



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ - ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΒΥΠΡΟΡΙΟΝ ΣΕ
ΟΥΡΑ ΑΝΘΡΩΠΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ DOPING**

ΧΑΣΑΠΗΣ ΚΥΡΙΑΚΟΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΑΘΗΝΑ 2006



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

Αριθ. Εισ.: 4725/1

Ημερ. Εισ.: 27-02-2006

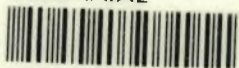
Δωρεά: Π.Θ.

Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ

2006

ΧΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087842

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο ελέγχου doping του Ολυμπιακού Αθλητικού Κέντρου Αθηνών, και είχε ως στόχο τη μελέτη της διεγερτικής ουσίας bupropion και των μεταβολιτών της, και την ένταξη της διαδικασίας ανίχνευσής αυτών των ουσιών στις ήδη υπάρχουσες διαδικασίες ρουτίνας του εργαστηρίου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον αναπληρωτή καθηγητή φαρμακολογίας του παναπιστημίου Θεσσαλίας κ. Δημήτρη Κουρέτα που μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο αντικείμενο. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω εκ βαθέων το διευθυντή του εργαστηρίου κ. Γεωργακόπουλο για την ευκαιρία που μου έδωσε για την πραγματοποίηση της ερευνητικής εργασίας και τον Δρ. χημείας κ. Ευστάθιο Κουκέα για τη βοήθειά του, το ενδιαφέρον του και τις χρήσιμες υποδείξεις του όσων αφορά τη διόρθωση της εργασίας. Επίσης ευχαριστώ από το προσωπικό του εργαστηρίου την κα Φωτεινή Χλαπάνα, τον κ. Γιάννη Αγγελή και την κα Στέλλα Λούη για την αμέριστη βοήθεια και στήριξή τους. Τέλος πάνω απ' όλους ευχαριστώ τον Δρ. Μανόλη Λυρή, για τη συνεχή καθοδήγησή του, την οργάνωση της έρευνας, το ενδιαφέρον του, τις χρήσιμες υποδείξεις του και τον πολύτιμο χρόνο που διέθεσε για μένα. Χωρίς τη βοήθεια του η διεξαγωγή της παρούσης εργασίας θα ήταν αδύνατη.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 : ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ DOPING

1.1	ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ	1
1.2	ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ ΚΡΟΥΣΜΑΤΩΝ DOPING	1
1.3	Ο ΤΡΟΠΟΣ ΔΙΕΞΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ DOPING	2
1.4	ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΑΠΑΓΟΡΕΥΜΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΩΝ	3
1.4.1	ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΑΠΑΓΟΡΕΥΜΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ	3
1.4.2	ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΑΠΑΓΟΡΕΥΜΕΝΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ	5
1.4.3	ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΑΠΑΓΟΡΕΥΜΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΕ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΑ ΑΘΛΗΜΑΤΑ	5
1.5	ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΙΣ ΔΙΕΓΕΡΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ	6
1.6	ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΞΕΝΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΤΟ ΗΠΙΑΡ	7

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 : BUPROPION

2.1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
2.2	ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ	8
2.3	ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ	9
2.4	ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΝΟΜΗ	9
2.5	ΤΟ BUPROPION ΩΣ ΑΝΤΙΚΑΤΑΘΛΙΠΤΙΚΟ	9
2.6	ΤΟ BUPROPION ΚΑΤΑ ΤΟΥ ΚΑΠΝΙΣΜΑΤΟΣ	11
2.7	ΠΑΡΕΝΕΡΓΕΙΕΣ ΤΟΥ BUPROPION	13

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 : ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΛΕΓΧΟΥ DOPING

3.1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	15
3.2	ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ	15
3.2.1	ΓΕΝΙΚΑ	15
3.2.2	ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΑΕΡΙΟΥ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΟΥ	15
3.2.3	ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΑΕΡΙΑΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	19
3.3	ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ	19
3.3.1	ΓΕΝΙΚΑ	19
3.3.2	ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΩΝ	20
3.4	ΣΥΝΔΕΣΗ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΑΕΡΙΟΥ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΟΥ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΟ ΜΑΖΩΝ	23

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 : ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ

4.1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	25
4.2	Η ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	25
4.3	ΠΑΡΑΓΩΓΟΠΟΙΗΣΗ	30
4.4	ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ	32
4.5	ΟΡΓΑΝΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	33
4.5.1	ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΣΥΣΚΕΥΕΣ	33
4.5.2	ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	34
4.5.3	ΛΟΙΠΑ ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ	35
4.5.4	ΓΥΑΛΙΝΑ ΣΚΕΥΗ	35
4.6	ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΣΤΟ GC – MS	36

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 : ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟ ΠΕΙΡΑΜΑ

38

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 : ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	40
6.2	ΠΕΙΡΑΜΑ ΠΡΩΤΟ : ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣ ΤΟΥ BUPROPION	40

6.3 ΠΕΙΡΑΜΑ ΔΕΥΤΕΡΟ : ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΚΟΡΥΦΩΝ ΤΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΤΟΥ ΒΥΡΡΟΡΙΟΝ	43
6.4 ΠΕΙΡΑΜΑ ΤΡΙΤΟ : ΛΗΨΗ ΤΩΝ ΦΑΣΜΑΤΩΝ ΜΑΖΑΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΤΟΥ ΒΥΡΡΟΡΙΟΝ	46
6.5 ΠΕΙΡΑΜΑ ΤΕΤΑΡΤΟ : ΠΑΡΑΓΩΓΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΤΟΥ ΒΥΡΡΟΡΙΟΝ	47
6.6 ΠΕΙΡΑΜΑ ΠΕΜΠΤΟ : ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ II ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΩΓΟΠΟΙΗΣΗ	53
6.7 ΠΕΙΡΑΜΑ ΕΚΤΟ : ΕΠΙΠΛΕΟΝ ΠΑΡΑΓΩΓΟΠΟΙΗΣΕΙΣ	53
6.7.1 ΣΚΟΠΟΣ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ	53
6.7.2 ΠΑΡΑΓΩΓΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ΠΥΡΙΔΙΝΗ	54
6.7.3 ΠΑΡΑΓΩΓΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ΤΡΑΑ	58
6.7.4 ΠΑΡΑΓΩΓΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ΜΤΒΣΤΡΑ	62
6.8 ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΟΥ ΒΥΡΡΟΡΙΟΝ ΣΤΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΡΟΥΤΙΝΑΣ ΤΟΥ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ	62
6.9 ΕΠΙΛΟΓΟΣ	64
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	65

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ : ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ DOPING

1.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ [1-6]

Ο όρος doping (φαρμακοδιέγερση) προέρχεται από το διεγερτικό ποτό με την ονομασία dop που χρησιμοποιούσαν κάποιες φυλές της Νοτίου Αφρικής. Το φαινόμενο όμως της χρήσης απαγορευμένων ουσιών με στόχο τη βελτίωση της αθλητικής απόδοσης ήταν γνωστό από την αρχαιότητα, τόσο στην αρχαία Ελλάδα με εφαρμογή στους Ολυμπιακούς Αγώνες, όσο μετέπειτα και στην αρχαία Ρώμη, όπου και χρησιμοποιούνταν στις αρένες στις οποίες μάχονταν οι μονομάχοι.

Στη σύγχρονη εποχή, το φαινόμενο του doping εμφανίστηκε προς το τέλος του 19ου αιώνα και γρήγορα επεκτάθηκε σε όλα τα αγωνίσματα. (στίβο, ποδηλασία, κολύμβηση κλπ) Μεταπολεμικά όμως, το doping εξελίχθηκε σε πραγματική μάστιγα και τα κρούσματα έγιναν τόσο πυκνά, ώστε η ανάγκη δημιουργίας ενός οργανισμού αντι – doping κατέστη απαραίτητη. Η World Anti Doping Agency δημιουργήθηκε το 1960 με σκοπό τη δημιουργία μεθόδων ελέγχου doping, την ανίχνευση των απαγορευμένων ουσιών και τη συνεχή εξέλιξη και βελτίωση αυτών των μεθόδων ώστε να ανιχνεύονται οι κατά καιρούς καινούριες απαγορευμένες ουσίες ή να εντοπίζονται οι νέες μέθοδοι βελτίωσης της αθλητικής απόδοσης με αθέμιτο τρόπο. Η πρώτη φορά που εφαρμόστηκαν έλεγχοι doping σε σύγχρονους αγώνες ήταν στη Γαλλία το 1955 στο αγώνισμα της ποδηλασίας, όπου και βρέθηκαν πέντε θετικά δείγματα από τα 25 που αναλύθηκαν. Συστηματικά όμως ο έλεγχος ξεκίνησε στους χειμερινούς Ολυμπιακούς αγώνες του 1968 και καθιερώθηκε ως μέρος των χειμερινών Ολυμπιακών του Μονάχου το 1972, όπου αναλύθηκαν 2079 δείγματα σε 14 ημέρες. Σύμφωνα με τη WADA, ως doping ορίζεται η χορήγηση απαγορευμένων ουσιών ή η χρήση απαγορευμένων μεθόδων. Το 1967 η WADA κατήρτισε τον πρώτο κατάλογο απαγορευμένων ουσιών.

Η πρώτη χώρα που ίδρυσε μυστικά βιομηχανία παραγωγής απαγορευμένων ουσιών με σκοπό τη βελτίωση και διάκριση των αθλητών της ήταν η Γερμανία. Οι ΑνατολικοΓερμανοί αθλητές έπαιρναν συστηματικά αναβολικές ουσίες κατά την προπόνησή τους, ενώ και οι ενέσεις τεστοστερόνης, στανοζολόλης και ναδρολόνης ήταν πρωτοποριακές για την εποχή. Τη σκυτάλη πήρε η Ρωσία, η οποία στα δικά της εργαστήρια παράγαγε φθινή ερυθροποιητίνη και διεγερτικές ουσίες όπως τα bromanton και carfedon. Βέβαιο πάντως θεωρείται ότι η σύγχρονη βιομηχανία του doping εδρεύει στις ΗΠΑ, ενώ έχει επίσης εξαπλωθεί και σε χώρες της Άπω Ανατολής όπως η Ινδία, το Πακιστάν και η Κίνα.

1.2 ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ ΚΡΟΥΣΜΑΤΩΝ DOPING [1-6]

Στα τέλη του 19^{ου} αιώνα ο μαραθωνοδρόμος Tom Hicks αφού κέρδισε το μαραθώνιο του Saint Louis έπαθε καταπληξία εξαιτίας της λήψης μεγάλης δόσης

στρυχνίνης και κονιάκ. Το 1960 στην Ολυμπιάδα της Ρώμης ο Δανός ποδηλάτης Kurt Jensen πεθαίνει από υπερβολική δόση αμφεταμίνης και νικοτινικού οξέος. Στους ίδιους Ολυμπιακούς αγώνες πεθαίνει και ο δρομέας Dick Howard από υψηλή δόση ηρωίνης. Ένα από τα μεγαλύτερα σκάνδαλα συνέβη κατά τους παναμερικανικούς αγώνες του Καράκας το 1984, στους οποίους αποκλείστηκαν επειδή βρέθηκαν θετικοί στον έλεγχο doping 19 αθλητές, ενώ άλλοι 14 αποχώρησαν για να αποφύγουν τον έλεγχο. Λίγα χρόνια αργότερα συνταράσσεται ο φίλαθλος κόσμος όταν ο Καναδός μεγάλος δρομέας Ben Jonson χάνει το χρυσό μετάλλιο που κατέκτησε στην Ολυμπιάδα της Σεούλ (1988) επειδή βρίσκεται θετικός σε έλεγχο σε αναβολικά στεροειδή και ο γιατρός του ομολογεί ότι τα χρησιμοποιούσε από το 1981. Με την πάροδο των χρόνων τα κρούσματα δεν εξαλείφονται καθώς η βιομηχανία του doping εξελίσσεται συνεχώς ώστε να δημιουργεί χημικούς παράγοντες μη ανιχνεύσιμους από τον έλεγχο της WADA. Έτσι, ακόμα και στους τελευταίους Ολυμπιακούς Αγώνες της Αθήνας δεν έλειψαν τα θετικά δείγματα, αλλά η μάλιστα αυτή δεν αποτελεί αποκλειστικό προνόμιο των Ολυμπιακών. Αντιθέτως έχει διαβρώσει κάθε πτυχή του αθλητισμού συμπεριλαμβανομένων και δύο εκ των λαοφιλέστερων αθλημάτων, του ποδοσφαίρου και της καλαθοσφαίρας. Το 1994 στο παγκόσμιο κύπελλο ποδοσφαίρου των ΗΠΑ βρέθηκε θετικός σε κοκαΐνη ο μύθος του αθλήματος Ντιέγο Αρμάντο Μαραντόνα που βρισκόταν τότε στη δύση της καριέρας του. Το 2002 βρέθηκε θετικός σε έλεγχο ο μπασκετμπολίστας του Παναθηναϊκού Γιαννούλης, ενώ την ίδια περίοδο αποδείχτηκε ότι οι γιατροί της διάσημης ποδοσφαιρικής ομάδας Juventus έβαζαν απαγορευμένες ουσίες στα ποτά των παικτών εν αγνοία των τελευταίων. Το 2004 ο Ρουμάνος επιθετικός αστέρας της αγγλικής Chelsea Αντριάν Μούτου βρίσκεται θετικός σε έλεγχο και αποβάλλεται από την ομάδα.

Όπως είναι φανερό, το doping εξαπλώνεται σαν καρκίνωμα και επηρεάζει όλες τις εκφάνσεις του αθλητισμού, προσβάλλοντας την αξία του εν αγωνιζέσθαι και πλήττοντας αποφασιστικά το αθλητικό ιδεώδες, απειλώντας ταυτόχρονα και την υγεία των αθλητών.

1.3 Ο ΤΡΟΠΟΣ ΔΙΕΞΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ DOPING [1,2,8,10,12,13]

Ο έλεγχος doping μπορεί να γίνει μετά από τυχαία ή σκόπιμη επιλογή του αθλητή, κατά την περίοδο της προετοιμασίας του (out of competition) ή και κατά τη διάρκεια των αγώνων (in competition). Ο αθλητής κάποιες φορές μπορεί να ενημερώνεται για τον έλεγχο, αλλά η WADA έχει το δικαίωμα να διεξάγει και αιφνίδιους ελέγχους.

Από τη στιγμή που επιλέγεται ο αθλητής, δίνει δείγμα ούρων που μοιράζεται εκείνη τη στιγμή σε δύο μπουκάλια. (Α και Β δείγμα) Τα μπουκάλια σφραγίζονται μπροστά στον αθλητή και μεταφέρονται στο εργαστήριο. Εκεί, το Β δείγμα αποθηκεύεται και το Α δείγμα ανοίγεται και αναλύεται. Εάν βρεθεί θετικό σε κάποια ουσία τότε ακολουθείται διαδικασία επιβεβαίωσης (confirmation). Στην περίπτωση που ο αθλητής επιθυμεί να αμφισβητήσει το αποτέλεσμα, αναλύεται και

το Β δείγμα και αν το αποτέλεσμα του ελέγχου είναι ίδιο με του Α δείγματος επιβάλλονται κυρώσεις στον αθλητή.

Η συντριπτική πλειοψηφία των αναλύσεων στα εργαστήρια ελέγχου doping πραγματοποιείται σε δείγματα ούρων. Η ανάλυση είναι εφικτή και σε δείγμα αίματος, αλλά η ανάλυση ούρων παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα : η διαδικασία συλλογής δείγματος δεν καταπονεί τον αθλητή, ο όγκος που λαμβάνεται είναι πολύ μεγαλύτερος, και τέλος στα ούρα πολλές φορές τόσο οι εξωγενείς ουσίες όσο και οι μεταβολίτες τους βρίσκονται σε πολύ μεγαλύτερη συγκέντρωση από ότι στο αίμα, κάτι που δικαιολογεί την επιλογή του συγκεκριμένου βιολογικού υγρού.

1.4 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΑΠΑΓΟΡΕΥΜΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΩΝ [1,2,7-10]

1.4.1 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΑΠΑΓΟΡΕΥΜΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

- **ΔΙΕΓΕΡΤΙΚΑ**

Αμφεπραμόνη, αμφεταμίνη, εφεδρίνη, νικεθαμίδιο, σελεγγιλίνη, επταμινόλη, στρυχνίνη και άλλες ουσίες με παρόμοια φαρμακολογική δράση και παρόμοια χημική δομή

- **ΝΑΡΚΩΤΙΚΑ**

Μορφίνη, μεθαδόνη, διαμορφίνη (ηρωίνη), πεθιδίνη κ.α.

- **ΑΝΑΒΟΛΙΚΑ**

Οι αναβολικοί παράγοντες διακρίνονται σε εξωγενείς (δεν μπορούν να παραχθούν από τον ανθρώπινο οργανισμό) και ενδογενείς (παράγονται φυσιολογικά στον ανθρώπινο οργανισμό). Όπως γίνεται εύκολα αντιληπτό στην περίπτωση των ενδογενών αναβολικών δεν επαρκεί ο ποιοτικός έλεγχος αλλά είναι απαραίτητος και ο ποσοτικός προσδιορισμός της ουσίας, και κατόπιν εφαρμόζονται ορισμένα κριτήρια για να εξακριβωθεί εάν η συγκέντρωση του αναβολικού βρίσκεται μέσα σε φυσιολογικά για τον οργανισμό όρια ή εάν έχει χορηγηθεί εξωγενώς.

α) ΕΞΩΓΕΝΕΙΣ ΑΝΑΒΟΛΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

στανολόλη, ναδρολόνη, μεθενολόλη, τρεμπολόνη, οξανδρολόνη, κλοστεβόλη και άλλες ουσίες με παρόμοια φαρμακολογική δράση και παρόμοια χημική δομή

β) ΕΝΔΟΓΕΝΕΙΣ ΑΝΑΒΟΛΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

τεστοστερόνη, δευδροεπιανδροτεστοστερόνη κ.α.

- **B-2 ΑΓΩΝΙΣΤΕΣ**

Κλενβουτερόλη, τερβουταλίνη, φαινοτερόλη κ.α.

- **ΔΙΟΥΡΗΤΙΚΑ**

Ακεταζολαμίδιο, φουροσεμίδιο, υδροχλωροθειαζίδιο και άλλες ουσίες με παρόμοια φαρμακολογική δράση και παρόμοια χημική δομή

- **ΠΕΠΤΙΔΙΚΕΣ ΚΑΙ ΓΛΥΚΟΠΡΩΤΕΙΝΙΚΕΣ ΟΡΜΟΝΕΣ**

Χοριακή γοναδοτροπίνη (hCG), ερυθροποιητίνη (EPO), αυξητική ορμόνη (hGH)κ.α.

- **ΚΑΛΥΠΤΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ (MASKING AGENTS)**

Διογκωτικές ουσίες πλάσματος (υδροξυ-αιθυλο-άμυλο, δεξτράνη), διουρητικά, επιτεστοστερόνη κ.α.

Τύπος ουσιών	Επιθυμητές ενέργειες	Παρενέργειες
Διεγερτικά Ψυχοκινητικά διεγερτικά (π.χ. αμφεταμίνες)	αναστολή εμφάνισης κοπώ-σεως ³	ταχυκαρδία, αρρυθμίες, αύξηση αρτηριακής πίεσεως, διαταραχές πεπτικού, ανορεξία, απώλεια βάρους, αϋπνία, κεφαλαλγία, ψυχική και σωματική εξάρτηση, ανοχή, απώλεια γενετήσιας επιθυμίας, απότομη εμφάνιση καμάτου, θάνατος
Συμπαθητικομιμητικές αμίνες (π.χ. εφεδρίνες) Καφεΐνη	αύξηση ροής αίματος στους μύς, αύξηση επιπέδων γλυκόζης στο αίμα, βρογχοδιαστολή διέγερση αναπνευστικού, προαγωγή λιπολύσεως	εμφάνιση καμάτου, θάνατος υπέρταση νευρικότητα, αϋπνία, υπέρταση, γαστρικές διαταραχές
Ναρκωτικά αναλγητικά	κάλυψη σωματικού άλγους	σωματική και ψυχική εξάρτηση, ανοχή
Αναβολικά Στεροειδή	αύξηση μυϊκής μάζας, δυνάμεως, επιθετικότητας	άνδρες: ατροφία όρχεων, αζωοσπερμία, στέρωση γυναίκες: δασυτριχισμός,

		αλλαγή χροιάς φωνής, μεγέθυνση κλειτορίδας, στείρωση γενικά: αλωπεκία, ακμή, απώλεια γενετήσιας επιθυμίας, μείωση HDL, αύξηση LDL, βλάβη τοιχωμάτων αγγείων, αύξηση αρτηριακής πίεσεως, ηπατική δυσλειτουργία, χολοστατικός ίκτερος, καρκίνος
β-blockers	ελάττωση stress, προ - αγωνιστικής εντάσεως, αποτέλεσμα κατά τρόμου	βρογχοσπασμός, σεξουαλικές δυσλειτουργίες σε άνδρες
Διουρητικά	Μη βελτίωση αποδόσεως, ελάττωση σωματικού βάρους, ελάττωση συγκεντρώσεως φαρμάκων στα ούρα	αφυδάτωση, διαταραχές ηλεκτρολυτών
HCG	διέγερση παραγωγής ενδογενούς τεστοστερόνης	κεφαλαγία, μεταβολές διαθέσεως, κατάθλιψη, οίδημα
HGH	αύξηση σωματικού μεγέθους και δυνάμεως	ακρομεγαλία, μυοπάθεια, περιφερειακή νευροπάθεια, παθήσεις στεφανιαίων, καρδιομυοπάθεια
EPO	αύξηση αριθμού ερυθροκυττάρων	υπέρταση, καρδιακή ανεπάρκεια, εγκεφαλικά επεισόδια

ΠΙΝΑΚΑΣ 1.1 ΕΠΙΘΥΜΗΤΕΣ ΕΝΕΡΓΕΙΕΣ ΚΑΙ ΠΑΡΕΝΕΡΓΕΙΕΣ ΑΠΑΓΟΡΕΥΜΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

1.4.2 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΑΠΑΓΟΡΕΥΜΕΝΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

- ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ Ή ΔΙΟΓΚΩΣΗ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ
- DOPING ΑΙΜΑΤΟΣ (BLOOD DOPING)
- ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΟΣ, ΧΗΜΙΚΟΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΟΣ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ
- DOPING ΓΟΝΙΔΙΩΝ

1.4.3 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΑΠΑΓΟΡΕΥΜΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΕ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΑ ΑΘΛΗΜΑΤΑ

- Οινόπνευμα
- Μαριχουάνα
- Τοπικά αναισθητικά π.χ. λιδοκαΐνη

- Κορτικοστεροειδή
- Β-αποκλειστές, π.χ. ατενολόλη, μετοπρολόλη, ναδολόλη

1.5 ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΙΣ ΔΙΕΓΕΡΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ [10,67]

Οι διεγερτικές ουσίες ήταν οι πρώτες που συμπεριλήφθηκαν στον κατάλογο απαγορευμένων ουσιών της WADA το 1967. Οι ουσίες αυτές δρουν απευθείας στο κεντρικό νευρικό σύστημα και επηρεάζουν τα ανθρώπινα συναισθήματα και την ανθρώπινη συμπεριφορά. Λόγω της πρόκλησης αισθήματος ευεξίας στον αθλητή, ο τελευταίος αισθάνεται μειωμένη κούραση, κάτι που τον βοηθά να κάνει πιο συστηματικές και επίπονες προπονήσεις μέχρι να εξαντληθεί ο οργανισμός του, κάτι που ενδεχομένως θα μπορούσε να αποβεί μοιραίο για την υγεία του. Είναι πάντως γεγονός ότι το παραπάνω πλεονέκτημα της χρήσης διεγερτικών κάνει ελκυστική τη χρήση τους στις περιόδους προετοιμασίας των αθλητών.

Επειδή οι διεγερτικές ουσίες έχουν μικρό χρόνο ημιζωής στον οργανισμό, η λήψη τους πρέπει να γίνεται σε μικρό χρονικό διάστημα πριν από τους αγώνες ώστε να βελτιωθεί η απόδοση κατά τη διάρκεια του αγώνα. Η σημαντική εξέλιξη όμως των μεθόδων αντι – doping κάνει εύκολη την ανίχνευση των διεγερτικών, οπότε οι αθλητές αποφεύγουν το ρίσκο και περιορίζονται στη χρήση τους μόνο κατά την προετοιμασία, όπου η πιθανότητα διεξαγωγής αιφνίδιου ελέγχου είναι μειωμένη. Ο μηχανισμός με τον οποίο τα διεγερτικά ανυψώνουν την απόδοση μέσα στον αγώνα εστιάζει σε γενικές γραμμές στην υπερδιέγερση του συμπαθητικού νευρικού συστήματος με αποτέλεσμα την όξυνση των αντανακλαστικών. Έτσι, σε ένα αγώνισμα μικρής διάρκειας, όπως π.χ. ο δρόμος των 100 μέτρων, μπορεί η επίδραση των διεγερτικών να είναι καθοριστική, π.χ. ο αθλητής ακούει και αντιδρά ταχύτερα στο σήμα εκκίνησης. Ένα άλλο αγώνισμα στο οποίο η χρήση διεγερτικών μπορεί να κάνει τη διαφορά είναι η πυγμαχία, καθώς είναι προφανές πόσο καταλυτικός είναι ο ρόλος των αυξημένων αντανακλαστικών για την αποφυγή και επίτευξη χτυπημάτων.

Η διαδικασία ταυτοποίησης των διεγερτικών ουσιών συνίσταται στην εύρεση της μητρικής ουσίας όσο και των μεταβολιτών της. Παρόλα ταύτα σε κάποιες περιπτώσεις η μητρική ουσία μεταβολίζεται σχεδόν σε ποσοστό 100% στο ήπαρ και η ανίχνευσή της στα ούρα είναι αδύνατη, οπότε η απόδειξη της λήψης της από τον αθλητή στηρίζεται αποκλειστικά στην ταυτοποίηση των μεταβολιτών της.

Οι διεγερτικές ουσίες εμφανίζουν αρκετές ομοιότητες στον τρόπο μεταβολισμού τους με τις ναρκωτικές ουσίες, γι' αυτό και η διαδικασία ανίχνευσής τους είναι κοινή. Τα κοινά χαρακτηριστικά τους είναι τα εξής :

- Εκκρίνονται στα ούρα ελεύθερες ή με τη μορφή γλυκουρονιδίων ή ως θειϊκοί εστέρες
- Είναι βασικές (pKa 7-10), κυρίως διότι περιέχουν αζωτούχες ομάδες.
- Είναι πτητικές εξαιτίας της μικρής σχετικά μοριακής τους μάζας.
- Διαθέτουν δραστικές ομάδες, γεγονός που καθιστά εύκολη την παραγωγοποίησή τους και συντελεί στη βελτίωση των χρωματογραφικών τους ιδιοτήτων.

Μακροχρόνια χρήση των διεγερτικών μπορεί να επιφέρει σοβαρές ψυχολογικές επιπτώσεις όπως κατάθλιψη, δημιουργούνται όμως και άλλες παρενέργειες όπως παθήσεις του αναπνευστικού, του μυοσκελετικού και του καρδιαγγειακού συστήματος και γενικευμένες δερματικές και γαστρεντερικές παθήσεις αναλόγως του είδους του χρησιμοποιούμενου διεγερτικού, της δοσολογίας και του ακριβούς διαστήματος χορήγησης της ουσίας.

1.6 ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΞΕΝΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΤΟ ΗΠΑΡ [1,2,11]

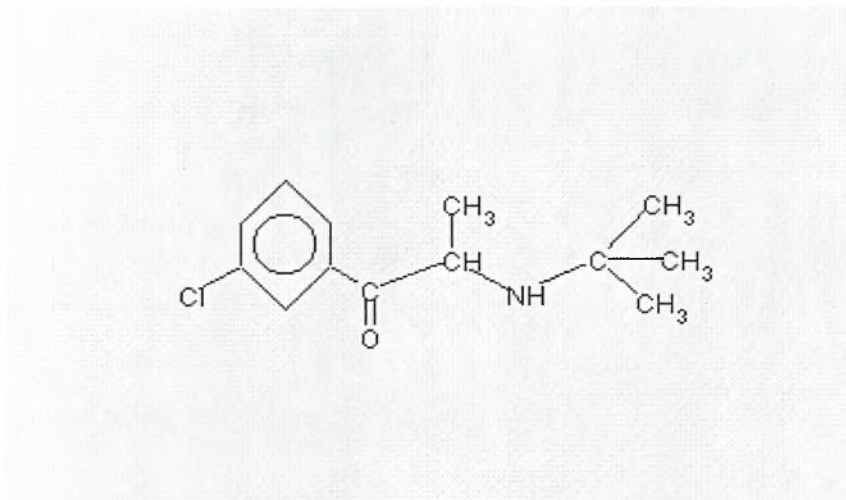
Όπως είναι γνωστό, στο ήπαρ συμβαίνουν δύο είδη αντιδράσεων που τροποποιούν τη χημική δομή των ξενοβιοτικών ουσιών με αποτέλεσμα την αδρανοποίησή τους και την αύξηση της πολικότητάς τους ώστε να μπορούν να απεκκριθούν εύκολα στα ούρα.

Οι αντιδράσεις της φάσης 1 περιλαμβάνουν κυρίως αντιδράσεις οξείδωσης, υδροξυλίωσης, υδρόλυσης, διάσπασης και ισομερίωσης. Στις περισσότερες περιπτώσεις το παραγόμενο προϊόν περιέχει μια από τις ομάδες $-OH$, $-NH_2$, $-SH$, $-COOH$. Σε ορισμένες περιπτώσεις το αποτέλεσμα των αντιδράσεων της φάσης 1 είναι ο μετασχηματισμός της προς μεταβολισμό ουσίας σε κατάλληλο υπόστρωμα για τα ένζυμα της φάσης 2.

Οι αντιδράσεις της φάσης 2 είναι αντιδράσεις σύζευξης κυρίως με γλυκουρονικό οξύ προς σχηματισμό γλυκουρονιδίων. Οι αντιδράσεις αυτές όμως περιλαμβάνουν και ακετυλίωση, μεθυλίωση κλπ. Σε ορισμένες περιπτώσεις οι αντιδράσεις σύζευξης δε λαμβάνουν χώρα και έτσι οι μεταβολιζόμενες ουσίες απεκκρίνονται στα ούρα ελεύθερες και όχι συζευγμένες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ : BUPROPION

2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ [14-22,42]



ΕΙΚΟΝΑ 2.1 ΔΟΜΗ ΤΟΥ BUPROPION

Το διεγερτικό bupropion κυκλοφορεί στην αγορά με τις εμπορικές ονομασίες Zyban και Wellbutrin από τη φαρμακευτική εταιρία GlaxoWellcome και χρησιμοποιείται κυρίως ως αντικαταθλιπτικό. Μια δευτερεύουσα φαρμακευτική χρήση του είναι η βοήθεια που προσφέρει στους καπνιστές για να διακόψουν το κάπνισμα.

Το bupropion ανήκει στην τάξη των αμινοκετονών και έχει δομή παρόμοια με της φαινυλαιθυλαμίνης. Ο χημικός τύπος της ουσίας φαίνεται στην εικόνα 1.1. Το bupropion έχει ΜΒ 276,2. Τα χάπια του bupropion αποτελούνται από λευκή κρυσταλλική σκόνη και έχουν υψηλή διαλυτότητα στο νερό καθώς περιέχουν και άλλα συστατικά εκτός της δραστικής ουσίας όπως κυστεΐνη, υδροχλωρικό οξύ, υδροξυ-προπυλ-μυθυλ-σελουλόζη, διοξείδιο του τιτανίου κλπ.

2.2 ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ [22,42]

Το ποσοστό του bupropion που εκκρίνεται αναλλοίωτο στα ούρα είναι μόλις 0,5%, κάτι που δείχνει ότι η ουσία αυτή μεταβολίζεται σε σχεδόν απόλυτο βαθμό στο ήπαρ. Οι μεταβολίτες της ουσίας είναι κυρίως τρεις : το υδροξυ- bupropion, που σχηματίζεται από υδροξυλίωση του αρχικού μορίου και τα αμινο-αλκοολοισομερή ερυθρο-υδροbupropion και θρεο-υδροbupropion, που σχηματίζονται από αναγωγή της καρβονυλομάδας του αρχικού μορίου. Και οι τρεις αυτές ουσίες προκύπτουν από τα μεταβολικά ηπατικά ένζυμα της φάσης 1. Τα ένζυμα της φάσης 2 δεν

εμπλέκονται καθόλου και δεν επηρεάζουν τα προϊόντα της φάσης 1. Πειράματα *in vitro* έδειξαν ότι το κύριο ένζυμο που είναι υπεύθυνο για το σχηματισμό του υδροξυ-bupropion είναι το κυτόχρωμα P450II_{B6}.

2.3 ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ [22,42]

Για την ανίχνευση ασθενών κορυφών των μεταβολιτών του φαρμάκου με χρήση της τεχνικής GC-MS (θα περιγραφεί παρακάτω) απαιτείται να συλλεχθεί το δείγμα του αθλητή τουλάχιστον τρεις ώρες μετά τη λήψη της ουσίας, αλλιώς η συγκέντρωσή της στα ούρα δεν προλαβαίνει να φτάσει σε ανιχνεύσιμα επίπεδα. Αντίστοιχα, για να φτάσει η συγκέντρωση των μεταβολιτών της ουσίας σε ανιχνεύσιμα επίπεδα στο πλάσμα απαιτείται η πάροδος έξι ωρών από τη λήψη. Ο χρόνος ημιζωής του bupropion είναι 21 ± 9 ώρες, του υδροξυ-bupropion 20 ± 5 ώρες, του ερυθρο-υδροbupropion 33 ± 10 ώρες και του θρεο-υδροbupropion 37 ± 13 ώρες.

2.4 ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ – ΚΑΤΑΝΟΜΗ [22,42]

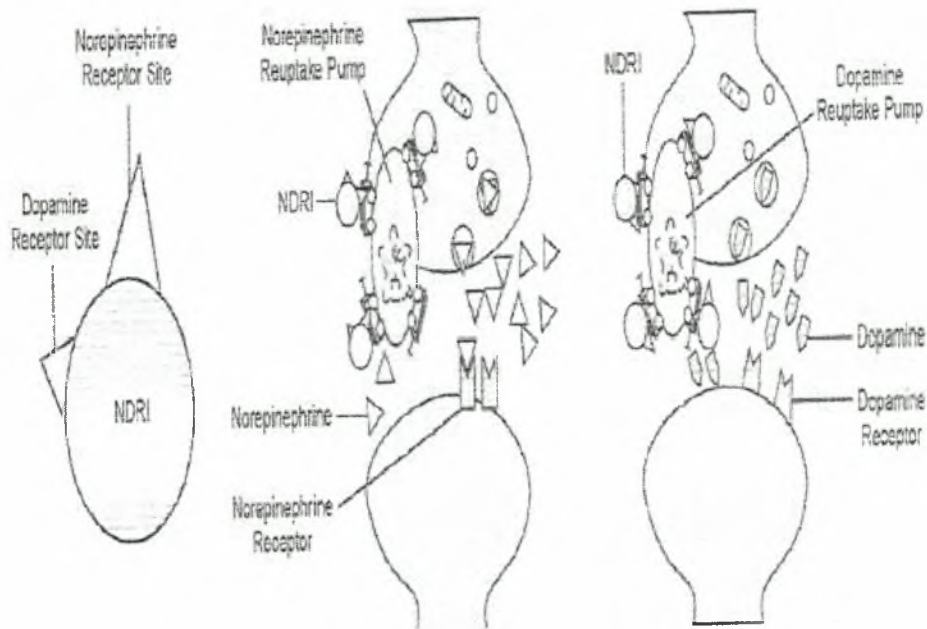
Η ανίχνευση του bupropion γίνεται σε δείγμα ούρων, στα οποία απεκκρίνεται το φάρμακο σε ποσοστό 87% περίπου έναντι του 10% που απεκκρίνεται στα κόπρανα σύμφωνα με τα αποτελέσματα πειράματος χορήγησης ραδιενεργούς δόσης σε εθελοντές. Η βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου στον ανθρώπινο οργανισμό δεν έχει προσδιορισθεί με ακρίβεια : σε πειράματα σε σκύλους και αρουραίους ποικίλλει από 5-20%. Τέλος, περίπου το 84% της ουσίας είναι δεσμευμένο σε πρωτεΐνες του πλάσματος.

2.5 ΤΟ BUPROPION ΩΣ ΑΝΤΙΚΑΤΑΘΛΙΠΤΙΚΟ [23-26,41]

Η θεωρία περί κατάθλιψης σήμερα είναι η εξής : η κατάθλιψη είναι μια διαταραχή στη λειτουργία του νευρικού συστήματος που προκύπτει από την υπολειτουργία του συστήματος των μονοαμινών, που περιλαμβάνει τα σεροτονινεργικά, νοραδρενεργικά και ντοπαμινεργικά μονοπάτια. Όπως έχει αποδειχτεί από πειράματα σε ζώα και κλινικές δοκιμές, μειωμένη δράση των νευροδιαβιβαστών σεροτονίνης, νορεπινεφρίνης και ντοπαμίνης προκαλεί κατάθλιψη, ενώ τα αντικαταθλιπτικά έχουν ως στόχο την ενίσχυση του σήματος των παραπάνω νευροδιαβιβαστών, α) είτε με αναστολείς των μονοαμινοοξειδασών (MAOIs), που αναστέλλουν τη δράση των υπεύθυνων ενζύμων για την αποικοδόμηση των μονοαμινών β) είτε με αναστολή της επαναπρόσληψης των νευροδιαβιβαστών στον προσυναπτικό νευρώνα, κάτι που οδηγεί σε αύξηση της συγκέντρωσής τους στην συναπτική σχισμή. (τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά TCAs, αναστολείς πρόσληψης σεροτονίνης SSRIs, bupropion)

Σε έρευνες σε ποντίκια έχει βρεθεί ότι η παράλληλη χρήση bupropion με αναστολείς της δράσης της ντοπαμίνης και της νορεπινεφρίνης μειώνει τα αντικαταθλιπτικά αποτελέσματα του φαρμάκου. Πιο σημαντικές έρευνες σε εθελοντές με κατάθλιψη έδειξαν ότι το bupropion συνδέεται με μεταφορείς ντοπαμίνης που επαναφέρουν την ουσία-νευροδιαβιβαστή στο προσυναπτικό νευρικό κύτταρο. Για την έρευνα αυτή χρησιμοποιήθηκε εγκεφαλική τομογραφία με φωτόνια ή ποζιτρόνια. Τέλος, in vitro πειράματα σε κυτταρικές σειρές έδειξαν ότι το bupropion συνδέεται και αναστέλλει τη δράση και των κυτταρικών μεταφορέων επαναπόσληψης νορεπινεφρίνης, ενώ η αντίστοιχη δράση του στο μεταφορέα της σεροτονίνης είναι μηδαμινή ακόμα και σε εξαιρετικά υψηλές συγκεντρώσεις της χορηγούμενης ουσίας. Από τα παραπάνω πειράματα εξάγεται το συμπέρασμα ότι το bupropion είναι ένας Norepinephrine Dopamine Reuptake Inhibitor (NDRI), δηλαδή αναστολέας επαναπόσληψης της νορεπινεφρίνης και της ντοπαμίνης, όχι όμως και της σεροτονίνης, σε αντίθεση με τα TCAs και τα SSRIs. Η τελευταία ιδιότητα του bupropion είναι υπεύθυνη για τις μειωμένες παρενέργειες του φαρμάκου σε σχέση με τα TCAs και τα SSRIs, κάτι που καθιστά το bupropion αντικαταθλιπτικό πρώτης γραμμής.

Figure 1. Norepinephrine-Dopamine Reuptake Inhibitor (NDRI) Molecule Blocking Both Norepinephrine and Dopamine Reuptake Pumps⁴



ΕΙΚΟΝΑ 2.2 ΟΙ NDRIs ΕΜΠΟΔΙΖΟΥΝ ΤΗΝ ΕΠΑΝΑΠΡΟΣΛΗΨΗ ΕΠΙΝΕΦΡΙΝΗΣ ΚΑΙ ΝΤΟΠΑΜΙΝΗΣ

ΕΙΔΟΣ ΑΝΤΙΚΑΤΑΘΛΙΠΤΙΚΟΥ	ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ	ΤΡΟΠΟΣ ΔΡΑΣΗΣ
ΜΑΟΙs	phenelzine	ΑΝΑΣΤΕΛΛΟΥΝ ΤΙΣ ΜΟΝΟΑΜΙΝΟΟΞΙΔΑΣΕΣ
TCAs	amitriptyline	ΑΝΑΣΤΕΛΛΟΥΝ ΤΗΝ ΕΠΑΝΑΠΡΟΣΛΗΨΗ ΣΕΡΟΤΟΝΙΝΗΣ ΚΑΙ/Η ΝΟΡΕΠΙΝΕΦΡΙΝΗΣ ΑΠΟ ΤΟ ΠΡΟΣΥΝΑΠΤΙΚΟ ΚΥΤΤΑΡΟ
SSRIs	sertraline	ΑΝΑΣΤΕΛΛΟΥΝ ΤΗΝ ΕΠΑΝΑΠΡΟΣΛΗΨΗ ΣΕΡΟΤΟΝΙΝΗΣ ΑΠΟ ΤΟ ΠΡΟΣΥΝΑΠΤΙΚΟ ΚΥΤΤΑΡΟ
ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΕΠΑΝΑΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΝΟΡΕΠΙΝΕΦΡΙΝΗΣ - ΣΕΡΟΤΟΝΙΝΗΣ	venlafaxine	ΑΝΑΣΤΕΛΛΟΥΝ ΤΗΝ ΕΠΑΝΑΠΡΟΣΛΗΨΗ ΣΕΡΟΤΟΝΙΝΗΣ ΚΑΙ ΝΟΡΕΠΙΝΕΦΡΙΝΗΣ ΑΠΟ ΤΟ ΠΡΟΣΥΝΑΠΤΙΚΟ ΚΥΤΤΑΡΟ
ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΕΠΑΝΑΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΝΟΡΕΠΙΝΕΦΡΙΝΗΣ - ΝΤΟΠΑΜΙΝΗΣ	bupropion	ΑΝΑΣΤΕΛΛΟΥΝ ΤΗΝ ΕΠΑΝΑΠΡΟΣΛΗΨΗ ΣΕΡΟΤΟΝΙΝΗΣ ΚΑΙ ΝΟΡΕΠΙΝΕΦΡΙΝΗΣ ΑΠΟ ΤΟ ΠΡΟΣΥΝΑΠΤΙΚΟ ΚΥΤΤΑΡΟ
$\alpha 2$ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΕΣ	mirtazapine	ΜΠΛΟΚΑΡΟΥΝ ΤΟΥΣ ΠΡΟΣΥΝΑΠΤΙΚΟΥΣ $\alpha 2$ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ, ΕΜΠΟΔΙΖΟΝΤΑΣ ΤΗΝ ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗΣ ΣΕΡΟΤΟΝΙΝΗΣ ΚΑΙ ΝΟΡΕΠΙΝΕΦΡΙΝΗΣ ΑΠΟ ΤΟ ΠΡΟΣΥΝΑΠΤΙΚΟ ΚΥΤΤΑΡΟ

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.1 ΤΡΟΠΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΚΑΤΑΘΛΙΠΤΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

2.6 ΤΟ ΒΥΡΟΡΙΟΝ ΚΑΤΑ ΤΟΥ ΚΑΠΝΙΣΜΑΤΟΣ [27-40]

Όπως προαναφέρθηκε, η χορήγηση του bupropion βοηθά τους καπνιστές να διακόψουν την επιβλαβή αυτή συνήθεια για την υγεία τους. Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο επιτυγχάνεται αυτό δεν είναι γνωστός. Η ιδιότητα αυτή του bupropion έχει εξακριβωθεί μετά από μια σειρά κλινικών δοκιμών.

ΠΕΙΡΑΜΑ 1 : Στο πρώτο πείραμα έλαβαν μέρος 1940 άτομα που κάπνιζαν κατά μέσο όρο 15 ή και περισσότερα τσιγάρα ανά ημέρα. Αυτά τα άτομα χωρίστηκαν σε ομάδες, εκ των οποίων η μία λάμβανε placebo ενώ οι άλλες λάμβαναν το bupropion σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν μετά από παρατήρηση 26 εβδομάδων έδειξαν σημαντική στατιστική διαφορά ανάμεσα στο ποσοστό των ασθενών που σταμάτησαν το κάπνισμα χάρη στο bupropion και στο αντίστοιχο ποσοστό των ασθενών που δε λάμβαναν το φάρμακο. Μάλιστα, το ποσοστό αυξανόταν ανάλογα με τη συγκέντρωση της χορηγούμενης ουσίας ανά ημέρα και τα πρώτα επιτυχή αποτελέσματα έγιναν εμφανή μετά τις πρώτες επτά εβδομάδες.

	Treatment groups			
Abstinence	Placebo	Zyban	Zyban	Zyban

from week 4 through specified week	(n=151) % (95% CI)	100mg/day (n=153) % (95% CI)	150mg/day (n=153) % (95% CI)	300mg/day (n=156) % (95% CI)
Week 7 (4-week quit)	17% (11-23)	22% (15-28)	27% * (20-35)	36% * (28-43)
Week 12	14% (8-19)	20% (15-26)	20% (14-27)	25% * (18-32)
Week 26	11% (6-16)	16% (11-22)	18% (12-24)	19% * (13-25)

* significantly different from placebo ($P \leq 0,05$)

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ 1 (ΠΟΣΟΣΤΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΠΟΥ ΔΙΕΚΟΨΑΝ ΤΟ ΚΑΠΝΙΣΜΑ ΧΑΡΗ ΣΤΟ ΒΥΡΟΡΙΟΝ ΣΕ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΑ ΠΟΣΟΣΤΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΠΟΥ ΛΑΜΒΑΝΑΝ PLACEBO)

ΠΕΙΡΑΜΑ 2 : Στο δεύτερο πείραμα που διήρκεσε 10 εβδομάδες, έγινε σύγκριση της αποτελεσματικότητας του bupropion με αυτή νικοτινικού σκευάσματος. Δοκιμάστηκε επίσης η αποτελεσματικότητα της χορήγησης ενός συνδυασμού των δύο παραπάνω σκευασμάτων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η δράση του bupropion έχει καλύτερα αποτελέσματα από τη δράση του νικοτινικού σκευάσματος, όμως η ιδανική θεραπεία που οδηγεί σε μεγαλύτερα ποσοστά διακοπής του καπνίσματος είναι η χορήγηση συνδυασμού νικοτίνης – bupropion.

Abstinence from week 4 through specified week	Treatment groups			
	Placebo (n=160) % (95% CI)	Nicotine Transdermal System (NTS) 21 mg/day (n=244) % (95% CI)	Zyban 300mg/day (n=244) % (95% CI)	Zyban 300mg/day and NTS 21mg/day (n=245) % (95% CI)
Week 7 (4-week quit)	23% (17-30)	36% (30-42)	49% (43-56)	58% (51-64)
Week 10	20% (14-36)	32% (26-37)	46% (39-52)	51% (45-58)

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ 2 (ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΗΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΒΥΡΟΡΙΟΝ ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΑΥΤΗ ΝΙΚΟΤΙΝΙΚΟΥ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΟΣ)

ΠΕΙΡΑΜΑ 3 : Το τρίτο πείραμα έδειξε ότι τα ποσοστά διακοπής του καπνίσματος από τη χορήγηση του bupropion ήταν ανεξάρτητα από από πιθανές προηγούμενες αποτυχημένες προσπάθειες των ασθενών να κόψουν το κάπνισμα μέσω χορήγησης νικοτινικού σκευάσματος.

2.7 ΠΑΡΕΝΕΡΓΕΙΕΣ ΤΟΥ BUPROPION [22,42]

Το bupropion, επειδή δεν επηρεάζει την επαναπρόσληψη της σεροτονίνης έχει πιο ήπιες παρενέργειες από άλλα αντικαταθλιπτικά (TCAs και SSRIs). Οι πιο συχνές παρενέργειες του bupropion είναι : ξηροστομία, αϋπνία, και ναυτία. Σε αντίθεση όμως με τα άλλα αντικαταθλιπτικά, το bupropion δεν προκαλεί προβλήματα σεξουαλικής δυσλειτουργίας, αύξησης βάρους και αταραξίας.

Ιδιαίτερα στην περίπτωση της αϋπνίας, το 29% περίπου των ασθενών που λαμβάνουν ποσότητα 150 mg/ημέρα και το 35% που λαμβάνουν την ίδια ουσία σε ποσότητα 300 mg/ημέρα υποφέρουν από έλλειψη ύπνου. Παρόλα ταύτα μόνο ένα ποσοστό της τάξης του 0,6% υποφέρει σε βαθμό τέτοιο που να αναγκάζεται να διακόψει τη θεραπεία.

Έχει επίσης παρατηρηθεί σε ψυχολογικά πιεσμένους καπνιστές η δημιουργία συμπτωμάτων από τη λήψη του φαρμάκου όπως ψύχωση, σύγχυση, απώλεια συγκέντρωσης και νευροψυχιατρικές διαταραχές, με σπάνια την ανάγκη διακοπής της θεραπείας. Τέτοια φαινόμενα όμως δεν έχουν παρατηρηθεί σε μη καταπιεσμένους ψυχολογικά ασθενείς. Σε αυτή την περίπτωση η συχνότητα των φαινομένων αυτών είναι ίδια με των ασθενών που λαμβάνουν placebo.

Όσον αφορά επιπτώσεις στο καρδιαγγειακό σύστημα έχει αποδειχτεί ότι η παράλληλη χρήση bupropion και νικοτίνης προκαλεί υπέρταση στο 6,1% των ασθενών με αναγκαία τη διακοπή της θεραπείας, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό για τους ασθενείς που λαμβάνουν placebo είναι 3,1%. Η πλειοψηφία πάντως των ασθενών που αντιμετωπίζουν το πρόβλημα έχει βεβαρημένο ιατρικό ιστορικό με αναφορές σε παρόμοια περιστατικά. Γενικά, ασθενείς με προβλήματα του καρδιαγγειακού πρέπει να λαμβάνουν το φάρμακο με πολλή προσοχή και υπό συνεχή ιατρική παρακολούθηση.

Η αντιμετώπιση ασθενών με ηπατική ή νεφρική ανεπάρκεια πρέπει να εστιάζει στη χορήγηση μειωμένης δόσης φαρμάκου καθώς υπάρχει ο κίνδυνος συσσώρευσης της ουσίας και των μεταβολιτών της στο αίμα και τους ιστούς (λόγω της μειωμένης ικανότητας μεταβολισμού και απέκκρισης της ουσίας) με επακόλουθα τοξικά αποτελέσματα.

Πιθανές επιπλοκές από ταυτόχρονη χορήγηση του bupropion με άλλα φάρμακα μπορεί να υπάρχουν καθώς το bupropion και το υδροξυ-bupropion αναστέλλουν τη λειτουργία του ηπατικού μεταβολικού ενζύμου CYP2D6, κάτι που μπορεί να εμποδίσει το μεταβολισμό άλλων φαρμάκων και να προκαλέσει ανεπιθύμητη συσσώρευση αυτών και των ενδιάμεσων (πιθανώς τοξικών) μεταβολιτών τους. Σε αυτή την κατηγορία των φαρμάκων που μεταβολίζονται από το ένζυμο CYP2D6 ανήκουν και τα SSRIs και πολλά TCAs, οπότε η ταυτόχρονη χορήγησή τους με το bupropion για τη θεραπεία της κατάθλιψης αποφεύγεται.

Επίσης, επιπλοκές μπορεί να προκαλέσει η ταυτόχρονη χορήγηση του bupropion με φάρμακα αναστολείς του ενζύμου P450IIIB6 (CYPB6) που είναι υπεύθυνο για το μεταβολισμό του bupropion σε υδροξυ-bupropion. Τέτοια φάρμακα είναι η οφεναδρίνη και η κυκλοφωσφαμίδη. Τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για τη δημιουργία των ερυθρο-υδροbupropion και θρεο-υδροbupropion δεν είναι γνωστά.

Τέλος, πειράματα με χορήγηση υψηλών δόσεων του bupropion σε αρουραίους (150-300 mg/kg ανά ημέρα) έδειξαν σχηματισμό νεοπλασιών, δεν εξετάστηκε όμως αν υπάρχει ίδιο ποσοστό μεταλλαξιγένεσης μετά από χορήγηση χαμηλότερων συγκεντρώσεων του φαρμάκου. Γενικά, τα πειράματα για το βαθμό κινδύνου πρόκλησης καρκινογένεσης από το bupropion είναι πολύ λίγα και τα δεδομένα είναι ανεπαρκή για να κριθεί αν μπορεί να υπάρξει πρόβλημα από τη χορήγηση του φαρμάκου σε ανθρώπους. Προληπτικά όμως δεν συνιστάται η χρήση του φαρμάκου από εγκύους παρά μόνο εάν είναι απόλυτα αναγκαίο.

Body system/ adverse experience	Zyban 100 to 300 mg/day (n=461) %	Placebo (n=150) %
Body (general)		
Neck pain	2	<1
Allergic reaction	1	0
Cardiovascular		
Hot flashes	1	0
Hypertension	1	<1
Digestive		
Dry mouth	11	5
Increased appetite	2	<1
Anorexia	1	<1
Musculoskeletal		
Arthalgia	4	3
Myalgia	2	1
Nervous system		
Insomnia	31	21
Dizziness	8	7
Tremor	2	1
Somnolence	2	1
Thinking	1	0
abnormality		
Respiratory		
Bronchitis	2	0
Skin		
Pruritis	3	<1
Rash	3	<1
Dry skin	2	0
Urticaria	1	0
Special senses		
Taste perversion	2	<1

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.4 ΠΑΡΕΝΕΡΓΕΙΕΣ ΤΟΥ BUPROPION (ΣΕ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕ PLACEBO)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ : ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΛΕΓΧΟΥ DOPING

3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Για την ανίχνευση των απαγορευμένων ουσιών από το εργαστήριο doping χρησιμοποιούνται απαραίτητα χρωματογραφικές τεχνικές. Οι χρωματογραφικοί διαχωρισμοί λαμβάνουν χώρα με ποικίλους μηχανισμούς και ανάλογα ταξινομούνται σε χρωματογραφία προσρόφησης, ιονανταλλαγής, μοριακού αποκλεισμού και συγγενείας. Με βάση τη μορφή της στατικής φάσης διακρίνονται σε χρωματογραφία στήλης και επίπεδη χρωματογραφία, ενώ με βάση τον τρόπο εισαγωγής και κινήσεως του δείγματος χωρίζονται σε χρωματογραφία εκτοπίσεως, μετωπική χρωματογραφία και χρωματογραφία εκλούσεως.

Για την ανίχνευση των διεγερτικών ουσιών σε δείγμα ούρων, το εργαστήριο ελέγχου doping χρησιμοποιεί την τεχνική αέριας χρωματογραφίας – φασματομετρίας μαζών. (GC – MS)

3.2 ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ [42-48]

3.2.1 ΓΕΝΙΚΑ

Η αέρια χρωματογραφία βασίζεται σε διαχωρισμό αεριοποιημένων συστατικών από ένα συνδυασμό διαχωρισμού προσρόφησης, κατανομής και πτητικότητας των ενώσεων που βρίσκονται σε αέρια φάση. Η τεχνική αυτή προϋποθέτει την ύπαρξη δύο φάσεων, της σταθερής και της κινητής. Τα συστατικά του προς ανάλυση δείγματος θα αεριοποιηθούν ταχύτατα μετά από είσοδό τους σε κλίβανο υψηλής θερμοκρασίας και θα παρασυρθούν από την κινητή φάση προς μια σπειροειδή στήλη. Οι αεριοποιημένες ουσίες θα καθυστερήσουν μέσα στη στήλη αναλόγως της συγγενείας τους προς τη στατική φάση. Στην αέρια χρωματογραφία, η κινητή φάση είναι πάντα ένα αδρανές αέριο, ενώ η στατική φάση είναι είτε στερεή (αέρια – στερεή χρωματογραφία) είτε υγρή (αέρια – υγρή χρωματογραφία). Στη δεύτερη περίπτωση η στατική φάση είναι ένα μη πτητικό υγρό καθηλωμένο είτε σε στερεό αδρανές φορέα είτε στα τοιχώματα ανοικτών τριχοειδών στηλών.

3.2.2 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΑΕΡΙΟΥ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΟΥ

Τα κυριότερα τμήματα μιας αεριοχρωματογραφικής διάταξης είναι τα ακόλουθα :
Φέρον αέριο

Ρυθμιστής πίεσης – ροόμετρο

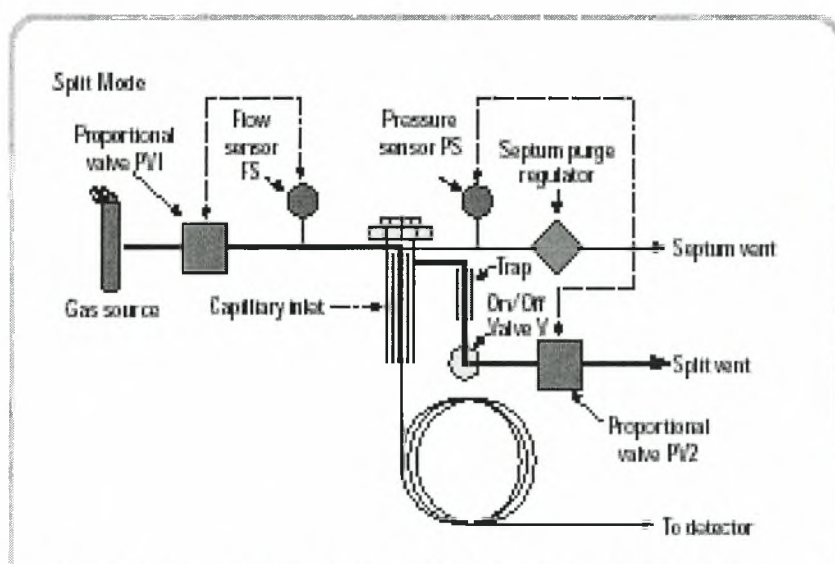
Σύστημα εισαγωγής του δείγματος

Θερμοστατούμενος κλίβανος

Στήλη

Ανιχνευτής

Σύστημα λήψεως και επεξεργασίας δεδομένων



ΕΙΚΟΝΑ 3.1 ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΑΕΡΙΟΥ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΟΥ

Φέρον αέριο

Το φέρον αέριο πρέπει να είναι χημικά αδρανές για να μην αντιδρά με τα συστατικά του δείγματος. Πρέπει επίσης να είναι ξηρό και απαλλαγμένο από οξυγόνο και οργανικές προσμίξεις. Τα συνήθη χρησιμοποιούμενα αέρια είναι τα He, N₂ και Ar με κυριότερο το He λόγω της μεγάλης ταχύτητας ροής του σε σχέση με τα υπόλοιπα. Ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο ανιχνευτή επιλέγεται και το κατάλληλο φέρον αέριο.

Ρυθμιστής πίεσης - ροόμετρο

Το φέρον αέριο βρίσκεται σε φιάλες από ανοξείδωτο υλικό σε υψηλή πίεση 100-200 Atm και διαβιβάζεται στο ρυθμιστή (μειωτήρα) πίεσεως ο οποίος, μέσω συστήματος βαλβίδων και ενδιάμεσων θαλάμων, μειώνει την πίεση σε ένα με δύο Atm πάνω από την

ατμοσφαιρική. Στη συνέχεια, διαβιβάζεται στο ροόμετρο, το οποίο μετράει με ακρίβεια την ταχύτητά του. Η ακριβής γνώση της τιμής της ταχύτητας ροής του φέροντος αερίου είναι αναγκαία καθώς από αυτήν εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό οι χρόνοι συγκρατήσεως των διαχωριζόμενων ουσιών.

Σύστημα εισαγωγής δείγματος

Η εισαγωγή του δείγματος γίνεται με μικροσύριγγα στην αρχή της στήλης μέσα από κατάλληλο στόμιο εισαγωγής, το οποίο φράσσεται με παχύ διάφραγμα από θερμοανθεκτικό ελαστικό υλικό. Το διάφραγμα αυτό δρα ως βαλβίδα επιτρέποντας την είσοδο του δείγματος στη στήλη αλλά όχι την έξοδό του ή την έξοδο του φέροντος αερίου από αυτή.

Η επίτευξη ικανοποιητικού βαθμού διαχωρισμού του δείγματος προϋποθέτει τα εξής :

- Το δείγμα πρέπει να εισάγεται ακαριαία προς αποφυγή της διασποράς της ζώνης του δείγματος
- Ο όγκος του δείγματος πρέπει να είναι μικρός (0,1-10 μL για υγρά, 1-10 mL για αέρια και 1-10 nL στην περίπτωση τριχοειδών στηλών με ειδικές διαιρετικές διατάξεις)
- Ο χώρος της εισαγωγής του δείγματος πρέπει να θερμαίνεται υψηλότερα από τη θερμοκρασία της στήλης προς επίτευξη άμεσης εξαέρωσης του δείγματος και παραλαβή των ατμών από το φέρον αέριο.

Θερμοστατούμενος κλίβανος

Ο χώρος εισαγωγής του δείγματος και η στήλη θερμοστατούνται συνήθως στην περιοχή των 50 – 300 $^{\circ}\text{C}$. Η εξαιρετικά υψηλή θερμοκρασία κατά την ανάλυση παρουσιάζει το πλεονέκτημα της μείωσης του χρόνου ανάλυσης αλλά ταυτόχρονα προκαλεί μείωση της διαχωριστικής ικανότητας.

Στο διαχωρισμό ενώσεων παρόμοιας χημικής δομής αλλά πολύ διαφορετικών σημείων ζέσεως ένα ισόθερμο πρόγραμμα δεν θα οδηγούσε σε ικανοποιητικό διαχωρισμό. Αφενός οι ουσίες με χαμηλό σημείο ζέσεως θα εμφανίζονταν πρώτες στο καταγράφημα με αρκετά αλληλεπικαλυπτόμενες περιοχές, αφετέρου οι λιγότερο πτητικές ουσίες θα εμφανίζονταν πολύ αργότερα με κορυφές ασαφείς, μικρού ύψους και μεγάλου πλάτους. Αυτό το πρόβλημα αίρεται με την εφαρμογή θερμοκρασιακού προγράμματος με βαθμιαία αύξηση της θερμοκρασίας. Έτσι όσο περισσότερο πτητικές είναι οι ενώσεις τόσο ταχύτερα θα εξέρχονται από τη στήλη, αφού οι ενώσεις χαμηλότερου σημείου ζέσεως δεν εξαερώνονται πλήρως όσο η θερμοκρασία είναι χαμηλή και δεν μπορούν να τρέξουν κανονικά στη στήλη. Έτσι, το σημείο ζέσεως αποτελεί (μαζί με το βαθμό συγγένειας προς τη στατική φάση) καθοριστικό παράγοντα που επηρεάζει το χρόνο ανασχέσεως της ουσίας. Η εφαρμογή προγράμματος μεταβαλλόμενης θερμοκρασίας έχει σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση ευδιάκριτων, οξείων και συμμετρικών κορυφών.

Στήλες

Ο διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος πραγματοποιείται στη στήλη του αερίου χρωματογράφου.

Στην αέρια – στερεή χρωματογραφία η στατική φάση αποτελείται από ένα κοκκώδες υλικό όπως διοξείδιο του πυριτίου (SiO_2), αλουμίνα (Al_2O_3) ή άνθρακας.

Στην αέρια – υγρή χρωματογραφία, το στερεό υλικό πάνω στο οποίο είναι προσδεδεμένη η υγρή στατική φάση είναι εντελώς αδρανές και δεν έχει καμιά επίδραση στο διαχωρισμό. Σε αυτή την κατηγορία χρωματογραφίας απαντώνται δύο είδη στηλών : οι τριχοειδείς στήλες (capillary columns) και οι στήλες πληρώσεως (packed columns).

Στις στήλες πληρώσεως το συνηθέστερο υλικό μηχανικής υποστήριξης της υγρής φάσης είναι η γη διατόμων, η οποία είναι μια μορφή εφυδατομένου SiO_2 με πολλές ελεύθερες υδροξυλομάδες στην επιφάνειά της (silica gel). Οι στήλες αυτές παρουσιάζουν πτωχές ιδιότητες μεταφοράς θερμότητας που έχει ως αποτέλεσμα αυξημένη τυπική απόκλιση των κορυφών και βραδεία εκρόφιση της ουσίας από την υγρή στοιβάδα στον αέριο φορέα.

Για να υπερνικηθούν οι παραπάνω δυσκολίες χρησιμοποιούνται οι τριχοειδείς στήλες οι οποίες αποτελούνται από μέταλλο, γυαλί ή οργανικό πολυμερές και συγκρατούν το διαλύτη λόγω αναπτυσσόμενων τριχοειδών φαινομένων με τα τοιχώματα της στήλης. Τα πλεονεκτήματα της χρήσης των τριχοειδών στηλών έναντι των στηλών πληρώσεως συνοψίζονται στα εξής :

- Μικρότεροι χρόνοι ανάσχεσης
- Μεγαλύτερη χημική αδράνεια
- Δυνατότητα χρήσεως για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, λόγω της αυξημένης σταθερότητάς τους
- Μεγαλύτερη αποδοτικότητα (μεγάλος αριθμός θεωρητικών πλακών)
- Καλύτερη επαναληπτικότητα
- Μεγαλύτερη ευαισθησία
- Δυνατότητα χρησιμοποίησης εξαιρετικά μικρής ποσότητας δείγματος
- Εξαιτίας της μικρής αντίστασης στη ροή του φέροντος αερίου και της μικρής πτώσης πίεσης κατά μήκος της στήλης μπορούν να χρησιμοποιηθούν στήλες μεγάλου μήκους (ως και 1000m) προς αύξηση της διαχωριστικότητας

Ανιχνευτής

Όταν η ουσία εξέρχεται της στήλης φτάνει στον ανιχνευτή. Με βάση την αρχή λειτουργίας τους, οι ανιχνευτές χωρίζονται σε δύο κατηγορίες :

- Σε ανιχνευτές που αποκρίνονται στη συγκέντρωση της ουσίας στον αέριο φορέα
- Σε ανιχνευτές που αποκρίνονται στην ταχύτητα ροής μάζας της ουσίας

Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν οι ανιχνευτές θερμικής αγωγιμότητας, ενώ στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν οι ανιχνευτές ηλεκτρικής αγωγιμότητας, ιονισμού με φλόγα, συλλήψεως

ηλεκτρονίων και ο φασματογράφος μαζών. Πλεονέκτημα των ανιχνευτών ταχύτητας ροής μαζών είναι η επίτευξη ακριβέστερου ποσοτικού προσδιορισμού των ουσιών.

Γενικά, τα χαρακτηριστικά που πρέπει να έχει ένας ποιοτικός ανιχνευτής είναι η υψηλή ευαισθησία, η καλή απόκριση για όλες τις ομάδες οργανικών ενώσεων, η καλή επαναληπτικότητα, το χαμηλό επίπεδο θορύβου, η γραμμική απόκριση για ευρεία δυναμική περιοχή, η απλότητα στη χρήση και η μη ύπαρξη ευαισθησίας σε μεταβολές ροής και θερμοκρασίας.

Σύστημα λήψης και επεξεργασίας δεδομένων

Κατά τη λήψη του σήματος πραγματοποιείται και ενίσχυσή του, σε τέτοιο βαθμό φυσικά που ο θόρυβος να μην υπερβαίνει το ελάχιστο όριο ανίχνευσης. Το χρωματογράφημα λαμβάνεται με τη βοήθεια ενός καταγραφέα ταχείας απόκρισης. Τα σύγχρονα μηχανήματα αέριου χρωματογράφου είναι συνδεδεμένα με ηλεκτρονικό υπολογιστή υψηλών προδιαγραφών με δυνατότητα άμεσης μέτρησης του ύψους και του εμβαδού των εμφανιζόμενων κορυφών.

Για την ανίχνευση των ουσιών ως κριτήριο χρησιμοποιείται ο χρόνος ανασχέσεως, ο οποίος αποτελεί μια σταθερά που εξαρτάται από το είδος της στήλης και τις χρωματογραφικές συνθήκες. Αυτό σημαίνει ότι αλλαγή των συνθηκών της διαδικασίας μεταβάλλει το χρόνο ανασχέσεως, για αυτό το λόγο χρησιμοποιείται εσωτερικό πρότυπο και υπολογίζεται ο σχετικός χρόνος ανασχέσεως (ισούται με το λόγο του χρόνου ανασχέσεως της ουσίας προς το χρόνο ανασχέσεως του εσωτερικού προτύπου), ο οποίος χρησιμοποιείται και στη βιβλιογραφία.

Στις περισσότερες περιπτώσεις το εμβαδόν της κορυφής είναι ανάλογο με τη συγκέντρωση της ουσίας, αυτό όμως πρέπει να αποδειχτεί και πειραματικά με τον υπολογισμό της συγκέντρωσης πρότυπων διαλυμάτων ώστε να γίνει σαφές ότι υπάρχει γραμμική σχέση ανάμεσα στο εμβαδόν και τη συγκέντρωση.

3.2.3 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΑΕΡΙΑΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ

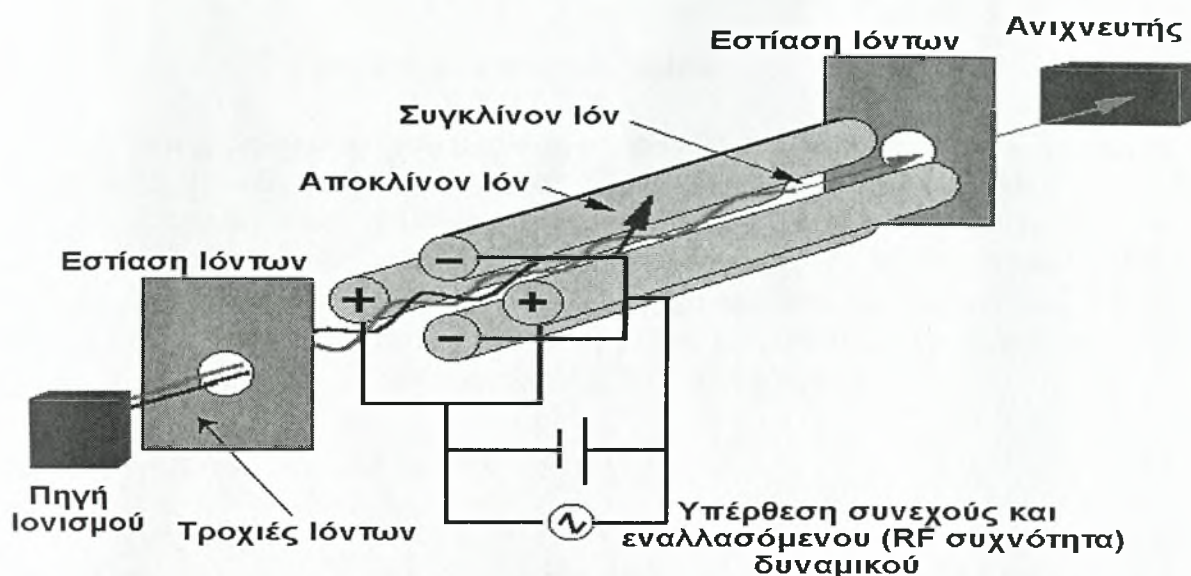
Σήμερα, η αέρια χρωματογραφία βρίσκει πλήθος εφαρμογών όσων αφορά τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό οργανικών και ανόργανων ουσιών. Συνήθως, η ανάλυση των δειγμάτων επιτυγχάνεται με αναλυτικά συγκροτήματα αέριου χρωματογράφου συνδεδεμένου με άλλα μηχανήματα όπως το φασματόμετρο μαζών. Χαρακτηριστικά παραδείγματα εφαρμογής της τεχνικής είναι η ανάλυση δείγματος ούρων από αθλητές και ο προσδιορισμός των φαρμάκων σε αυτά, ο προσδιορισμός θερμογόνου δυνάμεως φυσικών αερίων κ.λ.π.

3.3 ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ [49-60]

3.3.1 ΓΕΝΙΚΑ

Η βασική αρχή της τεχνικής της φασματομετρίας μαζών είναι η εξής :

Ηλεκτρόνια υψηλής ενεργειακής στάθμης προσκρούουν σε μόρια μιας ένωσης που βρίσκεται σε αέρια φάση κάτω από συνθήκες υψηλού κενού με αποτέλεσμα την μετατροπή των μορίων της ένωσης σε ιόντα θετικού συνήθως φορτίου. Έπειτα τα παραχθέντα ιόντα ευθυγραμμίζονται σε μια στενή δέσμη υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Η δέσμη αποκλίνει από την αρχική κατεύθυνση καθώς διέρχεται σε ηλεκτρικό ή μαγνητικό πεδίο ανάλογα με το λόγο μαζών προς ηλεκτρικό φορτίο (m/z) και κατόπιν το δημιουργούμενο ρεύμα με τη μορφή αποκλίνουσας δέσμης εισέρχεται στον ανιχνευτή,



ΕΙΚΟΝΑ 3.2 ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΤΕΤΡΑΠΟΛΙΚΟΥ ΑΝΑΛΥΤΗ ΜΑΖΩΝ

όπου μετράται η έντασή του. Κάθε φορά μόνο δέσμη συγκεκριμένης μαζών μπορεί να εισέλθει στον ανιχνευτή. Λόγω των συνεχών προσκρούσεων ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας το μόριο σπάει σε θραύσματα διαφορετικού μοριακού βάρους, τα ιόντα των οποίων είναι όλα ανιχνεύσιμα. Έτσι, κάθε ουσία αφήνει χαρακτηριστικό αποτύπωμα (φάσμα μαζών) στον ανιχνευτή, όπως θα αναλυθεί λεπτομερέστερα στη συνέχεια.

Η φασματομετρία μαζών σε συνδυασμό με την αέρια χρωματογραφία μπορεί να επιτύχει τον ακριβή προσδιορισμό της ταυτότητας και της ποσότητας των συστατικών ακόμα και εξαιρετικά πολύπλοκων οργανικών ή ανόργανων δειγμάτων, με σαφώς μεγαλύτερη ευαισθησία και εξειδίκευση από άλλες τεχνικές. Στα μειονεκτήματα της τεχνικής πρωταρχικό ρόλο παίζει το υψηλό κόστος αγοράς, λειτουργίας και συντήρησης των μηχανημάτων καθώς και η απαραίτητη εξειδίκευση του προσωπικού για τη σωστή ερμηνεία των φασμάτων μαζών.

3.3.2 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΟΥ ΜΑΖΩΝ

Το φασματομέτρο μαζών αποτελείται από τα εξής τμήματα :

- Σύστημα εισαγωγής δείγματος
- Πηγή ιόντων
- Αναλυτής μαζών
- Ανιχνευτής

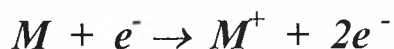
Σύστημα εισαγωγής δείγματος

Το δείγμα χρειάζεται προετοιμασία πριν εισαχθεί στο χώρο ιοντισμού. Καταρχήν πρέπει να εξαερωθεί (αν δε βρίσκεται ήδη σε αέρια μορφή προερχόμενο από τη στήλη του αεριοχρωματογράφου) υπό συνθήκες κενού (πίεση 10-2 Torr) στο πρώτο δοχείο του χώρου εισαγωγής δείγματος. Με κατάλληλο στόμιο εισαγωγής το αέριο δείγμα εισάγεται σε ενδιάμεσο δοχείο μικρότερης πίεσης (10-5 Torr) και από εκεί με σταθερή ροή οδηγείται στο χώρο ιοντισμού, όπου επικρατούν συνθήκες υψηλού κενού και ακόμα μικρότερη πίεση (10-7 Torr) ώστε να αποφεύγονται οι συγκρούσεις μεταξύ των ιόντων.

Πηγές ιόντων

Στην πηγή ιόντων πραγματοποιείται ο ιοντισμός των μορίων με τη χρήση μονομοριακών ή διμοριακών τεχνικών. Οι καθιερωμένες τεχνικές για τον ιοντισμό των οργανικών ενώσεων είναι ο ιοντισμός με πρόσκρουση ηλεκτρονίων (electron impact, EI), ο χημικός ιοντισμός (chemical ionization, CI), ο ιοντισμός ευαίσθητων υλικών, ο ιοντισμός με ακτίνες λέιζερ υποβοηθούμενος από μήτρα (MALDI), η φασματομετρία μαζών εκκρόφησης πλάσματος (PDMS), ο ηλεκτροψεκασμός (electron spray, ES), ο θερμοψεκασμός (thermo spray, TS), ο ιοντισμός με πεδίο (field dissociation) και ο ιοντισμός με σπινθήρα (spark source).

Ο ιοντισμός με πρόσκρουση ηλεκτρονίων είναι η παλαιότερη και ευρύτερα εφαρμοσμένη μέθοδος. Το ρεύμα των μορίων της ένωσης M που εισάγεται στην πηγή βομβαρδίζεται από δέσμη ηλεκτρονίων μεγάλης κινητικής ενέργειας στην περιοχή των 10 – 70 eV. Η δέσμη παράγεται σε μεταλλικό νήμα από βολφράμιο ή ρήνιο. Κατά πορεία τους, τα ηλεκτρόνια της δέσμης συγκρούονται με κάποια από τα μόρια της ένωσης M , με αποτέλεσμα την παραγωγή θετικών μοριακών ιόντων (κατιοντικών ριζών), που προκύπτουν από την αντίδραση :



Στη συνέχεια οι σχηματιζόμενες κατιοντικές ρίζες απωθούνται από μια μεταλλική πλάκα θετικού δυναμικού (ion repeller) η οποία συνδέεται ηλεκτρικά με ένα σύστημα καθοδικών πλακών (accelerating plates) που φέρουν οπή στο κέντρο τους. Το σχηματιζόμενο ηλεκτρικό πεδίο προκαλεί σύγκλιση των ιόντων σε μια λεπτή ταινιωτή δέσμη με ελάχιστη απόκλιση, κατάλληλη να υποστεί ανάλυση στον αναλυτή μαζών.

Το ιόν M^+ ονομάζεται μοριακό ιόν της ένωσης M . Τα μοριακά ιόντα περιέχουν ασύζευκτο ηλεκτρόνιο, είναι δηλαδή ιόντα - ρίζες. Όταν η ενέργεια ιοντισμού είναι αρκετά

χαμηλή, του μεγέθους 6 – 8 eV, το μόριο δεν θραύεται σε μεγάλο βαθμό και συνεπώς παράγεται σχεδόν αποκλειστικά το μοριακό ιόν M^+ , με όφελος τον άμεσο και εύκολο προσδιορισμό του μοριακού βάρους της ουσίας.

Από τη συνολική ποσότητα των μορίων που θα εισέλθουν στο χώρο της πηγής ιόντων μόνο ένα μικρό ποσοστό της τάξης του 1% μετατρέπεται τελικά σε ιόντα. Το ποιος αντιδράσεις θα πραγματοποιηθούν και σε ποιο ποσοστό εξαρτάται από τη φύση της ένωσης και την ενέργεια ιοντισμού. Όσο αυξάνει το μέγεθος του μορίου αλλά και η ενέργεια ιοντισμού, ευνοείται η παραγωγή περισσότερων ιόντων - θραυσμάτων της ένωσης. Πολλές φορές, λόγω των εκτεταμένων θραύσεων δεν εμφανίζεται στα φάσματα το μοριακό ιόν της ουσίας. Τα λαμβανόμενα φάσματα είναι πολύ αναπαραγωγίμα και βρίσκονται καταχωρημένα σε βιβλιοθήκες φασμάτων στη βιβλιογραφία.

Αναλυτής μαζών

Η βασική λειτουργία του αναλυτή μαζών είναι να διαχωρίσει τα ιόντα που παράγονται στην πηγή ανάλογα με τις διαφορετικές τιμές του λόγου 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 .

Το κυριότερο χαρακτηριστικό ποιότητας ενός φασματομέτρου μαζών είναι η διαχωριστική ικανότητα του αναλυτή μαζών, η οποία εξαρτάται από το είδος του αναλυτή. Η διαχωριστική ικανότητα R ορίζεται από τη σχέση $R = m/\Delta m$, όπου m και $m + \Delta m$ αντιστοιχούν σε λόγους m/z με κορυφές ικανοποιητικά διαχωρισμένες. Κατά συνθήκη, ικανοποιητικός διαχωρισμός ανάμεσα σε δύο ουσίες επιτυγχάνεται όταν οι περίπου ισοϋψείς κορυφές αλληπικαλύπτονται σε ύψος που δεν υπερβαίνει το 10% του ύψους των κορυφών.

Τα φασματομέτρα μαζών χωρίζονται σε φασματομέτρα υψηλής και χαμηλής διαχωριστικότητας. Τα χαμηλής διαχωριστικότητας ($R = 100-1000$) ταυτοποιούν τα διάφορα μοριακά ιόντα με βάση την ονομαστική μάζα (nominal mass) που αντιστοιχεί στην πλησιέστερη ακέραιη τιμή προς το μοριακό τους βάρος. Τα φασματομέτρα υψηλής διαχωριστικότητας από την άλλη ($R = 10.000-100.000$) μπορούν να διαχωρίσουν ιόντα ίδιας ονομαστικής μάζας, που έχουν όμως διαφορετικές τιμές ακριβούς μάζας (exact mass), που διαφέρουν στο τρίτο ή τέταρτο δεκαδικό ψηφίο.

Η κύρια διαφορά ανάμεσα στους διάφορους τύπους φασματομέτρων μαζών οφείλεται στα διαφορετικά είδη αναλυτών μαζών που χρησιμοποιούν για το διαχωρισμό των ιόντων. Οι συνηθέστεροι τύποι αναλυτών μαζών είναι :

- Αναλυτές απλής εστίασεως με μαγνητική εκτροπή (magnetic – electric sector)
- Αναλυτές διπλής εστίασεως (double focusing)
- Αναλυτές χρόνου πτήσης (time of flight, TOF)
- Τετραπολικοί αναλυτές μαζών (quadropole)
- Παγιδευτής ιόντων (ion trap)

Από τους παραπάνω αναλυτές, ο ιδανικότερος όταν χρησιμοποιείται συνδυασμός αέριας χρωματογραφίας με φασματομετρία μαζών είναι ο τετραπολικός αναλυτής, λόγω του

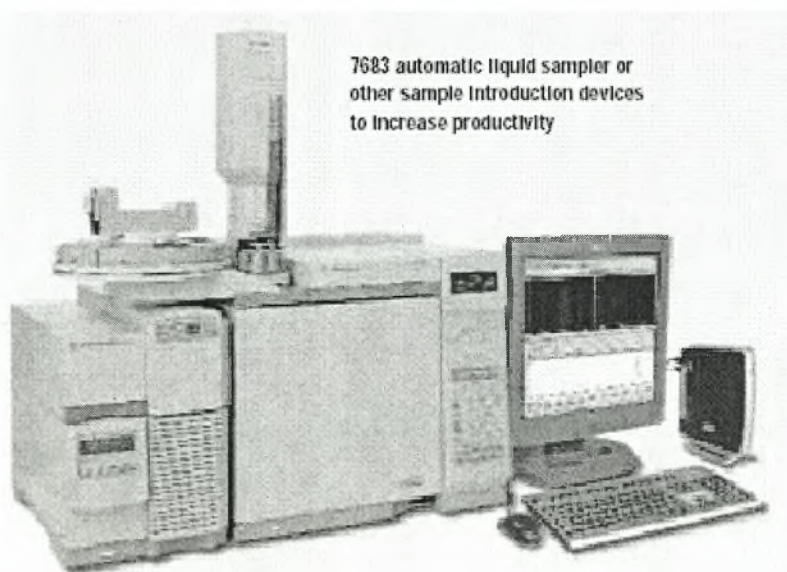
ελάχιστου απαιτούμενου χρόνου για τη λήψη ενός φάσματος μαζών. (μόλις λίγα δευτερόλεπτα) Η λειτουργία του τετραπολικού αναλυτή βασίζεται στην ύπαρξη ενός συστήματος παραλλήλων μεταλλικών ράβδων που συνδέονται ηλεκτρικά ανά ζεύγη με μια συνεχή και μια εναλλασσόμενη τάση. (εικόνα 3.2) Το δυναμικό των ράβδων μπορεί να ελέγχεται και να μεταβάλλεται με ακρίβεια μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή. Όλα τα παραπάνω, σε συνδυασμό με το σχετικά χαμηλό κόστος, το μικρό του μέγεθος και το μεγάλο χρόνο ζωής αποτελούν πρόσθετα σημαντικά πλεονεκτήματα του τετραπολικού αναλυτή σε σχέση με τους υπόλοιπους αναλυτές. Μοναδικό μειονέκτημα είναι η χαμηλή διαχωριστική του ικανότητα, συνήθως $R = 700-800$, και μέγιστο $R = 2000$, ενώ οι μάζες που μπορούν να αναλυθούν έχουν μέγιστη τιμή $m/z = 1200$.

Ανιχνευτές ιόντων

Ο ανιχνευτής ιόντων παράγει στην έξοδό του ηλεκτρικό σήμα ανάλογο του αριθμού ιόντων και του φορτίου τους, που δέχεται στην είσοδό του στη μονάδα του χρόνου. Οι πιο συνηθισμένοι τύποι ανιχνευτών είναι :

- Φαρανταϊκό κύπελλο
- Ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής
- Φωτογραφική πλάκα

3.4 ΔΙΑΣΥΝΔΕΣΗ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΑΕΡΙΟΥ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΟΥ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΟ ΜΑΖΩΝ [64]



ΕΙΚΟΝΑ 3.3 ΔΙΑΣΥΝΔΕΣΗ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΑΕΡΙΟΥ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΟΥ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΟ ΜΑΖΩΝ

Ο συνδυασμός αέριας χρωματογραφίας (GC) – φασματομετρίας μαζών (MS) αποτελεί όπως προαναφέρθηκε μία από τις πιο ευαίσθητες αναλυτικές τεχνικές για το διαχωρισμό, την ταυτοποίηση, και την ποσοτικοποίηση συστατικών πολύπλοκων δειγμάτων. Το φασματόμετρο μαζών αποτελεί τον ανιχνευτή εξαιρετικής εκλεκτικότητας για το χρωματογραφικό σύστημα. Το βασικότερο πρόβλημα που μπορεί να προκύψει είναι να μην συμβιβάζονται οι συνθήκες άριστου χρωματογραφικού διαχωρισμού με τις απαιτούμενες συνθήκες για ιονισμό των ενώσεων που εκλύονται από τη χρωματογραφική στήλη. Για παράδειγμα, η παρουσία μεγάλης περιόσεως φέροντος αερίου στο έκλουσμα αποτελεί κύριο πρόβλημα και δεν επιτρέπει άμεση είσοδο του εκλούσματος στην πηγή ιόντων. Στις περιπτώσεις αυτές γίνεται επεξεργασία του εκλούσματος πριν τη διαβίβασή του στην πηγή ιόντων με τη βοήθεια μοριακών διαχωριστών, οι οποίοι εκδιώκουν από το έκλουσμα το φέρον αέριο.

Παρά τις δυσκολίες που μπορεί να προκύψουν, όλα τα σύγχρονα συστήματα αέριου χρωματογράφου – φασματομέτρου μαζών παρέχουν άψογη επίδοση χωρίς σημαντικούς συμβιβασμούς στη συμπεριφορά των δύο τεχνικών. Μάλιστα, όταν η όλη διάταξη είναι συνδεδεμένη με ηλεκτρονικό υπολογιστή, ο αναλυτής μαζών δε ρυθμίζεται έτσι ώστε να επιτρέπει την ανίχνευση ενός μόνο ιόντος με προκαθορισμένη τιμή m/z , αλλά προγραμματίζεται να αλλάζει ταχύτατα διαδοχικές τιμές m/z από ένα πίνακα τιμών που έχει ορίσει ο χρήστης. Σε κάθε νέα τιμή m/z ο υπολογιστής καταχωρεί το αντίστοιχο σήμα από τον ανιχνευτή, που αντιστοιχεί σε δεδομένο χρόνο κατακρατήσεως. Μετά την πλήρη έκλυση των συστατικών του δείγματος ο υπολογιστής μπορεί να αναπαραγάγει το χρωματογράφημα, που αντιστοιχεί σε κάθε τιμή m/z .

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ : ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ

4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ [1,2]

Τα προς ανάλυση δείγματα, μετά την προσθήκη συντηρητικού υφίστανται την αρχική επεξεργασία στο παρασκευαστήριο πριν εισαχθούν στον αέριο χρωματογράφο. Οι παρασκευαστικές πορείες του εργαστηρίου είναι οι παρακάτω :

ΠΟΡΕΙΑ 1 : Παράγοντες doping που περιέχουν άζωτο και εκκρίνονται ελεύθεροι (GC).

ΠΟΡΕΙΑ 2 : Παράγοντες doping που περιέχουν άζωτο και εκκρίνονται δεσμευμένοι (GC/MS).

ΠΟΡΕΙΑ 3 : Ποσοτικός προσδιορισμός καφεΐνης με HPLC.

ΠΟΡΕΙΑ 4 : α. Στεροειδή που εκκρίνονται ελεύθερα (GC/MS).
β. Στεροειδή που εκκρίνονται δεσμευμένα(GC/MS).

ΠΟΡΕΙΑ 5 : Οξινες ουσίες (διουρητικά, probenecid). (GC/MS ή HPLC).

ΠΟΡΕΙΑ 6 : β-blockers (GC και/ή GC/MS).

ΠΟΡΕΙΑ 7 : hCG (ανοσοπροσδιορισμοί).

Οι πορείες διαφοροποιούνται όπως είναι προφανές για να επιτευχθεί η ανίχνευση διαφορετικών ομάδων χημικών ουσιών. Πρακτικά, στο εργαστήριο για την ανάλυση δειγμάτων ούρων εφαρμόζονται σε συστηματική βάση οι πορείες 2, 4 και 5. Για την ανίχνευση των διεγερτικών χρησιμοποιείται η πορεία 2.

Τα βασικά χαρακτηριστικά μιας παρασκευαστικής πορείας είναι η υδρόλυση των συζευγμένων ομάδων, η εκχύλιση των (υδρόφοβων) απαγορευμένων ουσιών σε οργανική φάση και η παραγωγοποίησή τους.

4.2 Η ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ [1,2,13,66]

Βήμα προς βήμα, η πορεία 2 έχει ως εξής : στα δείγματα ούρων προστίθεται κυστεΐνη (50 mg), προς αποφυγή αντιδράσεων οξειδωσης και μετά προστίθενται 250 mL διαλύματος HCl 6,0M ώστε να προκληθεί **όξινη υδρόλυση** γλουκουρονικών και θειικών εστέρων. Τα

δείγματα μεταφέρονται με μεταλλικό στατό στο φούρνο στους 100 ± 2 °C για 30 λεπτά, χρόνος αρκετός για την πλήρη υδρόλυση των συζευγμένων μορίων.

Ακολουθεί προσθήκη 100 mL εσωτερικού προτύπου κοδεΐνης (100μg/mL). Έπειτα η εισαγωγή στο δείγμα 250 mL διαλύματος NaOH 6,0M προκαλεί την εξουδετέρωση του διαλύματος HCl, ενώ η προσθήκη 2 g στερεού άλατος $\text{NaHCO}_3 : \text{Na}_2\text{CO}_3$ 10 : 1 ρυθμίζει το pH στο 9,5 – 10, που είναι το ιδανικό pH για την εκχύλιση που θα ακολουθήσει. Εάν υπάρχει αμφιβολία για την τιμή του pH, αυτή μπορεί να μετρηθεί με πεχαμετρικό χαρτί.

Η ανάμειξη της υδατικής φάσης των ούρων με 5,0 mL μίγματος διαιθυλαιθέρα : ισοπροπανόλης 5 : 1 (οργανική φάση) , σε συνδυασμό με την προσθήκη 1,5 g άνυδρο Na_2SO_4 που προκαλεί κορεσμό της υδατικής φάσης, έχει ως αποτέλεσμα την μετακίνηση των υδρόφοβων διεγερτικών ουσιών (και των ναρκωτικών ουσιών) στην οργανική στοιβάδα που δημιουργείται μετά από καλή ανάδευση του δείγματος και φυγοκέντρηση. Η οργανική στοιβάδα

α/α	ΣΤΑΔΙΟ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ	ΟΚ	ΠΑΡΑΣΚ/ΣΤΗΣ
1	Προετοιμασία δειγμάτων CALB, CALWADA και BLANKB (κατάψυξη 42, Τομέας 2)		
1.1	Παραμονή των σωλήνων RIA για το CALB, το CALWADA και το BLANKB στον εργαστηριακό πάγκο προς απόψυξη τουλάχιστον 30 min. Vortex 15 s.		
1.2	Μετάγγιση του περιεχομένου των σωλήνων στους αντίστοιχους ψηλούς δοκιμαστικούς σωλήνες του CALB, CALWADA και BLANKB.		
2	ΥΔΡΟΛΥΣΗ		
2.1	Προσθήκη 50 mg κυστεΐνης (A016), (1 κουταλιά κοφτή AN26), vortex		
2.2	Προσθήκη 250 μL HCl 6.0 M (Δ037) με επαναληπτική πιπέτα θέση 5 (tip των 2.5 mL), vortex, πωματισμός		
2.3	Μεταφορά στο φούρνο στους $(100 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ για 30 min		
2.4	Έλεγχος και καταγραφή θερμοκρασίας φούρνου.		
2.5	Επαναφορά των δειγμάτων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (αναμονή ~ 10min)		
3	ΠΡΟΣΘΗΚΗ ISTD		
3.1	Προσθήκη 100 μL κοδεΐνης 100 ppm (Δ017) με επαναληπτική πιπέτα θέση 1 (tip των 5.0 mL), vortex 5s		
4	ΡΥΘΜΙΣΗ PH		
4.1	Προσθήκη 250 μL NaOH 6 M (Δ355) με επαναληπτική πιπέτα θέση 5, (tip των 2.5 mL), vortex 5s		
4.2	Προσθήκη 2 g $\text{NaHCO}_3:\text{Na}_2\text{CO}_3$ 10:1 (Δ354), (2 κουταλιές AN25 κοφτές) pH 9.5-10, vortex 5s αμέσως μετά την προσθήκη του άλατος σε κάθε σωλήνα		

5		ΕΚΧΥΑΙΣΗ	
5.1	Προσθήκη 5,0 mL μίγματος διαιθυλαιθέρα:ισοπροπανόλης 5:1 (Δ048) με dispenser DI2, vortex 5s		
5.2	Προσθήκη ~1,5g άνυδρο Na₂SO₄ (A009) , (1 κουτάλι AN24 γεμάτο-μικρό κουτάλι), vortex 5s αμέσως μετά την προσθήκη σε κάθε σωλήνα.		
5.3	Πωματισμός, ανάδευση στους ανακινητήρες για 20 min		
5.4	Αφαίρεση πωμάτων για το πλυντήριο, ισοβάρυνση των σωλήνων, (μέγιστη διαφορά βάρους των δύο ομάδων σωλήνων 0,5g και 0,4g για φυγόκεντρο HermLe Z510 και Z513 αντίστοιχα).		
5.5	Ελεγχος στροφών φυγοκέντρου 1900 - 2000 rpm, φυγοκέντρωση για 10 min		
5.6	Επισήμανση κωνικών σωλήνων με ετικέτες		
5.7	Μεταφορά οργανικής στιβάδας στους κωνικούς σωλήνες με πιπέτα 1-5 mL		
6		ΕΞΑΤΜΙΣΗ - ΞΗΡΑΝΣΗ	
6.1	Ηπια εξάτμιση σε ρεύμα N ₂ μέχρι ξηρού, μέγιστο 40°C		
6.2	Ελεγχος και καταγραφή θερμοκρασίας hot block.		
6.3	Καθαρά tips στις απολήξεις, αρχικά μικρή ροή N ₂ , προοδευτική αύξηση της ροής		
6.4	Ελεγχος ξηρού υπολείμματος σε κάθε κωνικό σωλήνα, "φύσημα" με N ₂ ένα-ένα		
7		ΠΑΡΑΓΩΓΟΠΟΙΗΣΗ	
7.1	Προσθήκη 100 μL MSTFA (A030) με πιπέτα των 20-200 μL, πωματισμός (η διαδικασία στον απαγωγό), vortex 10s		
7.2	Επώαση στους (80 ± 5)°C, 10 min hot block (κωνικές θήκες χαμηλές)		
7.3	Ελεγχος και καταγραφή θερμοκρασίας hot block		
7.4	Επαναφορά των δειγμάτων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (αναμονή ~ 10 min)		
7.5	Προσθήκη 30 μL MBTFA (A029) με πιπέτα 20-200 μL (η διαδικασία στον απαγωγό), πωματισμός, vortex 10s		
7.6	Επώαση στους (80 ± 5)°C, 5 min hot block		
7.7	Ελεγχος και καταγραφή θερμοκρασίας hot block.		
7.8	Αυτοκόλλητες ετικέτες στα vials των 2 mL με insert		

7.9	Επαναφορά των δειγμάτων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (αναμονή ~ 10min)		
7.10	Μεταφορά παραγωγ/μένου δείγματος στα vials με πιπέτα των 20-200 μ L		
7.11	Ερμητικός πωματισμός		
8	ΠΑΡΑΔΟΣΗ - ΠΑΡΑΛΑΒΗ		
8.1	Υπογραφή στην παρούσα Φόρμα και στη Φόρμα Διαδικασίας II		
8.2	Παράδοση vials στο επιστημονικό προσωπικό του Τομέα 2 και υπογραφή στη Φόρμα Διαδικασίας II της συγκεκριμένης Παρτίδας στο πεδίο Παράδοση Φιαλιδίων.		
8.3	Αν διαπιστωθεί έλλειψη ή ελάχιστη ποσότητα οποιουδήποτε αντιδραστήριου, διαλύματος ή διαλύτη να ενημερώνεται ο Υπεύθυνος της Παρασκευαστικής Διαδικασίας		
ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ:			

ΠΙΝΑΚΑΣ 4.1 ΠΟΡΕΙΑ 2 (ΟΞΙΝΗ ΥΔΡΟΛΥΣΗ)

βρίσκεται στην κορυφή του διαλύματος και συλλέγεται με πιπέτα, τοποθετείται σε καινούριο κωνικό σωλήνα και εξατμίζεται σε ρεύμα N_2 μέχρι ξηρού σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Τέλος, γίνεται προσθήκη διαλύματος **παραγωγοποίησης** (100 μ L MSTFA και 30 μ L MBTFA) με τον τρόπο που περιγράφεται στο πρωτόκολλο. Το παραγωγοποιημένο διάλυμα είναι έτοιμο για εισαγωγή στον αέριο χρωματογράφο.

Εκτός από τα δείγματα ούρων προς ανάλυση, για τον έλεγχο της μεθόδου αναλύεται και δείγμα ελέγχου μίγματος ουσιών (cal) που παρασκευάζονται από πρότυπα διαλύματα τα οποία παραγωγοποιούνται. Τέλος, για λευκό δείγμα (blank) χρησιμοποιούνται ούρα ατόμου που δεν λαμβάνει κανένα φάρμακο και άρα είναι ελεύθερα απαγορευμένων ουσιών.

Αξίζει να αναφερθεί πως εκτός από την όξινη υδρόλυση υπάρχει και ενζυματική υδρόλυση που επιτελείται από το ένζυμο γλυκουρονιδάση (εφαρμόζεται στην πορεία των αναβολικών γιατί δίνει καλύτερα αποτελέσματα). Συνήθως προτιμάται η όξινη υδρόλυση επειδή είναι απλούστερη, ταχύτερη και δεν απαιτεί προσεκτική ρύθμιση του pH. Επιπλέον, δεν εμποδίζεται η υδρόλυση από τυχόν ενζυμικούς αναστολείς και δεν υδρολύονται μόνο οι γλυκουρονικές ομάδες αλλά και οι θεικές.

Επίσης, είναι σημαντική η επιλογή του οργανικού μέσου εκχύλισης, η οποία εξαρτάται απόλυτα από την πολικότητα των μορίων των οποίων η ανίχνευση είναι επιθυμητή. Γενικός κανόνας είναι ότι η αύξηση της πολικότητας μιας ουσίας είναι ανάλογη με τον αριθμό των ομάδων οξυγόνου που περιέχει, με θετική συσχέτιση των δύο αυτών παραμέτρων.

Επειδή στο συγκεκριμένο πείραμα οι ουσίες που θα αναλυθούν απεκκρίνονται στα ούρα ασύζευκτες, η παρασκευαστική πορεία που ακολουθείται είναι η 1, η οποία είναι παρόμοια με την 2 με τη βασική διαφορά ότι δεν γίνεται υδρόλυση. Στον πίνακα 4.2 παρατίθεται το έντυπο με τα στάδια της πορείας 1 και τα αντίστοιχα αντιδραστήρια. Παρόλο

που δεν αναγράφεται το τελικό στάδιο παραγωγοποίησης, αυτό το στάδιο μπορεί να εφαρμοσθεί με την πρόσθεση στο τέλος του κατάλληλου αντιδραστηρίου παραγωγοποίησης εάν και εφόσον εξυπηρετεί τις ανάγκες του πειράματος

α/α	ΣΤΑΔΙΟ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ	ΟΚ	ΠΑΡΑΣΚ/ΣΤΗΣ
1	Προετοιμασία δειγμάτων CALA και BLANKA (κατάψυξη 42, Τομέας 2)		
1.1	Παραμονή των σωλήνων RIA για το CALA και το BLANKA στον εργαστηριακό πάγκο προς απόψυξη τουλάχιστον 30 min. Vortex 15 s.		
1.2	Μετάγγιση του περιεχομένου των σωλήνων στους αντίστοιχους ψηλούς δοκιμαστικούς σωλήνες του CALA και BLANKA.		
2	ΠΡΟΣΘΗΚΗ ISTD		
2.1	Προσθήκη 50 μL διαλύματος διφαινυλαμίνης 130 ppm (Δ015) , ISTD, με επαναληπτική πιπέτα θέση 2 (tip 1.25 mL), vortex 5s.		
3	ΡΥΘΜΙΣΗ PH		
3.1	Προσθήκη 250 μL καυστικό κάλιο 5.0 M (Δ032) , με επαναληπτική πιπέτα θέση 5 (tip 2.5 mL), vortex 5s.		
4	ΕΚΧΥΛΙΣΗ		
4.1	Προσθήκη 1,0 mL τριτοταγή βουτυλο-μεθυλο-αιθέρα (A109) με dispenser DI5, vortex 5s.		
4.2	Προσθήκη 2g άνυδρο Na₂SO₄ (A009) , (1 κουτάλι AN24 γεμάτο-μικρό κουτάλι), vortex 5s αμέσως μετά την προσθήκη σε κάθε σωλήνα.		
4.3	Πωματισμός, ανάδευση στους ανακινητήρες για 20 min		
4.4	Αφαίρεση πωμάτων για το πλυντήριο, ισοβάρυνση των σωλήνων, (μέγιστη διαφορά βάρους των δύο ομάδων σωλήνων 0,5 g και 0,4g για φυγόκεντρο HermLe Z510 και Z513 αντίστοιχα).		
4.5	Έλεγχος στροφών φυγόκεντρου 1900 - 2000 rpm, φυγόκεντρωση για 10 min		
4.6	Επισήμανση vials 1,5 mL με ετικέτα.		
4.7	Μεταφορά οργανικής στιβάδας στα vials των 1,5 mL, με πιπέτα του 1-5 mL		
4.8	Ερμητικός πωματισμός		

5 ΠΑΡΑΔΟΣΗ - ΠΑΡΑΛΑΒΗ			
5.1	Υπογραφή στην παρούσα Φόρμα και στη Φόρμα Διαδικασίας I.		
5.2	Παράδοση vials στο επιστημονικό προσωπικό του Τομέα 2 και υπογραφή στη Φόρμα Διαδικασίας I της συγκεκριμένης Παρτίδας στο πεδίο Παράδοση Φιαλιδίων.		
5.3	Αν διαπιστωθεί έλλειψη ή ελάχιστη ποσότητα οποιουδήποτε αντιδραστηρίου, διαλύματος ή διαλύτη και των αυτοκόλλητων να ενημερώνεται ο Υπεύθυνος της Παρασκευαστικής Διαδικασίας		

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ:

ΠΙΝΑΚΑΣ 4.2 ΠΟΡΕΙΑ 1

4.3 ΠΑΡΑΓΩΓΟΠΟΙΗΣΗ [61-63]

Η παραγωγοποίηση μιας χημικής ουσίας είναι η αντίδρασή της με κάποιο αντιδραστήριο (αντιδραστήριο παραγωγοποίησης), έτσι ώστε να προκύψει παράγωγο, το οποίο θα ανιχνεύεται ή θα διαχωρίζεται πιο εύκολα.

Η παραγωγοποίηση συνήθως έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της πτητικότητας των μορίων με την προσθήκη λιπόφιλων ομάδων και άρα τον περιορισμό των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πολικών ομάδων των ενώσεων. Ακόμα, η παραγωγοποίηση μορίων μεγάλου μοριακού βάρους έχει το ίδιο αποτέλεσμα, δηλαδή την πτώση του σημείου ζέσεως. Τέλος, η παραγωγοποίηση θερμοασταθών μορίων ενδέχεται να οδηγήσει σε σχηματισμό θερμοσταθερών προϊόντων. Η αύξηση της πτητικότητας και της θερμοσταθερότητας έχουν την ίδια κατάληξη : τη βελτίωση των χρωματογραφικών ιδιοτήτων της ουσίας, κάτι που

SPURIOUS ADSORPTION

3

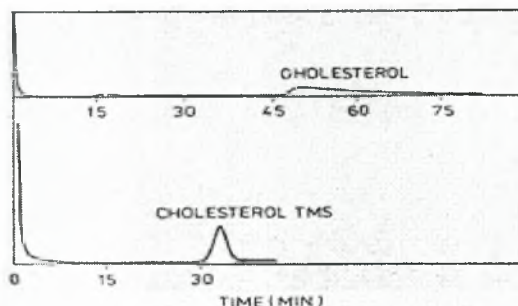


Fig. 1.1. Comparison of the chromatograms of free and trimethylsilylated cholesterol on non-deactivated support coated with F-60. (Reproduced from ref. 1 by courtesy of W.J.A. VandenHeuvel and the publisher.)

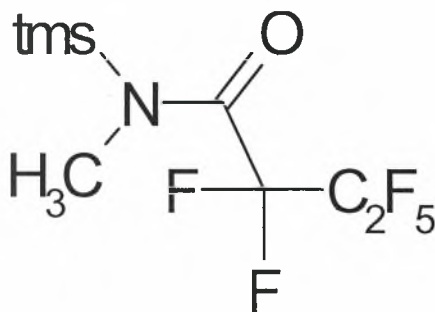
ΕΙΚΟΝΑ 4.1 ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΠΑΡΑΓΩΓΟΠΟΙΗΣΗ

αντανακλάται στην εμφάνιση πιο ευκρινών και καλά διαχωρισμένων κορυφών στο χρωματογράφημα. Για παράδειγμα,

στην εικόνα 4.1 φαίνεται η βελτίωση της κορυφής της χοληστερόλης στο χρωματογράφημα όταν η ουσία παραγωγοποιείται με αντιδραστήριο σιλανοποίησης. (λαμβάνει μια TMS ομάδα) Η συνηθέστερη αντίδραση παραγωγοποίησης είναι η αντικατάσταση του ενεργού υδρογόνου σε πολικές ομάδες (-OH, -SH, -NH) από μια ομάδα του αντιδραστήριου παραγωγοποίησης με αποτέλεσμα:

- Αλκυλίωση
- Ακυλίωση
- Συμπύκνωση
- Σιλανοποίηση

Ειδικότερα οι αντιδράσεις σιλανοποίησης είναι πολύ αποτελεσματικές και χρησιμοποιούνται σε μεγάλο βαθμό. Χαρακτηριστικό αντιδραστήριο σιλανοποίησης είναι το MSTFA (N – μεθυλο – N – τριμεθυλο – σιλυλο – τριφθορο – ακεταμίδιο) , το οποίο αποδίδει την TMS ομάδα του στις ουσίες με ενεργό υδρογόνο.



ΕΙΚΟΝΑ 4.2 ΔΟΜΗ ΤΟΥ *MSTFA*

4.4 ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ [1,2,65]

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΠΗΓΕΣ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ	ΕΣΕΠ (ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ)
Εμβολιασμός δειγμάτων	Ακρίβεια και επαναληψιμότητα συγκέντρωσης από χρήση πιπέτας	Προσδιορίζονται οι τιμές των συγκεντρώσεων των ουσιών σε δείγματα ελέγχου (εφαρμογή σε ποσοτικές μεθόδους)
Προσθήκη εσωτερικού προτύπου (ISTD)	Ακρίβεια και επαναληψιμότητα συγκέντρωσης από χρήση πιπέτας	Σήμα ανιχνευτή, κορυφή του ISTD
Υδρόλυση	Ακρίβεια στη ρύθμιση του pH, σταθερότητα του χρησιμοποιούμενου ενζύμου, χρόνος επώασης, ρύθμιση θερμοκρασίας, επιμόλυνση δείγματος	Έλεγχος υδρόλυσης συζευγμένου δείγματος ελέγχου
Εκχύλιση	Ακρίβεια στη ρύθμιση του pH, κίνδυνος επιμόλυνσης	Σήμα ανιχνευτή, κορυφή του ISTD, εμφάνιση αγνώστων κορυφών σε λευκό δείγμα, εξέταση εμφάνισης ουσιών στο δείγμα ελέγχου
Εξάτμιση	Ροή N ₂ , ρύθμιση θερμοκρασίας, κίνδυνος επιμόλυνσης	Σήμα ανιχνευτή, κορυφή του ISTD, εμφάνιση αγνώστων κορυφών σε λευκό δείγμα, εξέταση εμφάνισης ουσιών στο δείγμα ελέγχου
Παραγωγοποίηση	Σταθερότητα αντιδραστηρίου παραγωγοποίησης, χρόνος επώασης, ρύθμιση της θερμοκρασίας	Έλεγχος πορείας παραγωγοποίησης ISTD με τη χρήση διαγνωστικών ιόντων της ουσίας, εξέταση εμφάνισης παραγωγοποιημένων ουσιών στο δείγμα ελέγχου
GC		
Εισαγωγέας δείγματος	Ενιέμενος όγκος δείγματος, θερμοκρασία εισαγωγέα, επιμόλυνση	Έλεγχος σήματος ανιχνευτή, κορυφή του ISTD (επιφάνεια προς ύψος κορυφής του ISTD και όσων ουσιών βρίσκονται στο δείγμα ελέγχου), εμφάνιση αγνώστων κορυφών σε λευκό δείγμα

Στήλη	Απόδοση στήλης, (διαχωριστική ικανότητα, κατακράτηση κλπ)	Έλεγχος χρόνων ανάσχεσης του ISTD και όσων ουσιών βρίσκονται στο δείγμα ελέγχου, έλεγχος λόγου S/N στο δείγμα ελέγχου, αξιολόγηση χρωματογραφικών κορυφών, μέτρηση S/N του ISTD και όσων ουσιών βρίσκονται στο δείγμα ελέγχου
Θερμοκρασιακό πρόγραμμα	Σύστημα θέρμανσης	
Ανιχνευτής	Ευαισθησία, σταθερότητα, λόγος σήμα/θόρυβο (S/N), γραμμική απόκριση κλπ	

ΠΙΝΑΚΑΣ 4.3 ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ΣΤΟΝ ΕΣΩΤΕΡΙΚΟ ΕΛΕΓΧΟ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Οι αναλυτικές διαδικασίες ανίχνευσης των απαγορευμένων ουσιών με τη χρήση της τεχνικής αέριας χρωματογραφίας – φασματομετρίας μαζών (GC – MS) περιλαμβάνουν μια σειρά από διαφορετικά στάδια προετοιμασίας των αναλυόμενων δειγμάτων (υδρόλυση, εκχύλιση, παραγωγοποίηση κλπ). Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό και με τη χρωματογραφική ανάλυση του δείγματος συντελεί στην αύξηση του αριθμού πιθανών πηγών σφάλματος. Είναι προφανές ότι ο έλεγχος κάθε μιας παραμέτρου ξεχωριστά είναι χρονοβόρα, επίπονη και γενικά ασύμφορη διαδικασία. Για αυτό το λόγο, ο εσωτερικός έλεγχος ποιότητας διενεργείται με την εξέταση ορισμένων μόνο παραμέτρων, που ελέγχουν το μεγαλύτερο φάσμα αυτών των σφαλμάτων, όπως φαίνεται και στον πίνακα 4.3.

4.5 ΟΡΓΑΝΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ [1,2,13,66]

4.5.1 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΣΥΣΚΕΥΕΣ

- Αναλυτικός ζυγός (τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων και μέγιστης ποσότητας ζύγισης 60g), τύπου GR2000 (AND).
- Φαρμακευτικός ζυγός τύπου CASBEE, MW1200 για την ισοβάρυνση των σωλήνων φυγοκέντρωσης.
- Θερμοστατούμενος κλίβανος 0-399 °C, τύπου SR30-2121 (EABEM).
- Αναδευτήρας περιδίνησης τύπου Vortex Genie 2, Scientific Industries.
- Οριζόντιοι ανακινητήρες τύπου Promax 1020 DT, Heindolph.
- Μεταλλόλουτρα θερμοκρασίας 0 – 100 °C τύπου TBK27 (EENON O.E.).
Φέρουν θερμαντική πλάκα με κατάλληλες οπές για την υποδοχή σωλήνων.
Διαθέτουν διακόπτη έναρξης και διακοπής της λειτουργίας, κομβία ρύθμισης

της θερμοκρασίας και δυνατότητα παρακολούθησης της καθορισμένης και πραγματικής τιμής της θερμοκρασίας.

- Φυγόκεντρος HermLe Z – 510 BHG, 30 θέσεων. Οι σωλήνες των δειγμάτων μετά την ισοβάρυνσή τους τοποθετούνται αντιδιαμετρικά.
- Συσκευή εξάτμισης.
Αποτελείται από σύστημα διανεμητή αερίου αζώτου και μεταλλόλουτρο. Ο διανεμητής αερίου αζώτου ποικίλλει και μπορεί να φέρει 7, 18, 27 ή και 36 θέσεις με δυνατότητα χρήσης όλων των θέσεων ή μερικών ανάλογα με τον αριθμό των αναλυόμενων δειγμάτων.
- Αυτόματες πιπέτες τύπου Finnpiquette – labsystems 5 – 40 μL , 40 – 200 μL , 200 – 1000 μL , 1 – 5 mL και επαναληπτική πιπέτα, διακριβωμένες.

4.5.2 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- Διάλυμα καυστικού καλίου KOH 5,0M (Panreac, 99%).
- Διάλυμα καυστικού νατρίου NaOH 6,0M (Panreac, 99%).
- Διαιθυλαιθέρας $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ (LABSCAN 99,5%).
- Άνυδρο θειϊκό νάτριο Na_2SO_4 (Panreac, 99%).
- Στερεό ρυθμιστικό μείγμα NaHCO_3 (Panreac, 99,8%) : Na_2CO_3 (Panreac, 99,7%) 10 : 1.
- Διάλυμα διαιθυλαιθέρα $(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{O}$ (LABSCAN, 99,5%) : ισοπροπανόλης $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ (LABSCAN, 99,5%) 5 : 1 v/v.
- L – κυστεΐνη, $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2\text{S}$ (Fluka, >99%).
- Διάλυμα υδροχλωρικού οξέως HCl 6,0M (Panreac, 99%).
- Πρότυπο διάλυμα διφαινυλαμίνης, (Sigma, 100%).
- Πρότυπο διάλυμα κοδεΐνης, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Sigma, 99%).
- Οξικός αιθυλεστέρας (LABSCAN, 99,8%).
- Οξικός ανυδρίτης (ALDRICH, 99%).
- Αντιδραστήριο παραγωγοποίησης MSTFA (N – μεθυλο – N – τριμεθυλο – σιλυλο – τριφθορο – ακεταμίδιο, Machery – Nagel 100%).

- Αντιδραστήριο παραγωγοποίησης MSTFA/NH₄I/EtSH (1000 : 2 : 6).
- Αντιδραστήριο παραγωγοποίησης MBTFA (N-μεθυλο-δι-τριφθορο-ακεταμίδιο).
- Αντιδραστήριο παραγωγοποίησης TFAA (τριφθορο-ακετοξικός ανυδρίτης).
- Αντιδραστήριο παραγωγοποίησης MTBSTFA (N-τριτοταγής βουτυλο-διμεθυλο-σιλιλο- N-μεθυλο-τριφθορο-ακεταμίδιο).

4.5.3 ΛΟΙΠΑ ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ

- Μεταλλική σπάτουλα, τύπου Roth.
- Πλαστικά ρύγχη πιπετών.
- Πώματα Aluminum Cap Clear lacquerel-11 mm, septum natural rybber/TEF πάχους 1,0 mm.
- Φιαλίδια Crimp Neck ND-11, διαφανή, χωρητικότητας 1,5 mL.
- Micro-insert χωρητικότητας 0,1 mL, διαφανή με κωνικό πυθμένα, 12 mm.
- Ψαλίδι κλεισίματος φιαλιδίων αυτόματου εισαγωγέα.
- pH μετρικός χάρτης εύρους 6,5 – 10, 7,5 – 14, 0 – 6.

4.5.4 ΓΥΑΛΙΝΑ ΣΚΕΥΗ

- Ψηλοί εσφυρισμένοι σωλήνες όγκου 15 mL.
- Εσφυρισμένοι σωλήνες με κωνική βάση.
- Γυάλινος σωλήνας με βιδωτό πώμα.
- Εσφυρισμένα πώματα.
- Βιδωτά πώματα.
- Γυάλινες πιπέτες Pasteur.
- Ογκομετρικές φιάλες βαθμονομημένες, παρασκευής και φύλαξης διαλυμάτων.

4.6 ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΣΤΗΝ ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ – ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ

Το χρωματογραφικό σύστημα που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία για τη διεξαγωγή των πειραμάτων αποτελείται από έναν αέριο χρωματογράφο, (Hewlett Packard HP 6890 Series Gas Chromatograph) με ανιχνευτή μαζών (HP5973) Inert Mass Selective Detector. Το σύστημα αυτό περιλαμβάνει αυτόματο δειγματολήπτη 7683 Series Injector και λογισμικό HP Chemstation.

Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε είναι τριχοειδής HP Ultra1 12m x 0,200m x 0,33μm (μήκος x εσωτερική διάμετρος x πάχος στατικής φάσης).

Η επιφάνεια διασύνδεσης του αέριου χρωματογράφου με τον ανιχνευτή μαζών είναι ένας θερμαινόμενος αγωγός που περιέχει την τριχοειδή στήλη. Το ένα άκρο της επιφάνειας διασύνδεσης διαπερνά τη μια πλευρά του αέριου χρωματογράφου και εξέρχεται από τον κλίβανο αυτού, ενώ το άλλο άκρο της επιφάνειας διασύνδεσης προσαρμόζεται στην πηγή ιόντων. Η θερμοκρασία στην επιφάνεια διασύνδεσης είναι 300 °C.

Ο εκλεκτικός ανιχνευτής μαζών επιτρέπει τον προσδιορισμό και την ταυτοποίηση των απαγορευμένων ουσιών με βάση το φάσμα μαζών τους, είτε με ταυτόχρονη παρακολούθηση του συνόλου των παραγόμενων ιόντων, οπότε αναφερόμαστε σε διαδικασία πλήρους σάρωσης (full scan), είτε με παρακολούθηση συγκεκριμένων ιόντων (selected ion monitoring, SIM), οπότε αναφερόμαστε σε διαδικασία ελέγχου επιλεγμένων ιόντων. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η διαδικασία πλήρους σάρωσης.

Σύστημα εισαγωγής δείγματος

- Όγκος εισαγόμενου δείγματος : 1 μL
- Θερμοκρασία συστήματος εισαγωγής δείγματος : 250 °C
- Διαμερισμός συστήματος εισαγωγής δείγματος : 1 : 15

Σύστημα διαχωρισμού

- Κινητή φάση : ήλιο
- Αρχική θερμοκρασία θερμοστατούμενου κλιβάνου : 150 °C
- Θερμοκρασιακό πρόγραμμα : 150 °C για 0,5 min, 12,5 °C/min μέχρι 310 °C μέχρι 12,5 min. Συνολικός χρόνος σάρωσης 12,5 min.

Σύστημα ανίχνευσης

- Πηγή ιονισμού : πρόσκρουση ηλεκτρονίων
- Θερμοκρασία πηγής ιονισμού : 220 °C
- Θερμοκρασία επιφάνειας διασύνδεσης : 300 °C
- Εύρος μαζών : 50 – 550
- Θερμοκρασία ανιχνευτή ιόντων : 300 °C

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΕΜΠΤΟ

ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟ ΠΕΙΡΑΜΑ

Κατά τη διάρκεια ενός μεταβολικού πειράματος, χορηγείται μια καινούρια προσφάτως ανιχνεύσιμη απαγορευμένη ουσία σε εθελοντή ο οποίος πρέπει να είναι υγιής, να μη λαμβάνει ταυτόχρονα άλλη φαρμακευτική αγωγή και να μην ανιχνεύονται στα ούρα του άλλες ουσίες που ενδεχομένως να παρεμποδίζουν την ανάλυση. Με τον όρο καινούρια ουσία εννοείται ότι η ουσία θεωρείται νέα για τον τομέα του doping και ενδεχομένως να μην είναι νέα όσον αφορά την ημερομηνία κυκλοφορίας της στην αγορά. Για παράδειγμα, η διεγερτική ουσία bupropion κυκλοφόρησε μεν ως αντικαταθλιπτικό από το 1989 στην αγορά, αλλά μόλις πρόσφατα έγινε γνωστή η χρήση της ως παράγοντας doping.

Από τη στιγμή που ο εθελοντής λαμβάνει την ουσία, ο οργανισμός του αρχίζει να τη μεταβολίζει και μετά από επεξεργασία στο ήπαρ μπορεί να απεκκριθεί (ασύζευκτη ή συζευγμένη) στα ούρα. Ο εθελοντής μαζεύει τα ούρα του σε πλαστικούς ουροσυλλέκτες για αρκετές ημέρες, τόσες όσες χρειάζονται ώστε η ουσία να απεκκριθεί σχεδόν κατά 100% από τον οργανισμό. Στον εθελοντή χορηγούνται εκτός από τους ουροσυλλέκτες και ετικέτες στις οποίες θα αναγράφεται η ημερομηνία και η ακριβής ώρα συλλογής του δείγματος ούρων καθώς και ο αύξων αριθμός του δείγματος (A/A). Τα στοιχεία αυτά πρέπει να συμπληρώνονται από τον εθελοντή και σε προτυπωμένο έντυπο μεταβολικού πειράματος. Κάθε δείγμα που συλλέγεται τοποθετείται αμέσως στην κατάψυξη του ψυγείου και αργότερα μεταφέρεται σε καταψύκτες στο εργαστήριο doping. Η χαμηλή θερμοκρασία είναι απαραίτητη για την παρεμπόδιση της ανάπτυξης βακτηριακών ομάδων, τόσο για λόγους υγείας όσο και για τη διαφύλαξη της ακεραιότητας του δείγματος. Μετά τη συλλογή όλων των δειγμάτων, οι ουροσυλλέκτες αποσύρονται από την κατάψυξη, τα δείγματα ξεπαγώνουν και ανοίγονται, και εν συνεχεία τους προστίθεται συντηρητικό (NaN_3) σε ποσότητα ανάλογη με τον όγκο του δείγματος (1 g/L, με σκοπό την παρεμπόδιση της ανάπτυξης βακτηριακών πλυθησμών). Πρέπει να σημειωθεί ότι πριν από τη λήψη της ουσίας ο εθελοντής συλλέγει δύο δείγματα ούρων του που προορίζονται για χρήση ως λευκά διαλύματα. (blank).

Αφού όλα τα δείγματα ανοιχτούν, μικρή ποσότητα καθενός εξ' αυτών διαμοιράζεται σε μικρά πλαστικά σωληνάκια RIA τα οποία θα χρησιμοποιηθούν βραχυπρόθεσμα για ανάλυση. Τα υπόλοιπα δείγματα θα αποθηκευτούν εκ νέου στους καταψύκτες για πιθανή μελλοντική χρήση. Στα σωληνάκια RIA επικολλώνται ετικέτες οι οποίες, όπως και στους ουροσυλλέκτες αναγράφουν ημερομηνία και ώρα συλλογής, αύξοντα αριθμό δείγματος αλλά αυτή τη φορά προστίθεται στις ετικέτες και το όνομα της χορηγούμενης ουσίας, για παράδειγμα

bupropion 3
12 : 45 23/5

Τα δείγματα που βρίσκονται μέσα στα σωληνάκια RIA θα χρησιμοποιηθούν για ανάλυση με τελικό στόχο την ανεύρεση και ταυτοποίηση των μεταβολιτών της χορηγούμενης ουσίας (και της μητρικής ουσίας αν και εφόσον βρίσκεται σε

ανιχνεύσιμο ποσοστό στο δείγμα) με τη βοήθεια της τεχνικής αέριας χρωματογραφίας – φασματομετρίας μαζών. Έπειτα, τα αποτελέσματα θα χρησιμοποιηθούν για την ενσωμάτωση της διαδικασίας ανίχνευσης της ουσίας του μεταβολικού πειράματος σε μια από τις γενικές διαδικασίες ανίχνευσης απαγορευμένων ουσιών που χρησιμοποιεί το εργαστήριο (εδώ στη γενική διαδικασία ανίχνευσης των διεγερτικών και ναρκωτικών ουσιών), ώστε η ανίχνευση να αποτελεί θέμα ρουτίνας. Η ύπαρξη γενικής αναλυτικής πορείας που να βρίσκει εφαρμογή σε μεγάλο φάσμα ουσιών είναι απαραίτητη όχι μόνο για τη διευκόλυνση γενικότερα των αναλύσεων αλλά και για οικονομικούς λόγους.

A/A	Ημερομηνία συλλογής	Ώρα συλλογής	Παρελθόν χρόνος από τη χορήγηση
1	9/5	02 : 25	2h 40min
2	9/5	15 : 15	15h 30min
3	9/5	20 : 25	20h 40min
4	10/5	01 : 25	25h 40min
5	10/5	09 : 25	33h 40min
6	10/5	17 : 10	41h 25min
7	10/5	19 : 20	43h 35min
8	11/5	02 : 10	50h 25min
9	11/5	15 : 50	64h 05min
10	12/5	03 : 35	75h 50min
11	12/5	19 : 10	91h 25min
12	13/5	13 : 40	109h 55min
13	13/5	23 : 35	119h 50min
14	14/5	15 : 05	135h 20min
15	14/5	19 : 40	139h 55min
16	15/5	14 : 55	159h 10min
17	15/5	21 : 25	165h 40min

ΠΙΝΑΚΑΣ 5.1 ΧΡΟΝΟΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΣΥΛΛΟΓΗΣ ΣΤΟΝ ΠΙΝΑΚΑ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ

Στο έντυπο του μεταβολικού πειράματος, εκτός από τον πίνακα 5.1 αναγράφεται και η ποσότητα της δραστικής ουσίας που χορηγήθηκε στον εθελοντή (73 mg), η εμπορική ονομασία της ουσίας (zyban), το όνομα της κατασκευάστριας εταιρίας (glaxowellcome), ο τρόπος χορήγησης της ουσίας (χάπι) και διάφορα άλλα στοιχεία.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΤΟ : ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Όπως προαναφέρθηκε, ο λόγος διεξαγωγής του μεταβολικού πειράματος είναι η ενσωμάτωση της διαδικασίας ανίχνευσης του bupropion σε μία από τις διαδικασίες ρουτίνας του εργαστηρίου. Για να επιτευχθεί αυτό πρέπει να ταυτοποιηθεί η δομή του bupropion ή ενός τουλάχιστον εκ των βασικών μεταβολιτών από το δείγμα ούρων του μεταβολικού πειράματος και έπειτα να καταχωρηθεί ο αντίστοιχος χρόνος ανάσχεσης στον αέριο χρωματογράφο (όποτε αναφέρεται χρόνος ανάσχεσης εννοείται ο σχετικός χρόνος ανάσχεσης). Βέβαια η δομές του bupropion και των μεταβολιτών του είναι ήδη γνωστές από τη βιβλιογραφία, επομένως αρκεί να επιβεβαιώσουμε ότι το φάσμα μαζών που δίνει η κάθε ουσία επαληθεύει τη δομή που δίδεται στα σχετικά άρθρα.

Για την επιβεβαίωση της παρουσίας μιας απαγορευμένης ουσίας σε εξεταζόμενο δείγμα αρκεί η ανίχνευση ενός και μόνο μεταβολίτη (ή της μητρικής ουσίας) του οποίου το χρωματογράφημα να εμφανίζει οξεία και ευδιάκριτη κορυφή και το φάσμα μαζών να περιέχει τουλάχιστον τρία βασικά ιόντα, με το ύψος της κορυφής του μικρότερου εκ των τριών σε ποσότητα ιόντων να μην είναι χαμηλότερη από το 10% του ύψους της υψηλότερης κορυφής.

6.2 ΠΕΙΡΑΜΑ ΠΡΩΤΟ : ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣ ΤΟΥ BUPROPION

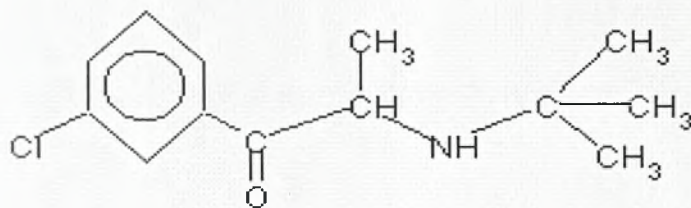
Λίγη σκόνη από το χάπι του bupropion διαλύεται σε μεθανολικό διάλυμα (10,976 mg σε 5 mL) και εισάγεται στον αέριο χρωματογράφο. Η μοναδική κορυφή που εμφανίζεται στο χρωματογράφημα αντιστοιχεί προφανώς στο bupropion και καταχωρείται ο χρόνος ανάσχεσης. Έπειτα το διάλυμα πρέπει να εισαχθεί στο φασματόμετρο μαζών για την ανάλυση του φάσματος μαζών και την επαλήθευση της δομής που προτείνει η βιβλιογραφία. Νωρίτερα όμως πρέπει να αφαιρεθεί μέρος του διαλύτη (μεθανόλη), για να μην εμποδίζει τη λειτουργία του φασματομέτρου. (όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο για το φασματόμετρο μαζών) Η αφαίρεση τμήματος του διαλύτη είναι εύκολη και επιτυγχάνεται με εξάτμιση με ρεύμα αζώτου σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, το διάλυμα εισάγεται ξανά στο σύστημα GC – MS και αυτή τη φορά τρέχει και στο φασματόμετρο μαζών. Με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή εμφανίζεται το φάσμα μαζών που προκύπτει από τη μοναδική χρωματογραφική κορυφή και ανήκει φυσικά στο bupropion.

Από τη στιγμή που έχει ανιχνευτεί το φάσμα μαζών της ουσίας και είναι γνωστή η υποψήφια δομή της, εφαρμόζεται η διαδικασία ταυτοποίησης με τη βοήθεια του προγράμματος ηλεκτρονικού υπολογιστή που ονομάζεται MSC Pro. Ο τρόπος λειτουργίας του προγράμματος είναι ο εξής :

Το πρόγραμμα παρέχει εξαιρετικές σχεδιαστικές ικανότητες ώστε ο σχεδιασμός της ακριβούς δομής της αναλυόμενης ουσίας να εύκολος και γρήγορος. Το πρόγραμμα έχει την ικανότητα να αναγνωρίζει κάθε άτομο της σχεδιαζόμενης ουσίας και να υπολογίζει το ατομικό του βάρος. Επίσης υπολογίζει και το μοριακό βάρος της ουσίας. Έπειτα, το πρόγραμμα μπορεί να υπολογίσει τα μοριακά βάρη όλων των πιθανών θραυσμάτων της ουσίας που προκύπτουν από το σπάσιμο ενός ή και δύο χημικών δεσμών. Με αυτό τον τρόπο, εάν ο χρήστης του ηλεκτρονικού υπολογιστή πληκτρολογήσει ένα μοριακό βάρος μικρότερο από αυτό του μοριακού ιόντος, το πρόγραμμα θα του εμφανίσει όλα τα πιθανά θραύσματα της αρχικής ουσίας με αυτό το μοριακό βάρος, εάν υπάρχουν φυσικά. Έτσι, θα μπορεί να ερμηνεύσει όλα τα θραύσματα που εμφανίζονται στο φάσμα μαζών της ουσίας και που έχουν προκληθεί από το βομβαρδισμό ηλεκτρονίων στο φασματοόμετρο μαζών. Εάν όμως τα θραύσματα που εμφανίζονται στο φάσμα μαζών δεν δικαιολογούνται από τη θραύση των δεσμών της χημικής δομής που έχει σχεδιαστεί στο MSC Pro, τότε πλέον είναι σαφές ότι η ουσία που έδωσε το συγκεκριμένο φάσμα μαζών είναι διαφορετική από αυτήν που σχεδιάστηκε στο πρόγραμμα.

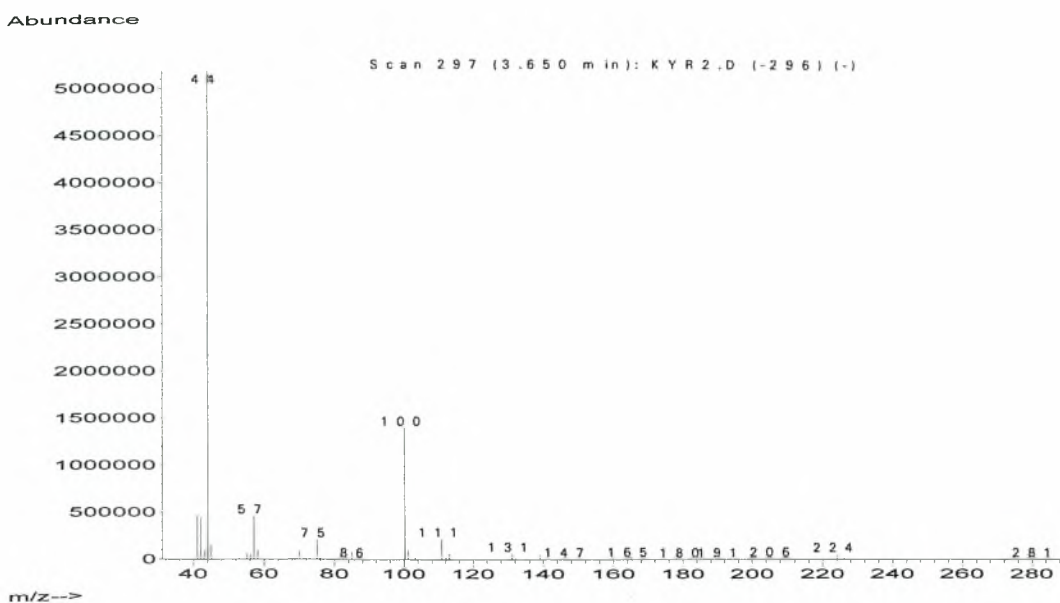
Ενώ είναι εύκολο να απορριφθεί μια υποψήφια δομή με βάση το φάσμα μαζών της, είναι σαφώς πιο δύσκολο να επιβεβαιωθεί αυτή η δομή. Ακόμα και αν δικαιολογούνται όλες οι θραύσεις του φάσματος από το MSC Pro, απαιτείται η ερμηνεία τουλάχιστον ενός ακόμα φάσματος μαζών της ίδιας ουσίας, αφού πρώτα υποστεί παραγωγοποίηση με κατάλληλο αντιδραστήριο. Η ερμηνεία αυτή θα πρέπει να επιβεβαιώνει την αντίστοιχη παραγωγοποιημένη δομή της ουσίας που έχει σχεδιαστεί στο MSC Pro. Εάν και αυτή τη φορά όλες οι θραύσεις δικαιολογούνται, τότε πια θεωρείται βέβαιο πως η σχεδιαζόμενη δομή είναι η σωστή και άρα θεωρείται ότι η ουσία που είναι υπεύθυνη για το εξεταζόμενο φάσμα μαζών έχει ταυτοποιηθεί.

Η δομή του bupropion όπως δίνεται από τη βιβλιογραφία φαίνεται στην εικόνα 6.1.



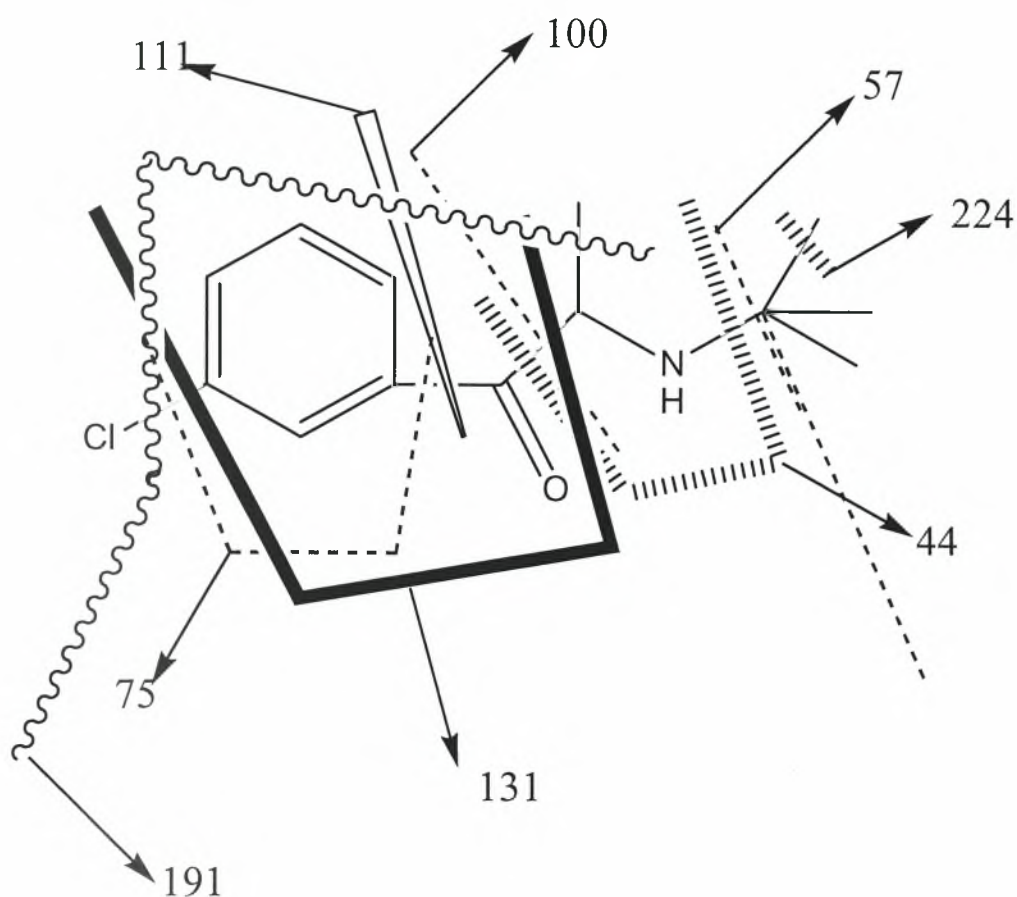
EΙΚΟΝΑ 6.1 ΔΟΜΗ ΤΟΥ BUPROPION

Το φάσμα μαζών του bupropion είναι το παρακάτω :



ΕΙΚΟΝΑ 6.2 ΤΟ ΦΑΣΜΑ ΜΑΖΩΝ ΤΟΥ BUPROPION

Όλα τα ιόντα που φαίνονται πρέπει να ερμηνευτούν, παρόλα ταύτα κάποιες μικρές κορυφές ενδέχεται να αποτελούν θόρυβο του φασματομέτρου. Για παράδειγμα, αφού το μοριακό βάρος του bupropion είναι 239, το ιόν 281 είναι μάλλον θόρυβος. Για την ερμηνεία του φάσματος αναζητούμε καταρχήν (εάν υπάρχει) την κορυφή του μοριακού ιόντος M^+ . Από τη στιγμή που αυτή δεν υπάρχει, αναζητούμε την κορυφή $M^+ -15$, που αντιστοιχεί στο bupropion που έχει χάσει μια μεθυλο-ομάδα. Στη γενική περίπτωση, το ιόν $M^+ -15$ εμφανίζεται σχεδόν πάντα στα φάσματα μαζών και η παρουσία του είναι απαραίτητη για την ταυτοποίηση της χημικής δομής μιας ουσίας. Πράγματι, είναι εμφανής η παρουσία του ιόντος 224 ($=239-15$). Όλα τα υπόλοιπα βασικά θραύσματα εξηγούνται στην εικόνα 6.3, που είναι το αποτέλεσμα της ανάλυσης με το MSC Pro.



ΕΙΚΟΝΑ 6.3 ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΟΥ ΦΑΣΜΑΤΟΣ ΜΑΖΩΝ ΤΟΥ BUPROPION

Μετά την ικανοποιητική εξήγηση του φάσματος του bupropion, πρέπει να γίνει παραγωγοποίησή του και ερμηνεία του φάσματος της παραγωγοποιημένης ουσίας για την πλήρη επιβεβαίωση της δομής. Όμως, ελεύθερο υδροξύλιο δεν υπάρχει παρά μόνο αυτό του αζώτου, που όμως είναι δύσκολο να δεχθεί την ομάδα παραγωγοποίησης λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης από τα γειτονικά μεθύλια. Παρόλα αυτά επιχειρήθηκε η παραγωγοποίηση με το αντιδραστήριο MSTFA, αλλά το φάσμα μαζών που παρουσιάστηκε ήταν ταυτόσημο με το μη παραγωγοποιημένο. Έτσι, αποδείχθηκε ότι η ουσία αυτή δεν μπορεί να παραγωγοποιηθεί, οπότε η ταυτοποίηση της δομής της θα γίνει και μέσω της ταυτοποίησης της δομής των μεταβολιτών της.

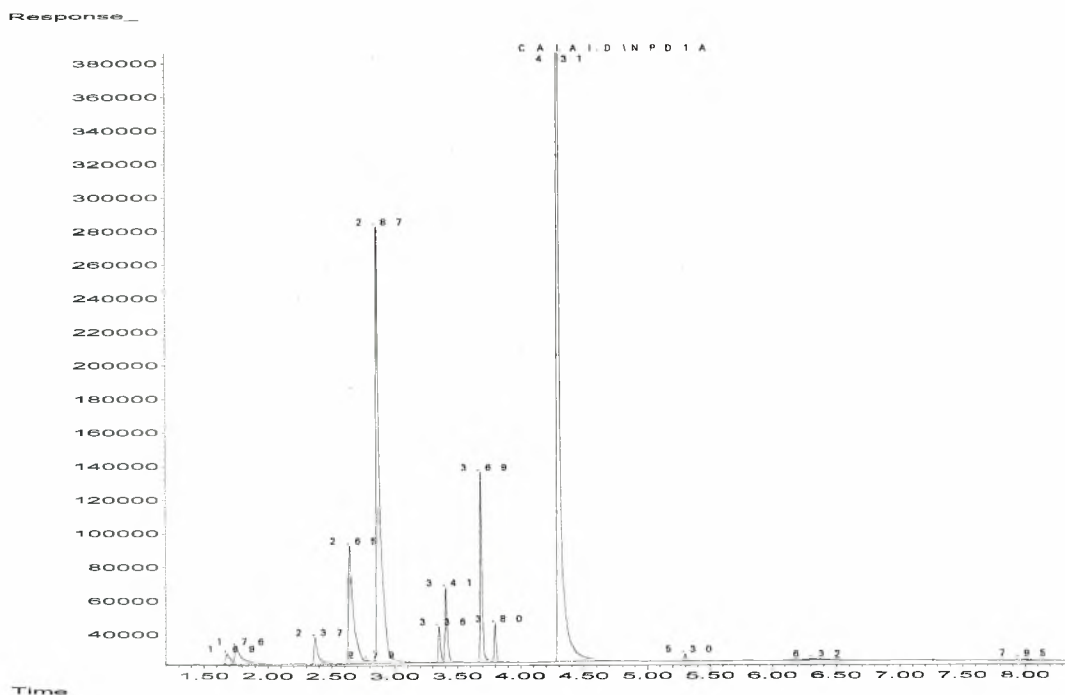
6.3 ΠΕΙΡΑΜΑ ΔΕΥΤΕΡΟ : ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΚΟΡΥΦΩΝ ΤΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΤΟΥ BUPROPION

Η μελέτη των χρωματογραφικών χαρακτηριστικών των μεταβολιτών του bupropion είναι ασφαλώς πιο πολύπλοκη διαδικασία, δεδομένου ότι οι μεταβολίτες δεν υπάρχουν σε καθαρή μορφή (όπως η μητρική ουσία που υπήρχε σε μορφή χαπιού). Είναι βέβαιο ότι όλοι οι μεταβολίτες θα απεκκριθούν στα ούρα του εθελοντή που έκανε το μεταβολικό πείραμα, ωστόσο είναι άγνωστο σε ποιο από τα τελικά δείγματα ούρων θα υπάρχει υψηλή συγκέντρωση όλων των μεταβολιτών. (υπάρχουν τρεις μεταβολίτες με βάση τη

βιβλιογραφία). Έτσι, και τα 17 δείγματα ούρων θα αναλυθούν αρχικά στον αέριο χρωματογράφο με στόχο **A)** τον εντοπισμό τριών καθαρών κορυφών, που θα αντιστοιχούν σε καθένα από τους τρεις μεταβολίτες. **B)** την επιλογή του μεταβολικού δείγματος με τις υψηλότερες και ευκρινέστερες κορυφές, το οποίο θα χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια των πειραμάτων.

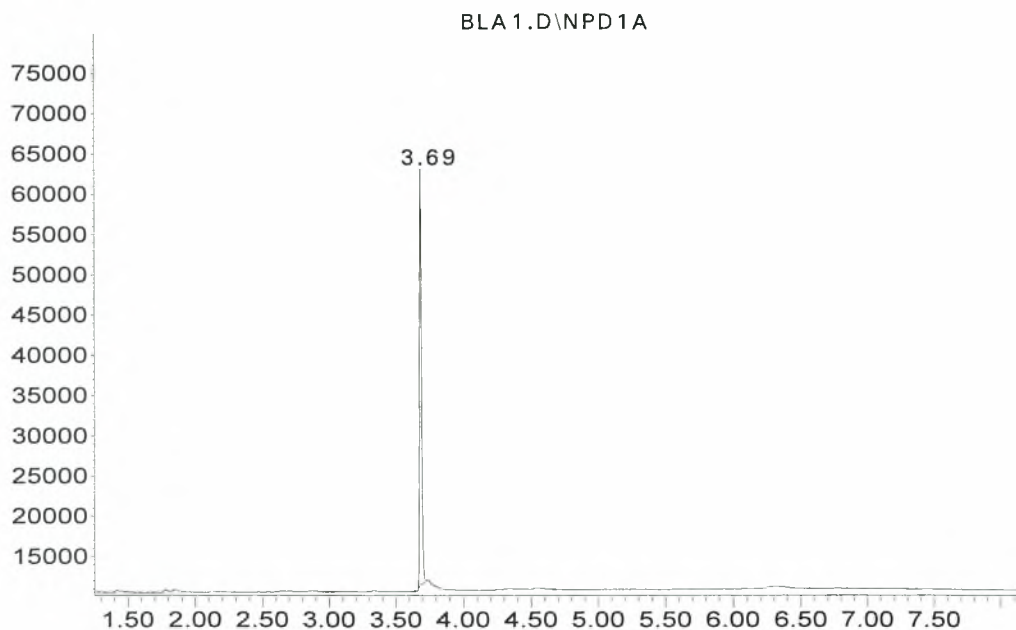
Επειδή από τη βιβλιογραφία υπάρχει η πληροφορία ότι το *hyrgrion* και οι μεταβολίτες του απεκκρίνονται ασύζευκτοι στα ούρα, κατά το παρασκευαστικό στάδιο δεν γίνεται υδρόλυση, δηλαδή ακολουθείται η παρασκευαστική πορεία 1 και όχι η 2.

Αρχικά, τα 17 δείγματα ούρων του μεταβολικού πειράματος ξεπαγώνουν και μέρος αυτών χρησιμοποιείται για ανάλυση. Η πορεία 1 εφαρμόζεται κατά γράμμα με τη διαφορά ότι σαν διάλυμα οργανικής φάσης χρησιμοποιείται διαιθυλαιθέρας (3mL) αντί του τριτοταγή βουτυλο-μεθυλο-αιθέρα, γιατί ο πρώτος είναι πιο πτητικός και θα εξατμιστεί ταχύτερα στη συνέχεια, όταν χρειαστεί να γίνει μερική εξάτμιση του διαλύτη πριν το δείγμα μπει στο φασματόμετρο μαζών. Σε πρώτη φάση δεν γίνεται παραγωγοποίηση, και τα δείγματα εισέρχονται στον αέριο χρωματογράφο. Τα χρωματογραφήματα που προκύπτουν εμφανίζουν τις αναμενόμενες κορυφές, αλλά οι πιο ευκρινείς κορυφές παρατηρούνται στα δείγματα KYP2 (το δεύτερο από τα 17) και KYP3. Στις εικόνες 6.4 και 6.5 φαίνονται τα χρωματογραφήματα του μίγματος ελέγχου (CAL) και του BLANK, στο οποίο φαίνεται η κορυφή του εσωτερικού προτύπου που είναι διφαινυλαμίνη, και στην εικόνα 6.6 φαίνεται το χρωματογράφημα του μεταβολικού δείγματος KYP2.



ΕΙΚΟΝΑ 6.4 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑ ΤΟΥ CALA

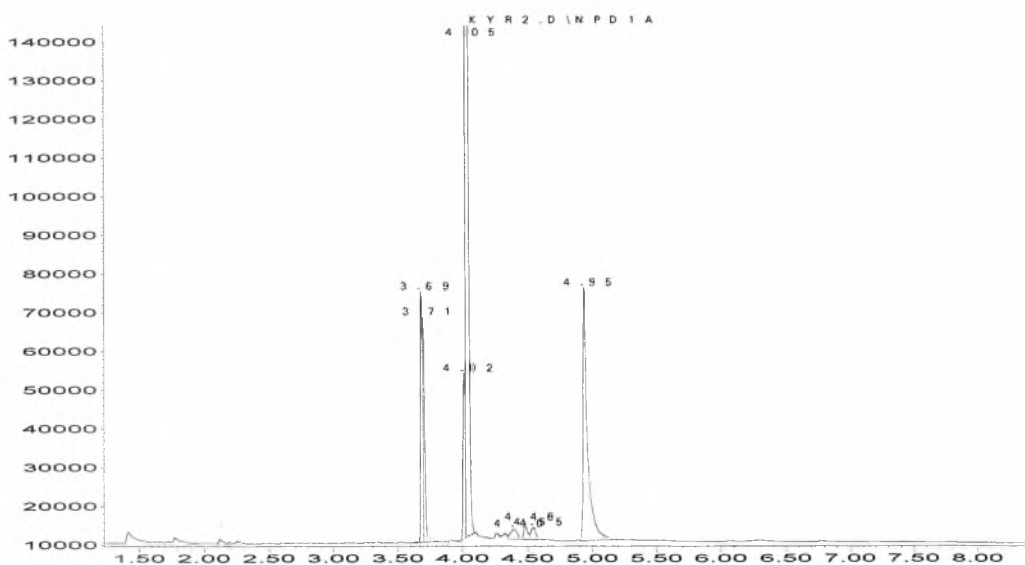
Response_



Time

ΕΙΚΟΝΑ 6.5 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑ ΤΟΥ BLANK

Response_



Time

ΕΙΚΟΝΑ 6.6 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑ ΤΟΥ KYP2

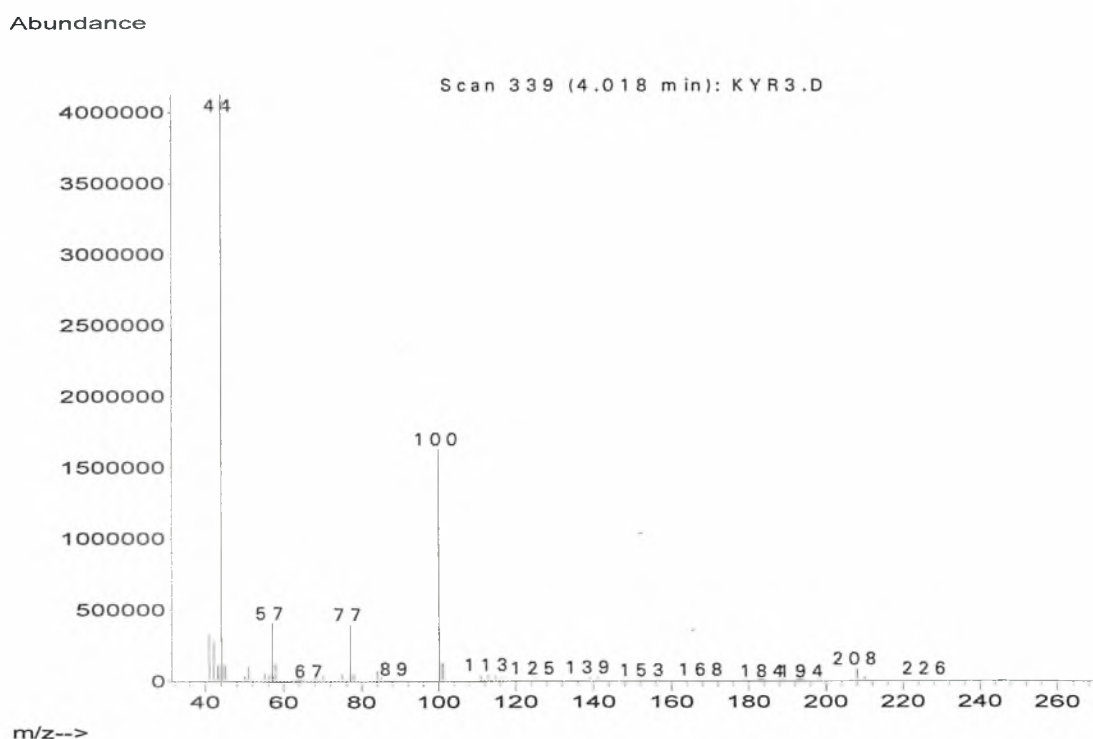
Στο χρωματογράφημα του δείγματος KYP2 παρατηρούνται αρκετές ευκρινείς κορυφές. Είναι πιθανόν πως το γεγονός ότι οι συγκεκριμένες ουσίες παρουσιάζουν τόσο ευκρινείς κορυφές χωρίς να παραγωγοποιηθούν οφείλεται στο μικρό τους μοριακό βάρος, που συνεπάγεται αυξημένη πτητικότητα. Η κορυφή που εμφανίζεται σε χρόνο 3,69 λεπτά αντιστοιχεί στο εσωτερικό πρότυπο, όπως φαίνεται από το χρωματογράφημα του BLANK. Η κορυφή που εμφανίζεται σε χρόνο 3,71 αντιστοιχεί στην κορυφή του ίδιου

του bupropion, του οποίου ο χρόνος ανάσχεσης είχε υπολογιστεί από το προηγούμενο πείραμα και ήταν ήδη γνωστός. Οι κορυφές 4,05 και 4,02 (μεταβολίτες M1 και M2) ενδεχομένως να ανήκουν στους δύο στερεοϊσομερείς μεταβολίτες του bupropion, ερυθρο- και θρεο- υδροbupropion, ενώ η κορυφή 4,95 (μεταβολίτης M3) ενδεχομένως να ανήκει στον τρίτο μεταβολίτη, υδροξυ – bupropion.

6.4 ΠΕΙΡΑΜΑ ΤΡΙΤΟ : ΛΗΨΗ ΤΩΝ ΦΑΣΜΑΤΩΝ ΜΑΖΩΝ ΤΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΤΟΥ BUPROPION

Μετά την ανίχνευση των τριών κορυφών των μεταβολιτών ακολουθεί η ανάλυση των φασμάτων μαζών τους. Πριν όμως πρέπει να μειωθεί ο όγκος του διαλύτη, κάτι που συμβαίνει με μερική εξάτμιση, όπως προαναφέρθηκε.

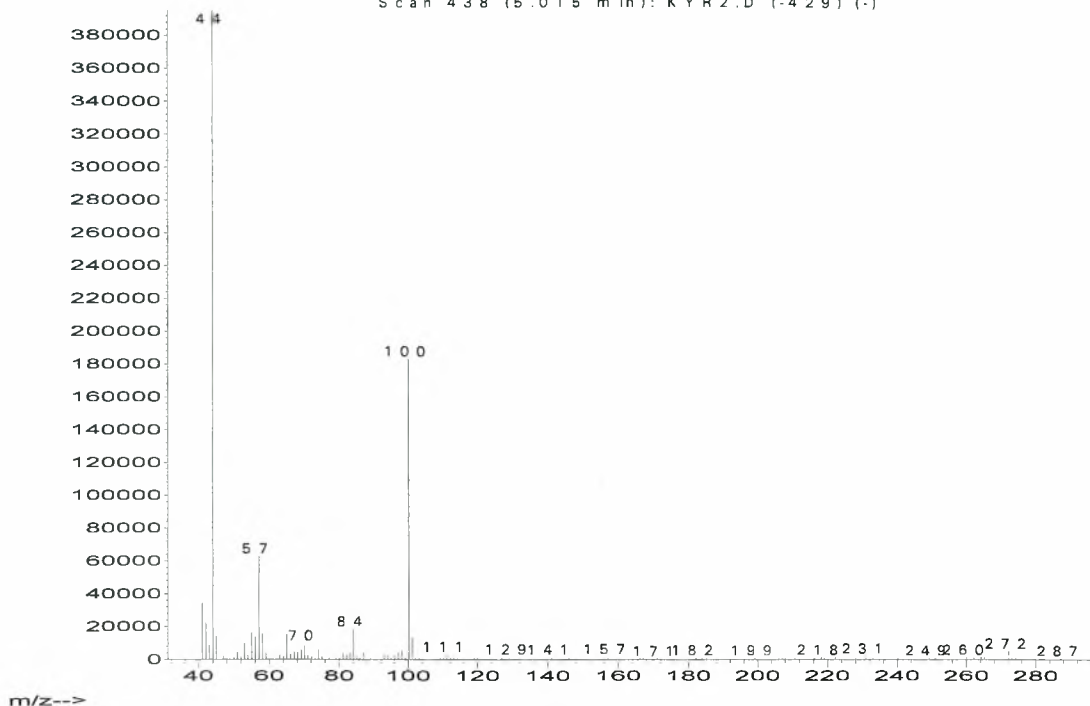
Από τα φάσματα μαζών που λαμβάνονται μετά την ανάλυση των δειγμάτων στο φασματομέτρο μαζών, επιλέγονται ως πιο “καθαρά” (μικρότερο επίπεδο θορύβου) αυτά του KYR3 για τους μεταβολίτες M1 και M2, ενώ για το μεταβολίτη M3 επιλέγεται ως πιο “καθαρό” το φάσμα που εμφανίζεται στο δείγμα KYR2. Τα φάσματα μαζών φαίνονται στις εικόνες 6.7 και 6.8. Επειδή δεν έχει ακόμα αποδειχτεί ότι ανήκουν στους συγκεκριμένους μεταβολίτες, αναφέρονται σαν πιθανά φάσματα των μεταβολιτών αυτών.



ΕΙΚΟΝΑ 6.7 ΦΑΣΜΑ ΜΑΖΩΝ ΤΩΝ ΜΗ ΠΑΡΑΓΩΓΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ M1, M2 (ΠΙΘΑΝΟ ΦΑΣΜΑ ΜΑΖΑΣ ΤΟΥ ΕΡΥΘΡΟ- Η ΘΡΕΟ- ΥΔΡΟΒUPROPION)

Abundance

Scan 438 (5.015 min): KYR2.D (-429) (-)



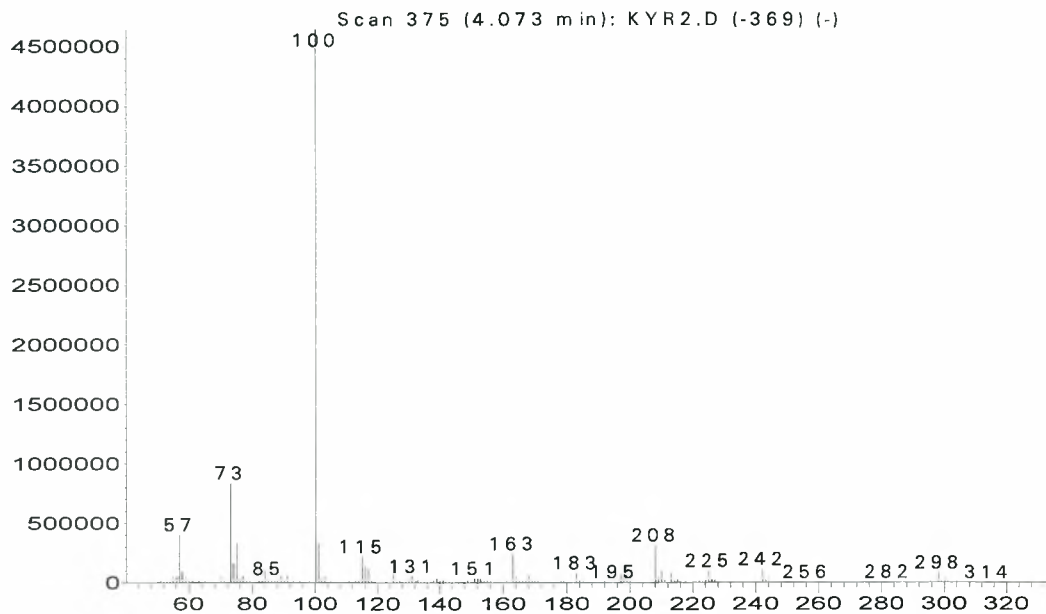
ΕΙΚΟΝΑ 6.8 ΦΑΣΜΑ ΜΑΖΩΝ ΤΟΥ ΜΗ ΠΑΡΑΓΩΓΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ Μ3 (ΠΙΘΑΝΟ ΦΑΣΜΑ ΜΑΖΑΣ ΤΟΥ ΥΔΡΟΞΥ-BUPROPION)

Η ερμηνεία αυτών των φασμάτων περιγράφεται στο υποκεφάλαιο 6.5.

6.5 ΠΕΙΡΑΜΑ ΤΕΤΑΡΤΟ : ΠΑΡΑΓΩΓΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΤΟΥ BUPROPION

Τα ίδια δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στο προηγούμενο πείραμα εξατμίζονται με ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού και τα μικρά γυάλινα σωληνάκια (inserts) έχουν μόνο τη διαλυμένη ουσία στα τοιχώματά τους (η χρήση των ίδιων δειγμάτων του προηγούμενου πειράματος είναι δυνατή, αφού για την ανάλυση στο GC – MS χρησιμοποιείται ποσότητα μόλις 1 μL). Έπειτα προστίθεται στα inserts αντιδραστήριο παραγωγοποίησης MSTFA (100 μL) και ακολουθεί επώαση στους 80 $^{\circ}\text{C}$ για 10 λεπτά. Έπειτα προστίθεται αντιδραστήριο παραγωγοποίησης MBTFA (30 μL) και η επώαση γίνεται στην ίδια θερμοκρασία για 5 λεπτά. Η διαδικασία αυτή εφαρμόζεται μόνο για τα δείγματα KYP 2 και KYP 3, των οποίων η ανάλυση αποδίδει πιο ξεκάθαρα αποτελέσματα. Τα φάσματα μαζών των παραγωγοποιημένων τριών μεταβολιτών που εμφανίζονται μετά την ανάλυση φαίνονται στις εικόνες 6.9, 6.10 και 6.11.

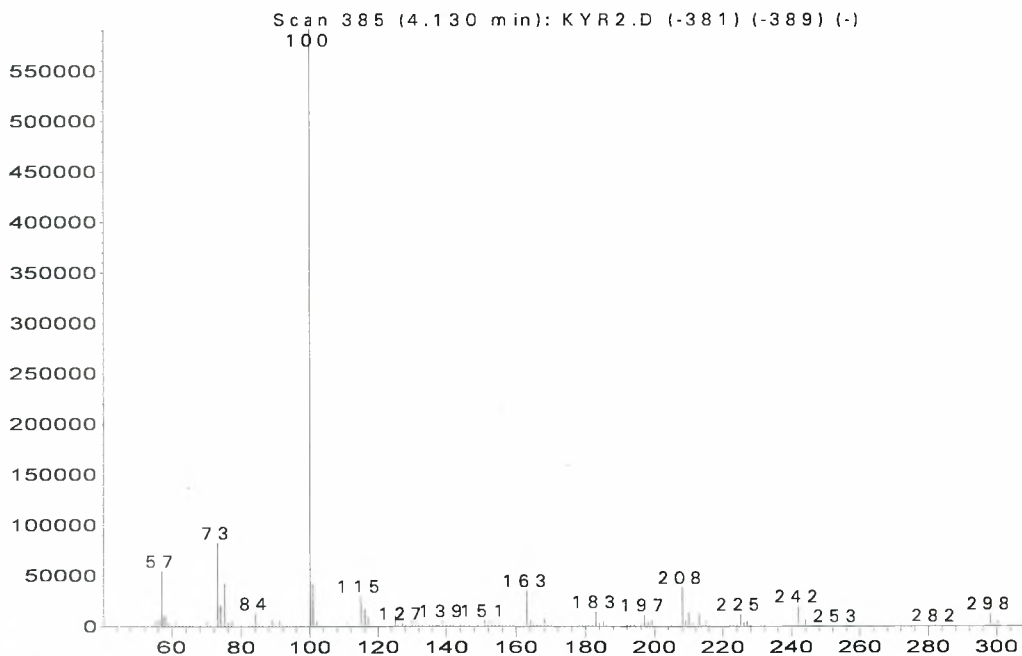
Abundance



m/z-->

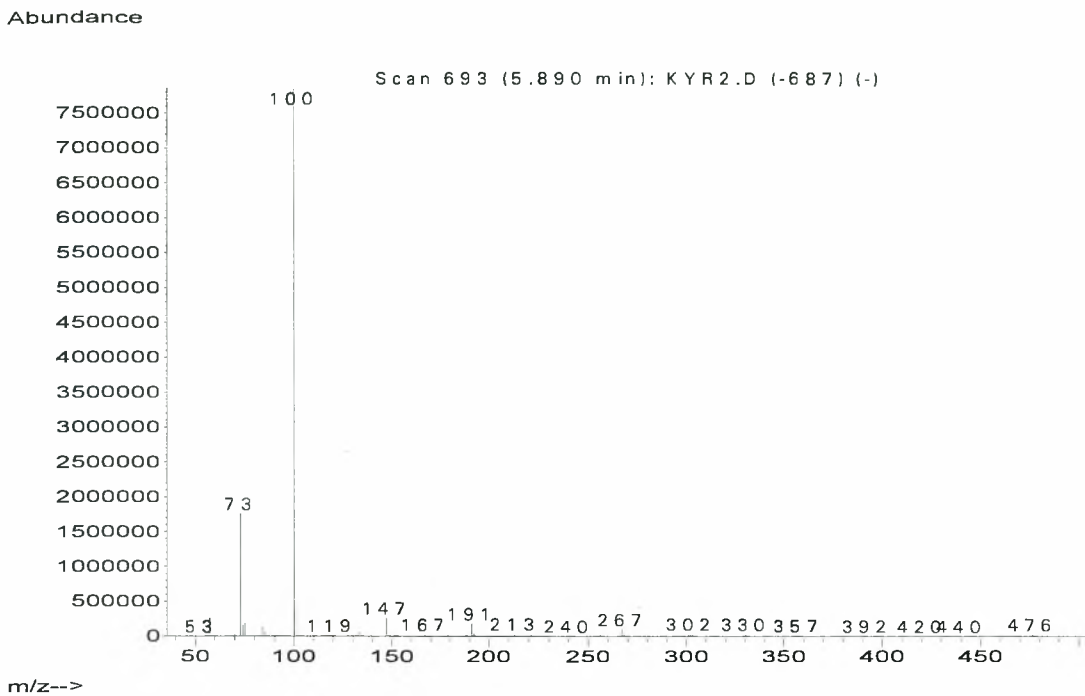
ΕΙΚΟΝΑ 6.9 ΦΑΣΜΑ ΜΑΖΩΝ ΤΟΥ Μ1-TMS (ΠΙΘΑΝΟ ΦΑΣΜΑ ΜΑΖΩΝ ΤΟΥ ΕΡΥΘΡΟ- Η ΘΡΕΟ- ΥΔΡΟΒΥΡΟΡΙΟΝ-TMS)

Abundance



m/z-->

ΕΙΚΟΝΑ 6.10 ΦΑΣΜΑ ΜΑΖΩΝ ΤΟΥ Μ2-TMS (ΠΙΘΑΝΟ ΦΑΣΜΑ ΜΑΖΩΝ ΤΟΥ ΕΡΥΘΡΟ- Η ΘΡΕΟ- ΥΔΡΟΒΥΡΟΡΙΟΝ-TMS)



m/z-->

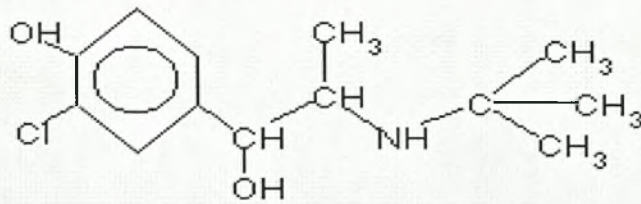
ΕΙΚΟΝΑ 6.11 ΦΑΣΜΑ ΜΑΖΩΝ ΤΟΥ M3-TMS (ΠΙΘΑΝΟ ΦΑΣΜΑ ΜΑΖΩΝ ΤΟΥ ΥΔΡΟΞΥ-ΒΥΠΡΟΡΙΟΝ-TMS)

Η μοναδική προσθετική ομάδα που συζεύγνεται με τους μεταβολίτες είναι η TMS. Η ομάδα TFA συνήθως αντιδρά με το ενεργό υδρογόνο ενός αζώτου, αλλά στη συγκεκριμένη περίπτωση αυτό είναι αδύνατον λόγω στεreoχημικής παρεμπόδισης από τις τρεις γειτονικές μεθυλο-ομάδες.

Αξίζει να σημειωθεί ότι μετά την παραγωγοποίηση οι μεταβολίτες M1 και M2 διαχωρίζονται λίγο καλύτερα στο χρωματογράφημα, γεγονός που αποτελεί ένδειξη ότι οι M1 και M2 είναι ισομερείς μορφές. Άλλωστε η υπόθεση αυτή μετατρέπεται σε βεβαιότητα μετά την παρατήρηση των φασμάτων μαζών των δύο ουσιών, τα οποία είναι πανομοιότυπα. Πάντως, για την επιβεβαίωση της δομής του μεταβολίτη επιλέγεται η χρήση του φάσματος του M1, επειδή σε αυτό το φάσμα εμφανίζεται (στην παραγωγοποιημένη μορφή) και το μοριακό ιόν. Άλλωστε ο M1 στο χρωματογράφημα εμφανίζει υψηλότερη κορυφή από τον M2.

Μετά τη λήψη των φασμάτων των παραγωγοποιημένων μεταβολιτών μπορεί να αρχίσει η διαδικασία ταυτοποίησης με τη βοήθεια του προγράμματος MSC Pro. (η αδιαμφισβήτητη επιβεβαίωση της δομής μπορεί να γίνει εφόσον ερμηνευτούν τα φάσματα τόσο του παραγωγοποιημένου όσο και του μη παραγωγοποιημένου μεταβολίτη)

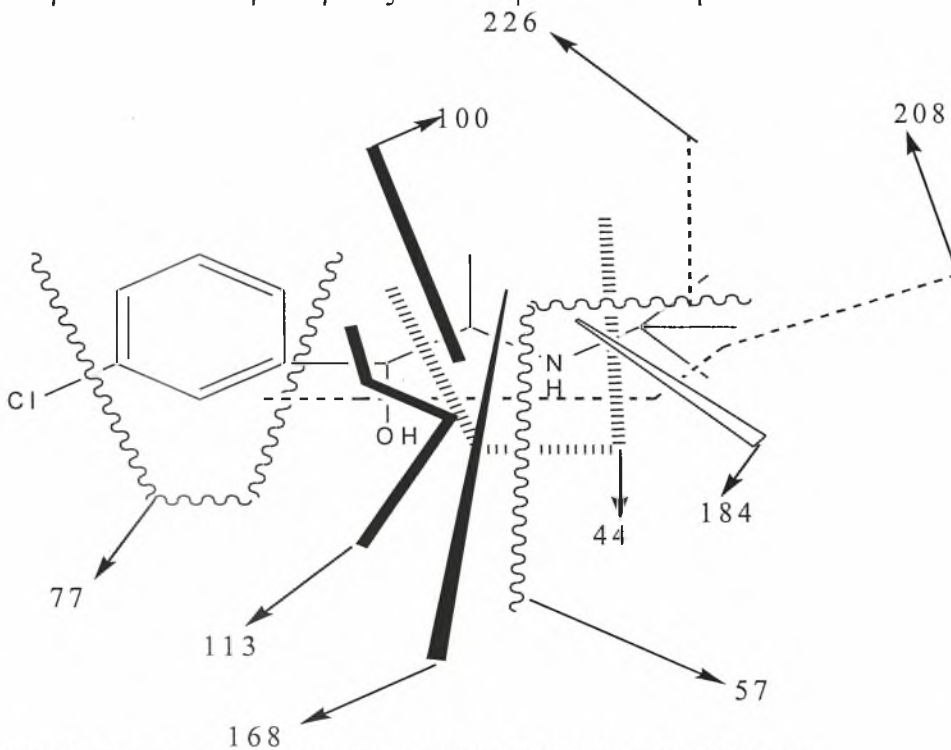
Η δομή του προτεινόμενου από τη βιβλιογραφία M1 (άρα και του ισομερούς M2) φαίνεται στην εικόνα 6.12. να σημειωθεί ότι είναι άγνωστο εάν ο μεταβολίτης M1 είναι η ερυθρο- ή η θρεο- μορφή του υδροβυπρορίον. Ως M1 ονομάσαμε αυθαίρετα το μεταβολίτη που εμφανίζει την υψηλότερη χρωματογραφική κορυφή σε σύγκριση με το ισομερές του, και αυτόν θα μελετήσουμε λόγω του καθαρότερου φάσματος μαζών που παρουσιάζει.



ΕΙΚΟΝΑ 6.12 ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΕΡΥΘΡΟ- Η ΘΡΕΟ- ΥΔΡΟΒΥΡΟΠΡΙΟΝ (ΠΙΘΑΝΗ ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ M1, M2)

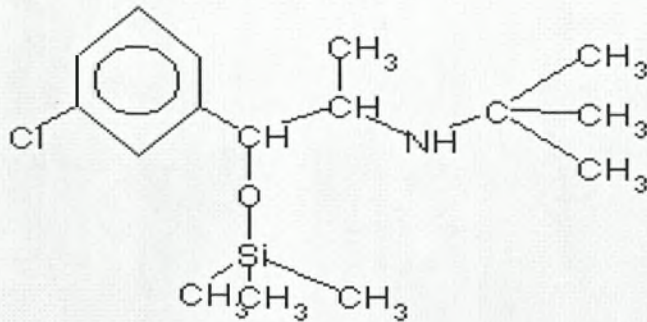
Καταρχήν θα γίνει σύγκριση των θραυσμάτων του μη παραγωγοποιημένου μεταβολίτη, όπως εμφανίζονται στο φάσμα μαζών, με τα δυνατά θραύσματα όπως εμφανίζονται στο πρόγραμμα.

Είναι πολύ βασικό ότι στο φάσμα εμφανίζεται η κορυφή 226 (=241-15), που αντιστοιχεί στο ιόν που προκύπτει όταν από το μοριακό ιόν αποκοπεί μια μεθυλομάδα. (το μοριακό βάρος του M1 είναι 241). Και τα υπόλοιπα θραύσματα όμως δικαιολογούνται. Τα κυριότερα εξ' αυτών φαίνονται στην εικόνα 6.13.



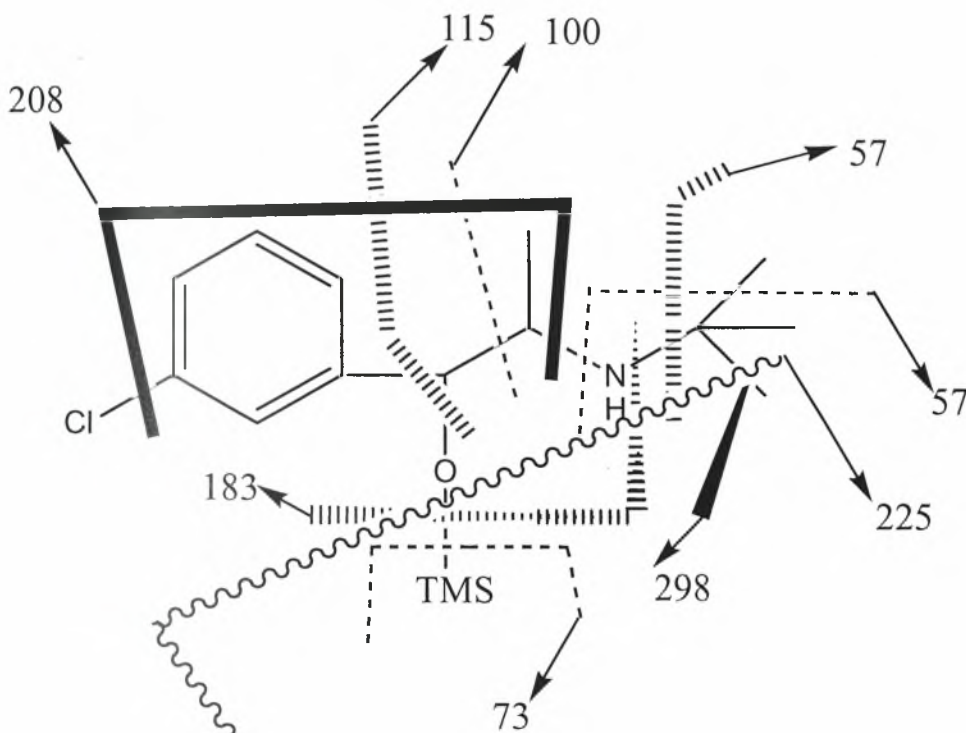
ΕΙΚΟΝΑ 6.13 ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΟΥ ΦΑΣΜΑΤΟΣ ΜΑΖΩΝ ΤΟΥ M1

Η δομή του παραγωγοποιημένου μεταβολίτη φαίνεται στην εικόνα 6.14 και αποτελεί το αποτέλεσμα της προσθήκης μιας ομάδας TMS στο υδροξύλιο του μορίου.



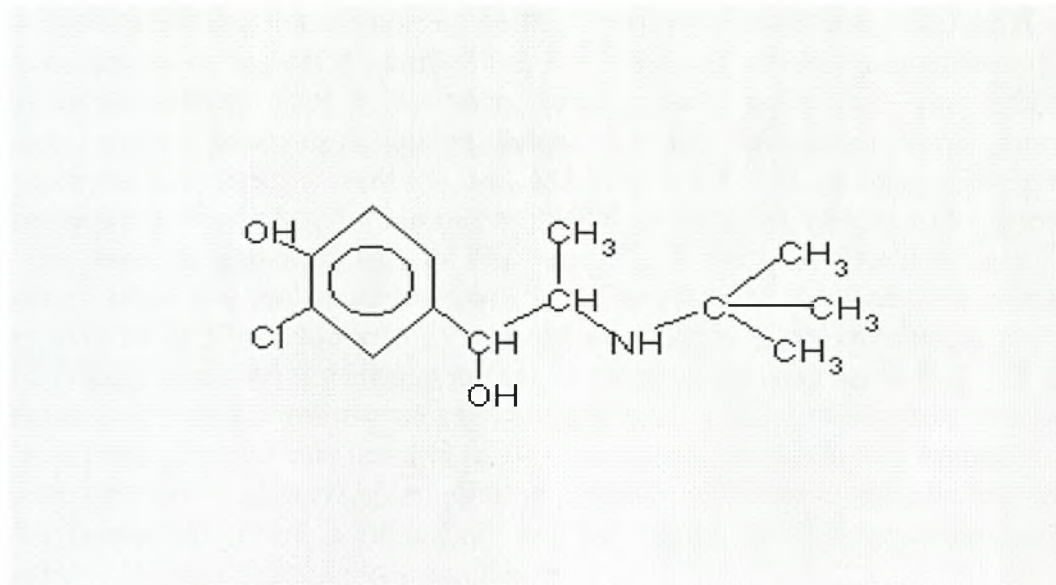
ΕΙΚΟΝΑ 6.14 ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΕΡΥΘΡΟ- Η ΘΡΕΟ- ΥΔΡΟΒΥΡΟΠΙΟΝ-TMS (ΠΙΘΑΝΗ ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ M1-TMS, M2-TMS)

Η προσθήκη της TMS ομάδας αυξάνει το μοριακό βάρος της ουσίας στο 313. Η ύπαρξη της πολύ μικρής κορυφής 314 μπορεί να φαίνεται περίεργη αλλά μάλλον οφείλεται σε θόρυβο ενώ δίπλα της υπάρχει μια λίγο μικρότερη κορυφή που αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν (313) και δεν φαίνεται σε αυτό το σχήμα. Η ύπαρξη πάντως του ιόντος $M^+ -15$ (298) είναι σημαντική. Τα υπόλοιπα θραύσματα εξηγούνται στην εικόνα 6.15.



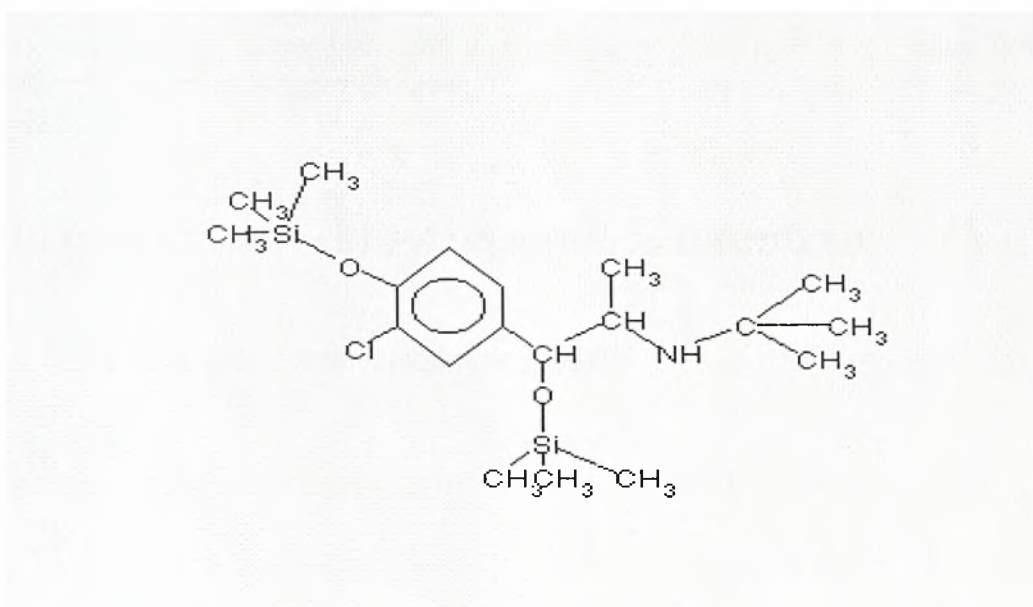
ΕΙΚΟΝΑ 6.15 ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΦΑΣΜΑΤΟΣ ΜΑΖΩΝ ΤΟΥ M1-TMS

Η δομή του μεταβολίτη M3 (υδροξυ-bupropιον) όπως δίδεται από τη βιβλιογραφία φαίνεται στην εικόνα 6.16.



ΕΙΚΟΝΑ 6.16 ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΥΔΡΟΞΥ- BUPROPION (ΠΙΘΑΝΗ ΔΟΜΗ ΤΟΥ M3)

Εντελώς αναπάντεχα, η δομή του τρίτου μεταβολίτη δεν δικαιολογεί τα θραύσματα του φάσματος μαζών.(εικόνα 6.8) Καταρχήν, το μοριακό βάρος του M3 είναι 257, ενώ το μοριακό ιόν που εμφανίζεται στο φάσμα μαζών είναι 287 και η κορυφή αυτή δεν μπορεί να αμφισβητηθεί, καθώς εμφανίζεται και το ιόν $M^+ -15$, δηλαδή το ιόν με μοριακό βάρος 272. Παρόλα αυτά εξετάζεται και το φάσμα του παραγωγοποιημένου M3. Η δομή του παραγωγοποιημένου υδροξυ-bupropιον-DiTMS σύμφωνα με τη βιβλιογραφία φαίνεται στην εικόνα 6.17.



ΕΙΚΟΝΑ 6.17 ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΥΔΡΟΞΥ- BUPROPION-DiTMS (ΠΙΘΑΝΗ ΔΟΜΗ ΤΟΥ M3-DiTMS)

Το μοριακό βάρος του υδροξυ-burporion-DiTMS μεταβολίτη είναι 399, αλλά στο φάσμα μαζών του M3 – TMS (εικόνα 6.11) εμφανίζονται αρκετές κορυφές μεγαλύτερες του μοριακού ιόντος, αλλά και κορυφές ανεξήγητες που δε μπορούν να δημιουργηθούν από τα θραύσματα της προτεινόμενης δομής, όπως η κορυφή που αντιστοιχεί στο ιόν 392. Είναι λοιπόν σαφές ότι ο μεταβολίτης M3 δεν είναι το υδροξυ-burporion-DiTMS. Παρόλα αυτά φαίνεται πως η άγνωστη αυτή χημική ουσία είναι μεταβολίτης του burporion : στη μη παραγωγοποιημένη μορφή της εμφανίζει κάποια βασικά θραύσματα κοινά με αυτά των μεταβολιτών M1 και M2 (ιόντα 100, 57 και 44), φαινόμενο που παρατηρείται και στην παραγωγοποιημένη μορφή με τα ιόντα 100, και 73. Επίσης είναι σαφές ότι περιέχει χλώριο όπως οι M1 και M2. Η ύπαρξη χλωρίου είναι εύκολα ανιχνεύσιμη λόγω των ισοτόπων του : το Cl 35 βρίσκεται σε ποσοστό 75% στις χημικές ενώσεις, ενώ το Cl 37 σε ποσοστό 25%. Αυτό σημαίνει πως για κάθε κορυφή ιόντος με μοριακό βάρος A στο φάσμα μαζών πρέπει να υπάρχει και μια κορυφή A + 2 με ύψος τόσο περίπου όσο το 1/3 του ύψους της κορυφής του ιόντος A. Πράγματι, στα φάσματα μαζών του burporion και των μεταβολιτών του παρατηρούνται τέτοιες κορυφές, αφού το burporion έχει μια ομάδα χλωρίου. Για να επιβεβαιωθεί όμως πλήρως εάν όντως η άγνωστη ουσία M3 είναι μεταβολίτης του burporion, πρέπει να γίνουν και άλλα πειράματα με διαφορετικές παραγωγοποιήσεις.

6.6 ΠΕΙΡΑΜΑ ΠΕΜΠΤΟ : ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ 2 ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΩΓΟΠΟΙΗΣΗ

Το πείραμα αυτό έγινε πριν αναλυθούν τα αποτελέσματα του προηγούμενου πειράματος και είχε σκοπό την επιβεβαίωση της βιβλιογραφικής αναφοράς ότι το burporion και οι μεταβολίτες του απεκκρίνονται ελεύθεροι (μη συζευγμένοι) στα ούρα. Η πορεία 2 εφαρμόστηκε κανονικά και τόσο το χρωματογράφημα όσο και τα φάσματα μαζών ήταν πανομοιότυπα με αυτά της πορείας 1. Το γεγονός ότι δεν εμφανίστηκε καινούριος μεταβολίτης αποδεικνύει τη μη ύπαρξη συζευγμένων μεταβολιτών.

6.7 ΠΕΙΡΑΜΑ ΕΚΤΟ : ΕΠΙΠΛΕΟΝ ΠΑΡΑΓΩΓΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

6.7.1 ΣΚΟΠΟΣ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Οι επιπλέον παραγωγοποιήσεις γίνονται για τους παρακάτω λόγους :

- Για την επιβεβαίωση σε ακόμα μεγαλύτερο βαθμό της δομής του μεταβολίτη

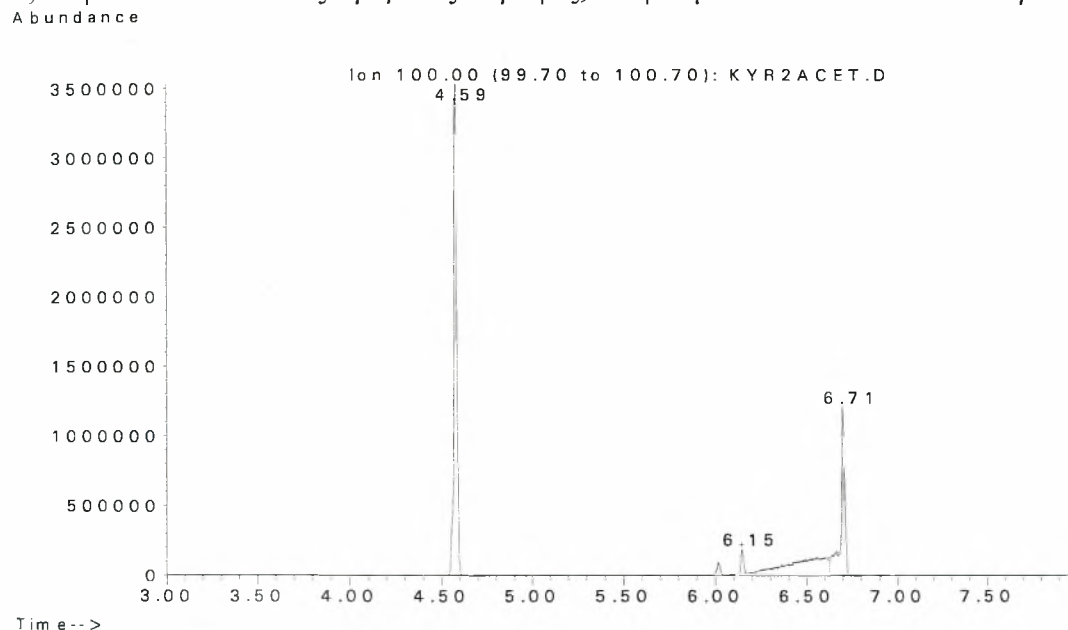
M1

- Γιατί η ανάλυση φασμάτων ακετυλο - παραγώγων και παραγώγων TFAA είναι χρήσιμη για την εφαρμογή του confirmation test
- Για την πιθανή ανεύρεση επιπλέον μεταβολιτών και κυρίως την αναζήτηση του μεταβολίτη υδροξυ – bupropion

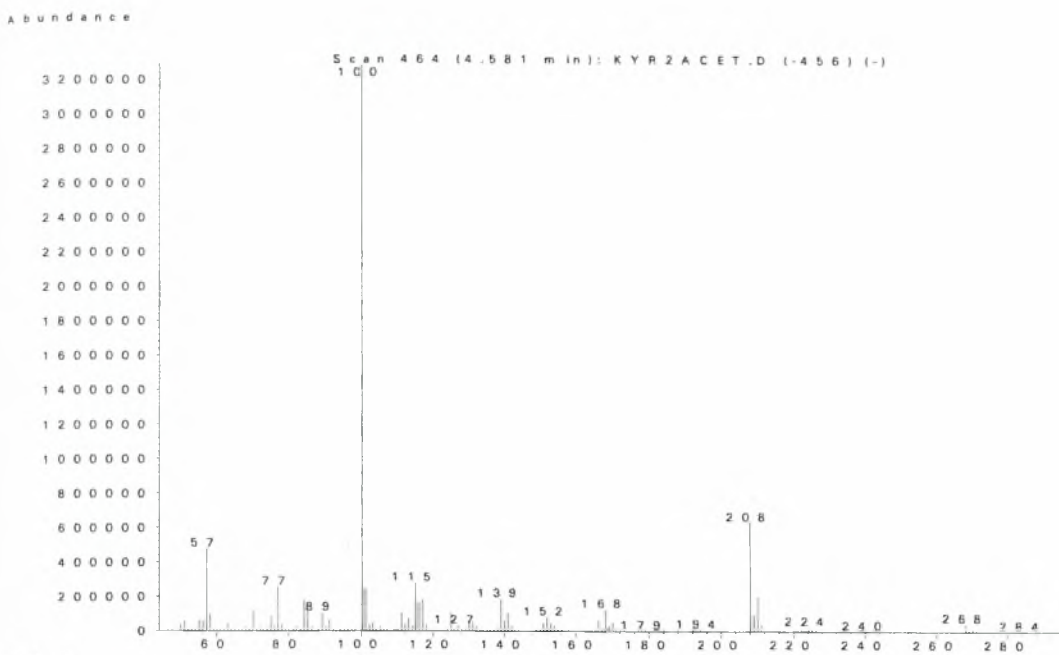
Για τα δείγματα KYP1 – KYP4 εφαρμόζεται η πορεία 1 με τη διαφορά ότι, όπως και στο δεύτερο πείραμα, σαν διάλυμα οργανικής φάσης χρησιμοποιείται διαιθυλαιθέρας (3mL) αντί του τριτοταγή βουτυλο-μεθυλο-αιθέρα. Στο τέλος της πορείας γίνεται παραγωγοποίηση με πυριδίνη, TFAA και MTBSTFA. (η πορεία 1 εφαρμόζεται τρεις φορές για κάθε δείγμα)

6.7.2 ΠΑΡΑΓΩΓΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ΠΥΡΙΔΙΝΗ

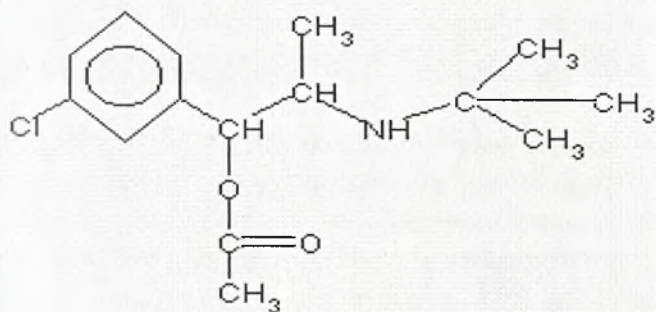
Μετά την εξάτμιση, στα δείγματα προστίθενται 100 μ L πυριδίνης και 100 μ L οξείκου ανυδρίτη. Τα δείγματα θερμαίνονται στο μεταλλόλουτρο για μια ώρα στους 30 $^{\circ}$ C, ακολουθεί εξάτμιση και ανασύσταση (πρόκληση αποκόλλησης των διαλυμένων ουσιών από τα τοιχώματα της κωνικής φιάλης) με 100 μ L οξικού αιθυλεστέρα. Δημιουργούνται ακετυλο-παραγωγα και τα δείγματα εισάγονται στο GC – MS. Στο χρωματογράφημα των ακετυλο – παραγώγων (εικόνα 6.18) φαίνεται καθαρά η κορυφή του M1 (δεν ξεχωρίζει από την M2 λόγω στερεοϊσομέρειας) με χρόνο ανάσχεσης 4,59 , και η κορυφή του άγνωστου μεταβολίτη M3 με χρόνο ανάσχεσης 6,71. Από το 6,00 – 6,50 φαίνονται κάποιες αβέβαιες κορυφές, τα φάσματα των οποίων θα διερευνηθούν.



ΕΙΚΟΝΑ 6.18 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑ ΑΚΕΤΥΛΟ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ

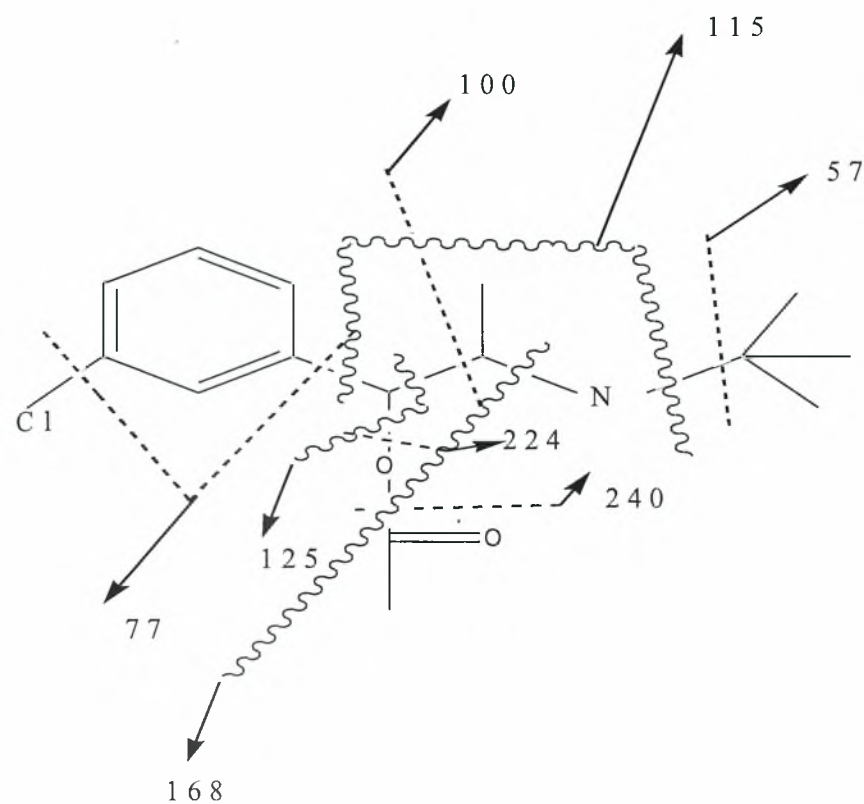


ΕΙΚΟΝΑ 6.19 ΦΑΣΜΑ ΜΑΖΑΣ ΤΟΥ Μ1 ΑΚΕΤΥΛΟ-ΠΑΡΑΓΩΓΟΥ



ΕΙΚΟΝΑ 6.20 ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΑΚΕΤΥΛΟ-ΠΑΡΑΓΩΓΟΥ ΤΟΥ ΕΡΥΘΡΟ- Η ΘΡΕΟ-ΥΔΡΟΒΥΡΡΙΟΝ

Η ερμηνεία του φάσματος του ακετυλο – M1 (εικόνα 6.19) είναι απλή και η δομή του μεταβολίτη αυτού (εικόνα 6.20) επιβεβαιώνεται ακόμα μια φορά. Η κορυφή 268 αντιστοιχεί στο ιόν $M^+ -15$. Η ερμηνεία του φάσματος μαζών φαίνεται στην εικόνα 6.21.

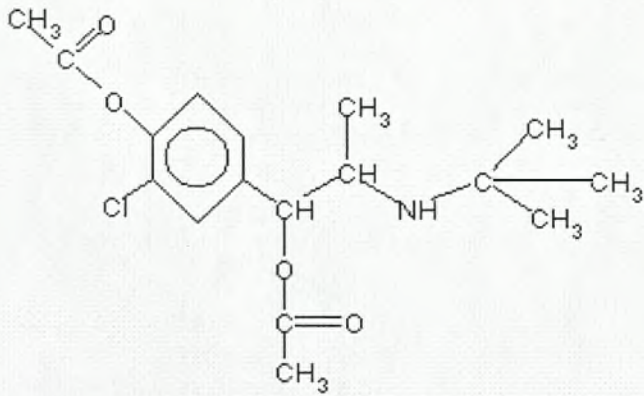


ΕΙΚΟΝΑ 6.21 ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΟΥ ΦΑΣΜΑΤΟΣ ΜΑΖΩΝ ΤΟΥ Μ1 ΑΚΕΤΥΛΟ-ΠΑΡΑΓΩΓΟΥ

Επίσης, η κορυφή του ιόντος 208 αντιστοιχεί στο θραύσμα 224 με αφαίρεση μιας μεθυλομάδας.

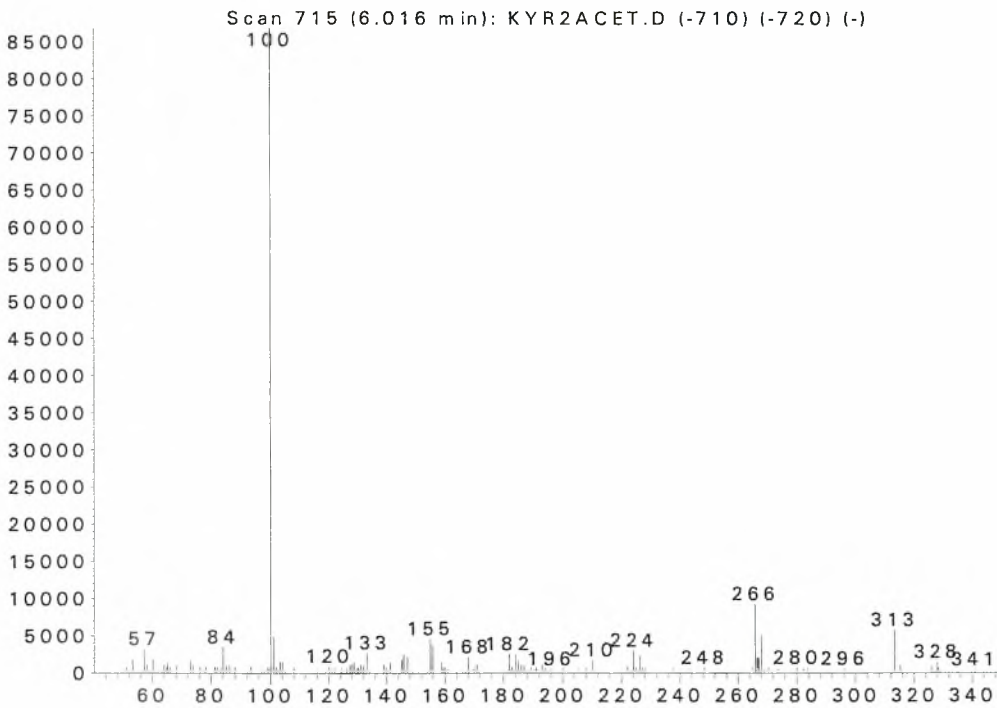
Απλά αναφέρεται ότι, όπως ήταν αναμενόμενο, το φάσμα μαζών του ακετυλ-Μ3 μεταβολίτη δεν μπορούσε να ερμηνεύσει τη δομή του ακετυλο – παραγώγου του υδροξυ – bupropion.

Αφού σχεδιάσαμε τη δομή του ακετυλιομένου υδροξυ – bupropion (εικόνα 6.22) ψάξαμε στις μικρές κορυφές του χρωματογραφήματος (χρόνοι ανάσχεσης 6.00 – 6.50 στην εικόνα 6.18) για τυχόν ανίχνευση ενός φάσματος που θα περιείχε το αντίστοιχο M^+ . Τέτοιες κορυφές ιόντων δεν είχαμε ανιχνεύσει στα φάσματα μαζών των TMS παραγώγων επειδή οι αντίστοιχες χρωματογραφικές κορυφές ήταν πολύ μικρές και ο θόρυβος ήταν πολύ μεγάλος.



ΕΙΚΟΝΑ 6.22 ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΑΚΕΤΥΛΟ-ΥΔΡΟΞΥ-BUPROPION

Abundance

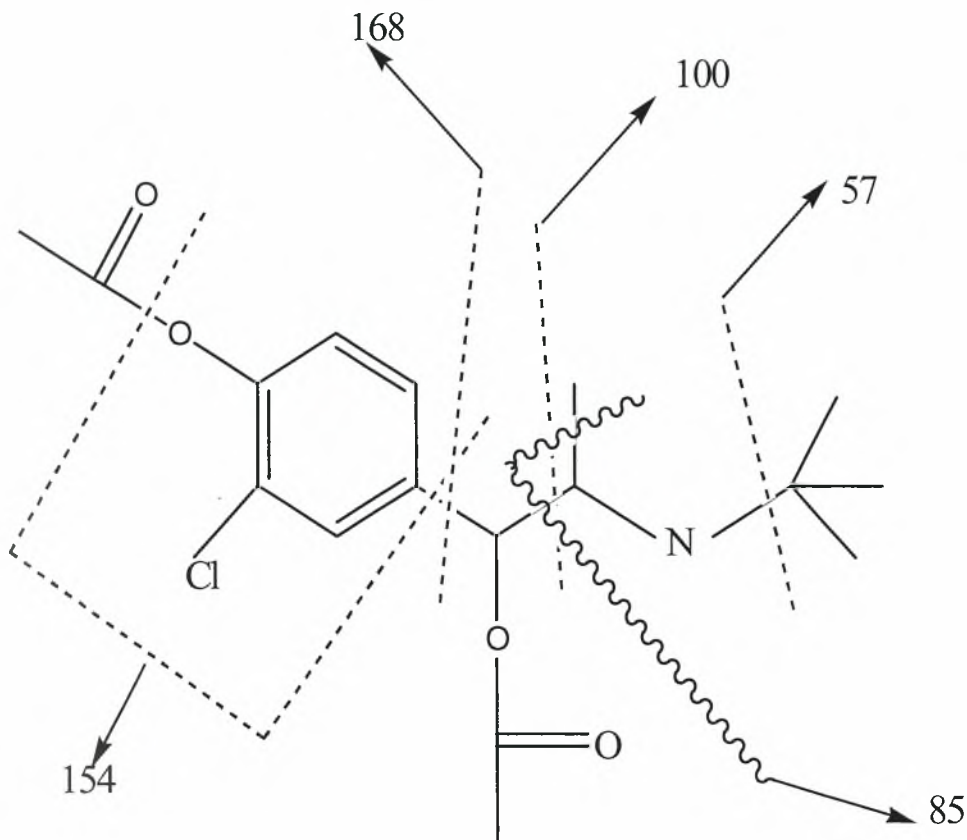


m/z-->

ΕΙΚΟΝΑ 6.23 ΠΙΘΑΝΟ ΦΑΣΜΑ ΜΑΖΩΝ ΤΟΥ ΑΚΕΤΥΛΟ-ΥΔΡΟΞΥ-BUPROPION

Τελικά, και προς ευχάριστη έκπληξη, βρίσκεται ένα φάσμα στο χρόνο 6,016 λεπτά (εικόνα 6.23) που έχει την κορυφή M^+ (341). Λόγω μεγάλου θορύβου πολλές από τις εμφανιζόμενες κορυφές ιόντων δεν ανήκουν στο ακέτυλο – υδροξύ – bupropion και δεν

ερμηνεύονται, κάτι που δυσκολεύει την ταυτοποίηση. Ερμηνεύονται πάντως κάποιες σημαντικές κορυφές.



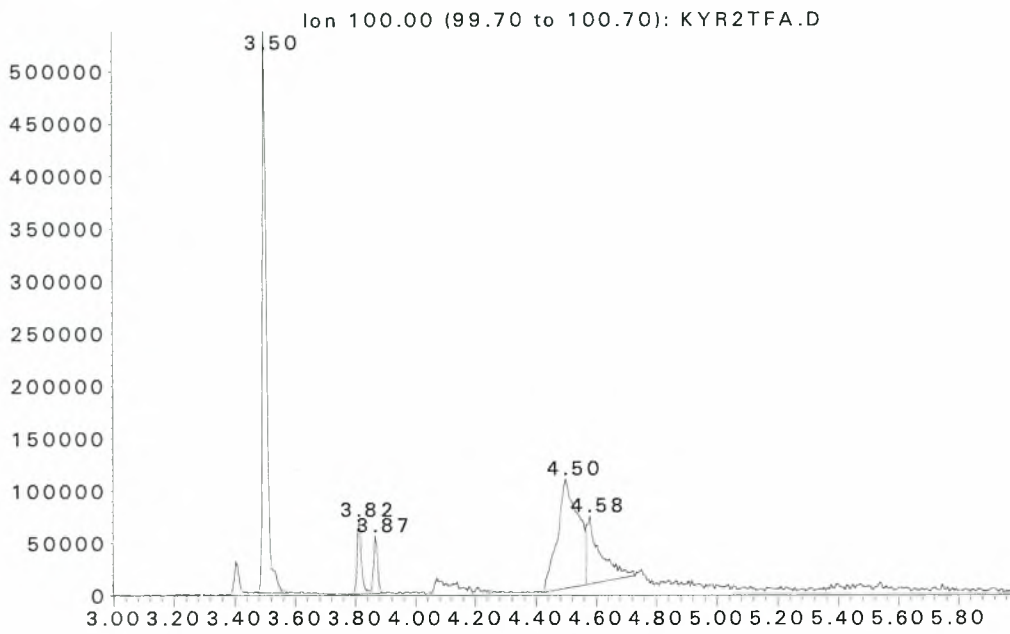
ΕΙΚΟΝΑ 6.24 ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΟΥ ΦΑΣΜΑΤΟΣ ΜΑΖΩΝ ΤΟΥ ΑΚΕΤΥΛΟ-ΥΔΡΟΞΥ-ΒΥΡΟΡΙΟΝ

Ακόμα, η κορυφή 313 προκαλείται από την αποκοπή δύο μεθυλομάδων από το αρχικό μόριο, η κορυφή 224 από την αποκοπή των δύο ομάδων O – CO – CH₃. Για να είμαστε βέβαιοι για την ταυτοποίηση της ουσίας, χρειάζεται η ανάλυση φάσματος μαζών και άλλου ενός παραγώγου του υδροξυ – bupropion.

6.7.3 ΠΑΡΑΓΩΓΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ΤΦΑΑ

Μετά την εξάτμιση, στα δείγματα προστίθενται 50 μL οξικού αιθυλεστέρα και 50 μL αντιδραστηρίου παραγωγοποίησης ΤΦΑΑ. Τα δείγματα τοποθετούνται σε μεταλλόλουτρο στους 60 °C για 20 λεπτά. Τέλος γίνεται ανασύσταση με προσθήκη 100 μL οξικού αιθυλεστέρα και τα δείγματα εισάγονται στο GC – MS. Στο χρωματογράφημα (εικόνα 6.25) φαίνεται η ευδιάκριτη κορυφή του M1-TFA, στο χρόνο 3,50 λεπτά. Η πιθανή κορυφή του υδροξυ-bupropion-TFA είναι χαμηλότερη και εμφανίζεται στο χρόνο 3,866, ενώ στο χρόνο 4,50 – 4,58 εμφανίζεται η κορυφή του άγνωστου μεταβολίτη M3-TFA.

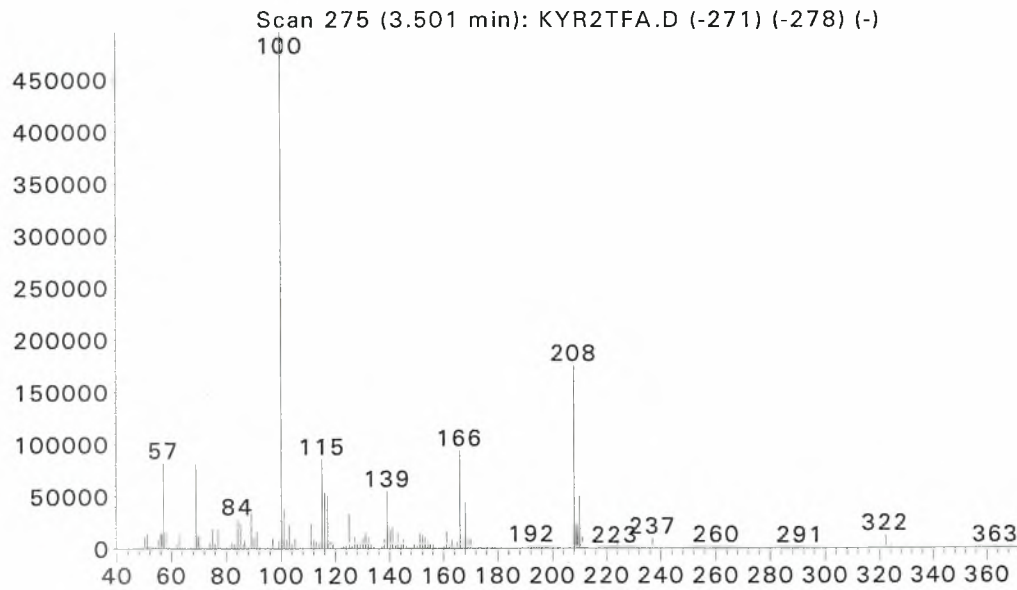
Abundance



Time-->

ΕΙΚΟΝΑ 6.25 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑ ΤΩΝ ΤΡΑ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ

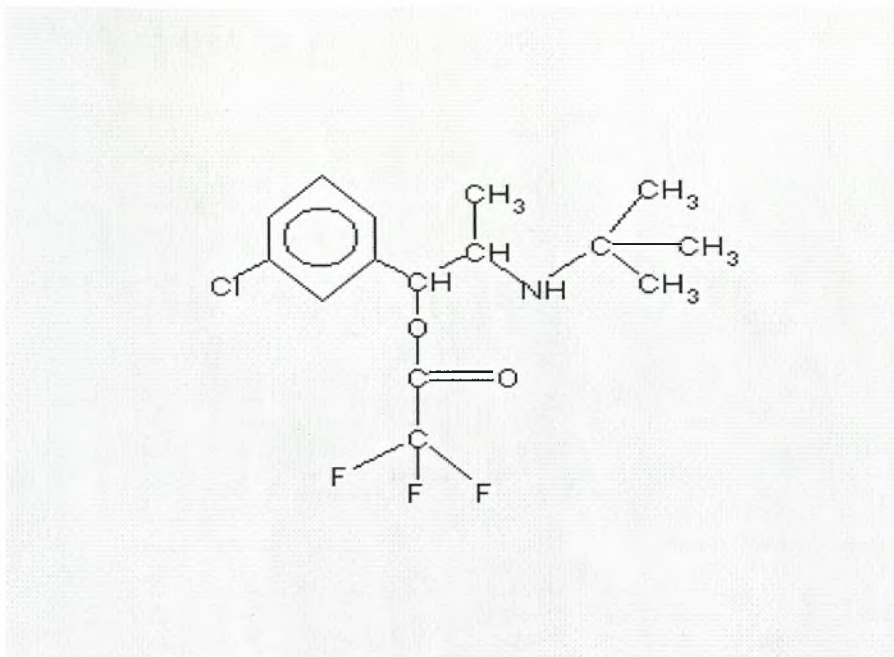
Abundance



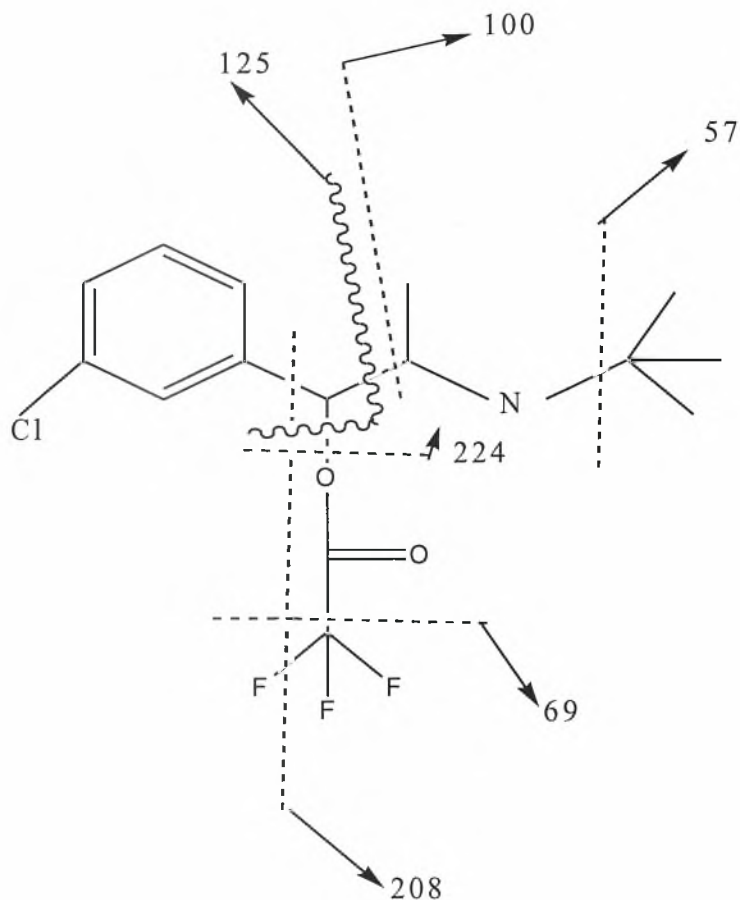
m/z-->

ΕΙΚΟΝΑ 6.26 ΦΑΣΜΑ ΜΑΖΩΝ ΤΟΥ Μ1-ΤΡΑ

Η ερμηνεία του φάσματος μαζών του Μ1-ΤΡΑ παραγώγου φαίνεται στην εικόνα 6.28. ($M^+ - 15 = 322$)



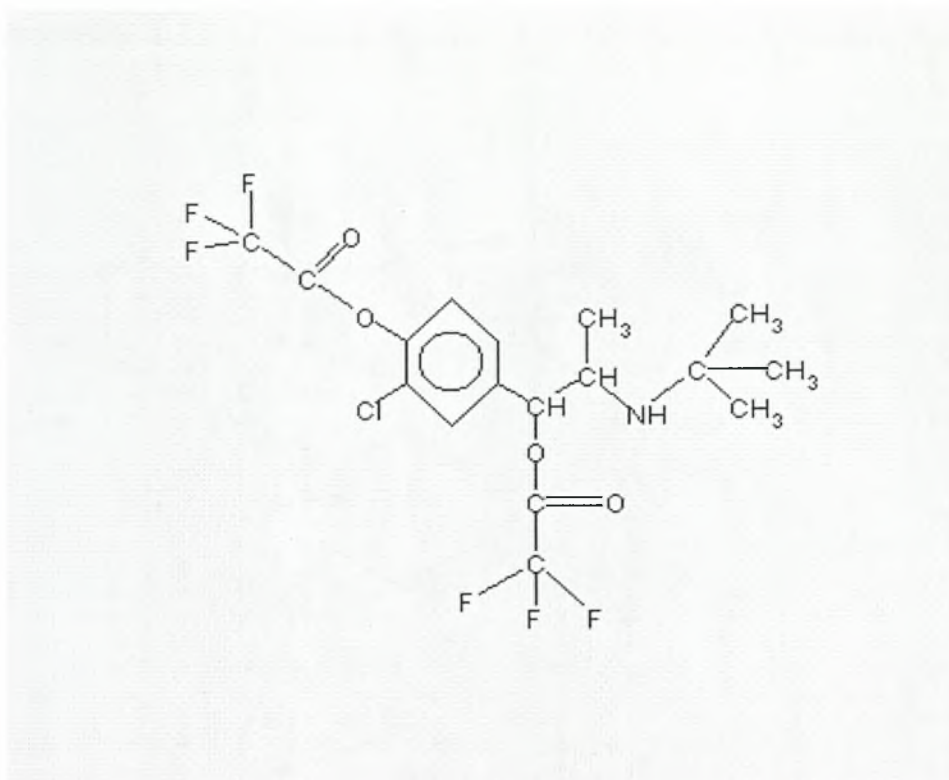
ΕΙΚΟΝΑ 6.27 ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΤΡΑ-ΠΑΡΑΓΩΓΟΥ ΤΟΥ ΕΡΥΘΡΟ- Η ΘΡΕΟ- ΥΔΡΟΒΥΡΟΡΙΟΝ



ΕΙΚΟΝΑ 6.28 ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΟΥ ΦΑΣΜΑΤΟΣ ΜΑΖΩΝ ΤΟΥ Μ1 – ΤΡΑ

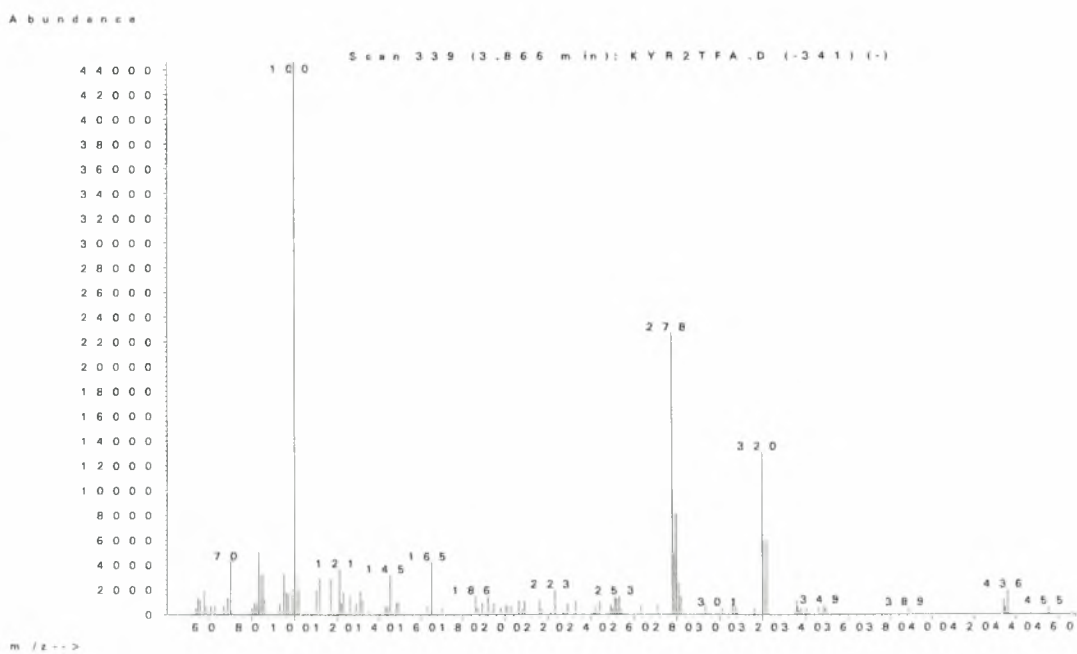
Επίσης, το θραύσμα 166 προκαλείται από την απόσχιση της ομάδας C-(CH₃)₃ από το θραύσμα 224.

Η προς ταυτοποίηση δομή του ΤΡΑ- υδροξυ -bupropion φαίνεται στην εικόνα 6.29.



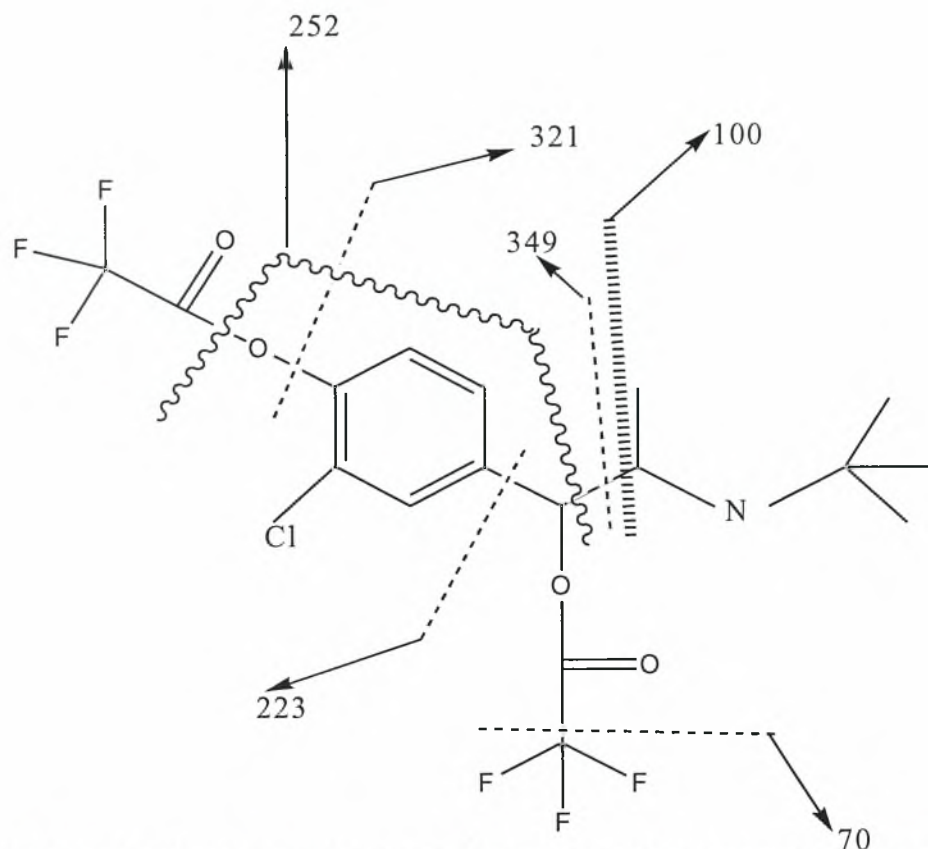
ΕΙΚΟΝΑ 6.29 ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΤΡΑ-ΥΔΡΟΞΥ-BUPROPION

Το ιόν $M^+ - 15$ είναι 436 και ανιχνεύεται μετά από ψάξιμο στην περιοχή του χρωματογραφήματος 3,80 – 3,87. (εικόνα 6.25) Το υποψήφιο φάσμα για την ταυτοποίηση της δομής του ΤΡΑ- υδροξυ –bupropion φαίνεται στην εικόνα 6.30.



ΕΙΚΟΝΑ 6.30 ΠΙΘΑΝΟ ΦΑΣΜΑ ΜΑΖΩΝ ΤΟΥ ΤΡΑ-ΥΔΡΟΞΥ-BUPROPION

Η ερμηνεία του φάσματος (εικόνα 6.31) είναι δύσκολη λόγω του αυξημένου θορύβου, αλλά η εξήγηση της παρουσίας των βασικών κορυφών είναι επιτυχής.



ΕΙΚΟΝΑ 6.31 ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΟΥ ΦΑΣΜΑΤΟΣ ΜΑΖΩΝ ΤΟΥ ΤΡΑ-ΥΔΡΟΞΥ-BUPROPION

Έτσι, η ταυτοποίηση της δομής του υδροξυ – bupropion θεωρείται πλήρης.

6.7.4 ΠΑΡΑΓΩΓΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ΜΤΒΣΤΡΑ

Μετά την εξάτμιση, στα δείγματα προστίθενται 100 μL αντιδραστηρίου παραγωγοποίησης ΜΤΒΣΤΡΑ και τα δείγματα μπαίνουν σε μεταλλόλουτρο στους 80°C για 90 λεπτά. Τα παράγωγα που προκύπτουν, πέραν του Μ1 μεταβολίτη, δε σχηματίζουν αξιόλογα ευκρινείς χρωματογραφικές κορυφές. Η ταυτοποίηση του Μ1 δεν υπάρχει λόγος να γίνει ξανά και από τη στιγμή που η ταυτοποίηση της υδροξυ – μορφής είναι αδύνατη, δεν υπάρχει λόγος να ασχοληθούμε με αυτά τα παράγωγα περαιτέρω.

6.8 ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΟΥ BUPROPION ΣΤΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΡΟΥΤΙΝΑΣ ΤΟΥ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ

Όπως έχει προαναφερθεί, η διαδικασία ταυτοποίησης μιας ουσίας απαιτεί την ανίχνευση είτε της ίδιας της ουσίας είτε ενός τουλάχιστον μεταβολίτη της. Στην

περίπτωση του bupropion, η ανίχνευση εστιάζεται πλέον στην εύρεση του μεταβολίτη M1, ο οποίος παρουσιάζει μια καθαρή, οξεία και εξαιρετικά ευδιάκριτη κορυφή. Το γεγονός ότι αυτή η κορυφή μπορεί να συμπίπτει με αυτή του M2 δε μας ενοχλεί καθόλου, αφού οι δυο μορφές είναι ισομερείς και τα φάσματα μαζών τους είναι πανομοιότυπα. Επίσης, δεν έχει σημασία το γεγονός ότι δε γνωρίζουμε εάν ο μεταβολίτης M1 είναι το ερυθρο- ή το θρεο- υδρο-bupropion.

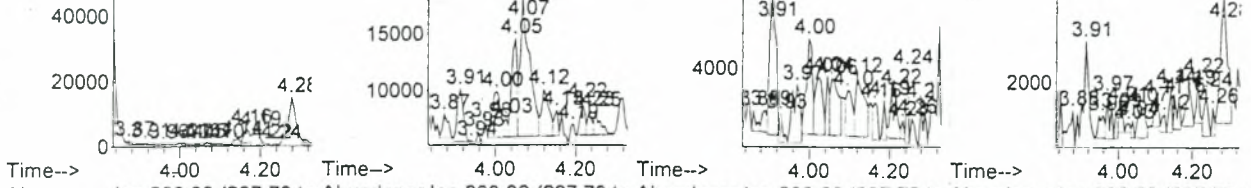
Επειδή η γενική πορεία για τα διεγερτικά είναι η πορεία 2, οι ουσίες παραγωγοποιούνται και εάν υπάρχει bupropion ή μεταβολίτης του στο δείγμα, θα εμφανίζονται πάντα παραγωγοποιημένα και θα φέρουν την ομάδα TMS. Ο χρόνος ανάλυσης στον αέριο χρωματογράφο του M1-TMS είναι 4,07 λεπτά, οπότε το “παράθυρο ανίχνευσης “ είναι 4,00 – 4,20 λεπτά. Για την ανίχνευση του M1-TMS αναζητείται η ύπαρξη δύο χαρακτηριστικών κορυφών ιόντων στο φάσμα μαζών, τα ιόντα 100 και 208. Έτσι, κατά τη σάρωση του αγνώστου δείγματος ούρων, εάν υπάρχει εμφάνιση κορυφής των ιόντων 100 και 208 μέσα στο χρονικό εύρος 4,00 – 4,20 λεπτά, τότε ελέγχεται το φάσμα μαζών και αν το δείγμα θεωρηθεί θετικό ακολουθεί το confirmation test. Εδώ πρέπει να αναφέρουμε ότι η ανίχνευση του υδροξυ-bupropion τελικά δεν μας προσφέρει κάποια βοήθεια όσον αφορά τη διαδικασία απόδειξης της χορήγησης της μητρικής ουσίας στον αθλητή του οποίου τα ούρα αναλύονται, καθώς το φάσμα του δεν είναι καν ανιχνεύσιμο στα TMS παράγωγα. Επίσης, η ανίχνευση της ίδιας της μητρικής ουσίας είναι δύσκολη λόγω της μικρής της ποσότητας στο δείγμα ούρων, κάτι που υποδηλώνει και η πολύ χαμηλή χρωματογραφική της κορυφή. Σίγουρα θα ήταν πιο επικερδές εάν μπορούσε να ταυτοποιηθεί ο άγνωστος μεταβολίτης M3 ο οποίος, από ότι φαίνεται από τα θραύσματά του, είναι και αυτός μεταβολίτης του bupropion και δεν αναφέρεται στη βιβλιογραφία. Μετά την ταυτοποίηση της δομής του θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στη διαδικασία ρουτίνας του εργαστηρίου, αφού δίνει ευκρινείς και οξείες κορυφές, αλλά η χρήση του δεν είναι απαραίτητη από τη στιγμή που ο μεταβολίτης M1 έχει ταυτοποιηθεί και καλύπτει όλες τις σχετικές ανάγκες του εργαστηρίου.

Επιπλέον, η ουσία bupropion προς το παρόν δε θεωρείται απαγορευμένη αλλά βρίσκεται στη λίστα των υποψήφιων προς ένταξη στις απαγορευμένες ουσίες σύμφωνα με τη WADA. Αυτό σημαίνει πως η ανίχνευσή της ζητείται από τα εργαστήρια anti-doping, αλλά δεν επιβάλλονται κυρώσεις στους αθλητές που τη χρησιμοποιούν. (κατάσταση monitoring) Αυτός είναι ένας επιπρόσθετος λόγος να μην χρειαστεί η ταυτοποίηση του M3 μεταβολίτη.

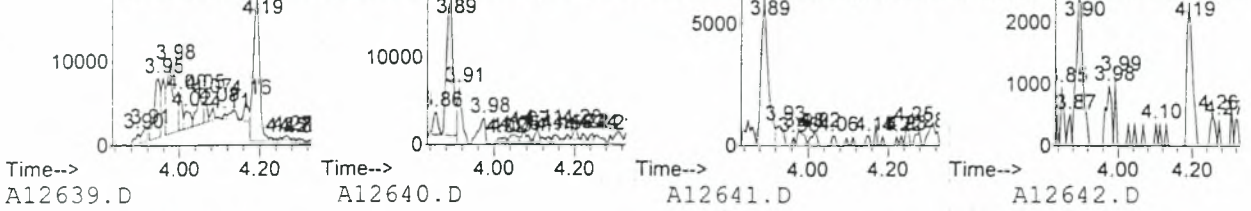
Στην τελευταία εικόνα φαίνεται το “παράθυρο ανίχνευσης “ του M1 στον αέριο χρωματογράφο. Σε κάθε σειρά φαίνεται το χρωματογράφημα που προκύπτει από το δείγμα ούρων του αθλητή, ένα λευκό δείγμα και δύο δείγματα ελέγχου cal. Το πέμπτο και έκτο δείγμα είναι θετικά στον M1 και θα αναλυθούν δεύτερη φορά. (confirmation test)

BUPROPION.MITMS, RT=4.08 STDMAN.D CALB1.D BLANK.D CALWADA_E.D

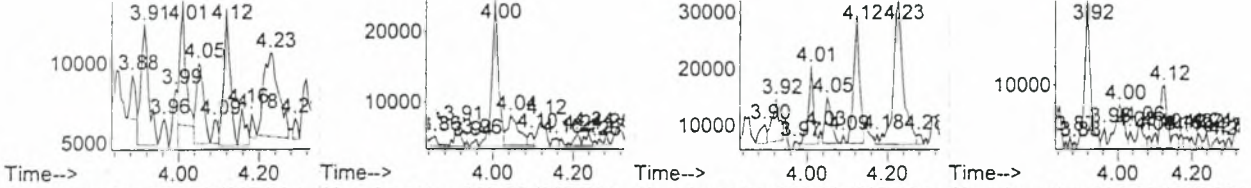
Abundance on 100.00 (99.70 to 1) Abundance on 100.00 (99.70 to 1) Abundance on 100.00 (99.70 to 1) Abundance on 100.00 (99.70 to 1)



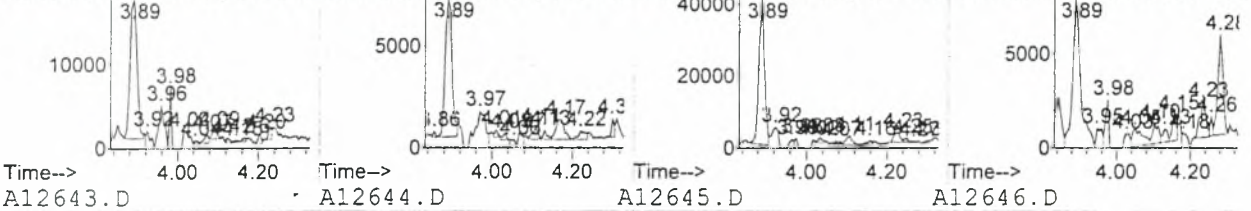
Abundance on 208.00 (207.70 to 208.00) Abundance on 208.00 (207.70 to 208.00) Abundance on 208.00 (207.70 to 208.00) Abundance on 208.00 (207.70 to 208.00)



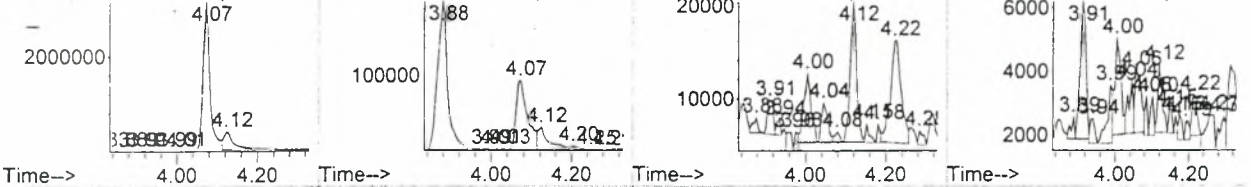
Abundance on 100.00 (99.70 to 1) Abundance on 100.00 (99.70 to 1) Abundance on 100.00 (99.70 to 1) Abundance on 100.00 (99.70 to 1)



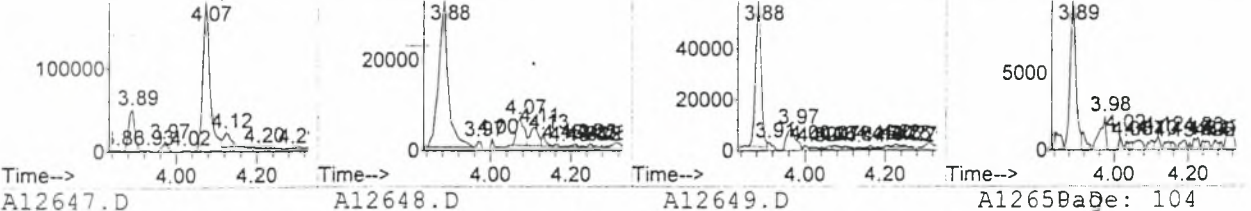
Abundance on 208.00 (207.70 to 208.00) Abundance on 208.00 (207.70 to 208.00) Abundance on 208.00 (207.70 to 208.00) Abundance on 208.00 (207.70 to 208.00)



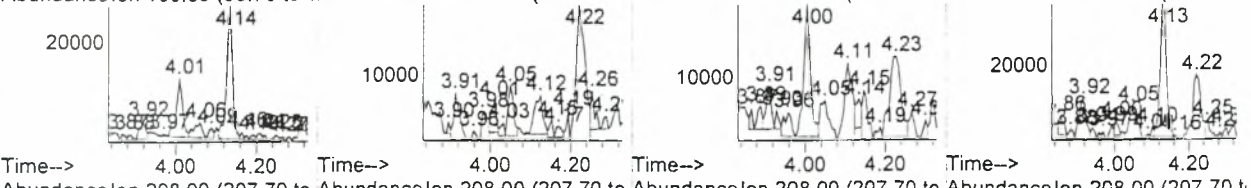
Abundance on 100.00 (99.70 to 1) Abundance on 100.00 (99.70 to 1) Abundance on 100.00 (99.70 to 1) Abundance on 100.00 (99.70 to 1)



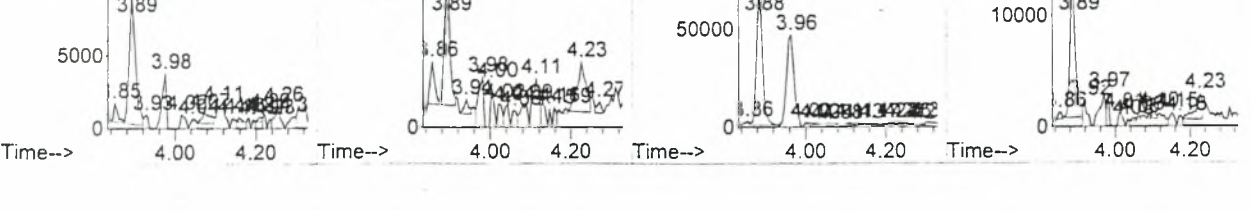
Abundance on 208.00 (207.70 to 208.00) Abundance on 208.00 (207.70 to 208.00) Abundance on 208.00 (207.70 to 208.00) Abundance on 208.00 (207.70 to 208.00)



Abundance on 100.00 (99.70 to 1) Abundance on 100.00 (99.70 to 1) Abundance on 100.00 (99.70 to 1) Abundance on 100.00 (99.70 to 1)



Abundance on 208.00 (207.70 to 208.00) Abundance on 208.00 (207.70 to 208.00) Abundance on 208.00 (207.70 to 208.00) Abundance on 208.00 (207.70 to 208.00)



Abundance on 208.00 (207.70 to 208.00) Abundance on 208.00 (207.70 to 208.00) Abundance on 208.00 (207.70 to 208.00) Abundance on 208.00 (207.70 to 208.00)



Abundance on 208.00 (207.70 to 208.00) Abundance on 208.00 (207.70 to 208.00) Abundance on 208.00 (207.70 to 208.00) Abundance on 208.00 (207.70 to 208.00)

6.9 ΕΠΙΛΟΓΟΣ

Πραγματοποιήθηκε μεταβολικό πείραμα για την ένταξη της διαδικασίας ανίχνευσης του διεγερτικού bupropion στη γενική διαδικασία ανίχνευσης των διεγερτικών με τη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας – φασματομετρίας μαζών που χρησιμοποιεί το εργαστήριο ελέγχου doping του ΟΑΚΑ. Αρχικά προσδιορίστηκε ο σχετικός χρόνος ανάσχεσης του bupropion και των μεταβολιτών του στον αέριο χρωματογράφο. Έπειτα πραγματοποιήθηκε λήψη των φασμάτων μαζών και ταυτοποίηση των ουσιών μέσω ερμηνείας των φασμάτων με βάση τη χημική δομή τους, η οποία δίδεται από τη βιβλιογραφία. Λόγω βέλτιστης χρωματογραφικής κορυφής και καθαρού φάσματος μαζών, επιλέχθηκε η χρησιμοποίηση του μεταβολίτη M1 (ερυθρο- ή θρεο- υδροbupropion) για την απόδειξη της χορήγησης του bupropion στο δότη του δείγματος ούρων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Εσωτερικό δίκτυο εργαστηρίου ΟΑΚΑ
(\\server2000\Documents\WADA\lab_standard_3.pdf)
- [2] Εσωτερικό δίκτυο εργαστηρίου ΟΑΚΑ
(\\server2000\Documents\WADA\standards 2004\list_standard_2004.pdf)
- [3] Verrocen M. (2001) Hormones and sport, ethical aspects and the prevalence of hormone abuse in sport. J. Endocrinol 170:49-54
- [4] Cowan DA, Kicman AT, (1997) Doping in sport : misuse, analytical tests and legal aspects. Clin. Chem. 43:1110-1113
- [5] Donohoe T. Johnson N. (1986) Four play? Drug abuse in sport. Blackwell, Oxford
- [6] Finley M., Plecuert H. (1976) The Olympic Games : the first hundred years. Chatto and Windus, London
- [7] Peters, Muller-Platz, "Biomedical Side Effects of Doping", Sport & Buch Strauss, Germany 2001, pp1-8
- [8] <http://www.cafdis-antidoping.net/en/article.asp?articleid=147>
- [9] World Anti Doping Code, The 2004 Prohibited List, Jan. 2004
- [10] <http://www.wada-ama.org/>
- [11] G. Gordon Gibson and P. Skett, "Introduction to Drug Metabolism", Chapman and Hall, Great Britain, 1986 pp 1-26
- [12] D. Hawcroft, T. Hector, "Clinical Specimens", John Wiley & Sons, Great Britain, 1987, pp56-63
- [13] R.D. McDowall, *Sample Preparation for Biomedical Analysis*, Journal of Chromatography, 492 (1989) 3-58
- [14] V. Borges et al / J. of Chromatography B, 804 (2004) 277-287
- [15] J.J. Steward, H.J. Berkel, R.C. Parish, M.R. Simar, A. Sued, J.A. Bocchini, J.T. Wilson, J.E. Manno, J. Clin. Pharmacol. 41 (2001) 770
- [16] L.M. Hesse, K. Venkatakrishnan, M.H. Court, L.L. Von Moltke, S.X. Suan, R.I. Shader, D.J. Greenblatt, Drug Metab. Dispos. 28 (200) 1176
- [17] S.R. Faucette, R.L. Howke, E.L. Lecluyse, S.S. Shord, B. Yan, R.M. Laethem, C.M. Lindley, Drug Metab. Dispos. 28 (200) 1222
- [18] N. Barbarin, D.B. Mawhinney, R. Black, J. Henion, J. of Chromatography B 783 (2003) 73
- [19] G. Sigmund, G. Optfermann, I. Seinh, W. Schanzer, Detection of Bupropion and metabolites, Institute of Biochemistry, German Sport University Cologne, Germany
- [20] Ascher JA, Cole JO, Colin JN, Feighner JP, Ferris RM, Fibiger HC, Golden RN, Martin P, Potter WZ, Richelson E, et al : Bupropion : a review of its mechanism of antidepressant activity. In: J. Clin Psychiatry 1995 Sep; 56(9):395-401
- [21] Golden RN, De Vane CL, Laizure SC, Rudorfer MV, Sherer MA, Potter WZ: Bupropion in depression. II. The role of metabolites in clinical outcome. In: Arch Gen Psychiatry 1988 Feb;45 (2):145-9

- [22] www.Glaxowellcome.com
- [23] Anonymous. Bupropion for depression. *Med Lett Drugs Ther* 1989; 31: 97–8. [PubMed](#)
- [24] Weisler RH, *et al.* Comparison of bupropion and trazodone for the treatment of major depression. *J Clin Psychopharmacol* 1994; 14: 170–9. [PubMed](#)
- [25] Kavoussi RJ, *et al.* Double-blind comparison of bupropion sustained release and sertraline in depressed outpatients. *J Clin Psychiatry* 1997; 58: 532–7. [PubMed](#)
- [26] Nieuwstraten CE, Dolovich LR. Bupropion versus selective serotonin-reuptake inhibitors for treatment of depression. *Ann Pharmacother* 2001; 35: 1608–13. [PubMed](#)
- [27] Cantwell DP. ADHD through the life span: the role of bupropion in treatment. *J Clin Psychiatry* 1998; 59 (suppl 4): 92–4. [PubMed](#)
- [28] Wilens TE, *et al.* A controlled clinical trial of bupropion for attention deficit hyperactivity disorder in adults. *Am J Psychiatry* 2001; 158: 282–8. [PubMed](#)
- [29] Anonymous. Bupropion (Zyban) for smoking cessation. *Med Lett Drugs Ther* 1997; 39: 77–8. [PubMed](#)
- [30] Benowitz NL. Treating tobacco addiction—nicotine or no nicotine? *N Engl J Med* 1997; 337: 1230–1. [PubMed](#)
- [31] Hurt RD, *et al.* A comparison of sustained-release bupropion and placebo for smoking cessation. *N Engl J Med* 1997; 337: 1195–1202. [PubMed](#)
- [32] Jorenby DE, *et al.* A controlled trial of sustained-release bupropion, a nicotine patch, or both for smoking cessation. *N Engl J Med* 1999; 340: 685–91. [PubMed](#)
- [33] 5. Holm KJ, Spencer CM. Bupropion: a review of its use in the management of smoking cessation. *Drugs* 2000; 59: 1007–1024. [PubMed](#)
- [34] 6. Tashkin DP, *et al.* Smoking cessation in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a double-blind, placebo-controlled, randomised trial. *Lancet* 2001; 357: 1571–5. [PubMed](#)
- [35] 7. Gonzales DH, *et al.* Bupropion SR as an aid to smoking cessation in smokers treated previously with bupropion: a randomized placebo-controlled study. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 69: 438–44. [PubMed](#)
- [36] 8. Hays JT, *et al.* Sustained-release bupropion for pharmacologic relapse prevention after smoking cessation: a randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 2001; 135: 423–33. [PubMed](#)
- [37] National Institute for Clinical Excellence. Guidance on the use of nicotine replacement therapy (NRT) and bupropion for smoking cessation (issued March 2002). Available at: [online](#) (accessed 04/06/04)
- [38] Ahluwalia JS, *et al.* Sustained-release bupropion for smoking cessation in African Americans: a randomized controlled trial. *JAMA* 2002; 288: 468–74. [PubMed](#)
- [39] Fagerström K, *et al.* Smoking cessation treatment with sustained-release bupropion: optimising approaches to management. A seminar-in-print. *Drugs* 2002; 62 (suppl 2): 1–70.
- [40] Hughes JR, *et al.* Antidepressants for smoking cessation. Available in *The Cochrane Library*; Issue 2. Chichester: John Wiley; 2004.
- [41] Stephen M. Stahl, James F. Pradko, Barbara R. Haigh, Jack G. Modell, Carol B. Rockett, Susan Learned-Coughlin. A review of the neuropharmacology of bupropion, a dual norepinephrine and dopamine inhibitor. *J. Clin. Psychiatry* 2004;6:159-166
- [42] Sweetman S (Ed), Martindale: The complete drug reference. London: Pharmaceutical Press. Electronic version, (2005).
- [43] Sewell P., Clarke B., *Chromatographic Separations*, John Wiley & Sons, Λονδίνο, Κεφ. 4, 1987

- [44] *Encyclopedia of Analytical Science*, Academic Press, Editor: Alan Townshed, Vol. 3, pp. 1761-1876, **1995**
- [45] Poole C., Poole S., *Chromatography today*, Elsevier, Oxford, pp. 246-268, **1991**
- [46] Χατζηϊωάννου Θ., *Εργαστηριακές Ασκήσεις Ποσοτικής Αναλυτικής Χημείας*, Εκδόσεις Πανεπιστημίου Αθηνών, Αθήνα, Κεφ. **28**, **1991**
- [47] Χατζηϊωάννου Θ., Κουππάρης Μ., *Ενόργανη Ανάλυση*, ΕΚΠΑ, Αθήνα, Κεφ. **19**, σελ. 439-466, **1997**
- [48] Σίσκος Π. Α., Νικολέλης Δ. Π., *Αναλυτικές Μέθοδοι Διαχωρισμού*, Εκδόσεις Πανεπιστημίου Αθηνών, Αθήνα, Κεφ. **6**, **1991**
- [49] Davis R., Freason M., *Mass Spectrometry*, published by John Wiley & Sons, Great Britain, **1987**
- [50] Rose M., Johnstone R., *Mass spectrometry for chemists and biochemists*, Cambridge University Press, Great Britain, **1982**
- [51] Χατζηϊωάννου Θ., Κουππάρης Μ., *Ενόργανη Ανάλυση*, ΕΚΠΑ, Αθήνα, Κεφ. **13**, σελ. 334-364, **1997**
- [52] R. Cole (Editor), *Electrospray Ionization Mass Spectrometry : Fundamentals, Instrumentation, and Applications (1997)*, John Wiley and Sons.
- [53] R. Cotter, *Time-Of-Flight Mass Spectrometry : Instrumentation and Applications in Biological Research (1997)* American Chemical Society.
- [54] G. Siuzdak, *Mass spectrometry for Biotechnology (1996)*, Academic Press.
- [55] C. Tuniz (Editor), J. R. Tuniz, D. Fink Bird, *Accelerator Mass Spectrometry : Ultrasensitive Analysis for Global Science (1998)* CRC Press.
- [56] W. M. A. Niessen, R. D. Voyksner (Editors) *Current Practice in Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (1998)* Elsevier Science Ltd.
- [57] R. Willoughby, E. Sheehan, S. Mitrovich, *A Global View of LC/MS : How to Solve Your Most Challenging Analytical Problems (1998)*, Global View Publishing.
- [58] F.W. Aston, *Mass-spectra and Isotopes*, 2nd ed. (1942), is a comprehensive account of the early work that laid the foundations of accurate mass and isotopic abundance measurements.
- [59] M. C. McMaster, C. McMaster, *GC/MS : A Practical User's Guide (1998)* John Wiley and Sons.
- [60] F.G. Kitson, B.S. Larsen, C. N. McEwen, *Gas Chromatography and Mass Spectrometry : A Practical Guide (1996)* Academic Press.
- [61] Drozd J. *Chemical derivatisation in gas chromatography*, Journal of Chromatography Library, Elsevier, Chapter **1,2,3**, **1981**
- [62] Knap D., *Handbook of Analytical Derivatization Reactions*, John Wiley & Sons, **Part 1**, **1979**
- [63] Opfermann G., Schanzer W., *Trimethylsilylation –Aspects for Derivatization*, Recent advances in Doping Analysis (4), Koln, **1997**
- [64] Goldberger, Huestis, Wilkins, *Commonly Practiced Quality Control and Quality Assurance Procedures for Gas Chromatography / Mass Spectrometry Analysis in*

Forensic Urine Drug-Testing Laboratories, Forensic Science Review, Vol. 9, No 2, December 1997

[65] John Keenan Taylor, «Διασφάλιση Ποιότητας των Χημικών Μετρήσεων», Απόδοση στην Ελληνική από τον Αναπληρωτή Καθηγητή Π.Α. Σίσκο, ΕΛ.ΚΕ.ΠΑ., 1996, pp.196-208

[66] B.King, *The Selection and Use of Reference Materials: A Basic Guide for Laboratories and Accreditation Bodies*, pp1-8

[67] <http://www.drugs.com>