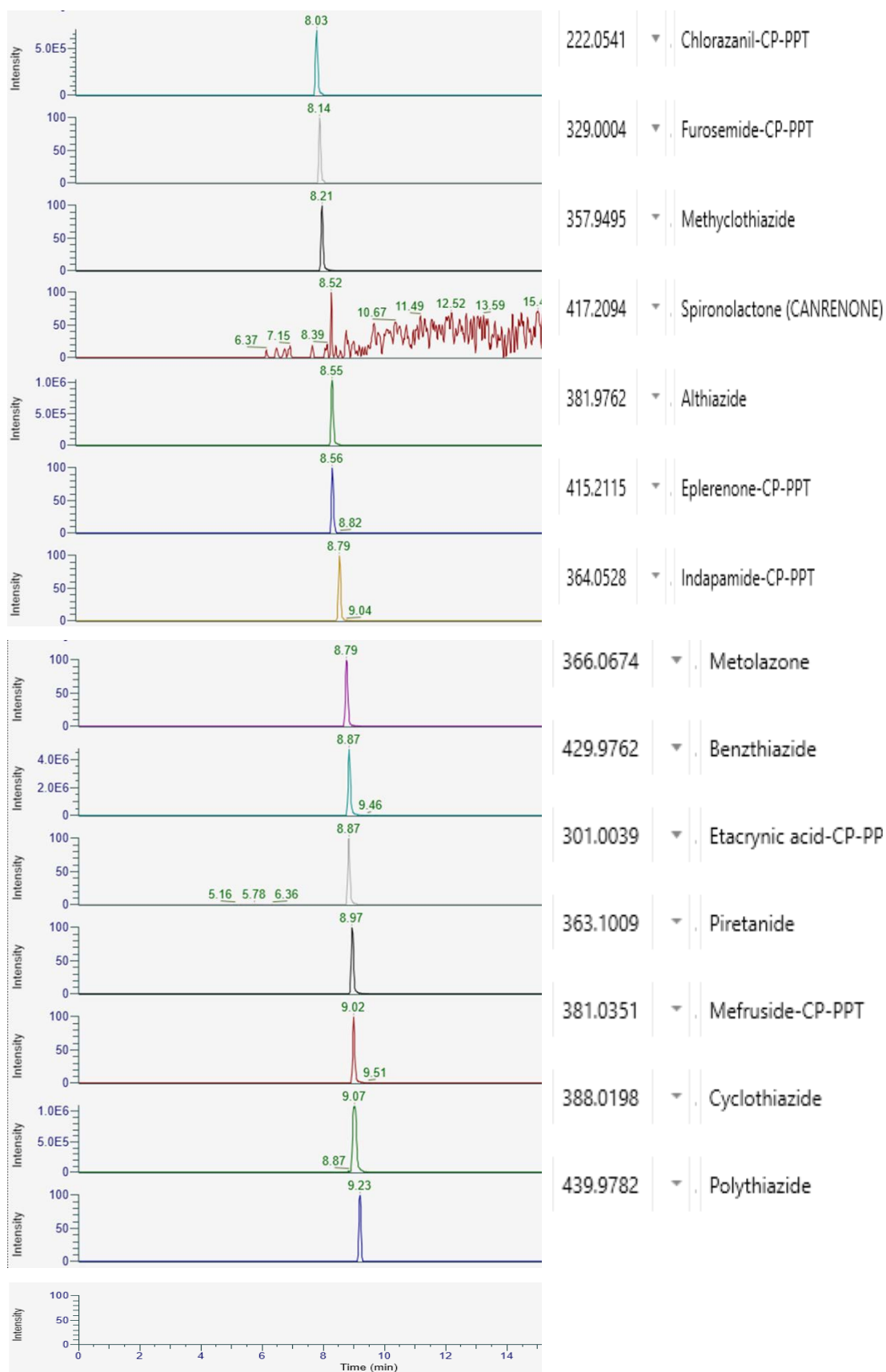
Τα χρωματογραφήματα για τις κατηγορίες ουσιών S7 Ναρκωτικά και S5 Διουρητικά και Παράγοντες απόκρυψης, με τη χρωματογραφική ανάπτυξη SOP_124_O, παρατίθενται παρακάτω (Εικόνα 7, Εικόνα 8).





Εικόνα 20: Χρωματογράφημα για την κατηγορία ουσιών S7 (Ναρκωτικά) με τη μέθοδο SOP124_O_ITP.





Εικόνα 21: Χρωματογράφημα για την κατηγορία ουσιών S5 (Διουρητικά και Παράγοντες απόκρυψης) με τη μέθοδο SOP_124_O_ITP

Η συνολική χρωματογραφική ανάπτυξη με τις επιμέρους δοκιμές της κάθε μεθόδου για τις κατηγορίες ουσιών S7 Ναρκωτικά και S5 Διουρητικά και Παράγοντες απόκρυψης παρουσιάζεται αναλυτικά στο Παράρτημα Β.

- Όσον αφορά τη χρωματογραφική ανάπτυξη της μεθόδου για τον διαχωρισμό των Ναρκωτικών (S7), η διαδικασία ξεκίνησε με την καθιερωμένη μέθοδο του εργαστηρίου, με κωδική ονομασία SOP_124_O_ITP (CHROM 1). Στο πλαίσιο της βελτιστοποίησης πραγματοποιήθηκαν συνολικά οκτώ χρωματογραφικές δοκιμές, βασισμένες σε παραλλαγές της αρχικής μεθόδου. Οι χρόνοι ανάλυσης που δοκιμάστηκαν κυμάνθηκαν μεταξύ 19 λεπτών (όπως η SOP_124_O_ITP_CHROM 1), 22 λεπτών και 35 λεπτών. Επιπλέον, εξετάστηκαν διάφορες αναλογίες ποσοστών διαλυτών (%A και %B), όπως παρουσιάζεται στο Παράρτημα Β. Αξιοσημείωτο είναι ότι, σε ορισμένες δοκιμές, επιχειρήθηκε η μέθοδος να μην ξεκινά με τις τυπικές αρχικές συνθήκες της στήλης (95% A και 5% B), αλλά με 98% A και 2% B. Ωστόσο, τα αποτελέσματα αυτών των δοκιμών δεν ήταν ικανοποιητικά, με αποτέλεσμα να επανέλθουμε στις αρχικές συνθήκες (95% A και 5% B), οι οποίες τελικά διατηρήθηκαν και στην τελική χρωματογραφική μέθοδο ανάλυσης των ναρκωτικών. Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, παρουσιάστηκαν αρκετές δυσκολίες που καθιστούσαν απαραίτητη τη συνεχή προσαρμογή των συνθηκών. Ένα από τα κύρια προβλήματα ήταν ότι (i) δεν παρατηρούνταν ουσιαστική διαφοροποίηση των αποτελεσμάτων μεταξύ ορισμένων δοκιμών, (ii) οι περισσότερες ουσίες συνεκλούονταν σε χρονικό εύρος 6–10 λεπτών, ανάλογα με τη μέθοδο και σε ορισμένες περιπτώσεις (iii) εμφανίζονταν τριπλέτες κορυφών ουσιών, γεγονός που περιόριζε τον διαχωρισμό. Έτσι, με διαδοχικές τροποποιήσεις των χρωματογραφικών συνθηκών, όπως φαίνεται στο Παράρτημα Β, επιτεύχθηκε τελικά σαφής διαχωρισμός των επιμέρους ουσιών. Στην τελική χρωματογραφική μέθοδο, η διάρκεια ανάλυσης ορίστηκε στα 35 λεπτά. Στα πρώτα 5 λεπτά, η αναλογία των διαλυτών διατηρείται στα 95% A και 5% B. Από το 5ο έως το 8ο λεπτό, το ποσοστό του οργανικού διαλύτη B αυξάνεται γραμμικά από 5% σε 15%, ενώ από το 8ο έως το 15ο λεπτό η αναλογία παραμένει στα 85% A και 15% B. Στη συνέχεια, από το 15ο έως το 28,5ο λεπτό, το %B αυξάνεται γραμμικά έως το 100%, όπου και διατηρείται για 3 λεπτά. Τέλος, η στήλη επιστρέφει στις αρχικές

χρωματογραφικές συνθήκες έως το 35ο λεπτό. Ένα επιπλέον χαρακτηριστικό της τελικής μεθόδου, το οποίο δεν υπήρχε στις προηγούμενες, είναι η μείωση της ροής από 0.200 mL/min σε 0.150 mL/min, ώστε να επιτευχθεί πιο αποτελεσματικός και καθαρός διαχωρισμός των ουσιών.

- Για την ανάπτυξη της χρωματογραφικής μεθόδου για τα διουρητικά και τους παράγοντες απόκρυψης, η διαδικασία ξεκίνησε με την καθιερωμένη μέθοδο του εργαστηρίου, με κωδική ονομασία SOP_124_O_ITP (*CHROM 1* στο παράρτημα Β). Η επόμενη δοκιμή πραγματοποιήθηκε με τις ίδιες αναλογίες διαλυτών, διαφοροποιώντας τη διάρκεια της ανάλυσης. Συγκεκριμένα, ο συνολικός χρόνος αυξήθηκε από 19 λεπτά στη μέθοδο *CHROM 1* σε 40 λεπτά στη *CHROM 2*. Στην *CHROM 1*, από το 1ο έως το 10ο λεπτό, το ποσοστό του οργανικού διαλύτη Β αυξάνεται γραμμικά από 5% σε 100%, παραμένει σταθερό στο 100% έως το 14,5ο λεπτό, και στη συνέχεια επανέρχεται στις αρχικές συνθήκες (95%Α και 5%B) της χρωματογραφικής στήλης μέχρι το τέλος της ανάλυσης, στο 19ο λεπτό. Στην *CHROM 2*, η κύρια διαφορά εντοπίζεται στη διάρκεια της γραμμικής αύξησης του διαλύτη Β και στον χρόνο ανάλυσης, όπως επισημάνθηκε. Συγκεκριμένα, το ποσοστό του οργανικού διαλύτη Β αυξάνεται από το 1ο έως το 30ο λεπτό, από 5%B σε 100%B και παραμένει στο 100% έως το 33,5ο λεπτό, και κατόπιν επιστρέφει στις αρχικές συνθήκες της χρωματογραφικής στήλης έως τη λήξη της ανάλυσης, στο 40ο λεπτό. Στην τρίτη δοκιμή χρωματογραφικής ανάπτυξης, *CHROM 3*, η αρχική αναλογία 95% Α και 5% Β διατηρήθηκε για 5 λεπτά αντί για 1 λεπτό, όπως στις δύο προηγούμενες δοκιμές. Από το 5ο έως το 30ο λεπτό, η αναλογία του διαλύτη Β αυξάνεται σταδιακά έως το 100%, παραμένει σταθερή μέχρι το 33,5ο λεπτό, και στη συνέχεια επανέρχεται στις αρχικές συνθήκες έως το τέλος του 40ού λεπτού. Με βάση τις παραπάνω δοκιμές, καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας ανάπτυξης, η τελική και επίσημη χρωματογραφική μέθοδος για τα διουρητικά και τους παράγοντες απόκρυψης καθορίστηκε ως SOP124_O_ **CHROM4**_CALDIUR. Η μέθοδος αυτή, *CHROM 4*, έχει συνολική διάρκεια 40 λεπτών, όπως οι *CHROM 2* και *CHROM 3*, με την αναλογία του οργανικού διαλύτη Β να αυξάνεται από 5% σε 100% στο διάστημα 1–30 λεπτών όπως η *CHROM 2*, να παραμένει στο 100% έως το 33,5ο λεπτό και στη συνέχεια να επιστρέφει στις αρχικές συνθήκες της στήλης

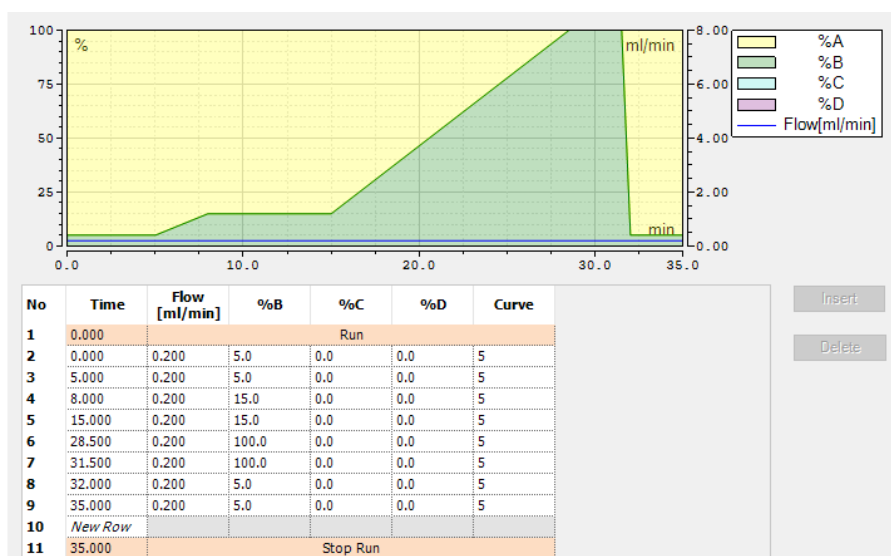
έως την λήξη της ανάλυσης. Ένα επιπλέον χαρακτηριστικό της τελικής μεθόδου, το οποίο δεν υπήρχε στις προηγούμενες, είναι η μείωση της ροής από 0.200 mL/min σε 0.150 mL/min, προκειμένου να επιτευχθεί πιο αποτελεσματικός διαχωρισμός των ουσιών.

Μετά την βελτιστοποίηση των χρωματογραφικών συνθηκών, οι τελικές βέλτιστες χρωματογραφίες για τις κατηγορίες S7 Ναρκωτικά και S5 Διουρητικά/παράγοντες απόκρυψης, προέκυψαν με την εφαρμογή του αναπτυχθέντος προγράμματος βαθμιαίας έκλουσης (Εικόνα 9, Εικόνα 11). Και τα αντίστοιχα χρωματογραφήματα παρουσιάζονται παρακάτω (Εικόνα 10, Εικόνα 12).

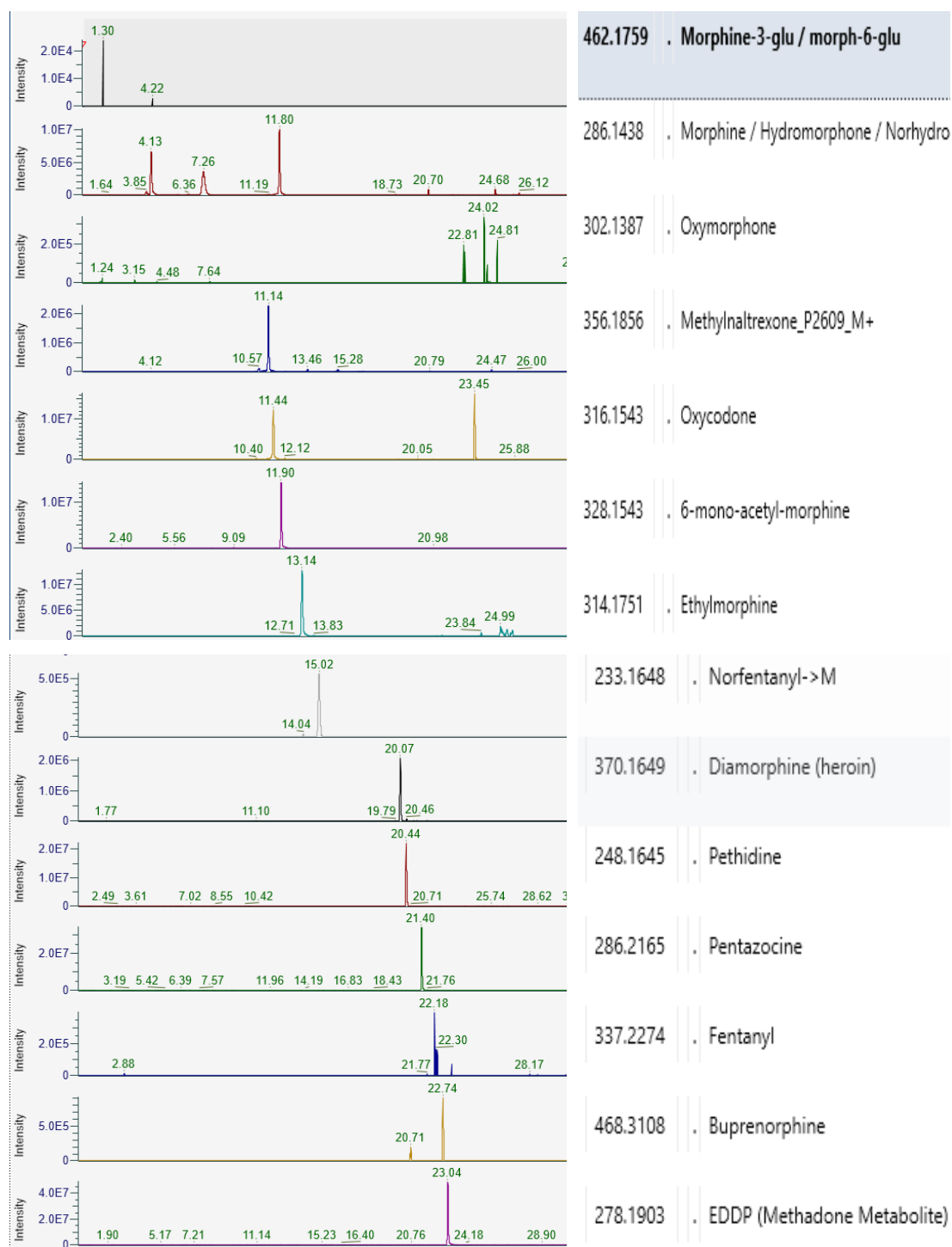
Ναρκωτικά, S7:

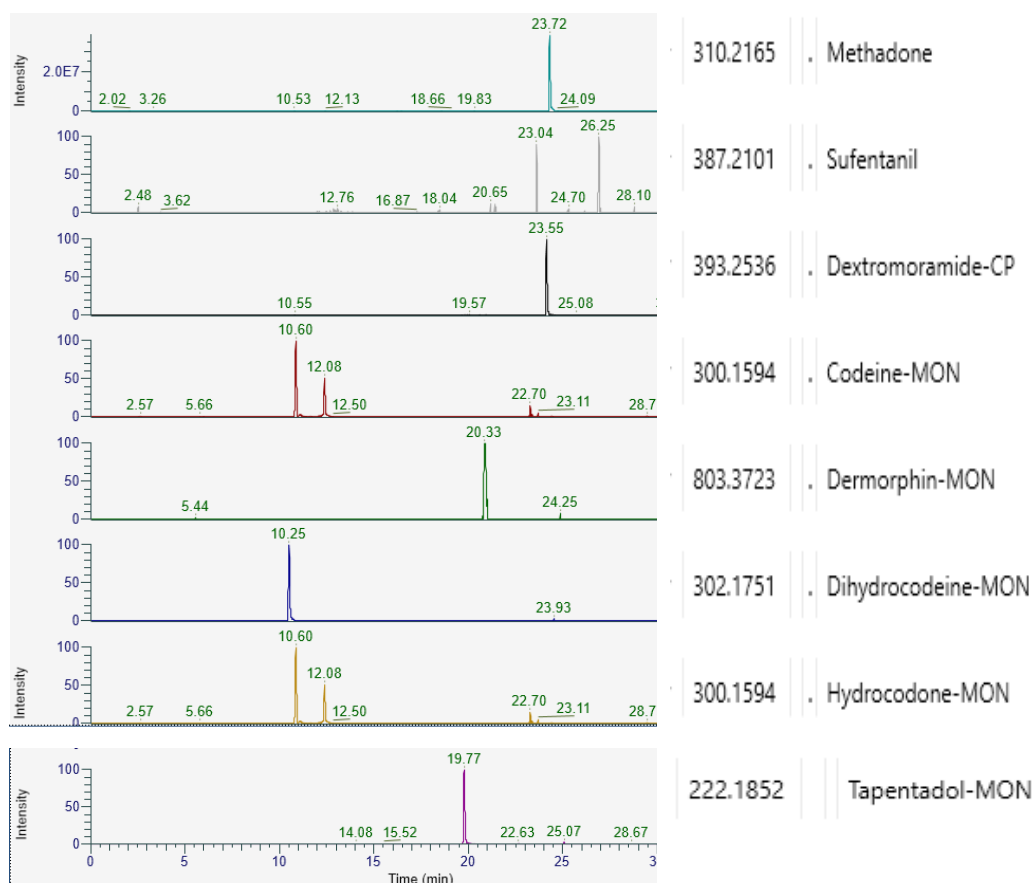
Αναπτύχθηκε νέο πρόγραμμα βαθμίδωσης αναλογίας διαλυτών, το οποίο διαφοροποιήθηκε από την αρχική SOP_124_O με σκοπό τον βελτιωμένο διαχωρισμό και την αποφυγή αλληλοεπικαλύψεων. Συγκεκριμένα, το πρόγραμμα ξεκινά με 5% B και μετά από 8 λεπτά αυξάνεται σταδιακά στο 15%, το οποίο διατηρείται μέχρι το 15^ο λεπτό, παρέχοντας έτσι καλύτερη διακρίσιμότητα στις πρώτες εκλουόμενες ενώσεις. Στη συνέχεια ακολουθεί γραμμική αύξηση της οργανικής φάσης μέχρι το 100% B, πριν την επαναφορά στις αρχικές συνθήκες.

Η επιλογή αυτής της βαθμίδωσης, οδήγησε σε πιο σταθερούς χρόνους κατακράτησης και σαφέστερη ανάλυση ουσιών με παρόμοια πολικότητα. Επίσης, αυτό το πρόγραμμα αύξησε τη διάρκεια της ανάλυσης, αλλά προσέφερε ανώτερη χρωματογραφική ανάλυση και πιο καθαρές κορυφές, γεγονός που καθιστά τη μέθοδο περισσότερο κατάλληλη για τη συγκεκριμένη κατηγορία ουσιών.



Εικόνα 22: Παράδειγμα προγράμματος βαθμίδωσης στην υγρή χρωματογραφία: μεταβολή της σύστασης της κινητής φάσης (%A, %B,) σε συνάρτηση με τον χρόνο, όπως καταγράφεται στο λογισμικό οργάνου. Όνομα μεθόδου: SOP_124_O_CHROM8_NARC

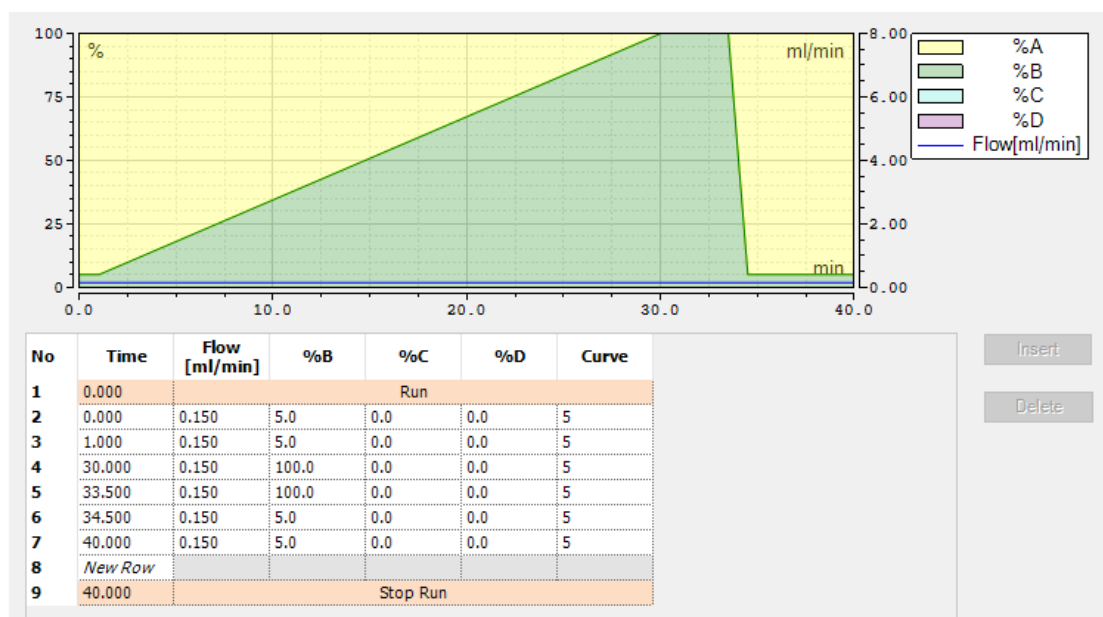




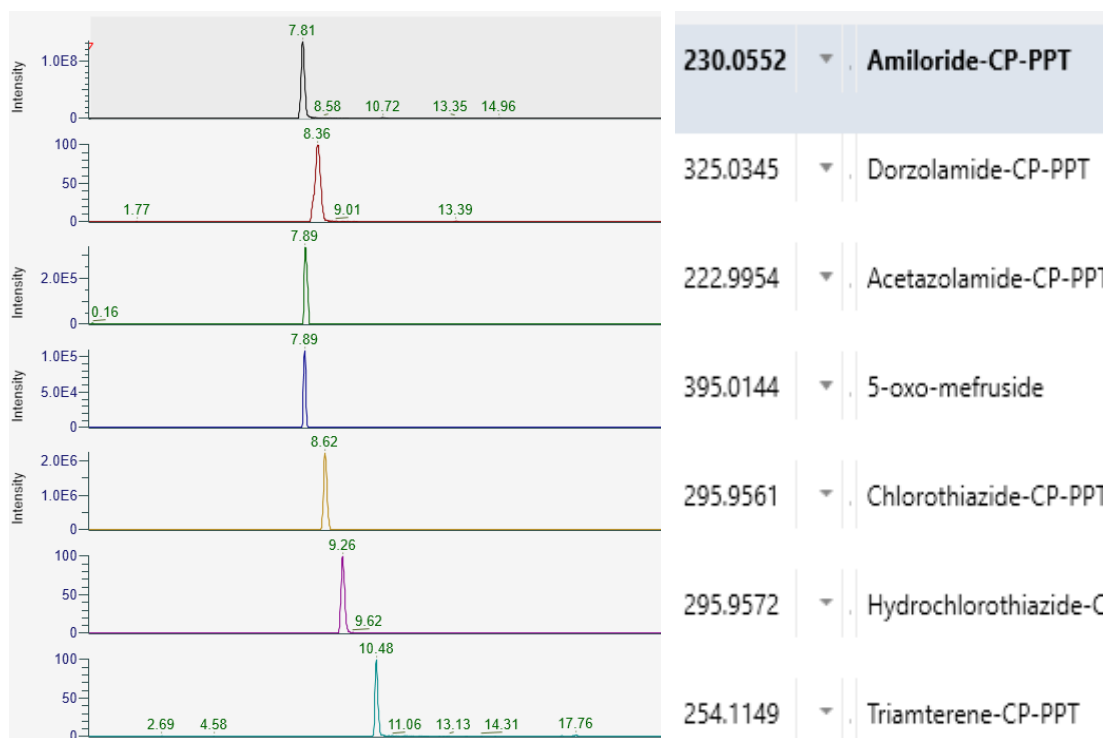
Εικόνα 23: Βελτιστοποιημένο Χρωματογράφημα για την κατηγορία ουσιών S7 (Ναρκωτικά) με τη μέθοδο SOP1_24_O_CHROM8_NARC.

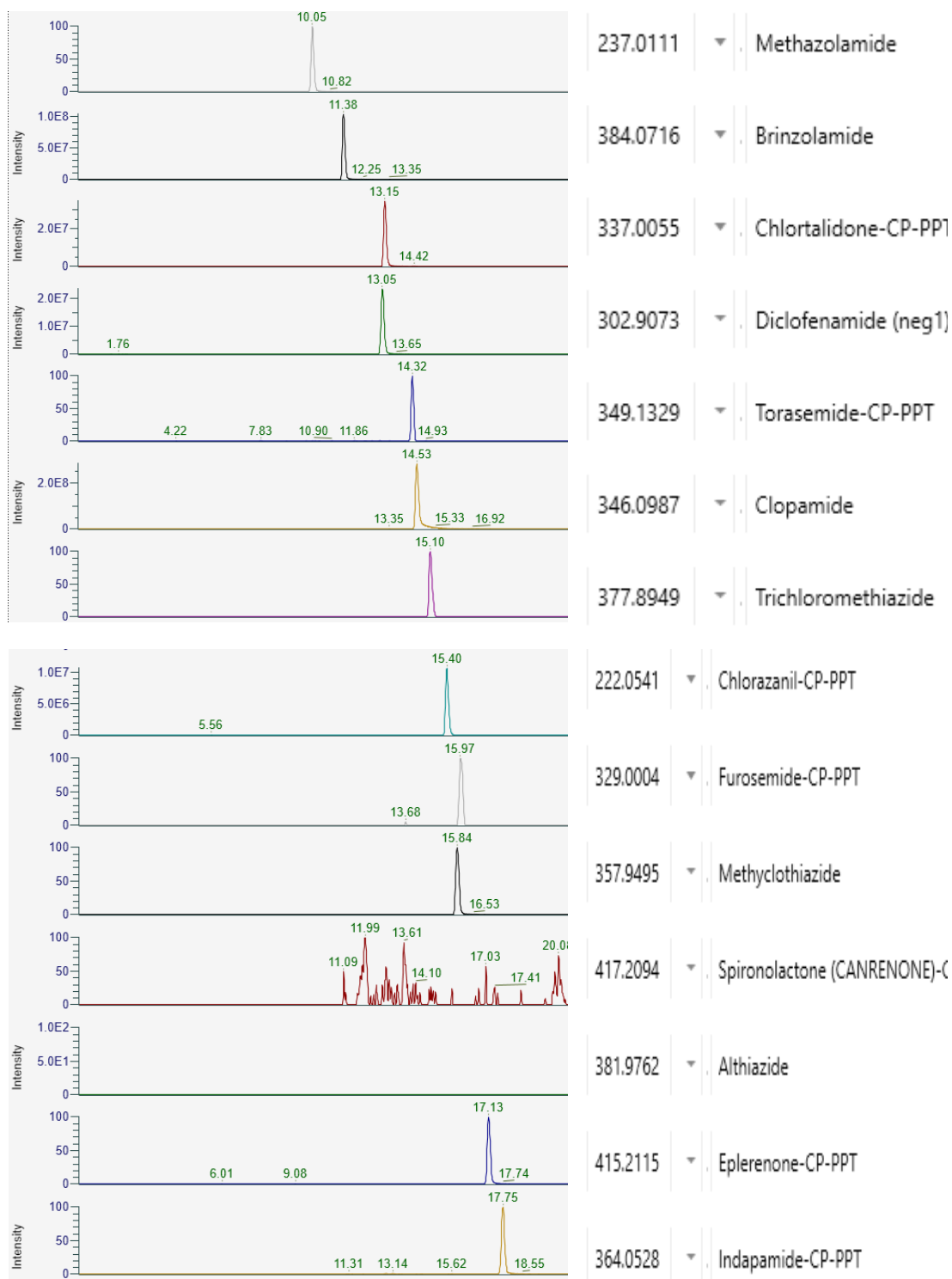
Διουρητικά και Παράγοντες απόκρυψης, S5:

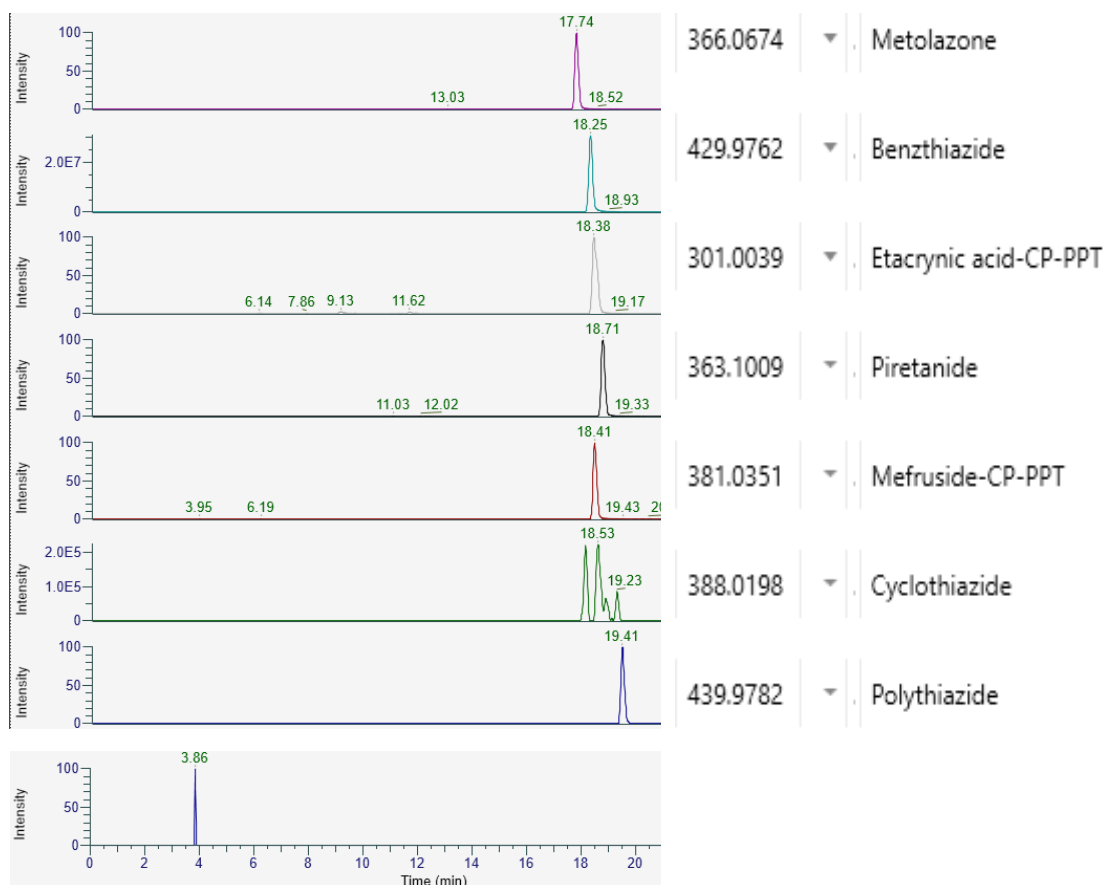
Σε αυτή τη μέθοδο η σημαντικότερη τροποποίηση αφορούσε τη μείωση της ροής από 0,20 mL/min σε 0,15 mL/min, με στόχο την καλύτερη ανάλυση και την ευκρινέστερη διάκριση των ουσιών στο χρωματογράφημα. Η αλλαγή αυτή οδήγησε σε μεγαλύτερη διαχωριστικότητα των κορυφών, μειώνοντας την πιθανότητα αλληλοεπικάλυψης και βελτιώνοντας την αξιοπιστία της ποιοτικής ταυτοποίησης. Ενώ η SOP_124_O αποτέλεσε την αξιόπιστη βάση για την ανάλυση, η εφαρμογή του μειωμένου ρυθμού ροής βελτίωσε την ευαισθησία της μεθόδου, καθιστώντας τη περισσότερο κατάλληλη για την κατηγορία S5.



Εικόνα 24: Παράδειγμα προγράμματος βαθμίδωσης στην υγρή χρωματογραφία: μεταβολή της σύστασης της κινητής φάσης (%A, %B) σε συνάρτηση με τον χρόνο, όπως καταγράφεται στο λογισμικό οργάνου. Όνομα μεθόδου: SOP_124_O_CHROM4_CALDIUR.







Εικόνα 25: Βελτιστοποιημένο Χρωματογράφημα για την κατηγορία ουσιών S5
(Διουρητικά και Παράγοντες απόκρυψης) με τη μέθοδο
SOP_124_O_CHROM4_CALDIUR

Και στις δυο περιπτώσεις κατηγοριών, ο χρωματογραφικός διαχωρισμός βελτιώθηκε αισθητά. Η επίτευξη αποτελεσματικού χρωματογραφικού διαχωρισμού οδηγεί σε χρονικά απομονωμένες και ευκρινώς διαμορφωμένες κορυφές, επιτρέποντας στο όργανο υψηλής ανάλυσης (Orbitrap) να εκτελεί ξεχωριστά MS/MS τμήματα (segments) για κάθε αναλυόμενη ουσία. Ως αποτέλεσμα, διατίθεται επαρκής χρόνος απόκτησης φάσματος ανά κορυφή, γεγονός που αυξάνει τον αριθμό σημείων δεδομένων και συνεπώς βελτιώνει την ευαισθησία και την ποιότητα των φασμάτων.

Βελτιστοποίηση Φασματομετρίας μάζας:

Η ανάπτυξη της μεθόδου στη φασματομετρία μάζας στηρίχθηκε στην βελτιστοποίηση των παραμέτρων κατακερματισμού για κάθε ουσία – στόχο των κατηγοριών S7 Ναρκωτικά και S5 Διουρητικά και Παράγοντες απόκρυψης. Στο παράρτημα Γ (Γ1, Γ2) παρατίθενται τα αντίστοιχα φάσματα μάζας για κάθε ένωση, τα οποία λήφθηκαν στην βέλτιστη ενέργεια κατακερμάτισης (Best CE) για κάθε ουσία – στόχο. Τα φάσματα καταδεικνύουν την παρουσία των χαρακτηριστικών θραυσμάτων, τα οποία αξιοποιήθηκαν για την ποιοτική ταυτοποίηση των ενώσεων.

ALDIUR_CP_500_OPT_11 #1973 RT: 13.22 AV: 1 NL: 3.78E+005
FTMS MS2 337.0055@hcd25.00 [50.0000-360.0000]
337.0054
337.0054
337.0054

Εικόνα 26: Παράδειγμα φάσματος μάζας για την ουσία Chlortalidone που ανήκει στην κατηγορία S5 Διουρητικά και Παράγοντες απόκρυψης με βέλτιστη κανονικοποιημένη ενέργεια σύγκρουσης στα 25 eV.

Επιπρόσθετα, παρατίθενται δύο συγκεντρωτικοί πίνακες, ένας για κάθε κατηγορία απαγορευμένων ουσιών που εξετάστηκαν, S7 και S5. Οι πίνακες αυτοί συνοψίζουν τα κρίσιμα ευρήματα της φασματομετρίας μάζας, περιλαμβάνοντας:

- Τα χαρακτηριστικά θραύσματα για κάθε ουσία – στόχο
- Την αντίστοιχη βέλτιστη ενέργεια κατακερματισμού.

Η παρουσίαση αυτή επιτρέπει την άμεση συσχέτιση των φασματικών δεδομένων με τις χρωματογραφικές συνθήκες, διευκολύνοντας τόσο τη διαδικασία επικύρωσης όσο και την εφαρμογή της μεθόδου σε δείγματα ρουτίνας.

S5 DIURETICS AND MASKING AGENTS			
SUBSTANCE	ION (m/z)[M+H]	BEST CE	FRAGMENTS
Amiloride	230.0552	45	189.0174 60.0564 171.0069 161.0226
Dorzolamide	325.0345	35	198.9884 151.0215 235.9505 216.0151

Acetazolamide	222.9954	35	180.9849 181.9693 214.9059 58.0657
Chlorothiazide	295.9561	45	204.9836 278.9291 230.9627 220.9784
Hydrochlorothiazide	295.9572	40	268.9461 204.9837 77.9643 72.1247
Methazolamide	237.0111	25	195.0005 131.0858 57.0456 73.7639
Triamterene	254.1149	70	237.0885 104.0500 195.0671 168.0555
Felypressin	520.7257	10	471.8056 301.6729 132.3244 109.4302 92.1287
Brinzolamide	384.0716	35	217.0102 280.9721 306.9877 163.0453
Diclofenamide	302.9073	45	77.9641 187.9570 238.9449 223.9339
Chlortalidone	337.0055	25	189.9726 146.0236 318.9947 283.0186
Torasemide	349.1329	25	264.0804 290.0592 137.6714 156.9345
Desmopressin (Acetate salt)	1069.4324	35	120.0810 276.1343 311.1827 237.1348
Clopamide	346.0987	55	55.0550 169.0164 98.0968 250.0047

Chlorazanyl	222.0541	60	178.0168 153.0215 91.0548 135.0442
Methyclothiazide	357.9495	25	321.9727 258.0107 194.0482 222.0337
Furosemide	329.0004	10	71.9598 285.0100 173.2187 97.4640
Althiazide	381.9762	20	340.9372 268.9453 71.7427 231.0269
Eplerenone	415.2115	25	163.0755 337.1798 121.0650 221.1172
Indapamide	364.0528	45	132.0316 77.9641 214.9681 126.0103
Benzthiazide	429.9762	35	307.9572 267.9381 338.9205 228.9843
Mefruside	381.0351	45	77.9641 188.9649 168.9829 317.0726
Cyclothiazide	388.0198	45	268.9461 204.9835 321.9718 77.9642
Etacrynic Acid	301.0039	10	301.0039 242.9981
Piretanide	363.1009	45	236.1071 282.1125 196.0759 237.1149
Polythiazide	439.97816	25	286.9560 172.0407 204.9837 142.9776

Bendroflumethiazide	420.0305	35	289.0448 327.9676 239.0100 223.9935
Xipamide	355.0514	35	122.0967 274.0632 290.0579 233.9625
Probenecid	286.1108	25	202.0171 244.0640 72.0815 184.9905
Bumetanide	365.1166	25	240.1386 184.0759 284.1285 123.0794
Canrenone	341.2111	55	107.0860 97.0653 143.0857 119.0859
Spironolactone (CANRENONE)	417.2094	10	341.2109 284.9607 244.6731 139.1633

Πίνακας 3: Φασματομετρικά δεδομένα για Διουρητικά και Παράγοντες απόκρυψης: κύρια ιόντα [M+H], βέλτιστη ενέργεια σύγκρουσης (Best CE) και χαρακτηριστικά θραύσματα (Fragments).

S7 NARCOTICS			
SUBSTANCE	ION (m/z)[M+H]	BEST CE	FRAGMENTS
Tapentadol	222.1852	55	107.0495 121.0649 135.0805 93.0704
Pethidine	248.1645	55	220.1333 70.0658 174.1277 202.1228
Pentazocine	286.2165	50	69.0706 218.1539 175.1117 159.0805

Oxycodone	316.1543	45	298.1436 256.1330 241.1091 187.0753
Norfentanyl	233.1648	45	84.0814 56.0503 150.0915 177.1386
Morphine	286.1438	60	201.0908 185.0595 155.0854 211.0753 229.0861 58.0659
Hydromorphone	286.1438	60	185.0597 227.0703 199.0754 211.0754 157.0649
Norhydrocodone	286.1438	60	199.0754 241.0858 213.0911 171.0805 225.0913
Methylnaltrexone	356.1856	50	284.1281 302.1386 338.1751 227.0704
Methadone	310.2165	35	265.1585 105.0339 223.1117 57.0342
Fentanyl	337.2274	45	188.1434 105.0702 134.0965 132.0809 216.1384
Ethylmorphine	314.1751	70	165.0699 157.0648 183.0804 153.0699

EDDP (Methadone Metabolite)	278.1903	55	234.1277 249.1511 201.1513
Dihydrocodeine	302.1751	55	199.0753 201.0909 227.1066 245.1171
Diamorphine (Heroin)	370.1649	60	58.0659 165.0698 211.0755 268.1333
Dextromoramide	393.2536	55	306.1852
Dermorphin	803.3723	25	202.1188 574.2665 136.0758 411.2026
Codeine	300.1594	70	215.1068 243.1016 225.0911 199.0755
Buprenorphine	468.3108	55	55.0550 84.0814 101.0965 396.2160 414.2643
6-mono-acetyl-morphine	328.1543	60	211.0754 193.0645 58.0659 183.0805 268.1331

Πίνακας 4: Φασματομετρικά δεδομένα για Ναρκωτικά: κύρια ιόντα [M+H], βέλτιστη ενέργεια σύγκρουσης (Best CE) και χαρακτηριστικά θραύσματα (Fragments).

Στον Πίνακα 4 παρουσιάζονται οι ουσίες που ανήκουν στην κατηγορία S7 Ναρκωτικά και παρατηρείται ότι οι ενώσεις Μορφίνη, Υδρομορφόνη και Νορυδροκοδεΐνη είναι επισημασμένες με το ίδιο χρώμα, καθώς αποτελούν ειδική περίπτωση κατά την ανάπτυξη της μεθόδου. Παρότι παρουσιάζουν ταυτόσημη τιμή m/z (286.1438), διαχωρίζονται χρωματογραφικά, ενώ εμφανίζουν διακριτά θραύσματα στο φάσμα

NARC120_2_BEST_CEs5 #2236 RT: 5.06 AV: 1 NL: 1.48E+006
FTMS + p ESI Full ms2 286.1438@hcd60.00 [50.0000-310.0000]
286.1437
06/09/2026 19:56:33 EEST - 216.73.216.250

Εικόνα 29: Παράδειγμα φάσματος μάζας για την ουσία Hydromorphone που ανήκει στην κατηγορία S7 Ναρκωτικά με βέλτιστη κανονικοποιημένη ενέργεια σύγκρουσης στα 60 eV.

NARC120_2_BEST_CEs5 #2738 RT: 5.99 AV: 1 NL: 1.76E+006
FTMS + p ESI Full ms2 286.1438@hcd60.00 [50.0000-310.0000]
286.1437
06/09/2026 19:56:33 EEST - 216.73.216.250

Εικόνα 30: Παράδειγμα φάσματος μάζας για την ουσία Norhydrocodone που ανήκει στην κατηγορία S7 Ναρκωτικά με βέλτιστη κανονικοποιημένη ενέργεια σύγκρουσης στα 60 eV.

Επικύρωση της μεθόδου:

Υστερα από τις διαδικασίες που περιγράφηκαν στις ενότητες 7.7 και 7.8, πραγματοποιήθηκε η επικύρωση της αναλυτικής μεθόδου για την κατηγορία απαγορευμένων ουσιών S5: Διουρητικά και Παράγοντες απόκρυψης. Η διαδικασία της επικύρωσης περιλάμβανε την αξιολόγηση παραμέτρων όπως τα χαρακτηριστικά θραύσματα ιόντων σε αναλογία με το μητρικό ιόν, τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης καθώς και η ακρίβεια και επαναληψιμότητα της μεθόδου. Με βάση τα παραπάνω κριτήρια αποδοχής, όλες οι ουσίες προς μελέτη, πληρούσαν τις απαιτήσεις και πέρασαν επιτυχώς την επικύρωση.

Η μέθοδος αυτή απέδειξε υψηλή εκλεκτικότητα, ευαισθησία και επαναληψιμότητα, ικανοποιώντας πλήρως τα κριτήρια του ISL 2021) και του Τεχνικού Εγγράφου (Technical Document) TD2021IDCR του WADA. Για όλες τις ουσίες, με βάση τα αποτελέσματα το LOI (Limit of Identification) ορίστηκε στο 25% του MRPL.

Παρακάτω παρουσιάζεται ένα παράδειγμα ουσίας από την κατηγορία S5 – Διουρητικά και Παράγοντες Απόκρυψης, το οποίο αφορά την αξιολόγηση των παραμέτρων επικύρωσης της μεθόδου. Η ουσία που επιλέχθηκε είναι η Chlortalidone (βλ. Παράρτημα Δ).

STD1

Standard injection 200 ng/ml						
Chlortalidone						
	RT _{ISTD}	RT _{analyte}	RRT	AREA	Rel. AREA	
283.0186		12.91	0.825	8,223,339	6.39%	
146.0236		12.91	0.825	128,674,280	100.00%	
189.9726		12.91	0.825	123,708,871	96.14%	
318.9947		12.91	0.825	14,652,914	11.39%	
IS-Furosemide_d5	15.65					

Standard injection 200 ng/ml AVERAGE						
	RT _{ISTD}	RT _{analyte}	RRT	AREA	Rel. AREA	
283.0186		13.06	0.83	8,585,229.70	6.51%	
146.0236		13.06	0.83	131,508,144.10	100.00%	
189.9726		13.06	0.83	127,457,297.00	96.76%	
318.9947		13.06	0.83	15,189,357.00	11.51%	
IS-Furosemide_d5	15.81					

Range of acceptance***						
Ion m/z	criterion 5% (absolute)		criterion 20% (relative)		criterion 10% (absolute)	
	min	max	min	max	min	max
283.0186	1.51%	11.51%	-	-	-	-
146.0236	-	-	-	-	90.00%	110.00%
189.9726	-	-	-	-	86.76%	106.76%
318.9947	6.51%	16.51%	-	-	-	-

Range of acceptance Chromatographic criteria						
Ion m/z	RRT criteria	RRT criteria		Ion m/z	RT criteria	RT criteria
	labeled istd				labeled istd	
	min	max			min	max
283.0186	0.818	0.835		283.0186	12.955	13.155
146.0236	0.818	0.835		146.0236	12.958	13.158
189.9726	0.818	0.835		189.9726	12.955	13.155
318.9947	0.818	0.835		318.9947	12.955	13.155

Πίνακας 5: Παράδειγμα πίνακα επεξεργασίας δεδομένων με αναφορά στο MRPL της ουσίας στο πρώτο δείγμα της ημέρας 1, για την αξιολόγηση της επικύρωσης της απαγορευμένης ένωσης Chlortalidone

Για την επιβεβαίωση μιας ουσίας, απαιτείται τόσο ο χρόνος κατακράτησης όσο και ο σχετικός χρόνος κατακράτησης να βρίσκονται εντός των αποδεκτών ορίων που καθορίζονται από το TD2021IDCR. Επιπλέον, πρέπει να ταυτοποιείται το ίδιο μητρικό ιόν, γεγονός που επιβεβαιώνεται μέσω επαναλήψιμων δοκιμών.

Όσον αφορά τα χαρακτηριστικά θραύσματα, αυτά πρέπει να είναι τα ίδια για κάθε ουσία, ωστόσο είναι γνωστό ότι δεν θραύονται πάντα με ακριβώς τον ίδιο τρόπο σε κάθε ανάλυση. Για τον λόγο αυτό, αντί να συγκρίνονται απόλυτες τιμές, εξετάζεται ο λόγος έντασης κάθε θραύσματος προς το βασικό ιόν (base peak). Αν και οι απόλυτες τιμές μπορεί να διαφέρουν ελαφρώς, κάθε θραύσμα πρέπει να ανήκει στο ίδιο εύρος ποσοστιαίας έντασης: 1–25%, 25–50% ή 50–100%.

Ανάλογα με το εύρος στο οποίο κατατάσσεται, επιτρέπεται ένα συγκεκριμένο περιθώριο απόκλισης ($\pm$), όπως ορίζεται από το TD2021IDCR. Με βάση τα παραπάνω

κριτήρια, πραγματοποιήθηκε η εξέταση και επιβεβαίωση κάθε ουσίας, και στη συνέχεια επικυρώθηκε η χρωματογραφική μέθοδος.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα εργασία επικεντρώθηκε στην ανάπτυξη, βελτιστοποίηση και αξιολόγηση μεθόδων επιβεβαίωσης διουρητικών και παραγόντων απόκρυψης (S5) καθώς και ναρκωτικών (S7) σε δείγματα ούρων αθλητών, σύμφωνα με τις τεχνικές και κανονιστικές απαιτήσεις του WADA.

Η κύρια επικυρωμένη μέθοδος βασίστηκε στη συνδυασμένη προσέγγιση ενζυμικής υδρόλυσης και εκχύλισης υγρού-υγρού (Liquid Liquid Extraction, LLE), ακολουθούμενη από ανάλυση με UHPLC–HRMS/Orbitrap. Η μέθοδος αυτή έδειξε υψηλή εκλεκτικότητα, ευαισθησία και επαναληψιμότητα, ικανοποιώντας πλήρως τα κριτήρια του ISL και του TD2021IDCR. Τα όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ) ήταν σημαντικά χαμηλότερα από τα MRPLs της WADA, ενώ η γραμμικότητα και η αναπαραγωγιμότητα παρέμειναν εντός αποδεκτών ορίων για όλες τις ουσίες των δύο κατηγοριών.

Η ενζυμική υδρόλυση με ένζυμο *E. coli* αποδείχθηκε ουσιώδης για την αποδέσμευση των συζευγμένων μορφών (κυρίως γλυκουρονιδίων) των ναρκωτικών, εξασφαλίζοντας ακριβή ποσοτικοποίηση. Η επακόλουθη υγρή–υγρή εκχύλιση με κατάλληλο οργανικό διαλύτη επέτρεψε ικανοποιητικό καθαρισμό της μήτρας, υψηλά ποσοστά ανάκτησης και σταθερότητα σήματος. Παράλληλα, η εφαρμογή ισοτοπικά επισημασμένων εσωτερικών προτύπων διασφάλισε την ακρίβεια της ποσοτικοποίησης, αντισταθμίζοντας πιθανές διαφοροποιήσεις κατά τη διαδικασία εξαγωγής ή ιοντισμού.

Η χρήση του Orbitrap HRMS για επιβεβαίωση ταυτότητας παρείχε υψηλή φασματική ακρίβεια και διαχωριστική ικανότητα, επιτρέποντας τον ακριβή καθορισμό των m/z τιμών και των διαγνωστικών ιόντων για κάθε ουσία. Η βελτιστοποίηση του χρωματογραφικού διαχωρισμού (βαθμίδωση, pH, οργανικός τροποποιητής, παροχή) επέτρεψε καθαρές, συμμετρικές κορυφές και σταθερούς χρόνους κατακράτησης, μειώνοντας σημαντικά τα φαινόμενα μήτρας. Ο επαρκής διαχωρισμός μεταξύ των κορυφών έδωσε τη δυνατότητα στο φασματόμετρο να πραγματοποιεί στοχευμένα MS/MS τμήματα ανά ουσία, αυξάνοντας τον αριθμό σημείων συλλογής δεδομένων ανά κορυφή και συνεπώς την ευαισθησία και την αξιοπιστία ταυτοποίησης.

Παράλληλα, στο πλαίσιο της μελέτης πραγματοποιήθηκε πειραματική εφαρμογή της τεχνικής online-SPE σε σύζευξη με LC-HRMS, με σκοπό τη διερεύνηση της

δυνατότητας αυτοματοποίησης της διαδικασίας προετοιμασίας δειγμάτων και μείωσης του χρόνου ανάλυσης. Η online-SPE παρουσίασε υποσχόμενα αποτελέσματα, προσφέροντας αποτελεσματική παγίδευση και καθαρισμό των αναλυτών, με ταυτόχρονη μείωση χειρισμών και πιθανών σφαλμάτων. Ωστόσο, παρατηρήθηκαν τεχνικές προκλήσεις, όπως περιορισμοί στη χωρητικότητα της στήλης παγίδευσης και ανάγκη περαιτέρω βελτιστοποίησης των χρονισμών φόρτωσης και μεταγωγής. Για τον λόγο αυτό, η τεχνική αξιολογήθηκε συμπληρωματικά και όχι ως επικυρωμένη μέθοδος, αποτελώντας βάση για μελλοντική έρευνα και πλήρη επικύρωση.

Τα αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι η αναπτυχθείσα μέθοδος LLE/UHPLC–HRMS είναι πλήρως συμβατή με τις απαιτήσεις της WADA για επιβεβαιωτικές αναλύσεις κατηγοριών S5 και S7. Η διαδικασία πληροί τα κριτήρια ειδικότητας, ικανότητας ταυτοποίησης, επαναληψιμότητας, ορθότητας, ανθεκτικότητας και ορίου ανίχνευσης, διασφαλίζοντας αξιόπιστη ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση τόσο σε δοκιμαστικά όσο και σε πραγματικά δείγματα. Επιπλέον, η μεθοδολογία είναι μεταφέρσιμη και αναπαραγώγιμη, καθώς βασίζεται σε καθιερωμένα πρότυπα οργάνων (Vanquish UHPLC – Q Exactive Orbitrap) και χρησιμοποιεί εμπορικά διαθέσιμα αντιδραστήρια υψηλής καθαρότητας.

Η συμβολή της παρούσας εργασίας έγκειται στην παροχή μιας ολιστικής, τεκμηριωμένης και κανονιστικά εναρμονισμένης μεθόδου για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό ουσιών διαφορετικών φαρμακολογικών κατηγοριών, που παρουσιάζουν κοινά χαρακτηριστικά ως προς την αναλυτική αντιμετώπιση και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Η συνδυαστική εξέταση ναρκωτικών και διουρητικών ενισχύει την κατανόηση της λειτουργικής σχέσης τους στο πλαίσιο του αντιντόπινγκ ελέγχου και συμβάλλει στη διαμόρφωση ολοκληρωμένων στρατηγικών ανίχνευσης.

Συνολικά, η εργασία απέδειξε ότι η LLE/UHPLC–HRMS μέθοδος αποτελεί ένα αξιόπιστο, επαναλήψιμο και συμβατό με τα πρότυπα του WADA εργαλείο, ενώ η online-SPE προσφέρει ερευνητικές προοπτικές για αυτοματοποίηση και μελλοντική βελτίωση της απόδοσης. Η συνέχιση της έρευνας προς την πλήρη επικύρωση της online-SPE και την εφαρμογή της σε άλλες κατηγορίες (όπως S6 διεγερτικά ή S9 γλυκοκορτικοειδή) θα μπορούσε να συμβάλει καθοριστικά στη μείωση του χρόνου ανάλυσης, την αύξηση της παραγωγικότητας και τη διατήρηση υψηλών προτύπων ποιότητας στα εργαστήρια αντιντόπινγκ.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

Παράρτημα Α1 – Κατηγορία S7: Ναρκωτικά				
A/A	Ουσία	Κατηγορία WADA	Καθαρότητα	Χαρακτηρισμός
1	6-mono-acetyl-morphine	S7 – Ναρκωτικά	>99%	Analytical Grade Standard
2	Buprenorphine	S7 – Ναρκωτικά	>99%	Analytical Grade Standard
3	Codeine	S7 – Ναρκωτικά	>99%	Analytical Grade Standard
4	Dermorphin	S7 – Ναρκωτικά	>99%	Analytical Grade Standard
5	Dextromoramide	S7 – Ναρκωτικά	>99%	Analytical Grade Standard
6	Diamorphine (Heroin)	S7 – Ναρκωτικά	>99%	Analytical Grade Standard
7	Ethylmorphine	S7 – Ναρκωτικά	>99%	Analytical Grade Standard
8	Fentanyl	S7 – Ναρκωτικά	>99%	Analytical Grade Standard
9	Hydrocodone	S7 – Ναρκωτικά	>99%	Analytical Grade Standard
10	Hydromorphone	S7 – Ναρκωτικά	>99%	Analytical Grade Standard
11	Methadone	S7 – Ναρκωτικά	>99%	Analytical Grade Standard
12	Methadone Metabolite (EDDP)	S7 – Ναρκωτικά	>99%	Analytical Grade Standard
13	Methylnaltrexone	S7 – Ναρκωτικά	>99%	Analytical Grade Standard
14	Morphine	S7 – Ναρκωτικά	>99%	Analytical Grade Standard
15	Morphine-3-glucuronide	S7 – Ναρκωτικά	>99%	Analytical Grade Standard
16	Morphine-6-glucuronide	S7 – Ναρκωτικά	>99%	Analytical Grade Standard
17	Norfentanyl	S7 – Ναρκωτικά	>99%	Analytical Grade Standard
18	Norhydrocodone	S7 – Ναρκωτικά	>99%	Analytical Grade Standard
19	Oxycodone	S7 – Ναρκωτικά	>99%	Analytical Grade Standard
20	Oxymorphone	S7 – Ναρκωτικά	>99%	Analytical Grade Standard
21	Pentazocine	S7 – Ναρκωτικά	>99%	Analytical Grade Standard
22	Pethidine	S7 – Ναρκωτικά	>99%	Analytical Grade Standard
23	Sufentanil	S7 – Ναρκωτικά	>99%	Analytical Grade Standard
24	Tapentadol	S7 – Ναρκωτικά	>99%	Analytical Grade Standard

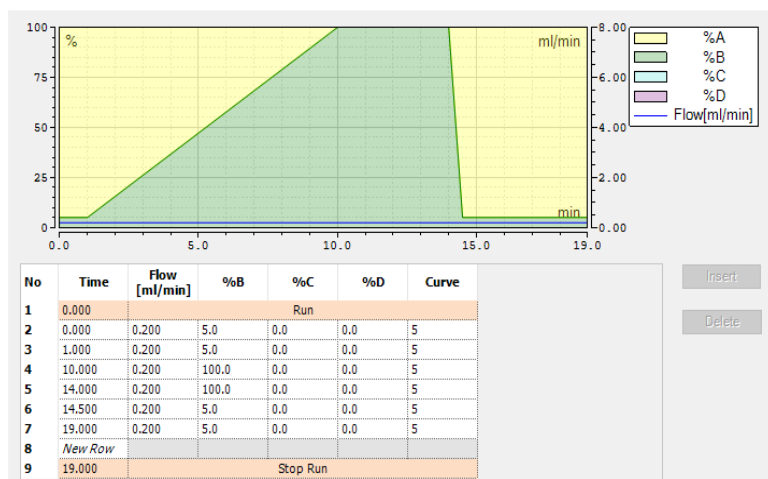
Παράρτημα Α2 – Κατηγορία S5 Διουρητικά και Παράγοντες απόκρυψης				
A/A	Ουσία	Κατηγορία WADA	Καθαρότητα	Χαρακτηρισμός
1	Acetazolamide	S5 – Διουρητικά και Παράγοντες απόκρυψης	>99%	Analytical Grade Standard
2	Althiazide	S5 – Διουρητικά και Παράγοντες απόκρυψης	>99%	Analytical Grade Standard
3	Amiloride	S5 – Διουρητικά και Παράγοντες απόκρυψης	>99%	Analytical Grade Standard
4	Bendroflumethiazide	S5 – Διουρητικά και Παράγοντες απόκρυψης	>99%	Analytical Grade Standard
5	Benzthiazide	S5 – Διουρητικά και Παράγοντες απόκρυψης	>99%	Analytical Grade Standard
6	Brinzolamide	S5 – Διουρητικά και Παράγοντες απόκρυψης	>99%	Analytical Grade Standard
7	Bumetanide	S5 – Διουρητικά και Παράγοντες απόκρυψης	>99%	Analytical Grade Standard
8	Canrenone	S5 – Διουρητικά και Παράγοντες απόκρυψης	>99%	Analytical Grade Standard
9	Chlorazanyl	S5 – Διουρητικά και Παράγοντες απόκρυψης	>99%	Analytical Grade Standard
10	Chlorothiazide	S5 – Διουρητικά και Παράγοντες απόκρυψης	>99%	Analytical Grade Standard
11	Chlortalidone	S5 – Διουρητικά και Παράγοντες απόκρυψης	>99%	Analytical Grade Standard
12	Clopamide	S5 – Διουρητικά και Παράγοντες απόκρυψης	>99%	Analytical Grade Standard
13	Cyclothiazide	S5 – Διουρητικά και Παράγοντες απόκρυψης	>99%	Analytical Grade Standard
14	Desmopressin	S5 – Διουρητικά και Παράγοντες απόκρυψης	>99%	Analytical Grade Standard
15	Diclofenamide	S5 – Διουρητικά και Παράγοντες απόκρυψης	>99%	Analytical Grade Standard
16	Dorzolamide	S5 – Διουρητικά και Παράγοντες απόκρυψης	>99%	Analytical Grade Standard
17	Eplerenone	S5 – Διουρητικά και Παράγοντες απόκρυψης	>99%	Analytical Grade Standard

18	Etacrynic acid	S5 – Διουρητικά και Παράγοντες απόκρυψης	>99%	Analytical Grade Standard
19	Felypressin	S5 – Διουρητικά και Παράγοντες απόκρυψης	>99%	Analytical Grade Standard
20	Furosemide	S5 – Διουρητικά και Παράγοντες απόκρυψης	>99%	Analytical Grade Standard
21	Hydrochlorothiazide	S5 – Διουρητικά και Παράγοντες απόκρυψης	>99%	Analytical Grade Standard
22	Indapamide	S5 – Διουρητικά και Παράγοντες απόκρυψης	>99%	Analytical Grade Standard
23	Mefruside	S5 – Διουρητικά και Παράγοντες απόκρυψης	>99%	Analytical Grade Standard
24	Methazolamide	S5 – Διουρητικά και Παράγοντες απόκρυψης	>99%	Analytical Grade Standard
25	Methyclothiazide	S5 – Διουρητικά και Παράγοντες απόκρυψης	>99%	Analytical Grade Standard
26	Piretanide	S5 – Διουρητικά και Παράγοντες απόκρυψης	>99%	Analytical Grade Standard
27	Polythiazide	S5 – Διουρητικά και Παράγοντες απόκρυψης	>99%	Analytical Grade Standard
28	Probenecid	S5 – Διουρητικά και Παράγοντες απόκρυψης	>99%	Analytical Grade Standard
29	Spironolactone (Canrenone)	S5 – Διουρητικά και Παράγοντες απόκρυψης	>99%	Analytical Grade Standard
30	Torasemide	S5 – Διουρητικά και Παράγοντες απόκρυψης	>99%	Analytical Grade Standard
31	Triamterene	S5 – Διουρητικά και Παράγοντες απόκρυψης	>99%	Analytical Grade Standard
32	Xipamide	S5 – Διουρητικά και Παράγοντες απόκρυψης	>99%	Analytical Grade Standard

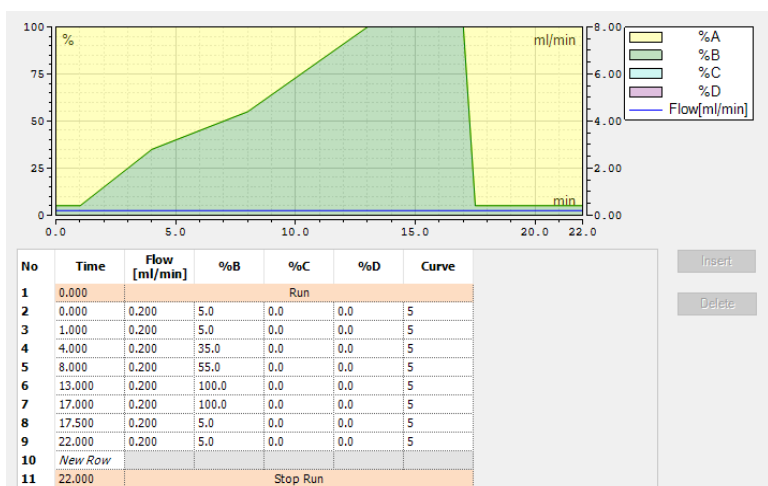
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β1 – ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ S7: ΝΑΡΚΩΤΙΚΑ

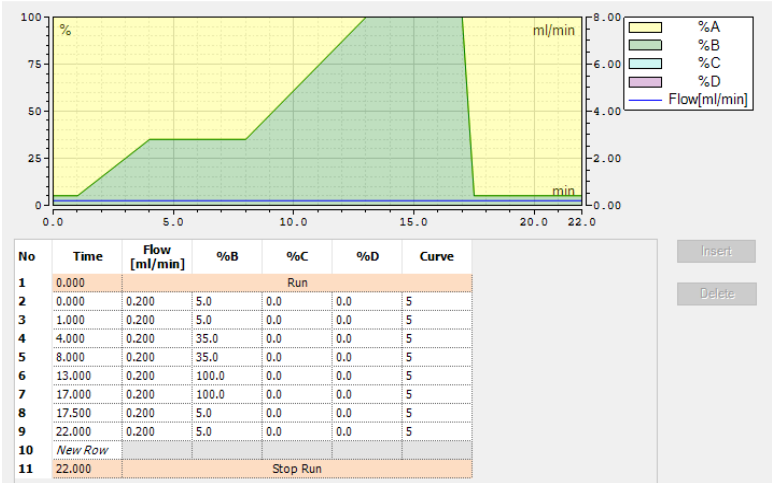
1] SOP124_O_ITP_NARC (CHROM1)



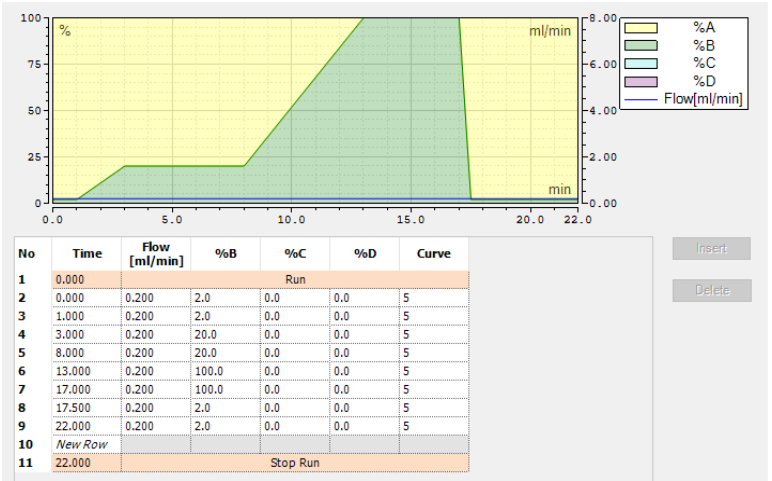
2] SOP124_O_CHROM2_NARC



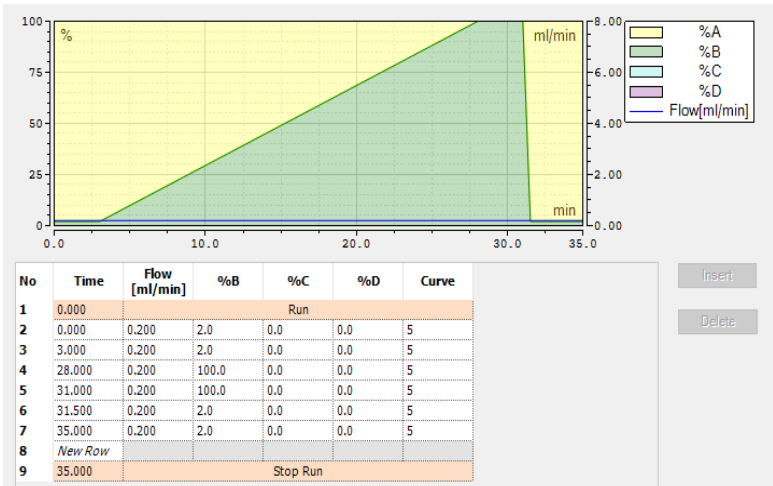
3] SOP124_O_CHROM3_NARC



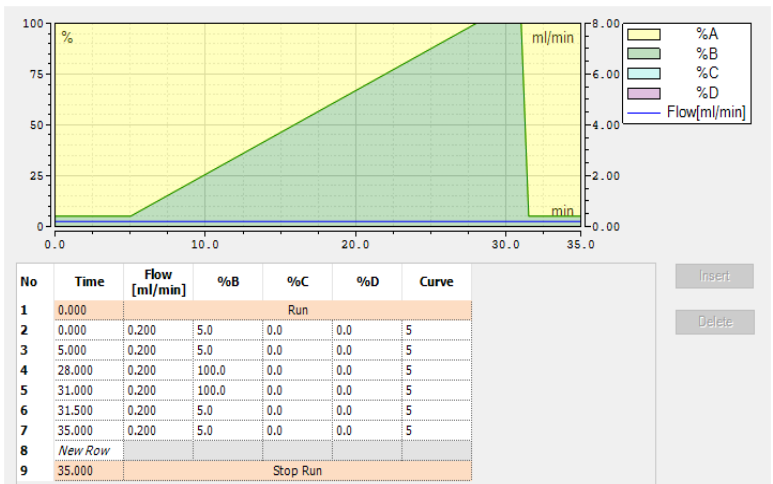
4] SOP124_O_CHROM4_NARC



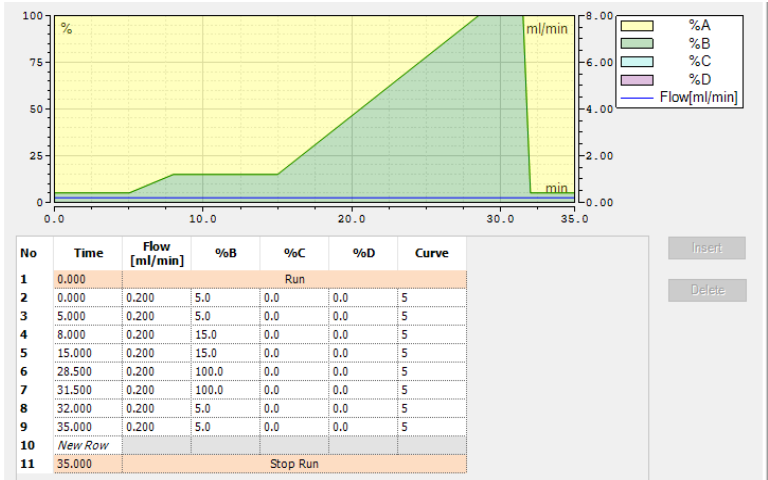
5] SOP124_O_CHROM5_NARC



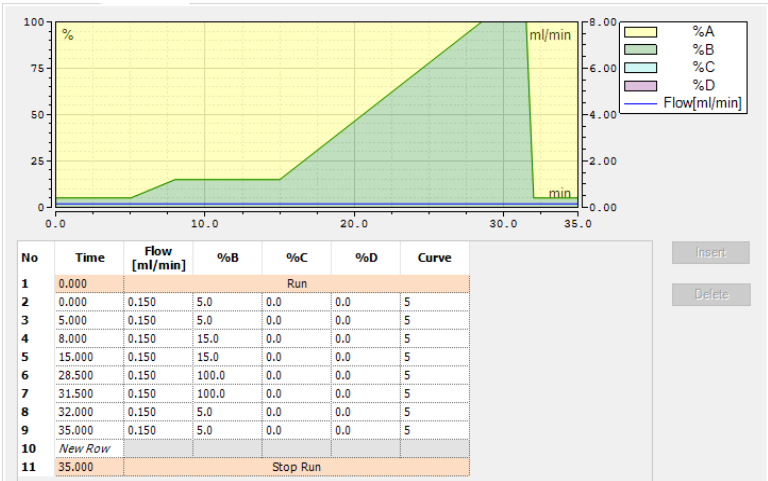
6] SOP124_O_CHROM6_NARC



7] SOP124_O_CHROM7_NARC

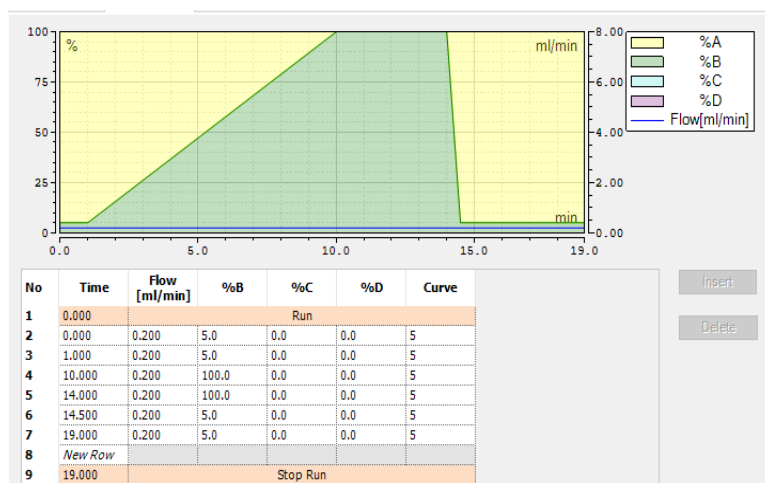


8] SOP124_O_CHROM8_NARC

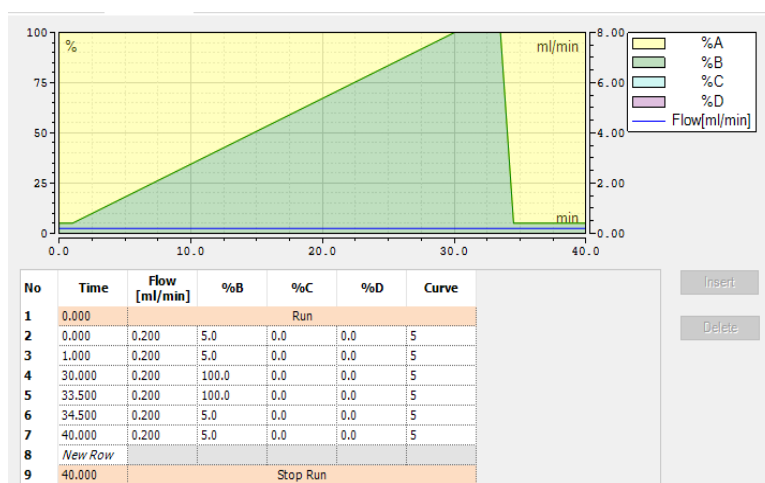


ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β2 – ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ S5: ΔΙΟΥΡΗΤΙΚΑ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΑΠΟΚΡΥΨΗΣ

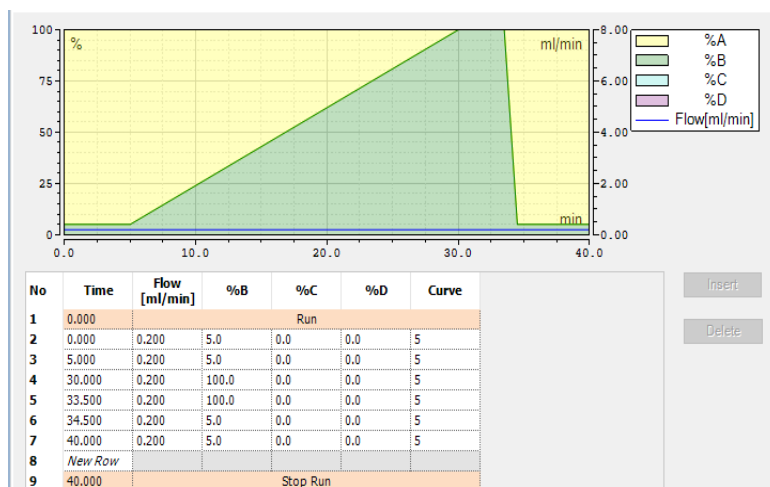
1] SOP124_O_ITP_CALDIUR (*CHROM1*)



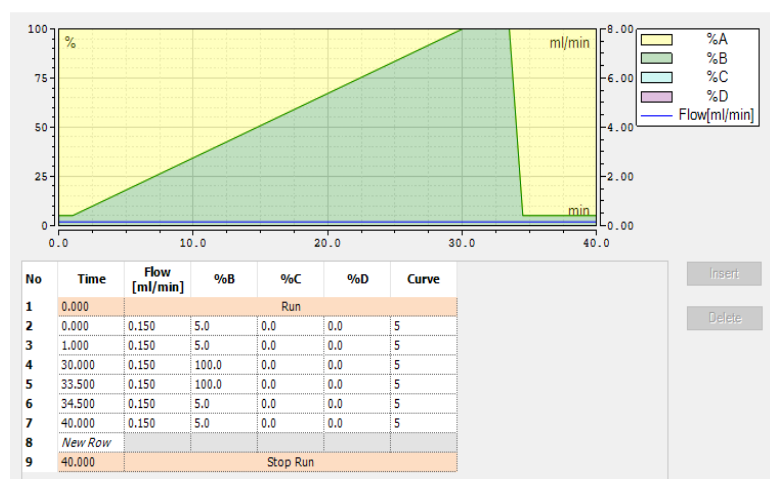
2] SOP124_O_CHROM2_CALDIUR



3] SOP124_O_CHROM3_CALDIUR



4] SOP124_O_CHROM4_CALDIUR



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ1 – ΦΑΣΜΑΤΑ ΜΑΖΑΣ ΓΙΑ ΚΑΘΕ ΕΝΩΣΗ ΣΤΗ ΒΕΛΤΙΣΤΗ ΚΑΝΟΝΙΚΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΕΝΕΡΓΕΙΑ ΣΥΓΚΡΟΥΣΗΣ

S7: ΝΑΡΚΩΤΙΚΑ

1) 6-mono-acetyl-morphine → Best NCE 50

NARC120_2_BEST_CEs #2798 RT: 5.96 AV: 1 NL: 1.36E+006
FTMS + p ESI Full ms2 328.1543@hcd50.00 [50.0000-355.0000]
Q659 1.81E+005
1.0000000000000000
50.000000000000000

2) Buprenorphine → Best NCE 55

NARC120_2_BEST_CEs #4036 RT: 8.15 AV: 1 NL: 1.81E+005
FTMS + p ESI Full ms2 468.3108@hcd55.00 [50.0000-495.0000]
Q659 1.81E+005
1.0000000000000000
50.000000000000000

3) Codeine → BEST NCE 45

NARC120_2_BEST_CEs #2596 RT: 5.60 AV: 1 NL: 1.01E+007
FTMS + p ESI Full ms2 300.1594@hcd45.00 [50.0000-325.0000]
Q659 1.01E+007
1.0000000000000000
50.000000000000000

[illegible]

MARC120_2_BEST_CEs #4324 RT: 8.65 AV: 1 NL: 9.27E+007
 FTMS + pESI Full Ms 2 393.2536@hcd25.00 [50.0000-420.0000]
 206.0756 2535
 500.0000 500.0000 500.0000 500.0000

ARC120_2_BEST_CEs5 #3252 RT: 6.89 AV: 1 NL: 2.07E+005
 165.063755
 151.18655
 133.33333
 116.66667
 100.00000
 83.33333
 66.66667
 50.00000
 33.33333
 16.66667
 0.00000

ARC120_2_BEST_CEs #3878 RT: 7.87 AV: 1 NL: 1.16E+006
FTMS Full MS2 337.2274@hcd45.00 [50.0000-360.0000]
105.0702
1.16E+006
337.2274

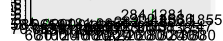
1) ARC120_2_BEST_CFS #2848 RT: 6.04 AV: 1 NL: 1.14E+007
FTMS + p_ESI-Full ms2 300.1594@hcd45.00 [50.0000-325.0000]
199.0753
0100077569-6111889-4127
00000226000022400830920

NARC120_2_BEST_CEs5_#2236 RT: 5.06 AV: 1 NL: 1.48E+006
 FTMS + p EST Full ms2 286.1438@hcd60.00 [50.0000-310.0000]
 286.1437
 80000020413212204370

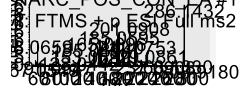
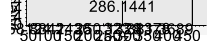
NARC120_2_BEST_CEs #2692 RT: 5.77 AV: 1 NL: 1.8E+006
FTMS + p ESI Full ms2 356.1856@hcd50.00 [50.0000-380.0000]

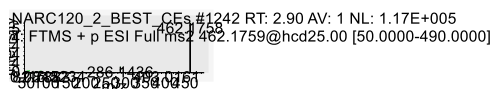
284.1884 1855

686.2944 220.0303 236.0750

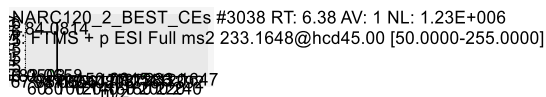


NARC_POS_CON_EA #1529-1626 RT: 3.56-3.74 AV: 24 SB: 23 3.18-3.41 NL: 3.67E6
FTMS 700 F500 d1fms2 286.1438@hcd60.00 [50.0000-310.0000]
06551652000633
5015567200000000
680004050228000

[illegible]



NARC120_2_BEST_CEs #3038 RT: 6.38 AV: 1.23E+006
 02.08.14
 : FIMS + p ESI Full ms2 233.1648@hcd45.00 [50.0000-255.0000]
 07.08.14
 06.08.14
 06.08.14



NARC120_2_BEST_CES #2764 RT: 5.90 AV: 1 NL: 3.55E+006
FTMS + p ESI Full MS 2 316.1543@hcd45.00 [50.0000-340.0000]
2256.6330
243.0262
445.0262
800.0262

NARC120_2_BEST_CEs #2110 RT: 4.70 AV: 1 NL: 2.10E+006
FTMS + p_ESI Full ms 2 302.1387@hcd45.00 [50.0000-325.0000]
227.0937
227.0937
227.0937
227.0937

NARC120_2_BEST_CEs5 #3598 RT: 7.48 AV: 1 NL: 9.42E+006
 F1RMS + p Esf f u r s 2 286.2165@hcd50.00 [50.0000-310.0000]
 2 2041 1756641284 205
 8000002041 1756641284 205
 8000002041 1756641284 205

22) Pethidine → Best NCE 55

NARC120_2_BEST_CEs #3458 RT: 7.13 AV: 1 NL: 1.21E+007
FTMS Full ms2 248.1645@hcd55.00 [50.0000-270.0000]
110.1431 107.0916 164.1645
100.0000 120.1122 248.1645

23) Sufentanil → Best NCE 35

NARC120_2_BEST_CEs #4230 RT: 8.49 AV: 1 NL: 4.85E+007
FTMS Full ms2 387.2101@hcd35.00 [50.0000-415.0000]
110.0200 140.3551 183.6
100.0000 112.0522 387.2101

24) Tapentadol → Best NCE 55

TAPENTADOL_100PPB_027D01_CEs #3290 RT: 6.84 AV: 1 NL: 1.81E+007
FTMS Full ms2 222.1852@hcd55.00 [50.0000-245.0000]
110.0200 140.3551 183.6
100.0000 112.0522 222.1852

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ2 – ΦΑΣΜΑΤΑ ΜΑΖΑΣ ΓΙΑ ΚΑΘΕ ΕΝΩΣΗ ΣΤΗ ΒΕΛΤΙΣΤΗ ΚΑΝΟΝΙΚΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΕΝΕΡΓΕΙΑ ΣΥΓΚΡΟΥΣΗΣ

S5: ΔΙΟΥΡΗΤΙΚΑ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΑΠΟΚΡΥΨΗΣ.

1) Acetazolamide → Best NCE 35

ALDIUR_CP_500_OPT_11 #1093 RT: 7.88 AV: 1 NL: 3.08E+004
FTMS - p ESI Full ms2 222.9954@hcd35.00 [50.0000-245.0000]
181.0693
500.0000 200.0000 300.0000 400.0000

2) Althiazide → Best NCE 20

ALDIUR_CP_500_OPT_11 #2654 RT: 17.10 AV: 1 NL: 2.00E+004
FTMS - p ESI Full ms2 381.9762@hcd20.00 [50.0000-410.0000]
174.27 268.9451
500.0000 200.0000 300.0000 400.0000

3) Amiloride → Best NCE 45

ALDIUR_CP_500_OPT_11 #1030 RT: 7.53 AV: 1 NL: 2.15E+006
FTMS - p ESI Full ms2 230.0552@hcd45.00 [50.0000-255.0000]
189.074
500.0000 200.0000 300.0000 400.0000

CALDIUR_CP_500_OPT_11 #3157 RT: 19.63 AV: 1 NL: 6.03E+004
FTMS - p-581.ms2 420.0305@hcd35.00 [50.0000-445.0000]
239.0748
239.0748
239.0748
239.0748

CALDIUR_CP_500_OPT_11 #2886 RT: 18.34 AV: 1 NL: 2.38E+006
FTMS - p ESI Fullms2 429.9762@hcd35.00 [50.0000-455.0000]
3-74500030700

ALDIUR_CP_500_OPT_11 #1668 RT: 11.36 AV: 1 NL: 2.08E+005
FTMS: 1.0000000000000000
1619.445561.9877
1619.445561.9877
50100750200295800350400

7) Bumetanide → Best NCE 25

CALDIUR_CP_500_OPT_11 #3267 RT: 20.21 AV: 1 NL: 1.14E+005
FTMS + p ESI Full ms2 365.1166@hcd25.00 [50.0000-390.0000]
121.070860
184.075944385
365.1166112
608.0020402000390

8) Canrenone → Best NCE 55

CALDIUR_CP_500_OPT_11 #3550 RT: 22.04 AV: 1 NL: 7.98E+005
FTMS + p ESI Full ms2 341.2111@hcd55.00 [50.0000-365.0000]
170.0933696
341.2111007
682.4222000
682.4222000

9) Chlorazanyl → Best NCE 60

CALDIUR_CP_500_OPT_11 #2363 RT: 15.47 AV: 1 NL: 7.44E+004
FTMS + p ESI Full ms2 222.0541@hcd60.00 [50.0000-245.0000]
153.051108
222.05410324
444.1082064
608.0020402000240

10) Chlorothiazide → Best NCE 45

ALDIUR_CP_500_OPT_11 #1204 RT: 8.59 AV: 1 NL: 3.81E+004
FTMS +ESI Full ms2 295.9561@hcd45.00 [50.0000-320.0000]
124.0271 221.0862 291.0562
06/09/2026 19:56:33 EEST - 216.73.216.250

11) Chlortalidone → Best NCE25

ALDIUR_CP_500_OPT_11 #1973 RT: 13.22 AV: 1 NL: 3.78E+005
FTMS +ESI Full ms2 337.0055@hcd25.00 [50.0000-360.0000]
160.0261 337.0054
06/09/2026 19:56:33 EEST - 216.73.216.250

12) Clopamide → Best NCE 55

ALDIUR_CP_500_OPT_11 #2182 RT: 14.56 AV: 1 NL: 1.54E+006
FTMS +ESI Full ms2 346.0987@hcd55.00 [50.0000-370.0000]
160.0261 346.0987
06/09/2026 19:56:33 EEST - 216.73.216.250

13) Cyclothiazide → Best NCE 45

CALDIUR_CP_500_OPT_11 #2959 RT: 18.69 AV: 1 NL: 3.43E+004
F TMS - p ESI Full ms2 388.0198@hcd45.00 [50.0000-415.0000]
321.9718
302.0000
50.0000-415.0000

14) Desmopressin (Acetate salt) → Best NCE 35

CAL_S5_CP_DESMOPRESSIN_AC_580 #1797 RT: 12.10 AV: 1 NL: 3.85E+005
F TMS - p ESI Full ms2 1069.4324@hcd35.00 [74.0000-1110.0000]
1069.4323
1069.4324
74.0000-1110.0000

15) Diclofenamide → Best NCE 45

CALDIUR_CP_500_OPT_11 #1952 RT: 13.11 AV: 1 NL: 3.56E+005
F TMS - p ESI Full ms2 302.9073@hcd45.00 [50.0000-325.0000]
302.9073
302.9073
50.0000-325.0000

CALDIUR_CP_500_OPT_11 #1099 RT: 7.92 AV: 1 NL: 2.82E+005
FTMS - p ESI Full ms2 325.0345@hcd35.00 [50.0000-350.0000]
151.0216 0.6505

CALDIUR_CP_500_OPT_11 #2683 RT: 17.23 AV: 1 NL: 1.58E+006
FTMS + p ESI Full ms2 415.2115@hcd25.00 [50.0000-440.0000]
221.0996 268.0937 415.2115
504.0032 504.0034

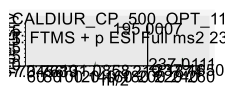
CALDIUR_CP_500_OPT_11 #2501 RT: 16.20 AV: 1 NL: 7.83E+003
FTMS - p ESI Full Scan 2009.0004@hcd10.00 [50.0000-355.0000]
149.0223 278.0100
97.0403 278.0100
68.0100 278.0100

CALDIUR_CP_500_OPT_11 #1309 RT: 9.24 AV: 1 NL: 3.81E+004
 FTMS - ²⁰⁴Pb 161.4421295.9572@hcd40.00 [50.0000-320.0000]
 7.9643
 16.4247 sec 267.0980569
 68000230052022403820

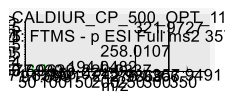
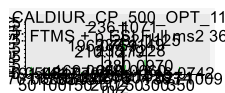
2 CALDIUR_CP_500_OPT_11 #2790 RT: 17.83 AV: 1 NL: 1.11E+005
 3 [1.122-0.316]
 4 [ETMS] - ePSI Full ms2 364.0528@hcd45.00 [50.0000-390.0000]
 5 709.053034 06813
 6 5011001502650300350
 7 5011001502650300350
 8 5011001502650300350
 9 5011001502650300350

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
84

CALDIUR_CP_500_OPT_11 #1434 RT: 10.06 AV: 1 NL: 9.98E+005
FTMS + p ESF full ms2 237.0111@hcd25.00 [50.0000-260.0000]
237.0111



CALDIUR_CP_500_OPT_11 #2444 RT: 15.90 AV: 1 NL: 2.92E+005
FTMS - p ESI Full ms2 357.9495@hcd25.00 [50.0000-385.0000]
258.0107
50.000150.000250.000350.000450.000550.000650.000750.000850.000950.001050.001150.001250.001350.001450.001550.001650.001750.001850.001950.002050.002150.002250.002350.002450.002550.002650.002750.002850.002950.003050.003150.003250.003350.003450.003550.003650.003750.003850.003950.004050.004150.004250.004350.004450.004550.004650.004750.004850.004950.005050.005150.005250.005350.005450.005550.005650.005750.005850.005950.006050.006150.006250.006350.006450.006550.006650.006750.006850.006950.007050.007150.007250.007350.007450.007550.007650.007750.007850.007950.008050.008150.008250.008350.008450.008550.008650.008750.008850.008950.009050.009150.009250.009350.009450.009550.009650.009750.009850.009950.010050.010150.010250.010350.010450.010550.010650.010750.010850.010950.011050.011150.011250.011350.011450.011550.011650.011750.011850.011950.012050.012150.012250.012350.012450.012550.012650.012750.012850.012950.013050.013150.013250.013350.013450.013550.013650.013750.013850.013950.014050.014150.014250.014350.014450.014550.014650.014750.014850.014950.015050.015150.015250.015350.015450.015550.015650.015750.015850.015950.016050.016150.016250.016350.016450.016550.016650.016750.016850.016950.017050.017150.017250.017350.017450.017550.017650.017750.017850.017950.018050.018150.018250.018350.018450.018550.018650.018750.018850.018950.019050.019150.019250.019350.019450.019550.019650.019750.019850.019950.020050.020150.020250.020350.020450.020550.020650.020750.020850.020950.021050.021150.021250.021350.021450.021550.021650.021750.021850.021950.022050.022150.022250.022350.022450.022550.022650.022750.022850.022950.023050.023150.023250.023350.023450.023550.023650.023750.023850.023950.024050.024150.024250.024350.024450.024550.024650.024750.024850.024950.025050.025150.025250.025350.025450.025550.025650.025750.025850.025950.026050.026150.026250.026350.026450.026550.026650.026750.026850.026950.027050.027150.027250.027350.027450.027550.027650.027750.027850.027950.028050.028150.028250.028350.028450.028550.028650.028750.028850.028950.029050.029150.029250.029350.029450.029550.029650.029750.029850.029950.030050.030150.030250.030350.030450.030550.030650.030750.030850.030950.031050.031150.031250.031350.031450.031550.031650.031750.031850.031950.032050.032150.032250.032350.032450.032550.032650.032750.032850.032950.033050.033150.033250.033350.033450.033550.033650.033750.033850.033950.034050.034150.034250.034350.034450.034550.034650.034750.034850.034950.035050.035150.035250.035350.035450.035550.035650.035750.035850.035950.036050.036150.036250.036350.036450.036550.036650.036750.036850.036950.037050.037150.037250.037350.037450.037550.037650.037750.037850.037950.038050.038150.038250.038350.038450.038550.038650.038750.038850.038950.039050.039150.039250.039350.039450.039550.039650.039750.039850.039950.040050.040150.040250.040350.040450.040550.040650.040750.040850.040950.041050.041150.041250.041350.041450.041550.041650.041750.041850.041950.042050.042150.042250.042350.042450.042550.042650.042750.042850.042950.043050.043150.043250.043350.043450.043550.043650.043750.043850.043950.044050.044150.044250.044350.044450.044550.044650.044750.044850.044950.045050.045150.045250.045350.045450.045550.045650.045750.045850.045950.046050.046150.046250.046350.046450.046550.046650.046750.046850.046950.047050.047150.047250.047350.047450.047550.047650.047750.047850.047950.048050.048150.048250.048350.048450.048550.048650.048750.048850.048950.049050.049150.049250.049350.049450.049550.049650.049750.049850.049950.050050.050150.050250.050350.050450.050550.050650.050750.050850.050950.051050.051150.051250.051350.051450.051550.051650.051750.051850.051950.052050.052150.052250.052350.052450.052550.052650.052750.052850.052950.053050.053150.053250.053350.053450.053550.053650.053750.053850.053950.054050.054150.054250.054350.054450.054550.054650.054750.054850.054950.055050.055150.055250.055350.055450.055550.055650.055750.055850.055950.056050.056150.056250.056350.056450.056550.056650.056750.056850.056950.057050.05

[illegible]

25) Polythiazide → Best NCE 25

CALDIUR_CP_500_OPT_11 #3138 RT: 19.54 AV: 1 NL: 8.88E+004
FTMS + p EST Full ms2 439.9781@hcd25.00 [50.0000-465.0000]
122.04667
142.04667
50.0000-465.0000

26) Probenecid → Best NCE 25

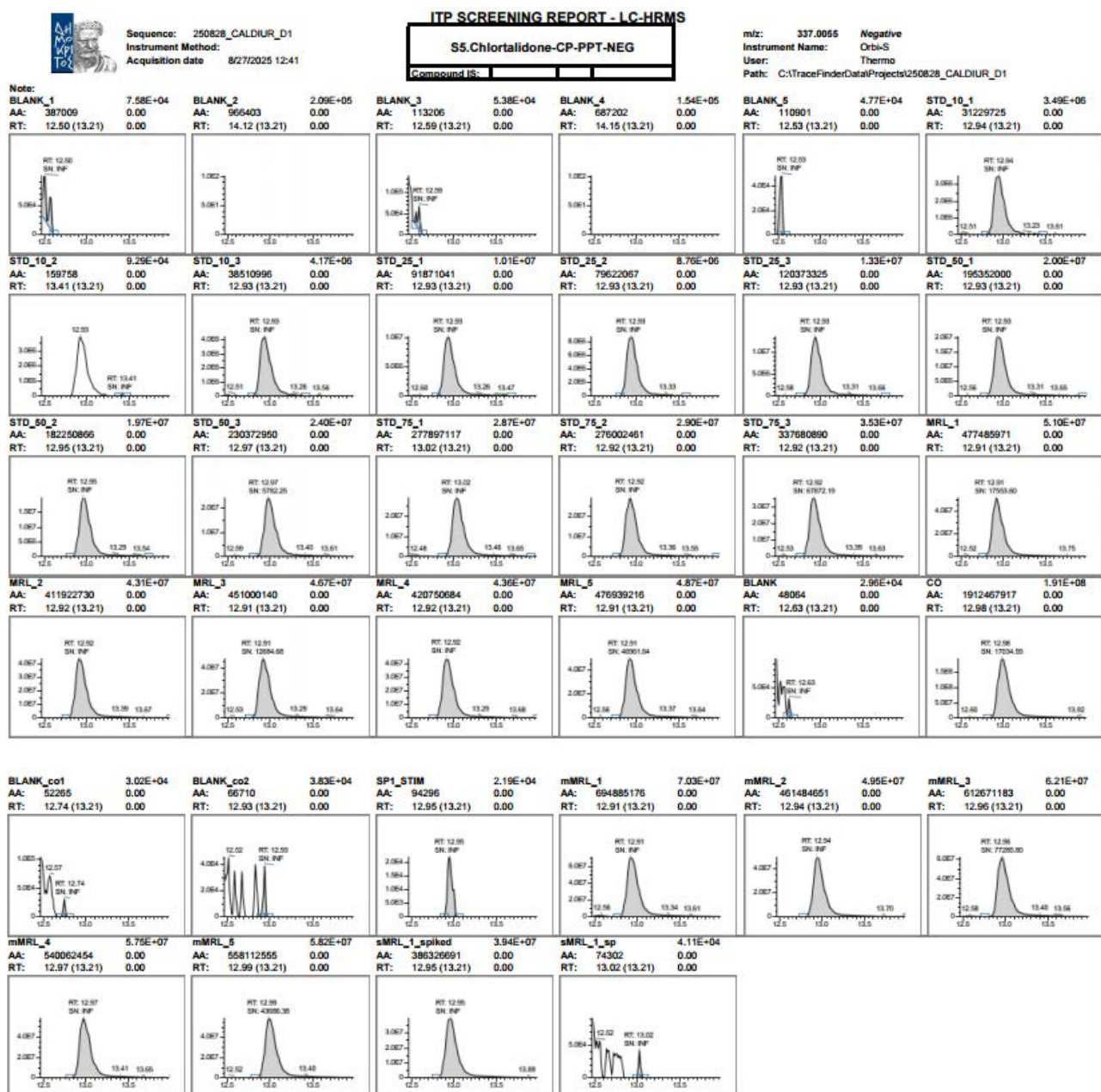
CALDIUR_CP_500_OPT_11 #3237 RT: 20.04 AV: 1 NL: 4.09E+005
FTMS + p EST Full ms2 286.1108@hcd25.00 [50.0000-310.0000]
100.11784
100.11784
50.0000-310.0000

27) Spironolactone (CANRENONE) → Best NCE 10

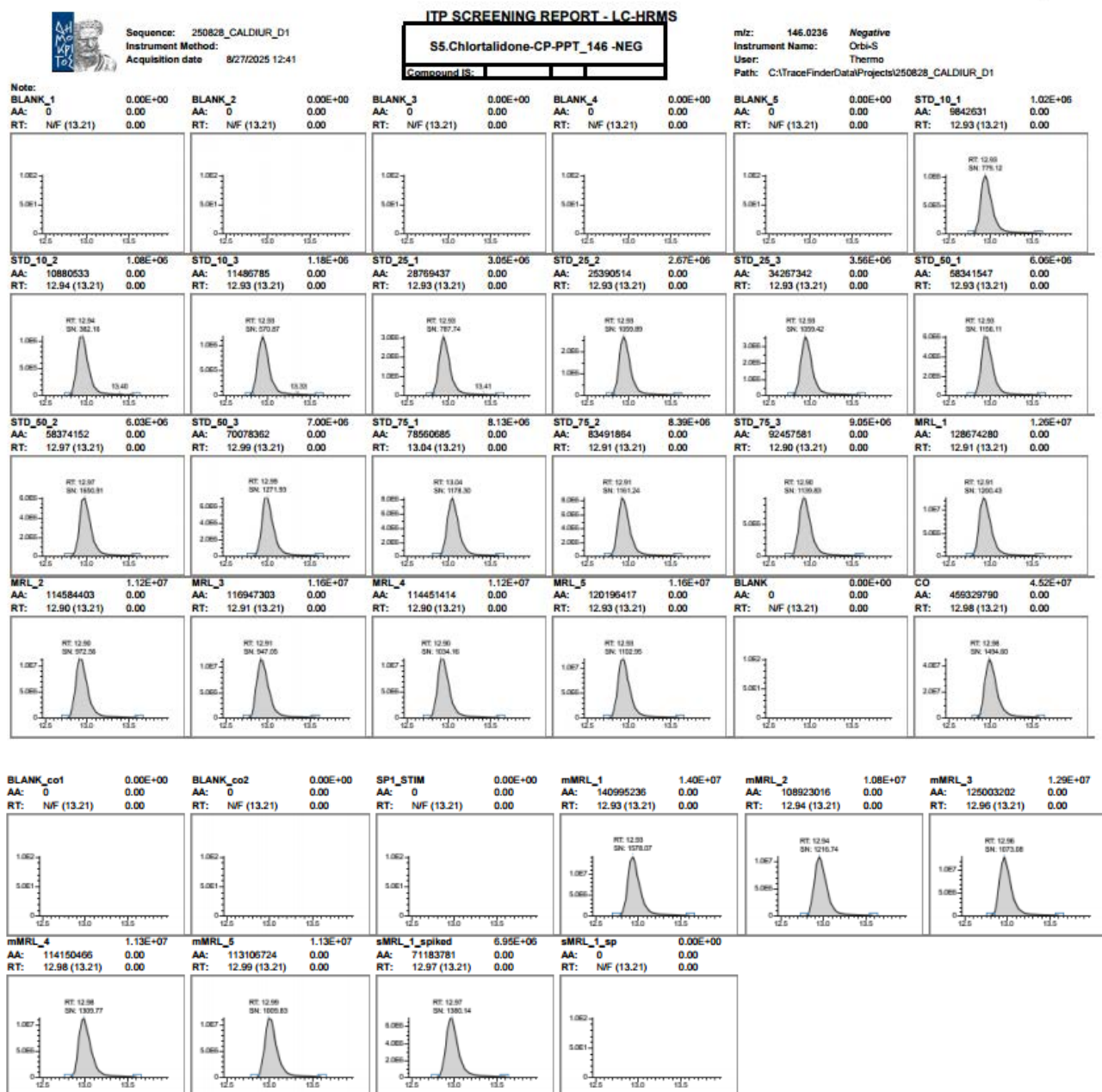
CALDIUR_SPIRONOLACTONE #3515 RT: 21.99 AV: 1 NL: 6.28E+004
FTMS + p EST Full ms2 417.2094@hcd10.00 [50.0000-445.0000]
124.6920
124.6920
50.0000-445.0000

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Δ

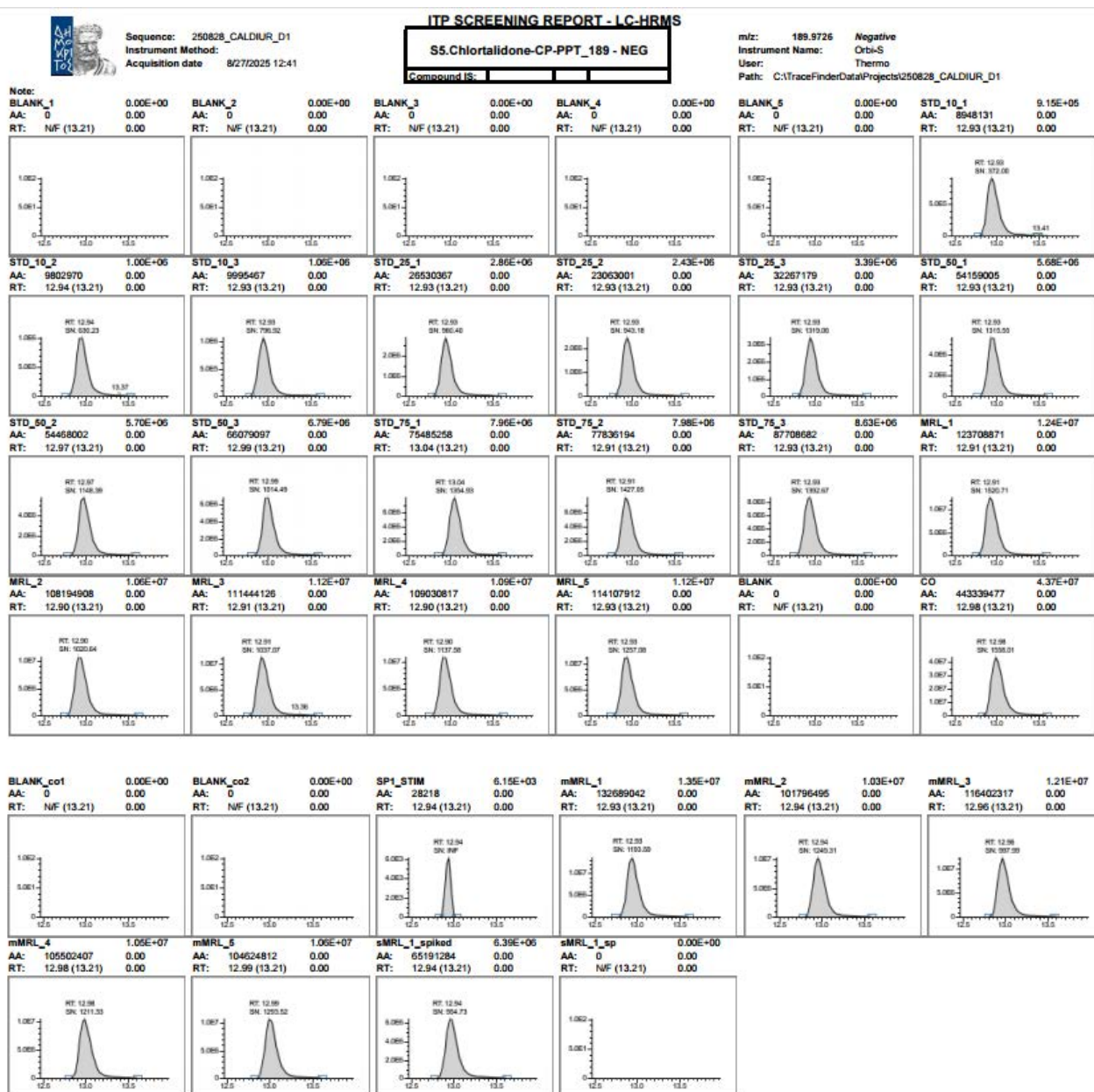
Παράδειγμα εκτύπωσης αναφοράς (report template) από το λογισμικό TraceFinder για την ανίχνευση της απαγορευμένης ουσίας Chlortalidone στα δείγματα D1



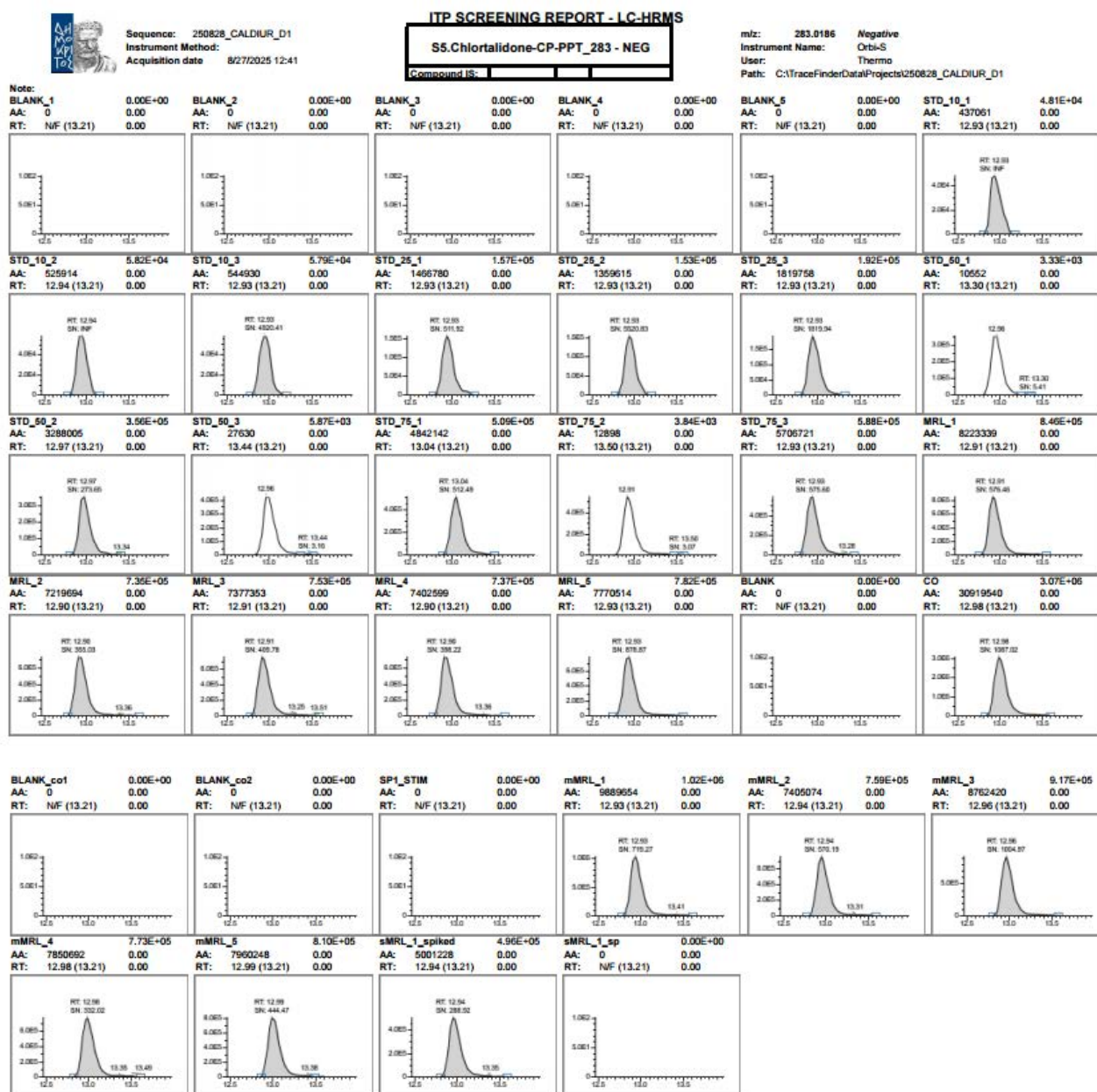
■ Θραύσμα 146.0236



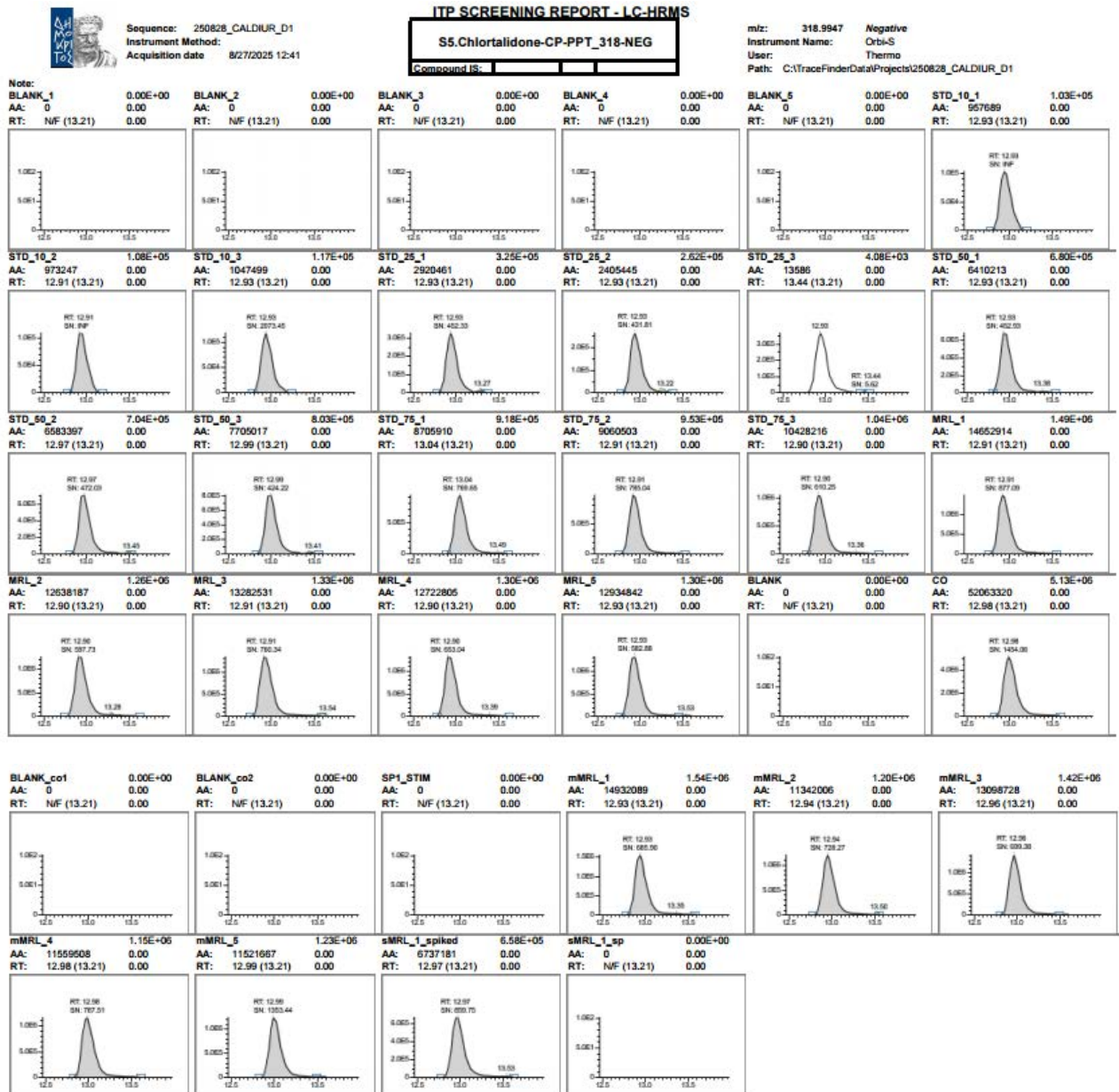
■ Θραύσμα 189.9726



■ Θραύσμα 283.0186



■ Θραύσμα 318.9947



Πίνακας που συμπληρώθηκε κατά την επεξεργασία δεδομένων, με αναφορά στο MRPL της ουσίας στο πρώτο δείγμα της ημέρας 1. Η χρήση τέτοιων πινάκων επεξεργασίας δεδομένων συμβάλλει στην τελική αξιολόγηση σχετικά με το εάν η ουσία πληροί τα κριτήρια επικύρωσης

STD1

Standard injection MRPL ng/ml						
NAME						
	RT _{ISTD}	RT _{analyte}	RRT	AREA	Rel. AREA	
			#ΔΙΑΙΡ/0!		#ΔΙΑΙΡ/0!	
			#ΔΙΑΙΡ/0!		#ΔΙΑΙΡ/0!	
			#ΔΙΑΙΡ/0!		#ΔΙΑΙΡ/0!	
			#ΔΙΑΙΡ/0!		#ΔΙΑΙΡ/0!	
Internal Standard						

Standard injection MRPL ng/ml AVERAGE						
	RT _{ISTD}	RT _{analyte}	RRT	AREA	Rel. AREA	
0.0000		#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	
0.0000		#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	
0.0000		#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	
0.0000		#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	
Internal Standard	#ΔΙΑΙΡ/0!					

Range of acceptance***						
Ion m/z	criterion 5% (absolute)		criterion 20% (relative)		criterion 10% (absolute)	
	min	max	min	max	min	max
0.0000	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
0.0000	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
0.0000	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
0.0000	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!

Range of acceptance Chromatographic criteria					
Ion m/z	RRT criteria	RRT criteria	Ion m/z	RT criteria	RT criteria
	labeled istd			labeled istd	
	min	max		min	max
0.0000	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	0.0000	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
0.0000	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	0.0000	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
0.0000	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	0.0000	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
0.0000	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	0.0000	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!

Παράδειγμα πίνακα επεξεργασίας δεδομένων με αναφορά στο MRPL της ουσίας στο πρώτο δείγμα της ημέρας 1, για την αξιολόγηση της επικύρωσης της απαγορευμένης ένωσης Chlortalidone

STD1						
Standard injection 200 ng/ml						
Chlortalidone						
	RT _{ISTD}	RT _{analyte}	RRT	AREA	Rel. AREA	
283.0186		12.91	0.825	8,223,339	6.39%	
146.0236		12.91	0.825	128,674,280	100.00%	
189.9726		12.91	0.825	123,708,871	96.14%	
318.9947		12.91	0.825	14,652,914	11.39%	
IS-Furosemide_d5	15.65					
Standard injection 200 ng/ml AVERAGE						
	RT _{ISTD}	RT _{analyte}	RRT	AREA	Rel. AREA	
283.0186		13.06	0.83	8,585,229.70	6.51%	
146.0236		13.06	0.83	131,508,144.10	100.00%	
189.9726		13.06	0.83	127,457,297.00	96.76%	
318.9947		13.06	0.83	15,189,357.00	11.51%	
IS-Furosemide_d5	15.81					
Range of acceptance***						
Ion m/z	criterion 5% (absolute)		criterion 20% (relative)		criterion 10% (absolute)	
	min	max	min	max	min	max
283.0186	1.51%	11.51%	-	-	-	-
146.0236	-	-	-	-	90.00%	110.00%
189.9726	-	-	-	-	86.76%	106.76%
318.9947	6.51%	16.51%	-	-	-	-
Range of acceptance Chromatographic criteria						
Ion m/z	RRT criteria	RRT criteria		Ion m/z	RT criteria	RT criteria
	labeled istd				labeled istd	
	min	max			min	max
283.0186	0.818	0.835		283.0186	12.955	13.155
146.0236	0.818	0.835		146.0236	12.958	13.158
189.9726	0.818	0.835		189.9726	12.955	13.155
318.9947	0.818	0.835		318.9947	12.955	13.155

Βιβλιογραφία:

(Christen **et al.** 2025) ή (Christen **et al.** 2025, p. 224) / Christen, C., Rajesh, J.B., Debbarma, J., Kar, P., Kumar, N., Das, M., Chakraborty, M., Debbarma, B., **Rose, Kh.T.**, Marwein, S.C., Debnath, A., Lucy, E., **Athreya, E.Y.** & Singh, A., 2025. Doping in equine and its implications in race horses. *International Journal of Veterinary Sciences and Animal Husbandry*, **10**(8), pp.220–229. doi:10.22271/veterinary.2025.v10.i8d.2481.

Breitsameter, C., 2017. How to justify a ban on doping? *Journal of Medical Ethics*, 43(5), pp.287–292. doi:10.1136/medethics-2017-104310

Bromirski, M., 2018. *First choice in high resolution mass spectrometry with Orbitrap mass analyzer technology for screening, confirmative and quantitative analyses*. White Paper 65146. San Jose, CA: Thermo Fisher Scientific.

Damjanovic, S., Rossi, C., Manolopoulos, N., Matijevic, T., Korpak, D., Kurtanovic, A., Murtin, V., Stanojevic, M., Giustino, V., Roklicer, R., Bianco, A. & Drid, P., 2025. Doping in combat sports: a systematic review. *The Physician and Sportsmedicine*, 53(2), pp.103–111. doi:10.1080/00913847.2025.2449812.

Eliuk, S. & Makarov, A., 2015. Evolution of Orbitrap mass spectrometry instrumentation. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 8, pp.61–80. doi:10.1146/annurev-anchem-071114-040325.

European Medicines Agency (EMA), 2022. *ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis*. EMA/CHMP/ICH/172948/2019. London: EMA.

European Medicines Agency (EMA), 2024. *Implementation strategy of ICH Guideline M10 on bioanalytical method validation*. EMA/449486/2023. Amsterdam: EMA.

Hellenic Anti-Doping Organization (**EOKAN**), n.d. *HADA — National Anti Doping Organisation* [homepage]. Available at: <https://eokan.gr/en> (Accessed: 12 September 2025)

International Organization for Standardization (ISO) & International Electrotechnical Commission (IEC), 2017. *ISO/IEC 17025:2017 – General requirements for the competence of testing and calibration laboratories*. Geneva: ISO.

Jiwan, J-L.H., Wallemacq, P. & Hérent, M-F., 2011. HPLC-high resolution mass spectrometry in clinical laboratory? *Clinical Biochemistry*, 44(2-3), pp.136–147. doi:10.1016/j.clinbiochem.2010.08.018.

Mottram, D. & Chester, N., 2022. *Φάρμακα στον Αθλητισμό*. 8η έκδοση. Επιμ. Αριστείδης Βεσκούκης. Αθήνα: Κωνσταντάρας Ιατρικές Εκδόσεις.

Ramirez, C.E., Wang, C., Gardinali, P.R., Massi, J. & Beck, J., 2014. *Fully automated, trace-level determination of parent and alkylated PAHs in environmental waters by online SPE-LC-APPI-MS/MS*. Application Note 598. Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA.

Ruamaram, S., 2021. *Principles of Orbitrap Mass Spectrometry*. Presentation. SciSpec Co. Ltd.

Schiessel, D., 2017. *An online-SPE approach to analyzing broad classes of emergent contaminants*. Thermo Fisher Scientific / Babcock Laboratories, Riverside, CA.

Thermo Fisher Scientific (n.d.) *Q Exactive Orbitrap Mass Spectrometers*. Available at: <https://www.thermofisher.com/gr/en/home/industrial/mass-spectrometry/liquid-chromatography-mass-spectrometry-lc-ms/lc-ms-systems/orbitrap-lc-ms/q-exactive-orbitrap-mass-spectrometers.html> (Accessed: 11 September 2025).

Thermo Fisher Scientific, 2011. *SOLA SPE cartridges and plates – Technical Guide*. Waltham, MA: Thermo Fisher Scientific.

Thermo Fisher Scientific, 2016. *Q Exactive Plus Orbitrap LC-MS/MS System – Product Specifications* (PS63912-EN). Waltham, MA: Thermo Fisher Scientific.

Thermo Fisher Scientific, 2017. *Exactive Series – Operating Manual* (P/N BRE0012255, Rev. A). Bremen, Germany: Thermo Fisher Scientific.

Thermo Fisher Scientific, 2022. *Vanquish UHPLC and HPLC Systems – Operating Manual* (4820.3601-EN, Rev. 5.0). Germering, Germany: Thermo Fisher Scientific.

Thermo Fisher Scientific, n.d. *High Performance Liquid Chromatography*. Thermo Fisher Scientific. Available at: <https://www.thermofisher.com/gr/en/home/industrial/chromatography/liquid-chromatography-lc.html> (Accessed: 12 September 2025).

U.S. Food and Drug Administration (FDA), 2018. *Bioanalytical Method Validation: Guidance for Industry*. Silver Spring, MD: FDA.

Vlad, R.A., Hancu, G., Popescu, G.C. & Lungu, I.A., 2018. Doping in sports, a never-ending story? *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 8(4), pp.529–534. doi:10.15171/apb.2018.062.

World Anti-Doping Agency (WADA), 2021. *International Standard for Laboratories*. Montreal: WADA.

World Anti-Doping Agency (WADA), 2021. *World Anti-Doping Code*. Montreal: WADA.

World Anti-Doping Agency (WADA), 2021c. *Guidelines for Sample Collection. 2021 Code Implementation Support Program (CISP)*. Montreal: WADA.

World Anti-Doping Agency (WADA), 2023. *International Standard for Testing and Investigations (ISTI)*. Montreal: WADA.

World Anti-Doping Agency (WADA), 2025. *World Anti-Doping Code: International Standard – Prohibited List 2025*. Montreal: WADA.

Zubarev, R.A. & Makarov, A., 2013. Orbitrap mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 85(11), pp.5288–5296. doi:10.1021/ac4001223.

Εθνικό Σύστημα Διαπίστευσης (Ε.ΣΥ.Δ.), 2022. *Εργαστήριο Ελέγχου Doping, ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος – Διαπιστεύσεις Εργαστηρίου*. Available at: <https://esyd.gr/εργαστήριο-ελέγχου-doping-εκεφε-δημόκριτος> (Accessed: 11 September 2025)

Εφημερίδα της Κυβερνήσεως, 2021. *Νόμος υπ' αριθμ. 4791: Αναγκαίες ρυθμίσεις για την εναρμόνιση της ελληνικής νομοθεσίας με τον αναθεωρημένο, με ισχύ από 1.1.2021, Κώδικα Αντιντόπινγκ του Παγκόσμιου Οργανισμού Αντιντόπινγκ*. ΦΕΚ Α' 51/03.04.2021. Αθήνα: Εθνικό Τυπογραφείο.

Λυμπούση, Α., 2016. *Ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου για τον ποσοτικό προσδιορισμό του μεταβολίτη της αιθανόλης σε ούρα αθλητών με διαδικασία απευθείας έγχυσης με GC/MS και GC/HRMS*. Διπλωματική εργασία (Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης). Διαπανεπιστημιακό Διατμηματικό Πρόγραμμα Σπουδών «Χημική Ανάλυση – Έλεγχος Ποιότητας», Αθήνα.

Παλάσκα, Β., 2013. *Ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδων επιβεβαίωσης διεγερτικών και ναρκωτικών ουσιών σε δείγματα ούρων αθλητών με υγροχρωματογραφία/φασματομετρία μαζών με αναλυτή παγίδας ιόντων (LC/MSD Ion Trap)*. Διπλωματική εργασία (Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης). Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Φαρμακευτικής, Αθήνα.

Σακελλαρίου, Π., 2020. *Συγκριτική μελέτη μεθόδων έμμεσης ανίχνευσης αυτόλογης μετάγγισης αίματος και διέγερσης ερυθροποίησης με εντοπισμό βιοδεικτών σε βιολογικά δείγματα για τον έλεγχο ντόπινγκ αθλητών*. Διδακτορική διατριβή. Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Βιολογίας.