

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ – ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΠΑΤΟΥΡΑ ΔΗΜΗΤΡΑ

**ΘΕΜΑ : ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΠΑΓΟΡΕΥΜΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΤΟ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΤΟΥ ΟΑΚΑ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΔΟ ΤΩΝ
ΟΛΥΜΠΙΑΚΩΝ ΑΓΩΝΩΝ ΤΟΥ 2004 ΣΤΗΝ ΑΘΗΝΑ
ΑΠΑΓΟΡΕΥΜΕΝΗ ΟΥΣΙΑ : ΚΟΚΑΪΝΗ**

**ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ : ΚΟΥΡΕΤΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ
ΕΠΙΤΡΟΠΗ : ΚΑΡΠΟΥΖΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ
ΚΟΜΙΩΤΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ
ΚΟΥΡΕΤΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ**



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 5007/1
Ημερ. Εισ.: 13-11-2006
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιδετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2006
ΠΑΤ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087759

ΕΛΕΓΧΟΣ DOPING (DOPING CONTROL)

1. DOPING

1.1. Εισαγωγή - Ιστορική Ανασκόπηση

Ο όρος **doping*** προέρχεται από την ολλανδική λέξη *dop*, δηλωτική αποστάγματος από φλοιούς σταφυλιού με διεγερτικές ιδιότητες που χρησιμοποιούσαν φυλές της Ν. Αφρικής. Ο όρος πρωτοεμφανίστηκε στο τέλος του περασμένου αιώνα για να περιγράψει τη χορήγηση ουσιών σε άλογα και σκύλους ώστε να ελαττωθούν οι πιθανότητες νίκης τους και να επηρεαστούν έτσι οι αποδόσεις των στοιχημάτων. Σήμερα ο όρος περιγράφει τη χορήγηση ουσιών που βελτιώνουν την αθλητική απόδοση. Η χρήση σκευασμάτων που προκαλούν αύξηση της αθλητικής αποδόσεως είναι γνωστή από την αρχαιότητα (αθλητές Ολυμπιακών Αγώνων στην Ελλάδα, μονομάχοι στη Ρώμη). Η παλαιότερη αναφορά λήψεως φαρμάκων σε σύγχρονους αγώνες αφορά κολυμβητικούς αγώνες στο Amsterdam το 1865, ενώ την ίδια εποχή αρχίζει η διάδοση διεγερτικών (καφεΐνη, στρυχνίνη, ηρωΐνη, κοκαΐνη) στους ποδηλάτες. Με την αναβίωση των Ολυμπιακών Αγώνων εμφανίζονται κρούσματα doping με στρυχνίνη σε μαραθωνοδρόμους (Tom Hicks, Ολυμπιονίκης 1904, Dorando Pietri, 1908). Το 1910 αρχίζει η προσπάθεια εργαστηριακού ελέγχου του doping με την ανίχνευση αλκαλοειδών σε σίελο αγωνιστικών σκύλων και αλόγων.

Η ανακάλυψη στη δεκαετία του 1930 των παραγώγων αμφεταμίνης και των αναβολικών στεροειδών οδήγησε σε έκρηξη του doping μετά το Β' Παγκόσμιο Πόλεμο. Μολονότι υπήρχαν υποψίες και ενδείξεις για τη χρήση διεγερτικών δεν υπήρχαν κανονισμοί εναντίον του doping μέχρι τους Ολυμπιακούς Αγώνες του 1960 (Roma). Την πρώτη ημέρα, ο 23χρονος Δανός ποδηλάτης **Knud Jensen** πέθανε κατά τη διάρκεια του αγώνα 100 Km. Επίσημη αιτία θανάτου θεωρήθηκε η ηλίαση, η αυτοψία όμως αποκάλυψε τη χρήση αμφεταμίνης και τρυγικού νικοτινιλίου. Ο θάνατος του Jensen έφερε στην επιφάνεια ένα ολοένα αυξανόμενο πρόβλημα. Το 1963 η Γαλλία εισήγαγε νομοθεσία κατά του doping και το Βέλγιο ακολούθησε δύο χρόνια αργότερα. Στην Ολυμπιάδα του 1964 (Tokyo) έγιναν οι πρώτες αναλύσεις σε ούρα ποδηλατών. Το 1966 οι πέντε πρώτοι ποδηλάτες στην κατάταξη του Παγκοσμίου Πρωταθλήματος αρνήθηκαν να υποστούν έλεγχο doping. Το 1967 συνέβη το περιστατικό που προκάλεσε το μεγαλύτερο, μέχρι τότε, θόρυβο, ίσως λόγω της τηλεοπτικής καλύψεως. Ο 29χρονος Βρετανός ποδηλάτης **Tommy Simpson**, πρώην παγκόσμιος πρωταθλητής, πέθανε κατά τη διάρκεια του Γύρου της Γαλλίας. Ο θάνατός του αποδόθηκε σε καρδιακή ανεπάρκεια λόγω θερμικής εξαντλήσεως. Η αυτοψία αποκάλυψε τη χρήση αμφεταμίνης και μεθαμφεταμίνης. Οι Simpson και Jensen λόγω της χρήσεως αμφεταμινών δεν ήταν ικανοί να αντιληφθούν το βαθμό εξαντλήσεώς τους. Το 1968 η **Διεθνής Ολυμπιακή Επιτροπή** (International Olympic Committee, IOC) συνέστησε Ιατρική Επιτροπή και εισήγαγε νομοθεσία κατά του doping. Στις Ολυμπιάδες του ίδιου έτους έγιναν τυχαίοι έλεγχοι doping για διεγερτικά, αναλγητικά, αντικαταθλιπτικά και ηρεμιστικά. Τα 86 δείγματα των χειμερινών αγώνων και 667 από τα 668

των θερινών ήταν αρνητικά. Στην Ολυμπιάδα του 1972 (Muncheu) εξετάστηκαν περισσότερα από 2000 δείγματα και 9 προέκυψαν θετικά. Χαρακτηριστική περίπτωση ήταν αυτή του νικητή των 400m ελευθέρως, Αμερικανού **Rick DeMont**, το δείγμα του οποίου ήταν θετικό ως προς εφεδρίνη. Ο DeMont είχε πάρει αντι-ασθματικό φάρμακο το οποίο είχε δηλώσει πριν τον αγώνα, όμως το μετάλλιο του αφαιρέθηκε και αποκλείστηκε από τα υπόλοιπα αγωνίσματα. Ο θόρυβος γύρω από την υπόθεση ανάγκασε την IOC να επιτρέψει στο εξής ορισμένους τύπους αντιασθματικών. (Αξίζει να σημειωθούν οι αλληλοσυγκρουόμενες αποφάσεις ως προς τις εφεδρίνες μέχρι σήμερα όπως η αθώωση του Βρετανού δρομέα ταχυτήτων **Linford Christie** το 1988).

Η **Διεθνής Ομοσπονδία Ερασιτεχνικού Αθλητισμού**, (International Amateur Athletic Federation, IAAF) απαγόρευσε τη χρήση στεροειδών το 1971. Το 1974 αναπτύχθηκε μέθοδος RIA για τον προ-σδιορισμό των στεροειδών και ακολούθως η IOC τα έθεσε στη λίστα απαγορευμένων ουσιών. Το 1976 η νομοθεσία της IOC ήταν ήδη αρκετά περίπλοκη, περιλαμβάνοντας τύπους απαγορευμένων φαρμάκων, επιτρεπόμενων φαρμάκων και κανονισμούς που αφορούσαν ρινικά διαλύματα, αναλγητικά και αντιασθματικά σκευάσματα. Στην Ολυμπιάδα του ίδιου έτους (Montreal) εξετάστηκαν 283 δείγματα για στεροειδή και 8 ήταν θετικά (7 άρση βαρών, 1 στίβος-δισκοβολία).

Στα χρόνια που ακολούθησαν πολλοί αθλητές βρέθηκαν να κάνουν χρήση απαγορευμένων ουσιών. Ορισμένοι από αυτούς αφού εξέτισαν τις ποινές τους επέστρεψαν στους στίβους κερδίζοντας μετάλλια, όπως η **Iлона Σlupianek**, η οποία αφού τιμωρήθηκε με 18μηνο αποκλεισμό, το 1977 κέρδισε τα Ευρωπαϊκά Πρωταθλήματα του 1978 και του 1982 και τους Ολυμπιακούς Αγώνες του 1980 στη σφαιροβολία. Άλλοι, βρέθηκαν να κάνουν χρήση σε περιόδους που ακολούθησαν νίκες τους, όπως η **Katrin Krabbe**, η οποία αφού κέρδισε τα 100 και 200 m στο Ευρωπαϊκό Πρωτάθλημα του 1990 και στο Παγκόσμιο Πρωτάθλημα του 1991, βρέθηκε να κάνει χρήση clenbuterol στις αρχές του 1992. Η πλέον γνωστή περίπτωση είναι αυτή του **Ben Johnson**, ο οποίος αφού κέρδισε τα 100m στο Παγκόσμιο Πρωτάθλημα του 1987 με το εξωπραγματικό για την εποχή 9.83, βρέθηκε να κάνει χρήση stanozolol ένα χρόνο αργότερα μετά τη νίκη του στους Ολυμπιακούς Αγώνες της Seoul με 9.79. Περιπτώσεις όπως οι προαναφερθείσες θέτουν εν αμφιβόλω τα αποτελέσματα του ελέγχου doping. Είναι διάχυτη η αντίληψη ότι εντοπίζονται μόνο οι αθλητές που κάνουν λάθη κατά τη λήψη των απαγορευμένων ουσιών. Χαρακτηριστική είναι η φήμη που διαδόθηκε σε αθλητικούς κύκλους για την περίπτωση της Slupianek: ο γιατρός της δεν χρησιμοποίησε αρκετά μακριά βελόνα και εισήγαγε το φάρμακο στο λιπώδη ιστό αντί στο μυ με αποτέλεσμα να παραμείνει στον οργανισμό της για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από αυτό που υπολόγιζαν. Μεγαλύτερη αμφιβολία για την αποτελεσματικότητα του ελέγχου doping έχουν δημιουργήσει κατά καιρούς οι επιδόσεις αθλητών και ομάδων. Η γυναικεία κολυμβητική ομάδα της NA Γερμανίας κυριάρχησε για μια δεκαεπταετία χωρίς να εμφανιστούν κρούσματα doping. Μετά την ένωση των Γερμανών, πολλοί Ανατολικογερμανοί προπονητές βρέθηκαν στην Κίνα και είναι μάλλον υπεύθυνοι για την απότομη άνοδο της κινεζικής γυναικείας κολυμβήσεως. Η Τσεχοσλοβάκα δρομέας των 400 και 800 m **Jarmila Kratochvilova** είχε σωματότυπο που θα μπορούσε να θεωρηθεί περισσότερο ανδρικός παρά γυναικείος. Οι επιδόσεις της στα 400 m θα μπορούσαν και σήμερα να της δίνουν την πρώτη θέση σε μεγάλες διοργανώσεις, ενώ το ρεκόρ της στα 800 m (1.53.28) είναι απλησίαστο από το 1983. Η Kratochvilova δεν βρέθηκε ποτέ να κάνει χρήση απαγορευμένων ουσιών. Η πιο χαρακτηριστική περίπτωση είναι μάλλον αυτή της αμερικανίδας δρομέα ταχυτήτων **Florence Giffith-Joyner**. Η Giffith κατά το μεγαλύτερο μέρος της αθλητικής της σταδιοδρομίας ήταν περισσότερο γνωστή για την ομορφιά της και τις εκκεντρικές της εμφανίσεις και λιγότερο για τις επιδόσεις της αν και είχε κερδίσει δύο αργυρά μετάλλια στα 200

m (Ολυμπιακοί Αγώνες 1984, Παγκόσμιο Πρωτάθλημα 1987). Το 1988 κατέρριψε τα παγκόσμια ρεκόρ στα 100 και 200 m με εξωπραγματικές επιδόσεις (10.49, 21.34) που παραμένουν ακατάρριπτες και κέρδισε δύο χρυσά ολυμπιακά μετάλλια κάνοντας τις αντιπάλους της να δείχνουν ακίνητες. Η Giffith δεν βρέθηκε να κάνει χρήση απαγορευμένων ουσιών και εγκατέλειψε το στίβο αμέσως μετά την Ολυμπιάδα της Seoul.

Καθώς η ανίχνευση των απαγορευμένων ουσιών γίνεται ευκολότερη, οι αθλητές στρέφονται σε νέους τύπους φαρμάκων ή και μεθόδων και ο όρος doping αποκτά ευρύτερη σημασία. Αξίζει να σημειωθεί ότι τέσσερα κρούσματα doping κατά την Ολυμπιάδα του 1996 (Atlanta) αφορούσαν την ουσία bromantan, η οποία είχε εν-ταχθεί στη λίστα των απαγορευμένων λίγες εβδομάδες πριν την έναρξη των αγώνων. Στην επόμενη παράγραφο δίνεται ο σύγχρονος ορισμός του doping και περιγράφονται σύντομα οι ουσίες και μέθοδοι που χρησιμοποιούνται.

1.2. Κατηγορίες doping

Ως πλησιέστερος ελληνικός όρος προς το doping θεωρείται ο όρος **φαρμακοδιέγερση**, προτιμάται όμως η χρήση του ξενόγλωσσου όρου ως πλέον ευέλικτου στο να περιλαμβάνει μεθόδους αυξήσεως της αθλητικής αποδόσεως πέραν της χορηγήσεως .

Σύμφωνα με τον Ιατρικό Κώδικα (Medical Code) της IOC το doping συνίσταται:

1. στη χορήγηση ουσιών που ανήκουν σε κατηγορίες απαγορευμένων φαρμακολογικών παραγόντων και/ή
2. στη χρήση διαφόρων απαγορευμένων μεθόδων.

1.2.1. Κατηγορίες απαγορευμένων ουσιών και μεθόδων

1.2.1.1. Κατηγορίες απαγορευμένων ουσιών

- Διεγερτικά
- Ναρκωτικά
- Αναβολικοί Παράγοντες
- Διουρητικά
- Πεπτιδικές και γλυκοπρωτεϊνικές ορμόνες και ανάλογα.

1.2.1.2. Απαγορευμένες μέθοδοι

- Doping αίματος
- Φαρμακολογική, Χημική και Φυσική παραποίηση

1.2.2. Κατηγορίες φαρμάκων που υπόκεινται σε ορισμένους περιορισμούς

- Αιθανόλη

- Μαριχουάνα (κανναβινοειδή)
- Τοπικά αναισθητικά
- Κορτικοστεροειδή
- β-ανταγωνιστές (β-blockers)

1.2.3. Χαρακτηριστικά παραδείγματα απαγορευμένων ουσιών κατά κατηγορία

1.2.3.1. Διεγερτικά

Αμφεταμίνες, Εφεδρίνες, Στρυχνίνη, Καφεΐνη, Mesocarb, Κοκαΐνη

1.2.3.2. Ναρκωτικά

Μορφίνη, Μεθαδόνη, Πεθιδίνη, Ηρωίνη, Πενταζοκίνη

1.2.3.3. Αναβολικά

Τεστοστερόνη, Διυδρο-τεστοστερόνη, Οξυμεστερόνη, Μεθυλ-τεστοστερόνη, Νανδρολόνη, Στανολόλη

1.2.3.4. Διουρητικά

Φουροσεμίδα, Σπιρονολακτόνη, Ακεταζολαμίδιο

1.2.3.5. Ορμόνες

Χοριονική Γοναδοτροφίνη (HCG), Κορτικοτροφίνη (ACTH), Αυξητική Ορμόνη (HGH), Ερυθροποιητίνη (EPO)

1.2.3.6. Τοπικά αναισθητικά

Λιδοκαΐνη, Προκαΐνη

1.2.3.7. Κορτικοστεροειδή

Κορτιζόνη, Βητα-μεθαζόνη, Πρεννισολόνη

1.2.3.8. β-blockers

Κλενβουτερόλη, Σαλβουταμόλη, Τερμπουταλίνη

1.2.4. Επιθυμητές ως προς την αθλητική απόδοση ενέργειες και παρενέργειες απαγορευμένων ουσιών

Το doping παραβιάζει την ηθική του αθλητισμού και της ιατρικής επιστήμης. Η χρήση απαγορευμένων ουσιών εκτός του ότι συνιστούν την πλέον μεγάλη αντίθεση στο fair play (Sebastian Coe) χαρακτηρίζεται από σοβαρές παρενέργειες. Στον πίνακα 1.1 συνοψίζονται οι επιθυμητές για την αθλητική απόδοση ενέργειες και χαρακτηριστικές παρενέργειες που προκύπτουν από τη χρήση διαφόρων τύπων απαγορευμένων ουσιών. Πρέπει να σημειωθεί ότι για διάφορες κατηγορίες ουσιών οι επιθυμητές ενέργειες είναι αμφισβητούμενες.

Πίνακας 1.1. Επιθυμητές ενέργειες και παρενέργειες απαγορευμένων ουσιών

Τύπος ουσιών	Επιθυμητές ενέργειες	Παρενέργειες
Διεγερτικά Ψυχοκινητικά διεγερτικά (π.χ. αμφεταμίνες)	αναστολή εμφάνισης κοπώσεως	ταχυκαρδία, αρρυθμίες, αύξηση αρτηριακής πίεσεως, διαταραχές πεπτικού, ανορεξία, απώλεια βάρους, αϋπνία, κεφαλαλγία, ψυχική και σωματική εξάρτηση, ανοχή, απώλεια γενετήσιας επιθυμίας, απότομη εμφάνιση καμάτου, θάνατος
Συμπαθητικομιμητικές αμίνες (π.χ. εφεδρίνες)	αύξηση ροής αίματος στους μυς, αύξηση επιπέδων γλυκόζης στο αίμα, βρογχοδιαστολή	ανορεξία, ταχυκαρδία, υπέρταση
Καφεΐνη	διέγερση αναπνευστικού, προαγωγή λιπολύσεως	νευρικότητα, αϋπνία, υπέρταση, γαστρικές διαταραχές
Ναρκωτικά αναλγητικά	κάλυψη σωματικού άλγους	σωματική και ψυχική εξάρτηση, ανοχή
Αναβολικά Στεροειδή	αύξηση μυϊκής μάζας, δυνάμεως, επιθετικότητας	άνδρες: ατροφία όρχεων, αζωοσπερμία, στειρώση γυναίκες: δασυτριχισμός, αλλαγή χροιάς φωνής, μεγέθυνση κλειτορίδας, στειρώση γενικά: αλωπεκία, ακμή, απώλεια γενετήσιας επιθυμίας, μείωση HDL, αύξηση LDL, βλάβη τοιχω- μάτων αγγείων, αύξηση αρτηριακής πίεσεως, ηπατική δυσλειτουργία, χολοστατικός ίκτερος, καρκίνος
β-blockers	ελάττωση stress, προαγωνιστικής εντάσεως, αποτέλεσμα κατά τρόμου	βρογχοσπασμός, σεξουαλικές δυσλειτουργίες σε άνδρες
Διουρητικά	Μη βελτίωση αποδόσεως ελάττωση σωματικού βάρους, ελάττωση συγκεντρώσεως φαρμάκων στα ούρα	αφυδάτωση, διαταραχές ηλεκτρολυτών
HCG	διέγερση παραγωγής	κεφαλαλγία, μεταβολές

	ενδογενούς τεστοστερόνης	διαθέσεως, κατάθλιψη, οίδημα
HGH	αύξηση σωματικού μεγέθους και δυνάμεως	ακρομεγαλία, μυοπάθεια, περιφερική νευροπάθεια, παθήσεις στεφανιαίων, καρδιομυοπάθεια
EPO	αύξηση αριθμού ερυθροκυττάρων	υπέρταση, καρδιακή ανεπάρκεια, εγκεφαλικά επεισόδια

1.2.5. Απανορευμένες μέθοδοι

1.2.5.1. Doping αίματος

Ο όρος **doping αίματος** (blood doping) συνίσταται στην αφαίρεση ποσότητας αίματος (τουλάχιστον 1 L³) από αθλητή, αποθήκευση για ορισμένο χρονικό διάστημα και στη συνέχεια εισαγωγή κατάλληλης ποσότητας στην κυκλοφορία του αθλητή μία με δύο μέρες πριν τον αγώνα. Μετά την αφαίρεση του αίματος ο μυελός των οστών διεγείρεται και αναπληρώνει την απώλεια ερυθροκυττάρων μέσα σε τρεις εβδομάδες. Η εισαγωγή της αφαιρεθείσας ποσότητας αυξάνει τον αριθμό των ερυθροκυττάρων και έτσι την ικανότητα του αίματος να μεταφέρει οξυγόνο από τους πνεύμονες στους μυς. Το θέμα πήρε διαστάσεις στη δεκαετία του 1970 με τις υποψίες να στρέφονται περί το **Lasse Viren**, Φινλανδό δρομέα αποστάσεων και νικητή στα 5000 και 10000 m στις Ολυμπιάδες του 1972 και 1976. Ο Viren, ο οποίος δεν είχε να επιδείξει κάτι αξιόλογο στο διάστημα μεταξύ των Ολυμπιάδων αρνήθηκε ότι έκανε doping αίματος, άλλοι Φινλανδοί δρομείς όμως το παραδέχτηκαν.

1.2.5.2. Φαρμακολογική, φυσική και χημική παραποίηση

Η προσπάθεια αλλοιώσεως της ακεραιότητας και αξιοπιστίας των δειγμάτων ούρων απαγορεύεται από την IOC. Παραδείγματα απαγορευμένων μεθόδων είναι ο καθετηριασμός, η αντικατάσταση ή τροποποίηση των ούρων, ο επηρεασμός της νεφρικής απεκκρίσεως μέσω της χρήσεως probenecid ή σχετικών ουσιών και η χορήγηση επιτεστοστερόνης. Η πλέον πρόσφατη τροποποίηση του Ιατρικού Κώδικα της IOC περιλαμβάνει στη λίστα των απαγορευμένων ουσιών ως κατηγορία τους **καλυπτικούς παράγοντες** (masking agents), probenecid, bromantan, επιτεστοστερόνη, ουσίες οι οποίες δεν επηρεάζουν την αθλητική απόδοση αλλά χρησιμοποιούνται με σκοπό την απόκρυψη απαγορευμένων ουσιών

2.ΕΛΕΓΧΟΣ DOPING

2.1.Εισαγωγή

Ο έλεγχος doping συνίσταται στην εξέταση δειγμάτων ούρων αθλητών για την ανίχνευση απαγορευμένων ουσιών. Η δειγματοληψία αίματος απαγορεύεται για ποικίλους λόγους αν και υπάρχουν πολλά επιχειρήματα υπέρ της. Ο έλεγχος doping διεξάγεται από **διαπιστευμένα** (accredited) εργαστήρια στην IOC. Η διαδικασία διαπιστεύσεως των εργαστηρίων περιλαμβάνει εξετάσεις τους σε διάφορα επίπεδα και καταλήγει σε διαπίστευση διαφόρων βαθμών. Το εργαστήριο του **ΟΑΚΑ** είναι αυτή τη στιγμή ένα από τα **πλήρως διαπιστευμένα** (fully accretided) εργαστήρια ελέγχου doping.

Η δειγματοληψία υπόκειται σε αυστηρούς κανόνες που έχουν σκοπό αφενός μεν τη διαφύλαξη της αξιοπιστίας του δείγματος αφετέρου δε την προστασία του αθλητή. Ποσότητες ούρων του αθλητή τοποθετούνται σε δύο φιαλίδια (A, B) εκ των οποίων το ένα (A) δίνεται για ανάλυση ενώ το άλλο (B) φυλάσσεται για να εξεταστεί σε περίπτωση που το δείγμα A χαρακτηριστεί θετικό. Κανόνες επίσης διέπουν τη μεταφορά των δειγμάτων από το χώρο δειγματοληψίας στο εργαστήριο, την υποδοχή τους και γενικότερα κάθε στάδιο από τη δειγματοληψία μέχρι και την ανάλυση ώστε να αποκλειστεί οποιαδήποτε παραποίηση του ελέγχου προς κάθε κατεύθυνση.

Ένα δείγμα θεωρείται θετικό αν ανιχνευθεί απαγορευμένη ουσία σε οποιαδήποτε ποσότητα. Εξαιρέσεις αποτελούν η καφεΐνη και η τεστοστερόνη για τις οποίες πραγματοποιούνται ποσοτικοί προσδιορισμοί. Το όριο για την καφεΐνη είναι 12 µg/mL ενώ για την τεστοστερόνη υπολογίζεται ο λόγος τεστοστερόνης προς επι-τεστοστερόνη ο οποίος δεν πρέπει να υπερβαίνει το 6.

2.2. Προκαθορισμένα στάδια διαδικασίας Ελέγχου Doping

2.2.1.Λήψη δειγματος από τον αθλητή

- 1.Παραγγελία / Εντολή ελέγχου
- 2.Διαδικασία επιλογής αθλητή
- 3.Εντοπισμός και ειδοποίηση αθλητή
- 4.Συνοδεία αθλητή προς σταθμό Ελέγχου Doping
- 5.Παροχή βοήθειας στον αθλητή / προπαρασκευαστικές διαδικασίες
- 6.Δειγματοληψία
- 7.Παραγωγή και συμπλήρωση εγγράφων
- 8.Συσκευασία δειγμάτων
- 9.Μέτρηση φυσικών παραμέτρων δείγματος (pH,SG,όγκος)
- 10.Υπογραφή εγγράφων και φύλαξη δείγματος
- 11.Συσκευασία δειγμάτων προς μεταφορά στο Εργαστήριο Ελέγχου Doping και παραγωγή αναλόγων συνοδευτικών εγγράφων
- 12.Παράδοση δειγμάτων στο Εργαστήριο

- 13.Ανάλυση δειγμάτων
- 14.Διαχείριση αποτελεσμάτων / Επιβολή ποινών

2.2.2. Προστασία μη αλλοίωσης δείγματος

- 1. Έγγραφη τεκμηρίωση κάθε σταδίου
- 2. Μυστική κλήρωση επιλογής αθλητή
- 3. Ειδοποίηση και εποπτεία αθλητή από διαπιστευμένους λειτουργούς των Υπηρεσιών Ελέγχου Doping
- 4. Επιλογή, έλεγχος δοχείου, χειρισμός δείγματος και ανάγνωση μετρήσεων από τον ίδιο τον αθλητή
- 5. Συνοδευόμενη από την Αστυνομία ή από την Υπηρεσία ΕΛΤΑ μεταφορά δείγματος και έγγραφου υλικού στο Εργαστήριο Ελέγχου Doping
- 6. Στεγανή διαδικασία επιβεβαίωσης και ανακοίνωσης αποτελεσμάτων

2.3. Βασικός εξοπλισμός

Ο βασικός εξοπλισμός που απαιτείται από την IOC για τα διαπιστευμένα εργαστήρια αφορά τις ακόλουθες τεχνικές:

- 1. Αέρια χρωματογραφία (GC).
- 2. Υγρή χρωματογραφία υψηλής αποδόσεως (HPLC).
- 3. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC).
- 4. Φασματομετρία μάζας (MS) σε συνδυασμό με GC.
- 5. Πρόσβαση σε εξοπλισμό ανοσοπροσδιορισμών.

Οριστική ταυτοποίηση μιας απαγορευμένης ουσίας απαιτεί ανάλυση με MS εκτός των πεπτιδικών ορμονών και των γλυκοπρωτεϊνών.

2.4. Διαδικασίες ελέγχου doping

Ο έλεγχος doping κατηγοριοποιείται στις ακόλουθες **διαδικασίες** (screening procedures):

- 1. Διαδικασία I: Παράγοντες doping που περιέχουν άζωτο και εκκρίνονται ελεύθεροι (GC).
- 2. Διαδικασία II: Παράγοντες doping που περιέχουν άζωτο και εκκρίνονται δεσμευμένοι (GC/MS).
- 3. Διαδικασία III: Ποσοτικός προσδιορισμός καφεΐνης με HPLC.
- 4. Διαδικασία IV: α. Στεροειδή που εκκρίνονται ελεύθερα (GC/MS).
β. Στεροειδή που εκκρίνονται δεσμευμένα (GC/MS).
- 5. Διαδικασία V: Οξινες ουσίες (διουρητικά, probenecid). (GC/MS ή HPLC).
- 6. Διαδικασία VI: β-blockers (GC και/ή GC/MS).
- 7. Διαδικασία VII: hCG (ανοσοπροσδιορισμοί).

2.5. Διαδικασίες ελέγχου doping στο εργαστήριο ΟΑΚΑ

Στο εργαστήριο ελέγχου doping του ΟΑΚΑ εκτελούνται σε μόνιμη βάση οι διαδικασίες 1,2 και 4 α,β στις οποίες έχουν ενταχθεί και προσδιορισμοί ουσιών που τοποθετούνται σε άλλες διαδικασίες (π.χ. β-blockers) ενώ σύντομα θα εκτελείται στο χώρο του εργαστηρίου και η διαδικασία VII.

2.5.1. Διαδικασία 1: Διενεργητικά και Ναρκωτικά εκκρινόμενα ελεύθερα

2.5.1.1. Αντιδραστήρια.

1. Διάλυμα KOH 5 N.
2. Na₂SO₄.
3. Διαιθυλαιθέρας.
4. Διάλυμα διφαινυλαμίνης 250ppm σε μεθανόλη (εσωτερικό πρότυπο). Φυλάσσεται στους -20° C και παραμένει τουλάχιστον 30 min πριν χρησιμοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Διάλυμα βαθμονομήσεως A (CALA). Από πυκνά μεθανολικά διαλύματα των παρακάτω ενώσεων παρασκευάζεται πρότυπο μεθανολικό διάλυμα τέτοιο ώστε η προσθήκη 50 μL αυτού σε 5 mL ούρων να οδηγεί στις ακόλουθες τελικές συγκεντρώσεις: αμφεταμίνη 500 ppb, ψευδοεφεδρίνη 10 ppb, νορεφεδρίνη 10 ppb, μεθυλφαινιδάτη 500 ppb, καφεΐνη 12 ppb, κοκαΐνη 500 ppb, pipradrol 100 ppb και στρυχνίνη 200 ppb. Φυλάσσεται στους -20°C και παραμένει τουλάχιστον 30 min πριν χρησιμοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Τυφλό. Χρησιμοποιούνται ούρα ατόμου που δεν λαμβάνει κανένα φάρμακο.

2.5.1.2. Όργανα.

1. GC HP5890 με αυτόματο δειγματολήπτη HP 7673 και λογισμικό HP Chemstation.
2. Τριχοειδής στήλη HP Ultra1, μήκος 12 m, εσωτερική διάμετρος 0,200 mm, πάχος film 0,33 μm.
3. Εισαγωγή Split/Splitless ið liner splitless.
4. Ανιχνευτής NPD.
5. Vortex.
6. Φυγόκεντρος HermLe Z 510.
7. Αυτόματες πιπέτες 50-200 μL, 200-1000 μL, 1-5 mL.
8. Σωλήνες φυγόκεντρου με εσμύρισμα.
9. Φιαλίδια (vials) - καπάκια αυτόματου εισαγωγέα όγκου 1,5 mL.

2.5.1.3. Πορεία.

1. Τοποθετούνται σε μεταλλική βάση σωλήνες με εσμύρισμα για κάθε δείγμα, για το τυφλό και για το διάλυμα βαθμονομήσεως ελέγχου και ονομάζονται.
2. Προστίθενται 5 mL ούρα από κάθε δείγμα με αυτόματη πιπέτα στους αντίστοιχους σωλήνες.
3. Προστίθενται 50 μL διαλύματος διφαινυλαμίνης 250 ppb.
4. Προστίθενται 0,5 mL KOH 5N και γίνεται ανάδευση στο Vortex (pH ~ 12).

5. Προστίθενται 2 mL διαιθυλαιθέρα.
6. Προστίθενται 3 g θειικό νάτριο.
7. Γίνεται ανάδευση στο Vortex επί 1 min περίπου.
8. Γίνεται φυγοκέντρωση στις 1900 rpm επί 10 min.
9. Μεταφέρεται η οργανική φάση σε vials του αυτόματου δειγματολήπτη.

2.5.1.4. Συνθήκες GC.

Ροή: 1 mL/min N₂ 50 °C.

Εισαγωγέας: splitless για 0,5 min

Θερμοκρασία: 2 min στους 80 °C, 25 °C/min, 250 °C επί 5 min, 30 °C/min, τελική 310 °C επί 2min.

Θερμοκρασία εισαγωγέα: 200°C

Ανιχνευτής: NPD (θερμοκρασία: 300°C, αυχ. gas: άζωτο 25 mL/min, υδρογόνο 4 mL/min, αέρας 120 mL/min).

2.5.2. Διαδικασία 2: Διενεργτικά, Ναρκωτικά και άλλες υπό έλεγχο ουσίες

2.5.2.1. Αντιδραστήρια.

1. Κυστεΐνη.
2. Διάλυμα HCl 6 N.
3. Διάλυμα H₃BO₃ 2,7M σε KOH 10 M.
4. Na₂CO₃.
5. Na₂SO₄.
6. Διαιθυλαιθέρας.
7. Ισοπροπανόλη.
8. Διάλυμα κωδεΐνης 100ppm, σε μεθανόλη (εσωτερικό πρότυπο).
9. Διάλυμα MSTFA 100ppm (N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide).
10. Διάλυμα MBTFA 100ppm (N-Methyl-bis(trifluoroacetamide)).
11. Διάλυμα βαθμονομήσεως B (CALB). Από πυκνά μεθανολικά διαλύματα των παρακάτω ενώσεων παρασκευάζεται πρότυπο μεθανολικό διάλυμα τέτοιο ώστε προσθήκη 50 μL αυτού σε 5 mL ούρων να οδηγεί σε τελικές συγκεντρώσεις 0,5ppm. Οι ουσίες που χρησιμοποιούνται είναι: μορφίνη, μεθαδόνη, πεθιδίνη, πενταζοκίνη (ναρκωτικά), ethamivan, pholedrine, mesocarb, etilephrine (διεγερτικά), terbutaline, fenoterol (β-blockers).
12. Τυφλό. Χρησιμοποιούνται ούρα ατόμου που δεν λαμβάνει κανένα φάρμακο.

2.5.2.2. Όργανα.

1. GC/MS HP5890/5971 με αυτόματο δειγματολήπτη HP7673 και λογισμικό HP Chemstation.
2. Τριχοειδής στήλη HP Ultra 2, μήκος 12m, εσωτερική διάμετρος 0,200mm, πάχος film 0,33μm.
- 3 Split/Splitless.
4. Vortex.
5. Φυγόκεντρος HermLe AE 510.
6. Αυτόματες πιπέτες 50-200 μL, 200-1000 μL, 1-5 mL.
7. Περιστροφικός συμπυκνωτήρας (Rotary evaporator, Buchi 461, water bath).
8. Σωλήνες φυγοκέντρου με εσμύρισμα.
9. Σωλήνες φυγοκέντρου με εσμύρισμα κωνικής βάσεως.
10. Φιαλίδια - καπάκια αυτόματου εισαγωγέα όγκου 300 μL.

2.5.2.3. Πορεία

1. Τοποθετούνται σε μεταλλική βάση σωλήνες με εσμύρισμα για κάθε δείγμα, για το τυφλό και το διάλυμα βαθμο-νομήσεως και ονομάζονται.
2. Προστίθενται 5,00 mL ούρων από κάθε δείγμα με αυτόματη πιπέτα στους αντίστοιχους σωλήνες.
3. Προστίθενται 100 mg κυστεΐνης.
4. Προστίθενται 0,5 mL HCl 6N και γίνεται ανάδευση στο Vortex.
5. Τα δείγματα τοποθετούνται σε κλίβανο θερμοκρασίας 100 °C επί 30 min. Μετά την πάροδο του χρόνου επωά-σεως, το δείγμα αφήνεται να επανέλθει στη θερμοκρασία περιβάλλοντος.
6. Ρυθμίζεται το pH στο 9,6 με προσθήκη 250 μL H₃BO₃ 2,7M σε 10M KOH και 400 mg Na₂CO₃.
7. Προστίθενται 2,5 mL διαιθυλαιθέρα.
8. Προστίθενται 0,5 mL ισοπροπανόλης.
9. Προστίθενται 3 g θειικό νάτριο.
10. Προστίθενται 50 μL μεθανολικού διαλύματος κωδεΐνης 100 ppm.
11. Γίνεται ανάδευση στο Vortex επί 1 min περίπου.
12. Γίνεται φυγοκέντρωση στις 1900 rpm επί 10 min.
13. Μεταφέρεται η οργανική φάση σε κωνικούς σωλήνες.
14. Γίνεται εξάτμιση υπό κενό (rotary evaporator) η οποία ολοκληρώνεται μέχρι ξηρού με διαβίβαση N₂.
15. Το εναπομείναν στερεό ξηραίνεται σε ξηραντήρα κενού υπό P₂O₅ επί 45 min.
16. Στο ξηρό υπόλειμμα προστίθενται 100 μL MSTFA και το μείγμα θερμαίνεται στους 80°C επί 10 min.
17. Προστίθενται 30 μL MBTFA και το μείγμα θερμαίνεται στους 80°C επί 5 min.
18. Μεταφέρεται το σύνολο του μείγματος σε vials αυτόματου δειγματολήπτη όγκου 300 μL.

2.5.2.4. Συνθήκες GC - MS.

GC

Flow: 0,7 mL/min He όδιόδο 100°C.

Εισαγωγέας: Split 1:10.

Θερμοκρασία: 2 min στους 80°C, 25°C/min, τελική θερμοκρασία 300°C επί 4 min.

Θερμοκρασία εισαγωγέα: 250°C.

Γραμμή μεταφοράς: 300°C.

MS

Ο MSD συλλέγει δεδομένα με μέθοδο σαρώσεως: m/z 40-550.

2.5.3. Διαδικασία 4^η: Ολικά Αναβολικά Στεροειδή

2.5.3.1. Αντιδραστήρια

1. Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (K_2HPO_4 0,70 M / KH_2PO_4 0,40 M), pH 7,0.
2. β-Γλουκουρονιδάση από *E. coli* (20 U/mg, 37°C).
3. Διάλυμα μεθυλο-τεστοστερόνης, 20 ppm, σε μεθανόλη (εσωτερικό πρότυπο).
4. Διάλυμα K_2CO_3 10% κ.ό.
5. Na_2SO_4 .
6. Διαιθυλαιθέρας.
7. Μείγμα παραγωγοποίησης. Παρασκευάζεται με ανάμειξη 10 mL MSTFA, 20 mg ιωδιούχου αμμωνίου και 40 mg διθειοερυθριτόλης.
8. Δείγμα επιβεβαίωσης χρόνων ανασχέσεως. Δείγμα ούρων που περιέχει τις ακόλουθες ενώσεις και/ή τους με-ταβολίτες τους: νανδρολόνη, μεθενολόνη, δροστανολόνη, μεστερολόνη, μεθυλοτεστοστερόνη, οξυμεθολόνη, οξυμε-στερόνη, κλοστεβόλη, προβενεσίδη, νοραιθανδρολόνη και φθοροξυμεστερόνη.
9. Διαλύματα βαθμονομήσεως. Σε 3 δείγματα 5 mL ούρων μικρού κοριτσιού προστίθενται κατάλληλες ποσότητες μεθανολικών διαλυμάτων παρακαταθήκης των ακολούθων στεροειδών ώστε να προκύψουν οι ακόλουθες συγκεντρώσεις: ανδροστερόνη, επιχοχολανολόνη 1000, 2000, 3000 ppb, 5 α -ανδροσταν-3 α ,17 β -διόλη 40, 80, 120 ppb, 5 β -ανδροσταν-3 α ,17 β -διόλη 80, 160, 240 ppb, τεστοστερόνη, επιτεστοστερόνη 15, 30, 45 ppb, διυδροτεστο-στερόνη 20, 40, 60 ppb, διυδροεπιανδροστερόνη 50, 100, 150 ppb.
10. Δείγμα ελέγχου ευαισθησίας. Προστίθενται σε ανδρικά ούρα κατάλληλες ποσότητες μεθανολικών διαλυμάτων 19-νορανδροστερόνης και 19-νορεπιχοχολανολόνης ώστε να προκύψουν συγκεντρώσεις 100 ppb και 9 ppb, αντί-στοιχα.
11. Τυφλό. Χρησιμοποιείται αρνητικό δείγμα προηγούμενης αναλύσεως.

2.5.3.2. Όργανα

1. GC/MS HP5890/5970 με αυτόματο δειγματολήπτη HP7673 και λογισμικό HP Chemstation.
2. Τριχοειδής στήλη HP Ultra 1, μήκος 17 m, εσωτερική διάμετρος 0,200mm, πάχος film 0,11 μm.
3. Άερόαυαίγιο Split/Splitless ιδ liner splitless.
4. Vortex.
5. Φυγόκεντρος HermLe Z 510.
6. Αυτόματες πιπέτες 50-200 μL, 200-1000 μL, 1-5 mL.
7. Περιστροφικός συμπυκνωτήρας (Rotary evaporator, Buchi 461, water bath).
8. Σωλήνες φυγοκέντρου με εσμύρισμα όγκου 25 mL.
9. Σωλήνες φυγοκέντρου με εσμύρισμα κωνικής βάσεως.
10. Φιαλίδια - καπάκια αυτόματου εισαγωγέα όγκου 300 μL.

2.5.3.3. Πορεία

1. Τοποθετούνται σε μεταλλική βάση σωλήνες με εσμύρισμα για κάθε δείγμα, για το τυφλό, για το δείγμα βαθμο-νομήσεως και το δείγμα ελέγχου και ονομάζονται.
2. Προστίθενται 5,00 mL ούρων από κάθε δείγμα με αυτόματη πιπέτα στους αντίστοιχους σωλήνες.
3. Προστίθενται 1,00 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών και ελέγχεται το pH.
4. Προστίθενται 20 μL πρότυπου διαλύματος μεθυλο-τεστοστερόνης και 100 μL διαλύματος β-γλυκουρονιδάσης από *E. coli* και γίνεται ανάδευση στο Vortex.
5. Τα δείγματα τοποθετούνται σε κλίβανο θερμοκρασίας 50 °C επί 1,5 h. Μετά την πάροδο του χρόνου επώα-σεως, το δείγμα αφήνεται να επανέλθει στη θερμοκρασία περιβάλλοντος.
6. Προστίθενται 0,700 mL διαλύματος K_2CO_3 10% κ.ό και μετά 1 min γίνεται έλεγχος του pH (9-10).
7. Προστίθενται 5 mL διαιθυλαιθέρα και γίνεται ήπια ανάδευση.
8. Προστίθενται 3 g Na_2SO_4 υπό ανάδευση.
9. Γίνεται φυγοκέντρωση στις 2000 rpm επί 15min.
10. Μεταφέρεται η αιθερική φάση σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα κωνικής βάσης.
11. Γίνεται εξάτμιση υπό κενό (rotary evaporator) η οποία ολοκληρώνεται μέχρι ξηρού με διαβίβαση N_2 .
12. Το εναπομείναν στερεό ξηραίνεται σε ξηραντήρα κενού υπό P_2O_5 επί 45 min.
13. Στο ξηρό υπόλειμμα, προστίθενται 100 μL μείγματος παραγωγοποίησης MSTFA/ NH_4I /DTE και το μείγμα επωάζεται στους 60 °C επί 30 min.
14. Μεταφέρεται το σύνολο του μείγματος σε vials αυτόματου δειγματολήπτη όγκου 300 μL.

2.5.3.4. Συνθήκες GC – MS

GC

Εισαγωγέας: Split 1:10.

Θερμοκρασία: 2 min στους 180 °C, 3°C/min μέχρι 235 °C, 30 °C/min μέχρι 310°C (τελική θερμοκρασία) επί 3,15 min.

Θερμοκρασία εισαγωγέα: 250°C.

Γραμμή μεταφοράς: 310°C.

MS

Ο MSD συλλέγει δεδομένα με μέθοδο **Selected Ion Monitoring (SIM)**.

2.5.4. Διαδικασία 4β: Αναβολικά Στεροειδή Εκκρινόμενα Ελεύθερα

2.5.4.1. Αντιδραστήρια

1. Μείγμα NaHCO₃/K₂CO₃ , 2:1 m/m.

2. Πρότυπο διάλυμα 4-OH-στανολόλης, 20 ppm σε μεθανόλη (εσωτερικό πρότυπο).

3. Πρότυπο διάλυμα 3-OH-στανολόλης, 10 ppm σε μεθανόλη.

4. Na₂SO₄.

5. Διαιθυλαιθέρας.

6. Μείγμα παραγωγοποίησης. Παρασκευάζεται με ανάμειξη MSTFA και τριμεθυλο-σιλυλο-ιμιδαζολίου (TMSI) σε αναλογία όγκων 100:2.

7. Δείγμα επιβεβαίωσης χρόνων ανασχέσεως. Δείγμα ούρων που περιέχει τις ακόλουθες ενώσεις και/ή τους με-ταβολίτες τους: φορμεβολόνη, στανολόλη, φθοροξυμεστερόνη, μεθανοδιενόνη, οξανδρολόνη και αμινεπτίνη.

8. Δείγμα βαθμονόμησης. Σε 5 mL ούρων μικρού κοριτσιού προστίθενται 10 µL προτύπου διαλύματος 3-OH-στανολόλης, 10ppm.

9. Τυφλό. Χρησιμοποιείται αρνητικό δείγμα προηγούμενης αναλύσεως.

2.5.4.2. Όργανα

1. GC/MS HP5890/5970 με αυτόματο δειγματολήπτη HP7673 και λογισμικό HP Chemstation.

2. Τριχοειδής στήλη HP Ultra 1, μήκος 12 m, εσωτερική διάμετρος 0,200mm, πάχος film 0,33 µm.

3 Split/Splitless.

4. Vortex.

5. Φυγόκεντρος HermLe Z 510.

6. Αυτόματες πιπέτες 50-200 µL, 200-1000 µL, 1-5 mL.

7. Περιστροφικός συμπυκνωτήρας (Rotary evaporator, Buchi 461, water bath).

8. Σωλήνες φυγοκέντρου με εσμύρισμα, όγκου 15 mL.

9. Σωλήνες φυγοκέντρου με εσμύρισμα κωνικής βάσεως.

10. Φιαλίδια - καπάκια αυτόματου εισαγωγέα όγκου 300 µL.

2.5.4.3. Πορεία

1. Τοποθετούνται σε μεταλλική βάση σωλήνες με εσμύρισμα για κάθε δείγμα, για το τυφλό, για το δείγμα βαθμο- νομήσεως και το δείγμα ελέγχου και ονομάζονται.
2. Προστίθενται 5,00 mL ούρων από κάθε δείγμα με αυτόματη πιπέττα στους αντίστοιχους σωλήνες.
3. Προστίθενται 0,5 g μείγματος $\text{NaHCO}_3/\text{K}_2\text{CO}_3$, και μετά 1min γίνεται έλεγχος της τιμής pH (9,6).
4. Προστίθενται 25 μL πρότυπου διαλύματος 4-OH-στανολόλης και γίνεται ανάδευση σε Vortex.
5. Προστίθενται 5 mL διαιθυλαιθέρα και γίνεται ήπια ανάδευση.
6. Προστίθενται 3 g Na_2SO_4 υπό ανάδευση.
7. Γίνεται φυγοκέντριση στις 2000 rpm επί 15min.
8. Μεταφέρεται η αιθερική φάση σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα κωνικής βάσης.
9. Στην υδατική φάση των ούρων προστίθενται εκ νέου 5 mL διαιθυλαιθέρα.
10. Επαναλαμβάνονται τα στάδια 6-7.
11. Οι αιθερικές φάσεις ενοποιούνται.
12. Γίνεται εξάτμιση υπό κενό (rotary evaporator) η οποία ολοκληρώνεται μέχρι ξηρού με διαβίβαση N_2 .
13. Το εναπομείναν στερεό ξηραίνεται σε ξηραντήρα κενού υπό P_2O_5 επί 45 min.
14. Στο ξηρό υπόλειμμα, προστίθενται 100 μL μείγματος παραγωγοποίησης MSTFA/TMSI και το μείγμα επωάζεται στους 80 °C επί 30 min.
15. Μεταφέρεται το σύνολο του μείγματος σε vials αυτόματου δειγματολήπτη όγκου 300 μL .

2.5.4.4. Συνθήκες GC – MS

GC

Flow: 0,7 mL/min He όδιδο 100°C.

Εισαγωγέας: Split 1:10.

Θερμοκρασία: 2 min στους 180 °C, 25°C/min, 310°C (τελική θερμοκρασία) επί 4 min.

Θερμοκρασία εισαγωγέα: 250°C.

Γραμμή μεταφοράς: 300°C.

MS

Ο MSD συλλέγει δεδομένα με μέθοδο SIM.

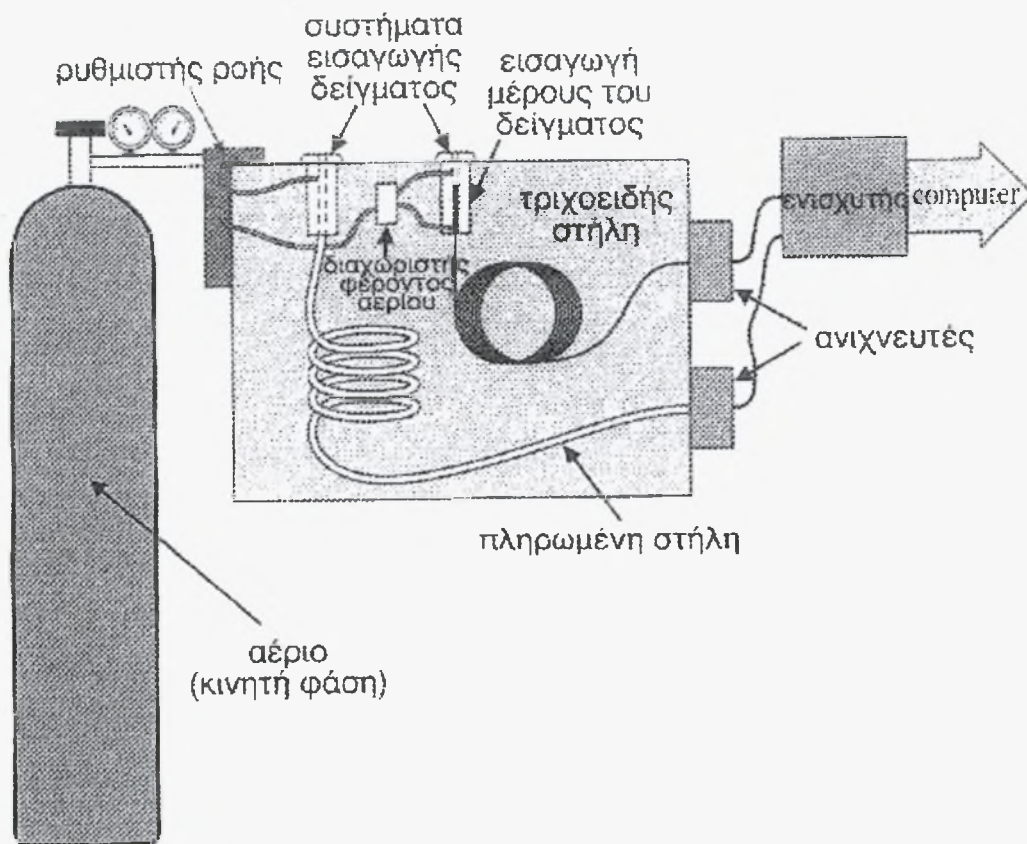
ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΠΑΓΟΡΕΥΜΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

Αέρια Χρωματογραφία (GC)

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τη δεκαετία του 1940, οι γερμανοί χημικοί Martin και Synge, έθεσαν τις θεωρητικές βάσεις για την ανάπτυξη της χρωματογραφίας. Παράλληλα, εισήγαγαν την αέρια χρωματογραφία (GC) που είχε μεγάλη απήχηση, κυρίως λόγω του ελάχιστου χρόνου που απαιτείται για το διαχωρισμό πολύπλοκων μιγμάτων. Για την προσφορά τους τιμήθηκαν με βραβείο Nobel το 1952.

Η αέρια χρωματογραφία ή πιο συγκεκριμένα η αέρια-υγρή χρωματογραφία περιλαμβάνει το δείγμα το οποίο αρχικά εγχύεται στην κορυφή της χρωματογραφικής στήλης και αμέσως ατμοποιείται. Το δείγμα μετακινείται μέσω της στήλης εξαιτίας της ροής της αδρανούς, αέριας κινητικής φάσης. Η στήλη εμπεριέχει υγρή στατική φάση η οποία είναι απορροφημένη πάνω στην επιφάνεια ενός αδρανούς στερεού.



Σχήμα 1.1 Σχηματική απεικόνιση ενός αερίου χρωματογράφου (GC)

2. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

Το βασικότερο τμήμα μιας αεροχρωματογραφικής διάταξης είναι η **χρωματογραφική στήλη**, η οποία μπορεί να είναι είτε πληρωμένη (packed), είτε τριχοειδής (capillary). Οι πληρωμένες στήλες έχουν διάμετρο 3-6 mm και μήκος 1-3 m και περιέχουν ένα στερεό υπόστρωμα διαποτισμένο με κατάλληλο υγρό, που αποτελεί την υγρή στατική φάση.

Οι τριχοειδείς στήλες έχουν πολύ μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα σε σχέση με τις πληρωμένες στήλες, γι' αυτό και οι τελευταίες έχουν περιορισμένη χρήση σήμερα. Αντίθετα, οι τριχοειδείς έχουν πολλές εφαρμογές, ιδιαίτερα για αναλύσεις πολύπλοκων μιγμάτων.

Πάνω από 100 διαφορετικές υγρές στατικές φάσεις έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία για τις πληρωμένες στήλες. Όμως για τις τριχοειδείς στήλες ο αριθμός των υγρών στατικών φάσεων είναι πολύ περιορισμένος. Κυρίως χρησιμοποιούνται έλαια σιλικόνης (polysiloxanes) και πολυαιθυλενογλυκόλες (polyethylene glycols). Όσον αφορά τις στερεές στατικές φάσεις, αυτές είναι συνήθως πορώδη υλικά πυριτικής βάσης, που στην περίπτωση των τριχοειδών στηλών φέρουν την επωνυμία PLOT.

Γενικά, το κριτήριο για την επιλογή της στατικής φάσης αποτελεί η χημική συγγένεια αυτής με τα συστατικά του δείγματος. Για παράδειγμα, η στατική φάση και οι ουσίες του δείγματος θα πρέπει να έχουν παραπλήσιες πολικότητες.

Το **φέρον αέριο** (κινητή φάση) θα πρέπει να είναι αδρανές έναντι της στατικής φάσης και του αναλυόμενου δείγματος. Είναι συνήθως He, N₂, ή Ar. Η φύση του φέροντος αερίου ουσιαστικά δεν επηρεάζει το χρόνο συγκράτησης των συστατικών του δείγματος στη στήλη και επιλέγεται συνήθως με βάση τον τύπο του χρησιμοποιούμενου ανιχνευτή. Η ροή του φέροντος αερίου είναι συνήθως 20- 100 ml / min για τις πληρωμένες στήλες και 0,5- 5 ml / min για τις τριχοειδείς.

Το φέρον αέριο από τη φιάλη, όπου βρίσκεται σε υψηλή πίεση 100-200 ατμοσφαιρών, διαβιβάζεται αρχικά μέσα από το **ρυθμιστή πίεσεως**, ο οποίος με σύστημα βαλβίδων και ενδιάμεσων θαλάμων μειώνει δραστικά την πίεση (συνήθως σε 1 με 2 atm πάνω από την ατμοσφαιρική πίεση), και στη συνέχεια μέσα από το **ροόμετρο**, με το οποίο μετρείται με ακρίβεια η ταχύτητά του. Η πολύ ακριβής μέτρηση της ταχύτητας ροής του φέροντος αερίου είναι απαραίτητη, ιδιαίτερα στην ταυτοποίηση ενώσεων, επειδή οι χρόνοι συγκράτησης εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την ταχύτητα.

2.α.Μέθοδοι

2.α.1.Εισαγωγή δείγματος

Η εισαγωγή του δείγματος στην αρχή της στήλης γίνεται με **μικροσύριγγα μέσω ελαστικού διαφράγματος (septum) ή με ειδικό σύστημα περιστρεφόμενης βαλβίδας με βρόχο (sampling valve)**. Ο χώρος εισαγωγής του δείγματος θερμαίνεται σε θερμοκρασίες συνήθως υψηλότερες από τη θερμοκρασία στήλης, ώστε να διασφαλίζεται η πλήρης εξαέρωση του εισαγόμενου δείγματος.

Στερεά ή πολύ ευαποσύνθετα υγρά δείγματα μπορούν να τοποθετηθούν μέσα σε γυάλινες μικροφύσιγγες, οι οποίες θραύονται ακριβώς πριν από τη στήλη. Το μέγεθος του δείγματος καθορίζεται από πολλούς παράγοντες (διαθέσιμη ποσότητα, χωρητικότητα στήλης, ευαισθησία ανιχνευτή, κτλ). Για τις packed στήλες, η ποσότητα δείγματος που χρησιμοποιείται κυμαίνεται από 0,1-20μl. Οι capillary στήλες χρειάζονται πολύ μικρότερη ποσότητα δείγματος, γύρω στα 10-3 μl. Για τις συγκεκριμένες στήλες χρησιμοποιείται ένα είδος έγχυσης που είναι γνωστό ως split/splitless και το διάγραμμα του παρατίθεται παρακάτω :

Ο εγχυτήρας περιλαμβάνει έναν θερμοστατούμενο κλίβανο και γυάλινες μικροφύσιγγες στις οποίες εισάγεται το δείγμα μέσω του διαφράγματος. Το δείγμα ατμοποιείται για τη δημιουργία ενός μείγματος το οποίο αποτελείται από 1) το φέρον αέριο, 2) ατμοποιημένο διαλύτη και 3) ατμοποιημένες διαλυμένες ουσίες. Ένα ποσοστό αυτού του μείγματος εισέρχεται στη στήλη αλλά το μεγαλύτερο μέρος εξέρχεται μέσω της εξόδου, ονομαζόμενης split outlet. Υπάρχει και μια άλλη έξοδος καθαρισμού του διαφράγματος (septum purge outlet) η οποία αποτρέπει την είσοδο μικροθραυσμάτων του διαφράγματος μέσα στη στήλη.

Η ακρίβεια των χρωματογραφικών αναλύσεων εξαρτάται ιδιαίτερα από την ακρίβεια και την επαναληψιμότητα της διαδικασίας εισαγωγής του δείγματος. Στις μέρες μας η έγχυση του δείγματος γίνεται πλέον με αυτόματους εγχυτήρες.

2.α.2.Θερμοστάτιση χρωματογραφικής στήλης

Η θερμοστάτιση της στήλης επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τη διαδικασία διαχωρισμού. Γι' αυτό η θερμοκρασία της στήλης ελέγχεται με μεγάλη ακρίβεια καθ' όλη τη διάρκεια της χρωματογραφικής ανάλυσης. Η στήλη είτε διατηρείται σε σταθερή θερμοκρασία (ισόθερμη χρωματογραφία), είτε μεταβάλλεται με καθορισμένο πρόγραμμα (θερμοπρογραμματιζόμενη χρωματογραφία).

2.α.3.Ανιχνευτές

Ο ανιχνευτής κάνει φανερή την παρουσία των συστατικών του δείγματος στην έξοδο της χρωματογραφικής στήλης, προσδιορίζοντας την ποσότητα (ή συγκέντρωση), τους στο φέρον αέριο.

Οι ανιχνευτές της αέριας χρωματογραφίας, διακρίνονται σε ανιχνευτές γενικής χρήσεως, όπως είναι ο ανιχνευτής ιονισμού φλόγας (FID), ο ανιχνευτής θερμικής αγωγιμότητας (TCD) και στους ειδικής χρήσεως, όπως είναι ο ανιχνευτής ηλεκτρονίων (ECD). Ο τελευταίος, χρησιμοποιείται κυρίως για αναλύσεις ενώσεων που περιέχουν O, P, S και αλογόνα. Άλλοι ανιχνευτές της GC είναι ο φλογοφωτομετρικός (FPD), ο φωτοϊονισμού (PID), καθώς επίσης και το φασματοφωτόμετρο μάζας (MS).

Το φασματοφωτόμετρο μάζας (MS) δρα ως ανιχνευτής εξαιρετικής εκλεκτικότητας για τον αεριοχρωματογράφο. Ο αναλυτήρας μάζας του φασματομέτρου μάζας ρυθμίζεται έτσι ώστε να επιτρέπει την ανίχνευση ιόντος με προκαθορισμένη τιμή m/z, οπότε πλέον το χρωματογράφημα

παρέχει χρωματογραφικές κορυφές μόνο για τις ουσίες που παρέχουν το συγκεκριμένο ιόν. Η συνδισμένη τεχνική GC/MS γίνεται περισσότερο αποδοτική, όταν η όλη διάταξη ελέγχεται από ηλεκτρονικό υπολογιστή. Στην περίπτωση αυτή ο αναλυτήρας μάζας δε ρυθμίζεται σε μια μόνο τιμή m/z , αλλά προγραμματίζεται να αλλάζει ταχύτατα διαδοχικές τιμές m/z , από ένα πίνακα τιμών που έχει ορίσει ο χρήστης. Σε κάθε νέα τιμή m/z , ο υπολογιστής καταχωρεί το αντίστοιχο σήμα από τον ανιχνευτή, που αντιστοιχεί σε δεδομένο χρόνο κατακράτησης. Μετά την πλήρη έκλυση όλων των συστατικών του αναλυόμενου μείγματος, ο χρήστης μπορεί να ζητήσει από τον υπολογιστή να αναπαραγάγει το χρωματογράφημα, που αμτιστοιχεί σε κάθε τιμή m/z .

Για την ανάλυση ουσιών με χρήση της αεριοχρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας έχουν κατασκευαστεί τα τελευταία χρόνια φασματόμετρα υψηλής διαχωριστικής ικανότητας (High Resolution Gas Chromatography Mass Spectrometry, GC/HRMS). Στο φασματόμετρο μάζας στην GC/HRMS, ο ανιχνευτής μάζας αποτελείται από ένα συνδυασμό δύο ηλεκτρικών και ενός μαγνητικού πεδίου. Τέτοια όργανα έχουν αναλυτική ικανότητα R (resolution) της τάξης των 2-5 ppm. Γι' αυτό και ονομάζονται Φασματόμετρα Μάζας Υψηλής Διαχωριστικής Ικανότητας. Έτσι για παράδειγμα ένα τέτοιο όργανο με $R=100.000$ θα μπορούσε να διακρίνει την ένωση $C_{24}H_{19}N$ με μάζα 321,1517 Da από την ένωση $C_{21}H_{23}SN$ με μάζα 321,1551 Da. Ουσιαστικά, το GC-MS αποτελεί μια από τις πιο επιτυχημένες συνδισαστικές τεχνικές, (hyphenated techniques). Τεχνικά, με μια πρώτη ματιά, ο συνδισμός αυτών των δύο τεχνικών ανάλυσης παρουσιάζει προβλήματα, λόγω των διαφορετικών απαιτήσεων. Το MS απαιτεί υψηλό κενό, ενώ το GC απαιτεί συνεχή ροή αερίου υπό πίεση. Ευτυχώς, τα πράγματα απλοποιήθηκαν με την καθολική χρήση των τριχοειδών στηλών στη GC και τη μείωση της ροής του φέροντος αερίου από 30- 80 ml / min σε 1 ml / min. Έτσι, είναι δυνατή η απ' ευθείας σύνδεση του MS με την έξοδο της τριχοειδούς στήλης του αεριοχρωματογράφου.

Τα τετραπολικά φίλτρα (Q) και οι παγίδες ιόντων (IT) έχουν την απαιτούμενη ταχύτητα, όμως, η διαχωριστική τους ικανότητα είναι σχετικά μικρή. Τα συστήματα GC- Q ή GC- IT έχουν αριστοποιηθεί και χαρακτηρίζονται ως αεριοχρωματογράφοι με ανιχνευτές MSD (Mass Selective Detectors). Η βάση στις αναλύσεις αυτές είναι η ρύθμιση του MS σε συγκεκριμένη μάζα που αντιστοιχεί στο ιόν της ουσίας που διερευνάται και κατόπιν η ταυτοποίηση αυτής σε κλάσματα έκλυσης από τη χρωματογραφική στήλη. Για την ταυτόχρονη ταυτοποίηση πολλών ουσιών χρησιμοποιούνται τα GC- FT, λόγω της εξαιρετικά υψηλής διαχωριστικής ικανότητας του μετασχηματισμού Fourier (FT). Άλλες τέτοιες επιτυχημένες συνδισαστικές τεχνικές είναι οι GC- IR (συνδισμός με φασματόμετρο υπεριώδους), GC- UV (με φασματόμετρο υπεριώδους) και GC- PD (με πλάσμα).

Φασματοσκοπία Μάζας

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η φασματομετρία μάζας είναι μία ευαίσθητη τεχνική για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό χημικών ενώσεων. Βασίζεται στον διαχωρισμό των μαζών φορτισμένων σωματιδίων (κυρίως κατιόντων) με την βοήθεια κατάλληλης διάταξης (μαγνητική, τετραπόλου, χρόνου πτήσης) και την εύρεση της αντιστοιχίας των μαζών των λαμβανομένων ιόντων με την δομή της πρόδρομης ένωσης. Η αντιστοιχία αυτή προϋποθέτει την γνώση των διαδικασιών ιοντισμού και επιπλέον του μηχανισμού της πιθανής θραυσματοποίησης των ιόντων.

Ο ιοντισμός των μορίων γίνεται με διάφορες τεχνικές, με συνηθέστερες τις α) ηλεκτρονιακή πρόσκρουση (Electron impact ionization, EI) με ταχέως κινούμενα ηλεκτρόνια σε ηλεκτρικό πεδίο, β) φωτοϊονισμός (Photoionization, PI), με την βοήθεια φωτός στην υπεριώδη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος και γ) χημικός ιοντισμός (Chemical ionization, CI), μέσω κρούσεως με άλλα ιόντα. Ο προσδιορισμός της μοριακής μάζας διευκολύνεται από της λήψη του κατιόντος της χημικής ένωσης (μητρικό ιόν), που προϋποθέτει την επιβιωσιμότητα του συγκεκριμένου κατιόντος. Επιπλέον, σε περιπτώσεις ανάλυσης χημικών ενώσεων με ίδιο μοριακό βάρος ή ισομερών, η θραυσματοποίηση του αρχικού μητρικού ιόντος σε ιόντα μικρότερης μάζας, δίνει πληροφορίες για την δομή των χημικών ενώσεων.

Η θραυσματοποίηση (fragmentation) του μητρικού ιόντος είναι αναπόφευκτη για την πληθώρα των χημικών ενώσεων που ιονίζονται με την απλούστερη και συχνότερα απαντούμενη τεχνική της πρόσκρουσης ηλεκτρονίων με κινητική ενέργεια στην περιοχή 40 – 70 eV. Οι ενέργειες ιοντισμού των χημικών ενώσεων είναι συνήθως μικρότερες από 15 eV και εξαρτώνται από την δομή της χημικής ένωσης. Σαν επακόλουθο, το μητρικό ιόν βρίσκεται διεγερμένο έχοντας ένα μεγάλο ποσοστό της αρχικής κινητικής ενέργειας των ηλεκτρονίων (>25 eV) και ακολουθεί πορείες μονομοριακής διάσπασης σε μικρότερα σωματίδια (θραύσματα), και αυτά με την σειρά τους σε άλλα μικρότερα, μέχρι είτε ιονισμένα άτομα, ή ιδιαίτερα σταθερά θετικά ιόντα. Οι πορείες διάσπασης εξαρτώνται από την χημική δομή κάθε ιόντος και μπορούν να είναι είτε α) ισομερείωση ιόντος ή β) διάσπαση ιόντος σε άλλο μικρότερο ιόν και ουδέτερο σωματίδιο. Οι παράμετροι που καθορίζουν την συνεισφορά κάθε πορείας είναι: α) σταθερότητα προδρόμου ιόντος και προϊόντων (ισομερές ή θραύσματα) β) αντίστοιχο ενεργειακό φράγμα της θραύσης του ιόντος και γ) εσωτερική ενέργεια του προδρόμου ιόντος.

Η άμεση πρόβλεψη όλων των διαδικασιών θραυσματοποίησης ενός ιόντος δεν είναι απλή, ιδιαίτερα αν το ποσοστό θραυσματοποίησης σε κάθε πορεία είναι

το κυρίως ζητούμενο. Μία απλή ποιοτική πρόβλεψη των κυριότερων πορειών είναι δυνατόν να επιτευχθεί με γνώμονα την χημική δομή του ιόντος καθώς και των προϊόντων θραυσματοποίησης χρησιμοποιώντας επιχειρήματα γενικής και οργανικής χημείας.

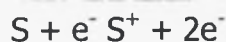
Η σταθερότητα ενός θετικά φορτισμένου ιόντος εξαρτάται από την ευκολία εξαίπλωσης του φορτίου σε περισσότερα από ένα άτομα του μορίου (αποεντόπιση φορτίου, π.χ. σταθερότητα κατιόντων σε συζυγιακά ή αρωματικά συστήματα) και την ύπαρξη ομάδων που ευνοούν ή απωθούν το θετικό φορτίο (π.χ. άτομα F απωθούν το θετικό φορτίο λόγω έντονης ηλεκτραρνητικότητας, ενώ άτομα N, O ευνοούν την ύπαρξη θετικού φορτίου λόγω των ζευγών ηλεκτρονίων που διαθέτουν σε αρκετά υψηλές ενεργειακές στάθμες – μακριά από τους πυρήνες, εύκολα ιονιζόμενα). Σε περιπτώσεις ύπαρξης θετικού φορτίου σε άτομο που συνδέεται με άλλες ομάδες, η ευκολία αποεντοπισμού του θετικού φορτίου στις ομάδες μέσω υπερσυζυγιακού φαινομένου (π.χ. σταθερότητες καρβοκατιόντων $(\text{CH}_3)_3\text{C}^+ > (\text{CH}_3)_2\text{CH}^+ > \text{CH}_3\text{CH}_2^+$) είναι σταθεροποιός παράγοντας του κατιόντος και οδηγεί είτε σε εκλεκτική διάσπαση δίνοντας το σταθερότερο κατιόν ή οδηγεί σε ισομερίωση σε σταθερότερο κατιόν. Η διάσπαση ενός κατιόντος με παραγωγή μικρού σταθερού ουδέτερου μορίου (π.χ. H_2O , CO_2 , CO , HCN) ευνοείται λόγω συνολικής μείωσης της ενέργειας του συστήματος με την αποβολή του σταθερού μορίου. Οι μηχανισμοί της διάσπασης για τα συνηθέστερα είδη μορίων θα συζητηθούν λεπτομερέστερα στη συνέχεια.

2. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

Ο φασματογράφος μάζας αποτελείται από τα ακόλουθα βασικά τμήματα: α) περιοχή ιοντισμού β) φίλτρο μαζών και γ) ανιχνευτής ιόντων. Η περιοχή ιοντισμού είναι ο χώρος στον οποίο ένα μέρος του δείγματος (στις περισσότερες τεχνικές ιοντισμού απαιτείται να βρίσκεται στην αέρια φάση) ιονίζεται και τα παραγόμενα ιόντα οδηγούνται στο φίλτρο μαζών. Ο σκοπός του φίλτρου μαζών είναι ο διαχωρισμός των ιόντων σύμφωνα με την μοριακή τους μάζα και την επιλογή των ιόντων με μάζα σε συγκεκριμένη περιοχή (με εύρος συνήθως 1 amu, διακριτική ικανότητα 1 amu) τα οποία συνεχίζουν την πορεία τους στον ανιχνευτή ιόντων. Ο ανιχνευτής συλλαμβάνει τα προσπίπτοντα ιόντα, ενισχύει το λαμβανόμενο ασθενές σήμα και το οδηγεί στην κεντρική συσκευή ελέγχου και μέτρησης. Η φασματογραφία μάζας αποτελεί μία ποσοτική αναλυτική τεχνική με μία συνεχώς ανανεούμενη ποικιλία μεθόδων ιοντισμού, διαχωρισμού μαζών και ανίχνευσης ιόντων.

2α. Μέθοδοι ιοντισμού

Η συνηθέστερα χρησιμοποιούμενη μέθοδος ιοντισμού στην αέρια φάση είναι του ηλεκτρονιακού ιοντισμού (Electron Ionization, Electron impact ionization, E.I.), με πλεονεκτήματα την καλή κατανόηση του μηχανισμού της, την καθολικότητα της εφαρμογής της σε όλες τις πτητικές χημικές ενώσεις και την αναπαραγωγιμότητα των λαμβανομένων φασμάτων μάζας. Η μέθοδος βασίζεται στον ιονισμό ενός μορίου S που προκαλείται από την σύγκρουση του με ταχέως κινούμενα ηλεκτρόνια:



Η παραγωγή των ηλεκτρονίων επιτυγχάνεται σε ένα πυρακτωμένο νήμα βολφραμίου W ή ρηνίου Re , που αποτελεί την κάθοδο, και η επιτάχυνση τους επιτυγχάνεται με την βοήθεια ηλεκτρικού πεδίου, δυναμικού από 10 έως 250 V. Συνεπώς κάθε ηλεκτρόνιο αποκτά κινητική ενέργεια $E_{kin} = q_e V$, όπου q_e είναι το φορτίο του ηλεκτρονίου και V η εφαρμοζόμενη διαφορά δυναμικού. Συνήθως, το εφαρμοζόμενο V είναι 70 V, με αποτέλεσμα κάθε ηλεκτρόνιο να έχει κινητική ενέργεια 70 eV (αποτελεί την πρότυπη κινητική ενέργεια ηλεκτρονίων που χρησιμοποιείται για την αρχειοθέτηση των φασμάτων μάζας σε κατάλληλους καταλόγους). Η πρόσκρουση του ηλεκτρονίου με κινητική ενέργεια E_{kin} μερικές δεκάδες eV είναι περισσότερο από αρκετή για τον ιονισμό του S , θεωρώντας ότι για τον απλό ιονισμό ενός ατόμου ή μορίου S χρειάζονται περίπου 5 – 25 eV. Στον Πίνακα 2.1 δίνονται (σε eV) τα δυναμικά πρώτου ιοντισμού ($S \rightarrow S^+$) για τα συνηθέστερα άτομα και μόρια (ή ελεύθερες ρίζες). Συνεπώς, το παραγόμενο κατιόν S^+ σχηματίζεται διεγερμένο και ακολουθεί πορείες μονομοριακής διάσπασης προς απλούστερα θραύσματα S_1^+ , S_2^+ , ...: ή ακόμη και δευτερογενής θραυσματοποίηση των πρωτογενών θραυσμάτων.

Το ανωτέρω σχήμα θραυσματοποίησης είναι κατανοητό θεωρώντας ότι η ενέργεια που απαιτείται για την θραύση ενός δεσμού (ή την αποχώρηση μιάς ουδέτερης ομάδας) βρίσκεται στην περιοχή 120 – 500 kJ/mol, με δεδομένη την σχέση 1 eV/σωματίδιο = 96.486 kJ/mol, και ότι το παραγόμενο κατιόν συνήθως είναι διεγερμένο κατά μερικά eV. Στον Πίνακα 2.2 παρατίθενται ενδεικτικά τυπικές ενέργειες διάσπασης δεσμών (σε kJ/mol) για τα συνηθέστερα ουδέτερα μόρια (δεν αναμένεται να διαφέρουν αρκετά από τις αντίστοιχες των κατιόντων). Οι πορείες θραυσματοποίησης εξαρτώνται από την μοριακή δομή του S και των παραγομένων κατιόντων, με αποτέλεσμα την ικανότητα προσδιορισμού της δομής του S με εξέταση του φάσματος μάζας. Είναι ακόμη δυνατή η ταυτοποίηση ισομερών με γνώμονα τις πιθανές διαφορές στις πορείες διάσπασης τους, και δεν είναι υπερβολικό να λεχθεί ότι η διασάφηση του μηχανισμού διάσπασης κατά τον ηλεκτρονιακό ιονισμό απαιτεί «χημική διαίσθηση» και η ανάλυση του φάσματος μάζας καθίσταται ευκολότερη χρησιμοποιώντας χημικά επιχειρήματα.

Πίνακας 2.1. Τυπικές ενέργειες πρώτου ιοντισμού (σε eV) ατόμων και μορίων.

H	13.598	N ₂	15.576
He	24.587	NH ₃	10.2
C	11.260	C□ N	14.3
N	14.534	HC□ N	13.8
O	13.618	NO	9.25
F	17.422	NO ₂	9.79
Si	8.151	O ₂	12.063
S	10.360	OH	13.17
Cl	12.967	H ₂ O	12.6
Br	11.814	CH ₃ OH	10.84
I	10.451	CH ₃ CH ₂ OH	10.49
H ₂	15.427	CO	14.013
CH ₂	10.396	CO ₂	13.769
CH ₃	9.83	F ₂	15.7
CH ₄	12.6	HF	15.77
HC CH	11.4	H ₂ S	10.4
H ₂ C=CH ₂	10.5	CH ₃ SH	9.448
CH ₃ CH ₂	8.4	Cl ₂	11.48
CH ₃ CH ₂	11.5	HCl	12.74
CH ₃ CH ₂ CH ₃	11.1	Br ₂	10.54
C ₆ H ₆	9.24	HBr	11.62
C ₆ H ₅ CH ₃	8.82	I ₂	9.28

Πίνακας 2.2. Τυπικές ενέργειες διάσπασης δεσμών μορίων (σε kJ mol^{-1}).

H-H	435.56	$\text{H}_2\text{C}=\text{CH}_2$	720.32
$\text{H}_3\text{C}-\text{H}$	439.32	$\text{HC}\equiv\text{CH}$	961.52
$\text{H}_3\text{C}-\text{CH}_3$	358.64	$\text{O}=\text{O}$	498.35
$\text{H}_3\text{C}-\text{OH}$	385.81	$\text{HO}-\text{H}$	498.81
$\text{H}_3\text{CO}-\text{H}$	436.39	$\text{N}\equiv\text{N}$	945.37
$\text{H}_3\text{C}-\text{F}$	459.38	$\text{F}-\text{F}$	158.78
$\text{H}_3\text{C}-\text{Cl}$	353.63	$\text{H}-\text{F}$	569.94
$\text{H}_3\text{C}-\text{Br}$	296.36	$\text{Cl}-\text{Cl}$	242.60
$\text{H}_3\text{C}-\text{I}$	239.10	$\text{H}-\text{Cl}$	431.61
$\text{H}_3\text{C}-\text{NH}_2$	343.60	$\text{Br}-\text{Br}$	192.81
$\text{H}_3\text{C}-\text{SH}$	309.30	$\text{I}-\text{I}$	151.10

Τα σοβαρότερα μειονεκτήματα της μεθόδου του ηλεκτρονιακού ιοντισμού είναι η απαιτούμενη πτητικότητα της χημικής ένωσης (ή μείγματος ενώσεων) και η εκτενής μοριακή θραυσματοποίηση που συνοδεύει τον ιονισμό. Συχνά, παρατηρείται ακόμη και η έλλειψη της μητρικής κορυφής (που αντιστοιχεί στην μοριακή μάζα της χημικής ένωσης) και η σχετική αδυναμία προσδιορισμού του μοριακού βάρους της ένωσης. Όμως, το δεύτερο μειονέκτημα δεν είναι εξαιρετικά σοβαρό και η θραυσματοποίηση οδηγεί σε ένα πλήθος ιόντων με χαρακτηριστικές θέσεις και εντάσεις στο φάσμα μάζας που αποτελεί το «δακτυλικό αποτύπωμα» της χημικής ένωσης. Το φάσμα μάζας είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί από προγράμματα υπολογιστών με την βοήθεια «βιβλιοθηκών αναφοράς» για την ταυτοποίηση της χημικής ενώσεως ή των χημικών ενώσεων που απαρτίζουν ένα μείγμα.

Όταν η θραυσματοποίηση δεν είναι επιθυμητή, δύο εναλλακτικοί μέθοδοι ιοντισμού μορίων στην αέρια φάση είναι ο χημικός ιοντισμός (Chemical Ionization, C.I.) και ο φωτοϊοντισμός (Photoionization, P.I.). Στον χημικό ιονισμό χρησιμοποιούνται αντιδράσεις μεταξύ ιόντων και μορίων για την παραγωγή ιόντων, χρησιμοποιώντας ένα αέριο (με γενικό τύπο RH), όπως μεθάνιο CH_4 , ισοβουτάνιο $(\text{CH}_3)_3\text{CH}$ ή αμμωνία NH_3 το οποίο ιονίζεται με ηλεκτρονιακό ιονισμό προς RH^+ . Μεγάλοι χρόνοι παραμονής ή υψηλή πίεση του αερίου συντελούν σε αντιδράσεις μεταφοράς φορτίου (ή ακόμη και ατόμων και ομάδων) μεταξύ του κατιόντος RH^+ και των συστατικών υπό ανάλυση S, δημιουργώντας ιόντα S^+ :



Το πλεονέκτημα της μεθόδου σε σχέση με τον ηλεκτρονιακό ιονισμό είναι η χαμηλή ενέργεια η οποία εναποτίθεται στο παραγόμενο κατιόν S^+ με αποτέλεσμα το μικρό ποσοστό θραυσματοποίησης του και την παρουσία (συνήθως) της μητρικής κορυφής του S με την επακόλουθη ευκολία προσδιορισμού του μοριακού βάρους του S . Τα λαμβανόμενα φάσματα μάζας είναι εξαιρετικά απλά, όμως περιέχουν πολύ μικρό ποσοστό πληροφορίας (εκτός της μοριακής μάζας του S) και δυστυχώς δεν είναι πάντα αναπαραγωγίσιμα, καθ' όσον εξαρτώνται πολύ από τις συνθήκες ιοντισμού, το είδος του αερίου RH , την πίεση και τον χρόνο παραμονής του δείγματος στην περιοχή ιοντισμού και την φύση του δείγματος. Η δημιουργία κατιόντων SH^+ , με μοριακή μάζα μεγαλύτερη από του S είναι ένα κοινό χαρακτηριστικό της μεθόδου του χημικού ιοντισμού, ακόμη και σε περιπτώσεις όπου ο ηλεκτρονιακός ιοντισμός δεν δίνει μητρικό ιόν S^+ .

Η μέθοδος του φωτοϊονισμού χρησιμοποιεί πηγή φωτός (συνήθως υπεριώδες, $\lambda < 350 \text{ nm}$) για τον ιονισμό του S , με την βοήθεια laser ή λυχνίας Hg ή Xe . Με δεδομένες τις σχέσεις $E = h\nu = hc/\lambda$ μετά από αριθμητική αντικατάσταση προκύπτει η ισοδυναμία $E(\text{eV}) = 1239.86 / \lambda (\text{nm})$ και $E(\text{kJ/mol}) = 1.196 \times 10^5 / \lambda (\text{nm})$. Συνεπώς, ένα μήκος κύματος μονοχρωματικού φωτός $\lambda = 248 \text{ nm}$ ισοδυναμεί με ενέργεια φωτονίων 5 eV και για μήκη κύματος $\lambda < 200 \text{ nm}$ (vacuum UV) η ενέργεια των φωτονίων είναι $E_\phi > 6 \text{ eV}$. Η ενέργεια των φωτονίων είναι μόλις αρκετή για τον ιονισμό μορίων και ελευθέρων ριζών με χαμηλά δυναμικά ιοντισμού:



Η μέθοδος του φωτοϊονισμού δεν χρησιμοποιείται για την ανάλυση των κοινών μορίων και αποτελεί μία μέθοδο ιοντισμού σε ερευνητικό επίπεδο για την ανάλυση και ανίχνευση ασταθών ελευθέρων ριζών που παράγονται σε χημικές αντιδράσεις, οι οποίες θα θρυμματιζόταν εντελώς κατά τον ηλεκτρονιακό ιονισμό. Μάλιστα, με κατάλληλη επιλογή του μήκους κύματος της ιονίζουσας ακτινοβολίας είναι δυνατή η εκλεκτική ανίχνευση ορισμένων μορίων ή ελευθέρων ριζών.

2β. Μέθοδοι διαχωρισμού μαζών

1) Μαγνητικό πεδίο. Ο διαχωρισμός μαζών είναι το κρισιμότερο στάδιο στην πορεία μιας ανάλυσης και έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι διαχωρισμού που διαφέρουν ως προς τα χαρακτηριστικά τους, τις δυνατότητες και τους περιορισμούς τους. Γενικά, δεν φαίνεται να υπάρχει μία μέθοδος διαχωρισμού

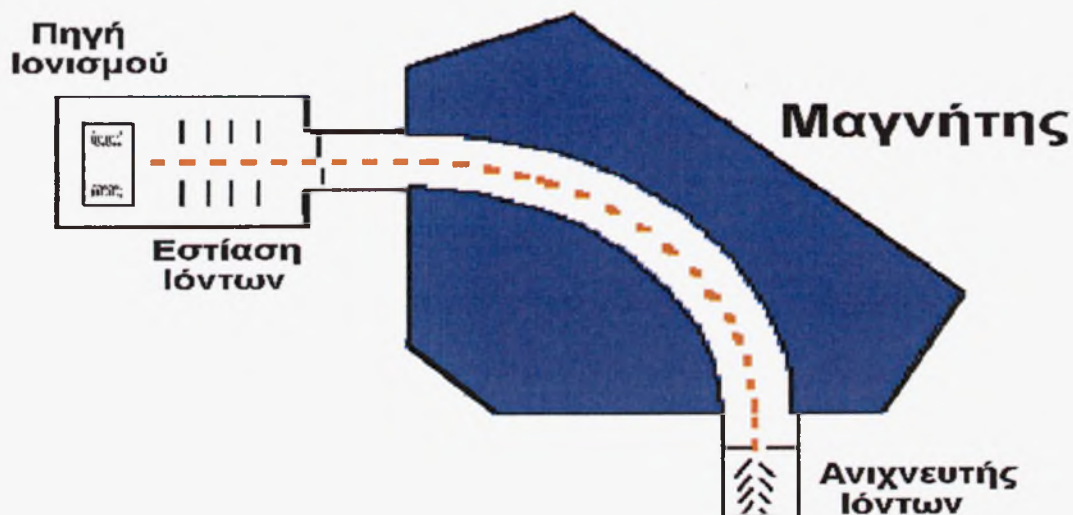
μαζών που να είναι εξ' ίσου αποτελεσματική σε όλες τις εφαρμογές της ανάλυσης με φασματογραφία μάζας. Οι συνηθέστερες μέθοδοι διαχωρισμού μαζών (φίλτρα μαζών) είναι α) μαγνητικού πεδίου β) τετραπόλου και γ) χρόνου πτήσης. Όλα τα φίλτρα μαζών βασίζονται στην εφαρμογή ηλεκτρικών και μαγνητικών πεδίων που επιδρούν στην κίνηση φορτισμένων σωματιδίων (ιόντων). Οι μαθηματικές σχέσεις που διέπουν την αλληλεπίδραση των ηλεκτρικών και μαγνητικών πεδίων με τα ιόντα έχουν διατυπωθεί από τον Νεύτωνα (δεύτερος νόμος) και τον νόμο της δύναμης του Lorentz, αντίστοιχα:

$$\mathbf{F} = m \boldsymbol{\gamma} \quad (1)$$

$$\mathbf{F} = z(\mathbf{E} + (\mathbf{v} \square \mathbf{B})) \quad (2)$$

όπου F είναι η το διάνυσμα της δύναμης που ασκείται στο ιόν, m η μάζα του, $\boldsymbol{\gamma}$ το διάνυσμα της επιτάχυνσης, z το φορτίο του ιόντος, E το διάνυσμα της έντασης του ηλεκτρικού πεδίου, v το διάνυσμα της ταχύτητας του ιόντος και B το διάνυσμα της έντασης του μαγνητικού πεδίου. Από την σχέση (1) φαίνεται ότι η δύναμη F προκαλεί επιτάχυνση ανάλογη της μάζας του σωματιδίου, ενώ από την σχέση (2) φαίνεται ότι η εφαρμοζόμενη δύναμη F είναι ανάλογη του ιοντικού φορτίου z . Συνεπώς, και οι τρεις προαναφερόμενες μέθοδοι διαχωρίζουν τα ιόντα ανάλογα με τον λόγο m/z , όπου m είναι η μοριακή μάζα του ιόντος και z το φορτίο του. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων τα παραγόμενα ιόντα είναι απλά φορτισμένα ($z=1$) και οι εξαιρέσεις ($z > 1$) πρέπει να αναζητηθούν σε μόρια με πολύ χαμηλά δυναμικά ιοντισμού (π.χ. θειούχες ενώσεις ή χημικές ενώσεις βαρέων στοιχείων). Παρ' όλα αυτά, η δημιουργία ιόντων με φορτίο $z > 1$ δεν συμβαίνει σε μεγάλο βαθμό και οι εντάσεις τους σε ένα φάσμα μάζας είναι μικρές.

Η μέθοδος του μαγνητικού πεδίου (magnetic sector mass filter) είναι η αρχαιότερη και ταυτόχρονα η περισσότερο ακριβής και δαπανηρή, ενώ μία απλή διάταξη του παρουσιάζεται στο επόμενο σχήμα.



Σχήμα 2.1. Μέθοδος διαχωρισμού μαζών μαγνητικού πεδίου

Τα ιόντα μετά την δημιουργία τους εστιάζονται κατάλληλα με «φακούς ιόντων» (ανομοιογενή ηλεκτρικά πεδία που συγκλίνουν τις τροχιές των ιόντων) με σκοπό την αύξηση της ευαισθησίας της μεθόδου και οδηγούνται σε ένα χώρο όπου μαγνητικό πεδίο έντασης B εφαρμόζεται κάθετα στην κατεύθυνση κίνησης των ιόντων. Τα ιόντα εισέρχονται στο μαγνητικό πεδίο έχοντας ευθύγραμμη ομαλή πορεία με ταχύτητα v , και αναγκάζονται να ακολουθήσουν κυκλική τροχιά, της οποίας η ακτίνα εξαρτάται από τον λόγο m/z . Η κινητική ενέργεια ενός ιόντος πριν εισέλθει στο μαγνητικό πεδίο είναι

$$T = zV_a = \frac{mv^2}{2}$$

ενώ η ταχύτητα v δίνεται από:

$$v = \sqrt{\frac{2zV_a}{m}}$$

όπου V_a το εφαρμοζόμενο δυναμικό επιτάχυνσης των ιόντων. Από τον νόμο της δύναμης του Lorentz, το μαγνητικό πεδίο εφαρμόζει μία δύναμη zvB η οποία ισούται με την φυγόκεντρο δύναμη mv^2/r , καθώς το ιόν κινείται σε κυκλική τροχιά, με ακτίνα r :

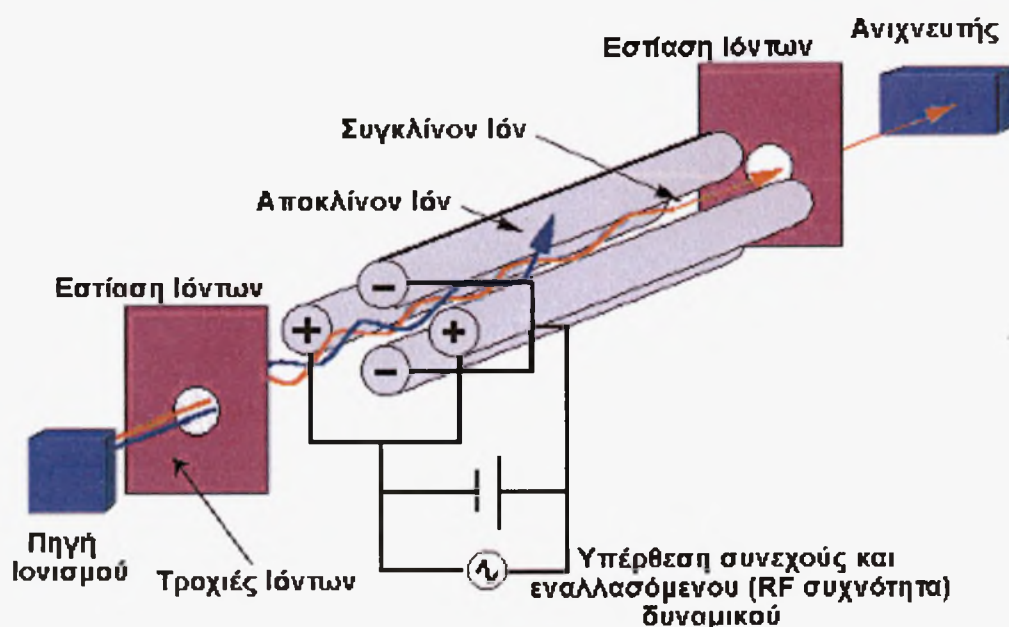
$$zvB = \frac{mv^2}{r}$$

Αντικατάσταση με την τιμή v της ταχύτητας, προκύπτει τελικά:

$$\frac{m}{z} = \frac{B^2 r^2}{2V_a}$$

Συνεπώς, αν ο ανιχνευτής βρίσκεται σε συγκεκριμένη θέση που αντιστοιχεί σε μία τροχιά με ακτίνα r , μόνο τα ιόντα με συγκεκριμένο λόγο m/z , ο οποίος ικανοποιεί την ανωτέρω ισότητα φθάνουν στον ανιχνευτή. Η σάρωση σε όλες τις επιθυμητές μάζες (ή ακριβέστερα τον λόγο m/z) γίνεται είτε μεταβάλλοντας την ένταση του μαγνητικού πεδίου B ή μεταβάλλοντας το αρχικό δυναμικό V_a επιτάχυνσης των ιόντων. Ο δεύτερος τρόπος έχει το πλεονέκτημα της έλλειψης υστέρησης της μεταβολής του μαγνητικού πεδίου, όμως η ευαισθησία είναι σχετικά ανάλογη του λόγου m/z . Η αναπόφευκτη θερμική κίνηση των ιόντων προκαλεί μία μείωση της θεωρητικά άπειρης διακριτικής ικανότητας, η οποία μπορεί να βελτιωθεί σημαντικά με την χρήση σχισμών (slits) οι οποίες τοποθετούνται πριν την είσοδο στο μαγνητικό πεδίο και περιορίζουν την είσοδο σε ιόντα που κινούνται σε συγκεκριμένη κατεύθυνση. Η αύξηση της διακριτικής ικανότητας συντελεί στη δυνατότητα διαχωρισμού ιόντων με διαφορές μάζας της τάξεως των 0.01 amu. Για παράδειγμα, ο διαχωρισμός των CO , N_2 , $H_2C=CH_2$ και της ελεύθερης ρίζας $H_2C=N$ με μοριακές μάζες 27.9949, 28.0062, 28.0312 και 28.0187, αντίστοιχα, είναι εφικτός. Επιπλέον, η μαγνητική μέθοδος διαχωρισμού μαζών χαρακτηρίζεται από εξαιρετικά καλή ευαισθησία, αναπαραγωγίσιμα φάσματα μάζας, υψηλή δυναμική περιοχή (μεγάλη κλίμακα μαζών) και μπορεί να εφαρμοστεί σε ποσοτικές εφαρμογές. Το σημαντικότερο μειονέκτημα της μεθόδου είναι το υψηλότερο κόστος.

2) Τετραπολικό φίλτρο μαζών (quadrupole mass filter). Αποτελεί μία από τις νεώτερες μεθόδους διαχωρισμού μαζών, οικονομικότερη από την χρήση του μαγνητικού φίλτρου μαζών με αποτέλεσμα την σημαντικά ευρύτερη χρήση της. Ο διαχωρισμός μαζών επιτυγχάνεται με την υπέρθεση ενός εναλλασσόμενου ηλεκτρικού πεδίου έχοντας συχνότητα στην περιοχή των ραδιοκυμάτων (RF, radiofrequency) σε ένα συνεχές (DC) ηλεκτρικό πεδίο. Το DC-RF πεδίο εφαρμόζεται σε τέσσερις παράλληλες ράβδους, όπως δείχνεται στο επόμενο σχήμα.



Σχήμα 2.2. Τετραπολικό φίλτρο μαζών

Σε κάθε ζεύγος αντιθέτως ευρισκομένων ράβδων το ηλεκτρικό πεδίο περιγράφεται με την σχέση:

$$W = 2[U + V\cos(\omega t)]$$

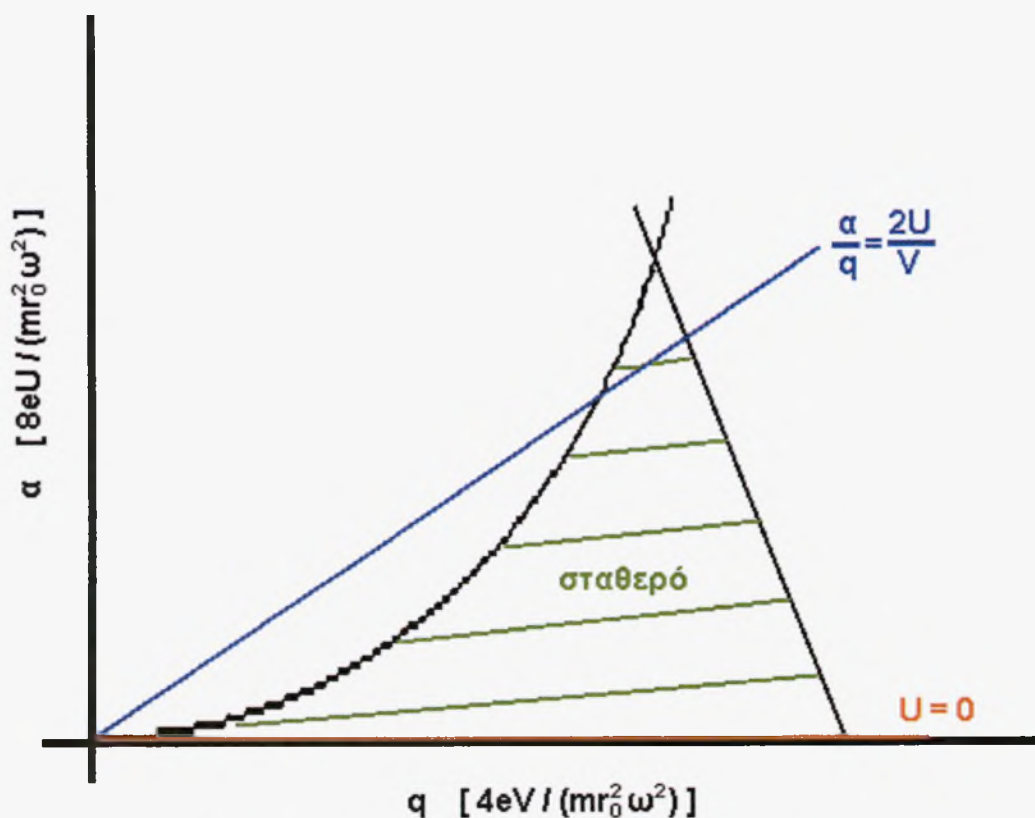
όπου U το δυναμικό του συνεχούς πεδίου, V το μέγιστο του δυναμικού του εναλλασσόμενου πεδίου, ω η κυκλική συχνότητα του πεδίου RF και t ο χρόνος. Τα ιόντα που κατευθύνονται στην κατεύθυνση του Z άξονα (ορίζεται ως παράλληλος με τις ράβδους) αναγκάζονται να κινηθούν σε μία τροχιά ταλάντωσης ανάμεσα στους άξονες X και Y. Η μαθηματική ανάλυση της κίνησης ενός ιόντος στο συνδυασμό των πεδίων είναι αρκετά πολύπλοκη, και έχει επιτευχθεί χρησιμοποιώντας κλασική μηχανική (εξισώσεις Matthieu). Η περιγραφή της κίνησης του ιόντος μπορεί να γίνει με την εισαγωγή των παραμέτρων:

$$a = \frac{8zU}{mr_0^2 \omega^2}$$

και

$q = \frac{4zV}{mr_0^2 \omega^2}$ όπου z το φορτίο του ιόντος, m η μάζα του και r_0 η ακτίνα του πεδίου (μέσον της απόστασης ανάμεσα στα κέντρα αντιθέτως ευρισκομένων ράβδων).

Οι υπολογισμοί δείχνουν ότι μόνο οι παράμετροι a και q αρκούν για τον προσδιορισμό της τροχιάς του ιόντος. Όταν το πλάτος της ταλάντωσης του ιόντος παραμένει σταθερό στο χρόνο η τροχιά χαρακτηρίζεται ως σταθερή, ενώ αν το πλάτος της ταλάντωσης αυξάνει με την πάροδο του χρόνου, τότε η τροχιά χαρακτηρίζεται ως ασταθής. Όπως είναι προφανές, μία σταθερή τροχιά έχει σαν αποτέλεσμα την διόδο ενός ιόντος διαμέσου του χώρου καθ' όλο το μήκος των ράβδων, ενώ αντίθετα, αν η τροχιά είναι ασταθής, το ιόν τελικά προσκρούει πάνω στις ράβδους, εξουδετερώνεται και δεν κατορθώνει να φτάσει στον ανιχνευτή (που βρίσκεται στο άλλο άκρο των ράβδων). Η ανάλυση της τροχιάς ενός ιόντος φαίνεται στο ακόλουθο διάγραμμα σταθερότητας $a = f(q)$.



Σχήμα 2.3. Διάγραμμα σταθερότητας $a=f(q)$

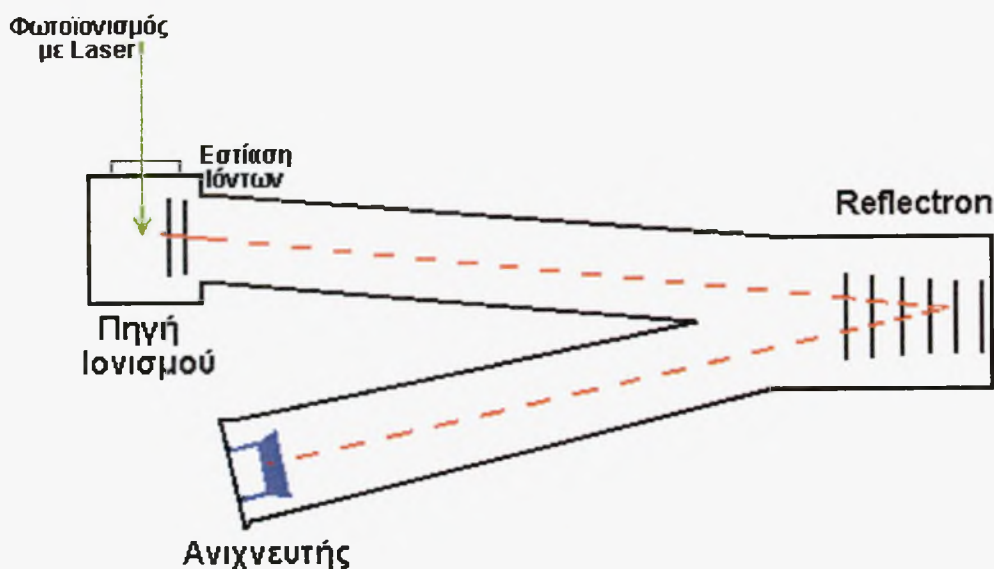
Μόνο τα ιόντα με τιμές a και q στην (σχεδόν) τριγωνική γραμμοσκιασμένη περιοχή εκτελούν σταθερές ταλαντώσεις. Για ένα δεδομένο λόγο $2U/V$, ο λόγος a/q είναι ο ίδιος για όλες τις μάζες και τα σημεία λειτουργίας για όλες τις μάζες βρίσκονται σε μία ευθεία γραμμή στο διάγραμμα σταθερότητας, η οποία διέρχεται από την αρχή των αξόνων. Το διάγραμμα σταθερότητας και οι εκφράσεις των παραμέτρων a και q δείχνουν ότι:

- α) η μάζα m είναι ανάλογη του V (με την ω σταθερή).
- β) η διακριτική ικανότητα $\Delta m/m$ είναι σταθερή για σταθερό λόγο U/V και επίσης δεν μεταβάλλεται με την μάζα m .
- γ) η διακριτική ικανότητα μπορεί να ρυθμιστεί με την μεταβολή του U .
- δ) οι παράμετροι a και q εξαρτώνται από το λόγο m/z .

Αξίζει να παρατηρηθεί ότι αν το εναλλασσόμενο πεδίο μηδενιστεί τότε όλα τα σημεία βρίσκονται στον q -άξονα και για ένα πολύ ασθενές εναλλασσόμενο πεδίο όλα τα ιόντα εκτελούν σταθερές ταλαντώσεις. Επιπλέον, λόγω της θερμικής κίνησης των ιόντων, η ανεξαρτησία της διακριτικής ικανότητας από την μάζα ισχύει μόνο για επαρκή χρόνο παραμονής στο τετραπολικό πεδίο και αρκετά στενή κατανομή ταχυτήτων στον άξονα Z . Η διαπερατότητα των ιόντων δια μέσου του τετραπολικού φίλτρου μειώνεται με την αύξηση της διακριτικής ικανότητας (αύξηση του U) καθ' όσον τα σημεία λειτουργίας ανέρχονται στο διάγραμμα σταθερότητας. Η σάρωση της κλίμακας μαζών συνήθως γίνεται είτε με μεταβολή της κυκλικής συχνότητας ω , ή με παράλληλη μεταβολή των εντάσεων των πεδίων U και V , κρατώντας τον λόγο U/V σταθερό.

Τα πλεονεκτήματα του τετραπολικού φίλτρου μαζών είναι το μικρό κόστος και η αναπαραγωγιμότητα των λαμβανομένων φασμάτων μάζας. Μειονεκτήματα του είναι η χαμηλή διακριτική ικανότητα (1 amu) και η εξάρτηση της διαπερατότητας ενός ιόντος από την μάζα του. Οι τετραπολικοί φασματογράφοι μάζας χρησιμοποιούνται ευρέως στην καθημερινή χημική ανάλυση και συνήθως ακολουθούν τους αέριους χρωματογράφους (Gas Chromatography, GC) οι οποίοι επιτυγχάνουν τον διαχωρισμό των συστατικών ενός μείγματος για την ευκολότερη ταυτοποίηση κάθε συστατικού.

3) Χρόνος πτήσης ιόντων (Time-of-flight). Η τεχνική του χρόνου πτήσης χρησιμοποιεί την εξάρτηση της ταχύτητας από την μάζα ενός ιόντος που κινείται σε χώρο απαλλαγμένο ηλεκτρομαγνητικών πεδίων.



Σχήμα 2.4. Τεχνική χρόνου πτήσης

Το σχηματιζόμενο ιόν επιταχύνεται σε ταχύτητα v κάτω από την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου δυναμικού V :

$$T = zV = \frac{mv^2}{2} \quad \text{ενώ η ταχύτητα του } v \text{ δίνεται από την σχέση:}$$

$$v = \sqrt{\frac{2zV}{m}}$$

Μετά την αρχική επιτάχυνση, το ιόν εισέρχεται σε χώρο απουσία ηλεκτρικού πεδίου στον οποίο κινείται ευθύγραμμα και ομαλά μέχρι τον ανιχνευτή, σε απόσταση L , απαιτώντας χρονικό διάστημα t :

$$t = \frac{L}{v} = L \sqrt{\frac{m}{2zV}}$$

Συνεπώς, ο απαιτούμενος χρόνος εξαρτάται από την μάζα του ιόντος και ως εκ τούτου επιτυγχάνεται η διάκριση των ιόντων ανάλογα της μάζας τους. Η τεχνική προαπαιτεί τον ακριβή καθορισμό του χρόνου εκκίνησης του ιόντος από την πηγή ιοντισμού. Είναι προφανές ότι η δημιουργία ιόντων και η τελική ανίχνευση τους δεν είναι δυνατόν να πραγματοποιείται με συνεχή τρόπο, αλλά μόνο με την μορφή παλμών. Ως εκ τούτου, η τεχνική συνιστάται στην χημική ανάλυση διαδικασιών που εκτελούνται παλμικά (φωτοδιάσπαση και απόξεση επιφανειών, με παλμικό laser).

2γ. Μέθοδοι ανίχνευσης ιόντων

Οι μέθοδοι ανίχνευσης ιόντων στηρίζονται στο γεγονός της δευτερογενούς εκπομπής ηλεκτρονίων κατά την πρόσπτωση ηλεκτρονίων ή ιόντων σε επιφάνεια, κατάλληλα επιστρωμένη με ειδικά υλικά ή πολωμένη σε πολύ υψηλό δυναμικό (kV). Συνήθως χρησιμοποιείται το «φαινόμενο

χιονοστιβάδας» (avalanche effect), κατά το οποίο η αρχική εκπομπή ηλεκτρονίων δίνει αφορμή σε επιπλέον εκπομπή από πολλαπλές προσπτώσεις των δευτερογενώς παραγομένων ηλεκτρονίων και την τελική ενίσχυση του ασθενέστατου ρεύματος των αρχικών ιόντων σε μετρήσιμο ρεύμα ηλεκτρονίων. Οι συνηθέστερες τεχνικές ανίχνευσης ιόντων είναι:

α) Κύπελλο (cup) Faraday. Αποτελείται από μία κοίλη επιφάνεια, η οποία συνδέεται με ένα ηλεκτρόμετρο (συσκευή μέτρησης ηλεκτρικού φορτίου). Φορτίζεται αρνητικά με την πρόσπτωση ηλεκτρονίων στην επιφάνεια της με συνέπεια την ανταπόκριση του ηλεκτρομέτρου. Είναι μία καθαρά αναλογική μέθοδος και δεν μπορεί να λειτουργήσει με παλμικές διατάξεις. Η ευαισθησία του Faraday cup είναι σχετικά μικρή, με σημαντικό πλεονέκτημα το χαμηλό κόστος.

β) Ηλεκτρονοπολλαπλασιαστής (Secondary Electron Multiplier, SEM). Αποτελείται από μία διαδοχική σειρά δυνόδων (μεταλλικές επιφάνειες – συνήθως κράμα Cu-Be– οι οποίες εκπέμπουν δευτερογενή ηλεκτρόνια) πολωμένων σε υψηλό δυναμικό. Μπορεί να λειτουργήσει σε αναλογικές ή ψηφιακές διατάξεις, έχει καλή ευαισθησία αλλά σχετικά υψηλό κόστος.

γ) Ανιχνευτής Daly. Αποτελείται από μία μεταλλική επιφάνεια με δυνατότητα εκπομπής δευτερογενών ηλεκτρονίων τα οποία επιταχύνονται προς ένα σπινθηριστή (scintillator) και το εκπεμπόμενο φώς ανιχνεύεται από φωτοπολλαπλασιαστή.

δ) Channeltron. Αποτελείται από μία δύνοδο σε σχήμα χωνιού έχοντας ειδική επιστροφή υλικού με δυνατότητα εκπομπής δευτερογενών ηλεκτρονίων των οποίων ο αριθμός αυξάνεται σημαντικά με το «φαινόμενο χιονοστοιβάδας», δίνοντας τελικά μία ένα ρεύμα εύκολα μετρήσιμο με ένα ηλεκτρόμετρο.

ε) Πλάκα μικροδιόδων (Microchannel plate). Αποτελείται από μία συστοιχία γυάλινων τριχοειδών σωλήνων με εσωτερική διάμετρο 10-25 μm , τα οποία είναι επιστρωμένα με κατάλληλο υλικό το οποίο έχει δυνατότητα εκπομπής δευτερογενών ηλεκτρονίων. Ταυτόχρονα τα τριχοειδή βρίσκονται πολωμένα σε υψηλή τάση και με την βοήθεια του «φαινομένου χιονοστοιβάδας» παράγεται ρεύμα ενισχυμένο κατά 10^3 ως 10^4 σε σχέση με το αρχικό ρεύμα ιόντων. Ο ανιχνευτής έχει μεγάλη ευαισθησία, ενώ η δυνατότητα κατασκευής μεγάλης επιφάνειας από πολλές οπές τριχοειδών επιτρέπει την χρήση του σε συστήματα μέτρησης πολλών μαζών ταυτόχρονα (multichannel detector, focal plane array detectors) σε συνδυασμό με φίλτρο μαζών μαγνητικού πεδίου.

ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΑΡΑΓΩΓΟΠΟΙΗΣΗΣ

Παραγωγοποίηση είναι η διαδικασία της χημικής τροποποίησης μιας ένωσης με στόχο την παραγωγή μιας νέας ένωσης που έχει τις κατάλληλες ιδιότητες ώστε να μπορεί να αναλυθεί χρησιμοποιώντας αέρια χρωματογραφία. Με την παραγωγοποίηση καθίσταται δυνατή η ανάλυση ενώσεων με βάση την πτητικότητα ή τη σταθερότητα και βελτιώνεται η χρωματογραφική συμπεριφορά ή ανιχνευσιμότητα. Πολλές ενώσεις δεν παράγουν ένα χρήσιμο χρωματογράφημα ή η ουσία που μας ενδιαφέρει δεν ανιχνεύεται στο δείγμα. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η παραγωγοποίηση του δείγματος είναι απαραίτητη για την ολοκλήρωση της ανάλυσης με την αέρια χρωματογραφία. Γενικά, με την παραγωγοποίηση:

- Αυξάνεται η πτητικότητα και η σταθερότητα
- Μειώνεται η παρουσία των πολικών ομάδων $-OH$, $-NH$, $-SH$
- Στοχεύονται δραστικές ομάδες O , S , N , P
- Αυξάνεται η ανιχνευσιμότητα, π.χ. στα στεροειδή.

Η συνηθέστερη αντίδραση παραγωγοποίησης είναι η αντικατάσταση του ενεργού υδρογόνου σε πολικές ομάδες ($-OH$, $-SH$, $-NH$) από μια ομάδα του αντιδραστήριου παραγωγοποίησης με αποτέλεσμα:

- Αλκυλίωση
- Ακυλίωση
- Συμπύκνωση
- Τριμεθυλοσιλανοποίηση

Διενεργτικά

1. Εισαγωγή



Όπως ήδη αναφέρθηκε, τα διεγερτικά ανήκουν σε μια ιδιαίτερα σημαντική κατηγορία απαγορευμένων ουσιών που υπόκεινται σε Έλεγχο Doping. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν οι αμφεταμίνες, η εφεδρίνη, η καφεΐνη, η στρυχνίνη, η κοκαΐνη, καθώς και άλλες συναφείς ουσίες. Ως φαρμακευτικές ουσίες είναι σε θέση να σώζουν ζωές όταν χρησιμοποιούνται για θεραπευτικούς σκοπούς, συχνά όμως χρησιμοποιούνται και παράνομα από αυτούς που κάνουν κατάχρηση απαγορευμένων ουσιών. Σκοπό της κατάχρησης διαφόρων διεγερτικών αποτελεί η καταστολή του άγχους, του πανικού και της όρεξης, η ευφορία και η καθυστέρηση της κόπωσης.

Ειδικότερα στον αθλητισμό, η κατάχρησή τους είναι ανήθικη και ενδεχομένως επικίνδυνη για την υγεία του αθλητή. Έχει διαπιστωθεί ότι αυξάνουν την εγρήγορση και βοηθούν σε αθλήματα που απαιτούν γρήγορα αντανακλαστικά, περιέχουν δηλαδή τα στοιχεία της επαγρύπνησης και της ετοιμότητας (ποδηλασία, πυγμαχία, ποδόσφαιρο, κολύμβηση και καλαθοσφαίριση). Επίσης μειώνουν και καθυστερούν την εμφάνιση της κόπωσης και δημιουργούν απώλεια κρίσης. Με τον τρόπο αυτό, οι αθλητές υπό συνθήκες μέγιστης προσπάθειας, όπως είναι η ώρα του αγώνα, μπορεί να οδηγηθούν μέχρι και στο θάνατο, εφόσον ξεπερνούν τη φυσιολογική κόπωση του οργανισμού τους.

2. Φαρμακευτική εξάρτηση

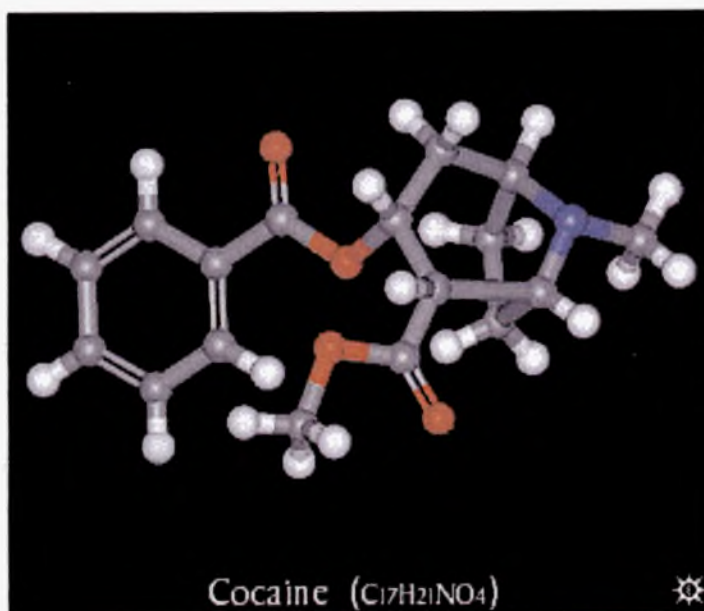
Όπως όλα τα φάρμακα που προκαλούν εξάρτηση, έτσι και τα διεγερτικά, παρουσιάζουν χημικές δράσεις στον εγκέφαλο οι οποίες προκαλούν αίσθηση ικανοποίησης ή ανταμοιβής. Υπάρχουν πολλά αισθήματα ανταμοιβής στα οποία συμπεριλαμβάνονται η επίδραση της καφεΐνης κατά της κόπωσης, η χαλάρωση που προκαλεί το οινόπνευμα, ακόμα και η κένωση του εντέρου μετά τη χρήση καθαρτικού. Παρόλ'αυτά χωρίς να υπάρχει σύγκριση, το μεγαλύτερο αίσθημα

είναι η αίσθηση της ευχαρίστησης που παράγεται από φάρμακα όπως είναι η κοκαΐνη και οι αμφεταμίνες. Η επίδραση αυτή θεωρείται ότι είναι αποτέλεσμα ενίσχυσης της ντοπαμινεργικής μεταβίβασης στο μεταιχμιακό σύστημα, ιδιαίτερα στον επικλινή πυρήνα. Είναι πιθανό όλα τα ερεθίσματα ευχαρίστησης να δρουν τελικά μέσω αυτής της ντοπαμινεργικής οδού, και πολλά φάρμακα που περιέχουν άλλου είδους ανταμοιβή να αυξάνουν επίσης έμμεσα τη μεταβίβαση ντοπαμίνης στον επικλινή πυρήνα. Επιπλέον, υπάρχουν νευρικές οδοί οι οποίες μέσω ομοιοειδών πεπτιδίων μπορεί να μεσολαβούν έμμεσα στην ευχαρίστηση, αλλά γενικά πιστεύεται ότι και αυτές επηρεάζουν έμμεσα τη ντοπαμινεργική μεταβίβαση στον επικλινή πυρήνα. Επειδή η ανταμοιβή από τέτοιου είδους φάρμακα οδηγεί σε συγκεκριμένη συμπεριφορά ώστε να επαναλαμβάνεται η λήψη τους, τα φάρμακα αυτά θεωρούνται θετικοί ενισχυτές και αυτό είναι καθοριστικό στη δημιουργία ψυχικής εξάρτησης. Επίσης, από πρόσφατα πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί, έχει βρεθεί ότι εξαρτησιογόνες ουσίες όπως είναι η κοκαΐνη, η κωδεΐνη, η μορφίνη, παρουσιάζουν γενικά μια ανοσοκατασταλτική δράση, μικρή ή μεγάλη, στο ανοσοποιητικό σύστημα του ανθρώπου. Πιο συγκεκριμένα, η κοκαΐνη βρέθηκε ότι προκαλεί αύξηση της κυτταροτοξικότητας των NK-κυττάρων, ενώ το crack και η βενζοϋλοεγκονίνη βρέθηκε ότι προκαλεί μείωση.

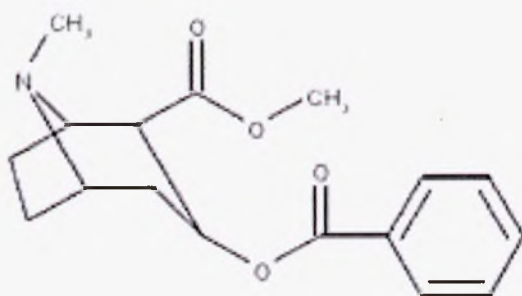
Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι ανταμοιβές και οι μηχανισμοί κάποιων διεγερτικών φαρμάκων που προκαλούν εξάρτηση:

Τύπος φαρμάκου	Φάρμακο	Ανταμοιβή	Μηχανισμός δράσης	Μεταβιβαστής
Διεγερτικό	Κοκαΐνη	Ευφορία, διέγερση	Αναστολή επαναπρόσληψης κατεχολαμινών	Ντοπαμίνη, νορεπινεφρίνη
Διεγερτικό	Αμφεταμίνες («έκσταση»)	Ευφορία, διέγερση, διαταραχή αντίληψης	Απελευθέρωση μονοαμίνης και αναστολή επαναπρόσληψης	Ντοπαμίνη, νορεπινεφρίνη, σεροτονίνη
Διεγερτικό	Νικοτίνη	Ευφορία, Συγκέντρωση, χαλάρωση	Ενεργοποίηση NicAChR προκαλώντας απελευθέρωση NT, NicAChR απευαισθητοποίηση	Ντοπαμίνη, νορεπινεφρίνη, ακετυλοχολίνη
Διεγερτικό	Καφεΐνη	Αναστολή κόπωσης, Συγκέντρωση	Ανταγωνισμός υποδοχέα αδενosίνης αυξάνοντας την απελευθέρωση	νορεπινεφρίνη

ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗΝ ΚΟΚΑΪΝΗ ΚΑΙ ΣΤΟΥΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ ΤΗΣ



ΚΟΚΑΪΝΗ



Χημικό όνομα: [1R-(exo,exo)]-3-(Benzyloxy)-8-methyl-8-azabicyclo [3.2.1]octane-2-carboxylic acid methyl ester

Εναλλακτικό χημικό όνομα: 3beta-hydroxy-1alphaH, 5alphaH-tropane-2beta-carboxylic acid methyl ester benzoate

2° Εναλλακτικό χημικό όνομα: 2beta-carbomethoxy-3beta-benzoxytropane, ecgonine methyl ester benzoate:

3° Εναλλακτικό χημικό όνομα: l-cocaine, beta-cocaine, benzoylmethyl-ecgonin

Χημικός τύπος: $C_{17}H_{21}NO_4$

Μοριακό βάρος: 303.36 g/mol

Βιοδιαθεσιμότητα: στοματικά: 33% ,
ρινικά: 19% (11%–26%)

Μεταβολισμός: στο συκώτι

Χρόνος ημιζωής: 72 ώρες

Απέκκριση: στα ούρα

Σημείο τήξης: 98° C

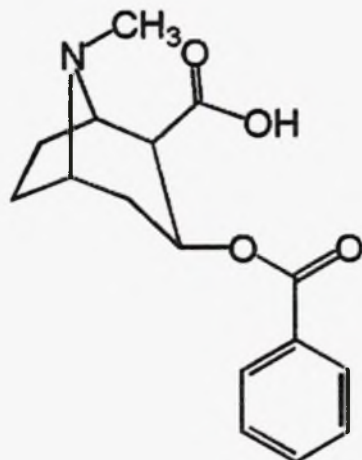


Αναλυτικότερα, η κοκαΐνη αποτελεί χημική ένωση που αποτελείται από C, H, O και N και ανήκει στα αλκαλοειδή. Βρίσκεται μαζί με άλλα αλκαλοειδή στα φύλλα του θαμνίσκου ερυθρόξυλον ή κόκα (*erythroxylon coca* οικογένεια ερυθροξυλίδαι συγγενής με την οικογένεια Λινίδων, Δικοτυλήδονα) που φύεται στην Βολιβία, Κολομβία, Περού, Αργεντινή, Σρι Λάνκα και στο νησί Ιαβα και καλλιεργείται σε μεγάλη κλίμακα . Από το 1988 ξεκίνησε μια παγκόσμια προσπάθεια για περιορισμό και εξαλειψη της καλλιέργειας της κόκα . Τα φύλλα του φυτού που οι ιθαγενείς μασάνε συχνά λόγω της επιδράσης τους επί των αισθήσεων, ξηρά περιέχουν από 0,2% έως 0,8% κοκαΐνη. Η ουσία βαφτίστηκε «κοκαΐνη» το 1860 από το Γερμανό Άλμπερτ Νίμαν, αλλά εγκρίθηκε ως φάρμακο μόνο τριάντα χρόνια αργότερα. Ο πρώτος όμως άνθρωπος που ανακάλυψε μια από τις ιδιότητες της κοκαΐνης, ήταν ο Σίγκμουντ Φρόντ το 1882. Ο «πατέρας της ψυχανάλυσης», στο σύγγραμμά του «Ouber Coca» («Πάνω απ' όλα η κοκαΐνη») ύστερα από τις δικές του προσωπικές εμπειρίες, συνιστούσε τους αρρώστους να τη χρησιμοποιούν, μόνο όμως στις περιπτώσεις βαριάς κατάθλιψης. Το 1923 ο Βιλστάιτερ παρασκεύασε συνθετικά την κοκαΐνη ξεκινώντας από απλές ουσίες . Η κοκαΐνη είναι ουσία κρυσταλική, άχρωμη, έχει πικρή γεύση και τήκεται στους 98° C. Είναι οπτικά ενεργή, διαλυτή σε αλκοόλη (λίγο στο νερό) και σε μερικούς οργανικούς διαλύτες. Σχηματίζει διάφορα άλατα με οξέα, μερικά από τα οποία όπως η χρωμική και υπερμαγγανική κόκα είναι αδιάλυτα. Πολλές έρευνες έχουν δείξει ότι η κοκαΐνη (CO) αποτελεί μια πλήρως μεταβολιζόμενη ουσία στον άνθρωπο. Οι κύριοι μεταβολίτες της στα ούρα είναι το benzoyllecgonine (BE) και το ecgonine methyl ester (EME), τα οποία εξάγονται κυρίως ελεύθερα στα ούρα. Το benzoyllecgonine (BE) και το ecgonine methyl ester (EME) σχηματίζονται από την κοκαΐνη μέσω υδρόλυσης ενός αιθυλο-αλκυλο εστέρα ή ενός φαινυλο-εστερικού δεσμού. Η κόκαΐνη όταν χρησιμοποιείται τοπικά παραλύει τις αισθητήριες απολύξεις των νεύρων: τοποθετούμενη στους βλενογόνους ή χορηγούμενη υποδόρια με ένεση καταργεί τις αισθήσεις του πόνου αφής και θερμότητας της περιοχής. Στο βλενογόνο της μύτης καταργεί της αίσθηση της όσφρησης . Όταν λαμβάνεται από το στόμα εξουδετερώνει την αίσθηση

της δίψας και της πείνας λόγω παράλυσης των νεύρων των οισοφάγων και του στομάχου. Έτσι εξηγείται επιστημονικά η παλιά συνήθεια των ιθαγενών να μασάνε τα φύλλα της κόκας κατά την διάρκεια μακρών πορειών σε δυσβατές περιοχές. Μέσω της γενικής οδού το αλκαλοειδές δρα επί του Κ.Ν.Σ προκαλώντας διεγερτικά φαινόμενα που ακολουθούνται από παραλυτικά. Η λήψη της κοκαΐνης για ηδονιστικούς σκοπούς οφείλεται στο ότι προκαλεί αίσθημα ευφορίας, δύναμης και μεγαλύτερης πνευματικής ικανότητας. Η φάση αυτή της διέγερσης ακολουθείται από κατασταλτικά φαινόμενα που αναγκάζει το άτομο να επαναλαμβάνει την λήψη του αλκοολοειδούς σε όλο και συντομότερα χρονικά διαστήματα. Η χρόνια δηλητηρίαση (κοκαινισμός) προκαλεί σύντομα μείωση της δύναμης της θέλησης και των ηθικών φραγμών ενώ εμφανίζονται παραληρήματα και οργανικές διαταραχές. Η οξεία δηλητηρίαση είναι αποτέλεσμα λήψης υπερβολικής ποσότητας και για αυτοκτονία ή από λάθος από τους κοκαινομανείς. Εκδηλώνεται με ψυχική και κινητική διέγερση, αύξηση της θερμοκρασίας του σώματος, μυικό τρόμο, σεξουαλική διέγερση, κια μπορεί να εξελιχθεί σε σοκ που χαρακτηρίζεται από έντονη ψυχρότητα, κρύους ιδρώτες, πτώση της αρτηριακής πίεσης, κώμα και κάποιες φορές καταλήγει σε θάνατο. Από καιρό έχει αποκλειστεί η χορήγηση της μέσω της γενικής οδού, ενώ η τοπική εφαρμογή της σαν αναισθητικού έχει πλέον αντικατασταθεί από τα σύνθετα υποκατάστατά της. Μια ορισμένη χρησιμότητα αναγνωρίζεται ακόμα στο κολλύριό της κοκαΐνης με το οποίο εκμεταλευόμαστε τις συμπαθομημιτικές ιδιότητες της ουσίας αυτής (τοπική αγγειοσυστολή και μυδρίαση).

ΒΕΝΖΟΥΛΕΓΚΟΝΙΝΗ

Χημικό όνομα: 3-benzoyloxy-8-methyl-8-azabicyclo[3.2.1] octane-4-carboxylic acid



Χημικός τύπος: $C_{16}H_{19}NO_4$

Μοριακό βάρος: 289.326 g/mol

Βιοδιαθεσιμότητα: ?

Μεταβολισμός: ?

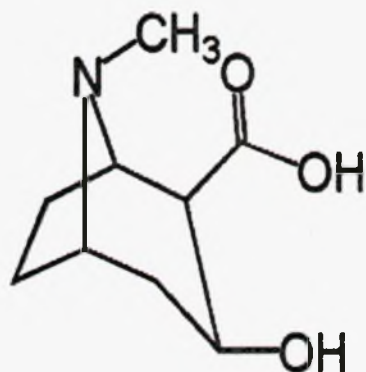
Χρόνος ημιζωής: ?

Απέκκριση: ?

Το benzoylecgonine (BE) αποτελεί τον κύριο μεταβολίτη της κοκαΐνης και έχει προταθεί ως ο καταλληλότερος δείκτης στη χρήση της. Σχηματίζεται μέσω υδρόλυσης της κοκαΐνης στο συκώτι και καταλύεται από καρβοξυλεστεράσες. Εξάγεται με τα ούρα από χρήστες της ουσίας ύστερα από διαδικασία στο συκώτι. Εξαιτίας της χημικής του φύσης (αμφοτερική ουσία, ιδιαίτερα πολική κ υδόφιλη), συχνά εξετάζεται ξεχωριστά από άλλες απαγορευμένες ουσίες. Μέθοδοι κοινώς χρησιμοποιούμενοι είναι ο ανοσοπροσδιορισμός, η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC), η υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία (HPLC), καθώς και η αέρια χρωματογραφία (GC) με ή χωρίς την φασματομετρία μάζας (MS).

ΕΓΚΟΝΙΝΗ

Χημικό όνομα: 3-hydroxy-8-methyl-8-azabicyclo[3.2.1]octane-2-carboxylic acid



Χημικός τύπος: $C_9H_{15}NO_3$

Μοριακό βάρος: 185,21 g/mol

Βιοδιαθεσιμότητα: ?

Μεταβολισμός: ?

Χρόνος ημιζωής: ?

Απέκκριση: ?

Η εγκονίνη αποτελεί μια χημική ένωση που βρίσκεται κατεξοχήν στα φύλλα της κόκας. Δομικά, είναι ένα κυκλοεπτάνιο παράγωγο με μια νιτρική γέφυρα. Αποκτάται μέσω υδρόλυσης της κοκαΐνης με οξέα ή

αλκάλια και κρυσταλλώνεται με ένα μόριο νερού. Είναι αριστερόστροφη ουσία και σε υψηλές θερμοκρασίες με αλκάλια δίνει iso-εγκονίνη, που είναι δεξιόστροφη. Αποτελεί μια τριτοταγή βάση και έχει ιδιότητες ενός οξέος και ενός αλκαλοειδούς.

Πειραματικό Μέρος

Στη συγκεκριμένη εργασία, γίνεται αναφορά σε δείγμα ούρων αθλητή, το οποίο βρέθηκε θετικό ως προς την ουσία benzoylcgonine, που αποτελεί τον κύριο μεταβολίτη του διεγερτικού της κοκαΐνης. Η παρτίδα που περιείχε το συγκεκριμένο δείγμα, διαπιστώθηκε ότι ανήκε σε αθλητές που προπονούνταν με σκοπό τη συμμετοχή τους σε αγώνες του Ιπποδρομείου. Εφόσον πραγματοποιήθηκαν με ασφάλεια και συνέπεια τα προκαταρκτικά στάδια διαδικασιών Ελέγχου Doping (σωστή λήψη και προστασία μη αλλοίωσης δείγματος), η παρτίδα έφτασε στο Εργαστήριο Ελέγχου Doping. Εκεί, η εθελοντική ομάδα του Τομέα των Διεγερτικών την παραλαμβάνει ώστε να γίνουν οι κατάλληλες διαδικασίες. Καταρχήν, διεξάγεται το παρασκευαστικό στάδιο των δειγμάτων, ώστε να είναι σε θέση να υποστούν τις κατάλληλες διεργασίες από τα όργανα GC και GC/MS. Όσον αφορά το παρασκευαστικό στάδιο των δειγμάτων, όπως ήδη έχει αναφερθεί στην εισαγωγή, τελούνται δύο διαδικασίες. Στη διαδικασία I υπόκεινται παράγοντες που περιέχουν άζωτο και εκκρίνονται ελεύθεροι και στη συνέχεια περνούν στο όργανο GC. Στη διαδικασία II υπόκεινται παράγοντες που περιέχουν άζωτο και εκκρίνονται δεσμευμένοι και στη συνέχεια περνούν στο όργανο GC/MS. Στη διαδικασία II, η κύρια αντίδραση που λαμβάνει χώρα, είναι μια υδρόλυση, που μπορεί να γίνεται είτε με τη βοήθεια κάποιου οξέος, είτε με τη βοήθεια κάποιου ενζύμου. Στο εργαστήριο πραγματοποιείται και η Διαδικασία I και η Διαδικασία II, η δεύτερη διαδικασία όμως γίνεται χρησιμοποιώντας οξύ, για λόγους οικονομίας χρόνου (η όξινη διαδικασία απαιτεί 3-4 ώρες για την ολοκλήρωσή της, ενώ η ενζυμική απαιτεί όλη τη νύχτα). Επίσης, η Διαδικασία I ολοκληρώνεται περίπου σε 2 ώρες.

Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται αναλυτικά τα βήματα που ακολουθούνται σε κάθε διαδικασία και η επιβεβαιωτική διαδικασία του θετικού δείγματος. Πριν ξεκινήσει κάθε διαδικασία, θα πρέπει να ετοιμάζονται τα δείγματα ελέγχου και τα blank. Συνήθως, προς οικονομία χρόνου και αποφυγή πιθανού λάθους, τα διαλύματα ελέγχου CALA, CALB και το BLANK ήταν έτοιμα και βρίσκονταν στην κατάψυξη. Τα δείγματα αυτά τα έπαιρναν οι εθελοντές, τα άφηναν στον εργαστηριακό πάγκο προς απόψυξη και τα ανακινούσαν χρησιμοποιώντας το vortex. Τα δείγματα ελέγχου, τα blank και τα δείγματα των παρτίδων περιείχαν από 2.5 ml.

A	Στάδιο Διαδικασίας I
1.	Προετοιμασία δείγματος ελέγχου CALA
1.1	Μετάγγιση του περιεχομένου του σωλήνα στον αντίστοιχο ψηλό δοκιμαστικό σωλήνα του CALA.
2.	Προετοιμασία BLANK
2.1	Μετάγγιση 2.50 ml blank στον αντίστοιχο ψηλό δοκιμαστικό σωλήνα του BLANK.
3.	Διαδικασία
3.1	Προσθήκη 50 μl διαλύματος διφαινυλαμίνης 130 ppm με επαναληπτική πιπέτα και στη συνέχεια vortex.
3.2	Προσθήκη 250 μl καυστικό κάλιο 5.0 M με επαναληπτική πιπέτα και στη συνέχεια vortex.
3.3	Προσθήκη 1.0 ml tert – butylmethylether με dispenser και στη συνέχεια vortex.
3.4	Προσθήκη 2 gr άνυδρο Na ₂ SO ₄ , και στη συνέχεια vortex.
3.5	Πωματισμός, ανάδευση στους ανακινήτες για 20 min.
3.6	Αφαίρεση πωμάτων για το πλυντήριο, ισοβάρυνση των σωλήνων
3.7	Έλεγχος στροφών φυγοκέντρου 1900 – 2000 rpm, φυγοκέντριση για 10 min.
3.8	Επισήμανση των vials 1.5 ml με αδιάβροχο μελάνι.
3.9	Μεταφορά οργανικής στιβάδας στα vials των 1.5 ml με πιπέτα του 1 – 5 ml.
3.10	Ερμητικός πωματισμός
3.11	Υπογραφή στη Φόρμα Διαδικασίας I.
3.12	Παράδοση των vials στο επιστημονικό προσωπικό του Τομέα των Διεγερτικών και Υπογραφή στη Φόρμα Συγκεντρωτικής Αναφοράς Αναλυτικών Διαδικασιών της συγκεκριμένης Παρτίδας.

B.1	Στάδιο Διαδικασίας II (Όξινη Υδρόλυση)
1.	Προετοιμασία δείγματος ελέγχου CALB
1.1	Μετάγγιση του περιεχομένου του σωλήνα στον αντίστοιχο ψηλό δοκιμαστικό σωλήνα του CALB.
2.	Προετοιμασία BLANK
2.1	Μετάγγιση 2.50 ml blank στον αντίστοιχο ψηλό δοκιμαστικό σωλήνα του BLANK.
3.	Διαδικασία
3.1	Προσθήκη 50 mg κυστεΐνης και στη συνέχεια vortex.
3.2	Προσθήκη 250 μl HCL 6.0 M με επαναληπτική πιπέτα και στη συνέχεια vortex. Πωματισμός.
3.3	Μεταφορά στο φούρνο στους (100±2)°C για 30 min
3.4	Επαναφορά των δειγμάτων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (αναμονή περίπου για 5 min)

3.5	Προσθήκη 100 μl φαιναζίνης 62.5 ppm και 50 μl mefenamic acid με επαναληπτική πιπέτα και στη συνέχεια vortex για 5 sec.
3.6	Προσθήκη 250 μl NaOH 6M με επαναληπτική πιπέτα και στη συνέχεια vortex
3.7	Προσθήκη 2 gr NaHCO ₃ : Na ₂ CO ₃ 10:1 ,ph 9.5-10,vortex.
3.8	Προσθήκη 5.0 ml μίγματος διαιθυλαιθέρα :ισοπροπανόλης 5:1 με dispenser και στη συνέχεια vortex.
3.9	Πωματισμός,ανάδευση στους ανακινητήρες για 20 min
3.10	Αφαίρεση πωμάτων για το πλυντήριο και ισοβάρυνση των σωλήνων
3.11	Έλεγχος στροφών φυγοκέντρου 1900 – 2000 rpm,φυγοκέντριση για 10 min.
3.12	Επισήμανση των κωνικών σωλήνων με αδιάβροχο μελάνι.
3.13	Μεταφορά οργανικής στιβάδας στους κωνικούς σωλήνες με πιπέτα του 1 – 5 ml.
3.14	Εξάτμιση σε ρεύμα N ₂ μέχρι ξηρού,μέγιστο 50°C
3.15	Καθαρά tips στις απολήξεις,αρχικά μικρή ροή N ₂ ,προοδευτική αύξηση της ροής
3.16	Έλεγχος ξηρού υπολείμματος σε κάθε κωνικό σωλήνα,»φύσημα»με N ₂ ένα-ένα,αν χρειάζεται
3.17	Μεταφορά στον ξηραντήρα,εφαρμογή κενού(λειτουργία αντλίας για 30sec),30 min
3.18	Προσθήκη 100μl MSTFA με πιπέτα των 20-200 μl,πωματισμός,vortex 10 sec
3.19	Επώαση στους (80±5)°C για 10 min hot block (κωνικές θήκες χαμηλές,έλεγχος θερμοκρασίας hot block)
3.20	Επαναφορά των δειγμάτων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (αναμονή περίπου για 5 min)
3.21	Προσθήκη 30μl MBTFA με πιπέτα των 20-200μl,πωματισμός,vortex 10 sec
3.22	Επώαση στους (80±5)°C για 5 min hot block (κωνικές θήκες χαμηλές,έλεγχος θερμοκρασίας hot block)
3.23	Επισήμανση των vials 2 ml με insert με αδιάβροχο μελάνι.
3.24	Επαναφορά των δειγμάτων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (αναμονή περίπου για 5 min)
3.25	Μεταφορά παραγωγοποιημένου δείγματος στα vials με πιπέτα των 20-200 μl
3.26	Ερμητικός πωματισμός
3.27	Υπογραφή στη Φόρμα Διαδικασίας II.
3.28	Παράδοση των vials στο επιστημονικό προσωπικό του Τομέα των Διεγερτικών και Υπογραφή στη Φόρμα Συγκεντρωτικής Αναφοράς Αναλυτικών Διαδικασιών της συγκεκριμένης Παρτίδας.

B.2	Στάδιο Διαδικασίας ΙΙ(Ενζυμική Υδρόλυση)
1.	Προετοιμασία δείγματος ελέγχου CALB
1.1	Μετάγγιση του περιεχομένου του σωλήνα στον αντίστοιχο ψηλό δοκιμαστικό σωλήνα του CALB.
2.	Προετοιμασία BLANK
2.1	Μετάγγιση 2.50 ml blank στον αντίστοιχο ψηλό δοκιμαστικό σωλήνα του BLANK.
3.	Διαδικασία
3.1	Προσθήκη 100 μl μίγματος κοδεΐνης και φαιναζίνης με επαναληπτική πιπέτα και στη συνέχεια vortex.
3.2	Προσθήκη 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος οξικών 1.0 M, pH 5.2 με επαναληπτική πιπέτα και στη συνέχεια vortex για 5 sec.
3.3	Έλεγχος pH 5-6.5 με πεχαμετρικό χαρτί 4-7
3.4	Προσθήκη 50ml β-γλυκουρονιδάση <i>H.pomatia</i> με πιπέτα των 20-200ml, πωματισμός, vortex 5 sec
3.5	Μεταφορά στο φούρνο στους $(50 \pm 2)^\circ\text{C}$ για 2.5 h ή στους $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$ για όλη τη νύχτα.
3.6	Επαναφορά των δειγμάτων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (αναμονή περίπου για 5 min)
3.7	Προσθήκη 2 gr NaHCO_3 : Na_2CO_3 10:1 , pH 9.5-10, vortex.
3.8	Προσθήκη 5.0 ml μίγματος διαιθυλαιθέρα :ισοπροπανόλης 5:1 με dispenser και στη συνέχεια vortex.
3.9	Πωματισμός, ανάδευση στους ανακινητήρες για 20 min
3.10	Αφαίρεση πωμάτων για το πλυντήριο και ισοβάρυση των σωλήνων
3.11	Έλεγχος στροφών φυγοκέντρου 1900 – 2000 rpm, φυγοκέντρωση για 10 min.
3.12	Επισήμανση των κωνικών σωλήνων με αδιάβροχο μελάνι.
3.13	Μεταφορά οργανικής στιβάδας στους κωνικούς σωλήνες με πιπέτα του 1 – 5 ml.
3.14	Εξάτμιση σε ρεύμα N_2 μέχρι ξηρού, μέγιστο 50°C
3.15	Καθαρά tips στις απολήξεις, αρχικά μικρή ροή N_2 , προοδευτική αύξηση της ροής
3.16	Έλεγχος ξηρού υπολείμματος σε κάθε κωνικό σωλήνα, «φύσημα» με N_2 ένα-ένα, αν χρειάζεται
3.17	Μεταφορά στον ξηραντήρα, εφαρμογή κενού (λειτουργία αντλίας για 30sec), 30 min
3.18	Προσθήκη 100ml MSTFA με πιπέτα των 20-200 ml, πωματισμός, vortex 10 sec
3.19	Επώαση στους $(80 \pm 5)^\circ\text{C}$ για 10 min hot block (κωνικές θήκες χαμηλές, έλεγχος θερμοκρασίας hot block)
3.20	Επαναφορά των δειγμάτων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (αναμονή περίπου για 5 min)
3.21	Προσθήκη 30ml MBTFA με πιπέτα των 20-

	200μl,πωματισμός,vortex 10 sec
3.22	Επώαση στους $(80\pm 5)^{\circ}\text{C}$ για 5 min hot block (κωνικές θήκες χαμηλές,έλεγχος θερμοκρασίας hot block)
3.23	Επισήμανση των vials 2 ml με insert με αδιάβροχο μελάνι.
3.24	Επαναφορά των δειγμάτων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (αναμονή περίπου για 5 min)
3.25	Μεταφορά παραγωγοποιημένου δείγματος στα vials με πιπέτα των 20-200 μl
3.26	Ερμητικός πωματισμός
3.27	Υπογραφή στη Φόρμα Διαδικασίας II.
3.28	Παράδοση των vials στο επιστημονικό προσωπικό του Τομέα των Διεγερτικών και Υπογραφή στη Φόρμα Συγκεντρωτικής Αναφοράς Αναλυτικών Διαδικασιών της συγκεκριμένης Παρτίδας.

Ακολουθεί ένα σχετικό σχεδιάγραμμα με την πορεία II καθώς και οι παράμετροι των οργάνων:



• Ανάλυση από τα όργανα

Τύπος οργάνου: GC/HRMS

Παράμετροι ένχυσης

Όγκος έγχυσης: 1μl

Θερμοκρασία έγχυσης: 250 °C

Παράμετροι διαχωρισμού:

Στήλη:

Μάρκα: Hewlett Packard

Διαστάσεις: 12m, 0.200mm

Πάχος φιλμ: 0.33μm

Παράμετροι ροής

Φέρον αέριο: Ήλιο

Ρυθμός ροής: 1,4ml/min στους 180°C

Πρόγραμμα θερμοκρασίας στον κλίβανο

Αρχική θερμοκρασία: 150°C

Αρχικός χρόνος: 0,5min

Ρυθμός 1: 12,5°C/min

Θερμοκρασία κράτησης: 310°C

Χρόνος κράτησης: 0min

Ρυθμός 2: 0°C/min

Τελική θερμοκρασία: 310°C

Τελικός χρόνος: 3,15min

Γραμμή μεταφοράς: 300°C

Παράμετροι ανίχνευσης

Θερμοκρασία μεσόφασης: 300

Θερμοκρασία πηγής: 220

Μέθοδος ιονισμού: EI

Κατά τη διεξαγωγή και των τριών Διαδικασιών, απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή σε ορισμένα σημεία, όπως:

- Να μη στάζουν οι σωλήνες κατά τον πωματισμό και την ανάδευση στους ανακινητήρες
- Η μέγιστη διαφορά βάρους των δύο ομάδων σωλήνων κατά την ισοβάρυνσή τους να μην ξεπερνά τα 0.5 gr
- Να μη λαμβάνεται υδατική στιβάδα κατά τη μεταφορά της οργανικής στιβάδας στους κωνικούς σωλήνες
- Οι διαδικασίες παραγωγοποίησης με MSTFA και MBTFA να γίνονται πάντα στον απαγωγό
- Να μην περιστρέφεται το καπάκι των vials κατά τον πωματισμό

Όταν πλέον έχουν ολοκληρωθεί οι διαδικασίες παρασκευής των δειγμάτων, η παρτίδα ετοιμάζεται για την επεξεργασία στα όργανα GC και GC/MS από το επιστημονικό προσωπικό του Τομέα των Διεγερτικών.

Παρακάτω παρουσιάζονται με τη μορφή φόρμας οι διαδικασίες προετοιμασίας των οργάνων GC/MSD και GC/HRMS, καθώς επίσης και η επιβεβαιωτική διαδικασία ενός θετικού δείγματος:

ΟΑΚΑ - ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΛΕΓΧΟΥ ΔΟΠΙΝΓ

ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ: 105
 ΟΡΓΑΝΟ: GC/MSD
 ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ: 01
 ΤΥΠΟΣ: 3001
 ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ: 11/11/2014
 ΥΠΟΓΡΑΦΗ: ΡΟΥΤΟΣ

Παράρτημα 21. Φόρμα Προετοιμασίας Οργάνου GC/MSD για τη Διαδικασία II Αθλητών

Εκτελεστής: _____
 Ημερομηνία: _____
 Ταυτότητα οργάνου: 59730
 Παρέμβαση / Δείγμα: 2

Α/Α	Σημεία Ελέγχου	Υπογραφή	Έλεγχος
1	Κατάσταση σύριγγας	Καθαρισμός σύριγγας με ετήσι ποσότητα	-
2	Διάλυτης έκδοσης	Πλήρωση δοχείων διαλύτη με ετήσι ποσότητα	-
3	Έλεγχος μάζας	Ψαλίδες πριν την ανάληψη κάθε καρτίδας (βλ. σελ. 2 για οδηγίες). Υπογραφή και ημερομηνία στο μπιπίng. Φύλλα στο θάκελο II του οργάνου. Check για αέρα, γραμμή < 20% της κορυφής 69. Ένταση κορυφής π/κ 502 > 12000.	-
4	Εκκωσής	Έλεγχος του pH/αίτη, πλήρωση με χημει εκκωσής.	-
5	Παραλαβή-ανάλυση δειγμάτων	Υπογραφή της Συγκριτικής Ανεπαρκούς Αναλυτικών Διαδικασιών Παρτίδας Δειγμάτων στο σημείο της απαράλαβης και ανάληψης φιαλιδίων, με την παραλαβή των δειγμάτων.	-
6	Δημιουργία sequence	Πρόγραμμα HP MS ChemStation (βλ. σελ. 2).	-
7	Έλεγχος sequence	Έλεγχος της sequence, της σειράς των vials, της ονομασίας των δειγμάτων, της μεθόδου.	-
8	Τοποθέτηση των vials	Τοποθέτηση των vials στο tray, σύμφωνα με τη sequence.	-
9	Φύλλα sequence	Υπογραφή και ημερομηνία στη sequence, φύλλα στο θάκελο Α του οργάνου GC/MS.	-
10	Ανάλυση δειγμάτων	Sequence, Run, Run Sequence.	-
11	Δείγμα έλεγχου	Έλεγχος ότι το δείγμα υπάρχει. Να ικανοποιούνται τα κριτήρια της φόρμας σημείων έλεγχου screening Διαδικασίας II Αθλητών. Αν δεν πληρούνται τα κριτήρια, λαμβάνονται διορθωτικά μέτρα, όπως αλλαγή liner, septum, προστήλης. Συνεννόηση με τον υπεύθυνο του Τομέα 2.	-
12	Ημερολόγιο οργάνου	Σημείωση στο Ημερολόγιο τυχόν επέμβαση στο όργανο	-

Μεταστέφου ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΛΕΓΧΟΥ ΔΟΠΙΝΓ ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 21 Φόρμα Προετοιμασίας Οργάνου GC/MSD για τη Διαδικασία II Αθλητών

p.d. 24A/47 EI
p.d. 22A/46

Document 34

ΟΑΚΑ - ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΛΕΓΧΟΥ ΔΟΠΙΝΓ Corbis

ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ: 018
 ΟΡΓΑΝΟ: GC/MSD
 ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ: 01
 ΤΥΠΟΣ: 3001
 ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ: 11/11/2014
 ΥΠΟΓΡΑΦΗ: ΡΟΥΤΟΣ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3. ΦΟΡΜΑ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΤΙΚΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ ΒΑΣΕΙ ΣΗΜΕΙΟΥ (Αθλητές)

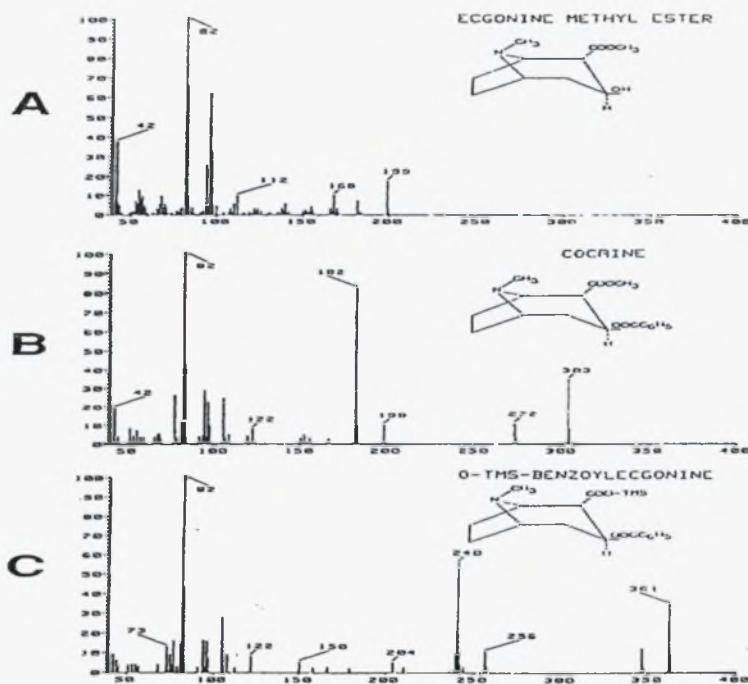
ΘΕΤΙΚΟ ΔΕΙΓΜΑ	ΚΩΔ. ΕΡΓ. ΠΡΟΙΟΥ	Α-ΔΕΙΓΜΑ	Β-ΔΕΙΓΜΑ
ΟΥΣΙΑ		0	0
ΔΕΙΓΜΑΤΑ	Benzoylecgonine, methylcgonine - Me-ethyl		
	CONFIRMATION	QUANTIFICATION	
	BLANK (x2)	/	
	ΘΕΤΙΚΟ ΔΕΙΓΜΑ (x1)		
	ΔΕΙΓΜΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ (x3) 1) 250 μl 8 10 ppm 2) 250 μl 8 10 ppm 3) 250 μl 8 10 ppm 4) 250 μl 8 10 ppm 5) 250 μl 8 10 ppm		
	CTRL (x2)		
	STANDARD (x3)		
	ΘΕΤΙΚΟ ΔΕΙΓΜΑ (x3)		
ΟΓΚΟΣ ΟΥΡΩΝ	4.5 mL		
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	- ουσία που ελέγχεται - διαλύτη διαλυτικό παράγωγο MSTFA 1000 μl methoxyamine b2.5 ppm 15 ml 10% w/v codone 74.5 ppm		
ΣΥΝΤΑΞΗ	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ:	ΥΠΟΓΡΑΦΗ Α:	ΥΠΟΓΡΑΦΗ Β:
ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ:	ΥΠΟΓΡΑΦΗ:	
ΑΝΑΛΥΣΗ	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ:	ΥΠΟΓΡΑΦΗ:	
ΕΠΑΝΑΛΗΨΗ	ΝΑΙ <input type="checkbox"/> ΟΧΙ <input checked="" type="checkbox"/>	ΑΙΤΙΑ:	ΥΠΟΓΡΑΦΗ:
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ		ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ:	ΥΠΟΓΡΑΦΗ:
<input type="checkbox"/> Αρνητικό		ΥΠΟΓΡΑΦΗ Α:	ΥΠΟΓΡΑΦΗ Β:
<input checked="" type="checkbox"/> Θετικό (Συγκέντρωση:			
ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ:			
ΑΠΟΒΗΚΕΥΣΗ Β-ΔΕΙΓΜ.	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ:	ΥΠΟΓΡΑΦΗ:	
ΦΥΛΑΞΗ VIALS	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ:	ΘΕΣΗ:	ΥΠΟΓΡΑΦΗ:
ΚΑΤΑΣΤΡΟΦΗ VIALS	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ:		ΥΠΟΓΡΑΦΗ:

Μεταστέφου ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΛΕΓΧΟΥ ΔΟΠΙΝΓ ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3 Φόρμα επιβεβαιωτικής διαδικασίας (Αθλητές)

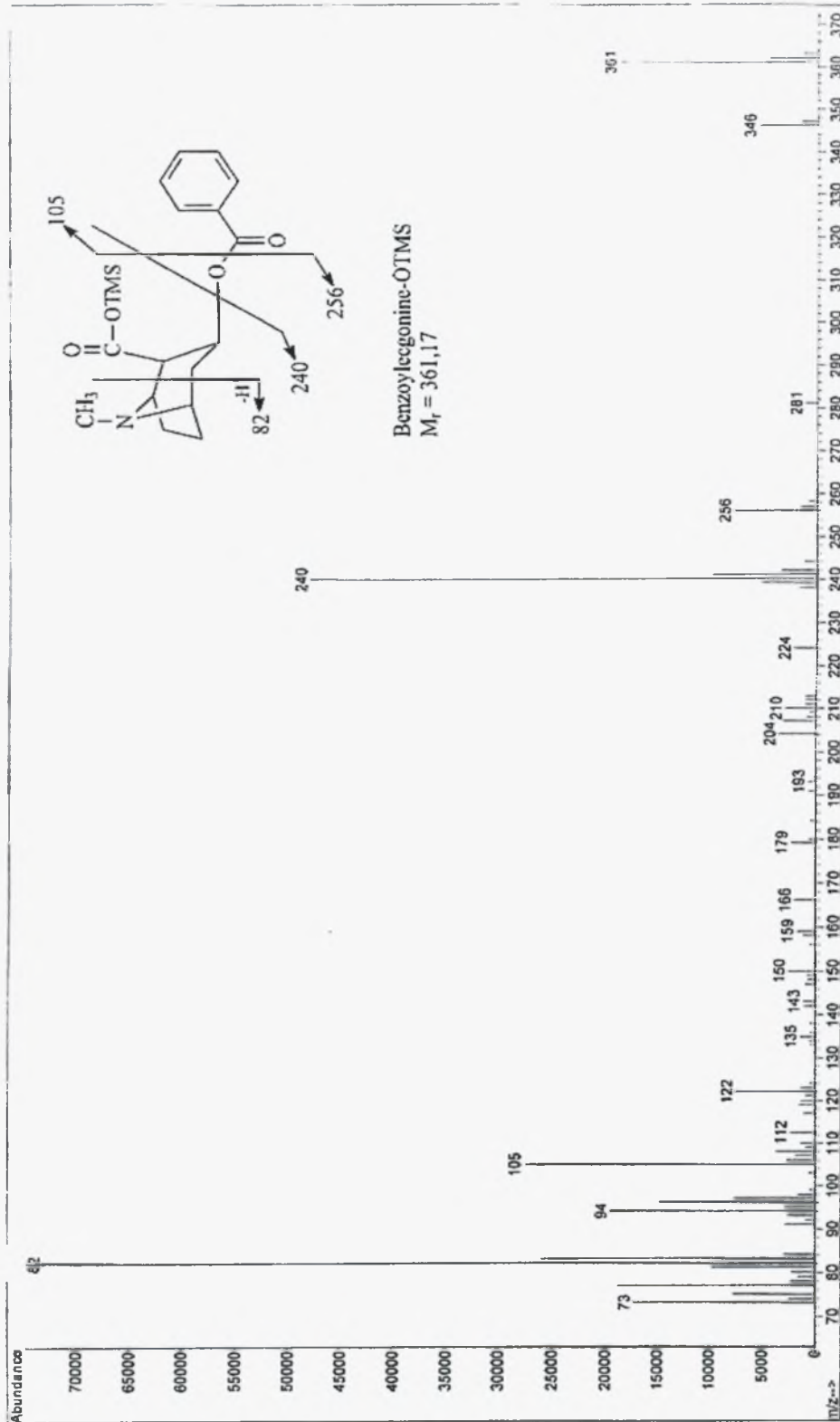
p.d. 24A/47 EI
p.d. 22A/46

Η επαναληπτική διαδικασία δεν πραγματοποιείται για όλα τα δείγματα παρά μόνο για όσα θεωρούνται «ύποπτα». Οι διαφορές που παρατηρούνται στην επιβεβαιωτική διαδικασία από την αρχική είναι ότι ο όγκος δείγματος που λαμβάνεται για ανάλυση είναι 3μl αντί για 1μl καθώς και διαφορές στη θερμοκρασία του κλιβάνου. Η αρχική θερμοκρασία στη δεύτερη περίπτωση είναι 200°C, υπάρχει μόνο ένα διάστημα αύξησης της θερμοκρασίας αντί για δύο με 15°C/min και τέλος η θερμοκρασία κράτησης είναι 315°C. Η επιβεβαιωτική διαδικασία είναι ειδική μέθοδος για την ανίχνευση του benzoylecgonine σε βάρος άλλων ουσιών. Στη συνέχεια θα δούμε τις απαντήσεις που μας δίνουν τα επιστημονικά όργανα και πως εμείς τις ερμηνεύουμε. Τα παρακάτω χρωματογραφήματα αναφοράς αντιπροσωπεύουν το δείγμα προς ανάλυση του αθλητή, ένα αρνητικό και ένα θετικό δείγμα.

- Χρωματογραφήματα αναφοράς A. ecgoninemethyl ester B. cocaine C. O-TMS



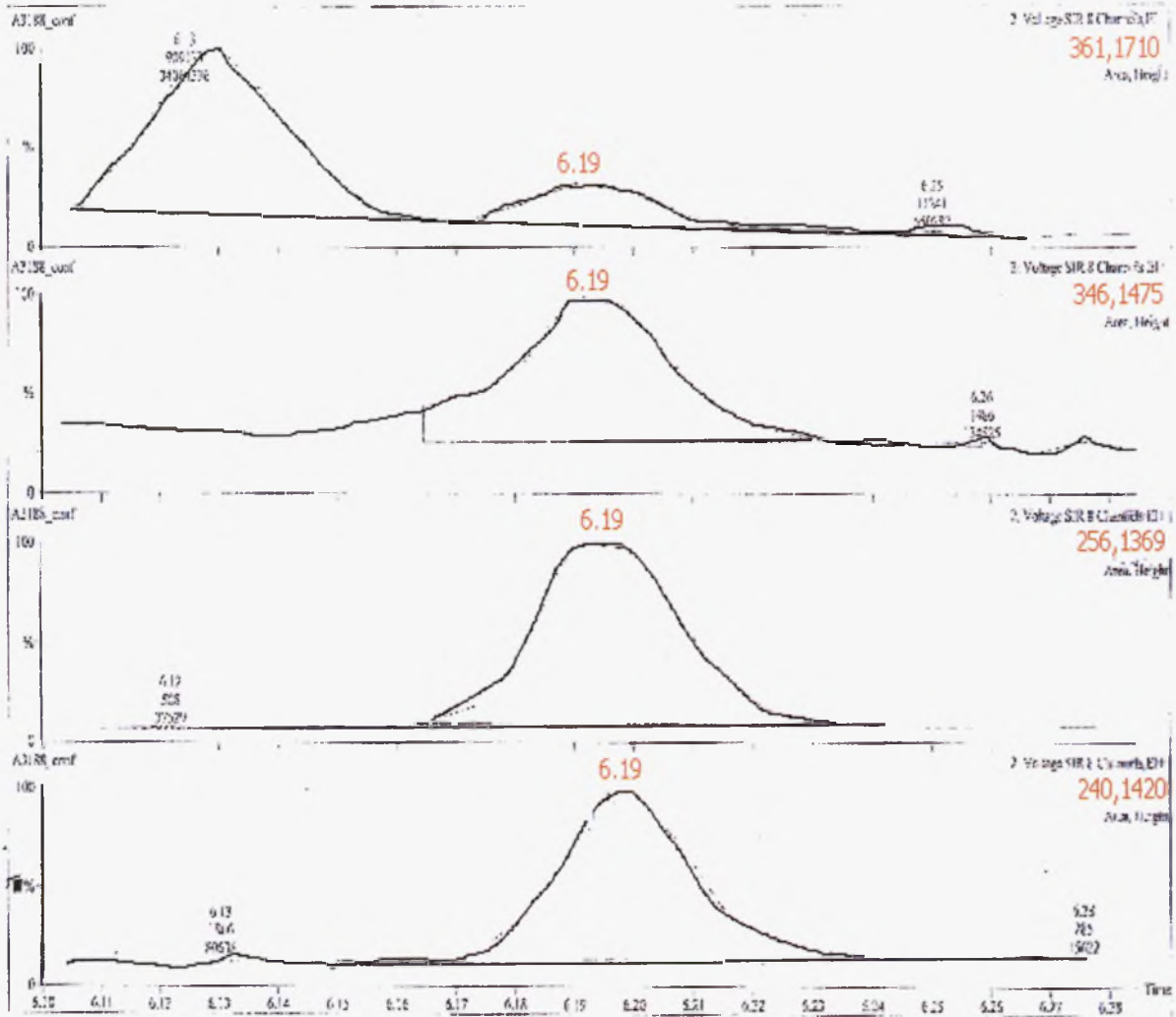
- Πιο ευδιάκριτα, το φασματογράφημα του benzoylecgonine



- Παρακάτω παρουσιάζεται το φασματογράφημα μάζας του αθλητή που βρέθηκε θετικός ως προς την ουσία benzoylcagonine



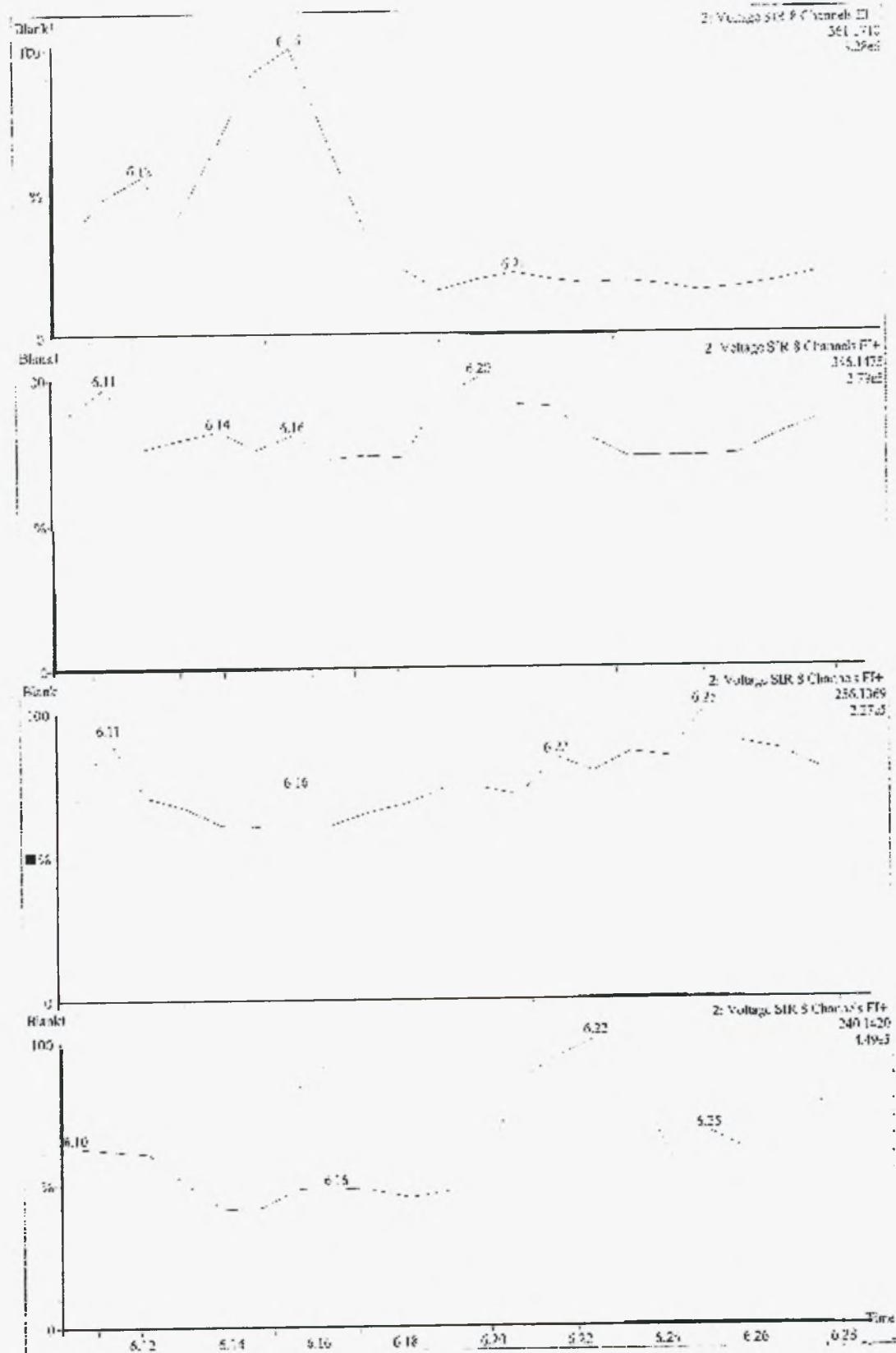
- Δείγμα αθλητή



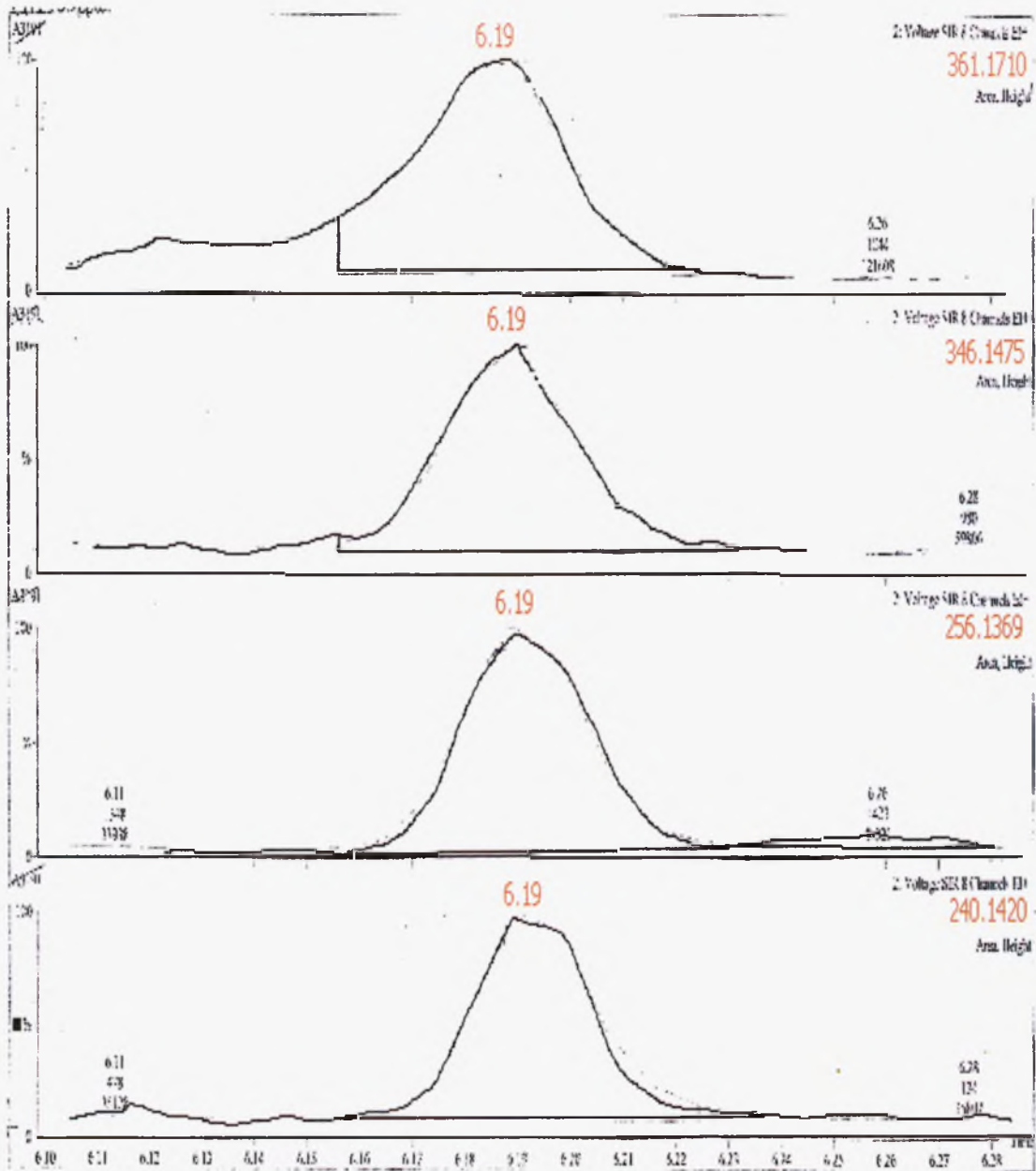
Δείγμα
Benzoyllecgonine-TMS

Ion m/z	RT ISRD	RT analyse	RRT**	Area	Rel.Area
361.1710		6.19	0.84	226.611	100%
256.1369		6.19	0.84	106.782	47.1%
240.1420		6.20	0.84	84.153	37.1%
371.1916	7.34				

- Αουητικό δείγμα-blank



- Θετικό δείγμα-αναφοράς



Θετικό δείγμα-αναφοράς-(ctrl 0.5 ppm)
Benzoylcegonine-TMS

Ion m/z	RT ISRD	RT analyse	RRT	Area	Rel.Area
361.1710		6.19	0.84	268.169	100%
256.1369		6.19	0.84	109.297	40.8%
240.1420		6.20	0.84	83.538	31.2%
371.1916	7.34				

Όρια αποδοχής***

Benzoylecgonine-TMS

Ion m/z	Κριτήριο 10%(απόλυτο)		Κριτήριο 20%(σχετικό)		Κριτήριο 5%(απόλυτο)	
	Min	max	Min	max	Min	max
361.1710	90%	110%				
256.1369			32.6%	48.9%		
240.1420			24.9 %	37.4%		

*:S/N για όλα τα διαγνωστικά ιόντα >>3

** :Relative Retention Time σε σχέση με το πρότυπο διάλυμα κοδεΐνης(ISTD)

***: Σε σχέση με το θετικό διάλυμα control

ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗΣ ΓΙΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΚΑΙ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΩΝ

Χρωματογραφικός διαχωρισμός

Για την αέρια χρωματογραφία, ο χρόνος ανάσχεσης (RT, retention time) του αναλυτή δεν πρέπει να διαφέρει περισσότερο από ένα τοις εκατό ή $\pm 0,2$ min (λαμβάνεται η μικρότερη τιμή από τις δύο) από το χρόνο ανάσχεσης της ίδιας ουσίας σε δείγμα ούρων, στο οποίο έχει εγχυθεί η ουσία και έχουν αναλυθεί ταυτόχρονα. Σε εκείνες τις περιπτώσεις όπου μετατοπίσεις του χρόνου ανάσχεσης δικαιολογούνται, για παράδειγμα, από sample overload, το κριτήριο χρόνου ανάσχεσης πρέπει να είναι πιο ελαστικό. Η πλήρης ή μερική σάρωση είναι η προτιμώμενη προσέγγιση για την επιβεβαίωση. Μια μερική σάρωση μπορεί να ξεκινά σε τιμή m/z μεγαλύτερη από οποιοδήποτε άφθονο ιόν, λόγω του αντιδραστηρίου παραγωγοποίησης ή του αντιδραστηρίου χημικού ιονισμού. Όταν λαμβάνεται φάσμα πλήρους ή μερικής σάρωσης, όλα τα διαγνωστικά ιόντα με σχετική αφθονία μεγαλύτερη από 10% στο φάσμα αναφοράς, που λαμβάνεται από ένα θετικό δείγμα ελέγχου, ένα μεταβολικό δείγμα αναφοράς ή ένα υλικό αναφοράς, πρέπει να είναι παρόντα στο φάσμα της άγνωστης κορυφής. Επιπλέον, η σχετική αφθονία των τριών διαγνωστικών ιόντων δε θα διαφέρει κατά ποσό μεγαλύτερο του αναφερόμενου στον πίνακα που παρατίθεται παρακάτω από τις σχετικές εντάσεις των ίδιων των ιόντων σε δείγμα ούρων κατόπιν έγχυσης σε μεταβολικό δείγμα αναφοράς. Η σχετική αφθονία των διαγνωστικών ιόντων μπορεί να ληφθεί από μεμονωμένα φάσματα ή από τον μέσο όρο των φασμάτων ή από την ολοκλήρωση των εμβαδών κορυφής. Η αφαίρεση του σήματος υποβάθρου (background), αν υιοθετείται, πρέπει να εφαρμόζεται ομοιόμορφα σε όλα τα δείγματα που αναλύονται ταυτόχρονα και να χρησιμοποιείται για τη λήψη αποφάσεων που αφορούν την παρουσία μιας Απαγορευμένης Ουσίας ή Μεθόδου, του Μεταβολίτη της ή τον Δείκτη της.

Επιτρέπεται η χρήση ηλεκτρονικής βιβλιοθήκης φασμάτων μάζας για αναζήτηση και ταυτοποίηση. Το εργαστήριο πρέπει να καθιερώνει κριτήρια αποδοχής της ταυτοποίησης ουσίας με βάση την ποιότητα του αποτελέσματος σύγκρισης φασμάτων. Καθώς η συγκριτική ταύτιση δύο φασμάτων σε μία αντίστροφη αναζήτηση δεν εγγυάται την ταυτοποίηση της ουσίας, όλες οι

ταυτοποιήσεις με βιβλιοθήκες φασμάτων πρέπει να ελέγχονται από κατάλληλο επιστημονικό προσωπικό.

Αν δεν είναι διαθέσιμα τρία διαγνωστικά ιόντα με σχετικό abundance μεγαλύτερο του 5% , θα ετοιμάζεται δεύτερο παράγωγο ή θα χρησιμοποιείται δεύτερη τεχνική ιονισμού ή θραύσης ιόντων. Το δεύτερο παράγωγο θα πρέπει να δίνει διαφορετικά διαγνωστικά ιόντα. Η δεύτερη τεχνική ιονισμού θα πρέπει να βασίζεται σε μια διαφορετική αρχή ,όπως για παράδειγμα ο χημικός ιονισμός έναντι του ιονισμού ηλεκτρονίων, όμως και πάλι θα πρέπει να δίνει διαφορετικά διαγνωστικά ιόντα. Δεν είναι αποδεκτή η χρήση τεχνικής που μεταβάλλει μόνο το σχετικό abundance των ιόντων των ίδιων των μαζών. Σε κάθε περίπτωση, είναι υποχρεωτική η ύπαρξη τουλάχιστον δύο διαγνωστικών σε κάθε φάσμα μάζας. Σε ορισμένες περιπτώσεις ίσως να είναι απαραίτητο να παρακολουθούνται επιλεγμένα ιόντα προκειμένου να ανιχνευτεί η ουσία στα Κατώτατα Απαιτούμενα Όρια Απόδοσης. Όταν ανιχνεύονται επιλεγμένα ιόντα, πρέπει να λαμβάνονται τουλάχιστον τρία διαγνωστικά ιόντα. Το σχετικό abundance ενός διαγνωστικού ιόντος θα καθορίζεται κατά προτίμηση από το εμβαδόν κορυφής ή το ύψος ολοκληρωμένων χρωματογραφημάτων επιλεγμένων ιόντων. Ο λόγος σήματος /θόρυβο του λιγότερου έντονου διαγνωστικού ιόντος πρέπει να είναι μεγαλύτερος από τρία προς ένα(3:1).

Σχετικό abundance (% της βασικής κορυφής)	GC/MS	CL-GC/MS LC/MS
>50%	±10% (απόλυτο)	±15%(απόλυτο)
25% έως 50%	±20%(απόλυτο)	±25%(απόλυτο)
<25%	±5%(απόλυτο)	±5%(απόλυτο)

Υπολογισμός συγκέντρωσης

Η συγκέντρωση μπορεί να υπολογιστεί με οποιαδήποτε από τις παραπάνω τεχνικές λαμβάνοντας το λόγο του ύψους κορυφής (ή του εμβαδού κορυφής) που λαμβάνεται στο χρόνο ανάλυσης του αναλυτή υπό εξέταση ως προς αυτό που λαμβάνεται από ένα εσωτερικό πρότυπο. Ένα κατάλληλα δευτεριωμένο εσωτερικό πρότυπο προτιμάται αλλά δεν είναι υποχρεωτικό. Ο λόγος ύψους κορυφών ή εμβαδών κορυφών μπορεί κατόπιν να συγκριθεί με ένα δείγμα ούρων αναφοράς ή ελέγχου. Η χρήση ενός μοναδικού ιόντος στην κατάλληλη αναλογία μάζας προς φορτίο που λαμβάνεται από ένα ιοντικό χρωματογράφημα επαρκεί για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης. Πρέπει να χρησιμοποιηθούν και επιπλέον ιόντα για την ικανοποίηση των κριτηρίων ταυτοποίησης.

ΑΠΟΔΟΧΗ Ή ΑΠΟΡΡΙΨΗ ΤΟΥ ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Στο φασματογράφημα του benzoylecgonine παρατηρούμε ότι εμφανίζονται αρκετές κορυφές που αντιστοιχούν σε ιόντα. Η μεγαλύτερη κορυφή αντιστοιχεί στο ιόν 82. Θα αναμέναμε λοιπόν να το εξετάζαμε στην επιβεβαιωτική διαδικασία. Παρ' όλα αυτά το συγκεκριμένο ιόν δεν επιλέγεται γιατί δεν το πλαισιώνουν κορυφές της ίδιας δυναμικότητας και ταυτόχρονα απέχει από τις επόμενες ψηλές κορυφές. Για να μπορέσει να γίνει η ταυτοποίηση μιας ουσίας είναι απαραίτητο να εμφανιστούν οι χαρακτηριστικές κορυφές οι οποίες όμως δεν πρέπει να απέχουν μεταξύ τους κυρίως για λόγους οικονομίας και ταχύτητας. Έτσι επιλέγονται τα συγκεκριμένα ιόντα τα οποία πληρούν τις συγκεκριμένες προδιαγραφές.

Με βάση τα κριτήρια που προαναφέρθηκαν, είμαστε σε θέση να χαρακτηρίσουμε ως θετικό ή αρνητικό το συγκεκριμένο δείγμα του αθλητή. Το πρώτο κριτήριο, το οποίο θέτει απαραίτητη προϋπόθεση ο χρόνος ανάλυσης να μην διαφέρει περισσότερο από 1% ή $\pm 0,2 \text{ min}$, παρατηρούμε ότι επαληθεύεται. Για το θετικό δείγμα αναφοράς έχουμε $RT=6.19$ και για το δείγμα του αθλητή έχουμε πάλι $RT=6.19$. Το δεύτερο κριτήριο, σχετίζεται με την αφθονία των επιμέρους ιόντων στο δείγμα. Στη συγκεκριμένη περίπτωση το ιόν 361 εμφανίζεται σε μεγαλύτερο ποσοστό και το ορίζουμε ως το 100% βάσει του οποίου υπολογίζουμε την αφθονία των υπόλοιπων ιόντων. Απαραίτητη προϋπόθεση για να ισχύει το δεύτερο κριτήριο είναι να ισχύουν τα όρια αποδοχής που παρατίθενται στους παραπάνω πίνακες. Βλέπουμε ότι ισχύουν για όλα τα ιόντα. Εφόσον πληρούνται όλες οι προϋποθέσεις που απαιτούνται για τον χαρακτηρισμό του δείγματος ως θετικό μπορούμε να το χαρακτηρίσουμε ως θετικό για την ουσία του benzoylecgonine.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Θύτες με θύματα τον εαυτό τους, όσοι αθλητές ντοπάρονται, είναι εκείνοι που πληρώνουν το τίμημα του doping, με κόστος την υγεία τους και κάποιες φορές την ίδια τους τη ζωή. Παρακάτω αναφέρονται κάποιες περιπτώσεις αθλητών που βρέθηκαν θετικοί σε διάφορες απαγορευμένες ουσίες.

Πίνακας 1.1. Χαρακτηριστικές περιπτώσεις doping.

Αθλητής	Χώρα	Ουσία	Άθλημα	Έτος
Knud Jensen*	Δανία	Αμφεταμίνες	Ποδηλασία	1960
Birgit Dressel*	Γερμανία	Αναβολικά Στεροειδή	Στίβος (Έπταθλο)	1987
Ilona Slupianek	Γερμανία	Αναβολικά Στεροειδή	Στίβος (Σφαιροβολία)	1977
Willie Johnston	Σκωτία	Φαιнкаμφαμίνη	Ποδόσφαιρο	1978
Martii Vainio	Φινλανδία	Αναβολικά Στεροειδή	Στίβος (10000, 5000 m)	1984
Άννα Βερούλη	Ελλάς	Αναβολικά Στεροειδή	Στίβος (Ακοντισμός)	1984

Thomas Johansson	Σουηδία	Αναβολικά Στεροειδή	Πάλη	1984
Jaroslav Morawiecki	Πολωνία	Αναβολικά Στεροειδή	Χόκεϋ επί πάγου	1988
Angel Myers	ΗΠΑ	Αναβολικά Στεροειδή	Κολύμβηση	1988
Ben Johnson	Καναδάς	Stanozolol	Όσβάϊο (100 m)	1988
Katrin Krabbe	Γερμανία	Clenbuterol	Όσβάϊο (100, 200 m)	1992
Git Breuer	Γερμανία	Clenbuterol	Όσβάϊο (400 m)	1992
Diego Maradona	Αργεντινή	Κοκαΐνη	Ποδόσφαιρο	1994
Samantha Riley	Αυστραλία	Dextropropoxyphen e**	Κολύμβηση (Πρόσθιο)	1995
Mary Onyali	Νιγηρία	Εφεδρίνη	Στίβος (100, 200 m)	1996
Antonella Bevilacqua	Ιταλία	Εφεδρίνη	Στίβος (Άλμα εις ύψος)	1996
Evrick Gay	ΗΠΑ	Εφεδρίνη	Basketball	1997
*Θάνατος αποδιδόμενος στη χρήση απαγορευμένων ουσιών				
** επιτρεπόμενη ουσία πλέον				

ΥΠΑΡΧΕΙ ΔΙΕΞΟΔΟ ΣΤΟ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ DOPING ?

Αιτίες ντοπαρίσματος μπορούν να θεωρηθούν η έλλειψη αυτοπεποίθησης, ο υπέρμετρος ανταγωνισμός, η εύκολη λύση. Επίσης, η άγνοια, η έλλειψη στόχων, το χρήμα, η δόξα, καθώς και η πίεση για νίκες εξωθούν τους αθλητές στη λήψη φαρμάκων. Αυτό όμως πρέπει να σταματήσει. Είναι ένα πρόβλημα που δεν αφορά μόνο κάποιους αρμόδιους του αθλητισμού, αλλά λαμβάνει συνεχώς ανεξέλεγκτες διαστάσεις που αφορά πλέον όλους μας. Αφορά την κοινωνία. Ο στόχος «αθλητισμός χωρίς φάρμακα» μπορεί να επιτευχθεί μόνο μέσα από τη σωστή πληροφόρηση και την παιδεία.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Θ.Π.Χατζηιωάννου,Μ.Α.Κούπαρη,«Ενόργανη Ανάλυση» Αθήνα 2000
- World Anti-Doping Agency,WADA «The World Anti-Doping Code»2005
- World anti-Doping Agency,WADA, «The 2005 prohibited list international standard»
- Ronald A.Hites «Gas Chromatography Mass Spectrometry» Indiana University School of Public and Enviromental Affairs»
- M.L.Vincent and D.G.Petrers,Journal of electroanalytical chemistry interfacial electrochemistry 1992
- CUBoulder Organic Chemistry Undergraduate Courses «Lab Techniques»,www.orgchem.colorado.edu
- Dr.Thomas,G.Chasteen «Coupling Gas Chromatography to Mass Spectometry», Sam Houston State University
- International Athletic Foundation World Symposium on Doping in Sport, Florence, 1987, Official Proceedings
- II International Athletic Foundation World Symposium on Doping in Sport, Monte Carlo, 1989, Official Proceedings
- International Olympic Committee,International Olympic Charter against doping in sport,Medical Commission, international communication,1990
- Encyclopedia of Analytical Science, Academic Press, Editor:Alan Townshed
- Rose M., Johnstone R., Mass spectrometry for chemists and biochemists,Campridge University Press, 1982
- Knap D.,Handbook of analytical derivativization reactions,John Wiley & Sons, 1979
- Παπαϊωάννου Δ.Α., Φασματομετρία Μάζας, Πάτρα,1999
- Διπλωματική Εργασία στην Τοξικολογία,Ανίχνευση Στανολόλης σε ούρα αθλητών κατά τη διάρκεια των Ολυμπιακών Αγώνων της Αθήνας 2004,Κορνηνού Ειρήνη
- Διπλωματική Εργασία,Ανίχνευση Απαγορευμένων Ουσιών, Κλενβουτερόλη,Αλεξοπούλου Αντωνία
- Εθελοντική Εργασία στις Υπηρεσίες Ελέγχου Doping, Dr.Τσιτσιμπίκου Χριστίνα
- Το Φαινόμενο του Doping και οι Προσπάθειες καταπολεμήσεως του,Δρ. Ευστάθιος Κουκέας
- Journal of chromatography B:Biomedical Applications,Stimulants,narcotics and β-blockers: 25 years of development in analytical technicques for doping control,P.Hemmersbach,R.de la Torre
- Simultaneous Determination and Quantitation of Cocaine Metabolites in Urine by GC/MS.Could Possibly Some of Them Be Used as New Reliable Markers of Cocaine Ingestion in Addition to Benzoylcgonine,Laboratorio de Analisis Antidoping,Universidad de Chile,Santiago,Chile
- Identification et dosage de la **benzoylcgonine**
- <http://en.wikipedia.org/wiki/Benzoylcgonine>".
- www.druglibrary.org/schaffer/cocaine/clearurine
- www.cocaine.org/
- www.1911encyclopedia.org/E/EC/ECGONINE.htm
- www.crack.cocaine.gr