

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

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

Σουλίδου Δέσποινα του Τριανταφύλλου

Λάρισα, 2022

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

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

**«DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A GAS
CHROMATOGRAPHY – MASS SPECTROMETRY (GS – MS)
METHOD FOR THE QUANTIFICATION OF LIDOCAINE IN HUMAN
BLOOD CLINICAL SAMPLES»**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Επιβλέπων Καθηγητής: ΡΑΪΚΟΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ

Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Συνεπιβλέπων Καθηγητής: ΚΟΥΡΕΤΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μέλος εξεταστικής επιτροπής: ΒΕΣΚΟΥΚΗΣ ΑΡΙΣΤΕΙΔΗΣ

Επικουρος Καθηγητής, Τμήμα Διαιτολογίας και Διατροφολογίας,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σουλίδου Δέσποινα του Τριανταφύλλου

Λάρισα, 2022

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του προπτυχιακού προγράμματος σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και κατά το 8^ο εξάμηνο φοίτησης. Όλες οι πειραματικές διεργασίες πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης υπό την καθοδήγηση του Καθηγητή κ. Νικόλαου Ράικου, ο οποίος κατέδειξε και το θέμα της πτυχιακής εργασίας. Τον ευχαριστώ ιδιαιτέρως για την άμεση ανταπόκρισή του και για την παραχώρηση του εργαστηριακού του χώρου, των οργάνων, των αντιδραστηρίων αλλά και των πραγματικών κλινικών δειγμάτων που διατέθηκαν, ώστε να εκπονηθεί η παρούσα πτυχιακή άσκηση.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω για την συνεργασία τον Καθηγητή κ. Κουρέτα Δημήτριο που ανέλαβε ως συνεπιβλέποντας της πτυχιακής μου εργασίας και τον Επίκουρο καθηγητή κ. Βεσκούκη Αριστείδη που ανέλαβε κι αυτός ως μέλος στην τριμελή εξεταστική επιτροπή.

Ένα τεράστιο ευχαριστώ οφείλω να δώσω στην κ. Φωτεινή Μήτσα που ήταν δίπλα μου καθ' όλη την διάρκεια των πειραματικών διαδικασιών για να με επιβλέψει και να με συμβουλέψει. Παράλληλα, ήταν ανά πάσα στιγμή διαθέσιμη για να απαντήσει σε τυχόν απορίες και να επιλύσει επίσης τα τυχόν προβλήματα. Υποδεικνύοντας όλη την πειραματική διαδικασία και εξηγώντας μου ταυτόχρονα κάθε βήμα που ακολουθήθηκε, μου έμαθε το πως πρέπει να λειτουργώ μέσα σε ένα εργαστήριο με ψυχραιμία και υπομονή. Η βοήθεια της ήταν πολύτιμη και χωρίς αυτή δεν θα είχε πραγματοποιηθεί ούτε στο ελάχιστο η παρούσα πτυχιακή εργασία.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλη την επιστημονική ομάδα του εργαστηρίου Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας του κ. Ράικου για όλη την βοήθεια και τις υποδείξεις που μου προσέφεραν κατά την διαπεραίωση των πειραματικών διαδικασιών.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ

WHO: Λίστα Φαρμάκων Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (Model Lists of Essential Medicines)

IVL: Ενδοφλέβια Λιδοκαΐνη (Intravenous Lidocaine)

IV: Χορήγηση ενδοφλεβίως

CYP3A4: Μέλος της ομάδας ενζύμων του κυτοχρώματος P450

MEGX: Μονοαιθυλογλυκινοξυλιδίδιο (monoethylglycinexylidide)

GX: Γλυκινοξυλιδίδιο (glycinexylidide)

ΚΝΣ: Κεντρικό Νευρικό Σύστημα

LAST: Συστηματική Τοξικότητα Τοπικών Αναισθητικών (Local Anesthetic Systemic toxicity)

GC: Αέρια Χρωματογραφία (Gas Chromatography)

MS: Φασματοσκοπία Μαζών (Mass Spectrometry)

GC–MS: Αέρια Χρωματογραφίας συζευγμένη με Φασματοσκοπία Μαζών (Gas Chromatography – Mass Spectrometry)

LOD: Όριο ανίχνευσης (Limit of Detection)

LOQ: Όριο ποσοτικού προσδιορισμού (Limit of Quantitation)

RSD%: Σχετική Τυπική Απόκλιση % (Relative Standard Deviation %)

SD: Τυπική Απόκλιση (Standard Deviation)

ΜΕΘ: Μονάδα Εντατικής Θεραπείας

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	3
ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ.....	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	7
ABSTRACT.....	8
A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	9
1. Λιδοκαΐνη	9
1.1 Εισαγωγή	9
1.2 Ταξινόμηση και Φαρμακοκινητική	9
1.3 Μοριακός μηχανισμός και δράσεις	10
1.4 Τοξικότητα λιδοκαΐνης	11
1.5 Θεραπευτικά, τοξικά και θανατηφόρα επίπεδα	12
2. Αέρια Χρωματογραφία (GC).....	13
2.1 Γενικά.....	13
2.2 Αρχή λειτουργίας αέριου χρωματογράφου.....	13
2.3 Βασική οργανολογία αέριας χρωματογραφίας	14
2.3.1 Φέρον αέριο	15
2.3.2 Σύστημα εισαγωγής δείγματος	15
2.3.3 Στήλη.....	15
2.3.4 Θάλαμος θέρμανσης της στήλης (oven)	16
2.3.5 Ανιχνευτής	16
3. Φασματομετρία μάζας (MS).....	18
3.1 Γενικά.....	18
3.2 Αρχή λειτουργίας φασματογράφου μάζας.....	18
3.3 Βασική οργανολογία φασματογράφου μάζας.....	18
3.3.1 Σύστημα εισαγωγής δείγματος	19
3.3.2 Πηγές ιόντων	19
3.3.3 Αναλυτής Μαζών	20
3.3.4 Ανιχνευτές	21
4. Αέρια Χρωματογραφία συζευγμένη με Φασματομετρία Μάζας.....	22
5. Προκατεργασία δείγματος	24
5.1 Εκχύλιση Υγρού – Υγρού (LLE).....	24
6. Βιβλιογραφική ανασκόπηση	25
B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	27
1. Σκοπός της εργασίας.....	27

2. Οργανολογία, Αντιδραστήρια και Διαλύτες.....	28
2.1 Πρότυπα διαλύματα, Αντιδραστήρια και Διαλύτες.....	28
2.2 Όργανα, συσκευές και λοιπός εξοπλισμός	28
2.3 Σύστημα GC - MS.....	29
2.4 Βιολογικά δείγματα.....	29
3. Ανάπτυξη αναλυτικής μεθόδου GC-MS	30
3.1 Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων	30
3.2 Παράμετροι GC – MS	30
4. Βελτιστοποίηση αναλυτικής μεθόδου	36
4.1 Επιλογή διαλύτη εκχύλισης	36
4.2 Επιλογή pH	36
5. Τελική βέλτιστη μέθοδος	37
5.1 Παρασκευή επιμολυσμένων (spiked) δειγμάτων	37
5.2 Προκατεργασία δείγματος	37
6. Επικύρωση αναλυτικής μεθόδου	38
6.1 Εκλεκτικότητα (Selectivity)	38
6.2 Γραμμικότητα (Linearity).....	38
6.3 Όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ)	39
6.4 Πιστότητα – Επαναληψιμότητα (Precision – Repeatability).....	40
6.5 Ακρίβεια - Ορθότητα (Accuracy - Trueness)	41
7. Εφαρμογή σε πραγματικά δείγματα	42
8. Συμπεράσματα.....	46
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	47

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η λιδοκαΐνη αποτελεί ένα από τα πιο κοινά τοπικά αναισθητικά με σημαντικό κλινικό ρόλο στην οδοντιατρική και στη χειρουργική, κυρίως για την παροδική ανακούφιση του πόνου [1]. Χρησιμοποιείται επίσης και ως αντιαρρυθμικός παράγοντας [2]. Στην παρούσα πτυχιακή εργασία περιγράφεται η ανάπτυξη μιας αξιόπιστης και σύντομης μεθόδου για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό της σε βιολογικό δείγμα ορού αίματος με μια σχετικά απλή προκατεργασία δείγματος και με την χρήση του οργάνου GC-MS.

Η προκατεργασία των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με εκχύλιση υγρού - υγρού ενός σταδίου, μειώνοντας έτσι το συνολικό χρόνο ανάλυσης. Ακολούθησε η επιλογή του κατάλληλου διαλύτη για την βελτιστοποίηση της αναλυτικής μεθόδου. Ο διαλύτης που επιλέχθηκε, καθώς επιτυγχάνει το βέλτιστο διαχωρισμό των δύο φάσεων, ήταν ο οξικός βουτυλεστέρας. Το pH ρυθμίστηκε σύμφωνα με την pK_a στην περιοχή 11 με ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικού καλίου. Τέλος, χρησιμοποιήθηκε εσωτερικό πρότυπο νορδιαζεπάμης- d_5 για τους ποσοτικούς υπολογισμούς.

Μετά από δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν για την επιλογή των παραμέτρων του GC-MS, η τελική μέθοδος που επιλέχθηκε είχε διάρκεια 9,1429 λεπτά. Όσον αφορά την μέθοδο GC-MS, έγινε επικύρωση της μεθόδου ως προς την ακρίβεια, την επαναληψιμότητα και τη γραμμικότητα και υπολογίστηκαν τα όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ). Η γραμμικότητα (R^2) προσδιορίστηκε σε $R^2=0,9947$. Τα όρια LOD προσδιορίστηκαν σε 0,054391 mg/L και τα όρια LOQ σε 0,16482 mg/L. Η μέθοδος ήταν ακριβής και επαναλήψιμη.

Τέλος, μετά την επικύρωση, η μέθοδος εφαρμόστηκε σε πραγματικά κλινικά δείγματα που προέρχονταν από ασθενείς νοσηλευόμενους σε ΜΕΘ καθώς και από το τμήμα τροχαίας της αστυνομίας και προσδιορίστηκε ποσοτικά η συγκέντρωση της λιδοκαΐνης.

ABSTRACT

Lidocaine is one of the most extensively used local anesthetics that plays an important role clinically in dentistry and in minor surgery for temporary relief of pain [1]. It also can be used as an antiarrhythmic agent [2]. The present study describes the development of a reliable and rapid method for the determination and the quantification of lidocaine in human blood samples using a simple sample preparation and GC – MS analyte.

Sample preparation was performed by one step liquid-liquid extraction. The solvent extraction method was optimized, with final selection of butyl acetate as the more appropriate solvent. According to the pKa of lidocaine, the pH was also adjusted in region 11 with potassium carbonate buffer solution. After agitation by vortex and centrifugation of the sample, the organic phase was taken and was directly injected into GC/MS. Nordiazepam-d₅ was used as internal standard.

The duration of the chromatographic analysis was 9,1429 minutes.

For the validation of the GC – MS method, accuracy, precision, linearity and limits of detection and quantification were estimated. The coefficient of determination (R^2) was $R^2=0,9947$. LOD was 0,054391 mg/L and the LOQ was 0,16482 mg/L. The method was accurate and reproducible.

Finally, the analytical method was applied for the quantification of lidocaine to real clinical blood samples from patients admitted to the ICU and to samples came from the traffic police department.

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Λιδοκαΐνη

1.1 Εισαγωγή

Η λιδοκαΐνη είναι ένα από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα τοπικά αναισθητικά. Συντέθηκε για πρώτη φορά το 1942 με την εμπορική ονομασία Xylocaine® και εγκρίθηκε για φαρμακευτική χρήση το 1948 στη Σουηδία [3]. Το 1977 εντάχθηκε στην λίστα των απαραίτητων φαρμάκων του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO Model Lists of Essential Medicines) ως τοπικό αναισθητικό καθώς επίσης και για τη διαχείριση της κοιλιακής αρρυθμίας [4].

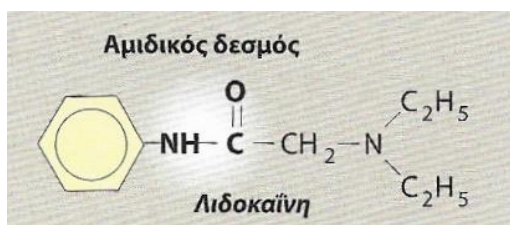
Ως τοπικό αναισθητικό, η λιδοκαΐνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για επιφανειακή αναισθησία, αναισθησία με διήθηση, για περιφερειακή ενδοφλέβια αναλγησία και αποκλεισμό των νεύρων και για οδοντική αναισθησία [1]. Επίσης, σε ασθενείς που νοσηλεύονται στη ΜΕΘ, η λιδοκαΐνη χρησιμοποιείται ως τοπικό αναισθητικό κατά την διασωλήνωση και εισαγωγή του καθετήρα.

Η λιδοκαΐνη έχει χρησιμοποιηθεί και ενδοφλεβίως (Intravenous Lidocaine - IVL) ως αντιαρρυθμικός παράγοντας και για πολλά χρόνια αποτελούσε την πρώτη επιλογή φαρμάκου που χορηγούνταν κατά την ανάνηψη των ασθενών μετά από ανακοπή καρδιάς [2].

Εξαιτίας των αναλγητικών δράσεων της λιδοκαΐνης, έχει προταθεί επίσης ότι η ενδοφλέβια χορήγησή της ίσως έχει θετικές επιδράσεις στη ρύθμιση της περιεγχειρητικής περιόδου, μειώνοντας τον πόνο, τη ναυτία και τους εμετούς, που ίσως επέρχονται μετά από μια εγχείρηση, αλλά παράλληλα βοηθώντας και στην ανάρρωση του ασθενούς [2].

1.2 Ταξινόμηση και Φαρμακοκινητική

Η λιδοκαΐνη ανήκει στα τοπικά αναισθητικά και ειδικότερα στην κατηγορία των αμινοαμιδίων. Τα αμιδικά αναισθητικά περιλαμβάνουν μια λιπόφιλη ομάδα που ενώνεται με έναν αμιδικό δεσμό σε μια αλυσίδα άνθρακα που ενώνεται στη συνέχεια με μια υδρόφιλη ομάδα [5].

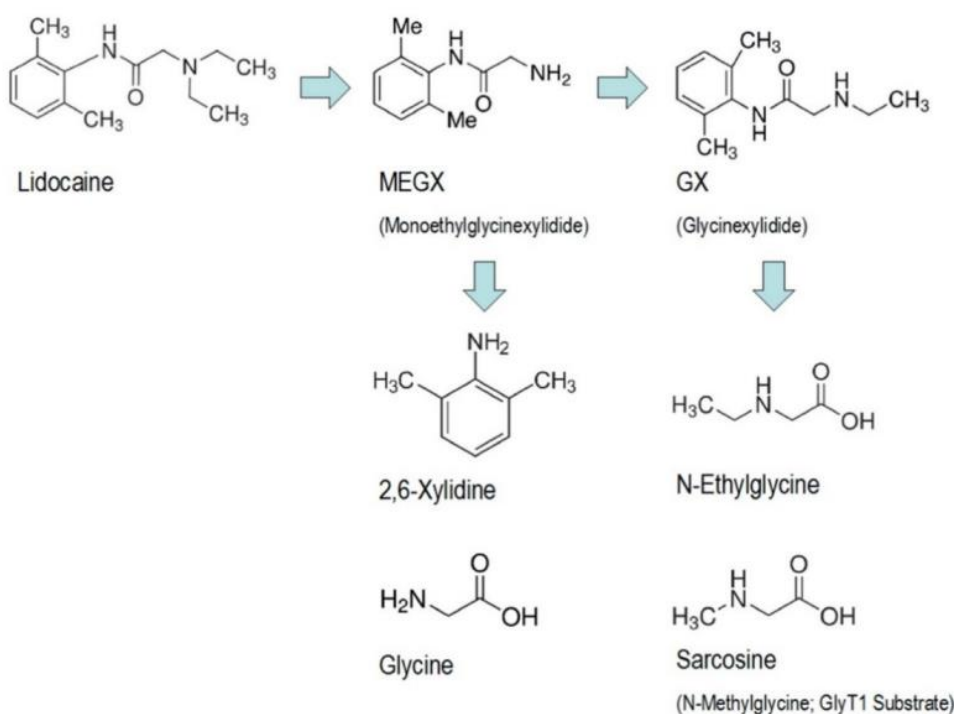


Εικόνα 1.2. 1: Μοριακή δομή της λιδοκαΐνης [5].

Η λιδοκαΐνη βρίσκεται στην κυκλοφορία του αίματος προσδεμένη κατά 60-80% με πρωτεΐνες του πλάσματος και διαχέεται από την κυκλοφορία στους περιφερικούς ιστούς, φτάνοντας πρώτα σε αυτούς με την περισσότερη αιμάτωση (καρδιά, πνεύμονες, ήπαρ,

σπλήνα) και στη συνέχεια στους ιστούς που αιματώνονται λιγότερο (μύες, λιπώδης ιστός). Η λιδοκαΐνη μπορεί ακόμη να διαπεράσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και τον πλακούντα με απλή διάχυση, ενώ εκκρίνεται και στο μητρικό γάλα [2].

Η λιδοκαΐνη μεταβολίζεται κατά κύριο λόγο στο ήπαρ από τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450 και κυρίως από το CYP3A4. Αρχικά, η λιδοκαΐνη υφίσταται μια N-απαλκυλίωση και μεταβαίνει στον φαρμακολογικά ενεργό μεταβολίτη της, το μονοαιθυλογλυκινυλιδίδιο (MEGX), το οποίο μπορεί περαιτέρω να αποαιθυλιωθεί σε γλυκινυλιδίδιο (GX) που υδρολύεται περαιτέρω σε άλλα μεταβολικά προϊόντα που αποβάλλονται με τα ούρα. Η λιδοκαΐνη θα αποβληθεί με τα ούρα κυρίως μετά την μετατροπή της στους μεταβολίτες της, ενώ ένα μικρό ποσοστό της (10%) αποβάλλεται ως έχει. Ο χρόνος ημίσειας ζωής είναι 90 – 120 λεπτά σε υγιή άτομα, ενώ αυτό μπορεί να μεταβάλλεται σε άτομα με κάποια διαταραχή (π.χ. ηπατική ή νεφρική δυσλειτουργία), σε ηλικιωμένους, παιδιά, εγκύους κ.α. Το MEGX εμφανίζει φαρμακολογικές ιδιότητες παραπλήσιες της λιδοκαΐνης και έχει κλινική σημασία καθώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση της νεφρικής λειτουργίας μετά τη χορήγηση της λιδοκαΐνης. Το GX είναι λιγότερο δραστικό χωρίς κάποια κλινική σημασία [6], [7].

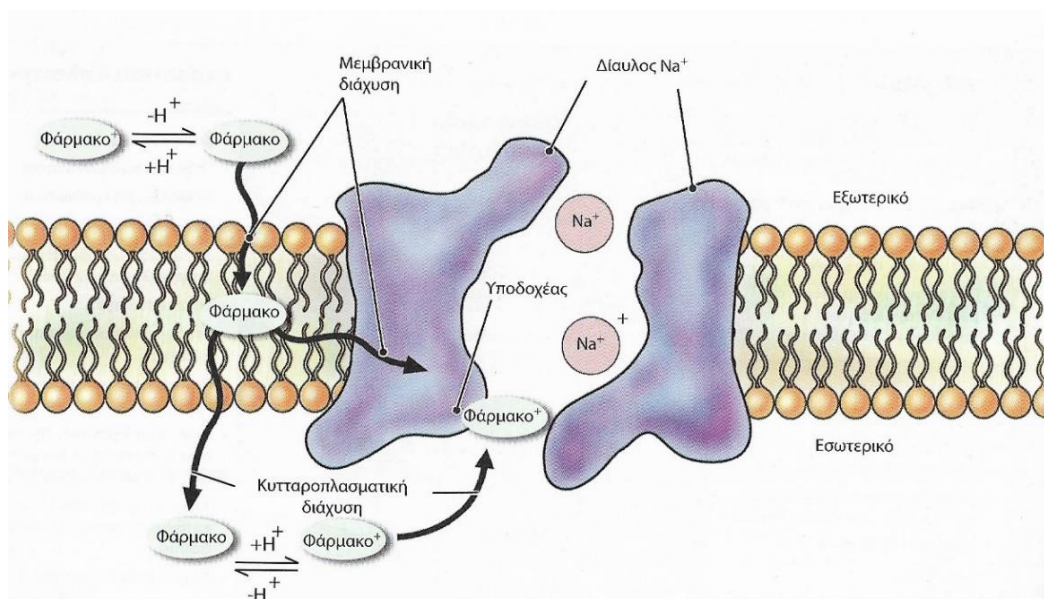


Εικόνα 1.2. 2: Ο μεταβολισμός της λιδοκαΐνης [7].

1.3 Μοριακός μηχανισμός και δράσεις

Η λιδοκαΐνη επιτελεί τις αναλγητικές της δράσεις αποκλείοντας την αγωγιμότητα των αισθητήριων νεύρων και την μετάδοση των ερεθισμάτων ενώ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις αποκλείει τις κινητικές ώσεις από την περιφέρεια προς το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ). Οι διάλυτοι ιόντων Na⁺ αποκλείονται για να αποφευχθεί η παροδική αύξηση της διαπερατότητας της νευρικής μεμβράνης για το Na⁺ που απαιτείται

για τη δημιουργία των δυναμικών ενέργειας. Έτσι, τα ερεθίσματα δεν μπορούν να μεταδοθούν από την πηγή διέγερσης στον εγκέφαλο. Οι μικρές, αμύελες νευρικές ίνες που είναι υπεύθυνες για τη μεταφορά ερεθισμάτων που σχετίζονται με το άλγος, τη θερμοκρασία και την αυτόνομη δραστηριότητα είναι πιο ευαίσθητες [5].



Εικόνα 1.3. 1: Μηχανισμός δράσης της λιδοκαΐνης [5].

Η λιδοκαΐνη διαθέτει σταθερά αποδέσμευσης, $pK_a=7.7$ και άρα θεωρείται μια ασθενής βάση. Ως αποτέλεσμα, ένα ποσοστό των μορίων της λιδοκαΐνης θα είναι μη ιοντισμένα και άρα διαθέσιμα για να μεταφερθούν κάτω από το φυσιολογικό $pH=7.4$ μέσα στα νευρικά κύτταρα. Η λιδοκαΐνη δηλαδή μπορεί να αρχίσει να εκτελεί τις δράσεις της πιο σύντομα από ό,τι κάποιο άλλο αναισθητικό με μεγαλύτερη τιμή pK_a [8].

Η λιδοκαΐνη έχει χρησιμοποιηθεί και ως ένα IV αντιαρρυθμικό καθώς επιδρά επίσης και στα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων. Η αποτελεσματικότητά της ως αντιαρρυθμικός παράγοντας εξαρτάται από την συγκέντρωσή της στο πλάσμα, με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις να επάγουν αγγειοδιαστολή ενώ χαμηλότερες αγγειοσυστολή [2].

1.4 Τοξικότητα λιδοκαΐνης

Τα τοπικά αναισθητικά, μεταξύ των οποίων και η λιδοκαΐνη μπορεί να προκαλέσουν συστηματική τοξικότητα τοπικών αναισθητικών (LAST: Local Anesthetic Systemic Toxicity) όταν τα επίπεδα του φαρμάκου στο αίμα φτάνουν σε τοξικές συγκεντρώσεις είτε μετά από επανειλημμένες εγχύσεις είτε μετά από μια ακούσια και μεγάλης ποσότητας σε αναισθητικό ένεση IV. Το LAST είναι κυρίως συνέπεια του αποκλεισμού διάδοσης παλμών στο ΚΝΣ και στον ιστό αγωγιμότητας του μυοκαρδίου. Τα πρώτα συμπτώματα περιλαμβάνουν την δυσγευσία (γεύση μετάλλου), ζάλη, θολή όραση και μούδιασμα γύρω από το στόμα ενώ σε μια σοβαρή δηλητηρίαση σε δεύτερο χρόνο εμφανίζονται σημάδια διέγερσης που μπορούν να οδηγήσουν σε επιληπτικές

κρίσεις, καρδιακή ανακοπή (κολποκοιλιακός καρδιακός αποκλεισμός και αρρυθμίες), ακόμη και θάνατο [2], [5].

1.5 Θεραπευτικά, τοξικά και θανατηφόρα επίπεδα

Ένωση	Επίπεδα σε ορό/αίμα σε (mg/L)		
Λιδοκαΐνη	Θεραπευτικά	Τοξικά	Κωματώδη-Θανατηφόρα
	(1-)1,5-5	6-7	10 -

Πίνακας 1.5. 1: Θεραπευτικά, τοξικά και κωματώδη-θανατηφόρα επίπεδα λιδοκαΐνης [9].

2. Αέρια χρωματογραφία (GC)

2.1 Γενικά

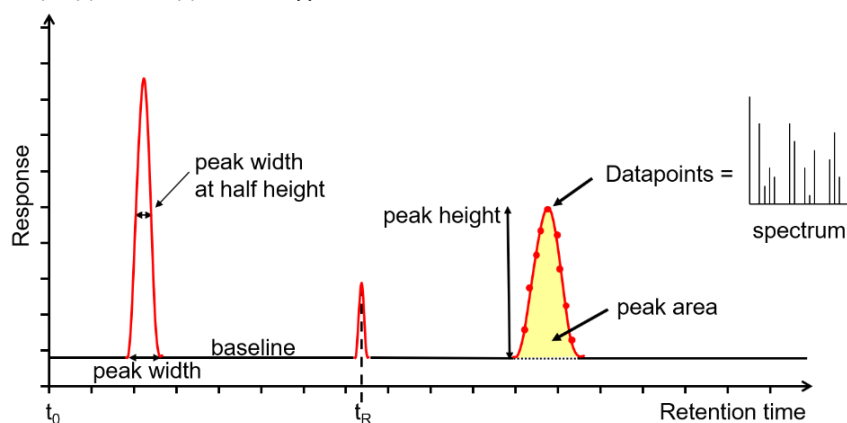
Η αέρια χρωματογραφία είναι μία από τις πιο σημαντικές και κοινές αναλυτικές τεχνικές διαχωρισμού. Χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό και τον εντοπισμό πολλών χημικών ουσιών που περιέχονται σε ένα περίπλοκο μίγμα διαφόρων ενώσεων. Στην αέρια χρωματογραφία τα προς διαχωρισμό συστατικά είναι πτητικές ενώσεις. Εκτός από τον διαχωρισμό μιας ουσίας που περιέχεται σε ένα δείγμα (ποιοτική ανάλυση), η τεχνική της αέριας χρωματογραφίας χρησιμοποιείται για την εύρεση και της ποσότητας (ποσοτική ανάλυση) των ενώσεων που περιέχονται σε ένα μίγμα [10].

Εξαιτίας της απλότητας, της ευαισθησίας και της αποτελεσματικότητάς της στον διαχωρισμό χημικών ενώσεων, η αέρια χρωματογραφία είναι ένα από τα πολυτιμότερα εργαλεία της επιστήμης της Αναλυτικής Χημείας και βρίσκει εφαρμογή αρχικά στην ανάλυση πτητικών ουσιών σε τρόφιμα, φάρμακα, προϊόντα πετρελαίου κ.λπ., καθώς επίσης και σε μελέτες ρύπανσης, σε ιατροδικαστικές αναλύσεις κ.α. [11], [12].

2.2 Αρχή λειτουργίας αέριου χρωματογράφου

Στον αέριο χρωματογράφο, διακρίνονται δύο φάσεις, η στατική (στερεά ή υγρή) και η αέρια κινητή φάση. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται γιατί οι ουσίες με διαφορετική σύνθεση κατανέμονται με διαφορετικό τρόπο μεταξύ των δύο φάσεων. Η κινητή φάση ή «εκλούτης» αποτελεί τον διαλύτη και κινείται συνεχώς μέσα ή πάνω από την επιφάνεια της σταθερής φάσης πάνω στην οποία συγκρατούνται τα προς διαχωρισμό συστατικά. Καθώς το δείγμα περνά μέσω της στήλης, τα πτητικότερα συστατικά (τα οποία αλληλεπιδρούν λιγότερο με τη στατική φάση), κινούνται μέσα στη στήλη γρηγορότερα από τα λιγότερο πτητικά συστατικά. Επομένως, τα συστατικά που διαχωρίζονται, βγαίνουν από τη στήλη σε διαφορετικούς χρόνους και ο χρόνος που απαιτείται για κάθε συστατικό να εξέλθει από τη στήλη είναι γνωστός ως χρόνος κατακράτησης [13].

Για την ανίχνευση των αναλυόμενων ουσιών κατά την έκλουση τους από τη στήλη χρησιμοποιούνται διάφοροι τύποι ανιχνευτών, οι οποίοι καταγράφουν τα δεδομένα ως σειρές κορυφών (peaks) κατά μήκος του άξονα των χρόνων. Το σύνολο των κορυφών που καταγράφει ο ανιχνευτής αποτελεί το χρωματογράφημα. Κάθε κορυφή αντιπροσωπεύει μια ξεχωριστή ένωση, ενώ η επιφάνεια κάτω από μια κορυφή είναι ανάλογη προς τη συγκέντρωση της ένωσης στο δείγμα [13].

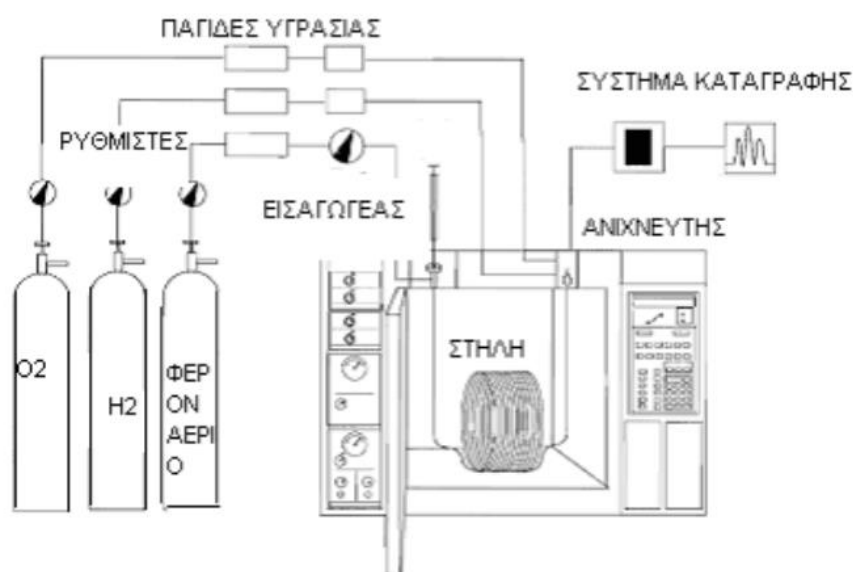


Εικόνα 2.2. 1: Παράδειγμα χρωματογραφήματος αέριας χρωματογραφίας [10].

2.3 Βασική οργανολογία αέριας χρωματογραφίας

Ένα σύστημα αέριας χρωματογραφίας αποτελείται από:

- Την πηγή του φέροντος αερίου
- Το σύστημα εισαγωγής δείγματος
- Την στήλη, η οποία περιέχεται σε ένα κλίβανο που διατηρεί σταθερή τη θερμοκρασία
- Τον ανιχνευτή
- Το σύστημα καταγραφής αποτελεσμάτων



Εικόνα 2.3. 1: Διάταξη αέριου χρωματογράφου [14].

Αρχικά, πραγματοποιείται εξάτμιση του δείγματος, το οποίο μεταφέρεται με τη βοήθεια του φέροντος αερίου στη χρωματογραφική στήλη. Το φέρον αέριο, το οποίο αποτελεί την κινητή φάση, περνά από μια φιάλη υψηλής πίεσης στη στήλη. Μετά την επιλογή του κατάλληλου θερμοκρασιακού προγράμματος, το δείγμα εγχύεται στον εισαγωγέα με μικροσύριγγα και εξατμίζεται. Αμέσως μετά, το δείγμα μεταφέρεται με τη βοήθεια του αερίου κατά μήκος της στήλης, όπου λαμβάνει χώρα ο διαχωρισμός των συστατικών. Για την παραμονή των συστατικών στην αέρια φάση, η στήλη βρίσκεται τοποθετημένη μέσα σε ένα θερμοστατικά ελεγχόμενο φούρνο. Μετά το διαχωρισμό, τα κλάσματα των συστατικών παρασύρονται από το φέρον αέριο και περνούν στον ανιχνευτή, όπου ένα σύστημα καταγραφής καταγράφει τα δεδομένα [14].

2.3.1 Φέρον αέριο

Στην αέρια χρωματογραφία το φέρον αέριο αποτελεί την κινητή φάση, που θα μεταφέρει το δείγμα από τον εισαγωγέα και μέσω της στήλης τελικά στον ανιχνευτή. Η διοχέτευση του φέροντος αερίου γίνεται υπό πίεση. Ένα μανόμετρο και μια βαλβίδα ρυθμίζουν την ταχύτητα ροής του φέροντος αερίου και εξασφαλίζουν την σταθερή πίεση και άρα την σταθερή ταχύτητα ροής του φέροντος αερίου.

Τα πιο κοινά χρησιμοποιούμενα αέρια είναι το ήλιο, το αργό, το άζωτο, και το διοξείδιο του άνθρακα. Το φέρον αέριο πρέπει να είναι αδρανές, υπερκάθαρο και χωρίς υγρασία γιατί απενεργοποιεί τη στατική φάση. Η επιλογή του φέροντος αερίου εξαρτάται επίσης και από τον τύπο του ανιχνευτή που χρησιμοποιείται κάθε φορά [11], [14].

2.3.2 Σύστημα εισαγωγής δείγματος

Μέσω του θαλάμου εισαγωγής ή εισαγωγέα (injector) γίνεται η εισαγωγή του δείγματος. Ο εισαγωγέας λειτουργεί σαν σύστημα προθέρμανσης του δείγματος, χωρίς να διακόπτεται η ροή του φέροντος αερίου [15].

Το δείγμα εισάγεται στον θάλαμο με σύριγγα που διαθέτει μεταλλική βελόνα και διαθέτει χωρητικότητα ως και 10 μL . Για να βρίσκεται συνεχώς το δείγμα στην αέρια φάση και για να αναμιχθεί πλήρως με το φέρον αέριο, η θερμοκρασία πρέπει να είναι τουλάχιστον 50 $^{\circ}\text{C}$ πάνω από το σημείο βρασμού του δείγματος και η εισαγωγή του πρέπει να γίνεται στιγμιαία [11].

Είδη εισαγωγέων:

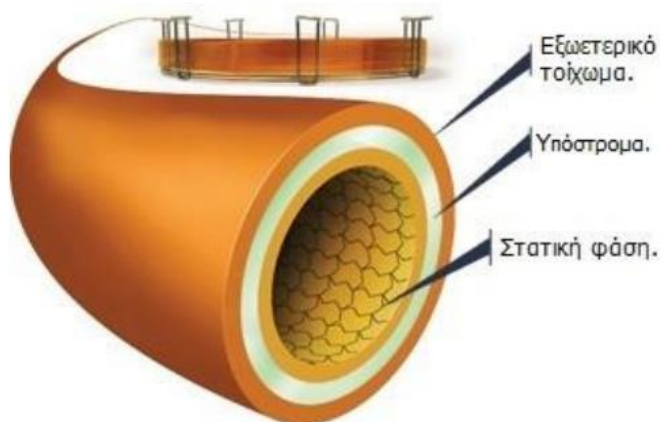
- Διαμοιρασμού (Split) / Μη διαμοιρασμού (Splitless):
Σε λειτουργία διαμοιρασμού, το δείγμα χωρίζεται στον θάλαμο, έτσι ώστε στη στήλη να εισάγεται μόνο μια μικρή ποσότητα από την ποσότητα του αρχικού δείγματος. Αντίθετα, σε λειτουργία μη διαμοιρασμού όλο το δείγμα που εισάγεται στον θάλαμο θα περάσει στη στήλη. Και στις δύο λειτουργίες το δείγμα θερμαίνεται στην είσοδο για εξάτμιση και για αυτό κανένας από τους δύο τύπους εισαγωγής του δείγματος δεν ενδείκνυνται για θερμο-ασταθείς ενώσεις.
- On column:
Σε αυτόν τον τύπο εισαγωγέα, γίνεται απευθείας εισαγωγή του υγρού δείγματος μέσα στην στήλη, χωρίς εξάτμιση ή προθέρμανση. Η λειτουργία αυτή, σε αντίθεση με τις παραπάνω, ενδείκνυται για θερμο-ασταθείς ενώσεις [16].

2.3.3 Στήλη

Στη στήλη λαμβάνει χώρα ο διαχωρισμός των συστατικών ενός δείγματος και επομένως θεωρείται το πιο σημαντικό τμήμα ενός αερίου χρωματογράφου. Ο καλύτερος διαχωρισμός των ενώσεων επιτυγχάνεται όσο αυξάνεται ο αριθμός των θεωρητικών πλακών της στήλης. Η στήλη μπορεί να είναι κατασκευασμένη από: ύαλο, ανοξείδωτο ατσάλι, κεραμικό υλικό κ.ά.

Το εσωτερικό της στήλης είναι κενό και στα εσωτερικά τοιχώματα φέρει ενσωματωμένο κατάλληλο υλικό, το οποίο αποτελεί την στατική φάση και μπορεί να είναι στερεό, υγρό, πορώδες πολυμερές ή προσροφητικό υλικό. Τα συνηθέστερα υλικά

κατασκευής στατικής φάσης είναι: το πολυσιλοξάνιο λόγω σταθερότητας, ανθεκτικότητας και πολλαπλών χρήσεων και πολυαιθυλένιο λόγω πολύ καλής διαχωριστικής ικανότητας [17].



Εικόνα 2.3.3. 1: Τομή τριχοειδούς στήλης [17].

Οι στήλες διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες στις πληρωμένες (packed) και στις τριχοειδείς (capillary). Οι πληρωμένες στήλες κατασκευάζονται από ανοξείδωτο χάλυβα, χαλκό, αλουμίνιο και από γυαλί. Ωστόσο σήμερα, οι πλέον χρησιμοποιούμενες είναι οι τριχοειδείς στήλες οι οποίες, σε σχέση με τις πληρωμένες στήλες, διαθέτουν μεγάλη διαχωριστική ικανότητα εξαιτίας του μεγάλου αριθμού θεωρητικών πλακών [17].

2.3.4 Θάλαμος θέρμανσης της στήλης (oven)

Με τη βοήθεια του θαλάμου θέρμανσης, ολόκληρη η στήλη θερμαίνεται και όλες οι ενώσεις που εισέρχονται στη στήλη εξατμίζονται. Ο θάλαμος θέρμανσης της στήλης αποτελεί σημαντικό μέρος του αέριου χρωματογράφου καθώς με τη σωστή λειτουργία του εξασφαλίζεται και η ακριβής ρύθμιση της θερμοκρασίας [15].

2.3.5 Ανιχνευτής

Μετά τον διαχωρισμό των ενώσεων μέσα στη στήλη ακολουθεί ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός τους, ο οποίος πραγματοποιείται μέσω του ανιχνευτή. Συγκεκριμένα, καθώς οι ενώσεις που έχουν διαχωριστεί διαπερνούν τον ανιχνευτή, αυτός παράγει ένα μετρήσιμο σήμα που είναι ανάλογο της συγκέντρωσης του συστατικού που περνά από αυτόν.

Υπάρχουν διάφοροι ανιχνευτές που μπορούν να επιλεγούν με την προϋπόθεση ότι διαθέτουν κάποια χαρακτηριστικά [13], [18]:

- Σταθερότητα
- Επαναληψιμότητα
- Ευαισθησία
- Εκλεκτικότητα

- Γραμμική απόκριση
- Αξιοπιστία
- Μικρό χρόνο απόκρισης
- Να μην καταστρέφουν το δείγμα
- Χαμηλό θόρυβο
- Ευκολία στο χειρισμό

Επίσης, μερικοί ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται σήμερα σε σύζευξη με αέριο χρωματογράφο είναι [13]:

- Ανιχνευτής Ιονισμού Φλόγας (FID)
- Ανιχνευτής θερμικής αγωγιμότητας (TCD)
- Ανιχνευτής δέσμευσης ηλεκτρονίων (ECD)
- Ανιχνευτής ιονισμού αζώτου φωσφόρου (NPD)
- Φασματογράφος μάζας (MS)

3. Φασματομετρία μάζας (MS)

3.1 Γενικά

Η φασματομετρία μάζας (mass spectrometry, MS) αποτελεί μία από τις πιο διαδεδομένες αναλυτικές τεχνικές που επιτρέπει τη μελέτη της χημικής σύστασης και της μοριακής μάζας των οργανικών ενώσεων. Η φασματομετρία μάζας επιτρέπει τον προσδιορισμό της μάζας μιας αναλυόμενης ουσίας με μεγάλη ακρίβεια και υψηλή ευαισθησία. Αυτή η πληροφορία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση και τον προσδιορισμό της χημικής σύστασης μιας ένωσης που μας ενδιαφέρει [20].

Η πρώτη εφαρμογή της φασματομετρίας μαζών ήταν για τη μελέτη της χημικής σύστασης και της μοριακής μάζας οργανικών ενώσεων. Ωστόσο, οι τεχνολογικές πρόοδοι των τελευταίων δύο δεκαετιών έχουν διευρύνει θεαματικά τη χρησιμότητα της φασματομετρίας μάζας στη μελέτη της δομής ενώσεων μεγάλου μοριακού βάρους (πρωτεΐνες), στον προσδιορισμό της δομής διαφόρων οργανικών ενώσεων (π.χ. νέων φαρμάκων) και στην ποιοτική και ποσοτική ανάλυση αγνώστων μιγμάτων ανόργανων και οργανικών ενώσεων [20].

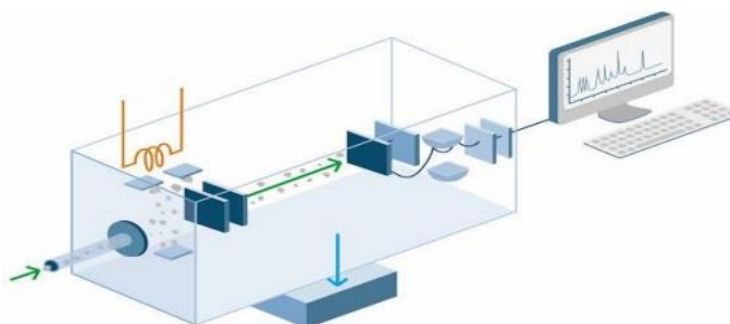
3.2 Αρχή λειτουργίας φασματογράφου μάζας

Οι φασματογράφοι μάζας λειτουργούν μετατρέποντας τα μόρια της αναλυόμενης ουσίας σε ταχύτατα κινούμενα ιόντα. Με την εφαρμογή συγκεκριμένων διαφορών δυναμικού τα συστατικά του δείγματος ιονίζονται και κάθε ένωση μπορεί να διασπαστεί σε ιόντα από τα οποία μπορεί να προκύψουν ακόμη μικρότερα ιόντα (θραύσματα). Τα ιόντα αυτά κινούνται κατά μήκος της διαφοράς δυναμικού που εφαρμόζεται και τα μικρότερα καταθάνουν πρώτα στον ανιχνευτή όπου υπολογίζεται ο λόγος της μάζας κάθε ιόντος προς το φορτίο του (λόγος m/z). Το διάγραμμα, που δίνει τη σχετική ένταση του μετρούμενου ρεύματος (άξονας y) ως συνάρτηση του λόγου m/z (άξονας x), ονομάζεται Φάσμα Μαζών (Mass Spectrum) της ένωσης και μπορεί να συγκριθεί με ήδη υπάρχοντα φάσματα μαζών για την ταυτοποίηση της ένωσης [13], [20].

3.3 Βασική οργανολογία φασματογράφου μάζας

Ένας φασματογράφος μάζας περιλαμβάνει έξι βασικές συνιστώσες:

- Το σύστημα της εισαγωγής του δείγματος
- Την πηγή ιόντων
- Τον αναλυτή μάζας
- Τον ανιχνευτή
- Το σύστημα κενού
- Τον ηλεκτρονικό υπολογιστή



Εικόνα 3.3. 1: Απεικόνιση φασματογράφου μάζας [21].

3.3.1 Σύστημα εισαγωγής δείγματος

Το σύστημα εισαγωγής προετοιμάζει την μικροποσότητα του δείγματος που θα εισαχθεί στο χώρο ιονισμού (πηγή ιόντων) που θα πρέπει να βρίσκεται πάντοτε σε αέρια φάση και κάτω από συνθήκες σταθερής ροής χωρίς τη διατάραξη του κενού. Τα συστήματα εισαγωγής του δείγματος ποικίλλουν ανάλογα με τη φυσική κατάσταση του δείγματος. Στην περίπτωση σύζευξης του φασματογράφου μάζας με τον αέριο χρωματογράφο, το αέριο δείγμα που εκλύεται από τη χρωματογραφική στήλη εισάγεται απευθείας στην πηγή ιόντων μέσω ενός σωλήνα (interface) υψηλής θερμοκρασίας [21].

3.3.2 Πηγές ιόντων

Η πηγή ιόντων επιτυγχάνει το πρώτο κρίσιμο βήμα στη φασματομετρική ανάλυση μάζας: τη μετατροπή της αναλυόμενης ουσίας σε ιόντα στην αέρια κατάσταση (ιοντισμός) [20]. Στην πηγή ιόντων, το δείγμα βομβαρδίζεται με δέσμη ηλεκτρονίων. Η σύγκρουση με το ενεργητικό ηλεκτρόνιο, μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα εκτός από τον ιοντισμό του μορίου και τη διάσπασή του σε ιόντα. Αυτή η διαδικασία θραυσματοποίησης δίνει ένα χαρακτηριστικό μίγμα ιόντων [13].

Κάποιες από τις συνηθισμένες πηγές ιοντισμού είναι [21]:

- Ιοντισμός με ηλεκτρόνια (Electron Impact, EI)
- Χημικός Ιοντισμός (Chemical Ionization)
- Ψεκασμός σε ηλεκτρικό δυναμικό (Electrospray)
- Ιοντισμός με Laser και Υποβοήθηση Υποστρώματος (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation, MALDI)

3.3.3 Αναλυτής μαζών

Τα νεοσχηματισθέντα ιόντα της αναλυόμενης ουσίας εισέρχονται στη συνέχεια, μετά τον ιονισμό τους στον αναλυτή μάζας, όπου διαχωρίζονται ανάλογα με τον λόγο m/z [20].

Τα χαρακτηριστικά ενός ιδανικού αναλυτή είναι διάκριση μικρών διαφορών στο λόγο m/z , η ανάλυση μεγάλου αριθμού ιόντων, η μεγάλη ευαισθησία και η συμβατότητά του με τα υπόλοιπα τμήματα του φασματογράφου μάζας. Το πιο σημαντικό όμως χαρακτηριστικό σε έναν αναλυτή μαζών είναι η διαχωριστική του ικανότητα (Resolution, R), η οποία ορίζεται από την σχέση:

$$R = m/\Delta m$$

Όπου,

m: η μάζα της πρώτης κορυφής και

Δm : η διαφορά μαζών δύο διαδοχικών κορυφών

Τα φασματομέτρα μάζας διακρίνονται σε [14]:

- Απλούς αναλυτές με μικρή διαχωριστική ικανότητα ($R=400-500$):

Τετραπολικό φίλτρο μάζας, αναλυτής μαζών με διαχωρισμό βάσει του χρόνου πτήσης και ιοντική παγίδα.

- Αναλυτές με μεγάλη διαχωριστική ικανότητα ($R=50.000$):

Αναλυτές μαγνητικού τομέα ή απλής εστίασης και αναλυτές διπλής εστίασης ή συνδυασμού ηλεκτροστατικού και μαγνητικού πεδίου.

Οι συνηθέστεροι τύποι αναλυτών μαζών είναι [22]:

- Αναλυτής απλής εστίασης
- Αναλυτής διπλής εστίασης
- Παγίδα ιόντων (Ion trap)
- Αναλυτής Χρόνου Πτήσης (Time of Flight, TOF)
- Υβριδικός αναλυτής Orbitrap
- Τετραπολικός αναλυτής (Quadrupole)

– Τετραπολικός Αναλυτής (Quadrupole MS)

Στα περισσότερα συστήματα GS-MS χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό των ιόντων ένα τετράπολο φίλτρο μαζών. Σε συνθήκες υψηλού κενού, τα ιόντα κινούνται κατά μήκος τεσσάρων ράβδων, στις οποίες εφαρμόζεται μεταβαλλόμενη τάση. Τα μεταβαλλόμενα ηλεκτρικά παιδία έχουν σαν αποτέλεσμα την κίνηση των ιόντων σε πολύπλοκες τροχιές, ενώ κάθε στιγμή μία μόνο μάζα φτάνει στον ανιχνευτή. Επομένως, μπορεί να ληφθεί και να αποθηκευτεί στον δίσκο υπολογιστή, ένας μεγάλος αριθμός φασμάτων μάζας [18].



Εικόνα 3.3.3. 1: Τετραπολικός αναλυτής [13].

– Αναλυτής Χρόνου Πτήσης (Time of Flight, TOF)

Σε αυτόν το τύπο αναλυτή τα ιόντα επιταχύνονται μέσα σε επιμήκη θάλαμο κάτω από την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου υπό σταθερή διαφορά δυναμικού. Ο χρόνος πτήσης κάθε θραύσματος εξαρτάται από το λόγο m/z . Για δύο ιόντα ίσου καθαρού φορτίου, το μικρότερο θα απαιτήσει λιγότερο χρόνο για να διασχίσει τον θάλαμο, απ' ό,τι το μεγαλύτερο. Η μάζα του κάθε ιόντος μπορεί να προσδιοριστεί με τη μέτρηση του χρόνου που χρειάζεται το συγκεκριμένο ιόν για να διασχίσει τον θάλαμο [20].

3.3.4 Ανιχνευτές

Τα ιόντα μετά τον αναλυτή μάζας κατευθύνονται στον ανιχνευτή, ο οποίος παράγει σήμα που είναι ανάλογο του αριθμού ιόντων [18].

Τα είδη των ανιχνευτών που χρησιμοποιούνται περισσότερο είναι [13]:

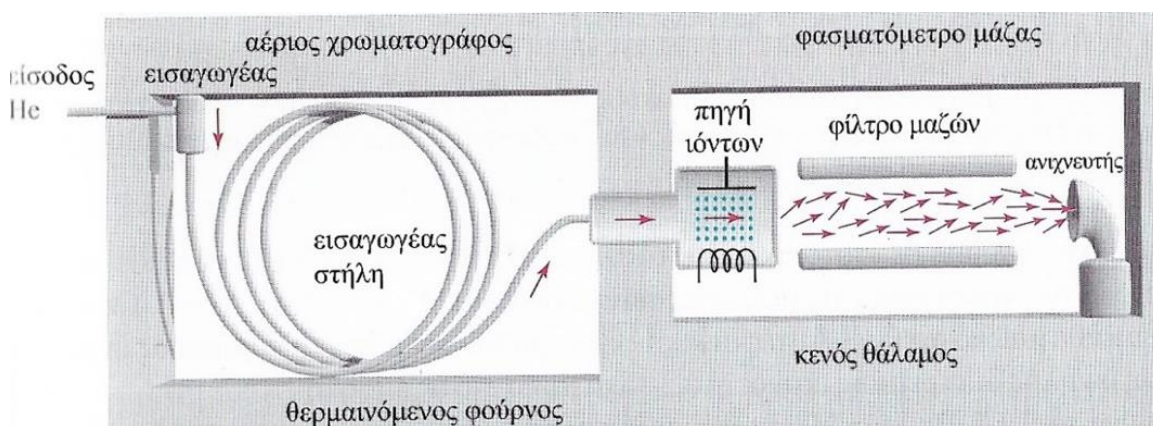
- Φαρανταϊκό Κύπελλο (Faraday Cup)
- Ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής (Electron Multiplier)

Ο ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής αποτελεί τη πιο συχνή διάταξη ανίχνευσης στους φασματογράφους μαζών. Είναι κατασκευασμένος από ύαλο υψηλής περιεκτικότητας σε μόλυβδο. Κατά μήκος του μεταλλάκτη εφαρμόζεται δυναμικό και τα ιόντα καθώς χτυπούν στην επιφάνεια αυτή εκβάλλουν ηλεκτρόνια, τα οποία αναπηδούν κατά μήκος της επιφάνειας προκαλώντας την απομάκρυνση περισσότερων ηλεκτρονίων μετά από κάθε πρόσκρουση. Κατά συνέπεια προκύπτει ένα ενισχυμένο σήμα, το οποίο καταγράφεται στο σύστημα δεδομένων [13].

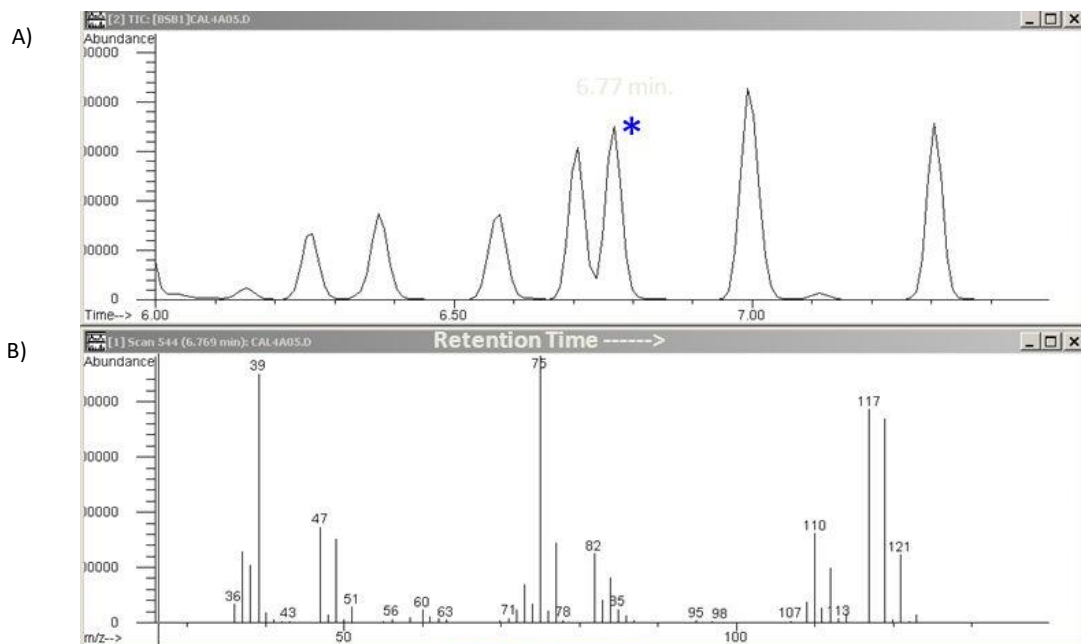
4. Αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με Φασματομετρία μάζας

Η αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC-MS) αποτελεί μια σύζευξη ισχυρών αναλυτικών τεχνικών σε μία ενιαία μέθοδο ανάλυσης. Ο αέριος χρωματογράφος παρέχει τη δυνατότητα ποσοτικοποίησης και διαχωρισμού των ενώσεων του δείγματος, βάσει της διαφορετικής συγκράτησής τους που εμφανίζουν στη στατική φάση. Παρόλα αυτά, η δομή των ενώσεων που υπάρχουν στο δείγμα δεν επιβεβαιώνεται μέσω του αέριου χρωματογράφου. Από την άλλη πλευρά, ο φασματογράφος μάζας παίζει το ρόλο του ιδανικού ανιχνευτή καθώς, με βάση τα ιόντα στα οποία διασπάται μια ένωση, μπορεί να ταυτοποιήσει τη δομή τους, εξάγοντας τελικά τα αποτελέσματα με τη μορφή φασμάτων μάζας που παρέχουν πληροφορίες σχετικά με το λόγο μάζας/φορτίου (m/z) και την ένταση του σήματος [14].

Η συνδυασμένη τεχνική GC-MS αξιοποιεί τα πλεονεκτήματα και των δύο αναλυτικών τεχνικών. Επομένως, αυτό που προκύπτει από τον συνδυασμό των δύο αναλυτικών τεχνικών είναι ένα χρωματογράφημα από τον αέριο χρωματογράφο, το οποίο, με βάση τον χρόνο συγκράτησης των ενώσεων ενός δείγματος, αξιοποιείται στο διαχωρισμό και στην ποσοτικοποίηση τους και ένα φάσμα μάζας από τον φασματογράφο μαζών που ταυτοποιεί την δομή καθενός από τα συστατικά [13].



Εικόνα 2.4. 1: Σχηματικό διάγραμμα GC-MS [13].



Εικόνα 2.4. 2: Παράδειγμα ανάλυσης δεδομένων GC–MS. Α) Χρωματογράφημα, Β) Φάσμα μαζών [23].

Κάποια από τα βασικά πλεονεκτήματα της συνδυασμένης τεχνικής GC–MS είναι [21]:

- Η μεγάλη ευαισθησία της τεχνικής σε χαμηλά επίπεδα συγκεντρώσεων δειγμάτων.
- Η μεγάλη εκλεκτικότητα της μεθόδου (απόλυτη ταυτοποίηση).
- Η μεγάλη διακριτική ικανότητα.
- Η υψηλή ακρίβεια ποσοτικής ανάλυσης.
- Η δυνατότητα ταυτοποίησης και ποσοτικού προσδιορισμού πτητικών και ημι-πτητικών οργανικών ενώσεων σε πολύπλοκα μίγματα.
- Ο προσδιορισμός του μοριακού βάρους άγνωστων οργανικών ενώσεων σε πολύπλοκα μίγματα.
- Ο συντακτικός προσδιορισμός άγνωστων οργανικών ενώσεων σε πολύπλοκα μίγματα.
- Η δυνατότητα αντιστοίχισης με τα φάσματα αναφοράς.

5. Προκατεργασία δείγματος

Ένα από τα πιο σημαντικά στάδια ανάπτυξης μιας αναλυτικής μεθόδου είναι η προκατεργασία του δείγματος. Η προκατεργασία συχνά καταλαμβάνει τον περισσότερο χρόνο που απαιτεί μια ανάλυση μέχρι την έκδοση του αποτελέσματος και άρα μπορεί τελικά να αποτελεί το καθοριστικό της βήμα [24].

Η προκατεργασία θα πρέπει να περιλαμβάνει όσο το δυνατό λιγότερα στάδια, ώστε να αυξάνεται η ταχύτητα ανάλυσης και να μειώνεται παράλληλα το κόστος. Επίσης, θα πρέπει να επιτευχθεί όσο το δυνατόν εκλεκτική παραλαβή των προσδιοριζόμενων ενώσεων, η οποία να είναι παράλληλα επαναλήψιμη και να έχει την ίδια ανάκτηση κάτω από τις ίδιες συνθήκες προκατεργασίας του δείγματος. Ακόμη, θα πρέπει να είναι φιλική προς το περιβάλλον, χρησιμοποιώντας όσο είναι εφικτό μη τοξικούς διαλύτες [24].

Ανάλογα με τον τύπο του δείγματος επιλέγεται και η κατάλληλη διαδικασία προκατεργασίας. Για τον προσδιορισμό υγρών δειγμάτων, και συγκεκριμένα τοξικών ενώσεων σε βιολογικά δείγματα, οι συνηθέστεροι τρόποι προκατεργασίας που χρησιμοποιούνται είναι: η εκχύλιση υγρού-υγρού (LLE), η εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) και η απευθείας έγχυση μετά από αραίωση (directinjection). Σήμερα, η εκχύλιση υγρού-υγρού κυριαρχεί στις βιοαναλυτικές εφαρμογές [24].

5.1 Εκχύλιση Υγρού-Υγρού (LLE)

Στην εκχύλιση υγρού-υγρού χρησιμοποιείται διαλύτης μη αναμίξιμος με το διαλύτη του δείγματος και ο διαχωρισμός των ενώσεων επιτυγχάνεται σύμφωνα με την διαφορετική κατανομή τους στον κατάλληλο διαλύτη ανάλογα με τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες. Πρακτικά οι ουσίες κατανέμονται μεταξύ δύο φάσεων που δεν αναμιγνύονται μεταξύ τους. Οι δύο διαλύτες, οργανικός και υδατικός, αλληλεπιδρούν με τις ενώσεις του δείγματος και πραγματοποιείται η εκχύλιση τους από τον υδατικό διαλύτη στον οργανικό, με τον οποίο έχουν μεγαλύτερη συγγένεια. Η οργανική φάση που περιέχει τις επιθυμητές ενώσεις, σε ορισμένες περιπτώσεις είναι απαραίτητο να εξατμιστεί εκ νέου μέχρι ξηρού και επαναδιαλυθεί σε ένα συμβατό με το αναλυτικό σύστημα διαλύτη. Για την αύξηση της ανάκτησης των ενώσεων και την ελαχιστοποίηση των παρεμποδίσεων η εκχύλιση μπορεί να περιλαμβάνει στάδια ρύθμισης του pH, σχηματισμό συμπλόκων κ.ά.

Η διαδικασία εκχύλισης τοξικών ενώσεων από βιολογικά δείγματα, αίμα ή ούρα περιλαμβάνει την κατεργασία με ένα ρυθμιστικό διάλυμα κατάλληλου pH, ανάλογα με την pK_a των ενώσεων, και στη συνέχεια την προσθήκη του οργανικού διαλύτη, ο οποίος διαχωρίζει το φάρμακο από την υδατική φάση [24].

6. Βιβλιογραφική ανασκόπηση

Στη βιβλιογραφία υπάρχει ένας σημαντικός αριθμός άρθρων επισκόπησης και μεθοδολογίας που αναφέρονται στην ταυτοποίηση και στον ποσοτικό προσδιορισμό της λιδοκαΐνης σε δείγματα αίματος ορού. Ο προσδιορισμός της λιδοκαΐνης γίνεται με την βοήθεια του αέριου χρωματογράφου συζευγμένου με την αέρια χρωματογραφία (GC–MS).

Πίνακας 6. 1: Βιβλιογραφική ανασκόπηση μεθόδων ποσοτικού προσδιορισμού λιδοκαΐνης με GC/MS σε δείγματα ορού αίματος.

Προκατεργασία	Εσωτερικό πρότυπο	Κινητή Φάση	Στήλη	Ταχύτητα Ροής	Αναφορά
Buffer: NaOH (pH 12-13) Διπλή εκχύλιση με οξικός αιθυλεστέρας Εκ νέου προσθήκη Buffer: NaOH (pH 11-12) Διπλή εκχύλιση με οξικός αιθυλεστέρας Εξάτμιση και επαναδιάλυση σε αιθανόλη	Δεξτρομεθορφάνη	Άζωτο	HP-5MS (Agilent Technologies, 30 m x 0.25 mm, 0.25 µm film thickness)	Δεν αναφέρεται	[25]
Buffer: NaOH Διαλύτης: t-butyl methyl ether Μεταφορά στην οργανική φάσης HCL Φυγοκέντρηση υδατικής φάσης με προσθήκη buffer: NaOH και διαλύτης: t-butyl methyl ether Εξάτμιση και επαναδιάλυση σε οξικό αιθυλεστέρα	Μεπιβακαΐνη	Ήλιο	HP-1MS (Agilent Technologies, 30 m x 0.25 mm, 0.25 µm film thickness)	1 ml/min	[26]
Buffer: Sodium borate (pH 12) Διαλύτης: 1-χλωροβουτάνιο Μεταφορά στην οργανική φάση θειικού οξέος και εκ νέου φυγοκέντρηση Μεταφορά στην οργανική φάση NaOH και 1-χλωροβουτάνιο και φυγοκέντρηση Εξάτμιση και επαναδιάλυση σε 1-χλωροβουτάνιο	Μεπιβακαΐνη	Ήλιο	EVDX-5MS Agilent column (25 m 0.20 mm i.d., 0.33 µm film thickness).	Δεν αναφέρεται	[27]

Οι παραπάνω αναφορές περιλαμβάνουν τα πιο πρόσφατα επιστημονικά δεδομένα που υπάρχουν στη βιβλιογραφία για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση της λιδοκαΐνης σε δείγματα ορού αίματος με χρήση του οργάνου GC–MS. Παλαιότερες επιστημονικές δημοσιεύσεις που υπάρχουν στην βιβλιογραφία δεν συμπεριλήφθηκαν στην ανασκόπηση, καθώς περιέχουν πολύ περισσότερο πολύπλοκες προκατεργασίες δειγμάτων και αποτελούν ξεπερασμένες αναλυτικές μεθόδους.

Συγκρίνοντας τη μέθοδο που αναπτύχθηκε κατά την εκπόνηση της παρούσας πτυχιακής εργασίας με τις μεθόδους που περιγράφονται στις παραπάνω επιστημονικές δημοσιεύσεις, τα συμπεράσματα που προκύπτουν είναι ότι η μέθοδος της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας εμπεριέχει μια συντομότερη και πιο οικονομική προκατεργασία του δείγματος. Η εκχύλιση υγρού–υγρού ενός σταδίου που πραγματοποιήθηκε, μείωσε σημαντικά τον χρόνο προκατεργασίας, ενώ το γεγονός ότι δεν απαιτήθηκε στάδιο εξάτμισης, επαναδιάλυσης ή παραγωγοποίησης μείωσε ακόμη περισσότερο τον χρόνο και το κόστος της ανάλυσης. Επίσης, η μέθοδος είναι πιο φιλική προς το περιβάλλον.

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Σκοπός της εργασίας

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε με σκοπό την ανάπτυξης μιας γρήγορης και αξιόπιστης μεθόδου ταυτοποίησης της λιδοκαΐνης με χρήση του οργάνου GC-MS. Η μέθοδος που αναπτύχθηκε είναι ταυτόχρονα πιο οικονομική και πιο φιλική προς το περιβάλλον, γεγονός που επιτεύχθηκε με την αποφυγή της χρήσης τοξικών διαλυτών. Σημαντική είναι επίσης η εφαρμογή της μεθόδου για τον ποσοτικό προσδιορισμό της λιδοκαΐνης, ώστε να είναι μετέπειτα αξιοποιήσιμη στην ποσοτικοποίηση της σε πραγματικά κλινικά δείγματα όρου αίματος.

Η ποσοτικοποίηση της λιδοκαΐνης είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς χορηγείται σε ασθενείς νοσηλευόμενους στη ΜΕΘ και έτσι ο ακριβής προσδιορισμός των επιπέδων της έχει ιδιαίτερη κλινική σημασία.

Κατά την ανάπτυξη της μεθόδου, πραγματοποιήθηκε βελτίωση του σταδίου της προκατεργασίας του δείγματος και έπειτα επιλέχθηκε το θερμοκρασιακό πρόγραμμα και οι κατάλληλες παράμετροι για το GC-MS. Ακολούθησε η επικύρωση της μεθόδου που αναπτύχθηκε και τέλος η μέθοδος αξιοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό λιδοκαΐνης σε πραγματικά κλινικά δείγματα όρου αίματος που προέρχονταν από ασθενείς νοσηλευόμενους σε ΜΕΘ και από τμήμα τροχαίας της αστυνομίας.

2. Οργανολογία, Αντιδραστήρια και Διαλύτες

2.1 Πρότυπα διαλύματα, Αντιδραστήρια και Διαλύτες

Για την πραγματοποίηση της εργασίας χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω πρότυπα διαλύματα, αντιδραστήρια και διαλύτες:

- Καθαρό νερό, συσκευή MILLIPORE, Direct-Q® 3 UV with Pump
- Μεθανόλη, LC–MS Grade, PanReac AppliChem ITW Reagents
- Οξικός βουτυλεστέρας, 99+%, Alfa Aesar
- Οξικός αιθυλεστέρας, HPLC grade, 99.8+%, CHEM-LAB
- Ανθρακικό κάλιο (K_2CO_3), PRS Panreac
- Πρότυπο αντιδραστήριο νορδιαζεπάμης- d_5 , Lipomed Inc.
- Lidocaine hydrochloride, working standard, ASTRA Sodertalje, Sweden

2.2 Όργανα, συσκευές και λοιπός εξοπλισμός

- Πιπέτα των 2 – 20 μ L, eppendorf Research plus
- Πιπέτα των 20 – 200 μ L, eppendorf Research plus
- Πιπέτα των 100 – 1000 μ L, eppendorf Research plus
- Πλαστικά φιαλίδια (eppendorf), 2mL, Sarstedt (Germany)
- Γυάλινο φιαλίδιο 4 mL Screw Neck Vial, 45 x 14.7 mm, amber glass, 1st hydrolytic class, Lab Logistics Group GmbH
- GC/MS γυάλινα φιαλίδια (vials), 1,5 mL, Short Thread Vial, 32 X 11.6 mm, clear glass, 1st hydrolytic class, wide opening, Lab Logistics Group GmbH
- 13mm Combination Seal: PP Screw Cap, black, closed top: RedRubber / PTFE beige, 45° shore A, 1,0 mm, Lab Logistics Group GmbH
- 9mm Combination Seal: PP Short Thread Cap, blue, centre hole: Natural Rubber red – orange / TEF transparent 60° shore A, 1mm, Lab Logistics Group GmbH
- Εισαγωγέας δείγματος, 0,1 mL Micro Insert, 31 x 6 mm, clear glass, 1st hydrolytic class, 1mm top, Lab Logistics Group GmbH
- Αναδευτήρας, Classic Advanced Vortex Mixer, Velp Scientifica
- Αναδευτήρας, Ibx instruments, VOS series
- Συσκευή υπερήχων, IP SELECTA s.a.
- Φυγόκεντρος, SIGMA 2 - 16P

- MILLIPORE, Direct-Q® 3 UV with Pump
- Αναλυτικός ζυγός ακριβείας, (Electronic Balance), CHAUS®, PR series

2.3 Σύστημα GC–MS

Το αναλυτικό σύστημα της αέριας χρωματογραφίας συζευγμένη με φασματογράφο μάζας που χρησιμοποιήθηκε για τις αναλύσεις αποτελείται από:

- Σύστημα αέριου χρωματογράφου 7890A (GC), Agilent Technologies
- Φασματογράφο μαζών MS 5975C inertXL EI/CI MSD with Triple-Axis Detector, Agilent Technologies
- Αυτόματο δειγματολήπτη CTCPal (CTC –CH 4222, Analytical Switzerland)
- Εισαγωγή δείγματος PVT inlet, Agilent Technologies
- Μικροσύριγγα, CTC 10 ul, pt 2 Combi/GC-Pal, Agilent Technologies

2.4 Βιολογικά δείγματα

Για όλα τα πειράματα (για την ανάπτυξη και για την επικύρωση της μεθόδου) χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ορού αίματος ελεύθερα φαρμάκων και άλλων ουσιών (blank serum). Η μέθοδος που αναπτύχθηκε στη συνέχεια εφαρμόστηκε σε πραγματικά κλινικά δείγματα ορού αίματος.

3. Ανάπτυξη αναλυτικής μεθόδου GC-MS

3.1 Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων

Για την ανάπτυξη της αναλυτικής μεθόδου παρασκευάστηκε πυκνό πρότυπο stock διάλυμα λιδοκαΐνης από σκόνη λιδοκαΐνης σε συγκέντρωση 10000 µg/L. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ζύγιση της σκόνης λιδοκαΐνης με αναλυτικό ζυγό ακριβείας, η οποία στη συνέχεια διαλύθηκε σε κατάλληλο όγκο διαλύτη μεθανόλη (MeOH), ώστε να προκύψει η επιθυμητή συγκέντρωση. Το πρότυπο διάλυμα αναδεύτηκε για μερικά λεπτά σε συσκευή vortex και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε συσκευή υπερήχων στους 30 °C για 30 λεπτά, ώστε να εξασφαλιστεί η διάλυση στον βέλτιστο βαθμό. Τέλος, αποθηκεύτηκε στην κατάψυξη στους -20 °C.

Έπειτα, από το πυκνό αυτό διάλυμα παρασκευάστηκαν διαλύματα που προέκυψαν με περεταίρω αραιώσεις και με προσθήκη του κατάλληλου όγκου διαλύτη MeOH, ώστε να προκύψει η επιθυμητή τελική συγκέντρωση. Οι συγκεντρώσεις αυτές επιλέχθηκαν με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία για την κατασκευή των σημείων της πρότυπης καμπύλης στην οποία εμπεριέχονται τα ανώτερα θεραπευτικά και τα κατώτερα τοξικά όρια της λιδοκαΐνης. Η καμπύλη στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό πραγματικών κλινικών δειγμάτων.

3.2 Παράμετροι GC – MS

Παράμετροι GC – MS	
Ένεση	Splitless
Στήλη	J&W 19091S-433UI: 325°C: 29,95 m x 250 µm x 0,25 µm
Πίεση	18,9 psi

Φούρνος		
Ροή φέροντος αερίου	1,2 mL/min	
Χρόνος ανάλυσης	19,1429 min	
Θερμοκρασιακό πρόγραμμα	Αρχική θερμοκρασία 120°C	Χρόνος παραμονής 4 min
	Αύξηση στους 300°C με ρυθμό 35° C/min	Χρόνος παραμονής 4 min
	Αντίθετη ροή στους 300°C	10 min

Πίνακας 3.2. 1: Παράμετροι εισαγωγέα.

Για την επιλογή του κατάλληλου θερμοκρασιακού προγράμματος πραγματοποιήθηκαν διάφορες δοκιμές οι οποίες φαίνονται παρακάτω:

Πίνακας 3.2. 2: Δοκιμή 1

Solvent delay (min)	Θερμοκρασία (°C)		Rate (°C/min)	Hold (min)	Run time (min)
3.50	Αρχική	Τελική	20	10	12
	120	300			

Πίνακας 3.2. 3: Δοκιμή 2

Solvent delay (min)	Θερμοκρασία (°C)		Rate (°C/min)	Hold (min)	Run time (min)
3.50	Αρχική	Τελική	25	6	7.2
	120	300			

Έπειτα από δοκιμές το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που επιλέχθηκε είναι αυτό της δοκιμής 3.

Πίνακας 3.2. 4: Δοκιμή 3

Solvent delay (min)	Θερμοκρασία (°C)		Rate (°C/min)	Hold (min)	Run time (min)
3.50	Αρχική	Τελική	35	4	9.1429
	120	300			

Συγκεκριμένα, η αρχική του θερμοκρασία είναι 120 °C και αυξάνει με ρυθμό 35°C/min μέχρι τους 300 °C όπου διατηρείται για 4 min. Η συνολική διάρκεια της μεθόδου είναι 9,1429 min και ακολούθως απαιτούνται άλλα 10 min στους 300 °C για να ολοκληρωθεί το (backflash) πρόγραμμα καθαρισμού της στήλης με αντίθετη ροή του φέροντος αερίου, που είναι το ήλιο (He).

Το παρόν θερμοκρασιακό πρόγραμμα βελτιστοποιήθηκε ώστε να μειωθεί ο συνολικός χρόνος ανάλυσης ενώ ταυτόχρονα να επιτευχθεί ο βέλτιστος διαχωρισμός και

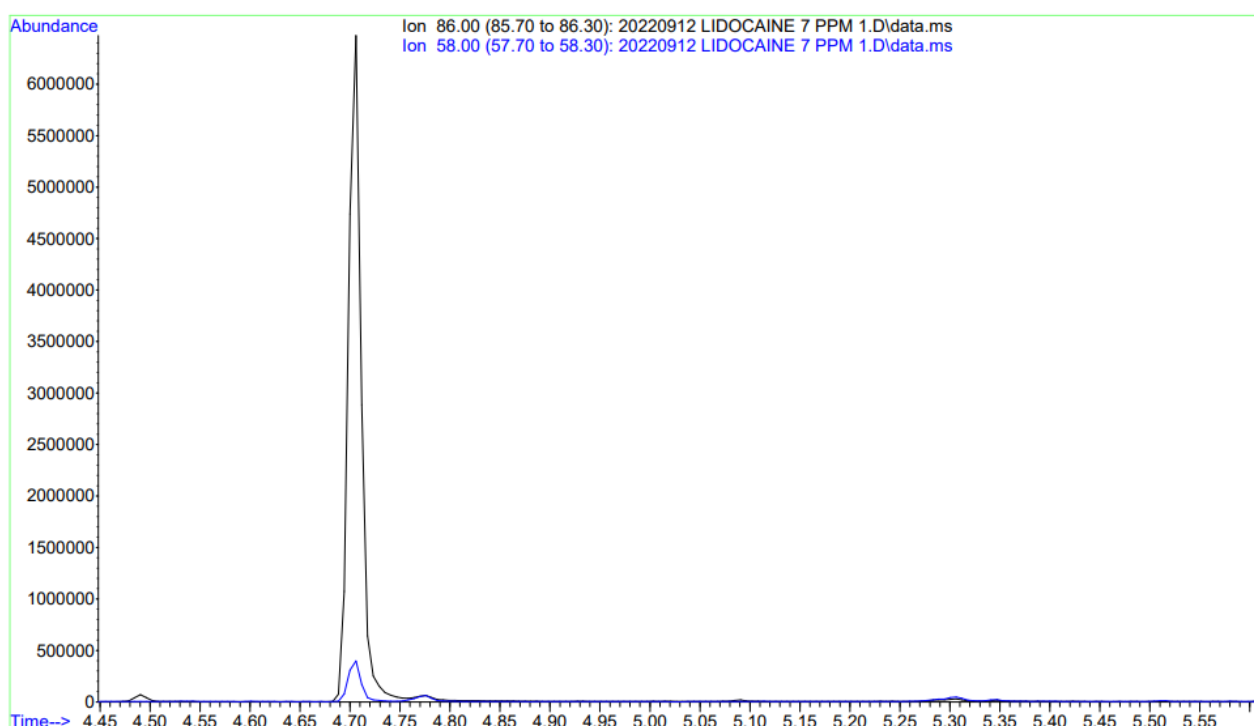
ποσοτικός προσδιορισμός όλων των συγκεντρώσεων τόσο της λιδοκαΐνης όσο και της νορδιαζεπάμης-d₅. Επίσης, με την αύξηση της ταχύτητας ροής που εφαρμόστηκε στη δοκιμή 3, αυτό που επιτεύχθηκε ήταν η αποφυγή της δημιουργίας “ουράς” στην κορυφή της λιδοκαΐνης στο χρωματογράφημα.

Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με πρόγραμμα ολικής σάρωσης (FullScan) για την ανίχνευση και την ταυτοποίηση της λιδοκαΐνης. Στον παρακάτω πίνακα δίνονται ο χρόνος έκλουσης (R_t) αλλά και τα χαρακτηριστικά ιόντα της λιδοκαΐνης, τα οποία είναι απαραίτητα για την ταυτοποίηση της ένωσης.

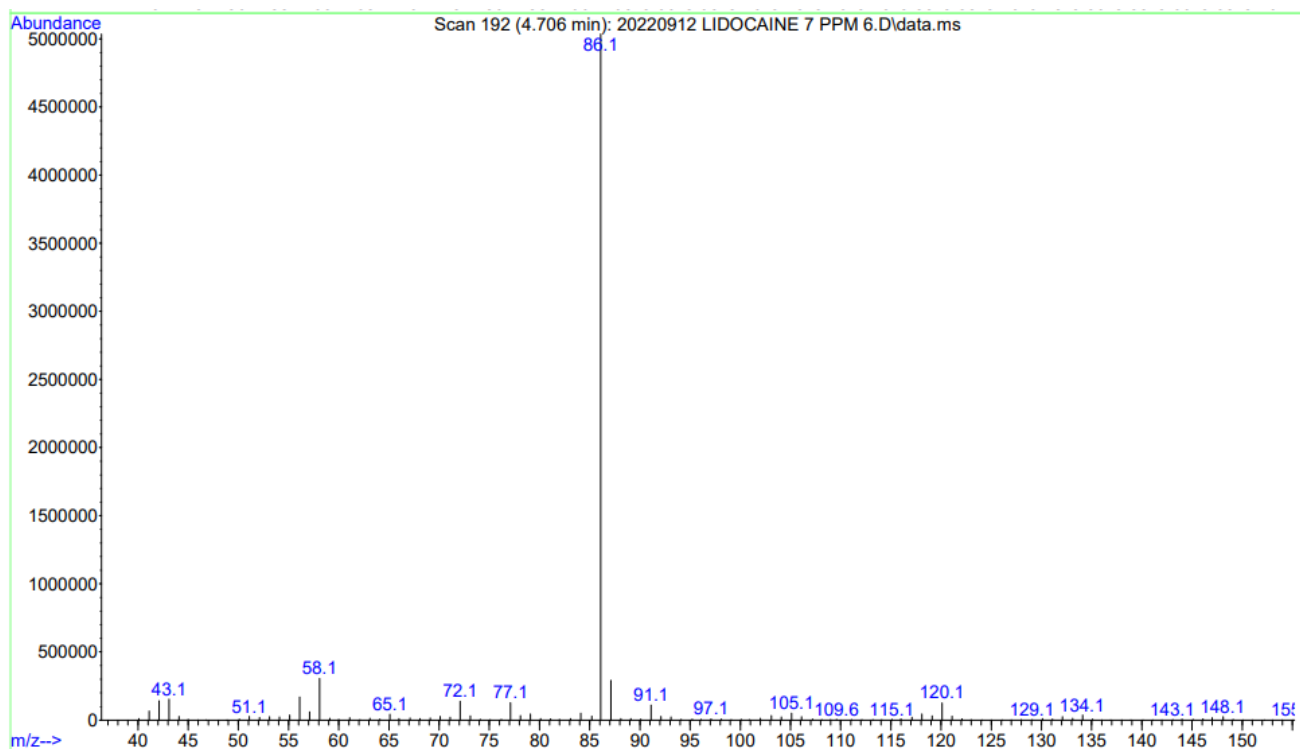
Πίνακας 3.2. 5: Χρόνος έκλουσης και χαρακτηριστικά ιόντα της λιδοκαΐνης.

Ένωση	Χρόνος έκλουσης (R _t) (min)	Ιόν ποσοτικοποίησης	Ιόν επιβεβαίωσης
Λιδοκαΐνη	4,735	86	58

Η ποσοτικοποίηση της λιδοκαΐνης έγινε με το ιόν 86, το οποίο επιλέχθηκε καθώς βρισκόταν σε μεγαλύτερη αναλογία σε σύγκριση με το 58.

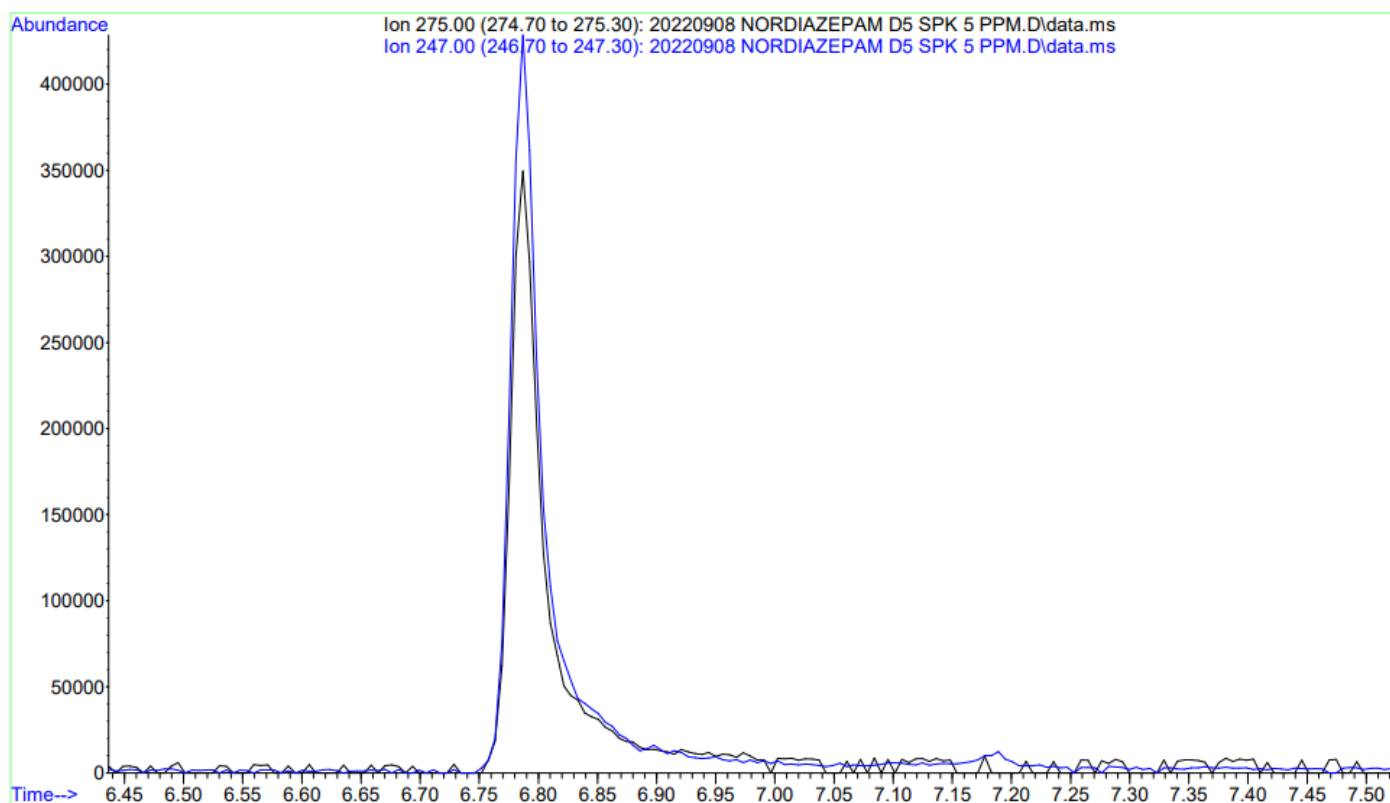


Εικόνα 3.2. 1: Χρωματογράφημα λιδοκαΐνης σε επιμολυσμένο λευκό δείγμα ορού αίματος σε συγκέντρωση 7 mg/L με πρόγραμμα ολικής σάρωσης (Fullscan).

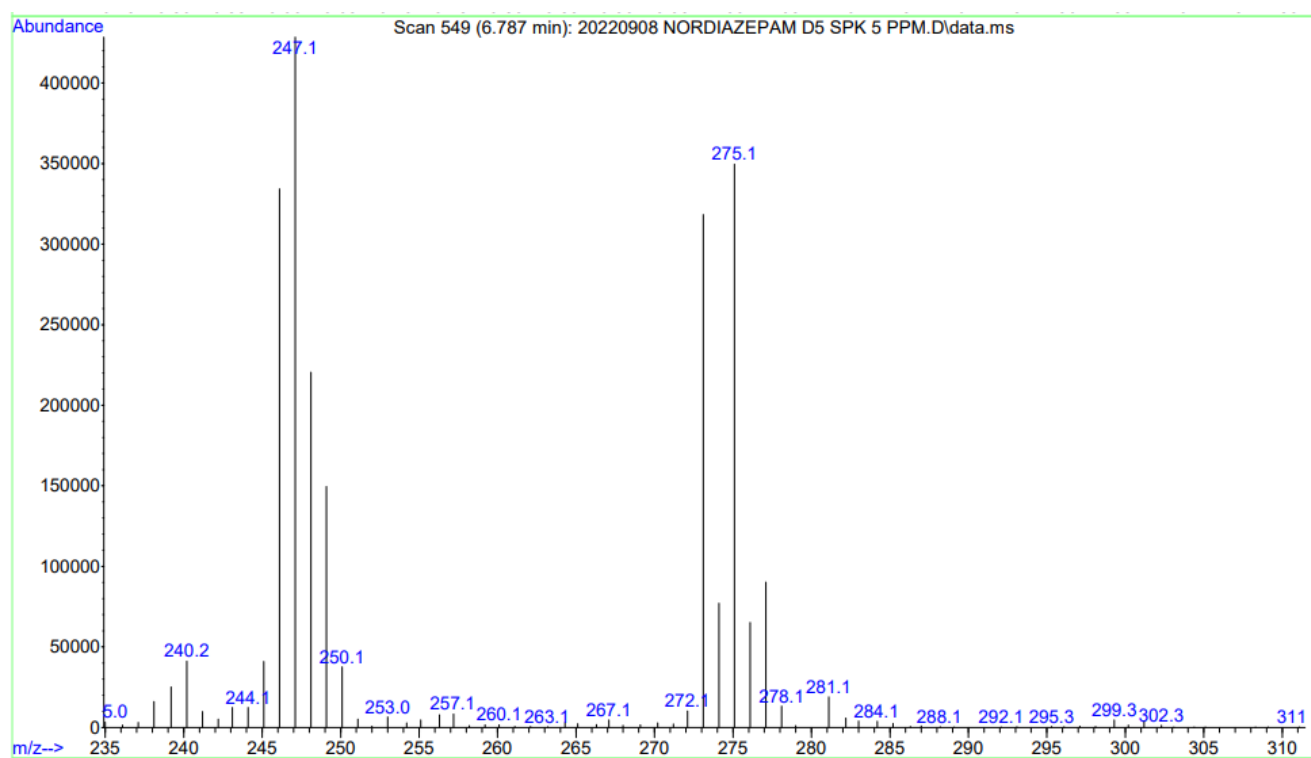


Εικόνα 3.2. 2: Φάσμα μαζών λιδοκαΐνης σε επιμολυσμένο λευκό δείγμα ορού αίματος σε συγκέντρωση 7 mg/L με πρόγραμμα ολικής σάρωσης (Fullscan).

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της λιδοκαΐνης χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο η νορδιαζεπάμη-d₅, με χαρακτηριστικά ιόντα το 247, που χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση και το 275. Ο χρόνος έκλουσης της νορδιαζεπάμης-d₅ ήταν στα 6,828 min.



Εικόνα 3.2. 3: Χρωματογράφημα εσωτερικού προτύπου (IS) νορδιαζεπάμης-d₅ σε λευκό δείγμα αίματος και συγκέντρωσης 5 mg/L.



Εικόνα 3.2. 4: Φάσμα μαζών εσωτερικού προτύπου νορδιαζεπάμης-d₅.

4. Βελτιστοποίηση αναλυτικής μεθόδου

4.1 Επιλογή διαλύτη εκχύλισης

Για την επίτευξη των βέλτιστων αναλυτικών αποτελεσμάτων έγιναν κάποιες δοκιμές κατά το στάδιο της προκατεργασίας του δείγματος για την επιλογή του κατάλληλου διαλύτη εκχύλισης. Ο διαλύτης θα πρέπει να μην αναμιγνύεται με την υδατική φάση, να είναι πτητικός, να μην είναι πολύ πολικός, να μην είναι τοξικός και να παραλαμβάνει σε επαρκές ποσοστό τις ενώσεις που επιθυμούμε να προσδιορίσουμε. Για να επιλεγεί τελικά ο καλύτερος διαλύτης εκχύλισης δοκιμάστηκαν 2 διαλύτες: ο οξικός βουτυλεστέρας και ο οξικός αιθυλεστέρας.

Με την χρήση οξικού αιθυλεστέρα δεν επιτεύχθηκε ικανοποιητικός διαχωρισμός οργανικής και υδατικής φάσης μετά την φυγοκέντρηση του δείγματος, με αποτέλεσμα να μην καθίσταται δυνατή η παραλαβή ικανοποιητικού όγκου οργανικής φάσης. Αντίθετα, με τον οξικό βουτυλεστέρα επιτεύχθηκε πολύ ικανοποιητικός διαχωρισμός των δύο φάσεων, ενώ ταυτόχρονα η ποσοτικοποίηση των κορυφών τόσο της λιδοκαΐνης όσο και της νορδιαζεπάμης- d_5 στα χρωματογραφήματα ήταν εύκολη. Επομένως, ως διαλύτης εκχύλισης επιλέχθηκε ο οξικός βουτυλεστέρας.

4.2 Επιλογή pH

Το pH ρυθμίστηκε σύμφωνα με την $pK_a = 7.7$ στην περιοχή 11 με ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικού καλίου (K_2CO_3).

5. Τελική βέλτιστη μέθοδος

5.1 Παρασκευή επιμολυσμένων (spiked) δειγμάτων

Τα επιμολυσμένα (spiked) δείγματα προκύπτουν όταν συγκεκριμένη ποσότητα διαλύματος γνωστής συγκέντρωσης (spike) του αναλύτη που μελετάμε προστίθεται σε ένα λευκό δείγμα απαλλαγμένο από τον συγκεκριμένο αναλύτη και άλλες ενώσεις. Έτσι, πραγματοποιείται επιμόλυνση του δείγματος, μια διαδικασία πολύ σημαντική για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης και για τον έλεγχο της εξέλιξης, της ακρίβειας και της εγκυρότητας της αναλυτικής μεθόδου. Συνήθως τα πρότυπα αυτά διαλύματα περιέχουν, 50–100 φορές μεγαλύτερη συγκέντρωση του αναλύτη που μελετάμε σε σύγκριση με τα μη επιμολυσμένα και προς ανάλυση δείγματα [28].

Σε ένα πλαστικό φιαλίδιο erpendorf 2mL μεταφέρονται 500 μ L λευκού δείγματος ορού αίματος (blank serum), ελεύθερο φαρμάκων και της ένωσης που επιθυμούμε να ανιχνεύσουμε. Στη συνέχεια, προστίθενται 20 μ L εσωτερικού προτύπου νορδιαζεπάμης- d_5 συγκέντρωσης 50 mg/L και 20 μ L πρότυπων διαλυμάτων λιδοκαΐνης διαφορετικών συγκεντρώσεων, ώστε στον τελικό όγκο του καθενός από τα δείγματα (500 μ L), η λιδοκαΐνη να έχει την επιθυμητή συγκέντρωση. Έπειτα, προστίθενται 250 μ L κορεσμένου ρυθμιστικού διαλύματος K_2CO_3 και τέλος γίνεται προσθήκη 150 μ L διαλύτη οξικού βουτυλεστέρα. Ακολουθεί ανάδευση για 10 λεπτά σε αναδευτήρα και στη συνέχεια 10 λεπτά φυγοκέντρηση στις 10.000 στροφές. Μετά την φυγοκέντρηση, παραλαμβάνονται 100 μ L οργανικής φάσης, τοποθετούνται σε γυάλινο εισαγωγέα δείγματος (insert), ο οποίος με τη σειρά του τοποθετείται σε γυάλινο φιαλίδιο και το δείγμα είναι έτοιμο για έγχυση στο GC–MS.

5.2 Προκατεργασία δείγματος

Σε ένα πλαστικό φιαλίδιο erpendorf των 2 mL μεταφέρονται 500 μ L βιολογικού δείγματος ορού αίματος. Έπειτα, προστίθενται 20 μ L εσωτερικού προτύπου νορδιαζεπάμης- d_5 , συγκέντρωσης 50 mg/L. Στη συνέχεια, προστίθενται 20 μ L καθαρού διαλύτη MeOH για εξισορρόπηση όγκων με τα επιμολυσμένα δείγματα ορού αίματος και ακολουθεί ρύθμιση του pH με προσθήκη 250 μ L ρυθμιστικού διαλύματος K_2CO_3 . Τέλος, γίνεται προσθήκη 150 μ L διαλύτη οξικού βουτυλεστέρα. Ακολουθεί ανάδευση για 10 λεπτά σε αναδευτήρα και στη συνέχεια 10 λεπτά φυγοκέντρηση στις 10.000 στροφές. Στην συνέχεια, παραλαμβάνονται 100 μ L οργανικής φάσης, τοποθετούνται σε γυάλινο εισαγωγέα δείγματος (insert), ο οποίος τοποθετείται σε γυάλινο φιαλίδιο και το δείγμα είναι έτοιμο για έγχυση στο GC–MS.

6. Επικύρωση αναλυτικής μεθόδου

Η επικύρωση της αναλυτικής μεθόδου αποτελεί ένα από τα βασικότερα πεδία της Αναλυτικής Χημείας και είναι απαραίτητη για την αξιολόγηση της αξιοπιστίας και των χαρακτηριστικών ποιότητας της χρησιμοποιούμενης αναλυτικής μεθόδου. Σε ένα εργαστήριο οι μη πρότυπες μέθοδοι, οι αναλύσεις ρουτίνας καθώς και οι τροποποιημένες πρότυπες μέθοδοι είναι αναγκαίο να επικυρώνονται, έτσι ώστε να επιβεβαιώνεται ότι είναι κατάλληλες για το σκοπό και για το πεδίο εφαρμογής για το οποίο προορίζονται.

Οι παράμετροι επικύρωσης που θα μελετηθούν για τη συγκεκριμένη αναλυτική μέθοδο είναι οι εξής:

- Εκλεκτικότητα (Selectivity)
- Γραμμικότητα (Linearity)
- Όριο ανίχνευσης (Limit of detection, LOD)
- Όριο ποσοτικοποίησης (Limit of quantification, LOQ)
- Πιστότητα (Precision)
 - ❖ Επαναληψιμότητα (Repeatability)
 - ❖ Ενδιάμεση πιστότητα (Intermediate Precision)
 - ❖ Αναπαραγωγιμότητα (Reproducibility)
- Ορθότητα (Trueness)

6.1 Εκλεκτικότητα (Selectivity)

Μία μέθοδος χαρακτηρίζεται ως εκλεκτική (selective), όταν μπορεί να παρέχει ορθά αναλυτικά αποτελέσματα κατά τον προσδιορισμό ενός συστατικού του μίγματος, χωρίς να υπάρχει παρεμπόδιση από τα υπόλοιπα συστατικά του μίγματος [29].

Στην παρούσα μελέτη για να διαπιστωθεί η εκλεκτικότητα της μεθόδου, έγινε σύγκριση μεταξύ spiked και blank δειγμάτων για να βρεθεί αν υπάρχει παρεμπόδιση κάποιας ένωσης από τα συστατικά του αίματος που δεν επιτρέπει τον ικανοποιητικό διαχωρισμό της λιδοκαΐνης από τις κορυφές των άλλων ενώσεων. Μετά από αυτή την σύγκριση, δεν εντοπίστηκε καμία ένωση που να παρεμβάλλεται και να παρεμποδίζει την ανίχνευση της λιδοκαΐνης.

6.2 Γραμμικότητα (Linearity)

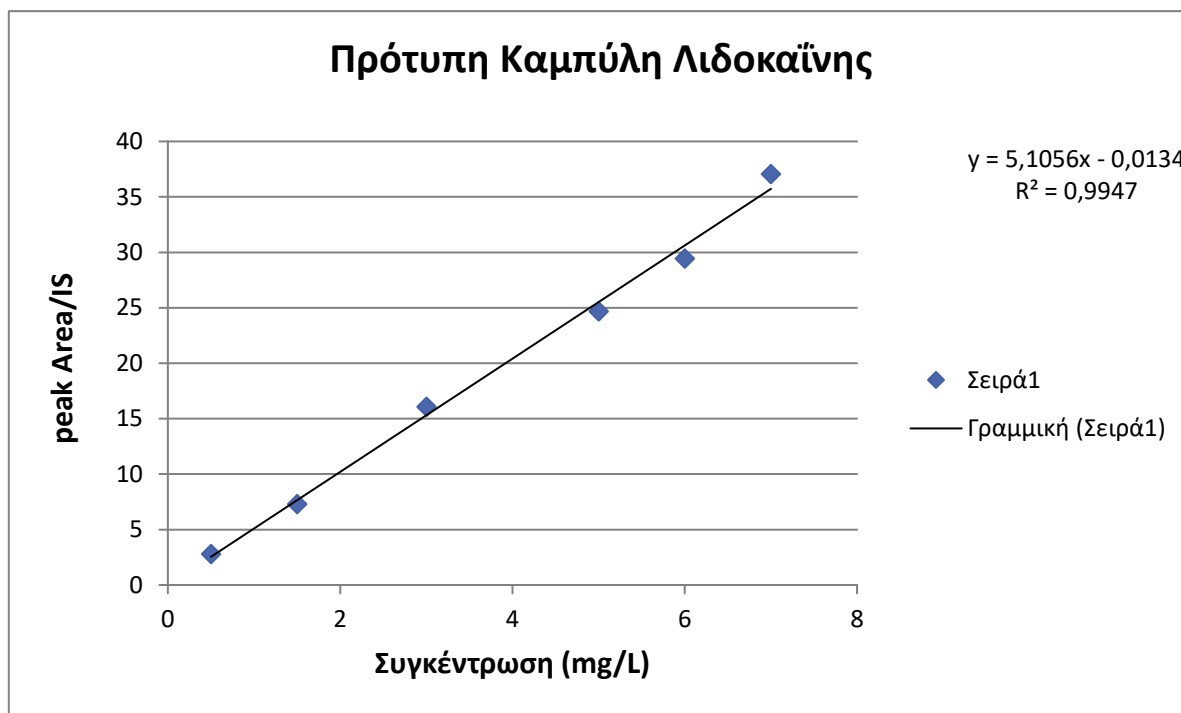
Η γραμμικότητα αναφέρεται στην ικανότητα της μεθόδου να δίνει αποτελέσματα που είναι ανάλογα με την συγκέντρωση της προσδιοριζόμενης ένωσης στο δείγμα [29].

Για τον έλεγχο της γραμμικότητας κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη λιδοκαΐνης με επιμόλυνση λευκών δειγμάτων ορού αίματος με μεθανολικά πρότυπα διαλύματα λιδοκαΐνης και με προσθήκη 20 μL εσωτερικού προτύπου νορδιαζεπάμης- d_5 με συγκέντρωση 50 mg/L. Παρασκευάστηκαν επίσης λευκά δείγματα ορού αίματος με και χωρίς εσωτερικό πρότυπο.

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης επιλέχθηκαν 7 συγκεντρώσεις λιδοκαΐνης. Οι τελικές συγκεντρώσεις των επιμολυσμένων διαλυμάτων που επιλέχθηκαν

για την λιδοκαΐνη ήταν οι εξής: 0,5 mg/L, 1 mg/L, 1,5 mg/L, 3 mg/L, 5 mg/L, 6 mg/L και 7 mg/L. Η τελική συγκέντρωση του εσωτερικού προτύπου νορδιαζεπάμης-d₅ ήταν 2 mg/L.

Στον άξονα του γ τοποθετήθηκε ο λόγος των εμβαδών της λιδοκαΐνης για κάθε συγκέντρωση ως προς το εμβαδόν του εσωτερικού προτύπου τα οποία υπολογίστηκαν από τα χρωματογραφήματα που προέκυψαν μετά την ανάλυση στο GC-MS. Στον άξονα του x τοποθετήθηκε η αντίστοιχη συγκέντρωση της λιδοκαΐνης.



Γράφημα 6.2. 1: Πρότυπη καμπύλης της λιδοκαΐνης με συγκεντρώσεις 0,5 mg/L, 1 mg/L 1,5 mg/L, 3 mg/L, 5 mg/L, 6 mg/L και 7 mg/L.

6.3 Όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ)

Το όριο ανίχνευσης (limit of detection, LOD) αναφέρεται στο κατώτατο όριο της υπό μελέτης ουσίας που μπορεί να ανιχνευθεί από τη μέθοδο χωρίς να απαιτείται ο ποσοτικός προσδιορισμός της. Επίσης, ο λόγος του σήματος προς το θόρυβο θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 3:1 [29].

Το όριο ποσοτικοποίησης (limit of qualification, LOQ) αποτελεί το χαμηλότερο επίπεδο συγκέντρωσης στο οποίο η προς προσδιορισμό ένωση μπορεί να ανιχνευθεί και να ποσοτικοποιηθεί από μια δεδομένη μέθοδο [29]. Τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης αποτελούν ένδειξη της ευαισθησίας της μεθόδου.

Οι τιμές των ορίων ευαισθησίας της μεθόδου παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 6.3. 1: Όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ).

Ένωση	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
Λιδοκαΐνη	0,054391	0,16482

6.4 Πιστότητα – Επαναληψιμότητα (Precision – Repeatability)

Η πιστότητα εκφράζει το κατά πόσο οι μετρήσεις της αναλυτικής μεθόδου για την αναλυόμενη ένωση αποκλίνουν μεταξύ τους όταν πραγματοποιούνται σειρές μετρήσεων για ένα δείγμα [29].

Για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας πραγματοποιήθηκαν επαναλαμβανόμενες αναλύσεις κατά τη διάρκεια της ίδιας μέρας (intraday) αλλά και αναλύσεις κατά τη διάρκεια 3 ημερών (interday). Λευκά δείγματα ορού αίματος (blank) επιμολύνθηκαν σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις, μία χαμηλή (0,5 mg/L), μία μεσαία (3 mg/L) και μία υψηλή (7 mg/L) συγκέντρωση και αναλύθηκαν κατά τη διάρκεια της ίδιας ημέρας (intraday). Στη συνέχεια υπολογίστηκε και η ενδιάμεση επαναληψιμότητα με ανάλυση επιμολυσμένων δειγμάτων αίματος (στις ίδιες τρεις συγκεντρώσεις) κατά τη διάρκεια 3 ημερών (inter-assay). Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται τα πειραματικά δεδομένα που προέκυψαν.

Πίνακας 6.4. 1: Πειραματικά αποτελέσματα επαναληψιμότητας κατά τη διάρκεια της ημέρας (intraday) και κατά τη διάρκεια 3 ημερών (interday).

Intra day			
Συγκέντρωση (mg/L)	Μέσος όρος (mg/L)	Τυπική απόκλιση	RSD %
0,5	0,534204	0,053984	9,807206
3	3,113043	0,23572	7,475249
7	6,648027	1,428457	19,67446

Inter day (n=3)			
Συγκέντρωση (mg/L)	Ολικός μέσος όρος (mg/L)	Τυπική απόκλιση	RSD %
0,5	0,496361	0,053626	11,10605
3	2,931142	0,265043	9,298312
7	6,49891	1,060214	15,97236

Σύμφωνα με τα δεδομένα για τη σχετική τυπική απόκλιση (RSD), η επαναληψιμότητα της μεθόδου είναι εντός των αποδεκτών ορίων ($\leq 20\%$).

6.5 Ακρίβεια - Ορθότητα (Accuracy – Trueness)

Η ορθότητα βρέθηκε υπολογίζοντας το σχετικό σφάλμα (relative bias, E%) και την εκατοστιαία ανάκτηση.

Στους παρακάτω πίνακες συνοψίζονται τα αποτελέσματα.

Πίνακας 6.5. 1: Πειραματικά αποτελέσματα ορθότητας λιδοκαΐνης.

Intra day			
Συγκέντρωση (mg/L)	Μέσος όρος (mg/L)	E%	Ανάκτηση%
0,5	0,534204	10,0894	110,0894
3	3,113043	5,111132	105,1111
7	6,648027	3,720922	103,7209

Inter day (n=3)			
Συγκέντρωση (mg/L)	Ολικός μέσος όρος (mg/L)	E%	Ανάκτηση%
0,5	0,496361	-0,72774	99,2722623
3	2,931142	-2,29526	97,70474094
7	6,49891	-7,15843	92,84157124

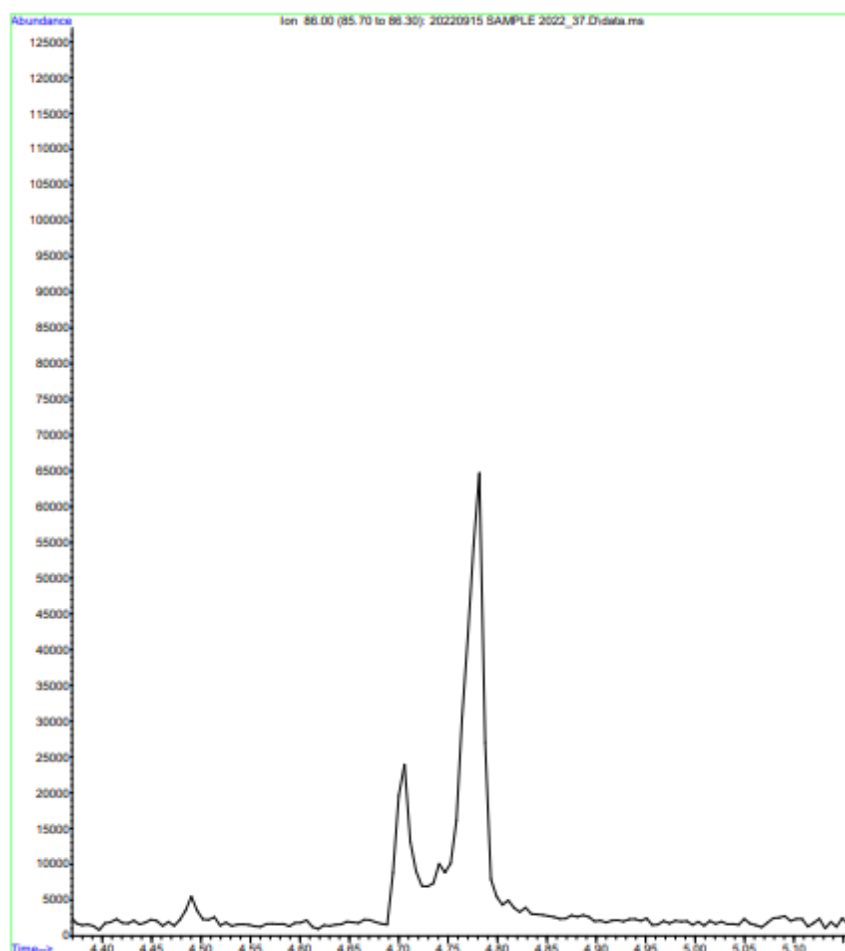
Από τα παραπάνω πειραματικά δεδομένα παρατηρείται ότι τόσο το σχετικό σφάλμα (<20%) όσο και η ανάκτηση (80–120 %) βρίσκονται εντός των επιτρεπτών ορίων. Επομένως η προτεινόμενη αναλυτική μέθοδος μπορεί να παρέχει ορθά και ακριβή αποτελέσματα.

7. Εφαρμογή σε πραγματικά δείγματα

Αφού πραγματοποιήθηκε η επικύρωση της αναλυτικής μεθόδου, ακολούθησε η εφαρμογή της στον ποσοτικό προσδιορισμό της λιδοκαΐνης σε πραγματικά κλινικά δείγματα ορού που είχαν ληφθεί από ασθενείς που νοσηλεύονταν σε μονάδες εντατικής θεραπείας (ΜΕΘ) νοσοκομείων της Θεσσαλονίκης, καθώς και στη ΜΕΘ του νοσοκομείου των Γιαννιτσών. Στις περιπτώσεις αυτές, η λιδοκαΐνη χορηγήθηκε ως τοπικό αναισθητικό κατά την διασωλήνωση και εισαγωγή του καθετήρα στον ασθενή.

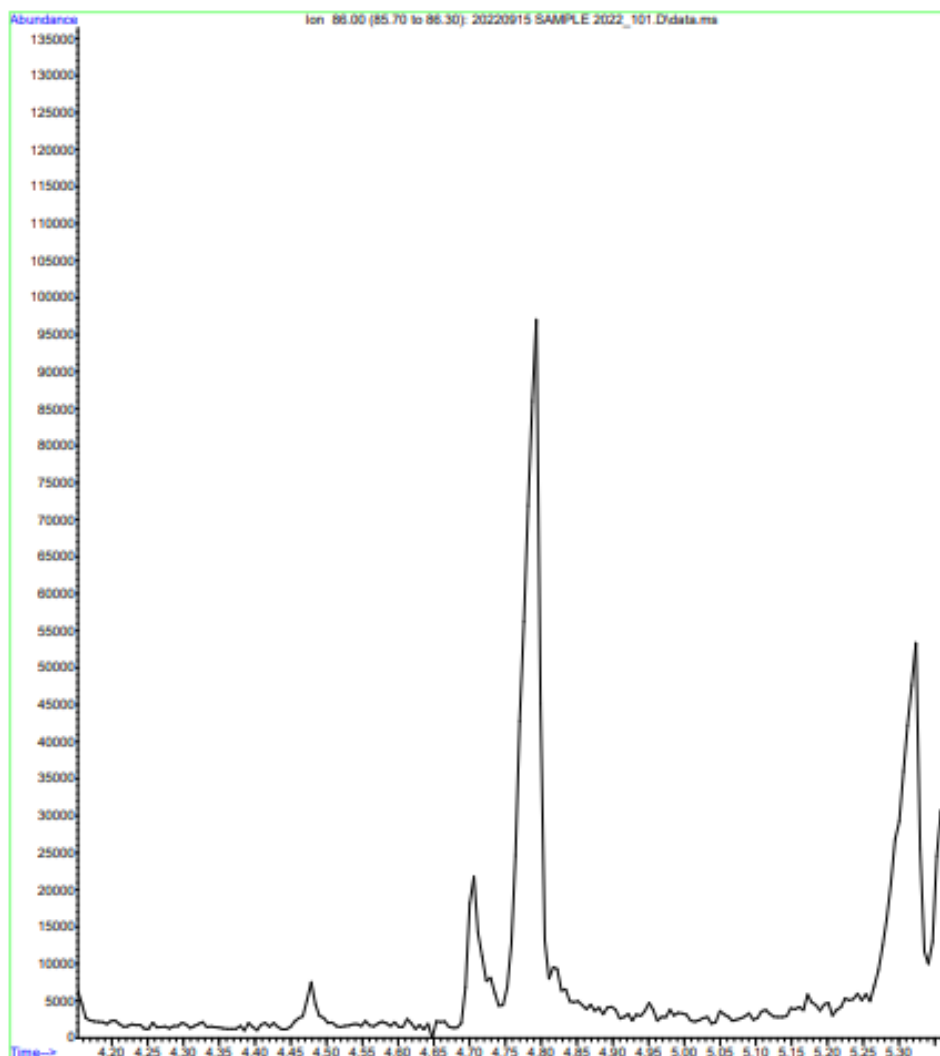
Ένα δείγμα προερχόταν επίσης από το τμήμα τροχαίας της αστυνομίας. Σε δείγματα τροχαίας μπορεί να ανιχνευτεί λιδοκαΐνη όταν έχει προηγηθεί κάποια ιατρική παρέμβαση, η οποία είναι απαραίτητο να αναφέρεται στο παραπεμπτικό όπως και η χορήγηση φαρμάκων στους ασθενείς και πολυτραυματίες. Η λιδοκαΐνη και σε αυτή την περίπτωση μπορεί να έχει χορηγηθεί τοπικά κατά την διασωλήνωση του ασθενή ή ακόμη και ενδοφλεβίως μετά από μια προσπάθεια ανάνηψής του.

Αριθμός δείγματος	Εντελλούσα αρχή	Φύλο	Ηλικία	Συγκέντρωση λιδοκαΐνης (mg/L)
1	ΤΡΟΧΑΙΑ	ΑΝΤΡΑΣ	-	0,306503



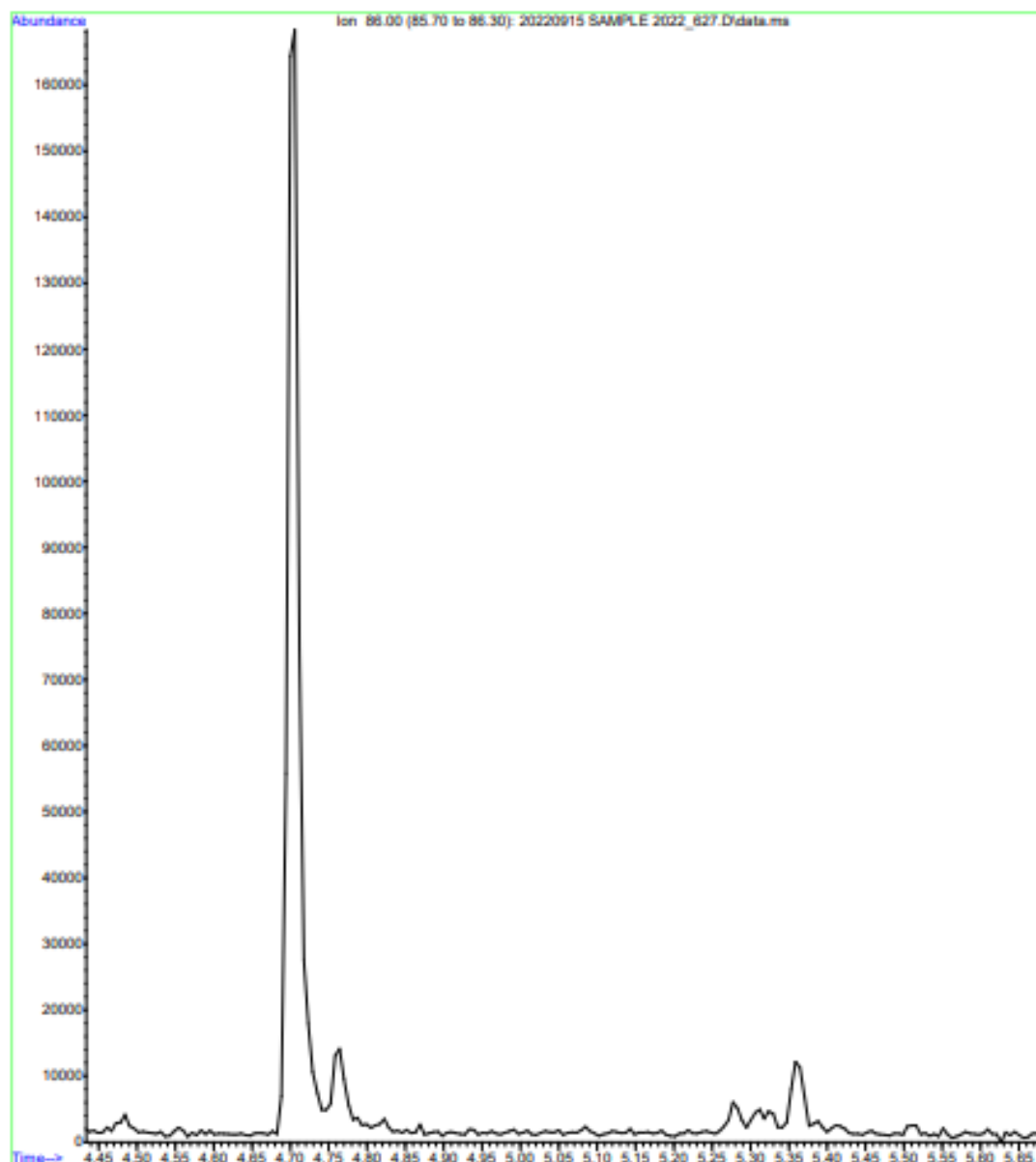
Εικόνα 7. 1: Χρωματογράφημα με το χαρακτηριστικό ιόν της λιδοκαΐνης (m/z 86) στο δείγμα 1.

Αριθμός δείγματος	Εντελλούσα αρχή	Φύλο	Ηλικία	Συγκέντρωση λιδοκαΐνης (mg/L)
2	ΜΕΘ Γ.Ν.Θ. ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ	ΑΝΤΡΑΣ	-	0,500832



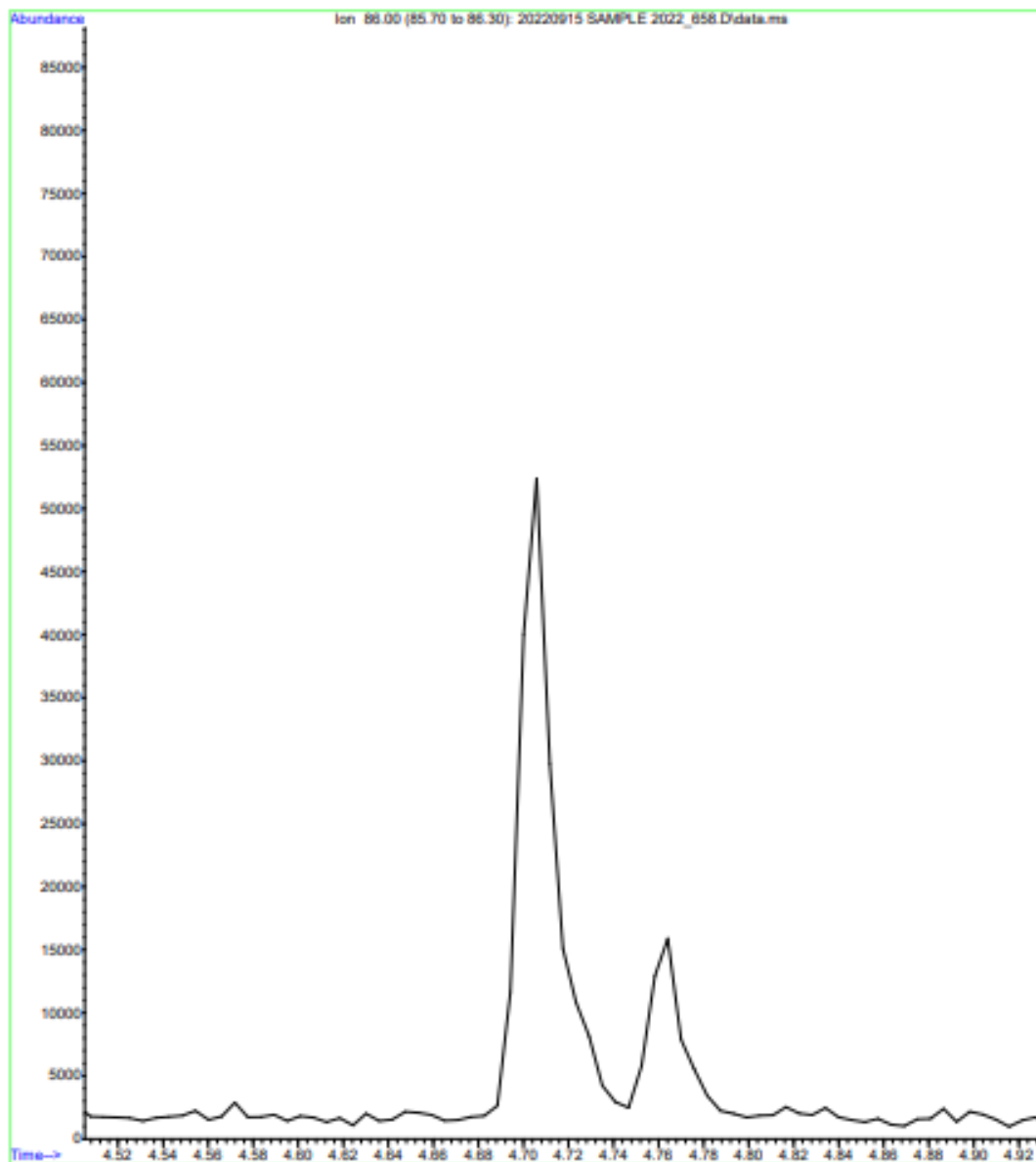
Εικόνα 7. 2: Χρωματογράφημα με το χαρακτηριστικό ιόν της λιδοκαΐνης (m/z 86) στο δείγμα 2.

Αριθμός δείγματος	Εντελλούσα αρχή	Φύλο	Ηλικία	Συγκέντρωση λιδοκαΐνης (mg/L)
3	ΜΕΘ Γ.Ν.Θ. ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ	ΓΥΝΑΙΚΑ	43	2,0553



Εικόνα 7. 3: Χρωματογράφημα με το χαρακτηριστικό ιόν της λιδοκαΐνης (m/z 86) στο δείγμα 3.

Αριθμός δείγματος	Εντελλούσα αρχή	Φύλο	Ηλικία	Συγκέντρωση λιδοκαΐνης (mg/L)
4	ΜΕΘ Γ.Ν. ΓΙΑΝΝΙΤΣΩΝ	ΑΝΤΡΑΣ	54	1,0774



Εικόνα 7. 4: Χρωματογράφημα με το χαρακτηριστικό ιόν της λιδοκαΐνης (m/z 86) στο δείγμα 4.

Μετά την εφαρμογή της μεθόδου σε κλινικά δείγματα και τον ποσοτικό προσδιορισμό της λιδοκαΐνης παρατηρήθηκε ότι σε κανένα από τα δείγματα τα επίπεδα λιδοκαΐνης δεν κυμάνθηκαν πάνω από τα επιτρεπόμενα, θεραπευτικά όρια (1,5-5).

8. Συμπεράσματα

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία επιτεύχθηκε η ανάπτυξη μιας γρήγορης, αξιόπιστης και εκλεκτικής αναλυτικής μεθόδου για τον προσδιορισμό της λιδοκαΐνης με την τεχνική της αέριας χρωματογραφίας συζευγμένη με φασματογράφο μάζας (GC-MS) σε βιολογικά δείγματα ορού αίματος. Επίσης, η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε και για τον ποσοτικό προσδιορισμό της λιδοκαΐνης.

Αρχικά, μετά από μελέτη του σταδίου της προκατεργασίας του δείγματος επιλέχθηκε ο κατάλληλος διαλύτης για την εκχύλιση υγρού-υγρού. Δοκιμάστηκαν δύο διαλύτες, ο οξικός βουτυλεστέρας και ο οξικός αιθυλεστέρας, και βρέθηκε ότι βέλτιστα αποτελέσματα έδινε ο οξικός βουτυλεστέρας.

Στη συνέχεια, ακολούθησε η επικύρωση της αναλυτικής μεθόδου και οι παράμετροι που ελέγχθηκαν ήταν οι εξής:

- Η γραμμικότητα. Ο συντελεστής συσχέτισης (R^2) είχε την τιμή $R^2 = 0,9947$
- Τα όρια LOD και LOQ προσδιορίστηκαν στα 0,054391 mg/L και 0,16482 mg/L αντίστοιχα.

Σε όλες τις περιπτώσεις τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης κάλυπταν τα χαμηλότερα θεραπευτικά επίπεδα του φαρμάκου στο αίμα.

- Η επαναληψιμότητα για τη χαμηλή συγκέντρωση (0,5 mg/L) κοντά στο όριο ποσοτικής αποτίμησης προσδιορίστηκε 9,807206% κατά τη διάρκεια της ημέρας και 11,10605% κατά τη διάρκεια των 3 ημερών. Για την συγκέντρωση 3 mg/L η επαναληψιμότητα προσδιορίστηκε 7,475249% κατά τη διάρκεια της ημέρας και 9,298312% στη διάρκεια των 3 ημερών και για τη συγκέντρωση 7 mg/L προσδιορίστηκε αντίστοιχα 19,67446% και 15,97236%.
- Η εκατοστιαία ανάκτηση βρέθηκε εντός των επιτρεπτών ορίων 80–120 % για όλες τις συγκεντρώσεις.

Τα αποτελέσματα ήταν ικανοποιητικά και αποδεκτά.

Επιπλέον, όσον αφορά τα πλεονεκτήματα της αναπτυγμένης μεθόδου είναι τα εξής:

- Είναι γρήγορη διότι περιλαμβάνει ένα μόνο στάδιο εκχύλισης και χωρίς εξάτμιση και επαναδιάλυση.
- Δεν απαιτείται παραγωγοποίηση, η οποία αυξάνει αρκετά τον χρόνο της ανάλυσης αλλά και το κόστος της.
- Μπορεί να λειτουργήσει σε πρόγραμμα ολικής σάρωσης, καθιστώντας την ενδεχομένως αξιοποιήσιμη στην ανίχνευση και ταυτοποίηση και άλλων τοξικών ενώσεων.
- Επίσης, με τη χρήση μικρού όγκου μη τοξικού διαλύτη η μέθοδος καθίσταται φιλική προς το περιβάλλον και πιο οικονομική.

Τέλος, η αναλυτική μέθοδος εφαρμόστηκε σε πραγματικά κλινικά δείγματα ορού αίματος, τα οποία προήλθαν από την τροχαία καθώς και από ασθενείς που νοσηλεύονταν σε ΜΕΘ.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] National Institute for Health and Care Excellence. British National Formulary: Lidocaine. Available online: <https://bnf.nice.org.uk/drug/lidocaine-hydrochloride.html> (accessed on 18 October 2021).
- [2] Beaussier, M.; Delbos, A.; Maurice-Szamburski, A.; Ecoffey, C.; Mercadal, L. Perioperative Use of Intravenous Lidocaine. *Drugs* 2018, 78, 1229–1246.
- [3] Löfgren, N. Studies on Local Anaesthetics: Xylocaine, a New Synthetic Drug. Ph.D. Thesis, Stockholm University, Stockholm, Sweden, 1948.
- [4] World Health Organisation. Lidocaine. WHO Model Lists of Essential Medicine. Available online: <https://list.essentialmeds.org/medicines/8> (accessed on 18 October 2021).
- [5] RICHARD A. HARVEY, KAREN WHALEN, RICHARD FINKEL, THOMAS A. PANAVELIL, Φαρμακολογία, LIPPINCOTT, 6^η έκδοση, εκδόσεις ΠΑΡΙΣΙΑΝΟΥ
- [6] Lee, I.W.-S.; Schraag, S. The Use of Intravenous Lidocaine in Perioperative Medicine: Anaesthetic, Analgesic and Immune-Modulatory Aspects. *J. Clin. Med.* 2022, 11, 3543. <https://doi.org/10.3390/jcm11123543>.
- [7] Hermanns, H.; Hollmann, M.W.; Stevens, M.F.; Lirk, P.; Brandenburger, T.; Piegeler, T.; Werdehausen, R. Molecular mechanisms of action of systemic lidocaine in acute and chronic pain: A narrative review. *Br. J. Anaesth.* 2019, 123, 335–349.
- [8] DrugBank, [Online]. Available: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00281>
- [9] M. Schulz, S. Iwersen-Bergmann, H. Andresen, et al., Therapeutic and toxic blood concentrations of nearly 1,000 drugs and other xenobiotics, *Crit. Care* 16 (2012) 136.
- [10] Dr Diane Turner, Anthias Consulting Ltd., Gas Chromatography – How a Gas Chromatography machine works, how to read a chromatograph and GCxGC, *Technology Networks*, published: march 17, 2021
- [11] Ι.Ν. Παπαδογιάννης, και Β.Φ. Σαμανίδου, "Ενόργανη Χημική Ανάλυση", Θεσσαλονίκη 2001. Ν. Αργυρόπουλος, and Κ. Βαρέλλα, "Σημειώσεις Πειραματικής Οργανικής Χημείας", Α.Π.Θ., Θεσσαλονίκη, 1997. [Online]. Available: <http://chimikoergastirio.blogspot.com/2009/11/s.html>
- [12] Abeer Fauzi Al-Rubaye et al., A Review: Uses of Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) Technique for Analysis of Bioactive Natural Compounds of Some Plants, *International Journal of Toxicological and Pharmacological Research* (2017); 9(1); 81-85, doi: 10.25258/ijtp.v9i01.9042
- [13] Wade Leroy G., Οργανική Χημεία, 9^η έκδοση, Εκδόσεις Τζιόλα
- [14] Αμβρόσιος Ορφανίδης, Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία 2013, Ανάπτυξη γρήγορης μεθόδου για την ανίχνευση 41 φαρμάκων και ναρκωτικών σε αίμα, μετά από αλκαλική εκχύλιση και ανάλυση σε αέριο χρωματογράφο - φασματογράφο μαζών (GC/MS).

- [15] H.-J. Hubschmann, "Handbook of GC-MS Fundamentals and Applications". Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2001.
- [16] Ε. Μπακέας, «Αεριοχρωματογραφία – Φασματομετρία μαζών», 2020, Εθνικών και Καποδιστριακών Πανεπιστημίων Αθηνών, [Online]. Available: <https://eclass.uoa.gr>
- [17] ΛΕΚΑΣ ΜΠΛΕΝΤΙΑΝ & ΒΛΑΧΟΥ ΛΑΜΠΡΙΝΗ, Πτυχιακή Εργασία 2012, «ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΠΟΙΟΤΙΚΗΣ & ΠΟΣΟΤΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΛΚΟΟΛΗΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΑΕΡΙΑΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ».
- [18] L. S. Ettre and K. I. Sakodynskii, "M. S. Tswett and the Discovery of Chromatography I: *Early Work* (1899-1903)," vol. 35, no. 3, p. 9.
- [19] F. A. Settle, Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall PTR, 1997.
- [20] JEREMY M. BERG JOHN L. TYMOCZKO GREGORY J. GATTO Jr. LUBERT STRYER, Βιοχημεία, 8^η έκδοση, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΚΡΗΤΗΣ.
- [21] Γ. Θεοδωρίδης, Σ. Γηρούση, Γ. Ζαχαριάδης, Α. Ζώτου, και Β. Σαμανίδου, "Βιοαναλυτική Χημεία". Αθήνα, Ελλάδα: Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών, 2015. [Online]. Available: <http://hdl.handle.net/11419/3667>
- [22] Ι. Στεφανίδου-Στεφανάτου, και Δ. Ρήγας, "Εισαγωγή στη Φασματοσκοπία Μαζών", 1η εκδ. Θεσσαλονίκη: Γαρταγάνης, 2011, σελ. 11-14, 47-49, 71, 92-96.
- [23] GC-MS Gas Chromatography-Mass Spectrometry presentation, available [online]: <https://slideplayer.com/slide/3836481/>
- [24] Β. Σαμανίδου, "Τεχνικές Προκατεργασίας Βιολογικών Δειγμάτων" στο Βιοαναλυτική Χημεία. Αθήνα, Ελλάδα: Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών, 2015. [Online]. Available: <http://hdl.handle.net/11419/3667>
- [25] Sang-Ki Lee et al., Lidocaine Intoxication: Two Fatal Cases, *Arch Pharm Res* Vol 26, No 4, 317-320, 2003
- [26] KEIKO KUDO et al., A Fatal Case of Poisoning by Lidocaine Overdosage – Analysis of Lidocaine in Formalin-Fixed Tissues: A case report A Fatal Case of Poisoning by Lidocaine Overdosage – Analysis of Lidocaine in Formalin-Fixed Tissues: A case report, *Med. Sci. Law* (2004) Vol. 44, No. 3
- [27] Francesco Paolo Busardo, A fatal accidental subarachnoid injection of lidocaine and levobupivacaine during a lumbar paravertebral block, *Forensic Science International* 256 (2015) 17–20.
- [28] Why and How to Matrix Spike, Thermo Fisher Scientific, [Online]. Available: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LPD/Product-Information/Why-How-Matrix-Spike-ST-MATSPIKE-EN.pdf>

[29] Introduction to Analytical Method Validation - Lab-Training.com, [Online]. Available: <https://lab-training.com/introduction-to-analytical-method-validation/>