

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΑΛΕΞΟΠΟΥΛΟΥ ΑΝΤΩΝΙΑ

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΠΑΓΟΡΕΥΜΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ
ΚΛΕΝΒΟΥΤΕΡΟΛΗ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

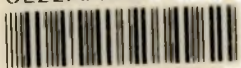
ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΚΟΥΡΕΤΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ
ΕΠΙΤΡΟΠΗ
ΚΟΜΙΩΤΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ
ΚΑΡΠΟΥΖΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ



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

Αριθ. Εισ.: 4653/1
Ημερ. Εισ.: 14-10-2005
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2005
ΑΛΕ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087874

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΤΙ ΕΙΝΑΙ DOPING:

Η Ελληνική απόδοση του όρου doping είναι φαρμακοδιέγερση η οποία αναφέρεται στους στόχους των φαρμάκων για τη θεραπεία ατόμων που πάσχουν από ασθένειες. Όταν χρησιμοποιούνται ορθολογικά, είναι σε θέση να σώσουν ζωές. Παρόλα αυτά οποιοδήποτε φάρμακο μπορεί να αποβεί επικίνδυνο, ειδικά όταν χρησιμοποιείται για μεγάλο χρονικό διάστημα και σε υψηλές δόσεις. Η καταχρηστική λήψη φαρμάκων μπορεί να αποβεί επιζήμια για την υγεία του αθλητή. Οι σημερινοί αθλητές είναι υποχρεωμένοι να προπονούνται σκληρότερα, για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα και από όσο το δυνατό μικρότερη ηλικία. Προκειμένου να ικανοποιήσουν τις αθλητικές τους φιλοδοξίες, ορισμένοι δεν διστάζουν να καταφύγουν σε παράνομα μέσα, όπως είναι η λήψη μιας απαγορευμένης ουσίας.

➤ Ο χώρος του αθλητισμού και ιδίως του πρωταθλητισμού στιγματίζεται συχνά από φαινόμενα κατάχρησης ουσιών, που θεωρούνται ότι προάγουν την αθλητική επίδοση.

➤ Η χρήση ουσιών ή μεθόδων για την αύξηση της αθλητικής απόδοσης θεωρείται απάτη, αδικία και είναι αντίθετη με το πνεύμα του έντιμου συναγωνισμού.

➤ Η καταχρηστική λήψη φαρμάκων μπορεί να αποβεί επιζήμια για την υγεία του ίδιου του αθλητή ή για τους συναθλητές του.

ΩΣ DOPING ΟΡΙΖΕΤΑΙ:

1. Η χρήση ενός μέσου (ουσίας ή μεθόδου), η οποία είναι ενδεχομένως βλαβερή για την υγεία των αθλητών και/ ή ικανή για την αύξηση της απόδοσής τους, ή
2. Η παρουσία στο σώμα ενός αθλητή μιας απαγορευμένης ουσίας ή απόδειξη της χρήσης από αυτόν ή απόδειξη της χρήσης απαγορευμένης μεθόδου.

Το ντόπινγκ αντικρούει τις θεμελιώδεις αρχές του Ολυμπισμού, των αθλημάτων και της ιατρικής ηθικής. Απαγορεύεται η σύσταση, πρόταση, έγκριση, εμπορία, παράβλεψη ή διευκόλυνση της χρήσης οποιασδήποτε ουσίας ή μεθόδου που καλύπτεται από τον ορισμό του ντόπινγκ. Αυτό που πρέπει να γνωρίζει ένας αθλητής, είναι ότι το ντόπινγκ μπορεί να τον σκοτώσει, σε κάθε περίπτωση πάντως σκοτώνει τον αθλητισμό. Το ντόπινγκ καταλύει όλες τις αρχές του αθλητισμού. Τραυματίζει ανεπανόρθωτα τη χαρά του παιχνιδιού, δεν σέβεται τους

ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΑΠΑΓΟΡΕΥΜΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

(Παγκόσμιος Κώδικας Αντί-ντόπινγκ 2005)

- Διεγερτικά
- Ναρκωτικά
- Κανναβινοειδή
- Αναβολικά
- Ορμόνες και ουσίες με παρόμοια δράση
- β2 Αγωνιστές
- Παράγοντες με Αντί-Οιστρογόνο δράση
- Διουρητικά και άλλοι παράγοντες συγκάλυψης (Μάσκες)
- Γλυκοκορτικοστεροειδή

ΔΙΕΓΕΡΤΙΚΑ

Είναι ουσίες που δρουν άμεσα στο ΚΝΣ και αυξάνουν τη διέγερση του εγκεφάλου και του σώματος. Είναι παράγωγα της αδρεναλίνης. Διαθέτουν επίσης περιφερικές δράσεις.

Παραδείγματα απαγορευμένων διεγερτικών:

Συμπαθομιμητικοί παράγοντες: Εφεδρίνη, Ψευδοεφεδρίνη, Φαινυλοπροπανολαμίνη.

Αμφεταμίνες: Μεθαμφεταμίνη, η 3,4-Μεθυλενοδιοξυαμφεταμίνη (MDA) και Έκσταση (MDMA).

Αμινεπτίνες, αμφεναζόλη, βρωματάνη, καφεΐνη, καρφεδόνη, κοκαΐνη, φορμοτερόλη, φενκαμφαμίνη, πεντετραζόλη, πιπρανόλη, σαλβουταμόλη, σαλμετερόλη, τερβουταλίνη και άλλες συγγενείς ουσίες.

👉 Τα διεγερτικά βρίσκονται σε ποικίλα φυτικά και διατροφικά συμπληρώματα, σε φάρμακα κατά του κρυολογήματος και της αλλεργικής ρινίτιδας.

ΛΟΓΟΙ ΧΡΗΣΗΣ ΔΙΕΓΕΡΤΙΚΩΝ

- Αυξάνουν την ετοιμότητα.
- Μειώνουν το αίσθημα της κόπωσης.
- Συγκαλύπτουν τον πόνο.
- Αυξάνουν την ανταγωνιστικότητα και την επιθετικότητα.
- Αυξάνουν τον συντονισμό των κινήσεων, τη δύναμη & την αντοχή του αθλητή.
- Προκαλούν βρογχοδιαστολή, αύξηση παλμού, ροής αίματος, επιπέδων γλυκόζης στο αίμα (Συμπαθομιμητικές Αμίνες).
- Διέγερση αναπνευστικού, προαγωγή λιπόλυσης (Καφεΐνη).

ΠΑΡΕΝΕΡΓΕΙΕΣ ΔΙΕΓΕΡΤΙΚΩΝ

- Συμπτώματα στέρησης: διαταραχές ύπνου, μυϊκές κράμπες, στομαχικά άλγη, εφίδρωση, αύξηση όρεξης, κατάθλιψη, εθισμός κ.ά.
- Βραχυπρόθεσμες παρενέργειες: ταχυπαλμίες, υπέρταση, πόνος στο στήθος, καταστολή αναπνευστικής λειτουργίας, επιθετικότητα, μυϊκή αδυναμία κ.ά.
- Μακροπρόθεσμες παρενέργειες: σοβαρή κατάθλιψη, προβλήματα μνήμης, μείωση βάρους και υποσιτισμός, ηπατική βλάβη, καρδιακή προσβολή κ.ά.

ΝΑΡΚΩΤΙΚΑ

Είναι παυσίπονα. Χρησιμοποιούνται για να ανακουφίσουν από τον πόνο και για τη θεραπεία της αναπνευστικής δύσπνοιας. Αποτελούν την ισχυρότερη μορφή παυσίπωνων.

Απαγορευμένα ναρκωτικά: Βουπρενορφίνη, Δεξτρομοραμίδη, Ηρωίνη, Υδροκωδεΐνη, Μεθαδόνη, Μορφίνη, Πενταζοκίνη, Πεθιδίνη κ.ά.

Επιτρέπονται: Μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (NSAIDs), ασπιρίνη, κωδεΐνη, δεξτρομεθορφάνη, δεξτροπροποξυφαΐνη, διυδροκωδεΐνη, διφαινοξυλικό, αιθυλομορφίνη, φολκοδίνη, προποξυφαΐνη, παρακεταμόλη και τραμαδόλη.

📌 Τα ναρκωτικά βρίσκονται σε φαρμακευτικά σκευάσματα που χρησιμοποιούνται για την ανακούφιση από τον ισχυρό πόνο.

ΛΟΓΟΙ ΧΡΗΣΗΣ ΝΑΡΚΩΤΙΚΩΝ

- Μείωση αντίληψης σωματικού άλγους.
- Ο αθλητής συνεχίζει να αγωνίζεται ή να προπονείται, ενώ είναι τραυματισμένος ή άρρωστος.

ΠΑΡΕΝΕΡΓΕΙΕΣ ΝΑΡΚΩΤΙΚΩΝ

- Εξάρτηση, ανοχή.
- Απώλεια συγκέντρωσης, ισορροπίας & συντονισμού κινήσεων.
- Λιποθυμίες, ταχυπαλμίες, νευρική κατάσταση, αλλαγές διάθεσης.
- Υπνηλία, καταστολή αναπνοής, ναυτία, εμετός, εφίδρωση, δυσκοιλιότητα.
- Μετάδοση μολυσματικών ασθενειών.

ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΗ

Η Ιατρική Επιτροπή της Διεθνούς Ολυμπιακής Επιτροπής (ΔΟΕ) αποφάσισε στις 28/4/1998, να συμπεριλάβει τα κανναβινοειδή στη λίστα των απαγορευμένων ουσιών.

ΛΟΓΟΙ ΧΡΗΣΗΣ ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΩΝ

- Σε μικρές ποσότητες προκαλούν αίσθημα χαλάρωσης και μειώνουν τις αναστολές. Συνήθως χρησιμοποιούνται για να μειωθεί ο φόβος του αγνώστου και να διατηρηθεί η ψυχραιμία.

ΠΑΡΕΝΕΡΓΕΙΕΣ ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΩΝ

- Μεγάλες ποσότητες μπορεί να βλάψουν τη νοητική λειτουργία. Ταυτόχρονα μπορεί να ελαττώσουν τον συντονισμό των κινήσεων και την ικανότητα του ατόμου να εκτελεί πολύπλοκες δραστηριότητες.

ΑΝΑΒΟΛΙΚΑ

Φυσικές ή τεχνητές ενώσεις που δρουν με τρόπο παρόμοιο με την ορμόνη τεστοστερόνη. Διαθέτουν τόσο Ανδρογόνες όσο και Αναβολικές ιδιότητες.

Απαγορεύονται:

Αναβολικά Ανδρογόνα Στεροειδή

- Εξωγενή όπως: Κλοστεβόλη, Νταναζόλη, Νανδρολόνη, Οξυμεθολόνη, Στανοζολόλη, Οξανδρολόνη, Μεθυλοτεστοστερόνη, Μεθανδριόλη.
- Ενδογενή όπως: Ανδροστενεδιόλη, Ανδροστενεδιόνη, Διυδροτεστοστερόνη, Διυδροεπιανδροστερόνη, Τεστοστερόνη.

Ο όρος Εξωγενής αναφέρεται σε μια ουσία η οποία δεν είναι δυνατόν να παραχθεί από το σώμα φυσικά.

Ο όρος Ενδογενής αναφέρεται σε μια ουσία η οποία είναι δυνατόν να παραχθεί από το σώμα φυσικά.

Άλλοι αναβολικοί παράγοντες που περιλαμβάνονται αλλά δεν περιορίζονται

Κλενβουτερόλη, Ζερανόλη και Ζιλπατερόλη

- ▶ Η κλεβουτερόλη είναι ένας β-αγωνιστής ο οποίος συμπεριφέρεται ως αναβολικός παράγοντας με ισχυρή δράση.

ΛΟΓΟΙ ΧΡΗΣΗΣ ΑΝΑΒΟΛΙΚΩΝ

- Αυξάνουν την πρωτεϊνοσύνθεση στα μυϊκά κύτταρα (διέγερση συστήματος RNA-πολυμεράσης)
- Εμποδίζουν την αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης μετά την άσκηση
- Προκαλούν:
 - Αύξηση μυϊκής μάζας, δύναμης, επιθετικότητας, αντοχής
 - Μείωση κόπωσης
 - Ήπιου βαθμού ευφορία.

ΠΑΡΕΝΕΡΓΕΙΕΣ ΑΝΑΒΟΛΙΚΩΝ

- Άνδρες: επιθετικότητα, στειρότητα και ανικανότητα, γυναικομαστία κ.ά.
- Γυναίκες: Ακμή, τριχοφυΐα στο πρόσωπο και στο σώμα, βάρυνση τόνου φωνής, διαταραχές έμμηνου κύκλου, αύξηση της επιθετικότητας και σεξουαλικής διάθεσης, αλωπεκία ανδρικού τύπου κ.ά
- Γενικά: ίκτερος, ηπατικές βλάβες, καρκίνος ήπατος, αλλαγές ισοζυγίου HDL/LDL

ΟΡΜΟΝΕΣ ΚΑΙ ΟΥΣΙΕΣ ΜΕ ΠΑΡΟΜΟΙΑ ΔΡΑΣΗ

Κατηγορίες

- Γοναδοτροπίνες: (χορειακή, υποφυσιακή και συνθετική γοναδοτροπίνη), απαγορεύεται και στους άνδρες και στις γυναίκες.
- Κορτικοτροπίνες: (ACTH, επινεφριδιότροπος ορμόνη).
- Αυξητική ορμόνη: (GH), αυξητικός παράγοντας της ινσουλίνης. (IGF-1), και όλοι οι αντίστοιχοι παράγοντες απελευθέρωσης και τα ανάλογά τους.
- Ερυθροποιητίνη (EPO).
- Ινσουλίνη: Επιτρέπεται μόνο για την θεραπεία αθλητών που πάσχουν αποδεδειγμένα από ινσουλινοεξαρτώμενο διαβήτη.

ΟΡΜΟΝΕΣ ΚΑΙ ΟΥΣΙΕΣ ΜΕ ΠΑΡΟΜΟΙΑ ΔΡΑΣΗ	ΛΟΓΟΙ ΧΡΗΣΗΣ	ΠΑΡΕΝΕΡΓΕΙΕΣ
Γονιδοτροπίνες (CG, LH)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Συναγωνιστική δράση με την GH. ▪ Αύξηση παραγωγής τεστοστερόνης (η χρήση της θεωρείται ανάλογη με τη λήψη τεστοστερόνης). 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Κεφαλαλγία, μεταβολές διάθεσης, κατάθλιψη, οίδημα. ▪ Διόγκωση των ωοθηκών και πιθανή υπογλυκαιμία. ▪ Άνδρες: ανάπτυξη γυναικομαστίας.
Κορτικοτροπίνες (ACTH)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Διεγείρουν την παραγωγή των κορτικοστεροειδών. ▪ Πρόκληση ευφορίας. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ψυχικές διαταραχές, σοβαρή μείωση οστικής μάζας.
Ινσουλίνη	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Διευκόλυνση εισόδου γλυκόζης στα κύτταρα. ▪ Βελτίωση αντοχής, ικανότητας ανάνηψης. ▪ Αύξηση μυϊκού όγκου. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Υπογλυκαιμίες.
Αυξητική ορμόνη (GH) & αυξητικός παράγοντας ινσουλινομόρφος της ινσουλίνης (IGF-1)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Διέγερση πρωτεϊνοσύνθεσης + λιπολυτική δράση. ▪ Αύξηση μυϊκής μάζας και δύναμης. ▪ hGH: Πρόληψη καταγμάτων, επιτάχυνση επούλωσης. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ GH: αύξηση μεγέθους οστών, μυοπάθειες, καρδιομυοπάθεια, δυσανοχή στην γλυκόζη / Σ.Δ, περιφερική νευροπάθεια. ▪ IGF-1: υπογλυκαιμία, τρέμουλο, εφίδρωση, υποθερμία.
Ερυθροποιητίνη (EPO)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Διέγερση παραγωγής ερυθροκυττάρων. ▪ Αύξηση ικανότητας μεταφοράς οξυγόνου (20%) & αντοχής. ▪ Αποτελέσματα παρόμοια με το Ντόπινγκ Αίματος. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Πονοκέφαλος, υπέρταση και αποπληξία. ▪ Θρομβοεμβολυτικές επιπλοκές: σχηματισμός θρόμβων αίματος, έμφραγμα, καρδιακή ανακοπή. ▪ Αύξηση δυσλειτουργιών μυελού.

Β2 ΑΓΩΝΙΣΤΕΣ

Όλοι οι β2 αγωνιστές συμπεριλαμβανομένων των D και L ισομερών τους απαγορεύονται. Η χρήση τους απαιτεί την Ιατρική απαλλαγή. Ανήκουν στους αναβολικούς παράγοντες.

Απαγορευμένοι β2 αγωνιστές: Φορμοτερόλη, Σαλβουταμόλη, Κλενβουτερόλη, Σαλμετερόλη, Τερβουταλίνη κ.ά. . Οι β2 αγωνιστές απαγορεύονται με εξαίρεση τις φορμοτερόλη, φαιντερμίνη, σαλβουταμόλη, σαλμετερόλη και τερβουταλίνη οι οποίες επιτρέπονται μόνο με χρήση συσκευής εισπνοής για την πρόληψη ή/και τη θεραπεία του άσθματος και του άσθματος που προκαλείται από την άσκηση.



ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΜΕ ΑΝΤΙ-ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΟ ΔΡΑΣΗ

Οι παράγοντες με αντί-οιστρογόνο δράση απαγορεύονται και στους άνδρες και στις γυναίκες:

1. Αναστολείς αρωματάσης όπως: αναστροζόλη, λετροζόλη, αμινογλουτεμίνη, εξεμεστάνη, φορμεστάνη, τεστολακτόνη
2. Εκλεκτικοί τροποποιητές υποδοχέα οιστρογόνων όπως: ραλοξιφαίνη, ταμοξιφαίνη, τορεμιφαίνη
3. Άλλες ουσίες με αντί-οιστρογόνο δράση όπως η κλομιφαίνη κ.ά.

ΔΙΟΥΡΗΤΙΚΑ ΚΑΙ ΑΛΛΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΣΥΓΚΑΛΥΨΗΣ (ΜΑΣΚΕΣ)

Ορίζεται οποιαδήποτε ουσία ή διαδικασία που χρησιμοποιείται με σκοπό, ή έχοντας την ιδιότητα, να αλλάξει ή να αλλοιώσει την αέραια σύσταση των ούρων ή άλλου δείγματος που χρησιμοποιείται για έλεγχο ντόπινγκ.

π.χ: τα διουρητικά, η επιτεστοστερόνη, η προβενεσίδη, τα υποκατάστατα του πλάσματος (π.χ υδροξυαιθυλάμυλο).

⚡ Σκευάσματα: φάρμακα για την θεραπεία της υπέρτασης, της καρδιακής ανεπάρκειας, των νεφρικών και ηπατικών διαταραχών καθώς και της προεμμηνορροϊκής διάτασης.

ΔΙΟΥΡΗΤΙΚΑ

Αυξάνουν τον όγκο των ούρων, συχνά μεταβάλλουν το ΡΗ και την ιοντική σύνθεση των ούρων και του αίματος.

Μειώνουν τον όγκο του πλάσματος και συνεπώς μειώνουν τη φλεβική επιστροφή στην καρδιά (προφορτίο)

Κατηγορίες

- Αναστολείς της Καρβονικής Ανυδράσης.
- Διουρητικά της Αγκύλης ή Ισχυρά Διουρητικά (π.χ η βουμετανίδη, η φουρεσαμίδη, η τορσεμίδη και το αιθακρυνικό οξύ).
- Θειαζιδικά Διουρητικά (π.χ χλωροθειαζίδη, χλωροθαλιδόνη, υδροχλωροθειαζίδη, ινδαπαμίδη, μετολαζόνη).
- Καλιοσυντηρητικά Διουρητικά (π.χ αμιλορίδη, η σπιρονολακτόνη, τριαμτερένη).
- Οσμωτικά Διουρητικά: (π.χ μαννιτόλη).

👉 Ποιοι τα χρησιμοποιούν: πυγμάχοι, οι αθλητές άλλων πολεμικών τεχνών, οι αρσιβαρίστες και γενικότερα όσοι επιδιώκουν να «φτιάξουν» το βάρος τους.

ΛΟΓΟΙ ΧΡΗΣΗΣ ΔΙΟΥΡΗΤΙΚΩΝ

- Ταχεία μείωση βάρους (απώτερος στόχος η συμμετοχή σε μικρότερη κατηγορία βάρους)
- Αύξηση παραγωγής και αποβολής ούρων (πιο δύσκολη η ανίχνευση απαγορευμένων ουσιών στα ούρα)

ΠΕΡΕΝΕΡΓΕΙΕΣ ΔΙΟΥΡΗΤΙΚΩΝ

- Αφυδάτωση
- Διαταραχές ηλεκτρολυτών
- Μυϊκές κράμπες
- Λιποθυμία, ζάλη, πονοκέφαλος
- Ναυτία, εμετός
- Αιματοπάθεια (αδυναμία καρδιακές αρρυθμίες)

ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΣΤΕΡΟΕΙΔΗ

Τα κορτικοστεροειδή είναι οι ισχυροί αντιφλεγμονώδεις παράγοντες. Η χρήση τους απαγορεύεται όταν χορηγούνται από το στόμα, πρωκτικά ή με ενδοφλέβια ή ενδομυϊκή ένεση. Η χορήγηση επιτρέπεται για:

- Τοπική χρήση (κρέμες, αλοιφές και σταγόνες για τα μάτια)
- Εισπνοή
- Ενδοαρθρικές ή τοπικές ενέσεις

ΛΟΓΟΙ ΧΡΗΣΗΣ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ

- Αίσθημα ευφορίας
- Αύξηση επιπέδων γλυκόζης στο αίμα άρα αύξηση αντοχής
- Αύξηση ερυθροποίησης
- Αύξηση διέγερσης παραγωγής στεροειδών

ΠΑΡΕΝΕΡΓΕΙΕΣ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ

- Αλλαγές διάθεσης
- Υπέρταση
- Ακμή
- Πτεπτικό έλκος
- Οστεοπόρωση
- Μείωση δράσης της ινσουλίνης

ΑΠΑΓΟΡΕΥΜΕΝΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΣΕ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΑ ΑΘΛΗΜΑΤΑ

- Αλκοόλη
- Β-Αδρενεργικοί αναστολείς
- Τοπικά αναισθητικά

ΑΛΚΟΟΛΗ

ΑΘΛΗΜΑΤΑ ΠΟΥ ΑΠΑΓΟΡΕΥΕΤΑΙ	ΛΟΓΟΙ ΧΡΗΣΗΣ	ΠΑΡΕΝΕΡΓΕΙΕΣ
<ul style="list-style-type: none">▪ Μηχανοκίνητος αθλητισμός,▪ Σκοποβολή▪ Ξιφασκία	<ul style="list-style-type: none">▪ Μείωση αισθήματος πόνου▪ Αύξηση αυτοπεποίθησης▪ Μείωση ψυχολογικών φραγμών▪ Μείωση στρες	<ul style="list-style-type: none">▪ Μείωση κρίσης αθλητή▪ Μείωση συντονισμού κινήσεων, χρόνου αντίδρασης▪ Αύξηση ρίσκου▪ Υπογλυκαιμία σε παρατεταμένη άσκηση▪ Αύξηση σωματικού βάρους

Β-ΑΔΡΕΝΕΡΓΙΚΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ

ΑΘΛΗΜΑΤΑ ΠΟΥ ΑΠΑΓΟΡΕΥΟΝΤΑΙ	ΛΟΓΟΙ ΧΡΗΣΗΣ	ΠΑΡΕΝΕΡΓΕΙΕΣ
<ul style="list-style-type: none">▪ Τοξοβολία,▪ Έλκηθρο▪ Καταδύσεις▪ Συγχρονισμένη κολύμβηση▪ Μοντέρνο πένταθλο▪ Σκοποβολή▪ Άλμα με σκι▪ Σκι ελεύθερου στιλ▪ Curling	<ul style="list-style-type: none">▪ Μείωση καρδιακού ρυθμού▪ Διατήρηση ψυχραιμίας	<ul style="list-style-type: none">▪ Η αλόγιστη χρήση μπορεί να ελαττώσει επικίνδυνα τον καρδιακό ρυθμό, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε καρδιακή ανεπάρκεια

ΤΟΠΙΚΑ ΑΝΑΙΣΘΗΤΙΚΑ

ΤΑ ΕΝΕΣΙΜΑ ΤΟΠΙΚΑ ΑΝΑΙΣΘΗΤΙΚΑ ΕΠΙΤΡΕΠΟΝΤΑΙ ΥΠΟ ΤΙΣ ΑΚΟΛΟΥΘΕΣ ΜΟΡΦΕΣ

- Βουπιβακαΐνη, λιδοκαΐνη, μεπιβακαΐνη, προκαΐνη, κ.α. μπορούν να χρησιμοποιηθούν αλλά όχι η κοκαΐνη. Αγγειοσυσταλτικοί παράγοντες (ανδρεναλίνη) ενδέχεται να χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό με τοπικά αναισθητικά.
- Μόνο τοπικές ή ενδο-αρθρικές εγχύσεις επιτρέπεται να εφαρμοστούν.
- Η χρήση τους επιτρέπεται μόνο με γραπτό σημείωμα από την υπεύθυνη ιατρική αρχή ή όταν κατά την διάρκεια των αγώνων εμφανιστεί ιατρική ανάγκη.

ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΑ

- Ειδικά συμπληρώματα πρωτεΐνης
- Συμπληρώματα βιταμινών & μετάλλων
- Συμπληρώματα βοτάνων
- Συμπληρώματα αμινοξέων
- Συμπληρώματα λιπιδίων
- Πλήρη - διατροφικά /ενεργειακά ποτά
- Ενεργειακές ράβδοι
- Gel υδατανθράκων

Συμπληρώματα διατροφής και αναβολικά ανδρογόνα στεροειδή

Εργαστήριο ντόπινγκ της Δ.Ο.Ε στην Κολωνία
Οκτώβριος 2000 έως Νοέμβριος 2001: αναλύθηκαν 634 μη ορμονικά συμπληρώματα διατροφής, σε 13 διαφορετικές χώρες, από 215 διαφορετικούς προμηθευτές.

- 14,8% βρέθηκε ότι περιείχαν απαγορευμένα Αναβολικά Ανδρογόνα Στεροειδή
- 24,5% προορμόνες νανδρολόνης & τεστοστερόνης
- 68,1% προορμόνες μόνο τεστοστερόνης
- 7,5% προορμόνες μόνο νανδρολόνης
- «θετικά συμπληρώματα» αγοράστηκαν στην Ολλανδία (25,8%), στην Αυστρία (22,7%), στο Ηνωμένο Βασίλειο (18,8%) και στην Αμερική (18,8%)

ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΑΠΑΓΟΡΕΥΜΕΝΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

A) Αύξηση Μεταφοράς Οξυγόνου

- Doping αίματος
- Χορήγηση προϊόντων που αυξάνουν την πρόληψη, μεταφορά ή διάθεση οξυγόνου

B) Φαρμακολογική, Φυσική και Χημική τροποποίηση

Γ) Γονιδιακό Doping

Αύξηση Μεταφοράς Οξυγόνου

- Ντόπινγκ αίματος: η χορήγηση αίματος, τεχνητών μεταφορέων οξυγόνου των ερυθρών κυττάρων του αίματος και σχετικών προϊόντων αίματος, σε έναν αθλητή, προκειμένου να αυξηθεί τεχνητά ο αριθμός των ερυθροκυττάρων
- Χορήγηση προϊόντων που αυξάνουν την πρόσληψη, μεταφορά ή διάθεση οξυγόνου:
 - Τροποποιημένα προϊόντα αιμοσφαιρίνης (π.χ αιμοσφαιρίνης βοοειδών και ανασυνδιασμένης αιμοσφαιρίνης)
 - Ενθυλακωμένα προϊόντα αιμοσφαιρίνης
 - Υπερφθοροχημικά & RSR13(το RSR13 τροποποιεί την αλλοστερική δομή της αιμοσφαιρίνης → επιτρέπει την απελευθέρωση περισσότερου O₂ στους ιστούς).

Φαρμακολογική, Φυσική και Χημική τροποποίηση

Η χρήση ουσιών και μεθόδων, συμπεριλαμβανομένων των Παραγόντων Συγκάλυψης (Μάσκες), οι οποίες αλλάζουν, επιχειρούν να αλλάξουν ή εύλογα αναμένεται ότι θα αλλάξουν την ακεραιότητα της σύστασης και την αξιοπιστία των δειγμάτων ούρων που χρησιμοποιούνται για τους ελέγχους ντόπινγκ.

Γονιδιακό Doping

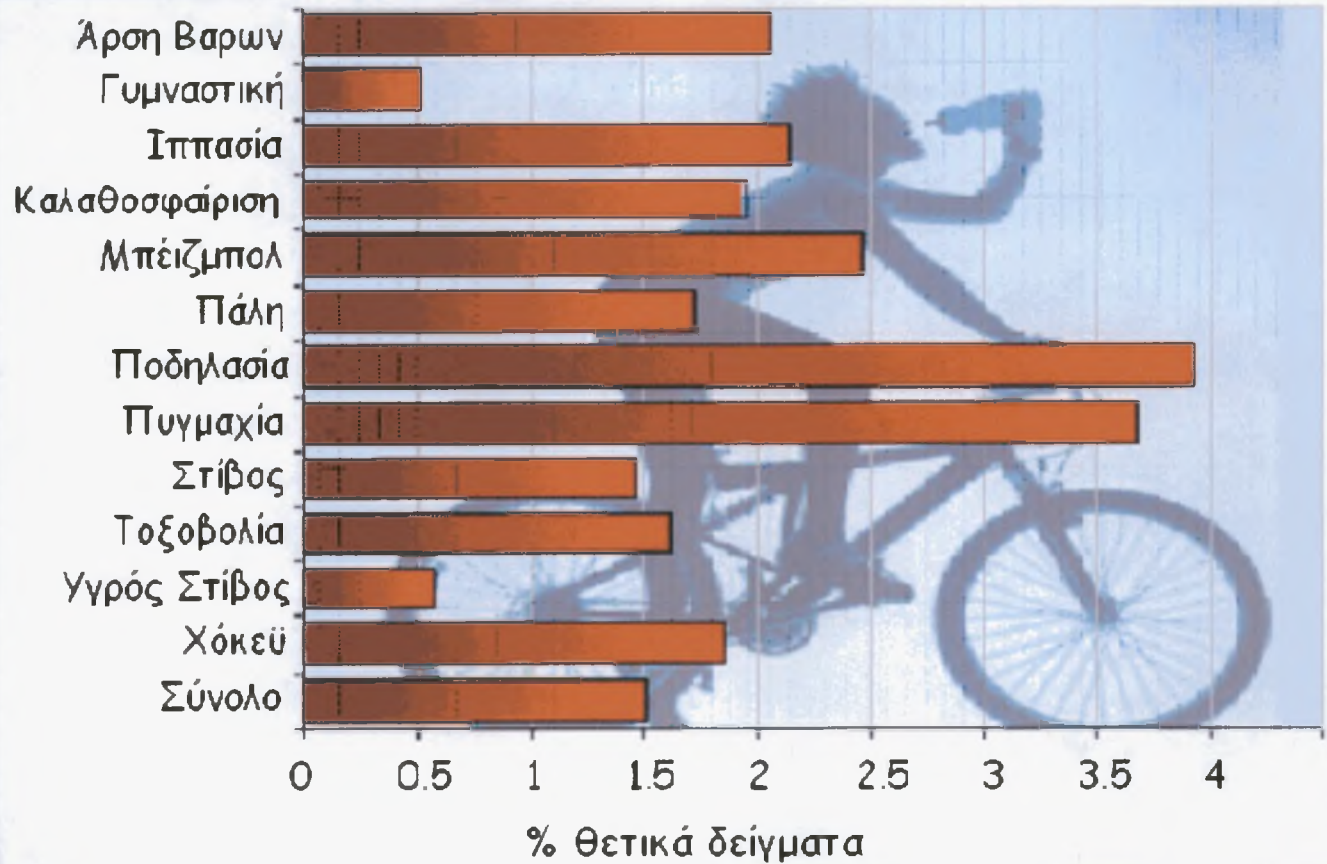
Ορίζεται η μη θεραπευτική χρήση γονιδίων, γενετικών στοιχείων και / ή κυττάρων, που έχουν την ικανότητα να βελτιώνουν την αθλητική απόδοση.

- Επίπεδα συγκεντρώσεων στα ούρα πάνω από τα οποία υφίσταται κανείς παράπτωμα doping

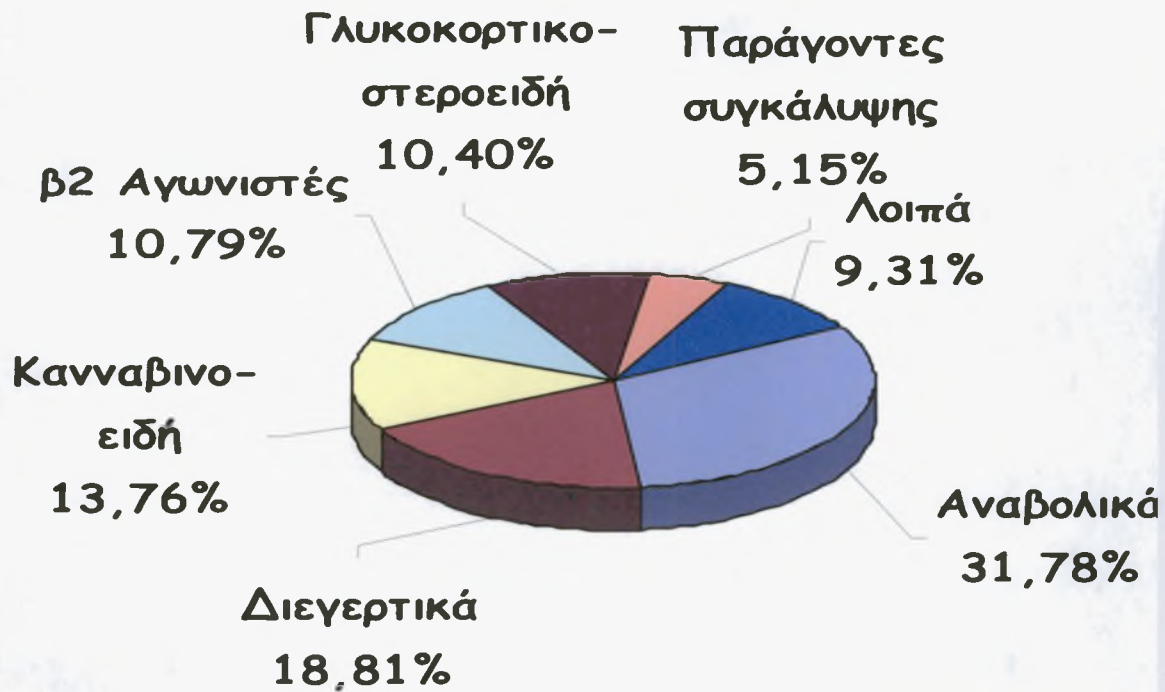
Κατηγορία απαγορευμένης ουσίας	Συγκεκριμένα παραδείγματα	Συγκεντρώσεις
Διεγερτικά		0.5 µg/mL
	Στρυχνίνη	0.2 µg/mL
Ναρκωτικά		0.2 µg/mL
	Βουπρενορφίνη	10 ng/mL
Αναβολικοί παράγοντες		10 ng/mL
	Κλενβουτερόλη	2 ng/mL
	Μεθαντιενόνη	2 ng/mL
	Μεθυλτεστοστερόνη	2 ng/mL
	Νορανδροστερόνη	1 ng/mL
	Στανοζολόλη	2 ng/mL
Β-αγωνιστές		0.5 µg/mL
Διουρητικά		0.25 µg/mL
Γλυκοκορτικοστεροειδή		30 ng/mL
Πεπτιδικές Ορμόνες		
	CG	5mIU/mL

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ: WADA 2003

▪ Ποσοστό % θετικών δειγμάτων σε ορισμένα ολυμπιακά αθλήματα

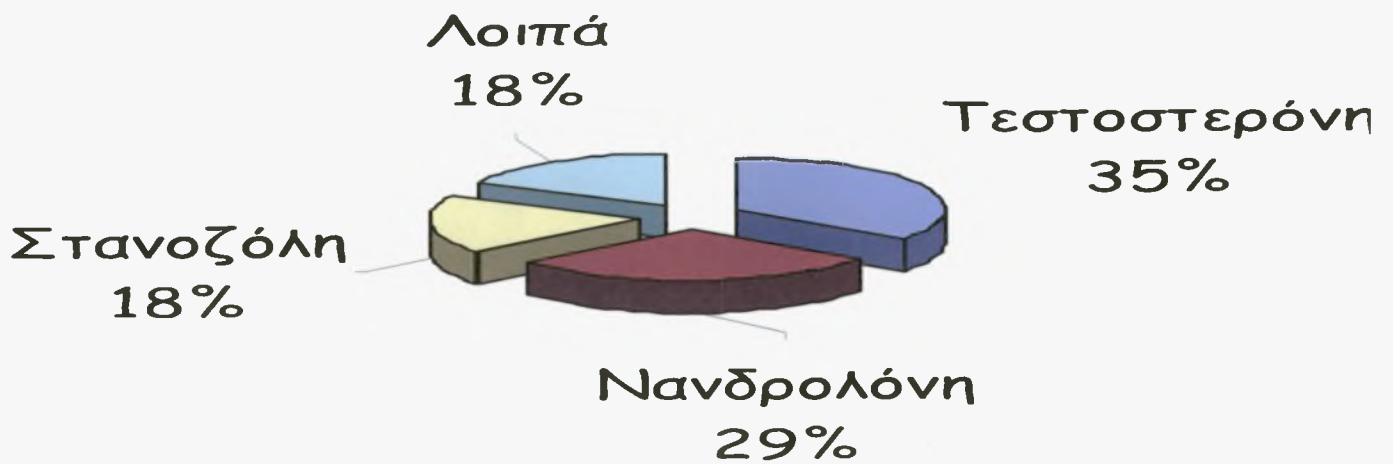


▪ Συμμετοχή της κάθε κατηγορίας απαγορευμένων ουσιών στο σύνολο των θετικών δειγμάτων



- Συμμετοχή των απαγορευμένων ουσιών σε κάθε κατηγορία

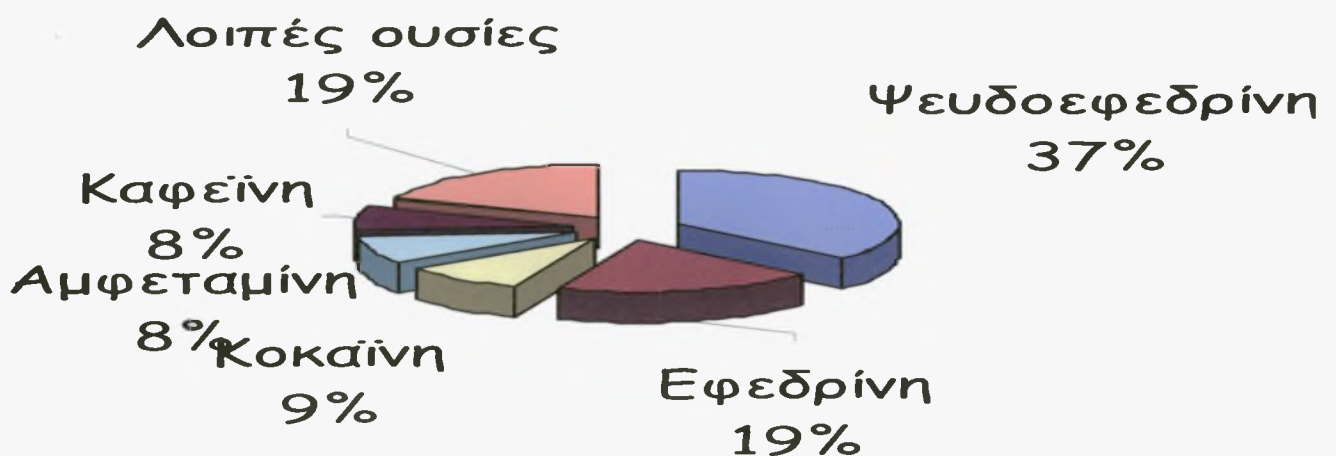
ΑΝΑΒΟΛΙΚΑ



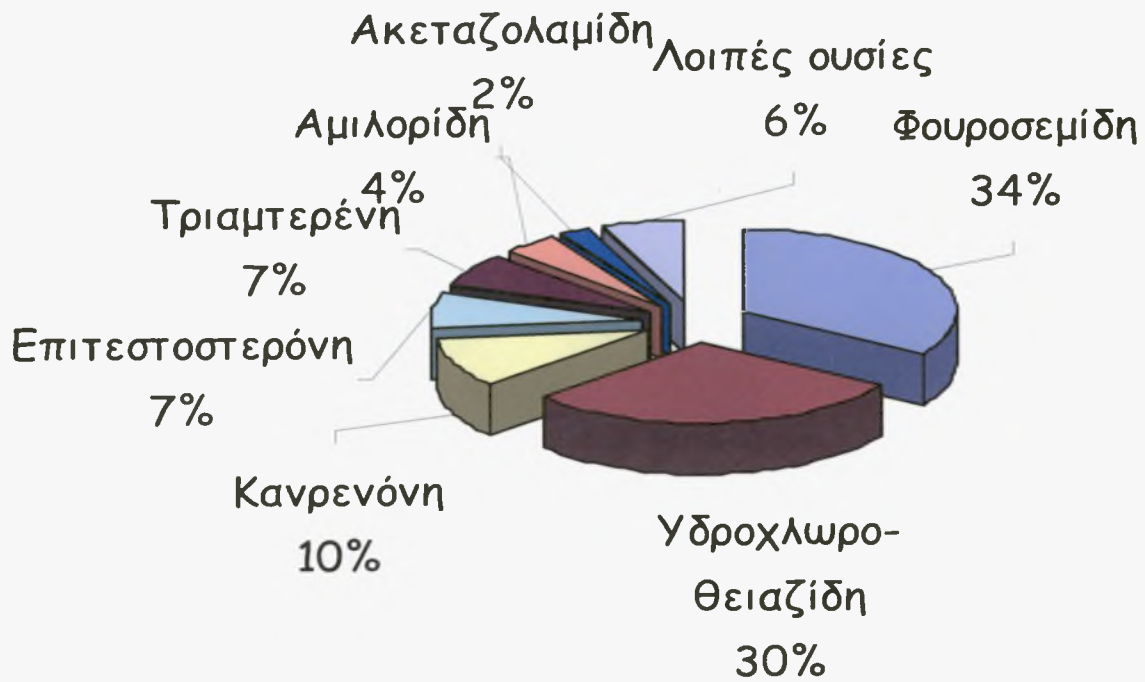
Β2 ΑΓΩΝΙΣΤΕΣ



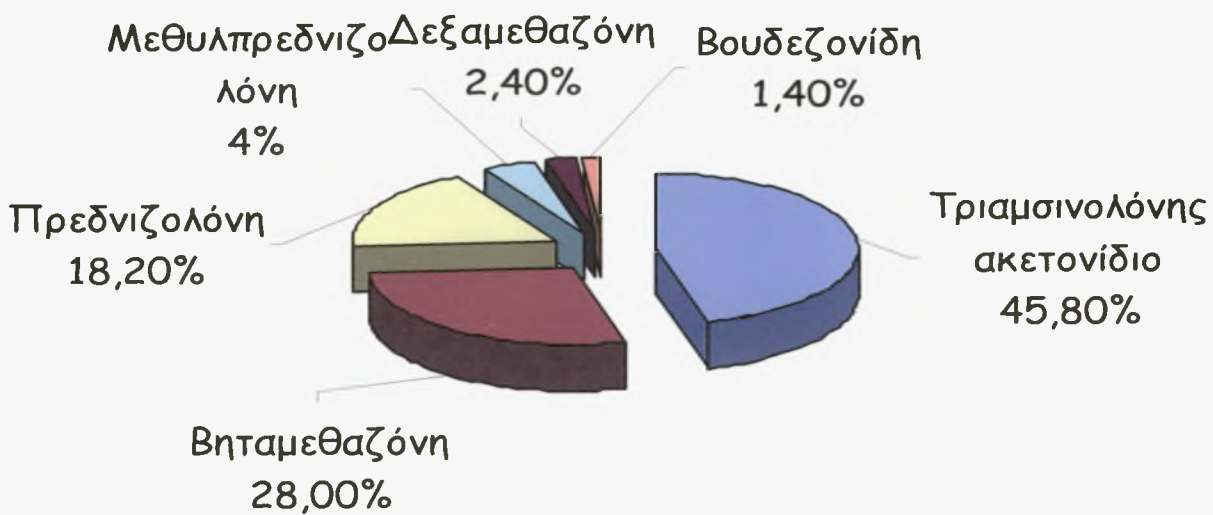
ΔΙΕΓΕΡΤΙΚΑ



ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΣΥΓΚΑΛΥΨΗΣ



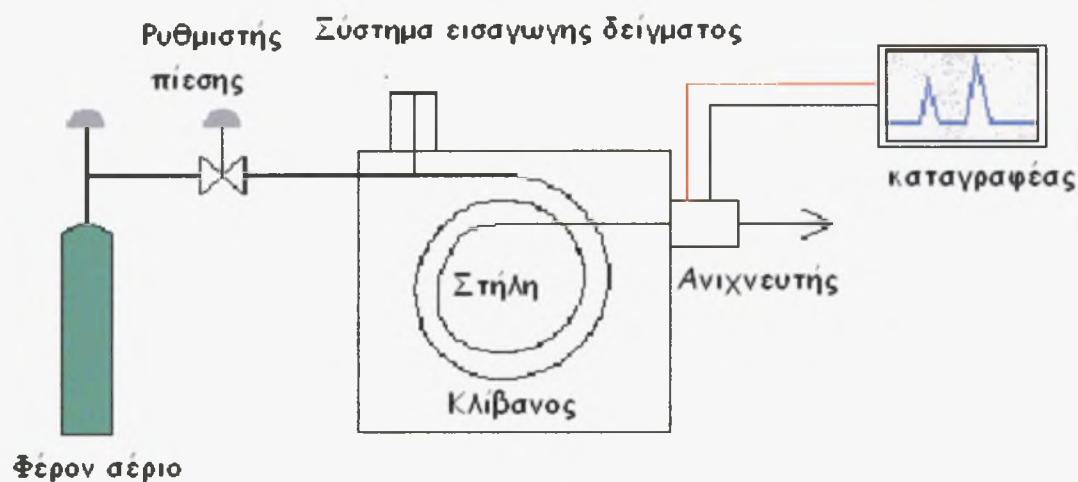
ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΣΤΕΡΟΕΙΔΗ



ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΑΠΑΓΟΡΕΥΜΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

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



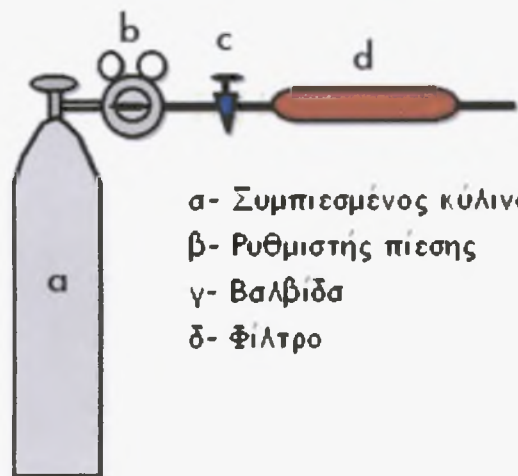
Σχηματική αναπαράσταση αέριας χρωματογραφίας.

➤ Οργανολογία Αέριας Χρωματογραφίας.

▪ Φέρον αέριο: Το φέρον αέριο αποτελεί την κινητική φάση, και πρέπει να είναι χημικά αδρανές έναντι του υλικού κατασκευής του αεριοχρωματογράφου, του πληρωτικού υλικού της στήλης και των προς διαχωρισμό ουσιών. Χρησιμοποιούνται κυρίως He, N₂ και Ar και σπανιότερα H₂ και CO₂. Η επιλογή του φέροντος αερίου γίνεται κυρίως με βάση τον τύπο του ανιχνευτή που χρησιμοποιείται, επειδή το φέρον αέριο πρέπει να διαφέρει σημαντικά από τις διαχωριζόμενες ουσίες ως προς μία ιδιότητα, π.χ. θερμική αγωγιμότητα, πυκνότητα κ.λ.π., στην οποία και βασίζεται η λειτουργία του ανιχνευτή. Το συνηθέστερο αέριο με ανιχνευτή θερμικής αγωγιμότητας είναι το ήλιο εξαιτίας της μεγάλης θερμικής αγωγιμότητας και μικρής πυκνότητας του, που επιτρέπει τη χρησιμοποίηση μεγαλύτερων ταχυτήτων ροής αερίου, με αντίστοιχη μείωση του χρόνου. Με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (FID) προτιμάται το άζωτο, ενώ με ανιχνευτή συλλήψεως ηλεκτρονίων (ECD) απαιτείται άζωτο ή αργό.

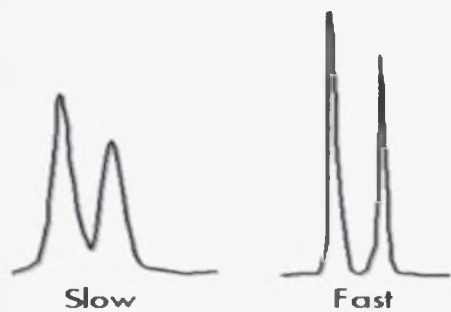
- Ρυθμιστής πίεσεως-ροόμετρο: Το φέρον αέριο από τη φιάλη, όπου βρίσκεται σε υψηλή πίεση 100-200 ατμοσφαιρών, διαβιβάζεται αρχικά μέσα από το ρυθμιστή πίεσεως ο οποίος με σύστημα βαλβίδων και ενδιάμεσων θαλάμων μειώνει δραστικά την πίεση (συνήθως σε 1 με 2 ατμ πάνω από την ατμοσφαιρική πίεση), και στη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

ΡΥΘΜΙΣΤΗΣ ΡΟΗΣ



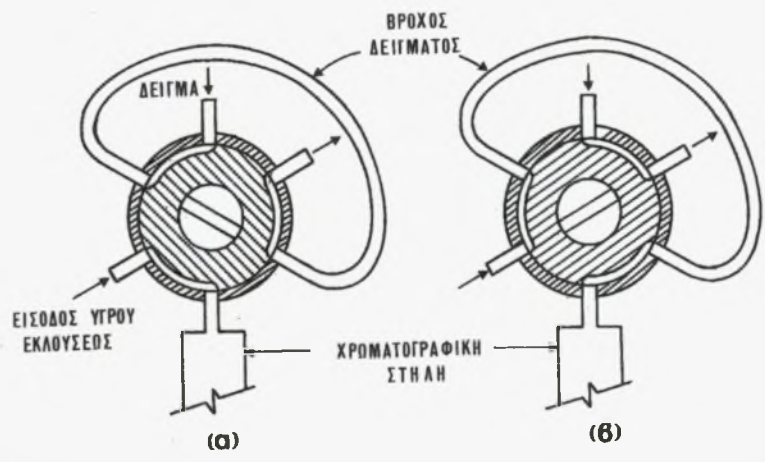
- α- Συμπιεσμένος κύλινδρος αέρα
- β- Ρυθμιστής πίεσης
- γ- Βαλβίδα
- δ- Φίλτρο

- Σύστημα εισαγωγής δείγματος: Το δείγμα εισάγεται με μικροσύριγγα στην αρχή της στήλης, μέσα από κατάλληλο στόμιο εισαγωγής που φράσσεται, με παχύ διάφραγμα από θερμοανθεκτικό ελαστικό (septum), το οποίο δρα ως βαλβίδα, που επιτρέπει την είσοδο του δείγματος, όχι όμως και την έξοδο αυτού και του φέροντος αερίου. Για την επίτευξη καλών διαχωρισμών πρέπει: 1) Η εισαγωγή του δείγματος να είναι ακαριαία (για να αποφευχθεί η διασπορά της ζώνης του δείγματος)



- 2) Ο όγκος του δείγματος να είναι όσο το δυνατόν μικρότερος (η διαχωριστική ικανότητα ελαττώνεται όταν η ποσότητα αυξάνεται) και 3) Ο χώρος εισαγωγής του δείγματος να θερμαίνεται υψηλότερα από τη θερμοκρασία της στήλης (σε θερμοκρασία υψηλότερη από τα σημεία ζέσεως των συστατικών του δείγματος), ώστε να επιτυγχάνεται άμεση εξαέρωση του δείγματος και παραλαβή των ατμών από το φέρον αέριο. Αν και τα αέρια δείγματα

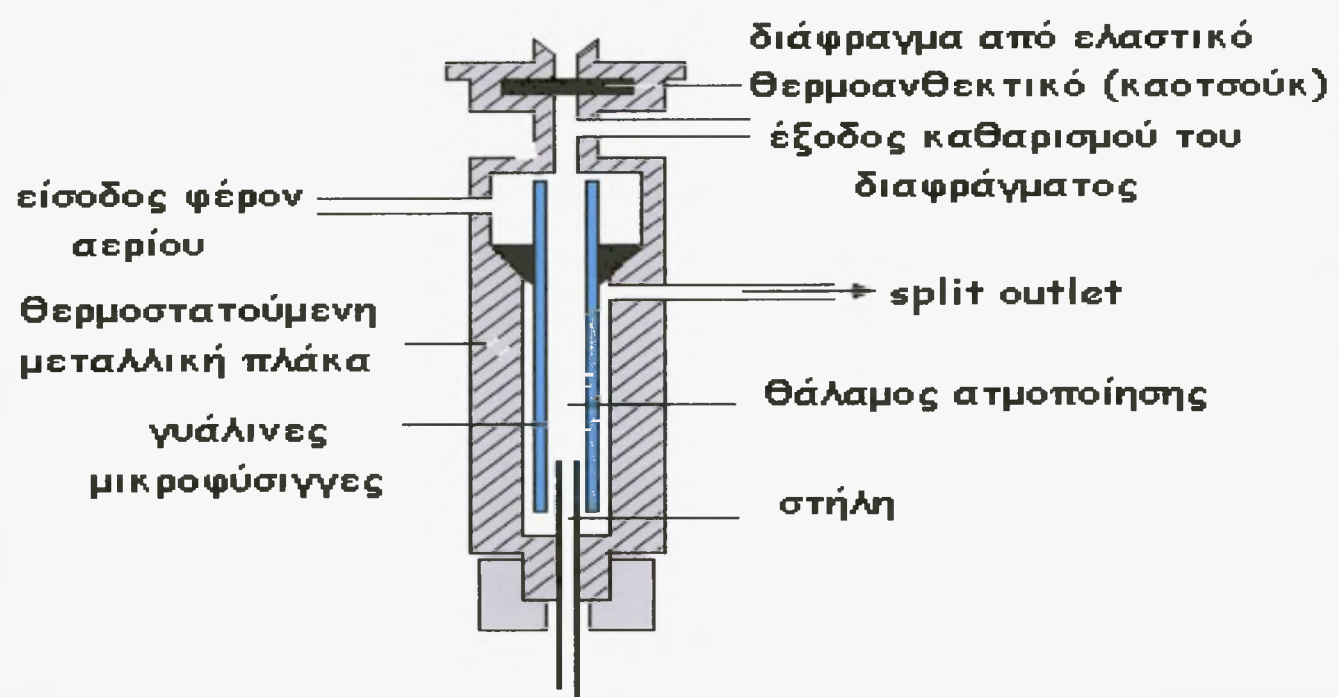
μπορούν να εισαχθούν με αεροστεγή σύριγγα, η εισαγωγή τους γίνεται συνήθως με ειδικό σύστημα περιστροφόμενης βαλβίδας με βρόγχο.



Στην διπλανή εικόνα παρατηρούμε το συγκεκριμένο σύστημα εισαγωγής όπου (α) η θέση 'φορτώσεως' και (β) η θέση εισαγωγής.

Στερεά ή πολύ ευαποσύνθετα υγρά δείγματα μπορούν να τοποθετηθούν μέσα σε γυάλινες μικροφύσιγγες, οι οποίες θραύονται ακριβώς πριν από τη στήλη. Το μέγεθος του δείγματος καθορίζεται από πολλούς παράγοντες (διαθέσιμη ποσότητα, χωρητικότητα στήλης, ευαισθησία ανιχνευτή κ.λ.π.). Για τις packed στήλες (θα αναλυθούν παρακάτω) η ποσότητα δείγματος που χρησιμοποιείται κυμαίνεται από 0.1-20μL. Οι capillary στήλες χρειάζονται πολύ μικρότερη ποσότητα δείγματος γύρω στα 10⁻³ μL. Για τις συγκεκριμένες στήλες χρησιμοποιείται ένα είδος έγχυσης το οποίο είναι γνωστό ως split/splitless και το διάγραμμα του παραθέτεται παρακάτω:

The split / splitless injector



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



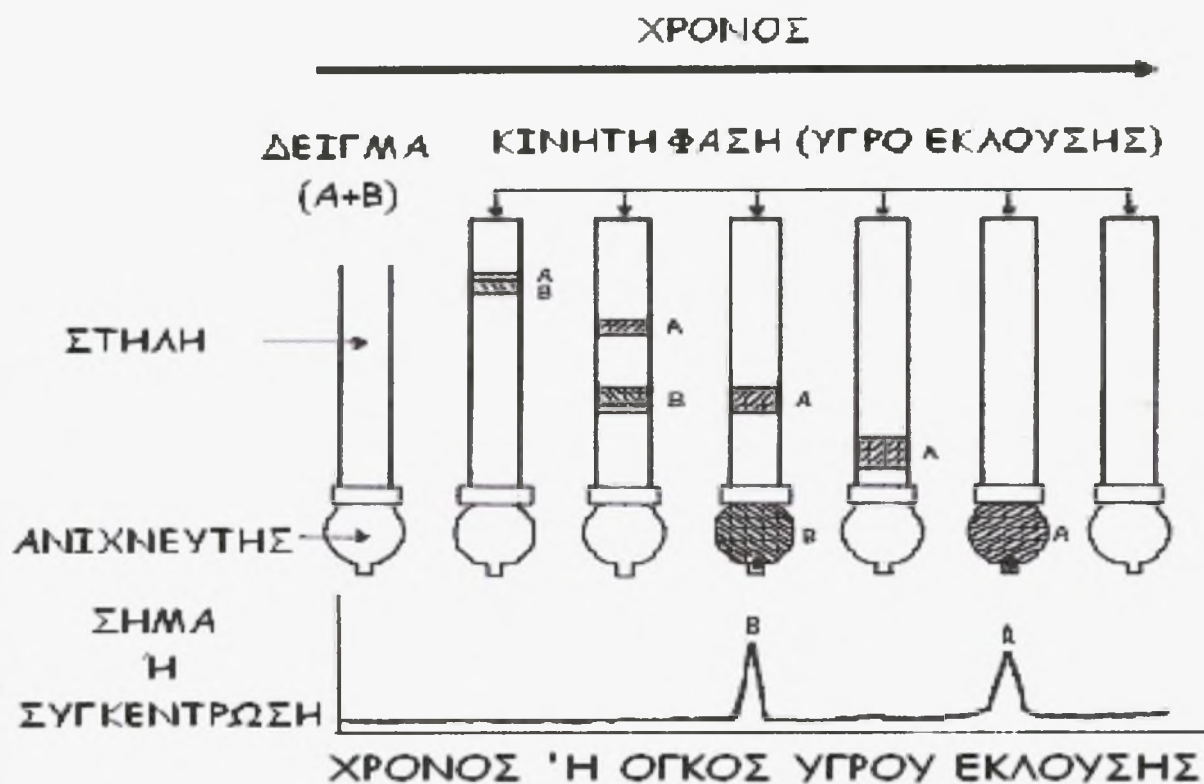
Η ακρίβεια των χρωματογραφικών αναλύσεων εξαρτάται πάρα πολύ από την ακρίβεια και την επαναληπτικότητα της διαδικασίας εισαγωγής του δείγματος. Στις μέρες μας η έγχυση του δείγματος γίνεται πλέον με αυτόματους εγχυτήρες.

▪ Θερμοστατούμενος κλίβανος: Ο χώρος εισαγωγής του δείγματος, η στήλη και σε πολλούς αέριους χρωματογράφους και ο ανιχνευτής, θερμοστατούνται στην περιοχή 50-300°C. Η βέλτιστη θερμοκρασία στήλης εξαρτάται από το σημείο βρασμού του δείγματος. Σαν γενικός κανόνας, μια θερμοκρασία λίγους βαθμούς υψηλότερη από τη μέση θερμοκρασία βρασμού του δείγματος φέρει χρόνο έκλουσης 2-30 λεπτά. Χαμηλές θερμοκρασίες δίνουν καλό διαχωρισμό, αλλά αυξάνουν το χρόνο έκλουσης. Η θερμοκρασία στήλης αυξάνεται καθώς η διαδικασία προχωρά.

▪ Στήλες: Η στήλη αποτελεί το σπουδαιότερο τμήμα του αέριου χρωματογράφου, και σε αυτήν γίνεται ο διαχωρισμός των συστατικών ενός μείγματος. Τα κύρια χαρακτηριστικά ποιότητας μιας στήλης είναι: 1) ο αριθμός των θεωρητικών πλακών 2) η διαχωριστικότητα 3) η χωρητικότητα και 4) ο απαιτούμενος χρόνος για την ανάλυση.

⚡ Αποτελεσματικότητα στήλης - Θεωρία πλακών. Στο σχήμα που ακολουθεί φαίνεται, ότι κατά τη διάρκεια της έκλουσης συμβαίνουν δύο ενδιαφέρουσες διαδικασίες: 1) τα συστατικά του μείγματος μετακινούνται στη στήλη με διαφορετικές ταχύτητες και 2) τα μόρια κάθε συστατικού διασπείρονται, από μία πολύ ευρύτερη ζώνη, καθώς εξέρχονται από τη στήλη (διεύρυνση ζώνης). Η πρώτη διαδικασία προκαλεί το διαχωρισμό ενώ η δεύτερη τείνει να τα κρατήσει αναμειγμένα. Η πρώτη θεωρία της χρωματογραφίας διατυπώθηκε το 1940 από τους Martin και Synge (βραβείο Nobel Χημείας 1952) και συνδύαζε τη διεύρυνση

των ζωνών με τη μετακίνηση των συστατικών στη στήλη. Σύμφωνα με τη θεωρία των πλακών, η κίνηση μιας ουσίας A μέσα από τη χρωματογραφική στήλη μπορεί να θεωρηθεί ως μετακίνηση μέσω διαδοχικών ζωνών εξισορροπήσεως, που ονομάζονται **θεωρητικές πλάκες**. Μια θεωρητική πλάκα είναι ο απαιτούμενος όγκος της στήλης, ώστε μέσα σε αυτόν να αποκαθίσταται η ισορροπία μεταξύ της στατικής και της κινητικής φάσης.



✦ **Διαχωριστικότητα:** Είναι ο βαθμός διαχωρισμού δύο ουσιών A και B. Με τη χρωματογραφία εμφανίζεται από το βαθμό αλληλοεπικάλυψης των αντιστοίχων κορυφών.

Υπάρχουν δύο γενικοί τύποι στηλών, α) οι **packed columns** (πληρωμένες στήλες) και β) οι **capillary columns** (τριχοειδείς στήλες γνωστές και σαν open tubular). Οι περισσότερες **packed columns** είναι 1.5-10m σε μήκος και 2-4mm σε διάμετρο. Περιέχουν ένα στερεό υπόστρωμα, συνήθως γη διατόμων ή πορώδη οργανικά πολυμερή, διαποτισμένο με κατάλληλο υγρό το οποίο αποτελεί την υγρή στατική φάση. Το στερεό υπόστρωμα πρέπει να είναι χημικά αδρανές, να παρουσιάζει μεγάλη επιφάνεια (ταχεία αποκατάσταση ισορροπίας), και να χαρακτηρίζεται από ομοιομορφία.



Οι *capillary columns* γνωστές και σαν *open tubular* (ανοικτού σωλήνα), χρησιμοποιούνται λιγότερο από τις *packed columns*, κυρίως για ειδικές αναλύσεις όπου είναι και πιο αποτελεσματικές. Κατασκευάζονται από γυαλί ή μέταλλο ή οργανικά πολυμερή, συνήθως δεν έχουν στέρεο υπόστρωμα (η υγρή

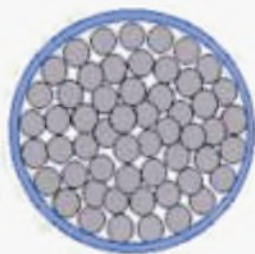


στατική φάση συγκρατείται απευθείας στα τοιχώματα του σωλήνα, με τη μορφή λεπτότατου υμένα), για το λόγο αυτό η χωρητικότητά τους είναι πολύ μικρή. Εξαιτίας της μικρής αντίστασης τους στη ροή του φέροντος αερίου και της μικρής πτώσης της πίεσης κατά μήκος τους, είναι δυνατή η λειτουργία τριχοειδών στηλών μήκους μεγαλύτερου από 1000 μέτρα. Βασικά

πλεονεκτήματα των στηλών αυτών είναι η δυνατότητα χρήσης εξαιρετικά μικρού δείγματος (1μg) και η υψηλή διαχωριστικότητα, που οφείλεται στον πολύ μεγάλο αριθμό θεωρητικών πλακών, μέχρι και 10^6 . Τις στήλες αυτές τις συναντάμε σε δύο κυρίως τύπους: στις *WCOT* (*wall-coated open tubular*) και στις *SCOT*. Οι *WCOT* είναι στήλες χωρίς στέρεο υπόστρωμα και τα τοιχώματά τους καλύπτονται από υγρή στατική φάση όπως προαναφέραμε. Οι *SCOT* (*support-coated open tubular*) φέρουν στα τοιχώματά τους ένα λεπτό στρώμα από υλικό, όπως γη διατόμων, το οποίο δρα βοηθητικά και πάνω σε αυτό απορροφάται η στατική φάση. Οι δεύτερες είναι λιγότερο αποτελεσματικές. Το 1979, εμφανίστηκε ένας νέος τύπος *WCOT* στηλών γνωστές ως *FSOT* (*fused silica open tubular*), οι στήλες αυτές κατασκευάζονται από λιωμένο πυρίτιο, είναι εύκαμπτες, ανθεκτικές και μπορούν να συσπειρώνονται σε έλικες. Στην παραπάνω φωτογραφία απεικονίζεται μια στήλη *FSOT*.

ΤΥΠΟΙ ΣΤΗΛΩΝ

Packed columns
Πληρωμένες στήλες



Capillary columns
Τριχοειδείς στήλες-open tubular



SCOT



WCOT

Οι ουσίες που χρησιμοποιούνται για την υγρή στατική φάση, διαφέρουν κυρίως ως προς τον βαθμό πολικότητας και την περιοχή που μπορούν να χρησιμοποιηθούν. Η υγρή φάση πρέπει να έχει τις εξής ιδιότητες:

- Να είναι σταθερή και να έχει αμελητέα τάση ατμών στη θερμοκρασία, στην οποία θα χρησιμοποιηθεί, γιατί διαφορετικά εκχέεται βραδέως από το υπόστρωμα και μολύνει τη στήλη.
- Να είναι αδρανής έναντι των διαχωριζομένων ενώσεων και του φέροντος αερίου, το οποίο πρέπει να είναι αδιάλυτο στην υγρή φάση.
- Να είναι καλός διαλυτής για τα συστατικά του δείγματος και οι συντελεστές κατανομής των διαχωριζομένων ενώσεων να διαφέρουν μεταξύ τους σε σημαντικό βαθμό, χωρίς όμως να είναι εξαιρετικά μικροί ή μεγάλοι.
- Να είναι αρκετά ρευστή στην περιοχή των θερμοκρασιών που επιλέγονται.
- Να διατίθεται στο εμπόριο σε τυποποιημένη μορφή, κατά προτίμηση ως μια καθαρή ένωση γνωστού μοριακού βάρους.

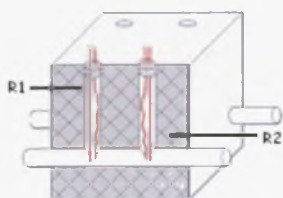
▪ Ανιχνευτές: Με τον ανιχνευτή γίνεται φανερή η παρουσία καθενός από τα συστατικά του μείγματος, τα οποία εξέρχονται από τη στήλη και μετρείται η ποσότητα ή η συγκέντρωσή τους μέσα στο φέρον αέριο. Διαφορετικοί ανιχνευτές θα δώσουν διαφορετικό τύπο διαχωρισμού. Ένας μη-εκλεκτικός ανιχνευτής αντιδρά θετικά σε όλα τα συστατικά εκτός από το φέρον αέριο. Ένας εκλεκτικός ανιχνευτής αντιδρά σε ένα εύρος συστατικών με μια συγκεκριμένη φυσική ή χημική ιδιότητα. Ένας ειδικός ανιχνευτής αντιδρά σε ένα μόνο χημικό συστατικό. Οι ανιχνευτές μπορούν να ταξινομηθούν σε δυο κατηγορίες, αναλόγως του εάν αυτοί αποκρίνονται στη συγκέντρωση της εκλυόμενης ουσίας X μέσα στο φέρον αέριο ή στην ταχύτητα ροής μάζας της X . Τα κυριότερα χαρακτηριστικά ποιότητας ενός ανιχνευτή είναι:

- Η ευαισθησία S [κλίση καμπύλης αποκρίσεως (σήματος R) του ανιχνευτή ως συνάρτηση της μετρούμενης ποσότητας Q της ουσίας X , $S = \Delta R / \Delta Q$]
- Η σταθερότητα
- 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 αποκρίσεως
- Η χημική δραστηριότητα (μερικές φορές δεν πρέπει να καταστραφεί η εκλυόμενη ποσότητα επειδή θα μελετηθεί περαιτέρω με άλλες τεχνικές)

Επειδή η ευαισθησία ενός ανιχνευτή ποικίλει ευρέως για διάφορες κατηγορίες ενώσεων, πολλοί αεριοχρωματογράφοι διαθέτουν δυο ή και περισσότερους ανιχνευτές συνδεδεμένους σε σειρά (όταν δεν καταστρέφεται το δείγμα) ή παράλληλα, για την ανίχνευση περισσότερων ουσιών στην έξοδο της ίδιας στήλης.

Παρακάτω περιγράφονται οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενοι ανιχνευτές.

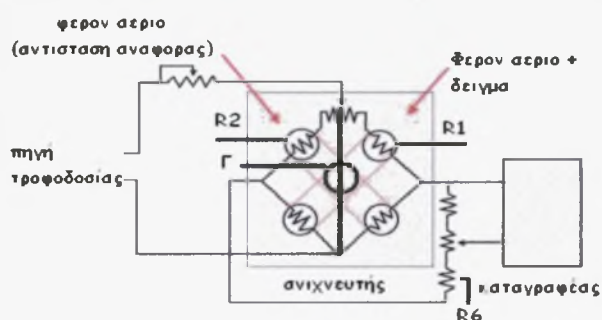
🔻 **Ανιχνευτής Θερμικής αγωγιμότητας.** Η λειτουργία του βασίζεται στο γεγονός ότι η ταχύτητα απώλειας θερμότητας από ένα θερμό σώμα εξαρτάται από τη θερμική αγωγιμότητα του αερίου που περιβάλλει το σώμα, επομένως και από τη σύσταση του. Στο διπλανό σχήμα δείχνονται α) η <κεφαλή> ενός ανιχνευτή θερμικής αγωγιμότητας με δύο θερμαινόμενες αντιστάσεις R1 και R2 και β) η



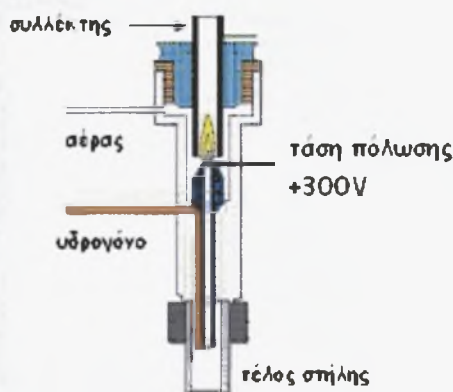
ηλεκτρική συνδεσμολογία του. Ο σωληνίσκος με την αντίσταση R1 περιβάλλεται από μείγμα του φέροντος αερίου και του συστατικού που εξέρχεται κάθε φορά από τη στήλη, ενώ η αντίσταση R2 περιβάλλεται μόνο από το φέρον αέριο και χρησιμεύει ως αντίσταση αναφοράς. Οι αντιστάσεις R1 και R2

παρεμβάλλονται σε γέφυρα Wheatstone, η οποία αρχικά ισορροπείται με το ποτενσιόμετρο R6 (ένδειξη 'μηδέν' στο γαλβανόμετρο Γ).

Όταν από τον ανιχνευτή διέρχεται μόνο το φέρον αέριο, η θερμική απώλεια είναι σταθερή, και για αυτό η θερμοκρασία των αντιστάσεων R1 και R2 παραμένει σταθερή. Όταν μεταβάλλεται η σύσταση του αερίου που περιβάλλει την αντίσταση R1 (έκλυση διαφόρων συστατικών τα οποία παρασύρονται από το φέρον αέριο), η θερμική αγωγιμότητα του μειώνεται, εξαιτίας της υψηλότερης θερμικής αγωγιμότητας του φέροντος αερίου σε σύγκριση με τις αέριες ουσίες που εκλύονται, και για αυτό η θερμοκρασία του σώματος της αντίστασης R1 και η ωμική της αντίσταση αυξάνονται, με αποτέλεσμα τη διατάραξη της ισορροπίας της γέφυρας. Το ρεύμα που απαιτείται για την αποκατάσταση της ισορροπίας της γέφυρας, μετρείται από τον καταγραφέα (χρωματογράφημα). Όσο μεγαλύτερη είναι η θερμική αγωγιμότητα του φέροντος αερίου και όσο μεγαλύτερη είναι η ένταση του ρεύματος (συνήθως 10-300mA) της γέφυρας (μεγαλύτερη θερμοκρασία των αντιστάσεων R1 και R2), τόσο περισσότερο ευαίσθητος είναι ο ανιχνευτής. Ως φέρον αέριο προτιμάται το He ή το H₂, εξαιτίας της υψηλής θερμικής αγωγιμότητας τους. Τονίζεται ότι, πριν από τη διαβίβαση ρεύματος από τον ανιχνευτή διαβιβάζεται από αυτόν για αρκετό χρόνο φέρον αέριο, και ουδέποτε ο ανιχνευτής βρίσκεται σε λειτουργία χωρίς σύγχρονη και συνεχή διαβίβαση φέροντος αερίου. Ο ανιχνευτής θερμικής αγωγιμότητας αποκρίνεται στη συγκέντρωση της προσδιοριζόμενης ουσίας και είναι κατάλληλος για την ποσοτική ανάλυση. Η απόκριση του ανιχνευτή εξαρτάται από τη φύση της ουσίας. Για αυτό και απαιτείται ξεχωριστή καμπύλη αναφοράς για κάθε προσδιοριζόμενη ουσία.



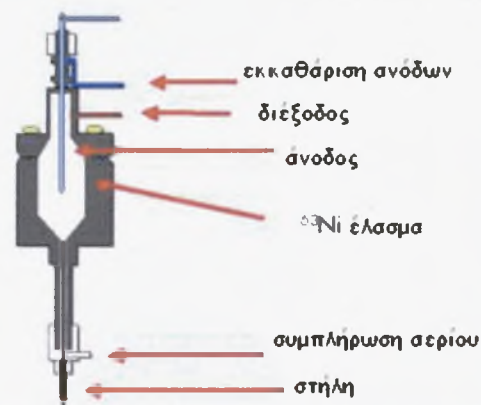
✚ **Ανιχνευτής ιονισμού φλόγας.** Η λειτουργία όλων των ανιχνευτών ιονισμού βασίζεται στο γεγονός ότι η ηλεκτρική αγωγιμότητα (εξαιτίας του ιονισμού) ενός αερίου είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των φορτισμένων σωματιδίων μέσα σε αυτό. Ο ιονισμός μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους (με φλόγα, ακτινοβολία, θερμική ή ηλεκτρική εκκένωση). Στον ανιχνευτή ιονισμού φλόγας το εκλυόμενο από τη στήλη αέριο αναμειγνύεται με υδρογόνο και καίεται στον αέρα. Η φλόγα βρίσκεται σε χώρο, όπου εφαρμόζεται τάση της τάξης των 100V, μεταξύ του ακροφυσίου (αρνητικό ηλεκτρόδιο) και ενός αλλού ηλεκτροδίου πάνω ή γύρω από



αυτό. Εφ' όσον το φέρον αέριο δεν περιέχει καύσιμες ενώσεις, μετά το άναμμα της φλόγας παρατηρείται ασθενέστερο ηλεκτρικό ρεύμα, εξαιτίας των ιόντων που σχηματίζονται κατά την καύση του υδρογόνου. Όταν όμως το καιγόμενο αέριο περιέχει και οργανικές ουσίες (έκλυσμα στήλης), παρατηρείται σημαντική αύξηση της εντάσεως του ρεύματος, εξαιτίας του μεγάλου αριθμού των ιόντων που παράγονται, το οποίο

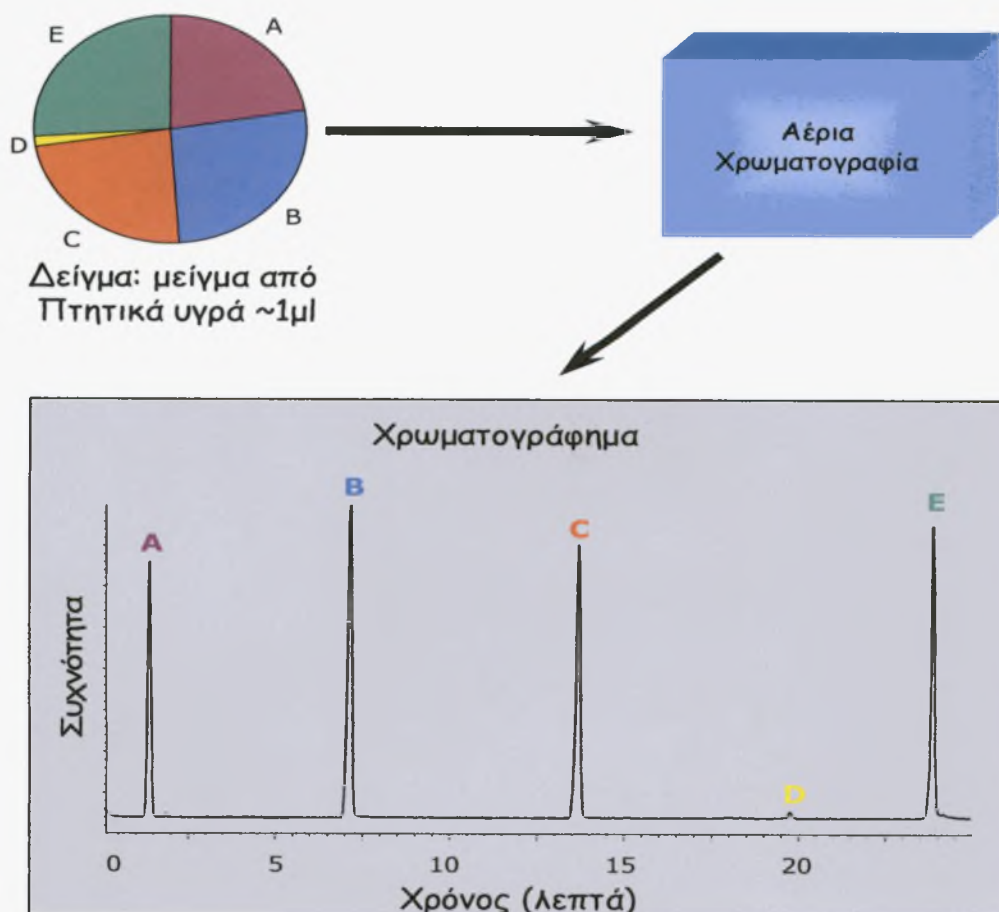
ενισχύεται και στη συνέχεια καταγράφεται. Οποτεδήποτε το έκλυσμα χρειάζεται για περαιτέρω μελέτη, μια ειδική διάταξη παρεμβάλλεται μεταξύ της στήλης και του ανιχνευτή, ώστε να μην καταστραφεί μέσα σε αυτόν. Ο ανιχνευτής αυτός χρησιμοποιείται στην ποσοτική ανάλυση οργανικών κυρίως συστατικών.

✚ **Ανιχνευτής συλλήψεως ηλεκτρονίων.** Η λειτουργία του βασίζεται στη μεταβολή της αγωγιμότητας του αερίου που διέρχεται από αυτόν, εξαιτίας των ιόντων που δημιουργούνται από ραδιενεργή πηγή, που βρίσκεται μέσα στον ανιχνευτή. Ο ανιχνευτής συλλήψεως ηλεκτρονίων αποκρίνεται στη συγκέντρωση της προσδιοριζόμενης ουσίας. Το έκλυσμα της στήλης εισάγεται μέσα σε θάλαμο, όπου υπάρχουν 2 μεταλλικοί σπλισμοί, συνδεδεμένοι με πηγή σταθερής τάσεως. Η αγωγιμότητα μεταξύ των σπλισμών αποκαθίσταται με την βοήθεια μιας σταθερής ροής ηλεκτρονίων, που προέρχονται από ραδιενεργή πηγή ακτινών β, η οποία αποτελείται από έλασμα που περιέχει ^{63}Ni . Όταν το έκλυσμα περιέχει μόρια οργανικών ενώσεων, προκαλείται ελάττωση της αγωγιμότητας του χώρου μεταξύ των σπλισμών, εξαιτίας της σύλληψης ηλεκτρονίων από αυτά και μείωση του ρεύματος. Το ρεύμα είναι πολύ ασθενές και για αυτό ενισχύεται πριν από την καταγραφή του.



▪ Ενισχυτής, καταγραφέας, παρουσίαση αποτελεσμάτων: Το σήμα που προέρχεται από τον ανιχνευτή είναι πολύ ασθενές και πρέπει να ενισχυθεί πριν την καταγραφή του. Ενισχυτές στερεής κατάστασης επιτρέπουν την ενίσχυση του σήματος πρακτικώς σε οποιοδήποτε βαθμό. Για τη λήψη του χρωματογραφήματος απαιτείται καταγραφέας ταχείας αποκρίσεως. Όταν ο ανιχνευτής εντοπίσει ένα συστατικό, στέλνει ηλεκτρονικό μήνυμα στον καταγραφέα, ο οποίος ανταποκρίνεται τυπώνοντας μια κορυφή σε χαρτί. Δύο συσκευές χρησιμοποιούνται για την καταγραφή των συστατικών που εντοπίζονται υπό την μορφή κορυφών (peaks): 1) οι ενσωματωμένες συσκευές 2) οι ηλεκτρονικοί υπολογιστές.

Κάθε τύπος συσκευής καταγράφει το μήνυμα το οποίο στέλνεται από τον ανιχνευτή υπό τη μορφή κορυφής, υπολογίζει τον χρόνο κατακράτησης και υπολογίζει την περιοχή κάτω από κάθε κορυφή. Όλες αυτές οι πληροφορίες περιλαμβάνονται στην εκτύπωση. Για παρόμοιες ενώσεις, τα εμβαδά κάτω από τις GC κορυφές είναι κατά προσέγγιση ανάλογα με τα ποσά των ενώσεων που εγχύθηκαν. Εάν ένα μείγμα δύο συστατικών δώσει συγγενικές περιοχές των 75:25, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι το μείγμα περιέχει 75% από το ένα συστατικό και 25% από το άλλο.



► Τι είναι χρόνος κατακράτησης (Retention Time):

Ο χρόνος κατακράτησης, RT, είναι ο χρόνος που χρειάζεται μια ένωση να «ταξιδέψει» από τη θέση έγχυσης έως τον ανιχνευτή. Ο χρόνος κατακράτησης μετρείται από τον καταγραφέα από τη στιγμή που θα εγχυθεί το δείγμα μέχρι που ο ανιχνευτής καταγράφει μια κορυφή.

Παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν τον διαχωρισμό στην αέρια χρωματογραφία

- Πτητικότητα των ενώσεων: συστατικά με χαμηλά σημεία βρασμού ταξιδεύουν γρηγορότερα μέσα στη στήλη από ότι συστατικά με υψηλά σημεία βρασμού.
- Πολικότητα των ενώσεων: πολικά συστατικά μετακινούνται βραδύτερα, ειδικά αν η στήλη είναι πολική.
- Θερμοκρασία της στήλης: αυξάνοντας την θερμοκρασία της στήλης επιταχύνεται η ταχύτητα όλων των συστατικών μέσα σε ένα μείγμα.
- Ταχύτητα ροής του φέροντος αερίου: αυξάνοντας την ταχύτητα ροής του αερίου που διέρχεται τη στήλη επιταχύνεται και η ταχύτητα με την οποία κινούνται όλες οι ενώσεις.
- Μήκος της στήλης: όσο μεγαλύτερη σε μήκος είναι η στήλη, τόσο περισσότερος χρόνος απαιτείται για την έκλουση του μείγματος. Παράλληλα, πραγματοποιείται καλύτερος διαχωρισμός.

GC/MS

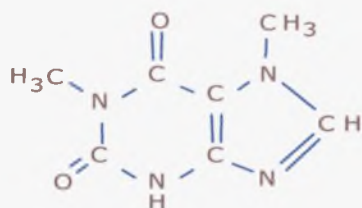
Από το συνδυασμό της αέριας χρωματογραφίας με την φασματομετρία μαζών προκύπτει η GC/MS. Οι δύο τεχνικές αλληλοσυμπληρώνονται με μεγάλη επιτυχία για τη δημιουργία της καινούργιας τεχνικής. Η αέρια χρωματογραφία μπορεί να ξεχωρίσει πτητικές και ημιπτητικές ουσίες με μεγάλη διακριτική ικανότητα αλλά δεν μπορεί να τις αναγνωρίσει. Από την άλλη, η φασματομετρία μαζών μπορεί να δώσει λεπτομερείς δομικές πληροφορίες για πληθώρα ενώσεων αλλά δεν είναι σε θέση να τις διαχωρίσει. Οπότε δεν μας προκαλεί έκπληξη ο συνδυασμός των δυο αυτών τεχνικών μετά την εφεύρεση της αέριας χρωματογραφίας.

Η αέρια χρωματογραφία και η φασματομετρία μαζών είναι δύο τεχνικές συμβατές. Και στις δυο τεχνικές, το δείγμα είναι υπό τη μορφή αεριοποιημένου υγρού, και οι δυο τεχνικές απαιτούν μικρή ποσότητα δείγματος (μικρότερη από 1ng). Δυστυχώς, υπάρχει μια διαφορά ανάμεσα στις δυο τεχνικές μεγάλης σημασίας. Η ένωση βγαίνοντας από την αέρια χρωματογραφία υπάρχει σε ίχνη μέσα στο φέρον αέριο σε πίεση περίπου 760 torr, ενώ αντίθετα η φασματομετρία μαζών λειτουργεί σε κενό στους 10^{-6} με 10^{-5} torr.

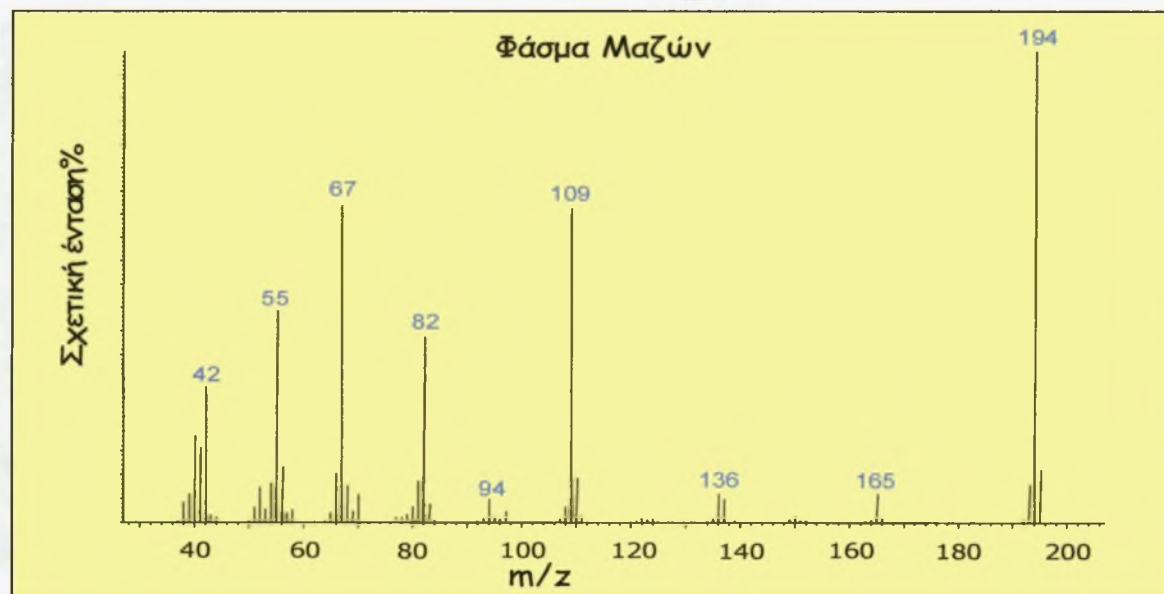
ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ

Η φασματομετρία μαζών είναι μια δυναμική τεχνική για την ταυτοποίηση «άγνωστων» συστατικών, για την μελέτη μοριακών δομών ακόμα και για την εξερεύνηση θεμελιωδών αρχών της χημείας. Η λειτουργία της φασματομετρίας βασίζεται στην ιδιότητα που εμφανίζουν τα ηλεκτρόνια, σχετικά υψηλής ενεργειακής στάθμης, όταν προσκρούσουν σε μόρια μιας ένωσης, που βρίσκεται σε αέρια φάση και σε συνθήκες υψηλού κενού, τότε τα μόρια της ένωσης μετατρέπονται σε ιόντα με θετικό, συνήθως φορτίο. Στη συνέχεια, με τη βοήθεια ηλεκτρικών πεδίων, τα παραχθέντα ιόντα ευθυγραμμίζονται σε λεπτή δομή(δέσμη). Η δέσμη διέρχεται μέσω ηλεκτρικού ή μαγνητικού πεδίου, όποτε 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 .

Mass Spectrometry



Τυπικό δείγμα: απομονωμένη ένωση ~1μg



Το παραπάνω διάγραμμα δείχνει την ένταση του μετρούμενου ρεύματος ως συνάρτηση του λόγου m/z και ονομάζεται φάσμα μαζών της ουσίας. Το φάσμα μαζών μιας ένωσης παριστάνεται συνήθως ως γράφημα, με τη μάζα (τιμές m/z) στον άξονα των x και την ένταση (αριθμός ιόντων δεδομένης τιμής m/z που φθάνουν στον ανιχνευτή) στον άξονα των y . Στην υψηλότερη κορυφή, που αποκαλείται βασική κορυφή, αποδίδεται αυθαίρετα ένταση 100%. Επειδή τα ιόντα που παράγονται φέρουν κατά κανόνα 1 φορτίο, ο λόγος m/z αντιστοιχεί αριθμητικά με το μοριακό βάρος του ιόντος.

➤ Οργανολογία Φασματομέτρων Μαζών

Τα φασματομέτρα μαζών αποτελούνται από τα ακόλουθα κοινά και διακριτικά τμήματα: 1) το σύστημα εισαγωγής του δείγματος 2) την πηγή ιόντων 3) τον αναλυτή μαζών και 4) τον ανιχνευτή. Εκτός από αυτά τα τμήματα, κάθε φασματομέτρο μαζών περιλαμβάνει συστήματα δημιουργίας υψηλού κενού, καθώς και συστήματα παρουσίασης των φασμάτων, όπως π.χ. καταγραφείς και παλμογράφους. Τα σύγχρονα φασματομέτρα μαζών περιλαμβάνουν ηλεκτρονικό υπολογιστή, τόσο για τον κεντρικό έλεγχο της λειτουργίας τους, όσο και για την ταχεία επεξεργασία, παρουσίαση και ερμηνεία του φάσματος.

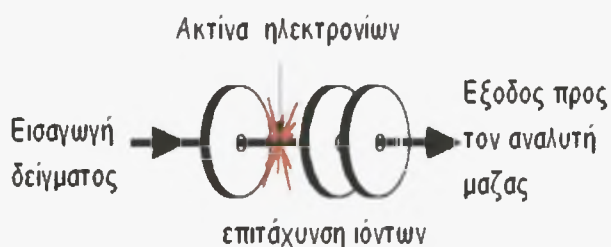


▪ Μέθοδοι ιονισμού: η παραγωγή ιόντων χαρακτηριστικών της υπό προσδιορισμό ουσίας πραγματοποιείται στην πηγή ιόντων.

⚡ Πηγή ιονισμού με πρόσκρουση ηλεκτρονίων (electron ionization ή EI).

Ο ιονισμός μέσω ηλεκτρονίων διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάλυση των μικρών μορίων. Στην πραγματικότητα, οι βάσεις δεδομένων που περιέχουν πάνω από 100.000 φάσματα μαζών ιονισμού μέσω ηλεκτρονίων χρησιμοποιούνται

καθημερινά από χιλιάδες χημικούς. Αυτές οι βάσεις δεδομένων που συνδυάζονται με την τρέχουσα ικανότητα αποθήκευσης στους υπολογιστές επιτρέπουν τη γρήγορη σύγκριση με τα γνωστά φάσματα μαζών, διευκολύνοντας κατά συνέπεια το δομικό προσδιορισμό μικρών

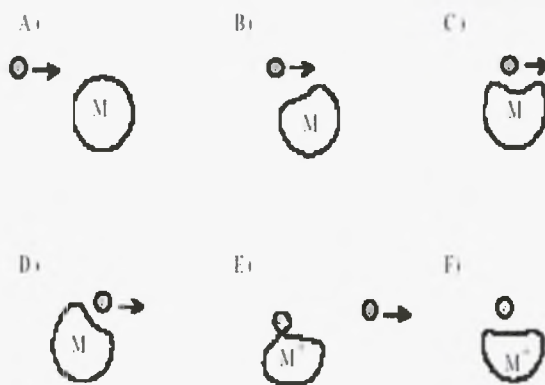


μορίων. Η τεχνική ιονισμού είναι απλή. Το δείγμα παραδίδεται υπό τη μορφή αερίου, σε αυτή τη φάση η ένωση περνά στην περιοχή ιονισμού όπου και αλληλεπιδρά με μια δέσμη (ακτίνα) ηλεκτρονίων μεγάλης κινητικής ενέργειας στην περιοχή ~70 eV. Κατά την πορεία τους τα ηλεκτρόνια συγκρούονται με μερικά από τα μόρια της ένωσης προκαλώντας τους κάποιο βαθμό τεμαχισμού, οπότε παράγονται θετικά μοριακά ιόντα (κατιονικές ρίζες), σύμφωνα με την αντίδραση :

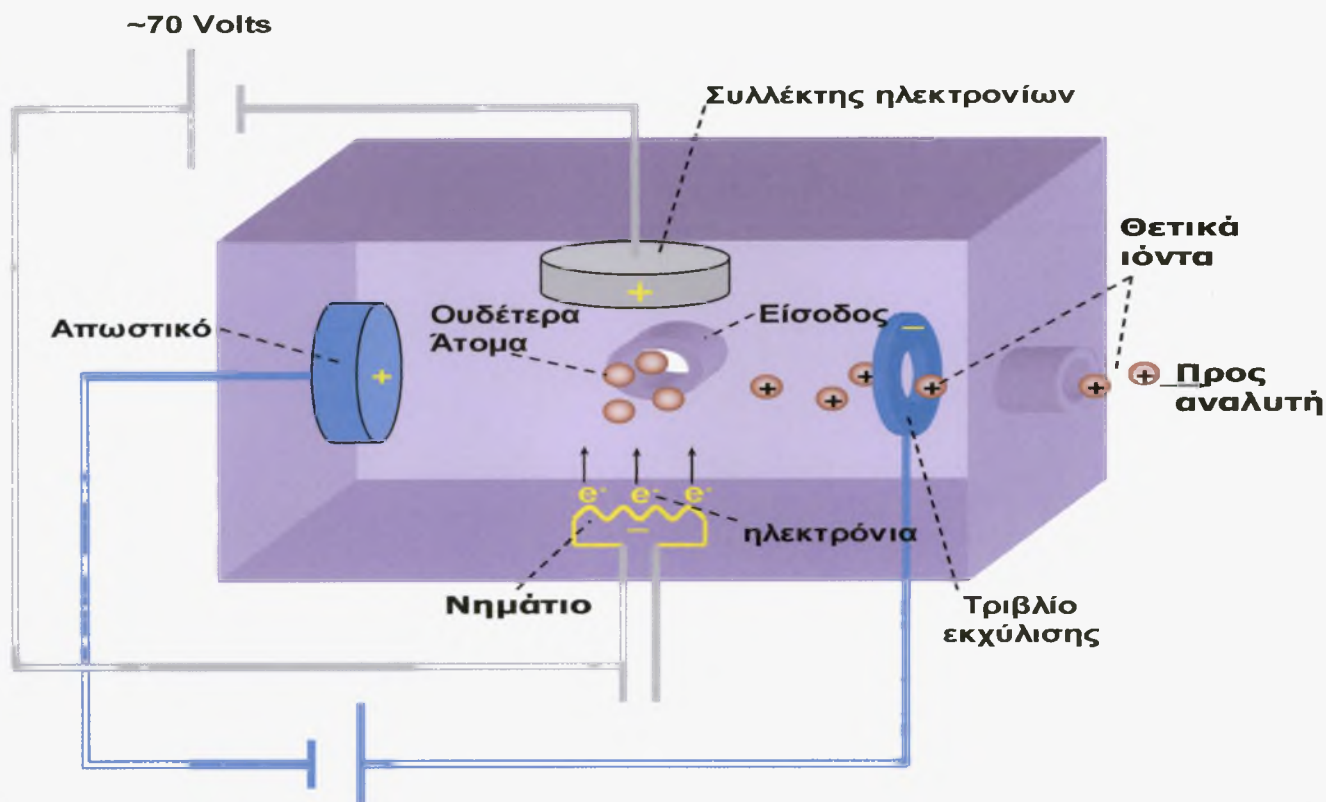


Στην συγκεκριμένη περίπτωση ο ιονισμός δεν προκαλείται με σύλληψη ηλεκτρονίων, αντίθετα όπως είδαμε παράγονται θετικά ιόντα του προς ανάλυση δείγματος.

Στη διπλανή εικόνα παρατηρούμε καθώς το ηλεκτρόνιο περνά δίπλα από το μόριο, το αρνητικό φορτίο του ηλεκτρονίου απωθεί και παραμορφώνει το ηλεκτρονιακό σύννεφο που περικλείει το μόριο. Αυτή η παραμόρφωση μεταφέρει κινητική ενέργεια από το ταχέως κινούμενο ηλεκτρόνιο στο ηλεκτρονιακό σύννεφο του μορίου.



Αν αρκετή ενέργεια μεταφερθεί από αυτή τη διαδικασία, το μόριο θα διώξει ένα ηλεκτρόνιο σθένους και θα δημιουργήσει μία κατιονική ρίζα. Από τη συνολική ποσότητα της ένωσης που θα εισέλθει στην πηγή ιόντων, μόνο ένα μικρό ποσοστό μετατρέπεται σε ιόντα. Όσο μεγαλύτερο είναι το μόριο τόσο μεγαλύτερη ποικιλία ιόντων-θραυσμάτων αναμένεται.



Στην παραπάνω εικόνα παρατηρούμε την μετατροπή των ουδέτερων ατόμων σε θετικά ιόντα μετέπειτα από την πρόσκρουση των ηλεκτρονίων σε αυτά. Στην αριστερή μεριά βλέπουμε μια θετικά φορτισμένη πλάκα η οποία ωθεί τα φορτισμένα σωματία προς την αντίθετη κατεύθυνση, τον αναλυτή.

✚ Χημικός ιονισμός

Στον χημικό ιονισμό χρησιμοποιείται ένα ιόν ως αντιδραστήριο το οποίο αντιδρά με τα προς ανάλυση μόρια για τη δημιουργία ιόντων με τη μεταφορά πρωτονίων ή υβριδίων.

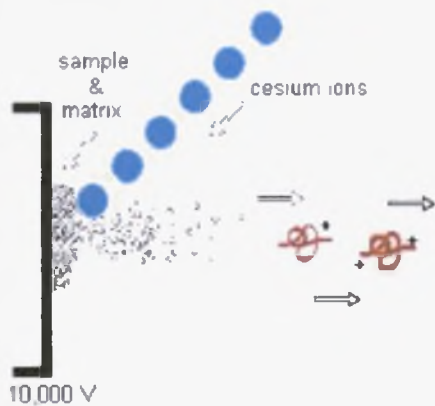


Τα αντιδραστήρια-ιόντα παράγονται εισάγοντας μια μεγάλη ποσότητα μεθανίου σε μια πηγή ιονισμού με πρόσκρουση ηλεκτρονίων. Οι ηλεκτρονιακές συγκρούσεις παράγουν CH_4^+ και CH_3^+ τα οποία στη συνέχεια αντιδρούν με το μεθάνιο για να παράγουν CH_5^+ και $C_2H_5^+$.



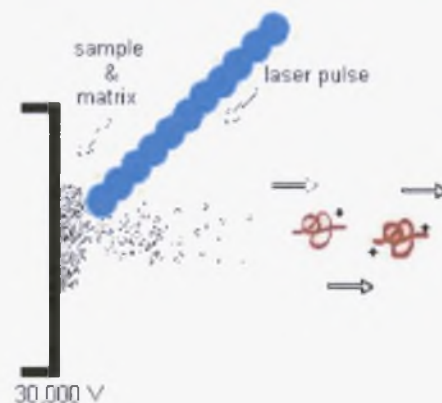
⚡ Βομβαρδισμός δια ταχέων ατόμων

Σε αυτή τη μέθοδο μια υψηλής ενέργειας ακτίνα από ουδέτερα άτομα, συνήθως Xe ή Ar, προσκρούει σε ένα στέρεο ή ένα υγρό με χαμηλή τάση ατμών προκαλώντας έκλυση και ιονισμό. Χρησιμοποιείται για μεγάλα βιολογικά μόρια τα οποία είναι δύσκολο να περάσουν στην αέρια φάση. Το δείγμα είναι συνήθως διασκορπισμένο σε μια μήτρα όπως η γλυκερόλη. Η μέθοδος FAB προκαλεί θραυσματοποίηση σε μικρό βαθμό και έτσι στο φάσμα μαζών εμφανίζεται μια μεγάλη κορυφή, διευκολύνοντας τον προσδιορισμό του Μοριακού Βάρους.

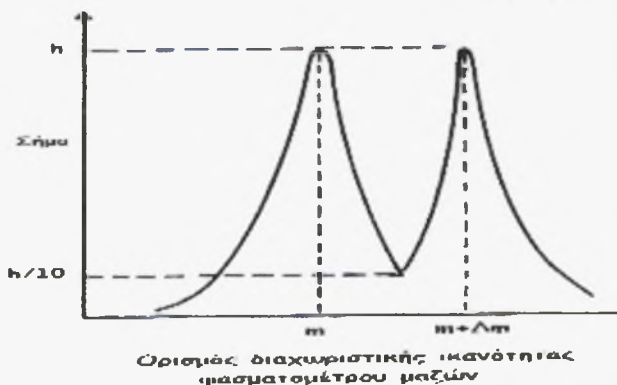


⚡ Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI)

Η μέθοδος αυτή είναι αναλυτικό εργαλείο για τα πεπτίδια, για τις πρωτεΐνες και τα περισσότερα βιομόρια. Τα βιομόρια είναι διάσπαρτα σε μια στερεή μήτρα όπως το νικοτινικό οξύ ή το διυδροξυβενζοϊκό οξύ. Ένας UV laser παλμός προκαλεί εκτομή στη μήτρα η οποία φέρει μερικά από τα μεγαλομόρια στην αέρια φάση σε ιονισμένη μορφή ώστε να μπορέσουν να εκχειλιστούν στην φασματομετρία μαζών.



▪ Αναλυτής μαζών: Η βασική λειτουργία του είναι να διαχωρίσει τα ιόντα που «πετάγονται» στην πηγή ιόντων, ανάλογα με τις διαφορετικές τιμές m/z . Ο διαχωρισμός είναι απαραίτητος, έτσι ώστε το μετρούμενο ιονικό ρεύμα στον ανιχνευτή ιόντων, που ακολουθεί τον αναλυτή μαζών, να αντιστοιχεί σε ιόντα με συγκεκριμένο λόγο m/z . Από τον τύπο του αναλυτή μαζών εξαρτάται η διαχωριστική ικανότητα του οργάνου που είναι και το σπουδαιότερο χαρακτηριστικό ποιότητας ενός φασματομέτρου μαζών. Η διαχωριστική ικανότητα (R) ορίζεται από τη σχέση : $R = m/\Delta m$ (όπου $m + \Delta m$ 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.



✚ Αναλυτές απλής εστίασης με μαγνητική εκτροπή

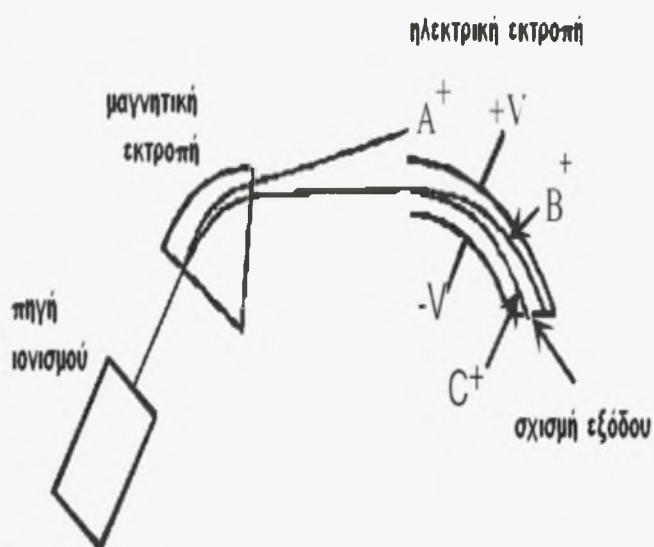
Οι αναλυτές μαγνητικής εκτροπής βασίζονται στην ανάπτυξη δυνάμεως, η οποία ασκείται σε κάθε ηλεκτρικό φορτίο, που κινείται κάθετα προς τις δυναμικές γραμμές ενός μαγνητικού πεδίου. Τα φασματομέτρα μαζών απλής εστίασης καταγράφουν το ιόν με στρογγυλεμένο στο ακέραιο τον αριθμό μονάδων μάζας του ($R < 5000$). Εφόσον τα ιόντα φέρουν φορτίο, καθώς αυτά κινούνται εντός του μαγνητικού πεδίου, μεταβάλλεται η ακτίνα τους και παίρνει το σχήμα τόξου. Η



ακτίνα του κάθε ιόντος εξαρτάται από την ορμή του ιόντος, το φορτίο του και την ένταση του μαγνητικού πεδίου.

✚ Αναλυτές διπλής εστίασης με ηλεκτρική εκτροπή

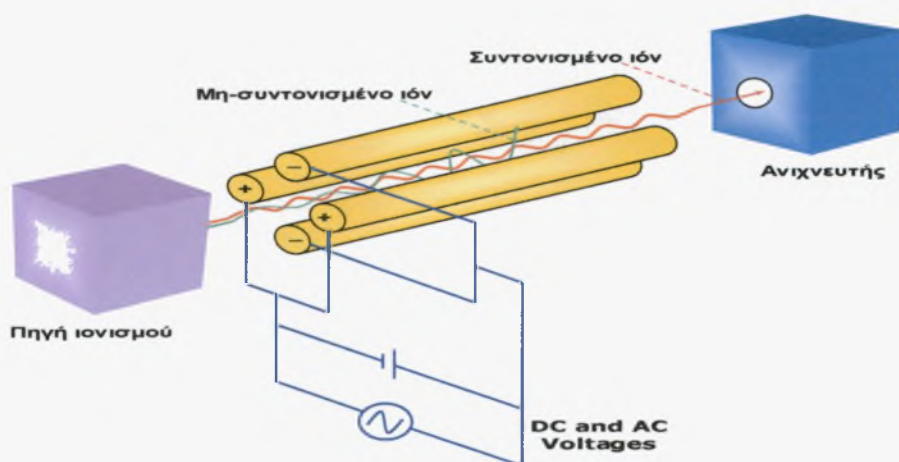
Όταν τοποθετείται σε σειρά η πηγή ιόντων, ο μαγνητικός αναλυτής και ένας ηλεκτροστατικός αναλυτής προκύπτει ο αναλυτής ιόντων διπλής εστίασης. Ο αναλυτής αυτός αποτελείται από δυο ομόκεντρες καμπύλες πλάκες. Δυναμικό εφαρμόζεται κατά μήκος των δύο αυτών πλακών με αποτέλεσμα να λυγίζει η ακτίνα των ιόντων καθώς αυτά περνάνε μέσα από τον αναλυτή. Σε ένα τέτοιο αναλυτή, ο μεν ηλεκτροστατικός αναλυτής εστιάζει τα ιόντα με βάση την ενέργεια, ενώ ο μαγνητικός αναλυτής με βάση τη διεύθυνση. Στα φασματομέτρα μαζών διπλής εστίασης δίνεται ο ακριβής αριθμός μονάδων μάζας του ιόντος, με ακρίβεια τρίτου ή και τέταρτου δεκαδικού ψηφίου.



Στην διπλανή εικόνα παρατηρούμε έναν αναλυτή διπλής εστίασης. Το ιόν A^+ έχει λόγο m/z 100.00, το B^+ έχει λόγο m/z 50.00 και το C^+ έχει λόγο m/z 50.01. Το A^+ αποβάλλεται από την μαγνητική εκτροπή εξαιτίας της μεγάλης ορμής. Τα B^+ και C^+ δεν διαχωρίζονται από τον μαγνητικό εκτροπέα γιατί διαθέτουν την ίδια ορμή. Ωστόσο, το B^+ πρέπει να έχει μεγαλύτερη κινητική ενέργεια από το C^+ , έτσι τα δύο ιόντα διαχωρίζονται από την ηλεκτρική εκτροπή.

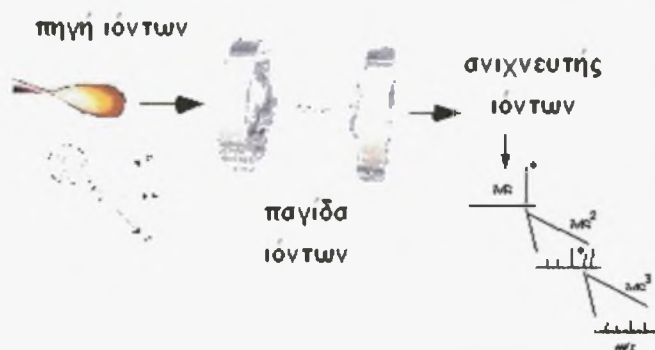
✦ Τετραπολικοί αναλυτές μαζών (Quadrupole)

Αποτελούνται από τέσσερις παράλληλες μεταλλικές ράβδους (πόλους), που είναι συμμετρικά τοποθετημένες, ως προς τη δέσμη των ιόντων, και διαγωνίως συνδέονται ηλεκτρικά μεταξύ τους. Στις δύο κάθετες ράβδους, όπως φαίνεται στο σχήμα παρακάτω, εφαρμόζεται αρνητικό ηλεκτρικό δυναμικό και στις άλλες δύο, τις οριζόντιες, εφαρμόζεται θετικό ηλεκτρικό δυναμικό. Η διαφορά δυναμικού που προκαλείται επηρεάζει την τροχιά των ιόντων που περνούν μέσα από τις τέσσερις ράβδους. Για συγκεκριμένα δυναμικά, μόνο ιόντα με συγκεκριμένους λόγους μάζας προς φορτίο μπορούν να περάσουν τον τετραπολικό αναλυτή, τα υπόλοιπα ιόντα εκτρέπονται της πορείας.



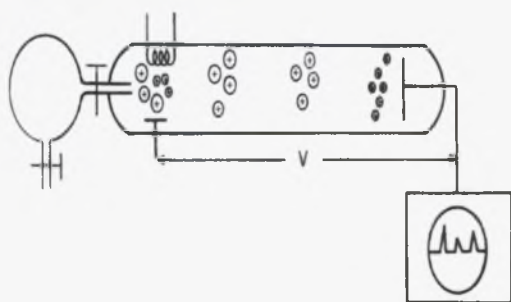
✦ Τετραπολικοί αναλυτές παγίδας ιόντων

Η δημιουργία του συγκεκριμένου αναλυτή έγινε την ίδια περίοδο με τον τετραπολικό καθώς και τους δύο διέπει η ίδια φυσική. Στον αναλυτή «παγίδα ιόντων», τα ιόντα εγκλωβίζονται στη συχνότητα του τετραπολικού πεδίου. Ένας τρόπος χρήσης του αναλυτή στη φασματομετρία μαζών είναι η δημιουργία ιόντων εξωτερικά μέσω ψεκασμού ηλεκτρονίων, τα οποία στη συνέχεια εγχέονται στην περιοχή της παγίδας. Τα ιόντα στη συνέχεια εκβάλλονται και ανιχνεύονται μέσω της σάρωσης του πεδίου συχνότητας.



✦ Αναλυτές 'χρόνου πτήσεως' (time-of-flight) Οι συγκεκριμένοι αναλυτές βασίζονται στο ότι, όταν ιόντα με διαφορετικές μάζες επιταχύνονται και αποκτούν την ίδια κινητική ενέργεια, κάθε ιόν αποκτά μια χαρακτηριστική ταχύτητα, που εξαρτάται από το λόγο m/z . Στην παρακάτω εικόνα δείχνεται παραστατικό διάγραμμα της αρχής λειτουργίας του αναλυτή αυτού του τύπου. Η παραγωγή

Ιόντων δεν είναι συνεχής, αλλά γίνεται κατά σύντομους παλμούς. Τα ιόντα



επιταχύνονται με δυναμικό V και διακρίνονται μεταξύ τους με βάση το διαφορετικό χρόνο πτήσεως, που απαιτείται για να διανύσουν κενό σωλήνα και να φθάσουν στον ανιχνευτή. Τα φασματομέτρα μαζών με αναλυτές 'χρόνου πτήσεως' είχαν αρχικά περιορισμένη διαχωριστική ικανότητα. Στις μέρες μας όμως,

θεωρούνται high resolution. Πλεονεκτούν ως προς την απλή κατασκευή τους και στο ότι παρέχουν το φάσμα μαζών ταχύτατα.

▪ Ανιχνευτής ιόντων: ο ανιχνευτής ιόντων παράγει στην έξοδο του ηλεκτρικό σήμα (συνήθως ηλεκτρικό ρεύμα), ανάλογο του αριθμού ιόντων και του φορτίου τους, που δέχεται στην είσοδο του στη χρονική μονάδα. Παρακάτω εξετάζονται οι συνηθέστεροι τύποι ανιχνευτών.

➤ Φαρανταϊκό κύπελλο (faraday cup)

Αποτελείται από μία μεταλλική κοιλότητα, που συνδέεται μέσω μιας αντίστασης μεγάλης τιμής με τη γείωση του οργάνου. Τα ιόντα, που προσπίπτουν στο κύπελλο,



εκφορτίζονται και το ρεύμα που διέρχεται από την αντίσταση (ιονικό ρεύμα), προκαλεί την πτώση τάσεως στα άκρα της. Η τάση ενισχύεται και καταγράφεται.

➤ Ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής (electron multiplier)

Η δέση των ιόντων προσπίπτει δε μια δύνοδο και προκαλεί την εκπομπή δευτερογενών ηλεκτρονίων, που προσπίπτουν στην επόμενη δύνοδο κ.ο.κ. Με τους ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστές μπορούν να μετρηθούν ιονικά ρεύματα, που αντιστοιχούν σε πρόσπτωση στον ανιχνευτή μερικών δεκάδων ιόντων το δευτερόλεπτο.



➤ Φωτογραφική πλάκα

Χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με διάφορους τύπους αναλυτών μαζών. Η φωτογράφιση είναι η παλαιότερη και πλέον ευαίσθητη μέθοδος αποτύπωσης και καταγραφής των φασμάτων μάζας, με μεγάλη διαχωριστική ικανότητα, συγχρόνως όμως και λιγότερο εύχρηστη, κυρίως επειδή η εμφάνιση του φιλμ είναι χρονοβόρα.

ΜΕΘΟΔΟΙ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ

Παρόλο που η ουρική απέκκριση μιας ορμόνης, ή των μεταβολιτών της, ή και των δύο, δεν ανταποκρίνεται στο ολικό πόσο τη ορμόνης που εκκρίνεται από τον αδένα, συνήθως εκπροσωπεί μια κατά προσέγγιση αναλογία του ποσού το οποίο εκκρίνεται κατά την διάρκεια της συλλογής ουρών. Έτσι, οι ουρικές διαδικασίες θεωρείται πως αντανakλούν τις εκκριτικές δραστηριότητες των ενδοκρινών αδένων. Ωστόσο, παράγοντες όπως λάθη κατά την συλλογή των ουρών, αλλαγές στην νεφρική λειτουργία, και εισφορά από περισσότερους του ενός αδένος της τελικής έκκρισης της ίδιας ορμόνης (π.χ. τόσο οι επινεφρίδιοι αδένες όσο και οι γοναδικοί) συντελούν σε ένα μη έγκυρο αποτέλεσμα.

- Η μέτρηση στεροειδών ορμονών σε ελεύθερη κατάσταση είναι, ίσως σε συγκεκριμένες συνθήκες, πιο ευδιάκριτη από ότι των προσδεδεμένων σε πρωτεΐνες. Όταν πραγματοποιούνται αλλαγές στις προσδεδεμένες πρωτεΐνες οι οποίες μεταφέρουν τα στεροειδή και συναφείς ουσίες στην κυκλοφορία, η ερμηνεία των επιπέδων του συγκεκριμένου στεροειδούς στην κυκλοφορία πιθανόν να επηρεάζεται σημαντικά. Επιπλέον, είναι η πρόσδεση της ελεύθερης ορμόνης στον υποδοχέα της στεροειδούς η οποία επιφέρει την βιοχημική απόκριση.

• Υδρόλυση, εκχύλιση και διαχωρισμός

Παρόλο που οι στεροειδείς ορμόνες διαφέρουν σημαντικά στις απεκκρίσεις που προκαλούν στο ανθρώπινο σώμα, ωστόσο ανιχνεύονται με τις ίδιες διαδικασίες. Ένα ή περισσότερα από τα επόμενα βήματα απαιτούνται για την τελική ποσοτικοποίηση: η υδρόλυση, η εκχύλιση, ο καθαρισμός και τέλος ο διαχωρισμός.

✚ Υδρόλυση

Οι στεροειδείς ορμόνες και οι μεταβολίτες τους εμφανίζονται στο αίμα και εκχυλίζονται στα ούρα κυρίως σαν υδατικά διαλύματα συζυγή με το γλυκουρονικό και το θειικό οξύ. Όταν οι ολικές συγκεντρώσεις (συζυγή και μη συζυγή μορφές) μιας στεροειδούς ορμόνης ή των μεταβολιτών της ανιχνευτούν, η υδρόλυση των εστερικών ή γλυκολικών δεσμών είναι υποχρεωτική.

Δύο γενικοί τύποι διαδικασιών υφίστανται, η όξινη υδρόλυση και η ενζυμική υδρόλυση. Στην όξινη υδρόλυση, ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα από ούρα 24ώρου επωάζεται, συνήθως με αναγωγή υπό την παρουσία συγκεκριμένης συγκέντρωσης HCl ή H₂SO₄ και για συγκεκριμένη περίοδο χρόνου. Για την **ενζυμική υδρόλυση** ένα μέρος από ούρα 24ώρου ή αντίστοιχα ένα δείγμα πλάσματος προσαρμόζεται με το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα στο κατάλληλο pH για την μετέπειτα ενζυμική χρήση. Μετά την προσθήκη της επαρκούς

ποσότητας των κατάλληλων υδρολυτικών ενζύμων, β-γλυκουρονιδάση (για την υδρόλυση γλυκουρονικών ομάδων) και σουλφατάση (για την υδρόλυση θειικών ομάδων), το δείγμα προς ανάλυση -test sample- επωάζεται για 1 ώρα και 30 λεπτά στους $50 \pm 2^\circ\text{C}$ ή για 18-72 ώρες σε θερμοκρασία 37°C .

Από τεχνικής απόψεως, η όξινη υδρόλυση προτιμάται (εξαιρούνται οι περιπτώσεις όπου οι ορμόνες είναι ασταθείς παρουσία οξέος) εξαιτίας της ταχύτητας και της απλότητας που διακρίνει την διαδικασία σε συνδυασμό με το γεγονός ότι τις περισσότερες φορές αφήνει ανεπηρέαστη τη φύση των ουσιών. Σε ορισμένες περιπτώσεις, επηρεάζει τη φύση των ουσιών και σε αυτό το σημείο εντοπίζεται και το μεγαλύτερο πρόβλημα της χημικής υδρόλυσης σε αντίθεση με την ήπια ενζυμική (π.χ. μεταθέσεις δεσμών, αφυδατώσεις). Από την άλλη μεριά, η ενζυμική υδρόλυση απαιτεί ειδική προσοχή σε παράγοντες όπως: την συγκέντρωση και τον τύπο του ενζύμου, το pH, τη θερμοκρασία και τη διάρκεια της επώασης. Επιπλέον, η πιθανή παρουσία των ενζυμικών αναστολέων οι οποίοι ποικίλουν τόσο σε αριθμό όσο και σε φύση για κάθε διαφορετικό δείγμα, δημιουργούν αμφιβολίες για την ολοκλήρωση της υδρόλυσης (για αυτό το λόγο ελέγχεται κάθε δείγμα για το ποσοστό της υδρόλυσης). Παρόλα τα αρνητικά η ενζυμική υδρόλυση χρησιμοποιείται για αναλύσεις των **στεροειδών** τα οποία είναι ασταθή σε όξινα διαλύματα (π.χ. **κορτικοστεροειδή**) καθώς και για να αποτρέψει την παρέμβαση ουσιών στην ανάλυση τα οποία δημιουργούνται με την όξινη υδρόλυση.

✚ Εκχύλιση

Μετά την υδρόλυση, τα αποσυζευγμένα στεροειδή γίνονται δυσδιάλυτα στα υδάτινα διαλύματα. Με αποτέλεσμα, όταν ένας αμιγώς οργανικός διαλύτης στον οποίο τα στεροειδή είναι ευδιάλυτα προστεθεί σε δείγμα που έχει υποστεί υδρόλυση και αναδευτεί, τα περισσότερα στεροειδή να εκχυλίζονται στην οργανική στιβάδα. Επαναλαμβάνοντας την διαδικασία της εκχύλισης με έναν νέο οργανικό διαλύτη επιτυγχάνεται μεγαλύτερη λήψη στεροειδών. Πρέπει να λαμβάνουμε υπ' όψιν ότι η προσθήκη ενός οργανικού διαλύτη διαφοροποιεί τη φύση των δεσμευμένων πρωτεϊνών. Η επιλογή του καταλληλότερου διαλύτη, ως εκχυλιστικού μέσου, γίνεται με βάση τα εξής κριτήρια:

- 1) Το εκχυλιστικό μέσο δεν πρέπει να αντιδρά με την εκχυλιζόμενη ουσία.
- 2) Μετά την έντονη ανακίνηση του διαλύτη με το υδατικό διάλυμα, οι δύο στιβάδες πρέπει να διαχωρίζονται γρήγορα. Για τον σκοπό αυτό η πυκνότητα d του διαλύτη πρέπει να είναι σημαντικά μικρότερη ή μεγαλύτερη από την πυκνότητα του ύδατος.
- 3) Η ουσία που εκχυλίζεται πρέπει να ανακτάται εύκολα από το εκχυλιστικό μέσο, με βρασμό ή με επανεκχύλιση με ύδωρ.

- 4) Η αμοιβαία διαλυτότητα των δύο υγρών πρέπει να είναι αμελητέα.
- 5) Οι δύο φάσεις πρέπει να μην εμφανίζουν τάσεις σχηματισμού γαλακτωμάτων.
- 6) Ο διαλύτης δεν πρέπει να είναι τοξικός ούτε εύφλεκτος.
- 7) Ο διαλύτης πρέπει να είναι οπτικά διαφανής, ώστε να είναι δυνατές οι φασματοφωτομετρικές μετρήσεις στα επόμενα στάδια.
- 8) Η διαλυτότητα της εκχυλιζόμενης ουσίας στο εκχυλιστικό μέσο πρέπει να είναι όσο το δυνατόν μεγαλύτερη, ενώ η διαλυτότητα των ανεπιθύμητων ουσιών πρέπει να είναι όσο το δυνατόν μικρότερη.

Η επιλογή του οργανικού διαλύτη βασίζεται στην πολικότητα της στεροειδούς ορμόνης η οποία θα εξεταστεί. Ο μη-πολικός τετρακυκλικός δακτύλιος είναι κοινός σε όλα τα στεροειδή, αλλά η πολικότητα αυξάνεται αναλογικά με τις ομάδες οξυγόνου (κετόνες και υδροξυλομάδες) και των διπλών δεσμών. Στεροειδή με ένα ή δυο οξυγόνα (π.χ. ανδρογόνα και οιστρογόνα) είναι χαμηλής πολικότητας: ένας καλός διαλύτης για την εκχύλιση τους είναι ένας συγγενικός μη πολικός διαλύτης όπως ο **δαιθυλαιθέρας**. Παρόμοια στεροειδή με τρία ή περισσότερα οξυγόνα (π.χ. κορτικοστεροειδή και οι μεταβολίτες τους) είναι αρκετά πολικοί: για την εκχύλιση τους οι οργανικοί πολικοί διαλύτες όπως τα χλωροφόρμιο ή διχλωρομεθάνιο είναι οι πλέον κατάλληλοι. Η συγγενική διαλυτότητα των ουσιών σε δύο μη αναμίξιμους διαλύτες είναι εκμεταλλεύσιμη όχι μόνο για την διαδικασία της εκχύλισης αλλά επίσης για τον διαχωρισμό και καθαρισμό των ουσιών (χρωματογραφία κατανομής). Ο λόγος της συγκέντρωσης μιας ουσίας σε μη-πολική φάση προς τη συγκέντρωσή της ίδιας ουσίας σε πολική φάση είναι γνωστός ως συντελεστής κατανομής (K). Ουσίες με υψηλές τιμές K, περισσότερο θα βρίσκονται σε μη πολική φάση, ενώ αντίθετα ουσίες με χαμηλές τιμές K, θα μετατοπίζονται αυθόρμητα στην πολική φάση. Στην διαδικασία της εκχύλισης, το σύστημα του διαλύτη συνίσταται από έναν οργανικό διαλύτη (μη πολική φάση) και το υδρολυμένο δείγμα, ούρα ή πλάσμα (πολική φάση). Τα στεροειδή με υψηλό συντελεστή κατανομής εκχυλίζονται, κατά συνέπεια, στην οργανική στιβάδα. Μια καλύτερη παραλαβή των πολικών ενώσεων (π.χ. ουρικά κορτικοστεροειδή) από την πολική φάση μπορεί να πραγματοποιηθεί προσθέτοντας θειικό αμμώνιο ή ανθρακικό χλώριο πριν τη διαδικασία της εκχύλισης. Η προσθήκη ανόργανων αλάτων αυξάνει τον συντελεστή κατανομής μειώνοντας τη διαλυτότητα των στεροειδών σε υδατικό διάλυμα.

👉 Καθαρισμός και Διαχωρισμός

Παρόλο που η σωστή επιλογή των διαλυτών βελτιώνει την εκλεκτικότητα της εκχύλισης, ένας μεγάλος στενών συγγενικά στεροειδών και άλλων μη συγκεκριμένων υλικών εκχυλίζονται μαζί με τα στεροειδή. Η απομάκρυνση

τέτοιων μολύνσεων, ειδικά αυτών που δύνανται να μεταβάλλουν την τελική εκτίμηση, είναι σημαντική όταν η αντισωματική εξειδίκευση που χρησιμοποιείται για την μέτρηση του στεροειδούς είναι χαμηλή. Με υψηλό διαχωρισμό και μεγάλης αγχιστείας αντισώματα επιτυγχάνεται καλύτερο αποτέλεσμα. Είναι αξιόλογο να αναφέρουμε πόσο εκλεκτικά είναι κάποια αντισώματα στη διαλογή στεροειδών με μικρές διαφορές στους υποκατάστατες. Στα σύγχρονα εργαστήρια χρησιμοποιείται η μέθοδος MS η οποία είναι σε θέση να ταυτοποιήσει ουσίες οι οποίες εμφανίζουν 100% επικάλυψη φασματογραφημάτων αρκεί να έχουν διαφορετικά ιόντα.

Ο βαθμός του διαχωρισμού και καθαρισμού εξαρτάται από τη μέθοδο η οποία θα χρησιμοποιηθεί για την ποσοτικοποίηση. Για παράδειγμα, αν το τελικό σύστημα προσδιορισμού είναι μια χρωμοαντίδραση, η οποία είναι πολύ συγκεκριμένη για ξεχωριστά στεροειδή, ή για μια ομάδα στεροειδών, ο περαιτέρω καθαρισμός των στεροειδών που έχουν εκχυλιστεί είναι απαραίτητος.

✚ Ποσοτικοποίηση

Πολλές διαφορετικές μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί για την μέτρηση των στεροειδών στα σωματικά υγρά. Παλαιότερες μέθοδοι ήταν οι φωτομετρικές και οι φθορισμομετρικές, οι οποίες αντικαταστάθηκαν από ανοσοπροσδιορισμούς^{2,57,60,63,77,94,123,147,150} και από μεθόδους βασισμένες στο διαχωρισμό όπως είναι η GC^{32,208}, η υγρή χρωματογραφία LC^{66,120}, η HPLC¹²⁰, η φασματομετρία μαζών, η GC/MS^{18,53, 54,137,178,180,187,210} και η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση.

➤ Παρακάτω αναφέρονται τα στάδια διαδικασίας της παρασκευής του δείγματος πριν αυτό φτάσει στον αναλυτή. Αρχικά να αναφέρουμε ότι σε κάθε παρτίδα δειγμάτων επιβάλλεται να υπάρχει ένα δείγμα του οποίου είμαστε σίγουροι για την καθαρότητα του, δηλαδή ότι είναι απαλλαγμένο από οποιαδήποτε εξωγενή ουσία, το δείγμα αυτό το ονομάζουμε τυφλό(blank). Τα δείγματα είναι μέσα σε γυάλινους σωλήνες οι οποίοι επιδέχονται πύμα.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΣΑΡΩΣΗΣ

- 1) Προσθήκη 1.0ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH 7.0, ανάδευση με vortex.
- 2) Προσθήκη 50ml μίγματος εσωτερικών προτύπων, μεθυλοτεστοστερόνη - γλυκουρονίδιο νορτεστοστερόνης, ανάδευση με vortex.
- 3) Προσθήκη 50ml διαλύματος ενζύμου E.coli αραιωμένου με κατάλληλη ποσότητα διαλύματος φωσφορικών, ανάδευση με vortex, πωματισμός.
- 4) Μεταφορά στο φούρνο στους $50 \pm 2^\circ\text{C}$ για 1.5h ή overnight στους 37°C .
- 5) Προσθήκη 700mg στέρεου μίγματος $\text{NaHCO}_3:\text{Na}_2\text{CO}_3$ σε αναλογία 10:1, ανάδευση με vortex.
- 6) Προσθήκη 5.0ml διαιθυλαιθέρα.
- 7) Προσθήκη 2g άνυδρου Na_2SO_4 , ανάδευση με vortex.
- 8) Πωματισμός ανάδευση στους ανακινήτηρες για 20 λεπτά (προσέχουμε να μην στάζουν οι σωλήνες).
- 9) Ισοβαρυνση των σωλήνων (μέγιστη διαφορά βάρους των δύο ομάδων 0.5g)
- 10) Έλεγχος στροφών φυγοκέντρου 1900-2000rpm, φυγοκέντριση για 10 λεπτά.
- 11) Επισήμανση των κωνικών σωλήνων (ειδικοί σωλήνες για την εξάτμιση που θα ακολουθήσει).
- 12) Μεταφορά της οργανικής στιβάδας στους κωνικούς σωλήνες (σκοπός είναι να μην πάρουμε καθόλου υδατική στιβάδα).
- 13) Εξάτμιση σε ρεύμα N_2 μέχρι ξηρού, μέγιστο 50°C . (Εδώ πρέπει να αναφέρουμε ότι η εξάτμιση πραγματοποιείται παρουσία του αερίου αζώτου καθώς η ιδιότητα του να ανήκει στα ευγενή αέρια δίνει όσο το δυνατό καλύτερη εξάτμιση, εφόσον δεν έχει την τάση να δημιουργεί κανενός είδους δεσμό με τα συστατικά του δείγματος).
- 14) Προοδευτική αύξηση της ροής του N_2 .
- 15) Προσθήκη 100ml αντιδραστηρίου παραγωγοποίησης πωματισμός, ανάδευση με vortex. Η προσθήκη αντιδραστηρίου παραγωγοποίησης είναι ουσιαστικά υπεύθυνη για την ανίχνευση τόσο των κύριων ενώσεων όσο και των παραγώγων τους. Το αντιδραστήριο αυτό ανασυντάσσει τις ενώσεις.
- 16) Επώαση στους 60°C για 30 λεπτά σε hot block.
- 17) Επαναφορά των δειγμάτων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
- 18) Μοίρασμα του παραγωγοποιημένου δείγματος σε 2 vials. Τα vials είναι έτοιμα για να τοποθετηθούν στους αναλυτές.

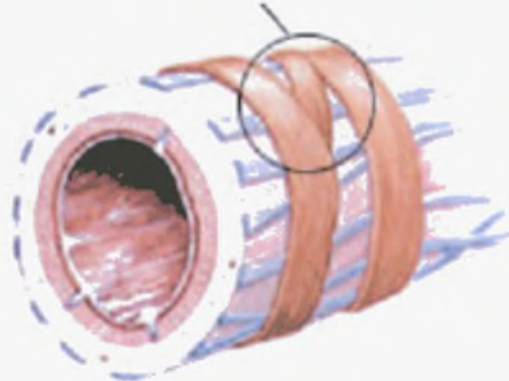
Η ΚΛΕΝΒΟΥΤΕΡΟΛΗ ΚΑΙ ΤΟ ΑΣΘΜΑ

Η δράση της κλενβουτερόλης συγκαταλέγεται σε αυτήν των β -2-αδρενεργικών αγωνιστών, της πιο διαδεδομένης τάξης βρογχοδιαστολέων στην θεραπεία του άσθματος. Άλλες ουσίες που περιλαμβάνει η συγκεκριμένη τάξη είναι η αλβουτερόλη, η πιρβουτερόλη και η σαλμετερόλη. Όταν οι συγκεκριμένοι αγωνιστές δεσμευτούν στους β -αδρενεργικούς υποδοχείς, ενεργοποιούν την αδενυλική κυκλάση η οποία οδηγεί σε αύξηση στην ενδοκυττάρια συγκέντρωση ενός δεύτερου αγγελιοφόρου μηνύματος, της μονοφωσφορικής αδενυλικής αδενοσίνης (cAMP) και στην ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA). Το τραχειοβρογχικό μονοπάτι, οι β -2-αγωνιστές, το cAMP και η PKA αναστέλλουν τη σύσπασση των λείων μυϊκών ινών ανοίγοντας τα κανάλια K^+ και μειώνοντας τη δράση κινάσης της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης. Στους αεραγωγούς οι βήτα-2-αδρενουποδοχείς δεν περιορίζονται μόνο στους λείους μυς. Απαντώνται επίσης στο επιθήλιο, στα φλεγμονώδη κύτταρα και στα αγγεία των οργάνων. Όταν οι επιθηλιακοί βήτα αδρενουποδοχείς ενεργοποιηθούν, η συχνότητα του βλεφαριδικού παλμού αυξάνεται. Το αποτέλεσμα όσον αφορά την έκκριση βλέννας είναι λιγότερο σταθερό, αλλά οι γνωματεύσεις υποδεικνύουν ότι οι β -2-αγωνιστές προάγουν την βλενοβλεφαριδική κάθαρση. Η ενεργοποίηση των β -2-αδρενουποδοχέων, στα φλεγμονώδη κύτταρα περιορίζει την απελευθέρωση των παραγόντων που προκαλούν τη φλεγμονή, στα αγγεία των οργάνων περιορίζει την αυξημένη διαπερατότητα η οποία απαντάται σε κατάσταση φλεγμονής. Αυτές οι διαδικασίες διευκολύνουν την αναπνοή. Η χορήγηση της κλενβουτερόλης μπορεί να πραγματοποιηθεί με διαφορετικούς τρόπους όπως: σιρόπια, σταγόνες, ενέσιμα διαλύματα, σφαίρια και αερολύματα. Για ανθρώπινη χρήση τα πιο χρησιμοποιούμενα είναι τα αερολύματα και για τα ζώα τα σιρόπια. Σαν βρογχοδιαστολείς, η κλενβουτερόλη ανοίγει τους αεραγωγούς σε άτομα που πάσχουν από άσθμα:

συμπιεσμένος βρογχικός μυς



χαλαρός βρογχικός μυς



Η ΚΛΕΝΒΟΥΤΕΡΟΛΗ ΚΑΙ Ο ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΣ

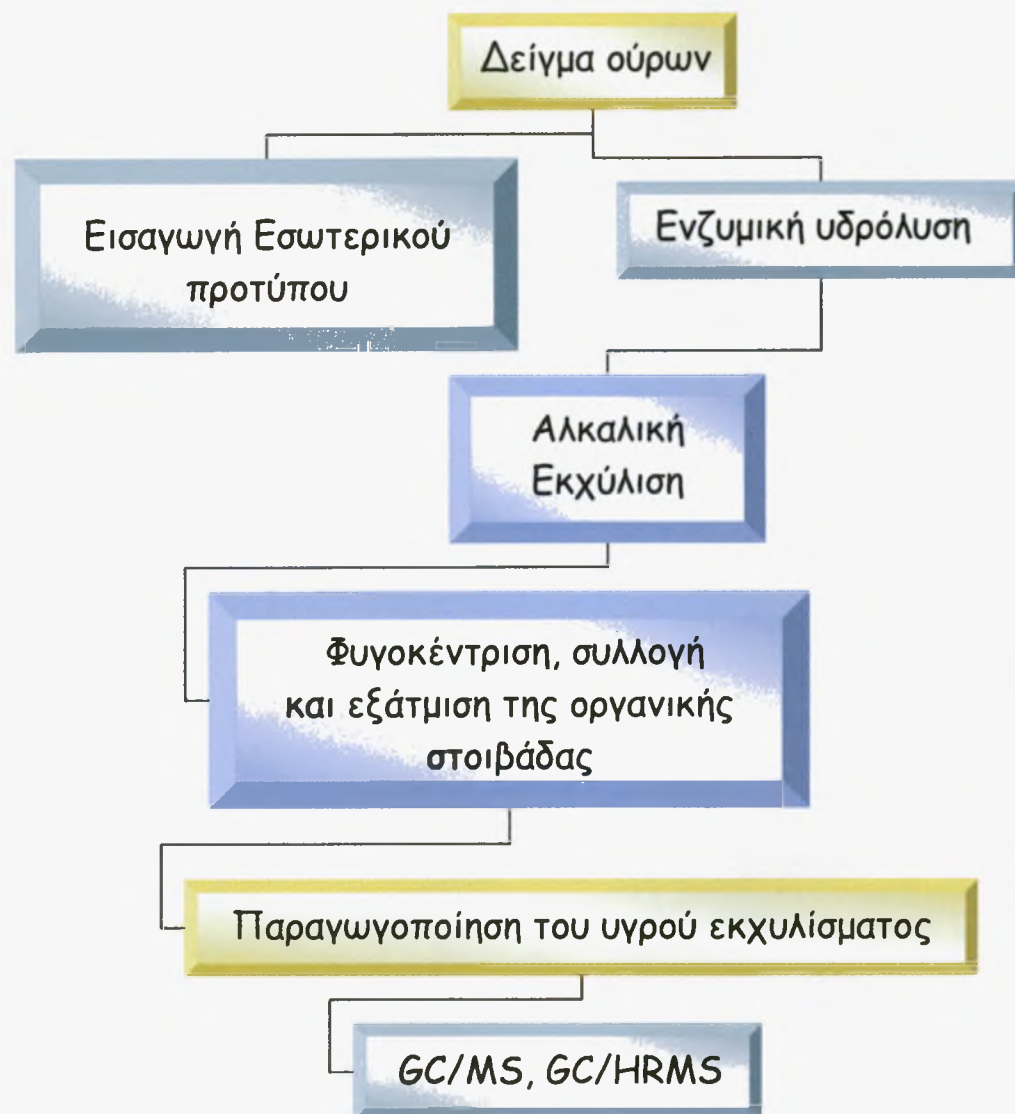
Η κλενβουτερόλη είναι μία πολύ διαδεδομένη και ενδιαφέρουσα ένωση. Δεν είναι στεροειδής ορμόνη παρόλα αυτά οι δράσεις της μπορούν να συγκριθούν με αυτές ενός στεροειδούς. Παρόμοια με την οξανδρονόλη, η κλενβουτερόλη μπορεί να προκαλέσει σύσσωμη, υψηλής ποιότητας μυϊκή αύξηση η οποία συμβαδίζει με σπουδαία απόκτηση δύναμης. Η κλενβουτερόλη πάνω από όλα έχει ισχυρή αντι-καταβολική δράση, μειώνοντας τον ρυθμό κατά τον οποίο η πρωτεΐνη περιορίζεται στα μυϊκά κύτταρα, συνεπώς προκαλεί αύξηση στα μυϊκά κύτταρα. Για αυτόν ακριβώς το λόγο αρκετοί αθλητές χρησιμοποιούν την κλενβουτερόλη μετά από αγωγή με στεροειδή για να ισορροπηθεί η προκληθείσα καταβολική φάση και με αυτόν τον τρόπο να αποκτηθεί η μέγιστη δύναμη και μυϊκή μάζα. Μια επιπλέον πλευρά της κλενβουτερόλης είναι η ευδιάκριτη αποτελεσματικότητα της στο «κάψιμο λίπους». Η κλενβουτερόλη καίει το λίπος χωρίς δίαιτα επειδή αυξάνει τη θερμοκρασία του σώματος, αναγκάζοντας το σώμα να κάψει λίπος για την διαδικασία αυτή. Η κλενβουτερόλη μεγενθύνει τις δράσεις των ανδρογόνων/αναβολικών στεροειδών όταν λαμβάνονται συγχρόνως, καθώς αυξάνεται η πρωτεϊνοσύνθεση. Οι αθλητές λαμβάνουν συνήθως 5-7 ταμπλέτες, 100-140 mcg ανά ημέρα, για τις γυναίκες η δόση, των 80-100 mg, είναι ικανοποιητική. Παρατηρείται όμως, η δοσολογία συνεχώς να αυξάνεται. Η ένωση λαμβάνεται συνήθως για 8-10 εβδομάδες. Καθώς η κλενβουτερόλη δεν είναι ορμόνη δεν έχει τις τυπικές παρενέργειες των αναβολικών στεροειδών, γι' αυτό το λόγο προτιμάται και από τις γυναίκες. Πιθανές παρενέργειες είναι: ανησυχία, ταχυπαλμία, τρέμουλο, πονοκέφαλοι, αϋπνία, μυϊκές κράμπες, αύξηση καρδιακής παροχής και ναυτία. Οι δράσεις αυτές είναι προσωρινές και συνήθως υποχωρούν μετά από 8-10 μέρες.

Η ΚΛΕΝΒΟΥΤΕΡΟΛΗ ΚΑΙ Η ΑΠΩΛΕΙΑ ΒΑΡΟΥΣ

Η κλενβουτερόλη είναι μια θερμογενής ένωση. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι αυξάνει τη θερμοκρασία του σώματος του ατόμου που την λαμβάνει. Όταν αυξηθεί η θερμοκρασία του σώματος το λίπος καίγεται πιο παραγωγικά. Είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική και αυτό την καθιστά την νούμερο ένα επιλογή για πολλούς bodybuilders και γενικά άτομα που θέλουν να χάσουν βάρος γρήγορα. Η δραστηριότητα της αυξάνεται σε συνδυασμό με άλλα παρόμοια προϊόντα όπως η Εφεδρίνη.

✦ Παρακάτω ακολουθεί η ανάλυση και η επιβεβαιωτική διαδικασία ενός θετικού δείγματος στην ουσία κλενβουτερόλη.

• Προετοιμασία του δείγματος όπως αναφέρθηκε



• Ανάλυση από τα όργανα

Τύπος οργάνου: GC/HRMS

Παράμετροι έγχυσης

Όγκος έγχυσης: 1μl

Θερμοκρασία έγχυσης: 250°C

Παράμετροι διαχωρισμού

➤ Στήλη:

Μάρκα: Hewlett Packard

Διαστάσεις: 12m, 0.200mm

Πάχος φιλμ: 0.33μm

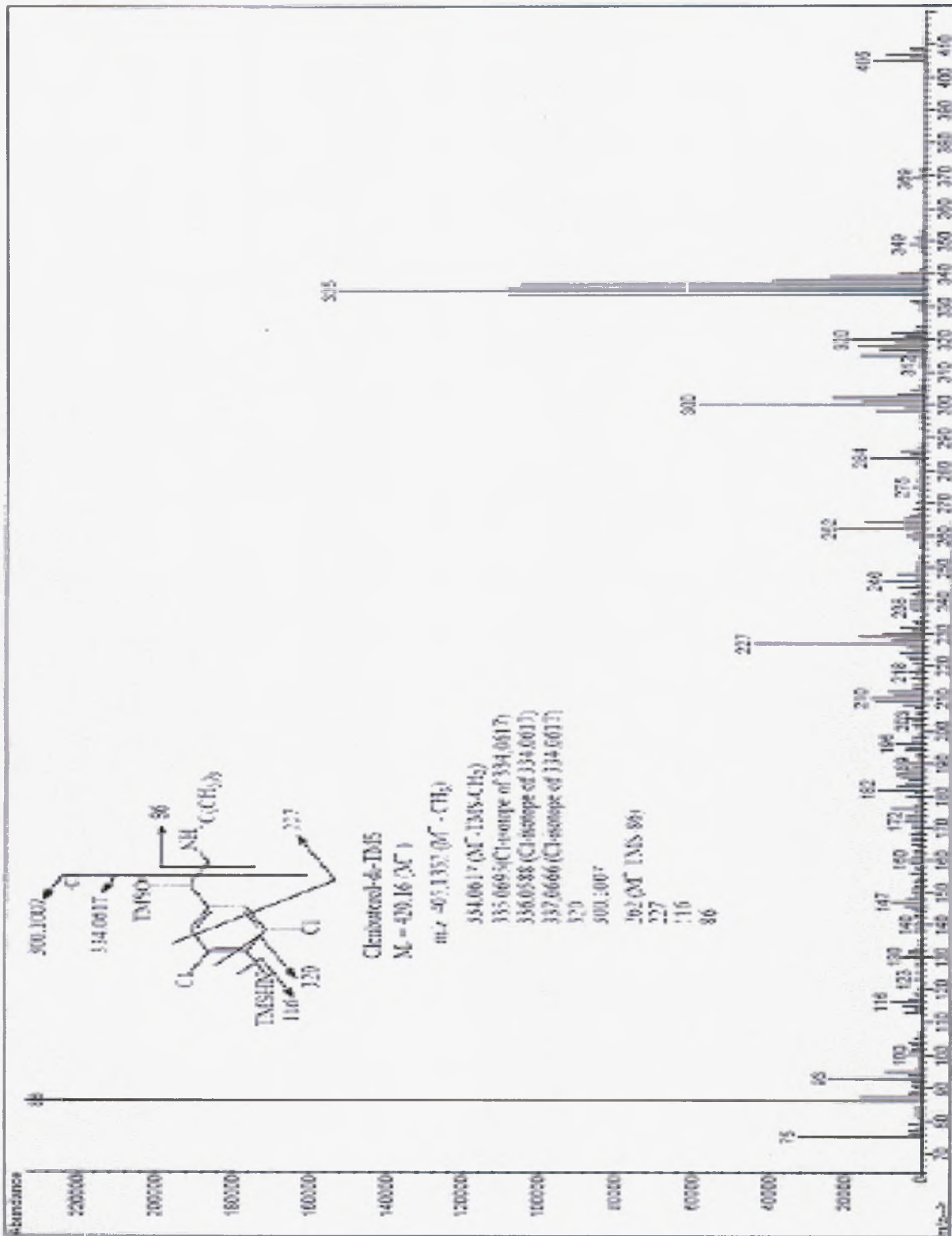
- Παράμετροι ροής
Φέρον αέριο: Ήλιο
Ρυθμός ροής: 1.4ml/min στους 180°C
- Πρόγραμμα Θερμοκρασίας στο κλίβανο
Αρχική θερμοκρασία: 150°C
Αρχικός χρόνος: 0.5min
Ρυθμός 1: 12.5 °C/min
Θερμοκρασία κράτησης: 310 °C
Χρόνος κράτησης: 0min
Ρυθμός 2: 0°C/min
Τελική θερμοκρασία: 310°C
Τελικός χρόνος: 3.15min
Γραμμή μεταφοράς: 300°C
- Παράμετροι ανίχνευσης
Θερμοκρασία μεσόφασης: 300
Θερμοκρασία πηγής: 220
Μέθοδος ιονισμού: EI

ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΒΑΣΕΙ ΣΗΜΕΙΟΥ (Α04.14.2)			
ΘΕΤΙΚΟ ΔΕΙΓΜΑ	ΚΩΔ. ΕΡΓ. ΠΡΟΪΟΥ	A-ΔΕΙΓΜΑ	B-ΔΕΙΓΜΑ
		○	○
ΟΥΣΙΑ	Clobutolol		
ΔΕΙΓΜΑΤΑ*	CONFIRMATION	QUANTIFICATION	
Blank (1x0.5ml)	Blank (1-2) ✓	X	
115°C (1x0.5ml)	ΘΕΤΙΚΟ ΔΕΙΓΜΑ (1-2) ✓		
150°C (1x0.5ml)	ΔΕΙΓΜΑ ΑΝΑΘΡΑΞΗ (1-2) ✓		
180°C (1x0.5ml)	Spiked clobutolol (1x0.5ml) (1.5 μg/ml) ✓		
180°C (1x0.5ml)	Blank Alcr ✓		
ΟΓΚΟΣ ΟΥΡΩΝ	0.5 ml		
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	TUE ICG Παράμετροι IC Διαδικασία		
ΣΥΝΤΑΞΗ	ΗΜΕΡΝΙΑ: 12/10/14	ΥΠΟΓΡΑΦΗ Α':	ΥΠΟΓΡΑΦΗ Β':
ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ	ΗΜΕΡΝΙΑ: 12/2/14	ΥΠΟΓΡΑΦΗ Α':	ΥΠΟΓΡΑΦΗ Β':
ΑΝΑΛΥΣΗ	ΗΜΕΡΝΙΑ: 15/2/14	ΥΠΟΓΡΑΦΗ Α':	ΥΠΟΓΡΑΦΗ Β':
ΕΠΑΝΑΛΗΠΤΗ	ΝΑΙ <input checked="" type="radio"/> ΟΧΙ <input type="radio"/>	ΑΙΤΙΑ:	ΥΠΟΓΡΑΦΗ:
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ	ΗΜΕΡΝΙΑ: 15/2/14	ΥΠΟΓΡΑΦΗ Α':	ΥΠΟΓΡΑΦΗ Β':
ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ:			
ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ B-ΔΕΙΓΜ.	ΗΜΕΡΝΙΑ: 15/2/14	ΥΠΟΓΡΑΦΗ Α':	ΥΠΟΓΡΑΦΗ Β':
ΦΥΛΑΞΗ VIALS	ΗΜΕΡΝΙΑ:	ΘΕΣΗ:	ΥΠΟΓΡΑΦΗ:
ΚΑΤΑΣΤΡΟΦΗ VIALS	ΗΜΕΡΝΙΑ:	ΥΠΟΓΡΑΦΗ:	

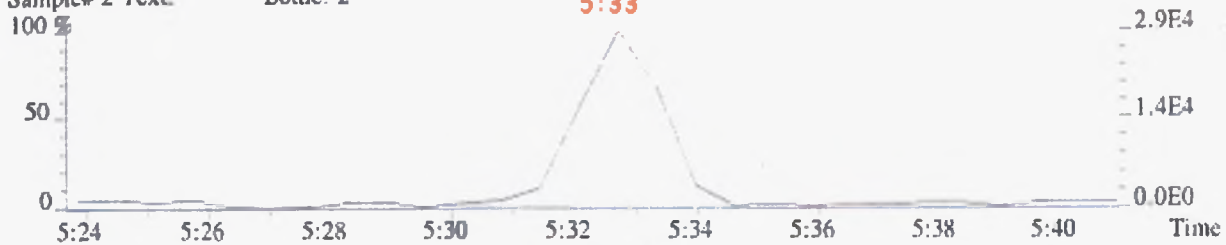
Φόρμα επιβεβαιωτικής διαδικασίας βάση σημείου

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

ΤΟ ΦΑΣΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑ ΤΗΣ ΚΛΕΝΒΟΥΤΕΡΟΛΗΣ



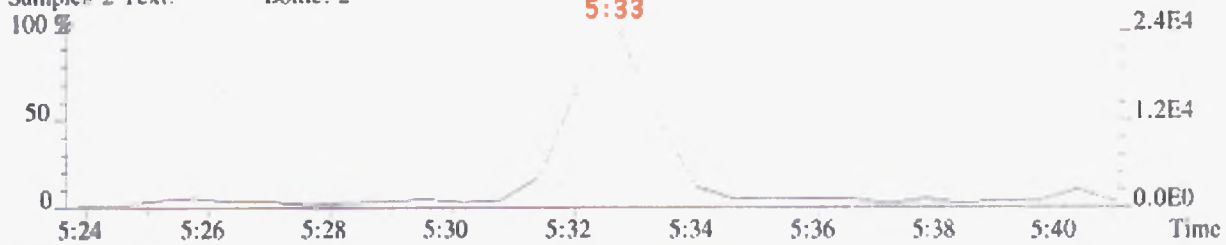
File: 334.0617 S:2 File Text: Confirmation Clenbuterol Exp: CLENBUTEROL Voltage SIR E>
Sample# 2 Text: Bottle: 2



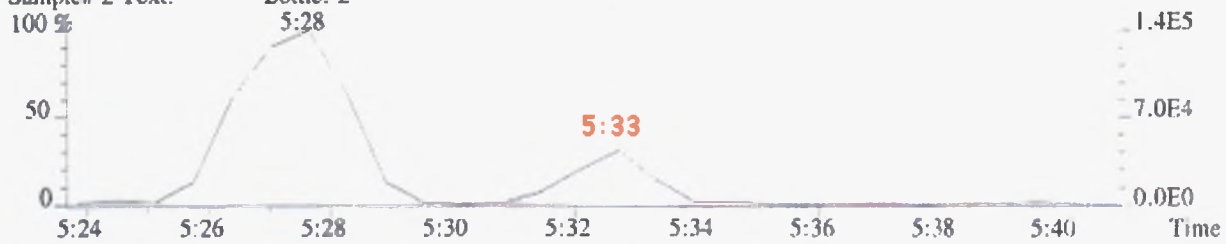
File: 335.0695 S:2 File Text: Confirmation Clenbuterol Exp: CLENBUTEROL Voltage SIR E>
Sample# 2 Text: Bottle: 2



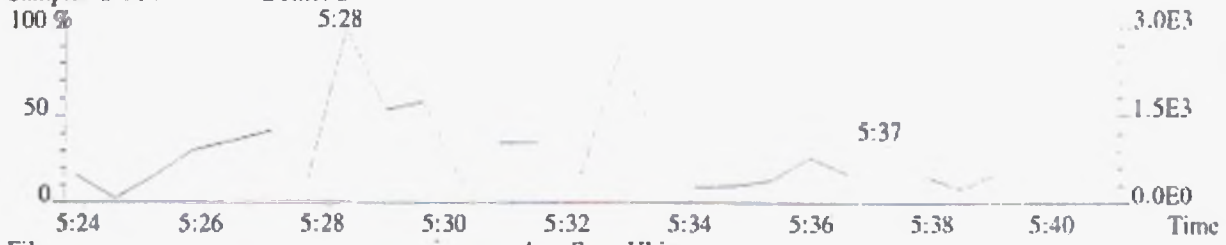
File: 336.0588 S:2 File Text: Confirmation Clenbuterol Exp: CLENBUTEROL Voltage SIR E>
Sample# 2 Text: Bottle: 2



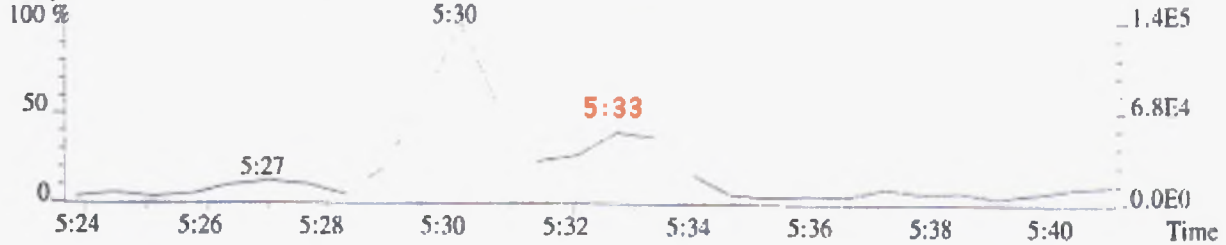
File: 337.0666 S:2 File Text: Confirmation Clenbuterol Exp: CLENBUTEROL Voltage SIR E>
Sample# 2 Text: Bottle: 2



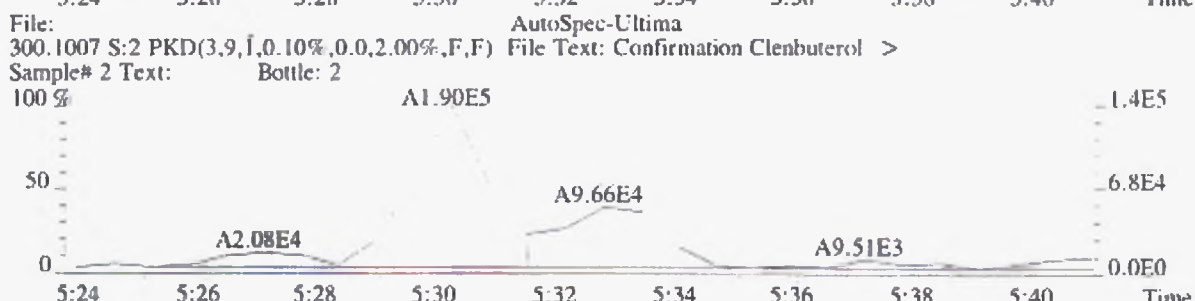
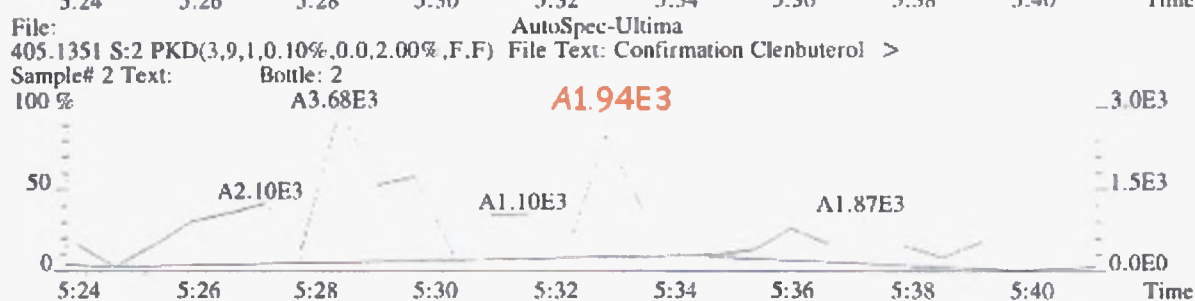
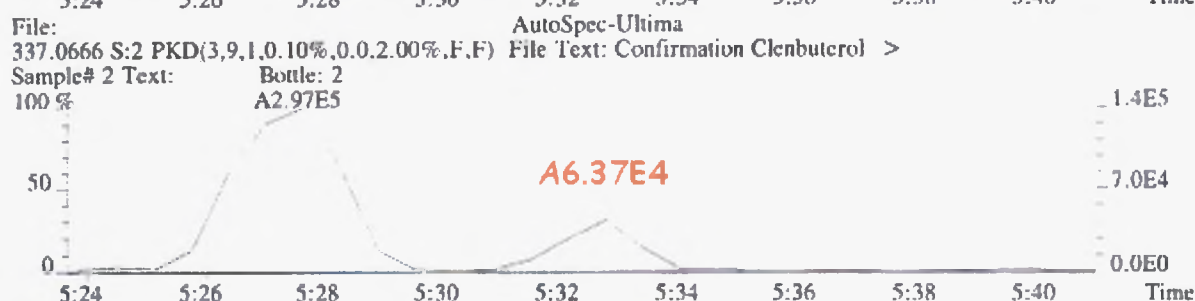
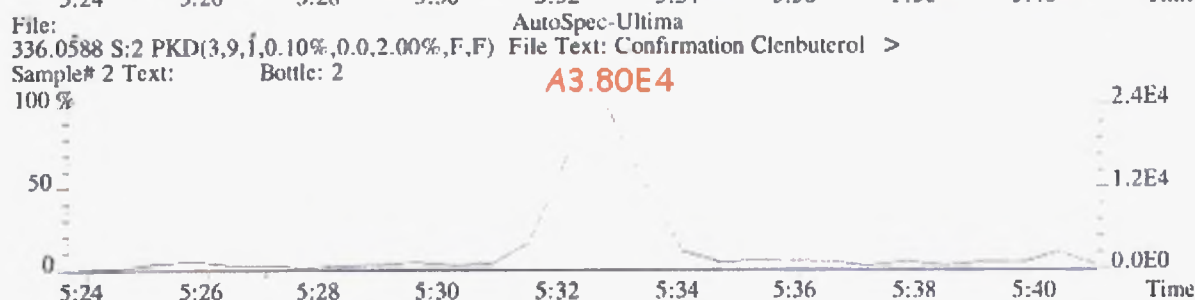
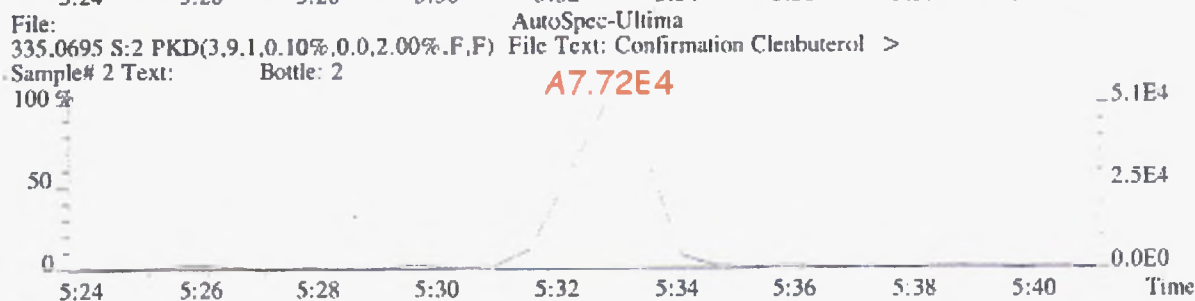
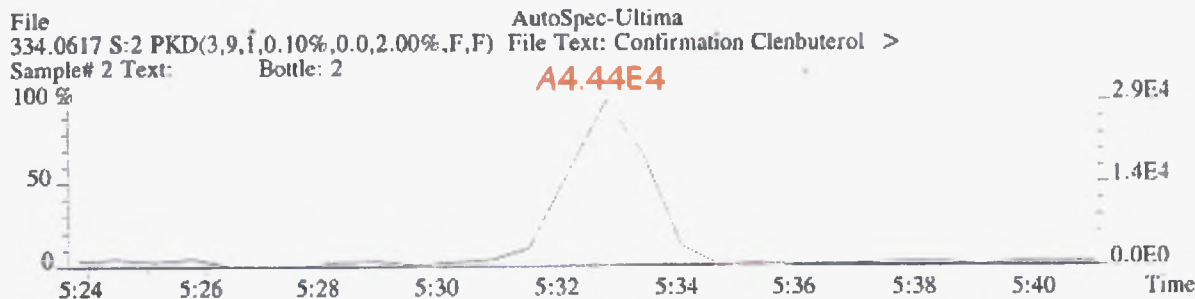
File: 405.1351 S:2 File Text: Confirmation Clenbuterol Exp: CLENBUTEROL Voltage SIR E>
Sample# 2 Text: Bottle: 2



File: 300.1007 S:2 File Text: Confirmation Clenbuterol Exp: CLENBUTEROL Voltage SIR E>
Sample# 2 Text: Bottle: 2

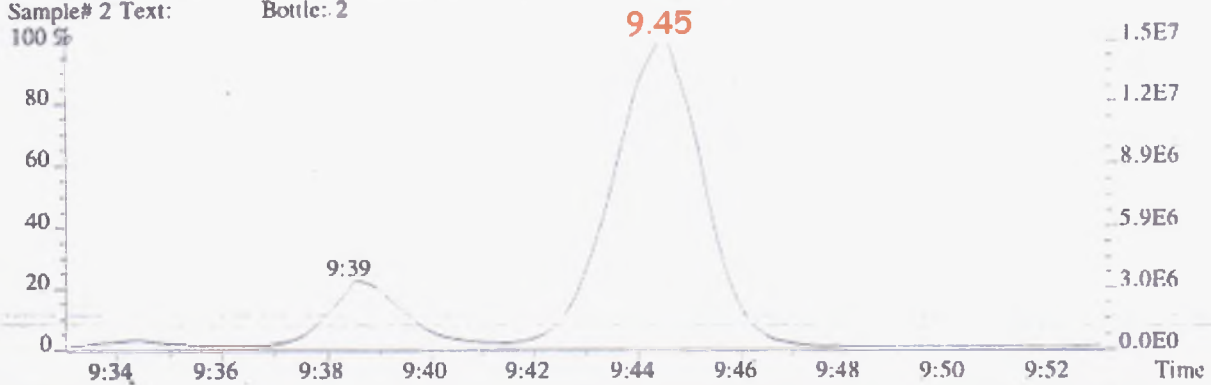


Δείγμα αθλητή



Δείγμα αθλητή

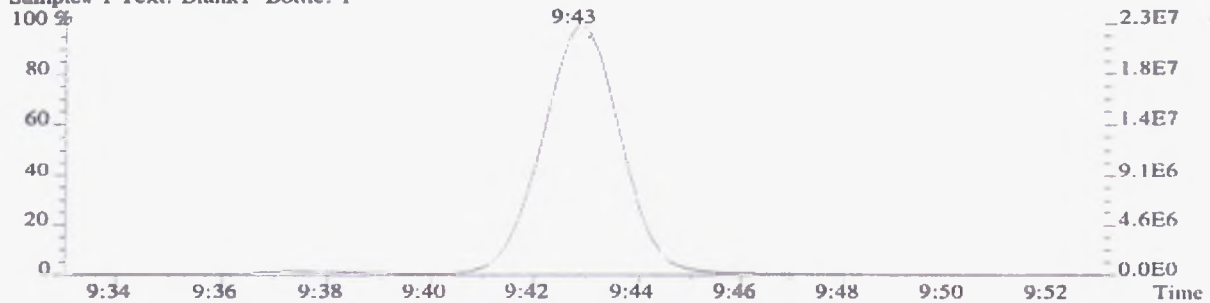
File: 446.3036 S:2 F:2 File Text: Confirmation Clenbuterol Exp: CLENBUTEROL Voltage S>
 Sample# 2 Text: Bottle: 2



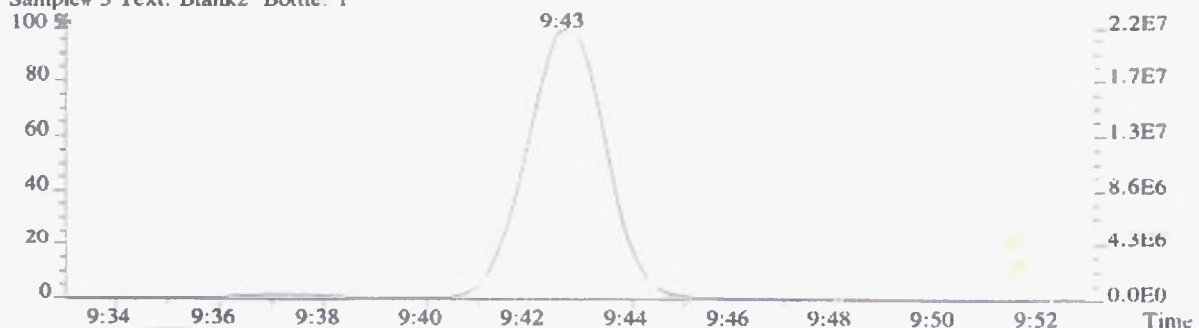
Δείγμα αθλητή

ΔΕΙΓΜΑ ΑΘΛΗΤΗ					
Κλεβουτερόλη					
Ιόν (m/z)	RT _{ISTD}	RT _{analyte}	RRT	AreaE2	Rel. Area
335,0695		5.33	0.56	772	100%
334,0617		5.33	0.56	444	57.5%
336,0588		5.33	0.56	380	49.2%
337,0666		5.33	0.56	637	82.5%
405,1351		5.33	0.56	19.4	2.51%
446,3036	9.45				

File: 446.3036 F:2 File Text: Confirmation Clenbuterol Exp: CLENBUTEROL Voltage SIR E>
 Sample# 1 Text: Blank1 Bottle: 1

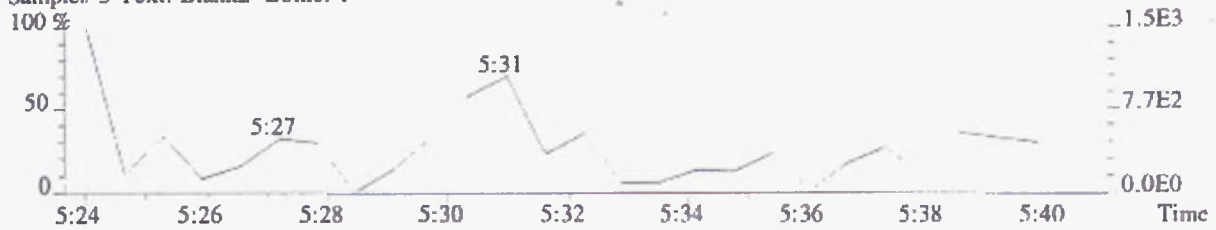


File: 446.3036 S:3 F:2 File Text: Confirmation Clenbuterol Exp: CLENBUTEROL Voltage S>
 Sample# 3 Text: Blank2 Bottle: 1

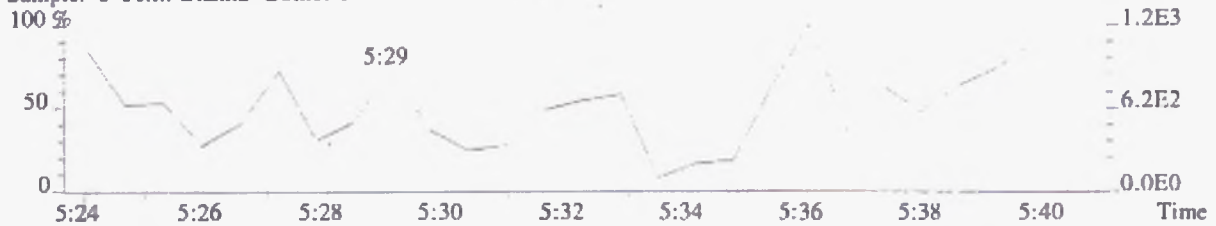


Εσωτερικό πρότυπο

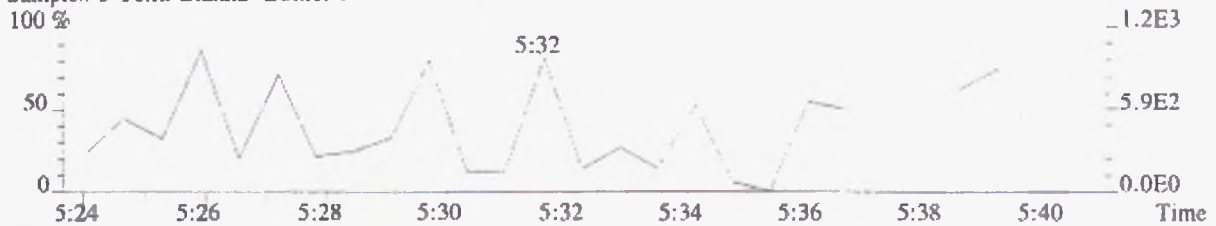
File: 334.0617 S:3 File Text: Confirmation Clenbuterol Exp: CLENBUTEROL Voltage SIR E >
Sample# 3 Text: Blank2 Bottle: 1



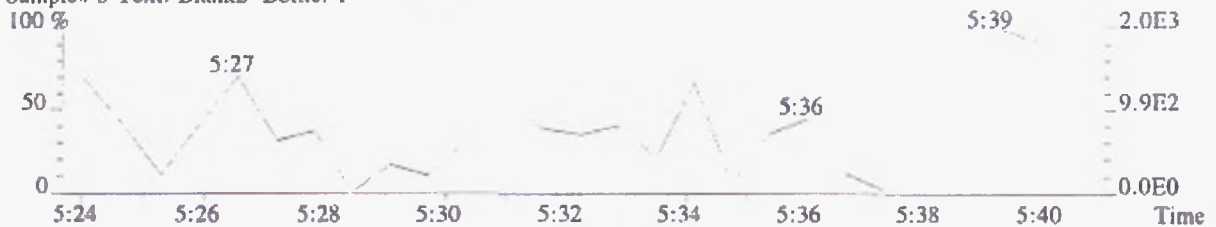
File: 335.0695 S:3 File Text: Confirmation Clenbuterol Exp: CLENBUTEROL Voltage SIR E >
Sample# 3 Text: Blank2 Bottle: 1



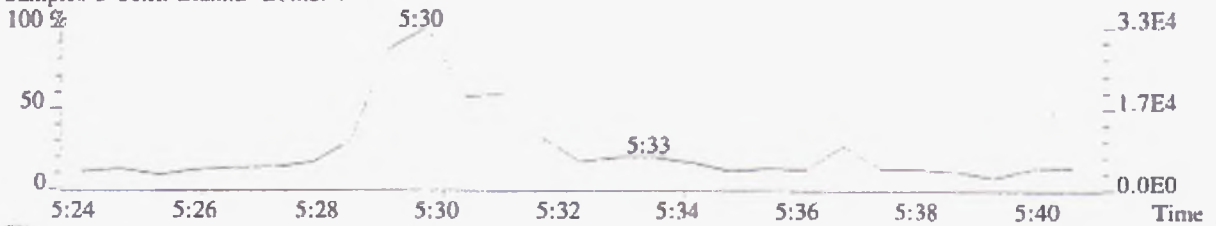
File: 336.0588 S:3 File Text: Confirmation Clenbuterol Exp: CLENBUTEROL Voltage SIR E >
Sample# 3 Text: Blank2 Bottle: 1



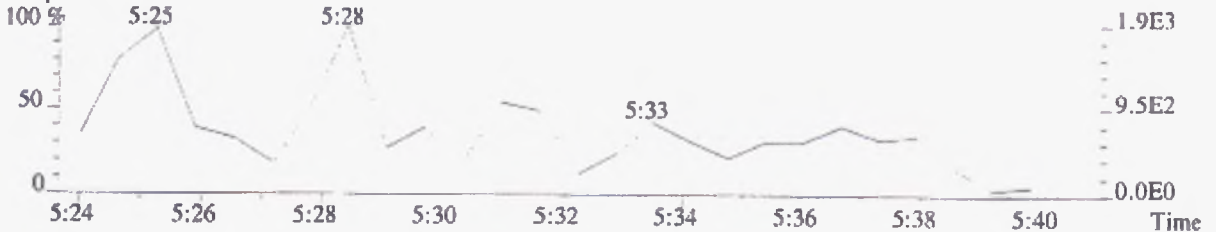
File: 337.0666 S:3 File Text: Confirmation Clenbuterol Exp: CLENBUTEROL Voltage SIR E >
Sample# 3 Text: Blank2 Bottle: 1



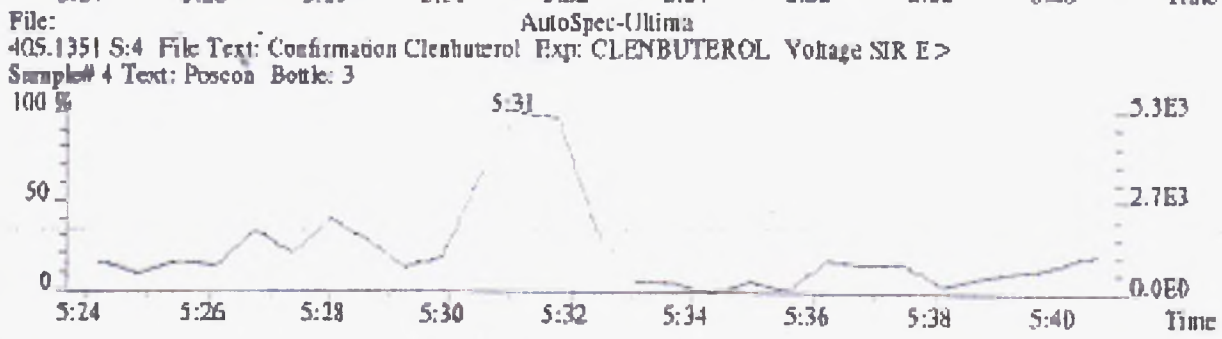
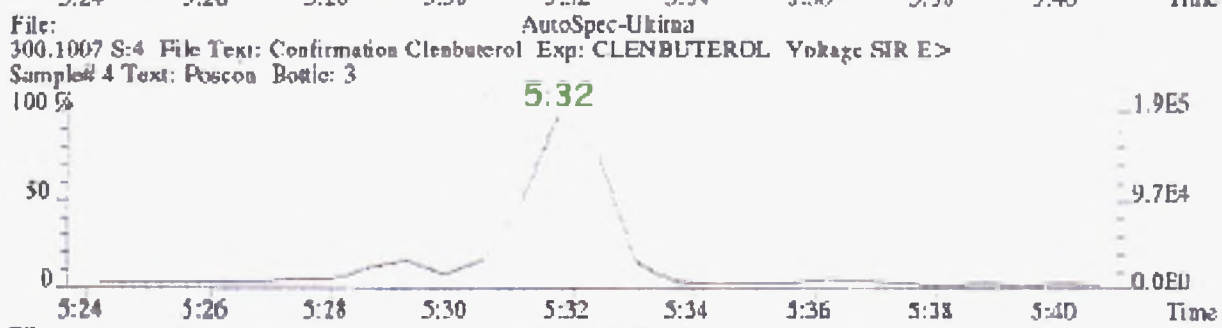
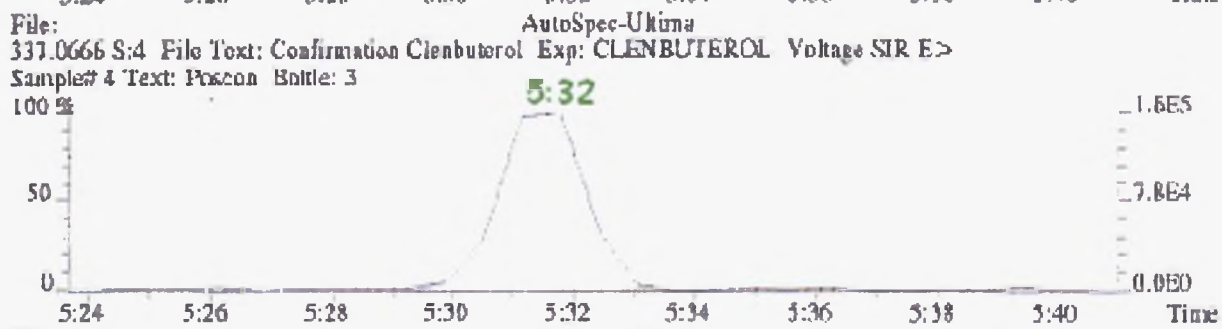
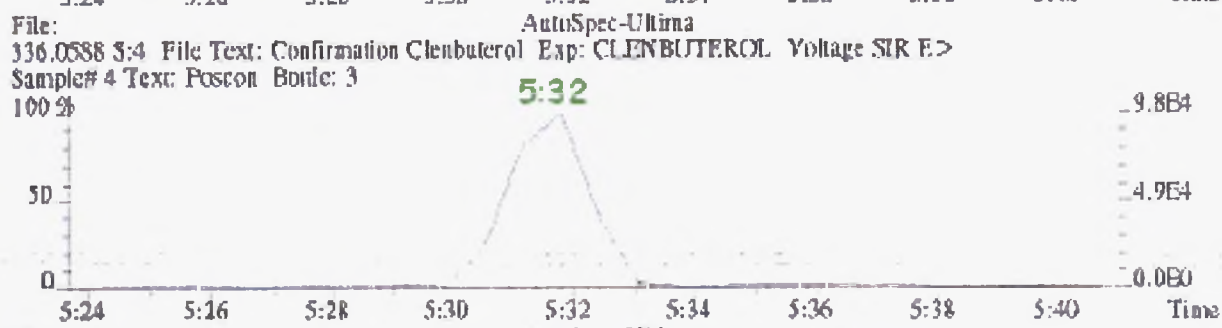
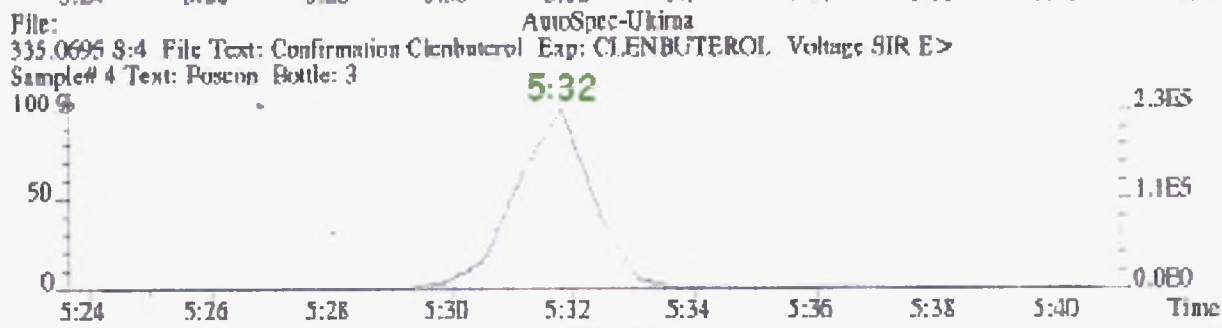
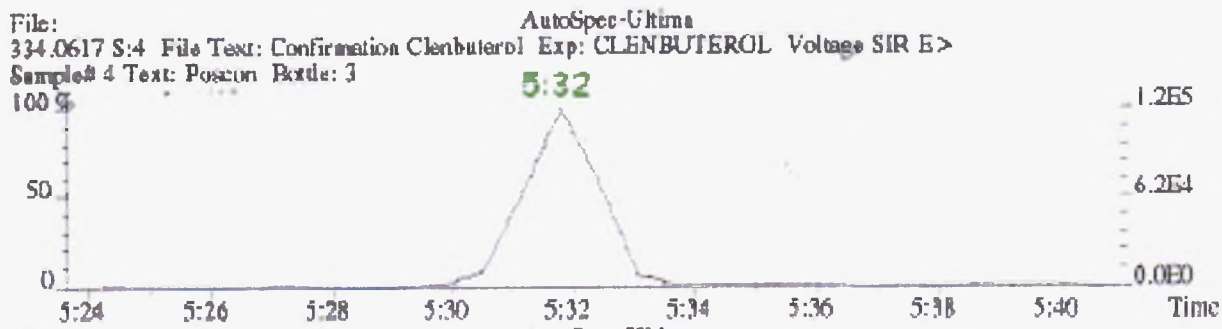
File: 300.1007 S:3 File Text: Confirmation Clenbuterol Exp: CLENBUTEROL Voltage SIR E >
Sample# 3 Text: Blank2 Bottle: 1



File: 405.1351 S:3 File Text: Confirmation Clenbuterol Exp: CLENBUTEROL Voltage SIR E >
Sample# 3 Text: Blank2 Bottle: 1

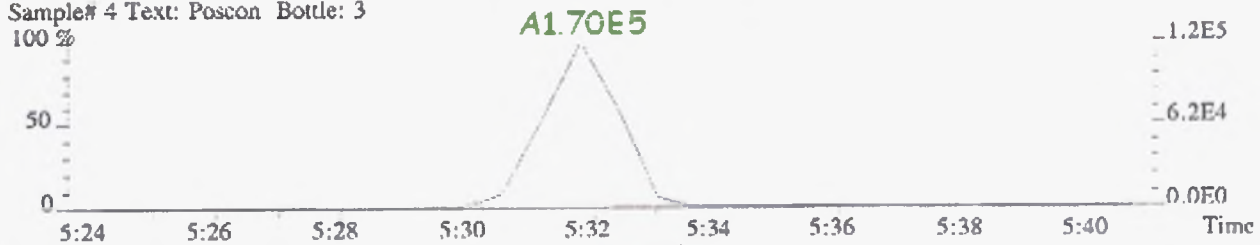


Αρνητικό δείγμα -blank-

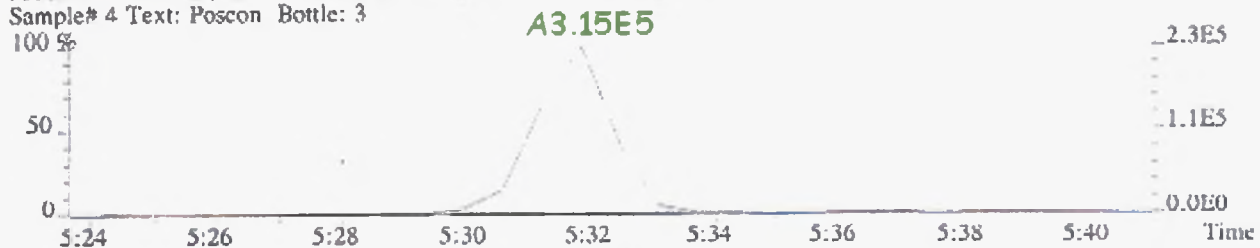


Θετικό δείγμα-αναφοράς

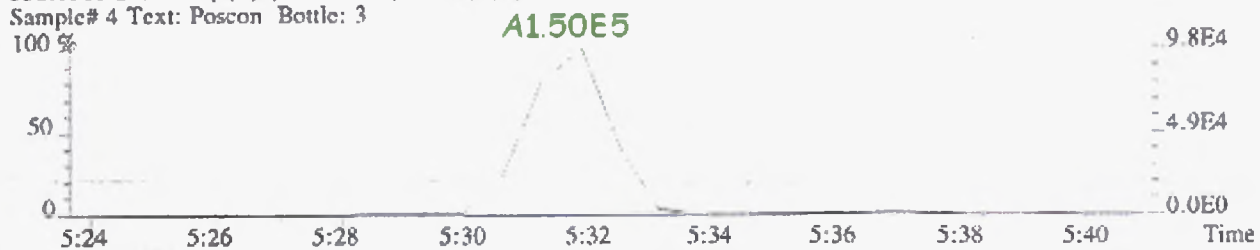
File: 334.0617 S:4 PKD(3,9,1,0.10%,0.0,2.00%,F,F) AutoSpec-Ultima File Text: Confirmation Clenbuterol >
Sample# 4 Text: Poscon Bottle: 3



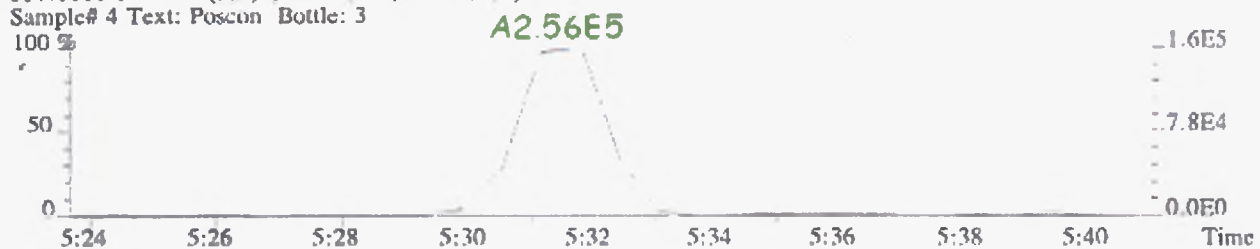
File: 335.0695 S:4 PKD(3,9,1,0.10%,0.0,2.00%,F,F) AutoSpec-Ultima File Text: Confirmation Clenbuterol >
Sample# 4 Text: Poscon Bottle: 3



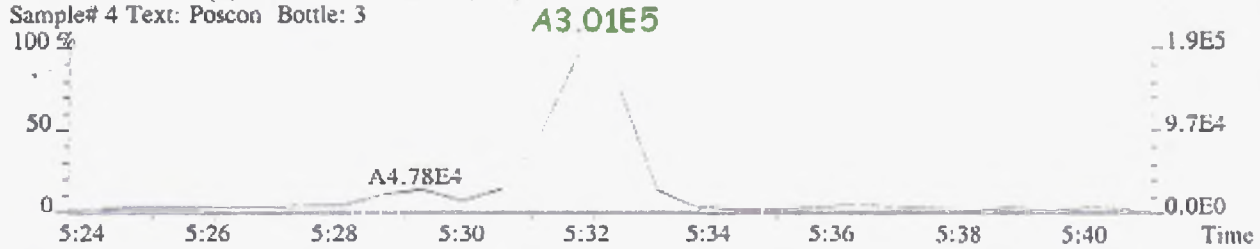
File: 336.0588 S:4 PKD(3,9,1,0.10%,0.0,2.00%,F,F) AutoSpec-Ultima File Text: Confirmation Clenbuterol >
Sample# 4 Text: Poscon Bottle: 3



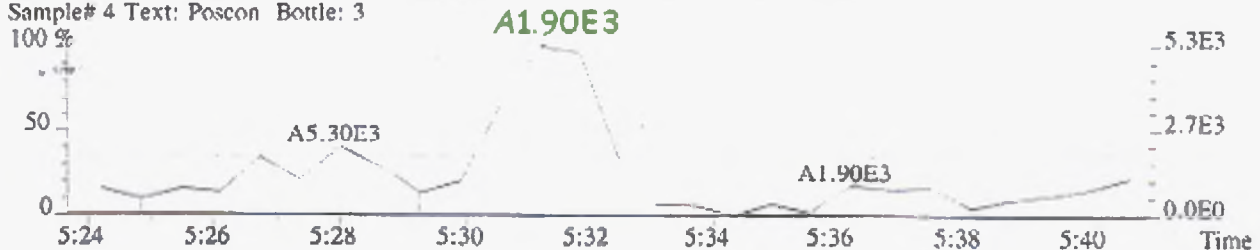
File: 337.0666 S:4 PKD(3,9,1,0.10%,0.0,2.00%,F,F) AutoSpec-Ultima File Text: Confirmation Clenbuterol >
Sample# 4 Text: Poscon Bottle: 3



File: 300.1007 S:4 PKD(3,9,1,0.10%,0.0,2.00%,F,F) AutoSpec-Ultima File Text: Confirmation Clenbuterol >
Sample# 4 Text: Poscon Bottle: 3



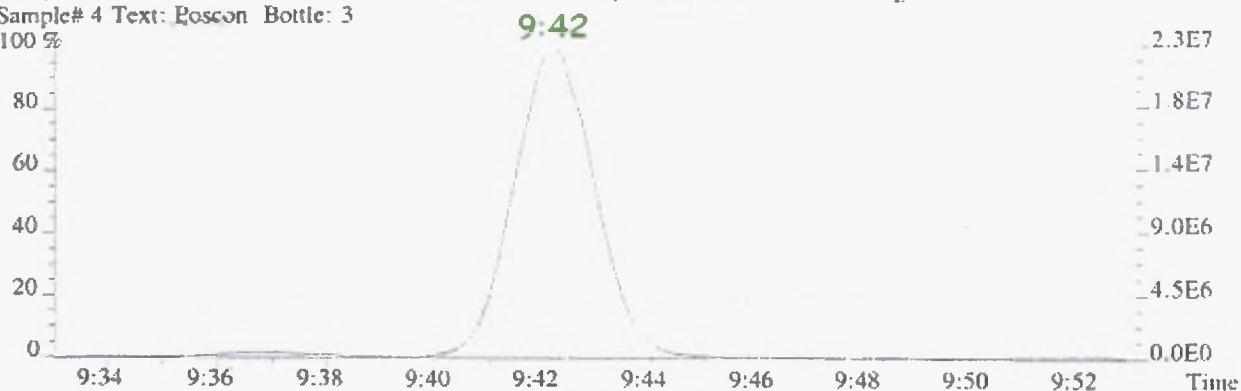
File: 405.1351 S:4 PKD(3,9,1,0.10%,0.0,2.00%,F,F) AutoSpec-Ultima File Text: Confirmation Clenbuterol >
Sample# 4 Text: Poscon Bottle: 3



Θετικό δείγμα-αναφοράς

File: 446.3036 S:4 F:2 File Text: Confirmation Clenbuterol Exp: CLENBUTEROL Voltage S>
 Sample# 4 Text: Roscon Bottle: 3
 100%

AutoSpec-Ultima



Εσωτερικό πρότυπο

ΘΕΤΙΚΟ ΔΕΙΓΜΑ					
Κλεβουτερόλη					
Ιόν (m/z)	RT _{ISTD}	RT _{analyte}	RRT	AreaE2	Rel. Area
335,0695		5.32	0.56	3150	100%
334,0617		5.32	0.56	1700	54%
336,0588		5.32	0.56	1500	47.6%
337,0666		5.32	0.56	2560	81.3%
405,1351		5.32	0.56	109	3.46%
446,3036	9.42				

ΟΡΙΑ ΑΠΟΔΟΧΗΣ						
Κλεβουτερόλη						
Ιόν (m/z)	Κριτήριο 5% (απόλυτο)		Κριτήριο 20%(σχετικό)		Κριτήριο 10% (απόλυτο)	
	min	max	min	max	min	max
335.0695					90.0%	110%
334,0617					44.0%	64.0%
336,0588			27.6%	67.6%		
337,0666					71.3%	91.3%
405,1351	-	8.5%				

ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗΣ ΓΙΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΚΑΙ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΩΝ

Χρωματογραφικός διαχωρισμός

Για την αέριο χρωματογραφία, ο χρόνος ανάσχεσης (RT, retention time) του αναλυτή δεν πρέπει να διαφέρει περισσότερο από ένα τοις εκατό ή ± 0.2 min (λαμβάνεται η μικρότερη τιμή από τις δύο) από το χρόνο ανάσχεσης της ίδιας ουσίας σε δείγμα ούρων, στο οποίο έχει εγχυθεί η ουσία και έχουν αναλυθεί ταυτόχρονα. Σε εκείνες τις περιπτώσεις όπου μετατοπίσεις του χρόνου ανάσχεσης δικαιολογούνται, για παράδειγμα, από sample overload, το κριτήριο χρόνου ανάσχεσης πρέπει να είναι πιο ελαστικό.

Ανίχνευση με Φασματομετρία Μάζας

Η πλήρης ή μερική σάρωση είναι η προτιμώμενη προσέγγιση για την επιβεβαίωση. Μια μερική σάρωση μπορεί να ξεκινά σε τιμή m/z μεγαλύτερη από οποιοδήποτε άφθονο ιόν, λόγω του αντιδραστηρίου παραγωγοποίησης ή του αντιδραστηρίου χημικού ιονισμού. Όταν λαμβάνεται φάσμα πλήρους ή μερικής σάρωσης, όλα τα διαγνωστικά ιόντα με σχετική αφθονία μεγαλύτερη από 10% στο φάσμα αναφοράς, που λαμβάνεται από ένα θετικό δείγμα ελέγχου, ένα μεταβολικό δείγμα αναφοράς ή ένα υλικό αναφοράς, πρέπει να είναι να είναι παρόντα στο φάσμα της άγνωστης κορυφής. Επιπλέον, η σχετική αφθονία των τριών διαγνωστικών ιόντων δεν θα διαφέρει κατά ποσό μεγαλύτερο του αναφερομένου στον πίνακα που παραθέτεται παρακάτω από τις σχετικές εντάσεις των ίδιων ιόντων σε δείγμα ούρων κατόπιν έγχυσης σε μεταβολικό δείγμα αναφοράς. Η σχετική αφθονία των διαγνωστικών ιόντων μπορεί να ληφθεί από μεμονωμένα φάσματα ή από τον μέσο όρο των φασμάτων ή από την ολοκλήρωση των εμβαδών κορυφής. Η αφαίρεση του σήματος υποβάθρου (background), αν υιοθετείται, πρέπει να εφαρμόζεται ομοιόμορφα σε όλα τα δείγματα που αναλύονται ταυτόχρονα και να χρησιμοποιείται για τη λήψη αποφάσεων που αφορούν την παρουσία μιας Απαγορευμένης Ουσίας ή Μεθόδου, του Μεταβολίτη της ή τον Δείκτη της.

Επιτρέπεται η χρήση ηλεκτρονικής βιβλιοθήκης φασμάτων μαζών για αναζήτηση και ταυτοποίηση. Το εργαστήριο πρέπει να καθιερώσει κριτήρια αποδοχής της ταυτοποίησης ουσίας με βάση την ποιότητα του αποτελέσματος σύγκρισης φασμάτων. Καθώς η συγκριτική ταύτιση δύο φασμάτων σε μία αντίστροφη αναζήτηση δεν εγγυάται την ταυτοποίηση της ουσίας, όλες οι ταυτοποιήσεις με βιβλιοθήκες φασμάτων πρέπει να ελέγχονται από κατάλληλο επιστημονικό προσωπικό.

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

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

Υπολογισμός συγκέντρωσης

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

ΑΠΟΔΟΧΗ Ή ΑΠΟΡΡΙΨΗ ΤΟΥ ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΑΘΛΗΤΗ

Στο φασματογράφημα της κλενβουτερόλης παρατηρούμε ότι εμφανίζονται αρκετές κορυφές οι οποίες αντιστοιχούν σε ιόντα. Η μεγαλύτερη κορυφή αντιστοιχεί στο ιόν 86. Θα αναμέναμε λοιπόν να το εξετάζαμε στην επιβεβαιωτική διαδικασία. Παρόλα αυτά το συγκεκριμένο ιόν δεν επιλέγεται γιατί δεν το πλαισιώνουν κορυφές τις ίδιες δυναμικότητας και ταυτόχρονα απέχει από τις επόμενες ψηλές κορυφές. Για να μπορέσει να γίνει η ταυτοποίηση μιας ουσίας είναι απαραίτητο να εμφανιστούν οι χαρακτηριστικές κορυφές οι οποίες όμως δεν πρέπει να έχουν απόσταση μεταξύ τους κυρίως για λόγους οικονομίας και ταχύτητας. Έτσι επιλέγονται τα συγκεκριμένα ιόντα τα οποία πληρούν τις συγκεκριμένες προϋποθέσεις.

Με βάση τα κριτήρια τα οποία αναφέραμε παραπάνω είμαστε σε θέση να χαρακτηρίσουμε ως θετικό ή ως αρνητικό το συγκεκριμένο δείγμα του αθλητού. Το 1ο κριτήριο, το οποίο θέτει απαραίτητη προϋπόθεση ο χρόνος ανάλυσης να μην διαφέρει περισσότερο από ένα τοις εκατό ή ± 0.2 min, παρατηρούμε ότι επαληθεύεται. Για το θετικό δείγμα αναφοράς έχουμε $RT=5.32$ και για το δείγμα του αθλητού έχουμε $RT=5.33$. Το 2ο κριτήριο, σχετίζεται με την αφθονία των επιμέρους ιόντων στο δείγμα. Στη συγκεκριμένη περίπτωση το ιόν 335 εμφανίζεται σε μεγαλύτερο ποσοστό και το ορίζουμε ως το 100% βάση του οποίου υπολογίζουμε την αφθονία των υπολοίπων ιόντων. Απαραίτητη προϋπόθεση για να ισχύει το 2ο κριτήριο είναι να ισχύουν τα όρια αποδοχής που παραθέτονται στους πίνακες παραπάνω, τα οποία βλέπουμε ότι ισχύουν για όλα τα ιόντα. Εφόσον πληρούνται όλες οι προϋποθέσεις που απαιτούνται για τον χαρακτηρισμό του δείγματος ως θετικό μπορούμε να χαρακτηρίσουμε το συγκεκριμένο δείγμα θετικό για την ουσία κλενβουτερόλη.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

► Χαρακτηριστικές περιπτώσεις doping

Θύτες με θύματα τον εαυτό τους, όσοι αθλητές ντοπάρονται, είναι εκείνοι που πληρώνουν το τίμημα του ντόπινγκ, με κόστος την υγεία τους και κάποιες φορές την ίδια τους τη ζωή.

▪ 1974: Ο μεγαλύτερος μποξέρ όλων των εποχών, Μοχάμεντ Άλι παραδέχεται ότι έχει χρησιμοποιήσει εκχυλίσματα θυροξίνης.



Σήμερα πάσχει από πάρκινσον.

▪ 1979: Καταγγελίες του τότε αθλητή και σημερινού προπονητή Χρήστου Ιακώβου, για χρήση απαγορευμένων ουσιών στην Άρση Βαρών. Η υπόθεση κλείνει με ποινές που επιβάλλει η Επιτροπή Φιλάθλου σε παράγοντες και τεχνικούς της Ομοσπονδίας

▪ 1984: Σε προληπτικό έλεγχο πριν τους Ολυμπιακούς τους Λος Άντζελες βρίσκονται ντοπέ ο αρσιβαρίστας Δ. Ζαρβατσίδης και ο άλτης Δ. Δεληφώτης.

Κατά τη διάρκεια των αγώνων βρίσκονται ντοπαρισμένοι η ακοντίστρια Α.Βερούλη κι ο αρσιβαρίστας Σερ. Γραμματικόπουλος.

▪ 1986: Πρώτο κρούσμα στο Ελληνικό ποδόσφαιρο. Ο Χιλιανός ποδοσφαιριστής του ΟΦΗ Ίσις βρίσκεται "θετικός" για χρήση αναβολικών.

▪ 1988: Στα ούρα του Βούλγαρου ποδοσφαιριστή Τσίνκοφ ανιχνεύεται κωδεΐνη κι η Λάρισα κινδυνεύει να χάσει στα χαρτιά το πρωτάθλημα που κέρδισε μέσα στο γήπεδο. Παρεμβαίνουν οι αγρότες, κλείνουν τους δρόμους, καίνε λάστιχα, απειλούν με νέο Κιλελέρ και το πρωτάθλημα ξαναγυρίζει στον Θεσσαλικό κάμπο.

▪ Ο Μπεν Τζόνσον νικάει στα 100μ. των Ολυμπιακών της Σεούλ, κάνει ένα εξωπραγματικό παγκόσμιο ρεκόρ και συλλαμβάνεται ντοπαρισμένος. Μετά από δύο χρόνια επαναλαμβάνει το "ατόπημα" του και τιμωρείται με ισόβιο αποκλεισμό.



▪ 1993: Θετικό δείγμα του ποδοσφαιριστή Ζήση Βρύζα πριν τους Μεσογειακούς της Γαλλίας. Τελικά αθώνεται γιατί καταφέρνει να αποδείξει ότι η φυσική παραγωγή τεστοστερόνης του, ξεπερνά τα όρια που είχαν θεσπιστεί στο αντιντόπινγκ!

▪ 1994: Ντοπέ ο Ντιέγκο Μαραντόνα με "κοκτέιλ" εφεδρίνης στο Παγκόσμιο Κύπελλο των Η.Π.Α. Τιμωρείται με 15 μήνες αποκλεισμό και λίγο μετά την επιστροφή του στα γήπεδα βρίσκεται θετικός σε χρήση ναρκωτικών



▪ Το σύνδρομο της Κίνας": Περισσότερες από 34 Κινέζες αθλήτριες βρίσκονται ντοπαρισμένες με απαγορευμένες ουσίες, σε διάφορες χρονικές περιόδους και σε

διαφορετικά αθλήματα. Οι Κινέζοι κατηγορούνται ότι κατασκευάζουν υπέρ-αθλήτριες, μέσα σε ένα δίκτυο στρατοπέδων εκπαίδευσης, υιοθετώντας απάνθρωπες προπονητικές μεθόδους και χρησιμοποιώντας συστηματικά το ντοπάρισμα.

▪ 1997: Η Διεθνής Ομοσπονδία Κολύμβησης πραγματοποιεί 1.187(!) ελέγχους ντόπινγκ, μεταξύ των οποίων 820 αιφνίδιους, κυρίως σε Κινέζους, Αμερικάνους και Αυστραλούς. Τρεις κολυμβητές εντοπίζονται θετικοί, κι ανάμεσα τους ο Ολυμπιονίκης Πισνένκο.

▪ 1998: Σειρά από δίκες στο Βερολίνο. Αποκαλύπτεται ότι όλοι οι Ανατολικογερμανοί αθλητές κι αθλήτριες που είχαν κερδίσει Ολυμπιακό μετάλλιο από το 1968 έως το 1981 έκαναν συστηματική χρήση φαρμάκων, βάση κεντρικού κρατικού σχεδιασμού. Οι μόνοι που την "γλίτωσαν" ήταν οι ιστιοπλόοι. Η Ιρλανδή Μισέλ Σριθ, τρεις φορές Ολυμπιονίκης στην κολύμβηση, κατηγορείται για χρήση απαγορευμένων ουσιών. Σε αιφνίδιο έλεγχο ντόπινγκ, άλλαξε το δείγμα της, με αποτέλεσμα τα ούρα της να έχουν οσμή από ούισκι. Στον ποδηλατικό γύρο της Γαλλίας αποκαλύπτεται ότι όλοι σχεδόν οι συμμετέχοντες χρησιμοποιούν την ορμόνη ερυθροποιητίνη. Λίγο αργότερα, γνωστοί Γάλλοι ποδηλάτες (Βιρένκ, Ρου, Γκαμόν) θα βρεθούν ντοπαρισμένοι και μερικοί παράγοντες θα διωχθούν (ως ύποπτοι για διακίνηση φαρμάκων). Ο Ντένις Μίτσελ, αργυρός Ολυμπιονίκης των 100μ. στην Βαρκελώνη βρίσκεται με υψηλά επίπεδα τεστοστερόνης σε συνήθη έλεγχο. Αθώνεται: τα υψηλά επίπεδα τεστοστερόνης οφείλονται στο γεγονός ότι την προηγούμενη ημέρα ήπια 5 μπουκάλια μπύρα.

Ο πρόωρος θάνατος της πολυ-ολυμπιονίκου της Σεούλ, Φλόρενς Γκρίφιθ, 39 ετών προκαλεί μεγάλη αναστάτωση στον αθλητικό χώρο. Η νεκροτομή έδειξε ήπιας μορφής καρδιακή υπερτροφία και σκλήρυνση των πνευμόνων.

▪ 1998-1999: Το Ελληνικό μπάσκετ έχει την τιμητική του, 9 παίκτες βρίσκονται θετικοί (7 ξένοι, 2 Έλληνες).

▪ 1999: Ο αθλητίατρος Ντίτριχ Χάνεμαν τιμωρείται με πρόστιμο 45.000 μάρκων γιατί από το 1977 έως και το 1989 προμήθευε με απαγορευμένες ουσίες Ανατολικογερμανίδες αθλήτριες.

▪ Πριν το Παγκόσμιο πρωτάθλημα κολύμβησης, η Κινέζα κολυμβήτρια Παν συλλαμβάνεται από τις τελωνειακές αρχές του Σίδνεϊ και στη βαλίτσα της ανακαλύπτονται 13 φιαλίδια αυξητικής ορμόνης. Η Παν τιμωρήθηκε με αποκλεισμό 4 ετών κι ο προπονητής της Τζόι Τζίβεν με 15 χρόνια.

▪ Ο Αλβανός ποδοσφαιριστής του Απόλλωνα Ίντριντ Φορτούζι βρίσκεται ντοπαρισμένος με ντεκαντουραμπολίν. Στα ούρα του κολυμβητή Παπαδόπουλου ανιχνεύεται η ουσία βρωματάνη που συνήθως χρησιμοποιείται για να κρύψει τη χρήση άλλων ουσιών.

▪ Τα τελευταία χρόνια όλοι οι Ιταλοί ποδοσφαιριστές έχουν βρεθεί στο στόχαστρο. Ο πρόεδρος της Ιταλικής Ολυμπιακής επιτροπής Μάριο Πεσκάντε αναγκάζεται να παραιτηθεί. Κλείνει το εργαστήριο ελέγχου ντόπινγκ της Ρώμης, αφού έχασε κάθε κύρος μετά από καλύψεις για "στημένα" τεστ και "ψευδείς ελέγχους". Ο ιταλικός Τύπος αναφέρεται σε λίστα 60 - 200 παλαιών ποδοσφαιριστών, υπόπτων για ντοπάρισμα.

➤ Το κύριο ερώτημα που προκύπτει από την ανάγνωση των παραπάνω είναι :
παίρνουν οι αθλητές απαγορευμένες ουσίες;

Η απάντηση είναι ναι. Η πλειονότητα όμως των αθλητών τουλάχιστον στις αναπτυγμένες χώρες δεν χρησιμοποιούν τις γνωστές ουσίες, προτιμούν τις πιο δραστικές οι οποίες δεν ανιχνεύονται στον έλεγχο doping.

➤ Βασικές αιτίες ντοπαρίσματος.

Η λήψη φαρμάκων για τη βελτίωση των επιδόσεων υποδηλώνει την έλλειψη αυτοπεποίθησης, υπέρμετρη βιασύνη και την αναζήτηση "εύκολων λύσεων". Η άγνοια, η έλλειψη προοπτικών και η πίεση για "νίκες", οδηγούν στο ντοπάρισμα ως μέσο για εύκολο κέρδος, επιβεβαίωση, αναγνώριση, άνοδο, χρήμα και προβολή. Η "σχεδόν" ελεύθερη κυκλοφορία των σκευασμάτων, ο εύκολος τρόπος εύρεσης τους, τα ανεπαρκή συστήματα ελέγχου ντόπινγκ και το ανεκτικό ποινολόγιο για όσους πιάνονται ντοπαρισμένοι για πρώτη φορά, μειώνουν τις ηθικές αντιστάσεις, αυξάνουν τα διλήμματα κι οδηγούν ευκολότερα στην απόφαση για χρησιμοποίηση τους.

➤ Υπάρχει τελικά λύση στο θέμα του doping;

▪ Πιστεύουμε πως ναι. Όμως αυτή δεν αφορά μόνο κάποιους αρμόδιους για τα θέματα του αθλητισμού. Αφορά όλη την κοινωνία. Ο στόχος «αθλητισμός χωρίς φάρμακα» μπορεί να επιτευχθεί μόνο μέσα από τη σωστή πληροφόρηση και την απόκτηση παιδείας.

▪ Όσο οι νέοι ταυτίζονται με το πρότυπο που προβάλλει η σημερινή εμπορευματοποίηση του αθλητικού θεάματος, τόσο το πρόβλημα του ντόπινγκ θα το βρίσκουμε μπροστά μας.

▪ Οι πιθανότητες της νίκης στον πόλεμο του doping είναι αρκετές όμως πολλοί ερευνητές, αθλητές και προπονητές ανησυχούν για τις συζητήσεις που γίνονται περί νομιμοποίησης των αναβολικών. Χαρακτηριστικά ένας Αμερικανός Ολυμπιονίκης είπε: «Θα παρακολουθούμε ένα δρομέα να σπάει τη μία μέρα το παγκόσμιο ρεκόρ και να πεθαίνει την επόμενη εβδομάδα, θα είναι σαν να επιτρέπουμε στους αθλητές να ' αυτοκτονούν.» .

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Θ.Π. Χατζηιωάννου, Μ.Α. Κούππαρη, «Ενόργανη Ανάλυση» Αθήνα 2000.
- World Anti-Doping Agency, WADA «THE WORLD ANTI-DOPING CODE» 2005
- World Anti-Doping Agency, WADA «THE 2005 PROHIBITED LIST INTERNATIONAL STANDARD»
- Page, Curtis, Sutter, Walker, Hoffman «PHARMACOLOGY» 1997
- Scott E. Van Bramer «An Introduction To Mass Spectrometry» 1997
- Arthur Vander, James Sherman, Dorothy Luciano, «HUMAN PHYSIOLOGY» 1970
- J.Munoz-Guerra, D.Carreras, C.Soriano, C.Rodriguez, A.F.Rodriguez, R.Cortes, «GC/MS/MS ANALYSIS FOR ANABOLIC STEROIDS IN URINE FOR ATHLETIC TESTING» Doping control laboratory of Madrid, Spain : www.varianinc.com
- Dr.Thomas, G.Chasteen «Coupling Gas Chromatography to Mass Spectrometry» Sam Houston State University, Texas : www.shsu.edu/~chemistry/primers/gcms.html
- Brian M.Tissue «Introduction to Mass Spectrometry» 2000 : www.chem.vt.edu/chem-ed/ms/ms-intro.html
- Sheffield Hallam University, School of Science and Mathematics : www.shu.ac.uk/schools/sci/chem/tutorials/chrom/gaschrn.htm
- CUBoulder Organic Chemistry Undergraduate Courses «Lab Techniques» : www.orgchem.colorado.edu
- C.Ayotte «Clenbuterol: Screening and Confirmation» INRS-Sante, Montreal, Canada
- Y.Xu, L.Shen, X.Liu, C.Zhang «Analytical and metabolic study of clenbuterol in human and rats' urine» National Research Institute of Sports Medicine, Beijing, China
- G.Gmeiner, H.Tausch, Th.Geisendorffer «Dope Control: Comparison of Different Detection Methods for Clenbuterol» Aystrian Research Centre Seibersdorf
- Ronald A.Hites «Gas Chromatography Mass Spectrometry» Indiana University School of Public and Environmental Affairs and Department of Chemistry: www.prenhall.com
- M.L. Vincent and D.G Petrers, Journal of Electroanalytical Chemistry Interfacial Electrochemistry 1992

- Elliott, C.T., McCaughey, W.J., Crooks, S.R.H., McEvoy, J.D.G. and Kennedy, D.G., « Residues of clenbuterol in cattle receiving therapeutic doses: Implications for differentiating between legal and illegal use » 1995
- «Αθλητισμός και Φάρμακα» Ινστιτούτο Φαρμακευτικής Έρευνας και Τεχνολογίας 2005
- Dope Control: comparison of Different Detection Methods for Clenbuterol, G. Gmeiner, H. Tausch, Th. Geisendorfer, Austrian Research Centre Seibersdorf, A-2444 Seibersdorf, Austria.
- Οργανική Χημεία, John McMurry, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, 1999