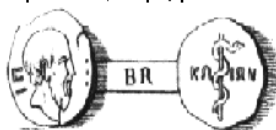




ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών
—ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837—

"ὠφελέειν, εἰ μὴ βλάπτειν"



'benefit and do not harm'

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ GC/HRMS ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΥΡΟΝΙΔΙΩΝ ΤΗΣ 19- ΝΟΡΑΝΔΡΟΣΤΕΡΟΝΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ 19- ΝΟΡΕΤΙΟΧΟΛΑΝΟΛΟΝΗΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΛΟΓΟΥ ΤΟΥΣ ΣΕ ΟΥΡΑ ΑΘΛΗΤΩΝ

ΜΙΧΑΛΑΚΗ ΑΦΡΟΔΙΤΗ

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΙΓΑΙΟΥ

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης

Κατεύθυνση: ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ & ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

ΑΘΗΝΑ 2018

Η έγκριση διατριβής ειδίκευσης από το Τμήμα Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα.'

(Ν. 5343/1932, άρθρο 202)

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ε. ΠΑΝΤΕΡΗ	Καθηγήτρια ΕΚΠΑ
Ι. ΛΟΥΚΑΣ	Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ
Ι. ΝΤΟΤΣΙΚΑΣ	Επίκουρος Καθηγητής ΕΚΠΑ (Επιβλέπων)

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία διπλώματος ειδίκευσης εκπονήθηκε εξ ολοκλήρου στο Εργαστήριο Αναλυτικού Ελέγχου Ντόπινγκ του Ολυμπιακού Αθλητικού Κέντρου Αθηνών (Ο.Α.Κ.Α.) κατά την περίοδο 2016-2017.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά και ειλικρινά, τον επιβλέποντα καθηγητή μου Δρ. Ιωάννη Ντότσικα για τη δυνατότητα που μου παρείχε να πραγματοποιήσω την διπλωματική μου εργασία σε έναν διεθνώς διακεκριμένο χώρο όπως το Εργαστήριο Ελέγχου Ντόπινγκ του Ο.Α.Κ.Α., για την επίβλεψη, τη συνεργασία που είχαμε καθ' όλη τη διάρκεια της δεδομένης προσπάθειας αλλά και την συνεχή στήριξη που μου προσέφερε σε ότι δυσκολία αντιμετωπίσαμε στην διάρκεια των Μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα άλλα δύο μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής την κ. Ε. Παντερή και τον κ. Ι. Λουκά για τον χρόνο που διέθεσαν για τη διπλωματική εργασία μου.

Ευχαριστώ θερμά τη Διευθύντρια του Εργαστηρίου Ελέγχου Ντόπινγκ Δρ. κα. Μαρία Τσίβου για την ανάθεση του θέματος, τη φιλοξενία τους και για την απεριόριστη δυνατότητα χρήσης αντιδραστηρίων και αναλωσίμων που μου παρείχαν, σε μια δύσκολη οικονομικά εποχή.

Ευχαριστώ ξεχωριστά και μέσα από την καρδιά μου, τον επιβλέποντά μου στο εργαστήριο Δρ. κ. Ιωάννη Αγγελή για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, για όλα όσα μου έμαθε, που ήταν πάντα δίπλα μου απαντώντας σε όλες μου τις ερωτήσεις, για την υπομονή του και για τον χρόνο που διέθετε πάντοτε.

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

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους φίλους μου, που είναι πάντα δίπλα μου σε κάθε επιλογή μου και με στηρίζουν.

Πίνακας περιεχομένων

Σκοπός Εργασίας.....	9
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	10
Εισαγωγή στο Ντόπινγκ.....	10
1.1 Εισαγωγή.....	10
1.2 Ιστορική Αναδρομή	12
1.3 Παγκόσμιο Πρόγραμμα Αντιντόπινγκ	13
1.4 Κατάλογος Απαγορευμένων Ουσιών.....	13
1.4.1. Ουσίες που απαγορεύονται σε όλες τις περιπτώσεις (εντός και εκτός αγώνων).....	15
1.4.2. Ουσίες και μέθοδοι που απαγορεύονται μόνο εντός αγώνων	21
1.4.3. Ουσίες που απαγορεύονται σε συγκεκριμένα αθλήματα	23
1.5 Διαπίστευση εργαστηρίων για τον έλεγχο doping	25
1.5.1. Ελληνικό εργαστήριο ελέγχου doping	26
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	27
Αεριοχρωματογραφία σε σύζευξη με φασματομετρία μαζών	27
2.1 Εισαγωγή.....	27
2.2 Αεριοχρωματογραφία	29
2.2.1 Οργανολογία Αεριοχρωματογράφου	30
2.3 Φασματομετρία μαζών	33
2.3.1 Οργανολογία φασματομέτρου μαζών	34
2.3.2 Πηγές ιόντων	34
2.3.4 Ανιχνευτής	40
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	41
Αναβολικά Ανδρογόνα Στεροειδή.....	41
3.1 Ορισμός-Φυσιολογία	41
3.2 Δομή και στερεοχημεία των ενδογενών ανδρογόνων αναβολικών στεροειδών	42
3.3 Βιοσύνθεση και μεταβολισμός των ενδογενών ανδρογόνων αναβολικών στεροειδών.....	45
3.3.1 Βιοσύνθεση της τεστοστερόνης.....	45
3.3.2 Μεταφορά της τεστοστερόνης	47
3.3.3. Μεταβολισμός της τεστοστερόνης και των υπολοίπων ενδογενών ανδρογόνων αναβολικών στεροειδών	48
3.4 Συνθετικά αναβολικά ανδρογόνα στεροειδή	51

3.5 Κατάχρηση των συνθετικών αναβολικών ανδρογενών στεροειδών – παρενέργειες	54
3.6 Η Ναδρολόνη και οι δύο βασικοί μεταβολίτες της	55
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	59
Εργαστηριακός Εξοπλισμός- Αντιδραστήρια- Προετοιμασία Δειγμάτων	59
4.1 Εργαστηριακές Συσκευές.....	59
4.2 Υάλινα Σκεύη και Αναλώσιμα	59
4.3 Διαλύτες- Αντιδραστήρια	60
4.3.1. Διαλύτες.....	60
4.3.2 Αντιδραστήρια	60
4.4 Διαλύματα Εργασίας.....	61
4.4.1. Ρυθμιστικά διαλύματα	61
4.4.3 Διαλύματα Εσωτερικού Προτύπου (ISTD)	62
4.4.4 Πρότυπα διαλύματα ουσιών	62
4.5 Πειραματική Διαδικασία Βιολογικών Δειγμάτων	63
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5	67
Επικύρωση της μεθόδου	67
5.1 Συνθήκες χρωματογραφίας- Φασματομετρίας μαζών	67
5.2 Κριτήρια επικύρωσης μεθόδου	69
5.3 Ανάλυση δεδομένων καμπυλών βαθμονόμησης	69
5.4 Σχετικός χρόνος ανάσχεσης (Relative Retention Time, RRT)	71
5.5 Γραμμικότητα	72
5.6 Ευαισθησία.....	74
5.7 Ορθότητα.....	76
5.8 Επαναληψιμότητα και ενδιάμεση πιστότητα	78
5.9 Όριο ανίχνευσης και όριο ποσοτικοποίησης.....	82
5.10 Έλεγχος επιμόλυνσης (Carryover contamination).....	83
5.11 Αβεβαιότητα.....	85
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	88
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	89
ABSTRACT	90
Παράρτημα 1	91

Παράρτημα 2	97
Βιβλιογραφία	121

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Σκοπός Εργασίας

Ο παγκόσμιος οργανισμός αντιντόπινγκ εκδίδει ανά τακτά χρονικά διαστήματα οδηγίες (technical document) προς τα διαπιστευμένα εργαστήρια ελέγχου ντόπινγκ έτσι ώστε να υπάρχει συνεχής βελτίωση των μεθόδων και των τεχνικών για τον έλεγχο χρήσης των απαγορευμένων ουσιών.

Τον Μάιο του 2016 εκδόθηκε οδηγία για την ενσωμάτωση στην επιβεβαιωτική διαδικασία ευρημάτων που αφορούν της χρήση της ναδρολόνης, μιας αναλυτικής διαδικασίας που να επιτρέπει τον προσδιορισμό και την ποσοτικοποίηση του λόγου, των 2 βασικότερων μεταβολιτών της ναδρολόνης, των γλυκουρονιδίων της 19-νορανδροστερόνη (19-NA) και της 19-νορετιχολανολόνη (19-NE). Το θεωρητικό υπόβαθρο αυτής της ενέργειας βασίζεται στο ότι υπάρχει ενδογενής παραγωγή της 19-NA από την απομεθυλίωση του άνθρακα 19 της ανδροστερόνης, όπου η αντίδραση είναι πιο αποτελεσματική με το 5β-ισομερές, δηλαδή της 19-NE. Στα δείγματα που έχει συμβεί η συγκεκριμένη απομεθυλίωση, παρουσιάζεται τιμή λόγου 19-NA/19-NE < 3, που είναι μικρότερη του αναμενόμενου.

Συνεπώς, σε δείγματα όπου η 19-NA υπάρχει σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες του ορίου απόφασης για την συγκεκριμένη ουσία με βάση τον WADA(decisionlimit, 2ng/mL) και μικρότερες των 10 ng/mL, τότε αν ο λόγος των 2 μεταβολιτών είναι μεγαλύτερος του 3 και η ανάλυση του δείγματος στο GC/IRMS δεν μπορεί να διευκρινίσει αν επρόκειτο για ενδογενή παραγωγή του 19-NA, έχουμε αδιευκρίνιστο εύρημα, και ο αθλητής στοχοποιείται για μελλοντικούς αιφνίδιους ελέγχους σε τακτά χρονικά διαστήματα. Αν ο λόγος των 2 μεταβολιτών είναι μικρότερος του 3, τότε καμία παράβαση δεν σημειώνεται για το συγκεκριμένο δείγμα.

Για τον σκοπό αυτό, στην παρούσα εργασία, επικυρώθηκε αναλυτική μέθοδος για την ποσοτικοποίηση του λόγου των δύο μεταβολιτών, έτσι ώστε να μπορεί να διευκρινιστεί με βεβαιότητα αν στο δείγμα του αθλητή, η παραγωγή του γλυουρονιδίου της 19-NA, είναι ενδογενής [41].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Εισαγωγή στο Ντόπινγκ

1.1 Εισαγωγή

Στα ελληνικά, η καλύτερη ερμηνεία του όρου ντόπινγκ είναι ο όρος φαρμακοδιέγερση, όμως για να μπορέσουν να καλυφθούν όλες οι μορφές ντόπινγκ πέρα από την χρήση φαρμάκων, έχει καθιερωθεί ο αγγλικός όρος.

Ο πρώτος ορισμός, που υιοθετήθηκε το 1963 από το συμβούλιο Ευρωπαϊκής Επιτροπής για την Εξωσχολική Εκπαίδευση, ανέφερε εκτός των άλλων, ότι ως ντόπινγκ στον αθλητισμό ορίζεται η χορήγηση ή η χρήση από ένα υγιές άτομο, οποιαδήποτε ουσίας ή παράγοντα που υπό φυσιολογικές συνθήκες δεν βρίσκεται στο σώμα ή βρίσκεται σε πολύ μικρότερες ποσότητες, με σκοπό την αύξηση της απόδοσης του αθλητή κατά την διάρκεια του αγώνα.

Μετά την ίδρυση του παγκόσμιου οργανισμού αντιντόπινγκ (World Anti-Doping Agency, WADA) το 1999 και σύμφωνα με τον καθιερωμένο παγκόσμιο κώδικα αντιντόπινγκ της WADA που ανανεώνεται ετησίως, ως ντόπινγκ ορίζεται η παράβαση ενός η περισσότερων κανονισμών αντιντόπινγκ. Τα παρακάτω αποτελούν παραβάσεις κανονισμών αντιντόπινγκ:

- Η παρουσία απαγορευμένης ουσίας ή μεταβολιτών της ή δεικτών της σε δείγμα αθλητή με εξαίρεση ουσίες που έχουν συγκεκριμένο ποσοτικό όριο. Ο αθλητής είναι υπεύθυνος για οποιαδήποτε απαγορευμένη ουσία ή μεταβολίτη ουσίας ή δείκτη βρεθεί στο δείγμα του.
- Χρήση ή απόπειρα χρήσης απαγορευμένης ουσίας ή απαγορευμένης μεθόδου από αθλητή. Αποτελεί προσωπική υποχρέωση κάθε αθλητή να διασφαλίζει ότι καμία απαγορευμένη ουσία δεν εισέρχεται στον οργανισμό του και ότι δεν γίνεται χρήση καμίας απαγορευμένης μεθόδου. Αντιστοίχως, δεν είναι απαραίτητο να αποδειχθεί πρόθεση, υπαιτιότητα, αμέλεια ή εσκεμμένη χρήση εκ μέρους του Αθλητή προκειμένου να στοιχειοθετηθεί παράβαση κανόνα αντιντόπινγκ για χρήση απαγορευμένης ουσίας ή απαγορευμένης μεθόδου.
- Η αποφυγή δειγματοληψίας, ή η άρνηση ή η μη υποβολή σε δειγματοληψία χωρίς επαρκή αιτιολόγηση μετά από ειδοποίηση, όπως προβλέπεται στους ισχύοντες κανόνες αντιντόπινγκ.

- Μη παροχή Πληροφοριών εντοπισμού. Οποιοσδήποτε συνδυασμός τριών άκαρπων ελέγχων και/ή ανεπαρκών υποβολών πληροφοριών εντοπισμού, όπως αυτές ορίζονται στο Διεθνές Πρότυπο Ελέγχων και Ερευνών, εντός περιόδου δώδεκα μηνών από έναν Αθλητή εγγεγραμμένο στον Κατάλογο ελεγχόμενων Αθλητών.
- Παραποίηση ή απόπειρα παραποίησης οποιουδήποτε μέρους του ελέγχου ντόπινγκ.
- Κατοχή απαγορευμένης ουσίας ή απαγορευμένης μεθόδου εντός ή εκτός αγώνα (για τις ουσίες που απαγορεύονται και εκτός αγώνων) από αθλητή ή από μέλος της ομάδας υποστήριξης του αθλητή.
- Διακίνηση ή απόπειρα διακίνησης οποιασδήποτε απαγορευμένης ουσίας ή απαγορευμένης μεθόδου
- Η εντός αγώνα χορήγηση ή η απόπειρα χορήγησης προς αθλητή οποιασδήποτε απαγορευμένης ουσίας ή απαγορευμένης μεθόδου ή η εκτός αγώνα χορήγηση ή η απόπειρα χορήγησης προς αθλητή οποιασδήποτε απαγορευμένης μεθόδου ή απαγορευμένης ουσίας που απαγορεύεται εκτός αγώνα.
- Η συνδρομή, ενθάρρυνση, βοήθεια, προτροπή, συνωμοσία, συγκαλύψη ή οποιαδήποτε άλλη μορφή εσκεμμένης συνέργειας που περιλαμβάνει παράβαση κανόνα ντόπινγκ, απόπειρα παράβασης κανόνα ντόπινγκ ή παράβαση του Άρθρου 10.12.1 από άλλο πρόσωπο.
- Η σύμπραξη από έναν αθλητή ή άλλο πρόσωπο υποκείμενο στη δικαιοδοσία ενός οργανισμού αντιντόπινγκ υπό την επαγγελματική ή αθλητική του ιδιότητα με οποιοδήποτε μέλος προσωπικού υποστήριξης αθλητή. Οι αθλητές δεν πρέπει να εργάζονται με προπονητές, εκπαιδευτές, ιατρούς ή άλλο προσωπικό υποστήριξης των αθλητών που τελούν υπό αποκλεισμό λόγω παράβασης κανονισμών αντιντόπινγκ ή που έχουν καταδικαστεί ποινικά ή τους έχει επιβληθεί ποινή σε επαγγελματικό επίπεδο σχετικά με το ντόπινγκ [1-2].

1.2 Ιστορική Αναδρομή

Επικρατεί η λανθασμένη θεωρία ότι το ντόπινγκ είναι φαινόμενο των τελευταίων χρόνων, στην πραγματικότητα όμως το ντόπινγκ είναι όσο παλιό όσο και ο ίδιος ο αθλητισμός. Η λέξη «πιθανότατα» αφορά το αλκοολούχο ρόφημα *dop*, το οποίο χρησιμοποιούσαν οι πολεμιστές των Ζουλού για να ενισχύσουν τις δυνάμεις τους για την μάχη.

Είναι γνωστό πως οι αρχαίοι Έλληνες αθλητές από τον 3ο αιώνα π.Χ. χρησιμοποιούσαν αφεψήματα από κρασί και κατανάλωναν παραισθησιογόνα μανιτάρια ή γεννητικά όργανα ζώων, με σκοπό την ενίσχυση των ικανοτήτων τους. Ακόμα κι εκείνη την εποχή όμως το ντόπινγκ θεωρούταν ανήθικο και οι τιμωρίες ήταν σκληρές. Όποιος πιανόταν να χρησιμοποιεί τέτοιες μεθόδους πουλιόταν ως σκλάβος, ενώ υπήρχαν και περιπτώσεις που οι παραβάτες θανατώνονταν.

Η σύγχρονη εποχή του ντόπινγκ ξεκινάει στις αρχές του 1900, με χρήση ουσιών στα άλογα του ιπποδρόμου. Η χρήση ντόπινγκ σε Ολυμπιακούς Αγώνες αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1904, από τον μαραθωνοδρόμο Thomas Hicks, ο οποίος έκανε ενέσεις στρυχνίνης και κατανάλωνε μπράντι κατά τη διάρκεια του αγώνα. Μέχρι το 1920 ήταν αρκετά συνηθισμένη η χρήση ουσιών, όπως στρυχνίνη, ηρωίνη και κοκαΐνη, μεταξύ των αθλητών. Η Διεθνής Ένωση Ομοσπονδιών Κλασικού Αθλητισμού (International Association Athletics Federation – IAAF) το 1928 έγινε η πρώτη Διεθνής Ομοσπονδία Αθλητισμού που απαγόρευσε τη χρήση διεγερτικών ουσιών. Οι μέθοδοι όμως ανίχνευσης των απαγορευμένων ουσιών δεν ήταν ανεπτυγμένες. Η χρήση ουσιών που ενισχύουν την απόδοση των αθλητών θεωρούταν αποδεκτή στην ποδηλασία μέχρι το 1930, όπου στον Γύρο της Γαλλίας (Tour de France) άλλαξε ο κανονισμός και οι εθνικές ομάδες θα χρηματοδοτούνταν από τους διοργανωτές. Την δεκαετία του 1950 η Σοβιετική Ολυμπιακή ομάδα ξεκίνησε να πειραματίζεται με την χορήγηση τεστοστερόνης, με σκοπό την αύξηση της δύναμης. Η χορήγηση τεστοστερόνης αποτελούσε πρόγραμμα υποστηριζόμενο από προπονητές και ιατρούς, χωρίς όμως να είναι γνωστές οι παρενέργειες. Οι γυναίκες αθλήτριες αύξησαν περισσότερο τις επιδόσεις τους, επηρεάστηκαν όμως περισσότερο από τους άνδρες, με συνέπεια ακόμα και τον θάνατο. Η ίδρυση της Ιατρικής Επιτροπής από την Διεθνή Ολυμπιακή Επιτροπή (ΔΟΕ) αποτέλεσε την αρχή για την εκστρατεία ενάντια στο ντόπινγκ. Ως αφορμή στάθηκε ο θάνατος ενός Δανού

ποδηλάτη που είχε κάνει λήψη διεγερτικών, ενώ αναφέρθηκε επίσης ότι υπέφερε από κούραση και αφυδάτωση. Το 1966 η Διεθνής Ένωση Ποδηλασίας και η Διεθνής Ομοσπονδία Ποδοσφαίρου ένωσαν τις δυνάμεις τους με την IAAF στην μάχη ενάντια στο ντόπινγκ, ενώ την επόμενη χρονιά ακολούθησε και η ΔΟΕ. Έναν χρόνο αργότερα, το 1968, πραγματοποιήθηκαν οι πρώτοι έλεγχοι ντόπινγκ στους Ολυμπιακούς Αγώνες του Μεξικό. Τα αναβολικά ανδρογόνα στεροειδή προστέθηκαν στην λίστα απαγορευμένων ουσιών της IAAF το 1976, όταν αναπτύχθηκε μέθοδος για την ανίχνευσή τους.

Η πρώτη μεγάλη προσπάθεια για έλεγχο ντόπινγκ έγινε στους Ολυμπιακούς Αγώνες του Μόναχο το 1972, όπου εξετάστηκαν πάνω από 2000 δείγματα αθλητών, κυρίως για διεγερτικά και ναρκωτικά [2,7-8].

1.3 Παγκόσμιο Πρόγραμμα Αντιντόπινγκ

Μετά από αρκετές αναθεωρήσεις της λίστας των απαγορευμένων ουσιών το 1999 ιδρύεται ο Παγκόσμιος Οργανισμός Αντί-Ντόπινγκ (World Anti-Doping Agency, WADA) , με την υποστήριξη ομοσπονδιών και κυβερνήσεων με σκοπό να οργανωθεί και να εναρμονιστεί ο παγκόσμιος αγώνας κατά του ντόπινγκ.

Το παγκόσμιο πρόγραμμα αντι-ντόπινγκ το οποίο συνίσταται σε τρία επίπεδα. Στο πρώτο επίπεδο είναι ο Παγκόσμιος Κώδικας Αντι-ντόπινγκ (W.A.D.A. Code), ο οποίος είναι το θεμελιώδες κείμενο που περιγράφει τις βασικές αρχές του προγράμματος. Στο δεύτερο επίπεδο είναι τα πέντε είδη Διεθνών Πρότυπων (International Standards) και στο τρίτο επίπεδο είναι οι Οδηγίες Βέλτιστης Πρακτικής (Model Rules and Guidelines).

Οι απαγορευμένες ουσίες και μέθοδοι που περιλαμβάνει η λίστα απαγορευμένων ουσιών, μπορούν να ταξινομηθούν σε κατηγορίες. Ορισμένες από τις ουσίες (S1-S5 & M1-M3) απαγορεύονται σε όλες τις περιπτώσεις, εντός και εκτός αγώνων, άλλες (S6, S9) είναι απαγορευμένες μόνο εντός αγώνων ενώ κάποιες άλλες (P1,P2) απαγορεύονται μόνο σε συγκεκριμένα αθλήματα [3-4].

1.4 Κατάλογος Απαγορευμένων Ουσιών

Ο Παγκόσμιος Κώδικας Αντιντόπινγκ αναφέρει ότι μια ουσία θα πρέπει να περιληφθεί στον Κατάλογο Απαγορευμένων Ουσιών, εάν η WADA καθορίσει ότι η ουσία ή η μέθοδος πληροί δύο από τα τρία κριτήρια που ακολουθούν:

1. Ύπαρξη οποιασδήποτε ιατρικής ή άλλης επιστημονικής απόδειξης, φαρμακολογικής επίδρασης ή εμπειρίας ότι η ουσία ή η μέθοδος, από μόνη της ή σε συνδυασμό με άλλες ουσίες ή μεθόδους, έχει τη δυνατότητα να βελτιώσει ή βελτιώνει την αθλητική απόδοση.

2. Ύπαρξη οποιασδήποτε ιατρικής ή άλλης επιστημονικής απόδειξης, φαρμακολογικής επίδρασης ή εμπειρίας ότι η χρήση της ουσίας ή της μεθόδου αποτελεί πραγματικό ή ενδεχόμενο κίνδυνο για την υγεία του αθλητή.

3. Η χρήση της ουσίας ή της μεθόδου παραβιάζει το πνεύμα του αθλητισμού που περιγράφεται στην Εισαγωγή του Κώδικα.

Επιπλέον, μια ουσία ή μέθοδος θα πρέπει να περιληφθεί στον Κατάλογο Απαγορευμένων Ουσιών εάν η WADA καθορίσει ότι υπάρχει ιατρική ή άλλη επιστημονική απόδειξη, φαρμακολογική επίδραση ή εμπειρία ότι η ουσία ή η μέθοδος έχει τη δυνατότητα να καλύψει τη χρήση άλλων Απαγορευμένων Ουσιών και Απαγορευμένων Μεθόδων. Για παράδειγμα, το Αμερικάνικο εργαστήριο BALCO παρήγαγε τετραϋδρογεστρινόνη (tetrahydroxygestrinone, THG) μόνο για τις «ανάγκες» αθλητών. Η άμεση αντίδραση της WADA ήταν η τοποθέτηση της THG μεταξύ των απαγορευμένων ουσιών στον αθλητισμό. Η ενσωμάτωση μιας φαρμακευτικής ουσίας σε μια από τις απαγορευμένες ουσίες του Καταλόγου κρίνεται με βάση τη δράση ή τη χημική δομή της από την Επιτροπή Εργασίας Καταλόγου Απαγορευμένων Ουσιών της WADA, που αποτελείται από επιλεγμένους επιστήμονες. Σύμφωνα με την έκδοση του Απαγορευμένου Καταλόγου του 2015 οι ουσίες (substances, S) και οι μέθοδοι (methods, M) ταξινομούνται σε κατηγορίες και χωρίζονται σε τρεις ομάδες.

- Αυτές που απαγορεύονται και εντός και εκτός αγώνων
- μόνο εντός αγώνων
- και μόνο σε συγκεκριμένα αθλήματα (particular-P) .

1.4.1. Ουσίες που απαγορεύονται σε όλες τις περιπτώσεις (εντός και εκτός αγώνων)

S0. Μη εγκεκριμένες ουσίες

Κάθε φαρμακολογική ουσία η οποία δεν καλύπτεται από καμία από τις επόμενες κατηγορίες του Καταλόγου και χωρίς ισχύουσα έγκριση από οποιαδήποτε κυβερνητική ρυθμιστική υγειονομική αρχή για ανθρώπινη θεραπευτική χρήση απαγορεύεται σε όλες τις περιπτώσεις (π.χ. φάρμακα υπό προ-κλινική ή κλινική μελέτη ή μελέτη που διεκόπη, σχεδιαζόμενα φάρμακα, ουσίες που έχουν εγκριθεί μόνο για κτηνιατρική χρήση).

S1. Αναβολικοί παράγοντες

Οι αναβολικοί παράγοντες είναι χημικά συστατικά ικανά να ενισχύσουν την αναβολική διεργασία στον οργανισμό. Επηρεάζουν το μεταβολισμό των πρωτεϊνών διεγείροντας την πρωτεϊνσύνθεση (αναβολική επίδραση) και αναστέλλοντας τη διάσπαση των πρωτεϊνών (καταβολική δράση). Οι δραστικές αναβολικές ουσίες που περιλαμβάνονται στον Απαγορευμένο Κατάλογο του 2016 υποδιαιρούνται στην ομάδα των αναβολικών ανδρογόνων στεροειδών και στην ομάδα των άλλων αναβολικών παραγόντων.

S1.1. Αναβολικά Ανδρογόνα Στεροειδή

Η ομάδα των αναβολικών ανδρογόνων στεροειδών (Anabolic Androgenic Steroids, AAS) περιλαμβάνει τις ενδογενώς παραγόμενες τεστοστερόνη (testosterone) και διυδροτεστοστερόνη (dehydrotestosterone, DHT), προορμόνες τεστοστερόνης και τους μεταβολίτες τους καθώς και εξωγενή αναβολικά ανδρογόνα στεροειδή, τα οποία είναι συνθετικά παράγωγα της τεστοστερόνης. Η τεστοστερόνη είναι η κύρια ανδρική ορμόνη και αποτελεί ταυτόχρονα και αναβολικό και ανδρογόνο στεροειδές. Συντίθεται από χοληστερόλη στα κύτταρα Leydig των όρχεων, ενώ μικρές ποσότητες τεστοστερόνης εκκρίνονται επίσης από τις ωοθήκες και τα επινεφρίδια. Η DHT είναι ένας ενεργός μεταβολίτης της τεστοστερόνης, ενώ εμφανίζει και ανδρογόνο δράση σε μερικούς ιστούς. Η δεϋδροεπιανδροστερόνη, η ανδροστενδιόνη και η ανδροστενδιόλη αποτελούν στεροειδή που σχηματίζονται στην πορεία της

βιοσύνθεσης των γεννητικών ορμονών και είναι πρόδρομες ορμόνες της ενδογενούς παραγωγής τεστοστερόνης και οιστρογόνων. Αυτά τα πρόδρομα στεροειδή είναι ασθενή ανδρογόνα και εκκρίνονται κυρίως από τα επινεφρίδια και στα δυο φύλλα. Παρέχουν μια δεξαμενή κυκλοφορούντων στεροειδών που μπορούν να μετατραπούν σε δραστικά ανδρογόνα και οιστρογόνα στους περιφερειακούς ιστούς. Η τεστοστερόνη δεν ασκεί κάποια ιδιαίτερη επίδραση στο ανθρώπινο σώμα εάν χορηγηθεί από το στόμα ή παρεντερικά διότι η ορμόνη μεταβολίζεται ταχύτατα από το ήπαρ και θα πρέπει να τροποποιηθεί χημικά, ώστε να παραχθούν κλινικά χρήσιμα παρασκευάσματα. Επιπρόσθετα, ο θεραπευτικός δείκτης της τεστοστερόνης ισούται με 1 που σημαίνει ότι υπάρχει ομοιότητα στην αναλογία μεταξύ αναβολικών και ανδρογόνων επιδράσεων. Τα συνθετικά AAS, διαμορφώνονται έτσι ώστε να επιβραδύνουν τη διαδικασία ορμονικού καταβολισμού και επίσης να διαχωρίζουν τις ανδρογόνες από τις αναβολικές επιδράσεις, έτσι ώστε να διατηρείται μόνο η αναβολική δράση, ενώ οι ανδρογόνες παρενέργειες να μειώνονται στο ελάχιστο. Οι κύριες τροποποιήσεις του μορίου της τεστοστερόνης είναι η αλκυλίωση στη 17α-θέση (χρήση σκευασμάτων από το στόμα) και η εστεροποίηση στη 17β-θέση (παρεντερική χρήση σκευασμάτων). Για τα ενδογενώς παραγόμενα AAS, θετικό αποτέλεσμα σε έλεγχο ντόπινγκ (Αντικανονικό Αναλυτικό Εύρημα) δίνεται όταν η συγκέντρωση της ουσίας ή των μεταβολιτών της ή των δεικτών της και/ή οποιωνδήποτε άλλων σχετικών αναλογιών στο δείγμα αυτό, παρεκκλίνει από το εύρος των φυσιολογικών τιμών που προκύπτουν ενδογενώς, εκτός αν ο αθλητής μπορεί να αποδείξει ότι η συγκέντρωση οφειλόταν σε μια φυσιολογική ή παθολογική κατάσταση.

S1.2. Άλλοι αναβολικοί παράγοντες

Η ομάδα των άλλων αναβολικών παραγόντων περιλαμβάνει διάφορες εξωγενείς ουσίες με αναβολικές παρενέργειες, όπως κλενβουτερόλη, ζιλπατερόλη, ζερανόλη, τιμπολόνη. Η κλενβουτερόλη είναι ένα δραστικό βρογχοδιασταλτικό φάρμακο που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του άσθματος. Η ζερανόλη είναι ένα μυκητοοιστρογόνο με μη-στεροειδή δομή συντιθέμενο από μύκητες (είδος *fusarium*). Η τιμπολόνη είναι ένα συνθετικό στεροειδές που συνδυάζει τις ιδιότητες των οιστρογόνων, της προγεστερόνης και των ανδρογόνων. Οι εκλεκτικοί τροποποιητές των υποδοχέων των ανδρογόνων (selective androgen receptor modulators - SARMs) αποτελούν καινούργιες μη-στεροειδείς ουσίες.

S2. Πεπτιδικές ορμόνες, αυξητικοί παράγοντες και σχετικές ουσίες και μιμητές

Οι ορμόνες πραγματοποιούν την ενδοκρινή ρύθμιση των λειτουργιών του σώματος. Είναι χημικοί αγγελιοφόροι που παράγονται από τους ενδοκρινείς αδένες και/ή από ενδοκρινικά κύτταρα σε άλλα όργανα (νεφρούς, καρδιά, κ.λπ.) των οποίων οι εκκρίσεις απελευθερώνονται άμεσα στο κυκλοφορικό σύστημα και μεταφέρονται στα κύτταρα στόχους, όπου οι ορμόνες, αφότου δεσμευτούν με τους υποδοχείς των πρωτεϊνικών κυττάρων, ασκούν τις συγκεκριμένες επιδράσεις τους. Οι κύριοι ενδοκρινείς αδένες στο σώμα είναι η υπόφυση, ο θυρεοειδής αδένας, οι παραθυρεοειδείς αδένες, τα επινεφρίδια, το πάγκρεας, οι ωοθήκες και οι όρχεις. Ο υποθάλαμος αποτελεί βασικό τμήμα του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος, αλλά επίσης, παράγει και ορμόνες και θεωρείται ως νευροενδοκρινικό όργανο. Ο υποθάλαμος εμφανίζει άμεση αγγειακή σύνδεση με τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης. Τα υποθαλαμικά νευρικά κύτταρα εκκρίνουν μέσα σε αυτή την πυλαία κυκλοφορία διάφορες εκλυτικές και ανασταλτικές ορμόνες που ρυθμίζουν την υποφυσιακή έκκριση. Κάθε μία από τις αρχικές ορμόνες του προσθίου λοβού της υπόφυσης έχει μια υποθαλαμική εκλυτική ορμόνη, συχνά αποκαλούμενη ως εκλυτικός παράγοντας (η εκλυτική ορμόνη της γοναδοτροπίνης διεγείρει την έκκριση ταυτόχρονα και των δύο γοναδοτροπινών του προσθίου λοβού της υπόφυσης, της ωχρινοτρόπου και της ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης). Η ερυθροποιητίνη (erythropoietin, EPO) είναι μια γλυκοπρωτεϊνική ορμόνη που απελευθερώνεται από τους νεφρούς και το ήπαρ (η έκκριση της διεγείρεται υπό συνθήκες υποξίας). Η ανθρώπινη αυξητική ορμόνη (human Growth Hormone, hGH) είναι μια πεπτιδική ορμόνη που εκκρίνεται από τον αδένα του προσθίου λοβού της υπόφυσης. Η υποθαλαμική εκλυτική ορμόνη της αυξητικής ορμόνης (Growth Hormone Releasing Hormone, GHRH) και πιθανώς η γκρελίνη (ghrelin) διεγείρουν την έκκριση hGH. Εκτός των άλλων άμεσων επιδράσεων της στα κύτταρα στόχους, η hGH διεγείρει τη σύνθεση του αυξητικού παράγοντα 1 της ινσουλίνης (Insulin Growth Factor-1, IGF-1) σε όλους τους ιστούς. Στους περισσότερους ιστούς ο IGF-1 ασκεί τοπικές δράσεις, αλλά από το ήπαρ εκκρίνεται μέσα στην κυκλοφορία. Η ινσουλίνη εκκρίνεται από τα β-κύτταρα των νησιδίων του Langerhans στο ενδοκρινές πάγκρεας. Κυρίως δρα στο μεταβολισμό των υδατανθράκων, των λιπιδίων και των πρωτεϊνών. Επιτρέπεται μόνο για τη θεραπεία αθλητών με βεβαιωμένο ινσουλινο-εξαρτώμενο σακχαρώδη διαβήτη. Ο μηχανοαυξητικός παράγοντας (Mechano Growth Factor, MGF) προέρχεται από το γονίδιο του IGF-1 με εναλλακτική σύνδεση και εκφράζεται στους σκελετικούς μύες. Στις

γοναδοτροπίνες οι οποίες είναι απαγορευμένες μόνο στους άνδρες, ανήκουν η ωχρινοτρόπος ορμόνη (Luteinizing Hormone, LH) και η ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη (human Chorionic Gonadotrophin, hCG). Η LH είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που εκκρίνεται από τον αδένα του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης, η οποία ρυθμίζει τις εκκριτικές και γαμετογενετικές λειτουργίες των όρχεων και των ωοθηκών. Η υποθαλαμική εκλυτική ορμόνη των γοναδοτροπινών (Gonadotropin Releasing Hormone, GnRH) διεγείρει την έκκριση της LH. Η hCG είναι μια ορμόνη του πλακούντα και η παρουσία της στο πλάσμα και τα ούρα αποτελεί μια από τις πιο πρώιμες ενδείξεις για εγκυμοσύνη και συνιστά τη βάση για τα τεστ εγκυμοσύνης. Μικρές ποσότητες hCG εκκρίνονται επίσης από διάφορες νεοπλασίες και στα δύο φύλα (καρκινικός δείκτης). Η κορτικοτροπίνη (φλοιοεπινεφριδιοτρόπος ορμόνη, Adrenocorticotrophic Hormone, ACTH) παράγεται στον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης και ρυθμίζει την έκκριση των στεροειδών ορμονών από το φλοιό των επινεφριδίων. Κάτω από την επίδραση ποικίλων στρεσογόνων παραγόντων, ο υποθάλαμος εκκρίνει την εκλυτική ορμόνη της κορτικοτροπίνης (Corticotropin Releasing Hormone, CRH), η οποία διεγείρει την απελευθέρωση της ACTH. Οι παραπάνω ορμόνες και οι εκλυτικοί τους παράγοντες καθώς και άλλες ουσίες με παρόμοια χημική δομή ή παρόμοιες βιοϊατρικές επιπτώσεις απαγορεύονται.

S3. Βήτα-2 αγωνιστές

Οι εκλεκτικοί βήτα-2 αγωνιστές των αδρενεργικών υποδοχέων (ή β^2 αγωνιστές), είναι πιο κοινά γνωστοί ως ανακουφιστικά του άσθματος ή βρογχοδιασταλτικά. Είναι φάρμακα που χαλαρώνουν και ανοίγουν τους αεραγωγούς (βρόγχους) στους πνεύμονες, οι οποίοι γίνονται πιο στενοί κατά τη διάρκεια μιας ασθματικής κρίσης. Τα πιο γνωστά φάρμακα αυτής της ομάδας είναι η σαλβουταμόλη και η τερβουταλίνη.

S4. Ορμονικοί και μεταβολικοί ρυθμιστές

Οι ορμόνες είναι αγγελιοφόρα μόρια που απελευθερώνονται από ενδοκρινείς αδένες για να ρυθμίσουν συγκεκριμένες σωματικές λειτουργίες όπως τα επίπεδα της γλυκόζης του αίματος ή τη μυϊκή ανάπτυξη. Οι ορμόνες δεσμεύονται από τους υποδοχείς στην κυτταρική μεμβράνη ή από τους υποδοχείς στον κυτταρικό πυρήνα. Έτσι, λοιπόν, οι ανταγωνιστές ορμονών και οι ρυθμιστές είναι ουσίες που επηρεάζουν αυτές τις δράσεις αναστέλλοντας ή

διεγείροντας συγκεκριμένους υποδοχείς και περαιτέρω επιταχύνοντας ή επιβραδύνοντας συγκεκριμένες αντιδράσεις από τα ένζυμα. Βασικές κατηγορίες τέτοιων ρυθμιστών είναι οι αναστολείς της αρωματάσης (π.χ. εξεμεστάνη, φορμεστάνη, εκλεκτικοί τροποποιητές υποδοχέων οιστρογόνων (Selective Estrogen Receptor Modulators, SERMs, π.χ. ραλοξιφένη, ταμοξιφένη, αντι-οιστρογονικές ουσίες, παράγοντες που τροποποιούν τη λειτουργία της μυοστατίνης και μεταβολικοί ρυθμιστές όπως η τριμεταζιδίνη.

S5. Διουρητικά και παράγοντες κάλυψης

Τα διουρητικά είναι προϊόντα που βοηθούν στην αποβολή των υγρών από το σώμα. Προκαλούν απώλεια νερού αναστέλλοντας μερικώς την επαναρρόφηση του νερού, δηλαδή αυξάνουν τον ρυθμό της ούρησης. Ισχυρά διουρητικά μπορούν να αυξήσουν τη ροή των ούρων ως 6 περίπου λίτρα ανά ημέρα. Τα διουρητικά περιέχουν ουσίες όπως ακεταζολαμίδη, αμιλορίδη, κανρενόνη, φουροσεμίδη, ινδαπαμίδη, τριαμετένη και θειαζίδες όπως βενδροφλουμεθειαζίδη, χλωροθειαζίδη, υδροχλωροθειαζίδη και άλλες ουσίες με παρόμοια χημική δομή ή παρόμοιες βιολογικές επιδράσεις.

Τα διουρητικά απαγορεύονται εντός και εκτός αγώνων εκτός από ελάχιστα (π.χ. δροσπερινόνη) που είναι νόμιμα. Τα διουρητικά και οι άλλοι παράγοντες συγκάλυψης ως κατηγορία φαρμάκων βρίσκονται στην πέμπτη θέση στη συχνότητα εμφάνισης κρουσμάτων ντόπινγκ με ποσοστό της τάξης του 6.7% στο σύνολο των θετικών δειγμάτων παγκοσμίως. Οι παράγοντες συγκάλυψης (μάσκες) είναι συστατικά που λαμβάνονται με σκοπό να κρύψουν ή να καλύψουν την παρουσία συγκεκριμένων παράνομων φαρμάκων που εξετάζονται στον έλεγχο ντόπινγκ. Οι παράγοντες συγκάλυψης έχουν τη δυνατότητα να μειώσουν ή να αποκρύψουν την απαγορευμένη ουσία στα ούρα. Τα διουρητικά μπορούν να θεωρηθούν ως παράγοντες συγκάλυψης εξαιτίας της προκαλούμενης αραίωσης των ούρων που οδηγεί σε χαμηλότερα επίπεδα έκκρισης της απαγορευμένης ουσίας από το σώμα.

M1. Χειρισμός του αίματος και των συστατικών του

Απαγορεύεται το ντόπινγκ αίματος συμπεριλαμβανομένης της χρήσης αυτόλογου, ομόλογου ή ετερόλογου αίματος ή παραγώγων ερυθρών αιμοσφαιρίων οποιασδήποτε προέλευσης. Επιπλέον, απαγορεύεται η τεχνητή

ενίσχυση της πρόσληψης, μεταφοράς και απόδοσης του οξυγόνου, με υπερφθωρισμένες χημικές ουσίες, (εφαππροξιράλη-RSR13) και τροποποιημένα παράγωγα αιμοσφαιρίνης (π.χ. υποκατάστατα του αίματος με βάση την αιμοσφαιρίνη, μικροεγκαψυλιωμένα προϊόντα αιμοσφαιρίνης) χωρίς όμως να περιορίζεται μόνο σε αυτά.

M2. Χημικός και φυσικός χειρισμός

Ο χημικός και φυσικός χειρισμός συνίσταται στη χρήση ουσιών και/ή μεθόδων οι οποίες πιθανά να τροποποιήσουν ή να προσπαθήσουν να τροποποιήσουν τα δείγματα που συλλέγονται κατά τη διάρκεια των ελέγχων ντόπινγκ, έτσι ώστε να μεταβάλλουν την ακεραιότητα και την εγκυρότητά τους. Ο χημικός και φυσικός χειρισμός των δειγμάτων απαγορεύεται και περιλαμβάνει τον καθετηριασμό, την αντικατάσταση των ούρων (με ούρα άλλου) και/ή τη μεταβολή τους χωρίς όμως να περιορίζεται μόνο σε αυτούς τους χειρισμούς. Επιπλέον, οι ενδοφλέβιες εγχύσεις απαγορεύονται εκτός αν πρόκειται για δικαιολογημένα σύννομη ιατρική θεραπεία. Ο χημικός και φυσικός χειρισμός είναι η τελευταία σε συχνότητα εμφάνισης κατηγορία ντόπινγκ με ποσοστό 0,1% του συνόλου των θετικών δειγμάτων παγκοσμίως. Ο φυσικός και όχι ο χημικός χειρισμός του δείγματος είναι συνήθως η προτιμώμενη μέθοδος. Υπάρχουν διάφορες τεχνικές χημικής και φυσικής τροποποίησης του δείγματος όπως οι παράγοντες συγκάλυψης με την προβενεσίδη που μπλοκάρει τη νεφρική απέκκριση τεστοστερόνης, παρέχοντας υποκατάστατα δείγματα ούρων για έλεγχο και χημικά τροποποιημένα ούρα. Η προβενεσίδη χρησιμοποιείται για να καλύψει τη χρήση ουσιών ντόπινγκ (παράγοντας συγκάλυψης) και ειδικότερα αναβολικών φαρμάκων καθυστερώντας την εξουδετέρωσή τους. Ωστόσο, οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι παράγοντες συγκάλυψης είναι η φιναστερίδη και η επιτεστοστερόνη. Συνεπώς, οι έλεγχοι ντόπινγκ ανιχνεύουν τους παράγοντες συγκάλυψης και αναλύουν ένα φάσμα χημικών και φυσικών ιδιοτήτων των ούρων ώστε να διαπιστωθεί η παραποίηση του δείγματος.

M3. Γονιδιακό ντόπινγκ

Ορίζεται ως η μη θεραπευτική χρήση των κυττάρων, γονιδίων ή γενετικών στοιχείων, ή η ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων που έχουν την ικανότητα να βελτιώνουν την αθλητική απόδοση. Με βάση τον Παγκόσμιο Οργανισμό Αντιντόπινγκ, απαγορεύεται η μεταφορά πολυμερών νουκλεϊκών οξέων ή αναλόγων νουκλεϊκών οξέων και η χρήση φυσιολογικών ή γενετικά τροποποιημένων κυττάρων.

1.4.2. Ουσίες και μέθοδοι που απαγορεύονται μόνο εντός αγώνων

S6. Διεγερτικά

Ο συμπαθητικός κλάδος του κεντρικού νευρικού συστήματος παίζει σημαντικό ρόλο στην έκθεση του οργανισμού σε κατάσταση μέγιστης επαγρύπνησης και ολικής φυσικής κινητοποίησης. Τα διεγερτικά (συμπαθομιμητικά) είναι τα φάρμακα που ενεργοποιούν το κεντρικό νευρικό σύστημα με τη δράση της αδρεναλίνης και της νοραδρεναλίνης. Είναι ικανά να βελτιώσουν τη διάθεση και τη διέγερση, να εξαλείψουν ή να μειώσουν το αίσθημα της κόπωσης και να βελτιώσουν τη φυσική απόδοση. Ωστόσο, τα διεγερτικά παρουσιάζουν μία μέτρια επίδραση στην απόδοση και μόνο όταν καταναλώνονται υψηλές δόσεις αυτών των ουσιών δίνεται θετικό δείγμα. Τα πιο διαδεδομένα διεγερτικά που χρησιμοποιούνται για σκοπούς ντόπινγκ είναι οι αμφεταμίνες, οι εφεδρίνες, η κοκαΐνη, το σκεύασμα «έκσταση», η μεθυλφενιδάτη κ.α. Η νικοτίνη και η καφεΐνη χρησιμοποιούνται επίσης συχνά ως διεγερτικά, αλλά δεν απαγορεύονται στον αθλητισμό.

S7. Ναρκωτικά

Τα ναρκωτικά θεωρούνται ως ουσίες και φάρμακα ικανά να μεταβάλουν τη ψυχική και φυσική κατάσταση ενός οργανισμού σε ένα ευρύ πεδίο από τον ύπνο και την πλήρη ακινητοποίηση έως την ευφορία και τη διέγερση. Αυτός ο ευρέως αποδεκτός ορισμός των ναρκωτικών είναι, επομένως, περισσότερο σχετικός με τα συμπτώματα που παρατηρούνται παρά με τη συγκεκριμένη δράση των ναρκωτικών ουσιών. Οι επιδράσεις των διαφόρων ναρκωτικών ουσιών προσδιορίζονται ακριβέστερα με βάση τη χημική τους δομή και τους βιολογικούς μηχανισμούς που διεγείρουν προκαλώντας μεταβολές στον ανθρώπινο

οργανισμό. Ένα ναρκωτικό είναι ένα εθιστικό φάρμακο που μειώνει τον πόνο, προκαλεί υπνηλία και μπορεί να μεταβάλει τη διάθεση ή τη συμπεριφορά. Ένα αναλγητικό ναρκωτικό συνήθως σημαίνει οπιοειδές ναρκωτικό, που αναφέρεται σε όλες τις φυσικές, ημισυνθετικές και συνθετικές ουσίες που δρουν φαρμακολογικά όπως η μορφίνη (το κύριο συστατικό του φυσικού οπίου) και η κωδεΐνη. Τα οπιοειδή ταξινομούνται στον Κατάλογο των απαγορευμένων ουσιών και μεθόδων της WADA ως ναρκωτικά. Τα οπιοειδή δρουν με οπιούχους υποδοχείς που εντοπίζονται τόσο στο κεντρικό όσο και στο περιφερικό νευρικό σύστημα. Ωστόσο, η κύρια δράση των οπιοειδών είναι η μεταβολή της λειτουργίας του κεντρικού νευρικού συστήματος. Η περιφερική δράση των αναλγητικών ναρκωτικών συνδέεται μερικώς με τις επιδράσεις της απελευθέρωσης της ισταμίνης που ακολουθεί τη λήψη ναρκωτικών. Σε κάποιες χώρες, το όνομα ναρκωτικά αφορά επίσης την κοκαΐνη, η οποία χημικά δεν είναι ναρκωτικό. Η άλλη ομάδα ουσιών, που λαθεμένα ονομάστηκε ως ναρκωτικά, είναι τα συμπαθομιμητικά που ταξινομούνται στον Κατάλογο της WADA ως διεγερτικά, όπως προαναφέρθηκε. Η τρίτη ομάδα αποτελείται από ουσίες ικανές να προκαλέσουν ψυχικές μεταβολές, όπως αυτές που εκδηλώνονται στην πορεία της ψύχωσης. Αυτές οι ουσίες αποκαλούνται ψυχομιμητικά, ή ψυχεδελικά, ή παραισθησιογόνα. Μεταξύ των ψυχομιμητικών, μόνο τα κανναβινοειδή τοποθετήθηκαν στον Κατάλογο του WADA ως ξεχωριστή ομάδα ουσιών.

S8. Κανναβινοειδή

Τα κανναβινοειδή είναι μια ομάδα φυσικών ουσιών που ανευρίσκονται στο φυτό Cannabis Sativa καθώς επίσης και τα συνθετικά τους αναλογικά ή οι μεταβολίτες τους. Χημικά, είναι παράγωγα της διβενζοπυρένης ή των μονοτερπενοειδών. Η Cannabis Sativa περιλαμβάνει περισσότερα από 420 χημικά συστατικά μεταξύ των οποίων τα πιο σημαντικά είναι: Δ9-τετραϋδροκανναβινόλη (Δ9-THC), Δ8-τετραϋδροκανναβινόλη (Δ8-THC), κανναβινόλη (CBN) και κανναβιδιόλη (CBD). Η κάνναβη, το χασίς και η μαριχουάνα αποτελούν τα συνηθέστερα φυσικά κανναβινοειδή. Από την άλλη τα κύρια χημικά παράγωγα (της διβενζοπυρένης ή των μονοτερπενοειδών) είναι η Δ9-τετραϋδροκανναβινόλη (Δ9-tetrahydrocannabinol, Δ9-THC), η Δ8-τετραϋδροκανναβινόλη (Δ8-tetrahydrocannabinol, Δ9-THC), η κανναβινόλη (cannabinol, CBN) και η κανναβιδιόλη (cannabidiol, CBD). Η χρόνια κατανάλωση κανναβινοειδών μπορεί να οδηγήσει σε καταστροφή μερικών νευρικών κανναβινοειδών υποδοχέων στον εγκέφαλο οδηγώντας σε έλλειψη προσοχής, απώλεια μνήμης και μειωμένη ικανότητα μάθησης.

S9. Γλυκοκορτικοστεροειδή

Τα γλυκοκορτικοειδή είναι φυσικά παραγόμενες στεροειδείς ορμόνες, ή συνθετικά συστατικά, που εμποδίζουν τη διαδικασία της φλεγμονής. Τα φυσικά γλυκοκορτικοειδή παράγονται στον φλοιό των επινεφριδίων. Φυσιολογικά, συμμετέχουν επίσης σε διάφορες μεταβολικές διαδικασίες και κυρίως στο μεταβολισμό της γλυκόζης και των λιπιδίων. Διαφέρουν από τα αναβολικά στεροειδή που χρησιμοποιούν οι αθλητές για την αύξηση της μυϊκής μάζας και δύναμης. Αντίθετα, τα γλυκοκορτικοειδή αποτελούν καταβολικά στεροειδή. Τα γλυκοκορτικοειδή και τα αλατοκορτικοειδή αποκαλούνται κοινώς κορτικοστεροειδή. Όλα έχουν τον ίδιο κοινό στεροειδή σκελετό αλλά διαφέρουν στην ομάδα που συνδέεται στον C17 ή στην κατεύθυνση αυτής της ομάδας. Η υδροκορτιζόνη, ένα αντιφλεγμονώδες φάρμακο είναι το πιο χρησιμοποιούμενο γλυκοκορτικοστεροειδές. Επιπρόσθετα με τα φυσικά κορτικοστεροειδή, (κορτιζόλη, δεοξυκορτόνη και υδροκορτιζόνη) έχουν αναπτυχθεί και συνθετικά στεροειδή. Αυτά τα χημικά ανάλογα προσπαθούν να διαχωρίσουν τις γλυκοκορτικοειδείς επιδράσεις από αυτές των αλατοκορτικοειδών. Το πιο μελετημένο και χρησιμοποιούμενο γλυκοκορτικοειδές είναι η κορτιζόλη.

1.4.3. Ουσίες που απαγορεύονται σε συγκεκριμένα αθλήματα

P1. Αλκοόλ

Το αλκοόλ ή χημικώς οριζόμενα «η αιθανόλη», είναι μια εξωγενής ουσία που περιλαμβάνεται στον Κατάλογο από το 2008. Απαγορεύεται σε ορισμένα αθλήματα και επί του παρόντος μόνο εντός αγώνων και αυτά είναι η αεροναυτική, η τοξοβολία, το αυτοκίνητο, ο μοτοσυκλετισμός και η λεμβοδρομία ισχύος. Η ανίχνευση γίνεται με ανάλυση του εκπνεόμενου αέρα και/ή του αίματος. Το όριο συγκέντρωσης αλκοόλης (στο αίμα), υπέρβαση του οποίου συνιστά παράβαση ντόπινγκ, είναι τα 0,10 g/L. Το αλκοόλ είναι ένα κατασταλτικό του κεντρικού νευρικού συστήματος που επιβραδύνει τις λειτουργίες του εγκεφάλου και του σώματος. Σκοπός της χρήσης του αλκοόλ είναι η μείωση της νευρικότητας, η μείωση της υπερκινητικότητας και η χαλάρωση. Συνεπώς, η χρήση του αλκοόλ

προτιμάται σε αθλήματα που χρειάζονται αυξημένη συγκέντρωση, όπως η τοξοβολία. Το αλκοόλ δεν οδηγεί σε βελτίωση της φυσικής απόδοσης. Ο συνδυασμός του αλκοόλ με άλλες ουσίες μπορεί να μεγεθύνει την επίδραση του αλκοόλ ή των άλλων ταυτόχρονα χορηγούμενων ουσιών. Γενικά, το αλκοόλ απαγορεύεται σε αθλήματα όπου η χρήση του μπορεί να θεωρηθεί επιζήμια για την απόδοση του αθλητή ή επικίνδυνη για την ασφάλεια, όπως στον μηχανοκίνητο αθλητισμό.

P2. Βήτα-αναστολείς

Οι ουσίες αυτές επιβραδύνουν τους ρυθμούς της καρδιάς και χρησιμοποιούνται σε αθλήματα που στηρίζονται στην ηρεμία του αγωνιζόμενου, για την εκτέλεση λεπτών και ακριβών κινήσεων. Οι β αναστολείς απαγορεύονται μόνο εντός αγώνων, εκτός εάν καθορίζεται διαφορετικά, στα παρακάτω αθλήματα: τοξοβολία, αυτοκίνητο, μπιλιάρδο, βελάκια, γκολφ, σκοποβολή, σκι, χιονοσανίδα και υποθαλάσσια σπορ. Οι σημαντικότεροι β αναστολείς είναι η ατενολόλη, η καρτεολόλη, η κελιπρολόλη, η λαβεταλόλη, η ναδολόλη, η προπρανολόλη κ.α. Οι β αναστολείς μπορεί να χρησιμοποιηθούν για τη θεραπεία ορισμένων καρδιακών παθήσεων. Είναι ένας τύπος φαρμάκου που χρησιμοποιείται σε διάφορες ενδείξεις, αλλά κυρίως για την αντιμετώπιση καρδιακών αρρυθμιών και προληπτικά μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου. Η προπρανολόλη ήταν ο πρώτος κλινικά χρήσιμος β αναστολέας. Θεωρείται ως μια από τις πιο σημαντικές συνεισφορές στην κλινική ιατρική και φαρμακολογία του 20^{ου} αιώνα .

Αξίζει να αναφερθεί ότι τα περισσότερα από τα συμπληρώματα διατροφής δεν απαγορεύονται από τον WADA. Τα συμπληρώματα διατροφής είναι ουσίες που υπάρχουν φυσικά στο σώμα και που καταναλώνονται επιπρόσθετα με τη φυσιολογική καθημερινή διατροφή. Οι ουσίες αυτές είναι εν μέρει απαραίτητες για την αύξηση και την ανάπτυξη ενός πολυκύτταρου οργανισμού, όπως το ανθρώπινο σώμα. Η πρόσθετη λήψη συμπληρωμάτων διατροφής για ιατρικούς λόγους έγκειται σε περιπτώσεις σχετικής ανεπάρκειας στο σώμα λόγω υποσιτισμού ή ασθένειας. Η χρήση συμπληρωμάτων διατροφής είναι διαδεδομένη στον αθλητισμό παγκοσμίως και δεν αφορά αποκλειστικά αθλητές

υψηλού επιπέδου. Οι κύριοι λόγοι για τη χρήση διατροφικών συμπληρωμάτων είναι η βελτίωση της φυσικής απόδοσης, η προαγωγή της υγείας, η μείωση του κινδύνου για εκδήλωση ασθενειών και το λιγότερο ο έλεγχος του σωματικού βάρους. Ένας από τους κύριους παράγοντες κινδύνου των συμπληρωμάτων διατροφής εκτός από την πιθανότητα θετικού ελέγχου ντόπινγκ από «μολυσμένα» συμπληρώματα είναι το γεγονός ότι πολλοί αθλητές χρησιμοποιούν συμπληρώματα χωρίς τη γνώση των παρενεργειών και των συνιστώμενων επιπέδων πρόσληψης. Στο πλαίσιο της τεράστιας αγοράς των συμπληρωμάτων διατροφής, το όριο μεταξύ της συνιστώμενης και της εσφαλμένης χρήσης δεν είναι ξεκάθαρο.

1.5 Διαπίστευση εργαστηρίων για τον έλεγχο doping

Η διαδικασία χορήγησης της διαπίστευσης σε ένα εργαστήριο γίνεται με βάση το διεθνές πρότυπο για τα εργαστήρια (International Standard for Laboratories, ISL). Το ISL αποτελεί ένα σύνολο κανονισμών που ορίζουν τις απαιτήσεις του WADA για την απόδοση της διαπίστευσης σε ένα εργαστήριο, αλλά και για το επίπεδο λειτουργίας του. Ο WADA εξασφαλίζει ότι η λειτουργία των διαπιστευμένων εργαστηρίων διατηρείται στο κατάλληλο επίπεδο με την εφαρμογή του ISO/ IEC 17025 για την ανάλυση δειγμάτων ούρων και αίματος με σκοπό τον έλεγχο χρήσης απαγορευμένων ουσιών, αλλά και με την υποχρέωση του εργαστηρίου να συμμετέχει σε διεργαστηριακά σχήματα ελέγχου ποιότητας. Επιπλέον, περιλαμβάνει κώδικα δεοντολογίας και εχεμύθειας σχετικά με τις γνώσεις και τις πληροφορίες που αφορούν τους αθλητές οι οποίες κοινοποιούνται στο προσωπικό του εργαστηρίου. Ο στόχος του διεθνούς αυτού προτύπου είναι η εξασφάλιση της παραγωγής έγκυρων αποτελεσμάτων από τους ελέγχους doping και ομοιόμορφων αποτελεσμάτων από όλα τα διαπιστευμένα εργαστήρια, τα οποία είναι 34 στον αριθμό, ενώ υπάρχουν και άλλα εργαστήρια τα οποία έχουν εκφράσει ενδιαφέρον να κερδίσουν την διαπίστευση.

Επιπλέον, ένα ελάχιστο απαιτούμενο όριο επίδοσης (Minimum Required Performance Level, MPRL) καθορίζεται από τη WADA για κάθε απαγορευμένη ουσία. Πρόκειται για την ελάχιστη συγκέντρωση της ουσίας την οποία υποχρεωτικά πρέπει να μπορεί να ανιχνεύσει το εργαστήριο. Συνήθως βρίσκεται στην τάξη μεγέθους των ng/ml. Τα εργαστήρια που εκτελούν τους ελέγχους doping πρέπει να αποδείξουν πως μπορούν να λειτουργήσουν στο MPRL. Την επίδοση αυτή μπορούν να την επιτύχουν είτε ακολουθώντας τις κατευθυντήριες οδηγίες που εκδίδονται από τη WADA, είτε χρησιμοποιώντας διαφορετικά μέσα.

Επιπρόσθετα, η WADA εκδίδει και έγγραφα πρακτικού περιεχομένου (Technical Documents) τα οποία γνωστοποιούν νέες, υποχρεωτικές υποδείξεις για τα διαπιστευμένα εργαστήρια ως προς τον τρόπο λειτουργίας σε ορισμένους τομείς. Το ISL και τα technical documents διευκρινίζουν ακριβώς τα κριτήρια τα οποία πρέπει να πληρούν τα διαπιστευμένα εργαστήρια. Αν τα ήδη διαπιστευμένα εργαστήρια πάψουν να συγχρονίζονται με τα technical documents κινδυνεύουν να χάσουν προσωρινά τη διαπίστευση τους.

1.5.1. Ελληνικό εργαστήριο ελέγχου doping

Το Ελληνικό Εργαστήριο Doping (Doping Control Laboratory of Athens, DCLA) ιδρύθηκε το 1986 και βρίσκεται στο χώρο του Ολυμπιακού Αθλητικού Κέντρου της Αθήνας (ΟΑΚΑ), “Σπύρος Λούης”. Ως διαπιστευμένο από τη WADA εργαστήριο, έχει την ικανότητα να παρέχει ολοκληρωμένες υπηρεσίες ελέγχου doping για εθνικές και διεθνείς αθλητικές ομοσπονδίες, για δείγματα αθλητών και αλόγων ιπποδρομιών. Έχει μέχρι στιγμής πρωτοστατήσει σε 3 μεγάλες διοργανώσεις σχετικά με το doping: το 6ο παγκόσμιο πρωτάθλημα κλασσικού αθλητισμού το 1997, τους 28ους Ολυμπιακούς Αγώνες το 2004 και τους 17ους Μεσογειακούς αγώνες το 2013. Ειδικά για τους Ολυμπιακούς αγώνες του 2004, απέσπασε την παγκόσμια αναγνώριση για τον πλέον αποτελεσματικό έλεγχο doping σε διοργάνωση Ολυμπιακών Αγώνων.

Από το 2000, έχει κερδίσει και διατηρεί την διαπίστευση ISO 17025 του ΕΣΥΔ (Εθνικό Συμβούλιο Διαπίστευσης). Ήταν μάλιστα το πρώτο εργαστήριο στην Ελλάδα το οποίο κέρδισε τη διαπίστευση του ΕΣΥΔ, έχοντας αριθμό πιστοποιητικού Νο.1. Συμμετέχει στο διεργαστηριακό σχήμα ελέγχου ποιότητας (External Quality Assessment Scheme, EQAS) της WADA, το οποίο περιλαμβάνει 3 εκπαιδευτικές δοκιμασίες επάρκειας (educational proficiency tests) το χρόνο και διπλές- τυφλές δοκιμασίες. Επιπλέον, συμμετέχει σε δοκιμασίες-

ελέγχου επάρκειας από τους συνδέσμους AORC

(Association of Official Racing Chemists) και WAADS (World Association of Anti-Doping Scientists). Επιπρόσθετα, το ελληνικό εργαστήριο doping οφείλει να συμβαδίζει με τις εκάστοτε απαιτήσεις του WADA (για παράδειγμα τα technical documents), είτε σχετικά με τη διαχείριση των δεδομένων ή με την προσθήκη νέων μεθόδων ή οργάνων, ώστε να διατηρήσει την διαπίστευσή του.

Μέσα στα επιτεύγματα του ελληνικού εργαστηρίου αντιστόπινγκ είναι ότι έχει καταφέρει να αυξήσει το ποσοστό της ανίχνευσης απαγορευμένων ουσιών κάτω από το MPRL (στο 22,1% το 2011), χρησιμοποιώντας διάφορες

μεθοδολογίες (σε όργανα GC/MS, GC/HRMS και LC-Q-TOFMS). Παράλληλα, σημείωσε χαμηλά ποσοστά ανάλυσης Β δειγμάτων. Το Β δείγμα είναι δείγμα που συλλέγεται την ίδια στιγμή με το Α δείγμα, το οποίο όμως αποσφραγίζεται μόνο παρουσία του ενδιαφερόμενου αθλητή ή/και εκπροσώπου του και στο οποίο εκτελούνται μόνο επιβεβαιωτικοί έλεγχοι, έπειτα από θετικό αποτέλεσμα στην ανάλυση του Α δείγματος. Το υψηλότερο ποσοστό σημειώνεται το 2006 (21,3%). Η μείωση του συγκεκριμένου ποσοστού, υποδηλώνει αποδοχή των αποτελεσμάτων των Α δειγμάτων και εμπιστοσύνη των αθλητικών φορέων στην ακρίβεια που επιτυγχάνει το εργαστήριο στις αναλύσεις[5-7].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Αεριοχρωματογραφία σε σύζευξη με φασματομετρία μαζών

2.1 Εισαγωγή

Η χρωματογραφία είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική διαχωρισμού, η οποία βρίσκει εφαρμογές σε κάθε κλάδο επιστήμης. Η χρωματογραφία εφευρέθηκε από τον Ρώσο βοτανολόγο Mikhail Tswett στις αρχές του 20ου αιώνα, ο οποίος και της έδωσε το όνομα αυτό. Χρησιμοποίησε την τεχνική αυτή για να διαχωρίσει διάφορες φυτικές χρωστικές, όπως ξανθοφύλλες και χλωροφύλλες, με διαβίβαση διαλύματός τους μέσω υάλινου σωλήνα, ο οποίος ήταν γεμάτος με εξαιρετικά λεπτό ανθρακικό ασβέστιο. Οι διαχωριζόμενες ουσίες εμφανίζονταν ως χρωματιστές ζώνες στη στήλη και αυτός ήταν ο λόγος για τον οποίο ο Tswett επέλεξε, από την Ελληνική γλώσσα, το χαρακτηριστικό αυτό όνομα για την τεχνική.

Σήμερα ο όρος χρωματογραφία αποδίδεται σε μια μεγάλη ποικιλία μεθόδων οι οποίες στοχεύουν στον διαχωρισμό ουσιών, με παραπλήσιες χημικές ιδιότητες, από σύνθετα μίγματα. Σε όλους τους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς το δείγμα κινείται σε μία κινητή φάση (mobile phase), η οποία μπορεί να είναι ένα αέριο, ένα υγρό ή ένα υπερκρίσιμο ρευστό. Στη συνέχεια, η κινητή φάση εξαναγκάζεται να διέλθει μέσω μίας στατικής φάσης (stationary phase), η οποία είναι καθηλωμένη σε μία στήλη ή σε μία στερεά επιφάνεια. Οι διαφορές στην συγγένεια των ουσιών ως προς τις δύο φάσεις, οδηγεί σε διαφορετική κατανομή

των ουσιών μεταξύ στατικής και κινητής φάσης με αποτέλεσμα οι ουσίες να μεταναστεύουν με διαφορετικές ταχύτητες κατά μήκος της διαδρομής της κινητής φάσης. Τα συστατικά που κατακρατούνται ισχυρότερα από τη στατική φάση κινούνται αργά κατά τη ροή της κινητής φάσης, ενώ τα συστατικά που κατακρατούνται ασθενέστερα κινούνται ταχύτερα. Ως αποτέλεσμα αυτών των διαφορών στην ευκινησία, τα συστατικά του δείγματος διαχωρίζονται καταλαμβάνοντας το καθένα διαφορετικές ζώνες, και στη συνέχεια μπορούν να προσδιοριστούν ποιοτικά ή/και ποσοτικά.

Ανάλογα με τον τύπο της κινητής φάσης και το είδος των ισορροπιών που εμπλέκονται στην ανταλλαγή των διαλυμένων ουσιών μεταξύ των φάσεων, υπάρχουν οι εξής τύποι χρωματογραφίας: η υγροχρωματογραφία, η αεριοχρωματογραφία και η χρωματογραφία υπερκρίσιμου ρευστού. Όπως είναι φανερό και από τις ονομασίες, οι κινητές φάσεις των τριών χρωματογραφικών τεχνικών είναι υγρά, αέρια και υπερκρίσιμα ρευστά, αντίστοιχα.

Οι αναλυτικές τεχνικές που εφαρμόζονται από τα εργαστήρια ντόπινγκ διαφοροποιούνται ανάλογα με τον τύπο του δείγματος, τη χημική δομή των εξεταζόμενων μορίων, τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες και ανάλογα με την έκταση του μεταβολισμού τους στον ανθρώπινο οργανισμό. Οι κυριότερες αναλυτικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται είναι οι εξής:

- Αέρια χρωματογραφία (GC) με φασματομετρία μαζών (MS) και διαδοχική φασματομετρία μάζας (MS/MS) για την ανίχνευση των διεγερτικών, των ναρκωτικών, των διουρητικών, των στεροειδών, των β-αναστολέων κλπ.
- Υγρή χρωματογραφία (LC) με ανιχνευτή UV/VIS - ή φασματομετρία μάζας (MS) και διαδοχική φασματομετρία μάζας (MS/MS) για την ανίχνευση των γλυκοκορτικοστεροειδών, των διεγερτικών, των ναρκωτικών, των διουρητικών κλπ.
- Αέρια Χρωματογραφία με καύση και φασματομετρία μάζας λόγου ισοτόπων (GC/C/IRMS) για τη διάκριση των ενδογενών από τα εξωγενή στεροειδή.
- Ισοηλεκτρική εστίαση, ανοσοχημικός προσδιορισμός και προσδιορισμός με χημειοφωταύγεια για την ανάλυση ερυθροποιητίνης.
- Αιματολογικός αναλυτής και κυτταρομετρία ροής για τις αιματολογικές παραμέτρους και για την ανίχνευση της μετάγγισης αίματος.
- Ανοσοφωτοχημικός προσδιορισμός για να διακρίνει την υποφυσιακή από την ανασυνδυαζόμενη αυξητική ορμόνη (hGH).
- Μέθοδος φθορισμομετρίας για την ανίχνευση των πεπτιδικών ορμονών.

2.2 Αεριοχρωματογραφία

Με τον όρο αεριοχρωματογραφία χαρακτηρίζεται η κατηγορία εκείνη των μεθόδων χρωματογραφίας, όπου η κινητή φάση είναι αέριο και η στατική φάση είναι είτε στερεή, είτε υγρή επί αδρανούς φορέα. Η αεριοχρωματογραφία μετά την ανάπτυξή της αποτελεί μια ευρέως εφαρμοσμένη ενόργανη μέθοδο διαχωρισμού. Με την αεριοχρωματογραφία υπάρχει η δυνατότητα προσδιορισμού του αριθμού των συστατικών ενός μίγματος ουσιών, της ανίχνευσης της παρουσίας ξένων προσμίξεων σε μια ουσία, και σε πολλές περιπτώσεις, της ταυτοποίησης των ουσιών.

Στην αεριοχρωματογραφία το δείγμα εξατμίζεται και μεταφέρεται μέσω της κινητής αέριας φάσης στη στήλη. Ο διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος βασίζεται στη σχετική τάση ατμών τους και στη χημική συγγένειά τους ως προς τη στατική φάση. Η αναλογία κάθε συστατικού, που βρίσκεται στην κινητή φάση σε κάθε χρονική στιγμή, είναι μια συνάρτηση της τάσης ατμών αυτής της ουσίας. Τα μόρια των συστατικών που εμφανίζουν υψηλότερες τάσεις ατμών καταμερίζονται περισσότερο προς την κινητή φάση, εκκλύονται πρώτα από τη στήλη και σαρώνονται από τον ανιχνευτή γρηγορότερα. Ουσίες που παρουσιάζουν χαμηλότερες τάσεις ατμών και συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις με τη στατική φάση, απαιτούν μεγαλύτερο χρονικό διάστημα για να φτάσουν στον ανιχνευτή και συνεπώς επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός με τις προηγούμενες.

Η εφαρμογή της αεριοχρωματογραφίας απαιτεί οι προσδιοριζόμενες ουσίες να είναι πτητικές, ώστε να μπορούν να μεταφερθούν μέσω της κινητής φάσης στη στήλη. Η χρωματογραφική διαδικασία απλοποιείται από το γεγονός ότι υπάρχει μικρή σύζευξη μεταξύ των αεριοποιημένων μορίων των προς διαχωρισμό ουσιών και των μορίων του φέροντος αερίου. Παρά ταύτα, η αεριοχρωματογραφία εφαρμόζεται και στην περίπτωση που οι ουσίες δεν είναι πτητικές. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της διαδικασίας της παραγωγοποίησης, η οποία ορίζεται ως η παρασκευή ή ο σχηματισμός ενός παραγώγου με σκοπό την αύξηση της πτητικότητας, της ανίχνευσης και ευαισθησίας ενός αναλύτη και τη βελτίωση του διαχωρισμού του με χρωματογραφία.

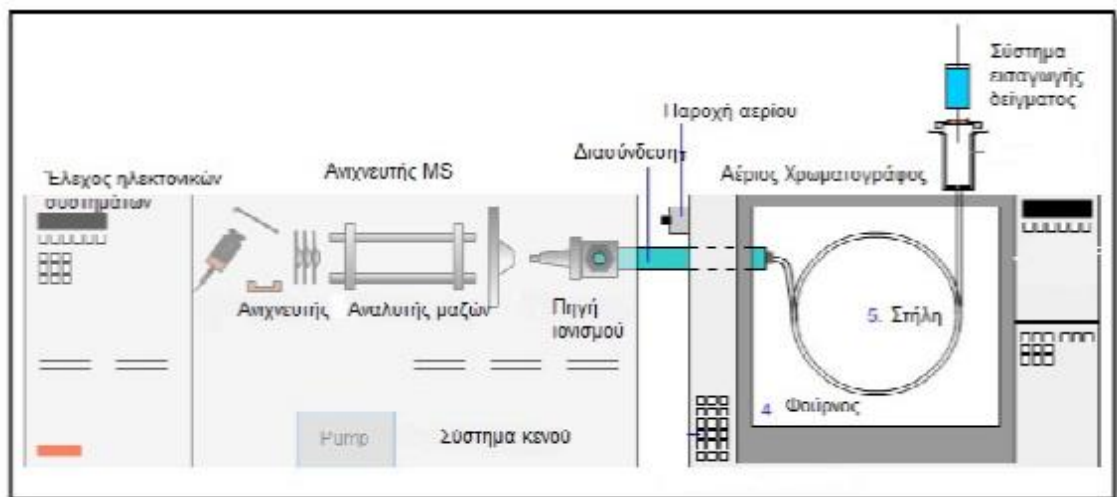
Επιπρόσθετα, επειδή ο διαχωρισμός εξαρτάται από την κατανομή της ουσίας μεταξύ δύο φάσεων, καταλυτικό ρόλο παίζει η θερμοκρασία της στήλης. Εάν η θερμοκρασία της στήλης είναι χαμηλή, τα συστατικά του υπό ανάλυση μίγματος παραμένουν στη στατική φάση, και σπάνια εισέρχονται στην κινητή φάση. Δε διαχωρίζονται το ένα από το άλλο και στην ακραία περίπτωση δεν εκκλύονται από τη στήλη. Εάν η θερμοκρασία της στήλης είναι πολύ υψηλή, τότε

τα συστατικά βρίσκονται τον περισσότερο χρόνο στην κινητή φάση, σπάνια εισέρχονται στη στατική φάση, και εκλούνται ως ένα μη διαχωριζόμενο μείγμα [33-35].

2.2.1 Οργανολογία Αεριοχρωματογράφου

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.1 τα κυριότερα τμήματα μιας αεριοχρωματογραφικής διάταξης είναι:

1. Φιάλη φέροντος αερίου -Ρυθμιστής πίεσης-ροόμετρο
2. Σύστημα εισαγωγής του δείγματος
3. Θερμοστατούμενος κλίβανος
4. Στήλη
5. Ανιχνευτής
6. Σύστημα λήψεως και επεξεργασίας δεδομένων



Εικόνα 2.1 : Κύρια τμήματα ενός αεριοχρωματογράφου.

2.2.1.1 Φέρον Αέριο - Ρυθμιστής Πίεσης

Ο αεριοχρωματογράφος απαιτεί την παροχή ενός κατάλληλου αερίου φορέα για την επίτευξη ενός επιθυμητού διαχωρισμού. Το φέρον αέριο πρέπει να είναι χημικά αδρανές, ξηρό και απαλλαγμένο από οξυγόνο ώστε να αποφευχθεί η υποβάθμιση της στήλης. Ακόμα, το φέρον αέριο πρέπει να μην περιέχει

οργανικές προσμίξεις, οι οποίες θα οδηγήσουν στη μείωση της ευαισθησίας του ανιχνευτή. Τα συνήθη χρησιμοποιούμενα αέρια είναι άζωτο, ήλιο ή υδρογόνο. Η επιλογή του φέροντος αερίου καθορίζεται από τον τύπο του χρησιμοποιούμενου ανιχνευτή. Στην περίπτωση της GC/MS ως φέρον αέριο χρησιμοποιείται το ήλιο. Το φέρον αέριο διαβιβάζεται από τη φιάλη που βρίσκεται υπό υψηλή πίεση 100-200 atm στο αεριοχρωματογραφικό σύστημα. Η πίεση του φέροντος αερίου ρυθμίζεται στη 1 έως 2 atm πάνω από την ατμοσφαιρική, μέσω ενός ρυθμιστή πίεσης και με τη βοήθεια ροόμετρου υπολογίζεται η ακριβής ταχύτητά του. Γενικά οι ταχύτητες ροής θεωρούνται σταθερές, εάν η πίεση στο στόμιο εισόδου παραμένει σταθερή.

2.2.1.2 Σύστημα εισαγωγής του δείγματος

Ο σκοπός του συστήματος εισαγωγής του δείγματος είναι να τοποθετήσει μια στενή ζώνη των συστατικών του δείγματος στην αρχή της στήλης ώστε να μεγιστοποιηθεί η διαχωριστική ικανότητα της στήλης. Για την επίτευξη καλών διαχωρισμών θα πρέπει η εισαγωγή του δείγματος να είναι ακαριαία, ώστε να αποφευχθεί η διασπορά της ζώνης του δείγματος και ο χρησιμοποιούμενος όγκος να είναι όσο το δυνατόν μικρότερος. Το δείγμα εισάγεται μέσω μικροσύριγγας στην αρχή της στήλης μέσω ενός θερμοανθεκτικού ελαστικού διαφράγματος (septum), το οποίο αποτρέπει την έξοδο της ουσίας ή του φέροντος αερίου από τη στήλη. Ακολουθεί η εξαέρωση του δείγματος και παραλαβή των ατμών του από το φέρον αέριο. Για τις κοινές αναλυτικές στήλες η ποσότητα δείγματος κυμαίνεται από λίγα δέκατα του μικρόλιτρου έως 20 μL . Οι τριχοειδείς στήλες απαιτούν πολύ μικρότερα δείγματα.

2.2.1.3 Θερμοστατούμενος κλίβανος

Η θερμοκρασία της στήλης αποτελεί μια σημαντική παράμετρο και πρέπει να ελέγχεται με ακρίβεια, αν απαιτούνται αναπαραγώγιμα αποτελέσματα. Για το λόγο αυτό η στήλη τοποθετείται σε θερμοστατούμενο κλίβανο. Η άριστη θερμοκρασία στήλης εξαρτάται από το σημείο βρασμού του δείγματος και τον απαιτούμενο βαθμό διαχωρισμού. Γενικά, μια θερμοκρασία ίση ή λίγο μεγαλύτερη από το σημείο βρασμού του δείγματος, οδηγεί σε λογικούς χρόνους έκλουσης (2-30 min). Ο χώρος εισαγωγής του δείγματος και η στήλη θερμοστατούνται συνήθως στην περιοχή 50-300 $^{\circ}\text{C}$. Η επιλογή ενός κατάλληλου θερμοκρασιακού προγράμματος είναι πάντα απαραίτητη, δεδομένου ότι αύξηση

της θερμοκρασίας προκαλεί μείωση του χρόνου ανάλυσης, αλλά και ταυτόχρονη μείωση της διαχωριστικότητας. Συνήθως, επιλέγεται θερμοπρογραμματιζόμενη αεριοχρωματογραφία που πλεονεκτεί έναντι της ισόθερμης στην περίπτωση ανίχνευσης και διαχωρισμού πολλών συστατικών, ευρείας περιοχής πολικότητας και σημείων ζέσεως.

2.2.1.4 Χρωματογραφική στήλη

Η αεριοχρωματογραφία μπορεί να διακριθεί σε δύο κατηγορίες ανάλογα με τη φύση της στατικής φάσης: 1) Αέριοστερεοχρωματογραφία στη μέθοδο αυτή η στατική φάση αποτελείται από κοκκιώδες υλικό όπως διοξείδιο του πυριτίου, αλουμίνα ή άνθρακα. Ο διαχωρισμός βασίζεται στην εκλεκτική προσρόφηση των ουσιών στην επιφάνεια του στερεού. Η τεχνική αυτή βρήκε περιορισμένη εφαρμογή, διότι το χρωματογράφημα, συνήθως, παρουσιάζει εκφυλισμένες καμπύλες κανονικής κατανομής. 2) Αεριουγροχρωματογραφία: στην αεριουγρόχρωματογραφία η στατική φάση είναι ένα μη πτητικό υγρό, που συγκρατείται πάνω σε μια αδρανή στερεή επιφάνεια με τη μορφή λεπτής στιβάδας. Δύο τύποι στηλών απαντώνται στην αεριοχρωματογραφία, οι τριχοειδείς (capillarycolumns) και οι πληρωμένες (packedcolumns). Το συνηθέστερο υλικό υποστήριξης της υγρής φάσης στις στήλες πλήρωσης είναι η γη διατόμων, που αποτελεί μια μορφή εφυδατωμένου SiO_2 με πολλές ελεύθερες υδροξυλομάδες στην επιφάνειά της. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη βραδεία απελευθέρωση της ουσίας από την υγρή στιβάδα στον αέριο φορέα έτσι, ώστε να δημιουργούνται ουρές στις κορυφές των διαχωριζόμενων ουσιών. Επιπρόσθετα, οι στήλες αυτές παρουσιάζουν φτωχές ιδιότητες μεταφοράς θερμότητας με αποτέλεσμα την αυξημένη τυπική απόκλιση στους χρόνους απόκρισης των κορυφών. Οι παραπάνω δυσκολίες αίρονται με τη χρήση τριχοειδών στηλών, οι οποίες αποτελούνται από μέταλλο, γυαλί ή οργανικό πολυμερές και συγκρατούν το διαλύτη λόγω ανάπτυξης τριχοειδών φαινομένων με τα τοιχώματα της στήλης. Έτσι, οι λαμβανόμενες κορυφές είναι οξύτερες, με αποτέλεσμα να έχουμε καλύτερη διαχωριστικότητα, ενώ ταυτόχρονα αυξάνει και η ευαισθησία της ανίχνευσης.

2.2.1.5 Ανιχνευτής

Πολλοί τύποι ανιχνευτών έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιούνται στην αεριοχρωματογραφία. Οι ανιχνευτές δύνανται να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες βάσει της αρχής λειτουργίας: 1) Ανιχνευτές που αποκρίνονται στη συγκέντρωση της εκλουόμενης ουσίας μέσα στο φέρον αέριο (σε mol/mL) και 2) ανιχνευτές που αποκρίνονται στην ταχύτητα ροής μάζας της εκλουόμενης ουσίας (σε mol/s). Τυπικό παράδειγμα ανιχνευτών πρώτης κατηγορίας είναι οι ανιχνευτές θερμικής αγωγιμότητας (Thermal Conductivity Detector, TCD) και της δεύτερης οι Ανιχνευτές Ιοντισμού Φλόγας (Flame Ionization Detector, FID) και Ανιχνευτές Συλλήψεως Ηλεκτρονίων (Electron Capture Detector, ECD). Το πλεονέκτημα των ανιχνευτών ταχύτητας ροής μάζας είναι ότι πραγματοποιείται ακριβέστερη ποσοτική ανάλυση [29-32, 36-43].

2.3 Φασματομετρία μαζών

Η φασματομετρία μαζών (Mass Spectrometry, MS) αποτελεί μια από τις πλέον σύγχρονες αναλυτικές τεχνικές η οποία παρουσιάζει ευρύ πεδίο εφαρμογών. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι η τεχνική αυτή παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη στοιχειακή σύσταση του εξεταζόμενου δείγματος, τις δομές ανόργανων, οργανικών και βιολογικών μορίων, την ποιοτική και ποσοτική σύσταση σύνθετων μειγμάτων και την αναλογία ισότοπων ατόμων σε δείγματα. Η φασματομετρία μαζών χαρακτηρίζεται από αυξημένη ευαισθησία και υψηλή εξειδίκευση και κατέχει λόγω αυτών των χαρακτηριστικών μια διακεκριμένη θέση ανάμεσα στις αναλυτικές τεχνικές.

Η χρήση της φασματομετρίας μαζών επεκτείνεται σε τομείς, όπως η ατομική φυσική, η ανάλυση τροφίμων και περιβαλλοντικών ρύπων, η ιατροδικαστική επιστήμη, η μελέτη κινητικών και θερμοδυναμικών παραμέτρων, η φαρμακευτική ανάλυση και η ανίχνευση και επιβεβαίωση της λήψης απαγορευμένων ουσιών από αθλητές κατά τον έλεγχο ντόπινγκ. Μεγάλο ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια παρουσιάζει η χρησιμοποίηση της στους τομείς της γονιδιωματικής (genomics) και πρωτεωμικής (proteomics), στη μελέτη των βιολογικών συστημάτων και στη διάγνωση ασθενειών και μεταβολικών νοσημάτων (metabolomics).

Η φασματομετρία μαζών αναπτύχθηκε ραγδαία κατά τη διάρκεια της τελευταίας εικοσαετίας, μεταξύ 1995-2015. Η πρόοδος αυτή οδήγησε στην κατασκευή ολοκληρωτικά νέων οργάνων. Αναπτύχθηκαν νέες πηγές ατμοσφαιρικής πίεσης, οι υπάρχοντες αναλυτές τελειοποιήθηκαν και νέα υβριδικά

όργανα δημιουργήθηκαν με πρωτότυπους συνδυασμούς αναλυτών για την εκπλήρωση των σημερινών αναλυτικών απαιτήσεων

2.3.1 Οργανολογία φασματομέτρου μαζών

Τα φασματομέτρα μαζών αποτελούνται από τα ακόλουθα τμήματα:

1. το σύστημα εισαγωγής του δείγματος
2. την πηγή ιόντων
3. τον αναλυτή μαζών
4. τον ανιχνευτή

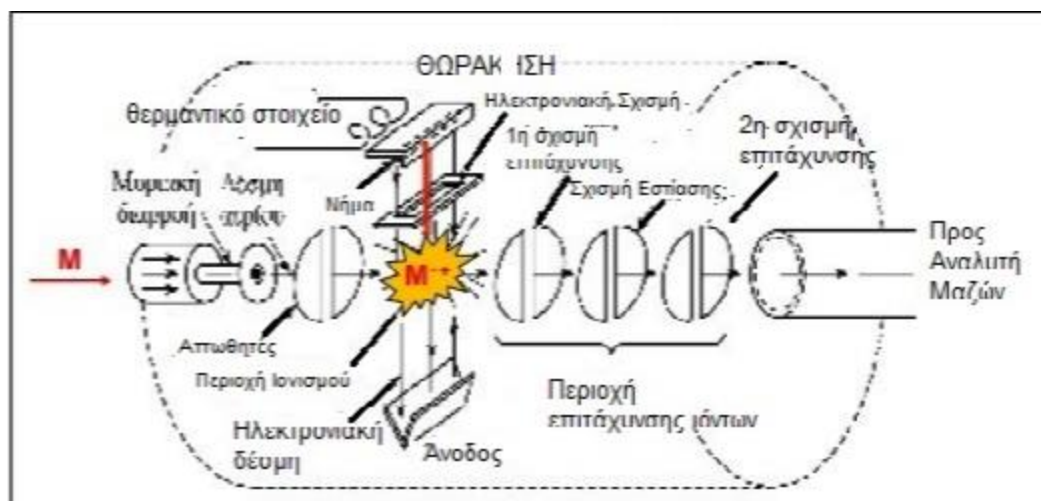
Εκτός από αυτά τα τμήματα, κάθε φασματομέτρο μαζών περιλαμβάνει συστήματα δημιουργίας υψηλού κενού, καθώς και συστήματα παρουσίασης των φασμάτων, όπως καταγραφείς και παλμογράφους. Για τα φασματομέτρα μαζών απαιτείται η λειτουργία ενός πολύπλοκου συστήματος κενού για να διατηρεί χαμηλή πίεση (10^{-4} έως 10^{-8} Torr) σε όλα τα τμήματα του οργάνου, εκτός από το τμήμα του επεξεργαστή του σήματος και του οργάνου παρουσίασης των ενδείξεων. Το υψηλό κενό εξασφαλίζει ότι τα παραγόμενα ιόντα φτάνουν στον ανιχνευτή χωρίς να αλληλεπιδρούν με άλλα αέρια μόρια, γεγονός που θα επέφερε, είτε εκτροπή από την επιθυμητή τροχιά, είτε περαιτέρω θραυσματοποίηση. Ακόμα, το υψηλό κενό προστατεύει την επιφάνεια της πηγής ιοντισμού, του αναλυτή και του ανιχνευτή από τη διάβρωση που μπορεί να επέλθει λόγω των ατμών, γεγονός που θα οδηγούσε στη μείωση της ικανότητας του φασματομέτρου να σχηματίζει, να διαχωρίζει και να ανιχνεύει ιόντα. Τα σύγχρονα φασματομέτρα μαζών περιλαμβάνουν ηλεκτρονικό υπολογιστή, τόσο για τον κεντρικό έλεγχο της λειτουργίας τους, όσο και για την ταχεία επεξεργασία, παρουσίαση και ερμηνεία του φάσματος.

2.3.2 Πηγές ιόντων

Τα μόρια του υπό ανάλυση δείγματος πρέπει να ιοντιστούν ώστε να είναι δυνατή η ανάλυση και η ανίχνευσή τους με φασματομετρία μαζών. Έχει αναπτυχθεί ποικιλία τεχνικών ιοντισμού και η επιλογή της εκάστοτε τεχνικής εξαρτάται από το ποσό της ενέργειας που μεταφέρεται κατά τη διαδικασία του

ιοντισμού και τις φυσικοχημικές ιδιότητες της υπό προσδιορισμό ουσίας. Οι πηγές ιοντισμού χωρίζονται σε δυο μεγάλες κατηγορίες: τις πηγές αέριας φάσης (gas-phase sources), όπου το δείγμα πρώτα εξαερώνεται και μετά ιοντίζεται και τις πηγές εκρόφησης (desorption sources) όπου το δείγμα σε στερεά ή υγρή κατάσταση, μετατρέπεται απ' ευθείας σε ιόντα στην αέρια φάση. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν οι πηγές πρόσκρουσης ηλεκτρονίων (electron impact, EI) και οι πηγές χημικού ιοντισμού (Chemical Ionization, CI). Οι πηγές αυτές συνήθως περιορίζονται σε θερμικώς σταθερές ενώσεις, με σημεία ζέσεως μικρότερα από περίπου 500 °C. Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν οι πηγές ιοντισμού πεδίου (Field Ionization, FI), εκρόφησης πεδίου Field Desorption, FD), ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization, ESI), ιοντισμού εκρόφησης με τη βοήθεια υλικού μήτρας (Matrix-Assisted Desorption/Ionization, MALDI), εκρόφησης πλάσματος (Plasma Desorption, PD), βομβαρδισμού με άτομα μεγάλης ταχύτητας (Fast Atom Bombardment, FAB) και ιοντισμού με θερμοψεκασμό. Πλεονέκτημα των πηγών εκρόφησης αποτελεί η δυνατότητα εφαρμογής τους σε μη πτητικά ή θερμικώς ασταθή δείγματα.

Η ευρύτερα εφαρμοζόμενη τεχνική ιοντισμού στην περίπτωση της GC/MS είναι ο ιοντισμός EI (electron impact) (Εικόνα 2.3). Τα ηλεκτρόνια εκπέμπονται από ένα θερμαινόμενο νήμα βολφραμίου ή ρηνίου και επιταχύνονται με μια τάση περίπου 70 eV, η οποία εφαρμόζεται μεταξύ νήματος και μιας ανόδου. Οι διαδρομές των ηλεκτρονίων και των εξαερωμένων μορίων σχηματίζουν ορθή γωνία και διασταυρώνονται στο κέντρο της πηγής, όπου γίνεται η πρόσκρουση και ο ιοντισμός. Η ενέργεια ιοντισμού για τις περισσότερες οργανικές ενώσεις κυμαίνεται μεταξύ 5-15 eV, με αποτέλεσμα υπό τις συγκεκριμένες φασματομετρικές συνθήκες (70 eV) να πραγματοποιείται όχι μόνο η αποβολή ενός ή περισσότερων ηλεκτρονίων, αλλά και περαιτέρω θραυσματοποίηση του μοριακού ιόντος ($M^{+•}$). Η επιπλέον αυτή θραυσματοποίηση παρέχει χρήσιμες πληροφορίες για τη διευκρίνιση της δομής άγνωστων ενώσεων. Κατά μέσο όρο παράγεται ένα ιόν ανά 1.000 μόρια που εισάγονται στην πηγή ιοντισμού. Επιπρόσθετα, σπάνια πραγματοποιείται πρόσληψη ηλεκτρονίων με αποτέλεσμα το σχηματισμό αρνητικά φορτισμένων ιόντων. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται υπό την παρουσία ηλεκτρονίων πολύ χαμηλής ενέργειας (0,1 eV).



Εικόνα 2.3: Πηγή ιονισμού με πρόσκρουση ηλεκτρονίων, ElectronImpact (EI)

Το σύνολο των ιόντων και των ουδέτερων προϊόντων που παράγονται πρέπει να διαχωριστούν με τέτοιο τρόπο ώστε τα θετικά ιόντα να κινηθούν προς τον αναλυτή μαζών, σε αντίθεση με τα αρνητικώς φορτισμένα ιόντα και τα ουδέτερα προϊόντα. Τα ουδέτερα προϊόντα απομακρύνονται μέσω του συστήματος κενού, καθώς το ηλεκτρικό και το μαγνητικό πεδίο δεν επηρεάζει την κίνησή τους. Παράλληλα, τα θετικά και αρνητικά ιόντα μπορούν να διαχωριστούν μέσω κατάλληλα φορτισμένων επιφανειών που βρίσκονται μέσα στην πηγή ιονισμού. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της μεταλλικής απωθητικής πλάκας (repeller), η οποία είναι θετικού δυναμικού, τόσο για να απομακρύνει τα θετικά ιόντα, όσο και για να έλκει τα αρνητικά ιόντα. Αντίθετα, η “extractorplate” και “ionfocusingplate” είναι αρνητικού δυναμικού με αποτέλεσμα να επιταχύνουν και να κατευθύνουν τη δέσμη ιόντων προς τον αναλυτή μαζών. Οι πηγές EI είναι εύχρηστες και παράγουν μεγάλα ρεύματα ιόντων, οπότε παρέχουν μεγάλη ευαισθησία. Η εκτεταμένη θραυσματοποίηση και επομένως ο μεγάλος αριθμός κορυφών συμβάλλει στην αναμφίβολη ταυτοποίηση μιας ουσίας αλλά συχνά, δεν επιτρέπει την ανίχνευση του μοριακού ιόντος. Ένα ακόμα πλεονέκτημα των πηγών EI είναι ότι υπάρχουν βιβλιοθήκες φασμάτων EI για πάνω από 100.000 ουσίες.

2.3.3 Αναλυτές μαζών

Η βασική λειτουργία του αναλυτή μαζών είναι διαχωρισμός των ιόντων, που παράγονται στην πηγή, ανάλογα με τις διαφορετικές τιμές των λόγων m/z . Ο διαχωρισμός είναι απαραίτητος έτσι, ώστε το μετρούμενο ρεύμα ιόντων στον ανιχνευτή ιόντων, που ακολουθεί τον αναλυτή μαζών, να αντιστοιχεί σε ιόντα με συγκεκριμένο λόγο m/z . Ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά ποιότητας των αναλυτών μάζας είναι η διακριτική ικανότητα (Resolving power, R). Εκφράζει την ικανότητα ενός φασματομέτρου μαζών να διακρίνει ιόντα με ίδιες σχεδόν μάζες. Ορίζεται από τη σχέση:

$$R = m / (m + \Delta m) \quad (2.3)$$

όπου, m και $m + \Delta m$ αντιστοιχούν σε δύο λόγους m/z με κορυφές ικανοποιητικά διαχωρισμένες. Κατά συνθήκη, ικανοποιητικός διαχωρισμός θεωρείται όταν ισοϋψείς περίπου κορυφές αλληλεπικαλύπτονται σε ύψος που δεν υπερβαίνει το 1/10 του ύψους των κορυφών. Ανάλογα με τη διαχωριστική τους ισχύ τα φασματομέτρα μαζών διακρίνονται σε φασματομέτρα χαμηλής και υψηλής διαχωριστικής ικανότητας. Τα πρώτα έχουν διαχωριστική ικανότητα από 100 έως 1000, ενώ στα φασματομέτρα υψηλής διαχωριστικής ικανότητας η τιμή R είναι της τάξεως του 10^4 - 10^5 και μπορούν να διαχωρίσουν τα ιόντα με βάση τις τιμές ακριβούς μάζας που μπορεί να διαφέρουν στο τρίτο ή και το τέταρτο δεκαδικό ψηφίο. Οι συνηθέστεροι τύποι αναλυτών μαζών είναι: 1) Αναλυτές απλής εστίασης με μαγνητική εκτροπή (Magnetic-Electric Sector), 2) Αναλυτές διπλής εστίασης (Double Focusing), 3) Αναλυτές χρόνου πτήσης (Time of Flight, TOF), 4) Τετραπολικοί αναλυτές μαζών (Quadrupole), 5) Παγιδευτής ιόντων (Ion Trap). Οι αναλυτές διακρίνονται σε συνεχείς αναλυτές μαζών και σε παλμικούς αναλυτές μαζών. Οι πρώτοι μεταφέρουν επιλεγμένο m/z προς τον ανιχνευτή και το φάσμα μαζών λαμβάνεται με σάρωση του αναλυτή οπότε ιόντα διαφορετικού m/z ανιχνεύονται σε κάθε χρονική στιγμή. Οι δε παλμικοί αναλυτές συλλέγουν ολόκληρο το φάσμα από παλμό ιόντων.

2.3.3.1 Αναλυτής μαζών μαγνητικού τομέα

Για να βελτιώσουν την διαχωριστικότητα τους οι αναλυτές διπλής εστίασης (Double Focusing) συνδυάζουν έναν μαγνητικό αναλυτή με έναν ηλεκτροστατικό αναλυτή. Το ηλεκτρικό πεδίο δρα σαν φίλτρο της κινητικής ενέργειας και

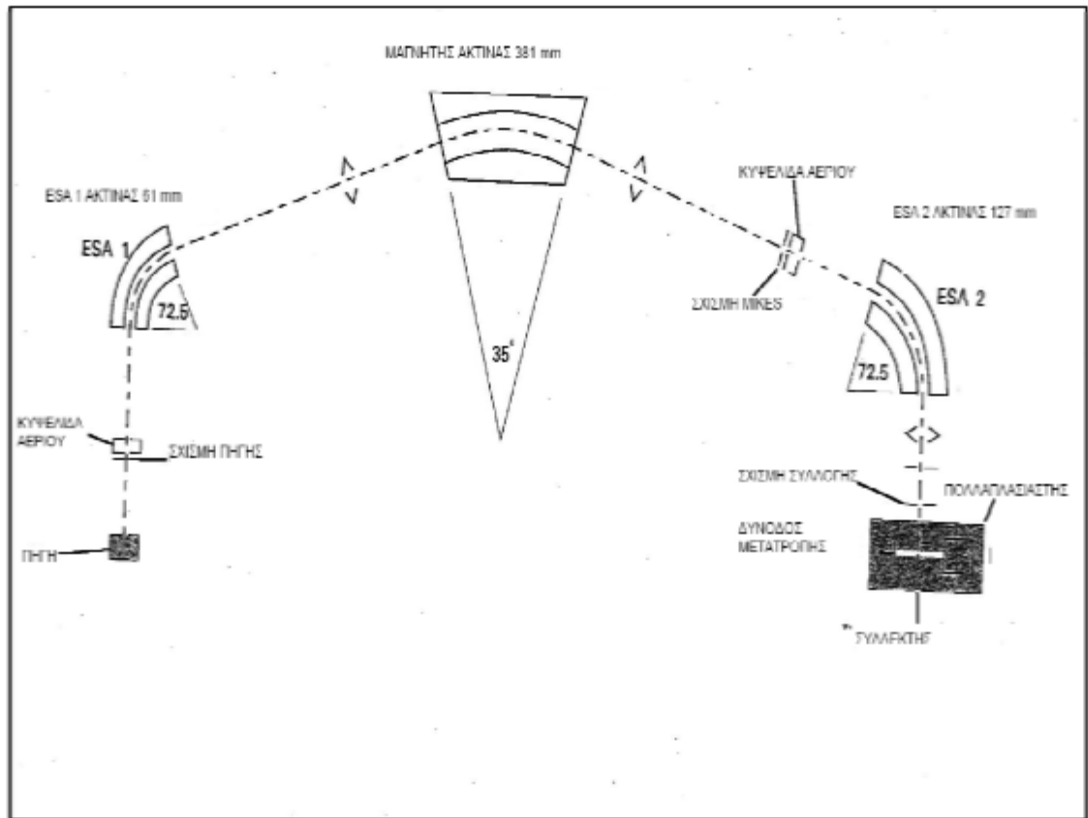
επιτρέπει μόνο σε ιόντα με συγκεκριμένη κινητική ενέργεια να περάσουν μέσα από το πεδίο τους, ανεξάρτητα από το λόγο μάζα προς φορτίο.

Ένας ηλεκτρικός τομέας αποτελείται από δύο ομόκεντρα καμπυλωτά πιάτα. Εφαρμόζεται δυναμικό κατά μήκος των πιάτων έτσι, ώστε να «λυγίσει» η δέσμη ιόντων καθώς «ταξιδεύει» κατά μήκος του αναλυτή. Το δυναμικό εφαρμόζεται έτσι, ώστε η ακτινοβολία να ακολουθεί την καμπύλη του αναλυτή. Η ακτίνα της τροχιάς των ιόντων (r) εξαρτάται από την κινητική ενέργεια των ιόντων (V) και το δυναμικό πεδίο (E) το οποίο εφαρμόζεται κατά μήκος των πιάτων.

$$r = 2V/E \quad (2.4)$$

Η εξίσωση (2.4) δείχνει ότι οι αναλυτές διαχωρίζουν τα ιόντα με τη βοήθεια του μαγνητικού πεδίου. Στη μαγνητική ανάλυση, τα ιόντα επιταχύνονται (χρησιμοποιώντας ένα ηλεκτρικό πεδίο) και περνούν διαμέσου ενός μαγνητικού πεδίου. Ένα φορτισμένο σωματίδιο «ταξιδεύοντας» με υψηλή ταχύτητα κατά μήκος ενός μαγνητικού πεδίου θα «αντιμετωπίσει» μια δύναμη και θα ταξιδέψει σε κυκλική τροχιά με ακτίνα η οποία θα εξαρτάται από το λόγο τα μάζας προς το φορτίο (m/z) και την ταχύτητα του ιόντος. Ένας μαγνητικός αναλυτής διαχωρίζει τα ιόντα σύμφωνα με την ακτίνα της «κύρτωσης», συνεπώς μόνο ιόντα με συγκεκριμένα m/z θα μπορούν να φτάσουν στον ανιχνευτή με συγκεκριμένο μαγνητικό πεδίο.

Ο αναλυτής έχει μια γεωμετρία τριών τομέων, διπλής εστίασης, του τύπου ESA, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 2.4 παρακάτω. Η γεωμετρία αυτή καθιστά δυνατό ένα συμβατικό μηχάνημα να κατασκευαστεί με λόγο Διασποράς προς Μεγέθυνση (Dispersion to Magnification ratio) 0,82m και παράγοντα μεταφοράς (Transmission factor) 0,42, περίπου δυο φορές καλύτερος από τα ισοδύναμα όργανα. Η υψηλή διαχωριστική ικανότητα (Resolution) του αναλυτή έχει επιτευχθεί με το γεωμετρικό σχεδιασμό με σημαντικά μηδενικές αποκλίσεις εικόνων και κατασκευασμένο με πολύ υψηλά μηχανικά πρότυπα.



Εικόνα 2.4: Αναλυτής μαζών μαγνητικού τομέα διπλής εστίασης (Double Focusing Magnetic Sector).

Χρησιμοποιώντας ειδικά σχεδιασμένους φακούς στον αναλυτή Autospec επιτυγχάνεται μεγάλη συγκέντρωση ενέργειας διαμέσου της ακτίνας της μάζας του οργάνου χωρίς να καταφεύγουμε σε μηχανική μετακίνηση του μαγνήτη όπως στα συμβατικά όργανα. Αυτός ο παράγοντας είναι σημαντικός για την ακριβή μέτρηση της μάζας.

Η πηγή και ο αναλυτής είναι τοποθετημένη σε ένα οπτικό "σημείο" (bench) το οποίο είναι απομονωμένο από το κυρίως πλαίσιο του φασματομέτρου μαζών, γεγονός που εξασφαλίζει ένα ελεύθερο από δονήσεις περιβάλλον. Τα πιάτα του ηλεκτρικού τομέα είναι ακριβώς τοποθετημένα στο κάτω τμήμα της βάσης σε αυτό το σημείο (bench) και από εκεί είναι τοποθετημένοι οι διάφοροι τύποι φακών, που δίνουν καλή οπτική ευθυγράμμιση. Αυτή η διευθέτηση επιτρέπει στους φακούς να είναι έτσι τοποθετημένοι, ακριβώς στη σωστή θέση κατά μήκος των οπτικών αξόνων έτσι, ώστε η απόδοση κάθε φακού να είναι η βέλτιστη. Επίσης, τα στοιχεία των φακών είναι μεγάλα με μεγάλα ανοίγματα ώστε να μειώσουν την πιθανότητα μόλυνσης και απώλειας. Η συνολική μεταφορά από

το όργανο ενισχύεται από το επιπρόσθετο Z φακό εστίασης πριν και μετά το μαγνητικό τομέα. Ο Z φακός κατά μήκος του σωλήνα πτήσης είναι επίσης μεγάλος, εξασφαλίζοντας τη μέγιστη μεταφορά κατά μήκος του αναλυτή. Η εικόνα κυρτότητας και περιστροφής των φακών χρησιμοποιείται επίσης για να μεγιστοποιήσει την ευαισθησία σε υψηλή διαχωριστική ικανότητα.

2.3.4 Ανιχνευτής

Ο ανιχνευτής ιόντων παράγει στην έξοδο του ηλεκτρικό σήμα ανάλογο του αριθμού ιόντων και του φορτίου τους, που δέχεται στην είσοδό του στη χρονική μονάδα. Οι συνηθέστεροι ανιχνευτές ιόντων είναι το φαρανταϊκό κύπελλο, ο ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής και η φωτογραφική πλάκα. Ο ανιχνευτής φασματομέτρου μαζών λειτουργεί με δύο κύριες μορφές, η επιλογή της οποίας καθορίζεται από τη φύση και τον αντικειμενικό σκοπό της ανάλυσης. Αυτοί είναι η ολική σάρωση (Full Scan) και η σάρωση επιλεγμένων ιόντων (Selected Ion Monitoring, SIM). Συγκεκριμένα, ολική σάρωση γίνεται όταν ο ανιχνευτής σαρώνει πάνω από μια περιοχή τιμών μαζών m/z . Η ολική σάρωση είναι απαραίτητη όταν θέλουμε να προσδιορίσουμε τη δομή μιας άγνωστης ένωσης. Η ευαισθησία της ανίχνευσης μπορεί να αυξηθεί σημαντικά με τη σάρωση επιλεγμένων ιόντων, επιτρέποντας στον ανιχνευτή να παρακολουθεί μόνο ένα, δύο ή και περισσότερα ιόντα. Η σάρωση επιλεγμένων ιόντων είναι κατάλληλη όταν το φάσμα μαζών και τα χαρακτηριστικά ανίχνευσης της υπό προσδιορισμό ουσίας είναι γνωστά [38, 43-45].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Αναβολικά Ανδρογόνα Στεροειδή

3.1 Ορισμός-Φυσιολογία

Τα αναβολικά στεροειδή είναι οι ευρύτερα χρησιμοποιούμενες απαγορευμένες ουσίες στο σύγχρονο αθλητισμό. Τα αναβολικά στεροειδή εισήχθησαν ως φάρμακα στα τέλη της δεκαετίας του 1950, για την αντιμετώπιση χρόνιων παθολογικών καταστάσεων. Ειδικότερα, τα αναβολικά στεροειδή χρησιμοποιούνται ακόμη στην αντιμετώπιση της γεροντικής αδυναμίας και της σωματικής εξασθένησης, στην αντιμετώπιση νόσων, όπως η απλαστική αναιμία, η νεφρική ανεπάρκεια ή η οστεοπόρωση, στην ανάρρωση από διάφορες παθολογικές καταστάσεις, στην ανορεξία κ.α.

Η χρήση των αναβολικών στεροειδών για μη ιατρικούς σκοπούς, με στόχο τη βελτίωση της αγωνιστικής ικανότητας, ακολούθησε γρήγορα τη θεραπευτική τους χρήση και αφορούσε αρχικά αθλητές της άρσης βαρών, αλλά και άλλων αθλημάτων που απαιτούν αυξημένη μυϊκή δύναμη. Ο στόχος ήταν πάντα η επίτευξη μεγέθους μυών, αλλά και μυϊκής δύναμης σημαντικά μεγαλύτερων από ότι επιτυγχάνεται μόνο με την εντατική προπόνηση και την κατάλληλη δίαιτα. Η χρήση για τέτοιους σκοπούς αμφισβητήθηκε έντονα στη διεθνή βιβλιογραφία και σήμερα, είναι γνωστό και γενικά παραδεκτό, ότι αύξηση του μυϊκού μεγέθους και της μυϊκής δύναμης επιτυγχάνεται σε αθλητές που χρησιμοποιούν αναβολικά στεροειδή, πάντα όμως σε συνδυασμό με την αυξημένη, ειδική για κάθε άθλημα, προπόνηση.

Τα ανδρογόνα αναβολικά στεροειδή διακρίνονται σε ενδογενή, τα οποία παράγονται από τον ανθρώπινο οργανισμό, και σε συνθετικά, τα οποία λαμβάνονται εξωγενώς. Το φυσικό αναβολικό στεροειδές που διάλεξε η φύση για τον άνθρωπο και το οποίο επιδρά, τόσο στο αναπαραγωγικό σύστημα, όσο και σε μη αναπαραγωγικούς ιστούς, είναι η τεστοστερόνη, η οποία παράγεται από τον ανθρώπινο οργανισμό. Αυτή εμφανίζει δύο σημαντικές δράσεις, την ανδρογόνο (ανάπτυξη των ανδρικών χαρακτηριστικών, όπως γεννητικά όργανα, μυϊκό σύστημα, τριχοφυΐα) και την αναβολική (προαγωγή της σύνθεσης πρωτεϊνών σε διάφορους ιστούς και όργανα). Μεγάλη ερευνητική προσπάθεια καταβάλλεται για να κατανοηθεί η δράση της τεστοστερόνης στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Ύστερα από την απομόνωση της τεστοστερόνης (1935) και την τεκμηρίωση των φαρμακολογικών ιδιοτήτων της, ακολούθησε η παραγωγή μιας

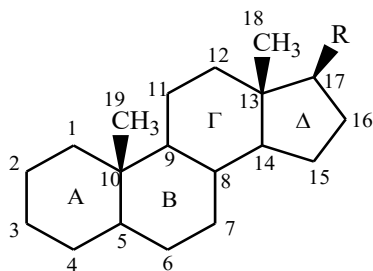
σειράς συνθετικών αναβολικών στεροειδών, χημικών και φαρμακολογικών αναλόγων της τεστοστερόνης, στο πλαίσιο της προσπάθειας για τη σύνθεση στεροειδών, τα οποία θα είχαν σημαντική αναβολική δράση, χωρίς όμως να διαθέτουν ανδρογονικές ιδιότητες. Μέχρι σήμερα, η προσπάθεια διαχωρισμού της αναβολικής από την ανδρογόνο δράση των στεροειδών έχει αποβεί άκαρπη.

Τα αναβολικά στεροειδή ασκούν τη φαρμακολογική τους δράση σε κυτταρικό επίπεδο, συνδεόμενα με τους υποδοχείς ανδρογόνων και διεγείροντας την παραγωγή mRNA, με τελικό αποτέλεσμα την αυξημένη πρωτεϊνοσύνθεση. Το είδος των κλινικών εκδηλώσεων που θα προκληθούν, προσδιορίζεται από τον τύπο και τις συγκεντρώσεις των υποδοχέων, αλλά και των ενζύμων που ελέγχουν τη βιομετατροπή των στεροειδών σε κάθε συγκεκριμένο όργανο. Τα αναβολικά εμφανίζουν επίσης, αντικαταβολική δράση, διευκολύνοντας την πιο αποτελεσματική αξιοποίηση των πρωτεϊνικών αποθεμάτων του οργανισμού, μέσω της αυξητικής ορμόνης και του ανταγωνισμού της καταβολικής δράσης των γλυκοκορτικοειδών.

Ακόμη, τα αναβολικά αυξάνουν τη σύνθεση της ερυθροποιητίνης, με επακόλουθη αύξηση του αιματοκρίτη και τελικό αποτέλεσμα, την καλύτερη οξυγόνωση των ιστών. Τέλος, τα αναβολικά μπορεί να οδηγήσουν σε αύξηση της μυϊκής δύναμης, να αυξήσουν την επιθετικότητα των αθλητών, να προκαλέσουν ευφορία, να ελαττώσουν το αίσθημα της κόπωσης και να μειώσουν το χρόνο αποκατάστασης, ύστερα από έντονη προπόνηση. Το τελικό αποτέλεσμα είναι ο αθλητής να μπορεί να αντέξει μεγαλύτερης διάρκειας και πιο επίπονη προπόνηση.

3.2 Δομή και στερεοχημεία των ενδογενών ανδρογόνων αναβολικών στεροειδών

Τα στεροειδή είναι μόρια, των οποίων οι δομές βασίζονται στο τετρακυκλικό σύστημα δακτυλίων που παρατίθεται στο σχήμα 2.1. Οι τέσσερις δακτύλιοι υποδηλώνονται ως Α, Β, Γ, Δ, αρχίζοντας από αριστερά, ενώ τα άτομα άνθρακα αριθμούνται, ξεκινώντας από το δακτύλιο Α. Οι τρεις πρώτοι εξαμελείς δακτύλιοι (Α, Β, Γ) υιοθετούν διαμορφώσεις τύπου ανακλίντρου. Λόγω της δύσκαμπτης γεωμετρικής διάταξης των δακτυλίων αυτών, τα στεροειδή δεν υφίστανται τη συνηθισμένη αναστροφή δακτυλίων των κυκλοεξανίων (ring-flip).



Σχήμα 3.1 Δομή στεροειδών (R:ανθρακική αλυσίδα).

Στους ανθρώπους, τα περισσότερα στεροειδή λειτουργούν ως ορμόνες, δηλαδή ως «χημικοί αγγελιοφόροι» που εκκρίνονται από τους αδένες και μέσω της κυκλοφορίας του αίματος, μεταφέρονται σε συγκεκριμένους ιστούς. Από χημική άποψη, οι στεροειδείς ορμόνες διακρίνονται, ανάλογα με το είδος του βασικού σκελετού, σε τρεις κατηγορίες:

α) ορμόνες του οιστρανίου, με 18 άτομα άνθρακα, χωρίς ανθρακική αλυσίδα στη θέση 17 και μεθύλιο στη θέση 10 (οιστρογόνα),

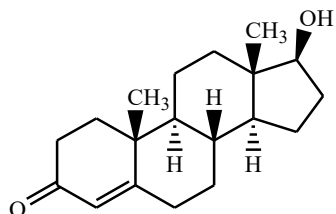
β) ορμόνες του ανδροστανίου, με 19 άτομα άνθρακα, χωρίς ανθρακική αλυσίδα στη θέση 17 (ανδρογόνα),

γ) ορμόνες του πρεγνανίου, με 21 άτομα άνθρακα και στη θέση 17 πλευρική αλυσίδα $R=CH_2CH_3$ (προγεστογόνα, κορτικοστεροειδή).

Από άποψη δομής, λοιπόν, τα ανδρογόνα είναι στεροειδή χωρίς πλευρική αλυσίδα, με οξυγονούχες ομάδες (υδροξυλομάδες, κετονομάδες) στις θέσεις C3 και C17. Η κατεύθυνση των υποκαταστατών στο χώρο, σε όλες τις θέσεις, συμβολίζεται συμβατικά με την ένδειξη α ή β, όταν οι υποκαταστάτες βρίσκονται αντίστοιχα κάτω ή πάνω από το επίπεδο του πυρήνα. Οι α-υποκαταστάτες σημειώνονται στο συντακτικό τύπο της ένωσης με διακεκομμένη γραμμή, ενώ οι β-υποκαταστάτες σημειώνονται με συνεχή έντονη γραμμή. Στα συνηθέστερα ανδρογόνα, η σύνδεση των δακτυλίων Α και Β είναι *trans*, με συνέπεια το υδρογόνο που βρίσκεται στη θέση C5 να είναι κάτω από το επίπεδο του μορίου, ενώ το μεθύλιο στη θέση C19 να έχει κατεύθυνση προς τα πάνω. Αντίθετα στα ανδρογόνα τύπου *cis* Α-Β, το μεθύλιο του C19, αλλά και το άτομο υδρογόνου του C5, κατευθύνονται προς την ίδια πλευρά του μορίου (επάνω). Η στερεοχημεία 5α ή 5β του C5 σημειώνεται στο όνομα της ένωσης εκτός, εάν υπάρχει διπλός δεσμός στη θέση C5.

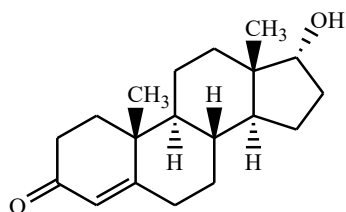
Ορισμένα από τα πιο χαρακτηριστικά ενδογενή ανδρογόνα αναβολικά στεροειδή είναι η τεστοστερόνη, η επιτεστοστερόνη, η ανδροστερόνη, η

ανδροστενολόνη και η ετιοχολανολόνη, που παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.2 [11-15].



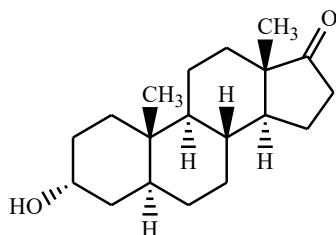
ΤΕΣΤΟΣΤΕΡΟΝΗ

(17β-υδροξυ-4-ανδροστεν-3-ονη)



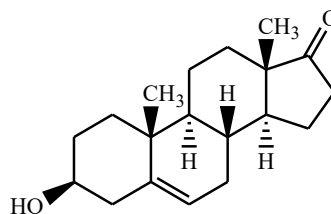
ΕΠΙΤΕΣΤΟΣΤΕΡΟΝΗ

(17α-υδροξυ-4-ανδροστεν-3-ονη)



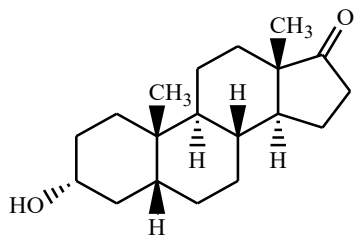
ΑΝΔΡΟΣΤΕΡΟΝΗ

(5α-ανδροσταν-3α-ολη-17-ονη)



ΑΝΔΡΟΣΤΕΝΟΛΟΝΗ

(5-δεϋδροεπιανδροστερόνη)



ΕΤΙΟΧΟΛΑΝΟΛΟΝΗ

(5β-ανδροσταν-3α-ολη-17-ονη)

Σχήμα 3.2 Η δομή ορισμένων από τα ενδογενή ανδρογόνα αναβολικά στεροειδή.

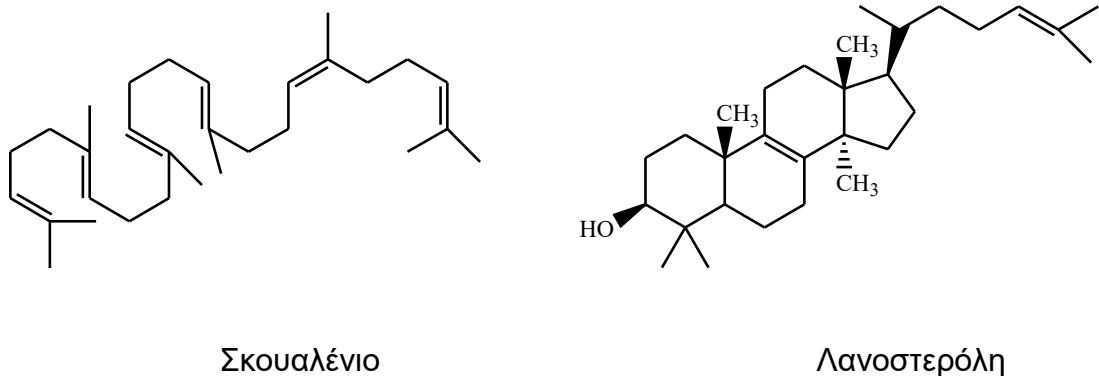
3.3 Βιοσύνθεση και μεταβολισμός των ενδογενών ανδρογενών αναβολικών στεροειδών

3.3.1 Βιοσύνθεση της τεστοστερόνης

Η τεστοστερόνη είναι η σπουδαιότερη ανδρική ορμόνη. Πάνω από το 95% εκκρίνεται στους όρχεις και πιο συγκεκριμένα στα κύτταρα Leydig. Η τεστοστερόνη έχει ως πρόδρομη ένωση τη χοληστερόλη. Τα μεταβολικά στάδια που απαιτούνται για τη μετατροπή της χοληστερόλης σε ανδρογόνα, λαμβάνουν χώρα σε περίπου 500 εκατομμύρια κύτταρα Leydig. Η δεξαμενή της χοληστερόλης στον ανθρώπινο οργανισμό, τροφοδοτείται από δύο πηγές:

- τη χοληστερόλη που απορροφάται από την τροφή,
- τη χοληστερόλη που βιοσυντίθεται στο ήπαρ και το λεπτό έντερο, όπως περιγράφεται παρακάτω.

Το μεβαλονικό οξύ, $\text{HOOCCH}_2\text{COH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, αποτελεί «ένωση κλειδί» στις βιοσυνθετικές πορείες προς σχηματισμό των στεροειδών ορμονών, γιατί η αναγωγή του β-υδροξυ-β-μεθυλο-γλουταρυλο-CoA προς μεβαλονικό οξύ είναι μη αντιστρεπτή πορεία. Κατά συνέπεια, εφόσον σχηματιστεί μεβαλονικό οξύ, τότε αυτό ακολουθεί ποσοτικά τη βιοσυνθετική του πορεία, η οποία αρχικά περιλαμβάνει τη βιοσύνθεση ενός μη κυκλικού τριτερπενίου, του σκουαλενίου (Σχήμα 3.3).

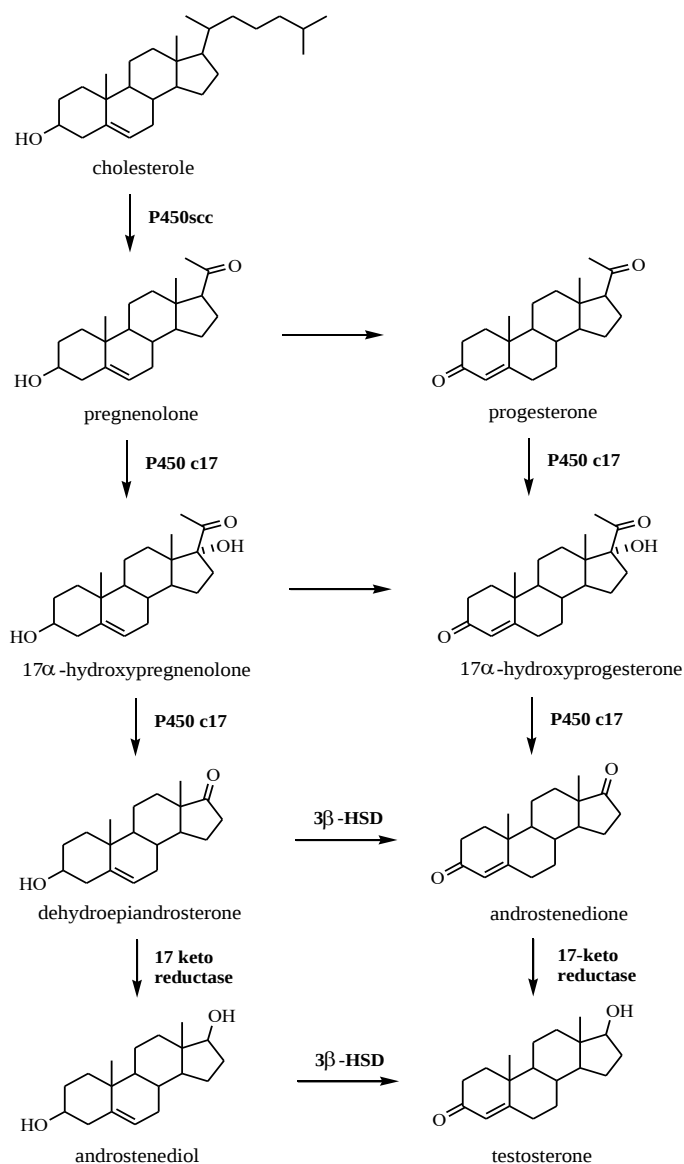


Σχήμα 3.3 Η χημική δομή του σκουαλενίου και της λανοστερόλης

Κατόπιν, μέσω μιας ενζυμικά καταλυόμενης εποξειδωσης του σκουαλενίου, σχηματίζεται το εποξειδίο του σκουαλενίου. Στη συνέχεια, ακολουθεί μια όξινα καταλυόμενη κυκλοποίησή του κι έπειτα, μια εξαιρετικά σύνθετη ακολουθία αναδιατάξεων καρβοκατιόντων, προς σχηματισμό της λανοστερόλης (σχήμα 3.3). Στη συνέχεια, η λανοστερόλη μετατρέπεται, παρουσία ορισμένων ενζύμων, σε χοληστερόλη, η οποία μπορεί να μετατραπεί ενζυμικά σε ένα πλήθος από διαφορετικές στεροειδείς ορμόνες. Η χοληστερόλη που βιοσυντίθεται, μεταφέρεται στους περιφερειακούς ιστούς με τις λιποπρωτεΐνες.

Η διάσπαση της πλευρικής αλυσίδας της χοληστερόλης και ο σχηματισμός της πρεγνενολόνης στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων, αποτελεί την έναρξη της βιοσύνθεσης των στεροειδών (σχήμα 3.4). Η αντίδραση διάσπασης καταλύεται από μια αιμοπρωτεΐνη, το κυτόχρωμα P450_{scc} (scc: sidechain cleavage). Κατόπιν αυτού, η πρεγνενολόνη μετατρέπεται, μέσω ενζύμων, σε μια ποικιλία από στεροειδή με 19 άτομα άνθρακα, στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Κατά συνέπεια, η βιοσύνθεση των βιολογικά ενεργών ανδρογόνων, είναι αποτέλεσμα μίας σταδιακής αποικοδόμησης της βιολογικά ανενεργής πρεγνενολόνης. Η διαδικασία καταλύεται από οξειδωτικά ένζυμα, ορισμένα από τα οποία είναι μέλη της ομάδας των πρωτεϊνών που είναι συνδεδεμένες με αίμη, γνωστές ως κυτόχρωμα P450.

Η παρουσία πολλών ενζύμων, σχετικών με τη διαδικασία βιοσύνθεσης των στεροειδών, επιτρέπει τη μετατροπή της πρεγνενολόνης προς τεστοστερόνη, μέσω διαφόρων διαδρομών, περισσότερων από μια. Ανάλογα με το εάν ο μετασχηματισμός της πρεγνενολόνης πραγματοποιείται από ένα σύμπλεγμα 3β-υδροξυστεροειδικής-δεϋδρογενάσης/Δ5-Δ4-ισομεράσης ή από το ένζυμο P450_{C17}, τότε κυριαρχεί η διαδρομή Δ4 ή Δ5 (προϊόντα με διπλό δεσμό στη θέση C4 ή C5). Όσον αφορά στους ανθρώπους, τα περισσότερα από τα στεροειδή σχηματίζονται μέσω της διαδρομής Δ5, με πρώτο ενδιάμεσο με 19 άτομα άνθρακα, τη δεϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA). Το ένζυμο 3β-υδροξυστεροειδική-δεϋδρογενάση/Δ5-Δ4-ισομεράση (3β-HSD) καταλύει τη μετατροπή των Δ5-3β-υδροξυστεροειδών σε Δ4-3-κετοστεροειδή, ένα απαραίτητο στάδιο στη βιοσυνθετική πορεία.



Σχήμα 3.4 Βιοσύνθεση της τεστοστερόνης από τη χοληστερόλη.

3.3.2 Μεταφορά της τεστοστερόνης

Στην περιφέρεια αποκαθίσταται γρήγορη ισορροπία μεταξύ της τεστοστερόνης που συναντάται στα διάφορα όργανα και αυτής που βρίσκεται στο αίμα. Το γεγονός αυτό αποδεικνύεται από τα ίδια επίπεδα ελεύθερης (μη συζευγμένης) τεστοστερόνης που υπάρχουν στο σάλιο και το αίμα. Η συνολική συγκέντρωση αυτής, και γενικότερα των στεροειδών, στους σχετικούς ιστούς και τα υγρά του αίματος, εξαρτάται κυρίως από της πρωτεΐνες σύνδεσης, όπως η

σφαιρίνη, η οποία έχει υψηλή συγγένεια με ορμόνες φύλου (SHBG) και η αλβουμίνη. Οι πρωτεΐνες σύνδεσης λειτουργούν και ως μια μορφή αποθήκης των στεροειδών, τα οποία παρουσιάζουν υψηλή ταχύτητα μεταβολισμού, κατά τη διέλευση του αίματος από το ήπαρ.

Συγκεκριμένα η τεστοστερόνη, εμφανίζει μεγάλη σύνδεση με τις πρωτεΐνες του πλάσματος. Περίπου το 40% είναι συνδεδεμένο με την υψηλής συγγένειας με αυτή, γλοβουλίνη, ενώ περίπου το 60% συνδέεται, με χαμηλή συγγένεια, με την αλβουμίνη. Επίσης, παραμένει ένα ποσοστό 2% ελεύθερο, δηλαδή μη συζευγμένο με κάποια από τις προαναφερθείσες πρωτεΐνες.

3.3.3. Μεταβολισμός της τεστοστερόνης και των υπολοίπων ενδογενών ανδρογόνων αναβολικών στεροειδών

Ο μεταβολισμός των ενδογενών αναβολικών στεροειδών αποτελεί ένα εκτεταμένο πεδίο μελέτης και αυτό αντανakλάται στην ποικιλία των χημικών αντιδράσεων, στις οποίες τα υποστρώματα μπορούν να λάβουν μέρος, κατά τη διάρκεια του μεταβολισμού. Ο μεταβολισμός τους υποδιαιρείται σε δύο φάσεις:

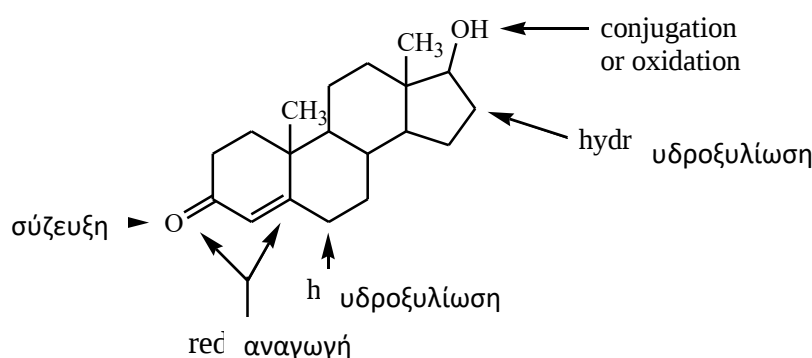
- φάση 1, η οποία περιλαμβάνει αντιδράσεις των δραστικών ομάδων, όπως οξείδωση, αναγωγή, υδροξυλίωση, επιμερείωση,
- φάση 2, στην οποία λαμβάνουν χώρα αντιδράσεις σύζευξης, σχηματίζοντας γλυκουρονίδια και θειικούς εστέρες των στεροειδών.

Τα τελικά προϊόντα της πρώτης φάσης περιέχουν μια ενεργή ομάδα π.χ. – OH, είναι δηλαδή χημικά ενεργά, ώστε να προχωρήσουν στη δεύτερη φάση του μεταβολισμού ή να αντιδράσουν με ένζυμα σύζευξης. Στην πραγματικότητα, ο κύριος σκοπός της φάσης 1 είναι να προετοιμάσει την ουσία για τη φάση 2 του μεταβολισμού. Η αποτοξίνωση πραγματοποιείται στη δεύτερη φάση, η οποία δίνει προϊόντα που θεωρούνται στο σύνολό τους ανενεργά, γενικά υδατοδιαλυτά και εύκολα απεκκρινόμενα από τον ανθρώπινο οργανισμό.

Οι κυριότεροι στόχοι στη φάση 1 του μεταβολισμού είναι οι δακτύλιοι Α, Β και Δ. Γενικά, η βιολογική δράση των στεροειδών απενεργοποιείται με κορεσμό των διπλών δεσμών. Ο διπλός δεσμός μεταξύ των ατόμων C4 και C5 ανάγεται προς 5α- και 5β- ισομερή. Επίσης, η κετονομάδα στον άνθρακα C3 ανάγεται εύκολα, δίνοντας κυρίως 3α-υδροξυ-ισομερή. Όσον αφορά στα στεροειδή με δομή 1,4-διένιο, ο δακτύλιος Α είναι ανθεκτικός σε αντιδράσεις αναγωγής και η πιο κοινή μεταβολική τους αλλαγή στο δακτύλιο Β είναι η 6β-υδροξυλίωση. Επιπλέον, στο δακτύλιο Δ, το άτομο του οξυγόνου στη θέση C17 είναι πολύ

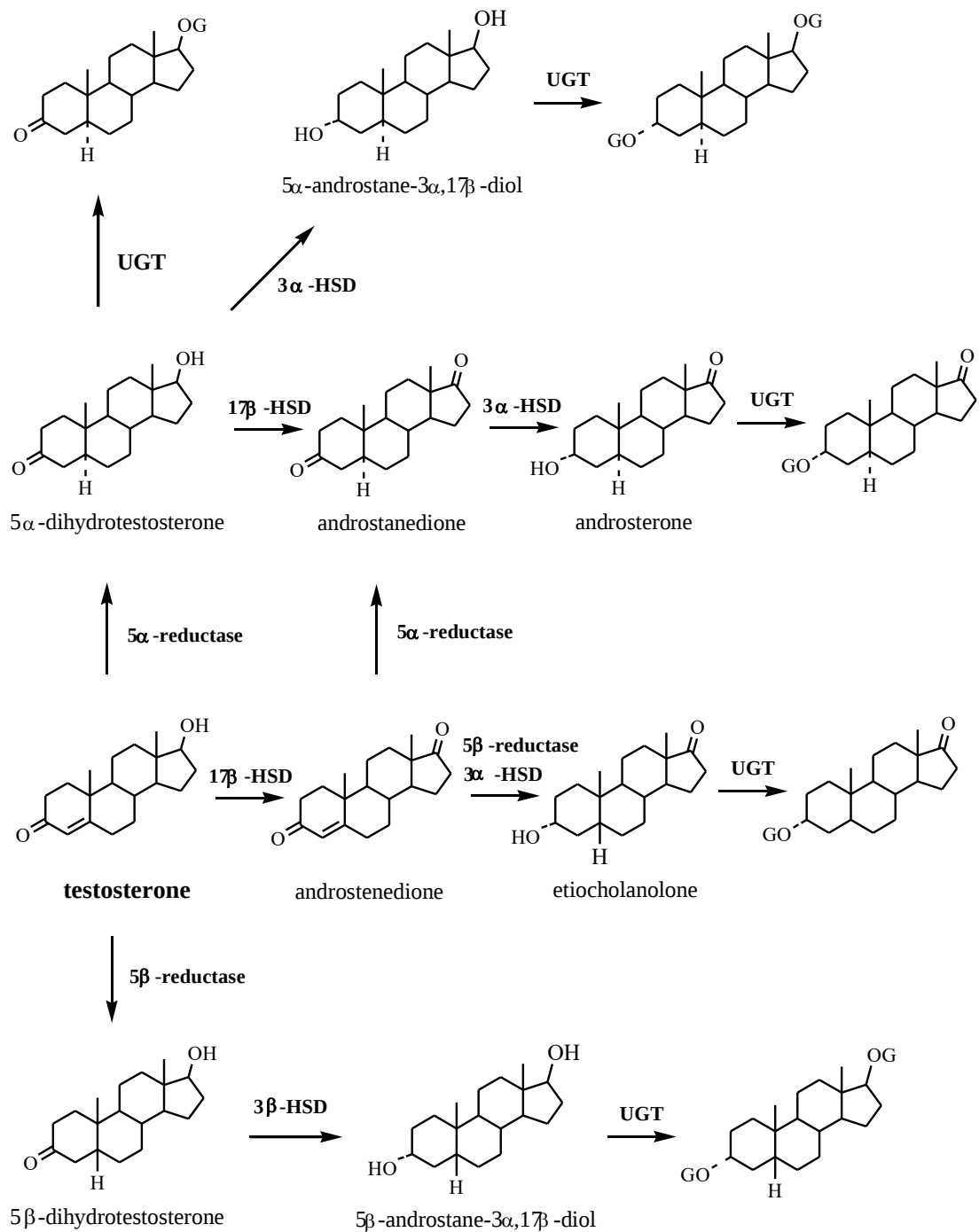
ευαίσθητο σε οξειδωαναγωγικές αντιδράσεις. Πολλά 17β-υδροξυ-στεροειδή οξειδώνονται προς 17-κετο-στεροειδή (σχήμα 3.5).

Οι αντιδράσεις σύζευξης που λαμβάνουν χώρα στη φάση 2 του μεταβολισμού είναι η γλυκουρονίωση και η σουλφονίωση, με κυριότερη την πρώτη, όσον αφορά στους ανθρώπους. Η σύζευξη γίνεται στους δακτυλίους Α και Δ. Στα 3α-υδροξυ-στεροειδή επικρατεί η σύζευξη με γλυκουρονικό οξύ, ενώ στα 3β-υδροξυ-στεροειδή μεθειικά. Αντίθετα, στα 17β-υδροξυ-στεροειδή είναι δυνατόν να γίνουν και οι δύο αντιδράσεις σύζευξης (Σχήμα 3.5).



Σχήμα 3.5 Πιθανές αντιδράσεις των φάσεων 1 και 2 του μεταβολισμού

Η τεστοστερόνη μπορεί να μετατραπεί σε ενεργούς μεταβολίτες, στους ανδρογόνους ιστούς. Στον προστάτη, στο δέρμα και στο ήπαρ, η τεστοστερόνη ανάγεται σε 5α-διϋδροτεστοστερόνη (DHT) μη αντιστρεπτά, μέσω του αναγωγικού ενζύμου, 5α-ρεδουκτάση, παρουσία NADPH. Η ανδρογόνος ιδιότητα της 5α-διϋδροτεστοστερόνης είναι 2-3 φορές πιο ισχυρή από την πρόδρομη ένωση. Επιπροσθέτως, η τεστοστερόνη μπορεί να αδρανοποιηθεί στο ήπαρ, με αντιδράσεις αναγωγής και οξείδωσης, οι οποίες ακολουθούνται από γλυκουρονίωση και νεφρική απέκκριση. Αρχικά, είναι δυνατόν να μεταβολιστεί σε ανδροστενεδιόνη, με οξείδωση της 17β-OH ομάδας, καθώς επίσης και σε ανδροστανοδιόνη, με 5α-αναγωγή του δακτυλίου Α στη θέση C5. Η ανδροστανοδιόνη μετατρέπεται περαιτέρω σε ανδροστερόνη, κατόπιν αναγωγής της κετονομάδας στη θέση C3. Εναλλακτικά, η ανδροστενεδιόνη μπορεί να μετατραπεί σε ετιοχολανολόνη, με αναγωγή της κετονομάδας στη θέση C3 και του διπλού δεσμού του δακτυλίου Α. Οι κυριότεροι μεταβολίτες που εκκρίνονται στα ούρα είναι η ανδροστερόνη και η ετιοχολανολόνη. Πρόκειται για δύο ανενεργούς μεταβολίτες, οι οποίοι εκκρίνονται συζευγμένοι, κατά βάση ως γλυκουρονίδια (Σχήμα 3.6) [16-20].



Σχήμα 3.6 Ο μεταβολισμός της τεστοστερόνης, όπου G:γλυκουρονίδιο, HSD: υδροξυ-στεροειδική-δεϋδρογονάση, UGT: UDP-γλυκουρονοσυλοτρανσφεράση

3.4 Συνθετικά αναβολικά ανδρογόνα στεροειδή

Εκτός από τις φυσικά παραγόμενες ανδρικές ορμόνες (ενδογενή στεροειδή), με σημαντικότερη την τεστοστερόνη, υπάρχουν και τα αντίστοιχα συνθετικά στεροειδή. Στον πίνακα που ακολουθεί, παρουσιάζονται τα εξωγενώς χορηγούμενα ενδογενή ανδρογόνα αναβολικά στεροειδή και οι αντίστοιχοι συζευγμένοι μεταβολίτες τους στα ούρα, ως γλυκουρονίδια (γ) ή φωσφορικά (φ).

Πίνακας 3.1 Χορηγούμενα ενδογενή ανδρογόνα αναβολικά στεροειδή και οι αντίστοιχοι μεταβολίτες τους στα ούρα

Χορηγούμενα στεροειδή	Μεταβολίτες στα ούρα
τεστοστερόνη, ανδροστενεδιόνη, δεϋδροεπιανδροστερόνη	τεστοστερόνη (γ)
Επιτεστοστερόνη	επιτεστοστερόνη (γ)
τεστοστερόνη, ανδροστενεδιόνη, δεϋδροεπιανδροστερόνη, ανδροστενοδιόλη, διϋδροτεστοστερόνη	ανδροστερόνη (γ)
τεστοστερόνη, ανδροστενεδιόνη, δεϋδροεπιανδροστερόνη, ανδροστενοδιόλη	ετιοχολανολόνη (γ)
Δεϋδροεπιανδροστερόνη	δεϋδροεπιανδροστερόνη (γ, φ)
Ανδροστενεδιόνη	6α-υδροξυ-ανδροστενοδιόνη (γ)
	6β-υδροξυ-ανδροστερόνη (γ)
	6β-υδροξυ-ετιοχολανολόνη (γ)
	6β-υδροξυ-επιανδροστερόνη (φ)

Η λήψη των συγκεκριμένων απαγορευμένων ουσιών από τους αθλητές, μπορεί να γίνει από το στόμα, με ένεση απευθείας στο μυ ή με τη μορφή αλοιφών που εφαρμόζονται στο δέρμα. Στην πρώτη περίπτωση, η ουσία δε χορηγείται απευθείας στον τόπο, όπου προορίζεται να δράσει. Ακόμη, όμως, και στην περίπτωση τοπικής χορήγησης, τα μόρια θα πρέπει να μεταβούν από το σημείο εφαρμογής της δόσης, μέχρι την «ειδική θέση», όπου θα δράσει. Στις περισσότερες περιπτώσεις, «ειδική θέση» σημαίνει υποδοχέας του στεροειδούς και η δράση που προκύπτει, είναι το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης απαγορευμένης ουσίας-υποδοχέα. Η άφιξη όμως στον υποδοχέα δεν είναι μια απλή διαδικασία, καθώς τόσο η δομή, όσο και σύσταση του ανθρώπινου σώματος δεν είναι ενιαία και επιπρόσθετα, η πρόσβαση στο εσωτερικό των κυττάρων, όπου υπάρχουν οι υποδοχείς, εμποδίζεται από μια σειρά φυσικών και μεταβολικών φραγμών. Η ενδοφλέβια χορήγηση διασφαλίζει την ταχεία άφιξη του συνόλου της χορηγούμενης δόσης στη γενική κυκλοφορία, με αποτέλεσμα την άμεση εκδήλωση της δράσης της ουσίας. Αντίθετα, όταν οι ουσίες χορηγούνται από άλλες οδούς, πρέπει να διασχίσουν ένα σύνολο μεμβρανών και ιστών, για να προσεγγίσουν τη γενική κυκλοφορία.

Οι τρεις διακριτές πορείες οι οποίες συνθέτουν τη γαστρεντερική απορρόφηση των ξενοβιοτικών ουσιών που λαμβάνονται από το στόμα, είναι η παροχή τους στα γαστρεντερικά υγρά, η μετακίνησή τους στο γαστρεντερικό σωλήνα και η πρόσληψή τους από τη γαστρεντερική βλεννογόνο στιβάδα. Η παροχή, δηλαδή η τροφοδότηση των γαστρεντερικών υγρών με την απαγορευμένη ουσία, εξαρτάται από τη δυνατότητα που υπάρχει να διαλυθεί το σκεύασμα στις συγκεκριμένες φυσιολογικές συνθήκες. Τα μόρια διαπερνούν τους επιθηλιακούς φραγμούς του σωλήνα, μόνο εάν βρίσκονται σε διαλυμένη κατάσταση και όχι σε στερεή.

Η άφιξη του στεροειδούς στο αίμα, εκτός από τη μετάβασή του στα γαστρεντερικά υγρά, προϋποθέτει και την παραμονή του, με την επιθυμητή μορφή, σε περιοχές του γαστρεντερικού σωλήνα, όπου μεγιστοποιείται η πιθανότητα της ποσοτικής πρόσληψής του από το γαστρεντερικό επιθήλιο. Η μετακίνηση αφορά κυρίως, στη διάβαση της φαρμακοτεχνικής μορφής κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα, μαζί με τη φυσιολογική μετακίνηση των περιεχομένων του γαστρεντερικού σωλήνα.

Η πρόσληψη που ακολουθεί, περιλαμβάνει την αρχική προσέγγιση του συνθετικού στεροειδούς στην επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων και στη συνέχεια, τη διαπέραση της βλεννογόνου στιβάδας. Γενικά, με τον όρο πρόσληψη συνοψίζονται όλες οι επιμέρους πορείες που οδηγούν στη μεταφορά

των ξενοβιοτικών ουσιών από το εσωτερικό του γαστρεντερικού σωλήνα προς τα αγγεία και κατόπιν στη γενική κυκλοφορία του αίματος. Η παρουσία τους στα γαστρεντερικά υγρά και στις θέσεις πρόσληψης με την επιθυμητή μορφή, αποτελεί προϋπόθεση για τη μεταφορά αυτή. Για την ολοκλήρωση της πρόσληψης, απαιτείται η υπερπήδηση μιας σειράς φραγμών, των φυσικών, οι οποίοι εμποδίζουν την άμεση πρόσβαση του φαρμάκου στα αγγεία, και των μεταβολικών, οι οποίοι οδηγούν στη βιομετατροπή του φαρμάκου, κατά τη διαπέραση. Η μεταφορά των ουσιών στη γενική κυκλοφορία του αίματος, διαμέσου των αιμοφόρων αγγείων που δικτυώνουν το γαστρεντερικό σωλήνα, αποτελεί τη βασική οδό που ακολουθείται.

Μετά την άφιξη των απαγορευμένων ουσιών στη γενική κυκλοφορία, οι πορείες που προσδιορίζουν την τύχη τους στο σώμα είναι η κατανομή και η απομάκρυνση. Η κατανομή επιτυγχάνεται, μέσω της κυκλοφορίας του αίματος. Μέσω αυτής, επιτρέπεται η ανάμιξη των συνθετικών στεροειδών με τα διάφορα υγρά στους ιστούς και τα όργανα του σώματος και έχει ως αποτέλεσμα την προσέγγιση στις θέσεις δράσης. Στον τομέα αυτό, πρωταρχικό ρόλο παίζει η σύνδεση των φαρμάκων με τις πρωτεΐνες του πλάσματος. Η πρωτεϊνική αυτή σύνδεση μπορεί να διακριθεί σε δύο κατηγορίες.

Στην πρώτη περίπτωση, στην ενδοκυττάρια σύνδεση, οι ουσίες συνδέονται με τον υποδοχέα των ανδρογόνων. Επίσης, υπάρχουν και οι δευτερεύοντες ή βουβοί υποδοχείς, με τους οποίους η σύνδεση γίνεται εξωκυττάρια και δε δημιουργεί μια άμεση «φαρμακολογική» απόκριση. Οι πιο σημαντικοί βουβοί υποδοχείς είναι οι πρωτεΐνες του πλάσματος και πιο ειδικά η αλβουμίνη.

Η εκδήλωση της δράσης των απαγορευμένων ουσιών, προϋποθέτει την προσέγγισή τους στους υποδοχείς που συνήθως βρίσκονται στους ιστούς. Αυτές δεν περιορίζονται στη γενική κυκλοφορία, αλλά διαχέονται προς το μεσοκυττάριο υγρό, διαπερνώντας τους πόρους των τριχοειδών του αίματος. Το μεσοκυττάριο υγρό συνιστά περίπου το 20% του όγκου των ιστών και είναι πλούσιο σε πρωτεΐνες του πλάσματος. Η εύκολη ανταλλαγή ουσιών μεταξύ αίματος και μεσοκυτταρίου υγρού, οφείλεται στη μεγάλη έκταση της επιφάνειας των τριχοειδών, καθώς και στη χαμηλή ταχύτητα ροής του αίματος, στα σημεία της ανταλλαγής. Το επόμενο στάδιο που μπορεί να ακολουθήσουν στη διαδικασία της κατανομής είναι να εισέλθει στα κύτταρα των ιστών και να κατανεμηθεί και στο ενδοκυττάριο υγρό που απαρτίζει περίπου το 65% του όγκου ενός ιστού.

Οι δύο σημαντικότερες διαδικασίες απομάκρυνσης των ξενοβιοτικών ουσιών είναι η απέκκριση και η βιομετατροπή που βασίζονται στη λειτουργία των νεφρών (νεφρική κάθαρση) και του ήπατος (ηπατική κάθαρση), αντίστοιχα. Η εκχύλιση που λαμβάνει χώρα στα συγκεκριμένα όργανα, έχει την έννοια της μη

επιστροφής των ουσιών στο αίμα, της οριστικής δηλαδή απομάκρυνσής τους, όπως συμβαίνει με την απέκκριση των απαγορευμένων ουσιών από τους νεφρούς στα ούρα ή της μεταβολής τους σε άλλες ουσίες (μεταβολίτες), όπως συνήθως συμβαίνει στο ήπαρ. Η διαδικασία του μεταβολισμού των συνθετικών ανδρογόνων αναβολικών στεροειδών είναι όμοια με αυτή που αναφέρθηκε για τα αντίστοιχα ενδογενή (εδάφιο 3.3.3).

3.5 Κατάχρηση των συνθετικών αναβολικών ανδρογόνων στεροειδών – παρενέργειες

Οι δόσεις των συνθετικών ανδρογόνων αναβολικών στεροειδών που λαμβάνουν οι αθλητές με σκοπό το ντόπινγκ, είναι από δέκα έως σαράντα φορές μεγαλύτερες από τις αποδεκτές για θεραπευτικούς σκοπούς. Είναι γνωστό ότι οποιαδήποτε χρήση φαρμάκων για θεραπευτικούς σκοπούς συνοδεύεται σχεδόν πάντα από ανεπιθύμητες ενέργειες. Έτσι, είναι αυτονόητο ότι η λήψη δόσεων κατά πολύ μεγαλύτερων από τις συνιστώμενες θεραπευτικές και μάλιστα από υγιή άτομα, όπως οι αθλητές, δε μπορεί παρά να συνοδεύεται, ομοίως, από ανεπιθύμητες ενέργειες.

Η χρόνια λήψη συνθετικών αναβολικών ανδρογόνων στεροειδών προκαλεί σημαντικές δομικές και λειτουργικές αλλαγές στο ήπαρ, αφού εκεί συντελείται η βιομετατροπή τους. Οι τιμές ηπατικών ενζύμων εμφανίζονται αυξημένες, αλλά συχνά επανέρχονται στις φυσιολογικές, όταν η χρήση των ουσιών διακοπεί. Η διαταραχή των ηπατικών λειτουργιών για μεγάλο χρονικό διάστημα μπορεί να προκαλέσει κίρρωση σημαντικού βαθμού.

Επιπροσθέτως, στις γυναίκες τα αναβολικά προκαλούν φαινόμενα «αρρενοποίησης» που εκδηλώνονται με αλλαγές στη χροιά της φωνής, δασυτριχισμό, αλλά και μείωση της τριχοφυΐας της κεφαλής ανδρικού τύπου (φαλάκρα). Οι εκδηλώσεις αυτές μπορεί να παραμείνουν ακόμη και μετά τη διακοπή της λήψης των συγκεκριμένων ουσιών. Στους άνδρες μπορεί να εμφανιστεί γυναιοκομασία, λόγω της βιομετατροπής των ανδρογόνων στεροειδών σε οιστρογόνα, αλλά και ελάττωση της τριχοφυΐας της κεφαλής.

Επιπλέον, η χρήση συνθετικών αναβολικών ανδρογόνων στεροειδών είναι δυνατόν να έχει ως αποτέλεσμα, μεταβολές στις συγκεντρώσεις των λιποπρωτεϊνών του ορού που περιλαμβάνουν αύξηση της LDL, ενώ παράλληλα αυξάνεται η συνολική χοληστερόλη και κατά συνέπεια, ο κίνδυνος αθηροσκλήρυνσης. Οι συγκεκριμένες απαγορευμένες ουσίες προκαλούν αύξηση της αρτηριακής πίεσης, πιθανώς, λόγω κατακράτησης υγρών και νατρίου, αλλά και λόγω της αύξησης των επιπέδων της κορτιζόλης του αίματος και της

υπερασβεστιαϊμίας που προκαλούν. Η προκαλούμενη υπερασβεστιαϊμία μπορεί να προκαλέσει στους αθλητές συμπτώματα αδυναμίας και εύκολης κόπωσης, αλλά και σοβαρότερες για την υγεία τους εκδηλώσεις.

Ακόμη, ανεπιθύμητες ενέργειες μπορεί να αφορούν και στο δέρμα. Ειδικότερα, μπορεί να προκαλέσουν αύξηση της έκκρισης σμήγματος από τους σμηγματογόνους αδένες του δέρματος, με αποτέλεσμα την εμφάνιση σμηγματορροϊκής δερματίτιδας και τη δημιουργία φαγεσώρων. Στη συνέχεια, εμφανίζονται χαρακτηριστικές βλάβες της κοινής ακμής σε διάφορες περιοχές του δέρματος, συνήθως στην πλάτη και στο πρόσωπο, και ενδεχόμενη εμφάνιση δευτερογενών μολύνσεων του δέρματος.

Λόγω του γεγονότος ότι οι μεταβολές στη δύναμη των τενόντων δε μπορούν να παρακολουθήσουν τις αυξήσεις της μυϊκής δύναμης από τη χρήση των εξεταζόμενων απαγορευμένων ουσιών, συχνά παρατηρούνται ρήξεις των τενόντων, ενώ δεν είναι σπάνιες και ταυτόχρονες εκτεταμένες κακώσεις των μυών.

Επίσης, η χρόνια χρήση των συγκεκριμένων αναβολικών μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση παραληρήματος και παρανοϊκών, μανιακών εκδηλώσεων και να ενεργοποιήσει λανθάνουσες ψυχοπαθολογικές καταστάσεις και ιδιαίτερα ψυχώσεις. Οι χρήστες εμφανίζουν, συχνότερα από τα φυσιολογικά άτομα, διαταραχές της προσωπικότητας, κυκλοθυμικά επεισόδια, αλλά και επεισόδια ευερεθιστότητας, άγχους, κατάθλιψης, θυμού, εχθρικής συμπεριφοράς και επιθετικότητας.

Τέλος, υπάρχουν ενδείξεις ότι η χρόνια χρήση των συνθετικών αναβολικών ανδρογόνων στεροειδών είναι δυνατόν να οδηγήσει σε ανάπτυξη ισχυρής ψυχικής, αλλά και σωματικής εξάρτησης, με αποτέλεσμα, μετά τη διακοπή παρατεταμένης λήψης, την εμφάνιση συνδρόμου αποστέρησης. Το σύνδρομο αυτό περιλαμβάνει άγχος, ναυτία, εμετούς ευερεθιστότητα, αϋπνία, ανορεξία, εφίδρωση, ανόρθωση των τριχών, ρίγη, μυαλγίες, κατάθλιψη, ταχυκαρδία και αύξηση της αρτηριακής πίεσης [21-28].

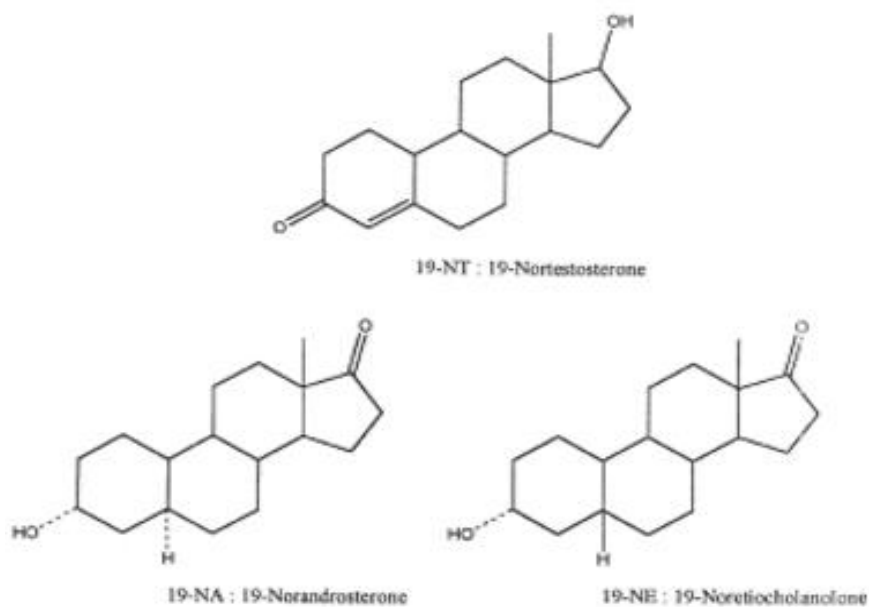
3.6Η Ναδρολόνη και οι δύο βασικοί μεταβολίτες της

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν δύο μεταβολίτες του συνθετικού αναβολικού ανδρογόνου στεροειδούς, νανδρολόνη ή αλλιώς 19-νορτεστοστερόνη. Η 19-νορανδροστερόνη (19-NA) και η 19-νορετιοχολανολόνη (19-NE). Η νανδρολόνη, ή η 19-νορτεστοστερόνη, είναι ένα συνθετικό αναβολικό ανδρογόνο στεροειδές (ΑΑΣ) μέρος της οικογένειας των νορ-στεροειδών και προέρχεται από

το μόριο τεστοστερόνης, την κύρια στεροειδής ορμόνη που παράγεται στον άνθρωπο και σε πολύ μεγαλύτερη ποσότητα, στον άνδρα. Η μικρή χημική τροποποίηση του άνθρακα στο άτομο 19 παρέχει περισσότερες αναβολικές από ανδρογονικές ιδιότητες στην νανδρολόνη. Αυτό το χαρακτηριστικό είναι σημαντικό όσον αφορά την ιατρική χρήση και αποτελεί την αιτία της εκτεταμένης παράνομης χρήσης της νανδρολόνης στον αθλητισμό. Η πρώτη σύνθεση της νανδρολόνης αναφέρθηκε το 1950. Από εκείνη την χρονική περίοδο, η φαρμακευτική βιομηχανία έχει παράξει νορ-στεροειδή για την χρήση τους σε διάφορες παθήσεις όπως οστεοπόρωση, υπογοναδισμό και αιματολογικές παθήσεις.

Η νανδρολόνη, μεταβολίζεται από τον οργανισμό σε αρκετά προϊόντα αποικοδόμησης. Δύο μεταβολίτες που αποβάλλονται με τα ούρα, η 19-νορανδροστερόνη (19-NA) και η 19-νορετιοχολανολόνη (19-NE) εμφανίζονται κυρίως ως γλυκουρονίδια, ενώ το τρίτο ισομερές η 19-νορεπιανδροστερόνη (19-NEA) φαίνεται να εμφανίζεται σχεδόν αποκλειστικά ως θειικό άλας. Ένα δείγμα αθλητή για να δοθεί ως θετικό για νανδρολόνη πρέπει το σύνολο της ελεύθερης και του γλυκουρονιδίου της 19-νορανδροστερόνης να είναι μεγαλύτερο από τα 2ng/mL. Αυτό το όριο έχει οριστεί από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Αντι-ντόπινγκ (WADA) και για τους άντρες αλλά και για τις γυναίκες. Αυτό το όριο θεσμίστηκε έτσι ώστε να εξετάζεται η πιθανής ενδογενής παραγωγή νανδρολόνης από τον άνθρωπο. Ωστόσο, κατά την διάρκεια μίας εγκυμοσύνης τα επίπεδα της 19-νορανδροστερόνης στα ούρα, μπορεί να φτάσουν μέχρι και τα 15ng/mL.

Γενικά, τα εργαστήρια ελέγχου ντόπινγκ, ανιχνεύουν την 19-νορανδροστερόνη και την 19-νορετιοχολανολόνη με αεριοχρωματογραφία σε σύζευξη με φασματομετρία μαζών. Ωστόσο για ερευνητικούς σκοπούς έχει βρεθεί ότι μπορεί να γίνει ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των δύο αυτών μεταβολιτών της νανδρολόνης, με ραδιοανοσοδοκιμασία [40,42].



Σχήμα 3.7 : Χημική δομή της νανδρολόνης και των δύο μεταβολιτών της νανδρολόνης, 19-νορανδροστερόνη και 19-νορετιοχολανολόνη, που ανιχνεύονται στα εργαστήρια ελέγχου ντόπινγκ.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Εργαστηριακός Εξοπλισμός- Αντιδραστήρια- Προετοιμασία Δειγμάτων

4.1 Εργαστηριακές Συσκευές

- Αυτόματες πιπέττες τύπου Finnpiquette-ThermoLabsystems μεταβλητού όγκου 2-20 μL , 20-200 μL , 200-1000 μL , 1-5 mL.
- Αυτόματη επαναληπτική πιπέττα τύπου Finnpiquette-ThermoLabsystems μεταβλητού όγκου 10-5000 μL .
- Αυτόματος αναδευτήρας περιδίνησης τύπου Vortex genie 2, Scientific Industries για την ανάδευση διαλυμάτων και δειγμάτων.
- Διακριβωμένος αναλυτικός ζυγός τύπου AND, ER-60A, τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων, μέγιστου φορτίου ζύγισης 60 g.
- Διανεμητής υγρών (dispenser) μέγιστου όγκου 10 mL.
- Εργαστηριακές μεταλλικές σπάτουλες τύπου Roth.
- Εργαστηριακά θερμόμετρα.
- Συσκευή εξάτμισης αποτελούμενη από το σύστημα διανεμητή αερίου αζώτου (N_2) και το μεταλλόλουτρο. Ο διανεμητής αερίου αζώτου (N_2) διαθέτει έως και 27 θέσεις, με δυνατότητα χρήσης όλων ή μερικών ανάλογα με τον αριθμό των αναλυόμενων δειγμάτων.
- 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 ψηλών υάλινων βιδωτών δοκιμαστικών σωλήνων πριν τη φυγοκέντρωση.
- Φυγόκεντρος τύπου Z-510 BHG, HERMLE 30 θέσεων όπου οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετούνται σε αντιδιαμετρικές θέσεις με μέγιστη επιτρεπόμενη διαφορά βάρους των αντιδιαμετρικών ομάδων τα 0,5 g.
- Ψαλίδι ανοίγματος και κλεισίματος υάλινων φιαλιδίων αυτόματου εισαγωγέα.

4.2 Υάλινα Σκεύη και Αναλώσιμα

- Διακριβωμένες ογκομετρικές φιάλες όγκου 1, 2, 5, 10, 20, 50 και 100 mL.

- Μικροφιαλίδια (micro-inserts), διαφανή με κωνικό πυθμένα, χωρητικότητας 200 μL .
- Ογκομετρικοί κύλινδροι 10, 50, 100, 500 και 1000 mL.
- Ογκομετρικές φιάλες παρασκευής και φύλαξης διαλυμάτων όγκου 1, 2, 5, 10, 20, 25, 50 mL, με πλαστικά πώματα.
- Παραφίλμ.
- Πλαστικά ρύγχη (tips) αυτόματων πιπιεττών και επαναληπτικής πιπέττας.
- Ουροσυλλέκτες.
- Υάλινα διαφανή φιαλίδια (vials) αυτόματου εισαγωγέα τύπου CrimpNeck ND-11, χωρητικότητας 1.5 mL.
- Υάλινοι εσφυρισμένοι κωνικοί δοκιμαστικοί σωλήνες όγκου 10 mL, με εσφυρισμένα πώματα.
- Υάλινες πιπέττες Pasteur 230 mm.
- Υάλινα ποτήρια ζέσεως, όγκου 250, 500 και 1000 mL.
- Υάλινες φιάλες διαλυτών με βιδωτό πώμα, όγκου 250, 500 και 1000 mL.
- Υάλινοι ψηλοί βιδωτοί δοκιμαστικοί σωλήνες όγκου 15 mL.

4.3 Διαλύτες- Αντιδραστήρια

4.3.1. Διαλύτες

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας:

- Δις-απεσταγμένο ύδωρ, H_2O .
- Μεθανόλη, CH_3OH , καθαρότητας HPLC 99,8% (LabscanLtd,Analytical Sciences, Ireland).
- κ-Πεντάνιο C_5H_{12} , καθαρότηταςHPLC 95,0% (Labscan Ltd,Analytical Sciences, Ireland)

4.3.2 Αντιδραστήρια

- Δισόξινοφωσφορικόκάλιο, KH_2PO_4 , καθαρότητας 99,0% (Panreac, Spain).
- Ένζυμοβ-γλυκουρονιδάσηαπόE.Coli, (Sigma-Aldrich, Germany).

- Ώξινοανθρακικόκάλιο, KHCO_3 , καθαρότητας 99,5% (Sigma-Aldrich, Germany).
- Ώξινοανθρακικόνάτριο, NaHCO_3 , καθαρότητας 99,8% (Panreac, Spain).
- Ώξινοφωσφορικόκάλιο, K_2HPO_4 , καθαρότητας 99,0% (Sigma-Aldrich, Germany). Acros).
- *N*-μέθυλο-*N*-τριμέθυλο-σιλυλοτριφθορο-ακεταμίδιο, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{ONF}_3\text{Si}$, MSTFA (Pierce)
- Ιωδιούχο αμμώνιο, NH_4I (Merck, 99,5%)
- Διθειοερυθρίτόλη, DTE (Merck 99%)

4.4 Διαλύματα Εργασίας

4.4.1. Ρυθμιστικά διαλύματα

1. Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ($\text{KHPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$), pH 7,0: Ζυγίζονται 32,4 g όξινου φωσφορικού καλίου και 13,5g δισόξινου φωσφορικού καλίου, τα οποία μεταφέρονται σε υάλινη φιάλη των 250 mL με βιδωτό πώμα και στη συνέχεια προστίθεται κατάλληλη ποσότητα απεσταγμένου νερού. Το μίγμα αναδεύεται ήπια, υπό μαγνητική ανάδευση, σε θερμαντήρα για 10 min και μετά την απόκτηση θερμοκρασίας δωματίου, ρυθμίζεται το pH στην τιμή 7,0.

2. Ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών 30%w/v K_2CO_3 : Ζυγίζονται 75g ανθρακικού καλίου K_2CO_3 σε πλαστικό ταψάκι ζύγισης σε φαρμακευτικό ζυγό, τα οποία μεταφέρονται σε υάλινη φιάλη των 250mL με βιδωτό πώμα, προστίθενται 250mL απεσταγμένου, η φιάλη πωματίζεται και ακολουθεί πολύ καλή ανάδευση.

5.4.2 Αντιδραστήριο παραγωγοποίησης

- Μίγμα παραγωγοποίησης MSTFA/ NH_4I /DTE 1000:2:4(v/w/w) παρασκευάζεται με ανάμιξη 10 mL *N*-μεθυλο-*N*-τριμεθυλοσιλυλοτριφθορακεταμίδιου MSTFA, 20 mg ιωδιούχου αμμωνίου (NH_4I) και 40mg διθειοερυθρίτόλης (DTE). Φυλάσσεται σε κλειστό γυάλινο δοχείο.

4.4.3 Διαλύματα Εσωτερικού Προτύπου (ISTD)

Η παρουσία εσωτερικού προτύπου (ISTD) καθίσταται αναγκαία κατά την ανάλυση ουσιών σε βιολογικά δείγματα, προκειμένου να αντισταθμιστούν απώλειες κατά το στάδιο της προκατεργασίας, σφάλματα κατά τον ιοντισμό και την αναλυτική μέτρηση και γενικά 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 της φασματομετρίας μαζών, 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 και ίδιο χρόνο έκλουσης. 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 το γλυκουρονίδιο της d4 19-νορανδροστερόνης.

4.4.4 Πρότυπα διαλύματα ουσιών

Πρόκειται για διαλύματα παρακαταθήκης, σε διαλύτη μεθανόλη, των προτύπων ενώσεων που χρησιμοποιήθηκαν, είτε μεμονωμένα κατά την διάρκεια των πειραμάτων ή με σκοπό την παρασκευή πολυσυστατικών διαλυμάτων. Τα διαλύματα αυτά φυλάσσονται σε σκουρόχρωμα φιαλίδια (vials) σε καταψύκτη θερμοκρασίας -20°C και έχουν διάρκεια ζωής έως 3 έτη. Η παρασκευή τους έγινε σε ογκομετρικές φιάλες των 5 mL, πριν την τοποθέτησή τους στα φιαλίδια των 2mL.

Παρασκευάστηκαν δύο πρότυπα διαλύματα 19-NA και δύο 19-NE με βάση την φόρμα διαλύματος ποσοτικού προσδιορισμού του εργαστηρίου, συγκεντρώσεων 105,8 και 100,2 ng/mL αντίστοιχα. Από τα δύο αυτά πρότυπα,

παρασκευάστηκαν δύο νέα διαλύματα που περιείχαν και τις δύο ουσίες σε αναλογία 3/1 (19-NA/19-NE). Το ένα διάλυμα χρησιμοποιήθηκε για τα δείγματα βαθμονόμησης της των καμπυλών αναφοράς, και το δεύτερο για τα δείγματα ελέγχου.

- **RMA_QC:** 100 μ L πρότυπο διάλυμα 19-NA-1 +35 μ L πρότυπο διάλυμα 19-NE-1 σε βαθμονομημένη ογκομετρική φιάλη των 2 mL, αραιώνοντας μέχρι την χαραγή με μεθανόλη.
- **RMA_STD:** 100 μ L πρότυπο διάλυμα 19-NA-2 +35 μ L πρότυπο διάλυμα 19-NE-2 σε βαθμονομημένη ογκομετρική φιάλη των 2 mL, αραιώνοντας μέχρι την χαραγή με μεθανόλη.

4.5 Πειραματική Διαδικασία Βιολογικών Δειγμάτων

Για τις ανάγκες της επικύρωσης, παρασκευάζοντουσαν σε κάθε εργαστηριακή ημέρα, μια καμπύλη αναφοράς πρότυπων δειγμάτων και δύο δείγματα ελέγχου που η συγκέντρωσή τους ήταν ίση μετα δύο αντίστοιχα σημεία της καμπύλης αναφοράς. Η παρασκευαστική τους πορεία παρατίθεται στον Πίνακα 4.1 και 4.2.

Πίνακας 4.1: Στάδια παρασκευής δειγμάτων

α/α	ΣΤΑΔΙΟ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ
1	Προετοιμασία Πρότυπων Δειγμάτων Καμπύλης Αναφοράς
1.1	Για τη δημιουργία καμπύλης χρησιμοποιούνται λευκά ούρα που έχουν ελεγχθεί για χαμηλή συγκέντρωση 19-νορανδροστερόνης ενδογενούς προέλευσης.
1.2	Δημιουργία 2 σειρών αναφοράς ούρων STDA και STDB με μειούμενη περιεκτικότητα σε γλυκουρονίδια 19NA και 19-NE ως εξής:
1.3	Προσθήκη με σύριγγα Hamilton 40 μ L RMA_STD γλυκουρονιδίων 19-NA/NE σε βαθμονομημένη ογκομετρική φιάλη 20 mL. Συμπλήρωση μέχρι τη χαραγή με λευκά ούρα σταδίου 1.1. Καλή ανακίνηση με vortex. Μετάγγιση με πιπέτα παστέρ 5 mL διαλύματος από την ογκομετρική φιάλη των 20 mL σε βαθμονομημένη ογκομετρική φιάλη 5 mL: STD1A Τελικές συγκεντρώσεις: 10,58/3,51ng/mL αντίστοιχα.
1.4	Επαναπλήρωση της ογκομετρικής φιάλης σταδίου 1.3 με λευκά ούρα σταδίου 1.1. Καλή ανακίνηση με vortex. Μετάγγιση με πιπέτα παστέρ 5 mL διαλύματος από την ογκομετρική φιάλη των 20 mL σε βαθμονομημένη ογκομετρική φιάλη 5 mL: STD2A . Τελικές συγκεντρώσεις: 7,94/2,63ng/mL αντίστοιχα.

1.5	Επαναπλήρωση της ογκομετρικής φιάλης σταδίου 1.4 με λευκά ούρα σταδίου 1.1. Καλή ανακίνηση με vortex. Μετάγγιση με πιπέτα παστέρ 5 mL διαλύματος από την ογκομετρική φιάλη των 20 mL σε βαθμονομημένη ογκομετρική φιάλη 5 mL: STD3A. Τελικές συγκεντρώσεις: 5,95/1,97 ng/mL αντίστοιχα.
1.6	Επαναπλήρωση της ογκομετρικής φιάλης σταδίου 1.5 με λευκά ούρα σταδίου 1.1. Καλή ανακίνηση με vortex. Μετάγγιση με πιπέτα παστέρ 5 mL διαλύματος από την ογκομετρική φιάλη των 20 mL σε βαθμονομημένη ογκομετρική φιάλη 5 mL: STD4A. Τελικές συγκεντρώσεις: 4,46/1,48ng/mL αντίστοιχα.
1.7	Επαναπλήρωση της ογκομετρικής φιάλης σταδίου 1.6 με λευκά ούρα σταδίου 1.1. Καλή ανακίνηση με vortex. Μετάγγιση με πιπέτα παστέρ 5 mL διαλύματος από την ογκομετρική φιάλη των 20 mL σε βαθμονομημένη ογκομετρική φιάλη 5 mL: STD5A. Τελικές συγκεντρώσεις: 3,34/1,11ng/mL αντίστοιχα.
1.8	Επαναπλήρωση της ογκομετρικής φιάλης σταδίου 1.7 με λευκά ούρα σταδίου 1.1. Καλή ανακίνηση με vortex. Μετάγγιση με πιπέτα παστέρ 5 mL διαλύματος από την ογκομετρική φιάλη των 20 mL σε βαθμονομημένη ογκομετρική φιάλη 5 mL: STD6A. Τελικές συγκεντρώσεις: 2,5/0,83ng/mL αντίστοιχα.
1.9	Επαναπλήρωση της ογκομετρικής φιάλης σταδίου 1.8 με λευκά ούρα σταδίου 1.1. Καλή ανακίνηση με vortex. Μετάγγιση με πιπέτα παστέρ 5 mL διαλύματος από την ογκομετρική φιάλη των 20 mL σε βαθμονομημένη ογκομετρική φιάλη 5 mL: STD7A. Τελικές συγκεντρώσεις: 1,88/0,62ng/mL αντίστοιχα.
1.10	Προσθήκη με σύριγγα Hamilton 40 µL RMD_STD γλυκουρονιδίων 19-NA/NE σε βαθμονομημένη ογκομετρική φιάλη 20 mL. Συμπλήρωση μέχρι τη χαραγή με λευκά ούρα σταδίου 1.1. Καλή ανακίνηση με vortex. Μετάγγιση με πιπέτα παστερ 5 mL διαλύματος από την ογκομετρική φιάλη των 20 mL σε βαθμονομημένη ογκομετρική φιάλη 5 mL: STD1B Τελικές συγκεντρώσεις: 10,58/3,51ng/mL αντίστοιχα.
1.11	Επανάληψη των σταδίων 1.4-1.9 για την δημιουργία της δεύτερης σειράς reference των προτύπων διαλυμάτων.(STD1B-STD7B)
2	Δημιουργία Δειγμάτων Ελέγχου Ποιότητας
2.1	Προσθήκη με σύριγγα Hamilton 40 µL RMD_CTRL γλυκουρονιδίων 19-NA/NE σε βαθμονομημένη ογκομετρική φιάλη 20 mL.

	Συμπλήρωση μέχρι τη χαραγή με λευκά ούρα σταδίου 1.1. Καλή ανακίνηση με vortex. Μετάγγιση με πιπέτα παστέρ 5 mL διαλύματος από την ογκομετρική φιάλη των 20 mL. Επαναπλήρωση της ογκομετρικής φιάλης. Μετάγγιση με πιπέτα παστέρ 5 mL διαλύματος από την ογκομετρική φιάλη των 20 mL σε βαθμονομημένη ογκομετρική φιάλη 5 mL: CTRL1A Τελικές συγκεντρώσεις: 7,94/2,63ng/mL αντίστοιχα.
2.2	Επαναπλήρωση της ογκομετρικής φιάλης σταδίου 2.1 με λευκά ούρα σταδίου 1.1. Καλή ανακίνηση με vortex. Μετάγγιση με πιπέτα παστέρ 15 mL διαλύματος από την ογκομετρική φιάλη των 20 mL. Επαναπλήρωση της ογκομετρικής φιάλης. Μετάγγιση με πιπέτα παστέρ 5 mL διαλύματος από την ογκομετρική φιάλη των 20 mL σε βαθμονομημένη ογκομετρική φιάλη 5 mL: CTRL2A Τελικές συγκεντρώσεις: 3,34/1,11ng/mL αντίστοιχα.
2.3	Προσθήκη με σύριγγα Hamilton 40 μL RMAΔ_CTRL γλυκουρονιδίων 19-NA/NE σε βαθμονομημένη ογκομετρική φιάλη 20 mL. Συμπλήρωση μέχρι τη χαραγή με λευκά ούρα σταδίου 1.1. Καλή ανακίνηση με vortex. Μετάγγιση με πιπέτα παστέρ 5 mL διαλύματος από την ογκομετρική φιάλη των 20 mL. Επαναπλήρωση της ογκομετρικής φιάλης. Μετάγγιση με πιπέτα παστέρ 5 mL διαλύματος από την ογκομετρική φιάλη των 20 mL σε βαθμονομημένη ογκομετρική φιάλη 5 mL: CTRL1B Τελικές συγκεντρώσεις: 7,94/2,63ng/mL αντίστοιχα.
2.4	Επαναπλήρωση της ογκομετρικής φιάλης σταδίου 2.3 με ούρα blank σταδίου 1.1. Καλό vortex. Μετάγγιση με πιπέτα παστέρ 15 mL διαλύματος από την ογκομετρική φιάλη των 20 mL. Επαναπλήρωση της ογκομετρικής φιάλης. Μετάγγιση με πιπέτα παστέρ 5 mL διαλύματος από την ογκομετρική φιάλη των 20 mL σε βαθμονομημένη ογκομετρική φιάλη 5 mL: CTRL2B Τελικές συγκεντρώσεις: 3,34/1,11ng/mL αντίστοιχα.

Πίνακας 4.2: Γενική Παρασκευαστική Πορεία Δειγμάτων

1	Γενική Παρασκευαστική Πορεία
1.1	Επισήμανση ψηλών σωληνώνως: STD1A-7A, STD1B-7B, CTRL1A-2A,

	CTRL1B-2BκαθώςκαιBLANK-A ,BLANK-B
1.2	Μετάγγιση 2 mL ούρων από τις αντίστοιχες ογκομετρικές φιάλες των 5 mL, με αυτόματη πιπέττα Eppendorf στους αντίστοιχους σωλήνες, ενώ για τα λευκά δείγματα γίνεται μετάγγιση 2 mL λευκών ούρων του σταδίου 1.1 του πίνακα 4.1.
2	Προσθήκη εσωτερικού προτύπου (αφορά όλα τα δείγματα)
2.1	Προσθήκη 50 μ L μεθυλοτεστοστερόνης 5 μ g/mL με σύριγγα Hamilton, vortex.
2.2	Προσθήκη 50 μ L γλυκουρονιδίου d ₄ 19-νορανδροστερόνης 195ng/mL με σύριγγα Hamilton, vortex.
3	Υδρόλυση- Εκχύλιση (αφορά όλα τα δείγματα)
3.1	Προσθήκη 1,0 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH 7, vortex.
3.2	Προσθήκη 50 μ L υγρού ενζύμου Roche E.coli με πιπέττα των 20-200 μ L, vortex, κάλυψη του συνόλου των δειγμάτων με φύλο αλουμινόχαρτου.
3.3	Μεταφορά στο φούρνο στους 50 ($\pm 2^\circ$ C) για 1,5h.
3.4	Επαναφορά των δειγμάτων σε θερμοκρασία περοβάλλοντος.
3.5	Προσθήκη 250 μ L ρυθμιστικού διαλύματος ανθρακικών 30% (w/v).
3.6	Ανάδευση και αναμονή για 3 min.
3.7	Έλεγχος του pH με pHμετρικό δείκτη. Ρύθμιση pH 9-10.
3.8	Προσθήκη 5 mL κ-πεντάνιο.
3.9	Πωματισμός και ανάδευση στους ανακινήτρες για 20 min.
3.10	Αφαίρεση πωμάτων, ισοβάρυση σωλήνων και μεταφορά στην φυγόκεντρο για 10 min (1900-2000rpm).
3.11	Μετάγγιση της οργανικής στοιβάδας σε επισημασμένους κωνικούς σωλήνες.
3.12	Εξάτμιση σε ρεύμα N ₂ (50 $\pm$ 5 $^\circ$ C)
4	Παραγωγοποίηση(αφορά όλα τα δείγματα)
4.1	Προσθήκη 75 μ L αντιδραστηρίου παραγωγοποίησης MSTFA/NH ₄ I/DTE, πωματισμός και καλή ανάδευση.
4.2	Επώαση στους (80 $\pm$ 5) $^\circ$ C, 30 min σε hotblock.
4.3	Επαναφορά των δειγμάτων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος
4.4	Μετάγγιση των παραγωγοποιημένων δειγμάτων με πιπέττα, σε vial.

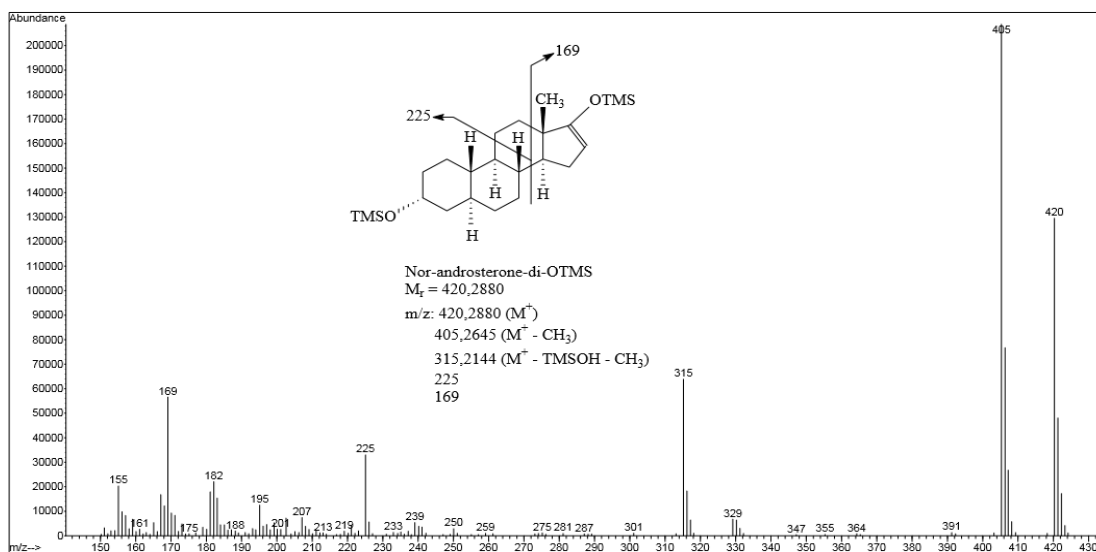
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Επικύρωση της μεθόδου

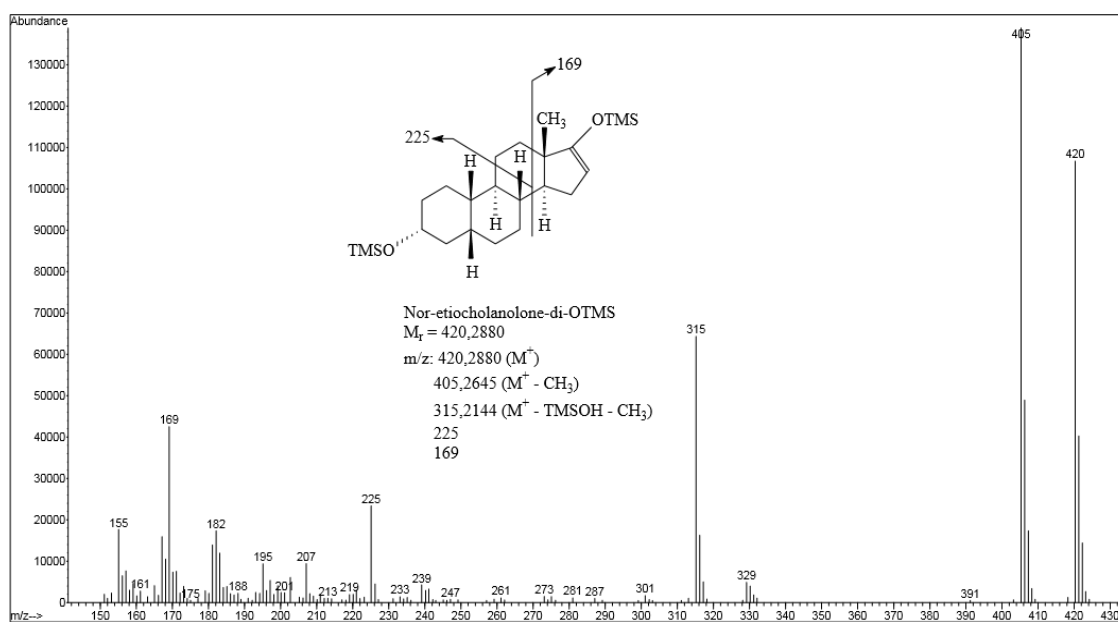
5.1 Συνθήκες χρωματογραφίας- Φασματομετρίας μαζών

Η ανάλυση βασίστηκε στην τεχνική της αεριοχρωματογραφίας συζευγμένης με υψηλής διαχωριστικής ικανότητας φασματομετρία μαζών (gas chromatography-high resolution mass spectrometry, GC/HRMS) και πραγματοποιήθηκε σε σύστημα Waters Micromass AutoSpec Ultima (Manchester, UK) συνδεδεμένο με αέριο χρωματογράφο Agilent 6890, ο οποίος ήταν εξοπλισμένος με μία Agilent Ultra 1 GC στήλη, μήκους 12 m, εσωτερικής διαμέτρου 0,2 mm και με 0,33 μm πάχος υμενίου. Φέρον αέριο ήταν το ήλιο, με ταχύτητα ροής 1.1 mL/min. Ο όγκος της ένεσης δείγματος ήταν 2 μL με διαμερισμό (split mode) 10 : 1. Η θερμοκρασία στον εισαγωγέα δείγματος και στην διεπαφή ρυθμίστηκαν στους 250 και 310 °C, αντίστοιχα. Η αρχική θερμοκρασία του κλιβάνου ήταν 150 °C για 0,5 min, και μετά αυξανόταν κατά 12,5 °C/min μέχρι τους 310 °C, όπου διατηρήθηκε για 2,5 min. Επιλέχτηκε η ρύθμιση επιλεκτικής καταγραφής ιόντων (SIR), με εύρος σάρωσης 315,21-446,30 m/z.

Το πρότυπο που χρησιμοποιήθηκε για την ρύθμιση του οργάνου ήταν κλάσμα περφλουοροτριβουτυλαμίνης για φασματομετρία μαζών (Agilent Technologies).



Εικόνα 6.1: Πλήρης σάρωση φάσματος του 19-NA-di-OTMS με αεριοχρωματογραφία-φασματομετρία μαζών.



Εικόνα 6.2: Πλήρης σάρωση φάσματος του 19-NE-di-OTMS με αεριοχρωματογραφία-φασματομετρία μαζών.

5.2 Κριτήρια επικύρωσης μεθόδου

Ο σκοπός του τμήματος αυτού της εργασίας είναι η αξιολόγηση της μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού του γλυκουρονιδίου της 19-νορανδροστερόνης και 19-νορετιοχολανολόνης καθώς και του λόγου αυτών σε ούρα αθλητών. Η μέθοδος αυτή είναι ποσοτική με μεθοδολογία σάρωσης που βασίζεται στη χρήση αεριοχρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών (GC/HRMS) και έχει σκοπό την εξασφάλιση της ποσοτικοποίησης των 19-NA και 19-NE σε ούρα, σύμφωνα με τις απαιτήσεις του WADA. Για την αξιολόγηση της μεθόδου πραγματοποιήθηκε μελέτη των ακόλουθων αναλυτικών χαρακτηριστικών σύμφωνα με το διεθνές πρότυπο ISO/IEC 17025, όπως εφαρμόζεται για τα εργαστήρια Ντόπινγκ και επιπλέον σύμφωνα με το πρότυπο ISL (International Standard for Laboratories) του WADA.

Τα αναλυτικά χαρακτηριστικά επικύρωσης που ελέγχθηκαν είναι:

- Σχετικός χρόνος ανάσχεσης (RRT)
- Γραμμικότητα (Linearity)
- Έλεγχος επιμόλυνσης (Carryover contamination)
- Διακύμανση ευαισθησίας (Sensitivity)
- Ορθότητα (Accuracy)
- Επαναληψιμότητα (Repeatability)
- Ενδιάμεση πιστότητα (Intermediate precision)
- Όριο ανίχνευσης (Limit of Detection)
- Όριο ποσοτικοποίησης (Limit of Quantification)
- Αβεβαιότητα μεθόδου (Uncertainty)

5.3 Ανάλυση δεδομένων καμπυλών βαθμονόμησης

Για την επικύρωση της μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού απαιτείται η ανάλυση τουλάχιστον 4 καμπυλών βαθμονόμησης των 5 σημείων σε διαφορετική εργαστηριακή ημέρα ή καθεμία. Έτσι, στην προκειμένη περίπτωση

παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν 5 καμπύλες αναφοράς των 7 σημείων για τις ανάγκες της επικύρωσης.

Για την κατασκευή μιας καμπύλης βαθμονόμησης απαιτούνται πρότυπα δείγματα (STD), δείγματα ελέγχου (CTRL) και λευκά δείγματα (BLANK), όλα παρασκευασμένα σε λευκά ούρα (blank), τα οποία παρασκευάζονται εις διπλούν (1+2) με την παρασκευαστική πορεία που προαναφέρθηκε. Τα δείγματα ελέγχου παρασκευάστηκαν σε 2 επίπεδα συγκέντρωσης 3,34 και 7,94ng/mL για το γλυκουρονίδιο της 19-νορανδροστερόνης και 1,11 και 2,63 ng/mL για το γλυκουρονίδιο της 19-νορετιοχολανολόνης. Τα πρότυπα δείγματα παρασκευάστηκαν σε 7 επίπεδα συγκέντρωσης (STD1, STD2, STD3, STD4, STD5, STD6, STD7) 1,88, 2,5, 3,34, 4,46, 5,95, 7,94, 10,58ng/mL για το γλυκουρονίδιο της 19-νορανδροστερόνης και 0,62, 0,83, 1,11, 1,48, 1,97, 2,63 και 3,51 για το γλυκουρονίδιο της 19-νορετιοχολανολόνης, με προσθήκη κατάλληλου όγκου 40 μ L από το πρότυπο διάλυμα RMD_QC για τα δείγματα ελέγχου και αντίστοιχα 40 μ L RMD_STD συγκέντρωσης 10,58/3,51ng/mL 19-NA/19-NE και τις κατάλληλες αραιώσεις.

Όλα τα προαναφερθέντα δείγματα της καμπύλης αναφοράς, αφού παρασκευάστηκαν, αναλύθηκαν εις διπλούν (A1+A2) στο GC/HRMS σύστημα με την προς επικύρωση μέθοδο. Η σειρά ανάλυσης ήταν: BLANK, STD7_A1, STD7_A2, STD7_B1, STD7_B2, STD6_A1...STD1_B1, STD1_B2, BLANK, CTRL2_A1, CTRL2_A2...CTRL1_B1, CTRL1_B2. Για λόγους εξοικονόμησης χώρου τα χρωματογραφήματα των αναλύσεων για το μητρικό ιόν του γλυκουρονιδίου της 19-NA, της 19-NE και το ιόν του εσωτερικού προτύπου παρατίθενται στο (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2).

Σε πρώτο στάδιο, υπολογίστηκε ο λόγος (relative area) της περιοχής κάτω από την καμπύλη ολοκλήρωσης των γλυκουρονιδίων της 19-NA και αντίστοιχα της 19-NE προς την αντίστοιχη περιοχή στο παράθυρο του εσωτερικού προτύπου. Τα δεδομένα από τον υπολογισμό των παραπάνω λόγων και οι θεωρητικές τιμές συγκέντρωσης των δειγμάτων αναλύονται με ανάλυση διακύμανσης (analysis of variation, ANOVA) για παλινδρόμηση (regression analysis). Με την ανάλυση παλινδρόμησης εξετάζεται η σχέση μεταξύ δύο ή περισσότερων μεταβλητών με σκοπό την πρόβλεψη των τιμών της μιας, μέσω των τιμών της άλλης (ή των άλλων). Σε κάθε πρόβλημα παλινδρόμησης διακρίνονται δύο είδη μεταβλητών, οι ανεξάρτητες και οι εξαρτημένες. Σε πειραματικές έρευνες ανεξάρτητη μεταβλητή X είναι εκείνη η οποία μπορεί να ελεγχθεί, δηλαδή να καθοριστούν οι τιμές της (στην παρούσα περίπτωση η θεωρητική συγκέντρωση). Εξαρτημένη μεταβλητή Y είναι εκείνη στην οποία αντανakλάται το αποτέλεσμα των μεταβολών στις ανεξάρτητες μεταβλητές (στην παρούσα περίπτωση ο λόγος περιοχής ολοκλήρωσης ουσίας προς αντίστοιχη

εσωτερικού προτύπου). Το αποτέλεσμα αυτής της αυτοματοποιημένης στατιστικής ανάλυσης δίνει μεταξύ άλλων την γραφική παράσταση της καμπύλης βαθμονόμησης και την εξίσωση της ευθείας παλινδρόμησης. Ο άξονας Y της γραφικής παράστασης συμβολίζει το relativearea, ενώ ο άξονας X την θεωρητική τιμή του γλυκουρονιδίου της 19-NA και 19-NE σε ng/mL. Η εξίσωση της ευθείας παλινδρόμησης είναι της μορφής $Y = a + bX$, όπου a η τομή επί τον άξονα και b η κλίση της ευθείας. Η ανάλυση διακύμανσης για παλινδρόμηση υπολογίζει και τον συντελεστή συσχέτισης R, καθώς και τον συντελεστή ροσδιορισμού (R^2) που ερμηνεύει το πόσο συσχετίζεται η μεταβολή της μιας μεταβλητής σε σχέση με την μεταβολή της άλλης. Ακόμα, υπολογίζεται το τυπικό σφάλμα (S_x/y), οι παράγοντες a και b της εξίσωσης της ευθείας παλινδρόμησης και η τυπική απόκλιση αυτών.

Έτσι, πλέον είναι εύκολος ο υπολογισμός της πειραματικής συγκέντρωσης κάθε δείγματος (X) με απλή αντικατάσταση του relativearea στην θέση του Y της εξίσωσης. Έπειτα, υπολογίζονται η μέση τιμή (mean) και η επί τοις εκατό σχετική τυπική απόκλιση ($\%CV = 100 \times SD / \text{mean}$) για όλες τις παραμέτρους. Τέλος, υπολογίζεται το επί τοις εκατό αναλυτικό σφάλμα [$100 \times (\text{πειραματική} - \text{θεωρητική}) / \text{θεωρητική}$] για κάθε ένεση δείγματος, αλλά και για το σύνολο των δειγμάτων ενός σημείου της καμπύλης. Για λόγους εξοικονόμησης χώρου οι πίνακες της ανάλυσης των δεδομένων των 5 καμπυλών αναφοράς παρατίθενται στο (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2).

5.4 Σχετικός χρόνος ανάσχεσης (Relative Retention Time, RRT)

Ο σχετικός χρόνος ανάσχεσης είναι το πηλίκο του χρόνου ανάσχεσης της ουσίας προς προσδιορισμό (19-NA και 19-NE), προς τον χρόνο ανάσχεσης του εσωτερικού προτύπου (d-19-NA).

ΠΙΝΑΚΑΣ 5.1: Σχετικοί χρόνοι ανάσχεσης γλυκουρονιδίου της 19-NA και του δευτεριωμένου εσωτερικού προτύπου.

α/α Εργαστ. Ημέρας	1		2		3		4		5		ΜΕΣΗ	SD	%RSD
Ημερ/νία	26/9/2016		7/10/2016		13/10/2016		31/10/2016		3/11/2016		TIMH		
ΑΡΧΕΙΟ	CTRL1_1.1	CTRL2_2.1	CTRL1_1.1	CTRL2_2.1	CTRL1_1.1	CTRL2_2.1	CTRL1_1.1	CTRL2_2.1	CTRL1_1.1	CTRL2_2.1			
RT 19NA (min)	7,370	7,390	7,380	7,390	7,390	7,380	7,370	7,370	7,360	7,350	7,375	0,014	0,18
RT d19NA (min)	7,360	7,370	7,370	7,370	7,380	7,370	7,340	7,340	7,340	7,340	7,358	0,016	0,22
RRT	1,001	1,003	1,001	1,003	1,001	1,001	1,004	1,004	1,003	1,001	1,002	0,001	0,11

ΠΙΝΑΚΑΣ 5.2: Σχετικοί χρόνοι ανάσχεσης γλυκουρονιδίου της 19-NE και του δευτεριωμένου εσωτερικού προτύπου.

α/α Εργαστ. Ημέρας	1		2		3		4		5		ΜΕΣΗ	SD	%RSD
Ημερ/νία	26/9/2016		7/10/2016		13/10/2016		31/10/2016		3/11/2016		TIMH		
ΑΡΧΕΙΟ	CTRL1_1.1	CTRL2_2.1	CTRL1_1.1	CTRL2_2.1	CTRL1_1.1	CTRL2_2.1	CTRL1_1.1	CTRL2_2.1	CTRL1_1.1	CTRL2_2.1			
RT 19NE (min)	7,690	7,700	7,690	7,700	7,710	7,700	7,670	7,680	7,670	7,670	7,688	0,015	0,19
RT d19NA (min)	7,360	7,370	7,370	7,370	7,380	7,370	7,340	7,340	7,340	7,340	7,358	0,016	0,22
RRT	1,045	1,045	1,043	1,045	1,045	1,045	1,045	1,046	1,045	1,045	1,045	0,001	0,066

5.5 Γραμμικότητα

Για την επικύρωση της μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού του γλυκουρονιδίου της 19-NA και της 19-NE κατασκευάστηκαν 5 καμπύλες βαθμονόμησης των 7 σημείων με εύρος συγκεντρώσεων 1,88-10,58ng/mL και 0,62-3,51ng/mL αντίστοιχα. Για τον έλεγχο της γραμμικότητας (linearity) υπολογίστηκαν για κάθε καμπύλη βαθμονόμησης, μέσω της ανάλυσης διακύμανσης για παλινδρόμηση, ο συντελεστής συσχέτισης R και ο συντελεστής προσδιορισμού R², που αποτελεί τον παράγοντα έκφρασης της γραμμικότητας. Επίσης, υπολογίστηκε η μέση τιμή (mean), η τυπική απόκλιση (SD) και η επί τοις εκατό σχετική τυπική απόκλιση (%CV=100xSD/mean), τόσο για τον R, όσο και

για το R^2 , όπως φαίνεται στον (Πίνακα 6.3 και 6.4). Οι γραφικές παραστάσεις των καμπυλών αναφοράς παρατίθενται στο (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2).

ΠΙΝΑΚΑΣ 5.3: Έλεγχος γραμμικότητας μεθόδου γλυκουρονιδίου 19-NA

α/α Εργαστ.	1	2	3	4	5	ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ	SD	%RSD
Ημερ/νία	26/9/2016	7/10/2016	13/10/2016	31/10/2016	3/11/2016			
R	1,000	1,000	1,000	1,000	0,996	0,999	0,002	0,16
R^2	1,000	1,000	1,000	0,999	0,992	0,998	0,003	0,33

ΠΙΝΑΚΑΣ 5.4: Έλεγχος γραμμικότητας μεθόδου γλυκουρονιδίου 19-NE

α/α Εργαστ.	1	2	3	4	5	ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ	SD	%RSD
Ημερ/νία	26/9/2016	7/10/2016	13/10/2016	31/10/2016	3/11/2016			
R	1,000	0,999	0,999	1,000	0,997	0,999	0,001	0,095
R^2	0,999	0,999	0,998	1,000	0,995	0,998	0,002	0,19

5.5.1 Στατιστικός Έλεγχος

Πραγματοποιήθηκε στατιστικός έλεγχος (t-test) στην τομή των καμπυλών βαθμονόμησης για το αν ο σταθερός όρος διαφέρει σημαντικά από το μηδέν (διέλευση από την αρχή των αξόνων). Για το σκοπό αυτό, όπως φαίνεται και στον (Πίνακα 5.5 και 5.6), υπολογίστηκε η πειραματική τιμή ($t_{exp} = |a|/SDa$, όπου a η τιμή της τομής και SDa η τυπική απόκλιση αυτής) για καθεμία από τις 5 καμπύλες αναφοράς και ο μέσος όρος αυτών ($mean$) βρέθηκε $|T|=1,5$ για το γλυκουρονίδιο της 19-NA και $|T|=0,26$ για το γλυκουρονίδιο της 19-NE, και συγκρίθηκε με την θεωρητική τιμή $t=2,78$ που αντιστοιχεί σε στάθμη εμπιστοσύνης 95%. Αφού $t_{exp} < t_{theor}$, συμπεραίνουμε ότι ισχύει η αρχική υπόθεση, δηλαδή ότι ο σταθερός όρος δεν διαφέρει σημαντικά από το μηδέν και άρα η καμπύλη αναφοράς διέρχεται από την αρχή των αξόνων.

Πίνακας 5.5: Στατιστικός έλεγχος (t-test)για τη γραμμικότητα της μεθόδουγια το γλυκουρονίδιο του 19-NA.

α/α Εργαστηριακής ημέρας	Τομή a	SDa	Ia/SDaI (t _{exp})
1	0,0185	0,0182	1,0
2	0,0286	0,0102	2,8
3	0,0322	0,0131	2,5
4	0,0076	0,0319	0,24
5	0,0750	0,0757	0,99
Μέση Τιμή	0,0324	0,0298	1,5

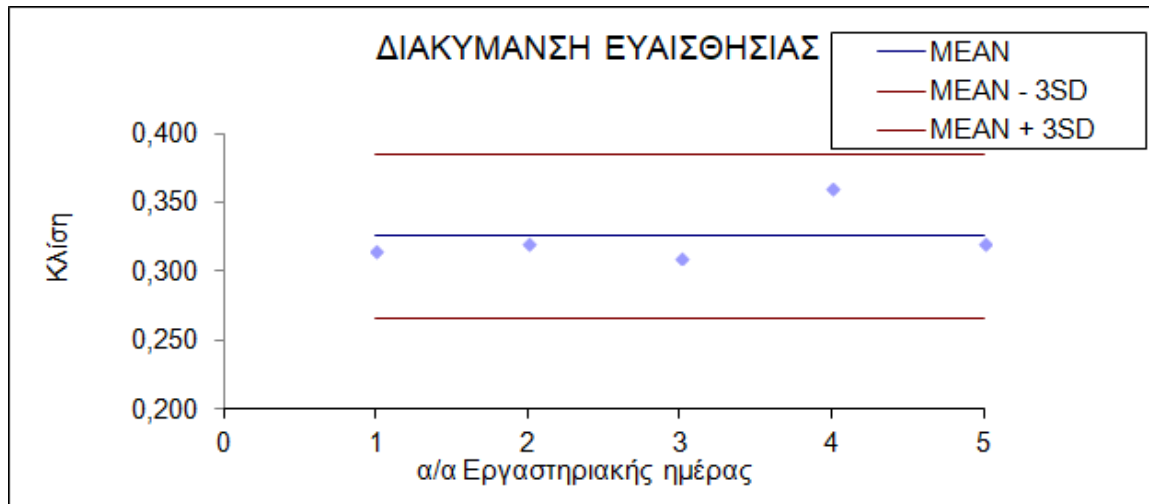
Πίνακας 5.6: Στατιστικός έλεγχος (t-test)για τη γραμμικότητα της μεθόδουγια το γλυκουρονίδιο του 19-NE.

α/α Εργαστηριακής ημέρας	Τομή a	SDa	Ia/SDaI (t _{exp})
1	0,0133	0,0065	2,0
2	-0,0400	0,0158	2,5
3	-0,0130	0,0106	1,2
4	0,0113	0,0046	2,5
5	0,0085	0,0160	0,53
Μέση Τιμή	-0,0040	0,0107	0,26

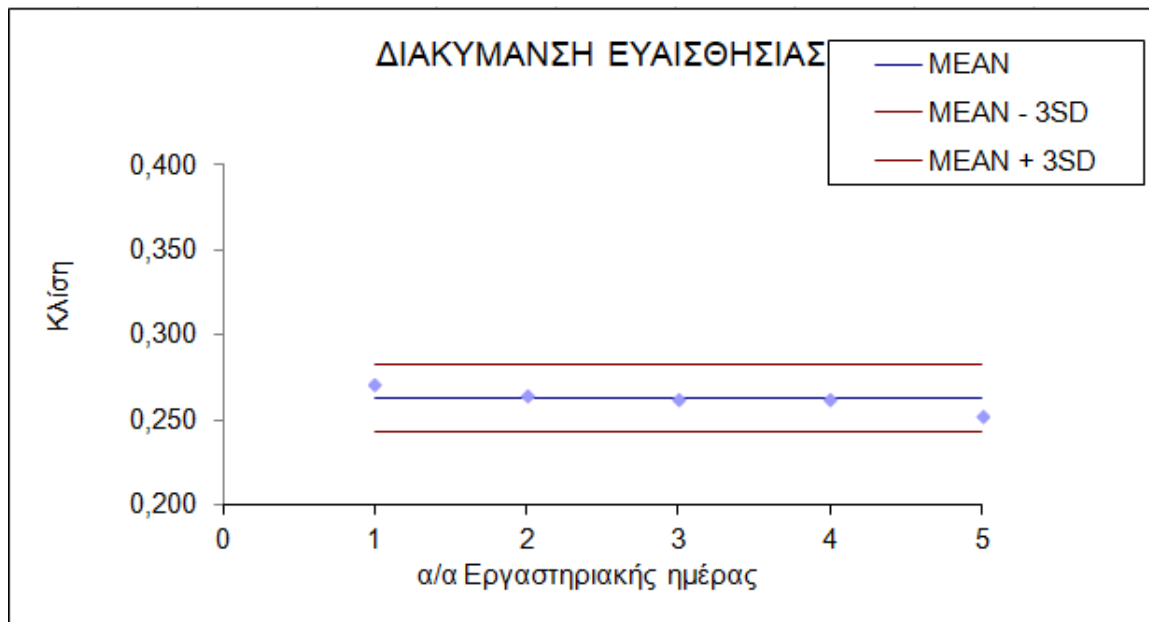
5.6 Ευαισθησία

Ο παράγοντας ευαισθησία (sensitivity) στην διαδικασία επικύρωσης με καμπύλη βαθμονόμησης αντιπροσωπεύει την αλλαγή στην απόδοση του σήματος (απόκριση οργάνου), που αντιστοιχεί σε αλλαγή της συγκέντρωσης της μετρούμενης ουσίας στα δείγματα. Ουσιαστικά, η ευαισθησία της μεθόδου ταυτίζεται με την κλίση της καμπύλης αναφοράς. Επίσης, σημαντική είναι και η διακύμανση της ευαισθησίας μεταξύ των διαφορετικών εργαστηριακών ημερών. Στα Σχήματα 5.1 και 5.2 απεικονίζεται η διακύμανση της ευαισθησίας και συγκεκριμένα οι τιμές της κλίσης για κάθε εργαστηριακή μέρα, η μέση τιμή αυτών

(mean) και τα όρια που αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή σε απόσταση τριών τυπικών αποκλίσεων ($\text{mean} \pm 3\text{SD}$).



Σχήμα 5.1:Διάγραμμα διακύμανσης ευαισθησίας μεθόδου για το γλυκουρονίδιο της 19-NA.



Σχήμα 5.2:Διάγραμμα διακύμανσης ευαισθησίας μεθόδου για το γλυκουρονίδιο της 19-NE.

Παράλληλα, στους Πίνακες 5.7 και 5.8 αναγράφονται οι τιμές της κλίσης της καμπύλης αναφοράς (δηλαδή της ευαισθησίας) για κάθε εργαστηριακή ημέρα και το αντίστοιχο τυπικό σφάλμα (SD) της κλίσης, όπως υπολογίστηκαν μέσω της

ανάλυσης διακύμανσης για παλινδρόμηση. Επιπλέον, έχει βρεθεί η μέση τιμή (mean), η τυπική απόκλιση (SD) και η επί τοις εκατό σχετική τυπική απόκλιση ($\%CV=100 \cdot SD/mean$) για τις τιμές της κλίσης μεταξύ των 5 καμπυλών αναφοράς.

Πίνακας 5.7 :Ευαισθησία και διακύμανση ευαισθησίας μεθόδου για το γλυκουρονίδιο της 19-NA.

α/α Εργαστηριακής ημέρας	1	2	3	4	5	ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ	SD	% RSD
ΚΛΙΣΗ	0,316	0,321	0,310	0,360	0,320	0,325	0,020	6,1
SD κλίσης	0,003	0,002	0,002	0,005	0,013			

Πίνακας 5.8 :Ευαισθησία και διακύμανση ευαισθησίας μεθόδου για το γλυκουρονίδιο της 19-NE.

α/α Εργαστηριακής ημέρας	1	2	3	4	5	ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ	SD	% RSD
ΚΛΙΣΗ	0,271	0,265	0,263	0,263	0,252	0,263	0,007	2,5
SD κλίσης	0,003	0,006	0,005	0,002	0,008			

5.7 Ορθότητα

Ο έλεγχος ορθότητας (accuracy) της μεθόδου αντικατοπτρίζει την εγγύτητα της πειραματικής τιμής προς τη θεωρητική τιμή. Πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τις υπολογισθείσες (πειραματικές) συγκεντρώσεις των δειγμάτων ελέγχου (control), όπως αυτές προέκυψαν από τις καμπύλες αναφοράς. Η ορθότητα μελετήθηκε σε δύο επίπεδα συγκέντρωσης (θεωρητικής) των δειγμάτων ελέγχου, 3,34 και 7,94ng/mL για το 19-NA, και 1,11 και 2,63ng/mL για το 19-NE. Ως μέτρο της ορθότητας χρησιμοποιήθηκε το επί τοις εκατό σχετικό σφάλμα ($\% \text{ RelativeError}$, $\%Er=100 \cdot (\text{πειραματική}-\text{θεωρητική})/\text{θεωρητική}$).

Στους πίνακες 5.8 και 5.9 καταγράφονται οι θεωρητικές και πειραματικές τιμές συγκέντρωσης γλυκουρονιδίου της 19-NA και 19-NE αντίστοιχα στα δείγματα ελέγχου και το %Er για κάθε δείγμα σε κάθε εργαστηριακή μέρα και στα δύο επίπεδα συγκέντρωσης που ελέγχθηκαν. Ακόμη, υπολογίστηκε η μέση τιμή (mean) των πειραματικών συγκεντρώσεων και των %Er ανά εργαστηριακή μέρα και ανά επίπεδο συγκέντρωσης. Ενώ, τέλος έχει υπολογιστεί η συνολική μέση τιμή (overallmean) των πειραματικών συγκεντρώσεων ανά επίπεδο συγκέντρωσης, καθώς και η επί τοις εκατό συνολική ορθότητα (overallaccuracy) ανά επίπεδο συγκέντρωσης [%συνολική ορθότητα=(συνολική μέση τιμή-θεωρητική)/θεωρητική].

Πίνακας 5.8: Έλεγχος ορθότητας μεθόδου για το γλυκουρονίδιο της 19-NA.

C_{theoretical} 3,34 ng/mL										
	Εργ. Ημέρα 1		Εργ. Ημέρα 2		Εργ. Ημέρα 3		Εργ. Ημέρα 4		Εργ. Ημέρα 5	
ΔΕΙΓΜΑ	C_{calc}, ng/mL	%E_R	C_{calc}, ng/mL	%E_R	C_{calc}, ng/mL	%E_R	C_{calc}, ng/mL	%E_R	C_{calc}, ng/mL	%E_R
CTRL1_A1	3,44	3,0	3,59	7,5	3,41	2,1	3,31	-0,9	3,38	1,2
CTRL1_A2	3,36	0,6	3,50	4,8	3,30	-1,2	3,36	0,6	3,14	-6,0
CTRL1_B1	3,50	4,8	3,46	3,6	3,46	3,6	3,20	-4,2	3,35	0,3
CTRL1_B2	3,42	2,4	3,59	7,5	3,52	5,4	3,09	-7,5	3,21	-3,9
ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ	3,43		3,54		3,42		3,24		3,27	
%E_R	2,7		5,8		2,5		-3,0		-2,1	

ΟΛΙΚΗ ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ, ng/mL	3,38	ΟΛΙΚΗ ΟΡΘΟΤΗΤΑ, %	1,2
-------------------------------	-------------	--------------------------	------------

C_{theoretical} 7,94 ng/mL										
	Εργ. Ημέρα 1		Εργ. Ημέρα 2		Εργ. Ημέρα 3		Εργ. Ημέρα 4		Εργ. Ημέρα 5	
ΔΕΙΓΜΑ	C_{calc}, ng/mL	%E_R	C_{calc}, ng/mL	%E_R	C_{calc}, ng/mL	%E_R	C_{calc}, ng/mL	%E_R	C_{calc}, ng/mL	%E_R
CTRL2_A1	7,75	-2,3	7,87	-0,8	8,18	3,1	7,80	-1,7	7,88	-0,7
CTRL2_A2	7,74	-2,5	8,36	5,4	8,12	2,3	8,00	0,8	8,66	9,1
CTRL2_B1	7,87	-0,8	7,99	0,7	8,55	7,8	7,91	-0,3	7,98	0,6
CTRL2_B2	7,95	0,2	8,16	2,8	8,06	1,6	8,01	0,9	8,49	7,0
ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ	7,83		8,10		8,23		7,90		8,25	

%E _R	-1,4	2,0	3,7	-0,4	4,0
-----------------	------	-----	-----	------	-----

ΟΛΙΚΗ ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ, ng/mL	8,06	ΟΛΙΚΗ ΟΡΘΟΤΗΤΑ, %	1,6
---------------------------	------	-------------------	-----

Πίνακας 5.9: Έλεγχος ορθότητας μεθόδου για το γλυκουρονίδιο της 19-NE.

C _{theoretical} 1,11 ng/mL										
	Εργ. Ημέρα 1		Εργ. Ημέρα 2		Εργ. Ημέρα 3		Εργ. Ημέρα 4		Εργ. Ημέρα 5	
ΔΕΙΓΜΑ	C _{calc} , ng/mL	%E _R	C _{calc} , ng/mL	%E _R	C _{calc} , ng/mL	%E _R	C _{calc} , ng/mL	%E _R	C _{calc} , ng/mL	%E _R
CTRL1_A1	1,18	6,4	1,24	11,8	1,05	-5,3	1,10	-0,8	1,04	-6,2
CTRL1_A2	1,12	1,0	1,22	10,0	1,04	-6,2	1,19	7,3	1,05	-5,3
CTRL1_B1	1,17	5,5	1,21	9,1	1,06	-4,4	1,09	-1,7	1,08	-2,6
CTRL1_B2	1,12	1,0	1,31	18,1	1,24	11,8	1,06	-4,4	1,11	0,1
ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ	1,15		1,25		1,10		1,11		1,07	
%E _R	3,5		12,3		-1,0		0,1		-3,5	

ΟΛΙΚΗ ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ, ng/mL	1,13	ΟΛΙΚΗ ΟΡΘΟΤΗΤΑ, %	2,3
------------------------	------	-------------------	-----

C _{theoretical} 2,63 ng/mL										
	Εργ. Ημέρα 1		Εργ. Ημέρα 2		Εργ. Ημέρα 3		Εργ. Ημέρα 4		Εργ. Ημέρα 5	
ΔΕΙΓΜΑ	C _{calc} , ng/mL	%E _R	C _{calc} , ng/mL	%E _R	C _{calc} , ng/mL	%E _R	C _{calc} , ng/mL	%E _R	C _{calc} , ng/mL	%E _R
CTRL2_A1	2,62	-0,4	2,58	-1,9	2,66	1,1	2,53	-3,8	2,36	-10,3
CTRL2_A2	2,52	-4,2	2,68	1,9	2,68	1,9	2,77	5,3	2,80	6,5
CTRL2_B1	2,61	-0,8	2,55	-3,0	2,83	7,6	2,65	0,8	2,35	-10,6
CTRL2_B2	2,71	3,0	2,57	-2,3	2,79	6,1	2,61	-0,8	2,73	3,8
ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ	2,62		2,60		2,74		2,65		2,56	
%E _R	-0,6		-1,3		4,2		0,8		-2,7	

ΟΛΙΚΗ ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ, ng/mL	2,63	ΟΛΙΚΗ ΟΡΘΟΤΗΤΑ, %	0,1
------------------------	------	-------------------	-----

5.8 Επαναληψιμότητα και ενδιάμεση πιστότητα

Η πιστότητα (precision) εκφράζει το βαθμό της συμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων ανεξάρτητων εφαρμογών της μεθόδου υπό ρητά καθορισμένες

συνθήκες. Ως μία παράμετρος ποιότητας της ανάλυσης, η πιστότητα μπορεί να περιγραφεί ως η ποσότητα που μετρά τη διασπορά των αποτελεσμάτων, όταν η αναλυτική μεθοδολογία επαναλαμβάνεται σε ένα δείγμα. Η διασπορά αυτή των αποτελεσμάτων μπορεί να προκληθεί από πολλές πηγές. Είναι κοινή πρακτική στην περιγραφή της πιστότητας να λαμβάνονται υπόψη μόνο οι πηγές που προκαλούν τυχαίες διακυμάνσεις στη μεθοδολογία. Υποσύνολα του όρου πιστότητα είναι οι όροι επαναληψιμότητα (repeatability) και ενδιάμεση πιστότητα (intermediate precision) ή αναπαραγωγιμότητα (reproducibility). Ο όρος επαναληψιμότητα περιγράφει το μέτρο της διασποράς των αποτελεσμάτων διαδοχικών ανεξάρτητων προσδιορισμών στο ίδιο δείγμα, που εκτελούνται κάτω από τις ίδιες συνθήκες, δηλαδή ίδια μέθοδος, ίδια συσκευή, ίδιο εργαστήριο και βραχύ χρονικό διάστημα. Ο όρος ενδιάμεση πιστότητα περιγράφει το μέτρο της διασποράς μεταξύ των αποτελεσμάτων ανεξάρτητων μετρήσεων, που λαμβάνονται με την ίδια μέθοδο στο ίδιο δείγμα κάτω από διαφορετικές συνθήκες, δηλαδή, διαφορετική συσκευή, ίδιο ή διαφορετικά εργαστήρια, και/ή διαφορετικούς χρόνους.

Ο έλεγχος της επαναληψιμότητας και της ενδιάμεσης πιστότητας έγινε με βάση τις πειραματικές τιμές συγκέντρωσης των δειγμάτων ελέγχου (control) σε επίπεδο συγκέντρωσης 3,34 και 7,94ng/mL για το 19-NA, και 1,11 και 2,63ng/mL για το 19-NE, αφού πρώτα υπολογίστηκε η μέση τιμή (mean), η τυπική απόκλιση (SD) και η % σχετική τυπική απόκλιση (%CV=100xSD/mean) ανά εργαστηριακή μέρα, καθώς κι η συνολική μέση τιμή (overall mean) των πειραματικών συγκεντρώσεων. Έπειτα, με την βοήθεια της ανάλυσης διακύμανσης για μονό παράγοντα (single factor analysis of variance, ANOVA) υπολογίστηκε η εντός της ημέρας διασπορά (μέσος όρος αθροίσματος τετραγώνων, MS_{intra}) και η μεταξύ των ημερών διασπορά (μέσος όρος αθροίσματος τετραγώνων, MS_{inter}). Βάσει αυτών βρέθηκε η εντός της ημέρας επαναληψιμότητα ($Sr^2=MS_{intra}$) και η μεταξύ των ημερών επαναληψιμότητα ($Sg^2=[(MS_{inter}-MS_{intra})/n]$, όπου n ο αριθμός των εργαστηριακών ημερών), καθώς και η αντίστοιχη ενδιάμεση πιστότητα ($SR=[(Sr)^2+(Sg)^2]^{1/2}$). Όλοι οι παραπάνω υπολογισμοί καταγράφονται στους πίνακες 5.9 για την 19-NA και 5.10 για την 19-NE.

Πίνακας 5.10 : Έλεγχος επαναληψιμότητας και ενδιάμεσης πιστότητας μεθόδου γλυκουρονιδίου της 19-NA σε επίπεδο συγκέντρωσης 3,34 µg/mL.

C_{theoretical} 3,34 ng/mL					
C_{calculated} (ng/mL)					
ΑΡΧΕΙΟ	Εργ. Ημέρα 1	Εργ. Ημέρα 2	Εργ. Ημέρα 3	Εργ. Ημέρα 4	Εργ. Ημέρα 5
CTRL1_A1	3,44	3,59	3,41	3,31	3,38
CTRL1_A2	3,36	3,50	3,30	3,36	3,14
CTRL1_B1	3,50	3,46	3,46	3,20	3,35
CTRL1_B2	3,42	3,59	3,52	3,09	3,21
ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ	3,43	3,54	3,42	3,24	3,27
SD	0,06	0,07	0,09	0,12	0,11
%RSD	1.7	1.9	2.7	3.7	3.5

ΟΛΙΚΗ ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ	3,38
MS_{intra}	0,009
MS_{inter}	0,060
% S_r	2,8
% S_{between}	3,0
% S_I	4,1

Πίνακας 5.11: Έλεγχος επαναληψιμότητας και ενδιάμεσης πιστότητας μεθόδου γλυκουρονιδίου της 19-NA σε επίπεδο συγκέντρωσης 7,94 µg/ml.

C_{theoretical} 7,94 ng/mL					
C_{calculated} (ng/mL)					
ΑΡΧΕΙΟ	Εργ. Ημέρα 1	Εργ. Ημέρα 2	Εργ. Ημέρα 3	Εργ. Ημέρα 4	Εργ. Ημέρα 5
CTRL2_A1	7,75	7,87	8,18	7,8	7,88
CTRL2_A2	7,74	8,36	8,12	8,0	8,66
CTRL2_B1	7,87	7,99	8,55	7,9	7,98
CTRL2_B2	7,95	8,16	8,06	8,0	8,49
ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ	7,83	8,10	8,23	7,92	8,27
SD	0,10	0,21	0,22	0,09	0,55
%RSD	1,3	2,6	2,7	1,1	6,7

ΟΛΙΚΗ ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ	8,07
MS_{intra}	0,059
MS_{inter}	0,132
% S_r	3,0
% S_{between}	1,5
% S_I	3,4

Πίνακας 5.12: Έλεγχος επαναληψιμότητας και ενδιάμεσης πιστότητας μεθόδου γλυκουρονιδίου της 19-NE σε επίπεδο συγκέντρωσης 1,11 µg/ml.

C_{theoretical} 1,11 ng/mL					
C_{calculated} (ng/mL)					
ΑΡΧΕΙΟ	Εργ. Ημέρα 1	Εργ. Ημέρα 2	Εργ. Ημέρα 3	Εργ. Ημέρα 4	Εργ. Ημέρα 5
CTRL1_A1	1,18	1,24	1,05	1,10	1,04
CTRL1_A2	1,12	1,22	1,04	1,19	1,05
CTRL1_B1	1,17	1,21	1,06	1,09	1,08
CTRL1_B2	1,12	1,31	1,24	1,06	1,11
ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ	1,15	1,25	1,10	1,11	1,07
SD	0,03	0,05	0,10	0,06	0,03
%RSD	2,8	3,6	8,7	5,0	3,0

ΟΛΙΚΗ ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ	1,13
MS_{intra}	0,003
MS_{inter}	0,019
% S_r	5,0
% S_{between}	4,9
% S_I	7,0

Πίνακας 5.13: Έλεγχος επαναληψιμότητας και ενδιάμεσης πιστότητας μεθόδου γλυκουρονιδίου της 19-NE σε επίπεδο συγκέντρωσης 2.63 µg/ml.

C_{theoretical} 2,63 ng/mL					
C_{calculated} (ng/mL)					
ΑΡΧΕΙΟ	Εργ. Ημέρα 1	Εργ. Ημέρα 2	Εργ. Ημέρα 3	Εργ. Ημέρα 4	Εργ. Ημέρα 5
CTRL2_A1	2,62	2,58	2,66	2,53	2,36
CTRL2_A2	2,52	2,68	2,68	2,77	2,80
CTRL2_B1	2,61	2,55	2,83	2,65	2,35
CTRL2_B2	2,71	2,57	2,79	2,61	2,73
ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ	2,62	2,60	2,74	2,64	2,58
SD	0,08	0,06	0,08	0,10	0,31
%RSD	3,0	2,2	3,0	3,8	12,1

ΟΛΙΚΗ ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ	2,63
MS_{intra}	0,019
MS_{inter}	0,019
% S_r	5,2
% S_{between}	0,4

% S _i	5,3
------------------	-----

Υπολογίστηκε η τιμή της σχετικής ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας $RSD_R = \%SR/mean$, στο κάθε επίπεδο συγκέντρωσης για τους δύο μεταβολίτες, και βρέθηκε ίση με $RSD_R = 1,98\%$ και $4,45\%$ για το 19-NE, και τα επίπεδα συγκέντρωσης 2,63 και 1,11 ng/mL αντίστοιχα, και $RSD_R = 0,81\%$ και $0,37\%$ για το 19-NA, και τα επίπεδα συγκέντρωσης 3,34 και 7,94 ng/mL αντίστοιχα. Άρα, είναι εντός των προδιαγραφών του εργαστηρίου ελέγχου ντόπινγκ, οι οποίες επιτρέπουν τιμές μέχρι και το 15%.

5.9 Όριο ανίχνευσης και όριο ποσοτικοποίησης

Το όριο ανίχνευσης (limit of detection, LOD) αποτελεί το χαμηλότερο επίπεδο συγκέντρωσης γλυκουρονιδίου της αιθανόλης, που μπορεί να διακριθεί από τη μηδενική ποσότητα και να ανιχνευτεί αξιόπιστα, ενώ το όριο ποσοτικοποίησης (limit of quantitation, LOQ) είναι η ελάχιστη συγκέντρωση γλυκουρονιδίου της αιθανόλης, που μπορεί εκτιμηθεί ποσοτικά σε ικανοποιητικό βαθμό εμπιστοσύνης. Τα όρια αυτά υπολογίζονται για κάθε εργαστηριακή μέρα βάσει της τομής (a) και της κλίσης (b) της εξίσωση της ευθείας παλινδρόμησης ($Y = a + bX$) κάθε καμπύλης αναφοράς. Πιο συγκεκριμένα, το όριο ανίχνευσης δίνεται από τον τύπο $LOD = 3.3 \times SDA/b$ ενώ το όριο ποσοτικοποίησης δίνεται από τον τύπο $LOQ = 10 \times SDA/b$ (όπου SDA η τυπική απόκλιση της τομής). Οι τελικές τιμές των ορίων βρίσκονται υπολογίζοντας τη μέση τιμή (mean) των ορίων που αντιστοιχούν σε κάθε εργαστηριακή μέρα, όπως φαίνεται από τον πίνακα 6.10 για την 19-NA και 6.11 για την 19-NE.

Πίνακας 5.14: Υπολογισμός ορίου ανίχνευσης και ορίου ποσοτικοποίησης για το γλυκουρονίδιο της 19-NA

	SD τομής	Κλίση	LOQ, ng/mL	LOD, ng/mL
1η εργ. Ημέρα	0,0182	0,3157	0,58	0,19
2η εργ. Ημέρα	0,0102	0,3207	0,32	0,11
3η εργ. Ημέρα	0,0131	0,3102	0,42	0,14
4η εργ. Ημέρα	0,0319	0,3603	0,89	0,29
5η εργ. Ημέρα	0,0757	0,3203	2,4	0,78
Μέση Τιμή	0,0298	0,3255	0,91	0,30

Πίνακας 5.15:Υπολογισμός ορίου ανίχνευσης και ορίου ποσοτικοποίησης για το γλυκουρονίδιο της 19-NE

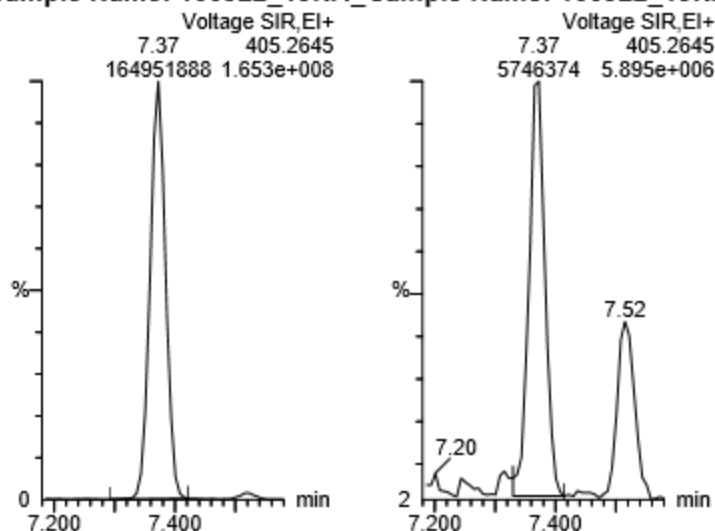
	SD intercept	slope	LOQ, ng/mL	LOD, ng/mL
1η εργ. Ημέρα	0,0065	0,2708	0,24	0,079
2η εργ. Ημέρα	0,0158	0,2727	0,58	0,19
3η εργ. Ημέρα	0,0106	0,2628	0,40	0,13
4η εργ. Ημέρα	0,0046	0,2627	0,17	0,057
5η εργ. Ημέρα	0,0160	0,2522	0,63	0,21
Μέση Τιμή	0,0107	0,2642	0,41	0,13

5.10 Έλεγχος επιμόλυνσης (Carryovercontamination)

Για τον έλεγχο επιμόλυνσης παρασκευάστηκε ένα λευκό δείγμα (blank) με την ίδια ακριβώς παρασκευαστική πορεία, που παρασκευάστηκαν και τα δείγματα των καμπυλών βαθμονόμησης όπως περιγράφηκε παραπάνω, και ένα πρότυπο δείγμα (standard) με την υψηλότερη συγκέντρωση γλυκουρονιδίου της αιθανόλης (10,58ng/ml για την 19-NA και 3,51 ng/ml για την 19-NE) των καμπυλών βαθμονόμησης.

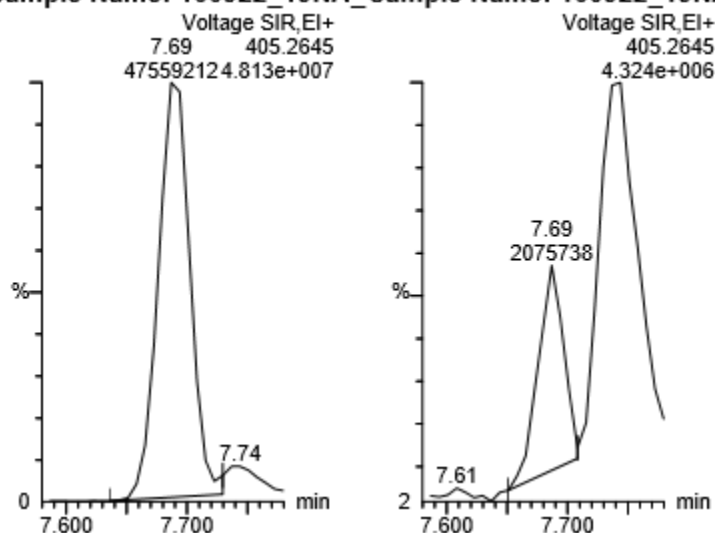
Συγκεκριμένα, αναλύθηκε πρώτα το πρότυπο δείγμα της καμπύλης και ακολούθως το λευκό δείγμα για τον έλεγχο επιμόλυνσης. Στην συνέχεια παρατίθενται τα χρωματογραφήματα της ανάλυσης αυτής για το ιόν του γλυκουρονιδίου της 19-NA και της 19-NE.

Sample Name: 160922_19NA_Sample Name: 160922_19NA_



Σχήμα 5.1: Χρωματογραφήματα για τον έλεγχο επιμόλυνσης για το γλυκουρονίδιο της 19-NA. Αριστερά το χρωματογράφημα του προτύπου με συγκέντρωση 10,58 ng/mL και δεξιά χρωματογράφημα του λευκού δείγματος. Η κορυφή μικρού εύρους που παρατηρείται στον χρόνο έκλουσης του γλυκουρονιδίου της 19-NA οφείλεται στην ενδογενή ύπαρξη του 19-NA όπου δεν ξεπερνάει τα 2ng/mL όπου είναι το όριο που έχει θεσπίσει ο WADA.

Sample Name: 160922_19NA_Sample Name: 160922_19NA_!



Σχήμα 5.2: Χρωματογραφήματα για τον έλεγχο επιμόλυνσης για το γλυκουρονίδιο της 19-NE. Αριστερά το χρωματογράφημα του προτύπου με συγκέντρωση 3,5 ng/ml και δεξιά χρωματογράφημα του λευκού δείγματος.

5.11 Αβεβαιότητα

Ο όρος αβεβαιότητα (uncertainty) περιγράφει μια παράμετρο που σχετίζεται με το αποτέλεσμα μιας μέτρησης και χαρακτηρίζει τη διασπορά των τιμών που μπορούν λογικά να αποδοθούν στη μετρούμενη παράμετρο. Η αβεβαιότητα δεν προσδίδει αμφιβολία για το κύρος της μέτρησης, αντίθετα η γνώση της αβεβαιότητας προσδίδει αυξημένη εμπιστοσύνη για το κύρος του αποτελέσματος της μέτρησης, καθώς περιγράφει το εύρος των τιμών της μετρούμενης παραμέτρου. Όταν η αβεβαιότητα εκφράζεται ως τυπική απόκλιση είναι γνωστή ως τυπική αβεβαιότητα (standarduncertainty). Η τυπική αβεβαιότητα που λαμβάνει υπόψη όλες τις πηγές σφάλματος, βάσει του νόμου διαδόσεως σφάλματος, ονομάζεται συνδυασμένη τυπική αβεβαιότητα (combinedstandarduncertainty).

Η εκτίμηση της συνδυασμένης τυπικής αβεβαιότητας της μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού γλυκουρονιδίου της 19-νορανδροστερόνης και της 19-νορετιοχολανολόνης, έγινε βάσει των πειραματικών συγκεντρώσεων των δειγμάτων ελέγχου (control) σε ένα επίπεδο συγκέντρωσης, το χαμηλό (3,34 και 1,11ng/mL19-NA και 19-NE αντίστοιχα). Σε πρώτη φάση υπολογίστηκε η μέση τιμή (mean), η τυπική απόκλιση (SD) και η επί τοις εκατό σχετική τυπική απόκλιση ($\%CV=100*SD/mean$) για κάθε εργαστηριακή μέρα, καθώς και η συνολική μέση τιμή (overallmean) για το σύνολο των ημερών μαζί με την τυπική απόκλιση και την επί τοις εκατό τυπική απόκλιση αυτής. Έπειτα, με την βοήθεια της ανάλυσης διακύμανσης για μονό παράγοντα (singlefactoranalysisofvariance, ANOVA) υπολογίστηκε η εντός της ημέρας διακύμανση (μέσο όρος τετραγώνων, MSwithingroups) που ισούται με τη διασπορά εντός της ημέρας ($S^2_{w_run}$), και η μεταξύ των ημερών διακύμανση (μέσος όρος τετραγώνων, MSbetweengroups). Έπειτα, βρέθηκε η διασπορά μεταξύ των ημερών [$S^2_{b_run} = (MSbetweengroups - MSwithingroups)/n$], όπου n ο αριθμός των επαναλήψεων του δείγματος σε κάθε ανάλυση δηλαδή 4). Βάσει των δύο αυτών διασπορών υπολογίστηκε το τετράγωνο της ενδιάμεσης ακρίβειας [$U^2_{PREC} = S^2_{b_run} + (S^2_{w_run}/4)$] και η τετραγωνική ρίζα αυτού ισούται με την ενδιάμεση ακρίβεια (U_{PREC}). Η επί τοις εκατό ενδιάμεση ακρίβεια ($\%U_{PREC} = 100 \times U_{PREC} / overallmean$) και το τετράγωνο αυτής ($\%U_{PREC}^2$) αποτελούν τον πρώτο παράγοντα για τον υπολογισμό της συνδυασμένης τυπικής αβεβαιότητας. Ο δεύτερος είναι η % αβεβαιότητα τύπου β του πρότυπου διαλύματος (RMD_QC) που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των δειγμάτων ελέγχου (control) και συγκεκριμένα το τετράγωνο αυτής. Έτσι η συνδυασμένη τυπική αβεβαιότητα δίνεται από τη σχέση

$\%u_c = [\%U_{PREC}^2 + (\text{αβεβαιότητα τύπου } \beta)^2]^{1/2}$. Όλοι οι παραπάνω υπολογισμοί καταγράφονται στους πίνακες 5.15 για το γλυκουρονίδιο της 19-NA και 5.16 για το γλυκουρονίδιο της 19-NE.

Πίνακας 5.15: Συνδυασμένη τυπική αβεβαιότητα για τη μέθοδο ποσοτικοποίησης του 19-NA.

$C_{\text{theoretical}}$ 3,34 ng/mL	Εργ. ημέρα 1	Εργ. ημέρα 2	Εργ. ημέρα 3	Εργ. ημέρα 4	Εργ. ημέρα 5	ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ
	C_{exp} (ng/mL)	C_{exp} (ng/mL)	C_{exp} (ng/mL)	C_{exp} (ng/mL)	C_{exp} (ng/mL)	
CTRL1_A1	3,44	3,59	3,41	3,31	3,38	
CTRL1_A2	3,36	3,50	3,30	3,36	3,14	
CTRL1_B1	3,50	3,46	3,46	3,20	3,35	
CTRL1_B2	3,42	3,59	3,52	3,09	3,21	
ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ	3,43	3,54	3,42	3,24	3,27	3,38
SD	0,06	0,07	0,10	0,12	0,11	0,12
% RSD	1,7	1,9	2,8	3,7	3,5	3,6
$S^2_{w_run}$	0,0026					
$S^2_{b_run}$	0,0078					
U^2_{PREC}	0,0085					
U_{PREC}	0,0921					
$U_{PREC} (\%) =$	2,7					
$U_{PREC} (\%)^2 =$	7,4					
Αβεβαιότητα τύπου β, %	3,0	RMA_QC	Συνδυασμένη Τυπική Αβεβαιότητα (Relative standard uncertainty)			
(Αβεβαιότητα τύπου β%)²	9,0					
			u_c, %		4,1	

Πίνακας 6.16: Συνδυασμένη τυπική αβεβαιότητα για τη μέθοδο ποσοτικοποίησης του 19-NE.

$C_{\text{theoretical}}$ 1,11 ng/mL	Εργ. ημέρα 1	Εργ. ημέρα 2	Εργ. ημέρα 3	Εργ. ημέρα 4	Εργ. ημέρα 5	ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ
	C_{exp} (ng/mL)	C_{exp} (ng/mL)	C_{exp} (ng/mL)	C_{exp} (ng/mL)	C_{exp} (ng/mL)	
CTRL1_A1	1,18	1,24	1,05	1,10	1,04	
CTRL1_A2	1,12	1,22	1,04	1,19	1,05	
CTRL1_B1	1,17	1,21	1,06	1,09	1,08	
CTRL1_B2	1,12	1,31	1,24	1,06	1,11	
ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ	1,15	1,25	1,10	1,11	1,07	1,13
SD	0,03	0,05	0,10	0,06	0,03	0,07
% RSD	2,8	3,6	8,7	5,0	3,0	6,0
$S^2_{w_run}$	0,0033					
$S^2_{b_run}$	0,0038					
U^2_{PREC}	0,0046					
U_{PREC}	0,0680					
$U_{\text{PREC}} (\%) =$	6,0					
$U_{\text{PREC}} (\%)^2 =$	36,0					
Αβεβαιότητα τύπου β, %	2,4	RMA_CQ	Συνδυασμένη Τυπική Αβεβαιότητα (Relative standard uncertainty)			
(Αβεβαιότητα τύπου β%)²	5,7					
			u_c, %		6,5	

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η μέθοδος που επικυρώθηκε χαρακτηρίστηκε ευαίσθητη με εξαιρετική γραμμικότητα και δεν δημιούργησε κανένα πρόβλημα παρεμποδίσεων στον ποσοτικό προσδιορισμό των δύο μεταβολιτών της ναδρολόνης. Η χρήση της μεθόδου κρίνεται απαραίτητη με βάση την οδηγία του WADA έτσι ώστε να μπορεί να επιβεβαιωθεί η ενδογενής ή μη προέλευσης του γλυκουρονιδίου της 19-νορανδροστερόνης.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η επικύρωση μεθόδου με την τεχνική GC/HRMS για την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση δύο μεταβολιτών του συνθετικού αναβολικού ναδρολόνης, των γλυκουρονιδίων της 19-νορανδροστερόνης και της 19-νορετιοχολανολόνης, αλλά και του λόγου αυτών.

Με βάση τις οδηγίες του Παγκόσμιου Οργανισμού Αντιντόπινγκ, κάθε διαπιστευμένο εργαστήριο πρέπει να διαθέτει επικυρωμένη μέθοδο για την ποσοτικοποίηση του λόγου των δύο μεταβολιτών για τις περιπτώσεις όπου δεν μπορεί να διευκρινιστεί αν επρόκειτο για ενδογενή ή εξωγενή προέλευση του γλυκουρονιδίου της 19-νορανδροστερόνης. Αν ο λόγος των δύο μεταβολιτών (19-NA/19-NE), είναι μικρότερος του 3 τότε οφείλεται σε ενδογενή παραγωγή.

Για την επεξεργασία των δειγμάτων, πραγματοποιήθηκε υγρό-υγρό εκχύλιση. Η ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με αεριοχρωματογραφικό σύστημα σε συνδυασμό με το φασματόμετρο μαζών μαγνητικού τομέα διπλής εστίασης, υψηλής διαχωριστικής ικανότητας (GC/HRMS). Για τον ιοντισμό των ουσιών, έγινε χρήση ιοντισμού με πρόσκρουση ηλεκτρονίων (electron impact, (+) EI).

Για την αξιολόγηση και επικύρωση της μεθόδου, ελέγχθηκαν και υπολογίστηκαν ο σχετικός χρόνος ανάσχεσης, η γραμμικότητα, η ειδικότητα της αναλυτικής μεθόδου, η διακύμανση της ευαισθησίας, το όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης για κάθε μία από τις δύο ουσίες, η ενδιαμέση πιστότητα της μεθόδου, η επαναληψιμότητα, ο έλεγχος επιμόλυνσης και η αβεβαιότητα της μεθόδου.

Συμπερασματικά η μέθοδος αξιολογήθηκε ως επαρκής και κατάλληλη για το σκοπό για τον οποίο αναπτύχθηκε.

ABSTRACT

The purpose of this Master Thesis was the validation of a GC/HRMS method for the detection and quantification of two metabolites of synthetic anabolic Nadrolone, glucuronides of 19-norandrosterone and 19-norcholanolone, but also their ratio.

Based on the World Anti-Doping Agency guidelines, each accredited laboratory must have a validated method for quantifying the ratio of the two metabolites in cases where it can not be determined whether it was an endogenous or exogenous origin of 19-norandrosterone glucuronide. If the ratio of the two metabolites (19-NA / 19-NE) is less than 3 then it is due to endogenous production.

For the sample processing liquid-liquid extraction was performed. The analysis of the samples was performed by with a gas chromatographic system combined with the mass spectrometer detector (GC / HRMS). Analytes were ionized with an electron ionization (electron impact, (+) EI).

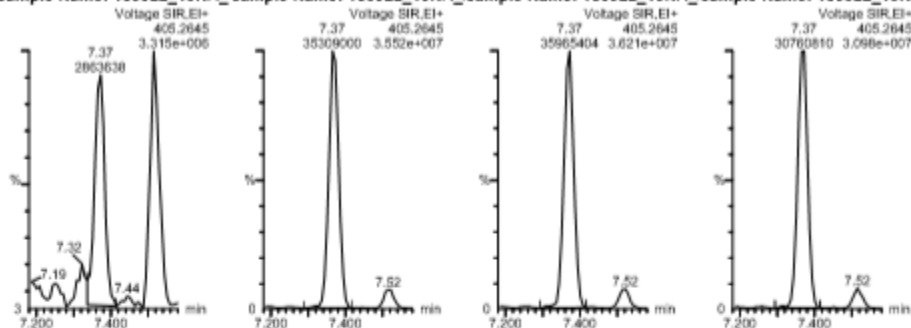
For the evaluation and validation of the method, the relative retention time, linearity, specificity, sensitivity variance, limit of detection and quantification for each of the two substances, the intermediate precision of the method, the repeatability, the carry over, and method uncertainty.

In conclusion, the method was assessed as adequate and appropriate for the purpose for which it was developed.

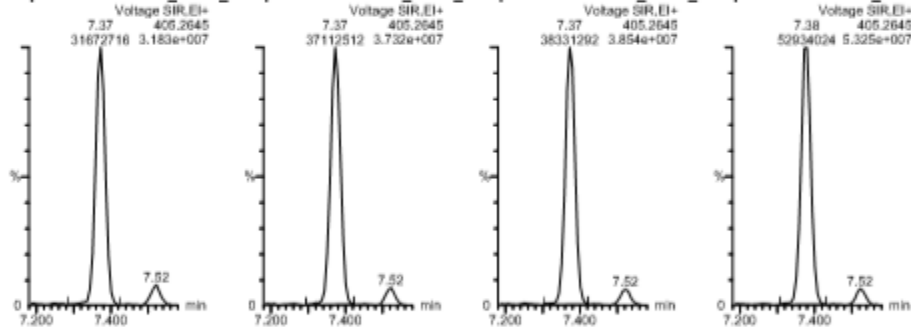
Παράρτημα 1
**Χρωματογραφήματα 1^{ης} καμπύλης αναφοράς για το γλυκουρονίδιο της 19-
 νορανδροστερόνης**
(26-09-2016)

Compound Name: 19na

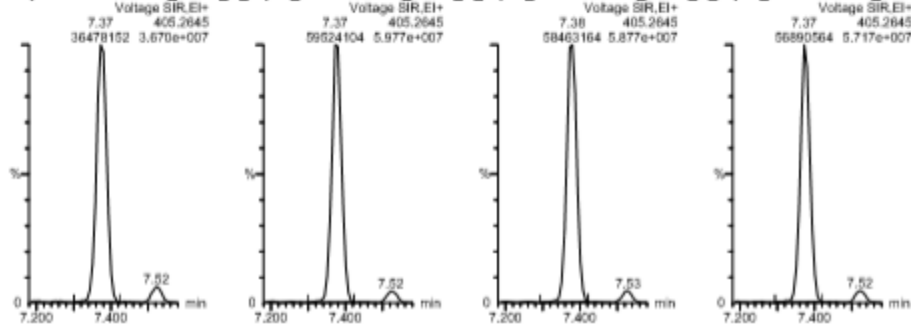
Sample Name: 160922_19NA_Sample Name: 160922_19NA_Sample Name: 160922_19NA_Sample Name: 160922_19NA_E_STD7_



Sample Name: 160922_19NA_Sample Name: 160922_19NA_Sample Name: 160922_19NA_Sample Name: 160922_19NA_E_STD6_

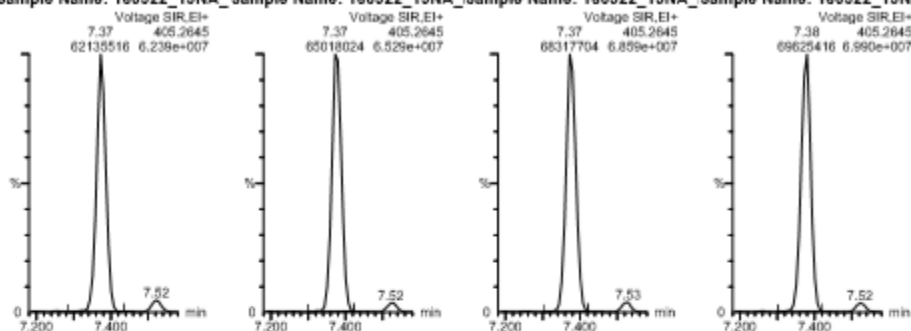


Sample Name: 160922_19NA_Sample Name: 160922_19NA_Sample Name: 160922_19NA_Sample Name: 160922_19NA_E_STD5_

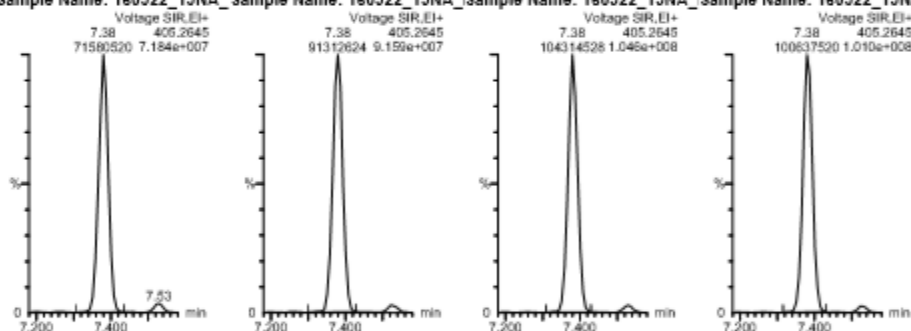


Compound Name: 19na

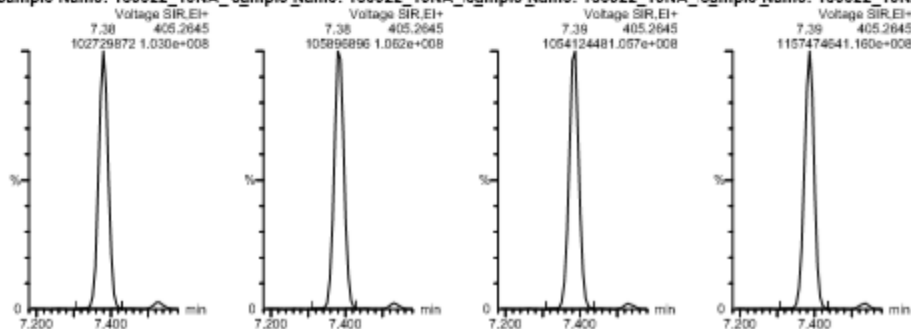
Sample Name: 160922_19NA_Sample Name: 160922_19NA_Sample Name: 160922_19NA_Sample Name: 160922_19NA_E_STD4



Sample Name: 160922_19NA_Sample Name: 160922_19NA_Sample Name: 160922_19NA_Sample Name: 160922_19NA_E_STD3

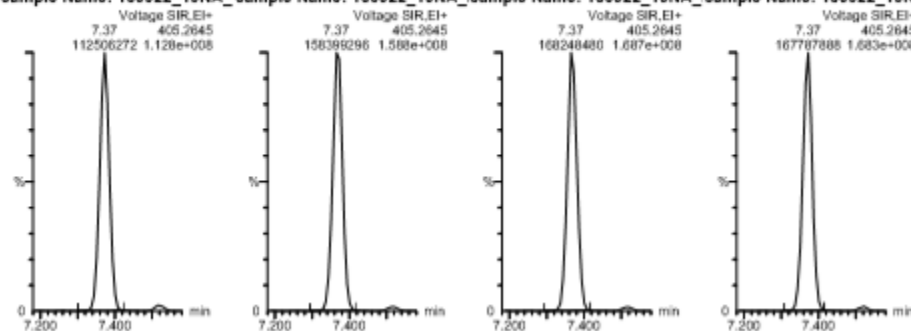


Sample Name: 160922_19NA_Sample Name: 160922_19NA_Sample Name: 160922_19NA_Sample Name: 160922_19NA_E_STD2

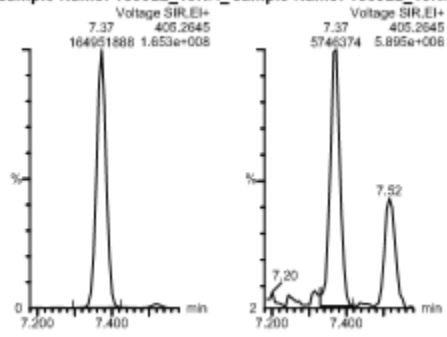


Compound Name: 19na

Sample Name: 160922_19NA_Sample Name: 160922_19NA_Sample Name: 160922_19NA_Sample Name: 160922_19NA_E_STD1

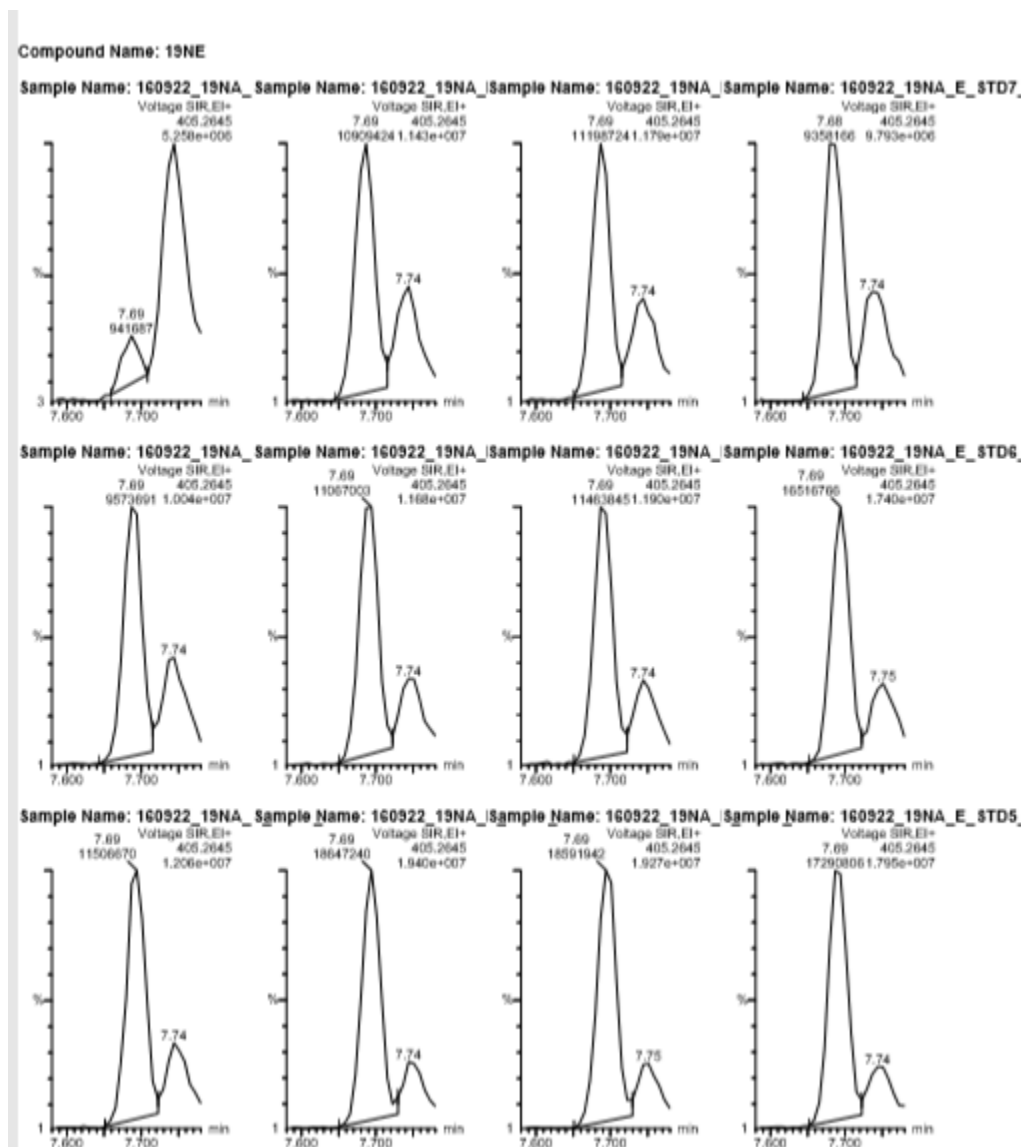


Sample Name: 160922_19NA_Sample Name: 160922_19NA_IS



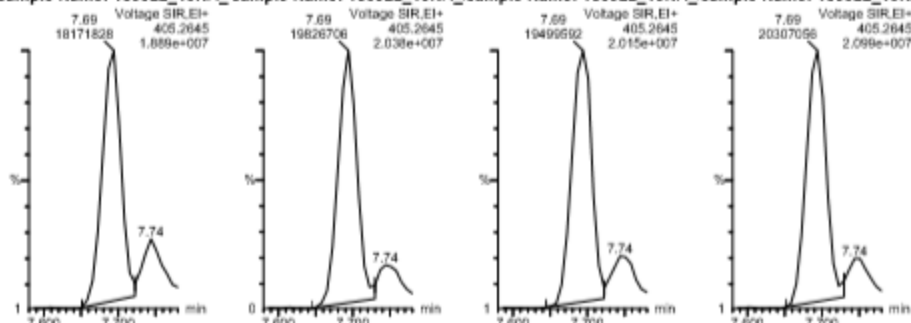
Χρωματογραφήματα 1^{ης} καμπύλης αναφοράς για το γλυκουρονίδιο της 19- νορετιοχολανολόνης

(26-09-2016)

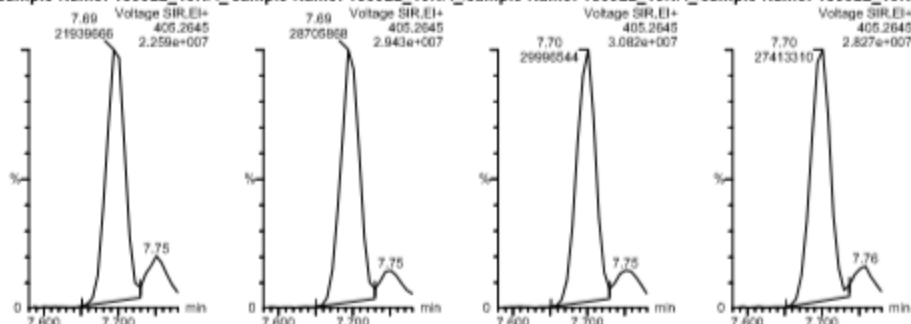


Compound Name: 19NE

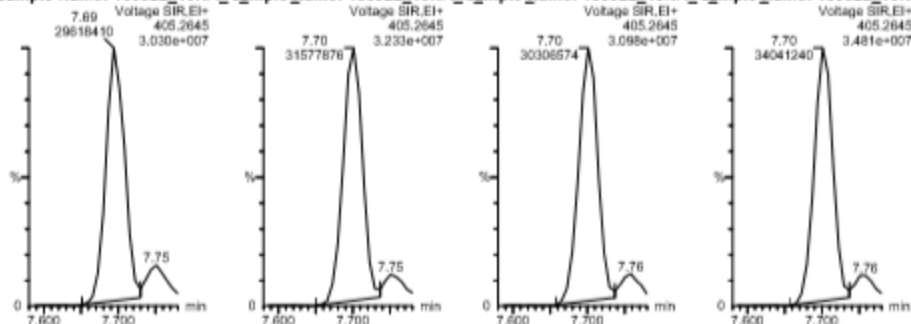
Sample Name: 160922_19NA_Sample Name: 160922_19NA_Sample Name: 160922_19NA_Sample Name: 160922_19NA_E_STD4



Sample Name: 160922_19NA_Sample Name: 160922_19NA_Sample Name: 160922_19NA_Sample Name: 160922_19NA_E_STD3

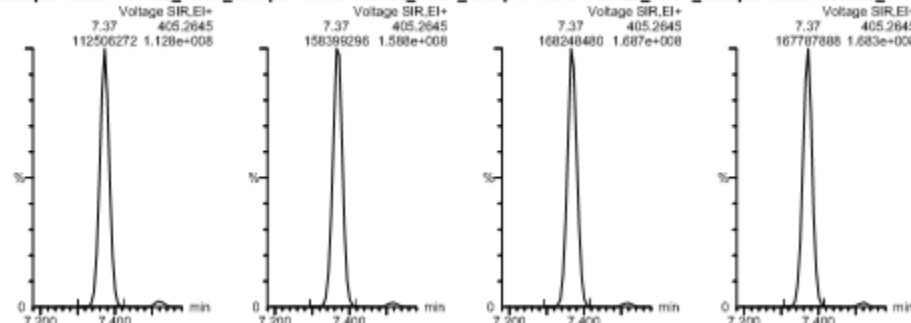


Sample Name: 160922_19NA_Sample Name: 160922_19NA_Sample Name: 160922_19NA_Sample Name: 160922_19NA_E_STD2

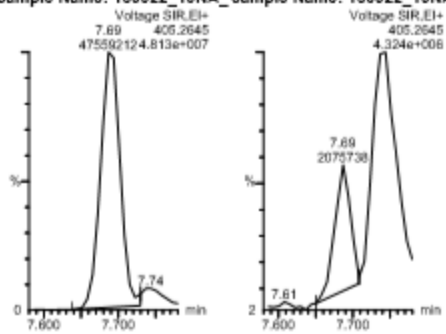


Compound Name: 19na

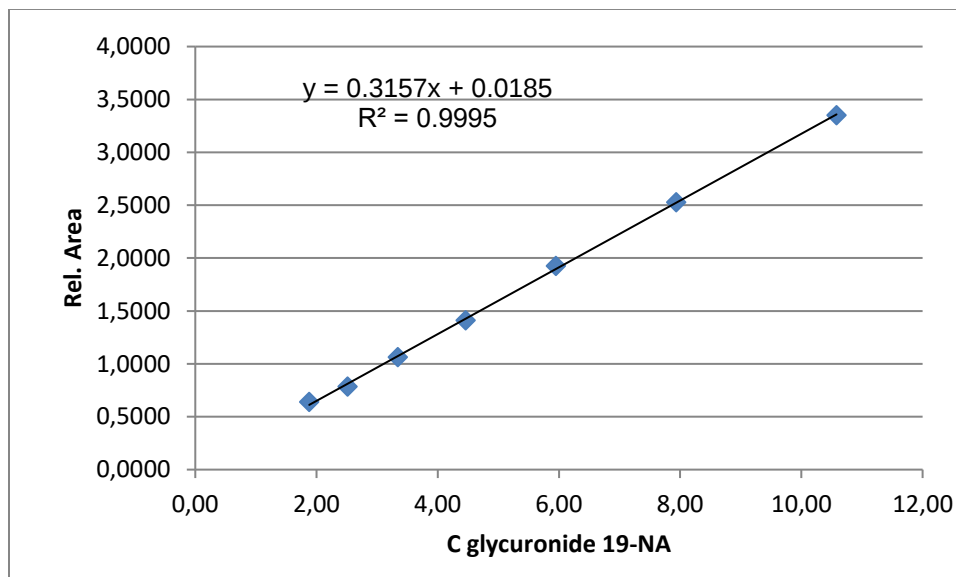
Sample Name: 160922_19NA_Sample Name: 160922_19NA_Sample Name: 160922_19NA_Sample Name: 160922_19NA_E_STD1



Sample Name: 160922_19NA_Sample Name: 160922_19NA_ISs



Παράρτημα 2
1^η καμπύλη αναφοράς για το γλυκουρονίδιο της 19-νορανδροστερόνης
(26-09-2016)

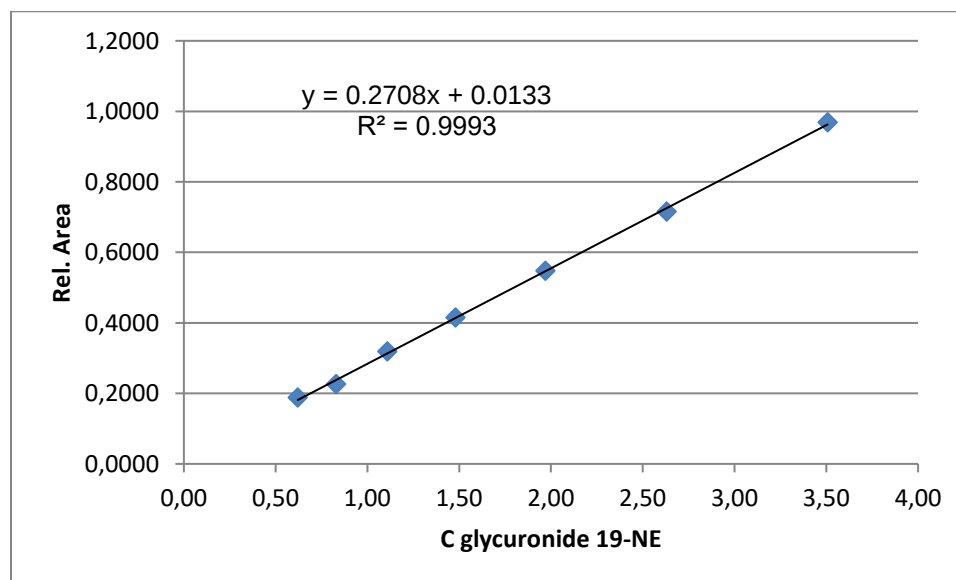


	AREA m/z 405	AREA m/z 409	REL. AREA	CONC. THEOR. ng/mL	CONC. . EXP. ng/mL	% ANAL. ERROR
BLANK	90.647.383	1.767.382.625	0,0513		0,11	
STD7_1.1	1.095.230.750	1.742.351.625	0,6286	1,88	1,94	
STD7_1.2	1.111.121.875	1.720.246.000	0,6459		1,99	
STD7_2.1	964.817.375	1.515.865.125	0,6365		1,96	
STD7_2.2	970.554.063	1.504.688.625	0,6450		1,99	
			0,6390	MEAN	1,97	4,86
			0,008	SD	0,026	
			1,273	RSD	1,31	
STD6_1.1	1.167.530.375	1.428.439.125	0,8173	2,51	2,54	
STD6_1.2	1.182.036.625	1.437.278.250	0,8224		2,55	
STD6_2.1	1.656.648.125	2.212.518.250	0,7488		2,32	

STD6_2.2	1.182.504.25 0	1.568.699.25 0	0,7538		2,34	
			0,7856	MEAN	2,44	-2,92
			0,040	SD	0,126	
			5,055	RSD	5,173	
STD5_1.1	1.842.339.37 5	1.728.673.12 5	1,0658	3,34	3,33	
STD5_1.2	1.859.168.00 0	1.732.012.00 0	1,0734		3,35	
STD5_2.1	1.704.892.75 0	1.639.670.12 5	1,0398		3,24	
STD5_2.2	1.800.184.62 5	1.683.107.87 5	1,0696		3,34	
			1,0621	MEAN	3,31	-0,76
			0,015	SD	0,048	
			1,433	RSD	1,46	
STD4_1.1	1.981.312.37 5	1.431.463.50 0	1,3841	4,46	4,34	
STD4_1.2	2.099.207.25 0	1.526.083.12 5	1,3756		4,31	
STD4_2.1	2.103.096.25 0	1.447.506.87 5	1,4529		4,56	
STD4_2.2	2.152.282.75 0	1.508.984.62 5	1,4263		4,47	
			1,4097	MEAN	4,42	-0,94
			0,036	SD	0,12	
			2,578	RSD	2,61	
STD3_1.1	2.863.335.50 0	1.520.794.00 0	1,8828	5,95	5,92	
STD3_1.2	3.104.871.50 0	1.653.474.75 0	1,8778		5,90	
STD3_2.1	3.022.901.00 0	1.535.711.87 5	1,9684		6,19	
STD3_2.2	3.062.915.75 0	1.548.009.50 0	1,9786		6,22	
			1,9269	MEAN	6,06	1,85
			0,054	SD	0,17	
			2,804	RSD	2,83	
STD2_1.1	3.276.053.75 0	1.306.829.25 0	2,5069	7,94	7,90	

STD2_1.2	3.234.363.00 0	1.255.884.62 5	2,5754		8,12	
STD2_2.1	3.517.555.50 0	1.407.293.50 0	2,4995		7,88	
STD2_2.2	3.336.408.00 0	1.392.545.25 0	2,3959		7,55	
			2,53	MEAN	7,97	0,39
			0,042	SD	0,13	
			1,655	RSD	1,67	
STD1_1.1	4.859.527.50 0	1.464.262.75 0	3,3188	10,58	10,48	
STD1_1.2	5.059.735.50 0	1.575.863.25 0	3,2108		10,14	
STD1_2.1	4.914.363.00 0	1.434.040.62 5	3,4269		10,82	
STD1_2.2	4.882.705.50 0	1.417.223.37 5	3,4453		10,88	
			3,3504	MEAN	10,58	-0,01
			0,109	SD	0,35	
			3,240	RSD	3,26	

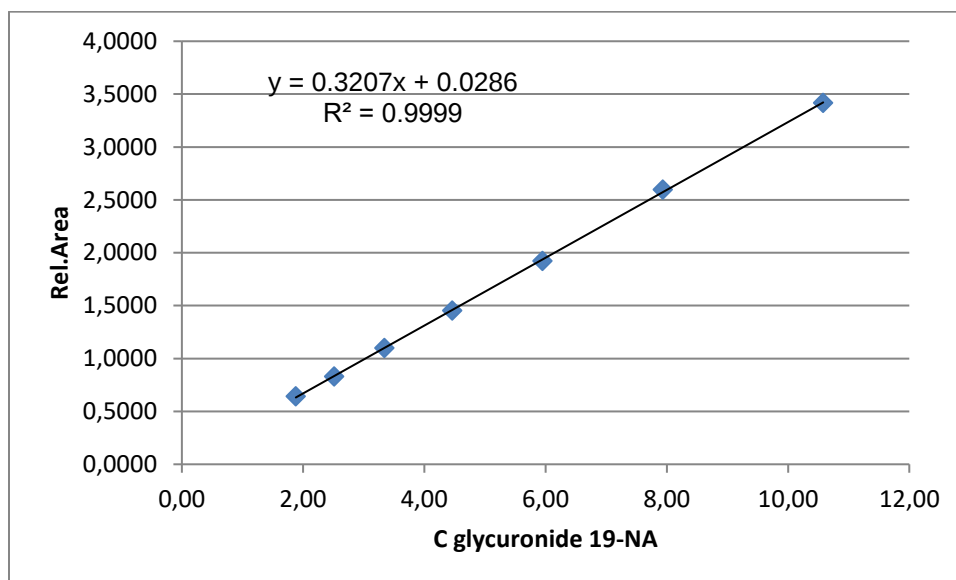
**1^η καμπύλη αναφοράς για το γλυκουρονίδιο της 19-νορετιοχολανολόνης
(26-09-2016)**



	AREA m/z 405	AREA m/z 409	REL. AREA	CONC. THEOR. ng/mL	CONC. EXP. ng/mL	% ANAL. ERROR
BLANK	90,647,383	1,767,382,625	0.0513		0.14	
STD7_1.1	333,127,125	1,742,351,625	0.1912	0.62	0.66	
STD7_1.2	320,719,063	1,720,246,000	0.1864		0.64	
STD7_2.1	287,439,938	1,515,865,125	0.1896		0.65	
STD7_2.2	281,117,094	1,504,688,625	0.1868		0.64	
			0.1885	MEAN	0.65	4,85
			0.002	SD	0.008	
			1.208	RSD	1.298	
STD6_1.1	339,880,844	1,428,439,125	0.2379	0.83	0.83	
STD6_1.2	340,285,188	1,437,278,250	0.2368		0.83	
STD6_2.1	471,136,625	2,212,518,250	0.2129		0.74	
STD6_2.2	343,410,344	1,568,699,250	0.2189		0.76	
			0.2266	MEAN	0.79	-4,67
			0.013	SD	0.047	
			5.566	RSD	5.904	
STD5_1.1	544,474,500	1,728,673,125	0.3150	1.11	1.12	
STD5_1.2	567,588,188	1,732,012,000	0.3277		1.17	
STD5_2.1	520,749,125	1,639,670,125	0.3176		1.13	
STD5_2.2	531,447,125	1,683,107,875	0.3158		1.12	
			0.3190	MEAN	1.13	2,20
			0.006	SD	0.022	
			1.851	RSD	1.929	
STD4_1.1	579,516,250	1,431,463,500	0.4048	1.48	1.45	
STD4_1.2	604,516,063	1,526,083,125	0.3961		1.42	
STD4_2.1	625,871,250	1,447,506,875	0.4324		1.55	
STD4_2.2	646,034,438	1,508,984,625	0.4281		1.54	
			0.4154	MEAN	1.49	0,69

			0.018	SD	0.065	
			4.246	RSD	4.384	
STD3_1.1	836,326,188	1,520,794,000	0.5499	1.97	1.99	
STD3_1.2	887,965,250	1,653,474,750	0.5370		1.94	
STD3_2.1	847,950,063	1,535,711,875	0.5522		2.00	
STD3_2.2	855,820,250	1,548,009,500	0.5529		2.00	
			0.5480	MEAN	1.98	0,58
			0.007	SD	0.027	
			1.353	RSD	1.386	
STD2_1.1	950,484,938	1,306,829,250	0.7273	2.63	2.65	
STD2_1.2	900,648,250	1,255,884,625	0.7171		2.61	
STD2_2.1	987,429,500	1,407,293,500	0.7017		2.55	
STD2_2.2	993,279,625	1,392,545,250	0.7133		2.59	
			0.72	MEAN	2.60	-1,09
			0.013	SD	0.048	
			1.807	RSD	1.840	
STD1_1.1	1,404,921,625	1,464,262,750	0.9595	3.51	3.51	
STD1_1.2	1,444,659,000	1,575,863,250	0.9167		3.35	
STD1_2.1	1,395,202,125	1,434,040,625	0.9729		3.56	
STD1_2.2	1,453,469,375	1,417,223,375	1.0256		3.75	
			0.9687	MEAN	3.54	0,93
			0.045	SD	0.166	
			4.631	RSD	4.694	

2^η καμπύλη αναφοράς για το γλυκουρονίδιο της 19-νορανδροστερόνης
(07-10-2016)

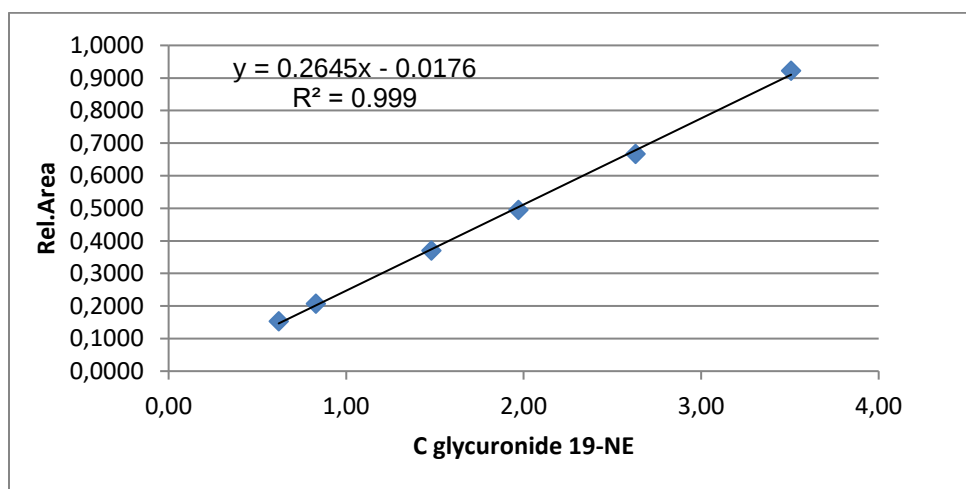


	AREA m/z 405	AREA m/z 409	REL. AREA	CONC. THEOR. ng/mL	CONC. EXP. ng/mL	% ANAL. ERROR
BLANK	29,430,102	498,381,500	0.0591		0.13	
STD7_1.1	303,935,500	502,479,969	0.6049	1.88	1.86	
STD7_1.2	310,425,625	501,905,844	0.6185		1.91	
STD7_2.1	321,509,813	482,103,156	0.6669		2.06	
STD7_2.2	317,948,188	472,455,219	0.6730		2.08	
			0.6408	MEAN	1.98	5,17
			0.034	SD	0.108	
			5.333	RSD	5.487	
STD6_1.1	478,395,156	579,661,313	0.8253	2.51	2.56	
STD6_1.2	477,210,188	568,447,125	0.8395		2.61	
STD6_2.1	516,692,594	621,518,750	0.8313		2.58	
STD6_2.2	499,666,625	604,312,688	0.8268		2.57	
			0.8307	MEAN	2.58	2,79
			0.006	SD	0.020	
			0.767	RSD	0.784	

STD5_1.1	549,651,688	500,963,813	1.0972	3.34	3.43	
STD5_1.2	525,794,688	461,888,344	1.1384		3.56	
STD5_2.1	590,608,875	549,650,125	1.0745		3.35	
STD5_2.2	597,807,625	553,024,313	1.0810		3.37	
			1.0978	MEAN	3.43	2,63
			0.029	SD	0.091	
			2.614	RSD	2.658	
STD4_1.1	684,415,688	475,934,906	1.4380	4.46	4.51	
STD4_1.2	663,034,375	455,756,188	1.4548		4.56	
STD4_2.1	735,744,750	517,929,875	1.4205		4.45	
STD4_2.2	745,805,125	497,114,313	1.5003		4.71	
			1.4534	MEAN	4.56	2,17
			0.034	SD	0.109	
			2.355	RSD	2.384	
STD3_1.1	947,024,500	472,508,938	2.0042	5.95	6.31	
STD3_1.2	885,554,688	450,989,406	1.9636		6.18	
STD3_2.1	994,864,938	519,457,625	1.9152		6.02	
STD3_2.2	999,654,875	553,165,438	1.8072		5.68	
			1.9225	MEAN	6.05	1,62
			0.085	SD	0.270	
			4.427	RSD	4.468	
STD2_1.1	1,271,273,250	498,913,281	2.5481	7.94	8.03	
STD2_1.2	1,244,866,625	478,494,000	2.6016		8.20	
STD2_2.1	1,284,139,500	486,985,750	2.6369		8.31	
STD2_2.2	1,154,115,250	445,443,469	2.5909		8.17	
			2.60	MEAN	8.18	3,12
			0.045	SD	0.142	
			1.723	RSD	1.735	

STD1_1.1	1,544,892,750	453,575,813	3.4060	10.58	10.76	
STD1_1.2	1,599,916,875	455,838,594	3.5098		11.09	
STD1_2.1	1,618,813,125	477,647,219	3.3891		10.70	
STD1_2.2	1,576,287,750	469,607,500	3.3566		10.60	
			3.4154	MEAN	10.79	1,94
			0.066	SD	0.210	
			1.939	RSD	1.949	

**2^η καμπύλη αναφοράς για το γλυκουρονίδιο της 19-νορετιοχολανολόνης
(07-10-2016)**

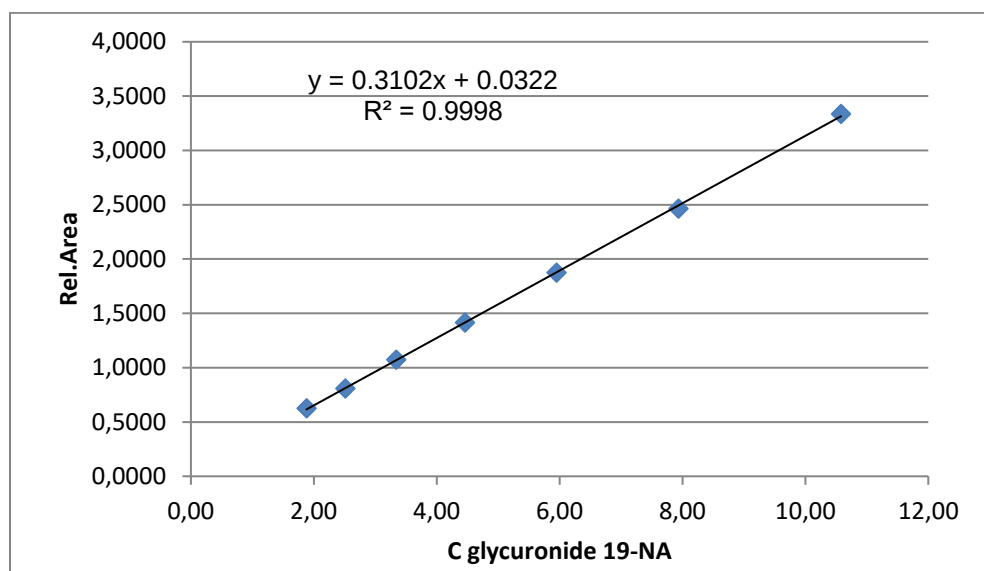


	AREA m/z 405	AREA m/z 409	REL. AREA	CONC. THEOR. ng/mL	CONC. EXP. ng/mL	% ANAL. ERROR
BLANK	29,430,102	498,381,500	0.0591		0.10	
STD7_1.1	68,768,727	502,479,969	0.1369	0.62	0.58	
STD7_1.2	74,886,383	501,905,844	0.1492		0.63	
STD7_2.1	75,312,148	482,103,156	0.1562		0.66	
STD7_2.2	79,792,242	472,455,219	0.1689		0.71	
			0.1528	MEAN	0.64	3,90
			0.013	SD	0.051	
			8.761	RSD	7.856	

STD6_1.1	113,490,188	579,661,313	0.1958	0.83	0.81	
STD6_1.2	120,971,328	568,447,125	0.2128		0.87	
STD6_2.1	130,100,570	621,518,750	0.2093		0.86	
STD6_2.2	126,491,750	604,312,688	0.2093		0.86	
			0.2068	MEAN	0.85	2,22
			0.008	SD	0.028	
			3.641	RSD	3.356	
				MEAN		
STD5_1.1						
STD5_1.2	176,939,719	475,934,906	0.3718	1.48	1.47	
STD5_2.1	181,098,656	455,756,188	0.3974		1.57	
STD5_2.2	182,440,063	517,929,875	0.3522		1.40	
	177,676,766	497,114,313	0.3574		1.42	
			0.3697	MEAN	1.46	-1,06
			0.020	SD	0.076	
			5.465	RSD	5.217	
STD4_1.1						
STD4_1.2	242,588,125	472,508,938	0.5134	1.97	2.01	
STD4_2.1	227,057,000	450,989,406	0.5035		1.97	
STD4_2.2	253,841,594	519,457,625	0.4887		1.91	
	262,176,031	553,165,438	0.4740		1.86	
			0.4949	MEAN	1.94	-1,65
			0.017	SD	0.065	
			3.487	RSD	3.367	
STD3_1.1						
STD3_1.2	337,561,031	498,913,281	0.6766	2.63	2.62	
STD3_2.1	302,768,031	478,494,000	0.6328		2.46	
STD3_2.2	337,004,125	486,985,750	0.6920		2.68	
	304,843,375	445,443,469	0.6844		2.65	
			0.67	MEAN	2.59	-1,57
			0.031	SD	0.116	
			4.609	RSD	4.491	
STD2_1.1						

STD2_1.2	416,372,938	453,575,813	0.9180	3.51	3.54	
STD2_2.1	424,481,438	455,838,594	0.9312		3.59	
STD2_2.2	443,933,625	477,647,219	0.9294		3.58	
	428,204,781	469,607,500	0.9118		3.51	
			0.9226	MEAN	3.55	1,36
			0.009	SD	0.035	
			1.005	RSD	0.986	

**3^η καμπύλη αναφοράς για το γλυκουρονίδιο της 19-νορανδροστερόνης
(13-10-2016)**

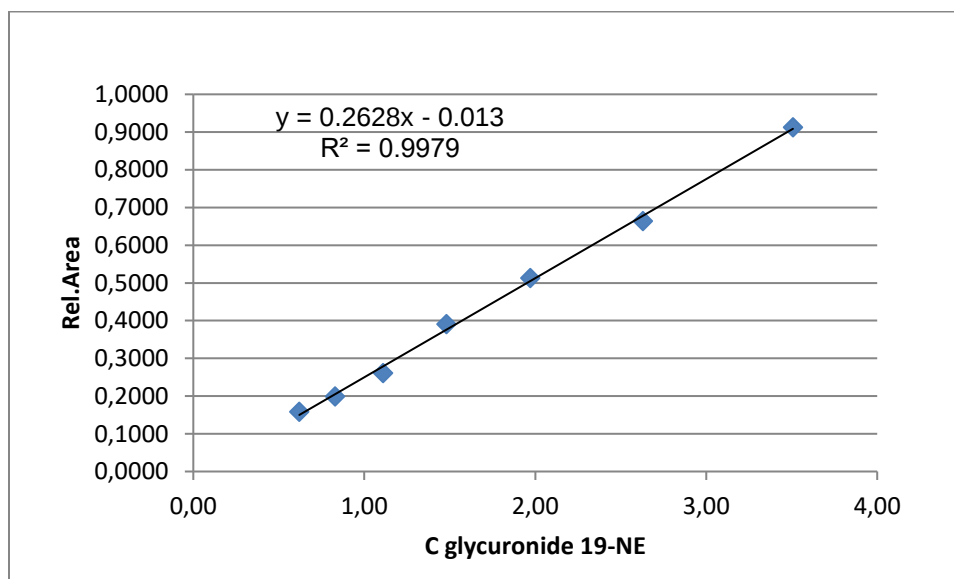


	AREA m/z 405	AREA m/z 409	REL. AREA	CONC. THEOR. ng/mL	CONC. EXP. ng/mL	% ANAL. ERROR
BLANK	28,606,994	584,998,313	0.0489		0.05	
STD7_1.1	337,612,625	552,069,750	0.6115	1.88	1.87	
STD7_1.2	332,302,813	541,819,625	0.6133		1.88	
STD7_2.1	373,110,531	565,862,063	0.6594		2.02	
STD7_2.2	343,816,438	559,241,313	0.6148		1.88	
			0.6248	MEAN	1.91	1,71
			0.023	SD	0.075	
			3.700	RSD	3.900	

STD6_1.1	449,821,625	567,388,750	0.7928	2.51	2.45	
STD6_1.2	456,854,469	576,649,938	0.7923		2.45	
STD6_2.1	495,225,906	592,547,250	0.8358		2.59	
STD6_2.2	476,969,250	588,223,250	0.8109		2.51	
			0.8079	MEAN	2.50	-0,28
			0.020	SD	0.066	
			2.534	RSD	2.639	
STD5_1.1	569,209,750	527,147,625	1.0798	3.34	3.38	
STD5_1.2	537,695,750	517,331,594	1.0394		3.25	
STD5_2.1	617,151,688	569,522,750	1.0836		3.39	
STD5_2.2	597,156,875	547,604,875	1.0905		3.41	
			1.0733	MEAN	3.36	0,57
			0.023	SD	0.074	
			2.149	RSD	2.215	
STD4_1.1	718,892,000	525,228,000	1.3687	4.46	4.31	
STD4_1.2	715,685,563	510,580,250	1.4017		4.42	
STD4_2.1	783,165,250	532,671,188	1.4703		4.64	
STD4_2.2	752,082,688	529,998,125	1.4190		4.47	
			1.4149	MEAN	4.46	0,02
			0.042	SD	0.137	
			2.995	RSD	3.064	
STD3_1.1	887,570,375	461,071,531	1.9250	5.95	6.11	
STD3_1.2	872,380,375	467,503,406	1.8660		5.92	
STD3_2.1	927,865,500	492,526,406	1.8839		5.97	
STD3_2.2	906,118,500	495,694,656	1.8280		5.79	
			1.8757	MEAN	5.95	-0,04
			0.040	SD	0.130	
			2.148	RSD	2.185	

STD2_1.1	1,280,826,000	511,784,344	2.5027	7.94	7.97	
STD2_1.2	1,223,853,875	509,710,656	2.4011		7.64	
STD2_2.1	1,328,061,625	533,369,063	2.4899		7.93	
STD2_2.2	1,295,943,750	518,833,469	2.4978		7.95	
			2.46	MEAN	7.85	-1,11
			0.055	SD	0.179	
			2.246	RSD	2.275	
STD1_1.1	1,628,023,625	489,992,281	3.3225	10.58	10.61	
STD1_1.2	1,568,761,250	479,863,313	3.2692		10.44	
STD1_2.1	1,650,723,125	487,300,656	3.3875		10.82	
STD1_2.2	1,610,502,500	478,990,281	3.3623		10.74	
			3.3354	MEAN	10.66	0,72
			0.052	SD	0.166	
			1.547	RSD	1.562	

**3^η καμπύλη αναφοράς για το γλυκουρονίδιο της 19-νορετιοχολανολόνης
(13-10-2016)**

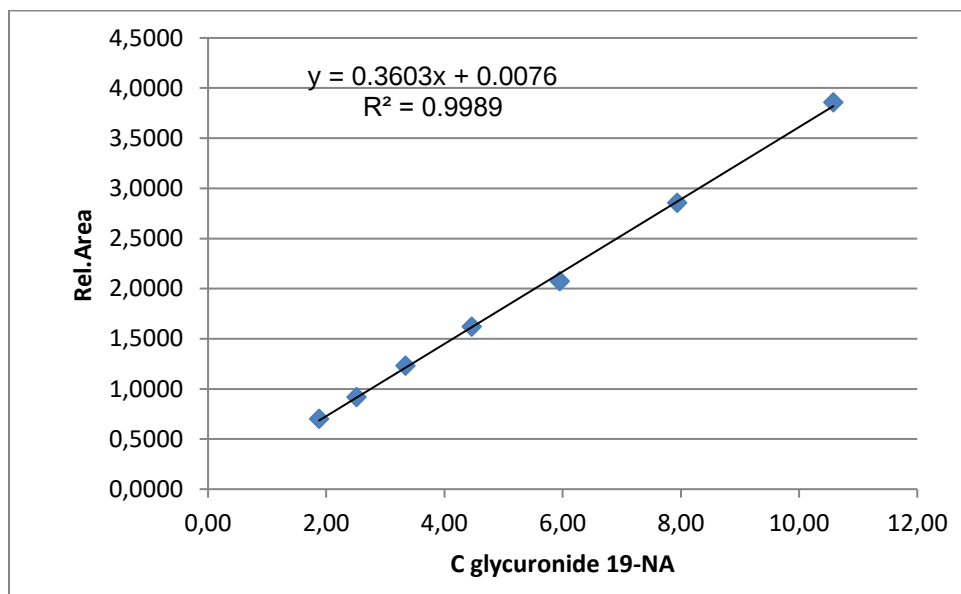


	AREA m/z 405	AREA m/z 409	REL. AREA	CONC. THEOR. ng/mL	CONC. EXP. ng/mL	% ANAL. ERROR
--	-----------------	-----------------	--------------	--------------------------	------------------------	---------------------

BLANK	28,606,994	584,998,313	0.0489		0.24	
STD7_1.1	88,745,742	552,069,750	0.1608	0.62	0.66	
STD7_1.2	84,972,469	541,819,625	0.1568		0.65	
STD7_2.1	88,963,438	565,862,063	0.1572		0.65	
STD7_2.2	89,193,602	559,241,313	0.1595		0.66	
			0.1586	MEAN	0.65	5,62
			0.002	SD	0.007	
			1.178	RSD	1.089	
STD6_1.1	117,703,727	567,388,750	0.2074	0.83	0.84	
STD6_1.2	110,540,516	576,649,938	0.1917		0.78	
STD6_2.1	124,698,508	592,547,250	0.2104		0.85	
STD6_2.2	110,290,922	588,223,250	0.1875		0.77	
			0.1993	MEAN	0.81	-2,39
			0.011	SD	0.043	
			5.705	RSD	5.356	
STD5_1.1	141,883,594	527,147,625	0.2692	1.11	1.08	
STD5_1.2	128,594,531	517,331,594	0.2486		1.00	
STD5_2.1	149,221,250	569,522,750	0.2620		1.05	
STD5_2.2	145,072,594	547,604,875	0.2649		1.06	
			0.2612	MEAN	1.05	-5,64
			0.009	SD	0.034	
			3.405	RSD	3.243	
STD4_1.1	204,212,031	525,228,000	0.3888	1.48	1.53	
STD4_1.2	183,225,641	510,580,250	0.3589		1.42	
STD4_2.1	222,814,766	532,671,188	0.4183		1.65	
STD4_2.2	211,419,797	529,998,125	0.3989		1.57	
			0.3912	MEAN	1.54	4,24
			0.025	SD	0.095	
			6.340	RSD	6.136	

STD3_1.1	239,436,531	461,071,531	0.5193	1.97	2.03	
STD3_1.2	234,193,094	467,503,406	0.5009		1.96	
STD3_2.1	256,763,000	492,526,406	0.5213		2.04	
STD3_2.2	254,183,563	495,694,656	0.5128		2.01	
			0.5136	MEAN	2.01	2,02
			0.009	SD	0.035	
			1.788	RSD	1.744	
STD2_1.1	343,930,844	511,784,344	0.6720	2.63	2.61	
STD2_1.2	333,078,594	509,710,656	0.6535		2.54	
STD2_2.1	355,915,531	533,369,063	0.6673		2.60	
STD2_2.2	337,594,625	518,833,469	0.6507		2.53	
			0.66	MEAN	2.58	-1,71
			0.010	SD	0.037	
			1.452	RSD	1.424	
STD1_1.1	440,397,250	489,992,281	0.8988	3.51	3.48	
STD1_1.2	437,881,563	479,863,313	0.9125		3.53	
STD1_2.1	450,192,250	487,300,656	0.9238		3.58	
STD1_2.2	439,073,031	478,990,281	0.9167		3.55	
			0.9130	MEAN	3.53	0,77
			0.011	SD	0.040	
			1.155	RSD	1.139	

4^η καμπύλη αναφοράς για το γλυκουρονίδιο της 19-νορανδροστερόνης
(31-10-2016)

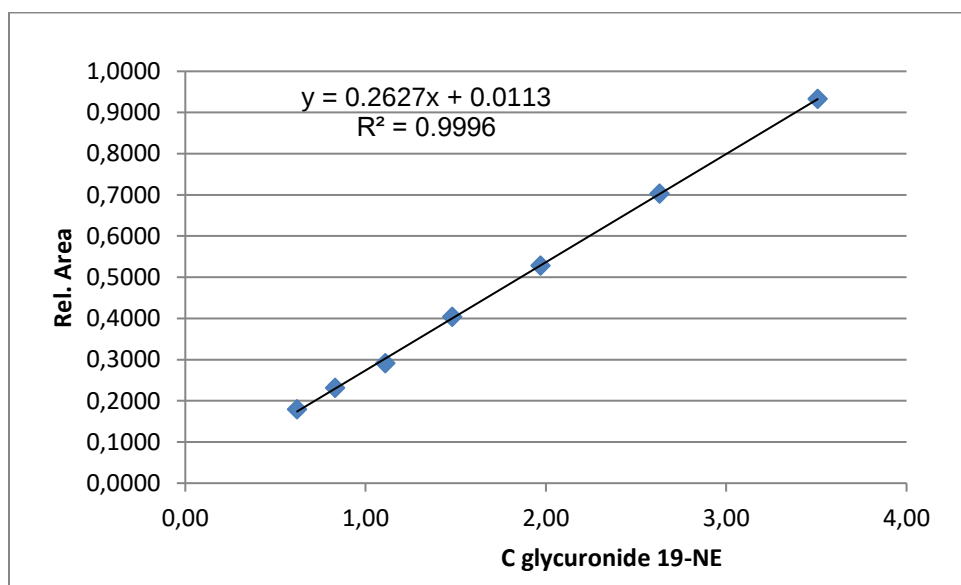


	AREA m/z 405	AREA m/z 409	REL. AREA	CONC. THEOR. ng/mL	CONC. EXP. ng/mL	% ANAL. ERROR
BLANK	8,145,190	116,747,578	0.0698		0.22	
STD7_1.1	56,213,965	306,257,938	0.1836	0.62	0.66	
STD7_1.2	50,764,141	300,006,313	0.1692		0.60	
STD7_2.1	43,667,652	256,829,125	0.1700		0.60	
STD7_2.2	43,746,199	223,878,219	0.1954		0.70	
			0.1795	MEAN	0.64	3,30
			0.012	SD	0.047	
			6.933	RSD	7.399	
STD6_1.1	53,156,629	234,944,328	0.2263	0.83	0.82	
STD6_1.2	48,317,363	223,241,594	0.2164		0.78	
STD6_2.1	52,176,984	218,992,906	0.2383		0.86	
STD6_2.2	48,820,078	200,911,125	0.2430		0.88	
			0.2310	MEAN	0.84	0,75

			0.012	SD	0.046	
			5.190	RSD	5.457	
STD5_1.1	55,896,129	192,466,938	0.2904	1.11	1.06	
STD5_1.2	63,967,633	217,349,313	0.2943		1.08	
STD5_2.1	71,053,281	234,473,500	0.3030		1.11	
STD5_2.2	61,811,047	222,485,203	0.2778		1.01	
			0.2914	MEAN	1.07	-3,86
			0.010	SD	0.040	
			3.595	RSD	3.740	
STD4_1.1	102,872,320	253,076,688	0.4065	1.48	1.50	
STD4_1.2	101,528,781	237,748,109	0.4270		1.58	
STD4_2.1	95,310,328	245,289,953	0.3886		1.44	
STD4_2.2	92,181,727	234,961,266	0.3923		1.45	
			0.4036	MEAN	1.49	0,90
			0.017	SD	0.066	
			4.318	RSD	4.442	
STD3_1.1	98,016,047	205,343,734	0.4773	1.97	1.77	
STD3_1.2	107,335,805	208,206,453	0.5155		1.92	
STD3_2.1	104,811,250	194,045,500	0.5401		2.01	
STD3_2.2	105,597,359	182,298,047	0.5793		2.16	
			0.5281	MEAN	1.97	-0,15
			0.043	SD	0.163	
			8.107	RSD	8.284	
STD2_1.1	133,088,469	192,687,063	0.6907	2.63	2.59	
STD2_1.2	132,931,547	185,477,375	0.7167		2.69	
STD2_2.1	158,679,688	226,190,234	0.7015		2.63	
STD2_2.2	151,327,813	213,520,969	0.7087		2.65	
			0.70	MEAN	2.63	0,11
			0.013	SD	0.050	

			1.858	RSD	1.888	
STD1_1.1	165,510,172	182,191,828	0.9084	3.51	3.42	
STD1_1.2	164,655,250	180,608,656	0.9117		3.43	
STD1_2.1	182,947,141	183,044,813	0.9995		3.76	
STD1_2.2	173,767,594	190,533,844	0.9120		3.43	
			0.9329	MEAN	3.51	0,03
			0.044	SD	0.169	
			4.760	RSD	4.819	

**4^η καμπύλη αναφοράς για το γλυκουρονίδιο της 19-νορεπιοχολανολόνης
(31-10-2016)**

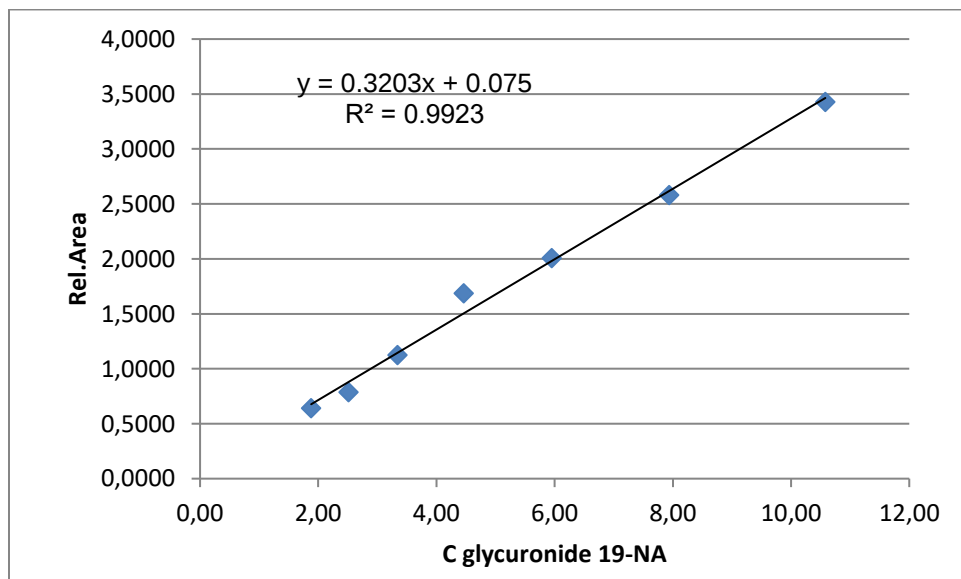


	AREA m/z 405	AREA m/z 409	REL. AREA	CONC. THEOR. ng/mL	CONC. EXP. ng/mL	% ANAL. ERROR
BLANK	5,487,275	116,747,578	0.0470		0.09	
STD7_1.1						
STD7_1.2	216,754,844	306,257,938	0.7078	1.88	1.92	
STD7_2.1	214,046,906	300,006,313	0.7135		1.93	
STD7_2.2	180,441,359	256,829,125	0.7026		1.90	

	153,776,109	223,878,219	0.6869		1.86	
			0.7027	MEAN	1.90	1,23
			0.011	SD	0.032	
			1.627	RSD	1.662	
STD6_1.1						
STD6_1.2	214,413,313	234,944,328	0.9126	2.51	2.48	
STD6_2.1	200,782,438	223,241,594	0.8994		2.45	
STD6_2.2	197,878,719	218,992,906	0.9036		2.46	
	192,188,203	200,911,125	0.9566		2.61	
			0.9180	MEAN	2.50	-0,44
			0.026	SD	0.073	
			2.862	RSD	2.910	
STD5_1.1						
STD5_1.2	232,402,938	192,466,938	1.2075	3.34	3.30	
STD5_2.1	275,341,500	217,349,313	1.2668		3.46	
STD5_2.2	288,330,313	234,473,500	1.2297		3.36	
	271,805,781	222,485,203	1.2217		3.34	
			1.2314	MEAN	3.37	0,78
			0.025	SD	0.070	
			2.056	RSD	2.081	
STD4_1.1						
STD4_1.2	409,557,906	253,076,688	1.6183	4.46	4.44	
STD4_2.1	395,155,406	237,748,109	1.6621		4.56	
STD4_2.2	388,150,656	245,289,953	1.5824		4.34	
	370,596,531	234,961,266	1.5773		4.32	
			1.6209	MEAN	4.44	-0,36
			0.039	SD	0.109	
			2.419	RSD	2.442	
STD3_1.1						
STD3_1.2	429,210,594	205,343,734	2.0902	5.95	5.74	
STD3_2.1	418,864,188	208,206,453	2.0118		5.53	
STD3_2.2	411,485,625	194,045,500	2.1206		5.83	
	396,102,125	182,298,047	2.1728		5.97	

			2.07	MEAN	5.70	-4,23
			0.056	SD	0.155	
			2.706	RSD	2.726	
STD2_1.1						
STD2_1.2	556,998,313	192,687,063	2.8907	7.94	7.96	
STD2_2.1	541,788,875	185,477,375	2.9211		8.04	
STD2_2.2	638,310,563	226,190,234	2.8220		7.77	
	596,727,188	213,520,969	2.7947		7.69	
			2.8571	MEAN	7.86	-0,95
			0.059	SD	0.162	
			2.055	RSD	2.066	
STD1_1.1	694,692,125	182,191,828	3.8130	10.58	10.51	
STD1_1.2	711,511,188	180,608,656	3.9395		10.86	
STD1_2.1	720,329,938	183,044,813	3.9353		10.85	
STD1_2.2	713,638,438	190,533,844	3.7455		10.32	
			3.8583	MEAN	10.63	0,52
			0.095	SD	0.264	
			2.473	RSD	2.482	

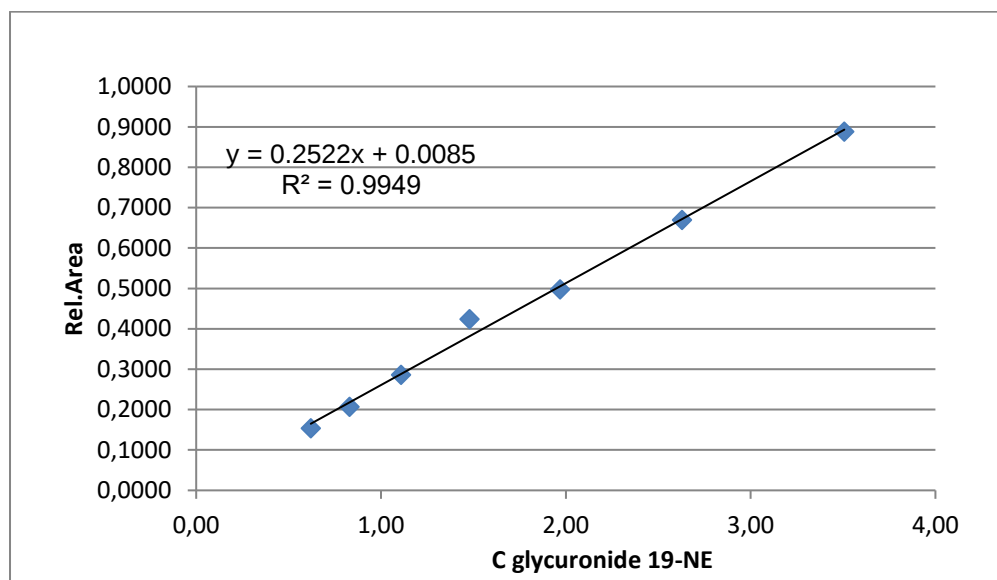
**5^η καμπύλη αναφοράς για το γλυκουρονίδιο της 19-νορανδροστερόνης
(03-11-2016)**



	AREA 405	AREA m/z 409	REL. AREA	CONC. THEOR. ng/mL	CONC. EXP. ng/mL	% ANAL. ERROR
BLANK	15,376,245	200,734,922	0.0766		0.00	
STD7_1.1	126,524,156	189,349,031	0.6682	1.88	1.85	
STD7_1.2	123,062,508	188,482,203	0.6529		1.80	
STD7_2.1	125,184,297	202,853,578	0.6171		1.69	
STD7_2.2	131,026,734	209,123,563	0.6266		1.72	
			0.6412	MEAN	1.77	-5,97
			0.024	SD	0.073	
			3.670	RSD	4.156	
STD6_1.1	159,319,703	195,636,125	0.8144	2.51	2.31	
STD6_1.2	161,983,031	203,019,984	0.7979		2.26	
STD6_2.1	173,432,063	220,373,297	0.7870		2.22	
STD6_2.2	163,301,734	216,367,672	0.7547		2.12	
			0.7885	MEAN	2.23	-11,25
			0.025	SD	0.079	
			3.191	RSD	3.526	
STD5_1.1	245,906,969	216,812,906	1.1342	3.34	3.31	
STD5_1.2	237,385,281	229,073,172	1.0363		3.00	
STD5_2.1	242,417,656	210,588,438	1.1511		3.36	
STD5_2.2	238,080,250	200,415,766	1.1879		3.47	
			1.1274	MEAN	3.29	-1,63
			0.065	SD	0.202	
			5.743	RSD	6.152	
STD4_1.1	302,173,406	154,911,328	1.9506	4.46	5.86	
STD4_1.2	308,395,438	151,761,469	2.0321		6.11	
STD4_2.1	295,306,844	210,830,422	1.4007		4.14	

STD4_2.2	276,559,719	201,310,141	1.3738		4.05	
			1.6893	MEAN	5.04	13,00
			0.351	SD	1.094	
			20.751	RSD	21.715	
STD3_1.1	442,432,781	219,546,609	2.0152	5.95	6.06	
STD3_1.2	420,385,781	208,553,969	2.0157		6.06	
STD3_2.1	352,729,031	185,586,125	1.9006		5.70	
STD3_2.2	363,637,875	173,300,125	2.0983		6.32	
			2.0075	MEAN	6.03	1,40
			0.081	SD	0.254	
			4.047	RSD	4.204	
STD2_1.1	504,443,469	192,934,297	2.6146	7.94	7.93	
STD2_1.2	460,154,750	198,403,672	2.3193		7.01	
STD2_2.1	508,616,188	180,757,609	2.8138		8.55	
STD2_2.2	497,575,063	198,621,000	2.5051		7.59	
			2.58	mean	7.83	-1,34
			0.249	sd	0.777	
			9.634	rsd	9.922	
STD1_1.1	599,353,188	183,936,031	3.2585	10.58	9.94	
STD1_1.2	578,045,313	169,709,625	3.4061		10.40	
STD1_2.1	616,089,750	183,388,656	3.3595		10.25	
STD1_2.2	624,081,875	168,923,672	3.6945		11.30	
			3.4296	mean	10.47	-1,01
			0.187	sd	0.584	
			5.452	rsd	5.574	

5^η καμπύλη αναφοράς για το γλυκουρονίδιο της 19-νορεπιοχολανολόνης
(03-11-2016)



	AREA 405	AREA m/z 409	REL. AREA	CONC. THEOR. ng/mL	CONC. EXP. ng/mL	% ANAL. ERROR
BLANK	15,376,245	200,734,922	0.0766		0.27	
STD7_1.1	29,763,350	189,349,031	0.1572	0.62	0.59	
STD7_1.2	29,253,180	188,482,203	0.1552		0.58	
STD7_2.1	29,758,320	202,853,578	0.1467		0.55	
STD7_2.2	32,287,322	209,123,563	0.1544		0.58	
			0.1534	mean	0.57	-7,35
			0.005	sd	0.018	
			3.000	rsd	3.176	
STD6_1.1	40,049,676	195,636,125	0.2047	0.83	0.78	
STD6_1.2	42,308,293	203,019,984	0.2084		0.79	
STD6_2.1	45,421,766	220,373,297	0.2061		0.78	
STD6_2.2	44,886,203	216,367,672	0.2075		0.79	
			0.2067	mean	0.79	-5,33
			0.002	sd	0.006	
			0.776	rsd	0.810	

STD5_1.1	66,569,117	216,812,906	0.3070	1.11	1.18	
STD5_1.2	61,052,434	229,073,172	0.2665		1.02	
STD5_2.1	59,633,438	210,588,438	0.2832		1.09	
STD5_2.2	57,221,059	200,415,766	0.2855		1.10	
			0.2856	mean	1.10	-0,94
			0.017	sd	0.066	
			5.823	rsd	6.001	
STD4_1.1	73,167,523	154,911,328	0.4723	1.48	1.84	
STD4_1.2	79,284,117	151,761,469	0.5224		2.04	
STD4_2.1	75,238,734	210,830,422	0.3569		1.38	
STD4_2.2	68,952,617	201,310,141	0.3425		1.32	
			0.4235	mean	1.65	11,19
			0.088	sd	0.348	
			20.749	rsd	21.174	
STD3_1.1	115,611,805	219,546,609	0.5266	1.97	2.05	
STD3_1.2	100,013,789	208,553,969	0.4796		1.87	
STD3_2.1	87,278,453	185,586,125	0.4703		1.83	
STD3_2.2	88,946,672	173,300,125	0.5133		2.00	
			0.4974	mean	1.94	-1,59
			0.027	sd	0.106	
			5.391	rsd	5.484	
STD2_1.1	132,107,984	192,934,297	0.6847	2.63	2.68	
STD2_1.2	120,373,633	198,403,672	0.6067		2.37	
STD2_2.1	129,524,023	180,757,609	0.7166		2.81	
STD2_2.2	132,721,875	198,621,000	0.6682		2.62	
			0.67	mean	2.62	-0,37
			0.057	sd	0.224	
			8.444	rsd	8.553	

STD1_1.1	159,038,469	183,936,031	0.8646	3.51	3.39	
STD1_1.2	153,501,547	169,709,625	0.9045		3.55	
STD1_2.1	164,814,563	183,388,656	0.8987		3.53	
STD1_2.2	149,072,750	168,923,672	0.8825		3.47	
			0.8876	mean	3.49	-0,61
			0.018	sd	0.071	
			2.018	rsd	2.037	

Βιβλιογραφία

1. Ι. Ζέρβας, , Ψυχολογία Φυσικής Αγωγής και Αθλητισμού (2002).
2. Σ. Αθανασέλης, Ε. Καμπερίδου, Σ. Χαρίτου, ΝΤΟΠΙΝΓΚ Σύγχρονη Θεώρηση του Προβλήματος.
3. WADA. A Brief History of Anti-Doping.
4. W.A.D.A. World Anti-Doping Code.
5. W.A.D.A. International Standards.
6. W.A.D.A. Laboratory Statistics.
7. Dr. Detlef Thieme, P.D.P.H., Doping in Sports (2010).
8. Μ. Σκουρολιάκου, Ντόπινγκ: Αθλητισμός και Φάρμακα, Ινστιτούτο Φαρμακευτικής Έρευνας & Τεχνολογίας (2005).
9. K. David, D.E., J. Freud, L. Laqueur, Uber krystallinisches mannliches Hormon aus Hoden (Testosteron) wirksamer als aus harn oder aus Cholesterin bereitetes Androsteron. Hoppe Seylers Z Physiol Chem., 233(5-6): p. 281–283 (1935).
10. S. Gunnar, "Drugs of natural origins. A textbook of pharmacognosy". (1992).
11. J. BergM, T.L.J., StryerL., Βιοχημεία, Τόμος II , Biochemistry. 5th edition. (2002)
12. W. Schanzer, Metabolism of anabolic androgenic steroids. Clinical Chemistry, 42(7): p. 1101-1020, (1996) .
13. Eberhard Nieschlag, H.M.B., Susan Nieschlag, Testosterone: Action, Deficiency, Substitution 3ed.: Cambridge University Press, (2004).
14. A.G. Fragkaki, Y.S.A., M. Koupparis, A. Tsantili-Kakoulidou, G. Kokotos, C. Georgakopoulos, Structural characteristics of anabolic androgenic steroids contributing to binding to the androgen receptor and to their anabolic and androgenic activities_ Applied modifications in the steroidal structure. Steroids, 74, (2009).
15. G.D. Braunstein, The influence of anabolic steroids on muscular strength, Principles of Medical Biology, Molecular and Cellular Pharmacology, 8, 465-474 (1997).
16. P.S. Rao, H.M. Mehendale, Androgens, Encyclopedia of Toxicology, 121-125, (2005).

17. Β. Ιγνατιάδου-Ραγκούση, Χημεία Φυσικών Προϊόντων, ΕΚΠΑ, Τμήμα Χημείας, (1998).
18. J.McMurry, Απόδοση στα ελληνικά: Α.Βάρβογλης, Μ.Ορφανόπουλος, Ι.Σμόνου, Μ.Στρατάκης, Οργανική Χημεία, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 2^η έκδοση, τόμος 2, (2001).
19. E.Nieschlag, H.M.Behre, S.Nieschlag, Testosterone Action, Deficiency, Substitution, Cambridge University Press, 3rd Edition, (2006).
20. Κ.Δημόπουλος, Σ.Αντωνοπούλου, Βασική Βιοχημεία, Αθήνα, (2000).
21. W.Gao, C.E.Bohl, J.T.Dalton, Chemistry and structural biology of androgen receptor, Chemical Reviews, 105, 3352-3370 (2005).
22. B.Green, R.E.Leake, Steroid hormones a practical approach, IRL Press, Oxford, Washington, (1987).
23. A.Leinonen, Novel mass spectrometric analysis methods for anabolic androgenic steroids in sports drug testing, Helsinki University Printing House, Helsinki, (2006).
24. D.H.Kerkhof, Steroid profiling in doping analysis, Universiteit Utrecht, Faculteit Farmacie, Nederlands, (2001).
25. L.T.Samuels, Metabolism of the steroid hormones, Progress in the chemistry of fats and other lipids, vol. 3, (1955).
26. Π.Μαχαίρας, Χ.Ρέππας, Βιοφαρμακευτική, Αθήνα, (1992).
27. J.K.Aronson, Androgens and anabolic steroids, Meyler's side effects of drugs: the international encyclopedia of adverse drug reactions, Elsevier B.V., 216-223 (2006).
28. M.Hart, Laymans guide to steroids, Mick Hart training systems, (2000).
29. Π.Α. Σίσκος, Δ.Π. Νικολέλης: Αναλυτικές μέθοδοι διαχωρισμού. ΕΚΠΑ (1991).
30. D.A Skoog, T.A Nieman, Αρχές Ενοργανης Ανάλυσης. (2008).
31. H.M. McNair, J.M. Miller,.: Basic Gas Chromatography. 2nd Ed. John Willey & Sons. (2009).
32. W. Jennings, E. Mittlefehldt, Strempel P., Analytical Gas Chromatography. 2nd Ed. Academic Press. (1997).
33. HP6890 Series Gas Chromatography. Operating Manual, General Information.
34. Θ.Π. Χατζηϊωάννου, Μ.Α. Κουππάρης: Ενόργανη Ανάλυση. ΕΚΠΑ. (2000).

35. E. Hoffmann., V Stroobant: Mass Spectrometry. John Wiley & Sons. 3rd Ed.(2007).
36. V.B. Scott., An introduction to Mass Spectrometry (1997)
37. Autospec Operator Manual, Micromass, Code Number 6666395, p. 4-6
38. F.G. Kitson, B.S Larsen , C.N McEwen.: Gas Chromatography and Mass Spectrometry. Academic Press.(1996).
39. M.Hebestreit, U. Flenker, M. Thevis, Determination of the origin of urinary norandrosterone traces by gas chromatography combustion isotope ratio mass spectrometry. Institute of biochemistry. German SportUniversity of Cologne (2016).
40. E. Stragm, N. Baume, P. Mangin, Profiling of 19-norandrosterone sulfate and glucuronide in human urine: Implications in athletes drug testing. Elsevier. (2008)
41. WADA Technical Document – TD2016NA
42. E Strahm, C Emery ,M Saugy, et al.Detection of testosterone administration based on the carbon isotope ratio profiling of endogenous steroids: international reference populations of professional soccer players. Br J Sports Med. 43:1041–4. (2009)
43. B. Μπακέας, Αέρια Χρωματογραφία, Σημειώσεις Μαθήματος Σύγχρονες Αναλυτικές Τεχνικές. (2008).
44. N. Θωμαΐδης, Εισαγωγή στη Φασματοσκοπία Μαζών, Σημειώσεις Μαθήματος Σύγχρονες Αναλυτικές Τεχνικές (2012).
45. R.M. Smith, Understanding Mass Spectra. A Basic Approach, ed. Wiley. 2nd Ed. (2004).