



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»

ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Ανάπτυξη και Επικύρωση Επιβεβαιωτικών Μεθόδων
Προσδιορισμού Απαγορευμένων Ουσιών σε Ούρα Αλόγων με την
Τεχνική UPLC-QTOFMS, για τον έλεγχο Ντόпинγκ**

**ΦΩΤΕΙΝΟΠΟΥΛΟΥ ΗΛΕΚΤΡΑ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΑΘΗΝΑ
ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2016**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Ανάπτυξη και Επικύρωση Επιβεβαιωτικών Μεθόδων Προσδιορισμού Ουσιών σε Ούρα Αλόγων με την Τεχνική UPLC-QTOFMS, για τον έλεγχο Doping

ΦΩΤΕΙΝΟΠΟΥΛΟΥ ΗΛΕΚΤΡΑ

A.M.: 11303

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Θωμαΐδης Νικόλαος

Αναπληρωτής Καθηγητής Αναλυτικής Χημείας, Τμήματος Χημείας ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κουμπάρης Μιχαήλ

Καθηγητής Αναλυτικής Χημείας – Φαρμακευτικής Ανάλυσης, Τμήματος Χημείας ΕΚΠΑ

Θωμαΐδης Νικόλαος

Αναπληρωτής Καθηγητής Αναλυτικής Χημείας, Τμήματος Χημείας ΕΚΠΑ

Οικονόμου Αθανάσιος

Αναπληρωτής Καθηγητής Αναλυτικής Χημείας, Τμήματος Χημείας ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 08/02/2016

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία διπλώματος ειδίκευσης εκπονήθηκε εξ ολοκλήρου στο Εργαστήριο Ελέγχου Ντόπινγκ του Ολυμπιακού Αθλητικού Κέντρου Αθηνών (Ο.Α.Κ.Α.) κατά την περίοδο 2014-2015, στα πλαίσια του Διαπανεπιστημιακού Διατμηματικού Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών 'Χημική Ανάλυση – Έλεγχος Ποιότητας' και σε συνεργασία με το Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Ε.Κ.Π.Α.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή κ. Νικόλαο Θωμαΐδη για τη δυνατότητα που μου παρείχε να πραγματοποιήσω των εργασία μου σε ένα διεθνώς διακεκριμένο χώρο όπως το Εργαστήριο Ελέγχου Ντόπινγκ του Ο.Α.Κ.Α., καθώς και την πίστη που έδειξε εξ αρχής στο πρόσωπό μου.

Ακόμη, ευχαριστώ τα άλλα δύο μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής κ. Μιχαήλ Κουμπάρη και κ. Αθανάσιο Οικονόμου για το χρόνο που διέθεσαν για τη διπλωματική μου εργασία.

Ευχαριστώ το διευθυντή του Εργαστηρίου Ελέγχου Ντόπινγκ, Δρ. κ. Μανώλη Λυρή για τη φιλοξενία του και για την απεριόριστη δυνατότητα χρήσης αντιδραστηρίων και αναλωσίμων που μου παρείχε, στη δύσκολη οικονομικά συγκυρία που διανύουμε.

Ευχαριστώ την υπεύθυνη του οργάνου στο εργαστήριο Δρ. κα. Αργυρώ Φραγκάκη για την εκπαίδευσή μου στην οργανολογία και την εκτίμηση των αποτελεσμάτων.

Ευχαριστώ ξεχωριστά και ιδιαίτερα την επιβλέπουσά μου στο εργαστήριο Δρ. κα. Πολυξένη Κιούση για την άριστη συνεργασία της, την απέραντη υπομονή της στις άπειρες ερωτήσεις που της έκανα και τις οποίες μου απαντούσε πρόθυμα, τον πολύτιμο χρόνο της που μου διέθετε και για την εμπιστοσύνη που εισέπραττα ότι είχε σε μένα.

Ευχαριστώ ένθερμα τον Δρ. κ. Ιωάννη Αγγελή για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, αναθέτοντάς μου τη δημιουργία μεθόδων πάνω στα πεπτίδια και για τη συνεχή του παρουσία και βοήθεια, όποτε τη χρειάστηκα και για τις ερωτήσεις που μου απάντησε από μεριάς του.

Επιπλέον, ευχαριστώ όλο το προσωπικό του εργαστηρίου στο σύνολό του για το ευχάριστο και φιλικό κλίμα συνεργασίας και για την εκτίμηση που έδειξαν στο πρόσωπό μου. Επίσης, ευχαριστώ την κα. Ιωάννα Κουτσούλη, την κα. Στέλλα Λούη και την κα. Φωτεινή Χλαπάνα για την εκπαίδευσή μου στο παρασκευαστικό κομμάτι και την καθημερινή βοήθειά τους.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ από καρδιάς στο μεταπτυχιακό φοιτητή Παναγιώτη Σακελλαρίου που ήταν ο συνοδοιπόρος – συνάδελφός μου στο εργαστήριο και στη φοιτήτρια Άννα Ψάλτα που ήταν το άτομο που με εκπαίδευσε σε παρασκευαστικό επίπεδο, για την άψογη συνεργασία μας, την ηθική στήριξη και την ανιδιοτελή βοήθειά τους. Ακόμη, ευχαριστώ όλες τις φοιτήτριες που πέρασαν από το εργαστήριο κατά τη διάρκεια της διπλωματικής μου για τη συμβολή τους στο φιλικό περιβάλλον εργασίας.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω την οικογένεια μου που είναι δίπλα μου σε κάθε επιλογή μου και με στηρίζει πάντα σε ότι κι αν επιλέξω να κάνω στη ζωή μου, καθώς επίσης τους φίλους μου γιατί είναι πολύ σημαντικοί για μένα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στόχος της παρούσας εργασίας, που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο ελέγχου doping του ΟΑΚΑ, σε συνεργασία με το ΕΚΠΑ, αποτελεί η ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδων επιβεβαίωσης (confirmation), για την ανίχνευση απαγορευμένων ουσιών σε ούρα αλόγων με τη χρήση υγροχρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών με αναλυτή χρόνου πτήσης σε σειρά με τετράπολο (Liquid Chromatography-Quadrupole-Time of Flight, LC-QTOF). Για τον ιοντισμό των ουσιών, έγινε χρήση ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό θετικής πολικότητας (electrospray ionization, (+)ESI).

Για την ανάπτυξη ακολουθήσαμε την εξής στρατηγική: Αρχικά αναλύθηκαν με LC-QTOF, σε διαδικασία πλήρους σάρωσης ιόντων (full scan), πολυσυστατικά διαλύματα που περιείχαν μεγάλο αριθμό απαγορευμένων ουσιών για την εύρεση του χρόνου ανάσχεσης και του σχετικού χρόνου ανάσχεσης τους και των κύριων ιόντων που εμφανίζονται στο φάσμα μαζών των ουσιών.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν μελέτες βελτιστοποίησης του δυναμικού της πηγής ιοντισμού με σκοπό τη βελτιστοποίηση του σήματος για τον προσδιορισμό των 90 απαγορευμένων ουσιών. Ακολούθησε μελέτη για την εύρεση των βέλτιστων τιμών της ενέργειας θραυσματοποίησης, έτσι ώστε να έχουμε τουλάχιστον 2 διαγνωστικά θραύσματα για κάθε ουσία. Τέλος κατασκευάστηκαν εξειδικευμένες μέθοδοι ανάλυσης και εκτύπωσης για κάθε μία από τις απαγορευμένες ουσίες που ελέχθησαν.

Για την επικύρωση της μεθόδου, εξετάστηκε μια σειρά παραμέτρων για 10 αντιπροσωπευτικές ουσίες. Η αξιολόγηση της μεθόδου επιβεβαίωσης, έδειξε ότι η μέθοδος αυτή εμφανίζει ειδικότητα για το σύνολο των ουσιών που εξετάστηκαν. Επίσης, δεν παρατηρήθηκαν επιμολύνσεις, ούτε και παρεμποδίσεις υποστρώματος.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε καταχώρηση των φασμάτων στην ηλεκτρονική βιβλιοθήκη του οργάνου.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Έλεγχος Ντόπινγκ

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: υγροχρωματογραφία, φασματομετρία μαζών, αναλυτής χρόνου πτήσης, ούρα αλόγων, πεπτίδια

ABSTRACT

This Master Thesis, conducted in doping control laboratory of the Olympic Stadium in Athens, in collaboration with the University of Athens, presents the development and validation of confirmatory methods for the detection of banned substances in horse urine using Liquid Chromatography – Mass Spectrometry and the use of a Time of Flight mass analyzer coupled with a quadrupole (LC-QTOF). Analytes were ionized with an electrospray ionization, performed in the positive mode [(+)ESI].

For the development we followed the following strategy: At first multicomponent solutions containing large number of prohibited substances were analyzed by LC-QTOF, at full ion scan (full scan), to find the retention time and the relative retention time and main ions that appear in the mass spectrum of substances.

Then, studies were conducted to optimize the dynamic of the ionization source in order to optimize the signal to determine the 90 banned substances. This was followed by a study finding the optimum collision energy values, in order to have at least 2 diagnostics fragments for each substance. Finally specialized analysis and printing methods were built for each of the restricted substances tested.

To validate the method, a number of parameters examined for 10 representative substances. The evaluation of the confirmation method, showed that this method exhibits specificity for all the substances tested. In addition, not any carry over nor matrix interferences have been observed in the analyzed samples.

Finally, a recording of spectra was held in the body of the electronic library.

SUBJECT AREA: Doping Control

KEYWORDS: liquid chromatography (LC), mass spectrometry (MS), time of flight (TOF), horse urine, peptides

Περιεχόμενα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	i
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	iii
ABSTRACT.....	iv
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	v

Κεφάλαιο 1 ΕΛΕΓΧΟΣ ΝΤΟΠΙΝΓΚ

1.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ	1
1.2 ΤΟ ΝΤΟΠΙΝΓΚ ΣΤΟΝ ΑΘΛΗΤΙΣΜΟ.....	4
1.2.1 Άνθρωποι.....	4
1.2.2 Άλογα.....	6
1.3 ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΝΤΟΠΙΝΓΚ.....	7
1.3.1 Άνθρωποι	7
1.3.2 Άλογα.....	8
1.4 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΝΤΟΠΙΝΓΚ.....	8
1.4.1 Επιλογή Εργαστηρίων	8
1.4.2 Αρχές Υπεύθυνες για Έλεγχο	9
1.4.3 Επιλογή Αλόγων για Έλεγχο.....	9
1.4.4 Χρόνος Συγκέντρωσης των Δειγμάτων	10
1.4.5 Ειδοποίηση για Δειγματοληψία (EADCMP Sampling)	10
1.4.6 Πρωτόκολλο Συλλογής Αίματος και Ούρων	11
1.4.7 Ανάλυση Δειγμάτων.....	11
1.5 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΑΠΑΓΟΡΕΥΜΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ.....	12
1.5.1 Εισαγωγή.....	12
1.5.2 Αναβολικά Ανδρογόνα Στεροειδή (ΑΑΣ).....	13
1.5.3 Διεγερτικά	15
1.5.4 Βρογχοδιασταλτικά.....	15
1.5.5 Μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα	16

1.5.6 Καταπραϋντικά και ηρεμιστικά	17
1.5.7 Τοπικά αναισθητικά.....	18
1.5.8 Οπιοειδή αναλγητικά.....	18
1.5.9 Διουρητικά	19
1.5.10 ΠΕΠΤΙΔΙΑ.....	19
1.5.10.1 Εισαγωγή.....	19
1.5.10.2 Κατηγορίες Πεπτιδίων.....	20
1.5.10.2.1 Αυξητική Ορμόνη (GH).....	20
1.5.10.2.2 Εκκριματοαγωγοί Αυξητικής Ορμόνης.....	21
1.5.10.2.3 GHRPs.....	21
1.5.10.2.4 Γοναδοτροπίνες (Gonadotropins).....	22
1.5.10.2.5 TB-500.....	22
1.5.10.2.6 Δεσμοπρεσίνη (Desmopressin).....	23

Κεφάλαιο 2 ΤΕΧΝΙΚΗ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ – ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΩΝ ΜΕ ΑΝΑΛΥΤΗ ΧΡΟΝΟΥ ΠΤΗΣΗΣ ΙΟΝΤΩΝ ΣΕ ΣΕΙΡΑ ΜΕ ΤΕΤΡΑΠΟΛΟ (LC-QTOFMS)

2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	24
2.2 ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ.....	24
2.2.1 Γενικά	24
2.2.2 Είδη χρωματογραφικού διαχωρισμού.....	24
2.2.3 Οργανολογία υγροχρωματογράφου.....	25
2.2.3.1 Δοχεία Κινητής Φάσης	25
2.2.3.2 Αντλία.....	26
2.2.3.3 Σύστημα Εισαγωγής Δείγματος	26
2.2.3.4 Κινητή Φάση	26
2.2.3.5 Στατική Φάση	27
2.2.3.6 Ανιχνευτές.....	27
2.2.3.7 Σύστημα λήψεως και επεξεργασίας δεδομένων.....	28

2.3 ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ.....	28
2.4 ΠΗΓΗ ΙΟΝΤΙΣΜΟΥ.....	29
2.5 ΑΝΑΛΥΤΕΣ ΜΑΖΩΝ.....	32
2.5.1 Εισαγωγή.....	32
2.5.2 Τετράπολο.....	32
2.5.3 Αναλυτής Μαζών Χρόνου Πτήσης (Time Of Flight).....	33
2.5.3.1. Εισαγωγή.....	33
2.5.3.2. Αρχή λειτουργίας	33
2.5.3.3. Τεχνική TOF	34
2.5.3.4. Ανακλαστικό κάτοπτρο (reflecton)	37
2.5.3.5. Ορθογώνια επιτάχυνση ιόντων (orthogonal acceleration)	38
2.6 ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ.....	38
2.7 ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΗ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ (MS/MS).....	39
2.8 ΣΥΖΕΥΞΗ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΟ ΜΑΖΩΝ.....	42
2.9 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ LC-QTOFMS(MS) ΣΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΝΤΟΠΙΝΓΚ.....	43

Κεφάλαιο 3 ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ – ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ – ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

3.1 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ.....	44
3.1.1 Εργαστηριακές συσκευές.....	44
3.1.2 Υάλινα σκεύη και αναλώσιμα.....	44
3.2 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	45
3.3 ΔΙΑΛΥΤΕΣ ΚΙΝΗΤΗΣ ΦΑΣΗΣ LC-QTOF.....	45
3.4 ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΑΝΑΣΥΣΤΑΣΗΣ (ΔΑ)	46
3.5 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΠΑΡΑΚΑΤΑΘΗΚΗΣ.....	46
3.6 ΠΟΛΥΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ.....	46
3.6.1 Πολυσυστατικό διάλυμα ελέγχου calb1.....	46
3.6.2 Πολυσυστατικά διαλύματα εργασίας.....	47
3.7 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ (ISTD).....	55

3.8 ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ.....	55
3.9 ΑΝΑΛΥΤΙΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ.....	56
3.10 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΟΡΓΑΝΟΥ.....	57
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	59
Κεφάλαιο 4 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΠΑΓΟΡΕΥΜΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΜΕ LC-QTOF	
4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	60
4.2 ΕΥΡΕΣΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΩΝ ΙΟΝΤΩΝ ΚΑΙ ΧΡΟΝΩΝ ΑΝΑΣΧΕΣΗΣ.....	60
4.3 ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΑΝΑΛΥΘΗΚΑΝ.....	60
4.4 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΓΙΑ ΤΙΣ ΟΥΣΙΕΣ ΑΛΟΓΩΝ	61
4.4.1 Μελέτες βελτιστοποίησης των δυναμικών της πηγής ιοντισμού (fragmentor) με LC-QTOF/MS.....	61
4.4.2 Μελέτες βελτιστοποίησης ενέργειας σύγκρουσης (collision energy) με LC-QTOF/MS	62
4.4.3 Δημιουργία μεθόδων.....	64
4.4.4 Καταχώρηση φασμάτων	64
4.5 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΓΙΑ ΤΑ ΠΕΠΤΙΔΙΑ	64
4.5.1 Μελέτες βελτιστοποίησης των δυναμικών της πηγής ιοντισμού (fragmentor) με LC-QTOF/MS.....	64
4.5.2 Μελέτες βελτιστοποίησης ενέργειας σύγκρουσης (collision energy) με LC-QTOF/MS	65
4.5.3 Δημιουργία μεθόδων	66
Κεφάλαιο 5 ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΠΑΓΟΡΕΥΜΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΜΕ LC-QTOF	
5.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	71
5.2 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	72
5.2.1 Ικανότητα προσδιορισμού (identification capability) απαγορευμένων ουσιών	73
5.2.2 Ειδικότητα (Specificity).....	73

5.2.3 Παρεμποδίσεις από τη Μήτρα (Matrix Interferences).....	73
5.2.4 Έλεγχος επιμόλυνσης (Carryover).....	73
5.2.5 Επίδραση από το υπόστρωμα (Matrix Effects).....	80
5.2.6 Ανάκτηση (Recovery).....	82
Κεφάλαιο 6 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	84
 ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ.....	 86
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ - ΑΡΤΙΚΟΛΕΞΑ - ΑΚΡΩΝΥΜΑ.....	88
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1.....	90
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2.....	104
Βιβλιογραφία.....	13030

Κατάλογος Σχημάτων

Σχήμα 2.1: Διάταξη ενός τυπικού συστήματος HPLC.....	25
Σχήμα 2.2: Αντιδράσεις ιοντισμού και θραυσματοποίησης ενός αναλυτή M.....	29
Σχήμα 2.3: Πορεία ιοντισμού των μορίων μιας ουσίας με ESI. Τα φορτισμένα ιόντα που τελικώς σχηματίζονται θα κατευθυνθούν προς τον αναλυτή του φασματομέτρου.....	30
Σχήμα 2.4: Σχηματική απεικόνιση του τετραπολικού φασματομέτρου μαζών.....	33
Σχήμα 2.5: Παρουσίαση του εσωτερικού ενός αναλυτή TOF. Τα ελαφρύτερα ιόντα θα φθάνουν νωρίτερα στον ανιχνευτή.....	35
Σχήμα 2.6: Μηχανισμός λειτουργίας ανακλαστικού κατόπτρου. m και E οι μάζες και οι ενέργειες των ιόντων αντίστοιχα. Τα ιόντα με μεγαλύτερη ενέργεια, διεισδύουν βαθύτερα στο κάτοπτρο και τελικά φθάνουν στον ανιχνευτή στον ίδιο χρόνο με τα ιόντα που είχαν μικρότερη ενέργεια.....	37
Σχήμα 2.7: Ανιχνευτής φασματομέτρου τύπου MCP.....	39
Σχήμα 2.8: Διάταξη αναλυτή Q-TOF με διπλό ανακλαστικό κάτοπτρο.....	41
Σχήμα 5.1: Ικανότητα προσδιορισμού και παρεμποδίσεις μήτρας για το 1 ^ο ιόν της ουσίας Glafenine.....	75
Σχήμα 5.2: Ικανότητα προσδιορισμού και παρεμποδίσεις μήτρας για το 2 ^ο ιόν της ουσίας Glafenine.....	76
Σχήμα 5.3: Χρωματογραφήματα ουσιών για την Ειδικότητα της μεθόδου.....	77
Σχήμα 5.4: Χρωματογραφήματα δειγμάτων δεκαπλάσιας συγκέντρωσης (έλεγχος επιμόλυνσης)....	78
Σχήμα 5.5: Χρωματογραφήματα λευκού δείγματος (έλεγχος επιμόλυνσης).....	79

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1.1: Παράδοση δειγμάτων και αλυσίδα παραγωγής – σφραγισμένα και επισημασμένα.....	11
Εικόνα 1.2: Αριστερά ανθρώπινο δείγμα. Δεξιά Δείγμα αλόγου.....	12
Εικόνα 2.1: Βελόνα ιοντισμού με ESI.....	31
Εικόνα 2.2: Φασματομέτρο Q-TOF.....	34
Εικόνα 4.1: Επιλογή βέλτιστου δυναμικού για την ουσία Benzbromarone (220 V).....	61
Εικόνα 4.2: Επιλογή βέλτιστου δυναμικού για την ουσία Alprazolam (240 V).....	62
Εικόνα 4.3: Φάσμα επιλογής βέλτιστης ενέργειας συγκρούσεως για την ουσία Chlophentermine (7.5 eV).....	63
Εικόνα 4.4: Φάσμα επιλογής βέλτιστης ενέργειας συγκρούσεως για την ουσία 7-Amino-Flunitrazepam (35 eV).....	63
Εικόνα 4.5: Φάσμα επιλογής βέλτιστης ενέργειας συγκρούσεως για το πεπτίδιο GHRP-1 για το ιόν 955.4964 (47.5 eV).....	66
Εικόνα 4.6: Φάσμα επιλογής βέλτιστης ενέργειας συγκρούσεως για το πεπτίδιο GHRP-1 για το ιόν 478.2524 (25.0eV).....	66

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 2.1: Πιθανές μετατροπές στη χημεία ενός στεροειδούς και η επίδραση τους στον χρόνο ανάσχεσης του (RT) κατά την εφαρμογή υνροχρωματογραφίας αντιστρόφου φάσης.....	27
Πίνακας 2.2: Χαρακτηριστικά ιόντα κατά τον ιοντισμό με ESI.....	31
Πίνακας 2.3: Χαρακτηριστικά σύζευξης LC-MS.....	42
Πίνακας 3.1: Πολυσυστατικό Διάλυμα CALH1.....	48
Πίνακας 3.2: Πολυσυστατικό Διάλυμα CALH2.....	49
Πίνακας 3.3: Πολυσυστατικό Διάλυμα CALH3.....	50
Πίνακας 3.4: Πολυσυστατικό Διάλυμα CALH4.....	51
Πίνακας 3.5: Πολυσυστατικό Διάλυμα CALH5.....	52
Πίνακας 3.6: Πολυσυστατικό Διάλυμα CALH6.....	53
Πίνακας 3.7: Πολυσυστατικό Διάλυμα CALH7.....	54
Πίνακας 3.8: Πολυσυστατικό Διάλυμα επικύρωσης calb1.....	55
Πίνακας 3.9: Παράμετροι Χρωματογραφικής ανάλυσης.....	56
Πίνακας 3.10: Παράμετροι λειτουργίας φασματομέτρου μαζών.....	56
Πίνακας 4.1: Χαρακτηριστικά πρωτεύοντα ιόντα, χρόνοι ανάσχεσης και μοριακοί τύποι απαγορευμένων ουσιών, CALH1.....	67
Πίνακας 4.2: Χαρακτηριστικά πρωτεύοντα ιόντα, χρόνοι ανάσχεσης και μοριακοί τύποι απαγορευμένων ουσιών, CALH2.....	68
Πίνακας 4.3: Χαρακτηριστικά πρωτεύοντα ιόντα, χρόνοι ανάσχεσης και μοριακοί τύποι απαγορευμένων ουσιών, CALH3.....	69
Πίνακας 4.4: Χαρακτηριστικά πρωτεύοντα ιόντα, χρόνοι ανάσχεσης και μοριακοί τύποι απαγορευμένων πεπτιδίων.....	70
Πίνακας 5.1: Οι υπό έλεγχο ουσίες.....	71
Πίνακας 5.2: Αποτελέσματα της % επίδρασης από το υπόστρωμα για το 1 ^ο ιόν της κάθε ουσίας....	81
Πίνακας 5.3: Αποτελέσματα της % επίδρασης από το υπόστρωμα για το 2 ^ο ιόν της κάθε ουσίας....	81
Πίνακας 5.4: % ανάκτηση για το 1 ^ο ιόν της κάθε ουσίας.....	83

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΛΕΓΧΟΣ ΝΤΟΠΙΝΓΚ

1.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ^[1-2]

Σύμφωνα με δημοσιεύματα του Φιλόστρατου και του Γαληνού, διάφορα φάρμακα χρησιμοποιούντο για την ενίσχυση της αθλητικής απόδοσης ήδη από τα τέλη του τρίτου αιώνα π.Χ..Οι Κινέζοι γιατροί πριν από περισσότερα από 5.000 χρόνια πριν, συνιστούσαν τη χρήση του Ma Huang (εκχύλισμα από το φυτό Ephedra) για αύξηση της απόδοσης, όταν το φάρμακο αυτό χρησιμοποιείτο συνήθως για να καταστείλει το βήχα και για να τονώσει την κυκλοφορία.

Η φυλή των Κάφρων στην Αφρική ονόμασε ένα πρωτόγονο αλκοολούχο ποτό το οποίο χρησιμοποιείτο σε θρησκευτικές τελετές ως διεγερτικό με τη λέξη «ντοπ». Άλλες αναφορές περιγράφουν τους πολεμιστές Ζουλού να χρησιμοποιούν «ντοπ», ένα αλκοολούχο ποτό παρασκευασμένο από φλούδες σταφυλιών και αφέψημα κόλα. Στη Δυτική Αφρική, η χρήση Cola accuminata και Cola nitida ήταν επίσης γνωστή κατά τη διάρκεια του αγώνα στο βάδην ή το τρέξιμο. Ακολούθως, οι Ολλανδοί άποικοι Boers χρησιμοποίησαν τον όρο «ντοπ» για να περιγράψουν οποιοδήποτε διεγερτικό αφέψημα και ακολούθως, ο όρος διαδόθηκε παγκοσμίως. Τελικά, ο όρος υιοθετήθηκε για ένα ευρύτερο φάσμα ουσιών και στον αθλητισμό και χρησιμοποιώντας αυτές τις ουσίες περιγράφηκε περαιτέρω ως «ντόπινγκ», όπου εμφανίζεται για πρώτη φορά σε Αγγλικό λεξικό το 1889.

Στην Αρχαία Ελλάδα, ειδικοί περιγράφεται να προσφέρουν στους αθλητές διατροφικά συστατικά προκειμένου να βελτιώσουν τη φυσική τους απόδοση. Αυτό θεωρείτο απολύτως απαραίτητο και οι τότε προμηθευτές μπορούν να συγκριθούν με τους σημερινούς εξειδικευμένους αθλητιάτρους. Επιπλέον, αναφέρεται πως οι αθλητές προσπαθούσαν να αυξήσουν τη φυσική τους δύναμη καταναλώνοντας διαφόρων ειδών κρέας ή ζωμό αίματος πριν από τους αγώνες.

Κατά τη διάρκεια των Ολυμπιακών Αγώνων τον 3^ο αιώνα π.Χ. οι αθλητές προσπαθούσαν να αυξήσουν την απόδοσή τους χρησιμοποιώντας μανιτάρια. Ο Φιλόστρατος αναφέρει ότι οι ιατροί ήταν πολύ σημαντικοί στην προετοιμασία των αθλητών για τους αγώνες και οι μάγειρες ετοίμαζαν ψωμί με αναλγητικές ιδιότητες. Τον 1ο αιώνα μ.Χ., αναφέρεται επίσης ότι οι Έλληνες δρομείς έπιναν ένα αφέψημα βοτάνων για να αυξήσουν τη δύναμή τους και να είναι ικανοί να αποδώσουν σε αθλήματα μεγάλης διάρκειας. Περισσότερες αναφορές σχετικά με αυτήν την περίοδο είναι δύσκολο να βρεθούν καθώς «η γνώση για το ντόπινγκ» ήταν καλά κρυμμένη από τους ιερείς. Η χρήση ουσιών στη Ρωμαϊκή ιστορία έχει, επίσης, καταγραφεί. Οι αρματοδρομείς έτρεφαν τα άλογά τους με διάφορα μείγματα προκειμένου να τα κάνουν να τρέχουν γρηγορότερα.

Περιγράφεται, επίσης, ότι οι μονομάχοι χρησιμοποιούσαν παράγοντες ντόπινγκ για την αύξηση της δύναμης.

Η Ινδή γιατρός Sutruta συνιστούσε τη βρώση όρχεων για την επιβολή της αρρενωπότητας γύρω στο 300 π.Χ. και οι Ούννοι κατανάλωναν όρχεις πριν από μάχες - προφανώς για τον ίδιο σκοπό. Παραισθησιογόναμανιτάρια ελήφθησαν κατά τον τρίτο αιώνα π.Χ. για τη βελτίωση των επιδόσεων κατά τη διάρκεια των Ολυμπιακών αγώνων, που έγιναν μεταξύ 776 π.Χ. και 393 μ.Χ..

Να σημειωθεί ότι, τα διαθέσιμα για εκείνην την εποχή υλικά μπορούν πιθανώς να κατηγοριοποιηθούν μεταξύ των θρεπτικών συστατικών ή των συμπληρωμάτων διατροφής (όπως τα αυγά, το κρέας, το αίμα) καθώς και πραγματικές «τύπου-φάρμακο» ουσίες με αντικειμενικά αναμενόμενη δραστηριότητα (όπως όρχεις ταύρου, ή αλκοολούχα ποτά).

Αυτό το αρχαίο "ντόπινγκ" απαγορευόταν αυστηρά από τους κανόνες των κλασικών Ολυμπιακών Αγώνων, όπως ισχύει και σήμερα. Οι κυρώσεις όμως ήταν πολύ πιο σοβαρές στους παλιούς Ελληνικούς Ολυμπιακούς Αγώνες καθώς και στο ντόπινγκ στα άλογα, ο Prokop (2002) αναφέρει μέχρι και θανατικές ποινές. Ο αυτοκράτορας Θεοδόσιος κατήργησε τους αρχαίους αγώνες κατά το έτος 395 μ.Χ., ισχυριζόμενος ότι είχαν γίνει «ένα φυτώριο εξαπάτησης, προσβολής της ανθρωπίνης αξιοπρέπειας και του ντόπινγκ».

Ενώ υπάρχουν κάποιες αναφορές για το ντόπινγκ - συμπεριλαμβανομένων σχετικών προσπαθειών και την απαγόρευσή τους - δεν έχουμε ακόμη καμία γνώση για το ρόλο τους σε ένα μεγάλο χρονικό διάστημα από τους Ελληνικούς Ολυμπιακούς Αγώνες, κατά το Μεσαίωνα και μέχρι τη σύγχρονη εποχή.

Η χρήση του ισχυρού διεγερτικού κοκαΐνη (φύλλα κόκας), παράλληλα με την καφεΐνη (καφές, guarana, καρπός kola και τσάι mate) αναφέρεται στη Λατινική Αμερική. Οι Ίνκας αναφέρεται ότι ήταν σε θέση να τρέξουν την απόσταση από το Κούσκο στο Κίτο (1.750 km) σε 5 ημέρες κάτω από την επίδραση αυτών των διεγερτικών - σχεδόν απίστευτο, ακόμη και με την κοκαΐνη.

Αργότερα, η στρυχνίνη, η καφεΐνη, η κοκαΐνη και το αλκοόλ συχνά χρησιμοποιούνταν από τους ποδηλάτες και άλλους αθλητές αντοχής μεμονωμένα ή σε συνδυασμό. Μεταξύ των παρασκευασμάτων που υπόσχονταν να παρέχουν ενέργεια ήταν το "κρασί Mariani", που παράχθηκε από κρασί από το Μπορντώ και εκχυλίσματα Coca και καταχωρήθηκε για πρώτη φορά το 1863 από τον Angelo Mariani. Επώνυμοι καταναλωτές το χρησιμοποίησαν (π.χ. Τόμας Έντισον, Ερρίκος Ίψεν, Ιούλιος Βερν), και λόγω της ιδιότητάς του ο Πάπας Λέων XIII παρείχε χρυσό μετάλλιο στο κρασί Mariani. Αυτό το ποτό αργότερα απαγορεύτηκε από το Νόμο του «οπίου» (ή Ναρκωτικών) στη Γερμανία το 1920.

Η αύξηση της χρήσης των ορικών φαρμάκων / δηλητηρίων όπως το αρσενικό, και η ανάπτυξη της γνώσης για τα φυτικά φάρμακα, ενδέχεται επίσης να οδήγησε στη χρήση τους για παραϊατρικό σκοπό. Η καθαρότητα, ο ορισμός και η διαλεύκανση της δομής των αλκαλοειδών και άλλων ενεργών συστατικών των φυτών, επικαλυπτόμενα με τα πρώτα συνθετικά οργανικά φαρμακευτικά προϊόντα, ήταν οι τελικές προϋποθέσεις για την έναρξη της «σύγχρονης εποχής» του ντόπινγκ στον δέκατο ένατο αιώνα.

Πολλές μεμονωμένες περιπτώσεις ντόπινγκ έχουν αναφερθεί από τα τέλη του δέκατου ένατου και το δεύτερο μισό του εικοστού αιώνα, όταν ξεκίνησαν επίσημες δοκιμές σε ανθρώπους αθλητές. Παράλληλα, εμφανίστηκαν οι πρώτοι ορισμοί και κανονισμοί κατά του ντόπινγκ στον αθλητισμό. Η Διεθνής Ομοσπονδία Αθλητισμού (IAAF) ήταν η πρώτη που απαγόρευσε τη χρήση διεγερτικών ουσιών στον αθλητισμό, αλλά αυτό παρέμεινε αδρανές, έως ότου καθιερώθηκαν πρωτόκολλα δοκιμών.

Αν και σίγουρα λιγότερο σημαντικό, το αντίθετο του κανονικού ντόπινγκ έχει επίσης διαδραματίσει κάποιο ρόλο στην ιστορία σαν «αρνητικό ντόπινγκ», προσπάθειες δηλαδή που γίνονταν για να εμποδίσουν την απόδοση των αθλητών, καθώς και των αλόγων (αρχικά ονομαζόταν «αντιντόπινγκ») ή άλλων ανταγωνιστικών ζώων, με την παράνομη χορήγηση ηρεμιστικών κ.λπ.

Ταυτόχρονα, ισχυρισμοί που προσπαθούν να αποδώσουν τα δυσμενή αναλυτικά ευρήματα σε δείγματα ούρων ως συνέπειες της δόλιας εισαγωγής των παραγόντων ντόπινγκ από άλλους, μπορούν να θεωρηθούν (ως μια προέκταση αυτών των πρώτων) απόπειρες δολιοφθοράς.

Ο Ludwig Prokop (Prokop 1957, 1970, 1972, 2002), περιγράφει, σε γενικές γραμμές, και όχι πάντα με σαφείς πηγές τεκμηρίωσης, την πρώτη υπόθεση ντόπινγκ στους Βρετανικούς κολυμβητικούς αγώνες της Μάγχης το 1865 (Pini 1964). Ο θάνατος του ποδηλάτη Linton στον αγώνα Παρίσι-Μπορντό έχει συσχετιστεί με υπερβολική δόση καφεΐνης. (Αυτή θα μπορούσε να ήταν πιθανότατα και η απλούστευση όσον αφορά την πολύ χαμηλή τοξικότητα της καφεΐνης.)

Οι εξαήμεροι ποδηλατικοί αγώνες (καθιερώθηκαν το 1879), η επαγγελματική πυγμαχία καθώς και οι αγώνες ταχύτητας αλόγων και σκύλων, προφανώς έδωσαν αφορμή για την αύξηση των προσπαθειών ντόπινγκ με αλκοόλ, κοκαΐνη, καφεΐνη, ηρωίνη, νιτρογλυκερίνη και στρυχνίνη. Ο νικητής του Μαραθωνίου στους Ολυμπιακούς Αγώνες του Σεντ Λούις το 1904, Τόμας Χικς, εκτός από την κατανάλωση ωμών αυγών και κονιάκ, έκανε χρήση ενέσιμης στρυχνίνης κατά τη διάρκεια της διαδρομής.

Είχε γίνει επίσης προσπάθεια πρόσμιξη αυτών των ουσιών ώστε να αυξήσουν τη διεγερτική απόδοσή τους, όπως:

- Το αλκοόλ, η καφεΐνη και η νιτρογλυκερόλη,
- Η κοκαΐνη και η ηρωίνη,
- Το αλκοόλ και η κοκαΐνη

Το 1908 Βελγικές ομάδες ποδοσφαίρου προσπάθησαν να βελτιώσουν τις επιδόσεις με την εισπνοή καθαρού οξυγόνου, αλλά εγκαταλείψαν αυτήν την προσπάθεια σύντομα.

Είναι δύσκολο να φανταστούμε πώς οι πρώτες αυτές περιπτώσεις θα μπορούσαν να είχαν ανακαλυφθεί - με άμεση παρατήρηση, από ομολογία ή με άλλο τρόπο.

Η πρώτη εφαρμογή χημικής ανάλυσης πραγματοποιήθηκε στην Αυστρία στις αρχές του εικοστού αιώνα, σε σχέση με μια σειρά από απρόσμενα αποτελέσματα σε αγώνες αλόγων. Ο Ludwig Prokop αναφέρει ότι η Αυστριακή Λέσχη Αναβατών - μετά από ύποπτες εκδηλώσεις κατά τη διάρκεια των υποδρομιών - κάλεσε το Ρώσο χημικό Bukowski να έρθει από την Αγία Πετρούπολη στη Βιέννη. Ο τελευταίος ήταν σε θέση να ανιχνεύσει αλκαλοειδή

στο σιέλο των ίππων. Ενώ ο Bukowski διατηρούσε τη μέθοδό του μυστική, ο καθηγητής Σίγκμουντ Frenkel ανέπτυξε τη δική του μέθοδο στο Πανεπιστήμιο της Βιέννης. Την περίοδο 1910-1911, πραγματοποιήθηκαν 218 αναλύσεις, οδηγώντας σε διάφορες κυρώσεις οι οποίες επιβλήθηκαν στους προπονητές μετά τα θετικά αποτελέσματα που βρέθηκαν στα δείγματα σιέλου των αλόγων.

Ενώ οι περιορισμοί για τη χρήση φαρμάκων στον αθλητισμό είχαν σύμφωνα με πληροφορίες εισαχθεί από το 1920, και η IAAF είχε απαγορεύσει το ντόπινγκ (χρήση διεγερτικών παραγόντων) το 1928, επίσημες δοκιμές σε ανθρώπους δεν είχαν ακόμη πραγματοποιηθεί. Ως εκ τούτου, οι περιορισμοί παρέμειναν αναποτελεσματικοί λόγω της έλλειψης δυνατοτήτων δοκιμών.

Το 1966 οι διεθνείς ομοσπονδίες UCI (ποδηλασία) και η FIFA (ποδόσφαιρο) εισήγαγαν το τεστ ντόπινγκ στα Παγκόσμια Πρωταθλήματα τους. Η Διεθνής Ολυμπιακή Επιτροπή (ΔΟΕ) συνέστησε τη δική της Ιατρική Επιτροπή και δημιούργησε τον πρώτο της κατάλογο απαγορευμένων ουσιών του 1967. Επίσης, εισήγαγε τις πρώτες δοκιμές στους Θερινούς Ολυμπιακούς Αγώνες το 1968 στο Μεξικό.

Οι δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια των αγώνων αποδείχθηκαν αναποτελεσματικές στον έλεγχο παραγόντων παρατεταμένης δράσης, όπως είναι οι αναβολικοί παράγοντες, εξαιτίας της δυνατότητας ανάκλησης τους πριν από τους αγώνες, ενώ η βελτίωση των επιδόσεων κρατούσε αρκετή ώρα μετά την αποβολή του ίδιου του μέσου. Αυτό οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η συλλογή δειγμάτων ήταν επίσης απαραίτητη εκτός των αγώνων. Παρά τις κάποιες αντιδράσεις, τελικά θεσπίστηκαν και τώρα αποτελούν τη ραχοκοκαλιά του ελέγχου ντόπινγκ.

Η θεαματική κατάχρηση στεροειδών από το δρομέα Ben Johnson στους Θερινούς Ολυμπιακούς Αγώνες της Σεούλ το 1988 προκάλεσε σοκ στην αθλητική κοινότητα και οδήγησε σε μια αυξημένη ετοιμότητα για να υποστηριχθούν αποτελεσματικά τα μέτρα ελέγχου ντόπινγκ. Παράλληλα, ο αριθμός των πιθανών παραγόντων ντόπινγκ άρχισε να αυξάνεται συνεχώς με την ανάπτυξη των συνθετικών οργανικών φαρμάκων, ο οποίος ακόμη συνεχίζεται.

Παρ' όλα αυτά - και παρά την συντριπτική πλειοψηφία των φαρμακευτικών προϊόντων στην παγκόσμια αγορά - η ανάπτυξη νέων φαρμακολογικών παραγόντων έχει επιβραδυνθεί σημαντικά εξαιτίας των πολύ αυστηρών απαιτήσεων των τοξικολογικών ελέγχων πριν από την καταχώρηση. Επειδή οι παράγοντες υπό ανάπτυξη είναι γνωστοί πολύ νωρίτερα από την τελική καταχώρηση και εισαγωγή τους στην αγορά, αυτό έρχεται σε αντίθεση με τη λαϊκή υπόθεση στα μέσα μαζικής ενημέρωσης ότι ο έλεγχος ντόπινγκ και η ανάλυση θα παραμένουν πάντα πολύ πίσω από την πρόοδο των στρατηγικών ντόπινγκ.

1.2 ΤΟ ΝΤΟΠΙΝΓΚ ΣΤΟΝ ΑΘΛΗΤΙΣΜΟ

1.2.1 Άνθρωποι^[2]

Το Ντόπινγκ στους **ανθρώπους** δεν είναι ένας σύγχρονος όρος. Σύμφωνα με αρχαίες πηγές που αναφέρονται στη Νορβηγική Μυθολογία, η χρήση ουσιών για την

αύξηση της δύναμης ήταν ήδη γνωστή μεταξύ των Berserkers. Αναφέρεται ότι λάμβαναν Bufotenin, που θεωρείται ότι βελτιώνει τη φυσική απόδοση και δύναμη. Το Bufotenin προέρχεται από το δέρμα ενός είδους βατράχων καθώς και από ταμανιτάρια Amanita.

Το Ντόπινγκ στο σύγχρονο αθλητισμό αξιόπιστα καταγράφηκε από το δεύτερο μισό του 19ου Αιώνα. Το 1865 εμφανίστηκε η πρώτη καταγεγραμμένη περίπτωση στην κολύμβηση κατά τον αγώνα στο κανάλι του Άμστερνταμ. Συγκεκριμένα, περιγράφηκε η πρόσληψη μιας ανώνυμης ουσίας που βελτιώνει την απόδοση. Το 1867, στους δημοφιλείς αγώνες ποδηλασίας 6 ημερών, οι Γάλλοι αθλητές προτιμούσαν μείγματα με βάση την καφεΐνη, οι Βέλγοι χρησιμοποιούσαν ζάχαρη αναμειγμένη με αιθέρα, ενώ άλλοι χρησιμοποιούσαν αλκοολούχα αφεψήματα ή νιτρογλυκερίνη.

Το 1896 αναφέρεται ο πρώτος θάνατος που προκλήθηκε από το ντόπινγκ. Ο Άγγλος ποδηλάτης A. Linton πέθανε, λόγω λήψης εφεδρίνης, στον αγώνα Παρίσι-Μπορντό. Το 1904, στο μαραθώνιο του St. Louis, ο Tom Hicks που μόλις είχε κερδίσει τον αγώνα, κατέρρευσε και οι ιατροί διαπίστωσαν πρόσληψη στρυχνίνης και κονιάκ πριν από τον αγώνα. Το 1910, ο James Jeffrie ισχυρίστηκε, αφού ηττήθηκε από τον Jack Johnson, ότι το τσάι του μολύνθηκε/ντοπαρίστηκε προκειμένου να τον νικήσει. Αυτή είναι η πρώτη αναφορά περίπτωσης στην οποία κατηγορούνται ντοπαρισμένοι αθλητές. Πολλές παρόμοιες περιπτώσεις για ντόπινγκ έχουν αναφερθεί στην Πυγμαχία κατά τη διάρκεια του πρώτου μισού του 20ου Αιώνα.

Το 1920, παρασκευάστηκαν για πρώτη φορά οι αμφεταμίνες, μια σχετικά γνωστή ομάδα ουσιών κατά τη διάρκεια του 20ου αιώνα όχι μόνο στον αθλητισμό. Το 1952, κατά τη διάρκεια των παγοδρομιών στο Όσλο, αίσθηση προκάλεσε η είδηση ότι αμπούλες και σύριγγες βρέθηκαν στα αποδυτήρια των αθλητών.

Η δραματική αύξηση χρήσης ουσιών ντόπινγκ ξεκίνησε τη δεκαετία του 1960. Η κοινωνία εκείνες τις μέρες πίστευε ότι υπήρχαν φάρμακα ικανά να οδηγήσουν σε οποιαδήποτε επιτυχία. Κατά τη διάρκεια των Ολυμπιακών Αγώνων της Ρώμης, το 1960, ο Δανός ποδηλάτης K. Jensen πέθανε λόγω χρήσης αμφεταμινών. Το 1967, ο 30 ετών Βρετανός ποδηλάτης Tom Simpson και ο δρομέας Dick Howard πέθαναν λόγω χρήσης αμφεταμινών και ηρωίνης, αντίστοιχα. Το 1968, ένα χρόνο αργότερα, ο Γερμανός πυγμάχος Jupp Elze πέθανε από χρήση ενός μίγματος αμφεταμινών. Στους Ολυμπιακούς Αγώνες του Μόντρεαλ, το 1976, ο Πολωνός αθλητής Z. Kaczmarek και ο Βούλγαρος αθλητής V. Khristov (αθλητές άρσης βαρών) αναγκάστηκαν να επιστρέψουν τα χρυσά τους μετάλλια όταν βρέθηκαν θετικοί σε Ντόπινγκ.

Ο Ben Johnson στους Ολυμπιακούς της Σεούλ το 1988, είναι το πιο γνωστό παράδειγμα νικητή που ακυρώθηκε, όπως και πολλοί άλλοι νικητές. Βρέθηκε θετικός για ένα απαγορευμένο αναβολικό στεροειδές (Στανοζολόλη), του αφαιρέθηκε το χρυσό του μετάλλιο στα 100 μέτρα ταχύτητας και αποκλείστηκε για δύο έτη. Αργότερα, αποδείχθηκε ότι όλοι, ή σχεδόν όλοι από τους φιναλίστ σε εκείνη την κούρσα είχαν πάρει απαγορευμένες ουσίες.

Η χαραυγή του 21ου αιώνα χαρακτηρίζεται από πολλά παραδείγματα Αθλητών που έχουν κατηγορηθεί για ντόπινγκ. Παραδείγματα αποτελούν οι δρομείς αγώνων ταχύτητας

όπως οι T. Montgomery, D. Chambers, M. Jones, ονόματα μερικών μόνο από τις πολυάριθμες γνωστές περιπτώσεις.

Δυστυχώς, το ντόπινγκ δεν είναι μόνο ιστορία αλλά προφανώς συνεχίζεται με νέες ουσίες και τεχνικές στις μέρες μας.

1.2.2 Άλογα^[5-8]

Η Ιππασία ως άθλημα, είναι γνωστή από την αρχαιότητα. Η χρήση του **αλόγου** ως μέσο μεταφοράς, ως βοηθός στις αγροτικές εργασίες ή στον πόλεμο, χάνεται στα βάθη των αιώνων. Η χρήση, όμως, του αλόγου σε αθλητικές συναντήσεις εμφανίζεται για πρώτη φορά στην αρχαία Ελλάδα, όπου από το 680 π.Χ. οι αρματοδρομίες και από το 648 π.Χ. οι ιπποδρομίες αποτελούσαν τα δύο από τα δέκα αγωνίσματα των Ολυμπιακών Αγώνων. Οι Αγώνες πραγματοποιούνταν μεταξύ 776 π.Χ. και 393 μ.Χ., κάθε τέσσερα χρόνια, χωρίς διακοπή. Το 1896 οι νέοι Ολυμπιακοί Αγώνες επανεισάγονται από τον βαρόνο Πιερ ντε Κουμπερτέν. Το 1909 πραγματοποιήθηκε το πρώτο Κύπελλο Υπερπήδησης Εμποδίων Εθνών στο Λονδίνο και το Σαν Σεμπαστιάν. Η ιππασία (Υπερπήδηση Εμποδίων, Ιππική Δεξιότητα, Ιππικό Τρίαθλο) αποτελεί επίσημο άθλημα των Ολυμπιακών Αγώνων από το 1912 στην Στοκχόλμη.

Το 1921 διαμορφώνεται η Διεθνής Ιππική Ομοσπονδία, FEI (Fédération Equestre Internationale), στη Λωζάννη της Ελβετίας. Ρυθμίζει διεθνείς διοργανώσεις στην Υπερπήδηση Εμποδίων, στην Ιππική Δεξιότητα και στο Ιππικό Τρίαθλο. Τα ιδρυτικά μέλη της είναι η Γαλλία, οι ΗΠΑ, η Σουηδία, η Ιαπωνία, το Βέλγιο, η Δανία, η Νορβηγία και η Ιταλία και το 1930 τυπώνει την πρώτη δημοσίευσή της, τον Κατάλογο FEI. Το 1953 πραγματοποιείται στο Παρίσι το πρώτο Παγκόσμιο Πρωτάθλημα Υπερπήδησης Εμποδίων, ακολουθούμενο το 1966 από Ιππική Δεξιότητα και τρίαθλο, Αμαξοδήγηση το 1972, Γυμναστική και Αντοχή το 1986, και Τιθάσευση το 2002.

Το 1996 η Παραϊπική Δεξιότητα γίνεται μέρος των Παραολυμπιακών Αγώνων. Το 2006 η FEI γίνεται το όργανο διοίκησης των κλάδων της Παραϊπικής Δεξιότητας και της Παραϊπικής Αμαξοδήγησης. Η FEI ήταν μία από τις πρώτες διεθνείς ομοσπονδίες οι οποίες άρχισαν να διέπουν και ρυθμίζουν ένα άθλημα τόσο για αρτιμελείς αθλητές όσο και για άτομα με αναπηρία.^[5,6]

Η Επιτροπή Αντι-Ντόπινγκ και Φαρμακευτικής αγωγής συστάθηκε το Νοέμβριο του 2008 για την αντιμετώπιση των κρουσμάτων ντόπινγκ υψηλού προφίλ τα οποία παρουσιάστηκαν στους Ολυμπιακούς Αγώνες του Πεκίνου, το 2008 και την επακόλουθη έκκληση προς τον Πρόεδρο της FEI από έναν αριθμό αναβατών οι οποίοι ζήτησαν μεγαλύτερη σαφήνεια σχετικά με το ζήτημα του ντόπινγκ και των ουσιών φαρμακευτικής αγωγής. Η νέα Επιτροπή έχει αναλάβει να συνεχίσει το έργο που ξεκίνησε η Ειδική Ομάδα Ντόπινγκ και Φαρμακευτικής αγωγής του 2004. Η Επιτροπή συγκέντρωσε εκπροσώπους από κάθε τομέα της κτηνιατρικής κι επιπλέον αντιπροσώπους όλων των ενδιαφερομένων για τον ιππικό αθλητισμό τομέων και των διευθυντικών οργάνων τους. Στόχος του ήταν να θεσπίσει το καλύτερο δυνατό σύστημα για την πρόληψη της χρήσης μεθόδων ή ουσιών που επηρεάζουν την απόδοση ενός διαγωνιζόμενου αλόγου, διασφαλίζοντας παράλληλα την

καλή διαβίωση των αλόγων ανά πάσα στιγμή. Για να μπορέσει η Επιτροπή να εκπληρώσει τα καθήκοντά της, τέσσερις ομάδες εστίασης συστάθηκαν με ειδικούς όρους αναφοράς. Οι Ομάδες Εργασίας περιλάμβαναν μέλη της Επιτροπής, καθώς και ειδικούς που εκπροσωπούσαν τους διάφορους ενδιαφερόμενους τομείς.

Επιπλέον, το Μάιο του 2009, η FEI δημιούργησε έναν πίνακα Ηθικής ως ανεξάρτητη επιτροπή για να αξιολογήσει και να διερευνήσει τις πρακτικές μεταξύ των μελών της γερμανικής ιππικής ομάδας και των υπαλλήλων της στα Ολυμπιακά ιππικά αγωνίσματα του 2008 στο Χονγκ Κονγκ. Υπό την προεδρία του πρώην Βρετανικού Επιτρόπου της Μητροπολιτικής Αστυνομίας Λόρδου Stevens, η επιτροπή Ηθικής μετονομάστηκε σε Επιτροπή Stevens. Η Επιτροπή Stevens στη συνέχεια διευρύνθηκε για να συμπεριλάβει μια ευρύτερη επισκόπηση των ιππικών αθλημάτων ώστε να συμβαδίζουν με τις εργασίες της Επιτροπής Ljungqvist και για να εφοδιάσει τη FEI με ένα πλήρες φάσμα των αλλαγών που πρέπει να εφαρμοστούν για την καταπολέμηση του ντόπινγκ. Οι συστάσεις της Επιτροπής Stevens, οι οποίες δημοσιεύθηκαν τον Σεπτέμβριο του 2009, υποστήριξαν και συμπλήρωσαν το έργο της Επιτροπής Ljungqvist. Το έργο των δύο επιτροπών στη συνέχεια ευθυγραμμίστηκε σε μια συνάντηση τον Οκτώβριο του 2009 για την παραγωγή των συστάσεων της Επιτροπής Κοινοπραξίας, η οποία έλαβε τη συντριπτική υποστήριξη στη Γενική Συνέλευση στην Κοπεγχάγη στις 19 Νοεμβρίου 2009, δημιουργώντας έναν χάρτη επαναστατικών αλλαγών οι οποίοι αποσκοπούν στο να αλλάξουν το πρόσωπο της ιππασίας.^[7]

Το 1911 οι υποδορμικές αρχές στην Αυστρία εξέφρασαν την ανησυχία τους ότι ορισμένα άλογα ανταγωνίζονταν υπό την επήρεια ναρκωτικών. Ένας Βιεννέζος χημικός, ο Δρ Frankel, προσελήφθη για να επινοήσει μια κατάλληλη μέθοδο για την ανίχνευση των μικρών ποσοτήτων των διεγερτικών φαρμάκων που χορηγούνται στα άλογα κούρσας. Μετά από κάποια αντιπαράθεση οι αναστολές των εκπαιδευτών έγιναν δεκτές και οι διαδικασίες του Δρ Frankel δικαιώθηκαν.

Την επόμενη χρονιά, το 1912, οι διαδικασίες του Frankel εφαρμόστηκαν στη Γαλλία και την Αγγλία. Άλλες ευρωπαϊκές χώρες, στις οποίες η χορήγηση φαρμάκων στα άλογα κούρσας είχε γίνει ένα σοβαρό πρόβλημα, σύντομα υιοθέτησαν τις μεθόδους του Frankel.

Ήταν ευρέως γνωστό από το 1930 ότι τα φάρμακα, συμπεριλαμβανομένων των ναρκωτικών, χρησιμοποιούνται ευρέως σε πίστες σε όλη τη Βόρεια Αμερική για να επηρεάσουν την απόδοση των αλόγων στους αγώνες. Ένα κύριο άρθρο στο "Το αίμα αλόγου" το 1932 έδωσε αφορμή στο Ομοσπονδιακό Γραφείο Ναρκωτικών να διερευνήσει τις καταγγελίες. Οι έρευνες αυτές οδήγησαν σε πάνω από εκατό καταδικαστικές αποφάσεις των ιδιοκτητών, των εκπαιδευτών και άλλου προσωπικού στην πίστα.^[8]

1.3 ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΝΤΟΠΙΝΓΚ

1.3.1 Άνθρωποι^[2-4]

Ο πλησιέστερος ελληνικός όρος στη λέξη ντόπινγκ (doping) είναι ο όρος φαρμακοδιέγερση, όμως για λόγους κάλυψης όλων των μορφών ντόπινγκ έχει καθιερωθεί

ο αγγλικός όρος. Στην ιστορία του ντόπινγκ έχουν υπάρξει πολλοί ορισμοί. Ο ισχύων επίσημος ορισμός του ντόπινγκ αποδίδεται βάσει του Παγκόσμιου Κώδικα Αντιντόπινγκ (World Anti-doping Code) ως ακολούθως: «Ως ντόπινγκ ορίζεται η παραβίαση ενός ή περισσότερων κανονισμών αντιντόπινγκ, όπως αυτοί αναγράφονται στα άρθρα 2.1 έως και 2.10 του Παγκόσμιου Κώδικα Αντιντόπινγκ»^[2,3]. Οι εκτενείς αυτοί κανονισμοί αναφέρονται κυρίως στην παρουσία απαγορευμένης ουσίας ή μεταβολιτών της, ή δεικτών σε ένα δείγμα προερχόμενο από το σώμα αθλητή, καθώς και σε άλλες παραβάσεις, όπως η άρνηση συμμετοχής του αθλητή σε δειγματοληψία, η κατοχή απαγορευμένων ουσιών κ.ά. Ο παραπάνω ορισμός είναι σαφής αφού συνοδεύεται από έναν κατάλογο απαγορευμένων ουσιών (Prohibited List)^[4] η οποία αναθεωρείται ετησίως και εκδίδεται από τη WADA (World Anti-Doping Agency).

Οποιαδήποτε περίπτωση ντόπινγκ επισύρει ποινή στον αθλητή. Οι ποινές που επιβάλλονται ποικίλλουν από απλή προειδοποίηση έως και αποκλεισμό του αθλητή από τους αγώνες εφόρου ζωής.^[3]

1.3.2 Άλογα^[9]

Σύμφωνα με τη Διεθνή Ιππική Ομοσπονδία, FEI (Fédération Equestre Internationale): Ως ντόπινγκ ορίζεται η εκδήλωση μιας ή περισσότερων παραβάσεων των κανόνων EAD (Equine Anti-Doping) όπως αυτοί ορίζονται στα άρθρα 2.1 έως 2.8 των EAD and Controlled Medication Regulations που ισχύουν από 1^η Ιανουαρίου 2015. Οι κανόνες αυτοί αναφέρονται κυρίως στην παρουσία απαγορευμένων ουσιών ή/και μεταβολιτών τους ή δεικτών τους σε ένα δείγμα προερχόμενο από άλογο, καθώς επίσης η χρήση ή η απόπειρα χρήσης μιας απαγορευμένης ουσίας ή μεθόδου, ή η αποφυγή, άρνηση ή παράλειψη υποβολής σε δειγματοληψία, ή η κατοχή μιας απαγορευμένης ουσίας ή μεθόδου κ.ά. Ο παραπάνω ορισμός είναι σαφής αφού συνοδεύεται από κατάλογο απαγορευμένων ουσιών (Prohibited List) ο οποίος αναθεωρείται ετησίως και εκδίδεται από τη FEI.

1.4 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΝΤΟΠΙΝΓΚ

1.4.1 Επιλογή Εργαστηρίων^[10,11]

Τα Αναγνωρισμένα Εργαστήρια Ελέγχου Ντόπινγκ της WADA εκτελούν την ανάλυση ελέγχου ντόπινγκ των δειγμάτων που συλλέγονται εκ μέρους των αθλητικών αρχών και ομοσπονδιών και πληρούν συγκεκριμένες προδιαγραφές ανάλυσης, ώστε τα αποτελέσματά τους να αναγνωρίζονται από τις αθλητικές αρχές.

Η WADA έχει συμπεριλάβει έναν Κώδικα Ηθικής στον Παγκόσμιο Κώδικα Αντιντόπινγκ προς συμμόρφωση από τα Αναγνωρισμένα Εργαστήρια.

Συνεπώς, τα Αναγνωρισμένα Εργαστήρια αναλύουν δείγματα τα οποία συλλέγονται εκ μέρους των αθλητικών αρχών και των επισήμων αντιντόπινγκ προγραμμάτων τους, που διεξάγονται σε ελέγχους εντός ή εκτός αγώνων. Όλα τα υπόλοιπα δείγματα που προέρχονται από προσωπικές ή εμπορικές συλλογές δεν γίνονται αποδεκτά.

Επιπλέον, το προσωπικό των Αναγνωρισμένων Εργαστηρίων δεν πρέπει να παρέχει καμία πληροφορία ή συμβουλή σε αθλητές που μπορεί να προσπαθήσουν να διαφύγουν τον έλεγχο.

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Κώδικα Αντιντόπινγκ, τα Αναγνωρισμένα Εργαστήρια πρέπει να λειτουργούν βάσει των απαιτήσεων της Διαπίστευσης ISO 17025. Συνεπώς, κάθε Αναγνωρισμένο Εργαστήριο πρέπει να έχει την Αναγνώριση της WADA, που διασφαλίζει ότι το εργαστήριο έχει την ικανότητα να εκτελεί αναλύσεις ελέγχου ντόπινγκ και τη Διαπίστευση ISO, που διασφαλίζει ότι οι προδιαγραφές της Αναγνώρισης της WADA εφαρμόζονται στις καθημερινές εργασίες ρουτίνας.

Η Διαπίστευση ISO παρέχεται και ελέγχεται συνήθως από εθνικούς οργανισμούς Διαπίστευσης, εξειδικευμένους σε αυτήν την υπηρεσία, και αναγνωρίζεται αμοιβαία από άλλους οργανισμούς Διαπίστευσης ανά τον κόσμο. Το τελευταίο σημαίνει ότι μία Διαπίστευση που παρέχεται σε μία χώρα από τον εθνικό οργανισμό Διαπίστευσης είναι ισότιμη με την Διαπίστευση που παρέχεται σε άλλη χώρα για παρόμοια δραστηριότητα από τον αντίστοιχο εθνικό οργανισμό Διαπίστευσης. Για την Ελλάδα, ο εθνικός φορέας Διαπίστευσης είναι το Εθνικό Σύστημα Διαπίστευσης (Ε.ΣΥ.Δ.) του Υπουργείου Ανάπτυξης.^[10]

Η αναγνώριση των εργαστηρίων προϋποθέτει τη λειτουργία τους σύμφωνα με το Διεθνές Πρότυπο για τα Εργαστήρια (International Standard for Laboratories) και περιλαμβάνει μεταξύ άλλων συνεχείς ελέγχους ικανότητας (proficiency tests).

Οι ίδιοι κανόνες ισχύουν και για τη Διεθνή Ιππική Ομοσπονδία (FEI).^[11]

1.4.2 Αρχές Υπεύθυνες για Έλεγχο

Όλα τα άλογα που έχουν εγγραφεί στη FEI ή σε κάποια Εθνική Ομοσπονδία, ή κατά οποιονδήποτε άλλο τρόπο είναι παρόντα ή αγωνίζονται σε μια Διεθνή Διοργάνωση, Εθνική Διοργάνωση ή Διαγωνισμό, θα πρέπει να υπόκεινται σε In-Competition Δοκιμή (α) από την FEI ή από οποιονδήποτε άλλο Αντιντόπινγκ Οργανισμό υπεύθυνο για το Διαγωνισμό ή τη Διοργάνωση σε περίπτωση Διεθνών Διοργανώσεων και (β) στην περίπτωση Εθνικής Διοργάνωσης, από την Εθνική Ομοσπονδία, μέσω της οποίας είναι εγγεγραμμένο το Άλογο, ή από οποιονδήποτε άλλον αρμόδιο Αντιντόπινγκ Οργανισμό για δοκιμές σε Διαγωνισμό ή Διοργάνωση.

1.4.3 Επιλογή Αλόγων για Έλεγχο

Η FEI καθορίζει τον αριθμό των δοκιμών που πρέπει να πραγματοποιηθούν και σε ποια Άλογα πρέπει να πραγματοποιηθούν. Επιπλέον, η Κτηνιατρική Επιτροπή, ο Κτηνιατρικός Αντιπρόσωπος ή/και οι Κτηνίατροι που πραγματοποιούν τους ελέγχους μπορούν επίσης να επιλέξουν Άλογα για τυχαίους ελέγχους ή/και στοχευμένους ελέγχους σε συνεργασία με την Αγωνοδίκη Επιτροπή σε Διεθνείς Διοργανώσεις. Κάθε Εθνική Ομοσπονδία καθορίζει, εντός της δικαιοδοσίας της, τον αριθμό των δοκιμών που πρέπει να πραγματοποιηθούν και σε ποιους ίππους θα πρέπει να εκτελεστούν.

Υπάρχουν τρεις έγκυρες μέθοδοι επιλογής αλόγων:

1) Υποχρεωτική δειγματοληψία:

Κατά τη διάρκεια του τελικού του Παγκοσμίου Κυπέλλου, των Παγκοσμίων και Ανώτερων Ηπειρωτικών Πρωταθλημάτων, των Ολυμπιακών Αγώνων και τα Παγκόσμια Παιχνίδια Ιππασίας, στα άλογα πρέπει να γίνεται δειγματοληπτικός έλεγχος ως εξής:

- i) Σε όλους τους Τελικούς Διαγωνισμούς για άτομα, τα 3 πρώτα άλογα,
- ii) Σε όλους τους Ομαδικούς Διαγωνισμούς, 1 άλογο από κάθε μία από τις 3 πρώτες Ομάδες.

2) Στοχευμένη δειγματοληψία:

Όταν ένας συγκεκριμένος λόγος ή περιστάσεις δικαιολογούν ότι ένα συγκεκριμένο Άλογο πρέπει να επιλεγεί για δειγματοληψία.

3) Τυχαία δειγματοληψία:

Τα άλογα μπορεί να επιλεγούν τυχαία, όπως συμφωνήθηκε από την Αγωνοδίκη Επιτροπή, τους Κτηνιατρικούς Αντιπροσώπους/Κτηνιατρική Επιτροπή και/ή τον Κτηνίατρο που πραγματοποιεί τον έλεγχο.

1.4.4 Χρόνος Συγκέντρωσης των Δειγμάτων

Τα άλογα μπορεί να επιλεχθούν για δειγματοληψία σε οποιαδήποτε στιγμή κατά τη διάρκεια της Περιόδου ενός Διαγωνισμού (για τις εντός Διαγωνισμού δοκιμές), όπως αυτό ορίζεται στους Γενικούς Κανονισμούς. Εκτός από τους Ολυμπιακούς και τους Παραολυμπιακούς Αγώνες αυτό γίνεται από μία ώρα πριν την πρώτη Επιθεώρηση Ίππων, και τελειώνει μισή ώρα μετά την ανακοίνωση των τελικών αποτελεσμάτων στο σχετικό γνωστικό αντικείμενο (relevant Discipline), εκτός εάν οι Αθλητικοί Κανόνες για το αντίστοιχο γνωστικό αντικείμενο (respective Discipline) προβλέπουν κάτι άλλο. Τα άλογα μπορεί να υποστούν δειγματοληψία αρκετές φορές κατά τη διάρκεια της περιόδου ενός Διαγωνισμού.

1.4.5 Ειδοποίηση για Δειγματοληψία (EADCMP Sampling)

Μόλις επιλεγεί ένα άλογο για δειγματοληψία ο υπεύθυνος ή μέλος του προσωπικού υποστήριξης του, πρέπει να ενημερωθεί,

Πρέπει να κοινοποιηθεί στον υπεύθυνο, ή σε ένα μέλος του προσωπικού υποστήριξης του, ότι το άλογό τους έχει επιλεγεί για δειγματοληψία το αργότερο 30 λεπτά μετά την ανακοίνωση των τελικών αποτελεσμάτων του Διαγωνισμού.

Εάν ένα άλογο που έχει επιλεχθεί για δειγματοληψία έχει αντικατασταθεί με κάποιο άλλο πριν από την τελετή απονομής των βραβείων, ο υπεύθυνος θα πρέπει να ειδοποιήσει τους υπεύθυνους υπαλλήλους ενημερώνοντάς τους ότι το άλογο δεν είναι αυτό που είχε αγωνιστεί και να βοηθήσει στο να διασφαλιστεί ότι στο προ-επιλεγμένο άλογο θα γίνει λήψη δείγματος.

Από τη στιγμή της κοινοποίησης, το άλογο πρέπει να συνοδεύεται έως ότου συλλεχθεί το δείγμα.

Μετά την κοινοποίηση, ο υπεύθυνος ή μέλος του προσωπικού υποστήριξης πρέπει να συνοδεύσει το άλογο στο Δωμάτιο Ελέγχου. Εάν ο υπεύθυνος δεν είναι σε θέση να συνοδεύσει το άλογο, πρέπει να ορίσει ένα μέλος του προσωπικού υποστήριξης για να το συνοδεύσει, και να είναι μάρτυρας της διαδικασίας δειγματοληψίας.

1.4.6 Πρωτόκολλο Συλλογής Αίματος και Ούρων

Μόνο εγκεκριμένος εργαστηριακός εξοπλισμός δειγματοληψίας από τη FEI, ή kit, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη συλλογή του δείγματος. Επαρκής εξοπλισμός δειγματοληψίας πρέπει να είναι διαθέσιμος για τον κτηνίατρο ή Κτηνιατρικούς Αντιπροσώπους / Κτηνιατρική Επιτροπή που πραγματοποιούν τον έλεγχο, ενώ κατάλληλα Δωμάτια Ελέγχου ή χώροι πρέπει να παρέχονται.

Δείγματα ούρων και αίματος θα πρέπει να συλλέγονται κανονικά από όλα τα άλογα που έχουν επιλεγεί για τη δειγματοληψία.

Οι Κτηνίατροι ή οι Κτηνιατρικοί Αντιπρόσωποι που πραγματοποιούν τον έλεγχο, οφείλουν, πρέπει να ορίσουν σαν αναμονή έως 1 ώρα ώστε το άλογο να δώσει ένα δείγμα ούρων από τη στιγμή που φτάνει στο χώρο που πρόκειται να ελεγχθεί.

Όσον αφορά τη συλλογή επαρκούς αριθμού δειγμάτων αίματος από το άλογο, τα δοχεία περιέκτες πρέπει να χωριστούν σε 2 ομάδες. 1 ομάδα πρέπει να προσδιορίζονται ως δείγμα αίματος Α και το άλλο ως δείγμα αίματος Β.

Όσον αφορά τη συλλογή ενός επαρκούς όγκου ούρων, τα ούρα θα πρέπει να κατανέμονται σε 2 ξεχωριστά δοχεία: 1 δοχείο πρέπει να αναγνωριστεί ως δείγμα ούρων Α και το άλλο ως δείγμα ούρων Β.

Όλα τα δείγματα πρέπει να σφραγίζονται σύμφωνα με το σύστημα που χρησιμοποιείται από το εγκεκριμένο εργαστήριο της FEI που προμηθεύει τον εξοπλισμό δοκιμών και διεξάγει την μετέπειτα ανάλυση.

1.4.7 Ανάλυση Δειγμάτων

Σ' ένα πρώτο στάδιο εφαρμόζονται αναλυτικές διαδικασίες σάρωσης (screening) με στόχο την ανάδειξη των ύποπτων δειγμάτων και το διαχωρισμό των αρνητικών δειγμάτων. Στις μέρες μας, οι διαδικασίες σάρωσης στην πλειοψηφία τους περιλαμβάνουν την προ-κατεργασία των δειγμάτων με διαδικασία υγρό εκχύλισης ή εκχύλισης στερεάς φάσης ή συνδυασμό αυτών και στη συνέχεια την ανάλυση των κατεργασμένων δειγμάτων με μεθόδους GC/MS, LC/MS και ανοσοχημικές τεχνικές, με στόχο την ανίχνευση όσο το δυνατό μεγαλύτερου αριθμού απαγορευμένων ουσιών.



Εικόνα 1.1: Παράδοση δειγμάτων και αλυσίδα παραγωγής – σφραγισμένα και επισήμασμένα

Σ' ένα δεύτερο στάδιο, στα ύποπτα δείγματα (δείγματα στα οποία έχουν βρεθεί απαγορευμένες ουσίες) που προέκυψαν από τις αναλύσεις της σάρωσης πραγματοποιείται επανάληψη της ανάλυσης με επιβεβαιωτικές διαδικασίες, εξειδικευμένες για την ανίχνευση της ύποπτης ουσίας.^[9,12]



Εικόνα 1.2: Αριστερά ανθρώπινο δείγμα. Δεξιά Δείγμα αλόγου

1.5 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΑΠΑΓΟΡΕΥΜΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

1.5.1 Εισαγωγή

Ο Κατάλογος Απαγορευμένων ουσιών της FEI είναι πλήρης και λεπτομερής. Επιτρέπει στους αθλητές και τους συμβούλους τους να προσδιορίσουν με σαφήνεια ουσίες που μπορούν να χρησιμοποιήσουν κανονικά εκτός συναγωνισμού οι οποίες ωστόσο, δεν επιτρέπονται ενώ αγωνίζονται, και αναφέρονται ως ελεγχόμενες ουσίες. Βοηθά επίσης να προσδιοριστούν οι ουσίες που δεν επιτρέπονται για χρήση σε ίππους, ανά πάσα στιγμή, και αναφέρονται ως Απαγορευμένες ουσίες. Θα πρέπει επίσης να επισημανθεί ότι οποιαδήποτε άλλη ουσία με παρόμοια χημική δομή ή παρόμοια βιολογική επίδραση-εις από τις ουσίες που περιλαμβάνονται στον κατάλογο θεωρούνται επίσης ως σχετικές με τη λίστα.^[13]

Στους ελέγχους ντόπινγκ των ιππικών αθλημάτων, υπάρχουν συχνά διαφορετικοί κανόνες για τη χρήση και τον έλεγχο των επιμέρους φαρμάκων ανάλογα με τη γεωγραφική θέση και το είδος του αθλήματος. Για παράδειγμα, η Διεθνής Ομοσπονδία Ιπποδρομικών Αρχών (IFHA) στοχεύει στην προώθηση της «καλής ρύθμισης και βέλτιστων πρακτικών» μεταξύ των εργαστηρίων που κάνουν ελέγχους για τις ιπποδρομίες, και προτείνει μια προσέγγιση για τον έλεγχο της χρήσης και κατάχρησης ναρκωτικών στις ιπποδρομίες με βάση την απαγόρευση της παρουσίας ναρκωτικών ή μεταβολιτών κατά τη στιγμή των αγώνων. Αυτή η προσέγγιση έχει επισημοποιηθεί με το άρθρο 6 της Διεθνούς Συμφωνίας Εκτροφής, Ιπποδρομίας και Στοιχήματος του IFHA, η οποία διαφέρει σημαντικά από την προσέγγιση του Παγκόσμιου Οργανισμού Αντι-Ντόπινγκ (WADA) για το ανθρώπινο ντόπινγκ δεδομένου ότι οι παράγοντες ντόπινγκ έχουν απαγορευτεί εξαιτίας της δυνατότητάς τους να επηρεάσουν έναν αριθμό σωματικών συστημάτων και όχι λόγω κάποιας ειδικής ονομασίας ή δομής. Οι τοπικές αρχές έχουν την τελική απόφαση για το ποιες διατάξεις του άρθρου 6 θα επιλέξουν να εφαρμόσουν ανάλογα με την περιοχή τους και ως εκ τούτου υπάρχει μια διάσπαση μεταξύ πλήρους και μερικής υπογραφής με το άρθρο 6. Επιπλέον, οι κανόνες για τα Ολυμπιακά Ιππικά αθλήματα όπως η εκγύμναση και το τρίαθλο είναι διαφορετικές από εκείνες των ιπποδρομικών αρχών. Η εικόνα για το κανονιστικό πλαίσιο της κάθε κατηγορίας φαρμάκων δίνεται περιγράφοντας την κατάταξή τους από τη Διεθνή

Ένωση Επιτρόπων Ιπποδρομιών (ARCI) ως παράδειγμα μιας αρχής ιπποδρομιών και της Διεθνούς Ιππικής Ομοσπονδίας (FEI) για ολυμπιακά αθλήματα.

Σύμφωνα με τους κανόνες της FEI, οι απαγορευμένες ουσίες ταξινομούνται είτε ως «απαγορευμένες» (οριστικό) είτε ως «ελεγχόμενες» (η χρήση τους είναι περιορισμένη), ανάλογα με το αν έχουν νόμιμη θεραπευτική χρήση σε ορισμένες περιπτώσεις. Η ταξινόμηση της ARCI είναι κάπως πιο περίπλοκη, με τις απαγορευμένες ουσίες να έχουν ταξινομηθεί σε πέντε διαφορετικές ομάδες, όπως καθορίζεται από τον συνδυασμό της φαρμακολογίας, της πρότυπης χρήσης ναρκωτικών, και την καταλληλότητα της χρήσης ναρκωτικών στον ιππόδρομο.

- Κατηγορία 1: διεγερτικά και αντικαταθλιπτικά φάρμακα που έχουν τις μεγαλύτερες πιθανότητες να επηρεάσουν την απόδοση και που δεν έχουν καμία γενικά αποδεκτή ιατρική χρήση στις ιπποδρομίες. Πολλοί από αυτούς τους παράγοντες ανήκουν στον κατάλογο II της Υπηρεσίας Κατά των Ναρκωτικών (DEA).
- Κατηγορία 2: Φάρμακα που έχουν μεγάλες δυνατότητες να επηρεάσουν την απόδοσή, αλλά λιγότερο από ό,τι τα φάρμακα της κατηγορίας 1. Τα φάρμακα αυτά: 1) δεν είναι γενικά αποδεκτά ως θεραπευτικοί παράγοντες σε αγωνιστικά άλογα, ή 2) είναι θεραπευτικοί παράγοντες που έχουν υψηλή πιθανότητα κατάχρησης.
- Κατηγορία 3: Φάρμακα που μπορεί να έχουν ή να μην έχουν γενικά αποδεκτή ιατρική χρήση στις ιπποδρομίες, αλλά η φαρμακολογία των οποίων υποδηλώνει μικρότερη πιθανότητα να επηρεάσουν την απόδοση από ό,τι τα φάρμακα της κατηγορίας 2.
- Κατηγορία 4: Θεραπευτικά φάρμακα που αναμένεται να έχουν λιγότερες πιθανότητες να επηρεάσουν την απόδοση από αυτά της κατηγορίας 3.
- Κατηγορία 5: Θεραπευτικά φάρμακα για τα οποία έχουν καθοριστεί όρια συγκέντρωσης από τις αρμόδιες αρχές των αγώνων, καθώς και ορισμένοι παράγοντες όπως το διμεθυλσουλφοξείδιο (DMSO) και άλλα φάρμακα, όπως καθορίζεται από τα ρυθμιστικά όργανα.^[13-15]

1.5.2 Αναβολικά Ανδρογόνα Στεροειδή (AAS)

Αναβολικά στεροειδή, τεχνικώς γνωστά ως αναβολικά-ανδρογόνα στεροειδή (AAS), είναι φάρμακα που έχουν δομική σχέση με το κυκλικό σύστημα δακτυλίων στεροειδών και έχουν παρόμοια επίδραση με την τεστοστερόνη στο σώμα. Αυξάνουν την πρωτεΐνη στα κύτταρα, ειδικά στους σκελετικούς μύες. Τα αναβολικά στεροειδή έχουν επίσης ανδρογόνες και αρρενωπές ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένης της ανάπτυξης και της συντήρησης των ανδρικών χαρακτηριστικών, όπως η ανάπτυξη των φωνητικών χορδών, των όρχεων (πρωτογενή σεξουαλικά χαρακτηριστικά) και της τριχοφυΐας του σώματος (δευτερογενή σεξουαλικά χαρακτηριστικά). Η λέξη αναβολικά προέρχεται από την ελληνική λέξη άναβολή και η λέξη ανδρογενές από τις ελληνικές άνδρός + -γενής.

Τα αναβολικά στεροειδή δημιουργήθηκαν αρχικά τη δεκαετία του 1930, και τώρα χρησιμοποιούνται για θεραπευτικούς σκοπούς στην ιατρική για να τονώσουν την ανάπτυξη των μυών και της όρεξης, να προκαλέσουν ανδρική εφηβεία και στη θεραπεία χρόνιων παθήσεων, όπως ο καρκίνος και το AIDS. Το Αμερικανικό Κολέγιο Αθλητιατρικής αναγνωρίζει ότι τα ΑΑΣ, με την παρουσία επαρκούς διατροφής, μπορούν να συμβάλουν στην αύξηση του σωματικού βάρους, συχνά καθώς αυξάνεται η άλιπη μάζα και ότι τα οφέλη σε μυϊκή δύναμη που μπορούν να επιτευχθούν μέσω της υψηλής έντονης άσκησης και της σωστής διατροφής μπορούν επιπλέον να αυξηθούν με τη χρήση των ΑΑΣ σε ορισμένα άτομα.

Κίνδυνοι για την υγεία μπορούν να προκληθούν από μακροχρόνια χρήση ή υπερβολικές δόσεις αναβολικών στεροειδών. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες περιλαμβάνουν, επιβλαβείς αλλαγές στα επίπεδα χοληστερόλης (αυξημένη χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη και μειωμένη υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη), ακμή, υψηλή πίεση του αίματος, βλάβη στο ήπαρ (κυρίως με από του στόματος στεροειδή), και επικίνδυνες αλλαγές στη δομή της αριστερής κοιλίας της καρδιάς. Συνθήκες που σχετίζονται με ορμονικές διαταραχές όπως γυναικομαστία και μείωση μεγέθους των όρχεων μπορεί επίσης να προκληθεί από τα αναβολικά στεροειδή.

Η χρήση των αναβολικών στεροειδών για την καλύτερη απόδοση στον αθλητισμό, στις υποδομιές και το body building, είναι αμφιλεγόμενη λόγω των δυσμενών επιπτώσεών τους και της δυνατότητας απόκτησης αθέμιτου πλεονεκτήματος το οποίο θεωρείται εξαπάτηση. Η χρήση τους αναφέρεται ως ντόπινγκ και απαγορεύτηκε από όλους τους μεγάλους αθλητικούς φορείς. Για πολλά χρόνια, τα ΑΑΣ ήταν οι πιο συχνά ανιχνευόμενες ουσίες ντόπινγκ στα διαπιστευμένα από τη Διεθνή Ολυμπιακή Επιτροπή εργαστήρια. Στις χώρες όπου τα ΑΑΣ είναι ελεγχόμενες ουσίες, υπάρχει συχνά η μαύρη αγορά στην οποία εισάγονται λαθραία, κατασκευάζονται παράνομα ή ακόμα πωλούνται στους χρήστες και εικονικά φάρμακα.^[16]

Λόγω της σημασίας τους ως εργογόνα ναρκωτικά κατάχρησης μέσα στη βιομηχανία υποδομιών και λόγω της συμμετοχής τους στην αναπαραγωγή των υποειδών, έχει δοθεί μεγαλύτερη βαρύτητα στο μεταβολισμό των στεροειδών στα άλογα από οποιαδήποτε άλλη κατηγορία ενώσεων. Τα αναβολικά-ανδρογόνα στεροειδή απαγορεύονται σύμφωνα με τους κανόνες της FEI (και επίσης από πολλές υποδομικές αρχές), αλλά δεν τους δίνεται το υψηλότερο επίπεδο της ταξινόμησης από την ARCI και τοποθετούνται στην κατηγορία 3. Αυτό συμβαίνει εν μέρει επειδή ορισμένα σκευάσματα αναβολικών-ανδρογόνων στεροειδών επιτρέπονται για χρήση εκτός των αγώνων.

In vivo και in vitro μελέτες τόσο ενδογενούς όσο και εξωγενούς στεροειδούς μεταβολισμού στα άλογα έχουν διεξαχθεί και υπάρχει πλέον μια ισχυρή έρευνα εντός του κτηνιατρικού τομέα ώστε να γίνει κατανοητή η μοριακή βιολογική της δράσης τους, καθώς και τη μέτρηση των συγκεντρώσεών τους σε βιολογικά υγρά. Η παρουσία και ο μεταβολισμός των ενδογενών αναβολικών-ανδρογόνων στεροειδών (AAS) στα κρεατοπαραγωγά ζώα, συμπεριλαμβανομένων των αλόγων, έχει πρόσφατα αναθεωρηθεί

και ένα άρθρο ανασκόπησης αναφερόμενο στο μεταβολισμό τόσο των ενδογενών όσο και των εξωγενών AAS στα άλογα έχει πρόσφατα δημοσιευτεί. Επίσης, η αναθεώρηση των αναλυτικών μεθόδων που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση στεροειδών έχει επίσης πρόσφατα δημοσιευθεί.^[14]

1.5.3 Διεγερτικά

Τα διεγερτικά (ονομάζονται επίσης ψυχοδιεγερτικά) είναι ψυχοτρόπα φάρμακα που προκαλούν προσωρινές βελτιώσεις είτε στις πνευματικές είτε στις σωματικές λειτουργίες ή και στις δύο. Παραδείγματα τέτοιου είδους ενεργειών μπορούν να περιλαμβάνουν αυξημένη εγρήγορση, επαγρύπνηση και κινητικότητα, μεταξύ άλλων. Επειδή επιδρούν με ένα χαρακτηριστικό "ανορθωτικό" συναίσθημα, περιστασιακά αναφέρονται ως «uppers» (βελτιωτικά της διάθεσης). Τα καταθλιπτικά ή "κατασταλτικά", τα οποία μειώνουν την ψυχική ή / και σωματική λειτουργία, είναι σε πλήρη αντίθεση με τα διεγερτικά και θεωρούνται ως τα λειτουργικά αντίθετά τους. Τα διεγερτικά χρησιμοποιούνται ευρέως σε όλο τον κόσμο ως συνταγογραφούμενα φάρμακα αλλά και χωρίς ιατρική συνταγή, τόσο ως νόμιμες όσο και ως παράνομες ουσίες για ψυχαγωγική χρήση ή κατάχρηση.

Τα διεγερτικά επιφέρουν μια διαφορετική επίδραση ενισχύοντας την δράση του κεντρικού και περιφερικού νευρικού συστήματος. Συχνές ανεπιθύμητες ενέργειες, οι οποίες ποικίλλουν ανάλογα με την ουσία και τη δοσολογία, μπορεί να περιλαμβάνουν αυξημένη εγρήγορση, ευαισθητοποίηση, επαγρύπνηση, αντοχή, αυξημένη απόδοση και δραστηριοποίηση, αυξημένη ερωτική διέγερση, υπερκινητικότητα, αύξηση του καρδιακού ρυθμού και της αρτηριακής πίεσης, και την αντίληψη της μειωμένης απαίτησης για φαγητό και ύπνο. Πολλά διεγερτικά είναι επίσης ικανά να βελτιώσουν τη διάθεση, την ανακούφιση του άγχους και μερικά μπορούν να προκαλέσουν ακόμη και αισθήματα ευφορίας. Ωστόσο διαφορετικές επιδράσεις είναι δοσοεξαρτώμενες, όπως η αμφεταμίνη που προκαλεί άγχος, δυσθυμία, υπερκινητικότητα και ενδεχομένως καρδιακή ανεπάρκεια σε υψηλές δόσεις, αλλά ανακούφιση του άγχους, παραγωγή ευθυμίας ή ευφορίας, μειωμένη υπερκινητικότητα και γενικά δεν προκαλεί σοβαρές παρενέργειες σε μέτριες δόσεις όταν χρησιμοποιείται στην κλινική ιατρική. Τα διεγερτικά επιδρούν μέσα από μια σειρά από διαφορετικούς φαρμακολογικούς μηχανισμούς, ο πιο σημαντικός από τους οποίους περιλαμβάνει τη ενίσχυση της νορεπινεφρίνης (νοραδρεναλίνη) κ.ά.^[17]

1.5.4 Βρογχοδιασταλτικά

Ένα βρογχοδιασταλτικό είναι μια ουσία η οποία διαστέλλει τους βρόγχους και τα βρογχιόλια, μειώνοντας την αντίσταση του αναπνευστικού αεραγωγού και αυξάνοντας τη ροή του αέρα στους πνεύμονες. Τα βρογχοδιασταλτικά μπορεί να είναι ενδογενή (παράγονται φυσικά μέσα στο σώμα), ή μπορεί να είναι φάρμακα που χορηγούνται για τη θεραπεία αναπνευστικών δυσκολιών. Είναι πιο χρήσιμα σε αποφρακτικές ασθένειες των πνευμόνων, εκ των οποίων το άσθμα και η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια είναι οι πιο κοινές παθήσεις. Παρόλο που αυτό παραμένει κάπως αμφιλεγόμενο, θα μπορούσαν να

είναι χρήσιμα σε βρογχιολίτιδα και βρογχιεκτασίες. Συχνά συνταγογραφούνται, αλλά, σε μη αποδεδειγμένης σημασίας περιοριστικές πνευμονοπάθειες.

Τα βρογχοδιασταλτικά έχουν βραχεία ή μακράς διάρκειας δράση. Τα φάρμακα βραχείας δράσης παρέχουν γρήγορη ή "σωτήρια" ανακούφιση από οξύ βρογχόσπασμο. Τα μακράς δράσης βρογχοδιασταλτικά βοηθούν στον έλεγχο και την πρόληψη των συμπτωμάτων. Οι τρεις τύποι των συνταγογραφούμενων βρογχοδιασταλτικών φαρμάκων είναι οι β2-αγωνιστές (βραχυπρόθεσμης και μακράς δράσης), τα αντιχολινεργικά (βραχείας δράσης) και η θεοφυλλίνη (μακράς δράσης).

- Βραχείας δράσης β2-αγωνιστές

Είναι φάρμακα γρήγορης ανακούφισης ή "διάσωσης" που προσφέρουν γρήγορη, προσωρινή ανακούφιση από τα συμπτώματα του άσθματος ή της έξαψης. Αυτά τα φάρμακα συνήθως δρουν μέσα σε 20 λεπτά ή λιγότερο, και μπορεί να διαρκέσουν από τέσσερις έως έξι ώρες. Αυτά τα εισπνεόμενα φάρμακα είναι καλύτερα για τη θεραπεία ξαφνικών και σοβαρών ή νέων συμπτωμάτων άσθματος. Αν ληφθούν 15 έως 20 λεπτά νωρίτερα, αυτά τα φάρμακα μπορούν επίσης να αποτρέψουν τα συμπτώματα του άσθματος που προκαλούνται από την άσκηση ή την έκθεση σε κρύο αέρα. Μερικοί βραχείας δράσης β-αγωνιστές (για παράδειγμα σαλβουταμόλη) είναι ειδικοί για τους πνεύμονες, καλούνται β2-αγωνιστές και μπορούν να ανακουφίσουν τους βρογχόσπασμους χωρίς ανεπιθύμητες καρδιακές παρενέργειες των μη ειδικών β-αγωνιστών (για παράδειγμα, εφεδρίνη ή επινεφρίνη). Ασθενείς οι οποίοι τακτικά ή συχνά πρέπει να πάρουν βραχείας δράσης β-αγωνιστές θα πρέπει να συμβουλευούνται το γιατρό τους, καθώς τέτοια χρήση δείχνει ανεξέλεγκτο άσθμα, και τα συνήθη φάρμακά τους μπορεί να χρειαστούν προσαρμογή.

- Μακράς δράσης β2-αγωνιστές

Αυτά είναι μεγάλης διάρκειας φάρμακα που λαμβάνονται συνήθως με σκοπό τον έλεγχο και την πρόληψη της βρογχοσυστολής. Δεν προορίζονται για γρήγορη ανακούφιση. Αυτά τα φάρμακα μπορεί να χρειαστούν περισσότερο χρόνο για να αρχίσουν να δρουν, αλλά ανακουφίζουν τη στένωση των αεραγωγών μέχρι και 12 ώρες. Συνήθως λαμβάνονται δύο φορές την ημέρα σε συνδυασμό με ένα αντιφλεγμονώδες φάρμακο, διατηρούν ανοιχτούς τους αεραγωγούς και αποτρέπουν τα συμπτώματα του άσθματος, ιδιαίτερα τη νύχτα.

Τέτοια παραδείγματα είναι η σαλμετερόλη και η φορμοτερόλη.^[18]

1.5.5 Μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα

Τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (συνήθως συντετμημένο στα ΜΣΑΦ ή NSAIDs, που ονομάζονται επίσης μη στεροειδείς αντιφλεγμονώδεις παράγοντες /

αναλγητικά (NSAIDs) ή μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (NSAIDs), είναι μια κατηγορία φαρμάκων που παρέχει αναλγητικά (παισιόπινα) και αντιπυρετικά (μείωση του πυρετού) αποτελέσματα, και, σε υψηλότερες δόσεις, αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις. Ο όρος μη στεροειδή φάρμακα τα διακρίνει από τα στεροειδή, τα οποία, ανάμεσα σε μια ευρεία γκάμα άλλων επιδράσεων, έχουν παρόμοια (eicosanoid) εικοσανοειδή-καταθλιπτική, αντιφλεγμονώδη δράση. Ως αναλγητικά, τα NSAIDs δεν συνηθίζονται καθότι είναι μη-ναρκωτικά και έτσι χρησιμοποιούνται ως εναλλακτική λύση στα ναρκωτικά αφού είναι μη εθιστικά.

Η έρευνα υποστηρίζει τη χρήση των NSAIDs για τον έλεγχο του πόνου που σχετίζεται με κτηνιατρικές διαδικασίες, όπως η κοπή των κεράτων και ο ευνουχισμός των μόσχων. Το καλύτερο αποτέλεσμα επιτυγχάνεται με το συνδυασμό ενός βραχυπρόθεσμου τοπικού αναισθητικού όπως η λιδοκαΐνη με ένα NSAID που ενεργεί ως ένα πιο μακροπρόθεσμο αναλγητικό. Ωστόσο, όπως διαφορετικά είδη ζώων έχουν διαφορετικές αντιδράσεις σε διαφορετικά φάρμακα της οικογένειας των NSAIDs, λίγα από τα υπάρχοντα ερευνητικά δεδομένα μπορούν να επεκταθούν σε ζωικά είδη πέρα από εκείνα που μελετήθηκαν ειδικά. Η σχετική κυβερνητική υπηρεσία σε μια περιοχή απαγορεύει μερικές φορές χρήσεις που έχουν εγκριθεί σε άλλες δικαιοδοσίες. Για παράδειγμα, οι επιπτώσεις της κετοπροφένης έχουν μελετηθεί σε άλογα περισσότερο από ότι σε μηρυκαστικά, αλλά, λόγω της διαμάχης για τη χρήση του σε ιπποδρομίες, οι κτηνίατροι που φροντίζουν τα ζώα στις Ηνωμένες Πολιτείες πιο συχνά συνταγογραφούν φλουνιζίνη μεγλουμίνη, η οποία, ενώ επισημαίνεται για χρήση σε τέτοια ζώα, δεν ενδείκνυται για μετεγχειρητικό πόνο.^[19]

Εκτός από τα αναβολικά-ανδρογόνα στεροειδή και κατασταλτικά / ηρεμιστικά, τα μη-στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (NSAIDs) είναι η πιο ευρέως μεταβολική τάξη φαρμάκων που έχει μελετηθεί σε άλογα. Αυτό οφείλεται εν μέρει στο ευρύ φάσμα δομών, αλλά και λόγω της σημασίας τους ως θεραπευτικά μέσα και την ανάγκη ελέγχου της χρήσης τους στις ιπποδρομίες. Διαφορετικές ρυθμιστικές αρχές διαθέτουν ποικίλες απόψεις σχετικά με τον έλεγχο της χρήσης των ΜΣΑΦ, ανάλογα με το ποιο φάρμακο έχει χορηγηθεί, είτε είναι κατά τη διάρκεια είτε εκτός διαγωνισμού, και αν η χρήση του φαρμάκου έχει δηλωθεί. Η ARCI τοποθετεί ένα μεγάλο αριθμό των ΜΣΑΦ στην κατηγορία 4, αλλά μερικά (όπως το etodolac και αρκετοί από τους αναστολείς COX-2) αναβαθμίζονται στην κατηγορία 2 ή 3, εάν δεν είναι εγκεκριμένα για χρήση σε άλογα ή αν προκαλούν άλλες επιπτώσεις στην απόδοση των ιπποειδών. Οι κανονισμοί της FEI ακολουθούν παρόμοια πορεία και πολλά από τα αδειοδοτημένα ΜΣΑΦ των ιπποειδών εμπίπτουν στην ελεγχόμενη κατηγορία, αλλά μαζί με άλλα φάρμακα τα οποία θεωρούνται απαγορευμένα.^[14]

1.5.6 Καταπραϋντικά και ηρεμιστικά

Εκτός από τα AAS και τα NSAIDs, τα καταπραϋντικά και τα ηρεμιστικά είναι οι πιο ευρέως μελετημένες κατηγορίες μεταβολικών φαρμάκων τα οποία είναι κατάλληλα για τον έλεγχο ναρκωτικών των ίππων. Αυτό οφείλεται εν μέρει στο ευρύ φάσμα των δομών και τρόπων δράσης τους, αλλά και λόγω της σημασίας τους ως θεραπευτικά μέσα και την

ανάγκη για έλεγχο της κατάχρησής τους σε ανταγωνιστικές υποδρομίες. Τα καταπραϋντικά / ηρεμιστικά έχουν σαφώς την ικανότητα να επηρεάσουν την απόδοση, αλλά μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν νόμιμα σε κτηνιατρικά πλαίσια εκτός διαγωνισμών. Ως εκ τούτου, ορισμένες κατηγορίες φαρμάκων απαγορεύονται από την FEI (δηλαδή τα βαρβιτουρικά και η ρεζερπίνη), μερικά φάρμακα ελέγχονται (όπως η ακεπρομαζίνη, η δετομιδίνη και η κεταμίνη) και άλλες έχουν ομάδες που εμπίπτουν και στις απαγορευμένες και στις ελεγχόμενες κατηγορίες ανάλογα με το κάθε φάρμακο (όπως οι βενζοδιαζεπίνες). Ομοίως, οι ταξινομήσεις του ARCI είναι ένα μίγμα κατηγοριών, με την πλειοψηφία να εμπίπτει είτε στην κατηγορία 2 (όπως τα βαρβιτουρικά, οι βενζοδιαζεπίνες, η κεταμίνη και η ρεζερπίνη) είτε στην κατηγορία 3 (όπως η ακεπρομαζίνη και η ντετομιδίνη).^[14]

1.5.7 Τοπικά αναισθητικά

Τα τοπικά αναισθητικά παράγουν τοπική αναισθησία μέσω αποκλεισμού των τασσεοελεγχόμενων διαύλων νατρίου. Ωστόσο, προκαλούν επίσης ποικίλες επιδράσεις στην καρδιά και διεγερτική επίδραση στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ). Ενώ η πλειοψηφία των τοπικών αναισθητικών αναφέρονται ως παράγοντες της κατηγορίας 3 σύμφωνα με την ARCI, λόγω της δυνατότητάς τους για χρήση ως νεύροανασταλτικοί παράγοντες, τα περισσότερα από τα ενέσιμα τοπικά αναισθητικά, συμπεριλαμβανομένων των βουπιβακαΐνη, βουτανλικαΐνη, λιδοκαΐνη, μεπιβακαΐνη, πριλοκαΐνη και ροπιβακαΐνη παρατίθενται ως παράγοντες της κλάσης 2. Εν όψει της διεγερτικής επίδρασης στο κεντρικό νευρικό σύστημα, η κοκαΐνη κατηγοριοποιείται ως παράγοντας στην κατηγορία 1, ενώ η προκαΐνη (η οποία χρησιμοποιείται επίσης σε σύμπλοκο με την πενικιλίνη) κατηγοριοποιείται ως παράγοντας στην κατηγορία 3. Ομοίως, οι ταξινομήσεις της FEI εξαρτώνται από το φάρμακο και είναι ένα μίγμα των απαγορευμένων (δηλαδή βουτανλικαΐνη, κοκαΐνη και ροπιβακαΐνη) και ελεγχόμενων (δηλ βουπιβακαΐνη, λιδοκαΐνη, μεπιβακαΐνη, πριλοκαΐνη και προκαΐνη) ουσιών.^[14]

1.5.8 Οπιοειδή αναλγητικά

Τα οπιοειδή παράγουν τις φαρμακολογικές επιδράσεις τους δρώντας σε διαφορετικούς υπό τύπους υποδοχέων οπιοειδών και οι χημικές δομές τους μπορούν να ταξινομηθούν ευρέως ως ενδογενείς (δηλ ενδορφινών και εγκεφαλινών), αλκαλοειδείς οπίου (π.χ. κωδεΐνη και μορφίνη), ημισυνθετικές (π.χ. οξυκωδόνη και διακετυλομορφίνη), ή συνθετικές (π.χ. μπουτορφανόλη, δεξτρομοραμίδιο, ετορφίνη, φαιντανύλη, προποξυφαίνη, ρεμιφεντανίλη και τραμαδόλη). Ανάλογα με τη δόση και το εν λόγω φάρμακο, τα οπιοειδή αναλγητικά μπορούν να προκαλέσουν αναλγησία, καταστολή, διέγερση του ΚΝΣ και ψυχολογική εξάρτηση και, ως εκ τούτου έχουν τυπικά χαρακτηριστεί από την αμερικανική Υπηρεσία Δίωξης Ναρκωτικών ως ουσίες του παραρτήματος 2. Λόγω αυτών των επιδράσεων, τα οπιοειδή αναλγητικά θεωρούνται επίσης ότι έχουν υψηλή πιθανότητα κατάχρησης στον αθλητισμό υποοιδών. Αυτό αναγνωρίζεται από την ένταξη της πλειοψηφίας των οπιοειδών αναλγητικών στο υψηλότερο επίπεδο της ταξινόμησης στο

πλαίσιο των κανόνων τόσο της ARCI (κυρίως ουσίες της κατηγορίας 1) όσο και της FEI (κυρίως απαγορευμένων ουσιών).^[14]

1.5.9 Διουρητικά

Διουρητική είναι οποιαδήποτε ουσία προάγει την παραγωγή των ούρων. Αυτό περιλαμβάνει την πρόκληση διούρησης. Υπάρχουν διάφορες κατηγορίες διουρητικών. Όλα τα διουρητικά αυξάνουν την απέκκριση του νερού από το σώμα, αν και κάθε τάξη το κάνει με ένα ξεχωριστό τρόπο. Εναλλακτικά, ένα αντιδιουρητικό όπως η βασοπρεσίνη, ή αντιδιουρητική ορμόνη, είναι ένας παράγοντας ή φάρμακο το οποίο μειώνει την έκκριση του νερού στα ούρα.

Στην ιατρική, τα διουρητικά χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία της καρδιακής ανεπάρκειας, της κίρρωσης του ήπατος, της υπέρτασης, της δηλητηρίασης από νερό και ορισμένες ασθένειες των νεφρών. Μερικά διουρητικά, όπως ακεταζολαμίδη, συμβάλουν ώστε να γίνουν τα ούρα πιο αλκαλικά και βοηθούν στην αύξηση της έκκρισης ουσιών, όπως η ασπιρίνη σε περιπτώσεις υπερδοσολογίας ή δηλητηρίασης. Συχνά γίνεται κατάχρηση των διουρητικών από τους πάσχοντες με διαταραχές πρόσληψης τροφής, ειδικά τους βουλιμικούς, στις προσπάθειες απώλειας βάρους.

Μια συνηθισμένη εφαρμογή των διουρητικών έχει σα σκοπό την ακύρωση της δοκιμής φαρμάκων. Τα διουρητικά αυξάνουν τον όγκο των ούρων και αραιώνουν τους παράγοντες ντόπινγκ και τους μεταβολίτες τους. Μια άλλη χρήση είναι για τη γρήγορη απώλεια βάρους ώστε να γίνει εφικτή η συμμετοχή σε συγκεκριμένη κατηγορία βάρους σε αθλήματα όπως η πυγμαχία, η πάλη και άλλα.^[20]

1.5.10 ΠΕΠΤΙΔΙΑ

1.5.10.1 Εισαγωγή^[64]

Τα πεπτίδια δημιουργούνται όταν η α-καρβοξυλική ομάδα ενός αμινοξέος θα συνδεθεί με την α-αμινική ομάδα ενός άλλου αμινοξέος με έναν πεπτιδικό δεσμό, που λέγεται και αμιδικός δεσμός. Μια σειρά αμινοξέων που ενώνονται με πεπτιδικούς δεσμούς δημιουργούν μια πολυπεπτιδική αλυσίδα. Τα πεπτίδια που έχουν μικρότερο αριθμό αμινοξέων ονομάζονται ολιγοπεπτίδια ή απλώς πεπτίδια. Ένα πεπτίδιο που αποτελείται από δύο αμινοξέα ονομάζεται διπεπτίδιο. Μια πολυπεπτιδική αλυσίδα αποτελείται από ένα σταθερά επαναλαμβανόμενο τμήμα, που ονομάζεται κύρια αλυσίδα ή κορμός, και ένα μεταβλητό τμήμα, που αποτελείται από τις διαφορετικές πλευρικές αλυσίδες.

Τα πεπτίδια διακρίνονται από τις πρωτεΐνες με βάση το μέγεθος, και ως αυθαίρετο σημείο αναφοράς μπορεί να γίνει κατανοητό να περιέχουν περίπου 50 ή λιγότερα αμινοξέα.^[21]

Οι πεπτιδικές και πρωτεϊνικές ορμόνες είναι ορμόνες των οποίων τα μόρια είναι πεπτίδια ή πρωτεΐνες, αντίστοιχα. Οι τελευταίες έχουν μεγαλύτερα μήκη αλυσίδων αμινοξέων από τις πρώτες. Οι ορμόνες αυτές έχουν επίδραση στο ενδοκρινικό σύστημα των ζώων, συμπεριλαμβανομένων και των ανθρώπων.^[22]

Πεπτίδια και πρωτεΐνες στόχοι με ιδιότητες που προάγουν την ανάπτυξη, αποτελούν αντικείμενο κακής χρήσης από τους αγρότες, αφού απαγορεύονται από την κοινοτική νομοθεσία, είναι πιθανό να είναι παρόμοια με τις ουσίες που εφαρμόζονται στην ανάλυση ελέγχου του αθλητικού ντόπινγκ. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Αντι-ντόπινγκ (WADA) απαγορεύει τη χρήση ενός αριθμού πεπτιδικών ορμονών και συναφών ουσιών, οι περισσότερες εκ των οποίων εμφανίζονται φυσικά στο σώμα. Σύμφωνα με τον Κατάλογο Απαγορευμένων Ουσιών του Παγκόσμιου Οργανισμού κατά του Ντόπινγκ, το 2015, μια ποικιλία από πεπτιδικά φάρμακα και υποψήφια φάρμακα απαγορεύονται στον αθλητισμό καθώς μπορεί να έχουν άμεσες και έμμεσες επιπτώσεις στην ανάπτυξη των μυών. Η πλειοψηφία των ενώσεων αυτών βρίσκεται στο τμήμα S2^[4] (πεπτιδικές ορμόνες, αυξητικοί παράγοντες, σχετικές ουσίες και μιμητικά), αλλά και σε άλλες κατηγορίες, όπως «ορμόνες και ρυθμιστές του μεταβολισμού» (S4)^[4] και «διουρητικά και παράγοντες συγκάλυψης» (S5)^[4], πεπτίδια και πρωτεΐνες όπως ινσουλίνες, λευκωματίνη, η δεσμοπρεσίνη.^[23,24]

1.5.10.2 Κατηγορίες Πεπτιδίων

1.5.10.2.1 Αυξητική Ορμόνη (GH)

Η αυξητική ορμόνη (GH) είναι ένας προαγωγός ανάπτυξης ιστού σε παιδιά, αλλά μετά την εφηβεία είναι κατά κύριο λόγο μια μεταβολική ορμόνη παρόλο που λανθάνοντα αυξητικά αποτελέσματα σε ιστούς μπορεί να προκληθούν κάτω από μη φυσιολογικές συνθήκες, όπως κατά τη διάρκεια ανάκαμψης ιστού από βλάβη.^[25]

Η GH ή σωματοτροπίνη, είναι μία φυσικός ενυπάρχουσα πολυπεπτιδική ορμόνη που εκκρίνεται από τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης. Η υποφυσιακή έκκριση GH ελέγχεται από ένα διπλό μηχανισμό υποθαλάμου, με μια διεγερτική δράση από την GH-εκλυτική ορμόνη (GHRH) και ενός ανασταλτικού αποτελέσματος από σωματοστατίνη. Η αυξητική ορμόνη επιταχύνει την ανάρρωση από αθλητικούς τραυματισμούς και διεγείρει την ανάπτυξη των μυών. Εκτός από τα γνωστά αποτελέσματά της να αυξήσει την παραγωγή γάλακτος στις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής, η ανασυνδυασμένη GH (rGH) μπορεί να είναι ιδιαίτερα ελκυστική για τους αθλητές που αναζητούν ευκαιρίες για να ενισχύσουν την αθλητική τους απόδοση, καθώς και για τους κτηνοτρόφους οι οποίοι αναζητούν ευκαιρίες για να ενισχύσουν την ανάπτυξη των μυών και / ή την παραγωγή γάλακτος. Η χρήση των αυξητικών ορμονών σε βοοειδή απαγορεύεται στην Ευρωπαϊκή Ένωση. Η χρήση ανασυνδυασμένης αυξητικής ορμόνης των βοοειδών (rBGH) ώστε να αυξηθεί η παραγωγή γάλακτος στις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής επιτρέπεται σε πολλές άλλες χώρες, όπως οι ΗΠΑ.^[23,26]

Ισχυρισμοί για τα οφέλη της GH στον αθλητισμό αφορούν αυξήσεις στην μυϊκή μάζα και τη δύναμη, ιδιαίτερα σε συνδυασμό με ανδρογόνα, και / ή βελτιωμένη επούλωση ιστού με ταχύτερη ανάρρωση είτε από σοβαρούς τραυματισμούς ή ελάσσονα επαναλαμβανόμενες βλάβες, όπως από την έντονη φυσική άσκηση επιτρέποντας περισσότερη αποτελεσματική άσκηση. Η παράνομη χρήση της GH και μέσο προαγωγής της GHS (Growth Hormone Secretagogues) από τους αθλητές έχει απαγορευτεί από τον

Παγκόσμιο Οργανισμό Αντι-Ντόпинγκ (WADA). Η κατάχρηση της GH μεταξύ των αθλητών βασίζεται στις αναβολικές και λιπολυτικές επιδράσεις που έχει η GH σε ασθενείς με ανεπάρκεια GH. Τα GHS έχουν δύο σημαντικές επιπτώσεις, διεγείροντας τόσο την ενδογενή έκκριση GH και την έναρξη της όρεξης, όπως και η γκρελίνη, και επίσης αναφέρεται ότι η εξαρελίνη έχει επίδραση στην καρδιά.^[25,26]

1.5.10.2.2 Εκκριματογωγοί Αυξητικής Ορμόνης (GHS)

Οι εκκριματογωγοί της αυξητικής ορμόνης (GHS) επάγουν ενδογενή παραγωγή και έκκριση της GH μέσω άμεσης δράσης στην υπόφυση. Παραδείγματα GHS περιλαμβάνουν την GH-εκλυτική ορμόνη (GHRH), GHRH ανάλογα, και πεπτιδίων απελευθέρωσης GH (GHRPs). Με την ενεργοποίηση της πλήρους GH-αλληλουχίας και, ως εκ τούτου, όλων των σχετικών με τις GH δραστηριότητες, είναι αυξημένες οι πιθανότητες κατάχρησης των GHS στον αθλητισμό ή τα ζώα εκτροφής. Επιπλέον, οι GHS μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως παράγοντες συγκάλυψης στην απαγορευμένη χορήγηση rGH διότι η διεγερμένη έκκριση όλων των φυσικών ισομορφών της υπόφυσης θα μειώσει την αναλογία ανασυνδυασμένης / υποφυσικής GH που χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση της GH. Ένα άλλο "πλεονέκτημα" της χρήσης GHS σε συνδυασμό με rGH είναι η συνεχής διέγερση της ενδογενούς έκκρισης της GH που ξεπερνά το μηχανισμό αρνητικής ανάδρασης που συνδέεται με τη χορήγηση της rGH μόνο.

Η GHRH είναι ένα γραμμικό πεπτίδιο που αποτελείται από τα κατάλοιπα 40- ή 44-αμινοξέων. Αρκετά ανάλογα της GHRH (π.χ. Sermorelin, tesamorelin και CJC-1295) έχουν αναπτυχθεί και διατίθενται στο εμπόριο για τη θεραπεία και τη διάγνωση της ανεπάρκειας της GH στον άνθρωπο. Τα GHRPs, από την άλλη πλευρά, είναι συνθετικά, μικρά (<1 kDa) πεπτίδια που αποτελούνται από τέσσερα έως επτά υπολείμματα αμινοξέων, συμπεριλαμβανομένων των GHRP-1, -2 (pralmorelin) -4, -5, -6, αλεξαμορελίνη (alexamorelin), ιπαμορελίνη (ipamorelin) και εξαρελίνη (hexarelin).^[23]

1.5.10.2.3 GHRPs

Τα πεπτίδια απελευθέρωσης αυξητικής ορμόνης (GHRPs) ανήκουν σε μια κατηγορία πεπτιδικών ορμονών απελευθέρωσης που διεγείρουν σημαντικά την έκκριση της ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης (hGH) από την υπόφυση και απαγορεύονται σύμφωνα με τους κανονισμούς της WADA ως "απελευθερωτικοί παράγοντες". Αποτελούν μια κατηγορία μικρών πεπτιδίων 4-7 αμινοξέα σε μέγεθος τα οποία περιλαμβάνουν τα GHRP-1, 2, 4, 5, 6, εξαρελίνη, αλεξαμορελίνη και ιπαμορελίνη. Εκτός από τη γενική ικανότητά τους να αυξάνουν την hGH παρέχοντας ένα πλεονέκτημα λόγω της λίγο αυξημένης hGH στα επίπεδα του πλάσματος, τα GHRP φέρεται να διαθέτουν το δυνατότητα να συγκαλύψουν μια πρόσφατη ένεση ανασυνδυασμένης hGH (rhGH) αντιδρώντας στην επίδραση καταστολής της εγχεόμενης αυξητικής ορμόνης στην φυσική παραγωγή και έκκριση της hGH. Μπορούν, επίσης, και μιμούνται τη βιολογική δράση της ενδογενούς ορμόνης γκρελίνης (ghrelin) με αποτέλεσμα να επηρεάζουν την έκκριση της αυξητικής ορμόνης (GH) από την υπόφυση.^[27]

Πολλά από τα πεπτίδια, όπως τα GHRP-2 και GHRP-6, είναι ευρέως διαθέσιμα σε διάφορες ιστοσελίδες του Διαδικτύου σε σκευάσματα για ενδοφλέβια ένεση, λήψη εκ του στόματος, και ενδο-ρινική χορήγηση. Τα GHRP-2, GHRP-6, ιταμορελίνη και εξαρελίνη έχουν ανιχνευθεί σε φιαλίδια που κατασχέθηκαν από αθλητές στη Γερμανία, το Βέλγιο και την Αυστραλία. Στις ΗΠΑ, τα GHRP-2, GHRP-6, και ιταμορελίνη έχουν ανιχνευθεί σε κατασκευμένα φιαλίδια. Το GHRP-2 έχει επίσης ανιχνευθεί σε συμπληρώματα διατροφής.^[28]

Τα πρώτα συνθετικά GHRPs ανακαλύφθηκαν σχεδόν πριν από 40 χρόνια, πολύ πριν από τα φυσικά συνδυαστικά GHRP, ένα GHRP μήκους 28 αμινοξέων που ονομάστηκε γρελίνη (ghrelin), ανακαλύφθηκε το 1999. Τα GHRP και GHRH ενεργούν διαφορετικά στην έκκριση της GH της υπόφυσης. Τα GHRPs, για παράδειγμα, επιδεικνύουν μεγαλύτερη δραστηριότητα στην έκκριση της GH, ενώ ταυτόχρονη χορήγηση GHRH και GHRPs δείχνει μια συνεργιστική αύξηση στην έκλυση της GH. Η προκύπτουσα απόκριση GH μετά τη χορήγηση GHS εξαρτάται από την δραστηριότητα των διαφόρων GHS.^[23]

1.5.10.2.4 Γοναδοτροπίνες (Gonadotropins)

Οι γοναδοτροπίνες αποτελούν μια οικογένεια γλυκοπρωτεϊνικών ορμονών, και περιλαμβάνουν την ωοθυλακιοτρόπο ορμόνη (FSH), την ωχρινοτρόπο ορμόνη (LH), και τη χοριακή γοναδοτροπίνη (CG). Οι CG και LH διεγείρουν την ενδογενή παραγωγή τεστοστερόνης και είναι, ως εκ τούτου, μεγάλη η πιθανότητα κακής χρήσης τους, είτε απ' ευθείας για την ενίσχυση της μυϊκής δύναμης ή έμμεσα ομαλοποιώντας την κατασταλτική ρύθμιση της παραγωγής τεστοστερόνης μετά από τη χρήση των αναβολικών στεροειδών. Επειδή μια ευεργετική επίδραση της CG στη μυϊκή δύναμη στις γυναίκες δεν έχει αποδειχθεί, και αυξημένα επίπεδα σε γυναίκες κανονικά δηλώνουν εγκυμοσύνη, οι γοναδοτροπίνες απαγορεύεται μόνο σε άντρες αθλητές. Οι γοναδοτροπίνες εκκρίνεται από την υπόφυση και ρυθμίζονται από την εκλυτική ορμόνη των γοναδοτροπινών (GnRH), επίσης γνωστής ως ωχρινοτρόπος ορμόνη-απελευθερωτική ορμόνη (LH-RH) ή γοναδορελίνη. Λόγω της δραστηριότητάς της για την τόνωση της γοναδοτροπίνης και την έκκριση τεστοστερόνης, η GnRH μπορεί επίσης να θεωρηθεί ως μια ουσία που προάγει την ανάπτυξη. Επιπλέον, η GnRH μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να συγχρονίσει τον κύκλο οίστρου σε αγελάδες και μοσχίδες, καθώς και να ανοσοευνουχίσει ταύρους με ένα εμβόλιο GnRH.^[23]

1.5.10.2.5 TB-500

Ένα άλλο παράδειγμα ενός πεπτιδίου με πιθανότητα κατάχρησης ώστε να ενισχύσει την ανάπτυξη των μυών είναι το συνθετικό πεπτίδιο TB-500, το οποίο περιέχει την ενεργή θέση της πρωτεΐνης βήτα-θυμοσίνης 4, και έχει αναφερθεί ότι διεγείρει την ανάπτυξη των μυών σε άλογα.^[23]

Η θυμοσίνη 4 είναι το πιο άφθονο μέλος μιας μεγάλης οικογένειας άκρως διατηρημένων, μικρό βιοενεργών πρωτεϊνών. Έχει τη δυνατότητα να παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη, συντήρηση, επισκευή και παθολογία του ιστού. Έχει αποδειχθεί ότι προάγει την κυτταρική μετανάστευση, την αγγειογένεση, και προστατεύει τα κύτταρα και

τους ιστούς από οξειδωτικές βλάβες. Είναι κρίσιμη για την επισκευή και την αναγέννηση του ματιού, της καρδιάς, του δέρματος, των νεύρων και του εγκεφαλικού ιστού μετά από τραυματισμό.

Το 2011, ένα κτηνιατρικό σκεύασμα που ονομάστηκε TB-500 διατίθεται στην αγορά για χρήση σε ίππους ή σκύλους αγώνων. Το βασικό συστατικό του TB-500 είναι ένα πεπτιδίο με τεχνητή ακετυλίωση του N-τελικού άκρου. Αυτό το προϊόν φέρεται να προάγει τη διαφοροποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων, αγγειογένεση σε δερματικούς ιστούς, μετανάστευση κερατινοκυττάρων, εναπόθεση κολλαγόνου και να μειώνει τις φλεγμονές. Λέγεται ότι βοήθησε στην επούλωση των πληγών, στην οικοδόμηση των μυών και στην ανάκτηση των μυϊκών ινών και των κυττάρων. Υπήρξαν φήμες ότι κάποιοι από τους διάσημους εκπαιδευτές του κόσμου είχαν βιώσει τεράστια ώθηση στην απόδοση μετά τη χρήση του εν λόγω παρασκευάσματος για τα ζώα τους. Το TB-500 απαγορεύεται ρητώς στις ιπποδρομίες.^[29]

1.5.10.2.6 Δεσμοπρεσίνη (Desmopressin)

Η δεσμοπρεσίνη είναι ένα συνθετικό παράγωγο της φυσικής πεπτιδικής ορμόνης αργινίνης βαζοπρεσίνης (AVP), η οποία αναπτύχθηκε ώστε να έχει μια πιο μακροχρόνια και πιο ισχυρή αντιδιουρητική επίδραση από την AVP. Πρόσφατα, έχει καταδειχθεί ότι η από του στόματος χορήγηση της δεσμοπρεσίνης μετά την πρόσληψη ερυθροποιητίνης (EPO) προκαλεί ταχεία αιμοδιάλυση, η οποία προκαλεί τη μείωση του αιματοκρίτη. Σε ανάλυση ελέγχου ντόπινγκ, ο αιματοκρίτης είναι ένας έμμεσος δείκτης κατάχρησης της EPO και του ντόπινγκ αίματος.^[30]

Θεραπευτικά, η δεσμοπρεσίνη χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της νυκτερινής ενοούρησης ή του άποιοι διαβήτη, η οποία χαρακτηρίζεται από εκτεταμένη πρόσληψη υγρών και δραματικά αυξημένο όγκο πολύ αραιωμένων ούρων. Η κακή χρήση στον αθλητισμό περιγράφεται με ένα φαινομενικό αιμοδιαλυτικό αποτέλεσμα και σημαντική μείωση των κρίσιμων παραμέτρων του αίματος (αιματοκρίτης, αιμοσφαιρίνη, κλπ), όταν η δεσμοπρεσίνη χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με την κατάποση του μεταλλικού νερού.^[31]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΤΕΧΝΙΚΗ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ – ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΩΝ ΜΕ ΑΝΑΛΥΤΗ ΧΡΟΝΟΥ ΠΤΗΣΗΣ ΙΟΝΤΩΝ ΣΕ ΣΕΙΡΑ ΜΕ ΤΕΤΡΑΠΟΛΟ (LC-QTOFMS)

2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στο Εργαστήριο Ελέγχου Ντόпинγκ του Ο.Α.Κ.Α. εφαρμόζονται μέθοδοι σάρωσης (screening procedures) και επιβεβαιωτικές διαδικασίες (confirmation procedures). Η αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό των απαγορευμένων ουσιών επιλέγεται με βάση την κατηγορία στην οποία ανήκουν οι προσδιοριζόμενες ουσίες, την συγκέντρωση αυτών στο βιολογικό υγρό, το είδος του βιολογικού δείγματος (ούρα, αίμα), την πηγή προέλευσης του βιολογικού υγρού (άνθρωποι ή άλογα) αλλά και τον αριθμό των μεταβολιτών που απεκκρίνονται.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της υγροχρωματογραφίας (liquid chromatography, LC) με αναλυτή χρόνου πτήσης ιόντων (time of flight, TOF) σε σειρά με τετράπολο (quadrupole, Q). Στο κεφάλαιο αυτό δίνονται οι βασικές πληροφορίες σε σχέση με την υγροχρωματογραφία, τη φασματομετρία μαζών (mass spectrometry, MS), τους αναφερθέντες αναλυτές (TOF, Q), τον τύπο ιοντισμού που χρησιμοποιήθηκε (electrospray ionization, ESI), καθώς και τις εφαρμογές και τα πλεονεκτήματα της τεχνικής αυτής στον έλεγχο ντόпинγκ.

2.2 ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ^[32-36]

2.2.1 Γενικά

Με τον όρο υγροχρωματογραφία εννοούνται όλα τα είδη χρωματογραφίας, που χρησιμοποιούν ως κινητή φάση ένα υγρό, ένα διαλύτη. Η στατική φάση μπορεί να είναι στερεά ή υγρή ακινητοποιημένη πάνω σε ένα αδρανές υπόστρωμα. Ο διαχωρισμός των ουσιών με την LC βασίζεται στις διαφορές τους ως προς το μέγεθος, το σχήμα, την πολικότητά τους κ.α., διαφοροποιώντας τη σχετική τους συγγένεια ως προς τη στατική και την κινητή φάση. Ταχύτερα θα εκλούεται η ουσία που συγκρατείται ασθενέστερα από τη στατική φάση. Στο τέλος της δεκαετίας του '60 αναπτύσσεται η χρήση πληρωτικών υλικών με σωματίδια διαμέτρου λίγων μm, προς βελτίωση της απόδοσης των στηλών. Η τεχνολογία αυτή απαιτούσε τη δυνατότητα λειτουργίας κάτω από υψηλές πιέσεις. Έτσι αναπτύσσεται η υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης HPLC (high performance liquid chromatography), η πλέον διαδεδομένη έκτοτε αναλυτική τεχνική.

2.2.2 Είδη υγροχρωματογραφικού διαχωρισμού

Οι κυριότεροι μηχανισμοί διαχωρισμού που χρησιμοποιούνται στην Υγροχρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης είναι οι εξής:^[37-39]

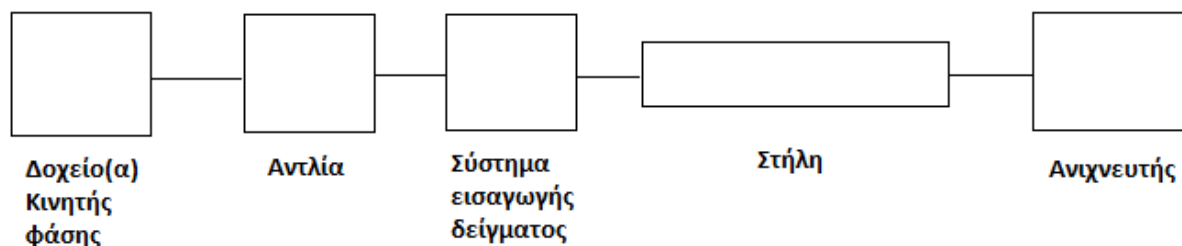
- Χρωματογραφία Προσρόφησης
- Χρωματογραφία Υγρού-Υγρού Διαχωρισμού
- Χρωματογραφία Ιονανταλλαγής
- Ιοντική Χρωματογραφία
- Χρωματογραφία Μοριακού Αποκλεισμού κατά Μέγεθος
- Χρωματογραφία Συγγένειας
- Χρωματογραφία Αντίστροφης Φάσης
- Χρωματογραφία Χημικώς Διασυνδεδεμένων Φάσεων
- Χρωματογραφία Ιοντικών Ζευγών

Στα πλαίσια της εργασίας εφαρμόστηκε Υγροχρωματογραφία αντίστροφης φάσης με βαθμιδωτή έκλυση. Η στατική φάση είναι σχετικώς μη πολική, ενώ η κινητή φάση, συνήθως μεθανόλη με νερό ή ακετονιτρίλιο με νερό, είναι πολική. Έτσι οι πολικότερες ουσίες εκλούνται ταχύτερα από τις περισσότερες άπολες.

2.2.3 Οργανολογία υγροχρωματογράφου^[32-35]

Τα κύρια μέρη ενός χρωματογραφικού συστήματος είναι (εικόνα 2.1):

- Αντλία
- Σύστημα εισαγωγής δείγματος
- Κινητή φάση
- Στατική φάση (στήλη)
- Ανιχνευτής



Σχήμα 2.1: Διάταξη ενός τυπικού συστήματος HPLC

Μετά τον ανιχνευτή υπάρχει σύστημα λήψεως και επεξεργασίας δεδομένων (καταγραφέας, ολοκληρωτής, υπολογιστής)

2.2.3.1 Δοχεία Κινητής Φάσης

Ο περιέκτης των διαλυτών, που συνιστούν την κινητή φάση, είναι μέσο αποθήκευσης φτιαγμένο από υλικό ανθεκτικό σε χημική προσβολή, συνήθως γυαλί και ερμητικά κλεισμένο. Η σύνδεσή του με την αντλία επιτυγχάνεται με λεπτό σωληνάκι «feedline», το οποίο φέρει στο άκρο που βυθίζεται στο διαλύτη ένα φίλτρο διαμέτρου πόρων 0.4 μm , ώστε να αποφεύγεται η είσοδος μικρών σωματιδίων στην αντλία.

2.2.3.2 Αντλία

Η αντλία θα πρέπει να επιτυγχάνει σταθερές ταχύτητες ροής που κυμαίνονται από 10 $\mu\text{l min}^{-1}$ έως 2 ml min^{-1} . Μια αντλία κατάλληλη για HPLC οφείλει να εξασφαλίζει σταθερή πίεση, σταθερή ταχύτητα ροής της κινητής φάσης (χωρίς παλμούς) από το χρωματογραφικό σύστημα (ακρίβεια αντλίας), να είναι κατασκευασμένη από υλικά ανθεκτικά στη κινητή φάση και εύκολη στη συντήρηση. Μια αντλία HPLC λειτουργεί είτε με ισοκρατική είτε με βαθμιδωτή έκλουση. Στην περίπτωση που θα χρησιμοποιηθεί ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό -όπως θα δούμε στη συνέχεια- και μικροπορώδη στήλη, η αντλία είναι προτιμότερο να λειτουργεί σε χαμηλή ροή. Πιθανή αστάθεια στην ταχύτητα ροής μπορεί να επιφέρει μετατόπιση στους χρόνους ανάσχεσης των ουσιών.

2.2.3.3 Σύστημα Εισαγωγής Δείγματος

Το πλέον κοινό σύστημα εισαγωγής δείγματος είναι ο «βρόχος» δειγματοληψίας (loop injector). Ο βρόχος γεμίζει μέσω μιας σύριγγας και η κινητή φάση ρέει από την αντλία προς τη στήλη. Οι διατάξεις αυτές μπορούν να εισάγουν όγκους από 0,5 – 500 μl , σε υψηλές πιέσεις και με καλή επαναληψιμότητα. Σημαντικό είναι ο βρόχος να γεμίζει επαναλαμβανόμενα και δίχως φυσαλίδες έτσι ώστε να μην παρατηρείται αστάθεια στην απόκριση του ανιχνευτή.

2.2.3.4 Κινητή Φάση

Στην HPLC, η σχετική συγγένεια του αναλύτη, τόσο με την κινητή, όσο και με τη στατική φάση, είναι εκείνη που καθορίζει το χρόνο ανάσχεσής της (retention time, RT) και κατ' επέκταση το εάν απομονώνεται. Παρακάτω δίνονται τα δύο άκρα όσον αφορά στη συμπεριφορά των ουσιών στο χρωματογραφικό σύστημα:

- Όλοι οι αναλύτες παρουσιάζουν μεγάλη συγγένεια με την κινητή φάση και καμία συγγένεια με τη στατική φάση. Έτσι όλοι οι αναλύτες κινούνται με την ίδια ταχύτητα με την κινητή φάση, φθάνουν γρήγορα στον ανιχνευτή με αποτέλεσμα να μη διαχωρίζονται.
- Όλοι οι αναλυτές παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια με τη στατική φάση και καμία συγγένεια με την κινητή φάση, με αποτέλεσμα να συγκρατούνται ισχυρά από τη στατική φάση και να μη φτάνουν ποτέ στον ανιχνευτή.

Είναι φανερό πως για να επιτευχθεί διαχωρισμός των αναλυτών σε ένα μίγμα, πρέπει η συμπεριφορά τους να μην ανήκει σε κανένα από τα δύο άκρα που μόλις περιγράφηκαν, αλλά να βρίσκεται κάπου στη μέση. Στον Πίνακα 2.1 δίδονται παραδείγματα της επίδρασης των αλλαγών στη χημεία ενός στεροειδούς στο χρόνο έκλουσής του.

Η κινητή φάση πρέπει να είναι ένας διαλύτης στον οποίο οι ουσίες να διαλύονται. Στους περισσότερους διαχωρισμούς -όπως και στην εν λόγω εργασία- χρησιμοποιείται σύστημα χρωματογραφίας αντιστρόφου φάσεως: η κινητή φάση είναι πολικότερη της στατικής κι έτσι οι πολικότερες ουσίες εκλούνται ταχύτερα από τις περισσότερο άπολες. Όμως δεν είναι πάντα εύκολο να επιτευχθεί διαχωρισμός με τη χρήση ενός και μόνο διαλύτη. Συχνά – όπως και στη συγκεκριμένη εργασία - χρησιμοποιείται μίγμα διαλυτών,

καθώς και σύστημα βαθμιδωτής έκλυσης: κατά τη διάρκεια της χρωματογραφικής ανάλυσης η σύσταση της κινητής φάσης διαφοροποιείται, αρχικά διοχετεύοντας διαλύτη που ευνοεί το διαχωρισμό των πιο πολικών ουσιών και στη συνέχεια αυξάνοντας το ποσοστό του διαλύτη που ευνοεί την έκλυση των πιο άπολων ουσιών.

Πίνακας 2.1: Πιθανές μετατροπές στη χημεία ενός στεροειδούς και η επίδραση τους στον χρόνο ανάσχεσης του (RT) κατά την εφαρμογή υδροχρωματογραφίας αντιστρόφου φάσης.

Μετατροπές	Αποτέλεσμα	Μετατόπιση RT
Προσθήκη μεθυλίου	πιο άπολο	Αύξηση
Προσθήκη υδροξυλίου	πιο πολικό	Μείωση
Μετατροπή διπλού δεσμού σε απλό	πιο άπολο	αύξηση
Μετατροπή απλού δεσμού σε διπλό	πιο πολικό	μείωση
Μετατροπή OH σε =O	πιο άπολο	αύξηση
Προσθήκη φθορίου	πιο άπολο	αύξηση
Αλλαγή στερεοχημείας (16αMe -> 16βMe)	πιο πολικό	μείωση

Σημειώνεται ότι στην κινητή φάση προστίθενται συχνά ανόργανα πτητικά οξέα (π.χ. φορμικό οξύ) με σκοπό την επίτευξη του επιθυμητού ποσοστού ιοντισμού των αναλυτών.

2.2.3.5 Στατική Φάση

Ο διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος πραγματοποιείται στη στήλη. Η φύση της στατικής φάσης σε συνδυασμό με τη φύση της κινητής φάσης καθορίζουν την απόδοση και την εκλεκτικότητα του διαχωρισμού. Το πλέον διαδεδομένο πληρωτικό υλικό των στηλών αυτών είναι η χημικά προσδεδεμένη με αλκύλιο 18 ατόμων άνθρακα πηκτή διοξειδίου του πυριτίου (C_{18} silica gel). Τα σωματίδια του πληρωτικού υλικού ποικίλλουν ανάλογα με το είδος, το μέγεθος και το σχήμα τους. Κυριαρχούν οι στήλες με σφαιρικά μικροπορώδη σωματίδια διαμέτρου 2 μm ώστε να επιτυγχάνεται ομοιόμορφη πλήρωση της στήλης και ελαχιστοποίηση της τάσης σχηματισμού κενών μέσα σε αυτή. Για την προστασία της στήλης γίνεται χρήση και προστήλης. Θα πρέπει να αποφεύγεται η χρήση κινητής φάσης με pH που προκαλεί καταστροφή της στήλης και έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ανεπιθύμητων κορυφών στο φάσμα των ουσιών που ανιχνεύονται.

2.2.3.6 Ανιχνευτές

Τα βασικά επιθυμητά χαρακτηριστικά που θα πρέπει να φέρει ένας ιδανικός υδροχρωματογραφικός ανιχνευτής είναι τα εξής: i) υψηλή ευαισθησία στη συγκέντρωση ή στη μάζα, ii) ειδικότητα, iii) μειωμένο θόρυβο, iv) ηλεκτρονική ευαισθησία, v) μικρή ολίσθηση, vi) μεγάλη γραμμική περιοχή, vii) να μη συνεισφέρει στη διεύρυνση των κορυφών, viii) να είναι αξιόπιστος και εύκολος στη χρήση.

Οι κυριότεροι τύποι ανιχνευτών που έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιούνται στην υδροχρωματογραφία, είναι επιγραμμικά οι εξής:

- ✓ Φασματομετρικός ανιχνευτής ορατού-υπεριώδους
- ✓ Φθορισμομετρικός ανιχνευτής

- ✓ Διαφορικός ανιχνευτής δείκτη διάθλασης
- ✓ Ηλεκτροχημικός ανιχνευτής
- ✓ Αγωγιμετρικός και φωταγωγιμετρικός ανιχνευτής
- ✓ Ανιχνευτής ραδιενέργειας
- ✓ Ανιχνευτής φασματομετρίας μαζών

Ο πλέον συνηθισμένος ανιχνευτής στην υγροχρωματογραφία είναι ο ανιχνευτής υπεριώδους (UV). Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής φασματομετρίας μαζών, ο οποίος συνδυάζει, τόσο τις ιδιότητες ενός γενικού ανιχνευτή (απλό MS), όσο και τις δυνατότητες ενός ειδικού ανιχνευτή με τη χρήση της συζευγμένης φασματομετρίας μαζών (MS/MS). Άλλοι συχνά χρησιμοποιούμενοι ανιχνευτές είναι οι ηλεκτροχημικοί, φθορισμού, δείκτη διάθλασης, απορρόφησης κ.α.

2.2.3.7 Σύστημα λήψεως και επεξεργασίας δεδομένων

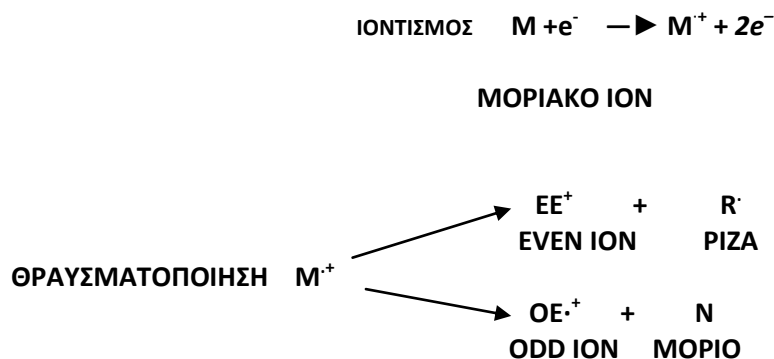
Ο ανιχνευτής παρέχει ηλεκτρονικό σήμα το οποίο σχετίζεται με τη συγκέντρωση του υπό προσδιορισμό συστατικού, στο έκλουσμα από τη στήλη. Ο ρόλος του είναι να παρουσιάσει και να ποσοτικοποιήσει τις λαμβανόμενες χρωματογραφικές κορυφές. Το χρωματογράφημα λαμβάνεται με τη βοήθεια ενός καταγραφέα ο οποίος πρέπει να είναι ταχείας απόκρισης και να διαθέτει ηλεκτρονικά υψηλού βαθμού σταθερότητας. Τα σύγχρονα υγροχρωματογραφικά συστήματα διαθέτουν ηλεκτρονικό υπολογιστή με κατάλληλο λογισμικό για την ηλεκτρονική ολοκλήρωση, την ταχεία στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, τη δυνατότητα αποθήκευσης των δεδομένων και ελέγχου του αναλυτικού οργάνου από αυτό.

2.3 ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ^[32-35]

Η φασματομετρία μαζών είναι η αναλυτική τεχνική με τη μεγαλύτερη άνθηση τα τελευταία χρόνια (1995-2015). Βρίσκει τη μεγαλύτερη ποικιλία εφαρμογών αφού παρέχει πληροφορίες σχετικά με: 1) τη στοιχειακή σύσταση του δείγματος, 2) τις δομές ανόργανων, οργανικών και βιολογικών μορίων, 3) τη δομή και σύσταση στερεών επιφανειών, 4) την ποιοτική και ποσοτική σύσταση μιγμάτων, 5) την αναλογία ισοτόπων ατόμων σε δείγματα. Η πρώτη εφαρμογή της σε χημικές αναλύσεις ρουτίνας πραγματοποιείται στις αρχές της δεκαετίας 1940 στη βιομηχανία αργού πετρελαίου, με την ποσοτική ανάλυση μιγμάτων υδρογονανθράκων που παράγονται από καταλυτική σχάση.

Η τεχνική αυτή βασίζεται στον ιοντισμό μιας ουσίας μέσω ποικίλων τρόπων. Στο βομβαρδισμό με ρεύμα ηλεκτρονίων (electron impact, EI) αποσπάται ένα ηλεκτρόνιο και σχηματίζεται το μοριακό ιόν M^+ . Η σύγκρουση αυτή μεταφέρει αρκετή ενέργεια στα μόρια ώστε να τα αφήσει σε διεγερμένη κατάσταση. Η αποδιέγερσή τους συντελείται με θραυσματοποίηση μέρους των μοριακών ιόντων τους προς ιόντα μικρότερης μάζας (Σχήμα

2.2). Τα ιόντα που τελικά παράγονται έλκονται μέσω της σχισμής του φασματομέτρου μαζών, όπου διαχωρίζονται βάσει του λόγου μάζας προς φορτίο (m/z) και παρουσιάζονται ως φάσμα μαζών. Συγκεκριμένα καταγράφεται σε μορφή ραβδογράμματος ο λόγος m/z συναρτήσει της σχετικής αφθονίας τους. Στη μεγαλύτερη κορυφή του φάσματος (βασική κορυφή) δίνεται αυθαίρετα η τιμή 100. Η τιμή m/z λαμβάνεται με διαίρεση τα ατομικής ή μοριακής μάζας ενός ιόντος με τον αριθμό (z) των φορτίων που φέρει.



Σχήμα 2.2: Αντιδράσεις ιοντισμού και θραυσματοποίησης ενός αναλυτή M

Η μορφή του φάσματος μαζών είναι χαρακτηριστική της αρχικής ουσίας και χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της ταυτότητας της.

Τα κυριότερα τμήματα ενός φασματομέτρου μαζών που θα αναλυθούν στη συνέχεια είναι: η πηγή ιοντισμού, ο/οι αναλυτή(ές) μαζών και ο ανιχνευτής. Σημειώνεται ότι όλη η διάταξη ενός φασματομέτρου μαζών πρέπει να λειτουργεί **υπό κενό**, ώστε να αποφευχθεί η σύγκρουση των ιόντων με άλλα μόρια κατά τη διάρκεια της αλληλεπίδρασής τους με ηλεκτρικά ή μαγνητικά πεδία. Συνεπώς χρησιμοποιείται σύστημα δημιουργίας υψηλού κενού (10^{-5} - 10^{-9} Torr).

2.4 ΠΗΓΗ ΙΟΝΤΙΣΜΟΥ^[32-34, 40-44]

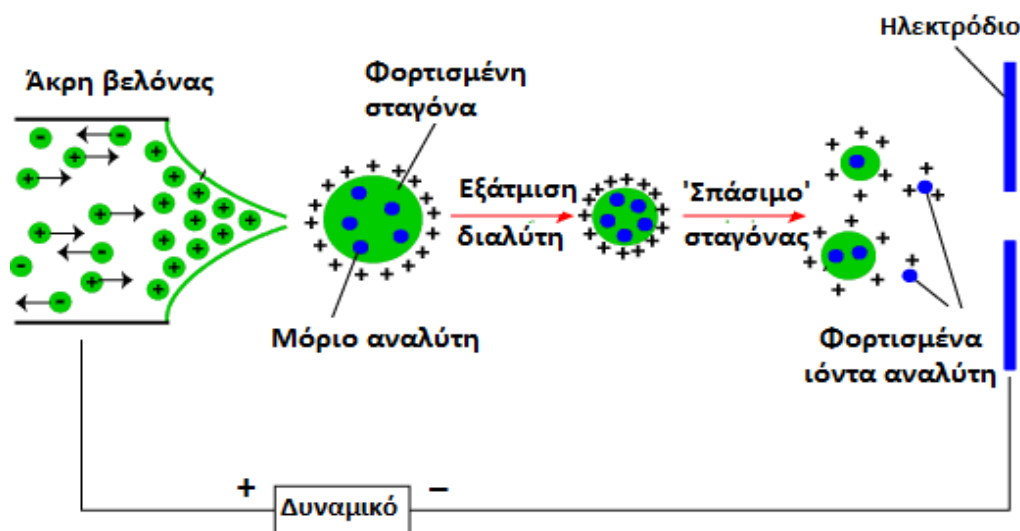
Το αρχικό στάδιο σε μια μέτρηση με φασματομετρία μαζών είναι ο σχηματισμός ιόντων του αναλύτη, διαδικασία καθοριστική για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Οι πηγές ιοντισμού διακρίνονται σε πηγές αέριας φάσης [πρόσκρουσης ηλεκτρονίων (EI), χημικού ιοντισμού (CI)] και σε πηγές εκρόφησης [ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό – electrospray ionization – (ESI), εκρόφησης με τη βοήθεια υλικού μήτρας (MALDI), κ.ά.]. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ιοντισμός τύπου ESI.

Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό

Η αρχή της τεχνικής στηρίζεται στο σχηματισμό ιόντων σε αέρια κατάσταση απευθείας από ένα υγρό διάλυμα. Για το σκοπό αυτό, το διάλυμα του προς ανάλυση δείγματος διέρχεται από τριχοειδές με μικρή ροή και με τη βοήθεια αερίου αποδιαλύτωσης και αερίου νεφελοποίησης (συνήθως αζώτου) μετατρέπεται σε αερόλυμα. Παράλληλα, με

την εφαρμογή διαφοράς δυναμικού 3-6 kV μεταξύ του τριχοειδούς και ενός αντιηλεκτροδίου δημιουργείται ισχυρό ηλεκτρικό πεδίο (σχήμα 2.3).

Διάφορες θεωρίες έχουν προταθεί για το μηχανισμό σχηματισμού των ιόντων κατά τον ιοντισμό ESI. Ξηραντικό αέριο, θέρμανση ή και τα δύο εφαρμόζονται στα σταγονίδια, σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης, προκαλώντας την εξάτμιση του διαλύτη. Σύμφωνα με μια θεωρία, το ηλεκτρικό πεδίο προκαλεί συσσώρευση του φορτίου στην επιφάνεια του υγρού στην άκρη του τριχοειδούς, γεγονός που οδηγεί στο σχηματισμό φορτισμένων σταγονιδίων (αερόλυμα φορτισμένων σταγονιδίων). Η εφαρμογή ξηραντικού αερίου ή/και θέρμανσης στα σταγονίδια, σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης οδηγεί στην εξάτμιση του διαλύτη. Καθώς το μέγεθος των σταγονιδίων μειώνεται, αυξάνεται η ηλεκτρονιακή πυκνότητα στην επιφάνειά τους. Οι απωστικές δυνάμεις Coulomb υπερνικούν τις δυνάμεις συνοχής των σταγονιδίων, με αποτέλεσμα τη διάσπαση τους σε ολοένα και μικρότερα σταγονίδια, από τα οποία τελικά εκροφώνται τα ιόντα, που κατευθύνονται μέσω ηλεκτροστατικών φακών προς τον αναλυτή μαζών.

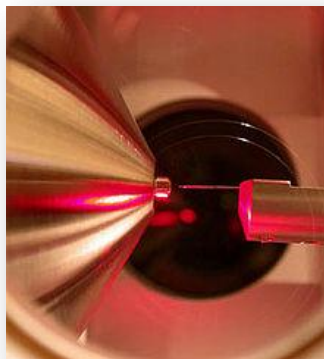


Σχήμα 2.3: Πορεία ιοντισμού των μορίων μιας ουσίας με ESI. Τα φορτισμένα ιόντα που τελικώς σχηματίζονται θα κατευθυνθούν προς τον αναλυτή του φασματομέτρου

Ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό προκαλεί το σχηματισμό μεμονωμένων φορτισμένων μικρών μορίων, όπως επίσης και το σχηματισμό πολλαπλά φορτισμένων ιόντων σε μεγαλομόρια. Στην δεύτερη περίπτωση, το φάσμα μαζών αντιστοιχεί σε στατιστική κατανομή διαδοχικών κορυφών χαρακτηριστικών των πολλαπλά φορτισμένων μοριακών ιόντων που λαμβάνονται από πρωτονίωση $[M+zH]^{z+}$, χωρίς να συμμετέχουν διαστάσεις και θραυσματοποιήσεις. Λαμβάνοντας πολλαπλά φορτισμένα ιόντα βελτιώνεται η ευαισθησία της τεχνικής και καθίσταται εφικτή η ανάλυση μορίων υψηλού μοριακού βάρους με αναλυτές μαζών μικρού εύρους μαζών, δεδομένου ότι το φασματόμετρο μετρά όχι την μάζα (m), αλλά τον λόγο μάζας προς φορτίο (m/z).

Ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό επηρεάζεται από μια ποικιλία παραγόντων που σχετίζονται τόσο με τη γεωμετρία της πηγής, όσο και με τη σύσταση του προς ανάλυση

δείγματος. Σε αυτούς περιλαμβάνονται: η φύση του διαλύτη της κινητής φάσης, η παρουσία ρυθμιστικών διαλυμάτων και το pH της κινητής φάσης, η ταχύτητα ροής, η φύση και η δομή του αναλυτή και η συγκέντρωση του στο δείγμα, η πολυπλοκότητα του δείγματος και η πορεία προκατεργασίας, η γεωμετρία της πηγής ιοντισμού κ.λπ.



Εικόνα 2.1: Βελόνα ιοντισμού με ESI

Η τεχνική ESI είναι σχετικά ήπια τεχνική ιοντισμού. Τα φάσματα μαζών περιέχουν κυρίως το πρωτονιωμένο μοριακό ιόν και μικρό ποσοστό θραυσμάτων. Ο σχηματισμός πολλαπλά φορτισμένων ιόντων δίνει τη δυνατότητα υπολογισμού του μοριακού βάρους ενώσεων χωρίς περιορισμό και την ανάλυση πρωτεϊνών και άλλων βιομορίων. Μπορεί να εφαρμοστεί για την ανάλυση πολικών μορίων μικρού μοριακού βάρους και μεγαλομορίων με ιονισμένες ομάδες. Ο ιονισμός των αναλυτών πραγματοποιείται σε σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες, γεγονός που καθιστά δυνατή την ανάλυση θερμοευαίσθητων ουσιών. Η τεχνική χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία και είναι κατάλληλη για ποσοτικούς προσδιορισμούς. Πρέπει να αναφερθεί ότι η ιδανική ροή κινητής φάσης για ιοντισμό τύπου ESI είναι $0,001-1 \text{ ml min}^{-1}$, συνεπώς και η επιλογή της στήλης πρέπει να είναι ανάλογη. Τέλος, σημειώνεται ότι υπάρχει δυνατότητα εφαρμογής θετικού ή αρνητικού δυναμικού, λαμβάνοντας θετικά ή αρνητικά φορτισμένα ιόντα αντίστοιχα (πίνακας 2.2).

Πίνακας 2.2: Χαρακτηριστικά ιόντα κατά τον ιοντισμό με ESI

	ESI	
	Θετικός ιοντισμός (+)	Αρνητικός ιοντισμός (-)
Αναλύτης	Κυρίως βάσεις [-NH ₂]	Κυρίως οξέο (-COOH, -OH)
Ενδεικτικά σχηματιζόμενα ιόντα	[M+H] ⁺ , [M+Na] ⁺ , [2M+H] ⁺ , [2M+Na] ⁺ , [M+NH ₄] ⁺ , [M+K] ⁺ , [M+H-H ₂ O] ⁺ , [M+MeOH+H] ⁺ , [M+CH ₃ CN+H] ⁺	[M-H] ⁻ , [M+CH ₃ COOH-H] ⁻ , [M+HCOOH-H] ⁻

2.5 ΑΝΑΛΥΤΕΣ ΜΑΖΩΝ^[32, 33, 40, 43]

2.5.1 Εισαγωγή

Στην παρούσα ερευνητική εργασία χρησιμοποιήθηκαν ως αναλυτές μαζών ένα τετράπολο (Q) και ένας αναλυτής χρόνου πτήσης ιόντων (TOF) σε σειρά. Τα ιόντα που έχουν δημιουργηθεί από τον ιοντισμό με ηλεκτροψεκασμό, εισέρχονται στους δύο αναλυτές, διαχωρίζονται βάσει του λόγου m/z τους και ακολούθως προσπίπτουν στον ανιχνευτή, δίνοντας έτσι τα φάσματα μαζών τους. Η ικανότητα ενός φασματομέτρου μαζών να διαχωρίζει μάζες συνήθως ορίζεται ως διακριτική ικανότητα R (resolution) και δίνεται από τη γενική σχέση 2.1:

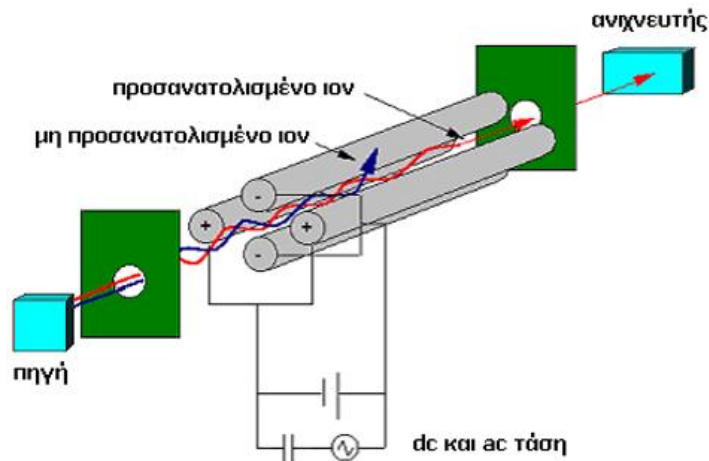
$$R = m/\Delta m(2.1)$$

όπου Δm είναι η διαφορά μαζών μεταξύ δύο μόλις διαχωριζόμενων κορυφών και m είναι η τιμή της μάζας της πρώτης κορυφής. Στη συνέχεια παρατίθενται οι βασικές αρχές λειτουργίας των παραπάνω αναλυτών.

2.5.2 Τετράπολο

Το τετράπολο ή τετραπολικός αναλυτής μαζών (quadrupole mass analyzer), είναι ο συχνότερα χρησιμοποιούμενος αναλυτής εξαιτίας του μικρού του μεγέθους, του χαμηλού του κόστους, της ανθεκτικότητάς του και της μεγάλης ταχύτητας σάρωσής του. Επιπλέον είναι ιδανικός για σύζευξη με χρωματογράφο LC ή GC, δεν έχει υψηλές απαιτήσεις κενού, ενώ παρέχει δυνατότητα χρήσης συζευγμένης φασματομετρίας MS/MS.

Αποτελείται από τέσσερις παράλληλες ράβδους, οι οποίες δρουν ως ηλεκτρόδια. Οι διαγώνιες ράβδοι συνδέονται ηλεκτρικά μεταξύ τους (σχήμα 2.4). Το κάθε ζεύγος συνδέεται με το θετικό και τον αρνητικό πόλο, αντίστοιχα, μιας πηγής μεταβλητής τάσης DC. Επιπλέον σε κάθε ζεύγος εφαρμόζονται μεταβλητές τάσεις AC που μεταξύ τους βρίσκονται σε διαφορά φάσης 180° . Τα ιόντα επιταχύνονται ανάμεσα στις ράβδους με ένα δυναμικό 5-10 V. Τα εναλλασσόμενα και συνεχή δυναμικά των ράβδων αυξάνουν, διατηρώντας όμως το λόγο τους σταθερό. Σε κάποια στιγμή όλα τα ιόντα, εκτός αυτών που έχουν μια συγκεκριμένη τιμή m/z , προσπίπτουν στις ράβδους και μετατρέπονται σε ουδέτερα μόρια. Έτσι εξέρχονται από το τετράπολο μόνον ιόντα των οποίων οι τιμές m/z βρίσκονται σε μια στενή περιοχή τιμών. Με τα τετράπολα μπορούν να διακριθούν ιόντα που διαφέρουν κατά μία μονάδα μάζας (χαμηλή διακριτική ικανότητα) και ως εκ τούτου είναι εφικτό να γίνει ταυτοποίηση μιας ένωσης. Τα τετράπολα ορθότερα μπορούν να χαρακτηριστούν ως 'φίλτρα' μαζών παρά ως φασματομέτρα μαζών.



Σχήμα 2.4: Σχηματική απεικόνιση του τετραπολικού φασματομέτρου μαζών

2.5.3 Αναλυτής Μαζών Χρόνου Πτήσης (Time Of Flight, TOF)^[32, 33, 40, 43, 45-48]

2.5.3.1. Εισαγωγή

Το πρώτο φασματόμετρο χρόνου πτήσης (Time Of Flight, TOF) κατασκευάστηκε στα τέλη της δεκαετίας του 1940, άρχισε όμως να χρησιμοποιείται ευρέως τα τελευταία μόνο χρόνια (δεκαετία του 1990). Αιτία ήταν η απουσία διαθέσιμων τεχνολογιών καταγραφής και επεξεργασίας φασμάτων σε χρονικό εύρος της τάξης των μsec . Τώρα πια οι τεχνικές αυτές είναι διαθέσιμες και, σε συνδυασμό με τη χρήση τεχνικών ιονισμού τύπου ESI και MALDI, η χρήση των αναλυτών TOF έχει αποκτήσει μεγάλη εφαρμογή ιδιαίτερα στην ανάλυση βιομορίων. Παράλληλα, η εισαγωγή τεχνολογιών, όπως τα ανακλαστικά κάτοπτρα μέσα στους αναλυτές TOF – όπως θα δούμε στη συνέχεια – έχει συμβάλει σημαντικά στην αύξηση της διαχωριστικής τους ικανότητας.

2.5.3.2. Αρχή λειτουργίας

Η λειτουργία του φασματόμετρου μαζών με αναλυτή χρόνου πτήσης (TOF-MS) βασίζεται στην αρχή ότι ένα πλήθος ιόντων με διαφορετική τιμή λόγου m/z που κινούνται προς την ίδια κατεύθυνση με την ίδια κινητική ενέργεια, θα έχουν αντίστοιχα και διαφορετική ταχύτητα, η οποία θα είναι αντιστρόφως ανάλογη της τετραγωνικής ρίζας του λόγου m/z . Έτσι, στο φασματόμετρο TOF τα σχηματιζόμενα στην πηγή ιοντισμού ιόντα με την εφαρμογή καθορισμένου δυναμικού από ηλεκτροστατικό πεδίο επιταχύνονται και αποκτούν υψηλή κινητική ενέργεια, οπότε μετράται ο χρόνος που απαιτείται για να διανύσουν καθορισμένη απόσταση απουσία εφαρμοζόμενου πεδίου και οι χρόνοι πτήσης που καταγράφονται, χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό των λόγων m/z των αντίστοιχων ιόντων.

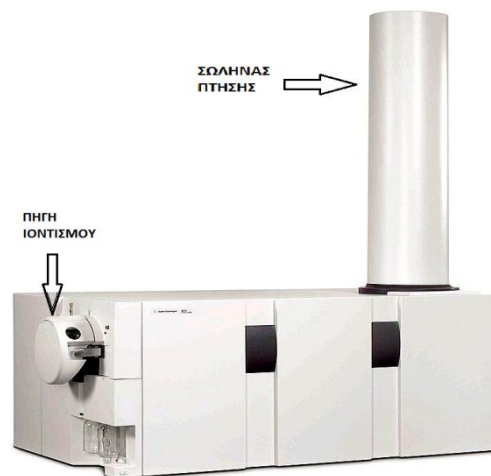
2.5.3.3. Τεχνική TOF

Ο διαχωρισμός των ιόντων, όπως έχει αναφερθεί γίνεται με βάση την τιμή m/z τους. Η αρχή στην οποία βασίζεται η λειτουργία του TOF, όπως προαναφέρθηκε, είναι ότι ιόντα στα οποία δίνεται η ίδια αρχική ενέργεια, θα έχουν ταχύτητες αντιστρόφως ανάλογες των τιμών m/z τους. Συνεπώς και ο χρόνος που θα κάνουν τα ιόντα αυτά να διασχίσουν μια περιοχή απαλλαγμένη από πεδία (το σωλήνα πτήσης του TOF), θα σχετίζεται άμεσα με τον λόγο m/z τους.

Ανεξαρτήτως της μεθόδου ιοντισμού που έχει εφαρμοστεί προηγουμένως, είναι απαραίτητο όλα τα σχηματισθέντα ιόντα να εισέλθουν στο TOF στον ίδιο αρχικό χρόνο έτσι, ώστε οι «χρόνοι πτήσης» τους – άρα και οι λόγοι m/z τους-, να μπορούν να μετρηθούν με ακρίβεια. Για αυτό το λόγο χρησιμοποιείται ηλεκτρικός παλμός 103 – 104 V, ο οποίος σε δεδομένο χρόνο t δημιουργεί έναν «πακέτο» ιόντων τα οποία είναι τόσο κοντά μεταξύ τους σαν να είχαν προέλθει από ακτινοβολία laser. Η εφαρμογή του ηλεκτρικού παλμού που δημιουργεί τα «πακέτα» ιόντων ορίζεται ως χρόνος έναρξης της πτήσης $t=0$. Μετά τον σχηματισμό τους τα «πακέτα» ιόντων επιταχύνονται με τη βοήθεια υψηλού δυναμικού έτσι, ώστε να αποκτήσουν την επιθυμητή ενέργεια και να μπορέσουν να εισέλθουν μέσα στο σωλήνα πτήσης του TOF.

Ο σωλήνας πτήσης έχει δεδομένο μήκος (έως και 4 m), είναι ελεύθερος πεδίων και ορίζεται ως η απόσταση μεταξύ πηγής ιόντων και ανιχνευτή. Τα ιόντα εισέρχονται σε αυτόν με την κατάλληλη ενέργεια και κατεύθυνση ώστε να φθάσουν στον ανιχνευτή. Ο σωλήνας πτήσης λειτουργεί στη μέγιστη επιτρεπόμενη για τον ανιχνευτή πίεση, η οποία συνήθως δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 10^{-5} Torr. Για δεδομένη κινητική ενέργεια, τα ιόντα που έχουν μικρή μάζα, θα κινούνται με μεγαλύτερη ταχύτητα μέσα στο σωλήνα πτήσης, ενώ αυτά που έχουν μεγαλύτερη μάζα θα κινούνται με μικρότερη ταχύτητα. Συνεπώς μετά από κάποιο χρονικό διάστημα πτήσης, τα ιόντα που βρίσκονταν στο ίδιο αρχικό 'πακέτο' θα διαχωριστούν σε μικρότερα 'πακέτα' βάσει του λόγου m/z τους και έτσι θα φθάνουν στον ανιχνευτή (σχήμα 2.5).

Είναι σημαντικό ο χρόνος μεταξύ διαδοχικών παλμών κατά τη δημιουργία των 'πακέτων' ιόντων να είναι μεγαλύτερος από το χρόνο πτήσης του ιόντος με το μεγαλύτερο m/z , αλλιώς θα υπάρχει ασάφεια στη μέτρηση των χρόνων πτήσης. Σημαντικό επίσης είναι να διατηρείται χαμηλή η πίεση στο εσωτερικό του 'σωλήνα πτήσης', ώστε να αποφεύγονται συγκρούσεις των ιόντων με υπολείμματα αερίου, κάτι που μειώνει την ταχύτητα τους και συνεπώς επηρεάζει την ακρίβεια του ανιχνευτή.



Εικόνα 2.2: Φασματόμετρο Q-TOF



Σχήμα 2.5: Παρουσίαση του εσωτερικού ενός αναλυτή TOF. Τα ελαφρύτερα ιόντα θα φθάνουν νωρίτερα στον ανιχνευτή.

Η μαθηματική προσέγγιση της παραπάνω τεχνικής είναι σχετικά απλή. Αρχικά εφαρμόζεται στα ιόντα ένα δυναμικό V ώστε να εξέλθουν από την πηγή. Εάν το φορτίο του ιόντος είναι z , η αρχική του ενέργεια θα δίνεται από τη σχέση 2.2

$$\text{Αρχική ενέργεια} = zV \quad (2.2)$$

Η ενέργεια αυτή, καθώς το ιόν κινείται μέσα στο σωλήνα πτήσης θα μετατρέπεται σε κινητική και τελικά θα ισοδυναμεί με την κινητική ενέργεια του ιόντος όταν αυτό θα φτάσει στον ανιχνευτή (σχέση 2.3)

$$zV = \frac{1}{2} mv^2 \quad (2.3)$$

Για το χρόνο πτήσης t και για απόσταση που ισοδυναμεί με το μήκος του σωλήνα πτήσης D , λαμβάνεται η σχέση 2.4

$$zV = \frac{1}{2} m (D / t)^2 \quad (2.4)$$

Εάν λυθεί η παραπάνω σχέση ως προς m/z θα προκύψει η σχέση 2.5 που αποτελεί και τη βάση της λειτουργίας του φασματομέτρου

$$m/z = 2 Vt^2 / D^2 \quad (2.5)$$

Είναι φανερό ότι για σταθερές τιμές D και V ο λόγος m/z είναι ανάλογος του τετραγώνου του χρόνου t στον οποίο δεδομένο ιόν φθάνει στον ανιχνευτή.

Εάν διαφορίσουμε τη σχέση 2.5 θα προκύψει η παρακάτω σχέση

$$m / dm = t / 2 dt \quad (2.6)$$

Ο αναλυτής TOF συνδυάζει απλότητα, υψηλή διακριτική ικανότητα $R=20.000$ (με τη χρήση των τεχνικών που θα αναφερθούν παρακάτω), καθώς και τη μεγαλύτερη ταχύτητα σάρωσης σε σχέση με κάθε άλλο ανιχνευτή ($v = 10^6 \text{ m/z s}^{-1}$). Ειδικά η μεγάλη ταχύτητα σάρωσης οφείλεται στο γεγονός ότι για κάθε εφαρμογή παλμού καταγράφεται ένα φάσμα,

χωρίς – να χρειάζεται σάρωση κάποιου δυναμικού ή ρεύματος όπως σε άλλους αναλυτές. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα του αναλυτή TOF είναι το απεριόριστο εύρος μαζών που μπορεί να ανιχνεύει, αφού στον ανιχνευτή του φθάνουν τελικά όλα τα ιόντα που σχηματίζονται σε κάθε παλμό. Το απεριόριστο αυτό εύρος μαζών ευνοεί την ανάλυση βιομορίων και πρωτεϊνών. Στα πλεονεκτήματα του αναλυτή TOF συγκαταλέγονται επίσης η μηχανική του ανθεκτικότητα, η εύκολη πρόσβαση στην πηγή ιόντων, η επίτευξη χαμηλών ορίων ανίχνευσης της τάξης των picogram και fmol, καθώς και η υψηλή του ακρίβεια.

Στα μειονεκτήματα της τεχνικής TOF συγκαταλέγονται το υψηλό κόστος των ηλεκτρονικών που απαιτούνται για τόσο υψηλές ταχύτητες σάρωσης, οι ψηλές απαιτήσεις κενού και η περιορισμένη χρήση στην ποσοτική ανάλυση.

Διαχωριστική ικανότητα (resolution)

Η διαχωριστική ικανότητα R του αναλυτή TOF θα δίνεται από τη σχέση

$$R = m / \Delta m = t / 2 \Delta t = L / 2 \Delta x \quad (2.7)$$

όπου Δm και Δt είναι τα πλάτη των κορυφών στο 50% του ύψους της χρωματογραφικής κορυφής και Δx το πάχος του πακέτου ιόντων που προσπίπτουν στον ανιχνευτή. Εφόσον η διαχωριστική ικανότητα είναι ανάλογη του χρόνου πτήσης και του μήκους που διανύουν τα ιόντα, ένας τρόπος για να αυξηθεί η διαχωριστική ικανότητα είναι να αυξηθεί το μήκος του σωλήνα πτήσης. Όμως υπερβολική αύξηση του σωλήνα πτήσης, δεν κάνει το όργανο μόνο δύσχρηστο, αλλά παράλληλα μειώνει την απόδοση του, αφού αυξάνει τις συγκρούσεις των ιόντων στο εσωτερικό του σωλήνα πτήσης. Ένας άλλος τρόπος αύξησης της διαχωριστικής ικανότητας μπορεί να επιτευχθεί με αύξηση του χρόνου πτήσης των ιόντων, μειώνοντας το δυναμικό επιτάχυνσης. Αυτό όμως επιδρά αρνητικά στην ευαισθησία του οργάνου. Ο μόνος τρόπος να επιτευχθεί ταυτοχρόνως καλή διαχωριστική ικανότητα και ευαισθησία είναι η χρησιμοποίηση ενός σωλήνα μήκους 1-2 m και ενός δυναμικού τουλάχιστον 20 kV.

Η διαχωριστική ικανότητα του αναλυτή TOF επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, όπως η διασπορά σχηματισμού ιόντων στην πηγή, η διασπορά ταχυτήτων, η ανομοιομορφία επιτάχυνση, η διασπορά στο χώρο κλπ. Αποτέλεσμα των παραπάνω είναι η εμφάνιση διασποράς στις κινητικές ενέργειες των ιόντων έτσι, ώστε ιόντα που έχουν ίδιες μάζες να φθάνουν στον ανιχνευτή σε ελαφρά διαφορετικούς χρόνους. Κάτι τέτοιο οδηγεί στη διεύρυνση των κορυφών των λαμβανομένων φασμάτων και σε μείωση της διαχωριστικής ικανότητας του αναλυτή. Δύο από τις κυριότερες τεχνικές που εφαρμόζονται προς ελαχιστοποίηση των παραπάνω παραγόντων που θα εξεταστούν στη συνέχεια είναι:

- Η χρήση του ανακλαστικού κατόπτρου (reflectron)
- Η χρήση ορθογώνιας επιτάχυνσης ιόντων (orthogonal acceleration)

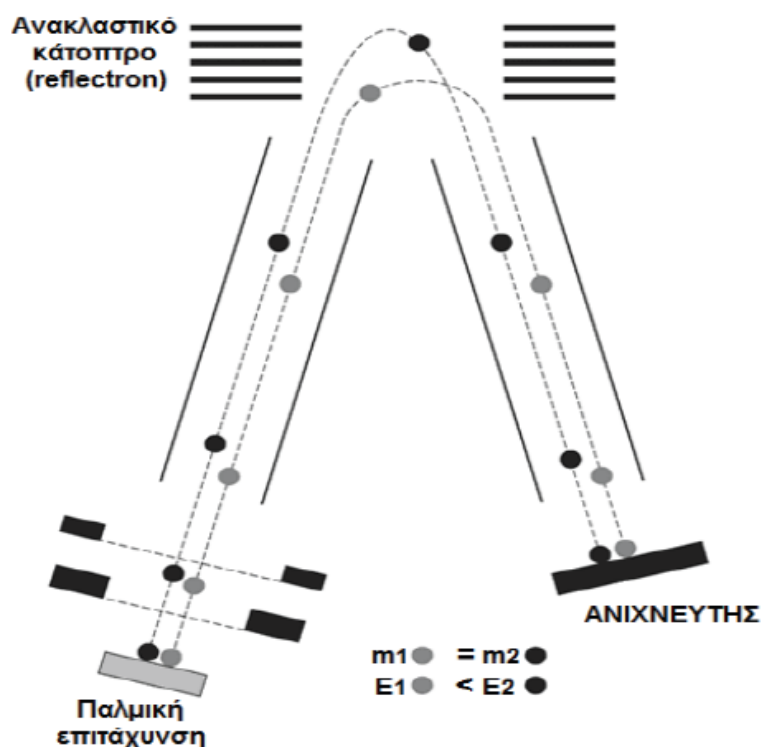
Άλλοι παράγοντες που επιδρούν στη διαχωριστική ικανότητα είναι ο χρόνος απόκρισης του ανιχνευτή, η σταθερότητα της παροχής ισχύος στο όργανο, τα ηλεκτρονικά του οργάνου και συγκεκριμένα οι διατάξεις ψηφιοποίησης, κ.α.

Όσον αφορά στην ευαισθησία, το βέλτιστο αποτέλεσμα λαμβάνεται όταν εξασφαλίζεται ότι τα ιόντα με χαμηλό m/z κάθε νέου 'πακέτου' ιόντων δεν θα φθάνουν στον ανιχνευτή την ίδια χρονική στιγμή με τα βαρύτερα ιόντα του προηγούμενου 'πακέτου'.

Γενικά, όπως αναφέρθηκε και πρωτύτερα, απαιτείται χρήση τεχνικών που επιτυγχάνουν ένα συμβιβασμό μεταξύ ευαισθησίας και διαχωριστικής ικανότητας.

2.5.3.4. Ανακλαστικό κάτοπτρο (reflectron)

Βασικός σκοπός του ανακλαστικού κατόπτρου (σχήμα 2.6) είναι η αύξηση του χρόνου πτήσης των ιόντων, χωρίς αύξηση του μήκους του σωλήνα πτήσης του οργάνου. Παράλληλα επιτυγχάνεται μείωση της διασποράς ταχυτήτων για ιόντα με το ίδιο m/z . Όλα τα παραπάνω έχουν ως αποτέλεσμα τη βελτίωση της διαχωριστικής ικανότητας του οργάνου.



Σχήμα 2.6: Μηχανισμός λειτουργίας ανακλαστικού κατόπτρου. m και E οι μάζες και οι ενέργειες των ιόντων αντίστοιχα. Τα ιόντα με μεγαλύτερη ενέργεια, διεισδύουν βαθύτερα στο κάτοπτρο και τελικά φθάνουν στον ανιχνευτή στον ίδιο χρόνο με τα ιόντα που είχαν μικρότερη ενέργεια

Η διάταξη αυτή η οποία χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα εργασία λειτουργεί ως εξής: Το ανακλαστικό κάτοπτρο τοποθετείται απέναντι από την παλμική πηγή ιόντων και ο ανιχνευτής στην ίδια πλευρά και παράλληλα προς αυτήν. Στα ιόντα, λίγο αφότου εισέλθουν στο σωλήνα πτήσης, εφαρμόζεται ένα δυναμικό 25% μικρότερο από αυτό της πηγής. Με αυτόν τον τρόπο τα ιόντα υφίστανται μια επιβράδυνση της τάξης του 25% περίπου της

ταχύτητάς τους. Στη συνέχεια τα ιόντα υφίστανται την εφαρμογή ενός δεύτερου δυναμικού το οποίο είναι ελαφρά μεγαλύτερο από αυτό της πηγής, με αποτέλεσμα να διεισδύουν στο ανακλαστικό κάτοπτρο και σχεδόν να σταματούν. Ακολουθώντας με εφαρμογή του ίδιου δυναμικού που αρχικά τα επιβράδυνε, τα ιόντα θα επιταχυνθούν ξανά και θα φτάσουν στον ανιχνευτή με την ίδια ταχύτητα (και αντίθετη κατεύθυνση) που αρχικά εισήλθαν στο σωλήνα πτήσης.

Τα ιόντα που έχουν μεγαλύτερη κινητική ενέργεια, άρα και μεγαλύτερη ταχύτητα, θα διεισδύσουν βαθύτερα στην περιοχή του ανακλαστικού κατόπτρου από ότι τα ιόντα με μικρότερη κινητική ενέργεια. Επομένως τα ταχύτερα ιόντα θα περνούν περισσότερη ώρα μέσα στην περιοχή του κατόπτρου και θα φτάνουν στον ανιχνευτή σχεδόν την ίδια στιγμή με τα βραδύτερα ιόντα ομοίου m/z .

Η ικανότητα του ανακλαστικού κατόπτρου να διορθώνει τη διασπορά μέχρι και 20 eV στις κινητικές ενέργειες ιόντων με ίδιο m/z , είναι σημαντικότερη από την αύξηση του χρόνου πτήσης που επίσης επιτυγχάνεται.

Πρέπει να σημειωθεί ότι πολλά σύγχρονα όργανα TOF έχουν πάνω από ένα ανακλαστικά κάτοπτρα. Άλλωστε το ολοένα αυξανόμενο ενδιαφέρον για μελέτη ιόντων με λόγο m/z πάνω και από 50000, απαιτεί την επίτευξη όσο το δυνατόν καλύτερης διαχωριστικής ικανότητας.

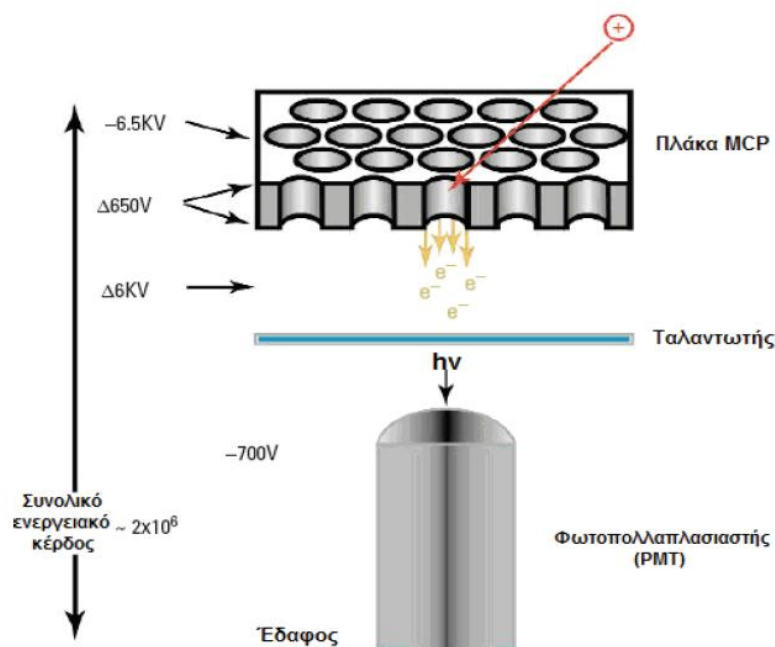
2.5.3.5. Ορθογώνια επιτάχυνση ιόντων (orthogonal acceleration)

Η τεχνική αυτή έχει ως σκοπό να βελτιώσει την ευαισθησία του οργάνου χωρίς να μειώσει την διαχωριστική του ικανότητα. Η αρχή λειτουργίας της βασίζεται στο γεγονός ότι ιόντα με αρχικές ταχύτητες κάθετες στο σωλήνα πτήσης παρουσιάζουν μικρότερη διασπορά χρόνων πτήσης. Στη διάταξη αυτή υπάρχει ένας πρόσθετος χώρος, ελεύθερος πεδίου, όπου 'μαζεύονται' τα ιόντα που προήλθαν από την πηγή ιοντισμού. Σε αυτόν τον χώρο εφαρμόζεται ταχύς παλμός δυναμικού έτσι, ώστε τα ιόντα να εισέλθουν σε δεύτερο χώρο. Εκεί τα ιόντα υφίστανται επιτάχυνση με φορά κάθετη προς την αρχική τους κατεύθυνση και εισέρχονται στο σωλήνα πτήσης.

2.6. ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ^[33, 34, 43, 47]

Η ανίχνευση ιόντων σε εφαρμογές TOF είναι απαιτητική λόγω της μικρής κλίμακας χρόνου στην οποία γίνεται η άφιξη των ιόντων. Ο ανιχνευτής ενός αναλυτή TOF μπορεί να είναι ένας ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής (electron multiplier) ή – όπως στην παρούσα εργασία – ένας ανιχνευτής πλακών πολλαπλής διέλευσης (multi-channel plate detector, MCP). Κάθε 'πακέτο' ιόντων που φθάνει στον ανιχνευτή μετατρέπεται σε μια κορυφή m/z στο λαμβανόμενο φάσμα.

Στην περίπτωση του MCP (Σχήμα 2.7), όταν ένα ιόν ολοκληρώσει την 'πτήσή' του, προσπίπτει πάνω σε μια λεπτή επιφάνεια που δεν είναι παρά μια πλάκα από πλήθος μικροσκοπικών σωλήνων (multi-channels).



Σχήμα 2.7: Ανιχνευτής φασματομέτρου τύπου MCP

Με την πρόσκρουση του, απελευθερώνεται ένα ή περισσότερα ηλεκτρόνια τα οποία προσκρούουν στα τοιχώματα των 'multi-channels' και με τη σειρά τους παράγουν ένα 'καταρράκτη' ηλεκτρονίων. Συγκεκριμένα, σε κάθε εισερχόμενο ιόν αντιστοιχούν 10 παραγόμενα ηλεκτρόνια, τα οποία μετά την έξοδο τους από τον MCP, προσκρούουν σε ταλαντωτή που με τη σειρά του εκπέμπει φωτόνια. Η ακτινοβολία αυτή, μέσω ενός φωτοπολλαπλασιαστή (photomultiplier tube, PMT), μετατρέπεται σε ηλεκτρικό σήμα. Το ηλεκτρικό αυτό σήμα εκφράζεται ως συνάρτηση του χρόνου πτήσης t και στη συνέχεια ως συνάρτηση των λόγων m/z .

Το σήμα που λαμβάνεται από τον ανιχνευτή, σε χρονικά διαστήματα της τάξης των nsec, πρέπει να ψηφιοποιηθεί με κατάλληλα και απαιτητικά συστήματα που επιτρέπουν την καταγραφή χιλιάδων φασμάτων ανά sec. Τέτοια συστήματα είναι τα ITRs (Intergrating Transient Records) και τα TDCs (Time-to-Digital Converters).

2.7 ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΗ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ (MS/MS)^[33-35]

Οι πληροφορίες που λαμβάνονται με τη χρήση απλής φασματομετρίας μαζών (MS) είναι πολλές φορές ανεπαρκείς, ειδικά όταν αυτή συνδυάζεται με μαλακό ιοντισμό, ο οποίος παράγει μικρό αριθμό θραυσμάτων. Για την ταυτοποίηση ενώσεων σε πολύπλοκα μίγματα χρειάζονται πρόσθετες πληροφορίες που λαμβάνονται με την εφαρμογή συζευγμένης ή δίδυμης φασματομετρίας μαζών (Tandem Mass Spectrometry, MS/MS).

Η συζευγμένη φασματομετρία μαζών (tandem mass spectrometry) βασίζεται στην απομόνωση ενός συγκεκριμένου ιόντος λόγου m/z (πρόδρομο ιόν) το οποίο στη συνέχεια υφίσταται θραυσματοποίηση προς θυγατρικά ιόντα και περιλαμβάνει δύο ή περισσότερα στάδια φασματομετρικής ανάλυσης. Για να επιτευχθεί ο παραπάνω στόχος γίνεται σύνδεση

πολλών αναλυτών στη σειρά (υβριδικά φασματομέτρα). Η πλέον δημοφιλής τεχνική για επίτευξη MS/MS είναι αυτή του τριπλού τετραπόλου. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε σύνδεση τετραπόλου (Q) με αναλυτή TOF.

Στη δίδυμη φασματομετρία μαζών, τα ιόντα, ενώ έχουν αποκτήσει αρκετή εσωτερική ενέργεια, δύναται να θραυσματοποιηθούν ώστε να δώσουν παραγόμενα ιόντα - τα θραύσματα – και ουδέτερα θραύσματα. Αυτά τα θραύσματα μπορούν να διακριθούν σύμφωνα με το χώρο όπου έγιναν οι θραυσματοποιήσεις. Εάν ο χρόνος ζωής του ιόντος είναι μεγαλύτερος από το χρόνο πτήσης, τότε το ιόν φτάνει στον ανιχνευτή χωρίς να πραγματοποιηθεί θραυσματοποίηση. Ενώ, εάν ο χρόνος ζωής του ιόντος είναι μικρότερος από το χρόνο που ξοδεύει το ιόν πριν την επιτάχυνση, το ιόν θραυσματοποιείται πριν να εκδιωχθεί από την πηγή. Οι θραυσματοποιήσεις διαχωρίζονται στις θραυσματοποιήσεις εντός της πηγής (In Source Decay, ESD) και εκτός της πηγής (Post Source Decay, PSD). Το πρόδρομο ιόν και τα θραύσματα ιόντων έχουν την ίδια κινητική ενέργεια μετά την επιτάχυνση κι έτσι φτάνουν στον ανιχνευτή ξεχωριστά, ανάλογα με το λόγο m/z . Ο χρόνος ζωής ενός ιόντος μπορεί να είναι ενδιάμεσος του χρόνου που ξοδεύει στην πηγή και στο χρόνο πτήσης του. Τα συγκεκριμένα αυτά ιόντα είναι αρκετά σταθερά ώστε να «αφήσουν» την πηγή αλλά περιέχουν αρκετή περίσσεια ενέργεια ώστε να επιτρέψουν τη θραυσματοποίησή τους στην ελεύθερη περιοχή του σωλήνα πτήσης, πριν να φτάσουν στον ανιχνευτή. Αυτό αντιστοιχεί στη θραυσματοποίηση μετασταθών ιόντων.

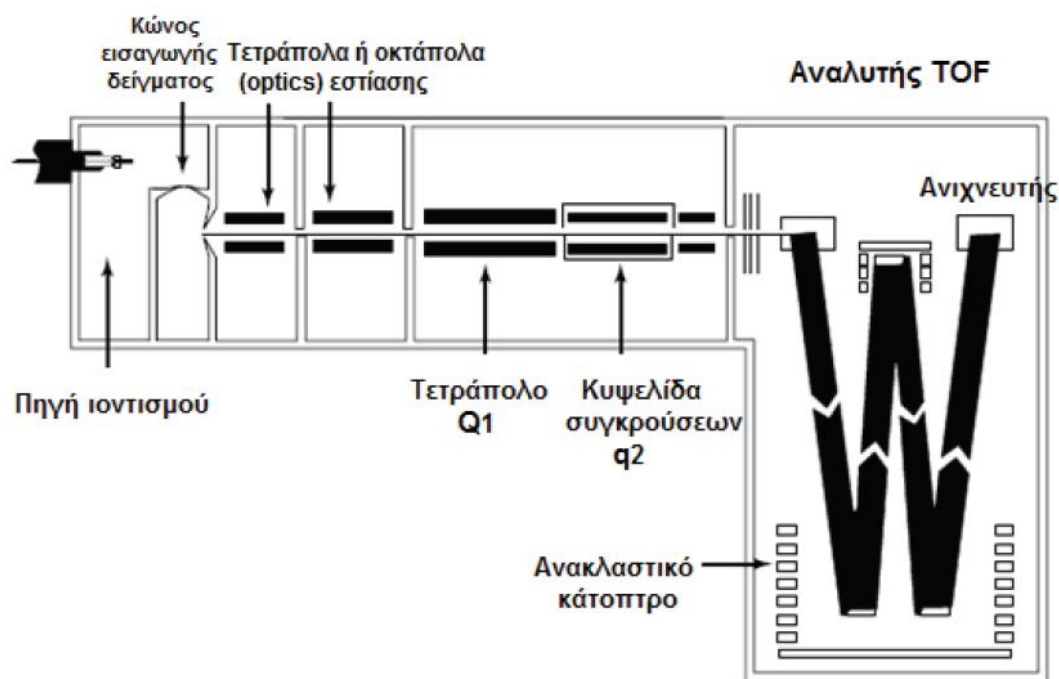
Σε ένα σύστημα MS/MS το μίγμα στόχος ιοντίζεται επιλεκτικά και τα χαρακτηριστικά του ιόντα διαχωρίζονται από τ' άλλα του μίγματος. Τα επιλεγμένα πρωταρχικώς ιόντα συγκρούονται κατόπιν με μόρια ενός αδρανούς αερίου σε μια ενδιάμεση περιοχή αντιδράσεων (collision cell), ώστε να παραχθούν θραύσματα τα οποία χωρίζονται και ταυτοποιούνται στο δεύτερο φασματομέτρο. Κάθε αναλυτής μαζών σαρώνει, και επιτρέπει τη δίοδο ενός μόνο ιόντος ή όλων των διερχομένων ιόντων. Στο ενδιάμεσο δύο φασματομετρήσεων τα ιόντα υποβάλλονται σε ορισμένες από τις παρακάτω διαδικασίες: συγκρούσεις με ουδέτερα ή αδρανή αέρια (π.χ. He), συγκρούσεις με επιφάνειες, αλληλεπίδραση με φωτόνια, ηλεκτρόνια ή άλλα ιόντα, επιτάχυνση ή επιβράδυνση, εξουδετέρωση, αποσύνθεση – διάσπαση.

Η πολλαπλότητα των επιλογών αυτών επιτρέπει απεριόριστες επιλογές ως προς τον τρόπο λήψης των φασμάτων δίδυμης φασματομετρίας μαζών. Ενδεικτικά οι κυριότερες είναι οι εξής:

- Σάρωση του θυγατρικού ιόντος. Αποτελεί την πιο διαδεδομένη μέθοδο σάρωσης σε MS/MS. Επιλέγεται συγκεκριμένο ιόν στον πρώτο αναλυτή και διοχετεύεται υψηλή ή χαμηλή ενέργεια σε αυτό. Ακολουθεί θραυσματοποίηση στην ενδιάμεση περιοχή αντιδράσεων και τα παραγόμενα ιόντα οδηγούνται στο δεύτερο αναλυτή, όπου διαχωρίζονται σύμφωνα με το λόγο m/z . Λαμβάνεται έτσι το φάσμα των παραγόμενων ιόντων.
- Σάρωση του πρόδρομου ιόντος.

- Παρακολούθηση προεπιλεγμένου ιόντος/ιόντων (Single/Multiple Reaction Monitoring- SRM/MRM). Προεπιλέγεται συγκεκριμένο ιόν με λόγο m/z στον πρώτο αναλυτή, οπότε αυξάνει εντυπωσιακά το σήμα των ιόντων που μας ενδιαφέρει. Ακολουθεί θραυσματοποίηση στην ενδιάμεση περιοχή αντιδράσεων. Κατόπιν επιλέγεται συγκεκριμένο ιόν. Τα παραγόμενα ιόντα οδηγούνται στο δεύτερο αναλυτή, απ' όπου εξέρχεται ιόν προεπιλεγμένου λόγου m/z .
- Σάρωση σταθερής απώλειας ή σταθερής προσθήκης ουδέτερου θραύσματος.

Η σύνδεση Q-TOF (σχήμα 2.8) περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1996 ως μια τεχνική που συνδυάζει την ικανότητα σάρωσης ενός τετραπόλου με τη διαχωριστική ικανότητα του αναλυτή TOF και μπορεί να παράγει απλά και καλής ποιότητας φάσματα, τόσο MS, όσο και MS/MS. Ένα τετράπολο Q1 συνδέεται με ένα δεύτερο αναλυτή q2 ο οποίος καλείται κυψελίδα συγκρούσεων [στην παρούσα εργασία η κυψελίδα συγκρούσεων (collision cell) ήταν ένα εξάπολο].



Σχήμα 2.8: Διάταξη αναλυτή Q-TOF με διπλό ανακλαστικό κάτοπτρο

Ο q2 συνδέεται με τον αναλυτή TOF σε ορθογώνια διάταξη. Στο Q1 γίνεται η επιλογή του επιθυμητού πρόδρομου ιόντος, το οποίο οδηγείται στο q2 όπου συγκρούεται με περίσσεια αδρανούς αερίου παράγοντας θυγατρικά ιόντα. Ο διαχωρισμός και η μέτρηση των θυγατρικών ιόντων γίνεται στον αναλυτή TOF. Η σύγκρουση του πρόδρομου ιόντος με αδρανές αέριο (collision induced dissociation, CID) στην προκειμένη περίπτωση έγινε με χαμηλή ενέργεια μικρότερη των 100 eV.

Σημειώνεται ότι στα περισσότερα συστήματα Q-TOF υπάρχει ένα πρόσθετο τετράπολο ή οκτάπολο πριν το Q1, το οποίο βοηθά την εστίαση των ιόντων στο χώρο.

2.8 ΣΥΖΕΥΞΗ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΟ ΜΑΖΩΝ^[32-34]

Μέχρι στιγμής παρουσιάστηκαν τα βασικά στοιχεία, τόσο της υγροχρωματογραφίας, όσο και του φασματομέτρου μαζών. Βασικό πρόβλημα στη σύνδεση LC-MS είναι η ασυμβατότητα μεταξύ των σχετικά μεγάλων όγκων διαλυτών που χρησιμοποιούνται στην υγροχρωματογραφία και στο κενό που απαιτείται στη φασματομετρία. Για την επίλυση του προβλήματος αυτού έχουν προταθεί διάφορα σχήματα διασύνδεσης, ένα από τα οποία είναι ο ιοντισμός με ESI που περιγράφηκε στο υποκεφάλαιο 2.4. Στον πίνακα 2.3 που ακολουθεί δίνονται συνοπτικά τα προβλήματα σύζευξης LC-MS, οι τρόποι επίλυσής τους, καθώς και τα πλεονεκτήματα της χρήσης ενός συστήματος LC-MS στην ανάλυση.

Πίνακας 2.3: Χαρακτηριστικά σύζευξης LC-MS

Πλεονεκτήματα Σύζευξης LC-MS	Προβλήματα Σύζευξης LC-MS	Επίλυση Προβλημάτων Σύζευξης LC-MS
Προσδιορισμός μη πτητικών (αποφυγή σταδίου παραγωγοποίησης) και θερμοευαίσθητων ουσιών	Ασυμβατότητα μεγάλων όγκων διαλυτών της LC και του κενού που απαιτεί το MS	Χρήση τεχνικών ιοντισμού, όπως ESI, APCI, MALDI
Μελέτη αναλυτών με μεγάλο εύρος μοριακών βαρών (<1000 Da: φάρμακα και μεταβολίτες τους, >100000 Da : βιοπολυμερή)	Ασυμβατότητα με τα μη πτητικά ρυθμιστικά διαλύματα της κινητής φάσης	Χρήση πτητικών ρυθμιστικών διαλυμάτων και ρυθμιστικών pH της κινητής φάσης.
Το MS(MS) είναι ο πιο αξιόπιστος ανιχνευτής για την ταυτοποίηση ενώσεων (προσδιορισμός μοριακού βάρους, δομής)		Διαχωρισμός ροής κινητής φάσης ώστε να εισάγεται μικρό κλάσμα στην πηγή ιοντισμού
Υψηλή εκλεκτικότητα και ευαισθησία		Χρήση στηλών μικρής διαμέτρου με μικροσωματιδιακό πληρωτικό υλικό
Χρήση ισοτοπικά επισημασμένων εσωτερικών προτύπων προς επίτευξη ποσοτικών προσδιορισμών με υψηλή ακρίβεια		

2.9 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ LC-QTOFMS(MS) ΣΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΝΤΟΠΙΝΓΚ^[49-54]

Η τεχνική LC-MS(MS) έχει επηρεάσει αποφασιστικά την ανάλυση στον έλεγχο ντόπινγκ. Θερμοευαίσθητες, μη πτητικές ή μεγάλου μοριακού βάρους ουσίες, στις οποίες δεν μπορούν να εφαρμοστούν τεχνικές όπως η GC-MS ή ανοσοχημικές μέθοδοι, μπορούν πλέον και ανιχνεύονται με μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητα, χωρίς επιπλέον τη μεσολάβηση σταδίου παραγωγοποίησης (π.χ. τα ασταθή προϊόντα παραγωγοποίησης των γλυκοκορτικοστεροειδών). Ειδικότερα με τη χρήση του αναλυτή TOF, η ταχεία ταυτόχρονη σάρωση εκατοντάδων ουσιών με αξιοπιστία και ακρίβεια για ένα τεράστιο εύρος μαζών βοηθά σημαντικά τις αναλύσεις σε επίπεδο ρουτίνας. Η δυνατότητα εφαρμογής MS/MS και η καλή διαχωριστική ικανότητα του Q-TOF επιτρέπει την ταυτοποίηση ουσιών σε δείγματα πολύπλοκης μήτρας, όπως τα ούρα. Η τεχνική QTOFMS μπορεί να συνδυαστεί, τόσο με θετικό, όσο και με αρνητικό ιοντισμό αυξάνοντας έτσι το πεδίο των ουσιών που ανιχνεύονται. Παράδειγμα αποτελεί η ανίχνευση θεικών εστέρων των ουσιών.

Σε ότι αφορά στην ανάλυση βιολογικών δειγμάτων, η τεχνική LC-QTOFMS(MS) επιτρέπει τον προσδιορισμό της δομής, ακόμη και αγνώστων ουσιών, χωρίς τη χρήση προτύπων διαλυμάτων, με συνδυασμό των πληροφοριών που δίνει για τα ακριβή μοριακά βάρη των ανιχνευόμενων ουσιών με βιβλιογραφικά δεδομένα μεταβολισμού. Η δυνατότητα αποκάλυψης αγνώστων συνθετικών ουσιών σε χρονικό διάστημα πολύ μεταγενέστερο του αρχικού χρόνου ανάλυσης των βιολογικών δειγμάτων, με απλό επανέλεγχο των ήδη αποθηκευμένων αναλυτικών δεδομένων, αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα της τεχνολογίας TOF.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ – ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ – ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

3.1 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

3.1.1 Εργαστηριακές συσκευές

- Αυτόματες πιπέττες τύπου Finipipette – Thermo Lab systems μεταβλητού όγκου 2-20 μl, 20-200 μl, 200-1000 μl, 1-5 ml.
- Αυτόματες πιπέττες τύπου Eppendorf μεταβλητού όγκου 2-20 μl, 20-200 μl, 200-1000 μl, 1-5 ml.
- Αυτόματη επαναληπτική πιπέττα τύπου Finipipette – Thermo Lab systems μεταβλητού όγκου 10-5000 μl.
- Αυτόματος αναδευτήρας περιδίνησης τύπου Vortex, για την ανάδευση διαλυμάτων και δειγμάτων.
- Διακριβωμένος αναλυτικός ζυγός τύπου AND, GR-200, τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων, μέγιστου φορτίου ζύγισης 210 g.
- Εργαστηριακές μεταλλικές σπάτουλες τύπου Roth.
- Εργαστηριακά θερμόμετρα.
- Κάθετοι και οριζόντιοι ανακινήτες για την ανακίνηση των δειγμάτων πριν τη φυγοκέντρωση.
- Κλίβανος τύπου Shimaden SR30 με εύρος λειτουργίας 0-400 °C για την ενζυμική υδρόλυση των δειγμάτων.
- Μεταλλόλουτρα (hot block) τύπου Techne Drib-lock DB3 για την εξάτμιση της οργανικής στοιβάδας, αποτελούμενα από θερμαντική πλάκα κατάλληλων οπών για την υποδοχή εσμυρισμένων κωνικών σωλήνων και με δυνατότητα παρακολούθησης της καθορισμένης και πραγματικής τιμής της θερμοκρασίας.
- Συσκευή εξάτμισης αποτελούμενη από σύστημα διανεμητή αερίου αζώτου (N₂), 27 θέσεων και μεταλλόλουτρο.
- Συσκευή παραγωγής νερού υψηλής καθαρότητας τύπου Milli-Q Academic (MS2), Millipore.
- Φαρμακευτικός ζυγός τύπου CASBEE, MW 1200, αναγνωσιμότητας 0,1 g, για την ισοβάρυνση των δοκιμαστικών σωλήνων πριν τη φυγοκέντρωση.
- Φυγόκεντρος τύπου Z510 BHG, HERMLE, 30 θέσεων με μέγιστη επιτρεπόμενη διαφορά βάρους των αντιδιαμετρικών ομάδων 0,5 g.
- Χρονόμετρα
- Ψαλίδι ανοίγματος και κλεισίματος φιαλιδίων αυτόματου εισαγωγέα.

3.1.2 Υάλινα σκεύη και αναλώσιμα

- Διακριβωμένες ογκομετρικές φιάλες όγκου 1, 2, 5, 10, 20, 50 και 100 ml.
- Ογκομετρικές φιάλες όγκου 1, 2, 5, 10, 20, 25, 50 ml.
- Πλαστικά πώματα ογκομετρικών φιαλών.
- Ογκομετρικοί κύλινδροι 10, 50, 100, 500 και 1000 ml.

- Υάλινοι εσφυρισμένοι κωνικοί δοκιμαστικοί σωλήνες όγκου 10 ml.
- Υάλινα εσφυρισμένα πώματα.
- Υάλινοι ψηλοί βιδωτοί δοκιμαστικοί σωλήνες, όγκου 15 ml.
- Υάλινα διαφανή φιαλίδια (vials) αυτόματου εισαγωγέα χωρητικότητας 2 ml.
- Μικροφιαλίδια (micro-insert), διαφανή με κωνικό πυθμένα, χωρητικότητας 200 μl.
- Καπάκια υάλινων διάφανων φιαλιδίων πάχους 1mm.
- Πλαστικά ρύγχη (tips) αυτόματων πιπετών και επαναληπτικής πιπέτας.
- Υάλινες πιπέτες Pasteur 230 mm.
- Ύφασμα για τον καθαρισμό του θαλάμου ψεκασμού.

3.2 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας HPLC grade ή analytical ή υψηλότερου βαθμού:

- Ακετονιτρίλιο, (ACN), βαθμού καθαρότητας LC/MS (Scharlau, Scharlab, Spain).
- Νερό (H₂O), δισαπασταγμένο και περαιτέρω καθαρισμένο με συσκευή Millipore, βαθμού καθαρότητας HPLC.
- Διάλυμα ισοπροπανόλης – νερού αναλογίας 50/50 (v/v) για τον καθαρισμό του θαλάμου ψεκασμού.
- Μεθανόλη, CH₃OH, καθαρότητας 99,8% (Merck, Darmstadt, Germany).
- Φορμικό οξύ (HCOOH), καθαρότητας 98,0%(Riedel-de Haen).
- Φορμικό αμμώνιο (HCOONH₄), καθαρότητας 97,0% (Sigma-Aldrich).
- Διάλυμα βαθμονόμησης και ρύθμισης φασματομέτρου TOF-MS (ESI-Low Concentration Tuning Mix, P/NG1969-85000, Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA). Πρόκειται για μίγμα 13 ουσιών (βεταΐνη, αμμωνιακό άλας τριφθοροξικού οξέος, εξαμεθοξυ-φωσφαζίνη και πολυφθοριωμένα παράγωγα φωσφαζίνης και τριαζίνης) διαλυμένες σε μίγμα ακετονιτρίλιου/νερού 95/5 (v/v).
- Πακέτο παρασκευής διαλύματος διόρθωσης και βαθμονόμησης φασματομέτρου TOF (API-TOF Reference Mass Solution Kit, P/NG1969085001, Agilent Technologies) που αποτελείται από δύο αμπούλες (2,2 ml) διαλύματος εξάκις-(1H,1H,3H-τετραφλουοροπροποξυ)-φωσφαζίνης (HP-0921) 2,5 mM σε ακετονιτρίλιο.
- Διαλύτης ανασύστασης LC/TOF-MS με απλή ανάμιξη διαλυτών κινητής φάσης με αναλογία A/B 80/20 (v/v).

3.3 ΔΙΑΛΥΤΕΣ ΚΙΝΗΤΗΣ ΦΑΣΗΣ LC-QTOF

Η κινητή φάση περιλαμβάνει το διαλύτη A και το διαλύτη B. Η παρασκευή τους έχει ως ακολούθως:

- **Διαλύτης A:** Υδατικό διάλυμα φορμικού αμμωνίου (HCOONH₄) 5 mM και φορμικού οξέος (HCOOH) 0,01% (v/v). Ζυγίζονται 0,315 g φορμικού αμμωνίου και μεταφέρονται σε υάλινη φιάλη 1 L με βιδωτό πώμα. Ακολουθεί διάλυση με 1L δισαπασταγμένο νερό και προσθήκη 100 μl φορμικού οξέος. Η φιάλη πωματίζεται και αναδεύεται καλά.
- **Διαλύτης B:** Διάλυμα φορμικού αμμωνίου (HCOONH₄) 5 mM και φορμικού οξέος (HCOOH) 0,01% (v/v) σε μίγμα ακετονιτρίλιου/νερού 90/10 (v/v): Ζυγίζονται 0.315 g

φορμικού αμμωνίου και μεταφέρονται σε υάλινη φιάλη 1L με βιδωτό πώμα και διαλύονται προσεκτικά με 100 ml δισαπνεσταγμένο νερό. Ακολουθεί προσθήκη 100 μl φορμικού οξέος και 900 ml ακετονιτριλίου LC-MS, πωματισμός της φιάλης και καλή ανάδευση του μίγματος.

- **Διαλύτης Έκπλυσης:** Διάλυμα ακετονιτριλίου-νερού με αναλογία ACN/H₂O 80/20 (v/v) για την έκπλυση του συστήματος εισαγωγής δείγματος του υγροχρωματογράφου.

3.4 ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΑΝΑΣΥΣΤΑΣΗΣ (ΔΑ)

Για την ανασύσταση των αναλυόμενων δειγμάτων παρασκευάστηκε διαλύτης (ΔΑ) ως εξής: Λήψη 800 ml Διαλύτη Α κινητής φάσης LC-QTOF με ογκομετρικό κύλινδρο 1 L και απόχυσή τους σε υάλινη φιάλη. Λήψη 200 ml Διαλύτη Β κινητής φάσης LC-QTOF με ογκομετρικό κύλινδρο 1 L και απόχυσή τους στην ίδια υάλινη φιάλη. Προκύπτει ο διαλύτης ανασύστασης H₂O/ACN σε αναλογία 80/20 (v/v).

3.5 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΠΑΡΑΚΑΤΑΘΗΚΗΣ

Πρόκειται για διαλύματα παρακαταθήκης του εργαστηρίου για τις υπό προσδιορισμό ουσίες, παρασκευασμένα, είτε με ζύγιση κατάλληλης ποσότητας στερεού και διάλυση, είτε με διάλυση προζυγισμένης ποσότητας ουσίας σε αμπούλα, είτε με κατάλληλη αραιώση υλικού αναφοράς σε μορφή διαλύματος χρησιμοποιώντας τον κατάλληλο διαλύτη (συνήθως μεθανόλη ή νερό), είτε με κονιοποίηση υλικών αναφοράς σε μορφή δισκίου, ζύγιση, διάλυση σε κατάλληλο διαλύτη υποβοηθούμενη από λουτρό υπερήχων και διέλευση του διαλύματος από φίλτρα. Όλα τα διαλύματα παρακαταθήκης των αναλυτών φυλάσσονται σε σκουρόχρωμα φιαλίδια και σε καταψύκτες στους -20°C.

3.6 ΠΟΛΥΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Στο εργαστήριο υπάρχουν 7 πολυσυστατικά διαλύματα απαγορευμένων ουσιών, τα οποία φυλάσσονται σε ογκομετρικές φιάλες σε θερμοκρασία -8-0°C. Για τις ανάγκες της παρούσας ερευνητικής εργασίας αναλύθηκαν 3 πολυσυστατικά διαλύματα ουσιών (CALH1-CALH3) καθώς επίσης για τα πειράματα επικύρωσης, παρασκευάστηκε πολυσυστατικό διάλυμα. Τα πολυσυστατικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στους Πίνακες 3.1-3.3.

3.6.1 Πολυσυστατικό διάλυμα ελέγχου calb1

Ως calb1 ορίζεται το πολυσυστατικό διάλυμα το οποίο παρασκευάστηκε για τα πειράματα επικύρωσης και του οποίου η σύσταση παρουσιάζεται στον πίνακα 3.8.

Για την παρασκευή του αραιωμένου διαλύματος ελέγχου επικύρωσης calb1, μεταφέρθηκαν κατάλληλοι όγκοι προτύπων διαλυμάτων παρακαταθήκης και έγινε αραιώση με μεθανόλη σε διακριβωμένες ογκομετρικές φιάλες. Μετά τις απαραίτητες αραιώσεις, μεταφέρθηκαν κατάλληλοι όγκοι του κάθε διαλύματος σε μια ογκομετρική των 5 ml και έγινε αραιώση μέχρι τη χαραγή με μεθανόλη αναλυτικού βαθμού καθαρότητας,

έτσι ώστε να έχουμε τελική συγκέντρωση ίση με το MRPL, 0,1 µg/mL (ppm). Το πολυσυστατικό διάλυμα μετά την παρασκευή του μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη και φυλάχθηκε σε θερμοκρασία 0-4° C. Δόθηκε προσοχή στο να παρασκευασθεί το πολυσυστατικό διάλυμα με τέτοιο τρόπο έτσι, ώστε να μην περιέχονται στο διάλυμα ουσίες που παρέχουν ίδια χαρακτηριστικά ιόντα σε κοντινούς χρόνους ανάλυσης.

3.6.2 Πολυσυστατικά διαλύματα εργασίας

Στην επικύρωση των μεθόδων επιβεβαίωσης των διεγερτικών και ναρκωτικών ουσιών περιλαμβάνεται και η αξιολόγηση της ειδικότητας (specificity) της μεθόδου να ανιχνεύει μόνο τις επιλεγμένες απαγορευμένες ουσίες. Τούτο αποδεικνύεται με τη διάκριση μεταξύ ουσιών παρόμοιας δομής ή άλλων απαγορευμένων ουσιών. Στα πλαίσια λοιπόν αυτά ελήφθη κατάλληλος όγκος από μια σειρά πρότυπων μεθανολικών πολυσυστατικών διαλυμάτων ελέγχου του εργαστηρίου με κωδικούς CALH4-CALH7 (πίνακες 3.4-3.7), τα οποία περιέχουν μια σειρά από απαγορευμένες διεγερτικές και ναρκωτικές ουσίες, χωρίς ωστόσο να περιέχουν τις υπό έλεγχο ουσίες του calb1.

Το πολυσυστατικό διάλυμα επικύρωσης παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.8.

Πίνακας 3.1: Πολυσυστατικό Διάλυμα CALH1

α/α	Ουσία	Θέση	C(vial), ppm
1	4-DIMETHYLAMINOANTIPYRINE	018J06	5280
2	7- AMINO-FLUNITRAZEPAM	013H08	1740
3	ALPRAZOLAM	034 J01	1980
4	AMBROXOL HCl	018J03	4500
5	AMINEPTINE	013I08	17052
6	AMPYRONE	018H05	6540
7	APOMORPHINE HCl. HEMIHYDRATE	018I01	3820
8	AZAPERONE	018I09	1100
9	BENZBROMARONE	013F09	4478
10	BROMAZEPAM	018H04	2700
11	BROMHEXINE HCl	018G07	2300
12	BUSPIRONE HCl	013D08	2240
13	CHLORPHENIRAMINE MALEATE SALT	020B10	2767
14	CHLORPHENTERMINE HCl	020B03	2070
15	CHLORPROPAMIDE	020A04	2233
16	CLOBAZAM	020E01	3135
17	BEMEGRIDE	018I10	2780
18	BAMETHANE SULFATE SALT	018J09	2540
19	DIMEFLINE	020E10	2695
20	CARISOPRODOL	042E09	2040
21	PIROXICAM	042F01	2080
22	GLIMEPIRIDE	042F04	2040
23	OXAPROZIN	042F07	1000
24	ACETOHEXAMIDE	042G07	2040

Πίνακας 3.2: Πολυσυστατικό Διάλυμα CALH2

α/α	Ουσία	Θέση	C(vial), ppm
1	1,7 - DIMETHYLXANTHINE	037E02	1978
2	CHLORDIAZEPOXIDE HCl	037E04	2033
3	CLONIDINE HCl	037E07	1966
4	CLORANOLOL HCl	037F01	2240
5	CYCLOBENZAPRINE HCl	037F04	1836
6	CYPROTERONE ACETATE	037F07	2520
7	DANTROLENE SODIUM SALT	037D10	1552
8	DIMETINDENE MALEATE	020D09	1324
9	DIPHENHYDRAMINE HCl	037G04	2149
10	DIPHENOXYLATE HCl	037G07	1567
11	DIPROPHYLLINE	037H01	2091
12	DOBUTAMINE	037H04	2000
13	DOXAPRAM HCl	037H07	2153
14	DOXEPIN HCl	037I01	2017
15	DOXYLAMINE SUCCINATE SALT	037I04	2380
16	DROFENINE HCl	037I07	1977
17	ETHOEPTAZINE CITRATE	037H10	2513
18	ETODOLAC	037J01	1100
19	FENSPIRIDE HCl	037J04	1945
20	FLUNITRAZEPAM	037J07	2240

Πίνακας 3.3: Πολυσυστατικό Διάλυμα CALH3

α/α	Ουσία	Θέση	C(vial), ppm
1	FLUOXETINE HCl	021A03	1560
2	FLUPHENAZINE 2HCl	021D08	2100
3	GLAFENINE	021E03	2360
4	GUANABENZ ACETATE	022B10	1857
5	HALOPERIDOL	021D06	3880
6	HYDROXYZINE 2HCl	021D03	1800
7	HYOSCINE HCl	021B06	1920
8	ISOETHARINE MESYLATE	021C09	1660
9	ISOPROTERENOL HCl	021C06	2720
10	ISOPYRIN HCl	021C03	4400
11	LEVALLORPHAN	022C10	1503
12	LOBELINE HCl	021B09	2420
13	MAZINDOL	023H09-1	658
14	MEBEVERINE HCl	018G01	2434
15	MEPHENESIN	020I09	2220
16	METARAMINOL (+) BITARTRATE SALT	021I07	2150
17	METHAPYRILENE HCl	021H01	7354
18	METHOTREXATE HYDRATE	018G10	2578
19	METHOTRIMEPRAZINE MALEATE SALT	020H01	3518

Πίνακας 3.4: Πολυσυστατικό Διάλυμα CALH4

α/α	Ουσία	Θέση	C(vial), ppm
1	METHOXAMINE HCl	020G02	2097
2	MIDODRINE HCl	022A07	2239
3	MORAZON	022D04	2500
4	NAFRONYL OXALATE SALT	021H07	2592
5	NAPHAZOLINE HCl	021F07	2420
6	NICARDIPINE HCl	021G04	3178
7	NICOTINE	022D01	2240
8	NIFENAZONE	019C01	1780
9	ORPHENADRINE HCl	021G07	1867
10	OXYMETAZOLINE HCl	020H04	2473
11	PENTOXIFYLLINE	021F04	4540
12	PHENYTOIN SODIUM SALT	021G01	4102
13	PHOLCODINE	023I02	2410
14	PICROTOXIN	013I01	2060
15	PIRACETAM	023A10	2200
16	PRILOCAINE HCl	013C02	1939
17	PROCAINAMIDE HCl	022F08	2026
18	PROCAINE HCl	013A05-2	1923
19	PROMETHAZINE HCl	022G04	2003

Πίνακας 3.5: Πολυσυστατικό Διάλυμα CALH5

α/α	Ουσία	Θέση	C(vial), ppm
1	PROPOFOL	023B03	2000
2	PROPOXYCAINE	022I01	2140
3	PYRILAMINE MALEATE	022J05	1975
4	PYROVALERONE HCl	023B06	2973
5	RANITIDINE HCl	018G05	1989
6	SULPHAMETHOXAZOLE	016H01	2000
7	TEMAZEPAM	022I03	1880
8	THIORIDAZINE HCl	022D10	1930
9	TRIFLUOPERAZINE 2HCl	023A04	2680
10	TRIMEPRAZINE . 1/2 TARTRATE	022I09	2045
11	TRIMETHOPRIM	022F02	2040
12	TRIPLENNAMINE CITRATE	022H07	2009
13	COTININE	022C07	3526
14	DESIPRAMINE HCl	023D01	2076
15	CLOMIPRAMINE HCl	023C08	2522
16	MEDAZEPAM	023I05	2100
17	VERAPAMIL HCl	043B09	2037
18	TENOXICAM	042G04	2070
19	ISOXICAM	042G01	2040
20	SULINDAC	042H01	2020
21	FLUOCINOLONE ACETONIDE	042H04	2060
22	FLUOROMETHOLONE	042H07	2068
23	LORNOXICAM	042G10	2014
24	IRBESARTAN	042I01	2301

Πίνακας 3.6: Πολυσυστατικό Διάλυμα CALH6

α/α	Ουσία	Θέση	C(vial), ppm
1	NITRAZEPAM	023G10	2940
2	LORAZEPAM	023G07	2360
3	ERGONOVINE MALEATE		590
4	METANEPHRINE HCl	040F07	1888
5	DEXTROMETHORPHAN.HBr.H ₂ O	018B07	1840
6	DIPYRONE	023F02	4060
7	NOREPINEPHRINE HCl	023E03	2089
8	PHACETOPERAN HCl	040G07	1985
9	MEPROBAMATE	023J04	2020
10	ACETOPROMAZINE MALEATE (ACEPROMAZINE MALEATE)	018A02	1549
11	ATROPINE SULFATE	018A08	1864
12	BENZOCAINE	018D01	2740
13	BUPIVACAINE. HCl	016I08	2440
14	DIAZEPAM	018E07	2120
15	ETHYLMORPHINE	018E03	2180
16	IMIPRAMINE.HCl	018A03	3200
17	ISOXSUPRINE. HCl	016I05	2600
18	KETAMINE. HCl	018C05	2120
19	GUAIFENESIN	018F07	2640
20	ETHOSUXIMIDE	043D01	2140
21	CAPSAICIN	029F01	2140

Πίνακας 3.7: Πολυσυστατικό Διάλυμα CALH7

α/α	Ουσία	VIAL	C(vial), ppm
1	YOHIMBINE HCl	022F05	2049
2	NALBUPHINE.HCl.. 2H ₂ O	018C02	1840
3	NEFOPAM. HCl	018D07	2420
4	NORTRIPTYLINE HCl	041I07	1915
5	NYLIDRIN HCl	018B01	2014
6	PHENOTHIAZINE	018C08	3140
7	PROMAZINE HCl	018D10	3040
8	PROPIONYL PROMAZINE HCl	013B03-1	2006
9	PROPOXYPHENE	010G05	37500
10	TETRACAINE. HCl	016H08	3840
11	THEOPHYLLINE. H ₂ O	010G10	3420
12	XYLAZINE	013B06	2100
13	ALLANTOIN	028G05	2500
14	AMITRIPTYLINE HCl	013A09	2050
15	CHLORPROMAZINE HCl	033B01	2860
16	LIDOCAINE. HCl	033B07	1832
17	MEPIVACAINE.HCl	033D02	2269
18	METHOCARBAMOL	033D05	2360
19	NORDIAZEPAM	033B10	4000
20	OXAZEPAM	033C09	4000
21	ANTIPYRINE	033E01	2440
22	HYDROCODONE BITARTATE SALT	018D04	1480
23	ROMIFIDINE	025C08	1752
24	RACTOPAMINE	029E02	2926

Πίνακας 3.8: Πολυσυστατικό διάλυμα επικύρωσης calb1

α/α	ΟΥΣΙΑ
1	ISOETHARINE
2	BAMETHAN SULFATE SALT
3	4-DIMETHYLAMINOANTIPYRINE
4	GLAFENINE ART
5	AZAPERONE
6	LOBELINE
7	FLUOXETINE
8	BROMHEXINE HCl
9	DIPHENOXYLATE
10	CYPROTERONE ACETATE

3.7 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ (ISTD)

Η παρουσία εσωτερικού προτύπου (ISTD) καθίσταται αναγκαία κατά την ανάλυση ουσιών σε βιολογικά δείγματα, προκειμένου να αντισταθμιστούν απώλειες κατά το στάδιο της προκατεργασίας, για να αποκλειστούν σφάλματα κατά τον ιοντισμό και την αναλυτική μέτρηση και γενικά για να εξασφαλιστεί η κατά το δυνατό πιο αξιόπιστη ποσοτικοποίηση των προσδιοριζόμενων ουσιών. Το εσωτερικό πρότυπο προστίθεται σε γνωστή συγκέντρωση, τόσο στα προς ανάλυση δείγματα, όσο και στα πρότυπα δείγματα βαθμονόμησης και δείγματα ελέγχου. Η επιλογή ενός ισοτοπικά επισημασμένου αναλόγου του αναλύτη ως εσωτερικό πρότυπο, αποτελεί επιλογή πρώτης εκλογής σε βιοαναλυτικές μεθόδους ποσοτικού προσδιορισμού με την τεχνική LC/MS επειδή μπορούν να διορθώσουν διακυμάνσεις στην απόκριση του αναλύτη που σχετίζονται με τη μέθοδο προκατεργασίας των δειγμάτων, ενώ ταυτόχρονα οι ουσίες αυτές επηρεάζονται σε διακυμάνσεις του συστήματος ανίχνευσης και της απόδοσης ιοντισμού σε ισοδύναμο βαθμό με τον αναλύτη, καθώς παρουσιάζουν πανομοιότυπες με αυτόν φυσικοχημικές ιδιότητες. Καθώς αναμένεται οι ουσίες αυτές να συνεκλούνται με τον αναλύτη, θα πρέπει να διαφέρουν κατά τουλάχιστον τρεις μονάδες μάζας, διαφορετικά οι ισοτοπικές κορυφές του αναλύτη θα επηρεάσουν το σήμα του εσωτερικού προτύπου. Ως εσωτερικό πρότυπο στην επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η ουσία μεθυλοτεστοστερόνη (methyltestosterone). Η μεθυλοτεστοστερόνη αποτελεί ήδη χρησιμοποιούμενο πρότυπο στις εφαρμοζόμενες διαδικασίες σάρωσης για την ανίχνευση των απαγορευμένων ουσιών σε ούρα αλόγων.

3.8 ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων επικύρωσης χρησιμοποιήθηκαν ούρα αλόγων, τα οποία ήταν αρνητικά ως προς το σύνολο των ουσιών που εξετάστηκαν.

3.9 ΑΝΑΛΥΤΙΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ^[39]

Η ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με υγροχρωματογραφικό σύστημα υπερυψηλής απόδοσης (UHPLC) της εταιρίας Agilent Technologies (1200 LC) σε συνδυασμό με το φασματοόμετρο μαζών 6520 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

Το χρωματογραφικό σύστημα αποτελείτο από σύστημα απαέρωσης διαλυτών (vacuum degasser), δυαδική αντλία υψηλής πίεσης (binary pump), αυτόματο δειγματολήπτη (auto sampler) με ψυχόμενη πλάκα τοποθέτησης των δειγμάτων (tray) και θερμοστάτη της χρωματογραφικής στήλης.

Το φασματοόμετρο μαζών που αναφέρθηκε ήταν φασματοόμετρο ορθογώνιας επιτάχυνσης συζευγμένο με τετράπολο αναλυτή (quadrupole) και αναλυτή χρόνου πτήσης ιόντων (Time Of Flight). Ως πηγή ιοντισμού χρησιμοποιήθηκε πηγή ηλεκτροψεκασμού (Electrospray Ionization, ESI) θετικής πολικότητας, ενώ το αέριο νεφελοποίησης (nebulizer gas) και ξήρανσης (drying gas) ήταν το αέριο άζωτο N₂, καθαρότητας 99,9%. Για την καταγραφή των φασμάτων χρησιμοποιήθηκε αναλογικός ψηφιοποιητής τύπου ADC (Analogue-to-digital converter) λειτουργίας στα 2 GHz. Ο διαχωρισμός των ενώσεων επιτυγχανόταν με στήλη αντιστρόφου φάσεως με μεταβαλλόμενη σύσταση των διαλυτών κατά τη διάρκεια του χρόνου ανάλυσης (βαθμιδωτή έκλυση).

Η λήψη, επεξεργασία και καταγραφή των χρωματογραφημάτων έγινε με τη βοήθεια τριών επιμέρους λογισμικών Mass Hunter Workstation της εταιρίας Agilent Technologies: Mass Hunter Data Acquisition for TOF/QTOF, Mass Hunter Qualitative Analysis, Mass Hunter Quantitative Analysis.

Οι παράμετροι της χρωματογραφικής ανάλυσης, της λειτουργίας του φασματομέτρου παρουσιάζονται στους ακόλουθους Πίνακες 3.9, και 3.10, αντίστοιχα.

Πίνακας 3.9: Παράμετροι Χρωματογραφικής ανάλυσης

Ενέσιμος όγκος δείγματος	5 µL
Θερμοκρασία στήλης	35°C (+/- 0,8)
Ροή κινητής φάσης	0,3 mL/min
Χρόνος ανάλυσης	13,5 min
Χρόνος εξισορρόπησης	3,5 min
Διαλύτης A (t = 0 min)	90%
Διαλύτης B (t = 0 min)	10%
Όρια πίεσης	0-550 bar

Πίνακας 3.10: Παράμετροι λειτουργίας φασματομέτρου μαζών

Πολικότητα ESI (+)	Skimmer: 65 V
Gas Temperature: 330°C	Fragmentor: 140 V
Drying Gas: 10 l/min	CID: 25eV
Nebulizer: 40 psi	Oct1 RF: 750 Vpp
Capillary: 3500 V	Scan range: 87-1100 m/z
Cycle: 1 scan/sec	

3.10 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΟΡΓΑΝΟΥ^[47]

Βαθμονόμηση (calibration)

Είναι η διαδικασία κατά την οποία γίνεται βαθμονόμηση του συστήματος ως προς τις τιμές m/z γνωστών προτύπων ουσιών που εισάγονται στο φασματομέτρο μαζών πριν την ανάλυση ενός δείγματος ή μιας σειράς δειγμάτων. Η βαθμονόμηση του συστήματος ως προς τις τιμές m/z (με ακρίβεια μέτρησης 4 δεκαδικών ψηφίων) πραγματοποιείται καθημερινά πριν την ανάλυση των δειγμάτων με βάση τις τιμές m/z γνωστών προτύπων ουσιών, σύμφωνα με τις προδιαγραφές και τις υποδείξεις του κατασκευαστή του οργάνου (Agilent Technologies). Για το σκοπό αυτό εισάγεται με απευθείας έγχυση στην πηγή ιοντισμού του φασματομέτρου μάζας διάλυμα βαθμονόμησης (calibrant mix) μίγματος 13 ουσιών (ESI-Low concentration tuning mix, Agilent Technologies) που στην περίπτωση θετικού ιοντισμού σχηματίζουν 10 πρωτονιωμένα ιόντα με τιμές m/z που κυμαίνονται από 118,0863 έως 2721,8950. Η βαθμονόμηση του άξονα των τιμών m/z πραγματοποιείται αυτόματα από το λογισμικό του οργάνου με τη βοήθεια πολυωνυμικής εξίσωσης και υπολογίζονται οι ακριβείς τιμές m/z για τα ιόντα αναφοράς, καθώς και τα σφάλματα αυτών. Κριτήριο αποδοχής της βαθμονόμησης είναι εμφάνιση τυχαία κατανεμημένων θετικών και αρνητικών σφαλμάτων για τα 10 ιόντα, ενώ η απόλυτη τιμή του σφάλματος δε θα πρέπει σε καμία περίπτωση να υπερβαίνει το 0,5.

Βελτιστοποίηση των παραμέτρων της μάζας (Tuning)

Με τον όρο 'tuning' εννοείται η αυτοματοποιημένη διαδικασία κατά την οποία όλες οι παράμετροι του φασματομέτρου μαζών ρυθμίζονται έτσι, ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη δυνατή απόκριση διατηρώντας ταυτόχρονα ικανοποιητική διαχωριστικότητα και το αντίστροφο. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται για την περίπτωση του αναλυτή χρόνου πτήσης μία έως δύο φορές μηνιαίως και ανά εξάμηνο για το τετράπολο, αλλά και κατόπιν συντήρησης του συστήματος ή διορθωτικών επεμβάσεων σε αυτό, οπότε και ανάλογα με την περίπτωση διαφοροποιείται για τον αναλυτή TOF ο αριθμός των προς βελτιστοποίηση παραμέτρων, καθώς και το εύρος των εξεταζόμενων τιμών κάθε παραμέτρου (διαδικασίες quick tune, standard tune και initial tune). Κριτήρια αποδοχής της διαδικασίας είναι η εμφάνιση σφαλμάτων μάζας μικρότερων από 2 ppm σε όλα τα ιόντα αναφοράς, η λήψη ικανοποιητικής μορφής κορυφών για τα ιόντα με τιμές m/z 118,0862, 1521,9714 και 2721,8948 και των ισοτοπικών κορυφών αυτών, η επίτευξη ικανοποιητικού διαχωρισμού της κορυφής που αντιστοιχεί στο ιόν με τιμή m/z 2721,8948 από τις κορυφές των ισοτοπικών ιόντων και η επίτευξη διαχωριστικής ικανότητας του οργάνου σε συνθήκες λειτουργίας 4 GHz μεγαλύτερης από 10000 και 18000 για τα ιόντα με τιμές m/z 118,0863 και 1521,9715, αντίστοιχα.

Διαδικασία Διόρθωσης Μάζας Αναφοράς

Για την επίτευξη υψηλής ακρίβειας μετρήσεων τιμών m/z εκτός από τη βαθμονόμηση του συστήματος TOF που προηγείται πριν την ανάλυση των δειγμάτων υπάρχει η δυνατότητα της συνεχούς διόρθωσης της καμπύλης βαθμονόμησης καθ' όλη τη

διάρκεια της ανάλυσης (reference mass correction). Αυτό πραγματοποιείται με συνεχή εισαγωγή στο φασματομέτρο μάζας διαλύματος αναφοράς (reference mix) που περιέχει εξάκις-(1H,1H,3H-τετραφλουοροπροποξυ)-φωσφαζίνη. Η διοχέτευση του διαλύματος διόρθωσης γίνεται αυτόματα από το σύστημα και ενεργοποιείται από το χειριστή του οργάνου λίγα λεπτά πριν την έναρξη της ανάλυσης.

Λοιπές διαδικασίες ημερήσιας και περιοδικής συντήρησης

Καθημερινά και πριν την έναρξη της ανάλυσης ελέγχονται οι φιάλες των διαλυτών της κινητής φάσης έτσι, ώστε να περιέχουν ικανή ποσότητα για τα προς ανάλυση δείγματα. Σε διαφορετική περίπτωση γίνεται αντικατάστασή τους με νέους διαλύτες και ενημερώνεται το λογισμικό του οργάνου για την πραγματική ποσότητα διαλύτη (solvent levels). Ελέγχονται τα επίπεδα των 'calibrant mix' και 'reference mix'. Γίνεται βαθμονόμηση και έκλυση της στήλης και της διαδρομής του δείγματος.

Η διαδικασία πραγματοποιείται καθημερινά. Συγκεκριμένα η στήλη και η διαδρομή του δείγματος ξεπλένονται με μίγμα ACN/H₂O (90:10) για 30 min με ροή 0,3 ml/min. Σε περίπτωση τροφοδότησης του συστήματος με νέους διαλύτες κινητής φάσης, οι διαδρομές ξεπλένονται εναλλάξ και με τους δύο διαλύτες (100% A, 100% B) με ροή σταδιακά αυξανόμενη από 0 έως 5 ml/min και στη συνέχεια σταδιακά μειούμενη από 5 έως 0 ml/min.

Στη συνέχεια πραγματοποιείται φόρτωση της μεθόδου λήψης δεδομένων και ελέγχεται η πίεση του χρωματογραφικού συστήματος (θα πρέπει να είναι μικρότερη από 400 bar) η οποία καταγράφεται. Στη συνέχεια ελέγχεται η ένταση του εσωτερικού προτύπου του πρώτου προς ανάλυση δείγματος η οποία θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 104 counts.

Η θερμοκρασία του χώρου όπου βρίσκεται εγκατεστημένο το αναλυτικό όργανο δε θα πρέπει να υπερβαίνει τους 22° C.

Περιοδικά – ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων που αναλύονται – θα πρέπει να γίνεται καθαρισμός του θαλάμου spray (spray chamber), έλεγχος του επιπέδου λαδιών της αντλίας και άδειασμα αυτών, καθαρισμός του τριχοειδούς και αλλαγή της στήλης και του φίλτρου που βρίσκεται πίσω από αυτήν. Σημαντικό τέλος είναι να ελέγχεται η τυχόν ύπαρξη διαρροής στο υδροχρωματογραφικό σύστημα.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στο Εργαστήριο Ελέγχου Ντόпинγκ του Ο.Α.Κ.Α. εφαρμόζονται μέθοδοι σάρωσης (screening procedures) και επιβεβαιωτικές διαδικασίες (confirmation procedures). Μετά το πρώτο στάδιο του ελέγχου των δειγμάτων ούρων για την πιθανή ύπαρξη κάποιας απαγορευμένης ουσίας, δηλαδή τις αναλύσεις σάρωσης (screening analysis), το ύποπτο δείγμα υπόκειται σε διαδικασίες επιβεβαίωσης.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανάπτυξη και επικύρωση επιβεβαιωτικών μεθόδων προσδιορισμού απαγορευμένων ουσιών με την τεχνική Υγροχρωματογραφία – Φασματομετρία Μαζών με αναλυτή χρόνου πτήσης (LC-QTOF/MS). Πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη μεθόδων επιβεβαίωσης για 90 απαγορευμένες ουσίες, με συνέπεια την εξοικονόμηση χρόνου στην ανάλυση πληθώρας δειγμάτων και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. Σύμφωνα με τις προδιαγραφές του AORC (Association of Official Racing Chemists), απαιτούνται τουλάχιστον 3 μεταπτώσεις για την επιβεβαίωση (confirmation) κάθε απαγορευμένης ουσίας.

Η καταλληλότητα και η εφαρμογή των μεθόδων επιβεβαίωσης, αξιολογήθηκε μέσα από εκτενή πειράματα επικύρωσης μίας ομάδας ουσιών, αντιπροσωπευτικής του συνόλου των ουσιών που μελετήθηκαν, τα οποία διενεργήθηκαν βάσει των προδιαγραφών του τρέχοντος Διεθνούς Προτύπου (International Standard for Laboratories, ISL).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΠΑΓΟΡΕΥΜΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΜΕ LC-QTOF

4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στο παρόν κεφάλαιο παρουσιάζεται η μελέτη που έγινε ως προς διάφορες παραμέτρους με σκοπό την επίτευξη των βέλτιστων συνθηκών για τον προσδιορισμό μιας μεγάλης σειράς απαγορευμένων ουσιών με υγροχρωματογραφία και αναλυτή χρόνου πτήσης ιόντων (LC-QTOF). Οι παράμετροι που εξετάστηκαν αφορούν στο αναλυτικό τμήμα της μεθόδου.

Τα αποτελέσματα συγκρίνονται με τα αποτελέσματα της ανάλυσης προτύπου δείγματος εμβολιασμένου με την ουσία που ελέγχεται αν πληρούνται τα κριτήρια που έχει θέσει ο AORC για την ταυτοποίηση απαγορευμένων ουσιών.

4.2 ΕΥΡΕΣΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΩΝ ΙΟΝΤΩΝ ΚΑΙ ΧΡΟΝΩΝ ΑΝΑΣΧΕΣΗΣ

Ένα από τα βασικότερα σημεία στην ανάπτυξη της μεθόδου ήταν ο προσδιορισμός των ιόντων για κάθε ουσία. Μέσω των προγραμμάτων Isotopic Mass Distribution, του MSCpro και της ιστοσελίδας Pubchem, προσδιορίστηκαν τα ιόντα της κάθε ουσίας τα οποία παρουσιάζονται στους πίνακες 4.1-4.3. Με τη βοήθεια του προγράμματος MSCpro σχεδιάστηκαν και επιβεβαιώθηκαν τα θραύσματα των ουσιών.

Σε επόμενο βήμα πραγματοποιήθηκε η εύρεση των χρόνων ανασχεσης (RT) και των σχετικών χρόνων ανασχεσης (RRT, το πηλίκο δηλαδή του χρόνου ανασχεσης κάθε ουσίας προς το χρόνο ανασχεσης του εσωτερικού προτύπου) των ουσιών. Για το σκοπό αυτό εξετάστηκε το σύνολο των ουσιών σε μορφή πολυσυστατικών διαλυμάτων (CALH1-3). Συγκεκριμένα παραλήφθηκαν 100 μl πολυσυστατικού διαλύματος, κάθε φορά. Ο όγκος αυτός, μεταφέρθηκε σε κωνική φιάλη, προστέθηκε ίσος όγκος διαλύματος μεθυλτεστοστερόνης (εσωτερικό πρότυπο, ISTD), το μίγμα εξατμίστηκε, με διοχέτευση ρεύματος αζώτου σε θερμοκρασία 50°C, το υπόλειμμα ανασυστάθηκε με 200 μl διαλύτη ανασύστασης (παρ. 3.4) και αναλύθηκε με LC-QTOF.

Στους πίνακες 4.1-4.4 παρουσιάζονται οι χρόνοι ανασχεσης και οι σχετικοί χρόνοι ανασχεσης, της κάθε ουσίας, ως προς το χρόνο ανασχεσης του εσωτερικού προτύπου, καθώς και οι ακριβείς μάζες των ιόντων και τα σχετικά ύψη τους στο χρωματογράφημα. Σε περίπτωση ανίχνευσης άλλων ιόντων, π.χ. διμερή, επιλέχθηκε το υψηλότερο σε αφθονία ιόν.

4.3 ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΘΗΚΑΝ

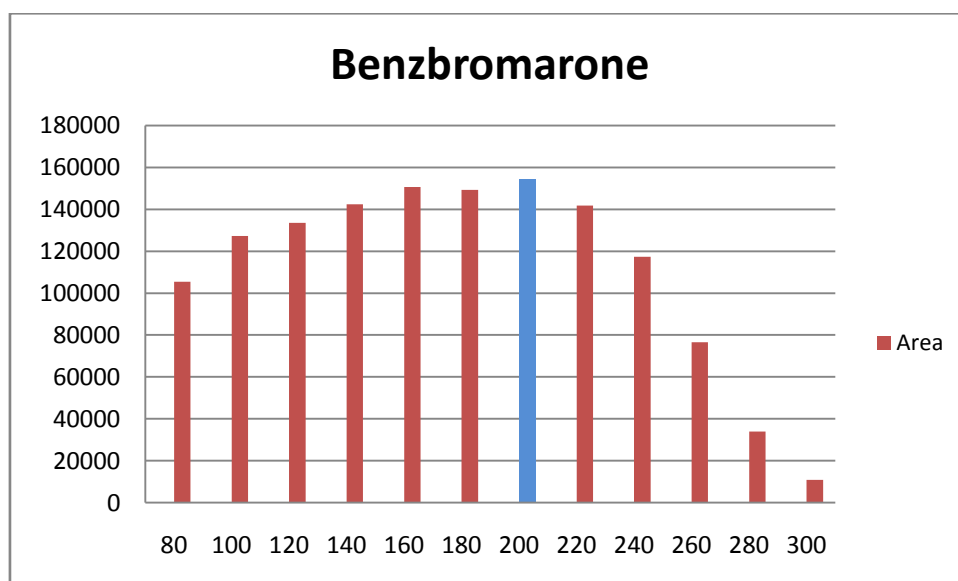
Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν 67 ουσίες (8 διεγερτικά, 3 διουρητικά, 1 β-παρεμποδιστή, 2 ναρκωτικά, 2 β₂-αγωνιστές, 2 βρογχοδιασταλτικά, 5 αναλγητικά, 5 μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη, 5 κατασταλτικά, 1 αντιυπερτασικό, 4 μυοχαλαρωτικά, 7 αγχολυτικά, 3 αντικαταθλιπτικά, 4 αντισταμινικά, 2 αντισπασμωδικά, 2 αντιψυχωσικά, 1

αγγειοδιασταλτικό, 1 ανοσοκατασταλτικό και 9 αναβολικά) και 23 πεπτίδια. Σε όλες τις ουσίες πραγματοποιήθηκαν μελέτες βελτιστοποίησης του δυναμικού της πηγής ιοντισμού (ion source fragmentor) με στόχο τη μεγιστοποίηση της αφθονίας του μοριακού ιόντος και με δεδομένη αυτή την παράμετρο προχωρήσαμε σε μελέτες βελτιστοποίησης παραμέτρων για τη βελτιστοποίηση της μάζας για τις MS/MS μεθόδους.

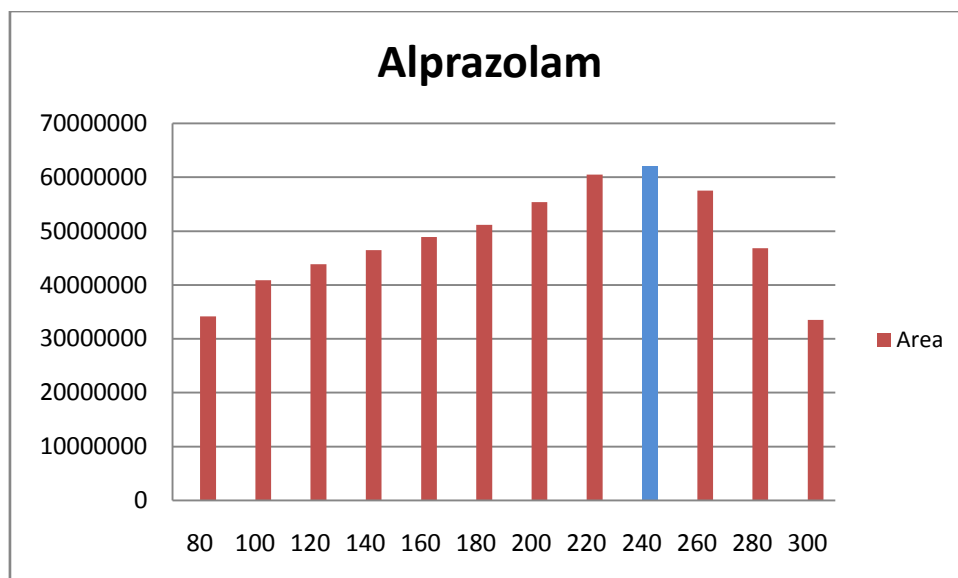
4.4 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΓΙΑ ΤΙΣ ΟΥΣΙΕΣ ΑΛΟΓΩΝ

4.4.1 Μελέτες βελτιστοποίησης των δυναμικών της πηγής ιοντισμού (fragmentor) με LC-QTOF/MS

Οι μελέτες βελτιστοποίησης του fragmentor πραγματοποιήθηκαν με σκοπό τη βελτιστοποίηση του σήματος για τον ποσοτικό προσδιορισμό των 67 αναλυτών με την ήδη υπάρχουσα μεθοδολογία. Για τη συγκεκριμένη μελέτη, επιλέχθηκαν τα 3 πρώτα διαλύματα παρακαταθήκης-πολυσυστατικά διαλύματα (CALH1-3, πίνακες 3.1-3.3). Τα δείγματα αναλύονται στο σύστημα LC-QTOF-MS σύμφωνα με τις συνθήκες που έχουν αναφερθεί στο κεφάλαιο 3. Κατά τη διάρκεια των μελετών βελτιστοποίησης του σήματος στη μέθοδο LC-QTOF/MS πραγματοποιήθηκαν χρωματογραφικές αναλύσεις των CALH σε εφαρμοζόμενη περιοχή δυναμικού πηγής από 80-300 V, με βήμα 20 V. Ως βέλτιστο δυναμικό καθορίζεται το δυναμικό στο οποίο η υπό προσδιορισμό ουσία εμφανίζει το βέλτιστο σήμα (εμβαδόν χρωματογραφικών κορυφών). Τα χρωματογραφήματα όλων των ουσιών που αναλύθηκαν παρουσιάζονται στο Παράρτημα 1.



Εικόνα 4.1: Επιλογή βέλτιστου δυναμικού για την ουσία Benzbromarone (200 V)



Εικόνα 4.2: Επιλογή βέλτιστου δυναμικού για την ουσία Alprazolam (240 V)

Υγροχρωματογραφικές συνθήκες

Το σύστημα LC-QTOFMS διαθέτει υγροχρωματογραφικό σύστημα υπερυψηλής απόδοσης (UHPLC) της εταιρίας Agilent Technologies (1200 LC Series). Οι παράμετροι της χρωματογραφικής ανάλυσης παρουσιάζονται στον πίνακα 3.9.

Συνθήκες φασματομετρίας μαζών

Το φασματόμετρο μαζών που χρησιμοποιήθηκε ως σύστημα ανίχνευσης (6520 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS, Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) διαθέτει τετραπολικό αναλυτή μαζών συζευγμένο με ορθογώνιας επιτάχυνσης αναλυτή χρόνου πτήσης (QTOF-MS) και ορθογώνιας διάταξης πηγή ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό, η οποία ρυθμίστηκε στην παραγωγή θετικών ιόντων (ESI+). Οι παράμετροι λειτουργίας του φασματομέτρου, αναφέρονται στον πίνακα 3.10.

4.4.2 Μελέτες βελτιστοποίησης ενέργειας σύγκρουσης (collision energy) με LC-QTOF/MS

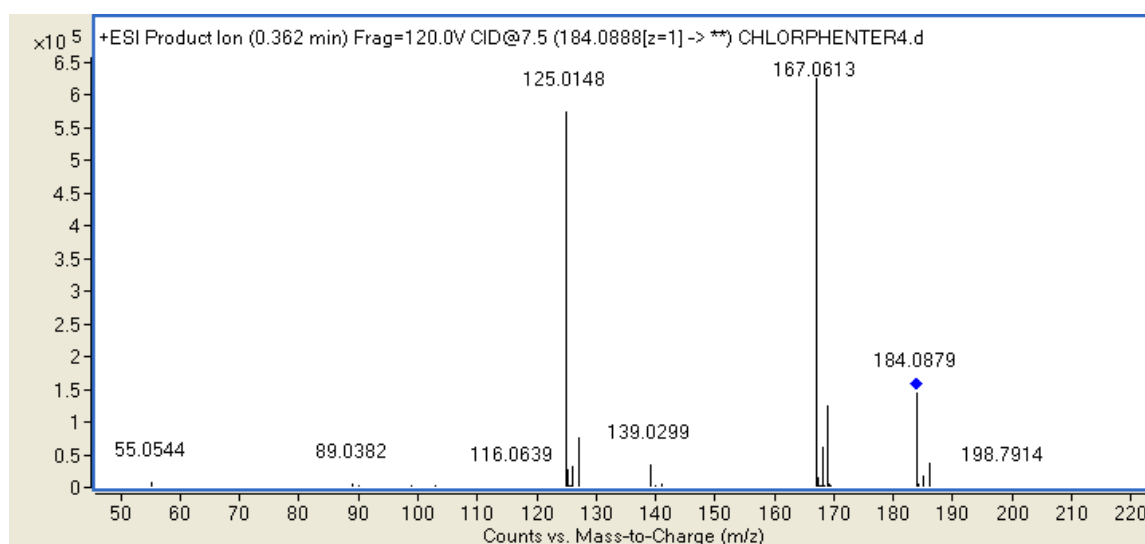
Στόχος των μελετών αυτών, ήταν η επιλογή της ενέργειας σύγκρουσης που δίνει τη χαμηλότερη (αλλά όχι απόλυτα μηδενική) απόδοση του πρωτονιομένου μοριακού ιόντος κάθε ουσίας σε συνδυασμό με το πλουσιότερο φάσμα και τη μεγαλύτερη απόδοση θραυσμάτων (θυγατρικών ιόντων). Για τη βελτιστοποίηση της συγκεκριμένης παραμέτρου, παρασκευάστηκαν διαλύματα για την κάθε υπό προσδιορισμό ουσία, ξεχωριστά.

Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε επαρκής ποσότητα από την κάθε ουσία, η οποία μεταφέρθηκε σε vial με insert μαζί με διάλυμα εσωτερικού προτύπου. Στα διαλύματα αυτά εφαρμόστηκε απευθείας έγχυση στο φασματόμετρο μάζας με τη χρήση της μεθόδου FIA (Flow Injection Analysis) η οποία είναι μια ειδική χρωματογραφική μέθοδος που επιτρέπει την ανάμειξη του δείγματος με την κινητή φάση και τη μεταφορά της ροής της κινητής

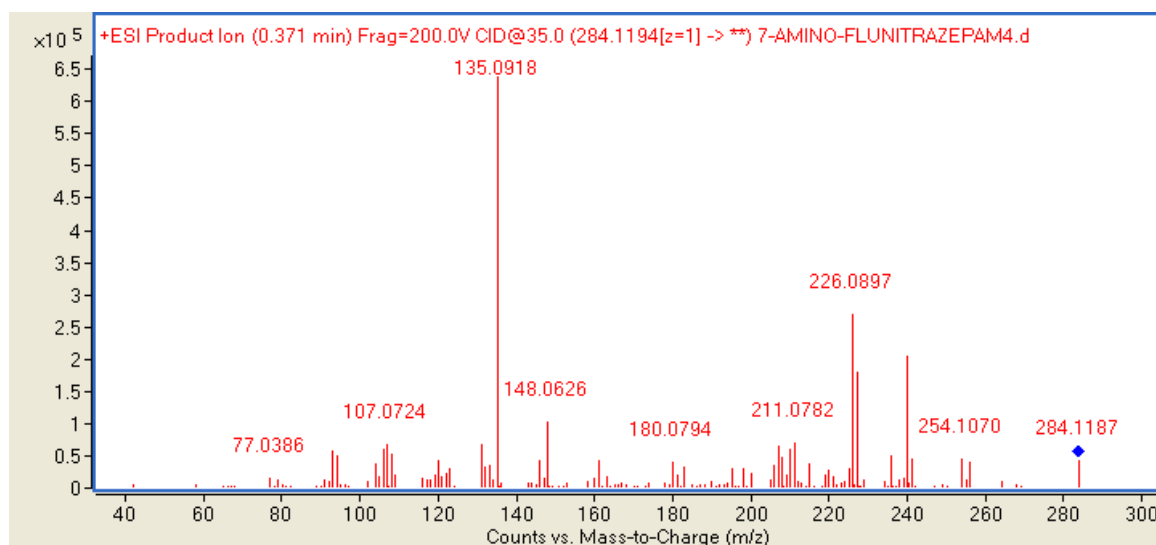
φάσης απευθείας στο φασματόμετρο μάζας, χωρίς να περάσει από τη χρωματογραφική στήλη. Ο όγκος ένεσης δείγματος, για τις μελέτες αυτές ήταν 2 μl.

Χρησιμοποιώντας το βέλτιστο δυναμικό για κάθε ουσία, ελέγχθηκαν οι τιμές ενέργειας σύγκρουσης από 5-40 eV με βήμα 5 eV σε κάθε δοκιμή. Σε κάποιες περιπτώσεις, που το πρωτονιομένο μοριακό ιόν είχε μεγάλη διαφορά απόδοσης στην αλλαγή κλίμακας ανά 5 eV χρησιμοποιήθηκε βήμα μικρότερο του 5 eV ανάμεσα στις εφαρμοζόμενες τιμές.

Με βάση τις απαιτήσεις του AORC απαιτείται η ύπαρξη τουλάχιστον 3 μεταπτώσεων για την έκδοση θετικού αποτελέσματος. Τα φάσματα όλων των ουσιών που αναλύθηκαν παρουσιάζονται στο Παράρτημα 2.



Εικόνα 4.3: Φάσμα επιλογής βέλτιστης ενέργειας συγκρούσεως για την ουσία Chlophentermine (7.5 eV)



Εικόνα 4.4: Φάσμα επιλογής βέλτιστης ενέργειας συγκρούσεως για την ουσία 7-Amino-Flunitrazepam (35 eV)

4.4.3 Δημιουργία μεθόδων

Μετά την εύρεση των βέλτιστων παραμέτρων, δημιουργήθηκαν μέθοδοι στο φασματομέτρο μαζών (Acquisition) και μέθοδοι επεξεργασίας (Data Analysis). Για τη δημιουργία των μεθόδων επεξεργασίας χρησιμοποιήθηκε κατάλληλο λογισμικό (Qualitative Analysis). Πραγματοποιήθηκε εύρεση των θεωρητικών μαζών που περιλαμβάνει τουλάχιστον 3 μεταπτώσεις καθώς και το πρόδρομο ιόν, όπως φαίνεται στο παράδειγμα (εικόνα 4.3).

Για τις ουσίες Amineptine, Chlorpheniramine Maleate Salt, Clobazam, Diphenhydramine και Etodolac δεν ήταν δυνατή η διάσπαση του πρόδρομου ιόντος σε περισσότερα από ένα θυγατρικά ιόντα, μέσα στο εύρος τιμών του δυναμικού της πηγής που είχαμε ορίσει. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε διάσπαση του θυγατρικού ιόντος, για τις ουσίες αυτές, με τη διαδικασία που περιγράφηκε στις παραγράφους 4.4.1 και 4.4.2, ενώ ακολούθως δημιουργήθηκαν μέθοδοι διπλής φασματομετρίας μάζας (MS/MS) για το θυγατρικό ιόν.

4.4.4 Καταχώρηση φασμάτων

Μετά την ολοκλήρωση των μεθόδων, πραγματοποιήθηκε καταχώρηση των φασμάτων στην ηλεκτρονική βιβλιοθήκη του μηχανήματος. Η δημιουργία βιβλιοθήκης φασμάτων αναφοράς είναι ιδιαίτερα σημαντική για την ταυτοποίηση των απαγορευμένων ουσιών που προσδιορίστηκαν.

4.5 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΓΙΑ ΤΑ ΠΕΠΤΙΔΙΑ

4.5.1 Μελέτες βελτιστοποίησης των δυναμικών της πηγής ιοντισμού (fragmentor) με LC-QTOF/MS

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε στις παραγράφους 4.3.1-4.3.3 εφαρμόστηκε και για τα πεπτίδια. Δημιουργήθηκαν 3 πολυσυστατικά διαλύματα. Τα δείγματα αναλύθηκαν στο σύστημα LC-QTOF-MS σύμφωνα με τις συνθήκες που αναφέρθηκαν στο κεφάλαιο 3. Κατά τη διάρκεια των μελετών βελτιστοποίησης του σήματος στη μέθοδο LC-QTOF/MS πραγματοποιήθηκαν χρωματογραφικές αναλύσεις των πολυσυστατικών μειγμάτων σε διαφορετικές τιμές του δυναμικού της πηγής ιοντισμού (fragmentor voltage, τιμές 80-300 V) και ο καθορισμός του βέλτιστου δυναμικού για κάθε αναλύτη υπολογίζεται με βάση τα εμβαδά των χρωματογραφικών κορυφών.

Από τα 23 πεπτίδια, μόνο 5 ήταν μονοϊονισμένα και κατ' επέκταση εμφάνιζαν ένα κύριο ιόν. Όλα τα υπόλοιπα ήταν δις-ιονισμένα οπότε υπήρχε και η παρουσία ενός δεύτερου ιόντος. Για το λόγο αυτό έγιναν περαιτέρω αναλύσεις για να αποφασιστεί ποιο ιόν θα χρησιμοποιηθεί, αλλά δεν βγήκε κάποιο συμπέρασμα. Γι' αυτό χρησιμοποιήθηκαν και τα δύο ιόντα, στα 18 αυτά πεπτίδια.

Υγροχρωματογραφικές συνθήκες

Το σύστημα LC-QTOFMS διαθέτει υγροχρωματογραφικό σύστημα υπερυψηλής απόδοσης (UHPLC) της εταιρίας Agilent Technologies (1200 LC Series). Οι παράμετροι της χρωματογραφικής ανάλυσης παρουσιάζονται στον πίνακα 3.9.

Συνθήκες φασματομετρίας μαζών

Το φασματόμετρο μαζών που χρησιμοποιήθηκε ως σύστημα ανίχνευσης (6520 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS, Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) διαθέτει τετραπολικό αναλυτή μαζών συζευγμένο με ορθογώνιας επιτάχυνσης αναλυτή χρόνου πτήσης (QTOF-MS) και ορθογώνιας διάταξης πηγή ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό, η οποία ρυθμίστηκε στην παραγωγή θετικών ιόντων (ESI+). Οι παράμετροι λειτουργίας του φασματομέτρου, αναφέρονται στον πίνακα 3.10.

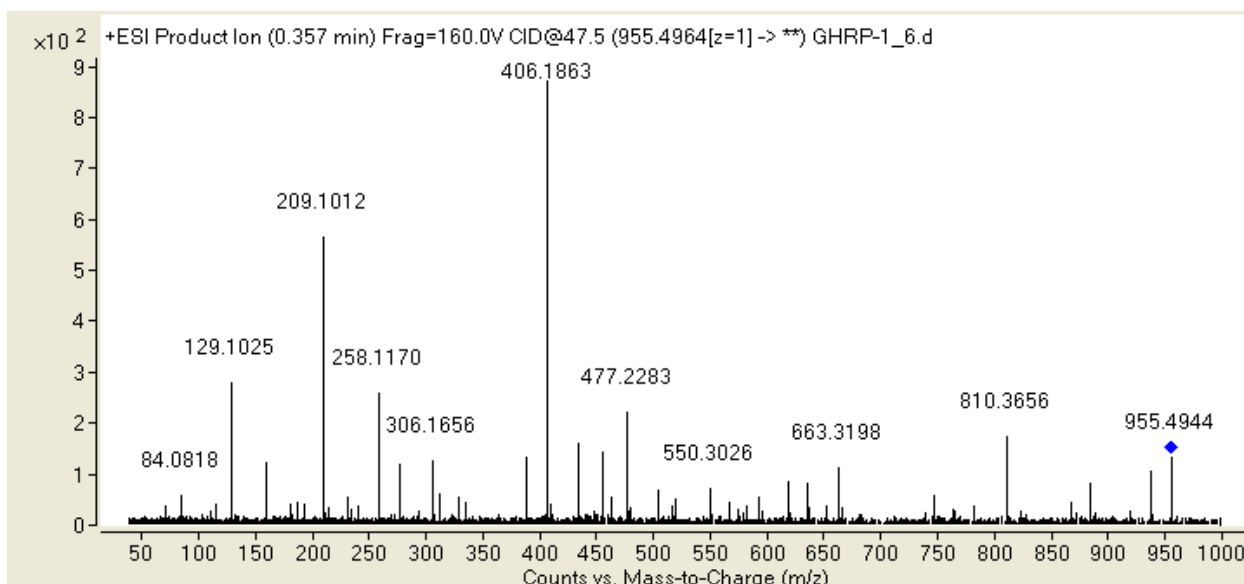
4.5.2 Μελέτες βελτιστοποίησης ενέργειας σύγκρουσης (collision energy) με LC-QTOF/MS

Στόχος των μελετών αυτών, ήταν η επιλογή της ενέργειας σύγκρουσης που δίνει τη χαμηλότερη (αλλά όχι απόλυτα μηδενική) απόδοση του πρωτονιομένου μοριακού ιόντος κάθε πεπτιδίου σε συνδυασμό με το πλουσιότερο φάσμα και τη μεγαλύτερη απόδοση θραυσμάτων (θυγατρικών ιόντων). Για τη βελτιστοποίηση της συγκεκριμένης παραμέτρου, παρασκευάστηκαν διαλύματα για το κάθε υπό προσδιορισμό πεπτίδιο, ξεχωριστά.

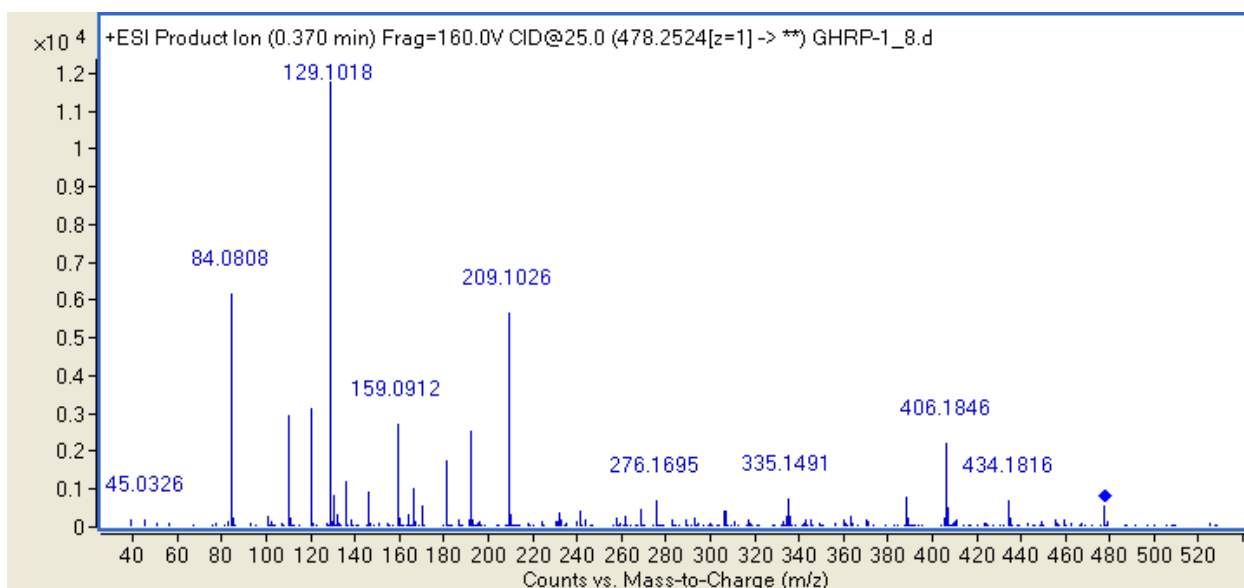
Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε επαρκής ποσότητα από το κάθε πεπτίδιο, η οποία μεταφέρθηκε σε vial με insert μαζί με διάλυμα εσωτερικού προτύπου. Στα διαλύματα αυτά εφαρμόστηκε απευθείας έγχυση στο φασματόμετρο μάζας με τη χρήση της μεθόδου FIA (Flow Injection Analysis) η οποία είναι μια ειδική χρωματογραφική μέθοδος που επιτρέπει την ανάμειξη του δείγματος με την κινητή φάση και τη μεταφορά της ροής της κινητής φάσης απευθείας στο φασματόμετρο μάζας, χωρίς να περάσει από τη χρωματογραφική στήλη. Ο όγκος ένεσης δείγματος, για τις μελέτες αυτές ήταν 2 μ l.

Χρησιμοποιώντας το βέλτιστο δυναμικό για κάθε ουσία, ελέγξαμε τις τιμές ενέργειας σύγκρουσης από 5-80 eV με βήμα 5 eV σε κάθε δοκιμή. Σε κάποιες περιπτώσεις, που το πρωτονιομένο μοριακό ιόν είχε μεγάλη διαφορά απόδοσης στην αλλαγή κλίμακας ανά 5 eV χρησιμοποιήθηκε βήμα μικρότερο του 5 eV ανάμεσα στις εφαρμοζόμενες τιμές.

Με βάση τις απαιτήσεις του AORC απαιτείται η ύπαρξη τουλάχιστον 3 μεταπτώσεων για την έκδοση θετικού αποτελέσματος.



Εικόνα 4.5: Φάσμα επιλογής βέλτιστης ενέργειας συγκρούσεως για το πεπτίδιο GHRP-1 για το ιόν 955.4964 (47.5 eV)



Εικόνα 4.6: Φάσμα επιλογής βέλτιστης ενέργειας συγκρούσεως για το πεπτίδιο GHRP-1 για το ιόν 478.2524 (25.0 eV)

4.5.3 Δημιουργία μεθόδων

Μετά την εύρεση των βέλτιστων παραμέτρων, δημιουργήθηκαν μέθοδοι διπλής φασματομετρίας μαζών (MS/MS) για το μητρικό ιόν του κάθε πεπτιδίου.

Για τα πεπτίδια GHRP-4, GHRP-5, GHRP-6 (2-5), Hexarelin (2-5) και Narfarelin υπήρχε μόνο ένα πρόδρομο ιόν. Για τα υπόλοιπα πεπτίδια πραγματοποιήθηκε διάσπαση και για τα δύο ιόντα και κατά συνέπεια δημιουργήθηκαν μέθοδοι διπλής φασματομετρίας μάζας (MS/MS) για το κάθε ένα από τα δύο πρόδρομα ιόντα του κάθε πεπτιδίου.

Πίνακας 4.1: Χαρακτηριστικά πρωτεύοντα ιόντα, χρόνοι ανάσχεσης και μοριακοί τύποι απαγορευμένων ουσιών, CALH1

a/a	ΟΥΣΙΑ	M.T.	RT (min)	RT(ISTD)	RRT (min)	FRAGMENTOR	COL. ENERGY	ION 1			ION 2		
								m / z	M + adduct	rel.height %	m / z	M + adduct	rel.height %
1	4-DIMETHYLAMINOANTIPYRINE	C ₁₃ H ₁₇ N ₃ O	4.257	9.282	0.46	140	15	232.1444	[M+H] ⁺	100			
2	7-AMINO-FLUNITRAZEPAM	C ₁₆ H ₁₄ FN ₃ O	5.960	9.282	0.64	200	35	284.1194	[M+H] ⁺	30	324.1623	[M+K] ⁺	100
3	ACETOHEXAMIDE	C ₁₅ H ₂₀ N ₂ O ₄ S	8.224	9.282	0.89	140	17.5	325.1217	[M+H] ⁺	100	671.2222	[2M+Na] ⁺	25
4	ALPRAZOLAM	C ₁₇ H ₁₃ ClN ₄	7.860	9.282	0.85	240	32.5	309.0901	[M+H] ⁺	100	617.1777	[2M+H] ⁺	25
5	AMBROXOL HCl	C ₁₃ H ₁₈ Br ₂ N ₂ O	5.480	9.282	0.59	140	12	376.9859 (378.9839)	[M+H] ⁺	50 (100)			
6	AMINEPTINE	C ₂₂ H ₂₇ NO ₂	6.968	9.282	0.75	100		338.2115	[M+H] ⁺	75			
	AMINEPTINE	C ₁₅ H ₁₃				200	22.5	193.1012					
7	AMPYRONE	C ₁₁ H ₁₃ N ₃ O	4.472	9.282	0.48	140	10	204.1131	[M+H] ⁺	100			
8	APOMORPHINE HCl HEMIHYDRATE	C ₁₇ H ₁₇ NO ₂	4.208	9.282	0.45	200	20	268.1332	[M+H] ⁺	100			
9	AZAPERONE	C ₁₉ H ₂₂ FN ₃ O	6.026	9.282	0.65	200	22.5	328.1820	[M+H] ⁺	100			
10	BAMETHAN SULFATE SALT	C ₁₂ H ₁₉ NO ₂	3.199	9.282	0.34	120	17.5	210.1489	[M+H] ⁺	100			
11	BEMEGRIDE	C ₈ H ₁₃ NO ₂	4.968	9.282	0.54	140	15	156.1019	[M+H] ⁺	100	304.3001	;	25
12	BENZBROMARONE	C ₁₇ H ₁₂ Br ₂ O ₃	11.546	9.282	1.24	200	25	422.9226 (424.9206)	[M+H] ⁺	50 (100)			
13	BROMAZEPAM	C ₁₄ H ₁₀ BrN ₃ O	6.819	9.282	0.73	200	32.5	316.0080	[M+H] ⁺	100			
14	BROMHEXINE HCl	C ₁₄ H ₂₀ Br ₂ N ₂	9.183	9.282	0.99	160	12.5	375.0066 (377.0073)	[M+H] ⁺	50 (100)			
15	BUSPIRONE HCl	C ₂₁ H ₃₁ N ₅ O ₂	6.059	9.282	0.65	220	32.5	386.2551	[M+H] ⁺	100			
16	CARISOPRODOL	C ₁₂ H ₂₄ N ₂ O ₄	7.926	9.282	0.85	100	7.5	261.1809	[M+H] ⁺	100	309.0914	[M+2Na] ⁺	60
17	CHLORPHENIRAMINE MALEATE SALT	C ₁₆ H ₁₉ ClN ₂	6.141	9.282	0.66	140		275.1310	[M+H] ⁺	100			
	CHLORPHENIRAMINE MALEATE SALT	C ₁₄ H ₁₃ ClN				240	35.0	230.0731					
18	CHLORPHENTERMINE HCl	C ₁₀ H ₁₄ ClN	5.315	9.282	0.57	120	7.5	184.0888	[M+H] ⁺	100			
19	CHLORPROPAMIDE	C ₁₀ H ₁₃ ClN ₂ O ₃ S	7.811	9.282	0.84	140	12.5	277.0408 (279.0579)	[M+H] ⁺	100	299.0440	[M+Na] ⁺	20
20	CLOBAZAM	C ₁₆ H ₁₃ ClN ₂ O ₂	8.654	9.282	0.93	200		301.0738	[M+H] ⁺	100			
	CLOBAZAM	C ₁₄ H ₁₂ ClN ₂ O				280	33	259.0633					
21	DIMEFLINE	C ₂₀ H ₂₁ NO ₃	5.960	9.282	0.64	160	12.5	324.1594	[M+H] ⁺	100			
22	GLIMEPIRIDE	C ₂₄ H ₃₄ N ₄ O ₅ S	10.439	9.282	1.12	160	15	491.2323	[M+H] ⁺	100			
23	OXAPROZIN	C ₁₈ H ₁₅ NO ₃	9.381	9.282	1.01	160		294.1125	[M+H] ⁺	100			
24	PIROXICAM	C ₁₅ H ₁₃ N ₃ O ₄ S	7.662	9.282	0.83	160	17.5	332.0700	[M+H] ⁺	100			

Πίνακας 4.2: Χαρακτηριστικά πρωτεύοντα ιόντα, χρόνοι ανάσχεσης και μοριακοί τύποι απαγορευμένων ουσιών, CALH2

α/α	ΟΥΣΙΑ	M.T.	RT _{new} (min)	RT(ISTD)	RRT (min)	FRAGMENTOR	COL. ENERGY	ION 1			ION 2		
								m / z	M + adduct	rel.height %	m / z	M + adduct	rel.height %
1	1,7 - DIMETHYLXANTHINE	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂	2.566	9.177	0.28	160	27.5	181.0720	[M+H] ⁺	100			
2	CHLORDIAZEPOXIDE	C ₁₆ H ₁₄ ClN ₃ O	7.310	9.177	0.80	160	20	300.0898	[M+H] ⁺	100			
3	CLONIDINE	C ₉ H ₉ Cl ₂ N ₃	3.227	9.177	0.35	180	35	230.0246	[M+H] ⁺	100	232.0217	[M+H] ⁺	67
4	CLORANOLOL	C ₁₃ H ₁₉ Cl ₂ NO ₂	6.500	9.177	0.71	140	20	292.0866	[M+H] ⁺	100	294.0838	[M+H] ⁺	67
5	CYCLOBENZAPRINE	C ₂₀ H ₂₁ N	7.442	9.177	0.81	180	22.5	276.1747	[M+H] ⁺	100			
6	CYPROTERONE ACETATE	C ₂₄ H ₂₉ ClO ₄	10.781	9.177	1.17	200	27.5	417.1827	[M+H] ⁺	100	419.1808	[M+H] ⁺	20
7	DANTROLENE	C ₁₄ H ₁₀ N ₄ O ₅	8.334	9.177	0.91	200	25	315.0724	[M+H] ⁺	100	377.1701	[M+H] ⁺	20
8	DIMETINDENE	C ₂₀ H ₂₄ N ₂	6.615	9.177	0.72	160	22.5	293.2012	[M+H] ⁺	100			
9	DIPHENHYDRAMINE	C ₁₇ H ₂₁ NO	6.682	9.177	0.73	100		256.1696	[M+H] ⁺	100	293.2026	[M+K] ⁺	80
	DIPHENHYDRAMINE	C ₁₃ H ₁₁				200	27.5	167.0855	[M+H] ⁺				
10	DIPHENOXYLATE	C ₃₀ H ₃₂ N ₂ O ₂	9.822	9.177	1.07	240	32.5	453.2537	[M+H] ⁺	100			
11	DIPROPHYLLINE	C ₁₀ H ₁₄ N ₄ O ₄	2.715	9.177	0.30	160	20	255.1088	[M+H] ⁺	100	277.0907	[M+Na] ⁺	50
12	DOBUTAMINE	C ₁₈ H ₂₃ NO ₃	4.450	9.177	0.48	160		302.1751	[M+H] ⁺	100			
13	DOXAPRAM	C ₂₄ H ₃₀ N ₂ O ₂	5.954	9.177	0.65	200	27.5	379.2380	[M+H] ⁺	100			
14	DOXEPIN	C ₁₉ H ₂₁ NO	6.880	9.177	0.75	160	25	280.1696	[M+H] ⁺	100			
15	DOXYLAMINE	C ₁₇ H ₂₂ N ₂ O	5.376	9.177	0.59	120	10	271.1805	[M+H] ⁺	100			
16	DROFENINE	C ₂₀ H ₃₁ NO ₂	8.533	9.177	0.93	160	25	318.2428	[M+H] ⁺	100			
17	ETHOHEPTAZINE	C ₁₆ H ₂₃ NO ₂	5.756	9.177	0.63	180	30	262.1802	[M+H] ⁺	100			
18	ETODOLAC	C ₁₇ H ₂₁ NO ₃	9.706	9.177	1.06	120	10	288.1594	[M+H] ⁺	100	309.1420	[M+Na] ⁺	23
	ETODOLAC	C ₁₂ H ₁₄ N				200	25	172.1121	[M+H] ⁺				
19	FENSPIRIDE	C ₁₅ H ₂₀ N ₂ O ₂	3.789	9.177	0.41	180	25	261.1598	[M+H] ⁺	100			
20	FLUNITRAZEPAM	C ₁₆ H ₁₂ FN ₃ O ₃	8.334	9.177	0.91	200	35	314.0935	[M+H] ⁺	100			

Πίνακας 4.3: Χαρακτηριστικά πρωτεύοντα ιόντα, χρόνοι ανάσχεσης και μοριακοί τύποι απαγορευμένων ουσιών, CALH3

α/α	ΟΥΣΙΑ	M.T.	RT(min)	RT(ISTD)	RRT (min)	FRAGMENTOR	COL. ENERGY	ION 1			ION 2		
								m / z	M + adduct	rel.height %	m / z	M + adduct	rel.height %
1	FLUOXETINE	C ₁₇ H ₁₈ F ₃ NO	7.889	9.228	0.85	100	10	310.1413	[M+H] ⁺	100	329.1685	[M+NH ₄] ⁺	70
2	FLUPHENAZINE	C ₂₂ H ₂₆ F ₃ N ₃ OS	8.518	9.228	0.92	200	35	438.1821	[M+H] ⁺	100			
3	GLAFENINE	C ₁₉ H ₁₇ ClN ₂ O ₄	5.311	9.228	0.58	200	—	373.0950	[M+H] ⁺	100	375.0928	[M+H] ⁺	35
	GLAFENINE ART	C ₁₆ H ₁₁ ClN ₂ O ₂	5.247	9.228	0.57	200	20	299.0582	[M+H] ⁺	100			
4	GUANABENZ	C ₈ H ₈ Cl ₂ N ₄	5.410	9.228	0.59	200	22.5	231.0199	[M+H] ⁺	100	233.0170	[M+H] ⁺	50
5	HALOPERIDOL	C ₂₁ H ₂₃ ClFNO ₂	7.179	9.228	0.78	200	25	376.1474	[M+H] ⁺	80	378.1453	[M+H] ⁺	39
6	HYDROXYZINE	C ₂₁ H ₂₇ ClN ₂ O ₂	7.493	9.228	0.81	200	15	375.1834	[M+H] ⁺	100	377.1812	[M+H] ⁺	41
7	HYOSCINE	C ₁₇ H ₂₁ NO ₄	3.658	9.228	0.40	200	25	304.1543	[M+H] ⁺	100			
8	ISOETHARINE	C ₁₃ H ₂₁ NO ₃	2.105	9.228	0.23	120	15	240.1594	[M+H] ⁺	100			
9	ISOPROTERENOL	C ₁₁ H ₁₇ NO ₃	1.328	9.228	0.14	100	10	212.1281	[M+H] ⁺	100			
10	ISOPYRIN	C ₁₄ H ₁₉ N ₃ O	4.633	9.228	0.50	200	15	246.1601	[M+H] ⁺	100			
11	LEVALLORPHAN	C ₁₉ H ₂₅ NO	5.509	9.228	0.60	200	35	284.2009	[M+H] ⁺	100	373.0962	;	5
12	LOBELINE	C ₂₂ H ₂₇ NO ₂	7.030	9.228	0.76	200	20	338.2115	[M+H] ⁺	100			
13	MAZINDOL	C ₁₆ H ₁₃ ClN ₂ O	5.840	9.228	0.63	200	30	285.0789	[M+H] ⁺	100	287.0764	[M+H] ⁺	40
14	MEBEVERINE	C ₂₅ H ₃₅ NO ₅	7.592	9.228	0.82	200	17.5	430.2588	[M+H] ⁺	100			
15	MEPHENESIN	C ₁₀ H ₁₄ O ₃	6.022	9.228	0.65	100	2.5	183.1016	[M+H] ⁺	0	200.1294	[M+NH ₄] ⁺	100
16	METARAMINOL (+)	C ₉ H ₁₃ NO ₂	1.361	9.228	0.15	100	10	168.1019	[M+H] ⁺	30			
17	METHAPYRILENE	C ₁₄ H ₁₉ N ₃ S	5.972	9.228	0.65	100	15	262.1372	[M+H] ⁺	100	285.0807	[M+Na] ⁺	10
18	METHOTRIMEPRAZINE	C ₁₉ H ₂₄ N ₂ OS	7.757	9.228	0.84	200	22.5	329.1682	[M+H] ⁺	100			
19	ROMIFIDINE	C ₉ H ₉ N ₃ BrF	2.832	9.228	0.31	200	—	258.0037	[M+H] ⁺	100	260.0028	[M+H] ⁺	100

Πίνακας 4.4: Χαρακτηριστικά πρωτεΐοντα ιόντα, χρόνοι ανάλυσης και μοριακοί τύποι απαγορευμένων πεπτιδίων

α/α	Peptide	COMPOSITION	M+H_THEORITICAL	ION FOUND 1	ION FOUND 2	IONS RATIO	RT	ESI CONDITIONS			
								FRAG1	FRAG2	CE1	CE2
1	ALEXAMORELIN	C ₅₀ H ₆₄ N ₁₃ O ₇	958.5051	958.5068	479.7587	3/2	5.203	160	160	47.5	20
2	DESMOPRESIN	C ₄₆ H ₆₄ N ₁₄ O ₁₂ S ₂	1069.4347	1069.4342	535.2207	3/1	5.05				
3	ghrp-1	C ₅₁ H ₆₂ N ₁₂ O ₇	955.4943	955.4964	478.2524	3/2	5.672	160	160	47.5	25
4	ghrp-2	C ₄₅ H ₅₅ N ₉ O ₆	818.4354	818.438	409.7235	3/1	6.204	160	150	42.5	12.5
5	ghrp-2_(1-3)	C ₂₀ H ₂₃ N ₃ O ₄	358.1767	358.1761	715.3463	1/1	5.119	150	150	12.5	12.5
6	ghrp-4	C ₃₄ H ₃₇ N ₇ O ₄	608.2985	608.2996			6.809	160		20	
7	ghrp-5	C ₄₃ H ₄₆ N ₈ O ₆	771.3619	771.3633			7.222	160		32.5	
8	ghrp-6	C ₄₆ H ₅₆ N ₁₂ O ₆	873.4525	873.4519	437.2296		5.538	150	150	45	17.5
9	ghrp-6 free acid	C ₄₆ H ₅₅ N ₁₁ O ₇	874.4363	874.4374	437.7230	5/4	5.891	150	150	47.5	20
10	ghrp-6-(2-5)	C ₃₄ H ₃₆ N ₆ O ₅	609.2825	609.2820			6.873	140		20	
11	ghrp-6-(2-6)	C ₄₀ H ₄₉ N ₉ O ₅	736.3935	736.3940	368.7021	3/1	5.701	150	150	35	12.5
12	ghrp-6-(2-6 free acid)	C ₄₀ H ₄₈ N ₈ O ₆	737.3775	737.3784	369.1941	4/1	6.273	160	150	37.5	12.5
13	HEXARELIN	C ₄₇ H ₅₈ N ₁₂ O ₆	887.4681	444.2403	887.4710	4/1	5.632	150	150	17.5	47.5
14	HEXARELIN (1-3)	C ₂₁ H ₂₆ N ₆ O ₄	427.2094	427.2100	853.4105	4/1	3.615	160	160	20	
15	HEXARELIN (2-5)	C ₄₁ H ₅₁ N ₉ O ₅	750,4092(623)	623.3005			6.995	150		20	
16	HEXARELIN (3-6)	C ₂₆ H ₃₄ N ₆ O ₃	479.2771	479.2778	957.5481	4/1	4.484	150	150	25	
	HEXARELIN (4-6_FREE ACID)	C ₂₆ H ₃₄ N ₅ O ₄	480.2611								
17	IPAMORELIN	C ₃₈ H ₄₉ N ₉ O ₅	712.3935	712.3954	356.7017	5/4	4.541	160	160	32.5	15
18	LHRH (2-10)	C ₅₀ H ₇₀ N ₁₆ O ₁₁	1071.5488	1071.5504	536.2799	4/5	4.289	160	160	75	25
19	NARFARELIN	C ₆₆ H ₈₃ N ₁₇ O ₁₃	1322.5328		661.8288		6.496		150		25
	NARFARELIN FREE ACID	C ₆₆ H ₈₂ N ₁₆ O ₁₄	1323.6274								
20	NARFARELIN METAB (5-10)	C ₄₁ H ₅₆ N ₁₀ O ₇	801.4412	801.4429	401.2264	3/2	6.134	160	150	55	12.5
	NARFARELIN METAB (5-10) FREE ACID	C ₄₁ H ₅₆ N ₉ O ₈	802.4252								
21	TB-500 MET 1 (AA1-2)	C ₁₉ H ₂₇ NO ₂	302.2115	302.2104	603.4087	5/1	2.355	150	150	20	5
22	TB-500 MET 2 (AA1-3)	C ₂₁ H ₃₅ N ₉ O	430.3037	430.3043	859.5992	4/1	1.682	150	150	25	10
23	TB-500 MET 3 (AA1-5)	C ₃₀ H ₄₉ N ₁₁ O ₆	660.394	660.3942	330.7013	5/4	1.965	160	150	32.5	17.5
24	TB-500	C ₃₈ H ₆₈ N ₁₀ O ₁₄	889.4995	889.4989	445.2531	1/4	2.009				
25	VASOPRESIN ARGININE	C ₄₆ H ₆₅ N ₁₅ O ₁₂ S ₂	1084.4495	1084.4457	542.7267	1/1	3.852				
26	VASOPRESIN LYSSINE	C ₄₆ H ₆₅ N ₁₃ O ₁₂ S ₂	1056.4396	1056.4389	528.7231	4/5	3.805				

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΠΑΓΟΡΕΥΜΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΜΕ LC-QTOF

5.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ^[55-61]

Η διαδικασία επικύρωσης της παρούσας μεθόδου προσδιορισμού απαγορευμένων ουσιών έγινε αξιολογώντας μια σειρά χαρακτηριστικών ποιότητας μέσω πειραματικής τεκμηρίωσης. Οι παράμετροι που εξετάστηκαν ήταν οι ακόλουθες:

- Ικανότητα προσδιορισμού (Identification Capability) απαγορευμένων ουσιών
- Ειδικότητα (Specificity)
- Παρεμποδίσεις Μήτρας (Matrix Interferences)
- Έλεγχος Επιμόλυνσης (Carryover)
- Επίδραση από το υπόστρωμα (Matrix effects)
- Ανάκτηση (Recovery)

Για την αξιολόγηση της μεθόδου μελετήθηκαν 10 αντιπροσωπευτικές ουσίες, 1 β2 ανδρενεργικός αγωνιστής υποδοχέας (beta 2 adrenergic receptor agonist), 1 αγγειοδιασταλτικός παράγοντας (vasodilator agent), 2 αντιφλεγμονώδεις μη στεροειδείς παράγοντες (anti-inflammatory agent non-steroidal), 1 καταπραϋντικό (sedative), 1 αναπνευστικό διεγερτικό (respiratory stimulant), 1 αντικαταθλιπτικό (antidepressant), 1 μυκολυτικό (mycolytic), 1 οπιούχος αγωνιστής (opiorid agonist) κι 1 ανταγωνιστή ανδρογόνων (androgen antagonist). Με τις ουσίες αυτές δημιουργήθηκε ένα πολυσυστατικό διάλυμα ελέγχου το οποίο παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 5.1: Οι υπό έλεγχο ουσίες

α/α	Ουσία	Μοριακός Τύπος
1	ISOETHARINE	$C_{13}H_{21}NO_3$
2	BAMETHAN SULFATE SALT	$C_{12}H_{19}NO_2$
3	4-DIMETHYLAMINOANTIPYRINE	$C_{13}H_{17}N_3O$
4	GLAFENINE ART	$C_{19}H_{17}ClN_2O_4$
5	AZAPERONE	$C_{19}H_{22}FN_3O$
6	LOBELINE	$C_{22}H_{27}NO_2$
7	FLUOXETINE	$C_{17}H_{18}F_3NO$
8	BROMHEXINE HCl	$C_{14}H_{20}Br_2N_2$
9	DIPHENOXYLATE	$C_{30}H_{32}N_2O_2$
10	CYPROTERONE ACETATE	$C_{24}H_{29}ClO_4$

Η πορεία που ακολουθήθηκε, καθώς και τα αποτελέσματα των πειραμάτων επικύρωσης για καθεμία από τις παραπάνω παραμέτρους, περιγράφεται στα υποκεφάλαια που ακολουθούν.

5.2 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η παρασκευαστική πορεία που ακολουθήθηκε για τα πειράματα είναι η ίδια για όλες τις παραμέτρους που εξετάστηκαν. Υπάρχει διαφοροποίηση στον αριθμό των δειγμάτων που αναλύθηκαν για κάθε παράμετρο, καθώς και σε ποια στιγμή προστέθηκε το πρότυπο πολυσυστατικό calb1.

Ακολουθούν αναλυτικά τα στάδια της παρασκευαστικής πορείας:

1. Επιλογή δειγμάτων ούρων προς ανάλυση. Αναμονή 30min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για απόψυξη.
2. Προετοιμασία λευκών δειγμάτων (blank), με μετάγγιση 5 ml ούρων στους αντίστοιχους ψηλούς δοκιμαστικούς σωλήνες.
3. Προετοιμασία δειγμάτων, με μετάγγιση 5 ml ούρων στους αντίστοιχους ψηλούς δοκιμαστικούς σωλήνες με εμβολιασμό αυτών (spiking) με 50 μ L αραιωμένου πρότυπου πολυσυστατικού διαλύματος των εξεταζομένων ουσιών calb1, ώστε να έχουμε την απαιτούμενη συγκέντρωση (MRPL).
4. Προσθήκη 2 ml ρυθμιστικού διαλύματος οξικών 1 M pH 5,2 με επαναληπτική πιπέτα και ανάδευση (vortex).
5. Προσθήκη 100 ml πρότυπου διαλύματος εσωτερικού προτύπου, με επαναληπτική πιπέτα και ανάδευση (vortex).
6. Προσθήκη 3 g στερεού ρυθμιστικού μίγματος ανθρακικών ($\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$), 10/1 w/w, έλεγχος του pH στην περιοχή 9-10 με πεχαμετρικό χάρτη και ανάδευση.
7. Προσθήκη 7 ml διαιθυλαιθέρα:οξικού αιθυλεστέρα:διχλωρομεθανίου 4:3:3,5.
8. Προσθήκη 3 g άνυδρου Na_2SO_4 και ανάδευση (vortex).
9. Κάλυψη κάθε δείγματος με αλουμινόχαρτο, πωματισμός και ανάδευση στους ανακινητήρες για 20 min.
10. Ισοβάρυνση των σωλήνων, με μέγιστη επιτρεπόμενη διαφορά βάρους τα 0,5 g.
11. Φυγοκέντρωση στις 2100 rpm για 10 min.
12. Συλλογή 3,5 ml της οργανικής στιβάδας σε κωνικούς σωλήνες.
13. Προσθήκη 50 μ L CH_3COOH 3M.
14. Εξάτμιση σε ρεύμα αζώτου (N_2) μέχρι ξηρού, σε μεταλλόλουτρο των 50° C.
15. Καθαρά ρύγχη στις απολήξεις του διανεμητή αερίου αζώτου, αρχικά μικρή ροή N_2 , με προοδευτική αύξηση αυτής.
16. Έλεγχος ξηρού υπολείμματος σε κάθε κωνικό σωλήνα, “φύσημα” με ρεύμα N_2 ένα – ένα αν χρειάζεται.
17. Προσθήκη 100 μ L διαλύτη ανασύστασης με πιπέτα 20-200 μ l.
18. Καλή ανάδευση για 15 s.

19. Μεταφορά του ανασυσταμένου δείγματος, σε επισημασμένο με ετικέτα, φιαλίδιο (vial) των 2 ml με insert, με πιπέτα των 20-200 µl.
20. Ερμητικός πωματισμός των φιαλιδίων και έλεγχος ότι δεν περιστρέφονται τα καπάκια.

5.2.1 Ικανότητα προσδιορισμού (identification capability) απαγορευμένων ουσιών

Η ικανότητα προσδιορισμού ελέγχθηκε με την παρασκευή 10 διαφορετικών δειγμάτων ούρων στα οποία προστέθηκε συγκεκριμένη ποσότητα από το πρότυπο πολυσυστατικό διάλυμα calb1. Δημιουργήθηκαν επίσης και 10 λευκά δείγματα (blank). Η παρασκευαστική πορεία πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 5.2.

Όπως μπορούμε να δούμε στα σχήματα 5.1 και 5.2, η μέθοδος που δημιουργήσαμε μπορεί να ανιχνεύσει όλες τις ουσίες.

5.2.2 Ειδικότητα (Specificity)

Με τον όρο ειδικότητα καλείτε η ικανότητα της μεθόδου να ανιχνεύει μόνο την επιλεγμένη απαγορευμένη ουσία που αποδεικνύεται με το διαχωρισμό των ουσιών παρόμοιας δομής.

Σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκαν 5 ml ούρα αλόγου και έγιναν spike τα υπόλοιπα CALH (CALH4-7). Στη συνέχεια ακολουθήθηκε η πειραματική πορεία (5.2) από το βήμα 4.

Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων, μετά την ανάλυση των 10 αρνητικών δειγμάτων ούρων (σχήμα 5.3) έδειξε ότι η μέθοδος κρίνεται ειδική για όλες τις ουσίες.

5.2.3 Παρεμποδίσεις από τη Μήτρα (Matrix Interferences)

Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι ουσίες, στο χρόνο έκλουσης των οποίων, εμφανίζονται παρεμποδίζουσες κορυφές από το μητρικό υλικό (ούρα). Το φαινόμενο μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα κατά την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

Η απουσία παρεμποδίσεων από το υπόστρωμα του δείγματος αποδεικνύεται χρησιμοποιώντας 10 χρωματογραφήματα διαφορετικών «λευκών δειγμάτων» ούρων (blank) κι ενός εμβολιασμένου δείγματος ούρων που περιέχει τις προσδιοριζόμενες ουσίες σε συγκέντρωση ίση με το Ελάχιστο Απαιτούμενο Επιπέδο Απόδοσης(MRPL).

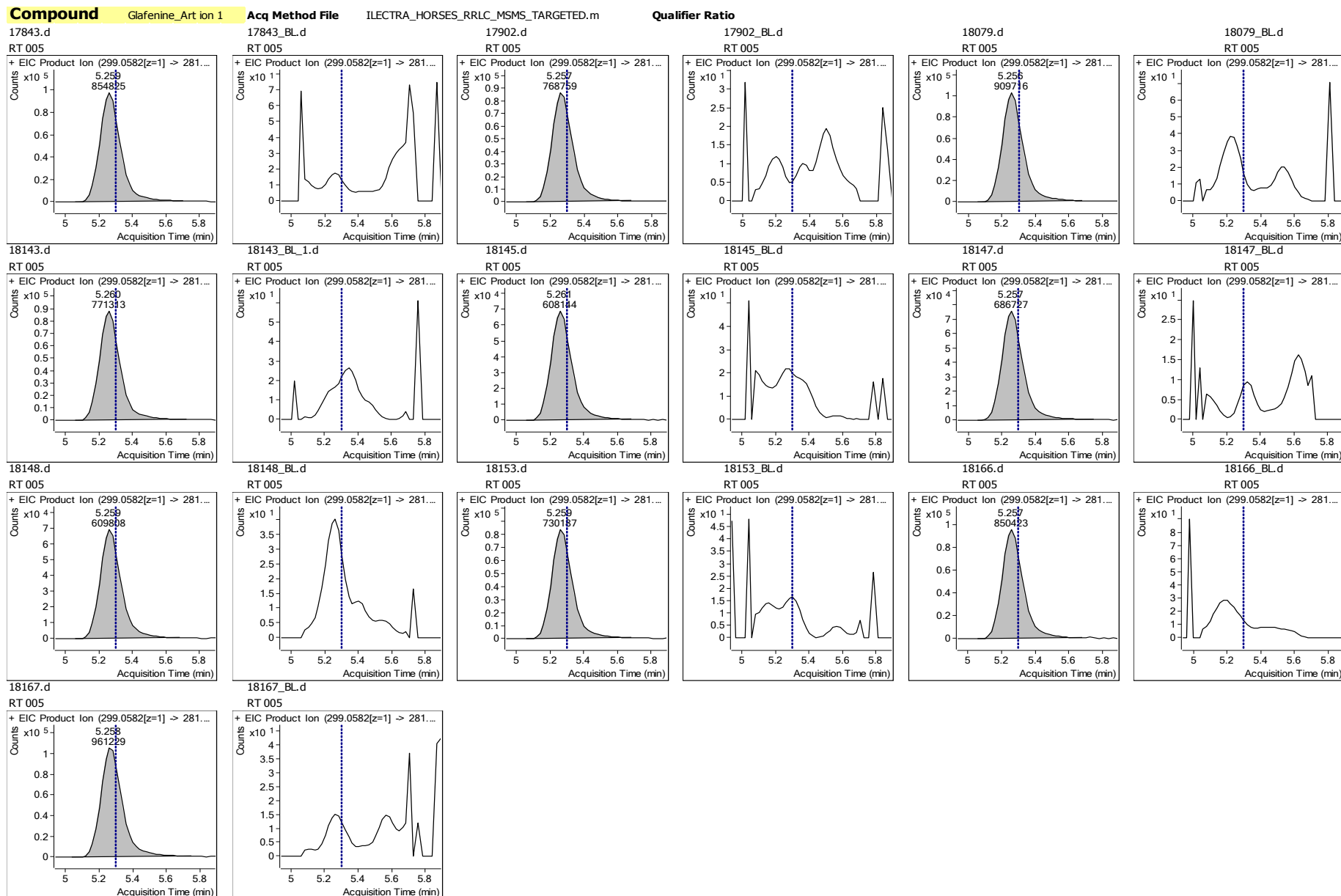
Από την παρατήρηση των χρωματογραφημάτων συμπεραίνουμε ότι δεν υπάρχουν παρεμποδίσεις υποστρώματος (σχήμα 5.1 και 5.2).

5.2.4 Έλεγχος επιμόλυνσης (Carryover)

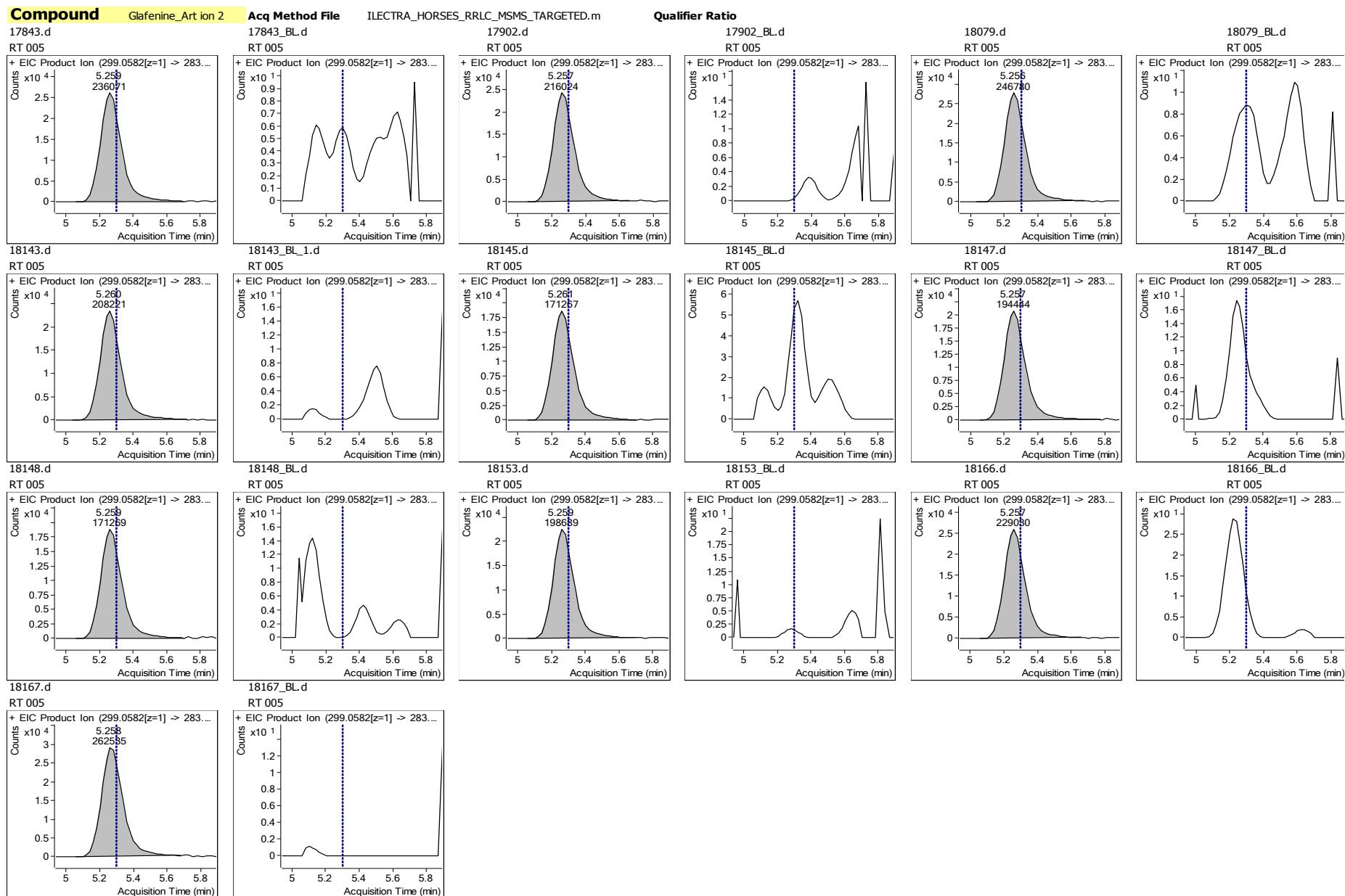
Με τον όρο επιμόλυνση (carry over contamination) καλούμε το φαινόμενο κατά το οποίο η παρουσία μιας ουσίας σε ένα δείγμα ενδέχεται να εμφανίζεται στο επόμενο κατά σειρά αναλυόμενο – ελεύθερο ουσιών – δείγμα.

Ο έλεγχος επιμόλυνσης πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφική ανάλυση «λευκού δείγματος» μετά από εμβολιασμένο δείγμα ούρων που περιείχε τις προσδιοριζόμενες ουσίες σε δεκαπλάσια συγκέντρωση (εικόνα 5.4).

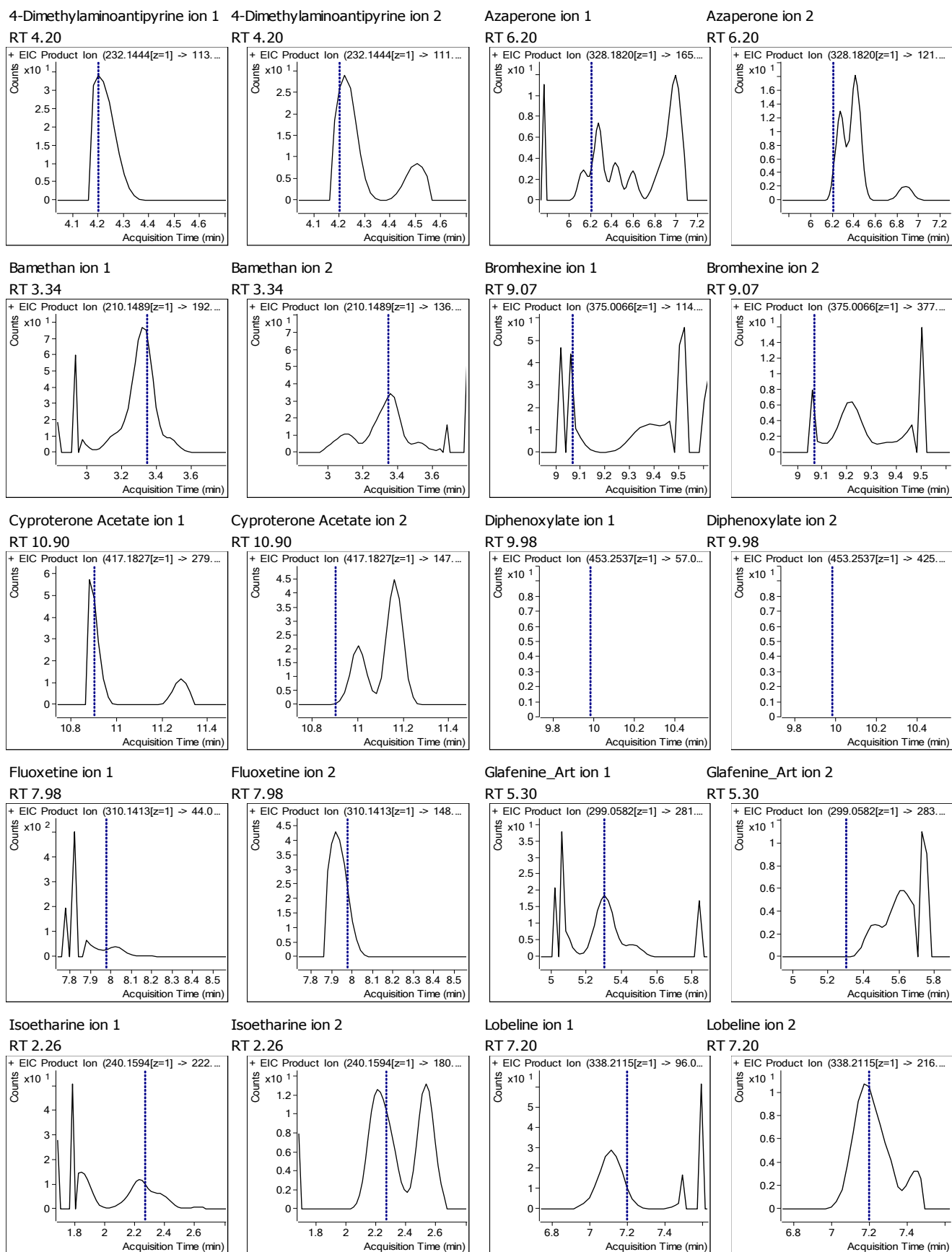
Συμπερασματικά, όπως φαίνεται και στην εικόνα 5.5 δεν παρατηρήθηκε επιμόλυνση στα «λευκά δείγματα» με τη χρήση του συγκεκριμένου χρωματογραφικού συστήματος.



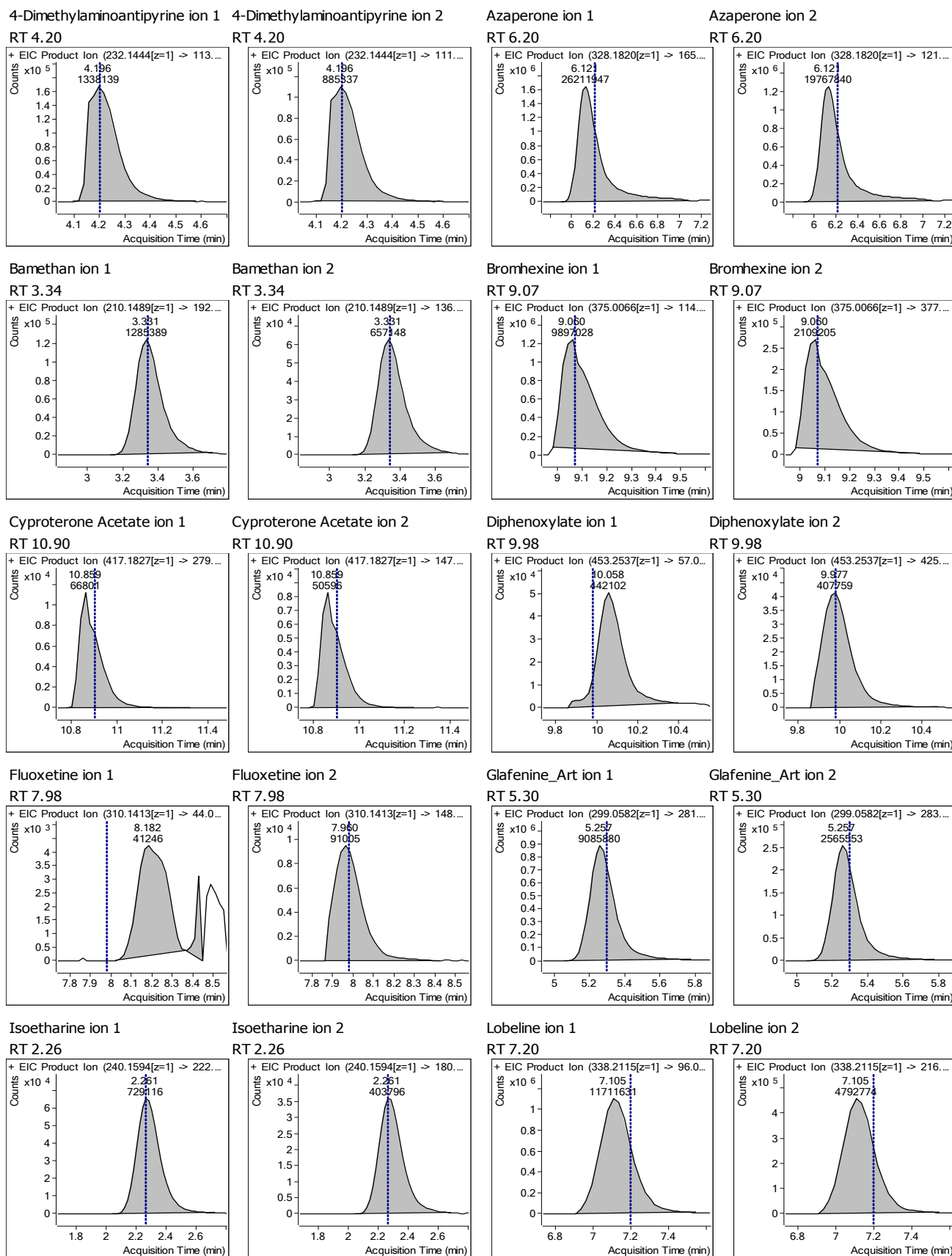
Σχήμα 5.1: Ικανότητα προσδιορισμού και παρεμποδισεις μήτρας για το 1^o ιόν της ουσίας Glafenine



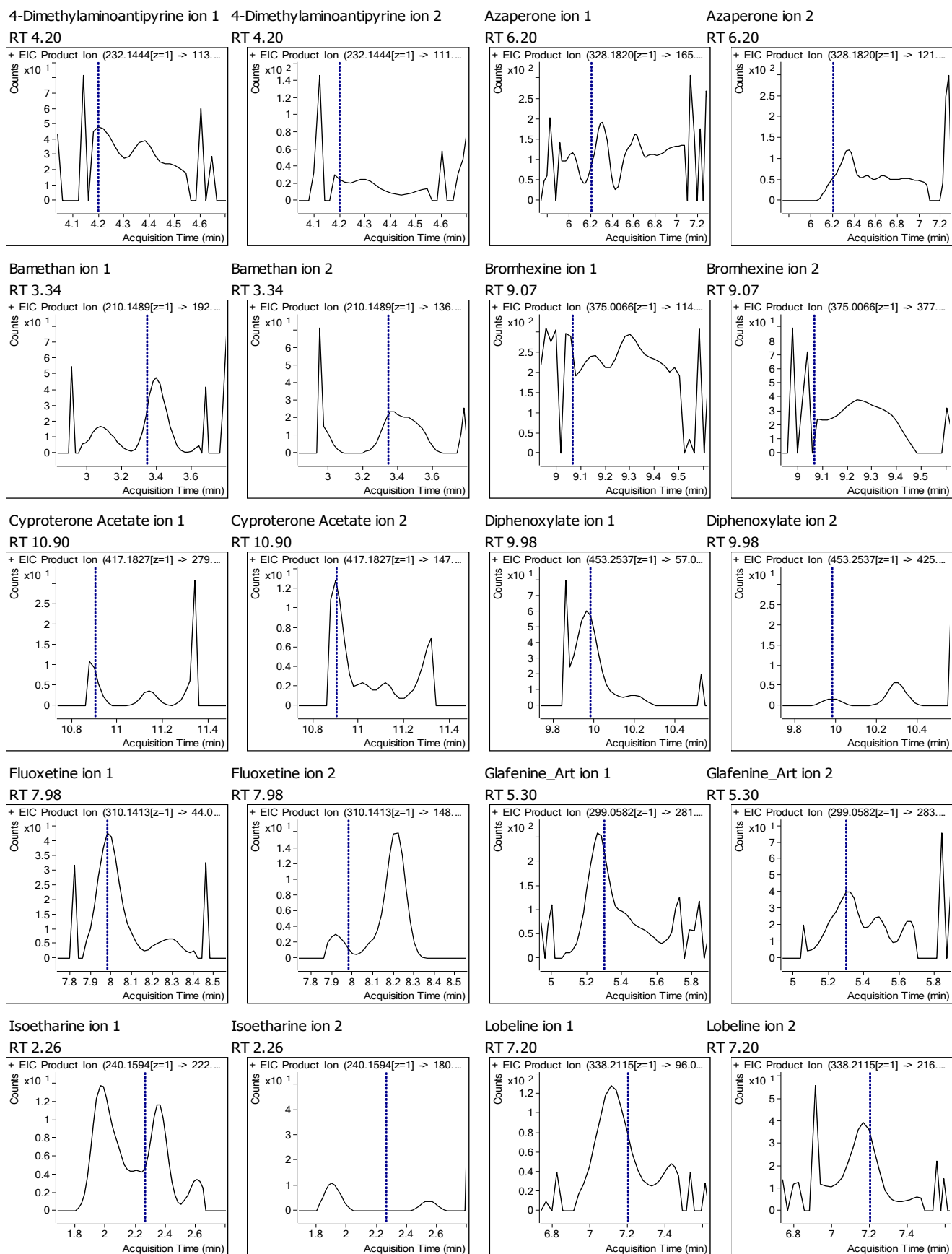
Σχήμα 5.2: Ικανότητα προσδιορισμού και παρεμποδισεις μήτρας για το 2^ο ιόν της ουσίας Glafenine



Σχήμα 5.3: Χρωματογραφήματα ουσιών για την Ειδικότητα της μεθόδου



Σχήμα 5.4: Χρωματογραφήματα δειγμάτων δεκαπλάσιας συγκέντρωσης (έλεγχος επιμόλυνσης)



Σχήμα 5.5: Χρωματογραφήματα λευκού δείγματος (έλεγχος επιμόλυνσης)

5.2.5 Επίδραση από το υπόστρωμα (Matrix Effects)^[62, 63]

Η εκατοστιαία επίδραση από το υπόστρωμα (% matrix effect, %ME) για κάθε ουσία υπολογίστηκε με σύγκριση του εμβαδού κορυφής 3 διαφορετικών δειγμάτων ούρων που εμβολιάστηκαν μετά την εκχύλιση και του εμβαδού κορυφής 3 δειγμάτων νερού που εμβολιάστηκαν επίσης μετά την εκχύλιση. Η συγκέντρωση των δειγμάτων που παρασκευάστηκαν είναι ίση με το MRPL. Οι υπολογισμοί έγιναν βάσει του ακόλουθου τύπου:

$$\%ME = [\text{Επιφάνεια κορυφής (A)} / \text{Επιφάνεια κορυφής (B)}] \times 100$$

όπου,

Επιφάνεια κορυφής (A) = Επιφάνεια κορυφής ιόντος στο δείγμα ούρων όπου ο εμβολιασμός έγινε μετά την εκχύλιση

Επιφάνεια κορυφής (B) = Επιφάνεια κορυφής ιόντος στο δείγμα νερού όπου ο εμβολιασμός έγινε μετά την εκχύλιση

Θα πρέπει να σημειωθεί εδώ, ότι με τον όρο matrix effect (%ME), υπολογισμένο όπως αναφέρθηκε, εννοείται το απόλυτο %ME^[62] (absolute matrix effect) που στη βιβλιογραφία αναφέρεται ως «επίδραση από το υπόστρωμα». Η παράμετρος υπολογισμένη με αυτό τον τρόπο, είναι η κοινώς αναφερόμενη στην βιβλιογραφία και εμπεριέχει τόσο την “ion suppression” (καταστολή σήματος), όσο και την “ion enhancement” (ενίσχυση σήματος). Η “ion suppression” θα μπορούσε να υπολογιστεί βάσει της σχέσης $[100 - \%ME]$. Σε αυτή την περίπτωση, αρνητική τιμή θα υποδήλωνε ύπαρξη “ion enhancement”. Με τους όρους “ion suppression” και “ion enhancement”, εννοούμε την «καταστολή του σήματος» και την «ενίσχυση του σήματος» του ιόντος, αντίστοιχα, ανάλογα με το πως επιδρά το υπόστρωμα στον προσδιορισμό μιας ουσίας.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους **Πίνακες 5.2 και 5.3**

Όπως διαπιστώνεται από τους πίνακες οι ουσίες εμφανίζουν τιμές %ME πολύ κοντά στο 100%. Αρκετές ουσίες παρουσιάζουν τιμές μεγαλύτερες του 100. Αυτό σημαίνει ότι επηρεάζονται θετικά από το υπόστρωμα και κατά συνέπεια υπάρχει ενίσχυση του σήματος. Οι υπόλοιπες ουσίες που παρουσιάζουν τιμές μικρότερες του 100 επηρεάζονται αρνητικά από το υπόστρωμα κι έτσι υπάρχει μείωση του σήματος.

Πίνακας 5.2: Αποτελέσματα της % επίδρασης από το υπόστρωμα για το 1^ο ιόν της κάθε ουσίας

Ουσία	Ιόν	RT	Επιφάνεια δείγματος 1 ούρων (Α) *	Επιφάνεια δείγματος 1 ούρων (Β) **	% ΜΕ δείγματος 1	Επιφάνεια δείγματος 2 ούρων (Α) *	Επιφάνεια δείγματος 2 ούρων (Β) **	% ΜΕ δείγματος 2	Επιφάνεια δείγματος 3 ούρων (Α) *	Επιφάνεια δείγματος 3 ούρων (Β) **	% ΜΕ δείγματος 3	Μέσος όρος
Isoetharine	222	2.105	16634	1208	>>100	61645	4594	>>100	26267	3078	>>100	>>100
Bamethan Sulfate Salt	192	3.199	207144	210939	98.2	235190	178503	131.8	230736	230663	100.0	110
4-Dimethylaminoantipyrine	113	4.257	136725	185325	73.8	138223	173791	79.5	175339	184118	95.2	83
Glafenine Art	281	5.247	2145507	2576241	83.3	1971259	1859329	106.0	2889801	3373367	85.7	92
Azaperone	165	6.026	2800661	3372591	83.0	2134557	2428006	87.9	3123136	3707543	84.2	85
Lobeline	96	7.030	1907204	2065215	92.3	1531801	1522911	100.6	1884697	2065329	91.3	95
Fluoxetine	44	7.889	408713	412574	99.1	306188	174751	175.2	309710	281229	110.1	128
Bromhexine HCl	114	9.183	995838	1052279	94.6	737460	376415	195.9	1034724	1179657	87.7	126
Diphenoxylate	57	9.822	233457	236536	98.7	85095	90276	94.3	275709	284981	96.7	97
Cyproterone Acetate	279	10.781	4455	4898	91.0	2716	2983	91.0	7116	7331	97.1	93

Πίνακας 5.3: Αποτελέσματα της % επίδρασης από το υπόστρωμα για το 2^ο ιόν της κάθε ουσίας

Ουσία	Ιόν	RT	Επιφάνεια δείγματος 1 ούρων (Α) *	Επιφάνεια δείγματος 1 ούρων (Β) **	% ΜΕ δείγματος 1	Επιφάνεια δείγματος 2 ούρων (Α) *	Επιφάνεια δείγματος 2 ούρων (Β) **	% ΜΕ δείγματος 2	Επιφάνεια δείγματος 3 ούρων (Α) *	Επιφάνεια δείγματος 3 ούρων (Β) **	% ΜΕ δείγματος 3	Μέσος όρος
Isoetharine	180	2.105	9576	543	>>100	33652	2545	>>100	14736	1737	>>100	>>100
Bamethan Sulfate Salt	136	3.199	103740	115782	89.6	113909	96582	117.9	121745	123035	99.0	102
4-Dimethylaminoantipyrine	111	4.257	109020	125064	87.2	110792	117744	94.1	114579	122014	93.9	92
Glafenine Art	283	5.247	658706	720366	91.4	528427	503934	104.9	776968	904317	85.9	94
Azaperone	121	6.026	2108936	2549314	82.7	1572350	1811837	86.8	2339021	2790418	83.8	84
Lobeline	216	7.030	711979	819336	86.9	600552	597468	100.5	724013	805429	89.9	92
Fluoxetine	148	7.889	9510	9690	98.1	8830	3955	223.3	9503	8820	107.7	143
Bromhexine HCl	377	9.183	117985	206311	57.2	149154	77325	192.9	194166	229001	84.8	112
Diphenoxylate	425	9.822	40639	42562	95.5	15304	15968	95.8	49584	51594	96.1	96
Cyproterone Acetate	147	10.781	4005	4324	92.6	1346	1394	96.6	5408	6479	83.5	91

Όπου,

* Επιφάνεια (Α): Επιφάνεια κορυφής του μεγαλύτερου σε αναλογία ιόντος στα δείγματα ούρων όπου η προσθήκη του προτύπου πολυσυστατικού διαλύματος calb1 και του εσωτερικού προτύπου έγινε μετά το στάδιο της εκχύλισης.

** Επιφάνεια (Β): Επιφάνεια κορυφής του μεγαλύτερου σε αναλογία ιόντος στα δείγματα νερού όπου η προσθήκη του προτύπου πολυσυστατικού διαλύματος calb1 και του εσωτερικού προτύπου έγινε μετά το στάδιο της εκχύλισης.

%ΜΕ: Η % επίδραση από το υπόστρωμα.

5.2.6 Ανάκτηση (Recovery)^[62]

Το ποσοστό ανάκτησης των μεθόδων για κάθε ανιχνευόμενη ουσία ελέγχθηκε με παράλληλη, συγκριτική ανάλυση ενός προτύπου δείγματος των ουσιών, το οποίο προέκυψε μετά από έγχυση (spiked) προτύπου διαλύματος των ουσιών σε αρνητικό δείγμα ούρων πριν την εκχύλιση, το οποίο στη συνέχεια ακολούθησε όλη την παρασκευαστική πορεία (5.2), με δείγμα το οποίο προέκυψε μετά από έγχυση ίδιου όγκου του προτύπου διαλύματος των ουσιών σε οργανικό υπόστρωμα ούρων, το οποίο ήδη είχε υποστεί την εκχύλιση της παρασκευαστικής πορείας. Η διαδικασία αυτή ακολούθηθηκε για 2 διαφορετικά δείγματα ούρων. Το ποσοστό ανάκτησης υπολογίζεται από το λόγο της επιφάνειας της κορυφής, συνήθως του ιόντος με την μεγαλύτερη ένταση, του δείγματος στο οποίο έχει πραγματοποιηθεί έγχυση προτύπου διαλύματος ουσιών πριν το στάδιο της εκχύλισης, προς την επιφάνεια της κορυφής του ίδιου ιόντος της ουσίας, του δείγματος στο οποίο έχει πραγματοποιηθεί έγχυση μετά την εκχύλιση, βάσει της ακόλουθης σχέσης:

$$\% \text{ Ανάκτηση} = \left[\frac{\text{(Επιφάνεια κορυφής) έγχυση προ της εκχύλισης}}{\text{(Επιφάνεια κορυφής) έγχυση μετά την εκχύλιση}} \right] \times 100$$

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον **Πίνακα 5.4**.

Από τη μελέτη των αποτελεσμάτων, παρατηρήθηκε ότι η ανάκτηση κυμαίνεται μεταξύ 5-41 %. Αυτό οφείλεται στο ότι η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε στηρίζεται στη γενική μέθοδο του εργαστηρίου, η οποία απευθύνεται σε πλήθος ουσιών. Η ουσία Isoetharine, για την οποία παρατηρείται η μικρότερη ανάκτηση, είναι πολύ πολική με αποτέλεσμα να εκλούεται πολύ γρήγορα. Επίσης το Bromhexine είναι πολύ βασικό.

Καλό θα ήταν μελλοντικά το εργαστήριο να ελέγξει την παρασκευαστική πορεία των ουσιών για τη διόρθωση αυτού του αποτελέσματος.

Η προετοιμασία των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε από προϋπάρχουσες παρασκευαστικές πορείες του εργαστηρίου και δεν ακολούθησε βελτιστοποίηση.

Πίνακας 5.4: % ανάκτηση για το 1^ο ιόν της κάθε ουσίας

Ουσία	Ιόν	Επιφάνεια δείγματος 1 ούρων (Α) *	Επιφάνεια δείγματος 1 ούρων (Β) **	% Ανάκτηση δείγματος 1 ***	Επιφάνεια δείγματος 2 ούρων (Α) *	Επιφάνεια δείγματος 2 ούρων (Β) **	% Ανάκτηση δείγματος 2 ***	Μέσος όρος
Isoetharine	222	4797	69772	6.9	1741	71470	2.4	4.7
Bamethan Sulfate Salt	192	92239	229115	40.3	102014	242451	42.1	41.2
4-Dimethylaminoantipyrine	113	49693	150108	33.1	62059	160117	38.8	35.9
Glafenine Art	281	712654	2135063	33.4	667221	2864469	23.3	28.3
Azaperone	165	833675	2748962	30.3	542883	3874800	14.0	22.2
Lobeline	96	486390	1335184	36.4	338087	1674135	20.2	28.3
Fluoxetine	44	125346	351796	35.6	77523	409154	18.9	27.3
Bromhexine HCl	114	105220	943520	11.2	116694	1217689	9.6	10.4
Diphenoxylate	57	17310	59033	29.3	2406	224143	1.1	15.2
Cyproterone Acetate	279	1225	2889	42.4	254	5674	4.5	23.4

Όπου,

* Επιφάνεια (Α): Επιφάνεια κορυφής του μεγαλύτερου σε αναλογία ιόντος στα δείγματα ούρων όπου η προσθήκη του calb1 έγινε πριν από το στάδιο της εκχύλισης

** Επιφάνεια (Β): Επιφάνεια κορυφής του μεγαλύτερου σε αναλογία ιόντος στα δείγματα ούρων όπου η προσθήκη του calb1 έγινε μετά το στάδιο της εκχύλισης

*** Ανάκτηση %: Επιφάνεια (Α) / Επιφάνεια (Β)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

ΟΥΣΙΕΣ ΑΛΟΓΩΝ

Στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια ανάπτυξης μεθόδων επιβεβαίωσης διεγερτικών και ναρκωτικών ουσιών με την τεχνική της υγροχρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών και αναλυτή χρόνου πτήσης σε σειρά με τετράπολο (LC-QTOF). Ο ιοντισμός έγινε με ηλεκτροψεκασμό θετικής πολικότητας [(+)ESI]. Η προσπάθεια αυτή αποσκοπούσε στην εύρεση βέλτιστων συνθηκών έτσι ώστε να έχουμε δύο τουλάχιστον διαγνωστικά θραύσματα σε κάθε επιβεβαιωτική μέθοδο. Η εργασία αυτή, οδήγησε στην ανάπτυξη 67 νέων μεθόδων για διαδικασίες επιβεβαίωσης διεγερτικών και ναρκωτικών ουσιών (μία για κάθε εξεταζόμενη ουσία).

Για την επικύρωση των μεθόδων, εξετάστηκε μια σειρά παραμέτρων για 10 αντιπροσωπευτικές ουσίες. Η αξιολόγηση των μεθόδων επιβεβαίωσης, έδειξε ότι οι μέθοδοι αυτές εμφανίζουν ειδικότητα για το σύνολο των ουσιών που εξετάστηκαν. Επίσης, δεν παρατηρήθηκαν επιμολύνσεις, ούτε και παρεμποδίσες υποστρώματος. Τέλος, οι ουσίες εμφάνισαν χαμηλές τιμές, όσον αφορά στην επίδραση από το υπόστρωμα (%ME). Στην πλειοψηφία τους οι ουσίες παρουσίασαν %RE 5 - 41%. Η χαμηλότερη ανάκτηση που παρουσίασαν κάποιες ουσίες δεν αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα για την εφαρμογή των μεθόδων καθώς είναι δυνατή η ανίχνευση των ουσιών στο επίπεδο του MRPL.

Όπως προκύπτει από τα παραπάνω, η μέθοδος κρίνεται κατάλληλη για τη διαδικασία επιβεβαίωσης (confirmation) όλων των ουσιών που μελετήθηκαν.

ΠΕΠΤΙΔΙΑ

Πραγματοποιήθηκε ανάπτυξης μεθόδων επιβεβαίωσης πεπτιδίων με την τεχνική της υγροχρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών και αναλυτή χρόνου πτήσης σε σειρά με τετράπολο (LC-QTOF). Ο ιοντισμός έγινε με ηλεκτροψεκασμό θετικής πολικότητας [(+)ESI]. Η προσπάθεια αυτή αποσκοπούσε στην εύρεση βέλτιστων συνθηκών έτσι ώστε να υπάρχουν δύο τουλάχιστον διαγνωστικά θραύσματα σε κάθε επιβεβαιωτική μέθοδο. Η εργασία αυτή, οδήγησε στην ανάπτυξη 23 νέων μεθόδων για διαδικασίες επιβεβαίωσης πεπτιδίων (μία για 5 πεπτίδια και δύο για 18 πεπτίδια).

Το δυναμικό της πηγής ιοντισμού είναι περίπου ίδιο για όλα τα πεπτίδια και κυμαίνεται από 140 έως 160 V. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στην παρόμοια δομή που έχουν όλα τα πεπτίδια, καθώς αποτελούνται από μια πολυπεπτιδική αλυσίδα, ίδια για όλα τα πεπτίδια και το μόνο που αλλάζει είναι οι πλευρικές ομάδες. Αξιοσημείωτο ήταν ότι πολλά θραύσματα ήταν κοινά, σε διαφορετικά πεπτίδια. Για το λόγο αυτό σε πολλά πεπτίδια επιλέξαμε δυναμικό 150 V, κυρίως σε εκείνα που έχουν πολλούς μεταβολίτες. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε ότι σε δυναμικό μεγαλύτερο από 200 V δεν υπάρχει καθόλου σήμα.

Παρατηρήθηκε, επιπλέον, ότι σε αρκετές περιπτώσεις το μονοϊονισμένο ιόν χρειάστηκε περισσότερη ενέργεια σύγκρουσης για τη διάσπασή του σε σχέση με το δις-ιονισμένο ιόν.

Τέλος, για τα πεπτίδια με μεγάλο m/z οι ενέργειες σύγκρουσης κυμαίνονται σε υψηλά επίπεδα (έως και 75 eV) για κάποια πεπτίδια, σε σχέση με τις υπόλοιπες ουσίες που είχαν χαμηλότερα m/z και παρουσίαζαν τιμές ενέργειας σύγκρουσης μέχρι 40 eV. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στο μέγεθος των μορίων των πεπτιδίων καθώς και στην ύπαρξη του πεπτιδικού δεσμού, ο οποίος έχει εν μέρει χαρακτήρα διπλού δεσμού.^[64]

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Πίνακας Α: Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίες των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός όρος
Abundance	Ένταση
Analogue-to-digital converter	Αναλογικός ψηφιοποιητής
Artifact	Τεχνητή ένωση που σχηματίζει η ουσία
Atmospheric Pressure Chemical Ionization	Χημικός Ιοντισμός Ατμοσφαιρικής Πίεσης
Autosampler	Αυτόματος Δειγματολήπτης
Binary pump	Διαδική αντλία υψηλής πίεσης
Blank	Λευκό δείγμα
Calibrant mix	Διάλυμα βαθμονόμησης
Calibration	Βαθμονόμηση
Carryover	Έλεγχος Επιμόλυνσης
Chemical Ionization	Χημικός Ιοντισμός
Collision cell	Κυψελίδα συγκρούσεων
Collision Induced Dissociation	Σύγκρουση του πρόδρομου ιόντος με αδρανές αέριο
Controlled Medication Regulations	Κανονισμοί για Ελεγχόμενη Φαρμακευτική Αγωγή
Doping	Ντόπινγκ (Φαρμακοδιέγερση)
Drying gas	Αέριο ξήρανσης
Electron Impact	Ιοντισμός με πρόσκρουση ηλεκτρονίων
Electron multiplier	Ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής
Electrospray Ionization	Ηλεκτροσπρέυ
Equine Anti-Doping	Αντί-Ντόπινγκ Ιπποειδών
Fédération Equestre Internationale	Διεθνής Ιππική Ομοσπονδία
Flow Injection Analysis	Ανάλυση Ροής Έγχυσης
Gonadotropins	Γοναδοτροπίνες
Growth Hormone	Αυξητική Ορμόνη
Growth Hormone Releasing Peptides	Πεπτίδια Απελευθέρωσης Αυξητικής Ορμόνης
Growth Hormone Secretagogues	Εκκριταγωγοί Αυξητικής Ορμόνης
Growth Hormone-Releasing Hormone	Αυξητική Ορμόνη-Εκλυτική Ορμόνη
High Performance Liquid Chromatography	Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης
Hot block	Μεταλλόλουτρο
human Growth Hormone	Ανθρώπινη Αυξητική Ορμόνη
Identification capability	Ικανότητα προσδιορισμού
IFHA	Διεθνής Ομοσπονδία Ιπποδρομιακών Αρχών
Internal Standard	Εσωτερικό Πρότυπο
International Standard for Laboratories	Διεθνές Πρότυπο Εργαστηρίων
Ion enhancement	Ενίσχυση σήματος
Ion suppression	Καταστολή σήματος
Liquid Chromatography	Υγροχρωματογραφία
Loop injector	Βρόχος δειγματοληψίας
M+adduct	Ιόν προσθήκης
Masking agent	Παράγων συγκάλυψης
Mass accuracy	Ικανότητα μέτρησης ακριβούς μάζας
Matrix Assisted Laser Desorption Ionization	Ιοντισμός με τη βοήθεια εκρόφησης μήτρας
Matrix effect	Επίδραση από το υπόστρωμα
Matrix interferences	Παρεμβολίδες από τη μήτρα

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός όρος
Metabolite	Μεταβολίτης
Micro-insert	Μικροφιαλίδιο
Minimum Required Performance Limit	Ελάχιστο Απαιτούμενο Όριο Απόδοσης
Multi-channel	Μικροσκοπικός σωλήνας
Multi-channel plate detector	Ανιχνευτής πλακών πολλαπλής διέλευσης
Narcotics	Ναρκωτικά
Nebulizer gas	Αέριο νεφελοποίησης
Orthogonal Acceleration	Ορθογώνια Επιτάχυνση
Peak area	Εμβαδόν χρωματογραφικής κορυφής
Peak split	Σχάση κορυφής
Photomultiplier tube	Φωτοπολλαπλασιαστής
Precursor ion	Μητρικό ιόν
Proficiency Tests	Έλεγχοι Ικανότητας
Quadrupole	Τετράπολο
recombinant Bovine Growth Hormone	Ανασυνδυασμένη Αυξητική Ορμόνη Βοοειδών
recombinant Growth Hormone	Ανασυνδυασμένη Αυξητική Ορμόνη
recombinant human Growth Hormone	Ανασυνδυασμένη Ανθρώπινη Αυξητική Ορμόνη
Recovery	Ανάκτηση
Reference mix	Διάλυμα ελέγχου
Reflectron	Ανακλαστικό Κάτοπτρο
Relative Retention Time	Σχετικός χρόνος ανάσχεσης
Resolution	Διαχωριστική Ικανότητα
Retention Time	Χρόνος Ανάσχεσης
Screening	Σάρωση
Signal-to-noise	Σήμα λόγου προς θόρυβο
Solid phase extraction	Εκχύλιση στερεάς φάσης
Solvent level	Επίπεδο διαλύτη
Specificity	Ειδικότητα
Spiking	Εμβολιασμός
Spray Chamber	Θάλαμος Ψεκασμού
Tandem Mass Spectrometry	Συζευγμένη Φασματομετρία Μαζών
Time Of Flight	Χρόνος πτήσης
Tip	Πλαστικό ρύγχος
Tray	Ψυχόμενη πλάκα τοποθέτησης δειγμάτων
Tuning	Ρύθμιση
Vacuum Degasser	Σύστημα Απαέρωσης Διαλυτών
Validation	Επικύρωση
Vial	Διαφανές φιαλίδιο
Vortex	Ανάδευση
World Anti-Doping Agency	Παγκόσμιος Οργανισμός Αντιντόπινγκ
World Anti-Doping Code	Παγκόσμιος Κώδικας Αντιντόπινγκ

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ - ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

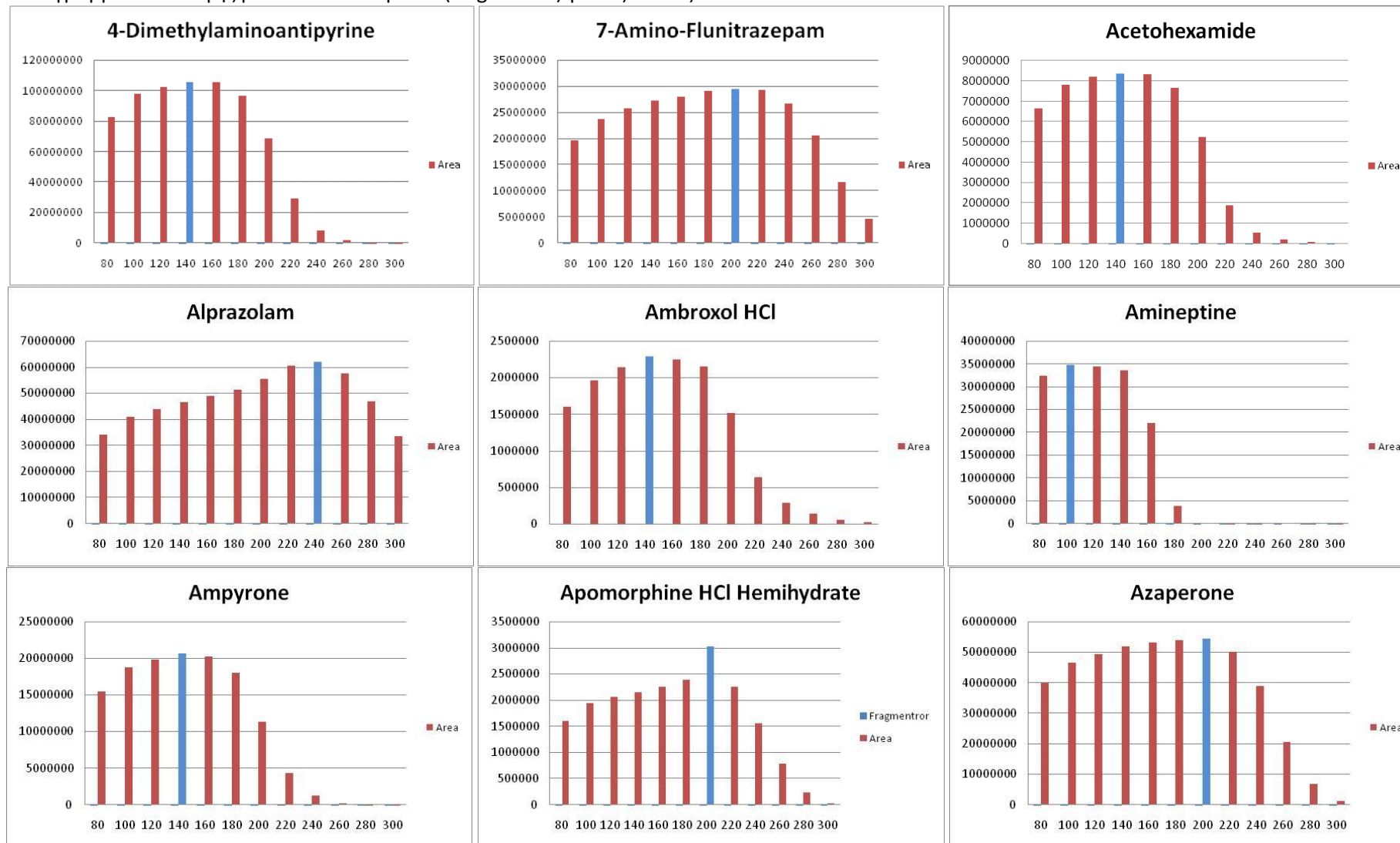
Πίνακας Β: Ακρωνύμια και η ανάπτυξή τους

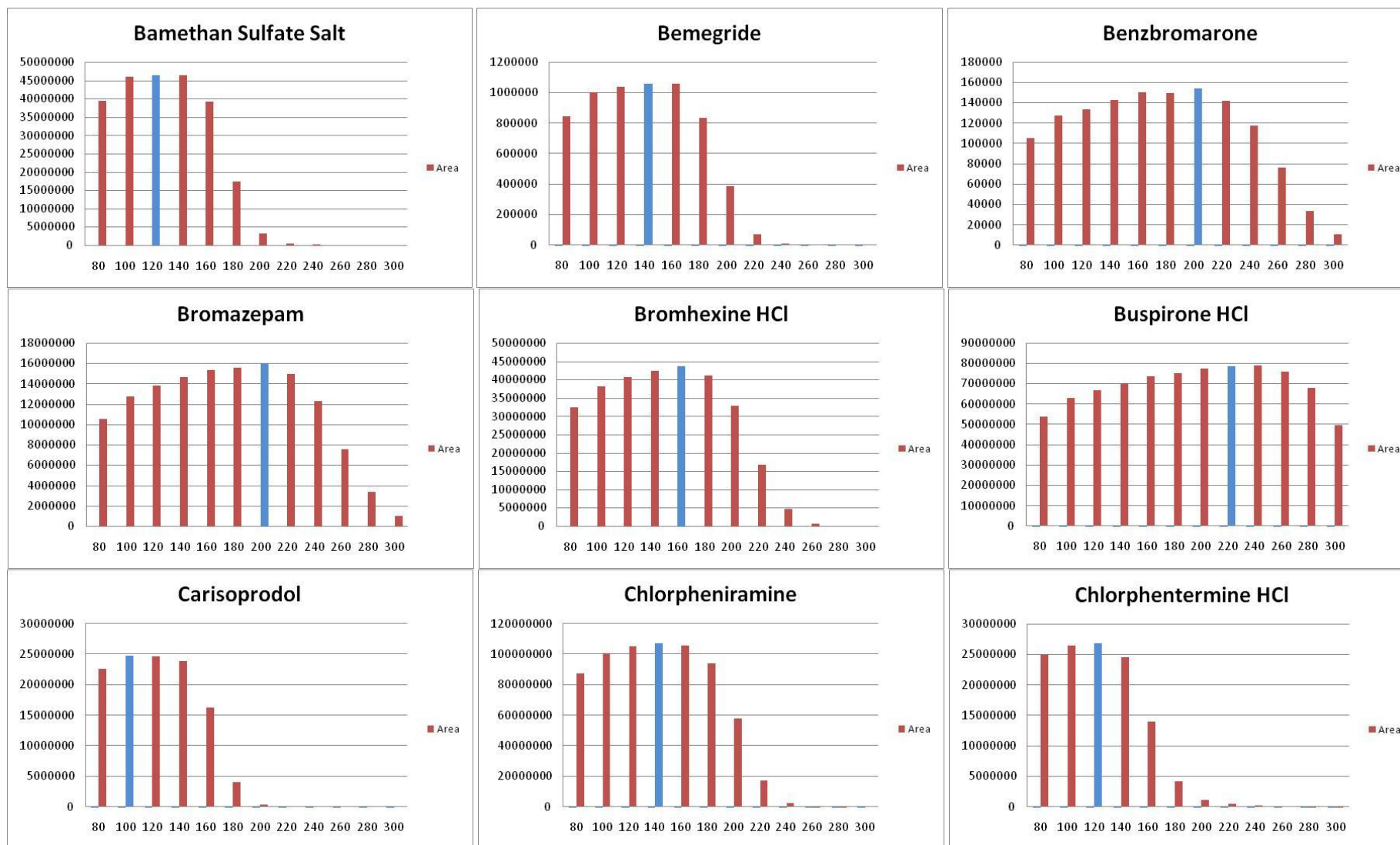
Ακρωνύμιο	Ανάπτυξη
ΑΑΣ	Αναβολικά Ανδρογόνα Στεροειδή
AAS	Androgenic Anabolic Steroids
ADC	Analogue-to-digital converter
AORC	Association of Official Racing Chemists
ARCI	Association of Racing Commissioners International
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
CI	Chemical Ionization
CID	Collision Induced Dissociation
CMR	Controlled Medication Regulations
ΔΑ	Διαλύτης Ανασύστασης
DEA	Drug Enforcement Administration
EAD	Equine Anti-Doping
EI	Electron Impact
Ε.Κ.Π.Α.	Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
ESI	Electrospray Ionization
Ε.ΣΥ.Δ.	Εθνικό Σύστημα Διαπίστευσης
EPO	Erythropoetin
FEI	Fédération Equestre Internationale
FIA	Flow Injection Analysis
GC	Gas Chromatography
GH	Growth Hormone
GHRPs	Growth Hormone Releasing Peptides
GHS	Growth Hormone Secretagogues
GHRH	Growth Hormone-Releasing Hormone
GnRH	Gonadotropins Releasing Hormones
hGH	human Growth Hormone
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IFHA	International Federation of Horseracing Authorities
ISL	International Standard for Laboratories
ISO	International Organisation of Standardization
ISTD	International Standard
ITR	Intergrating Transient Records
ΚΝΣ	Κεντρικό Νευρικό Σύστημα
LC	Liquid Chromatography
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
MCP	Multi-channel Plate Detector
ME	Matrix Effects
ΜΣΑΦ	Μη Στεροειδή Αντιφλεγμονώδη Φάρμακα
MRPL	Minimun Required Performance Limit
MS	Mass Spectrometry

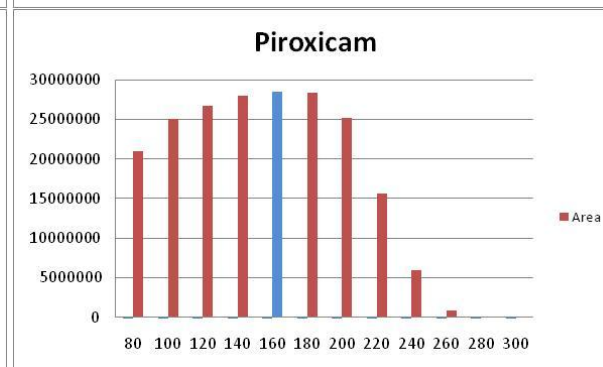
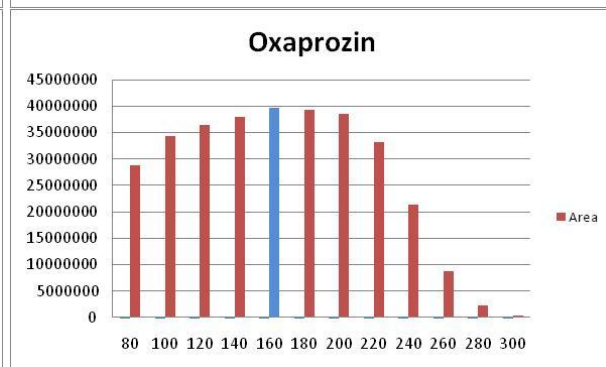
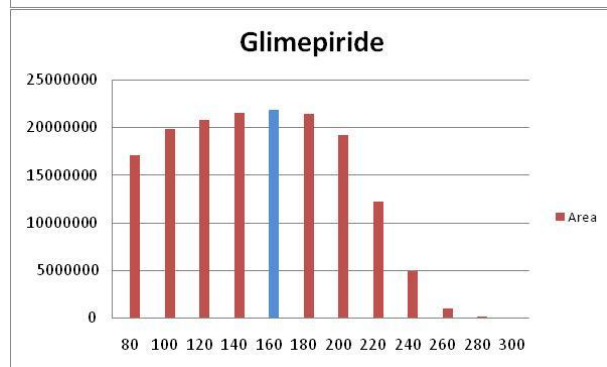
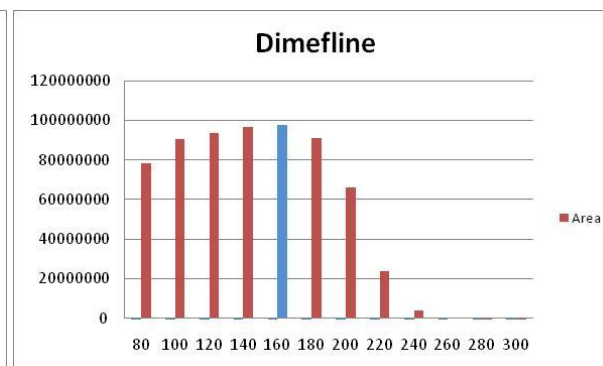
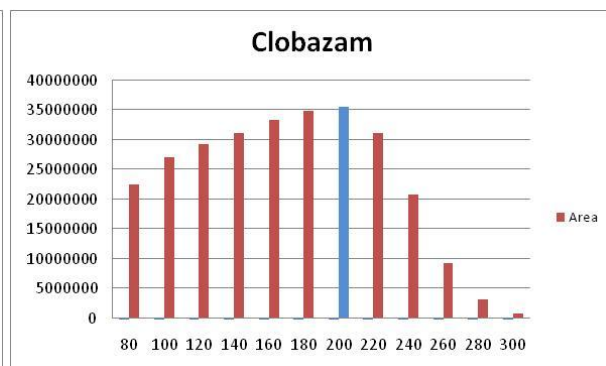
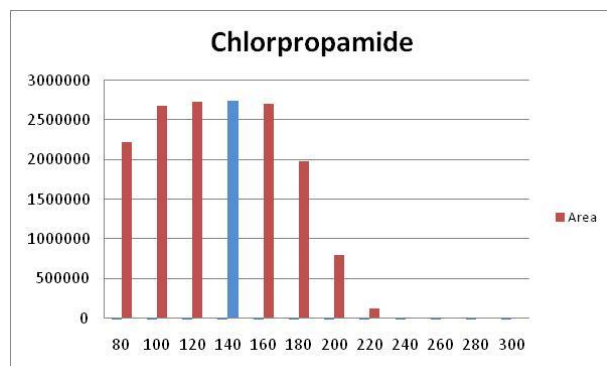
Ακρωνύμιο	Ανάπτυξη
MS/MS	Mass Spectrometry/Mass Spectrometry
M.T.	Μοριακός Τύπος
NSAIAs	Non Steroidal Anti Inflammatory Agents/Analgesics
NSAIDs	Non Steroidal Anti Inflammatory Drugs
NSAIMs	Non Steroidal Anti Inflammatory Medicines
O.A.K.A.	Ολυμπιακό Αθλητικό Κέντρο Αθηνών
PMT	Photomultiplier tube
Q, q	Quadrupole
R	Resolution
RE	Recovery
rBGH	recombinant Bovine Growth Hormone
rGH	recombinant Growth Hormone
rhGH	recombinant human Growth Hormone
RRT	Relative Retention Time
RT	Retention Time
S/N	Signal-to-Noise
TDC	Time-to-Digital Converters
TOF	Time Of Flight
UHPLC	Ultra High Performance Liquid Chromatography
WADA	World Anti Doping Agency

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1

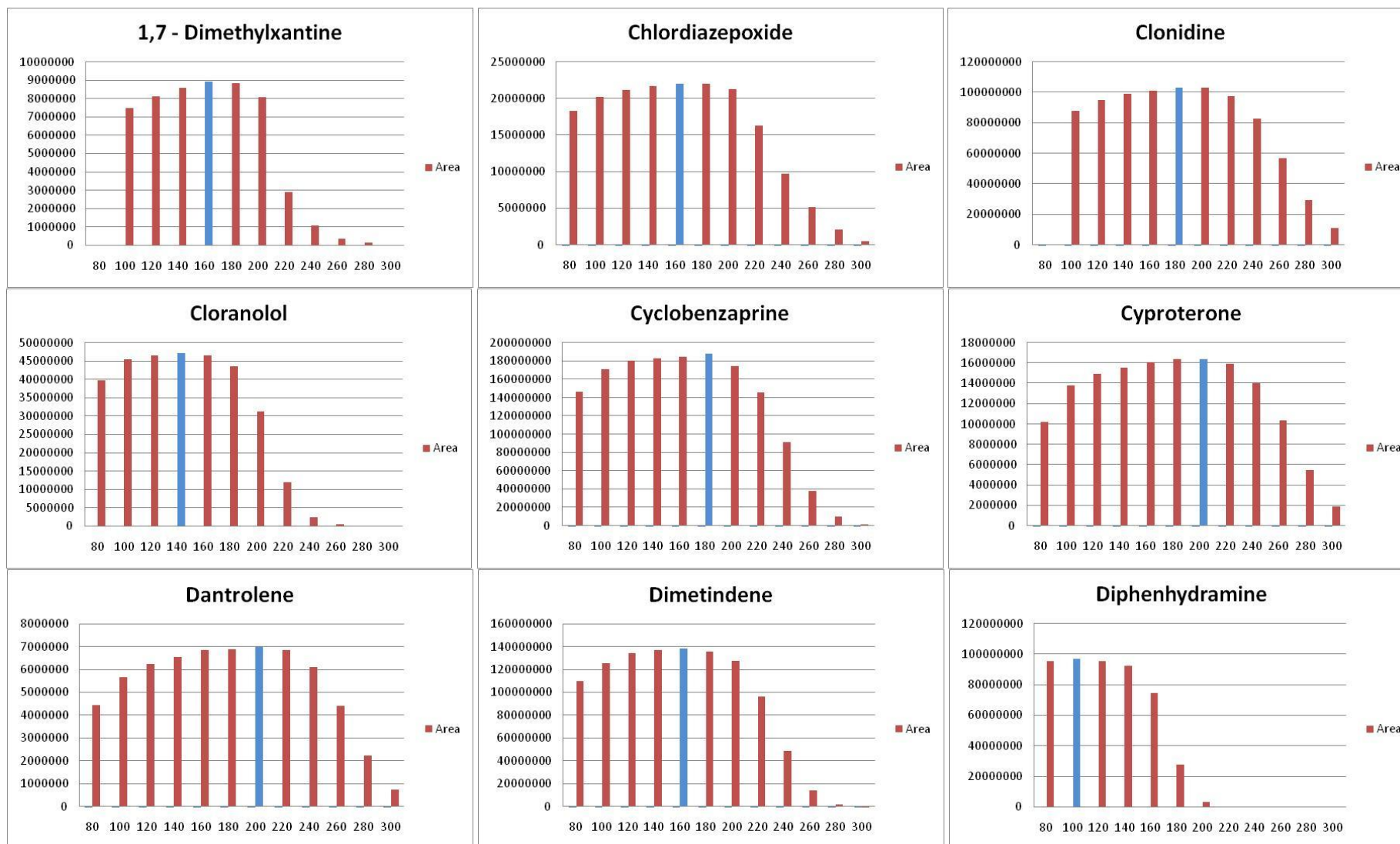
Διαγράμματα επιλογής βέλτιστου δυναμικού (fragmentor) για τις ουσίες του CALH1

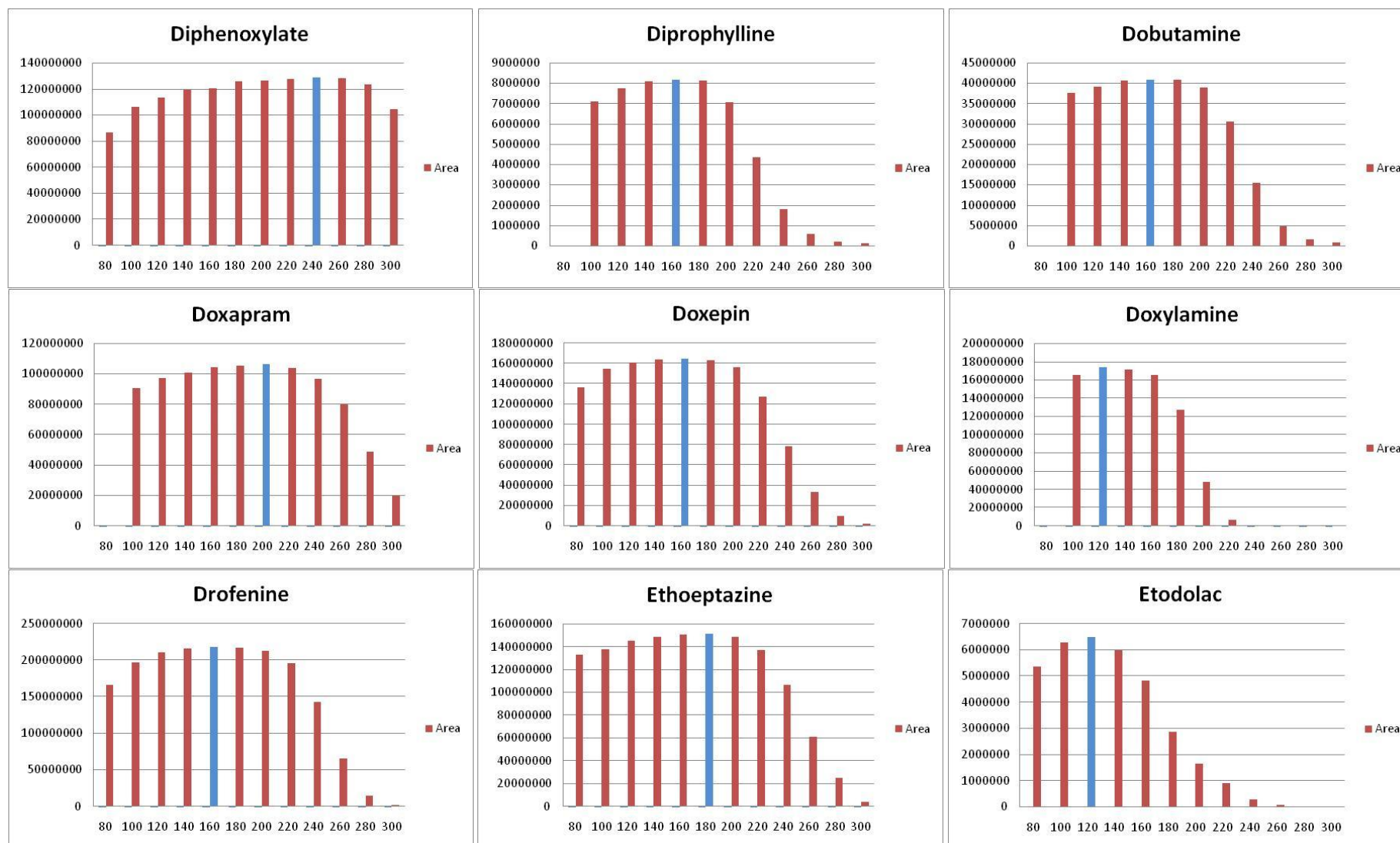


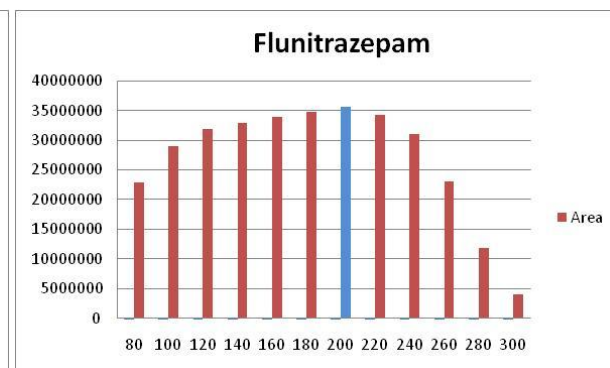
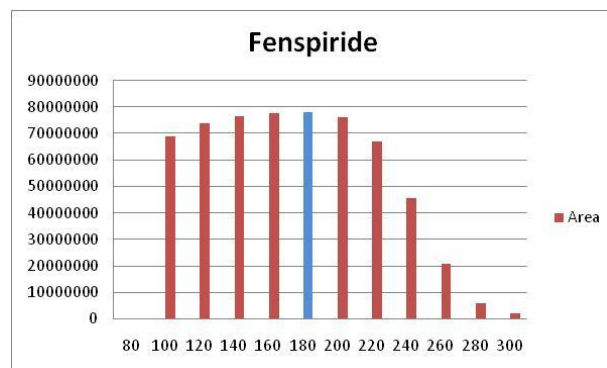




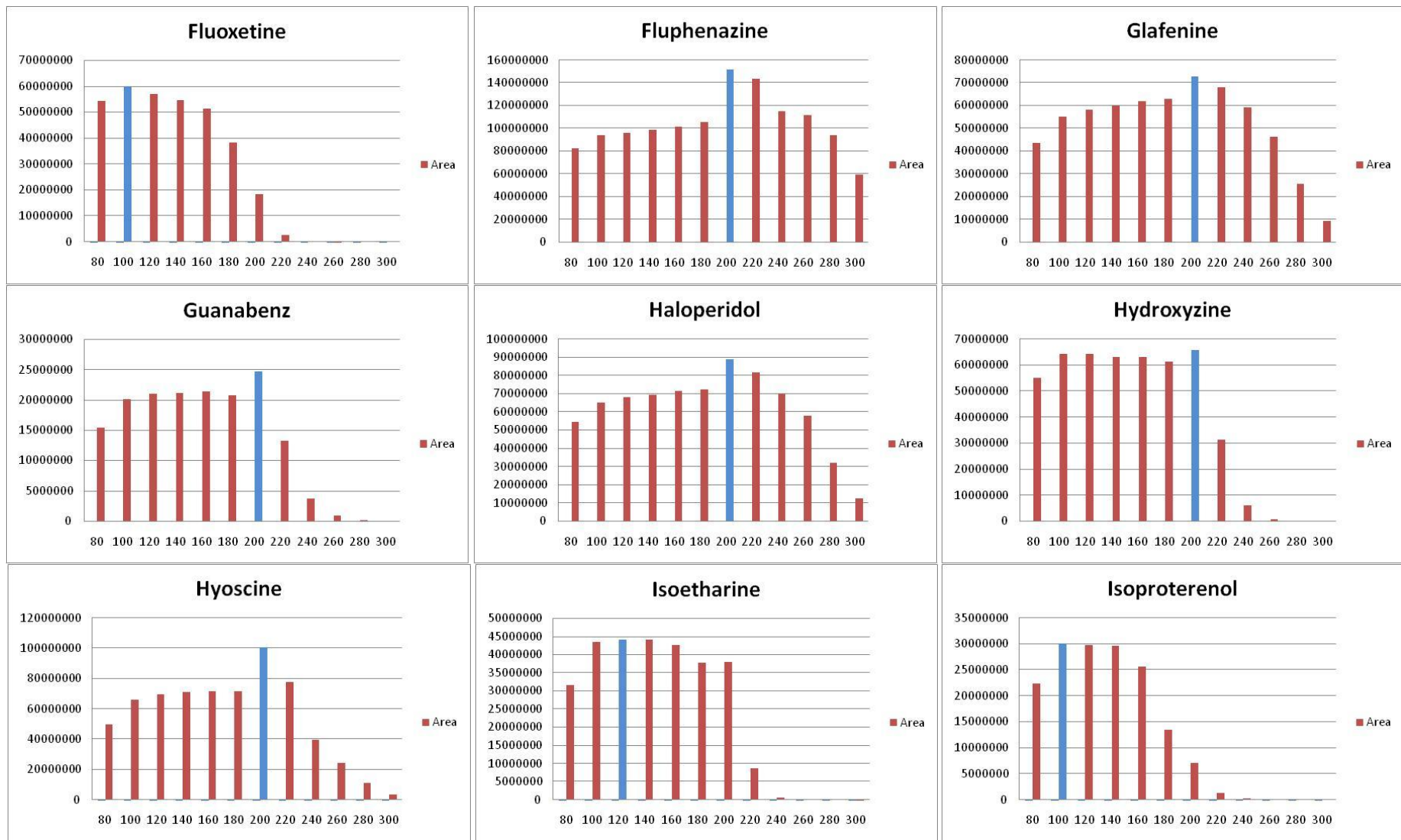
Διαγράμματα επιλογής βέλτιστου δυναμικού (fragmentor) για τις ουσίες του CALH2

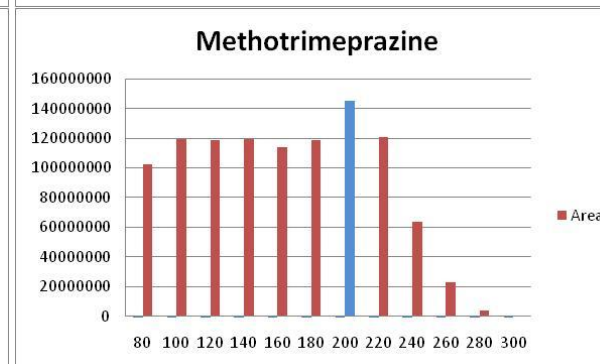
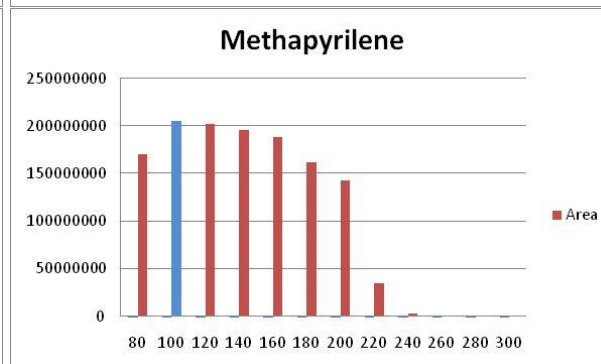
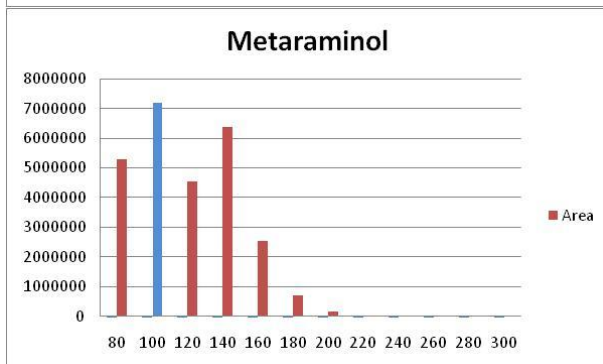
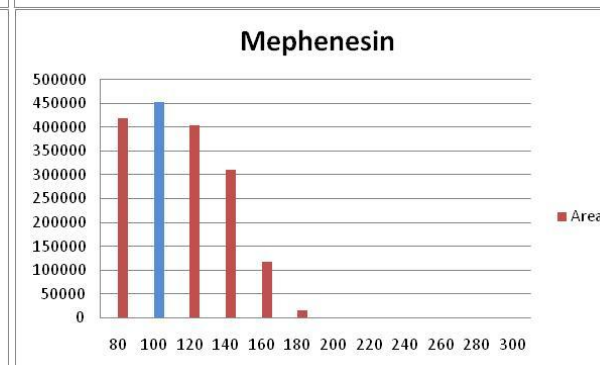
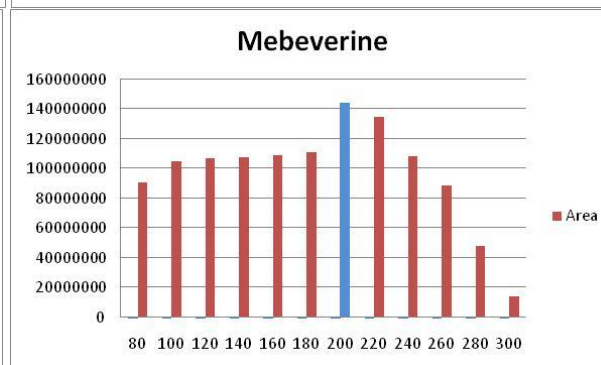
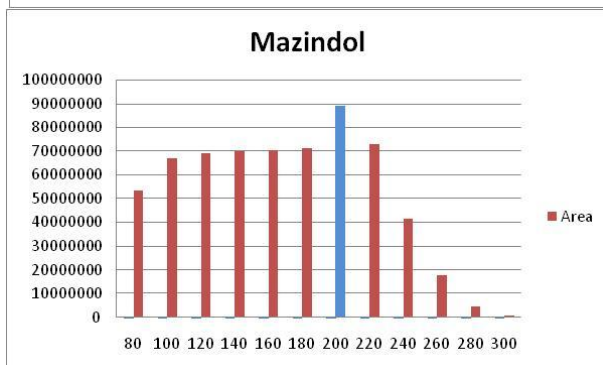
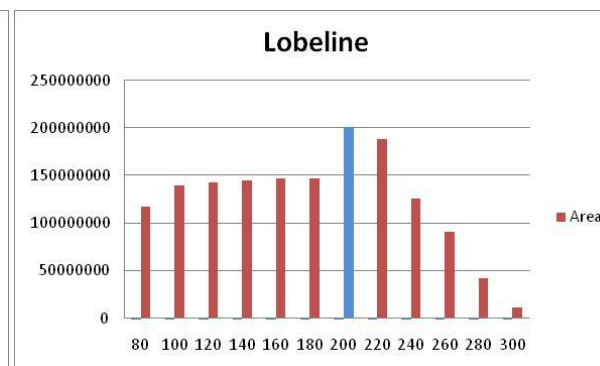
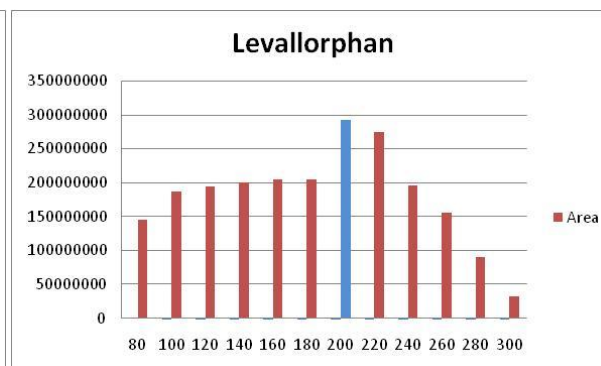
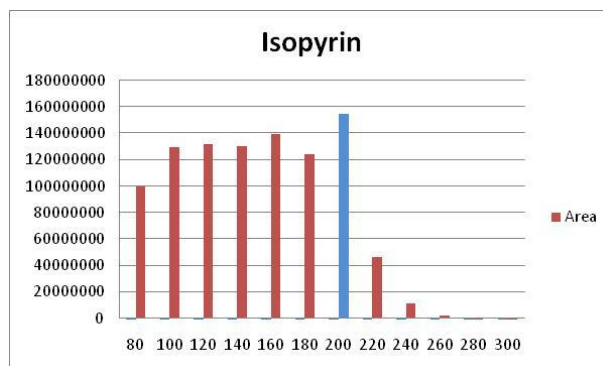


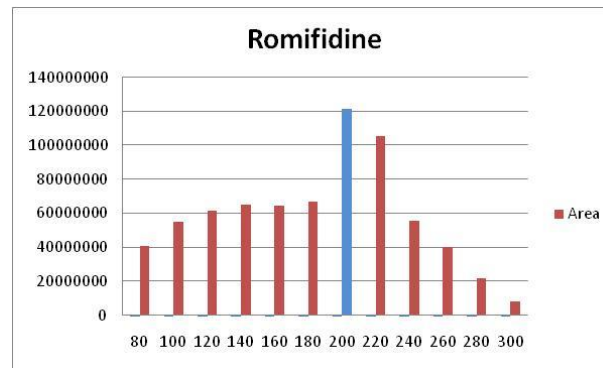




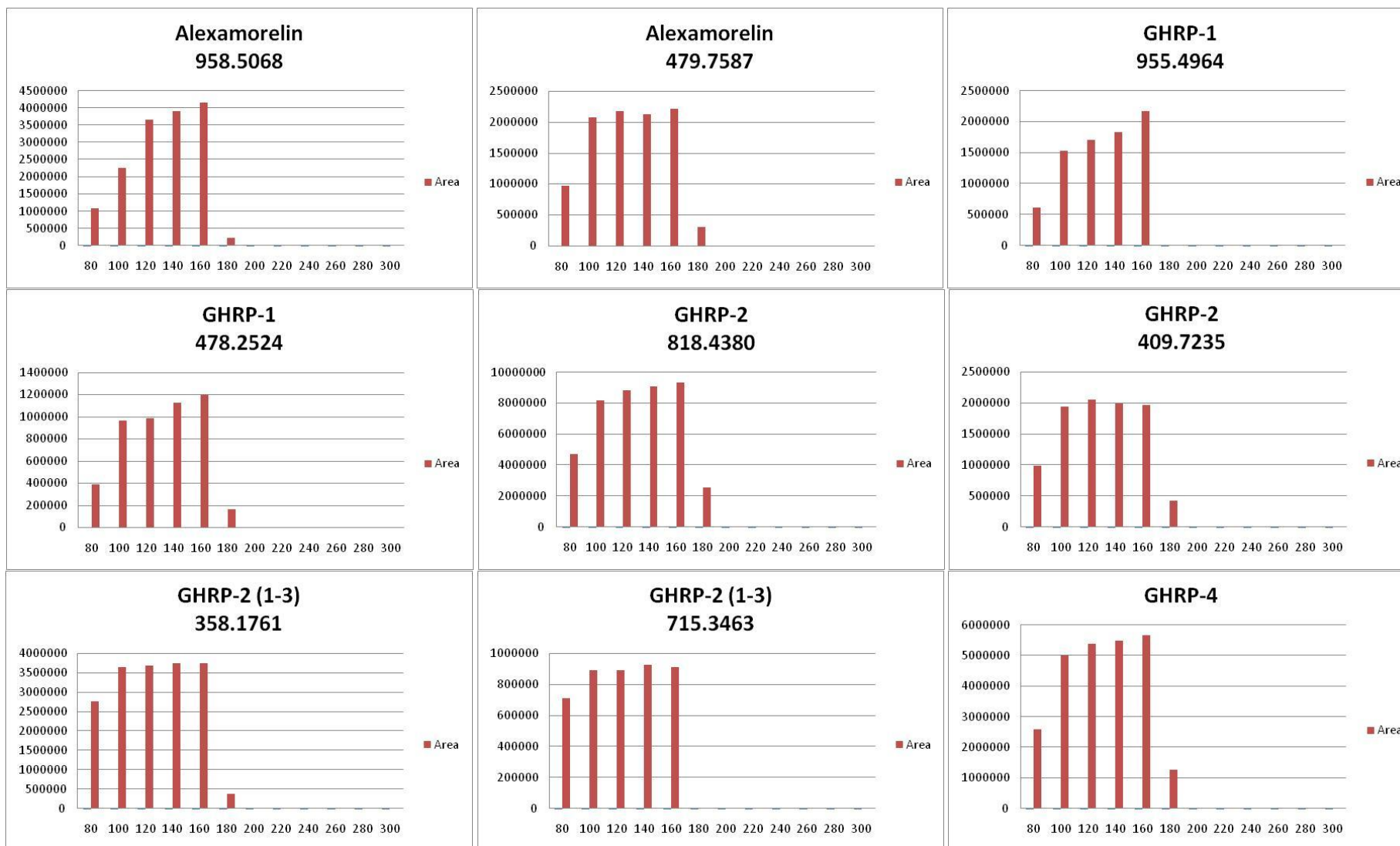
Διαγράμματα επιλογής βέλτιστου δυναμικού (fragmentor) για τις ουσίες του CALH3

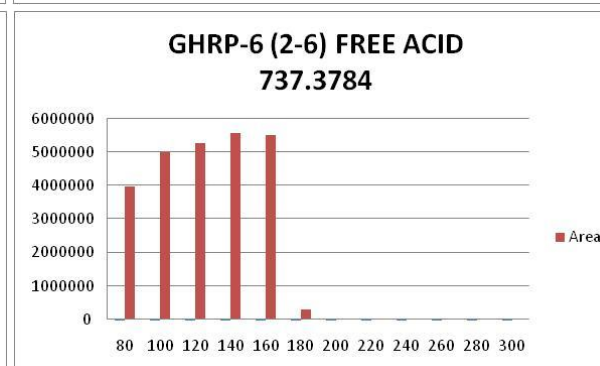
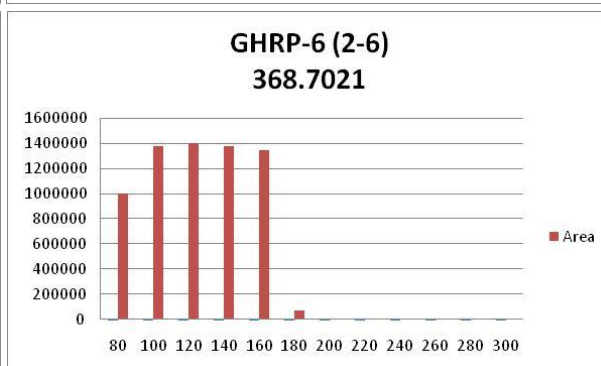
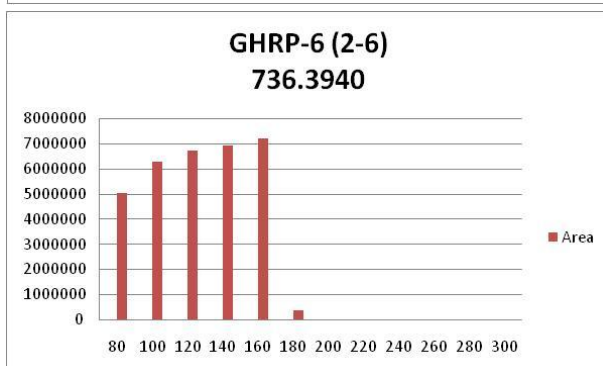
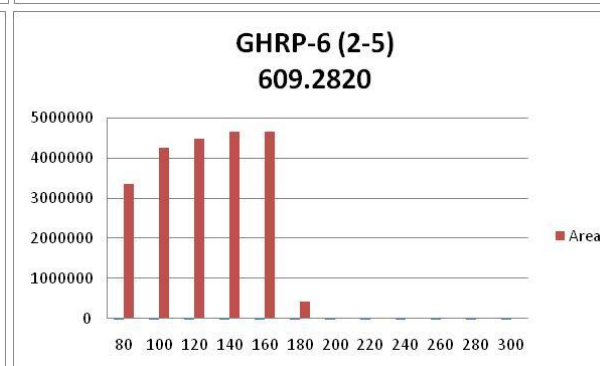
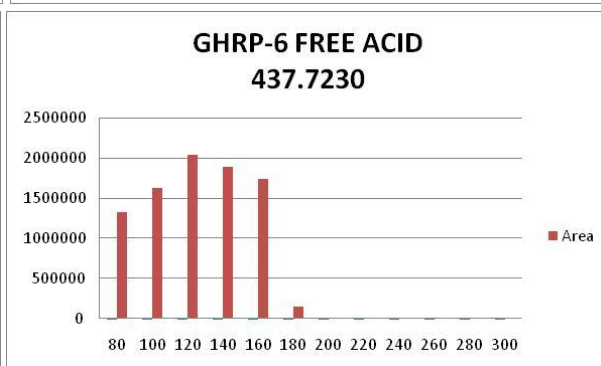
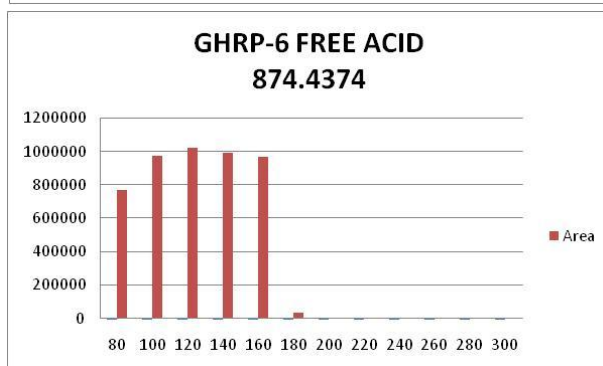
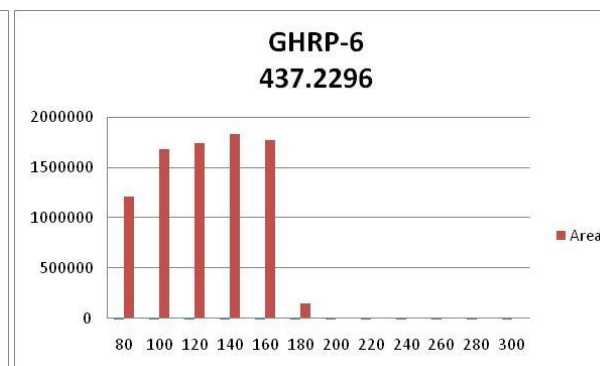
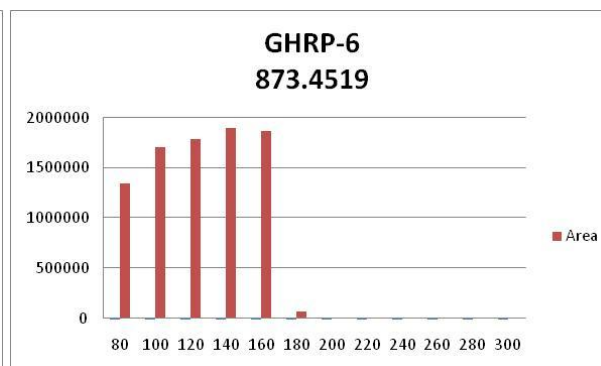
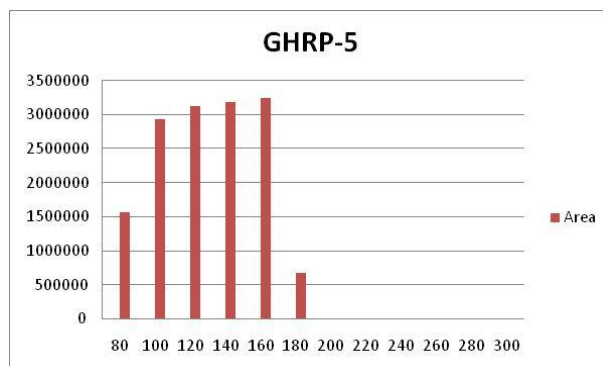


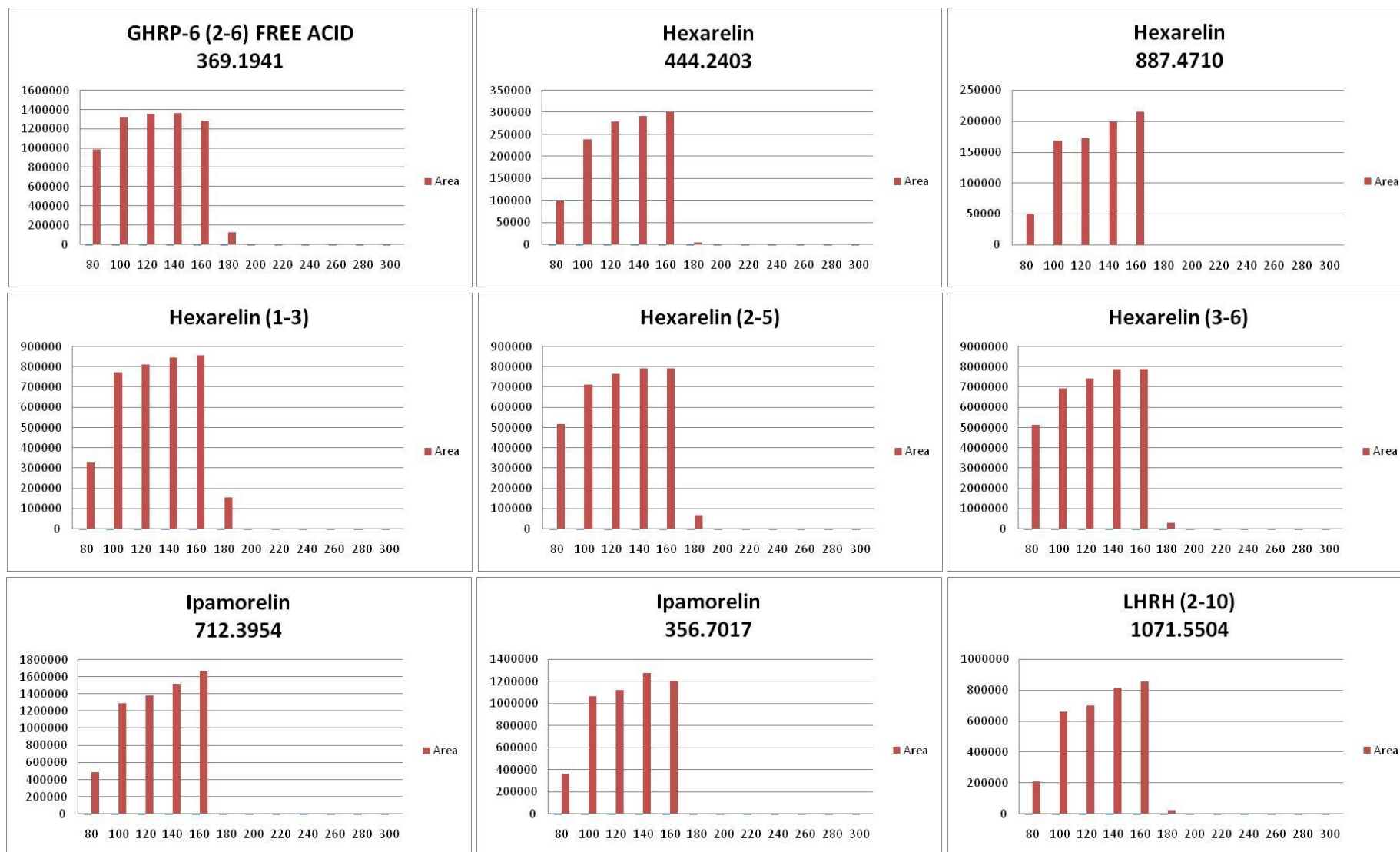


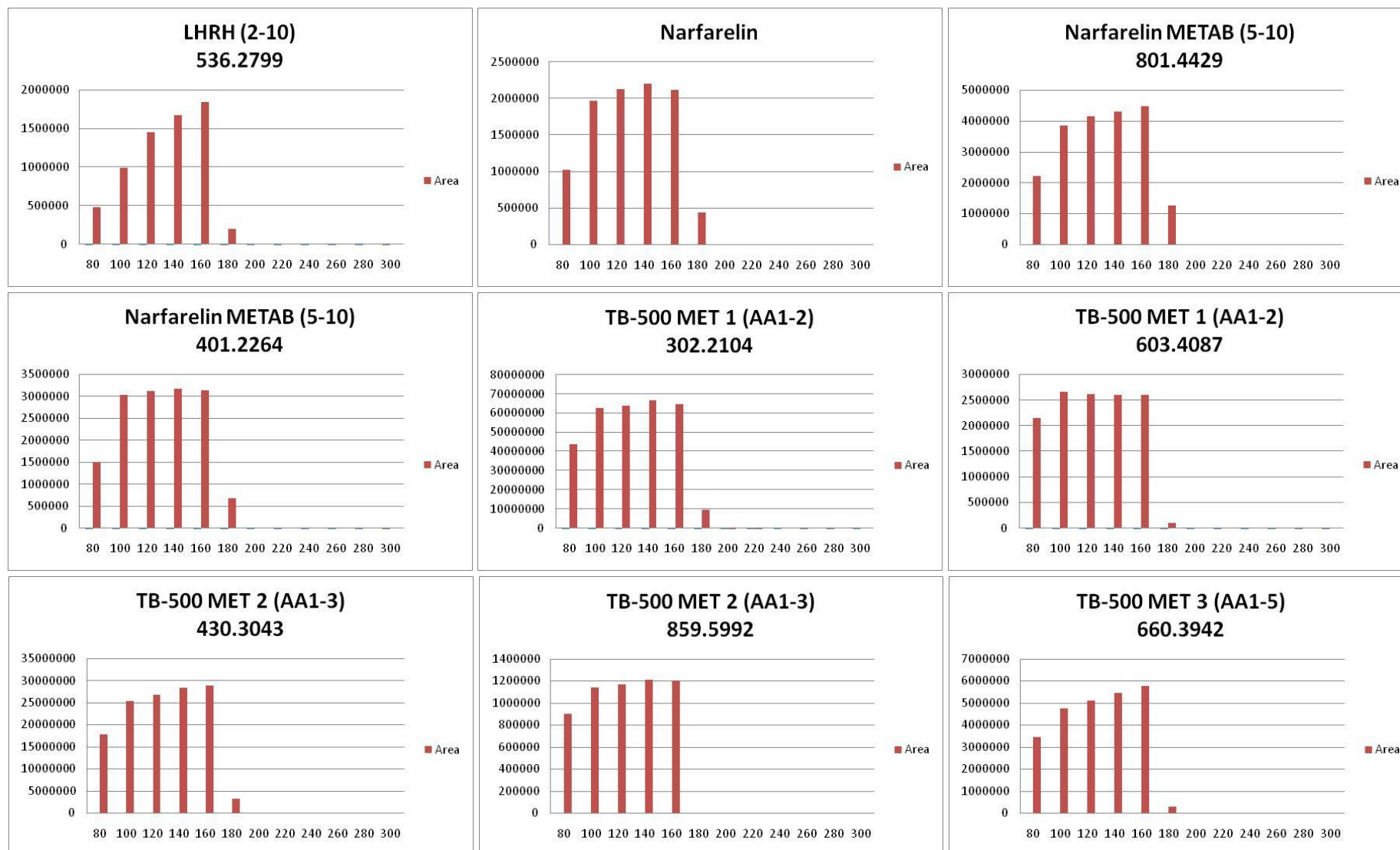


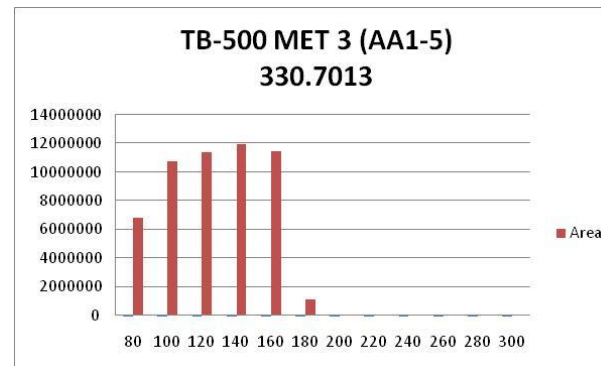
Διαγράμματα επιλογής βέλτιστου δυναμικού (fragmentor) για τα Πεπτίδια





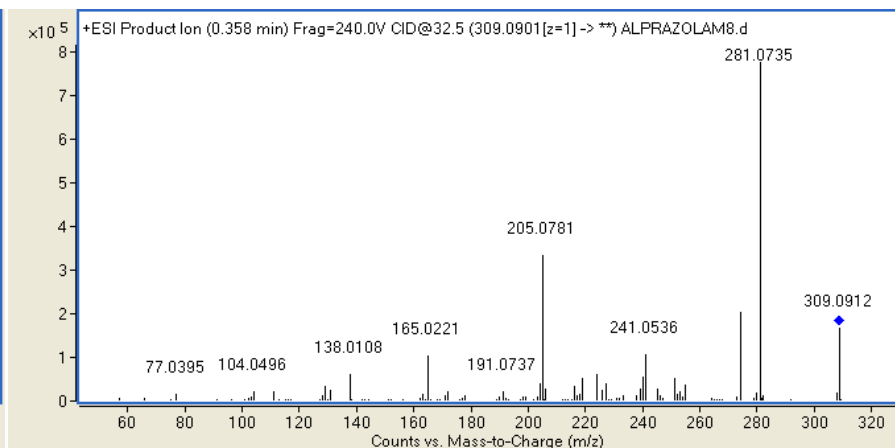
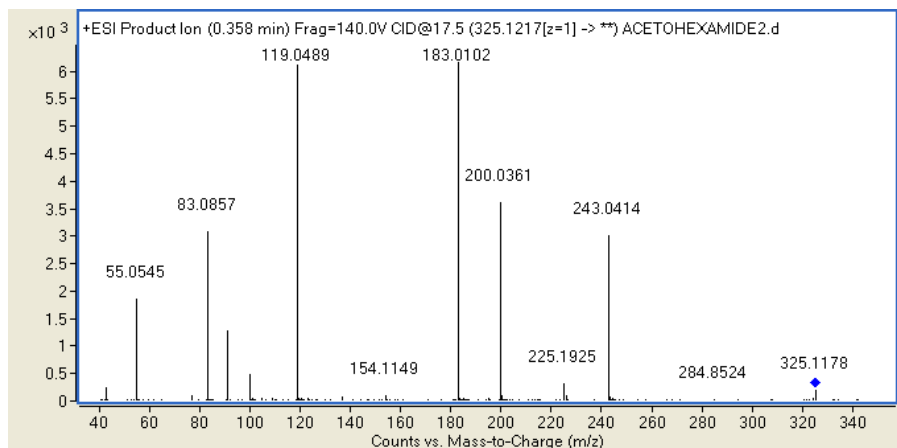
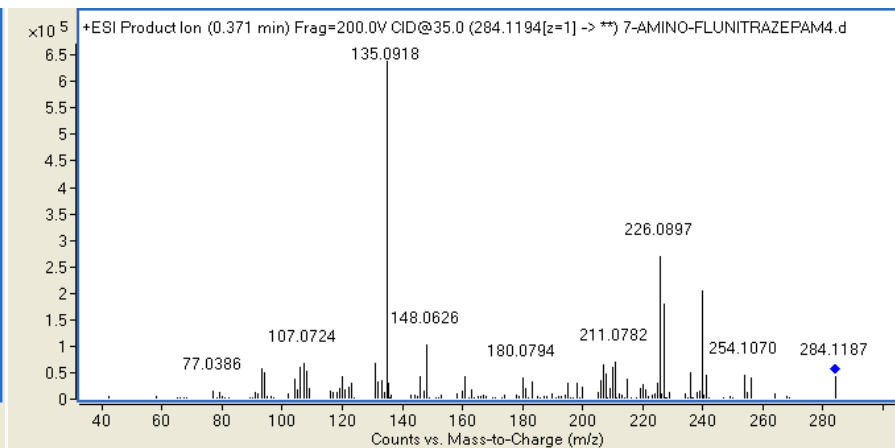
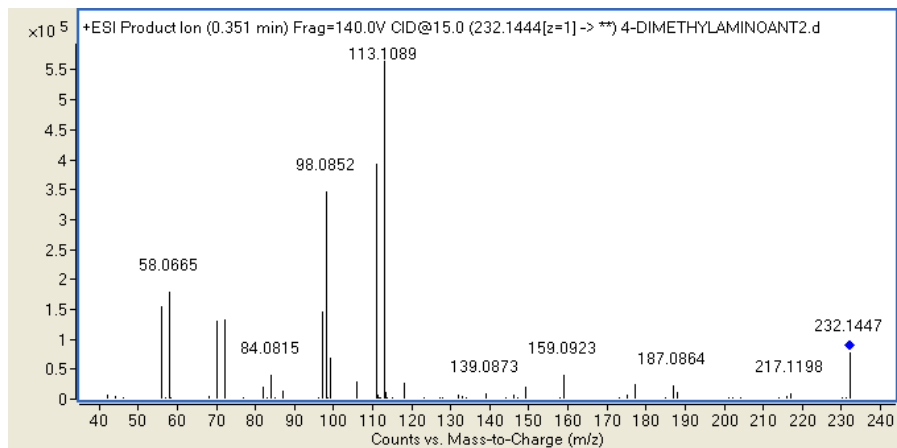


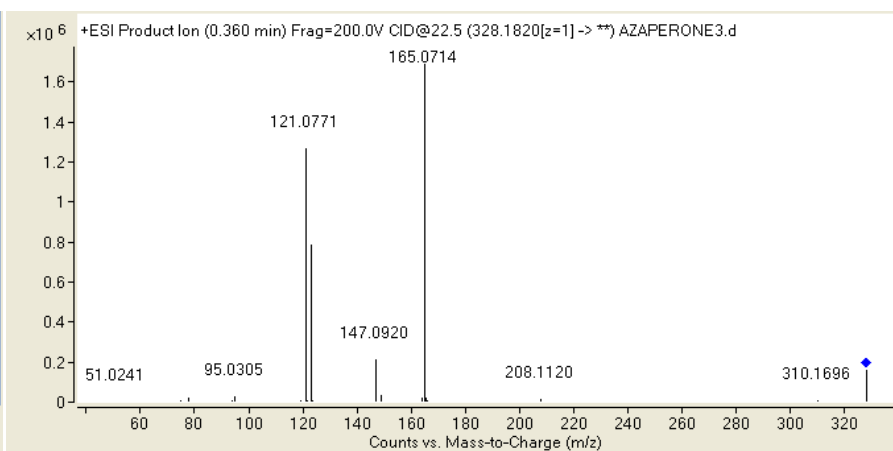
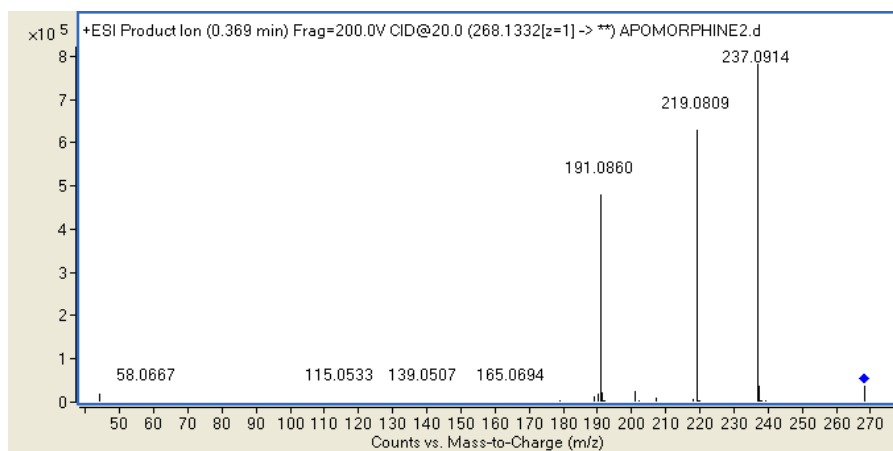
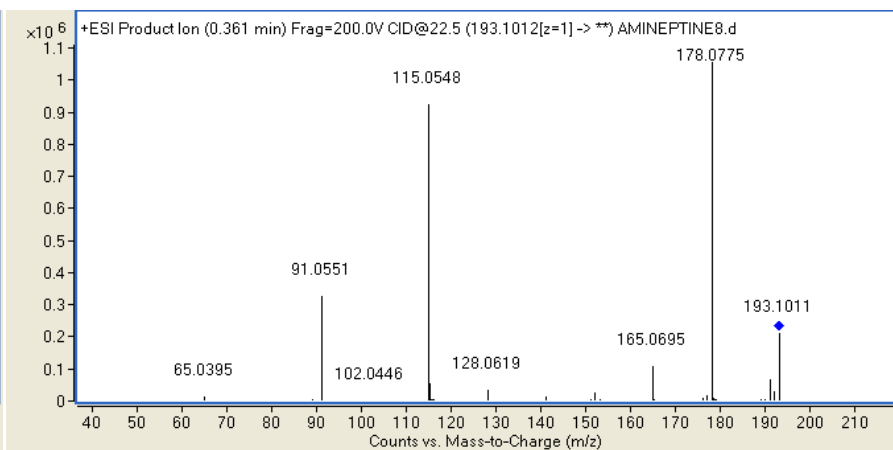
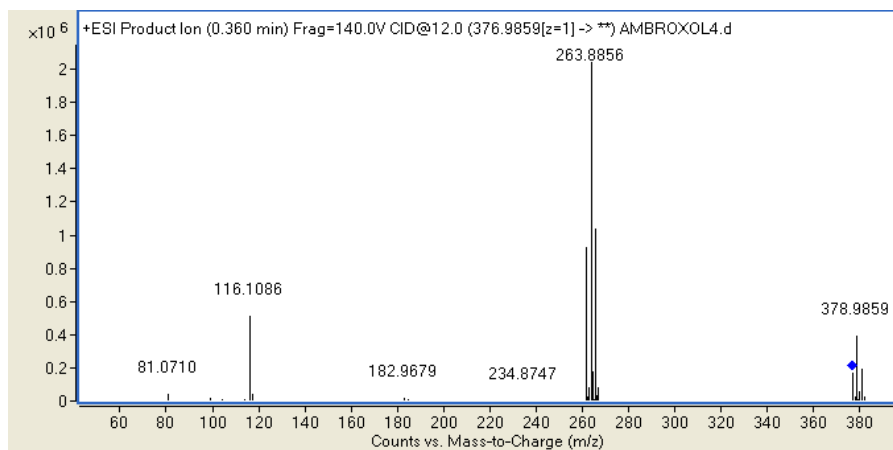


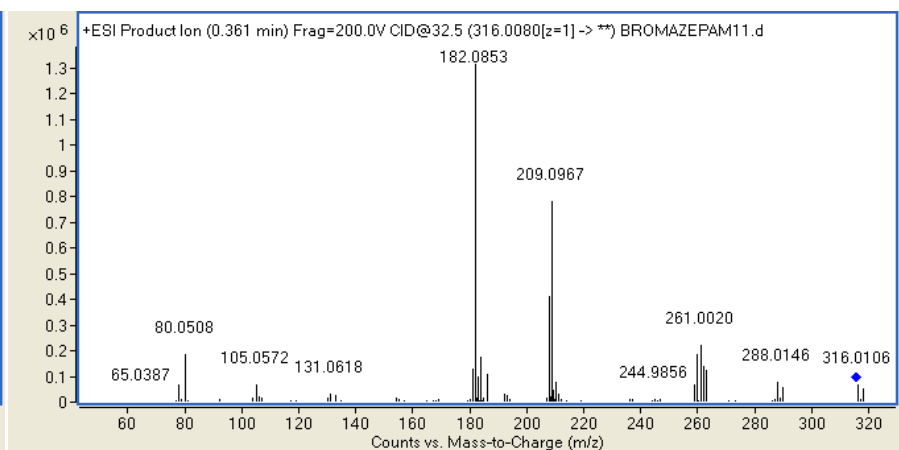
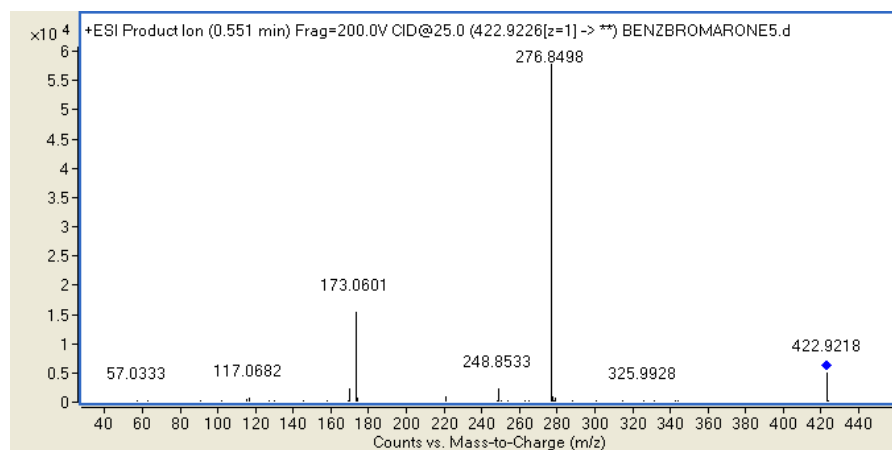
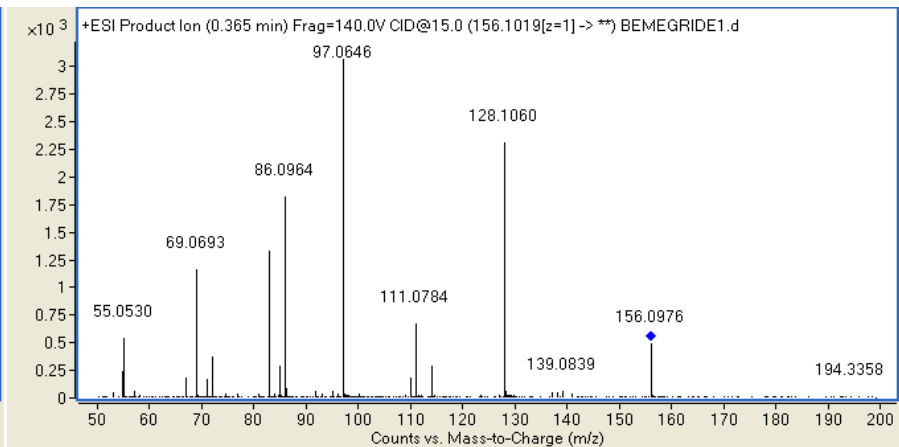
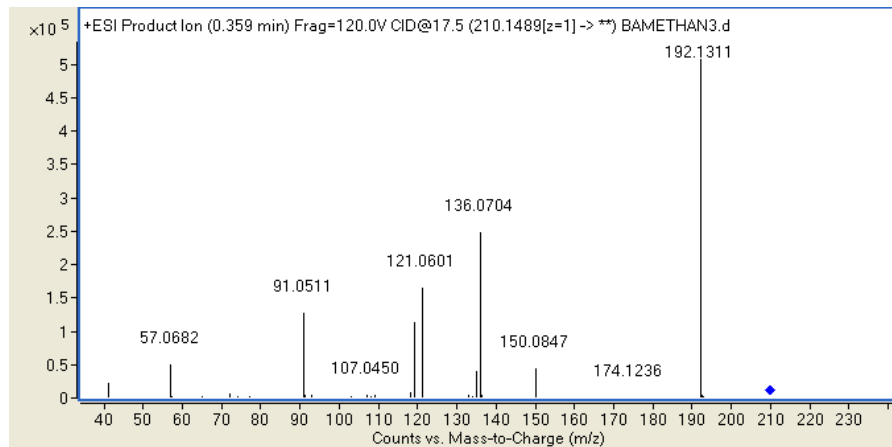


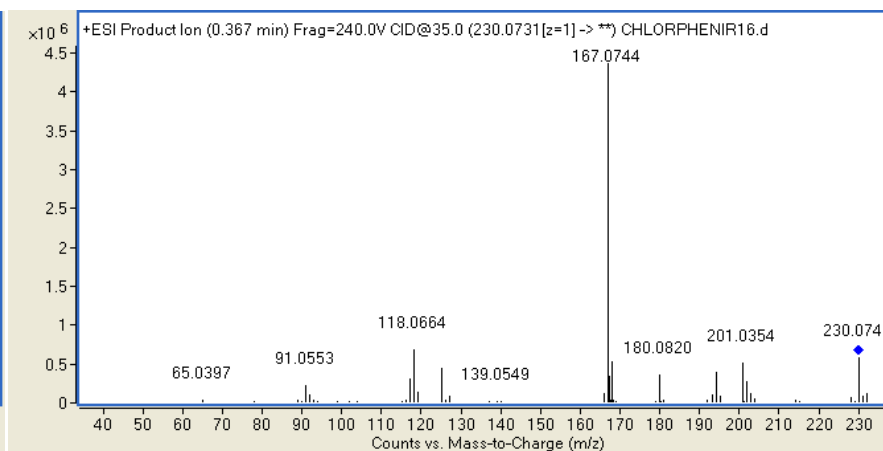
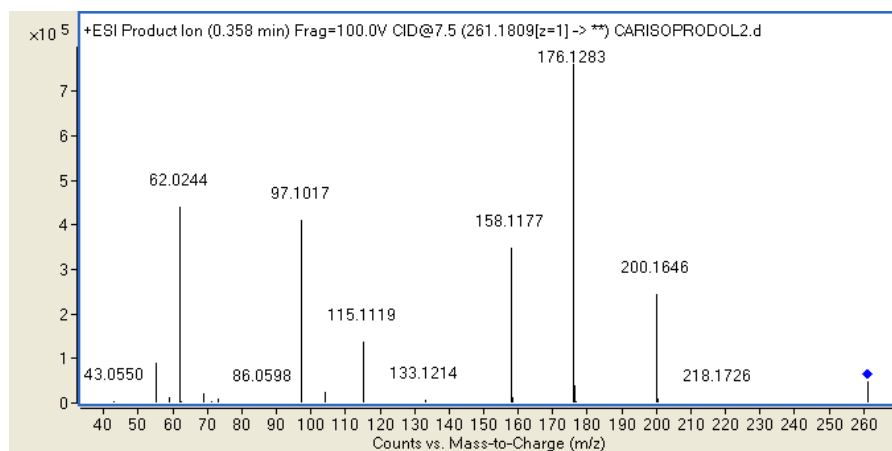
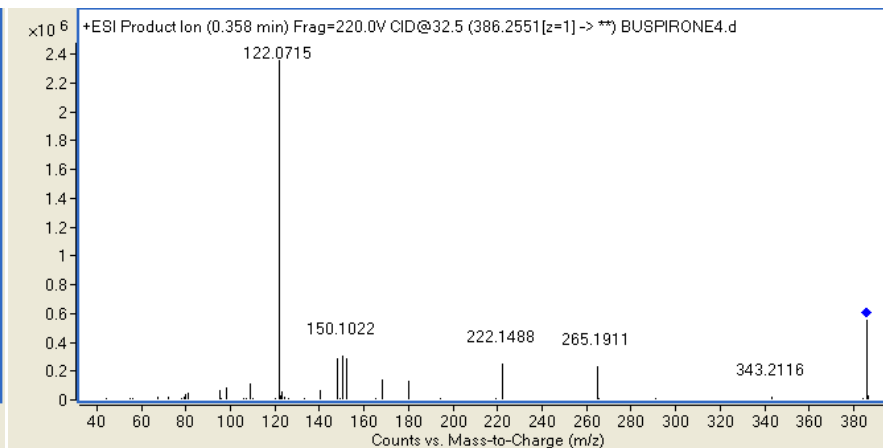
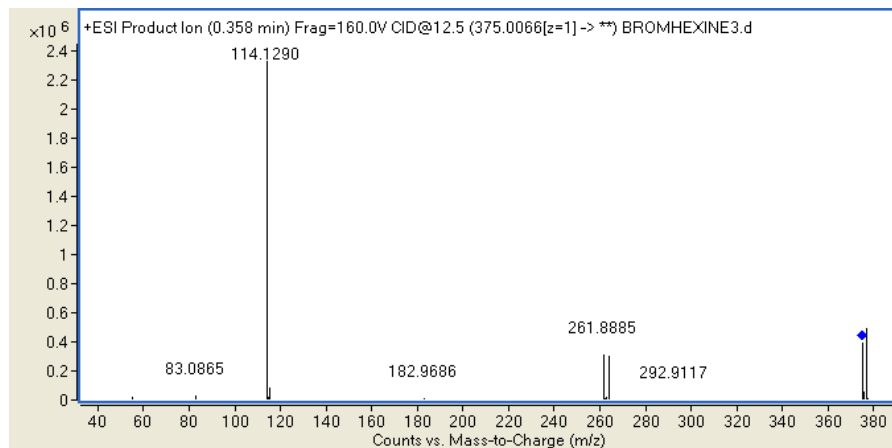
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2

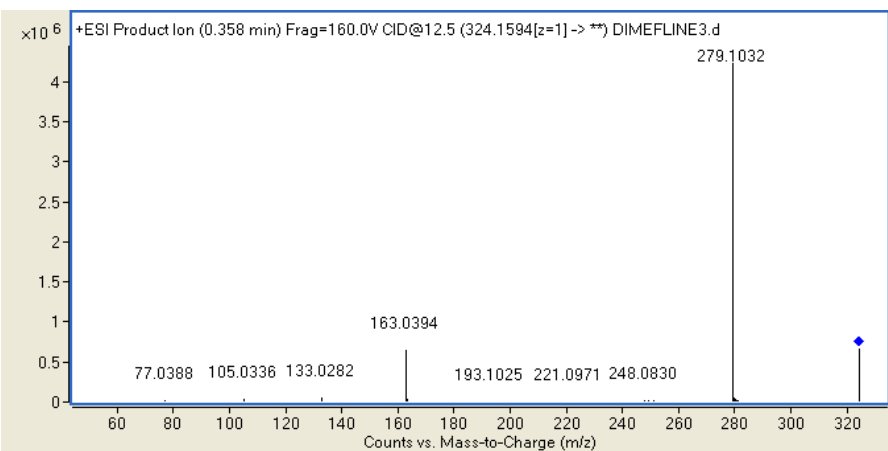
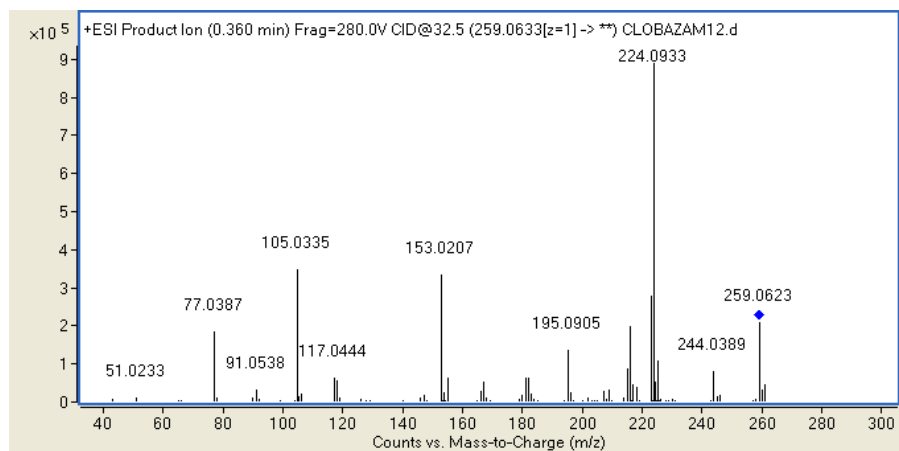
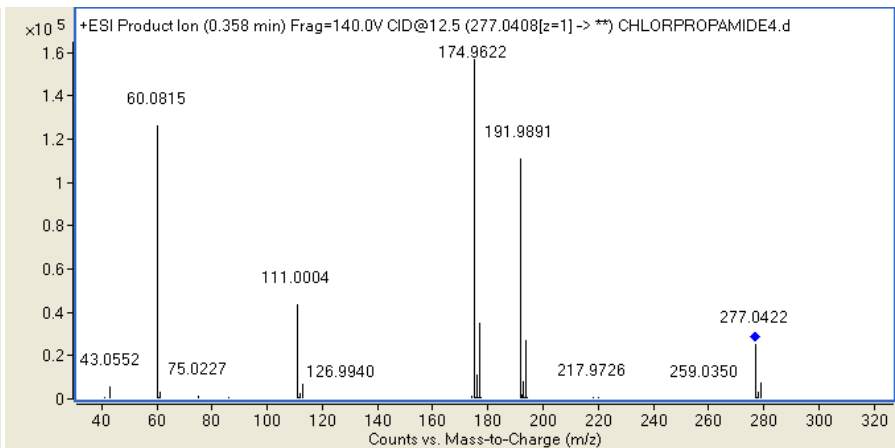
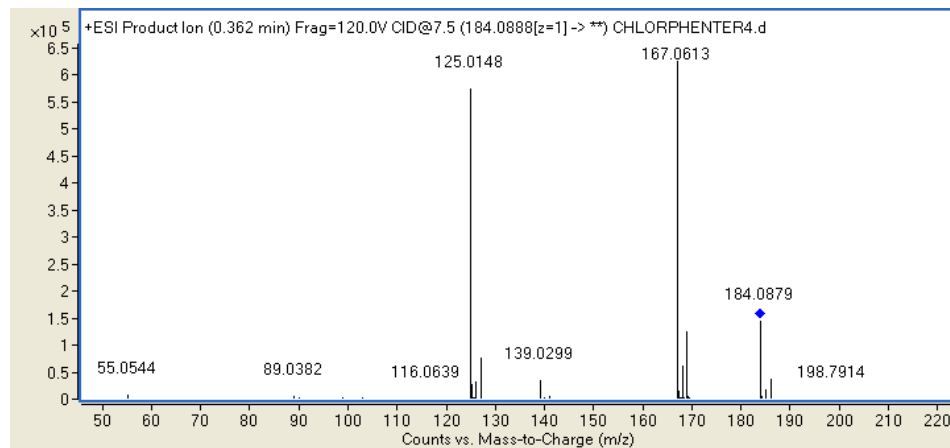
Φάσματα επιλογής βέλτιστης ενέργειας συγκρούσεως για το CALH1

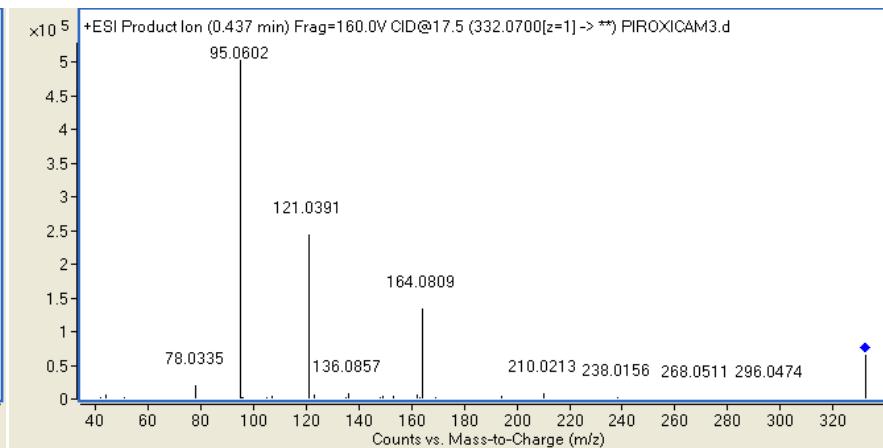
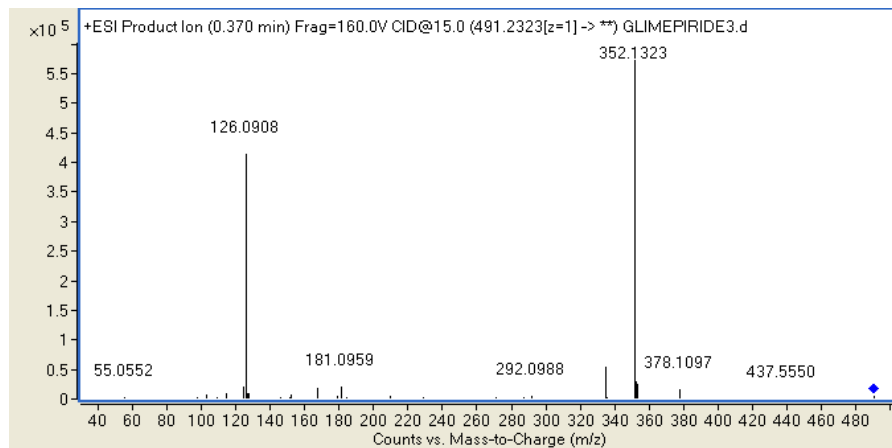




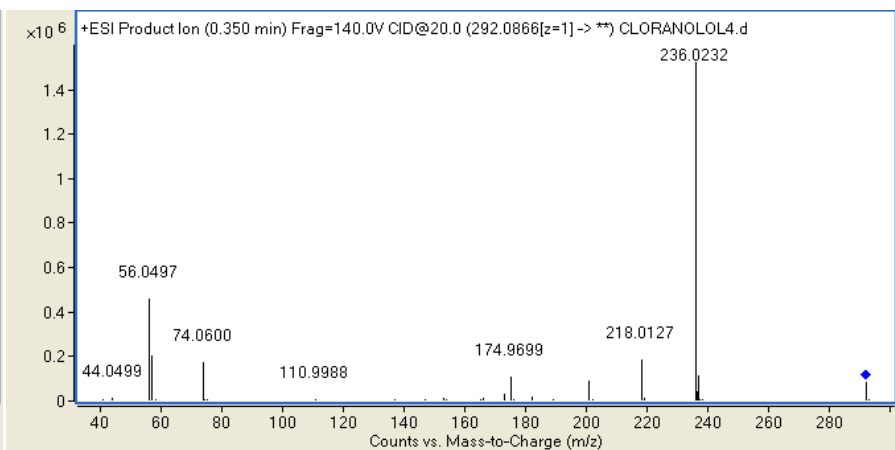
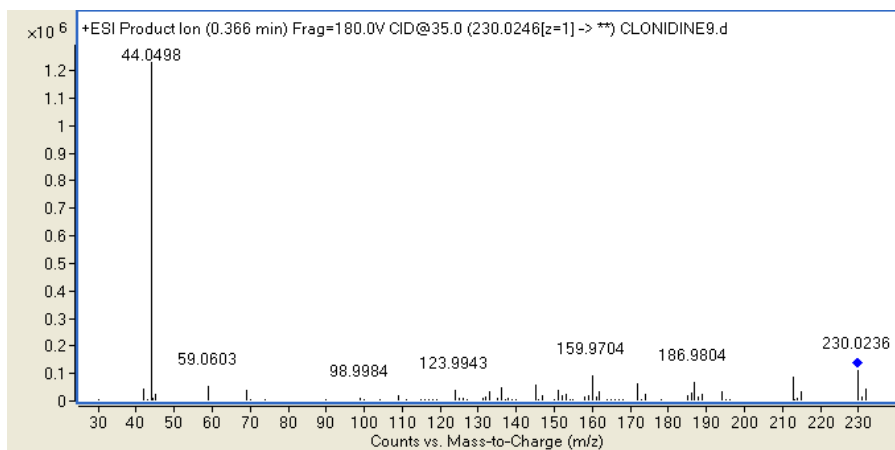
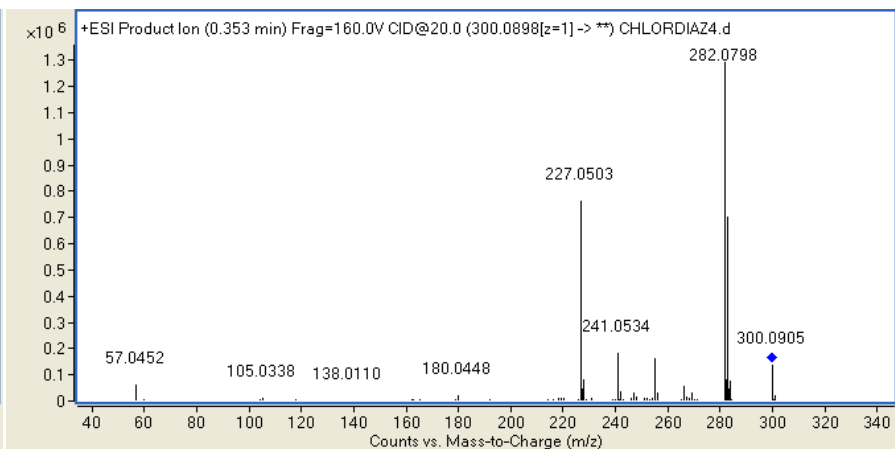
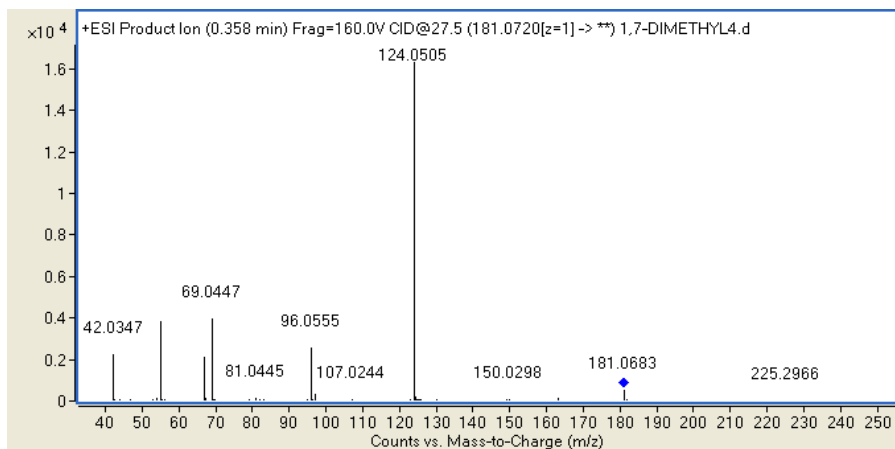


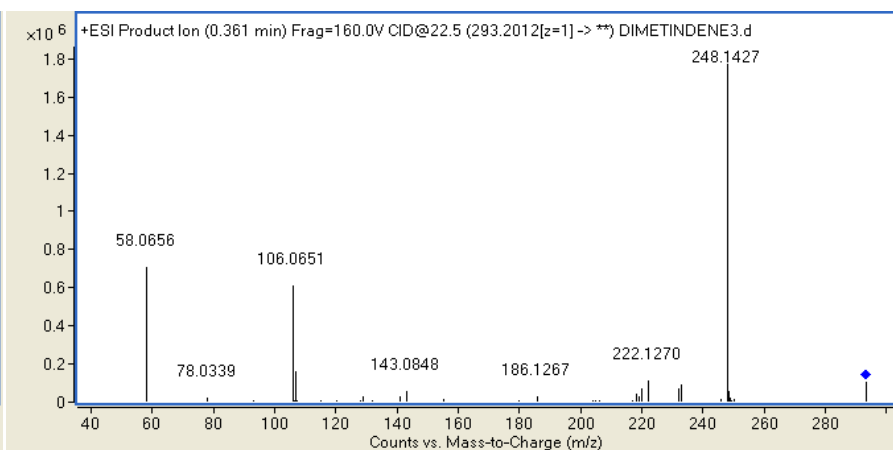
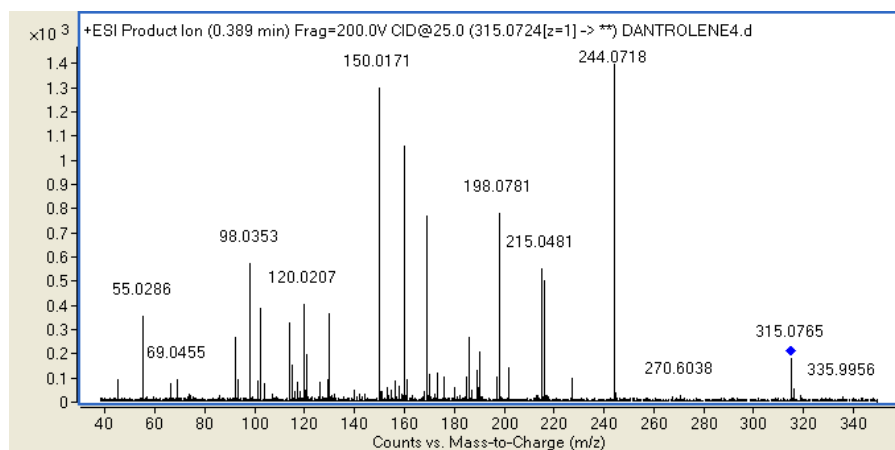
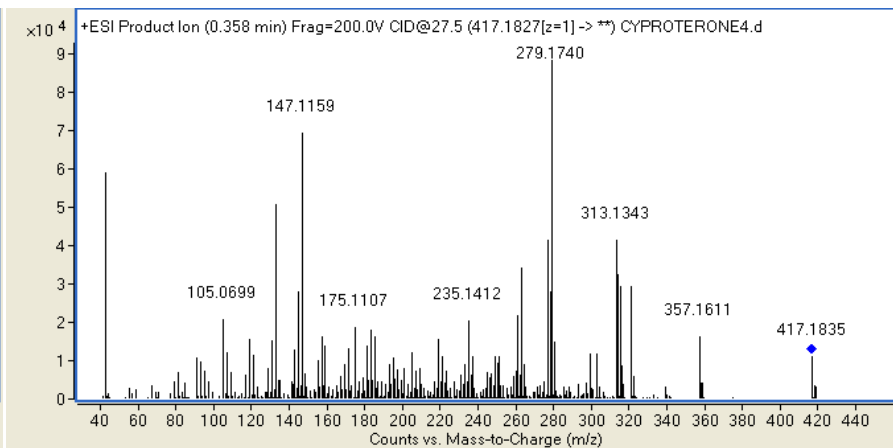
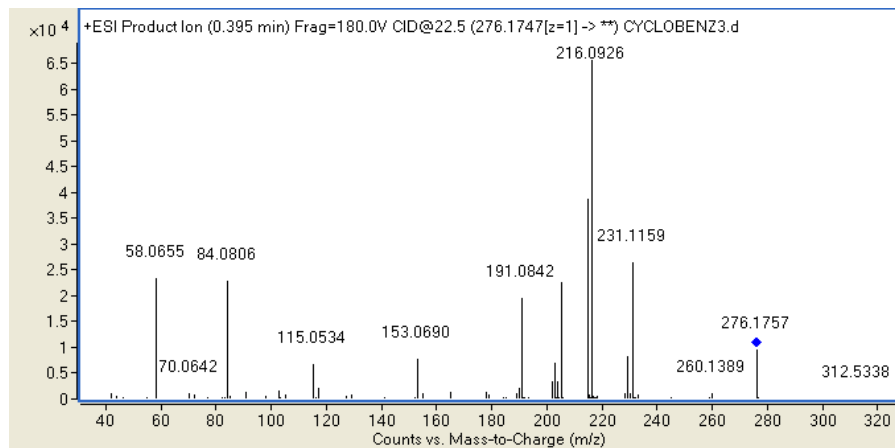


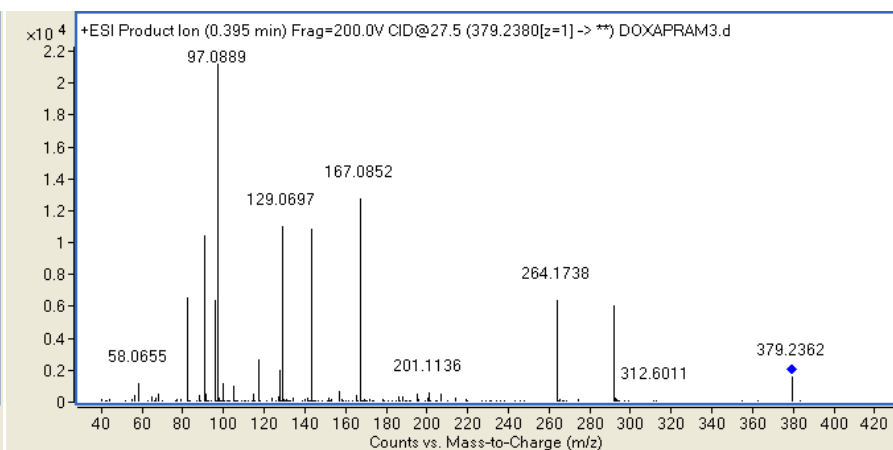
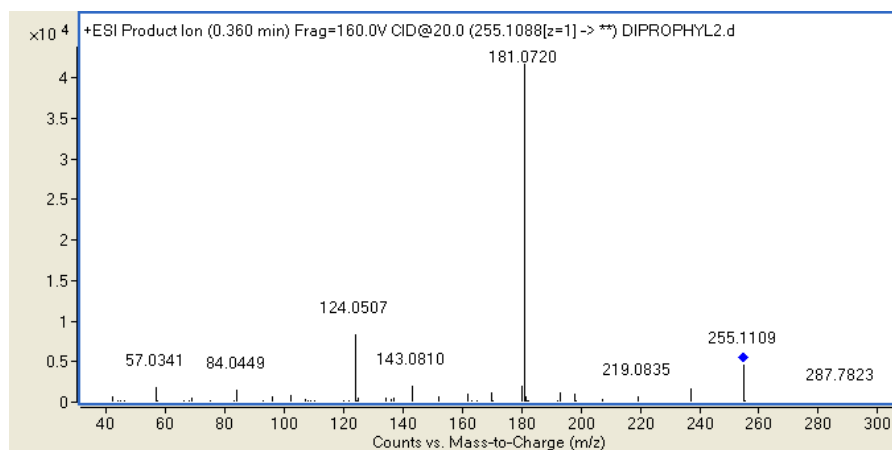
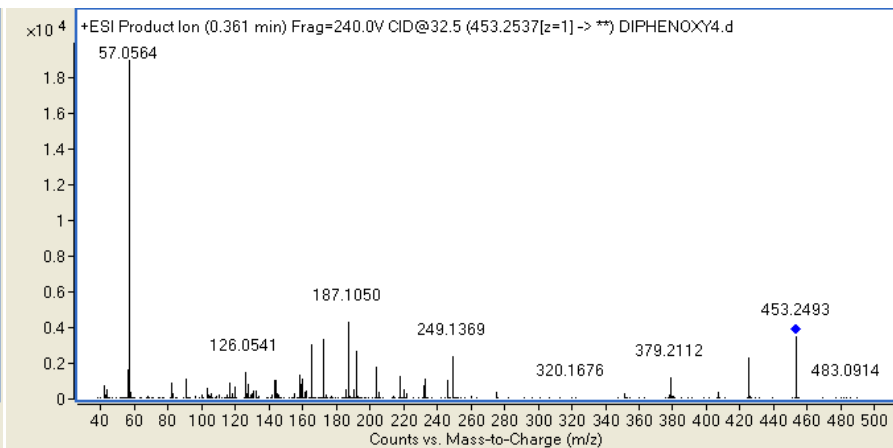
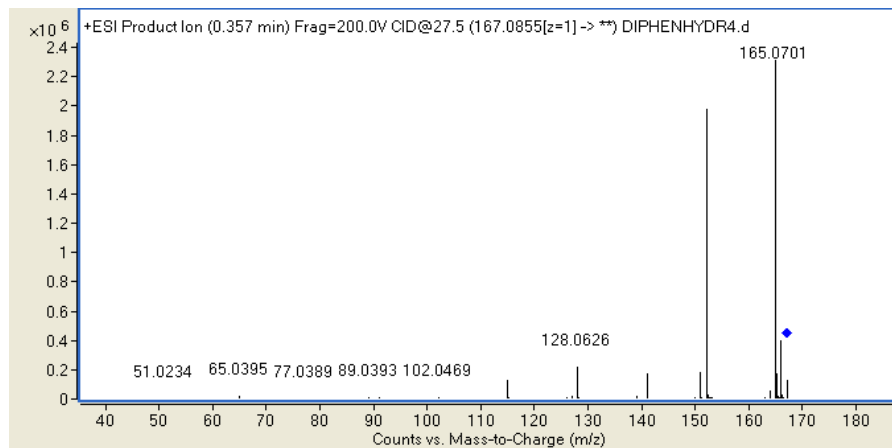


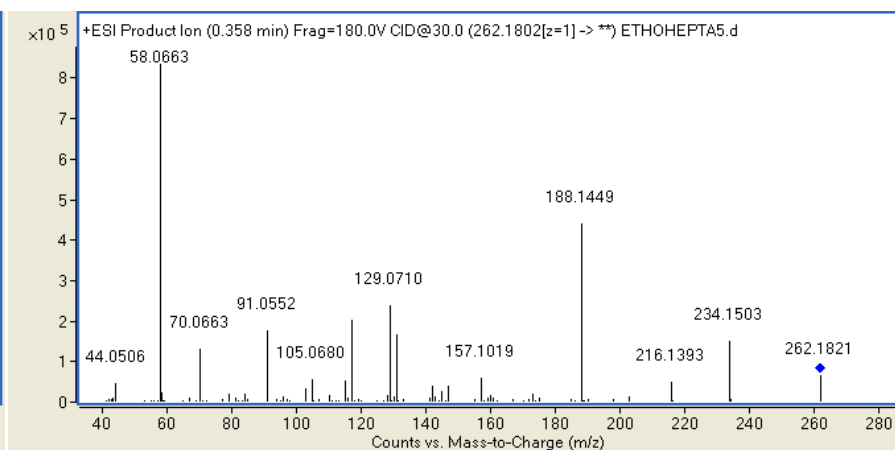
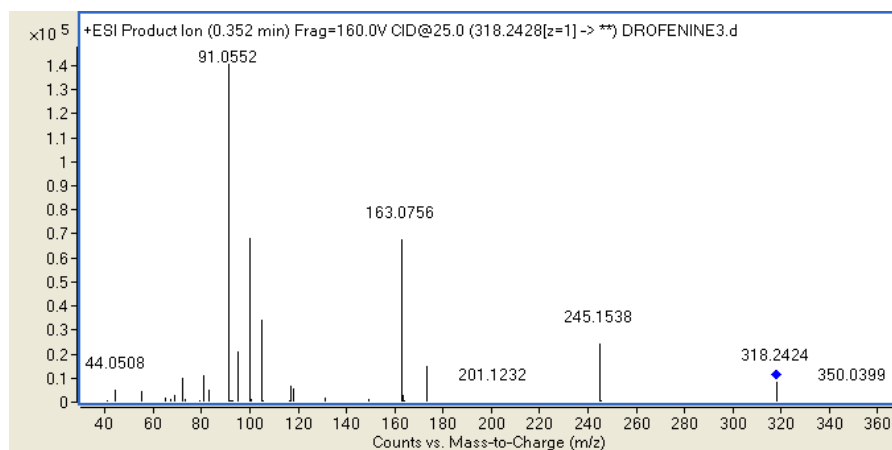
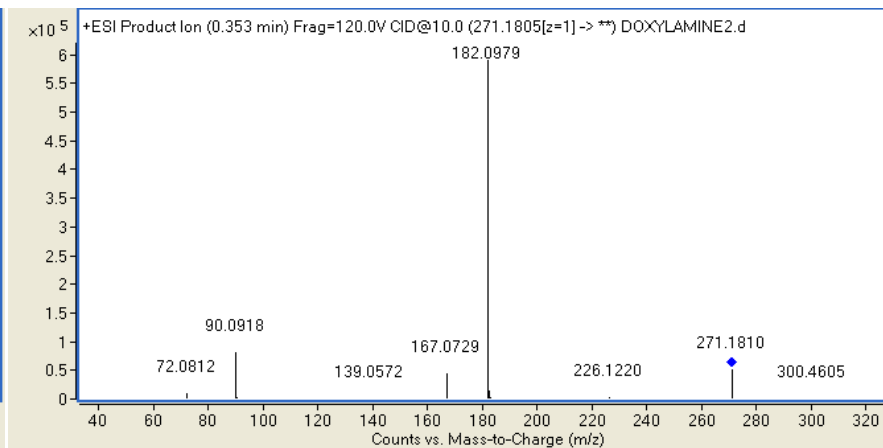
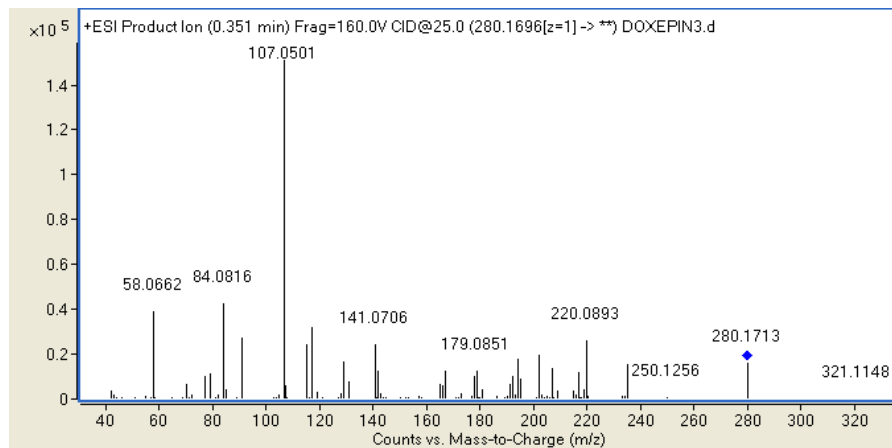


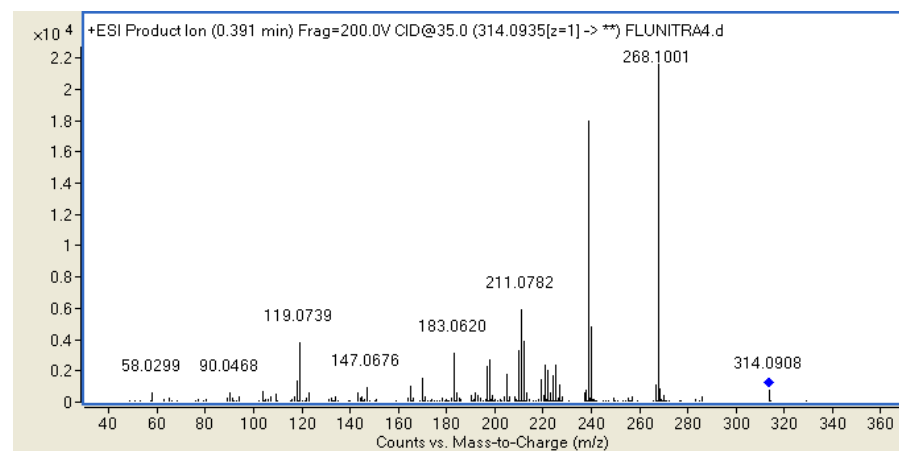
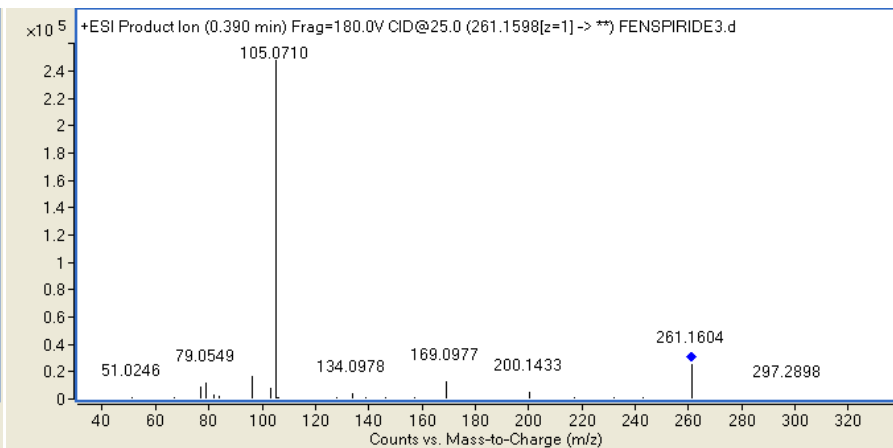
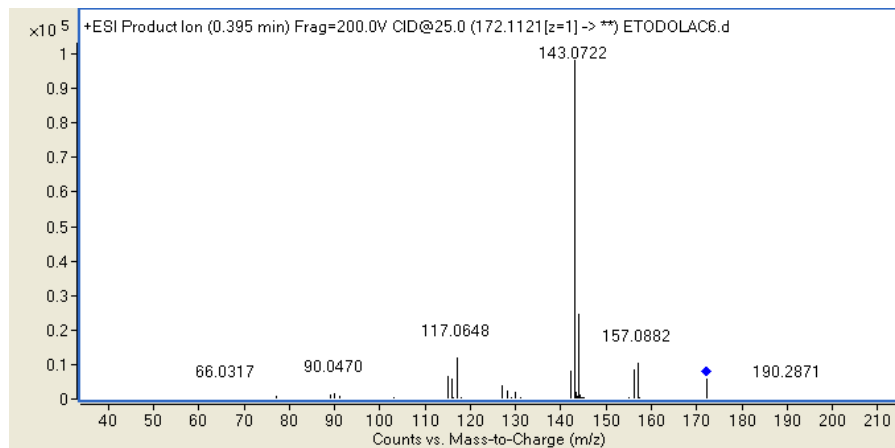
Φάσματα επιλογής βέλτιστης ενέργειας συγκρούσεως για το CALH2



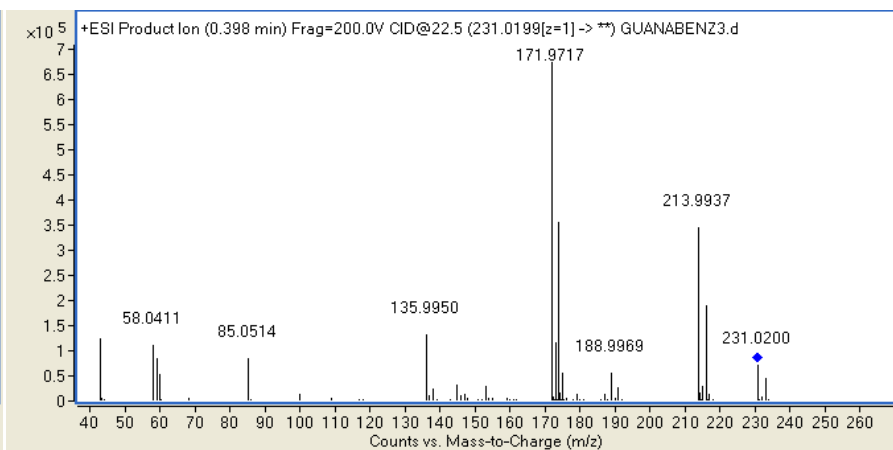
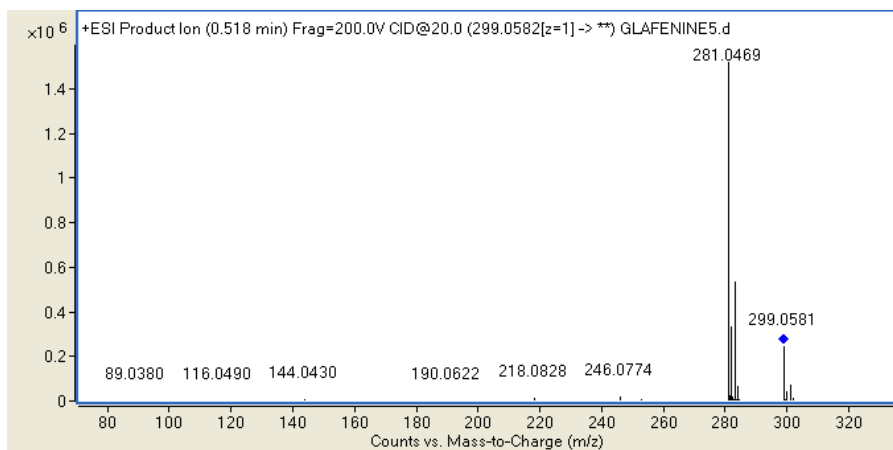
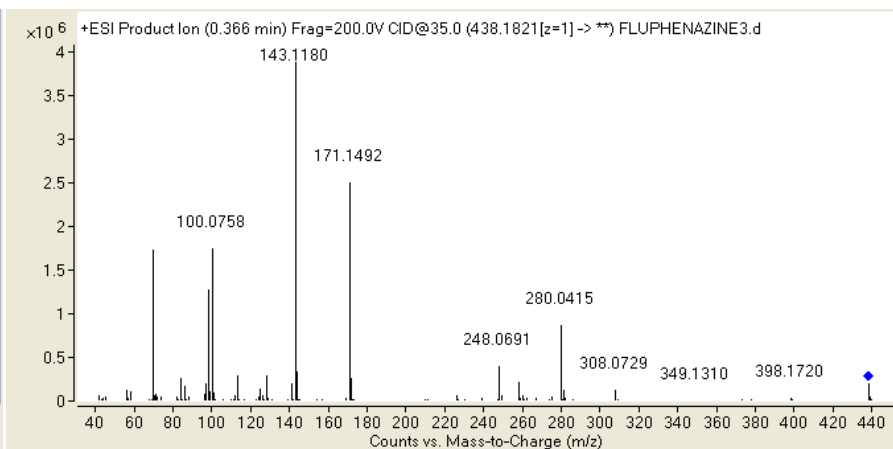
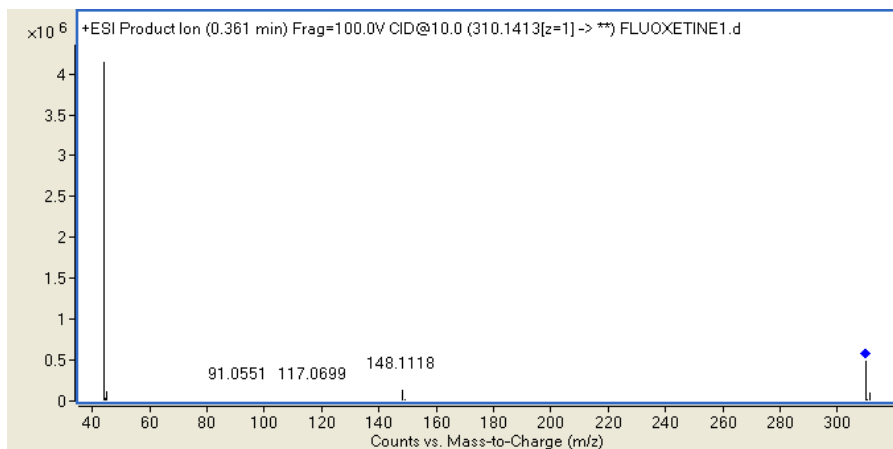


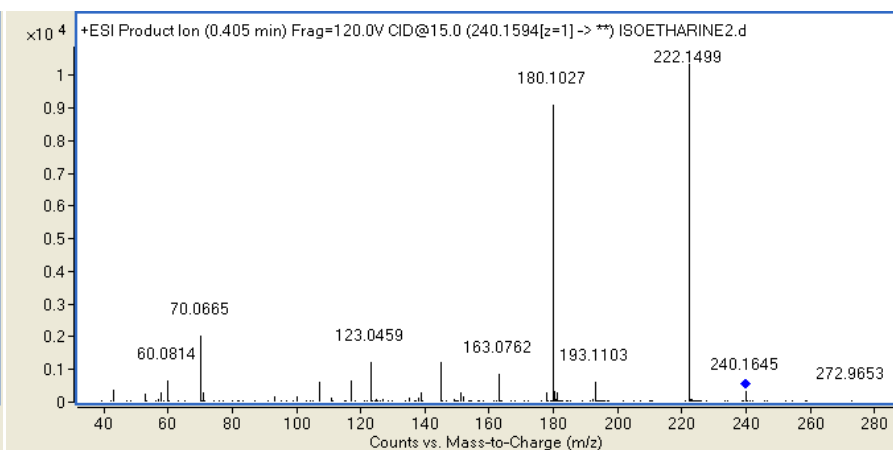
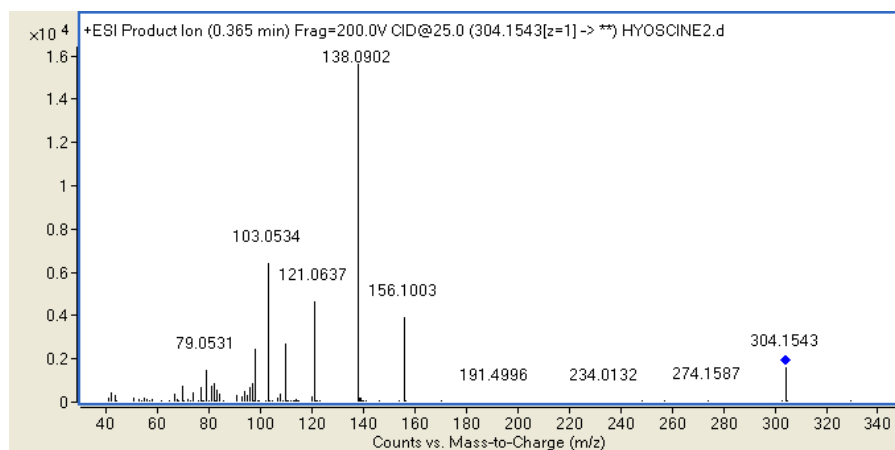
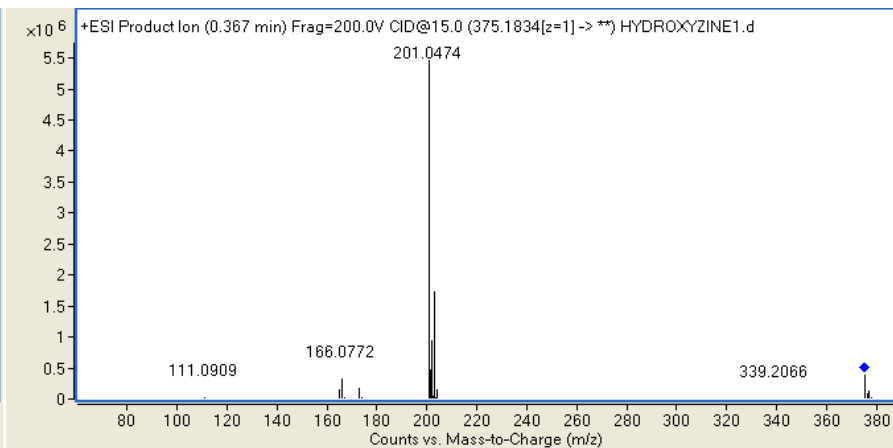
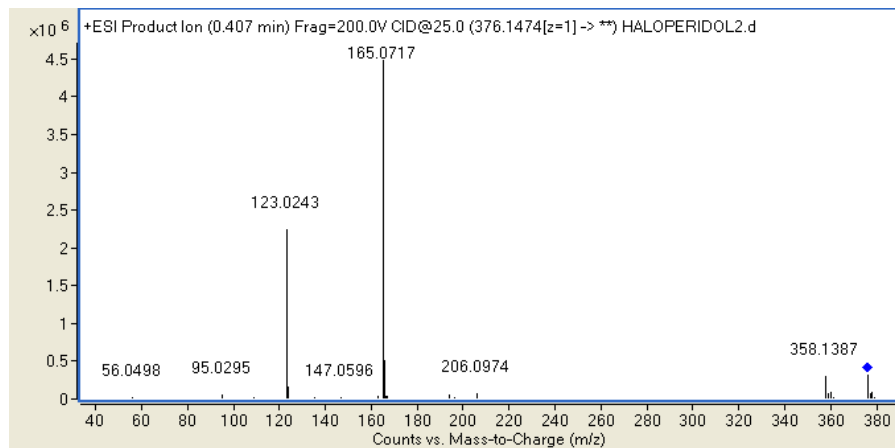


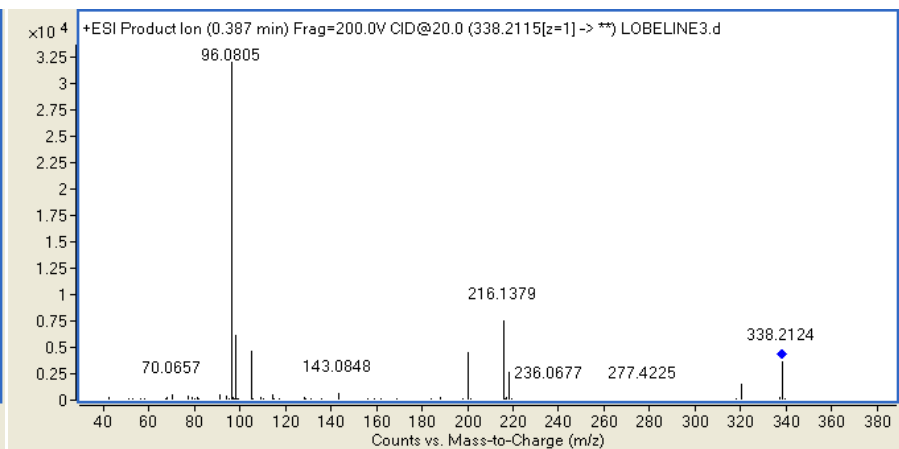
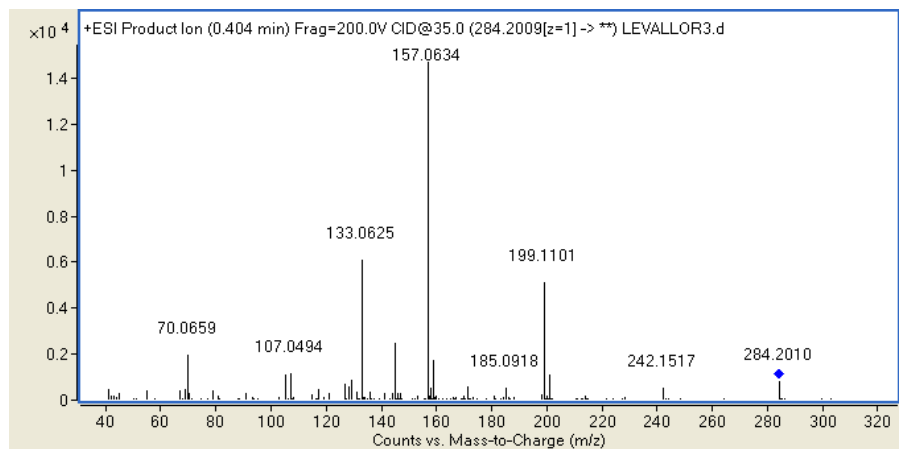
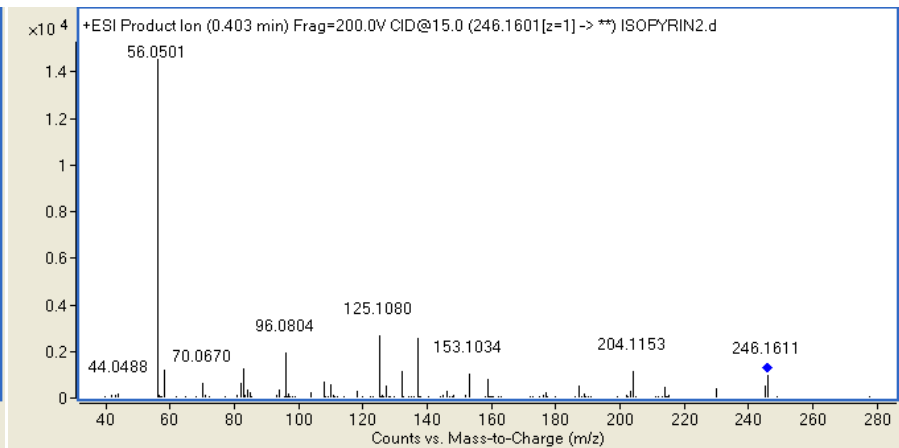
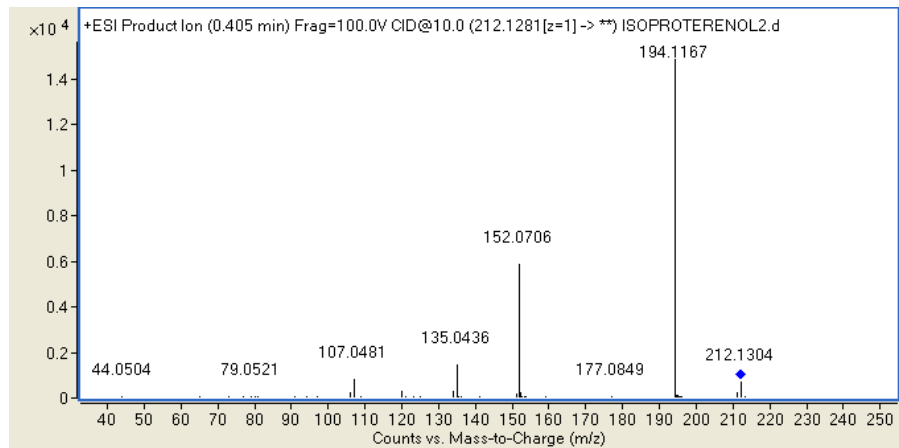


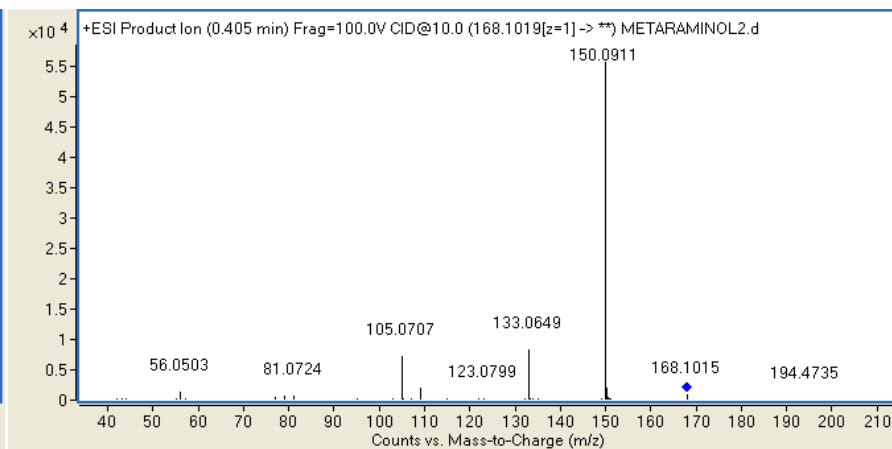
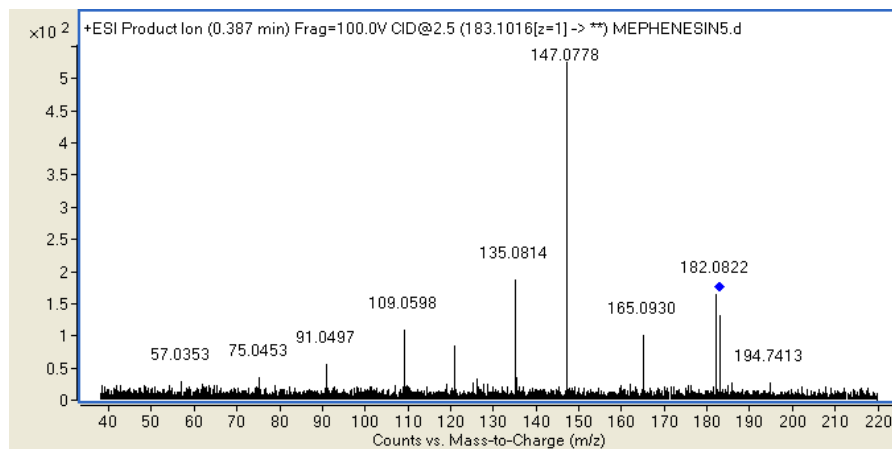
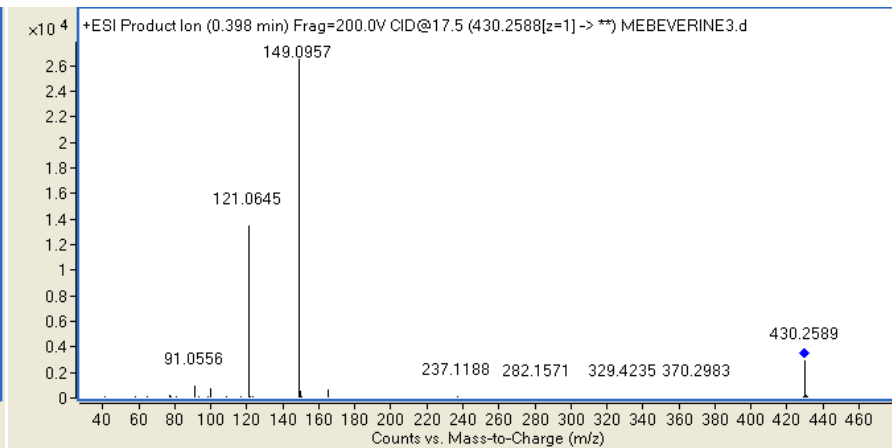
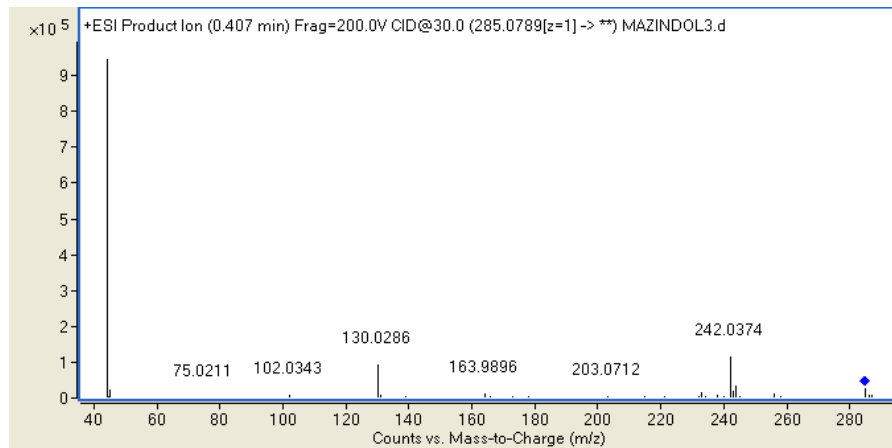


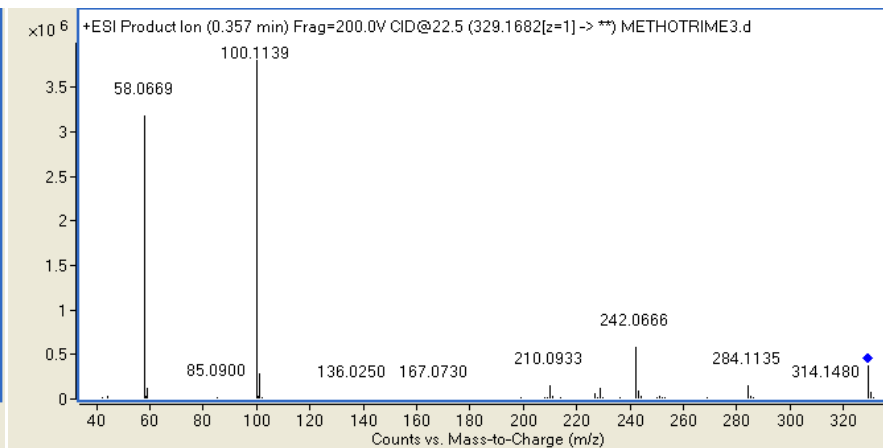
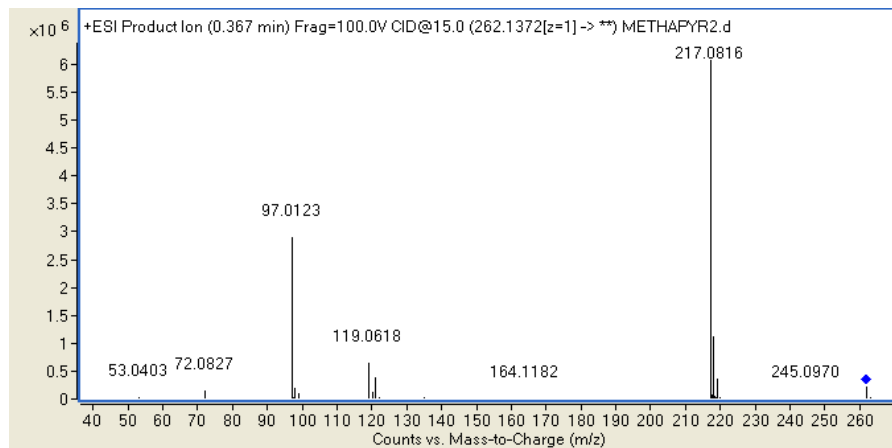
Φάσματα επιλογής βέλτιστης ενέργειας συγκρούσεως για το CALH3



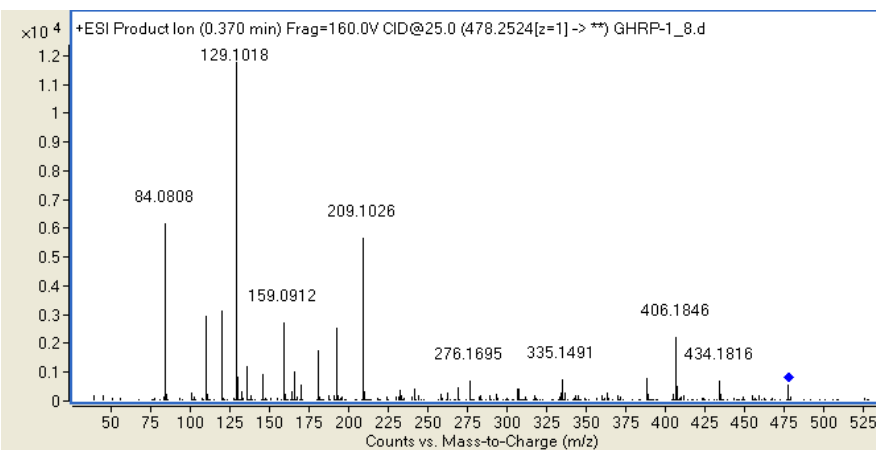
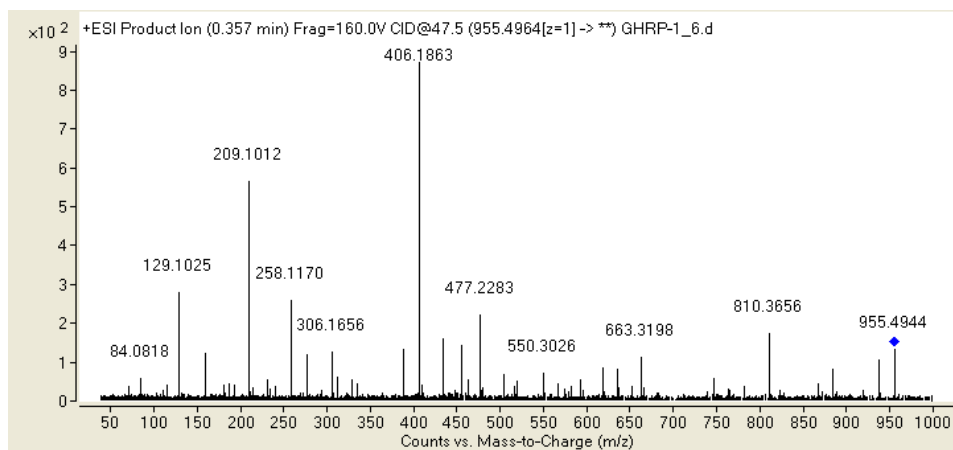
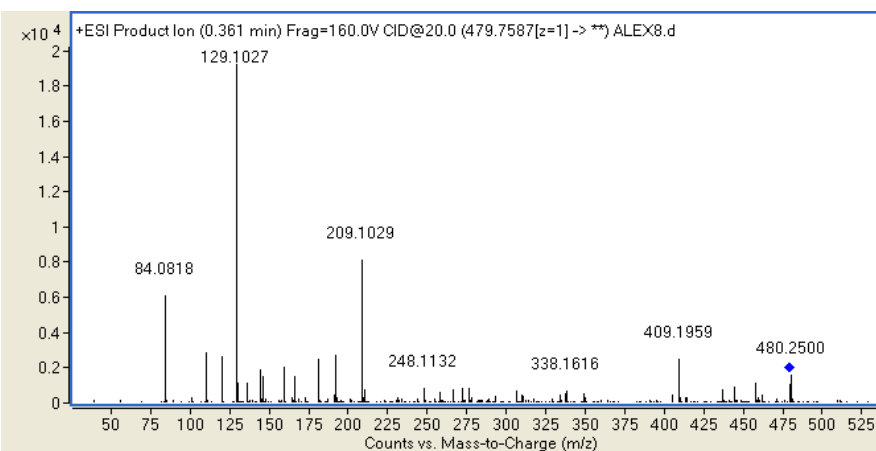
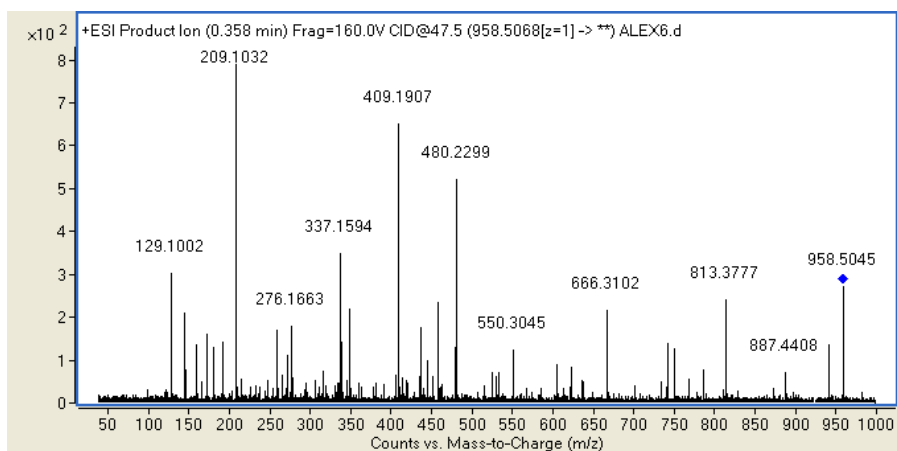


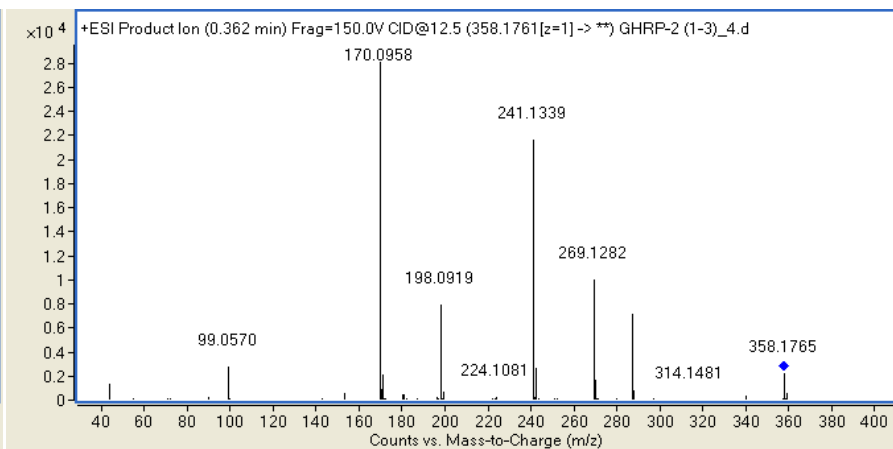
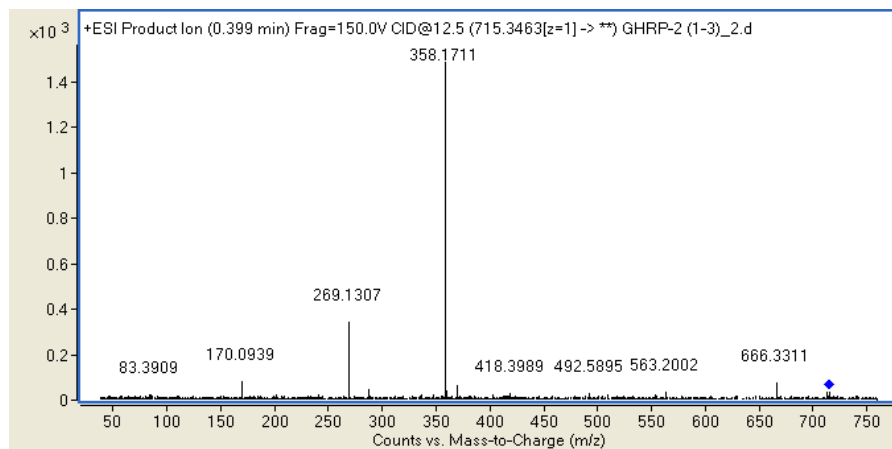
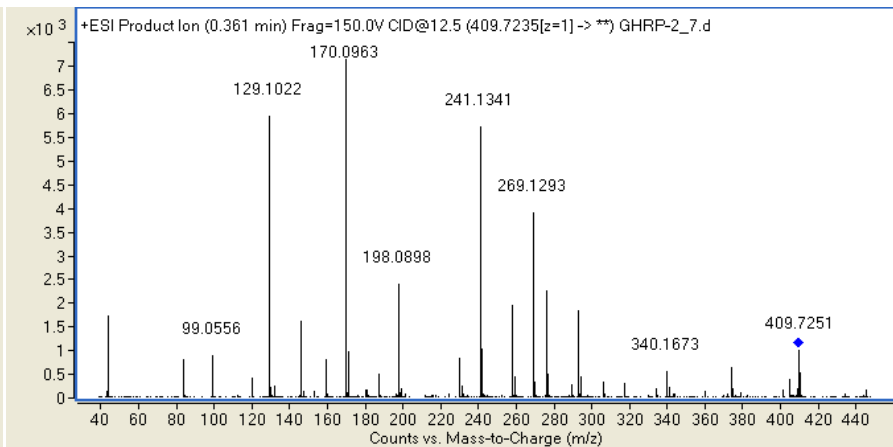
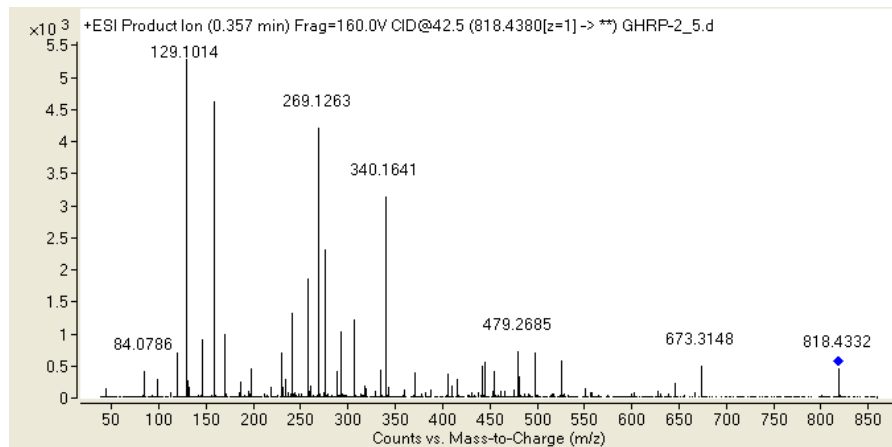


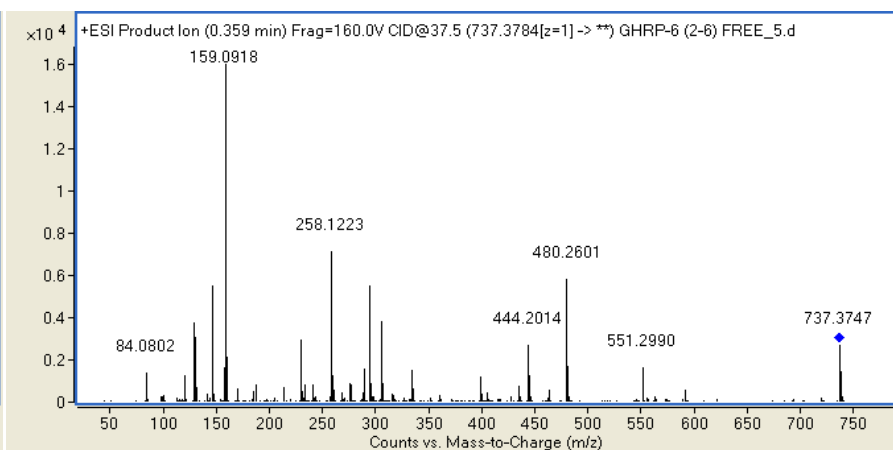
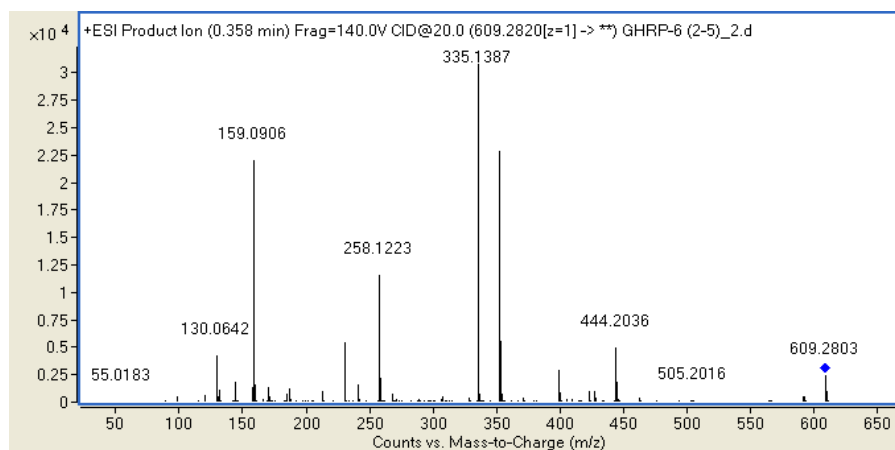
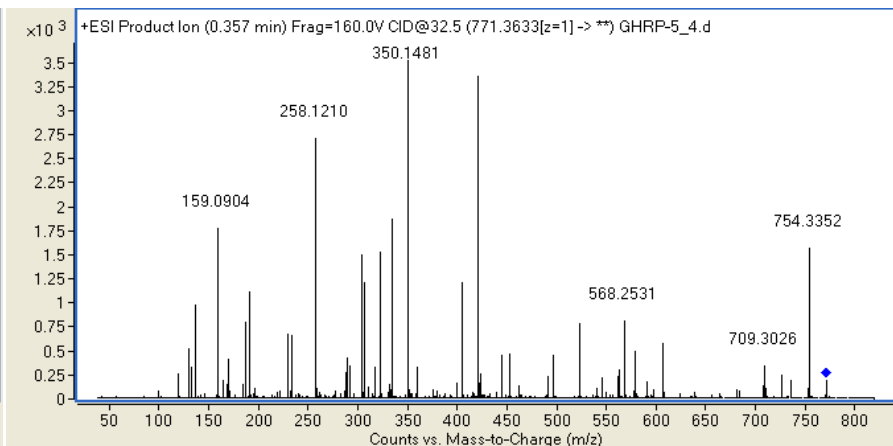
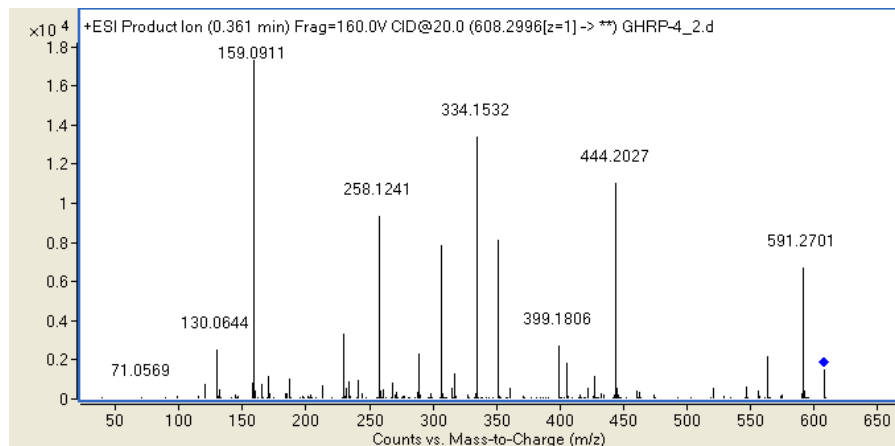


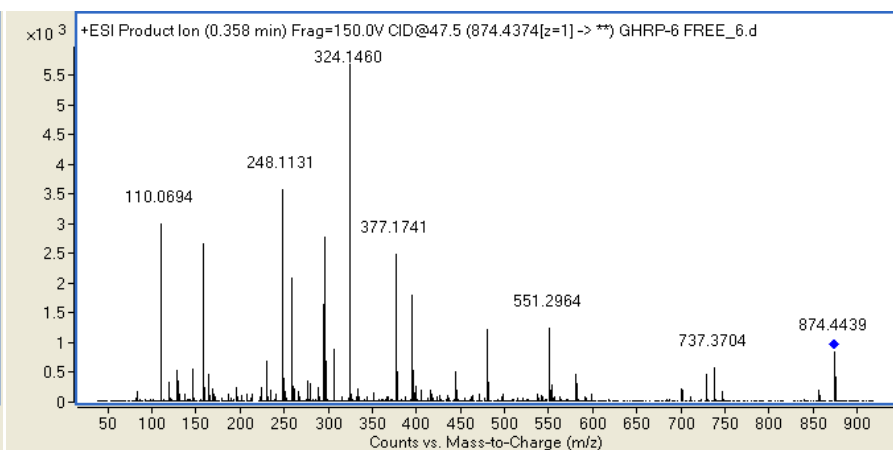
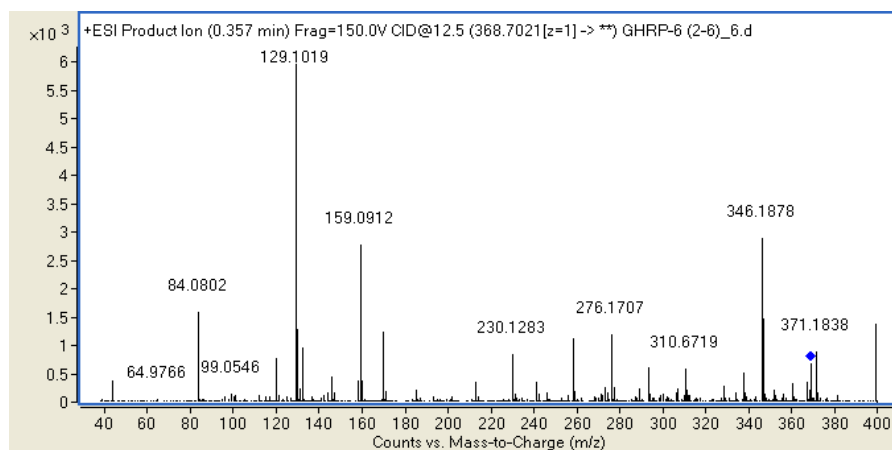
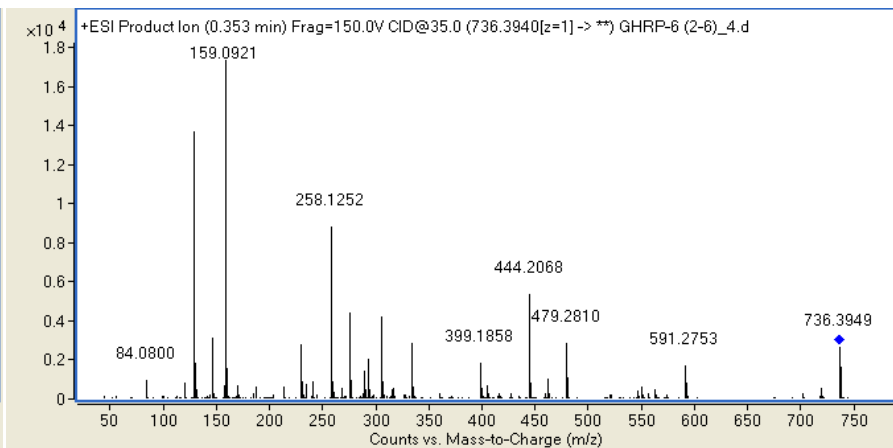
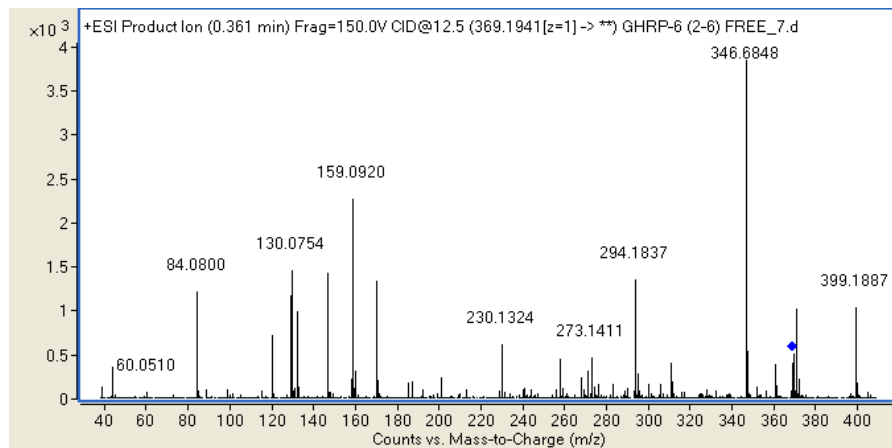


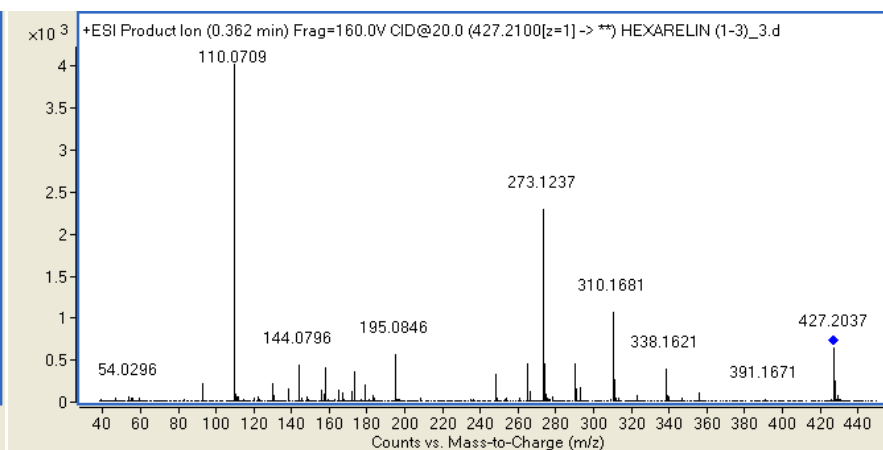
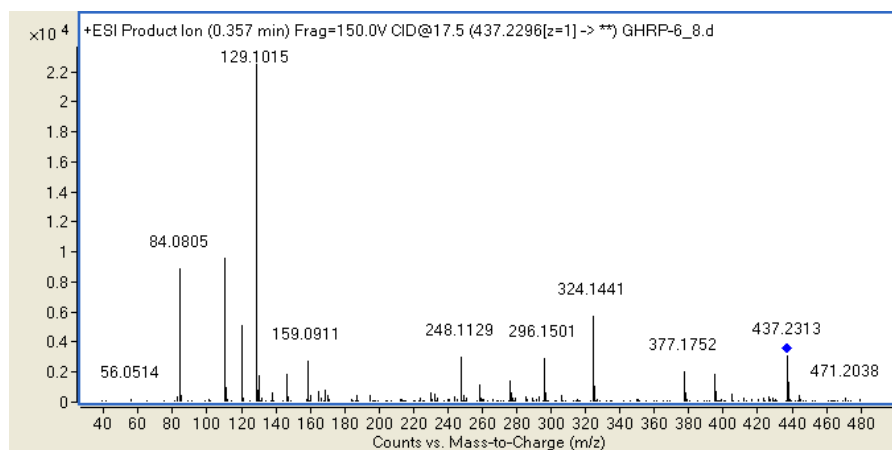
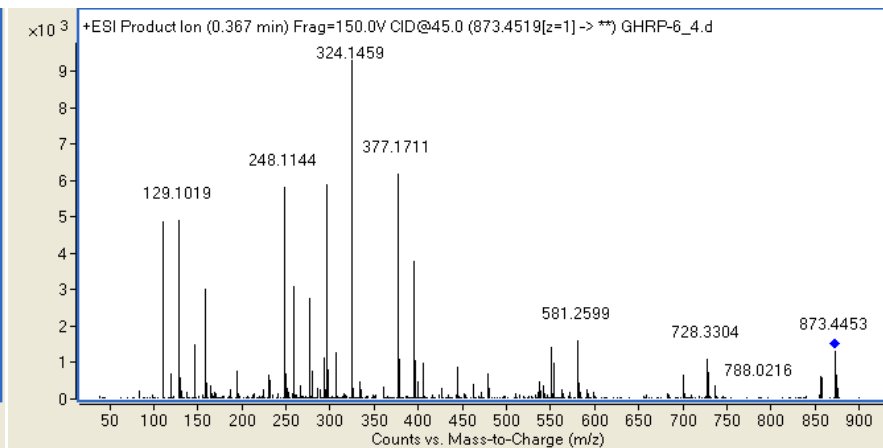
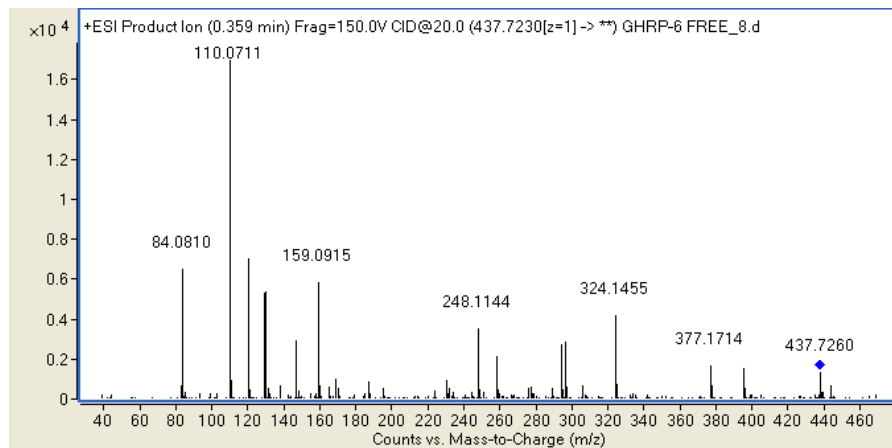
Φάσματα επιλογής βέλτιστης ενέργειας συγκρούσεως για τα Πεπτίδια

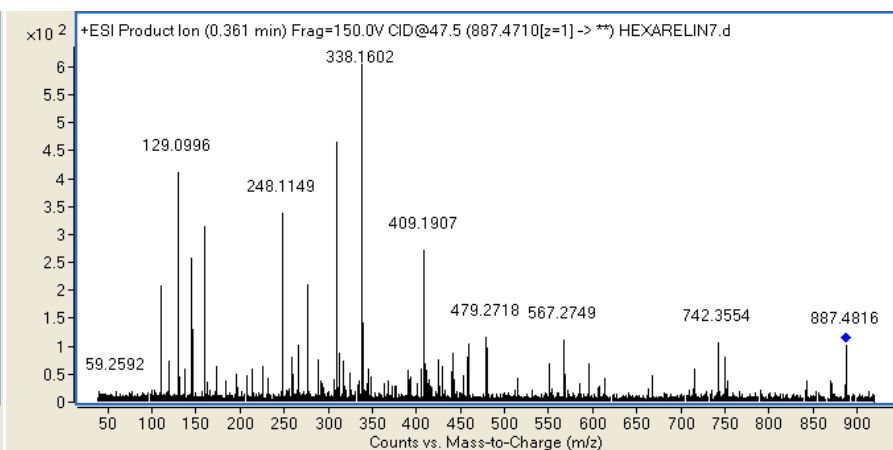
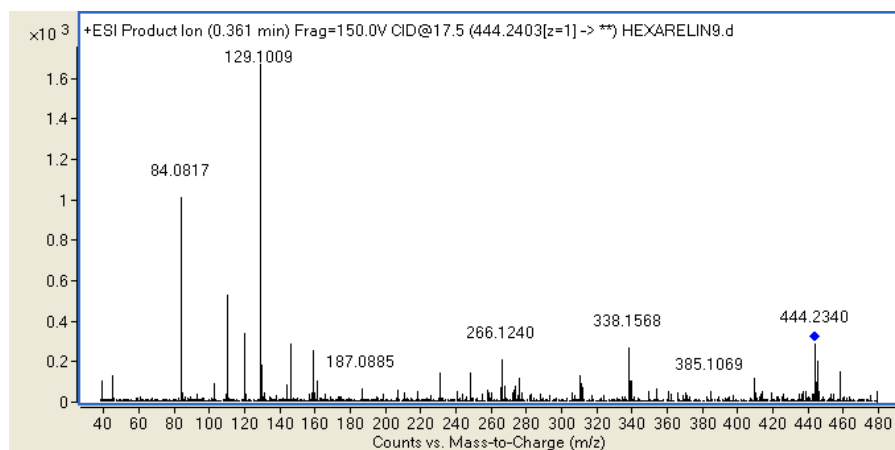
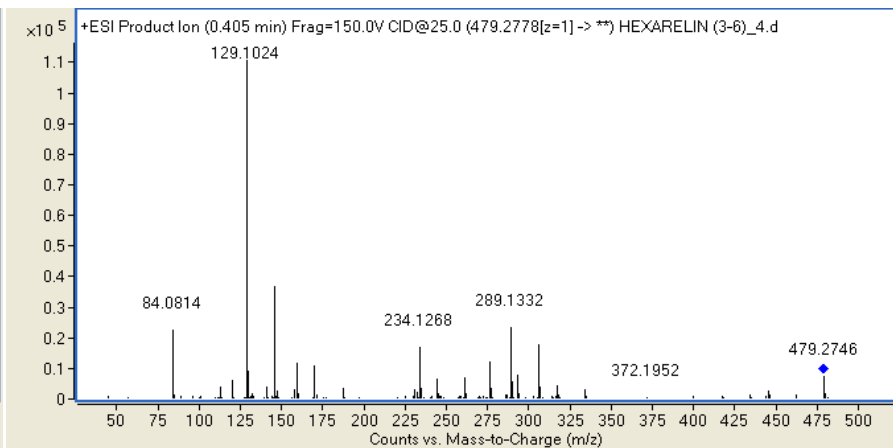
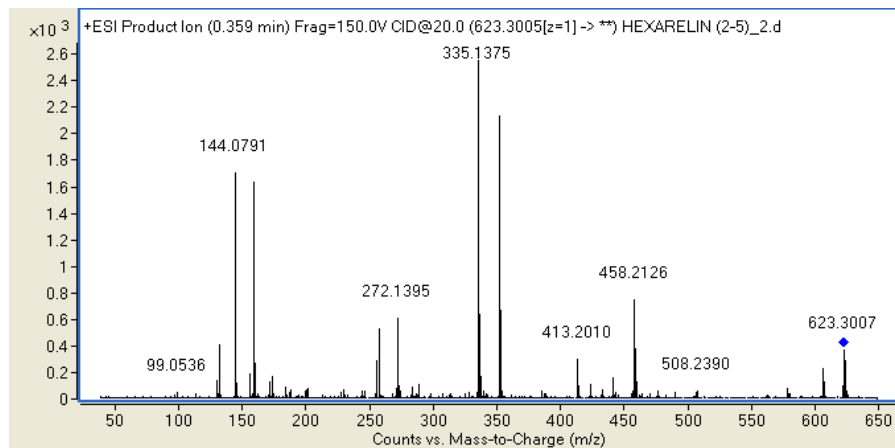


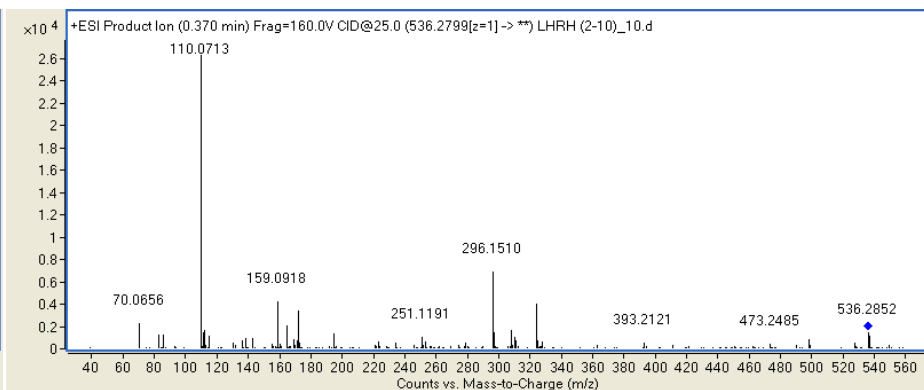
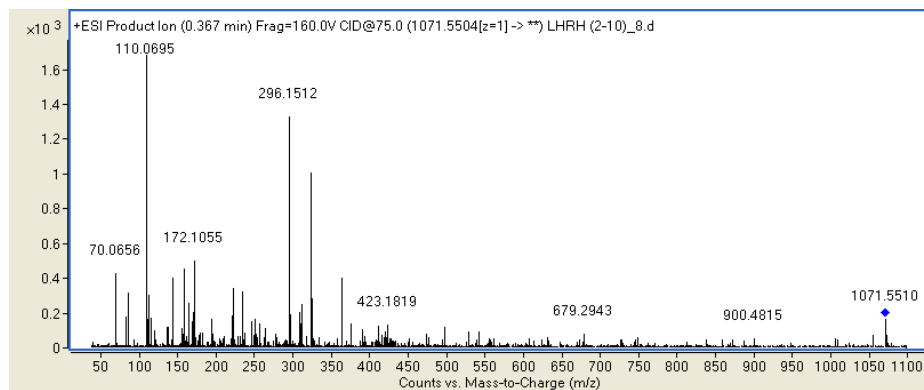
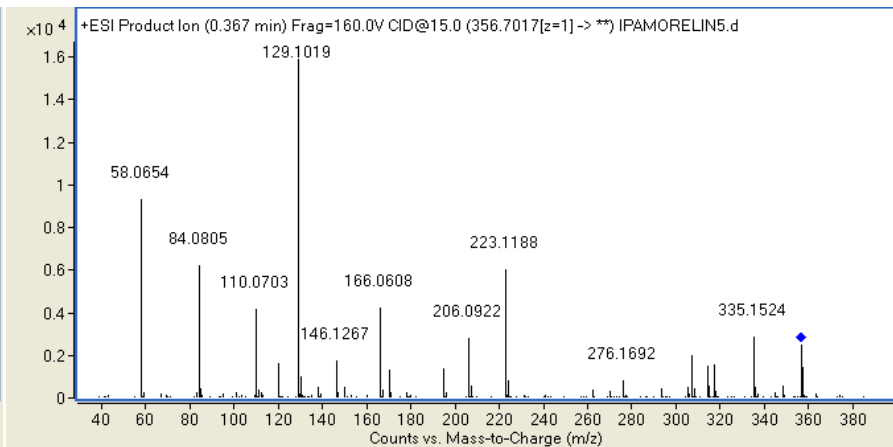
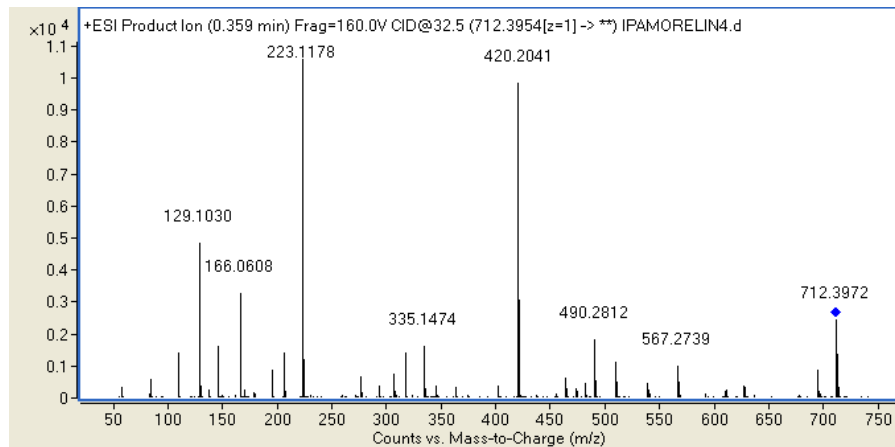


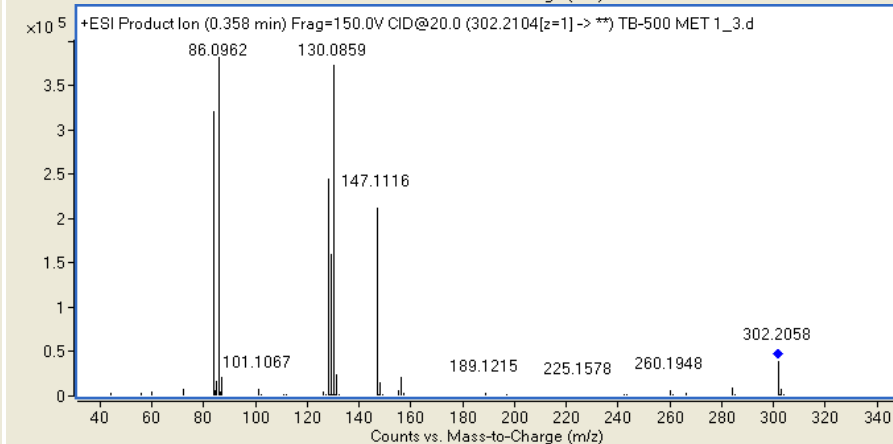
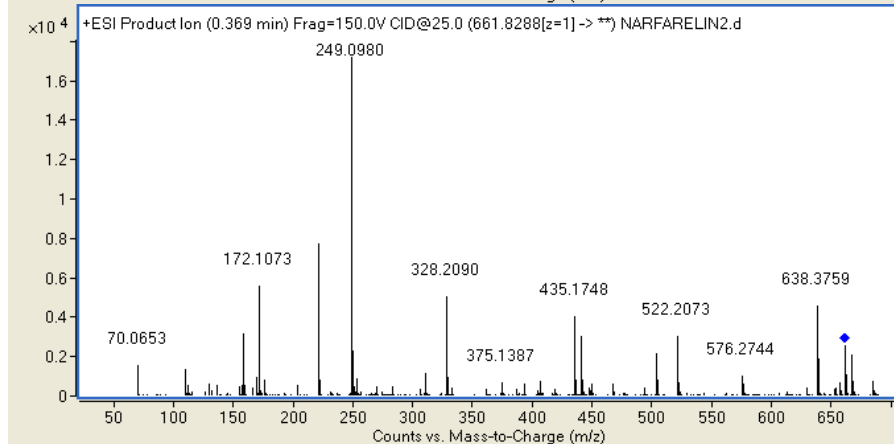
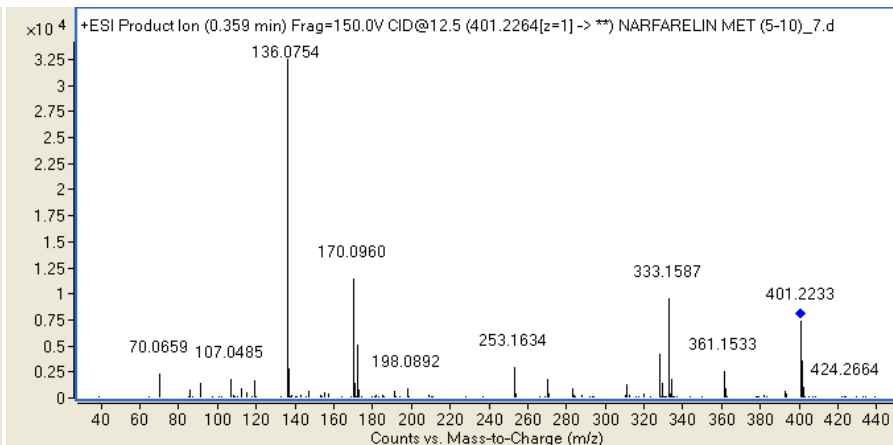
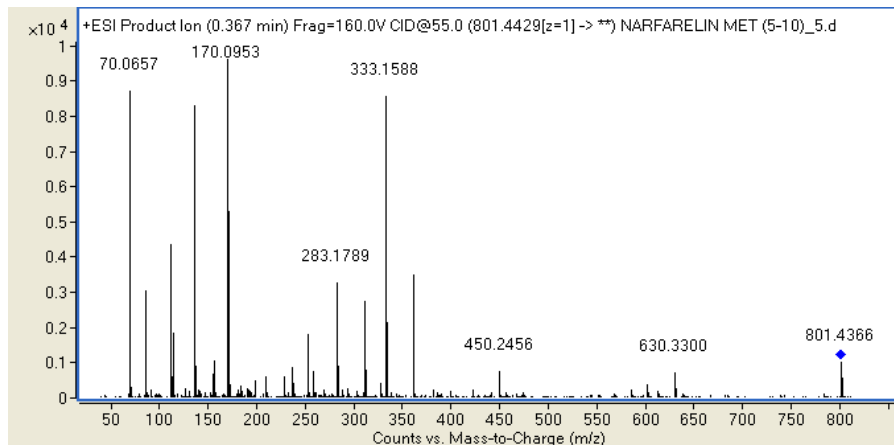


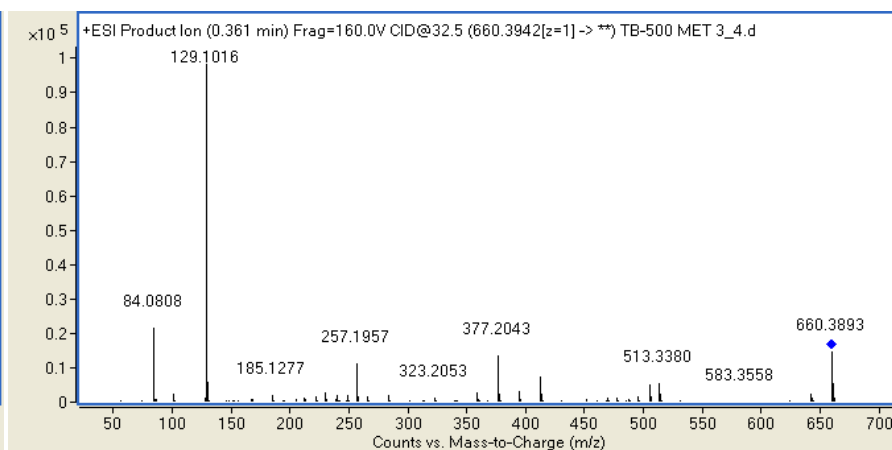
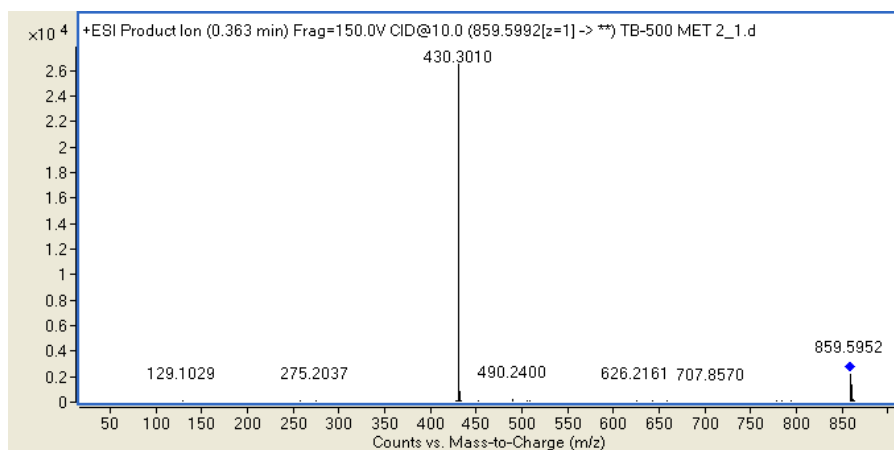
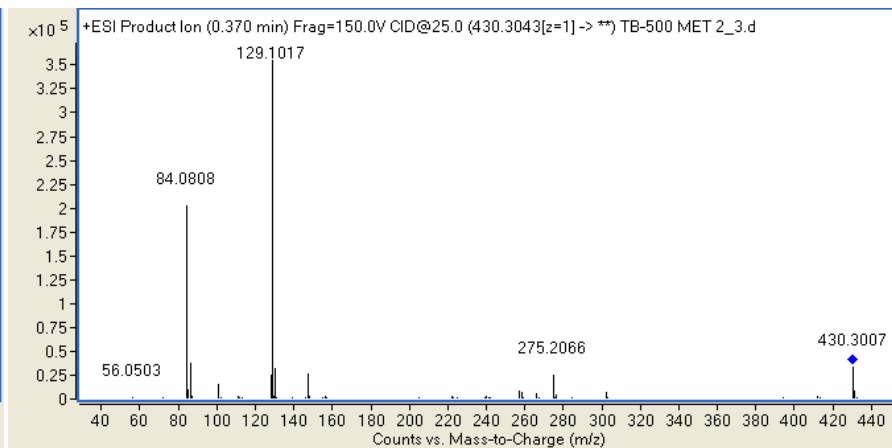
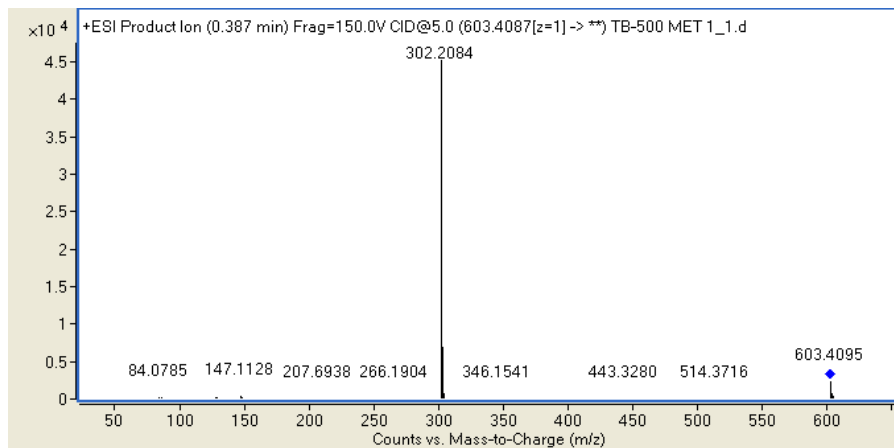


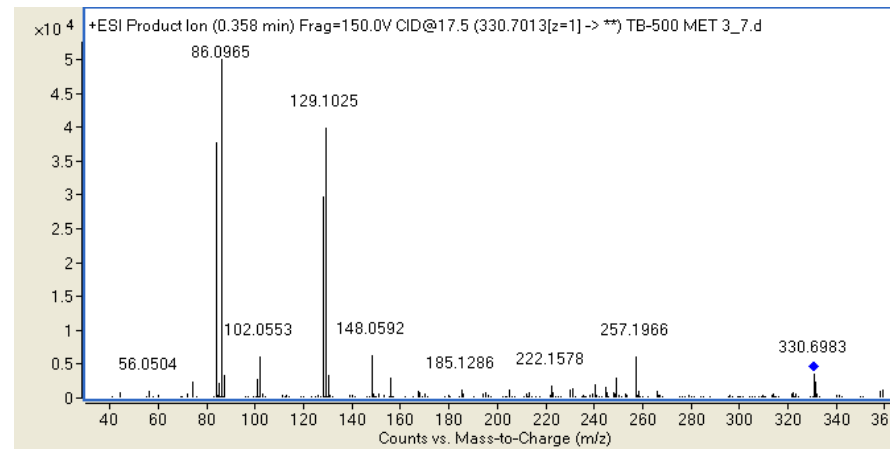












Βιβλιογραφία

1. R. K. Müller, History of Doping and Doping Control, Doping in Sports, Handbook of Experimental Pharmacology 195, D. Thieme, P. Hemmersbach (eds), Springle – Verlag Berlin Heidelberg, 2010
2. <http://www.doping-prevention.sp.tum.de/el/doping-in-general/history-of-doping.html> (18/05/15)
3. WADA, the World anti-doping code, released at <https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/wada-2015-world-anti-doping-code.pdf> (18/05/15)
4. WADA, the 2015 Prohibited List, released at <https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/wada-2015-prohibited-list-en.pdf> (18/05/15)
5. FEI, <http://www.fei.org/fei/about-fei/history/history-of-the-fei> (18/05/15)
6. HEF, Hellenic Equestrian Federation, <http://www.hef.gr/greek/index.htm> (18/05/15)
7. FEI, <http://www.fei.org/fei/cleansport/resources/history> (18/05/15)
8. AORC, <http://www.aorc-online.org/about/our-history/> (18/05/15)
9. FEI, <http://www.fei.org/sites/default/files/2015%20EADCMRS%20-%20Effective%201%20January%202015%20-%20Final%20Version.pdf> (14/05/15)
10. <http://www.oaka.com.gr/%CF%85%CF%80%CE%BF%CF%83%CF%84%CE%AE%CF%81%CE%B9%CE%BE%CE%B7-%CE%B1%CE%B8%CE%BB%CE%B7%CF%84%CF%8E%CE%BD/%CE%AD%CE%BB%CE%B5%CE%B3%CF%87%CE%BF%CF%82-%CE%BD%CF%84%CF%8C%CF%80%CE%B9%CE%BD%CE%B3%CE%BA/%CF%80%CE%B1%CF%81%CE%AC%CF%81%CF%84%CE%B7%CE%BC%CE%B1-%CE%B5%CF%80%CE%B5%CE%BE%CE%B7%CE%B3%CE%B7%CE%BC%CE%B1%CF%84%CE%B9%CE%BA%CF%8E%CE%BD-%CE%BA%CE%B5%CE%B9%CE%BC%CE%AD%CE%BD%CF%89%CE%BD-%CF%83/>
11. FEI, <http://www.fei.org/system/files/FEI%20Standard%20for%20Laboratories%20-%20May%202011%20-%20CLEAN.pdf> (05/06/15)
12. FEI, http://www.fei.org/sites/default/files/2015Vet_Regs%20-%20Clean%20version_3.pdf (05/06/15)
13. FEI, <http://www.fei.org/fei/cleansport/ad-h/prohibited-list> (05/06/15)
14. J. P. Scarth, P. Teale and T. Kuuranne, Drug metabolism in the horse: a review, Drug Testing and Analysis, 2011, 3, 19-53
15. ARCI, <http://arcicom.businesscatalyst.com/model-rules---standards.html> (05/06/15)
16. https://en.wikipedia.org/wiki/Anabolic_steroid
17. <https://en.wikipedia.org/wiki/Stimulant>
18. <https://en.wikipedia.org/wiki/Bronchodilator>
19. https://en.wikipedia.org/wiki/Nonsteroidal_anti-inflammatory_drug
20. <https://en.wikipedia.org/wiki/Diuretic>
21. <https://en.wikipedia.org/wiki/Peptide>
22. https://en.wikipedia.org/wiki/Peptide_hormone
23. I. Broek, M. Blokland, M. A. Nessen, S. Sterk, Current trends in mass spectrometry of peptides and proteins: Application to veterinary and sports-doping control, Mass Spectrometry Reviews, 2013, 1-24

24. M. Thevis, A. Thomas and W. Schänzer, Detecting peptidic drugs, drug candidates and analogs in sports doping: current status and future directions, *Expert Rev. Proteomics*, 2014, **11**(6), 663-673
25. D. J. Handelsman, *Performance Enhancing Hormones in Sports Doping, Endocrinology: Adult and Pediatric (7th Edition)* 2016, 441-454
26. M. Okano, M. Sato, A. Ikekita and S. Kageyama, Determination of growth hormone secretagogue pralmorelin (GHRP-2) and its metabolite in human urine by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2010, **24**, 2046–2056
27. M. Thevis, A. Thomas and W. Schänzer, Doping control analysis of selected peptide hormones using LC–MS(/MS), *Forensic Science International*, 2011, **213**, 35–41
28. H. D. Cox, C. M. Hughes and D. Eichner, Detection of GHRP-2 and GHRP-6 in urine samples from athletes, *Drug Test. Analysis*, 2015
29. E.N.M. Ho, W.H. Kwok, M.Y. Lau, A.S.Y. Wong, T.S.M. Wan, K.K.H. Lam, P. J. Schiff, B.D. Stewart, Doping control analysis of TB-500, a synthetic version of an active region of thymosin β 4, in equine urine and plasma by liquid chromatography–mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 2012, **1265**, 57– 69
30. S. Esposito, K. Deventer, G. T’Sjoen, A. Vantilborgh and P. V. Eenoo, Doping control analysis of desmopressin in human urine by LC-ESI-MS/MS after urine delipidation, *Biomed. Chromatogr.*, 2012
31. A. Thomas, E. Solymos, W. Schänzer, N. Baume, M. Saugy, F. Dellanna, M. Thevis, Determination of Vasopressin and Desmopressin in urine by means of liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry for doping control purposes, *Analytica Chimica Acta*, 2011, **707**, 107– 113
32. R. E. Ardrey, *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction*, John Wiley & Sons, 2003
33. D. A. Skoog, F. J. Holler, T. A. Nieman, Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης, μετάφραση Μ. Ι. Καραγιάννης, Κ. Η. Ευσταθίου, Ν. Χανιωτάκης, Εκδόσεις Κωσταράκη, 5^η έκδοση, 2005.
34. E. de Hoffmann and V. Stroobant, *Mass Spectrometry Principles and Applications*, Wiley, 3rd edition
35. R.M. Smith, *Understanding Mass Spectra*, Wiley Inter science. 2nd edition, 2004
36. R. E. Ardrey, *Liquid Chromatography –Mass Spectrometry: An Introduction*, John Wiley & Sons, 2003
37. Θ. Π. Χατζηιωάννου, Μ. Α. Κουμπάρη, Ενόργανη Ανάλυση, εκδόσεις ΕΚΠΑ, 2010.
38. Σίσκος Π. Α., Νικολέλης Δ. Π. Αναλυτικές Μέθοδοι Διαχωρισμού. ΕΚΠΑ. Αθήνα. 1991.
39. Lindsay S. *High Performance Liquid Chromatography*. Wiley, New York. Analytical Chemistry by Open Learning. 1987
40. A. El-Aneel, A. Cohen and J. Banoud, *Applied Spectroscopy Reviews*, 2009, **44**, 210-230
41. P. Kebarle and L. Tang, From ions in solution to ions in the gas phase – the mechanism of electrospray mass spectrometry, *Anal. Chem.*, 1993, **65**, 972-986
42. J. T. Watson and O. D. Sparkman, *Introduction to Mass Spectrometry*, John Wiley & Sons, 4th edition, 2007
43. L. T. Watson, O. D. Sparkman, *Introduction to Mass Spectrometry*, Wiley, 4th edition, 2007
44. https://en.wikipedia.org/wiki/Electrospray_ionization (05/06/15)
45. TOF Fundamentals Tutorial, Jordan TOF Products Inc., 1-18

46. B. A. Mamyrin, Time-of-flight mass spectrometry (concepts, achievements and prospects), Intern. J. of Mass Spec., 2001, **206**, 251-266
47. Agilent 6200 Series TOF and 6500 Series Q-TOF/MS System
48. http://www.kore.co.uk/ms-200_principles.htm (05/06/15)
49. R. J. B. Peters, A. A. M. Stolker, J. G. J. Mol, A. Lommen, E. Lyris, Y. Angelis, A. Vonaparti, M. Stamou, C. Georkakopoulos, M. W. F. Nielen, Screening in veterinary drug and sports doping control based on full-scan, accurate-mass spectrometry, Trends Anal. Chem., 2010, **29**, 1250-1268
50. M. Mazzarino and F. Botre, A fast liquid chromatography / mass spectrometric screening method for the simultaneous detection of synthetic glucocorticoids, some stimulants, anti-oestrogen drugs and synthetic anabolic steroids, Rapid Commun. Mass Spectrom., 2006, **20**, 3465-3476
51. J. Badoud, E. Grata, L. Perrenoud, L. Avois, M. Saugy, S. Rudaz, J.-L. Veuthey, Fast analysis of doping agents in urine by ultra-high-pressure liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. I: Screening analysis, J. Chromatogr. A, 2009, **1216**, 4423-4433
52. J. Badoud, E. Grata, L. Perrenoud, M. Saugy, S. Rudaz, J.-L. Veuthey, Fast analysis of doping agents in urine by ultra-high-pressure liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. II: Confirmatory analysis, J. Chromatogr. A, 2010, **1217**, 4109-4119
53. A. Vonaparti, E. Lyris, Y. S. Angelis, I. Panderi, M. Koupparis, A. Tsantili-Kakoulidou, R. J. B. Peters, M. W. F. Nielen and C. Georgakopoulos, Preventive doping control screening analysis of prohibited substances in human urine using rapid-resolution liquid chromatography / high-resolution time-of-flight mass spectrometry, Rapid Commun. Mass Spectrom., 2010, **24**, 1595-1609
54. D. Ortelli, E. Cognard, P. Jan, P. Edler, Comprehensive fast multi residue screening of 150 veterinary drugs in milk by ultra-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry, J. Chromatogr. B., 2009, **877**, 2363-2374
55. WADA, International Standard for Laboratories, <https://www.wada-ama.org/en/resources/laboratories/international-standard-for-laboratories-isl>
56. Μ. Κουππάρη, Σημειώσεις Χημειομετρίας, ΕΚΠΑ, 2014
57. Μ. Κουππάρη, Ν. Θωμάιδη, Συστήματα Διασφάλισης Ποιότητας, ΕΚΠΑ, 2014
58. Z. D. Tzouganaki, J. Atta-Politou, M. A. Koupparis, Development and validation of liquid chromatographic method for the determination of lycopene in plasma, Anal. Chim. Acta, 2002, **467**, 115-123
59. J.-P. Antignac, B. Le Bizec, F. Monteau, F. Andre, Validation of analytical methods based on mass spectrometric detection according to the "2002/657/EC" European decision: guideline and application, Anal. Chim. Acta, 2003, **483**, 325-334
60. The Fitness for Purpose of Analytical Methods, Eurachem Guide, 1998.
61. M. Thevis, G. Opfermann, W. Schanzer, Liquid chromatography / electrospray ionization tandem mass spectrometric screening and confirmation methods for β_2 -agonists in human or equine urine, J. Mass Spectrom., 2003, **38**, 1197-1206
62. B. K. Matuszewski, M. L. Constanzer and C. M. Chavez-Eng, Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS, Anal. Chem., 2003, **75**, 3019-3030

63. I. Marchi, V. Viette, F. Badoud, M. Fathi, M. Saugy, S. Rudaz, J.-L. Veuthey, Characterization and classification of matrix effects in biological samples analyses, *J. Chromatogr. A*, 2010, **1217**, 4071-4078
64. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, Βιοχημεία, μετάφραση Α. Αλετράς, Θ. Βαλκανά, Δ. Δραΐνας, Κ. Δραΐνας, Η. Κούβελας, Γ. Κ. Παπαδόπουλος, Μ. Φράγκου-Λαζαρίδη, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Τόμος Ι