



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΑΙΣΘΗΤΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΕ
ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΙΜΑΤΟΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΑΕΡΙΑΣ
ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΣΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕ
ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ (GC-MS)**

Γρηγόριος-Παναγιώτης Γεωργίου Αναστασιάδης

2021

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΑΙΣΘΗΤΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΕ
ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΙΜΑΤΟΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΑΕΡΙΑΣ
ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΣΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕ
ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ (GC-MS)

DETERMINATION OF DRUGS USED IN ANESTHESIA IN
BLOOD SAMPLES USING GAS CHROMATOGRAPHY AND
MASS SPECTOMETRY (GC-MS)

Γρηγόριος-Παναγιώτης Γεωργίου Αναστασιάδης

Επιβλέπων Καθηγητής : Νικόλαος Ράϊκος

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή :

Επιβλέπων Καθηγητής : Νικόλαος Ράϊκος

Συνεπιβλέπων Καθηγητής : Δημήτριος Κουρέτας

Μέλος : Δημήτριος Στάγκος

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του προγράμματος προπτυχιακών σπουδών του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Το θέμα της εργασίας αυτής υποδείχθηκε από τον Καθηγητή του τμήματος Ιατρικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης κ. Νικόλαο Ράϊκο και τον Καθηγητή του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Δημήτριο Κουρέτα. Τους ευχαριστώ ιδιαίτερα για τη συνεργασία, τη συνεχή επίβλεψη και βοήθεια τους προκειμένου να υλοποιηθεί η παρούσα εργασία.

Το πειραματικό μέρος έλαβε χώρα στο Εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης υπό την καθοδήγηση του Καθηγητή κ. Νικόλαου Ράϊκου, τον οποίο ευχαριστώ ιδιαιτέρως για την παραχώρηση του εργαστηριακού χώρου και του οργάνου (GC-MS) αλλά και των πραγματικών δειγμάτων που παραχωρήθηκαν για την διεκπεραίωση της πειραματικής εργασίας.

Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω σε ολόκληρη την ομάδα της δικαστικής και κλινικής τοξικολογίας και ειδικότερα στον υποψήφιο Διδάκτορα κ. Διαμαντή Κρόκο, στην Διδάκτορα κα. Μαστρογιάννη Ορθοδοξία και στον κ. Αμβρόσιο Ορφανίδη χωρίς τους οποίους δεν θα ήταν δυνατή η εκπλήρωση της πειραματικής εργασίας.

Θεσσαλονίκη 2021

Περιεχόμενα

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	6
1. ΑΝΑΙΣΘΗΤΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ.....	7
A. Γενικά Αναισθητικά	7
B. Τοπικά Αναισθητικά	12
2. ΕΠΙΠΕΔΑ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΑ, ΤΟΞΙΚΑ ΚΑΙ ΘΑΝΑΤΗΦΟΡΑ ΤΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ	14
3. ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	15
4. ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	16
4.1 Προκατεργασία Βιολογικού Δείγματος	16
4.2 Εκχύλιση Υγρού-Υγρού (LLE)	17
5. ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ.....	19
5.1 Εισαγωγή.....	19
5.2 Ανιχνευτές.....	22
5.3 Αέριος Χρωματογραφία – Φασματοσκοπία Μαζών (GC – MS).....	23
6. ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΜΑΖΩΝ, ΦΑΣΜΑΤΟΓΡΑΦΟΣ ΜΑΖΩΝ	25
6.1 Ορισμός.....	25
6.2 Χρήση της φασματοσκοπίας μαζών	25
6.3 Δυναμική της φασματοσκοπίας μαζών	26
6.4 Βασικές διαδικασίες φασματοσκοπίας μαζών	26
7. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	32
B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	33
8. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	34
8.1 Αντιδραστήρια και Διαλύτες	34
8.2 Όργανα και Συσκευές.....	34
8.3 Βιολογικά Δείγματα	35
9. ΜΕΘΟΔΟΣ	36
9.1 Προκατεργασία Δείγματος.....	36
9.2 Σύστημα GC – MS	36
ΕΙΣΑΓΩΓΕΑΣ	38
ΦΟΥΡΝΟΣ	38
10. ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ	41
10.1 Επιλογή Διαλύτη Εκχύλισης	41
11. ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ.....	42

11.1 Παράμετροι επικύρωσης	43
11.1.1 Γραμμικότητα της μεθόδου	43
11.1.2 Όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ)	44
11.1.3 Έλεγχος Επαναληψιμότητας	45
11.1.4 Εκλεκτικότητα.....	46
11.1.5 Μεταφορά Αναλύτη σε Διαδοχικά Δείγματα (carryover)	47
12. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΦΑΣΜΑΤΑ ΜΑΖΩΝ.....	49
13. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	54
14. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	56

Α. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΑΝΑΙΣΘΗΤΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ

A. Γενικά Αναισθητικά

Τα γενικά αναισθητικά διακρίνονται σε: α) χορηγούμενα ενδοφλεβίως και β) χορηγούμενα μέσω εισπνοής. Χορηγούνται από ειδικούς και εφόσον διατίθενται τα μέσα καρδιαναπνευστικής ανάνηψης.

Στα ενδοφλέβια αναισθητικά υπάγονται τα ταχείας έναρξης και σχετικά βραχείας διάρκειας δράσης βαρβιτουρικά, όπως θειοπεντάλη και μη βαρβιτουρικά, όπως βενζοδιαζεπίνες, νευροληπτικά, οπιοειδή, κεταμίνη, προποφόλη κ.ά.

Τα αναισθητικά χορηγούμενα δια εισπνοής μέσω του συστήματος αναισθησίας ταξινομούνται σε αέρια και πτητικά αναισθητικά.

Στα αέρια υπάγονται το υποξείδιο του αζώτου και στα πτητικά αναισθητικά οι αλογονωμένοι υδρογονάνθρακες (αλοθάνιο) και οι αλογονωμένοι αιθέρες (ισοφλουράνιο, δεσφλουράνιο, σεβοφλουράνιο). Εισπνεόμενοι παράγοντες ιστορικού ενδιαφέροντος είναι το κυκλοπροπάνιο, χλωροφόρμιο, χλωριούχο αιθύλιο, διαιθυλαιθέρας κ.ά., ενώ η χρήση του μεθοξυφλουρανίου έχει σχεδόν εγκαταλειφθεί λόγω των ανεπιθύμητων ενεργειών του.

Έχει αναφερθεί ότι τα αλογονωμένα αναισθητικά αλληλεπιδρούν με ξηρές απορροφητικές ουσίες του διοξειδίου του άνθρακα, σχηματίζοντας μονοξείδιο του άνθρακα σε κλειστά κυκλώματα αναισθησίας, με πιθανότητα αυξημένων επιπέδων ανθρακυλαιμοσφαιρίνης στο αίμα. Για το λόγο αυτό θα πρέπει να χρησιμοποιούνται υγρές απορροφητικές ουσίες του διοξειδίου του άνθρακα. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν, η προποφόλη, η κεταμίνη και η φεντανύλη.[4]

1.1 Βαρβιτουρικά

Η θειοπεντάλη είναι ένα ισχυρό αναισθητικό και ασθενές αναλγητικό. Η θειοπεντόνη ή θειοπεντάλη εξακολουθεί να έχει ευρεία εφαρμογή, λόγω της ταχείας και ευχάριστης εισαγωγής στην αναισθησία και του χαμηλού κόστους. Τα βαρβιτουρικά δεν έχουν σημαντική αναλγητική δράση και απαιτούν επιπλέον χορήγηση κάποιας μορφής αναλγητικού κατά τη διάρκεια της αναισθησίας, αλλιώς μπορεί να προκληθούν δυσάρεστες μεταβολές στην αρτηριακή πίεση και τη λειτουργία του αυτόνομου νευρικού συστήματος.

1.2 Βενζοδιαζεπίνες

Λόγω της αποτελεσματικότητας και ασφάλειάς τους, αλλά και της μεγάλης συχνότητας του άγχους και της αϋπνίας στον πληθυσμό, οι βενζοδιαζεπίνες έχουν ευρύτατη χρήση. Αν και εξάρτηση μπορεί να συμβεί ακόμη και με θεραπευτικές δόσεις μετά από μακρά, μεγαλύτερη των 6 μηνών λήψη, ο κίνδυνος να προκύψουν σοβαρά προβλήματα εξάρτησης είναι σχετικά πολύ μικρός. Το ενδεχόμενο της εξάρτησης θα πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψη κατά τη χορήγηση των βενζοδιαζεπινών, αλλά και δεν θα πρέπει, λόγω υπερβολικού φόβου, να αποστερούνται μιας αποτελεσματικής θεραπείας ασθενείς που υποφέρουν από άγχος ή αϋπνία. Οι βενζοδιαζεπίνες έχουν αγχολυτικές, υπνωτικές, αντιεπιληπτικές και μυοχαλαρωτικές ιδιότητες, η κύριά τους όμως ένδειξη είναι η βραχυχρόνια συμπτωματική αντιμετώπιση του έντονου παθολογικού άγχους και της αϋπνίας. Συνιστώνται μόνο όταν η διαταραχή είναι σοβαρή, περιορίζει τις δραστηριότητες του ασθενή ή του προκαλεί έντονη δυσφορία. Δεν έχουν ένδειξη στο άγχος και στην υπερένταση που συνδέονται με προβλήματα της καθημερινής ζωής. Η αγωγή θα πρέπει να είναι όσο το δυνατόν βραχύτερης διάρκειας. Γενικά η συνολική διάρκεια της αγωγής δεν πρέπει να υπερβαίνει τις 8-12 εβδομάδες, συμπεριλαμβανομένου και του χρόνου σταδιακής διακοπής της. Σε εξαιρετικές περιπτώσεις δυνατόν να απαιτηθεί παράταση της αγωγής πέραν της μέγιστης συνιστώμενης διάρκειας. Ορισμένες βενζοδιαζεπίνες χορηγούνται και στο σύνδρομο στέρησης του οινοπνεύματος (delirium

tremens), ως συμπληρωματική θεραπεία. Σχετικές ενδείξεις αποτελούν οι νυχτερινοί εφιάλτες και η υπνοβασία, αλλά και σε αυτές τις περιπτώσεις έχουν παρατηρηθεί ανεπιθύμητες ενέργειες και επιπλοκές που κάνουν προβληματική τη χρήση τους. Η χορήγησή τους σε παιδιά πρέπει κατά το δυνατόν να αποφεύγεται.

Όλες οι βενζοδιαζεπίνες έχουν παρόμοιες φαρμακολογικές ιδιότητες και διαφοροποιούνται μόνο ως προς την κατασταλτική τους επίδραση, την ισχύ (potency) και τη φαρμακοκινητική συμπεριφορά. Ορισμένα μεγάλης ισχύος παράγωγα έχουν χρησιμότητα στις διαταραχές πανικού και στην επιληψία, αλλά μπορεί να αυξάνουν την πιθανότητα εξάρτησης.

Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν: η διαζεπάμη, η φλουνιτραζεπάμη, η 7-AF, η μιδαζολάμη, η αλπραζολάμη. Αν και η διαζεπάμη είναι το πρότυπο των βενζοδιαζεπινών, η μιδαζολάμη είναι πιο ισχυρή. Ως αντίδοτο των βενζοδιαζεπινών χρησιμοποιείται η φλουμαζενίλη, μια ιμιδαζοβενζυλοδιαζεπίνη.

1.3 Οπιοειδή

Τα οπιούχα περιλαμβάνουν μια μεγάλη οικογένεια φαρμάκων με φαρμακολογικές δράσεις ανάλογες της μορφίνης, που αποτελεί την κύρια ουσία της ομάδας. Η μορφίνη είναι το σπουδαιότερο αλκαλοειδές του οπίου και από την οποία λαμβάνονται πολλά παράγωγα με τροποποίηση του μορίου της, όπως η ηρωίνη, η οξυκωδόνη, η κωδεΐνη (φυσικό αλκαλοειδές επίσης του οπίου), η υδροκωδόνη, η υδρομορφόνη κλπ. Το όπιο είναι ο αποξηραμένος χυμός (οπός) της άγουρης κάψας (κωδία) του φυτού μηκών η υπνοφόρος (*Papaver Somniferum*).

Η ηρωίνη παρασκευάζεται σε παράνομα εργαστήρια με ακετυλίωση της μορφίνης. Το προϊόν που παράγεται συνήθως νοθεύεται με αδρανή σάκχαρα, όπως λακτόζη και γλυκόζη. Μερικές φορές η σκόνη της ηρωίνης αναμιγνύεται και με ουσίες που τροποποιούν τη φαρμακολογία και την τοξικολογία του προϊόντος, όπως λιδοκαΐνη, παρακεταμόλη, στρυχνίνη, κινίνη, κλπ. Στα οπιοειδή που λαμβάνονται

συνθετικά περιλαμβάνονται η μεθαδόνη, η φαιντανύλη, η πεθιδίνη κλπ. Η φεντανύλη χρησιμοποιείται συχνότερα από τη μορφίνη.



Εικόνα 1.1. Απεικόνιση του φυτού *Papaver somniferum*.

1.4 Αντιψυχωσικά

Ονομάζονται και νευροληπτικά ή μείζονα ηρεμιστικά και περιλαμβάνουν τα κλασικά και τα άτυπα αντιψυχωσικά.

Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν κυρίως τα παράγωγα της φαινοθειαζίνης που είναι τα αλειφατικά παράγωγα (χλωροπρομαζίνη, λεβομεπρομαζίνη), τα πιπεριδινικά και τα πιπεραζινικά (τριφθοριοπεραζίνη), τα παράγωγα της βουτυροφαινόνης (αλοπεριδόλη, πιπαμπερόνη), τα παράγωγα της διφαινυλοβουτυλοπιπεριδίνης (πιμοζίδη, πενφλουριδόλη), τα παράγωγα του θειοξανθενίου (ζουκλοπενθιξόλη) και οι υποσουλπιδίδη, τιαπρίδη.

Στη δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνονται τα άτυπα αντιψυχωσικά αμισουλπρίδη, αριπιπραζόλη, κλοζαπίνη, αλανζαπίνη, κουετιαπίνη, ρισπεριδόνη, ζιπρασιδόνη, σερτινδόλη και ζοτεπίνη.

Πιο πιθανός τρόπος δράσης θεωρείται ο αποκλεισμός των υποδοχέων D2 της ντοπαμίνης. Η ιδιότητα αυτή φαίνεται να συσχετίζεται θετικά με τη θεραπευτική τους αποτελεσματικότητα. Ωστόσο τα άτυπα αντιψυχωσικά δεσμεύουν σε μικρότερο βαθμό τους D2 υποδοχείς, αλλά

δεσμεύουν ταυτόχρονα σε σημαντικό βαθμό τους υποδοχείς τύπου 2 της σεροτονίνης (5HT₂), σε αντίθεση με τα κλασικά αντιψυχωσικά. Ακόμη, η εμφάνιση εξωπυραμιδικών συμπτωμάτων και η αύξηση της προλακτίνης οφείλεται στην αντιντοπαμινεργική τους δράση. Επίσης τα αντιψυχωσικά αποκλείουν, σε άλλοτε άλλο βαθμό, τους αδρενεργικούς, χολινεργικούς, ισταμινεργικούς και άλλους σεροτονινεργικούς υποδοχείς, ιδιότητες που συνδέονται με ανεπιθύμητες ενέργειες, όπως ορθοστατική υπόταση, ταχυκαρδία, ξηροστομία, δυσκοιλιότητα κ.ά.

Τα νευροληπτικά όταν συγχωρηγούνται με οπιοειδή βραχείας διάρκειας δράσης (π.χ. φεντανύλη) προκαλούν αναισθησία που χαρακτηρίζεται από καταληψία, ακινησία, ισχυρή αναλγησία και καταστολή του εμετού. Η χρήση τους σήμερα είναι πολύ περιορισμένη, λόγω των ανεπιθύμητων ενεργειών τους.

1.5 Κεταμίνη

Η κεταμίνη προκαλεί μια "κατάσταση διαχωρισμού" κατά την οποία ο ασθενής φαίνεται ξύπνιος αλλά δεν έχει συνείδηση και δεν αισθάνεται πόνο. Αυτή η διαχωριστική αναισθησία προκαλεί καταστολή, αμνησία και ακινησία. Η κεταμίνη προκαλεί κεντρική συμπαθητική διέγερση, πράγμα το οποίο με τη σειρά του, οδηγεί σε διέγερση της καρδιάς και αυξημένη αρτηριακή πίεση και καρδιακή παροχή. Επίσης αυξάνει τα επίπεδα των κατεχολαμινών του πλάσματος και την αιματική ροή. Η κεταμίνη χρησιμοποιείται επομένως όταν δεν είναι επιθυμητή η καταστολή της κυκλοφορίας. Το φάρμακο είναι λιπόφιλο και εισέρχεται στην εγκεφαλική κυκλοφορία ταχύτατα, αλλά όπως και με τα βαρβιτουρικά μπορεί να ανακατανεμηθεί σε άλλα όργανα και ιστούς.

1.6 Προποφόλη

Η προποφόλη είναι παράγωγο των φαινολών. Τα χαρακτηριστικά της ανάνηψης (ταχεία και πλήρης) και η πιθανή αντιεμετική της δράση την καθιστούν παράγοντα πρώτης επιλογής σε βραχείας διάρκειας χειρουργικές επεμβάσεις. Απαιτείται επιπρόσθετη χορήγηση ναρκωτικών

για την αναλγησία. Ενώ η προποφόλη διευκολύνει την καταστολή του ΚΝΣ, υψηλά επίπεδα στο πλάσμα μπορεί να προκαλέσουν διέγερση. Η προποφόλη μειώνει την αρτηριακή πίεση χωρίς να καταστέλλει το μυοκάρδιο. Επίσης μειώνει την ενδοκράνια πίεση.

B. Τοπικά Αναισθητικά

Τα τοπικά αναισθητικά είναι ουσίες που προκαλούν αναστρέψιμο αποκλεισμό της μετάδοσης των ώσεων κατά μήκος των κεντρικών και περιφερικών νευρικών οδών. Η δράση τους πιστεύεται ότι οφείλεται σε αναστολή της διόδου των ιόντων νατρίου στις κυτταρικές μεμβράνες με αποτέλεσμα επιβράδυνση της αποπόλωσης σε βαθμό που δεν αναπτύσσεται δυναμικό ενέργειας.

Τα τοπικά αναισθητικά ανάλογα με τη χημική τους δομή διακρίνονται σε εστέρες του βενζοϊκού, όπως κοκαΐνη, παρα-αμινοβενζοϊκού οξέος (αμινοεστέρες), όπως προκαΐνη και σε αμίδια αρωματικών οξέων (αμινοαμίδια), όπως λιδοκαΐνη, βουπιβακαΐνη, αρτικαΐνη, μεπιβακαΐνη, πριλοκαΐνη, ροπιβακαΐνη. Πρόσφατα έχει εισαχθεί η λεβοβουπιβακαΐνη που είναι το αριστερόστροφο S(-) εναντιομερές της ρακεμικής βουπιβακαΐνης, με παρόμοια αναισθητική και αναλγητική δράση, αλλά θεωρείται ότι έχει λιγότερες ανεπιθύμητες ενέργειες.

Τα τοπικά αναισθητικά ταξινομούνται, επίσης, ανάλογα με τη διάρκεια δράσης, σε μικρής διάρκειας (προκαΐνη), μέσης (λιδοκαΐνη) και μεγάλης διάρκειας (βουπιβακαΐνη). Οι αμινοεστέρες υδρολύονται από τη βουτυλοχολινεστεράση (Butylocholinesterase ή Buch), ενώ ο ρυθμός υδρόλυσης καθορίζει και το βαθμό της τοξικότητας. Τα αμινοαμίδια μεταβολίζονται κυρίως στο ήπαρ και μόνο 1-5% αποβάλλεται αναλλοίωτο με τα ούρα.

Τα τοπικά αναισθητικά, εκτός της κοκαΐνης, μπορούν να δοθούν με α-αδρενεργικούς διεγέρτες, κυρίως επινεφρίνη (αδρεναλίνη). Η προσθήκη της παρατείνει τη δράση του φαρμάκου και ελαττώνει την τοξικότητα. Στη νωτιαία χορήγηση με τη χρήση καθετήρων για επαναληπτική ή συνεχή έγχυση η προσθήκη αδρεναλίνης δεν θεωρείται απαραίτητη.

2. ΕΠΙΠΕΔΑ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΑ, ΤΟΞΙΚΑ ΚΑΙ ΘΑΝΑΤΗΦΟΡΑ ΤΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ

Στον παρακάτω πίνακα αναφέρονται τα θεραπευτικά, τοξικά και θανατηφόρα επίπεδα των 7 φαρμάκων που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία.

Πίνακας 2.1. Επίπεδα φαρμακευτικών ενώσεων και ναρκωτικών στο αίμα.

Ένωση	Επίπεδα σε ορό/αίμα σε (μg/mL)			Χρόνος ημίσειας ζωής $t_{1/2}$ σε ώρες
	Θεραπευτικά	Τοξικά από	Κωματώδη-Θανατηφόρα από	
Διαζεπάμη	0,2-2	3-5		24-28
Φεντανύλη	0,003-0,3		3,0	1-3,5
Κεταμίνη	1-6	7 (βιασμός)		1-3
Λιδοκαΐνη	1-5	6-7	10	1-4
Μιδαζολάμη	0,04-0,25	1-1,5		1,5-3
Προποφόλη	2-8			3-8
Ροπιβακαΐνη		(1-) 2		2

3. ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Προτού αρχίσει η τοξικολογική ανάλυση, αξιολογούνται διάφορες παράμετροι, όπως η ποσότητα των διαθέσιμων δειγμάτων, η φύση και οι ιδιότητες της τοξικής ουσίας που θα αναζητηθεί, καθώς και ο πιθανός βιομετασχηματισμός της ουσίας.

Στις περιπτώσεις που η οδός εισόδου είναι γαστρεντερική, αναλύεται πρώτα το **στομαχικό περιεχόμενο**, όπου μπορεί να βρεθούν ποσότητες της ουσίας που δεν πρόλαβαν να απορροφηθούν, να αναγνωριστούν μακροσκοπικά αδιάλυτα δισκία φαρμακευτικών ουσιών, να αναδύεται οσμή πετρελαίου στις περιπτώσεις φυτοφαρμάκων που κυκλοφορούν σε αιώρημα με πετρέλαιο ή να διακρίνεται η διάβρωση του στομάχου από τη λήψη διαβρωτικής ή καυστικής ουσίας.

Τα **ούρα** είναι το επόμενο υλικό ανάλυσης, αφού οι νεφροί αποτελούν το κύριο όργανο απέκκρισης για τις περισσότερες τοξικές ουσίες και συγκρατούν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις των ουσιών ή/και των μεταβολιτών τους. Μετά την απορρόφηση από τη γαστρεντερική οδό, τα φάρμακα ή τα δηλητήρια, μεταφέρονται στο ήπαρ πριν οδηγηθούν στη συστηματική κυκλοφορία.

Όταν δεν υπάρχει αμφιβολία για το είδος του δηλητηρίου, απαιτείται ποιοτική και ποσοτική ανάλυση του **αίματος**. Ενώ αντίθετα, αν η διάγνωση δεν είναι ξεκάθαρη, τα δείγματα του αίματος κρατούνται τελευταία για μελλοντικές μετρήσεις, αφού το δηλητήριο βρεθεί είτε στο στομαχικό περιεχόμενο, είτε στα ούρα. Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι τα νέα ψυχοτρόπα φάρμακα είναι πολύ λιποδιαλυτά και εναποτίθενται σε εξωαγγειακούς ιστούς. Έτσι, ακόμη και σε περίπτωση υπερδοσολογίας, η συγκέντρωση των φαρμάκων στο αίμα είναι τόσο στιγμιαία που παραμένει μη ανιχνεύσιμη με τις απλές εργαστηριακές τεχνικές. Μόνο τα πολύ εξειδικευμένα τοξικολογικά εργαστήρια, εξοπλισμένα με υψηλής ποιότητας και εξειδίκευσης εξοπλισμό, είναι σε θέση να προβούν σε ανάλυση αίματος. Είναι άκρως απαραίτητο υλικό, όπως προαναφέρθηκε, για τη διερεύνηση της αλκοόλης, του μονοξειδίου του άνθρακα και τον ποσοτικό προσδιορισμό φαρμάκων προκειμένου να διαπιστώσουμε αν η συγκέντρωση είναι σε θεραπευτικά ή τοξικά επίπεδα.

4. ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Μια τοξικολογική ανάλυση αποτελείται από την προκατεργασία του βιολογικού δείγματος και την ανάλυση με χρωματογραφία (αέρια ή υγρή) σε συνδυασμό με διάφορους ανιχνευτές και συνηθέστερα με φασματογράφο μάζας. Η προκατεργασία του βιολογικού δείγματος έχει σκοπό να απομονώσει εκλεκτικά, κατά το δυνατόν, τα διάφορα φάρμακα, μεταβολίτες τους κ.ά. από την υδατικό υπόστρωμα του βιολογικού υλικού σε μια φάση (π.χ. σε ένα διαλύτη ή σύστημα διαλυτών) συμβατών για ανάλυση στο χρωματογράφο. Μετά την εκχύλιση (απομόνωση) των διαφόρων φαρμάκων κ.ά. από το βιολογικό δείγμα, ακολουθεί η ανάλυση συνήθως με χρωματογραφία (αέρια ή υγρή) για τον διαχωρισμό των ενώσεων που υπάρχουν στο τελικό εκχύλισμα του δείγματος και τέλος ακολουθεί η ανίχνευση των διαφόρων ουσιών με την χρήση της φασματομετρίας μάζας.

4.1 Προκατεργασία Βιολογικού Δείγματος

Για τον προσδιορισμό των διαφόρων φαρμάκων σε βιολογικά υλικά η αναλυτική τεχνική της αέριας χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (GC-MS) είναι μέθοδος εκλογής, καθώς έχει ικανοποιητική ευασθησία και έχει το μεγάλο πλεονέκτημα της ύπαρξης. Η συνηθέστερη και απλούστερη προκατεργασία του δείγματος είναι η εκχύλιση υγρού-υγρού (LLE). Στην εκχύλιση υγρού-υγρού στο δείγμα αίματος ή ούρων προστίθεται ένα ρυθμιστικό διάλυμα για την ρύθμιση του pH, ακολουθεί η προσθήκη διαλύτη ή συστήματος διαλυτών για να παραλάβει το φάρμακο από το υδατικό υπόστρωμα. Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι το χλωροφόρμιο, ο διαιθυλαιθέρας, ο οξικός αιθυλεστέρας, το τολουόλιο, το εξάνιο, διάφορες αλκοόλες, χλωριούχο βουτύλιο κλπ. Η οργανική φάση (διαλύτης) στη συνέχεια διαχωρίζεται από την υδατική φάση (αίμα, ούρα) και είτε καθαρίζεται περαιτέρω με άλλη διαδικασία εκχύλισης ή εξατμίζεται μέχρι ξηρού πριν την ανάλυση με GC-MS.

4.2 Εκχύλιση Υγρού-Υγρού (LLE)

Η εκχύλιση περιλαμβάνει την κατανομή μιας ουσίας μεταξύ δύο υγρών φάσεων οι οποίες δεν αναμιγνύονται πρακτικά μεταξύ τους, π.χ. νερό και χλωροφόρμιο, νερό και τετραχλωράνθρακας κλπ. Η ιδιότητα αυτή των διαφόρων χημικών ουσιών να κατανέμονται μεταξύ δύο υγρών φάσεων χρησιμοποιείται σε πολλές περιπτώσεις όπως π.χ. στη συνθετική χημεία, στη μεταλλουργία, στη χημική ανάλυση κλπ. Στη χημική ανάλυση χρησιμοποιείται τόσο στις περιπτώσεις της προσυγκέντρωσης, της αύξησης δηλαδή της συγκέντρωσης της προσδιοριζόμενης ουσίας, όσο και στις περιπτώσεις απαλοιφής παρεμποδίσεων. Στην πράξη, η εκχύλιση αποτελεί μια από τις απλούστερες, αποτελεσματικότερες και φθηνότερες διαχωριστικές τεχνικές η οποία συνδυάζεται εύκολα με διάφορες αναλυτικές μεθόδους.

Η εκχύλιση περιλαμβάνει συνήθως την μίξη ενός δείγματος υδατικού διαλύματος με έναν μη-αναμίξιμο οργανικό διαλύτη για μια χρονική περίοδο και έπειτα επιτρέπει σε αυτές τις δύο υγρές φάσεις να αλληλεπιδράσουν, έτσι ώστε οι ενώσεις που μας ενδιαφέρουν εκχυλίζονται από την υδατική στην οργανική στοιβάδα, καθώς ο οργανικός διαλύτης έχει μεγαλύτερη συγγένεια με αυτές. Η εκλεκτικότητα και η αποδοτικότητα της διαδικασίας εκχύλισης καθορίζονται από την επιλογή των δύο μη-αναμίξιμων υγρών. Οι πιο υδρόφιλες ενώσεις προτιμούν την υδατική φάση και οι πιο υδροφοβικές ενώσεις θα βρεθούν στον οργανικό διαλύτη καθώς τα "όμοια" διαλύουν "όμοια". Οι οργανικοί διαλύτες όπως το μεθυλενο-χλωρίδιο, το χλωροφόρμιο, ο οξικός αιθυλεστέρας, ο διαιθυλαιθέρας προτιμώνται, γιατί μπορούν να απομακρυνθούν εύκολα με εξάτμιση. Μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν χηλικοί και άλλοι συμπλοκοποιητικοί παράγοντες, ζεύγη ενώση και εναντιομερείς ενώσεις. Αφού διαχωριστούν τα μη-αναμίξιμα υγρά, η οργανική στοιβάδα που περιέχει την εκχυλισμένη ένωση απομακρύνεται, εξατμίζεται μέχρι ξηρού και επαναδιαλύεται σε έναν κατάλληλο διαλύτη συμβατό με το αναλυτικό σύστημα. Ένας περιορισμός είναι ότι πολλοί υδατοδιαλυτοί διαλύτες δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εκχύλιση. Άλλα μειονεκτήματα είναι :

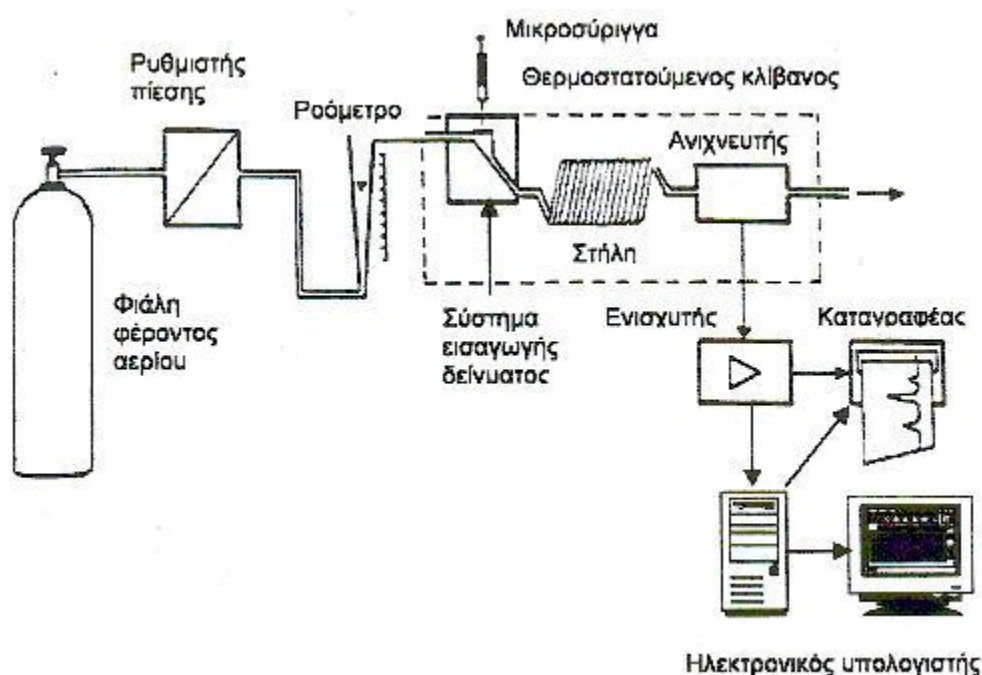
- Η χρήση μεγάλων ποσοτήτων οργανικών διαλυτών που οδηγούν σε ένα υπολογίσιμο κόστος για την απόκτηση και διάθεσή τους.

- Ο σχηματισμός γαλακτωμάτων κατά τη διάρκεια της ανάμιξης.
- Απαιτείται απομάκρυνση του οργανικού διαλύτη με εξάτμιση, η οποία συνεπάγεται αύξηση του χρόνου προκατεργασίας και πιθανές απώλειες της αναλυόμενης ουσίας.
- Η συνεκχύλιση άλλων συστατικών του υποστρώματος που παρεμποδίζουν λόγω του ότι έχουν παραπλήσιες ιδιότητες, καθώς οι διαλύτες δεν είναι εκλεκτικοί.

5. ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

5.1 Εισαγωγή

Η αέρια χρωματογραφία αναπτύχθηκε ως αναλυτική τεχνική τα τελευταία τριάντα χρόνια. Η τεχνική αυτή είναι σχετικά απλή, αν συγκριθεί με ανάλογες τεχνικές χημικής ανάλυσης και με τις μεγάλες δυνατότητες εφαρμογής που έχει. Η αέρια χρωματογραφία χρησιμοποιείται σήμερα για την ανάλυση πτητικών ουσιών σε τρόφιμα, φάρμακα, προϊόντα πετρελαίου, βιομηχανίες αρωματοποιίας κτλ. Η διάταξη ενός αέριου χρωματογράφου δίνεται στο παρακάτω σχήμα:



Σχήμα 5.1 Διάταξη αέριου χρωματογράφου συνδεδεμένου με σύστημα καταγραφής

Το φέρον αέριο (συνήθως N_2 , He , H_2 , Ar) από τη φιάλη υψηλής πίεσης, μέσα από ρυθμιστές παροχής, οδηγείται στη στήλη. Η εισαγωγή του δείγματος γίνεται με μικροσύριγγα στη βαλβίδα εισαγωγής του δείγματος στην κορυφή της στήλης. Τα συστατικά του δείγματος συμπαρασύρονται από το φέρον αέριο κατά μήκος της στήλης και διαχωρίζονται. Τα κλάσματα στη συνέχεια ανιχνεύονται στον ανιχνευτή και τα σήματα ανίχνευσης καταγράφονται από καταγραφικό. Σε ορισμένες περιπτώσεις, στη συνέχεια υπάρχει μια διάταξη, όπου συλλέγονται τα

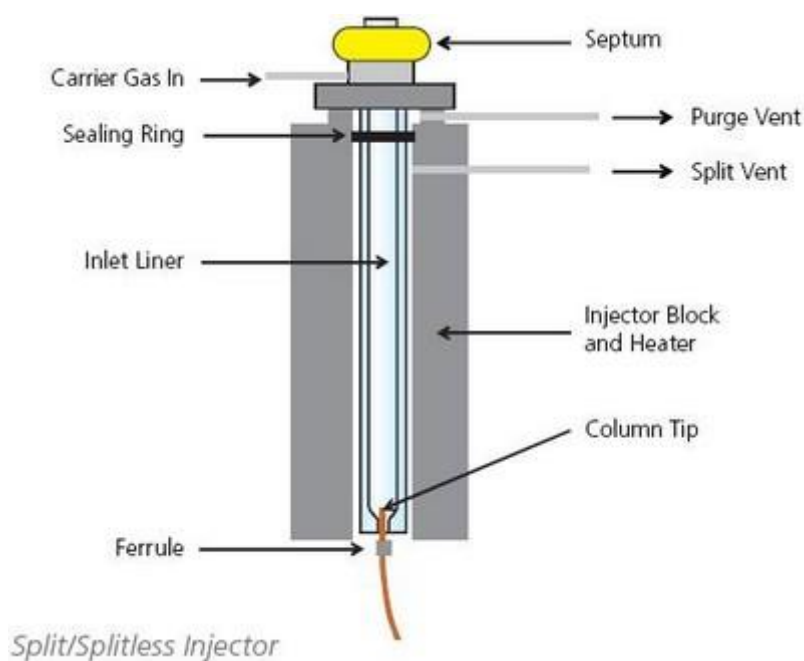
διάφορα κλάσματα και ένα ροόμετρο για τον έλεγχο της ταχύτητας ροής του φέροντος αερίου.

Ως φέρον αέριο μπορεί να χρησιμοποιηθεί κάθε αέριο σε υπερκάθαρη κατάσταση, το οποίο μπορεί να διαφοροποιηθεί στον ανιχνευτή, από τα διάφορα συστατικά του μίγματος. Το φέρον αέριο πρέπει να είναι αδρανές και απαλλαγμένο από προσμίξεις. Επίσης δεν πρέπει να περιέχει οξυγόνο, γιατί οξειδώνει τη στατική φάση και αυτό σημαίνει καταστροφή της στήλης, ιδιαίτερα όταν αυτή είναι τριχοειδής και η ποσότητα της στατικής φάσης είναι ελάχιστη. Ίχνη υγρασίας επίσης απενεργοποιούν τη στατική φάση, για αυτό το φέρον αέριο πρέπει να είναι απαλλαγμένο από υγρασία. Η επιλογή του φέροντος αερίου εξαρτάται κυρίως από τον τύπο του ανιχνευτή που χρησιμοποιείται. Η καρδιά του χρωματογράφου είναι η στήλη. Οι στήλες που χρησιμοποιούνται στη χρωματογραφία είναι συνήθως γυάλινες ή χαλύβδινες στήλες πληρωμένες με διάφορα υλικά ανάλογα με τα συστατικά που θέλουμε να διαχωρίσουμε. Το σχήμα τους έχει τη μορφή έλικας και η διάμετρος τους είναι πάρα πολύ μικρή. Σήμερα χρησιμοποιούνται τριχοειδείς γυάλινες στήλες μήκους μέχρι 25 m, οι οποίες εσωτερικά είναι καλυμμένες με διάφορα υλικά (Coated Capillary Glass Columns)

Το δείγμα, συνήθως όγκου 1μL εισάγεται στο ρεύμα του φέροντος αερίου στην αρχή της στήλης με μια μικροσύριγγα, διαμέσου μιας ελαστικής πλακέτας ή διαφράγματος (septum). Η ταχύτητα και η ικανότητα του διαχωρισμού εξαρτώνται από τη θερμοκρασία. Για αυτό το λόγο η στήλη βρίσκεται σε φούρνο ακριβείας ο οποίος μας δίνει αυστηρά επαναλήψιμες συνθήκες. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται εξαιτίας των διαφόρων δυνάμεων συγκράτησης και έκλυσης ανάμεσα στα συστατικά του μίγματος, το υλικό πλήρωσης της στήλης και της ροής του φέροντος αερίου. Στο κύριο μέρος του χρωματογράφου θα πρέπει να συμπεριληφθεί και ο ανιχνευτής, ο οποίος τοποθετείται στο τέλος της στήλης. Τα σήματα ενισχύονται και καταγράφονται στο καταγραφικό σύστημα.

Από τα παραπάνω είναι εύκολο να διαπιστώσει κανείς ότι σε έναν αέριο χρωματογράφο οι συνθήκες που έχει την ευχέρεια να αλλάζει ο αναλυτικός χημικός είναι ουσιαστικά οι θερμοκρασίες στο σύστημα εισαγωγής ούτως ώστε

να έχουμε φόρτωση σταθερής ποσότητας δείγματος χωρίς να έχουμε φαινόμενα υπερφόρτωσης του δείγματος και να επιτυγχάνεται κάθε φορά απομάκρυνση όλης της ποσότητας του δείγματος ούτως ώστε το σύστημα εισαγωγής να διατηρείται καθαρό και έτοιμο για την επόμενη ανάλυση. Επίσης ο αναλυτικός χημικός έχει την δυνατότητα να ρυθμίζει το θερμοκρασιακό πρόγραμμα του φούρνου όπου βρίσκεται η στήλη και έτσι μπορεί να τροποποιήσει και να αλλάξει όπως επιθυμεί τον χρόνο έκλυσης των αναλυόμενων ενώσεων. Η επιλογή της στήλης δεδομένου ότι η τριχοειδής χρησιμοποιείται ευρέως απλά γίνεται επιλογή της πολικότητας της.



Εικόνα 5.1 Σύστημα εισαγωγής δείγματος σε στήλη αέριου χρωματογράφου

5.2 Ανιχνευτές

Ο σκοπός ενός ανιχνευτή είναι να μας δίνει μια απόκριση, η οποία να είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση ή την ποσότητα ενός συστατικού που περνά μέσα από αυτόν και η απόκριση αυτή να έχει τη μορφή ενός σήματος, το οποίο μπορεί να μετρηθεί. Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει ανιχνευτής, ο οποίος να συνδυάζει ευαισθησία, γραμμικότητα και εκλεκτικότητα και να μπορεί να εφαρμοστεί σε όλες τις αεροχρωματογραφικές αναλύσεις. Υπάρχουν πολλοί τύποι ανιχνευτών, αλλά σε γενικές γραμμές χρησιμοποιούνται λίγοι. Για να χρησιμοποιηθεί ένας ανιχνευτής θα πρέπει να πληροί ορισμένες προϋποθέσεις:

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

5.3 Αέριος Χρωματογραφία - Φασματοσκοπία Μαζών (GC - MS)

Η φασματοσκοπία μαζών ήδη από το 1960 χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με την αέριο χρωματογραφία για την ανάλυση πτητικών οργανικών ενώσεων (GC/MS), ενώ από τα μέσα του 1970 εφαρμόστηκε ο συνδυασμός της φασματοσκοπίας μαζών με την υγρή χρωματογραφία (LC/MS), για την ανάλυση μη πτητικών οργανικών μιγμάτων.

Στο σημείο αυτό δεν είναι βέβαια σκόπιμη η ανάλυση της χρωματογραφικής μεθόδου. Όπως είναι γνωστό το υπό εξέταση μίγμα διαχωρίζεται στα συστατικά του με τη βοήθεια του αέριου χρωματογράφου. Η στήλη της αερίου χρωματογραφίας βρίσκεται σε θερμοστατούμενο θάλαμο (ρυθμιζόμενο κάτω από την θερμοκρασία αντοχής της εκάστοτε στήλης, πάντα κάτω από 350°C). Το τέλος της στήλης οδηγεί στην πηγή ιονισμού του φασματογράφου, όπου τα συστατικά του μίγματος καθώς βγαίνουν από τη στήλη ιονίζονται και καταγράφονται.

Επειδή όμως υπάρχει ο κίνδυνος να γίνει και πάλι ανάμιξη των διαχωρισθέντων στη στήλη συστατικών, καθώς διασχίζουν το σύστημα διασύνδεσης (interface) αέριου χρωματογράφου-φασματογράφου μαζών, πρέπει αυτό να είναι όσο το δυνατόν μικρού μεγέθους και θερμαινόμενο (περίπου 20°C πάνω από τη θερμοκρασία της στήλης της αερίου χρωματογραφίας) ώστε να αποφεύγεται μερική συμπύκνωση των συστατικών του μίγματος.

Η ποσότητα ουσίας που απαιτείται για τη λήψη ικανοποιητικού φάσματος μαζών είναι 1ppm (10^{-6} g) σε 1g διαλύματος, ενώ η ποσότητα της διαλυμένης ουσίας σε 1μL είναι 10^{-9} g (1ng). Σήμερα η ευαισθησία έχει βελτιωθεί στην τάξη του femtogram (10^{-15} g). Έτσι μπορούμε να έχουμε δεδομένα σε ppb (parts per billion- μέρη ανά δισεκατομμύριο) αλλά ακόμη και ppt (parts per quadrillion-μέρη ανά τετράκις εκατομμύριο).

Τα φασματόμετρα μαζών που μπορούν να συνδυαστούν με τον αέριο χρωματογράφο είναι τα τετράπολα, τα χρόνου πτήσεως, οι παγίδες ιόντων.

Με τη συζευγμένη αυτή τεχνική πετυχαίνουμε διαχωρισμό των ουσιών με τον αέριο χρωματογράφο και στη συνέχεια την ταυτοποίηση άγνωστων ενώσεων από το φάσμα μαζών. Γενικά ο προσδιορισμός μια ουσίας με GC/MS γίνεται βάση του χρόνου έκλουσης (R_t) της και με βάση του φάσματος μάζας της (συγκρινόμενο με κάποιο από την βιβλιοθήκη αν αυτό είναι δυνατόν, π.χ. όταν χρησιμοποιούμε (EI) ιονισμό).

6. ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΜΑΖΩΝ, ΦΑΣΜΑΤΟΓΡΑΦΟΣ ΜΑΖΩΝ

6.1 Ορισμός

Είναι το τμήμα της χημικής επιστήμης που ασχολείται με τη δημιουργία, ανίχνευση και καταγραφή ιόντων. Τα ιόντα μπορεί να είναι φορτισμένα αρνητικά (ανιόντα) ή θετικά (κατιόντα) και ν' αντιστοιχούν σε άτομα, μόρια ή μέρη μορίων. Η μελέτη των ιόντων δίνει πληροφορίες για τη δομή, το μοριακό βάρος ή τη δυνατότητα ταυτοποίησης μιας άγνωστης ένωσης.

Είναι το επιστημονικό όργανο με το οποίο πραγματοποιείται η φασματοσκοπία μαζών.

6.2 Χρήση της φασματοσκοπίας μαζών

- Προσδιορισμός του μοριακού βάρους.
- Διαχωρισμός (GC-MS, LC-MS), ταυτοποίηση ενώσεων (φυσικά προϊόντα και προϊόντα αντίδρασης)
- Προσδιορισμός του μοριακού τύπου.
- Προσδιορισμός μοριακού ιόντος, μεγάλη διαχωριστική ικανότητα
- Ανάλυση δομής.
- Σύγκριση με δομές από βιβλιοθήκες ή με πρότυπα προϊόντα.
- Ισοτοπική επισήμανση για μελέτες δομής

6.3 Δυναμική της φασματοσκοπίας μαζών

Μεγάλη επιλεκτικότητα επειδή έχουμε ακριβή μέτρηση των μαζών.

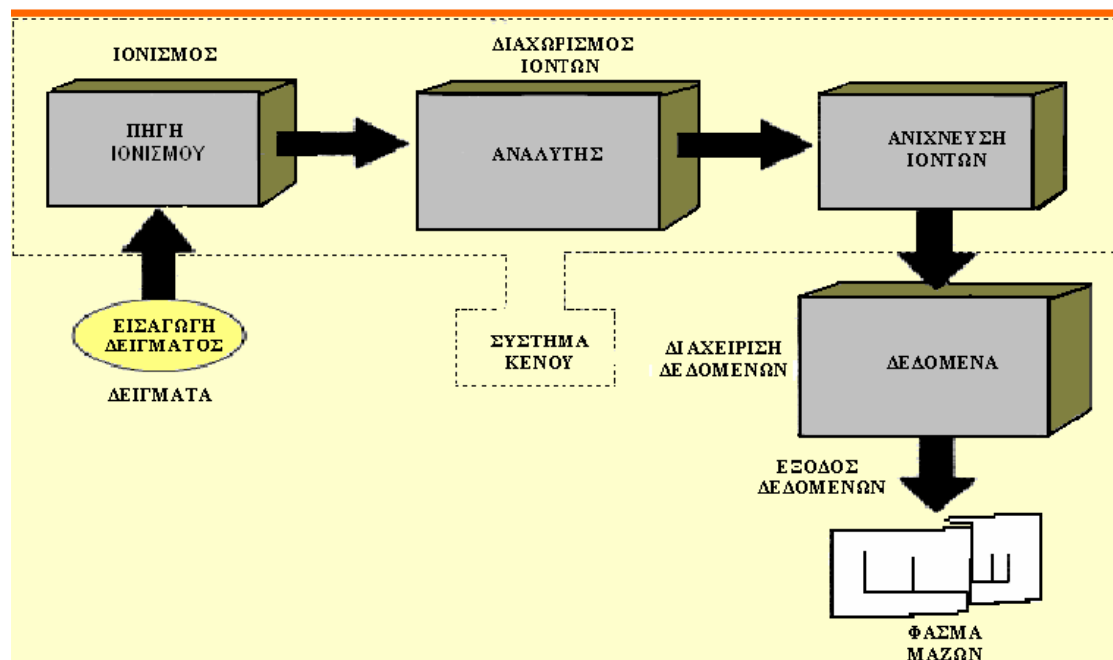
Υψηλή ευαισθησία που φτάνει τα 10-15 (femtomol).

Δράση της φασματοσκοπίας μαζών σαν ολικός ανιχνευτής, άρα ανάλυση οποιουδήποτε σώματος ανεξάρτητα από τη φύση του.

6.4 Βασικές διαδικασίες φασματοσκοπίας μαζών

Γενικά ένα φασματόμετρο μαζών συγκροτείται από τα τμήματα:

- Δημιουργίας κενού
- Εισαγωγής δειγμάτων
- Ιονισμού
- Διαχωρισμού ανάλογα με το λόγο m/z
- Ανίχνευσης και καταγραφής



Εικόνα 6.1 Γενικό σχήμα φασματόμετρου μαζών

6.4.1 Σύστημα κενού στα MS και σημαντικότητά του

Το κενό δημιουργείται με συνδυασμό δύο συστημάτων (δύο στάδια δημιουργίας κενού). Με περιστροφικές αντλίες κενού (που δημιουργούν κενό της τάξης 10^{-2} μέχρι 10^{-5} Torr). Με στροβιλοφόρες (μοριακές) ή αντλίες διαχύσεως που δημιουργούν κενό 10^{-5} μέχρι 10^{-9} Torr..

Στο χώρο δημιουργίας και επιτάχυνσης των ιόντων υπάρχει, όπως ήδη αναφέρθηκε, υψηλό κενό της τάξης των 10^{-6} - 10^{-8} Torr για να:

- 1) μην καίγεται το νήμα παραγωγής ηλεκτρονίων (filament).
- 2) Δημιουργούνται ατμοί από την ουσία που ανιχνεύεται.
- 3) συγκρούονται τα ηλεκτρόνια με μόρια μόνο της ουσίας και όχι με μόρια του ατμοσφαιρικού αέρα που θα υπήρχε χωρίς το κενό.
- 4) ελαχιστοποιείται η πιθανότητα σύγκρουσης των σχηματιζόμενων ιόντων με μόρια του ατμοσφαιρικού αέρα.
- 5) απομακρύνονται όλα τα ουδέτερα μόρια της ένωσης και τα ουδέτερα προϊόντα διάσπασης ώστε να ξαναχρησιμοποιηθεί το όργανο σε μικρό χρονικό διάστημα.
- 6) αποφευχθεί πρόκληση σπινθήρα λόγω μεγάλης τιμής του ηλεκτρικού πεδίου επιτάχυνσης των ιόντων.

6.4.2 Σύστημα εισαγωγής

Το σύστημα εισαγωγής εισάγει το δείγμα, από ένα χώρο έξω από το σύστημα κενού, στο χώρο όπου αυτό θα ιονιστεί.

Με το σύστημα εισαγωγής μπορεί να εισαχθούν δείγματα σε αέρια, υγρή ή στερεά μορφή.

6.4.3 Ιονισμός δειγμάτων

Τα δείγματα ιονίζονται με διάφορες διατάξεις όπως:

- Σύγκρουση με ηλεκτρόνια (Electron impact, EI)
- Χημικό ιονισμό (Chemical ionization, CI)
- Βομβαρδισμό με ταχέως κινούμενα άτομα (Fast atom bombardment, FAB)
- Δευτερεύοντα ιόντα (Secondary ions MS, SIMS)
- Εκρόφηση πλάσματος ή με δέσμη λέιζερ
- Πηγές σπινθηρισμών

Σύγκρουση με ηλεκτρόνια με ισχύ 70eV (Electron impact, EI)

Ηλεκτρόνια προερχόμενα από θερμαινόμενο νήμα, συγκρούονται με μόρια του δείγματος, εκτοπίζοντας από αυτά ένα ηλεκτρόνιο (έτσι τα μόρια καθίστανται θετικά), αφού προσδίδουν στα ηλεκτρόνια επιπλέον ενέργεια.

Η επιπλέον ενέργεια δημιουργεί δονήσεις και περιστροφή των μορίων με αποτέλεσμα να προκαλεί και μερική θραυσματοποίησή τους.

Ο ιονισμός με σύγκρουση ηλεκτρονίων, είναι μια διαδικασία ιονισμού που δημιουργεί μεγάλο αριθμό θραυσμάτων σε μερικά μόρια, ενώ μπορεί να θραυσματοποιήσει και το μοριακό ιόν. Τα φάσματα μαζών με EI ιονισμό, χρησιμοποιούνται στις βιβλιοθήκες φασμάτων, για την ταυτοποίηση αγνώστων ενώσεων.

Πλεονεκτήματα

Δίνει καλές πληροφορίες, μπορεί να εφαρμοστεί ουσιαστικά σε όλα τα πτητικά δείγματα. Δίνει φάσματα που επαναλαμβάνονται γιατί αποφεύγονται οι συγκρούσεις μεταξύ ιόντων και μορίων. Η θραυσματοποίηση δίνει πληροφορίες

για τη δομή των δειγμάτων, μπορούμε να ανατρέξουμε σε υπάρχουσες βιβλιοθήκες φασμάτων μαζών που έχουν ληφθεί με EI οπότε ταυτοποιείται η ένωση σαν “δακτυλικό αποτύπωμα”.

Περιορισμοί

Τα δείγματα πρέπει να είναι θερμικά πτητικά και σταθερά, γεγονός που αποτελεί σοβαρό περιορισμό, για τις πάρα πολλές θερμικά ευαίσθητες ενώσεις βιολογικής προέλευσης. Το μοριακό ιόν μπορεί να είναι ασθενές, δηλαδή μικρή αφθονία (abundance) μοριακού ιόντος ή να μην εμφανίζεται καθόλου. Λόγω μεταθέσεων παρουσιάζονται δυσκολίες στην ερμηνεία του φάσματος.

Περιοχή μάζας τυπικά χαμηλότερη των 1000 Da.

Χημικός ιονισμός, CI (chemical ionization)

Ο χημικός ιονισμός χρησιμοποιεί ηλεκτρόνια 100eV, που συγκρούονται με άτομα ή μόρια αερίου, το οποίο εισάγεται στη διάταξη. Τα μόρια ή άτομα του αερίου δημιουργούν φορτισμένα ιόντα ή άτομα που επιδρούν στο δείγμα και δημιουργούν φορτισμένα μοριακά ιόντα (συνήθως M+1)

Ο χημικός ιονισμός είναι μια ήπια διαδικασία (μαλακός ιονισμός), που τείνει να δημιουργήσει πρωταρχικά ιόντα (M+H)⁺.

Ο CI χρησιμοποιείται συνήθως όταν θέλουμε περισσότερες πληροφορίες για το μοριακό ιόν και στη διαδοχική φασματοσκοπία μαζών (MS-MS)

Πλεονεκτήματα

Δίνει πληροφορίες για το μοριακό βάρος διαμέσου ιόντων τύπου μοριακού ιόντος, [όπως (M+H)⁺, που μερικές φορές χαρακτηρίζεται σαν οιονεί μοριακό ιόν-quasi molecular ion, που δεν είναι ιονική ρίζα, με αποτέλεσμα να εμφανίζεται απλούστερη θραυσματοποίηση], ακόμη και όταν η EI μέθοδος δε μπορεί να δώσει μοριακό ιόν.

Δίνει απλά φάσματα μαζών και περιορίζει την θραυσματοποίηση σε σχέση με τον EI

Δημιουργία αρνητικών ιόντων σε ποσότητα συγκρίσιμη με αυτήν των θετικών.

Περιορισμοί

Τα δείγματα πρέπει να είναι πτητικά και θερμικά σταθερά.

Έχει μικρότερη θραυσματοποίηση από τον EI, γεγονός που δε δίνει πολλές πληροφορίες και τα φάσματα δεν είναι επαναλήψιμα οπότε περιορίζει την άντληση πληροφοριών από βιβλιοθήκες.

Τα αποτελέσματα εξαρτώνται από τον τύπο του αερίου αντίδρασης, την πίεσή του ή το χρόνο αντίδρασης του και το είδος του δείγματος.

Περιοχή μάζας τυπικά χαμηλότερη των 1000 Da.

Αναλυτής Μαζών

Ο αναλυτής μαζών διαχωρίζει και αναλύει τα διάφορα θραύσματα ανάλογα με το λόγο m/z .

Όπου m η μάζα του θραύσματος και z το φορτίο του

Είδη αναλυτών μάζας:

- ✓ Απλής εστίασης (μαγνητικός)
- ✓ Διπλής εστίασης (Μαγνητικός και ηλεκτροστατικός)
- ✓ Τετραπολικός με φίλτρο μαζών
- ✓ Τετραπολικός με παγίδα ιόντων
- ✓ Χρόνου πτήσεως

Τετράπολα Φασματομέτρα

Τα ιόντα εστιάζονται σε διάταξη τεσσάρων ράβδων (ανά δύο με αντίθετο φορτίο). Μια RF/DC τάση που μεταβάλλεται από χαμηλή προς υψηλότερη τιμή,

με σταθερό το λόγο RF/DC, επιδρά στην τροχιά των ιόντων, τα διαχωρίζει ανάλογα με το λόγο m/z και τα οδηγεί στον ανιχνευτή.

Χαρακτηριστικά τετραπόλου:

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

Είναι από τα πλέον χρησιμοποιούμενα φασματόμετρα σαν αναλυτές μαζών και σε συνδυασμό με αέριους χρωματογράφους.

Ανιχνευτές ιόντων στα φασματόμετρα και διαχείριση δεδομένων

Οι πλέον κοινοί ανιχνευτές στα φασματόμετρα μαζών είναι οι πολλαπλασιαστές ηλεκτρονίων. Τα ιόντα προσπίπτουν σε μία επιφάνεια του ανιχνευτή από την οποία εκπέμπονται ηλεκτρόνια, τα οποία πολλαπλασιαζόμενα κινούνται προς την άνοδο, όπου και συλλέγονται.

Τα σύγχρονα φασματόμετρα μαζών συνεργάζονται με υπολογιστές τόσο για τη διαχείριση των δεδομένων όσο και για τον έλεγχο της λειτουργίας τους. Τα δεδομένα συλλέγονται, επεξεργάζονται και παρουσιάζονται με τη μορφή φασμάτων μαζών.

7. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο σκοπός αυτής της εργασίας αυτής ήταν η ανάπτυξη αξιόπιστης και ταχείας μεθόδου ανάλυσης φαρμάκων που συνήθως χορηγούνται στην αναισθησία και στις Μονάδες Εντατικής Θεραπείας στο ολικό αίμα, με τη χρήση της αέριας χρωματογραφίας και φασματομετρίας μάζας. Η ανάπτυξη της μεθόδου αυτής θα συμβάλει στην ταχεία ανάλυση δειγμάτων αίματος σε επείγοντα κλινικά περιστατικά (μέτρηση των επιπέδων των φαρμάκων), αλλά και την εφαρμογή της σε μεταθανάτια δείγματα αίματος.

Με σκοπό το σύντομον της ανάλυσης, για την προκατεργασία του δείγματος επιλέχθηκε η εκχύλιση υγρού - υγρού με έναν διαλύτη χαμηλής πτητικότητας χωρίς το στάδιο της εξάτμισης και αποφύγαμε επίσης την παραγωγοποίηση των ουσιών πριν την ανάλυση τους στο GC-MS.

Β. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

8. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

8.1 Αντιδραστήρια και Διαλύτες

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

Ανθρακικό κάλιο (Potassium Carbonate) for analysis, PRS Panreac

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

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

Οξικός αιθυλεστέρας (ethyl acetate) HPLC grade, Chem-Lab

Εξάνιο (n-Hexan) Pro analysis, Merck

Ισοοκτάνιο (Isooctane) HPLC grade, Carlo Erba

4-μέθυλ-2-πεντανόνη (4-methyl-2-pentanone), for analysis, Panreac

1-βουτανόλη (1-butanol) for analysis, Merck

Οι ενώσεις που προσδιορίστηκαν ήταν σε σκόνη υψηλής αναλυτικής καθαρότητας του οίκου Lipomed , και βαθμού Reference Standards (εκτός από μερικές εξαιρέσεις, που παρασκευάστηκαν από φαρμακευτικά σκεύασματα)

Νορδιαζεπάμη-D₅ (Nordiazepam-D₅) cerilliant, Certified Reference Material 100μg/mL (ampule)

Φαιντανύλη (Fentanyl) Certified Reference Material 100μg/mL (ampule)

8.2 Όργανα και Συσκευές

Πιπέτες των 100-1000μL, 20-200μL, 2-20μL, TIPOR-V⁺, Orange scientific

Tips, Gilson

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

GC/MS γυάλινα φυαλίδια (vials), Agilent Technologies

Ζυγός, Electronic Balance, Kern & Sohn GmbI

Vortex Zx³, Velp Scientifica

Ανακινητήρας 19 θέσεων για eppendorf Classic Advanced Vortex Mixer, Velp Scientifica

Φυγόκεντρος, Universal 16, Hettich Zentrifugen

8.3 Βιολογικά Δείγματα

Για όλα τα πειράματα (βελτιστοποίηση της διαδικασίας εκχύλισης και για την επικύρωση της μεθόδου) χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ολικού αίματος ελεύθερα φαρμάκων και άλλων ουσιών. Τέλος η αναπτυχθείσα μέθοδος εφαρμόστηκε σε πραγματικά κλινικά και μεταθανάτια δείγματα αίματος.

9. ΜΕΘΟΔΟΣ

9.1 Προκατεργασία Δείγματος

Μεταφορά 1 mL βιολογικού δείγματος αίματος σε καθαρό πλαστικό φιαλίδιο των 2 mL (erpendorf) και ακολούθως προσθήκη 25 μ L εσωτερικού προτύπου (IS) Νορδιαζεπάμης-D₅ συγκέντρωσης 10 μ g/mL και 100 μ L μεθανολικού διαλύματος μίγματος των 7 φαρμάκων ή αν είναι άγνωστο το δείγμα προστίθεται μόνο μεθανόλη, στη συνέχεια γίνεται ρύθμιση του pH=12 με προσθήκη 0,5 mL κορεσμένου διαλύματος K₂CO₃ και τέλος γίνεται προσθήκη 0,25 mL του διαλύτη. Ακολουθεί ανάμιξη για 10 λεπτά σε vortex και 10 λεπτά φυγοκέντρηση στις 10.000 rpm. Ακολουθεί ποσοτική παραλαβή 200 μ L της οργανικής στοιβάδας και μεταφορά σε γυάλινο φιαλίδιο του GC/MS και ακολούθως εισαγωγή 1 μ L στον αέριο χρωματογράφο που είναι συζευγμένος με το φασματογράφο μαζών.

Αν το πραγματικό δείγμα βρίσκεται πάνω από το υψηλότερο σημείο της καμπύλης αναφοράς τότε γίνεται αραιώση με λευκό δείγμα αίματος (blank) ούτως ώστε να βρεθεί εντός της γραμμικής περιοχής.

9.2 Σύστημα GC – MS

Αυτόματος δειγματολήπτης CTC Pal (CTC –CH 4222, Analytical Switzerland)

Εισαγωγέας δείγματος PVT inlet, Agilent Technologies

Σύστημα αέριου χρωματογράφου (GC), Agilent Technologies 7890A, (Wilmington, USA)

Φασματογράφος μαζών MS 5975C inrtXL EI/CI MSD with Triple-Axis Detector, Agilent Technologies



Εικόνα 9.1. Σύστημα GC – MS

9.2.1 Παράμετροι του GC – MS

Για τις αναλύσεις όλων των βιολογικών δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε αυτόματος δειγματολήπτης CTC Pal (CTC –CH 4222, Analytical Switzerland) 98 θέσεων. Για κάθε ανάλυση γινόταν έγχυση 1 μL σε PVT Inlet. Πιο αναλυτικά πριν τη εισαγωγή του δείγματος στο GC/MS γίνονται τρεις πλύσεις με μεθανόλη και εν συνεχεία τρεις πλύσεις με οξικό βουτυλεστέρα ούτως ώστε να καθαρίζεται η μικροσύριγγα. Ακολούθως γίνεται πλύση με το δείγμα ακολουθεί 6 φορές φόρτωση του δείγματος πετυχαίνοντας έτσι και ανάμιξη του δείγματος, σε περίπτωση που έχουν περάσει πολλές ώρες λόγω ανάλυσης πολλών δειγμάτων. Μετά την εισαγωγή του δείγματος ακολούθουν πάλι τρεις πλύσεις με μεθανόλη και τρεις με οξικό βουτυλεστέρα. Όλοι οι παράμετροι για τον εισαγωγέα αναγράφονται στον πίνακα 9.2.1. Η επιλογή των παραμέτρων για τον εισαγωγέα έγινε βάση προγράμματος του οργάνου και σύμφωνα με τις ιδιότητες του διαλύτη του δείγματος.

Πίνακας 9.2.1... Παράμετροι εισαγωγέα

ΕΙΣΑΓΩΓΕΑΣ	
Διαίρεση Δείγματος	splitless
Θερμοκρασία	Αρχική 200°C, Αύξηση στους 320 °C με ρυθμό 320 °C/min και παραμονή για 5 min
Πίεση	30,2 psi

Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε για τις αναλύσεις ήταν Optima-5-ms, 340°C διαστάσεων 30 m x 250 μm x 0.25 μm της εταιρίας Scitech Scientific, Duren, Germany. Όλοι οι παράμετροι για το φούρνο του αέριου χρωματογράφου αναγράφονται στον πίνακα 9.2.2.

Πίνακας 9.2.2 Παράμετροι φούρνου GC.

ΦΟΥΡΝΟΣ		
Ροή	2,1 ml/min	
Χρόνος	21 min	
Θερμοκρασιακό πρόγραμμα	Αρχική 120°C	Παραμονή 1min
	Αύξηση στους 300°C με ρυθμό 15°C/min.	Παραμονή 8 min
	Εφαρμογή αντίθετης ροής στους 300°C (backflash).	10 min

Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα στο φούρνο ξεκινάει από τους 120°C όπου παραμένει για 1 λεπτό και αυξάνει με ρυθμό 15°C/min μέχρι τους 300°C. Η τελική θερμοκρασία διατηρείται για 8 min έτσι ώστε να εκλουστούν όλες οι ενώσεις από τη στήλη. Η ροή του φέροντος αερίου είναι 2,1 mL/min. Ο χρόνος που χρειάζεται το πρόγραμμα για να ολοκληρωθεί είναι 21 min και ακολούθως απαιτούνται άλλα 10 min στους 300°C για να ολοκληρωθεί το (backflash) πρόγραμμα καθαρισμού της στήλης με αντίθετη ροή του φέροντος αερίου, που είναι το ήλιο (He). Ο ανιχνευτής είναι ανοιχτός από τα 3 λεπτά έως τα 16,2 λεπτά, μένει κλειστός από τα 16,2 έως 17,1 λεπτά γιατί σε εκείνο τον χρόνο εκλούεται από την στήλη η χοληστερόλη, η οποία δίνει πολύ μεγάλο σήμα στον ανιχνευτή και μειώνει τον χρόνο ζωής του και την απόκρισή του, έπειτα ξανά ανοίγει μέχρι το τέλος του προγράμματος στα 21 λεπτά.

Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με πρόγραμμα ολικής σάρωσης (full scan mode) με εύρος μαζών (40-500 amu) για την εύρεση και επιβεβαίωση των καταλλήλων ιόντων των θραυσμάτων των φαρμάκων και των ναρκωτικών που μελετάμε, αλλά και για να είναι δυνατή η ανίχνευση άλλων ουσιών που μπορεί να προκαλέσουν τοξική δράση. Το παρόν θερμοκρασιακό πρόγραμμα και γενικότερα η μέθοδος επιλέχθηκε μετά από επανειλημμένες δοκιμές μεθανολικών πρότυπων διαλυμάτων, ως η ιδανικότερη για την ανίχνευση εκείνων των ενώσεων που έχουν τοξικολογικό ενδιαφέρον αλλά και τον ικανοποιητικό διαχωρισμό των ενώσεων. Στον παρακάτω πίνακα 9.2.3 δίνονται ο χρόνος έκλουσης αλλά και τα χαρακτηριστικά ιόντα της κάθε ένωσης. Σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία η ταυτοποίηση μιας ένωσης με GC/MS πραγματοποιείται με βάση τον χρόνο έκλουσης (R_t), ένα ιόν ταυτοποίησης (target ion) και δύο βοηθητικά (δευτερεύοντα) ιόντα (qualifier ions).

Πίνακας 9.2.3 Χρόνος έκλυσης και χαρακτηριστικά ιόντα των προς ανάλυση

ΕΝΩΣΗ	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣ ΗΣ (R _T) (MIN)	ΙΟΝ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣ ΗΣ (TARGET ION)	ΔΕΥΤΕΡΕΥΟΝΤΑ ΙΟΝΤΑ (QUALIFIER IONS)	
Προποφόλη	4,448	163	178	117
Κεταμίνη	8,488	209	180	182
Λιδοκαΐνη	8,530	58	86	120
Ροπιβακαΐνη	10,713	126	84	127
Διαζεπάμη	12,211	283	256	221
Νορδιαζεπάμη-D ₅ , (IS)	12,613	275	247	274
Μιδαζολάμη	13,037	310	325	163
Φεντανύλη	13,720	245	146	189

φαρμάων

10. ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ

10.1 Επιλογή Διαλύτη Εκχύλισης

Για την επιτυχία καλύτερων αναλυτικών αποτελεσμάτων και για την βελτιστοποίηση της μεθόδου προκατεργασίας βελτιστοποιήθηκε το στάδιο της εκχύλισης υγρού-υγρού ως προς τον διαλύτη εκχύλισης. Ο οποίος πρέπει να έχει τα εξής επιθυμητά χαρακτηριστικά: να μην είναι αναμίξιμος με την υδατική φάση που είναι το βιολογικό δείγμα, να είναι πτητικός, να μην είναι πολύ πολικός, να μην είναι τοξικός και να παραλαμβάνει σε επαρκές ποσοστό τις ενώσεις που προσδιορίζουμε. Για την επιλογή του βέλτιστου διαλύτη εκχύλισης δοκιμάστηκαν οι εξής 6 διαλύτες: οξικός βουτυλεστέρας, οξικός αιθυλεστέρας, 1-βουτανόλη, 4-μεθυλ-2-πεντανόνη, εξάνιο και το ισοοκτάνιο. Η 1-βουτανόλη δεν διαχωρίστηκε καθόλου από την υδατική φάση. Ο οξικός αιθυλεστέρας δημιούργησε γαλάκτωμα σε μεγάλο βαθμό και δεν ήταν δυνατή η παραλαβή μεγάλου όγκου του (και επίσης είναι πολύ πτητικός). Η 4-μεθυλ-2-πεντανόνη δημιουργεί γαλάκτωμα αλλά σε πολύ μικρότερο βαθμό. Δίνει όμως ιδιαίτερα επιβαρυνόμενο χρωματογράφημα και επιβαρύνει τη στήλη καθώς είναι αρκετά βαρύς και πολικός διαλύτης, ακόμα αν παραλαμβάνει περισσότερο λίγες ενώσεις δεν δίνει καλές κορυφές καθώς είναι ιδιαίτερα έντονο το “tailing”, δηλαδή δεν έχουμε οξείες κορυφές αλλά κορυφές με ουρά. Οι διαλύτες που δεν δημιούργησαν καθόλου γαλακτώματα ήταν ο οξικός βουτυλεστέρας και το ισοοκτάνιο. Τελικά επιλέχθηκε ο οξικός βουτυλεστέρας ως ο καλύτερος διαλύτης, καθώς έχει τα εξής πλεονεκτήματα, δεν δημιουργεί γαλακτώματα, δεν είναι τοξικός, δεν είναι πολύ πτητικός, δεν επιβαρύνει το χρωματογράφημα και δεν δημιουργεί κορυφές με ουρά και παραλαμβάνει όλες τις ενώσεις που μελετήσαμε.

Ως καταλληλότερος διαλύτης εκχύλισης επιλέχθηκε ο οξικός βουτυλεστέρας καθώς:

- Εκχυλίζει περισσότερο τις 6 από τις 7 ενώσεις
- Δεν σχηματίζει γαλακτώματα
- Δεν δίνει επιβαρυσμένο χρωματογράφημα (χαμηλό baseline)
- Δεν είναι πολύ πτητικός
- Δεν είναι τοξικός

Ακολουθεί πίνακας 10.1.1 τον απόλυτων εμβαδών των ενώσεων για κάθε διαλύτη εκχύλισης.

Πίνακας 10.1.1 Απόλυτα εμβαδά των ενώσεων για κάθε διαφορετικό διαλύτη εκχύλισης.

		ΕΜΒΑΔΟΝ 10⁶			
ΈΝΩΣΗ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (µg/mL)	ΟΞΙΚΟΣ ΒΟΥΤΥΛΕΣΤΕΡΑΣ	4-ΜΕΘΥΛ-2- ΠΕΝΤΑΝΟΝΗ	ΕΞΑΝΙΟ	ΙΣΟΟΚΤΑΝΙΟ
Προποφόλη	1.250	4,79	9,28	13,97	14,19
Κεταμίνη	1.250	2,52	2,52	1,30	0,77
Λιδοκαΐνη	1.250	2,17	1,95	1,01	0,67
Ροπιβακαΐνη	0.200	5,00	3,65	0,34	0,07
Διαζεπάμη	1.250	7,99	7,25	2,29	2,07
Νορδιαζεπάμη- D ₅	0.250	0,77	0,65	N.D.	N.D.
Μιδαζολάμη	0.250	5,96	4,76	0,64	0,48
Φεντανύλη	0.125	1,64	1,32	1,04	0,83

*N.D.=Not detected, Δεν ανιχνεύτηκε, κάτω από το όριο ανίχνευσης.

11. ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

11.1 Παράμετροι επικύρωσης

Για τις ποσοτικές βιοαναλυτικές διαδικασίες, είναι γενικά αποδεκτό ότι οι ακόλουθες παράμετροι επικύρωσης πρέπει να αξιολογούνται: η εκλεκτικότητα, η γραμμικότητα (πρότυπη καμπύλη), η σταθερότητα, η ορθότητα (ακρίβεια, bias) , η επαναληψιμότητα (precision), το χαμηλότερο όριο ποσοτικού προσδιορισμού (LLOQ).

11.1.1 Γραμμικότητα της μεθόδου

Η επιλογή του κατάλληλου μοντέλου βαθμονόμησης είναι απαραίτητο για την αξιόπιστη ποσοτική μέτρηση. Γιαυτό πρέπει να διερευνηθεί η σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης του αναλύτη στο δείγμα με την αντίστοιχη απόκριση του οργάνου (στις βιοαναλυτικές μεθόδους συνήθως χρησιμοποιείται ο λόγος του εμβαδού του αναλύτη προς το εμβαδό του εσωτερικού προτύπου IS). Είναι γενικά αποδεκτό για τις βιοαναλυτικές μεθόδους ότι τα πρότυπα διαλύματα για την καμπύλη (calibrators) θα είναι βασισμένα στο υπόστρωμα π.χ. θα παρασκευάζονται με επιμόλυνση λευκών (blank) δειγμάτων. Τα calibrators θα πρέπει να καλύπτουν ολόκληρο το εύρος της καμπύλης και θα πρέπει να είναι εξίσου κατανομημένα. Οι περισσότερες οδηγίες απαιτούν το ελάχιστο πέντε επίπεδα συγκέντρωσης με οχτώ και επίσης απαιτούν δύο με έξι ίδια δείγματα (replicates) ανα συγκέντρωση. Γενικά είναι καλύτερο να παρασκευάζεται καμπύλη αναφοράς με λιγότερα επίπεδα συγκέντρωσης αλλά περισσότερα δείγματα ανα συγκέντρωση. Τέλος μετά από την μέτρηση των αναγκαίων δειγμάτων είναι αναγκαίο ένα μαθηματικό μοντέλο που θα περιγράφει την σχέση της συγκέντρωσης του αναλύτη με την απόκριση (σήμα) του οργάνου. Συνήθως χρησιμοποιείται γραμμικό μοντέλο, όπως η εξίσωση ευθείας ελάχιστων τετραγώνων.

Για τον έλεγχο της γραμμικότητας κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη με επιμόλυνση (spiking) λευκών δειγμάτων (blank) με 25μL εσωτερικού προτύπου, Νορδιαζεπάμης-D₅ ,(10 μg/mL σε μεθανόλη) και επιμολύνθηκαν επίσης με 100 μL από πρότυπα μεθανολικά διαλύματα των 41 ενώσεων ούτως ώστε να

προκύψουν διαλύματα 5 συγκεντρώσεων. Κατασκευάστηκαν 2 δείγματα για κάθε συγκέντρωση και έτσι έγινε κατασκευή της πρότυπης καμπύλης με 10 σημεία. Ακόμα παρασκευάστηκαν ένα λευκό δείγμα με εσωτερικό πρότυπο και ένα λευκό δείγμα χωρίς εσωτερικό πρότυπο. Το εύρος των πρότυπων καμπύλων αναφοράς σχεδιάστηκε ούτως ώστε να καλύπτει τα θεραπευτικά και τοξικά επίπεδα της κάθε ένωσης. Ο συντελεστής συχέτισης (R^2) κοιμάνθηκε από 0,9955 (λιδοκαΐνη) έως 0,9998 (ροπιβακαΐνη). Στον παρακάτω πίνακα 11.1.1 δίνονται οι γραμμικές περιοχές καθώς και ο συντέλεστής συσχέτισης αλλά και η εξίσωση ευθείας για όλες τις προσδιοριζόμενες ενώσεις.

11.1.2 Όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ)

Ο όρος LOQ προκύπτει από τα αρχικά των λέξεων Limits Of Quantification και είναι το όριο ποσοτικής αποτίμησης, δηλαδή το κατώτατο επίπεδο συγκέντρωσης μιας ένωσης το οποίο μπορεί να ανιχνευτεί και να προσδιοριστεί ποσοτικά. Ο όρος LOD προκύπτει από τα αρχικά των λέξεων Limits Of Detection και αναφερόμαστε στο κατώτατο όριο κατά το οποίο δύναται να ανιχνευθεί η ένωση που μας αφορά χωρίς όμως να υπάρχει δυνατότητα ποσοτικού προσδιορισμού. Το LOQ υπολογίστηκε πειραματικά από τον λόγο 10/1 του σήματος της προσδιοριζόμενης ένωσης προς τον θόρυβο του οργάνου. Το LOD υπολογίστηκε και αυτό πειραματικά από τον λόγο 3/1 του σήματος της προσδιοριζόμενης ένωσης προς τον θόρυβο του οργάνου. Η ποσοτικοποίηση κάτω από το LOQ εξ'ορισμού δεν είναι αποδεκτή, ως εκ τούτου κάτω από την τιμή αυτή μπορούν να αναπαραχθούν μόνο ημιποσοτικά ή ποιοτικά δεδομένα. Ωστόσο ιδιαίτερα στην αναλυτική τοξικολογία είναι πολύ σημαντικό να γνωρίζει κανείς το LOD της μεθόδου, η οποία μπορεί να οριστεί ως η χαμηλότερη συγκέντρωση αναλύτη σε ένα δείγμα το οποίο μπορεί να ανιχνευτεί αλλά όχι απαραίτητα ως μια ακριβή τιμή ή ως η χαμηλότερη συγκέντρωση ενός αναλύτη σε ένα δείγμα που η βιοαναλυτική διαδικασία μπορεί αξιόπιστα να διαφορποιήσει από τον φόντο του θορύβου (background noise). Το LOD κοιμάνθηκε από 2 ng/mL (μιδαζολάμη) έως 14 ng/mL (διαζεπάμη). Το LOQ κοιμάνθηκε από 7 ng/mL (μιδαζολάμη) έως 45

ng/mL (διαζεπάμη). Στον παρακάτω πίνακα 11.1.1 δίνονται οι τιμές των ορίων ευαισθησίας της μεθόδου.

Πίνακας 11.1.1 Γραμμικότητα και όρια ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού των ενώσεων.

ΕΝΩΣΗ	ΓΡΑΜΜΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ (µg/mL)	ΕΞΙΣΩΣΗ ΕΥΘΕΙΑΣ	R ²	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
Προποφόλη	0,100 - 5,000	$y=24,617x-2,6623$	0,9983	0,005	0,017
Κεταμίνη	0,100 - 5,000	$y=2,9372x+0,3221$	0,9957	0,011	0,038
Λιδοκαΐνη	0,100 - 5,000	$y=5,7228x+0,7541$	0,9955	0,009	0,029
Ροπιβακαΐνη	0,080 - 2,000	$y=32,713x-0,4533$	0,9998	0,003	0,009
Διαζεπάμη	0.100-5.000	$y=8,8033x-0,5545$	0,9987	0,014	0,045
Μιδαζολάμη	0.020-1.000	$y=30,607x-0,3161$	0,9975	0,002	0,007
Φεντανύλη	0.010-0.500	$y=14,9604x-0,1360$	0,9977	0,003	0,010

11.1.3 Έλεγχος Επαναληψιμότητας

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος της ακρίβειας και της επαναληψιμότητας (CV%): Έξι (blank) λευκά δείγματα αίματος επιμολύνθηκαν σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις, μία χαμηλή, μία μέση και μία υψηλή και επίσης με ίδια ποσότητα εσωτερικού προτύπου (25 µL Νορδιαζεπάμης-D₅ συγκέντρωσης 10 µg/mL) και αναλύθηκαν κατά τη διάρκεια της ίδιας ημέρας (intra-day). Η ενδιάμεση επαναληψιμότητα υπολογίστηκε με ανάλυση επιμολυσμένων δειγμάτων αίματος (στις ίδιες τρεις συγκεντρώσεις) κατά τη διάρκεια μιας εβδομάδας (inter-assay). Η ορθότητα και η ακρίβεια της μεθόδου έγιναν αποδεκτές. Παρακάτω

παρατίθεται ο πίνακας 11.1.2 για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας για κάθε

Ένωση	Συγκέντρωση (µg/mL)	ΜΕΣΑ ΣΤΗΝ ΗΜΕΡΑ (intra-assay)				ΜΕΣΑ ΣΤΗΝ ΕΒΔΟΜΑΔΑ (inter-assay)			
		Μέσος όρος (µg/mL)	Τυπική απόκλιση	Επαναληψιμότητα %	Ακρίβεια %	Ολικός μέσος όρος (µg/mL)	Τυπική απόκλιση	CV % Επαναληψιμότητα %	Ακρίβεια %
Διαζεπάμη	0.250	0.271	0.042	15.50	108.40	0.257	0.039	15.18	102.80
	1.250	1.308	0.061	4.66	104.64	1.247	0.103	8.26	99.76
	5.000	5.255	0.402	7.60	105.10	5.069	0.466	9.19	101.38
Μιδαζολάμη	0.050	0.056	0.003	5.36	112.00	0.059	0.005	8.50	118.00
	0.250	0.210	0.010	4.76	84.00	0.224	0.020	8.93	88.00
	1.000	0.930	0.070	7.53	93.00	1.000	0.100	10.00	100.00
Φεντανύλη	0.025	0.026	0.003	11.54	104.00	0.026	0.003	11.54	104.00
	0.125	0.107	0.006	5.61	85.6	0.108	0.008	7.41	86.40
	0.500	0.450	0.046	10.22	90.00	0.481	0.050	10.40	96.20

ένωση ταξινομημένες με βάση τον χρόνο έκλυσης (R_t).

Ένωση	Συγκέντρωση (µg/mL)	ΜΕΣΑ ΣΤΗΝ ΗΜΕΡΑ (intra-assay)				ΜΕΣΑ ΣΤΗΝ ΕΒΔΟΜΑΔΑ (inter-assay)			
		Μέσος όρος (µg/mL)	Τυπική απόκλιση	Επαναληψιμότητα %	Ακρίβεια %	Ολικός μέσος όρος (µg/mL)	Τυπική απόκλιση	CV % Επαναληψιμότητα %	Ακρίβεια %
Προποφόλη	0.250	0.275	0.014	5.10	110.00	0.279	0.014	5.02	111.60
	1.250	1.170	0.080	6.84	93.60	1.191	0.124	10.41	95.28
	5.000	5.200	0.395	7.60	104.00	5.244	0.488	9.31	104.88
	5.000	5.089	0.508	9.98	101.78	4.892	0.431	8.81	97.84
	10.000	10.811	1.048	9.69	108.11	10.326	0.956	9.26	103.26
Κεταμίνη	0.250	0.230	0.021	9.13	92.00	0.224	0.028	12.50	89.60
	1.250	0.213	0.088	7.86	89.60	1.068	0.082	7.68	85.44
	5.000	5.068	0.305	6.00	102.00	4.909	0.423	8.62	98.18
Λιδοκαΐνη	0.250	0.252	0.025	9.92	100.80	0.237	0.028	11.81	94.80
	1.250	1.310	0.092	7.02	104.80	1.345	0.117	8.70	107.60
	5.000	4.964	0.268	5.40	99.28	5.072	0.506	9.98	101.44
	1.250	1.279	0.079	6.18	102.32	1.282	0.066	5.15	102.56
	5.000	5.172	0.401	7.75	103.44	5.103	0.420	8.23	102.06
Ροπιβακαΐνη	0.080	0.090	0.003	3.33	112.50	0.089	0.003	3.37	111.25
	0.500	0.495	0.020	4.04	99.00	0.495	0.013	2.63	99.00
	2.000	1.986	0.042	2.11	99.30	1.974	0.037	1.87	98.70
	1.250	1.285	0.086	6.69	102.80	1.291	0.069	5.34	103.28
	5.000	4.956	0.084	1.69	99.12	4.994	0.100	2.00	99.88

Πίνακας 11.1.2 Επαναληψιμότητα και Ακρίβεια των φαρμάκων.

11.1.4 Εκλεκτικότητα

Εκλεκτικότητα (ειδικότητα): Εκφράζει την έλλειψη παρεμπόδισης στον προσδιορισμό των ουσιών σε ένα δείγμα από άλλα συστατικά του δείγματος. Μια μέθοδος είναι εκλεκτική όταν δίνει ορθά αναλυτικά αποτελέσματα για τις

επιμέρους ουσίες του δείγματος χωρίς να υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ τους. Για να ελεγχθεί η εκλεκτικότητα έγιναν δοκιμές πάνω από δέκα λευκών δειγμάτων αίματος από διαφορετικούς ανθρώπους που αναλύθηκαν σύμφωνα με την προκατεργασία που αναφέρθηκε προηγουμένως χωρίς προσθήκη των ενώσεων που προσδιορίσαμε και με επιμόλυνση των ενώσεων που προσδιορίσαμε. Ακολούθως έγινε επικάλυψη των εξαγόμενων χρωματογραφήματων στο χαρακτηριστικό ιόν κάθε ένωσης. Παρατηρήθηκε ότι η μέθοδος είναι εκλεκτική καθώς δεν υπάρχει παρεμπόδιση από το υπόστρωμα στο συγκεκριμένο χρόνο που εκλούεται κάθε ένωση.

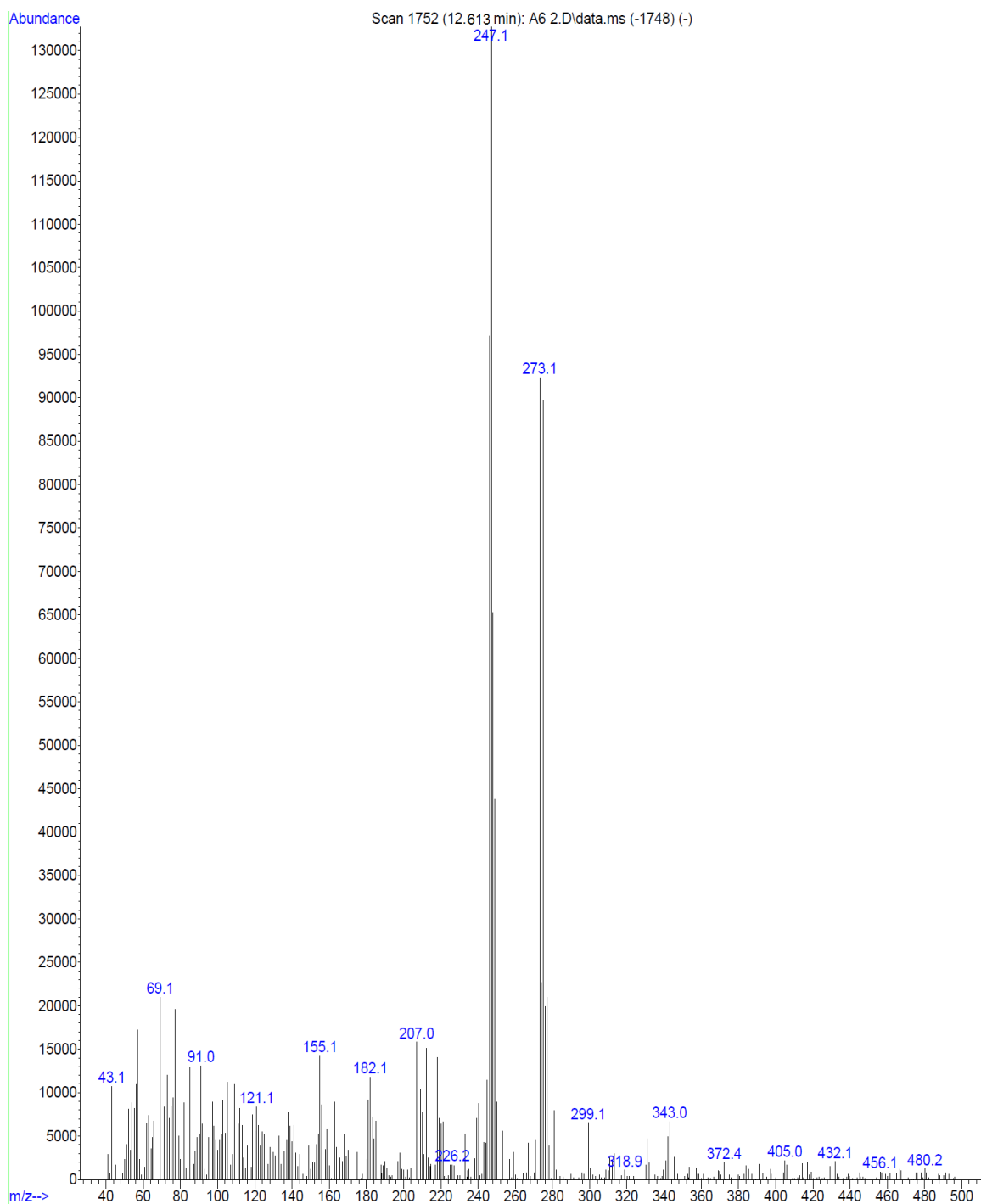
11.1.5 Μεταφορά Αναλύτη σε Διαδοχικά Δείγματα (carryover)

Η μεταφορά του αναλύτη σε ένα επόμενο δείγμα μπορεί να οδηγήσει σε ανακριβή ποιοτικά και ποσοτικά αποτελέσματα όταν χρησιμοποιούνται ενόργανες μέθοδοι. Η μεταφορά του αναλύτη (carryover) πρέπει να αξιολογείται κατά τη διάρκεια της επικύρωσης της μεθόδου που αποσκοπεί για την ταυτοποίηση ή / και τον ποσοτικό προσδιορισμό. Για την αξιολόγηση της μεταφοράς του αναλύτη, στο πλαίσιο της επικύρωσης της μεθόδου, ένα λευκό δείγμα (blank) αναλύεται πριν και αμέσως μετά από ένα δείγμα υψηλής συγκέντρωσης του αναλύτη. Η υψηλότερη συγκέντρωση του αναλύτη στην οποία δεν παρατηρείται μεταφορά στο λευκό δείγμα (πάνω από το LOD της μεθόδου) προσδιορίζεται ότι είναι η συγκέντρωση στην οποία η μέθοδος είναι απαλλαγμένη από το περαιτέρω. Η συγκέντρωση αυτή πρέπει να επιβεβαιωθεί με τη χρήση τριπλών αναλύσεων. Είναι αποδεκτό να περιοριστεί η μελέτη μεταφοράς στο υψηλότερο σημείο της καμπύλης αναφοράς, ή ακόμα καλύτερα και σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Για τον έλεγχο της μεταφοράς αναλύτη (carryover) έγινε ανάλυση λευκού δείγματος μετά από έξι διαδοχικές μετρήσεις επιμολυσμένων δειγμάτων στην υψηλότερη συγκέντρωση της καμπύλης αναφοράς κάθε αναλύτη και δεν διαπιστώθηκε μεταφορά αναλύτη στο λευκό δείγμα. Ο έλεγχος αυτός έγινε αρκετές φορές κατά τη διάρκεια της επικύρωσης της μεθόδου, τόσο κατά την διάρκεια του ελέγχου της γραμμικότητας, όσο και

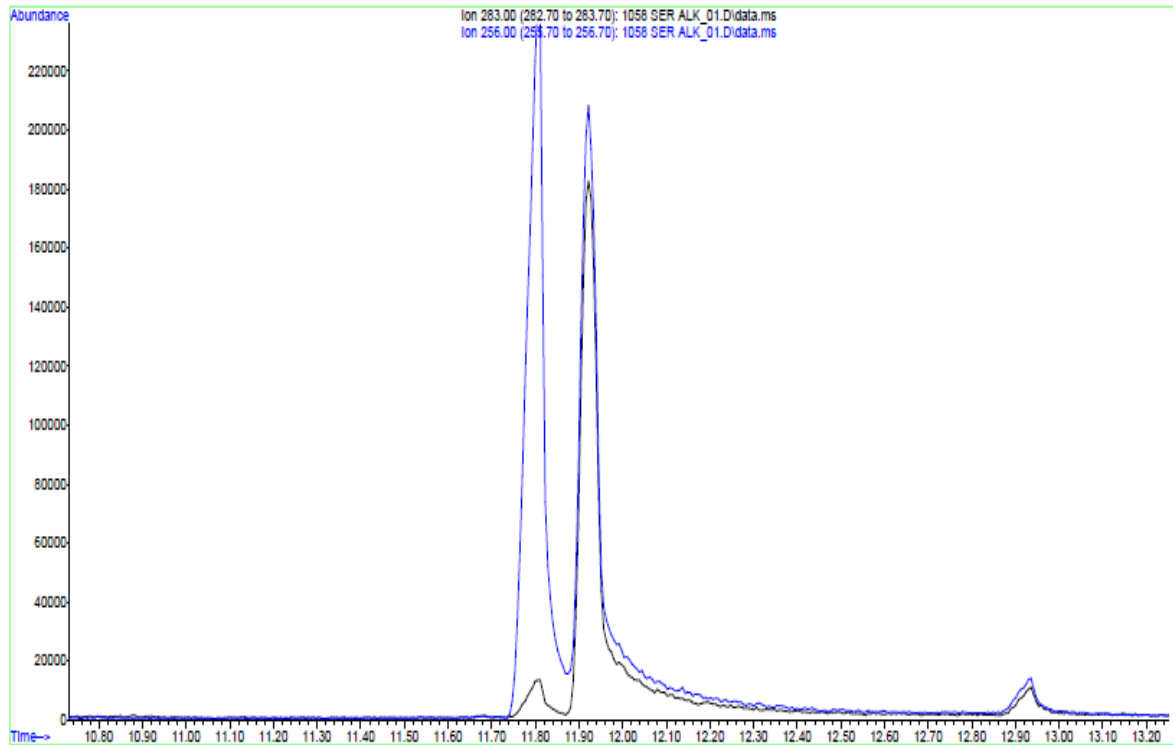
κατά την διάρκεια του ελέγχου της ορθότητας και της πιστότητας (accuracy and precision).

12. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΦΑΣΜΑΤΑ ΜΑΖΩΝ

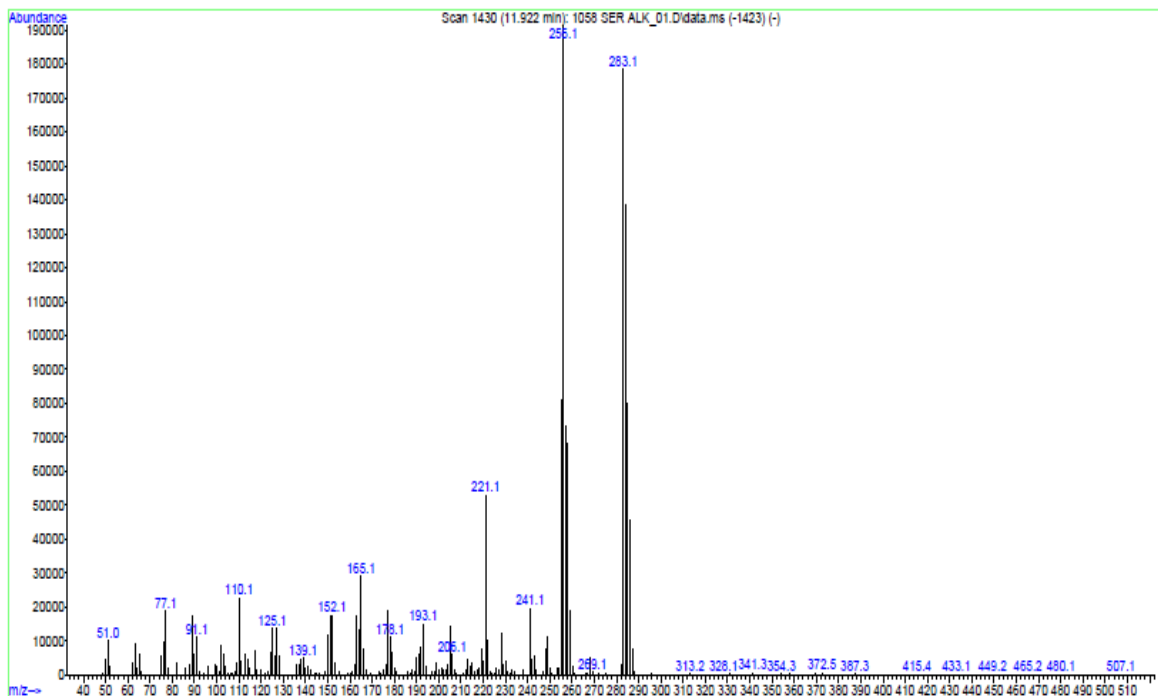
Ως εσωτερικό πρότυπο χρησιμοποιήθηκε η νορδιαζεπάμη-D₅ η οποία εκλύεται στα 12,613 λεπτά. Στην παρακάτω εικόνα 12.1 παρουσιάζεται το φάσμα μάζα της όπως αναλύθηκε στο GC/MS.



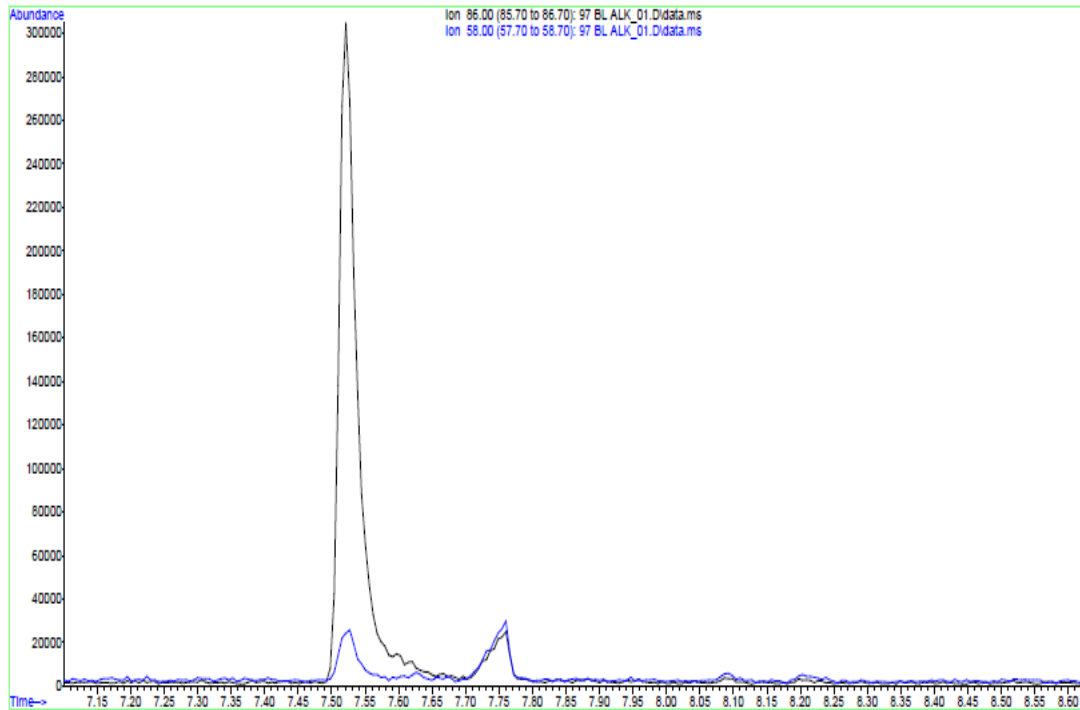
Εικόνα 12.1 Φάσμα μαζών του εσωτερικού προτύπου ,της νορδιαζεπάμης-D₅



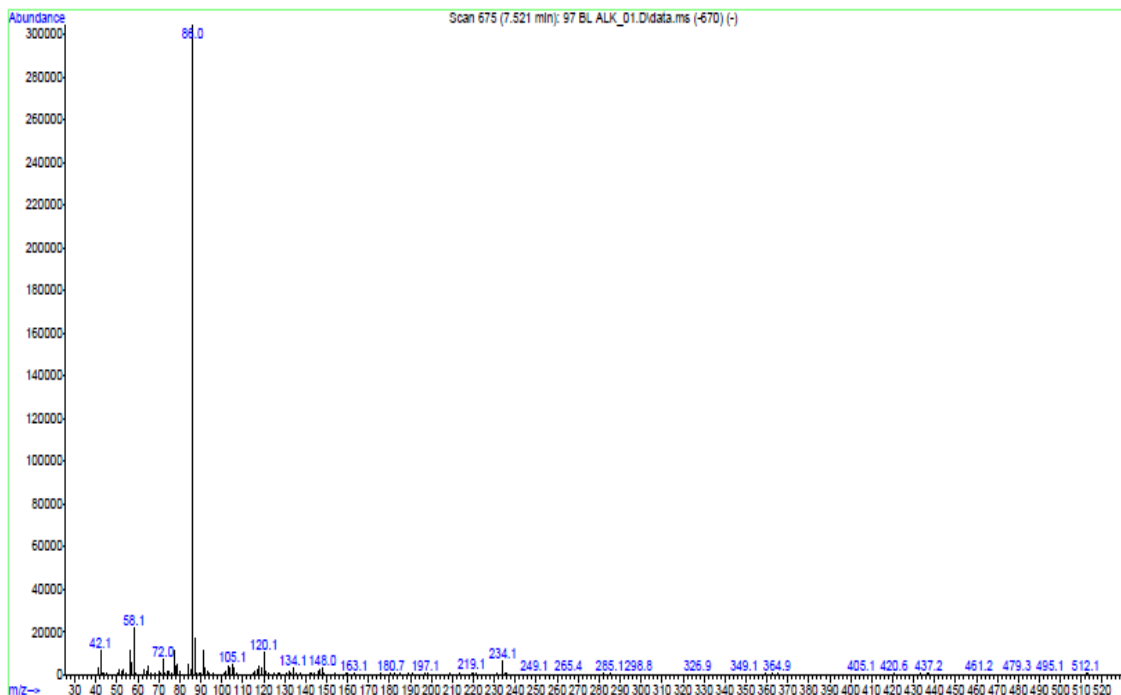
Εικόνα 12.2 Χρωματογράφημα πραγματικού περιστατικού που ανιχνεύτηκε η διαζεπάμη (SIM= Selective Ion Monitoring): 256, 283



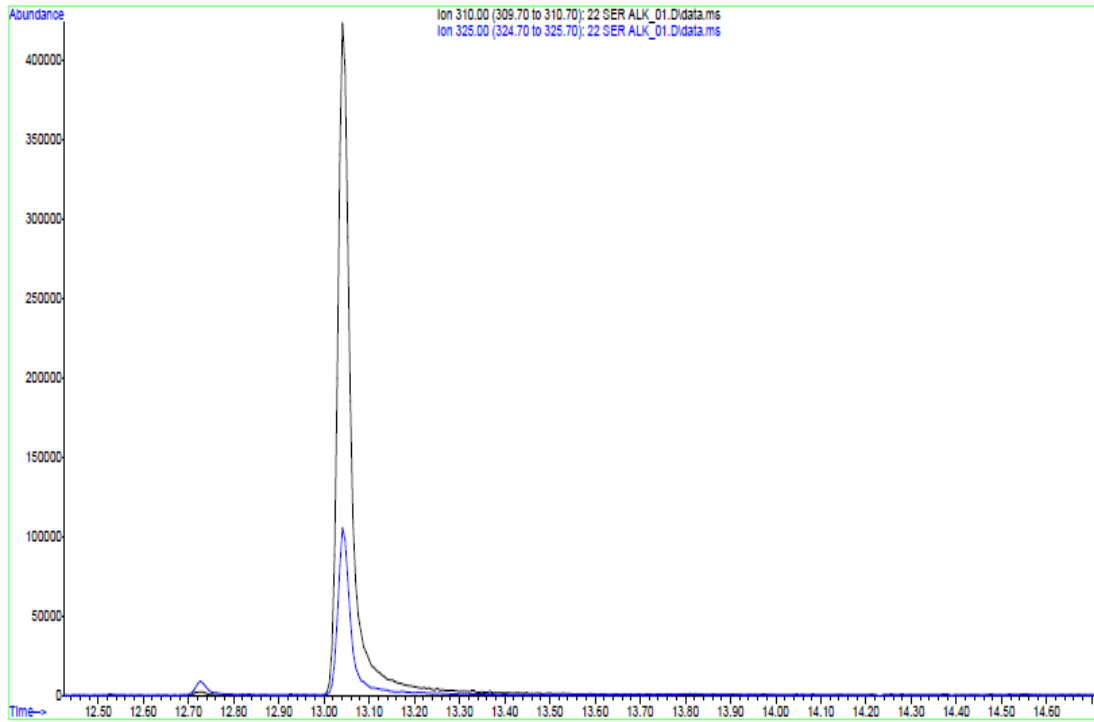
Εικόνα 12.3 Φάσμα μαζών της διαζεπάμης από πραγματικό δείγμα



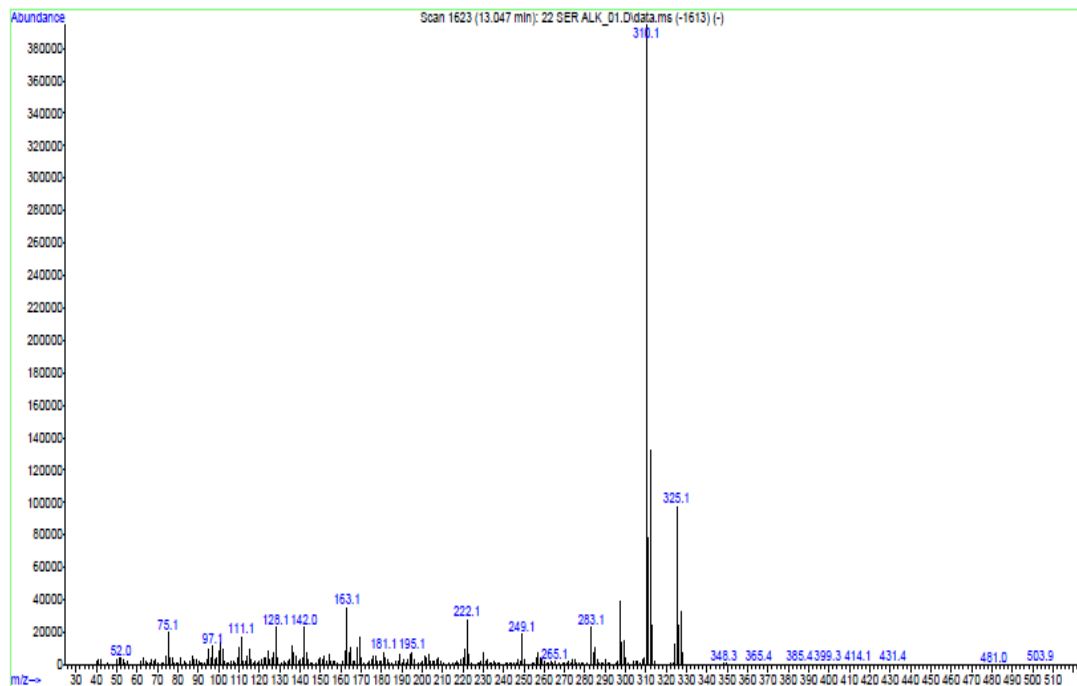
Εικόνα 12.4 Χρωματογράφημα πραγματικού περιστατικού που ανιχνεύτηκε η λιδοκαΐνη (SIM): 86,58



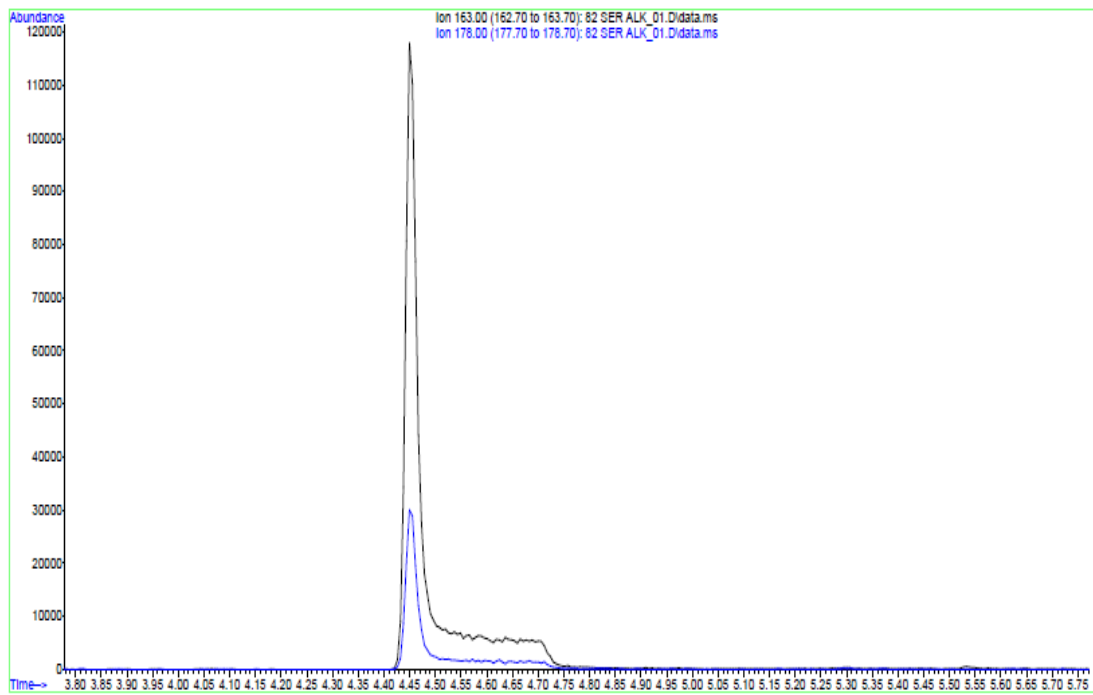
Εικόνα 12.5 Φάσμα μαζών της λιδοκαΐνης από πραγματικό δείγμα



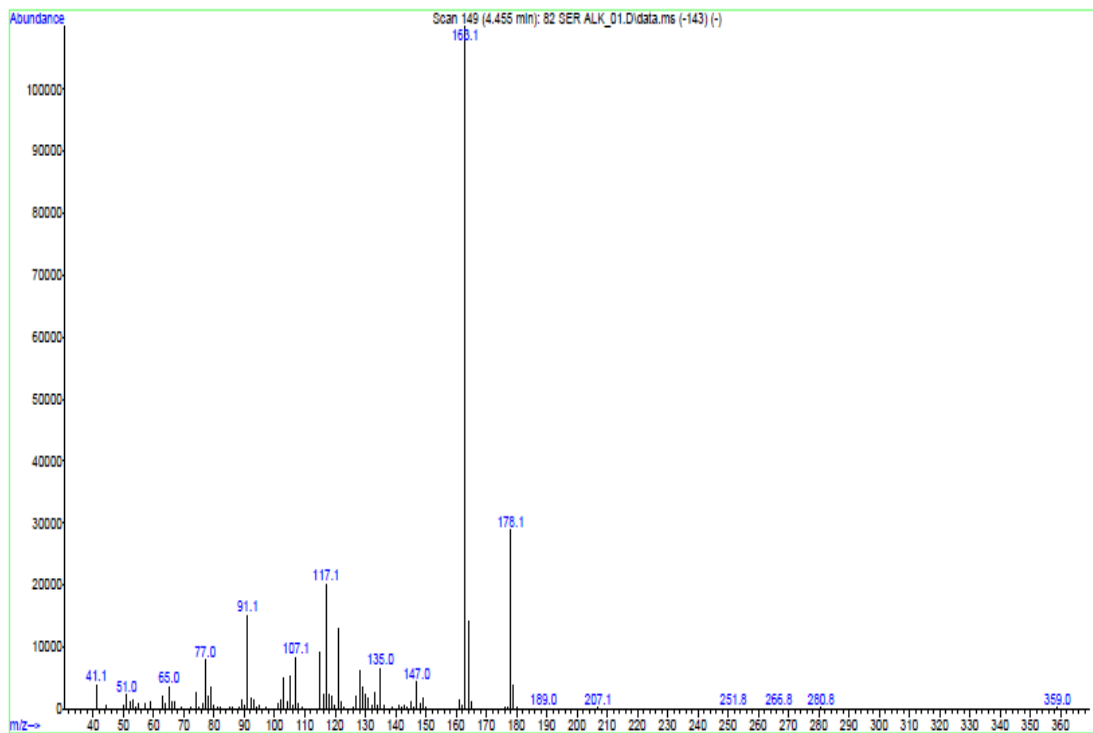
Εικόνα 12.6 Χρωματογράφημα πραγματικού περιστατικού που ανιχνεύτηκε η μιδαζολάμη (SIM): 310,325



Εικόνα 12.7 Φάσμα μαζών της μιδαζολάμης από πραγματικό δείγμα



Εικόνα 12.8 Χρωματογράφημα πραγματικού περιστατικού που ανιχνεύτηκε η προποφόλη (SIM): 163,178



Εικόνα 12.9 Φάσμα μαζών της προποφόλης από πραγματικό δείγμα

13. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία αναπτύχθηκε μέθοδος προσδιορισμού 7 φαρμάκων που χορηγούνται στην αναισθησία με τη χρήση GC-MS μετά από εκχύλιση υγρού-υγρού. Ειδικότερα βελτιστοποιήθηκε η διαδικασία εκχύλισης (υγρού-υγρού) των φαρμάκων από το βιολογικό υπόστρωμα, με την εφαρμογή διαφόρων διαλυτών. Τελικά επιλέχθηκε ο οξικός βουτυλεστέρας ως ο ιδανικότερος καθώς:

- Εκχυλίζει περισσότερο τις 6 από τις 7 ενώσεις
- Δεν σχηματίζει γαλακτώματα
- Δεν δίνει επιβαρυσμένο χρωματογράφημα (χαμηλό baseline)
- Δεν είναι πολύ πτητικός
- Δεν είναι τοξικός

Όσον αφορά την επικύρωση της μεθόδου είχαμε τα κάτωθι δεδομένα:

- Γραμμικότητα - Ο συντελεστής συχέτισης (R^2) κοιμάνθηκε από 0,999 έως 0,999.
- Η εκλεκτικότητα ήταν ικανοποιητική καθώς δεν παρατηρήθηκε καποια παραμπόδιση λόγω υποστρώματος
- Carryover - δεν παρατηρήθηκε μεταφορά των φαρμάκων σε λευκό δείγμα αίματος μετά από ανάλυση δείγματος με υψηλή συγκέντρωση των φαρμάκων..
- LOD - κυμάνθηκαν από 2 ng/mL (μιδαζολάμη) έως 14 ng/mL (διαζεπάμη).
- LOQ - κοιμάνθηκαν από 7 ng/mL (μιδαζολάμη) έως 47 ng/mL (διαζεπάμη).
- Η επαναληψιμότητα κατά τη διάρκεια της ημέρας προσδιορίστηκε στην χαμηλότερη συγκέντρωση έως 15,5 % (διαζεπάμη) και κατά την διάρκεια της εβδομάδας έως 15,18 % (διαζεπάμη).
- Η ακρίβεια κυμάνθηκε στην χαμηλότερη συγκέντρωση από 100,8 % (λιδοκαΐνη) έως 112,5 % (ροπιβακαΐνη) κατά τη διάρκεια της ημέρας και

από 102.8 % (διαζεπάμη) έως 118 % (μιδαζολάμη) κατά τη διάρκεια της εβδομάδας.

Τα αποτελέσματα ήταν ικανοποιητικά και αποδεκτά.

Επίσης στα θετικά της μεθόδου καταγράφονται:

- Η χρήση μικρού όγκου μη τοξικού διαλύτη καθιστώντας την έτσι φιλική προς το περιβάλλον αλλά πιο οικονομική.
- Είναι ταχεία καθώς απαιτεί μόνο ένα στάδιο εκχύλισης χωρίς το στάδιο της εξάτμισης και της επαναδιάλυσης,
- Επίσης δεν χρειάζεται παραγωγοποίηση, η οποία απαιτεί χρόνο και αυξάνει το κόστος της ανάλυσης.

Τελικά η αναπτυχθείσα μέθοδος εφαρμόστηκε με επιτυχία τόσο σε κλινικά περιστατικά όσο και σε νεκροτομικά, καταδεικνύοντας ότι αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο στο πεδίο της κλινικής και δικαστικής τοξικολογίας.

14. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1 Κρόκος Διαμαντής, Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία 2016, Ανάπτυξη Ταχείας Μεθόδου Ποσοτικού Προσδιορισμού 41 Ναρκωτικών και Φαρμάκων σε Αίμα με Αέρια Χρωματογραφία Συζευγμένη με Φασματομετρία Μάζας μετά από Εκχύλιση Υγρού - Υγρού

2 Αμβρόσιος Ορφανίδης, Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία 2013, Ανάπτυξη γρήγορης μεθόδου για την ανίχνευση 41 φαρμάκων και ναρκωτικών σε αίμα, μετά από αλκαλική εκχύλιση και ανάλυση σε αέριο χρωματογράφο-φασματογράφο μαζών (GC/MS).

3 Olaf H. Drummer, *The Forensic Pharmacology of Drugs of Abuse*, 2001

4 Therapeutic and toxic blood concentrations of more than 800 drugs and other xenobiotics, M. Schulz, A. Schmoltdt, *Pharmazie* 58, 447-474 (2003)

5 Τσούκαλη-Παπαδοπούλου Ε. Επιλεγμένα Σύγχρονα Θέματα Τοξικολογίας, Παρισιανού, Αθήνα, 2008 pp. 5-6,17-20, 110-111.

6 Fenton J.J. in *TOXICOLOGY A Case - Oriented Approach*, CRC PRESS eds Raton B., NEW YORK, 2002, pp.1-6.

7 Meadway C., George C., Braithwaite R., *Forensic Science International*, 2002,127, pp. 136-141.

8 Α.Ν. Βουλγαρόπουλος, Γ.Α. Ζαχαριάδης, Ι.Α. Στράτης, Εισαγωγή στην Ποσοτική Χημική Ανάλυση, 2001, σελίδα 255

9 Ι. Ν. Παπαδογιάννης, Σύγχρονες Διαχωριστικές Τεχνικές στην Ενόργανη Χημική Ανάλυση

10 V.P. Shah, K.K. Midha, S. Dighe, I.J. McGilveray, J.P. Skelly, A. Yacobi, T. Layloff, C.T. Viswanathan, C.E. Cook, R.D. McDowall, K.A. Pittman, S. Spector, *Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. Conference report, Pharm. Res.* 9 (1992) 588-592.

11 International Conference on Harmonization (ICH), *Validation of analytical methods: definitions and terminology*, ICH Q2 A, 1994.

12 International Conference on Harmonization (ICH), *Validation of analytical methods: methodology*, ICH Q2 B, 1996.

13 EURACHEM, The Fitness for Purpose of Analytical Methods—A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, 1998.

14 V.P. Shah, K.K. Midha, J.W. Findlay, H.M. Hill, J.D. Hulse, I.J. McGilveray, G. McKay, K.J. Miller, R.N. Patnaik, M.L. Powell, A. Tonelli, C.T. Viswanathan, A. Yacobi, Bioanalytical method validation—a revisit with a decade of progress, *Pharm. Res.* 17 (2000) 1551–1557.

15 M. Thompson, S.L.R. Ellison, R. Wood, Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC technical report), *Pure Appl. Chem.* 74 (2002) 835–855.

16 F.T. Peters, M. Hartung, M. Herbold, G. Schmitt, T. Daldrup, F. Musshoff, Anlage zu den Richtlinien der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen, Anhang C: Anforderungen an die Durchführung von Analysen, 1. Validierung, *Toxichem. Krimtech.* 71 (2004) 146–154.

17 Στεφανίδου-Στεφανάτου Ιουλία, Δ. Ρήγας, Εισαγωγή στη Φασματοσκοπία Μαζών

18 Simple and sensitive screening and quantitative determination of 88 psychoactive drugs and their metabolites in blood through LC-MS/MS: Application on postmortem samples, Cristina Sempio, Luca Morini, Claudia Vignali, Angelo Groppi, *Journal of Chromatography B*, Volume 970, 1 November 2014, Pages 1-7

19 Mary J. Mycek, Richard A. Harvey, Pamela C. Champe, Φαρμακολογία με πλούσια διδακτική εικονογράφηση

20. Randall C. Baselt, Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man

21 Development and validation of an EI-GC-MS method for the determination of benzodiazepine drugs and their metabolites in blood: Applications in clinical and forensic toxicology Ioannis I. Papoutsis, Sotirios A. Athanaselis, Panagiota D. Nikolaou, Constantinos M. Pistos, Chara A. Spiliopoulou, Constantinos P. Maravelias *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 52 (2010) 609–614

22 Screening and semi-quantitative analysis of post mortem blood for basic drugs using gas chromatography/ion trap mass spectrometry, Sue Paterson, Rosa Cordero, Simon Burlinson, *Journal of Chromatography B* Volume 813, Issues 1–2, 25 December 2004, Pages 323–330

23 Effects of triglycerides levels in human whole blood on the extraction of 19 commonly used drugs using liquid-liquid extraction and gas chromatography-mass spectrometry, ZhiBin Huang, Tianfang Yu, Lin Guo, Zebin Lin, ZiQin

Zhao, Yiwen Shen, Yan Jiang, Yonghong Ye, Yulan Rao, Toxicology Reports 2 (2015) 785–791

24 Development of a simple one-pot extraction method for various drugs and metabolites of forensic interest in blood by modifying the QuEChERS method, Shuntaro Matsuta, Keiko Nakanishi, Akihiro Miki, Kei Zaito, Noriaki Shima, Tooru Kamata, Hiroshi Nishioka, Munehiro Katagi, Michiaki Tatsuno, Kento Tsuboi, Hitoshi Tsuchihashi, Koichi Suzuki, Forensic Science International Volume 232, Issues 1–3, 10 October 2013, Pages 40–45

25 Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens, UNITED NATIONS New York, 2009, Laboratory and Scientific Section United Nations Office on Drugs and Crime, Vienna,

26 Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology, SWGTOX Doc 003 Revision 1 Published May 20, 2013, Page 13

27. http://www.unodc.org/documents/scientific/validation_E.pdf

28 www.gallinos.gr

29 <https://www.agilent.com>