

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ - ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΚΟΜΝΗΝΟΥ ΕΙΡΗΝΗ**

**ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΣΤΑΝΟΖΟΛΟΛΗΣ ΣΕ ΟΥΡΑ ΑΘΛΗΤΩΝ  
ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΩΝ ΟΛΥΜΠΙΑΚΩΝ ΑΓΩΝΩΝ ΤΗΣ  
ΑΘΗΝΑΣ 2004**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΣΤΗΝ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ  
Δ. ΚΟΥΡΕΤΑΣ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2005**

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ - ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΚΟΜΝΗΝΟΥ ΕΙΡΗΝΗ**

**ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΣΤΑΝΟΖΟΛΟΛΗΣ ΣΕ ΟΥΡΑ ΑΘΛΗΤΩΝ  
ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΩΝ ΟΛΥΜΠΙΑΚΩΝ ΑΓΩΝΩΝ ΤΗΣ  
ΑΘΗΝΑΣ 2004**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΣΤΗΝ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ  
Δ. ΚΟΥΡΕΤΑΣ**

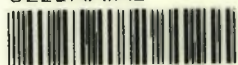
**ΛΑΡΙΣΑ 2005**



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

Αριθ. Εισ.: 4296/1  
Ημερ. Εισ.: 24-02-2005  
Δωρεά:  
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ  
2005  
ΚΟΜ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087994

## **ΠΡΟΛΟΓΟΣ**

Η παρούσα Πτυχιακή Εργασία, εκπονήθηκε σύμφωνα με τους κανονισμούς του Τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Το πειραματικό μέρος της εργασίας πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Έλεγχου Doping του Ολυμπιακού Αθλητικού Κέντρου Αθηνών κατά την προπαρασκευαστική περίοδο πριν τους Ολυμπιακούς Αγώνες της Αθήνας 2004 και κατά τη διάρκειά τους.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα, Καθηγητή Δ. Κουρέτα για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ σε ένα από τα καλύτερα εξοπλισμένα εργαστήρια της Ελλάδας.

Επίσης, αισθάνομαι την ανάγκη να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον Δρ Ε. Κουκέα, Υπεύθυνο Συντονισμού Εγκαταστάσεων και Εργαστηρίου της Οργανωτικής Επιτροπής Ολυμπιακών Αγώνων ΑΘΗΝΑ 2004 για την άψογη συνεργασία, τη συμπάραστασή του κατά τη διάρκεια της εργασίας, καθώς και για τις πληροφορίες που μου πρόσφερε.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω το διευθυντή του Εργαστηρίου Ελέγχου Doping ΟΑΚΑ Δρ Κ. Γεωργακόπουλο, καθώς και όλο το προσωπικό για την πολύτιμη συνεργασία τους.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	<b>1</b>
1.1. Ιστορική Αναδρομή	1
1.2. Κατηγορίες doping	3
1.2.1 Κατηγορίες απαγορευμένων ουσιών και μεθόδων	
1.2.1.2. Απαγορευμένες μέθοδοι	3
1.2.1.3. Κατηγορίες φαρμάκων που σε ορισμένες περιπτώσεις ανήκουν στις απαγορευμένες ουσίες	3
1.2.2. Επιθυμητές ενέργειες και παρενέργειες απαγορευμένων ουσιών	4
1.3 Αναβολικά στεροειδή	5
1.3.1 Εισαγωγή	5
1.3.2 Μεταβολισμός	6
1.4 Στανολόλη	14
1.5 Αναλυτικές τεχνικές για τον προσδιορισμό των στεροειδών.	17
1.5.1. Αέρια χρωματογραφία	17
1.5.1.1. Εισαγωγή	17
1.5.1.2. Οργανολογία Αεριοχρωματογράφου	17
1.5.1.3. Εφαρμογές αεριοχρωματογραφίας	20
1.5.2. Φασματομετρία μάζας	21
1.5.2.1. Εισαγωγή	21
1.5.2.2. Οργανολογία	21
1.5.2.3. Εφαρμογές φασματομετρίας μάζας	24
1.5.3 Συνδυασμός φασματομετρίας μάζας και αέριας χρωματογραφίας	25
1.5.4 Μέθοδοι παραγωγοποίησης	26
1.5.4.1. Εισαγωγή	26
1.5.4.2. Αλκυλίωση	27
1.5.4.3. Ακυλίωση	27
1.5.4.4. Συμπύκνωση	28
1.5.4.5. Τριμεθυλοσιλανοποίηση	28
<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ- ΠΟΡΕΙΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ</b>	<b>31</b>
2.1 Αντιδραστήρια	31
2.2 Υλικά	37
2.3 Συσκευές	38
2.4 Όργανα	38
2.5 Πορεία εργασίας	38
2.6 Συνθήκες GC/HRMS	41
2.6.1 Παράμετροι εισαγωγής	41
2.6.2 Παράμετροι διαχωρισμού	41
2.6.3 Παράμετροι ανίχνευσης	41
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ</b>	<b>42</b>
3.1. Εισαγωγή	42
3.2. Θετικά δείγματα stanozolol	42

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1. Ιστορική Αναδρομή

Ο όρος doping πρωτοεμφανίστηκε στο τέλος του περασμένου αιώνα για να περιγράψει τη χορήγηση ουσιών σε άλογα και σκύλους ώστε να ελαττωθούν οι πιθανότητες νίκης τους και να επηρεαστούν έτσι οι αποδόσεις των στοιχημάτων.<sup>1</sup> Σήμερα ο όρος περιγράφει τη χρήση διαφόρων ουσιών ή μεθόδων που βελτιώνουν την αθλητική απόδοση. Η χρήση σκευασμάτων που προκαλούν αύξηση της αθλητικής απόδοσης είναι γνωστή από την αρχαιότητα (αθλητές Ολυμπιακών Αγώνων στην Ελλάδα, μονομάχοι στη Ρώμη).<sup>1-4</sup> Τον τρίτο αιώνα π.Χ. ο “Έλληνας Γαληνός” παρατήρησε ότι κατά την διάρκεια των Ολυμπιακών Αγώνων οι αθλητές χρησιμοποίησαν διεγερτικά για να βελτιώσουν την αθλητική τους απόδοση.

Η παλαιότερη αναφορά για λήψη φαρμάκων σε σύγχρονους αγώνες αφορά τους αγώνες κολύμβησης στο Amsterdam το 1865<sup>1,3</sup> ενώ την ίδια εποχή αρχίζει η χρήση διεγερτικών (καφεΐνη, στρυχνίνη, ηρωίνη, κοκαΐνη) από τους ποδηλάτες. Με την αναβίωση των Ολυμπιακών Αγώνων εμφανίζονται κρούσματα doping με στρυχνίνη σε μαραθωνοδρόμους (Tom Hicks, Ολυμπιονίκης 1904, Dorando Pietri, 1908).<sup>3,5</sup>

Μετά το Β' Παγκόσμιο Πόλεμο ξεκίνησε η ευρεία χρήση των διεγερτικών, ενώ η χρήση των αναβολικών στεροειδών άρχισε από σοβιετικούς αρσιβαρίστες στις αρχές της δεκαετίας του '50 (Ελσίνκι 1952). Αυτά τα περιστατικά οδήγησαν σε μια ραγδαία αύξηση της χρήσης ουσιών doping κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του '60. Μολονότι υπήρχαν υποψίες και ενδείξεις για τη χρήση διεγερτικών δεν υπήρχαν κανονισμοί εναντίον του doping μέχρι τους Ολυμπιακούς Αγώνες του 1960 (Ρώμη). Κατά τη διάρκεια αυτών των αγώνων, ο Δανός ποδηλάτης Knud Enmark Jensen έχασε τη ζωή του από υπερβολική δόση αμφεταμινών, γεγονός που οδήγησε σε διάφορες δραστηριότητες κατά του doping.<sup>1,4</sup> Έτσι, ο ορισμός του doping δόθηκε από τη Διεθνή Ολυμπιακή Επιτροπή ( ΔΟΕ ) και το 1963 η Γαλλία εισήγαγε νομοθεσία κατά του doping ενώ το Βέλγιο ακολούθησε δύο χρόνια αργότερα.<sup>1,6</sup> Στην Ολυμπιάδα του 1964 (Tokyo) έγιναν οι πρώτες αναλύσεις σε ούρα ποδηλατών. Το 1967 συνέβη το περιστατικό που προκάλεσε το μεγαλύτερο, μέχρι τότε, θόρυβο, ίσως λόγω της τηλεοπτικής καλύψεως. Ο 29χρονος Βρετανός ποδηλάτης Tommy Simpson, πρώην παγκόσμιος πρωταθλητής, πέθανε κατά τη διάρκεια του Γύρου της Γαλλίας. Ο θάνατός του αποδόθηκε σε καρδιακή ανεπάρκεια λόγω θερμικής εξαντλήσεως. Η αυτοψία αποκάλυψε τη χρήση αμφεταμίνης και μεθαμφεταμίνης. Οι Simpson και

Jensen λόγω της χρήσεως αμφεταμινών δεν ήταν ικανοί να αντιληφθούν το βαθμό εξαντλήσεώς τους.<sup>1</sup> Μετά από αυτά τα περιστατικά, η ΔΟΕ δημοσίευσε (1967) τη πρώτη λίστα απαγορευμένων ουσιών που περιελάμβανε διεγερτικά, ναρκωτικά, αντικαταθλιπτικά και ηρεμιστικά. Η χρήση αναβολικών στεροειδών αν και διαδεδομένη, δεν επέσυρε ποινές.

Παρόλο που στους Ολυμπιακούς αγώνες του Μεξικού (1968) είχαν πραγματοποιηθεί 668 έλεγχοι doping, κατάλληλοι έλεγχοι doping ξεκίνησαν στους Ολυμπιακούς αγώνες του Μονάχου (1972). Από τα 2079 δείγματά προέκυψαν 7 θετικά. Τα αναβολικά στεροειδή δεν μπορούσαν να ανιχνευτούν από τους ελέγχους doping και δεν περιλαμβάνονταν στην απαγορευμένη λίστα μέχρι το 1974.<sup>7</sup> Τη χρονιά εκείνη όμως αναπτύχθηκε μέθοδος RIA για τον προσδιορισμό των στεροειδών και ακολούθως η ΔΟΕ τα έθεσε στη λίστα απαγορευμένων ουσιών.<sup>1</sup> Οι β-αναστολείς, τα διουρητικά και οι καλυπτικοί παράγοντες προστέθηκαν αργότερα (1985-1987) στη λίστα των απαγορευμένων ουσιών. Επιπλέον, η αυξητική ορμόνη και άλλες πεπτιδικές ορμόνες όπως η κορτικοτροπίνη (ACTH) και η ερυθροποιητίνη συμπεριλήφθηκαν στη λίστα της ΔΟΕ και απαγορεύτηκαν κατά τη διάρκεια των Ολυμπιακών αγώνων της Βαρκελώνης το 1992.

Καθώς η ανίχνευση των απαγορευμένων ουσιών γίνεται ευκολότερη οι αθλητές στρέφονται σε νέους τύπους φαρμάκων ή και μεθόδων και ο όρος doping αποκτά ευρύτερη σημασία. Το Ολυμπιακό καταστατικό εναντίον του doping στον αθλητισμό δηλώνει ότι το doping είναι μη υγιεινό και ότι παραβιάζει την ηθική του αθλητισμού.<sup>8</sup> Η χρήση διάφορων ουσιών σε συνδυασμό είναι ένα συχνό φαινόμενο και δεν είναι ακόμη γνωστή η αλληλεπίδραση και η αντίδραση τους καθώς και το μέγεθος του ρίσκου στην εμφάνιση των παρενεργειών.

Εξαιτίας του μεγάλου εύρους των διατροφικών ουσιών είναι δύσκολο να διευκρινιστεί που σταματά η διατροφική υποστήριξη και που ξεκινά το doping. Η κρεατινίνη για παράδειγμα χρησιμοποιείται ευρέως στο body-building και έχει βρεθεί ότι αυξάνει την αθλητική απόδοση. Μέχρι τώρα η κρεατινίνη δεν περιλαμβάνεται στην απαγορευμένη λίστα και κανένα ρίσκο υγείας δεν έχει αναφερθεί όταν χρησιμοποιείται για μικρό χρονικό διάστημα. Τίποτα όμως δεν είναι γνωστό για τις μακροπρόθεσμες επιδράσεις μεγάλων ποσοτήτων από αυτές τις ουσίες ή συνδυασμών των διάφορων προϊόντων. Έτσι υπάρχει ανάγκη για επιπλέον έρευνα.

Η Ευρωπαϊκή Ένωση, έχοντας γνώση όλων αυτών των αυξανόμενων προβλημάτων, οργάνωσε τις δραστηριότητες της εναντίον του doping τα τελευταία

χρόνια. Προγράμματα όπως το Βρετανικό “GH 2000” υποστηρίχτηκαν τελικά από την Ευρωπαϊκή Ένωση σε συνεργασία με την IOC. Επιπλέον, με τη δραστική υποστήριξη του συμβουλίου της Ευρώπης δημιουργήθηκε ο Παγκόσμιος Οργανισμός Αντι-Doping (WADA) με σκοπό να προωθήσει και να οργανώσει τον αγώνα εναντίον του doping σε παγκόσμιο επίπεδο.<sup>1,4</sup>

## 1.2. Κατηγορίες doping

Σύμφωνα με τον Ιατρικό Κώδικα (Medical Code) της IOC<sup>9</sup> το doping συνίσταται:

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

### 1.2.1 Κατηγορίες απαγορευμένων ουσιών και μεθόδων

#### 1.2.1.1 Κατηγορίες απαγορευμένων ουσιών

- Διεγερτικά
- Ναρκωτικά
- Αναβολικοί Παράγοντες : αναβολικά ανδρογενή στεροειδή και β2 αγωνιστές
- Διουρητικά
- Πεπτιδικές και γλυκοπρωτεϊνικές ορμόνες και ανάλογα

#### 1.2.1.2. Απαγορευμένες μέθοδοι

- Doping αίματος: χρήση προϊόντων (π.χ. ερυθροποιητίνη) που βελτιώνουν το ποσοστό, τη μεταφορά ή την παράδοση του οξυγόνου.
- Φαρμακολογική, Χημική και Φυσική παραποίηση: χρήση ουσιών και μεθόδων με σκοπό την αλλαγή της ποιότητας και της αξιοπιστίας των δειγμάτων που συλλέγονται για τον έλεγχο doping.

#### 1.2.1.3. Κατηγορίες φαρμάκων που σε ορισμένες περιπτώσεις ανήκουν στις απαγορευμένες ουσίες

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



### 1.2.2. Επιθυμητές ενέργειες και παρενέργειες απαγορευμένων ουσιών

Το doping παραβιάζει την ηθική του αθλητισμού και της ιατρικής επιστήμης.<sup>9</sup> Η χρήση απαγορευμένων ουσιών εκτός του ότι συνιστά την πλέον μεγάλη αντίθεση στο fair play (Sebastian Coe)<sup>1</sup> χαρακτηρίζεται από σοβαρές παρενέργειες. Στον πίνακα 1.1 συνοψίζονται οι επιθυμητές για την αθλητική απόδοση ενέργειες και οι χαρακτηριστικές παρενέργειες που προκύπτουν από τη χρήση διαφόρων τύπων απαγορευμένων ουσιών. Πρέπει να σημειωθεί ότι για διάφορες κατηγορίες ουσιών οι επιθυμητές ενέργειες είναι αμφισβητούμενες.

**Πίνακας 1.1.** Επιθυμητές ενέργειες και παρενέργειες απαγορευμένων ουσιών

Τύπος ουσιών	Επιθυμητές ενέργειες	Παρενέργειες
Διεγερτικά Ψυχοκινητικά διεγερτικά (π.χ. αμφεταμίνες)	αναστολή εμφανίσεως κοπώ- σεως <sup>3</sup>	ταχυκαρδία, αρρυθμίες, αύξηση αρτηριακής πίεσεως, διαταραχές πεπτικού, ανορεξία, απώλεια βάρους, αϋπνία, κεφαλαλγία, ψυχική και σωματική εξάρτηση, ανοχή, απώλεια γενετήσιας επιθυμίας, απότομη εμφάνιση καμάτου, θάνατος <sup>3</sup> ανορεξία, ταχυκαρδία, υπέρταση <sup>2</sup>
Συμπαθητικομμητικές αμίνες (π.χ. εφεδρίνες)	αύξηση ροής αίματος στους μυς, αύξηση επιπέδων γλυκόζης στο αίμα, βρογχοδιαστολή <sup>1</sup>	νευρικότητα, αϋπνία, υπέρταση, γαστρικές διαταραχές <sup>2</sup>
Καφεΐνη	διέγερση αναπνευστικού, προ-αγωγή λιπολύσεως <sup>1</sup>	
Ναρκωτικά αναλγητικά	κάλυψη σωματικού άλγους <sup>3</sup>	σωματική και ψυχική εξάρτηση, ανοχή <sup>3</sup>
Αναβολικά Στεροειδή (π.χ. στανοζολόλη)	αύξηση μυϊκής μάζας, δύναμης, επιθετικότητας <sup>2,3</sup>	άνδρες: ατροφία όρχεων, αζωο- σπερμία, στείρωση γυναίκες: δασυτριχισμός, αλλαγή χροιάς φωνής, μεγέθυνση κλειτορίδας, στείρωση γενικά: αλωπεκία, ακμή, απώλεια γενετήσιας επιθυμίας, μείωση HDL, αύξηση LDL, βλάβη τοιχωμάτων αγγείων, αύξηση αρτηριακής πίεσεως, ηπατική δυσλειτουργία, χολοστατικός ίκτερος, καρκίνος <sup>2,3</sup>
β-blockers	ελάττωση stress <sup>1</sup>	βρογχοσπασμός, σεξουαλικές δυσλειτουργίες σε άνδρες <sup>2</sup>
Διουρητικά	Μη βελτιωμένη απόδοση, ελάττωση σωματικού βάρους, ελάττωση συγκέντρωσης φαρμάκων στα ούρα <sup>2</sup>	αφυδάτωση, διαταραχές ηλεκτρο- λυτών <sup>2</sup>

HCG	διέγερση παραγωγής ενδογενούς τεστοστερόνης <sup>1</sup>	μεταβολές διαθέσεως, κατάθλιψη, οίδημα <sup>2</sup>
HGH	αύξηση σωματικού μεγέθους και δυνάμεως <sup>1</sup>	ακρομεγαλία, μυοπάθεια, περιφερειακή νευροπάθεια, παθήσεις στεφανιαίων, καρδιομυοπάθεια <sup>2</sup>
EPO	αύξηση αριθμού ερυθροκυττάρων <sup>2</sup>	υπέρταση, καρδιακή ανεπάρκεια, εγκεφαλικά επεισόδια <sup>2</sup>

### 1.3 Αναβολικά στεροειδή

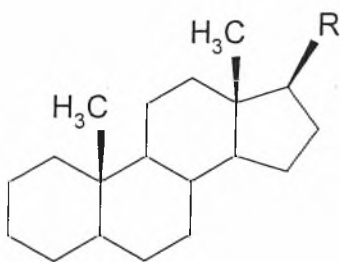
#### 1.3.1 Εισαγωγή

Ο όρος «αναβολικά στεροειδή» αναφέρεται σε συνθετικές ουσίες σχετικές με τις ανδρικές φυλετικές ορμόνες (ανδρογόνα).Τα αναβολικά/ ανδρογόνα στεροειδή (AAS) είναι ανάλογα της τεστοστερόνης, της ανδρικής φυλετικής ορμόνης. Το κύριο χαρακτηριστικό της χημικής δομής των AAS είναι η παρουσία του βασικού στεροειδικού δακτυλίου των 17 ατόμων C, ο οποίος προσδίδει στα AAS τις αναβολικές και ανδρογόνες ιδιότητές τους (σχήμα 1.1). Οι ανδρογόνες επιδράσεις περιλαμβάνουν τις αλλαγές στα πρωτογενή και δευτερογενή φυλετικά χαρακτηριστικά όπως ο σχηματισμός και η αύξηση των ανδρικών φυλετικών οργάνων, οι αλλαγές της φωνής, η αύξηση της τριχοφυΐας του προσώπου και της περιοχής των γεννητικών οργάνων η αύξηση της επιθετικότητας, κ.τ.λ. Οι αναβολικές επιδράσεις των AAS αναφέρονται στην αύξηση της σωματικής μυϊκής μάζας, της δύναμης, των ερυθροκυττάρων του αίματος, της νευρικής αγωγής, κ.α. Επομένως, η χρήση των αναβολικών στεροειδών για τη μη φυσιολογική ενίσχυση των αθλητικών επιδόσεων βασίζεται στην αναβολική δράση τους. Πολλά συνθετικά στεροειδή έχουν συντεθεί, με στόχο την αύξηση της αναβολικής δράσης και/ ή την ελάττωση της ανδρογόνου.<sup>10</sup>

Τα αναβολικά στεροειδή παρήχθησαν για πρώτη φορά στο τέλος της δεκαετίας του 1930, με σκοπό την ίαση του υπογοναδισμού, μία ασθένεια κατά την οποία οι όρχεις (γονάδες) δεν παράγουν επαρκή ποσότητα τεστοστερόνης για τη φυσιολογική αύξηση, ανάπτυξη και φυλετική λειτουργικότητα. Οι κύριες ιατρικές χρήσεις των ουσιών αυτών περιλαμβάνουν τη θεραπεία διάφορων τύπων αναιμίας, της κατάθλιψης και της μελαγχολίας. Πρόσφατές μελέτες εκδήλωσαν τις θετικές επιδράσεις των AAS στη θεραπεία του υιού της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV) και στο σύνδρομο της ανοσοανεπάρκειας.<sup>11</sup>

Γύρω στο 1930 οι επιστήμονες ανακάλυψαν ότι τα αναβολικά στεροειδή ήταν ικανά να διευκολύνουν την αύξηση των σκελετικών μυών σε πειραματόζωα, κάτι που οδήγησε στη χρήση των ουσιών αυτών αρχικά από αρσιβαρίστες, bodybuilders και ακολούθως από διάφορους άλλους αθλητές. Η κατάχρηση αναβολικών έχει γίνει τόσο διαδεδομένη στον αθλητισμό, ώστε επηρεάζει το αποτέλεσμα των αθλητικών αγώνων. Πάνω από 100 διαφορετικά αναβολικά στεροειδή έχουν παραχθεί, τα περισσότερα από τα οποία χορηγούνται με συνταγογράφηση. Παρόλα αυτά, πολλά αναβολικά παρασκευάζονται σε κρυφά εργαστήρια και στη συνέχεια διοχετεύονται στη «μαύρη αγορά».

Οι κυριότεροι λόγοι που εξηγούν την κατάχρηση των αναβολικών είναι η βελτίωση της αθλητικής επίδοσης, η αύξηση της μυϊκής μάζας και/ ή ελάττωση του σωματικού λίπους. Εκτός από αυτές τις επιθυμητές ενέργειες που επιφέρει η χρήση των αναβολικών στεροειδών, παρουσιάζει και κάποιες παρενέργειες (πίνακας 1.1).<sup>2,10</sup>

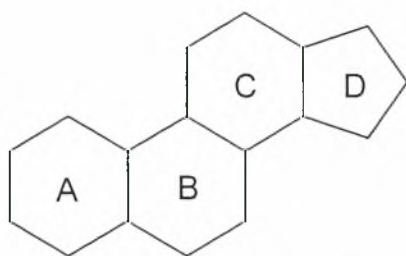


**Σχήμα 1.1** Στεροειδής δακτύλιος

### 1.3.2 Μεταβολισμός<sup>12</sup>

Γενικά, ο μεταβολισμός των ανδρογόνων αναβολικών στεροειδών πραγματοποιείται σε δυο φάσεις: φάση I και φάση II.

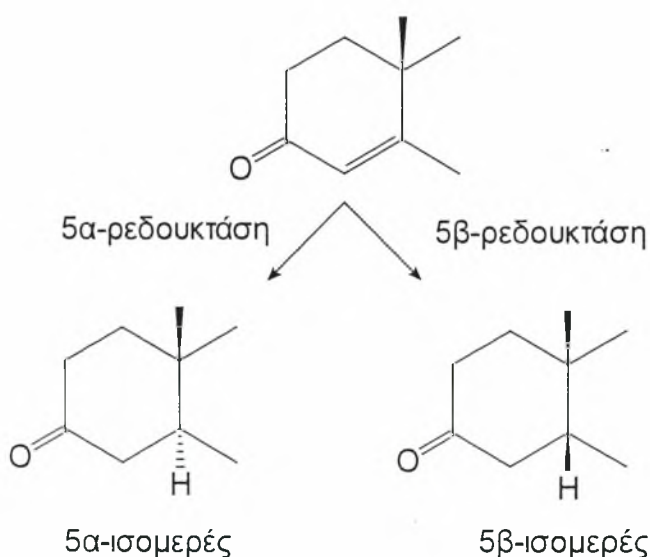
Φάση I μεταβολισμού: οι αντιδράσεις της I φάσης του μεταβολισμού μετατρέπουν τα στεροειδή σε πιο πολικές ενώσεις ώστε να αποβάλλονται πιο εύκολα από τον οργανισμό. Οι αντιδράσεις αυτές είναι κυρίως οξειδώσεις, αναγωγές ή υδροξυλιώσεις και καταλύονται από ένζυμα. Παρακάτω θα δούμε τις μεταβολικές αλλαγές που συμβαίνουν, κατά την διάρκεια της φάσης αυτής, σε κάθε έναν δακτύλιο (A-D) της βασικής δομής των στεροειδών (σχήμα 1.2).



Σχήμα 1.2: Βασική δομή των στεροειδών

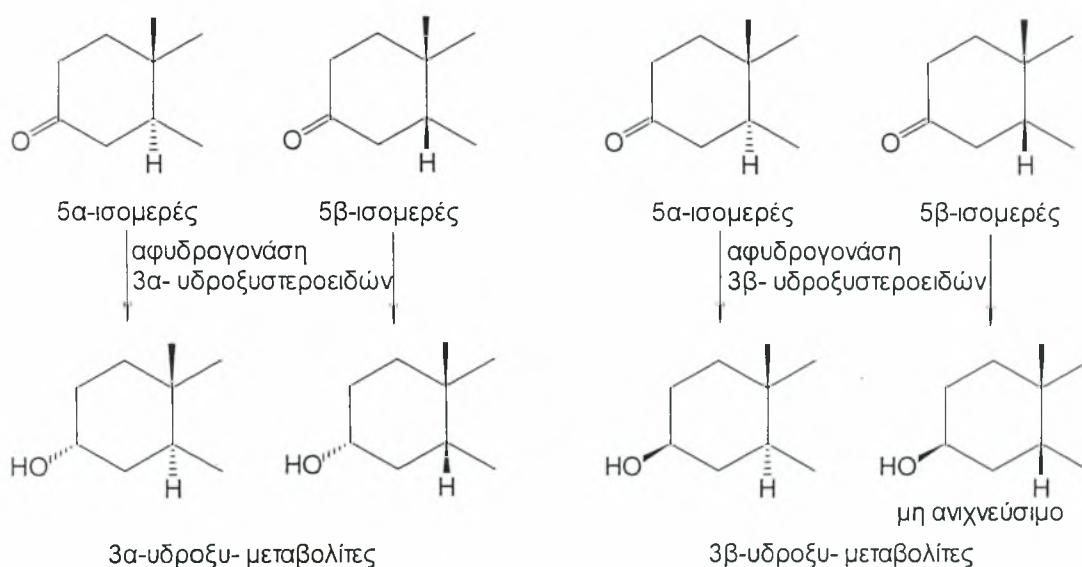
•Μεταβολισμός του δακτυλίου A.

5α και 5β αναγωγή: Η αναγωγή του διπλού δεσμού μεταξύ του άνθρακα 4 και 5 αποτελεί το βασικό βήμα μεταβολισμού των 3-κετο-4-εν στεροειδών, όπως της τεστοστερόνης. Η αναγωγή αυτή αποδίδει ένα ασυμμετρικό κέντρο στον C-5 έτσι ώστε να μπορούν να σχηματιστούν δύο ισομερείς στερεοχημικές δομές (σχήμα 1.3), η 5α (με το υδρογόνο στον C-5 κάτω από το μοριακό επίπεδο) και η 5β (με το υδρογόνο στον C-5 πάνω από το μοριακό επίπεδο). Τα ένζυμα που καταλύουν τις αντιδράσεις αυτές, η 5α και η 5β ρεδουκτάση, χρειάζονται το NADPH ως συμπράγοντα και εντοπίζονται κυρίως στο συκώτι. Συγκεκριμένα, η 5α ρεδουκτάση βρίσκεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο ενώ η 5β ρεδουκτάση εντοπίζεται κυρίως στο κυτόπλασμα. Ο βαθμός παραγωγής των δύο ισομερών εξαρτάται από τη δομή των στεροειδών. Υπάρχουν στεροειδή, όπως η μετανδιενόνη (metandienone), που δεν σχηματίζουν καθόλου 5α ισομερή. Ακόμα, έχειδειχτεί ότι η δραστηριότητα των δύο ενζύμων επηρεάζεται σημαντικά από τις διαφορές στην δομή του δακτυλίου D.



Σχήμα 1.3: 5α- και 5β- αναγωγή των 3-κετο-4-εν στεροειδών

3α- και 3β- υδροξύ-αναγωγή: Μετά την αναγωγή του διπλού δεσμού μεταξύ του C-4,5, η 3-κετοομάδα υφίσταται υδροξύ-αναγωγή υπό την επίδραση είτε της δεϋδρογονάσης των 3α-υδροξυστεροειδών είτε της δεϋδρογονάσης των 3β-υδροξυστεροειδών (σχήμα 1.4). Στον μεταβολισμό της τεστοστερόνης, μετά από στοματική χορήγηση, παράγονται κυρίως 3α- υδροξύ ισομερή και σε πολύ μικρότερο ποσοστό οι 3β- υδροξύ- 5α μεταβολίτες.



**Σχήμα 1.4:** Αναγωγή της 3-κετοομάδας από την 3α-υδροξυστεροειδή δεϋδρογονάση και την 3β-υδροξυστεροειδή δεϋδρογονάση

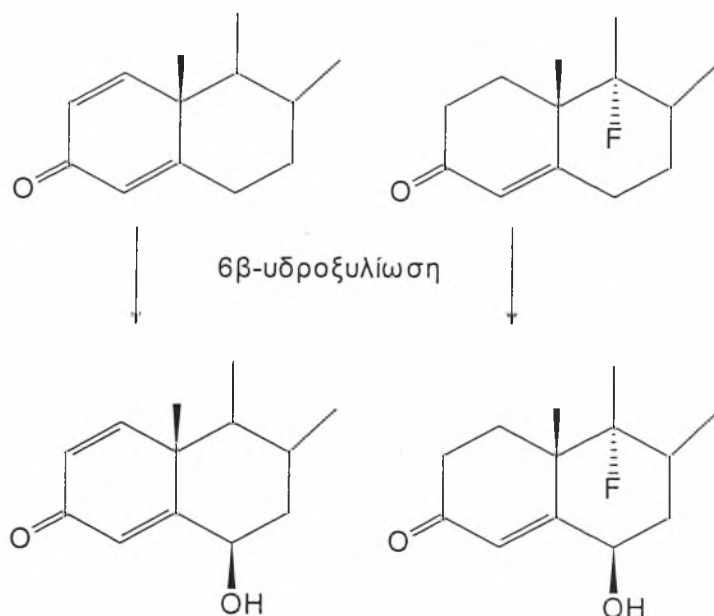
Άλλες μεταβολικές αλλαγές του δακτυλίου A :

- α) 1,2- υδρογόνωση των 3-κέτο-ανδρό-1,4-διέν στεροειδών.
- β) 1,2-αφυδρογόνωση των 3-κέτο-4-εν στεροειδών.

•Μεταβολισμός του δακτυλίου B.

6β-υδροξυλίωση: Αποτελεί τη κύρια μεταβολική οδό για τα 17β-υδροξύ-17α-μέθυλ στεροειδή στα οποία η αναγωγή του δακτυλίου A παρεμποδίζεται από την παρουσία του διπλού δεσμού μεταξύ του άνθρακα 1 και 2 (σχήμα 1.5).

6.7-αφυδρογόνωση: Θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως ένα ασήμαντο μεταβολικό μονοπάτι αφού εμφανίζεται στο μεταβολισμό μόνο ενός στεροειδούς, της μετανδιενόνης.



**Σχήμα 1.5:** 6β-υδροξυλίωση

•Μεταβολισμός του δακτυλίου C.

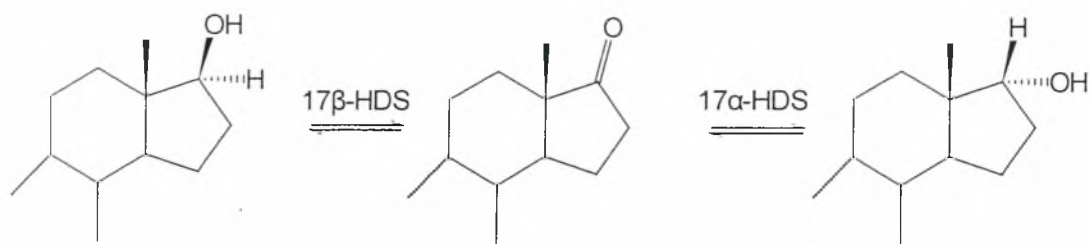
12-υδροξυλίωση: Είναι η μοναδική μεταβολική αλλαγή που έχει μέχρι σήμερα παρατηρηθεί στο δακτύλιο αυτό. Εμφανίζεται στα περισσότερα αναβολικά στεροειδή, ενώ η στεreoχημεία του άνθρακα 12 (C-12α ή C-12β) δεν είναι ακόμα γνωστή.

•Μεταβολισμός του δακτυλίου D.

17-οξείδωση της 17β-υδροξυομάδας: Το πιο κατανοητό μονοπάτι στο μεταβολισμό των 17β-υδροξυστεροειδών είναι η οξείδωσή τους υπό την επίδραση της δεϋδρογονάσης των 17β-υδροξυστεροειδών (σχήμα 1.6). Η αντίδραση αυτή οδηγεί στον σχηματισμό των 17-κετοστεροειδών, τα οποία αποτελούν τους κύριους εκκρινόμενους μεταβολίτες της τεστοστερόνης αλλά και όλων εκείνων των AAS που περιέχουν μια δευτεροταγή 17β-υδροξυλ-ομάδα.

17β-υδροξυλίωση των 17-κετοστεροειδών: Η 17-κετοομάδα μπορεί να ξαναμετατραπεί σε υδροξυλομάδα από το ίδιο ένζυμο, τη δεϋδρογονάση των 17β-υδροξυστεροειδών (σχήμα 1.6). Το σημείο ισορροπίας της αντιστρεπτής αυτής αντίδρασης εξαρτάται από τον ρυθμό των επόμενων μεταβολικών βημάτων (π.χ. αναγωγή του δακτυλίου B και 17β-σύζευξη).





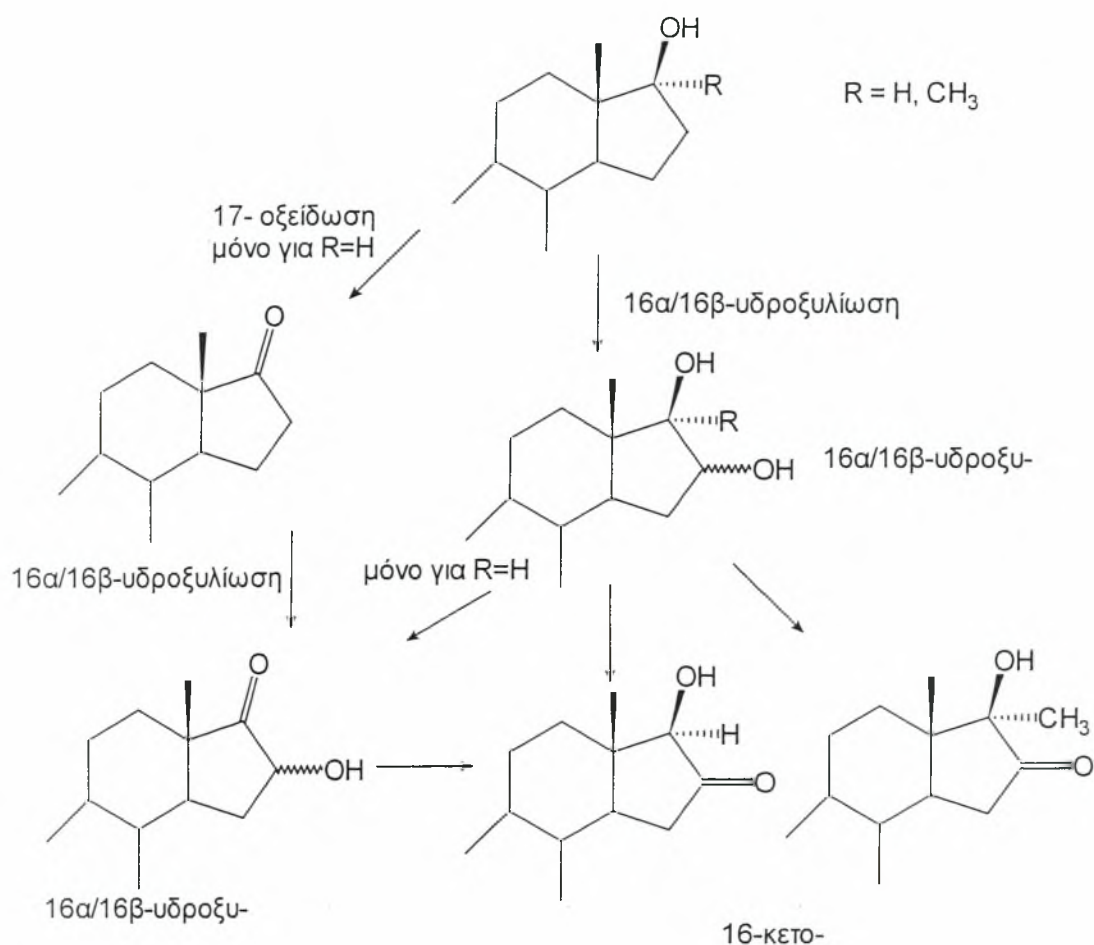
**Σχήμα 1.6:** Οξείδωση των 17β-υδροξυομάδων από την 17β-υδροξυστεροειδή δεϋδρογονάση (17β-HDS) και σχηματισμός των 17α- υδροξυστεροειδών μέσω αναγωγής των 17-κετομεταβολιτών από την 17α-υδροξυστεροειδή δεϋδρογονάση (17α-HDS).

17α-υδροξυλίωση των 17-κετοστεροειδών: Στον ανθρώπινο οργανισμό απεκκρίνονται 17α-υδροξυμεταβολίτες μόνο κατά το μεταβολισμό της τρενμπολόνης (trenbolone). Θεωρείται ότι σχηματίζονται μέσω των 17-κετομεταβολιτών υπό την παρουσία του ενζύμου δεϋδρογονάση των 17α-υδροξυστεροειδών (σχήμα 1.6).

16α- και 16β-υδροξυλίωση: Αυτή η αντίδραση (σχήμα 1.7) λαμβάνει χώρα κατά το μεταβολισμό αρκετών στεροειδών και οδηγεί στο σχηματισμό δύο ισομερών στερεοχημικών διαμορφώσεων (C-16α και C-16β). Ο βαθμός σχηματισμού αυτών των δυο ισομερών διαφέρει ανάμεσα στα διάφορα αναβολικά στεροειδή και έχει βρεθεί ότι σε κάποιες περιπτώσεις σχηματίζεται μόνο το ένα ισομερές.

#### Άλλες μεταβολικές αλλαγές του δακτυλίου D:

- α) 16-Οξείδωση: Ενζυμική οξείδωση των 16α/16β- υδροξυστεροειδών οδηγεί στην παραγωγή των 16-κετοστεροειδών.
- β) Επιμερισμός στον άνθρακα 17.
- γ) Υδροξυλίωση στον άνθρακα 18 ή στον άνθρακα 19.



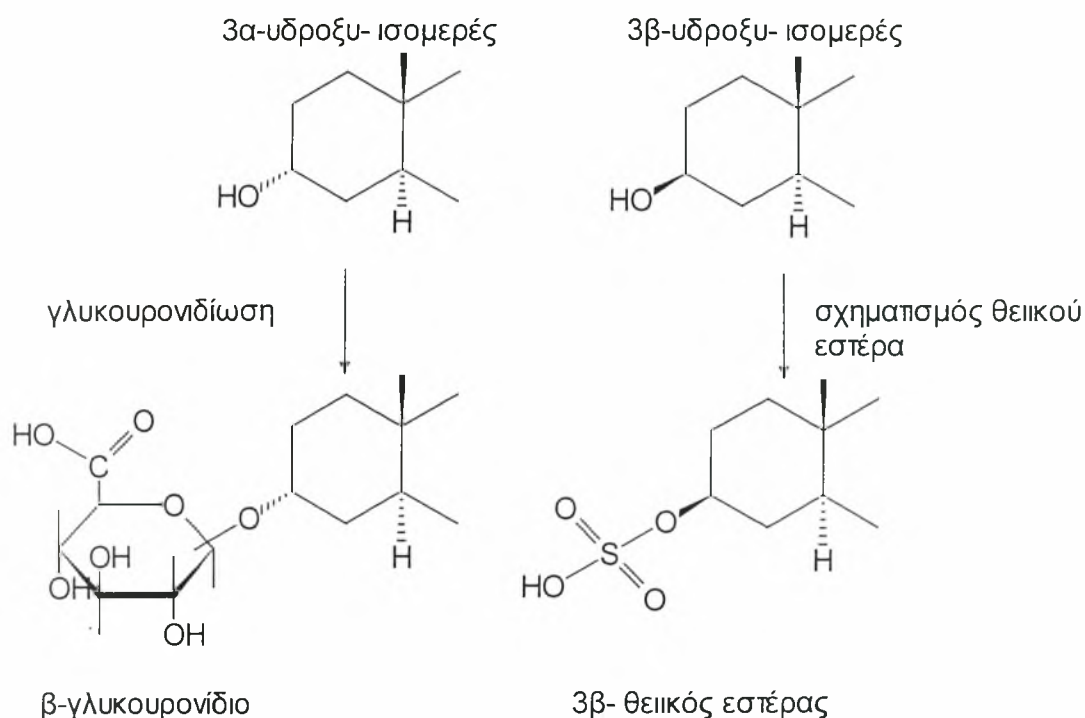
**Σχήμα 1.7:** 16-υδροξυλίωση και σχηματισμός των 17-κετομεταβολιτών

Φάση II μεταβολισμού: Οι αντιδράσεις της δεύτερης φάσης του μεταβολισμού αναφέρονται επίσης ως αντιδράσεις σύζευξης αφού έχουν ως αποτέλεσμα τη σύνδεση του αναβολικού στεροειδούς ή των μεταβολιτών αυτού, με το γλυκουρονικό οξύ ή τηθεική ομάδα. Η σύνδεση αυτή βοηθάει την αποβολή του αναβολικού από τον οργανισμό. Και οι δύο αντιδράσεις σύζευξης ελέγχονται από ένζυμα. Στη σύνδεση του γλυκουρονικού οξέος εμπλέκεται το UDP-γλυκουρονικό οξύ ως υπόστρωμα, ενώ η 3'-φωσφοαδενοσινο-5'-φωσφοθειική ομάδα εμπλέκεται στη σύνδεση τηςθειικής ομάδας.

Οι μεταβολίτες που εκκρίνονται μετά από χορήγηση αναβολικών, δεν είναι όλοι συζευγμένοι. Έτσι μπορούμε να διακρίνουμε τους ελεύθερους εκκρινόμενους μεταβολίτες από τους συζευγμένους μεταβολίτες.



•Σύνδεση στο δακτύλιο A του στεροειδούς: Στο μεταβολισμό των στεροειδών, η αναγωγή της 3-κετοομάδας οδηγεί κυρίως στον σχηματισμό της 3α-υδροξυ διαμόρφωσης (βλέπε 3α- και 3β- αναγωγή). Τα 3α-υδροξυστεροειδή συνδέονται με το γλυκουρονικό οξύ, ενώ τα 3β-υδροξυστεροειδή εκκρίνονται συνδεδεμένα με θειική ομάδα (σχήμα 1.8).



**Σχήμα 1.8:** Γλυκουρονιλίωση της 3α-υδροξυομάδας και σχηματισμός θειικού εστέρα μέσω της σύνδεσης των 3β-υδροξυστεροειδών με θειική ομάδα.

•Σύνδεση στο δακτύλιο B και C του στεροειδούς: Μέχρι σήμερα δεν έχουν αναφερθεί αντιδράσεις σύζευξης στους δακτυλίους αυτούς.

•Σύνδεση στο δακτύλιο D του στεροειδούς:

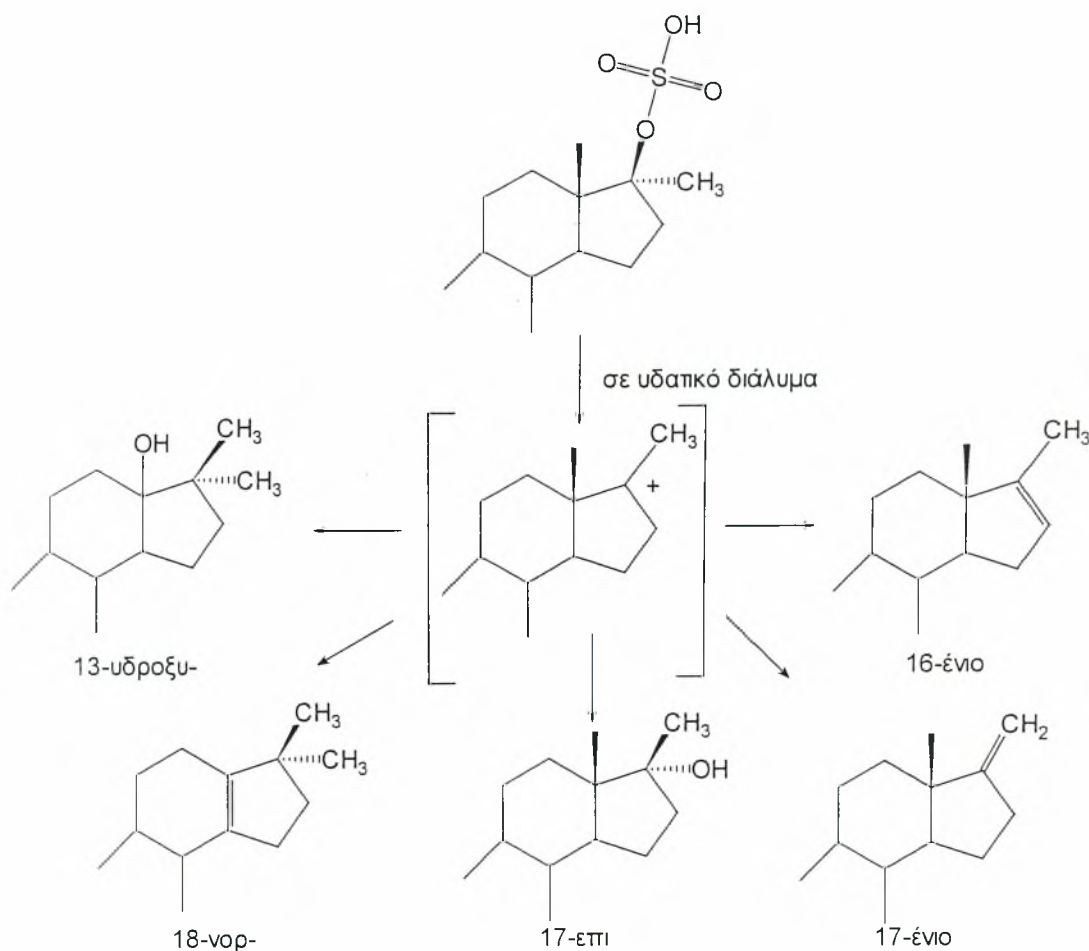
Γλυκουρονιλίωση της δευτεροταγούς 17β-υδροξυλομάδας: τα αναβολικά ανδρογόνα στεροειδή με δευτεροταγή 17β-υδροξυλομάδα εκκρίνονται σε συζευγμένη μορφή, η οποία υφίσταται ταχεία υδρόλυση από την β-γλυκουρονιδάση του βακτηρίου *Escherichia coli*. Το ένζυμο αυτό εμφανίζει υψηλή εξειδίκευση στο να υδρολύει β-

γλυκουρονίδια, και ειδικά στα στεροειδή, γεγονός που φανερώνει ότι τα στεροειδή αυτά εκκρίνονται ως 17β-γλυκουρονίδια.

Γλυκουρονιλίωση της τριτοταγούς 17β-υδροξυλομάδας των 17β-υδροξυ-17α-μεθυλστεροειδών.

Εστεροποίηση με θεική ομάδα της δευτεροταγούς 17β-υδροξυλομάδας: Η αντίδραση αυτή έχει περιγραφεί κυρίως για τον μεταβολισμό της τεστοστερόνης.

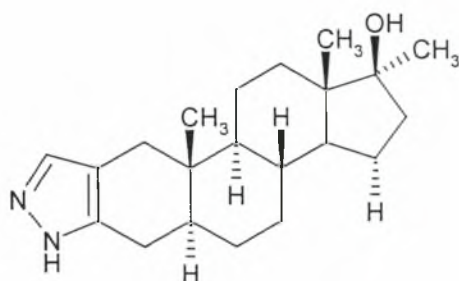
Εστεροποίηση με θεική ομάδα της τριτοταγούς 17β-υδροξυλομάδας των 17β-υδροξυ-17α-μεθυλστεροειδών και εμφάνιση επιμερισμού στη θέση 17: Ο θεικός εστέρας στην τριτοταγή υδροξυλομάδα αποσυντίθεται στα ούρα για να σχηματίσει διάφορα αφυδατωμένα προϊόντα και τον αντίστοιχο επιμερισμό στον C17 (17α-υδρόξυ- και 17β-υδροξύ) (σχήμα 1.9).



**Σχήμα 1.9:** Εστεροποίηση με θεική ομάδα της τριτοταγούς 17β-υδροξυλομάδας των 17β-υδροξυ-17α-μεθυλστεροειδών και εμφάνιση επιμερισμού στη θέση 17

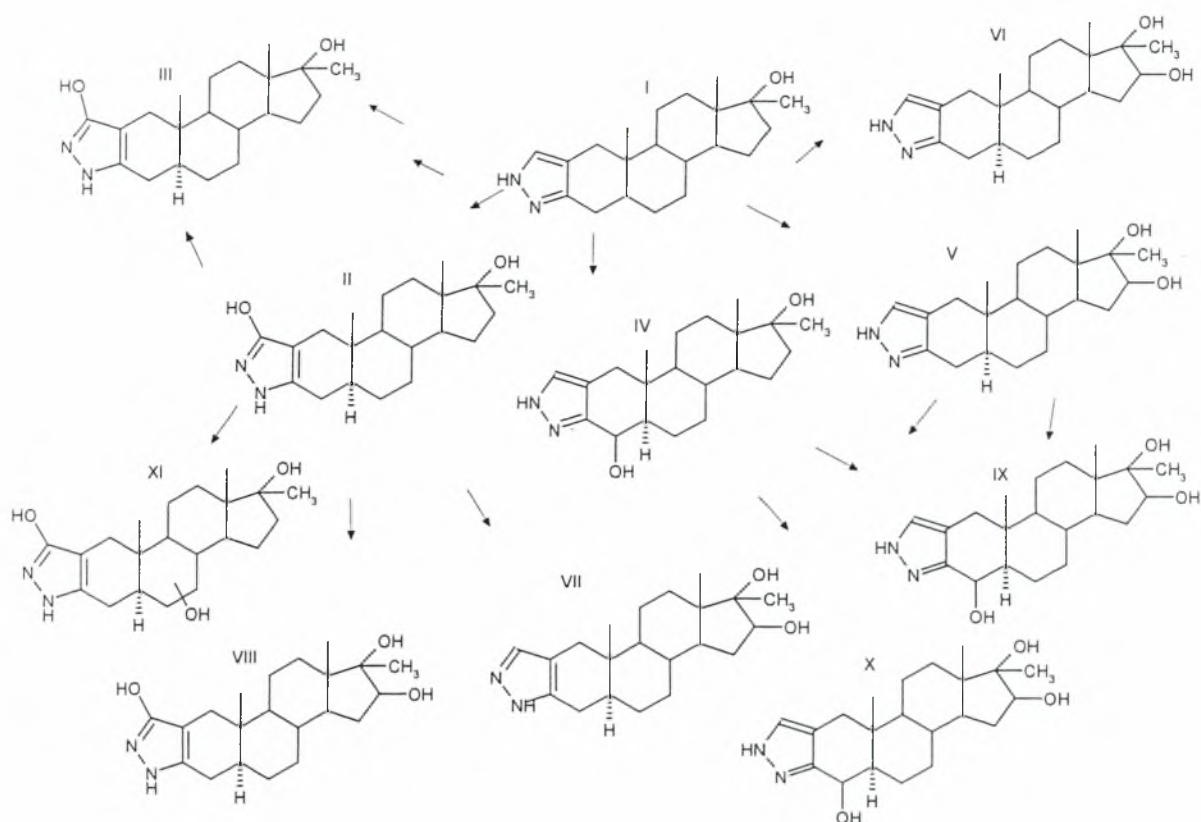
#### 1.4 Στανοζολόλη

Η στανοζολόλη (17β-υδροξυ-17α-μεθύλ-5α-ανδροστ-2-ένο(3,2-ε)-πυραζόλιο) πρωτοσυντέθηκε το 1959 από τους Clinton και συν. (σχήμα 1.10). Η συμπύκνωση της 2-υδροξυ-μεθυλέν-17α-μεθύλ-17β-υδροξυ-5α-ανδροσταν-3-όνης με ένυδρη υδραζίνη οδηγεί στη σύνθεση της στανοζολόλης, ενός στεροειδούς με ένα συμπυκνωμένο δακτύλιο πυραζολίου. Κλινικά χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις οστεοπόρωσης και σε ανεπάρκεια σύνθεσης πρωτεϊνών. Σε αντίθεση με ενδεικνυόμενες ιατρικές χορηγήσεις, η κατάχρησή της από τους αθλητές είναι πολύ διαδεδομένη λόγω των αυξημένων αναβολικών επιδράσεων που εμφανίζει.<sup>13</sup>



**Σχήμα 1.10.** Χημική δομή της στανοζολόλης

Στον ανθρώπινο οργανισμό, η στανοζολόλη μεταβολίζεται σε μεγάλο βαθμό και ο μεταβολισμός αυτός οδηγεί στον σχηματισμό 11 διαφορετικών μεταβολιτών (σχήμα 1.11). Οι περισσότεροι από αυτούς ( 3'-υδροξυστανοζολόλη (II), στανοζολόλη (I), 4β-υδροξυστανοζολόλη (IV), 16β-υδροξυστανοζολόλη (V), 16α-υδροξυστανοζολόλη (VI), δύο ισομερή της 3', 16-διυδροξυστανοζολόλης (VII, VIII), δυο ισομερή της 4β, 16-διυδροξυστανοζολόλης (IX, X), και μια 3',?-διυδροξυστανοζολόλη (XI) ), αποβάλλονται από τον οργανισμό συζευγμένοι με το γλυκουρονικό οξύ. Το ποσοστό των μεταβολιτών που αποβάλλονται σε ελεύθερη μορφή ( 3'-υδροξυστανοζολόλη (II) και 3'-υδροξυ-17-επιστανοζολόλη (III) ) είναι πολύ μικρό (μόνο 1-2% της ποσότητας των συζευγμένων μεταβολιτών). Οι μεταβολίτες της στανοζολόλης, που αποβάλλονται σε μεγαλύτερες ποσότητες από τον οργανισμό και χρησιμοποιούνται



**Σχήμα 1.11.** Μεταβολισμός της στανοζολόλης: **I** στανοζολόλη, **II** 3'-υδροξυστανοζολόλη, **III** 3'-υδροξυ-17-επιστανοζολόλη, **IV** 4β- υδροξυστανοζολόλη, **V** 16β- υδροξυστανοζολόλη, **VI** 16α- υδροξυστανοζολόλη, **VII** 3',16-διυδροξυστανοζολόλη 1, **VIII** 3',16-διυδροξυστανοζολόλη 2, **IX** 4,16-διυδροξυστανοζολόλη 1, **X** 4,16- διυδροξυστανοζολόλη 2, **XI** διυδροξυστανοζολόλη με την μία υδροξυλομάδα στη θέση 3' του δακτυλίου της πυραζόλης ενώ η θέση της άλλης είναι ακόμα άγνωστη.

για την ανίχνευση της ουσίας αυτής με την μέθοδο HPLC, είναι οι ακόλουθοι: 3'-υδροξυστανοζολόλη (II), 4β-υδροξυστανοζολόλη (IV) και 16β-υδροξυστανοζολόλη (V). Και οι τρεις αυτοί μεταβολίτες εκκρίνονται συζευγμένοι με γλυκουρονικό οξύ στο δακτύλιο της πυραζόλης τους και έτσι μπορούν να υδρολυσθούν από την β-γλυκουρονιδάση.<sup>13,14</sup>

Οι πίνακες 1.2 και 1.3 δείχνουν τις ποσότητες καθώς και τους χρόνους που εκκρίνονται οι ελεύθεροι και οι βασικοί συζευγμένοι μεταβολίτες αντίστοιχα, μετά από χορήγηση 40mg στανοζολόλης. Με βάση τους πίνακες αυτούς διαπιστώνουμε ότι για την ανίχνευση της στανοζολόλης σε δείγματα αθλητών, αρκεί να βασιστούμε στους τρεις κύριους (άφθονους) μεταβολίτες της.<sup>13</sup>

Χρόνος μετά τη χορήγηση (h)	Ρυθμός απέκκρισης 3'-υδροξυ-στανολόλης (ng/min)	Ρυθμός απέκκρισης 3'-υδροξυ-17-επι-στανολόλης (ng/min)
0-6,5	3,2	2,6
6,5-15,5	5,9	6,6
15,5-24,0	8,3	7,6
24,0-31,0	2,7	6,2
31,0-39,0	3,9	8,8
39,0-50,0	2,5	6,3
50,0-54,5	4,6	5,3
54,5-63,0	2,6	5,2
63,0-69,5	4,4	6,0
89,0-92,0	3,0	4,2
122,0-126,0	1,5	1,6
137,0-141,0	0,6	0,7
Ολική απεκκριθείσα ποσότητα	23 μg	33 μg

**Πίνακας 1.2:** Απέκκριση της 3'-υδροξυ-στανολόλης και της 3'-υδροξυ-17-επι-στανολόλης μετά από στοματική χορήγηση 40mg στανολόλης.

Περίοδος συλλογής (h)	ST (I) (ng/min)	3'-HO-ST (II) (ng/min)	4β-HO-ST (IV) (ng/min)	16β-HO-ST (V) (ng/min)	16α-HO-ST (VI) (ng/min)
0-1,0	36	3	9	17	0
1,0-2,0	115	54	164	169	15
2,0-4,0	220	104	334	424	27
4,0-6,0	230	158	387	483	73
6,0-8,0	168	136	230	414	74
8,0-11,0	319	222	493	935	158
11,0-13,1	189	155	284	542	115
13,1-21,2	99	103	94	302	66
21,2-25,5	64	103	110	225	38
25,5-30,3	39	73	80	142	28
30,3-36,0	58	62	110	135	27
36,0-45,0	46	55	47	123	24
45,0-50,7	29	59	40	106	25
50,7-56,0	-	56	32	113	20
56,0-61,5	-	57	36	103	15
61,5-69,0	-	32	13	48	10
69,0-77,5	-	23	10	35	6
77,5-85,0	-	27	9	40	-
85,0-93,0	-	13	3	25	-

93,0-101,8	-	17	2	13	-
101,8-107,7	-	-	-	-	-
107,7-117,2	-	-	-	-	-
Ολική απεκκριθείσα ποσότητα	314 µg	367 µg	468 µg	874 µg	164 µg

**Πίνακας 1.3:** Απέκκριση των συζευγμένων μεταβολιτών μετά από στοματική χορήγηση 40mg στανοζολόλης (I).

**1.5 Αναλυτικές τεχνικές για τον προσδιορισμό των στεροειδών.**

Για τον προσδιορισμό των αναβολικών στεροειδών χρησιμοποιείται αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας υψηλής διαχωριστικής ικανότητας (GC/HRMS).

1.5.1. Αέρια χρωματογραφία

1.5.1.1. Εισαγωγή

Με τον όρο χρωματογραφία χαρακτηρίζουμε τη μέθοδο διαχωρισμού, η οποία βασίζεται στις διαφορές της φυσικοχημικής συγγένειας των ουσιών ως προς δυο φάσεις, τη στατική και την κινητή. Η στατική φάση (υγρό ή στερεό) αποτελείται από ένα ακίνητο στρώμα μεγάλου εμβαδού ενώ η κινητή φάση αποτελείται από ένα ρευστό ( υγρό ή αέριο) που κινείται διαμέσου και κατά μήκος της στατικής φάσης. Οι παρατηρούμενες διαφορές φυσικοχημικής συγγένειας οφείλονται κυρίως σε μηχανισμούς προσροφήσεως και κατανομής. Όσο μεγαλύτερη είναι η συγγένεια της προς ανάλυση ουσίας για τη στατική φάση τόσο περισσότερο χρόνο θα παραμείνει η ουσία αυτή στη στήλη του χρωματογράφου.<sup>15</sup>

1.5.1.2. Οργανολογία Αεριοχρωματογράφου

Η συσκευή μπορεί να διακριθεί σε δύο συστήματα:

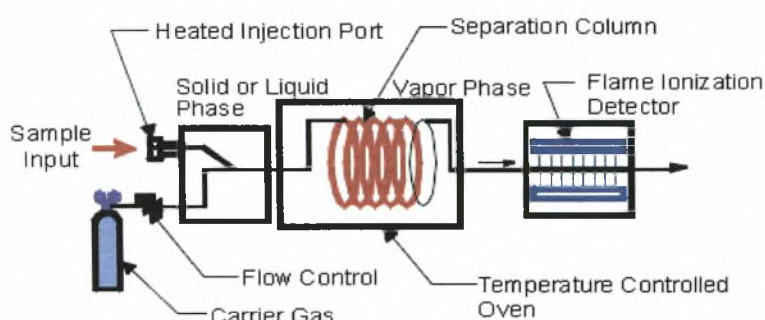
- το φυσικοχημικό (η εκλογή των υλικών κινητής και στατικής φάσεως)
- και το ηλεκτρονικό (ή αναλυτικό) σύστημα.

Τα σημαντικότερα τμήματα ενός αεριοχρωματογράφου είναι (σχήμα 1.12) :

- η στήλη στην οποία λαμβάνει χώρα ο διαχωρισμός των συστατικών και η οποία μπορεί να είναι πληρώσεως ή τριχοειδής
- οι οβίδες αερίου φορέα



- ο μετρητής παροχής αερίου φορέα
- το σύστημα εισαγωγής του δείγματος
- ο ανιχνευτής θερμικής ή ηλεκτρικής αγωγιμότητας, ιονισμού φλογός, συλλήψεως ηλεκτρονίων κ.λ.π.
- το σύστημα επεξεργασίας σήματος και αποτελεσμάτων ή ο καταγραφέας.<sup>16</sup>



**Σχήμα 1.12**

Στην αέρια χρωματογραφία (gas chromatography) η κινητή φάση είναι πάντα αέριο και η στατική δύναται να είναι στερεό ή υγρό προσδεμένο σε αδρανή φορέα. Στην πρώτη περίπτωση έχουμε την αέριο-στερεά χρωματογραφία, όπου η στατική φάση αποτελείται από ένα κοκκώδες υλικό π.χ. διοξείδιο του πυριτίου  $\text{SiO}_2$ , αλουμίνα  $\text{Al}_2\text{O}_3$  ή άνθρακας. Στην περίπτωση που η στατική φάση είναι ένα μη πτητικό υγρό προσδεμένο σε μία αδρανή επιφάνεια με τη μορφή λεπτής στιβάδας, τότε έχουμε την αέριο-υγρά χρωματογραφία. Το στερεό υπόστρωμα σε αυτή τη περίπτωση δεν πρέπει να έχει καμία επίδραση στο διαχωρισμό αλλά απλώς να χρησιμεύει ως μηχανικό υποστήριγμα της υγρής φάσης. Το συνηθέστερο υλικό υποστηρίξεως της υγρής φάσης είναι η γη διατόμων, η οποία είναι μία μορφή εφυδατομένου  $\text{SiO}_2$  με πολλές ελεύθερες υδροξυλομάδες στην επιφάνειά της. Οι παραπάνω στήλες, οι οποίες είναι γνωστές ως στήλες πληρώσεως, παρουσιάζουν πτωχές ιδιότητες μεταφοράς θερμότητας που έχει ως αποτέλεσμα αυξημένη τυπική απόκλιση των κορυφών και βραδεία εκρόφηση της ουσίας από την υγρή στοιβάδα στον αέριο φορέα. Για να αποφευχθούν οι παραπάνω δυσκολίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν τριχοειδείς στήλες. Οι στήλες αυτές είναι τριχοειδείς σωλήνες από μέταλλο, γυαλί ή οργανικό πολυμερές και συγκρατούν το διαλύτη λόγω των αναπτυσσόμενων τριχοειδών φαινομένων με τα τοιχώματα της στήλης. Τα πλεονεκτήματα των τριχοειδών στηλών σε σχέση με τις στήλες πληρώσεως συνοψίζονται στα εξής:

- μικρότεροι χρόνοι συγκρατήσεως,

- μεγαλύτερη χημική αδράνεια,
- μεγαλύτερος χρόνος ζωής λόγω της μεγάλης σταθερότητάς τους,
- μεγαλύτερη αποδοτικότητα (μεγάλος αριθμός θεωρητικών πλακών) ,
- καλύτερη επαναληπτικότητα και
- μεγαλύτερη ευαισθησία.

Οι ουσίες που χρησιμοποιούνται για την υγρή στατική φάση διαφέρουν κυρίως ως προς το βαθμό πολικότητας και την περιοχή θερμοκρασιών, στην οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν. Οι στατικές φάσεις χαρακτηρίζονται συνήθως ως μη πολικές, μέσης πολικότητας, πολικές και υψηλής πολικότητας.<sup>16,17</sup>

Για τη χρήση της αέριας χρωματογραφίας ως αναλυτική μέθοδο είναι απαραίτητο το δείγμα να μπορεί να ατμοποιηθεί. Γι' αυτό το λόγο η ρύθμιση της θερμοκρασίας είναι σημαντική και η θερμοστάτηση όλου του συστήματος απαραίτητη. Οι αεριοχρωματογράφοι απαιτούν την παροχή ενός καταλλήλου αερίου φορέα με την απαραίτητη πίεση έτσι ώστε να επιτευχθεί ο επιθυμητός διαχωρισμός. Το φέρον αέριο πρέπει να είναι αδρανές, ξηρό, απαλλαγμένο οξυγόνου και οργανικών προσμίξεων και συνήθως είναι υδρογόνο, άζωτο, αργό ή ήλιο.<sup>16</sup>

Η εισαγωγή του δείγματος στον αεριοχρωματογράφο πρέπει να γίνεται με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε να διατηρείται η πίεση και η ροή στη στήλη σταθερή και να εμποδίζεται η είσοδος αέρα σ' αυτή. Ο όγκος του δείγματος που εισάγεται στο όργανο πρέπει να είναι μικρός 0,100-50μl και το δείγμα πρέπει να θερμαίνεται στο δοχείο εισαγωγής σε θερμοκρασία μεγαλύτερη του σημείου ζέσεως της ουσίας.

Η στήλη όπου γίνεται ο διαχωρισμός των ουσιών αξιολογείται με βάση την απόδοσή της (αριθμός θεωρητικών πλακών), τη διαχωριστικότητά της και τη συμμετρία των κορυφών που παρέχει.<sup>15</sup>

Μετά τη στήλη το δείγμα φτάνει στον ανιχνευτή. Με τον ανιχνευτή γίνεται φανερή η παρουσία καθενός από τα συστατικά του δείγματος και μετριέται η ποσότητα ή η συγκέντρωσή τους μέσα στο φέρον αέριο. Τα κυριότερα χαρακτηριστικά ποιότητας ενός ανιχνευτή είναι η σταθερότητα, η ευαισθησία, η περιοχή γραμμικότητας, δηλαδή ο λόγος του μέγιστου προς το ελάχιστο σήμα για τα οποία η απόκριση είναι ανάλογη του μεγέθους του δείγματος, ο χρόνος απόκρισης και η χημική δραστηριότητα. Στη βιβλιογραφία αναφέρονται πολλοί ανιχνευτές, οι οποίοι όμως ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες από άποψη αρχής λειτουργίας:

- ανιχνευτές που αποκρίνονται στη συγκέντρωση της ουσίας στο φέρον αέριο και
- ανιχνευτές που αποκρίνονται στην ταχύτητα ροής μάζας της ουσίας.



Τυπικό παράδειγμα ανιχνευτών της πρώτης κατηγορίας είναι οι ανιχνευτές θερμικής αγωγιμότητας και της δεύτερης κατηγορίας οι ανιχνευτές ηλεκτρικής αγωγιμότητας, ιονισμού με φλόγα, συλλήψεως ηλεκτρονίων ή ακόμα και το φασματομέτρο μάζας. Πλεονέκτημα των ανιχνευτών ταχύτητας ροής μάζας είναι ότι πραγματοποιείται ακριβέστερος προσδιορισμός ουσιών.<sup>15,17,18</sup>

Στο διαχωρισμό ενώσεων παρομοίου τύπου, αλλά μεγάλης περιοχής πτητικότητας, εάν ο διαχωρισμός γίνει σε σταθερή θερμοκρασία, τα χαμηλού σημεία ζέσεως συστατικά εμφανίζονται πρώτα και το ένα κοντά στο άλλο στο καταγράφημα, ενώ τα λιγότερο πτητικά πολύ αργότερα με κορυφές ασαφείς και μικρού ύψους. Η παραπάνω δυσκολία υπερνικάται αυξάνοντας τη θερμοκρασία βαθμιαία. Αυτό γίνεται σήμερα με τις μονάδες προγραμματιζόμενης θερμοκρασίας, που αποτελούν εξαρτήματα του αέριου χρωματογράφου, οπότε λαμβάνονται αποδεκτές χρωματογραφικά κορυφές.<sup>18</sup>

#### 1.5.1.3. Εφαρμογές αεριοχρωματογραφίας

Η αεριοχρωματογραφία βρίσκει εφαρμογή τόσο στην ανίχνευση όσο και στον προσδιορισμό των ουσιών. Για την ανίχνευσή τους χρησιμοποιείται ως κριτήριο ο χρόνος ανάλυσης. Ο χρόνος ανάλυσης ( $t_R$ ) αποτελεί μία σταθερά εξαρτώμενη από τη φύση της ουσίας για μία καθορισμένη στήλη και καθορισμένες παραμέτρους λειτουργίας της. Άρα ο χρόνος ανάλυσης δεν είναι εφαρμόσιμος για την ταυτοποίηση των ουσιών όταν αλλάζουμε τις συνθήκες της στήλης. Γι' αυτό γίνεται χρήση της μεθόδου του εσωτερικού προτύπου (σταθερή προσθήκη μίας προτύπου ουσίας παρόμοιας χημικής δομής με τις προς ανάλυση ουσίες σε ένα μίγμα ουσιών προς διαχωρισμό), οπότε λαμβάνονται οι σχετικοί χρόνοι ανάλυσης ( $t_{R,R}$ ). Για γνωστές ουσίες, ο προσδιορισμός τους γίνεται από το καταγραφέν χρωματογράφημα. Εάν οι κορυφές είναι στενές και οξείες, το ύψος της κορυφής είναι ανάλογο της ποσότητας της ουσίας, αλλιώς χρησιμοποιείται το εμβαδόν της κορυφής.

Σήμερα, η αεριοχρωματογραφία βρίσκει πληθώρα εφαρμογών για την ανάλυση δειγμάτων, ιδιαίτερα σε συνδυασμό με άλλες αναλυτικές τεχνικές ταυτοποίησης και προσδιορισμού οργανικών και ανόργανων ουσιών. Έτσι, υπάρχουν εμπορικά διαθέσιμα αναλυτικά συγκροτήματα αεριοχρωματογραφίας-φασματομετρίας υπερύθρου ή αεριοχρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας, συνδεδεμένα με ψηφιακούς υπολογιστές που παρέχουν αυτοματισμό λειτουργίας του συγκροτήματος και ποιοτικά και ποσοτικά αποτελέσματα των διαχωριζόμενων ουσιών κατά τη

διάρκεια εκτέλεσης του πειράματος. Χαρακτηριστικά παραδείγματα εφαρμογής της αεριοχρωματογραφίας είναι ο προσδιορισμός φαρμάκων στον ορό και στα ούρα (ανάλυση βιολογικών υγρών αθλητών στους Ολυμπιακούς αγώνες), η ανάλυση εντομοκτόνων, ο προσδιορισμός θερμογόνου δυνάμεως φυσικών αερίων κ.τ.λ.<sup>16,19</sup>

### 1.5.2. Φασματομετρία μάζας

#### 1.5.2.1. Εισαγωγή

Όταν ηλεκτρόνια, σχετικά υψηλής ενεργειακής στάθμης, προσκρούσουν σε μόρια μιας ένωσης, που βρίσκεται σε αέρια φάση και σε συνθήκες υψηλού κενού, τα μόρια της ένωσης μετατρέπονται σε ιόντα με θετικό συνήθως φορτίο. Στη συνέχεια, με τη βοήθεια ηλεκτρικών πεδίων, τα παραχθέντα ιόντα ευθυγραμμίζονται σε λεπτή δέσμη. Η δέσμη διέρχεται μέσω ηλεκτρικού ή μαγνητικού πεδίου, οπότε το κάθε ιόν, ανάλογα με το λόγο μάζα/ηλεκτρικό φορτίο ( $m/z$ ), αποκλίνει από την αρχική κατεύθυνση. Με κατάλληλο ανιχνευτή μπορεί να μετρηθεί το ηλεκτρικό ρεύμα που παρέχουν τα ιόντα με διαφορετικό λόγο  $m/z$ .

Η αναλυτική τεχνική προσδιορισμού της ταυτότητας και της ποσότητας της αρχικής ουσίας από τις πληροφορίες που παρέχει το φάσμα μαζών της ονομάζεται φασματομετρία μάζας (MS). Η μορφή του φάσματος μαζών, που λαμβάνεται κάτω από αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες, είναι χαρακτηριστική της αρχικής ουσίας και χρησιμοποιείται για την ταυτοποίησή της. Τα κύρια πλεονεκτήματα της φασματομετρίας μάζας είναι η αυξημένη ευαισθησία της, σε σύγκριση με άλλες αναλυτικές τεχνικές, και η υψηλή εξειδίκευσή της κατά τον προσδιορισμό της ταυτότητας ουσιών ή την επιβεβαίωση της παρουσίας υπόπτων ουσιών. Ως μειονεκτήματα της φασματομετρίας μάζας μπορεί να θεωρηθούν το συγκριτικά μεγάλο κόστος των απαιτούμενων οργάνων, το μεγάλο κόστος λειτουργίας και συντηρήσής τους, και ο μεγάλος βαθμός εξειδίκευσης του χρήστη για το χειρισμό των σχετικών συσκευών και την ορθή ερμηνεία των φασμάτων μαζών.<sup>20,21</sup>

#### 1.5.2.2. Οργανολογία

Το φασματόμετρο μάζας αποτελείται από τα εξής τμήματα:

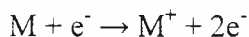
- σύστημα εισαγωγής δείγματος
- πηγή ιόντων
- αναλυτήρα μάζας και

- ανιχνευτή.

Εκτός απ' αυτά τα τμήματα, κάθε φασματόμετρο μάζας περιλαμβάνει και συστήματα δημιουργίας κενού, καθώς και συστήματα παρουσιάσης των φασμάτων, όπως π.χ. καταγραφείς και παλμογράφους. Τα σύγχρονα φασματόμετρα μαζών περιλαμβάνουν ηλεκτρονικό υπολογιστή, τόσο για τον κεντρικό έλεγχο της λειτουργίας τους, όσο και για την ταχεία επεξεργασία, παρουσίαση και ερμηνεία του φάσματος. Παρακάτω αναφέρεται συνοπτικά η αρχή λειτουργίας κάθε επιμέρους τμήματός του και οι πλέον συνηθισμένοι τύποι του.<sup>22</sup>

Το φασματόμετρο μάζας απαιτεί ένα σύστημα εισαγωγής δείγματος διότι το δείγμα χρειάζεται προετοιμασία για εισαγωγή στο χώρο ιονισμού κάτω από συνθήκες σταθερής ροής και σε αέρια πάντοτε κατάσταση. Το δοχείο δείγματος είναι υπό πίεση της τάξεως του  $10^{-2}$  Torr. Με κατάλληλο στόμιο εισαγωγής, το αέριο δείγμα εισάγεται σε ενδιάμεσο χώρο με ακόμη μικρότερη πίεση ( $10^{-5}$  Torr). Τέλος, με σταθερή παροχή οδηγείται στο χώρο ιονισμού, όπου επικρατεί ακόμη μικρότερη πίεση ( $10^{-7}$  Torr), ώστε να αποφεύγονται οι συγκρούσεις μεταξύ των ιόντων.<sup>21</sup>

Η παραγωγή ιόντων χαρακτηριστικών της υπό προσδιορισμό ουσίας πραγματοποιείται στην πηγή ιόντων με μονομοριακές (πρόσκρουση ηλεκτρονίων, ιονισμός με πεδίο) ή διμοριακές (χημικός ιονισμός) τεχνικές. Στην περίπτωση της πηγής ιονισμού με πρόσκρουση ηλεκτρονίων, το ρεύμα των μορίων της ένωσης M, που εισάγεται στην πηγή, βομβαρδίζεται με δέσμη ηλεκτρονίων μεγάλης κινητικής ενέργειας, στην περιοχή των 10-70 eV. Κατά την πορεία τους, τα ηλεκτρόνια συγκρούονται με μερικά από τα μόρια της ένωσης M, οπότε παράγονται θετικά μοριακά ιόντα (κατιοντικές ρίζες), σύμφωνα με την αντίδραση:



Όλα τα παραγόμενα ιόντα αρχικά έχουν τυχαίες κατευθύνσεις, το ισχυρότερο όμως ηλεκτρικό πεδίο προκαλεί σύγκλιση των ιόντων σε μια λεπτή ταινιωτή δέσμη με ελάχιστη απόκλιση, κατάλληλη για να υποστεί ανάλυση στον αναλυτή μαζών.

Το ιόν  $M^+$  ονομάζεται μοριακό ιόν της ένωσης M. Τα μοριακά ιόντα περιέχουν ασύζευκτο ηλεκτρόνιο και συνεπώς είναι ιόντα-ρίζες. Όταν η ενέργεια ιονισμού είναι χαμηλή (6 έως 8 eV), πετυχαίνεται σχεδόν αποκλειστική παραγωγή μοριακών ιόντων. Τα φάσματα μαζών, που προκύπτουν κάτω από αυτές τις συνθήκες, παρουσιάζουν έντονη κορυφή του ιόντος  $M^+$  και χρησιμεύουν για τον ακριβή υπολογισμό του μοριακού βάρους της ένωσης.

Από τη συνολική ποσότητα της ένωσης, που θα εισέλθει στην πηγή ιόντων, μόνο ένα μικρό ποσοστό (της τάξεως του 1%) μετατρέπεται σε ιόντα. Το ποιες αντιδράσεις θα πραγματοποιηθούν και σε ποιο ποσοστό, εξαρτάται, τόσο από τη φύση της ένωσης, όσο και από την ενέργεια ιονισμού. Όσο μεγαλύτερο είναι το μόριο, τόσο μεγαλύτερη ποικιλία ιόντων-θραυσμάτων αναμένεται.

Στην περίπτωση της πηγής χημικού ιονισμού, η πηγή περιέχει ένα «αντιδραστήριο αέριο», συνήθως μεθάνιο, με μεγάλη σχετικά πίεση (περίπου 1 Torr). Η παραγωγή ιόντων γίνεται σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο, το «αντιδραστήριο αέριο», που βρίσκεται σε χιλιαπλάσια περίπου περίσσεια, ως προς τη μετρούμενη ένωση M, αντιδρά με τα ηλεκτρόνια και παράγει ιόντα. Στο δεύτερο στάδιο πολλά από τα παραγόμενα ιόντα, που είναι ισχυροί δότες πρωτονίων, αντιδρούν με αποτέλεσμα την εμφάνιση κορυφών M+1 και αντίστοιχα, τα παραγόμενα ιόντα που δεν έχουν ισχυρά πυρηνόφιλα κέντρα μπορούν να οδηγήσουν σε απόσπαση πρωτονίων, με αντίστοιχη εμφάνιση κορυφών M-1.

Οι πηγές χημικού ιονισμού προκαλούν μικρότερη, σε ποσοστό, θραύση στα μόρια, δίνοντας κυρίως κορυφές ιόντων M+1. Το μικρό ποσοστό θραύσης συνεπάγεται μεγαλύτερη ευαισθησία, γιατί η διαδικασία ιονισμού επικεντρώνεται κυρίως στο μοριακό ιόν. Τα φάσματα χημικού ιονισμού παρέχουν άμεση πληροφόρηση για το μοριακό βάρος της ουσίας και είναι περισσότερο χρήσιμα για την ανάλυση μιγμάτων ουσιών. Υπάρχουν και άλλα είδη πηγής ιονισμού, όπως η πηγή ιονισμού με σπινθήρα και η πηγή ιονισμού με πεδίο.<sup>22-24</sup>

Ο αναλυτήρας μάζας χρησιμεύει σε ότι και ο μονοχρωμάτορας στα φασματοφωτόμετρα οπτικών τεχνικών. Η βασική λειτουργία του σε ένα φασματομέτρο μάζας είναι να διαχωρίσει τα ιόντα, που παράγονται στην πηγή ιόντων, ανάλογα με τις διαφορετικές τιμές των λόγων m/z. Ο διαχωρισμός είναι απαραίτητος έτσι ώστε το μετρούμενο ιονικό ρεύμα στον ανιχνευτή ιόντων, που ακολουθεί τον αναλυτήρα μάζας, να αντιστοιχεί σε ιόντα με συγκεκριμένο λόγο m/z. Από τον τύπο του αναλυτήρα μάζας εξαρτάται η διαχωριστική ικανότητα του οργάνου, που είναι το σπουδαιότερο χαρακτηριστικό ποιότητας ενός φασματομέτρου μάζας. Η διαχωριστική ικανότητα (R) ορίζεται από τη σχέση:

$$R = m/\Delta m$$

όπου m και m + Δm αντιστοιχούν σε λόγους m/z με κορυφές ικανοποιητικά διαχωρισμένες. Κατά συνθήκη, ικανοποιητικός διαχωρισμός θεωρείται ότι

πετυχαίνεται, όταν οι περίπου ισοϋψείς κορυφές επικαλύπτονται σε ύψος, που δεν υπερβαίνει το 10% του ύψους των κορυφών.<sup>21</sup>

Τα φασματόμετρα μάζας διακρίνονται σε φασματόμετρα χαμηλής και υψηλής διαχωριστικής ικανότητας. Με τα πρώτα, που έχουν διαχωριστική ικανότητα από 100 ως 1000, τα διάφορα ιόντα διακρίνονται με βάση την ονομαστική μάζα, που αντιστοιχεί στην πλησιέστερη ακέραιη τιμή προς το μοριακό τους βάρος. Με τα φασματόμετρα υψηλής διαχωριστικής ικανότητας όμως ( $R = 10^4$ - $10^5$ ) μπορούν να διαχωριστούν ιόντα με ίδια ονομαστική μάζα, αλλά με διαφορετικές τιμές ακριβούς μάζας, που διαφέρουν στο τρίτο ή στο τέταρτο δεκαδικό ψηφίο.

Η κύρια διαφορά μεταξύ των φασματόμετρων μάζας έγκειται στους αναλυτήρες που χρησιμοποιούν για τον διαχωρισμό των ιόντων.

Οι συνηθέστεροι τύποι αναλυτήρων μάζας είναι:

- αναλυτήρες απλής εστίασης με μαγνητική εκτροπή
- αναλυτήρες διπλής εστίασης
- τετραπολικοί αναλυτήρες μάζας και
- αναλυτήρες χρόνου πτήσεως.

Ο ανιχνευτής ιόντων παράγει στην έξοδό του ηλεκτρικό σήμα (συνήθως ηλεκτρικό ρεύμα) ανάλογο του αριθμού ιόντων και του φορτίου τους, που δέχεται στην είσοδό του στη χρονική μονάδα. Οι συνηθέστεροι τύποι ανιχνευτών είναι:

- φαρανταϊκό κύπελλο
- ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής και
- φωτογραφική πλάκα.<sup>20,21</sup>

#### 1.5.2.3. Εφαρμογές φασματομετρίας μάζας

Οι κυριότερες εφαρμογές της φασματομετρίας μάζας είναι ο προσδιορισμός της ταυτότητας και η εύρεση του τύπου των οργανικών κυρίως ενώσεων. Το φάσμα μαζών μιας ένωσης (θραυσματογράφημα μάζας) αποτελεί το «δακτυλικό αποτύπωμα» της, γιατί το μόριο της κάθε ένωσης θραύεται και ιονίζεται στο φασματόμετρο μάζας με τέτοιο τρόπο, ώστε να παρέχει πληροφορίες για τη δομή μίας ένωσης. Η εξαιρετικά μικρή ποσότητα δείγματος, ( $10^{-6}$ - $10^{-9}$  g) που απαιτείται στη φασματομετρία μάζας για τον προσδιορισμό της ταυτότητας αλλά και για το προσδιορισμό της ποσότητας σε ορισμένες περιπτώσεις, καθιστά την τεχνική αυτή



ιδιαίτερα πολύτιμη σε βιοχημικές μελέτες, που συνήθως διεξάγονται σε απειροελάχιστες ποσότητες ουσιών.

Συχνά πριν από τον προσδιορισμό της ταυτότητας, τη μελέτη δομής και τον προσδιορισμό της ποσότητας, σχηματίζονται παράγωγα των ενώσεων με διάφορα αντιδραστήρια με σκοπό την αύξηση της πτητικότητας, το σχηματισμό θραυσμάτων που αντιστοιχούν σε τιμές  $m/z$  που δεν παρεμποδίζονται από άλλες ενώσεις του δείγματος και στη βελτίωση των χρωματογραφικών χαρακτηριστικών των ενώσεων, στην περίπτωση της τεχνικής GC/MS.

Η φασματομετρία μάζας αποκτά ολοένα και περισσότερο ενδιαφέρον στην ιατρική και φαρμακευτική επιστήμη. Ο προσδιορισμός της ταυτότητας και της ποσότητας φαρμάκων, μεταβολιτών, τοξινών, ναρκωτικών και δηλητηρίων είναι πεδίο εφαρμογής της τεχνικής. Η χρήση θραυσματογραφημάτων μάζας των βιολογικών υγρών μπορεί επίσης να αποδειχθεί χρήσιμη στη διάγνωση ασθενειών, αφού η διατάραξη των ισορροπιών των βιοχημικών αντιδράσεων, που προκαλούν οι ασθένειες, αλλάζει χαρακτηριστικά τη μορφή του φάσματος μάζας.<sup>20-22</sup>

### 1.5.3 Συνδυασμός φασματομετρίας μάζας και αέριας χρωματογραφίας

Το φασματόμετρο μάζας δρα ως ανιχνευτής εξαιρετικής εκλεκτικότητας για τον αεριοχρωματογράφο. Ο αναλυτήρας μάζας του φασματόμετρου μάζας ρυθμίζεται έτσι ώστε να επιτρέπει την ανίχνευση ιόντος με προκαθορισμένη τιμή  $m/z$ , οπότε πλέον το χρωματογράφημα παρέχει χρωματογραφικές κορυφές μόνο για τις ουσίες που παρέχουν το συγκεκριμένο ιόν. Η συνδυασμένη τεχνική GC/MS γίνεται περισσότερο αποδοτική, όταν η όλη διάταξη ελέγχεται από ηλεκτρονικό υπολογιστή. Στην περίπτωση αυτή ο αναλυτήρας μάζας δε ρυθμίζεται σε μία μόνο τιμή  $m/z$ , αλλά προγραμματίζεται να αλλάζει ταχύτατα διαδοχικές τιμές  $m/z$ , από ένα πίνακα τιμών που έχει ορίσει ο χρήστης. Σε κάθε νέα τιμή  $m/z$ , ο υπολογιστής καταχωρεί το αντίστοιχο σήμα από τον ανιχνευτή, που αντιστοιχεί σε δεδομένο χρόνο κατακρατήσεως. Μετά την πλήρη έκλυση όλων των συστατικών του αναλυόμενου μίγματος, ο χρήστης μπορεί να ζητήσει από τον υπολογιστή να αναπαραγάγει το χρωματογράφημα, που αντιστοιχεί σε κάθε τιμή  $m/z$ .<sup>20</sup>

Για την ανάλυση ουσιών με χρήση της αεριοχρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας έχουν κατασκευαστεί τα τελευταία χρόνια φασματόμετρα υψηλής διαχωριστικής ικανότητας (High Resolution Gas Chromatography Mass

Spectrometry, GC/HRMS). Στο φασματόμετρο μάζας στην GC/HRMS, ο ανιχνευτής μάζας αποτελείται από ένα συνδυασμό δυο ηλεκτρικών και ενός μαγνητικού πεδίου. Τέτοια όργανα έχουν αναλυτική ικανότητα  $R$  (resolution) της τάξης του 10.000-100.000 και ακρίβεια στη μέτρηση μαζών της τάξης των 2-5 ppm. Γι' αυτό και ονομάζονται Φασματόμετρα Μάζας Υψηλής Διαχωριστικής Ικανότητας. Έτσι για παράδειγμα ένα τέτοιο όργανο με  $R=100.000$  θα μπορούσε να διακρίνει την ένωση  $C_{24}H_{19}N$  με μάζα 321,1517 Da από την ένωση  $C_{21}H_{23}SN$  με μάζα 321,1551 Da.<sup>25</sup>

#### 1.5.4 Μέθοδοι παραγωγοποίησης

##### 1.5.4.1. Εισαγωγή

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

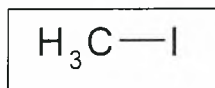
- αυξάνεται η πτητικότητα και η σταθερότητα
- μειώνεται η παρουσία των πολικών ομάδων -OH, -NH-, -SH
- στοχεύονται δραστικές ομάδες O,S,N,P
- αυξάνεται η ανιχνευσιμότητα, π.χ. στα στεροειδή.

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

- Αλκυλίωση
- Ακυλίωση
- Συμπύκνωση
- Τριμεθυλοσιλανοποίηση.<sup>26</sup>

#### 1.5.4.2. Αλκυλίωση

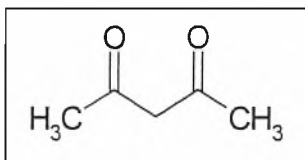
Η αλκυλίωση μειώνει την πολικότητα των μορίων αντικαθιστώντας ενεργά υδρογόνα με αλκυλομάδες. Αυτά τα χημικά αντιδραστήρια χρησιμοποιούνται για την τροποποίηση ενώσεων με όξινα υδρογόνα όπως είναι τα καρβοξυλικά οξέα και οι φαινόλες. Η αντίδραση αλκυλίωσης οδηγεί σε αιθέρες, εστέρες, αλκυλικές αμίνες και αλκυλικά αμίδια. Τα αντιδραστήρια αλκυλίωσης είναι κυρίως αλκυλοβρωμίδια ή ιωδίδια, π.χ. μεθυλοιωδίδιο ( $\text{CH}_3\text{I}$ , Σχήμα 1.13).



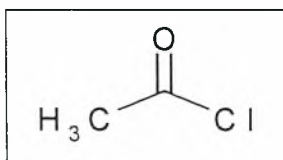
Σχήμα 1.13 Μεθυλοιωδίδιο

#### 1.5.4.3. Ακυλίωση

Τα ακυλο-παράγωγα σχηματίζονται με ακυλο-αλογονίδια, ανυδρίτες οξέων κ.α. (οξικός ανυδρίτης ( $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_3$ , Σχήμα 1.14), ακετυλοχλωρίδιο ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{OCl}$ , Σχήμα 1.15). Σχηματίζουν όμως και όξινα παραπροϊόντα, τα οποία πρέπει να απομακρυνθούν πριν την αεριοχρωματογραφική ανάλυση, γιατί καταστρέφουν την στήλη. Οι ακυλίωσεις πραγματοποιούνται σε πυριδίνη, τετραϋδροφουράνιο, ή κάποιο όξινο διαλύτη ικανό να δεχτεί το υποπροϊόν οξέος που παράγεται. Οι αμίνες μπορούν να δράσουν ως καταλύτες στις αντιδράσεις ακυλίωσης.



Σχήμα 1.14. Οξικός ανυδρίτης



Σχήμα 1.15. Ακετυλοχλωρίδιο

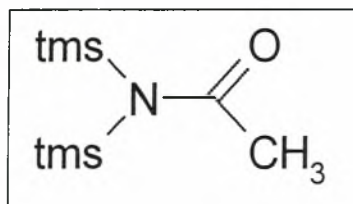


#### 1.5.4.4. Συμπύκνωση

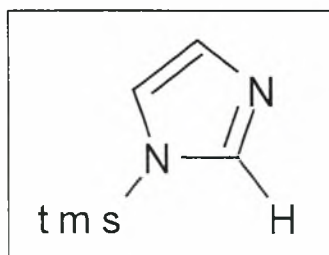
Η συμπύκνωση είναι η αντίδραση ένωσης δύο μορίων μιας χημικής ένωσης με ταυτόχρονη αφυδάτωση. Η εστεροποίηση ενός οξέος με μία αλκοόλη είναι ένα είδος συμπύκνωσης. Επίσης, η εστεροποίηση διολών με αλκανο-βορονικά οξέα ανήκει στην κατηγορία της συμπύκνωσης.<sup>26,27</sup>

#### 1.5.4.5. Τριμεθυλοσιλανοποίηση

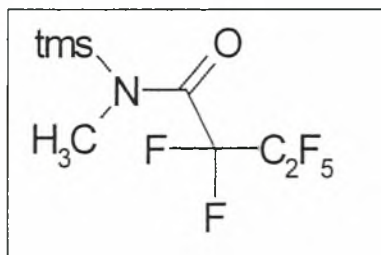
Η τριμεθυλοσιλανοποίηση, η εισαγωγή δηλαδή της ομάδας TMS ( $-\text{Si}-(\text{CH}_3)_3$ ) στη θέση του ενεργού υδρογόνου των χαρακτηριστικών ομάδων που περιέχουν οι ενώσεις, είναι η πιο κατάλληλη μέθοδος παραγωγοποίησης για την αέρια χρωματογραφία και τη GC/MS. Τα πρώτα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα τριμεθυλοσιλάνια, αργότερα οι TMS-αμίνες, οι TMS-εστέρες των οργανικών οξέων, τα TMS-αμίδια και πιο συχνά οι TMS-εστέρες των ανόργανων οξέων. Γενικά στον έλεγχο doping χρησιμοποιείται το N-TMS-αμίδιο στο οποίο συχνά προστίθεται ένας καταλύτης. Το πρώτο αντιδραστήριο σιλανοποίησης που παρασκευάστηκε ήταν το BSA (σχήμα 1.16.) το 1963. Ακολούθησε το TMSI το 1965 (σχήμα 1.17.) και άλλα, όπως το BSTFA το 1968 και το MSTFA το 1969 (σχήμα 1.18.).



**Σχήμα 1.16.** N,N-Bis-τριμεθυλοσιλυλο- ακεταμίδιο (BSA, 1965)

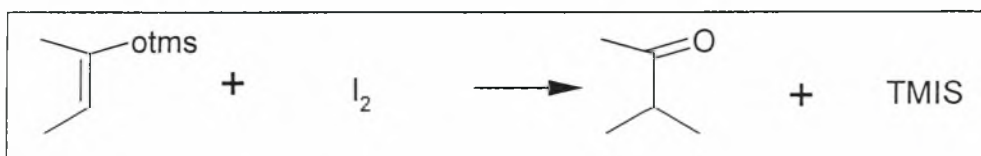


**Σχήμα 1.17.** N-τριμεθυλοσιλυλο-ιμιδαζόλιο (TMSI, 1965)



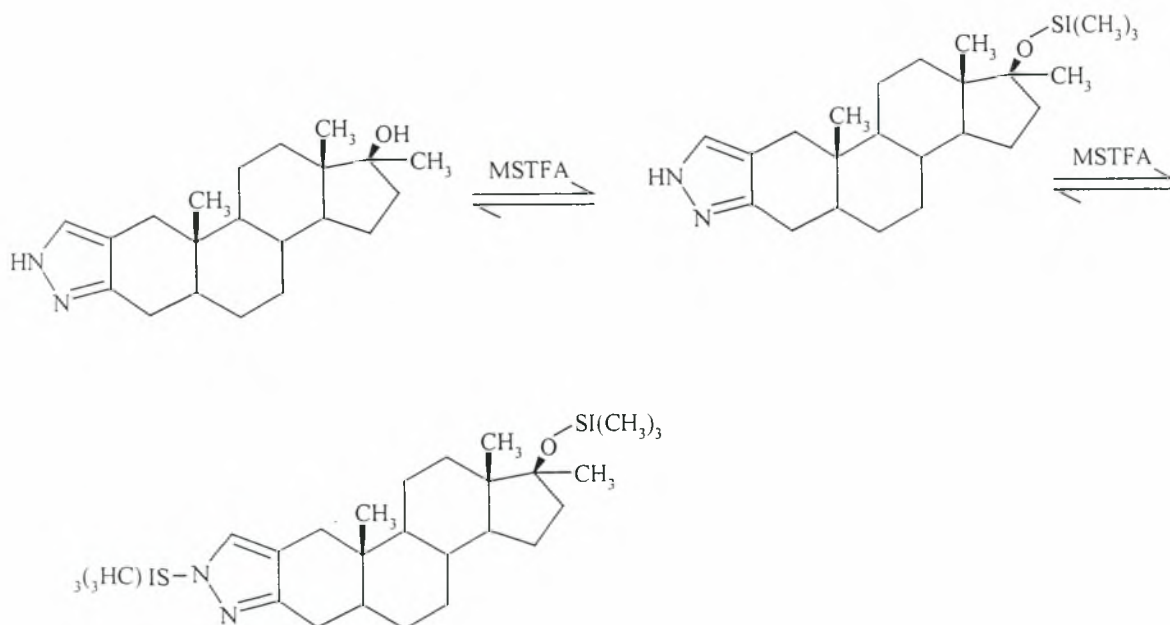
**Σχήμα 1.18.** N-μεθυλο-N-τριμεθυλοσιλυλο-τριφθορο-ακεταμίδιο (MSTFA, 1969)

Σήμερα, το BSTFA και το MSTFA είναι οι πιο σημαντικοί και οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενοι παράγοντες παραγωγοποίησης. Το MSTFA μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αντιδραστήριο παραγωγοποίησης όλων των πρωτικών ομάδων και έναντι άλλων ανάλογων αντιδραστηρίων παρουσιάζει το πλεονέκτημα ότι τόσο το ίδιο το MSTFA όσο και τα παραπροϊόντα του είναι πολύ πτητικές ενώσεις. Επίσης, το MSTFA μπορεί να χρησιμοποιηθεί χωρίς διαλύτη διότι λόγω της υψηλής πολικότητας του διαλύει εύκολα ακόμα και ισχυρά πολικές ομάδες. Η ικανότητα σιλιανοποίησης του MSTFA μπορεί να αυξηθεί χρησιμοποιώντας σαν καταλύτη τριμεθυλο-ιωδο-σιλάνιο (TMSI) ή ιωδιούχο αμμώνιο ( $\text{NH}_4\text{I}$ ). Χρησιμοποιώντας όμως το TMSI ή  $\text{NH}_4\text{I}$  σαν καταλύτη λαμβάνουν χώρα ανεπιθύμητες αντιδράσεις ιωδίωσης των προς ανάλυση ουσιών (**Αντίδραση 1.1**).

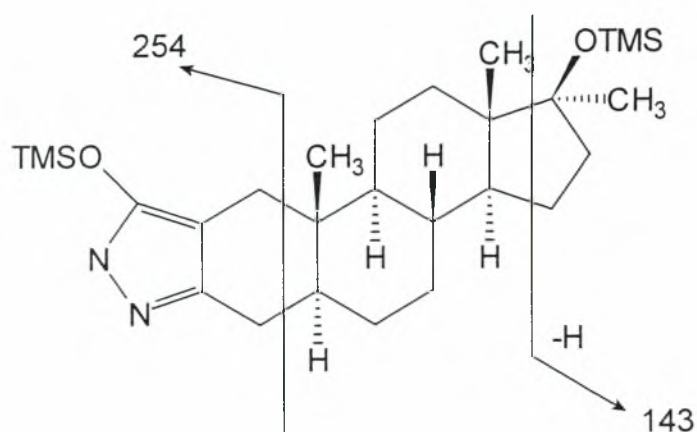


**Αντίδραση 1.1.** Αντίδραση Ιωδίωσης σιλιανοποιημένου ενολο-παραγώγου.

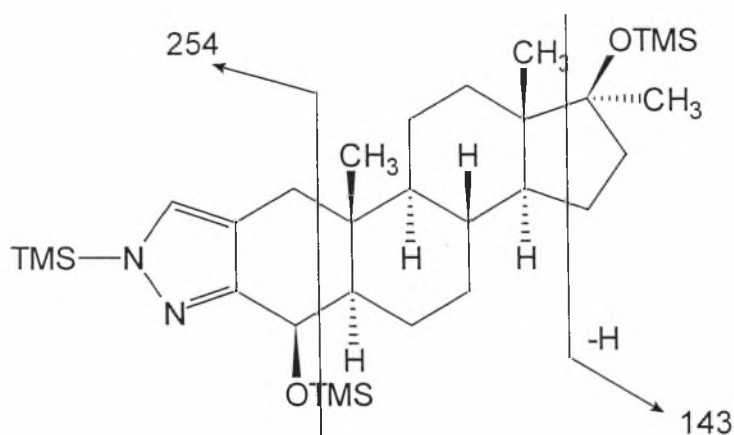
Οι αντιδράσεις αυτές όμως μπορούν να παρεμποδιστούν με τη προσθήκη θειολών (π.χ. διθειοερυθρίτολη DTE), οι οποίες ανάγουν το ιώδιο που παράγεται στο διάλυμα του MSTFA και του TMSI. Στο παρακάτω σχήμα (1.19.) δίνεται η αντίδραση παραγωγοποίησης της στανοζολόλης. Εφόσον πραγματοποιηθεί η αντίδραση αυτή, τα δείγματα αναλύονται με την μέθοδο HPLC και έτσι ανιχνεύονται τα ιόντα στα οποία διασπάται κάθε ένας από τους τρεις κύριους μεταβολίτες της στανοζολόλης (σχήματα 1.20, 1.21 και 1.22).<sup>28</sup>



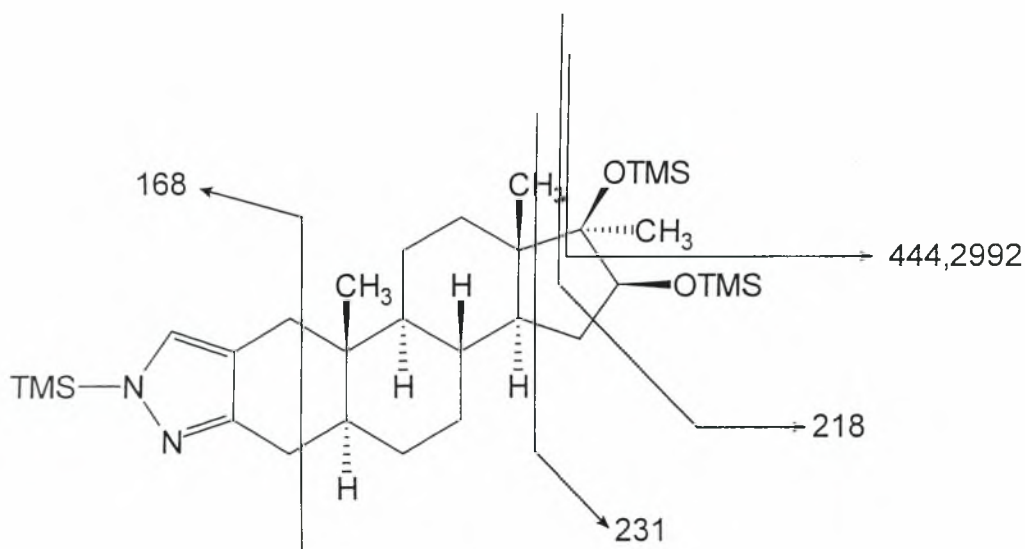
**Σχήμα 1.19.** Αντίδραση παραγωγοποίησης του στεροειδούς στανοζολόλη.



**Σχήμα 1.20:** Διαγνωστικά ιόντα για την 3'-υδροξυστανοζολόλη (II)



Σχήμα 1.21: Διαγνωστικά ιόντα για την 4β-υδροξυστανοζολόλη (IV)



Σχήμα 1.22: Διαγνωστικά ιόντα για την 16β-υδροξυστανοζολόλη

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ- ΠΟΡΕΙΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

### 2.1 Αντιδραστήρια

#### 2.1.1 Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7.0.

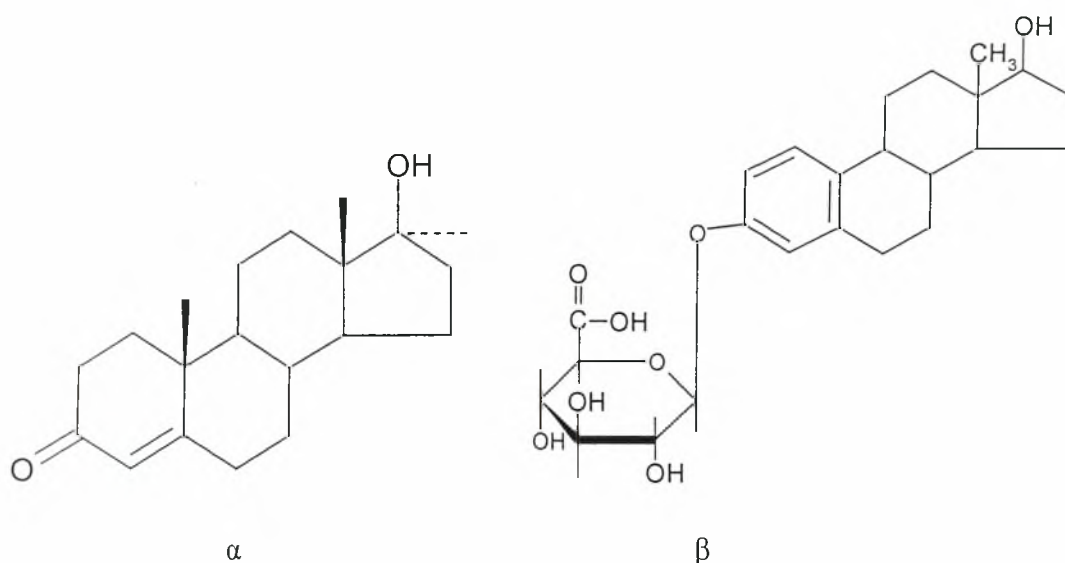
Για την παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος ως ουσίες επιλέγονται το όξινο φωσφορικό κάλιο ( $K_2HPO_4$ ) και δισόξινο φωσφορικό κάλιο ( $KH_2PO_4$ ). Ζυγίζονται 32.4 g όξινου φωσφορικού καλίου και 13.5 g δισόξινου φωσφορικού καλίου, τα

οποία μεταφέρονται σε υάλινη φιάλη των 250 mL με βιδωτό πώμα και προστίθεται 250 mL απεσταγμένου νερού. Στη συνέχεια το μίγμα θερμαίνεται ήπια, υπό μαγνητική ανάδευση, σε θερμοαντήρα για 10 λεπτά. Όταν η φιάλη αποκτήσει θερμοκρασία δωματίου ρυθμίζεται το pH στην τιμή 7.0.

2.1.2 Ένζυμο β-Γλυκουρονιδάση από E. Coli.

2.1.3 Πρότυπο διάλυμα μίγματος εσωτερικών προτύπων Μεθυλοτεστοστερόνης 5ppm/ Γλυκουρονιδίου της Εστραδιόλης 20 ppm.

Για την παρασκευή του πρότυπου διαλύματος μεταγγίζονται 625  $\mu$ L διαλύματος μεθυλοτεστοστερόνης 200 ppm και 175  $\mu$ L διαλύματος γλυκουρονικού εστέρα της οιστραδιόλης 5000 ppm σε ογκομετρική φιάλη των 25 mL. Οι χημικές δομές της μεθυλοτεστοστερόνης και του γλυκουρονικού εστέρα της οιστραδιόλης φαίνονται στο σχήμα 2.1.



**Σχήμα 2.1.** α. Μεθυλο-τεστοστερόνη  $C_{20}H_{30}O_2$ , β. Γλυκουρονικός εστέρας της οιστραδιόλης.

2.1.4 Στερεό ρυθμιστικό μίγμα ανθρακικών, ( $NaHCO_3$ : $Na_2CO_3$  10:1 w/w).

2.1.5 Άνυδρο θειικό νάτριο ( $Na_2SO_4$ ), καθαρότητας 99.0%.

2.1.6 Διαιθυλαιθέρας [ $(C_2H_5)_2O$ ], καθαρότητας 99.5%.

2.1.7 Μίγμα παραγωγοποίησης MSTFA/ $NH_4I$ /DTE, 1000:2:4 (v/w/w).

Για την παρασκευή του αναμιγνύονται 200 mg ιωδιούχου αμμωνίου ( $NH_4I$ ), 400 mg διθειοερυθριτόλης (DTE) σε 100 mL N-μέθυλο-N-τριμέθυλο-σίλυλο-τρίφθορο-ακεταμιδίου (MSTFA).

2.1.8 Διάλυμα ελέγχου CALMIX 10.

Για την παρασκευή του διαλύματος ελέγχου CALMIX 10 επιλέγονται τα διαλύματα Δ266, Δ267, Δ310, Δ395, Δ396 και Δ415, των οποίων η περιεκτικότητα σε πρότυπες ουσίες καθώς και οι τελικές συγκεντρώσεις των ουσιών αυτών αναφέρονται στους πίνακες 2.1 έως 2.6. Έτσι, προστίθενται 200 μL από τα διαλύματα Δ266, Δ267, Δ310, Δ396, Δ415 και 2000 μL από το διάλυμα Δ395 σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και προστίθενται ούρα ενήλικα μέχρι την χαραγή της ογκομετρικής φιάλης. Έπειτα η ογκομετρική φιάλη αναδεύεται σε μαγνητικό αναδευτήρα για 30 λεπτά και αφού παραμείνει στον εργαστηριακό πάγκο για 2 ώρες μεταφέρεται το περιεχόμενο της σε υάλινο ποτηράκι των 250 mL. Το διάλυμα αυτό μοιράζεται σε πλαστικούς σωλήνες RIA, σε κάθε έναν από τους οποίους μεταγγίζονται 5 mL.

2.1.9 Δείγμα ελέγχου Δ847U.

Αρχικά παρασκευάζεται το διάλυμα Δ463 σύμφωνα με τον πίνακα 2.7. Η συγκέντρωση σε prb αναφέρεται στην τελική συγκέντρωση των προτύπων διαλυμάτων στο μεθανολικό διάλυμα. Αφού παρασκευαστεί το διάλυμα Δ463 μεταφέρονται 2.0 mL από αυτό σε ογκομετρική φιάλη όγκου 100 mL και προστίθεται ούρα ενήλικα μέχρι την χαραγή της ογκομετρικής φιάλης. Έπειτα, η ογκομετρική φιάλη αναδεύεται σε μαγνητικό αναδευτήρα για 30 λεπτά και αφού παραμείνει στον εργαστηριακό πάγκο για 2 ώρες μεταφέρεται το περιεχόμενο της σε καθαρό υάλινο ποτήρι των 250 mL. Από το διάλυμα αυτό μεταγγίζονται από 5 mL σε κάθε πλαστικό σωλήνα RIA.

**Πίνακας 2.1** Συγκεντρώσεις ουσιών προτύπου διαλύματος Δ266.

ΟΥΣΙΑ	C <sub>CAL</sub> (ppm)
Zeranol	5
19-norandrestolone (Nandrolone mt )	5
19-noretiocholanolone (Nandrolone mt )	5
Salbutamol	5
4-OH-Testosterone-acetate	5
17α-methyl-5β-androstane-3α-,17β-diol (Methyltestosterone mt)	5
Epimetendiol (Methandienone mt )	5
Formoterol	5
Formestane	5
18-nor-17,17-dimethyl-fluoxymesterone (Fluoxymesterone mt)	5
9α-F-17α-methyl-androst-4-ene-3α, 6β, 11β, 17β-tetrol (Fluoxymesterone mt)	5
3'-OH-Stanozolol (Stanozolol mt )	5
2-OH-methyl-17α-methyl-androstan-6,11α,17β-triol (OH-	5

Formebolone)	
6- $\alpha$ -OH-androsten(4)dione	5
6- $\beta$ -OH-Methendione	5
Mibolerone	5
17-ethyl-5b-estran-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol(Norethandrolone mt)	5
Salmeterol	5
Aminoglutethimide	5

**Πίνακας 2.2** Συγκεντρώσεις ουσιών προτύπου διαλύματος Δ267.

ΟΥΣΙΑ	C <sub>CAL</sub> (ppm)
Oxandrolone	5
5 $\beta$ -androst-1-en-17 $\beta$ -ol-3-one(Boldenone mt)	5
17 $\alpha$ -ethyl-5 $\beta$ -estrane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol(Norethandrolone mt)	5
Oxymesterone	5
Fenoterol	5
Ethisterone	5
Terbutaline	5
Clenbuterol	5
17 $\alpha$ -methyl-5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol(Methyltestosterone mt)	5
6 $\beta$ -OH-4-CI-dexydromethyltestosterone(Oral Turinabol mt)	5
16 $\beta$ -OH-Furanazol (Furanazol mt)	5
Calusterone	5
7 $\beta$ ,17 $\alpha$ -dimethyl-5 $\beta$ -androstan-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol(Calusterone mt)	5
13 $\beta$ -17 $\alpha$ -diethyl-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -dihydroxy-5 $\alpha$ -gonane(Norbolethone mt)	5
13 $\beta$ -17 $\alpha$ -diethyl-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -dihydroxy-5 $\beta$ -gonane(Norbolethone mt)	5
Formoterol	5
Tetrahydrogestrinone	5

**Πίνακας 2.3** Συγκεντρώσεις ουσιών προτύπου διαλύματος Δ310.

ΟΥΣΙΑ	C <sub>CAL</sub> (ppm)
Benzoyl Ecgonine (Cocaine mt)	5
Boldenone PC	5
Methenolone PC	5
Furazabol PC	5
16 $\beta$ -OH-Stanozolol	5
Bambuterol	5
2 $\alpha$ -methyl-5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ -ol-17-one (Drostanolone mt)	5
17-epimethandienone ( )	5
Epioxandrolone	5
7 $\alpha$ -17 $\alpha$ -dimethyl-5 $\beta$ -androstan-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol (Bolasterone mt)	5
17-ethyl-5 $\alpha$ -estran-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol (Norethandrolone mt)	5
1 $\alpha$ -methylen-5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ -ol-17-one (Methenolone mt)	5
1 $\alpha$ -methyl-5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ -ol-17-one (Methenolone mt)	5
4-chloro-4-androstene-3 $\alpha$ -ol-17-one(Clostebol mt)	5
Gestrinone	5
Bolasterone pc	5



**Πίνακας 2.4** Συγκεντρώσεις ουσιών προτύπου διαλύματος Δ395.

ΟΥΣΙΑ	C <sub>CAL</sub> (ppm)
Acebutolol	25
Alprenolol	25
Atenolol	25
Bisoprolol	25
Bunolol	25
Betaxolol	25
Carteolol	25
Carvedilol	25
Celiprolol	25
Esmolol	25
Labetalol	25
Lenobunolol	25
Metipranolol	25
Metoprolol	25
Nadolol	25
Oxprenolol	25
Penbutolol	25
Pindolol	25
Propranolol	25
Sotalol	25
Timolol	25
Pemoline	25
Amiloride	13
Cloramide	13
Triamterene	13
Buprenorphine	10
Benzoyl Ecgonine	25
Probenecid	13
Codeine	25
Oxycodone	10
Hydromorphone	10
Amiphenazole	25

**Πίνακας 2.5** Συγκεντρώσεις ουσιών προτύπου διαλύματος Δ396.

ΟΥΣΙΑ	C <sub>CAL</sub> (ppm)
Androsterone	5
Etiocholanolone	5
5a-Androstane diol	5
5b- Androstane diol	5
Testosterone	5
Epitestosterone	5
DHT	5
DHEA	5
Androstene-4-dione	5



**Πίνακας 2.6** Συγκεντρώσεις ουσιών προτύπου διαλύματος Δ415

ΟΥΣΙΑ	C <sub>CAL</sub> (ppm)
Tramcinolone	15
Hydroxyprednisolone	15
Prednisolone	15
Fludrocortisone	15
Prednisone	15
Methylprednisolone	15
Dexamethasone	15
Flumethasone	15
Beclomethasone	15
Fluocortolone	15
Triamcinolone acetonide	5
Trenbolone	15
Desonide	15

**Πίνακας 2.7** Συγκεντρώσεις ουσιών προτύπου διαλύματος Δ463

ΟΥΣΙΑ	C <sub>CAL</sub> ppb σε 25 mL
19 Norandrosterone	100
19 Noretiocholanolone	50
17α-methyl-5α-androstan-3α,17β diol	50
17α-methyl-5β-androstan-3α,17β diol	50
Clenbuterol	50
4β -hydroxystanozolol	100
3'-OH-Stanozolol	100
Epimethendiol	50
18-nor-17, 17 dimethyl-5β-androst-1,13 dien-3α -ol	100
buprenorpnine	500

2.1.10 Δείγμα ελέγχου ευαισθησίας και βαθμονόμησης Δ471U.

Για την παρασκευή του δείγματος ελέγχου Δ471U παρασκευάζονται τα διαλύματα Δ312 και Δ414 σύμφωνα με τους πίνακες 2.8 και 2.9 αντίστοιχα. Το διάλυμα Δ312 παρασκευάζεται σε ογκομετρική φιάλη των 25 mL, όπου προστίθεται μεθανόλη μέχρι την χαραγή, ενώ για το διάλυμα Δ414 επιλέγεται ως διαλύτης το ακετονιτρίλιο. Για την παρασκευή του διαλύματος Δ471U χρησιμοποιούνται 4,0 mL από το διάλυμα Δ312 και 2,0 mL από το διάλυμα Δ414, τα οποία προστίθενται σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL. Στη συνέχεια προστίθενται ούρα μικρού κοριτσιού μέχρι τη χαραγή της ογκομετρικής φιάλης και αναδεύεται στον αναδευτήρα για τουλάχιστον 30 λεπτά. Το

διάλυμα αφήνεται για 2 ώρες στον εργαστηριακό πάγκο και έπειτα μοιράζεται σε πλαστικούς σωλήνες RIA στους οποίους προστίθενται 5 mL στον καθένα.

**Πίνακας 2.8.** Συγκεντρώσεις ουσιών προτύπου διαλύματος Δ312.

ΟΥΣΙΑ	C <sub>CAL</sub> (ppm)
Androsterone	62,58
Etiocholanolone	62,56
5 <sup>α</sup> -Androstene diol	2,48
5β-Androstene diol	4,48
Testosterone	4,48
Epitestosterone	0,75
d3- Testosterone	2,24
d3- Epitestosterone	0,36
DHT	0,52
DHEA	3,10
Salbutamol	24,95
Morphine glucorinade	25,00
THC-COOH	0,37
18-nor-17,17-dimethyl-fluoxymesterone	2,52
16β-Hydroxy-Furanazol	2,52
Furanazol	2,50

**Πίνακας 2.9.** Συγκεντρώσεις ουσιών προτύπου διαλύματος Δ414.

ΟΥΣΙΑ	C <sub>CAL</sub> (ppm)
Bethamethasone	1,50
Flunisolide	1,50
Epitrenbolone	0,50

**2.2 Υλικά**

- 2.2.1 Γυάλινοι σωλήνες βιδωτοί ή με εσμύρισμα.
- 2.2.2 Γυάλινος σωλήνας με εσμύρισμα κωνικής βάσης.
- 2.2.3 Φιαλίδια αυτόματου εισαγωγέα Crimp Neck ND-11, χωρητικότητας 1.5 ml, 32 x 11.6 mm, διαφανή.
- 2.2.4 Micro-insert, χωρητικότητας 0.1 mL, διαφανή με κωνικό πυθμένα, 12 mm.
- 2.2.5 Καπάκια Aluminum cap clear lacquered-11mm Septum natural rubber/TEF, transparent, πάχους 1,0 mm.
- 2.2.6 Εσμυρισμένα πόματα ή πλαστικά βιδωτά πόματα.
- 2.2.7 Γυάλινες πιπέτες παστέρ.

2.2.8 pHμετρικά χαρτιά εύρους pH 7,5-14.

2.2.9 Σπάτουλα.

2.2.10 Αυτόματες πιπέττες 5-40  $\mu\text{L}$ , 40-200  $\mu\text{L}$ , 200-1000  $\mu\text{L}$ , 1-5 mL.

2.2.11 Πλαστικά ρύγχη αυτόματων πιπετών.

2.2.12 Ψαλίδι κλεισίματος και ανοίγματος φιαλιδίων αυτόματου εισαγωγέα.

## **2.3 Συσκευές**

2.3.1 Αυτόματος αναδευτήρας τύπου δύνης (vortex).

2.3.2 Οριζόντιοι ανακινητήρες.

2.3.3 Διανεμητής υγρών (dispenser).

2.3.4 Φυγόκεντρος HermLe Z510.

2.3.5 Κλίβανος 50°C.

2.3.6 Ρεύμα  $\text{N}_2$ .

2.3.7 Ξηραντήρας με  $\text{P}_2\text{O}_5$  υπό κενό.

2.3.8 Μεταλλόλουτρα 50°C και 80°C.

## **2.4 Όργανα**

2.4.1 Αέριοι χρωματογράφοι με ανιχνευτή φασματομέτρο μάζας υψηλής διαχωριστικής ικανότητας HP 6890 / AUTOSPEC - ULTIMAE MICROMASS με αυτόματο δειγματολήπτη HP (HRMS) και λογισμικά OPUS V3.5 και MassLynx V4.SP1.

2.4.2 Τριχοειδής στήλη HP Ultra 1 methyl silicone gum, 12 m x 0.200 mm x 0.33  $\mu\text{m}$  (GC/HRMS, ULTRA1-33)

## **2.5 Πορεία εργασίας**

### 1. Προετοιμασία δείγματος Δ847U.

1.1. Παραμονή δείγματος, στον εργαστηριακό πάγκο προς απόψυξη, τουλάχιστον 30 λεπτά. Vortex 15 s.

1.2. Μετάγγιση του περιεχομένου του σωλήνα στον αντίστοιχο ψηλό δοκιμαστικό σωλήνα του 847U.

### 2. Προετοιμασία δείγματος ελέγχου ευαισθησίας Δ471U.

2.1. Παραμονή δείγματος στον εργαστηριακό πάγκο προς απόψυξη, τουλάχιστον 30 λεπτά. Vortex 15 s.

2.2. Μετάγγιση του περιεχομένου του σωλήνα στον αντίστοιχο ψηλό δοκιμαστικό σωλήνα του 471U.

### 3. Προετοιμασία δείγματος ελέγχου ευαισθησίας CALMIX10.

3.1. Παραμονή δείγματος στον εργαστηριακό πάγκο προς απόψυξη, τουλάχιστον 30 λεπτά. Vortex 15 s.

3.2. Μετάγγιση του περιεχομένου του σωλήνα στον αντίστοιχο ψηλό δοκιμαστικό σωλήνα του CALMIX10.

### 4. Προετοιμασία BLANK.

4.1. Μετάγγιση 5.00 mL τυφλού δείγματος (ούρα μικρού κοριτσιού ελεύθερα απαγορευμένων ουσιών) στον αντίστοιχο ψηλό δοκιμαστικό σωλήνα του BLANK.

### 5. Προετοιμασία δειγμάτων.

5.1. Προστίθενται 5.00 mL ούρων από κάθε δείγμα με αυτόματη πιπέττα στους αντίστοιχους σωλήνες.

### 6. Διάλυση στερεού ενζύμου E.Coli.

6.1. Επιλογή του κατάλληλου αριθμού πλαστικών σωλήνων RIA που περιέχουν το ένζυμο, (ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων) από την κατάψυξη.

6.2. Διάλυση ενζύμου με κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού (100  $\mu$ L επί τον αριθμό των δειγμάτων που αναγράφεται στον πλαστικό σωλήνα RIA) ή επιλογή έτοιμου διαλύματος που έχει απομείνει .

6.3. Ήπια ανάδευση στο vortex και δια χειρός μέχρι πλήρη διαλυτοποίηση.

### 7. Διαδικασία.

7.1. Προσθήκη 1.00 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH 7.0 με πιπέττα, vortex.

7.2. Προσθήκη 100  $\mu$ L μίγματος εσωτερικών προτύπων Μεθυλοτεστοστερόνης 5 ppm / Γλυκουρινίδιο της Εστραδιόλης 20 ppm ,vortex.

7.3. Προσθήκη 100  $\mu$ L διαλύματος αραιωμένου ενζύμου E.Coli, vortex, πωματισμός.

7.4. Μεταφορά στον φούρνο στους  $(50\pm 2)$  °C για 1,5 h ή overnight στους  $(37\pm 2)$  °C.

7.5. Επαναφορά των δειγμάτων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (αναμονή < 5min ).

7.6. Προσθήκη 1.4 mg στερεού μίγματος  $\text{NaHCO}_3$  :  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  10 : 1 w/w, pH 9-10, vortex.

7.7. Προσθήκη 5.0 mL διαιθυλαιθέρα με dispenser.

7.8. Πωματισμός, ανάδευση στους ανακινητήρες για 20 λεπτά.

- 7.9. Προσθήκη 3 g ανυδρού θειϊκού νατρίου ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) αναδεύοντας ενδιάμεσα, vortex.
- 7.10. Ισοβάρυνση των σωλήνων (μέγιστη διαφορά βάρους των δύο ομάδων σωλήνων 0.4 g).
- 7.11. Έλεγχος στροφών φυγοκέντρου 1900-2000 rpm, φυγοκέντρωση για 10 λεπτά.
- 7.12. Επισήμανση κωνικών σωλήνων με ετικέτα.
- 7.13. Μεταφορά της οργανικής στοιβάδας στους κωνικούς σωλήνες με πιπέττα 1.00-5.00 mL.
- 7.14. Εξάτμιση σε ρεύμα  $\text{N}_2$  μέχρι ξηρού, μέγιστο 50 °C.
- 7.15. Αρχικά μικρή ροή  $\text{N}_2$  προοδευτική αύξηση της ροής (προσοχή να μην πεταχτεί ο αιθέρας ).
- 7.16. Έλεγχος ξηρού υπολείμματος σε κάθε κωνικό σωλήνα, "φύσημα" με  $\text{N}_2$  ένα-ένα.
- 7.17. Πλύσιμο των διανεμητών αζώτου δύο φορές με μεθανόλη.
- 7.18. Προσθήκη 100  $\mu\text{L}$  αντιδραστηρίου παραγωγοποίησης MSTFA/ $\text{NH}_4\text{I}$ /DTE με πιπέττα 20-200  $\mu\text{L}$ , πωματισμός, vortex. Η προσθήκη γίνεται στον απαγωγό.
- 7.19. Επώαση στους  $(80 \pm 5)$  °C, 30 λεπτά hot block.
- 7.20. Επισήμανση vials, των 2 mL με insert, με ετικέτα.
- 7.21. Επαναφορά των δειγμάτων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (αναμονή < 5min ).
- 7.22. Μοίρασμα του παραγωγοποιημένου δείγματος σε 2 vials με πιπέττα των 20-200  $\mu\text{L}$ .
- 7.23 Δημιουργία δυο σειρών vials.
- 7.24 Η μια σειρά αναλύεται με χρήση αέριου χρωματογράφου/φασματομέτρου μάζας (GC/MS), ενώ η άλλη σειρά αναλύεται με χρήση αέριου χρωματογράφου/φασματομέτρου μάζας υψηλής διαχωριστικής ικανότητας (GC/HRMS).
- 7.25 Εύρεση ύποπτων- θετικών δειγμάτων για παρουσία της στεροειδή στανολόλης.
- 7.26 Επανάληψη από την αρχή της ίδιας πορείας για τα δείγματα αυτά, με την διαφορά ότι η εκχύλιση πραγματοποιείται δύο φορές.
- 7.27 Επιβεβαίωση- εύρεση των θετικών δειγμάτων.

## 2.6 Συνθήκες GC/HRMS

Τύπος μηχανήματος: GC/HRMS.

Μοντέλο μηχανήματος: Agilent 6890/Micromass Autospec Ultima.

### 2.6.1 Παράμετροι εισαγωγής

Αναλογία split: 1:10.

Όγκος εισαγωγής δείγματος: 1 μl.

Θερμοκρασία εισαγωγής: 250°C.

### 2.6.2 Παράμετροι διαχωρισμού

• Στήλη:

Brand: Hewlett Packard.

Τύπος: HP Ultra 1.

Μήκος: 12 m.

Εσωτερική διάμετρος: 0.200 mm.

Πάχος υμενίου: 0.33 m.

• Παράμετροι ροής:

Φέρον αέριο: Ήλιο.

Ρυθμός ροής: 1.3 ml/λεπτό στους 180°C.

• Θερμοκρασιακό πρόγραμμα κλίβανου:

Αρχική θερμοκρασία: 150°C.

Αρχικός χρόνος: 0.5 λεπτά.

Ρυθμός αύξησης: 12.5°C/λεπτό.

Τελική θερμοκρασία: 310°C.

Τελικός χρόνος: 3.15 λεπτά.

Γραμμή μεταφοράς: 300°C.

### 2.6.3 Παράμετροι ανίχνευσης:

Θερμοκρασία διασύνδεσης: 300°C.

Θερμοκρασία πηγής: 220°C.

Τρόπος ιονισμού: EI

•Τρόπος λήψης δεδομένων: SIR (διαχωρισμός 10.000, δυναμικό επιτάχυνσης 8000.0 V)

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ

#### 3.1. Εισαγωγή

Τα δείγματα που έφθαναν στο Εργαστήριο επί 24ωρου βάσεως από τους χώρους δειγματοληψίας (γηπεδικές εγκαταστάσεις, Πολυκλινική Ολυμπιακού Χωριού) αναλύονταν άμεσα ώστε το αναλυτικό αποτέλεσμα να ανακοινώνεται προς τη ΔΟΕ το πολύ 24 ώρες μετά την άφιξη των δειγμάτων. Η ανάλυση περιελάμβανε τις διαδικασίες σάρωσης (screening procedures) για κάθε κατηγορία απαγορευμένων ουσιών και στην περίπτωση ευρήματος που να πιθανολογεί τη χρήση απαγορευμένης ουσίας, ενεργοποιείτο η διαδικασία επιβεβαίωσης (confirmation procedure) με βάση την οποία αποδιδόταν ο χαρακτηρισμός “θετικό” σε ένα δείγμα.

#### 3.2. Θετικά δείγματα stanozolol

Τα κρίσιμα στοιχεία του δείγματος ενός αθλητή κατά την ανίχνευση αναβολικών ανδρογόνων στεροειδών με τη διαδικασία σάρωσης φαίνονται στα σχήματα 3.1 – 3.4. Στη διαδικασία σάρωσης συγκρίνονται οι χρόνοι ανάσχεσης των πτητικών παραγώγων των μεταβολιτών του stanozolol 3'-OH-stanozolol-tri-TMS και 4β-OH-stanozolol-tri-TMS ενός θετικού δείγματος ελέγχου και του προς ανάλυση δείγματος αθλητή, με χρήση επιλεγμένων διαγνωστικών ιόντων. Είναι αναγκαία η σύγκριση τουλάχιστον δύο μεταβολιτών και η ανάλυση τυφλού ώστε να πιστοποιείται η απουσία κορυφών των μεταβολιτών σε καθαρά ούρα. Στον πίνακα 3.1 συνοψίζονται οι χρόνοι ανάσχεσης για τα επιλεγμένα διαγνωστικά ιόντα των παραγώγων των μεταβολιτών. Τα διαγνωστικά ιόντα είναι σε όρους m/z τα 446,3036 για το εσωτερικό πρότυπο και 560,3650, 545,3415 για τα παράγωγα των δύο μεταβολιτών ενώ για το παράγωγο του τρίτου μεταβολίτη τα διαγνωστικά ιόντα είναι τα 560,3650 και 470,3149.

Για την αεριοχρωματογραφία ο χρόνος ανάσχεσης της προσδιοριζόμενης ουσίας σε δείγμα αθλητή δεν πρέπει να διαφέρει περισσότερο από 1% ή 0,2 min από τον



αντίστοιχο σε θετικό δείγμα ελέγχου, ώστε να θεωρηθεί το δείγμα ότι πιθανόν περιέχει τη συγκεκριμένη ουσία.

Είναι προφανές (Πίνακας 3.1) ότι τα παραπάνω κριτήρια ικανοποιούνται για το δείγμα του αθλητή και αυτό αξιολογείται ως ύποπτο με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της διαδικασίας επιβεβαίωσης προκειμένου να χαρακτηριστεί θετικό.

Τα καταγραφήματα της διαδικασίας επιβεβαίωσης φαίνονται στα σχήματα 3.5 – 3.9. Στη διαδικασία επιβεβαίωσης συγκρίνονται οι χρόνοι ανάλυσης και τα σχετικά εμβαδά κορυφών των πτητικών παραγώγων των μεταβολιτών του stanozolol 3’-OH-stanozolol-tri-TMS, 4β-OH-stanozolol-tri-TMS και 16β-OH-stanozolol-tri-TMS ενός θετικού δείγματος ελέγχου και του προς ανάλυση δείγματος αθλητή. Μάλιστα, κατά τη διαδικασία επιβεβαίωσης ελέγχονται διαδοχικά τυφλό, δείγμα αθλητή, τυφλό, θετικό δείγμα ελέγχου.

Στην περίπτωση της επιλεγμένης παρακολούθησης ιόντων (selected ion monitoring), καταγράφονται αποτελέσματα για τουλάχιστον 3 διαγνωστικά ιόντα. Η σχετική αφθονία ενός διαγνωστικού ιόντος υπολογίζεται με βάση το εμβαδόν (ή το ύψος) κορυφής που προκύπτει από ολοκλήρωση της κορυφής. Ο λόγος σήμα προς θόρυβο για το διαγνωστικό ιόν με το μικρότερο σήμα πρέπει να είναι τουλάχιστον 3:1. Οι σχετικές εντάσεις των ιόντων στο δείγμα αθλητή δεν πρέπει να διαφέρουν περισσότερο από τις ποσότητες που αναφέρονται στον Πίνακα 3.2. ως προς τις αντίστοιχες των ιόντων θετικού δείγματος ελέγχου. Οι συγκεντρώσεις των ουσιών στο δείγμα του αθλητή και στο θετικό δείγμα ελέγχου πρέπει να είναι συγκρίσιμες.

**Πίνακας 3.1.** Χρόνοι ανάλυσης παραγώγων μεταβολιτών stanozolol κατά τη διαδικασία σάρωσης.

Ουσία/Μεταβολίτης	Θετικό δείγμα ελέγχου (t <sub>R</sub> , min)		Δείγμα Αθλητή (t <sub>R</sub> , min)	
Διαγνωστικό Ιόν (m/z)	446,3036		446,3036	
Μεθυλο-τεστοστερόνη-di-TMS	9,30		9,31	
Διαγνωστικό Ιόν (m/z)	560,3650	545,3415	560,3650	545,3415
3’-OH-stanozolol-tri-TMS	11,72	11,72	11,72	11,72
4β-OH-stanozolol-tri-TMS	11,75	11,75	11,78	11,76
Διαγνωστικό Ιόν (m/z)	560,3650	470,3149	560,3650	470,3149
16β-OH-stanozolol-tri-TMS	12,34	12,34	12,33	12,34

**Πίνακας 3.2.** Μέγιστη ανοχή για σχετικές εντάσεις ιόντων για ταυτοποίηση.

Σχετική Αφθονία (% κύριας κορυφής)	EI – GC/MS	CI – GC/MS, GC/MS <sup>n</sup>
>50%	±10% (απόλυτο)	±15% (απόλυτο)
25% - 50%	±20% (σχετικό)	±25% (σχετικό)
< 25%	±5% (απόλυτο)	±10% (απόλυτο)

Στους πίνακες 3.3 – 3.29 συνοψίζονται οι χρόνοι ανάσχεσης, οι σχετικοί χρόνοι ανάσχεσης (εξίσωση 3.1), οι σχετικές αφθονίες όπως προκύπτουν από τα σχετικά εμβαδά κορυφών (εξίσωση 3.2) και η εφαρμογή των κριτηρίων του πίνακα 3.2 (εξισώσεις 3.3-3.5) για τα επιλεγμένα διαγνωστικά ιόντα των παραγώγων των τριών μεταβολιτών της στανοζολόλης για τρία θετικά δείγματα αθλητών. Είναι προφανές ότι τα κριτήρια ικανοποιούνται και επιτρέπουν την αξιολόγηση των δειγμάτων ως θετικών.

$$RRT = RT_{\text{ουσίας}}/RT_{\text{ISTD}}$$

(3.1)

$$\text{Rel. Area} = (\text{Area}_{\text{ιόντος}}/\text{Area}_{\text{αφθονότερου ιόντος}}) \cdot 100$$

(3.2)

$$\text{Κριτήριο 10\%: Rel. Area}_{(\text{CONTROL})} \pm 10\%$$

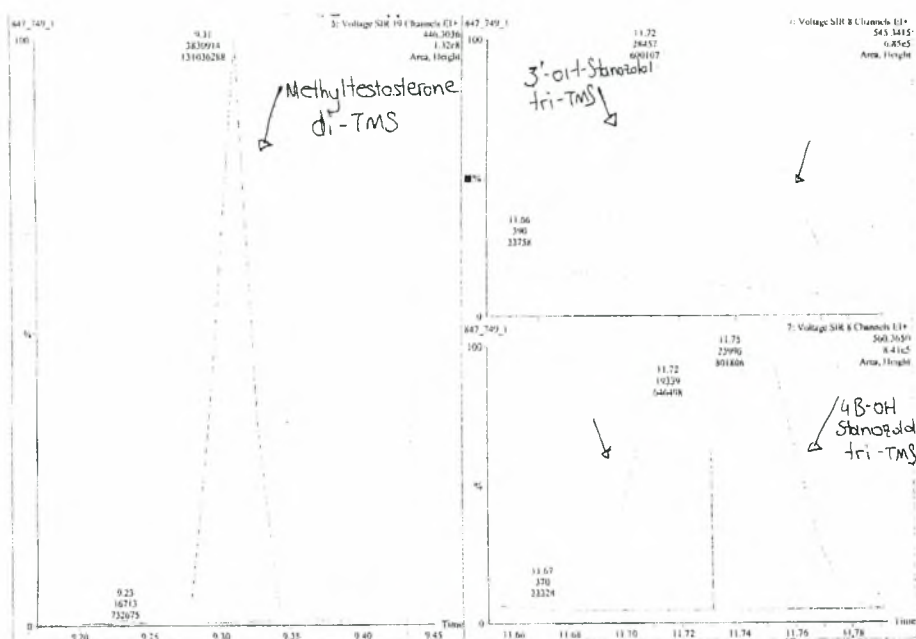
(3.3)

$$\text{Κριτήριο 20\%: Rel. Area}_{(\text{CONTROL})} \pm 0,2\text{Rel. Area}_{(\text{CONTROL})}$$

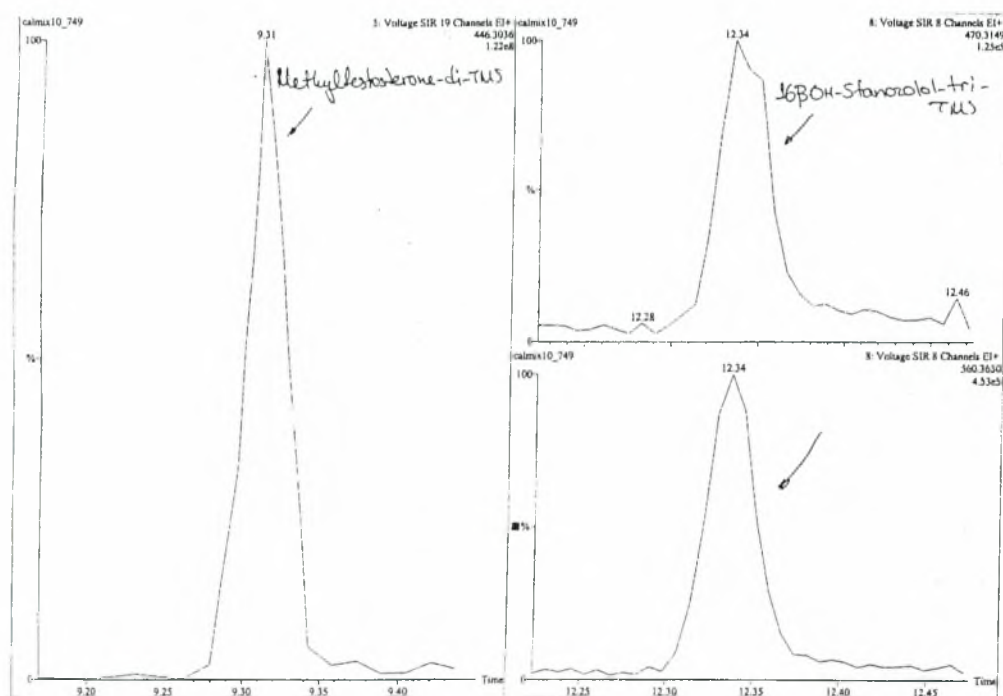
(3.4)

$$\text{Κριτήριο 5\% : Rel. Area}_{(\text{CONTROL})} \pm 5\%$$

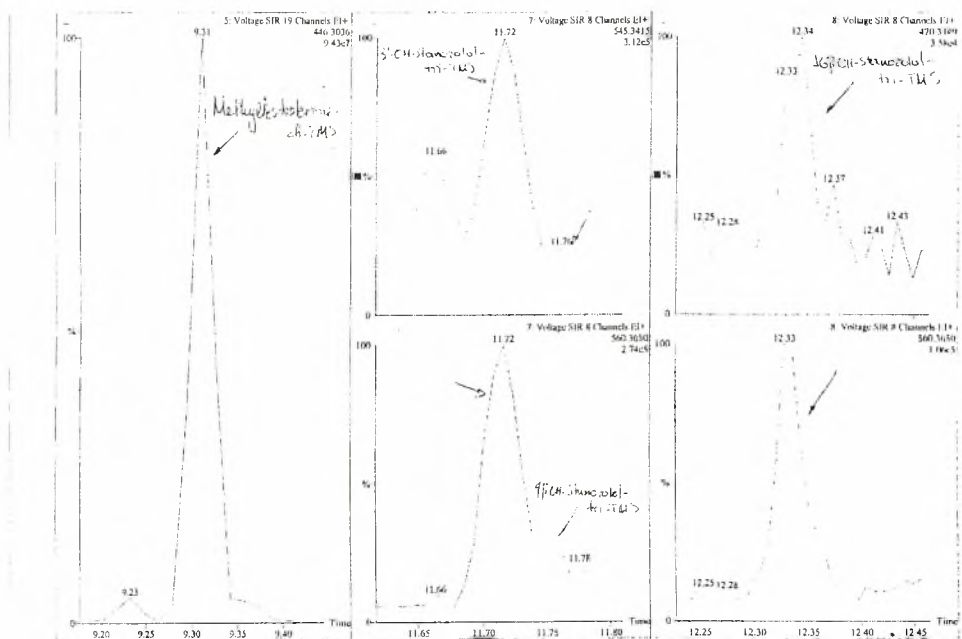
(3.5)



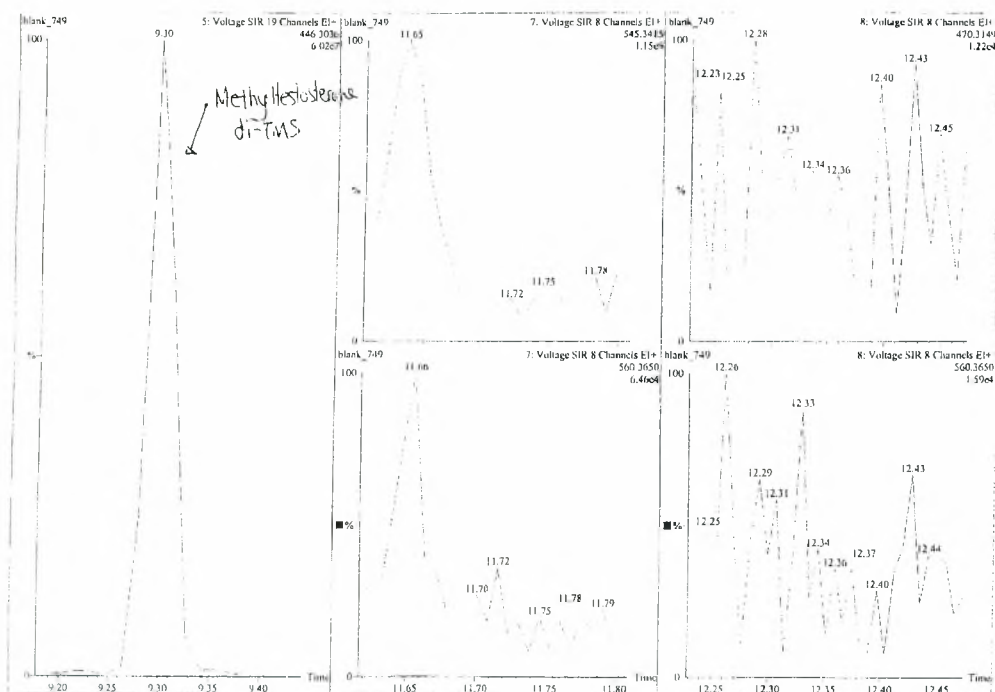
**Σχήμα 3.1.** Καταγραφήματα GC-MS θετικού δείγματος ελέγχου κατά τη διαδικασία σάρωσης αναβολικών. α. Εσωτερικό πρότυπο (Μεθυλο-τεστοστερόνη-di-TMS), β. Μεταβολίτες 3'- OH-stanozolol-tri-TMS και 4β-OH-stanozolol-tri-TMS (μοριακό θραύσμα 545,3415), γ. Μεταβολίτες 3'- OH-stanozolol-tri-TMS και 4β-OH-stanozolol-tri-TMS (μοριακό θραύσμα 560,3650).



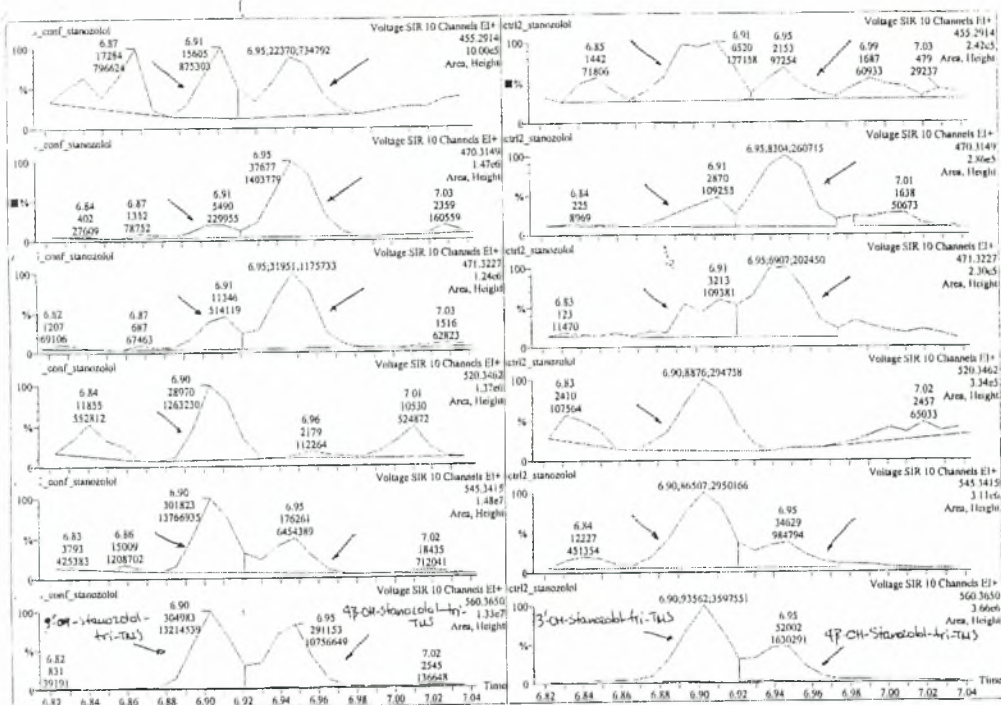
**Σχήμα 3.2** Καταγραφήματα GC-MS θετικού δείγματος ελέγχου κατά τη διαδικασία σάρωσης του μεταβολίτη 16β-OH-stanozolol-tri-TMS α. Εσωτερικό πρότυπο (Μεθυλο-τεστοστερόνη-di-TMS), β. μοριακό θραύσμα 470,3149 γ. μοριακό θραύσμα 560,3650.



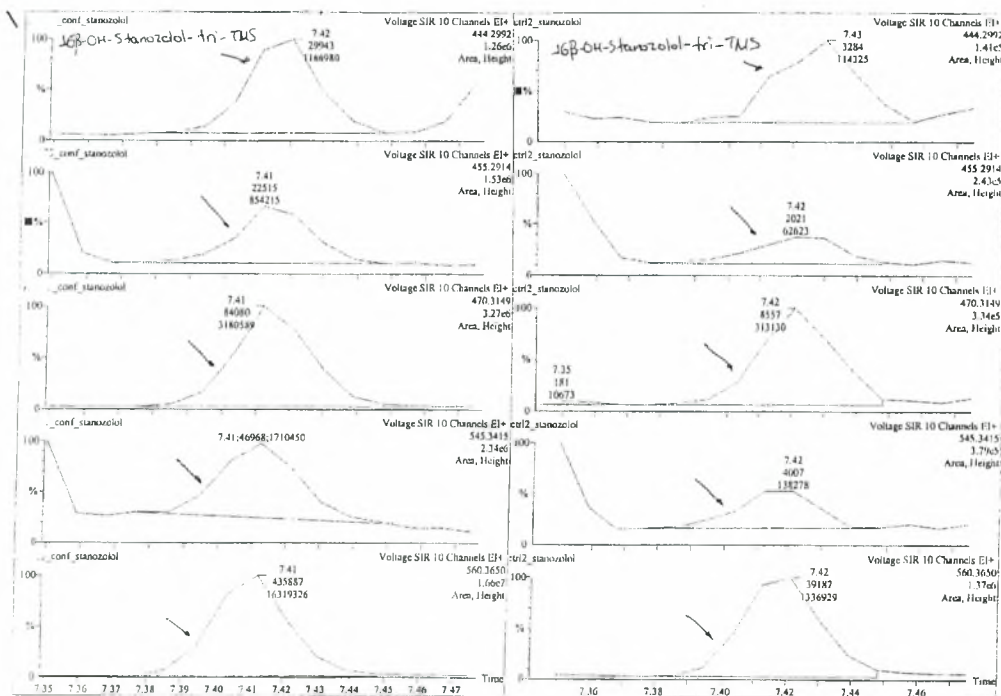
**Σχήμα 3.3** Καταγραφήματα GC-MS δείγματος αθλητή κατά τη διαδικασία σάρωσης αναβολικών. α. Εσωτερικό πρότυπο (Μεθυλο-τεστοστερόνη-di-TMS), β. Μεταβολίτες 3'- OH-stanozolol-tri-TMS και 4β-OH-stanozolol-tri-TMS (μοριακό θραύσμα 545,3415), γ. Μεταβολίτες 3'- OH-stanozolol-tri-TMS και 4β-OH-stanozolol-tri-TMS (μοριακό θραύσμα 560,3650) δ. Μεταβολίτης 16β-OH-stanozolol-tri-TMS (μοριακό θραύσμα 470,3149) ε. Μεταβολίτης 16β-OH-stanozolol-tri-TMS (μοριακό θραύσμα 560,3650)



**Σχήμα 3.4** Καταγραφήματα GC-MS τυφλού δείγματος κατά τη διαδικασία σάρωσης αναβολικών α. Εσωτερικό πρότυπο (Μεθυλο-τεστοστερόνη-di-TMS), β. μοριακό θραύσμα 545.3415 γ. μοριακό θραύσμα 560,3650 δ. μοριακό θραύσμα 470,3149, ε. μοριακό θραύσμα 560.3650.

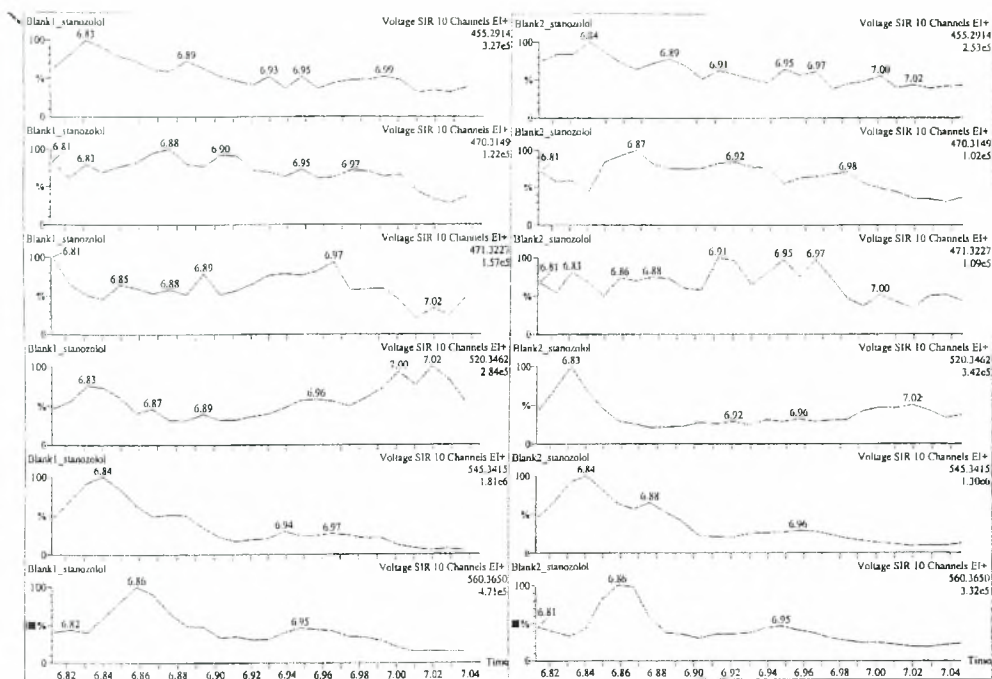


**Σχήμα 3.5** Καταγραφήματα GC-MS δείγματος αθλητή (στήλη 1) και θετικού δείγματος ελέγχου (στήλη 2) κατά τη διαδικασία επιβεβαίωσης για τους μεταβολίτες 3'- OH-stanozolol-tri-TMS και 4β-OH-stanozolol-tri-TMS α. μοριακό θραύσμα 455,2914 β. μοριακό θραύσμα 470,3149 γ. μοριακό θραύσμα 471,3227, δ. μοριακό θραύσμα 520,3462, ε. μοριακό θραύσμα 545,3415, ζ. μοριακό θραύσμα 560,3650.

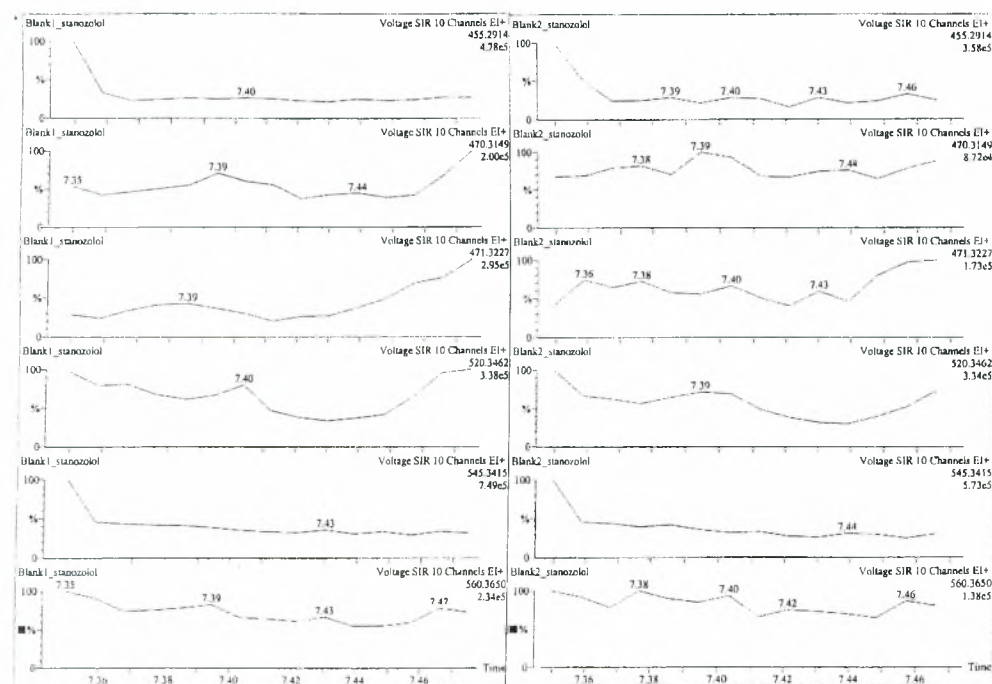


**Σχήμα 3.6** Καταγραφήματα GC-MS δείγματος αθλητή (στήλη 1) και θετικού δείγματος ελέγχου (στήλη 2) κατά τη διαδικασία επιβεβαίωσης για το μεταβολίτη 16β-OH-stanozolol-tri-TMS α. μοριακό θραύσμα 444,2992. β. μοριακό θραύσμα 455,2914 γ. μοριακό θραύσμα 470,3149, δ. μοριακό θραύσμα 545,3415, ε. μοριακό θραύσμα 560,3650.

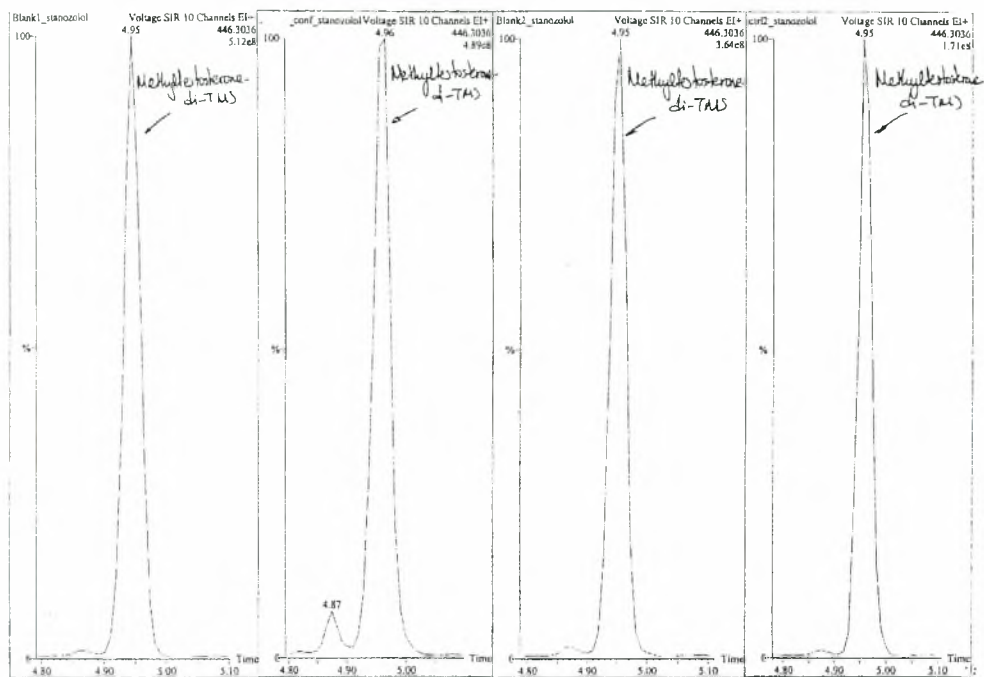




**Σχήμα 3.7** Καταγραφήματα GC-MS τυφλού δείγματος 1 (στήλη 1) και τυφλού δείγματος 2 (στήλη 2) κατά τη διαδικασία επιβεβαίωσης για τους μεταβολίτες 3'-OH-stanozolol-tri-TMS και 4β-OH-stanozolol-tri-TMS α. μοριακό θραύσμα 455,2914 β. μοριακό θραύσμα 470,3149 γ. μοριακό θραύσμα 471,3227, δ. μοριακό θραύσμα 520,3462, ε. μοριακό θραύσμα 545,3415, ζ. μοριακό θραύσμα 560,3650.



**Σχήμα 3.8** Καταγραφήματα GC-MS τυφλού δείγματος 1 (στήλη 1) και τυφλού δείγματος 2 (στήλη 2) κατά τη διαδικασία επιβεβαίωσης για το μεταβολίτη 16β-OH-stanozolol-tri-TMS α. μοριακό θραύσμα 444,2992, β. μοριακό θραύσμα 455,2914 γ. μοριακό θραύσμα 470,3149, δ. μοριακό θραύσμα 545,3415, ε. μοριακό θραύσμα 560,3650.



**Σχήμα 3.9** Καταγραφήματα GC-MS εσωτερικού προτύπου, Μεθυλο-τεστοστερόνης-di-TMS (μοριακό θραύσμα 446,3036). α. τυφλό δείγμα 1, β. δείγμα αθλητή, γ. τυφλό δείγμα 2, δ. θετικό δείγμα ελέγχου.

**Πίνακας 3.3.** Χρόνοι ανάσχεσης και εμβαδά κορυφών των ιόντων  $m/z = 560,3650$ ,  $545,3415$ ,  $520,3462$ ,  $471,3227$ ,  $470,3149$ ,  $455,2914$ , για το θετικό δείγμα αθλητή 1. ( $RT_{ISTD}$ : χρόνος ανάσχεσης δις-TMS-Μεθυλ-τεστοστερόνης,  $RT_{ουσίας}$ : χρόνος ανάσχεσης τρις-TMS-3'-OH-Στανοζολόλης,  $RRT$ : σχετικός χρόνος ανάσχεσης,  $Area$ : εμβαδόν κορυφής,  $Rel. Area$ : σχετικό εμβαδόν.

<b>Δείγμα αθλητή 1</b>					
Διαγνωστικό Ion $m/z$	$RT_{ISTD}$ D	$RT_{ουσίας}$	RRT	Area	Rel. Area
560,3650	-	6,90	1,39	304983	100,0%
545,3415	-	6,90	1,39	301823	99,0%
520,3462	-	6,90	1,39	28970	9,50%
471,3227	-	6,91	1,39	11346	3,72%
470,3149	-	6,91	1,39	5490	1,80%
455,2914	-	6,91	1,39	15605	5,12%
446.3036	4,95	-	-	-	-



**Πίνακας 3.4.** Χρόνοι ανάσχεσης και εμβαδά κορυφών των ιόντων m/z = 560,3650, 545,3415, 520,3462, 471,3227, 470,3149, 455,2914, για το δείγμα ελέγχου 1. (RT<sub>ISTD</sub>: χρόνος ανάσχεσης δις-TMS-Μεθυλ-τεστοστερόνης, RT<sub>ουσίας</sub>: χρόνος ανάσχεσης τρις-TMS-3'-OH-Στανοζολόλης, RRT: σχετικός χρόνος ανάσχεσης, Area: εμβαδόν κορυφής, Rel. Area: σχετικό εμβαδόν.

Δείγμα ελέγχου 1: 3'-OH-Στανοζολόλη 2 ng/mL					
Ion m/z	RT <sub>ISTD</sub>	RT <sub>ουσίας</sub>	RRT	Area	Rel. Area
560,3650	-	6,90	1,39	93562	100,0%
545,3415	-	6,90	1,39	86507	92,5%
520,3462	-	6,90	1,39	8876	9,49%
471,3227	-	6,91	1,40	3213	3,43%
470,3149	-	6,91	1,40	2870	3,07%
455,2914	-	6,91	1,40	6520	6,97%
446,3036	4,95	-	-	-	-

**Πίνακας 3.5.** Κριτήρια αποδοχής ιόντων βασιζόμενα στη σχετική επιφάνεια κορυφών.

Κριτήρια αποδοχής						
Ion m/z	Κριτήριο 5%		Κριτήριο 20%		Κριτήριο 10%	
	(απόλυτο)		(σχετικό)		(απόλυτο)	
	min	max	min	max	Min	max
560,3650	-	-	-	-	90,0%	110%
545,3415	-	-	-	-	82,5%	102%
520,3462	4,49%	14,5%	-	-	-	-
471,3227	-	8,4%	-	-	-	-
470,3149	-	8,1%	-	-	-	-
455,2914	1,97%	12,0%	-	-	-	-

**Πίνακας 3.6.** Χρόνοι ανάσχεσης και εμβαδά κορυφών των ιόντων  $m/z = 560,3650, 545,3415, 471,3227, 470,3149, 455,2914$ , για το θετικό δείγμα αθλητή 1. ( $RT_{ISTD}$ : χρόνος ανάσχεσης δις-TMS-Μεθυλ-τεστοστερόνης,  $RT_{ουσίας}$ : χρόνος ανάσχεσης τρις-TMS-4β-OH-Στανοζολόλης, RRT: σχετικός χρόνος ανάσχεσης, Area: εμβαδόν κορυφής, Rel. Area: σχετικό εμβαδόν.

<u>Δείγμα αθλητή 1</u>					
Διαγνωστικό Ion $m/z$	$RT_{ISTD}$ D	$RT_{ουσίας}$	RRT	Area	Rel. Area
560,3650	-	6,95	1,34	291153	100,0%
545,3415	-	6,95	1,34	176261	60,5%
471,3227	-	6,95	1,34	31951	11,0%
470,3149	-	6,95	1,34	37677	12,9%
455,2914	-	6,95	1,34	15605	7,68%
446,3036	5,19	-	-	-	-

**Πίνακας 3.7.** Χρόνοι ανάσχεσης και εμβαδά κορυφών των ιόντων  $m/z = 560,3650, 545,3415, 471,3227, 470,3149, 455,2914$ , για το δείγμα ελέγχου 1. ( $RT_{ISTD}$ : χρόνος ανάσχεσης δις-TMS-Μεθυλ-τεστοστερόνης,  $RT_{ουσίας}$ : χρόνος ανάσχεσης τρις-TMS-4β-OH-Στανοζολόλης, RRT: σχετικός χρόνος ανάσχεσης, Area: εμβαδόν κορυφής, Rel. Area: σχετικό εμβαδόν.

<u>Δείγμα ελέγχου 1: 4β-OH-Στανοζολόλη 2 ng/mL</u>					
Ion $m/z$	$RT_{ISTD}$	$RT_{ουσίας}$	RRT	Area	Rel. Area
560,3650	-	6,95	1,34	52002	100,0%
545,3415	-	6,95	1,34	34629	66,6%
471,3227	-	6,95	1,34	6907	13,3%
470,3149	-	6,95	1,34	8304	16,0%
455,2914	-	6,95	1,34	2153	4,14%
446,3036	4,95	-	-	-	-

**Πίνακας 3.8.** Κριτήρια αποδοχής ιόντων βασισόμενα στη σχετική επιφάνεια κορυφών.

<u>Κριτήρια αποδοχής</u>						
Ion $m/z$	Κριτήριο 5%		Κριτήριο 20%		Κριτήριο 10%	
	(απόλυτο)		(σχετικό)		(απόλυτο)	
	min	Max	min	max	Min	max
560,3650	-	-	-	-	90,0%	110%
545,3415	-	-	-	-	56,6%	76,6%
471,3227	8,28%	8,4%	-	-	-	-
470,3149	11,0%	21,0	-	-	-	-
455,2914	-	9,1%	-	-	-	-

**Πίνακας 3.9.** Χρόνοι ανάσχεσης και εμβαδά κορυφών των ιόντων  $m/z = 560,3650, 545,3415, 470,3149, 455,2914, 444,2992$ , για το θετικό δείγμα αθλητή 1. ( $RT_{ISTD}$ : χρόνος ανάσχεσης δις-TMS-Μεθυλ-τεστοστερόνης,  $RT_{ουσίας}$ : χρόνος ανάσχεσης τρις-TMS-16β-OH-Στανοζολόλης,  $RRT$ : σχετικός χρόνος ανάσχεσης,  $Area$ : εμβαδόν κορυφής,  $Rel. Area$ : σχετικό εμβαδόν.

<b>Δείγμα αθλητή 1</b>					
Διαγνωστικό Ion $m/z$	$RT_{ISTD}$ D	$RT_{ουσίας}$	$RRT$	Area	Rel. Area
560,3650	-	7,41	1,49	435887	100,0%
545,3415	-	7,41	1,49	46968	10,8%
470,3149	-	7,41	1,49	84080	19,3%
455,2914	-	7,41	1,50	22515	5,17%
444,2992	-	7,41	1,50	29943	6,87%
446,3036	4,96	-	-	-	-

**Πίνακας 3.10.** Χρόνοι ανάσχεσης και εμβαδά κορυφών των ιόντων  $m/z = 560,3650, 545,3415, 470,3149, 455,2914, 444,2992$ , για το δείγμα ελέγχου 1. ( $RT_{ISTD}$ : χρόνος ανάσχεσης δις-TMS-Μεθυλ-τεστοστερόνης,  $RT_{ουσίας}$ : χρόνος ανάσχεσης τρις-TMS-16β-OH-Στανοζολόλης,  $RRT$ : σχετικός χρόνος ανάσχεσης,  $Area$ : εμβαδόν κορυφής,  $Rel. Area$ : σχετικό εμβαδόν.

<b>Δείγμα ελέγχου 1: 16β-OH-Στανοζολόλη 2 ng/mL</b>					
Ion $m/z$	$RT_{ISTD}$	$RT_{ουσίας}$	$RRT$	Area	Rel. Area
560,3650	-	7,42	1,50	39187	100,0%
545,3415	-	7,42	1,50	4007	10,2%
470,3149	-	7,42	1,50	8557	21,8%
455,2914	-	7,42	1,50	2021	5,16%
444,2992	-	7,42	1,50	3284	8,38%
446,3036	4,95	-	-	-	-

**Πίνακας 3.11.** Κριτήρια αποδοχής ιόντων βασιζόμενα στη σχετική επιφάνεια κορυφών.

<b>Κριτήρια αποδοχής</b>						
Ion $m/z$	Κριτήριο 5%		Κριτήριο 20%		Κριτήριο 10%	
	(απόλυτο)		(σχετικό)		(απόλυτο)	
	Min	Max	min	max	Min	max
560,3650	-	-	-	-	90,0%	110%
545,3415	5,23%	15,2%	-	-	-	-
470,3149	16,8%	26,8%	-	-	-	-
455,2914	0,16%	10,2%	-	-	-	-
444,2992	3,38%	13,4%	-	-	-	-

**Πίνακας 3.12.** Χρόνοι ανάσχεσης και εμβαδά κορυφών των ιόντων  $m/z = 560,3650, 545,3415, 520,3462, 471,3227, 455,2914$ , για το θετικό δείγμα αθλητή 2. ( $RT_{ISTD}$ : χρόνος ανάσχεσης δις-TMS-Μεθυλ-τεστοστερόνης,  $RT_{ουσίας}$ : χρόνος ανάσχεσης τρις-TMS-3'-OH-Στανοζολόλης,  $RRT$ : σχετικός χρόνος ανάσχεσης,  $Area$ : εμβαδόν κορυφής,  $Rel. Area$ : σχετικό εμβαδόν.

Δείγμα αθλητή 2					
Διαγνωστικό Ion $m/z$	$RT_{ISTD}$ D	$RT_{ουσίας}$	$RRT$	Area	Rel. Area
560,3650	-	7,13	1,37	1560000	77,2%
545,3415	-	7,13	1,37	2020000	100%
520,3462	-	7,13	1,37	68500	3,39%
471,3227	-	7,13	1,37	130000	6,44%
455,2914	-	7,13	1,37	277000	13,7%
446,3036	5,20	-	-	-	-

**Πίνακας 3.13.** Χρόνοι ανάσχεσης και εμβαδά κορυφών των ιόντων  $m/z = 560,3650, 545,3415, 520,3462, 471,3227, 470,3149, 455,2914$ , για το δείγμα ελέγχου 2. ( $RT_{ISTD}$ : χρόνος ανάσχεσης δις-TMS-Μεθυλ-τεστοστερόνης,  $RT_{ουσίας}$ : χρόνος ανάσχεσης τρις-TMS-3'-OH-Στανοζολόλης,  $RRT$ : σχετικός χρόνος ανάσχεσης,  $Area$ : εμβαδόν κορυφής,  $Rel. Area$ : σχετικό εμβαδόν.

Δείγμα ελέγχου 2: 3'-OH-Στανοζολόλη 10 ng/mL					
Ion $m/z$	$RT_{ISTD}$	$RT_{ουσίας}$	$RRT$	Area	Rel. Area
560,3650	-	7,12	1,37	1840000	84,0%
545,3415	-	7,12	1,37	2190000	100%
520,3462	-	7,12	1,37	65000	2,97%
471,3227	-	7,13	1,37	144000	6,58%
455,2914	-	7,13	1,37	294000	13,4%
446,3036	5,19	-	-	-	-

**Πίνακας 3.14.** Κριτήρια αποδοχής ιόντων βασιζόμενα στη σχετική επιφάνεια κορυφών.

Κριτήρια αποδοχής						
Ion $m/z$	Κριτήριο 5%		Κριτήριο 20%		Κριτήριο 10%	
	(απόλυτο)		(σχετικό)		(απόλυτο)	
	min	max	min	Max	Min	max
560,3650	-	-	-	-	74,0%	94,0%
545,3415	-	-	-	-	90,0%	110,0%
520,3462	-	8,39%	-	-	-	-
471,3227	1,58%	11,6%	-	-	-	-
455,2914	8,4%	18,4%	-	-	-	-

**Πίνακας 3.15.** Χρόνοι ανάσχεσης και εμβαδά κορυφών των ιόντων  $m/z = 560,3650, 545,3415, 471,3227, 455,2914$ , για το θετικό δείγμα αθλητή 2. (RT<sub>ISTD</sub>: χρόνος ανάσχεσης δις-TMS-Μεθυλ-τεστοστερόνης, RT<sub>ουσίας</sub>: χρόνος ανάσχεσης τρις-TMS-4β-OH-Στανοζολόλης, RRT: σχετικός χρόνος ανάσχεσης, Area: εμβαδόν κορυφής, Rel. Area: σχετικό εμβαδόν.

<b>Δείγμα αθλητή 2</b>					
Διαγνωστικό Ion $m/z$	RT <sub>ISTD</sub> D	RT <sub>ουσίας</sub>	RRT	Area	Rel. Area
560,3650	-	7,16	1,40	1180000	100,0%
545,3415	-	7,16	1,40	678000	57,5%
471,3227	-	7,16	1,40	236000	20,0%
455,2914	-	7,16	1,40	232000	19,7%
446,3036	5,09	-	-	-	-

**Πίνακας 3.16.** Χρόνοι ανάσχεσης και εμβαδά κορυφών των ιόντων  $m/z = 560,3650, 545,3415, 471,3227, 455,2914$ , για το δείγμα ελέγχου 2. (RT<sub>ISTD</sub>: χρόνος ανάσχεσης δις-TMS-Μεθυλ-τεστοστερόνης, RT<sub>ουσίας</sub>: χρόνος ανάσχεσης τρις-TMS-4β-OH-Στανοζολόλης, RRT: σχετικός χρόνος ανάσχεσης, Area: εμβαδόν κορυφής, Rel. Area: σχετικό εμβαδόν.

<b>Δείγμα ελέγχου 2: 4β-OH-Στανοζολόλη 10 ng/mL</b>					
Ion $m/z$	RT <sub>ISTD</sub>	RT <sub>ουσίας</sub>	RRT	Area	Rel. Area
560,3650	-	7,15	1,40	1750000	100,0%
545,3415	-	7,15	1,40	1157000	66,9%
471,3227	-	7,15	1,40	443000	25,3%
455,2914	-	7,15	1,40	373000	21,3%
446,3036	4,95	-	-	-	-

**Πίνακας 3.17.** Κριτήρια αποδοχής ιόντων βασιζόμενα στη σχετική επιφάνεια κορυφών.

<b>Κριτήρια αποδοχής</b>						
Ion $m/z$	Κριτήριο 5%		Κριτήριο 20%		Κριτήριο 10%	
	(απόλυτο)		(σχετικό)		(απόλυτο)	
	min	Max	min	max	Min	max
560,3650	-	-	-	-	90,0%	110,0%
545,3415	-	-	-	-	56,9%	76,9%
471,3227	-	-	20,3%	30,4%	-	-
455,2914	16,3%	26,3%	-	-	-	-

**Πίνακας 3.18.** Χρόνοι ανάσχεσης και εμβαδά κορυφών των ιόντων  $m/z = 560,3650, 545,3415, 471,3227, 455,2914, 444,2992$ , για το θετικό δείγμα αθλητή 2. ( $RT_{ISTD}$ : χρόνος ανάσχεσης δις-TMS-Μεθυλ-τεστοστερόνης,  $RT_{ουσίας}$ : χρόνος ανάσχεσης τρις-TMS-16β-OH-Στανοζολόλης,  $RRT$ : σχετικός χρόνος ανάσχεσης,  $Area$ : εμβαδόν κορυφής,  $Rel. Area$ : σχετικό εμβαδόν.

Δείγμα αθλητή 2					
Διαγνωστικό Ion $m/z$	$RT_{ISTD}$ D	$RT_{ουσίας}$	RRT	Area	Rel. Area
560,3650	-	7,45	1,50	1490000	100,0%
545,3415	-	7,45	1,50	214000	14,4%
471,3227	-	7,46	1,49	132000	8,86%
455,2914	-	7,46	1,50	263000	17,7%
444,2992	-	7,46	1,50	311000	20,9%
446,3036	4,96	-	-	-	-

**Πίνακας 3.19.** Χρόνοι ανάσχεσης και εμβαδά κορυφών των ιόντων  $m/z = 560,3650, 545,3415, 470,3149, 455,2914, 444,2992$ , για το δείγμα ελέγχου 1. ( $RT_{ISTD}$ : χρόνος ανάσχεσης δις-TMS-Μεθυλ-τεστοστερόνης,  $RT_{ουσίας}$ : χρόνος ανάσχεσης τρις-TMS-16β-OH-Στανοζολόλης,  $RRT$ : σχετικός χρόνος ανάσχεσης,  $Area$ : εμβαδόν κορυφής,  $Rel. Area$ : σχετικό εμβαδόν.

Δείγμα ελέγχου 2: 16β-OH-Στανοζολόλη 10 ng/mL					
Ion $m/z$	$RT_{ISTD}$	$RT_{ουσίας}$	RRT	Area	Rel. Area
560,3650	-	7,44	1,50	987000	100,0%
545,3415	-	7,44	1,50	119000	12,1%
471,3227	-	7,45	1,50	94800	9,6%
455,2914	-	7,45	1,50	155000	15,7%
444,2992	-	7,45	1,50	239000	24,2%
446,3036	4,95	-	-	-	-

**Πίνακας 3.20.** Κριτήρια αποδοχής ιόντων βασιζόμενα στη σχετική επιφάνεια κορυφών.

Κριτήρια αποδοχής						
Ion $m/z$	Κριτήριο 5% (απόλυτο)		Κριτήριο 20% (σχετικό)		Κριτήριο 10% (απόλυτο)	
	Min	Max	min	max	Min	max
560,3650	-	-	-	-	90,0%	110,0%
545,3415	7,1%	17,1%	-	-	-	-
471,3227	4,60%	14,6%	-	-	-	-
455,2914	10,7%	20,7%	-	-	-	-
444,2992	19,2%	29,2%	-	-	-	-



**Πίνακας 3.21.** Χρόνοι ανάσχεσης και εμβαδά κορυφών των ιόντων  $m/z = 560,3650, 545,3415, 520,3462, 471,3227, 455,2914$ , για το θετικό δείγμα αθλητή 3. ( $RT_{ISTD}$ : χρόνος ανάσχεσης δις-TMS-Μεθυλ-τεστοστερόνης,  $RT_{ουσίας}$ : χρόνος ανάσχεσης τρις-TMS-3'-OH-Στανοζολόλης, RRT: σχετικός χρόνος ανάσχεσης, Area: εμβαδόν κορυφής, Rel. Area: σχετικό εμβαδόν.

<b>Δείγμα αθλητή 3</b>					
Διαγνωστικό Ion $m/z$	$RT_{ISTD}$ D	$RT_{ουσίας}$	RRT	Area	Rel. Area
560,3650	-	7,14	1,38	1020000	87,9%
545,3415	-	7,14	1,38	1160000	100%
520,3462	-	7,14	1,38	152000	13,1%
455,2914	-	7,14	1,38	138000	11,9%
446,3036	5,17	-	-	-	-

**Πίνακας 3.22.** Χρόνοι ανάσχεσης και εμβαδά κορυφών των ιόντων  $m/z = 560,3650, 545,3415, 520,3462, 470,3149, 455,2914$ , για το δείγμα ελέγχου 3. ( $RT_{ISTD}$ : χρόνος ανάσχεσης δις-TMS-Μεθυλ-τεστοστερόνης,  $RT_{ουσίας}$ : χρόνος ανάσχεσης τρις-TMS-3'-OH-Στανοζολόλης, RRT: σχετικός χρόνος ανάσχεσης, Area: εμβαδόν κορυφής, Rel. Area: σχετικό εμβαδόν.

<b>Δείγμα ελέγχου 3: 3'-OH-Στανοζολόλη 10 ng/mL</b>					
Ion $m/z$	$RT_{ISTD}$	$RT_{ουσίας}$	RRT	Area	Rel. Area
560,3650	-	7,14	1,38	1540000	97,5%
545,3415	-	7,14	1,38	1580000	100%
520,3462	-	7,14	1,38	273000	17,28%
455,2914	-	7,15	1,38	200000	12,7%
446,3036	5,18	-	-	-	-

**Πίνακας 3.23.** Κριτήρια αποδοχής ιόντων βασιζόμενα στη σχετική επιφάνεια κορυφών.

<b>Κριτήρια αποδοχής</b>						
Ion $m/z$	Κριτήριο 5%		Κριτήριο 20%		Κριτήριο 10%	
	(απόλυτο)		(σχετικό)		(απόλυτο)	
	min	max	min	max	Min	max
560,3650	-	-	-	-	87,5%	107%
545,3415	-	-	-	-	90%	110%
520,3462	12,3%	22,3%	-	-	-	-
455,2914	7,66%	17,7%	-	-	-	-



**Πίνακας 3.24.** Χρόνοι ανάσχεσης και εμβαδά κορυφών των ιόντων  $m/z = 560,3650, 545,3415, 471,3227, 455,2914$ , για το θετικό δείγμα αθλητή 3. ( $RT_{ISTD}$ : χρόνος ανάσχεσης δις-TMS-Μεθυλ-τεστοστερόνης,  $RT_{ουσίας}$ : χρόνος ανάσχεσης τρις-TMS-4β-OH-Στανοζολόλης, RRT: σχετικός χρόνος ανάσχεσης, Area: εμβαδόν κορυφής, Rel. Area: σχετικό εμβαδόν.

Δείγμα αθλητή 3					
Διαγνωστικό Ion $m/z$	$RT_{ISTD}$ D	$RT_{ουσίας}$	RRT	Area	Rel. Area
560,3650	-	7,16	1,40	1180000	100,0%
545,3415	-	7,16	1,40	678000	57,5%
471,3227	-	7,16	1,40	236000	20,0%
455,2914	-	7,16	1,40	232000	19,7%
446,3036	5,09	-	-	-	-

**Πίνακας 3.25.** Χρόνοι ανάσχεσης και εμβαδά κορυφών των ιόντων  $m/z = 560,3650, 545,3415, 471,3227, 455,2914$ , για το δείγμα ελέγχου 3. ( $RT_{ISTD}$ : χρόνος ανάσχεσης δις-TMS-Μεθυλ-τεστοστερόνης,  $RT_{ουσίας}$ : χρόνος ανάσχεσης τρις-TMS-4β-OH-Στανοζολόλης, RRT: σχετικός χρόνος ανάσχεσης, Area: εμβαδόν κορυφής, Rel. Area: σχετικό εμβαδόν.

Δείγμα ελέγχου 3: 4β-OH-Στανοζολόλη 10 ng/mL					
Ion $m/z$	$RT_{ISTD}$	$RT_{ουσίας}$	RRT	Area	Rel. Area
560,3650	-	7,15	1,40	1750000	100,0%
545,3415	-	7,15	1,40	1157000	66,9%
471,3227	-	7,15	1,40	443000	25,3%
455,2914	-	7,15	1,40	373000	21,3%
446,3036	4,95	-	-	-	-

**Πίνακας 3.26.** Κριτήρια αποδοχής ιόντων βασιζόμενα στη σχετική επιφάνεια κορυφών.

Κριτήρια αποδοχής						
Ion $m/z$	Κριτήριο 5% (απόλυτο)		Κριτήριο 20% (σχετικό)		Κριτήριο 10% (απόλυτο)	
	min	Max	min	max	Min	max
560,3650	-	-	-	-	90,0%	110,0%
545,3415	-	-	-	-	55,9%	76,9%
471,3227	-	-	20,3%	30,4%	-	-
455,2914	16,3%	26,3%	-	-	-	-

**Πίνακας 3.27.** Χρόνοι ανάσχεσης και εμβαδά κορυφών των ιόντων m/z = 560,3650, 545,3415, 470,3148, 444,2992, για το θετικό δείγμα αθλητή 3. (RT<sub>ISTD</sub>: χρόνος ανάσχεσης δις-TMS-Μεθυλ-τεστοστερόνης, RT<sub>ουσίας</sub>: χρόνος ανάσχεσης τρις-TMS-16β-OH-Στανοζολόλης, RRT: σχετικός χρόνος ανάσχεσης, Area: εμβαδόν κορυφής, Rel. Area: σχετικό εμβαδόν.

Δείγμα αθλητή 3					
Διαγνωστικό Ion m/z	RT <sub>ISTD</sub> D	RT <sub>ουσίας</sub>	RRT	Area	Rel. Area
560,3650	-	7,46	1,50	1260000	100,0%
545,3415	-	7,46	1,50	198000	15,7%
470,3148	-	7,47	1,50	528000	41,9%
444,2992	-	7,47	1,50	202000	16,0%
446,3036	4,97	-	-	-	-

**Πίνακας 3.28.** Χρόνοι ανάσχεσης και εμβαδά κορυφών των ιόντων m/z = 560,3650, 545,3415, 470,3149, 455,2914, 444,2992, για το δείγμα ελέγχου 1. (RT<sub>ISTD</sub>: χρόνος ανάσχεσης δις-TMS-Μεθυλ-τεστοστερόνης, RT<sub>ουσίας</sub>: χρόνος ανάσχεσης τρις-TMS-16β-OH-Στανοζολόλης, RRT: σχετικός χρόνος ανάσχεσης, Area: εμβαδόν κορυφής, Rel. Area: σχετικό εμβαδόν.

Δείγμα ελέγχου 2: 16β-OH-Στανοζολόλη 5 ng/mL					
Ion m/z	RT <sub>ISTD</sub>	RT <sub>ουσίας</sub>	RRT	Area	Rel. Area
560,3650	-	7,47	1,50	251000	100,0%
545,3415	-	7,47	1,50	40100	16,0%
470,3148	-	7,47	1,50	135000	53,8%
444,2992	-	7,47	1,50	43100	15,2%
446,3036	4,97	-	-	-	-

**Πίνακας 3.29.** Κριτήρια αποδοχής ιόντων βασιζόμενα στη σχετική επιφάνεια κορυφών.

Κριτήρια αποδοχής						
Ion m/z	Κριτήριο 5%		Κριτήριο 20%		Κριτήριο 10%	
	Κριτήριο (απόλυτο)		Κριτήριο (σχετικό)		Κριτήριο (απόλυτο)	
	Min	Max	min	max	Min	max
560,3650	-	-	-	-	90,0%	110%
545,3415	10,98%	21,0%	-	-	-	-
470,3148	-	-	-	-	43,8%	63,8%
444,2992	10,2%	20,2%	-	-	-	-

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Donohoe T. and Johnson N., *"Foul Play"*, Basil Blackwell Ltd, Oxford, UK, **1986**.
2. International Athletic Foundation World Symposium on Doping in Sport, Florence, **1987**, Official Proceedings.
3. II<sup>nd</sup> International Athletic Foundation World Symposium on Doping in Sport, Monte Carlo, **1989**, Official Proceedings.
4. Verroken M., *Drug use and abuse in sport*, Bailliere's Clin. Endocrin. Metab. **14**:1-23, **2000**.
5. Todd T., *Anabolic steroids: the gremlins of sport*, J. Sports History **14**:87-107, **1987**.
6. Voy R. O., Dirix A. and Knuttgen H. G., *Clinical aspects of the doping classes*, The Olympic book of sports medicine, Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp 659-668, **1988**.
7. Mondenard J. P., *Dopage aux Jeux Olympiques*, Editions Amphora SA, Condé-sur-Noireau/ France, **1996**.
8. International Olympic Committee, *International Olympic Charter against doping in sport*, Medical Commission, international communication, **1990**.
9. International Olympic Committee, *"Medical Code and Explanatory Document"*, **1996**.
10. Society for Sport Science: <http://sportsci.org>.
11. Basaria S., Wahlstrom J. T. and Dobs A. S., *Anabolic-Androgenic Steroid Therapy in the Treatment of Chronic Diseases*, J. of Clinical Endocrinology & Metab. **86**(11): 5108-5117, U.S.A., **2001**.
12. Schanzer W., *Metabolism of anabolic androgenic steroids*, Clinical Chemistry **42**(7): 1001-1020, **1996**.
13. Schanzer W., Opferman G. and Donike M., *Metabolism of Stanozolol: Identification and synthesis of urinary metabolites*, J. steroid Biochem. , pp 1-21, **1990**.
14. Masse R., Ayotte C., Honggang B. I. and Dugal R., *Detection and characterization of stanozolol urinary metabolites in humans by gas chromatography-mass spectrometry*, J. of Chromatography **497**: 17-37, **1989**.
15. Sewell P., Clarke B., *Chromatographic Separations*, John Wiley & Sons, Λονδίνο, Κεφ. **4**, **1987**.
16. Encyclopedia of Analytical Science, Academic Press, Editor: Alan Townshed, Vol. 3, pp 1761-1876, **1995**.
17. Χατζηϊωάννου Θ., Κουμπάρης Μ., *Ενόργανη Ανάλυση*, ΕΚΠΑ, Αθήνα, Κεφ. **19**, σελ. 439-466, **2000**.
18. Σίσκος Π. Α., Νικολέλης Δ. Π., *Αναλυτικές Μέθοδοι Διαχωρισμού*, Εκδόσεις Πανεπιστημίου Αθηνών, Αθήνα, Κεφ. **6**, **1991**.
19. Poole C., Poole S., *Chromatography today*, Elsevier, Oxford, pp. 246-268. **1991**.
20. Χατζηϊωάννου Θ., Κουμπάρης Μ., *Ενόργανη Ανάλυση*, ΕΚΠΑ, Αθήνα, Κεφ. **13**, σελ. 334-364, **2000**.
21. Rose M., Johnstone R., *Mass spectrometry for chemists and biochemists*, Cambridge University Press, Great Britain, **1982**.
22. Davis R., Freason M., *Mass Spectrometry*, published by John Wiley & Sons, Great Britain, **1987**.

23. Touchstone J., Zweig G., Sherma J., *Handbook of Chromatography, Steroids*, CRC Press, Chapter 3, **1986**.
24. Blau K., Halket J., *Handbook of Derivatives for Chromatography*, John Wiley & Sons, Chapter 14, pp 298-325, **1977**.
25. Παπαιωάννου Δ. Α., Φασματομετρία Μάζας, Πάτρα, σελ. 15-16, **1999**.
26. Drozd J. *Chemical derivatisation in gas chromatography*, Journal of Chromatography Library, Elsevier, Chapter **1,2,3**, **1981**.
27. Knap D., *Handbook of Analytical Derivatization Reactions*, John Wiley & Sons, **Part I**, **1979**.
28. Opfermann G., Schanzer W., *Trimethylsilation –Aspects for Derivatisation*, Recent advances in Doping Analysis (4), Koln, **1997**.