



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ << ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ >>

Βελτιστοποίηση μεθόδου (EI-GC/MS) και ποσοτικός προσδιορισμός δύο αντικαταθλιπτικών φαρμάκων SSRI στο αίμα νεκροτομικών δειγμάτων από πνιγμό

ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ ΨΥΧΟΥ
ΧΗΜΙΚΟΣ

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2021



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ << ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ >>

Βελτιστοποίηση μεθόδου (EI-GC/MS) και ποσοτικός προσδιορισμός δύο αντικαταθλιπτικών φαρμάκων SSRI στο αίμα νεκροτομικών δειγμάτων από πνιγμό

ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ ΨΥΧΟΥ
ΧΗΜΙΚΟΣ

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2021

Τριμελής Επιτροπή:

Ελένη Γκίκα, Επίκουρη καθηγήτρια, Εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας, Α.Π.Θ

Νικόλαος Ράϊκος, Καθηγητής, Εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας, Α.Π.Θ

Γεώργιος Θεοδορίδης, Καθηγητής, Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας, Α.Π.Θ.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών σπουδών «Τοξικολογία» του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Το θέμα της εργασίας αυτής επιλέχθηκε από την επίκουρη καθηγήτρια του Εργαστηρίου Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης κα. Ελένη Γκίκα, την οποία ευχαριστώ πολύ για τη συνεργασία, την επίβλεψη, την καθοδήγηση, τις χρήσιμες και εποικοδομητικές συμβουλές της προκειμένου να ολοκληρωθεί επιτυχώς η διπλωματική εργασία.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου που με παρότρυναν να προχωρήσω στην μεταπτυχιακή μου εκπαίδευση και με ενθάρρυναν και υποστήριξαν σε όλη της διάρκειά της. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον κο. Νικόλαο Ράϊκο που μου έδωσε την ευκαιρία να βρίσκομαι στο Εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης καθώς και για τη στήριξή του σε κάθε μου βήμα αλλά και για την παραχώρηση του εργαστηριακού χώρου και του οργάνου της αέριας χρωματογραφίας (GC-MS). Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την τριμελή επιτροπή η οποία απαρτίζεται από την Επίκουρη καθηγήτρια του Εργαστηρίου Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας κα. Ελένη Γκίκα, τον καθηγητή κο. Νικόλαο Ράϊκο και τον καθηγητή Αναλυτικής Χημείας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης κο. Γεώργιο Θεοδωρίδη.

Τα δείγματα ελήφθησαν από το Εργαστήριο Τοξικολογίας της Ιατροδικαστικής Υπηρεσίας Θεσσαλονίκης και αναλύθηκαν στο Εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης υπό τη καθοδήγηση της Επίκουρης καθηγήτριας του εργαστηρίου κας Ελένης Γκίκα, με τη βοήθεια της Ευδοκίας Δ. Μπούσα, Χημικού MSc και της Φωτεινής Μήτσα, Χημικού MSc, τις οποίες θα ήθελα να ευχαριστήσω για την εξαιρετική συνεργασία τους, την επιστημονική καθοδήγηση καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας, τις παρατηρήσεις, αλλά και τη συνεχή ενημέρωση.

Θεσσαλονίκη, 2021

ΛΙΣΤΑ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

GC/MS : Αέρια Χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (Gas Chromatography / Mass Spectrometry)

LLE: εκχύλιση υγρού-υγρού (Liquid-Liquid Extraction)

SPE: εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction)

LC/MS : Υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (Liquid Chromatography mass spectrometry)

P.T.V. Injector : Programmed Temperature Vaporising Injector, Εγχυτήρας εισαγωγής δείγματος μέσω προγραμματισμού της θερμοκρασίας

SIM: Selected Ion Monitoring, Πρόγραμμα εκλεκτικής παρακολούθησης ιόντων

Full Scan: Πλήρης σάρωση

ADs : Αντικαταθλιπτικά (Antidepressants)

SSRIs : Επιλεκτικοί Αναστολείς Επαναπρόσληψης της σεροτονίνης (Selective Serotonin Reuptake Inhibitors)

SIM (single ion monitoring): πρόγραμμα επιλεγμένων ιόντων

PMR (Postmortem Redistribution): μεταθανάτια ανακατανομή

mg: χιλιοστό του γραμμαρίου

min: λεπτό

mL: χιλιοστό του λίτρου

μL: εκατομμυριοστό του λίτρου

SERT (Serotonin Transporter): μεταφορέας σεροτονίνης

5-HT (5-hydroxytryptamine): σεροτονίνη

ng: δισεκατομμυριοστό του γραμμαρίου.

μg: εκατομμυριοστό του γραμμαρίου

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σε ένα σύγχρονο τοξικολογικό εργαστήριο είναι πάντοτε αναγκαία και επιθυμητή μια ταχεία και ακριβής μέθοδος ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού τόσο φαρμάκων, όσο και παράνομων ψυχοτρόπων ουσιών προκειμένου να έχουμε άμεσα αποτελέσματα τοξικολογικού ενδιαφέροντος.

Σε αυτήν τη μεταπτυχιακή διατριβή έγινε βελτιστοποίηση μιας ήδη υπάρχουσας μεθόδου στο GC-MS για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό δύο αντικαταθλιπτικών φαρμάκων, της σερτραλίνης και της σιταλοπράμης, τα οποία ανήκουν στην κατηγορία των εκλεκτικών αναστολέων επαναπρόσληψης της σεροτονίνης (SSRIs). Οι μετρήσεις έγιναν σε ολικό αίμα νεκροτομικών δειγμάτων που σχετίζονται με πνιγμό στη θάλασσα. Η μέθοδος που περιγράφεται είναι απλή και γρήγορη για τον προσδιορισμό δύο, συνήθως συγχορηγούμενων αντικαταθλιπτικών - σερτραλίνης και σιταλοπράμης - σε ολικό αίμα.

Η προκατεργασία του δείγματος περιλάμβανε εκχύλιση υγρού-υγρού (LLE) των αναλυτών και προσδιορισμό των συγκεντρώσεων των φαρμάκων με αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας χωρίς το στάδιο της παραγωγοποίησης, χρησιμοποιώντας ένα σταθερό επισημασμένο εσωτερικό πρότυπο, Cocaine-D₃, κατάλληλο για αναλύσεις αίματος στον τομέα της κλινικής τοξικολογίας και της εγκληματολογικής ανάλυσης. Ο διαλύτης που επιλέχθηκε για τη διαδικασία εκχύλισης ήταν ο οξικός αιθυλεστέρας. Η ανάλυση των ADs πραγματοποιήθηκε σε αέριο χρωματογράφο Agilent Technologies 7890A με MS 5975C inrXL, EI / CI MSD, μετά την εκχύλιση υγρού-υγρού.

Η μέθοδος εφαρμόστηκε σε συνολικά εννέα νεκροτομικά δείγματα ολικού αίματος και οι συγκεντρώσεις τους προσδιορίστηκαν με επιτυχία. Οι συντελεστές συσχέτισης των καμπυλών βαθμονόμησης για τα δύο φάρμακα στο ολικό αίμα κυμάνθηκαν από 0,9991-0,9996. Ο συνολικός χρόνος ανάλυσης ήταν τα 11 λεπτά, με τους AD να εκλούνται σε χρόνους συγκράτησης τα 5,59 λεπτά για τη σερτραλίνη και τα 5,67 λεπτά για τη σιταλοπράμη. Δεν επιτεύχθηκε χρωματογραφικός διαχωρισμός των δύο ενώσεων, ωστόσο, αυτό δεν είναι απαραίτητο, καθώς η φασματομετρική ανίχνευση μάζας με διαφορετικά ιόντα θραύσματος είναι επαρκής για μια σαφή ανίχνευση και εκλεκτική ποσοτικοποίηση. Ο χαμηλότερος βαθμονομητής επιλέχθηκε ως όριο ποσοτικού προσδιορισμού και ήταν τα 50ng/mL και για τις δύο ενώσεις, τιμή που βρίσκεται κοντά στο χαμηλότερο εύρος της θεραπευτικής συγκέντρωσης. Δεν ήταν δυνατή η πλήρης επικύρωση της μεθόδου σύμφωνα με τις διεθνείς οδηγίες λόγω περιορισμών που προκλήθηκαν από την πανδημία COVID-19.

ABSTRACT

In a modern and state-of-the-art Forensic Toxicology laboratory, a rapid and accurate method for detection and quantification of drugs and illegal psychotropic substances is always necessary and desirable in order to have immediate and reliable results of toxicological interest.

This dissertation optimized an already existing method in GC-MS for the detection and quantification of two antidepressant drugs, sertraline and citalopram, in the category of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs), in whole blood of post-mortem samples related to drowning at sea. The method described is simple and fast for the determination of two, usually co-administered antidepressants - sertraline and citalopram - in whole blood.

The sample preparation method included liquid-liquid extraction (LLE) with ethyl acetate of the analytes and determination of drug concentrations by gas chromatography coupled to mass spectrometry, using a stable-isotope labelled internal standard (-Cocaine-D₃) which was found to be suitable for clinical and forensic analysis.

The ADs were analyzed in selected-ion monitoring mode with electron impact ionization with a GC-MS (7890A GC and an MSD 5975C inrXL, Agilent Technologies) after liquid-liquid extraction from blood.

The method was applied to post-mortem blood samples of forensic cases and their concentrations were successfully determined. The correlation coefficients of the calibration curves for the two drugs in whole blood ranged from 0.9991-0.9996. Overall-run time of analysis was 11 min, with the ADs eluting at retention times of 5.59 min. for sertraline and 5.67 min. for citalopram. A chromatographic base-line separation of the two compounds was not achieved, however, this is not necessary, since mass spectrometric detection with different compound-typical fragment ions is sufficient for unequivocal identification and selective quantification. The lowest calibrator was selected as limit of quantification and was 50ng/mL for both of the drugs- which is near the lowest range of the therapeutic concentration. A full method-validation according to international guidelines was not possible due to restrictions caused by the COVID-19 pandemic.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	iv
ΛΙΣΤΑ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ	v
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	vi
ABSTRACT	vii
A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1
1. ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ	2
1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	2
1.2 ΙΑΤΡΟΔΙΚΑΣΤΙΚΗ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ	3
1.3 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΟΔΙΚΑΣΤΙΚΗΣ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ	3
1.4 ΧΡΗΣΗ ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΟΔΙΚΑΣΤΙΚΗ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ	4
2. ΑΝΤΙΚΑΤΑΘΛΙΠΤΙΚΑ	5
2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	5
2.2 ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΕΠΑΝΑΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΣΕΡΟΤΟΝΙΝΗΣ(SSRIs): ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ	6
2.3 ΣΕΡΤΡΑΛΙΝΗ.....	9
2.3.1 ΓΕΝΙΚΑ.....	9
2.3.2 ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ	10
2.3.3 ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ	11
2.3.4 ΠΑΡΕΝΕΡΓΕΙΕΣ.....	12
2.4 ΣΙΤΑΛΟΠΡΑΜΗ	13
2.4.1 ΓΕΝΙΚΑ.....	13
2.4.2 ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ	14
2.4.3 ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ	14
2.4.4 ΠΑΡΕΝΕΡΓΕΙΕΣ.....	16
2.5 ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΚΙΝΔΥΝΟΣ ΘΑΝΑΤΟΥ	16
2.6 ΜΕΘΑΝΑΤΙΑ ΑΝΑΚΑΤΑΝΟΜΗ ΣΕΡΤΡΑΛΙΝΗΣ ΚΑΙ ΣΙΤΑΛΟΠΡΑΜΗΣ.....	17
3. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ	18
3.1 ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	18
3.2 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΥΓΡΟΥ-ΥΓΡΟΥ (LLE).....	19
3.3 ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΚΑΙ ΣΗΜΑΣΙΑ	20
4. ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ	21
4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	21
4.2 ΣΥΣΤΗΜΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ	25
4.3 ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΗ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΜΑΖΩΝ	26
4.4 ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ (Mass Spectrometry, MS).....	28
4.4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	28
4.4.2 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ	29
4.4.3 ΣΥΣΤΗΜΑ ΕΙΣΑΓΩΓΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	30
4.4.4 ΠΗΓΗ ΙΟΝΤΩΝ.....	30
4.4.4.1 ΙΟΝΤΙΣΜΟΣ ΜΕ ΗΛΕΤΡΟΝΙΑ(ELECTRON IMPACT)	31
4.4.5 ΑΝΑΛΥΤΗΣ ΜΑΖΩΝ	32
4.4.5.1 ΤΕΤΡΑΠΟΛΙΚΟΣ ΑΝΑΛΥΤΗΣ	33
4.5 ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ	35
4.5.1 ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΗΣ(Electron Multiplier)	35
4.6 ΣΥΣΤΗΜΑ ΚΕΝΟΥ	36

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ	37
B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	39
6. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ.....	40
6.1 ΟΡΓΑΝΑ ΚΑΙ ΛΟΙΠΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ.....	40
6.2 ΠΡΟΤΥΠΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ, ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΛΥΤΕΣ.....	41
6.3 ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ	41
7. ΜΕΘΟΔΟΣ	42
7.1 ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ GC/MS	42
7.1.1 ΣΥΣΤΗΜΑ GC/MS.....	42
7.1.2 ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΟΡΓΑΝΟΥ.....	43
7.2 ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	45
7.3 ΧΡΟΝΟΙ ΣΥΓΚΡΑΤΗΣΗΣ.....	45
7.4 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑΤΑ ΕΝΩΣΕΩΝ	46
7.5 ΦΑΣΜΑΤΑ ΜΑΖΩΝ	47
8. ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ	49
8.1 ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗΣ	49
8.1.1 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΤΥΠΗΣ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ.....	50
8.1.2 ΟΡΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ (LOD) ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ (LOQ).....	53
9. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΣΕ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ	54
10. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	63
11. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	65

Α. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η Τοξικολογία είναι η μελέτη των χημικών ουσιών στα βιολογικά συστήματα. Η επιστήμη γεννήθηκε προκειμένου να ασχοληθεί με την ασφαλή χρήση τους, τα οποία μπορούν σε αντίθετη περίπτωση να είναι πιο επίπονα και επικίνδυνα από οποιαδήποτε ασθένεια[1]. Ο παραδοσιακός ορισμός της τοξικολογίας είναι «η επιστήμη των δηλητηρίων». Ένας πιο περιγραφικός ορισμός είναι «η μελέτη των αρνητικών επιπτώσεων χημικών, βιολογικών ή φυσικών παραγόντων μέσα σε ζωντανούς οργανισμούς». Αυτές οι ανεπιθύμητες ενέργειες μπορεί να εμφανιστούν με πολλές μορφές, που κυμαίνονται από λεπτές αλλαγές που δεν παρατηρούνται μέχρι μήνες ή χρόνια αργότερα, έως τον ακαριαίο θάνατο [2].

Μπορεί να χωριστεί στις παρακάτω κατηγορίες:

- Ιατροδικαστική Τοξικολογία
- Κλινική Τοξικολογία
- Διατροφική Τοξικολογία
- Αναπαραγωγική Τοξικολογία
- Τοξικολογία της ανάπτυξης
- Κτηνιατρική Τοξικολογία
- Περιβαλλοντική Τοξικολογία
- Αναλυτική Τοξικολογία
- Θαλάσσια Τοξικολογία
- Οικοτοξικολογία
- Τοξικολογία Τροφίμων
- Επαγγελματική Τοξικολογία
- Γενετική Τοξικολογία
- Βιομηχανική Τοξικολογία
- Κανονιστική Τοξικολογία [1]

1.2 ΙΑΤΡΟΔΙΚΑΣΤΙΚΗ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ

Η Τοξικολογία στο πλαίσιο της εγκληματολογίας αφορά την ανάλυση βιολογικών δειγμάτων (σωματικά υγρά και ιστούς) για να προσδιορίσει ποιοτικά, αλλά συνήθως και ποσοτικά τη συγκέντρωση φαρμάκων και δηλητηρίων. Τα αποτελέσματα αυτής της ανάλυσης πρέπει να συσχετίζονται με τις περιστάσεις κάθε εγκληματολογικής υπόθεσης που βρίσκεται υπό μελέτη, προκειμένου να προσδιορίσουν κατά πόσο κάποια από τις εξεταζόμενες ουσίες συνέβαλε ή έστω έπαιξε κάποιο ρόλο στο ολοκληρωτικό αποτέλεσμα. Αυτή η συνάρτηση συσχέτισης ονομάζεται συνήθως ερμηνεία αποτελέσματος [3]. Ασχολείται κυρίως με την ανίχνευση ναρκωτικών και άλλων χημικών ουσιών σε καταστάσεις που αφορούν νομικές διαδικασίες. Αυτός ο κλάδος καλείται ιατροδικαστική τοξικολογία: ωστόσο, η αναλυτική τοξικολογία εφαρμόζεται συχνά σε αυτή την υποειδικότητα της τοξικολογίας. Ένας ιατροδικαστικός τοξικολόγος ασχολείται με την ανίχνευση ναρκωτικών ή δηλητηρίων σε δείγματα και είναι ικανός να υποστηρίξει τα αποτελέσματα του στο δικαστήριο. Ένας εγκληματολογικός τοξικολόγος είναι επίσης σε θέση να βοηθήσει νομικές διαδικασίες στην ερμηνεία της σημασίας των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται [4].

1.3 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΟΔΙΚΑΣΤΙΚΗΣ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ

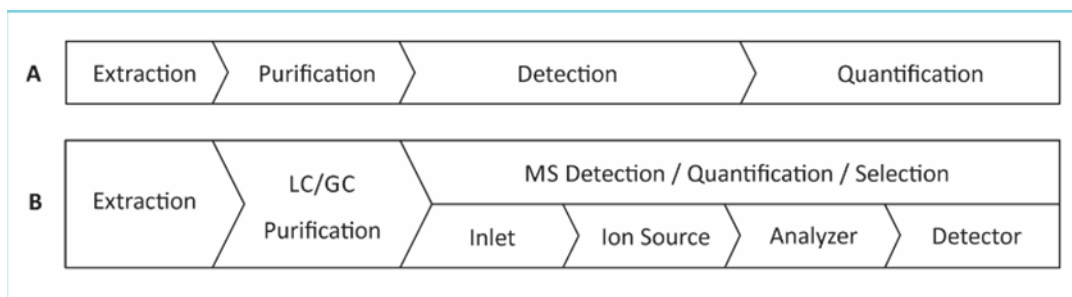
Η ιατροδικαστική τοξικολογία έχει μεγάλο φάσμα εφαρμογών. Περιλαμβάνει την εξέταση και αποτίμηση μιας ναρκωτικής ουσίας ή ενός φαρμάκου σε βιολογικά υλικά (για παράδειγμα αίμα, ούρα, περιεχόμενο στομάχου, σπλάχνα και τρίχες) ανθρώπων αλλά και ζώων. Γίνεται εξέταση άγνωστης σκόνης, χαπιών, συριγγίων, δισκίων, φαρμακευτικών καψουλών και φιαλιδίων έτσι ώστε να προσδιοριστεί η χημική τους ταυτότητα. Ασχολείται επίσης, με την ταυτοποίηση φυσικών αλκαλοειδών όπως είναι η νικοτίνη ή η στρυχνίνη στους ιστούς νεκροτομικών δειγμάτων. Καθορίζει την αιτία θανάτου από εξωτερικούς κινδύνους δηλητηρίασης. Βοηθά στον προσδιορισμό της ποσότητας αλκοόλ στο αίμα και σε δείγματα ούρων σε περιπτώσεις οδήγησης υπό την επήρεια αυτού. Ακόμη, ασχολείται με την ανίχνευση δηλητηρίων στα τρόφιμα και στο πόσιμο νερό. Περιγράφει την αιτία και την επίδραση ενός δηλητηρίου σε διαφορετικά μέρη του σώματος, όταν αυτό λαμβάνεται μέσω του δέρματος, μέσω του στόματος ή είναι ενέσιμο. Επιπλέον, μπορεί να προσδιορίσει την επιβλαβή επίδραση μίας συγκεκριμένης ουσίας καθώς και το πως αυτή θα καταλήξει στο σώμα (μεταβολισμός) [5]. Ο τοξικολογικός έλεγχος είναι επίσης σημαντικός σε θύματα ενός

εγκλήματος, ή σε πρόσωπα που έχουν συλληφθεί για ένα έγκλημα. Φάρμακα μπορεί να έχουν δοθεί από τον επιτιθέμενο για να μειώσουν τη συνείδηση του θύματος, όπως σε περιπτώσεις βιασμού. Σε αυτά τα φάρμακα περιλαμβάνονται οι βενζοδιαζεπίνες (π.χ., Rohypnol, Valium, Ativan, κλπ) και το γάμμα-υδροξυβουτυρικό (GHB). Η τοξικολογία διερευνά επίσης εάν οποιοδήποτε φάρμακο που είχε χρησιμοποιηθεί από το θύμα μπορεί να επηρεάσει τη συνείδηση ή τη συμπεριφορά. Οι κατηγορούμενοι που συνελήφθησαν λίγο μετά τη διάπραξη βίαιων εγκλημάτων μπορεί να είναι υπό την επήρεια ναρκωτικών[4]. Τέλος, μπορεί να προσδιορίσει την αιτία θανάτου, εξετάζοντας τη μεταθανάτια χρώση και οσμή του σώματος, το χρώμα των νυχιών και των τριχών της κεφαλής, αλλά και από τυχόν σημάδια εμφανή στο δέρμα [5].

1.4 ΧΡΗΣΗ ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΟΔΙΚΑΣΤΙΚΗ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ

Τα εργαστήρια Ιατροδικαστικής Τοξικολογίας χρησιμοποιούν διάφορες πειραματικές διαδικασίες για να απομονώσουν, να ανιχνεύσουν και να προσδιορίσουν ένα ύποπτο δείγμα. Η μέθοδος ποικίλλει ανάλογα με τον τύπο του δείγματος καθώς και την διαθέσιμη ποσότητα αυτού. Στην τοξικολογία, το γενικό αναλυτικό σχήμα για την αξιολόγηση των ύποπτων ουσιών σε διάφορα υποστρώματα περιλαμβάνει 1) εκχύλιση 2) καθαρισμό 3) ανίχνευση και 4) ποσοτικοποίηση (Σχέδιο Α) [6].

Καθώς οι τεχνολογίες MS, GC και LC εξακολούθησαν να αναπτύσσονται στο δεύτερο μισό του 20ού αιώνα, οι πιο εξελιγμένες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται σε σύγχρονα εργαστήρια τοξικολογίας άρχισαν να εμφανίζονται ως συνδυασμοί τρόπων διαχωρισμού και ανίχνευσης, δημιουργώντας νέες ισχυρές αναλυτικές εφαρμογές. Σε αυτές περιλαμβάνονται: υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC), GC-MS, LC-MS, MS / MS και MSn. Αυτές οι νέες τεχνολογίες χρησιμοποιήθηκαν αρχικά από ερευνητικά εργαστήρια και αργότερα υιοθετήθηκαν και σε κλινικά εργαστήρια. Μέχρι σήμερα, πολλές από τις σύγχρονες αναλυτικές εφαρμογές όπως του GC-MS και του LC-MS εξακολουθούν να ενσωματώνουν το ίδιο αναλυτικό σχήμα που χρησιμοποιήθηκε από τα πρώτα εργαστήρια τοξικολογίας. Θεωρείται ότι είναι πιο ευέλικτα, συνδυάζοντας πολλαπλά βήματα στη διαδικασία ανάλυσης, με δυνατότητες αυτοματισμού (Σχέδιο 1, Β) [7,8].



A) Τα βήματα που ακολουθούνται για την αξιολόγηση ύποπτων ουσιών

B) Συγχώνευση βημάτων GC-MS και LC-MS στην αναλυτική διαδικασία για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό τοξικών ενώσεων

Μέχρι και σήμερα, το MS και οι συζευγμένες εφαρμογές του (GC / LC -MS) έχουν αναδειχθεί ως ένα ισχυρό αναλυτικό εργαλείο για εφαρμογές στην τοξικολογία. Το GC-MS χρησιμοποιείται γενικά για την ανάλυση πτητικών και θερμοσταθερών ενώσεων, ενώ το LC-MS για ανάλυση μη πτητικών και θερμικά ασταθών ενώσεων [7]-[11].

2. ΑΝΤΙΚΑΤΑΘΛΙΠΤΙΚΑ

2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία ψυχικών διαταραχών, οι οποίες συνήθως ‘συνοδεύονται’ από κατάθλιψη ονομάζονται αντικαταθλιπτικά [12]. Αυτός ο ιστορικός ορισμός σήμερα αντικατοπτρίζει μόνο μία πλευρά του μεγάλου φάσματος της θεραπευτικής τους ικανότητας, αλλά και των εφαρμογών τους. Πάνω από σαράντα χρόνια κλινικής εμπειρίας καθώς και επιστημονικής έρευνας που αφορούν τα αντικαταθλιπτικά, έδειξαν ότι υπάρχουν διαφορετικές ενδείξεις για την αποτελεσματικότητά τους, όσον αφορά την ανακούφιση των συμπτωμάτων της διαταραχής γενικευμένου άγχους αλλά και την ιδεοψυχαναγκαστική διαταραχή (OCD). Φυσικά χρησιμοποιούνται και για τη θεραπεία και άλλων ιατρικών καταστάσεων, όπως είναι η διαταραχή κοινωνικού άγχους (κοινωνική φοβία ή αγοραφοβία), κρίσεις πανικού, η βουλιμία, το μετατραυματικό στρες (PTSD), η διπολική διαταραχή (μανιοκατάθλιψη), η νυχτερινή ενούρηση στα παιδιά καθώς και η προεμμηνορυσιακή δυσφορική διαταραχή [13]. Με λίγα λόγια, τα αντικαταθλιπτικά είναι ικανά να διορθώσουν την ανισορροπία των νευροδιαβιβαστών στον εγκέφαλο, κυρίως της σεροτονίνης και της ντοπαμίνης, ουσίες που θεωρούνται υπεύθυνες για τις αλλαγές της διάθεσης και της συμπεριφοράς [14].

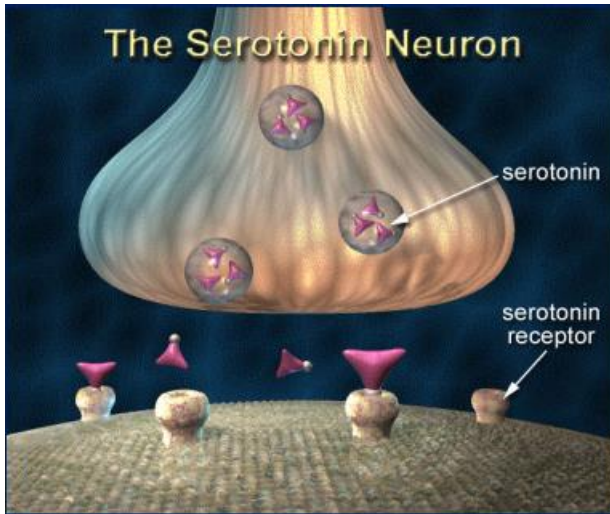
Τα αντικαταθλιπτικά χωρίζονται στις εξής κατηγορίες:

1. **Τρικυκλικά Αντικαταθλιπτικά (TCAs)** (ιμιπραμίνη, τριμιπραμίνη, αμιτριπτυλίνη, δοξεπίνη, δοθειεπίνη, δεσιπραμίνη, πρωτριπτυλίνη, νοτριπτυλίνη, αμοξαπίνη, μαπροτιλίνη, μιρταζαπίνη)
2. **Αναστολείς της Μονοαμινοξειδάσης (MAOIs)** (φαινελζίνη, ισοκαρβοξαζίδη, τρανυλκυπρομίνη, μοκλοβεμίδη)
3. **Οι επιλεκτικοί αναστολείς της επαναπρόσληψης της σεροτονίνης (SSRIs)** (φλουοξετίνη, σιταλοπράμη, εσκιταλοπράμη, φλουβοξαμίνη, παροξετίνη, σερτραλίνη)
4. **Οι επιλεκτικοί αναστολείς της επαναπρόσληψης της σεροτονίνης και της νοραδρεναλίνης (SNRIs)** (δεσιπραμίνη, ρεβοξετίνη, μαπροτιλίνη, βιλοξαζίνη, ατομοξετίνη)
5. **Διπλοί αναστολείς πρόσληψης SSRI / SNRI**, (ντουλοξετίνη, βενλαφαξίνη, δεσβενλαφαξίνη μιλνακιπράνη,σιβουτραμίνη)
6. **Αναστολείς διπλής πρόσληψης SNRI / SDARI** (βουπροπιόνη)
7. **Νοραδρεναλίνη και ειδικά σεροτονινεργικά αντικαταθλιπτικά (NaSSAs)** (μιανσερίνη, μιρταζαπίνη)
8. **Αναστολείς επαναπρόσληψης νορεπινεφρίνης και ντοπαμίνης (NDRI)** (βουπροπιόνη)
9. **Τροποποιητές και διεγέρτες των υποδοχέων σεροτονίνης (SMS)** (βορτιοξετίνη)
10. **Αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης και ανταγωνιστές των 5-HT₂ υποδοχέων (SARI)** (τραζοδόνη, νεφαζοδόνη) [15,16].

2.2 ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΕΠΑΝΑΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΣΕΡΟΤΟΝΙΝΗΣ(SSRIs): ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ

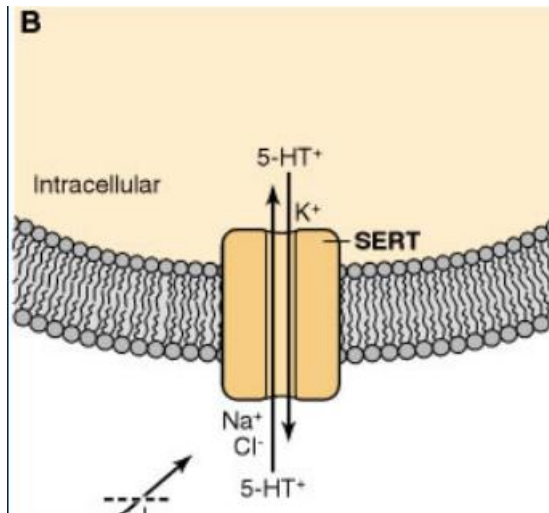
Πάνω από το 90% των αντικαταθλιπτικών (για παράδειγμα: SSRIs, SNRIs, SARIs και NaSSAs) που κυκλοφορούν στην αγορά στοχεύουν στον μεταφορέα της σεροτονίνης , SERT [17]. Έρευνες έχουν δείξει ότι στις περισσότερες χώρες, οι SSRIs, είναι η πιο κοινή κατηγορία συνταγογραφούμενων αντικαταθλιπτικών [18]-[20] και επίσης προσφέρουν

πλεονεκτήματα όσον αφορά την ανεκτικότητα και την αποτελεσματικότητα έναντι των τρικυκλικών αντικαταθλιπτικών [21].



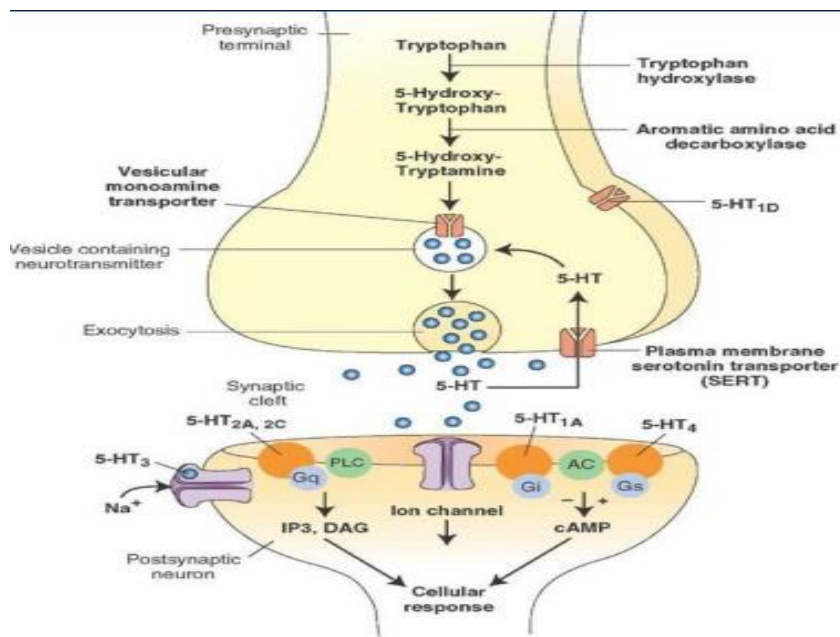
Εικόνα 2.2.1 Νευρώνες σεροτονίνης

Ο SERT(ή 5HTT) είναι μια πρωτεΐνη με δώδεκα διαμεμβρανικές περιοχές και είναι υπεύθυνη για την μεταφορά της σεροτονίνης από την συναπτική σχισμή στο νεύρο στόχο. Επί πρόσδεσης μορίου σεροτονίνης στο μεταφορέα προκαλείται δομική τροποποίηση του με αποτέλεσμα την είσοδο του, εντός του νευρώνα της σεροτονίνης μαζί με ιόντα νατρίου και χλωρίου. Η πρόσδεση καλίου από την εσωτερική πλευρά του κυττάρου στο μεταφορέα οδηγεί στο μετασχηματισμό της πρωτεΐνης στην αρχική της δομή με παράλληλη απελευθέρωση της σεροτονίνης στο εσωτερικό του νευρώνα. Αυτή η πρωτεΐνη-μεταφορέας δρα ως ένας ρυθμιστής των επιπέδων σεροτονίνης καθώς μεταλλάξεις στο γονίδιο 5HTT έχουν δειχθεί να διαταράσσουν την πρόσληψη σεροτονίνης [22].



Εικόνα 2.2.2 Είσοδος σεροτονίνης στο εσωτερικό του νευρώνα

Ο SERT παίζει κρίσιμο ρόλο όσον αφορά τα κεντρικά επίπεδα σεροτονίνης, μεσολαβώντας για την επαναπρόσληψη σεροτονίνης από τη συναπτική σχισμή στον προσυναπτικό νευρώνα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, οι SSRI να δρουν ως αναστολείς του προσυναπτικού μεταφορέα SERT, αυξάνοντας τα επίπεδα σεροτονίνης στη σύναψη αποκαθιστώντας έτσι την ισορροπία των επιπέδων μονοαμίνης στον εγκέφαλο [23]. Ωστόσο, δεδομένου ότι οι SSRI απαιτούν 2-6 εβδομάδες για να έχουν κλινικό αποτέλεσμα, υποδηλώνεται ότι υπάρχει επίσης μια ακόμη προσαρμογή στη λειτουργία αυτών των φαρμάκων. Αυτή η καθυστέρηση στη θεραπευτική τους δράση πιστεύεται ότι οφείλεται στον χρόνο που απαιτείται για την αποτράχυνση του υποδοχέα σεροτονίνης 1A (5-HT_{1A}) στον εγκέφαλο. Ο υποδοχέας 5-HT_{1A} βρίσκεται στο σωματοδενδριτικό διαμέρισμα των σεροτονινεργικών νευρώνων που βρίσκονται στον πυρήνα ραφής (Raph Nuclei). Η ενεργοποίηση αυτών των υποδοχέων μειώνει τη σύνθεση της σεροτονίνης στα σημεία προβολής. Έπειτα από μακροχρόνια έκθεση σε SSRI, ο 5-HT_{1A} γίνεται αρκετά ευαίσθητος, αυξάνοντας την σεροτονινεργική νευροδιαβίβαση μέσω εσωτερικοποίησης ή ενδοκυττάρωσης αυτών των υποδοχέων [24]. Οι SSRI μεταβολίζονται από τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450. Στο μεταβολισμό των περισσότερων συμμετέχει το ένζυμο CYP2D6. Οι SSRI εμφανίζουν ανασταλτική δράση του ενζύμου αυτού και άλλων ενζύμων του CYP παρεμβαίνοντας έτσι στο μεταβολισμό διαφόρων άλλων φαρμάκων (Βαρφαρίνη, Τρικυκλικά κ.α.).



Εικόνα 2.2.3 Βήματα που εμπλέκονται στη σύνθεση και την απελευθέρωση της σεροτονίνης. Δείχνεται επίσης η κατανομή μερικών υποδοχέων 5-HT σε διαφορετικά συστατικά της σεροτονεργικής σύναψης

2.3 ΣΕΡΤΡΑΛΙΝΗ

2.3.1 ΓΕΝΙΚΑ

Η ιατρική χρήση της σερτραλίνης για τη θεραπεία της κατάθλιψης, εγκρίθηκε από την Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) στις Ηνωμένες Πολιτείες το 1991, με βάση τη σύσταση της Συμβουλευτικής Επιτροπής Ψυχοφαρμακολογικών Φαρμάκων και αρχικά πωλήθηκε από την Pfizer, ενώ είχε ήδη διατεθεί στο Ηνωμένο Βασίλειο τον προηγούμενο χρόνο [25]. Η σερτραλίνη, που πωλείται με την επωνυμία Zoloft®, στην Ελλάδα επίσης ως Epilyd, Zortal ή Zolotrin, είναι τρίτης γενιάς αντικαταθλιπτικό της κατηγορίας του εκλεκτικού αναστολέα επαναπρόσληψης σεροτονίνης (SSRI). Το δίπλωμα ευρεσιτεχνίας των ΗΠΑ για το Zoloft έληξε το 2006 και η σερτραλίνη είναι πλέον διαθέσιμη ως γενόσημο φάρμακο και διατίθεται στην αγορά με πολλές επωνυμίες παγκοσμίως [26].

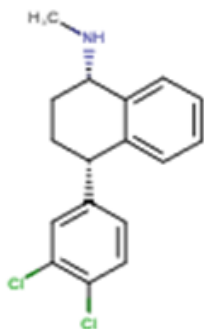


Εικόνα 2.3.1 Μορφές ταμπλετών σετραλίνης

Η σετραλίνη είναι ένας ισχυρός αναστολέας της επαναπρόσληψης της σεροτονίνης στο κεντρικό νευρικό σύστημα και χρησιμοποιείται ευρέως κλινικά όχι μόνο για τη θεραπεία της κατάθλιψης, της ψυχαναγκαστικής διαταραχής και της διαταραχής πανικού αλλά και για την αντιμετώπιση της βουλιμίας, της προεμμηνορροϊκής δυσφορικής διαταραχής και τέλος της διαταραχής μετατραυματικού στρες [27,28]. Η σετραλίνη λαμβάνεται από το στόμα και βρίσκεται στην αγορά με τη μορφή ταμπλετών από 20 έως 100mg/mL.

2.3.2 ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ

Η σετραλίνη είναι ο δεύτερος ισχυρότερος αναστολέας της επαναπρόσληψης της σεροτονίνης (5-HT) και ο δεύτερος πιο εκλεκτικός αποκλειστής της σεροτονίνης έναντι της πρόσληψης νοραδρεναλίνης. Είναι το μόνο SSRI που συνδέεται με τους μεταφορείς ντοπαμίνης. Έχει πολύ ασθενή δράση στην επαναπρόσληψη της νορεπινεφρίνης και της ντοπαμίνης από τους νευρώνες [29].



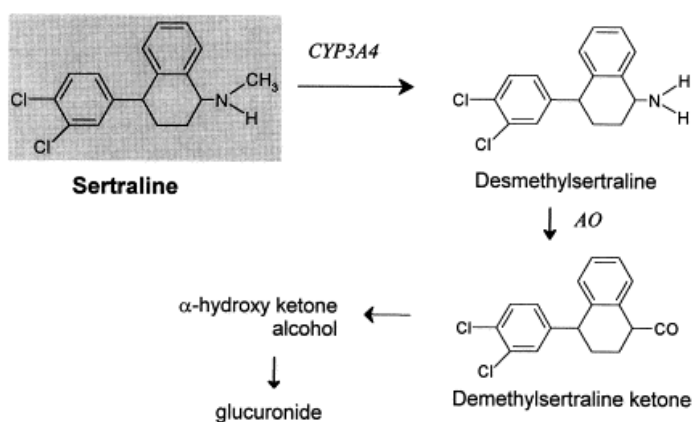
Εικόνα 2.3.2 Μοριακή δομή Σετραλίνης

Η σερτραλίνη απορροφάται αργά όταν λαμβάνεται από το στόμα, επιτυγχάνοντας τη μέγιστη συγκέντρωσή της στο πλάσμα 6 έως 8 ώρες μετά την κατάποση. Στο αίμα, δεσμεύεται κατά περίπου 98,5% στις πρωτεΐνες του πλάσματος και έχει ημιζωή 22 έως 36 ώρες. Στοχεύει στον εξαρτώμενο από το νάτριο μεταφορέα σεροτονίνης και αναστέλλει την επαναπρόσληψη της σεροτονίνης από τους νευρώνες. Αυτό αυξάνει τη συγκέντρωση σεροτονίνης στη συναπτική σχισμή, πράγμα που σημαίνει ότι υπάρχει περισσότερη διαθέσιμη για να δράσει στους μετασυναπτικούς νευρώνες με αποτέλεσμα την αντικαταθλιπτική δράση. Η σερτραλίνη έχει μικρή αντιχολινεργική δράση και έχει λιγότερες ηρεμιστικές και καρδιαγγειακές επιδράσεις από ότι τα τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά φάρμακα [30,31].

2.3.3 ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ

Παρόλο που ο ηπατικός μεταβολισμός της είναι η πιο σημαντική οδός απομάκρυνσης της σερτραλίνης, με μόνο το 0,2% της από του στόματος δόσης να απεκκρίνεται αμετάβλητο στα ούρα, οι πληροφορίες σχετικά με το μεταβολισμό της είναι σχετικά περιορισμένες [30].

Ο κύριος δραστικός μεταβολίτης της είναι η νορσερτραλίνη (N-δισμεθυλσετραλίνη) η οποία είναι σημαντικά λιγότερο δραστική βιολογικά από τη μητρική του ένωση καθώς είναι περίπου 50 φορές ασθενέστερη ως αναστολέας του μεταφορέα σεροτονίνης από ότι η σερτραλίνη και η κλινική της επίδραση είναι αμελητέα.



Εικόνα. 2.3.3 Μεταβολισμός σερτραλίνης

Η σερτραλίνη μεταβολίζεται σε μεγάλο βαθμό στο ήπαρ (**Εικόνα. 2.3.3**). Υποβάλλεται σε N-απομεθυλίωση για να σχηματίσει N-δισμεθυλσετραλίνη, η οποία όπως προαναφέρθηκε είναι πολύ λιγότερο ισχυρή στη φαρμακολογική της δράση από τη σερτραλίνη. Εκτός από τη N-απομεθυλίωση, ο μεταβολισμός της σερτραλίνης περιλαμβάνει N-υδροξυλίωση, οξειδωτική αποαμίνωση και τέλος γλυκουρονιδίωση. Σύμφωνα με *in vitro* μελέτες, η σερτραλίνη μεταβολίζεται από πολλαπλές ισομορφές του κυτοχρώματος 450, οι οποίες είναι: CYP2D6, CYP2C9, CYP2B6, CYP2C19 και CYP3A4 [32]. Η N-απομεθυλίωση συσχετίζεται με τη δραστηριότητα του CYP3A4, υποδηλώνοντας ότι εμπλέκεται αυτό το ένζυμο. Δεν παρατηρούνται διαφορές στη φαρμακοκινητική της σερτραλίνης μεταξύ ατόμων με υψηλή και χαμηλή δραστηριότητα του CYP2D6. Ωστόσο, όσοι έχουν μειωμένη δραστηριότητα του CYP2C19 έχουν 1,5 φορές υψηλότερα επίπεδα σερτραλίνης από τους φυσιολογικούς. Τα δεδομένα *in vitro* δείχνουν, επίσης, ότι η αναστολή του CYP2B6 θα πρέπει να έχει ακόμη μεγαλύτερη επίδραση από την αναστολή του CYP2C19, ενώ η συμβολή των CYP2C9 και CYP3A4 στον μεταβολισμό της σερτραλίνης θα είναι μικρή. Αυτά τα συμπεράσματα δεν έχουν επαληθευτεί σε μελέτες σε ανθρώπους. Η σερτραλίνη μπορεί να αποαμινοωθεί *in vitro* από μονοαμινοξειδάσες. Ο μεταβολισμός της σερτραλίνης καταλύεται κυρίως από τα CYP3A4 και CYP2B6, με ίσως κάποια δραστηριότητα να αντιστοιχεί στα CYP2C19 και στα CYP2D6 [31].

2.3.4 ΠΑΡΕΝΕΡΓΕΙΕΣ

Σε σύγκριση με άλλα SSRI, η σερτραλίνη τείνει να σχετίζεται με υψηλότερο ποσοστό ψυχιατρικών παρενεργειών και διάρροιας. Τείνει να είναι πιο διεγερτικό (δηλαδή, σχετίζεται με υψηλότερο ποσοστό άγχους, διέγερσης, αϋπνίας κ.λπ.) από άλλα SSRI. Όπως και άλλα SSRI, η σερτραλίνη σχετίζεται με σεξουαλικές παρενέργειες, συμπεριλαμβανομένης της σεξουαλικής διέγερσης και της δυσκολίας επίτευξης οργασμού. Μπορεί επίσης να εμφανιστούν οι εξής παρενέργειες όπως είναι η ξηροστομία, πονοκέφαλοι, ζαλάδες, τρέμουλο, ναυτία, κόπωση καθώς και ψυχωτικά επεισόδια. Έχει παρατηρηθεί επίσης και πρόκληση του συνδρόμου της σεροτονίνης όταν η σερτραλίνη λαμβάνεται μόνη, όπως και αυτοκτονικές τάσεις. Ανεπιθύμητες ενέργειες σχετικές με τη διακοπή της θεραπείας (αντιδράσεις απόσυρσης) είναι συνήθεις, ιδιαίτερα εάν η θεραπεία σταματάει απότομα. Τα συμπτώματα μπορεί να περιλαμβάνουν συμπτώματα που μοιάζουν με γρίπη. Για αυτό το λόγο πρέπει να γίνεται σταδιακή διακοπή της [33].

2.4 ΣΙΤΑΛΟΠΡΑΜΗ

2.4.1 ΓΕΝΙΚΑ

Η σιταλοπράμη συντέθηκε για πρώτη φορά το 1972, από τον χημικό Κλάους Μπέγκεσε και την ερευνητική του ομάδα στην εταιρία Lundbeck και κυκλοφόρησε αρχικά στη Δανία. Το 1998 κυκλοφόρησε και για πρώτη φορά στις Η.Π.Α., έπειτα από έγκριση για ιατρική χρήση από τον FDA. Η σιταλοπράμη, που πωλείται με την επωνυμία Celexa, στην Ελλάδα επίσης ως Varom ή Cinapren, είναι ένα δικυκλικό παράγωγο του φθαλενίου. Το δίπλωμα ευρεσιτεχνίας έληξε το 2003, οπότε πλέον πωλείται ως γενόσημο σκεύασμα από διαφορετικές φαρμακευτικές εταιρίες [34-35].

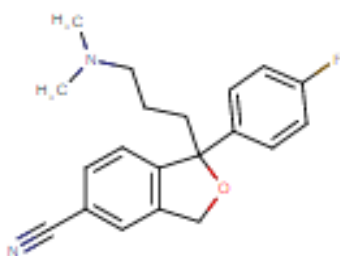


Εικόνα 2.4.1 Μορφές ταμπλετών σιταλοπράμης

Η σιταλοπράμη ανήκει σε μια κατηγορία αντικαταθλιπτικών γνωστών ως εκλεκτικοί αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης (SSRIs) και χρησιμοποιείται ευρέως για τη θεραπεία των συμπτωμάτων της κατάθλιψης. Η χημική της δομή δεν σχετίζεται με εκείνη των υπόλοιπων SSRI ή τρικυκλικών, τετρακυκλικών ή άλλων συνταγογραφούμενων αντικαταθλιπτικών. Εκτός της αντιμετώπισης της μείζονος καταθλιπτικής διαταραχής, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ακόμη και για τη θεραπεία της σεξουαλικής δυσλειτουργίας, για αλλαγές στη συμπεριφορά μετά το εγκεφαλικό επεισόδιο, για την ιδεοψυχαναγκαστική διαταραχή (OCD) στα παιδιά, τη διαταραχή πανικού, της κοινωνικής φοβίας, της προεμμηνορροϊκής δυσφορικής διαταραχής, της σωματικής δυσμορφικής διαταραχής ακόμα και για μείωση των συμπτωμάτων διαβητικής νευροπάθειας [36]. Λαμβάνεται από το στόμα και τυπικά είναι διαθέσιμο των υδροβρωμιούχο άλας αυτής, σε μορφή ταμπλετών των 10 mg έως 40 mg [33].

2.4.2 ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ

Η σιταλοπράμη (citalopram) είναι δικυκλικό παράγωγο του φθαλενίου με αντικαταθλιπτική δράση και έχει χαρακτηριστεί ως ρακεμικό μίγμα. Η σιταλοπράμη είναι πολύ εκλεκτικός αναστολέας επαναπρόσληψης της σεροτονίνης (SSRI) και έχει μακράν την υψηλότερη επιλεκτικότητα για την αναστολή της επαναπρόσληψης σεροτονίνης έναντι της επαναπρόσληψης νοραδρεναλίνης (NA). Η σιταλοπράμη δεν επηρεάζει την επαναπρόσληψη νορεπνερίνης, ντοπαμίνης ή του GABA (γ-αμινο-βουτυρικού οξέος).



Εικόνα 2.4.2 Μοριακή δομή Σιταλοπράμης

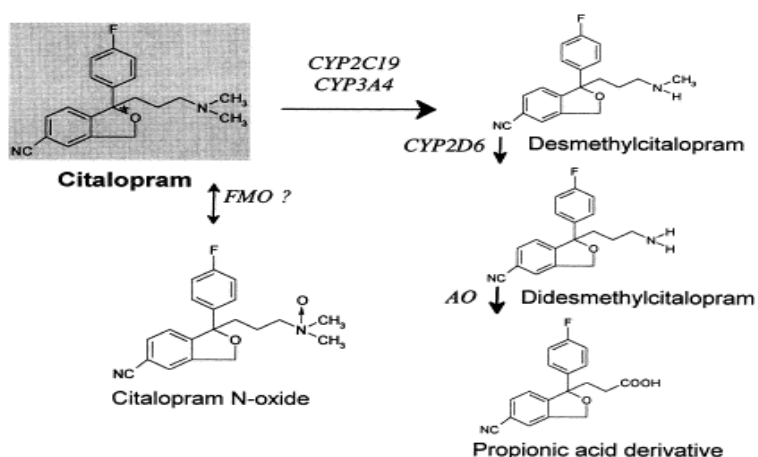
Η σιταλοπράμη απορροφάται γρήγορα και σε μεγάλο βαθμό από το γαστρεντερικό σωλήνα. Λαμβάνεται από το στόμα επιτυγχάνοντας τη μέγιστη συγκέντρωσή της στο πλάσμα 4 ώρες μετά την κατάποση. Στο αίμα, δεσμεύεται κατά περίπου 80% στις πρωτεΐνες του πλάσματος και έχει χρόνο ημιζωής περίπου 35 ώρες [37-38].

2.4.3 ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ

Η σιταλοπράμη μεταβολίζεται στο ήπαρ κυρίως από το CYP2C19, αλλά επίσης από το CYP3A4 και το CYP2D6 και οδηγεί σε δύο φαρμακολογικά ενεργούς μεταβολίτες με δύο εναντιομερή έκαστος. Μόνο όμως τα S-(+) εναντιομερή των μεταβολιτών έχουν ιδιότητες αναστολής της επαναπρόσληψης της σεροτονίνης. Οι μεταβολίτες δισμεθυλσιταλοπράμη και διδεσμεθυλσιταλοπράμη είναι σημαντικά λιγότερο ενεργοί και η συμβολή τους στη συνολική δράση της σιταλοπράμης είναι αμελητέα. Περίπου το 80% αποβάλλεται από το ήπαρ και 20%

από τα νεφρά. Η διαδικασία αποβολής είναι πιο αργή στους ηλικιωμένους και σε ασθενείς με ηπατική ή νεφρική ανεπάρκεια. Με μια δόση μία φορά την ημέρα, επιτυγχάνονται σταθερές συγκεντρώσεις στο πλάσμα σε περίπου μία εβδομάδα. Ισχυροί αναστολείς των CYP2C19 και CYP3A4 ενδέχεται να μειώσουν την κάθαρση της σιταλοπράμης [37].

Η σιταλοπράμη μεταβολίζεται κυρίως στο ήπαρ **Εικόνα 2.4.3** μέσω N-απομεθυλίωσης στον κύριο μεταβολίτη της, της διςμεθυλσιταλοπράμης από CYP2C19 και CYP3A4. Άλλοι μεταβολίτες περιλαμβάνουν τη διδεσμεθυλσιταλοπράμη μέσω του μεταβολισμού CYP2D6 και το N-οξείδιο της σιταλοπράμης μέσω ενζύμων μονοαμινοξειδάσης και οξειδάσης της αλδεϋδης. Είναι παράγωγο αποαμινοποιημένου προπιονικού οξέος [37].



Εικόνα 2.4.3 Μεταβολισμός σιταλοπράμης

Μετά από μία εφάπαξ δόση σιταλοπράμης, οι μέγιστες συγκεντρώσεις στο αίμα εμφανίζονται περίπου σε 4 ώρες. Αυτό το φάρμακο βρίσκεται κυρίως αμετάβλητο στο πλάσμα ως σιταλοπράμη. Τα ισοένζυμα του κυτοχρώματος P450 (CYP) 3A4 και 2C19 φαίνεται να εμπλέκονται σε μεγάλο βαθμό στην παραγωγή της διςμεθυλσιταλοπράμης. Η διςμεθυλσιταλοπράμη φαίνεται περαιτέρω N-απομεθυλιωμένη από το CYP2D6 σε διδεσμεθυλσιταλοπράμη. Οι μεταβολίτες της σιταλοπράμης ασκούν μικρή φαρμακολογική δράση σε σύγκριση με το μητρικό φάρμακο, δηλαδή περίπου φτάνουν το 50% της συγκέντρωσής της στο αίμα έναντι του μητρικού, και δεν είναι πιθανό να συμβάλουν στην κλινική επίδραση της σιταλοπράμης [37].

2.4.4 ΠΑΡΕΝΕΡΓΕΙΕΣ

Συχνές παρενέργειες της σιταλοπράμης περιλαμβάνουν: υπνηλία, αϋπνία, ναυτία, αλλαγές βάρους (συνήθως αύξηση βάρους), αύξηση της όρεξης, έντονα όνειρα, συχνή ούρηση, μειωμένη σεξουαλική διάθεση, ξηροστομία, αυξημένη εφίδρωση, τρόμος, διάρροια, υπερβολικό χασμουρητό και κόπωση. Λιγότερο συχνές παρενέργειες περιλαμβάνουν έμετο, καρδιακές αρρυθμίες, μεταβολές της αρτηριακής πίεσης, διασταλμένες κόρες, άγχος, αλλαγές στη διάθεση, κεφαλαλγία, υπερκινητικότητα και ζάλη. Σπάνιες παρενέργειες περιλαμβάνουν σπασμούς, ψευδαισθήσεις, σοβαρές αλλεργικές αντιδράσεις και φωτοευαισθησία. Ορισμένα στοιχεία δείχνουν ότι η σιταλοπράμη μπορεί να προκαλέσει εφιάλτες. Η σιταλοπράμη σχετίζεται με υψηλότερο κίνδυνο αρρυθμιών σε σύγκριση με άλλα SSRI. Μπορεί να εμφανιστούν συμπτώματα στέρησης όταν αυτό το φάρμακο σταματήσει ξαφνικά, όπως παραισθήσεις κ.α.. Η θεραπεία με σιταλοπράμη πρέπει να μειώνεται σταδιακά όταν ολοκληρωθεί η θεραπεία [33].

2.5 ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΚΙΝΔΥΝΟΣ ΘΑΝΑΤΟΥ

Ως δηλητήριο ορίζεται κάθε ουσία που μπορεί να προκαλέσει βλάβες στο βιολογικό σύστημα, στις λειτουργίες του οργανισμού ή το θάνατο. Έτσι λοιπόν κάθε χημική ουσία θα μπορούσε να γίνει τοξική αν υπάρχει σε ικανοποιητική ποσότητα. Η τοξικότητα πέραν αυτού καθορίζεται και από το χρόνο έκθεσης, την οδό χορήγησης αλλά και την ιδιοσυγκρασία του οργανισμού, την ηλικία, το φύλλο κ.α. Στον **Πίνακα 2.5.1**, δίνονται οι συγκεντρώσεις των δύο αντικαταθλιπτικών φαρμάκων που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία για τις οποίες η εκάστοτε ουσία έχει θεραπευτική ή τοξική δράση με βάση τη βιβλιογραφία και ο χρόνος ημίσειας ζωής τους στον οργανισμό. Αξίζει να σημειωθεί ότι δεν υπάρχουν ακριβή θεραπευτικά, τοξικά και θανατηφόρα όρια στις δύο ενώσεις καθώς αυτά ποικίλουν ανάλογα με τον οργανισμό, την προγενέστερη χρήση (ανάπτυξη ανοχής), την συνέργεια μεταξύ ουσιών και άλλα [39].

Πίνακας 2.5.1 Επίπεδα φαρμακευτικών ενώσεων στο αίμα [39]

Ένωση	Συγκέντρωση σε ορό/αίμα σε (ng/mL)			Χρόνος Ημίσειας Ζωής $t_{1/2}$ σε ώρες	pKa
	Θεραπευτική από	Τοξική από	Θανατηφόρα, Κωματώδη από		
Σιταλοπράμη	50-110	220	500-600	25-40	9,5
Σερτραλίνη	10-150	290	1500-3000	22-36	8,5

Σύμφωνα με μελέτες μετα-ανάλυσης και μη, η μακροχρόνια έκθεση σε αντικαταθλιπτικά τύπου SSRI συνδέεται με υψηλότερο κίνδυνο καρδιαγγειακών επεισοδίων, όπως αιφνίδια καρδιακή ανακοπή και θανατηφόρες κοιλιακές αρρυθμίες χωρίς όμως να περιλαμβάνει παράταση του διαστήματος QT [40]. Η παράταση του διαστήματος QT είναι μια ανωμαλία της ηλεκτρικής δραστηριότητας της καρδιάς που θέτει τους ασθενείς σε κίνδυνο για κοιλιακές αρρυθμίες. Σοβαρές επιπλοκές της παράτασης του διαστήματος QT που προκαλείται από φάρμακα είναι σπάνιες [41]. Επιπλέον μία ακόμη έρευνα μετα-ανάλυσης, η οποία έγινε στην περιοχή της Βόρειας Ελλάδας και Θεσσαλίας και αφορούσε τη μελέτη των αιτιών θανάτων από πνιγμό, έδειξε ότι η έκθεση στα αντικαταθλιπτικά που είναι επιλεκτικοί αναστολείς επαναπρόσληψης της σεροτονίνης (SSRIs) ήταν η πιο συνηθέστερη αιτία θανάτου των θυμάτων. Τέλος, ένα ακόμη συμπέρασμα της έρευνας ήταν ότι άτομα με καρδιαγγειακές παθήσεις είναι πολύ πιθανότερο να οδηγηθούν σε πνιγμό την ώρα της κολύμβησης, με το μεγαλύτερο ποσοστό των θυμάτων να είναι άνδρες, άτομα μεγάλης ηλικίας και αλλοδαποί. Αν και η αιτιολογία είναι ασαφής, τα αντικαταθλιπτικά SSRIs μπορεί να συμβάλουν σε αυτό το μοιραίο αποτέλεσμα [42].

2.6 ΜΕΘΑΝΑΤΙΑ ΑΝΑΚΑΤΑΝΟΜΗ ΣΕΡΤΡΑΛΙΝΗΣ ΚΑΙ ΣΙΤΑΛΟΠΡΑΜΗΣ

Η μεταθανάτια ανακατανομή είναι ένα αποδεκτό τοξικολογικού ενδιαφέροντος φαινόμενο που συχνά επηρεάζει την τιμή της μεταθανάτιας συγκέντρωσης ενός φαρμάκου στο αίμα του θανόντος ατόμου [43]. Συνήθως, η μεταθανάτια ανακατανομή οδηγεί σε προκλήσεις όσον αφορά την ερμηνεία αποτελεσμάτων σε περιπτώσεις θανάτου. Συγκεκριμένα, πολλά αντικαταθλιπτικά και νευροληπτικά φάρμακα υπόκεινται σε PMR λόγω των φυσικοχημικών τους ιδιοτήτων [44]. Οι μεταθανάτιες συγκεντρώσεις φαρμάκων μπορεί να διαφέρουν ανάλογα με το μέρος της δειγματοληψίας, τον όγκο του αίματος που συλλέχθηκε καθώς και τη μέθοδο δειγματοληψίας, κάνοντας έτσι σημαντική την ανάλυση δειγμάτων από

διαφορετικά μέρη του σώματος έτσι ώστε να εντοπιστεί η PMR και να αποφευχθούν λανθασμένα συμπεράσματα για την αιτία και τον τρόπο θανάτου [45]. Όταν εμφανίζεται η PMR, δείγματα αίματος που λαμβάνονται από το σώμα ή την καρδιά παρατηρείται να έχουν υψηλότερες συγκεντρώσεις φαρμάκων μεταθανάτια, από ότι δείγματα αίματος που προέρχονται από περιφερειακές περιοχές, κυρίως από τη μηριαία περιοχή [46].

Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από μελέτες υποδηλώνουν ότι η σεβτραλίνη απορροφάται εύκολα από όλους τους ιστούς και τα υγρά του σώματος, υποδηλώνοντας ότι αυτή η ουσία υφίσταται σημαντική μεταθανάτια ανακατανομή στη συγκέντρωση της στο αίμα [46,47]. Το ίδιο συμβαίνει και με τη σιταλοπράμη, η οποία υπόκειται σε μεταθανάτια ανακατανομή κυρίως όταν το δείγμα λαμβάνεται από κάποια κεντρική αρτηρία ή καρδιακό ιστό και όχι από τη μηριαία φλέβα [48,49].

3. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

3.1 ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Η προκατεργασία του δείγματος πριν από την ανάλυση πολλές φορές είναι απαραίτητη όσο και αποτελεσματική και αν είναι η διαχωριστική μέθοδος που χρησιμοποιείται. Η προκατεργασία του δείγματος έχει ως στόχο

- την αλλαγή της φάσης του δείγματος, προκειμένου αυτό να είναι συμβατό με το όργανο, για την απλοποίηση του υποστρώματος,
- την απομάκρυνση τυχόν παρεμποδίσεων
- και την αύξηση των συγκεντρώσεων των ενώσεων ενδιαφέροντος.

Η μέθοδος που θα εφαρμοστεί εξαρτάται από το υπόστρωμα και την πολυπλοκότητα του δείγματος. Με την κατάλληλη προκατεργασία του δείγματος επιτυγχάνεται αύξηση της ακρίβειας, της επαναληψιμότητας καθώς και της εκλεκτικότητας του δείγματος.

Για τον προσδιορισμό τοξικών ενώσεων σε βιολογικά δείγματα, οι ενδεδειγμένες αναλυτικές τεχνικές είναι η αέρια και υγρή χρωματογραφία συνδυασμένες με φασματομετρία μάζας. Συγκεκριμένα η τεχνική GC/MS θεωρείται η πιο εύχρηστη για τον τοξικολογικό έλεγχο καθώς έχει υψηλή ευαισθησία και παρέχει το μεγάλο πλεονέκτημα της χρήσης των βιβλιοθηκών με τις οποίες μπορούν να ταυτοποιηθούν άγνωστες ενώσεις. Η συνηθέστερη

προκατεργασία που απαιτείται πριν την ανάλυση είναι η εκχύλιση του δείγματος, για απομόνωση της ουσίας από ενδογενή συστατικά. Τρεις τύποι προκατεργασίας χρησιμοποιούνται συνήθως: η εκχύλιση υγρού-υγρού (LLE), η εκχύλιση στερεού-υγρού (SPE) και η απευθείας έγχυση (direct injection). Παραδοσιακά, οι εκχυλίσεις υγρού-υγρού χρησιμοποιούνται περισσότερο. Σε αυτές το δείγμα, το οποίο μπορεί να είναι αίμα ή ούρα, κατεργάζεται με ένα ρυθμιστικό διάλυμα κατάλληλου pH και ακολουθεί ανάμιξη με έναν διαλύτη ικανό να διαχωρίσει το φάρμακο από το την υδατική φάση. Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται περιλαμβάνουν συνήθως το χλωροφόρμιο, το διαιθυλαιθέρα, το τολουόλιο, το εξάνιο, τον οξικό αιθυλεστέρα, διάφορες αλκοόλες, το χλωριούχο βουτύλιο και μίγματα αυτών. Ο διαλύτης στη συνέχεια απομονώνεται από το μίγμα και είτε καθαρίζεται σε άλλη διαδικασία εκχύλισης ή εξατμίζεται μέχρι ξηρού [50].

3.2 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΥΓΡΟΥ-ΥΓΡΟΥ (LLE)

Η εκχύλιση περιλαμβάνει την κατανομή μιας ουσίας μεταξύ δύο υγρών φάσεων οι οποίες δεν αναμιγνύονται πρακτικά μεταξύ τους, π.χ. νερό και χλωροφόρμιο, νερό και τετραχλωράνθρακας και ούτω καθεξής. Η ιδιότητα αυτή των διαφόρων χημικών ουσιών να κατανέμονται μεταξύ δύο υγρών φάσεων χρησιμοποιείται σε πολλές περιπτώσεις όπως για παράδειγμα στη συνθετική χημεία, στη μεταλλουργία, στη χημική ανάλυση κλπ. Στη χημική ανάλυση χρησιμοποιείται τόσο στις περιπτώσεις της προσυγκέντρωσης, της αύξησης δηλαδή της συγκέντρωσης της προσδιοριζόμενης ουσίας, όσο και στις περιπτώσεις απαλοιφής παρεμποδίσεων. Στην πράξη, η εκχύλιση αποτελεί μια από τις απλούστερες, αποτελεσματικότερες και φθηνότερες τεχνικές απομόνωσης η οποία συνδυάζεται εύκολα με διάφορες αναλυτικές μεθόδους [50].

Η εκχύλιση περιλαμβάνει συνήθως την μίξη ενός δείγματος υδατικού διαλύματος με έναν μη-αναμίξιμο οργανικό διαλύτη για μια χρονική περίοδο και επιτρέπει σε αυτές τις δύο υγρές φάσεις να αλληλοεπιδράσουν, έτσι ώστε οι ενώσεις που μας ενδιαφέρουν εκχυλίζονται από την υδατική στην οργανική στοιβάδα, καθώς ο οργανικός διαλύτης έχει μεγαλύτερη συγγένεια με αυτές. Η εκλεκτικότητα και η αποδοτικότητα της διαδικασίας εκχύλισης καθορίζονται από την επιλογή των δύο μη-αναμίξιμων υγρών. Οι πιο υδρόφιλες ενώσεις προτιμούν την υδατική φάση και οι πιο υδρόφοβες ενώσεις θα βρεθούν στον οργανικό διαλύτη. Είναι προτιμότεροι οργανικοί διαλύτες όπως είναι το μεθυλενο-χλωρίδιο, το

χλωροφόρμιο, ο οξικός αιθυλεστέρας, ο διαιθυλαιθέρας γιατί μπορούν να απομακρυνθούν εύκολα με εξάτμιση. Μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν χηλικοί και άλλοι συμπλοκοποιητικοί παράγοντες, ζεύγη ενώσεων και εναντιομερείς ενώσεις. Αφού διαχωριστούν τα μη-αναμίξιμα υγρά, η οργανική στοιβάδα που περιέχει την εκχυλισμένη ένωση απομακρύνεται, εξατμίζεται μέχρι ξηρού και επαναδιαλύεται σε έναν κατάλληλο διαλύτη συμβατό με το αναλυτικό σύστημα. Ένας περιορισμός είναι ότι πολλοί υδατοδιαλυτοί διαλύτες δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εκχύλιση. Άλλα μειονεκτήματα είναι:

- Η χρήση μεγάλων ποσοτήτων οργανικών διαλυτών που οδηγούν σε ένα υπολογίσιμο κόστος για την απόκτηση και διάθεσή τους.
- Ο σχηματισμός γαλακτωμάτων κατά τη διάρκεια της ανάμιξης.
- Απαιτείται απομάκρυνση του οργανικού διαλύτη με εξάτμιση, η οποία συνεπάγεται αύξηση του χρόνου προκατεργασίας και πιθανές απώλειες της αναλυόμενης ουσίας.
- Η συνεκχύλιση άλλων συστατικών του υποστρώματος που παρεμποδίζουν λόγω του ότι έχουν παραπλήσιες ιδιότητες, καθώς οι διαλύτες δεν είναι εκλεκτικοί.
- Και τέλος η τοξικότητα τους [51].

3.3 ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΚΑΙ ΣΗΜΑΣΙΑ

Η βάση για την υψηλή ποιότητα των δεδομένων είναι η επικύρωση της αναλυτικής μεθόδου. Τα αξιόπιστα αναλυτικά δεδομένα αποτελούν την προϋπόθεση για την ορθή ερμηνεία των τοξικολογικών ευρημάτων τόσο σε επιστημονικές μελέτες όσο και στην εργαστηριακή ρουτίνα. Αναξιόπιστα αναλυτικά δεδομένα στην κλινική και ιατροδικαστική τοξικολογία, θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε αδικαιολόγητες νομικές συνέπειες για τον εναγόμενο αν παρουσιαστούν στο δικαστήριο, ή θα μπορούσαν να έχουν σημαντικές συνέπειες καθώς καθορίζουν τη θεραπεία ασθενών. Επομένως η επικύρωση μεθόδων για τις τοξικολογικές αναλύσεις είναι ιδιαίτερης σημασίας καθώς από τα αποτελέσματα αυτών κρίνεται η υγεία ενός αρρώστου ή η έκβαση μιας δικαστικής υπόθεσης.

Ως εκ τούτου, νέες μέθοδοι ανάλυσης που θα χρησιμοποιηθούν στην κλινική και / ή ιατροδικαστική τοξικολογία απαιτούν προσεκτική ανάπτυξη που ακολουθείται από μια ενδεδειγμένη επικύρωση της τελικής μεθόδου. Σε αυτό το σημείο πρέπει να επισημανθεί ότι η

ποιότητα των αναλυτικών δεδομένων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ανάπτυξη της μεθόδου και όχι τόσο από την επικύρωσή της. Θα πρέπει, η ίδια η μέθοδος να είναι κατάλληλη για το σκοπό τον οποίο προορίζεται. Μόνο η επικύρωση μπορεί να αποδείξει αντικειμενικά την καταλληλότητα μιας αναλυτικής μεθόδου, από την εκπλήρωση ελάχιστων αποδεκτών ορίων. Επειδή τέτοια αντικειμενικά δεδομένα απόδοσης είναι απαραίτητα για την αξιολόγηση της ποιότητας μιας μεθόδου, η σημασία της επικύρωσης γίνεται φανερή.

Λόγω της σημασίας της επικύρωσης στο πεδίο της αναλυτικής χημείας, μια σειρά οδηγιών για το θέμα αυτό έχουν εκδοθεί από διάφορους διεθνείς οργανισμούς και συμβούλια [52]-[58].

Για την επικύρωση των βιοαναλυτικών μεθόδων, απαιτείται έλεγχος των ακόλουθων παραμέτρων:

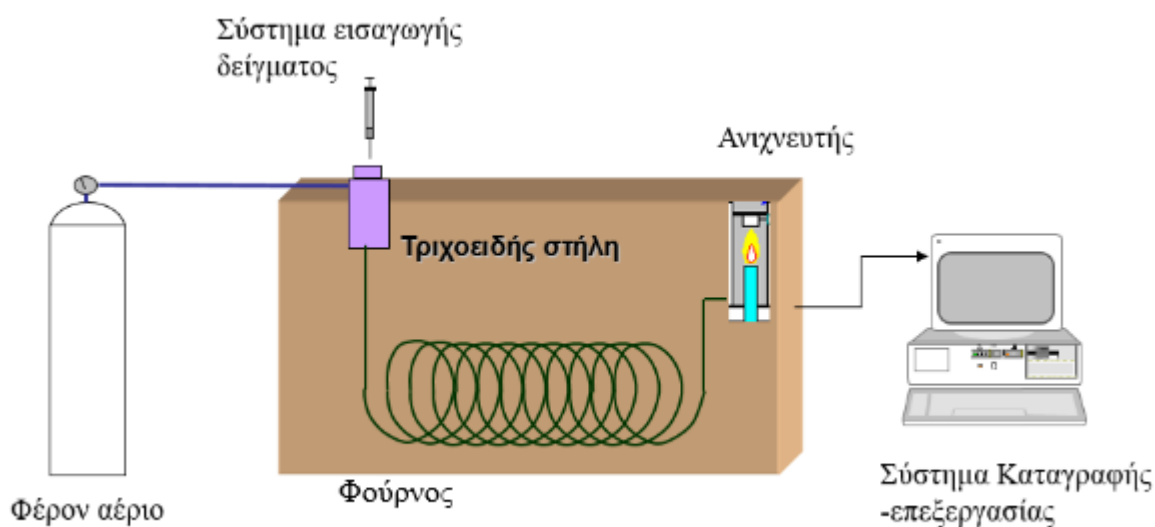
- ακρίβεια (accuracy),
- πιστότητα (precision),
- όρια ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού (LOD, limit of detection and LOQ, limit of quantitation),
- ευαισθησία (sensitivity),
- ειδικότητα (specificity),
- ανάκτηση (recovery),
- σταθερότητα (stability).

4. ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η αέρια χρωματογραφία αναπτύχθηκε ως αναλυτική τεχνική τα τελευταία σαράντα χρόνια. Η αέρια χρωματογραφία είναι σχετικά απλή, αν συγκριθεί με ανάλογες τεχνικές χημικής ανάλυσης και έχει μεγάλες δυνατότητες εφαρμογής. Η αέρια χρωματογραφία αποτελεί σήμερα μια από τις πιο διαδεδομένες αναλυτικές τεχνικές και βρίσκει εφαρμογή στην ανάλυση πτητικών ουσιών σε τρόφιμα, φάρμακα, προϊόντα πετρελαίου, βιομηχανίες αρωματοποιίας κτλ. [59]. Ένα σύγχρονο σύστημα αέριας χρωματογραφίας αποτελείται από μια φιάλη αερίου, τον εισαγωγέα δείγματος, τη στήλη, η οποία είναι τοποθετημένη σε

φούρνο, τον ανιχνευτή καθώς και ένα σύστημα καταγραφής αποτελεσμάτων. Η διάταξη ενός αέριου χρωματογράφου συνδεδεμένο με σύστημα καταγραφής δίνεται στο παρακάτω σχήμα:



Σχήμα 4.1.1 Διάταξη ενός αέριου χρωματογράφου

Στην αέρια χρωματογραφία, η κινητή φάση αποτελείται από ένα αέριο το οποίο είναι αδρανές και ονομάζεται «φέρον αέριο». Το φέρον αέριο (συνήθως N_2 , He , H_2 , Ar) από τη φιάλη υψηλής πίεσης, μέσα από ρυθμιστές παροχής, οδηγείται στη στήλη. Η εισαγωγή του δείγματος γίνεται με μικροσύριγγα στη βαλβίδα εισαγωγής του δείγματος στην κορυφή της στήλης. Τα συστατικά του δείγματος συμπαρασύρονται από το φέρον αέριο κατά μήκος της στήλης και τελικά διαχωρίζονται. Στη συνέχεια ανιχνεύονται τα κλάσματα στον ανιχνευτή και τα σήματα ανίχνευσης καταγράφονται σε ένα καταγραφικό. Σε ορισμένες περιπτώσεις, στη συνέχεια υπάρχει μια διάταξη, όπου συλλέγονται τα διάφορα κλάσματα και ένα ροόμετρο για τον έλεγχο της ταχύτητας ροής του φέροντος αερίου [59].

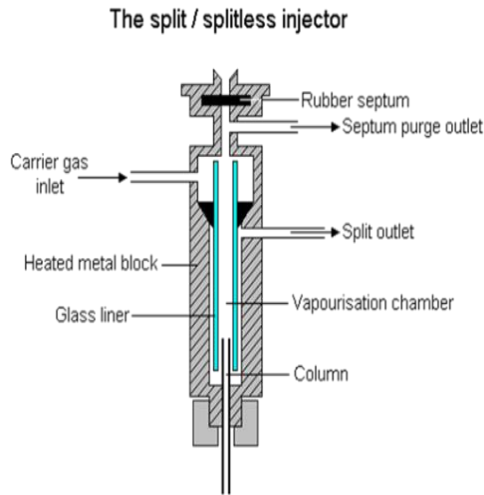
Ως φέρον αέριο μπορεί να χρησιμοποιηθεί κάθε αέριο σε υπερκάθαρη κατάσταση, το οποίο μπορεί να διαφοροποιηθεί στον ανιχνευτή, από τα διάφορα συστατικά του μίγματος. Το φέρον αέριο πρέπει να είναι αδρανές και απαλλαγμένο από προσμίξεις. Επίσης, δεν πρέπει να περιέχει οξυγόνο, γιατί οξειδώνει τη στατική φάση και αυτό θα οδηγήσει σε καταστροφή της στήλης, ιδιαίτερα όταν αυτή είναι τριχοειδής και η ποσότητα της στατικής φάσης είναι ελάχιστη. Επιπλέον, η στατική φάση μπορεί να απενεργοποιηθεί από ίχνη υγρασίας, για αυτό το λόγο και το φέρον αέριο πρέπει να είναι απαλλαγμένο τελείως από αυτήν. Η επιλογή του φέροντος αερίου εξαρτάται κυρίως από τον τύπο του ανιχνευτή που χρησιμοποιείται. Κατά

κύριο λόγο χρησιμοποιείται το He, αλλά σε πολλές περιπτώσεις μπορεί να αντικατασταθεί από αέρια όπως το Ar, N₂ και το H₂ [59]. Το αέριο διοχετεύεται στη χρωματογραφική στήλη από τη φιάλη υψηλής πίεσης και η παροχή του ρυθμίζεται με ειδικές βαλβίδες και ροόμετρα. Σημαντική παράμετρος αποτελεί η σταθερότητα παροχής του αερίου που εκφράζεται με τη γραμμική ταχύτητα παροχής του. Η ταχύτητα αυτή μπορεί να μετρηθεί κατά την έγχυση μιας ένωσης που δεν αλληλοεπιδρά με τη στατική φάση της στήλης π.χ. (αργό ή βουτάνιο). Έπειτα υπολογίζεται ο χρόνος που μεσολαβεί από την έγχυση της ουσίας μέχρι την ανίχνευση σε δευτερόλεπτα και διαιρείται με το μήκος της στήλης. Το φέρον αέριο πρέπει να βρίσκεται σε υπερκάθαρη κατάσταση για να αποφευχθεί η επιμόλυνση τόσο της στήλης όσο και του δείγματος, μειώνοντας την ποιότητα και στην αξιοπιστία της ανάλυσης. Ωστόσο και στις δυο περιπτώσεις συνίσταται η χρήση φίλτρων για προληπτικούς λόγους. Το αέριο ως αδρανές πρέπει:

1. να μην αντιδρά με το συστατικό ή το μίγμα συστατικών προς ανάλυση αλλά και με το πληρωτικό υλικό της διαχωριστικής στήλης
2. να έχει σταθερές φυσικοχημικές ιδιότητες
3. να μην παρουσιάζει οξειδωτικές ή διαβρωτικές ιδιότητες κατά τη μεταφορά και την αποθήκευσή του [60]

Το βασικότερο μέρος ενός χρωματογράφου είναι η στήλη. Υπάρχουν δύο είδη στηλών: οι πληρωμένες στήλες και οι τριχοειδείς. Σήμερα οι στήλες που χρησιμοποιούνται στην αέρια χρωματογραφία είναι τριχοειδείς γυάλινες στήλες μεγάλου μήκους π.χ. 25 - 30 m, οι οποίες εσωτερικά έχουν επίστρωση από διάφορα υλικά (Coated Capillary Glass Columns) [59].

Το δείγμα, συνήθως όγκου 1μL, εισάγεται στο ρεύμα του φέροντος αερίου στην αρχή της στήλης με μια μικροσύριγγα, διαμέσου μιας ελαστικής πλακέτας ή διαφράγματος (septum). Στο σχήμα 4.1.2 απεικονίζεται ένα κλασσικό σύστημα έγχυσης δείγματος για την αέρια χρωματογραφία.



Σχήμα 4.1.2 Σύστημα εισαγωγής δείγματος

Η θερμοκρασία καθορίζει την ταχύτητα και την ικανότητα του διαχωρισμού. Για αυτό το λόγο η στήλη βρίσκεται σε φούρνο θερμοκρασιακής ακρίβειας. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται εξαιτίας των διαφόρων δυνάμεων συγκράτησης και έκλυσης ανάμεσα στα συστατικά του μίγματος, το υλικό πλήρωσης της στήλης και της ροής του φέροντος αερίου. Στο κύριο μέρος του χρωματογράφου συμπεριλαμβάνεται και ο ανιχνευτής, ο οποίος τοποθετείται στο τέλος της στήλης. Τα σήματα ενισχύονται και καταγράφονται στο καταγραφικό σύστημα [59].

Από τα παραπάνω είναι εύκολο να διαπιστώσει κανείς ότι σε έναν αέριο χρωματογράφο οι συνθήκες που έχει την ευχέρεια να αλλάζει ο αναλυτικός χημικός είναι ουσιαστικά οι θερμοκρασίες στο σύστημα εισαγωγής ούτως ώστε να έχουμε φόρτωση σταθερής ποσότητας δείγματος χωρίς να έχουμε φαινόμενα υπερφόρτωσης του δείγματος και να επιτυγχάνεται κάθε φορά απομάκρυνση όλης της ποσότητας του δείγματος. Έτσι το σύστημα εισαγωγής διατηρείται καθαρό και έτοιμο για την επόμενη ανάλυση. Επίσης, ο αναλυτικός χημικός έχει την δυνατότητα να ρυθμίζει το θερμοκρασιακό πρόγραμμα του φούρνου όπου βρίσκεται η στήλη και έτσι μπορεί να τροποποιήσει και να αλλάξει όπως επιθυμεί τον χρόνο έκλυσης των αναλυόμενων ενώσεων. Η επιλογή της στήλης γίνεται με κριτήριο τις ουσίες που θέλουμε να διαχωρίσουμε επιλέγοντας την πολικότητα του υλικού επίστρωσης της [61].

4.2 ΣΥΣΤΗΜΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ

Ο σκοπός ενός ανιχνευτή είναι αποκρίνεται ανάλογα με τη συγκέντρωση ή την ποσότητα ενός συστατικού που περνά μέσα από αυτόν και η απόκριση αυτή να έχει τη μορφή ενός σήματος, το οποίο μπορεί να ποσοτικοποιηθεί. Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει ανιχνευτής ο οποίος να συνδυάζει ευαισθησία, γραμμικότητα και εκλεκτικότητα και μπορεί να εφαρμοστεί σε όλες τις αεροχρωματογραφικές αναλύσεις. Υπάρχουν πολλοί τύποι ανιχνευτών, αλλά σε γενικές γραμμές χρησιμοποιούνται λίγοι [62]. Τα κύρια χαρακτηριστικά που καθιστούν ιδανικό έναν ανιχνευτή αέριας χρωματογραφίας είναι:

- Υψηλή Ευαισθησία (χαμηλά όρια ανίχνευσης) (Limit of Detection, LOD)
- Σταθερότητα και επαναληψιμότητα
- Ευρεία γραμμική περιοχή
- Χαμηλό θόρυβο
- Αξιοπιστία
- Γρήγορους χρόνους απόκρισης ανεξάρτητους από την ταχύτητα ροής
- Ευκολία στο χειρισμό
- Παρόμοια απόκριση σε όλες τις διαχωριζόμενες ουσίες
- Να μην καταστρέφει το δείγμα
- Θερμοκρασίες λειτουργίας από 25 °C μέχρι 400 °C

Κανένας ωστόσο από τους χρησιμοποιούμενους ανιχνευτές δεν συγκεντρώνει όλα τα παραπάνω χαρακτηριστικά ταυτόχρονα. Ένα μεγάλο πλεονέκτημα της GC είναι η ποικιλία των ανιχνευτών που είναι διαθέσιμοι, καθένας εκ των οποίων εξυπηρετεί με τον καλύτερο τρόπο διαφορετικές εφαρμογές.

Οι πιο δημοφιλείς ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται σήμερα συζευγμένοι έναν με αέριο χρωματογράφο είναι:

1. Ανιχνευτής Ιονισμού Φλόγας (FID)
2. Ανιχνευτής θερμικής αγωγιμότητας (TCD)

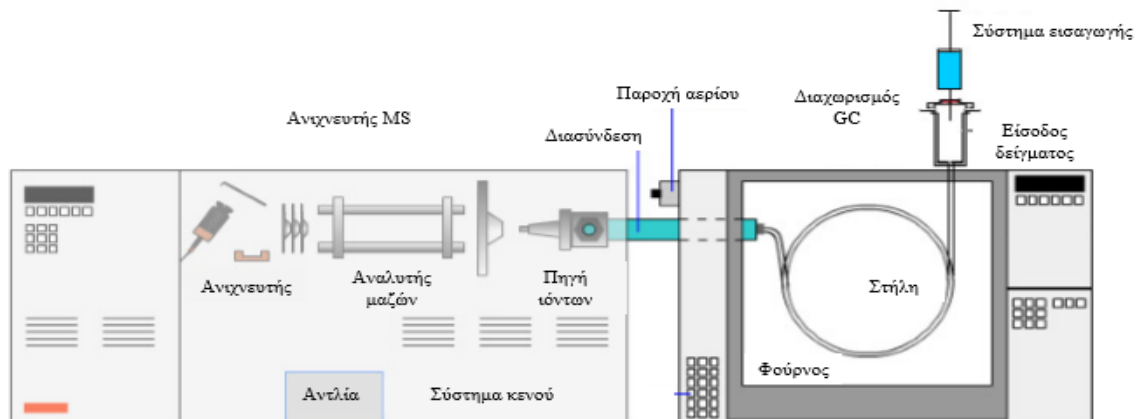
3. Ανιχνευτής σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD)
4. Θερμοϊοντικοί ανιχνευτές (TID)
5. Ανιχνευτές ηλεκτρολυτικής αγωγιμότητας
6. Ανιχνευτής φωτοϊοντισμού (PID)
7. Ανιχνευτές ατομικής εκπομπής (AED)
8. Φωτομετρικός ανιχνευτής φλόγας (FPD)
9. Ανιχνευτής ιονισμού αζώτου φωσφόρου (NPD)
10. Φασματογράφος μαζών (MS) [62]

4.3 ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΗ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΜΑΖΩΝ

Η φασματοσκοπία μαζών ήδη από το 1960 χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με την αέριο χρωματογραφία για την ανάλυση πτητικών οργανικών ενώσεων. Η συνδυασμένη τεχνική GC-MS αξιοποιεί τα πλεονεκτήματα των δύο μεμονωμένων τεχνικών, δηλαδή τη δυνατότητα άριστου διαχωρισμού και ποσοτικού προσδιορισμού που παρέχει ο αέριος χρωματογράφος και η δυνατότητα ταυτοποίησης που παρέχει το φασματόμετρο μαζών. Η συνδυασμένη τεχνική GC-MS ήταν από τις πρώτες που εφαρμόστηκαν και ο στόχος της μπορεί να είναι διττός. Αυτό σημαίνει ότι ο φασματογράφος μαζών μπορεί να αποτελέσει ανιχνευτή στην αέρια χρωματογραφία, αλλά και ο αέριος χρωματογράφος να είναι το σύστημα κατεργασίας- εισαγωγής του δείγματος για το φασματογράφο μαζών. Όπως είναι γνωστό το υπό εξέταση μίγμα διαχωρίζεται στα συστατικά του με τη βοήθεια του αέριου χρωματογράφου. Η στήλη της αερίου χρωματογραφίας βρίσκεται σε θερμοστατούμενο θάλαμο (ρυθμιζόμενο κάτω από την θερμοκρασία αντοχής της εκάστοτε στήλης, πάντα κάτω από 350°C). Το τέλος της στήλης οδηγεί στην πηγή ιονισμού του φασματογράφου, όπου τα συστατικά του μίγματος καθώς βγαίνουν από τη στήλη ιονίζονται και καταγράφονται [63].

Στο σχήμα φαίνεται η σχηματική αναπαράσταση ενός χαρακτηριστικού φασματόμετρου μάζας συνδεδεμένη με αέριο χρωματογράφο. Αποτελείται από μια φιάλη φέροντος αερίου (He ή H₂), σύστημα έγχυσης του δείγματος, βαλβίδες που ελέγχουν την θερμοκρασία του φούρνου, έναν μικροεπεξεργαστή και σωληνώσεις για τη σύνδεση του εγχυτήρα στην στήλη

και στην έξοδο, όπου συνδέεται με το φασματόμετρο μάζας. Η στήλη θα πρέπει να είναι επικαλυμμένη με μια στατική φάση, επειδή εκεί λαμβάνει χώρα ο διαχωρισμός των συστατικών. Το τέλος της στήλης οδηγεί στην πηγή ιονισμού του φασματογράφου όπου τα συστατικά του μείγματος καθώς βγαίνουν από τη στήλη ιονίζονται και καταγράφονται. Το φασματόμετρο μάζας αποτελείται από την πηγή ιονισμού, το φακό εστίασης, τον αναλυτή μάζας, τον ανιχνευτή ιόντων και πολλαπλές βαλβίδες άντλησης [63].



Σχήμα 4.3.1 Αέρια χρωματογραφία συνδεδεμένη με φασματογράφο μάζας

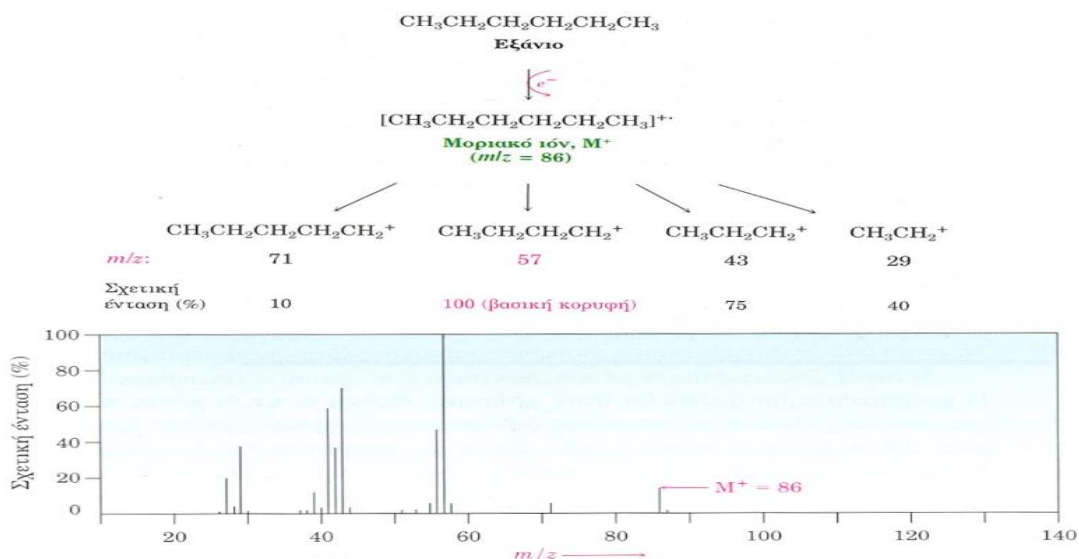
Η ποσότητα ουσίας που απαιτείται για τη λήψη ικανοποιητικού φάσματος μαζών είναι 1ppm (10^{-6} g) σε 1g διαλύματος, ενώ η ποσότητα της διαλυμένης ουσίας σε 1μL είναι 10^{-9} g (1ng). Σήμερα η ευαισθησία έχει βελτιωθεί στην τάξη του femtogram (10^{-15} g). Έτσι μπορούμε να έχουμε δεδομένα σε ppb (parts per billion- μέρη ανά δισεκατομμύριο) αλλά ακόμη και ppt (parts per quatrilion-μέρη ανά τετράκις εκατομμύριο). Τα φασματόμετρα μαζών που μπορούν να συνδυαστούν με τον αέριο χρωματογράφο είναι τα τετράπολα, τα χρόνου πτήσεως και οι παγίδες ιόντων. Με τη συζευγμένη αυτή τεχνική πετυχαίνουμε διαχωρισμό των ουσιών με τον αέριο χρωματογράφο και στη συνέχεια την ταυτοποίηση άγνωστων ενώσεων από το φάσμα μαζών. Γενικά ο προσδιορισμός μια ουσίας με GC/MS γίνεται βάση του χρόνου έκλουσης (R_t) της και με βάση του φάσματος μάζας της (συγκρινόμενο με κάποιο από την βιβλιοθήκη αν αυτό είναι δυνατόν, π.χ. όταν χρησιμοποιούμε (EI) ιονισμό [64].

4.4 ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ (Mass Spectrometry, MS)

4.4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η αναλυτική τεχνική ταυτοποίησης και προσδιορισμού της αρχικής ένωσης από τις πληροφορίες που παρέχει το φάσμα μαζών της, ονομάζεται Φασματομετρία Μαζών (Mass Spectrometry, MS). Η φασματομετρία μαζών εφαρμόζεται στον προσδιορισμό της δομής ενώσεων μεγάλου μοριακού βάρους. Η μορφή του φάσματος μαζών, που λαμβάνεται κάτω από αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες, είναι χαρακτηριστική της αρχικής ένωσης και χρησιμοποιείται για την ταυτοποίησή της. Σε μια τυπική διαδικασία Φασματομετρίας Μαζών, ένα δείγμα, το οποίο μπορεί να είναι στερεό, υγρό ή αέριο, ιονίζεται. Τα ιόντα διαχωρίζονται ανάλογα με το λόγο της μάζας προς το φορτίο (m/z , mass-to-charge ratio). Τα ιόντα ανιχνεύονται από ένα μηχανισμό, ο οποίος είναι ικανός να ανιχνεύει φορτισμένα σωματίδια. Το διάγραμμα, που δίνει τη σχετική ένταση του μετρούμενου ρεύματος ως συνάρτηση του λόγου m/z , ονομάζεται Φάσμα Μαζών (Mass Spectrum) της ένωσης. Τα άτομα ή μόρια μπορούν να ταυτοποιηθούν, με τη βοήθεια του χαρακτηριστικού φάσματός τους, με συσχέτισμό των γνωστών μαζών με ήδη υπάρχουσες μάζες ή μέσω του χαρακτηριστικού τρόπου θραυσματοποίησης. Σήμερα, η φασματομετρία μαζών χρησιμοποιείται ευρύτατα, κυρίως για την επαλήθευση ή διερεύνηση της δομής των διαφόρων οργανικών ενώσεων κατά τη διαδικασία σύνθεσης (όπως π.χ. νέων φαρμάκων), για την εξακρίβωση της δομής πολλών φυσικών ενώσεων, για τη διερεύνηση της παρουσίας και του ποσοστού ισοτόπων, καθώς και στην ποιοτική και ποσοτική ανάλυση αγνώστων μιγμάτων ανόργανων και οργανικών ενώσεων [60].

Στην Εικόνα 4.4.1.1 φαίνεται ο τρόπος παρουσίασης των φασματικών δεδομένων. Τα ιόντα που παράγονται στην πηγή, έλκονται στο φασματόμετρο μαζών, όπου διαχωρίζονται ανάλογα με το λόγο μάζας προς φορτίο, m/z και παρουσιάζονται ως φάσματα μαζών.



Εικόνα 4.4.1.1 Φασματογράφημα μαζών εξανίου και τα πιο κοινά θραύσματα του

Η μεγαλύτερη κορυφή του φάσματος, στην οποία δίνεται αυθαίρετα η τιμή, ονομάζεται βασική κορυφή (base peak). Τα ύψη των υπόλοιπων κορυφών μετρούνται ως το ποσοστό του ύψους της βασικής γραμμής. Τα σύγχρονα φασματόμετρα μαζών είναι προγραμματισμένα να αναγνωρίζουν τη βασική κορυφή και να κανονικοποιούν ως προς αυτήν τις υπόλοιπες κορυφές.

Η φασματομετρία μαζών μπορεί να συνδυαστεί με την Υγρή Χρωματογραφία (Liquid Chromatography, LC) και έτσι παρέχει στον αναλυτή τη συνδυαζόμενη τεχνική LC-MS, η συμβολή της οποίας στην έρευνα και σε εφαρμογές ρουτίνας θεωρείται ανεκτίμητη. [60]

4.4.2 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

Ένα τυπικό φασματόμετρον μαζών αποτελείται από τα εξής επιμέρους τμήματα:

1. Σύστημα εισαγωγής του δείγματος: Ο σκοπός αυτού του τμήματος είναι η εισαγωγή μικρών ποσοτήτων δείγματος στο όργανο. Το δείγμα εισάγεται στην αέρια ή στην υγρή του μορφή.
2. Πηγή ιόντων: Εδώ τα εισερχόμενα συστατικά μετατρέπονται σε ιόντα, είτε με βομβαρδισμό με ηλεκτρόνια, ιόντα, μόρια ή φωτόνια, είτε με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου ή υψηλής θερμοκρασίας. Συχνά το σύστημα εισαγωγής συνενώνεται με την πηγή ιόντων. Το προϊόν του ενιαίου αυτού τμήματος είναι ένα ρεύμα ιόντων (συνήθως

θετικά φορτισμένων) τα οποία στη συνέχεια επιταχύνονται και εισέρχονται στον αναλυτή μαζών.

3. Αναλυτής μαζών: Εδώ γίνεται διαχωρισμός των ιόντων ανάλογα με το λόγο που φέρουν. Είναι η πραγματική καρδιά του συστήματος. Υπάρχουν διάφορες κατηγορίες αναλυτών μαζών, των οποίων η λειτουργία βασίζεται σε διαφορετικές αρχές.
4. Ανιχνευτής: Σκοπός της διάταξης αυτής είναι να συλλάβει τα διαχωριζόμενα ιόντα και να τα μετατρέψει σε ηλεκτρικό σήμα. Στη συνέχεια, γίνεται επεξεργασία του σήματος με ειδικό λογισμικό σε ηλεκτρονικό υπολογιστή.
5. Σύστημα κενού: Ολόκληρο το φασματόμετρο (εκτός από το σύστημα επεξεργασίας δεδομένων) βρίσκεται υπό κενό που δημιουργείται από εσωτερικές και εξωτερικές αντλίες κενού. [60]

4.4.3 ΣΥΣΤΗΜΑ ΕΙΣΑΓΩΓΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Ο σκοπός του συστήματος εισαγωγής δείγματος είναι η προετοιμασία του δείγματος για εισαγωγή του στο χώρο ιοντισμού (πηγή ιόντων), κάτω από συνθήκες σταθερής ροής και σε αέρια κατάσταση. Η εξαέρωση δειγμάτων, που περιέχουν ενώσεις με περιορισμένη πτητικότητα ή στερεών δειγμάτων, διευκολύνεται με θέρμανση σε συνθήκες υψηλού κενού. Στο δοχείο δείγματος, η πίεση που επικρατεί είναι της τάξης των 10^{-2} Torr. Με κατάλληλο στόμιο εισαγωγής, το αέριο δείγμα εισάγεται σε ενδιάμεσο χώρο με ακόμη μικρότερη πίεση (10^{-3} Torr) απ' όπου, με σταθερή παροχή, εισάγεται στο χώρο ιοντισμού, όπου επικρατεί ακόμη χαμηλότερη πίεση (10^{-7} Torr), ώστε να αποφεύγονται οι συγκρούσεις μεταξύ των παραγόμενων ιόντων.

Στη συνδυασμένη τεχνική GC-MS, το αέριο που εκλύεται από τη χρωματογραφική στήλη οδηγείται κατευθείαν στην πηγή ιόντων, μέσω ενός σωλήνα (interface) υψηλής θερμοκρασίας. [60]

4.4.4 ΠΗΓΗ ΙΟΝΤΩΝ

Κάθε διακριτό τμήμα του φασματόμετρου μαζών παίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργία και απόδοση του συνόλου. Έτσι η επιλογή της τεχνικής ιοντισμού, που θα εφαρμοστεί, είναι

μεγάλης σημασίας για την ανάλυση που θα ακολουθήσει. Ένας διαχωρισμός των τεχνικών ιοντισμού μπορεί να γίνει μεταξύ «μαλακών» και «σκληρών» τεχνικών.

«Σκληρές» καλούνται οι τεχνικές στις οποίες χρησιμοποιείται υψηλή ενέργεια, η οποία μεταφέρεται στην προσδιοριζόμενη ένωση κατά τον ιοντισμό, προκαλώντας διάσπασή της σε θυγατρικά ιόντα (θραύση). «Μαλακές» καλούνται οι τεχνικές που επιτυγχάνουν τον ιοντισμό σε ηπιότερες συνθήκες με μικρή ή μηδαμινή θραύση.

Η πλειονότητα των φασματομέτρων μαζών εφαρμόζει ιοντισμό σε αέρια φάση. Οι περισσότερες τεχνικές εφαρμόζονται κατά προτίμηση σε ενώσεις σταθερές στη θέρμανση και σε σημείο ζέσης κάτω από . Συχνά μάλιστα, περιορίζονται σε ενώσεις με σχετική μοριακή μάζα κάτω από 1000 Da. Εξαιρεση αποτελεί η τεχνική ψεκασμού σε ηλεκτρικό πεδίο, όπου μόρια με μάζα έως και 200000Da μπορούν να αναλυθούν, εφόσον φορτιστούν πολλαπλώς.

Υπάρχουν αρκετές μέθοδοι παραγωγής ιόντων και παρουσιάζονται παρακάτω:

- Ηλεκτρονιακός Ιοντισμός (Electron Ionization, EI)
- Χημικός ιοντισμός (Chemical Ionization, CI)
- Φωτοϊοντισμός (Photoionization, PI)
- Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization, ESI)
- Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI)
- Γρήγορος βομβαρδισμός ατόμων (Fast Atom Bombardment, FAB) και φασματομετρία μαζών δευτερογενών ιόντων υγρών (Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry, LSIMS) [60]

4.4.4.1 ΙΟΝΤΙΣΜΟΣ ΜΕ ΗΛΕΤΡΟΝΙΑ(ELECTRON IMPACT)

Στον ιονισμό με ηλεκτρόνια το δείγμα εισάγεται ως αέριο σε μια κοιλότητα ενός μεταλλικού τμήματος, όπου εκτίθεται σε ένα ρεύμα ηλεκτρονίων, τα οποία προκύπτουν από ένα θερμαινόμενο σύρμα βολφραμίου, στο οποίο εφαρμόζεται δυναμικό. Τα ηλεκτρόνια που προκύπτουν έχουν υψηλή ενέργεια (70 eV) ώστε να ιονίσουν το δείγμα. Τα μόρια του δείγματος συγκρούονται με τα ηλεκτρόνια και προκύπτουν ιόντα με θετικό φορτίο. Τα θετικά φορτισμένα ιόντα απομακρύνονται από την κοιλότητα με την εφαρμογή ηλεκτροστατικού πεδίου ανάμεσα σε θετικό ηλεκτρόδιο και αρνητικό επιταχυντή και οδηγούνται στον

τετραπολικό αναλυτή. Το κενό της τάξης $10^{-5} - 10^{-8}$ Torr βοηθάει την κίνηση των ιόντων και εμποδίζει συγκρούσεις με μη ιονισμένα μόρια ή τις μεταξύ τους συγκρούσεις.

Η ενέργεια 70 eV των ηλεκτρονίων είναι αρκετά υψηλή όχι μόνο για τον ιονισμό των μορίων του δείγματος, αλλά και για την πρόκληση θραυσματοποίησης. Τα θραύσματα που προκύπτουν από το αρχικό ιόν για μια ορισμένη ενέργεια ηλεκτρονίων είναι χαρακτηριστικά για το ιονιζόμενο μόριο.

Κάθε φορά που ένα μόριο μιας συγκεκριμένης ένωσης ιονίζεται κάτω από τις ίδιες συνθήκες σχηματίζεται πάντα η ίδια ποσότητα και το ίδιο είδος ιόντων. Το σύνολο των θραυσμάτων αποτελεί το αποτύπωμα κάθε ένωσης και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση της ένωσης [60].

4.4.5 ΑΝΑΛΥΤΗΣ ΜΑΖΩΝ

Ο αναλυτής μαζών ή αλλιώς φασματόμετρο μαζών, αποτελεί το επόμενο τμήμα στον φασματογράφο μάζας αμέσως μετά την πηγή ιόντων. Η βασικότερη λειτουργία ενός φασματόμετρου μαζών είναι να μπορεί να διαχωρίσει τα ιόντα που παράγονται στην πηγή ιόντων, έτσι ώστε το μετρούμενο ιοντικό ρεύμα στον ανιχνευτή ιόντων, που ακολουθεί τον αναλυτή μαζών, να αντιστοιχεί σε ιόντα με συγκεκριμένο λόγο m/z . Ο σκοπός του φίλτρου μαζών είναι ο διαχωρισμός δέσμης ιόντων σύμφωνα με την μοριακή τους μάζα σε σχέση με μια δέσμη ιόντων με παρόμοιας μάζας (ταξινομούνται με βάση το λόγο μάζας προς φορτίο m/z) και η επιλογή των ιόντων με μάζα σε συγκεκριμένη περιοχή έχοντας τη δυνατότητα να μεγιστοποιεί τις διαχωρισμένες εντάσεις (με διακριτική ικανότητα συνήθως 1 amu) τα οποία συνεχίζουν την πορεία τους στον ανιχνευτή ιόντων. Τα ταξινομημένα με βάση τη μάζα ιόντα, ανιχνεύονται από έναν πολλαπλασιαστή ηλεκτρονίων και το σήμα που προκύπτει στέλνεται σε ένα σύστημα δεδομένων για επεξεργασία. Από τον τύπο του αναλυτή μαζών εξαρτάται η Διαχωριστική Ικανότητα (Resolution, R) του οργάνου, που είναι το σπουδαιότερο χαρακτηριστικό της ποιότητας ενός φασματόμετρου μαζών.

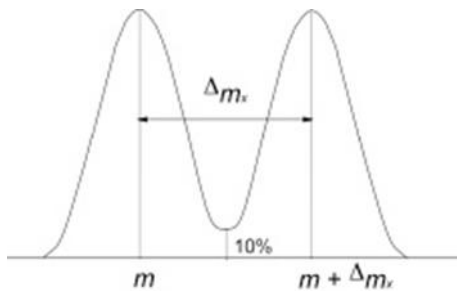
Η διαχωριστική (ή διακριτική) ικανότητα, R , ορίζεται από τη σχέση:

$$R = \frac{M}{\Delta M},$$

όπου M : μάζα της πρώτης κορυφής και ΔM : διαφορά μαζών δύο διαδοχικών κορυφών.

Τα φασματόμετρα μαζών διακρίνονται σε φασματόμετρα χαμηλής και υψηλής διαχωριστικής ικανότητας. Κατά συνθήκη, ικανοποιητικός διαχωρισμός θεωρείται ότι επιτυγχάνεται όταν δύο περίπου ισοϋψείς κορυφές επικαλύπτονται σε ύψος που δεν υπερβαίνει το 10% του ύψους των κορυφών, όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.4.5.

Για παράδειγμα, $R=1000$ σε μάζα 100,0 σημαίνει ότι το φασματόμετρο μπορεί να διαχωρίσει τη μάζα 100 από τη μάζα 100,1 ($\Delta M = 0,1$).



Σχήμα 4.4.5.1 Διαχωριστική Ικανότητα στη Φασματομετρία Μαζών

Η κύρια διαφορά μεταξύ των φασματόμετρων μαζών έγκειται στους αναλυτές που χρησιμοποιούν για το διαχωρισμό ιόντων. Οι συνηθέστεροι τύποι αναλυτών μαζών είναι:

1. Αναλυτής απλής εστίασης
2. Αναλυτής διπλής εστίασης
3. Παγίδα ιόντων (Ion trap)
4. Αναλυτής Χρόνου Πτήσης (Time of Flight, TOF)
5. Υβριδικός αναλυτής Orbitrap
6. Τετραπολικός αναλυτής (Quadrupole)
7. Κυκλοτρονικού συντονισμού ιόντων με μετασχηματισμό Fourier – Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance, FT-ICR. [60]

4.4.5.1 ΤΕΤΡΑΠΟΛΙΚΟΣ ΑΝΑΛΥΤΗΣ

Ένας από τους πιο ευρέως χρησιμοποιούμενους, οικονομικούς αλλά και με χαμηλή διαχωριστική ικανότητα αναλυτές μάζας είναι το τετράπολο, το οποίο αποτελείται από τέσσερις παράλληλους πόλους ή ράβδους. Είναι ο πιο διαδεδομένος αναλυτής μαζών γιατί παρουσιάζει μια σειρά από πλεονεκτήματα όπως είναι, πέρα των προαναφερθέντων, η

συμπαγής κατασκευή του, ταχεία σάρωση (<100ms), δυνατότητα συνδυασμών με υβριδικά όργανα (όργανα με άνω του ενός αναλυτή μαζών) και τέλος αμεσότερη συμβατότητα με χρωματογραφικές τεχνικές. Ο διαχωρισμός μαζών βασίζεται στην κίνηση των ιόντων που επιτυγχάνεται με την υπέρθεση ενός εναλλασσόμενου ηλεκτρικού πεδίου με συχνότητα στην περιοχή των ραδιοκυμάτων (RF, radiofrequency), σε ένα συνεχές (DC) ηλεκτρικό πεδίο. Το DC-RF πεδίο εφαρμόζεται στις τέσσερις παράλληλες ράβδους, όπως δείχνεται στην Εικόνα 4.4.5.1.1



Εικόνα 4.4.5.1.1 Τετραπολικός αναλυτής

Τα ιόντα από την πηγή, εγχύονται στο άκρο μεταξύ των τεσσάρων ράβδων. Ο διαχωρισμός μάζας επιτυγχάνεται με ένα συνδυασμό των πεδίων RF και DC με αντίθετες πολικότητες στα ζεύγη αντίθετων ράβδων. Οι ταλαντώσεις διαδρομής που προκαλούνται από το μεταβαλλόμενο πεδίο RF τείνουν να προκαλούν τα ελαφρύτερα ιόντα να χτυπήσουν τους θετικούς πόλους και τα βαρύτερα να χτυπήσουν το αρνητικό ζεύγος, φιλτράροντας όλα τα ιόντα εκτός από αυτά της επιθυμητής μάζας. Ο Dawson (1976) συνέκρινε τη λειτουργία του με το να εμποδίζεται μια μπάλα να πέσει από μια σέλα, αναστρέφοντας τη σέλα στην κατάλληλη συχνότητα. Ένα πλεονέκτημα του τετράπολου έναντι των μαγνητικών αναλυτών είναι ότι τα πεδία που απαιτούνται για την εστίαση μιας συγκεκριμένης μάζας μπορούν να αλλάξουν πολύ γρήγορα (10^{-3} sec), το οποίο είναι ιδιαίτερα πολύτιμο για μετρήσεις ελεγχόμενες από υπολογιστή, όπως η παρακολούθηση πολλαπλών ιόντων (Multiple Ion Monitoring). 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 σε χημικές αναλύσεις και συνήθως χρησιμοποιούνται μετά από αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography, GC) με την οποία επιτυγχάνεται διαχωρισμός των συστατικών ενός μίγματος, για ευκολότερη ταυτοποίηση κάθε συστατικού [65].

4.5 ANIXNEYTHS

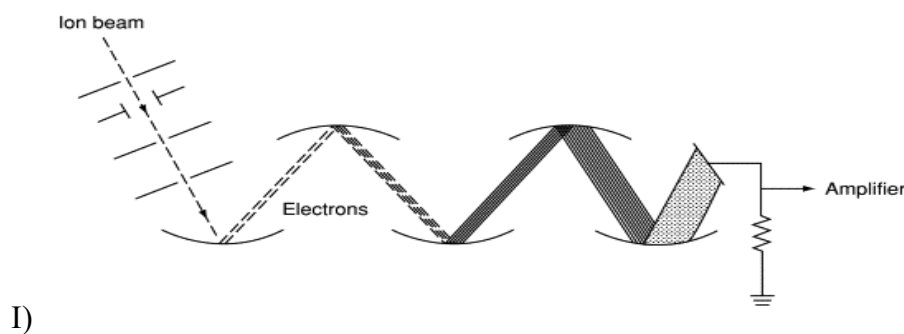
Ο ανιχνευτής παράγει στην έξοδό του ηλεκτρικό σήμα (συνήθως ηλεκτρικό ρεύμα) ανάλογο του αριθμού ιόντων και του φορτίου τους, που δέχεται στην είσοδό του στη μονάδα του χρόνου.

Δύο είναι τα είδη των ανιχνευτών που χρησιμοποιούνται περισσότερο:

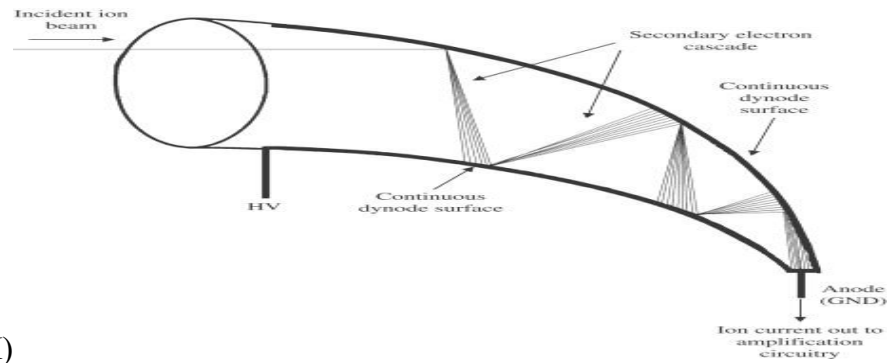
- i. Φαρανταϊκό Κύπελλο (Faraday Cup)
- ii. Ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής (Electron Multiplier)

4.5.1 ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΗΣ (Electron Multiplier)

Είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη διάταξη ανίχνευσης στο φασματομέτρο μαζών. Η κατασκευή ουσιαστικά αποτελείται από γυάλινο ή μεταλλικό σωλήνα με μεταλλική επίστρωση, που παρουσιάζει χαμηλή ηλεκτρική αγωγιμότητα. Εφαρμόζεται διαφορά δυναμικού στα δύο άκρα με τρόπο, ώστε να εμφανίζει γραμμική μεταβολή του δυναμικού κατά μήκος του σωλήνα. Η κάθοδος καλύπτεται από επιφάνεια Cu/Be από όπου με τη σύγκρουση ιόντος ακολουθεί εκπομπή ηλεκτρονίων. Ανάλογα με το σχεδιασμό του ανιχνευτή, μπορεί να επιτευχθεί ενίσχυση σήματος έως και 10^7 . Στο Σχήμα 4.5.1, δίνεται η βασική διάταξη ενός πολλαπλασιαστή ηλεκτρονίων και ενός πολλαπλασιαστή ηλεκτρονίων σχήματος τρομπέτας. Στο συγκεκριμένο ανιχνευτή, εφαρμόζεται δυναμικό 1,8-2V κατά μήκος του. Ακολουθώντας την αρχική σύγκρουση των ιόντων, η δέσμη των ηλεκτρονίων που έχει διαφύγει, προσπίπτει στο απέναντι εσωτερικό πλευρό του σωλήνα και εκπέμπει περισσότερα ηλεκτρόνια σε κάθε κρούση. Τέτοιες διατάξεις επιτυγχάνουν πολλαπλασιασμό της δέσμης (άρα και της έντασης του σήματος) κατά 10^5 - 10^8 [60].



I)



II)

Σχήμα 4.5.1.1 I) Βασική διάταξη ενός πολλαπλασιαστή II) Πολλαπλασιαστής ηλεκτρονίων σχήματος τρομπέτας

4.6 ΣΥΣΤΗΜΑ ΚΕΝΟΥ

Η λειτουργία των φασματόμετρων μαζών προϋποθέτει τη συνεχή λειτουργία συστήματος παραγωγής υψηλού κενού στην περιοχή 10^{-5} - 10^{-8} Torr, οπότε δημιουργείται επαρκής ποσότητα ατμών για τη λήψη του φάσματος. Η παραμικρή διαρροή ατμοσφαιρικού αέρα, π.χ. στην πηγή ιόντων, θα έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της παραγωγής ιόντων της εξεταζόμενης ένωσης και την εμφάνιση σημάτων που αντιστοιχούν στον ιοντισμό των συστατικών της ατμόσφαιρας.

Στα περισσότερα φασματόμετρα μαζών το κενό επιτυγχάνεται με συνδυασμό αντλιών. Περιστροφικές αντλίες μειώνουν αρχικά την πίεση στα 10^{-3} Torr και στη συνέχεια αναλαμβάνουν αντλίες διάχυσης ελαίου.

Η παρουσία του κενού είναι απαραίτητη προκειμένου να συγκρούονται τα ηλεκτρόνια μόνο με τα μόρια της ένωσης και όχι με τα μόρια αερίων που βρίσκονται στον ατμοσφαιρικό αέρα αλλά και για τα σχηματιζόμενα ιόντα να μη συγκρούονται με τα μόρια του ατμοσφαιρικού αέρα, γεγονός που θα οδηγούσε στην καταστροφή τους [60].

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

Για την επιλογή κατάλληλης μεθόδου ανάλυσης των δύο αντικαταθλιπτικών φαρμάκων σερτραλίνης και σιταλοπράμης, πραγματοποιήθηκε βιβλιογραφική ανασκόπηση. Από αυτήν προέκυψε ότι για τον ποσοτικό προσδιορισμό αυτών των ενώσεων χρησιμοποιείται κυρίως η υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας [67],[69-72]. Η υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματογράφο σε σειρά όμως δεν μπορεί να αναλύσει πτητικές ενώσεις γρήγορα και υστερεί και στην ταυτοποίηση αγνώστων κορυφών τοξικών ουσιών, γι' αυτό το λόγο η αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας προτιμάται σε ένα τοξικολογικό εργαστήριο. Με τη χρήση αυτής της τεχνικής επιτυγχάνεται γρήγορη ανάλυση, υψηλός διαχωρισμός των ενώσεων, μεγάλη ευαισθησία αλλά και ακρίβεια. Το σημαντικότερο δε όλων είναι ότι η τεχνική είναι σχεδόν ανέξοδη και κυρίως μη καταστρεπτική, κάνοντας δυνατή την on-line σύζευξη, για παράδειγμα, με το φασματόμετρο μάζας. Με την αέρια χρωματογραφία υπάρχουν κάποιες εργασίες ποσοτικού προσδιορισμού αυτών των ενώσεων [66,68],[73-75]. Γενικά η προκατεργασία του δείγματος που χρησιμοποιείται περισσότερο είναι η εκχύλιση στερεού-υγρού, ακολουθούμενη από εξάτμιση της οργανικής φάσης, επαναδιαλυτοποίηση και παραγωγοποίηση. Αυτό όμως παρουσιάζει ένα μειονέκτημα καθώς απαιτεί πολύ μεγάλο χρόνο προκατεργασίας. Αξίζει να σημειωθεί ότι στις περισσότερες εργασίες επιλέγεται πρόγραμμα επιλεγμένων ιόντων (SIM) για αύξηση της ευαισθησίας. Δεν υπάρχουν αναφορές σε μεθόδους ποσοτικού προσδιορισμού μεγάλου αριθμού ενώσεων που να χρειάζονται μόνο ένα στάδιο προκατεργασίας. Παρακάτω στον πίνακα 5.1 παρουσιάζονται συνοπτικά μερικές σημαντικές εργασίες από το 2007 έως σήμερα που αναφέρουν τον ποσοτικό προσδιορισμό των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων με αέρια αλλά και υγρή χρωματογραφία συζευγμένες με φασματομετρία μάζας

Πίνακας 5.1. Βιβλιογραφική ανασκόπηση μεθόδων ποσοτικού προσδιορισμού αντικαταθλιπτικών με αέρια και υγρή χρωματογραφία συζευγμένες με φασματομετρία μάζας

Πηγή	Ενώσεις	Βιολογικό Δείγμα	Τεχνική	Προκατεργασία	Σχόλια	Έτος
[66]	11 αντικαταθλιπτικά και 4 μεταβολίτες τους	Αίμα	GC-MS	SPE, παραγωγποίηση	SIM mode, Ευαισθησία	2012
[67]	Όλοι οι SSRIs και οι μεταβολίτες τους	Πλάσμα	HPLC- MS	SPE	Μεγάλος χρόνος προκατεργασίας	2012
[68]	Σερτραλίνη και δισμεθυλσετραλίνη	Αίμα	GC-MS	SPE, παραγωγποίηση	SIM mode	2011
[69]	18 αντικαταθλιπτικά και μεταβολίτες	Σάλιο	LC-MS-MS	SPE	MRM, αρκετά γρήγορη	2020
[70]	9 αντικαταθλιπτικά και μεταβολίτες τους	Σάλιο και πλάσμα	LC-MS/MS	SPE	MRM	2008
[71]	14 αντικαταθλιπτικά και μεταβολίτες τους	Πλάσμα	LC-MS	On line-SPE	MRM σχεδόν χωρίς προκατεργασία	2007
[72]	Σιταλοπράμη, Σερτραλίνη, βουπροπιόνη και υδροξυβουπροπιόνη	πλάσμα	(TFC-MS/MS)	SPE	Υψηλοί συντελεστές συσχέτισης	2014
[73]	Χλωζαπίνη, βουπροπιόνη, μιρταζαπίνη, σερτραλίνη, χλωμιπραμίνη,σιταλοπράμη	Πλάσμα, ορός, ολικό αίμα	GC-MS	SPE χωρίς παραγωγποίηση	Πολύ καλή αποτελεσματικότητα μεταξύ διάφορων υποστρωμάτων	2016
[74]	αντικαταθλιπτικά	Ολικό αίμα	GC/MSD και GC/NPD/μECD	SPE παραγωγποίηση	Πολύ υψηλή ευαισθησία, μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων και εφαρμογή σε ολικό αίμα	2013
[75]	14 αντικαταθλιπτικά	Ολικό αίμα	GC-MS/MS	SPE, εξάτμιση, επαναδιάλυση	SIM-SIM MODE Πολύ καλά όρια LOD LLOQ Υψηλή ευαισθησία	2016

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

6. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

6.1 ΟΡΓΑΝΑ ΚΑΙ ΛΟΙΠΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

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

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

GC/MS γυάλινα φιαλίδια (vials), Agilent Technologies

Vortex Zx³, Velp Scientifica

Ανακινήτριας 19 θέσεων για eppendorf (Classic Advanced Vortex Mixer), Velp Scientifica

Φυγόκεντρος, Universal 320, Hettich Zentrifugen



Εικόνα 6.1.1 Φυγόκεντρος



Εικόνα 6.1.2 Ζυγός



Εικόνα 6.1.3 Ανακινήτριας eppendorf



Εικόνα 6.1.4 Vortex

6.2 ΠΡΟΤΥΠΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ, ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΛΥΤΕΣ

Πρότυπα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς:

- Sertraline 1000ppm
- Citalopram 1000ppm
- Cocaine-D₃ Certified Reference Material 100μg/mL (ampule)

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγμάτωση εκχύλισης υγρού-υγρού σε βιολογικά δείγματα και πιο συγκεκριμένα σε δείγματα αίματος τοξικολογικού και ιατροδικαστικού ενδιαφέροντος, ήταν:

- Οξικός Έθυλεστέρας (Ethyl Acetate) HPLC grade, Chem-Lab
- Μεθανόλη (Methanol) Chromasolv® LC-MS grade, Fluka

Ρυθμιστής του pH: Ανθρακικό κάλιο (Potassium Carbonate) for analysis, PRS Panreac

Οι τεχνικές εκχύλισης με διαλύτες σχεδιάζονται για να απομακρύνουν όσο το δυνατόν περισσότερη αναλυόμενη ουσία από το αρχικό υπόστρωμα προς ανάλυση. Η επιλογή του διαλύτη είναι σημαντική για την ελαχιστοποίηση του φαινομένου της συν-εκχύλισης μη επιθυμητών ενώσεων και συνεπώς την αύξηση του θορύβου και την εξασθένηση του σήματος. Ως εκ τούτου απαιτείται καθαρισμός δείγματος για τη μείωση των παρεμβολών, καθώς οι παρεμβολές αυτές μπορούν να καταστρέψουν τα αναλυτικά όργανα και να περιπλέξουν τον προσδιορισμό και την ποσοτικοποίηση των αναλυτών.

6.3 ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Αναλύθηκαν τα νεκροτομικά δείγματα από διάφορες υποθέσεις της Ιατροδικαστικής Υπηρεσίας Θεσσαλονίκης. Συγκεκριμένα λήφθηκαν δείγματα, τα οποία είναι περιστατικά πνιγμών, από τα έτη 2016 έως 2018, στα οποία είχαν βρεθεί με μέθοδο ‘screening’ τα δύο αντικαταθλιπτικά, σερτραλίνη και σιταλοπράμη προκειμένου να ποσοτικοποιηθούν με αυτή τη μέθοδο. Παρακάτω, στον **πίνακα 6.3.1** παρατίθενται χρήσιμες πληροφορίες για τα περιστατικά.

Περιστατικά	Έτος	Ημ/νια Θανάτου ή Εύρεσης	Φύλο	Ηλικία
Περιστατικό 1	2017	04/02/2017	Θήλυ	72
Περιστατικό 2	2018	24/02/2018	Θήλυ	74
Περιστατικό 3	2018	25/04/2018	Θήλυ	65
Περιστατικό 4	2018	21/07/2018	Άρρεν	38
Περιστατικό 5	2018	21/07/2018	Άρρεν	76
Περιστατικό 6	2018	22/07/2018	Άρρεν	81
Περιστατικό 7	2018	15/08/2018	Θήλυ	73
Περιστατικό 8	2018	02/09/2018	Άρρεν	70
Περιστατικό 9	2018	09/09/2018	Θήλυ	64

Πίνακας 6.3.1 Συγκεντρωτικός πίνακας πληροφοριών πραγματικών δειγμάτων

7. ΜΕΘΟΔΟΣ

7.1 ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ GC/MS

7.1.1 ΣΥΣΤΗΜΑ GC/MS

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



Εικόνα 7.1.1 Σύστημα αέριου χρωματογράφου συζευγμένο με φασματογράφο μάζας και αυτόματο δειγματολήπτη.

7.1.2 ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΟΡΓΑΝΟΥ

Για τις αναλύσεις όλων των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε αυτόματος δειγματολήπτης CTC Pal (CTC –CH 4222, Analytical Switzerland) 98 θέσεων με διατηρούμενη σταθερή θερμοκρασία στους 4°C. Για κάθε ανάλυση γινόταν έγχυση 1 μL σε PVT Inlet. Πιο αναλυτικά πριν τη εισαγωγή του δείγματος στο GC/MS γίνονται τρεις πλύσεις με μεθανόλη και στη συνέχεια τρεις πλύσεις με οξικό αιθυλεστέρα έτσι ώστε να καθαρίζεται η μικροσύριγγα. Έπειτα γίνεται πλύση με το δείγμα, ακολουθεί 6 φορές ρόφηση του δείγματος, πετυχαίνοντας έτσι και ανάμιξη του δείγματος σε περίπτωση που έχουν περάσει πολλές ώρες λόγω ανάλυσης πολλών δειγμάτων. Μετά την εισαγωγή του δείγματος ακολουθούν πάλι τρεις πλύσεις με μεθανόλη και τρεις με οξικό αιθυλεστέρα. Όλοι οι παράμετροι για τον εισαγωγέα του αέριου χρωματογράφου αναγράφονται στον **πίνακα 7.1.2.1**. Η επιλογή των παραμέτρων για τον εισαγωγέα έγινε βάση προγράμματος λογισμικού του οργάνου και σύμφωνα με τις ιδιότητες του διαλύτη του δείγματος.

GC	Agilent 7890A
Διαίρεση δείγματος	splitless
Συνθήκες MS	Agilent 5975 C, EI 70 eV ,mass range : 50-450 amu
Πρόγραμμα Θερμοκρασιών	Αρχική θερμοκρασία 230 °C Τελική θερμοκρασία 325 °C
Πίεση	51,2 psi

Πίνακας 7.1.2.1. Παράμετροι εισαγωγή

Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε για όλες τις αναλύσεις ήταν Agilent J&W HP-5ms capillary column με διαστάσεις 30 m x 0.25mm x 0.25 μm. Όλοι οι παράμετροι για το φούρνο του αέριου χρωματογράφου αναγράφονται στον **πίνακα 7.1.2.2.**

ΦΟΥΡΝΟΣ		
Ροή	2,0 mL/min	
Χρόνος	11 min	
Θερμοκρασιακό πρόγραμμα	Αρχική 230°C	Παραμονή 1 min
	Αύξηση στους 325°C με ρυθμό 11°C/min.	Παραμονή 10 min
	Εφαρμογή αντίθετης ροής στους 325°C (backflash).	5 min

Πίνακας 7.1.2.2 Παράμετροι φούρνου

Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα στο φούρνο ξεκινάει από τους 230°C και αμέσως ανεβαίνει στους 230°C όπου παραμένει για 1 λεπτό και αυξάνει με ρυθμό 11°C/min μέχρι τους 325°C. Η τελική θερμοκρασία διατηρείται για 5 min έτσι ώστε να εκλουστούν όλες οι ενώσεις από τη στήλη. Η ροή του φέροντος αερίου είναι 2,0 mL/min. Ο χρόνος που χρειάζεται το πρόγραμμα για να ολοκληρωθεί είναι 11 min και ακολούθως απαιτούνται άλλα 5 min στους 325 °C για να ολοκληρωθεί το (backflash) πρόγραμμα καθαρισμού της στήλης με αντίθετη ροή του φέροντος αερίου, που είναι το ήλιο (He).

Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με πρόγραμμα σάρωσης επιλεκτικής παρακολούθησης ιόντων (Single Ion Monitoring-SIM) για την εύρεση και επιβεβαίωση των καταλλήλων ιόντων των θραυσμάτων των δύο φαρμάκων που μελετάμε. Εφόσον η ανάλυση αποσκοπεί στη μέτρηση ενώσεων με γνωστά φάσματα χρησιμοποιείται η τεχνική της επιλεκτικής παρακολούθησης ιόντων. Για κάθε ένωση επιλέχθηκαν τρία χαρακτηριστικά ιόντα του φάσματός της καθεμίας, ενώ ο αναλυτής μεταβαίνει τάχιστα από τη μια μάζα στην άλλη, μετρώντας μόνον αυτά τα ιόντα. Η τεχνική αυτή προσφέρει μεγάλη ευαισθησία. Το παρόν θερμοκρασιακό πρόγραμμα και γενικότερα η μέθοδος επιλέχθηκε μετά από επανειλημμένες δοκιμές μεθανολικών πρότυπων διαλυμάτων.

7.2 ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Σε ένα καθαρό πλαστικό φιαλίδιο των 2 mL (erpendorf) μεταφέρεται 250 μ L βιολογικού δείγματος, αίματος και ακολούθως προσθήκη 25 μ L εσωτερικού προτύπου (IS) Κοκαΐνης-D3 συγκέντρωσης 10 μ g/mL, στη συνέχεια γίνεται ρύθμιση του pH (περίπου 12) με προσθήκη 100 μ L κορεσμένου διαλύματος K₂CO₃ και τέλος γίνεται προσθήκη 1 mL οργανικού διαλύτη οξικού αιθυλεστέρα (ethyl acetate). Ακολουθεί ανάδευση για 10 λεπτά σε ανακινητήρα και 10 λεπτά φυγοκέντρηση στις 10.000 rpm. Μετά ακολουθεί ποσοτική παραλαβή της οργανικής στοιβάδας που βρίσκεται επάνω καθώς ο οξικός αιθυλεστέρας έχει μικρότερη πυκνότητα από το νερό ($d_{\text{ethyl acetate}} = 0,902 \text{ g/ml}$) και ένα στάδιο εξάτμισης μέχρι ξηρού. Τέλος, γίνεται επαναδιάλυση σε 50 μ L οξικού αιθυλεστέρα και μεταφορά σε inlet μέσα σε φιαλίδιο (vial) GC. Τέλος, πραγματοποιείται η έγχυση μέσω ένεσης 1 μ L στον αέριο χρωματογράφο που είναι συζευγμένος με φασματογράφο μάζας.

7.3 ΧΡΟΝΟΙ ΣΥΓΚΡΑΤΗΣΗΣ

Τα δυο αντικαταθλιπτικά φάρμακα αναλύθηκαν στο χρωματογραφικό σύστημα GC-MS Agilent Technologies 7890A με τη χρωματογραφική μέθοδο που περιεγράφηκε στην προηγούμενη παράγραφο και καταγράφηκαν οι χρόνοι συγκράτησης. Στον παρακάτω πίνακα 7.1.3.1 δίνονται ο χρόνος έκλουσης αλλά και τα χαρακτηριστικά ιόντα της κάθε ένωσης. Σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία η ταυτοποίηση μιας ένωσης με GC/MS

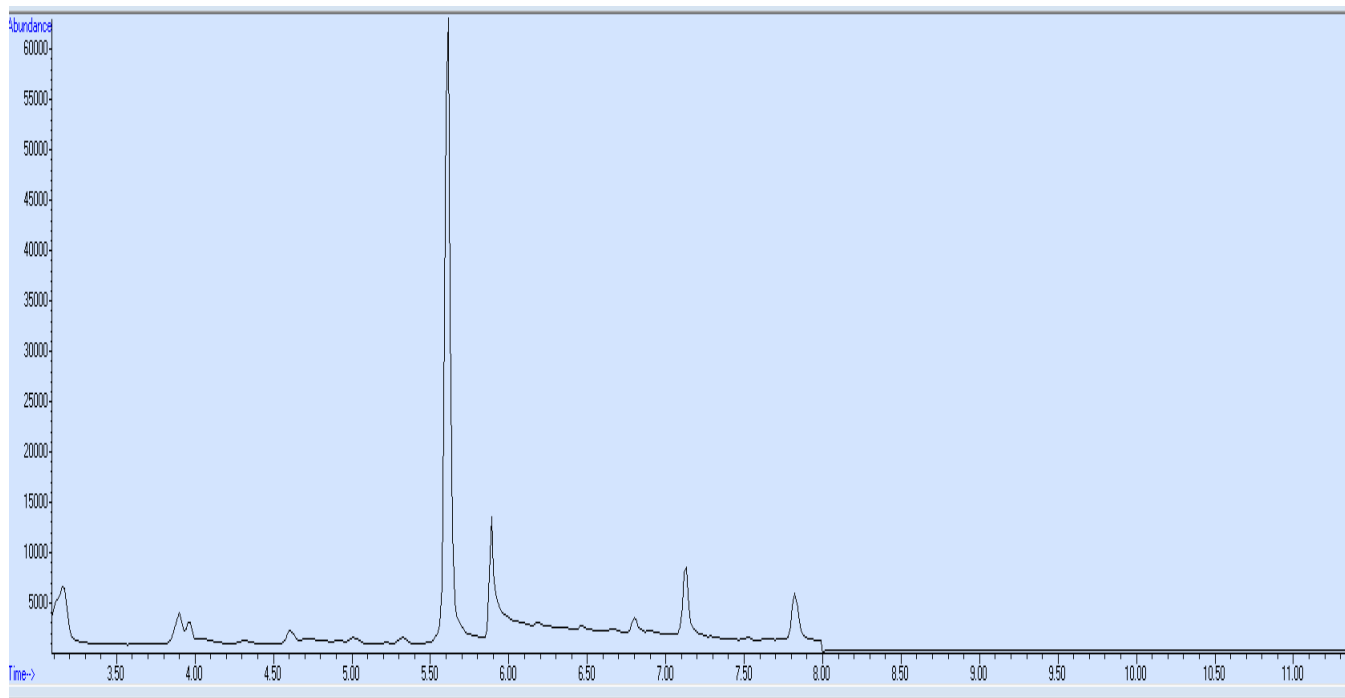
πραγματοποιείται με βάση τον χρόνο έκλουσης (Rt), ένα ιόν ταυτοποίησης (target ion) και δύο βοηθητικά (δευτερεύοντα) ιόντα (qualifier ions).

Ένωση	Χρόνος Συγκράτησης (min)	Κύριο Ιόν (m/z)	Ιόν ταυτοποίησης (m/z)	Ιόν Ποσοτικοποίησης (m/z)
Σερτραλίνη	5.59	274	274	274
Σιταλοπράμη	5.67	58	238	58

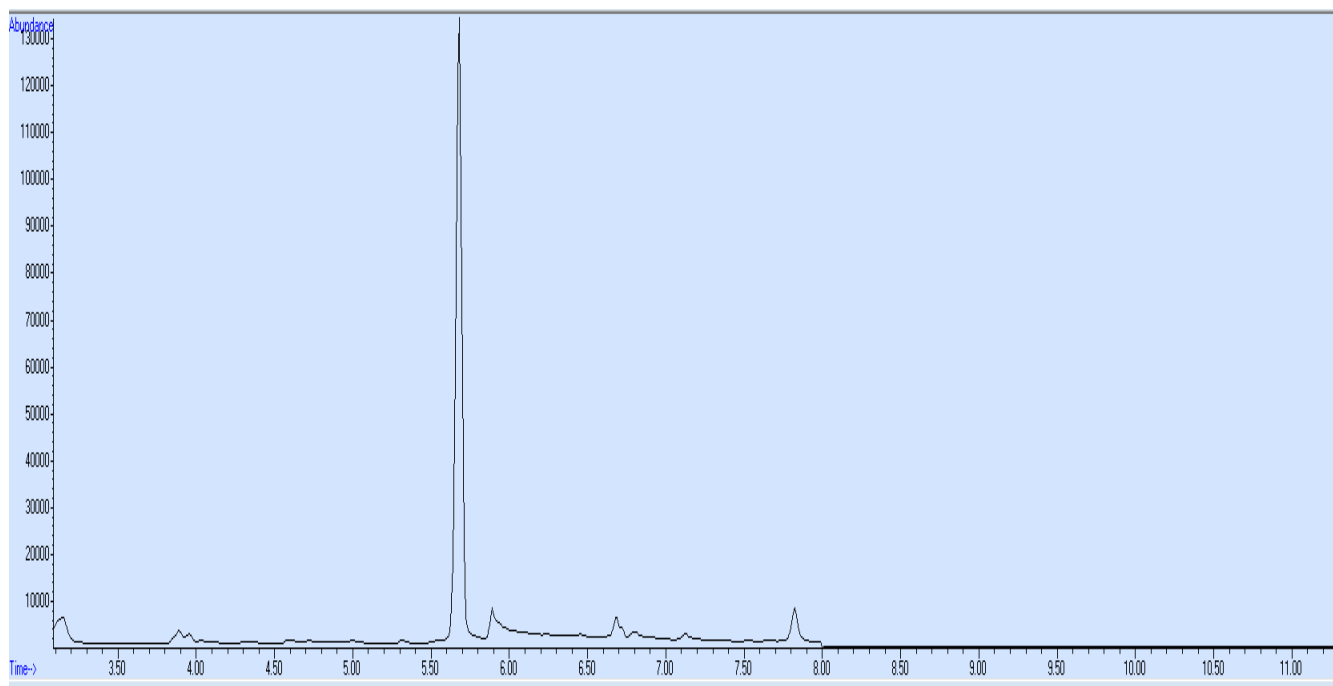
Πίνακας 7.1.3.1 Συνολική καταγραφή χρόνου συγκράτησης, κύριου ιόντος, ιόντος ταυτοποίησης και ποσοτικοποίησης των ενώσεων

7.4 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑΤΑ ΕΝΩΣΕΩΝ

Οι δύο ενώσεις αναλύθηκαν στο χρωματογραφικό σύστημα GC-MS Agilent Technologies 7890A με τη χρωματογραφική μέθοδο που περιεγράφηκε στην παράγραφο 7.1.2 και καταγράφηκαν οι χρόνοι συγκράτησης όπως προαναφέρθηκε. Στα σχήματα 7.4.1 και 7.4.2 απεικονίζονται τα χρωματογραφήματα αυτών.



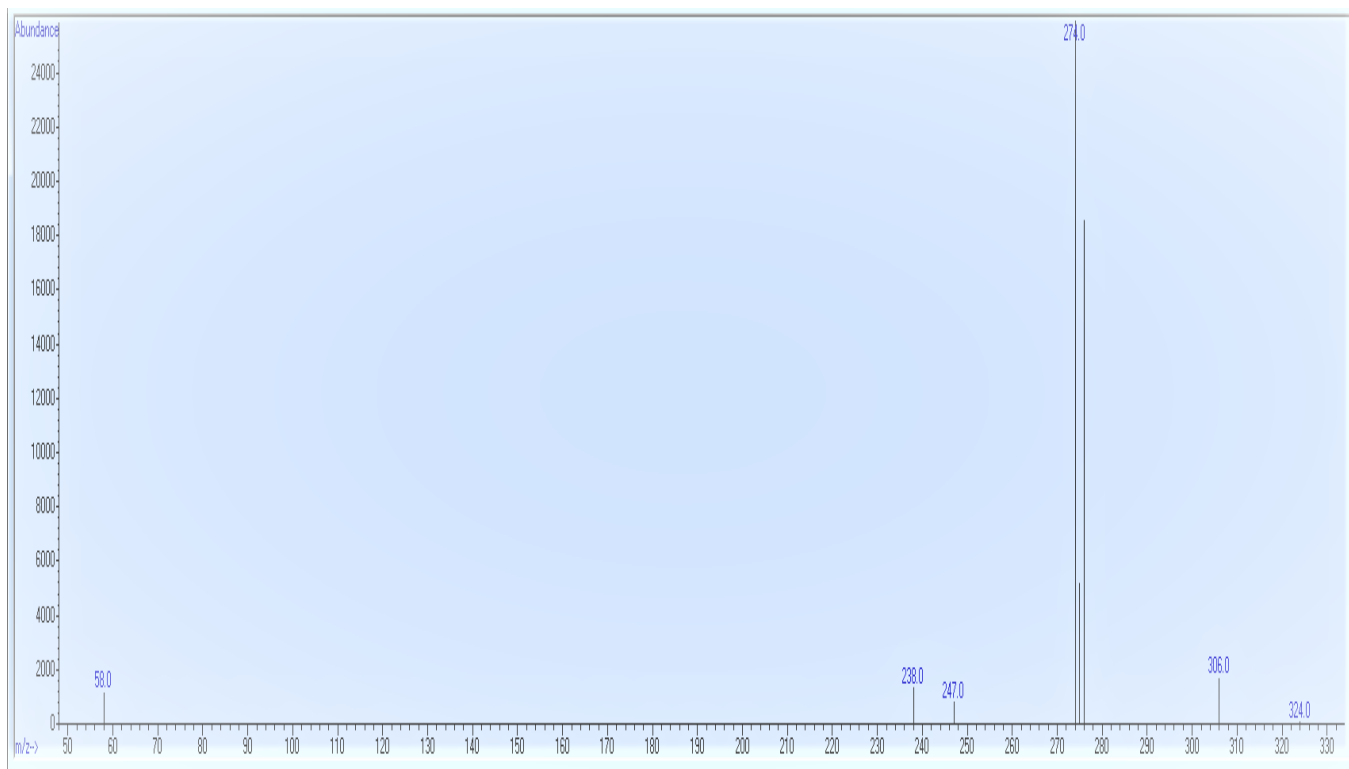
Σχήμα 7.4.1 Χρωματογράφημα σετραλίνης για 274 m/z και 276 m/z



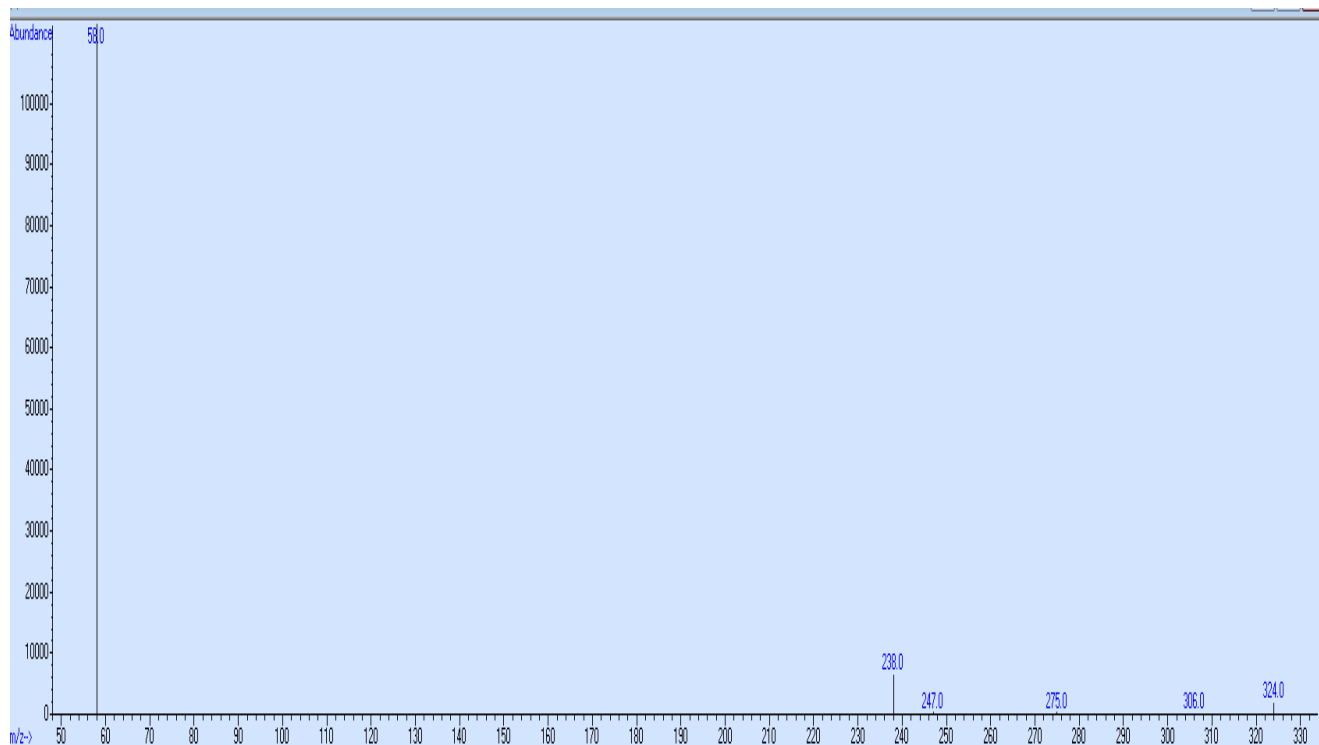
Σχήμα 7.4.2 Χρωματογράφημα σιταλοπράμης για 58 m/z και 238 m/z

7.5 ΦΑΣΜΑΤΑ ΜΑΖΩΝ

Στα Σχήματα 7.5.1, 7.5.2 απεικονίζονται τα φάσματα μαζών αυτών.

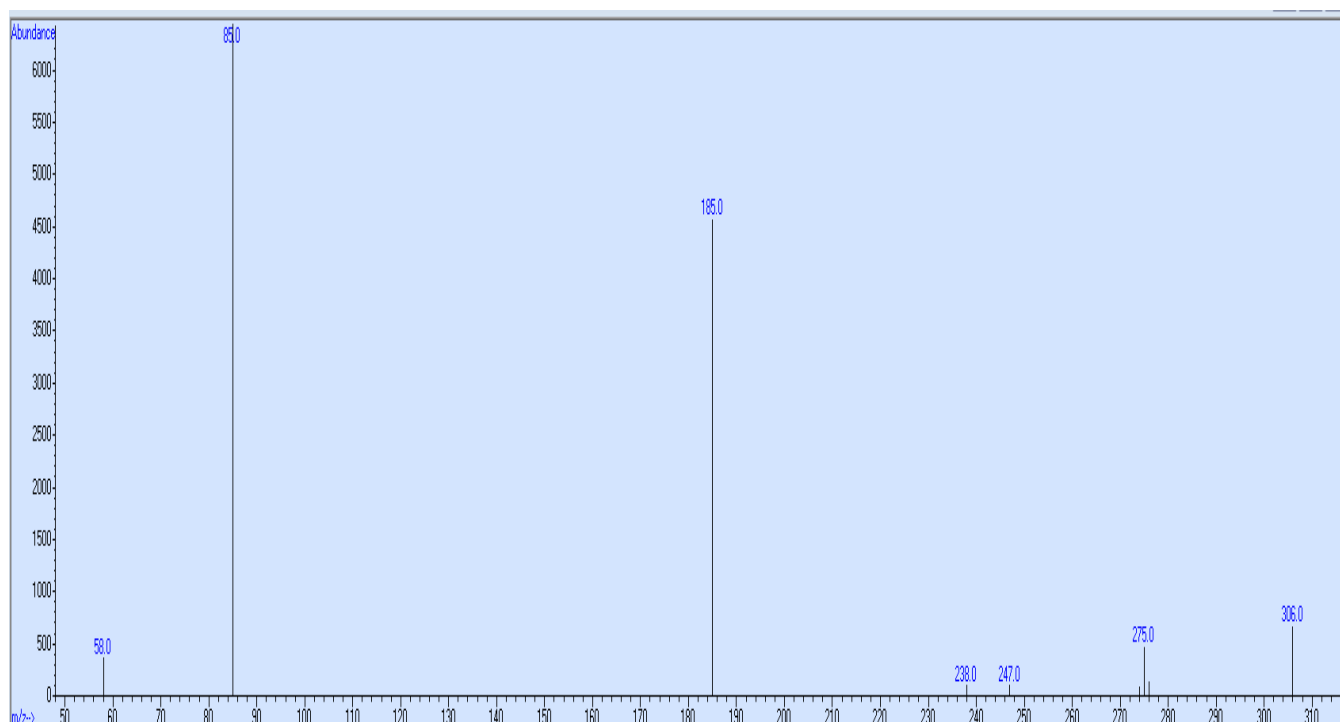


Σχήμα 7.5.1 Απεικόνιση φάσματος σετραλίνης



Σχήμα 7.5.2 Απεικόνιση φάσματος σιταλοπράμης

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο η Cocaine-D₃ η οποία εκλύεται στα 3,95 λεπτά. Στο παρακάτω σχήμα 7.5.3 παρουσιάζεται το φάσμα μάζας της όπως μετρήθηκε στο GC/MS.



Σχήμα 7.5.3 Φάσμα μάζας εσωτερικού προτύπου Cocaine-D₃

8. ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Λόγω της εξαιρετικής σημασίας της επικύρωσης της μεθόδου σε ολόκληρο το πεδίο της αναλυτικής χημείας, ένας μεγάλος αριθμός από έγγραφα καθοδήγησης σε αυτό το θέμα έχουν εκδοθεί από πολλούς διαφορετικούς διεθνείς οργανισμούς και επιτροπές.

Όλα αυτά τα έγγραφα είναι σημαντικά και πιθανότατα βοηθητικά για κάθε επικύρωση μεθόδου, αλλά μόνο λίγες αναφέρουν ειδικά ανάλυση ναρκωτικών, φαρμάκων και των μεταβολιτών τους σε βιολογικά δείγματα [52]- [58].

8.1 ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗΣ

Αναλυτικές μέθοδοι στην κλινική και εγκληματολογική τοξικολογία μπορεί να χρησιμοποιηθούν για ολιστική ανάλυση (screening) και ταυτοποίηση των ναρκωτικών, δηλητηρίων και των μεταβολιτών σε βιολογικά υγρά ή ιστούς αλλά και για την ταυτόχρονη

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

8.1.1 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΤΥΠΗΣ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Η πρότυπη καμπύλη αναφοράς των δύο αντικαταθλιπτικών φαρμάκων αποτελείται από επτά σημεία. Προκειμένου να κατασκευαστεί πρότυπη καμπύλη αναφοράς, παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα:

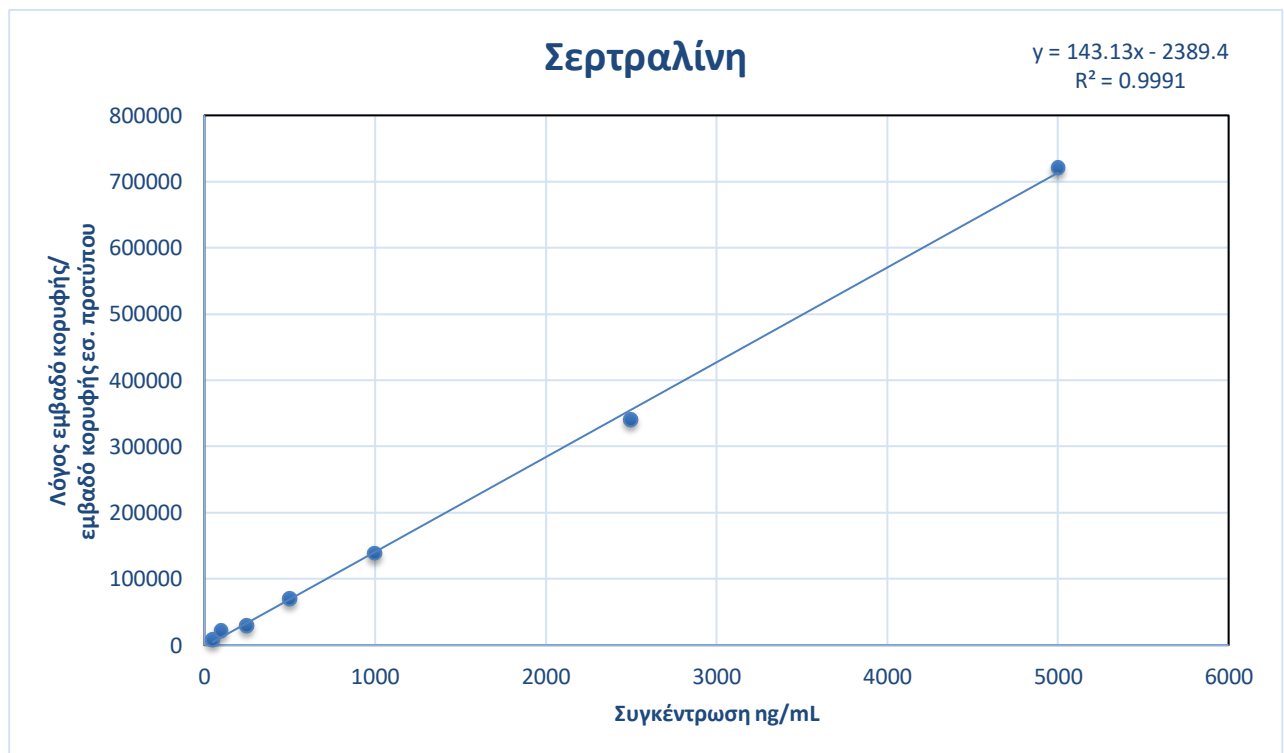
- Σερτραλίνης
- Σιταλοπράμης

σε συγκεντρώσεις:

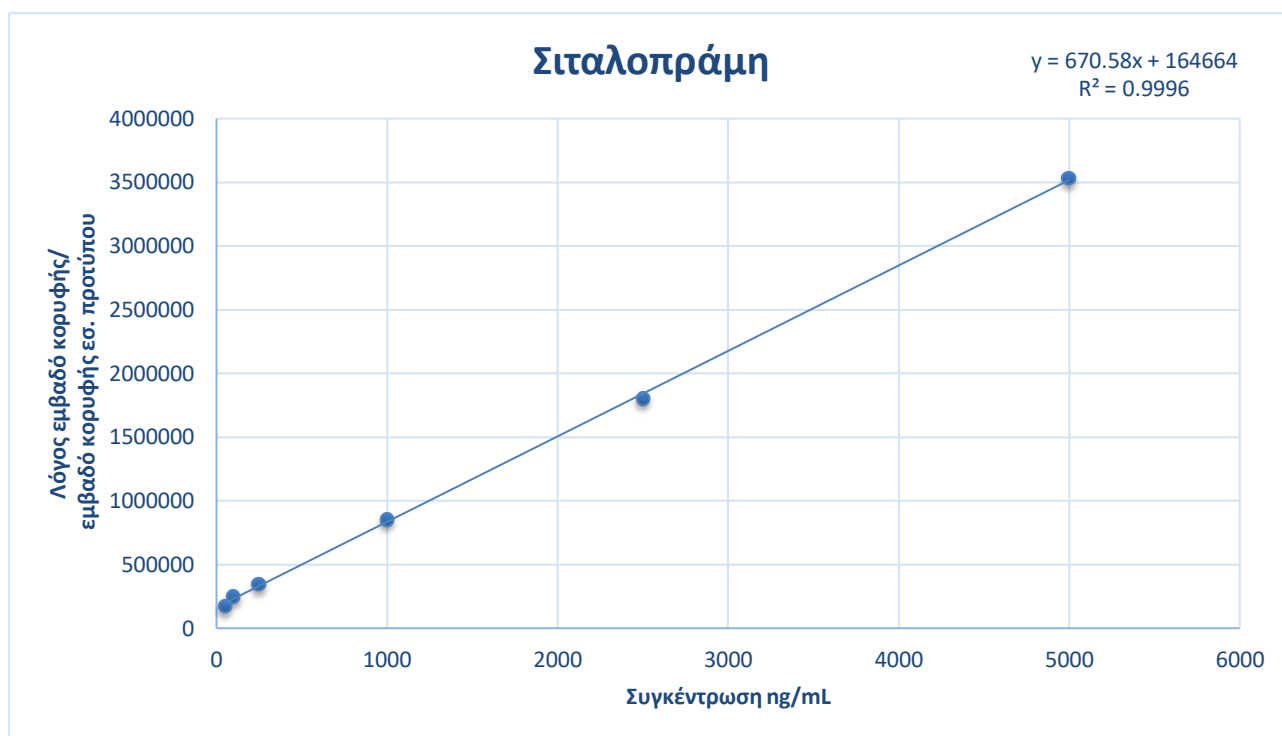
- 50 ng/mL
- 100 ng/mL
- 250 ng/mL
- 500 ng/mL
- 1000 ng/mL
- 2500 ng/mL
- 5000 ng/mL

Η πρότυπη καμπύλη αναφοράς κατασκευάστηκε με επιμόλυνση blank δείγματος ολικού αίματος με 25μL εσωτερικού προτύπου (IS) Κοκαΐνη-D₃ (Cocaine-D₃) 100μg/mL, εν συνεχεία προστέθηκαν τα πρότυπα μεθανολικά διαλύματα των δύο ενώσεων ούτως ώστε να προκύψουν οι αντίστοιχες τελικές συγκεντρώσεις (50,100,250,500,1000,2500,5000 ng/mL) στο αίμα. Ακολουθεί η ρύθμιση του pH με προσθήκη 100μL ρυθμιστικού διαλύματος K₂CO₃. Τέλος προστίθεται ο οργανικός διαλύτης σε ποσότητα 1 mL (οξικός αιθυλεστέρας). Ακολουθεί ανάμιξη για 10 λεπτά σε ανακινητήρα και 10 λεπτά φυγοκέντρηση στις 10.000 rpm. Έπειτα, γίνεται παραλαβή της οργανικής στοιβάδας, εξάτμιση μέχρι ξηρού και επαναδιάλυση σε 50 μL διαλύτη, τοποθέτηση σε inlets μέσα στα vials και εισαγωγή στο GC για ανάλυση.

Κατασκευάστηκε μία καμπύλη για κάθε ένωση χωριστά και έτσι έγινε κατασκευή της πρότυπης καμπύλης με 7 σημεία. Το εύρος των πρότυπων καμπύλων αναφοράς σχεδιάστηκε ούτως ώστε να καλύπτει τα θεραπευτικά και τοξικά επίπεδα της κάθε ένωσης. Όπως αυτά αναφέρθηκαν προγενέστερα στον **πίνακα 2.5.1** . Ο συντελεστής συσχέτισης (R^2) κυμάνθηκε από 0,9991 (σετραλίνη) έως 0,9996 (σιταλοπράμη). Ακολουθούν τα δύο σχήματα με τις πρότυπες καμπύλες αναφοράς.



Σχήμα 8.1.1.1 Πρότυπη καμπύλη αναφοράς Σετραλίνης



Σχήμα 8.1.1.2 Πρότυπη καμπύλη αναφοράς Σιταλοπράμης

Στον παρακάτω πίνακα 8.1.1.3 δίνονται οι γραμμικές περιοχές καθώς και ο συντελεστής συσχέτισης αλλά και η εξίσωση ευθείας για τις προσδιοριζόμενες ενώσεις.

Ένωση	Εξίσωση καμπύλης αναφοράς	R ²
Σερτραλίνη	$y = 143.13x - 2389.4$	0.9991
Σιταλοπράμη	$y = 670.58x + 164664$	0.9996

Πίνακας 8.1.1.3 Εξισώσεις ευθείας και συντελεστές συσχέτισης

Κατά την επικύρωση της μεθόδου ελέγχθηκε πρωτίστως η γραμμικότητα της καμπύλης αναφοράς. Η μέθοδος έδειξε ικανοποιητική γραμμικότητα για την περιοχή συγκεντρώσεων από 50 έως 5000 ng/mL. Η γραμμικότητα εκφράζεται με τον συντελεστή παλινδρόμησης (R²), ο οποίος είναι >0,990 και για τις δύο ενώσεις, κάτι που γίνεται εμφανές και στα παραπάνω σχήματα που απεικονίζουν τις καμπύλες αναφοράς.

Η επιλογή του κατάλληλου μοντέλου βαθμονόμησης είναι απαραίτητο για την αξιόπιστη ποσοτική μέτρηση. Γι' αυτό πρέπει να διερευνηθεί η σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης του αναλύτη στο δείγμα με την αντίστοιχη απόκριση του οργάνου (στις βιοαναλυτικές μεθόδους συνήθως χρησιμοποιείται ο λόγος του εμβαδού του αναλύτη προς το εμβαδό του εσωτερικού προτύπου IS). Τα πρότυπα αυτά διαλύματα θα πρέπει να καλύπτουν εξ' ολοκλήρου το εύρος της καμπύλης και θα πρέπει να είναι εξίσου κατανομημένα. Οι περισσότερες οδηγίες απαιτούν το ελάχιστο πέντε με οκτώ επίπεδα συγκέντρωσης και επίσης απαιτούν δύο έως έξι ίδια δείγματα (replicates) ανά συγκέντρωση. Γενικά είναι καλύτερο να παρασκευάζεται καμπύλη αναφοράς με λιγότερα επίπεδα συγκέντρωσης αλλά περισσότερα δείγματα ανά συγκέντρωση. Τέλος μετά από την μέτρηση των αναγκαίων δειγμάτων είναι αναγκαίο ένα μαθηματικό μοντέλο που θα περιγράφει την σχέση της συγκέντρωσης του αναλύτη με την απόκριση (σήμα) του οργάνου. Συνήθως χρησιμοποιείται γραμμικό μοντέλο, όπως η εξίσωση ευθείας ελάχιστων τετραγώνων.

8.1.2 ΟΡΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ (LOD) ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ (LOQ)

Ως όριο ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD) ορίζεται η μικρότερη ποσότητα μιας ουσίας που μπορεί να ανιχνευθεί με μια μέθοδο [59]. Το LOD λήφθηκε με βάση το τριπλάσιο ύψος κορυφής του θορύβου της βασικής γραμμής, σύμφωνα με τον τύπο:

$$S/N=3$$

όπου: S το σήμα της κορυφής και N ο θόρυβος της βασικής γραμμής.

Το όριο ποσοτικού προσδιορισμού (Limit of Quantification, LOQ) είναι η μικρότερη ποσότητα της ουσίας που μπορεί να προσδιοριστεί ποσοτικά με ακρίβεια και επαναληψιμότητα. Το LOQ έχει τιμή τριπλάσια του LOD και λήφθηκε ως το δεκαπλάσιο ύψος του θορύβου της βασικής γραμμής, σύμφωνα με τον τύπο:

$$S/N=10$$

Στην παρούσα εργασία, τα όρια ποσοτικού προσδιορισμού αποτελούν το πρώτο σημείο στις καμπύλες αναφοράς κάθε προσδιοριζόμενης ένωσης. Στον Πίνακα 8.1.2.1 δίνονται τα LOD και LOQ για τις δύο ενώσεις.

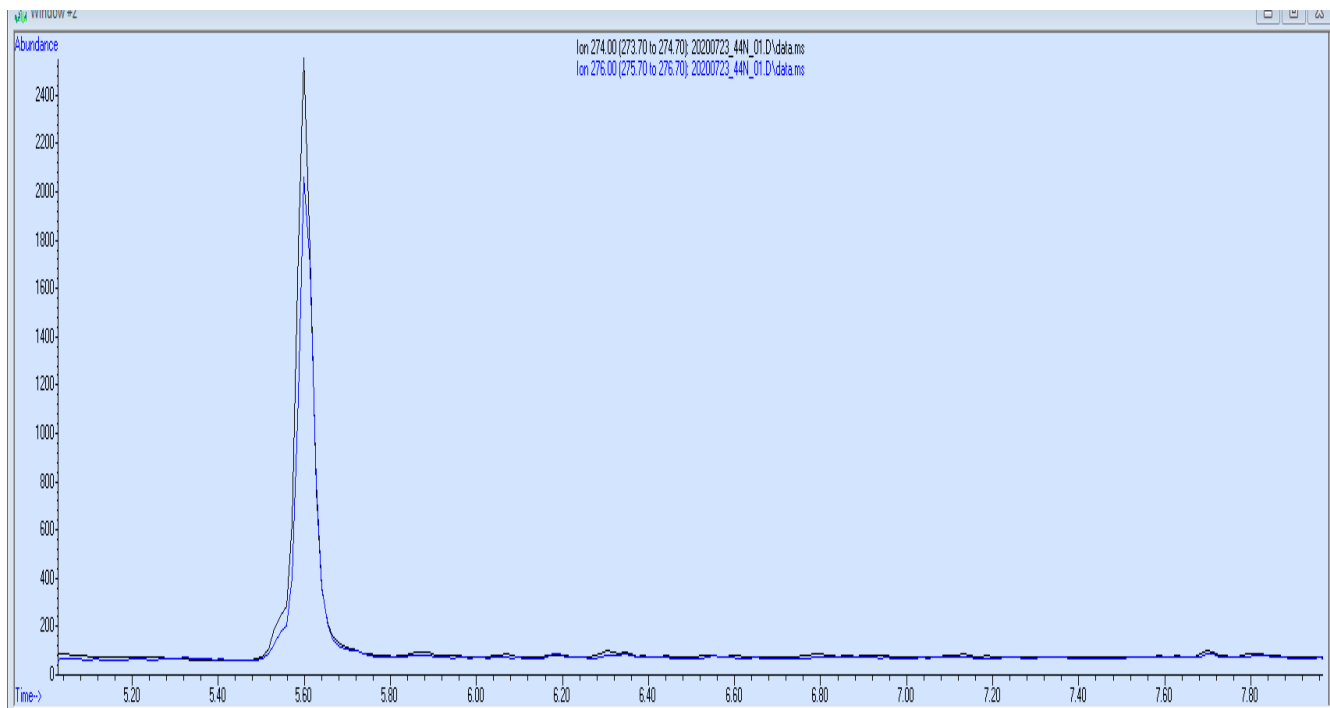
Ενώσεις	LOD	LOQ
Σερτραλίνη	16,67 ng/mL	50 ng/mL
Σιταλοπράμη	16,67 ng/mL	50 ng/mL

Πίνακας 8.1.2.1 LOD και LOQ

9. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΣΕ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

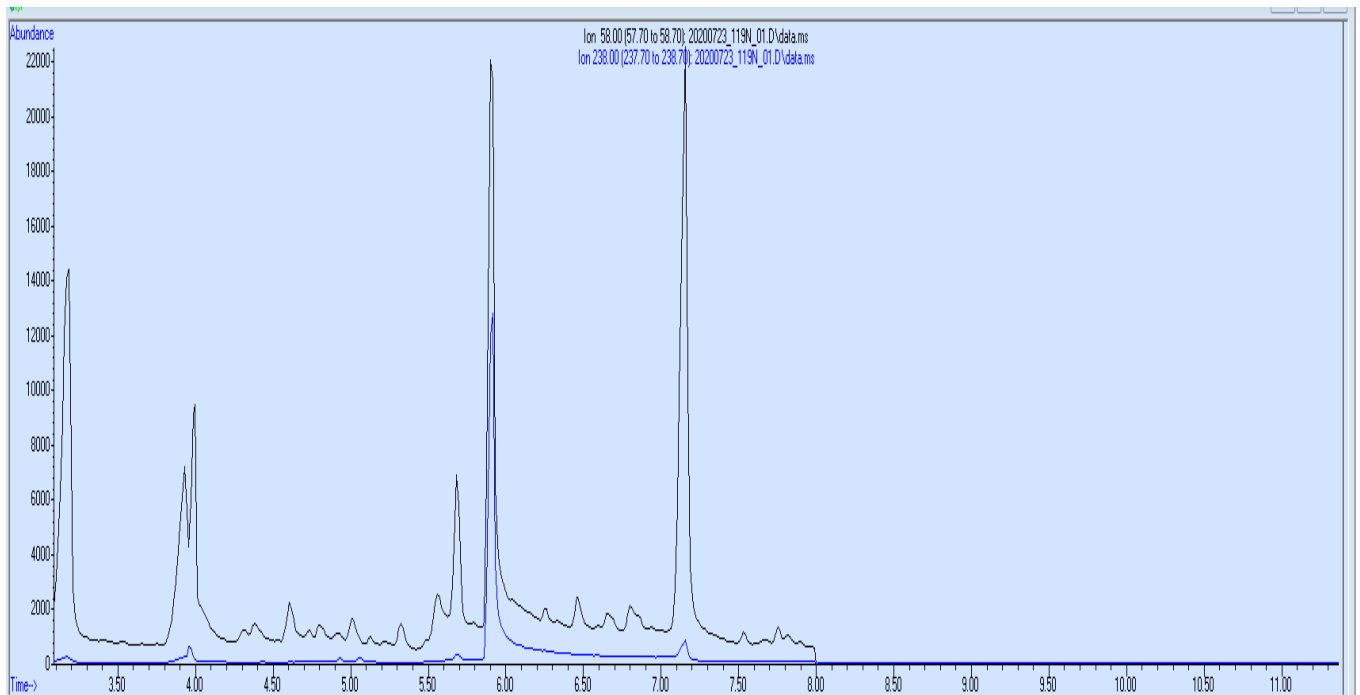
Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε σε εννέα πραγματικά νεκροτομικά δείγματα από περιστατικά πνιγμών προκειμένου να γίνει ο ποσοτικός προσδιορισμός των δύο αντικαταθλιπτικών και να διερευνηθεί εάν οι συγκεντρώσεις είναι πάνω από τα τοξικά όρια για τα δείγματα μας. Ακολουθούν τα χρωματογραφήματα των αντιπροσωπευτικών πραγματικών νεκροτομικών περιστατικών:

Περιστατικό 1. Στοιχεία θανούσας: ετών 72, αιτία θανάτου πνιγμός εντός ύδατος, ιστορικό ψυχικής διαταραχής και λάμβανε ψυχοφάρμακα. Από την τοξικολογική ανάλυση του νεκροτομικού αίματος που πραγματοποιήθηκε προσδιορίστηκε η σερτραλίνη σε συγκέντρωση 500 ng/mL. Βρέθηκε επίσης και μιρταζαπίνη χωρίς όμως να προσδιοριστεί η συγκέντρωσή της. Τα τοξικολογικά ευρήματα ταιριάζουν με το ιστορικό καθώς η θανούσα έπασχε από κατάθλιψη, και η μιρταζαπίνη και η σερτραλίνη είναι αντικαταθλιπτικά τα οποία χορηγούνται μαζί. Η τιμή της σερτραλίνης βρέθηκε σε τοξικά επίπεδα. Παρακάτω στην **εικόνα 9.1** δίνεται το χρωματογράφημα του πραγματικού δείγματος εξαγόμενου ιόντος 274 m/z για τη σερτραλίνη.



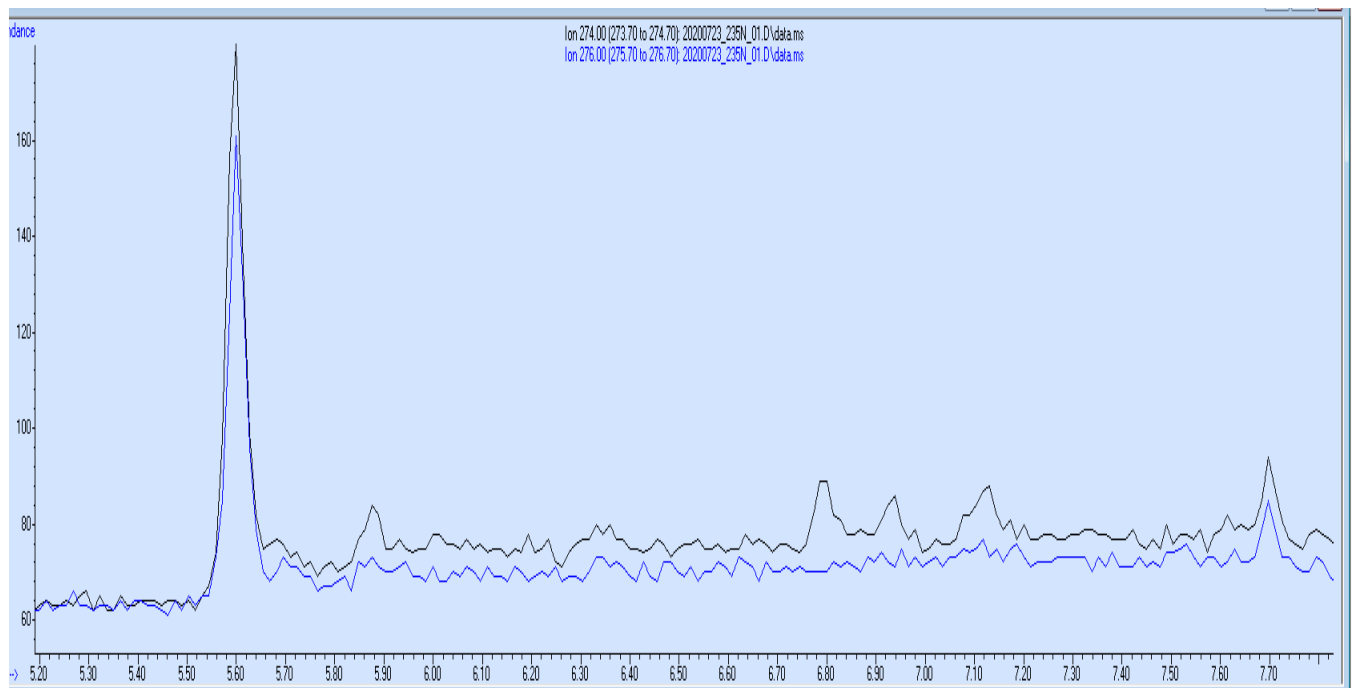
Εικόνα 9.1 Χρωματογράφημα εξαγόμενων ιόντων στα 274 και 276 m/z πραγματικού δείγματος, θετικού σε σερτραλίνη συγκέντρωσης 500 ng/mL.

Περιστατικό 2. Στοιχεία θανούσας: ετών 74, αιτία θανάτου πνιγμός εντός θαλάσσιου ύδατος, ψυχιατρική ασθενής, υπό αγωγή. Από την τοξικολογική ανάλυση του νεκροτομικού αίματος που πραγματοποιήθηκε προσδιορίστηκε η σιταλοπράμη σε συγκέντρωση 620 ng/mL. Βρέθηκε επίσης και κλοβαζάμη χωρίς όμως να προσδιοριστεί η συγκέντρωσή της. Η κλοβαζάμη είναι ένα φάρμακο που ανήκει στην ομάδα των βενζοδιαζεπινών και χορηγείται σε αγχώδεις διαταραχές αλλά και ως συμπληρωματική θεραπεία στην επιληψία. Τα τοξικολογικά ευρήματα ταιριάζουν με το ιστορικό καθώς η θανούσα ως ψυχιατρική ασθενής ακολουθούσε φαρμακευτική αγωγή η οποία περιλάμβανε κλοβαζάμη και σιταλοπράμη, ένα αντιεπιληπτικό και ένα αντικαταθλιπτικό φάρμακο. Η τιμή της σιταλοπράμης βρέθηκε σε τοξικά επίπεδα. Παρακάτω στην **εικόνα 9.2** δίνεται το χρωματογράφημα του πραγματικού δείγματος εξαγόμενου ιόντος 238 m/z για τη σιταλοπράμη.



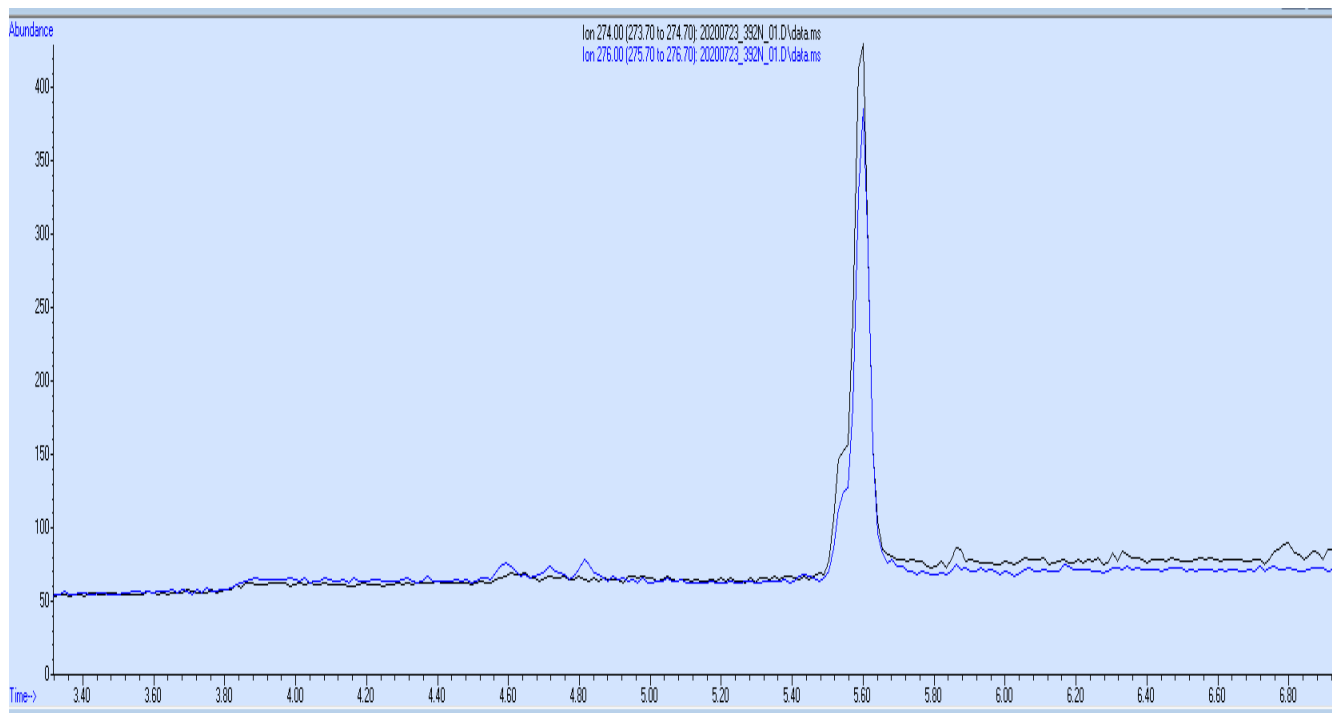
Εικόνα 9.2 Χρωματογράφημα εξαγόμενων ιόντων στα 58 και 238 m/z πραγματικού δείγματος, θετικού σε σιταλοπράμη συγκέντρωσης 620 ng/mL.

Περιστατικό 3. Στοιχεία θανούσας: ετών 65, αιτία θανάτου πνιγμός επί εμφράγματος του μυοκαρδίου-υπερτροφικής μυοκαρδιοπάθειας διατακτικού τύπου με σοβαρού βαθμού αθηρωματικές αλλοιώσεις, έλλειψη ιστορικού θανούσας. Από την τοξικολογική ανάλυση του νεκροτομικού αίματος που πραγματοποιήθηκε προσδιορίστηκε η σετραλίνη σε συγκέντρωση 40 ng/mL. Βρέθηκαν επίσης στο αίμα τα εξής φάρμακα: παρακεταμόλη, κωδεΐνη, λιδοκαΐνη, ο μεταβολίτης της σετραλίνης-δισμεθυλσετραλίνη- και διφαινυδραμίνη χωρίς όμως να προσδιοριστεί η συγκέντρωσή τους. Η τιμή της σετραλίνης βρέθηκε σε θεραπευτικά επίπεδα. Παρακάτω στην **εικόνα 9.3** δίνεται το χρωματογράφημα του πραγματικού δείγματος εξαγόμενου ιόντος 274 m/z για τη σετραλίνη.



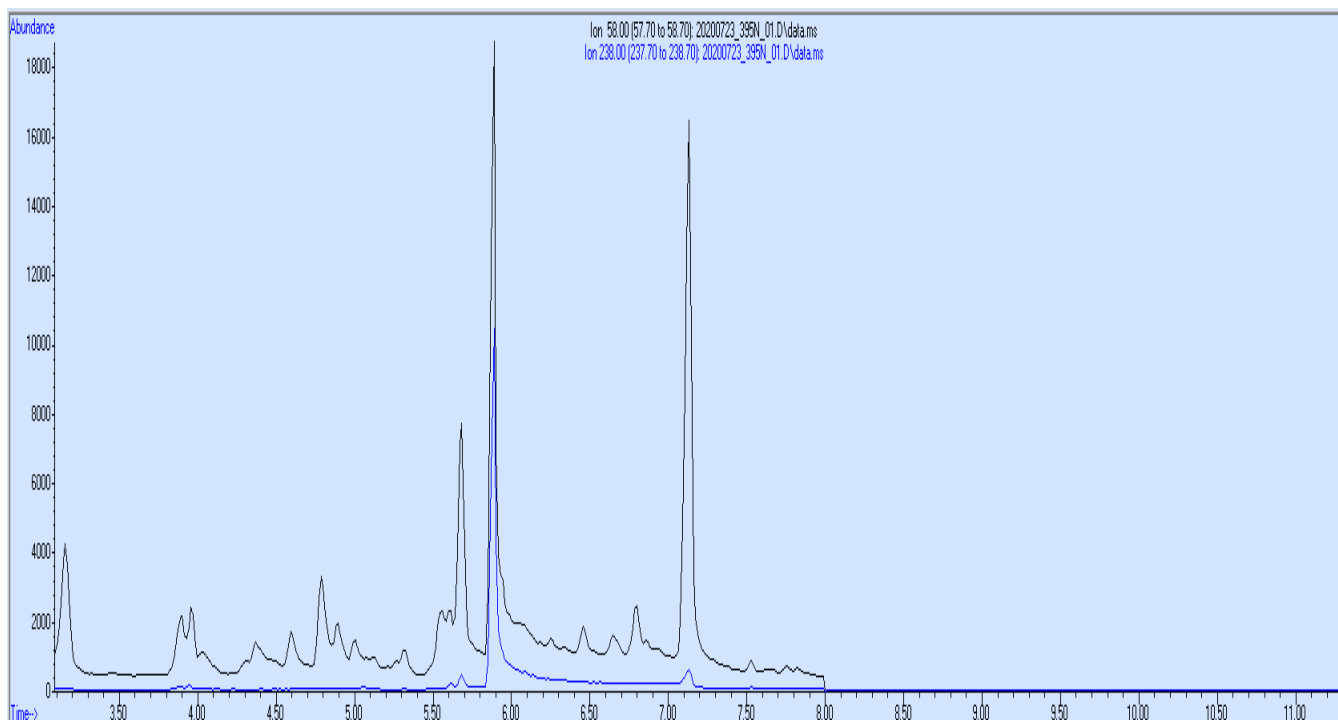
Εικόνα 9.3 Χρωματογράφημα εξαγόμενων ιόντων στα 274 και 276 m/z πραγματικού δείγματος, θετικού σε σερτραλίνη συγκέντρωσης 40 ng/mL.

Περιστατικό 4. Στοιχεία θανάτου: ετών 38, αιτία θανάτου πνιγμός εντός θαλάσσιου ύδατος, έλλειψη ιστορικού. Από την τοξικολογική ανάλυση του νεκροτομικού αίματος που πραγματοποιήθηκε προσδιορίστηκε η σερτραλίνη σε συγκέντρωση 100 ng/mL. Βρέθηκαν επίσης οι φαρμακευτικές ουσίες νορδιαζεπάμη (μεταβολίτης της διαζεπάμης) και χλωροδιαζεποξείδιο, χωρίς όμως να προσδιοριστεί η συγκέντρωσή τους. Η διαζεπάμη (diazepam) όπως και οι υπόλοιπες βενζοδιαζεπίνες μειώνουν το άγχος αναστέλλοντας με εκλεκτικό τρόπο νευρωνικά κυκλώματα στο μεταιχμιακό σύστημα του εγκεφάλου. Το χλωροδιαζεποξείδιο, μεταξύ άλλων, είναι ένα ηρεμιστικό και υπνωτικό φάρμακο της κατηγορίας βενζοδιαζεπινών. χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του άγχους, της αϋπνίας και των συμπτωμάτων απόσυρσης από το αλκοόλ και άλλα φάρμακα. Τα τοξικολογικά ευρήματα υποδηλώνουν ότι ίσως ο θανών έπασχε από ψυχολογικές διαταραχές. Η τιμή της σερτραλίνης βρέθηκε σε θεραπευτικά επίπεδα. Παρακάτω στην **εικόνα 9.4** δίνεται το χρωματογράφημα του πραγματικού δείγματος εξαγόμενου ιόντος 274 m/z για τη σερτραλίνη.



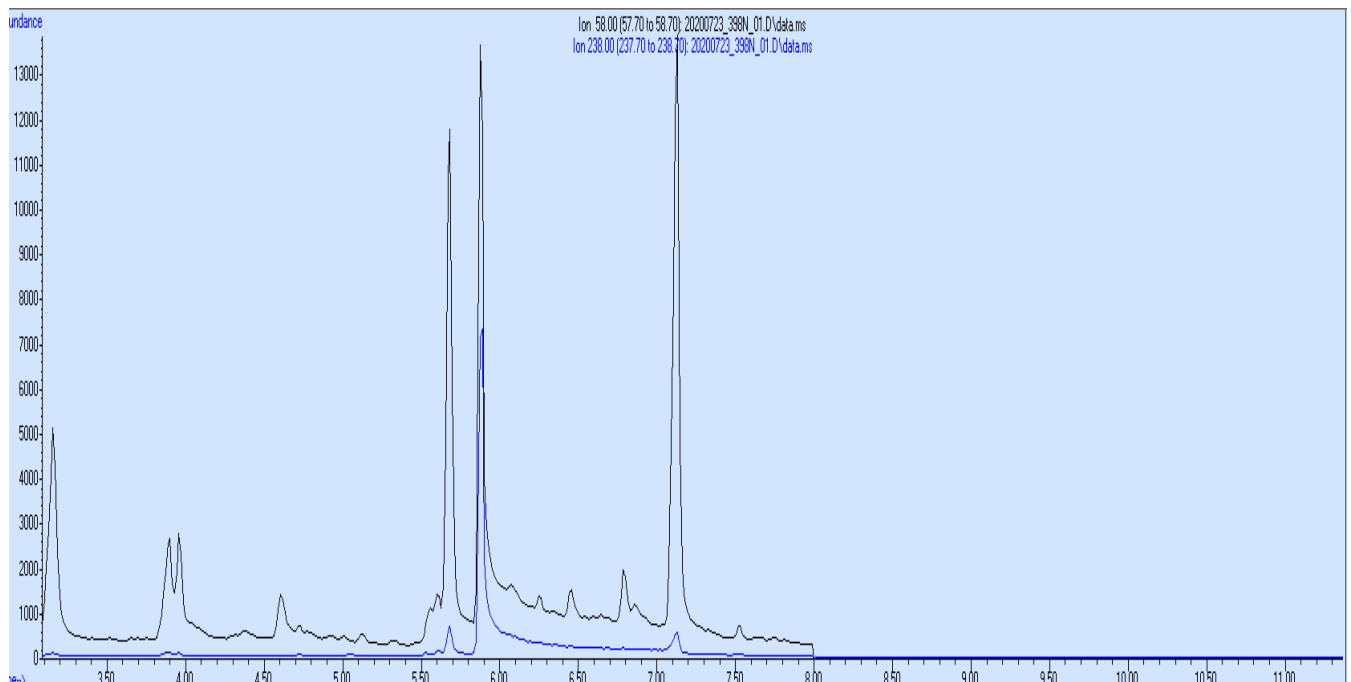
Εικόνα 9.4 Χρωματογράφημα εξαγόμενων ιόντων στα 274 και 276 m/z πραγματικού δείγματος, θετικού σε σερτραλίνη συγκέντρωσης 100 ng/mL.

Περιστατικό 5. Στοιχεία θανούντος: ετών 76, αιτία θανάτου πνιγμός εντός θαλάσσιου ύδατος ο οποίος προήλθε από ισχαιμική καρδιοπάθεια και αθηροσκληρυντικές βλάβες στεφανιαίων αγγείων, με ιστορικό παλαιού εμφράγματος καθώς και καρδιοχειρουργικής επέμβασης BYPASS. Από την τοξικολογική ανάλυση του νεκροτομικού αίματος που πραγματοποιήθηκε προσδιορίστηκε η σιταλοπράμη σε συγκέντρωση 410 ng/mL. Δε βρέθηκαν άλλες φαρμακευτικές ουσίες στο αίμα του θανούντος. Η τιμή της σιταλοπράμης βρέθηκε στα τοξικά επίπεδα. Παρακάτω στην **εικόνα 9.5** δίνεται το χρωματογράφημα του πραγματικού δείγματος εξαγόμενου ιόντος 238 m/z για τη σιταλοπράμη.



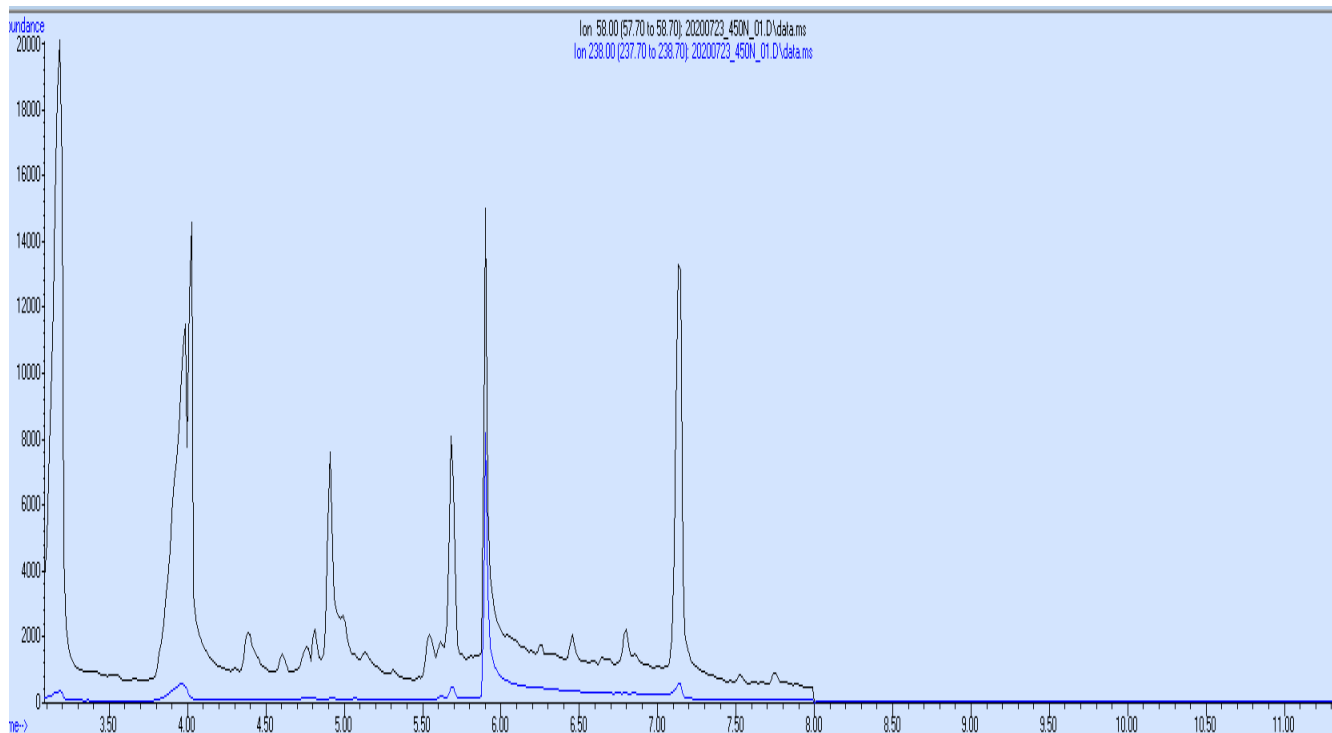
Εικόνα 9.5 Χρωματογράφημα εξαγόμενων ιόντων στα 58 και 238 m/z πραγματικού δείγματος, θετικού σε σιταλοπράμη συγκέντρωσης 410 ng/mL.

Περιστατικό 6. Στοιχεία θανούντος: ετών 81, αιτία θανάτου πνιγμός εντός θαλάσσιου ύδατος ο οποίος προήλθε από αθηροσκλήρωση στεφανιαίων αγγείων με παρατήρηση μονήρης πνεύμονας δεξιά, χωρίς ιστορικό αγωγής. Από την τοξικολογική ανάλυση του νεκροτομικού αίματος που πραγματοποιήθηκε προσδιορίστηκε η σιταλοπράμη σε συγκέντρωση 230 ng/mL. Δε βρέθηκαν άλλες φαρμακευτικές ουσίες στο αίμα του θανούντος. Η τιμή της σιταλοπράμης βρέθηκε κοντά στα τοξικά επίπεδα. Παρακάτω στην **εικόνα 9.6** δίνεται το χρωματογράφημα του πραγματικού δείγματος εξαγόμενου ιόντος 238 m/z για τη σιταλοπράμη.



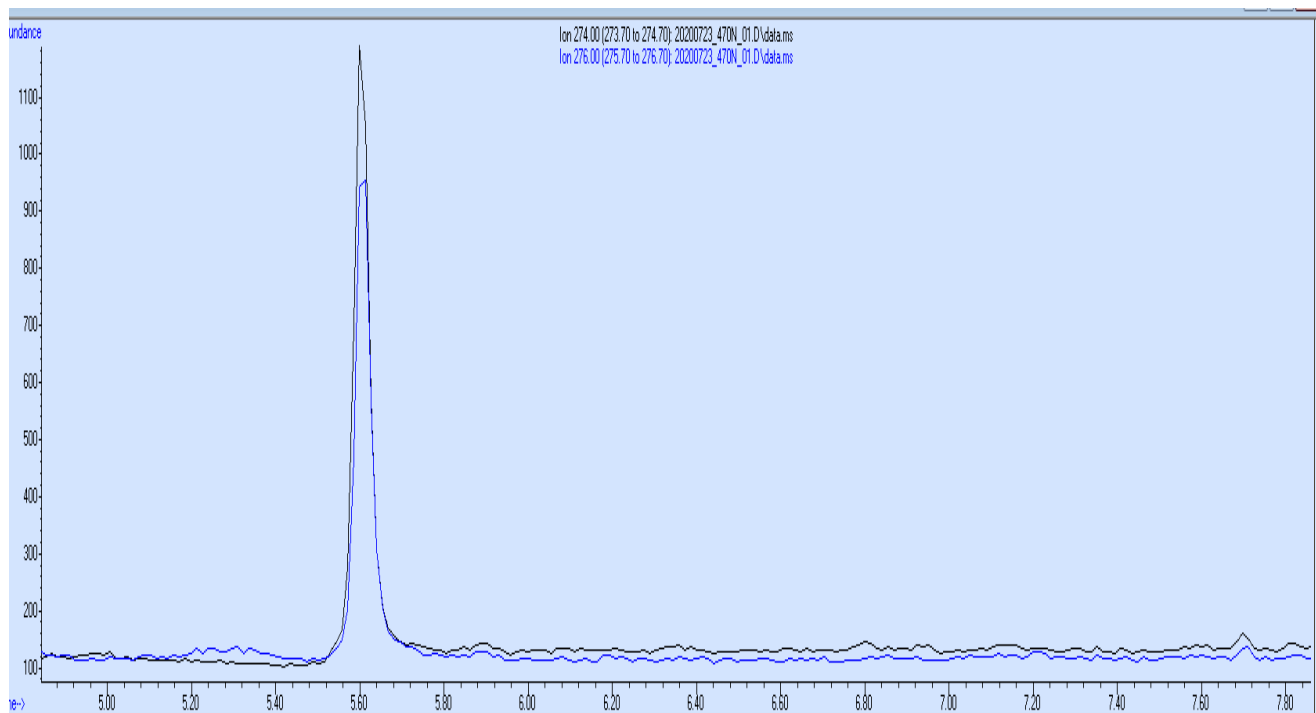
Εικόνα 9.6 Χρωματογράφημα εξαγόμενων ιόντων στα 58 και 238 m/z πραγματικού δείγματος, θετικού σε σιταλοπράμη συγκέντρωσης 230 ng/mL.

Περιστατικό 7. Στοιχεία θανούσας: ετών 73, αιτία θανάτου πνιγμός εντός θαλάσσιου ύδατος, έλλειψη ιστορικού. Από την τοξικολογική ανάλυση του νεκροτομικού αίματος που πραγματοποιήθηκε προσδιορίστηκε η σιταλοπράμη σε συγκέντρωση 90 ng/mL. Δε βρέθηκαν άλλες φαρμακευτικές ουσίες στο αίμα της θανούσας. Η τιμή της σιταλοπράμης βρέθηκε σε θεραπευτικά επίπεδα. Παρακάτω στην **εικόνα 9.7** δίνεται το χρωματογράφημα του πραγματικού δείγματος εξαγόμενου ιόντος 238 m/z για τη σιταλοπράμη.



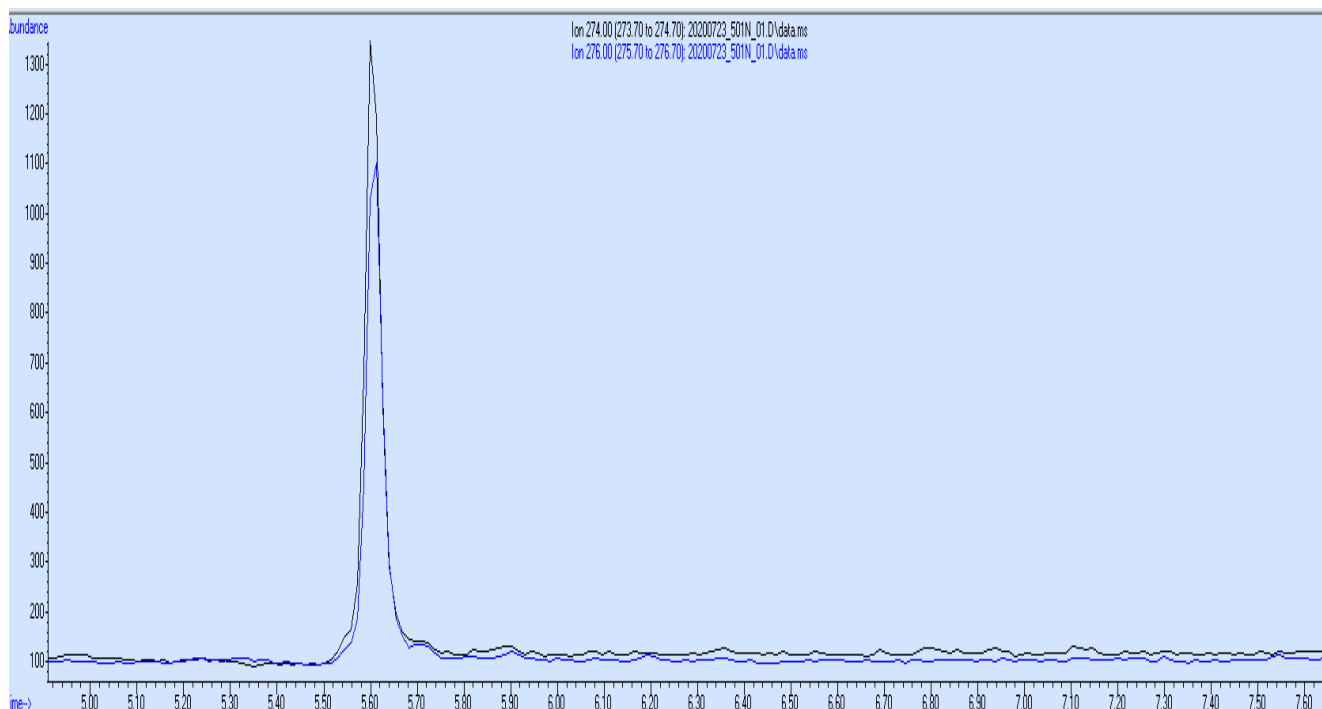
Εικόνα 9.7 Χρωματογράφημα εξαγόμενων ιόντων στα 58 και 238 m/z πραγματικού δείγματος, θετικού σε σιταλοπράμη συγκέντρωσης 90 ng/mL.

Περιστατικό 8. Στοιχεία θανούντος: ετών 70, αιτία θανάτου πνιγμός εντός ύδατος, ο οποίος προήλθε από βαριές αθηροσκληρυντικές βλάβες των στεφανιαίων αγγείων, με ιστορικό παλαιού εμφράγματος του μυοκαρδίου και παρατήρηση παρουσίας βηματοδότη. Από την τοξικολογική ανάλυση του νεκροτομικού αίματος που πραγματοποιήθηκε προσδιορίστηκε η σερτραλίνη σε συγκέντρωση 230 ng/mL. Βρέθηκε επίσης και μιρταζαπίνη χωρίς όμως να προσδιοριστεί η συγκέντρωσή της. Η μιρταζαπίνη και η σερτραλίνη είναι αντικαταθλιπτικά τα οποία χορηγούνται συνήθως μαζί. Η τιμή της σερτραλίνης βρέθηκε κοντά στα τοξικά επίπεδα. Παρακάτω στην **εικόνα 9.8** δίνεται το χρωματογράφημα του πραγματικού δείγματος εξαγόμενου ιόντος 274 m/z για τη σερτραλίνη.



Εικόνα 9.8 Χρωματογράφημα εξαγόμενων ιόντων στα 274 και 276 m/z πραγματικού δείγματος, θετικού σε σερτραλίνη συγκέντρωσης 230 ng/mL.

Περιστατικό 9. Στοιχεία θανούσας: ετών 64, αιτία θανάτου πνιγμός εντός ύδατος, ο οποίος προήλθε από ισχαιμικές αλλοιώσεις του μυοκαρδίου και παρατηρούμενων αθηρωματικών αλλοιώσεων των στεφανιαίων αγγείων και της αορτής, έλλειψη ιστορικού. Από την τοξικολογική ανάλυση του νεκροτομικού αίματος που πραγματοποιήθηκε προσδιορίστηκε η σερτραλίνη σε συγκέντρωση 240 ng/mL. Βρέθηκαν επίσης οι φαρμακευτικές ουσίες σαλικυλικό οξύ και υδροξυγλωροκίνη χωρίς όμως να προσδιοριστεί η συγκέντρωσή τους. Η υδροξυγλωροκίνη, μεταξύ άλλων, είναι ένα φάρμακο που χρησιμοποιείται για την πρόληψη και τη θεραπεία ορισμένων τύπων ελονοσίας. Η τιμή της σερτραλίνης βρέθηκε κοντά στα τοξικά επίπεδα. Παρακάτω στην **εικόνα 9.9** δίνεται το χρωματογράφημα του πραγματικού δείγματος εξαγόμενου ιόντος 274 m/z για τη σερτραλίνη.



Εικόνα 9.9 Χρωματογράφημα εξαγόμενων ιόντων στα 274 και 276 m/z πραγματικού δείγματος, θετικού σε σερτραλίνη συγκέντρωσης 240 ng/mL.

10. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Αποτέλεσμα αυτής της εργασίας ήταν η ανάπτυξη μιας ταχείας πολύ ευαίσθητης, ακριβούς και αξιόπιστης μεθόδου ανίχνευσης και ποσοτικής αποτίμησης δύο φαρμακευτικών ενώσεων στο αίμα νεκροτομικών δειγμάτων. Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται καθημερινά για την αντιμετώπιση τόσο κλινικών περιστατικών (δηλητηριάσεων) όσο και νεκροτομικών.

Τα αποτελέσματα ήταν ικανοποιητικά και αποδεκτά.

Όλες οι ενώσεις ταυτοποιήθηκαν και στα δύο εργαστήρια και μετρήθηκαν ποσοτικά μόνο από το εργαστήριο μας. Οι συντελεστές συσχέτισης κυμάνθηκαν από 0,9991(σερτραλίνη) έως 0,9996(σιταλοπράμη). Στην παρούσα εργασία, τα όρια ποσοτικού προσδιορισμού αποτελούν το πρώτο σημείο στις καμπύλες αναφοράς κάθε προσδιοριζόμενης ένωσης δηλαδή και για τις δύο ενώσεις είναι τα 50 ng/mL.

Η μέθοδος κάνει χρήση μικρού όγκου μη τοξικού διαλύτη καθιστώντας την έτσι φιλική προς το περιβάλλον αλλά και οικονομική. Είναι ταχεία καθώς απαιτεί ένα στάδιο εκχύλισης μόνο το στάδιο της εξάτμισης και της επαναδιάλυσης καθώς και δεν απαιτεί παραγωγοποίηση, η

οποία απαιτεί χρόνο, αυξάνει το κόστος αλλά και δημιουργεί πιθανώς ασταθή παράγωγα τα οποία πρέπει να μελετηθούν.

Επίσης, εφόσον αναζητήσαμε συγκεκριμένες ενώσεις σε χαμηλή συγκέντρωση τότε η μέθοδος με χρήση SIM mode (Selected Ion Monitoring) , δηλαδή προγράμματος εκλεκτικής παρακολούθησης ιόντων για κάθε ένωση αντί για του προγράμματος πλήρους σάρωσης (full scan) αύξησε την ευαισθησία του ανιχνευτή, δίνοντας υψηλότερο σήμα για την αναζητούμενες ενώσεις.

Με αυτή τη μέθοδο έγινε ποσοτικός προσδιορισμός των δύο ενώσεων σε νεκροτομικά δείγματα πνιγμών, όμως πρέπει να λάβουμε υπόψιν μας και το φαινόμενο της μεταθανάτιας ανακατανομής που υπέστησαν αυτά τα δείγματα έχοντας ως δεδομένο ότι το αίμα που πάρθηκε δεν ήταν περιφερειακό αλλά λήφθηκε από κεντρικό σημείο. Μπορούμε όμως, βλέποντας τα δεδομένα και συνδυάζοντας τα, να καταλήξουμε σε ένα συμπέρασμα ότι αυτές οι δύο ενώσεις μπορούν να συμμετέχουν εν δυνάμει σε αρκετές καρδιαγγειακές και δυνητικά αρρυθμιολογικές διαταραχές οι οποίες προδιαθέτουν τα άτομα σε αυξημένο κίνδυνο πνιγμού. Η έκθεση σε αντικαταθλιπτικά που ανήκουν στην κατηγορία των ειδικών αναστολέων της επαναπρόσληψης σεροτονίνης (SSRIs) φαίνεται να είναι πιο διαδεδομένη σε θύματα πνιγμού.

11. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] P. K. Gupta, "Definitions and scope of toxicology," *Fundam. Toxicol.*, pp. 9–17, 2016, doi: 10.1016/b978-0-12-805426-0.00002-0.
- [2] J. Radenkova-Saeva, "Historical development of toxicology," *Acta Medica Bulg.*, vol. 35, no. 1, pp. 47–52, 2008.
- [3] O. H. Drummer, *Encyclopedia of Forensic Sciences*, 2nd ed., J. A. Siegel, P. J. Saukko and M. M. Houck, Eds., Southbank, VIC, Australia: CRC Press, 2013, pp. 218-223.
- [4] O. H. Drummer und M. Odell, *The Forensic Pharmacology of Drugs of Abuse*, 2001
- [5] [Online]. Available: <https://sciencemonk.com/forensic-toxicology/> (τελευταία προβολή 21.01.2021)
- [6] Pappas, A. A., Massoll, N. A., and Cannon, D. J. (1999) Toxicology: Past, present, and future, *Ann Clin Lab Sci*29, 253-262.
- [7] Wen, B., & Zhu, M. (2015). Applications of mass spectrometry in drug metabolism: 50 years of progress. *Drug Metabolism Reviews*, 47(1), 71–87. <https://doi.org/10.3109/03602532.2014.1001029>
- [8] Grebe SK, Singh RJ. LC-MS/MS in the Clinical Laboratory - Where to From Here? *Clin Biochem Rev.* 2011 Feb;32(1):5-31. PMID: 21451775; PMCID: PMC3052391.
- [9] Viette, V., Hochstrasser, D., and Fathi, M. (2012) LC-MS (/MS) in Clinical Toxicology Screening Methods, *Chimia*66, 339-342
- [10] Garg, U., and Zhang, Y. V. (2016) Mass Spectrometry in Clinical Laboratory: Applications in Therapeutic Drug Monitoring and Toxicology, *Methods Mol Biol*1383, 1-10.
- [11] Nair, H., Woo, F., Hoofnagle, A. N., and Baird, G. S. (2013) Why GCMS Remains an Invaluable Tool in a Toxicology Lab: A Novel Approach to Clinical Validation of a High Sensitive GCMS Platform for Urine Drug Screening, *American journal of clinical pathology*140, 431-431.
- [12] Vardanyan, R. S., & Hruby, V. J. (2006). Antidepressants. *Synthesis of Essential Drugs*, 103–116.
- [13] Gada, M. T., Pradhan, P. V., Shah, L. P., & Bagadia, V. N. (1984). Antidepressant drugs. *Psychopharmacology Bulletin*, 20(1), 180–182. <https://doi.org/10.1201/9781315385020-19>
- [14] Lolak, S., Suwannarat, P., & Lipsky, R. H. (2014). Epigenetics of Depression. *Epigenetics and Neuroplasticity—Evidence and Debate*, 103–137.
- [15] Vardanyan, R., & Hruby, V. (2016). Antidepressants. *Synthesis of Best-Seller Drugs*, 111–143. <https://doi.org/10.1016/c2012-0-07004-4>

- [16] Fava, M., & Papakostas, G. I. (2015). Antidepressants (Maurizio Fava & G. I. Papakostas (eds.); Vol. 2000, p. 595)
- [17] Celada, P., Bortolozzi, A. & Artigas, F. Serotonin 5-HT_{1A} Receptors as Targets for Agents to Treat Psychiatric Disorders: Rationale and Current Status of Research. *CNS Drugs* 27, 703–716 (2013). <https://doi.org/10.1007/s40263-013-0071-0>
- [18] Smith, A.J., Sketris, I., Cooke, C., Gardner, D., Kisely, S., Tett, S.E., 2008. A comparison of antidepressant use in Nova Scotia, Canada and Australia. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 17, 697–706. doi:10.1002/pds.1541
- [19] Trifirò, G., Tillati, S., Spina, E., Ferrajolo, C., Alacqua, M., Aguglia, E., Rizzi, L., Caputi, A. P., Cricelli, C., & Samani, F. (2013). A nationwide prospective study on prescribing pattern of antidepressant drugs in Italian primary care. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 69(2), 227–236. <https://doi.org/10.1007/s00228-012-1319-1>
- [20] Wemakor, A., Casson, K., Dolk, H., 2014. Prevalence and sociodemographic patterns of antidepressant use among women of reproductive age: a prescription database study. *J Affect Disord* 167, 299–305. doi:10.1016/j.jad.2014.06.015
- [21] Sanchez, C., Reines, E. H., & Montgomery, S. A. (2014). A comparative review of escitalopram, paroxetine, and sertraline: Are they all alike? *International Clinical Psychopharmacology*, 29(4), 185–196. <https://doi.org/10.1097/YIC.0000000000000023>
- [22] Gary Rudnick, SERT, Serotonin Transporter, Editor(s): S.J. Enna, David B. Bylund, *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, Elsevier, 2007, Pages 1-6, ISBN 9780080552323, <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.60442-8>.
- [23] Fidalgo S, Ivanov DK, Wood SH. Serotonin: from top to bottom. *Biogerontology*. 2013 Feb;14(1):21-45. doi: 10.1007/s10522-012-9406-3. Epub 2012 Oct 26. PMID: 23100172.
- [24] Hensler, J. Differential Regulation of 5-HT_{1A} Receptor-G Protein Interactions in Brain Following Chronic Antidepressant Administration. *Neuropsychopharmacol* 26, 565–573 (2002). [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(01\)00395-5](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(01)00395-5)
- [25] Leonard, B.E. (1998), *The Antidepressant Era*. David Healy. Harvard University Press, Cambridge, Mass., 1997.p.168 ISBN: 0-674-03957-2. Price £26.50.. Hum. Psychopharmacol. Clin. Exp., 13: 530-531. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1077\(199810\)13:7<530::AID-HUP36>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1077(199810)13:7<530::AID-HUP36>3.0.CO;2-Q)
- [26] «Sertraline» [Online]. Available: <https:// Drugs.com> (τελευταία επίσκεψη 20.01.2021)
- [27] Levine, B., Jenkins, A. J., & Smialek, J. E. (1994). Distribution of sertraline in postmortem cases. *Journal of Analytical Toxicology*, 18(5), 272–274. <https://doi.org/10.1093/jat/18.5.272>
- [28] Bosch, M. E., Sánchez, A. J. R., Rojas, F. S., & Ojeda, C. B. (2008). Analytical methodologies for the determination of sertraline. *Journal of Pharmaceutical and*

- Biomedical Analysis, 48(5), 1290–1302. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2008.09.036>
- [29] Cusack, B., Nelson, A., & Richelson, E. (1994). Binding of antidepressants to human brain receptors: Focus on newer generation compounds. *Psychopharmacology*, 114(4), 559–565. <https://doi.org/10.1007/BF02244985>
- [30] Murdoch, D., McTavish, D. Sertraline. *Drugs* 44, 604–624 (1992). <https://doi.org/10.2165/00003495-199244040-00007>
- [31] [Online]. Available: <https://go.drugbank.com/drugs/DB01104> (τελευταία επίσκεψη 22.01.2021)
- [32] Dziurkowska E, Wesolowski M. Sertraline - isolation methods and quantitation in biological material. *Psychiatr Pol*. 2018 Dec 29;52(6):997-1012. English, Polish. doi: 10.12740/PP/85788. Epub 2018 Dec 29. PMID: 30659562.
- [33] Robert A Middleberg, Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man—11th Edition, *Journal of Analytical Toxicology*, Volume 42, Issue 2, March 2018, <https://doi.org/10.1093/jat/bkx063>
- [34] [Online]. Available :<https://www.galinos.gr/web/drugs/main/substances/citalopram> (τελευταία επίσκεψη 22.01.2021)
- [35] Benjamin Rawe and Paul May for Molecule of the Month. 2009 Citalopram: A new treatment for depression <http://www.chm.bris.ac.uk/motm/citalopram/citalopramh.htm>
- [36] [Online]. Available: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00215>(τελευταία επίσκεψη 22.01.2021)
- [37] Hiemke, C., & Härtter, S. (2000). Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. In *Pharmacology and Therapeutics* (Vol. 85, Issue 1, pp. 11–28). Pergamon. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(99\)00048-0](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(99)00048-0)
- [38] [Online]. Available: <https://www.galinos.gr/web/drugs/main/substances/citalopram> (τελευταία επίσκεψη 22.01.2021)
- [39] Schulz, M., Schmoldt, A., Andresen-Streichert, H., & Iwersen-Bergmann, S. (2020). Revisited: Therapeutic and toxic blood concentrations of more than 1100 drugs and other xenobiotics. *Critical Care*, 24(1), 1–4. <https://doi.org/10.1186/s13054-020-02915-5>
- [40] Leonard, C. E., Bilker, W. B., Newcomb, C., Kimmel, S. E., & Hennessy, S. (2011). Antidepressants and the risk of sudden cardiac death and ventricular arrhythmia. *Pharmacoepidemiology and drug safety*, 20(9), 903–913. <https://doi.org/10.1002/pds.2181>
- [41] Vorchheimer DA. What is QT interval prolongation? *J Fam Pract*. 2005 Jun;Suppl:S4-7. PMID: 15938992.
- [42] Kevrekidis, D. P., Brousa, E., Mastrogianni, O., Orfanidis, A., Gika, H. G., & Raikos, N. (2020). Risk factors for fatal drowning in a Greek region: A retrospective case-

- control study. *Injury Prevention*, 1–8. <https://doi.org/10.1136/injuryprev-2020-043788>
- [43] Gerostamoulos, D., Beyer, J., Staikos, V., Tayler, P., Woodford, N., & Drummer, O. H. (2012). The effect of the postmortem interval on the redistribution of drugs: A comparison of mortuary admission and autopsy blood specimens. *Forensic Science, Medicine, and Pathology*, 8(4), 373–379. <https://doi.org/10.1007/s12024-012-9341-2>
- [44] Brockbals, L., Staeheli, S. N., Gascho, D., Ebert, L. C., Kraemer, T., & Steuer, A. E. (2020). Time- and Site-dependent Postmortem Redistribution of Antidepressants and Neuroleptics in Blood and Alternative Matrices. *Journal of Analytical Toxicology*. <https://doi.org/10.1093/jat/bkaa092>
- [45] Hargrove, V. M., & McCutcheon, J. R. (2008). Comparison of drug concentrations taken from clamped and unclamped femoral vessels. *Journal of Analytical Toxicology*, 32(8), 621–625. <https://doi.org/10.1093/jat/32.8.621>
- [46] McIntyre, I. M., & Mallett, P. (2012). Sertraline concentrations and postmortem redistribution. *Forensic Science International*, 223(1–3), 349–352. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2012.10.020>
- [47] Lewis, R. J., Angier, M. K., Williamson, K. S., & Johnson, R. D. (2013). Analysis of sertraline in postmortem fluids and tissues in 11 aviation accident victims. *Journal of Analytical Toxicology*, 37(4), 208–216. <https://doi.org/10.1093/jat/bkt014>
- [48] Mikkelsen, C. R., Jornil, J. R., Andersen, L. V., Banner, J., & Hasselstrøm, J. B. (2018). Distribution of eight QT-prolonging drugs and their main metabolites between postmortem cardiac tissue and blood reveals potential pitfalls in toxicological interpretation. *Journal of Analytical Toxicology*, 42(6), 375–383. <https://doi.org/10.1093/jat/bky018>
- [49] Brockbals, L., Staeheli, S. N., Gascho, D., Ebert, L. C., Kraemer, T., & Steuer, A. E. (2020). Time- and Site-dependent Postmortem Redistribution of Antidepressants and Neuroleptics in Blood and Alternative Matrices. *Journal of Analytical Toxicology*. <https://doi.org/10.1093/jat/bkaa092>
- [50] Α.Ν. Βουλγαρόπουλος, Γ.Α. Ζαχαριάδης, Ι.Α. Στράτης, Εισαγωγή στην Ποσοτική Χημική Ανάλυση, 2001, σελίδα 255
- [51] Ι. Ν. Παπαδογιάννης, Σύγχρονες Διαχωριστικές Τεχνικές στην Ενόργανη Χημική Ανάλυση
- [52] V.P. Shah, K.K. Midha, S. Dighe, I.J. McGilveray, J.P. Skelly, A. Yacobi, T. Layloff, C.T. Viswanathan, C.E. Cook, R.D. McDowall, K.A. Pittman, S. Spector, Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. Conference report, *Pharm. Res.* 9 (1992) 588–592
- [53] International Conference on Harmonization (ICH), Validation of analytical methods: definitions and terminology, ICH Q2 A, 1994
- [54] International Conference on Harmonization (ICH), Validation of analytical methods: methodology, ICH Q2 B, 1996

- [55] EURACHEM, *The Fitness for Purpose of Analytical Methods—A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, 1998
- [56] V.P. Shah, K.K. Midha, J.W. Findlay, H.M. Hill, J.D. Hulse, I.J. McGilveray, G. McKay, K.J. Miller, R.N. Patnaik, M.L. Powell, A. Tonelli, C.T. Viswanathan, A. Yacobi, *Bioanalytical method validation—a revisit with a decade of progress*, *Pharm. Res.* 17 (2000) 1551–1557
- [57] M. Thompson, S.L.R. Ellison, R. Wood, *Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC technical report)*, *Pure Appl. Chem.* 74 (2002) 835–855
- [58] F.T. Peters, M. Hartung, M. Herbold, G. Schmitt, T. Daldrup, F. Musshoff, *Anlage zu den Richtlinien der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen, Anhang C: Anforderungen an die Durchführung von Analysen, 1. Validierung*, *Toxichem. Krimtech.* 71 (2004) 146–154
- [59] Παπαδογιάννης, ΙΝ., Σαμανίδου, Β.Φ., *Ενόργανη Χημική Ανάλυση*, Θεσσαλονίκη, 2001
- [60] O. D. Sparkman, Z. Penton and F. Kitson, *Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide*, 2nd ed., Academic Press, 2011.
- [61] Στεφανίδου-Στεφανάτου, Ι., και Ρήγας Δ., *Εισαγωγή στη Φασματοσκοπία Μαζών*, 1η εκδ., Γαρταγάνης, Θεσσαλονίκη, 2011, σελ. 11-14, 47-49, 71, 92-96.
- [62] Douglas A. Skoog, F. Holler J., *Principles of Instrumental Analysis*, 6th edition, Canada, 2017, pp 904-910
- [63] Moini, M. (1999). *GC/MS: A Practical User's Guide* By Christopher McMaster and Marvin McMaster (University of Missouri, St. Louis). Wiley: New York. 1998. 167 pp. \$59.95. ISBN 0-471-24826-6. In *Journal of the American Chemical Society* (Vol. 121, Issue 20). <https://doi.org/10.1021/ja9857460>
- [64] Settle, F.A., *Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry*, Prentice Hall PTR, United States of America, (1997) 125-143.
- [65] McLafferty, F.W. and Mruzek, M.N. (1982), Fred W. McLafferty. *Interpretation of mass spectra*, 3rd edition. University science books, California, 1980 (first two editions published by W. A. Benjamin). *Org. Mass Spectrom.*, 17: 246-246., pages 7-8 <https://doi.org/10.1002/oms.1210170511>
- [66] Papoutsis, I., Khraiweh, A., Nikolaou, P., Pistos, C., Spiliopoulou, C., & Athanaselis, S. (2012). A fully validated method for the simultaneous determination of 11 antidepressant drugs in whole blood by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 70, 557–562. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.05.007>
- [67] Ansermot, N., Brawand-Amey, M., & Eap, C. B. (2012). Simultaneous quantification of selective serotonin reuptake inhibitors and metabolites in human plasma by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry for therapeutic drug monitoring.

Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 885–886, 117–130. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.12.028>

- [68] Khraiwesh, A., Papoutsis, I., Nikolaou, P., Pistos, C., Spiliopoulou, C., & Athanaselis, S. (2011). Development and validation of an EI-GC/MS method for the determination of sertraline and its major metabolite desmethyl-sertraline in blood. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 879(25), 2576–2582. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.07.015>
- [69] Shin, S. S., Borg, D., & Stripp, R. (2020). Developing and Validating a Fast and Accurate Method to Quantify 18 Antidepressants in Oral Fluid Samples Using SPE and LC-MS-MS. *Journal of Analytical Toxicology*, 44(6), 610–617. <https://doi.org/10.1093/jat/bkz117>
- [70] de Castro, A., Concheiro, M., Quintela, O., Cruz, A., & López-Rivadulla, M. (2008). LC-MS/MS method for the determination of nine antidepressants and some of their main metabolites in oral fluid and plasma. Study of correlation between venlafaxine concentrations in both matrices. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 48(1), 183–193. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2008.05.024>
- [71] de Castro, A., Fernandez, M. del M. R., Laloup, M., Samyn, N., De Boeck, G., Wood, M., Maes, V., & López-Rivadulla, M. (2007). High-throughput on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous analysis of 14 antidepressants and their metabolites in plasma. *Journal of Chromatography A*, 1160(1–2), 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.01.137>
- [72] Petrides, A. K., Moskowitz, J., Johnson-Davis, K. L., Jannetto, P. J., Langman, L. J., Clarke, W., & Marzinke, M. A. (2014). The development and validation of a turbulent flow-liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for the simultaneous quantification of citalopram, sertraline, bupropion and hydroxybupropion in serum. *Clinical Biochemistry*, 47(15), 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2014.07.018>
- [73] Boumba, V. A., Rallis, G., Petrikis, P., Vougiouklakis, T., & Mavreas, V. (2016). Determination of clozapine, and five antidepressants in human plasma, serum and whole blood by gas chromatography–mass spectrometry: A simple tool for clinical and postmortem toxicological analysis. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1038, 43–48. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.10.023>
- [74] Bravo, F., Zambra, C., Venegas, K., Rios, D., Calderon, P. B., & Benites, J. (2013). Forensic cases in the north of Chile: Determination of antidepressant drugs in human whole blood. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 58(2), 1733–1736. <https://doi.org/10.4067/S0717-97072013000200020>
- [75] Boumba, V. A., Rallis, G., Petrikis, P., Vougiouklakis, T., & Mavreas, V. (2016). Determination of clozapine, and five antidepressants in human plasma, serum and whole blood by gas chromatography–mass spectrometry: A simple tool for clinical and postmortem toxicological analysis. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1038, 43–48. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.10.023>

