



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΤΗΣ
ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ / ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΩΝ
ΜΕ ΑΝΑΛΥΤΗ ΧΡΟΝΟΥ ΠΤΗΣΗΣ (LC/TOF-MS)
ΣΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΝΤΟΠΙΝΓΚ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ
ΣΕ ΟΥΡΑ ΑΘΛΗΤΩΝ ΚΑΙ ΑΛΟΓΩΝ

ΒΟΝΑΠΑΡΤΗ ΑΡΙΑΔΝΗ

ΦΑΡΜΑΚΟΠΟΙΟΣ Ε.Κ.Π.Α.

ΑΘΗΝΑ 2011



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΤΗΣ
ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ / ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΩΝ
ΜΕ ΑΝΑΛΥΤΗ ΧΡΟΝΟΥ ΠΤΗΣΗΣ (LC/TOF-MS)
ΣΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΝΤΟΠΙΝΓΚ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ
ΣΕ ΟΥΡΑ ΑΘΛΗΤΩΝ ΚΑΙ ΑΛΟΓΩΝ

ΒΟΝΑΠΑΡΤΗ ΑΡΙΑΔΝΗ

ΦΑΡΜΑΚΟΠΟΙΟΣ Ε.Κ.Π.Α.

ΑΘΗΝΑ 2011

‘Η έγκριση διδακτορικής διατριβής ειδίκευσης από το Τμήμα Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα.’

(N.5343/1932, άρθρο 202)

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ε. ΠΑΝΤΕΡΗ	ΑΝ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ Ε.Κ.Π.Α.	Επιβλέπον μέλος ΔΕΠ Μέλος τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής
Μ. ΚΟΥΠΠΑΡΗΣ	ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Ε.Κ.Π.Α.	Μέλος τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής
Α. ΤΣΑΝΤΙΛΗ-ΚΑΚΟΥΛΙΔΟΥ	ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ Ε.Κ.Π.Α.	Μέλος τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής
Α. ΑΝΤΩΝΙΑΔΟΥ-ΒΥΖΑ	ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ Ε.Κ.Π.Α.	
Ε. ΜΙΚΡΟΣ	ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Ε.Κ.Π.Α.	
Ι. ΛΟΥΚΑΣ	ΑΝ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Ε.Κ.Π.Α.	
Ε. ΓΚΙΚΑΣ	ΛΕΚΤΟΡΑΣ	

Αντί προλόγου.....

Η εκπόνηση της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ελέγχου Ντόπινγκ του Ολυμπιακού Αθλητικού Κέντρου Αθηνών σε συνεργασία με το Εργαστήριο Φαρμακευτικής Ανάλυσης του τομέα Φαρμακευτικής Χημείας του τμήματος Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Αθηνών κατά την περίοδο 2007-2010. Η ανάθεση του θέματος έγινε από την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ειρήνη Παντερή σε συνεργασία με το Διευθυντή του Εργαστηρίου Ελέγχου Ντόπινγκ Δρ. Κωνσταντίνο Γεωργακόπουλο. Με την ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής αισθάνομαι πως κλείνει ένας πολύ σημαντικός κύκλος σπουδών, γεμάτος γνώσεις, εμπειρίες και στιγμές άλλοτε ευχάριστες και άλλοτε δύσκολες και επίπονες. Οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλους αυτούς τους ανθρώπους που συνέβαλαν και βοήθησαν με οποιοδήποτε τρόπο και σε οποιοδήποτε βαθμό στην εκπόνηση και ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής.

Πρώτα από όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω το επιβλέπον μέλος Δ.Ε.Π, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ειρήνη Παντερή, για την ανάθεση και επίβλεψη του θέματος. Την ευχαριστώ για την καθοδήγηση, την εμπιστοσύνη και την ουσιαστική της στήριξη όλα τα χρόνια της συνεργασίας μας. Η αγάπη μου για την επιστήμη αυτή οφείλεται σε ένα μεγάλο μέρος σε εκείνη και την ευχαριστώ για αυτό.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον Διευθυντή του Εργαστηρίου Ελέγχου Ντόπινγκ του Ο.Α.Κ.Α., Δρ. Κωνσταντίνο Γεωργακόπουλο για την ανάθεση του θέματος, την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω τη διδακτορική μου διατριβή σε ένα εξαιρετικά σύγχρονο και πρότυπα οργανωμένο εργαστήριο και να αποκτήσω γνώσεις και εμπειρία σε μια τόσο σύγχρονη τεχνολογία όπως αυτή του LC/TOF-MS. Τον ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την ελευθερία ανάληψης πρωτοβουλιών, το ενδιαφέρον του και τις πολύτιμες συμβουλές του, αλλά και τις εργασιακές ευκαιρίες που μου προσέφερε στο διάστημα αυτό.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα δύο μέλη της τριμελούς επιτροπής, Καθηγητή Μιχαήλ Κουμπάρη και Καθηγήτρια Άννα Τσαντίλη-Κακουλίδου για την καθοδήγηση, τις χρήσιμες υποδείξεις και την αξιολόγηση της παρούσας εργασίας, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς επιτροπής, Καθηγήτρια Αικατερίνη Αντωνιάδου-Βυζά, Καθηγητή Εμμανουήλ Μικρό, Αναπληρωτή Καθηγητή Ιωάννη Λουκά και Λέκτορα Ευάγγελο Γκίκα, για την ιδιαίτερη τιμή να αξιολογήσουν την παρούσα εργασία.

Θεωρώ τον εαυτό μου ιδιαίτερα τυχερό καθώς είχα την τιμή να συνεργαστώ στο Εργαστήριο με δυο πραγματικά αξιόλογους επιστήμονες και ξεχωριστούς ανθρώπους. Ευχαριστώ τον Δρ. Εμμανουήλ Λυρή για την πολύτιμη και συνεχή καθοδήγηση και βοήθεια, τη συμπαράσταση και την υπομονή. Τον ευχαριστώ γιατί ήταν ο άνθρωπος που μου μετέδωσε την απαιτούμενη ψυχραιμία σε δύσκολες στιγμές και που στο πλαίσιο των απαιτήσεων αυτής της διατριβής διέθεσε πολύτιμο προσωπικό χρόνο. Ευχαριστώ τον Δρ. Ιωάννη Αγγελή για τις εύστοχες παρατηρήσεις και υποδείξεις του, την αστείρευτη και συνεχή μετάδοση πληροφοριών και γνώσεων, την ψυχολογική στήριξη και συμπαράσταση και τις ατελείωτες επιστημονικές συζητήσεις.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Ελέγχου Ντόπινγκ, για την άριστη συνεργασία, τη στήριξη και τη βοήθειά τους. Τους ευχαριστώ για τις

όμορφες στιγμές που μου χάρισαν από το 2004 μέχρι σήμερα στο εργαστήριο. Ήταν μεγάλη χαρά και τιμή να συνεργαστώ μαζί τους και χάρη σε εκείνους θα αισθάνομαι για πάντα μέλος αυτής της τόσο ξεχωριστής επιστημονικής ομάδας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την εταιρεία *Agilent Technologies* για την προσφορά των αναλυτικών οργάνων *LC/TOF-MS* και *LC/QTOF-MS*. Η κίνησή της αυτή αποτέλεσε την αφορμή και τη βάση για την έναρξη της παρούσας διατριβής. Την ευχαριστώ επίσης για την δυνατότητα που μου έδωσε να πραγματοποιήσω συμπληρωματικό μέρος των πειραμάτων στα εργαστήριά της στην Καλσρούη της Γερμανίας, παρέχοντας μου ένα ταξίδι γεμάτο επιστημονικές και όχι μόνο εμπειρίες. Ευχαριστώ τους τεχνικούς της εταιρείας *Lea Bonningtonn* και *Bernard Wuest* για την εκπαίδευση και την πολύτιμη βοήθειά τους σε τεχνικά θέματα που αφορούσαν τα παραπάνω αναλυτικά συστήματα.

Ευχαριστώ το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών για την οικονομική στήριξη με τη χορήγηση υποτροφίας κατά τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους δικούς μου ανθρώπους, την οικογενειά μου και τους φίλους μου για την αγάπη, τη στήριξη, τη συμπαράσταση, την υπομονή και τη δύναμη που άντλησα από εκείνους. Η εκπόνηση και ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την υποστήριξη και την αγάπη της οικογένειάς μου. Θα ήθελα να αφιερώσω την παρούσα εργασία στους γονείς μου, ως ελάχιστη ένδειξη ευγνωμοσύνης για όλα όσα μου έχουν προσφέρει...

Αριάδνη Βοναπάρτη
Αθήνα, 2011

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	1
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ - ΟΡΟΛΟΓΙΑ	3

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 – ΝΤΟΠΙΝΓΚ/ ΕΛΕΓΧΟΣ ΝΤΟΠΙΝΓΚ

1.1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ – ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ.....	7
1.2.	ΟΡΙΣΜΟΣ ΝΤΟΠΙΝΓΚ.....	10
1.3.	ΠΑΓΚΟΣΜΙΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΑΝΤΙ-ΝΤΟΠΙΝΓΚ.....	10
1.4.	ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΑΠΑΓΟΡΕΥΜΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ.....	11
1.4.1.	ΑΠΑΓΟΡΕΥΜΕΝΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΕ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΠΕΡΙΠΤΩΣΕΙΣ (ΕΝΤΟΣ ΚΑΙ ΕΚΤΟΣ ΑΓΩΝΩΝ).....	12
1.4.1.1.	Απαγορευμένες ουσίες.....	12
1.4.1.2.	Απαγορευμένες μέθοδοι.....	14
1.4.2.	ΑΠΑΓΟΡΕΥΜΕΝΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΟΝΟ ΕΝΤΟΣ ΑΓΩΝΩΝ.....	15
1.4.3.	ΑΠΑΓΟΡΕΥΜΕΝΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΣΕ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΑ ΑΘΛΗΜΑΤΑ.....	16
1.5.	ΕΛΕΓΧΟΣ ΝΤΟΠΙΝΓΚ.....	20
1.5.1.	ΕΙΔΗ ΕΛΕΓΧΟΥ ΝΤΟΠΙΝΓΚ.....	20
1.5.2.	ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΝΤΟΠΙΝΓΚ.....	20
1.5.3.	ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΣΑΡΩΣΗΣ.....	22
1.5.4.	ΕΛΑΧΙΣΤΟ ΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΟ ΟΡΙΟ ΑΠΟΔΟΣΗΣ.....	24
1.6.	ΝΤΟΠΙΝΓΚ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΝΤΟΠΙΝΓΚ ΣΕ ΑΛΟΓΑ.....	25
1.6.1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	25
1.6.2.	Η ΔΙΕΘΝΗΣ ΣΥΜΦΩΝΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ, ΤΙΣ ΙΠΠΟΔΡΟΜΙΕΣ ΚΑΙ ΤΑ ΣΤΟΙΧΗΜΑΤΑ – ΤΟ ΑΡΘΡΟ 6.....	26
1.6.3.	ΑΠΑΓΟΡΕΥΜΕΝΕΣ ΟΥΣΙΕΣ.....	27
1.6.4.	ΑΠΑΓΟΡΕΥΜΕΝΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΟΡΙΟΥ.....	31
1.6.5.	ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΝΤΟΠΙΝΓΚ.....	32

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 – ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ/ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ ΧΡΟΝΟΥ ΠΤΗΣΗΣ (LC/ΤΟF-MS)

2.1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ – ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ.....	33
2.2.	ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ ΧΡΟΝΟΥ ΠΤΗΣΗΣ.....	34
2.2.1.	ΑΡΧΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ.....	34
2.2.2.	ΣΥΝΤΟΜΟ ΙΣΤΟΡΙΚΟ.....	35
2.2.3.	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΤΟF-MS.....	35
2.2.4.	ΔΙΑΧΩΡΙΣΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΑΝΑΛΥΤΩΝ ΤΟF-MS.....	36

2.2.4.1.	Διαχωριστική ικανότητα.....	36
2.2.4.2.	Ευαισθησία.....	38
2.2.4.3.	Σχέση ευαισθησίας – διαχωριστικής ικανότητας.....	39
2.3.	ΑΝΑΛΥΤΕΣ ΤΟΦ ΟΡΘΟΓΩΝΙΑΣ ΕΠΙΤΑΧΥΝΣΗΣ.....	39
2.4.	ΑΝΑΚΛΑΣΤΙΚΟ ΚΑΤΟΠΤΡΟ.....	40
2.5.	ΑΝΙΧΝΕΥΤΕΣ ΙΟΝΤΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ ΨΗΦΙΟΠΟΙΗΣΗΣ.....	40
2.5.1.	ΑΝΙΧΝΕΥΤΕΣ ΙΟΝΤΩΝ.....	40
2.5.2.	ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ ΨΗΦΙΟΠΟΙΗΣΗΣ.....	43
2.6.	ΠΗΓΕΣ ΙΟΝΤΙΣΜΟΥ.....	44
2.7.	ΤΕΧΝΙΚΗ LC/ΤΟF-MS.....	47

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 - ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΔΡΟΦΙΛΩΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ (HYDROPHILIC INTERACTION LIQUID CHROMATOGRAPHY, HILIC)

3.1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	49
3.2.	ΛΟΓΟΙ ΕΠΙΛΟΓΗΣ ΤΗΣ HILIC.....	50
3.3.	ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΣΥΓΚΡΑΤΗΣΗΣ ΣΤΗ HILIC.....	51
3.4.	ΣΤΑΤΙΚΕΣ ΦΑΣΕΙΣ HILIC.....	52
3.4.1.	ΓΕΝΙΚΑ.....	52
3.4.2.	ΜΗ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΣΙΛΙΚΑ (UNDERIVATIZED SILICA).....	52
3.4.3.	ΣΙΛΙΚΑ ΜΕ ΠΡΟΠΥΛΑΜΙΝΟ-ΟΜΑΔΕΣ (AMINOPROPYL SILICA).....	53
3.4.4.	ΣΙΛΙΚΑ ΜΕ ΑΜΙΔΟ-ΟΜΑΔΕΣ (AMIDE SILICA).....	54
3.4.5.	ΣΙΛΙΚΑ ΜΕ ΣΥΝΔΕΔΕΜΕΝΕΣ ΟΜΑΔΕΣ ΠΟΛΥΣΟΥΕΙΝΙΜΙΔΙΟΥ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΟΥ (POLY(SUCCINIMIDE)-BONDED SILICA AND ITS DERIVATIVES).....	54
3.4.6.	ΣΙΛΙΚΑ ΜΕ ΟΜΑΔΕΣ ΔΙΟΛΗΣ (DIOL SILICA).....	54
3.4.7.	ΣΙΛΙΚΑ ΜΕ ΟΜΑΔΕΣ ΠΡΟΠΥΛΟΝΙΤΡΙΑΙΟΥ (CYANOPROPYL SILICA).....	56
3.4.8.	ΣΙΛΙΚΑ ΜΕ ΟΜΑΔΕΣ ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΗΣ (CYCLODEXTRIN-BASED SILICA).....	56
3.4.9.	ΣΙΛΙΚΑ ΜΕ ΟΜΑΔΕΣ ΣΟΥΛΦΟΑΛΚΥΛΟΒΕΤΑΙΝΗΣ (SULFOALKYLBETAINE SILICA).....	57
3.4.10.	ΑΛΛΕΣ ΣΤΑΤΙΚΕΣ ΦΑΣΕΙΣ.....	57
3.5.	Η ΚΙΝΗΤΗ ΦΑΣΗ ΣΤΗ HILIC.....	58
3.5.1.	ΓΕΝΙΚΑ.....	58
3.5.2.	ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ.....	58
3.5.3.	ΕΠΙΔΡΑΣΗ pH.....	59
3.6.	ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ HILIC.....	59

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 - ΒΑΣΙΚΗ ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ / ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

4.1	ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ.....	62
4.1.1.	ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ LC/MS, LC/MSMS.....	62

4.1.1.1.	Σύστημα LC/IT-MS.....	62
4.1.1.2.	Σύστημα LC/TOF-MS.....	63
4.1.1.3.	Σύστημα LC/QTOF-MS.....	63
4.1.2.	ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ LC/TOF-MS, LC/QTOF-MS.....	64
4.1.2.1.	Προετοιμασία υγροχρωματογραφικού συστήματος.....	64
4.1.2.2.	Προετοιμασία φασματομέτρου μαζών.....	65
4.2.	ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΣΥΣΚΕΥΕΣ.....	68
4.3.	ΥΛΙΚΑ.....	69
4.4.	ΔΙΑΛΥΤΕΣ – ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ-ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ.....	70
4.4.1.	ΔΙΑΛΥΤΕΣ.....	70
4.4.2.	ΑΝΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ.....	70
4.4.3.	ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ.....	74

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 –ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΑΡΩΣΗΣ LC/TOF-MS ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΠΑΓΟΡΕΥΜΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΕ ΟΥΡΑ ΑΘΛΗΤΩΝ

5.1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ – ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	76
5.2.	ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΕΞΕΤΑΣΤΗΚΑΝ.....	80
5.3.	ΥΛΙΚΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ (REFERENCE MATERIAL).....	80
5.3.1.	ΠΡΟΤΥΠΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ.....	81
5.3.2.	ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ.....	81
5.4.	ΠΡΟΤΥΠΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΠΑΡΑΚΑΤΑΘΗΚΗΣ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	81
5.4.1.	ΠΡΟΤΥΠΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΠΑΡΑΚΑΤΑΘΗΚΗΣ.....	81
5.4.2.	ΠΡΟΤΥΠΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	82
5.5.	ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ LC/QTOF-MS.....	82
5.5.1.	ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ.....	82
5.5.2.	ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΟΥ ΜΑΖΩΝ.....	83
5.6.	ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ-ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ.....	83
5.7.	ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΕΝΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΥΡΩΝ.....	85
5.7.1.	ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΥΡΩΝ.....	85
5.7.2.	ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΕΝΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΥΡΩΝ – ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ.....	88
5.8.	ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΑΡΩΣΗΣ LC/QTOF-MS ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΠΑΓΟΡΕΥΜΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΕ ΟΥΡΑ ΑΘΛΗΤΩΝ.....	89
5.8.1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	89
5.8.2.	ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ – ΟΡΙΟ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ (LOD)..89	
5.8.3.	ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑΣ (SPECIFICITY)- ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΕΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ (MATRIX INTERFERENCE).....	90
5.8.4.	ΑΝΑΚΤΗΣΗ (EXTRACTIION RECOVERY).....	90
5.8.5.	ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ (MATRIX EFFECT).....	91

5.8.6.	ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ.....	91
5.8.7.	ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ/ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΛΟΓΟΥ m/z	92
5.8.7.	ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗΣ (CARRY OVER).....	92
5.8.9.	ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	92
5.9.	ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΠΡΟΤΕΙΝΟΜΕΝΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΑΡΩΣΗΣ LC/QTOF-MS ΣΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	93
5.10.	ΑΝΑΔΡΟΜΙΚΗ ΕΠΑΝΕΞΕΤΑΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ (RETROSPECTIVE ANALYSIS).....	94
5.11.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	95
5.12	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	115

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΑΠΕΥΘΕΙΑΣ ΕΓΧΥΣΗΣ (DIRECT INJECTION) ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΚΑΙ ΤΗΝ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ (ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ) ΟΥΣΙΩΝ ΟΡΙΟΥ ΣΕ ΟΥΡΑ ΑΛΟΓΩΝ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 –ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ (ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ) ΤΗΣ ΥΔΡΟΚΟΡΤΙΖΟΝΗΣ ΣΕ ΟΥΡΑ ΑΛΟΓΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΔΥΟ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ LC/MS

6.1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ-ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	118
6.2.	ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ.....	121
6.3.	ΕΠΙΛΟΓΗ/ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ LC/MS.....	121
6.3.1.	ΜΕΘΟΔΟΣ LC/IT-MS.....	121
	Υγροχρωματογραφικές συνθήκες.....	121
	Επιλογή-βελτιστοποίηση συνθηκών λειτουργίας φασματομέτρου μαζών LC/IT-MS.....	122
6.3.2.	ΜΕΘΟΔΟΣ LC/TOF-MS.....	126
	Υγροχρωματογραφικές συνθήκες.....	126
	Επιλογή-βελτιστοποίηση συνθηκών λειτουργίας φασματομέτρου μαζών LC/TOF-MS.....	126
6.4.	ΠΡΟΤΥΠΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΠΑΡΑΚΑΤΑΘΗΚΗΣ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	128
6.5.	ΠΡΟΤΥΠΑ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΕΝΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΟΥΡΩΝ.....	129
6.6	ΠΟΡΕΙΑ ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΥΡΩΝ.....	129
6.7.	ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΜΗΤΡΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ – ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ.....	129
6.8.	ΤΕΧΝΙΚΗ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΓΝΩΣΤΩΝ ΠΟΣΟΤΗΤΩΝ – ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ.....	131
6.9.	ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΚΟΡΤΙΖΟΛΗΣ ΣΕ ΟΥΡΑ ΑΛΟΓΩΝ.....	134
6.9.1.	ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΓΝΩΣΤΩΝ ΠΟΣΟΤΗΤΩΝ – ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	134
6.9.2.	ΟΡΘΟΤΗΤΑ.....	134
6.9.3.	ΕΝΤΟΣ ΤΗΣ ΗΜΕΡΑΣ ΠΙΣΤΟΤΗΤΑ.....	135
6.9.4.	ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΗΜΕΡΩΝ ΠΙΣΤΟΤΗΤΑ.....	136
6.9.5.	ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ.....	138

6.9.6.	ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ.....	138
6.9.7.	ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗΣ ΕΚ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ.....	138
6.10.	ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΚΟΡΤΙΖΟΛΗΣ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΟΥΡΩΝ ΑΛΟΓΩΝ (CONFIRMATION, IDENTIFICATION).....	139
6.11.	ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΕ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟ ΔΕΙΓΜΑ.....	140
6.12.	ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ LC/IT-MS ΚΑΙ LC/TOF-MS.....	142
6.13.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	143

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 –ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ (ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ) ΤΗΣ ΘΕΟΒΡΩΜΙΝΗΣ ΣΕ ΟΥΡΑ ΑΛΟΓΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΔΥΟ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ LC/MS

7.1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ-ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	144
7.2.	ΕΣΩΤΕΡΙΚΟ ΠΡΟΤΥΠΟ.....	147
7.3.	ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ.....	147
7.4.	ΕΠΙΛΟΓΗ-ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ LC/MS.....	148
7.4.1.	ΜΕΘΟΔΟΣ LC/IT-MS.....	148
	Υδροχρωματογραφικές συνθήκες.....	148
	Επιλογή-βελτιστοποίηση συνθηκών λειτουργίας φασματομέτρου LC/IT-MS.....	149
7.4.2.	ΜΕΘΟΔΟΣ LC/TOF-MS.....	153
	Υδροχρωματογραφικές συνθήκες.....	153
	Επιλογή-βελτιστοποίηση συνθηκών λειτουργίας φασματομέτρου LC/TOF-MS.....	154
7.5.	ΠΡΟΤΥΠΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΠΑΡΑΚΑΤΑΘΗΚΗΣ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	157
7.6.	ΠΡΟΤΥΠΑ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΕΝΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΟΥΡΩΝ.....	157
7.7.	ΠΟΡΕΙΑ ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΥΡΩΝ.....	158
7.8.	ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑΣ-ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ.....	158
7.9.	ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΚΟΡΤΙΖΟΛΗΣ ΣΕ ΟΥΡΑ ΑΛΟΓΩΝ.....	165
7.9.1.	ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΓΝΩΣΤΩΝ ΠΟΣΟΤΗΤΩΝ – ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	165
7.9.2.	ΟΡΘΟΤΗΤΑ.....	165
7.9.3.	ΕΝΤΟΣ ΤΗΣ ΗΜΕΡΑΣ ΠΙΣΤΟΤΗΤΑ.....	166
7.9.4.	ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΗΜΕΡΩΝ ΠΙΣΤΟΤΗΤΑ.....	166
7.9.5.	ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ.....	168
7.9.6.	ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ.....	168
7.9.7.	ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗΣ ΕΚ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ.....	168
7.10.	ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΘΕΟΒΡΩΜΙΝΗΣ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΟΥΡΩΝ ΑΛΟΓΩΝ.....	169
7.11.	ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΕ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ.....	169
7.12.	ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ LC/IT-MS ΚΑΙ LC/TOF-MS.....	171
7.13.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	172

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8 -ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ Κ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ (ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ) ΣΑΛΙΚΥΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΕ ΟΥΡΑ ΑΛΟΓΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ LC/QTOF –MS

8.1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ-ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	173
8.2.	ΕΣΩΤΕΡΙΚΟ ΠΡΟΤΥΠΟ.....	178
8.3.	ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ.....	178
8.4.	ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ LC/QTOF-MS.....	178
8.4.1.	ΕΠΙΛΟΓΗ-ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΟΥ ΜΑΖΩΝ.....	178
8.4.2.	ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ.....	181
8.5.	ΠΡΟΤΥΠΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΠΑΡΑΚΑΤΑΘΗΚΗΣ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	182
8.6.	ΠΟΡΕΙΑ ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΥΡΩΝ.....	182
8.7.	ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΕΝΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΥΡΩΝ.....	184
8.8	ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΣΑΛΙΚΥΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΕ ΟΥΡΑ ΑΛΟΓΩΝ.....	185
8.8.1.	ΕΛΕΓΧΟΣ ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑΣ – ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ.....	185
8.8.1.1.	Θεωρητικό υπόβαθρο.....	185
8.8.1.2.	Έλεγχος ομοσκεδαστικότητας.....	186
8.8.1.3.	Εφαρμογή ζυγισμένης γραμμικής ανάλυσης παλινδρόμησης –Επιλογή βέλτιστου παράγοντα ζύγισης.....	188
8.8.1.4.	Έλεγχος γραμμικότητας μεθόδου.....	191
8.8.2.	ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ.....	195
8.8.3.	ΕΛΕΓΧΟΣ ΟΡΘΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΠΙΣΤΟΤΗΤΑΣ.....	198
8.8.3.1.	Ορθότητα.....	198
8.8.3.2.	Πιστότητα.....	200
8.8.4.	ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ.....	204
8.8.5.	ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ-ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΕΙΣ ΑΠΟ ΤΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ.....	204
8.8.6	ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗΣ ΕΚ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ.....	204
8.9.	ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΣΑΛΙΚΥΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΟΥΡΩΝ ΑΛΟΓΩΝ.....	205
8.10.	ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΕ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ.....	205
8.11.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	206

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9 -ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ Κ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ (ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ) 3-ΜΕΘΟΞΥΤΥΡΑΜΙΝΗΣ ΣΕ ΟΥΡΑ ΑΛΟΓΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ LC/QTOF –MS

9.1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ-ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	208
9.2.	ΕΣΩΤΕΡΙΚΟ ΠΡΟΤΥΠΟ.....	212
9.3.	ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ.....	212
9.4.	ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ LC/QTOF-MS.....	212
9.4.1.	ΕΠΙΛΟΓΗ-ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΟΥ ΜΑΖΩΝ.....	212

9.4.2.	ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ.....	218
9.5.	ΠΡΟΤΥΠΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΠΑΡΑΚΑΤΑΘΗΚΗΣ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	220
9.6.	ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΕΝΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΥΡΩΝ.....	220
9.7.	ΠΟΡΕΙΑ ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΥΡΩΝ.....	221
9.8.	ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ.....	222
9.9	ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ 3-ΜΕΘΟΕΥΤΥΡΑΜΙΝΗΣ ΣΕ ΟΥΡΑ ΑΛΟΓΩΝ.....	226
9.9.1	ΕΛΕΓΧΟΣ ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑΣ-ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ.....	226
9.9.2.	ΕΛΕΓΧΟΣ ΟΡΘΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΠΙΣΤΟΤΗΤΑΣ.....	230
9.9.2.1.	Ορθότητα.....	230
9.9.2.2.	Πιστότητα.....	232
9.9.3.	ΌΡΙΟ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ.....	236
9.9.4.	ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ.....	236
9.9.5.	ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ-ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΕΙΣ ΑΠΟ ΤΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ.....	236
9.10.	ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ 3-ΜΕΘΟΕΥΤΥΡΑΜΙΝΗ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΟΥΡΩΝ ΑΛΟΓΩΝ.....	237
9.11.	ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΕ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ.....	238
9.12	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	240

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

P1.	Μέθοδος σάρωσης με απαγορευμένων ουσιών με LC/TOF-MS: Ουσίες που μελετήθηκαν.....	242
P2.	Μέθοδος σάρωσης LC/TOF-MS: Δεδομένα προέλευσης και καθαρότητας ουσιών αναφοράς.....	256
P3.	Μέθοδος σάρωσης LC/TOF-MS: Πρότυπα διαλύματα παρακαταθήκης και εργασίας αναλυτών.....	259
P4.	Μέθοδος σάρωσης LC/TOF-MS: Χρόνοι ανάλυσης και ιόντα αναλυτών σε πρότυπα διαλύματα.....	262
P5.	Μέθοδος σάρωσης LC/TOF-MS: Πορεία παρασκευής εμβολιασμένων δειγμάτων ούρων για τη μελέτη ικανότητας ανίχνευσης των αναλυτών και τον προσδιορισμό του ορίου ανίχνευσης.....	271
P6.	Αξιολόγηση μεθόδου σάρωσης LC/TOF-MS: Αποτελέσματα Επαναληψιμότητας, Ορίου Ανίχνευσης & Ακρίβειας μέτρησης λόγου m/z.....	272
P7.	Μεθόδος σάρωσης LC/TOF-MS: επιβεβαιωτική LC/QTOF-MS/MS επανάλυση δειγμάτων ύποπτων δειγμάτων για την ουσία methyltrienolone.....	278
P8.	Μέθοδος σάρωσης LC/TOF-MS: Ανάλυση μεταβολικών δειγμάτων.....	279
P9.	Μέθοδος σάρωσης LC/TOF-MS: Ιοντικά χρωματογραφήματα αναλυτών σε εμβολιασμένα δείγματα ούρων και μεταβολικά δείγματα.....	283
P10.	Μέθοδος Σάρωσης LC/TOF-MS: έλεγχος ειδικότητας - παράδειγμα εκτύπωσης δειγμάτων ρουτίνας αθλητών για την ουσία 16-Hydroxystanozolol.....	293

P11.	Μέθοδος Σάρωσης LC/TOF-MS: ανάλυση πραγματικών θετικών δειγμάτων.....	294
P12.	Αξιολόγηση Μεθόδου Ποσοτικού Προσδιορισμού της Κορτιζόλης σε Ούρα Αλόγων – Καμπύλες Προσθήκης Γνωστών Ποσοτήτων.....	297
P13.	Έλεγχος ειδικότητας μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού κορτιζόλης σε ούρα αλόγων: Εξεταζόμενες Ουσίες.....	298
P14.	Αξιολόγηση Μεθόδου Ποσοτικού Προσδιορισμού της Θεοβρωμίνης σε Ούρα Αλόγων – Καμπύλες Προσθήκης Γνωστών Ποσοτήτων.....	300
P15.	Αξιολόγηση μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού θεοβρωμίνης σε ούρα αλόγων – χρωματογραφικά χαρακτηριστικά (S/N) στο κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης.....	301
P16.	Αξιολόγηση μεθόδου LC/Ion Trap-MS για την ταυτοποίηση (επιβεβαίωση) της θεοβρωμίνης σε ούρα αλόγων.....	302
P17.	Αξιολόγηση μεθόδου LC/TOF-MS για την ταυτοποίηση (επιβεβαίωση) της θεοβρωμίνης σε ούρα αλόγων.....	303
P18.	Ποσοτικός προσδιορισμός σαλικυλικού οξέος σε ούρα αλόγων με LC/QTOF-MS: πρότυπα διαλύματα παρακαταθήκης και εργασίας.....	304
P19.	Ποσοτικός προσδιορισμός σαλικυλικού οξέος σε ούρα αλόγων με LC/QTOF-MS: παρασκευή προτύπων εμβολιασμένων δειγμάτων καμπύλης αναφοράς και δειγμάτων ελέγχου.....	305
P20.	Ποσοτικός προσδιορισμός σαλικυλικού οξέος σε ούρα αλόγων με LC/QTOF-MS: Πειραματικά αποτελέσματα καμπυλών αναφοράς.....	306
P21.	Ποσοτικός προσδιορισμός σαλικυλικού οξέος σε ούρα αλόγων με LC/QTOF-MS: Έλεγχος ορθότητας και πιστότητας: πειραματικά υπολογιζόμενες συγκεντρώσεις εμβολιασμένων δειγμάτων ελέγχου (quality control samples, QC's).....	308
P22.	Αξιολόγηση μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού σαλικυλικού οξέος σε ούρα αλόγων με LC/QTOF-MS: χρωματογραφικά χαρακτηριστικά (S/N) στο κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης.....	311
P23.	Έλεγχος ειδικότητας μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού σαλικυλικού σε ούρα αλόγων - Ουσίες που μελετήθηκαν.....	312
P24.	Αξιολόγηση μεθόδου LC/QTOF-MS για την ταυτοποίηση (επιβεβαίωση) του σαλικυλικού οξέος σε ούρα αλόγων.....	314
P25.	Ποσοτικός προσδιορισμός 3-Μεθοξυτυραμίνης σε Ούρα Αλόγων με HILIC/QTOF-MS: Πρότυπα Διαλύματα Παρακαταθήκης και Εργασίας.....	315
P26.	Ποσοτικός προσδιορισμός 3-Μεθοξυτυραμίνης σε Ούρα Αλόγων με HILIC/QTOF-MS: Παρασκευή προτύπων δειγμάτων καμπύλης αναφοράς και δειγμάτων ελέγχου.....	316
P27.	Αξιολόγηση μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού 3-μεθοξυτυραμίνης σε ούρα αλόγων με HILIC/QTOF-MS: Αποτελέσματα καμπυλών αναφοράς.....	317
P28.	Αξιολόγηση μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού 3-μεθοξυτυραμίνης σε ούρα αλόγων με HILIC/QTOF-MS - Έλεγχος ορθότητας και πιστότητας: πειραματικά υπολογιζόμενες συγκεντρώσεις εμβολιασμένων δειγμάτων ελέγχου (quality control samples, QC's).....	319

Π29. Αξιολόγηση μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού 3-μεθοξυτυραμίνης σε ούρα αλόγων με HILIC/QTOF-MS: Έλεγχος ειδικότητας-πρεμποδίσεων από το υπόστρωμα.....321

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....322

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....336

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ.....339

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....343

SUMMARY.....346

Σκοπός της εργασίας

Ο έλεγχος ντόπινγκ αθλητών και αλόγων στηρίζεται στην ανάλυση δειγμάτων ούρων (και σε κάποιες περιπτώσεις αίματος) για την ανίχνευση, την ταυτοποίηση και σε ορισμένες περιπτώσεις τον ποσοτικό προσδιορισμό απαγορευμένων ουσιών. Η συνδυασμένη τεχνική της υγροχρωματογραφίας με τη φασματομετρία μαζών αποτελεί τα τελευταία χρόνια βασικό εργαλείο για τα διαπιστευμένα εργαστήρια που διενεργούν τους ελέγχους προσφέροντας πλεονεκτήματα όπως η υψηλή ευαισθησία και εκλεκτικότητα, η ταχύτητα και απλότητα των αναλύσεων. Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η ανάπτυξη και αξιολόγηση νέων βελτιωμένων αναλυτικών μεθόδων ανίχνευσης και προσδιορισμού απαγορευμένων ουσιών σε ούρα αθλητών και αλόγων με την τεχνική αυτή χρησιμοποιώντας σύστημα φασματομετρίας μαζών με αναλυτή χρόνου πτήσης. Η συγκεκριμένη τεχνολογία χαρακτηρίζεται από υψηλή διαχωριστική ικανότητα και μεγάλη ακρίβεια στη μέτρηση του λόγου μάζα προς φορτίο των σχηματιζόμενων ιόντων και χρησιμοποιείται ολοένα και περισσότερο για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση φαρμακευτικών και όχι μόνο μορίων και για την ταυτοποίηση της δομής άγνωστων ουσιών και βιομορίων.

Το πρώτο μέρος της διατριβής αυτής εστιάζεται στην εφαρμογή της τεχνολογίας LC/TOF-MS στον έλεγχο σάρωσης απαγορευμένων ουσιών σε ούρα αθλητών. Λαμβάνοντας υπόψη τη δυνατότητα της συνεχούς λήψης φασμάτων σάρωσης σε μεγάλο εύρος τιμών λόγου μάζας προς φορτίο από το παραπάνω αναλυτικό σύστημα, γίνεται προσπάθεια ανάπτυξης ενός διευρυμένου αναλυτικού πρωτοκόλλου για την ανίχνευση μεγάλου αριθμού χαμηλού μοριακού βάρους ενώσεων από όλες τις κατηγορίες απαγορευμένων ουσιών. Στόχο αποτελεί η ενοποίηση των διαφορετικών αναλυτικών διαδικασιών σάρωσης που εφαρμόζονται από το εργαστήριο σε ένα αναλυτικό πρωτόκολλο γεγονός που θα συμβάλλει σημαντικά στη μείωση του χρόνου και του κόστους των αναλύσεων. Η ανάπτυξη ενός τέτοιου πρωτοκόλλου έχει ως στόχο την ικανοποιητική ανίχνευση όχι μόνο των ήδη γνωστών απαγορευμένων ουσιών που συμπεριλαμβάνονταν στη λίστα του WADA που τέθηκε σε ισχύ για το έτος 2010, αλλά και σε μελλοντική αναδρομική ανίχνευση άγνωστων μέχρι στιγμής ουσιών.

Το δεύτερο μέρος της διατριβής αναφέρεται στην ανάπτυξη και αξιολόγηση αναλυτικών μεθόδων LC/MS για τον ποσοτικό προσδιορισμό ουσιών ορίου σε ούρα αλόγων δηλαδή ουσιών των οποίων η ανίχνευση σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από τα ισχύοντα όρια θα πρέπει να αναφέρεται στις αρχές ως παραβίαση ντόπινγκ. Οι προς ανάλυση ουσίες είναι η υδροκορτιζόνη, κορτικοστεροειδές που αποτελεί ταυτόχρονα και ενδογενή ουσία για τα άλογα, η θεοβρωμίνη, το σαλικυλικό οξύ και η 3-μεθοξυτυραμίνη. Κοινή προσέγγιση στην ανάπτυξη των μεθόδων για την ποσοτική ανάλυση των παραπάνω ουσιών αποτελεί η εφαρμογή της απλούστερης δυνατής πορείας προκατεργασίας των δειγμάτων ούρων που θα βασίζεται στην αραίωση και στην απευθείας έγχυση και ανάλυσή τους από το σύστημα LC/MS. Λόγω της πολύπλοκης σύστασης του υποστρώματος των ούρων στα άλογα καθίσταται μέγιστης σημασίας η μελέτη της επίδρασης του μητρικού υλικού στην απόκριση των αναλυτών και η επιλογή της κατάλληλης μεθοδολογίας που θα διασφαλίσει την

εξαγωγή αξιόπιστων αποτελεσμάτων ποσοτικοποίησης. Στόχο αποτελεί επιπλέον οι αναπτυχθείσες μέθοδοι να επιτρέπουν επιπρόσθετα και την ταυτοποίηση (επιβεβαίωση) των απαγορευμένων ουσιών με το ίδιο αναλυτικό πρωτόκολλο και εφόσον είναι εφικτό στην ίδια ανάλυση με την ποσοτικοποίηση. Η αξιολόγηση και επικύρωση των μεθόδων βάσει διεθνών επίσημων οδηγιών θα διασφαλίσει την αξιοπιστία τους για την εφαρμογή τους στον έλεγχο ντόπινγκ και θα ακολουθήσει η εφαρμογή των μεθόδων για τον προσδιορισμό των προαναφερθέντων ουσιών σε δείγματα ούρων αγωνιζόμενων αλόγων.

Συντμήσεις - Ορολογία

- AAS (Anabolic Androgenic Steroids): Αναβολικά ανδρογόνα στεροειδή (ΑΑΣ)
- ACN (Acetonitrile): Ακετονιτρίλιο
- ADC (Analogue to Digital Converter): Αναλογοψηφιακός μετατροπέας
- AORC (Association of Official Racing Chemists): Ομοσπονδία χημικών επίσημων αγώνων
- APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization): Χημικός ιοντισμός σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης
- API (Atmospheric Pressure Ionization): Ιοντισμός σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης
- APPI (Atmospheric Pressure Photoionization): Ιοντισμός με δέσμη φωτονίων σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης
- ARCI (Association of Racing Commissioners International): Διεθνής σύνδεσμος επιτρόπων ιπποδρομιών
- BSTFA (N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide): N,O-δισ(τριμεθυλοσιλυλο)τριφθοροακεταμίδιο
- CE (Capillary Electrophoresis): Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση
- CE (Collision Energy): Ενέργεια θραυσματοποίησης
- CG (Chorionic Gonadotropin): Χοριακή γοναδοτροπίνη
- CDS (Calibrant Delivery System): Σύστημα παροχής διαλύματος βαθμονόμησης
- COMT (Catechol-O-Methyl-Transferase): κατεχολο-O-μεθυλοτρανσφεράση
- COX (Cyclooxygenase): Κυκλοξυγενάση
- DMSO (Dimethyl sulfoxide): Διμεθυλοσουλφοξείδιο
- DOPAC (3,4-dihydroxyphenylacetic acid): 3,4-διυδροξυφαινυλο-οξικό οξύ
- DTE (Dithioerythritol): Διθειοερυθριτόλη
- % E (% Extraction Recovery): Εκατοστιαία ανάκτηση
- % E_r (% Relative Error): Επί τοις εκατό σχετικό αναλυτικό σφάλμα
- EI (Electron Ionization): Ιοντισμός με πρόσκρουση ηλεκτρονίων
- ESI (Electrospray Ionization): Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό
- EPO (Erythropoietin): Ερυθροποιητίνη
- FEI (Federation Equestrian International): Παγκόσμια ομοσπονδία ιπποδρομιών
- FIA (Flow Injection Analysis): Ανάλυση με απευθείας έγχυση στο φασματόμετρο μαζών
- FWHM (Full Width Half Maximum): Πλάτος φασματικής κορυφής στο μισό του ύψους της
- GC (Gas Chromatography): Αεριοχρωματογραφία
- GC/MS (Gas Chromatography/Mass Spectrometry): Αεριοχρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μαζών
- GH (Growth Hormone): Αυξητική ορμόνη
- HDL (High-Density Lipoprotein): Υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη
- HILIC (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography): Χρωματογραφία υδρόφιλων αλληλεπιδράσεων

- HPLC (High Performance Liquid Chromatography): Υψηλής απόδοσης υγροχρωματογραφία
- HRMS (High Resolution Mass Spectrometry): Φασματομετρία μαζών υψηλής διαχωριστικής ικανότητας
- HVA (Homovallinic acid): Ομοβαλλινικό οξύ, 3-μεθοξυ-4-υδροξυ-φαινυλο-οξικό οξύ
- IAAF (International Amateur Athletic Federation): Διεθνής ομοσπονδία ερασιτεχνικού αθλητισμού
- IFHA (International Federation of Horseracing Authorities): Παγκόσμια ομοσπονδία αρχών ιπποδρομιών
- IGF (Insulin-like Growth Factor): Ινσουλινόμορφος αυξητικός παράγοντας
- ILAC (International Laboratory Accreditation Cooperation): Διεθνής συνεργασία διαπίστευσης εργαστηρίων
- IOC (International Olympic Committee): Διεθνής ολυμπιακή επιτροπή (ΔΟΕ)
- IRMS (Isotope-Ratio Mass Spectrometry): Φασματομετρία μαζών λόγου ισοτόπων
- IS (International Standard): Διεθνές πρότυπο
- ISTD (Internal Standard): Εσωτερικό πρότυπο
- ISL (International Standard for Laboratories): Διεθνές πρότυπο για τα εργαστήρια
- IT-MS (Ion Trap- Mass Spectrometry): Φασματομετρία μαζών με αναλυτή μαζών παγίδας ιόντων
- LC (Liquid Chromatography): Υγροχρωματογραφία
- LC/MS (Liquid Chromatography/ Mass Spectrometry) Υγροχρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μαζών
- LDL (Low-Density Lipoprotein): Χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη
- LH (Luteinizing Hormone): Ωχρινοτρόπος ορμόνη
- LLE (Liquid Liquid Extraction): Υγρό υγρό εκχύλιση
- LLOQ (Lowest Limit Of Quantification): Κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης
- LOD (Limit Of Detection): Όριο ανίχνευσης
- LOQ (Limit Of Quantification): Όριο ποσοτικοποίησης
- m/z (mass to charge ratio): Λόγος μάζας προς φορτίο
- 3-MT (3-Methoxytyramine): 3-Μεθοξυτυραμίνη
- MALDI (Matrix-assisted laser desorption ionization): Ιοντισμός εκρόφησης με laser υποβοηθούμενος από το μητρικό υλικό
- MAO (Mono Amino Oxidase): Μονοαμινο-οξειδάση
- MBTFA (N-Methyl-bis(trifluoroacetamide)): N-μεθυλο-δισ(τριφθοροακεταμίδιο)
- MCP (Multi Channel Plate): Ανιχνευτής πλακών πολλαπλής διέλευσης
- MDA (Methylenedioxyamphetamine): Μεθυλενοδιοξαμφεταμίνη
- MDMA (Methylenedioxyamphetamine): Μεθυλενοδιοξυμεθαμφεταμίνη
- MeOH (Methanol): Μεθανόλη
- % MF (% Matrix Factor): Εκατοστιαίος παράγοντας υποστρώματος
- MRM (Multiple Reaction Monitoring): Παρακολούθηση πολλαπλών προεπιλεγμένων ιόντων
- MRPL (Minimum Required Performance Level): Ελάχιστο απαιτούμενο όριο απόδοσης
- MS (Mass Spectrometry): Φασματομετρία μαζών
- MSMS (Tandem Mass Spectrometry): Δίδυμη φασματομετρία μαζών

- MSTFA (N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide): N-μεθυλο-N-(τριμεθυλοσιλυλο)τριφθοροακεταμίδιο
- MT (Metabolite): Μεταβολίτης
- NPD (Nitrogen Phosphorus Detector): Ανιχνευτής αζώτου φωσφόρου
- NP-HPLC (Normal Phase High Performance Liquid Chromatography): Κανονικής φάσεως υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης
- NSAID (Non-steroidal anti-inflammatory drugs): Μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (ΜΣΑΦ)
- oa-TOF-MS (Orthogonal acceleration time of flight): ορθογώνιας επιτάχυνσης αναλυτής χρόνου πτήσης
- PIS (Product Ion Scan): Σάρωση θυγατρικών ιόντων
- PSP (Paralytic Shellfish Poisoning): Παραλυτική δηλητηρίαση από μαλάκια
- 3-PX (3-Propylxanthine): 3-Προπυλοξανθίνη
- QC (Quality Control): Πρότυπο δείγμα ελέγχου ποιότητας
- QTOF/MS (Quadrupole Time Of Flight Mass Spectrometry): Φασματομετρία μαζών με τετραπολικό αναλυτή μαζών συζευγμένο με αναλυτή χρόνου πτήσης
- R (Resolution): Διαχωριστική ικανότητα
- RP-HPLC (Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography): Αντιστρόφου φάσεως υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης
- RP-SPE (Reversed Phase Solid Phase Extraction): Αντιστρόφου φάσεως εκχύλιση στερεάς φάσης
- RRT (Relative Retention Time): Σχετικός χρόνος ανάσχεσης
- % RSD (% Relative Standard Deviation): Επί τοις εκατό σχετική τυπική απόκλιση
- RT (Retention Time): Χρόνος συγκράτησης, χρόνος ανάσχεσης
- SARM (Selective Androgen Receptor Modulator): Εκλεκτικός τροποποιητής του υποδοχέα των ανδρογόνων
- SD (Standard Deviation): Τυπική απόκλιση
- SERM (Selective Estrogen Receptor Modulator): Εκλεκτικός τροποποιητής του υποδοχέα των οιστρογόνων
- SG (Specific Gravity): Ειδικό βάρος
- SIL-ISTD (Stable Isotopic Labeled Internal Standard): Σταθερά ισοτοπικά επισημασμένο εσωτερικό πρότυπο
- SIM (Selected Ion Monitoring): Παρακολούθηση προεπιλεγμένου ιόντος
- S/N (Signal to Noise Ratio): Λόγος σήμα προς θόρυβο
- SPE (Solid Phase Extraction): Εκχύλιση στερεάς φάσης
- SS (Sum of Squares): Άθροισμα τετραγώνων
- STD (Standard): Πρότυπο δείγμα καμπύλης αναφοράς
- TD (Technical Document): Τεχνικό έγγραφο
- TDC (Time to Digital Converter): Χρονοψηφιακός μετατροπέας
- T/E (Testosterone/Epitestosterone): Λόγος συγκεντρώσεων τεστοστερόνης προς επιτεστοστερόνη
- THG (Tetrahydrogestrinone): Τετραϋδρογεστρινόνη
- TLC (Thin Layer Chromatography): Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας
- TOF (Time Of Flight): Χρόνος πτήσης

- TOF/MS (Time Of Flight Mass Spectrometry): Φασματομετρία μαζών με αναλυτή χρόνου πτήσης
- TUE (Therapeutic Use Exemption): Εξαίρεση χρήσης απαγορευμένης ουσίας για θεραπευτικούς σκοπούς
- UHPLC (Ultra High Performance Liquid Chromatography): Υγροχρωματογραφία υπερυψηλής απόδοσης
- ULOQ (Upper Limit Of Quantification): Ανώτερο όριο ποσοτικοποίησης
- USADA (United States Anti-Doping Agency): Οργανισμός αντι-ντόπινγκ Ηνωμένων Πολιτειών
- WAADS (World Association of Anti-Doping Scientists): Παγκόσμια ένωση επιστημόνων αντι-ντόπινγκ
- WADA (World Anti-Doping Agency): Παγκόσμιος οργανισμός αντι-ντόπινγκ
- ΔΠ: Διάλυμα παρακαταθήκης
- ΔΕ: Διάλυμα εργασίας
- ΕΣΚΑΝ: Εθνικό συμβούλιο καταπολέμησης ντόπινγκ
- ΕΣΥΔ: Εθνικό συμβούλιο διαπίστευσης
- ΚΝΣ: Κεντρικό Νευρικό Σύστημα
- ΟΑΚΑ: Ολυμπιακό Αθλητικό Κέντρο Αθηνών

Θεωρητικό

Μέρος

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΝΤΟΠΙΝΓΚ – ΕΛΕΓΧΟΣ ΝΤΟΠΙΝΓΚ

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ – ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ ¹⁻¹⁰

Το ντόπινγκ αποτελεί σήμερα μια παγκόσμια πραγματικότητα, ένα σοβαρό και αδιαφιλονίκητο πρόβλημα στο διεθνή αθλητικό χώρο. Ένα πρόβλημα που απασχολεί κάθε αθλητική εκδήλωση, που τροφοδοτεί την αμφιβολία και την αμφισβήτηση και τείνει να μειώσει την αξία της προσπάθειας. Στοχεύοντας στην τεχνητή βελτίωση των επιδόσεων, το ντόπινγκ αντιτίθεται στις δύο βασικές αρχές του αθλητισμού, την ενθάρρυνση του δίκαιου και επί ίσοις όροις ανταγωνισμού («ευ αγωνίζεσθαι»), όπως και στην αρχή ότι η αθλητική δραστηριότητα προάγει την υγεία («νους υγιής εν σώματι υγιή»), αφού πολλές από τις λαμβανόμενες ουσίες μπορούν να αποβούν εξαιρετικά επικίνδυνες για την υγεία του αθλητή όταν λαμβάνονται για άλλους σκοπούς εκτός από ιατρικούς.

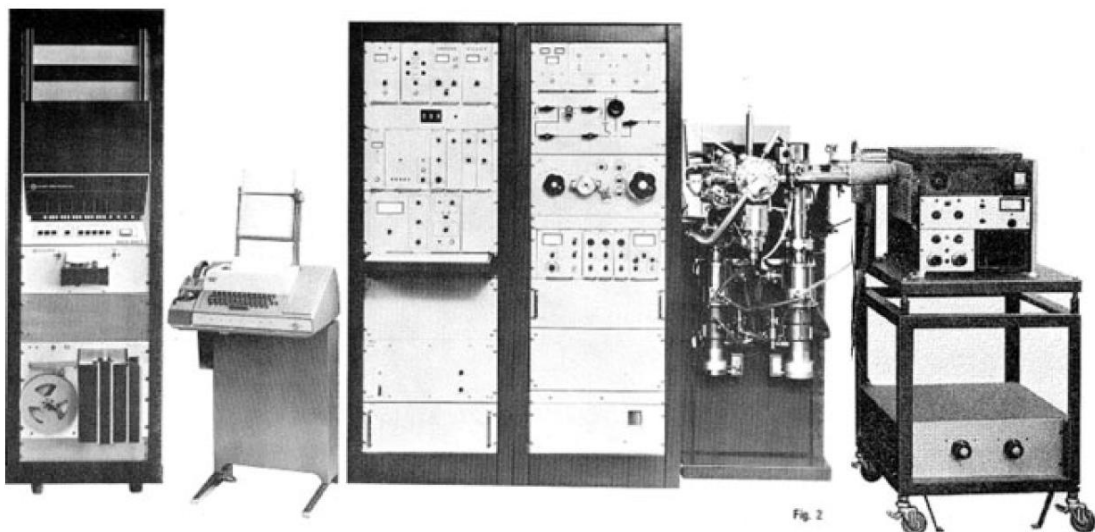
Το ντόπινγκ δεν αποτελεί φαινόμενο της σύγχρονης κοινωνίας. Από τότε που εισήχθη η έννοια του ανταγωνισμού στον αθλητισμό αναζητούνται τρόποι για την τεχνητή βελτίωση των ικανοτήτων και την υπερνίκηση των ορίων της φύσης. Τον 6^ο π.Χ. αιώνα οι αθλητές προσπαθούσαν να αυξήσουν τη δύναμή τους αναμιγνύοντας στη διατροφή τους διαφορετικά είδη κρέατος, ενώ ο Φιλόστρατος και ο Γαληνός αναφέρουν το 2^ο π.Χ. αιώνα την κατανάλωση ουσιών για το σκοπό αυτό και ο Πλίνιος (1^{ος} μ.Χ. αιώνα) αναφέρει την κατανάλωση του φυτού ίππουρις από δρομείς για την αύξηση της μυϊκής μάζας τους. Κινέζοι θεραπευτές χιλιάδες χρόνια πριν συνιστούσαν αφέψημα του φυτού εφέδρα για την αύξηση της αθλητικής απόδοσης, ενώ υπάρχουν αναφορές για την κατανάλωση ορισμένων μανιταριών και σπόρων σησαμιού κατά τους Ολυμπιακούς Αγώνες της αρχαιότητας για τον ίδιο πάντα σκοπό.

Ο όρος ντόπινγκ προέρχεται από τη λέξη *dop*, που αναφέρεται σε φυσικής προέλευσης απόσταγμα από φλοιούς σταφυλιών που χρησιμοποιούσαν οι Κάφροι της ΝΑ Αφρικής ως διεγερτικό σε θρησκευτικές τελετές. Η λέξη ντόπινγκ αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1889 σε αγγλικό λεξικό για να περιγράψει ένα μείγμα οπίου και άλλων ναρκωτικών ουσιών που χρησιμοποιήθηκε σε άλογα αγώνων ιπποδρόμου για να μειώσει την απόδοσή τους. Σήμερα, ο αγγλικός όρος ντόπινγκ έχει επικρατήσει διεθνώς για να περιγράψει τη χρησιμοποίηση απαγορευμένων μέσων (ουσιών ή μεθόδων) από έναν αθλητή με στόχο τη βελτίωση της αγωνιστικής του διάθεσης, ικανότητας ή απόδοσης κατά τη διάρκεια των αγώνων ή κατά το στάδιο της προπονητικής προετοιμασίας του. Για την απόδοση του όρου στα ελληνικά έχει προταθεί ο όρος φαρμακοδιέγερση, ο οποίος όμως δεν αποδίδει πλήρως το περιεχόμενο του αγγλικού όρου και για αυτό έχει υιοθετηθεί και στην ελληνική γλώσσα ο ξένος όρος «ντόπινγκ».

Ακολουθεί μια σύντομη ιστορική αναδρομή και παράθεση των σημαντικότερων γεγονότων στο χώρο του ντόπινγκ από το 1865.

- **1865:** Πρώτη αναφορά της λήψης φαρμάκων σε κολυμβητικούς αγώνες στο Αμστερνταμ.
- **1866:** Πρώτος καταγεγραμμένος θάνατος από χρήση φαρμακευτικών ουσιών, του Άγγλου ποδηλάτη Linton, κατά τη διάρκεια ποδηλατικού αγώνα στη Γαλλία.

- **1904:** Ο νικητής του μαραθωνίου του St. Lewis (T. Hicks) καταρρέει μετά τον αγώνα από κατανάλωση μεγάλης δόσης στρυχνίνης και κονιάκ.
- **1910:** Πρώτες προσπάθειες εργαστηριακού ελέγχου του ντόπινγκ με την ανίχνευση αλκαλοειδών στο σίελο αγωνιστικών αλόγων και σκύλων.
- **1928:** Η Διεθνής Ομοσπονδία Ερασιτεχνικού Αθλητισμού (International Amateur Athletic Federation, IAAF) εισάγει τον πρώτο κανονισμό απαγόρευσης του ντόπινγκ.
- **1950-1970:** Ευρεία διάδοση της χρήσης των διεγερτικών τύπου αμφεταμίνης με θανατηφόρα κρούσματα (θάνατος ποδηλάτη K. Jansen από λήψη αμφεταμίνης και νικοτινικού οξέος και T. Simpson μετά από λήψη μεθαμφεταμίνης)
- **Δεκαετία 1960:** Διάδοση της χρήσης των αναβολικών ανδρογόνων στεροειδών
- **1967:** Σύσταση ιατρικής επιτροπής της Διεθνούς Ολυμπιακής Επιτροπής (ΔΟΕ, International Olympic Committee, IOC), σύνταξη της πρώτης λίστας απαγορευμένων ουσιών και εισαγωγή νομοθεσίας περί ντόπινγκ.
- **1968:** Στους θερινούς Ολυμπιακούς Αγώνες στο Μεξικό και στους χειμερινούς Ολυμπιακούς Αγώνες στη Γκρενόμπλ εφαρμόζονται πιλοτικά για πρώτη φορά επίσημοι έλεγχοι ντόπινγκ στους αθλητές.
- **1960 – 1980:** Ανατολικογερμανοί ιατροί χορηγούν συστηματικά απαγορευμένες ουσίες (κυρίως αναβολικά στεροειδή), πολλές από τις οποίες συντίθενται για πρώτη φορά σε παράνομα εργαστήρια θέτοντας σε κίνδυνο την υγεία πολλών αθλητών, γεγονός που αποκαλύφθηκε με την πτώση του Τείχους του Βερολίνου.
- **1972:** Στους Ολυμπιακούς Αγώνες που διεξάγονται στο Μόναχο εισάγεται η φασματομετρία μαζών (mass spectrometry, MS) στον έλεγχο ντόπινγκ, που για πρώτη φορά διεξάγεται σε όλα τα αθλήματα. Από τότε μέχρι και σήμερα, η τεχνική MS αποτελεί πολύτιμο εργαλείο για την ανίχνευση απαγορευμένων ουσιών, διαδραματίζοντας καθοριστικό ρόλο τόσο στην αποτελεσματικότητα των ελέγχων όσο και στη νομική κατοχύρωση των αθλητών. Η διάταξη του πρώτου φασματομέτρου μαζών που εγκαταστάθηκε στο εργαστήριο του Μονάχου σε συνδυασμό με σύστημα αεριοχρωματογραφίας παρουσιάζεται στο Σχήμα 1.1.



Σχήμα 1.1: Το πρώτο σύστημα GC/MS με φασματόμετρο μαζών μαγνητικής εστίασης που χρησιμοποιήθηκε στον έλεγχο ντόπινγκ αθλητών στους Ολυμπιακούς Αγώνες του Μονάχου το 1972.

Ο Manfred Donike, επικεφαλής του εργαστηρίου του Μονάχου, σηματοδότησε την έναρξη της σύγχρονης εποχής στον έλεγχο ντόπινγκ, καθώς εισηγάγε επίσης στους αγώνες αυτούς τη χρήση του ανιχνευτή αζώτου-φωσφόρου (Nitrogen Phosphorus Detector, NPD), όπως και την εφαρμογή των μέχρι σήμερα χρησιμοποιούμενων αντιδραστηρίων παραγωγοποίησης σε αναλύσεις GC και GC/MS, όπως το N-μεθυλο-N-(τριμεθυλοσιλυλο)τριφθοροακεταμίδιο (MSTFA) και το N,O-δισ-(τριμεθυλοσιλυλο)τριφθοροακεταμίδιο (BSTFA).

- **1984:** Στους Ολυμπιακούς Αγώνες που διεξάγονται στο Λος Άντζελες η τεχνική GC/MS με τριχοειδείς πλέον στήλες και “bench-top” φασματομέτρα μαζών, εφαρμόζεται για την ανίχνευση απαγορευμένων ουσιών σε αναλύσεις σάρωσης επιπέδου ρουτίνας, επιτρέποντας την ανίχνευση απαγορευμένων ουσιών και των μεταβολιτών τους σε χαμηλές συγκεντρώσεις.
- **1986:** Το ντόπινγκ αίματος εισάγεται ως απαγορευμένη μέθοδος στη λίστα της ΔΟΕ.
- **1988:** Σοκ για την αθλητική κοινότητα αποτελεί η είδηση της λήψης του αναβολικού παράγοντα στανοζολόλη (stanozolol) από τον δρομέα Ben Johnson, στους Ολυμπιακούς Αγώνες της Σεούλ. Δέκα χρόνια μετά τους αγώνες αυτούς η κάτοχος του χρυσού μεταλλίου στα 100 και 200 μέτρα Florence Griffith Joyner βρίσκεται νεκρή και ο θάνατός της αποδίδεται στη χρήση απαγορευμένων ουσιών κατά τη διάρκεια της αθλητικής της καριέρας.
- **1990:** Η ερυθροποιητίνη (EPO) εισάγεται στη λίστα απαγορευμένων ουσιών, αλλά η ο έλεγχος για την ανίχνευσή της πραγματοποιείται για πρώτη φορά δέκα χρόνια αργότερα στους Ολυμπιακούς Αγώνες του Σίδνεϋ.
- **1999:** Ιδρύεται στη Λωζάνη της Ελβετίας ο Παγκόσμιος Οργανισμός Αντι-Ντόπινγκ (World Anti-doping Agency, WADA). Πρόκειται για έναν ανεξάρτητο διεθνή οργανισμό που δημιουργήθηκε για την προώθηση, το συντονισμό και την παρακολούθηση της καταπολέμησης του ντόπινγκ στον αθλητισμό, σε παγκόσμιο επίπεδο. Διοικείται και χρηματοδοτείται τόσο από το ολυμπιακό κίνημα, όσο και από τις κρατικές κυβερνήσεις.
- **2001:** Ιδρύεται η Παγκόσμια Ένωση Επιστημόνων Αντι-ντόπινγκ (World Association of Anti-Doping Scientists, WAADS), που έχει ως αντικείμενο την ανταλλαγή γνώσεων, θεμάτων και προβλημάτων μεταξύ των επιστημόνων που ασχολούνται με τον έλεγχο ντόπινγκ ανά τον κόσμο.
- **2003:** Συγκροτείται το Εθνικό Συμβούλιο Καταπολέμησης Ντόπινγκ (ΕΣΚΑΝ) με αρμοδιότητες το σχεδιασμό και προγραμματισμό των ελέγχων, τη διοργάνωση ενημερωτικών και εκπαιδευτικών προγραμμάτων για την πρόληψη της χρήσης απαγορευμένων ουσιών, την κατάρτιση των υπευθύνων για τις δειγματοληψίες, την παρακολούθηση εφαρμογής των κανονισμών κ.λ.π.
- **2003:** Το σκάνδαλο της BALCO φέρνει στην επιφάνεια αρχεία, ονόματα αθλητών και νέες απαγορευμένες ουσίες (“designer steroids”).
- **2004:** Στους Ολυμπιακούς Αγώνες της Αθήνας σημειώνονται 25 περιπτώσεις θετικών δειγμάτων, γεγονός που αποτελεί αξιοσημείωτο αριθμό, στην πλειοψηφία τους θετικά για αναβολικούς παράγοντες και σε αυτό συνέβαλε η χρησιμοποίηση συστημάτων υψηλής διαχωριστικής ικανότητας (HRMS), ενώ αναφέρονται για πρώτη φορά κρούσματα ντόπινγκ χωρίς αναλυτικά ευρήματα, καθώς η παραβίαση έγκειται στην άρνηση των αθλητών να συμμετέχουν στον έλεγχο.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΣ ΝΤΟΠΙΝΓΚ ^{11,12}

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Κώδικα Αντι-ντόπινγκ (World Anti-Doping Code) που έχει εκδόσει ο WADA, ως ντόπινγκ ορίζεται η παραβίαση ενός ή περισσότερων από τους κανονισμούς 2.1 έως 2.8 του Κώδικα και συνοψίζονται στα παρακάτω:

- ◆ Παρουσία απαγορευμένης ουσίας ή μεταβολίτη αυτής ή δείκτη σε δείγμα αθλητή.
- ◆ Χρήση ή απόπειρα χρήσης απαγορευμένης ουσίας ή απαγορευμένης μεθόδου από αθλητή.
- ◆ Άρνηση ή αποτυχία, χωρίς επαρκή αιτιολόγηση, συμμετοχής στη διαδικασία δειγματοληψίας μετά από ειδοποίηση, όπως περιγράφεται από τους ισχύοντες κανονισμούς ή κατά οποιοδήποτε τρόπο αποφυγή της διαδικασίας δειγματοληψίας.
- ◆ Παραβίαση των ισχύοντων κανονισμών περί διαθεσιμότητας του αθλητή για έλεγχο εκτός συναγωνισμού, συμπεριλαμβανομένων της αποτυχίας υποβολής των απαιτούμενων πληροφοριών διαμονής (whereabouts information) και της μη εμφάνισης του αθλητή στον έλεγχο. Οποιοσδήποτε συνδυασμός των παραπάνω παραβάσεων τρεις φορές σε διάστημα 18 μηνών αποτελεί παραβίαση των κανονισμών αντι-ντόπινγκ.
- ◆ Αλλοίωση ή απόπειρα αλλοίωσης οποιουδήποτε τμήματος του ελέγχου ντόπινγκ.
- ◆ Κατοχή απαγορευμένων ουσιών ή μεθόδων.
- ◆ Διακίνηση ή απόπειρα διακίνησης απαγορευμένων ουσιών ή μεθόδων.
- ◆ Χορήγηση ή απόπειρα χορήγησης σε αθλητή απαγορευμένης ουσίας ή μεθόδου εντός ή εκτός συναγωνισμού ή υποβοήθηση, ενθάρρυνση, υποκίνηση, συγκάλυψη, ή οποιοδήποτε άλλου είδους συνενοχή σε παραβίαση ή απόπειρα παραβίασης των κανονισμών αντι-ντόπινγκ.

1.3. ΠΑΓΚΟΣΜΙΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΑΝΤΙ-ΝΤΟΠΙΝΓΚ ^{10, 12-18}

Το Παγκόσμιο Πρόγραμμα Αντι-Ντόπινγκ περιλαμβάνει όλα εκείνα τα στοιχεία που απαιτούνται για να διασφαλιστεί η βέλτιστη εναρμόνιση και εφαρμογή των παγκόσμιων και εθνικών προγραμμάτων αντι-ντόπινγκ και δομείται στα ακόλουθα τρία επίπεδα:

- Παγκόσμιος Κώδικας Αντι-ντόπινγκ (World Anti-Doping Code)
- Διεθνή Πρότυπα (International Standards, IS)
- Οδηγίες Βέλτιστης Πρακτικής (Models of Best Practice and Guidelines)

Το Παγκόσμιο Πρόγραμμα Αντι-Ντόπινγκ έχει στόχο: α) την προάσπιση του δικαιώματος των αθλητών να συμμετέχουν σε αθλητισμό χωρίς ντόπινγκ και έτσι προωθεί την υγεία, την αμεροληψία και την ισότητα των αθλητών ανά τον κόσμο β) τη διασφάλιση εναρμονισμένων, συντονισμένων και αποτελεσματικών προγραμμάτων καταπολέμησης του ντόπινγκ σε διεθνές και εθνικό επίπεδο σε ό,τι αφορά την ανίχνευση, την αποτροπή και την πρόληψη του φαινομένου.

Ο Κώδικας, που αποτελεί το θεμελιώδες κείμενο πάνω στο οποίο στηρίζεται το Παγκόσμιο Πρόγραμμα Αντι-ντόπινγκ και τα Διεθνή Πρότυπα, που καθορίζουν τις λεπτομέρειες εφαρμογής του Κώδικα, είναι δεσμευτικά και υποχρεωτικά κείμενα. Οι Οδηγίες Βέλτιστης Πρακτικής είναι συνιστώμενες και η εφαρμογή τους είναι προαιρετική.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Ντόπινγκ – Έλεγχος Ντόπινγκ

Ο Κώδικας παρέχει το πλαίσιο εναρμόνισης των πολιτικών, των κανονισμών και των ρυθμίσεων σχετικά με το αντι-ντόπινγκ εντός των αθλητικών οργανισμών και μεταξύ των δημοσίων φορέων.

Τα Διεθνή Πρότυπα περιλαμβάνουν πέντε κείμενα που έχει εκδόσει ο WADA:

- τον Κατάλογο Απαγορευμένων Ουσιών και Μεθόδων (Prohibited List), που καθορίζει τις απαγορευμένες ουσίες και κατηγορίες απαγορευμένων ουσιών και τις απαγορευμένες μεθόδους εντός και εκτός αγώνων.
- το Διεθνές Πρότυπο για τους Ελέγχους (International Standard for Testing), που περιγράφει τη διαδικασία προγραμματισμού των ελέγχων και έχει σκοπό το σχεδιασμό και τη διεξαγωγή αποτελεσματικών ελέγχων, τόσο εκτός όσο και εντός συναγωνισμού και τη διασφάλιση της ακεραιότητας και της ταυτότητας των συλλεχθέντων δειγμάτων από τη στιγμή της ειδοποίησης του αθλητή μέχρι τη μεταφορά των δειγμάτων στο εργαστήριο που θα τα αναλύσει. Έτσι σε αυτό περιλαμβάνονται τα πρότυπα για το σχεδιασμό και διαμοιρασμό των ελέγχων, την ειδοποίηση των αθλητών, την προετοιμασία και τη διεξαγωγή της συλλογής των δειγμάτων και τη μεταφορά τους.
- το Διεθνές Πρότυπο για τα Εργαστήρια (International Standard for Laboratories, ISL), που έχει σκοπό να διασφαλίσει την εξαγωγή αξιόπιστων αποτελεσμάτων από τους εργαστηριακούς ελέγχους και να επιτευχθούν ομοιόμορφα και εναρμονισμένα αποτελέσματα και αναφορές από όλα τα διαπιστευμένα ανά τον κόσμο εργαστήρια. Περιλαμβάνει τις απαιτήσεις για την απόκτηση και τη διατήρηση της διαπίστευσης των εργαστηρίων από το WADA, τις προδιαγραφές λειτουργίας τους και περιγραφή της διαδικασίας απόκτησης της διαπίστευσης. Κατά καιρούς εκδίδονται από το WADA τεχνικά έγγραφα (Technical Documents, TD's) που αφορούν τον τρόπο διαχείρισης συγκεκριμένων θεμάτων που αφορούν τα εργαστήρια, όπως π.χ. τα κριτήρια ανίχνευσης απαγορευμένων ουσιών για ποιοτικές μεθόδους που βασίζονται στη χρωματογραφία /φασματομετρία μαζών, τα ελάχιστα απαιτούμενα όρια απόδοσης (Minimum Required Performance Levels, MRPL), οδηγίες για την αναφορά και αξιολόγηση της του λόγου τεστοστερόνης προς επιτεστοστερόνη (T/E) και άλλων ενδογενών στεροειδών κ.λ.π.
- το Διεθνές Πρότυπο για τις Εξαιρέσεις Χρήσης για Θεραπευτικούς Σκοπούς (International Standard for Therapeutic Use Exemptions, TUE's), που έχει στόχο να διασφαλίσει την εναρμονισμένη χορήγηση TUE μεταξύ διαφορετικών αθλημάτων και μεταξύ των χωρών.
- το Διεθνές Πρότυπο για την Προστασία των Προσωπικών Δεδομένων (International Standard for Protection of Privacy and Personal Information), που έχει σκοπό να διασφαλίσει την τήρηση προφυλάξεων, από μέρους των εμπλεκόμενων στο αντι-ντόπινγκ φορέων, κατά τη συλλογή και διαχείριση προσωπικών πληροφοριών που αφορούν τον αθλητή, όπως θέματα σχετικά με τη διαμονή, τον έλεγχο ντόπινγκ και τα TUE's.

1.4. ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΑΠΑΓΟΡΕΥΜΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ^{1, 19-23}

Ο Κατάλογος Απαγορευμένων Ουσιών (List of Prohibited Substances) περιλαμβάνει όλες τις κατηγορίες φαρμακευτικών ουσιών και τις μεθόδους που απαγορεύονται εντός και εκτός

αγώνων. Συντάσσεται και αναθεωρείται σε ετήσια βάση από ειδική επιτροπή του WADA αποτελούμενη από 11 διεθνώς διακεκριμένους επιστήμονες και η αναθεωρημένη έκδοσή του τίθεται σε ισχύ στην αρχή κάθε ημερολογιακού έτους. Για την εισαγωγή μιας ουσίας ή μεθόδου στον Κατάλογο θα πρέπει να πληρούνται δύο από τα ακόλουθα κριτήρια:

1. ιατρική ή άλλη επιστημονικά τεκμηριωμένη απόδειξη ή φαρμακολογική δράση ή εμπειρία ότι η ουσία ή η μέθοδος, μόνη της ή σε συνδυασμό με άλλες ουσίες ή μεθόδους, βελτιώνει ή μπορεί να βελτιώσει την αθλητική απόδοση.
2. ιατρική ή άλλη επιστημονικά τεκμηριωμένη απόδειξη ή φαρμακολογική δράση ή εμπειρία ότι η χρήση της ουσίας ή της μεθόδου θέτει σε πραγματικό ή δυνητικό κίνδυνο την υγεία του αθλητή.
3. ο WADA κρίνει ότι η χρήση της ουσίας ή της μεθόδου παραβιάζει το πνεύμα του αθλητισμού όπως αυτό περιγράφεται στην εισαγωγή του κειμένου του Κώδικα.

Στη Λίστα συμπεριλαμβάνονται επίσης ουσίες και μέθοδοι οι οποίες μπορούν να καλύψουν τη χρήση άλλων απαγορευμένων ουσιών ή μεθόδων. Ακολουθεί συνοπτική παράθεση της Λίστας Απαγορευμένων Ουσιών και Μεθόδων που ισχύει για το έτος 2011.

1.4.1. Απαγορευμένες ουσίες και μέθοδοι σε όλες τις περιπτώσεις (εντός και εκτός αγώνων)

1.4.1.1. Απαγορευμένες Ουσίες

S0. Μη εγκεκριμένες ουσίες (non-approved substances)

Οποιαδήποτε φαρμακευτική ουσία που δεν αναφέρεται σε κάποια από τις επόμενες ενότητες της λίστας και δε διαθέτει ισχύουσα έγκριση για θεραπευτική χρήση σε ανθρώπους από κάποια κρατική υγειονομική αρχή απαγορεύεται σε όλες τις περιπτώσεις (π.χ. ουσίες σε στάδιο κλινικής ή προκλινικής ανάπτυξης ή υπό διακοπή).

S1. Αναβολικοί παράγοντες (Anabolic agents)

Σε αυτούς περιλαμβάνονται τα αναβολικά ανδρογόνα στεροειδή (εξωγενή και ενδογενή) και άλλοι αναβολικοί παράγοντες:

- I. Αναβολικά ανδρογόνα στεροειδή (ΑΑΣ) (Anabolic androgenic steroids, AAS)
 - ♦ Εξωγενή ΑΑΣ: πρόκειται για ουσίες που υπό φυσιολογικές συνθήκες δεν είναι δυνατό να παραχθούν από τον οργανισμό, όπως για παράδειγμα οι ουσίες: 1-androstenedione, bolandiol, bolasterone, boldenone, boldione, calusterone, clostebol, danazol, drostanolone, ethylestrenol, fluoxumesterone, formebolone, furazabol, stanozolol, metribolone και άλλες ουσίες με παρόμοια δομή ή παρόμοια φαρμακολογική και βιολογική δράση.
 - ♦ Ενδογενή ΑΑΣ: πρόκειται για ουσίες που παράγονται φυσιολογικά από τον ανθρώπινο οργανισμό, όπως οι ουσίες androstenediol, androstenedione, dihydrotestosterone, prasterone (dehydroepiandrosterone), testosterone, καθώς και μεταβολίτες και ισομερή των ουσιών αυτών, όπως για παράδειγμα οι ουσίες epitestosterone, 19-norandrosterone, 19-noretiocholanolone, epi-dihydrotestosterone, 5 α -androstane-3 α ,17 α -diol κ.α.

Για τα ενδογενώς παραγόμενα αναβολικά ανδρογόνα στεροειδή «αντικανονικό αναλυτικό εύρημα» (Adverse Analytical Finding) αναφέρεται όταν η τιμή της συγκέντρωσης της ουσίας ή των μεταβολιτών της ή δεικτών αυτής ή/και

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Ντόπινγκ – Έλεγχος Ντόπινγκ

οποιασδήποτε συσχετιζόμενης αναλογίας στο δείγμα του αθλητή παρεκκλίνει από το εύρος τιμών που παρατηρείται υπό φυσιολογικές συνθήκες και δεν μπορεί να αποδοθεί σε ενδογενή παραγωγή, εκτός εάν ο αθλητής μπορεί να αποδείξει ότι η τιμή αυτή μπορεί να αποδοθεί σε κάποια φυσιολογική ή παθολογική κατάσταση.

- II. Άλλοι αναβολικοί παράγοντες: σε αυτούς περιλαμβάνονται (χωρίς να περιορίζονται μόνο σε αυτά) οι εκλεκτικοί τροποποιητές των υποδοχέων των ανδρογόνων (selected androgen receptor modulators, SARMs, όπως οι ουσίες andarine (S4) και S22) και οι ουσίες clenbuterol, tibolone, zeranol και zilpaterol.

S2. Πεπτιδικές Ορμόνες, Αυξητικοί παράγοντες και σχετικές ουσίες

Απαγορεύονται οι παρακάτω ουσίες, καθώς και οι εκλυτικοί τους παράγοντες:

- I. Παράγοντες που διεγείρουν την ερυθροποίηση, όπως για παράδειγμα η ερυθροποιητίνη, οι σταθεροποιητές του επαγόμενου από την υποξία παράγοντα (hypoxia-inducible factor, HIF), CERA, αιματιδίνη κ.α.
- II. Χοριακή γοναδοτροπίνη (CG) και ωχρινότροπος ορμόνη (LH) στους άνδρες.
- III. Ινσουλίνες
- IV. Κορτικοτροπίνες
- V. Αυξητική ορμόνη (GH), αυξητικοί παράγοντες τύπου ινσουλίνης (π.χ. IGF-1), ινοβλαστικοί αυξητικοί παράγοντες, ηπατοκυτταρικός αυξητικός παράγοντας (HGF), μηχανοαυξητικοί παράγοντες (MGF's) και κάθε αυξητικός παράγοντας που επηρεάζει την σύνθεση ή την αποικοδόμηση πρωτεϊνών στους μύες, τους τένοντες ή τους συνδέσμους, την αιμάτωση, την αξιοποίηση της ενέργειας, την ικανότητα αναγέννησης κ.λ.π.

και οποιαδήποτε ουσία με παρόμοια χημική δομή ή βιολογική δράση.

S3. β₂-Αγωνιστές

Απαγορεύονται όλοι οι β₂-αγωνιστές (συμπεριλαμβανομένων των D- και L- οπτικών ισομερών τους), με εξαίρεση τη δι' εισπνοής λήψη σαλβουταμόλης (μέγιστη ποσότητα λήψης 1600 μικρογραμμάρια ανά 24ωρο) και σαλμετερόλης. Η ανίχνευση της σαλβουταμόλης στα ούρα αθλητή σε συγκέντρωση μεγαλύτερη από 1000 ng mL⁻¹ θα πρέπει να αναφέρεται ως «αντικανονικό αναλυτικό εύρημα», εκτός αν ο αθλητής αποδείξει μέσω ελεγχόμενης φαρμακοκινητικής μελέτης ότι το αποτέλεσμα αυτό προέρχεται από τη λήψη θεραπευτικής δόσης της ουσίας μέσω εισπνοής.

S4. Ανταγωνιστές και Τροποποιητές ορμονών

Απαγορεύονται οι ακόλουθες κατηγορίες ουσιών:

- I. Αναστολείς αρωματάσης (Aromatase inhibitors), συμπεριλαμβανομένων, αλλά μη περιοριζόμενων, στις ουσίες: anastrozole, aminoglutethimide, androstetrienedione, 4-androstene-3,6,17-trione, exemestane, formestane, letrozole, testolactone.
- II. Εκλεκτικοί τροποποιητές υποδοχέων οιστρογόνων (Selective estrogen receptor modulators, SERM's), συμπεριλαμβανομένων, αλλά μη περιοριζόμενων, στις ουσίες raloxifene, toremifene, tamoxifene.
- III. Άλλες ουσίες με αντι-οιστρογόνο δράση, συμπεριλαμβανομένων, αλλά μη περιοριζόμενων, στις ουσίες clomiphene, cyclofenil, fulvestrant.

- IV. Παράγοντες που τροποποιούν τις λειτουργίες της μυστατίνης, συμπεριλαμβανομένων, αλλά μη περιοριζόμενων, στους αναστολείς της μυστατίνης.

S5. Διουρητικά και άλλοι καλυπτικοί παράγοντες

Απαγορεύονται οι καλυπτικοί παράγοντες, στους οποίους περιλαμβάνονται: διουρητικές ουσίες, διαστολείς πλάσματος (plasma expanders, π.χ. γλυκερόλη και ενδοφλέβια χορήγηση αλβουμίνης, δεξτράνης, υδροξυαιθυλο-αμύλου, μαννιτόλης), προβενεσίδη και ουσίες με αντίστοιχη βιολογική δράση.

Στα διουρητικά περιλαμβάνονται οι ουσίες: acetazolamide, amiloride, bumetanide, canrenone, chlorthalidone, ethacrynic acid, furosemide, indapamide, metolazone, spironolactone, θειαζιδικές διουρητικές ενώσεις (π.χ. hydrochlorothiazide, bendroflumethiazide, chlorothiazide), triamterene και άλλες ουσίες με παρόμοια χημική δομή ή αντίστοιχες βιολογικές δράσεις. Εξαιρέση αποτελούν οι ουσίες drosperinone, pamabrom και η τοπική χορήγηση των ουσιών dorzolamide και brinzolamide, που δεν είναι απαγορευμένες. Αξίζει στο σημείο αυτό να αναφέρουμε ότι για τη χρήση απαγορευμένης ουσίας ορίου σε οποιαδήποτε ποσότητα (π.χ. σαλβουταμόλης, μορφίνης, καθίνης, εφεδρίνης, μεθυλοεφεδρίνης και ψευδοεφεδρίνης) σε συνδυασμό με κάποια διουρητική ουσία ή άλλο καλυπτικό παράγοντα, απαιτείται η επιπλέον χορήγηση TUE για την απαγορευμένη ουσία πέραν αυτού που δίδεται για τη χρήση του καλυπτικού παράγοντα.

1.4.1.2. Απαγορευμένες Μέθοδοι

M1. Ενίσχυση μεταφοράς οξυγόνου

Απαγορεύονται:

- I. το ντόπινγκ αίματος, συμπεριλαμβανομένης της χρήσης αυτόλογου, ομόλογου ή ετερόλογου αίματος, ή προϊόντων ερυθρών αιμοσφαιρίων οποιασδήποτε προέλευσης.
- II. τεχνητή ενίσχυση της πρόσληψης, της μεταφοράς ή της απόδοσης του οξυγόνου συμπεριλαμβανομένης, αλλά όχι περιοριζόμενης, στη χρήση υπερφθοριωμένων χημικών ουσιών, εφαπροξιράλης και τροποποιημένων προϊόντων αιμοσφαιρίνης (υποκατάστατα αίματος βασισμένα στην αιμοσφαιρίνη, προϊόντα μικροενκαψυλιωμένης αιμοσφαιρίνης).

M2. Χημικοί και φυσικοί χειρισμοί

Απαγορεύονται:

- I. η αλλοίωση ή η απόπειρα αλλοίωσης με σκοπό τη μεταβολή της ακεραιότητας και της εγκυρότητας των δειγμάτων που συλλέγονται κατά τον έλεγχο ντόπινγκ. Οι χειρισμοί περιλαμβάνουν, αλλά δεν περιορίζονται σε καθετηριασμό, αντικατάσταση ή/και νόθευση ούρων (π.χ. πρωτεάσες).
- II. οι ενδοφλέβιες εγχύσεις, εκτός από περιπτώσεις που έχουν πραγματοποιηθεί νόμιμα, κατά τη διάρκεια εισαγωγής στο νοσοκομείο ή σε κλινικές μελέτες.
- III. διαδοχική απόσυρση, τροποποίηση και επανέγχυση του αίματος στο κυκλοφορικό σύστημα.

M3. Γονιδιακό ντόπινγκ

Απαγορεύονται τα ακόλουθα που μπορούν να αυξήσουν την αθλητική απόδοση:

- I. η μεταφορά νουκλεϊνικών οξέων ή αλληλουχιών νουκλεϊνικών οξέων
- II. η χρήση φυσιολογικών ή γενετικά τροποποιημένων κυττάρων
- III. η χρήση παραγόντων, οι οποίες άμεσα ή έμμεσα επηρεάζουν λειτουργίες που είναι γνωστό ότι επηρεάζουν την αθλητική απόδοση με την τροποποίηση της γονιδιακής έκφρασης όπως για παράδειγμα οι αγωνιστές του υποδοχέα δ ενεργοποιημένου από τον πολλαπλασιαστή των υπεροξυσωμάτων (Peroxisome Proliferator Activated Receptor δ (PPARδ)) (π.χ. GW1516) και οι αγωνιστές του άξονα PPARδ-AMP-ενεργοποιημένης πρωτεϊνικής κινάσης (AMPK) (π.χ. AICAR).

1.4.2. Απαγορευμένες ουσίες και μέθοδοι μόνο εντός αγώνων

Επιπλέον των ουσιών και μεθόδων που προαναφέρθηκαν και απαγορεύονται σε όλες τις περιπτώσεις, οι ακόλουθες κατηγορίες απαγορεύονται μόνο εντός αγώνων.

S6. Δεγερτικά

Απαγορεύονται όλες οι διεγερτικές ουσίες (συμπεριλαμβανομένων και των δύο οπτικών ισομερών τους, όπου υπάρχουν) εκτός από τα παράγωγα του ιμαδαζολίου για τοπική χρήση και τα διεγερτικά που περιλαμβάνονται στο Πρόγραμμα Παρακολούθησης (Monitoring Program) για το 2011 (bupropion, caffeine, synephrine, phenylephrine, phenylpropranolamine, pirradol).

Σύμφωνα με τη Λίστα οι διεγερτικές ουσίες ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες ουσιών, για κάθε μια από τις οποίες αναμένεται διαφορετική ποινή όταν ανιχνευθούν στα ούρα αθλητή κατά τον έλεγχο ντόπινγκ.

- I. Μη καθορισμένα διεγερτικά (non-specified stimulants): σε αυτά περιλαμβάνονται οι ουσίες adrafinil, amfepramone, amiphenazole, amphetamine, amphetaminil, benfluorex, benzphetamine, benzylpiperazine, bromantan, clobenzorex, cocaine, cropropamide, crotethamide, dimethylamphetamine, etilamphetamine, famprofazone, fencamine, fenethylline, fenfluramine, fenproporex, furfenorex, mefenorex, mephentermine, mesocarb, d-methamphetamine, p-methylamphetamine, MDA, MDMA, modafinil, norfenfluramine, phendimetrazine, phenmetrazine, phentermine, carphedon, prenylamine, prolintane. Οποιαδήποτε διεγερτική ουσία δεν αναφέρεται στη λίστα αυτή, τότε ανήκει στα καθορισμένα διεγερτικά.
- II. Καθορισμένα διεγερτικά (specified stimulants): Ως παράδειγμα στην κατηγορία αυτή αναφέρονται οι ουσίες adrenaline, (εξάιρεση αποτελεί η αδρεναλίνη ως συστατικό σκευασμάτων τοπικών αναισθητικών ή λαμβανόμενη για τοπική χρήση π.χ. οφθαλμική ή ρινική, οπότε και δεν απαγορεύεται), etamivan, heptaminol, l-methamphetamine, methylhexanamine, nikethamide, oxilofrine, pentetrazol, strychnine και άλλες ουσίες με παρόμοια χημική δομή ή βιολογικές δράσεις.

Οι ουσίες cathine, ephedrine, methylephedrine και pseudoephedrine απαγορεύονται όταν η συγκέντρωσή τους στα ούρα είναι μεγαλύτερη από τις τιμές, 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ και 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$, αντίστοιχα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Ντόπινγκ – Έλεγχος Ντόπινγκ

S7. Ναρκωτικά

Απαγορεύονται οι ακόλουθες ουσίες: buprenorphine, dextromoramide, heroin, fentanyl και τα παράγωγα αυτού, hydromorphone, methadone, morphine, oxycodone, oxymorphone, pentazocine, pethidine.

S8. Κανναβινοειδή

Απαγορεύονται τόσο τα φυσικά (π.χ. κάνναβις, μαριχουάνα, χασίς) όσο και τα συνθετικά κανναβινοειδή (δ-τετραυδροκανναβινόλη) και οι κανναβομιμητικές ουσίες.

S9. Γλυκοκορτικοστεροειδή

Απαγορεύονται όλα τα γλυκοκορτικοστεροειδή όταν χορηγούνται από το στόμα, το ορθό, ενδοφλέβια ή ενδομυϊκά.

1.4.3. Απαγορευμένες ουσίες σε συγκεκριμένα αθλήματα

P1. Αιθυλική αλκοόλη

Η αιθανόλη απαγορεύεται μόνο εντός αγώνων στα ακόλουθα αθλήματα: αεροναυτική, τοξοβολία, αυτοκίνητο, καράτε, μοτοσικλετισμό, μπόουλινγκ, λεμβοδρομία ισχύος. Για την ανίχνευσή της πραγματοποιείται ανάλυση του εκπνεόμενου αέρα ή /και ανάλυση αίματος. Το όριο συγκέντρωσης της αιθανόλης στο αίμα, υπέρβαση του οποίου συνιστά παραβίαση ντόπινγκ έχει οριστεί στα 0,10 g L⁻¹.

P2. β-Αναστολείς

Οι ουσίες αυτές που επιβραδύνουν τον καρδιακό ρυθμό χρησιμοποιούνται σε αθλήματα που στηρίζονται στην ηρεμία του αγωνιζόμενου, για την εκτέλεση κινήσεων που απαιτούν ακρίβεια και λεπτότητα. Έτσι, απαγορεύονται μόνο εντός των αγώνων στα ακόλουθα αθλήματα, εκτός αν καθορίζεται διαφορετικά: αεροναυτική, τοξοβολία (απαγορεύονται και εκτός αγώνων), αυτοκίνητο, μπυλιάρδο, έλκυθρο, "boules", μπριτζ, κέρλινγκ, βέλη, γκολφ, μοτοσικλετισμός, μοντέρνο πένταθλο, μπόουλινγκ, λεμβοδρομία ισχύος, ιστιοπλοΐα (μόνο σε αγώνα πηδαλίων), σκοποβολή (απαγορεύονται και εκτός αγώνων), σκι σε χιόνι – χιονοσανίδα (άλμα και ελεύθερο) και πυγμαχία. Οι β-αναστολείς περιλαμβάνουν χωρίς να περιορίζονται στις ακόλουθες ουσίες: acebutolol, alprenolol, atenolol, betaxolol, bisoprolol, bunolol, carteolol, carvedilol, celiprolol, esmolol, labetalol, levobunolol, metipranolol, metoprolol, nadolol, oxprenolol, pindolol, propranolol, sotalol, timolol.

Στον Πίνακα 1.1 που ακολουθεί παρουσιάζονται συνοπτικά για ορισμένες κατηγορίες απαγορευμένων ουσιών, οι «επιθυμητές» δράσεις τους στην αθλητική απόδοση και επίδοση που αποτελούν και το λόγο λήψης τους από τους αθλητές, καθώς και οι ανεπιθύμητες ενέργειες από τη χρήση τους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Ντόπινγκ – Έλεγχος Ντόπινγκ

Πίνακας 1.1: «Επιθυμητές» (για τον αθλητή) δράσεις και ανεπιθύμητες ενέργειες απαγορευμένων ουσιών

Κατηγορία Ουσιών	Επιθυμητές Ενέργειες	Παρενέργειες
Αναβολικά ανδρογόνα στεροειδή (ΑΑΣ) και άλλοι αναβολικοί παράγοντες	αύξηση μυικής μάζας, αύξηση δύναμης και επιθετικότητας, μείωση αισθήματος κόπωσης, μείωση χρόνου αποκατάστασης μετά από έντονη προπόνηση	<p>Άνδρες: ατροφία όρχεων, ολιγοσπερμία, αζωοσπερμία, σεξουαλική ανικανότητα, γυναικομαστία, ατροφία προστάτη, στέρωση</p> <p>Γυναίκες: δασυτριχισμός, αλλαγή χροιάς φωνής, μεγέθυνση κλειτορίδας, διαταραχές εμμηνορρυσιακού κύκλου, στέρωση</p> <p>Γενικές: αλωπεκία, ακμή, απώλεια γενετήσιας επιθυμίας, βλάβη τοιχώματος αγγείων, κατακράτηση νερού και νατρίου και αύξηση αρτηριακής πίεσης, μείωση επιπέδων HDL, αύξηση επιπέδων LDL και κινδύνου αθηροσκλήρυνσης, ηπατική δυσλειτουργία, χολοστατικός ίκτερος, ψυχιατρικές διαταραχές (μανιακές εκδηλώσεις, παραλήρημα, ψύχωση, άγχος, ευερεθιστότητα, εχθρική συμπεριφορά) καρκινογένεση</p>
Ερυθροποιητίνη	διέγερση παραγωγής ερυθρών αιμοσφαιρίων, αύξηση μεταφοράς οξυγόνου στους ιστούς, μείωση χρόνου επίδοσης σε αθλήματα αντοχής που προέχει η αερόβια μυική άσκηση	ανεξέλεγκτη αύξηση του αιματοκρίτη με κίνδυνο αιμοσυμπύκνωσης, αύξηση ιξώδους αίματος και αρτηριακής πίεσης, κίνδυνος θρομβοεμβολικών επεισοδίων, κίνδυνος απλασίας μυελού ως προς τα ερυθροκύτταρα
Χοριακή γοναδοτροπίνη	στους άνδρες παραγωγή τεστοστερόνης από τους όρχεις, λαμβάνεται από τους αθλητές που παίρνουν αναβολικά στεροειδή για να μετριάσουν τις βλάβες που προκαλούν αυτά στους όρχεις	παρενέργειες αντίστοιχες με αυτές των αναβολικών στεροειδών λόγω αύξησης παραγωγής τεστοστερόνης, γυναικομαστία, αλλαγή κατανομής λιπώδους ιστού, συμπτώματα εγκυμοσύνης (ναυτία, εμετοί, πρωινή αδιαθεσία)
Ινσουλίνη	αύξηση σύνθεσης γλυκογόνου, λιπαρών οξέων και πρωτεϊνών, διευκόλυνση εισόδου της γλυκόζης στα κύτταρα σε μεγάλα ποσά, βελτίωση της αντοχής και της ικανότητας ανάνηψης μετά τον αγώνα όταν λαμβάνεται προαγωνιστικά ή κατά την προπόνηση, αύξηση μυικής μάζας και απόδοσης όταν ινσουλίνες βραχείας δράσης συνδυάζονται με διατροφή πλούσια σε υδατάνθρακες λόγω καταστολής του καταβολισμού των μυικών πρωτεϊνών	υπογλυκαιμία, σπασμοί, σοβαρές εγκεφαλικές βλάβες μετά από παρατεταμένη έλλειψη γλυκόζης στο ΚΝΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Ντόπινγκ – Έλεγχος Ντόπινγκ

Κατηγορία Ουσιών	Επιθυμητές Ενέργειες	Παρενέργειες
Κορτικοτροπίνη	διέγερση παραγωγής κορτικοστεροειδών, βοηθά στην αναδόμηση ιστών και μυών και στην ανταπόκριση του οργανισμού στο στρες.	ανάλογες με αυτές των γλυκοκορτικοστεροειδών
Αυξητική ορμόνη	αύξηση μυϊκής μάζας με αντίστοιχη μείωση του μυϊκού λίπους (αναβολική και λιπολυτική δράση), αύξηση μυϊκής δύναμης, μείωση χρόνου αποκατάστασης μεταξύ των προπονήσεων, πρόληψη και αντιμετώπιση τραυματισμών	αλλεργικές αντιδράσεις, υπερλιπιδαιμία, υποθυρεοειδισμός, συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια, υπέρταση, μυοκαρδιοπάθεια, σακχαρώδης διαβήτης, μυϊκή αδυναμία, αρθρίτιδα, σεξουαλική ανικανότητα, οστεοπόρωση, περιφερική πολυνευροπάθεια, διαταραχή ομιλίας, μερική απώλεια οπτικού πεδίου
IGF-1	αναβολική δράση ανάλογη με αυτή της αυξητικής ορμόνης	τρόμος, εφίδρωση, υποθερμία, επιδείνωση καρδιαγγειακής νόσου, αναφυλακτικό σοκ, αλλεργία στην ινσουλίνη
Διεγερτικά		
Ψυχοκινητικά Διεγερτικά (Αμφεταμινικά παράγωγα)	αύξηση εγρήγορσης, αναστολή εμφάνισης κόπωσης, αύξηση αγωνιστικής διάθεσης και επιθετικότητας	νευρολογικά συμπτώματα (ανησυχία, ζάλη, σύγχυση, τρόμος, παραισθήσεις, αϋπνία, τοξική ψύχωση), διαταραχές καρδιακού ρυθμού και αρτηριακής πίεσης, διαταραχές θερμορύθμισης, γαστρεντερικές διαταραχές (ανορεξία, απώλεια βάρους), σπασμοί, κώμα, εγκεφαλική αιμορραγία, ψυχική και σωματική εξάρτηση η αναστολή του αισθήματος κόπωσης μπορεί να οδηγήσει σε πλήρη εξάντληση και θάνατο
Συμπαθομιμητικές Αμίνες (π.χ. εφεδρίνη)	αύξηση καρδιακού ρυθμού, ελάττωση ρυθμού αποκατάστασης μετά από μυϊκή προσπάθεια	αντίστοιχες με της προηγούμενης ομάδας, οι ανεπιθύμητες ενέργειες από την ψυχική σφαίρα είναι πολύ ηπιότερες
Κανναβινοειδή	αύξηση αρτηριακής πίεσης, ψευδαισθησιογόνες ιδιότητες, παραισθησιογόνες ιδιότητες, χωρίς να παρουσιάζουν κανένα θετικό αποτέλεσμα στην αθλητική απόδοση, τη δύναμη ή την αντοχή	Βραχυπρόθεσμες: ερεθισμός αναπνευστικού βλεννογόνου, διάρροια-δυσκοιλιότητα, απώλεια ισορροπίας και συντονισμού, μείωση ικανότητας συγκέντρωσης, αύξηση καρδιακού ρυθμού, ζάλη, παραλήρημα Μακροπρόθεσμες: μείωση ψυχοκινητικών ικανοτήτων, μνήμης, ικανότητας μάθησης, διαταραχές αντίληψης και συγκέντρωσης, κίνδυνος εξάρτησης, χρόνια βρογχίτιδα, πτώση ανοσοποιητικού συστήματος

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Ντόπινγκ – Έλεγχος Ντόπινγκ

Κατηγορία Ουσιών	Επιθυμητές Ενέργειες	Παρενέργειες
Ναρκωτικά	κάλυψη σωματικού άλγους από τραυματισμό, αίσθημα ευφορίας	υπνηλία, ναυτία, δυσκοιλιότητα, μείωση ικανότητας συγκέντρωσης, ισορροπίας και συντονισμού, καταστολή αναπνευστικής λειτουργίας, σωματική και ψυχική εξάρτηση
Διουρητικά	<p>ρύθμιση σωματικού βάρους μέσω ελεγχόμενης απώλειας υγρών με στόχο την ένταξη σε συγκεκριμένη κατηγορία βάρους σε αθλήματα όπως η άρση βαρών, η πυγμαχία, η πάλη κ.α.</p> <p>αύξηση παραγωγής ούρων και αραίωση αυτών, μείωση της συγκέντρωσης ουσιών στα ούρα και αδυναμία ανίχνευσης άλλων απαγορευμένων ουσιών σε αυτά</p>	<p>Βραχυπρόθεσμες: απώλεια βάρους, πυρετός, συχνοουρία, αφυδάτωση, υπόταση, διαταραχή ηλεκτρολυτών, πονοκέφαλος, διαταραχές εμμηνορροίας, απώλεια συντονισμού, γαστρεντερικές διαταραχές, μυϊκές κράμπες</p> <p>Μακροπρόθεσμες: νεφρική και ηπατική ανεπάρκεια, έκπτωση νεφρικής και καρδιακής λειτουργίας, καρδιακή ανεπάρκεια</p>
β-Αναστολείς	μείωση καρδιακού ρυθμού, έντασης καρδιακής συστολής και αρτηριακής πίεσης, μείωση άγχους και μυϊκού τρόμου, βελτίωση της απόδοσης σε αθλήματα που απαιτούν ηρεμία	βρογχόσπασμος, βραδυκαρδία, υπόταση, καρδιακή ανεπάρκεια, ανικανότητα, επιβάρυνση προϋπάρχουσας περιφερικής αγγειοπάθειας, αίσθημα κόπωσης, ελαττωμένη αντοχή, μειωμένη ικανότητα ρύθμισης σακχάρου σε διαβητικούς
Κορτικοστεροειδή	αναβολική δράση στο ήπαρ, καταβολική σε μυς, δέρμα, λέμφο, λιπώδη και συνδετικό ιστό, συγκάλυψη τραυματισμένης άρθρωσης ή μύος και αύξηση της απόδοσης τραυματισμένου αθλητή αύξηση της απόδοσης λόγω αύξησης της γλυκόζης στο αίμα και αύξησης ερυθροποίησης αίσθημα ευφορίας	προβλήματα αυτοσυγκέντρωσης μακρόχρονη χρήση μπορεί να προκαλέσει οστεοπόρωση, υπέρταση, οίδημα, πεπτικά έλκη και ψύχωση
Ντόπινγκ αίματος	αύξηση μεταφοράς οξυγόνου στους ιστούς μέσω αύξησης του αριθμού των ερυθροκυττάρων, βρίσκει εφαρμογή σε αθλήματα αντοχής (αγώνες δρόμου, ποδηλασία, σκι)	υπερφόρτωση κυκλοφορικού συστήματος, σχηματισμός θρόμβων, αλλεργικές αντιδράσεις, μετάδοση μολυσματικών ασθενειών (π.χ. ηπατίτιδα, AIDS)

1.5. ΕΛΕΓΧΟΣ ΝΤΟΠΙΝΓΚ

1.5.1. Είδη ελέγχου ντόπινγκ ¹²

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Κώδικα Αντι-ντόπινγκ οι έλεγχοι ντόπινγκ χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: στους ελέγχους εντός αγώνων (in competition), που πραγματοποιούνται μετά τη λήξη του αγωνίσματος και στους ελέγχους εκτός αγώνων (out of competition), που πραγματοποιούνται χωρίς προειδοποίηση κατά τη διάρκεια της προπονητικής περιόδου και έχουν στόχο την ανίχνευση απαγορευμένων ουσιών που λαμβάνονται από τον αθλητή κατά το στάδιο της προετοιμασίας του και διακόπτονται για κάποιο διάστημα πριν τους αγώνες, ενώ διατηρούνται ακόμα οι “ευεργετικές” δράσεις τους. Τα δείγματα των ελέγχων εντός αγώνων εξετάζονται για όλες τις κατηγορίες απαγορευμένων ουσιών, ενώ τα εκτός αγώνων δείγματα δεν ελέγχονται για την ανίχνευση διεγερτικών και ναρκωτικών ουσιών.

1.5.2. Διαδικασία Ελέγχου Ντόπινγκ ^{12, 15, 21, 24}

Το πρώτο στάδιο του ελέγχου ντόπινγκ αποτελεί η διαδικασία δειγματοληψίας. Τα δείγματα (ούρα και σε κάποιες περιπτώσεις αίμα) συλλέγονται από εξειδικευμένο προσωπικό με αυστηρές διαδικασίες που περιγράφονται με λεπτομέρειες τόσο στο Διεθνές Πρότυπο για τους Ελέγχους (International Standard for Testing), όσο και στη Νομοθεσία κάθε χώρας. Στην περίπτωση εντός αγώνων ελέγχων, η δειγματοληψία πραγματοποιείται σε ειδικά για το σκοπό αυτό επαρκώς εξοπλισμένο χώρο των αθλητικών εγκαταστάσεων που πληρεί συγκεκριμένες αυστηρές προδιαγραφές (σταθμός ελέγχου ντόπινγκ), ενώ σε περιπτώσεις εκτός αγώνων ελέγχων, ως χώρος ελέγχου ντόπινγκ διαμορφώνεται οποιοσδήποτε χώρος.

Ο ελεγχόμενος αθλητής, που βρίσκεται υπό συνεχή εποπτεία μέχρι να ολοκληρωθεί η διαδικασία της δειγματοληψίας, επιλέγει από τρεις τουλάχιστον συσκευασίες, ένα σφραγισμένο αποστειρωμένο ουροσυλλέκτη και υπό την επίβλεψη δειγματολήπτη του ίδιου φύλου μεταβαίνει στην τουλέτα, όπου παρέχει κατάλληλη ποσότητα δείγματος εντός του ουροσυλλέκτη που μεταφέρει. Ακολούθως επιλέγει μια από τουλάχιστον τρεις συσκευασίες ελέγχου ούρων, οι οποίες περιέχουν δύο διαφανείς γυάλινες φιάλες, μια με την ένδειξη «δείγμα Α» και μια με την ένδειξη «δείγμα Β» και αντίστοιχα πώματα, κατάλληλα σφραγισμένα, ενώ πάνω στις φιάλες και στα πώματά τους είναι ανεξίτηλα αποτυπωμένος ένας κωδικός αριθμός. Ο αθλητής μεταγγίζει περίπου το 1/3 της ποσότητας των ούρων από τον ουροσυλλέκτη στη φιάλη Β και τα 2/3 περίπου στη φιάλη Α και στη συνέχεια κλείνει ερμητικά τις δύο φιάλες και ελέγχει, όπως και ο Υπεύθυνος Ελέγχου Ντόπινγκ, εάν υπάρχουν τυχόν διαρροές, ενώ τυχόν υπολειπόμενα ούρα απορρίπτονται. Συμπληρώνονται και υπογράφονται τα απαραίτητα έγγραφα και πρωτόκολλα από όλους τους εμπλεκόμενους.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Ντόπινγκ – Έλεγχος Ντόπινγκ

Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας δειγματοληψίας, τα συλλεχθέντα δείγματα μαζί με τα κατάλληλα έγγραφα τοποθετούνται σε σάκκους μεταφοράς που ακολούθως ασφαλίζονται και μεταφέρονται από το δειγματολήπτη στο εργαστήριο που θα πραγματοποιήσει την ανάλυσή τους. Για την εξασφάλιση της ανωνυμίας του αθλητή, το Εργαστήριο Ελέγχου Ντόπινγκ δεν εμπλέκεται στη διαδικασία δειγματοληψίας. Κατά την παραλαβή των δειγμάτων από εξουσιοδοτημένο μέλος του προσωπικού του Εργαστηρίου, ελέγχεται η ακεραιότητα των δειγμάτων καθώς και των εγγράφων που τα συνοδεύουν και τα οποία αφενός μεν εξασφαλίζουν την ανωνυμία του αθλητή, αφετέρου δε επιτρέπουν την παρακολούθηση και καταγραφή όλων των σταδίων μετακίνησης του δείγματος.

Τα δείγματα ελέγχου ντόπινγκ αναλύονται από Αναγνωρισμένα Εργαστήρια από το WADA, ώστε τα αποτελέσματά τους να αναγνωρίζονται ως έγκυρα από τις αθλητικές αρχές. Η διαδικασία ανάλυσης των δειγμάτων ελέγχου ντόπινγκ περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

- άνοιγμα των εξωτερικών συσκευασιών και έλεγχος της ακεραιότητας των φιαλών των δειγμάτων και της σφραγίδας τους.
- εισαγωγή των δειγμάτων στην ηλεκτρονική βάση δεδομένων του εργαστηρίου, όπου καθορίζονται οι αναλύσεις στις οποίες θα υποβληθεί κάθε δείγμα και αποδίδεται ένας εργαστηριακός κωδικός άνα δείγμα. Ο εργαστηριακός κωδικός εξαφανίζει οποιαδήποτε σχέση του αθλητή με το δείγμα, αφού η ανάλυση πραγματοποιείται μόνο με τον εργαστηριακό κωδικό και όχι με τον κωδικό της συσκευασίας συλλογής, ο οποίος είναι γνωστός στον αθλητή.
- ομαδοποίηση των δειγμάτων σε παρτίδες, οι οποίες αποτελούν τις μονάδες εργασίας μέσα στο εργαστήριο.
- άνοιγμα του Α-δείγματος με καταστροφή της σφραγίδας. Κλάσματα αυτού χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση απαγορευμένων ουσιών κατά το στάδιο των προσανατολιστικών και επιβεβαιωτικών ελέγχων.
- Διατήρηση του Β-δείγματος ακέραιο σε καταψύκτη. Σε περίπτωση θετικού αποτελέσματος μπορεί να ζητηθεί από τον αθλητή άνοιγμα και ανάλυση του Β-δείγματος.
- Εκτέλεση προαναλυτικών διαδικασιών (μέτρηση όγκου, pH, ειδικού βάρους)
- Διεξαγωγή προσανατολιστικών διαδικασιών αναλύσεων σάρωσης (screening) για την ανίχνευση απαγορευμένων ουσιών που περιλαμβάνονται στον ισχύοντα Κατάλογο του WADA, με σκοπό τη διάκριση των ύποπτων δειγμάτων από τα αρνητικά. Οι διαδικασίες ανάλυσης αποφασίζονται από το Εργαστήριο, ανάλογα με το είδος του ελέγχου (εντός ή εκτός αγώνων έλεγχος).
- Διεξαγωγή επιβεβαιωτικών διαδικασιών για τα ύποπτα θετικά δείγματα.
- Αναφορά αποτελεσμάτων
- Ανάλυση Β-δείγματος πραγματοποιείται σε περίπτωση θετικού αποτελέσματος και εφόσον ζητηθεί από τον αθλητή ή την αθλητική αρχή, με σκοπό να επιβεβαιωθεί το αποτέλεσμα του Α-δείγματος. Περιλαμβάνει την αποσφράγιση του Β-δείγματος και εφαρμογή της επιβεβαιωτικής διαδικασίας που εκτελέστηκε στο Α-δείγμα, απουσία ή παρουσία του αθλητή ή εξουσιοδοτημένου αντιπροσώπου του.

1.5.3. Αναλυτικές διαδικασίες σάρωσης ^{6, 25-28}

Οι αναλυτικές διαδικασίες σάρωσης που εφαρμόζονται από τα Εργαστήρια για την ανίχνευση απαγορευμένων ουσιών σε ούρα αθλητών διαφοροποιούνται ανάλογα με τη χημική δομή των εξεταζόμενων μορίων, τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες και ανάλογα με την έκταση του μεταβολισμού τους στον ανθρώπινο οργανισμό περιλαμβάνουν την ανίχνευση της μητρικής ουσίας ή /και των προϊόντων μεταβολισμού αυτής. Οι διαδικασίες σάρωσης περιλαμβάνουν κατά το στάδιο της προκατεργασίας των δειγμάτων την υδρόλυση των συζευγμένων μορίων, την απομόνωση των ελεύθερων μορίων των ουσιών από το υπόστρωμα των ούρων με εφαρμογή εκχυλιστικής διαδικασίας, με την οποία επιτυγχάνεται ταυτόχρονα και συμπύκνωση των δειγμάτων. Ακολουθεί ανάλυση των κατεργασμένων δειγμάτων με υψηλής ευαισθησίας μεθόδους πολλαπλής ανίχνευσης που βασίζονται κυρίως στη χρήση τεχνικών χρωματογραφίας – φασματομετρίας μαζών, αλλά όχι μόνο.

Για την ανίχνευση απαγορευμένων ουσιών στα ούρα των αθλητών, το Εργαστήριο Ελέγχου Ντόπινγκ του ΟΑΚΑ εφαρμόζει τις ακόλουθες αναλυτικές διαδικασίες:

- Διαδικασία I: Ανίχνευση β-ανταγωνιστών, διεγερτικών και ναρκωτικών ουσιών που εκκρίνονται μη συζευγμένες στα ούρα και ημιποσοτικοποίηση της εφεδρίνης και της νορψευδοεφεδρίνης με την εφαρμογή βασικής εκχύλισης και τη χρήση αεριοχρωματογραφίας με ανιχνευτή αζώτου φωσφόρου (GC/NPD).
- Διαδικασία II: Ανίχνευση β-ανταγωνιστών, διεγερτικών και ναρκωτικών ουσιών σε ούρα αθλητών με όξινη ή ενζυμική υδρόλυση, βασική εκχύλιση και ανάλυση με αεριοχρωματογραφία / φασματομετρία μαζών (GC/MS).
- Διαδικασία IV: Ανίχνευση αναβολικών παραγόντων, β-ανταγωνιστών, β₂-αγωνιστών και κορτικοστεροειδών σε ούρα αθλητών με ενζυμική υδρόλυση των γλυκουρονικών εστέρων τους, εκχύλιση και ανάλυση του βασικού εκχυλίσματος με τρία αναλυτικά συστήματα: GC/MS, GC/HRMS και LC/MSMS.
- Διαδικασία V: Ανίχνευση διουρητικών ουσιών που βασίζεται σε GC/MS ανάλυση του οργανικού βασικού εκχυλίσματος των ούρων μετά από σχηματισμό μεθυλιωμένων παραγώγων των προσδιοριζόμενων ουσιών.
- Ανίχνευση διογκωτικών πλάσματος που εκκρίνονται στα ούρα αθλητών με βιοχημικό αναλυτή Cobas Mira Plus, η οποία βασίζεται στη διαφορά της συγκέντρωσης της γλυκόζης πριν και μετά την όξινη υδρόλυση του δείγματος των ούρων συγκρινόμενη με ένα πληθυσμό αναφοράς.
- Διαδικασία VI: Ανίχνευση χοριακής ανθρώπινης γοναδοτροπίνης με βιοχημικό ανιχνευτή.
- Ταυτοποίηση ανασυνδυασμένης ερυθροποιητίνης με διαχωρισμό μέσω ισοηλεκτρικής εστίασης και ανοσοχημική ανίχνευση.
- Ταυτοποίηση ανασυνδυασμένης ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης σε ορό ή πλάσμα αίματος αθλητών με διαφορική φθορισμοανοσοχημική μέθοδο ELISA.

Στον Πίνακα 1.2 συνοψίζονται τα αναλυτικά χαρακτηριστικά των διαδικασιών σάρωσης I, II, IV και V που εφαρμόζονταν από το Εργαστήριο για την ανίχνευση απαγορευμένων ουσιών χαμηλού μοριακού βάρους (<600) στα ούρα αθλητών μέχρι την ολοκλήρωση της παρούσας ερευνητικής εργασίας. Στη διαδικασία IV το οργανικό εκχύλισμα μοιράζεται ισόποσα σε 2 μέρη από τα οποία το ένα (A) παραγωγοποιείται και αναλύεται σε δύο συστήματα GC/MS, ενώ το δεύτερο (B) αναλύεται με LC/MS.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Ντόπινγκ – Έλεγχος Ντόπινγκ

Πίνακας 1.2: Αναλυτικές διαδικασίες σάρωσης μικρομοριακών ουσιών

	Διαδικασία I	Διαδικασία II	Διαδικασία IV			Διαδικασία V
			IV A ₁	IV A ₂	IV B	
Όγκος δείγματος	2,5 mL	2,5 mL	5,0 mL	5,0 mL	5,0 mL	2,5 mL
Εσωτερικό πρότυπο	Διφαινυλαμίνη	Κωδεΐνη 3-Μεθοξυτυραμίνη	17α-Μεθυλοτεστε ρόνη	17α-Μεθυλοτεστε ρόνη	17α-Μεθυλοτεστε ρόνη	Μεφρουσίδη
Υδρόλυση	Δ.Ε ¹	Όξινη(HCl),κυστεΐνη	Ενζυματική <i>E.Coli</i> β-γλυκουρονιδάση	Ενζυματική <i>E.Coli</i> β-γλυκουρονιδάση	Ενζυματική <i>E.Coli</i> β-γλυκουρονιδάση	Δ.Ε ¹
Συνθήκες υδρόλυσης	Δ.Ε ¹	100 °C, 30 min	50 °C, 90 min	50 °C, 90 min	50 °C, 90 min	Δ.Ε ¹
Διαλύτης εκχύλισης	tert-Βουτυλ-μεθυλ- αιθέρας	Διαιθυλαιθέρας/ Ισοπροπανόλη (5/1)	Διαιθυλαιθέρας	Διαιθυλαιθέρας	Διαιθυλαιθέρας	Οξικός αιθυλεστέ ρας
pH εκχύλισης	14	9,5 – 10	9-10	9-10	9-10	7
Διαλύτης ανασύστασης	Δ.Ε ¹	Δ.Ε ¹	Δ.Ε ¹	Δ.Ε ¹	ACN/H ₂ O (50/50) 0,1 % οξικό οξύ	Δ.Ε ¹
Αντιδραστήριο παραγωγποίησης	Δ.Ε ¹	MSTFA/ MBTFA	MSTFA/NH ₄ I/DTE	MSTFA/NH ₄ I/DTE	Δ.Ε ¹	CH ₃ COCH ₃ , CH ₃ I, K ₂ CO ₃
Συνθήκες επώασης	Δ.Ε ¹	80 °C, 10 min/ 80 °C, 5 min	80 °C, 30 min	80 °C, 30 min	Δ.Ε ¹	20 min, 900 W ³
Όγκος ένεσης	2 μL	2 μL	2 μL	1 μL	10 μL	1
Διαμοιρασμός ένεσης ²	Χωρίς ²	1/10	1/15	1/10	Δ.Ε ¹	1/15
Ανάλυση	GC/NPD ⁴	GC/MS (full scan) ⁵	GC/MS (SIM) ⁶	GC/HRMS ⁷ (SIM)	LC/IT-MS (PIS) ⁸	GC/MS (SIM)
Αναλύτες	Μη συζευγμένα διεγερτικά, ναρκωτικά	Διεγερτικά, ναρκωτικά	Αναβολικοί παράγοντες κ.α.	Αναβολικοί παράγοντες κ.α.	Κορτικοστεροειδή, αναβολικοί παράγοντες κ.α.	Διουρητικά

¹ Δ.Ε: δεν εφαρμόζεται, ² διαμοιρασμός ένεσης (split) - χωρίς διαμοιρασμό (splitless), ³ η παραγωγποίηση πραγματοποιείται σε φούρνο μικροκυμάτων

⁴ GC/NPD: αεριοχρωματογραφία με ανιχνευτή αζώτου-φωσφόρου, ⁵ GC/MS (full scan): αεριοχρωματογραφία /φασματομετρία μαζών πλήρους σάρωσης

⁶ SIM: παρακολούθηση επιλεγμένου ιόντος (selected ion monitoring), ⁷ HRMS: υψηλής διαχωριστικότητας φασματομετρία μαζών

⁸ LC/IT-MS: υγροχρωματογραφία φασματομετρία μαζών παγίδας ιόντων, PIS: σάρωση θυγατρικών ιόντων (product ion scan)

1.5.4. Ελάχιστο Απαιτούμενο Όριο Απόδοσης ²⁹

Προκειμένου να διασφαλιστεί ότι όλα τα διαπιστευμένα από το WADA εργαστήρια μπορούν να αναφέρουν με ομοίμορφο τρόπο την ύπαρξη απαγορευμένων ουσιών ή μεταβολιτών ή δεικτών αυτών έχουν καθιερωθεί από το WADA επίπεδα για την ελάχιστη ικανότητα ανίχνευσης στις αναλύσεις ρουτίνας. Τα Ελάχιστα Απαιτούμενα Όρια Απόδοσης (Minimum Required Performance Level, MRPL) δεν αποτελούν όριο απαγόρευσης, όριο ανίχνευσης ή ποσοτικοποίησης, αλλά αναλυτικές προδιαγραφές της τεχνικής απόδοσης των εργαστηρίων, που θα πρέπει να πληρούν όλα τα εργαστήρια κατά τον έλεγχο ανίχνευσης απαγορευμένων ουσιών, ενώ είναι δυνατό να αναφέρουν Αντικανονικά Αναλυτικά Ευρήματα που αφορούν την παρουσία ουσιών σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες από το MRPL. Οι ελάχιστες συγκεντρώσεις για κάθε κατηγορία ουσιών που οφείλουν τα Εργαστήρια να μπορούν να ανιχνεύσουν στις αναλύσεις ρουτίνας δίνονται στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 1.3).

Πίνακας 1.3: Ελάχιστα Απαιτούμενα Όρια Απόδοσης (MRPL) απαγορευμένων ουσιών

Κατηγορία Απαγορευμένων Ουσιών	Ειδικά παραδείγματα/εξαιρέσεις	Συγκέντρωση (MRPL)
S1. Εξωγενή αναβολικά στεροειδή ¹		10 ng mL ⁻¹
	Clenbuterol	2 ng mL ⁻¹
	Methandienone ²	2 ng mL ⁻¹
	Methyltestosterone ³	2 ng mL ⁻¹
	Stanozolol ⁴	2 ng mL ⁻¹
S2. Πεπτιδικές ορμόνες, αυξητικοί παράγοντες και σχετικές ουσίες	Ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη (hCG)	5 mIU mL ⁻¹
S3. β ₂ -Αγωνιστές		100 ng mL ⁻¹
S4. Ανταγωνιστές και τροποποιητές ορμονών ⁵		50 ng mL ⁻¹
S5. Διουρητικά ⁶		250 ng mL ⁻¹
S6. Διεγερτικά ^{1,7}		500 ng mL ⁻¹
	Strychnine	200 ng mL ⁻¹
S7. Ναρκωτικά ⁷		200 ng mL ⁻¹
	Buprenorphine	10 ng mL ⁻¹
	Fentanyl και παράγωγα	10 ng mL ⁻¹
S9. Κορτικοστεροειδή ^{1,8}		30 ng mL ⁻¹
P3. β-Ανταγωνιστές ⁹		500 ng mL ⁻¹

¹ Για τη μητρική ουσία και τους μεταβολίτες,

² Για το μεταβολίτη: 17β-methyl-5β-androst-1-ene-3α,17α-diol, ³ Για το μεταβολίτη: 17α-methyl-5β-androstane-3α,17β-diol, ⁴ Για το μεταβολίτη: 3'-hydroxystanozolol

⁵ Ευρήματα formestane συγκέντρωσης <100 ng mL⁻¹ θα πρέπει να συνοδεύονται από ανάλυση IRMS

⁶ Για τους μεταβολίτες και τα προϊόντα αποικοδόμησης των θειαζιδικών διουρητικών

⁷ Για τις ουσίες (όχι ουσίες ορίου) που απαγορεύονται μόνο εντός αγώνων, συστήνεται στα Εργαστήρια να μην τις αναφέρουν εάν η συγκέντρωσή τους είναι χαμηλότερη από το 10 % του MRPL

⁸ Κορτικοστεροειδή και οι μεταβολίτες τους δεν πρέπει να αναφέρονται σε συγκέντρωση < MRPL.

1.6. ΝΤΟΠΙΝΓΚ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΝΤΟΠΙΝΓΚ ΣΕ ΑΛΟΓΑ ΑΓΩΝΩΝ

1.6.1. Εισαγωγή³⁰⁻³⁵

Αν και το ντόπινγκ είναι ως επί το πλείστον συνδεδεμένο με τους αθλητές, η αρχική μορφή του φαινομένου σχετίζεται άμεσα με τις ιπποδρομίες (horseracing) και τους αγώνες λαγωνικών (greyhound racing) και έχει τις ρίζες του στα αρχαία ρωμαϊκά χρόνια, όπου ένα μίγμα νερού με μέλι χρησιμοποιήθηκε ως διεγερτικό σε άλογα που ελάμβαναν μέρος σε αρματοδρομίες.

Στα νεότερα χρόνια, οι πρώτες αναφορές ντόπινγκ σε αγωνιζόμενα άλογα εντοπίζονται το 1666, όπου με διάταγμα στην Αγγλία απαγορεύτηκε η χρήση ουσιών, οι οποίες στην πλειονότητά τους αφορούσαν ουσίες που χορηγούνταν σε αγωνιζόμενα άλογα από τους αντιπάλους και αποσκοπούσαν στη μείωση της απόδοσής τους. Η πρώτη και τεκμηριωμένη υπόθεση ντόπινγκ στη Μεγάλη Βρατανία σημειώθηκε την περίοδο 1807-1812, όταν ο D. Dwason αποπειράθηκε να ντοπάρει άλογα στις περιοχές του New Market και του Doncaster χρησιμοποιώντας αρσενικό, γεγονός που οδήγησε στο θάνατο πολλών αλόγων και στις δύο περιοχές, ενώ ο ίδιος κρεμάστηκε για την εγκληματική αυτή ενέργεια το 1812.

Στο τέλος του 19^{ου} αιώνα ξεκίνησε από Αμερικανούς εκπαιδευτές αλόγων η χρησιμοποίηση των αλκαλοειδών, ουσίες που στα επόμενα χρόνια έγιναν ιδιαίτερα δημοφιλείς σε βαθμό που κρίθηκε αναγκαία η λήψη κατασταλτικών μέτρων και έτσι το 1903 στην Αγγλία και τη Γαλλία το ντόπινγκ αλόγων χαρακτηρίστηκε ως ποινικό αδίκημα. Παρ' όλα αυτά η ανίχνευση των αλκαλοειδών στο σάλιο των αλόγων επιτεύχθηκε λίγο αργότερα, το 1910, οπότε και αναδείχθηκαν επίσημα τα πρώτα κρούσματα.

Με το Δεύτερο Παγκόσμιο Πόλεμο ενισχύθηκε η ανάπτυξη της οργανικής και αναλυτικής χημείας και την περίοδο 1940-1950 διαδόθηκε ευρέως η χρήση των αμφεταμινών και ηρεμιστικών ουσιών. Το 1947, σε μια προσπάθεια να ενισχυθούν οι ερευνητικές προσπάθειες με στόχο την καταπολέμηση του ντόπινγκ, επιστήμονες αναλυτές συνέστησαν την Ομοσπονδία των Χημικών Επίσημων Αγώνων (Association of Official Racing Chemists, AORC). Τη δεκαετία 1950 η εφαρμογή χρωματογραφικών τεχνικών όπως η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC) και η αεριοχρωματογραφία (GC) οδήγησαν στην ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων που επέτρεπαν την ανίχνευση χαμηλών συγκεντρώσεων απαγορευμένων ουσιών και μεταβολιτών τους. Την ίδια εποχή διαδόθηκε ευρέως η χρήση των αναβολικών στεροειδών και των μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών (ΜΣΑΦ) σε αγωνιζόμενα άλογα και ένας αξιοσημείωτος αριθμός αναλυτικών μεθόδων αναπτύχθηκε για την ανίχνευσή τους από τα μέλη του AORC. Το 1961 αναφέρθηκε η αποτελεσματική ανίχνευση του πρώτου κορτικοστεροειδούς σε άλογα (πρεδνιζόνη).

Στα επόμενα χρόνια έγιναν σημαντικά βήματα και εκτεταμένες έρευνες από την πλευρά των επιστημόνων για την αποσαφήνιση του μεταβολισμού μεγάλου αριθμού φαρμακευτικών ουσιών στα άλογα, επιτρέποντας την ανίχνευση των μητρικών ουσιών και των μεταβολιτών τους. Οι χρησιμοποιούμενες αναλυτικές μέθοδοι για το σκοπό αυτό βασίζονται σε ανοσοχημικές τεχνικές, υγροχρωματογραφία και αεριοχρωματογραφία, ενώ ο συνδυασμός των χρωματογραφικών τεχνικών με τη φασματομετρία μαζών οδήγησε στην επίτευξη χαμηλών ορίων ανίχνευσης και την παροχή επαρκώς τεκμηριωμένων αποδεικτικών στοιχείων για την παρουσία μιας απαγορευμένης ουσίας.

Το υψηλό επίπεδο απόδοσης των εφαρμοζόμενων αναλυτικών τεχνικών έθεσε απροσδόκητα νέα θέματα καθώς με τα νέα δεδομένα φαρμακευτικές ουσίες

χρησιμοποιούμενες για θεραπευτικούς σκοπούς είναι δυνατό να ανιχνεύονται σε χρονικά διαστήματα μεγαλύτερα από αυτά που εκτιμάται ότι διαρκεί η φαρμακολογική τους δράση, οδηγώντας σε θετικά αποτελέσματα κατά τον έλεγχο ντόπινγκ. Έτσι, τέθηκε υπό συζήτηση η εφαρμογή ορίων ή επιπέδων αναφοράς σχετικά με ορισμένες φαρμακευτικές ουσίες που έχουν θεραπευτική εφαρμογή και προτάθηκε τα επίπεδα αναφοράς για κάθε μια από τις ουσίες αυτές να βασίζονται στα «μη αποτελεσματικά όρια» (no-effect limits). Παρ'όλα αυτά, η πολιτική που ακολουθείται μέχρι και στις μέρες μας είναι αυτή της «μηδενικής ανοχής» δηλαδή στα δείγματα που λαμβάνονται μετά τις ιπποδρομίες εφαρμόζονται αναλυτικές διαδικασίες για την ανίχνευση κάθε είδους ουσίας ανεξαρτήτως της ικανότητας ή της δυνατότητας που έχει να επηρεάσει ή όχι το αποτέλεσμα του αγώνα και κάθε θετικό αποτέλεσμα αναφέρεται στις αρμόδιες αρχές ακόμα και σε αξιοσημείωτα χαμηλές συγκεντρώσεις. Οι προσπάθειες θέσπισης ορίων και επιπέδων αναφοράς συνεχίζεται με την αξιολόγηση δεδομένων φαρμακοκινητικής και φαρμακοδυναμικής στα άλογα, που έχουν στόχο στην εύρεση των αποτελεσματικών συγκεντρώσεων των φαρμακευτικών ουσιών στο πλάσμα και ακολούθως των μη αποτελεσματικών συγκεντρώσεων στο πλάσμα και στα ούρα των αγωνιζόμενων αλόγων (irrelevant plasma/urine concentration, IPC/IUC), καθώς και των χρονικών παραθύρων ανίχνευσης των συγκεντρώσεων αυτών μετά τη χορήγησή τους στα άλογα.

1.6.2. Η Διεθνής Συμφωνία για την Αναπαραγωγή, τις Ιπποδρομίες και τα Στοιχήματα – Το Άρθρο 6 ^{36,37}

Οι δικαιοδοσίες των ιπποδρομιών έχουν υπογράψει τη Διεθνή Συμφωνία για την Αναπαραγωγή και τους Αγώνες (International Agreement on Breeding and Racing) που δημοσιεύτηκε από την Παγκόσμια Ομοσπονδία Αρχών Ιπποδρομιών (International Federation of Horseracing Authorities, IFHA), σύμφωνα με την οποία τα άλογα θα πρέπει να αγωνίζονται στηριζόμενα αποκλειστικά στη φυσική τους ικανότητα, χωρίς καμία επίδραση από φαρμακευτικές ουσίες. Η Διεθνής Συμφωνία συγκεντρώνει μια σειρά από άρθρα, παραρτήματα και κατευθυντήριες γραμμές που ορίζουν τις βέλτιστες συνιστώμενες πρακτικές της διαχείρισης σε σημαντικούς τομείς των ιπποδρομιών, του γενεαλογικού βιβλίου των αλόγων (stud book administration) και των στοιχημάτων.

Έχει σχεδιαστεί για να βοηθήσει τις αρχές των ιπποδρομιών στην προώθηση των ακόλουθων στόχων:

- να ενισχύσει την εμπιστοσύνη του κοινού στην ακεραιότητα των αγώνων και της βιομηχανίας που το αναπαράγει.
- να προστατεύσει την ασφάλεια και την ευημερία των αλόγων και των υπέων.
- να συντονίσει και να εναρμονίσει προσεγγίσεις από όλο τον κόσμο προωθώντας την ανάπτυξη μιας παγκόσμιας διάστασης.
- να ενισχύσει τις ευκαιρίες για την προώθηση των ιπποδρομιών και για την οικονομική τους ευημερία, προστατεύοντας τα δικαιώματα πνευματικής ιδιοκτησίας τους από την πειρατεία μη εξουσιοδοτημένων φορέων στοιχημάτων.

Το Άρθρο 6 της Διεθνούς Συμφωνίας έχει ως αντικείμενο να προστατεύσει την ακεραιότητα των ιπποδρομιών, ελέγχοντας τη χρήση φαρμακευτικών ουσιών που σε έναν αγώνα μπορούν να φέρουν κάποιο άλογο σε πλεονεκτική ή μειονεκτική θέση σε σχέση με τις

εγγενείς ικανότητές του. Το Άρθρο 6 καθορίζει τις κατηγορίες απαγορευμένων ουσιών ταξινομώντας τις με βάση τη φυσιολογική τους δράση και ορίζει ότι η εύρεση μιας απαγορευμένης ουσίας μπορεί να αφορά την ανίχνευση της ίδιας της ουσίας ή ισομερούς αυτής ή μεταβολίτη απαγορευμένης ουσίας ή ισομερούς μεταβολίτη καθώς επίσης και ότι η εύρεση οποιασδήποτε επιστημονικής ένδειξης χορήγησης ή έκθεσης σε απαγορευμένη ουσία ισοδυναμεί με εύρεση της ουσίας.

Όταν ένα δείγμα που λαμβάνεται από άλογο μετά από αγώνα βρεθεί να περιέχει κάποια απαγορευμένη ουσία τότε το άλογο αυτό θα πρέπει να αποκλειστεί και στον εκπαιδευτή του θα πρέπει να επιβληθούν κυρώσεις. Όταν η απαγορευμένη ουσία ανιχνευθεί σε δείγμα αλόγου που έχει ληφθεί οποιαδήποτε άλλη χρονική στιγμή, τότε οι αρχές των ιπποδρομιών μπορούν να επιβάλλουν κυρώσεις, σύμφωνα με τους δικούς τους κανονισμούς, στο άλογο, τον εκπαιδευτή, τον ιδιοκτήτη ή άλλο πρόσωπο. Σε κάθε περίπτωση ο εκπαιδευτής του αλόγου είναι πάντα υπεύθυνος:

- ♦ για τη σίτιση, τη διαχείριση, την προστασία και την ασφάλεια των αλόγων που έχει στη φροντίδα του.
- ♦ για τη λήψη των κατάλληλων προφυλάξεων ώστε να αποφευχθεί η έκθεση των αλόγων σε απαγορευμένες ουσίες.
- ♦ να παραμένει ενημερωμένος για τις πιθανές συνέπειες της θεραπείας που χορηγείται στα αλόγά του.

Στο Άρθρο 6 καθορίζονται επίσης οι υποχρεώσεις των εργαστηρίων των χωρών που έχουν υπογράψει τη Διεθνή Συμφωνία, μεταξύ αυτών και η Ελλάδα, σύμφωνα με τις οποίες τα Εργαστήρια που αναλαμβάνουν την ανάλυση των δειγμάτων των ιπποδρομιών θα πρέπει να έχουν διαπιστευθεί σύμφωνα με το Διεθνές Πρότυπο ISO/IEC17025 (γενικές απαιτήσεις για την διεξαγωγή εργαστηριακών δοκιμών) και το συμπληρωματικό έγγραφο ILAC-G7 (απαιτήσεις διακρίβωσης και κριτήρια λειτουργίας εργαστηρίων ανάλυσης δειγμάτων ιπποδρόμου), να συμμορφώνονται με την οδηγία για τον καθορισμό της ύπαρξης απαγορευμένων ουσιών (μέρος Β του ILAC-G7), να πληρούν τις προδιαγραφές απόδοσης που έχει θέσει η IFHA, να παίρνουν μέρος σε διεργαστηριακές συγκριτικές δοκιμές και να ελέγχουν τη λήψη νόμιμων θεραπευτικών ουσιών εφαρμόζοντας διεθνώς εναρμονισμένα κριτήρια ανίχνευσης.

1.6.3. Απαγορευμένες Ουσίες ^{36, 38,39}

Το εύρος των απαγορευμένων ουσιών στην περίπτωση των αγωνιζόμενων αλόγων είναι πολύ μεγαλύτερο από αυτό που καλύπτει ο Κατάλογος απαγορευμένων ουσιών που εκδίδεται από το WADA και ισχύει για τους αθλητές. Επίσης, σε αντίθεση με το WADA που κατηγοριοποιεί τις απαγορευμένες ουσίες ανάλογα με τη φαρμακολογική τους δράση, το Άρθρο 6 της προαναφερθείσας Διεθνούς Συμφωνίας κατατάσσει τις απαγορευμένες ουσίες στα άλογα ανάλογα με τη φυσιολογική τους δράση και το σύστημα του οργανισμού στο οποίο δρουν. Σύμφωνα με το Άρθρο 6 απαγορεύονται οι παρακάτω ουσίες:

- I. ουσίες ικανές να προκαλέσουν κάθε στιγμή μια ενέργεια ή μια επίδραση ή και τα δύο σε ένα από τα ακόλουθα φυσιολογικά συστήματα των θηλαστικών:
 - ♦ νευρικό σύστημα
 - ♦ καρδιαγγειακό σύστημα
 - ♦ αναπνευστικό σύστημα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Ντόπινγκ – Έλεγχος Ντόπινγκ

- ♦ πεπτικό σύστημα
 - ♦ ουροποιητικό σύστημα
 - ♦ αναπαραγωγικό σύστημα
 - ♦ μυοσκελετικό σύστημα
 - ♦ κυκλοφορικό σύστημα
 - ♦ ανοσοποιητικό σύστημα με εξαίρεση εγκεκριμένα εμβόλια ενάντια σε μολυσματικούς παράγοντες
 - ♦ ενδοκρινικό σύστημα
- II. εκκρίσεις του ενδοκρινικού συστήματος και συνθετικά ανάλογα αυτών
- III. καλυπτικοί παράγοντες

Προκειμένου να διευκολύνουν τους εκπαιδευτές και τους κτηνιάτρους, οι αρχές των ιπποδρομιών μπορούν να ενσωματώσουν στους κανονισμούς τους παραδείγματα απαγορευμένων ουσιών και κατηγοριοποίηση αυτών. Έτσι, ο Διεθνής Σύνδεσμος Επιτρόπων Ιπποδρομιών (Association of Racing Commissioners International, ARCI) έχει συντάξει μια οδηγία ταξινόμησης των απαγορευμένων ουσιών και των συνιστώμενων ποινών, που έχει σκοπό να βοηθήσει τους επιτρόπους των ιπποδρομιών στην αξιολόγηση της σοβαρότητας των παραβάσεων που αφορούν στη χορήγηση φαρμάκων και απαγορευμένων ουσιών στα άλογα αγώνων. Όπως αναφέρεται και στην οδηγία αυτή, η ταξινόμηση των φαρμακευτικών ουσιών προτείνεται μόνο σαν κατευθυντήρια γραμμή και θα πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο για να βοηθήσει τα αρμόδια πρόσωπα στην εκδίκαση των γεγονότων και στην κατανόηση της σοβαρότητας των αδικημάτων, αφού σε κάθε περίπτωση τα πραγματικά γεγονότα είναι διαφορετικά και μπορεί να υπάρχουν ελαφρυντικές περιστάσεις που θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη. Η βαρύτητα των ποινών που προτείνονται από τον ARCI είναι τόσο μεγαλύτερη όσο μικρότερης τάξης είναι η ουσία που έχει χορηγηθεί. Η ταξινόμηση των απαγορευμένων ουσιών στα άλογα σύμφωνα με τον ARCI συνοψίζεται στον Πίνακα 1.4. Στην κατηγοριοποίηση αυτή δεν περιλαμβάνονται οι ουσίες εκείνες που δεν έχουν καμία επίδραση στη φυσιολογία των αγωνιζόμενων αλόγων και συμβάλλουν είτε στη βελτίωση της διατροφής τους, είτε στην αντιμετώπιση και πρόληψη λοιμώξεων και παρασιτώσεων. Στις ουσίες αυτές ανήκουν τα αντιμικροβιακά και αντιπαρασιτικά φάρμακα και τα θρεπτικά συστατικά, όπως οι βιταμίνες.

Αντίστοιχα, η Παγκόσμια Ομοσπονδία Ιπποδρομιών (Federation Equestrian International, FEI) εκδίδει σε ετήσια βάση Κατάλογο Απαγορευμένων Ουσιών στον οποίο αναφέρονται ονομαστικά οι απαγορευμένες ουσίες και οι φαρμακολογικές τους δράσεις. Για το 2011 ο Κατάλογος αυτός περιλαμβάνει 1156 ουσίες και τέθηκε σε ισχύ από τις αρχές Απριλίου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Ντόπινγκ – Έλεγχος Ντόπινγκ

Πίνακας 1.4: Ταξινόμηση απαγορευμένων ουσιών στα άλογα σύμφωνα με τον ARCI

Τάξη	Περιγραφή	Παραδείγματα
1	Διεγερτικές και ναρκωτικές ουσίες που παρουσιάζουν τη μέγιστη δυνατότητα να επηρεάσουν την αθλητική απόδοση και δεν έχουν καμία αποδεκτή ιατρική εφαρμογή στα αγωνιζόμενα άλογα	Οπιούχα, παράγωγα του οπίου, συνθετικά οπιοειδή, ψυχοδραστικές ουσίες, αμφεταμίνες, ουσίες τύπου αμφεταμίνης και ανάλογες ουσίες (όπως π.χ. οι ουσίες nikethamide, mazindol, pemoline, pentetrazole)
2	Ουσίες που έχουν πολύ μεγάλη δυνατότητα να επηρεάσουν την αθλητική απόδοση, αλλά μικρότερη από αυτή των ουσιών της τάξης 1 και δεν είναι γενικώς αποδεκτές ως θεραπευτικοί παράγοντες στα άλογα αγώνων ή είναι θεραπευτικοί παράγοντες με μεγάλη δυνατότητα κατάχρησης	<ul style="list-style-type: none"> - μερικοί αγωνιστές οπιοειδών, μικτοί αγωνιστές-ανταγωνιστές - μη οπιοειδή ψυχοτρόπα φάρμακα (μπορεί να έχουν διεγερτική, κατασταλτική, αναλγητική ή νευροληπτική δράση) - φάρμακα που μπορεί να έχουν διεγερτική δράση στο ΚΝΣ - φάρμακα με εμφανή κατασταλτική δράση του ΚΝΣ - αντικαταθλιπτικά και αντιψυχωσικά με ή χωρίς εμφανή διεγερτική ή κατασταλτική επίδραση στο ΚΝΣ - νευρομυικοί ανταγωνιστές - τοπικά αναισθητικά (ενέσιμα) με δυνατότητα χρήσης ως αναστολείς του νευρικού συστήματος (πλην της προκαΐνης) - δηλητήρια φιδιών και άλλες ουσίες βιολογικής προέλευσης με δυνατότητα χρήσης ως αναστολείς του νευρικού συστήματος
3	Ουσίες που μπορεί να έχουν ή όχι γενικά αποδεκτή ιατρική εφαρμογή στα άλογα αγώνων, αλλά οι φαρμακολογικές τους ιδιότητες υποδηλώνουν μικρότερη δυνατότητα να επηρεάσουν την απόδοση συγκριτικά με τις ουσίες της τάξης 2	<ul style="list-style-type: none"> - φάρμακα που επηρεάζουν το αυτόνομο νευρικό σύστημα, χωρίς εμφανή δράση στο ΚΝΣ, αλλά δρουν στο καρδιαγγειακό και στο αναπνευστικό, συμπεριλαμβανομένων των βρογχοδιασταλτικών - τοπικά αναισθητικά με δυνατότητα αποκλεισμού του νευρικού συστήματος αλλά και με δυνατότητα ανίχνευσης υπολειμμάτων στα ούρα σε επίπεδα που δε σχετίζονται με την αναισθητική δράση (προκαΐνη) - φάρμακα με ήπια κατασταλτική δράση (π.χ. αντισταμινικά) - αγγειοδιασταλτικές και αντιυπερτασικές ουσίες - ισχυρά διουρητικά που επηρεάζουν τη νεφρική λειτουργία και τη σύσταση των υγρών του σώματος (διουρητικά αγκύλης ή υψηλής ουδου, 'high ceiling') - αναβολικά ανδρογόνα στεροειδή και αναβολικοί παράγοντες

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Ντόπινγκ – Έλεγχος Ντόπινγκ

4	<p>Ουσίες με θεραπευτική χρήση με μικρότερη δυνατότητα να επηρεάσουν την αγωνιστική απόδοση των αλόγων</p>	<ul style="list-style-type: none"> - μη οπιοειδή με ήπια αντιυπερτική δράση μέσω ΚΝΣ - φάρμακα που επηρεάζουν το αυτόνομο νευρικό σύστημα αλλά δεν έχουν επίδραση στο ΚΝΣ, στο καρδιαγγειακό και το αναπνευστικό: τοπικά αποσυμφορητικά και αγγειοσυσταλτικά, αντισπασμωδικά γαστρεντερικού, φάρμακα με κύρια δράση στα αγγεία του ΚΝΣ και στους λείους μύες των σπλάχνων, ουσίες που προάγουν την κένωση της ουροδόχου κύστης - αντισταμινικές ουσίες που δεν παρουσιάζουν αξιόλογη κατασταλτική δράση του ΚΝΣ (αναστολείς των H₂-υποδοχέων δε συμπεριλαμβάνονται εδώ αλλά στην τάξη 5) - αλατοκορτικοειδή - χαλαρωτικά σκελετικών μυών - αντιφλεγμονώδη φάρμακα που μπορούν να μειώσουν τον πόνο ως συνέπεια της αντιφλεγμονώδους δράσης τους: μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη (ΜΣΑΦ), γλυκοκορτικοστεροειδή, άλλοι αντιφλεγμονώδεις παράγοντες - λιγότερο ισχυρά διουρητικά - καρδιακοί γλυκοσίδες και αντιαρρυθμικοί παράγοντες - τοπικά αναισθητικά μη διαθέσιμα σε ενέσιμη μορφή - αντιδιαρροϊκά φάρμακα - βλεννολυτικά, αποχρεμπτικά
5	<p>Ουσίες με θεραπευτική εφαρμογή για τις οποίες έχουν καθοριστεί όρια συγκέντρωσης από τις αρχές των ιπποδρομιών και άλλοι παράγοντες που εμφανίζουν κυρίως τοπικές δράσεις</p>	<p>διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO), φάρμακα κατά του έλκους, κάποια αντιαλλεργικά, αντιπηκτικές ουσίες</p>

1.6.4. Απαγορευμένες Ουσίες Ορίου ^{36,40}

Σύμφωνα με το Άρθρο 6 όρια συγκέντρωσης μπορούν να καθιερωθούν σε παγκόσμιο επίπεδο:

1. για ουσίες που είναι ενδογενείς για τα άλογα
2. για ουσίες προερχόμενες από φυτά που χρησιμοποιούνται παραδοσιακά για βοσκή ή συγκομιδή ως ζωοτροφή των αλόγων
3. για ουσίες που περιέχονται στις ζωοτροφές των αλόγων και μπορεί να προέρχονται από επιμόλυνση κατά την καλλιέργεια, τη μεταποίηση ή την επεξεργασία, την αποθήκευση ή τη μεταφορά.

Οι ουσίες για τις οποίες έχει επιβληθεί όριο συγκέντρωσης και τα ισχύοντα ανώτερα επιτρεπτά όρια συνοψίζονται στον Πίνακα 1.5. Για όλες τις ουσίες, με εξαίρεση τη θεοβρωμίνη ο καθορισμός των ορίων προέκυψε μετά από εκτίμηση των φυσιολογικών συγκεντρώσεων σε δείγματα που ελήφθησαν από ένα μεγάλο πληθυσμό αλόγων, μελέτες που σε πολλές περιπτώσεις διεξήχθησαν σε παγκόσμιο επίπεδο. Τα εργαστήρια που αναλαμβάνουν την ανάλυση δειγμάτων ιπποδρομιών θα πρέπει να διαθέτουν αξιόπιστες μεθόδους για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ουσιών αυτών, η ανίχνευση των οποίων σε συγκέντρωση μεγαλύτερη από τα ισχύοντα όρια θα πρέπει να αναφέρεται στις αρχές ως παραβίαση ντόπινγκ.

Πίνακας 1.5: Απαγορευμένες ουσίες ορίου και ανώτερα επιτρεπτά όρια συγκέντρωσης

Απαγορευμένη Ουσία Ορίου	Όριο συγκέντρωσης
Αρσενικό	0,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ολική συγκέντρωση αρσενικού στα ούρα
Μπολδενόνη	0,015 $\mu\text{g mL}^{-1}$ μπολδενόνης ελεύθερης κ συζευγμένης στα ούρα αρσενικών αλόγων (εξαιρούνται οι εκτομίες)
Διοξειδίο του άνθρακα	36 mM διοξειδίου του άνθρακα στο πλάσμα
Διμυθλοσουλφοξείδιο (DMSO)	15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ DMSO στα ούρα ή 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ DMSO στο πλάσμα
Οιστρανεδιόλη σε αρσενικά (όχι εκτομίες)	0,045 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 5 α - estrane-3 β ,17 α -diol ελεύθερης και συζευγμένης με γλυκουρονικό οξύ στα ούρα
Υδροκορτιζόνη	1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ υδροκορτιζόνης στα ούρα
3-Μεθοξυτυραμίνη	4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ελεύθερης και συζευγμένης 3-μεθοξυτυραμίνης στα ούρα
Σαλικυλικό οξύ	750 $\mu\text{g mL}^{-1}$ σαλικυλικού οξέος στα ούρα 6,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ σαλικυλικού οξέος στο πλάσμα
Τεστοστερόνη	0,02 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ελεύθερης και συζευγμένης τεστοστερόνης στα ούρα εκτομία 0,055 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ελεύθερης και συζευγμένης τεστοστερόνης στα ούρα θηλυκών αλόγων
Θεοβρωμίνη	2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ θεοβρωμίνης στα ούρα 0,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ θεοβρωμίνης στο πλάσμα

1.6.5. Διαδικασία ελέγχου ντόπινγκ ^{31,36,41-43}

Η διαδικασία ελέγχου ντόπινγκ στα άλογα είναι παρεμφερής με αυτή που αναφέρθηκε για τους αθλητές και περιλαμβάνει τη δειγματοληψία μετά τον αγώνα, αλλά και σε οποιαδήποτε άλλη στιγμή και το διαμοιρασμό του δείγματος σε δύο μέρη (Α- και Β- δείγμα), τη μεταφορά των δειγμάτων στο εργαστήριο υπό αυστηρούς κανονισμούς ασφάλειας και με τη συνοδεία σαφώς καθορισμένων από τις αρχές εγγράφων που αφορούν τα δείγματα, την εργαστηριακή ανάλυση και την αναφορά των αποτελεσμάτων. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων, τα εξεταζόμενα δείγματα είναι δείγματα ούρων και σπανιότερα δείγματα αίματος, δεδομένου ότι τα ούρα έχουν τα πλεονεκτήματα της ευκολότερης συλλογής, της παρουσίας σε αυτά μεταβολιτών των ληφθέντων φαρμάκων και της ύπαρξης των μητρικών ουσιών και των μεταβολιτών τους σε υψηλότερες συγκεντρώσεις συγκριτικά με το αίμα.

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

Σε ένα δεύτερο στάδιο, τα ύποπτα δείγματα που προέκυψαν από τις αναλύσεις σάρωσης επανααναλύονται με επιβεβαιωτικές διαδικασίες, εξειδικευμένες για την ανίχνευση της ύποπτης ουσίας. Για το σκοπό αυτό εφαρμόζεται χρωματογραφικός διαχωρισμός και ανίχνευση της ουσίας με φασματομετρία μαζών, καθώς ο συνδυασμός τους προσφέρει υψηλή εξειδίκευση και εκλεκτικότητα. Τα αποτελέσματα συγκρίνονται με τα αποτελέσματα της ανάλυσης πρότυπου δείγματος εμβολιασμένου με την ουσία και ελέγχεται αν πληρούνται τα κριτήρια που έχει θέσει ο AORC για την ταυτοποίηση απαγορευμένων ουσιών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ – ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ ΧΡΟΝΟΥ ΠΤΗΣΗΣ (LC/TOF-MS)

2.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ – ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ ⁴⁴⁻⁴⁷

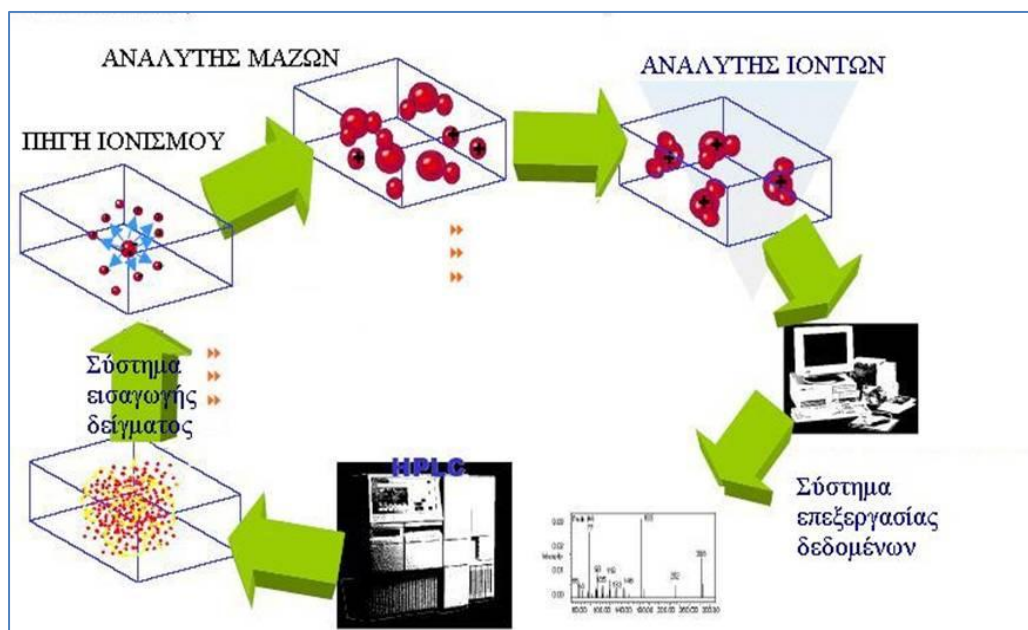
Η φασματομετρία μαζών (mass spectrometry, MS) αποτελεί μια από τις πλέον σύγχρονες αναλυτικές τεχνικές και στηρίζεται στο σχηματισμό ιόντων σε αέρια φάση από ένα δείγμα (στερεό, υγρό ή αέριο) και στην ανάλυση των ιόντων αυτών βάσει του λόγου της μάζας προς το φορτίο (mass to charge ratio, m/z). Με τη χρησιμοποίηση κατάλληλου ανιχνευτή επιτυγχάνεται η μέτρηση του ηλεκτρικού ρεύματος που παρέχουν τα ιόντα με διαφορετικό λόγο m/z και το διάγραμμα που απεικονίζει την ένταση συναρτήσει του λόγου m/z αποτελεί το φάσμα μαζών που η μορφή του κάτω από αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες είναι χαρακτηριστική για κάθε ουσία («δακτυλικό αποτύπωμα»). Η φασματομετρία μαζών χαρακτηρίζεται από αυξημένη ευαισθησία, υψηλή ειδικότητα και εκλεκτικότητα, δυνατότητα εφαρμογής σε μεγάλο εύρος μαζών, δυνατότητα διασύνδεσης με τεχνικές διαχωρισμού όπως η αεριοχρωματογραφία (GC/MS), η υγροχρωματογραφία (LC/MS) και η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (CE/MS), πλεονεκτήματα που αντισταθμίζουν το υψηλό κόστος αγοράς και συντήρησης των συστημάτων MS, που αποτελεί κύριο μειονέκτημα της τεχνικής. Λόγω των παραπάνων πλεονεκτημάτων βρίσκει εφαρμογή σε ένα ευρύ επιστημονικό πεδίο (ατομική φυσική, χημική και φαρμακευτική ανάλυση, προσδιορισμό φυσικοχημικών παραμέτρων, μελέτη βιολογικών συστημάτων κ.λ.π) και χρησιμοποιείται τόσο κατά την ποιοτική ανάλυση, τη διερεύνηση της δομής, την ταυτοποίηση και τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους ουσιών, όσο και στην ποσοτική ανάλυση και τον προσδιορισμό φαρμακευτικών ουσιών σε βιολογικά υγρά, βιοδεικτών, μεταβολιτών και πρωτεϊνών για τη διάγνωση και την αντιμετώπιση ασθενειών και σε πολλούς άλλους τομείς.

Κάθε φασματόμετρο μαζών αποτελείται από τα εξής βασικά τμήματα: α) το σύστημα εισαγωγής δείγματος, β) την πηγή ιοντισμού, γ) τον αναλυτή μαζών και δ) τον ανιχνευτή των ιόντων. Εκτός από τα τμήματα αυτά τα φασματόμετρα μαζών διαθέτουν και άλλες μονάδες απαραίτητες για τη λειτουργία τους, όπως αντλίες παροχής υψηλού κενού και συστήματα παρουσίασης και καταγραφής των λαμβανόμενων φασμάτων. Σήμερα, τα συστήματα αυτά είναι συνδεδεμένα με ηλεκτρονικούς υπολογιστές και εξειδικευμένα λογισμικά προγράμματα, με τα οποία πραγματοποιείται ο κεντρικός έλεγχος της λειτουργίας του οργάνου και η καταγραφή, επεξεργασία, ερμηνεία και παρουσίαση των λαμβανόμενων αναλυτικών αποτελεσμάτων.

Στο Σχήμα 2.1 απεικονίζονται οι δομικές μονάδες ενός φασματομέτρου μαζών. Τα μόρια του προς ανάλυση δείγματος εισέρχονται μέσω του κατάλληλου συστήματος εισαγωγής στην πηγή ιοντισμού, όπου λαμβάνει χώρα η μετατροπή τους σε θετικά ή αρνητικά φορτισμένα ιόντα, τα οποία στη συνέχεια ευθυγραμμίζονται σε λεπτή δέσμη και με τη βοήθεια ηλεκτρικού πεδίου επιταχύνονται και κατευθύνονται προς τον αναλυτή μαζών. Στο τμήμα αυτό τα ιόντα διαχωρίζονται με βάση το λόγο m/z , είτε στο χώρο είτε στο χρόνο. Το

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Υγροχρωματογραφία – Φασματομετρία Μαζών Χρόνου Πτήσης (LC/TOF-MS)

παραγόμενο ηλεκτρικό ρεύμα των ιόντων μετρείται με τη βοήθεια κατάλληλου ανιχνευτή και το λαμβανόμενο σήμα καταγράφεται από το σύστημα επεξεργασίας δεδομένων.



Σχήμα 2.1: Διαγραμματική απεικόνιση των βασικών μονάδων ενός φασματομέτρου μαζών

Από τις αρχές του 20^{ου} αιώνα, οπότε και εφευρέθηκε το πρώτο φασματόμετρο μαζών από τον Thomson, μέχρι σήμερα, η τεχνολογική ανάπτυξη των συστημάτων φασματομετρίας μαζών έχει σημειώσει ραγδαία εξέλιξη, διευρύνοντας ταυτόχρονα το πεδίο εφαρμογών της τεχνικής. Ιδιαίτερη έμφαση έχει δοθεί τα τελευταία χρόνια στην ανάπτυξη νέων ή στη βελτίωση των ήδη χρησιμοποιούμενων πηγών ιοντισμού και αναλυτών μαζών, για την επίτευξη ακόμα καλύτερων επιδόσεων σε ό,τι αφορά την ευαισθησία και τη διαχωριστική ικανότητα. Στο παρόν κεφάλαιο παρατίθενται τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά της τεχνικής της φασματομετρίας μαζών με αναλυτή χρόνου πτήσης (Time Of Flight Mass Spectrometry, TOF-MS), η οποία έχει υποστεί στις μέρες μας σημαντικές βελτιώσεις και αποκτά ολοένα και μεγαλύτερη εφαρμογή σε τομείς όπως τοξικολογικές αναλύσεις, έλεγχος ντόπινγκ, ανάλυση πρωτεϊνών κ.λ.π.

2.2 ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ ΧΡΟΝΟΥ ΠΤΗΣΗΣ

2.2.1. Αρχή λειτουργίας ⁴⁸

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

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Υγροχρωματογραφία – Φασματομετρία Μαζών Χρόνου Πτήσης (LC/TOF-MS)

που καταγράφονται, χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό των λόγων m/z των αντίστοιχων ιόντων.

2.2.2. Σύντομο ιστορικό⁴⁸⁻⁵²

Η έννοια του αναλυτή μαζών χρόνου πτήσης περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1946 από τον W. Stephens και το 1948 οι A.E. Cameron και D.F. Eggers κατασκεύασαν το πρώτο φασματόμετρο μαζών TOF, που περιελάμβανε μια παλμική πηγή ιόντων, ένα θάλαμο πτήσης και έναν παλμογράφο για την ανίχνευση των ιόντων. Η διαχωριστική ικανότητα του συστήματος αυτού ήταν πολύ χαμηλή. Λίγα χρόνια μετά, το 1955 οι W.C. Wiley και J.B. McLaren, δημοσίευσαν το σχεδιασμό ενός γραμμικού συστήματος TOF-MS, που αργότερα έγινε και το πρώτο εμπορικά διαθέσιμο σύστημα, οπότε και ξεκίνησε μια σειρά μελετών, στη δεκαετία του '60, που έδωσε σημαντική ώθηση στην εφαρμογή και εξέλιξη της τεχνικής, η οποία όμως σύντομα αντικαταστάθηκε από συστήματα που έφεραν μαγνητικούς και τετραπολικούς αναλυτές μαζών που παρουσίασαν μεγαλύτερη ευαισθησία και διαχωριστική ικανότητα. Σημαντικό ρόλο σε αυτό έπαιξε η απουσία διαθέσιμων τεχνολογιών ταχείας καταγραφής των λαμβανόμενων σημάτων και επεξεργασίας των φασμάτων μαζών σε χρονικό εύρος της τάξης των μsec . Η εξέλιξη της τεχνολογίας στον τομέα αυτό σε συνδυασμό με την εξέλιξη των τεχνικών ιοντισμού μεγαλομοριακών βιομορίων οδήγησε τα τελευταία χρόνια στην επανεμφάνιση των συστημάτων, με τον αναλυτή TOF να αποτελεί στις μέρες μας ένα πολλά υποσχόμενο αναλυτή μαζών.

2.2.3. Περιγραφή τεχνικής TOF-MS^{51, 53-56}

Η κινητική ενέργεια (E) που αποκτά ένα ιόν φορτίου ez (όπου e είναι το φορτίο ενός ηλεκτρονίου) όταν εφαρμοστεί σε αυτό σταθερό δυναμικό (V) δίνεται από την εξίσωση:

$$E = Vez = \frac{1}{2}mu^2 \quad [2.1]$$

όπου m η μάζα του ιόντος και u η ταχύτητα με την οποία κινείται.

Η εξίσωση 2.1 μπορεί να γραφεί και με την ακόλουθη μορφή, από την οποία φαίνεται ότι για δεδομένη κινητική ενέργεια, τα ιόντα με μικρή μάζα θα έχουν μεγαλύτερη ταχύτητα από τα ιόντα με μεγαλύτερη μάζα:

$$m = \frac{2Vez}{u^2} \quad [2.2]$$

Μετά την έξοδό τους από την πηγή ιοντισμού τα ιόντα επιταχύνονται προς δεδομένη κινητική ενέργεια και με την εφαρμογή παλμού εισέρχονται στο θάλαμο πτήσης, μήκους L , όπου υπάρχει ισχυρό κενό και απουσία πεδίου και διαχωρίζονται κατά τη διάρκεια της πτήσης τους με βάση την τιμή του λόγου m/z και προσκρούουν στον ανιχνευτή, όπου καταγράφονται οι αντίστοιχοι για κάθε ιόν χρόνοι πτήσης. Ο χρόνος εφαρμογής του παλμού ορίζεται ως χρόνος μηδέν. Ο χρόνος πτήσης t ενός ιόντος δίνεται από τη σχέση:

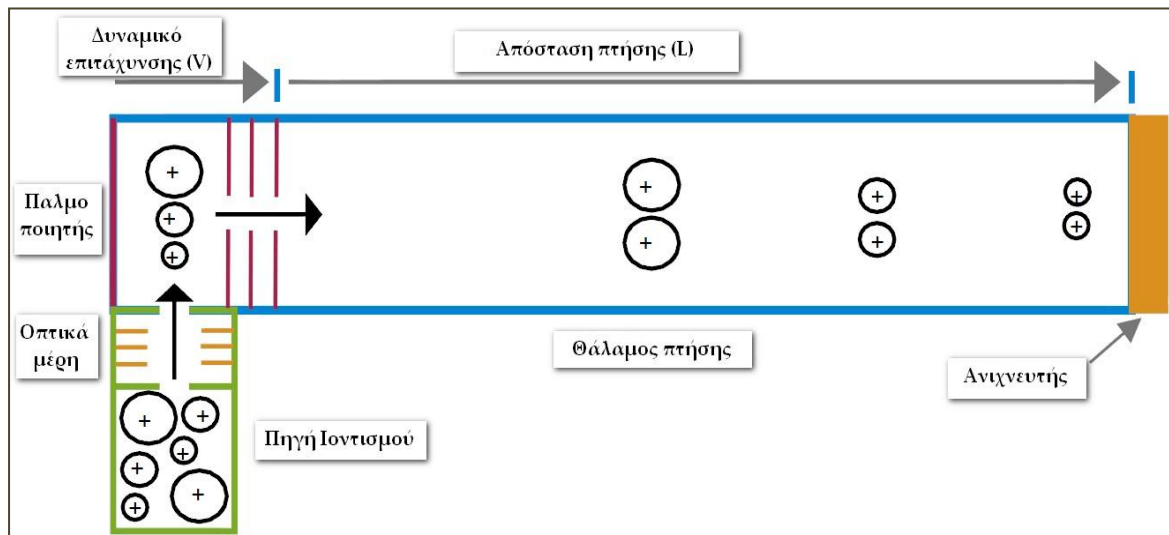
$$t = \frac{L}{u} \quad [2.3]$$

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Υγροχρωματογραφία – Φασματομετρία Μαζών Χρόνου Πτήσης (LC/TOF-MS)

Ακολούθως ο λόγος m/z του ιόντος υπολογίζεται από τη σχέση 2.4, όπου φαίνεται ότι για δεδομένο μήκος διαδρομής πτήσης και δυναμικό του εφαρμοζόμενου πεδίου, είναι ανάλογος του τετραγώνου του χρόνου πτήσης του αντίστοιχου ιόντος.

$$\frac{m}{z} = 2Ve \left(\frac{t}{L} \right)^2 \quad [2.4]$$

Έτσι στον αναλυτή TOF, η εφαρμογή παλμού δημιουργεί ένα σύνολο ιόντων, γνωστό και ως πακέτο ιόντων (transients), που διαχωρίζεται στο θάλαμο πτήσης ανάλογα με τις επιμέρους ταχύτητες των ιόντων. Ο χρόνος μεταξύ δύο διαδοχικών παλμών θα πρέπει να είναι μεγαλύτερος από το χρόνο πτήσης του ιόντος με τη μεγαλύτερη τιμή m/z . Στην πράξη ο μετρούμενος χρόνος πτήσης των ιόντων είναι μεγαλύτερος από τον πραγματικό αφού συμπεριλαμβάνονται σε αυτόν και δύο χρονικές καθυστερήσεις: ο χρόνος που μεσολαβεί από την εφαρμογή του παλμού μέχρι την εμφάνιση του υψηλού δυναμικού στην πλάκα του παλμοποιητή και ο χρόνος που μεσολαβεί από την πρόσκρουση ενός ιόντος στον ανιχνευτή μέχρι τη λήψη του ψηφιακού σήματος.



Σχήμα 2.2: Αναλυτής Χρόνου Πτήσης: ιόντα με μικρότερη τιμή m/z κινούνται με μεγαλύτερη ταχύτητα και φτάνουν πιο γρήγορα στον ανιχνευτή ιόντων (μικρότερος χρόνος πτήσης) σε σχέση με ιόντα με μεγαλύτερη τιμή m/z

2.2.4. Διαχωριστική ικανότητα και ευαισθησία αναλυτών TOF-MS

2.2.4.1. Διαχωριστική Ικανότητα^{48, 51, 53, 54, 56-63}

Η διαχωριστική ικανότητα (resolution, R) του αναλυτή TOF-MS υπολογίζεται με εφαρμογή των εξισώσεων που ακολουθούν:

$$\frac{m}{z} = \left(\frac{2eV}{L^2} \right) t^2 \quad [2.4]$$

$$\frac{1}{z} dm = \left(\frac{2eV}{L^2} \right) 2t dt \quad [2.5]$$

$$R = \frac{m}{\Delta m} = \frac{t}{2\Delta t} \quad [2.6]$$

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Υγροχρωματογραφία – Φασματομετρία Μαζών Χρόνου Πτήσης (LC/TOF-MS)

όπου m και t , η μάζα και ο χρόνος πτήσης του ιόντος και Δm και Δt , το εύρος των κορυφών μετρούμενο στο ημιύψος (full width half maximum, FWHM) στους άξονες μάζας και χρόνου, αντίστοιχα.

Στην πράξη, οι μετρούμενοι χρόνοι πτήσης επηρεάζονται σημαντικά από παράγοντες που οδηγούν σε διεύρυνση των φασματικών κορυφών και συντελούν στη μείωση της διαχωριστικής ικανότητας. Οι κυριότεροι παράγοντες είναι:

- διασπορά του χρόνου σχηματισμού των ιόντων στην πηγή ιοντισμού
- διασπορά ταχυτήτων και κινητικής ενέργειας
- turn around time: χρόνος που μεσολαβεί ώστε τα ιόντα που κινούνται σε κατεύθυνση αντίθετη προς τον ανιχνευτή να επιβραδυνθούν σε μηδενική ταχύτητα και ακολούθως να επιταχυνθούν ξαναπερνώντας από την αρχική τους θέση
- διασπορά στο χώρο
- ανομοιόμορφη επιτάχυνση

Οι παραπάνω παράγοντες, που συνήθως δεν αλληλοσχετίζονται, έχουν σαν αποτέλεσμα να εμφανίζεται διασπορά στις κινητικές ενέργειες των ιόντων κατά την εφαρμογή του παλμού και συνεπώς διασπορά των ταχυτήτων τους. Κατά συνέπεια, ιόντα με τις ίδιες τιμές λόγου m/z μπορούν να φτάσουν στον ανιχνευτή με πολύ μικρές διαφορές στο χρόνο, της τάξης των μs , γεγονός που προκαλεί διεύρυνση των κορυφών των ιόντων στα λαμβανόμενα φάσματα μαζών και μείωση της διαχωριστικής ικανότητας. Σε μεγάλο βαθμό, η επίδραση των παραγόντων που αναφέρθηκαν μπορεί να ελαχιστοποιηθεί με την εφαρμογή συγκεκριμένων βελτιώσεων. Συγκεκριμένα:

- εστίαση των ιόντων στο χώρο: η τεχνική διόρθωσης του φαινομένου διασποράς των ιόντων στο χώρο περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Wiley και McLaren τη δεκαετία του 50 και αφορά κατάλληλη ρύθμιση του ηλεκτροστατικού πεδίου επιτάχυνσης, ώστε ιόντα με την ίδια τιμή m/z που βρίσκονται σε μεγαλύτερη απόσταση σε σχέση με τον ανιχνευτή, να επιταχύνονται για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στη διάταξη επιτάχυνσης, αποκτώντας μεγαλύτερες ταχύτητες από τα αντίστοιχα που βρίσκονται σε θέση πιο κοντά στον ανιχνευτή. Έτσι, όλα τα ιόντα φτάνουν στον ανιχνευτή την ίδια χρονική στιγμή (για απόστασεις των αρχικών θέσεων της τάξης των 2 mm)
- μείωση της διασποράς αρχικών ταχυτήτων: μέσω χρονικής υστέρησης μεταξύ του ιοντισμού και της εφαρμογής του παλμού ώθησης, τα ιόντα διαφορετικών ταχυτήτων που σχηματίζονται στην πηγή ιοντισμού κατανέμονται σε διάφορα σημεία του χώρου στον επιταχυντή, οπότε οι αρχικές διαφορές ταχυτήτων μετατρέπονται σε διασπορά των ιόντων στο χώρο και στην συνέχεια εστιάζονται όπως περιγράφηκε παραπάνω.
- Μείωση του χρόνου “turn around time” : μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με ενίσχυση του εφαρμοζόμενου ηλεκτροστατικού πεδίου κατά την επιτάχυνση, είτε με αύξηση του χρόνου πτήσης. Και οι δύο τρόποι αντιμετώπισης του φαινομένου παρουσιάζουν δυσκολίες, καθώς υψηλής έντασης ηλεκτροστατικό πεδίο μπορεί να οδηγήσει σε μεγάλες διασπορές της κινητικής ενέργειας, ενώ η αύξηση του χρόνου πτήσης συνεπάγεται τεχνικές δυσκολίες (αύξηση μεγέθους θαλάμου πτήσης, δυσκολία διατήρησης υψηλού κενού κ.λ.π)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Υγροχρωματογραφία – Φασματομετρία Μαζών Χρόνου Πτήσης (LC/TOF-MS)

- Διατάξεις ενεργειακής εστίασης και εστίασης στο χώρο: στις βελτιώσεις αυτές συμπεριλαμβάνεται η χρήση ιοντικού ανακλαστικού κατόπτρου (ion reflectron) που θα περιγραφεί σε επόμενη παράγραφο.
- Ορθογώνια επιτάχυνση ιόντων: η διάταξη ορθογώνιας επιτάχυνσης εκμεταλλεύεται την απουσία διασποράς ταχυτήτων σε κατεύθυνση κάθετη προς την κατεύθυνση της δέσμης των ιόντων που εξέρχεται από την πηγή ιοντισμού και περιγράφεται σε επόμενη παράγραφο.

Επιπλέον παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν τη διαχωριστική ικανότητα του αναλυτή μαζών χρόνου πτήσης, είναι ο χρόνος απόκρισης του ανιχνευτή, η αβεβαιότητα χρονομέτρησης των γεγονότων εφαρμογής του παλμού ($t=0$) και πρόσκρουσης των ιόντων στον ανιχνευτή και οι μεταβολές της παροχής ισχύος στο όργανο. Συγκεκριμένα, διακυμάνσεις υψηλής συχνότητας προκαλούν διεύρυνση των φασματικών κορυφών και μείωση της διαχωριστικής ικανότητας, ενώ βραδείες μεταβολές προκαλούν μετατόπιση των μετρούμενων τιμών m/z και καθιστούν αναγκαία τη συχνότερη βαθμονόμηση του συστήματος σε ό,τι αφορά τον άξονα τιμών m/z . Οι παράγοντες αυτοί οδηγούν σε διασπορά των καταγραφόμενων χρονικών στιγμών πρόσκρουσης στον ανιχνευτή ιόντων με την ίδια ή παρόμοια τιμή m/z . Το πρόβλημα επιδεινώνεται από την έλλειψη ψηφιοποιητών με προδιαγραφές τέτοιες ώστε να ανταποκρίνονται στη μεγάλη ταχύτητα λήψης φασμάτων μάζας και στην ανάγκη μεγάλου γραμμικού δυναμικού εύρους λειτουργίας. Στην πλειοψηφία των συστημάτων TOF-MS, ένα φάσμα μαζών καταγράφεται σε χρόνο 50 μsec περίπου και αντιστοιχεί θεωρητικά σε 2000 λαμβανόμενα σήματα, τα οποία αθροίζονται και ο μέσος όρος τους αποτελεί ένα πλήρες φάσμα μαζών. Τα τελευταία χρόνια αποτελεί ιδιαίτερης σημασίας η προσπάθεια βελτίωσης των λειτουργικών χαρακτηριστικών των ανιχνευτών που χρησιμοποιούνται στα συστήματα TOF-MS.

2.2.4.2. Ευαισθησία⁶⁰

Η ευαισθησία του αναλυτή χρόνου πτήσης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον «Παράγοντα Κύκλου Λειτουργίας» (Duty Cycle), που αναφέρεται στο λόγο του αριθμού των ιόντων που εξέρχονται από το πεδίο επιτάχυνσης σε σχέση με τον αριθμό των ιόντων που φτάνουν σε αυτό. Πιο αυστηρά, θα μπορούσε να οριστεί ως ποσοστό χρόνου της συνολικής διάρκειας του παλμού που απαιτείται ώστε τα ιόντα με δεδομένη τιμή m/z να φτάσουν στον ανιχνευτή και να καταγραφούν, δηλαδή μέτρο του ποσοστού των ιόντων που ανιχνεύονται σε σχέση με αυτά που επιταχύνονται. Συνολικά όμως η ευαισθησία ενός φασματομέτρου TOF-MS είναι συνάρτηση τόσο του παράγοντα κύκλου λειτουργίας, όσο και της αποτελεσματικότητας του αναλυτή και του ανιχνευτή. Το βέλτιστο αποτέλεσμα λαμβάνεται όταν ο χρόνος που απαιτείται για την πλήρωση του επιταχυντή με ένα πακέτο ιόντων είναι ίδιος με το χρόνο που χρειάστηκε το προηγούμενο πακέτο για να φτάσει από τον επιταχυντή στον ανιχνευτή, οπότε και εξασφαλίζεται ότι τα ιόντα με χαμηλή τιμή m/z του νέου πακέτου δε θα φτάσουν στον αναλυτή μαζί με τα βαρύτερα ιόντα του προηγούμενου πακέτου ιόντων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Υγροχρωματογραφία – Φασματομετρία Μαζών Χρόνου Πτήσης (LC/TOF-MS)

2.2.4.3. Σχέση ευαισθησίας – διαχωριστικής ικανότητας^{58,62}

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι σημαντικότεροι παράγοντες που επηρεάζουν την ευαισθησία και την διαχωριστική ικανότητα συστημάτων με αναλυτή TOF αφορούν το χώρο, το χρόνο και την ενέργεια των σχηματιζόμενων ιόντων και καθένας τους συμβάλλει στη διασπορά των παρατηρούμενων χρόνων πτήσης των ιόντων. Η βελτίωση της εστίασης των ιόντων στο χώρο και στο χρόνο έχει σαν αποτέλεσμα μεγαλύτερος αριθμός ιόντων να φτάνει στον ανιχνευτή σε μικρότερο χρόνο, γεγονός που συμβάλλει στην ενίσχυση της ευαισθησίας. Μετά την επίτευξη της βέλτιστης εστίασης, περαιτέρω αύξηση του αριθμού των ιόντων μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της διαχωριστικής ικανότητας. Με παρεμφερή τρόπο η ανάγκη δημιουργίας διακριτών πακέτων ιόντων με παρόμοιες ταχύτητες και ενέργειες υπαγορεύει τη χρήση τεχνικών που θα αυξήσουν σημαντικά τη διαχωριστική ικανότητα, συχνά όμως εις βάρος της ευαισθησίας. Έτσι και εδώ όπως και σε άλλους αναλυτές μαζών, απαιτείται ένας συμβιβασμός μεταξύ της επιθυμητής ευαισθησίας και διαχωριστικής ικανότητας.

2.3. ΑΝΑΛΥΤΕΣ TOF ΟΡΘΟΓΩΝΙΑΣ ΕΠΙΤΑΧΥΝΣΗΣ (oa-TOF)^{48,51,54,56,57,59,61}

Καθοριστικής σημασίας για τη βελτίωση του Παράγοντα Κύκλου Λειτουργίας των αναλυτών TOF αποτέλεσε η τροποποίηση των συστημάτων για την επίτευξη ορθογωνίας επιτάχυνσης των ιόντων (orthogonal acceleration, oa), η οποία βασίστηκε στο γεγονός ότι ιόντα που οι αρχικές τους ταχύτητες είναι κάθετες προς τη φορά πτήσης παρουσιάζουν μικρότερη διασπορά χρόνων πτήσης. Στα συστήματα αυτά η δέσμη των ιόντων που προέρχεται από από την πηγή ιοντισμού αφήνεται αρχικά να γεμίσει ένα χώρο του επιταχυντή των ιόντων, στον οποίο δεν υπάρχει επίδραση πεδίου. Στη συνέχεια, με την εφαρμογή παλμού δυναμικού (10-100 nsec) μεταξύ των ηλεκτροδίων του επιταχυντή δημιουργείται αναπαραγωγίμο ηλεκτρικό πεδίο, υπό την επίδραση του οποίου όλα ιόντα που βρίσκονται στο χώρο του επιταχυντή εισέρχονται μέσω λεπτής σχισμής σε ένα δεύτερο χώρο, στον οποίο υφίστανται ταυτόχρονα την ίδια επιτάχυνση και με φορά κάθετη προς την αρχική διεύθυνση κίνησης εισέρχονται στο θάλαμο πτήσης. Το ηλεκτροστατικό πεδίο στο χώρο αυτό είναι έτσι σχεδιασμένο έτσι ώστε η εφαρμοζόμενη δύναμη να είναι αυστηρά κάθετη στον άξονα της δέσμης των ιόντων και καθώς αυτά κινούνται σχεδόν παράλληλα χωρίς διασπορά ταχύτητας στον κάθετο άξονα, επιτυγχάνεται η βέλτιστη εστίαση των ιόντων στον άξονα του θαλάμου πτήσης. Τα παραπάνω συμβάλλουν καθοριστικά στην αύξηση της διαχωριστικής ικανότητας. Η συνιστώσα της ταχύτητας των ιόντων στην αρχική διεύθυνση της δέσμης πριν την ορθογώνια επιτάχυνση παραμένει. Επομένως, ο ανιχνευτής των ιόντων που τοποθετείται κάθετα προς τη διεύθυνση πτήσης και παράλληλα προς την αρχική δέσμη των ιόντων θα πρέπει να διαθέτει ικανοποιητικό μήκος, ώστε να προσκρούσουν σε αυτόν όλα τα ιόντα που είναι διασπαρμένα στο πλάτος του θαλάμου πτήσης (Σχήμα 2.3.α).

Μετά την επιτάχυνση του πρώτου πακέτου ιόντων τα ηλεκτρόδια ηρεμούν, ώστε ο χώρος του επιταχυντή να γεμίσει με το επόμενο τμήμα της δέσμης των ιόντων (fill-up mode). Ο χρόνος αυτός θα πρέπει να είναι επαρκής ώστε τα βαρύτερα ιόντα της δέσμης να εισέλθουν στο χώρο πριν την εφαρμογή του επόμενου παλμού (push-out mode). Με κατάλληλη ρύθμιση της ενέργειας της αρχικής δέσμης των ιόντων και ρύθμιση της πτήσης των ιόντων που έχουν επιταχυνθεί έτσι ώστε ο χρόνος που απαιτείται για το γέμισμα του επιταχυντή να

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Υγροχρωματογραφία – Φασματομετρία Μαζών Χρόνου Πτήσης (LC/TOF-MS)

είναι περίπου ίσος με το χρόνο που απαιτείται για την πτήση του ιόντος με τη μεγαλύτερη τιμή m/z , επιτυγχάνεται η βελτιστοποίηση του Παράγοντα Κύκλου Λειτουργίας, με επακόλουθη βελτίωση της ευαισθησίας.

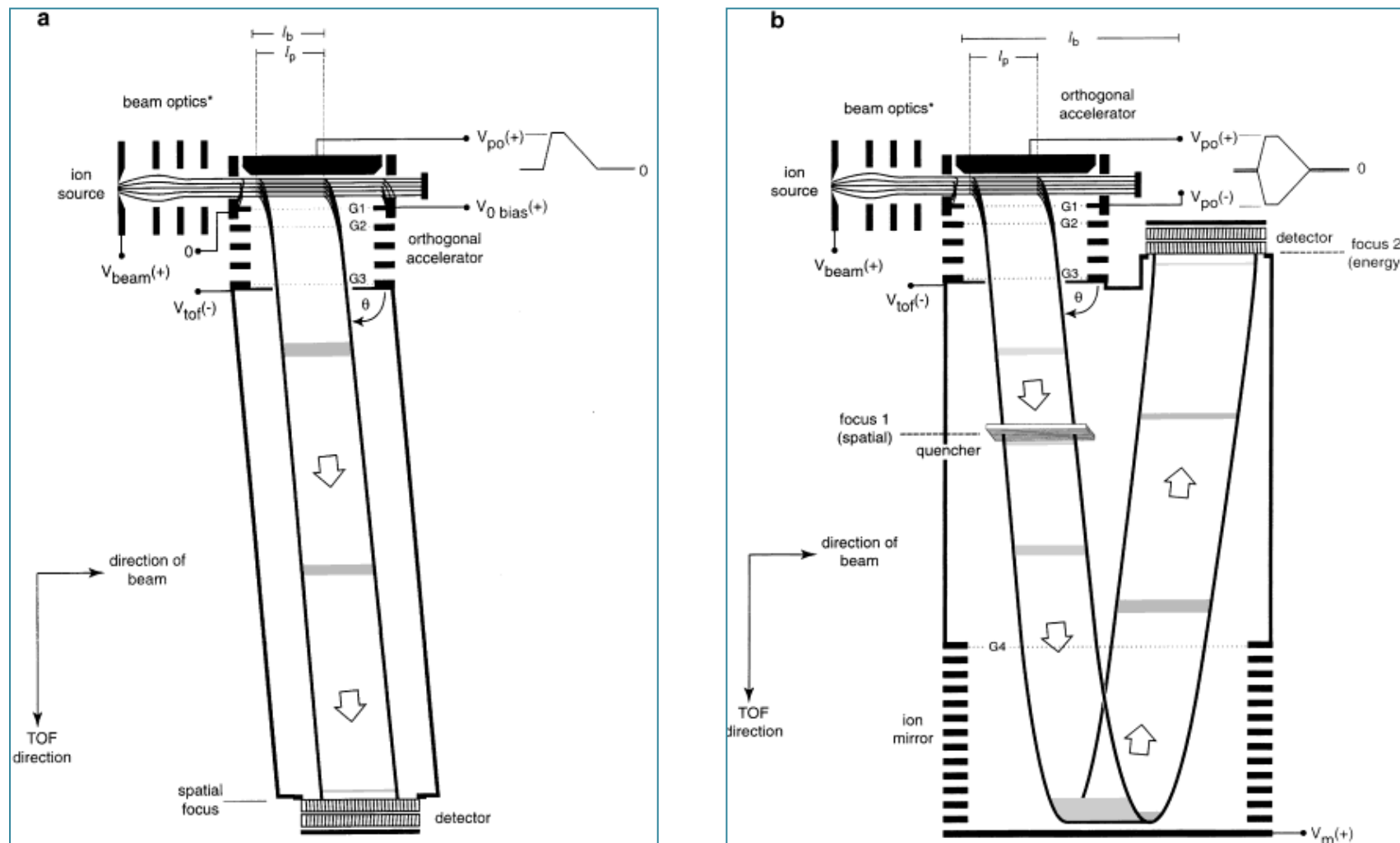
2.4. ΑΝΑΚΛΑΣΤΙΚΟ ΚΑΤΟΠΤΡΟ ^{52,54,56,64}

Το ανακλαστικό κάτοπτρο αποτελεί μια διάταξη που χρησιμοποιήθηκε στους αναλυτές TOF για να περιορίσει τη διασπορά των ταχυτήτων που παρατηρείται κατά την πτήση ιόντων με την ίδια τιμή λόγου m/z και να βελτιώσει τη διαχωριστική ικανότητα. Αποτελείται από ένα ηλεκτροστατικό κάτοπτρο που δημιουργεί ένα ή περισσότερα πεδία επιβράδυνσης και τοποθετείται στο τέλος της διαδρομής του θαλάμου πτήσης (Σχήμα 2.3.β) Τα ιόντα που φτάνουν στο κάτοπτρο διεισδύουν σε αυτό για χρόνο που είναι αντιστρόφως ανάλογος της ενέργειας πτήσης τους δηλαδή ιόντα που κινούνται ταχύτερα με μεγαλύτερη ενέργεια εισέρχονται σε μεγαλύτερο βάθος στο κάτοπτρο και επομένως απαιτείται μεγαλύτερο χρονικό διάστημα για την ανάκλασή τους. Έτσι, ανακλώνται ταυτόχρονα με τα βραδύτερα ιόντα του ίδιου m/z που εισέρχονται λιγότερο βαθιά στο κάτοπτρο. Επομένως, με κατάλληλη ρύθμιση του επιβραδυντικού πεδίου γίνεται απόσβεση των διασπορών ταχύτητας και χωροδιάταξης, με αποτέλεσμα τα ιόντα με την ίδια τιμή m/z να προσπίπτουν ταυτόχρονα στον ανιχνευτή. Η γωνία εισόδου των ιόντων στο κάτοπτρο αποκλίνει λίγο από τις 90° και έτσι τα ιόντα που αναδύονται από το κάτοπτρο ακολουθούν αντεστραμμένη διαδρομή διαφορετική από την προηγούμενη και έτσι είναι δυνατή η τοποθέτηση του ανιχνευτή σε σημείο που δεν παρεμβάλλεται στον άξονα πορείας της αρχικής δέσμης των ιόντων που εξέρχονται από τον επιταχυντή. Επίσης η τοποθέτηση του κατόπτρου αυξάνει (σχεδόν διπλασιάζει) τη διαδρομή πτήσης των ιόντων χωρίς να αυξάνεται το μέγεθος του οργάνου και έτσι στην εξίσωση [2.6] της διαχωριστικής ικανότητας, αυξάνεται η παράμετρος t , ενώ η παράμετρος Δt παραμένει μικρή λόγω της αποσβεστικής ικανότητας του κατόπτρου, γεγονός που συντελεί στην βελτίωση της διαχωριστικής ικανότητας του αναλυτή TOF.

2.5. ΑΝΙΧΝΕΥΤΕΣ ΙΟΝΤΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ ΨΗΦΙΟΠΟΙΗΣΗΣ

2.5.1. Ανιχνευτές ιόντων

Οι ανιχνευτές ιόντων που χρησιμοποιούνται στα φασματόμετρα μαζών με αναλυτές TOF θα πρέπει να έχουν χαρακτηριστικά ταχύτητας που ανταποκρίνονται στην ταχεία και μικρή διάρκεια των συμβάντων της άφιξης των ιόντων καθώς κατάλληλο μήκος, τουλάχιστον ίσο με το πλάτος της δέσμης των ιόντων που διέρχεται από το θάλαμο πτήσης του αναλυτή TOF. Οι συχνότερα χρησιμοποιούμενοι ανιχνευτές είναι ο ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής (electron multiplier) και ο ανιχνευτής πλακών πολλαπλής διέλευσης (multi-channel plate, MCP).

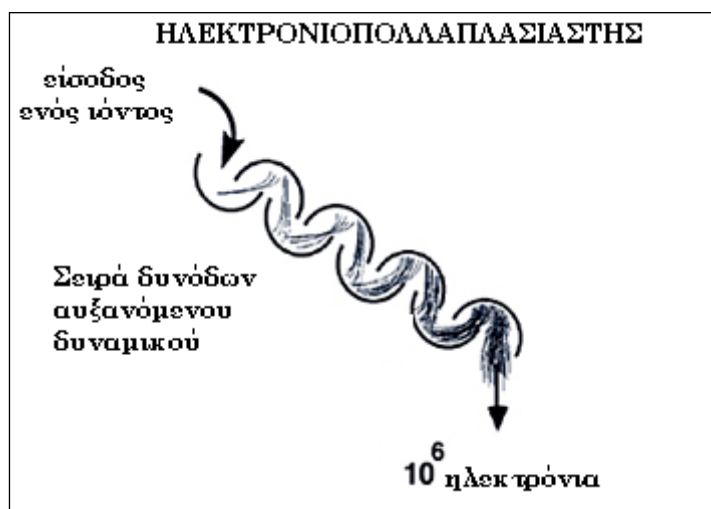


Σχήμα 2.3: Ορθογώνιας επιτάχυνσης αναλυτές χρόνου πτήσης (oa-TOF): Α. χωρίς ανακλαστικό κάτοπτρο Β. με ανακλαστικό κάτοπτρο (reflectron)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Υγροχρωματογραφία – Φασματομετρία Μαζών Χρόνου Πτήσης (LC/TOF-MS)

Ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής⁴⁷

Η λειτουργία του βασίζεται στην αρχή λειτουργίας του φαρανταϊκού κύπελλου. Σε αντίθεση με το φαρανταϊκό κύπελλο που αποτελείται από μία δύνοδο, ο ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής είναι κατασκευασμένος από σειρά δυνόδων στις οποίες εφαρμόζονται αυξανόμενα δυναμικά. Η δέσμη των ιόντων προσπίπτει αρχικά σε δύνοδο μετατροπής οπότε εκπέμπονται δευτερογενή ηλεκτρόνια. Τα ηλεκτρόνια αυτά προσπίπτουν στην επόμενη δύνοδο προκαλώντας εκπομπή κι άλλων ηλεκτρονίων κ.ο.κ., δημιουργώντας έναν «καταρράκτη» ηλεκτρονίων, που καταλήγει στο μετρούμενο ρεύμα στο τέλος του ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστή (Σχήμα 2.4). Η διάρκεια ζωής του μπορεί να φτάσει και τα 5 χρόνια χωρίς συντήρηση.

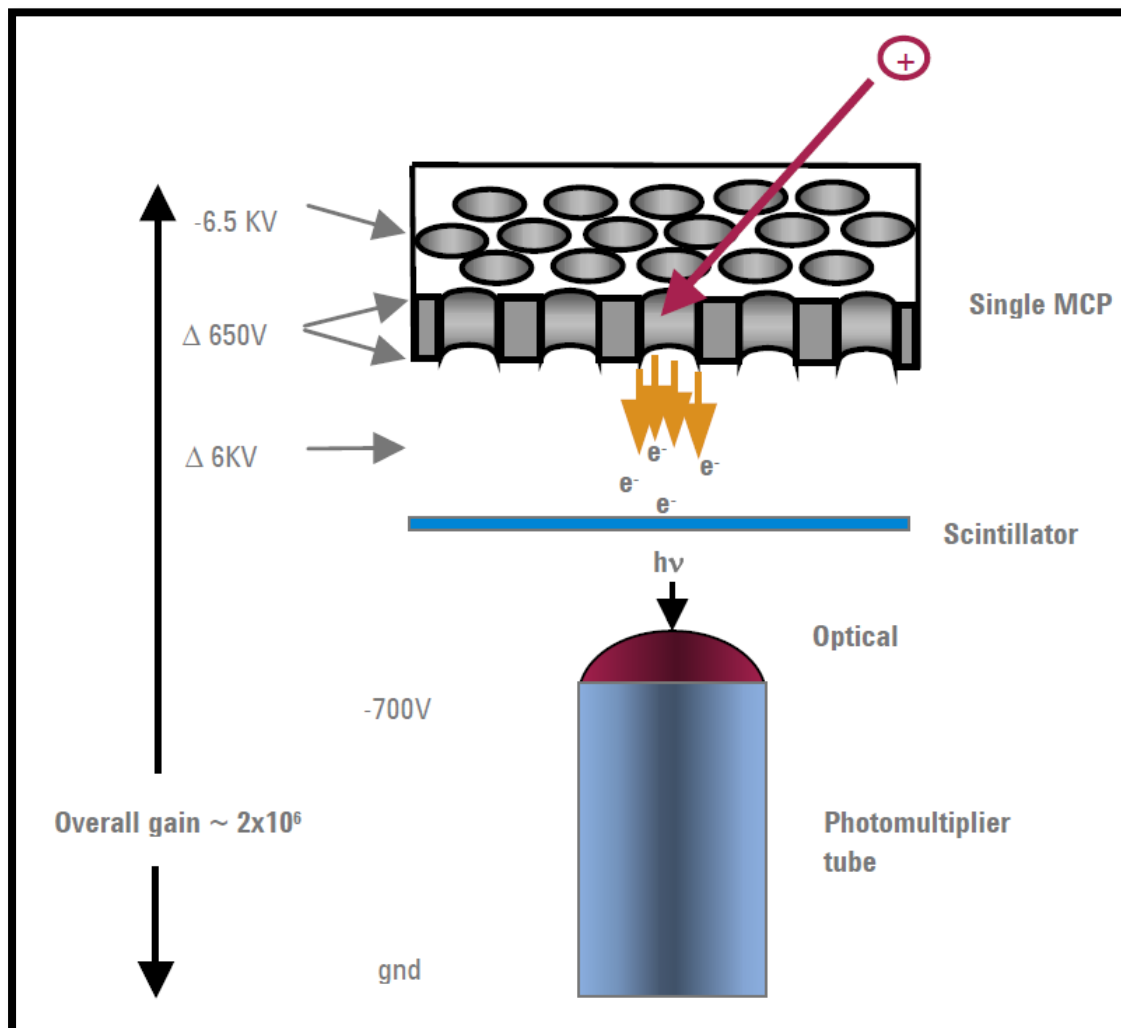


Σχήμα 2.4: Αρχή λειτουργίας ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστή

Ανιχνευτής πλακών πολλαπλής διέλευσης (MCP)⁵⁵

Αποτελείται από μια λεπτή πλάκα που φέρει πολλαπλούς μικροσωλήνες και κάθε μικροσωλήνας λειτουργεί ως ένας ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής. Έτσι όταν ένα ιόν χτυπά στην επιφάνεια της πλάκας ελευθερώνεται ένα ηλεκτρόνιο και ξεκινά η διαδικασία ενίσχυσης του ηλεκτρικού σήματος. Καθώς τα ηλεκτρόνια που ελευθερώνονται μετακινούνται και συγκρούονται με τα τοιχώματα των μικροσκοπικών σωλήνων προκαλούν την απελευθέρωση ενός συνεχώς αυξανόμενου καταρράκτη ηλεκτρονίων και τελικά τα ηλεκτρόνια που εξέρχονται από την πλάκα είναι περίπου 10 φορές περισσότερα σε αριθμό από τα εισερχόμενα ιόντα.

Τα ηλεκτρόνια αυτά στη συνέχεια επιταχύνονται και προσκρούουν σε ένα σπινθηριστή, ο οποίος ακολούθως παράγει μια λάμψη φωτός, που εστιάζεται με τη βοήθεια δύο μικρών φακών σε ένα φωτοπολλαπλασιαστή, ο οποίος με τη σειρά του παράγει το ηλεκτρικό σήμα που καταγράφεται από το σύστημα. (Σχήμα 2.5).



Σχήμα 2.5: Ανιχνευτής πλακών πολλαπλής διέλευσης (MCP)

2.5.2. Διατάξεις ψηφιοποίησης ^{48,55,60,65}

Η ταχύτητα καταγραφής των λαμβανόμενων φασμάτων αποτελεί βασική προδιαγραφή για τα φασματομέτρα μαζών TOF. Αν υποθέσουμε ότι σε ένα σύστημα ο μέγιστος χρόνος πτήσης είναι 50 μsec , τότε η συχνότητα σάρωσης είναι 20 kHz, που σημαίνει ότι θεωρητικά λαμβάνονται 20000 φάσματα κάθε δευτερόλεπτο. Στην πραγματικότητα, ένα σύνολο από πρακτικούς και θεμελιώδεις περιορισμούς μειώνουν σημαντικά τον αριθμό των «χρήσιμων» φασμάτων που καταγράφονται στα 100 φάσματα ανά δευτερόλεπτο, μέγεθος που εξακολουθεί να είναι σημαντικά υψηλότερο σε σχέση με τα φασματομέτρα σάρωσης. Η τρέχουσα διαθέσιμη τεχνολογία ηλεκτρονικών υπολογιστών έχει τη δυνατότητα επεξεργασίας των φασμάτων που λαμβάνονται με αυτό το ρυθμό, αλλά οι μέθοδοι ψηφιοποίησης παλμού που είναι διαθέσιμες δεν καλύπτουν πλήρως τις ανάγκες των σημερινών αναλυτών TOFMS και παρουσιάζουν περιορισμούς γραμμικού δυναμικού εύρους. Ακολουθεί μια συνοπτική περιγραφή των δύο διατάξεων ψηφιοποίησης που είναι σήμερα διαθέσιμες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Υγροχρωματογραφία – Φασματομετρία Μαζών Χρόνου Πτήσης (LC/TOF-MS)

Χρονοψηφιακός μετατροπέας – Time to Digital Converter (TDC)

Τα συστήματα ψηφιοποίησης TDC ανιχνεύουν χρονικά τους παλμούς ιόντων (start και stop events) και αποθηκεύουν τους χρόνους των συμβάντων έναρξης και λήξης ή το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί μεταξύ τους. Κάθε παλμός επιτάχυνσης καταλήγει σε ένα φάσμα από χρόνους άφιξης ιόντων και αυτά τα μεμονωμένα φάσματα αθροίζονται στη μνήμη ηλεκτρονικού υπολογιστή, ο οποίος κατασκευάζει ένα ιστόγραμμα που αποτελείται από αρκετές εκατοντάδες παλμούς ιόντων σε συνεχόμενα μεμονωμένα χρονικά διαστήματα. Τα συστήματα αυτά διαθέτουν ηλεκτρονικές διατάξεις για τη διάκριση του μεγέθους του λαμβανόμενου σήματος, οι οποίες δίνουν το έναυσμα έναρξης της καταγραφής, μόνο όταν η έντασή του ξεπερνά ένα οριακό «κατώφλι» και καταγράφεται απλά η ιοντική άφιξη αλλά όχι ο αριθμός των ιόντων και για αυτό το λόγο παρουσιάζουν περιορισμένο γραμμικό δυναμικό εύρος.

Τα συστήματα TDC λειτουργούν ικανοποιητικά στην καταγραφή του χρόνου άφιξης όταν για μια δεδομένη τιμή μάζας για κάθε πακέτο ιόντων προσκρούει στον ανιχνευτή το πολύ ένα ιόν. Όταν όμως συμπέσουν δύο ιόντα που μόλις διαχωρίζονται στο χρόνο (με βάση τη διαχωριστική ικανότητα του αναλυτή), τότε το δεύτερο εισερχόμενο σήμα δεν καταγράφεται παρά μόνο όταν το σήμα από το πρώτο ιόν πέσει κάτω από το προκαθορισμένο όριο καταγραφής, (νεκρός χρόνος), γεγονός που έχει δυσμενείς συνέπειες στην ακρίβεια μέτρησης του μέσου χρόνου άφιξης των ιόντων. Στις περιπτώσεις αυτές παρατηρούνται απώλειες καταγραφών και μετατόπιση των μετρούμενων χρόνων άφιξης προς μικρότερες τιμές, το οποίο μεταφράζεται σε αρνητικό σφάλμα στην τιμή του μετρούμενου λόγου m/z . Πλεονεκτήματα της διάταξης TDC αποτελούν η μη καταγραφή μηδενικών δεδομένων, τα χαμηλά επίπεδα θορύβου και η απλότητα των συσκευών.

Αναλογοψηφιακός μετατροπέας – Analogue to Digital Converter (ADC)

Στα συστήματα ADC, το σήμα από τον ανιχνευτή λαβάνεται και ψηφιοποιείται σε δεδομένα χρονικά διαστήματα της τάξης του 1 nanosec, γεγονός που μεταφράζεται σε συχνότητα λειτουργίας της τάξης του 1 GHz. Σε κάθε λήψη, η ένταση του σήματος μεταφράζεται σε ψηφιακό σήμα (8-bit). Κάθε φορά που ξεκινάει ένας νέος παλμός η διάταξη ADC αρχίζει να μετατρέπει κάθε λαμβανόμενο σήμα από τον ανιχνευτή του συστήματος και οι μετρούμενες ψηφιοποιημένες τιμές προστίθενται στις αντίστοιχες τιμές που έχουν καταγραφεί και αποθηκευτεί στη μνήμη για το προηγούμενο πακέτο ιόντων. Πλεονεκτούν έναντι των συστημάτων TDC στο ότι δεν παρουσιάζουν απώλεια δεδομένων σε υψηλούς ρυθμούς άφιξης ιόντων, παρέχοντας καλύτερα αποτελέσματα ακριβούς μέτρησης τιμών λόγου m/z και εμφανίζουν μεγαλύτερο δυναμικό εύρος γραμμικότητας (αν και είναι δυνατό και αυτά να εμφανίσουν σε κάποιες περιπτώσεις κορεσμό, αλλά λιγότερο συχνά), ενώ παρουσιάζουν το μειονέκτημα του υψηλού κόστους και του σχετικά υψηλού σήματος υποβάθρου.

2.6. ΠΗΓΕΣ ΙΟΝΤΙΣΜΟΥ

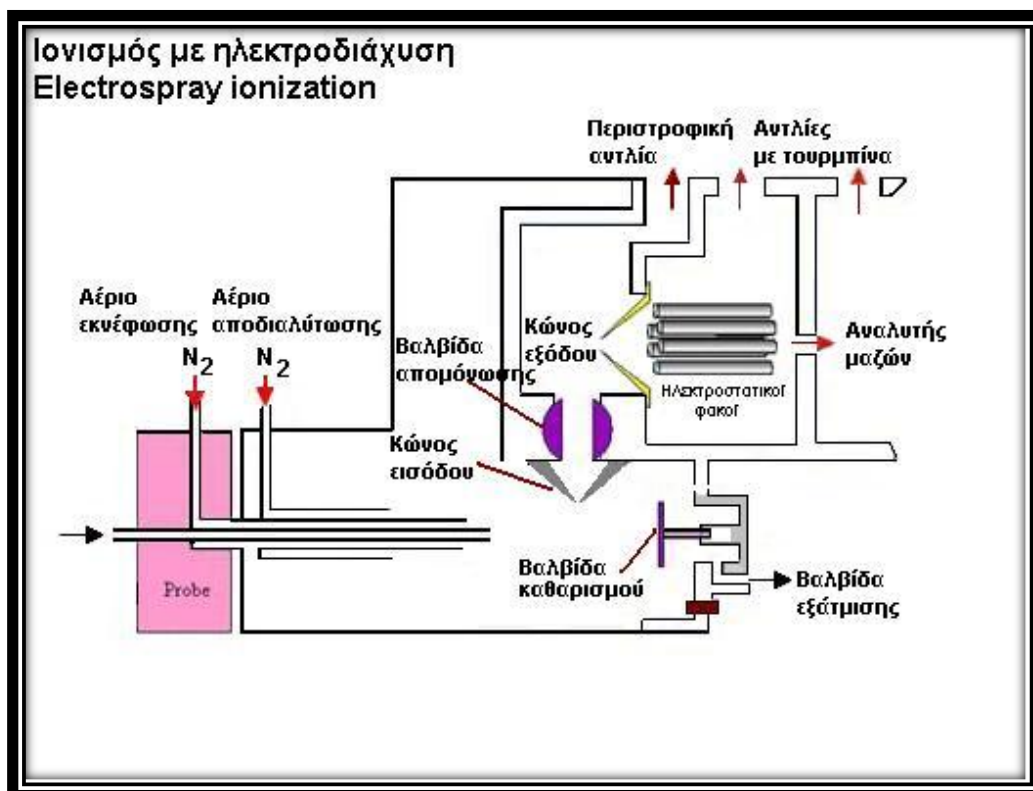
Τα φασματόμετρα χρόνου πτήσης που είναι σήμερα εμπορικά διαθέσιμα συνδυάζονται με μια ποικιλία πηγών ιοντισμού όπως ο ιοντισμός με εκρόφηση υποβοηθούμενος από το

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Υγροχρωματογραφία – Φασματομετρία Μαζών Χρόνου Πτήσης (LC/TOF-MS)

μητρικό υλικό (MALDI), ο ιοντισμός με πρόσκρουση ηλεκτρονίων (EI, κύρια τεχνική χρησιμοποιούμενη σε συστήματα GC/TOF-MS) και οι τεχνικές ιοντισμού σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης (Atmospheric Pressure Ionization, API) που χρησιμοποιούνται για τη διασύνδεση του φασματομέτρου μαζών με συστήματα υγροχρωματογραφίας και διακρίνονται στον ιοντισμό με ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization, ESI), στο χημικό ιοντισμό σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης (Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI) και στον ιοντισμό με δέσμη φωτονίων σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης (Atmospheric Pressure Photoionization, APPI). Η τεχνική ESI αποτελεί τη συχνότερα χρησιμοποιούμενη πηγή ιοντισμού σε συστήματα LC/TOF –MS, η οποία χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα εργασία και θα ακολουθήσει σύντομη περιγραφή της.

Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό

Η αρχή της τεχνικής στηρίζεται στο σχηματισμό ιόντων σε αέρια κατάσταση απευθείας από ένα υγρό διάλυμα. Για το σκοπό αυτό, το διάλυμα του προς ανάλυση δείγματος διέρχεται από τριχοειδές με μικρή ροή και με τη βοήθεια αερίου αποδιαλύτωσης και αερίου νεφελοποίησης (συνήθως αζώτου) μετατρέπεται σε αερόλυμα. Παράλληλα, με την εφαρμογή διαφοράς δυναμικού 3-6 kV μεταξύ του τριχοειδούς και ενός αντιηλεκτροδίου δημιουργείται ισχυρό ηλεκτρικό πεδίο. Στο Σχήμα 2.6 παρουσιάζονται τα βασικά τμήματα της πηγής ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό.

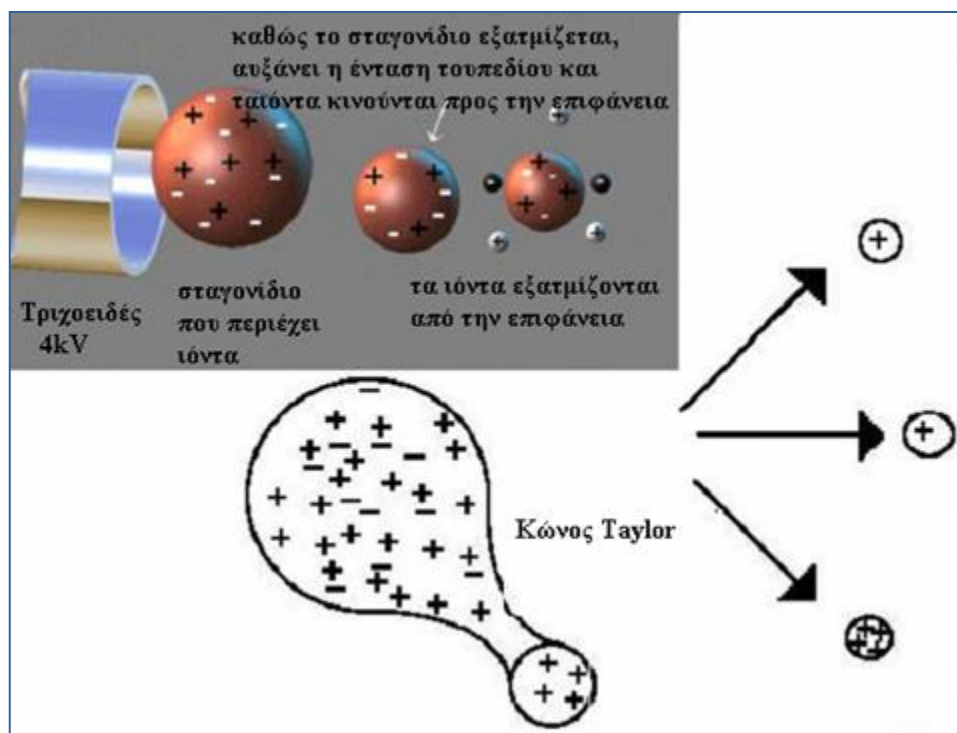


Σχήμα 2.6: Σχηματική απεικόνιση πηγής ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό

Διάφορες θεωρίες έχουν προταθεί για το μηχανισμό σχηματισμού των ιόντων κατά τον ιοντισμό ESI. Ξηραντικό αέριο, θέρμανση ή και τα δύο εφαρμόζονται στα σταγονίδια, σε

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Υγροχρωματογραφία – Φασματομετρία Μαζών Χρόνου Πτήσης (LC/TOF-MS)

συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης, προκαλώντας την εξάτμιση του διαλύτη. Σύμφωνα με μια θεωρία, το ηλεκτρικό πεδίο προκαλεί συσσώρευση του φορτίου στην επιφάνεια του υγρού στην άκρη του τριχοειδούς, γεγονός που οδηγεί στο σχηματισμό φορτισμένων σταγονιδίων (αερόλυμα φορτισμένων σταγονιδίων). Η εφαρμογή ξηραντικού αερίου ή/και θέρμανσης στα σταγονίδια, σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης οδηγεί στην εξάτμιση του διαλύτη. Καθώς το μέγεθος των σταγονιδίων μειώνεται, αυξάνεται η πυκνότητα φορτίου στην επιφάνειά τους. Οι απωστικές δυνάμεις Coulomb υπερνικούν τις δυνάμεις συνοχής των σταγονιδίων, με αποτέλεσμα τη διάσπασή τους σε ολοένα και μικρότερα σταγονίδια που είναι γνωστά ως κώνοι Taylor (Taylor cone) (Σχήμα 2.7), από τα οποία τελικά εκροφώνται τα ιόντα, που κατευθύνονται μέσω ηλεκτροστατικών φακών προς τον αναλυτή μαζών.



Σχήμα 2.7: Σχηματισμός ιόντων με την τεχνική του ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό

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

Η επιλογή του κατάλληλου διαλύτη κινητής φάσης είναι πρωταρχικής σημασίας, εξαρτάται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες των αναλυτών και γίνεται με σκοπό την ενίσχυση του σήματος και την ταυτόχρονη βελτίωση της χρωματογραφικής συμπεριφοράς των αναλυτών σε περίπτωση συνδυασμού LC/MS. Συνήθως, χρησιμοποιούνται πρωτικοί διαλύτες, όπως η μεθανόλη ή το ακετονιτρίλιο σε κατάλληλη αναλογία με υπερκάρθο νερό. Απρωτικοί

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Υγροχρωματογραφία – Φασματομετρία Μαζών Χρόνου Πτήσης (LC/TOF-MS)

διαλύτες όπως, διμεθυλοσουλφοξείδιο ή τετραϋδροφουράνιο σε νερό χρησιμοποιούνται για να βελτιώσουν τη διαλυτότητα ορισμένων αναλυτών. Σε αρκετές περιπτώσεις χρησιμοποιούνται και πτητικά ρυθμιστικά διαλύματα ($\text{CH}_3\text{COONH}_4/\text{CH}_3\text{COOH}$, $\text{HCOONH}_4/\text{HCOOH}$), με σκοπό τη βελτίωση του σήματος και της χρωματογραφικής συμπεριφοράς των αναλυτών.

Ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό επηρεάζεται από μια ποικιλία παραγόντων που σχετίζονται τόσο με τη γεωμετρία της πηγής, όσο και με τη σύσταση του προς ανάλυση δείγματος. Σε αυτούς περιλαμβάνονται: η φύση του διαλύτη της κινητής φάσης, η παρουσία ρυθμιστικών διαλυμάτων και το pH της κινητής φάσης, η ταχύτητα ροής, η φύση και η δομή του αναλύτη και η συγκέντρωσή του στο δείγμα, η πολυπλοκότητα του δείγματος και η πορεία προκατεργασίας, η γεωμετρία της πηγής ιοντισμού κ.λπ.

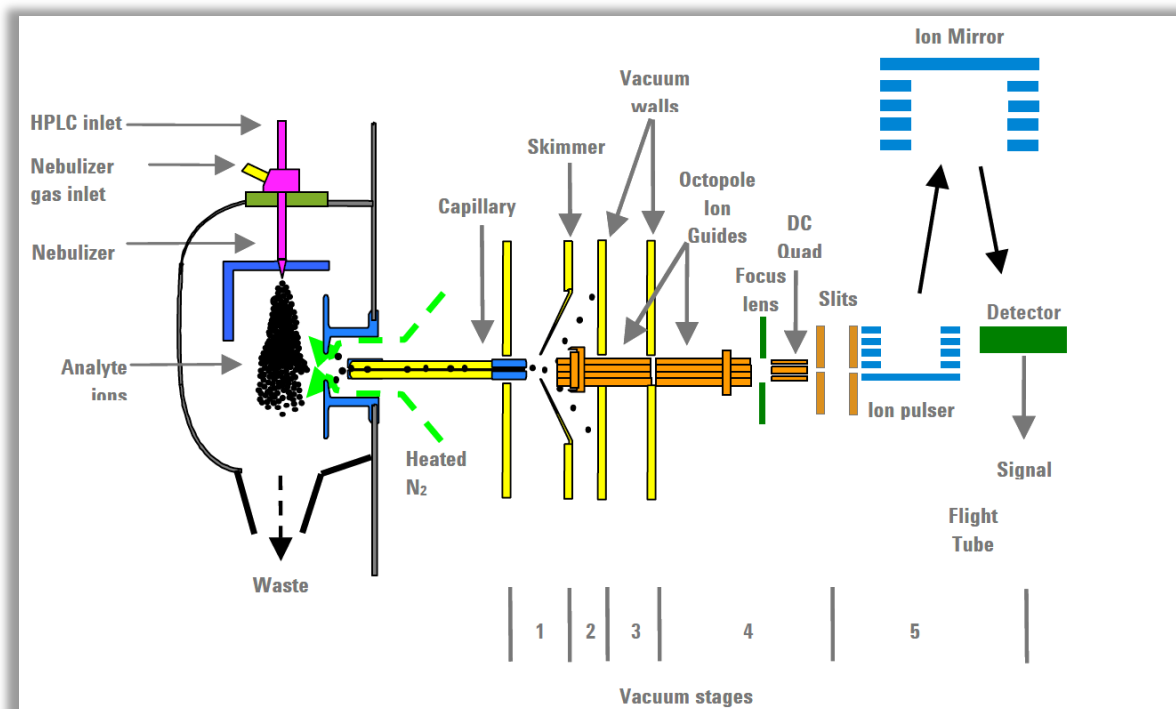
Η τεχνική ESI είναι σχετικά ήπια τεχνική ιοντισμού. Τα φάσματα μαζών περιέχουν κυρίως το πρωτονιωμένο μοριακό ιόν και μικρό ποσοστό θραυσμάτων. Ο σχηματισμός πολλαπλά φορτισμένων ιόντων δίνει τη δυνατότητα υπολογισμού του μοριακού βάρους ενώσεων χωρίς περιορισμό και την ανάλυση πρωτεϊνών και άλλων βιομορίων. Μπορεί να εφαρμοστεί για την ανάλυση πολικών μορίων μικρού μοριακού βάρους και μεγαλομορίων με ιονισμένες ομάδες. Σε περιπτώσεις που η ανάλυση πραγματοποιείται παρουσία ιόντων Na^+ , NH_4^+ , K^+ , τότε εμφανίζονται τα αντίστοιχα προϊόντα προσθήκης, οπότε στο φάσμα μαζών εμφανίζονται κορυφές που αντιστοιχούν στις τιμές m/z $[\text{M}+23]^+$, $[\text{M}+18]^+$ και $[\text{M}+39]^+$, αντίστοιχα.

Ο ιοντισμός των αναλυτών πραγματοποιείται σε σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες, γεγονός που καθιστά δυνατή την ανάλυση θερμοευαίσθητων ουσιών. Η τεχνική χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία και είναι κατάλληλη για ποσοτικούς προσδιορισμούς. Συνδυάζεται εύκολα τόσο με την υγροχρωματογραφία, όσο και με την τριχοειδή ηλεκτροφόρηση. Τροποποίηση της τεχνικής αυτής αποτελεί η τεχνική Nanoelectrospray (nanoESI), στην οποία η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης είναι της τάξεως nL min^{-1} . Στην περίπτωση, αυτή η βελόνα της ηλεκτροδιάχυσης είναι πολύ μικρότερης διαμέτρου και η αποδιαλύτωση γίνεται ουσιαστικά μόνο με τη συμβολή του ηλεκτροστατικού πεδίου. Πλεονεκτήματα της τεχνικής αυτής είναι η δυνατότητα χρησιμοποίησης πολύ μικρών ποσοτήτων δείγματος και η εξαιρετικά αυξημένη ευαισθησία.

2.7. ΤΕΧΝΙΚΗ LC/TOF-MS⁵⁵

Τα τελευταία χρόνια ο συνδυασμός της υγροχρωματογραφία με τη φασματομετρία μαζών TOF, βρίσκει ολοένα αυξανόμενη εφαρμογή σε ποιοτικές και ποσοτικές αναλύσεις φαρμακευτικών ουσιών και βιομορίων (πρωτεΐνες, DNA) σε πολύπλοκα βιολογικά δείγματα. Στο σχήμα που ακολουθεί απεικονίζεται διαγραμματικά το σύστημα LC/TOF-MS που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Υγροχρωματογραφία – Φασματομετρία Μαζών Χρόνου Πτήσης (LC/TOF-MS)



Σχήμα 2.8: Σχηματική απεικόνιση του συστήματος LC/ESI-TOF-MS ορθογώνιας επιτάχυνσης με ανακλαστικό κάτοπτρο της εταιρίας Agilent Technologies, που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.8, το υγροχρωματογραφικό έκλουσμα εισέρχεται στην ορθογώνια διάταξη βελόνα νεφελοποίησης (nebulizer), όπου με τη βοήθεια θερμοκρασίας και αερίου αζώτου (nebulizer gas) μετατρέπεται σε αερόλυμα. Στη συνέχεια τα σχηματιζόμενα φορτισμένα σταγονίδια διέρχονται από τριχοειδές (capillary) όπου σε συνδυασμό με την εφαρμοζόμενη υψηλή θερμοκρασία απομακρύνονται υπολείμματα του διαλύτη. Στην έξοδο του τριχοειδούς τα ιόντα διέρχονται από το άνοιγμα ενός διαχωριστή ιόντων (skimmer) ο οποίος επιτρέπει τη διέοδο των βαρύτερων ιόντων με μεγάλη ταχύτητα, ενώ τα ελαφριά ιόντα του αερίου ξήρανσης απομακρύνονται με τη βοήθεια αντλίας κενού. Κατόπιν τα ιόντα διέρχονται από ένα οκτάπολο εστίασης της ιοντικής δέσμης (με εφαρμοζόμενο δυναμικό ραδιοσυχνότητας) και κατόπιν, υπό υψηλότερο κενό, διέρχονται από δεύτερο οκτάπολο το οποίο τα επιταχύνει ώστε να εισέλθουν στο τμήμα ιοντικής εστίασης (ion optics) του αναλυτή μαζών TOF, που περιλαμβάνει ένα τετράπολο και ένα συγκεντρωτικό φακό ώστε να σχηματιστεί μια αυστηρά λεπτή και ευθυγραμμισμένη δέσμη ιόντων. Η δέσμη αυτή με την εφαρμογή παλμού εισέρχεται στον αναλυτή TOF-MS που είναι ορθογώνιας επιτάχυνσης και φέρει ανακλαστικό κάτοπτρο στο τέλος του θαλάμου πτήσης (flight tube). Στο τέλος της διαδρομής πτήσης βρίσκεται ο ανιχνευτής πλακών πολλαπλής διέλευσης (MCP), του οποίου το σήμα καταγράφεται και ψηφιοποιείται από διάταξη αναλογοψηφιακού μετατροπέα (ADC).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΔΡΟΦΙΛΩΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ (HYDROPHILIC INTERACTION LIQUID CHROMATOGRAPHY)

3.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ⁷²⁻⁷⁶

Η Υγροχρωματογραφία Υδροφίλων Αλληλεπιδράσεων (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography, HILIC) αποτελεί μια σχετικά νέα χρωματογραφική τεχνική που βρίσκει ολοένα και μεγαλύτερη εφαρμογή στην ανάλυση και το διαχωρισμό πολικών ουσιών που παρουσιάζουν μικρή, ελάχιστη ή και καθόλου συγκράτηση στις πλέον χρησιμοποιούμενες στήλες αντιστρόφου φάσεως υγροχρωματογραφίας (reversed-phase HPLC, RP-HPLC). Βασίζεται στη χρησιμοποίηση μιας υδρόφιλης στατικής φάσης και μιας λιγότερο υδρόφιλης κινητής φάσης που αποτελείται από μίγμα νερού και οργανικού διαλύτη (συνήθως ακετονιτριλίου) με το οργανικό κλάσμα να υπερτερεί έναντι του υδατικού. Ο μηχανισμός αλληλεπίδρασης των αναλυόμενων ουσιών με το υπόστρωμα δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί και σχετίζεται ουσιαστικά με φαινόμενα κατανομής των μορίων του αναλύτη ανάμεσα στην κινητή φάση και σε ένα πλούσιο σε νερό στρώμα που σχηματίζεται στην επιφάνεια του υψηλής πολικότητας υποστρώματος της στατικής φάσης.

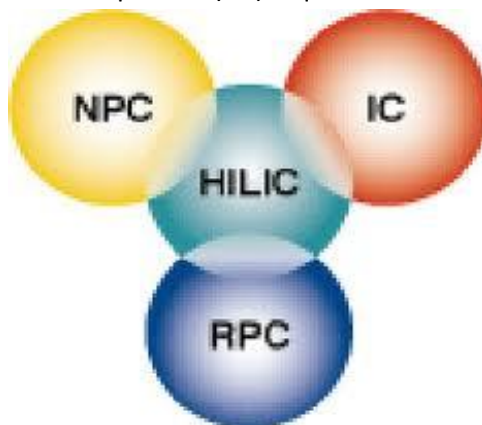
Το ακρονύμιο HILIC προτάθηκε το 1990 από τον Alpert για να περιγράψει τη χρησιμοποίηση μια παραλλαγής της υγροχρωματογραφίας κανονικής φάσης (normal phase HPLC, NP-HPLC) για το διαχωρισμό πεπτιδίων, νουκλεοτιδίων και άλλων πολικών ουσιών χρησιμοποιώντας μια υδρόφοβη στατική φάση σίλικα που στην επιφάνειά της έφερε αλυσίδες πολυ(υδροξυαιθυλο)-ασπαρταμιδίου και κινητή φάση με νερό και υψηλό ποσοστό οργανικού διαλύτη. Εντούτοις, υπάρχουν και παλιότερες αναφορές εφαρμογής της τεχνικής αυτής κυρίως στην ανάλυση σακχάρων και υδατανθράκων από το 1975, όταν ο Linden χρησιμοποίησε πληρωτικά υλικά που έφεραν τροποποιημένη σίλικα με πολυμερισμένες ομάδες στην επιφάνειά της. Ένας αξιόλογος αριθμός στατικών φάσεων χρωματογραφίας HILIC έχει παρασκευαστεί μέχρι σήμερα, γεγονός που συνέβαλε στη σημαντική αύξηση των εφαρμογών της τεχνικής. Από τις πιο πρόσφατες και με μεγάλη σήμερα εφαρμογή στατικές φάσεις είναι η στήλη ZIC-HILIC που φέρει ως πληρωτικό υλικό πορώδη σίλικα στην επιφάνεια της οποίας έχουν συνδεθεί μόνιμα ομάδες τύπου σουλφοβηταΐνης, που την καθιστούν μια υψηλής πολικότητας και μόνιμως φορτισμένη στατική φάση με ιδιότητες αμφολύτη που συνολικά φέρει μηδενικό φορτίο. Η ανάπτυξη των πληρωτικών υλικών χρωματογραφίας HILIC τα τελευταία χρόνια συνοδεύεται ταυτόχρονα και από μια ραγδαία αύξηση του αριθμού των δημοσιευμένων επιστημονικών εργασιών που χρησιμοποιούν την HILIC από το 2000 έως τις μέρες μας και σχετίζονται με εφαρμογές της τεχνικής στην ποιοτική αλλά και ποσοτική ανάλυση μεγάλου εύρους πολικών ουσιών (φαρμακευτικών ουσιών, φυσικών προϊόντων, αμινοξέων, πεπτιδίων, πρωτεϊνών κ.α.) σε πολύπλοκα βιολογικά δείγματα. Μεγάλο μέρος των εργασιών αυτών συνδυάζει τη χρωματογραφία HILIC με τη φασματομετρία μαζών.

3.2. ΛΟΓΟΙ ΕΠΙΛΟΓΗΣ ΤΗΣ HILIC ⁷⁶⁻⁸³

Η RP-HPLC αποτελεί την πλέον διαδεδομένη και χρησιμοποιούμενη τεχνική ανάμεσα σε όλους τους τύπους υδροχρωματογραφίας και στηρίζεται στη χρήση μιας άπολης στατικής φάσης και μιας περισσότερο πολικής κινητής φάσης και η κατακράτηση του αναλύτη είναι μεγαλύτερη όσο μειώνεται η πολικότητα των μορίων του ή/και της στατικής φάσης ή/και αυξάνεται η πολικότητα της κινητής φάσης. Ενώ μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε πληθώρα διαφορετικών εφαρμογών, η RP-HPLC παρουσιάζει το μειονέκτημα ότι υδρόφιλες και υψηλής πολικότητας ουσίες συγκρατούνται ελάχιστα ή καθόλου. Το φαινόμενο αυτό σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με την ικανότητα των πολικών ομάδων των μορίων (θετικά ή αρνητικά φορτισμένες ομάδες ή ομάδες ικανές να σχηματίζουν διπολικούς δεσμούς ή δεσμούς υδρογόνου) να σχηματίζουν δεσμούς διπόλου με τα μόρια του διαλύτη και δεδομένου ότι η στατική φάση δεν παρουσιάζει αντίστοιχες ιδιότητες, τα επιδιαιλυμένα μόρια του αναλύτη εμφανίζουν μεγαλύτερη συγγένεια με την κινητή φάση οπότε και παραμένουν σε αυτή και εκλούνται με το νεκρό όγκο. Εναλλακτικά, για τις ουσίες υψηλής πολικότητας που φέρουν φορτισμένες ομάδες μπορεί να χρησιμοποιηθεί η υδροχρωματογραφία ιοναντάλλαγής ή σχηματισμού ζεύγους ιόντων, ενώ για τις μη φορτισμένες πολικές ουσίες θα πρέπει να προηγηθεί κάποιο στάδιο παραγωγοποίησης με τα κατάλληλα αντιδραστήρια, που θα μετατρέψουν τις πολικές ομάδες σε περισσότερο υδρόφοβες ομάδες.

Στη NP-HPLC χρησιμοποιείται πολική στατική φάση και μικρής πολικότητας κινητή φάση και η συγκράτηση αυξάνεται όταν η πολικότητα των αναλυόμενων μορίων ή/και του υποστρώματος αυξάνεται ή/και όταν η πολικότητα της κινητής φάσης μειώνεται. Έτσι για πολλά χρόνια η NP-HPLC αποτέλεσε τεχνική επιλογής για την ανάλυση πολικών ουσιών παρουσιάζοντας ως κύρια προβλήματα τη χρησιμοποίηση στην κινητή φάση διαλυτών που είναι υψηλού κόστους και συχνά τοξικοί και μη φιλικό προς το περιβάλλον, ενώ ταυτόχρονα οι πολικές ουσίες παρουσιάζουν χαμηλή διαλυτότητα στους διαλύτες αυτούς.

Η χρωματογραφία HILIC συνδυάζει χαρακτηριστικά τόσο της NP-HPLC όσο και της RP-HPLC, αφού χρησιμοποιεί υδρόφιλη και υψηλής πολικότητας στατική φάση όπως στην NP-HPLC, αλλά οι διαλύτες της κινητής φάσης είναι αυτοί που χρησιμοποιούνται και στην RP-HPLC, δηλαδή μίγματα νερού και οργανικού διαλύτη (όπως το ακετονιτρίλιο), με το υδατικό μέρος να κυμαίνεται συνήθως σε ποσοστό 5 – 40 %. Για αυτό συχνά η χρωματογραφία HILIC αναφέρεται ως “reversed reversed phase” ή ως “aqueous normal-phase”.



Σχήμα 3.1: Η HILIC συμπληρώνει το κενό μεταξύ των διαφορετικών τεχνικών υδροχρωματογραφίας, ενώ ταυτόχρονα παρουσιάζει εν μέρει και κοινά σημεία με καθεμία από αυτές.

Συγκρινόμενη με τις άλλες τεχνικές υγροχρωματογραφίας η HILIC παρουσιάζει τα ακόλουθα πλεονεκτήματα:

- ◆ Επιτυγχάνει τη συγκράτηση πολικών ουσιών που παρουσιάζουν μη ικανοποιητική ή καθόλου συγκράτηση σε στήλες RP-HPLC.
- ◆ Χρησιμοποιεί στην κινητή φάση διαλύτες αντίστοιχους με αυτούς που χρησιμοποιούνται στη RP-HPLC, που είναι περισσότερο φιλικό προς το περιβάλλον και συμβατό με συστήματα φασματομετρίας μαζών.
- ◆ Επιτρέπει τη χρησιμοποίηση νερού στην κινητή φάση, σε αντίθεση με τη NP-HPLC, που επιβάλλει αυστηρά άνυδρες συνθήκες και δύσκολους χειρισμούς για την απομάκρυνση υπολειμμάτων νερού από τους διαλύτες της κινητής φάσης. Το υδατικό μέρος επιτρέπει ταυτόχρονα και ικανοποιητική διαλυτότητα των αναλυόμενων πολικών ουσιών στην κινητή φάση.
- ◆ Η χρησιμοποίηση υψηλού ποσοστού οργανικού διαλύτη στην κινητή φάση συνεπάγεται διατήρηση χαμηλής πίεσης στο χρωματογραφικό σύστημα επιτρέποντας την αύξηση της ταχύτητας ροής της κινητής φάσης και μειώνοντας έτσι το χρόνο της ανάλυσης.
- ◆ Αύξηση της ευαισθησίας όταν η HILIC συνδυάζεται με συστήματα ESI/MS, γεγονός που σχετίζεται με σημαντική βελτίωση της απόδοσης του ιοντισμού της τεχνικής ESI λόγω του υψηλού ποσοστού του οργανικού διαλύτη (συνήθως ακετονιτριλίου) στην κινητή φάση.
- ◆ Μπορεί να συνδυαστεί με αντιστρόφου φάσεως εκχύλιση στερεάς φάσης (RP-SPE), καθώς ο διαλύτης υψηλής εκλουστικής ισχύος που χρησιμοποιείται για την παραλαβή του αναλύτη από το στηλάκι SPE αποτελεί ασθενές εκλουστικό μέσο στη χρωματογραφία HILIC και αντίστροφα, επιτρέποντας την απευθείας έγχυση του εκλούσματος SPE στο χρωματογραφικό σύστημα ή την αυτοματοποιημένη διασύνδεσή τους (on line SPE), ενώ ταυτόχρονα μειώνεται ο χρόνος της ανάλυσης και αποφεύγονται περαιτέρω χειρισμοί που μπορούν να οδηγήσουν σε απώλεια δείγματος. Αυτή η προσέγγιση μπορεί να εφαρμοστεί σε αναλύτες που παρουσιάζουν συγκράτηση σε υποστρώματα αντιστρόφου φάσεως και HILIC.

3.3. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΣΥΓΚΡΑΤΗΣΗΣ ΣΤΗ HILIC ^{72,77, 84-90}

Σύμφωνα με τον Alpert, ο όρος HILIC θα πρέπει να χρησιμοποιείται εφόσον ισχύουν οι παρακάτω δύο προϋποθέσεις:

- το νερό αποτελεί τον ισχυρότερο εκλουστικό διαλύτη
- η συγκράτηση των προς ανάλυση μορίων πραγματοποιείται με μηχανισμό κατανομής.

Ο ίδιος πρότεινε ότι ο μηχανισμός συγκράτησης στη HILIC σχετίζεται με την κατανομή των διαλυμένων μορίων ανάμεσα στο διαλύτη έκλουσης και σε ένα πλούσιο σε νερό στρώμα ακινητοποιημένο στην επιφάνεια της στατικής φάσης, βασιζόμενος σε πειράματα συγκράτησης και διαχωρισμού υδατανθράκων και νουκλειϊκών οξέων που πραγματοποίησαν οι Verhaar και Kuster, Orth και Engelhardt και Nikolov και Reilly. Ο Alpert υποστήριξε επίσης ότι τα φαινόμενα που ευθύνονται για την κατανομή μεταξύ των δύο φάσεων δεν είναι σαφή και ότι μπορεί να συμπεριλαμβάνονται σε αυτά και

αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου και πρότεινε τη διεξαγωγή περαιτέρω μελετών για τη διευκρίνιση των εμπλεκόμενων μηχανισμών. Το 2005 οι Guo και Gaiki μελέτησαν τη χρωματογραφική συμπεριφορά πολικών ουσιών (σαλικυλικού οξέος και παραγώγων, νουκλεοσιδίων και νουκλεοτιδίων) σε τέσσερα διαφορετικά υποστρώματα HILIC (μη τροποποιημένη síλικά και síλικά τροποποιημένη με αμινο-ομάδες, αμιδο-ομάδες και ομάδες σουλφοβηταΐνης) καθώς και την επίδραση ποικίλων παραγόντων (θερμοκρασίας, ποσοστού ακετονιτριλίου, pH και περιεκτικότητας αλάτων στην κινητή φάση) στη συγκράτηση των ουσιών σε κάθε κινητή φάση και κατέληξαν σε συμπεράσματα που υποστηρίζουν το μηχανισμό κατανομής που πρότεινε ο Alpert.

Ακολούθησαν και άλλες μελέτες για το σκοπό αυτό και έτσι η άποψη που έχει επικρατήσει σήμερα είναι ότι στο μηχανισμό συγκράτησης και διαχωρισμού στη HILIC εμπλέκονται φαινόμενα κατανομής καθώς και ηλεκτροστατικές επιδράσεις σε περιπτώσεις φορτισμένων στατικών φάσεων, δεσμοί υδρογόνου και αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου. Ο βαθμός στον οποίο καθένα από τα παραπάνω συνεισφέρει στο συνολικό μηχανισμό συγκράτησης ποικίλει και εξαρτάται από τη φύση του αναλύτη, το είδος της χρησιμοποιούμενης στατικής φάσης και τη σύσταση της κινητής φάσης συμπεριλαμβανομένων του είδους και της αναλογίας του οργανικού διαλύτη, αλλά και του είδους και της συγκέντρωσης των χρησιμοποιούμενων σε αυτή ρυθμιστικών αλάτων και του pH.

3.4. ΣΤΑΤΙΚΕΣ ΦΑΣΕΙΣ HILIC ^{76,77,91-93}

3.4.1. Γενικά

Όπως ήδη αναφέρθηκε, τα τελευταία χρόνια έχει σχεδιαστεί ένας σημαντικός αριθμός πληρωτικών υλικών για εφαρμογές HILIC. Εν τούτοις οι στατικές φάσεις RP-HPLC εξακολουθούν να υπερέχουν σημαντικά ως προς την ποικιλία. Σε γενικές γραμμές οι στατικές φάσεις HILIC ταξινομούνται ανάλογα με το φορτίο που φέρουν σε τρεις κατηγορίες:

- ουδέτερες όπως π.χ. οι στήλες τύπου διόλης και αμιδίου, στις οποίες δεν παρατηρούνται ηλεκτροστατικές επιδράσεις με τα μόρια του αναλύτη ανεξαρτήτως του pH της κινητής φάσης και χαρακτηρίζονται από μικρή εκλεκτικότητα.
- φορτισμένες, όπως π.χ. η μη τροποποιημένη síλικά, που παρουσιάζουν αυξημένη εκλεκτικότητα, ενώ ο μηχανισμός συγκράτησης του αναλύτη περιλαμβάνει υδρόφιλες και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και εξαρτάται από το pH της κινητής φάσης.
- τύπου αμφολύτη, π.χ. ZIC-HILIC, που παρουσιάζουν υψηλή εκλεκτικότητα και δευτερεύουσας σημασίας ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις ανεξάρτητες από το pH της κινητής φάσης.

3.4.2. Μη τροποποιημένη síλικά (underivatized silica) ⁹⁴

Αποτελεί την κλασική στατική φάση στη NP-HPLC και εξακολουθεί να βρίσκει και σήμερα εφαρμογή στη χρωματογραφία HILIC και να αναφέρεται σε σημαντικό αριθμό δημοσιευμένων επιστημονικών εργασιών με διαφορετικά εμπορικά ονόματα όπως Betasil,

Hypersil (Thermo Scientific), Chromolith (Merck) και Atlantis (Waters), η οποία έχει σχεδιαστεί ειδικά για διαχωρισμούς HILIC. Η απουσία συνδεδεμένων ομάδων στη μη τροποποιημένη síλικά, οι οποίες είναι δυνατό να αποκολληθούν και να οδηγήσουν στην εμφάνιση “περίεργων” κορυφών στα φάσματα μαζών, την καθιστά χρήσιμη σε αναλύσεις LC/MS. Αν και το νερό αποτελεί το ισχυρότερο μέσο για την απενεργοποίηση των ελεύθερων ομάδων σιλανόλης και το σχηματισμό του ενυδατωμένου στρώματος στην επιφάνεια του πληρωτικού υλικού, είναι δυνατό να παρατηρηθούν μη αντιστρεπτά φαινόμενα προσρόφησης του αναλύτη στη síλικά, γεγονός που οδηγεί σε μη επαναλήψιμα αποτελέσματα. Για την αποφυγή ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στην αρνητικά φορτισμένη επιφάνεια της síλικά και θετικά φορτισμένα μόρια του δείγματος επιβάλλεται η προσθήκη ηλεκτρολυτών στην κινητή φάση. Τέλος, είναι δυνατό να παρατηρηθούν αξιοσημείωτα διαφορετικές χρωματογραφικές συμπεριφορές ανάμεσα σε στήλες síλικά που προέρχονται από διαφορετικούς κατασκευαστές, γεγονός που σχετίζεται με διαφορές στην καθαρότητα της síλικά και στη διαδικασία παρασκευής της.

3.4.3. Síλικά με προπυλαμινο-ομάδες (Aminopropyl silica) ⁹⁴

Αποτελεί την πρώτη συνδεδεμένη στατική φάση síλικά που χρησιμοποιήθηκε ευρέως σε διαχωρισμούς υδατανθράκων με τη HILIC. Χρησιμοποιείται σε χρωματογραφία κατανομής κανονικής φάσης και σε χρωματογραφία HILIC με πολλά αντιπροσωπευτικά εμπορικά ονόματα στηλών, όπως Luna[®] Amino (Phenomenex), Spherisorb[®] NH₂ (Waters), Hypersil[®] APS2 (Thermo), Zorbax[®] NH₂ (Agilent). Παρουσιάζει ομοιότητες σε σύγκριση με την τροποποιημένη síλικά, καθώς το φορτίο της εξαρτάται από το pH της κινητής φάσης και μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων με φορτισμένα μόρια του αναλύτη, καθιστώντας απαραίτητη την προσθήκη υψηλών συγκεντρώσεων ρυθμιστικών αλάτων για τον περιορισμό τους. Πλεονεκτεί όμως έναντι αυτής λόγω της ικανότητας εμφάνισης πολυστροφισμού περιορίζοντας την εμφάνιση διπλών κορυφών κατά την ανάλυση οπτικών ισομερών. Έχει αναφερθεί ότι απαιτείται εκτεταμένη εξισορρόπηση των στηλών αυτών κατά τη χρησιμοποίηση ορισμένων ρυθμιστικών ιόντων, καθώς και σημαντικές διαφορές στη χρωματογραφική απόδοση μεταξύ διαφορετικών εμπορικά στηλών, οπότε και συνιστάται η χρησιμοποίηση στηλών ειδικά κατασκευασμένων για εφαρμογή HILIC. Ένα από τα προβλήματα που έχουν αναφερθεί κατά τη χρησιμοποίηση των στηλών αυτών σχετίζεται με την αντιδραστική φύση των αμινομάδων στην επιφάνεια της στατικής φάσης, που μπορεί να οδηγήσει σε μη αντιστρεπτή προσρόφηση των αναλυτών στο υπόστρωμα. Έτσι, ουσίες που φέρουν αλδεϋδομάδα σχηματίζουν βάσεις του Schiff με τις πρωτοταγείς αμινομάδες της τροποποιημένης síλικά, γεγονός που έχει σαν αποτέλεσμα την προσρόφηση των αναλυτών που φέρουν καρβονυλομάδες και την μεταβολή της λειτουργικότητας της στατικής φάσης. Τέλος, ως μειονέκτημα έχει αναφερθεί η περιορισμένη σταθερότητα αυτών των στατικών φάσεων σε υδατικά εκλύσματα, γεγονός που οδηγεί στην ταχεία αποσύνδεση των συνδεδεμένων ομάδων με επακόλουθες συνέπειες την αλλοίωση του σχήματος των χρωματογραφικών κορυφών, την ενίσχυση του θορύβου και την ιοντική καταστολή του σήματος για πολλούς αναλύτες.

3.4.4. Σίλικα με αμιδο-ομάδες (Amide silica)

Δεδομένου ότι η αμιδική ομάδα παρουσιάζει μικρότερη δραστικότητα και στερείται βασικότητας, οι στατικές φάσεις αυτού του τύπου στερούνται των προβλημάτων που αναφέρθηκαν παραπάνω για τις στατικές φάσεις που φέρουν αμινομάδα, όπως η μη αναστρέψιμη χημειοπροσρόφηση και ο σχηματισμός βάσεων του Schiff κατά την ανάλυση σακχάρων και άλλων ενώσεων που φέρουν καρβονύλιο. Οι στατικές φάσεις αυτού του τύπου εμφανίζουν συγκράτηση που επηρεάζεται σε μικρότερο βαθμό από το pH του εκλουστικού μέσου, ενώ έχει αναφερθεί ότι εμφανίζουν ικανοποιητική ανάκτηση και σταθερότητα ακόμα και μετά από 500 ενέσεις. Αποτελούν ευρέως διαδεδομένα πληρωτικά υλικά με αντιπροσωπευτικά εμπορικά ονόματα όπως TSKgel Amide-80 (Tosoh Bioscience), GlycoSep N (ProZyme).

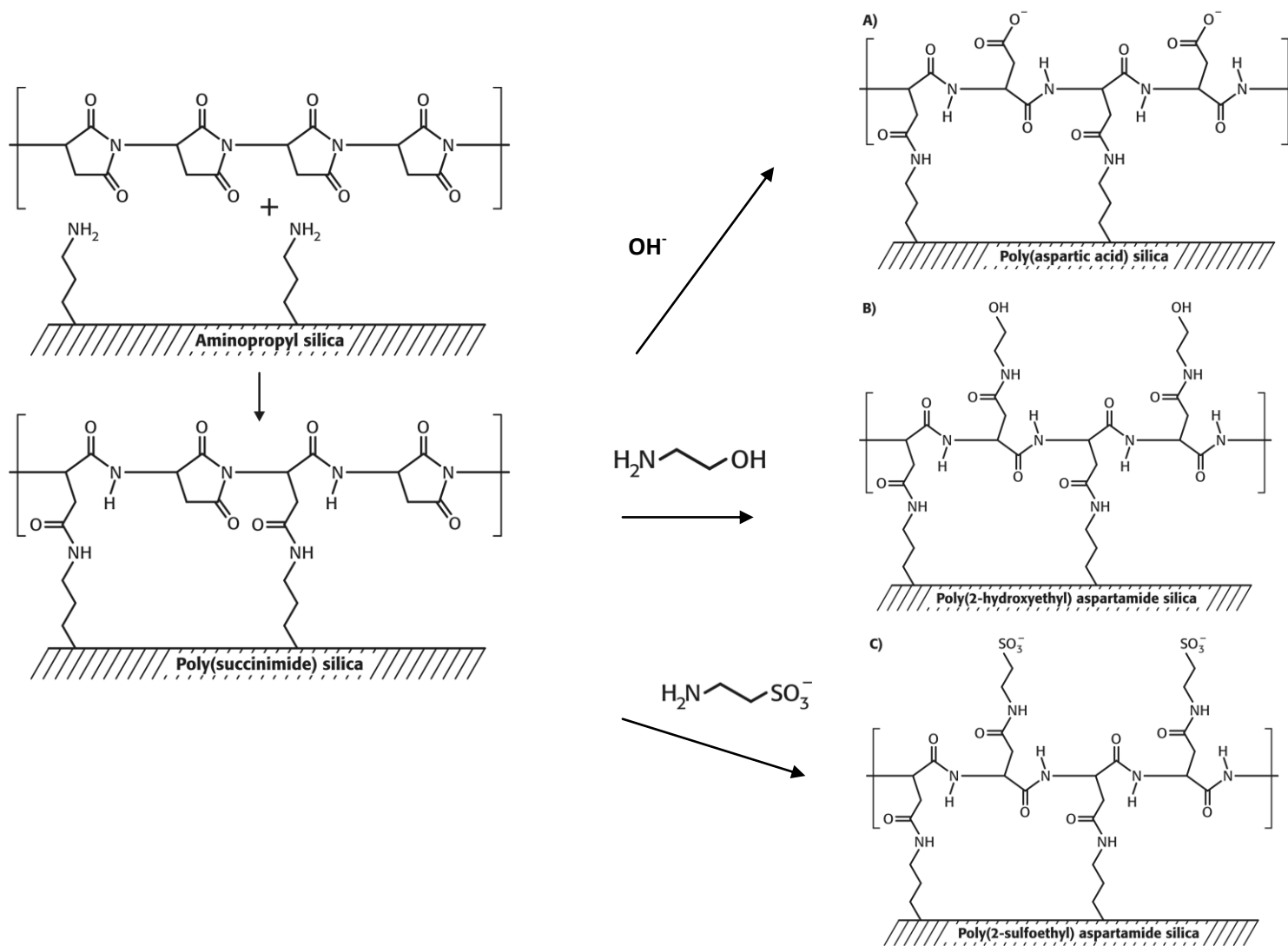
3.4.5. Σίλικα με συνδεδεμένες ομάδες πολυηλεκτριμιδίου και παραγώγων του (Poly(succinimide)-bonded silica and its derivatives)

Η στατική φάση σίλικα που φέρει συνδεδεμένες ομάδες πολυηλεκτριμιδίου (εμπορική ονομασία PolyGlycorplex (PolyLC)) προκύπτει μετά από την αντίδραση του πολυδουξινιμιδίου με σίλικα που φέρει προπυλαμινο-ομάδες και αποτελεί επιπλέον το ενδιάμεσο βήμα για την κατασκευή μιας σειράς πληρωτικών υλικών, αφού μόνο ένα μέρος των δακτυλίων σχηματίζει δεσμούς με την επιφάνεια της σίλικα και οι μη συνδεδεμένοι δακτύλιοι παραμένουν άθικτοι και επιρρεπείς σε πηρηνόφιλες αντιδράσεις. Στο Σχήμα 3.2 παρουσιάζεται η παρασκευή στατικών φάσεων σίλικα με πολυασπαρτικό οξύ (εμπορική ονομασία PolyCAT A (PolyLC)), που αποτελεί ασθενή κατιονανταλλάκτη, μετά από αλκαλική υδρόλυση (A), σίλικα με πολυ(2-υδροξυαιθυλο)ασπαρταμίδιο (εμπορική ονομασία PolyHydroxyethyl A (PolyLC)), μετά από αντίδραση με αιθανολαμίνη (B) και σίλικα με πολυ(2-σουλφοαιθυλο)ασπαρταμίδιο (εμπορική ονομασία PolySulfoethyl A (PolyLC)), που αποτελεί ισχυρό κατιονανταλλάκτη, μετά από αμινόλυση με ταυρίνη. Οι στατικές φάσεις αυτές έχουν χρησιμοποιηθεί σε μεγάλο εύρος εφαρμογών για την ανάλυση υδατανθράκων, πρωτεϊνών, νουκλεϊνικών οξέων, βασικών ενώσεων, φαρμακευτικών ουσιών κ.λ.π.

3.4.6. Σίλικα με ομάδες διόλης (Diol silica)

Η τροποποιημένη σίλικα που φέρει ομάδες διόλης αποτελεί τη στατική φάση που προσομοιάζει περισσότερο από πλευράς πολικότητας με τη μη τροποποιημένη σίλικα και ήταν από τις πρώτες συνδεδεμένες στατικές φάσεις σίλικα που παρασκευάστηκαν με σκοπό να αποφευχθούν τα ανεπιθύμητα φαινόμενα προσρόφησης που παρατηρούνται στη μη τροποποιημένη σίλικα. Η υψηλή πολικότητα και η ικανότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου σε συνδυασμό με την σχετική απουσία αποσπώμενων ομάδων, καθιστούν τις στατικές φάσεις διόλης ιδανική λύση για εφαρμογές HILIC, όπου δεν επιθυμείται η εμφάνιση μικτών αλληλεπιδράσεων, όπως ιοντικές αλληλεπιδράσεις με ομάδες σιλανόλης. Παρ' όλα αυτά ο αριθμός δημοσιευμένων εργασιών με αυτές παραμένει σχετικά περιορισμένος. Αντιπροσωπευτικά εμπορικά ονόματα τέτοιων στηλών περιλαμβάνουν Lichrospher® Diol 100 (Merck), ProteinPak™ 60 (Waters), Silasorb Diol (Chemapol), YMC-pack® Diol-120-NP (YMC) και έχουν χρησιμοποιηθεί στην ανάλυση αμινοξέων, ουρίας, πολυμερών γλυκόζης κ.λ.π.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Υγροχρωματογραφία Υδρόφιλων Αλληλεπιδράσεων (HILIC)



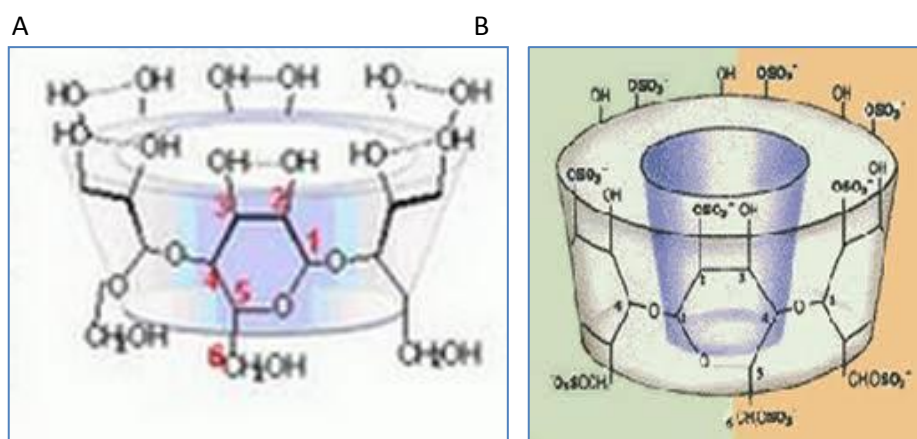
Σχήμα 3.2: Πορεία παρασκευής στατικών φάσεων πολυηλεκτριμιδίου και παραγώγων του

3.4.7. Σίλικα με ομάδες προπυλονιτριλίου (Cyanopropyl silica)

Η στατική φάση αυτού του τύπου υπάρχει πολλά χρόνια αλλά αποτελεί από τις πλέον λιγότερο χρησιμοποιούμενες στατικές φάσεις με ελάχιστες εφαρμογές στη HILIC. Αν και συχνά αναφέρεται ως πολικό υπόστρωμα, η απουσία ιδιοτήτων δότη σε δεσμούς υδρογόνου οδηγεί σε περιορισμένη συγκράτηση σε χρωματογραφία κανονικής φάσεως, ενώ συχνά βρίσκει εφαρμογή στην RP-HPLC. Μια επιπλέον παράμετρος που δυσχεραίνει την εφαρμογή των στηλών αυτών αποτελεί η μηχανική αστάθεια της στατικής φάσης όταν χρησιμοποιούνται ενδιάμεσης πολικότητας διαλύτες στην κινητή φάση, γεγονός που οφείλεται στην εξασθένηση των ενδοσωματιδιακών δυνάμεων που συμβάλλουν στη διατήρηση της ακεραιότητας του υποστρώματος με άπολους ή υψηλής πολικότητας διαλύτες.

3.4.8. Σίλικα με ομάδες κυκλοδετρίνης (Cyclodextrin-based silica)

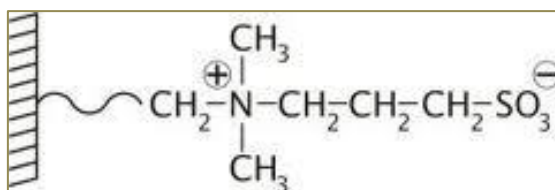
Οι κυκλοδετρίνες είναι κυκλικοί ολιγοσακχαρίτες αποτελούμενοι από πέντε ή περισσότερα μόρια α-D-γλυκόζης που συνδέονται μεταξύ τους με 1,4-γλυκοσιδικό δεσμό. Οι πιο διαδεδομένες είναι οι α-, β- και γ-κυκλοδετρίνες, που αποτελούνται από έξι, επτά και οκτώ μόρια γλυκόζης, αντίστοιχα, από τις οποίες η β-κυκλοδετρίνη είναι η πλέον μελετημένη και ευρέως χρησιμοποιούμενη στο πεδίο των διαχωρισμών. Τα μόρια αυτά εμφανίζουν στο χώρο σχήμα κόλουρου κώνου και στην επιφάνεια του μικρού και του μεγάλου ανοίγματος εισόδου τους εκτίθενται πρωτοταγείς και δευτεροταγείς υδροξυλομάδες, αντίστοιχα (Σχήμα 3.3). Το εσωτερικό της κοιλότητας του μορίου είναι σημαντικά λιγότερο υδόφιλο σε σχέση με το εξωτερικό του μορίου και μπορεί να φιλοξενήσει υδρόφοβα μόρια. Καθώς η κοιλότητά τους έχει σχηματιστεί από οπτικά ενεργά σάκχαρα, οι στατικές φάσεις σίλικα με κυκλοδετρίνες έχουν χρησιμοποιηθεί ευρύτατα σε χειρόμορφους διαχωρισμούς, ενώ η υψηλή πυκνότητα των εκτεθειμένων στην εξωτερική επιφάνεια υδροξυλίων τις καθιστά πολλά υποσχόμενα πληρωτικά υλικά για χειρόμορφους διαχωρισμούς HILIC.



Σχήμα 3.3: Τρισδιάστατη δομή μορίων α-κυκλοδετρίνης (A) και β-κυκλοδετρίνης (B)

3.4.9. Σίλικα με ομάδες σουλφοαλκυλοβηταΐνης (Sulfoalkylbetaine silica)

Μια σχετικά πρόσφατη κατηγορία στατικών φάσεων HILIC βασίζεται στην ενσωμάτωση λειτουργικών ομάδων σουλφοαλκυλοβηταΐνης που συνδέονται στην επιφάνεια της σίλικα, οι οποίες παρουσιάζουν αμφολυτικές ιδιότητες, καθώς φέρουν ταυτόχρονα ένα κατιονικό κέντρο τεταρτοταγούς αμμωνίου και μια αρνητικά φορτισμένη σουλφονική ομάδα σε αναλογία 1:1 (Σχήμα 3.4) και κατά συνέπεια παρουσιάζουν ισχυρή ικανότητα συγκράτησης του νερού και δημιουργία υδατικού στρώματος, ενώ ταυτόχρονα διατηρούν συνολικά μηδενικό φορτίο. Τα πληρωτικά υλικά αυτού του τύπου αναπτύχθηκαν αρχικά για το διαχωρισμό ανόργανων αλάτων, μικρών ιονιζόμενων μορίων και πρωτεϊνών. Στις μέρες μας είναι πρωταρχικής εφαρμογής στη HILIC, γεγονός που αποδίδεται αφενός μεν στην ικανότητα διατήρησης του υδατικού στρώματος και αφετέρου στη διατήρηση χαμηλού φορτίου στην επιφάνεια ανεξαρτήτως του pH της κινητής φάσης, γεγονός που δυσχεραίνει την εμφάνιση ιοντικών αλληλεπιδράσεων. Η συγκράτηση του αναλύτη εξαρτάται από την πολικότητά του, χωρίς τα φαινόμενα προσρόφησης και ιοντικής αλληλεπίδρασης που παρατηρούνται σε υποστρώματα με μη τροποποιημένη σίλικα ή σίλικα που φέρει αμινομάδες. Μικρής έντασης ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις είναι δυνατό να εμφανιστούν και σχετίζονται με την αρνητικά φορτισμένη σουλφονική ομάδα, αλλά είναι ανεξάρτητες του pH και μπορούν κατ' επιλογή να ενισχυθούν ή να περιοριστούν με κατάλληλη προσθήκη αλάτων. Η εμπορική ονομασία της στατικής φάσης είναι ZIC®-HILIC και διατίθεται από την Merck και τα διαθέσιμα μεγέθη σωματιδίων του πληρωτικού υλικού είναι 3,5, 5,0 και 10 μm. Από την ίδια εταιρεία διατίθεται και η στήλη ZIC®-pHILIC, που φέρει την ίδια ομάδα συνδεδεμένη σε πολυμερές υλικό και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μεγαλύτερο εύρος τιμών pH (pH: 2-10) σε σχέση με αυτή που βασίζεται στη σίλικα (pH: 3-8)



Σχήμα 3.4: Η λειτουργική ομάδα σουλφοαλκυλοβηταΐνης που συναντάται στις στατικές φάσεις ZIC®-HILIC και ZIC®-pHILIC

3.4.10. Άλλες στατικές φάσεις

Στη βιβλιογραφία συναντώνται επιπλέον αρκετές στατικές φάσεις HILIC από αυτές που ήδη αναφέρθηκαν, οι οποίες είτε φέρουν άλλες λειτουργικές ομάδες (π.χ. ομάδες 1,2,4-τριαζολίου, μακροκυκλικού αντιβιοτικού, κλπ) συνδεδεμένες στην επιφάνεια της σίλικα, είτε φέρουν ομάδες που συνδέονται σε κάποιο άλλο στρώμα πολυμερούς υλικού και όχι σε σίλικα (π.χ. σωματίδια πολυστυρενίου-διβινυλοβενζυλίου, κυτταρίνη κ.λ.π)

3.5. Η ΚΙΝΗΤΗ ΦΑΣΗ ΣΤΗ HILIC^{75,77,83,86,95-97}

3.5.1. Γενικά

Για μια αποτελεσματική ανάλυση HILIC και εφόσον έχει επιλεγεί το κατάλληλο υπόστρωμα ως στατική φάση, η κινητή φάση θα πρέπει να επιλέγεται κατάλληλα ώστε να ικανοποιεί τις ακόλουθες προϋποθέσεις:

- ♦ ικανοποιητική διαλυτοποίηση των αναλυόμενων ουσιών
- ♦ κατάλληλη περιεκτικότητα σε νερό, επαρκή για το σχηματισμό του υδατικού στρώματος στην επιφάνεια της στατικής φάσης
- ♦ χημική συγγένεια με τους αναλύτες μικρότερη από αυτή που παρουσιάζουν με τη στατική φάση, ώστε να επιτευχθεί ικανοποιητική συγκράτηση και διαχωρισμός

Οι τυπικά χρησιμοποιούμενες κινητές φάσεις στη χρωματογραφία HILIC περιέχουν οργανικό διαλύτη (συνήθως ακετονιτρίλιο) σε αναλογία 40-97 % σε νερό ή κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα. Όσο μεγαλύτερη είναι η αναλογία του οργανικού τροποποιητή σε σχέση με την υδατική φάση, τόσο αυξάνεται ο χρόνος συγκράτησης των αναλυτών. Για την εξαγωγή επαναλήψιμων χρωματογραφικών αποτελεσμάτων απαιτείται ελάχιστη περιεκτικότητα σε νερό 3 %, ποσότητα απαραίτητη για την επαρκή ενυδάτωση των σωματιδίων της στατικής φάσης.

Αν και στη HILIC είναι περισσότερο διαδεδομένη η διατήρηση σταθερής της σύστασης της κινητής φάσης (ισοκρατική έκλυση), είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί και βαθμιδωτή έκλυση προκειμένου να επιτευχθεί αποτελεσματικός διαχωρισμός και ικανοποιητική συγκράτηση ουσιών που παρουσιάζουν σημαντικά διαφορετικά χαρακτηριστικά. Στην περίπτωση αυτή, η μετάβαση πραγματοποιείται αντίστροφα σε σχέση με την RP-HPLC, δηλαδή αφορά σταδιακή αύξηση της πολικότητας της κινητής φάσης που πραγματοποιείται με σταδιακή μείωση της αναλογίας του οργανικού τροποποιητή και αύξηση του υδατικού μέρους. Επίσης, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ότι η μετάβαση από 100 % οργανικό τροποποιητή σε 100 % νερό δεν είναι επιτρεπτή στη HILIC και ότι οι στατικές φάσεις HILIC είναι λιγότερο ανεκτικές σε ταχείς ρυθμούς εναλλαγής της σύστασης της κινητής φάσης κατά τη βαθμιδωτή έκλυση και απαιτούν μεγαλύτερο χρόνο για την εξισορρόπηση στην αρχική αναλογία της κινητής φάσης πριν την έναρξη της επόμενης ανάλυσης, σε σχέση με την RP-HPLC.

Αν και το ακετονιτρίλιο αποτελεί τον πλέον χρησιμοποιούμενο οργανικό διαλύτη στη HILIC, είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν και άλλοι πολικοί διαλύτες, αναμίξιμοι με το νερό. Η εκλυστική ισχύς των διαλυτών στην περίπτωση της HILIC είναι αντίστροφη από αυτή που παρατηρείται στη χρωματογραφία αντιστρόφου φάσεως:

τετραυδροφουράνιο < ακετόνη < ακετονιτρίλιο < ισοπροπανόλη < μεθανόλη < νερό

Η μεθανόλη θεωρείται σχετικά ισχυρό εκλυστικό μέσο στη χρωματογραφία HILIC και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε περιπτώσεις αναλυτών που παρουσιάζουν μειωμένη διαλυτότητα στο ακετονιτρίλιο.

3.5.2. Ρυθμιστικά διαλύματα

Οι κατασκευαστές στηλών HILIC προτείνουν τη χρησιμοποίηση ρυθμιστικών παραγόντων με σκοπό να περιοριστούν οι ανεπιθύμητες ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα φορτισμένα μόρια των αναλυτών και στη στατική φάση, καλύπτοντας τα φορτισμένα

κέντρα του υποστρώματος. Ως προτεινόμενα ρυθμιστικά διαλύματα αναφέρονται το οξικό και το μυρμηκικό αμμώνιο και τα αντίστοιχα οξέα τους, καθώς παρουσιάζουν εξαιρετική διαλυτότητα στην κινητή φάση ακόμα και σε υψηλή αναλογία οργανικού τροποποιητή και είναι συμβατά με τη φασματομετρία μαζών. Φωσφορικά άλατα θα πρέπει να χρησιμοποιούνται με προσοχή εξαιτίας της χαμηλής διαλυτότητάς τους, αν και είναι δυνατό να αυξήσουν την ευαισθησία σε αναλύσεις HILIC φασματοφωτομετρικό ανιχνευτή υπεριώδους ορατού, ενώ το υδροξείδιο του αμμωνίου μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε περιπτώσεις που απαιτούνται υψηλές τιμές pH. Η χρησιμοποίηση ρυθμιστικών διαλυμάτων δεν είναι απαραίτητη στην ανάλυση ουδέτερων μη φορτισμένων μορίων. Η συγκέντρωση των ρυθμιστικών παραγόντων επιλέγεται ανάλογα με τη διαλυτότητά τους και την επίδραση στο λαμβανόμενο σήμα και συνήθως συγκεντρώσεις σε εύρος 5 - 30 mM είναι επαρκείς για τους περισσότερους αναλύτες με ανώτερο επιτρεπόμενο όριο τα 200-300 mM ανάλογα με τη διαλυτότητά τους στο εκλουστικό μέσο. Έτσι για παράδειγμα, σύμφωνα με τους κατασκευαστές για τις στήλες SeQuant ZIC®-HILIC και ZIC®-pHILIC ως κατάλληλες αρχικές συνθήκες με δυνατότητα περαιτέρω βελτιστοποίησης κατά την ανάπτυξη της μεθόδου προτείνονται σε περίπτωση ισοκρατικής έκλουσης μίγμα ακετονιτριλίου και οξικού ή μυρμηκικού αμμωνίου (20 mM) σε αναλογία 80/20 (v/v) και για βαθμιδωτή έκλουση προτείνεται γραμμική μεταβολή από αναλογία 90/10 % σε 40/60 % ακετονιτρίλιο/ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου (20 mM) εντός περίπου 20 min (κλίση 3 % min⁻¹, περίπου) και χρόνος εξισορρόπησης 10 min.

3.5.3. Επίδραση pH

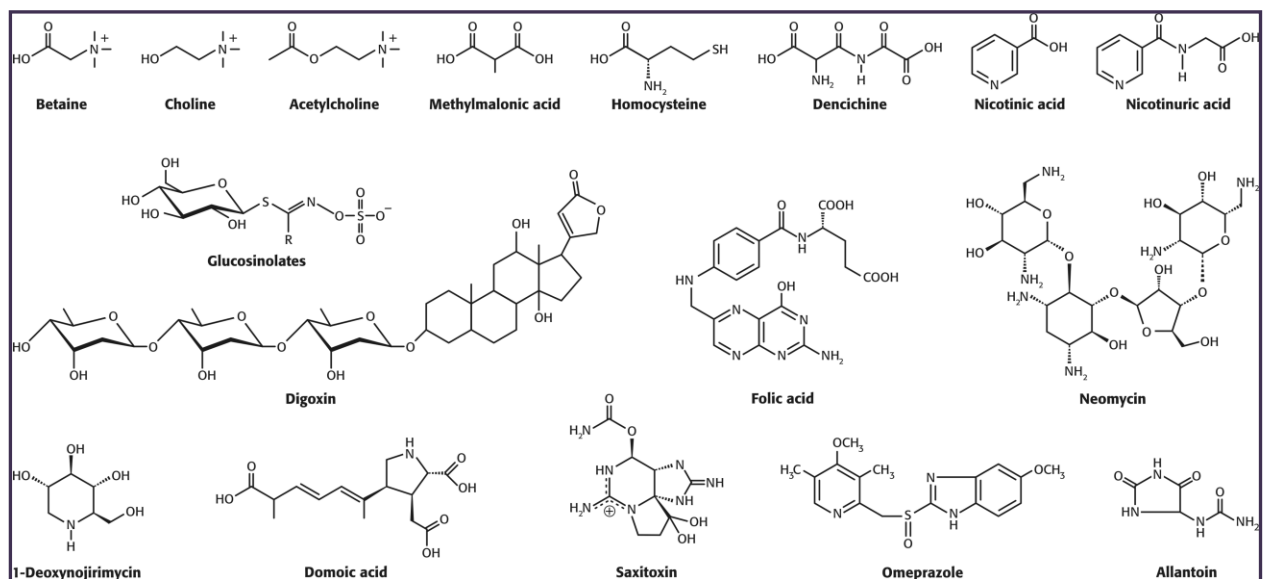
Η τιμή του pH της κινητής φάσης είναι δυνατό να επηρεάσει τη συγκράτηση του αναλύτη στη στατική φάση, καθώς είναι καθοριστικής σημασίας για το αν τα αναλυόμενα μόρια θα βρίσκονται στην ιοντισμένη ή την αδιάστατη μορφή τους, ανάλογα με το αν είναι μεγαλύτερη ή μικρότερη από την τιμή pK_a των ουσιών, γεγονός που επηρεάζει την πολικότητα και την υδροφιλία τους και την αλληλεπίδρασή τους με στατική φάση. Το συνιστώμενο εύρος τιμών pH για τις στατικές φάσεις με βάση τη σίλικα είναι 2-8, ενώ για στήλες με πολυμερισμένο πληρωτικό υλικό 2-10.

3.6. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ HILIC ^{75,77,87,98-100}

Όπως αναφέρθηκε ήδη, αν και η χρωματογραφία HILIC ήταν γνωστή εδώ και πολλά χρόνια, μόλις την τελευταία δεκαετία απέκτησε ευρεία εφαρμογή ως αναλυτική τεχνική διαχωρισμού σε πολλούς τομείς πλην της ανάλυσης των υδατανθράκων. Ο αριθμός των δημοσιευμένων επιστημονικών εργασιών που χρησιμοποιούν την HILIC παρουσιάζει αξιοσημείωτη αύξηση μετά το 2003. Στο άρθρο επισκόπησης που δημοσίευσαν οι P. Hemstrom και K. Irgum γίνεται εκτενής αναφορά στις εφαρμογές της τεχνικής για την ανάλυση μεγάλης ποικιλίας ως προς τη δομή πολικών ουσιών εξυπηρετώντας αναλυτικούς σκοπούς σε ένα ιδιαίτερα ευρύ πεδίο αναλυτικών εφαρμογών

Ανάλυση μικρομοριακών ουσιών

Η HILIC έχει χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση πλήθους μικρών πολικών μορίων, κυρίως βασικών ουσιών που θα απαιτούσαν το σχηματισμό ζεύγους ιόντων για ικανοποιητική συγκράτηση σε χρωματογραφία αντιστρόφου φάσης. Για το σκοπό αυτό έχει χρησιμοποιηθεί μεγάλη ποικιλία στατικών φάσεων και συστήματα ανίχνευσης φασματοφωτομετρίας υπεριώδους και φασματομετρίας μαζών. Ενδεικτικά αναφέρουμε την ανάλυση χολίνης και ακετυλοχολίνης, γλυκίνης, ουρίας, ομοκυστεΐνης, αλλαντοΐνης και λυσίνης και μεγάλου εύρους βασικών φαρμακευτικών ουσιών π.χ. ατενολόλη, ισοπρεναλίνη κ.α. (Σχήμα 3.5). Ακολουθεί συνοπτική αναφορά των πεδίων εφαρμογών της HILIC που αφορά στην ανάλυση μικρομοριακών ουσιών.



Σχήμα 3.5: Αντιπροσωπευτικές πολικές και βασικές ουσίες που έχουν αναλυθεί με εφαρμογή της τεχνικής HILIC.

- ◆ **Βιοαναλυτικές εφαρμογές και φαρμακοκινητική:** η HILIC βρίσκει εφαρμογή κατά το στάδιο ανάπτυξης νέων φαρμακευτικών ουσιών, όπου υποψήφιες ενώσεις αναλύονται σε πολύ χαμηλά επίπεδα συγκέντρωσης σε βιολογικά δείγματα. Ενδεικτικά αναφέρουμε τον προσδιορισμό παραγώγων του φολικού οξέος σε ανθρώπινο πλάσμα, της ομεπραζόλης και του υδροξυλιωμένου μεταβολίτη της σε ανθρώπινο πλάσμα, αντιψυχωσικών φαρμάκων, του ισονιαζιδίου, της ακυκλοβίρης σε πλάσμα, αμνιακό υγρό, πλακούντα και εμβρυικό οστό γάτας και του νικοτινικού οξέος και των μεταβολιτών του με εφαρμογή σε φαρμακοκινητική μελέτη.
- ◆ **Ανάλυση αντιβιοτικών και κυτταροστατικών ουσιών:** τόσο τα αντιβιοτικά όσο και τα αντικαρκινικά φάρμακα αποτελούν πολύ υδρόφιλα μόρια. Ενδεικτικά αναφέρουμε εφαρμογή της HILIC για το διαχωρισμό τετρακυκλινών, την ανάλυση νεομυκίνης σε ανθρώπινο πλάσμα, αμινογλυκοσιδών σε ανθρώπινο ορό για την παρακολούθηση των θεραπευτικών τους επιπέδων και κυτταροστατικών όπως η 5-φθοριουρακίλη, η φαρμακοκινητική παρακολούθηση της ζεβουλαρίνης και των μεταβολιτών της κ.α.

- ◆ Φαρμακευτική ανάπτυξη και ανακάλυψη δραστικών ουσιών: η HILIC έχει χρησιμοποιηθεί στην ανάλυση και το διαχωρισμό δραστικών ουσιών που απομονώνονται από φυσικά προϊόντα, χαρακτηρισμό του μεταβολικού προφίλ (fingerprinting) στα ούρα αρουραίων συνδυάζοντας αναλυτικά δεδομένα από δύο υγροχρωματογραφικές τεχνικές (HILIC και RP-HPLC).
- ◆ Ουσίες κατάχρησης: εφαρμογές της HILIC περιλαμβάνουν την ανάλυση κοκαΐνης και 7 μεταβολιτών της σε ανθρώπινα υγρά και ιστούς και τον προσδιορισμό της μορφίνης και των μεταβολιτών της με τη μορφή γλυκουρονιδίων σε πλάσμα

Ανάλυση τοξινών

Πολλές τοξίνες φυσικής προέλευσης αποτελούν ιδιαίτερα υδρόφιλες ουσίες. Οι θαλάσσιες τοξίνες που σχετίζονται με παραλυτικές δηλητηριάσεις από μαλάκια (paralytic shellfish poisoning, PSP) είναι ιδιαίτερα κατάλληλες ενώσεις για διαχωρισμό με HILIC. Παραδείγματα εφαρμογής αποτελούν η απομόνωση αναλόγων της σαξιτοξίνης από το είδος *Gymnodinium catenatum*, η απομόνωση και ο ποσοτικός προσδιορισμός μεγάλου αριθμού τοξινών από κυανοβακτήρια με μέθοδο ανάλυσης HILIC, που στη συνέχεια επεκτάθηκε στην ανάλυση του δομοϊκού οξέος και μεγάλου εύρους τοξινών PSP. Σε όλες τις περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε ως στατική φάση σίλικα με αμιδικές ομάδες.

Ανάλυση συνθετικών πολυμερών

Μέχρι πρόσφατα η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους και διαπερατότητας γέλης αποτελούσαν τεχνικές επιλογής για το διαχωρισμό συνθετικών πολυμερών, όπως επίσης και η τεχνική καταβύθισης /επαναδιάλυσης. Η HILIC έχει χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό μορίων πολυβινυλοπυρρολιδόνης μοριακού βάρους μέχρι 360 kDa, επιτυγχάνοντας οξείες χρωματογραφικές κορυφές και για το διαχωρισμό ολιγομερών δεξτράνης με 3-12 μόρια γλυκόζης.

Ανάλυση υδατανθράκων

Η HILIC χρησιμοποιείται κατεξοχήν για το διαχωρισμό υδατανθράκων, καθώς παρουσιάζουν ιδιότητες που δυσχεραίνουν την ανάλυσή τους με άλλες χρωματογραφικές τεχνικές, όπως ο μεγάλος αριθμός των υδροξυλίων και άλλων πολικών ομάδων, η θερμική τους αστάθεια που καθιστά αδύνατη την ανάλυσή τους με αεριοχρωματογραφία και η δυσκολία ανίχνευσής τους με ικανοποιητική ακρίβεια. Έτσι, η HILIC χρησιμοποιήθηκε από πολύ νωρίς για την ανάλυση των ουσιών αυτών όπως για το διαχωρισμό υδατανθράκων που περιέχονται σε φαγητά και ποτά, σακχάρων σε παραδοσιακά κινέζικα φάρμακα και θαλάσσια δείγματα, γλυκοσαμινογλυκανών, γλυκοπρωτεϊνών, υψηλού μοριακού βάρους πολυσακχαριτών, συνθετικών γλυκοπολυμερών, γλυκοπεπτιδίων, κ.λ.π.

Ανάλυση πρωτεϊνών, πεπτιδίων και αμινοξέων

Μετά την ανάλυση υδατανθράκων, ο διαχωρισμός πεπτιδίων αποτελεί τη δεύτερη κατά σειρά συχνότητας εφαρμογή της HILIC. Ενδεικτικά αναφέρουμε εφαρμογές της HILIC στην ανάλυση μετα-μεταφραστικών τροποποιητικών πρωτεϊνών όπως φωσφορυλιωμένων πεπτιδίων, πεπτιδίων N-ακετυλιωμένων στο τελικό άκρο και γλυκοσυλιωμένων πεπτιδίων και στην μελέτη τροποποιήσεων των ιστονών με την ανάλυση ακετυλιωμένων και μεθυλιωμένων ιστονών.

Πειραματικό

Μέρος

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΒΑΣΙΚΗ ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ - ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφονται τα όργανα, οι συσκευές, τα υλικά, οι διαλύτες και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην εκπόνηση της παρούσας εργασίας.

4.1. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

4.1.1. Συστήματα LC/MS, LC/MS-MS

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν τρία συστήματα LC/MS της εταιρείας Agilent Technologies (Santa Clara, California, USA). Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της υδροκορτιζόνης και της θεοβρωμίνης σε ούρα αλόγων χρησιμοποιήθηκε σύστημα LC/TOF-MS που περιελάμβανε σύστημα υγροχρωματογραφίας υπερυψηλής απόδοσης (Ultra High Performance Liquid Chromatography, UHPLC) συνδεδεμένο με φασματόμετρο μαζών με αναλυτή χρόνου πτήσης (TOF-MS) και σύστημα LC/IT-MS αποτελούμενο από υγροχρωματογραφικό σύστημα υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) και φασματόμετρο μαζών με αναλυτή μαζών τετραπολική παγίδα ιόντων (IT-MS). Για την ποιοτική ανίχνευση απαγορευμένων ουσιών σε ούρα αθλητών και τον ποσοτικό προσδιορισμό του σαλικυλικού οξέος και της 3-μεθοξυτυραμίνης σε ούρα αλόγων χρησιμοποιήθηκε σύστημα LC/QTOF-MS αποτελούμενο από υγροχρωματογραφικό σύστημα UHPLC και φασματόμετρο μαζών με τετραπολικό αναλυτή μαζών συζευγμένο με αναλυτή χρόνου πτήσης (QTOF-MS). Κα τα τρία φασματόμετρα μαζών που χρησιμοποιήθηκαν διέθεταν πηγή ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI).

4.1.1.1. Σύστημα LC/IT-MS

Το σύστημα LC/IT-MS περιελάμβανε υγροχρωματογραφικό σύστημα HPLC 1100 LC Series (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) αποτελούμενο από αυτόματο σύστημα απαέρωσης για την απομάκρυνση του αέρα από τα κανάλια διόδου της κινητής φάσης, αντλία δύο καναλιών, αυτόματο δειγματολήπτη 100 θέσεων με δυνατότητα ρύθμισης του όγκου ένεσης μεταξύ 0,1 – 100 μL και θερμοστατούμενο θάλαμο τοποθέτησης της χρωματογραφικής στήλης. Το φασματόμετρο μαζών παγίδας ιόντων Ion Trap SL MSD (Agilent Technologies, Santa Clara, California USA) διέθετε πηγή ιοντισμού ηλεκτροψεκασμού ορθογώνιας διάταξης με δυνατότητα ρύθμισης σε λειτουργία θετικού ή/και αρνητικού ιοντισμού. Ως αέριο εκνέφωσης και αποδιαλύτωσης χρησιμοποιήθηκε άζωτο, η παροχή του οποίου πραγματοποιείται μέσω γεννήτριας αζώτου. Ως αέριο σύγκρουσης για την πραγματοποίηση θραυσματοποιήσεων στην παγίδα ιόντων χρησιμοποιήθηκε το ήλιο που διοχετευόταν από οβίδα ηλίου. Το σύστημα διέθετε φωτοπολλαπλασιαστή ως ανιχνευτή των ιόντων και δυνατότητα μέτρησης τιμών m/z στην περιοχή 50-2000 amu με μέγιστη ταχύτητα 1650 $m/z \text{ sec}^{-1}$ και στην περιοχή 200 – 4000 amu με μέγιστη ταχύτητα 27000 $m/z \text{ sec}^{-1}$. Σε ό,τι αφορά τους δυνατούς τρόπους λήψης φασμάτων με το συγκεκριμένο σύστημα είναι δυνατή η λήψη φασμάτων πλήρους σάρωσης (full scan spectra), καθώς και η λήψη φασμάτων σάρωσης θυγατρικού ιόντος (product ion

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Βασική Οργανολογία - Αντιδραστήρια

scan spectra, PIS) δηλαδή η σάρωση των θυγατρικών ιόντων που προέρχονται από τη θραυσματοποίηση προεπιλεγμένου πρόδρομου ιόντος (ή ιόντων) (δυνατότητα λειτουργίας MS2 ή και MS3). Για τη ρύθμιση όλων των παραμέτρων του οργάνου, τη λήψη και την επεξεργασία των χρωματογραφικών και φασματομετρικών δεδομένων χρησιμοποιήθηκε ηλεκτρονικός υπολογιστής με λειτουργικό σύστημα Windows 2000 και τα λογισμικά Chemstation και LC/MSD Trap Software.

4.1.1.2. Σύστημα LC/TOF-MS

Το σύστημα LC/TOF-MS διαθέτει υγροχρωματογραφικό σύστημα υπερυψηλής απόδοσης (1200-SL LC Series Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) αποτελούμενο από αντλία βαθμιδωτής έκλουσης με δυνατότητα παροχής διαλυτών από τέσσερις διαφορετικούς περιέκτες, σύστημα αυτόματης απαέρωσης, θερμοστατούμενο αυτόματο δειγματολήπτη 106 θέσεων και θερμοστατούμενο θάλαμο τοποθέτησης της χρωματογραφικής στήλης με συνδεσμολογία κατάλληλη για την ταυτόχρονη τοποθέτηση και εναλλακτική λειτουργία δύο διαφορετικών στηλών.

Το φασματόμετρο μαζών χρόνου πτήσης (6210 TOF-MSD, Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) διαθέτει ορθογώνιας διάταξης πηγή ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό με δυνατότητα ρύθμισης της λειτουργίας αυτής σε θετικό ή αρνητικό ιοντισμό. Ο αναλυτής χρόνου πτήσης ήταν ορθογώνιας επιτάχυνσης (oa-TOF) και επέτρεπε τη μέτρηση τιμών m/z σε εύρος 50-3200 amu με ακρίβεια τέταρτου δεκαδικού ψηφίου με την τεχνική της πλήρους σάρωσης (full scan). Ο ανιχνευτής του συστήματος ήταν αναλογοψηφιακός μετατροπέας (analogue to digital converter, ADC) που λειτουργούσε με συχνότητα 1 GHz. Για τον έλεγχο λειτουργίας του οργάνου χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Mass Hunter, ενώ για την επεξεργασία των ληφθέντων χρωματογραφικών και φασματομετρικών δεδομένων το λογισμικό Analyst.

4.1.1.3. Σύστημα LC/QTOF-MS

Το σύστημα υγροχρωματογραφίας στην περίπτωση αυτή ήταν αντίστοιχο με αυτό του προηγούμενου συστήματος (1200-SL LC-Series). Σύμφωνα με τις προδιαγραφές του κατασκευαστή, η αντλία του συστήματος λειτουργεί σε εύρος ταχύτητας ροής 0,05 - 5,00 mL min⁻¹. Η μέγιστη πίεση που μπορεί να αναπτυχθεί στο σύστημα είναι 600 bar (8700 psi). Ο αυτόματος δειγματολήπτης χωρητικότητας 106 φιαλιδίων όγκου 2 mL (vials), επιτρέπει την ένεση όγκου δείγματος σε εύρος 0,1 - 100,0 μL με βήμα 0,1 μL και επαναληψιμότητα (% RSD) μικρότερη από 0,25 % (για όγκο ένεσης 5-100 μL) και 1 % για όγκο ένεσης 1-5 μL. Για την αποφυγή εμφάνισης επιμόλυνσης εκ μεταφοράς δείγματος (carry over), το σύστημα επιτρέπει τη δυνατότητα συνεχούς έκπλυσης της βελόνας ένεσης εξωτερικά με κατάλληλο μίγμα διαλυτών, ενώ ταυτόχρονα πραγματοποιείται συνεχής έκπλυση της βελόνας εσωτερικά κατά τη διάρκεια της ανάλυσης από τη ροή της κινητής φάσης. Η θερμοκρασία του αυτόματου δειγματολήπτη μπορεί να ρυθμίζεται σε εύρος 4 - 55 °C και η μέγιστη πίεση που μπορεί να αναπτυχθεί σε αυτόν είναι 600 bar, ενώ η θερμοκρασία του θαλάμου τοποθέτησης της χρωματογραφικής στήλης ρυθμίζεται σε εύρος 20 - 100 °C.

Το παραπάνω σύστημα υγροχρωματογραφίας συνδέεται με σύστημα δίδυμης φασματομετρίας μαζών QTOF-MS, (6520 Accurate-Mass QTOF LC/MS, Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) με ορθογώνιας διάταξης πηγή ιοντισμού ESI, αντίστοιχη με

αυτή του συστήματος που περιγράφηκε παραπάνω. Το σύστημα διαθέτει τετραπολικό αναλυτή μαζών συζευγμένο με ορθογώνιας επιτάχυνσης αναλυτή χρόνου πτήσης, ενώ υψηλής καθαρότητας άζωτο χρησιμοποιήθηκε τόσο στην πηγή ιοντισμού ως αέριο εκνέφωσης (nebulizing gas) και αποδιαλύτωσης (drying gas), όσο και στο θάλαμο συγκρούσεων (collision cell) ως αέριο σύγκρουσης (collision gas). Ο ανιχνευτής του συστήματος, αντίστοιχης τεχνολογίας με αυτόν του συστήματος LC/TOF-MS (ADC) επιτρέπει τη δυνατότητα επιλογής λειτουργίας του συστήματος σε συχνότητα 4 GHz (πολύ υψηλή διαχωριστική ικανότητα, High Resolution mode), 2 GHz (υψηλό δυναμικό εύρος, Extended Dynamic Range mode) ή 1 GHz (Minimum Storage Size mode), ενώ για κάθε μια από τις προαναφερθέντες δυνατότητες λειτουργίας υπάρχει επιπλέον η δυνατότητα επιλογής σάρωσης σε χαμηλό (50 – 1700 *amu*) ή υψηλό (50 – 3200 *amu*) εύρος τιμών *m/z*. Σε ό,τι αφορά τους τρόπους λήψης φασμάτων με το σύστημα LC/QTOF-MS υπάρχουν τρεις δυνατότητες: η λήψη φασμάτων πλήρους σάρωσης, όπως ακριβώς και με το προηγούμενο σύστημα (MS mode), η λήψη φασμάτων σάρωσης θυγατρικών ιόντων προεπιλεγμένων μητρικών ιόντων για την ανάλυση γνωστών ουσιών (targeted MS/MS mode) και ο αυτοματοποιημένος τρόπος λήψης φασμάτων MS/MS στην περίπτωση μη γνωστών αναλυτών (auto MS/MS mode). Ο έλεγχος λειτουργίας του οργάνου, η επεξεργασία των ληφθέντων χρωματογραφημάτων και φασμάτων, η επεξεργασία και ανάλυση δεδομένων ποσοτικοποίησης και η αυτοματοποιημένη λήψη και εκτύπωση ποιοτικών και ποσοτικών αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση τριών επιμέρους λογισμικών Mass Hunter Workstation Software της εταιρείας Agilent Technologies: Mass Hunter Data Acquisition for TOF/QTOF (B.02.01), Mass Hunter Qualitative Analysis (B.03.01), Mass Hunter Quantitative Analysis (B.04.00).

4.1.2. Προετοιμασία λειτουργίας συστημάτων LC/TOF-MS και LC/QTOF-MS

Πριν από την ανάλυση των δειγμάτων με τα συστήματα LC/TOF-MS και LC/QTOF-MS, πραγματοποιείται η προετοιμασία των αναλυτικών οργάνων, η οποία περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

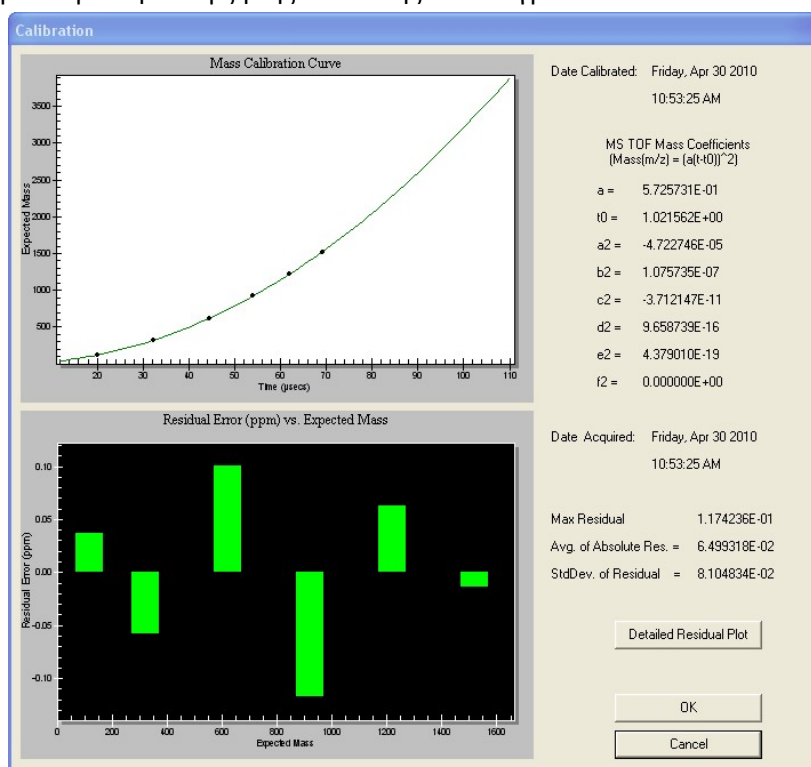
4.1.2.1. Προετοιμασία υγροχρωματογραφικού συστήματος

- Παρασκευή επαρκούς ποσότητας από το διαλύτη ή τους διαλύτες που αποτελούν την κινητή φάση του υγροχρωματογραφικού συστήματος και ενημέρωση του λογισμικού του οργάνου με τον ακριβή όγκο του διαλύτη σε καθέναν από τους τέσσερις περιέκτες.
- Ξέπλυμα της διαδρομής του δείγματος με διαλύτη υψηλής περιεκτικότητας σε οργανικό τροποποιητή, αντίστοιχο με αυτό που χρησιμοποιείται στην κινητή φάση π.χ. μίγμα ακετονιτριλίου/νερού 90/10 (v/v).
- Πλήρωση του περιέκτη έκπλυσης της σύριγγας του αυτόματου δειγματολήπτη με διαλύτη ακετονιτρίλιο/νερό 70/30 (v/v).
- Σταθεροποίηση της χρωματογραφικής στήλης με την κινητή φάση της μεθόδου ανάλυσης και καταγραφή της πίεσης του συστήματος και του αριθμού των αναλυόμενων δειγμάτων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Βασική Οργανολογία - Αντιδραστήρια

4.1.2.2. Προετοιμασία φασματομέτρου μαζών

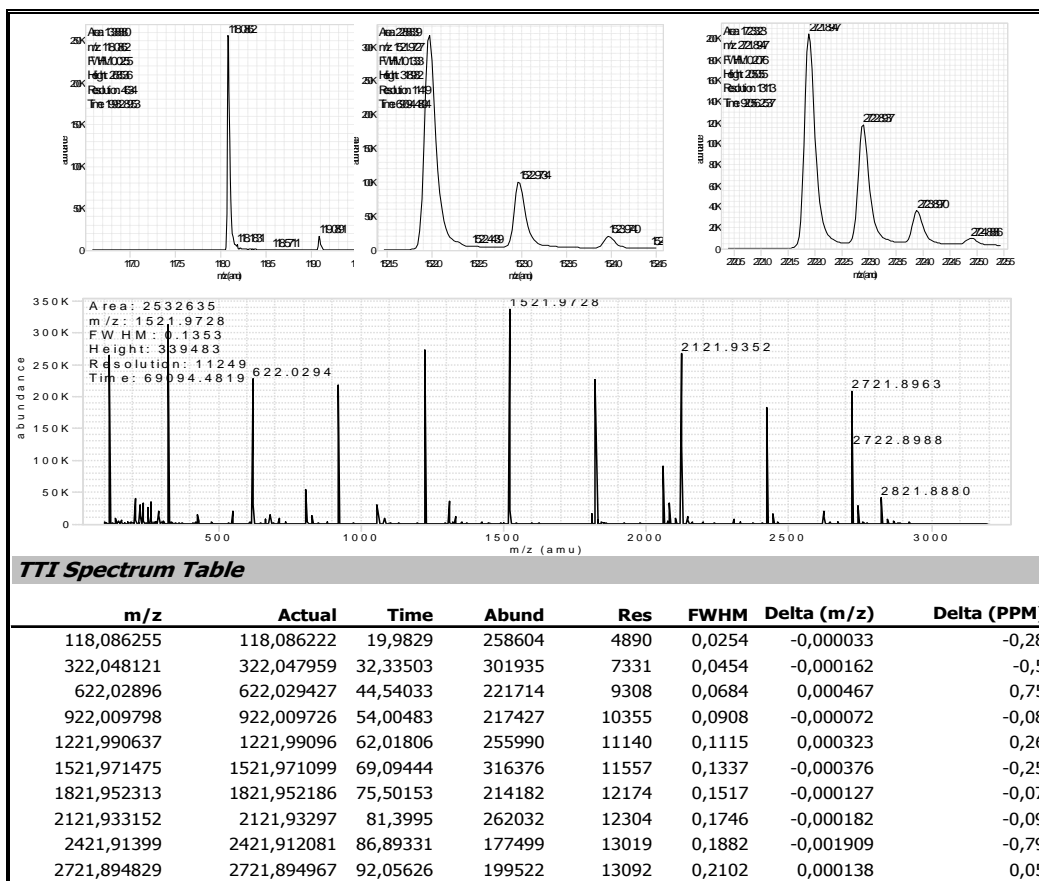
- Βαθμονόμηση (calibration) του συστήματος ως προς τις τιμές m/z (με ακρίβεια μέτρησης 4 δεκαδικών ψηφίων) με βάση τις τιμές m/z γνωστών προτύπων ουσιών, σύμφωνα με τις προδιαγραφές και τις υποδείξεις του κατασκευαστή του οργάνου (Agilent Technologies). Για το σκοπό αυτό εισάγεται με απευθείας έγχυση στην πηγή ιοντισμού του φασματομέτρου μαζών διάλυμα μίγματος 13 ουσιών (ESI-L low concentration tuning mix, 4.4.2.15) που στην περίπτωση θετικού ιοντισμού σχηματίζουν 10 πρωτονιωμένα ιόντα με τιμές m/z που κυμαίνονται από 118,0863 έως 2721,8950, ενώ σε λειτουργία αρνητικού ιοντισμού σχηματίζουν ιόντα (αποπρωτονιωμένα ιόντα και ιόντα προσθήκης τριφθοροξικού οξέος) σε εύρος τιμών m/z 112,9856 – 2833,8731. Η βαθμονόμηση του άξονα των τιμών m/z πραγματοποιείται αυτόματα από το λογισμικό του οργάνου με τη βοήθεια πολυωνυμικής εξίσωσης και υπολογίζονται οι ακριβείς τιμές m/z για τα ιόντα αναφοράς, καθώς και τα σφάλματα αυτών. Η διαδικασία βαθμονόμησης πραγματοποιείται κάθε φορά στις εκάστοτε συνθήκες λειτουργίας που επιλέγονται και για την επακόλουθη ανάλυση των δειγμάτων (instrument state 1, 2 ή 4 GHz και χαμηλό (μέχρι 1700 amu) ή υψηλό (μέχρι 3200 amu) εύρος σάρωσης τιμών m/z). Κριτήριο αποδοχής της διαδικασίας βαθμονόμησης είναι η εμφάνιση τυχαία κατανεμημένων θετικών και αρνητικών σφαλμάτων για τα 10 ιόντα, ενώ η απόλυτη τιμή του σφάλματος δε θα πρέπει σε καμία περίπτωση να υπερβαίνει τα 2 ppm (Σχήμα 4.1). Η διαδικασία βαθμονόμησης του άξονα m/z πραγματοποιείται καθημερινά πριν την έναρξη της ανάλυσης των δειγμάτων.



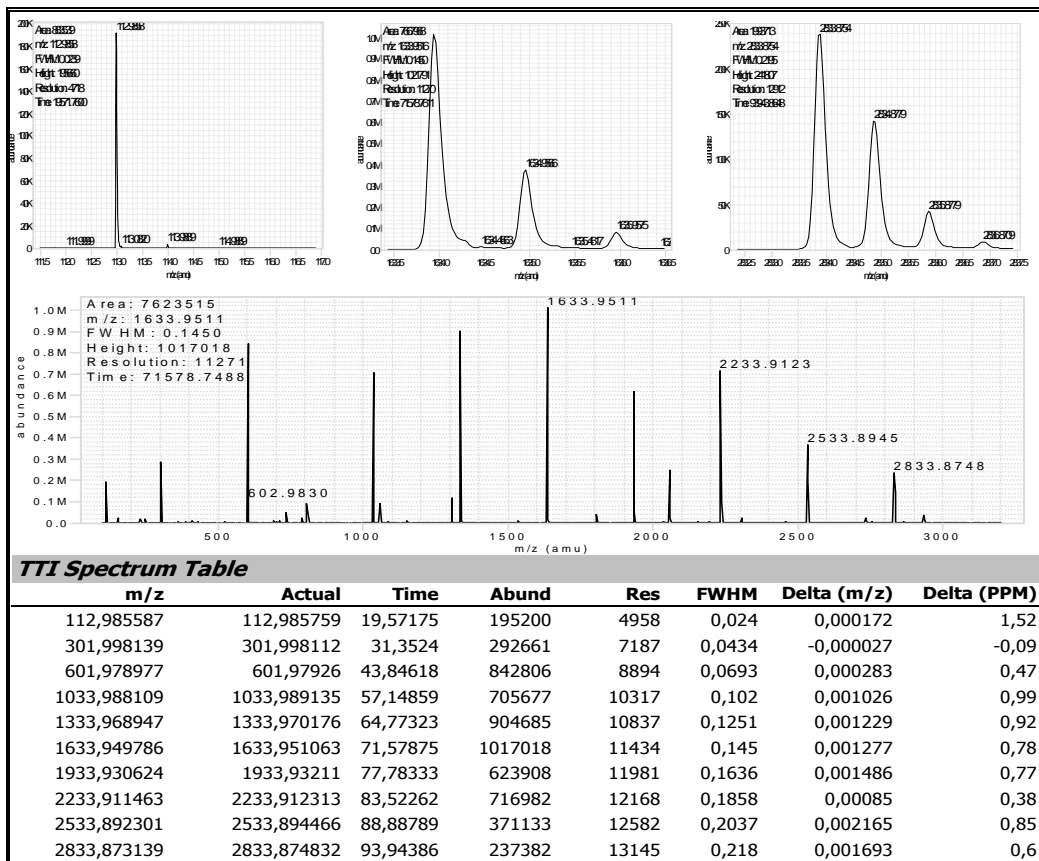
Σχήμα 4.1: Αποτελέσματα αυτοματοποιημένης διαδικασίας βαθμονόμησης του φασματομέτρου TOF-MS σε συνθήκες λειτουργίας 2 GHz και εύρος σάρωσης μέχρι 1700 m/z . Η διαδικασία έχει ολοκληρωθεί με επιτυχία καθώς παρατηρούνται για τα ιόντα αναφοράς τυχαία κατανεμημένες τιμές στα σφάλματα που δεν υπερβαίνουν τα 2 ppm σε σχέση με τις αντίστοιχες θεωρητικές τιμές m/z .

- Διαδικασία ρύθμισης/βελτιστοποίησης παραμέτρων (tuning): Με τον όρο tuning νοείται η αυτοματοποιημένη (μέσω του λογισμικού του συστήματος) διαδικασία, κατά την οποία οι παράμετροι του φασματομέτρου μαζών, τόσο του αναλυτή χρόνου πτήσης, όσο και του τετραπόλου (για το σύστημα QTOF), βελτιστοποιούνται και ρυθμίζονται στις κατάλληλες τιμές με στόχο να επιτευχθεί η μέγιστη δυνατή απόκριση διατηρώντας ταυτόχρονα αποδεκτή διαχωριστική ικανότητα (resolution) και το αντίστροφο. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται για την περίπτωση του αναλυτή TOF μία έως δύο φορές το μήνα και ανά εξάμηνο για το τετράπολο, αλλά και κατόπιν συντήρησης του συστήματος ή διορθωτικών επεμβάσεων σε αυτό, οπότε και ανάλογα με την περίπτωση διαφοροποιείται για τον αναλυτή TOF ο αριθμός των προς βελτιστοποίηση παραμέτρων, καθώς και το εύρος των εξεταζόμενων τιμών για κάθε παράμετρο (διαδικασίες quick tune, standard tune και initial tune). Πραγματοποιείται με την απευθείας εισαγωγή του διαλύματος του μίγματος αναφοράς (4.4.2.15) στο φασματόμετρο μαζών, όπως αναφέρθηκε παραπάνω κατά τη διαδικασία βαθμονόμησης. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να σημειωθεί ότι η διαδικασία tuning πραγματοποιείται σε συνθήκες λειτουργίας 2 GHz και εύρος σάρωσης m/z 50 – 3200 amu, ανεξάρτητα από τις συνθήκες που εφαρμόζονται στη συνέχεια κατά την ανάλυση των δειγμάτων. Κριτήρια αποδοχής της διαδικασίας είναι η εμφάνιση σφαλμάτων μάζας μικρότερων από 2 ppm σε όλα τα ιόντα αναφοράς, η λήψη ικανοποιητικής μορφής κορυφών για τα ιόντα με τιμές m/z 118,0862, 1521,9714 και 2721,8948 και των ισοτοπικών κορυφών αυτών (και αντίστοιχα των ιόντων με τιμές m/z 112,9856, 1633,9950 και 2833,8731, στην περίπτωση αρνητικού ιοντισμού), η επίτευξη ικανοποιητικού διαχωρισμού της κορυφής που αντιστοιχεί στο ιόν με τιμή m/z 2721,8948 (m/z 2833,8731 σε ESI(-)) από τις κορυφές των ισοτοπικών ιόντων και η επίτευξη διαχωριστικής ικανότητας (resolution) σε συνθήκες λειτουργίας 4 GHz του οργάνου μεγαλύτερης από 10000 και 18000 για τα ιόντα με τιμές m/z 118,0863 και 1521,9715, αντίστοιχα. Στα σχήματα 4.2 και 4.3 που ακολουθούν απεικονίζονται σχηματικά οι αναφορές (reports) με τα αποτελέσματα που λαμβάνονται μετά τις διαδικασίες tuning του αναλυτή TOF του συστήματος σε συνθήκες θετικού και αρνητικού ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό, αντίστοιχα. Με τη μορφή πίνακα στις αναφορές αυτές παρουσιάζονται για κάθε ένα από τα ιόντα αναφοράς οι θεωρητικές τιμές m/z (m/z), οι μετρούμενες τιμές m/z μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας tuning (actual), ο χρόνος πτήσης (time), η απόκριση (abundance), η διαχωριστική ικανότητα (res), η τιμή FWHM που αντιστοιχεί στο εύρος της φασματικής κορυφής στο ημιύψος αυτής (full width half maximum), η διαφορά ανάμεσα στη θεωρητική και μετρούμενη τιμή m/z (delta (m/z)) και το σφάλμα εκφρασμένο σε ppm (delta (ppm)).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Βασική Οργανολογία - Αντιδραστήρια



Σχήμα 4.2: Αποτελέσματα αυτοματοποιημένης διαδικασίας tuning σε συνθήκες ESI(+).



Σχήμα 4.3: Αποτελέσματα αυτοματοποιημένης διαδικασίας tuning σε συνθήκες ESI(-).

- Διόρθωση ακριβούς μέτρησης τιμών m/z με τη χρήση διαλύματος: Για την επίτευξη υψηλής ακρίβειας μετρήσεων τιμών m/z εκτός από τη βαθμονόμηση του συστήματος TOF που προηγείται την ανάλυση των δειγμάτων υπάρχει η δυνατότητα της συνεχούς διόρθωσης της καμπύλης βαθμονόμησης καθ' όλη τη διάρκεια της ανάλυσης (reference mass correction). Αυτό πραγματοποιείται με τη συνεχή εισαγωγή στο φασματόμετρο μαζών διαλύματος που περιέχει τις ουσίες αναφοράς πουρίνη και εξάκις-(1H,1H,3H-τετραφλουοροπροποξυ)-φωσφαζίνη και εππλέον την ουσία τριφθοροξικό αμμώνιο στην περίπτωση εφαρμογής αρνητικού ιοντισμού. Οι λεπτομέρειες παρασκευής του διαλύματος αυτού από το αντίστοιχο kit (4.4.2.16) αναφέρονται σε επόμενη παράγραφο. Προκειμένου να αποφευχθεί η πρόκληση φαινομένου καταστολής του σήματος των ιόντων των προς ανάλυση ουσιών από τις παραπάνω ουσίες αναφοράς, το προαναφερθέν διάλυμα εισάγεται στο φασματόμετρο μαζών και μετατρέπεται σε αερόλυμα σε διαφορετική βελόνα νεφελοποίησης από εκείνη που διέρχεται η εξερχόμενη από τη χρωματογραφική στήλη κινητή φάση. Η διοχέτευση του διαλύματος διόρθωσης γίνεται αυτόματα από το σύστημα παροχής CDS (calibrant delivery system) με μέση μέση ταχύτητα $45 \pm 10 \mu\text{L min}^{-1}$ και ενεργοποιείται από το χειριστή του οργάνου λίγα λεπτά πριν την έναρξη της ανάλυσης. Ελέγχεται η απόκριση των αντίστοιχων ιόντων να βρίσκεται μεταξύ των τιμών 40-200 K.

4.2. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΣΥΣΚΕΥΕΣ

- 4.2.1. Αυτόματος αναδευτήρας τύπου δύνης, *Vortex Genie, Scientific Industries*, για την ανάδευση δειγμάτων και διαλυμάτων.
- 4.2.2. Συσκευές οριζόντιας ανακίνησης, τύπου *Promax 1020 DT, Heidolph* και κάθετης ανακίνησης τύπου *Reax 2, Heidolph*, για την ανακίνηση των δειγμάτων κατά την υγρό-υγρό εκχύλιση.
- 4.2.3. Αναδευτήρας τύπου *Labinco heat control-hotplate magnetic stirrer* για την ανάδευση διαλυμάτων υπο θέρμανση.
- 4.2.4. Αυτόματες πιπέτες τύπου *Finnpipette-ThermoLabSystems* μεταβλητού όγκου 5-40 μL , 20-200 μL , 200-1000 μL και 1-5 mL και τύπου *Eppendorf* όγκου 20-100 μL , 100-1000 μL και 500-5000 μL .
- 4.2.5. Αυτόματη επαναληπτική πιπέτα τύπου *Finnpipette-ThermoLabSystems* μεταβλητού όγκου 10-5000 μL .
- 4.2.6. Διακριβωμένος αναλυτικός ζυγός τύπου *AND GR200*, τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων με μέγιστο όριο ζύγισης 60 g, για τη ζύγιση προτύπων ουσιών αναφοράς και αντιδραστηρίων.
- 4.2.7. Φαρμακευτικός ζυγός τύπου *CASBE MW1200*, ενός δεκαδικού ψηφίου, για την ισοβάρυνση των υάλινων δοκιμαστικών σωλήνων που περιέχουν τα δείγματα πριν τη φυγοκέντρησή τους.
- 4.2.8. Διανεμητής υγρών (dispenser) μέγιστου όγκου 10 mL για την προσθήκη του διαλύτη στα δείγματα κατά τη διαδικασία της υγρό-υγρό εκχύλισης.
- 4.2.9. Κλίβανος, τύπου *Shimaden SR30*, με εύρος λειτουργίας 0-400 °C, για την ενζυμική υδρόλυση των δειγμάτων ούρων.
- 4.2.10. Φυγοκέντρος ψηλών υάλινων σωλήνων, τύπου *Z510 BHG, Hermle*, 30 θέσεων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Βασική Οργανολογία - Αντιδραστήρια

- 4.2.11. Φυγόκεντρος κωνικών σωλήνων, τύπου *Econospin Sorvall Instruments DuPont*.
- 4.2.12. Υπερφυγόκεντρος τύπου *Hettich Micro 20*, με κεφαλή προσαρμοζόμενη για τη φυγοκέντρωση περιεκτών erpendorf χωρητικότητας 1,5 mL και μέγιστη ταχύτητα φυγοκέντρωσης 14000 rpm.
- 4.2.13. Συσκευή εξάτμισης, αποτελούμενη από μεταλλόλουτρο και το διανεμητή αερίου αζώτου. Το μεταλλόλουτρο είναι τύπου *Techne driblock DB3*, με θερμαντική πλάκα που φέρει οπές κατάλληλες για την υποδοχή των σωλήνων και χρησιμοποιείται τόσο για την εξάτμιση του οργανικού διαλύτη μετά τη διαδικασία της υγρό – υγρό εκχύλισης, όσο και για τη διεξαγωγή αντιδράσεων παραγωγοποίησης. Ο διανεμητής αερίου αζώτου ποικίλει και μπορεί να φέρει έως και 27 θέσεις και δυνατότητα χρήσης όλων ή μερικών θέσεων, ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων.
- 4.2.14. Συσκευή παραγωγής νερού υψηλής καθαρότητας (HPLC grade) τύπου *Milli-Q Academic (MS2), Millipore*.
- 4.2.15. Εργαλεία σφράγισης και αποσφράγισης φιαλιδίων αυτόματου εισαγωγέα.

4.3. ΥΛΙΚΑ

- 4.3.1. Ογκομετρικοί κύλινδροι χωρητικότητας 10, 25, 50, 100, 250, 500 και 1000 mL.
- 4.3.2. Υάλινοι βιδωτοί σωλήνες, χωρητικότητας 15 mL.
- 4.3.3. Πλαστικοί σωλήνες μιας χρήσης, χωρητικότητας 5 mL (σωλήνες RIA).
- 4.3.4. Υάλινοι σωλήνες κωνικής βάσης με βιδωτό ή εσφυρισμένο πώμα, χωρητικότητας 10 mL.
- 4.3.5. Υάλινες πιπέτες Pasteur.
- 4.3.6. Πεχαμετρικό χαρτί εύρους pH 4-7 και 7,5-14.
- 4.3.7. Πλαστικά ρύγχη αυτόματων πιπετών και επαναληπτικής πιπέτας.
- 4.3.8. Εργαστηριακές μεταλλικές σπάτουλες τύπου *Roth*.
- 4.3.9. Εργαστηριακά κουτάλια.
- 4.3.10. Πλαστικά σκαφίδια ζύγισης.
- 4.3.11. Υάλινες φιάλες διαλυτών και αντιδραστηρίων με βιδωτό πώμα, χωρητικότητας 100, 250, 500 και 1000 mL.
- 4.3.12. Υάλινα, διαφανή φιαλίδια αυτόματου εισαγωγέα (vials) Crimp Neck ND-11, χωρητικότητας 1,5 mL (32 × 11,6 mm).
- 4.3.13. Υάλινα μικρο-ενθέματα (micro-inserts) χωρητικότητας 0,3 mL διαφανή με κωνικό πυθμένα, 12 mm.
- 4.3.14. Πώματα Aluminum cap clear lacquered-11 mm Septum natural rubber/TEF, πάχους 1,0 mm.
- 4.3.15. Βαθμονομημένες ογκομετρικές φιάλες παρασκευής και φύλαξης διαλυμάτων, χωρητικότητας 2, 5, 10, 25, 100 και 250 mL.
- 4.3.16. Πλαστικές σύριγγες μιας χρήσεως, χωρητικότητας 1 mL.
- 4.3.17. Φίλτρα διήθησης δειγμάτων τύπου Syringe Driven Filter, Millipore με διάμετρο πόρων 0,45 μm.
- 4.3.18. Φιαλίδια Erpendorf χωρητικότητας 1,5 mL.

4.4. ΔΙΑΛΥΤΕΣ – ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ – ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

4.4.1. Διαλύτες

- 4.4.1.1. Μεθανόλη (CH_3OH), αναλυτικού βαθμού καθαρότητας 99,8 % (Merck, Darmstadt, Germany).
- 4.4.1.2. Ακετονιτρίλιο (CH_3CN , ACN), αναλυτικού βαθμού καθαρότητας 99,9 % (Labscan, Dublin, Ireland).
- 4.4.1.3. Νερό (H_2O), δισαπεσταγμένο και περαιτέρω καθαρισμένο με συσκευή Millipore, βαθμού καθαρότητας HPLC.
- 4.4.1.4. Διαιθυλαιθέρας ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$), αναλυτικού βαθμού καθαρότητας 99,5 % (Labscan).
- 4.4.1.5. Ακετονιτρίλιο (CH_3CN , ACN), βαθμού καθαρότητας LC/MS (Riedel-de Haen, Seelze, Germany).
- 4.4.1.6. Νερό (H_2O), βαθμού καθαρότητας LC/MS (Riedel-de Haen).
- 4.4.1.7. Ισοπροπανόλη ($\text{C}_3\text{H}_7\text{OH}$), βαθμού καθαρότητας HPLC 99,98% (Labscan).
- 4.4.1.8. Οξικός αιθυλεστέρας ($\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$), βαθμού καθαρότητας 99,8% (Labscan).

4.4.2. Αντιδραστήρια

- 4.4.2.1. Ένζυμο β-γλυκουρονιδάση από *Escherichia coli* (Sigma - Aldrich, Steinheim, Germany).
- 4.4.2.2. Ένζυμο β-γλυκουρονιδάση από *Helix pomatia* (115600 units mL^{-1} , διαθέτει επιπλέον και δραστηριότητα σουλφατάσης) (Sigma-Aldrich).
- 4.4.2.3. Όξινο φωσφορικό κάλιο (K_2HPO_4), καθαρότητας 98,0 % (Panreac, Barcelona, Spain).
- 4.4.2.4. Δισόξινο φωσφορικό κάλιο (KH_2PO_4) καθαρότητας 99,0% (Panreac).
- 4.4.2.5. Φωσφορικό οξύ (H_3PO_4), 85% (v/v) (Mallinckrodt, St. Louis, MO).
- 4.4.2.6. Ανθρακικό νάτριο (Na_2CO_3), καθαρότητας 99,8% (Panreac).
- 4.4.2.7. Όξινο ανθρακικό νάτριο (NaHCO_3), καθαρότητας 99,7 % (Panreac).
- 4.4.2.8. Άνυδρο θειικό νάτριο (Na_2SO_4), καθαρότητας 99,0% (Panreac).
- 4.4.2.9. Μυρμηκικό αμμώνιο (HCOONH_4), καθαρότητας 97,0 % (Sigma - Aldrich).
- 4.4.2.10. Οξικό αμμώνιο ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$), καθαρότητας 98,0 % (Sigma - Aldrich).
- 4.4.2.11. Μυρμηκικό οξύ (HCOOH), καθαρότητας 98,0 % (Riedel-de Haën).
- 4.4.2.12. Παγόμορφο οξικό οξύ (CH_3COOH), καθαρότητας 99,8 % (Merck).
- 4.4.2.13. Άνυδρο οξικό νάτριο (CH_3COONa), καθαρότητας 99,0 % (Panreac).
- 4.4.2.14. Σφαιρίδια (pellets) υδροξείδιο του νατρίου (NaOH), καθαρότητας 97,0 %, (Mallinckrodt).
- 4.4.2.15. Διάλυμα βαθμονόμησης και tuning φασματομέτρου TOF-MS (ESI-L Low Concentration Tuning Mix, P/N G1969-85000, Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA). Πρόκειται για μίγμα αποτελούμενο από 13 ουσίες (βηταΐνη, αμμωνιακό άλας τριφθοροξικού οξέος, εξαμεθοξυ-φωσφαζίνη και πολυφθοριωμένα παραγωγα φωσφαζίνης και τριαζίνης) διαλυμένες σε μίγμα ακετονιτρίλιου/νερού 95/5 (v/v). Χρησιμοποιείται ως έχει στις διαδικασίες βαθμονόμησης και tuning του φασματομέτρου TOF-MS, όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη παράγραφο ([4.1.2.2](#)).

- 4.4.2.16. Kit παρασκευής διαλύματος διόρθωσης βαθμονόμησης φασματομέτρου TOF (API-TOF Reference Mass Solution Kit, P/N G1969-85001, Agilent Technologies). Το kit αποτελείται από δύο αμπούλες (2,2 mL) διαλύματος αμμωνιακού άλατος του τριφθοροξικού οξέος ($\text{CF}_3\text{COONH}_4$, TFANH_4) 100 mM σε μίγμα ACN/ H_2O 90/10 (v/v), δύο αμπούλες (2,2 mL) διαλύματος πουρίνης 5 mM σε μίγμα ACN/ H_2O 90/10 (v/v) και 2 αμπούλες (2,2 mL) διαλύματος της ουσίας εξάκις-(1H,1H,3H-τετραφλουοροπροποξυ)-φωσφαζίνης (HP-0921) 2,5 mM σε ακετονιρίλιο. Το kit χρησιμοποιείται για την παρασκευή του διαλύματος αναφοράς που χρησιμοποιείται για τη διόρθωση της βαθμονόμησης του φασματομέτρου TOF-MS κατά τη διάρκεια των αναλύσεων.
- 4.4.2.17. Στερεό ρυθμιστικό μίγμα ανθρακικών NaHCO_3 : Na_2CO_3 10:1 (w/w) pH 9,5
Παρασκευάζεται με ανάμιξη 200 g όξινου ανθρακικού νατρίου (4.4.2.7) και 20 g ανθρακικού νατρίου (4.4.2.6) σε υάλινη φιάλη και φυλάσσεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Χρησιμοποιείται στη διαδικασία υγρό-υγρό εκχύλισης που περιγράφεται στο [κεφάλαιο 5](#).
- 4.4.2.18. Διάλυμα οξικού οξέος, CH_3COOH , 3M
Για την παρασκευή του αναμιγνύονται 17 mL παγόμορφου οξικού οξέος (4.4.2.12) (μετρημένα με κύλινδρο 25 mL) και 83 mL οξικού αιθυλεστέρα (4.4.1.8) (μετρημένα με κύλινδρο 100 mL) σε υάλινη φιάλη 100 mL. Φυλάσσεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και χρησιμοποιείται στην παρασκευαστική πορεία κατεργασίας των δειγμάτων του [κεφαλαίου 5](#).
- 4.4.2.19. Διάλυμα ενζύμου β-γλυκουρονιδάσης από *E. Coli*
Ανάλογα με τον αριθμό των αναλυόμενων δειγμάτων, ζυγίζεται ποσότητα ενζύμου που να αντιστοιχεί σε 4448,8 μονάδες δραστηριότητας (units) ανά δείγμα. Μετά τη ζύγιση της κατάλληλης ποσότητας στερεού ενζύμου (4.4.2.1) σε σωλήνες RIA, ακολουθεί διάλυση με τον κατάλληλο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH 7,0 (4.4.3.1) (υπολογίζεται όγκος 100 μL επί τον αριθμό των δειγμάτων για τα οποία έχει ζυγισθεί η συγκεκριμένη ποσότητα ενζύμου). Π.χ. για 30 δείγματα, ζυγίζονται 80,4 mg στερεού ενζύμου και διαλύονται με 3 mL ρυθμιστικού διαλύματος. Η μέγιστη διάρκεια χρήσης του διαλύματος είναι 10 ημέρες από τη στιγμή της διάλυσής του. Χρησιμοποιείται στην ενζυμική υδρόλυση των δειγμάτων ούρων αθλητών ([κεφάλαιο 5](#)).
- 4.4.2.20. Υδατικό διάλυμα μυρμηκικού αμμωνίου, HCOONH_4 , 5 mM και μυρμηκικού οξέος, HCOOH , 0,01 % (v/v)
Ζυγίζονται 0,315 g μυρμηκικού αμμωνίου (HCOONH_4 , 4.4.2.9) και μεταφέρονται σε υάλινη φιάλη 1 L με βιδωτό πώμα. Ακολουθεί διάλυση με 1000 mL νερού LC/MS (4.4.1.6) (μετρημένα με ογκομετρικό κύλινδρο 1000 mL) και προσθήκη 100 μL μυρμηκικού οξέος (HCOOH , 4.4.2.11). Η φιάλη πωματίζεται και το διάλυμα αναδεύεται καλά. Χρησιμοποιείται ως διαλύτης κινητής φάσης (διαλύτης Α κινητής φάσης LC/TOF-MS [κεφάλαιο 5](#) και [6](#)) και για την παρασκευή του διαλύτη ανασύστασης των δειγμάτων ούρων αθλητών (4.4.2.22)

- 4.4.2.21. Διάλυμα μυρμηκικού αμμωνίου, HCOONH_4 , 5 mM και μυρμηκικού οξέος, HCOOH , 0,01 % (v/v) σε μίγμα ακετονιτριλίου/νερού 90/10 (v/v)
Ζυγίζονται 0,315 g μυρμηκικού αμμωνίου (HCOONH_4 , 4.4.2.9), μεταφέρονται σε υάλινη φιάλη 1 L με βιδωτό πώμα και διαλύονται προσεκτικά με 100 mL νερού LC/MS (4.4.1.6) (μετρημένα με ογκομετρικό κύλινδρο 100 mL). Ακολουθεί προσθήκη 100 mL μυρμηκικού οξέος (HCOOH , 4.4.2.11) και 900 mL ακετονιτριλίου LC/MS (4.4.1.5) (μετρημένα με κύλινδρο 1000 mL), πωματισμός της φιάλης και καλή ανάδευση του μίγματος. Χρησιμοποιείται ως διαλύτης κινητής φάσης (διαλύτης Β κινητής φάσης LC/TOF-MS κεφάλαιο [5](#) και [6](#)) και για την παρασκευή του διαλύτη ανασύστασης των δειγμάτων ούρων αθλητών (4.4.2.22).
- 4.4.2.22. Διαλύτης ανασύστασης δειγμάτων ούρων αθλητών για την ανίχνευση απαγορευμένων ουσιών με LC/TOF-MS
Λαμβάνονται 80 mL από το διαλύτη Α της κινητής φάσης της μεθόδου (4.4.2.20) με ογκομετρικό κύλινδρο 100 mL και 20 mL από το διαλύτη Β της κινητής φάσης (4.4.2.21) με ογκομετρικό κύλινδρο 25 mL και μεταφέρονται σε υάλινη φιάλη. Ακολουθεί ανάδευση. ([κεφάλαιο 5](#))
- 4.4.2.23. Διάλυμα οξικού οξέος, CH_3COOH 0,1 % (v/v) σε νερό HPLC
Σε υάλινη φιάλη όγκου 1 L μεταφέρονται 1000 mL νερού καθαρότητας HPLC (4.4.1.3) (μετρημένα με ογκομετρικό κύλινδρο 1000 mL) και ακολούθως προστίθενται 1000 mL οξικού οξέος (CH_3COOH , 4.4.2.12). Ακολουθεί ανάδευση του μίγματος και ενημέρωση του λογισμικού του οργάνου LC/Ion Trap-MS με τη νέα ποσότητα διαλύτη (διαλύτης Α κινητής φάσης μεθόδου ποσοτικοποίησης της κορτιζόλης σε ούρα αλόγων με LC/IT-MS, κεφάλαιο [6](#)).
- 4.4.2.24. Διάλυμα οξικού οξέος, CH_3COOH 0,1 % (v/v) σε ακετονιτρίλιο
Σε υάλινη φιάλη όγκου 1 L μεταφέρονται 1000 mL ακετονιτριλίου HPLC (4.4.1.2) (μετρημένα με ογκομετρικό κύλινδρο 1000 mL) και ακολούθως προστίθενται 1000 mL οξικού οξέος (CH_3COOH , 4.4.2.12). Ακολουθεί ανάδευση του μίγματος και ενημέρωση του λογισμικού του οργάνου LC/IT-MS με τη νέα ποσότητα διαλύτη (διαλύτης Β κινητής φάσης μεθόδων ποσοτικοποίησης της κορτιζόλης και της θεοβρωμίνης σε ούρα αλόγων με LC/IT-MS, κεφάλαια [6](#) και [7](#))
- 4.4.2.25. Διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου, NaOH , 1 M
Παρασκευάζεται με διάλυση 10 g στερεού υδροξειδίου του νατρίου (pellets NaOH , 4.4.2.14) σε 250 mL απεσταγμένου νερού (μετρημένα με ογκομετρικό κύλινδρο 250 mL). Το διάλυμα φυλάσσεται σε πλαστική φιάλη σε θερμοκρασία δωματίου. Χρησιμοποιείται για την παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων παρακαταθήκης της θεοβρωμίνης και του εσωτερικού προτύπου ([κεφάλαιο 7](#))
- 4.4.2.26. Διάλυμα οξικού οξέος, CH_3COOH , 0,1 % (v/v)
Για την παρασκευή του 500 mL οξικού οξέος (CH_3COOH , 4.4.2.12) προστίθενται και αναμειγνύονται με 500 mL απεσταγμένου νερού σε υάλινη φιάλη. Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και χρησιμοποιείται ως διαλύτης αραιώσης των δειγμάτων ούρων αλόγου κατά την ποσοτικοποίηση της θεοβρωμίνης ([κεφάλαιο 7](#)).

- 4.4.2.27. Διάλυμα οξικού οξέος, CH₃COOH 0,1 % (v/v) σε μίγμα νερό/ακετονιτρίλιο 97/3 (v/v)
Σε υάλινη φιάλη όγκου 1 L μεταφέρονται 970 mL νερού HPLC (4.4.1.3) (μετρημένα με ογκομετρικό κύλινδρο 1000 mL) και 30 mL ακετονιτρίλιου HPLC (4.4.1.2) (μετρημένα με ογκομετρικό κύλινδρο 50 mL) και ακολούθως προστίθενται 1000 μL οξικού οξέος (CH₃COOH, 4.4.2.12). Ακολουθεί ανάδευση του μίγματος και ενημέρωση του λογισμικού του οργάνου LC/IT-MS με τη νέα ποσότητα διαλύτη (διαλύτης A κινητής φάσης μεθόδου ποσοτικοποίησης της θεοβρωμίνης σε ούρα αλόγων με LC/IT-MS, κεφάλαιο 7).
- 4.4.2.28. Υδατικό διάλυμα οξικού οξέος, CH₃COOH, 0,5 % (v/v)
Για την παρασκευή του 500 μL οξικού οξέος (4.4.2.12) προστίθενται και αναμειγνύονται με 100 mL νερού σε υάλινη φιάλη. Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και χρησιμοποιείται για την παρασκευή διαλύματος εργασίας της 3-PX (κεφάλαιο 7).
- 4.4.2.29. Διάλυμα οξικού οξέος, CH₃COOH 0,1 % (v/v) σε μίγμα νερό/ακετονιτρίλιο 40/60 (v/v)
Σε υάλινη φιάλη όγκου 1 L μεταφέρονται 400 mL νερού LC/MS (4.4.1.6) (μετρημένα με ογκομετρικό κύλινδρο 1000 mL) και 600 mL ακετονιτρίλιου LC/MS (4.4.1.5) (μετρημένα με ογκομετρικό κύλινδρο 1000 mL) και ακολούθως προστίθενται 1000 μL οξικού οξέος (4.4.2.12). Χρησιμοποιείται ως κινητή φάση και ως διαλύτης αραίωσης των δειγμάτων στη μέθοδο ποσοτικοποίησης του σαλικυλικού οξέος σε ούρα αλόγων με LC/QTOF-MS, (κεφάλαιο 8).
- 4.4.2.30. Διάλυμα μυρμηκικού αμμωνίου, HCOONH₄, 5 mM και μυρμηκικού οξέος, HCOOH, 0,05 % (v/v) σε μίγμα ακετονιτρίλιου/νερού 80/20 (v/v)
Ζυγίζονται 0,315 g μυρμηκικού αμμωνίου (4.4.2.9), μεταφέρονται σε υάλινη φιάλη 1 L με βιδωτό πώμα και διαλύονται προσεκτικά με 200 mL νερού LC/MS (4.4.1.6) (μετρημένα με κύλινδρο 250 mL). Ακολουθεί προσθήκη 500 μL μυρμηκικού οξέος (4.4.2.11) και 800 mL ακετονιτρίλιου LC/MS (4.4.1.5) (μετρημένα με ογκομετρικό κύλινδρο 1000 mL), πωματισμός της φιάλης και καλή ανάδευση του μίγματος. Χρησιμοποιείται ως διαλύτης κινητής φάσης στη μέθοδο ποσοτικοποίησης της 3-μεθοξυτυραμίνης (κεφάλαιο 9).
- 4.4.2.31. Διάλυμα διόρθωσης μαζών αναφοράς σε λειτουργία θετικού ιοντισμού
Παρασκευάζεται από το API-TOF Reference mass solution kit (4.4.2.16) ως εξής: Σε φιάλη πολυπροπυλενίου με βιδωτό πώμα, μεταφέρεται το περιεχόμενο (2,2 mL) μιας αμπούλας της ουσίας HP-0921 και 2 αμπούλων πουρίνης και ακολούθως αραιώνονται με προσθήκη 900 mL ακετονιτρίλιου LC/MS (4.4.1.5) και 100 mL νερού LC/MS (4.4.1.6). Ακολουθεί καλή ανάμιξη και φύλαξη σε θερμοκρασία δωματίου. Ποσότητα από το παραπάνω διάλυμα μεταφέρεται στον κατάλληλο υάλινο περιέκτη του συστήματος διοχέτευσης των διαλυμάτων βαθμονόμησης του οργάνου και αραιώνεται με την κατάλληλη ποσότητα ακετονιτρίλιου LC/MS (4.4.1.5), έτσι ώστε η ένταση των ιόντων αναφοράς με τιμές *m/z* 121,0509 και 922,0098 να μην υπερβαίνει κατά τη διάρκεια της ανάλυσης τα 200 K. Η ένταση των ιόντων αναφοράς

διαφοροποιείται σημαντικά ανάλογα με την ταχύτητα ροής της κινητής φάσης και τη σύσταση αυτής, τη χρησιμοποίηση ή όχι όξινων τροποποιητών, την εφαρμογή ισοκρατικής ή βαθμιδωτής έκλουσης και τις συνθήκες λειτουργίας του φασματομέτρου μαζών (κυρίως τις τιμές των δυναμικών του οκταπόλου και του fragmentor). Για το λόγο αυτό, ο συντελεστής αραιώσης του διαλύματος μαζών αναφοράς προσαρμόζεται κάθε φορά ανάλογα με τις συνθήκες τις εκάστοτε αναλυτικής μεθόδου.

4.4.2.32. Διάλυμα διόρθωσης μαζών αναφοράς σε λειτουργία αρνητικού ιοντισμού

Παρασκευάζεται από το API-TOF Reference mass solution kit (4.4.2.16) ως εξής: Σε φιάλη πολυπροπυλενίου με βιδωτό πώμα, μεταφέρεται το περιεχόμενο (2,2 mL) μιας αμπούλας τριφθοροξικού αμμωνίου, μιας αμπούλας της ουσίας HP-0921 και 2 αμπουλών πουρίνης και ακολούθως αραιώνονται με προσθήκη 900 mL ακετονιτριλίου LC/MS (4.4.1.5) και 100 mL νερού LC/MS (4.4.1.6). Ακολουθεί καλή ανάμιξη και φύλαξη σε θερμοκρασία δωματίου. Ποσότητα από το παραπάνω διάλυμα μεταφέρεται στον κατάλληλο υάλινο περιέκτη του συστήματος διοχέτευσης των διαλυμάτων βαθμονόμησης του οργάνου και αραιώνεται με την κατάλληλη ποσότητας ακετονιτριλίου LC/MS (4.4.1.5), έτσι που η ένταση των παρατηρούμενων ιόντων αναφοράς να κυμαίνεται κατά τη διάρκεια της ανάλυσης εντός του εύρους 40-200 K. Στην περίπτωση του αρνητικού ιοντισμού το είδος των παρατηρούμενων ιόντων εξαρτάται σημαντικά από τη σύσταση της κινητής φάσης, κυρίως ως προς το είδος και την αναλογία του όξινου τροποποιητή.

4.4.3. Ρυθμιστικά Διαλύματα

- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7,0
Ζυγίζονται 32,4 g όξινου φωσφορικού καλίου (K_2HPO_4 , 4.4.2.3) και 13,5 g δισόξινου φωσφορικού καλίου (KH_2PO_4 , 4.4.2.4) και διαλύονται σε 250 mL απεσταγμένου νερού σε υάλινη φιάλη των 250 mL. Ακολουθεί ήπια θέρμανση του διαλύματος υπό μαγνητική ανάδευση, επαναφορά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και ρύθμιση του pH στην τιμή 7,0 (εφόσον χρειάζεται), που γίνεται προσθήκη σταγόνων πυκνού φωσφορικού οξέος 85 % (4.4.2.5). Φυλάσσεται στο ψυγείο και χρησιμοποιείται κατά την προκατεργασία δειγμάτων ούρων αθλητών στο στάδιο της ενζυμικής υδρόλυσης ([κεφάλαιο 5](#)).
- Ρυθμιστικό διάλυμα οξικών 1M pH 5,2
Παρασκευάζεται ως εξής: 57 mL παγόμορφου οξικού οξέος (CH_3COOH , 4.4.2.12) αραιώνονται με 1000 mL απεσταγμένου νερού σε υάλινη φιάλη με βιδωτό πώμα και το διάλυμα που προκύπτει μετά από ανάδευση (διάλυμα Α) φυλάσσεται στο ψυγείο. Ζυγίζονται 82,1 g άνυδρου οξικού νατρίου (CH_3COONa , 4.4.2.13) και διαλύονται σε 1000 mL απεσταγμένου νερού σε υάλινη φιάλη των 1000 mL με βιδωτό πώμα και το διάλυμα που προκύπτει (διάλυμα Β) φυλάσσεται στο ψυγείο. Για την παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος οξικών αναμινύονται 232 mL διαλύματος Α με 768 mL

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Βασική Οργανολογία - Αντιδραστήρια

διαλύματος Β σε υάλινη φιάλη των 1000 mL. Ελέγχεται το pH του διαλύματος. Στην περίπτωση που η τιμή του pH υπερβαίνει το 5,3 προστίθεται διάλυμα Α μέχρι το pH να γίνει 5,2, ενώ εάν η τιμή αυτού είναι μικρότερη από 5,1 προτίθεται διάλυμα Β. Το ρυθμιστικό διάλυμα που προκύπτει φυλάσσεται στο ψυγείο και χρησιμοποιείται στο στάδιο της ενζυμικής υδρόλυσης ούρων αλόγων κατά την ποσοτικοποίηση της 3-μεθοξυτυραμίνης ([κεφάλαιο 9](#)).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΑΡΩΣΗΣ LC/TOF-MS ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΠΑΓΟΡΕΥΜΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΕ ΟΥΡΑ ΑΘΛΗΤΩΝ

5.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ – ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η Λίστα Απαγορευμένων Ουσιών, που ανανεώνεται και ανακοινώνεται σε ετήσια βάση από το WADA, περιλαμβάνει ένα μεγάλο αριθμό ουσιών, τόσο σχετικά χαμηλού μοριακού βάρους (<600, π.χ. στεροειδή, αζωτούχες ενώσεις κλπ), όσο και μεγαλομορίων (πρωτεϊνικής ή πολυσακχαριδικής φύσεως π.χ. αυξητική ορμόνη, παράγωγα αμύλου κλπ).¹⁹ Η φασματομετρία μαζών συνδυασμένη είτε με αεριοχρωματογραφία (GC/MS), είτε με υγροχρωματογραφία (LC/MS) αποτελεί την κύρια τεχνική ανάλυσης που χρησιμοποιούν τα εργαστήρια ελέγχου ντόπινγκ στο πρώτο στάδιο του ελέγχου των δειγμάτων ούρων για την πιθανή ύπαρξη κάποιας απαγορευμένης ουσίας, δηλαδή τις αναλύσεις σάρωσης (screening analysis).^{5,7} Στις αναλύσεις αυτές τα ούρα αποτελούν το κατεξοχήν χρησιμοποιούμενο βιολογικό υλικό, όπου ελέγχεται η ύπαρξη απαγορευμένων ουσιών ή/και προϊόντων του μεταβολισμού αυτών. Τα διαπιστευμένα εργαστήρια για να επιτύχουν την ανίχνευση των εκατοντάδων διαφορετικών μορίων χαμηλού μοριακού βάρους που ποικίλουν ως προς τα δομικά χαρακτηριστικά και τις φυσικοχημικές ιδιότητες, χρησιμοποιούν περισσότερα του ενός αναλυτικά πρωτόκολλα σάρωσης, τα οποία διαφέρουν τόσο στον τρόπο κατεργασίας των δειγμάτων (π.χ. το είδος, το pH, ή/και το διαλύτη της εκχυλιστικής διαδικασίας, το είδος παραγωγοποίησης), όσο και στην αναλυτική τεχνική (GC, GC/MS ή LC/MS) ή/και τον τύπο του αναλυτικού οργάνου (π.χ. GC/HRMS, GC/TOF-MS, LC/MSMS, LC/TOF-MS).^{6,25,26} Νέες απαγορευμένες ουσίες προστίθενται κάθε χρόνο στη Λίστα, υποχρεώνοντας τα εργαστήρια να διαθέτουν αναλυτικές διαδικασίες που επιτρέπουν την εύκολη ενσωμάτωση νέων αναλυτών στο πεδίο των ελεγχόμενων ουσιών και να ικανοποιούν τα κριτήρια του WADA για ανίχνευση στο Ελάχιστο Απαιτούμενο Όριο Απόδοσης (MRPL). Στο Εργαστήριο του ΟΑΚΑ, όπως ήδη έχει αναφερθεί σε προηγούμενο κεφάλαιο, στο στάδιο των προσανατολιστικών διαδικασιών σάρωσης για την ανίχνευση μικρομοριακών ουσιών στα ούρα αθλητών, εφαρμόζονταν έξι διαφορετικές αναλυτικές διαδικασίες που περιελάμβαναν τέσσερα ξεχωριστά πρωτόκολλα κατεργασίας των δειγμάτων ούρων.

Σύμφωνα με τα στατιστικά δεδομένα του WADA, ο αριθμός των δειγμάτων που ελέγχονται από τα 38 ανά τον κόσμο διαπιστευμένα εργαστήρια παρουσιάζει σημαντική αύξηση τα τελευταία χρόνια, φτάνοντας περίπου τα 200.000 δείγματα ετησίως.¹⁰¹ Λαμβάνοντας υπόψη το συνεχώς αυξανόμενο αριθμό απαγορευμένων ουσιών και αναλυόμενων δειγμάτων, αλλά και τις υψηλές απαιτήσεις στο χρόνο έκδοσης των αποτελεσμάτων, το συχνά περιορισμένο διαθέσιμο όγκο δείγματος ούρων και το υψηλό κόστος των αναλύσεων, η ανάπτυξη αναλυτικών διαδικασιών σάρωσης που να επιτυγχάνουν την ταυτόχρονη ανίχνευση μεγάλου αριθμού ουσιών καθίσταται πρωταρχικής σημασίας για τα εργαστήρια ελέγχου ντόπινγκ.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Ανάπτυξη και αξιολόγηση μεθόδου σάρωσης απαγορευμένων ουσιών σε ούρα αθλητών με LC/TOF-MS

Για πολλά χρόνια ο συνδυασμός της αεριοχρωματογραφίας με τη φασματομετρία μαζών αποτελούσε την κύρια εφαρμοζόμενη αναλυτική τεχνική στις διαδικασίες σάρωσης απαγορευμένων ουσιών. Εν τούτοις, η τεχνική αυτή παρουσιάζει το μειονέκτημα της αδυναμίας ανάλυσης θερμοευαίσθητων ουσιών, ενώ η επίπονη παρασκευαστική προκατεργασία που απαιτείται για την ανάλυση πολικών και μη πτητικών ουσιών, καθιστά δύσκολη την εφαρμογή της σε ενοποιημένα πρωτόκολλα σάρωσης μεγάλου αριθμού και ποικίλης φύσης απαγορευμένων ουσιών. Την τελευταία δεκαετία, ο συνδυασμός της φασματομετρίας μαζών με την υγροχρωματογραφία, βρίσκει όλο και περισσότερες εφαρμογές στον έλεγχο ντόπινγκ, αφού επιτρέπει την ανίχνευση όχι μόνο των χαμηλού μοριακού βάρους μορίων αλλά και των μεγαλομοριακών ουσιών που περιλαμβάνονται στη Λίστα.¹⁰²⁻¹⁰⁸ Σε ό,τι αφορά την ανάλυση μικρομοριακών ενώσεων, η συνεχής τεχνολογική εξέλιξη των αναλυτών μαζών που χρησιμοποιούνται στα συστήματα LC/MS καθιστά πλέον εφικτή την ταυτόχρονη ανάλυση εκατοντάδων ουσιών με εξαιρετική ευαισθησία και εκλεκτικότητα.¹⁰⁹⁻¹¹¹

Τα τελευταία χρόνια έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία ένας σημαντικός αριθμός εργασιών που αφορούν αναλυτικές διαδικασίες σάρωσης με στόχο τη σύγχρονη ανίχνευση απαγορευμένων ουσιών διαφορετικών κατηγοριών, γεγονός που υποστηρίζει και την ανάγκη ύπαρξης τέτοιων συνδυαστικών αναλυτικών πρωτοκόλλων για τα εργαστήρια που διενεργούν τους ελέγχους. Στις εργασίες αυτές ο συνδυασμός υγροχρωματογραφίας – φασματομετρίας μαζών αποτελεί την κατεξοχήν χρησιμοποιούμενη αναλυτική τεχνική ανίχνευσης των απαγορευμένων ουσιών στα ούρα των αθλητών. Οι σχετικές βιβλιογραφικές αναφορές παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.1 που ακολουθεί, όπου παρατίθενται περιληπτικά και κάποια στοιχεία των αναλυτικών πρωτοκόλλων που αναπτύχθηκαν στις αναφερόμενες ερευνητικές εργασίες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Ανάπτυξη και αξιολόγηση μεθόδου σάρωσης απαγορευμένων ουσιών σε ούρα αθλητών με LC/TOF-MS

Πίνακας 5.1: Βιβλιογραφικές αναφορές αναλύσεων σάρωσης απαγορευμένων ουσιών με την τεχνική της υγροχρωματογραφίας – φασματομετρίας μαζών

Αναφορά (Έτος)	Ανιχνευόμενες Ουσίες	Στοιχεία Αναλυτικής Διαδικασίας (προκατεργασία δειγμάτων ούρων, τεχνική ιοντισμού, αναλυτής μαζών, χρόνος ανάλυσης)
112 (2006)	κορτικοστεροειδή, διεγερτικά, αντι-οιστρογόνα, αναβολικά στεροειδή (συνολικά 28 αναλύτες)	Υγρό-υγρό εκχύλιση Υγροχρωματογραφία υπερευψηλής απόδοσης ESI(+),UHPLC-MS/MS (αναλυτής τριπλό τετράπολο, λειτουργία MRM) Χρόνος ανάλυσης: 15 min
113 (2006)	κορτικοστεροειδή, αναβολικά στεροειδή, αντιδιαβητικά, αντιφλεγμονώδη, διουρητικά κ.α (συνολικά 85 ουσίες σε άλογα)	Εκχύλιση στερεάς φάσης, συλλέγονται 2 κλάσματα που αναλύονται με ξεχωριστή μέθοδο: ESI(+),LC-MS/MS και ESI(-),LC-MS/MS (αναλυτής τριπλό τετράπολο, MRM) Χρόνος ανάλυσης: 10 min για κάθε κλάσμα
114 (2007)	διεγερτικά, ναρκωτικά, διουρητικά, β-ανταγωνιστές, β ₂ -αγωνιστές, διουρητικά, αντι-οιστρογόνα (συνολικά 97 αναλύτες)	Εκχύλιση στερεάς φάσης, συλλέγονται δύο εκλούσματα που αναλύονται ξεχωριστά ESI(+), LC/TOF-MS Χρόνος ανάλυσης: 27 min για κάθε κλάσμα
115 (2008)	διεγερτικά, διουρητικά, οπιοειδή (συνολικά 130 αναλύτες)	Απευθείας ανάλυση ούρων μετά από αραιώση Υγροχρωματογραφία υπερευψηλής απόδοσης UHPLC-MS/MS (τριπλό τετράπολο σε λειτουργία MRM). Ιοντισμός ESI(+) και ESI(-) σε διαφορετικά χρονικά παράθυρα στην ίδια μέθοδο ανάλυσης Χρόνος ανάλυσης: 7,5 min
116 (2008)	αναβολικά στεροειδή, β ₂ -αγωνιστές, αντι-οιστρογόνα κ.α αναβολικοί παράγοντες	Υγρό-υγρό εκχύλιση LC/Orbitrap-MS, Τεχνική ιοντισμού: APCI (Μέτρηση ακριβούς μάζας τριών ιόντων για κάθε ουσία από θραυσματοποίηση στην πηγή ιοντισμού).
117 (2008)	κορτικοστεροειδή, διεγερτικά, αντι-οιστρογόνα, αναβολικά στεροειδή, β-ανταγωνιστές, διουρητικά (συνολικά 28 αναλύτες)	Διπλή υγρό-υγρό εκχύλιση LC-MS/MS (τριπλό τετράπολο σε λειτουργία MRM). Ιοντισμός ESI(+) και ESI(-) σε διαφορετικά χρονικά παράθυρα στην ίδια μέθοδο ανάλυσης Χρόνος ανάλυσης: 19 min
118 (2009)	β-ανταγωνιστές, β ₂ -αγωνιστές, διεγερτικά, ναρκωτικά, διουρητικά, αντι-οιστρογόνα (συνολικά 28 αναλύτες)	Απευθείας ανάλυση μετά από φυγοκέντρηση και αραιώση των δειγμάτων ούρων Υγροχρωματογραφία υπερευψηλής απόδοσης UHPLC/QTOF-MS (λειτουργία πλήρους σάρωσης, full scan). Διπλή ανάλυση κάθε δείγματος σε συνθήκες ESI(+) και ESI(-). Χρόνος κάθε ανάλυσης: 9 min
119 (2009)	β-ανταγωνιστές, β ₂ -αγωνιστές, διεγερτικά, ναρκωτικά, διουρητικά, αντι-οιστρογόνα, αναβολικά στεροειδή, κορτικοστεροειδή (συνολικά 197 αναλύτες)	Διπλή εκχύλιση στερεάς φάσης Υγροχρωματογραφία υπερευψηλής απόδοσης UHPLC/TOF-MS Διπλή ανάλυση κάθε δείγματος σε συνθήκες ESI(+) και ESI(-). Χρόνος κάθε ανάλυσης: 8 min
120 (2010)	διεγερτικά, ναρκωτικά, αναβολικά στεροειδή, κορτικοστεροειδή, διουρητικά, β ₂ -αγωνιστές (συνολικά 56 αναλύτες)	Εκχύλιση στερεάς φάσης Υγροχρωματογραφία υπερευψηλής απόδοσης UHPLC/TOF-MS Διπλή ανάλυση κάθε δείγματος σε συνθήκες ESI(+) και ESI(-). Χρόνος κάθε ανάλυσης: 13 min

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Ανάπτυξη και αξιολόγηση μεθόδου σάρωσης απαγορευμένων ουσιών σε ούρα αθλητών με LC/TOF-MS

Όπως διαπιστώνεται από τη βιβλιογραφική έρευνα, ο συνδυασμός της υγροχρωματογραφίας με συστήματα δίδυμης φασματομετρίας (συστήματα τριπλού τετραπόλου ή παγίδας ιόντων) έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για αναλύσεις σάρωσης πολλαπλών απαγορευμένων ουσιών, επιτυγχάνοντας εξαιρετική ευαισθησία και εκλεκτικότητα. Εντούτοις, η τεχνική αυτή μπορεί να εφαρμοστεί για την ανίχνευση μεγάλου, αλλά όχι απεριόριστου αριθμού γνωστών ουσιών, για τις οποίες έχει προεπιλεγεί η απομόνωση, η θραυσματοποίηση και η παρακολούθηση συγκεκριμένων μητρικών και θυγατρικών ιόντων. Αντίθετα, αναλυτές μαζών όπως ο αναλυτής χρόνου πτήσης (TOF) και ο αναλυτής τροχιακής παγίδας (Orbitrap) λειτουργούν με τη συνεχή λήψη φασμάτων πλήρους σάρωσης και επιτυγχάνουν ευαισθησία και εκλεκτικότητα χάρη στην υψηλή διαχωριστική τους ικανότητα και την εξαιρετικά υψηλή ακρίβεια στη μέτρηση των τιμών λόγου m/z . Με τον τρόπο αυτό, αναλυτές τέτοιου τύπου μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παρακολούθηση απεριόριστου αριθμού γνωστών ουσιών, αλλά και για την ανίχνευση ουσιών των οποίων τα στοιχεία είναι άγνωστα κατά τη στιγμή της ανάλυσης του δείγματος. Η χρησιμοποίηση του αναλυτή TOF σε αναλύσεις σάρωσης γνωστών και άγνωστων ενώσεων βρίσκει εφαρμογή εκτός από τον έλεγχο ντόπινγκ^{114,118-122} και σε άλλα πεδία, όπως στην τοξικολογία¹²³⁻¹²⁶, στην ανάλυση τροφίμων^{122,127-132}, κτηνιατρικών φαρμάκων, στην εύρεση και ταυτοποίηση μεταβολιτών¹³³⁻¹³⁷, στην ανίχνευση φυτοφαρμάκων^{129,131,138,139} και σε άλλου είδους περιβαλλοντικές αναλύσεις¹⁴⁰⁻¹⁴².

Ο συνδυασμός της φασματομετρίας μαζών με αναλυτή χρόνου πτήσης με συστήματα υγροχρωματογραφίας υπερυψηλής απόδοσης (UHPLC) συναντάται σε ένα πολύ μεγάλο μέρος των εργασιών που προαναφέρθηκαν και αφορούν αναλύσεις σάρωσης μεγάλου αριθμού ουσιών. Η χρησιμοποίηση πληρωτικών υλικών χρωματογραφίας με μέγεθος σωματιδίων κάτω από 2 μm , οδηγεί στον ταχύ και ικανοποιητικό διαχωρισμό των αναλυτών, ακόμα και αυτών παραπλήσιας δομής. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται δραστική μείωση του χρόνου της ανάλυσης (σε σχέση με τη συμβατική υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης, HPLC), διατηρώντας συγχρόνως ικανοποιητικό χρωματογραφικό διαχωρισμό¹⁴³ και αυξάνεται σημαντικά η ευαισθησία. Καθώς το εύρος των χρωματογραφικών κορυφών ελαττώνεται, κρίνεται αναγκαία η χρησιμοποίηση αναλυτών ταχείας σάρωσης, όπως οι αναλυτές χρόνου πτήσης, αλλά και οι αναλυτές τριπλού τετραπόλου, ώστε να επιτευχθεί η λήψη ικανοποιητικού αριθμού μετρήσεων (σημείων) για τον ορθό καθορισμό μιας χρωματογραφικής κορυφής.

Αντικείμενο της παρούσας εργασίας ήταν η ανάπτυξη μεθόδου σάρωσης για την ανίχνευση χαμηλού μοριακού βάρους απαγορευμένων ουσιών σε ούρα αθλητών. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε σύστημα υγροχρωματογραφίας υπερυψηλής απόδοσης και φασματόμετρο μαζών με τετραπολικό αναλυτή συζευγμένο με αναλυτή χρόνου πτήσης (QTOF-MS). Αρχικός στόχος ήταν, με αφορμή την ευγενική προσφορά του παραπάνω συστήματος από την εταιρεία Agilent Technologies στο Εργαστήριο Ελέγχου Doping του ΟΑΚΑ, η ανάπτυξη μιας μεθόδου σάρωσης για την ανίχνευση των κορτικοστεροειδών και μικρού αριθμού αναβολικών παραγόντων και β_2 -αγωνιστών, αντίστοιχη με την ήδη προϋπάρχουσα και εφαρμοζόμενη στο Εργαστήριο διαδικασία ανίχνευσης με το αναλυτικό σύστημα LC-/IT-MS.²⁷ Η παραπάνω αναπτυχθείσα μέθοδος επικυρώθηκε και έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα για τις ουσίες που είχαν επιλεγεί, χωρίς την ανάγκη τροποποίησης της παρασκευαστικής διαδικασίας που ήδη χρησιμοποιούσε το Εργαστήριο

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Ανάπτυξη και αξιολόγηση μεθόδου σάρωσης απαγορευμένων ουσιών σε ούρα αθλητών με LC/TOF-MS

για την διαδικασία ανίχνευσης αναβολικών παραγόντων και κορτικοστεροειδών. Έτσι, τέθηκε ως στόχος η περαιτέρω διερεύνηση της δυνατότητας επέκτασης της εφαρμογής της παραπάνω μεθόδου στην ανίχνευση μικρομοριακών ουσιών από όλες τις κατηγορίες απαγορευμένων ουσιών. Έγινε δηλαδή προσπάθεια ανάπτυξης ενός διευρυμένου αναλυτικού πρωτοκόλλου σάρωσης απαγορευμένων ουσιών διατηρώντας την παρασκευαστική πορεία ανίχνευσης των αναβολικών παραγόντων, που αποτελεί μια σχετικά απλή διαδικασία χειρισμού των αναλυόμενων δειγμάτων ούρων (μονή πορεία υγρό – υγρό εκχύλισης) και ανάλυση του εκχυλίσματος με το σύστημα LC/QTOF-MS σε συνθήκες λειτουργίας πλήρους σάρωσης. Η ανάπτυξη ενός τέτοιου πρωτοκόλλου είχε ως στόχο την ικανοποιητική ανίχνευση όχι μόνο των ήδη γνωστών απαγορευμένων ουσιών που συμπεριλαμβάνονταν στη Λίστα του WADA που τέθηκε σε ισχύ για το έτος 2010, αλλά και σε μελλοντική αναδρομική ανίχνευση άγνωστων μέχρι στιγμής ουσιών (designer drugs).

5.2. ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΕΞΕΤΑΣΤΗΚΑΝ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν ουσίες από όλες τις κατηγορίες των χαμηλού μοριακού βάρους απαγορευμένων ουσιών: αναβολικά στεροειδή και άλλοι αναβολικοί παράγοντες, ανταγωνιστές και ρυθμιστές ορμονών, β_2 -αγωνιστές, διουρητικά και άλλοι καλυπτικοί παράγοντες, διεγερτικά, κορτικοστεροειδή, β -αναστολείς. Λαμβάνοντας υπόψη τις διαθέσιμες πληροφορίες για το μεταβολισμό καθεμιάς εκ των παραπάνω ουσιών, ελέγχεται στα ούρα η ύπαρξη της μητρικής ουσίας ή/και ενός ή περισσότερων μεταβολιτών αυτής. Οι απαγορευμένες ουσίες και οι μεταβολίτες αυτών που μελετήθηκαν αναφέρονται στο [Παράρτημα 1](#), όπου παρατίθενται για καθεμία από αυτές η χημική δομή, ο μοριακός τύπος, η ακριβής μοριακή μάζα, η κατηγορία στην οποία ανήκει και η ελάχιστη συγκέντρωση που πρέπει να ανιχνεύεται στα ούρα των αθλητών από τα εργαστήρια ελέγχου ντόπινγκ (Minimum Required Performance Level, MRPL), όπως αυτή καθορίζεται από το WADA.²⁹

5.3. ΥΛΙΚΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ (Reference material)

Ως υλικό αναφοράς στον έλεγχο ντόπινγκ ορίζεται μια ουσία για την οποία έχουν καθιερωθεί επαρκώς μια ή περισσότερες ιδιότητες, ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν ουσία στη βαθμονόμηση ενός αναλυτικού συστήματος, στην αξιολόγηση και επικύρωση μιας αναλυτικής μεθόδου και στη διαδικασία επιβεβαίωσης ενός θετικού δείγματος. Ως υλικό αναφοράς στην περίπτωση ποιοτικής μεθόδου ανάλυσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί και δείγμα ούρων που λαμβάνεται μετά από χορήγηση σκευάσματος απαγορευμένης ουσίας (μεταβολικό δείγμα), με την προϋπόθεση τα αναλυτικά δεδομένα να είναι αρκετά, ώστε να δικαιολογείται η ταυτότητα των μεταβολιτών της χορηγούμενης ουσίας. Επίσης, τα δείγματα αξιολόγησης του Εργαστηρίου (proficiency test samples) και δείγματα άλλων διεργαστηριακών δοκιμών και επίσημων ελέγχων είναι υλικά αναφοράς.¹⁶

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Ανάπτυξη και αξιολόγηση μεθόδου σάρωσης απαγορευμένων ουσιών σε ούρα αθλητών με LC/TOF-MS

Τα υλικά αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία (ποιοτική ανάλυση) είχαν τη μορφή πρότυπης ουσίας υπό τη μορφή σκόνης, διαλύματος ή φαρμακευτικού σκευάσματος και τη μορφή μεταβολικού δείγματος.

5.3.1. Πρότυπες ουσίες αναφοράς

Στο [Παράρτημα 2](#) παρουσιάζονται οι πληροφορίες καθαρότητας και προέλευσης των ουσιών αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων των εξεταζόμενων ουσιών. Ένας αριθμός αναλυτών δεν ήταν εμπορικά διαθέσιμος και οι ουσίες αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν ήταν προσφορά από άλλα διαπιστευμένα εργαστήρια ελέγχου ντόπινγκ (Κολωνίας (Γερμανία), Γάνδης (Βέλγιο), Ρώμης (Ιταλία), Seibersdorf (Αυστρία), Μόσχας (Ρωσία), Τόκιο (Ιαπωνία), Σύδνεϋ (Αυστραλία)), ή από τον Οργανισμό Αντι-ντόπινγκ των Ηνωμένων Πολιτειών (United States Anti-doping Agency, USADA, Colorado Springs, CO, USA) και την Παγκόσμια Ένωση Επιστημόνων Αντι-ντόπινγκ (World Association of Anti-doping Scientists, WAADS).

5.3.2. Μεταβολικά δείγματα

Τα μεταβολικά δείγματα που αναλύθηκαν για την ανίχνευση μη εμπορικά διαθέσιμων μεταβολιτών με την αναπτυχθείσα μέθοδο σάρωσης, ελήφθησαν από εθελοντές μετά από ελεγχόμενη χορήγηση θεραπευτικών δόσεων απαγορευμένων ουσιών και λήψη δειγμάτων ούρων ανά τακτά χρονικά διαστήματα, ή παραχωρήθηκαν στο Εργαστήριο από άλλα διαπιστευμένα εργαστήρια, το WADA και τη WAADS. Οι απαγορευμένες ουσίες για τις οποίες αναλύθηκαν μεταβολικά δείγματα αναφέρονται στο [Παράρτημα 1](#).

5.4. ΠΡΟΤΥΠΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΠΑΡΑΚΑΤΑΘΗΚΗΣ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

5.4.1. Πρότυπα διαλύματα παρακαταθήκης

Για όλες τις απαγορευμένες ουσίες, για τις οποίες υπήρχαν διαθέσιμες ουσίες αναφοράς παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα παρακαταθήκης, είτε με ζύγιση κατάλληλης ποσότητας στερεού και διάλυση, είτε με διάλυση προζυγισμένης ποσότητας ουσίας σε αμπούλα, είτε με κατάλληλη αραιώση υλικού αναφοράς σε μορφή διαλύματος χρησιμοποιώντας τον κατάλληλο διαλύτη (συνήθως μεθανόλη ή νερό ή μίγματα αυτών). Στην περίπτωση υλικών αναφοράς σε μορφή δισκίου προηγήθηκε κονιοποίηση αυτού και ακολούθησε ζύγιση, διάλυση σε κατάλληλο διαλύτη υποβοηθούμενη από λουτρό υπερήχων και διέλευση του διαλύματος από φίλτρα μεγέθους πόρων 0,45 μm. Η συγκέντρωση των αναλυτών στα παραπάνω πρότυπα διαλύματα κυμάνθηκε στις περισσότερες περιπτώσεις μεταξύ 1 – 5 mg mL⁻¹.

Λαμβάνοντας κατάλληλους όγκους από τα παραπάνω διαλύματα και με κατάλληλη αραιώση με μεθανόλη παρασκευάστηκαν 12 πρότυπα πολυσυστατικά διαλύματα παρακαταθήκης, που περιελάμβαναν την πλειοψηφία των αναλυτών που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία ([Παράρτημα 3](#)). Όλα τα διαλύματα παρακαταθήκης των αναλυτών φυλάσσονταν στο σκοτάδι και σε καταψύκτες στους -20 °C.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Ανάπτυξη και αξιολόγηση μεθόδου σάρωσης απαγορευμένων ουσιών σε ούρα αθλητών με LC/TOF-MS

Μεθανολικά διαλύματα παρακαταθήκης παρασκευάστηκαν για τις ουσίες 17 α -methyltestosterone και codeine που χρησιμοποιήθηκαν ως εσωτερικά πρότυπα σε συγκεντρώσεις 0,6 mg mL⁻¹ και 5 mg mL⁻¹, αντίστοιχα.

5.4.2. Πρότυπα διαλύματα εργασίας

Τα πρότυπα διαλύματα εργασίας που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των εμβολιασμένων δειγμάτων ούρων παρασκευάστηκαν με κατάλληλη αραιώση των πολυσυστατικών διαλυμάτων παρακαταθήκης των αναλυτών με μεθανόλη και παρατίθενται στο [Παράρτημα 3](#). Με κατάλληλη αραιώση των διαλυμάτων παρακαταθήκης των εσωτερικών προτύπων με μεθανόλη παρασκευάστηκε διάλυμα εργασίας αυτών που περιείχε τις ουσίες 17 α -methyltestosterone και codeine σε συγκέντρωση 5 μ g mL⁻¹. Τα διαλύματα εργασίας φυλάσσονταν στο σκοτάδι στους -20 °C και αποψύχονταν την ημέρα της χρήσης.

5.5. ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ LC/QTOF-MS

5.5.1. Συνθήκες λειτουργίας υδροχρωματογραφικού συστήματος

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε σύστημα υδροχρωματογραφίας υπερυψηλής απόδοσης (UHPLC) της εταιρείας Agilent Technologies. Η αναλυτική στήλη που χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό των αναλυτών, τόσο μεταξύ τους όσο και από τα συστατικά του μητρικού υλικού είναι στήλη που φέρει ως υλικό πλήρωσης ομάδες σιλανόλης χημικά συνδεδεμένες με αλυσίδες 18 ατόμων άνθρακα και αναφέρεται συνήθως ως C18. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε η στήλη Zorbax Eclipse Plus C18 (Agilent Technologies), με μήκος 10 cm, εσωτερική διάμετρο 2,1 mm και διάμετρο σωματιδίων 1,8 μ m. Η θερμοκρασία της στήλης ρυθμίστηκε στους 35 °C. Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε υδατικό διάλυμα μυρμηκικού αμμωνίου 5 mM και μυρμηκικού οξέος 0,01 % (v/v) (διαλύτης A, 4.4.2.20) και διάλυμα μυρμηκικού αμμωνίου 5 mM και μυρμηκικού οξέος 0,01 % (v/v) σε μίγμα ακετονιτριλίου νερού 90/10 (v/v) (διαλύτης B, 4.4.2.21). Λαμβάνοντας υπόψη ότι οι αναλυόμενες ουσίες παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία ως προς την πολικότητά τους, επιλέχθηκε η χρησιμοποίηση βαθμιδωτής έκλουσης (gradient elution) με διατήρηση σταθερής ταχύτητας ροής της κινητής φάσης στην τιμή 0,3 mL min⁻¹. Στο πρόγραμμα έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε η αρχική αναλογία του διαλύτη B στην κινητή φάση ήταν 10 % , αυξανόμενη γραμμικά και φτάνοντας το 80 % σε χρόνο 9 min και στη συνέχεια το 100 % σε 1 min, όπου παρέμενε σταθερή για 2 min και τέλος ακολουθούσε ταχεία επιστροφή στην αρχική αναλογία (10 %) σε 0,5 min, όπου παρέμενε για 3,5 min για την εξισορρόπηση του χρωματογραφικού συστήματος στην αρχική σύσταση της κινητής φάσης. Ο συνολικός χρόνος ανάλυσης ήταν 13,5 min. Ο αναλυόμενος όγκος δείγματος ήταν 5 μ L. Η βαλβίδα που υπάρχει στο χρησιμοποιούμενο σύστημα μετά την έξοδο του χρωματογραφικού εκλούσματος από τη στήλη και πριν την είσοδό του στην πηγή ιοντισμού του φασματομέτρου μαζών (divert valve) ρυθμίστηκε να διοχετεύει τη ροή της κινητής φάσης εκτός του ανιχνευτή μετά τα 11,5 min, χρόνος στον οποίο έχει ολοκληρωθεί η έκλυση όλων των ανιχνευόμενων ουσιών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Ανάπτυξη και αξιολόγηση μεθόδου σάρωσης απαγορευμένων ουσιών σε ούρα αθλητών με LC/TOF-MS

5.5.2. Συνθήκες λειτουργίας φασματομέτρου μαζών

Το φασματομέτρο μαζών που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία διέθετε τετραπολικό αναλυτή μαζών συζευγμένο με ορθογώνιας επιτάχυνσης αναλυτή χρόνου πτήσης (QTOF-MS) και ορθογώνιας διάταξης πηγή ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό, η οποία ρυθμίστηκε στην παραγωγή θετικών ιόντων (ESI+). Η θερμοκρασία και η ταχύτητα ροής του αερίου αποδιαλύτωσης (αζώτου) ρυθμίστηκαν στους 350 °C και 10 L min⁻¹, αντίστοιχα. Η πίεση του αερίου στη βελόνα νεφελοποίησης στην οποία εισάγεται το χρωματογραφικό έκλουσμα ρυθμίστηκε στα 45 psi. Το δυναμικό του τριχοειδούς (capillary voltage) και του τεμαχιστή (skimmer) στην έξοδο του τριχοειδούς ρυθμίστηκαν στα 4000 V και 60 V, αντίστοιχα. Το δυναμικό της πηγής ιοντισμού που μπορεί να οδηγήσει σε θραυσματοποίηση των ιόντων των αναλυτών (fragmentor voltage) ρυθμίστηκε στα 140 V, με στόχο την επίτευξη ήπιων συνθηκών ιοντισμού που δεν οδηγούν σε θραυσματοποίηση των (πρωτωνιομένων ως επί το πλείστον) μοριακών ιόντων των αναλυτών και την βελτιστοποίηση με τον τρόπο αυτό της ευαισθησίας της μεθόδου, για την πλειοψηφία των εξεταζόμενων αναλυτών. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, στην παρούσα εργασία επιλέχθηκε η λειτουργία του αναλυτή χρόνου πτήσης (TOF) σε συνθήκες πλήρους σάρωσης, δηλαδή το τετράπολο και ο θάλαμος θραυσματοποίησης που βρίσκονται πριν τον αναλυτή TOF επέτρεπαν να φτάσουν σε αυτόν όλα τα ιόντα με τη μορφή που αυτά σχηματίζονταν στην πηγή ιοντισμού. Το εύρος των ανιχνευόμενων τιμών m/z ρυθμίστηκε σε 100 – 1100 m/z και η ταχύτητα σάρωσης ήταν 1 scan sec⁻¹. Ο ανιχνευτής των ιόντων ρυθμίστηκε να λειτουργεί με συχνότητα 2 GHz, η οποία προσδίδει στο σύστημα το μέγιστο δυναμικό εύρος λειτουργίας. Όλες οι υπόλοιπες παράμετροι λειτουργίας του φασματομέτρου μαζών, (όπως οι τιμές των δυναμικών του εξαπόλου και των φακών για την εστίαση και επιτάχυνση της δέσμης των ιόντων, του αναλυτή TOF και του ανιχνευτή των ιόντων) ρυθμίζονταν και βελτιστοποιούνταν στο σύνολό τους από τη διαδικασία tuning με στόχο τη μέγιστη δυνατή διαχωριστική ικανότητα και ευαισθησία του συστήματος QTOF-MS. Επιλέχθηκε η δυνατότητα συνεχούς διόρθωσης της βαθμονόμησης του συστήματος κατά τη διάρκεια της ανάλυσης με τη διοχέτευση κατάλληλου διαλύματος (4.4.2.31) από ξεχωριστή βελόνα νεφελοποίησης της πηγής ιοντισμού και ως μάζες αναφοράς για τη διόρθωση του άξονα m/z χρησιμοποιήθηκαν τα ιόντα με τιμές m/z 121,0509 και 922,0098.

5.6. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ – ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ

Πρότυπα διαλύματα των εξεταζόμενων ουσιών και των εσωτερικών προτύπων σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν μεταξύ 0,5- 5,0 μg mL⁻¹ και σε διαλύτη παραπλήσιο με την αρχική σύσταση της κινητής φάσης (διαλύτη Α/ διαλύτη Β: 80/20 (v/v)) αναλύθηκαν υπό τις προαναφερθείσες συνθήκες του συστήματος LC/QTOF-MS, με στόχο την εύρεση του χρόνου ανάσχεσης και των ανιχνευόμενων ιόντων για κάθε ουσία. Στο [Παράρτημα 4](#) παρατίθενται για κάθε αναλύτη ο χρόνος ανάσχεσης (retention time, RT), το ιόν ή τα ιόντα προσθήκης που ανιχνεύθηκαν, οι θεωρητικά υπολογιζόμενες και οι πειραματικά μετρούμενες τιμές m/z των ιόντων αυτών (m/z theoretical και m/z experimental, αντίστοιχα) και το σφάλμα μέτρησης ακριβούς μάζας (mass error), όπως αυτό υπολογίζεται από την ακόλουθη εξίσωση

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Ανάπτυξη και αξιολόγηση μεθόδου σάρωσης απαγορευμένων ουσιών σε ούρα αθλητών με LC/TOF-MS

$$\text{σφάλμα μάζας (ppm)} = 10^6 \times \frac{m/z_{\text{πειραματικό}} - m/z_{\text{θεωρητικό}}}{m/z_{\text{θεωρητικό}}} \quad [5.1]$$

Όπως φαίνεται και στον πίνακα του [Παράρτηματος 4](#), η πλειοψηφία των διεγερτικών και ναρκωτικών ουσιών, των κορτικοστεροειδών και των ανταγωνιστών ορμονών, κάτω από τις συνθήκες ιοντισμού που εφαρμόστηκαν, σχηματίζουν τα πρωτονιωμένα μοριακά ιόντα τους ($[M+H]^+$). Η χρησιμοποίηση του μυρμηκικού οξέος ως όξινου τροποποιητή στην κινητή φάση, ενισχύει σημαντικά το σχηματισμό των πρωτονιωμένων ιόντων, ενώ παράλληλα βελτιώνει σημαντικά τη χρωματογραφική συμπεριφορά των αναλυτών, δίνοντας οξείες κορυφές. Η παρουσία του μυρμηκικού αμμωνίου στην κινητή φάση, αποδείχθηκε καθοριστική για την ανίχνευση ορισμένων αναβολικών στεροειδών (drostanolone mt., mesterolone mt., 19-norandrosterone, 19-noretiocholanolone) και των θειαζιδικών διουρητικών που επιτυγχάνεται με τη μορφή ιόντων προσθήκης αμμωνίου ($[M+NH_4]^+$). Αξίζει να αναφερθεί ότι σε όλες τις βιβλιογραφικές αναφορές η ανίχνευση των θειαζιδικών διουρητικών επιτυγχάνεται με την εφαρμογή αρνητικού ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό και για αυτό το λόγο οι μέθοδοι σάρωσης LC/TOF-MS που έχουν αναπτυχθεί βασίζονται σε διπλή ανάλυση των κατεργασμένων ούρων σε συνθήκες ESI(+) και ESI(-). Όπως φαίνεται και από τα δεδομένα που παρουσιάζονται στο [Παράρτημα 4](#) οι ουσίες αυτές στις συνθήκες ανάλυσης που εφαρμόστηκαν στην παρούσα εργασία εκτός από ιόντα προσθήκης αμμωνίου, ανιχνεύονται επίσης και ως διμερή ιόντα προσθήκης αμμωνίου, νατρίου ή/και καλίου. Αν και όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη παράγραφο τα δυναμικά στην έξοδο του τριχοειδούς της πηγής ιοντισμού ρυθμίστηκαν σε χαμηλές τιμές με στόχο τη αποφυγή της θραυσματοποίησης στην πηγή, εντούτοις για μικρό αριθμό διεγερτικών ουσιών παρατηρήθηκε σχηματισμός θραυσματοποιημένων ιόντων κυρίως με απώλεια ενός μορίου νερού ή αμμωνίας, όμως σε σχετικά χαμηλή αφθονία σε σύγκριση με τα αντίστοιχα πρωτονιωμένα μοριακά ιόντα τους.

Τα αναβολικά στεροειδή στην πλειοψηφία τους δε διαθέτουν κάποια όξινη ή βασική ομάδα στο μόριο τους και συχνά διαθέτουν μια καρβονυλική ομάδα (συνήθως στη θέση 3 ή στη θέση 17) ως πιθανή θέση πρωτονίωσης. Για αυτό το λόγο η ανίχνυσή τους με τις συνήθειες τεχνικές ιοντισμού υπό συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης (ESI και APCI) εμφανίζει ιδιαίτερες δυσκολίες, μια εκ των οποίων είναι ο σχηματισμός των πρωτονιωμένων μοριακών ιόντων σε πολύ χαμηλή ένταση και για κάποιες ουσίες ακόμα και η παντελής αδυναμία σχηματισμού αυτών. Η δομή των αναβολικών στεροειδών αποτελεί τον καθοριστικό παράγοντα για τον ιοντισμό τους. Ο σχηματισμός πρωτονιωμένου μοριακού ιόντος εξαρτάται κυρίως από την παρουσία ομάδας καρβονυλίου ή ατόμου αζώτου και την ύπαρξη συζυγίας. Έτσι, στεροειδή μόρια με καρβονυλομάδα σε πλούσιο συζυγιακό σύστημα (π.χ. gestrinone, trenbolone, bolasterone, boldenone κ.λ.π.) ή με αζωτούχο δακτύλιο (π.χ. 16β-hydroxystanozolol) ιοντίζονται κυρίως προς τα αντίστοιχα πρωτονιωμένα μόρια, τα οποία όμως σχηματίζονται σε ελάχιστο βαθμό ή καθόλου σε στεροειδή που δε διαθέτουν καρβονυλική ομάδα σε συζυγία (π.χ. epimetendiol, bolasterone mt. κ.λ.π.). Τα στεροειδή που δεν σχηματίζουν πρωτονιωμένα μοριακά ιόντα, ανιχνεύονται με τη μορφή διαφόρων ιόντων προσθήκης, διμερών και αφυδατωμένων πρωτονιωμένων ιόντων, όπως $[M+NH_4]^+$, $[M+Na]^+$, $[2M+H]^+$, $[2M+Na]^+$, $[M+H-H_2O]^+$, $[M+H-2H_2O]^+$, $[M+NH_4-H_2O]^+$.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Ανάπτυξη και αξιολόγηση μεθόδου σάρωσης απαγορευμένων ουσιών σε ούρα αθλητών με LC/TOF-MS

Αντίστοιχα συμπεράσματα σχετικά με τον ιοντισμό των αναβολικών στεροειδών έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία, όπου επισημαίνεται επίσης η καθοριστική σημασία της διάταξης της πηγής ιοντισμού και της κινητής φάσης στο είδος των σχηματιζόμενων ιόντων.¹⁴⁴⁻¹⁴⁷

Με το πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης που εφαρμόστηκε και αναφέρθηκε σε προηγούμενη παράγραφο, είναι δυνατός ο χρωματογραφικός διαχωρισμός και κατά συνέπεια η ανίχνευση απαγορευμένων ουσιών με τον ίδιο μοριακό τύπο, που σχηματίζουν ιόντα με την ίδια ακριβώς τιμή λόγου m/z . Παραδείγματα αποτελούν οι ισομερείς ουσίες 3-hydroxystanozolol/16β-hydroxystanozolol (m/z 345,2537), trenbolone/17α-epitrenbolone (m/z 271,1693), boldenone/methyldienolone (m/z 287,2006), boldione/methyltrienolone (m/z 285,1849), methamphetamine/phentermine (m/z 150,1277), dimethylamphetamine/ethylamphetamine/mephentermine (m/z 164,1434), ortetamine/phenpromethamine/p-methylamphetamine (m/z 150,1277), 4-methyl-2-hexanamine/tuaminoheptane (m/z 116,1434), prednisolone/cortisone (ενδογενές κορτικοστεροειδές, μη απαγορευμένη ουσία) (m/z 361,2009). Αντίθετα, δεν ήταν εφικτός ο χρωματογραφικός διαχωρισμός των ουσιών norpseudoephedrine/norephedrine (μη απαγορευμένη ουσία) (m/z 152,1070), ephedrine/pseudoephedrine (m/z 166,1226) και των ουσιών mibolerone και methenolone, τόσο μεταξύ τους, όσο και με το εσωτερικό πρότυπο 17α-methyltestosterone (m/z 303,2319).

Όπως προαναφέρθηκε, στην παρούσα μελέτη αναλύθηκαν διαλύματα όλων των εξεταζόμενων ενώσεων για τις οποίες υπήρχαν διαθέσιμες ουσίες αναφοράς. Από τις ουσίες αυτές οι απαγορευμένες ουσίες furazabol, 5α-tetrahydronorethisterone (danazol mt.) και letrozol mt. δεν ανιχνεύθηκαν κατά την ανάλυση των αντίστοιχων διαλυμάτων με την προτεινόμενη μέθοδο, γεγονός που οφείλεται σε αδυναμία ιοντισμού τους υπό τις συνθήκες που εφαρμόστηκαν. Επιπλέον, δεν ανιχνεύθηκε η ουσία meclofenoxate, που παρουσιάζει προβλήματα σταθερότητας σε διάλυμα και δεν ανιχνεύεται σε αυτά με την πάροδο λίγων ημερών μετά την παρασκευή τους, ενώ παράλληλα δεν ανιχνεύθηκαν τα προϊόντα διάσπασης της ουσίας που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία.

5.7. ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΕΝΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΥΡΩΝ

5.7.1 Προκατεργασία Δειγμάτων Ούρων

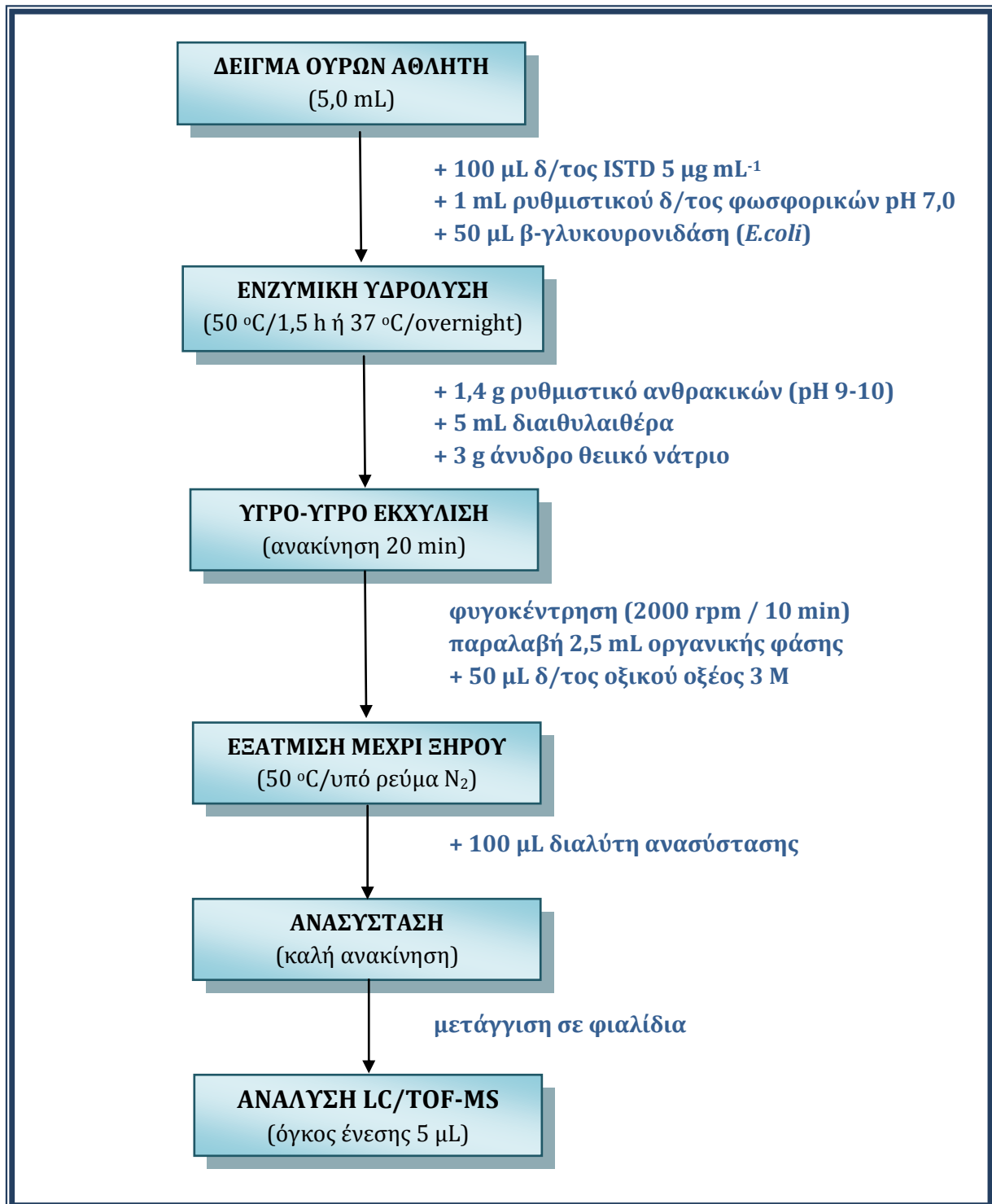
Όπως ήδη αναφέρθηκε, για την απομόνωση των αναλυτών από τα δείγματα ούρων, εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο κατεργασίας που ήδη εφαρμόζεται στο Εργαστήριο ελέγχου ντόπινγκ για τον έλεγχο σάρωσης αναβολικών ουσιών και κορτικοστεροειδών. Αντικείμενο στην παρούσα εργασία αποτέλεσε η μελέτη της απόδοσης της εφαρμογής του παραπάνω πρωτοκόλλου στην ανίχνευση και άλλων κατηγοριών απαγορευμένων ουσιών (διεγερτικών, ναρκωτικών και διουρητικών), οι οποίες από την ανάλυση προτύπων διαλυμάτων έδειξαν ότι ιονίζονται ικανοποιητικά με τις εφαρμοζόμενες συνθήκες LC/ESI-MS παρουσιάζοντας υψηλής έντασης σήματα στο σύστημα LC/QTOF-MS. Η εφαρμοζόμενη διαδικασία προκατεργασίας περιλαμβάνει σε πρώτο στάδιο την υδρόλυση των δειγμάτων ούρων με στόχο την διάσπαση των γλυκουρονικών εστέρων των αναλυτών και στη συνέχεια την απομόνωσή τους από το μητρικό υλικό με υγρό-υγρό εκχύλιση. Μοναδική παρεμβατική τροποποίηση στην ήδη εφαρμοζόμενη διαδικασία αποτέλεσε η προσθήκη διαλύματος

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Ανάπτυξη και αξιολόγηση μεθόδου σάρωσης απαγορευμένων ουσιών σε ούρα αθλητών με LC/TOF-MS

οξικού οξέος στην οργανική φάση πριν από την εξάτμιση αυτής, με σκοπό την αποφυγή ολικής ή μερικής απώλειας των υψηλής πτητικότητας αζωτούχων μικρομοριακών ενώσεων (π.χ. amphetamine, ephedrine, nikethamide, 4-methylhexanamine, tuaminoheptane κ.α.) κατά το στάδιο της εξάτμισης του οργανικού εκχυλίσματος.^{148,149}

Ακολουθεί αναλυτική περιγραφή των σταδίων προκατεργασίας των προς ανάλυση δειγμάτων ούρων. Το Σχήμα 5.1 που ακολουθεί συνοψίζει διαγραμματικά το εφαρμοζόμενο πρωτόκολλο. Τα προς ανάλυση δείγματα ούρων όγκου 5 mL μεταγγίζονται σε υάλινους ψηλούς βιδωτούς σωλήνες και προστίθενται σε αυτά 100 μ L διαλύματος εργασίας των εσωτερικών προτύπων (codeine και 17 α -methyltestosterone) συγκέντρωσης 5 μ g mL⁻¹. Στη συνέχεια, προστίθενται 1,0 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH=7,0 (4.4.3.1) και 100 μ L διαλύματος ενζύμου β -γλυκουρονιδάσης από *Escherichia coli* (4.4.2.19). Ακολουθεί ανάδευση των δειγμάτων και μεταφορά τους σε φούρνο στους (50 \pm 2) °C για 1,5 ώρα ή στους (37 \pm 2) °C καθ' όλη τη διάρκεια της νύχτας (overnight υδρόλυση). Μετά το πέρας της ενζυμικής υδρόλυσης και την επαναφορά των δειγμάτων σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθενται 1,4 g στερεού ρυθμιστικού μίγματος ανθρακικών NaHCO₃: Na₂CO₃ 10:1 (w/w) (4.4.2.17) και μετά από καλή ανάδευση των δειγμάτων γίνεται δειγματοληπτικός έλεγχος της τιμής του pH σε κάποια από αυτά (pH=9 – 10) με πεχαμετρικό χάρτη εύρους pH 7,5-14,0. Ακολουθεί η προσθήκη 5 mL διαιθυλαιθέρα (4.4.1.4) με διανεμητή υγρών (dispenser) και σταδιακή προσθήκη 3 g στερεού άνυδρου θειικού νατρίου (4.4.2.8), με ανάδευση μετά από κάθε προσθήκη, πωματισμός των σωλήνων και τοποθέτησή τους στους οριζόντιους και κάθετους ανακινητήρες προς ανακίνηση για 20 min. Μετά από αφαίρεση των πωμάτων και ισοβάρυση των σωλήνων (ανά πεντάδες), τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 2000 rpm για 10 min. Ακολουθεί μετάγγιση 2,5 mL οργανικής στοιβάδας σε επισημασμένους υάλινους κωνικούς σωλήνες, προσθήκη 50 μ L διαλύματος οξικού οξέος 3 M (4.4.2.18) και ανάδευση σε πολύ χαμηλή ένταση. Το οργανικό εκχύλισμα εξατμίζεται μέχρι ξηρού στους 50 °C και σε ρεύμα αζώτου και ακολουθεί η ανασύσταση των δειγμάτων με προσθήκη 100 μ L διαλύτη ανασύστασης (μίγμα διαλυτών κινητής φάσης (A)/(B) 80/20 (v/v), 4.4.2.22) και καλή ανάδευση και τέλος, η μετάγγιση των ανασυσταμένων δειγμάτων σε επισημασμένα υάλινα φιαλίδια του αυτόματου εισαγωγέα (vials με insert). Το Σχήμα 5.1 που ακολουθεί συνοψίζει διαγραμματικά το πρωτόκολλο προκατεργασίας των δειγμάτων ούρων που εφαρμόστηκε.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Ανάπτυξη και αξιολόγηση μεθόδου σάρωσης απαγορευμένων ουσιών σε ούρα αθλητών με LC/TOF-MS



Σχήμα 5.1: Πορεία κατεργασίας δειγμάτων ούρων για την ανίχνευση απαγορευμένων ουσιών σε ούρα αθλητών με LC/TOF-MS

5.7.2. Ανάλυση εμβολιασμένων δειγμάτων ούρων - προκαταρκτικές δοκιμές (pre-validation study)

Δύο διαφορετικές σειρές λευκών δειγμάτων ούρων (ούρα αθλητή και ούρα μικρού κοριτσιού, ελεύθερα απαγορευμένων ουσιών) εμβολιάστηκαν σε χωριστούς δοκιμαστικούς σωλήνες με καθένα από τα διαλύματα εργασίας των αναλυτών σε δύο επίπεδα συγκέντρωσης (που αντιστοιχούσαν στο MRPL και στο διπλάσιο του MRPL). Τα εμβολιασμένα δείγματα και ένα λευκό δείγμα από κάθε σειρά κατεργάστηκαν με την διαδικασία που περιγράφηκε και αναλύθηκαν με την προτεινόμενη μέθοδο LC/QTOF-MS, όπου διαπιστώθηκε ότι σε συγκέντρωση ίση με το MRPL το μεγαλύτερο μέρος των αναλυτών έδωσε χρωματογραφικές κορυφές με ικανοποιητικό σήμα προς θόρυβο (μεγαλύτερο του 10), ενώ χαμηλής έντασης κορυφές ή/και αδυναμία ανίχνευσης παρουσίασε ένας αριθμός αναβολικών παραγόντων. Ουσίες με σήματα υψηλής έντασης όπως οι β-ανταγωνιστές, τα ναρκωτικά και οι διεγερτικές ουσίες, ανιχνεύθηκαν σε συγκεντρώσεις διπλάσιες του MRPL δίνοντας ικανοποιητικές χρωματογραφικές κορυφές και σφάλματα μέτρησης ακριβούς μάζας αντίστοιχα με αυτά που προέκυψαν από την ανάλυση προτύπων διαλυμάτων, χωρίς να παρουσιαστούν προβλήματα που να σχετίζονται με κορεσμό του ανιχνευτή του φασματομετρικού συστήματος. Οι εντάσεις των σημάτων που παρατηρήθηκαν για κάθε κατηγορία απαγορευμένων ουσιών αποτέλεσαν αντικείμενο μελέτης στο στάδιο των προκαταρκτικών δοκιμών προκειμένου να ληφθεί η απόφαση για τα επίπεδα των συγκεντρώσεων που θα μελετηθούν στη συνέχεια κατά το στάδιο της αξιολόγησης της μεθόδου.

5.8. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΑΡΩΣΗΣ LC/QTOF-MS ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΠΑΓΟΡΕΥΜΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΕ ΟΥΡΑ ΑΘΛΗΤΩΝ

5.8.1. Εισαγωγή

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε αξιολογήθηκε με βάση τις προδιαγραφές του WADA^{16,150}, τις οδηγίες αξιολόγησης μεθόδων της Eurachem¹⁵¹, καθώς και τη διεθνή επιστημονική βιβλιογραφία^{114,117,152-156}. Λαμβάνοντας υπόψη ότι η προτεινόμενη μέθοδος αφορά την ποιοτική ανίχνευση απαγορευμένων ουσιών, οι παράμετροι που μελετήθηκαν κατά την αξιολόγησή της ήταν οι ακόλουθες:

- Ικανότητα ανίχνευσης των εξεταζόμενων των ουσιών (detection capability) και προσδιορισμός του ορίου ανίχνευσης (limit of detection, LOD)
- Ειδικότητα (specificity) – Παρεμποδίσεις από το υπόστρωμα (matrix interferences)
- Ανάκτηση (extraction recovery)
- Επίδραση υποστρώματος (matrix effect)
- Επαναληψιμότητα (repeatability)
- Ικανότητα-ακρίβεια μέτρησης λόγου m/z (mass accuracy)
- Έλεγχος επιμόλυνσης εκ μεταφοράς δείγματος (carry over)

5.8.2. Ικανότητα ανίχνευσης εξεταζόμενων ουσιών – Όριο ανίχνευσης (LOD)

Για τη μελέτη της ικανότητας ανίχνευσης και τον προσδιορισμό του ορίου ανίχνευσης των εξεταζόμενων ουσιών, για τις οποίες υπήρχαν διαθέσιμες ουσίες αναφοράς, παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν εμβολιασμένα δείγματα ούρων σε διαφορετικά επίπεδα συγκέντρωσης. Για το σκοπό αυτό, επιλέχθηκαν δέκα διαφορετικές παρτίδες λευκών δειγμάτων ούρων. Για κάθε παρτίδα ούρων παρασκευάστηκαν δείγματα εμβολιασμένα με τα πολυσυστατικά διαλύματα των αναλυτών σε επίπεδα συγκέντρωσης που σχετίζονταν με το MRPL (0,1 x MRPL, 0,2 x MRPL, 0,5 x MRPL, MRPL, 2 x MRPL και 4 x MRPL), τα οποία αναλύθηκαν μαζί με το αντίστοιχο λευκό δείγμα με την προτεινόμενη μέθοδο LC/QTOF-MS. Η πορεία παρασκευής των εμβολιασμένων δειγμάτων ούρων για τη μελέτη του ορίου ανίχνευσης παρατίθεται στο [Παράρτημα 5](#). Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε 5 εργαστηριακές ημέρες, εξετάζοντας δυο διαφορετικές παρτίδες ούρων κάθε ημέρα.

Καθώς ο βασικός στόχος των προσανατολιστικών μεθόδων σάρωσης (screening methods) είναι η διάκριση μεταξύ θετικών και αρνητικών δειγμάτων, μελετήθηκε για κάθε αναλύτη ο συνολικός αριθμός θετικών ευρημάτων στο σύνολο των δέκα διαφορετικών εμβολιασμένων δειγμάτων ούρων σε κάθε επίπεδο συγκέντρωσης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο [Παράρτημα 6](#). Το όριο ανίχνευσης προσδιορίστηκε ως η ελάχιστη μελετούμενη συγκέντρωση στην οποία κάθε αναλύτης ανιχνεύεται με λόγο σήμα προς θόρυβο μεγαλύτερο από 3 και στα δέκα δείγματα ούρων που εξετάστηκαν (αριθμός θετικών ευρημάτων 10/10). Για την εξαγωγή των ιοντικών χρωματογραφημάτων των αναλυτών χρησιμοποιήθηκε παράθυρο ανοχής ακρίβειας $m/z \pm 50$ ppm.

Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο Παράρτημα 6, όλες οι διουρητικές ουσίες (με εξαίρεση την ουσία acetazolamide με LOD 50 ng mL⁻¹), τα διεγερτικά (με εξαίρεση τις ουσίες amiphenazole, MDA, etilefrine, phenylephrine και synephrine με όρια ανίχνευσης 100, 250, 100 και 250 ng mL⁻¹, αντίστοιχα), και το σύνολο των ναρκωτικών

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Ανάπτυξη και αξιολόγηση μεθόδου σάρωσης απαγορευμένων ουσιών σε ούρα αθλητών με LC/TOF-MS

ουσιών και των β-αναστολέων ανιχνεύονται επιτυχώς στο σύνολο των εξεταζόμενων ούρων σε συγκεντρώσεις που αντιστοιχούν στο υποδεκαπλάσιο του ελάχιστου ορίου που καθορίζει ο WADA.

5.8.3. Ειδικότητα (specificity) – Έλεγχος παρεμποδίσεων από το υπόστρωμα (matrix interference)

Για την αξιολόγηση της ειδικότητας της προτεινόμενης μεθόδου, 20 διαφορετικά λευκά δείγματα ούρων αθλητών κατεργάστηκαν και αναλύθηκαν, με σκοπό να ελεγχθεί η ύπαρξη παρεμποδιστικών κορυφών σε χρόνους ανάλυσης κοντά στο χρόνο έκλουσης των αντίστοιχων αναλυτών στα εκλεκτικά χρωματογραφήματα των χαρακτηριστικών ιόντων των μελετούμενων ουσιών (extracted ion chromatograms). Για την πλειοψηφία των εξεταζόμενων ουσιών δε διαπιστώθηκαν παρεμποδιστικές κορυφές από το υπόστρωμα και για τα 20 διαφορετικά δείγματα ούρων που αναλύθηκαν. Εξάιρεση σε αυτό αποτελούν οι ουσίες oxilofrine, oxandrolone mt., bolasterone mt., methenolone mt., norethandrolone mt.1, oxymesterone, boldenone mt., 5α-tetrahydronorethisterone, furazabol mt. και 1-testosterone, καθώς για αυτές παρατηρήθηκαν παρεμποδίσεις από το υπόστρωμα των ούρων, καθιστώντας αδύνατη την ανίχνευσή τους με την προτεινόμενη μέθοδο.

Μικρής έντασης παρεμποδιστικές κορυφές σε κάποια από τα λευκά δείγματα που αναλύθηκαν διαπιστώθηκαν για την αναβολική ουσία methyltrienolone. Προκειμένου να αποφευχθεί η έναρξη επιβεβαιωτικής διαδικασίας για δείγματα αθλητών που παρουσιάζουν ψευδώς-θετική εικόνα ύπαρξης της ουσίας methyltrienolone, ακολούθησε επιπλέον για τα ύποπτα δείγματα του screening LC/QTOF-MS/MS ανάλυση, με χρωματογραφικές συνθήκες αντίστοιχες με αυτές της μεθόδου σάρωσης. Στην ανάλυση αυτή στο χρονικό παράθυρο έκλουσης της ουσίας methyltrienolone ((7,8 ±0,5) min) η λειτουργία του φασματομέτρου QTOF-MS ρυθμίστηκε κατάλληλα για την ταυτόχρονη λήψη φασμάτων πλήρους σάρωσης και φασμάτων σάρωσης θυγατρικών ιόντων μετά από απομόνωση του πρωτονιωμένου μοριακού ιόντος της παραπάνω ουσίας (m/z 285) και θραυσματοποίηση αυτού με ενέργεια 25 V στο θάλαμο συγκρούσεων (λειτουργία targeted MS/MS mode). Στο [Παράρτημα 7](#) παρουσιάζεται το φάσμα σάρωσης θυγατρικών ιόντων του πρωτονιωμένου μοριακού ιόντος της ουσίας methyltrienolone, μαζί με τα σφάλματα μέτρησης μάζας για τα διαγνωστικά ιόντα, όπως αυτά ελήφθησαν μετά από την ανάλυση εμβολιασμένου δείγματος ούρων συγκέντρωσης 5 ng mL⁻¹, μαζί με τα αντίστοιχα ιοντικά χρωματογραφήματα του εμβολιασμένου δείγματος και ενός λευκού δείγματος ούρων που κατά την ανάλυση πλήρους σάρωσης έδωσε ψευδώς-θετικό σήμα για την παραπάνω ουσία.

5.8.4. Ανάκτηση (Extraction recovery)

Για τον έλεγχο της ανάκτησης της εκχυλιστικής πορείας που εφαρμόστηκε στην προτεινόμενη μεθοδολογία, λευκά δείγματα ούρων εμβολιάστηκαν με τους αναλύτες σε συγκέντρωση αντίστοιχη του MRPL και κατεργάστηκαν με τη πορεία που περιγράφηκε σε προηγούμενη παράγραφο, μαζί με τα αντίστοιχα λευκά δείγματα ούρων, τα οποία εμβολιάστηκαν με τους αναλύτες στο ίδιο επίπεδο συγκέντρωσης κατά τη φάση συλλογής

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Ανάπτυξη και αξιολόγηση μεθόδου σάρωσης απαγορευμένων ουσιών σε ούρα αθλητών με LC/TOF-MS

του οργανικού εκχυλίσματος, δηλαδή πριν το στάδιο της εξάτμισης του διαιθυλαιθέρα. Η εκατοστιαία ανάκτηση (% Extraction Recovery, % E) για κάθε αναλύτη υπολογίστηκε από το λόγο της επιφάνειας της χρωματογραφικής κορυφής του αναλύτη στο δείγμα ούρων που εμβολιάστηκε πριν την εκχυλιστική διαδικασία ($R_{\text{πριν}}$) προς την επιφάνεια της κορυφής του ίδιου αναλύτη στο δείγμα που εμβολιάστηκε μετά την εκχύλιση ($R_{\text{μετά}}$) (εξίσωση 5.2). Ο έλεγχος ανάκτησης πραγματοποιήθηκε σε 6 διαφορετικές παρτίδες ούρων σε διαφορετικές εργαστηριακές ημέρες και σε συγκέντρωση αντίστοιχη του MRPL για κάθε αναλύτη και τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα 5.2, όπου παρουσιάζεται για κάθε αναλύτη η μέση τιμή της εκατοστιαίας ανάκτησης και η τυπική απόκλιση μεταξύ των διαφορετικών υποστρωμάτων ούρων και των διαφορετικών ημερών.

$$\% E \text{ (εκατοστιαία ανάκτηση)} = 100 \times \frac{R_{\text{πριν}}}{R_{\text{μετά}}} \quad [5.2]$$

5.8.5. Επίδραση υποστρώματος (matrix effect)

Ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα κατά τη χρησιμοποίηση των συστημάτων LC/MS αποτελεί το φαινόμενο της ιοντικής καταστολής (ion suppression phenomenon) που παρατηρείται στην τεχνική της φασματομετρία μαζών και κυρίως σε συστήματα με πηγή ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό και αφορά στην καταστολή του σήματος του αναλύτη από ουσίες του υποστρώματος που συνεκλούνται και εισέρχονται ταυτόχρονα με αυτόν στην πηγή ιοντισμού και μπορεί να οδηγήσει σε δραστική μείωση της ευαισθησίας της αναλυτικής μεθόδου, με κίνδυνο ακόμα την εσφαλμένη εξαγωγή ψευδώς-αρνητικού αποτελέσματος. Η ένταση του φαινομένου μπορεί να διαφέρει από το ένα δείγμα στο άλλο. Για την εκτίμηση της επίδρασης του υποστρώματος στο σήμα του κάθε αναλύτη υπολογίστηκε ο % παράγοντας υποστρώματος (% Matrix Factor, % MF) συγκρίνοντας το σήμα που λαμβάνεται μετά την ανάλυση κατεργασμένου λευκού δείγματος ούρων, το οποίο εμβολιάστηκε με τους αναλύτες πριν την εξάτμιση του οργανικού διαλύτη ($R_{\text{μετά}}$), με το σήμα του αναλύτη σε διάλυμα αντίστοιχης συγκέντρωσης παρασκευασμένο σε διαλύτη ανασύστασης ($R_{\text{διάλυμα}}$) (εξίσωση 5.3)¹⁵⁷. Η μελέτη της επίδρασης του υποστρώματος πραγματοποιήθηκε σε έξι διαφορετικά λευκά δείγματα ούρων και σε συγκέντρωση αντίστοιχη του MRPL για κάθε αναλύτη, ενώ παράλληλα εκτιμήθηκε και η τυπική απόκλιση της πτώσης του σήματος μεταξύ των διαφορετικών παρτίδων ούρων. Τα αποτελέσματα της μελέτης συνοψίζονται στον Πίνακα 5.2.

$$\% MF \text{ (% παράγοντας υποστρώματος)} = 100 \times \frac{R_{\text{μετά}}}{R_{\text{διάλυμα}}} \quad [5.3]$$

5.8.6. Επαναληψιμότητα

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η προτεινόμενη μέθοδος έχει σκοπό την ποιοτική ανίχνευση των εξεταζόμενων ουσιών σε ούρα αθλητών και για το λόγο αυτό, η μελέτη επαναληψιμότητας περιορίστηκε για κάθε αναλύτη στα κάτωθι:

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Ανάπτυξη και αξιολόγηση μεθόδου σάρωσης απαγορευμένων ουσιών σε ούρα αθλητών με LC/TOF-MS

- μελέτη της επαναληψιμότητας του σχετικού χρόνου ανάσχεσης ως προς το εσωτερικό πρότυπο 17α-methyltestosterone (Relative Retention Time, RRT), που πραγματοποιήθηκε σε 10 εργαστηριακές ημέρες σε συνολικό διάστημα ενός μήνα.
- μελέτη της μεταξύ των ημερών διακύμανσης της σχετικής απόκρισης κάθε αναλύτη (ως προς το εσωτερικό πρότυπο 17α-methyltestosterone), που πραγματοποιήθηκε με την παρασκευή και ανάλυση εμβολιασμένων δειγμάτων ούρων σε 4 εργαστηριακές ημέρες και σε συγκέντρωση ίση με το διπλάσιο του MRPL για κάθε αναλύτη.

Τα αποτελέσματα μελέτης της επαναληψιμότητας παρουσιάζονται στο [Παράρτημα 6](#).

5.8.7. Ικανότητα - Ακρίβεια μέτρησης λόγου m/z (mass accuracy)

Μελετήθηκε η ικανότητα ακριβούς μέτρησης του λόγου m/z των κύριων διαγνωστικών ιόντων των αναλυτών (ιόντων που παρουσίασαν τη μεγαλύτερη αφθονία και αποδεκτή εκλεκτικότητα) σε εμβολιασμένα δείγματα ούρων στο επίπεδο του MRPL. Για κάθε αναλύτη προσδιορίστηκε το σφάλμα λόγου μάζας προς φορτίο (mass error) σε ppm σε σχέση με τη θεωρητικά υπολογιζόμενη (με βάση το μοριακό τύπο) τιμή m/z και για τα 10 διαφορετικά δείγματα ούρων που εξετάστηκαν κατά τον έλεγχο της ικανότητας ανίχνευσης (παράγραφος 5.8.2) και υπολογίστηκε η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση της απόλυτης τιμής των σφαλμάτων αυτών. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.2.

Παράλληλα αξιολογήθηκε και η ικανότητα ακριβούς μέτρησης του λόγου m/z και στα δείγματα ούρων που εμβολιάστηκαν με τους αναλύτες σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες του MRPL και αναλύθηκαν κατά τον προσδιορισμό του ορίου ανίχνευσης, με σκοπό να ελεγχθεί η διακύμανση του σφάλματος μάζας ανάλογα με τη συγκέντρωση του αναλύτη και τα αποτελέσματα συνοψίζονται στο [Παράρτημα 6](#).

5.8.8. Έλεγχος επιμόλυνσης (carry over)

Ο έλεγχος επιμόλυνσης πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφική ανάλυση ενός λευκού δείγματος ούρων μετά από ένα πρότυπο δείγμα εμβολιασμένο με τους αναλύτες σε συγκέντρωση διπλάσια του MRPL. Η αλληλουχία ανάλυσης των δειγμάτων αυτών ήταν:

- Λευκό δείγμα
- Πρότυπο δείγμα
- Λευκό δείγμα
- Πρότυπο δείγμα
- Λευκό δείγμα

Από την εξέταση των χρωματογραφικών δεδομένων στα παραπάνω λευκά δείγματα, διαπιστώθηκε η απουσία επιμόλυνσης εκ μεταφοράς μεταξύ των δειγμάτων.

5.8.9. Ανάλυση μεταβολικών δειγμάτων

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, για ορισμένες από τις απαγορευμένες ουσίες που μελετήθηκαν και για ορισμένους μεταβολίτες απαγορευμένων ουσιών δεν υπήρχαν διαθέσιμες πρότυπες ουσίες αλλά δείγματα ούρων προερχόμενα από μεταβολικές μελέτες. Αναλύθηκαν είτε πλήρεις σειρές μεταβολικών δειγμάτων που ελήφθησαν σε διαδοχικά χρονικά διαστήματα,

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Ανάπτυξη και αξιολόγηση μεθόδου σάρωσης απαγορευμένων ουσιών σε ούρα αθλητών με LC/TOF-MS

είτε τα δείγματα στα οποία είχε ανιχνευθεί από το Εργαστήριο ο μέγιστος αριθμός μεταβολιτών για κάθε ουσία μετά από ανάλυση των δειγμάτων αυτών με τεχνολογίες GC/MS ή GC/HRMS. Στο [Παράρτημα 8](#) παρουσιάζονται συνοπτικά οι απαγορευμένες ουσίες για τις οποίες αναλύθηκαν μεταβολικά δείγματα και οι αναλύτες που ανιχνεύθηκαν σε καθένα από αυτά.

Σημειώνεται ότι για τις ουσίες που ανιχνεύθηκαν από μεταβολικά δείγματα, λόγω της έλλειψης προτύπων και λαμβάνοντας υπόψη τον περιορισμένο διαθέσιμο όγκο ούρων για τα δείγματα αυτά, δεν ήταν δυνατός ο έλεγχος όλων των παραμέτρων αξιολόγησης της προτεινόμενης μεθόδου. Κατά συνέπεια, η ικανότητα της μεθόδου για την ανίχνευση των εν λόγω ουσιών περιορίστηκε στην κατεργασία και ανάλυση των παραπάνω δειγμάτων μαζί με λευκά δείγματα ούρων, με στόχο την εύρεση του απόλυτου και σχετικού χρόνου ανάσχεσης, την ακρίβεια μέτρησης του λόγου m/z , τον έλεγχο απουσίας παρεμποδιστικών κορυφών ή συνέκλωσης άλλων ουσιών στους αντίστοιχους χρόνους ανάσχεσης. Οι κύριοι αναλύτες που ανιχνεύθηκαν από την ανάλυση μεταβολικών δειγμάτων συμπεριλαμβάνονται στον Πίνακα 5.2 και σημειώνονται σε αυτόν με έναν αστερίσκο.

5.9. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΠΡΟΤΕΙΝΟΜΕΝΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΑΡΩΣΗΣ LC/QTOF-MS ΣΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Η καταλληλότητα της μεθόδου στην ανίχνευση των 266 απαγορευμένων ουσιών σε πραγματικά δείγματα αθλητών, μελετήθηκε με την ανάλυση πραγματικών θετικών δειγμάτων ούρων. Τα δείγματα αυτά, είτε αποτελούσαν δείγματα αθλητών στα οποία είχε ανιχνευθεί και επιβεβαιωθεί η ύπαρξη κάποιας απαγορευμένης ουσίας με τις ήδη εφαρμοζόμενες αναλυτικές διαδικασίες και τεχνολογίες του Εργαστηρίου, είτε προέρχονταν από ελέγχους εξωτερικής αξιολόγησης ποιότητας (external quality assessment scheme – Proficiency Test).^{16,150} Οι έλεγχοι αυτοί πραγματοποιούνται από το WADA ανά τρίμηνο στα πλαίσια των υποχρεώσεων ενός διαπιστευμένου Εργαστηρίου Ελέγχου Ντόπινγκ ως μέσο παρακολούθησης των δυνατοτήτων του εργαστηρίου και αξιολόγησης της ικανότητάς του να πραγματοποιεί ελέγχους φαρμακοδιέγερσης και ως μέσο βελτιστοποίησης της ομοιομορφίας στην απόδοση θετικών αποτελεσμάτων ελέγχου μεταξύ των διαπιστευμένων Εργαστηρίων. Ο έλεγχος αυτός περιλαμβάνει μια σειρά δειγμάτων ούρων που αποστέλλονται από το WADA στο Εργαστήριο και τα οποία μπορεί ή όχι να περιέχουν μια ή περισσότερες απαγορευμένες ουσίες. Τα δείγματα αυτά αναλύονται με τις διαπιστευμένες μεθόδους από το Εργαστήριο και τα αποτελέσματά τους αποστέλλονται στον WADA προς αξιολόγηση και σύγκριση με τα αποτελέσματα των άλλων εργαστηρίων.

Στην παρούσα εργασία, αναλύθηκαν θετικά δείγματα για όλες τις κατηγορίες απαγορευμένων ουσιών που μελετήθηκαν, σε χρονικό διάστημα έξι μηνών. Τα δείγματα αυτά παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν, μαζί με ένα λευκό δείγμα ούρων και πρότυπα δείγματα εμβολιασμένα με τους αναλύτες στο MRPL. Στο [Παράρτημα 11](#) παρουσιάζονται οι ουσίες που ανιχνεύθηκαν στα παραπάνω δείγματα με την προτεινόμενη μέθοδο, αλλά και με τις ήδη εφαρμοζόμενες μεθόδους του Εργαστηρίου και τα αντίστοιχα ιοντικά χρωματογραφήματα για κάθε αναλύτη μαζί με το υπολογιζόμενο σφάλμα μέτρησης του

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Ανάπτυξη και αξιολόγηση μεθόδου σάρωσης απαγορευμένων ουσιών σε ούρα αθλητών με LC/TOF-MS

λόγου m/z σε σχέση με τη θεωρητική τιμή και τη διαφορά του χρόνου ανάλυσης σε σχέση με το εμβολιασμένο δείγμα αναφοράς που αναλύθηκε με την ίδια παρτίδα δειγμάτων.

5.10 ΑΝΑΔΡΟΜΙΚΗ ΕΠΑΝΕΞΕΤΑΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ (Retrospective analysis)

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η Λίστα απαγορευμένων ουσιών του WADA ανανεώνεται και εκδίδεται σε ετήσια βάση, περιλαμβάνοντας κάθε χρόνο ολοένα και περισσότερες ουσίες. Τα τελευταία χρόνια, ουσίες (κυρίως στεροειδή, αλλά όχι μόνο) με τροποποιημένη χημική δομή ως προς ήδη γνωστές απαγορευμένες ουσίες, που δεν έχουν κλινική εφαρμογή και είτε συντέθηκαν παλιότερα, είτε σχεδιάζονται και συντίθενται σκόπιμα με στόχο την ενίσχυση της απόδοσης, γίνονται γνωστές στις αρμόδιες αρχές που ασχολούνται με το ντόπινγκ. Τόσο το WADA, όσο και τα διαπιστευμένα από αυτό εργαστήρια καταβάλλουν μεγάλες προσπάθειες για την ανακάλυψη τέτοιων ουσιών, γνωστών και ως designer drugs και την ενσωμάτωσή τους στη Λίστα απαγορευμένων ουσιών. Αξίζει να σημειώσουμε ότι στη Λίστα του WADA για πολλές κατηγορίες ουσιών υπάρχει μετά την ονομαστική παράθεση συγκεκριμένων ενώσεων η φράση «και άλλες παρεμφερείς ουσίες».

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Κώδικα Αντι-Ντόπινγκ του WADA, δείγματα αθλητών που έχουν ήδη αναλυθεί είναι δυνατό να επαναλυθούν από τα Εργαστήρια σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή με αποκλειστική οδηγία από το WADA ή την αρχή που συνέλεξε το δείγμα, όπως π.χ. μετά από εμφάνιση μιας νέας απαγορευμένης ουσίας.^{16,158} Πρόσφατα, ο Οργανισμός Αντι-Ντόπινγκ της Αυστραλίας (ASADA), ανακοίνωσε την φύλαξη (διατήρηση, αποθήκευση) των δειγμάτων ούρων και αίματος για διάστημα τουλάχιστον οκτώ ετών, με σκοπό να είναι δυνατή η μελλοντική επανεξέτασή τους (π.χ με νέες τεχνολογίες).¹⁵⁹ Κατά την ανάλυση σάρωσης δειγμάτων ρουτίνας ούρων αθλητών το 2009 με τη Διαδικασία I (αεριοχρωματογραφική (GC/NPD) ανάλυση βασικού οργανικού εκχυλίσματος ούρων για την ανίχνευση διεγερτικών και ναρκωτικών ουσιών που απεκκρίνονται ελεύθερες με τα ούρα), η τυχαία λήψη φασμάτων GC/MS πλήρους σάρωσης και αναζήτηση/σύγκριση με βιβλιοθήκες φασμάτων γνωστών ουσιών ανέδειξε με αφορμή το δείγμα ενός αθλητή τη χρήση μιας ύποπτης ουσίας. Πρόκειται για την ουσία 4-methyl-2-hexanamine, η οποία στη συνέχεια χαρακτηρίστηκε από το WADA ως απαγορευμένη και εντάχθηκε στην κατηγορία των διεγερτικών ουσιών. Μετά την παραλαβή προτύπου αναφοράς, η ουσία αυτή συμπεριλήφθηκε στους αναλύτες που ανιχνεύονται επιτυχώς με την προτεινόμενη μέθοδο, δίνοντας ικανοποιητικά αποτελέσματα κατά τη μελέτη όλων των παραμέτρων αξιολόγησης. Στη συνέχεια έγινε εκ νέου επεξεργασία σε όλα τα αρχεία των δειγμάτων αθλητών του Εργαστηρίου που φυλάσσονταν ακόμα στο Εργαστήριο και που είχαν αναλυθεί με την αναπτυχθείσα μέθοδο σάρωσης LC/TOF-MS, προκειμένου να ελεγχθεί τυχόν λήψη της ουσίας 4-methyl-2-hexanamine και από άλλους αθλητές στο κοντινό παρελθόν. Με τον τρόπο αυτό βρέθηκαν ακόμα 11 επιπλέον ύποπτα δείγματα, τα οποία είχαν χαρακτηριστεί ως αρνητικά, ακολούθησε επιβεβαιωτική επανανάλυση των δειγμάτων αυτών, η οποία επιβεβαίωσε την ύπαρξη της παραπάνω ουσίας και στα 11 αυτά δείγματα, τα οποία τελικά χαρακτηρίστηκαν ως θετικά δείγματα στις αρμόδιες αρχές.

5.11. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στον Πίνακα 5.2 παρουσιάζονται όλοι οι αναλύτες που ανιχνεύθηκαν στα ούρα με την προτεινόμενη μέθοδο σάρωσης και συνοψίζονται τα αποτελέσματα αξιολόγησης της μεθόδου για καθέναν από αυτούς. Για κάθε αναλύτη αναφέρεται ο χρόνος έκλουσης και το ιόν που παρουσιάζει την υψηλότερη αφθονία ταυτόχρονα με ικανοποιητική εκλεκτικότητα στα εμβολιασμένα δείγματα ούρων που αναλύθηκαν. Στο [Παράρτημα 9](#) παρατίθενται τυπικά χρωματογραφήματα που ελήφθησαν από την ανάλυση δειγμάτων ούρων εμβολιασμένων με τους αναλύτες σε συγκέντρωση αντίστοιχη του MRPL για κάθε αναλύτη, καθώς και χρωματογραφήματα των αναλυτών που ανιχνεύθηκαν από την ανάλυση μεταβολικών δειγμάτων.

Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός των αναλυτών επιτεύχθηκε με τη χρησιμοποίηση χρωματογραφικής στήλης C18 με μέγεθος σωματιδίων 1,8 μm (χρωματογραφία υπερυψηλής απόδοσης, UHPLC), με αποτέλεσμα την επίτευξη κορυφών μικρού εύρους (10 sec) και κατά συνέπεια, την αύξηση της ευαισθησίας και τον ικανοποιητικό διαχωρισμό των αναλυτών από συστατικά του υποστρώματος των ούρων. Όπως ήδη αναφέρθηκε, εφαρμόστηκε πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης, στην αρχή του οποίου πραγματοποιήθηκε η έκλυση των περισσότερων υδρόφιλων μορίων (π.χ. ecgonine methylester, morphine, etilefrine, phenylephrine, atenolol), ενώ προς το τέλος της ανάλυσης παρατηρείται η έκλυση της πλειοψηφίας των αναβολικών στεροειδών και ταυτόχρονα, με τη διατήρηση υψηλού ποσοστού οργανικού τροποποιητή πραγματοποιήθηκε η έκπλυση της χρωματογραφικής στήλης και του συστήματος πριν την έναρξη της επόμενης ανάλυσης. Οι αναλύτες που συνεκλούνται διαχωρίζονται λόγω των διαφορετικών τιμών m/z των ανιχνευόμενων ιόντων τους (με εξαίρεση τις ουσίες norphedrine-pseudoephedrine και ephedrine-pseudoephedrine). Από τη μελέτη επαναληψιμότητας που πραγματοποιήθηκε σε διάστημα 15 ημερών διαπιστώθηκε ότι οι σχετικοί χρόνοι ανάσχεσης παραμένουν σταθεροί με σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) μικρότερη από 0,8 % (μέση τιμή % RSD για όλους του αναλύτες 0,2) ([Παράρτημα 6](#)). Διαπιστώθηκε επίσης διατήρηση σταθερής συμπεριφοράς της χρωματογραφικής στήλης για την ανάλυση περίπου 1200 δειγμάτων ούρων με την προτεινόμενη μεθοδολογία.

Η ακρίβεια μέτρησης των τιμών m/z των ανιχνευόμενων ιόντων των αναλυτών μελετήθηκε σε δέκα διαφορετικά δείγματα ούρων και σε διαφορετικά επίπεδα συγκέντρωσης, πολλαπλάσια του MRPL. Στον Πίνακα 6.2 παρουσιάζεται για το επίπεδο του MRPL η υπολογισθείσα μέση τιμή του απόλυτου σφάλματος μάζας και η τυπική απόκλιση για τα δέκα διαφορετικά υποστρώματα που εμβολιάστηκαν με τους αναλύτες. Για τα αναβολικά στεροειδή που σχηματίζουν πρωτονιωμένα μοριακά ιόντα και για τους αναλύτες των υπολοίπων απαγορευμένων κατηγοριών, το σφάλμα μάζας στο επίπεδο του MRPL δεν ξεπέρασε τα 20 ppm και για τις περισσότερες ουσίες οι τιμές του σφάλματος που υπολογίστηκαν στα εμβολιασμένα δείγματα ούρων δεν παρουσίασαν μεγάλες διαφορές από αυτές που υπολογίστηκαν κατά την ανάλυση προτύπων διαλυμάτων (εξαίρεση αποτελεί η ουσία methoxyphenamine για την οποία διαπιστώθηκαν ασυνήθιστα μεγάλες τιμές σφάλματος που σε πολλές περιπτώσεις υπερέβαιναν τα 50 ppm). Για την πλειονότητα των αναλυτών αυτών, το παρατηρούμενο σφάλμα δεν ξεπέρασε τα 20 ppm στα διαφορετικά υποστρώματα που εξετάστηκαν ακόμα και στα δείγματα που εμβολιάστηκαν

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Ανάπτυξη και αξιολόγηση μεθόδου σάρωσης απαγορευμένων ουσιών σε ούρα αθλητών με LC/TOF-MS

στο επίπεδο συγκέντρωσης που αντιστοιχεί στο LOD του κάθε αναλύτη. Για τα αναβολικά στεροειδή που ανιχνεύονται με τη μορφή ιόντων προσθήκης ή με τη μορφή θυγατρικών ιόντων που σχηματίζονται μετά από θραυσματοποίηση στην πηγή ιοντισμού, διαπιστώθηκαν μεγαλύτερα σφάλματα που φτάνουν στο επίπεδο του MRPL τα 80 ppm και ταυτόχρονα παρουσιάζουν και σχετικά μεγάλες διακυμάνσεις μεταξύ των διαφορετικών υποστρωμάτων. Κάτι τέτοιο πιθανώς να οφείλεται στη χαμηλή αφθονία των συγκεκριμένων ιόντων, τα οποία έδωσαν χαμηλής έντασης χρωματογραφικές κορυφές, αφού παρατηρήθηκε ότι τα σφάλματα μάζας βελτιώνονται σημαντικά για τους αναλύτες αυτούς σε υψηλότερες συγκεντρώσεις που αντιστοιχούν στο τετραπλάσιο του MRPL. Γενικά υψηλά σφάλματα μαζών διαπιστώθηκαν για χαμηλής έντασης σήματα ($abundance < 2 \cdot 10^4$). Αντίθετα, για ουσίες με πολύ υψηλά σήματα ($abundance < 5 \cdot 10^6$) δεν παρατηρήθηκαν μεγάλα σφάλματα, καθώς η λειτουργία του συστήματος σε συχνότητα 2 GHz, προσδίδει στον ανιχνευτή ADC του φασματομέτρου μαζών το βέλτιστο δυνατό δυναμικό εύρος, αποφεύγοντας έτσι την εμφάνιση φαινομένων κορεσμού, ακόμα και σε περίπτωση ταυτόχρονης έκλυσης υψηλής έντασης ιόντων δύο ή και περισσότερων αναλυτών ή/και συστατικών των ούρων.

Απαγορευμένες ουσίες ή μεταβολίτες απαγορευμένων ουσιών μη εμπορικά διαθέσιμοι ανιχνεύθηκαν μετά από ανάλυση μεταβολικών δειγμάτων. Για τους αναλύτες αυτούς δεν ήταν δυνατό να προσδιοριστούν παράμετροι όπως η εκχυλιστική απόδοση, το όριο ανίχνευσης και η επίδραση υποστρώματος. Παράλληλα, αναλύθηκαν μεταβολικά δείγματα που ελήφθησαν μετά από λήψη των ουσιών *etilefrine*, *ethamivan* και *sydnocarb*, οι οποίες σύμφωνα με τη βιβλιογραφία απεκκρίνονται στα ούρα συζευγμένες με θειικό οξύ. Τα δείγματα αυτά κατεργάστηκαν και αναλύθηκαν με την προτεινόμενη μέθοδο και ανιχνεύθηκε σε αυτά η ελεύθερη μορφή των ουσιών *etilefrine*, *ethamivan* και *p-hydroxysydnocarb*, αντίστοιχα, δίνοντας υψηλής έντασης χρωματογραφικές κορυφές στους αναμενόμενους χρόνους ανάλυσης.

Συνολικά, από τις 232 απαγορευμένες ουσίες που ήταν διαθέσιμες ως υλικά αναφοράς και εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία, οι 208 συμπεριλήφθησαν στους αναλύτες που μπορούν να ανιχνευθούν με την προτεινόμενη μεθοδολογία. Στον Πίνακα 5.3 παρουσιάζονται οι εξεταζόμενες ουσίες που δεν ανιχνεύθηκαν με την προτεινόμενη μέθοδο, είτε λόγω χαμηλής εκχυλιστικής ικανότητας (π.χ. *dichlorphenamide*, *ritalinic acid*, *fluticasone*, *octopamine*), είτε λόγω ύπαρξης παρεμποδιστικών κορυφών από το υπόστρωμα των ούρων (π.χ. *oxilofrine*, *1-testosterone*, *methenolone met.*, *boldenone met.*), είτε λόγω ανεπαρκούς ιοντισμού του μορίου στις συνθήκες που εφαρμόστηκαν. Για παράδειγμα, οι ουσίες *5 α -tetrahydronorethisterone*, *16 β -hydroxyfurazabol*, *17 α -methyltestosterone metabolites*, *norbolethone metabolite 1*, οι οποίες όπως διαπιστώθηκε από την ανάλυση προτύπων διαλυμάτων σχηματίζουν χαμηλής έντασης ιόντα προσθήκης ή θραυσματοποιημένα ιόντα κατόπιν απώλειας μορίων νερού από τα πρωτονιωμένα μοριακά ιόντα τους, δεν ήταν ανιχνεύσιμες και στα 10 διαφορετικά ούρα που εμβολιάστηκαν, ακόμα και σε συγκεντρώσεις που αντιστοιχούσαν στο τετραπλάσιο του MRPL. Το μεγαλύτερο ποσοστό των ουσιών που δεν ανιχνεύθηκαν με την παρούσα μεθοδολογία ανήκουν στην κατηγορία των αναβολικών στεροειδών, για τα οποία η τεχνική GC/MS αποτελεί την κατεξοχήν εφαρμοζόμενη αναλυτική τεχνική στον έλεγχο ντόπινγκ και

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Ανάπτυξη και αξιολόγηση μεθόδου σάρωσης απαγορευμένων ουσιών σε ούρα αθλητών με LC/TOF-MS

επιτυγχάνει την ανίχνευσή τους σε ούρα αθλητών ακόμα και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις.

Λαμβάνοντας υπόψη τα δεδομένα μελέτης της σταθερότητας των χρόνων ανάλυσης και της ικανότητας ακριβούς μέτρησης του λόγου m/z των ιόντων των αναλυτών, ο χρόνος ανάλυσης και το σφάλμα μάζας χαρακτηρίστηκαν ως τα κύρια διαγνωστικά κριτήρια που θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη για την αξιολόγηση της ύπαρξης μιας απαγορευμένης ουσίας κατά την ανάλυση σάρωσης δειγμάτων ούρων αθλητών σε επίπεδο ανάλυσης ρουτίνας. Συγκεκριμένα, η ικανοποίηση των παρακάτω συνθηκών ισοδυναμεί με την υποψία ύπαρξης απαγορευμένης ουσίας:

- Ύπαρξη κορυφής στο χρωματογραφικό παράθυρο της ουσίας με λόγο S/N μεγαλύτερο του 3.
- Μέγιστη διαφορά χρόνου ανάλυσης της ύποπτης κορυφής από το χρόνο ανάλυσης της συγκεκριμένης ουσίας σε εμβολιασμένο δείγμα ούρων (δείγμα ελέγχου) που παρασκευάζεται και αναλύεται στην ίδια σειρά δειγμάτων: $\pm 0,05$ min.
- Μέγιστο σφάλμα μάζας ± 20 ppm για τα πρωτονιωμένα ιόντα των αναβολικών στεροειδών και όλες τις άλλες κατηγορίες απαγορευμένων ουσιών και ± 50 ppm για τα ιόντα προσθήκης ή τα θυγατρικά ιόντα των αναβολικών στεροειδών.

Αξιολόγηση Μεθόδου

Όριο Ανίχνευσης: Προσδιορίστηκε το όριο ανίχνευσης για την πλειοψηφία των εξεταζόμενων ουσιών, ως η συγκέντρωση εκείνη του αναλύτη στην οποία η ουσία ανιχνεύεται επιτυχώς σε 10 διαφορετικά εμβολιασμένα δείγματα ούρων. Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 5.2 για τις διουρητικές ουσίες (με εξαίρεση την ουσία acetazolamide με LOD 50 ng mL^{-1}), τα διεγερτικά (με εξαίρεση τις ουσίες amiphenazole, MDA, etilefrine, phenylephrine και synephrine με LOD 100, 250, 100, 500 και 250 ng mL^{-1} , αντίστοιχα), τα ναρκωτικά και τους β -ανταγωνιστές ανιχνεύθηκαν ακόμα και σε συγκεντρώσεις που αντιστοιχούν στο υποδεκαπλάσιο του MRPL. Περαιτέρω μελέτη της ικανότητας ανίχνευσης των ουσιών αυτών σε ακόμα χαμηλότερες συγκεντρώσεις δεν κρίθηκε σκόπιμη, καθώς, σύμφωνα με τις οδηγίες του WADA, η ανίχνευση των παραπάνω απαγορευμένων ουσιών στα ούρα αθλητών σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες από το 1/10 του MRPL συστήνεται να μην αναφέρεται από τα Εργαστήρια ως παραβίαση του Κώδικα Αντι-ντόπινγκ. Λαμβάνοντας υπόψη ότι δέκα από τους αναλύτες που αναφέρονται στον Πίνακα 5.2 και ανήκουν στην κατηγορία των αναβολικών στεροειδών δεν ανιχνεύθηκαν επιτυχώς στο MRPL στα δέκα διαφορετικά ούρα που εξετάστηκαν, η προτεινόμενη μέθοδος μπορεί να εφαρμοσθεί για τον έλεγχο σάρωσης 33 αναβολικών ουσιών.

Ειδικότητα: Για την πλειοψηφία των αναλυτών δεν παρατηρήθηκαν παρεμποδιστικές κορυφές από το υπόστρωμα των ούρων στα ιοντικά χρωματογραφήματα που ελήφθησαν από την ανάλυση 20 διαφορετικών λευκών δειγμάτων ούρων που πραγματοποιήθηκε για τον έλεγχο ειδικότητας της μεθόδου. Η ανίχνευση οκτώ απαγορευμένων ουσιών δεν ήταν δυνατή λόγω της σύγχρονης έκλουσης συστατικών των ούρων στα ιοντικά χρωματογραφικά παράθυρα των αναλυτών αυτών, οι οποίοι αναφέρονται στον Πίνακα 5.3. Στο [Παράρτημα 10](#) παρουσιάζεται ως παράδειγμα ειδικότητας της μεθόδου μια τυπική σελίδα (που αντιστοιχεί στην ουσία 16 α -hydroxystanozolol) του πακέτου εκτύπωσης των

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Ανάπτυξη και αξιολόγηση μεθόδου σάρωσης απαγορευμένων ουσιών σε ούρα αθλητών με LC/TOF-MS

χρωματογραφημάτων που ελήφθησαν από την ανάλυση σάρωσης μιας σειράς δειγμάτων ρουτίνας (σειρά δειγμάτων ούρων αθλητών), συμπεριλαμβανομένου και ενός δείγματος ελέγχου (δείγμα ούρων εμβολιασμένο με τους αναλύτες στο MRPL). Μικρής έντασης παρεμποδιστικές κορυφές παρατηρήθηκαν από κάποια δείγματα ούρων για την ουσία methyltrienolone και προκειμένου να αποφευχθεί η έναρξη επιβεβαιωτικών διαδικασιών για ψευδώς θετικά δείγματα, για τα δείγματα αυτά αποφασίστηκε η επανάλυση τους με μέθοδο LC/QTOF-MS/MS, ειδική για την ουσία methyltrienolone.

Ανάκτηση: Όπως έχει ήδη αναφερθεί, στην παρούσα εργασία για την προκατεργασία των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο του Εργαστηρίου που εφαρμόζεται για την ανίχνευση σάρωσης αναβολικών παραγόντων και κορτικοστεροειδών και δοκιμάστηκε η δυνατότητα εφαρμογής του για την απομόνωση και ανίχνευση αναλυτών και από άλλες κατηγορίες απαγορευμένων ουσιών. Πραγματοποιήθηκε μελέτη προσδιορισμού της ανάκτησης της εκχυλιστικής πορείας για την πλειοψηφία των αναλυτών σε επίπεδο συγκέντρωσης που αντιστοιχεί στο MRPL. Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.2 για 176 από τις 189 ουσίες που εξετάστηκαν (ποσοστό 93 % των εξεταζόμενων ουσιών) διαπιστώθηκε ανάκτηση μεγαλύτερη από 20 %. Αξίζει να αναφερθεί ότι οι ουσίες salbutamol, atenolol, piretanide, benzoylecgonine και heptaminol ανιχνεύθηκαν επιτυχώς ακόμα σε συγκεντρώσεις πολύ χαμηλότερες του MRPL, αν και διαπιστώθηκε ότι παρουσιάζουν πολύ χαμηλή εκχυλιστική απόδοση (ανάκτηση <20 %).

Επίδραση υποστρώματος: Για την πλειοψηφία των εξεταζόμενων ουσιών διαπιστώθηκε κατασταλτική επίδραση του υποστρώματος των ούρων στο λαμβανόμενο ιοντικό σήμα σε ποσοστό (% MF) που κυμαίνεται για τους 189 αναλύτες από 24% έως 109% (Πίνακας 5.2). Για τους περισσότερους αναλύτες, η ένταση του φαινομένου της ιοντικής καταστολής ποικίλει ανάλογα με το υπόστρωμα των ούρων που χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό, με αποτέλεσμα να παρατηρείται μεγάλη διακύμανση μεταξύ των έξι διαφορετικών παρτίδων ούρων που μελετήθηκαν.

Επαναληψιμότητα: Για όλους τους αναλύτες διαπιστώθηκε επαναληψιμότητα των σχετικών χρόνων ανάλυσης μεταξύ των ημερών με τη σχετική τυπική απόκλιση να μην υπερβαίνει το 0,7%. Η μεταξύ των ημερών σχετική τυπική απόκλιση της σχετικής απόκρισης των αναλυτών ως προς το εσωτερικό πρότυπο κυμάνθηκε μεταξύ των τιμών 0,7 – 17,4 %, ενώ για 158 από τους 189 αναλύτες δεν ξεπέρασε το 10%.

Η καταλληλότητα εφαρμογής της μεθόδου στην ανάλυση δειγμάτων ρουτίνας ελέγχθηκε επιπλέον με την ανάλυση πραγματικών θετικών δειγμάτων στα οποία είχε επιβεβαιωθεί η ύπαρξη των ουσιών indapamide, salbutamol, THG, oxprenolol, probenecid, sydnocarb, stanozolol, 4-methyl-2-hexanamine, trenbolone, exemestane και cocaine με τις ήδη εφαρμοζόμενες διαδικασίες του Εργαστηρίου. Οι παραπάνω απαγορευμένες ουσίες, καθώς και μεταβολίτες αυτών ανιχνεύθηκαν επιτυχώς με την προτεινόμενη διαδικασία σάρωσης. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, στην παρούσα εργασία η ανίχνευση των απαγορευμένων ουσιών βασίζεται στην συνεχή λήψη των φασμάτων πλήρους σάρωσης σε εύρος τιμών m/z 100-1100, χωρίς την παρακολούθηση προεπιλεγμένων ιόντων. Αυτό αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα της εφαρμογής της τεχνολογίας LC/TOF-MS σε αναλύσεις σάρωσης, καθώς επιτρέπει όχι μόνο την ανίχνευση απεριόριστου αριθμού γνωστών ουσιών, αλλά και την αναδρομική επανεξέταση των ληφθέντων φασματομετρικών

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Ανάπτυξη και αξιολόγηση μεθόδου σάρωσης απαγορευμένων ουσιών σε ούρα αθλητών με LC/TOF-MS

δεδομένων για την ανίχνευση ουσιών που ήταν άγνωστες κατά τη στιγμή της ανάλυσης των δειγμάτων και εισάγονται αργότερα στον κατάλογο των απαγορευμένων ουσιών του WADA. Η επανεξέταση δειγμάτων ρουτίνας αθλητών που είχαν αναλυθεί με την προτεινόμενη μέθοδο, για την αναδρομική ανίχνευση μιας νέας διεγερτικής ουσίας με το όνομα 4-methyl-2-hexanamine, οδήγησε στον εκ νέου χαρακτηρισμό 11 δειγμάτων ως θετικά ενώ αρχικά είχαν δηλωθεί ως αρνητικά.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Ανάπτυξη και αξιολόγηση μεθόδου σάρωσης απαγορευμένων ουσιών σε ούρα αθλητών με LC/TOF-MS

Πίνακας 5.2: Θεωρητικά δεδομένα και πειραματικά αποτελέσματα για τους αναλύτες που ανιχνεύθηκαν με την προτεινόμενη μεθοδολογία

Ουσία	Μοριακός Τύπος	Ιόν	Ιόν m/z	RT ¹ (min)	Σφάλμα Μάζας (\pm SD) ² (ppm)	% MF (\pm SD) ³	% E (\pm SD) ⁴	LOD ⁵ (ng mL ⁻¹)	
Αναβολικοί Παράγοντες (MRPL 10 ng mL⁻¹)									
1	1-Androstenedione	C ₁₉ H ₂₆ O ₂	[M+H] ⁺	287,2006	9,42	17 (\pm 20)	56 (\pm 15)	86,8 (\pm 7,9)	10
2	Bolasterone	C ₂₁ H ₃₂ O ₂	[M+H] ⁺	317,2475	9,12	4,5 (\pm 5,0)	37 (\pm 17)	79,8 (\pm 7,3)	5
3	Boldenone	C ₁₉ H ₂₆ O ₂	[M+H] ⁺	287,2006	7,67	1,3 (\pm 1,0)	42 (\pm 18)	89,3 (\pm 5,9)	<2
4	Boldione	C ₁₉ H ₂₄ O ₂	[M+H] ⁺	285,1849	8,19	5,1 (\pm 5,5)	63 (\pm 14)	89,3 (\pm 4,6)	<2
5	Calusterone	C ₂₁ H ₃₂ O ₂	[M+H] ⁺	317,2475	9,37	2,1 (\pm 1,6)	37,6 (\pm 9,2)	91 (\pm 12)	<2
6	Calusterone metabolite	C ₂₁ H ₃₆ O ₂	[M+H-2H ₂ O] ⁺	285,2577	9,88	20 ppb 14 (\pm 15)	48 (\pm 16)	79 (\pm 24)	20
7	Clenbuterol (MRPL 2 ng mL ⁻¹)	C ₁₂ H ₁₈ N ₂ OCl ₂	[M+H] ⁺	277,0869	4,66	4,2 (\pm 4,3)	94,1 (\pm 9,9)	92,2 (\pm 7,2)	4
8	Clostebol metabolite	C ₁₉ H ₂₇ O ₂ Cl	[M+NH ₄ -H ₂ O] ⁺	322,1927	10,11	7,8 (\pm 9,4)	73,7 (\pm 8,0)	70 (\pm 10)	40
9	Danazol metabolite	C ₂₁ H ₂₈ O ₂	[M+H] ⁺	313,2162	8,86	2,3 (\pm 3,3)	42 (\pm 15)	85 (\pm 10)	5
10	Drostanolone metabolite	C ₂₁ H ₂₈ O ₂	[M+NH ₄] ⁺	322,2735	11,09	3,1 (\pm 4,2)	44 (\pm 15)	73,5 (\pm 2,1)	10
11	Fluoxymesterone metabolite 1	C ₂₀ H ₂₇ FO ₂	[M+H] ⁺	319,2068	10,05	2,1 (\pm 1,3)	69 (\pm 16)	83,3 (\pm 5,0)	<2
12	Fluoxymesterone metabolite 2	C ₂₀ H ₃₁ FO ₄	[M+H-H ₂ O] ⁺	337,2173	3,88	9 (\pm 12)	36 (\pm 11)	89,2 (\pm 6,6)	10
13	Formebolone metabolite	C ₂₁ H ₃₀ O ₄	[M+H] ⁺	347,2217	5,72	4,9 (5,5)	62 (\pm 13)	85,5 (\pm 4,5)	5
14	Gestrinone	C ₂₁ H ₂₄ O ₂	[M+H] ⁺	309,1849	8,67	1,5 (\pm 1,2)	61 (\pm 24)	83,8 (\pm 6,9)	<2
15	6 α -Hydroxyandrostenedione	C ₁₉ H ₂₆ O ₃	[M+H] ⁺	303,1955	6,39	7 (\pm 12)	48 (\pm 13)	85,2 (\pm 7,3)	10
16	4-Hydroxytestosterone	C ₁₉ H ₂₈ O ₃	[M+H] ⁺	305,2111	8,48	10 (\pm 10)	47 (\pm 15)	83,1 (\pm 6,8)	10
17	Mesterolone metabolite	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	[M+NH ₄] ⁺	322,2735	10,58	2,7 (\pm 1,5)	49 (\pm 12)	72,9 (\pm 5,9)	<2
18	Methandienone metabolite 1 (MRPL 2 ng mL ⁻¹)	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	[M+H-2H ₂ O] ⁺	269,2264	10,96	5 ppb 7,0 (\pm 3,8)	78 (\pm 23)	78 (\pm 17)	5
19	Methandienone metabolite 2	C ₂₀ H ₂₈ O ₃	[M+H] ⁺	317,2111	5,94	4,5 (\pm 5,8)	37,9 (\pm 9,7)	86,9 (\pm 4,8)	5
20	Methandienone metabolite 3	C ₂₀ H ₂₆ O ₂	[M+H] ⁺	299,2006	8,46	10,1 (\pm 9,2)	42 (\pm 12)	90,2 (\pm 9,1)	10
21	Methyl-1-testosterone	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	[M+H] ⁺	303,2319	9,30	4,5 (\pm 5,6)	41,3 (\pm 7,8)	86,4 (\pm 6,3)	10
22	Methyldienolone	C ₁₉ H ₂₆ O ₂	[M+H] ⁺	287,2006	7,91	2,3 (\pm 1,3)	55 (\pm 11)	96,4 (\pm 4,9)	<2

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Ανάπτυξη και αξιολόγηση μεθόδου σάρωσης απαγορευμένων ουσιών σε ούρα αθλητών με LC/TOF-MS

Ουσία	Μοριακός Τύπος	Ιόν	Ιόν m/z	RT ¹ (min)	Σφάλμα Μάζας (\pm SD) ² (ppm)	% MF (\pm SD) ³	% E (\pm SD) ⁴	LOD ⁵ (ng mL ⁻¹)	
23	Methyltrienolone (Metribolone)	C ₁₉ H ₂₄ O ₂	[M+H] ⁺	285,1849	7,85	0,8 (\pm 0,6)	43 (\pm 15)	91,0 (\pm 5,7)	<2
24	19-Norandrosterone (MRPL 2 ng mL ⁻¹)	C ₁₈ H ₂₈ O ₂	[M+NH ₄] ⁺	294,2422	9,52	5 ppb 11,2 (\pm 8,4)	58 (\pm 12)	75,2 (\pm 3,6)	5
25	19-Noretiocholanolone	C ₁₈ H ₂₈ O ₂	[M+NH ₄] ⁺	294,2422	9,21	7,8 (\pm 9,3)	47 (\pm 20)	77,8 (\pm 4,2)	5
26	Norbolethone metabolite 2	C ₂₁ H ₃₆ O ₂	[M+H-2H ₂ O] ⁺	285,2577	10,70	40 ppb 19 (\pm 14)			40
27	*Normethandrolone-5 β ,3 α -tetrahydro met.	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	[M+H-2H ₂ O] ⁺	257,2264	8,74	-1,9			
28	*Normethandrolone-5 α ,3 α -tetrahydro met.	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	[M+H-2H ₂ O] ⁺	257,2264	9,05	-0,4			
29	*Normethandrolone hydroxy-metabolite	C ₁₉ H ₂₈ O ₃	[M+H] ⁺	305,2111	6,77	-0,3			
30	Oral Turinabol metabolite	C ₂₀ H ₂₇ ClO ₃	[M+H] ⁺	351,1721	7,05	40 ppb 13 (\pm 22)	33 (\pm 10)	85,9 (\pm 6,9)	40
31	Oxandrolone	C ₁₉ H ₃₀ O ₃	[M+H] ⁺	307,2268	8,13	4,9 (\pm 5,7)	46 (\pm 16)	77,2 (\pm 4,9)	<2
32	*Prostanozol hydroxy-17-keto metabolites	C ₂₀ H ₂₈ N ₂ O ₂	[M+H] ⁺	329,2224	6,58 6,85 7,12	-3,0 -2,7 1,8			
33	*Prostanozol dihydroxy-17-keto metabolites	C ₂₀ H ₂₈ N ₂ O ₃	[M+H] ⁺	345,2173	5,31 5,53 5,67	1,2 -5,5 -2,9			
34	16 α -Hydroxystanozolol	C ₂₁ H ₃₂ N ₂ O ₂	[M+H] ⁺	345,2537	7,26	4,9 (\pm 2,7)	24,2 (\pm 9,5)	79,4 (\pm 6,2)	5
35	3-Hydroxystanozolol (MRPL 2 ng mL ⁻¹)	C ₂₁ H ₃₂ N ₂ O ₂	[M+H] ⁺	345,2537	6,90	10 ppb 3,7 (\pm 4,7)	42,3 (\pm 3,8)	99 (\pm 16)	10
36	Tetrahydrogestrinone (THG)	C ₂₁ H ₂₈ O ₂	[M+H] ⁺	313,2162	9,64	1,5 (\pm 0,9)	50 (\pm 15)	82 (\pm 12)	<2
37	Trenbolone	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	[M+H] ⁺	271,1693	7,45	1,7 (\pm 1,5)	55 (\pm 20)	84,6 (\pm 7,0)	<2
38	17 α -Epitrenbolone	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	[M+H] ⁺	271,1696	7,69	2,6 (\pm 1,4)	64 (\pm 29)	88,2 (\pm 6,4)	<2
39	α -Zearalanol	C ₁₈ H ₂₆ O ₅	[M+H] ⁺	323,1853	8,04	17 (\pm 17)	64 (\pm 16)	73 (\pm 19)	20

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Ανάπτυξη και αξιολόγηση μεθόδου σάρωσης απαγορευμένων ουσιών σε ούρα αθλητών με LC/TOF-MS

Ουσία	Μοριακός Τύπος	Ιόν	Ιόν m/z	RT ¹ (min)	Σφάλμα Μάζας (\pm SD) ² (ppm)	% MF (\pm SD) ³	% E (\pm SD) ⁴	LOD ⁵ (ng mL ⁻¹)	
40	β -Zearalanol	$C_{18}H_{26}O_5$	[M+H] ⁺	323,1853	7,38	18 (\pm 18)		20	
41	Zilpaterol	$C_{14}H_{19}N_3O_2$	[M+H] ⁺	262,1550	1,65	2,2 (\pm 0,9)	88 (\pm 14)	75,1 (\pm 3,4)	<2
42	Norethandrolone metabolite 2	$C_{24}H_{32}O_2$	[M+H-2H ₂ O] ⁺	271,2420	9,62	16 (\pm 13)	50,0 (\pm 7,0)	66 (\pm 11)	10
43	*Estra-4,9(10)-diene-3,17-dione 17-hydroxy metabolite	$C_{18}H_{24}O_2$	[M+H] ⁺ [2M+Na] ⁺	273,1849 567,3445	7,4/8,1	7,0 5,9			
<i>β_2-Αγωνιστές (MRPL 100 ng mL⁻¹)</i>									
44	Bambuterol	$C_{18}H_{29}N_3O_5$	[M+H] ⁺	368,2180	5,13	0,8 (\pm 0,5)	97,9 (\pm 2,8)	92,8 (\pm 6,3)	<20
45	Fenoterol	$C_{17}H_{21}NO_4$	[M+H] ⁺	304,1543	2,98	0,6 (\pm 0,6)	89,9 (\pm 7,2)	40 (\pm 20)	<20
46	Fenoterol (formaldehyde) artifact	$C_{18}H_{21}NO_4$	[M+H] ⁺	316,1543	3,31	1,4 (\pm 1,0)			
47	Formoterol	$C_{19}H_{24}N_2O_4$	[M+H] ⁺	345,1809	4,67	1,2 (\pm 1,5)	99,0 (\pm 7,2)	90,3 (\pm 7,5)	<20
48	Ractopamine	$C_{18}H_{23}NO_3$	[M+H] ⁺	302,1751	4,10	0,7 (\pm 0,6)			<20
49	Salbutamol	$C_{13}H_{21}NO_3$	[M+H] ⁺	240,1594	1,65	1,2 (\pm 1,5)	96,2 (\pm 5,2)	17,3 (\pm 1,7)	<20
50	Salmeterol	$C_{25}H_{37}NO_4$	[M+H] ⁺	416,2795	7,45	0,9 (\pm 0,6)	73 (\pm 11)	80 (\pm 11)	<20
51	Terbutaline	$C_{12}H_{19}NO_3$	[M+H] ⁺	226,1438	1,67	1,3 (\pm 0,5)	102,0 (\pm 6,7)	27,8 (\pm 1,2)	<20
<i>β-Ανταγωνιστές (MRPL 500 ng mL⁻¹)</i>									
52	Acebutolol	$C_{18}H_{28}N_2O_4$	[M+H] ⁺	337,2122	4,44	1,1 (\pm 0,6)	97,7 (\pm 2,0)	89,5 (\pm 4,0)	<50
53	Alprenolol	$C_{15}H_{23}NO_2$	[M+H] ⁺	250,1802	5,96	2,1 (\pm 0,7)	99,1 (\pm 2,3)	92,4 (\pm 6,0)	<50
54	Atenolol	$C_{14}H_{22}N_2O_3$	[M+H] ⁺	267,1703	1,77	1,0 (\pm 0,7)	98,3 (\pm 3,4)	16 (\pm 11)	<50
55	Betaxolol	$C_{18}H_{29}NO_3$	[M+H] ⁺	308,2220	6,10	1,7 (\pm 0,7)	93,7 (\pm 2,8)	97,3 (\pm 4,0)	<50
56	Bisoprolol	$C_{18}H_{31}NO_4$	[M+H] ⁺	326,2326	5,50	1,0 (\pm 0,8)	96,3 (\pm 3,8)	98,3 (\pm 4,9)	<50
57	Carteolol	$C_{16}H_{24}N_2O_3$	[M+H] ⁺	293,1860	3,41	2,5 (\pm 1,1)	97,0 (\pm 3,1)	82,3 (\pm 8,0)	<50
58	Carvedilol	$C_{24}H_{26}N_2O_4$	[M+H] ⁺	407,1965	6,87	0,6 (\pm 0,6)	70 (\pm 11)	66,5 (\pm 5,4)	<50
59	Celiprolol	$C_{20}H_{33}N_3O_4$	[M+H] ⁺	380,2544	5,06	0,6 (\pm 0,6)	98,2 (\pm 1,8)	90,6 (\pm 3,7)	<50
60	Esmolol	$C_{16}H_{25}NO_4$	[M+H] ⁺	296,1856	4,98	1,2 (\pm 0,6)	98,1 (\pm 2,0)	97,1 (\pm 3,4)	<50
61	Labetalol	$C_{19}H_{24}N_2O_3$	[M+H] ⁺	329,1860	5,46	2,0 (\pm 0,8)	92,8 (\pm 6,2)	80,6 (\pm 8,4)	<50

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Ανάπτυξη και αξιολόγηση μεθόδου σάρωσης απαγορευμένων ουσιών σε ούρα αθλητών με LC/TOF-MS

Ουσία	Μοριακός Τύπος	Ιόν	Ιόν m/z	RT ¹ (min)	Σφάλμα Μάζας (\pm SD) ² (ppm)	% MF (\pm SD) ³	% E (\pm SD) ⁴	LOD ⁵ (ng mL ⁻¹)	
62	Levobunolol	C ₁₇ H ₂₅ NO ₃	[M+H] ⁺	292,1907	4,72	1,3 (\pm 0,7)	96,4 (\pm 4,4)	94,8 (\pm 5,1)	<50
63	Metipranolol	C ₁₇ H ₂₇ NO ₄	[M+H] ⁺	310,2013	5,78	0,7 (\pm 0,7)	97,1 (\pm 2,8)	94,6 (\pm 3,8)	<50
64	Metoprolol	C ₁₅ H ₂₅ NO ₃	[M+H] ⁺	268,1907	4,57	1,4 (\pm 0,4)	99,5 (\pm 2,8)	98,3 (\pm 1,5)	<50
65	Nadolol	C ₁₇ H ₂₇ NO ₄	[M+H] ⁺	310,2013	3,55	2,0 (\pm 0,7)	99,9 (\pm 2,0)	43,3 (\pm 4,8)	<50
66	Oxprenolol	C ₁₅ H ₂₃ NO ₃	[M+H] ⁺	266,1751	5,27	1,0 (\pm 0,8)	96,8 (\pm 2,9)	95,8 (\pm 3,4)	<50
67	Pindolol	C ₁₄ H ₂₀ N ₂ O ₂	[M+H] ⁺	249,1598	3,68	2,3 (\pm 0,8)	94,9 (\pm 2,7)	102,5 (\pm 4,6)	<50
68	Propranolol	C ₁₆ H ₂₁ NO ₂	[M+H] ⁺	260,1645	5,87	2,0 (\pm 0,5)	93,3 (\pm 2,8)	93,1 (\pm 3,9)	<50
69	Sotalol	C ₁₂ H ₂₀ N ₂ O ₃ S	[M+H] ⁺	273,1267	1,91	1,9 (\pm 1,2)	94,9 (\pm 4,4)	42 (\pm 11)	<50
70	Timolol	C ₁₃ H ₂₄ N ₃ O ₄ S	[M+H] ⁺	317,1642	4,37	1,4 (\pm 0,6)	99,7 (\pm 1,9)	98,4 (\pm 3,0)	<50
Κορτικοστεροειδή (MRPL 30 ng mL⁻¹)									
71	Beclomethasone	C ₂₂ H ₂₉ ClO ₅	[M+H] ⁺	409,1776	7,24	1,5 (\pm 1,7)	56 (\pm 14)	79,5 (\pm 5,5)	<6
72	Betamethasone	C ₂₂ H ₂₉ FO ₅	[M+H] ⁺	393,2072	6,97	2,0 (\pm 1,3)	72,1 (\pm 6,5)	94,2 (\pm 4,3)	<6
73	Budesonide	C ₂₅ H ₃₄ O ₆	[M+H] ⁺	431,2428	8,59	1,4 (\pm 1,3)	57 (\pm 24)	73,6 (\pm 8,6)	<6
74	Budesonide metabolite	C ₂₁ H ₂₈ O ₆	[M+H] ⁺	377,1959	5,34	0,5 (\pm 0,3)	61 (\pm 12)	84,2 (\pm 6,1)	15
75	*Deflazacort desacetyl metabolites	C ₂₃ H ₂₉ NO ₅	[M+H] ⁺	400,2119	5,15 6,28	-2,2 -1,0			
76	*Deflazacort desacetyl-hydroxy-metabolites	C ₂₃ H ₂₉ NO ₆	[M+H] ⁺	416,2068	4,31 5,68 6,44 6,56	0,2 -0,7 -0,5 1,9			
77	*Deflazacort desacetyl-epoxy metabolites	C ₂₃ H ₃₁ NO ₆	[M+H] ⁺	418,2224	5,80 6,04	-3,1 0,5			
78	*Deflazacort desacetyl-keto metabolite	C ₂₃ H ₂₇ NO ₅	[M+H] ⁺	398,1962	6,09 6,22	2,0 1,0			
79	Desonide	C ₂₄ H ₃₂ O ₆	[M+H] ⁺	417,2272	7,43	1,2 (\pm 0,7)	58 (\pm 19)	84,7 (\pm 4,7)	<6
80	Dexamethasone	C ₂₂ H ₂₉ FO ₅	[M+H] ⁺	393,2072	7,03	1,2 (\pm 0,7)	66 (\pm 14)	86,5 (\pm 4,7)	<6

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Ανάπτυξη και αξιολόγηση μεθόδου σάρωσης απαγορευμένων ουσιών σε ούρα αθλητών με LC/TOF-MS

Ουσία	Μοριακός Τύπος	Ιόν	Ιόν m/z	RT ¹ (min)	Σφάλμα Μάζας (\pm SD) ² (ppm)	% MF (\pm SD) ³	% E (\pm SD) ⁴	LOD ⁵ (ng mL ⁻¹)	
81	Fludrocortisone	C ₂₁ H ₂₉ FO ₅	[M+H] ⁺	381,2072	6,34	5,7 (\pm 5,8)	53 (\pm 15)	85,6 (\pm 3,6)	30
82	Flumethasone	C ₂₂ H ₂₈ F ₂ O ₅	[M+H] ⁺	411,1978	7,07	1,0 (\pm 0,5)	60 (\pm 13)	84,6 (\pm 4,1)	<6
83	Flunisolide	C ₂₄ H ₃₁ FO ₆	[M+H] ⁺	435,2177	7,47	2,3 (\pm 1,2)	32 (\pm 14)	86,0 (\pm 6,5)	<6
84	Fluocortolone	C ₂₂ H ₂₉ FO ₄	[M+H] ⁺	377,2123	7,70	7,1 (\pm 6,4)	42 (\pm 14)	84,2 (\pm 5,5)	<6
85	Methylprednisolone	C ₂₂ H ₃₀ O ₅	[M+H] ⁺	375,2166	6,83	0,6 (\pm 0,7)	47 (\pm 10)	84,8 (\pm 4,0)	<6
86	Prednisolone	C ₂₁ H ₂₈ O ₅	[M+H] ⁺	361,2009	6,20	2,2 (\pm 3,4)	54 (\pm 14)	86,8 (\pm 2,4)	15
87	Prednisone	C ₂₁ H ₂₆ O ₅	[M+H] ⁺	359,1853	6,25	1,2 (\pm 1,3)	61 (\pm 16)	87,6 (\pm 5,3)	<6
88	Triamcinolone	C ₂₁ H ₂₇ FO ₆	[M+H] ⁺	395,1864	5,39	1,7 (\pm 1,5)	67 (\pm 12)	83,9 (\pm 5,4)	15
89	Triamcinolone Acetonide	C ₂₄ H ₃₁ FO ₆	[M+H] ⁺	435,2177	7,38	2,3 (\pm 2,6)	59 (\pm 19)	83,9 (\pm 4,9)	<6
Διουρητικές Ουσίες κ.α. Καλυπτικοί παράγοντες (MRPL 250 ng mL⁻¹)									
90	Acetazolamide	C ₄ H ₆ N ₄ O ₆ S ₂	[M+H] ⁺	222,9954	2,68	3,0 (\pm 2,3)	87,4 (\pm 9,9)	2,1 (\pm 0,3)	50
91	Althiazide	C ₁₁ H ₁₄ N ₃ O ₄ S ₃ Cl	[M+NH ₄] ⁺	401,0168	6,94	2,9 (\pm 1,1)	109 (\pm 19)	47,7 (\pm 6,4)	<25
92	Amiloride	C ₆ H ₈ N ₇ OCl	[M+H] ⁺	230,0552	1,96	1,8 (\pm 0,9)	82 (\pm 11)	6,2 (\pm 1,8)	<25
93	Bendroflumethiazide	C ₁₅ H ₁₄ N ₃ O ₄ S ₂ F ₃	[M+NH ₄] ⁺	439,0711	8,00	1,8 (\pm 0,8)	100 (\pm 14)	43,7 (\pm 4,3)	<25
94	Brinzolamide	C ₁₂ H ₁₁ N ₃ O ₅ S ₃	[M+H] ⁺	384,0716	4,47	1,2 (\pm 1,2)	84,2 (\pm 5,4)	77,3 (\pm 4,3)	<25
95	Bumetanide	C ₁₇ H ₂₀ N ₂ O ₅ S	[M+H] ⁺	365,1166	8,09	0,6 (\pm 0,6)	95,2 (\pm 9,4)	32,1 (\pm 1,2)	<25
96	Canrenone	C ₂₂ H ₂₈ O ₃	[M+H] ⁺	341,2111	9,15	1,0 (\pm 0,6)	58 (\pm 11)	24,0 (\pm 3,2)	<25
97	Chlorothiazide	C ₇ H ₆ N ₃ O ₄ S ₂ Cl	[M+NH ₄] ⁺	312,9821	3,11	10,8 (\pm 7,9)	92,3 (\pm 3,2)	1,0 (\pm 1,0)	250
98	Chlorthalidone	C ₁₄ H ₁₁ N ₂ O ₄ SCl	[M+NH ₄] ⁺	356,0461	5,24	1,7 (\pm 1,1)	82,1 (\pm 5,3)	83,1 (\pm 4,0)	<25
99	Cloпамide	C ₁₄ H ₂₀ N ₃ O ₃ SCl	[M+NH ₄] ⁺	346,0987	5,95	1,6 (\pm 0,5)	83,9 (\pm 5,8)	89,1 (\pm 2,8)	<25
100	Cyclothiazide	C ₁₄ H ₁₆ N ₃ O ₄ S ₂ Cl	[M+NH ₄] ⁺	407,0604	7,72	1,4 (\pm 1,0)	92,4 (\pm 8,2)	35,9 (\pm 5,9)	<25
101	Dorzolamide	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₄ S ₃	[M+H] ⁺	325,0345	2,64	1,4 (\pm 0,6)	74 (\pm 17)	65,0 (\pm 5,2)	<25
102	Ethacrynic acid	C ₁₃ H ₁₂ O ₄ Cl ₂	[M+H] ⁺	303,0185	7,28	2,5 (\pm 1,8)	55,9 (\pm 9,1)	5,4 (\pm 2,0)	<25
103	Hydrochlorothiazide	C ₇ H ₈ N ₃ O ₄ S ₂ Cl	[M+NH ₄] ⁺	314,9978	3,44	1,9 (\pm 1,0)	89,3 (\pm 4,1)	53,8 (\pm 2,0)	<25
104	Hydroflumethiazide	C ₈ H ₈ N ₃ O ₄ S ₂ F ₃	[M+NH ₄] ⁺	349,0241	4,58	1,7 (\pm 1,1)	99,5 (\pm 4,7)	75,5 (\pm 3,9)	<25
105	Indapamide	C ₁₆ H ₁₆ N ₃ O ₃ SCl	[M+H] ⁺	366,0674	7,31	0,8 (\pm 0,7)	77,9 (\pm 8,3)	82,6 (\pm 2,8)	<25

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Ανάπτυξη και αξιολόγηση μεθόδου σάρωσης απαγορευμένων ουσιών σε ούρα αθλητών με LC/TOF-MS

Ουσία	Μοριακός Τύπος	Ιόν	Ιόν m/z	RT ¹ (min)	Σφάλμα Μάζας (\pm SD) ² (ppm)	% MF (\pm SD) ³	% E (\pm SD) ⁴	LOD ⁵ (ng mL ⁻¹)	
106	Methylclothiazide	C ₉ H ₁₁ N ₃ O ₄ S ₂ Cl ₂	[M+NH ₄] ⁺	379,9901	6,42	1,2 (\pm 0,8)	66,8 (\pm 7,9)	83,2 (\pm 4,4)	<25
107	Metolazone	C ₁₆ H ₁₆ N ₃ O ₃ SCI	[M+H] ⁺	366,0674	6,74	1,2 (\pm 0,4)	47 (\pm 16)	97,4 (\pm 5,0)	<125
108	Piretanide	C ₁₇ H ₁₈ N ₂ O ₅ S	[M+H] ⁺	363,1009	7,52	0,9 (\pm 0,8)	87,5 (\pm 9,8)	11,2 (\pm 0,9)	<25
109	Polythiazide	C ₁₁ H ₁₃ N ₃ O ₄ S ₃ ClF ₃	[M+NH ₄] ⁺	457,0042	7,96	2,1 (\pm 1,0)	94 (\pm 13)	81,5 (\pm 3,9)	<25
110	Probenecid	C ₁₃ H ₁₉ NO ₄ S	[M+H] ⁺	286,1108	7,91	0,7 (\pm 0,6)	67,0 (\pm 7,8)	43,6 (\pm 1,7)	<25
111	Torasemide	C ₁₆ H ₂₀ N ₄ O ₃ S	[M+H] ⁺	349,1329	5,79	1,5 (\pm 1,0)	91,9 (\pm 4,9)	48,2 (\pm 1,7)	<25
112	Trichloromethiazide	C ₈ H ₈ N ₃ O ₄ S ₂ Cl ₃	[M+NH ₄] ⁺	398,9355	6,12	1,3 (\pm 1,0)	89,8 (\pm 8,5)	59,6 (\pm 3,4)	<25
113	Triamterene	C ₁₂ H ₁₁ N ₇	[M+H] ⁺	254,1149	3,87	2,3 (\pm 0,9)	91,8 (\pm 9,7)	91,5 (\pm 5,8)	<25
114	Xipamide	C ₁₅ H ₁₅ N ₂ O ₄ SCI	[M+H] ⁺	355,0514	8,07	0,7 (\pm 0,5)	72,1 (\pm 9,0)	55,7 (\pm 1,1)	<25
Ναρκωτικά (MRPL 200 ng mL⁻¹)									
115	6-Acetylmorphine	C ₁₅ H ₂₃ N	[M+H] ⁺	328,1543	3,37	2,9 (\pm 1,0)	61,5 (\pm 9,8)	91,8 (\pm 5,5)	<20
116	Alfentanyl (MRPL 10 ng mL ⁻¹)	C ₂₁ H ₃₂ N ₆ O ₃	[M+H] ⁺	417,2609	6,13	1,0 (\pm 1,0)	90,6 (\pm 8,7)	72,9 (\pm 9,7)	<10
117	Buprenorphine (MRPL 10 ng mL ⁻¹)	C ₂₉ H ₄₁ NO ₄	[M+H] ⁺	468,3108	6,75	0,8 (\pm 0,7)	84 (\pm 14)	77 (\pm 13)	<1
118	Norbuprenorphine (MRPL 10 ng mL ⁻¹) (Buprenorphine metabolite)	C ₂₅ H ₃₅ NO ₄	[M+H] ⁺	414,2639	5,40	3,9 (\pm 2,3)			
119	Dextromoramide	C ₂₅ H ₃₂ N ₂ O ₂	[M+H] ⁺	393,2537	7,22	0,9 (\pm 1,2)	88,5 (\pm 3,4)	61,6 (\pm 4,2)	<20
120	Dihydrocodeine	C ₁₈ H ₂₃ NO ₃	[M+H] ⁺	302,1751	2,64	1,8 (\pm 0,9)	81 (\pm 11)	73,7 (\pm 8,8)	<20
121	Fentanyl (MRPL 10 ng mL ⁻¹)	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O	[M+H] ⁺	337,2274	6,14	1,7 (\pm 1,2)	70,5 (\pm 7,5)	74 (\pm 12)	<10
122	Hydromorphone	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	[M+H] ⁺	286,1438	1,80	1,8 (\pm 1,0)	90,2 (\pm 7,1)	87 (\pm 17)	<20
123	Methadone	C ₂₁ H ₂₇ NO	[M+H] ⁺	310,2165	7,32	2,2 (\pm 1,7)	84,8 (\pm 7,5)	63,6 (\pm 6,5)	<20
124	Methadone metabolite	C ₂₀ H ₂₃ N	[M+H] ⁺	278,1903	6,78	4,0 (\pm 2,7)	84,7 (\pm 5,8)	47,7 (\pm 7,8)	<20
125	Morphine (MRPL 1000 ng mL ⁻¹)	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	[M+H] ⁺	286,1438	1,40	2,5 (\pm 0,8)	81,9 (\pm 8,1)	83,6 (\pm 3,9)	<100
126	Norcodeine	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	[M+H] ⁺	286,1438	2,58	1,5 (\pm 1,4)	75 (\pm 13)	18,8 (\pm 6,7)	<20
127	Norfentanyl (MRPL 10 ng mL ⁻¹)	C ₁₄ H ₂₀ N ₂ O	[M+H] ⁺	233,1648	4,16	2,1			
128	Normorphine	C ₁₆ H ₁₇ NO ₃	[M+H] ⁺	272,1281	1,25	1,8 (\pm 1,0)	69,5 (\pm 6,4)	2,6 (\pm 0,7)	100
129	Oxycodone	C ₁₈ H ₂₁ NO ₄	[M+H] ⁺	316,1543	3,27	1,4 (\pm 0,7)	90 (\pm 15)	88,0 (\pm 6,8)	<20

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Ανάπτυξη και αξιολόγηση μεθόδου σάρωσης απαγορευμένων ουσιών σε ούρα αθλητών με LC/TOF-MS

Ουσία	Μοριακός Τύπος	Ιόν	Ιόν m/z	RT ¹ (min)	Σφάλμα Μάζας (\pm SD) ² (ppm)	% MF (\pm SD) ³	% E (\pm SD) ⁴	LOD ⁵ (ng mL ⁻¹)	
130	Oxymorphone	$C_{17}H_{19}NO_4$	[M+H] ⁺	302,1387	1,54	1,3			
131	Pentazocine	$C_{19}H_{27}NO$	[M+H] ⁺	286,2154	5,60	2,1 (\pm 0,6)	83,3 (\pm 7,0)	69,8 (\pm 7,8)	<20
132	Pethidine	$C_{15}H_{21}NO_2$	[M+H] ⁺	248,1645	5,10	2,8 (\pm 0,7)	82,6 (\pm 3,9)	72 (\pm 11)	<20
133	*Pethidine metabolite (Norpethidine)	$C_{17}H_{19}NO_2$	[M+H] ⁺	234,1489	5,01	0,9			
134	Sulfentanyl (MRPL 10 ng mL ⁻¹)	$C_{22}H_{30}N_2O_2S$	[M+H] ⁺	387,2101	7,13	3,5 (\pm 1,1)	52,4 (\pm 6,8)	77,9 (\pm 4,9)	<10
Ενισχυτής Μεταφοράς Οξυγόνου									
135	Efaproxiral (RSR13)	$C_{20}H_{33}NO_4$	[M+H] ⁺	342,1700	8,17	1,0 (\pm 0,6)	78 (\pm 12)	45,1 (\pm 8,5)	<2
Αναστολείς Αρωματάσης (MRPL 50ng mL⁻¹)									
136	Aminoglutethimide	$C_{13}H_{26}N_2O_2$	[M+H] ⁺	233,1285	4,95	2,4 (\pm 1,9)	57 (\pm 22)	91,5 (\pm 8,0)	25
137	Anastrozole	$C_{17}H_{17}N_5$	[M+H] ⁺	294,1713	7,23	2,3 (\pm 1,2)	77,8 (\pm 7,2)	91,0 (\pm 3,2)	<10
138	Androst-1,4,6-triene-3,17-dione	$C_{19}H_{22}O_2$	[M+H] ⁺	283,1693	7,99	7,0 (\pm 5,7)	33 (\pm 13)	88,0 (\pm 8,9)	<25
139	*Androst-4,6-diene-3,17-dione (Androst-1,4,6-triene-3,17-dione met)	$C_{19}H_{24}O_2$	[M+H] ⁺	285,1849	8,50	0,5			
140	*17 β -Hydroxy-androst-1,4,6-triene-3-one (Androst-1,4,6-triene-3,17-dione met)	$C_{19}H_{24}O_2$	[M+H] ⁺	285,1849	7,46	0,6			
141	6-Oxoandrostene-3,17-dione	$C_{19}H_{24}O_3$	[M+H] ⁺	301,1798	7,55	-4,3			
142	6-Hydroxytestosterone (6-Oxoandrostene-3,17-dione met)	$C_{19}H_{28}O_3$	[M+H] ⁺	305,2111	5,63	4,2 (\pm 4,5)			
143	Exemestane	$C_{20}H_{24}O_2$	[M+H] ⁺	297,1849	9,00	4,2 (\pm 3,2)	49 (\pm 15)	88,3 (\pm 4,9)	25
144	*Exemestane dihydro-metabolite	$C_{20}H_{26}O_2$	[M+H] ⁺	299,2006	8,40	1,3			
145	Formestane	$C_{19}H_{26}O_3$	[M+H] ⁺	303,1955	9,10	10,9 (\pm 8,9)			50
146	*Testolactone	$C_{19}H_{24}O_3$	[M+H] ⁺	301,1798	6,76	3,7			
147	*Testolactone dihydro-metabolite	$C_{19}H_{26}O_3$	[M+H] ⁺	303,1955	7,80	1,0			
148	*Testolactone tetrahydro-metabolite	$C_{19}H_{28}O_3$	[2M+H] ⁺	609,4150	8,07	4,1			

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Ανάπτυξη και αξιολόγηση μεθόδου σάρωσης απαγορευμένων ουσιών σε ούρα αθλητών με LC/TOF-MS

Ουσία	Μοριακός Τύπος	Ιόν	Ιόν m/z	RT ¹ (min)	Σφάλμα Μάζας (\pm SD) ² (ppm)	% MF (\pm SD) ³	% E (\pm SD) ⁴	LOD ⁵ (ng mL ⁻¹)	
Εκλεκτικοί Ρυθμιστές Υποδοχέων Οιστρογόνων (MRPL 50ng mL⁻¹)									
149	Raloxifene	C ₂₈ H ₂₇ NO ₄ S	[M+H] ⁺	474,1734	6,36	2,2 (\pm 1,2)	54 (\pm 31)	89 (\pm 10)	<10
150	Tamoxifene 3-hydroxy-4-methoxy met.	C ₂₇ H ₃₁ NO ₃	[M+H] ⁺	418,2377	8,57	2,4 (\pm 1,3)	66 (\pm 36)	79 (\pm 14)	<10
151	* Tamoxifene N-desmethyl-hydroxy met.	C ₂₅ H ₂₇ NO ₂	[M+H] ⁺	374,2115	6,78	0,8			
152	*Tamoxifene N-desmethyl-hydroxy-methoxy metabolite	C ₂₆ H ₂₉ NO ₃	[M+H] ⁺	404,2220	7,26	1,7			
153	*Toremifene-carboxy metabolite *Tamoxifene-carboxy metabolite	C ₂₆ H ₂₇ NO ₃	[M+H] ⁺	402,2064	6,60	0,5			
154	Toremifene	C ₂₆ H ₂₈ NOCl	[M+H] ⁺	406,1932	9,31	2,3 (\pm 1,3)	50 (\pm 12)	61,8 (\pm 1,8)	<10
155	*Toremifene-hydroxy metabolite	C ₂₆ H ₂₈ NO ₂ Cl	[M+H] ⁺	422,1881	7,49	2,4			
156	*Toremifene-hydroxy-desmethyl met.	C ₂₅ H ₂₆ NO ₂ Cl	[M+H] ⁺	408,1725	7,34	0,2			
157	*Toremifene-hydroxy-methoxy-desmethyl metabolite	C ₂₆ H ₂₈ NO ₃ Cl	[M+H] ⁺	438,1830	7,90	2,1			
Αντι-οιστρογόνα (MRPL 50 ng mL⁻¹)									
158	*Clomiphene-4-hydroxy-metabolite	C ₂₆ H ₂₈ NO ₂ Cl	[M+H] ⁺	422,1881	8,00	0,2			
159	*Clomiphene-hydroxy-methoxy met.	C ₂₇ H ₃₀ NO ₃ Cl	[M+H] ⁺	452,1987	8,12	1,5			
160	*Clomiphene-N-desethyl-hydroxy met.	C ₂₄ H ₂₄ NO ₂ Cl	[M+H] ⁺	394,1568	7,62	1,3			
Διεγερτικά (MRPL 50 ng mL⁻¹)									
161	Adrafinil	C ₁₅ H ₁₅ NO ₃ S	Artifact [C ₁₃ H ₁₀] ⁺	167,0855	5,93	0,7 (\pm 0,7)	88,9 (\pm 4,3)	59,7 (\pm 2,2)	<50
162	Amiphenazole	C ₉ H ₉ N ₃ S	[M+H] ⁺	192,0590	2,32	2,9 (\pm 1,7)	87,8 (\pm 8,9)	65 (\pm 12)	100
163	Amphepramone	C ₁₃ H ₁₉ NO	[M+H] ⁺	206,1539	3,66	3,4 (\pm 0,8)	60,2 (\pm 7,5)	67 (\pm 16)	<50
164	*N,N-Diethylnorephedrine (Amphepramone metabolite)	C ₁₃ H ₂₁ NO	[M+H] ⁺	208,1696	3,72	0,5			

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Ανάπτυξη και αξιολόγηση μεθόδου σάρωσης απαγορευμένων ουσιών σε ούρα αθλητών με LC/TOF-MS

Ουσία	Μοριακός Τύπος	Ιόν	Ιόν m/z	RT ¹ (min)	Σφάλμα Μάζας (\pm SD) ² (ppm)	% MF (\pm SD) ³	% E (\pm SD) ⁴	LOD ⁵ (ng mL ⁻¹)
165 *N-Ethylnorephedrine (Amphetamine metabolite)	C ₁₁ H ₁₇ NO	[M+H] ⁺	180,1383	3,20	2,2			
166 *Nordihethylpropion (Amphetamine metabolite)	C ₁₁ H ₁₅ NO	[M+H] ⁺	178,1226	3,13	4,5			
167 Amphetamine	C ₉ H ₁₃ N	[M+H] ⁺	136,1121	3,15	4,0 (\pm 1,7)	82,4 (\pm 8,9)	66 (\pm 11)	<50
168 *Benfluorex	C ₁₉ H ₂₀ NO ₂ F ₃	[M+H] ⁺	352,1519	8,79	2,3			
169 *Benfluorex desbenzaldehyde-met.	C ₁₂ H ₁₆ NOF ₃	[M+H] ⁺	248,1257	5,04	5,1			
170 *Benfluorex desbenzaldehyde-carboxy metabolite	C ₁₂ H ₁₄ NO ₂ F ₃	[M+H] ⁺	262,1049	5,19	5,2			
171 Benzphetamine	C ₁₇ H ₂₁ N	[M+H] ⁺	240,1747	6,00	2,6 (\pm 0,6)	86,0 (\pm 8,3)	63,5 (\pm 8,8)	<50
172 Benzylamphetamine	C ₁₆ H ₁₉ N	[M+H] ⁺	226,1590	5,82	2,4 (\pm 0,6)	89,1 (\pm 4,5)	72,2 (\pm 8,5)	<50
173 1-Benzylpiperazine	C ₁₁ H ₁₆ N ₂	[M+H] ⁺	177,1386	2,80	4,6 (\pm 0,6)	69 (\pm 11)	62,2 (\pm 9,5)	<50
174 Buflomedil	C ₁₇ H ₂₅ NO ₄	[M+H] ⁺	308,1856	4,92	0,5 (\pm 0,5)	86,3 (\pm 7,2)	87,8 (\pm 9,6)	<50
175 Bupropion	C ₁₃ H ₁₈ NOCl	[M+H] ⁺	240,1150	5,37	2,2 (\pm 0,7)	70 (\pm 10)	64 (\pm 16)	<50
176 *Bupropion dihydro-metabolite	C ₁₃ H ₂₀ NOCl	[M+H] ⁺	242,1306	5,16	1,3			
177 *Bupropion hydroxy-metabolites	C ₁₃ H ₁₈ NO ₂ Cl	[M+H] ⁺	256,1099	4,35 4,56	-0,4 -0,8			
178 *Bupropion dihydro-hydroxy-metabolites	C ₁₃ H ₂₀ NO ₂ Cl	[M+H] ⁺	258,1255	3,70 4,03 4,76	0,4 4,6 -1,2			
179 1-(3-Chlorophenyl)piperazine	C ₁₀ H ₁₃ N ₂ Cl	[M+H] ⁺	197,0840	4,72	2,4 (\pm 1,2)	67 (\pm 10)	78 (\pm 16)	<50
180 Carphedone	C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₂	[M+H] ⁺	219,1128	4,70	1,8 (\pm 1,6)	70 (\pm 11)	46,7 (\pm 8,1)	<50
181 *Carphedone-4-hydroxy metabolite	C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₃	[M+H] ⁺	235,1077	2,64	3,4			
182 *Clobenzorex	C ₁₆ H ₁₈ NCl	[M+H] ⁺	260,1201	6,53	0,4			
183 *Clobenzorex dihydroxy-metabolites	C ₁₆ H ₁₈ NO ₂ Cl	[M+H] ⁺	292,1099	4,65 4,98 5,33	2,1 1,4 2,7			

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Ανάπτυξη και αξιολόγηση μεθόδου σάρωσης απαγορευμένων ουσιών σε ούρα αθλητών με LC/TOF-MS

Ουσία	Μοριακός Τύπος	Ιόν	Ιόν m/z	RT ¹ (min)	Σφάλμα Μάζας (\pm SD) ² (ppm)	% MF (\pm SD) ³	% E (\pm SD) ⁴	LOD ⁵ (ng mL ⁻¹)
184	*Clobenzorex hydroxy-metabolites	C ₁₆ H ₁₈ NOCl	[M+H] ⁺	276,1150	5,08 5,39 5,66 5,95	0,4 2,9 1,8 1,4		
185	Cocaine	C ₁₇ H ₂₁ NO ₄	[M+H] ⁺	304,1543	5,05	1,0 (\pm 0,6)	87,8 (\pm 6,3)	78,4 (8,6)
186	Benzoyllecgonine (Cocaine metabolite)	C ₁₆ H ₁₉ NO ₄	[M+H] ⁺	290,1387	3,96	1,3 (\pm 1,2)	95,7 (\pm 4,2)	2,6 (\pm 1,6)
187	Ecgonine methylester (Cocaine met.)	C ₁₀ H ₁₇ NO ₃	[M+H] ⁺	200,1281	0,93	5,6 (\pm 1,9)	91,4 (\pm 3,5)	38 (\pm 10)
188	Cropropamide	C ₁₃ H ₂₄ N ₂ O ₂	[M+H-C ₂ H ₅ NH ₂] ⁺	196,1332	6,40	3,4 (\pm 0,6)	71 (\pm 12)	86,1 (\pm 8,2)
189	Crotethamide	C ₁₂ H ₂₂ N ₂ O ₂	[M+H-C ₂ H ₅ NH ₂] ⁺	182,1176	5,44	4,0 (\pm 0,6)	76 (\pm 11)	92,5 (\pm 4,1)
190	Cyclazodone	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O ₂	[M+H] ⁺	217,0972	5,56	2,9 (\pm 1,9)	72 (\pm 12)	93,1 (\pm 4,7)
191	Dimethylamphetamine	C ₁₁ H ₁₇ N ₇	[M+H] ⁺	164,1434	3,64	4,1 (\pm 0,8)	81,7 (\pm 8,6)	85,5 (\pm 5,3)
192	Ephedrine/Pseudoephedrine	C ₁₀ H ₁₅ NO	[M+H] ⁺ [M+H-H ₂ O] ⁺	166,1226 148,1121	2,57	1,1 (\pm 0,5)	97,9 (\pm 1,5)	64,7 (\pm 7,8)
193	Etafedrine	C ₁₂ H ₁₉ NO	[M+H] ⁺	194,1539	3,34	4,7 (\pm 1,0)	84,5 (\pm 7,5)	87,7 (\pm 7,7)
194	Ethamivan	C ₁₂ H ₁₇ NO ₃	[M+H] ⁺	224,1281	5,53	2,7 (\pm 0,6)	94,6 (\pm 3,7)	90,8 (\pm 8,0)
195	*Ethamivan N-desethyl metabolite	C ₁₀ H ₁₃ NO ₃	[M+H] ⁺	196,0968	3,07	4,1		
196	Ethylamphetamine	C ₁₁ H ₁₇ N	[M+H] ⁺	164,1434	3,91	4,3 (\pm 0,6)	86,9 (\pm 9,8)	80 (\pm 11)
197	Etilefrine	C ₁₀ H ₁₅ NO ₂	[M+H] ⁺	182,1176	1,37	2,6 (\pm 1,6)	89,1 (\pm 5,0)	26,4 (\pm 4,4)
198	Famprofazone	C ₂₄ H ₃₁ N ₃ O	[M+H] ⁺	378,2540	10,94	0,6 (\pm 0,3)	84,9 (\pm 8,9)	73 (\pm 13)
199	Fenbutrazate	C ₂₃ H ₂₉ NO ₃	[M+H] ⁺	368,2220	10,80	11,1 (\pm 1,2)	61,9 (\pm 7,3)	78,7 (\pm 4,4)
200	Fencamfamine	C ₁₅ H ₂₁ N	[M+H] ⁺	216,1747	5,53	3,0 (\pm 0,6)	88,9 (\pm 6,4)	80,4 (\pm 9,7)
201	Fencamine	C ₂₈ H ₂₆ N ₆ O ₂	[M+H] ⁺	385,2436	4,37	4,1 (\pm 2,1)	61 (\pm 15)	92,8 (\pm 2,3)
202	Fenethylline	C ₁₈ H ₂₃ N ₅ O ₂	[M+H] ⁺	342,1925	4,68	1,6 (\pm 0,8)	70 (\pm 11)	88,4 (\pm 7,1)
203	*7-(2-hydroxyethyl)-theophylline (Fenethylline metabolite)	C ₉ H ₁₂ N ₄ O ₃	[M+H] ⁺	225,0982	2,65	6,5		
204	Fenfluramine	C ₁₂ H ₁₆ F ₃ N	[M+H] ⁺	232,1308	5,68	3,0 (\pm 2,1)	79 (\pm 11)	69,5 (\pm 9,0)
205	Fenproporex	C ₁₂ H ₁₆ N ₂	[M+H] ⁺	189,1386	3,74	4,1 (\pm 0,5)	89,6 (\pm 7,9)	74,4 (8,0)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Ανάπτυξη και αξιολόγηση μεθόδου σάρωσης απαγορευμένων ουσιών σε ούρα αθλητών με LC/TOF-MS

Ουσία	Μοριακός Τύπος	Ιόν	Ιόν m/z	RT ¹ (min)	Σφάλμα Μάζας (\pm SD) ² (ppm)	% MF (\pm SD) ³	% E (\pm SD) ⁴	LOD ⁵ (ng mL ⁻¹)	
206	*Fenproporex-hydroxy metabolite	$C_{12}H_{16}N_2O$	[M+H] ⁺	205,1335	1,73	2,6			
207	Flephedrone	$C_{10}H_{12}FNO_3$	[M+H] ⁺	182,0976	3,09	2,0 (\pm 1,1)			
208	Fluoroamphetamine	$C_9H_{12}FN$	[M+H] ⁺	154,1021	3,41 3,64	2,7 (\pm 2,1) 1,6 (\pm 1,3)			
209	Furfenorex	$C_{15}H_{19}NO$	[M+H] ⁺	230,1539	5,26	1,4 (\pm 0,6)	79,6 (\pm 5,7)	67 (\pm 12)	<50
210	Heptaminol	$C_8H_{19}NO$	[M+H] ⁺	146,1539	1,51	1,4 (\pm 0,5)	95,7 (\pm 5,6)	5,3 (\pm 1,7)	<50
211	p-Hydroxyamphetamine	$C_9H_{12}NO$	[M+H] ⁺ [M+H-NH ₃] ⁺	152,1070 135,0804	1,51	7,4 (\pm 5,1) 3,0 (\pm 1,6)			
212	6-Hydroxybromantan	$C_{16}H_{20}NOBr$	[M+H] ⁺	322,0801	10,21	0,6 (\pm 0,7)	44,1 (\pm 4,9)	70 (\pm 14)	<50
213	*Isometheptene	$C_9H_{19}N$	[M+H] ⁺	142,1590	4,52	0,7			
214	*Isometheptene-hydroxy metabolites	$C_9H_{19}NO$	[M+H] ⁺	158,1539	1,65 1,78	4,4 3,2			
215	MDMA	$C_{11}H_{15}NO_2$	[M+H] ⁺	194,1176	3,62	2,6 (\pm 0,8)	91,0 (\pm 5,7)	84,2 (\pm 7,6)	<50
216	*Hydroxy-methoxy-amphetamine (HMA) (MDMA metabolite)	$C_{10}H_{15}NO_2$	[M+H] ⁺	182,1176	1,86	2,7			
217	*Hydroxy-methoxy-methamphetamine (HMMA, MDMA metabolite)	$C_{11}H_{17}NO_2$	[M+H] ⁺	196,1332	2,00	4,1			
218	MDA	$C_{10}H_{13}NO_2$	[M+H] ⁺	180,1014	3,38	18 (\pm 17)	81 (\pm 11)	74,6 (\pm 8,3)	250
219	Mefenorex	$C_{12}H_{18}NCl$	[M+H] ⁺	212,1201	5,09	2,9 (\pm 0,9)	90,0 (\pm 8,4)	75,7 (\pm 5,5)	<50
220	*Mefenorex p-hydroxy metabolite	$C_{12}H_{18}NOCl$	[M+H] ⁺	228,1150	3,61	0,9			
221	*Mefenorex p-hydroxy-m-methoxy met.	$C_{13}H_{20}NO_2Cl$	[M+H] ⁺	258,1255	3,95	0,4			
222	Mephedrone	$C_{11}H_{15}NO$	[M+H] ⁺	178,1226	3,93	2,8 (\pm 1,7)			
223	Mephentermine	$C_{11}H_{17}N$	[M+H] ⁺	164,1434	3,98	4,0 (\pm 0,6)	92,0 (\pm 0,6)	84,1 (\pm 8,6)	<50
224	Methamphetamine	$C_{10}H_{15}N$	[M+H] ⁺	150,1277	3,45	4,5 (\pm 0,9)	90,8 (\pm 5,5)	75,7 (\pm 9,5)	<50
225	Methoxyphenamine	$C_{11}H_{17}NO$	[M+H] ⁺	180,1383	4,14	58,5 (\pm 7,2)	90,2 (\pm 5,6)	83,5 (\pm 6,1)	<50
226	p-Methylamphetamine	$C_{10}H_{15}N$	[M+H] ⁺	150,1277	4,32	1,9 (\pm 1,7)	78,9 (\pm 6,4)	90,7 (\pm 2,2)	<250

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Ανάπτυξη και αξιολόγηση μεθόδου σάρωσης απαγορευμένων ουσιών σε ούρα αθλητών με LC/TOF-MS

Ουσία	Μοριακός Τύπος	Ιόν	Ιόν m/z	RT ¹ (min)	Σφάλμα Μάζας (\pm SD) ² (ppm)	% MF (\pm SD) ³	% E (\pm SD) ⁴	LOD ⁵ (ng mL ⁻¹)	
227	Methylenedioxypropylamphetamine	<chem>C16H21NO3</chem>	[M+H] ⁺	276,1594	5,08	1,7 (\pm 0,9)			
228	Methylephedrine	<chem>C11H17NO</chem>	[M+H] ⁺	180,1383	2,88	4,1 (\pm 0,6)	93,2 (\pm 4,3)	85,0 (\pm 8,9)	<50
229	4-Methyl-2-hexanamine	<chem>C7H17N</chem>	[M+H] ⁺	116,1434	3,76	1,5 (\pm 1,1)	56 (\pm 21)	76,5 (\pm 5,0)	<250
230	Methylphenidate	<chem>C14H19NO2</chem>	[M+H] ⁺	234,1489	4,65	2,2 (\pm 0,8)	90,9 (\pm 7,3)	82,2 (\pm 4,2)	<50
231	Modafinil	<chem>C15H15NO2S</chem>	Artifact [C ₁₃ H ₁₀] ⁺	167,0855	6,13	4,0 (\pm 2,1)	89 (\pm 11)	79,0 (\pm 8,3)	<50
232	Nikethamide	<chem>C10H14N2O</chem>	[M+H] ⁺	179,1179	4,22	4,2 (\pm 0,8)	83 (\pm 13)	82,8 (\pm 7,1)	<50
233	*N-Ethylnicotinamide (Nikethamide met.)	<chem>C8H10N2O</chem>	[M+H] ⁺	151,0866	2,41	1,3			
234	Norfenfluramine	<chem>C10H12NF3</chem>	[M+H] ⁺	204,0995	5,17	3,9 (\pm 0,7)	69 (\pm 10)	87 (\pm 10)	<50
235	Norpseudoephedrine Norephedrine	<chem>C9H13NO</chem>	[M+H] ⁺ [M+H-H ₂ O] ⁺	152,1070 134,0964	2,11	1,6 (\pm 1,2)	106,0 (\pm 8,7)	49,1 (\pm 8,0)	<100
236	Ortetamine	<chem>C10H15N</chem>	[M+H] ⁺	150,1277	4,14	1,4 (\pm 1,1)	70,7 (\pm 9,7)	89,4 (\pm 4,8)	<50
237	Pemoline	<chem>C9H8N2O2</chem>	[M+H] ⁺	177,0659	3,75	2,0 (\pm 1,6)	100,0 (\pm 5,7)	62,4 (\pm 9,0)	<50
238	Pentetrazol	<chem>C6H10N4</chem>	[M+H] ⁺	139,0978	3,52	3,1 (\pm 0,6)	77,0 (\pm 9,4)	83,8 (\pm 6,0)	<50
239	*Pentetrazol hydroxy-metabolites	<chem>C6H10N4O</chem>	[M+H] ⁺	155,0927	1,39				
240	Phendimetrazine	<chem>C12H17NO</chem>	[M+H] ⁺	192,1383	3,44	4,9 (\pm 1,2)	66 (\pm 12)	76,3 (\pm 9,4)	<50
241	Phenmetrazine	<chem>C11H15NO</chem>	[M+H] ⁺	178,1226	3,38	4,2 (\pm 2,4)	45,5 (\pm 7,4)	82 (\pm 13)	<50
242	Phenpromethamine	<chem>C10H15N</chem>	[M+H] ⁺	150,1277	3,49	2,1 (\pm 2,2)	58 (\pm 11)	91,9 (\pm 6,2)	<50
243	Phentermine	<chem>C10H15N</chem>	[M+H] ⁺	150,1277	3,73	3,8 (\pm 1,3)	96,5 (\pm 6,2)	81 (\pm 12)	<50
244	Phenylephrine	<chem>C9H13NO2</chem>	[M+H] ⁺	168,1019	1,19	6,2 (\pm 4,2)	62 (\pm 13)	4,6 (\pm 2,0)	500
245	Pholedrine	<chem>C10H15NO</chem>	[M+H] ⁺	166,1226	1,62	4,5 (\pm 0,7)	90,9 (\pm 3,7)	57,5 (\pm 5,4)	<50
246	Pipradrol (MRPL 200 ng mL ⁻¹)	<chem>C8H19N</chem>	[M+H] ⁺	268,1696	5,36	2,3 (\pm 0,5)	86,0 (\pm 9,3)	73,9 (\pm 3,5)	<20
247	Prenylamine	<chem>C24H27N</chem>	[M+H] ⁺	330,2216	8,19	1,2 (\pm 0,9)			
248	Prenylamine metabolite	<chem>C15H17N</chem>	[M+H] ⁺	212,1434	5,83	2,3 (\pm 1,5)			
249	Prolintane	<chem>C15H23N</chem>	[M+H] ⁺	218,1903	5,66	3,3 (\pm 4,0)	92,5 (\pm 7,8)	73,3 (\pm 4,6)	<50
250	*Prolintane-dihydroxy-metabolite	<chem>C15H23NO2</chem>	[M+H] ⁺	250,1802	5,22	2,4			

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Ανάπτυξη και αξιολόγηση μεθόδου σάρωσης απαγορευμένων ουσιών σε ούρα αθλητών με LC/TOF-MS

Ουσία	Μοριακός Τύπος	Ιόν	Ιόν m/z	RT ¹ (min)	Σφάλμα Μάζας (\pm SD) ² (ppm)	% MF (\pm SD) ³	% E (\pm SD) ⁴	LOD ⁵ (ng mL ⁻¹)	
251	*Prolintane-hydroxy-metabolite	C ₁₅ H ₂₃ NO	[M+H] ⁺	234,1852	4,34	3,0			
252	*Prolintane-oxo-hydroxy-metabolite	C ₁₅ H ₂₁ NO ₂	[M+H] ⁺	248,1645	5,88	1,2			
253	*Prolintane-oxo-metabolite	C ₁₅ H ₂₁ NO	[M+H] ⁺	232,1696	8,72	2,2			
254	Propylhexedrine	C ₁₀ H ₂₁ N	[M+H] ⁺	156,1747	5,08	3,4 (\pm 0,9)	81,2 (\pm 9,4)	86,5 (\pm 99)	<50
255	*Propylhexedrine hydroxy-metabolites	C ₁₀ H ₂₁ NO	[M+H] ⁺	172,1696	1,60 1,72 2,05	4,1 4,1 5,8			
256	*Nor-propylhexedrine	C ₉ H ₁₉ N	[M+H] ⁺	142,1590	4,99	4,2			
257	Strychnine (MRPL 200 ng mL ⁻¹)	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₂	[M+H] ⁺	335,1754	3,88	1,8 (\pm 0,6)	73,9 (\pm 9,3)	80,9 (\pm 5,6)	<20
258	*Sibutramine-N-desmethyl-hydroxy metabolites	C ₁₆ H ₂₄ NOCl	[M+H] ⁺	282,1619	5,79 6,07 6,68	1,1 1,4 1,8			
259	*Sibutramine-N-desmethyl-metabolite	C ₁₆ H ₂₄ NCl	[M+H] ⁺	266,1670	7,52	0,8			
260	*Sibutramine-didesmethyl-hydroxy mets.	C ₁₅ H ₂₂ NOCl	[M+H] ⁺	268,1463	5,34 5,59 6,02 6,48	0,4 1,5 1,9 1,1			
261	*Sibutramine-N-didesmethyl-metabolite	C ₁₅ H ₂₂ NCl	[M+H] ⁺	252,1514	7,32	1,6			
262	Sydnocarb	C ₁₈ H ₁₈ N ₄ O ₂	[M+H] ⁺	323,1503	9,00	2,0 (\pm 0,6)	39,6 (\pm 5,8)	73 (\pm 13)	<50
263	Sydnocarb metabolite	C ₁₈ H ₁₈ N ₄ O ₃	[M+H] ⁺	339,1452	7,21	4,5 (\pm 1,1)	54 (\pm 11)	96,2 (6,0)	<250
264	Synephrine	C ₁₃ H ₁₇ NO ₂	[M+H-H ₂ O] ⁺	150,0913	1,02	3,7 (\pm 4,2)	47 (\pm 14)	3,2 (\pm 0,6)	250
265	1-(3-Trifluoro-methylphenyl)-piperazine	C ₁₁ H ₁₃ N ₂ F ₃	[M+H] ⁺	231,1104	5,42	2,5 (\pm 0,6)	81 (\pm 11)	82 (\pm 14)	<50
266	Tuaminoheptane	C ₇ H ₁₇ N	[M+H] ⁺	116,1434	3,97	2,3 (\pm 0,9)	82 (\pm 11)	81 (\pm 12)	<50

¹ RT (Retention Time): Χρόνος Ανάσχεσης

² Μέση τιμή και τυπική απόκλιση (SD) του απόλυτου σφάλματος μάζας σε 10 διαφορετικά δείγματα ούρων εμβολιασμένα με τους αναλύτες στο MRPL. Για τις ουσίες 6, 17, 23, 25, 33, 29 παρατίθενται δεδομένα σε συγκεντρώσεις που αντιστοιχούν στο LOD.

³ Παράγοντας επίδρασης υποστρώματος (% Matrix Factor) σε 6 διαφορετικά δείγματα ούρων (μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση)

⁴ Εκχυλιστική απόδοση (% Extraction Recovery) σε 6 διαφορετικά δείγματα ούρων (μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση)

⁵ LOD (Limit Of Detection): Όριο Ανίχνευσης

* Αναλύτες που ανιχνεύθηκαν από την ανάλυση μεταβολικών δειγμάτων

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Ανάπτυξη και αξιολόγηση μεθόδου σάρωσης απαγορευμένων ουσιών σε ούρα αθλητών με LC/TOF-MS

Πίνακας 5.3: Αναλύτες που δεν ανιχνεύθηκαν με την προτεινόμενη μέθοδο σάρωσης

Ουσία	Ιόντα που ανιχνεύθηκαν σε πρότυπα διαλύματα	Αδυναμία ανίχνευσης σε ούρα με την προτεινόμενη μέθοδο
1 Dichlrophenamide	$[2M+Na]^+$	Χαμηλή απόδοση ιοντισμού σε συνθήκες ESI(+) Χαμηλή εκχυλιστική απόδοση (ανάκτηση <2 %)
2 Furosemide	$[2M+K]^+$ $[2M+Na]^+$	Χαμηλή απόδοση ιοντισμού σε συνθήκες ESI(+) (ανιχνεύθηκε μόνο σε πρότυπα διαλύματα)
3, 4 Octopamine, Ritalinic acid	$[M+H]^+$	Χαμηλή εκχυλιστική απόδοση (ανάκτηση <1 %)
5, 6 Norfenefrine, Methasterone	$[M+H]^+$ $[M+H-H_2O]^+$	Χαμηλή απόδοση ιοντισμού σε συνθήκες ESI(+) (ανιχνεύθηκαν μόνο σε πρότυπα διαλύματα)
7, 8 Furazabol, Letrozol metabolite	-	Δεν ανιχνεύθηκαν σε πρότυπα διαλύματα
9, 10 1-Testosterone, 17-Epioxandrolone	$[M+H]^+$	Παρεμποδίσεις από το υπόστρωμα των ούρων
11, 12 Mibolerone, Methenolone	$[M+H]^+$	Συνέκλυση με το εσωτερικό πρότυπο 17 α -methyltestosterone (m/z 303,2319 και για τις τρεις ουσίες)
13 Norbolethone metabolite 1	$[M+H-H_2O]^+$	Χαμηλή απόδοση ιοντισμού σε συνθήκες ESI(+) (ανιχνεύθηκε σε συγκέντρωση 4 x MRPL σε 9/10 δείγματα ούρων και με σφάλμα μάζας 42 (\pm 26) ppm)
14 16-Hydroxyfurazabol	$[M+NH_4]^+$ $[2M+Na]^+$	Χαμηλή απόδοση ιοντισμού σε συνθήκες ESI(+) Παρεμποδίσεις από το υπόστρωμα των ούρων
15, 16 17 α -methyltestosterone metabolites	$[M+H-2H_2O]^+$	Χαμηλή απόδοση ιοντισμού σε συνθήκες ESI(+) (ανιχνεύθηκαν σε δείγματα ούρων εμβολιασμένα σε συγκέντρωση μεγαλύτερη από 4 x MRPL)
17, 18 5 α -Tetrahydronorethisterone, Bolasterone metabolite	$[M+NH_4]^+$ $[M+H-H_2O]^+$	Χαμηλή απόδοση ιοντισμού σε συνθήκες ESI(+) Παρεμποδίσεις από το υπόστρωμα των ούρων
19 Boldenone metabolite	$[M+H]^+$	Παρεμποδίσεις από το υπόστρωμα των ούρων

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Ανάπτυξη και αξιολόγηση μεθόδου σάρωσης απαγορευμένων ουσιών σε ούρα αθλητών με LC/TOF-MS

	Ουσία	Ιόντα που ανιχνεύθηκαν σε πρότυπα διαλύματα	Αδυναμία ανίχνευσης σε ούρα με την προτεινόμενη μέθοδο
20	Oxymesterone	$[M+H]^+$	Χαμηλή απόδοση ιοντισμού σε συνθήκες ESI(+) Παρεμποδίσσεις από το υπόστρωμα των ούρων
21	Norethandrolone metabolite 1	$[M+H-H_2O]^+$	Παρεμποδίσσεις από το υπόστρωμα των ούρων
22	Methenolone metabolite	$[M+NH_4]^+$ $[M+H-H_2O]^+$	Παρεμποδίσσεις από το υπόστρωμα των ούρων σε κάποια δείγματα ούρων, ενώ σε άλλα δείγματα ανιχνεύθηκε ακόμα και σε συγκέντρωση 2 ng mL^{-1}
23	Oxilofrine	$[M+H]^+$ $[M+H-H_2O]^+$	Παρεμποδίσσεις από το υπόστρωμα των ούρων
24	Meclofenoxate	-	Ασταθής ουσία σε διαλύματα και σε ούρα (δεν ανιχνεύθηκαν τα προϊόντα διάσπασης)
25	Fluticasone	$[M+H]^+$	Χαμηλή εκχυλιστική απόδοση (ανάκτηση <2 %) (Αναλύθηκε σειρά μεταβολικών δειγμάτων)
26	Normethandrolone	$[M+H]^+$ $[2M+H]^+$	Παρεμποδίσσεις από το υπόστρωμα των ούρων

5.12. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία αναπτύχθηκε μέθοδος σάρωσης (screening) για την ανίχνευση 266 απαγορευμένων ουσιών (διεγερτικών, ναρκωτικών, διουρητικών, β_2 -αγωνιστών, β -ανταγωνιστών, αντιοιστρογόνων, κορτικοστεροειδών και αναβολικών παραγόντων) και των μεταβολιτών τους σε ούρα αθλητών. Τα εργαστήρια ελέγχου ντόπινγκ στην πλειοψηφία τους χρησιμοποιούν διαφορετικά αναλυτικά πρωτόκολλα για την ανίχνευση των ποικίλης δομής μικρού μοριακού βάρους απαγορευμένων ουσιών. Η προτεινόμενη μέθοδος και τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την αξιολόγησή της, δείχνουν πως μια απλή διαδικασία υγρό-υγρό εκχύλισης σε συνδυασμό με ανάλυση πλήρους σάρωσης LC/ESI(+)/TOF-MS μπορούν να εφαρμοσθούν σε ανάλυση ρουτίνας για τη σάρωση μεγάλου αριθμού απαγορευμένων μικρομοριακών ενώσεων σε δείγματα ούρων αθλητών. Η παρούσα μεθοδολογία υπερέρχει έναντι αντίστοιχων LC/MS μεθόδων σάρωσης της βιβλιογραφίας, οι οποίες είτε χρησιμοποιούν πολυπλοκότερα και περισσότερο χρονοβόρα πρωτόκολλα για την κατεργασία των δειγμάτων ούρων (διπλή υγρό-υγρό εκχύλιση ή εκχύλιση στερεάς φάσης ή και τα δύο), είτε εφαρμόζουν διπλή ανάλυση κάθε δείγματος σε συνθήκες θετικού και αρνητικού ιοντισμού. Η ενοποίηση διαφορετικών αναλυτικών διαδικασιών σάρωσης σε ένα αναλυτικό πρωτόκολλο, αποτελεί σημαντικό επίτευγμα για το Εργαστήριο καθώς απλοποιούνται οι παρασκευαστικές διαδικασίες προκατεργασίας δειγμάτων και ελαττώνεται σημαντικά ο χρόνος και το κόστος των αναλύσεων. Αυτό αποτελεί ιδιαίτερα σημαντικό πλεονέκτημα σε περιπτώσεις όπου επιβάλλεται ταχεία έκδοση των αποτελεσμάτων (π.χ. εντός 24ώρου ή και λιγότερο σε περιπτώσεις παγκόσμιων υψηλού κύρους αθλητικών διοργανώσεων) ή σε περιπτώσεις μικρής διαθεσιμότητας όγκου ούρων.

Η προτεινόμενη μεθοδολογία καθιστά δυνατή την ανίχνευση του 80 % των μικρομοριακών ενώσεων που αναφέρονται στη Λίστα Απαγορευμένων ουσιών του WADA (πλην των ενδογενών στεροειδών), ενώ επιπλέον ουσίες με αντίστοιχα χαρακτηριστικά μπορούν σχετικά εύκολα να ενσωματωθούν στις ανιχνευόμενες ουσίες, χωρίς να απαιτείται αλλαγή στις χρωματογραφικές ή φασματομετρικές συνθήκες που εφαρμόζονται. Η σταθερότητα στους χρόνους έκλουσης των αναλυτών που εξασφάλισε το υγροχρωματογραφικό σύστημα υπερυψηλής απόδοσης και ταυτόχρονα η ικανότητα μέτρησης ακριβούς μάζας από τον υψηλής διαχωριστικής ικανότητας αναλυτή μαζών του φασματομέτρου μαζών TOF-MS επέτρεψαν να χρησιμοποιηθούν ως αξιόπιστα κριτήρια ανίχνευσης των αναλυτών, ο χρόνος έκλουσης και το σφάλμα μέτρησης του λόγου m/z . Παράλληλα, η λήψη φασμάτων πλήρους σάρωσης με ακρίβεια τετάρτου δεκαδικού ψηφίου στη μέτρηση των τιμών m/z , αποτελεί πολύτιμο εργαλείο στην αναδρομική επανεξέταση δειγμάτων που έχουν ήδη αναλυθεί στο παρελθόν προκειμένου να διαπιστωθεί η λήψη νέων ουσιών (designer drugs) που εισάγονται μετέπειτα στη Λίστα του WADA.

Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι η προτεινόμενη μέθοδος επικυρώθηκε από το Εθνικό Συμβούλιο Διαπίστευσης (ΕΣΥΔ) και εντάχθηκε στο πεδίο διαπίστευσης του Εργαστηρίου. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα την κατάργηση της εφαρμογής των επιμέρους διαδικασιών I, II και V που αφορούσαν την ανίχνευση διεγερτικών, ναρκωτικών και διουρητικών ουσιών με διαφορετικά πρωτόκολλα προκατεργασίας των δειγμάτων ούρων και ανάλυση GC/MS, αντίστοιχα. Με τον τρόπο αυτό, στο στάδιο των προσανατολιστικών

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Ανάπτυξη και αξιολόγηση μεθόδου σάρωσης απαγορευμένων ουσιών σε ούρα αθλητών με LC/TOF-MS

δοκιμασιών (διαδικασιών σάρωσης) όλα τα δείγματα ουρων αθλητών κατεργάζονται με τη διαδικασία υγρό-υγρό εκχύλισης που εφαρμόσθηκε στην παρούσα εργασία (Διαδικασία IV) και στη συνέχεια το λαμβανόμενο οργανικό εκχύλισμα χωρίζεται ισόποσα για την ανίχνευση απαγορευμένων ουσιών με την προτεινόμενη μέθοδο LC/TOFMS και με τις ήδη εφαρμοζόμενες μεθόδους GC/MS και GC/GHRMS για την ανίχνευση αναβολικών παραγόντων και των ουσιών που δεν ανιχνεύθηκαν με την παραπάνω μέθοδο.

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ
ΜΕΘΟΔΩΝ ΑΠΕΥΘΕΙΑΣ ΕΓΧΥΣΗΣ
(DIRECT INJECTION) ΓΙΑ ΤΟΝ
ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΔΙΟΡΙΣΜΟ ΚΑΙ ΤΗΝ
ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ (ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ)
ΟΥΣΙΩΝ ΟΡΙΟΥ ΣΕ ΟΥΡΑ ΑΛΟΓΩΝ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ (ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ) ΤΗΣ ΥΔΡΟΚΟΡΤΙΖΟΝΗΣ ΣΕ ΟΥΡΑ ΑΛΟΓΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΔΥΟ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ LC/MS

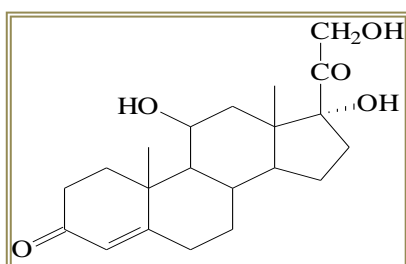
6.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ – ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η υδροκορτιζόνη ή αλλιώς κορτιζόλη (11β,17α,21-trihydroxypregn-4-ene-3,20-dione, Σχήμα 6.1) αποτελεί το κύριο ενδογενές γλυκοκορτικοστεροειδές που εκκρίνεται από το φλοιό των επινεφριδίων. Οι κύριες λειτουργίες της περιλαμβάνουν τη ρύθμιση του μεταβολισμού των λιπιδίων, των πρωτεϊνών και των υδατανθράκων, την αύξηση του σακχάρου στο αίμα μέσω της γλυκονεογένεσης (καταβολισμός λίπους και πρωτεϊνών σε προϊόντα που μπορούν να μετατραπούν σε γλυκόζη στο συκώτι) και την καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος. Παράλληλα, ενεργοποιεί μηχανισμούς καταπολέμησης φλεγμονωδών καταστάσεων και καταστάσεων stress. Στους ανθρώπους χρησιμοποιείται τόσο σε θεραπεία υποκατάστασης σε φλοιοεπινεφριδιακή ανεπάρκεια (π.χ. στη νόσο Addison), καθώς και στην αντιμετώπιση φλεγμονών, αλλεργιών και ρευματοειδών παθήσεων.¹⁶⁰ Στα άλογα η υδροκορτιζόνη βρίσκεται κτηνιατρική εφαρμογή κυρίως λόγω της αντιφλεγμονώδους δράσης της. Όπως ισχύει και για όλες τις αντιφλεγμονώδεις ουσίες, η χορήγηση της κορτιζόλης σε άλογα που λαμβάνουν μέρος σε αθλήματα (π.χ. πένταθλο) και σε ιπποδρομίες θεωρείται παραβίαση των κανονισμών και χαρακτηρίζεται ως ντόπινγκ. Η κορτιζόλη ανήκει στις απαγορευμένες ουσίες ορίου, δεδομένου ότι αποτελεί για τα άλογα ενδογενή ουσία, η οποία ταυτόχρονα μπορεί να συμβάλλει στην βελτίωση της αθλητικής τους απόδοσης και η συγκέντρωσή της στα ούρα δεν πρέπει να υπερβαίνει το 1 μg mL⁻¹.³⁶ Αυξημένα επίπεδα υδροκορτιζόνης στο πλάσμα και στα ούρα των αλόγων μπορούν να παρατηρηθούν μετά από χορήγησή της ή προφαρμάκων αυτής με τη μορφή εστέρων ή μετά από χορήγηση της ορμόνης αδρενοκορτικοτροπίνης (ACTH) ή συνθετικών αναλόγων αυτής.^{161,162} Πολύ αυξημένες συγκεντρώσεις στα ούρα μπορούν να συσχετιστούν μόνο με τη χορήγηση κορτιζόλης.^{163,164} Οι αναλυτικές τεχνικές που έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό της κορτιζόλης σε ούρα αλόγων και αναφέρονται στη βιβλιογραφία περιλαμβάνουν ανοσοχημικές τεχνικές,^{163,164} υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)^{163,165-167} αεριοχρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μαζών (GC/MS)^{165,168,169} και υγροχρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μαζών (LC/MS)^{164,170-176}. Για την ανίχνευση της εξωγενούς χορήγησης κορτιζόλης έχει επίσης χρησιμοποιηθεί αεριοχρωματογραφία συνδυασμένη με την τεχνική της φασματομετρίας μαζών μέτρησης λόγου ισοτόπων (GC/IRMS).¹⁷⁷ Οι ανοσοχημικές τεχνικές είναι απλές, σχετικά χαμηλού κόστους και επιτρέπουν τη σύγχρονη ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων, υπόκεινται όμως σε μεγάλο βαθμό σε επιδράσεις από το υπόστρωμα και σε περίπτωση εφαρμογής τους σε ποσοτικό προσδιορισμό είναι δυνατό να οδηγήσουν σε μη αξιόπιστα αποτελέσματα με υψηλό σφάλμα. Η υγροχρωματογραφική ανάλυση της υδροκορτιζόνης σε ούρα αλόγων παρουσιάζει ως κύρια μειονεκτήματα την έλλειψη ευαισθησίας και εκλεκτικότητας καθώς συχνά παρουσιάζονται παρεμποδισμοί από το υπόστρωμα των ούρων. Η ανίχνευση με GC/MS αν και χαρακτηρίζεται από ειδικότητα και εκλεκτικότητα,

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Υδροκορτιζόνη

είναι χρονοβόρα λόγω του απαραίτητου σταδίου παραγωγοποίησης του μορίου της κορτιζόλης. Η τεχνική LC/MS φαίνεται να αποτελεί πλέον τεχνική επιλογής για την ποιοτική και ποσοτική ανίχνευση της κορτιζόλης σε ούρα αλόγων, καθώς χαρακτηρίζεται από υψηλή εκλεκτικότητα και ευαισθησία και είναι λιγότερο χρονοβόρα σε σχέση με την τεχνική GC/MS. Η τεχνική αυτή έχει χρησιμοποιηθεί ευρύτατα για τον προσδιορισμό της κορτιζόλης στα άλογα και ως τεχνική προκατεργασίας αναφέρεται είτε η εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE), είτε η υγρό-υγρό εκχύλιση (LLE). Στον Πίνακα 6.1 που ακολουθεί παρατίθενται ορισμένα αναλυτικά χαρακτηριστικά των μεθόδων LC/MS που έχουν αναπτυχθεί για τον προσδιορισμό της κορτιζόλης.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανάπτυξη, η αξιολόγηση και η επικύρωση μιας αναλυτικής μεθόδου για τον ποσοτικό προσδιορισμό και την ταυτοποίηση (επιβεβαίωση) της υδροκορτιζόνης σε ούρα αλόγων με την τεχνική LC/MS. Κύρια επιδίωξη ήταν να εφαρμοσθεί η απλούστερη πορεία κατεργασίας της απευθείας έγχυσης αραιωμένου δείγματος στο αναλυτικό σύστημα (direct injection, "dilute and shoot"), λαμβάνοντας ταυτόχρονα υπόψη την πιθανή επίδραση του πολύπλοκου υποστρώματος των ούρων στην αξιοπιστία του ποσοτικού προσδιορισμού.¹⁷⁸⁻¹⁸⁰ Ένας επιπλέον παράγοντας που έπρεπε να ληφθεί υπόψη είναι η αδυναμία εύρεσης λευκού δείγματος ούρων, δεδομένου ότι η κορτιζόλη αποτελεί για τα άλογα ενδογενή ουσία. Στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί η δυνατότητα λήψης ούρων ελεύθερων κορτιζόλης μετά από διέλευσή τους από ρητίνη XAD-16 amberlite, όμως η διεργασία αυτή τροποποιεί γενικότερα τη φύση του υποστρώματος καθώς και άλλα συστατικά των ούρων κατακρατούνται από τη ρητίνη. Έχει ακόμα αναφερθεί η χρησιμοποίηση ούρων αλόγων στα οποία έχει γίνει εξωγενής χορήγηση κορτικοστεροειδών, με αποτέλεσμα να εμφανίζουν δραστική μείωση των επιπέδων της ενδογενώς παραγόμενης κορτιζόλης. Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε κατά πόσο η εφαρμογή της τεχνικής προσθήκης γνωστών ποσοτήτων ως εναλλακτική μέθοδος ποσοτικοποίησης είναι δυνατό να επιλύσει προβλήματα επιδράσεων από το υπόστρωμα (matrix effect) σε περιπτώσεις που δεν εφαρμόζεται εκτενής καθαρισμός του δείγματος και πορεία απομόνωσης του αναλύτη από τη μήτρα, δε χρησιμοποιείται (ή δεν είναι εμπορικά διαθέσιμο) σταθερά ισοτοπικά επισημασμένο ανάλογο του αναλύτη ως εσωτερικό πρότυπο (Stable Isotopic Labeled Internal Standard, SIL-ISTD) και παράλληλα, δεν είναι δυνατή η χρησιμοποίηση λευκού υποστρώματος. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό και την επιβεβαίωση της κορτιζόλης αναπτύχθηκαν δύο μέθοδοι που βασίζονται σε κοινή πορεία κατεργασίας των δειγμάτων ούρων και ανάλυσή τους σε δύο συστήματα LC/MS: LC/Ion Trap-MS και LC/TOF-MS.



Σχήμα 6.1: Χημική δομή της υδροκορτιζόνης

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Υδροκορτιζόνη

Πίνακας 6.1: Χαρακτηριστικά αναλυτικών μεθόδων προσδιορισμού της υδροκορτιζόνης σε ούρα αλόγων με LC/MS

Αναφορά (Ετος)	Μέθοδος	Μητρικό Υλικό	Ανιχνευτής MS	Εύρος συγκεντρώσεων	Προκατεργασία	Εσωτερικό Προτυπο	Χρωματογραφική Στήλη	Κινητή Φάση – Ταχύτητα Ροής
164 (1999)	ποσοτική	Ορός Ούρα	thermospray τριπλό τετράπολο	0,5 – 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$	εκχύλιση στερεάς φάσης	πρεδνιζολόνη	Chrompack Microsphere C18 (100 x 4,6 mm, 3 μm)	ACN:CH ₃ COONH ₄ 0,05 M (72:28) – 1 ml min ⁻¹
170 (1994)	ποσοτική	Ούρα	APCI, τετράπολο (SIM mode)	0,5 – 500 ng mL ⁻¹	εκχύλιση στερεάς φάσης	d ₅ -υδροκορτιζόνη	ChromSep C8 (100 x 3 mm)	MeOH:H ₂ O (50:50) - 0,4 ml min ⁻¹
171 (2001)	ποιοτική	Ούρα	APCI, τριπλό τετράπολο	-	υγρό-υγρό εκχύλιση	d ₄ -υδροκορτιζόνη	Supelco DB-8 (75 x 4,6 mm, 3 μm)	MeOH:CH ₃ COOH 1% (βαθμιδωτή έκλουση) 1 ml min ⁻¹
172 (1999)	ποσοτική	Ούρα	APCI, τριπλό τετράπολο	0,5– 300 ng mL ⁻¹	εκχύλιση στερεάς φάσης	d ₃ -υδροκορτιζόνη	Colochrom Nucleosil C18 (150 x 4,6 mm, 3 μm)	MeOH:H ₂ O (59:41)
173 (1996)	ποιοτική	Ούρα	APCI, τριπλό τετράπολο	-	εκχύλιση στερεάς φάσης		Hypersil ODS (100 x 2,1 mm, 5 μm)	ACN:H ₂ O (30:70) - 0,25 ml min ⁻¹
174 (2006)	ποιοτική	Ούρα	ESI(+), τριπλό τετράπολο	-	εκχύλιση στερεάς φάσης	d ₄ -υδροκορτιζόνη	Supelcosil LC-8-DM (33 x 2,1 mm, 3 μm)	CH ₃ COONH ₄ 10 mM:CH ₃ COOH 5mM MeOH (βαθμιδωτή έκλουση)-0,2 ml min ⁻¹
175 (2005)	ποιοτική	Ούρα	ESI(+), τριπλό τετράπολο	-	εκχύλιση στερεάς φάσης	d ₄ -υδροκορτιζόνη	Supelcosil LC-8-DM (33 x 2,1 mm, 3 μm)	MeOH: CH ₃ COONH ₄ 10 mM (βαθμιδωτή έκλουση) - 0,2 ml min ⁻¹

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Υδροκορτιζόνη

6.2. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Οι πρότυπες ουσίες υδροκορτιζόνη και δεσονίδη (desonide), η οποία χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο (internal standard, ISTD) ελήφθησαν αντίστοιχα από τις εταιρείες Sigma-Aldrich και Steraloids. Οι καθαρότητα των παραπάνω ουσιών ήταν 98 % και 100 %, αντίστοιχα.

6.3. ΕΠΙΛΟΓΗ - ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ LC/MS

6.3.1. Μέθοδος LC/IT-MS

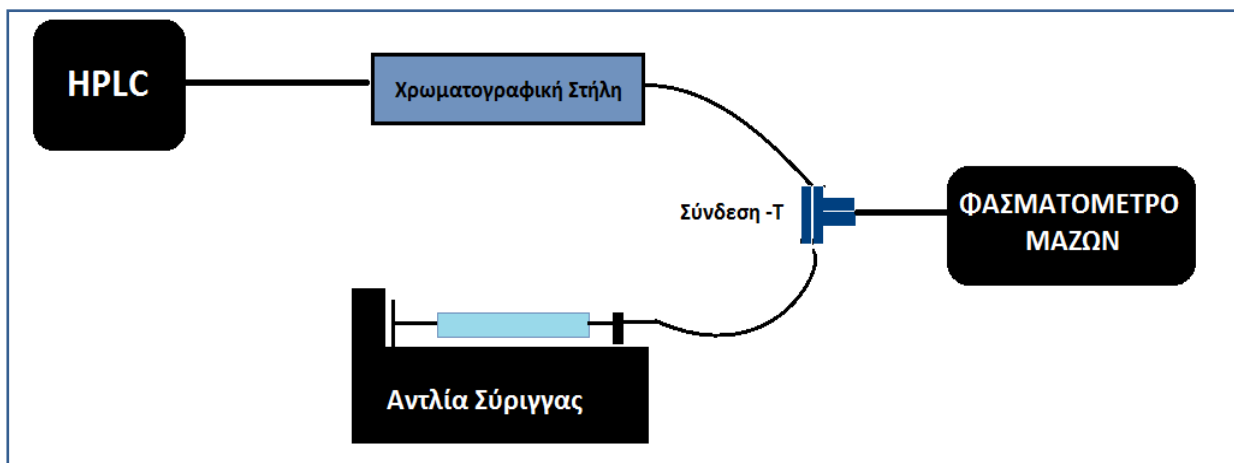
Υγροχρωματογραφικές Συνθήκες

Για την απομόνωση και το χρωματογραφικό διαχωρισμό της υδροκορτιζόνης και του εσωτερικού προτύπου από τα συστατικά των ούρων χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφική στήλη Zorbax RX-C8 με μήκος 15 cm, εσωτερική διάμετρο 2,1 mm και διάμετρο σωματιδίων 5 μm (Agilent Technologies). Η θερμοκρασία της στήλης ρυθμίστηκε στους 35 °C. Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 0,1 % (v/v) (διαλύτης A, 4.4.2.23) και διάλυμα οξικού οξέος 0,1 % (v/v) σε ακετονιτρίλιο (διαλύτης B, 4.4.2.24). Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι τόσο η χρωματογραφική στήλη όσο και η κινητή φάση που προαναφέρθηκαν είναι αυτές που ήδη χρησιμοποιούσε το Εργαστήριο για τις αναλύσεις σάρωσης κορτικοστεροειδών, αναβολικών και άλλων ουσιών σε δείγματα ούρων αθλητών, οι οποίες πραγματοποιούνταν σε επίπεδο ρουτίνας με το σύστημα LC/IT-MS. Έτσι, κρίθηκε σημαντικό η προς ανάπτυξη μέθοδος ποσοτικοποίησης και επιβεβαίωσης της κορτιζόλης να χρησιμοποιεί την ίδια στήλη και κινητή φάση, εξοικονομώντας χρόνο και επιτρέποντας τη σύγχρονη ανάλυση δειγμάτων ρουτίνας αθλητών και δειγμάτων ούρων αλόγων στην ίδια αλληλουχία δειγμάτων (sequence) π.χ κατά τη διάρκεια της νύχτας. Η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης διατηρήθηκε σταθερή και ρυθμίστηκε στην τιμή 0,3 mL min⁻¹. Εφαρμόσθηκε πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης (gradient elution), στο οποίο η αρχική αναλογία του διαλύτη B της κινητής φάσης ήταν 25 %, διατηρούμενη σταθερή για 1 min και αυξανόμενη γραμμικά στη συνέχεια φτάνοντας το 50% σε χρόνο 2,5 min, όπου παρέμενε σταθερή για 2 min. Στη συνέχεια αυξανόταν και πάλι γραμμικά εντός 2 min φτάνοντας το 80% και παραμένοντας σε αυτό σταθερή για 2 min, οπότε και επανερχόταν στην αρχική της τιμή (25%) εντός 2 min. Ο συνολικός χρόνος της ανάλυσης ήταν 9 min ακολουθούμενος από το χρόνο εξισορρόπησης της κινητής φάσης στην αρχική της σύνθεση, που ήταν 4 min. Ο αναλυόμενος όγκος δείγματος ήταν 5 μL. Η βαλβίδα που υπάρχει στο χρησιμοποιούμενο σύστημα μετά την έξοδο του χρωματογραφικού εκλούσματος από τη στήλη και πριν την είσοδό του στην πηγή ιοντισμού του φασματομέτρου μαζών (divert valve) ρυθμίστηκε να διοχετεύει τη ροή της κινητής φάσης εντός του ανιχνευτή MS για το χρονικό διάστημα 4,5 - 9,0 min, ενώ για το υπόλοιπο διάστημα το έκλουσμα διοχετευόταν στα απόβλητα του συστήματος. Υπό τις παραπάνω χρωματογραφικές συνθήκες, ο χρόνος έκλουσης της υδροκορτιζόνης και του εσωτερικού προτύπου ήταν 6,0 min και 8,2 min, αντίστοιχα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Υδροκορτιζόνη

Επιλογή – Βελτιστοποίηση συνθηκών λειτουργίας φασματομέτρου μαζών Ion Trap-MS

Η ανίχνευση της υδροκορτιζόνης και του εσωτερικού προτύπου πραγματοποιήθηκε με θετικό μηχανισμό της τεχνικής ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI+). Προκειμένου να επιτευχθεί η μέγιστη δυνατή ευαισθησία και εκλεκτικότητα πραγματοποιήθηκαν μελέτες βελτιστοποίησης των συνθηκών λειτουργίας του φασματομέτρου μαζών, ώστε να λαμβάνεται η μέγιστη δυνατή αφθονία των πρόδρομων και θυγατρικών ιόντων της κορτιζόλης. Η θερμοκρασία και η ταχύτητα ροής του αερίου αποδιαλύτωσης (αερίου αζώτου) στην πηγή ιοντισμού ρυθμίστηκαν στους 325 °C και 10 L min⁻¹, αντίστοιχα. Η πίεση του αερίου αζώτου στην βελόνα νεφελοποίησης στην οποία εισάγεται το χρωματογραφικό έκλουσμα ρυθμίστηκε στην τιμή 50 psi. Οι παραπάνω τιμές είναι αυτές οι οποίες καθορίζονται από τον κατασκευαστή ως συμβατές με την ταχύτητα της ροής της κινητής φάσης που εφαρμόστηκε (0,3 ml min⁻¹). Στη συνέχεια, με τη βοήθεια αυτοματοποιημένων διαδικασιών του λογισμικού του συστήματος βελτιστοποιήθηκαν οι υπόλοιπες παράμετροι του φασματομέτρου μαζών παγίδας ιόντων, όπως το δυναμικό του τριχοειδούς (capillary voltage), της περιοχής εξόδου του τριχοειδούς (capillary exit), του τεμμαχιστή (skimmer), καθώς και τα δυναμικά του οκταπόλου και των φακών που βοηθούν στην εστίαση και επιτάχυνση της δέσμης των ιόντων ώστε να φτάσουν στον αναλυτή μαζών δηλαδή στην παγίδα ιόντων. Η διαδικασία βελτιστοποίησης των παραπάνω παραμέτρων πραγματοποιήθηκε με απευθείας έγχυση στο φασματόμετρο μαζών (infusion) διαλύματος υδροκορτιζόνης σε κινητή φάση συγκέντρωσης 1 μg mL⁻¹. Η έγχυση έγινε με ταχύτητα ροής 20 μL min⁻¹ με τη βοήθεια αντλίας σύριγγας (syringe pump) που συνδέθηκε μαζί με τη ροή της κινητής φάσης στη βελόνα αποδιαλύτωσης της πηγής ιοντισμού με τη βοήθεια σύνδεσης T (Tee-connection). Η διάταξη που χρησιμοποιήθηκε απεικονίζεται στο Σχήμα 6.2.



Σχήμα 6.2: Πειραματική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε για την διεξαγωγή μελετών βελτιστοποίησης των συνθηκών λειτουργίας του φασματομέτρου Ion Trap-MS

Οι βελτιστοποιημένες τιμές των δυναμικών του συστήματος για τις οποίες παρατηρήθηκε η μέγιστη αφθονία για το πρωτονιωμένο μοριακό ιόν της κορτιζόλης [M+H]⁺ με τιμή m/z 363 παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.2.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Υδροκορτιζόνη

Πίνακας 6.2: Βέλτιστες τιμές παραμέτρων – δυναμικών φασματομέτρου LC/Ion Trap-MS

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ	ΒΕΛΤΙΣΤΗ ΤΙΜΗ
Δυναμικό τριχοειδούς (Capillary voltage)	-5000 V
Δυναμικό τεμμαχιστή (Skimmer voltage)	40,0 V
Έξοδος τριχοειδούς (Capillary exit)	104,6 V
Δυναμικό 1 ^{ου} οκταπόλου (Octapole 1 DC)	12,00 V
Δυναμικό 2 ^{ου} οκταπόλου (Octapole 1 DC)	1,70 V
Δυναμικό οκταπόλου RF (Octapole RF)	100,0 Vpp
1 ^η δέσμη φακών (Lens 1)	-5,0 V
2 ^η δέσμη φακών (Lens 2)	-60,0 V
Trap drive	43,0
Πίεση αερίου νεφελοποίησης (Nebulizer gas pressure)	50,0 psi
Ροή αερίου ξήρανσης (Dry gas)	10,0 L min ⁻¹
Θερμοκρασία ξήρανσης (Dry temperature)	325 °C

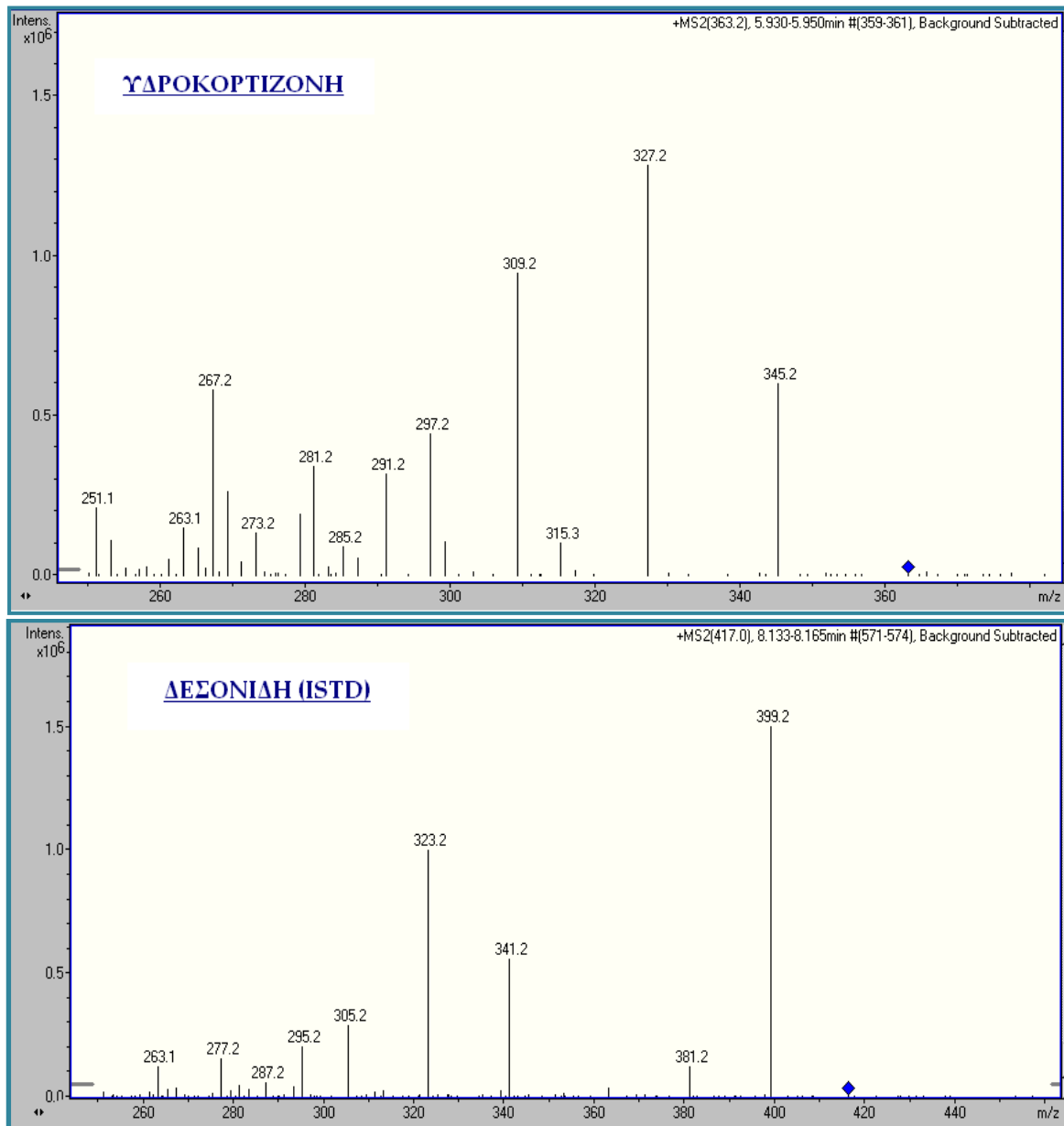
Για μεγαλύτερη ευαισθησία και εκλεκτικότητα επιλέχθηκε επιλέχθηκε MS/MS λειτουργία του φασματομέτρου παγίδας ιόντων και συγκεκριμένα η λήψη φασμάτων σάρωσης θυγατρικών ιόντων (product ion scan) μετά από απομόνωση (isolation) και θραυσματοποίηση (fragmentation) των πρωτονιωμένων μοριακών ιόντων του αναλύτη (m/z 363) και του εσωτερικού προτύπου (m/z 417). Για την περίπτωση της κορτιζόλης η θραυσματοποίηση οδήγησε στο σχηματισμό τριών κύριων θυγατρικών ιόντων με τιμές m/z 345, 327 και 309, που προκύπτουν από το πρωτονιωμένο μοριακό ιόν με διαδοχικές απώλειες ενός, δύο και τριών μορίων νερού, αντίστοιχα. Ο σχηματισμός των θυγατρικών ιόντων με τιμές m/z 297 και 267 μπορεί να αποδοθεί στην απώλεια ενός μορίου φορμαλδεΰδης και γλυκολαλδεΰδης, αντίστοιχα, από το ιόν με m/z 327.¹⁸¹ Για το εσωτερικό πρότυπο (desonide) η απομόνωση και θραυσματοποίηση του πρωτονιωμένου μοριακού ιόντος με τιμή m/z 417 οδήγησε στο σχηματισμό τριών κύριων θυγατρικών ιόντων με τιμές m/z 399, 341 και 323. Στο Σχήμα 6.3 παρουσιάζονται τα φάσματα σάρωσης θυγατρικών ιόντων (product ion spectra) του πρωτονιωμένου μοριακού ιόντος της υδροκορτιζόλης και της δεσονίδης, που ελήφθησαν υπό τις βέλτιστες συνθήκες από την ανάλυση προτύπων διαλύματος σε κινητή φάση συγκέντρωσης 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Για την παρακολούθηση των θυγατρικών ιόντων του αναλύτη και του εσωτερικού προτύπου χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά χρονικά παράθυρα (time segments), τα οποία παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.3.

Πίνακας 6.3: Χρονικά παράθυρα μεθόδου LC/Ion Trap -MS για την παρακολούθηση της κορτιζόλης και του εσωτερικού προτύπου

Χρονικό Παράθυρο (min)	Παρακολουθούμενη Ουσία	RT (min)	Μητρικό Ιόν (m/z)	Ένταση θραυσματοποίησης	Θυγατρικά Ιόντα (m/z)
4,5 – 6,8	Κορτιζόλη	6,0	363	0,95	327 309 345 267 297
6,8 – 9,0	Δεσονίδη (ISTD)	8,1	417	0,90	399 323 341

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Υδροκορτιζόνη

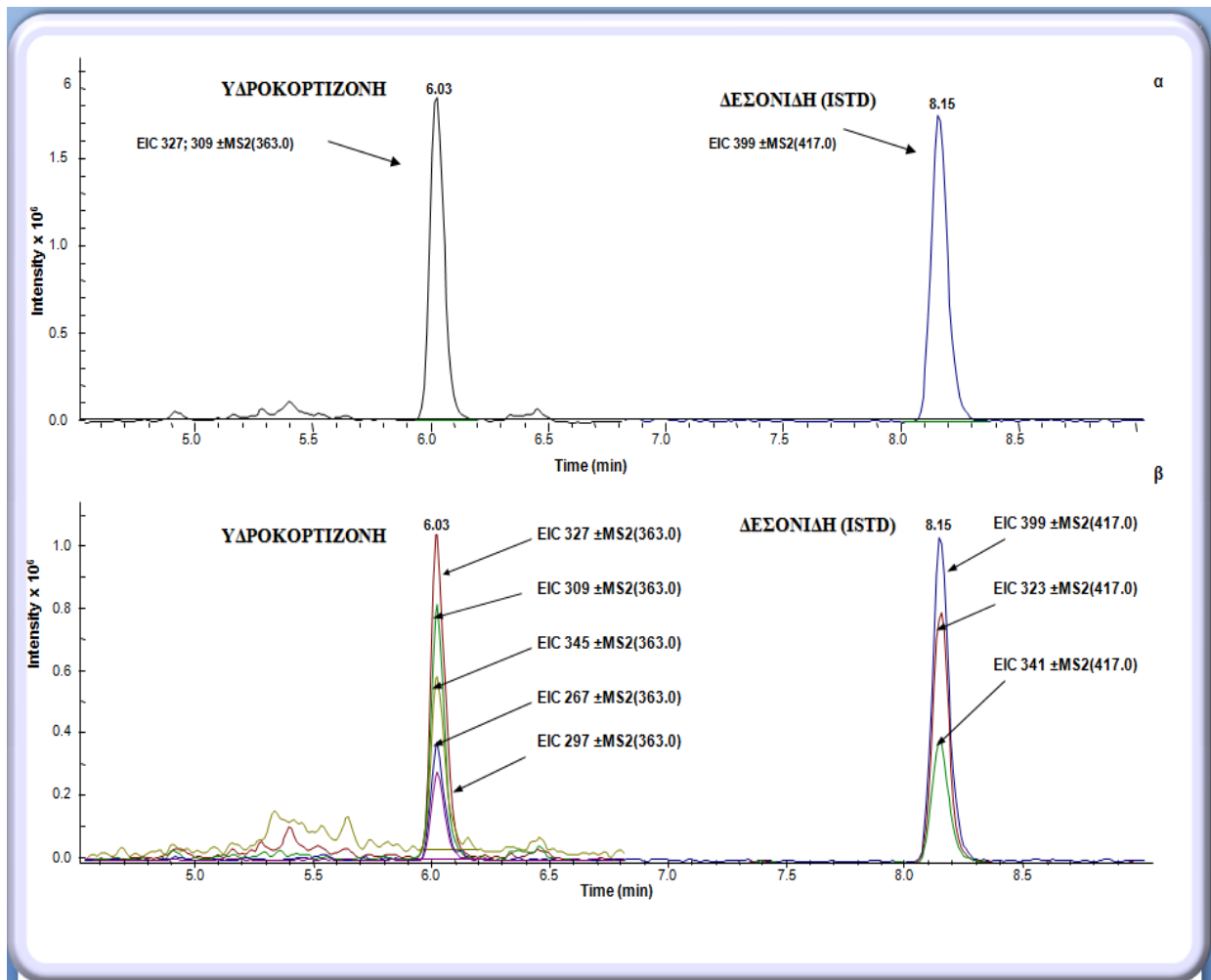


Σχήμα 6.3: Φάσματα σάρωσης θυγατρικών ιόντων (*product ion spectra*) των πρωτιωμένων μοριακών ιόντων της υδροκορτιζόνης και του εσωτερικού προτύπου (δεσονίδη). Ελήφθησαν υπό τις βέλτιστες συνθήκες με απευθείας έγχυση στο φασματόμετρο μαζών IT-MS προτύπων διαλυμάτων σε κινητή φάση συγκέντρωσης $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ και ροή $20 \mu\text{L min}^{-1}$.

Κύριο πλεονέκτημα της μεθόδου LC/IT-MS αποτελεί το γεγονός ότι επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό και την επιβεβαίωση (ποιοτική ανίχνευση) της κορτιζόλης με την ίδια ανάλυση, χρησιμοποιώντας διαφορετική μέθοδο επεξεργασίας (*data analysis processing method*) των λαμβανόμενων χρωματογραφικών δεδομένων (*total ion chromatogram*). Ο ποσοτικός προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε λαμβάνοντας υπόψη τη χρωματογραφική κορυφή του αθροίσματος των ιόντων με m/z 327 και 309 (*summarized extracted ion chromatogram*) για την κορτιζόλη και τη χρωματογραφική κορυφή του ιόντος με τιμή m/z 399 (*extracted ion chromatogram*) για το εσωτερικό πρότυπο. Για την επιβεβαίωση

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Υδροκορτιζόνη

χρησιμοποιήθηκαν ως διαγνωστικά ιόντα της κορτιζόλης και τα 5 θυγατρικά ιόντα που προαναφέρθηκαν (m/z 345, 327, 309, 297, 267). Στο Σχήμα 6.4 παρουσιάζονται τα ιοντικά χρωματογραφήματα που ελήφθησαν από την ανάλυση δείγματος ούρων αλόγου εμβολιασμένου με τον αναλύτη και το εσωτερικό πρότυπο σε συγκεντρώσεις $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ και $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ αντίστοιχα, όπως αυτά λαμβάνονται με τη χρησιμοποίηση των δύο διαφορετικών μεθόδων επεξεργασίας για την ποσοτικοποίηση (α) και την επιβεβαίωση (β) της κορτιζόλης στο δείγμα.



Σχήμα 6.4 Χρωματογραφήματα μαζών της κορτιζόλης και της δεξονίδης, που ελήφθησαν μετά από ανάλυση υπό της βέλτιστες συνθήκες του συστήματος LC/Ion Trap-MS εμβολιασμένου δείγματος ούρων αλόγου σε συγκεντρώσεις $1,0$ και $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ για τον αναλύτη και το εσωτερικό πρότυπο, αντίστοιχα και επεξεργασία των δεδομένων για την εξαγωγή αποτελεσμάτων για την ποσοτικοποίηση (α) και την επιβεβαίωση (β) της κορτιζόλης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Υδροκορτιζόνη

6.3.2. Μέθοδος LC/TOF-MS

Υγροχρωματογραφικές Συνθήκες

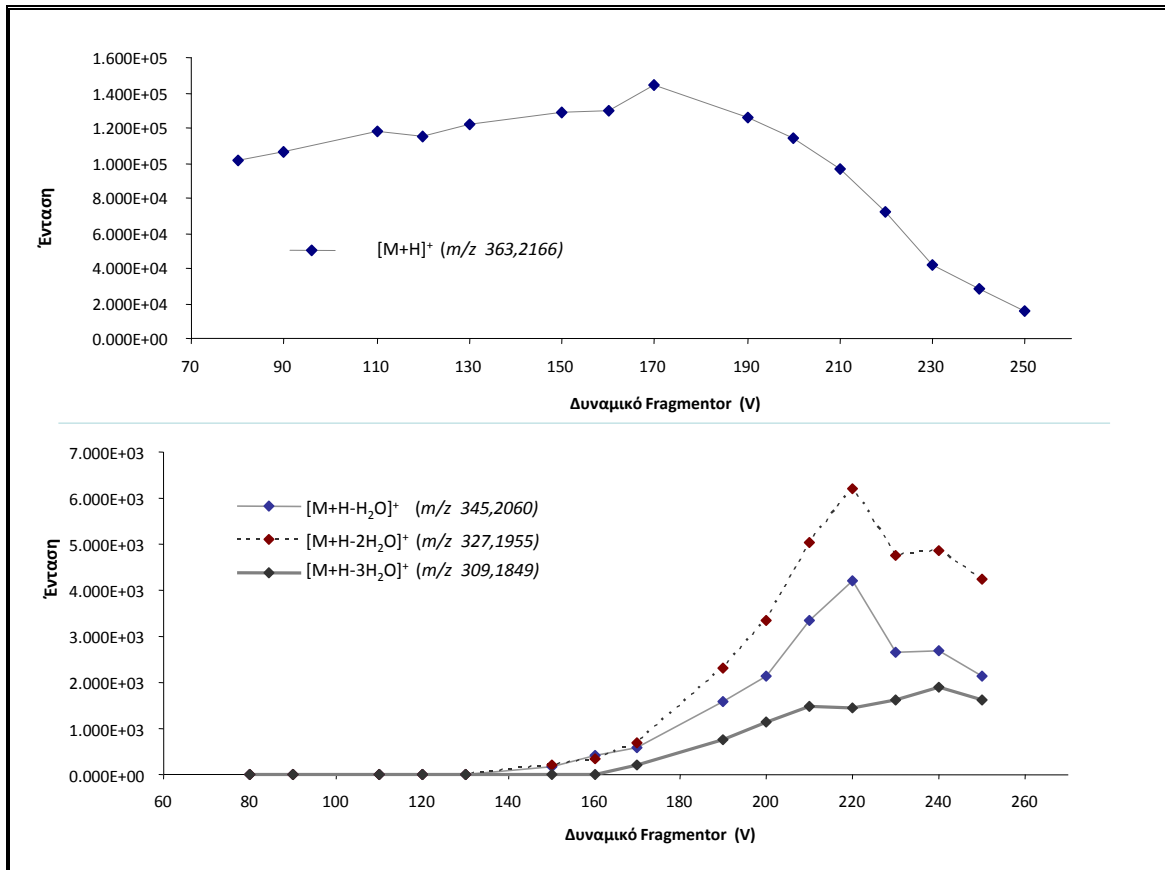
Το σύστημα LC/TOF-MS διέθετε υγροχρωματογραφικό σύστημα υπερυψηλής απόδοσης (UHPLC) της εταιρείας Agilent Technologies (1200-SL LC Series). Η αναλυτική στήλη που χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό της υδροκορτιζόνης και του εσωτερικού προτύπου από τα συστατικά του μητρικού υλικού ήταν Zorbax Eclipse Plus C18 (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) μήκους 10 cm, εσωτερικής διαμέτρου 2,1 mm και διαμέτρου σωματιδίων 1,8 μm. Η θερμοκρασία της στήλης ρυθμίστηκε στους 35 °C. Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκαν οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν και στη μέθοδο σάρωσης του προηγούμενου κεφαλαίου δηλαδή υδατικό διάλυμα μυρμηκικού αμμωνίου 5 mM και μυρμηκικού οξέος 0,05 % (v/v) (διαλύτης A, 4.4.2.20) και διάλυμα μυρμηκικού αμμωνίου 5 mM και μυρμηκικού οξέος 0,05 % (v/v) σε μίγμα ακετονιτριλίου νερού 90/10 (v/v) (διαλύτης B, 4.4.2.21). Η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης ήταν 0,30 mL min⁻¹. Στο πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης που εφαρμόστηκε η αρχική αναλογία του διαλύτη B στην κινητή φάση ήταν 20%, αυξανόμενη γραμμικά σε 40% σε χρόνο 3 min, όπου παρέμενε σταθερή για 1,5 min και στη συνέχεια έφτανε στο 90% σε χρόνο 5,5 min όπου παρέμενε σταθερή για 2,5 min και τέλος μειωνόταν στην αρχική αναλογία (20%) σε χρόνο 8,5 min. Ακολουθούσαν 3 min για την εξισορρόπηση του συστήματος στην αρχική σύσταση της κινητής φάσης πριν την έναρξη της επόμενης ανάλυσης. Ο ενιέμενος όγκος δείγματος ήταν 5 μL. Η βαλβίδα divert valve ρυθμίστηκε να διοχετεύει το χρωματογραφικό έκλουσμα εντός του φασματομέτρου μαζών για το χρονικό διάστημα 4,0 – 8,0 min. Ο χρόνος έκλουσης της υδροκορτιζόνης και του εσωτερικού προτύπου υπό τις συνθήκες αυτές ήταν 5,3 min και 7,0 min, αντίστοιχα.

Επιλογή – Βελτιστοποίηση συνθηκών λειτουργίας φασματομέτρου μαζών TOF-MS

Το φασματόμετρο μαζών που χρησιμοποιήθηκε ως σύστημα ανίχνευσης (6210 TOF-MSD, Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) διέθετε ορθογώνιας διάταξης πηγή ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό, η οποία ρυθμίστηκε στην παραγωγή θετικών ιόντων (ESI+) και ορθογώνιας επιτάχυνσης αναλυτή χρόνου πτήσης. Η θερμοκρασία και ταχύτητα ροής του αερίου αζώτου στην πηγή ιοντισμού ρυθμίστηκαν στους 350 °C και 10 L min⁻¹, αντίστοιχα και η πίεση του αερίου νεφελοποίησης στην τιμή 45 psi. Το δυναμικό του τριχοειδούς (capillary voltage) και του διαχωριστή (skimmer voltage) στην έξοδο του τριχοειδούς ρυθμίστηκαν στα 400 V και 60 V, αντίστοιχα. Το εύρος σάρωσης των ανιχνευόμενων τιμών m/z ρυθμίστηκε σε 100 – 1100 amu και η ταχύτητα σάρωσης ήταν 1 scan sec⁻¹. Η συχνότητα λειτουργίας του ανιχνευτή στο χρησιμοποιούμενο σύστημα ήταν 1 GHz. Όλες οι επιπλέον παράμετροι λειτουργίας του φασματομέτρου μαζών (δυναμικά εξαπόλου, φακών, αναλυτή χρόνου πτήσης, ανιχνευτή ιόντων) ρυθμίζονται και βελτιστοποιούνται στο σύνολό τους από τους από τη διαδικασία tuning του συστήματος, η οποία προγραμματιζόταν σε εβδομαδιαία βάση (Η διαδικασία tuning του φασματομέτρου TOF-MS έχει περιγραφεί στο κεφάλαιο 4). Το δυναμικό θραυσματοποίησης της πηγής ιοντισμού (fragmentor voltage) αποτελεί την παράμετρο που βελτιστοποιήθηκε με διαδοχικές αναλύσεις προτύπου διαλύματος υδροκορτιζόνης σε κινητή φάση, συγκέντρωσης 1 μg mL⁻¹. Η πορεία βελτιστοποίησης του δυναμικού της πηγής

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Υδροκορτιζόνη

απεικονίζεται διαγραμματικά στο Σχήμα 6.5 όπου παρουσιάζεται η μεταβολή του σήματος των διαγνωστικών ιόντων του αναλύτη, δηλαδή του πρωτονιωμένου μοριακού ιόντος και των ιόντων που σχηματίζονται από αυτό με σταδιακή αύξηση του παραπάνω δυναμικού μετά από θραυσματοποίηση στην πηγή ιοντισμού.

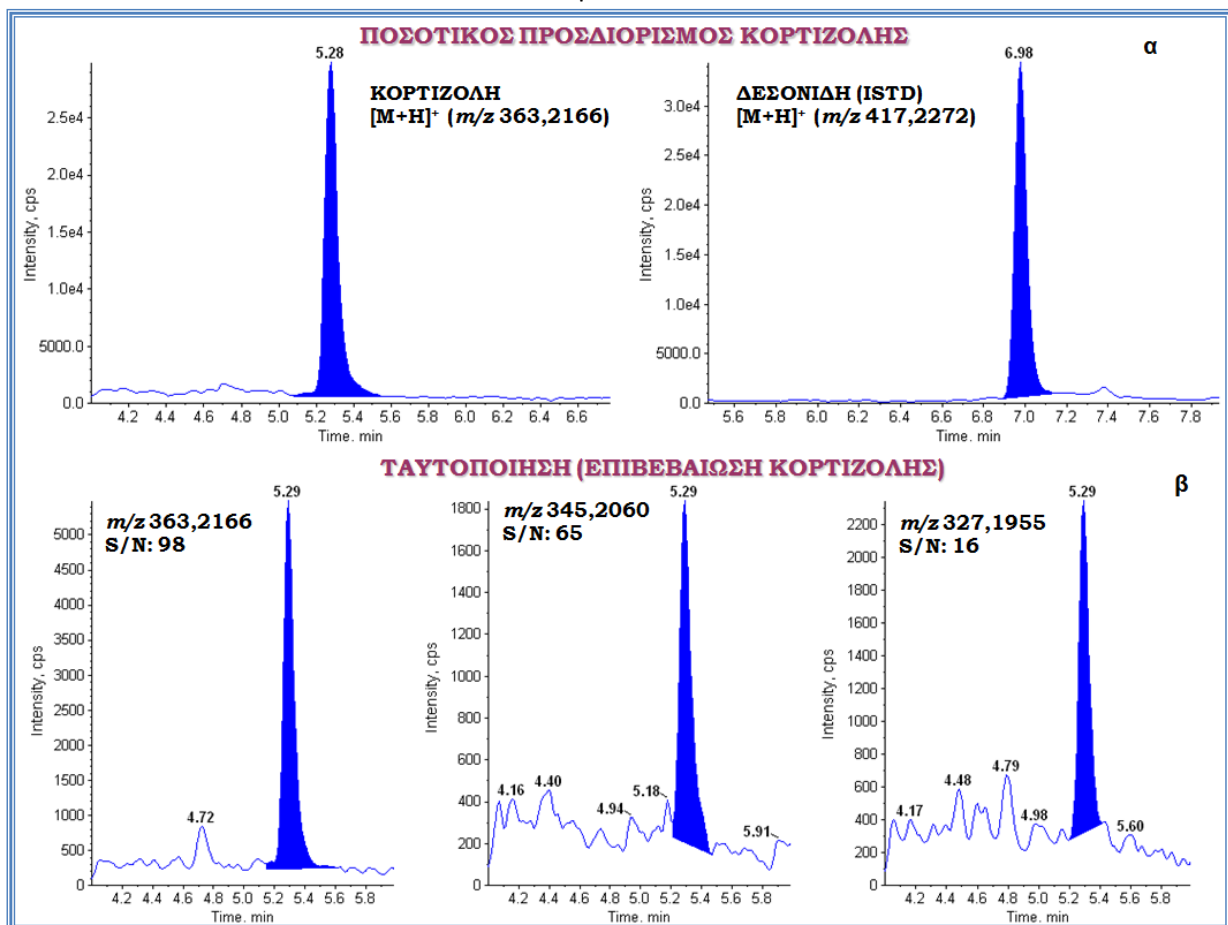


Σχήμα 6.5 Επίδραση του δυναμικού θραυσματοποίησης της πηγής ιοντισμού (fragmentor voltage) στην ένταση του πρωτονιωμένου μοριακού ιόντος και των σχηματιζόμενων από αυτό θραυσματοποιημένων διαγνωστικών ιόντων της κορτιζόλης

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της κορτιζόλης το παραπάνω δυναμικό ρυθμίστηκε στην τιμή 170 V, όπου παρατηρήθηκε η μέγιστη αφθονία των πρωτονιωμένων μοριακών ιόντων του αναλύτη με τιμή m/z 363,2166. Για την ποιοτική ανίχνευση (επιβεβαίωση) της κορτιζόλης όπου είναι απαραίτητη η μέτρηση τριών τουλάχιστον διαγνωστικών ιόντων,^{182,183} η τιμή του δυναμικού ρυθμίστηκε στα 220 V (πραγματοποίηση δεύτερης ανάλυσης), όπου ανιχνεύονται ικανοποιητικά τόσο το πρωτονιωμένο μοριακό ιόν της κορτιζόλης όσο και δύο θυγατρικά ιόντα με τιμές m/z 345,2060 και 327,1955, τα οποία σχηματίζονται στην πηγή ιοντισμού με απώλεια ενός και δυο μορίων νερού αντίστοιχα από το πρωτονιωμένο μόριο της κορτιζόλης. Τυπικά χρωματογραφήματα που ελήφθησαν από την ανάλυση LC/TOF-MS δείγματος ούρων αλόγου εμβολιασμένο με τον αναλύτη και το εσωτερικό πρότυπο σε συγκέντρωση 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ και 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ αντίστοιχα με τη μέθοδο χαμηλού δυναμικού (μέθοδος ποσοτικοποίησης (α)) και με τη μέθοδο υψηλού δυναμικού (μέθοδος επιβεβαίωσης (β)) παρατίθενται στο Σχήμα 6.6.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Υδροκορτιζόνη

τιμ



Σχήμα 6.6: Ιοντικά χρωματογραφήματα (παράθυρο ανοχής m/z 20 ppm) της κορτιζόλης και της δεξονίδης, που ελήφθησαν μετά από LC/TOF-MS ανάλυση εμβολιασμένου δείγματος ούρων αλόγου σε συγκεντρώσεις 1,0 και 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ για τον αναλύτη και το εσωτερικό πρότυπο, αντίστοιχα, σε α) χαμηλή τιμή (170 V) του δυναμικού θραυσματοποίησης της πηγής (μέθοδος ποσοτικοποίησης) και β) υψηλή τιμή (220 V) του δυναμικού θραυσματοποίησης της πηγής (μέθοδος ταυτοποίησης).

6.4. ΠΡΟΤΥΠΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΠΑΡΑΚΑΤΑΘΗΚΗΣ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Πρότυπα διαλύματα παρακαταθήκης της υδροκορτιζόνης και της δεξονίδης συγκέντρωσης 1 mg mL^{-1} παρασκευάστηκαν με ζύγιση 10,0 mg στερεής πρότυπης ουσίας σε χωριστές βαθμονομημένες ογκομετρικές φιάλες των 10 mL και ακόλουθη αραιώση μέχρι χαραγής με μεθανόλη. Λαμβάνοντας κατάλληλο όγκο (100 μL) από τα διαλύματα παρακαταθήκης και αραιώνοντας με μεθανόλη σε βαθμονομημένες ογκομετρικές φιάλες των 10 mL παρασκευάστηκαν τα πρότυπα διαλύματα εργασίας του αναλύτη και του εσωτερικού προτύπου με τελική συγκέντρωση 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Όλα τα διαλύματα μετά την παρασκευή τους μεταφέρθηκαν σε σκουρόχρωμα υάλινα φιαλίδια (vials) και αποθηκεύτηκαν στο σκοτάδι σε θερμοκρασία $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.5. ΠΡΟΤΥΠΑ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΕΝΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΟΥΡΩΝ

Για την αξιολόγηση της γραμμικότητας της μεθόδου και τη μελέτη των επιδράσεων από το μητρικό υλικό (matrix effect) παρασκευάστηκαν πρότυπα δείγματα καμπύλης βαθμονόμησης και δείγματα ελέγχου σε ούρα αλόγου εμβολιασμένα με κορτιζόλη. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν ούρα αλόγων που περιείχαν χαμηλές συγκεντρώσεις ενδογενούς κορτιζόλης. Τα δείγματα της καμπύλης βαθμονόμησης (standard calibration samples, STD's) παρασκευάστηκαν σε έξι επίπεδα συγκέντρωσης 0,25, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 και 2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ με προσθήκη κατάλληλου όγκου διαλύματος εργασίας της υδροκορτιζόνης (25, 50, 100, 150, 200 και 250 μL , αντίστοιχα) σε υάλινους κωνικούς σωλήνες. Ακολούθησε εξάτμιση του μεθανολικού διαλύματος σε ρεύμα αζώτου και θερμοκρασία 50 °C και ανασύσταση με 1 mL ούρων. Τα πρότυπα δείγματα ελέγχου (quality control samples, QC's) παρασκευάστηκαν με αντίστοιχο τρόπο σε τρία επίπεδα συγκέντρωσης 0,5, 1,0 και 2,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Για την παρασκευή των δειγμάτων ελέγχου χρησιμοποιήθηκε διαφορετικό διάλυμα εργασίας της κορτιζόλης, το οποίο με τη σειρά του παρασκευάστηκε από ξεχωριστό διάλυμα παρακαταθήκης από αυτά που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των προτύπων δειγμάτων της καμπύλης αναφοράς.

6.6. ΠΟΡΕΙΑ ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΥΡΩΝ

Τα προς ανάλυση δείγματα ούρων όγκου 1 mL μεταγγίζονται σε υάλινους κωνικούς σωλήνες και ακολούθως αραιώνονται με 1 mL νερού καθαρότητας HPLC. Ακολουθεί προσθήκη 50 μL διαλύματος εργασίας του εσωτερικού προτύπου και ανάδευση. Τα αραιωμένα δείγματα στη συνέχεια φυγοκεντρώνονται για 10 min με ταχύτητα 2500 rpm σε φυγόκεντρο που φέρει κατάλληλη υποδοχή για κωνικούς σωλήνες. Ποσότητα του υπερκείμενου υγρού διηθείται με τη βοήθεια σύριγγας μέσω φίλτρων με διάμετρο πόρων 0,45 μm (Millex HV syringe driven filters, Millipore) και το διήθημα μεταγγίζεται σε υάλινα φιαλίδια (vials) πριν την ανάλυση στα συστήματα LC/MS.

6.7. ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΜΗΤΡΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ – ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ

Αλλαγές στην απόκριση του αναλύτη που αποδίδονται στο μητρικό υλικό αποτελούν ένα φαινόμενο που μπορεί να επηρεάσει αρνητικά την αξιοπιστία της τεχνικής LC/MS σε ό,τι αφορά την εφαρμογή της στον ποσοτικό προσδιορισμό ουσιών σε βιολογικά υγρά. Το φαινόμενο αυτό που χαρακτηρίζεται με τον όρο «επίδραση μητρικού υλικού» (matrix effect) μπορεί να οδηγήσει είτε σε μείωση (ιοντική καταστολή) είτε σε αύξηση της απόκρισης (ιοντική ενίσχυση).^{180,184,185} Μια βιοαναλυτική μέθοδος LC/MS με σύστημα ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI) είναι πιο επιρρεπής από μια αντίστοιχη με χημικό ιοντισμό υπο συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης (APCI), καθώς επίσης σημαντική επίδραση στην ένταση του φαινομένου έχει η διάταξη και τα λειτουργικά χαρακτηριστικά της πηγής ιοντισμού.

Η αναπτυχθείσα μεθοδολογία βασίστηκε στην απευθείας LC/MS ανάλυση δειγμάτων ούρων αλόγων. Για αυτό το λόγο κρίθηκε αναγκαία η εκτενής μελέτη των επιδράσεων από το υπόστρωμα. Τα ούρα αλόγων αποτελούν ένα ιδιαίτερα πολύπλοκο μητρικό υλικό με

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Υδροκορτιζόνη

συστατικά που ποικίλουν ως προς τη χημική φύση, τη δομή και την πολικότητα και παρουσιάζει σημαντικές διαφοροποιήσεις από το ένα δείγμα στο άλλο.

Στην παρούσα εργασία για την αξιολόγηση της γραμμικότητας της μεθόδου και τη μελέτη του φαινομένου της επίδρασης του μητρικού υλικού παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν καμπύλες αναφοράς της κορτιζόλης σε ευρος συγκεντρώσεων 0,25 – 2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (standard calibration curves) σε εμβολιασμένα δείγματα τριών διαφορετικών παρτίδων ούρων αλόγων (χαμηλού, μεσαίου και υψηλού ειδικού βάρους), καθώς και σε υδατικά δείγματα. Τα δείγματα για κάθε επίπεδο συγέντρωσης της καμπύλης βαθμονόμησης παρασκευάστηκαν εις διπλούν, κατεργάστηκαν σύμφωνα με την πορεία που προαναφέρθηκε και ενέθηκαν εις διπλούν σε καθένα από τα δυο συστήματα LC/MS. Ως απόκριση λαμβάνεται ο λόγος της επιφάνειας της χρωματογραφικής κορυφής της κορτιζόλης προς την επιφάνεια της χρωματογραφικής κορυφής του εσωτερικού προτύπου. Οι εξισώσεις συμμεταβολής που ελήφθησαν για τις τέσσερις καμπύλες αναφοράς παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.4, στον οποίο παρατίθενται επίσης οι τιμές της τυπικής απόκλισης για την τομή και την κλίση, ο συντελεστής συσχέτισης (r) και το τετράγωνο αυτού (r^2) και το τυπικό σφάλμα. Σε όλες τις περιπτώσεις διαπιστώθηκε ικανοποιητική γραμμικότητα (συντελεστής συσχέτισης $r > 0,997$), ενώ οι πειραματικά υπολογιζόμενες συγκεντρώσεις τόσο για τα δείγματα των καμπυλών αναφοράς όσο και για τα δείγματα ελέγχου, παρουσίασαν σχετικό αναλυτικό σφάλμα (Relative Error) μικρότερο από 7,0 %.

Διαπιστώθηκε ότι η τιμή της κλίσης των καμπυλών αναφοράς παρουσιάζει μεγάλη διακύμανση μεταξύ των διαφορετικών παρτίδων ούρων και των δειγμάτων σε νερό. Στον Πίνακα 6.5 παρουσιάζονται συνοπτικά τα αποτελέσματα αξιολόγησης της επίδρασης του υποστρώματος στην απόκριση της κορτιζόλης και του εσωτερικού προτύπου καθώς και στο λόγο των αποκρίσεων του αναλύτη προς του εσωτερικού προτύπου για τα τρία επίπεδα συγκέντρωσης των δειγμάτων ελέγχου. Οι τιμές της απόκρισης και της σχετικής απόκρισης στα διαφορετικά δείγματα ούρων παρουσιάζονται κανονικοποιημένες ως προς τις αντίστοιχες τιμές που ελήφθησαν από την ανάλυση των υδατικών δειγμάτων. Όπως φαίνεται και από τα αποτελέσματα του Πίνακα 6.5 στη μέθοδο LC/IT-MS το μητρικό υλικό προκαλεί σημαντική καταστολή του σήματος τόσο της κορτιζόλης όσο και του εσωτερικού προτύπου, ενώ στη μέθοδο LC/TOF-MS η απόκριση της δεσονίδης παρουσιάζει μεγαλύτερη διακύμανση από ότι το σήμα της κορτιζόλης μεταξύ των διαφορετικών υποστρωμάτων που μελετήθηκαν. Η ένταση του φαινομένου της ιοντικής καταστολής δε φαίνεται να επηρεάζεται ιδιαίτερα από τη συγκέντρωση του αναλύτη, για τα τρία επίπεδα συγκέντρωσης που μελετήθηκαν.

Η διακύμανση του μεγέθους της ιοντικής καταστολής που παρατηρείται μεταξύ διαφορετικών δειγμάτων και προκαλείται πιθανότατα από ουσίες του υποστρώματος που συνεκλούνται με την προς ποσοτικοποίηση ουσία μπορεί να αντιμετωπιστεί με τη χρησιμοποίηση ενός ισοτοπικά επισημασμένου αναλόγου του αναλύτη ως εσωτερικού προτύπου, δεδομένου ότι αυτό παρουσιάζει παραπλήσιες αντίστοιχες με τον αναλύτη φυσικοχημικές ιδιότητες και εκλύεται στον ίδιο χρόνο ανάσχεσης.^{186,187} Λαμβάνοντας υπόψη το υψηλό κόστος ενός δευτεριωμένου εσωτερικού προτύπου (d_3 -υδροκορτιζόνη ή d_4 -υδροκορτιζόνη), αλλά και το γεγονός ότι δεν ήταν δυνατή η εύρεση δειγμάτων ούρων αλόγου ελεύθερων κορτιζόλης για την παρασκευή των εμβολιασμένων δειγμάτων της

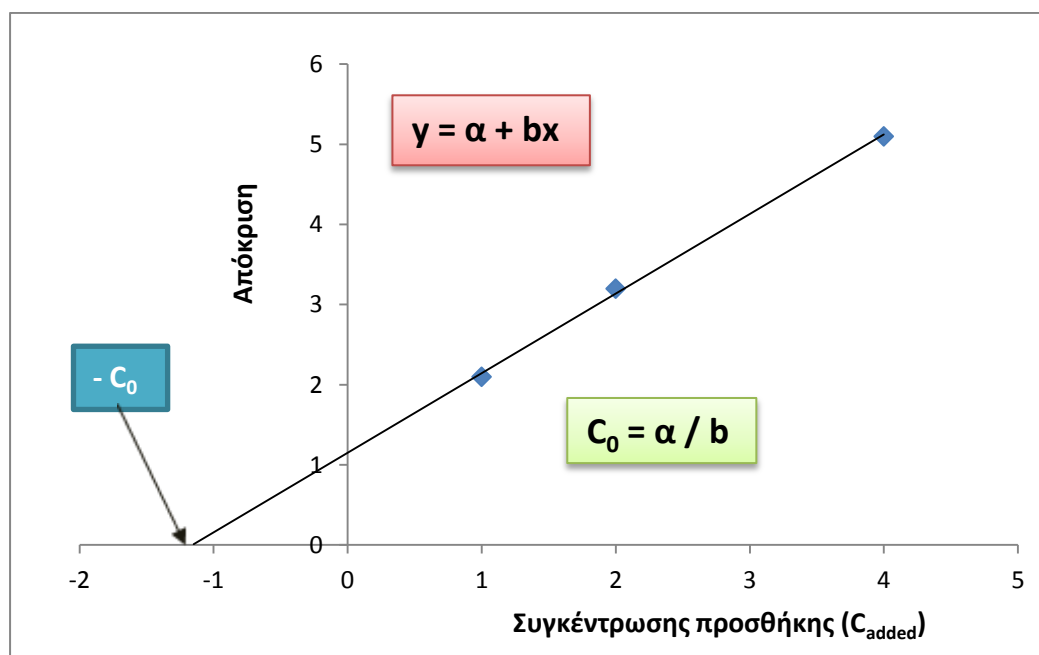
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Υδροκορτιζόνη

καμπύλης αναφοράς, εξετάστηκε η δυνατότητα εφαρμογής της καμπύλης προσθήκης γνωστών ποσοτήτων ως τεχνικής ποσοτικοποίησης της κορτιζόλης σε ούρα αλόγων.

6.8. ΤΕΧΝΙΚΗ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΓΝΩΣΤΩΝ ΠΟΣΟΤΗΤΩΝ - ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

Η τεχνική της προσθήκης γνωστών ποσοτήτων χρησιμοποιείται όταν είναι αδύνατη η παρασκευή προτύπων παρόμοιας σύστασης με τα προς ανάλυση δείγματα, είτε γιατί η σύστασή τους είναι άγνωστη ή ποικίλλει από δείγμα σε δείγμα είτε επειδή υπάρχουν ουσίες που παρεμποδίζουν. Βασίζεται στην προσθήκη (εμβολιασμό) γνωστών συγκεντρώσεων της προσδιοριζόμενης ουσίας σε τμήματα του προς ανάλυση δείγματος, ώστε να προκληθεί αύξηση της συγκέντρωσης κατά ΔC με μικρή ή αμελητέα αύξηση του όγκου.^{44,188} Τα εμβολιασμένα δείγματα αναλύονται μαζί με το άγνωστο δείγμα (δειγμα χωρίς προσθήκη, μηδενικό δείγμα). Κατασκευάζεται διάγραμμα της μετρούμενης απόκρισης του αναλύτη (άξονας y) συναρτήσει της συγκέντρωσης προσθήκης ΔC (άξονας x) και η αρνητική προέκταση της ευθείας παλινδρόμησης στο σημείο τομής του άξονα x εκφράζει την τιμή της συγκέντρωσης του αναλύτη στο άγνωστο δείγμα. (Σχήμα 6.7). Η συγκέντρωση αυτή (C_0) υπολογίζεται μαθηματικά ως το πηλίκο της τομής προς την κλίση της ευθείας παλινδρόμησης που υπολογίζονται με τη μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων. Η τυπική απόκλιση της υπολογιζόμενης συγκέντρωσης C_0 δίνεται από την εξίσωση 6.1, όπου a η τομή της ευθείας, n ο αριθμός των σημείων της καμπύλης προσθήκης, Y η μετρούμενη απόκριση και x η συγκέντρωση προσθήκης

$$SD(C_0) = \frac{S_{y/x}}{a} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{Y}^2}{a^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad [6.1]$$



Σχήμα 6.7: Γραφική παράσταση της μεθόδου προσθήκης γνωστών ποσοτήτων

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Υδροκορτιζόνη

ΠΙΝΑΚΑΣ 6.4: Αποτελέσματα στατιστικής επεξεργασίας των καμπυλών αναφοράς της υδροκορτιζόνης σε υδατικά δείγματα και σε δείγματα ούρων χαμηλού ('low'), μεσαίου ('medium') και υψηλού ('high') ειδικού βάρους (specific gravity, SG)

ΜΕΘΟΔΟΣ	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ	ΕΞΙΣΩΣΗ ΠΑΛΙΝΔΡΟΜΗΣΗΣ	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ		R	r ²	ΤΥΠΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ
			ΤΟΜΗΣ (s _a)	ΚΛΙΣΗΣ (s _b)			
LC/IT-MS	Νερό	$y = 0,800 x + 0,100$	0,016	0,010	0,9997	0,9993	0,020
	Ούρα 'low' SG	$y = 0,827 x + 0,037$	0,017	0,011	0,9996	0,9992	0,022
	Ούρα 'medium' SG	$y = 0,759 x + 0,035$	0,031	0,020	0,998	0,997	0,040
	Ούρα 'high' SG	$y = 0,593 x + 0,103$	0,024	0,016	0,998	0,997	0,030
LC/TOF-MS	Νερό	$y = 0,5171 x - 0,040$	0,012	0,0082	0,9995	0,9990	0,016
	Ούρα 'low' SG	$y = 0,4909 x - 0,019$	0,015	0,0097	0,9992	0,998	0,019
	Ούρα 'medium' SG	$y = 0,953 x + 0,013$	0,024	0,016	0,9994	0,998	0,031
	Ούρα 'high' SG	$y = 0,863 x + 0,050$	0,042	0,028	0,997	0,995	0,054

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Υδροκορτιζόνη

ΠΙΝΑΚΑΣ 6.5: Αποτελέσματα μελέτης επίδρασης του μητρικού υλικού στην απόκριση μετά από παρασκευή και ανάλυση καμπυλών αναφοράς σε υδατικά δείγματα και σε δείγματα ούρων χαμηλού ('low'), μεσαίου ('medium') και υψηλού ('high') ειδικού βάρους (specific gravity, SG). Οι τιμές για τα δείγματα ούρων παρουσιάζονται κανονικοποιημένες ως προς τις αντίστοιχες των υδατικών δειγμάτων.

ΜΕΘΟΔΟΣ LC/IT-MS										
Υπόστρωμα	Δείγμα Ελέγχου (QC) 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$			Δείγμα Ελέγχου (QC) 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$			Δείγμα Ελέγχου (QC) 2,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$			Κλίση
	Επιφάνεια Κορτιζόλης	Επιφάνεια Δεσονίδης	Λόγος Επιφανειών	Επιφάνεια Κορτιζόλης	Επιφάνεια Δεσονίδης	Λόγος Επιφανειών	Επιφάνεια Κορτιζόλης	Επιφάνεια Δεσονίδης	Λόγος Επιφανειών	
Νερό	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0,800
Ούρα 'low' SG	75	90	83	80	82	98	76	76	100	0,827
Ούρα 'medium' SG	52	68	77	55	60	92	49	55	91	0,759
Ούρα 'high' SG	49	65	75	45	56	79	45	57	78	0,593
ΜΕΘΟΔΟΣ LC/TOF-MS										
Υπόστρωμα	Δείγμα Ελέγχου (QC) 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$			Δείγμα Ελέγχου (QC) 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$			Δείγμα Ελέγχου (QC) 2,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$			Κλίση
	Επιφάνεια Κορτιζόλης	Επιφάνεια Δεσονίδης	Λόγος Επιφανειών	Επιφάνεια Κορτιζόλης	Επιφάνεια Δεσονίδης	Λόγος Επιφανειών	Επιφάνεια Κορτιζόλης	Επιφάνεια Δεσονίδης	Λόγος Επιφανειών	
Νερό	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0,5171
Ούρα 'low' SG	83	83	101	81	83	98	80	83	97	0,4909
Ούρα 'medium' SG	112	52	217	102	47	217	83	42	198	0,953
Ούρα 'high' SG	97	43	229	81	42	194	72	41	177	0,863

6.9. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΚΟΡΤΙΖΟΛΗΣ ΣΕ ΟΥΡΑ ΑΛΟΓΩΝ

6.9.1. Καμπύλες προσθήκης γνωστών ποσοτήτων - Παρασκευή δειγμάτων (standard addition calibration samples)

Για την αξιολόγηση της αξιοπιστίας της μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού της κορτιζόλης σε ούρα αλόγων με την εφαρμογή της προσθήκης γνωστών ποσοτήτων παρασκευάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν δείγματα – μοντέλα που περιείχαν τον αναλύτη σε δύο επίπεδα συγκέντρωσης ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ και $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Παρασκευάστηκαν με προσθήκη κατάλληλου όγκου διαλύματος εργασίας της κορτιζόλης σε ογκομετρικές φιάλες και αραιώση με ούρα μέχρι χαραγής. Κάθε εργαστηριακή ημέρα χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των δειγμάτων μοντέλα ούρα αλόγων διαφορετικών παρτίδων, τα οποία παρουσίασαν χαμηλή συγκέντρωση ενδογενούς κορτιζόλης κατά τη διαδικασία σάρωσης απαγορευμένων ουσιών σε άλογα με GC/MS, που εφαρμόζεται στο Εργαστήριο. Συνολικά για κάθε δείγμα μοντέλο κατασκευάστηκαν πέντε καμπύλες προσθήκης τριών σημείων σε πέντε εργαστηριακές ημέρες. Τα δείγματα βαθμονόμησης των καμπυλών προσθήκης παρασκευάστηκαν εις διπλούν με προσθήκη 0, 50 και 100 μL διαλύματος εργασίας της κορτιζόλης $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ (συγκεντρώσεις προσθήκης (C_{added}) 0, 0,5 και $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, αντίστοιχα) σε υάλινους κωνικούς σωλήνες, εξάτμιση του διαλύματος και ανασύσταση με 1 mL από το δείγμα-μοντέλο. Ακολούθως κατεργάστηκαν με την πορεία που έχει ήδη περιγραφεί και ενέθηκαν εις διπλούν σε καθένα από τα δύο συστήματα LC/MS. Οι καμπύλες προσθήκης γνωστών ποσοτήτων στα δείγματα-μοντέλα χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση της ορθότητας και πιστότητας της μεθόδου.^{44,189} Τα αποτελέσματα στατιστικής επεξεργασίας των καμπυλών προσθήκης για τις πέντε εργαστηριακές ημέρες συνοψίζονται στο [Παράρτημα 12](#).

6.9.2. Ορθότητα (Accuracy)

Ο έλεγχος ορθότητας των μεθόδων που αναπτύχθηκαν πραγματοποιήθηκε σε πέντε εργαστηριακές ημέρες, χρησιμοποιώντας τις υπολογισθείσες από τις καμπύλες προσθήκης συγκεντρώσεις της κορτιζόλης στα δείγματα-μοντέλα. Μελετήθηκε η ορθότητα σε δύο επίπεδα συγκέντρωσης $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ και $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Η συγκέντρωση της ενδογενούς κορτιζόλης στα δείγματα ούρων που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή των δειγμάτων μοντέλων υπολογίστηκε με τη βοήθεια καμπύλης αναφοράς και στη συνέχεια αφαιρέθηκε από την υπολογιζόμενη συγκέντρωση της καμπύλης προσθήκης. Ως μέτρο της ορθότητας χρησιμοποιείται το επί τοις εκατό σχετικό σφάλμα (% Relative Error, % E_r) που υπολογίστηκε ως εξής:

$$\% E_r = 100 \times \frac{C_{\text{υπολογιζόμενη}} - C_{\text{blank}} - C_{\text{θεωρητική}}}{C_{\text{θεωρητική}}} \quad [6.2]$$

όπου, $C_{\text{υπολογιζόμενη}}$ είναι η πειραματικά υπολογιζόμενη από την καμπύλη προσθήκης συγκέντρωση της κορτιζόλης στο δείγμα μοντέλο (τομή (α) προς κλίση (b) της ευθείας

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Υδροκορτιζόνη

παλινδρόμησης της καμπύλης προσθήκης), C_{blank} η συγκέντρωση της ενδογενούς κορτιζόλης στα ούρα αλόγων που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των δειγμάτων-μοντέλων και $C_{\text{θεωρητική}}$, η θεωρητική συγκέντρωση της κορτιζόλης στο δείγμα μοντέλο ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ και $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Τα αποτελέσματα ορθότητας της μεθόδου LC/IT-MS και LC/TOF-MS για τις πέντε εργαστηριακές ημέρες συνοψίζονται στους Πίνακες 6.6 και 6.7, αντίστοιχα. Το σχετικό αναλυτικό σφάλμα δεν ξεπέρασε το 7,6 % και για τις δύο μεθόδους.

6.9.3. Εντός της ημέρας πιστότητα (intra-day precision)

Για την εκτίμηση της εντός της ημέρας πιστότητας υπολογίστηκε η τυπική απόκλιση (SD_0) που προκύπτει από τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των δειγμάτων-μοντέλων. Η τυπική απόκλιση SD_0 υπολογίζεται από τις εξισώσεις:

$$SD(C_0) = \frac{S_{y/x}}{a} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{Y}^2}{a^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad [6.3]$$

όπου

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y})^2}{n - 2}} \quad [6.4]$$

όπου \hat{y} είναι η τιμή του y (λόγος επιφανειών) που προκύπτει από την εξίσωση της καμπύλης προσθήκης (fitted y -values)

a , η κλίση της ευθείας παλινδρόμησης

n , ο αριθμός των σημείων της καμπύλης προσθήκης

\bar{x} , η μέση τιμή των τιμών x_i (συγκέντρωση προσθήκης σε $\mu\text{g mL}^{-1}$)

\bar{Y} , η μέση τιμή των τιμών y_i (λόγος επιφανειών κορτιζόλης /εσωτερικού προτύπου)

Ως μέτρο της εντός της ημέρας πιστότητας χρησιμοποιείται η επί τοις εκατό σχετική τυπική απόκλιση ($\%RSD_{\text{intra-day}}$) που υπολογίστηκε για κάθε εργαστηριακή ημέρα σε δύο επίπεδα συγκέντρωσης ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ και $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) από τη σχέση:

$$\%RSD_{\text{intra-day}} = 100 \times \frac{SD(C_0)}{C_{\text{υπολογιζόμενη}}} \quad [6.5]$$

όπου, $C_{\text{υπολογιζόμενη}}$ η πειραματικά υπολογιζόμενη από την καμπύλη προσθήκης συγκέντρωση της κορτιζόλης στο δείγμα-μοντέλο (τομή προς κλίση της ευθείας παλινδρόμησης της καμπύλης προσθήκης).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Υδροκορτιζόνη

Τα αποτελέσματα της εντός ημέρας πιστότητας παρατίθενται συνοπτικά στους πίνακες 6.6 και 6.7 για τις μεθόδους LC/IT-MS και LC/TOF-MS, αντίστοιχα. Η τιμή της σχετικής τυπικής απόκλισης δεν ξεπέρασε το 9,1 % για τη μέθοδο LC/IT-MS και το 7,2 % για τη μέθοδο LC/TOF-MS.

6.9.4. Μεταξύ των ημερών πιστότητα (inter-day precision)

Ως μέτρο της πιστότητας μεταξύ των ημερών υπολογίστηκε η επί τοις εκατό σχετική τυπική απόκλιση (% $RSD_{inter-day}$) των πειραματικά υπολογιζόμενων συγκεντρώσεων της κορτιζόλης στα δείγματα-μοντέλα (μετά τη διόρθωση ως προς τη συγκέντρωση της ενδογενούς κορτιζόλης στο εκάστοτε υπόστρωμα ούρων που χρησιμοποιήθηκε) για τις πέντε εργαστηριακές ημέρες και σε δύο επίπεδα συγκέντρωσης. Η τιμή $RSD_{inter-day}$ δεν ξεπέρασε την τιμή 4,7 και για τις δύο μεθόδους LC/IT-MS και LC/TOF-MS, όπως φαίνεται στους Πίνακες 6.6 και 6.7.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Υδροκορτιζόνη

Πίνακας 6.6: Αποτελέσματα αξιολόγησης της ορθότητας και επαναληψιμότητας της μεθόδου LC/IT-MS για την ποσοτικοποίηση της κορτιζόλης

Αναλυτική Δοκιμασία	Θεωρητική Συγκέντρωση Δειγμάτων-Μοντέλων							
	0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$				1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$			
	$C_{\text{πειραματική}}$ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	% E_r	SD (C_0) ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	% $RSD_{\text{intra-day}}$	$C_{\text{πειραματική}}$ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	% E_r	SD (C_0) ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	% $RSD_{\text{intra-day}}$
Ημέρα 1	0,525	4,9	0,049	7,6	0,965	-3,4	0,082	7,5
Ημέρα 2	0,505	1,0	0,051	8,0	1,023	2,3	0,041	3,6
Ημέρα 3	0,502	0,4	0,0050	0,8	1,04	3,9	0,10	8,6
Ημέρα 4	0,536	7,1	0,054	9,1	0,951	-4,8	0,085	8,4
Ημέρα 5	0,538	7,6	0,031	4,7	1,061	6,1	0,066	6,0
% $RSD_{\text{inter-day}}$	3,2				4,7			

Πίνακας 6.7: Αποτελέσματα αξιολόγησης της ορθότητας και επαναληψιμότητας της μεθόδου LC/TOF-MS για την ποσοτικοποίηση της κορτιζόλης

Αναλυτική Δοκιμασία	Θεωρητική Συγκέντρωση Δειγμάτων-Μοντέλων							
	0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$				1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$			
	$C_{\text{πειραματική}}$ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	% E_r	SD (C_0) ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	% $RSD_{\text{intra-day}}$	$C_{\text{πειραματική}}$ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	% E_r	SD (C_0) ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	% $RSD_{\text{intra-day}}$
Ημέρα 1	0,530	6,0	0,046	7,2	0,991	-0,9	0,052	4,8
Ημέρα 2	0,517	3,3	0,012	2,0	1,049	4,9	0,079	6,9
Ημέρα 3	0,469	-6,2	0,021	3,6	1,070	7,0	0,050	4,2
Ημέρα 4	0,511	2,1	0,028	5,0	1,005	0,4	0,075	7,1
Ημέρα 5	0,510	2,1	0,014	2,5	1,0678	6,8	0,0038	0,3
% $RSD_{\text{inter-day}}$	4,5				3,5			

$C_{\text{πειραματική}}$: πειραματικά υπολογιζόμενη συγκέντρωση κορτιζόλης διορθωμένη ως προς την ενδογενή συγκέντρωση των ούρων, % E_r : % σχετικό αναλυτικό σφάλμα, SD (C_0): τυπική απόκλιση της υπολογιζόμενης από την καμπύλη προσθήκης συγκέντρωσης, % $RSD_{\text{intra-day}}$: εντός της ημέρας % σχετική τυπική απόκλιση, % $RSD_{\text{inter-day}}$: δια των ημερών % σχετική τυπική απόκλιση

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Υδροκορτιζόνη

6.9.5. Χρωματογραφικά Χαρακτηριστικά

Λόγος σήματος προς θόρυβο (Signal to noise ratio, S/N)

Από την οπτική παρατήρηση των χρωματογραφημάτων διαπιστώθηκε ότι στο χαμηλότερης συγκέντρωσης πρότυπο των καμπυλών αναφοράς ($0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$) ισχύει $S/N \gg 10$ (ύψος χρωματογραφικής κορυφής της κορτιζόλης σε αυθαίρετες μονάδες προς το ύψος της γραμμής βάσης πριν την αρχή της κορυφής σε αυθαίρετες μονάδες).

Σχετικός χρόνος ανάσχεσης (Relative retention time, RRT)

Ο σχετικός χρόνος ανάσχεσης αντιστοιχεί στο λόγο του χρόνου ανάσχεσης της υδροκορτιζόνης προς το χρόνο ανάσχεσης του εσωτερικού προτύπου. Διαπιστώθηκε ότι οι σχετικοί χρόνοι ανάσχεσης διατηρούνται σταθεροί μεταξύ των ημερών και στα δύο χρησιμοποιούμενα συστήματα LC/MS (%RSD <0,9).

6.9.6. Ειδικότητα (Specificity)

Η ειδικότητα της μεθόδου αποδεικνύεται από τα διαφορετικά διαγνωστικά ιόντα και τη διαφορά των σχετικών χρόνων ανάσχεσης των απαγορευμένων ουσιών παρόμοιας δομής σε σχέση με την κορτιζόλη. Για τη μελέτη της ειδικότητας παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν ένα 'λευκό' δείγμα ούρων αλόγου (δείγμα ούρων χαμηλής περιεκτικότητας σε ενδογενή κορτιζόλη), ένα δείγμα εμβολιασμένο με κορτιζόλη σε συγκέντρωση $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ και επτά δείγματα ούρων εμβολιασμένα με ουσίες παραπλήσιας δομής, κυρίως κορτικοστεροειδή και αναβολικά στεροειδή. Οι ουσίες που μελετήθηκαν στον έλεγχο ειδικότητας αναφέρονται αναλυτικά στο [Παράρτημα 13](#). Διαπιστώθηκε απουσία παρεμποδιστικών κορυφών στα ιοντικά χρωματογραφήματα του αναλύτη και του εσωτερικού προτύπου στους χρόνους έκλουσης αυτών από τις ουσίες που μελετήθηκαν και για τις δύο προτεινόμενες LC/MS μεθόδους.

6.9.7 Έλεγχος επιμόλυνσης εκ μεταφοράς δείγματος (Carry over)

Ο έλεγχος επιμόλυνσης πραγματοποιήθηκε κάθε εργαστηριακή ημέρα με την ανάλυση λευκού υδατικού δείγματος και 'λευκού' δείγματος ούρων (δείγμα ούρων χαμηλής περιεκτικότητας σε ενδογενή κορτιζόλη) στην αρχή και αμέσως μετά την ανάλυση του υψηλότερης συγκέντρωσης προτύπου της καμπύλης αναφοράς της κορτιζόλης ($2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$). Δεν παρατηρήθηκε επιμόλυνση εκ μεταφοράς δείγματος, καθώς διαπιστώθηκε απουσία σήματος στα υδατικά δείγματα, ενώ το σήμα της κορτιζόλης στα μη εμβολιασμένα δείγματα ούρων που αναλύθηκαν πριν και μετά την καμπύλη αναφοράς δεν παρουσίασε αξιοσημείωτη μεταβολή.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Υδροκορτιζόνη

6.10. ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΚΟΡΤΙΖΟΛΗΣ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΟΥΡΩΝ ΑΛΟΓΩΝ (CONFIRMATION, IDENTIFICATION)

Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη παράγραφο, στο σύστημα LC/IT-MS η ανίχνευση της κορτιζόλης πραγματοποιείται με σάρωση των θυγατρικών ιόντων που σχηματίζονται μετά από απομόνωση και θραυσματοποίηση του πρωτονιωμένου μοριακού ιόντος και η επιβεβαίωση (confirmation) γίνεται ταυτόχρονα με την ποσοτικοποίηση. Στο σύστημα LC/TOF-MS, για την επιβεβαίωση της κορτιζόλης στο ύποπτο δείγμα απαιτείται μια επιπλέον ανάλυση των απαιτούμενων δειγμάτων (κατά σειρά: 'τυφλό' δείγμα –ύποπτο δείγμα –'τυφλό' δείγμα –εμβολιασμένο δείγμα αναφοράς) σε συνθήκες υψηλού δυναμικού θραυσματοποίησης της πηγής ιοντισμού (220 V) για το σχηματισμό των κατάλληλων διαγνωστικών ιόντων. Ελέγχθηκε η επαναληψιμότητα της σχετικής αναλογίας των διαγνωστικών ιόντων ως προς το κύρια σχηματιζόμενο θυγατρικό ιόν, που αποτελεί κριτήριο για την επιβεβαίωση της ύπαρξης της κορτιζόλης στο ύποπτο δείγμα. Για το σκοπό αυτό, παρασκευάστηκαν έξι δείγματα ούρων εμβολιασμένα με τον αναλύτη σε συγκέντρωση 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, τα οποία αναλύθηκαν με τη μέθοδο επιβεβαίωσης. Οι υπολογισθείσες σχετικές αναλογίες των διαγνωστικών ιόντων της κορτιζόλης παρουσίασαν ικανοποιητική επαναληψιμότητα (% RSD < 7,5), όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 6.8: Επαναληψιμότητα της σχετικής αναλογίας διαγνωστικών ιόντων κατά τον έλεγχο επιβεβαίωσης της κορτιζόλης σε δείγματα ούρων αλόγων

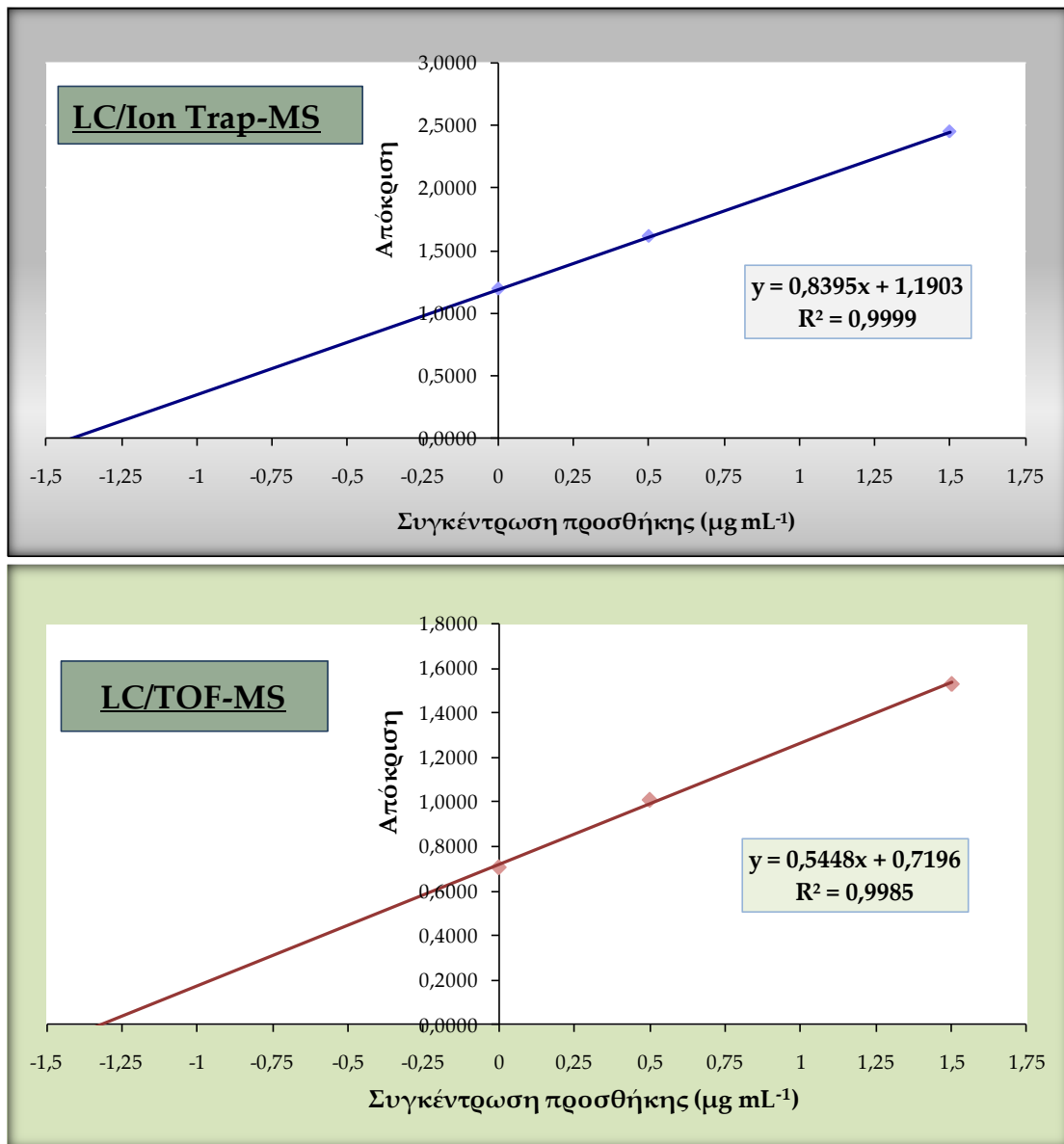
Δείγμα	% Σχετικές Αναλογίες Διαγνωστικών Ιόντων Κορτιζόλης*								
	Ιόντα LC/IT-MS (m/z)					Ιόντα LC/TOF-MS (m/z)			
	327	309	345	267	297	363,2166	345,2060	327,1955	309,1849
1	100	71,9	54,7	38,4	30,3	100	42,9	38,8	22,4
2	100	68,6	54,1	37,5	30,4	100	39,1	38,1	20,0
3	100	72,1	47,1	38,1	28,4	100	41,3	38,0	18,2
4	100	71,1	52,6	37,6	29,1	100	38,5	36,7	19,8
5	100	75,1	49,9	41,4	32,4	100	41,4	37,4	20,7
6	100	73,4	49,6	38,3	33,0	100	39,1	39,1	21,7
Μέση Τιμή	100	72,0	51,3	38,6	30,6	100	40,4	38,0	20,5
SD		2,2	2,9	1,4	1,8		1,7	0,9	1,5

* επί τοις εκατό σχετική αναλογία της αφθονίας των διαγνωστικών ιόντων ως προς την αφθονία του κύρια σχηματιζόμενου ιόντος

6.11. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΕ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟ ΔΕΙΓΜΑ

Η προτεινόμενη μεθοδολογία ποσοτικού προσδιορισμού και επιβεβαίωσης της κορτιζόλης σε ούρα αλόγων εφαρμόστηκε σε πραγματικό δείγμα αλόγου, το οποίο κατά τον έλεγχο σάρωσης με τη μέθοδο ρουτίνας GC/MS του Εργαστηρίου παρουσίασε υψηλή συγκέντρωση κορτιζόλης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανάλυσης σάρωσης, όπου πραγματοποιείται ταυτόχρονα και ημιποσοτικός προσδιορισμός της κορτιζόλης η εκτιμώμενη συγκέντρωση της κορτιζόλης στο δείγμα αυτό ήταν υψηλότερη από $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (μέγιστη μελετούμενη συγκέντρωση ποσοτικοποίησης της προτεινόμενης μεθόδου LC/MS). Για το λόγο αυτό, το προς ανάλυση δείγμα αραιώθηκε με νερό πριν την ανάλυσή του με συντελεστή αραιώσης (dilution factor) 2,5 (αναλυτικότερα, 4 mL δείγματος αραιώθηκαν με νερό μέχρι χαραγής σε ογκομετρική φιάλη 10 mL). Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της κορτιζόλης εφαρμόστηκε η τεχνική προσθήκης γνωστών ποσοτήτων. Τα δείγματα της καμπύλης προσθήκης παρασκευάστηκαν εις διπλούν με προσθήκη 0, 50 και 150 μL μεθανολικού διαλύματος εργασίας της υδροκορτιζόνης συγκέντρωσης $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ σε κωνικούς σωλήνες, εξάτμιση και ανασύσταση με 1 mL του αραιωμένου ύποπτου δείγματος (συγκεντρώσεις προσθήκης 0, 0,5 και $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, αντίστοιχα). Τα δείγματα κατεργάστηκαν με το προτεινόμενο πρωτόκολλο (προσθήκη εσωτερικού προτύπου, αραιώση, φυγοκέντρηση και φιλτράρισμα) και αναλύθηκαν στα δύο συστήματα LC/MS. Οι καμπύλες προσθήκης που ελήφθησαν παρουσιάζονται στο Σχήμα 6.8, ενώ η συγκέντρωση της κορτιζόλης (\pm τυπική απόκλιση) στο ύποπτο δείγμα μετά την αραιώση βρέθηκε $1,4179 (\pm 0,0041) \mu\text{g mL}^{-1}$ με τη μέθοδο LC/IT-MS και $1,321 (\pm 0,025)$ με τη μέθοδο LC/TOF-MS. Ακολούθως, στο αρχικό ύποπτο δείγμα η συγκέντρωση της κορτιζόλης (\pm τυπική απόκλιση) βρέθηκε $3,545 (\pm 0,010) \mu\text{g mL}^{-1}$ με τη μέθοδο LC/IT-MS και $3,302 (\pm 0,062)$ με τη μέθοδο LC/TOF-MS.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Υδροκορτιζόνη



Σχήμα 6.8: Καμπύλες προσθήκης που ελήφθησαν με τις προτεινόμενες μεθόδους LC/Ion Trap-MS και LC/TOF-MS για την ποσοτικοποίηση της κορτιζόλης σε ύποπτο δείγμα αλόγου μετά από αραιώση

Για την επιβεβαίωση της κορτιζόλης στο ύποπτο δείγμα αναλύθηκαν τα παρακάτω δείγματα με την ακόλουθη αλληλουχία: υδατικό λευκό δείγμα – ‘λευκό’ δείγμα ούρων (μη εμβολιασμένο δείγμα ούρων αλόγου με χαμηλή συγκέντρωση ενδογενούς κορτιζόλης) – ύποπτο δείγμα (μηδενικό πρότυπο της καμπύλης προσθήκης) – ‘λευκό’ δείγμα ούρων – εμβολιασμένο δείγμα ούρων συγκέντρωσης 1 µg mL⁻¹ (δείγμα αναφοράς, positive control). Στον Πίνακα 6.9 συνοψίζονται τα αποτελέσματα της επιβεβαιωτικής ανάλυσης και για τα δύο αναλυτικά συστήματα καθώς και τα διαγνωστικά κριτήρια που πρέπει να ικανοποιούνται.¹⁸²

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Υδροκορτιζόνη

Πίνακας 6.9: Αποτελέσματα επιβεβαίωσης της κορτιζόλης στο ύποπτο δείγμα

ΜΕΘΟΔΟΣ LC/IT-MS						
Ιόν (<i>m/z</i>)	Σχετική Αναλογία Ιόντων		Όρια Αποδοχής			
	Ύποπτο Δείγμα	Δείγμα Αναφοράς	Κριτήριο 15% (απόλυτο)		Κριτήριο 35% (σχετικό)	
			min	Max	Min	max
327	100%	100%	85,0%	115,0%	65,0%	135,0%
309	73,3%	79,3%	64,3%	94,3%	51,5%	107,1%
345	47,9%	50,7%	35,7%	65,7%	33,0%	68,4%
267	39,3%	41,6%	26,6%	55,6%	27,0%	56,2%
297	33,1%	31,2%	16,2%	46,2%	20,3%	42,1%
ΜΕΘΟΔΟΣ LC/TOF-MS						
Ιόν (<i>m/z</i>)	Σχετική Αναλογία Ιόντων		Όρια Αποδοχής			
	Ύποπτο Δείγμα	Δείγμα Αναφοράς	Κριτήριο 15% (απόλυτο)		Κριτήριο 35% (σχετικό)	
			Min	Max	Min	max
363,2166	100,0%	100,0%	85,0%	115,0%	65,0%	135,0%
345,2060	52,3%	46,7%	31,7%	61,7%	30,4%	63,1%
327,1955	44,4%	34,4%	19,4%	49,4%	22,4%	46,5%
309,1849	34,1%	27,6%	12,6%	42,6%	18,0%	37,3%

6.12. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ LC/IT-MS ΚΑΙ LC/TOF-MS

Οι δύο αναλυτικές μέθοδοι LC/MS που αναπτύχθηκαν για τον ποσοτικό προσδιορισμό της κορτιζόλης συγκρίθηκαν μεταξύ τους λαμβάνοντας υπόψη τις πειραματικά υπολογιζόμενες συγκεντρώσεις των δειγμάτων-μοντέλων που αναλύθηκαν στα δύο συστήματα LC/MS με την τεχνική της προσθήκης γνωστών ποσοτήτων κατά την αξιολόγηση των μεθόδων. Η σύγκριση πραγματοποιήθηκε εφαρμόζοντας τη δοκιμασία Student κατά ζεύγη (paired t-test) για εννέα βαθμούς ελευθερίας και στάθμη εμπιστοσύνης 95%. Διαπιστώθηκε ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά ανάμεσα στα αποτελέσματα ποσοτικοποίησης της κορτιζόλης που ελήφθησαν από τα δύο αναλυτικά συστήματα LC/IT-MS και LC/TOF-MS ($t_{\text{πειραματικό}} (=0,82) < t_{\text{θεωρητικό}} (=2,26)$).

6.13 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

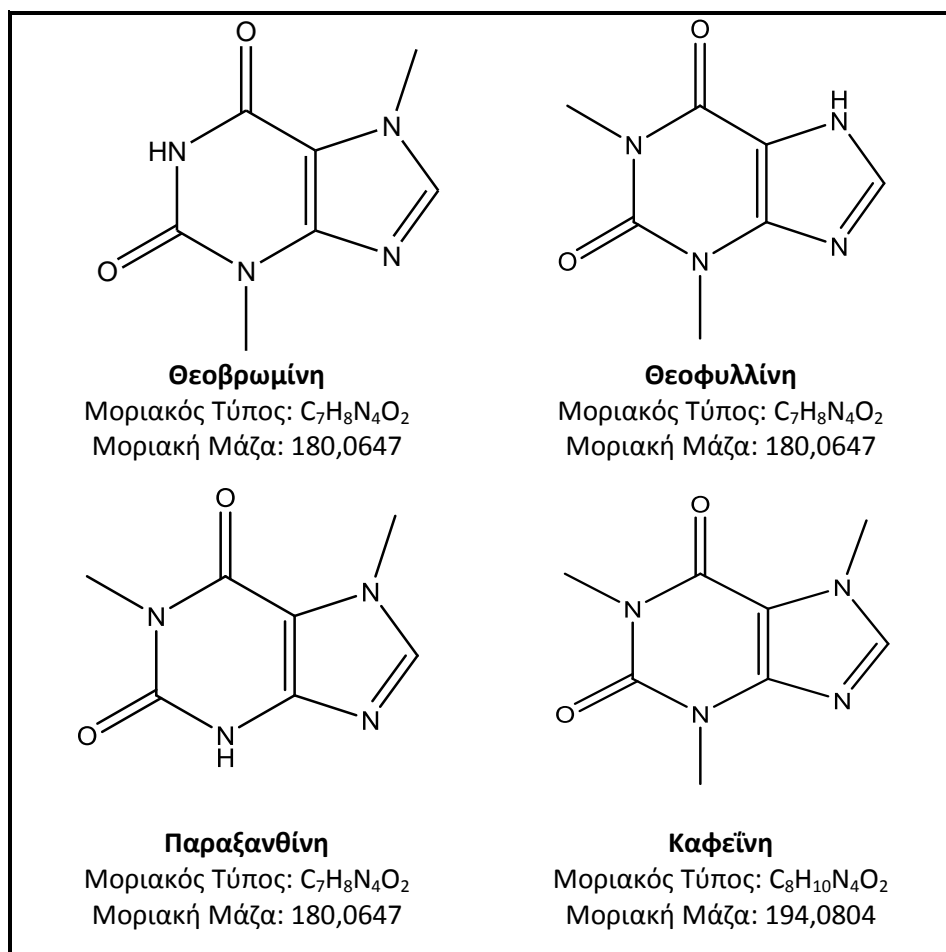
Στην παρούσα μελέτη, αναπτύχθηκαν και αξιολογήθηκαν δύο μέθοδοι για τον ποσοτικό προσδιορισμό και την επιβεβαίωση της υδροκορτιζόνης σε ούρα αλόγων με τη χρησιμοποίηση δύο διαφορετικών συστημάτων LC/MS (LC/IT-MS και LC/TOF-MS). Κύριο πλεονέκτημα της προτεινόμενης μεθοδολογίας έναντι αυτών που έχουν ήδη αναπτυχθεί και αναφερθεί στη βιβλιογραφία αποτελεί η απλοποιημένη και ταχεία πορεία κατεργασίας των δειγμάτων, που βασίζεται στην απευθείας έγχυση του φιλτραρισμένου και αραιωμένου δείγματος ούρων στο αναλυτικό σύστημα. Στην περίπτωση της μεθόδου LC/IT-MS η επιβεβαίωση της κορτιζόλης πραγματοποιείται ταυτόχρονα με την ποσοτικοποίηση, ενώ για το σύστημα LC/TOF-MS η ταυτοποίηση πραγματοποιείται με επανάλυση των δειγμάτων σε υψηλό δυναμικό της πηγής ιοντισμού. Λαμβάνοντας υπόψη την πολυπλοκότητα του υποστρώματος των ούρων και τη μη εφαρμογή εκχυλιστικής διαδικασίας για τον καθαρισμό των δειγμάτων, πραγματοποιήθηκε εκτενής μελέτη της επίδρασης του μητρικού υλικού, όπου διαπιστώθηκε ιοντική καταστολή το μέγεθος της οποίας ποικίλει από δείγμα σε δείγμα. Για το λόγο αυτό και δεδομένου ότι η κορτιζόλη αποτελεί ενδογενή ουσία, εφαρμόστηκε η τεχνική της προσθήκης γνωστών ποσοτήτων για την εξαγωγή αξιόπιστων αποτελεσμάτων ποσοτικοποίησης. Οι δύο μέθοδοι αξιολογήθηκαν ως προς τα κύρια χαρακτηριστικά ποιότητας (γραμμικότητα, ορθότητα, πιστότητα, χρωματογραφικά χαρακτηριστικά, ειδικότητα, επιμόλυνση εκ μεταφοράς δείγματος) δίνοντας ικανοποιητικά αποτελέσματα, που τις καθιστούν κατάλληλη για το σκοπό που αναπτύχθηκαν και επιτρέπουν την εφαρμογή τους στον έλεγχο ντόπινγκ που διενεργείται από τα διεπιστευμένα εργαστήρια για την ποσοτικοποίηση και την επιβεβαίωση της κορτιζόλης σε ούρα αλόγων. Πραγματοποιήθηκε εφαρμογή της προτεινόμενης μεθοδολογίας στην ανάλυση πραγματικού δείγματος αλόγου. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι οι μέθοδοι επικυρώθηκαν από το Εθνικό Συμβούλιο Διαπίστευσης (ΕΣΥΔ) και έχουν ενταχθεί στο πεδίο διαπίστευσης των επιβεβαιωτικών διαδικασιών αλόγων που εφαρμόζονται στο Εργαστήριο ελέγχου ντόπινγκ του ΟΑΚΑ.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ (ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ) ΤΗΣ ΘΕΟΒΡΩΜΙΝΗΣ ΣΕ ΟΥΡΑ ΑΛΟΓΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΔΥΟ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ LC/MS

7.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ – ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η θεοβρωμίνη (3,7-διμεθυλο-ξανθίνη), της οποίας η χημική ονομασία είναι 3,7-dihydro-3,7-dimethyl-H-purine-2,6-dione, ανήκει στην κατηγορία των αλκαλοειδών που είναι γνωστά ως μεθυλο-ξανθίνες (Σχήμα 7.1). Οι μεθυλο-ξανθίνες συναντώνται σε 16 περίπου διαφορετικά φυτικά είδη και σε αυτές περιλαμβάνονται επίσης η καφεΐνη (1,3,7-τριμεθυλο-ξανθίνη), κύριο αλκαλοειδές του καφέ (*Coffea arabica* και *Coffea canephora* οικ. *Rubiaceae*) και η θεοφυλλίνη (1,3-διμεθυλο-ξανθίνη), που βρίσκεται κυρίως στο τσάι (*Camelia sinensis* οικ. *Theaceae*). Η θεοβρωμίνη αποτελεί την κύρια μεθυλο-ξανθίνη στο κακάο (*Theobroma cacao* οικ. *Sterculiaceae*) (περιεκτικότητα 2 % επί ξηρού βάρους στους κόκκους του κακαόδεντρου (coca beans)), ενώ ταυτόχρονα αποτελεί και μεταβολίτη της καφεΐνης μαζί με την θεοφυλλίνη και την παραξανθίνη (1,7-διμεθυλοξανθίνη), τόσο στον άνθρωπο, όσο και στα άλλα.



Σχήμα 7.1: Χημική δομή μεθυλο-ξανθινών

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Θεοβρωμίνη

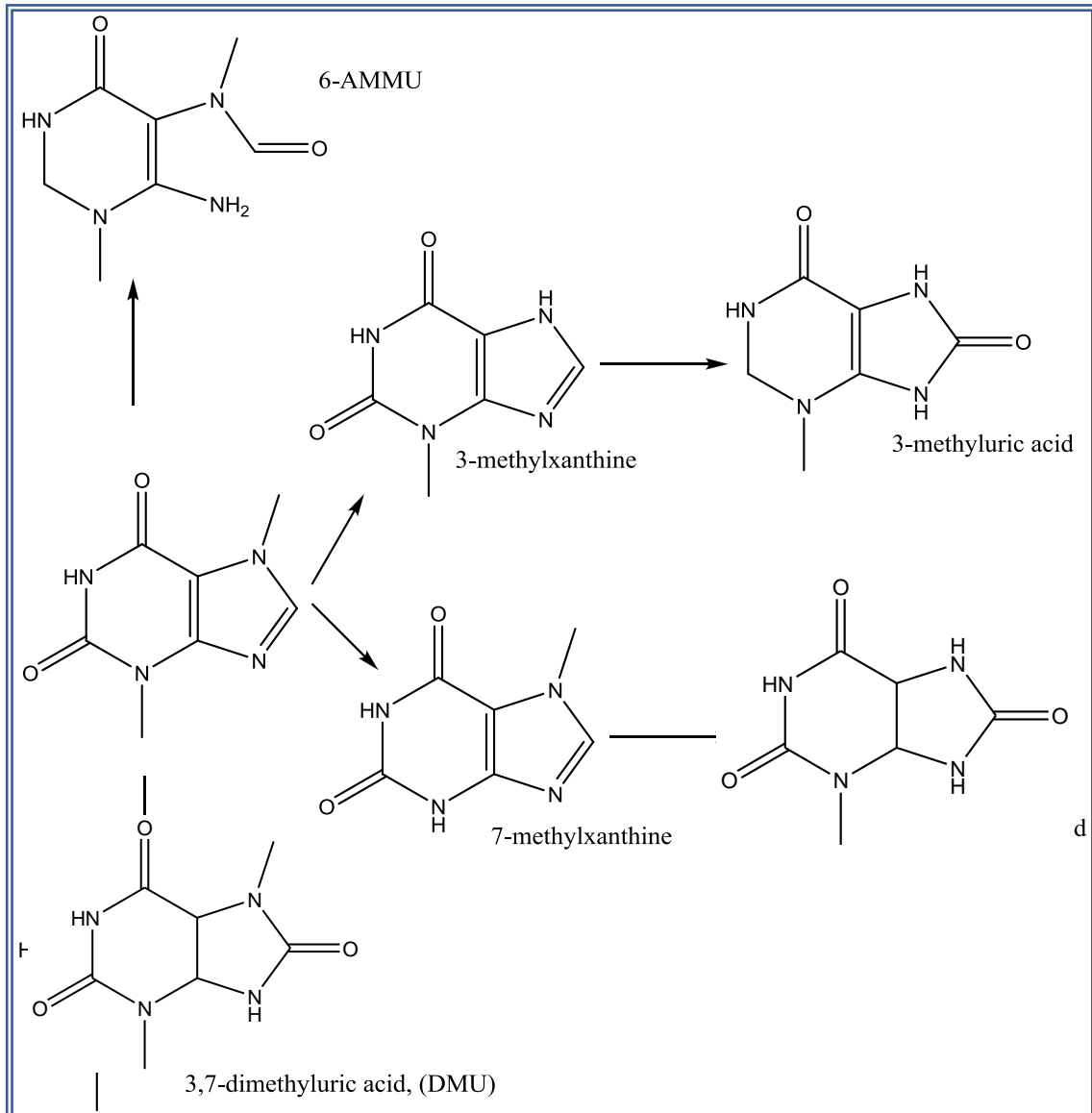
Σύμφωνα με το άρθρο 6 της Διεθνούς Συμφωνίας που έχει εκδόσει η Παγκόσμια Ομοσπονδία των Αρχών Ιπποδρομιών (IFHA), ουσίες όπως η θεοβρωμίνη που μπορούν να βρεθούν στις ζωοτροφές των αλόγων λόγω επιμόλυνσης κατά την καλλιέργεια, τη μεταποίηση ή την επεξεργασία τους, συμπεριλαμβάνονται στις απαγορευμένες ουσίες ορίου. Ο AORC έχει θέσει ως ανώτερο επιτρεπόμενο όριο στη συγκέντρωση της θεοβρωμίνης στα ούρα των αλόγων τα $2 \mu\text{g mL}^{-1}$. Έτσι, δείγματα αλόγων που περιέχουν θεοβρωμίνη σε συγκέντρωση μεγαλύτερη από $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ χαρακτηρίζονται ως θετικά στους ελέγχους ντόπινγκ που διενεργούν τα αρμόδια εργαστήρια.³⁶ Την εικοσαετία 1980-2000 στη Μεγάλη Βρετανία, η θεοβρωμίνη αποτέλεσε την συχνότερα ανιχνευόμενη απαγορευμένη ουσία στα άλογα και στην πλειοψηφία των περιπτώσεων η πηγή εντοπίστηκε στην επεξεργασμένη ζωοτροφή, όπου υπήρξαν και περιπτώσεις που η περιεκτικότητα σε θεοβρωμίνη έφτανε το 1 mg Kg^{-1} .^{190,191}

Η θεοβρωμίνη, όπως και οι υπόλοιπες μεθυλοξανθίνες, αποτελούν διεγερτικά του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ) και του καρδιαγγειακού συστήματος, ενώ παράλληλα έχουν διουρητική, βρογχοδιασταλτική και αγγειοδιασταλτική δράση και διεγείρουν το μεταβολισμό.¹⁹²⁻¹⁹⁴ Στη θεοβρωμίνη υπερισχύει η διουρητική δράση, ενώ για την καφεΐνη και τη θεοφυλλίνη προεξέχουσες δράσεις είναι η διέγερση του ΚΝΣ και η βρογχοδιασταλτική, αντίστοιχα.

Στους ανθρώπους και σε ζώα που έχουν μελετηθεί (αρρουαίους, ποντίκια, κουνέλια και σκύλους) η θεοβρωμίνη μεταβολίζεται στο συκώτι (φαινόμενο πρώτης διόδου) και οι κύριες οδοί μεταβολισμού της είναι η 3-N- και η 7-N- απομεθυλίωση, οδηγώντας αντίστοιχα στο σχηματισμό 7-μεθυλοξανθίνης και 3-μεθυλοξανθίνης, ουσίες οι οποίες ακολούθως υφίστανται οξείδωση και μετατρέπονται στα αντίστοιχα μεθουρικά οξέα (7-methyluric acid και 3-methyluric acid). Παράλληλα, η θεοβρωμίνη μπορεί να υποστεί απευθείας οξείδωση στη θέση C8 σχηματίζοντας δύο επιπλέον μεταβολίτες (3,7-dimethyluric acid και 6-amino-5-(N-methylformyl-amino)-1-methyluracil, 6-AMMU).¹⁹⁵⁻¹⁹⁷ Τόσο η θεοβρωμίνη, όσο και οι σχηματιζόμενοι μεταβολίτες της δεν υποκείνται σε περαιτέρω αντιδράσεις βιομετατροπής φάσης II και απεκκρίνονται στα ούρα μη συζευγμένοι. Στο Σχήμα 7.2 παρουσιάζονται σχηματικά οι κύριες οδοί μεταβολισμού της θεοβρωμίνης.

Στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί εννέα φαρμακοκινητικές μελέτες απέκκρισης της θεοβρωμίνης στα άλογα, μετά από μονή ή πολλαπλή χορήγηση ζωοτροφών που περιείχαν σε ποικίλες ποσότητες προϊόντα με βάση το κακάο.¹⁹⁸⁻²⁰⁶ Διαπιστώθηκε ότι η απέκκριση της θεοβρωμίνης και των μεταβολιτών της παρουσιάζει μεταβλητότητα, είναι δοσοεξαρτώμενη και σχετίζεται με διαφοροποιήσεις στη νεφρική απέκκριση και τη νεφρική αιματική ροή. Σε όλες τις περιπτώσεις, η θεοβρωμίνη ήταν ανιχνεύσιμη στα ούρα των αλόγων για διάστημα πολλών ημερών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Θεοβρωμίνη



Σχήμα 7.2: Πορεία βιομετατροπής της θεοβρωμίνης

Έχουν αναπτυχθεί αρκετές μέθοδοι ανίχνευσης και προσδιορισμού για τη θεοβρωμίνη σε διάφορα μητρικά υλικά (φυτικά είδη,²⁰⁷ ροφήματα,^{208,209} ζωοτροφές,^{191,204} συμπληρώματα διατροφής,²¹⁰ πλάσμα, ούρα κ.α). Για τον προσδιορισμό της θεοβρωμίνης σε ούρα (ανθρώπινα ούρα ή ούρα αλόγων) έχουν χρησιμοποιηθεί μέθοδοι υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με φασματοφωτομετρικό ανιχνευτή (HPLC)^{204,212-217} και μέθοδοι αεριοχρωματογραφίας /φασματομετρίας μαζών (GC/MS)^{217,218}. Στις μεθόδους αυτές τα προς ανάλυση δείγματα κατεργάζονται με την τεχνική της υγρό-υγρό εκχύλισης ή της εκχύλισης στερεάς φάσης. Τα τελευταία χρόνια αναφέρθηκε στη βιβλιογραφία η εφαρμογή της τεχνικής της υγροχρωματογραφίας /φασματομετρίας μαζών (LC/MC) για τον ποσοτικό προσδιορισμό της θεοβρωμίνης σε ούρα.²¹⁹⁻²²¹ Σε μία από τις αναφορές αυτές²²⁰ πραγματοποιείται απευθείας προσδιορισμός της θεοβρωμίνης καθώς και άλλων μεταβολιτών της καφεΐνης σε ανθρώπινα ούρα, αλλά παρατηρήθηκε σημαντική καταστολή του σήματος από το υπόστρωμα για κάποιες από τις αναλυόμενες ξανθίνες. Το φαινόμενο

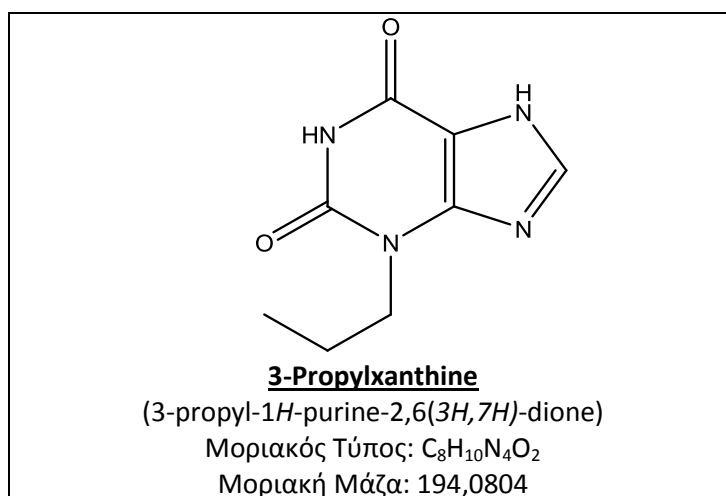
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Θεοβρωμίνη

της ιοντικής καταστολής λόγω υποστρώματος φαίνεται ότι μπορεί να εξαλειφθεί στην ανάλυση ούρων ανθρώπου με την εφαρμογή της τεχνικής isotope dilution mass spectrometry,^{219,221,222} αλλά ισοτοπικά επισημασμένα ανάλογα της θεοβρωμίνης (²H-θεοβρωμίνη ή ¹³C-θεοβρωμίνη) δεν είναι εμπορικά διαθέσιμα.

Αντικείμενο της παρούσας εργασίας ήταν η ανάπτυξη, η αξιολόγηση και η επικύρωση μιας διαδικασίας για τον ποσοτικό προσδιορισμό και την ταυτοποίηση (επιβεβαίωση) της θεοβρωμίνης σε ούρα αλόγων με την απλούστερη δυνατή πορεία κατεργασίας της απευθείας έγχυσης αραιωμένου δείγματος στο αναλυτικό σύστημα (direct injection, “dilute and shoot”). Για το σκοπό αυτό, αναπτύχθηκαν δύο μέθοδοι LC/MS, που βασίζονται σε κοινή πορεία κατεργασίας των δειγμάτων ούρων και στην ανάλυσή τους σε δύο ξεχωριστά συστήματα LC/MS: LC/Ion Trap-MS και LC/TOF-MS.

7.2. ΕΣΩΤΕΡΙΚΟ ΠΡΟΤΥΠΟ

Το εσωτερικό πρότυπο που χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό της θεοβρωμίνης ήταν η 3-προπυλοξανθίνη (3-propylxanthine), η οποία συντομογραφικά αποδίδεται στην παρούσα εργασία ως 3-PX. Επιλέχθηκε διότι εμφανίζει παρόμοια δομικά και χημικά χαρακτηριστικά με αυτά της θεοβρωμίνης και επομένως παρεμφερή συμπεριφορά κατά τον ιοντισμό (Σχήμα 7.3).



Σχήμα 7.3: Χημική δομή 3-προπυλοξανθίνης

7.3. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Οι ουσίες θεοβρωμίνη, θεοφυλλίνη, καφεΐνη, παραξανθίνη, αμινοφυλλίνη (aminophylline), πεντοξυφυλλίνη (pentoxifylline) και το εσωτερικό πρότυπο, 3-προπυλοξανθίνη, ελήφθησαν από τη Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) και ήταν βαθμού καθαρότητας 100 %. Η διπροφυλλίνη (diprophylline, δισκίο περιεκτικότητας 200 mg) και η φεναιθυλλίνη (fenethylline) ελήφθησαν από τη Minerva Pharmaceuticals (Athens, Greece) και την LCG Standards (Wessel, Germany), αντίστοιχα.

7.4. ΕΠΙΛΟΓΗ - ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ LC/MS

7.4.1. Μέθοδος LC/IT-MS

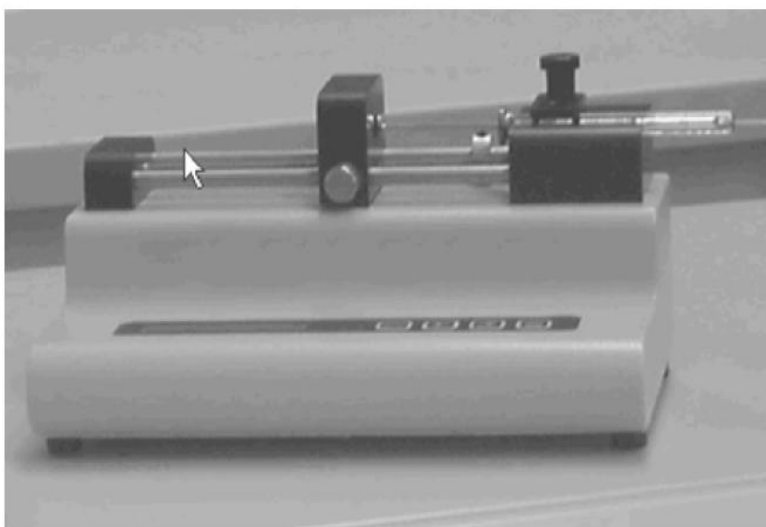
Υγροχρωματογραφικές Συνθήκες

Για την απομόνωση και το χρωματογραφικό διαχωρισμό της θεοβρωμίνης και του εσωτερικού προτύπου από τα συστατικά των ούρων χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφική στήλη Zorbax RX-C8 με μήκος 15 cm, εσωτερική διάμετρο 2,1 mm και διάμετρο σωματιδίων 5 μm (Agilent Technologies). Η θερμοκρασία της στήλης ρυθμίστηκε στους 35 °C. Για την προστασία της στήλης τοποθετήθηκε πριν την είσοδο αυτής φίλτρο διαμέτρου πόρων 0,5 μm (pre-column in-line filter, Agilent Technologies). Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε διάλυμα οξικού οξέος 0,1 % (v/v) σε μίγμα νερού/ακετονιτριλίου 97/3 (v/v) (διαλύτης A, 4.4.2.27) και διάλυμα οξικού οξέος 0,1 % (v/v) σε ακετονιτρίλιο (διαλύτης B, 4.4.2.24). Η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης διατηρήθηκε σταθερή και ρυθμίστηκε στην τιμή 0,3 mL min⁻¹. Κατά την ανάπτυξη της μεθόδου δοκιμάστηκαν ποικίλα προγράμματα βαθμιδωτής έκλουσης (gradient elution) χρησιμοποιώντας κατά την έναρξη της ανάλυσης υψηλό ποσοστό υδατικού διαλύτη στην κινητή φάση, με στόχο να επιτευχθεί ικανοποιητική συγκράτηση του αναλύτη και του εσωτερικού προτύπου που είναι σχετικά υψηλής πολικότητας ουσίες, ενώ μετά την έκλουσή τους θεωρήθηκε απαραίτητη η απομάκρυνση των άπολων συστατικών του υποστρώματος με κινητή φάση πλούσια σε οργανικό τροποποιητή πριν την έναρξη της επόμενης ανάλυσης. Παράλληλα, κρίθηκε σημαντικό να επιτευχθεί χρωματογραφικός διαχωρισμός της θεοβρωμίνης και της 3-PX από τις άλλες μεθυλοξανθίνες (θεοφυλλίνη και παραξανθίνη) και την καφεΐνη. Τελικά, στο πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης που εφαρμόστηκε η αρχική αναλογία του διαλύτη B της κινητής φάσης ήταν 0 %, διατηρούμενη σταθερή για 1 min και αυξανόμενη γραμμικά στη συνέχεια φτάνοντας το 15% σε χρόνο 4 min, όπου παρέμενε σταθερή για 4 min. Στη συνέχεια, αυξανόταν και πάλι γραμμικά φτάνοντας το 80% εντός 1,5 min και παραμένοντας σε αυτό σταθερή για 3 min, οπότε και επανερχόταν στην αρχική της τιμή (0 %) εντός 0,5 min. Ο χρόνος της ανάλυσης ήταν 13 min ακολουθούμενος από το χρόνο εξισορρόπησης της κινητής φάσης στην αρχική της σύνθεση, που ήταν 5 min. Υπό τις παραπάνω χρωματογραφικές συνθήκες η θεοβρωμίνη και το εσωτερικό πρότυπο εκλούονταν σε χρόνο 7,6 min και 8,7 min, αντίστοιχα, ενώ οι χρόνοι έκλουσης της θεοφυλλίνης, της παραξανθίνης και της καφεΐνης ήταν 8,5 min, 8,9 min και 10,0 min, αντίστοιχα. Ο αναλυόμενος όγκος δείγματος ήταν 4 μL. Η βαλβίδα που υπάρχει στο χρησιμοποιούμενο σύστημα μετά την έξοδο του χρωματογραφικού εκλούσματος από τη στήλη και πριν την είσοδό του στην πηγή ιοντισμού του φασματομέτρου μαζών (divert valve) ρυθμίστηκε να διοχετεύει τη ροή της κινητής φάσης εντός του ανιχνευτή MS για το χρονικό διάστημα 6,0 – 9,5 min, ενώ για το υπόλοιπο διάστημα το έκλουσμα διοχετευόταν στα απόβλητα του συστήματος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Θεοβρωμίνη

Επιλογή – Βελτιστοποίηση συνθηκών λειτουργίας φασματομέτρου μαζών Ion Trap-MS

Η ανίχνευση της θεοβρωμίνης και του εσωτερικού προτύπου πραγματοποιήθηκε με θετικό μηχανισμό της τεχνικής ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI+). Προκειμένου να επιτευχθεί η μέγιστη δυνατή ευαισθησία και εκλεκτικότητα πραγματοποιήθηκαν μελέτες βελτιστοποίησης των συνθηκών λειτουργίας του φασματομέτρου μαζών, ώστε να λαμβάνεται η μέγιστη δυνατή αφθονία των πρόδρομων και θυγατρικών ιόντων της θεοβρωμίνης. Η θερμοκρασία και η ταχύτητα ροής του αερίου αποδιαλύτωσης (αερίου αζώτου) στην πηγή ιοντισμού ρυθμίστηκαν στους 325 °C και 10 L min⁻¹, αντίστοιχα. Η πίεση του αερίου αζώτου στην βελόνα νεφελοποίησης στην οποία εισάγεται το χρωματογραφικό έκλουσμα ρυθμίστηκε στην τιμή 50 psi. Οι παραπάνω τιμές είναι αυτές που καθορίζονται από τον κατασκευαστή ως συμβατές με την ταχύτητα της ροής της κινητής φάσης που εφαρμόστηκε (0,3 ml min⁻¹). Στη συνέχεια, με τη βοήθεια αυτοματοποιημένων διαδικασιών του λογισμικού του συστήματος βελτιστοποιήθηκαν οι υπόλοιπες παράμετροι του φασματομέτρου μαζών παγίδας ιόντων, όπως το δυναμικό του τριχοειδούς (capillary voltage), της περιοχής εξόδου του τριχοειδούς (capillary exit), του τεμμαχιστή (skimmer), καθώς και τα δυναμικά του οκταπόλου και των φακών που βοηθούν στην εστίαση και επιτάχυνση της δέσμης των ιόντων ώστε να φτάσουν στον αναλυτή μαζών δηλαδή στην παγίδα ιόντων. Η διαδικασία βελτιστοποίησης των παραπάνω παραμέτρων πραγματοποιήθηκε με απευθείας έγχυση (infusion) στο φασματόμετρο μαζών διαλύματος θεοβρωμίνης συγκέντρωσης 2 μg mL⁻¹ σε μίγμα ακετονιτριλίου νερού 50/50 (v/v) που περιείχε οξικό οξύ σε αναλογία 0,1% (v/v). Η έγχυση έγινε με ταχύτητα ροής 20 μL min⁻¹ με τη βοήθεια αντλίας σύριγγας (syringe pump, Σχήμα 7.4) που συνδέθηκε μαζί με τη ροή της κινητής φάσης στη βελόνα αποδιαλύτωσης της πηγής ιοντισμού με τη βοήθεια σύνδεσης T. Στον Πίνακα 7.1 παρουσιάζονται οι τιμές των δυναμικών του συστήματος που επιλέχθηκαν μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας ως οι βέλτιστες για τη λήψη της μέγιστη αφθονίας του πρωτονιωμένου μοριακού ιόντος της θεοβρωμίνης [M+H]⁺ με τιμή *m/z* 181.



Σχήμα 7.4: Συσκευή αντλίας σύριγγας (syringe pump) που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη βελτιστοποίησης των παραμέτρων λειτουργίας του φασματομέτρου LC/Ion Trap-MS

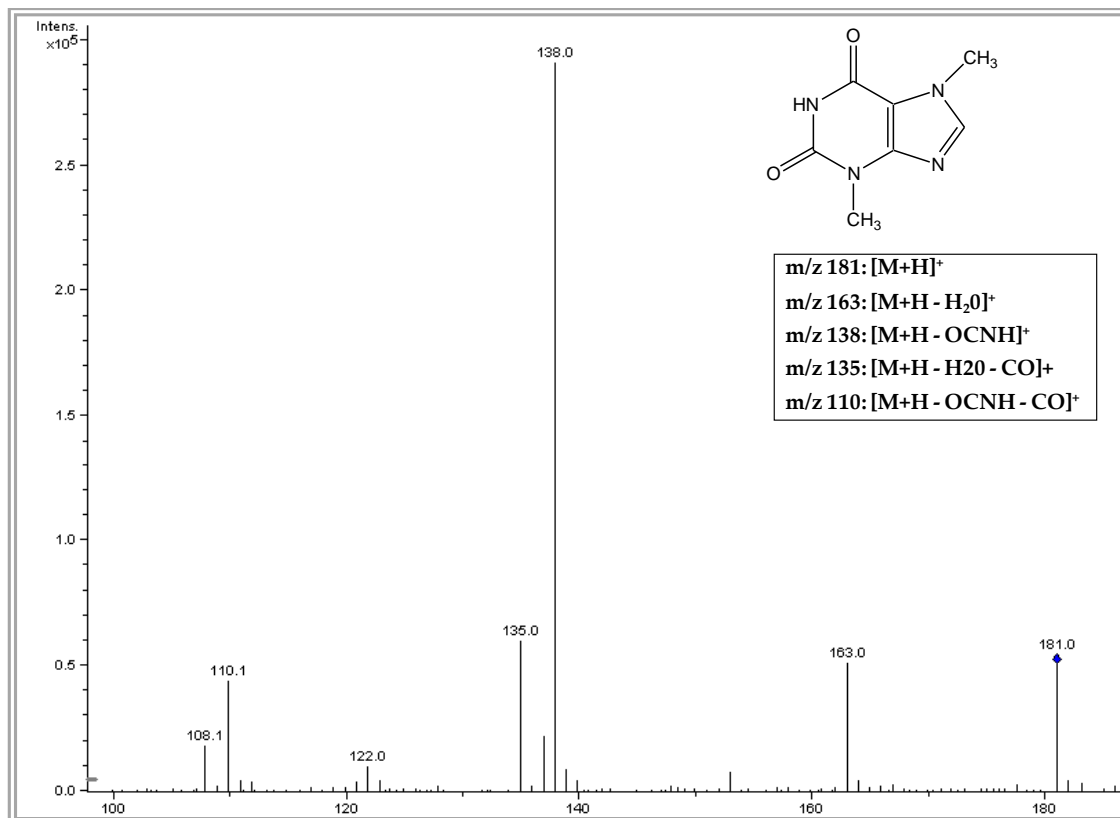
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Θεοβρωμίνη

Πίνακας 7.1: Βέλτιστες τιμές παραμέτρων φασματομέτρου LC/Ion Trap-MS

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ	ΒΕΛΤΙΣΤΗ ΤΙΜΗ
Δυναμικό τριχοειδούς (Capillary voltage)	-5000 V
Δυναμικό διαχωριστή (Skimmer voltage)	40,0 V
Έξοδος τριχοειδούς (Capillary exit)	118,2 V
Δυναμικό 1 ^{ου} οκταπόλου (Octapole 1 DC)	10,00 V
Δυναμικό 2 ^{ου} οκταπόλου (Octapole 1 DC)	1,50 V
Δυναμικό οκταπόλου RF (Octapole RF)	100,0 Vpp
1 ^η δέσμη φακών (Lens 1)	-5,0 V
2 ^η δέσμη φακών (Lens 2)	-50,0 V
Trap drive	48,3
Πίεση αερίου νεφελοποίησης (Nebulizer gas pressure)	50,0 psi
Ροή αερίου ξήρανσης (Dry gas)	10,0 L min ⁻¹
Θερμοκρασία ξήρανσης (Dry temperature)	325 °C

Για την επίτευξη μεγαλύτερης εκλεκτικότητας και ευαισθησίας επιλέχθηκε να προκληθεί θραύση των ιόντων τύπου συζευγμένης φασματομετρίας μαζών (MS/MS) στο φασματόμετρο παγίδας ιόντων. Για το σκοπό αυτό, μελετήθηκε η λήψη φασμάτων σάρωσης θυγατρικών ιόντων (product ion scan) μετά από απομόνωση (isolation) και θραυσματοποίηση (fragmentation) των πρωτονιωμένων μοριακών ιόντων του αναλύτη (m/z 181) και του εσωτερικού προτύπου (m/z 195). Με προεπιλεγμένη ρύθμιση της τιμής αποκοπής m/z (cut-off m/z) στην προτεινόμενη από το σύστημα τιμή (default), που αντιστοιχεί στο 27% της τιμής m/z του πρόδρομου ιόντος, η σταδιακή αύξηση του δυναμικού θραυσματοποίησης στην παγίδα ιόντων είχε ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός μόνο θυγατρικού ιόντος με τιμή m/z 138. Προκειμένου να επιτευχθεί ο σχηματισμός τουλάχιστων τριών θυγατρικών ιόντων, τα οποία είναι απαραίτητα για τη διαδικασία επιβεβαίωσης της θεοβρωμίνης, κατά τη διάρκεια των πειραμάτων απευθείας έγχυσης, πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση του δυναμικού θραυσματοποίησης με παράλληλη μεταβολή της τιμής αποκοπής. Στο Σχήμα 7.5 παρουσιάζεται το φάσμα σάρωσης θυγατρικών ιόντων (product ion scan spectrum) του πρωτονιωμένου μοριακού ιόντος της θεοβρωμίνης που λαμβάνεται από την ανάλυση προτύπου διαλύματος σε κινητή φάση συγκέντρωσης 2,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ υπο τις βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας της παγίδας ιόντων.

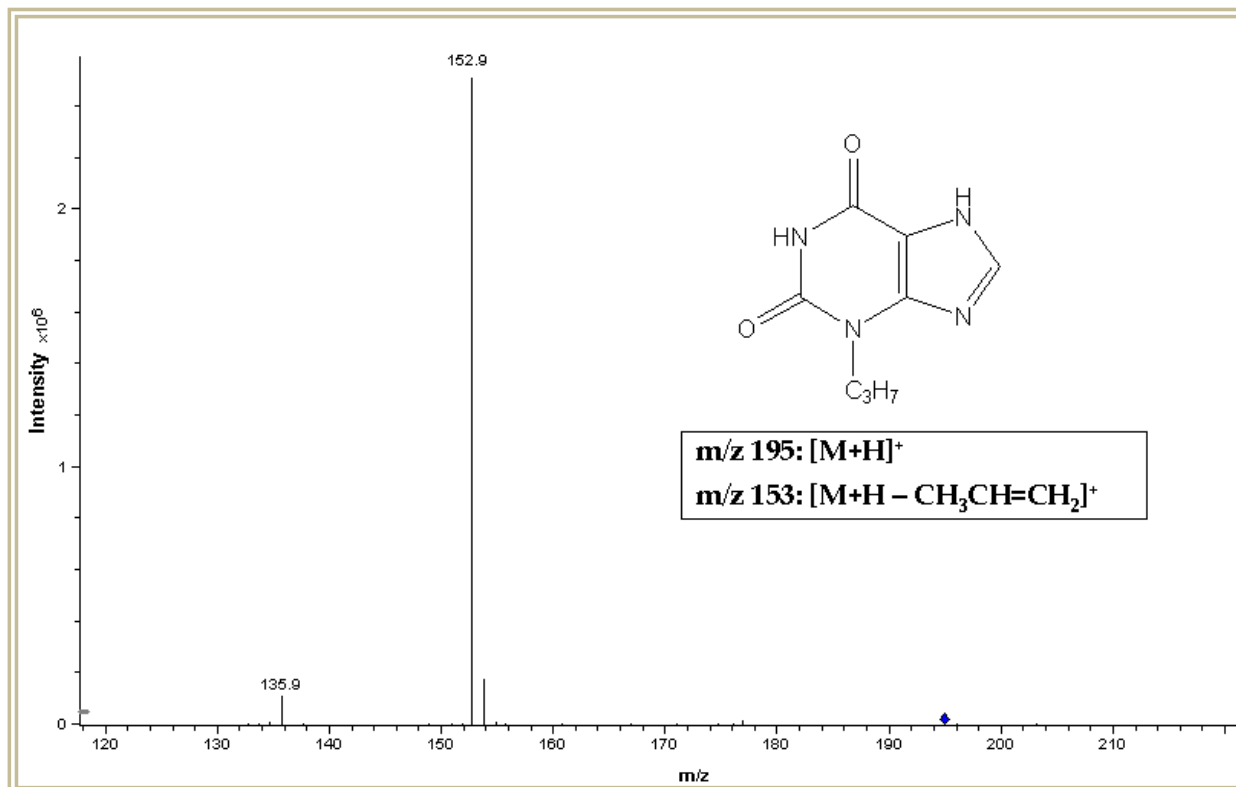
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Θεοβρωμίνη



Σχήμα 7.5: Φάσμα σάρωσης θυγατρικών ιόντων (*product ion scan spectrum*) της θεοβρωμίνης μετά από ανάλυση πρότυπου διαλύματος συγκέντρωσης 2,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ υπό τις βέλτιστες συνθήκες του συστήματος LC/Ion Trap-MS.

Το ιόν με τιμή m/z 138 αποτελεί το κύριο διαγνωστικό ιόν και σχηματίζεται από το πρωτονιωμένο μοριακό ιόν με απώλεια ενός μορίου ισοκυανικού οξέος, ενώ με περαιτέρω απώλεια ενός μορίου μονοξειδίου του άνθρακα από το ιόν αυτό σχηματίζεται το διαγνωστικό ιόν με τιμή m/z 110. Η απώλεια ενός μορίου νερού από το πρωτονιωμένο μόριο της θεοβρωμίνης οδηγεί στο σχηματισμό του ιόντος με τιμή m/z 163, από το οποίο με περαιτέρω απώλεια ενός μορίου μονοξειδίου του άνθρακα σχηματίζεται το διαγνωστικό ιόν με τιμή m/z 135. Ο μηχανισμός της πορείας θραυσματοποίησης της θεοβρωμίνης έχει μελετηθεί και εξηγηθεί εκτενώς σε βιβλιογραφική αναφορά²¹⁹ με τη χρησιμοποίηση ισοτοπικά επισημασμένου αναλόγου αυτής (²H₆-theobromine). Για το εσωτερικό πρότυπο (3-PX) η απομόνωση και πλήρης θραυσματοποίηση του μοριακού ιόντος με τιμή m/z 195 οδήγησε στην απώλεια ενός μορίου προπυλενίου και στο σχηματισμό του θυγατρικού ιόντος με τιμή m/z 153 (Σχήμα 7.6). Για την παρακολούθηση των θυγατρικών ιόντων του αναλύτη και του εσωτερικού προτύπου χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά χρονικά παράθυρα (*time segments*), τα οποία παρατίθενται στον Πίνακα 7.2.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Θεοβρωμίνη



Σχήμα 7.6: Φάσμα σάρωσης θυγατρικών ιόντων (*product ion scan spectrum*) της 3-προπυλοξανθίνης (εσωτερικό πρότυπο) μετά από ανάλυση προτύπου διαλύματος συγκέντρωσης $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ υπό τις βέλτιστες συνθήκες του συστήματος LC/Ion Trap-MS.

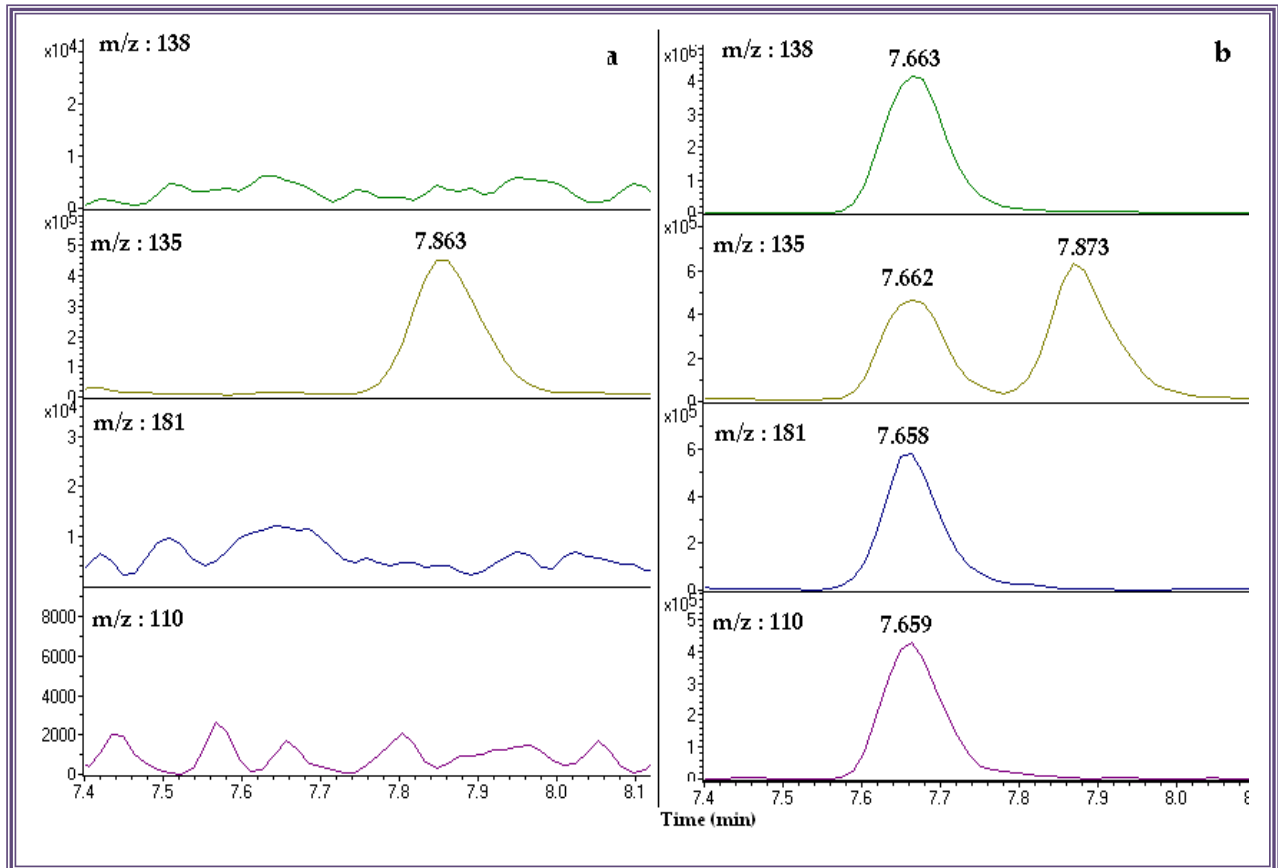
Πίνακας 7.2: Χρονικά παράθυρα της μεθόδου LC/IT-MS για την παρακολούθηση της θεοβρωμίνης και της 3-προπυλοξανθίνης (εσωτερικό πρότυπο)

Χρονικό Παράθυρο (min)	Ουσία	RT (min)	Μητρικό Ιόν (m/z)	Θραυσματοποίηση		Θυγατρικά Ιόντα (m/z)		
				Ένταση	Cut-off (m/z)			
6,0 – 8,1	Θεοβρωμίνη	7,6	181	0,95	100	138	135	110
6,8 – 9,0	3-PX (ISTD)	8,1	417	0,90	100	153		

Στην περίπτωση της μεθόδου LC/IT-MS, σημαντικό πλεονέκτημα αποτελεί το γεγονός ότι οι ίδιες συνθήκες ανάλυσης επιτρέπουν ταυτόχρονα τον ποσοτικό προσδιορισμό και την επιβεβαίωση (ποιοτική ανίχνευση) της θεοβρωμίνης με μια ανάλυση, χρησιμοποιώντας διαφορετική μέθοδο επεξεργασίας των λαμβανόμενων χρωματογραφικών δεδομένων (*total ion chromatogram*). Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της θεοβρωμίνης υπολογίστηκε η επιφάνεια της χρωματογραφικής κορυφής του ιόντος με τιμή m/z 138 για τη θεοβρωμίνη και η επιφάνεια της χρωματογραφικής κορυφής του ιόντος με τιμή m/z 153 για το εσωτερικό πρότυπο (*extracted ion chromatograms*). Για την επιβεβαίωση, τα θυγατρικά ιόντα με τιμές m/z 138, 135 και 110 και το μη θραυσματοποιημένο πρωτονιωμένο μοριακό ιόν με τιμή m/z 181, χρησιμοποιήθηκαν ως διαγνωστικά ιόντα της θεοβρωμίνης. Το θυγατρικό ιόν με τιμή m/z 163, δεν χρησιμοποιήθηκε ως διαγνωστικό ιόν, καθώς σε λευκά δείγματα ούρων που αναλύθηκαν κατά τον έλεγχο ειδικότητας της μεθόδου

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Θεοβρωμίνη

διαπιστώθηκαν στο χρόνο έκλουσης της θεοβρωμίνης παρεμποδίζουσες κορυφές. Στο Σχήμα 7.7 παρουσιάζονται τα ιοντικά χρωματογραφήματα που ελήφθησαν από την ανάλυση ενός λευκού δείγματος ούρων αλόγου και ενός δείγματος ούρων αλόγου εμβολιασμένου με θεοβρωμίνη σε συγκέντρωση $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ (συγκέντρωση ορίου, threshold).



Σχήμα 7.7: Χρωματογραφήματα LC/Ion-Trap-MS των διαγνωστικών ιόντων της θεοβρωμίνης που ελήφθησαν μετά από ανάλυση λευκού δείγματος ούρων (α) και εμβολιασμένου δείγματος συγκέντρωσης $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (β).

7.4.2. Μέθοδος LC/TOF-MS

Υγροχρωματογραφικές Συνθήκες

Κατά την επιλογή των χρωματογραφικών συνθηκών ανάλυσης στο σύστημα LC/TOF-MS πρωταρχικής σημασίας κριτήριο αποτέλεσε ο ικανοποιητικός χρωματογραφικός διαχωρισμός της θεοβρωμίνης από τη θεοφυλλίνη και την παραξανθίνη και της 3-προπυλοξανθίνης (εσωτερικό πρότυπο) από την καφεΐνη, καθώς οι ουσίες αυτές απαντώνται συχνά στα ούρα αλόγων και τα πρωτονιωμένα ιόντα τους έχουν την ίδια τιμή ακριβούς μάζας (m/z) (181,0720 για τις διμεθυλοξανθίνες και 195,0876 για την καφεΐνη και την 3-PX). Για το σκοπό αυτό, δοκιμάστηκαν διαφορετικές κινητές φάσεις και προγράμματα έκλουσης. Ως αναλυτική στήλη χρησιμοποιήθηκε η στήλη Zorbax RX-C8 (150 x 2,1 mm, 5 μm) (Agilent Technologies), που χρησιμοποιήθηκε και στη μέθοδο LC/IT-MS. Η θερμοκρασία της στήλης ρυθμίστηκε στους $35 \text{ }^\circ\text{C}$. Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε

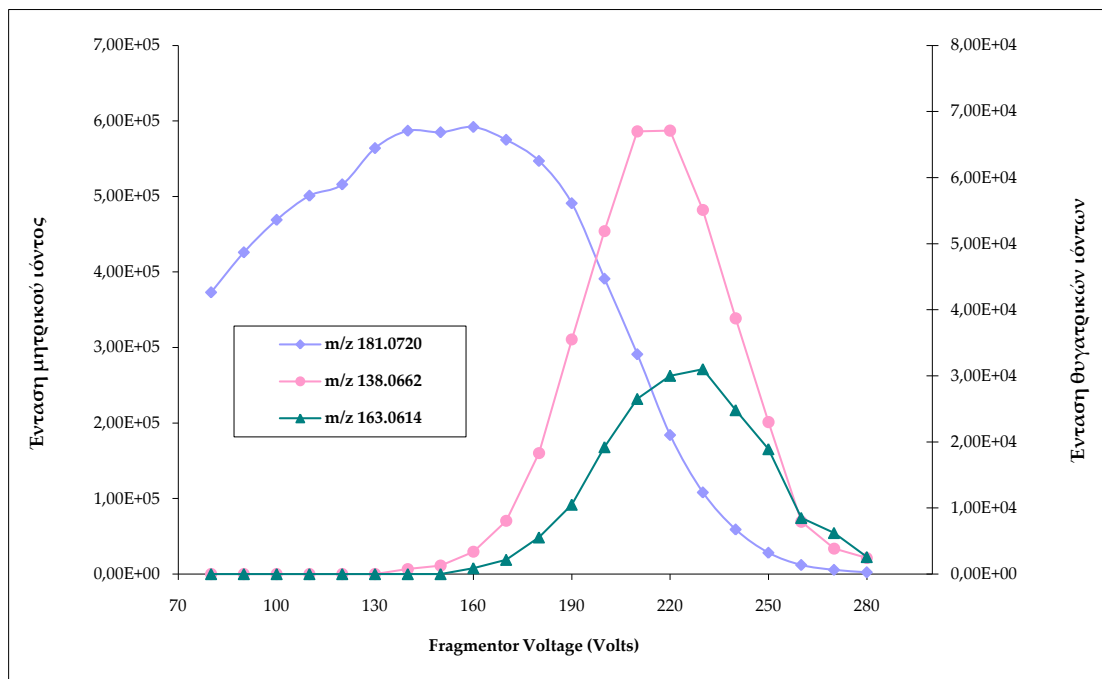
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Θεοβρωμίνη

υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 0,1 % (v/v) (διαλύτης Α, 4.4.2.23) και διάλυμα οξικού οξέος 0,1 % (v/v) σε ακετονιτρίλιο (διαλύτης Β, 4.4.2.24). Η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης ήταν 0,25 mL min⁻¹. Στο πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης που εφαρμόστηκε η αρχική αναλογία του διαλύτη Β στην κινητή φάση ήταν 3 %, διατηρούμενη σταθερή για 6 min και αυξανόμενη γραμμικά στη συνέχεια φτάνοντας το 15% σε χρόνο 9 min, όπου παρέμενε σταθερή για 4,5 min. Στη συνέχεια αυξανόταν και πάλι γραμμικά εντός 1,0 min φτάνοντας το 90% και παραμένοντας σε αυτό σταθερή για 3 min, οπότε και επανερχόταν στην αρχική της τιμή (3%) εντός 0,5 min. Ακολουθούσαν 4 min για την εξισορρόπηση του συστήματος στην αρχική σύσταση της κινητής φάσης πριν την έναρξη της επόμενης ανάλυσης. Ο ενιέμενος όγκος δείγματος ήταν 10 μL. Η βαλβίδα divert valve ρυθμίστηκε να διοχετεύει το χρωματογραφικό έκλουσμα εντός του φασματομέτρου μαζών για το χρονικό διάστημα 10,0 – 13,5 min. Ο χρόνος έκλουσης της θεοβρωμίνης και του εσωτερικού προτύπου ήταν 11,4 min και 12,8 min, αντίστοιχα, ενώ οι ισομερείς ουσίες θεοφυλλίνη, παραξανθίνη και καφεΐνη εκλούονταν σε χρόνους 12,1 min, 12,4 min και 14,4 min, αντίστοιχα.

Επιλογή – Βελτιστοποίηση συνθηκών λειτουργίας φασματομέτρου μαζών TOF-MS

Η ανίχνευση της θεοβρωμίνης και του εσωτερικού προτύπου πραγματοποιήθηκε με θετικό μηχανισμό με την τεχνική του ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI+), (όπως στην πλειοψηφία των βιβλιογραφικών αναφορών) και με ορθογώνιας επιτάχυνσης αναλυτή μαζών χρόνου πτήσης (TOF). Η θερμοκρασία και ταχύτητα ροής του αερίου αζώτου στην πηγή ιοντισμού ρυθμίστηκαν στους 350 °C και 10,0 L min⁻¹ αντίστοιχα και η πίεση του αερίου νεφελοποίησης στην τιμή 40 psi. Το δυναμικό του τριχοειδούς (capillary voltage) και του διαχωριστή (skimmer voltage) στην έξοδο του τριχοειδούς ρυθμίστηκαν στα 4000 V και 60 V, αντίστοιχα. Το εύρος σάρωσης των ανιχνευόμενων τιμών m/z ρυθμίστηκε σε 100 – 1100 και η ταχύτητα σάρωσης ήταν 1 scan sec⁻¹. Η συχνότητα λειτουργίας του ανιχνευτή των ιόντων στο χρησιμοποιούμενο σύστημα ήταν 1 GHz. Όλες οι επιπλέον παράμετροι λειτουργίας του φασματομέτρου μαζών (δυναμικά εξαπόλου, φακών, αναλυτή χρόνου πτήσης, ανιχνευτή ιόντων) ρυθμίζονταν και βελτιστοποιούνταν στο σύνολό τους από τη διαδικασία tuning του συστήματος. Το δυναμικό θραυσματοποίησης της πηγής ιοντισμού (fragmentor voltage) αποτελεί την παράμετρο που βελτιστοποιήθηκε με διαδοχικές αναλύσεις προτύπου διαλύματος θεοβρωμίνης σε κινητή φάση, συγκέντρωσης 1,0 μg mL⁻¹. Η πορεία βελτιστοποίησης του δυναμικού της πηγής απεικονίζεται διαγραμματικά στο Σχήμα 7.8 όπου παρουσιάζεται η μεταβολή του σήματος των διαγνωστικών ιόντων του αναλύτη. Τόσο για τη θεοβρωμίνη, όσο και για το εσωτερικό πρότυπο η μέγιστη ένταση των πρωτονιωμένων ιόντων τους (m/z 181,0720 και m/z 195,0876, για τη θεοβρωμίνη και την 3-PX, αντίστοιχα) λαμβάνεται με ρύθμιση του παραπάνω δυναμικού στην τιμή 160 V.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Θεοβρωμίνη



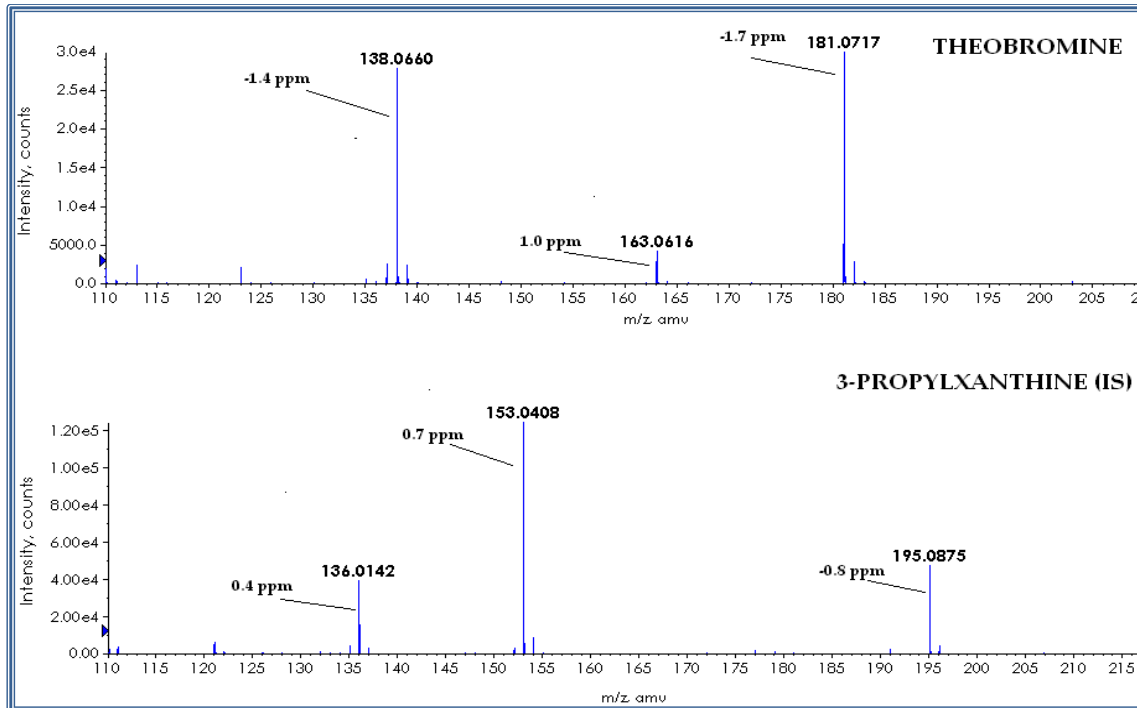
Σχήμα 7.8: Επίδραση του δυναμικού θραυσματοποίησης της πηγής ιοντισμού (fragmentor voltage) στην ένταση του πρωτονιωμένου μοριακού ιόντος και των σχηματιζόμενων από αυτό θραυσματοποιημένων διαγνωστικών ιόντων της θεοβρωμίνης

Κατά την ανάλυση διαφορετικών παρτίδων λευκών δειγμάτων ούρων αλόγων σε δυναμικό 170 V διαπιστώθηκαν παρεμποδιστικές κορυφές στους χρόνους έκλουσης τόσο της θεοβρωμίνης, όσο και του εσωτερικού προτύπου, οι οποίες προέρχονταν από συστατικά του μητρικού υλικού που σχημάτιζαν πολύ υψηλής έντασης ιόντα με τιμές m/z 180,0667 και 194,0873, αντίστοιχα. Έτσι, η τιμή του δυναμικού της πηγής ιοντισμού ρυθμίστηκε στην τιμή 220 V, όπου ανιχνεύονταν τόσο το αδιάσπαστο πρωτονιωμένο μοριακό ιόν της θεοβρωμίνης, όσο και τα θυγατρικά ιόντα που σχηματίζονται από αυτό με απώλεια ενός μορίου ισοκυανικού οξέος (m/z 138,0662) και ενός μορίου νερού (m/z 163,0614), ενώ στις συνθήκες αυτές δεν παρατηρήθηκαν παρεμποδιστικές κορυφές από ουσίες του υποστρώματος στα ιοντικά χρωματογραφήματα των παραπάνω τιμών m/z . Στο Σχήμα 7.9 παρουσιάζονται τα φάσματα πλήρους σάρωσης που ελήφθησαν μετά από την ανάλυση δείγματος ούρων αλόγου εμβολιασμένου με τη θεοβρωμίνη και το εσωτερικό πρότυπο σε συγκεντρώσεις $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ και $3,6 \mu\text{g mL}^{-1}$, αντίστοιχα, υπό τις βέλτιστες συνθήκες του συστήματος LC/TOF-MS.

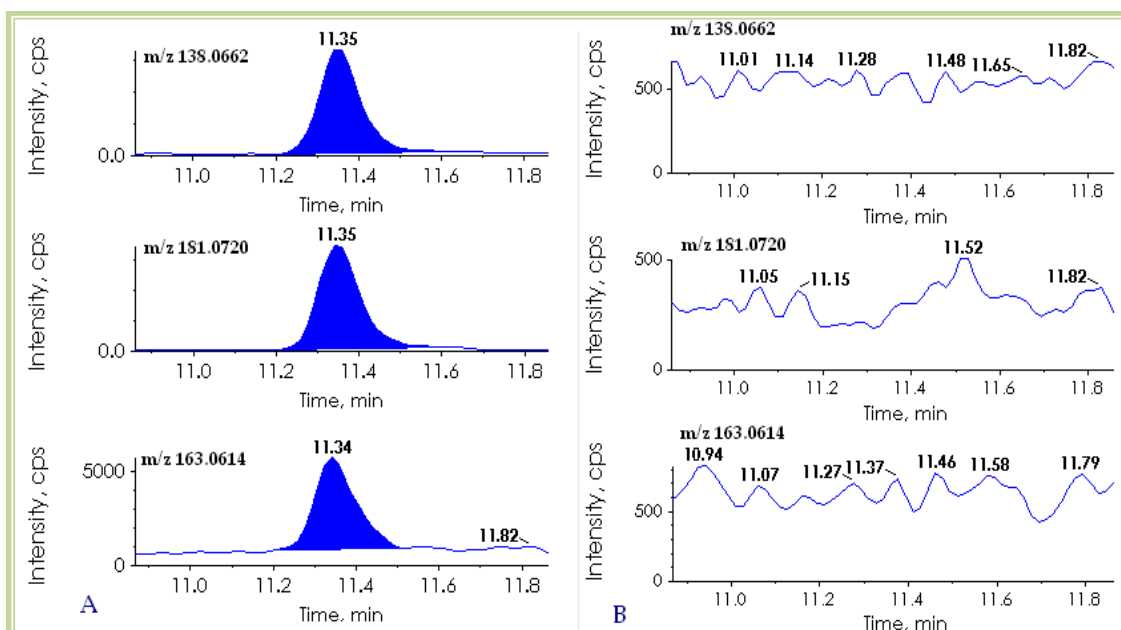
Η εφαρμογή του υψηλού δυναμικού θραυσματοποίησης (220 V), είχε επίσης ως αποτέλεσμα η ποσοτικοποίηση και η επιβεβαίωση της θεοβρωμίνης στο ύποπτο δείγμα να μπορούν να πραγματοποιηθούν ταυτόχρονα με μια ανάλυση. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της θεοβρωμίνης πραγματοποιήθηκε λαμβάνοντας υπόψη την επιφάνεια της χρωματογραφικής κορυφής του ιόντος με τιμή m/z 138,0662 για τη θεοβρωμίνη και την επιφάνεια της χρωματογραφικής κορυφής του ιόντος με τιμή m/z 153,0407 για το εσωτερικό πρότυπο (extracted ion chromatograms). Για την επιβεβαίωση, τα θυγατρικά ιόντα με τιμές m/z 138,0662 και 163,0614 και το μη θραυσματοποιημένο πρωτονιωμένο μοριακό ιόν με τιμή m/z 181,0720, χρησιμοποιήθηκαν ως διαγνωστικά ιόντα της

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Θεοβρωμίνη

θεοβρωμίνης. Τα ιοντικά χρωματογραφήματα που ελήφθησαν από την ανάλυση LC/TOF-MS του προαναφερθέντος εμβολιασμένου δείγματος ούρων αλόγου (α) και ενός λευκού δείγματος αλόγου (β) παρουσιάζονται στο Σχήμα 7.10.



Σχήμα 7.9: Φάσματα πλήρους σάρωσης (*full scan spectra*) της θεοβρωμίνης και του εσωτερικού προτύπου μετά από ανάλυση πρότυπου εμβολιασμένου δείγματος συγκέντρωσης $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ υπό τις βέλτιστες συνθήκες του συστήματος LC/TOF-MS.



Σχήμα 7.10: Χρωματογραφήματα LC/TOF-MS των διαγνωστικών ιόντων της θεοβρωμίνης που ελήφθησαν μετά από ανάλυση εμβολιασμένου δείγματος συγκέντρωσης $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (A) και λευκού δείγματος ούρων αλόγου (B).

7.5. ΠΡΟΤΥΠΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΠΑΡΑΚΑΤΑΘΗΚΗΣ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Παρασκευάστηκαν δύο διαλύματα παρακαταθήκης της θεοβρωμίνης, από τα οποία το πρώτο χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των διαλυμάτων εργασίας των προτύπων δειγμάτων της καμπύλης αναφοράς και των δειγμάτων μοντέλων, ενώ από το δεύτερο προέκυψαν τα διαλύματα εργασίας των δειγμάτων ελέγχου. Η συγκέντρωση κάθε διαλύματος παρακαταθήκης ήταν $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ και παρασκευάστηκαν με ζύγιση $25,0 \text{ mg}$ στερεής πρότυπης ουσίας σε αναλυτικό ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων μέσα σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL . Για τη διάλυση της θεοβρωμίνης χρησιμοποιήθηκε μεθανόλη και στο σχηματιζόμενο εναιώρημα προστέθηκαν σταγόνες διαλύματος καυστικού νατρίου $\text{NaOH } 1 \text{ M}$ (4.4.2.25), μέχρι πλήρους διάλυσης του στερεού και τα διαλύματα τοποθετήθηκαν για λίγα λεπτά σε λουτρό υπερήχων. Με αντίστοιχο τρόπο παρασκευάστηκε πρότυπο διάλυμα παρακαταθήκης του εσωτερικού προτύπου (3-PX), συγκέντρωσης $1,2 \text{ mg mL}^{-1}$. Ακολούθησε μεταφορά όλων των διαλυμάτων σε σκουρόχρωμα υάλινα φιαλίδια (vials) και αποθηκεύτηκαν στο σκοτάδι σε θερμοκρασία $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Παρασκευάστηκαν τρεις σειρές προτύπων διαλυμάτων εργασίας της θεοβρωμίνης με συγκεντρώσεις $125 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, $30 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ και $25 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, τα οποία προέκυψαν λαμβάνοντας κατάλληλους όγκους από τα διαλύματα παρακαταθήκης ($500 \text{ } \mu\text{L}$, $120 \text{ } \mu\text{L}$ και $100 \text{ } \mu\text{L}$, αντίστοιχα) και αραιώνοντας με μεθανόλη σε βαθμονομημένες ογκομετρικές φιάλες των 10 mL . Τα διαλύματα εργασίας αποθηκεύτηκαν σε σκοτεινόχρωμες φιάλες στους $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Το διάλυμα εργασίας του εσωτερικού προτύπου συγκέντρωσης $36 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ παρασκευαζόταν σε κάθε εργαστηριακή ημέρα με αραιώση $150 \text{ } \mu\text{L}$ του αντίστοιχου διαλύματος παρακαταθήκης ($1200 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) με υδατικό διάλυμα οξικού οξέος $0,5\%$ (v/v) (4.4.2.28).

7.6. ΠΡΟΤΥΠΑ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΕΝΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΟΥΡΩΝ

Για την αξιολόγηση της γραμμικότητας της μεθόδου και τη μελέτη των επιδράσεων από το μητρικό υλικό (matrix effect) παρασκευάστηκαν πρότυπα δείγματα καμπύλης βαθμονόμησης και δείγματα ελέγχου σε ούρα αλόγου εμβολιασμένα με θεοβρωμίνη. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν ούρα αλόγων που βρέθηκε ότι περιείχαν ελάχιστη ή καθόλου θεοβρωμίνη κατά τον έλεγχο σάρωσης του Εργαστηρίου με την τεχνική GC/MS. Τα δείγματα της καμπύλης βαθμονόμησης (standard calibration samples, STD's) παρασκευάστηκαν σε επτά επίπεδα συγκεντρωσης $0,75$, $1,5$, $3,0$, $6,0$, $9,0$, $12,0$ και $15,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ με προσθήκη κατάλληλου όγκου διαλύματος εργασίας της θεοβρωμίνης συγκέντρωσης $30 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ($12,5$, 25 , 50 , 100 , 150 , 200 και $250 \text{ } \mu\text{L}$, αντίστοιχα) σε υάλινους κωνικούς σωλήνες. Ακολούθησε εξάτμιση του μεθανολικού διαλύματος σε ρεύμα αζώτου και θερμοκρασία $50 \text{ }^\circ\text{C}$ και ανασύσταση με $500 \text{ } \mu\text{L}$ τυφλού δείγματος ούρων. Τα πρότυπα δείγματα ελέγχου (quality control samples, QC's) παρασκευάστηκαν με αντίστοιχο τρόπο σε τρία επίπεδα συγκέντρωσης $2,0$, $5,0$ και $10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. Για την παρασκευή των δειγμάτων ελέγχου χρησιμοποιήθηκε διαφορετικό διάλυμα εργασίας της θεοβρωμίνης συγκέντρωσης $25 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, το οποίο με τη σειρά του παρασκευάστηκε από ξεχωριστό διάλυμα παρακαταθήκης από αυτά που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των προτύπων δειγμάτων της καμπύλης αναφοράς.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Θεοβρωμίνη

7.7. ΠΟΡΕΙΑ ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΥΡΩΝ

Τα προς ανάλυση δείγματα ούρων, όγκου 500 μL , μεταγγίζονται σε υάλινους κωνικούς σωλήνες και ακολούθως αραιώνονται με 1 mL υδατικού διαλύματος οξικού οξέος 0,1% (v/v) (4.4.2.26). Ακολουθεί προσθήκη 50 μL διαλύματος εργασίας του εσωτερικού προτύπου και ανάδευση. Τα αραιωμένα δείγματα στη συνέχεια φυγοκεντρώνονται για 10 min με ταχύτητα 2500 rpm σε φυγόκεντρο που φέρει κατάλληλη υποδοχή για κωνικούς σωλήνες. Ποσότητα του υπερκείμενου υγρού φιλτράρεται με τη βοήθεια σύριγγας μέσω φίλτρων με διάμετρο πόρων 0,45 μm (Millex HV syringe driven filters, Millipore) και το προς ανάλυση φιλτραρισμένο δείγμα μεταγγίζεται σε υάλινα φιαλίδια (vials).

7.8. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑΣ – ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα ούρα των αλόγων αποτελούν ένα ιδιαίτερα πολύπλοκο μητρικό υλικό με συστατικά που ποικίλουν ως προς τη χημική φύση και τη δομή, από απλά ανόργανα άλατα μέχρι υψηλού μοριακού βάρους πρωτεΐνες. Η πολυσύστατη φύση του υποστρώματος των ούρων παρουσιάζει σημαντικές διαφοροποιήσεις από το ένα δείγμα στο άλλο. Η αναπτυχθείσα μεθοδολογία βασίστηκε στην απευθείας LC/MS ανάλυση δειγμάτων ούρων αλόγων και η επίδραση του υποστρώματος στην απόκριση του αναλύτη και του εσωτερικού προτύπου από ουσίες του μητρικού υλικού που συνεκλούνται και επηρεάζουν τον ιοντισμό μελετήθηκε εκτενώς για να εξασφαλιστεί η εξαγωγή αξιόπιστων αποτελεσμάτων ποσοτικού προσδιορισμού. Στην παρούσα εργασία, για τη μελέτη του φαινομένου της ιοντικής καταστολής πραγματοποιήθηκαν δύο σειρές πειραμάτων. Στην πρώτη σειρά πειραμάτων ελήφθησαν οκτώ διαφορετικά λευκά δείγματα ούρων αλόγων και εμβολιάστηκαν με τον αναλύτη σε δύο επίπεδα συγκέντρωσης ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$ και $10 \mu\text{g mL}^{-1}$). Τα δείγματα κατεργάστηκαν με την πορεία που περιγράφηκε παραπάνω και αναλύθηκαν στα δύο συστήματα LC/MS. Η απόκριση της θεοβρωμίνης και του εσωτερικού προτύπου καθώς και ο λόγος των αποκρίσεων συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα αποτελέσματα που ελήφθησαν από την ανάλυση υδατικών δειγμάτων εμβολιασμένων με θεοβρωμίνη σε αντίστοιχες συγκεντρώσεις. Διαπιστώθηκε και για τα δύο αναλυτικά συστήματα, καταστολή του σήματος, τόσο της θεοβρωμίνης, όσο και του εσωτερικού προτύπου σε βαθμό που ποικίλλει αφενός μεν για τις δύο ουσίες, αφετέρου μεταξύ των διαφορετικών υποστρωμάτων που μελετήθηκαν. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα ο λόγος των αποκρίσεων να παρουσιάζει σημαντική διακύμανση μεταξύ των δειγμάτων ούρων. Η έκταση του φαινομένου της ιοντικής καταστολής διαπιστώθηκε ότι δεν επηρεάζεται από τη συγκέντρωση του αναλύτη. Τα αποτελέσματα της μελέτης συνοψίζονται στους Πίνακες 7.3 και 7.4 για το σύστημα LC/IT-MS και LC/TOF-MS, αντίστοιχα, όπου παρατίθενται για τα οκτώ διαφορετικά δείγματα ούρων και το υδατικό δείγμα, οι τιμές των αποκρίσεων για τον αναλύτη και το εσωτερικό πρότυπο και ο λόγος των αποκρίσεων. Στη συνέχεια, τα αποτελέσματα της μελέτης παρουσιάζονται διαγραμματικά, όπου οι τιμές της απόκρισης και της σχετικής απόκρισης της θεοβρωμίνης στα διαφορετικά δείγματα ούρων παρουσιάζονται κανονικοποιημένες ως προς τις αντίστοιχες τιμές που ελήφθησαν από την ανάλυση των υδατικών δειγμάτων (Σχήμα 7.11).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Θεοβρωμίνη

Πίνακας 7.3: Αποτελέσματα μελέτης της επίδρασης του μητρικού υλικού στην απόκριση της θεοβρωμίνης, του εσωτερικού προτύπου και του λόγου των αποκρίσεων, μετά από εμβολιασμό και ανάλυση διαφορετικών δειγμάτων ούρων με το σύστημα LC/IT-MS.

Υπόστρωμα	ΜΕΘΟΔΟΣ LC/IT-MS					
	Συγκέντρωση Θεοβρωμίνης 2,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$			Συγκέντρωση Θεοβρωμίνης 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$		
	Απόκριση Θεοβρωμίνης	Απόκριση 3-PX	Λόγος Αποκρίσεων	Απόκριση Θεοβρωμίνης	Απόκριση 3-PX	Λόγος Αποκρίσεων
Υδατικό δείγμα	$8,17 \times 10^6$ (100)*	$4,48 \times 10^7$ (100)	0,183 (100)	$3,01 \times 10^7$ (100)	$3,98 \times 10^7$ (100)	0,756 (100)
Δείγμα ούρων 1	$6,96 \times 10^6$ (85)	$2,35 \times 10^7$ (52)	0,297 (162)	$2,94 \times 10^7$ (98)	$2,36 \times 10^7$ (59)	1,245 (165)
Δείγμα ούρων 2	$6,17 \times 10^6$ (76)	$2,76 \times 10^7$ (62)	0,224 (123)	$2,77 \times 10^7$ (92)	$2,78 \times 10^7$ (70)	0,995 (132)
Δείγμα ούρων 3	$6,16 \times 10^6$ (75)	$2,00 \times 10^7$ (45)	0,308 (169)	$2,69 \times 10^7$ (89)	$2,15 \times 10^7$ (54)	1,252 (166)
Δείγμα ούρων 4	$6,01 \times 10^6$ (74)	$3,41 \times 10^7$ (76)	0,176 (96)	$2,55 \times 10^7$ (85)	$3,35 \times 10^7$ (84)	0,762 (101)
Δείγμα ούρων 5	$6,14 \times 10^6$ (75)	$1,80 \times 10^7$ (40)	0,341 (187)	$2,57 \times 10^7$ (85)	$1,73 \times 10^7$ (43)	1,489 (197)
Δείγμα ούρων 6	$3,36 \times 10^6$ (41)	$1,48 \times 10^7$ (33)	0,228 (125)	$1,59 \times 10^7$ (53)	$1,51 \times 10^7$ (38)	1,056 (140)
Δείγμα ούρων 7	$6,02 \times 10^6$ (74)	$1,68 \times 10^7$ (37)	0,359 (196)	$2,56 \times 10^7$ (85)	$1,77 \times 10^7$ (44)	1,451 (192)
Δείγμα ούρων 8	$5,10 \times 10^6$ (62)	$2,43 \times 10^7$ (54)	0,209 (115)	$2,44 \times 10^7$ (81)	$2,57 \times 10^7$ (64)	0,949 (125)
Μέση Τιμή	$5,74 \times 10^6$ (70)	$2,24 \times 10^7$ (50)	0,268 (147)	$2,52 \times 10^7$ (84)	$2,28 \times 10^7$ (57)	1,150 (152)
SD	$1,08 \times 10^6$ (13)	$0,64 \times 10^7$ (14)	0,067 (37)	$0,40 \times 10^7$ (13)	$0,62 \times 10^7$ (16)	0,25 (34)
%RSD	18,9	28,5	25,1	16,1	27,2	22,0

*Εντός παρενθέσεως αναγράφονται οι τιμές κανονικοποιημένες ως προς τις αντίστοιχες των υδατικών δειγμάτων

Η μέση τιμή, η τυπική απόκλιση (SD) και η % σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) υπολογίστηκαν για τα οκτώ διαφορετικά δείγματα ούρων

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Θεοβρωμίνη

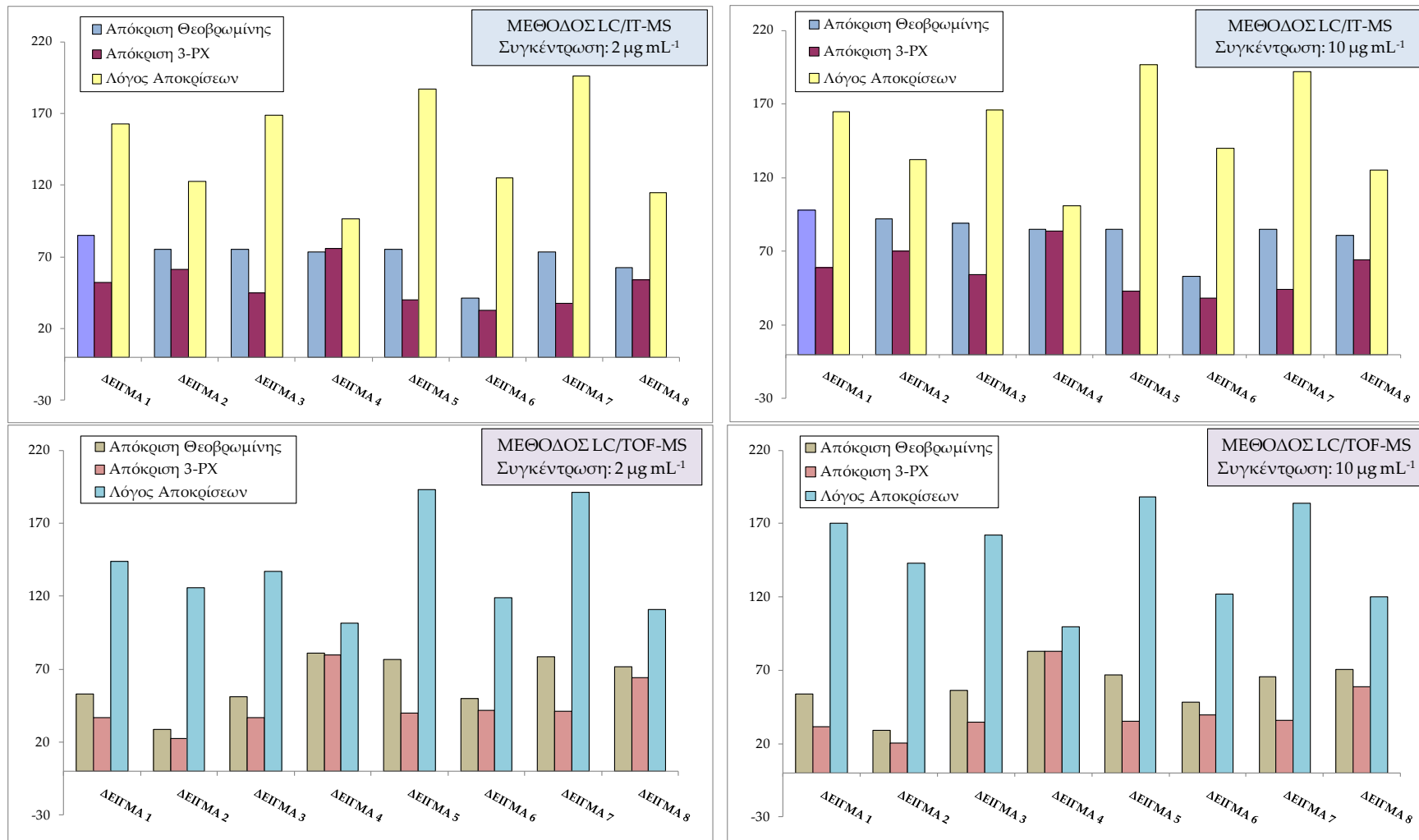
Πίνακας 7.4: Αποτελέσματα μελέτης της επίδρασης του μητρικού υλικού στην απόκριση της θεοβρωμίνης, του εσωτερικού προτύπου και του λόγου των αποκρίσεων, μετά από εμβολιασμό και ανάλυση διαφορετικών δειγμάτων ούρων με το σύστημα LC/TOF-MS.

Υπόστρωμα	ΜΕΘΟΔΟΣ LC/TOF-MS					
	Συγκέντρωση Θεοβρωμίνης 2,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$			Συγκέντρωση Θεοβρωμίνης 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$		
	Απόκριση Θεοβρωμίνης	Απόκριση 3-PX	Λόγος Αποκρίσεων	Απόκριση Θεοβρωμίνης	Απόκριση 3-PX	Λόγος Αποκρίσεων
Υδατικό δείγμα	$4,73 \times 10^5$ (100)*	$2,01 \times 10^6$ (100)	0,235 (100)	$2,72 \times 10^6$ (100)	$2,42 \times 10^6$ (100)	1,12 (100)
Δείγμα ούρων 1	$2,50 \times 10^5$ (53)	$7,38 \times 10^5$ (37)	0,338 (144)	$1,46 \times 10^6$ (54)	$7,66 \times 10^5$ (32)	1,91 (170)
Δείγμα ούρων 2	$1,34 \times 10^5$ (28)	$4,53 \times 10^5$ (23)	0,296 (126)	$7,88 \times 10^5$ (29)	$4,90 \times 10^5$ (20)	1,60 (143)
Δείγμα ούρων 3	$2,42 \times 10^5$ (51)	$7,52 \times 10^5$ (37)	0,322 (137)	$1,53 \times 10^6$ (56)	$8,43 \times 10^5$ (35)	1,81 (162)
Δείγμα ούρων 4	$3,83 \times 10^5$ (81)	$1,60 \times 10^6$ (80)	0,238 (101)	$2,24 \times 10^6$ (83)	$2,01 \times 10^6$ (83)	1,11 (99)
Δείγμα ούρων 5	$3,63 \times 10^5$ (77)	$8,01 \times 10^5$ (40)	0,453 (193)	$1,81 \times 10^6$ (67)	$8,57 \times 10^5$ (35)	2,11 (188)
Δείγμα ούρων 6	$2,35 \times 10^5$ (50)	$8,38 \times 10^5$ (42)	0,280 (119)	$1,31 \times 10^6$ (48)	$9,62 \times 10^5$ (40)	1,37 (122)
Δείγμα ούρων 7	$3,70 \times 10^5$ (78)	$8,23 \times 10^5$ (41)	0,449 (191)	$1,78 \times 10^6$ (66)	$8,65 \times 10^5$ (36)	2,06 (184)
Δείγμα ούρων 8	$3,38 \times 10^5$ (72)	$1,29 \times 10^6$ (64)	0,261 (111)	$1,91 \times 10^6$ (70)	$1,42 \times 10^6$ (59)	1,34 (120)
Μέση Τιμή	$2,89 \times 10^5$ (61)	$9,14 \times 10^5$ (45)	0,330 (140)	$1,62 \times 10^6$ (59)	$1,04 \times 10^6$ (42)	1,65 (149)
SD	$0,88 \times 10^5$ (19)	$3,63 \times 10^5$ (18)	0,081 (35)	$0,44 \times 10^6$ (16)	$0,47 \times 10^6$ (20)	0,36 (33)
%RSD	30,3	39,8	24,6	27,4	46,2	21,9

*Εντός παρενθέσεως αναγράφονται οι τιμές κανονικοποιημένες ως προς τις ανίσοιχες των υδατικών δειγμάτων

Η μέση τιμή, η τυπική απόκλιση (SD) και η % σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) υπολογίστηκαν για τα οκτώ διαφορετικά δείγματα ούρων

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Θεοβρωμίνη



Σχήμα 7.11: Διαγραμματική απεικόνιση αποτελεσμάτων μελέτης της επίδρασης του μητρικού υλικού στις αποκρίσεις, οι οποίες παρουσιάζονται κανονικοποιημένες ως προς τις τιμές που ελήφθησαν από την ανάλυση υδατικών δειγμάτων

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Θεοβρωμίνη

Στη δεύτερη σειρά πειραμάτων για τη μελέτη του φαινομένου της επίδρασης του μητρικού υλικού και παράλληλα την αξιολόγηση της γραμμικότητας της μεθόδου, παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν καμπύλες αναφοράς της θεοβρωμίνης σε εύρος συγκεντρώσεων 0,75 – 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (standard calibration curves) σε εμβολιασμένα δείγματα τριών διαφορετικών παρτίδων ούρων αλόγων (χαμηλού, μεσαίου και υψηλού ειδικού βάρους), καθώς και σε υδατικά δείγματα. Τα δείγματα για κάθε επίπεδο συγέντρωσης της καμπύλης βαθμονόμησης παρασκευάστηκαν εις διπλούν, κατεργάστηκαν σύμφωνα με την πορεία που προαναφέρθηκε και ενέθηκαν εις διπλούν σε καθένα από τα δύο συστήματα LC/MS. Ως απόκριση λαμβάνεται ο λόγος της επιφάνειας της χρωματογραφικής κορυφής της θεοβρωμίνης προς την επιφάνεια της χρωματογραφικής κορυφής του εσωτερικού προτύπου. Οι εξισώσεις για τις τέσσερις καμπύλες αναφοράς παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.5, στον οποίο παρατίθενται επίσης οι τιμές της τυπικής απόκλισης για την τομή και την κλίση, ο συντελεστής συσχέτισης (r) και το τετράγωνο αυτού (r^2) και το τυπικό σφάλμα. Σε όλες τις περιπτώσεις διαπιστώθηκε ικανοποιητική γραμμικότητα (συντελεστής συσχέτισης $r > 0,997$), ενώ οι πειραματικά υπολογιζόμενες συγκεντρώσεις, τόσο για τα δείγματα βαθμονόμησης, όσο και για τα δείγματα ελέγχου, δεν παρουσίασαν σχετικό αναλυτικό σφάλμα (% Relative Error, % E_r) μεγαλύτερο από 15%. Όπως φαίνεται και στον Πίνακα, η τιμή της κλίσης των καμπυλών αναφοράς παρουσιάζει μεγάλη διακύμανση μεταξύ των διαφορετικών παρτίδων ούρων και των δειγμάτων σε νερό. Στο Σχήμα 7.12 παρουσιάζονται και για τα δύο αναλυτικά συστήματα συγκριτικά διαγράμματα των καμπυλών αναφοράς που ελήφθησαν κατά τη μελέτη επίδρασης του υποστρώματος. Σε όλες τις περιπτώσεις κατά την ανάλυση των δειγμάτων ούρων προέκυψαν καμπύλες αναφοράς με μεγαλύτερη τιμή κλίσης σε σχέση με την καμπύλη αναφοράς σε νερό, καθώς το εσωτερικό πρότυπο υφίσταται ιοντική καταστολή σε μεγαλύτερο βαθμό από την θεοβρωμίνη.

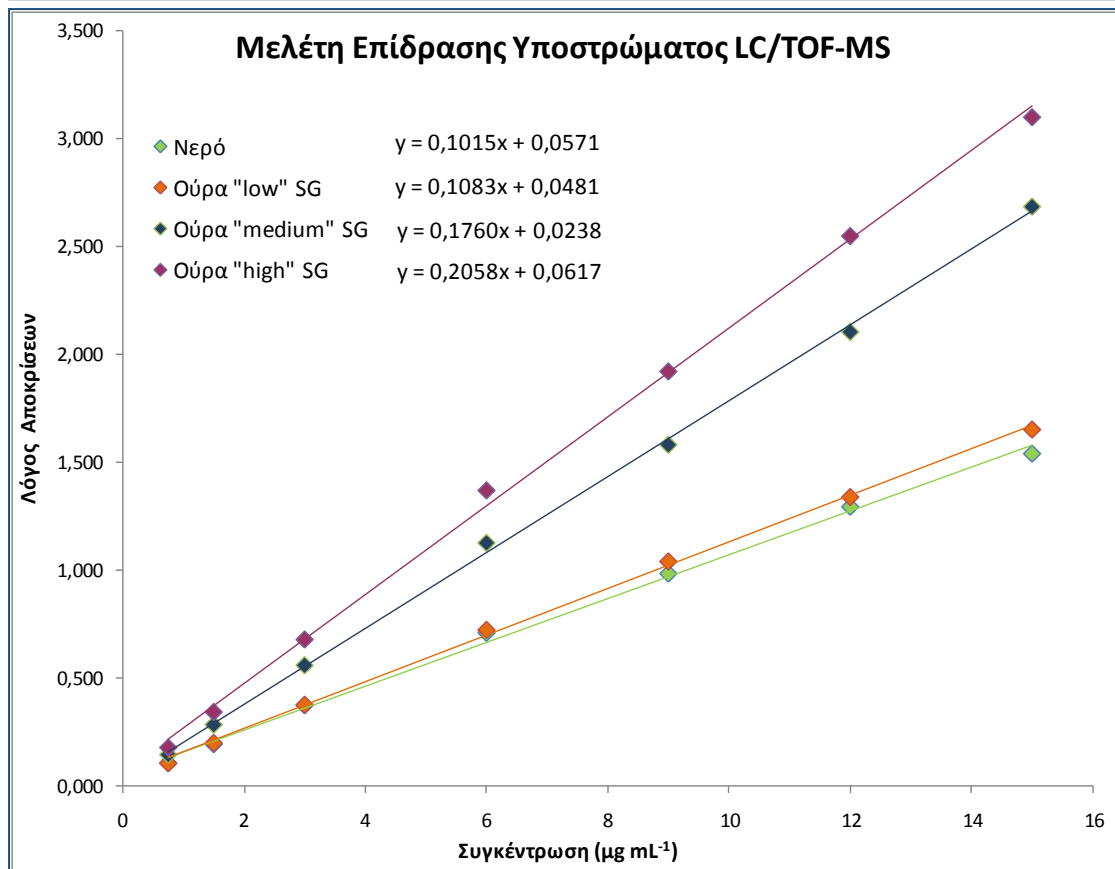
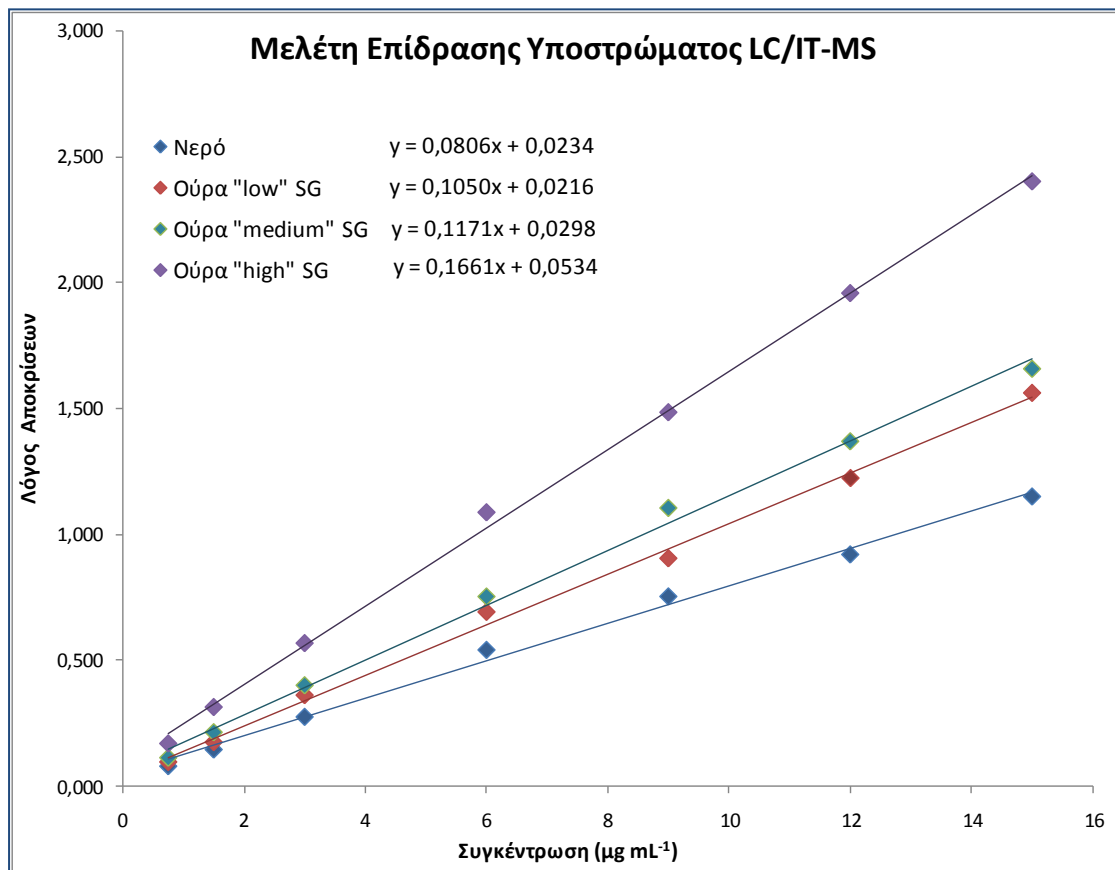
Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η διακύμανση του μεγέθους της ιοντικής καταστολής που παρατηρείται μεταξύ διαφορετικών δειγμάτων και προκαλείται πιθανότατα από ουσίες του υποστρώματος που συνεκλούνται με την προς ποσοτικοποίηση ουσία και το εσωτερικό πρότυπο μπορεί να αντιμετωπιστεί με τη χρησιμοποίηση ενός ισοτοπικού αναλόγου του αναλύτη ως εσωτερικού προτύπου, δεδομένου ότι αυτό παρουσιάζει παραπλήσιες φυσικοχημικές ιδιότητες, εκλούεται στον ίδιο χρόνο ανάσχεσης και παρουσιάζει αντίστοιχης έκτασης διακυμάνσεις στην απόκριση και τον ιοντισμό με τον αναλύτη. Εν τούτοις, ισοτοπικά επισημασμένα ανάλογα της θεοβρωμίνης δεν είναι εμπορικά διαθέσιμα και για αυτό το λόγο, εξετάστηκε η δυνατότητα εφαρμογής της προσθήκης γνωστών ποσοτήτων ως τεχνικής ποσοτικοποίησης για τον προσδιορισμό της θεοβρωμίνης σε ούρα αλόγων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Θεοβρωμίνη

ΠΙΝΑΚΑΣ 7.5 Αποτελέσματα στατιστικής επεξεργασίας των καμπυλών αναφοράς της θεοβρωμίνης σε υδατικά δείγματα και σε δείγματα ούρων χαμηλού ('low'), μεσαίου ('medium') και υψηλού ('high') ειδικού βάρους (specific gravity, SG)

ΜΕΘΟΔΟΣ	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ	ΕΞΙΣΩΣΗ ΠΑΛΙΝΔΡΟΜΗΣΗΣ	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ		R	r ²	ΤΥΠΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ
			ΤΟΜΗΣ (s _α)	ΚΛΙΣΗΣ (s _β)			
LC/IT-MS	Νερό	$y = 0,0806 x + 0,0234$	0,0044	0,0026	0,997	0,995	0,0051
	Ούρα 'low' SG	$y = 0,1050 x + 0,0216$	0,0060	0,0035	0,998	0,996	0,0068
	Ούρα 'medium' SG	$y = 0,1171 x + 0,0298$	0,0057	0,0033	0,998	0,995	0,0065
	Ούρα 'high' SG	$y = 0,1661 x + 0,0534$	0,0094	0,0054	0,997	0,995	0,011
LC/TOF-MS	Νερό	$y = 0,1015 x + 0,057$	0,020	0,0024	0,998	0,997	0,032
	Ούρα 'low' SG	$y = 0,1083 x + 0,048$	0,013	0,0015	0,9995	0,998	0,020
	Ούρα 'medium' SG	$y = 0,1760 x + 0,024$	0,019	0,0022	0,9996	0,9992	0,030
	Ούρα 'high' SG	$y = 0,2058 x + 0,062$	0,029	0,0034	0,9993	0,998	0,045

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Θεοβρωμίνη



Σχήμα 7.12: Καμπύλες αναφοράς της θεοβρωμίνης σε νερό και διαφορετικά δείγματα ούρων

7.9. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΘΕΟΒΡΩΜΙΝΗΣ ΣΕ ΟΥΡΑ ΑΛΟΓΩΝ

7.9.1. Καμπύλες προσθήκης γνωστών ποσοτήτων - Παρασκευή δειγμάτων (standard addition calibration samples)

Για την αξιολόγηση της αξιοπιστίας της μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού της θεοβρωμίνης σε ούρα αλόγων με την εφαρμογή της προσθήκης γνωστών ποσοτήτων παρασκευάστηκαν δείγματα – μοντέλα που περιείχαν τον αναλύτη σε τρία επίπεδα συγκέντρωσης ($1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, $3,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ και $4,5 \mu\text{g mL}^{-1}$), με προσθήκη κατάλληλου όγκου ($120 \mu\text{L}$, $240 \mu\text{L}$ και $360 \mu\text{L}$, αντίστοιχα) διαλύματος εργασίας της θεοβρωμίνης συγκέντρωσης $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ σε ογκομετρικές φιάλες 10 mL και αράιωση με λευκό δείγμα ούρων αλόγου μέχρι χαραγής. Κάθε εργαστηριακή ημέρα χρησιμοποιήθηκαν ούρα αλόγων διαφορετικών παρτίδων, τα οποία παρουσίασαν πολύ χαμηλή συγκέντρωση θεοβρωμίνης κατά τη διαδικασία σάρωσης απαγορευμένων ουσιών σε άλογα με GC/MS, που εφαρμόζεται στο Εργαστήριο. Συνολικά, για κάθε δείγμα μοντέλο κατασκευάστηκαν πέντε καμπύλες προσθήκης τεσσάρων σημείων σε πέντε εργαστηριακές ημέρες. Τα δείγματα βαθμονόμησης των καμπυλών προσθήκης παρασκευάστηκαν εις διπλούν με προσθήκη $0, 25, 50$ και $75 \mu\text{L}$ διαλύματος εργασίας της θεοβρωμίνης συγκέντρωσης $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ (συγκεντρώσεις προσθήκης (C_{added}) $0, 1,5, 3,0$ και $4,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, αντίστοιχα) σε υάλινους κωνικούς σωλήνες, εξάτμιση του διαλύματος υπό ρεύμα αζώτου και ανασύσταση με $500 \mu\text{L}$ από το δείγμα-μοντέλο. Ακολούθως κατεργάστηκαν με την πορεία που έχει ήδη περιγραφεί και ενέθηκαν εις διπλούν σε καθένα από τα δύο συστήματα LC/MS. Οι καμπύλες προσθήκης γνωστών ποσοτήτων στα δείγματα-μοντέλα χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση της ορθότητας και της πιστότητας της μεθόδου. Τα αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας των καμπυλών προσθήκης για τις πέντε εργαστηριακές ημέρες συνοψίζονται στο [Παράρτημα 14](#).

7.9.2. Ορθότητα (Accuracy)

Ο έλεγχος ορθότητας των μεθόδων πραγματοποιήθηκε σε πέντε εργαστηριακές ημέρες, χρησιμοποιώντας τις πειραματικά υπολογιζόμενες από τις καμπύλες προσθήκης συγκεντρώσεις της θεοβρωμίνης στα δείγματα-μοντέλα. Μελετήθηκε η ορθότητα σε τρία επίπεδα συγκέντρωσης $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, $3,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ και $4,5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Ως μέτρο της ορθότητας χρησιμοποιείται το επί τοις εκατό σχετικό σφάλμα (% Relative Error, % E_r) που υπολογίστηκε ως εξής:

$$\% E_r = 100 \times \frac{C_{\text{υπολογιζόμενη}} - C_{\text{θεωρητική}}}{C_{\text{θεωρητική}}} \quad [7.1]$$

όπου, $C_{\text{υπολογιζόμενη}}$ είναι η πειραματικά υπολογιζόμενη από την καμπύλη προσθήκης συγκέντρωση της θεοβρωμίνης στο δείγμα μοντέλο (τομή (α) προς κλίση (b) της ευθείας παλινδρόμησης της καμπύλης προσθήκης) και $C_{\text{θεωρητική}}$, η θεωρητική συγκέντρωση της θεοβρωμίνης στο δείγμα μοντέλο ($1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, $3,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ και $4,5 \mu\text{g mL}^{-1}$). Τα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Θεοβρωμίνη

αποτελέσματα ορθότητας της μεθόδου LC/IT-MS και LC/TOF-MS για τις πέντε εργαστηριακές ημέρες συνοψίζονται στους Πίνακες 7.6 και 7.7, αντίστοιχα. Το σχετικό αναλυτικό σφάλμα δεν ξεπέρασε το 8,7 % και για τις δύο μεθόδους.

7.9.3. Εντός της ημέρας πιστότητα (intra-day precision)

Για την εκτίμηση της εντός της ημέρας πιστότητας υπολογίστηκε η τυπική απόκλιση (SD_0) που προκύπτει από τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των δειγμάτων-μοντέλων. Η τυπική απόκλιση SD_0 υπολογίζεται από τις εξισώσεις:

$$SD(C_0) = \frac{S_{y/x}}{a} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{Y}^2}{a^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2}}, \quad [7.2] \quad \text{όπου} \quad S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y})^2}{n-2}} \quad [7.3]$$

όπου \hat{y} είναι η τιμή του y (λόγος επιφανειών) που προκύπτει από την εξίσωση της καμπύλης προσθήκης (fitted y -values)

a , η κλίση της ευθείας παλινδρόμησης

n , ο αριθμός των σημείων της καμπύλης προσθήκης

\bar{x} , η μέση τιμή των τιμών x_i (συγκέντρωση προσθήκης σε $\mu\text{g mL}^{-1}$)

\bar{Y} , η μέση τιμή των τιμών y_i (λόγος επιφανειών κορυφών θεοβρωμίνης /εσωτερικό πρότυπο)

Ως μέτρο της εντός της ημέρας επαναληψιμότητας χρησιμοποιείται η επί τοις εκατό σχετική τυπική απόκλιση ($\%RSD_{\text{intra-day}}$) που υπολογίστηκε για κάθε εργαστηριακή ημέρα σε τρία επίπεδα συγκέντρωσης ($1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, $3,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ και $4,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) από τη σχέση:

$$\%RSD_{\text{intra-day}} = 100 \times \frac{SD(C_0)}{C_{\text{υπολογιζόμενη}}} \quad [7.4]$$

όπου $C_{\text{υπολογιζόμενη}}$ η πειραματικά υπολογιζόμενη από την καμπύλη προσθήκης συγκέντρωση της θεοβρωμίνης στο δείγμα-μοντέλο (τομή προς κλίση της ευθείας παλινδρόμησης της καμπύλης προσθήκης).

Τα αποτελέσματα της εντός ημέρας πιστότητας παρατίθενται συνοπτικά στους πίνακες 7.6 και 7.7 για τις μεθόδους LC/IT-MS και LC/TOF-MS, αντίστοιχα. Η εντός της ημέρας σχετική τυπική απόκλιση βρέθηκε μικρότερη από 8,6 % για τη μέθοδο LC/IT-MS και μικρότερη από 5,7 % για τη μέθοδο LC/TOF-MS.

7.9.4. Μεταξύ των ημερών πιστότητα (inter-day precision)

Ως μέτρο της πιστότητας μεταξύ των ημερών υπολογίστηκε η επί τοις εκατό σχετική τυπική απόκλιση ($\%RSD_{\text{inter-day}}$) των πειραματικά υπολογιζόμενων συγκεντρώσεων της θεοβρωμίνης στα δείγματα-μοντέλα για τις πέντε εργαστηριακές ημέρες σε καθένα από τα τρία επίπεδα συγκέντρωσης που εξετάστηκαν. Η παράμετρος $RSD_{\text{inter-day}}$ δεν ξεπέρασε την τιμή 7,2% και 5,8% για τις μεθόδους LC/IT-MS και LC/TOF-MS, αντίστοιχα, όπως φαίνεται και στους Πίνακες 7.6 και 7.7.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Θεοβρωμίνη

Πίνακας 7.6: Αποτελέσματα αξιολόγησης της ορθότητας και πιστότητας της μεθόδου LC/IT-MS για την ποσοτικοποίηση της θεοβρωμίνης σε ούρα αλόγων

Θεωρητική Συγκέντρωση Δειγμάτων – Μοντέλα												
Αναλυτική Δοκιμασία	1,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$				3,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$				4,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$			
	$C_{\text{πειραματική}}$ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	% E_r	SD (C_0) $\mu\text{g mL}^{-1}$	% $RSD_{\text{intra-day}}$	$C_{\text{πειραματική}}$ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	% E_r	SD (C_0) $\mu\text{g mL}^{-1}$	% $RSD_{\text{intra-day}}$	$C_{\text{πειραματική}}$ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	% E_r	SD (C_0) $\mu\text{g mL}^{-1}$	% $RSD_{\text{intra-day}}$
Ημέρα 1	1,49	0,4	0,12	7,7	3,07	2,3	0,17	5,6	4,41	-2,0	0,33	7,5
Ημέρα 2	1,528	1,9	0,048	3,1	2,80	-6,8	0,22	8,0	4,24	-5,7	0,25	6,0
Ημέρα 3	1,535	2,3	0,011	0,7	2,92	-2,8	0,13	4,5	4,78	6,1	0,25	5,2
Ημέρα 4	1,369	-8,7	0,12	8,6	2,78	-7,3	0,21	7,6	4,52	0,4	0,26	5,7
Ημέρα 5	1,51	0,4	0,13	8,5	2,88	-4,0	0,20	7,0	4,71	4,8	0,24	5,0
% $RSD_{\text{inter-day}}$	4,6				4,0				7,2			

Πίνακας 7.7: Αποτελέσματα αξιολόγησης της ορθότητας και πιστότητας της μεθόδου LC/TOF-MS για την ποσοτικοποίηση της θεοβρωμίνης σε ούρα αλόγων

Θεωρητική Συγκέντρωση Δειγμάτων – Μοντέλα												
Αναλυτική Δοκιμασία	1,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$				3,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$				4,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$			
	$C_{\text{πειραματική}}$ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	% E_r	SD (C_0) $\mu\text{g mL}^{-1}$	% $RSD_{\text{intra-day}}$	$C_{\text{πειραματική}}$ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	% E_r	SD (C_0) $\mu\text{g mL}^{-1}$	% $RSD_{\text{intra-day}}$	$C_{\text{πειραματική}}$ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	% E_r	SD (C_0) $\mu\text{g mL}^{-1}$	% $RSD_{\text{intra-day}}$
Ημέρα 1	1,507	0,5	0,057	3,8	2,99	-0,3	0,10	3,3	4,52	0,5	0,26	5,7
Ημέρα 2	1,486	-0,9	0,082	5,5	3,232	7,7	0,059	1,8	4,86	8,0	0,16	3,3
Ημέρα 3	1,402	-6,5	0,072	5,1	2,772	-7,6	0,099	3,6	4,50	0,04	0,22	4,9
Ημέρα 4	1,591	6,1	0,073	4,6	3,103	3,4	0,065	2,1	4,62	2,7	0,21	4,5
Ημέρα 5	1,596	6,4	0,027	1,7	2,998	-0,4	0,043	1,4	4,665	3,7	0,092	2,0
% $RSD_{\text{inter-day}}$	5,6				5,8				3,5			

$C_{\text{πειραματική}}$: πειραματικά υπολογιζόμενη συγκέντρωση της θεοβρωμίνης, % E_r : % σχετικό αναλυτικό σφάλμα, SD (C_0): τυπική απόκλιση της υπολογιζόμενης από την καμπύλη προσθήκης συγκέντρωσης, % $RSD_{\text{intra-day}}$: εντός της ημέρας % σχετική τυπική απόκλιση, % $RSD_{\text{inter-day}}$: δια των ημερών % σχετική τυπική απόκλιση

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Θεοβρωμίνη

7.9.5. Χρωματογραφικά Χαρακτηριστικά

Λόγος σήματος προς θόρυβο (Signal to noise ratio, S/N)

Από την οπτική παρατήρηση των χρωματογραφήματων διαπιστώθηκε ότι στο χαμηλότερης συγκέντρωσης πρότυπο των καμπυλών αναφοράς ($0,75 \mu\text{g mL}^{-1}$) ισχύει $S/N > 10$ (ύψος χρωματογραφικής κορυφής της θεοβρωμίνης σε αυθαίρετες μονάδες προς το ύψος της γραμμής βάσης πριν την αρχή της κορυφής σε αυθαίρετες μονάδες). Στο [Παράρτημα 15](#) παρατίθενται τα χρωματογραφήματα που ελήφθησαν από την ανάλυση ενός δείγματος ούρων αλόγου εμβολιασμένο με θεοβρωμίνη σε συγκέντρωση $0,75 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Σχετικός χρόνος ανάσχεσης (Relative retention time, RRT)

Αντιστοιχεί στο λόγο του χρόνου ανάσχεσης της θεοβρωμίνης προς το χρόνο ανάσχεσης του εσωτερικού προτύπου (3-προπυλοξανθίνη). Διαπιστώθηκε ότι σχετικοί χρόνοι ανάσχεσης διατηρούνται σταθεροί μεταξύ των ημερών και στα δύο χρησιμοποιούμενα συστήματα LC/MS (% RSD < 0,4).

7.9.6. Ειδικότητα (Specificity)

Η ειδικότητα της μεθόδου αποδεικνύεται από τα διαφορετικά διαγνωστικά ιόντα και τη διαφορά των σχετικών χρόνων ανάσχεσης των απαγορευμένων ή μη ουσιών, παρόμοιας δομής σε σχέση με τη θεοβρωμίνη. Για τη μελέτη της ειδικότητας παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν ένα λευκό δείγμα ούρων αλόγου, ένα δείγμα ούρων εμβολιασμένο με θεοβρωμίνη σε συγκέντρωση $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ (συγκέντρωση ορίου) και τρία δείγματα ούρων (spec1, spec2 και spec3) εμβολιασμένα με ουσίες παραπλήσιας δομής και συγκεκριμένα με τις ουσίες καφεΐνη, θεοφυλλίνη (spec1), αμινοφυλλίνη, διπροφυλλίνη (spec2), φεναιθυλίνη και πεντοξυφυλλίνη (spec3). Διαπιστώθηκε απουσία παρεμποδιστικών κορυφών στους χρόνους έκλουσης του αναλύτη και του εσωτερικού προτύπου από τις ουσίες που μελετήθηκαν και για τις δύο προτεινόμενες LC/MS μεθόδους.

7.9.7. Έλεγχος επιμόλυνσης εκ μεταφοράς δείγματος (Carry over)

Ο έλεγχος επιμόλυνσης πραγματοποιήθηκε με διαδοχικές αναλύσεις ενός τυφλού δείγματος ούρων και ενός προτύπου δείγματος που περιείχε τη θεοβρωμίνη σε συγκέντρωση $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ (αλληλουχία ανάλυσης: λευκό δείγμα – πρότυπο δείγμα – λευκό δείγμα – πρότυπο δείγμα – λευκό δείγμα). Δεν παρατηρήθηκε επιμόλυνση εκ μεταφοράς δείγματος, καθώς διαπιστώθηκε απουσία σήματος στα λευκά δείγματα που αναλύθηκαν μετά από τα υψηλής συγκέντρωσης πρότυπα.

7.10. ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΘΕΟΒΡΩΜΙΝΗΣ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΟΥΡΩΝ ΑΛΟΓΩΝ (CONFIRMATION, IDENTIFICATION)

Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη παράγραφο, με την προτεινόμενη μέθοδο η επιβεβαίωση της θεοβρωμίνης πραγματοποιείται με την ίδια μέθοδο ανάλυσης, τόσο στο σύστημα LC/IT-MS, όπου πραγματοποιείται θραυσματοποίηση του πρωτονιωμένου μοριακού ιόντος εντός της παγίδας και σάρωση των θυγατρικών ιόντων, όσο και στο σύστημα LC/TOF-MS, όπου πραγματοποιείται σάρωση των ιόντων της θεοβρωμίνης, το πρωτονιωμένο μοριακό ιόν της οποίας κάτω από τις συνθήκες που επιλέχθηκαν διασπάται εν μέρει εντός της πηγής ιοντισμού, δίνοντας με τον τρόπο αυτό τα απαιτούμενα για τους σκοπούς της επιβεβαίωσης τρία διαγνωστικά ιόντα. Ελέγχθηκε η επαναληψιμότητα της σχετικής αναλογίας των διαγνωστικών ιόντων ως προς το κύρια σχηματιζόμενο θυγατρικό ιόν, που αποτελεί κριτήριο για την επιβεβαίωση ύπαρξης της θεοβρωμίνης στο ύποπτο δείγμα. Για το σκοπό αυτό υπολογίστηκε η σχετική αναλογία των σχηματισθέντων διαγνωστικών ιόντων σε σαράντα δείγματα από τα εμβολιασμένα δείγματα ούρων, τα οποία παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν κατά την αξιολόγηση της μεθόδου, σε συγκεντρώσεις που κάλυπταν όλη τη γραμμική περιοχή που μελετήθηκε ($0,75 - 15 \mu\text{g mL}^{-1}$). Οι υπολογισθείσες σχετικές αναλογίες των διαγνωστικών ιόντων της θεοβρωμίνης παρουσιάζονται στα Παραρτήματα [16](#) και [17](#). Όπως προκύπτει από τα δεδομένα του Παραρτήματος για τη μέθοδο LC/IT-MS η μέση τιμή (\pm τυπική απόκλιση) για τις σχετικές εντάσεις των ιόντων με τιμές m/z 181, 135, και 110 (ως προς την ένταση του κύρια σχηματιζόμενου ιόντος με τιμή m/z 138) ήταν $13,1 (\pm 1,3)$, $10,9 (\pm 1,0)$ και $9,9 (\pm 0,7)$, αντίστοιχα ($N=40$). Για τη μέθοδο LC/TOF-MS η μέση τιμή (\pm τυπική απόκλιση) για τις σχετικές εντάσεις των ιόντων με τιμές m/z 138,0662 και 163,0614 (ως προς την ένταση του ιόντος με τιμή m/z 181,0720) ήταν $80,6 (\pm 7,3)$ και $12,8 (\pm 1,4)$, αντίστοιχα ($N=40$). Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι οι αναλογίες των διαγνωστικών ιόντων της θεοβρωμίνης παρουσιάζουν ικανοποιητική επαναληψιμότητα, τόσο μεταξύ των ημερών όσο και μεταξύ των διαφορετικών επιπέδων συγκέντρωσης του αναλύτη.

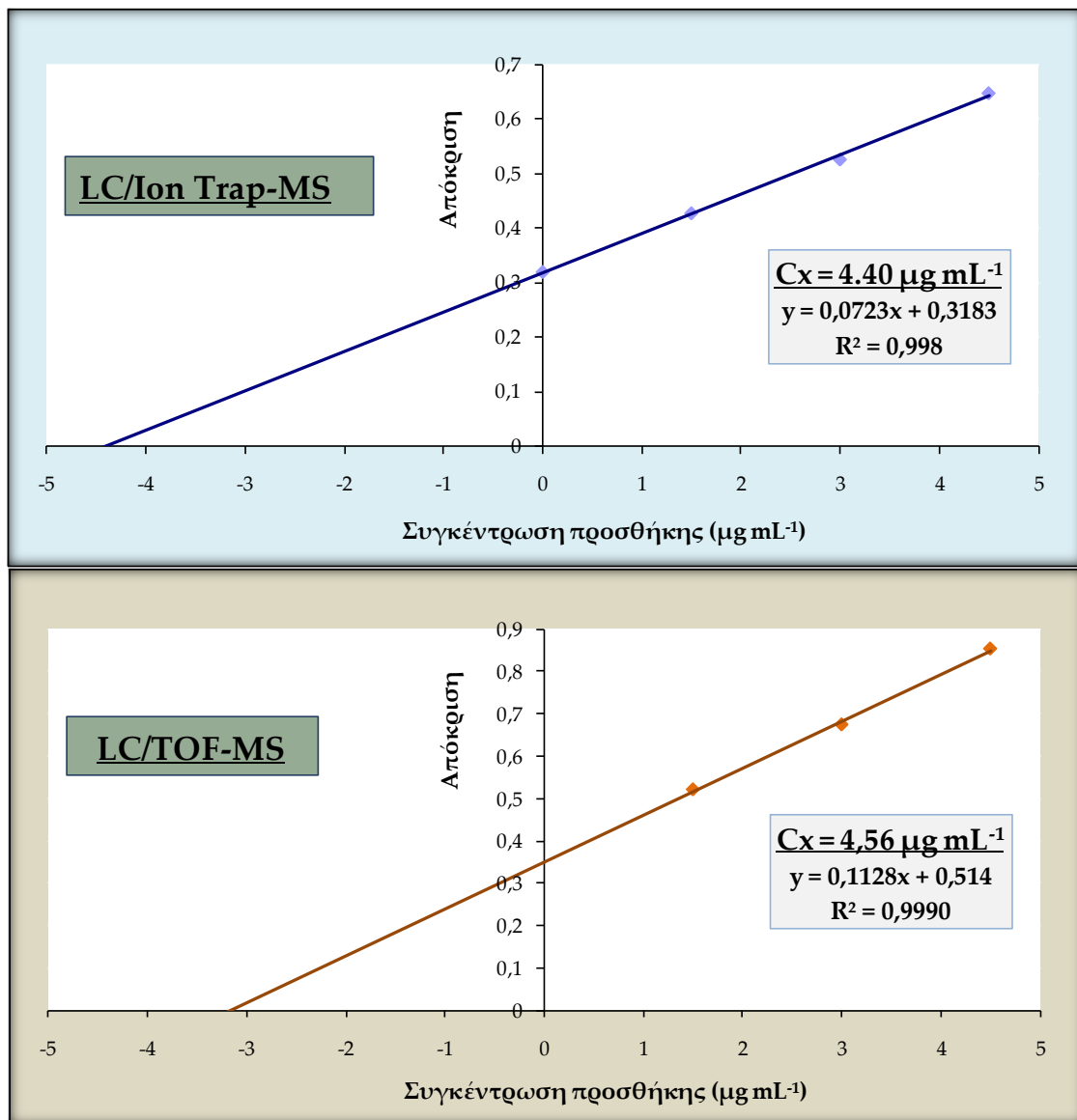
Παράλληλα, για τη μέθοδο LC/TOF-MS μελετήθηκε η ικανότητα μέτρησης ακριβούς μάζας (mass accuracy). Υπολογίστηκε το σφάλμα μάζας (τιμών m/z) των διαγνωστικών ιόντων τόσο της θεοβρωμίνης όσο και του εσωτερικού προτύπου στα προαναφερθέντα δείγματα και βρέθηκε χαμηλότερο από 3 ppm, με εξαίρεση το χαμηλής έντασης ιόν της θεοβρωμίνης με τιμή m/z 163,0614, για το οποίο σε χαμηλά επίπεδα συγκέντρωσης ($<2 \mu\text{g mL}^{-1}$) το σφάλμα μάζας κυμαίνεται σε τιμές από 3 -10 ppm.

7.11. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΕ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Η προτεινόμενη μεθοδολογία ποσοτικού προσδιορισμού και επιβεβαίωσης της θεοβρωμίνης σε ούρα αλόγων εφαρμόστηκε σε δύο πραγματικά δείγματα ούρων αλόγων, τα οποία κατά τον έλεγχο σάρωσης που περιλαμβάνει ταυτόχρονα και ημιποσοτικοποίηση της θεοβρωμίνης με τη μέθοδο ρουτίνας GC/MS του Εργαστηρίου, παρουσίασαν συγκέντρωση θεοβρωμίνης υψηλότερες του ορίου των $2 \mu\text{g mL}^{-1}$. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της θεοβρωμίνης στα ύποπτα δείγματα εφαρμόστηκε η τεχνική προσθήκης γνωστών ποσοτήτων και τα δείγματα κάθε καμπύλης προσθήκης παρασκευάστηκαν εις

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Θεοβρωμίνη

διπλούν με προσθήκη 0, 25, 50 και 75 μL διαλύματος εργασίας της θεοβρωμίνης συγκέντρωσης $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ (συγκεντρώσεις προσθήκης 0, 1,5, 3,0 και 4,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, αντίστοιχα) σε κωνικούς σωλήνες, εξάτμιση και ανασύσταση με 500 μL από το εκάστοτε προς ανάλυση ύποπτο δείγμα. Τα δείγματα κατεργάστηκαν με το προτεινόμενο πρωτόκολλο (προσθήκη εσωτερικού προτύπου, αραιώση, φυγοκέντρηση και φιλτράρισμα) και αναλύθηκαν στα δύο συστήματα LC/MS. Οι καμπύλες προσθήκης που προέκυψαν για ένα από τα δείγματα φαίνονται στο Σχήμα 7.13. Η συγκέντρωση της θεοβρωμίνης στα δύο ύποπτα δείγματα βρέθηκε $4,76 (\pm 0,41) \mu\text{g mL}^{-1}$ και $4,40 (\pm 0,20) \mu\text{g mL}^{-1}$ με τη μέθοδο LC/IT-MS και αντίστοιχα $4,73 (\pm 0,13) \mu\text{g mL}^{-1}$ και $4,56 (\pm 0,16) \mu\text{g mL}^{-1}$ με τη μέθοδο LC/TOF-MS.



Σχήμα 7.13: Καμπύλες προσθήκης που ελήφθησαν με τις προτεινόμενες μεθόδους LC/Ion Trap-MS και LC/TOF-MS για την ποσοτικοποίηση της θεοβρωμίνης σε ύποπτο δείγμα αλόγου

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Θεοβρωμίνη

Για την επιβεβαίωση της θεοβρωμίνης στα ύποπτα δείγματα αναλύθηκαν τα παρακάτω δείγματα με την ακόλουθη αλληλουχία: λευκό δείγμα ούρων – ύποπτο δείγμα (μηδενικό πρότυπο της καμπύλης προσθήκης) – λευκό δείγμα ούρων – εμβολιασμένο δείγμα ούρων συγκέντρωσης $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (δείγμα αναφοράς, positive control). Στον Πίνακα 7.8 συνοψίζονται τα αποτελέσματα της επιβεβαιωτικής ανάλυσης και για τα δύο αναλυτικά συστήματα, καθώς και τα διαγνωστικά κριτήρια που πρέπει να ικανοποιούνται.¹⁸²

Πίνακας 7.8: Αποτελέσματα επιβεβαίωσης της θεοβρωμίνης στα ύποπτα δείγματα

Μέθοδος LC/IT-MS							
Ιόν (<i>m/z</i>)	Σχετική Αναλογία Ιόντων			Όρια Αποδοχής			
	Ύποπτο Δείγμα 1	Ύποπτο Δείγμα 2	Δείγμα Αναφοράς	Κριτήριο 15% (απόλυτο)		Κριτήριο 35% (σχετικό)	
				min	max	min	max
138	100,0 %	100,0 %	100,0	85,0 %	115,0 %	65,0 %	135,0 %
181	11,7 %	12,1 %	10,6	0,0 %	25,6 %	6,9 %	14,3 %
135	11,7 %	9,1 %	9,9	0,0 %	24,9 %	6,5 %	13,4 %
110	10,2 %	9,1 %	8,2	0,0 %	23,2 %	5,3 %	11,1 %
Μέθοδος LC/TOF-MS							
Ιόν (<i>m/z</i>)	Σχετική Αναλογία Ιόντων			Όρια Αποδοχής			
	Ύποπτο Δείγμα 1	Ύποπτο Δείγμα 2	Δείγμα Αναφοράς	Κριτήριο 15% (απόλυτο)		Κριτήριο 35% (σχετικό)	
				min	max	min	max
181,0720	100,0%	100,0%	100,0%	85,0%	115,0%	65,0%	135,0%
138,0662	92,1%	89,5%	90,3%	75,3%	105,3%	58,7%	121,9%
163,0614	12,1%	11,9%	13,1%	0,0%	28,1%	8,5%	17,7%

7.12. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ LC/IT-MS ΚΑΙ LC/TOF-MS

Οι δύο αναλυτικές LC/MS μέθοδοι που αναπτύχθηκαν για τον ποσοτικό προσδιορισμό της θεοβρωμίνης σε ούρα αλόγων συγκρίθηκαν μεταξύ τους λαμβάνοντας υπόψη τις πειραματικά υπολογιζόμενες συγκεντρώσεις των δειγμάτων-μοντέλων που αναλύθηκαν στα δύο αναλυτικά συστήματα LC/IT-MS και LC/TOF-MS με την τεχνική της προσθήκης γνωστών ποσοτήτων κατά την αξιολόγηση των μεθόδων. Η σύγκριση πραγματοποιήθηκε εφαρμόζοντας τη δοκιμασία Student κατά ζεύγη (paired t-test) για 14 βαθμούς ελευθερίας και στάθμη εμπιστοσύνης 95%. Διαπιστώθηκε ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά ανάμεσα στα αποτελέσματα ποσοτικοποίησης της κορτιζόλης που ελήφθησαν από τα δύο αναλυτικά συστήματα LC/IT-MS και LC/TOF-MS ($t_{\text{πειραματικό}} (=1,42) < t_{\text{θεωρητικό}} (=2,14)$).

7.13. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη, αναπτύχθηκαν και αξιολογήθηκαν δύο μέθοδοι για τον ποσοτικό προσδιορισμό και την επιβεβαίωση της θεοβρωμίνης σε ούρα αλόγων με τη χρησιμοποίηση δύο διαφορετικών συστημάτων LC/MS (LC/IT-MS και LC/TOF-MS). Κύριο πλεονέκτημα της προτεινόμενης μεθοδολογίας έναντι αυτών που έχουν ήδη αναπτυχθεί και αναφερθεί στη βιβλιογραφία αποτελεί η απλοποιημένη και ταχεία πορεία κατεργασίας των δειγμάτων, που βασίζεται στην απευθείας έγχυση του φιλτραρισμένου και αραιωμένου δείγματος ούρων στο αναλυτικό σύστημα. Η ποσοτικοποίηση και η επιβεβαίωση της θεοβρωμίνης στα ύποτα δείγματα επιτυγχάνονται ταυτόχρονα με την ίδια αναλυτική μέθοδο. Τα λαμβανόμενα φάσματα μαζών για τη θεοβρωμίνη πληρούν τα κριτήρια που έχει θέσει ο AORC για την επιβεβαίωση απαγορευμένων ουσιών σε δείγματα αλόγων και στα τα δύο αναλυτικά συστήματα. Λαμβάνοντας υπόψη την πολυπλοκότητα του υποστρώματος των ούρων και τη μη εφαρμογή εκχυλιστικής διαδικασίας για τον καθαρισμό των δειγμάτων, πραγματοποιήθηκε εκτενής μελέτη της επίδρασης του μητρικού υλικού με εμβολιασμό και ανάλυση διαφορετικών δειγμάτων ούρων αλόγων (αρσενικά, θηλυκα και εκτομίες), όπου διαπιστώθηκε ιοντική καταστολή το μέγεθος της οποίας ποικίλει από δείγμα σε δείγμα. Για το λόγο αυτό και δεδομένου ότι ισοτοπικά επισημασμένο ανάλογο του αναλύτη δεν ήταν εμπορικά διαθέσιμο για να χρησιμοποιηθεί ως εσωτερικό πρότυπο, εφαρμόστηκε η τεχνική της προσθήκης γνωστών ποσοτήτων για την εξαγωγή αξιόπιστων αποτελεσμάτων ποσοτικοποίησης. Οι μέθοδοι αξιολογήθηκαν ως προς τα κύρια χαρακτηριστικά ποιότητας (γραμμικότητα, ορθότητα, πιστότητα, χρωματογραφικά χαρακτηριστικά, ειδικότητα, επιμόλυνση εκ μεταφοράς δείγματος) δίνοντας ικανοποιητικά αποτελέσματα, που τις καθιστούν κατάλληλες για το σκοπό που αναπτύχθηκαν και επιτρέπουν την εφαρμογή τους στον έλεγχο ντόπινγκ που διενεργείται από τα διαπιστευμένα εργαστήρια για την ποσοτικοποίηση και την επιβεβαίωση της θεοβρωμίνης σε ούρα αλόγων. Τέλος, πραγματοποιήθηκε εφαρμογή της προτεινόμενης μεθοδολογίας στην ανάλυση δύο πραγματικών δειγμάτων και σύγκριση των αποτελεσμάτων που ελήφθησαν από τα δύο αναλυτικά συστήματα και δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά. Στο σημείο αυτό, αξίζει να σημειωθεί ότι οι μέθοδοι διαπιστεύθηκαν από το Εθνικό Σύστημα Διαπίστευσης (ΕΣΥΔ) και έχουν ενταχθεί στο πεδίο διαπίστευσης των διαδικασιών που εφαρμόζονται στο Εργαστήριο ελέγχου ντόπινγκ του ΟΑΚΑ.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ (ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ) ΤΟΥ ΣΑΛΙΚΥΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΕ ΟΥΡΑ ΑΛΟΓΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ LC/QTOF-MS

8.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ – ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Τα παράγωγα του σαλικυλικού οξέος (2-υδροξυβενζοϊκό οξύ) (salicylates) με κύριο εκπρόσωπο το ακετυλοσαλικυλικό οξύ (ασπιρίνη), ανήκουν στην κατηγορία των μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών ουσιών (non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs). Οι ουσίες αυτές εμφανίζουν αντιπυρετική, αναλγητική και αντιφλεγμονώδη δράση, μέσω της αναστολής του ενζύμου κυκλοξυγενάση τύπου-1 (cyclooxygenase, COX-1), που έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή του σχηματισμού των προσταγλανδινών και των θρομβοξανών από το αραχιδονικό οξύ, ενώ ταυτόχρονα μπορούν να προκαλέσουν και αναστολή του ενζύμου κυκλοξυγενάση τύπου-2 (COX-2), η οποία σχετίζεται με την εμφάνιση ανεπιθύμητων ενεργειών (κυρίως από το γαστερεντερικό σύστημα) κατά τη λήψη των παραπάνω δραστικών ουσιών. Η χορήγηση αντιφλεγμονωδών ουσιών στα άλογα αγώνων για την ανακούφιση από τον πόνο και την κάλυψη φλεγμονωδών καταστάσεων είναι συχνή πρακτική και αποτελεί παράβαση των κανονισμών περί ντόπινγκ. Παράγωγα του σαλικυλικού οξέος (κυρίως το σαλικυλικό μεθύλιο, methyl salicylate) συναντώνται ευρύτατα σε ορισμένα φυτά όπως *Salix alba* οικ. *Salicaceae*, *Gaultheria procumbens* οικ. *Ericaceae* and *Populus balsamifera* οικ. *Salicaceae*, ενώ το ίδιο το σαλικυλικό οξύ αποτελεί για τα φυτά ορμόνη και παίζει ρόλο στην ανάπτυξη του φυτού, τη φωτοσύνθεση, τη διαπνοή, την πρόσληψη και τη μεταφορά ιόντων και κυρίως συμμετέχει ως μεσολαβητής στην ενεργοποίηση μηχανισμών άμυνας έναντι παθογόνων ερεθισμάτων. Έτσι, η παρουσία των παραγώγων του σαλικυλικού οξέος στα άλογα μπορεί να έχει ως πηγή προέλευσης φυτικά είδη που αποτελούν μέρος της τροφής τους ή/και ταυτόχρονα μπορεί να προέρχονται από εξωγενή χορήγησή τους για κτηνιατρική χρήση και σε αυτές τις περιπτώσεις έχουν αναφερθεί ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις σαλικυλικού οξέος στο αίμα και στα ούρα των αλόγων αυτών.²²³⁻²²⁵ Όπως έχει ήδη αναφερθεί σε προηγούμενο κεφάλαιο, σύμφωνα με το Άρθρο 6 της διεθνούς συμφωνίας που έχει εκδόσει η Παγκόσμια Ομοσπονδία των Αρχών Ιπποδρομιών (IFHA), ουσίες που μπορούν να προέρχονται από φυτά που χρησιμοποιούνται παραδοσιακά για τη βοσκή ή τη συγκομιδή για την παραγωγή ζωοτροφών των αλόγων, όπως είναι το σαλικυλικό οξύ, συμπεριλαμβάνονται στην κατηγορία απαγορευμένων ουσιών ορίου. Μετά από σειρές μελετών που διεξήχθησαν σε πληθυσμούς ειδών αλόγων για τον προσδιορισμό των «φυσιολογικών» συγκεντρώσεων του σαλικυλικού οξέος που ανιχνεύονται ως αποτέλεσμα πρόσληψης μέσω της τροφής τους, ο AORC έχει θεσπίσει ως ανώτατο επιτρεπόμενο όριο συγκέντρωσης σαλικυλικού οξέος στα ούρα και στο πλάσμα των αλόγων τα $750 \mu\text{g mL}^{-1}$ και $6,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, αντίστοιχα.^{36,226} Τα δείγματα αλόγων που υπερβαίνουν τα παραπάνω όρια χαρακτηρίζονται ως θετικά στους ελέγχους ντόπινγκ που διενεργούν τα αρμόδια εργαστήρια, καθώς υψηλότερες από το όριο αυτό συγκεντρώσεις μπορούν να αποδοθούν μόνο σε εξωγενή χορήγηση ακετυλοσαλικυλικού οξέος ή άλλων παραγώγων του σαλικυλικού οξέος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Σαλικυλικό Οξύ

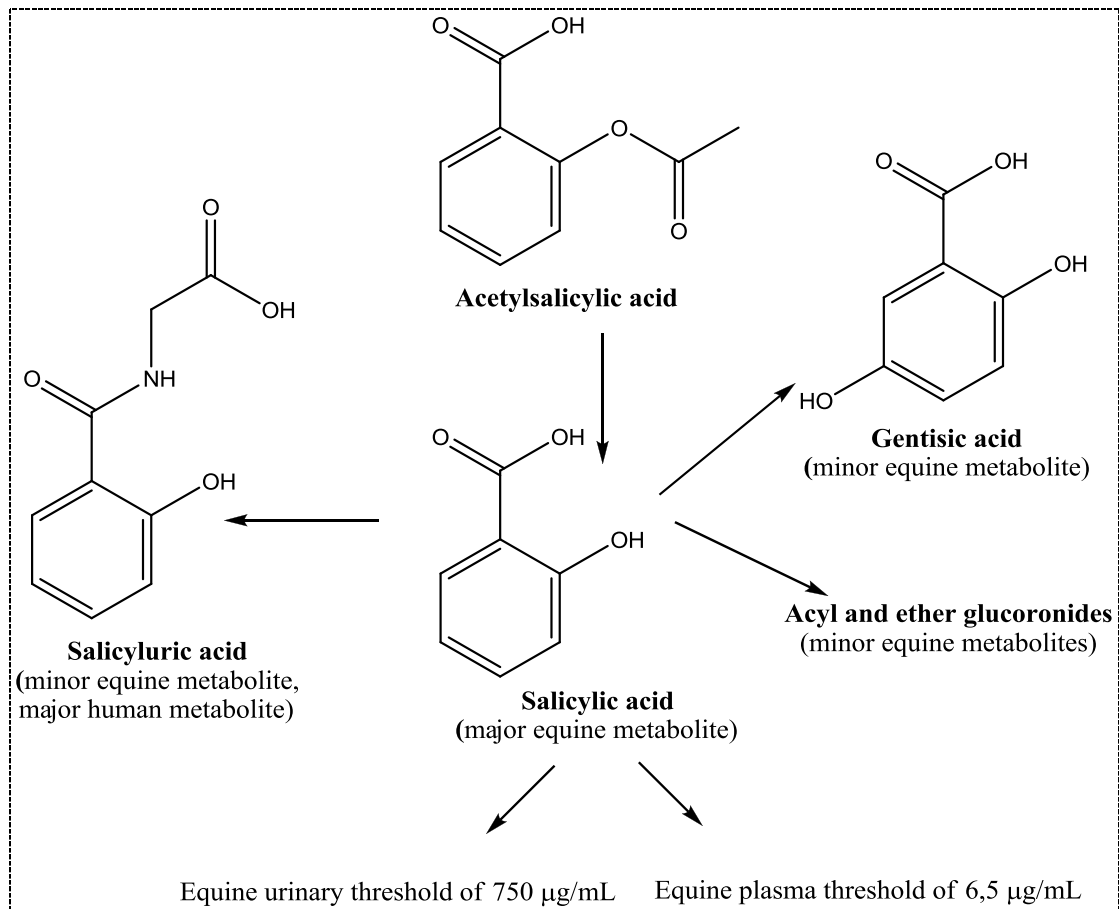
Στη βιβλιογραφία υπάρχουν αρκετές αναφορές που σχετίζονται με το μεταβολισμό των παραγώγων του σαλικυλικού οξέος στα άλογα.²²⁷ Κατά τη χορήγηση του ακετυλοσαλικυλικού οξέος, αυτό μεταβολίζεται ταχέως προς σαλικυλικό οξύ, το οποίο αποτελεί τον κύριο μεταβολίτη στα ούρα. Το ακετυλοσαλικυλικό οξύ και ο υδροξυλιωμένος μεταβολίτης του σαλικυλικού οξέος γεντισικό οξύ (gentisic acid) έχει βρεθεί ότι εμφανίζονται στα ούρα των αλόγων σε πολύ μικρό ποσοστό (συγκεντρώσεις μικρότερες από το 5 % της συγκέντρωσης του σαλικυλικού οξέος), σε αντίθεση με τον άνθρωπο, όπου ο συζευγμένος μεταβολίτης του σαλικυλικού οξέος με γλυκίνη, το σαλικυλοϊκό οξύ (salicylic acid), αντιπροσωπεύει περίπου το 64 % των προϊόντων απέκκρισης στα ούρα.²²⁸

Σε άλλη μελέτη μεταβολισμού που πραγματοποιήθηκε με χορήγηση ραδιοϊσοτοπικά επισημασμένου σαλικυλικού οξέος σε άλογα και πόνυ, διαπιστώθηκε ότι στα ούρα απεκκρίνεται περίπου το 98 % της χορηγούμενης δόσης. Σύμφωνα με τη μελέτη αυτή²²⁹ το σαλικυλικό οξύ απεκκρίνεται κυρίως αμετάβλητο (ποσοστό 94,3 % της απεκκρινόμενης δόσης), ενώ σε πολύ μικρό ποσοστό ανιχνεύθηκαν προϊόντα μεταβολισμού αυτού, με τη μορφή σαλικυλοϊκού οξέος (salicylic acid, 0,4 %), σαλικυλ-ακυλο-γλυκουρονιδίου (salicyl-acyl-glucuronide, 0,1 %), σαλικυλ-αιθερο-γλυκουρονιδίου (salicyl-ether-glucuronide, 2,2 %) και γεντισικού οξέος (gentisic acid, 3,0 %) (Σχήμα 8.1).

Στη βιβλιογραφία έχει δημοσιευθεί ένας αριθμός εργασιών που αναφέρονται σε μεθόδους προσδιορισμού του σαλικυλικού οξέος (συνά μαζί με τους μεταβολίτες του ή μαζί με άλλα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη) σε διάφορα μητρικά υλικά (ανθρώπινο πλάσμα, ούρα, ιστούς, γάλα και φυτικά είδη). Οι αναλυτικές τεχνικές που έχουν χρησιμοποιηθεί για το σκοπό αυτό περιλαμβάνουν την χρήση υδροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με φασματοφωτομετρικό ανιχνευτή²³⁰⁻²³⁴ (HPLC) και το συνδυασμό φασματομετρίας μαζών με αεριοχρωματογραφία (GC/MS)²³⁵⁻²³⁷ ή υδροχρωματογραφία (LC/MS)²³⁸⁻²⁴⁶. Στις αναφορές αυτές για την κατεργασία των προς ανάλυση δειγμάτων εφαρμόζονται διαδικασίες όπως η υγρό-υγρό εκχύλιση, η εκχύλιση στερεάς φάσης και η καταβύθιση πρωτεϊνών. Στον Πίνακα 8.1 που ακολουθεί παρατίθενται περιληπτικά ορισμένα αναλυτικά χαρακτηριστικά των υδροχρωματογραφικών μεθόδων που έχουν αναπτυχθεί για τον προσδιορισμό του σαλικυλικού οξέος.

Στη βιβλιογραφία δεν υπάρχει κάποια αναφορά που να περιγράφει μια μεθοδολογία για τον ποσοτικό προσδιορισμό και την ανίχνευση του σαλικυλικού οξέος σε ούρα αλόγων με σκοπό την εφαρμογή της στον έλεγχο ντόπινγκ. Έτσι, αντικείμενο της παρούσας εργασίας αποτέλεσε η ανάπτυξη, η αξιολόγηση και η επικύρωση μιας απλής, ταχείας και αξιόπιστης διαδικασίας για τον ποσοτικό προσδιορισμό και την ταυτοποίηση (επιβεβαίωση) του σαλικυλικού οξέος σε ούρα αλόγων αγώνων, με τη χρησιμοποίηση ενός σύγχρονου αναλυτικού συστήματος υδροχρωματογραφίας υπερυψηλής απόδοσης (Ultra High Performance Liquid Chromatography, UHPLC) συνδυασμένο με φασματόμετρο μαζών τετραπολικού αναλυτή/αναλυτή χρόνου πτήσης (Quadrupole/Time Of Flight Mass Spectrometer, QTOF-MS) (LC/QTOF-MS). Λαμβάνοντας υπόψη την υψηλή ευαισθησία του αναλυτικού συστήματος LC/QTOF-MS και την υψηλή συγκέντρωση ορίου που έχει καθοριστεί για το σαλικυλικό οξύ στα ούρα ($750 \mu\text{g mL}^{-1}$) εφαρμόστηκε η απλούστερη πορεία κατεργασίας της απευθείας έγχυσης αραιωμένου δείγματος στο αναλυτικό σύστημα (direct injection, "dilute and shoot").

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών
Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Σαλικυλικό Οξύ



Σχήμα 8.1: Βασικές οδοί βιομετατροπής του σαλικυλικού οξέος

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Σαλικυλικό Οξύ

Πίνακας 8.1: Χαρακτηριστικά αναλυτικών μεθόδων υγροχρωματογραφίας για τον προσδιορισμό του σαλικυλικού οξέος

Αναφορά (Έτος)	Αναλύτες	Μέθοδος	Μητρικό Υλικό	Εσωτερικό Πρότυπο	Κατεργασία	Αναλ. Τεχνική	Χρωματογραφική Στήλη	Κινητή Φάση	Ανιχνευτής MS
Kees (1996)	σαλικυλικό οξύ ακετυλοσαλικυλικό οξύ	ποσοτική	πλάσμα	μεθυλο-βενζοϊκό οξύ	καταβύθιση πρωτεϊνών	HPLC	Novapack C18 (150 x 3,9 mm, 4 μm)	ACN/H ₂ O (18/74) pH 2,5 (ορθο-φωσφορικό οξύ)	-
Bakar (1983)	ακετυλοσαλικυλικό οξύ και μεταβολίτες ¹	ποσοτική	πλάσμα, ούρα	o-toluic acid (πλάσμα) o-anisic acid (ούρα)	καταβύθιση πρωτεϊνών	HPLC	μBondapack 18	H ₂ O/MeOH/CH ₃ COOH (64/35/1, v/v/v)	-
Peng (1978)	σαλικυλικό οξύ ακετυλοσαλικυλικό οξύ σαλικυλουρικό οξύ	ποσοτική	πλάσμα	phthalic acid	καταβύθιση πρωτεϊνών, LLE ²	HPLC	μBondapack 18	ACN/H ₂ O (30/70) pH 2,5 (ορθο-φωσφορικό οξύ)	-
Ο'Kruk (1984)	ακετυλοσαλικυλικό οξύ και μεταβολίτες ¹	ποσοτική	πλάσμα	3,4,5-τριμεθοξυ-βενζαλδεΐδη	καταβύθιση πρωτεϊνών	HPLC	Alltech C8 (250 x 4,6 mm, 10 μm)	MeOH /H ₂ O (35/65, v/v) pH 3,9 (KH ₂ PO ₄)	-
Pirola (1998)	σαλικυλικό οξύ ακετυλοσαλικυλικό οξύ	ποσοτική	δέρμα πλάσμα	piroxicam (δερμα) phenobarbital (πλάσμα)	καταβύθιση πρωτεϊνών, SPE ³	HPLC	LiChrospher 100 RP-18 (250 x 4 mm, 5 μm)	H ₂ O/PB ⁴ (pH 2,5)/ACN (35/40/25, v/v/v)	-
Croubels (2005)	σαλικυλικό οξύ και μεταβολίτες ⁵	ποσοτική	πλάσμα, ιστοί πουλερικών	phenoxyacetic acid	LLE, SPE	LC/MS	Nucleosil 100-5 C18 (125 mm x 3 mm)	MeOH /CH ₃ COOH 0,1% (βαθμιδωτή έκλουση)	ESI (-) τριπλό τετράπολο
Wang (2008)	σαλικυλικό οξύ, διπυριδαμόλη	ποσοτική	πλάσμα	διαζεπάμη	LLE	LC/MS	Shimadzu VP-ODS-C18 (150 x 2,0 mm, 5 μm)	MeOH/ H ₂ O (70/30 v/v) CH ₃ COONH ₄ 2mM pH4,2	ESI (-), τετράπολο (SIM mode)
Bae (2008)	σαλικυλικό οξύ ακετυλοσαλικυλικό οξύ	ποσοτική	πλάσμα	σιμβαστατίνη	καταβύθιση πρωτεϊνών	LC/MS	Luna C18 (50 x 2,0 mm, 3 μm)	ACN/H ₂ O (80/20 v/v) 0,1% HCOOH	ESI (-) τριπλό τετράπολο
Segarra (2006)	σαλικυλικό οξύ jasmonic acid	ποσοτική	φυτικά εκχυλίσματα	-	LLE	LC/MS	Supelco Discovery C18 (150 x 2,1 mm, 5 μm)	MeOH /CH ₃ COOH 0,05% (βαθμιδωτή έκλουση)	ESI (-) τριπλό τετράπολο
Wilbert (1998)	σαλικυλικό οξύ jasmonic acid	ποσοτική	φυτικά εκχυλίσματα	d ₄ -σαλικυλικό οξύ dihydrojasmonic acid	LLE	LC/MS	("home-made" τριχοειδής στήλη)	MeOH /H ₂ O, 1% NH ₃ -5 mM CH ₃ COONH ₄	ESI (-) τριπλό τετράπολο
Pirker (2004)	σαλικυλικό, γεντισικό, σαλικυλουρικό οξύ	ποσοτική	πλάσμα	p-toluic acid	SPE	LC/MS	Prontosil C18-AQ (250 x 2,0 mm, 5 μm)	ACN/CH ₃ COOH 0,24% (βαθμιδωτή έκλουση)	ESI (-) τριπλό τετράπολο

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Σαλικυλικό Οξύ

Αναφορά (Έτος)	Αναλύτες	Μέθοδος	Μητρικό Υλικό	Εσωτερικό Πρότυπο	Κατεργασία	Αναλ. Τεχνική	Χρωματογραφική Στήλη	Κινητή Φάση	Ανιχνευτής MS
Vinci (2006)	σαλικυλικό οξύ κ.α ΜΣΑΦ ⁶ (14 συνολικά)	ποσοτική	ορός, πλάσμα ζώων ⁷	-	καταβύθιση πρωτεϊνών, SPE	LC/MS	Synergi RP (250 × 3,0 mm, 4 μm)	ACN/H ₂ O, 0,1% HCOOH (βαθμιδωτή έκλουση)	ESI (-),(+) τριπλό τετράπολο
Gallo (2008)	σαλικυλικό οξύ κ.α ΜΣΑΦ ⁶ (15 συνολικά)	ποιοτική	γάλα βοοειδών	-	καταβύθιση πρωτεϊνών, SPE	LC/MS	Synergi RP (250 × 3,0 mm, 4 μm)	ACN/H ₂ O, 0,1% HCOOH (βαθμιδωτή έκλουση)	ESI (-),(+) τριπλό τετράπολο
Van Hoof (2004)	σαλικυλικό οξύ κ.α ΜΣΑΦ ⁶ (6 συνολικά)	ποιοτική	μυϊκός ιστός βοοειδών	δεσοξυμεθαζόνη	καταβύθιση πρωτεϊνών, SPE	LC/MS	Alltima HP C18 (150 × 2.1 mm, 5 μm)	ACN/H ₂ O, 0,1% CH ₃ COOH (βαθμιδωτή έκλουση)	ESI (-),(+) παγίδα ιόντων

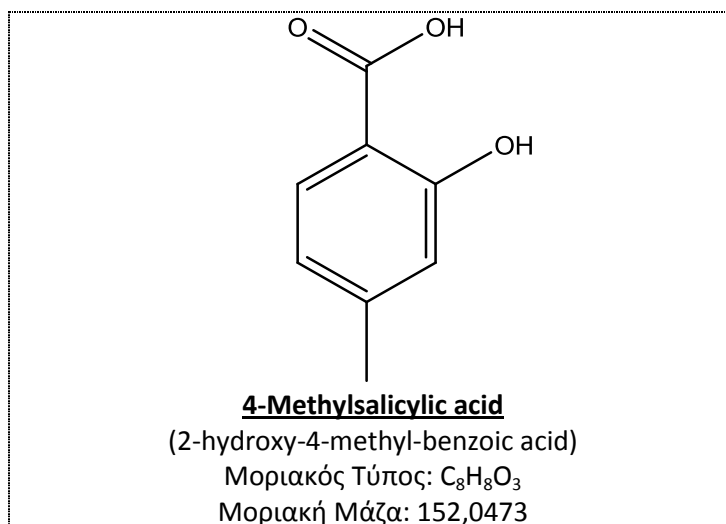
¹σαλικυλικό οξύ, σαλικυλουρικό οξύ και γεντισικό οξύ ²LLE: υγρό-υγρό εκχύλιση (liquid-liquid extraction) ³SPE: εκχύλιση στερεάς φάσης (solid phase extraction)

⁴PB: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (phosphate buffer) ⁵γεντισικό οξύ, σαλικυλουρικό οξύ, προϊόν διπλής σύζευξης με ορνιθίνη

⁶ΜΣΑΦ: μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα ⁷βοοειδών, γουρουνιών, κουνελιών, αλόγων

8.2 ΕΣΩΤΕΡΙΚΟ ΠΡΟΤΥΠΟ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η παρουσία εσωτερικού προτύπου 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 για να εξασφαλιστεί η κατά το δυνατό πιο αξιόπιστη ποσοτικοποίηση των προσδιοριζόμενων ουσιών. Το εσωτερικό πρότυπο προστίθεται σε γνωστή συγκέντρωση, τόσο στα προς ανάλυση δείγματα, όσο και στα πρότυπα δείγματα βαθμονόμησης και δείγματα ελέγχου. Για τον προσδιορισμό του σαλικυλικού οξέος χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο η ουσία 4-μεθυλοσαλικυλικό οξύ, η οποία επιλέχθηκε γιατί εμφανίζει παρόμοια δομικά και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά με τον αναλύτη.



Σχήμα 8.2: Χημική δομή 4-μεθυλοσαλικυλικού οξέος

8.3. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Οι πρότυπες ουσίες σαλικυλικό οξύ (καθαρότητα 99,5 %), 3-υδροξυβενζοϊκό οξύ (καθαρότητα 98,0 %), 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ (καθαρότητα 99,0 %) και το εσωτερικό πρότυπο 4-μεθυλοσαλικυλικό οξύ (καθαρότητα 99,0 %), ελήφθησαν από τη Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

8.4. ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ LC/QTOF-MS

8.4.1. Επιλογή-Βελτιστοποίηση συνθηκών λειτουργίας φασματομέτρου μαζών

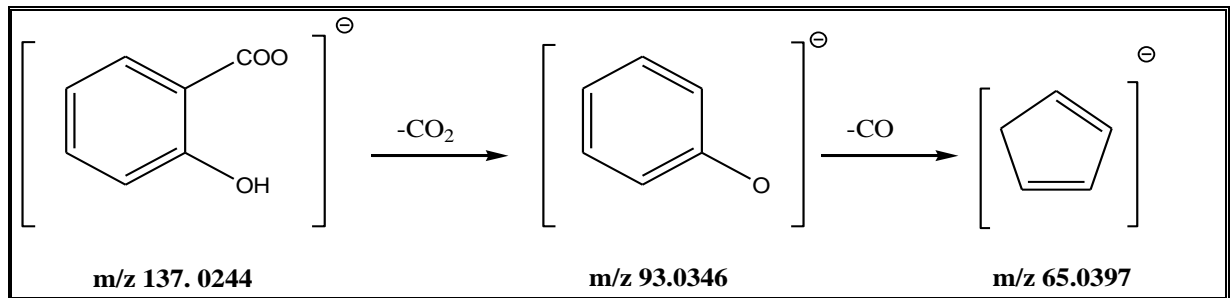
Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε φασματοόμετρο μαζών της εταιρείας Agilent, το οποίο διέθετε τετραπολικό αναλυτή μαζών συζευγμένο με αναλυτή χρόνου πτήσης ορθογώνιας επιτάχυνσης και ορθογώνιας διάταξης πηγή ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμο. Το σαλικυλικό οξύ και το μεθυλιωμένο παράγωγό του που χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο φέρουν καρβοξυλική ομάδα και για την ανίχνευση των ιόντων τους εφαρμόστηκε αρνητικός ηλεκτροψεκασμός (ESI-) όπως ισχύει και σε όλες τις βιβλιογραφικές μεθόδους

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Σαλικυλικό Οξύ

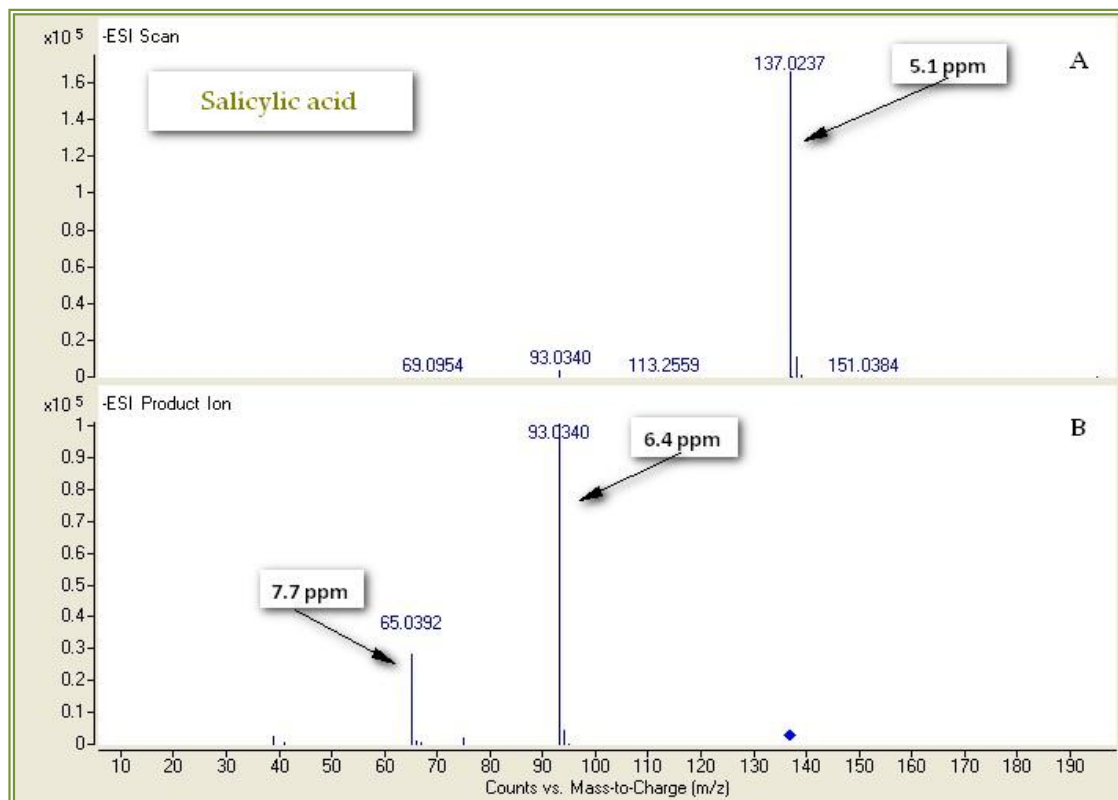
ανίχνευσης του σαλικυλικού οξέος με την τεχνική LC/MS. Ο ανιχνευτής των ιόντων ρυθμίστηκε να λειτουργεί με συχνότητα 2 GHz, η οποία προσδίδει στο σύστημα το βέλτιστο δυναμικό εύρος λειτουργίας. Η θερμοκρασία και η ταχύτητα ροής του αερίου αζώτου στην πηγή ιοντισμού ρυθμίστηκαν στους 330 °C και 10 L min⁻¹, αντίστοιχα και η πίεση του αερίου νεφελοποίησης (αερίου αζώτου) στην τιμή 40 psi. Τα δυναμικά θραυσματοποίησης της πηγής ιοντισμού (fragmentor voltage) και το δυναμικό του τριχοειδούς (capillary voltage) αποτέλεσαν παραμέτρους που βελτιστοποιήθηκαν με τη διαδικασία ανάλυσης FIA (Flow Injection Analysis), δηλαδή ανάλυση με τη συμμετοχή του αυτόματου δειγματολήπτη και της χρωματογραφικής αντλίας, αλλά απουσία χρωματογραφικής στήλης. Για τις μελέτες βελτιστοποίησης χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα του σαλικυλικού οξέος και του εσωτερικού προτύπου σε κινητή φάση συγκέντρωσης 1,0 μg mL⁻¹. Με στόχο την επίτευξη της μέγιστης δυνατής ευαισθησίας το δυναμικό fragmentor voltage ρυθμίστηκε στην τιμή 130 V, όπου παρατηρήθηκε η μέγιστη αφθονία των αποπρωτονιωμένων ιόντων του σαλικυλικού οξέος ([M-H]⁺) με τιμή *m/z* 137,0244. Το δυναμικό του τριχοειδούς (capillary voltage), το οποίο διαπιστώθηκε ότι επηρεάζει σε μικρότερο βαθμό την ένταση του παραγόμενου σήματος ρυθμίστηκε στην τιμή 3500 V. Όλες οι επιπλέον παράμετροι λειτουργίας του φασματομέτρου μαζών (δυναμικά εξαπόλου, φακών, αναλυτή χρόνου πτήσης, ανιχνευτή ιόντων) ρυθμίζονταν και βελτιστοποιούνταν στο σύνολό τους από τους από τη διαδικασία tuning του συστήματος που έχει περιγραφεί στο κεφάλαιο 4. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του σαλικυλικού οξέος επιλέχθηκε η λειτουργία του συστήματος QTOF-MS σε κατάσταση πλήρους σάρωσης (MS mode) δηλαδή σα να επρόκειτο για σύστημα TOF-MS. Το εύρος σάρωσης των ανιχνευόμενων τιμών *m/z* ρυθμίστηκε σε 80 – 1100 και η ταχύτητα σάρωσης ήταν 1 scan sec⁻¹. Για την επιβεβαίωση του σαλικυλικού οξέος, όπου όπως έχει ήδη αναφερθεί, απαιτούνται τουλάχιστον 3 διαγνωστικά ιόντα ικανοποιητικής έντασης (με αναλογία μεγαλύτερη από 5 % σε σχέση με την ένταση του κύρια σχηματιζόμενου ιόντος) επιλέχθηκε λειτουργία “targeted MS/MS” του συστήματος QTOF-MS, κατά την οποία λαμβάνει χώρα εναλλάξ διαδικασία λήψης φασμάτων σάρωσης των θυγατρικών ιόντων, τα οποία σχηματίζονται μετά από απομόνωση μητρικών ιόντων προεπιλεγμένων τιμών *m/z* στον τετραπολικό αναλυτή και θραυσματοποίησή τους στο θάλαμο συγκρούσεων με τη βοήθεια αερίου αζώτου (MS/MS spectra) και φασμάτων πλήρους σάρωσης χωρίς θραυσματοποίηση (MS spectra). Οι παράμετροι που αφορούν το εύρος μαζών σάρωσης και την ταχύτητα σάρωσης ρυθμίζονται στην περίπτωση αυτή ξεχωριστά για κάθε μια διαδικασία. Έτσι, για τη διαδικασία MS το εύρος σάρωσης τιμών *m/z* ρυθμίστηκε σε 80 – 1100 με ταχύτητα σάρωσης 3 scan sec⁻¹, ενώ για τη διαδικασία MS/MS οι αντίστοιχες τιμές ήταν για το εύρος 30-200 (*m/z*) και την ταχύτητα 2 scan sec⁻¹. Ως πρόδρομο ιόν επιλέχθηκε το αποπρωτονιωμένο μοριακό ιόν του σαλικυλικού οξέος και πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αναλύσεις FIA για την εύρεση του κατάλληλου δυναμικού θραυσματοποίησης (collision energy, CE), το οποίο τελικά ρυθμίστηκε στην τιμή 30 V. Υπό τις συνθήκες αυτές το αποπρωτονιωμένο μοριακό ιόν του σαλικυλικού οξέος (*m/z* 137,0244) με απώλεια ενός μορίου διοξειδίου του άνθρακα σχηματίζει το θυγατρικό ιόν με τιμή *m/z* 93,0346, από το οποίο με περαιτέρω απώλεια ενός μορίου μονοξειδίου του άνθρακα προκύπτει το ιόν με τιμή *m/z* 65,0397 (Σχήμα 8.3). Τα θυγατρικά αυτά ιόντα μαζί με το αποπρωτονιωμένο μητρικό ιόν χρησιμοποιήθηκαν ως διαγνωστικά ιόντα του σαλικυλικού οξέος κατά τον έλεγχο επιβεβαίωσης, ενώ ο ποσοτικός προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε με διαδικασία

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Σαλικυλικό Οξύ

πλήρους σάρωσης λαμβάνοντας υπόψη την επιφάνεια της χρωματογραφικής κορυφής του ιόντος με τιμή m/z 137,0244 για το σαλικυλικό οξύ και του ιόντος με τιμή m/z 151,0401, για το εσωτερικό πρότυπο. Στα σχήματα που ακολουθούν παρουσιάζονται το φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Σχήμα 8.4.α) και το φάσμα σάρωσης θυγατρικών ιόντων του σαλικυλικού οξέος (8.4.β), καθώς και το φάσμα σάρωσης του εσωτερικού προτύπου (Σχήμα 8.5), όπως αυτά ελήφθησαν μετά από την ανάλυση δείγματος ούρων αλόγου εμβολιασμένο με τον αναλύτη σε συγκέντρωση $7,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (συγκέντρωση που αντιστοιχεί στη συγκέντρωση ορίου) υπό τις βέλτιστες συνθήκες του συστήματος LC/QTOF-MS (targeted MS/MS).

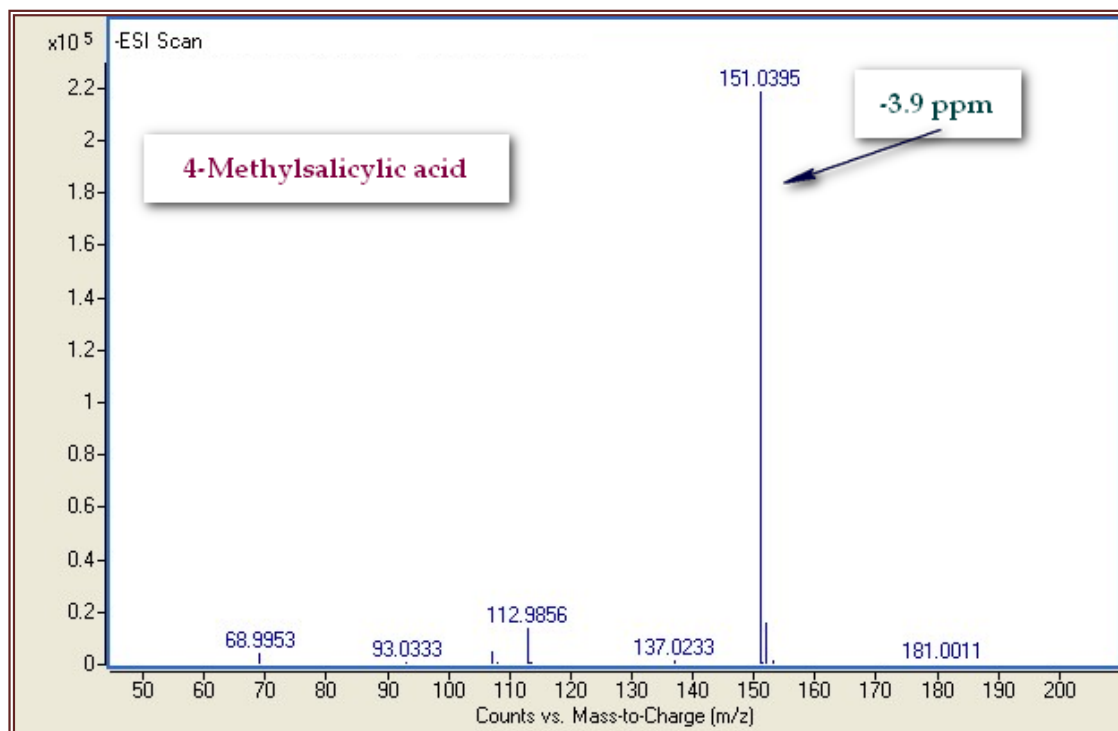


Σχήμα 8.3: Πορεία θραυσματοποίησης του σαλικυλικού οξέος κατά τον αρνητικό ιοντισμό με μηχανισμό ηλεκτροψεκασμού (ESI-) και κάτω από σταδιακά αυξανόμενες τιμές του δυναμικού θραυσματοποίησης (collision energy) του συστήματος QTOF-MS.



Σχήμα 8.4: Φάσμα πλήρους σάρωσης (full scan spectrum, A) και φάσμα σάρωσης θυγατρικών ιόντων (product ion scan spectrum, B) του σαλικυλικού οξέος που ελήφθησαν μετά από ανάλυση LC/QTOF-MS/MS ανάλυση πρότυπου εμβολιασμένου δείγματος συγκέντρωσης $7,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ υπό τις βέλτιστες συνθήκες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Σαλικυλικό Οξύ



Σχήμα 8.5: Φάσμα πλήρους σάρωσης (*full scan spectrum*) του εσωτερικού προτύπου μετά από ανάλυση πρότυπου εμβολιασμένου δείγματος συγκέντρωσης $7,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ υπό τις βέλτιστες συνθήκες του συστήματος LC/QTOF-MS.

8.4.2. Υγροχρωματογραφικές συνθήκες

Το σύστημα LC/QTOF-MS διαθέτει υγροχρωματογραφικό σύστημα υπερυψηλής απόδοσης (UHPLC) της εταιρείας Agilent Technologies. Η αναλυτική στήλη που χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό του σαλικυλικού οξέος και του εσωτερικού προτύπου από τα συστατικά του μητρικού υλικού ήταν η Zorbax Eclipse Plus C18 (Agilent Technologies) μήκους 10 cm, εσωτερικής διαμέτρου 2,1 mm και διαμέτρου σωματιδίων 1,8 μm . Η θερμοκρασία της στήλης ρυθμίστηκε στους 35 °C. Το σύστημα διαθέτει θερμοστατούμενο αυτόματο δειγματολήπτη, η θερμοκρασία του οποίου ρυθμίστηκε στους 5 °C. Το σαλικυλικό οξύ αποτελεί ιδιαίτερα πολικό μόριο και για να επιτευχθεί ικανοποιητική συγκράτηση αυτού στη στήλη, δοκιμάστηκαν ποικίλες κινητές φάσεις που διέφεραν ως προς την αναλογία ακετονιτριλίου (οργανικού τροποποιητή) και νερού, ενώ παράλληλα δοκιμάστηκαν διαφορετικοί όξινοι τροποποιητές (μυρμηκικό οξύ, οξικό οξύ, μυρμηκικό αμμώνιο και οξικό αμμώνιο) προκειμένου να βρεθεί η σύσταση της κινητής φάσης που επιτυγχάνει ταυτόχρονα ικανοποιητική χρωματογραφική συμπεριφορά (συγκράτηση και σχήμα κορυφής) και μεγαλύτερη ένταση σήματος για το σαλικυλικό οξύ. Η σύσταση της κινητής φάσης που επιλέχθηκε ήταν μίγμα ακετονιτριλίου νερού σε αναλογία 60/40 (v/v) που περιείχε οξικό οξύ σε αναλογία 0,1% (v/v) (4.4.2.29) και παρέμενε σταθερή σε όλη τη διάρκεια της ανάλυσης. Η ταχύτητα ροής ήταν $0,3 \text{ mL min}^{-1}$. Ο συνολικός χρόνος ανάλυσης ήταν 2 min και ο ενιέμενος όγκος δείγματος 5 μL . Υπό τις παραπάνω χρωματογραφικές συνθήκες οι χρόνοι έκλουσης για το σαλικυλικό οξύ και το 4-μεθυλοσαλικυλικό οξύ ήταν 1,23 min και 1,32 min, αντίστοιχα. Οι ουσίες 3-υδροξυβενζοϊκό οξύ και 4-υδροξυβενζοϊκό

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Σαλικυλικό Οξύ

οξύ που μελετήθηκαν κατά τον έλεγχο ειδικότητας καθώς αποτελούν ισομοριακές ουσίες με το σαλικυλικό οξύ (και ιονίζονται με αντίστοιχο τρόπο προς το ιόν με τιμή m/z 137,0244) διαπιστώθηκε ότι διαχωρίζονται χρωματογραφικά από αυτό καθώς εκλούονταν σε χρόνους 0,89 min και 0,93 min, αντίστοιχα. Στο Σχήμα 8.6 παρουσιάζονται τα ιοντικά χρωματογραφήματα που ελήφθησαν από την ανάλυση ενός λευκού δείγματος ούρων και ενός δείγματος ούρων αλόγου εμβολιασμένο με τον αναλύτη σε συγκέντρωση $7,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ υπό τις βέλτιστες συνθήκες του συστήματος LC/QTOF-MS (ανάλυση 'targeted MS/MS mode').

8.5. ΠΡΟΤΥΠΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΠΑΡΑΚΑΤΑΘΗΚΗΣ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

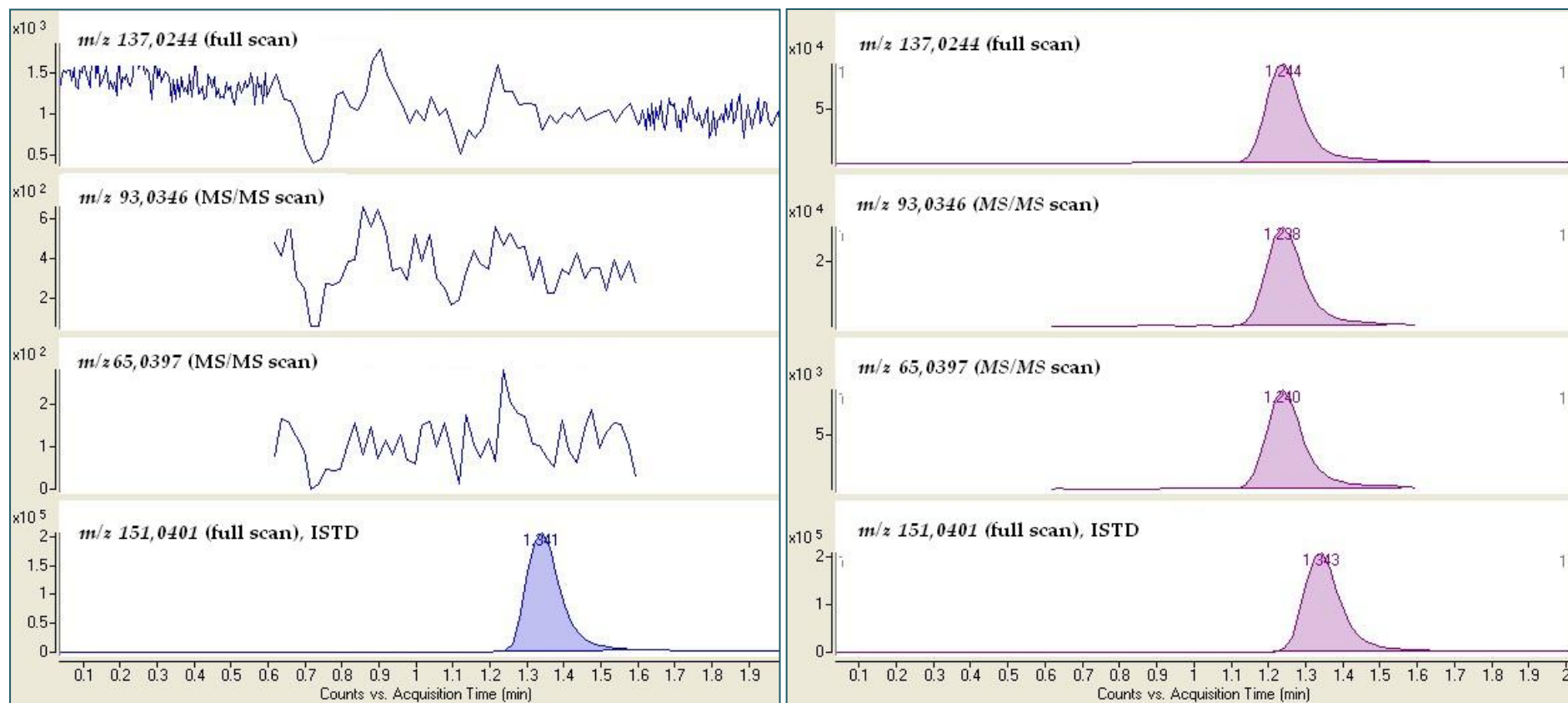
Παρασκευάστηκαν δύο πρότυπα διαλύματα παρακαταθήκης του σαλικυλικού οξέος (ΔΠ1, ΔΠ2), από τα οποία το πρώτο χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του διαλύματος εργασίας των δειγμάτων των καμπυλών βαθμονόμησης και το δεύτερο για την παρασκευή του διαλύματος εργασίας των δειγμάτων ελέγχου. Καθένα από τα διαλύματα παρακαταθήκης παρασκευάστηκε με ζύγιση στερεής πρότυπης ουσίας σε αναλυτικό ζυγό ακρίβειας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων μέσα σε βαθμονομημένη ογκομετρική φιάλη και ακόλουθη αραιώση με μεθανόλη μέχρι χαραγής. Για την καλύτερη διάλυση της ουσίας τα διαλύματα τοποθετήθηκαν για πέντε λεπτά σε λουτρό υπερήχων. Με ανάλογο τρόπο παρασκευάστηκε πρότυπο μεθανολικό διάλυμα παρακαταθήκης του εσωτερικού προτύπου συγκέντρωσης $4,0 \text{ mg mL}^{-1}$. Ακολούθησε μεταφορά όλων των διαλυμάτων σε σκοτεινόχρωμα φιαλίδια (vials), τα οποία αποθηκεύτηκαν στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία -20°C .

Λαμβάνοντας κατάλληλους όγκους από τα διαλύματα παρακαταθήκης και αραιώνοντας με το μίγμα διαλυτών της κινητής φάσης (ακετονιτρίλιο/νερό 60/40, 0,1% οξικό οξύ, 4.4.2.29) σε βαθμονομημένες ογκομετρικές φιάλες παρασκευάστηκαν τα διαλύματα εργασίας του αναλύτη συγκέντρωσης $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Το διάλυμα εργασίας του εσωτερικού προτύπου παρασκευάστηκε με αντίστοιχο τρόπο σε συγκέντρωση $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Όλα τα πρότυπα διαλύματα εργασίας παρασκευάζονταν φρέσκα κάθε εργαστηριακή ημέρα και δεν αποθηκεύονταν.

Στο [Παράρτημα 18](#) φαίνονται οι συγκεντρώσεις των προτύπων διαλυμάτων παρακαταθήκης και εργασίας και οι απαιτούμενοι όγκοι διαλυμάτων για την παρασκευή τους.

8.6. ΠΟΡΕΙΑ ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΥΡΩΝ

Λαμβάνονται με ακρίβεια 100 μL από το ύποπτο δείγμα και αραιώνονται με κινητή φάση σε ογκομετρική φιάλη όγκου 10 mL (παράγοντας αραιώσεως 100) και 1000 μL από το αραιωμένο δείγμα ούρων μεταγγίζονται ακολούθως σε ψηλούς υάλινους σωλήνες. Ακολουθεί προσθήκη 80 μL διαλύματος εργασίας του εσωτερικού προτύπου (4-μεθυλοσαλικυλικό οξύ $200 \mu\text{g mL}^{-1}$) και προσθήκη επιπλέον 8 mL του διαλύτη αραιώσεως (κινητή φάση). Ακολουθεί καλή ανάδευση (vortex) και μετάγγιση μέρους του προς ανάλυση μίγματος σε υάλινα φιαλίδια του αυτόματου δειγματολήπτη (vials).



Σχήμα 8.6: Χρωματογραφήματα LC/QTOF-MS των διαγνωστικών ιόντων του σαλικυλικού οξέος και του εσωτερικού προτύπου που ελήφθησαν μετά από ανάλυση λευκού δείγματος ούρων αλόγου και εμβολιασμένου δείγματος συγκέντρωσης $7,5 \mu\text{g mL}^{-1}$.

8.7. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΕΝΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΥΡΩΝ

Κατά την αξιολόγηση της μεθόδου παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν πρότυπα δείγματα καμπύλης βαθμονόμησης και δείγματα ελέγχου σε ούρα αλόγου εμβολιασμένα με τον αναλύτη. Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ούρων διαφορετικών αλόγων (αρσενικά, θηλυκά και εκτομίες), τα οποία κατά τον έλεγχο σάρωσης του Εργαστηρίου με την τεχνική GC/MS παρουσίασαν πολύ χαμηλή συγκέντρωση σαλικυλικού οξέος. Παρασκευάστηκε έτσι ένα μίγμα από τα παραπάνω δείγματα (pooled urine), το οποίο χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα πειράματα αξιολόγησης της μεθόδου. Όπως περιγράφηκε στην προηγούμενη παράγραφο, λόγω της υψηλής συγκέντρωσης ορίου που έχει καθοριστεί για το σαλικυλικό οξύ πρώτο στάδιο στην κατεργασία των ύποπτων δειγμάτων αποτελεί η αραιώσή τους με κινητή φάση σε αναλογία 1/100. Αντίστοιχα, κατά την παρασκευή των εμβολιασμένων προτύπων δειγμάτων προηγήθηκε η ανάλογη αραιώση των προς εμβολιασμό ούρων. Συγκεκριμένα, κάθε εργαστηριακή ημέρα ελήφθησαν 500 μL λευκού δείγματος (pooled urine) και αραιώθηκαν με την κινητή φάση σε ογκομετρική φιάλη των 50 mL. Τα πρότυπα δείγματα της καμπύλης αναφοράς (standard calibration samples, STD) παρασκευάστηκαν σε επτά επίπεδα συγκέντρωσης (2,5, 5,0, 10,0, 20,0, 30,0, 40,0 και 50,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) με εμβολιασμό κατάλληλου όγκου διαλύματος εργασίας του σαλικυλικού οξέος σε 1 mL αραιωμένου λευκού δείγματος ούρων, προσθήκη 80 μL διαλύματος εργασίας του εσωτερικού προτύπου και ακόλουθη αραιώση με τον κατάλληλο όγκο κινητής φάσης (τελικός όγκος δείγματος 9,08 mL). Τα πρότυπα δείγματα ελέγχου (quality control samples, QC) παρασκευάστηκαν με αντίστοιχο τρόπο σε τέσσερα επίπεδα συγκέντρωσης χρησιμοποιώντας ξεχωριστό διάλυμα εργασίας του αναλύτη και οι τιμές τους καθορίστηκαν ως εξής: η κατώτερη συγκέντρωση είναι παραπλήσια με το πρώτο σημείο της καμπύλης αναφοράς που αντιστοιχεί στο κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης (Lowest Limit Of Quantification, LLOQ), το δεύτερο επίπεδο συγκέντρωσης αντιστοιχεί στο όριο που έχει καθοριστεί από τον AORC για το σαλικυλικό οξύ, το τρίτο επίπεδο αντιστοιχεί περίπου στο μέσο της καμπύλης αναφοράς και το τέταρτο επίπεδο αντιστοιχεί στο 90% του τελευταίου σημείου της καμπύλης και καλείται ανώτερο όριο ποσοτικοποίησης (Upper Limit Of Quantification, ULOQ). Πιο συγκεκριμένα, οι συγκεντρώσεις του σαλικυλικού οξέος στα δείγματα ελέγχου ήταν 3,0, 7,5, 25,0 και 45,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Στο [Παράρτημα 19](#) παρουσιάζεται αναλυτικά ο τρόπος παρασκευής των εμβολιασμένων δειγμάτων της καμπύλης αναφοράς και των δειγμάτων ελέγχου.

8.8. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΣΑΛΙΚΥΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΕ ΟΥΡΑ ΑΛΟΓΩΝ

8.8.1. Έλεγχος γραμμικότητας – Καμπύλες αναφοράς

8.8.1.1. Θεωρητικό Υπόβαθρο^{156,188}

Η εξαγωγή αξιόπιστων αποτελεσμάτων σε έναν ποσοτικό προσδιορισμό προϋποθέτει την χρησιμοποίηση μιας ορθής καμπύλης αναφοράς, η οποία εκφράζεται από συγκεκριμένη εξίσωση συμμεταβολής, μέσω της οποίας καθορίζεται η σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης της προσδιοριζόμενης ουσίας και της αναλυτικής απόκρισης. Στην απλούστερη περίπτωση η εξίσωση παλινδρόμησης αποτελεί μια γραμμική εξίσωση της μορφής $y = a + bx$ που ισχύει για μια δυναμικά ευρεία περιοχή συγκεντρώσεων (γραμμική περιοχή), όπου: y η απόκριση του αναλύτη (ή η σχετική απόκριση του αναλύτη ως προς την απόκριση του εσωτερικού προτύπου), x η συγκέντρωση του αναλύτη, a η τομή στον άξονα των y και b η κλίση της καμπύλης αναφοράς.

Σε ορισμένες περιπτώσεις, παρατηρούνται αποκλίσεις από το απλό γραμμικό μοντέλο παλινδρόμησης, όπως όταν το μελετούμενο εύρος συγκεντρώσεων είναι ιδιαίτερα μεγάλο, οπότε κρίνεται αναγκαία η χρήση πολυπλοκότερων μαθηματικών μοντέλων για την ορθή προσαρμογή και απόδοση της σχέσης απόκρισης – συγκέντρωσης. Προκειμένου να διευρευνηθεί αν το απλό γραμμικό μοντέλο είναι επαρκές, απαιτείται έλεγχος ομοσκεδαστικότητας με μελέτη του διαγράμματος των υπολοίπων. Με τον όρο υπόλοιπο εννοείται η διαφορά ανάμεσα στη μετρούμενη απόκριση (πειραματική απόκριση, $Y_{\text{πειραμ}}$) και στην απόκριση που υπολογίζεται από την εξίσωση παλινδρόμησης (εκτιμώμενη απόκριση, $Y_{\text{εκτιμ}}$). Όταν τα υπόλοιπα έχουν την ίδια διασπορά σε όλα τα σημεία της καμπύλης αναφοράς τότε χαρακτηρίζονται από ομοσκεδαστικότητα. Παράλληλα με τον έλεγχο στα διαγράμματα υπολοίπων για τον έλεγχο του φαινομένου μπορεί να εφαρμοστεί η δοκιμασία F (F -test) υπολογίζοντας το λόγο της διακύμανσης των αποκρίσεων του υψηλότερης συγκέντρωσης σημείου της καμπύλης αναφοράς (ULOQ) προς αυτή του χαμηλότερης συγκέντρωσης σημείου (LLOQ) που εκφράζει την πειραματική τιμή F ($F_{\text{πειρ}}$) και συγκρίνοντάς τη με τη θεωρητική τιμή F ($F_{\text{θεωρ}}$) (για $f_1 = f_2 = (N-1)$ βαθμούς ελευθερίας (N : αριθμός πειραματικών μετρήσεων για κάθε σημείο)).

Σε περίπτωση που διαπιστωθεί η μη ύπαρξη ομοσκεδαστικότητας ($F_{\text{πειρ}} > F_{\text{θεωρ}}$) χρησιμοποιείται η ζυγισμένη παλινδρόμηση ελαχίστων τετραγώνων (weighted least squares regression), όπου με την εισαγωγή ενός συντελεστή βαρύτητας (w_i) επιδιώκεται να ελαχιστοποιηθεί το άθροισμα των τετραγώνων των ζυγισμένων υπολοίπων (Sum of Squares, SS), το οποίο δίνεται από τη σχέση:

$$SS = \sum w_i (Y_{\text{πειραμ},i} - Y_{\text{εκτιμ},i})^2 \quad [8.1]$$

Όλες οι εξισώσεις για τον υπολογισμό των παραμέτρων a και b , καθώς και του συντελεστή συσχέτισης r τροποποιούνται για να εμπεριέχουν το συντελεστή βαρύτητας:

$$\alpha = \frac{\sum x_i^2 \sum y_i - \sum x_i \sum x_i y_i}{n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2} \quad \Longrightarrow \quad \alpha = \frac{\sum w_i x_i^2 \sum w_i y_i - \sum w_i x_i \sum w_i x_i y_i}{\sum w_i \sum w_i x_i^2 - (\sum w_i x_i)^2} \quad [8.2]$$

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Σαλικυλικό Οξύ

$$b = \frac{n \sum x_i y_i - \sum x_i \sum y_i}{n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2} \quad \Longrightarrow \quad b = \frac{\sum w_i \sum w_i x_i y_i - \sum w_i x_i \sum w_i y_i}{\sum w_i \sum w_i x_i^2 - (\sum w_i x_i)^2} \quad [8.3]$$

$$r = \frac{n \sum x_i y_i - \sum x_i \sum y_i}{\sqrt{(n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2)(n \sum y_i^2 - (\sum y_i)^2)}} \quad \Longrightarrow \quad r = \frac{\sum w_i \sum w_i x_i y_i - \sum w_i x_i \sum w_i y_i}{\sqrt{(\sum w_i \sum w_i x_i^2 - (\sum w_i x_i)^2)(\sum w_i \sum w_i y_i^2 - (\sum w_i y_i)^2)}} \quad [8.4]$$

Ως καταλληλότερος συντελεστής βαρύτητας w_i χρησιμοποιείται το πηλίκο $w_i = 1/\sigma_i^2$, όπου σ_i , η διακύμανση της απόκρισης κάθε σημείου της καμπύλης βαθμονόμησης. Επειδή η χρήση αυτού του παράγοντα απαιτεί πολλούς υπολογισμούς, συνήθως για την εύρεση του καταλληλότερου παράγοντα ζύγισης δοκιμάζονται άλλοι παράγοντες που βασίζονται στις παραμέτρους x (συγκέντρωση) και y (απόκριση), από τους οποίους οι πλέον συνήθεις είναι οι λόγοι $1/x$, $1/x^2$, $1/y$ και $1/y^2$. Ως κριτήριο για την επιλογή του καταλληλότερου παράγοντα ζύγισης χρησιμοποιείται το επί τοις εκατό σχετικό σφάλμα (% Relative Error, % E_r) της πειραματικά υπολογιζόμενης συγκέντρωσης από την εξίσωση παλινδρόμησης εφαρμόζοντας τον καθένα παράγοντα ζύγισης w_i ($C_{\text{υπολ}}$) σε σχέση με την θεωρητική συγκέντρωση ($C_{\text{θεωρ}}$). Για κάθε παράγοντα ζύγισης αξιολογείται το διάγραμμα απεικόνισης του σχετικού σφάλματος συναρτήσει της συγκέντρωσης καθώς και το ολικό άθροισμα των απολύτων τιμών σχετικού σφάλματος ($\Sigma \% E_r$) και επιλέγεται ο συντελεστής στατιστικού βάρους w_i με τον οποίο παρατηρείται μικρότερη κατανομή σφαλμάτων % E_r γύρω από τον άξονα της συγκέντρωσης και μικρότερη τιμή αθροίσματος $\Sigma \% E_r$ σε όλο το εύρος των συγκεντρώσεων.

$$\% E_r = 100 \times \frac{C_{\text{υπολ}} - C_{\text{θεωρ}}}{C_{\text{θεωρ}}} \quad [8.5]$$

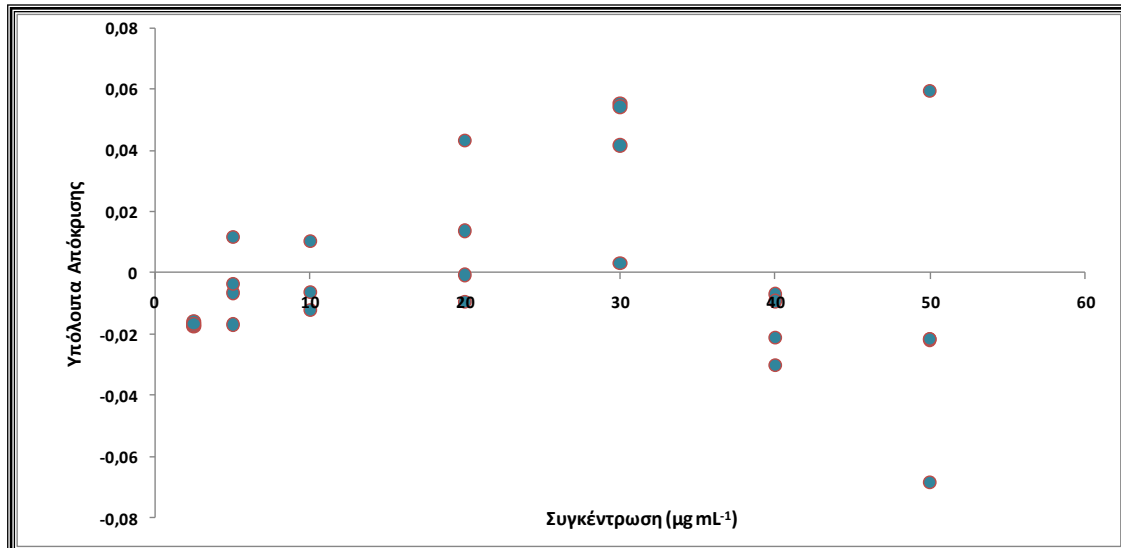
8.8.1.2. Έλεγχος ομοσκεδαστικότητας

Κατά την αξιολόγηση γραμμικότητας της μεθόδου παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν καμπύλες αναφοράς του σαλικυλικού οξέος σε έξι διαφορετικές εργαστηριακές ημέρες. Κάθε καμπύλη αποτελείτο από επτά μη μηδενικά πρότυπα με εύρος συγκεντρώσεων για το σαλικυλικό οξύ από 2,5 - 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, ενώ παράλληλα αναλύθηκε και ένα λευκό δείγμα. Κάθε πρότυπο παρασκευάστηκε και αναλύθηκε εις διπλούν (συνολικά 4 μετρήσεις ανά σημείο της καμπύλης). Ως απόκριση λαμβάνεται ο λόγος της επιφάνειας της χρωματογραφικής κορυφής του σαλικυλικού οξέος προς την επιφάνεια της χρωματογραφικής κορυφής του εσωτερικού προτύπου (4-μεθυλοσαλικυλικό οξύ).

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε έλεγχος ύπαρξης ομοσκεδαστικότητας για τα πρότυπα δείγματα της καμπύλης αναφοράς λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα της πρώτης σειράς αναλυτικών δεδομένων. Για το σκοπό αυτό, κατασκευάστηκε το διάγραμμα των υπολοίπων των αποκρίσεων συναρτήσει των επιπέδων συγκέντρωσης της καμπύλης αναφοράς του σαλικυλικού οξέος για το μη ζυγισμένο γραμμικό μοντέλο (Σχήμα 8.7). Επιπρόσθετα, για την επιβεβαίωση πιθανής ετεροσκεδαστικότητας συγκρίθηκαν οι διακυμάνσεις των υπολοίπων που αντιστοιχούν στο χαμηλότερο και στο υψηλότερο επίπεδο συγκέντρωσης με εφαρμογή δοκιμής F-test (Πίνακας 8.2). Ο λόγος των διακυμάνσεων του τελευταίου προς το πρώτο σημείο της καμπύλης βαθμονόμησης (πειραματική τιμή F) συγκρίθηκε με τη θεωρητική τιμή F που ελήφθη από πίνακα για

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Σαλικυλικό Οξύ

$(N_A - 1) = (N_B - 1) = 3$ βαθμούς ελευθερίας (όπου $N_A = N_B = 4$, ο αριθμός των μετρήσεων για κάθε σημείο) και στάθμη εμπιστοσύνης 99%.



Σχήμα 8.7: Διαγραμματική απεικόνιση της κατανομής των υπολοίπων απόκρισης συναρτήσει της συγκέντρωσης του σαλικυλικού οξέος (μη ζυγισμένο γραμμικό μοντέλο) για τον έλεγχο ομοσκεδαστικότητας

Πίνακας 8.2: Δοκιμασία F για τον έλεγχο ομοσκεδαστικότητας μεταξύ του πρώτου και του τελευταίου σημείου της καμπύλης βαθμονόμησης

Στατιστικό Στοιχείο Υπολοίπων	Σημείο 1 (2,5 μg mL ⁻¹)	Σημείο 7 (50 μg mL ⁻¹)
Μέση Τιμή (N=4)	-0,01693	-0,013
Τυπική απόκλιση (SD)	0,00071	0,053
Διακύμανση (SD ²)	5,03 x 10 ⁻⁷	2,83 x 10 ⁻³
F _{πειραματικό} (SD ₇ ² / SD ₁ ²)	5627	
F _{θεωρητικό} (f ₁ = f ₇ = 3, 99%)	29,46	
	$F_{\text{πειραματικό}} > F_{\text{θεωρητικό}}$ σημαντική διαφορά διακυμάνσεων	

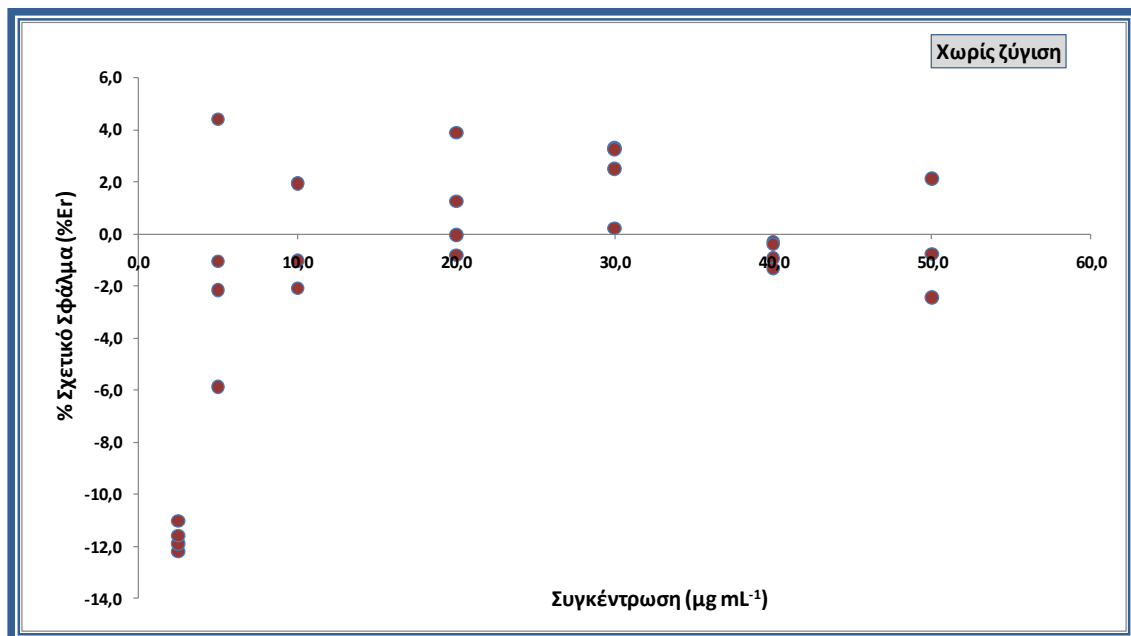
Από την οπτική παρατήρηση του διαγράμματος των υπολοίπων και κυρίως από τα αποτελέσματα της δοκιμασίας F κρίνεται αναγκαία η χρησιμοποίηση ενός παράγοντα ζύγισης ώστε να δοθεί μεγαλύτερη σημαντικότητα στα σημεία χαμηλής συγκέντρωσης της καμπύλης αναφοράς, τα οποία είναι περισσότερο επιρρεπή στη μετατόπιση της κλίσης που προκαλεί η αυξημένη διακύμανση των σημείων υψηλής συγκέντρωσης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Σαλικυλικό Οξύ

8.8.1.3. Εφαρμογή ζυγισμένης γραμμικής ανάλυσης παλινδρόμησης – Επιλογή βέλτιστου παράγοντα ζύγισης

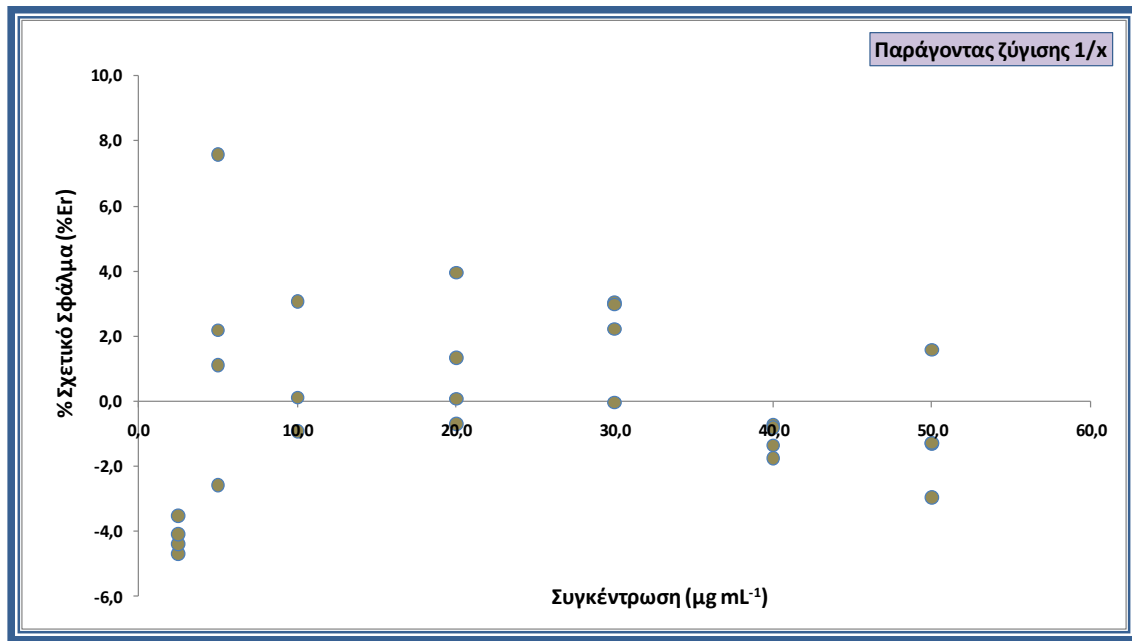
Η επιλογή του καταλληλότερου παράγοντα ζύγισης έγινε μετά από δοκιμή των συνηθέστερα χρησιμοποιούμενων παραγόντων ($1/x$, $1/x^2$, $1/y$, $1/y^2$) στην καμπύλη αναφοράς της πρώτης αναλυτικής διαδικασίας και εξαγωγή των αντίστοιχων εξισώσεων παλινδρόμησης. Για κάθε ζυγισμένο μοντέλο κατασκευάστηκαν διαγράμματα απεικόνισης του % σχετικού αναλυτικού σφάλματος (% Relative Error, % E_r) συναρτήσει της θεωρητικής συγκέντρωσης για τα πρότυπα δείγματα της καμπύλης βαθμονόμησης και υπολογίστηκε το ολικό άθροισμα των % E_r ($\Sigma\%E_r$) σε όλο το εύρος των συγκεντρώσεων. Στα Σχήματα 8.8- 8.12 που ακολουθούν φαίνονται τα διαγράμματα των % E_r για το μη ζυγισμένο μοντέλο και τα ζυγισμένα μοντέλα με κάθε έναν από τους συντελεστές βαρύτητας, ενώ στον Πίνακα 8.3 συνοψίζονται τα αποτελέσματα του ολικού αθροίσματος των % E_r .

Από την παρατήρηση των παρακάτω διαγραμμάτων φαίνεται ότι με τη χρήση του μη ζυγισμένου γραμμικού μοντέλου προκύπτει υποεκτίμηση των υπολογιζόμενων συγκεντρώσεων στο χαμηλό επίπεδο συγκέντρωσης, η οποία δεν υπερβαίνει το 15 % της θεωρητικής τιμής, αλλά το σφάλμα είναι σημαντικά μεγαλύτερο από αυτό που παρατηρείται στις υψηλότερες συγκεντρώσεις, γεγονός που οφείλεται στην ετεροσκεδαστικότητα των υπολοίπων. Ως παράγοντας ζύγισης επιλέχθηκε ο συντελεστής $1/x^2$, που έδωσε το γραμμικό μοντέλο με μικρότερο εύρος κατανομής στις τιμές του σχετικού σφάλματος αλλά και το μικρότερο συνολικό άθροισμα.

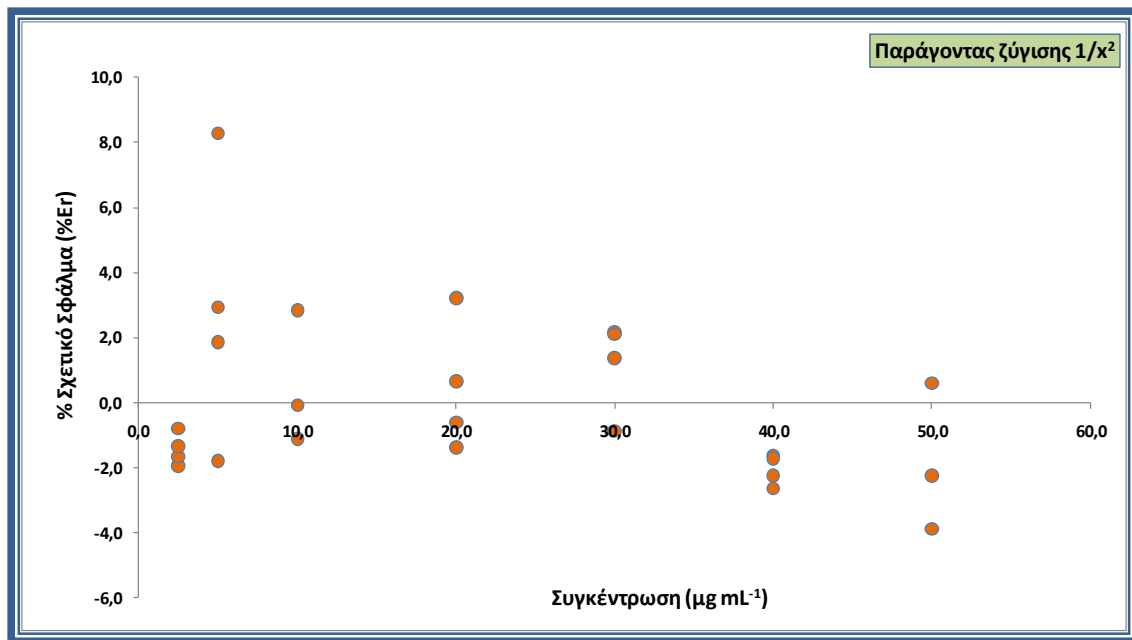


Σχήμα 8.8: Διάγραμμα % σχετικού σφάλματος υπολογιζόμενης συγκέντρωσης του σαλικυλικού οξέος συναρτήσει της θεωρητικής συγκέντρωσης για το μη ζυγισμένο γραμμικό μοντέλο

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Σαλικυλικό Οξύ

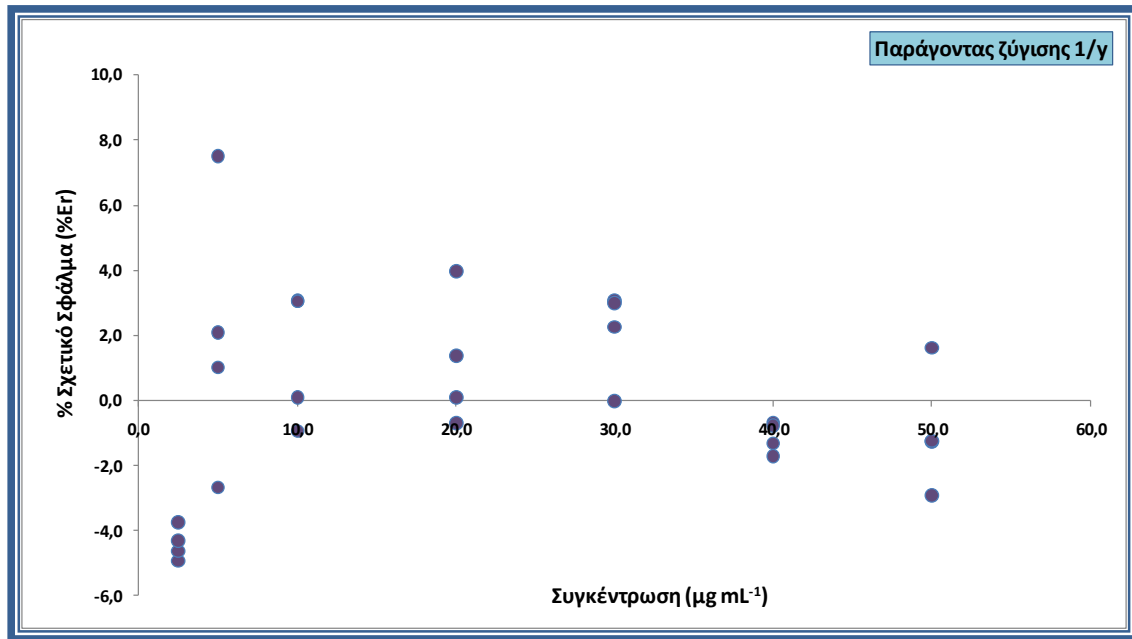


Σχήμα 8.9: Διάγραμμα % σχετικού σφάλματος της πειραματικά υπολογιζόμενης συγκέντρωσης του σαλικυλικού οξέος συναρτήσει της θεωρητικής συγκέντρωσης για το ζυγισμένο γραμμικό μοντέλο με παράγοντα ζύγισης 1/x

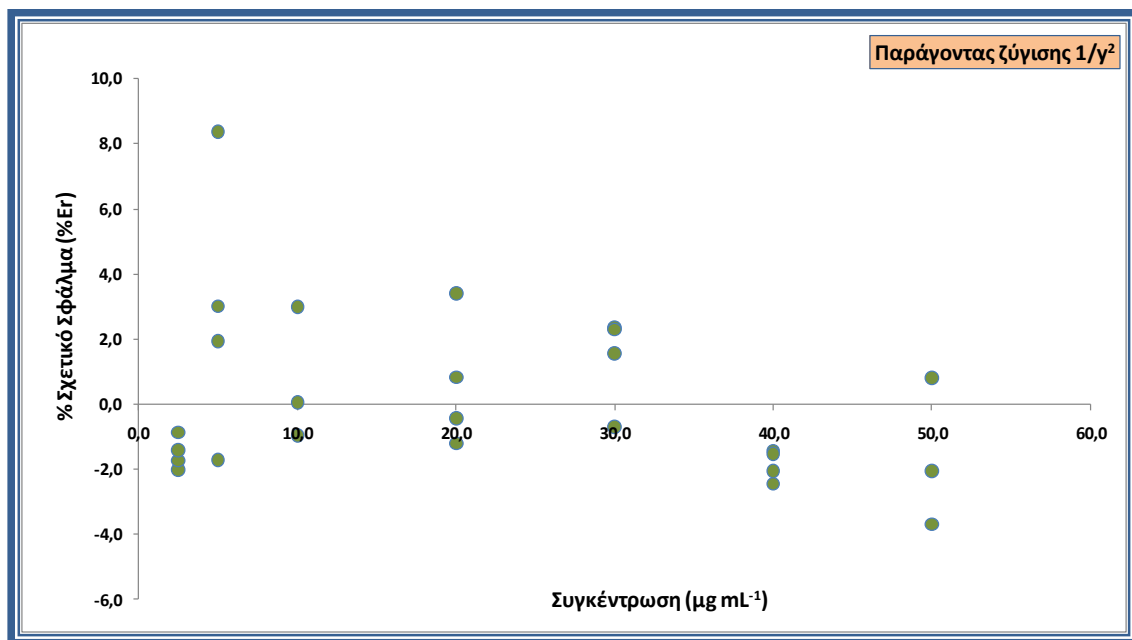


Σχήμα 8.10: Διάγραμμα % σχετικού σφάλματος της πειραματικά υπολογιζόμενης συγκέντρωσης του σαλικυλικού οξέος συναρτήσει της θεωρητικής συγκέντρωσης για το ζυγισμένο γραμμικό μοντέλο με παράγοντα ζύγισης 1/x²

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Σαλικυλικό Οξύ



Σχήμα 8.11: Διάγραμμα % σχετικού σφάλματος της πειραματικά υπολογιζόμενης συγκέντρωσης του σαλικυλικού οξέος συναρτήσει της θεωρητικής συγκέντρωσης για το ζυγισμένο γραμμικό μοντέλο με παράγοντα ζύγισης $1/\gamma$



Σχήμα 8.12: Διάγραμμα % σχετικού σφάλματος της πειραματικά υπολογιζόμενης συγκέντρωσης του σαλικυλικού οξέος συναρτήσει της θεωρητικής συγκέντρωσης για το ζυγισμένο γραμμικό μοντέλο με παράγοντα ζύγισης $1/\gamma^2$

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Σαλικυλικό Οξύ

Πίνακας 8.3: Ολικό άθροισμα του % σχετικού σφάλματος ($\Sigma\%E_r$) για κάθε παράγοντα ζύγισης

Παράγοντας ζύγισης	$\Sigma\%E_r$ (N=28 (7x4))
-	91,5
1/x	63,4
1/x ²	56,0
1/y	64,0
1/y ²	57,9

Στον Πίνακα 8.4 που ακολουθεί παρουσιάζεται η σύγκριση ανάμεσα στο μη ζυγισμένο γραμμικό μοντέλο και στο ζυγισμένο γραμμικό μοντέλο με συντελεστή στατιστικού βάρους 1/x² που τελικά επιλέχθηκε. Παρουσιάζονται η μέση τιμή της πειραματικά υπολογιζόμενης συγκέντρωσης για κάθε σημείο της καμπύλης από το σύνολο των τεσσάρων μετρήσεων σε κάθε επίπεδο και το % σχετικό αναλυτικό σφάλμα που προκύπτει συγκρίνοντας τη μέση τιμή με τη θεωρητική συγκέντρωση. Όπως φαίνεται και στον πίνακα για το μη ζυγισμένο μοντέλο παρατηρείται μια υποεκτίμηση της συγκέντρωσης του πρώτου σημείου της καμπύλης αναφοράς.

Πίνακας 8.4: Σύγκριση απλού και ζυγισμένου 1/x² γραμμικού μοντέλου ως προς το % σχετικό σφάλμα ($\%E_r$) των υπολογιζόμενων από την εξίσωση συγκεντρώσεων για κάθε σημείο της καμπύλης βαθμονόμησης

Γραμμικό μοντέλο	Χωρίς ζύγιση		Με ζύγιση 1/x ²	
	Μέση πειραματική συγκέντρωση (N=4) (μg mL ⁻¹)	$\%E_r$	Μέση πειραματική συγκέντρωση (N=4) (μg mL ⁻¹)	$\%E_r$
2,5	2,21	-11,7	2,46	-1,4
5	4,94	-1,2	5,14	2,8
10	10,02	0,2	10,11	1,1
20	20,22	1,1	20,09	0,5
30	30,70	2,3	30,36	1,2
40	39,71	-0,7	39,18	-2,1
50	49,77	-0,5	49,03	-1,9

8.8.1.4. Έλεγχος γραμμικότητας μεθόδου

Για την αξιολόγηση της γραμμικότητας της μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού του σαλικυλικού οξέος παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν έξι καμπύλες αναφοράς σε ξεχωριστές εργαστηριακές ημέρες. Η στατιστική επεξεργασία των αναλυτικών δεδομένων και η εξαγωγή των εξισώσεων παλινδρόμησης έγινε με εφαρμογή ζυγισμένης γραμμικής ανάλυσης παλινδρόμησης με συντελεστή στατιστικού βάρους τον όρο 1/x² που πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του στατιστικού προγράμματος SPSS 10.0 for Windows. Στο [Παράρτημα 20](#) παρουσιάζονται αναλυτικά τα αποτελέσματα για κάθε εργαστηριακή ημέρα, ενώ στον Πίνακα 8.5 που ακολουθεί παρουσιάζονται συνοπτικά οι εξισώσεις συμμεταβολής για κάθε μια από τις έξι σειρές μετρήσεων μαζί με τα όρια εμπιστοσύνης της τομής και της κλίσης και τις αντίστοιχες τιμές του συντελεστή συσχέτισης, του τυπικού σφάλματος και των τυπικών αποκλίσεων για την τομή και την κλίση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Σαλικυλικό Οξύ

Πίνακας 8.5: Αποτελέσματα στατιστικής επεξεργασίας των καμπυλών αναφοράς του σαλικυλικού οξέος σε εμβολιασμένα δείγματα ούρων για κάθε έναν από τους έξι προσδιορισμούς για τον έλεγχο γραμμικότητας της μεθόδου

ΣΕΙΡΑ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ	ΕΞΙΣΩΣΗ ¹ ΠΑΛΙΝΔΡΟΜΗΣΗΣ	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ		ΟΡΙΑ ΕΜΠΙΣΤΟΣΥΝΗΣ ΤΟΜΗΣ ²		ΟΡΙΑ ΕΜΠΙΣΤΟΣΥΝΗΣ ΚΛΙΣΗΣ ³		r ⁴	r ²⁵	ΤΥΠΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ
		ΤΟΜΗΣ (s _a)	ΚΛΙΣΗΣ (s _b)	min	max	min	max			
1	$y = 0,05720 x + 0,0230$	0,0035	0,00061	0,0143	0,0317	0,05566	0,05874	0,9997	0,9994	0,0012
2	$y = 0,05811 x + 0,0308$	0,0041	0,00071	0,0203	0,0413	0,05628	0,05994	0,9996	0,9992	0,0014
3	$y = 0,05618 x + 0,0314$	0,0032	0,00055	0,0232	0,0396	0,05477	0,05759	0,9998	0,9995	0,0011
4	$y = 0,05527 x + 0,0292$	0,0043	0,00076	0,0181	0,0403	0,05332	0,05722	0,9995	0,9991	0,0015
5	$y = 0,05710 x + 0,0240$	0,0049	0,00085	0,0114	0,0366	0,05491	0,05929	0,9994	0,998	0,0017
6	$y = 0,05581 x + 0,0166$	0,0044	0,00077	0,0053	0,0279	0,05383	0,05779	0,9995	0,9990	0,0015

¹ Λόγος επιφανειών σαλικυλικού οξέος/4-μεθυλοσαλικυλικού οξέος (y) συναρτήσει συγκέντρωσης σαλικυλικού οξέος (x), ελήφθησαν με εφαρμογή ζυγισμένης γραμμικής ανάλυσης παλινδρόμησης (συντελεστής ζύγισης 1/x²)

² $a \pm s_a$ t_{θεωρητικό} (t_{θεωρητικό}=2.571, στάθμη εμπιστοσύνης 95% και 5 (N-2) βαθμοί ελευθερίας)

³ $b \pm s_b$ t_{θεωρητικό} (t_{θεωρητικό}=2.571, στάθμη εμπιστοσύνης 95% και 5 (N-2) βαθμοί ελευθερίας)

⁴ r: συντελεστής συσχέτισης

⁵ r²: συντελεστής προσδιορισμού (τετράγωνο συντελεστή συσχέτισης)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Σαλικυλικό Οξύ

Διαπιστώθηκε ικανοποιητική γραμμικότητα καθώς η τιμή του συντελεστή συσχέτισης βρέθηκε μεγαλύτερη από 0,9994, ενώ για όλα τα πρότυπα της καμπύλης αναφοράς, το επί τοις εκατό σχετικό σφάλμα των πειραματικά υπολογιζόμενων συγκεντρώσεων δεν ξεπέρασε την τιμή $\pm 10\%$.

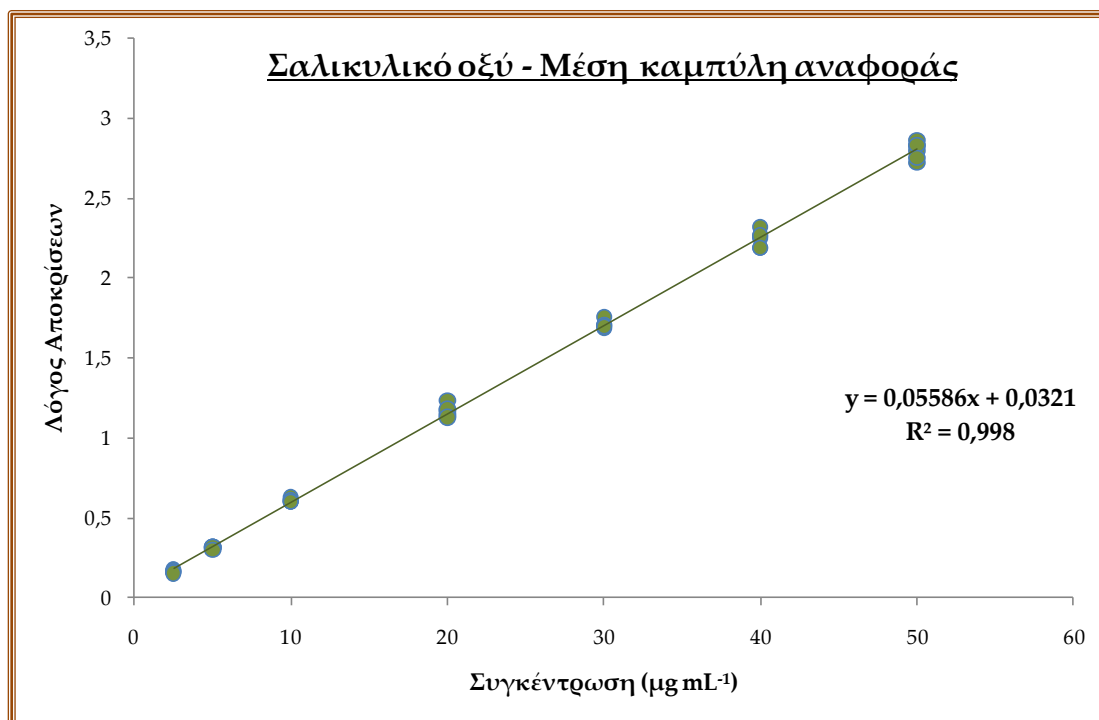
Τέλος, πραγματοποιήθηκε έλεγχος διέλευσης των καμπυλών αναφοράς από την αρχή των αξόνων και συγκεκριμένα εφαρμογή της δοκιμασίας Student (t-test) προκειμένου να διαπιστωθεί εάν οι πειραματικές τιμές της τομής των εξισώσεων συσχέτισης διαφέρουν σημαντικά από το μηδέν. Για το σκοπό αυτό, υπολογίστηκε η πειραματική τιμή t ($t_{\text{πειρ.}}$) από τη σχέση $t_{\text{πειρ.}} = \alpha/s_{\alpha}$, όπου α , η τομή της εκάστοτε εξίσωσης συμμεταβολής και s_{α} , η αντίστοιχη τυπική απόκλιση. Η τιμή $t_{\text{πειρ.}}$ στη συνέχεια συγκρίθηκε με τη θεωρητική τιμή $t_{\text{θεωρ.}}$ από τον πίνακα της κατανομής Student για στάθμη εμπιστοσύνης 95% και για N-2 βαθμούς ελευθερίας (όπου N, ο αριθμός των προτύπων της καμπύλης αναφοράς). Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα του Πίνακα 8.6 οι υπολογισθείσες τιμές του τλόγου $t_{\text{πειρ.}}$ υπερβαίνουν και για τις 6 αναλυτικές δοκιμασίες την θεωρητική τιμή που για 5 βαθμούς ελευθερίας και σταθμη εμπιστοσύνης 95% είναι ίση με 2,571. Αυτό συνεπάγεται ότι η τομή σε όλες τις καμπύλες βαθμονόμησης διαφέρει σημαντικά από το μηδέν (γεγονός που θα μπορούσε να αποδοθεί στην παρουσία πολύ χαμηλών συγκεντρώσεων σαλικυλικού οξέος στα τυφλά δείγματα ούρων που εμβολιάστηκαν για την παρασκευή των προτύπων δειγμάτων) και επομένως ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του σαλικυλικού οξέος σε ύποπτα ούρα αλόγων μπορεί να γίνει με την τεχνική της καμπύλης αναφοράς και όχι με εφαρμογή ποσοτικοποίησης σημείου (ποσοτικοποίηση με ανάλυση προτύπων δειγμάτων εμβολιασμένων σε ένα επίπεδο συγκέντρωσης).

Πίνακας 8.6: Έλεγχος διέλευσης των καμπυλών βαθμονόμησης του σαλικυλικού οξέος από την αρχή των αξόνων

Σειρά Μετρήσεων	Τομή (α)	Τυπική απόκλιση (s_{α})	$t_{\text{πειρ.}}$ (α/s_{α})
1	0,0230	0,0035	6,76
2	0,0308	0,0041	7,51
3	0,0314	0,0032	9,81
4	0,0292	0,0043	6,79
5	0,0240	0,0049	4,90
6	0,0166	0,0044	3,77

Στον Σχήμα 8.13 απεικονίζεται η μέση καμπύλη για το σαλικυλικό οξύ και για τις έξι σειρές μετρήσεων και στον Πίνακα 8.7 παρουσιάζονται τα στατιστικά δεδομένα για τη μέση καμπύλη.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Σαλικυλικό Οξύ



Σχήμα 8.13: Μέση καμπύλη βαθμονόμησης που προκύπτει από τις έξι αναλυτικές δοκιμασίες για το σαλικυλικό οξύ

Πίνακας 8.7: Αποτελέσματα στατιστικής επεξεργασίας μέσης καμπύλης σαλικυλικού οξέος

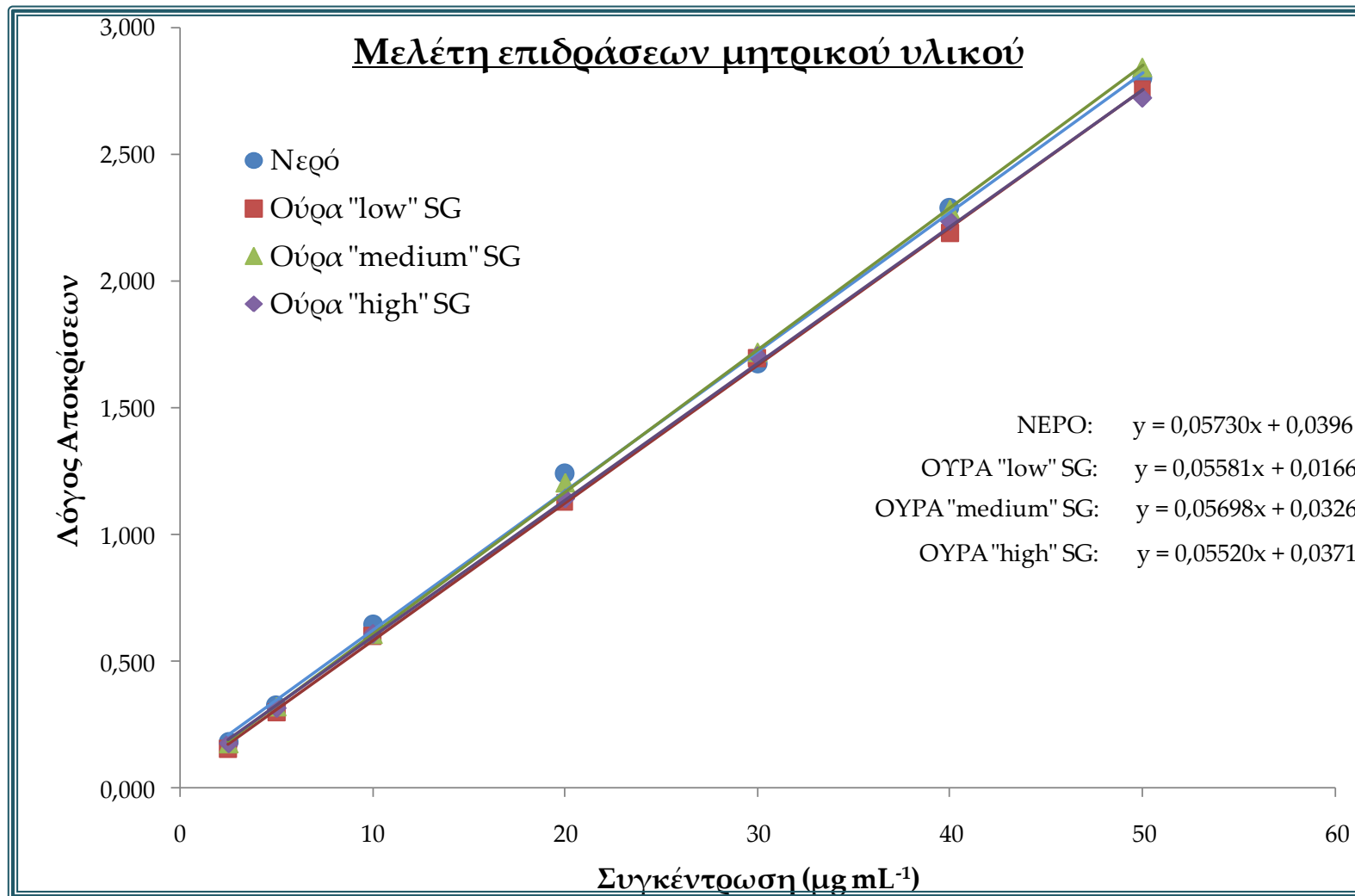
Παράμετρος	Τιμή
Εξίσωση παλινδρόμησης	$y = 0,05586 + 0,0321$
Τυπική απόκλιση	τομής (s_a)
	κλίσης (s_b)
Όρια εμπιστοσύνης τομής	min
	max
Όρια εμπιστοσύνης κλίσης	min
	max
r	0,9995
r ²	0,998
Τυπικό σφάλμα	0,0069
α/s_α	8,23

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Σαλικυλικό Οξύ

8.8.2. Μελέτη επιδράσεων από το υπόστρωμα

Η αναπτυχθείσα μεθοδολογία βασίζεται στην απευθείας LC/MS ανάλυση δειγμάτων ούρων αλόγων. Αν και η κατεργασία των δειγμάτων περιλαμβάνει αραίωση των ούρων με συντελεστή αραίωσης 1: 900, κρίθηκε αναγκαία η μελέτη των επιδράσεων από το υπόστρωμα, δεδομένου ότι τα ούρα αλόγων αποτελούν ένα ιδιαίτερα πολύπλοκο μητρικό υλικό με σημαντικές διαφοροποιήσεις από το ένα δείγμα στο άλλο.

Στην παρούσα εργασία, για την αξιολόγηση του φαινομένου της επίδρασης του μητρικού υλικού παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν καμπύλες αναφοράς του σαλικυλικού οξέος σε εύρος συγκεντρώσεων 2,5 – 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ σε εμβολιασμένα δείγματα τριών διαφορετικών παρτίδων ούρων (χαμηλού, μεσαίου και υψηλού ειδικού βάρους), καθώς και σε υδατικά δείγματα. Διαπιστώθηκε ότι η τιμή της κλίσης των καμπυλών αναφοράς δεν παρουσιάζει σημαντική διακύμανση μεταξύ των διαφορετικών παρτίδων ούρων και των δειγμάτων σε νερό (Σχήμα 8.14). Στον Πίνακα 8.8 παρουσιάζονται συνοπτικά τα αποτελέσματα αξιολόγησης της επίδρασης του υποστρώματος στην απόκριση του σαλικυλικού οξέος και του εσωτερικού προτύπου καθώς και στο λόγο των αποκρίσεων του αναλύτη προς του εσωτερικού προτύπου για τρία επίπεδα συγκέντρωσης (χαμηλή, μεσαία, υψηλή συγκέντρωση προτύπων δειγμάτων). Οι τιμές της απόκρισης και της σχετικής απόκρισης στα διαφορετικά δείγματα ούρων παρουσιάζονται κανονικοποιημένες ως προς τις αντίστοιχες τιμές που ελήφθησαν από την ανάλυση των υδατικών δειγμάτων. Όπως φαίνεται και από τα αποτελέσματα του πίνακα η υψηλής αναλογίας αραίωση των δειγμάτων ούρων είχε ως αποτέλεσμα την μείωση του φαινομένου της ιοντικής καταστολής, δίνοντας επαναλήψιμες τιμές απόκρισης μεταξύ διαφορετικών υποστρωμάτων για όλο το εύρος των μελετούμενων επιπέδων συγκέντρωσης. Επομένως, η ποσοτικοποίηση του σαλικυλικού οξέος σε ύποπτα δείγματα αλόγων μπορεί να πραγματοποιηθεί με την τεχνική της καμπύλης αναφοράς χρησιμοποιώντας ένα μίγμα λευκών δειγμάτων ούρων (pooled urine) για την παρασκευή των προτύπων δειγμάτων και των δειγμάτων ελέγχου.



Σχήμα 8.14: Καμπύλες αναφοράς σαλικυλικού οξέος σε νερό και διαφορετικά δείγματα ούρων

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Σαλικυλικό Οξύ

ΠΙΝΑΚΑΣ 8.8: Αποτελέσματα της μελέτης επίδρασης του μητρικού υλικού στην απόκριση μετά από παρασκευή και ανάλυση καμπυλών αναφοράς του σαλικυλικού οξέος σε υδατικά δείγματα και σε δείγματα ούρων χαμηλού ('low'), μεσαίου ('medium') και υψηλού ('high') ειδικού βάρους (specific gravity, SG). Οι τιμές των απόλυτων και σχετικών αποκρίσεων για τα δείγματα ούρων παρουσιάζονται κανονικοποιημένες ως προς τις αντίστοιχες τιμές των υδατικών δειγμάτων.

Υπόστρωμα	Συγκέντρωση σαλικυλικού οξέος									Κλίση (b)
	Πρότυπο δείγμα (STD) 2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$			Πρότυπο δείγμα (STD) 20,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$			Πρότυπο δείγμα (STD) 50,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$			
	Επιφάνεια SA	Επιφάνεια IS	Λόγος Επιφανειών	Επιφάνεια SA	Επιφάνεια IS	Λόγος Επιφανειών	Επιφάνεια SA	Επιφάνεια IS	Λόγος Επιφανειών	
Νερό	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0,05730
Ούρα 'low' SG	84	92	91	91	100	91	99	101	98	0,05581
Ούρα 'medium' SG	88	91	97	94	97	97	99	98	102	0,05698
Ούρα 'high' SG	86	89	97	90	98	92	91	94	97	0,05520
%RSD	7,9	5,2	3,8	4,7	1,7	4,5	4,5	3,4	2,0	1,7

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Σαλικυλικό Οξύ

8.8.3. Έλεγχος Ορθότητας (Accuracy) και Πιστότητας (Precision)

Η ορθότητα και η πιστότητα αποτελούν κύρια χαρακτηριστικά ποιότητας των μεθόδων ποσοτικού προσδιορισμού και ο υπολογισμός τους είναι απαραίτητος για την αξιολόγηση και την επικύρωση των μεθόδων αυτών. Πραγματοποιήθηκε έλεγχος της ορθότητας και της πιστότητας της προτεινόμενης μεθόδου, τόσο κατά τη διάρκεια μιας εργαστηριακής ημέρας (within-day ή intra-day accuracy and precision), όσο και διά των ημερών (between-days ή inter-day accuracy and precision). Για τον έλεγχο αυτό παρασκευάστηκαν εμβολιασμένα δείγματα ελέγχου (quality control samples, QC's) σε αραιωμένα λευκά ούρα αλόγων, τα οποία κατεργάστηκαν και αναλύθηκαν όπως ακριβώς και τα εμβολιασμένα δείγματα των καμπυλών αναφοράς. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, για την παρασκευή των δειγμάτων ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα παρακαταθήκης και εργασίας του σαλικυλικού οξέος ξεχωριστά από αυτά που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των προτύπων δειγμάτων βαθμονόμησης. Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε σε τέσσερα επίπεδα συγκέντρωσης (3,0, 7,5, 25,0 και 45,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Σε κάθε επίπεδο συγκέντρωσης παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν έξι δείγματα κάθε εργαστηριακή ημέρα, ενώ ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε σε έξι εργαστηριακές ημέρες (36 συνολικά μετρήσεις ανα επίπεδο συγκέντρωσης). Οι πειραματικά υπολογιζόμενες συγκεντρώσεις των δειγμάτων ελέγχου που αναλύθηκαν κατά την αξιολόγηση της μεθόδου και χρησιμοποιήθηκαν για την εξαγωγή των στατιστικών παραμέτρων της ορθότητας και της πιστότητας που θα παρουσιαστούν στη συνέχεια αναφέρονται αναλυτικά στο [Παράρτημα 21](#).

8.8.3.1. Ορθότητα (Accuracy)

Η ορθότητα αποτελεί μέτρο της εγγύτητας της πειραματικά μετρούμενης τιμής προς την πραγματική συγκέντρωση του αναλύτη (αληθινή τιμή). Ως μέτρο έκφρασης της ορθότητας χρησιμοποιείται το επί τοις εκατό σχετικό σφάλμα (%Relative Error, %E_r), που υπολογίστηκε από την εξίσωση [8.5].

Αξιολογήθηκε η ορθότητα της μεθόδου, τόσο με έλεγχο της ορθότητας εντός της κάθε δοκιμασίας, όσο και μεταξύ των ημερών.

Σε κάθε εργαστηριακή σειρά ανάλυσης υπολογίστηκαν για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης:

- η μέση τιμή των πειραματικά υπολογιζόμενων συγκεντρώσεων των 6 δειγμάτων ελέγχου
- η τυπική απόκλιση (SD) αυτών και η επί τοις εκατό σχετική τυπική απόκλιση (%RSD)
- το επί τοις εκατό σχετικό σφάλμα (%E_r)

Ως κριτήριο αποδοχής της ορθότητας λαμβάνονται τα όρια της μέσης τιμής της πειραματικά υπολογιζόμενης συγκέντρωσης που θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ του 85 και 115% της αντίστοιχης θεωρητικής τιμής ($-15 < \%E_r < +15$) για κάθε επίπεδο που μελετήθηκε.

Τα αποτελέσματα της ορθότητας για κάθε αναλυτική δοκιμασία συνοψίζονται στους Πίνακες 8.9-8.14 και για το σύνολο των εργαστηριακών ημερών στον Πίνακα 8.15.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Σαλικυλικό Οξύ

Πίνακας 8.9: Αξιολόγηση ορθότητας μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού του σαλικυλικού οξέος κατά την 1^η σειρά μετρήσεων

1^η ΣΕΙΡΑ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ				
Επίπεδο Συγκέντρωσης ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		Μέση τιμή \pm SD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	%RSD	%E _r
1	3,0	3,042 \pm 0,065	2,1	1,4
2	7,5	7,78 \pm 0,18	2,3	3,8
3	25,0	25,10 \pm 0,69	2,8	0,4
4	45,0	43,9 \pm 1,2	2,7	-2,5

Πίνακας 8.10: Αξιολόγηση ορθότητας μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού του σαλικυλικού οξέος κατά την 2^η σειρά μετρήσεων

2^η ΣΕΙΡΑ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ				
Επίπεδο Συγκέντρωσης ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		Μέση τιμή \pm SD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	%RSD	%E _r
1	3,0	3,007 \pm 0,072	2,4	0,2
2	7,5	7,679 \pm 0,036	0,5	2,4
3	25,0	25,09 \pm 0,49	1,9	0,4
4	45,0	47,2 \pm 2,1	4,5	4,8

Πίνακας 8.11: Αξιολόγηση ορθότητας μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού του σαλικυλικού οξέος κατά την 3^η σειρά μετρήσεων

3^η ΣΕΙΡΑ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ				
Επίπεδο Συγκέντρωσης ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		Μέση τιμή \pm SD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	%RSD	%E _r
1	3,0	2,915 \pm 0,093	3,2	-2,8
2	7,5	7,68 \pm 0,12	1,6	2,3
3	25,0	25,08 \pm 0,60	2,4	0,3
4	45,0	44,49 \pm 0,41	0,9	-1,1

Πίνακας 8.12: Αξιολόγηση ορθότητας μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού του σαλικυλικού οξέος κατά την 4^η σειρά μετρήσεων

4^η ΣΕΙΡΑ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ				
Επίπεδο Συγκέντρωσης ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		Μέση τιμή \pm SD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	%RSD	%E _r
1	3,0	2,979 \pm 0,074	2,5	-0,7
2	7,5	7,64 \pm 0,16	2,1	1,8
3	25,0	24,78 \pm 0,33	1,3	-0,9
4	45,0	44,08 \pm 0,80	1,8	-2,0

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Σαλικυλικό Οξύ

Πίνακας 8.13: Αξιολόγηση ορθότητας μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού του σαλικυλικού οξέος κατά την 5^η σειρά μετρήσεων

5 ^η ΣΕΙΡΑ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ				
Επίπεδο Συγκέντρωσης ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		Μέση τιμή \pm SD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	%RSD	%E _r
1	3,0	3,021 \pm 0,030	1,0	0,7
2	7,5	7,95 \pm 0,26	3,3	6,0
3	25,0	24,74 \pm 0,34	1,4	-1,1
4	45,0	43,83 \pm 0,48	1,1	-2,6

Πίνακας 8.14: Αξιολόγηση ορθότητας μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού του σαλικυλικού οξέος κατά την 6^η σειρά μετρήσεων

6 ^η ΣΕΙΡΑ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ				
Επίπεδο Συγκέντρωσης ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		Μέση τιμή \pm SD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	%RSD	%E _r
1	3,0	3,116 \pm 0,051	1,6	3,9
2	7,5	7,74 \pm 0,21	2,7	3,3
3	25,0	25,03 \pm 0,26	1,1	0,1
4	45,0	43,68 \pm 0,69	1,6	-2,9

Πίνακας 8.15: Αξιολόγηση ορθότητας μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού του σαλικυλικού οξέος σε τέσσερα επίπεδα συγκεντρώσεων και για τις έξι αναλυτικές δοκιμασίες

1 ^η - 6 ^η ΣΕΙΡΑ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ				
Επίπεδο Συγκέντρωσης ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		Μέση τιμή \pm SD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	%RSD	%E _r
1	3,0	3,013 \pm 0,067	2,2	-0,1
2	7,5	7,74 \pm 0,11	1,5	3,3
3	25,0	24,97 \pm 0,17	0,7	-0,1
4	45,0	44,5 \pm 1,3	3,0	-1,3

Όπως διαπιστώνεται από τους παραπάνω πίνακες η απόλυτη τιμή του επί τοις εκατό σχετικού σφάλματος κυμαίνεται από 0,2 % έως 6,0 %, δηλαδή εντός των αποδεκτών ορίων και επομένως η μέθοδος χαρακτηρίζεται από ορθότητα τόσο εντός της ημέρας όσο και δια των ημερών.

8.8.3.2. Πιστότητα

Η πιστότητα εκφράζει την εγγύτητα μεταξύ των αποτελεσμάτων μιας σειράς ανεξάρτητων εφαρμογών της μεθόδου υπό αυστηρά καθορισμένες συνθήκες και εκφράζεται συνήθως με την τυπική απόκλιση (SD), με την σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) ή με το εύρος του διαστήματος εμπιστοσύνης. Για την αξιολόγηση της μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού του σαλικυλικού οξέος σε ούρα αλόγων μελετήθηκε τόσο η εντός της ημέρας πιστότητα (intra-day ή within-day precision), όσο και η μεταξύ των ημερών πιστότητα (inter-day ή

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Σαλικυλικό Οξύ

between-days precision) και ως μέτρο αυτής χρησιμοποιήθηκε η επί τοις εκατό σχετική τυπική απόκλιση (% RSD). Για την εξαγωγή των στατιστικών παραμέτρων χρησιμοποιήθηκε η μονόδρομη ανάλυση διακύμανσης (one way ANOVA).

Για τον υπολογισμό της εντός της ημέρας επί τοις εκατό σχετικής τυπικής απόκλισης (%RSD_{intra-day}) εφαρμόστηκε η εξίσωση:

$$\% RSD_{intra-day} = 100 \times \frac{\sqrt{\text{μέσο τετράγωνο}_{intra-day}}}{\text{ολική μέση τιμή}} \quad [8.6]$$

Η μεταξύ των ημερών επί τοις εκατό σχετική τυπική απόκλιση (%RSD_{inter-day}) υπολογίστηκε από την εξίσωση:

$$\% RSD_{inter-day} = 100 \times \frac{\sqrt{\frac{\text{μέσο τετράγωνο}_{inter-day} - \text{μέσο τετράγωνο}_{intra-day}}{6}}}{\text{ολική μέση τιμή}} \quad [8.7]$$

Οι υπολογισμοί σε κάθε επίπεδο συγκέντρωσης έγιναν για 35 βαθμούς ελευθερίας, που αντιστοιχούν στις 36 αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν συνολικά (6 προσδιορισμοί ανά ημέρα x 6 ημέρες).

Το κριτήριο αποδοχής των αποτελεσμάτων πιστότητας λαμβάνεται για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης με εφαρμογή της εξίσωσης Horwitz, σύμφωνα με την οποία:

$$\% RSD_{max} = 2^{(1-0.5 \times \log C)} \quad [8.8]$$

όπου C, η θεωρητική συγκέντρωση του σαλικυλικού οξέος ($\mu\text{g mL}^{-1}$)

Οι τιμές της εντός της ημέρας και διά των ημερών σχετικής τυπικής απόκλισης δε θα πρέπει να υπερβαίνουν τις τιμές $2/3 RSD_{max}$ και RSD_{max} αντίστοιχα.

Τα αποτελέσματα αξιολόγησης της πιστότητας για τα τέσσερα επίπεδα συγκέντρωσης που μελετήθηκαν συνοψίζονται στον Πίνακα 8.16 που ακολουθεί. Η εντός της ημέρας και δια των ημερών τιμές RSD δεν ξεπέρασαν τις τιμές 2,5 % και 2,8 %, αντίστοιχα και για τα τέσσερα επίπεδα συγκέντρωσης βρέθηκαν εντός των αποδεκτών ορίων που υπολογίστηκαν από την εξίσωση Horwitz.

Επιπρόσθετα, σε κάθε αναλυτική δοκιμασία εφαρμόστηκε για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης η δοκιμασία Q του Dixon, με σκοπό να ελεγχθεί η ύπαρξη τυχόν έκτροπων τιμών. Για το σκοπό, αυτό τα αποτελέσματα των μετρήσεων κάθε ημέρας τοποθετήθηκαν κατά αύξουσα σειρά ($x_1 < x_2 < x_3 \dots < x_6$) και υπολογίστηκαν οι τιμές $Q_{πειρ, \min}$ και $Q_{πειρ, \max}$ για την ελάχιστη (x_1) και τη μέγιστη (x_6) τιμή, αντίστοιχα και συγκρίθηκαν με την κρίσιμη τιμή $Q_{θεωρ.}$ για στάθμη εμπιστοσύνης 95%.

$$Q_{πειραμ. \min} = \frac{x_2 - x_1}{x_6 - x_1} \quad [8.9] \quad \text{και} \quad Q_{πειραμ. \max} = \frac{x_6 - x_5}{x_6 - x_1} \quad [8.10]$$

εάν $Q_{πειραμ.} > Q_{θεωρ.}$ τότε η τιμή χαρακτηρίζεται ως έκτροπη και μπορεί να απορριφθεί σε δεδομένη στάθμη εμπιστοσύνης. Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας ανίχνευσης έκτροπων τιμών για κάθε μία δοκιμασία παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.17.

Πίνακας 8.16: Αξιολόγηση πιστότητας μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού του σαλικυλικού οξέος σε ούρα αλόγων

Σειρά Μετρήσεων		$C_{\theta\epsilon\omega\rho.} (\mu\text{g mL}^{-1})$				
		3,0	7,5	25	45	
1		3,042 ± 0,065	7,78 ± 0,18	25,10 ± 0,69	43,9 ± 1,2	
2		3,007 ± 0,072	7,679 ± 0,036	25,09 ± 0,49	47,2 ± 2,1	
3	$C_{\text{πειραμ}} \pm \text{SD}$ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	2,915 ± 0,093	7,68 ± 0,12	25,08 ± 0,60	44,49 ± 0,41	
4		2,979 ± 0,074	7,64 ± 0,16	24,78 ± 0,33	44,08 ± 0,80	
5		3,021 ± 0,030	7,95 ± 0,26	24,74 ± 0,34	43,83 ± 0,48	
6		3,116 ± 0,051	7,74 ± 0,21	25,03 ± 0,26	43,68 ± 0,69	
Ολική μέση τιμή (overall mean)		3,013	7,745	24,97	44,53	
Αριθμός μετρήσεων (n)		36	36	36	36	
Μέσο τετράγωνο intra-day ($MS_{\text{intra-day}}$) ¹		0,0045	0,0308	0,2279	1,2429	
Μέσο τετράγωνο inter-day ($MS_{\text{inter-day}}$) ¹		0,0267	0,0771	0,1699	10,6189	
Εντός της ημέρας % σχετική τυπική απόκλιση ($\%RSD_{\text{intra-day}}$)		2,2	2,3	1,9	2,5	
Μεταξύ των ημερών % σχετική τυπική απόκλιση ($\%RSD_{\text{inter-day}}$)		2,0	1,1	-	2,8	
Κριτήρια Αποδοχής	$\%RSD_{\text{intra max}}$ ²	9,1	7,9	6,6	6,0	
	$\%RSD_{\text{inter max}}$ ²	13,6	11,8	9,9	9,0	

¹ Εντός της ημέρας και δια των ημερών μέσα τετράγωνα, υπολογίστηκαν με την εφαρμογή one-way ANOVA

² Μέγιστη αποδεκτή τιμή, υπολογίστηκε με εφαρμογή της εξίσωσης Horwitz

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών
Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Σαλικυλικό Οξύ**

Πίνακας 8.17: Εφαρμογή δοκιμασίας Q για την ανίχνευση έκτροπων τιμών

1^η ΣΕΙΡΑ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ						
Επίπεδο Συγκέντρωσης ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Αριθμός μετρήσεων	$Q_{\text{πειρ,min}}$	$Q_{\text{πειρ,max}}$	Κρίσιμη τιμή ($Q_{\text{θεωρ.}}$)	Έκτροπη τιμή	
1	3,0	6	0,310	0,111	0,625	✗
2	7,5	6	0,443	0,070	0,625	✗
3	25,0	6	0,148	0,374	0,625	✗
4	45,0	6	0,488	0,282	0,625	✗
2^η ΣΕΙΡΑ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ						
Επίπεδο Συγκέντρωσης ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Αριθμός μετρήσεων	$Q_{\text{πειρ,min}}$	$Q_{\text{πειρ,max}}$	Κρίσιμη τιμή ($Q_{\text{θεωρ.}}$)	Έκτροπη τιμή	
1	3,0	6	0,119	0,046	0,625	✗
2	7,5	6	0,077	0,235	0,625	✗
3	25,0	6	0,253	0,009	0,625	✗
4	45,0	6	0,162	0,474	0,625	✗
3^η ΣΕΙΡΑ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ						
Επίπεδο Συγκέντρωσης ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Αριθμός μετρήσεων	$Q_{\text{πειρ,min}}$	$Q_{\text{πειρ,max}}$	Κρίσιμη τιμή ($Q_{\text{θεωρ.}}$)	Έκτροπη τιμή	
1	3,0	6	0,133	0,078	0,625	✗
2	7,5	6	0,111	0,199	0,625	✗
3	25,0	6	0,186	0,180	0,625	✗
4	45,0	6	0,212	0,189	0,625	✗
4^η ΣΕΙΡΑ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ						
Επίπεδο Συγκέντρωσης ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Αριθμός μετρήσεων	$Q_{\text{πειρ,min}}$	$Q_{\text{πειρ,max}}$	Κρίσιμη τιμή ($Q_{\text{θεωρ.}}$)	Έκτροπη τιμή	
1	3,0	6	0,232	0,097	0,625	✗
2	7,5	6	0,209	0,759	0,625	1 έκτροπη τιμή
3	25,0	6	0,013	0,131	0,625	✗
4	45,0	6	0,032	0,029	0,625	✗
5^η ΣΕΙΡΑ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ						
Επίπεδο Συγκέντρωσης ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Αριθμός μετρήσεων	$Q_{\text{πειρ,min}}$	$Q_{\text{πειρ,max}}$	Κρίσιμη τιμή ($Q_{\text{θεωρ.}}$)	Έκτροπη τιμή	
1	3,0	6	0,302	0,065	0,625	✗
2	7,5	6	0,197	0,323	0,625	✗
3	25,0	6	0,063	0,568	0,625	✗
4	45,0	6	0,126	0,577	0,625	✗
6^η ΣΕΙΡΑ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ						
Επίπεδο Συγκέντρωσης ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Αριθμός μετρήσεων	$Q_{\text{πειρ,min}}$	$Q_{\text{πειρ,max}}$	Κρίσιμη τιμή ($Q_{\text{θεωρ.}}$)	Έκτροπη τιμή	
1	3,0	6	0,339	0,009	0,625	✗
2	7,5	6	0,033	0,333	0,625	✗
3	25,0	6	0,271	0,010	0,625	✗
4	45,0	6	0,548	0,115	0,625	✗

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Σαλικυλικό Οξύ

8.8.4. Χρωματογραφικά Χαρακτηριστικά

Λόγος σήματος προς θόρυβο (Signal to noise ratio, S/N)

Από την οπτική παρατήρηση των χρωματογραφημάτων διαπιστώθηκε ότι στο χαμηλότερης συγκέντρωσης πρότυπο των καμπυλών αναφοράς ($2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) ισχύει $S/N \gg 10$ (ύψος χρωματογραφικής κορυφής του σαλικυλικού οξέος σε αυθαίρετες μονάδες προς το ύψος της γραμμής βάσης πριν την αρχή της κορυφής σε αυθαίρετες μονάδες). Στο [Παράρτημα 22](#) παρατίθεται χρωματογράφημα δείγματος ούρων αλόγου εμβολιασμένο με τον αναλύτη σε συγκέντρωση ίση με το κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης ($2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Σχετικός χρόνος ανάσχεσης (Relative retention time, RRT)

Αντιστοιχεί στο λόγο του χρόνου ανάσχεσης του σαλικυλικού οξέος προς το χρόνο ανάσχεσης του εσωτερικού προτύπου (4-μεθυλοσαλικυλικό οξύ). Διαπιστώθηκε ότι σχετικοί χρόνοι ανάσχεσης διατηρούνται σταθεροί μεταξύ των ημερών (%RSD = 0,04, N=24).

8.8.5. Ειδικότητα (Specificity) - Παρεμποδίσεις από το υπόστρωμα (Matrix interference)

Η ειδικότητα της μεθόδου αποδεικνύεται από τα διαφορετικά διαγνωστικά ιόντα και τη διαφορά των σχετικών χρόνων ανάσχεσης των απαγορευμένων ή μη ουσιών, παρόμοιας δομής σε σχέση με το σαλικυλικό οξύ. Για τη μελέτη της ειδικότητας παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν ένα λευκό δείγμα ούρων αλόγου, ένα δείγμα ούρων εμβολιασμένο με σαλικυλικό οξύ σε συγκέντρωση $7,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (δείγμα που αντιστοιχεί στη συγκέντρωση ορίου) και τέσσερα δείγματα ούρων (spec1-spec4) εμβολιασμένα με ουσίες παραπλήσιας δομής και άλλες απαγορευμένες ουσίες. Οι ουσίες που μελετήθηκαν στον έλεγχο ειδικότητας της μεθόδου αναφέρονται αναλυτικά στο [Παράρτημα 23](#). Διαπιστώθηκε απουσία παρεμποδιστικών κορυφών στους χρόνους έκλουσης του αναλύτη και του εσωτερικού προτύπου από τις ουσίες που μελετήθηκαν. Προκειμένου να ελεγχθεί η απουσία παρεμποδίσεων από το υπόστρωμα κατεργάστηκαν και αναλύθηκαν δέκα διαφορετικά τυφλά δείγματα ούρων αλόγων και από την παρατήρηση των ληφθέντων χρωματογραφημάτων, δεν διαπιστώθηκε συνέκλουση συστατικών των ούρων στο χρόνο έκλουσης του σαλικυλικού οξέος και του εσωτερικού προτύπου.

8.8.6 Έλεγχος επιμόλυνσης εκ μεταφοράς δείγματος (Carry over)

Ο έλεγχος επιμόλυνσης εκ μεταφοράς δείγματος πραγματοποιήθηκε σε κάθε εργαστηριακή ημέρα με την ανάλυση λευκού δείγματος ούρων στην αρχή της καμπύλης αναφοράς και αμέσως μετά την ανάλυση του υψηλότερης συγκέντρωσης προτύπου της καμπύλης του σαλικυλικού οξέος ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$). Δεν παρατηρήθηκε επιμόλυνση εκ μεταφοράς δείγματος, καθώς διαπιστώθηκε ότι το σήμα στο ιοντικό χρωματογράφημα του σαλικυλικού οξέος στο μη εμβολιασμένο δείγμα ούρων που αναλύθηκε πριν και μετά την καμπύλη αναφοράς δεν παρουσίασε αξιοσημείωτη μεταβολή.

8.9. ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΣΑΛΙΚΥΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΟΥΡΩΝ ΑΛΟΓΩΝ (CONFIRMATION, IDENTIFICATION)

Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη παράγραφο, με την προτεινόμενη μέθοδο η επιβεβαίωση του σαλικυλικού οξέος στα ύποπτα δείγματα πραγματοποιείται με επανανάλυση MS/MS των κατεργασμένων δειγμάτων και παρακολούθηση της αναλογίας τριών διαγνωστικών ιόντων του αναλύτη (του αποπρωτονιωμένου μοριακού ιόντος και δύο θυγατρικών ιόντων που σχηματίζονται με απομόνωση και θραυσματοποίηση του πρώτου). Ελέγχθηκε η επαναληψιμότητα της σχετικής αναλογίας των διαγνωστικών ιόντων ως προς το κύρια σχηματιζόμενο διαγνωστικό ιόν, που αποτελεί κριτήριο για την επιβεβαίωση ύπαρξης του σαλικυλικού οξέος στο ύποπτο δείγμα. Για το σκοπό αυτό, υπολογίστηκε η σχετική αναλογία των διαγνωστικών ιόντων του αναλύτη σε 20 δείγματα εμβολιασμένα δείγματα ούρων σε συγκεντρώσεις που κάλυπταν όλη τη γραμμική περιοχή που μελετήθηκε ($2,5 - 50 \mu\text{g mL}^{-1}$), τα οποία παρασκευάστηκαν κατά το διάστημα αξιολόγησης της μεθόδου ποσοτικοποίησης και επανααναλύθηκαν με την επιβεβαιωτική μέθοδο. Οι υπολογισθείσες σχετικές αναλογίες των διαγνωστικών ιόντων του σαλικυλικού οξέος παρουσιάζονται στο [Παράρτημα 24](#). Όπως προκύπτει από τα δεδομένα του Παραρτήματος, η μέση τιμή (\pm τυπική απόκλιση) για τις σχετικές εντάσεις των ιόντων με τιμές m/z 93,0346 και 65,0397 (ως προς την ένταση του κύρια σχηματιζόμενου ιόντος με τιμή m/z 137,0244) ήταν 36,0 (\pm 3,6) και 10,7 (\pm 1,0), αντίστοιχα ($N=20$). Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι οι αναλογίες των διαγνωστικών ιόντων του σαλικυλικού οξέος παρουσιάζουν ικανοποιητική επαναληψιμότητα, ακόμα και μεταξύ των διαφορετικών επιπέδων συγκέντρωσης του αναλύτη.

Επιπρόσθετα, μελετήθηκε η ικανότητα μέτρησης ακριβούς μάζας (mass accuracy). Υπολογίστηκε το σφάλμα μάζας (τιμών m/z) των διαγνωστικών ιόντων του αναλύτη κατά τη διαδικασία επιβεβαίωσης (ανάλυση MS/MS) στα προαναφερθέντα δείγματα και βρέθηκε και βρέθηκε ότι κυμαίνεται από 1,0 – 18,5 ppm. Μικρότερες τιμές για το σφάλμα μάζας ($0,8 \pm 1,0$ ppm, $N=40$) ελήφθησαν για τα αποπρωτονιωμένα μοριακά ιόντα του σαλικυλικού οξέος και του εσωτερικού προτύπου κατά την διαδικασία ποσοτικοποίησης (ανάλυση πλήρους σάρωσης), γεγονός που βρίσκεται σε συμφωνία με τις προδιαγραφές λειτουργίας του συστήματος LC/QTOF-MS που χρησιμοποιήθηκε.

8.10. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΕ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Η προτεινόμενη μεθοδολογία για τον ποσοτικό προσδιορισμό και την επιβεβαίωση του σαλικυλικού οξέος σε ούρα αλόγων εφαρμόστηκε σε δύο ύποπτα δείγματα ούρων αλόγων, τα οποία κατά τον έλεγχο σάρωσης αντιφλεγμονωδών ουσιών που περιλαμβάνει ταυτόχρονα και ημιποσοτικοποίηση του σαλικυλικού οξέος με τη μέθοδο ρουτίνας GC/MS του Εργαστηρίου παρουσίασαν συγκεντρώσεις υψηλότερες του ορίου των $750 \mu\text{g mL}^{-1}$. Τα ύποπτα δείγματα αραιώθηκαν σε χωριστές ογκομετρικές φιάλες κατά 100 φορές και κατεργάστηκαν το καθένα εις διπλούν όπως έχει περιγραφεί σε προηγούμενη παράγραφο (προσθήκη IS και αραιώση). Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του σαλικυλικού οξέος στα ύποπτα δείγματα εφαρμόστηκε η τεχνική της καμπύλης αναφοράς επτά σημείων. Τα πρότυπα δείγματα βαθμονόμησης παρασκευάστηκαν εις διπλούν όπως και κατά την

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Σαλικυλικό Οξύ

αξιολόγηση της μεθόδου, με εμβολιασμό λευκού αραιωμένου (1/100) δείγματος ούρων, κατεργάστηκαν όπως ακριβώς και τα ύποπτα δείγματα και αναλύθηκαν το καθένα εις διπλούν. Η συγκέντρωση του σαλικυλικού οξέος στα δύο ύποπτα αραιωμένα δείγματα βρέθηκε $9,441 (\pm 0,097) \mu\text{g mL}^{-1}$ και $3,058 (\pm 0,041) \mu\text{g mL}^{-1}$, καθιστώντας το πρώτο δείγμα θετικό.

Για την επιβεβαίωση του σαλικυλικού οξέος στα ύποπτα δείγματα αναλύθηκαν τα παρακάτω δείγματα με την ακόλουθη αλληλουχία: λευκό δείγμα ούρων – ύποπτο δείγμα – λευκό δείγμα ούρων – εμβολιασμένο δείγμα ούρων συγκέντρωσης ορίου $7,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (δείγμα αναφοράς, positive control) και τα αποτελέσματα που ελήφθησαν επιβεβαίωσαν την παρουσία του σαλικυλικού οξέος σύμφωνα με τα κριτήρια που έχει θέσει ο AORC για την ανίχνευση απαγορευμένων ουσιών. Στον Πίνακα 8.18 συνοψίζονται τα αποτελέσματα της επιβεβαιωτικής ανάλυσης και για τα δύο δείγματα καθώς και τα διαγνωστικά κριτήρια που πρέπει να πληρούνται.

Πίνακας 8.18: Αποτελέσματα επιβεβαίωσης της ανίχνευσης του σαλικυλικού οξέος στα ύποπτα δείγματα ούρων

Ιόν (m/z)	Σχετική Αναλογία Ιόντων			Όρια Αποδοχής			
	Ύποπτο Δείγμα 1	Ύποπτο Δείγμα 2	Δείγμα Αναφοράς	Κριτήριο 15% (απόλυτο)		Κριτήριο 35% (σχετικό)	
				min	max	min	max
137,0244	100,0 %	100,0 %	100,0 %	85,0 %	115,0 %	65,0 %	135,0 %
93,0346	45,7 %	51,6 %	45,6 %	30,6 %	60,6 %	29,6 %	61,6 %
65,0397	14,2 %	16,0 %	13,2 %	0,0 %	28,2 %	8,6 %	17,8 %

8.11 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη, αναπτύχθηκε, αξιολογήθηκε και επικυρώθηκε μέθοδος απευθείας έγχυσης (direct injection) LC-QTOF-MS για τον ποσοτικό προσδιορισμό και την επιβεβαίωση του σαλικυλικού οξέος σε δείγματα ούρων αλόγων. Κύριο πλεονέκτημα της προτεινόμενης μεθοδολογίας έναντι αυτών που έχουν ήδη αναπτυχθεί και αναφερθεί στη βιβλιογραφία αποτελεί η απλοποιημένη και ταχεία πορεία κατεργασίας των δειγμάτων, που βασίζεται στην απευθείας έγχυση του δείγματος ούρων στο αναλυτικό σύστημα μετά από αραιώση χωρίς κάποια περαιτέρω διαδικασία καθαρισμού (π.χ εκχύλιση). Αξίζει να αναφερθεί ότι ο χρόνος που απαιτείται για την προκατεργασία μιας σειράς δειγμάτων (αποτελούμενη από τυφλό δείγμα (x1), δείγματα βαθμονόμησης (7x2), δείγματα ελέγχου (4x3) και ύποπτο δείγμα (x3), συνολικά 30 δείγματα) δεν υπερβαίνει τα 60 λεπτά. Ο χρόνος δε της ανάλυσης κάθε δείγματος με το σύστημα LC/QTOF-MS ανέρχεται μόλις σε 2 λεπτά. Ο ποσοτικός προσδιορισμός πραγματοποιείται με λειτουργία του φασματομέτρου μαζών Q/TOF-MS σε συνθήκες πλήρους σάρωσης και παρακολούθηση εντάσεων των αποπρωτονιωμένων μοριακών ιόντων του αναλύτη και του εσωτερικού προτύπου. Για την επιβεβαίωση του σαλικυλικού οξέος στα ύποπτα πραγματοποιείται επανανάλυση των ήδη παρασκευασμένων δειγμάτων σε βελτιστοποιημένες MS/MS συνθήκες του συστήματος για τη λήψη τριών διαγνωστικών ιόντων, δίνοντας αποτελέσματα που πληρούν τα διαγνωστικά

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: Σαλικυλικό Οξύ

κριτήρια που έχει θέση ο AORC ως απαραίτητη προϋπόθεση για την επιβεβαίωση μιας απαγορευμένης ουσίας σε δείγματα αλόγων. Κατά τον έλεγχο μελέτης επίδρασης του υποστρώματος στην απόκριση των αναλυτών διαπιστώθηκε ότι η αραιώση (1/900) που εφαρμόζεται στην παρούσα μεθοδολογία ελαχιστοποιεί το φαινόμενο ιοντικής καταστολής και τις υψηλού βαθμού διακυμάνσεις σήματος που παρατηρούνται συνήθως μεταξύ διαφορετικών εμβολιασμένων υποστρωμάτων ούρων αλόγων. Το γεγονός αυτό κατέστησε επιτρεπτή την εφαρμογή της καμπύλης βαθμονόμησης ως τεχνικής ποσοτικοποίησης του σαλικυλικού οξέος στα ύποπτα αραιωμένα δείγματα και η μέθοδος αξιολογήθηκε ως προς τα κύρια χαρακτηριστικά ποιότητας, δίνοντας ικανοποιητικά αποτελέσματα που την καθιστούν κατάλληλη για το σκοπό που αναπτύχθηκε και επιτρέπουν την εφαρμογή της στον έλεγχο ντόπινγκ που διενεργείται από τα διεπιστευμένα εργαστήρια για την ποσοτικοποίηση και την επιβεβαίωση του σαλικυλικού οξέος σε ούρα αλόγων. Τέλος, πραγματοποιήθηκε εφαρμογή της προτεινόμενης μεθοδολογίας στην ανάλυση δύο πραγματικών δειγμάτων. Στο σημείο αυτό, αξίζει να σημειωθεί ότι η μέθοδος επικυρώθηκε από το Εθνικό Σύστημα Διαπίστευσης (ΕΣΥΔ) και έχει ενταχθεί στο πεδίο διαπίστευσης των διαδικασιών που εφαρμόζονται στο Εργαστήριο ελέγχου ντόπινγκ του ΟΑΚΑ και αφορούν τις διαδικασίες επιβεβαιωτικής ανάλυσης σε άλογα αγώνων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

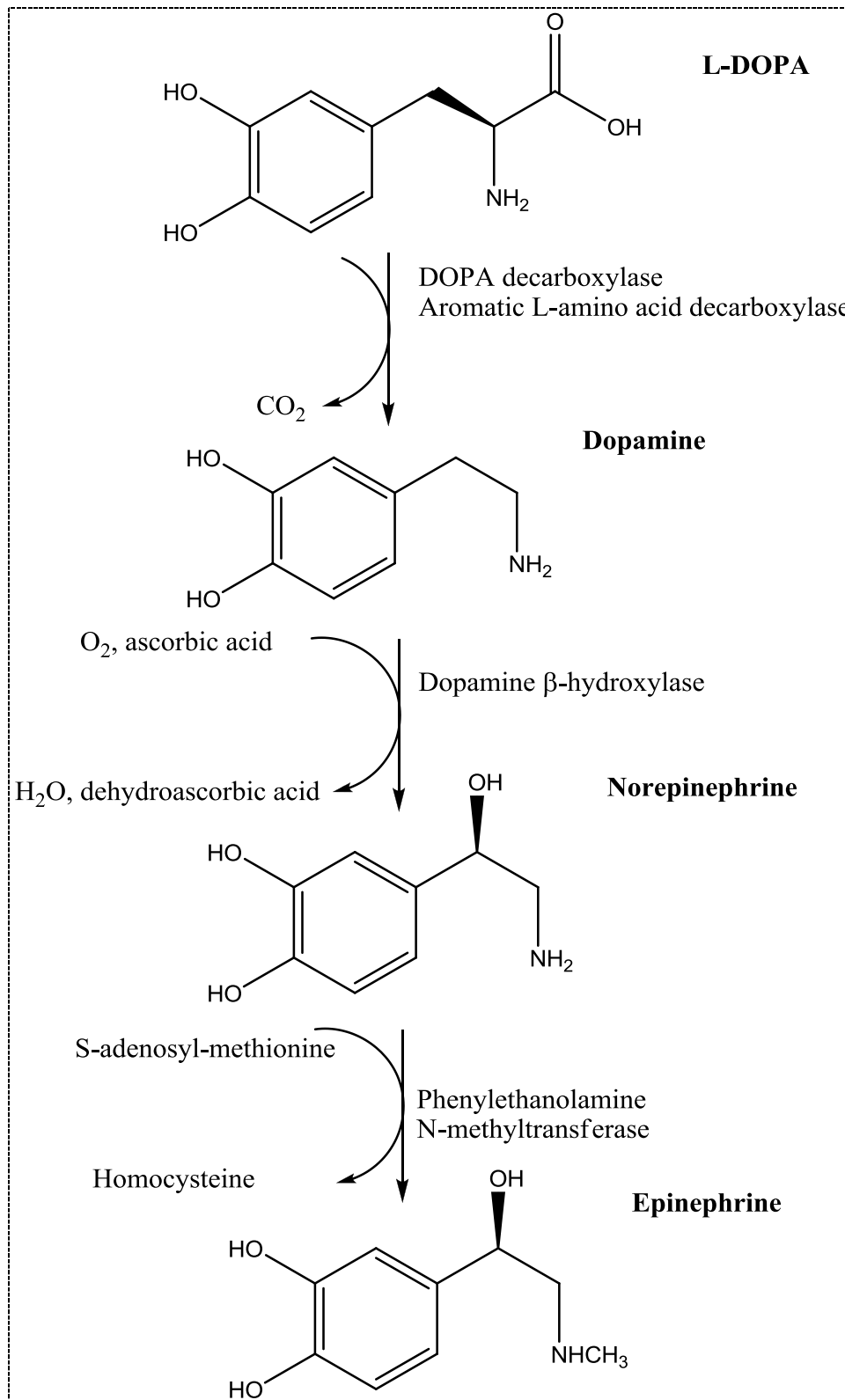
ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ (ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ) ΤΗΣ 3-ΜΕΘΟΞΥΤΥΡΑΜΙΝΗΣ ΣΕ ΟΥΡΑ ΑΛΟΓΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ LC/QTOF-MS

9.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ – ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η ντοπαμίνη αποτελεί για τα άλογα, όπως και για τους ανθρώπους, νευροδιαβιβαστική ουσία της κατηγορίας των κατεχολαμινών, που εμπλέκεται κατά κύριο λόγο στη διαφοροποίηση της κινητικής συμπεριφοράς μέσω διέγερσης του ντοπαμινεργικού συστήματος του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ), το οποίο φαίνεται να ασκεί μια τονική και υποστηρικτική δράση στην κινητική δραστηριότητα. Ταυτόχρονα, η ντοπαμίνη επηρεάζει τη λειτουργία συστημάτων εκτός του ΚΝΣ και παίζει ρόλο στη ρύθμιση της καρδιακής λειτουργίας. Οι δράση της αυτή σχετίζεται με διέγερση των υποδοχέων της ντοπαμίνης και των α-αδρενεργικών και β-αδρενεργικών υποδοχέων. Για παράδειγμα, σε υψηλή δόση μπορεί να διεγείρει τους α υποδοχείς και να προκαλέσει αγγειοσυσπασση, ενώ σε χαμηλές δόσεις διεγείρει τους β₁ υποδοχείς της καρδιάς και έχει θετική ινότροπο και χρονότροπο δράση. Επιπλέον, διαστέλλει τα αρτηρίδια των νεφρών και των σπλάχνων ενεργοποιώντας ντοπαμινεργικούς υποδοχείς και έτσι αυξάνει την αιματική ροή προς τους νεφρούς και τα σπλάχνα. Για όλες τις παραπάνω δράσεις, η ντοπαμίνη αποτελεί φάρμακο εκλογής στην αντιμετώπιση της καταπληξίας (shock) και χορηγείται με συνεχή ενδοφλέβια έγχυση. Η ίδια η ντοπαμίνη δε διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Η ουσία λεβοντόπα (L-3,4-dihydroxy-phenylalanine, levodopa, L-DOPA), που χορηγείται στην θεραπευτική αντιμετώπιση της νόσου Parkinson, αποτελεί άμεσο πρόδρομο της ντοπαμίνης που διαπερνά ευκολότερα τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και μετατρέπεται σε ντοπαμίνη, τόσο στον εγκέφαλο, όσο και στο περιφερικό νευρικό σύστημα, με τη μεσολάβηση του ενζύμου αποκαρβοξυλάση της ντοπαμίνης (L-amino acid decarboxylase, DOPA-decarboxylase, DCC). Οι δράσεις της λεβοντόπα στο ΚΝΣ μπορούν να ενισχυθούν σημαντικά από τη σύγχρονη χορήγηση της ουσίας καρβιντόπα (carvidopa), ενός αναστολέα της αποκαρβοξυλάσης της ντοπαμίνης, ο οποίος δε διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και μειώνει το μεταβολισμό της λεβοντόπα στο γαστρεντερικό σωλήνα και τους περιφερικούς ιστούς.¹⁶⁰ Όπως η ντοπαμίνη, έτσι και η L-DOPA, αποτελεί απαγορευμένη ουσία για τα άλογα αγώνων, καθώς η χορήγησή της μπορεί να επηρεάσει την αθλητική τους απόδοση, μέσω της ενίσχυσης των επιπέδων της ντοπαμίνης στον εγκέφαλο ή των επιδράσεων στο καρδιαγγειακό σύστημα ή συνδυασμού αυτών.²⁴⁷

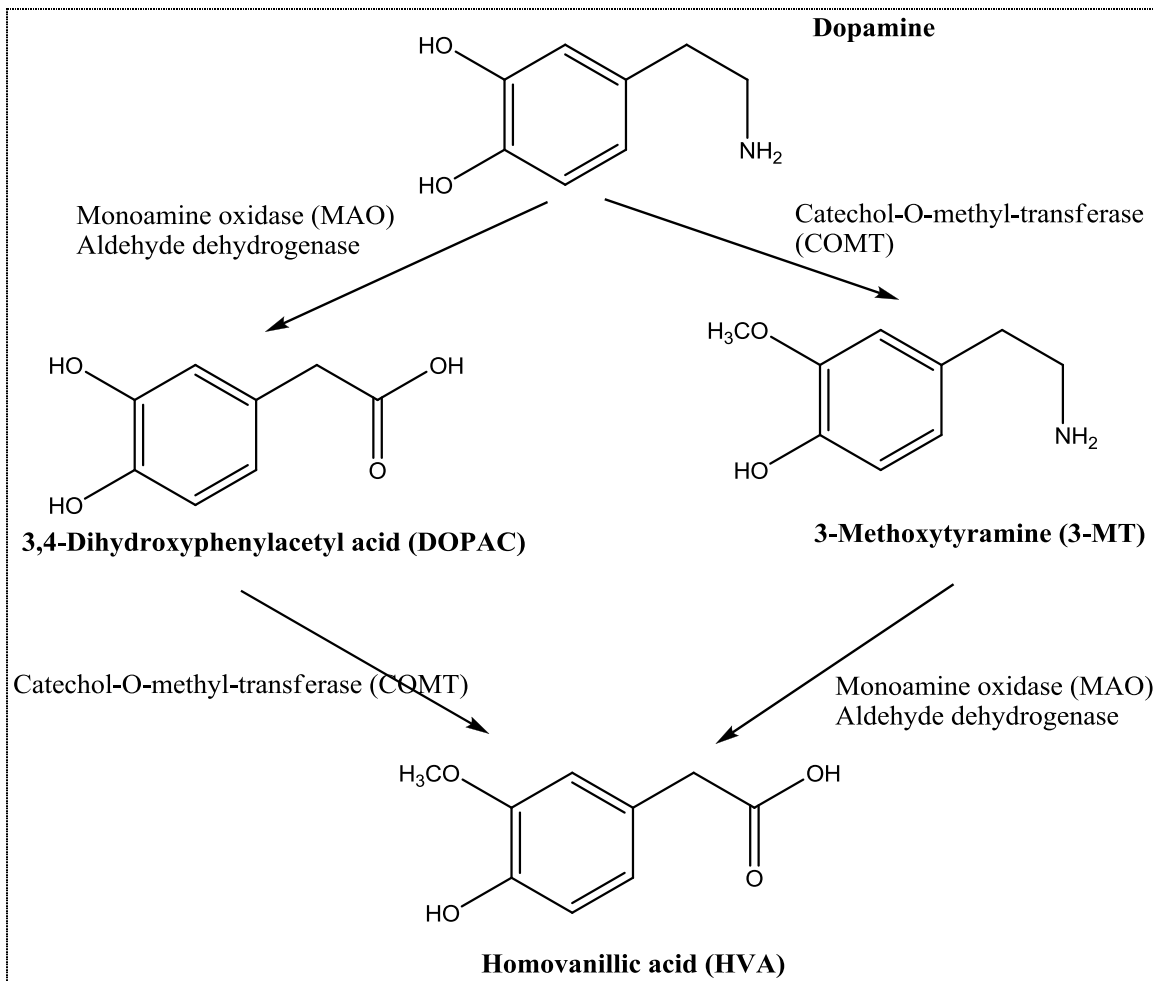
Ο μεταβολισμός των ουσιών αυτών περιλαμβάνει εκτός από το σχηματισμό των κατεχολαμινών αδρεναλίνη (adrenaline, epinephrine) και νοραδρεναλίνη (noradrenaline, norepinephrine) το σχηματισμό των ουσιών 3-μεθοξυτυραμίνη (3-methoxytyramine, 3-MT), 3,4-διυδροξυφαινοξικό οξύ (3,4-dihydroxyphenylacetic acid, DOPAC) και ομοβαλλινικό οξύ (3-methoxy-4-hydroxyphenylacetic acid, homovallinic acid, HVA). Ο μεταβολισμός της ντοπαμίνης και της λεβοντόπα παρουσιάζεται διαγραμματικά στο Σχήμα 9.1 που ακολουθεί.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών
Ορίου σε Ούρα Αλόγων: 3-Μεθοξυτυραμίνη



Σχήμα 9.1: Οδοί βιομετατροπής της ντοπαμίνης και της L-DOPA

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: 3-Μεθοξυτυραμίνη



Σχήμα 9.1: Οδοί βιομετατροπής της ντοπαμίνης και της L-DOPA (συνέχεια)

Μελέτες²⁴⁸⁻²⁵¹ έδειξαν ότι η εξωγενής χορήγηση της ουσίας L-DOPA στα άλογα συνοδεύεται από δόσοεξαρτώμενη ενίσχυση της απέκκρισης των μεταβολιτών 3-MT και DOPAC, κάτι που δε φαίνεται να ισχύει για την ουσία HVA, της οποίας τα επίπεδα αρχικά αυξάνονται, αλλά στη συνέχεια επανέρχονται στα αρχικά (προ-χορήγησης της L-DOPA) επίπεδα, την ίδια στιγμή που τα επίπεδα των 3-MT και DOPAC συνεχίζουν να αυξάνονται. Η εξήγηση του φαινομένου αυτού σχετίζεται με αναστολή του σχηματισμού της από τις παραπάνω πρόδρομες ουσίες όταν η συγκέντρωση της ντοπαμίνης βρίσκεται σε πολύ υψηλά επίπεδα (ανταγωνισμός ντοπαμίνης για τις θέσεις σύνδεσης των ουσιών 3-MT και DOPAC στα ένζυμα 3-COMT και MAO, αντίστοιχα). Οι προηγούμενες εργασίες που αφορούν την απέκκριση της 3-MT και των άλλων μεταβολιτών της ντοπαμίνης στα ούρα των αλόγων έδειξαν ότι η ουσία 3-μεθοξυτυραμίνη αποτελεί τον πλέον κατάλληλο μεταβολίτη που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης για τον έλεγχο της χορήγησης των απαγορευμένων ουσιών ντοπαμίνη και L-DOPA στα άλογα. Η ουσία DOPAC βρέθηκε ότι θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί εναλλακτικά ως δείκτης αλλά παρουσιάζει προβλήματα σταθερότητας στα ούρα κατά την μακρά αποθήκευση αυτών (>6 μήνες) στους -20 °C. Λαμβάνοντας υπόψη τα δεδομένα απέκκρισης των μεταβολιτών της L-DOPA και της ντοπαμίνης από μελέτες που διεξήχθησαν σε φυσιολογικούς πληθυσμούς αλόγων, αλλά και σε άλογα κατόπιν

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: 3-Μεθοξυτυραμίνη

χορήγησης της απαγορευμένης ουσίας L-DOPA, καθιερώθηκε ανώτερο επιτρεπτό όριο στη συγκέντρωση της 3-μετοξυτυραμίνης (ελεύθερης και συζευγμένης) στα ούρα των αλόγων, το οποίο καθορίστηκε στα $4 \mu\text{g mL}^{-1}$, οδηγία που αναφέρεται και επίσημα στο Άρθρο 6 της διεθνούς συμφωνίας που έχει εκδόσει η Παγκόσμια Ομοσπονδία των Αρχών Ιπποδρομιών (International Federation of Horseracing Authorities)³⁶. Τα δείγματα αλόγων που υπερβαίνουν το παραπάνω όριο, χαρακτηρίζονται ως θετικά στους ελέγχους ντόπινγκ που διενεργούν τα αρμόδια εργαστήρια, καθώς υψηλότερες του ορίου συγκεντρώσεις της 3-μεθοξυτυραμίνης στα ούρα μπορούν να αποδοθούν μόνο σε εξωγενή χορήγηση L-DOPA ή ντοπαμίνης. Κατά συνέπεια, τα διαπιστευμένα εργαστήρια πρέπει να διαθέτουν αξιόπιστες και επικυρωμένες μεθόδους για την ποιοτική ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό της παραπάνω ουσίας στα δείγματα ούρων αλόγων. Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειώσουμε ότι το 2003 από το αρμόδιο Εργαστήριο της Αυστραλίας αναφέρθηκε ένας αξιοσημείωτος αριθμός δειγμάτων ούρων που ελήφθησαν από αγωνιζόμενα άλογα –νικητές μετά τους αγώνες και στα οποία ανιχνεύθηκαν υψηλές συγκεντρώσεις της ουσίας 3-μεθοξυτυραμίνη (υψηλότερες του ορίου), καθώς και η ουσία irbesartan, ένα αντιυπερτασικό φάρμακο που ανήκει στους ανταγωνιστές των υποδοχέων της αγγειοτασίνης II. Περαιτέρω έρευνες που ακολούθησαν οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι στα συγκεκριμένα άλογα είχε γίνει χορήγηση της ουσίας L-DOPA με στόχο την ενίσχυση των αγωνιστικών τους επιδόσεων, ενώ ο λόγος χορήγησης της ουσίας irbesartan παραμένει υπό μελέτη και αποδίδεται πιθανότατα στην εξισορρόπηση της υπέρτασης και της περιφερικής αγγειοσύσπασης που σχετίζονται με την επακόλουθη αύξηση των επιπέδων της ντοπαμίνης από την χορήγηση της L-DOPA.²⁵²

Στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί δύο αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού της 3-μεθοξυτυραμίνης για τον έλεγχο ντόπινγκ αλόγων.^{250,252} Οι μέθοδοι αυτές βασίζονται στην GC/MS ανάλυση του παραγωγοποιημένου εκχυλίσματος που λαμβάνεται μετά από υδρόλυση του δείγματος των ούρων και απομόνωση της προσδιοριζόμενης ουσίας με διαδικασία υγρό-υγρό εκχύλισης.

Αντικείμενο της παρούσας εργασίας ήταν η ανάπτυξη, η αξιολόγηση και η επικύρωση μιας διαδικασίας για τον ποσοτικό προσδιορισμό και την ταυτοποίηση (επιβεβαίωση) της 3-μεθοξυτυραμίνης σε ούρα αλόγων με την απλούστερη δυνατή πορεία κατεργασίας. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η συνδυασμένη τεχνική της Υγροχρωματογραφίας Υδρόφιλων Αλληλεπιδράσεων (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography, HILIC) και της Φασματομετρίας Μαζών με σύστημα QTOF/MS. Η χρωματογραφία HILIC επιλέχθηκε στην παρούσα μέθοδο ως εναλλακτική χρωματογραφική τεχνική προκειμένου να επιτευχθεί ικανοποιητική χρωματογραφική συγκράτηση της προσδιοριζόμενης ουσίας, ενώ όπως έχει ήδη αναφερθεί σε προηγούμενο κεφάλαιο η εφαρμογή της σε συνδυασμό με συστήματα φασματομετρίας μαζών παρουσιάζει και επιπρόσθετα πλεονεκτήματα, όπως η ενίσχυση της ευαισθησίας λόγω του αποτελεσματικότερου ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό, γεγονός που σχετίζεται με το υψηλό ποσοστό οργανικού τροποποιητή στην κινητή φάση, η δυνατότητα χρησιμοποίησης υψηλότερης ταχύτητας ροής της κινητής φάσης και η μείωση των επιδράσεων από το υποστρώμα^{77,83,86,93}.

9.2. ΕΣΩΤΕΡΙΚΟ ΠΡΟΤΥΠΟ

Για τον προσδιορισμό της 3-μεθοξυτυραμίνης χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο ένα ισοτοπικά επισημασμένο ανάλογο του αναλύτη, η ουσία 3-μεθοξυτυραμίνη-1,1,2,2-d₄. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η παρουσία εσωτερικού προτύπου 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 για να εξασφαλιστεί η κατά το δυνατό πιο αξιόπιστη ποσοτικοποίηση των προσδιοριζόμενων ουσιών. Σε προηγούμενα κεφάλαια έγινε ήδη αναφορά για το φαινόμενο της ιοντικής καταστολής που παρατηρείται στην τεχνική της φασματομετρίας μαζών και κυρίως σε συστήματα με πηγή ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό και αφορά στην καταστολή του σήματος του αναλύτη από ουσίες του υποστρώματος που συνεκλούνται και εισέρχονται ταυτόχρονα με αυτόν στην πηγή του ιοντισμού. Η έκταση του φαινομένου αυτού αφενός μεν εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη χημική δομή του αναλύτη, αφετέρου μπορεί να διαφοροποιείται σημαντικά μεταξύ διαφορετικών υποστρωμάτων. Η επιλογή ενός ισοτοπικά επισημασμένου αναλόγου του αναλύτη ως εσωτερικού προτύπου αποτελεί επιλογή πρώτης εκλογής σε βιοαναλυτικές μεθόδους ποσοτικού προσδιορισμού με την τεχνική LC/MS, αφού όχι μόνο μπορούν να διορθωθούν διακυμάνσεις στην απόκριση του αναλύτη που σχετίζονται με τη μέθοδο προκατεργασίας των δειγμάτων (αραίωση, εκχυλιστική διαδικασία, παραγωγοποίηση κλπ.), αλλά ταυτόχρονα οι ουσίες αυτές επηρεάζονται σε διακύμανσεις του συστήματος ανίχνευσης και της απόδοσης ιοντισμού σε ισοδύναμο βαθμό με τον αναλύτη, καθώς παρουσιάζουν πανομοιότυπες με αυτόν φυσικοχημικές ιδιότητες. Καθώς αναμένεται οι ουσίες αυτές να συνεκλούνται με τον αναλύτη, θα πρέπει να διαφέρουν κατά τρεις μονάδες μάζας τουλάχιστον, διαφορετικά οι ισοτοπικές κορυφές του αναλύτη θα επηρεάσουν το σήμα του εσωτερικού προτύπου. Επιπρόσθετα, επιβάλλεται η καθαρότητα του εσωτερικού προτύπου να είναι υψηλού βαθμού, προκειμένου να αποφευχθεί η συνεισφορά αυτού στο σήμα του αναλύτη.^{186,187}

9.3. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Οι πρότυπες ουσίες 3-μεθοξυτυραμίνη και 3-μεθοξυτυραμίνη-d₄ υπό τη μορφή υδροχλωρικών αλάτων (βαθμού καθαρότητας 99,5 και 99,0 %, αντίστοιχα) ελήφθησαν από τη Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) και τη CDN Isotopes (Quebec, Canada), αντίστοιχα.

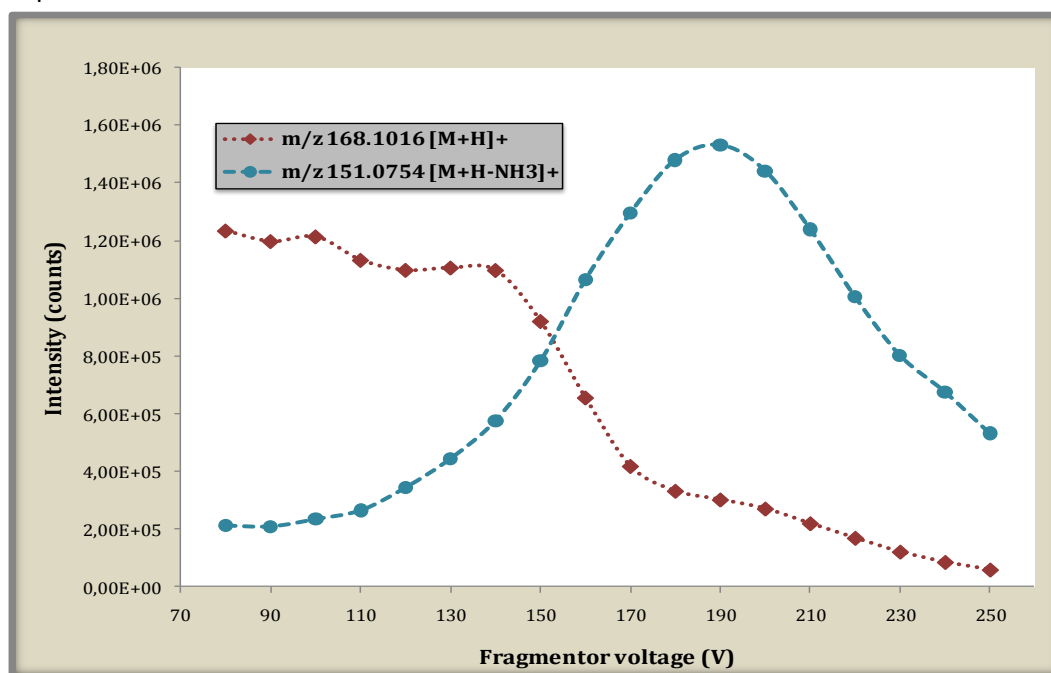
9.4. ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ LC/QTOF-MS

9.4.1. Επιλογή-Βελτιστοποίηση συνθηκών λειτουργίας φασματομέτρου μαζών

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε φασματόμετρο μαζών της εταιρείας Agilent, το οποίο διαθέτει τετραπολικό αναλυτή μαζών συζευγμένο με ορθογώνιας επιτάχυνσης αναλυτή χρόνου πτήσης και πηγή ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό, ορθογώνιας διάταξης (6520 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS, Agilent Technologies, Santa Clara, California USA). Ο ανιχνευτής του συστήματος (αναλογο-ψηφιακός μετατροπέας, ADC) επιλέχθηκε να λειτουργεί σε συχνότητα 2 GHz, η οποία προσδίδει στο φασματόμετρο μαζών το μέγιστο δυναμικό εύρος λειτουργίας (extended dynamic range mode). Η 3-μεθοξυτυραμίνη φέρει

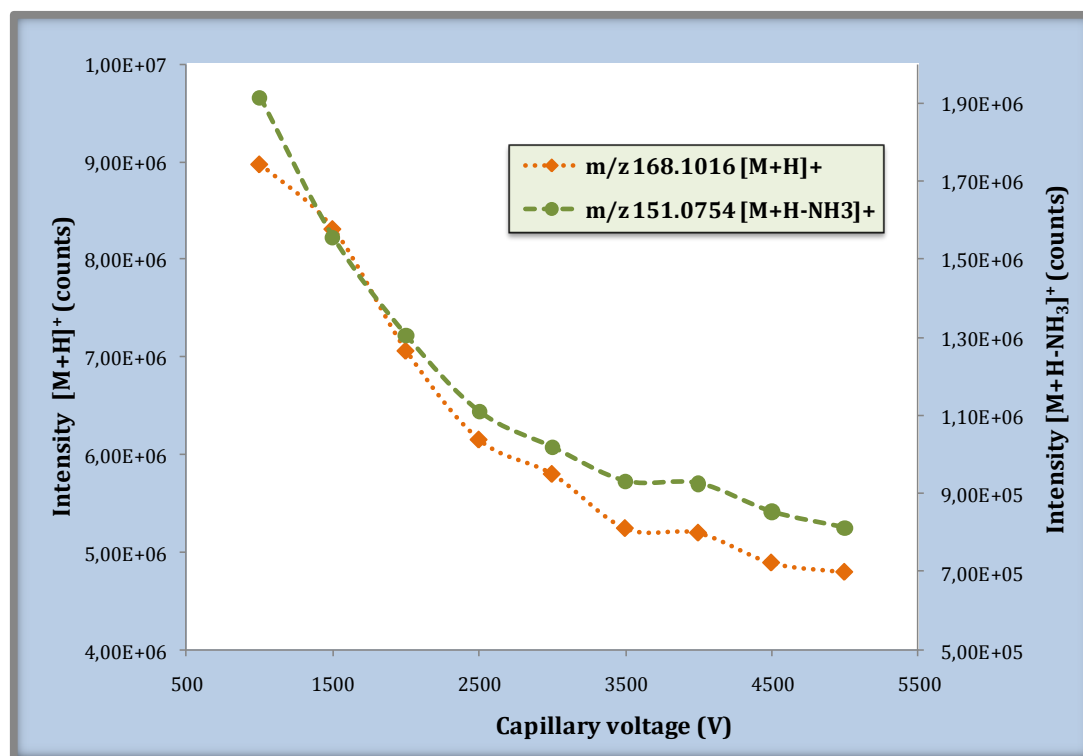
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: 3-Μεθοξυτυραμίνη

στο μόριό της μια πρωτοταγή αμινομάδα και για την ανίχνευσή της εφαρμόστηκε θετικός ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (ESI+). Η θερμοκρασία και η ταχύτητα ροής του αερίου αζώτου στην πηγή ιοντισμού ρυθμίστηκαν στους 330 °C και 10 L min⁻¹, αντίστοιχα και η πίεση του αερίου νεφελοποίησης (αερίου αζώτου) στην τιμή 40 psi. Τα δυναμικά θραυσματοποίησης της πηγής ιοντισμού (fragmentor voltage) και το δυναμικό του τριχοειδούς (capillary voltage) βελτιστοποιήθηκαν με τη διαδικασία ανάλυσης FIA, δηλαδή με διαδοχικές αναλύσεις προτύπου διαλύματος του αναλύτη σε μίγμα ακετονιτριλίου/νερού 50/50 (v/v) συγκέντρωσης 1,0 μg mL⁻¹, με τη συμμετοχή του αυτόματου δειγματολήπτη και του χρωματογραφικού συστήματος χωρίς την παρουσία χρωματογραφικής στήλης. Το πρωτονιωμένο μόριο της 3-μεθοξυτυραμίνης με τιμή m/z 168,1016 διαπιστώθηκε ότι θραυσματοποιείται εύκολα ακόμα και σε ήπιες συνθήκες της πηγής ιοντισμού με απώλεια της αμινομάδας με τη μορφή ενός μορίου αμμωνίας σχηματίζοντας το ιόν με τιμή m/z 151,0754. Στόχος των αναλύσεων FIA ήταν η εύρεση των βέλτιστων τιμών των δυναμικών που προαναφέρθηκαν, που εξασφαλίζουν την μέγιστη δυνατή αφθονία των αδιάσπαστων πρωτονιωμένων μορίων του αναλύτη, ελαχιστοποιώντας τη θραυσματοποίηση στην πηγή ιοντισμού. Τα αποτελέσματα της πορείας βελτιστοποίησης των δυναμικών απεικονίζονται διαγραμματικά στα Σχήματα 9.2 και 9.3, αντίστοιχα, όπου παρουσιάζεται η μεταβολή του σήματος τόσο για το πρωτονιωμένο μοριακό ιόν, όσο και για το θραυσματοποιημένο ιόν της 3-μεθοξυτυραμίνης. Τελικά, το δυναμικό θραυσματοποίησης (fragmentor voltage) ρυθμίστηκε στην τιμή 100 V και το δυναμικό του τριχοειδούς, το οποίο διαπιστώθηκε ότι επηρεάζει σε μικρότερο βαθμό την ένταση του σήματος ρυθμίστηκε στην τιμή 1500 V. Όλες οι επιπλέον παράμετροι λειτουργίας του φασματομέτρου μαζών (δυναμικά εξαπόλου, φακών, αναλυτή χρόνου πτήσης, ανιχνευτή ιόντων) ρυθμίζονταν και βελτιστοποιούνταν στο σύνολό τους από τους από τη διαδικασία tuning του συστήματος που έχει περιγραφεί στο κεφάλαιο 4.



Σχήμα 9.2: Επίδραση του δυναμικού θραυσματοποίησης της πηγής ιοντισμού στην ένταση του πρωτονιωμένου μοριακού ιόντος και του θραυσματοποιημένου ιόντος της 3-μεθοξυτυραμίνης

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: 3-Μεθοξυτυραμίνη

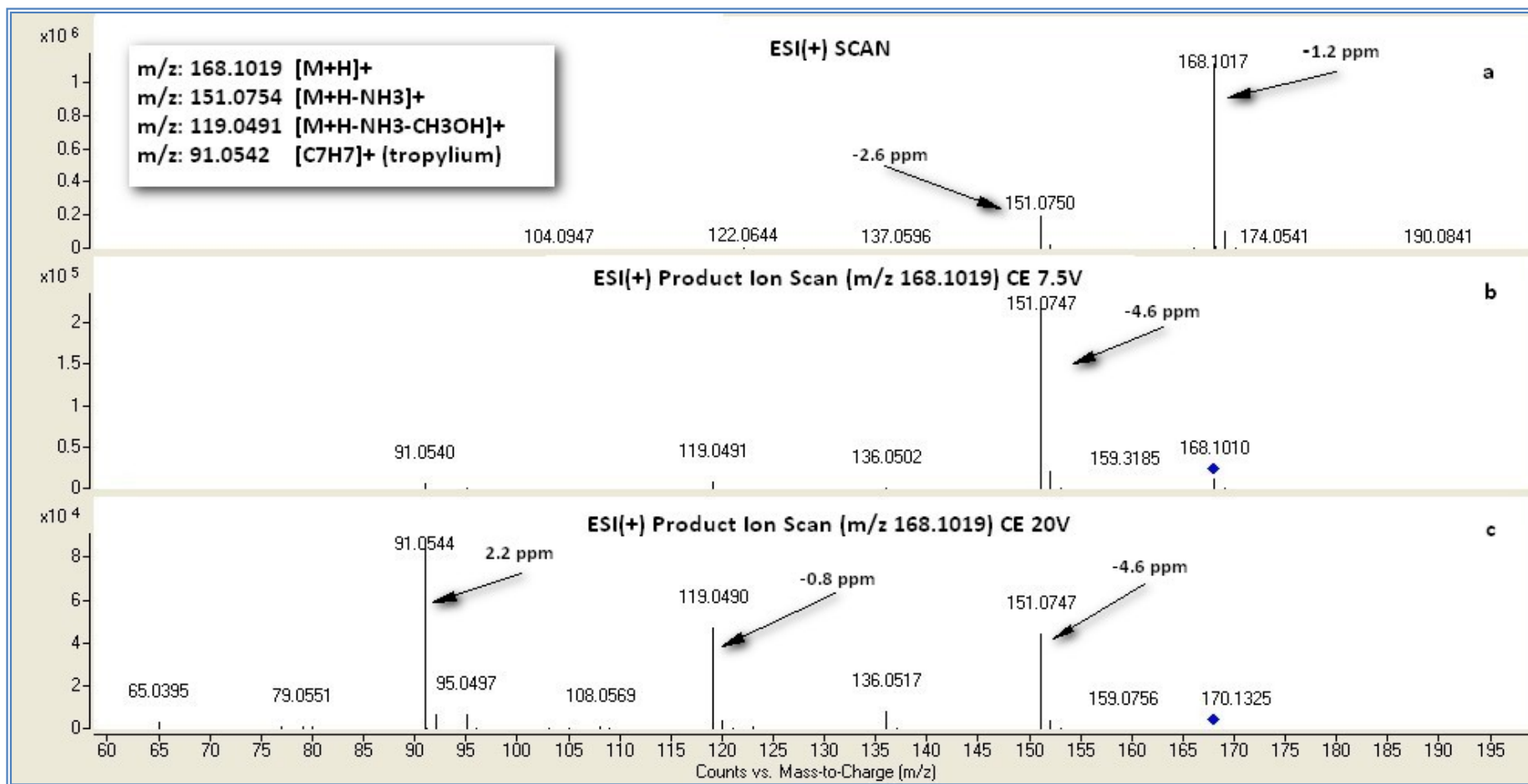


Σχήμα 9.3: Επίδραση του δυναμικού του τριχοειδούς (capillary voltage) στην ένταση του πρωτονιωμένου μοριακού ιόντος και του θραυσματοποιημένου ιόντος της 3-μεθοξυτυραμίνης

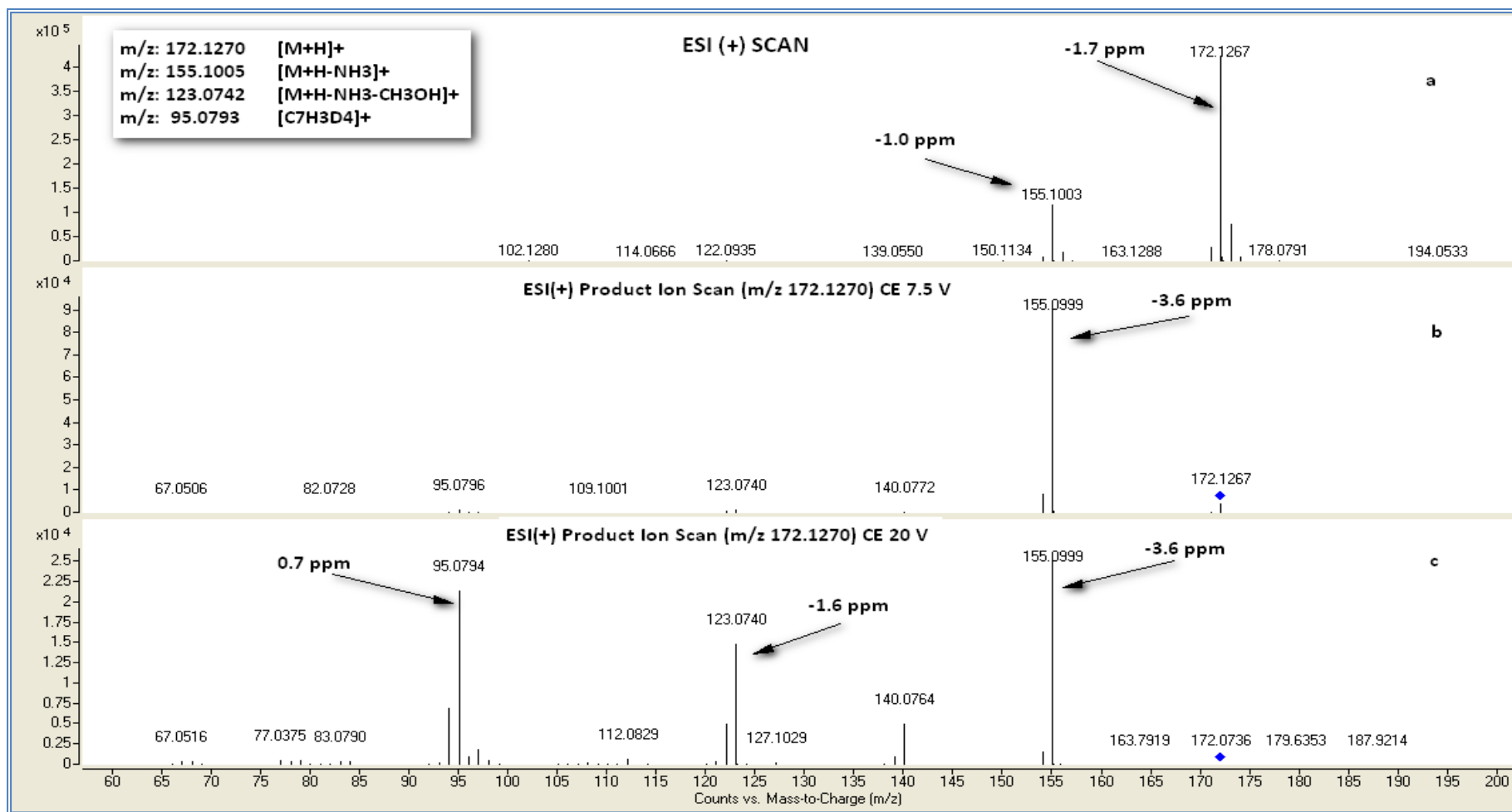
Για την επίτευξη της μέγιστης δυνατής εκλεκτικότητας και ευαισθησίας κατά τον ποσοτικό προσδιορισμό και την ικανοποίηση των απαιτούμενων κριτηρίων για την επιβεβαίωση της 3-μεθοξυτυραμίνης (σχηματισμός τουλάχιστον τριών διαγνωστικών ιόντων), επιλέχθηκε η λειτουργία «targeted MS/MS» του φασματομέτρου Q/TOF-MS, κατά την οποία λαμβάνει χώρα εναλλάξ διαδικασία λήψης φασμάτων σάρωσης των θυγατρικών ιόντων, τα οποία σχηματίζονται μετά από απομόνωση μητρικών ιόντων προεπιλεγμένων τιμών m/z στον τετραπολικό αναλυτή και θραυσματοποίησή τους στο θάλαμο συγκρούσεων με τη βοήθεια αερίου αζώτου (MS/MS spectra) και διαδικασία λήψης φασμάτων πλήρους σάρωσης χωρίς θραυσματοποίηση (MS spectra). Οι παράμετροι που αφορούν το εύρος μαζών σάρωσης και την ταχύτητα σάρωσης ρυθμίζονται στην περίπτωση αυτή ξεχωριστά για κάθε μια διαδικασία. Έτσι, για τη διαδικασία MS το εύρος σάρωσης τιμών m/z ρυθμίστηκε σε 100 – 1100 (m/z) με ταχύτητα σάρωσης 3 scan sec^{-1} , ενώ για τη διαδικασία MS/MS οι αντίστοιχες τιμές ήταν για το εύρος 50-220 (m/z) και την ταχύτητα 4 scan sec^{-1} . Ως πρόδρομα ιόντα για την 3-μεθοξυτυραμίνη και το εσωτερικό πρότυπο επιλέχθηκαν τα πρωτονιωμένα μοριακά ιόντα τους με τιμές m/z 168,1019 και 172,1270, αντίστοιχα και πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αναλύσεις FIA για την εύρεση του κατάλληλου δυναμικού θραυσματοποίησης (collision energy, CE). Σταδιακή αύξηση του δυναμικού θραυσματοποίησης από 2,5 έως 10 V οδήγησε σε θραυσματοποίηση του μοριακού ιόντος προς το θυγατρικό ιόν με τιμή m/z 151,0754, που όπως προαναφέρθηκε σχηματίζεται από αυτό με απώλεια ενός μορίου αμμωνίας. Περαιτέρω θραυσματοποίηση παρατηρείται με αύξηση του δυναμικού θραυσματοποίησης σε υψηλότερες τιμές (10 - 25 V), που οδηγεί στο σχηματισμό των θυγατρικών ιόντων με τιμές m/z 151,0754, 119,0491 (απώλεια ενός μορίου

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: 3-Μεθοξυτυραμίνη

μεθανόλης) και 91,0542 (ιόν τροπυλλίου). Όπως ήταν αναμενόμενο, για το ισοτοπικά επισημασμένο ανάλογο της 3-μεθοξυτυραμίνης (3MT-d₄), που χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο παρατηρήθηκε συμπεριφορά θραυσματοποίησης αντίστοιχη με αυτή του αναλύτη. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της 3-μεθοξυτυραμίνης, το δυναμικό θραυσματοποίησης ρυθμίστηκε στην τιμή 7,5 V λαμβάνοντας υπόψη τις αποκρίσεις των ιόντων με τιμές m/z 151,0754 για τον αναλύτη και 155,1005 για το εσωτερικό πρότυπο, ενώ για την επιβεβαίωση αυτής πραγματοποιήθηκε επανάλυση των δειγμάτων σε δυναμικό θραυσματοποίησης 20 V. Στο σχήμα 9.4 παρουσιάζονται για την 3-μεθοξυτυραμίνη το φάσμα πλήρους σάρωσης (α) και τα φάσματα σάρωσης θυγατρικών ιόντων του πρωτονιωμένου μοριακού ιόντος αυτής σε τιμές δυναμικού θραυσματοποίησης 7,5 V (β) και 20 V (γ), μαζί με τα σφάλματα μέτρησης μάζας για τα διαγνωστικά ιόντα, όπως αυτά ελήφθησαν μετά από την ανάλυση προτύπου διαλύματος του αναλύτη συγκέντρωσης 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Αντίστοιχα φάσματα μαζών, παρουσιάζονται και για το εσωτερικό πρότυπο 3-μεθοξυτυραμίνη-d₄ στο Σχήμα 9.5, τα οποία ελήφθησαν από την ανάλυση προτύπου διαλύματος συγκέντρωσης 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$.



Σχήμα 9.4: Φάσμα πλήρους σάρωσης (a) και φάσματα σάρωσης θυγατρικών ιόντων μετά από θραυσματοποίηση του πρωτονιωμένου μοριακού ιόντος με ενέργεια θραυσματοποίησης (CE) 7.5 V (b) και 20 V (c). Ελήφθησαν με ανάλυση προτύπου διαλύματος της 3-μεθοξυτυραμίνης συγκέντρωσης 1,0 μg mL⁻¹ υπό τις βέλτιστες συνθήκες του συστήματος QTOF-MS.



Σχήμα 9.5: Φάσμα πλήρους σάρωσης (a) και φάσματα σάρωσης θυγατρικών ιόντων 3-μεθοξυτυραμίνης-*d*₄ μετά από θραυσματοποίηση του πρωτονιωμένου μοριακού ιόντος με ενέργεια (CE) 7.5 V (b) και 20 V (c). Ελήφθησαν με ανάλυση προτύπου διαλύματος συγκέντρωσης 0,5 μg mL⁻¹ υπό τις βέλτιστες συνθήκες του συστήματος QTOF-MS.

9.4.2. Υγροχρωματογραφικές συνθήκες

Το σύστημα LC/QTOF-MS που χρησιμοποιήθηκε διέθετε χρωματογραφική αντλία υπερυψηλής απόδοσης (UHPLC) (Agilent 1200 Series, Rapid Resolution LC, Agilent Technologies) και θερμοστατούμενο αυτόματο δειγματολήπτη 105 θέσεων, η θερμοκρασία του οποίου ρυθμίστηκε στους 5 °C. Αρχικά, κατά τη μελέτη επιλογής των κατάλληλων χρωματογραφικών συνθηκών, για το διαχωρισμό της 3-μεθοξυτυραμίνης από τα συστατικά του υποστρώματος επιλέχθηκε μια στήλη C18 χρωματογραφίας UHPLC αντιστρόφου φάσεως (Zorbax Eclipse Plus C18, 100 x 2,1 mm i.d, 1,8 μm), ενώ παράλληλα δοκιμάστηκαν διάφορες κινητές φάσεις αποτελούμενες από μίγμα ακετονιτριλίου /νερού σε συνδυασμό με κάποιο όξινο τροποποιητή (μυρμηκικό οξύ μόνο του ή σε μίγμα με μυρμηκικό αμμώνιο, οξικό οξύ μόνο του ή σε συνδυασμό με οξικό αμμώνιο). Η 3-μεθοξυτυραμίνη, που είναι ένα ιδιαίτερα πολικό μόριο, παρουσίασε πολύ χαμηλή συγκράτηση (παράγοντας χωρητικότητας < 1,3) σε όλες τις συνθήκες που δοκιμάστηκαν ακόμα και σε κινητές φάσεις με πολύ χαμηλό ποσοστό οργανικού τροποποιητή (αναλογία νερού/ακετονιτριλίου 95/5 (v/v)). Κατά τις μελέτες αυτές το υψηλό ποσοστό υδατικού μέρους της κινητής φάσης επέβαλε η αραίωση των δειγμάτων να γίνεται υποχρεωτικά με νερό στις δοκιμαστικές αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν σε δείγματα ούρων, ενώ διαπιστώθηκε μεγάλου βαθμού ιοντική καταστολή και παρατηρήθηκαν υψηλής έντασης παρεμποδιστικές κορυφές από το υπόστρωμα, προερχόμενες κυρίως από τη β-γλυκουρονιδάση που χρησιμοποιείται για την ενζυμική υδρόλυση των δειγμάτων των ούρων.

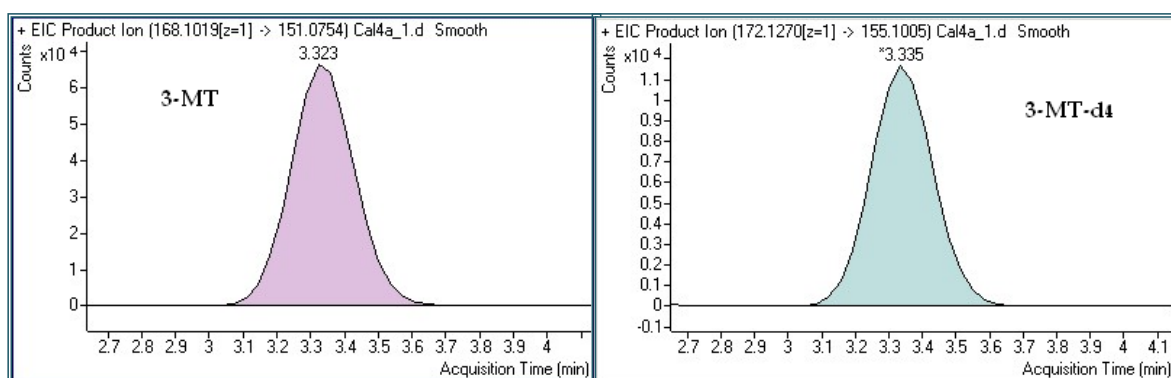
Η Υγροχρωματογραφία Υδροφίλων Αλληλεπιδράσεων (HILIC) επιλέχθηκε ως εναλλακτική χρωματογραφική τεχνική που επιτρέπει την ικανοποιητική συγκράτηση ιδιαίτερα πολικών και υδροφίλων μορίων που συγκρατούνται ελάχιστα ή καθόλου με τη χρωματογραφία αντιστρόφου φάσεως. Η χρωματογραφική στήλη που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία ήταν η zwitterionic SeQuant ZIC®-HILIC (Merck, Darmstadt, Germany) μήκους 15 cm, εσωτερικής διαμέτρου 2,1 mm και διαμέτρου σωματιδίων 3,5 μm. Για την προστασία της στήλης χρησιμοποιήθηκε αντίστοιχου τύπου προσθήκη η SeQuant ZIC®-HILIC (20 x 2,1 mm, μεγέθους σωματιδίων 5 μm). Η συγκεκριμένη στήλη φέρει ως πληρωτικό υλικό πορώδη σίλικα στην επιφάνεια της οποίας έχουν προσδεθεί ομοιοπολικά ομάδες σουλφοβηταΐνης, που την καθιστούν μια μονίμως φορτισμένη και υψηλής πολικότητας στατική φάση. Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός στην περίπτωση αυτή επιτυγχάνεται με μηχανισμό συγκράτησης που σχετίζεται με υδρόφιλη κατανομή των αναλυόμενων μορίων ανάμεσα στην κινητή φάση και στο υδρόφιλο περιβάλλον του πληρωτικού υλικού και σε δευτερεύουσας σημασίας ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με τις φορτισμένες ομάδες των αλυσίδων της σουλφοβηταΐνης, επιτρέποντας την προσθήκη χαμηλής συγκέντρωσης ρυθμιστικών παραγόντων στην κινητή φάση, όπως είναι τα αμμωνιακά άλατα του μυρμηκικού και του οξικού οξέος, ή το μυρμηκικό και το οξικό οξύ, που είναι και τα πλέον χρησιμοποιούμενα και συμβατά στις μεθόδους LC/MS. Επιπλέον, η χρήση ενός ρυθμιστικού αμμωνιακού άλατος συνίσταται για τη συγκεκριμένη στήλη, προκειμένου να διατηρηθεί μια ομοιόμορφη ηλεκτροστατική επίδραση μεταξύ των διαλυμένων στην κινητή φάση μορίων και της στατικής φάσης στην περίπτωση φορτισμένων αναλυτών.^{75,253}

Η εφαρμογή της χρωματογραφίας HILIC στην παρούσα εργασία επιλέον της ικανοποιητικής συγκράτησης του αναλύτη είχε δύο επιπρόσθετα σημαντικά πλεονεκτήματα. Επέτρεψε την

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: 3-Μεθοξυτυραμίνη

χρήση υψηλού ποσοστού οργανικού τροποποιητή στην κινητή φάση (80%), γεγονός που συνέβαλε στη βελτίωση της απόδοσης του ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό και στην ενίσχυση της απόκρισης του φασματομέτρου μαζών. Στη χρωματογραφία HILIC απαραίτητη προϋπόθεση για την επίτευξη ικανοποιητική συγκράτησης και διαχωρισμού αποτελεί το προς ανάλυση δείγμα να βρίσκεται σε μορφή διάλυματος που περιέχει το λιγότερο σε αναλογία 50% οργανικό τροποποιητή αντίστοιχο με αυτό της κινητής φάσης. Το γεγονός αυτό επέτρεψε την προσθήκη ποσότητας ακετονιτριλίου στα υδρολυμένα δείγματα ούρων και ακολούθως την υπερφυγοκέντρωσή τους με στόχο την καταβύθιση των πρωτεϊνικών και πεπτιδικών υπολειμμάτων της υδρόλυσης και τον καθαρισμό του δείγματος, περιορίζοντας της παρεμποδίσεις και την ιοντική καταστολή από συνεκλούμενες ουσίες του υποστρώματος.

Κατά την ανάπτυξη της μεθόδου, δοκιμάστηκαν διαφορετικές κινητές φάσεις που αποτελούνταν από μίγμα ακετονιτριλίου/ νερού σε αναλογία 80/20 (v/v) (προτεινόμενη αναλογία από τον κατασκευαστή της στήλης) και διαφορετικές αναλογίες μυρμηκικού οξέος (0-0,1%) και μυρμηκικού αμμωνίου (0-20 mM), προκειμένου να επιτευχθεί ικανοποιητική χρωματογραφική συμπεριφορά του αναλύτη και του εσωτερικού προτύπου (συγκράτηση και σχήμα χρωματογραφικών κορυφών), ταυτόχρονα με ικανοποιητική απόκριση του φασματομέτρου μαζών. Η σύσταση της κινητής φάσης που τελικά επιλέχθηκε ήταν μίγμα ακετονιτριλίου νερού σε αναλογία 80/20 (v/v) που περιείχε 5 mM μυρμηκικού αμμωνίου και 0,05 % (v/v) μυρμηκικό οξύ και παρέμενε σταθερή σε όλη τη διάρκεια της ανάλυσης. Η ταχύτητα ροής ήταν $0,3 \text{ mL min}^{-1}$. Ο συνολικός χρόνος ανάλυσης ήταν 10 min και ο ενιέμενος όγκος δείγματος 5 μL . Υπό τις παραπάνω χρωματογραφικές συνθήκες οι χρόνοι έκλουσης για την 3-μεθοξυτυραμίνη και το δευτεριωμένο εσωτερικό πρότυπο ήταν 3,3 min. Η βαλβίδα divert valve του φασματομέτρου μαζών ρυθμίστηκε να διοχετεύει το χρωματογραφικό έκλουσμα εντός της πηγής ιοντισμού φασματομέτρου μαζών για το χρονικό διάστημα 2,5 – 5,5 min. Ενδεικτικά, στο σχήμα 9.6 που ακολουθεί παρουσιάζονται τυπικά χρωματογράφημα που έχουν ληφθεί από την ανάλυση δείγματος ούρων αλόγου εμβολιασμένο με τον αναλύτη σε συγκέντρωση $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ (συγκέντρωση ορίου) υπό τις βέλτιστες συνθήκες του συστήματος LC/Q-TOF-MS.



Σχήμα 9.6: Ιοντικά χρωματογράφημα του αναλύτη και του εσωτερικού προτύπου που ελήφθησαν από την ανάλυση δείγματος ούρων αλόγου εμβολιασμένο με τον αναλύτη σε συγκέντρωση $4,0 \mu\text{g mL}^{-1}$.

9.5. ΠΡΟΤΥΠΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΠΑΡΑΚΑΤΑΘΗΚΗΣ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων αξιολόγησης της μεθόδου, παρασκευάστηκαν δύο σειρές προτύπων διαλυμάτων της 3-μεθοξυτυραμίνης, από τις οποίες η πρώτη χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των διαλυμάτων εργασίας που χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό και την παρασκευή των προτύπων δειγμάτων βαθμονόμησης των καμπυλών αναφοράς (standard calibration samples STD's), ενώ η δεύτερη σειρά χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των διαλυμάτων εργασίας των εμβολιασμένων δειγμάτων ελέγχου (quality control samples, QC's). Καθένα από τα διαλύματα παρακαταθήκης παρασκευάστηκε με ζύγιση στερεής πρότυπης ουσίας (3-μεθοξυτυραμίνη με τη μορφή υδροχλωρικού άλατος) σε αναλυτικό ζυγό ακρίβειας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων μέσα σε βαθμονομημένη ογκομετρική φιάλη και ακόλουθη διάλυση με μίγμα μεθανόλης/ νερού 50/50 (v/v) μέχρι χαραγής. Με ανάλογο τρόπο, παρασκευάστηκε πρότυπο διάλυμα παρακαταθήκης του εσωτερικού προτύπου (3-μεθοξυτυραμίνη-d₄ υπό τη μορφή υδροχλωρικού άλατος). Ακολούθησε μεταφορά όλων των διαλυμάτων σε σκοτεινόχρωμα φιαλίδια (vials), τα οποία αποθηκεύτηκαν στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία -20 °C.

Λαμβάνοντας κατάλληλους όγκους από τα διαλύματα παρακαταθήκης και αραιώνοντας με με μεθανόλη σε βαθμονομημένες ογκομετρικές φιάλες παρασκευάστηκαν τα διαλύματα εργασίας του αναλύτη συγκέντρωσης 250 μg mL⁻¹. Το διάλυμα εργασίας του εσωτερικού προτύπου παρασκευάστηκε με αντίστοιχο τρόπο σε συγκέντρωση 100 μg mL⁻¹. Τα πρότυπα διαλύματα εργασίας αποθηκεύτηκαν σε σκοτεινόχρωμες φιάλες στους -20 °C.

Στο [Παράρτημα 25](#) φαίνονται οι συγκεντρώσεις των προτύπων διαλυμάτων παρακαταθήκης και εργασίας και οι απαιτούμενοι όγκοι διαλυμάτων για την παρασκευή τους.

9.6. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΕΝΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΥΡΩΝ

Κατά την αξιολόγηση της μεθόδου παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν πρότυπα δείγματα καμπύλης βαθμονόμησης και δείγματα ελέγχου σε ούρα αλόγου εμβολιασμένα με τον αναλύτη. Για το σκοπό επιλέχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ούρων διαφορετικών αλόγων (αρσενικά, θηλυκά και εκτομίες), τα οποία κατά τον έλεγχο σάρωσης και ημιποσοτικοποίησης του Εργαστηρίου με την τεχνική GC/MS παρουσίασαν πολύ χαμηλή συγκέντρωση 3-μεθοξυτυραμίνης. Παρασκευάστηκε έτσι ένα μίγμα από τα παραπάνω δείγματα (pooled urine), το οποίο μοιράστηκε σε ποσότητες των 100 mL που αποθηκεύθηκαν στους -20 °C και ακολούθως χρησιμοποιήθηκαν για κάθε αναλυτική διαδικασία σε όλα τα πειράματα αξιολόγησης της μεθόδου.

Τα πρότυπα δείγματα της καμπύλης βαθμονόμησης (standard calibration samples, STD's) παρασκευάστηκαν κάθε εργαστηριακή ημέρα σε έξι επίπεδα συγκέντρωσης (1,0, 2,5, 5,0, 10,0 15,0 και 20 μg mL⁻¹) με εμβολιασμό κατάλληλου όγκου διαλύματος εργασίας της 3-μεθοξυτυραμίνης σε 2,5 mL λευκού δείγματος ούρων αλόγου και ακόλουθη προσθήκη κατάλληλου όγκου νερού για ισοστάθμιση του όγκου σε όλα τα δείγματα. Τα πρότυπα δείγματα ελέγχου (quality control samples, QC's) παρασκευάστηκαν με αντίστοιχο τρόπο σε τέσσερα επίπεδα συγκέντρωσης, χρησιμοποιώντας για τον εμβολιασμό διαφορετικό διάλυμα εργασίας του αναλύτη από αυτό που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: 3-Μεθοξυτυραμίνη

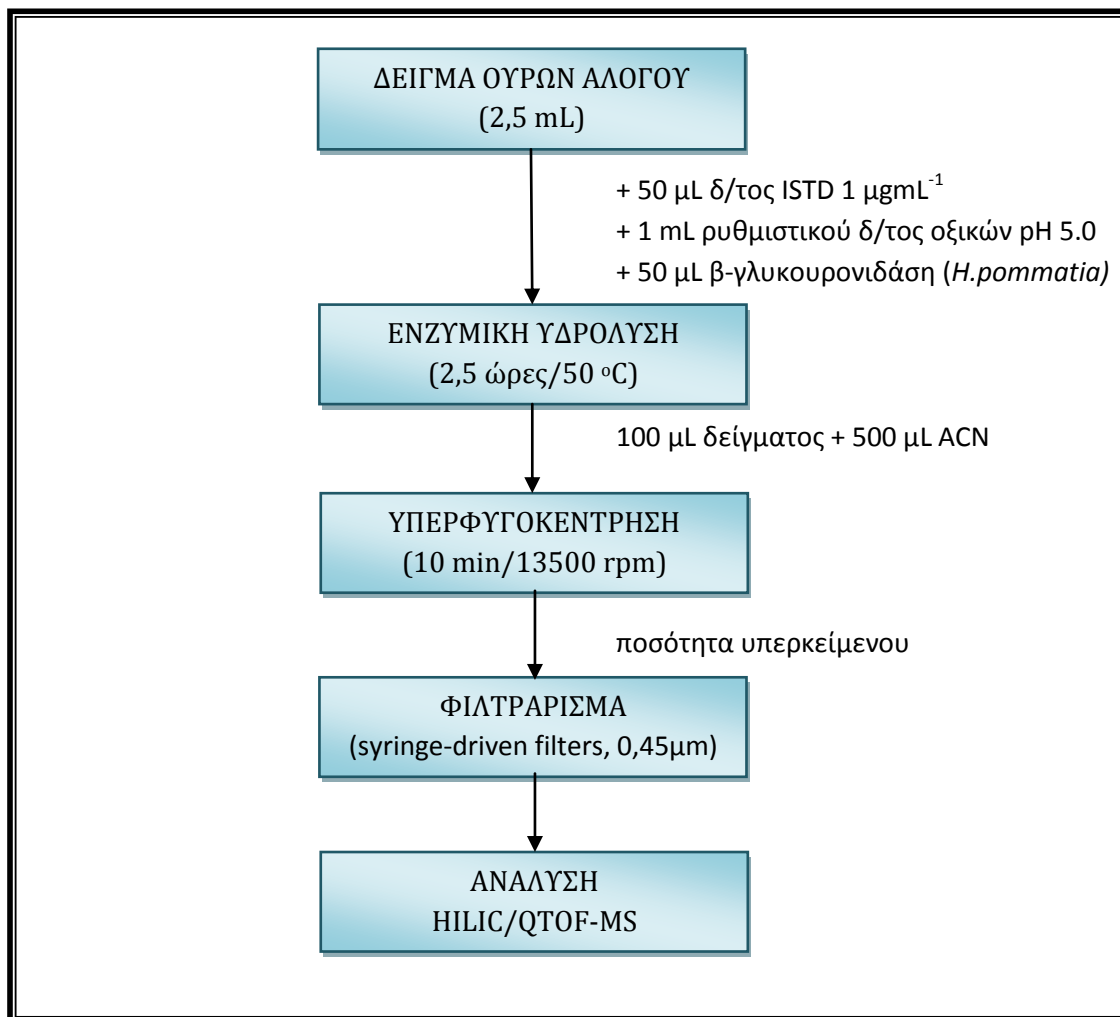
δειγμάτων βαθμονόμησης. Οι τιμές της συγκέντρωσης της 3-μεθοξυτυραμίνης στα δείγματα ελέγχου καθορίστηκαν ως εξής: χαμηλή συγκέντρωση ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$), συγκέντρωση αντίστοιχη με το απαγορευμένο όριο που έχει καθοριστεί από τον AORC για την 3-μεθοξυτυραμίνη ($4 \mu\text{g mL}^{-1}$), συγκέντρωση που αντιστοιχεί στο μέσο περίπου για το μελετούμενο εύρος γραμμικότητας ($12 \mu\text{g mL}^{-1}$), συγκέντρωση υψηλή που αντιστοιχεί στο 90% του τελευταίου σημείου της καμπύλης (ανώτερο όριο ποσοτικοποίησης, ULOQ) ($18 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Στο [Παράρτημα 26](#) παρουσιάζεται αναλυτικά ο τρόπος παρασκευής των προτύπων εμβολιασμένων δειγμάτων της καμπύλης αναφοράς και των δειγμάτων ελέγχου.

9.7. ΠΟΡΕΙΑ ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΥΡΩΝ

Τα προς ανάλυση δείγματα ούρων (όγκου 2,5 mL) μεταγγίζονται σε ψηλούς υάλινους σωλήνες και ακολούθως προστίθενται 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος οξικών (pH 5,0) (4.4.3.2), 50 μL διαλύματος ενζύμου β-γλυκουρονιδάσης από *Helix pommatia* (4.4.2.2.) και 50 μL διαλύματος εργασίας του εσωτερικού προτύπου (3-μεθοξυτυραμίνη- d_4). Ακολουθεί ανάδευση, πωματισμός των σωλήνων και τοποθέτησή τους στο φούρνο για επώαση στους 50 °C για 2,5 ώρες. Μετά το πέρας της υδρόλυσης, 100 μL του μίγματος από κάθε υδρολυμένο δείγμα μεταγγίζονται σε φιαλίδια Erpendorf και προστίθενται 500 μL ακετονιτριλίου καθαρότητας LC/MS (4.4.1.5). Ακολουθεί υπερφυγοκέντρηση των δειγμάτων για 10 min με ταχύτητα 13500 rpm σε κατάλληλη φυγόκεντρο που φέρει κεφαλή κατάλληλη για υποδοχή φιαλιδίων Erpendorf. Ποσότητα του υπερκείμενου υγρού φιλτράρεται με τη βοήθεια σύριγγας μέσω φίλτρων με διάμετρο πόρων 0,45 μm (Millex HV syringe driven filters, Millipore) και το προς ανάλυση φιλτραρισμένο δείγμα μεταγγίζεται σε υάλινα φιαλίδια του αυτόματου δειγματολήπτη (vials με insert). Συνοπτικά η πορεία κατεργασίας απεικονίζεται στο διάγραμμα που ακολουθεί (Σχήμα 9.7).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: 3-Μεθοξυτυραμίνη



Σχήμα 9.7: Πορεία κατεργασίας δειγμάτων ούρων για τον ποσοτικό προσδιορισμό και την επιβεβαίωση της 3-μεθοξυτυραμίνης

9.8. ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί και σε προηγούμενα κεφάλαια, τα ούρα των αλόγων αποτελούν ένα ιδιαίτερα πολύπλοκο υλικό, η πολυσύστατη φύση του οποίου διαφοροποιείται συχνά σε μεγάλο βαθμό από το ένα δείγμα στο άλλο. Η επίδραση του υποστρώματος στην απόκριση του αναλύτη και του εσωτερικού προτύπου από ουσίες του μητρικού υλικού που δεν ανιχνεύονται αλλά συνεκλούνται και επηρεάζουν τον ιονισμό μελετήθηκε εκτενώς για να εξασφαλιστεί η εξαγωγή αξιόπιστων αποτελεσμάτων ποσοτικού προσδιορισμού.

Για τη μελέτη του μεγέθους του φαινομένου της ιοντικής καταστολής στην παρούσα εργασία παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν καμπύλες αναφοράς της 3-μεθοξυτυραμίνης σε εύρος συγκεντρώσεων 1-20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (standard calibration curves) σε εμβολιασμένα δείγματα τριών διαφορετικών παρτίδων ούρων αλόγων καθώς και σε υδατικά δείγματα. Τα δείγματα για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης παρασκευάστηκαν και κατεργάστηκαν σύμφωνα με την πορεία που προαναφέρθηκε και αναλύθηκαν εις διπλούν με την προτεινόμενη μέθοδο HILIC/QTOF-MS. Ως απόκριση λαμβάνεται ο λόγος της επιφάνειας της

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: 3-Μεθοξυτυραμίνη

χρωματογραφικής κορυφής της 3-μεθοξυτυραμίνης (m/z 151,0754) προς την επιφάνεια της χρωματογραφικής κορυφής του δευτεριωμένου εσωτερικού προτύπου (m/z 155,1005). Οι εξισώσεις συμμεταβολής που ελήφθησαν για τις τέσσερις καμπύλες αναφοράς παρουσιάζονται στον Πίνακα 9.1, στον οποίο παρατίθενται επίσης οι τιμές της τυπικής απόκλισης για την τομή (s_a) και την κλίση (s_b), ο συντελεστής συσχέτισης (r) και το τετράγωνο αυτού (r^2) και το τυπικό σφάλμα. Διαπιστώθηκε ότι η τιμή της κλίσης των καμπυλών αναφοράς δεν παρουσιάζει σημαντική διακύμανση μεταξύ των διαφορετικών παρτίδων ούρων και των δειγμάτων σε νερό (Σχήμα 9.8). Ακολούθως, στον Πίνακα 9.2 παρουσιάζονται συνοπτικά τα αποτελέσματα αξιολόγησης της επίδρασης του υποστρώματος στην απόκριση της 3-μεθοξυτυραμίνης και του ισοτοπικά επισημασμένου αναλόγου αυτής καθώς και στο λόγο των αποκρίσεων του αναλύτη προς του εσωτερικού προτύπου σε τρία επίπεδα συγκέντρωσης των προτύπων δειγμάτων. Οι τιμές της απόκρισης και της σχετικής απόκρισης στα διαφορετικά δείγματα ούρων παρουσιάζονται κανονικοποιημένες ως προς τις αντίστοιχες τιμές που ελήφθησαν από την ανάλυση των υδατικών δειγμάτων. Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα του Πίνακα, για όλα τα δείγματα ούρων που μελετήθηκαν διαπιστώθηκε καταστολή σήματος για τον αναλύτη και το εσωτερικό πρότυπο, η ένταση του οποίου κυμαίνεται σημαντικά μεταξύ των διαφορετικών παρτίδων ούρων. Παρ' όλ' αυτά η χρησιμοποίηση του δευτεριωμένου αναλόγου του αναλύτη ως εσωτερικό πρότυπο, του οποίου η απόκριση υφίσταται αναλόγου βαθμού καταστολή με αυτή του αναλύτη οδήγησε σε επαναληψιμα αποτελέσματα του λόγου των αποκρίσεων μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων ούρων. Επομένως, η ποσοτικοποίηση της 3-μεθοξυτυραμίνης σε ύποπτα δείγματα ούρων αλόγων μπορεί να πραγματοποιηθεί με την τεχνική της καμπύλης αναφοράς και για τον έλεγχο αξιολόγησης της μεθόδου χρησιμοποιήθηκε ένα μίγμα λευκών δειγμάτων ούρων (pooled blank urine) για την παρασκευή των προτύπων δειγμάτων και των δειγμάτων ελέγχου.

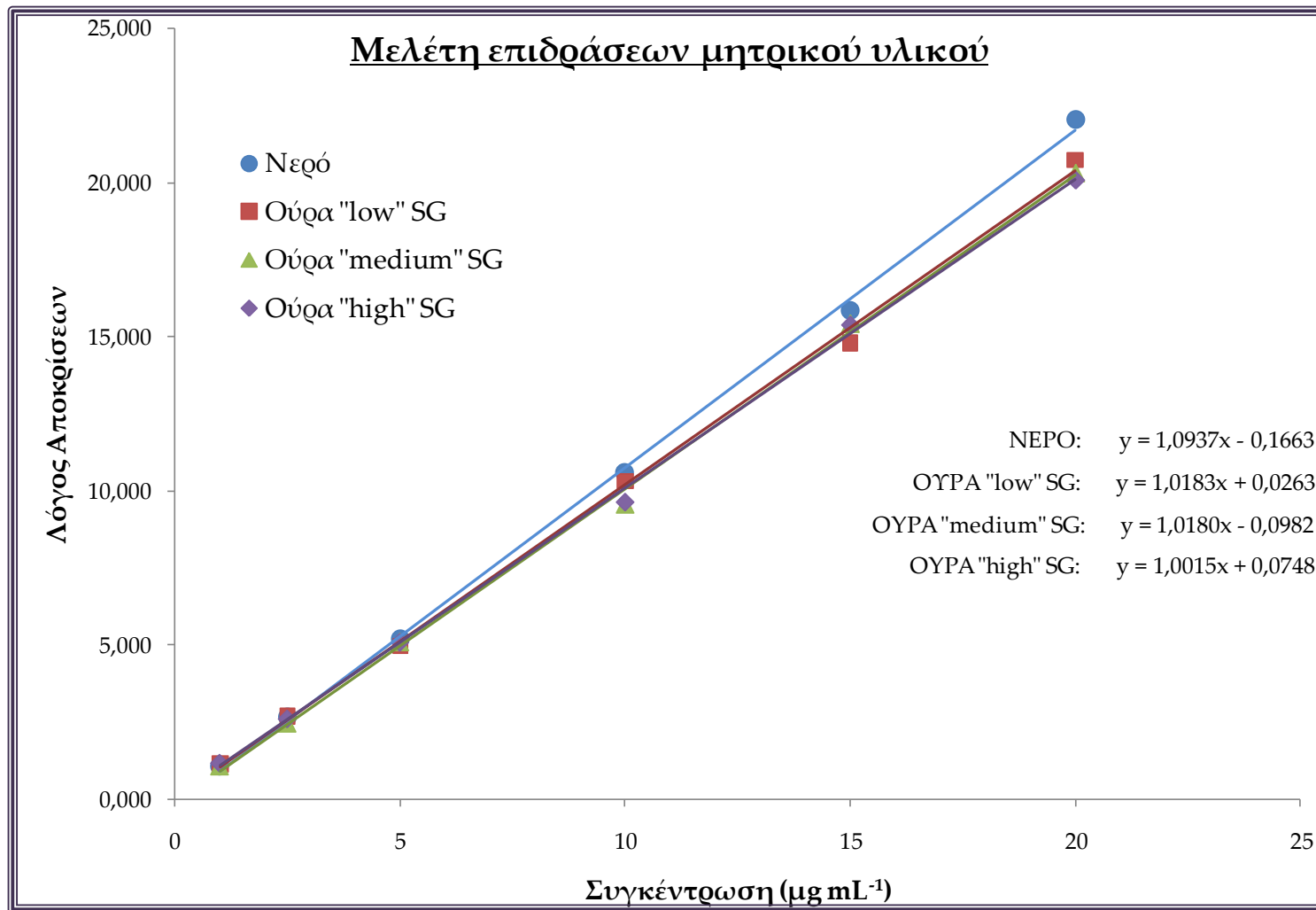
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: 3-Μεθοξυτυραμίνη

ΠΙΝΑΚΑΣ 9.1: Αποτελέσματα στατιστικής επεξεργασίας των καμπυλών αναφοράς της 3-μεθοξυτυραμίνης σε υδατικά δείγματα και σε δείγματα ούρων χαμηλού ('low'), μεσαίου ('medium') και υψηλού ('high') ειδικού βάρους (specific gravity, SG)

ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ	ΕΙΣΩΣΗ ΠΑΛΙΝΔΡΟΜΗΣΗΣ	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ		r	r ²	ΤΥΠΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ
		ΤΟΜΗΣ (s _a)	ΚΛΙΣΗΣ (s _b)			
Νερό	$\gamma = 1,094 x - 0,17$	0,20	0,018	0,9995	0,998	0,30
Ούρα 'low' SG	$\gamma = 1,018 x + 0,03$	0,22	0,020	0,9993	0,998	0,33
Ούρα 'medium' SG	$\gamma = 1,018 x - 0,10$	0,20	0,018	0,9994	0,998	0,30
Ούρα 'high' SG	$\gamma = 1,001 x + 0,07$	0,18	0,016	0,9995	0,998	0,27

ΠΙΝΑΚΑΣ 9.2: Αποτελέσματα μελέτης επίδρασης του μητρικού υλικού στην απόκριση της 3-μεθοξυτυραμίνης (3MT) και του εσωτερικού προτύπου (3MT-d₄) μετά από παρασκευή και ανάλυση καμπυλών αναφοράς σε υδατικά δείγματα και σε δείγματα ούρων χαμηλού ('low'), μεσαίου ('medium') και υψηλού ('high') ειδικού βάρους (specific gravity, SG). Οι τιμές των απόλυτων και σχετικών αποκρίσεων για τα δείγματα ούρων παρουσιάζονται κανονικοποιημένες ως προς τις αντίστοιχες τιμές των υδατικών δειγμάτων.

Υπόστρωμα	Συγκέντρωση 3-Μεθοξυτυραμίνης									Κλίση (b)
	Πρότυπο δείγμα (STD) 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$			Πρότυπο δείγμα (STD) 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$			Πρότυπο δείγμα (STD) 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$			
	Επιφάνεια 3MT	Επιφάνεια 3MT-d ₄	Λόγος Επιφανειών	Επιφάνεια 3MT	Επιφάνεια 3MT-d ₄	Λόγος Επιφανειών	Επιφάνεια 3MT	Επιφάνεια 3MT-d ₄	Λόγος Επιφανειών	
Νερό	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1,094
Ούρα 'low' SG	88	83	106	80	84	95	98	105	94	1,018
Ούρα 'medium' SG	75	76	99	82	84	95	93	101	91	1,018
Ούρα 'high' SG	64	58	111	48	49	98	63	69	91	1,001
%RSD	19,1	22,2	5,4	28,1	27,3	1,9	19,8	17,8	4,3	4,0



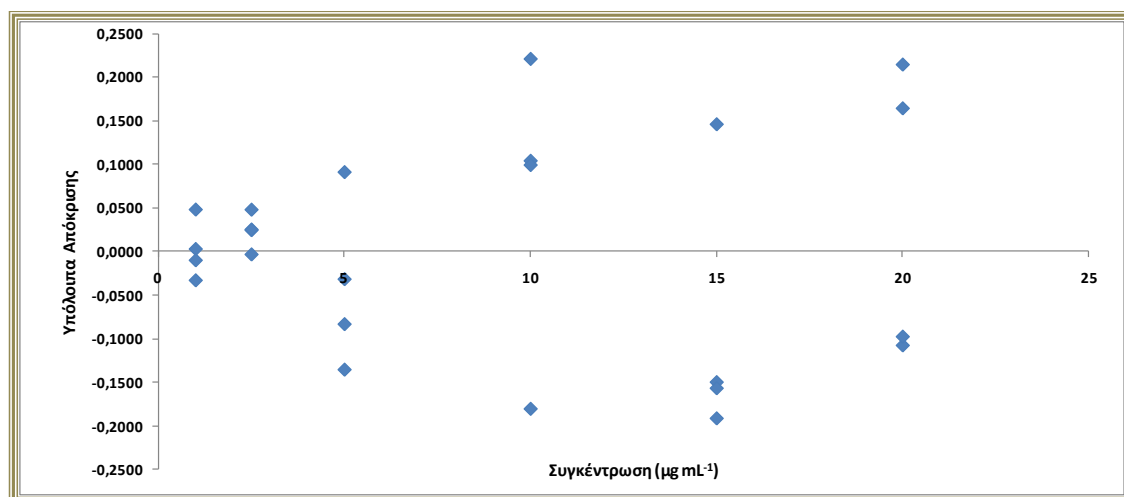
Σχήμα 9.8: Καμπύλες αναφοράς της 3-μεθόξυτυραμίνης σε νερό και διαφορετικά δείγματα ούρων.

9.9. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ 3-ΜΕΘΟΞΥΤΥΡΑΜΙΝΗΣ ΣΕ ΟΥΡΑ ΑΛΟΓΩΝ

9.9.1. Έλεγχος γραμμικότητας – Καμπύλες αναφοράς

Κατά την αξιολόγηση γραμμικότητας της μεθόδου παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν καμπύλες αναφοράς της 3-μεθοξυτυραμίνης σε πέντε εργαστηριακές ημέρες. Κάθε καμπύλη αναφοράς περιελάμβανε έξι πρότυπα με εύρος συγκεντρώσεων για τον αναλύτη $1 - 20 \mu\text{g mL}^{-1}$, ενώ παράλληλα αναλύθηκαν και ένα λευκό δείγμα χωρίς εσωτερικό πρότυπο (blank) και ένα μηδενικό δείγμα (λευκό δείγμα με εσωτερικό πρότυπο, zero). Κάθε πρότυπο παρασκευάστηκε και αναλύθηκε εις διπλούν (συνολικά 4 μετρήσεις ανά σημείο της καμπύλης βαθμονόμησης). Ως απόκριση λαμβάνεται ο λόγος της επιφάνειας της χρωματογραφικής κορυφής της 3-μεθοξυτυραμίνης προς την αντίστοιχη επιφάνεια του εσωτερικού προτύπου (3-μεθοξυτυραμίνη- d_4).


Αρχικά, πραγματοποιήθηκε έλεγχος ύπαρξης ομοσκεδαστικότητας για τα πρότυπα δείγματα της καμπύλης αναφοράς με την κατασκευή του διαγράμματος των υπολοίπων των αποκρίσεων συναρτήσει των επιπέδων συγκέντρωσης του αναλύτη για το μη ζυγισμένο γραμμικό μοντέλο (Σχήμα 9.9). Επιπρόσθετα, για την επιβεβαίωση απουσίας ετεροσκεδαστικότητας πραγματοποιήθηκε έλεγχος με εφαρμογή της δοκιμασίας F-test, για τη σύγκριση των διακυμάνσεων των υπολοίπων που αντιστοιχούν στο χαμηλότερο και στο υψηλότερο επίπεδο συγκέντρωσης. Ο υπολογιζόμενος λόγος των διακυμάνσεων (πειραματική τιμή F) συγκρίθηκε με τη θεωρητική τιμή που λαμβάνεται από πίνακες για $(N_A-1) = (N_B-1) = 3$ βαθμούς ελευθερίας (όπου $N_A=N_B=4$, ο αριθμός των μετρήσεων για κάθε σημείο) και στάθμη εμπιστοσύνης 99% (Πίνακας 9.3).



Σχήμα 9.9: Διαγραμματική απεικόνιση της κατανομής των υπολοίπων απόκρισης συναρτήσει της συγκέντρωσης της 3-μεθοξυτυραμίνης (μη ζυγισμένο γραμμικό μοντέλο) για τον έλεγχο ομοσκεδαστικότητας

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: 3-Μεθοξυτυραμίνη

Πίνακας 9.3: Δοκιμασία F για τον έλεγχο ομοσκεδαστικότητας μεταξύ του πρώτου και του τελευταίου σημείου της καμπύλης βαθμονόμησης

Στατιστικό Στοιχείο Υπολοίπων	Σημείο 1 (1 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	Σημείο 7 (20 $\mu\text{g mL}^{-1}$)
Μέση Τιμή (N=4)	0,002	0,04
Τυπική απόκλιση (SD)	0,034	0,17
Διακύμανση (SD^2)	0,001166	0,028829
$F_{\text{πειραματικό}} (SD_7^2 / SD_1^2)$	24,72	
$F_{\text{θεωρητικό}} (f_1 = f_7 = 3, 99\%)$	29,46	
$F_{\text{πειραματικό}} < F_{\text{θεωρητικό}}$  μη σημαντική διαφορά διακυμάνσεων		

Από την οπτική παρατήρηση του διαγράμματος των υπολοίπων και κυρίως από τα αποτελέσματα της δοκιμασίας F δεν κρίθηκε αναγκαία η χρησιμοποίηση ενός παράγοντα ζύγισης, και για την εξαγωγή των εξισώσεων συμμεταβολής των καμπυλών αναφοράς και για το σκοπό αυτό εφαρμόστηκε η απλή (μη ζυγισμένη) γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης. Τα αποτελέσματα ελέγχου της γραμμικότητας για κάθε εργαστηριακή ημέρα παρουσιάζονται αναλυτικά στο [Παράρτημα 27](#), ενώ στον Πίνακα 9.4 που ακολουθεί παρουσιάζονται συνοπτικά οι εξισώσεις συμμεταβολής για κάθε μια από τις πέντε σειρές μετρήσεων μαζί με τα όρια εμπιστοσύνης της τομής και της κλίσης και τις αντίστοιχες τιμές του συντελεστή συσχέτισης, του τυπικού σφάλματος και των τυπικών αποκλίσεων για την τομή και την κλίση. Διαπιστώθηκε ικανοποιητική γραμμικότητα, καθώς η τιμή του συντελεστή συσχέτισης βρέθηκε μεγαλύτερη από 0,9998. Το επί τοις εκατό σχετικό σφάλμα των πειραματικά υπολογιζόμενων συγκεντρώσεων των προτύπων δειγμάτων δεν ξεπέρασε την τιμή $\pm 15\%$.

Επιπλέον έγινε έλεγχος διέλευσης των καμπυλών αναφοράς από την αρχή των αξόνων. Με χρήση της δοκιμασίας Student (t-test), ελεγχθηκε εάν οι πειραματικές τιμές των εξισώσεων παλινδρόμησης διαφέρουν σημαντικά από τη θεωρητική τιμή μηδέν. Για το σκοπό αυτό, υπολογίστηκε η πειραματική τιμή t ($t_{\text{πειρ.}}$) από τη σχέση $t_{\text{πειρ.}} = \alpha / s_{\alpha}$, όπου α , η τομή της εκάστοτε εξίσωσης συμμεταβολής και s_{α} , η αντίστοιχη τυπική απόκλιση. Στη συνέχεια, συγκρίθηκε με τη θεωρητική τιμή $t_{\text{θεωρ.}}$ από τον πίνακα της κατανομής Student για στάθμη εμπιστοσύνης 95% και για N-2 βαθμούς ελευθερίας (όπου N, ο αριθμός των προτύπων της καμπύλης αναφοράς). Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα του Πίνακα 9.4 και για τις πέντε αναλυτικές δοκιμασίες οι υπολογισθείσες τιμές του λόγου $t_{\text{πειρ.}}$ δεν υπερβαίνουν την θεωρητική τιμή που για 4 βαθμούς ελευθερίας και στάθμη εμπιστοσύνης 95% είναι ίση με 2,78. Το γεγονός αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η τομή της ευθείας παλινδρόμησης δε διαφέρει σημαντικά από μηδέν και για την ποσοτικοποίηση της μεθοξυτυραμίνης στα ύποπτα δείγματα ούρων μπορεί να εφαρμοστεί ποσοτικοποίηση ενός σημείου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: 3-Μεθοξυτυραμίνη

Πίνακας 9.4: Αποτελέσματα στατιστικής επεξεργασίας των καμπυλών αναφοράς του σαλικυλικού οξέος σε εμβολιασμένα δείγματα ούρων για κάθε έναν από τους έξι προσδιορισμούς για τον έλεγχο γραμμικότητας της μεθόδου

ΣΕΙΡΑ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ	ΕΞΙΣΩΣΗ ¹ ΠΑΛΙΝΔΡΟΜΗΣΗΣ	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ		ΟΡΙΑ ΕΜΠΙΣΤΟΣΥΝΗΣ ΤΟΜΗΣ ²		ΟΡΙΑ ΕΜΠΙΣΤΟΣΥΝΗΣ ΚΛΙΣΗΣ ³		r^4	r^{25}	ΤΥΠΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ	α/s_α ⁶
		ΤΟΜΗΣ (s_α)	ΚΛΙΣΗΣ (s_b)	min	max	min	max				
1	$y = 0,5103 x + 0,056$	0,036	0,0032	-0,044	0,156	0,5014	0,5192	0,99992	0,9998	0,054	1,54
2	$y = 0,5351 x + 0,044$	0,060	0,0053	-0,123	0,210	0,5203	0,5499	0,9998	0,9996	0,089	0,73
3	$y = 0,5235 x + 0,077$	0,053	0,0047	-0,071	0,225	0,5103	0,5367	0,9998	0,9996	0,079	1,44
4	$y = 0,5201 x - 0,004$	0,027	0,0024	-0,079	0,070	0,5135	0,5268	0,99996	0,99992	0,040	0,16
5	$y = 0,5141 x + 0,012$	0,042	0,0037	-0,104	0,128	0,5038	0,5245	0,9998	0,9998	0,062	0,29

¹ Λόγος επιφανειών 3-μεθοξυτυραμίνης/3-μεθοξυτυραμίνης- d_4 (y) συναρτήσεως συγκέντρωσης 3-μεθοξυτυραμίνης (x), ελήφθησαν με εφαρμογή γραμμικής ανάλυσης παλινδρόμησης

² $\alpha \pm s_\alpha$ $t_{\text{θεωρητικό}}$ ($t_{\text{θεωρητικό}}=2,78$, στάθμη εμπιστοσύνης 95% και 4 (N-2) βαθμοί ελευθερίας)

³ $b \pm s_b$ $t_{\text{θεωρητικό}}$ ($t_{\text{θεωρητικό}}=2,78$, στάθμη εμπιστοσύνης 95% και 4 (N-2) βαθμοί ελευθερίας)

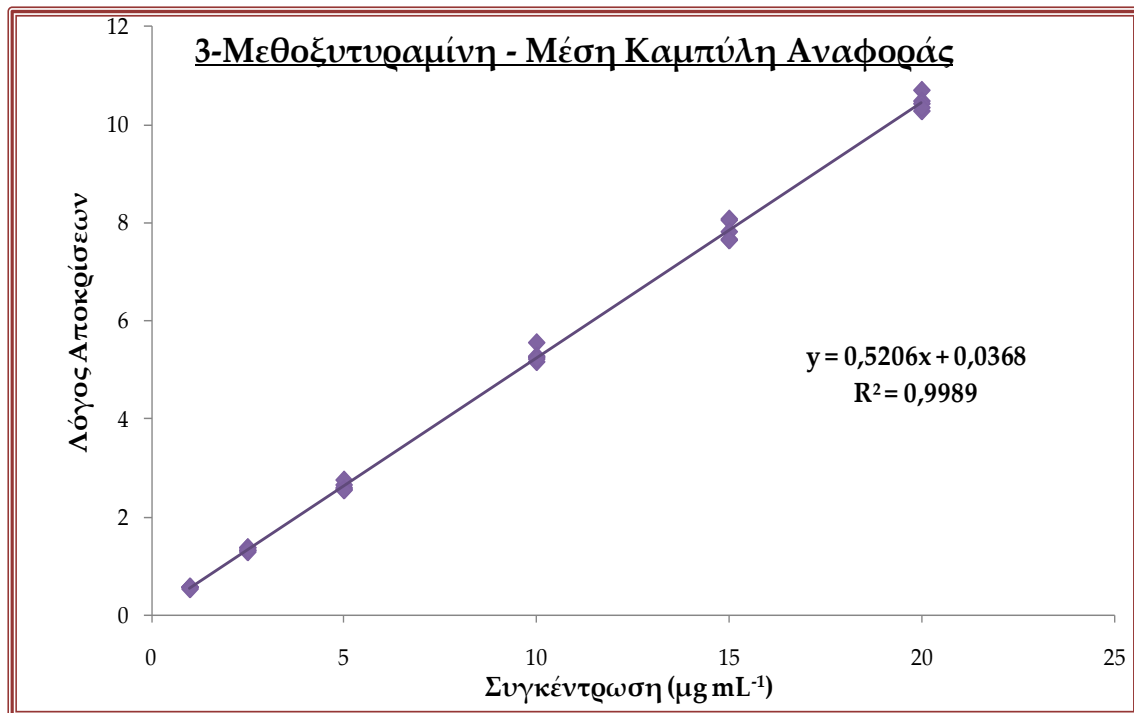
⁴ r : συντελεστής συσχέτισης

⁵ r^2 : συντελεστής προσδιορισμού (τετράγωνο συντελεστή συσχέτισης)

⁶ πειραματική τιμή δοκιμασίας Student για τον έλεγχο διέλευσης της καμπύλης από την αρχή των αξόνων (θεωρητική τιμή t : 2,78, (στάθμη εμπιστοσύνης 95%, 4 βαθμοί ελευθερίας))

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: 3-Μεθοξυτυραμίνη

Στο Σχήμα 9.10 απεικονίζεται η μέση καμπύλη για τη 3-μεθοξυτυραμίνη και για τις πέντε αναλυτικές δοκιμασίες και στον Πίνακα 9.5 παρουσιάζονται τα στατιστικά δεδομένα για τη μέση καμπύλη



Σχήμα 9.10: Μέση καμπύλη βαθμονόμησης που προκύπτει από τις πέντε αναλυτικές δοκιμασίες για την 3-μεθοξυτυραμίνη

Πίνακας 9.5: Στατιστική επεξεργασία μέσης καμπύλης βαθμονόμησης της 3-μεθοξυτυραμίνης		
Παράμετρος		Τιμή
Εξίσωση παλινδρόμησης		$y = 0,5206 x + 0,037$
Τυπική απόκλιση	τομής (s_a)	0,036
	κλίσης (s_b)	0,0032
Όρια εμπιστοσύνης τομής	min	-0,038
	max	0,112
Όρια εμπιστοσύνης κλίσης	min	0,5140
	max	0,5273
r		0,9994
r²		0,998
Τυπικό σφάλμα		0,12
α/s_a		1,008

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: 3-Μεθοξυτυραμίνη

9.9.2. Έλεγχος Ορθότητας (Accuracy) και Πιστότητας (Precision)

Πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση της ορθότητας και της πιστότητας της προτεινόμενης μεθόδου, τόσο κατά τη διάρκεια μιας εργαστηριακής ημέρας (within-day ή intra-day accuracy and precision), όσο και μεταξύ των ημερών (between-days ή inter-day accuracy and precision). Για τον έλεγχο αυτό παρασκευάστηκαν δείγματα ελέγχου (quality control samples, QC's) εμβολιασμένα με τον αναλύτη σε τέσσερα επίπεδα συγκέντρωσης (2, 4, 12 και 18 $\mu\text{g mL}^{-1}$), τα οποία κατεργάστηκαν και αναλύθηκαν όπως τα εμβολιασμένα δείγματα των καμπυλών αναφοράς. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, για την παρασκευή των δειγμάτων ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά διαλύματα παρακαταθήκης και εργασίας της 3-μεθοξυτυραμίνης από αυτά που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των προτύπων δειγμάτων βαθμονόμησης. Σε κάθε επίπεδο συγκέντρωσης παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν έξι δείγματα κάθε ημέρα, ενώ ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε σε πέντε εργαστηριακές ημέρες (συνολικά 30 μετρήσεις ανά επίπεδο συγκέντρωσης). Οι πειραματικά υπολογιζόμενες συγκεντρώσεις του αναλύτη στα δείγματα ελέγχου που αναλύθηκαν κατά την αξιολόγηση της μεθόδου και χρησιμοποιήθηκαν για την εξαγωγή των στατιστικών παραμέτρων της ορθότητας και της πιστότητας παρουσιάζονται αναλυτικά στο [Παράρτημα 28](#).

9.9.2.1. Ορθότητα (Accuracy)

Αξιολογήθηκε η ορθότητα της μεθόδου, τόσο με έλεγχο της ορθότητας εντός της κάθε δοκιμασίας, όσο και μεταξύ των ημερών.

Σε κάθε εργαστηριακή σειρά ανάλυσης υπολογίστηκε για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης:

- η μέση τιμή των πειραματικά υπολογιζόμενων συγκεντρώσεων των 6 δειγμάτων ελέγχου
- η τυπική απόκλιση (SD) αυτών και η επί τοις εκατό σχετική τυπική απόκλιση (% RSD)
- το επί τοις εκατό σχετικό σφάλμα (% E_r).

Ως μέτρο έκφρασης της ορθότητας χρησιμοποιείται το επί τοις εκατό σχετικό σφάλμα, το οποίο θα πρέπει να κυμαίνεται για τη μέση πειραματικά υπολογιζόμενη συγκέντρωση μεταξύ των τιμών -15 % και 15 % για κάθε επίπεδο που μελετήθηκε.

Τα αποτελέσματα της ορθότητας για κάθε αναλυτική δοκιμασία συνοψίζονται στους Πίνακες 9.6-9.10 και για το σύνολο των εργαστηριακών ημερών στον Πίνακα 9.11.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: 3-Μεθοξυτυραμίνη

Πίνακας 9.6: Αξιολόγηση ορθότητας μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού της 3-μεθοξυτυραμίνης κατά την 1^η σειρά μετρήσεων

1^η ΣΕΙΡΑ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ				
Επίπεδο Συγκέντρωσης ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		Μέση τιμή \pm SD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	%RSD	%E _r
1	2	1,92 \pm 0,12	6,5	-3,9
2	4	3,92 \pm 0,12	3,0	-2,1
3	12	11,79 \pm 0,39	3,3	-1,8
4	18	18,08 \pm 0,72	4,0	0,4

Πίνακας 9.7: Αξιολόγηση ορθότητας μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού της 3-μεθοξυτυραμίνης κατά την 2^η σειρά μετρήσεων

2^η ΣΕΙΡΑ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ				
Επίπεδο Συγκέντρωσης ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		Μέση τιμή \pm SD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	%RSD	%E _r
1	2	1,922 \pm 0,060	3,1	-3,9
2	4	3,75 \pm 0,12	3,2	-6,2
3	12	11,64 \pm 0,61	5,2	-3,0
4	18	17,74 \pm 0,57	3,2	-1,4

Πίνακας 9.8: Αξιολόγηση ορθότητας μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού της 3-μεθοξυτυραμίνης κατά την 3^η σειρά μετρήσεων

3^η ΣΕΙΡΑ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ				
Επίπεδο Συγκέντρωσης ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		Μέση τιμή \pm SD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	%RSD	%E _r
1	2	1,960 \pm 0,077	3,9	-2,0
2	4	3,95 \pm 0,14	3,5	-1,4
3	12	11,47 \pm 0,49	4,3	-4,4
4	18	17,82 \pm 0,92	5,1	-1,0

Πίνακας 9.9: Αξιολόγηση ορθότητας μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού της 3-μεθοξυτυραμίνης κατά την 4^η σειρά μετρήσεων

4^η ΣΕΙΡΑ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ				
Επίπεδο Συγκέντρωσης ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		Μέση τιμή \pm SD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	%RSD	%E _r
1	2	2,035 \pm 0,029	1,4	1,8
2	4	4,11 \pm 0,13	3,2	2,8
3	12	11,98 \pm 0,35	2,9	-0,2
4	18	18,06 \pm 0,33	1,8	0,4

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: 3-Μεθοξυτυραμίνη

Πίνακας 9.10: Αξιολόγηση ορθότητας μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού της 3-μεθοξυτυραμίνης κατά την 5^η σειρά μετρήσεων

5 ^η ΣΕΙΡΑ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ				
Επίπεδο Συγκέντρωσης ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		Μέση τιμή \pm SD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	%RSD	%E _r
1	2	2,073 \pm 0,059	2,8	3,6
2	4	4,030 \pm 0,097	2,4	0,4
3	12	12,00 \pm 0,58	4,9	0,0
4	18	17,80 \pm 0,39	2,2	-1,1

Πίνακας 9.11: Αξιολόγηση ορθότητας μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού της 3-μεθοξυτυραμίνης σε τέσσερα επίπεδα συγκέντρωσης και για τις πέντε αναλυτικές διαδικασίες

1 ^η - 5 ^η ΣΕΙΡΑ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ				
Επίπεδο Συγκέντρωσης ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		Μέση τιμή \pm SD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	%RSD	%E _r
1	2	1,982 \pm 0,068	3,4	-0,9
2	4	3,95 \pm 0,14	3,4	-1,2
3	12	11,78 \pm 0,23	1,9	-1,9
4	18	17,90 \pm 0,16	0,9	-0,6

Όπως διαπιστώνεται από τους παραπάνω πίνακες, η απόλυτη τιμή του επί τοις εκατό σχετικού σφάλματος κυμαίνεται από 0,0% έως 6,2%, δηλαδή εντός των αποδεκτών ορίων και επομένως η μέθοδος χαρακτηρίζεται από ορθότητα τόσο εντός της ημέρας όσο και δια των ημερών.

9.9.2.2. Πιστότητα

Για την αξιολόγηση της μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού της 3-μεθοξυτυραμίνης σε ούρα αλόγων μελετήθηκε τόσο η εντός της ημέρας πιστότητα (intra-day ή within-day precision), όσο και η μεταξύ των ημερών πιστότητα (inter-day ή between-days precision) και ως μέτρο αυτής χρησιμοποιήθηκε η επί τοις εκατό σχετική τυπική απόκλιση (%RSD). Για την εξαγωγή των στατιστικών παραμέτρων χρησιμοποιήθηκε η μονόδρομη ανάλυση διακύμανσης (one way ANOVA). Οι υπολογισμοί σε κάθε επίπεδο συγκέντρωσης έγιναν για 29 βαθμούς ελευθερίας, που αντιστοιχούν στις 30 αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν συνολικά (6 προσδιορισμοί ανά ημέρα x 5 ημέρες).

Για τον υπολογισμό της εντός της ημέρας επί τοις εκατό σχετικής τυπικής απόκλισης (%RSD_{intra-day}) εφαρμόστηκε η εξίσωση 8.6 και η μεταξύ των ημερών επί τοις εκατό σχετική τυπική απόκλιση (%RSD_{inter-day}) υπολογίστηκε από την εξίσωση 8.7.

Το κριτήριο αποδοχής των αποτελεσμάτων πιστότητας λαμβάνεται για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης με υπόλογίζοντας το RSD_{max} με εφαρμογή της εξίσωσης Horwitz (εξίσωση 8.8). Οι τιμές της εντός της ημέρας και δια των ημερών σχετικής τυπικής απόκλισης δε θα πρέπει να υπερβαίνουν τις τιμές 2/3 RSD_{max} και RSD_{max}, αντίστοιχα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: 3-Μεθοξυτυραμίνη

Τα αποτελέσματα αξιολόγησης της πιστότητας για τα τέσσερα επίπεδα συγκέντρωσης που μελετήθηκαν συνοψίζονται στον Πίνακα 9.12 που ακολουθεί. Η εντός της ημέρας και δια των ημερών σχετική τυπική απόκλιση δεν ξεπέρασαν τις τιμές 4,2 και 3,2, αντίστοιχα και για τα τέσσερα επίπεδα συγκέντρωσης βρέθηκαν εντός των αποδεκτών ορίων που υπολογίστηκαν από την εξίσωση Horwitz.

Επιπρόσθετα, σε κάθε αναλυτική δοκιμασία εφαρμόστηκε για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης η δοκιμασία Q του Dixon, με σκοπό να ελεγχθεί η ύπαρξη τυχόν έκτροπων τιμών. Για το σκοπό αυτό τα αποτελέσματα των μετρήσεων κάθε ημέρας τοποθετήθηκαν κατά αύξουσα σειρά ($x_1 < x_2 < x_3 \dots < x_6$) και υπολογίστηκαν οι τιμές $Q_{\text{πειρ, min}}$ (εξίσωση 8.9) και $Q_{\text{πειρ, max}}$ (εξίσωση 8.10) για την ελάχιστη (x_1) και τη μέγιστη (x_6) τιμή, αντίστοιχα και συγκρίθηκαν με την κρίσιμη τιμή $Q_{\text{θεωρ.}}$ για στάθμη εμπιστοσύνης 95%.

Εάν $Q_{\text{πειραμ.}} > Q_{\text{θεωρ.}}$ τότε η τιμή χαρακτηρίζεται ως έκτροπη και μπορεί να απορριφθεί σε δεδομένη στάθμη εμπιστοσύνης. Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας ανίχνευσης έκτροπων τιμών για κάθε μία δοκιμασία παρουσιάζονται στον Πίνακα 9.13.

Πίνακας 9.12: Αξιολόγηση πιστότητας μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού της 3-μεθοξυτυραμίνης σε ούρα αλόγων

Σειρά Μετρήσεων	$C_{\text{πειραμ}} \pm SD$ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	$C_{\text{θεωρ.}} (\mu\text{g mL}^{-1})$			
		2	4	12	18
1		1,92 ± 0,12	3,92 ± 0,12	11,79 ± 0,39	18,07 ± 0,72
2		1,922 ± 0,060	3,75 ± 0,12	11,64 ± 0,61	17,74 ± 0,57
3	$C_{\text{πειραμ}} \pm SD$ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1,960 ± 0,077	3,95 ± 0,14	11,47 ± 0,49	17,82 ± 0,92
4		2,035 ± 0,029	4,11 ± 0,13	11,98 ± 0,35	18,06 ± 0,33
5		2,073 ± 0,059	4,030 ± 0,097	12,00 ± 0,58	17,80 ± 0,39
Ολική μέση τιμή (overall mean)		1,983	3,95	11,78	17,90
Αριθμός μετρήσεων (n)		30	30	30	30
Μέσο τετράγωνο intra-day ($MS_{\text{intra-day}}$) ¹		0,00589	0,01480	0,24523	0,38789
Μέσο τετράγωνο inter-day ($MS_{\text{inter-day}}$) ¹		0,02803	0,10935	0,30574	0,14929
Εντός της ημέρας % σχετική τυπική απόκλιση ($\%RSD_{\text{intra-day}}$)		3,9	3,1	4,2	3,5
Μεταξύ των ημερών % σχετική τυπική απόκλιση ($\%RSD_{\text{inter-day}}$)		3,1	3,2	0,9	N.V ³
Κριτήρια Αποδοχής	$\%RSD_{\text{intra max}}$ ²	9,9	9,1	8,0	7,6
	$\%RSD_{\text{inter max}}$ ²	14,8	13,7	12,0	11,4

¹ Εντός της ημέρας και δια των ημερών μέσα τετράγωνα, υπολογίστηκαν με την εφαρμογή one-way ANOVA

² Μέγιστη αποδεκτή τιμή, υπολογίζεται με εφαρμογή της εξίσωσης Horwitz

³ N.V: non variable

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών
Ορίου σε Ούρα Αλόγων: 3-Μεθοξυτυραμίνη**

Πίνακας 9.13: Εφαρμογή δοκιμασίας Q για την ανίχνευση έκτροπων τιμών

1^η ΣΕΙΡΑ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ						
Επίπεδο Συγκέντρωσης ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Αριθμός μετρήσεων	$Q_{\text{πειρ,min}}$	$Q_{\text{πειρ,max}}$	Κρίσιμη τιμή ($Q_{\text{θεωρ.}}$)	Έκτροπη τιμή	
1	2	6	0,286	0,542	0,625	✗
2	4	6	0,227	0,448	0,625	✗
3	12	6	0,294	0,425	0,625	✗
4	18	6	0,167	0,205	0,625	✗
2^η ΣΕΙΡΑ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ						
Επίπεδο Συγκέντρωσης ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Αριθμός μετρήσεων	$Q_{\text{πειρ,min}}$	$Q_{\text{πειρ,max}}$	Κρίσιμη τιμή ($Q_{\text{θεωρ.}}$)	Έκτροπη τιμή	
1	2	6	0,748	0,020	0,625	1 έκτροπη τιμή
2	4	6	0,441	0,169	0,625	✗
3	12	6	0,347	0,498	0,625	✗
4	18	6	0,323	0,322	0,625	✗
3^η ΣΕΙΡΑ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ						
Επίπεδο Συγκέντρωσης ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Αριθμός μετρήσεων	$Q_{\text{πειρ,min}}$	$Q_{\text{πειρ,max}}$	Κρίσιμη τιμή ($Q_{\text{θεωρ.}}$)	Έκτροπη τιμή	
1	2	6	0,149	0,565	0,625	✗
2	4	6	0,264	0,297	0,625	✗
3	12	6	0,263	0,159	0,625	✗
4	18	6	0,420	0,236	0,625	✗
4^η ΣΕΙΡΑ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ						
Επίπεδο Συγκέντρωσης ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Αριθμός μετρήσεων	$Q_{\text{πειρ,min}}$	$Q_{\text{πειρ,max}}$	Κρίσιμη τιμή ($Q_{\text{θεωρ.}}$)	Έκτροπη τιμή	
1	2	6	0,431	0,315	0,625	✗
2	4	6	0,413	0,058	0,625	✗
3	12	6	0,283	0,185	0,625	✗
4	18	6	0,043	0,063	0,625	✗
5^η ΣΕΙΡΑ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ						
Επίπεδο Συγκέντρωσης ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Αριθμός μετρήσεων	$Q_{\text{πειρ,min}}$	$Q_{\text{πειρ,max}}$	Κρίσιμη τιμή ($Q_{\text{θεωρ.}}$)	Έκτροπη τιμή	
1	2	6	0,459	0,069	0,625	✗
2	4	6	0,494	0,012	0,625	✗
3	12	6	0,110	0,345	0,625	✗
4	18	6	0,106	0,444	0,625	✗
1^η - 5^η ΣΕΙΡΑ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ						
Επίπεδο Συγκέντρωσης ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Αριθμός μετρήσεων	$Q_{\text{πειρ,min}}$	$Q_{\text{πειρ,max}}$	Κρίσιμη τιμή ($Q_{\text{θεωρ.}}$)	Έκτροπη τιμή	
1	2	5	0,004	0,249	0,710	✗
2	4	5	0,454	0,229	0,710	✗
3	12	5	0,314	0,047	0,710	✗
4	18	5	0,166	0,036	0,710	✗

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: 3-Μεθοξυτυραμίνη

9.9.3. Όριο Ανίχνευσης και Ποσοτικοποίησης

Ο προσδιορισμός του ορίου ανίχνευσης (limit of detection, LOQ) και του ορίου ποσοτικοποίησης (limit of quantitation, LOQ) πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τους ορισμούς του του ICH Topic Q2B, με εφαρμογή των ακόλουθων εξισώσεων.

$$LOD = 3.3 \frac{S_a}{b} \quad [9-1]$$

$$LOQ = 10 \frac{S_a}{b} \quad [9-2]$$

Όπου s_a , η τυπική απόκλιση της τομής και b , η κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης. Λαμβάνοντας υπόψη τα δεδομένα στατιστικής επεξεργασίας των καμπυλών αναφοράς τριών αναλυτικών σειρών το όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της 3-μεθοξυτυραμίνης υπολογίστηκαν $0,312 \mu\text{g mL}^{-1}$ και $0,946 \mu\text{g mL}^{-1}$, αντίστοιχα.

9.9.4. Χρωματογραφικά Χαρακτηριστικά

Λόγος σήματος προς θόρυβο (Signal to noise ratio, S/N)

Από την οπτική παρατήρηση των χρωματογραφήματων διαπιστώθηκε ότι στο χαμηλότερης συγκέντρωσης πρότυπο των καμπυλών αναφοράς ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) ισχύει $S/N \gg 10$ (ύψος χρωματογραφικής κορυφής της οξέος σε αυθαίρετες μονάδες προς το ύψος της γραμμής βάσης πριν την αρχή της 3-μεθοξυτυραμίνης κορυφής σε αυθαίρετες μονάδες). Στο [Παράρτημα 29](#) παρατίθεται χρωματογράφημα δείγματος ούρων αλόγου εμβολιασμένο με τον αναλύτη σε συγκέντρωση ίση με το κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Σχετικός χρόνος ανάσχεσης (Relative retention time, RRT)

Αντιστοιχεί στο λόγο του χρόνου ανάσχεσης της προσδιοριζόμενης ουσίας (3-μεθοξυτυραμίνη) προς το χρόνο ανάσχεσης του εσωτερικού προτύπου (3-μεθοξυτυραμίνη- d_4). Διαπιστώθηκε μεταξύ των ημερών σταθερότητα, τόσο στους χρόνους ανάσχεσης ($3,42 \pm 0,23 \text{ min}$ και $3,42 \pm 0,24 \text{ min}$, για τον αναλύτη και το εσωτερικό πρότυπο, αντίστοιχα), όσο και στο σχετικό χρόνο ανάσχεσης (%RSD = 0,5, N=10).

9.9.5. Ειδικότητα (Specificity) - Παρεμποδίσεις από το υπόστρωμα (Matrix interference)

Η ειδικότητα της μεθόδου αποδεικνύεται από τα διαφορετικά διαγνωστικά ιόντα και τη διαφορά των σχετικών χρόνων ανάσχεσης των απαγορευμένων ή μη ουσιών, παρόμοιας δομής σε σχέση με τη 3-μεθοξυτυραμίνη. Για τη μελέτη της ειδικότητας παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν ένα λευκό δείγμα ούρων αλόγου, ένα δείγμα ούρων εμβολιασμένο με τον αναλύτη σε συγκέντρωση $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ (δείγμα που αντιστοιχεί στη συγκέντρωση ορίου) και πέντε δείγματα ούρων (spec1-spec5) εμβολιασμένα με ουσίες παραπλήσιας δομής και άλλες απαγορευμένες ουσίες. Διαπιστώθηκε απουσία παρεμποδιστικών κορυφών στους χρόνους έκλουσης του αναλύτη και του εσωτερικού προτύπου από τις ουσίες που μελετήθηκαν.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: 3-Μεθοξυτυραμίνη

Προκειμένου να ελεγχθεί η απουσία παρεμποδίσεων από το υπόστρωμα κατεργάστηκαν και αναλύθηκαν τέσσερα διαφορετικά δείγματα ούρων αλόγων που παρουσίασαν πολύ χαμηλά επίπεδα 3-μεθοξυτυραμίνης κατά τον έλεγχο σάρωσης και ημιοσοτικοποίησης του εργαστηρίου με την τεχνική GC/MS. Σε ότι αφορά το ιοντικά χρωματογραφήματα του αναλύτη, δεν παρατηρήθηκαν κορυφές που να υπερβαίνουν σε ένταση το 10% της σχετικής απόκρισης της 3-μεθοξυτυραμίνης σε συγκέντρωση που αντιστοιχεί στο χαμηλότερο όριο ποσοτικοποίησης ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$). Σε ό,τι αφορά τα ιοντικά χρωματογραφήματα του εσωτερικού προτύπου διαπιστώθηκε απουσία παρεμποδιστικών κορυφών του υποστρώματος που να συνεκλούνται με αυτό. Στο Παράρτημα 29 παρουσιάζονται τα ιοντικά χρωματογραφήματα μη εμβολιασμένου δείγματος ούρων συγκριτικά με τα χρωματογραφήματα του ίδιου δείγματος ούρων εμβολιασμένο με τον αναλύτη στο κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης, $1 \mu\text{g mL}^{-1}$.

9.10. ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ 3-ΜΕΘΟΞΥΤΥΡΑΜΙΝΗΣ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΟΥΡΩΝ ΑΛΟΓΩΝ (CONFIRMATION, IDENTIFICATION)

Με την προτεινόμενη μεθοδολογία η ταυτοποίηση της 3-μεθοξυτυραμίνης στα ύποπτα δείγματα πραγματοποιείται με επανάλυση MS/MS των κατεργασμένων δειγμάτων σε υψηλότερη τιμή της ενέργειας θραυσματοποίησης του συστήματος QTOF-MS από αυτή που εφαρμόζεται για την ποσοτικοποίηση και παρακολούθηση της αναλογίας τριών διαγνωστικών ιόντων του αναλύτη (του πρωτονιωμένου μοριακού ιόντος και δύο θυγατρικών ιόντων που σχηματίζονται με απομόνωση και θραυσματοποίηση του πρώτου). Ελέγχθηκε η επαναληψιμότητα της σχετικής αναλογίας των διαγνωστικών ιόντων ως προς το κύρια σχηματιζόμενο διαγνωστικό ιόν, που αποτελεί κριτήριο για την επιβεβαίωση ύπαρξης του αναλύτη στο ύποπτο δείγμα. Για το σκοπό αυτό, υπολογίστηκε η σχετική αναλογία των διαγνωστικών ιόντων της 3-μεθοξυτυραμίνης σε 24 εμβολιασμένα δείγματα ούρων σε συγκεντρώσεις που κάλυπταν όλη τη γραμμική περιοχή που μελετήθηκε, τα οποία παρασκευάστηκαν κατά το διάστημα αξιολόγησης της μεθόδου ποσοτικοποίησης και επανααναλύθηκαν σε τρεις εργαστηριακές ημέρες με την επιβεβαιωτική μέθοδο. Η μέση τιμή (\pm τυπική απόκλιση) για τις σχετικές εντάσεις των ιόντων με τιμές m/z 119,0491 και 151,0754 (ως προς την ένταση του κύρια σχηματιζόμενου ιόντος με τιμή m/z 91,0542) ήταν 56,3 (\pm 1,6) και 52,2 (\pm 2,7), αντίστοιχα ($N=20$). Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι οι αναλογίες των διαγνωστικών ιόντων της 3-μεθοξυτυραμίνης παρουσιάζουν ικανοποιητική επαναληψιμότητα μεταξύ των διαφορετικών επιπέδων συγκέντρωσης του αναλύτη και μεταξύ των ημερών.

Επιπρόσθετα, μελετήθηκε η ικανότητα μέτρησης ακριβούς μάζας (mass accuracy). Υπολογίστηκε το σφάλμα μάζας (τιμών m/z) των διαγνωστικών θυγατρικών ιόντων του αναλύτη και του εσωτερικού προτύπου κατά τη διαδικασία επιβεβαίωσης (αναλυση MS/MS) στα προαναφερθέντα δείγματα και βρέθηκε ότι κυμαίνεται από 1,1 – 16,5 ppm, ενώ για τα πρόδρομα μητρικά ιόντα στο φάσμα πλήρους σάρωσης που λαμβάνεται κατά τη διαδικασία 'targeted MS/MS το σφάλμα μάζας δεν ξεπέρασε τα 10 ppm, γεγονός που βρίσκεται σε συμφωνία με τις προδιαγραφές λειτουργίας του συστήματος LC/QTOF-MS που χρησιμοποιήθηκε.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: 3-Μεθοξυτυραμίνη

9.11. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΕ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

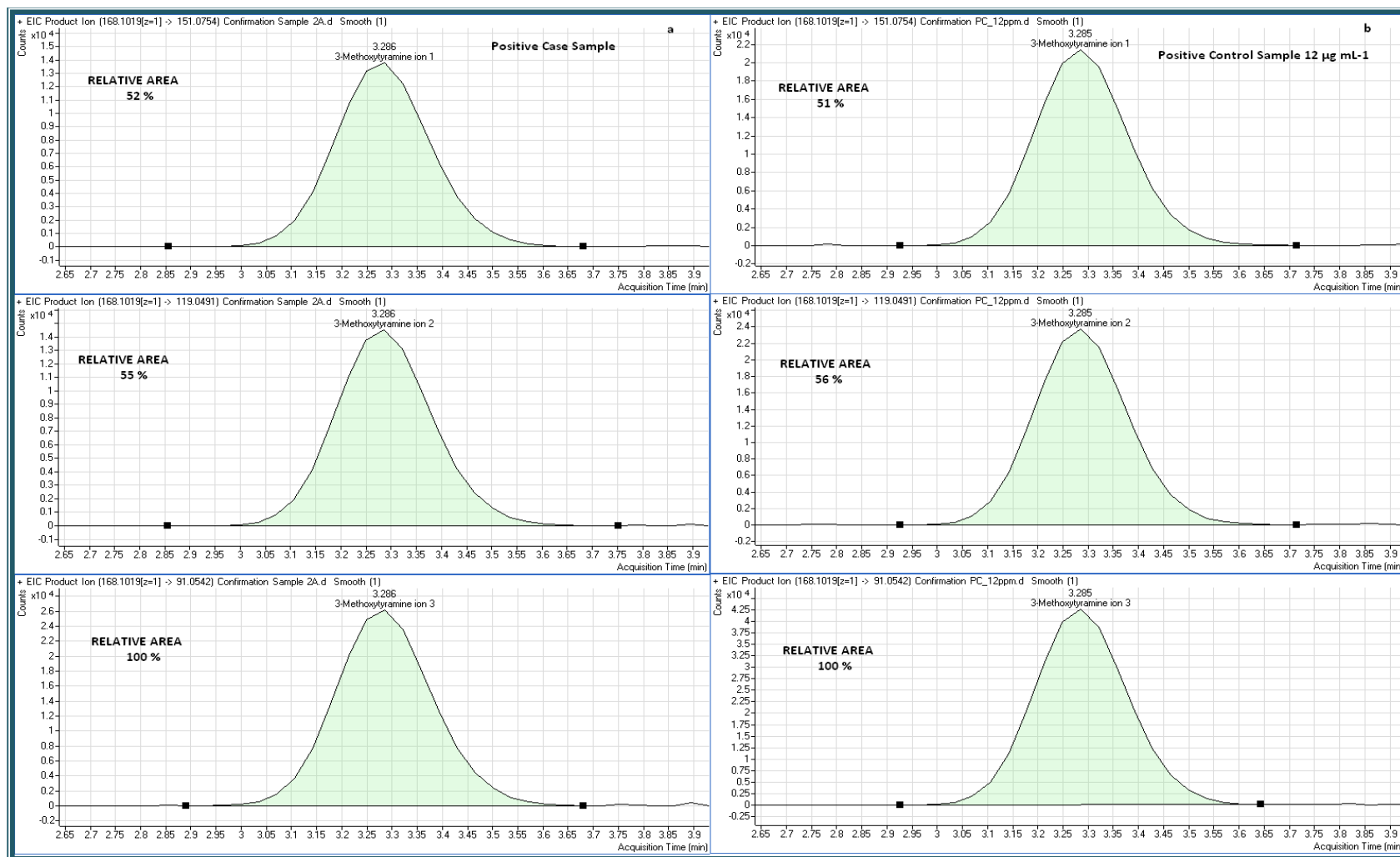
Η προτεινόμενη μεθοδολογία για τον ποσοτικό προσδιορισμό και την επιβεβαίωση της 3-μεθοξυτυραμίνης σε ούρα αλόγων εφαρμόστηκε σε τρία ύποπτα δείγματα ούρων αλόγων, τα οποία κατά τον έλεγχο σάρωσης βασικών ουσιών που περιλαμβάνει ταυτόχρονα και ημιποσοτικοποίηση της 3-μεθοξυτυραμίνης με τη μέθοδο ρουτίνας GC/MS του Εργαστηρίου παρουσίασαν συγκέντρωσεις υψηλότερες του ορίου των $4,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της 3-μεθοξυτυραμίνης στα ύποπτα δείγματα εφαρμόστηκε η τεχνική ποσοτικοποίησης του ενός σημείου, λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα αξιολόγησης της μεθόδου που έδειξαν ότι η τομή της καμπύλης βαθμονόμησης δε διαφέρει σημαντικά από το μηδέν. Τα ύποπτα και τα πρότυπα δείγματα (STD's και QC's) κατεργάστηκαν εις τριπλούν και ενέθηκαν εις διπλούν στο σύστημα HILIC/QTOF-MS. Η συγκέντρωση της 3-μεθοξυτυραμίνης στα ύποπτα δείγματα βρέθηκε $18,94 (\pm 0,62) \mu\text{g mL}^{-1}$, $11,51 (\pm 0,35) \mu\text{g mL}^{-1}$ και $3,69 (\pm 0,11) \mu\text{g mL}^{-1}$, καθιστώντας θετικά τα δύο πρώτα δείγματα.

Ακολούθησαν επιβεβαιωτικές ανάλυσεις των ύποπτων δειγμάτων μαζί με το κατάλληλο δείγμα αναφοράς σε υψηλή τιμή του δυναμικού θραυσματοποίησης (CE 20 V) που επιβεβαίωσαν την παρουσία της 3-μεθοξυτυραμίνης σε αυτά δίνοντας αποτελέσματα σε συμφωνία με τα κριτήρια που έχει θέσει ο AORC για την ανίχνευση απαγορευμένων ουσιών. Στον Πίνακα 9.14 συνοψίζονται τα αποτελέσματα της επιβεβαιωτικής ανάλυσης και για τα τρία δείγματα καθώς και τα διαγνωστικά κριτήρια που πρέπει να πληρούνται. Στο Σχήμα 9.11 παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα που ελήφθησαν από την επιβεβαιωτική ανάλυση θετικού δείγματος και του δείγματος αναφοράς.

Πίνακας 9.14: Αποτελέσματα επιβεβαίωσης της ανίχνευσης της 3-μεθοξυτυραμίνης οξέος στα ύποπτα δείγματα ούρων

Ιόν (m/z)	Σχετική Αναλογία Ιόντων				Όρια Αποδοχής			
	Υποπτο Δείγμα 1	Υποπτο Δείγμα 1	Υποπτο Δείγμα 2	Δείγμα Αναφοράς	Κριτήριο 15% (απόλυτο)		Κριτήριο 35% (σχετικό)	
					min	max	min	max
91,0542	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	85,0 %	115,0 %	65,0 %	135 %
119,0491	56,3 %	55,3 %	56,2 %	56,3 %	41,3 %	71,3 %	36,6 %	76,0 %
151,0754	52,2 %	52,0 %	53,3 %	50,8 %	35,8 %	65,8 %	33,0 %	68,6 %

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9: Ποσοτικός Προσδιορισμός και Ταυτοποίηση Ουσιών Ορίου σε Ούρα Αλόγων: 3-Μεθοξυτυραμίνη



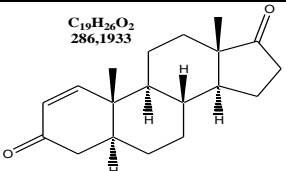
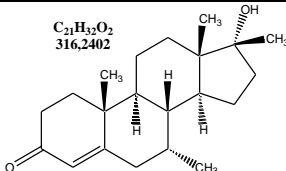
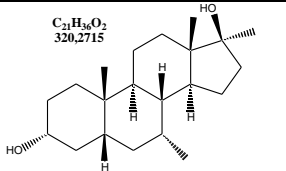
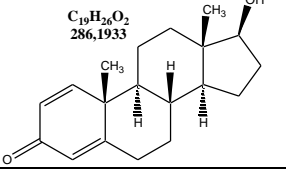
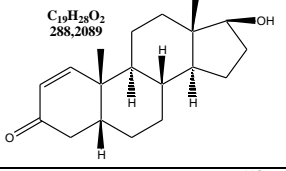
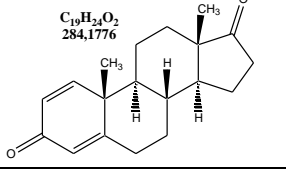
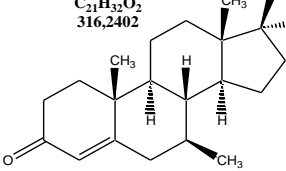
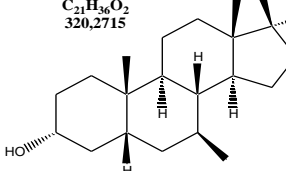
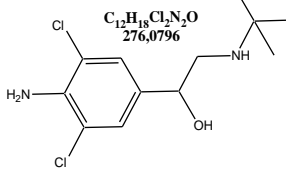
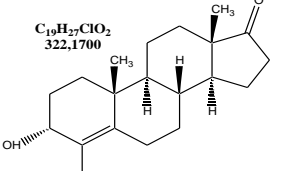
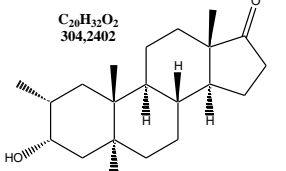
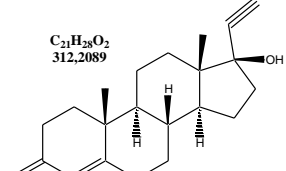
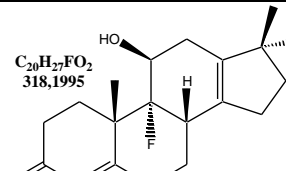
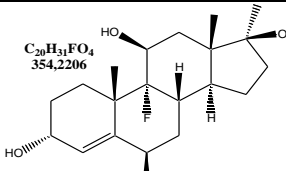
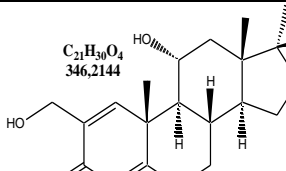
Σχήμα 9.11: Χρωματογραφήματα των διαγνωστικών ιόντων της 3-μεθοξυτυραμίνης που ελήφθησαν από την επιβεβαιωτική ανάλυση HILIC /QTOF-MS ενός θετικού δείγματος ούρων αλόγου (α) και ενός πρότυπου εμβολιασμένου δείγματος συγκέντρωσης $12 \mu\text{g mL}^{-1}$.

9.12. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

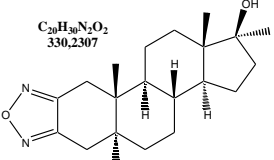
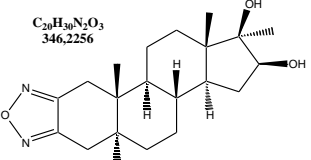
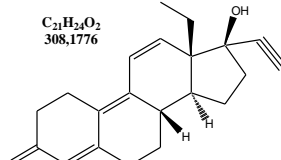
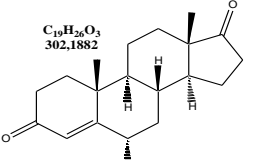
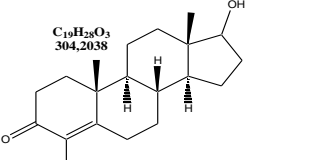
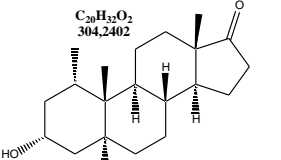
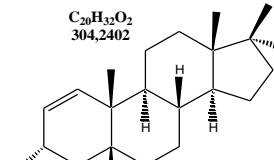
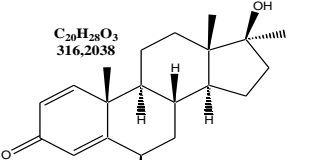
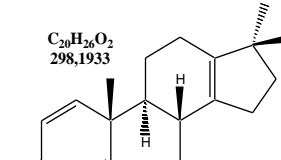
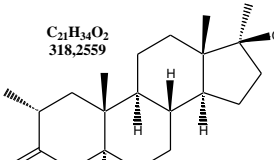
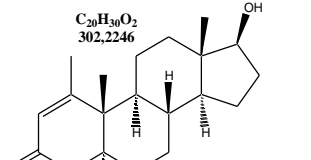
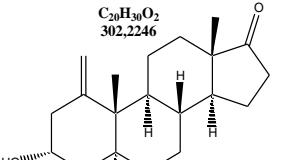
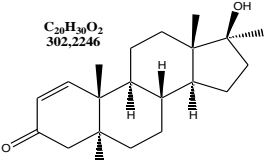
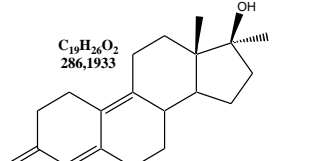
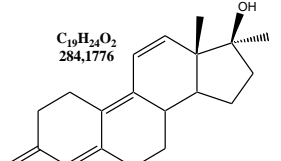
Στην παρούσα μελέτη, αναπτύχθηκε, αξιολογήθηκε και επικυρώθηκε μέθοδος HILIC/QTOF-MS για τον ποσοτικό προσδιορισμό και την επιβεβαίωση της 3-μεθοξυτυραμίνης σε δείγματα ούρων αλόγων. Η προτεινόμενη μεθοδολογία συνδυάζει τα πλεονεκτήματα που προσέφερε η εφαρμογή της χρωματογραφίας HILIC (αποτελεσματική συγκράτηση του πολικού μορίου, ενίσχυση της ευαισθησίας λόγω της υψηλής περιεκτικότητας του οργανικού τροποποιητή στην κινητή φάση και περιορισμός της ιοντικής καταστολής λόγω κατεργασίας των δειγμάτων ούρων με ακετονιτρίλιο) με την υψηλή ευαισθησία και εκλεκτικότητα του αναλυτή QTOF-MS που συνδυάζει την ανάλυση MS/MS με την ικανότητα μέτρησης ακριβούς μάζας για τα πρόδρομα και θυγατρικά ιόντα. Για την ποσοτικοποίηση και επιβεβαίωση της 3-μεθοξυτυραμίνης τα δείγματα κατεργάζονται μια φορά και αναλύονται εις διπλούν σε χαμηλό και υψηλό δυναμικό θραυσματοποίησης (collision energy). Κατά τον έλεγχο μελέτης επίδρασης του υποστρώματος στην απόκριση των αναλυτών διαπιστώθηκε ότι η χρησιμοποίηση ισοτοπικού αναλόγου του αναλύτη ως εσωτερικού προτύπου που εφαρμόζεται στην παρούσα μεθοδολογία ελαχιστοποιεί το φαινόμενο ιοντικής καταστολής και τις υψηλού βαθμού διακυμάνσεις σήματος που παρατηρούνται συνήθως μεταξύ διαφορετικών εμβολιασμένων υποστρωμάτων ούρων αλόγων. Το γεγονός αυτό κατέστησε επιτρεπτή την εφαρμογή της καμπύλης βαθμονόμησης ως τεχνικής ποσοτικοποίησης της 3-μεθοξυτυραμίνης στα ύποπτα αραιωμένα δείγματα και η μέθοδος αξιολογήθηκε ως προς τα κύρια χαρακτηριστικά ποιότητας, δίνοντας ικανοποιητικά αποτελέσματα που την καθιστούν κατάλληλη για το σκοπό που αναπτύχθηκε και επιτρέπουν την εφαρμογή της στον έλεγχο ντόπινγκ που διενεργείται από τα διεπιστευμένα εργαστήρια για την ποσοτικοποίηση και την επιβεβαίωση της 3-μεθοξυτυραμίνης σε ούρα αλόγων. Τέλος, πραγματοποιήθηκε εφαρμογή της προτεινόμενης μεθοδολογίας στην ποσοτική και επιβεβαιωτική ανάλυση πραγματικών δειγμάτων. Στο σημείο αυτό, αξίζει να σημειωθεί ότι η μέθοδος επικυρώθηκε από το Εθνικό Συμβούλιο Διαπίστευσης (ΕΣΥΔ) και έχει ενταχθεί στο πεδίο διαπίστευσης των διαδικασιών που εφαρμόζονται στο Εργαστήριο ελέγχου ντόπινγκ του ΟΑΚΑ και αφορούν τις διαδικασίες επιβεβαιωτικής ανάλυσης σε άλογα αγώνων.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

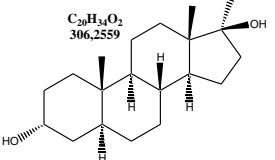
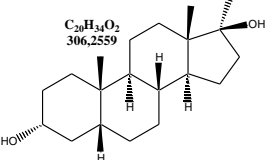
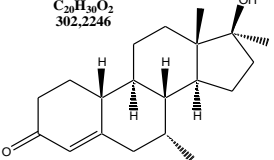
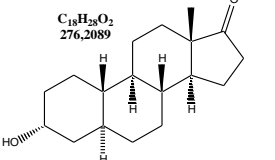
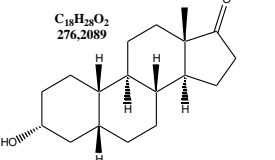
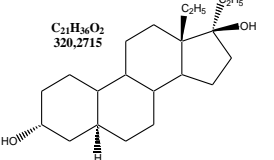
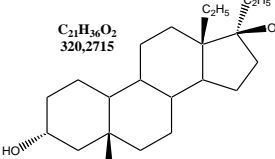
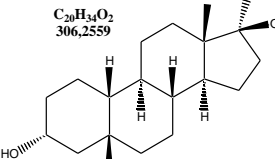
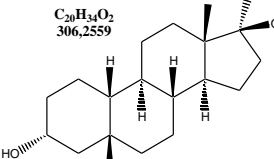
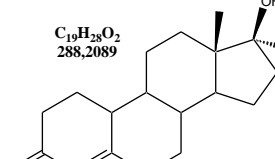
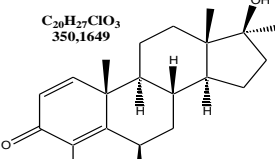
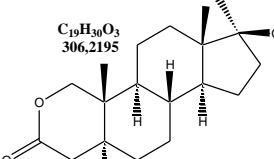
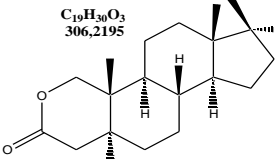
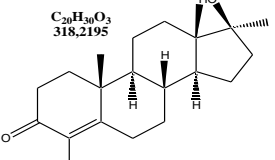
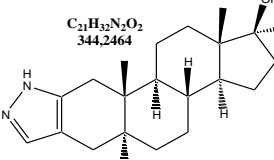
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1: Μέθοδος σάρωσης απαγορευμένων ουσιών με LC/TOF-MS: Ουσίες που μελετήθηκαν

ΟΥΣΙΑ – ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ – MRPL	ΧΗΜΙΚΗ ΔΟΜΗ – ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΤΥΠΟΣ – ΑΚΡΙΒΗΣ ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΑΖΑ	ΟΥΣΙΑ – ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ – MRPL	ΧΗΜΙΚΗ ΔΟΜΗ – ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΤΥΠΟΣ – ΑΚΡΙΒΗΣ ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΑΖΑ	ΟΥΣΙΑ – ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ – MRPL	ΧΗΜΙΚΗ ΔΟΜΗ – ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΤΥΠΟΣ – ΑΚΡΙΒΗΣ ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΑΖΑ
[1] 1-Androstenedione Αναβολικό στεροειδές MRPL 10 ng mL ⁻¹	 C ₁₉ H ₂₆ O ₂ 286,1933	[2] Bolasterone Αναβολικό στεροειδές MRPL 10 ng mL ⁻¹	 C ₂₁ H ₃₂ O ₂ 316,2402	[3] Bolasterone metabolite (7α,17α-dimethyl-5β-androstane-3α,17β-diol) MRPL 10 ng mL ⁻¹	 C ₂₁ H ₃₆ O ₂ 320,2715
[4] Boldenone Αναβολικό στεροειδές MRPL 10 ng mL ⁻¹	 C ₁₉ H ₂₆ O ₂ 286,1933	[5] Boldenone metabolite (5β-androst-1-en-17β-ol-3-one) MRPL 10 ng mL ⁻¹	 C ₁₉ H ₂₈ O ₂ 288,2089	[6] Boldione Αναβολικό στεροειδές MRPL 10 ng mL ⁻¹	 C ₁₉ H ₂₄ O ₂ 284,1776
[7] Calusterone Αναβολικό στεροειδές MRPL 10 ng mL ⁻¹	 C ₂₁ H ₃₂ O ₂ 316,2402	[8] Calusterone metabolite (7β,17α-dimethyl-5β-androstane-3α,17β-diol) MRPL 10 ng mL ⁻¹	 C ₂₁ H ₃₆ O ₂ 320,2715	[9] Clenbuterol Αναβολικός παράγων MRPL 2 ng mL ⁻¹	 C ₁₂ H ₁₈ Cl ₂ N ₂ O 276,0796
[10] Clostebol metabolite (4-chloro-androst-4-en-3α-ol-17-one) Αναβολικό στεροειδές MRPL 10 ng mL ⁻¹	 C ₁₉ H ₂₇ ClO ₂ 322,1700	[11] Drostanolone metabolite (2α-methyl-5α-androstane-3α-ol-17-one) Αναβολικό στεροειδές MRPL 10 ng mL ⁻¹	 C ₂₀ H ₃₂ O ₂ 304,2402	[12] Danazol metabolite (ethisterone) Αναβολικό στεροειδές MRPL 10 ng mL ⁻¹	 C ₂₁ H ₂₈ O ₂ 312,2089
[13] Fluoxymesterone met. 1 (9α-fluoro-18-nor-17,17-dimethyl-androsta-4,13-dien-11β-ol-3-one) Αναβολικό στεροειδές MRPL 10 ng mL ⁻¹	 C ₂₀ H ₂₇ FO ₂ 318,1995	[14] Fluoxymesterone met. 2 (9α-fluoro-17α-methyl-androst-4-ene-3α,6β,11β,17β-tetrol) Αναβολικό στεροειδές MRPL 10 ng mL ⁻¹	 C ₂₀ H ₃₁ FO ₄ 354,2206	[15] Formebolone metabolit (2-hydroxymethyl-17α-methyl-androstane-1,4-diene-11,17β-diol-3-one) Αναβολικό στεροειδές MRPL 10 ng mL ⁻¹	 C ₂₁ H ₃₀ O ₄ 346,2144

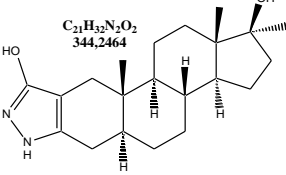
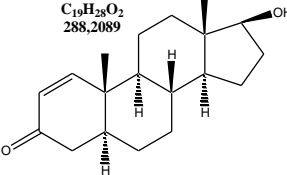
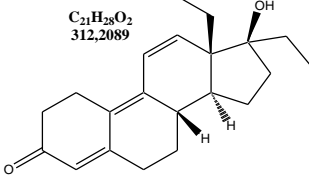
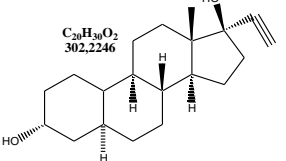
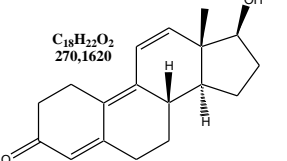
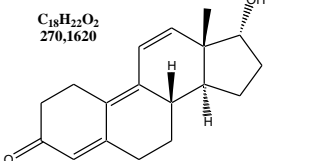
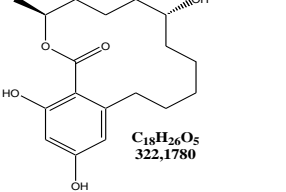
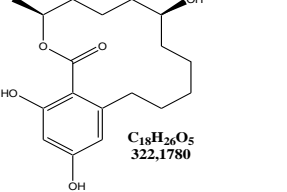
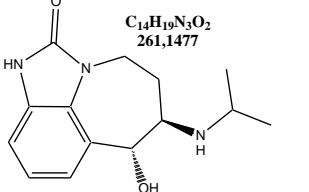
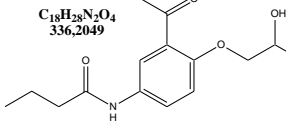
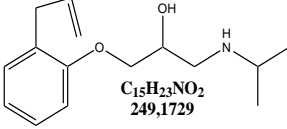
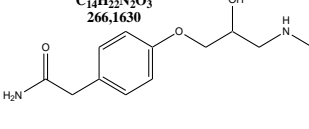
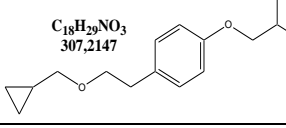
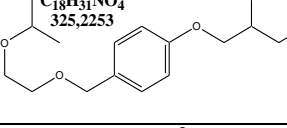
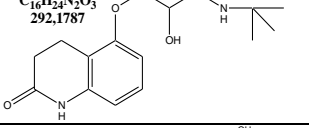
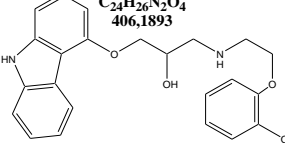
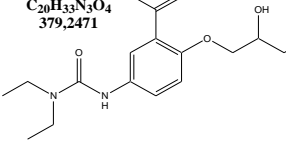
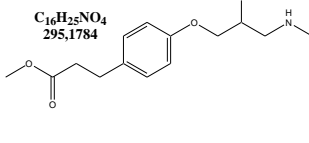
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1: Μέθοδος σάρωσης LC/TOF-MS: Ουσίες που μελετήθηκαν (συνέχεια)

<p>[16] Furazabol</p> <p>Αναβολικό στεροειδές</p> <p>MRPL 10 ng mL⁻¹</p>	<p>$C_{20}H_{30}N_2O_2$ 330,2307</p> 	<p>[17] Furazabol metabolite (16β-hydroxy-furazabol)</p> <p>MRPL 10 ng mL⁻¹</p>	<p>$C_{20}H_{30}N_2O_3$ 346,2256</p> 	<p>[18] Gestrinone</p> <p>Αναβολικό στεροειδές</p> <p>MRPL 10 ng mL⁻¹</p>	<p>$C_{21}H_{34}O_2$ 308,1776</p> 
<p>[19] 6α-Hydroxyandrostenedione (Androstenedione metabolite)</p> <p>MRPL 10 ng mL⁻¹</p>	<p>$C_{19}H_{26}O_3$ 302,1882</p> 	<p>[20] 4-Hydroxytestosterone</p> <p>Αναβολικό στεροειδές (Formestane metabolite)</p> <p>MRPL 10 ng mL⁻¹</p>	<p>$C_{19}H_{28}O_3$ 304,2038</p> 	<p>[21] Mesterolone metabolite (1α-methyl-5α-androstane-3α-ol-17-one)</p> <p>Αναβολικό στεροειδές</p> <p>MRPL 10 ng mL⁻¹</p>	<p>$C_{20}H_{32}O_2$ 304,2402</p> 
<p>[22] Methandienone metabolite 1 (Epimetendiol)</p> <p>Αναβολικό στεροειδές</p> <p>MRPL 2 ng mL⁻¹</p>	<p>$C_{20}H_{32}O_2$ 304,2402</p> 	<p>[23] Methandienone met. 2 (6β-Hydroxy-methandienone)</p> <p>Αναβολικό στεροειδές</p> <p>MRPL 10 ng mL⁻¹</p>	<p>$C_{20}H_{32}O_3$ 316,2038</p> 	<p>[24] Methandienone met. 3 (18-nor-17β-hydroxymethyl-17α-methyl-androst-1,4,13-triene-3-one)</p> <p>MRPL 10 ng mL⁻¹</p>	<p>$C_{20}H_{26}O_2$ 298,1933</p> 
<p>[25] Methasterone</p> <p>Αναβολικό στεροειδές</p> <p>MRPL 10 ng mL⁻¹</p>	<p>$C_{21}H_{34}O_2$ 318,2559</p> 	<p>[26] Methenolone</p> <p>Αναβολικό στεροειδές</p> <p>MRPL 10 ng mL⁻¹</p>	<p>$C_{20}H_{30}O_2$ 302,2246</p> 	<p>[27] Methenolone metabolite (1-methylen-5α-androstan-3α-ol-17-one)</p> <p>Αναβολικό στεροειδές</p> <p>MRPL 10 ng mL⁻¹</p>	<p>$C_{20}H_{30}O_2$ 302,2246</p> 
<p>[28] Methyl-1-testosterone</p> <p>Αναβολικό στεροειδές</p> <p>MRPL 10 ng mL⁻¹</p>	<p>$C_{20}H_{30}O_2$ 302,2246</p> 	<p>[29] Methyldienolone</p> <p>Αναβολικό στεροειδές</p> <p>MRPL 10 ng mL⁻¹</p>	<p>$C_{19}H_{28}O_2$ 286,1933</p> 	<p>[30] Methyltrienolone (Metribolone)</p> <p>Αναβολικό στεροειδές</p> <p>MRPL 10 ng mL⁻¹</p>	<p>$C_{19}H_{24}O_2$ 284,1776</p> 

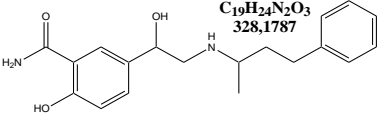
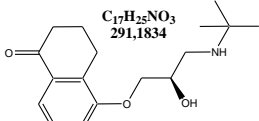
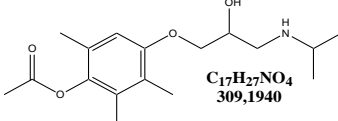
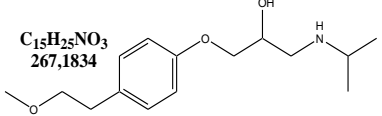
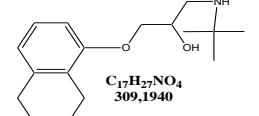
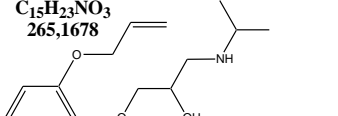
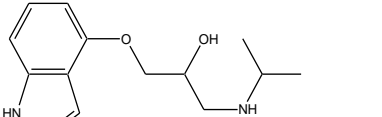
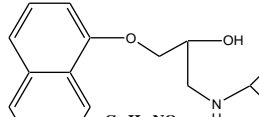
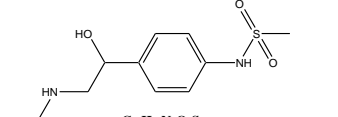
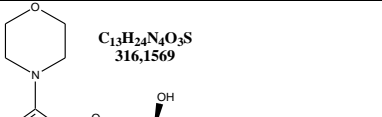
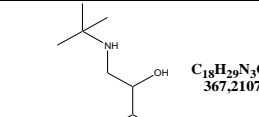
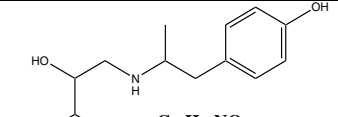
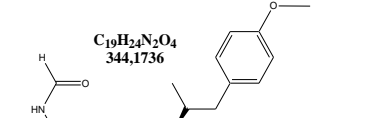
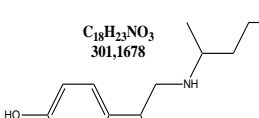
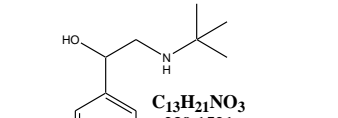
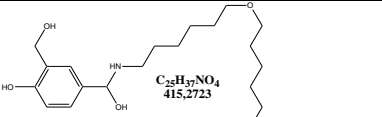
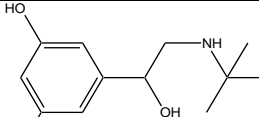
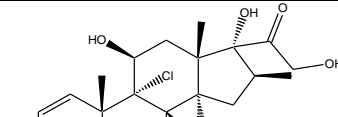
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1: Μέθοδος σάρωσης LC/TOF-MS: Ουσίες που μελετήθηκαν (συνέχεια)

<p>[31] 17α-Methyltestosterone metabolite 1 (17α-methyl-5α-androstane-3α,17β-diol)</p> <p>Αναβολικό στεροειδές MRPL 10 ng mL⁻¹</p>	<p><chem>C20H34O2</chem> 306,2559</p> 	<p>[32] 17α-Methyltestosterone metabolite 2 (17α-methyl-5β-androstane-3α,17β-diol)</p> <p>Αναβολικό στεροειδές MRPL 2 ng mL⁻¹</p>	<p><chem>C20H34O2</chem> 306,2559</p> 	<p>[33] Mibolerone</p> <p>Αναβολικό στεροειδές MRPL 10 ng mL⁻¹</p>	<p><chem>C20H30O2</chem> 302,2246</p> 
<p>[34] 19-Norandrosterone (Nandrolone metabolite 1)</p> <p>Αναβολικό στεροειδές MRPL 2 ng mL⁻¹</p>	<p><chem>C18H28O2</chem> 276,2089</p> 	<p>[35] 19-Noretiocholanolone (Nandrolone metabolite 2)</p> <p>Αναβολικό στεροειδές MRPL 10 ng mL⁻¹</p>	<p><chem>C18H28O2</chem> 276,2089</p> 	<p>[36] Norbolethone met. 1 (13β,17α-diethyl-3α,17β-dihydroxy-5α-gonane)</p> <p>Αναβολικό στεροειδές MRPL 10 ng mL⁻¹</p>	<p><chem>C21H36O2</chem> 320,2715</p> 
<p>[37] Norbolethone metabolite 2 (13β,17α-diethyl-3α,17β-dihydroxy-5β-gonane)</p> <p>Αναβολικό στεροειδές MRPL 10 ng mL⁻¹</p>	<p><chem>C21H36O2</chem> 320,2715</p> 	<p>[38] Norethandrolone met. 1 (17α-ethyl-5α-estrane-3α,17β-diol)</p> <p>Αναβολικό στεροειδές MRPL 10 ng mL⁻¹</p>	<p><chem>C20H34O2</chem> 306,2559</p> 	<p>[39] Norethandrolone met. 2 (17α-ethyl-5β-estrane-3α,17β-diol)</p> <p>Αναβολικό στεροειδές MRPL 10 ng mL⁻¹</p>	<p><chem>C20H34O2</chem> 306,2559</p> 
<p>[40] Normethandrolone</p> <p>Αναβολικό στεροειδές MRPL 10 ng mL⁻¹</p> <p>Αναλύθηκε και μεταβολικό δείγμα</p>	<p><chem>C19H28O2</chem> 288,2089</p> 	<p>[41] Oral Turinabol metabolite (6β-hydroxyturinabol)</p> <p>Αναβολικό στεροειδές MRPL 10 ng mL⁻¹</p>	<p><chem>C20H27ClO3</chem> 350,1649</p> 	<p>[42] Oxandrolone</p> <p>Αναβολικό στεροειδές MRPL 10 ng mL⁻¹</p>	<p><chem>C19H30O3</chem> 306,2195</p> 
<p>[43] Oxandrolone metabolite (17-Erioxandrolone)</p> <p>MRPL 10 ng mL⁻¹</p>	<p><chem>C19H30O3</chem> 306,2195</p> 	<p>[44] Oxymesterone</p> <p>Αναβολικό στεροειδές MRPL 10 ng mL⁻¹</p>	<p><chem>C20H30O3</chem> 318,2195</p> 	<p>[45] Stanozolol metabolite 1 (16β-hydroxystanozolol)</p> <p>Αναβολικό στεροειδές MRPL 10 ng mL⁻¹</p>	<p><chem>C21H32N2O2</chem> 344,2464</p> 

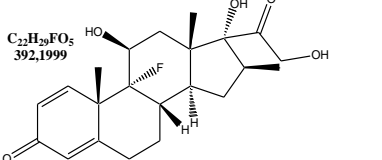
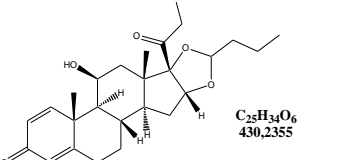
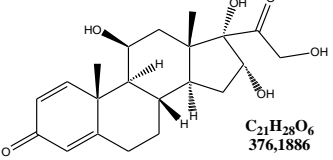
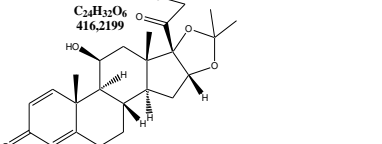
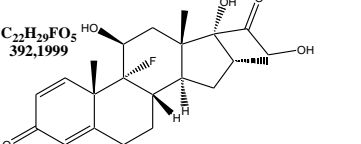
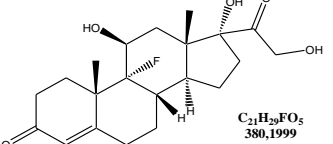
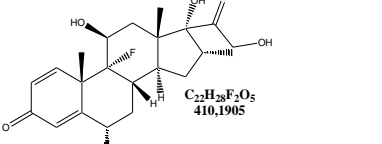
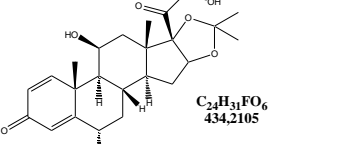
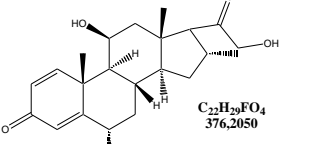
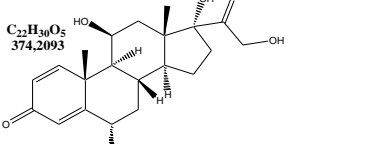
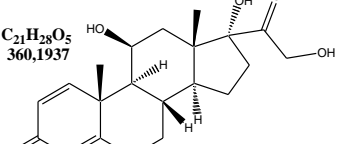
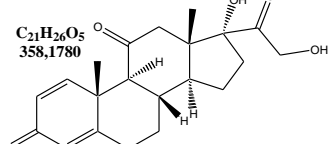
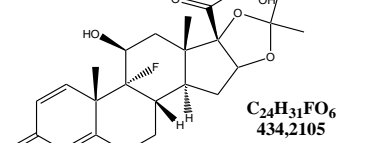
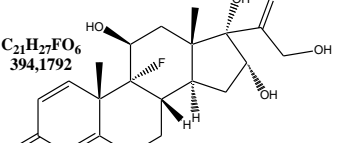
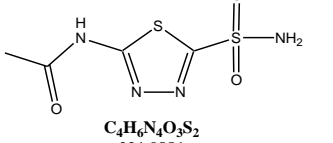
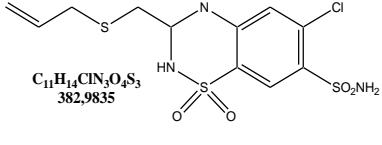
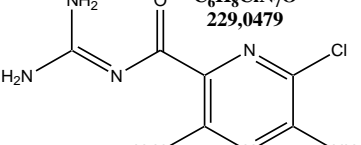
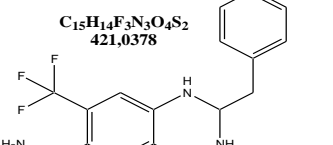
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1: Μέθοδος σάρωσης LC/TOF-MS: Ουσίες που μελετήθηκαν (συνέχεια)

<p>[46] Stanozolol metabolite 2 (3-hydroxystanozolol)</p> <p>Αναβολικό στεροειδές MRPL 2 ng mL⁻¹</p>	 <p style="text-align: center;">$C_{21}H_{32}N_2O_2$ 344,2464</p>	<p>[47] 1-Testosterone</p> <p>Αναβολικό στεροειδές MRPL 10 ng mL⁻¹</p>	 <p style="text-align: center;">$C_{19}H_{28}O_2$ 288,2089</p>	<p>[48] Tetrahydrogestrinone (THG)</p> <p>Αναβολικό στεροειδές MRPL 10 ng mL⁻¹</p>	 <p style="text-align: center;">$C_{21}H_{38}O_2$ 312,2089</p>
<p>[49] 5α-Tetrahydrorethisterone (Norethisterone metabolite)</p> <p>Αναβολικό στεροειδές MRPL 10 ng mL⁻¹</p>	 <p style="text-align: center;">$C_{20}H_{30}O_2$ 302,2246</p>	<p>[50] Trenbolone</p> <p>Αναβολικό στεροειδές MRPL 10 ng mL⁻¹</p>	 <p style="text-align: center;">$C_{18}H_{22}O_2$ 270,1620</p>	<p>[51] Trenbolone metabolite 17α-Epitrenbolone</p> <p>MRPL 10 ng mL⁻¹</p>	 <p style="text-align: center;">$C_{18}H_{28}O_2$ 270,1620</p>
<p>[52] α-Zearalanol</p> <p>Αναβολικό στεροειδές MRPL 10 ng mL⁻¹</p>	 <p style="text-align: center;">$C_{18}H_{26}O_5$ 322,1780</p>	<p>[53] β-Zearalanol</p> <p>Αναβολικό στεροειδές MRPL 10 ng mL⁻¹</p>	 <p style="text-align: center;">$C_{18}H_{26}O_5$ 322,1780</p>	<p>[54] Zilpaterol</p> <p>Αναβολικός παράγων MRPL 10 ng mL⁻¹</p>	 <p style="text-align: center;">$C_{14}H_{19}N_3O_2$ 261,1477</p>
<p>[55] Acebutolol</p> <p>β-Ανταγωνιστής MRPL 500 ng mL⁻¹</p>	 <p style="text-align: center;">$C_{18}H_{28}N_2O_4$ 336,2049</p>	<p>[56] Alprenolol</p> <p>β-Ανταγωνιστής MRPL 500 ng mL⁻¹</p>	 <p style="text-align: center;">$C_{15}H_{23}NO_2$ 249,1729</p>	<p>[57] Atenolol</p> <p>β-Ανταγωνιστής MRPL 500 ng mL⁻¹</p>	 <p style="text-align: center;">$C_{14}H_{22}N_2O_3$ 266,1630</p>
<p>[58] Betaxolol</p> <p>β-Ανταγωνιστής MRPL 500 ng mL⁻¹</p>	 <p style="text-align: center;">$C_{18}H_{29}NO_3$ 307,2147</p>	<p>[59] Bisoprolol</p> <p>β-Ανταγωνιστής MRPL 500 ng mL⁻¹</p>	 <p style="text-align: center;">$C_{18}H_{31}NO_4$ 325,2253</p>	<p>[60] Carteolol</p> <p>β-Ανταγωνιστής MRPL 500 ng mL⁻¹</p>	 <p style="text-align: center;">$C_{16}H_{24}N_2O_3$ 292,1787</p>
<p>[61] Carvedilol</p> <p>β-Ανταγωνιστής MRPL 500 ng mL⁻¹</p>	 <p style="text-align: center;">$C_{24}H_{26}N_2O_4$ 406,1893</p>	<p>[62] Celiprolol</p> <p>β-Ανταγωνιστής MRPL 500 ng mL⁻¹</p>	 <p style="text-align: center;">$C_{20}H_{33}N_3O_4$ 379,2471</p>	<p>[63] Esmolol</p> <p>β-Ανταγωνιστής MRPL 500 ng mL⁻¹</p>	 <p style="text-align: center;">$C_{16}H_{25}NO_4$ 295,1784</p>

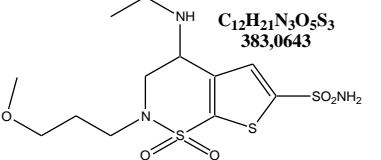
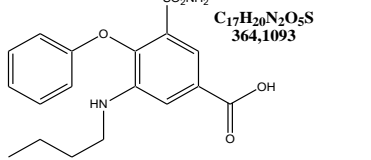
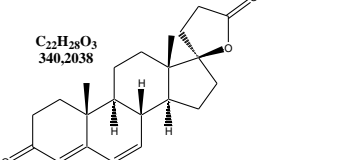
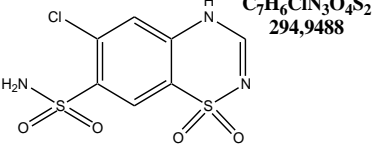
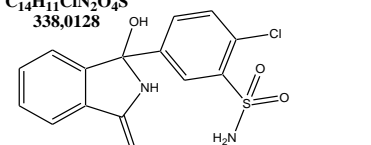
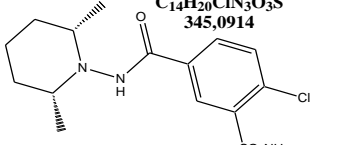

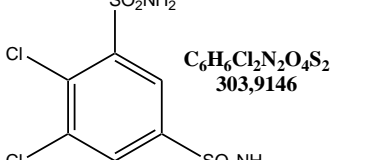
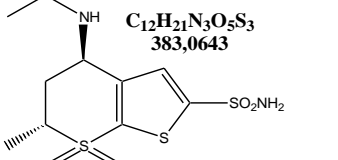
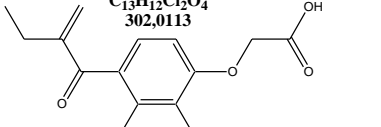
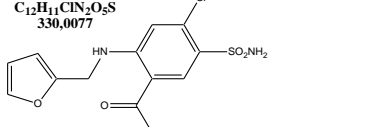
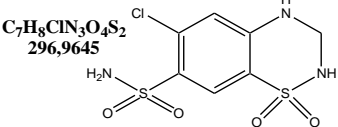
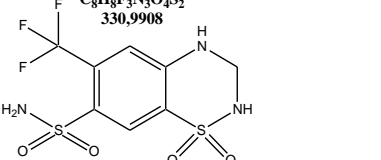
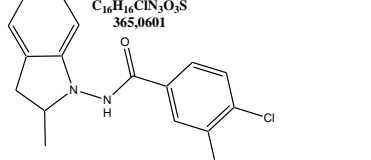
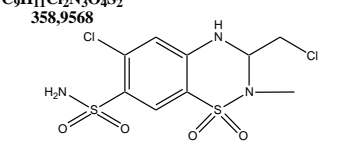
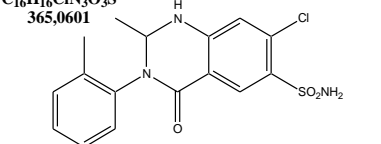
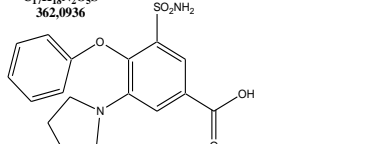
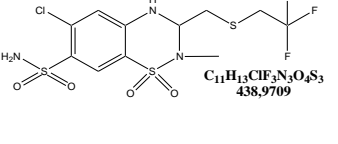
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1: Μέθοδος σάρωσης LC/TOF-MS: Ουσίες που μελετήθηκαν (συνέχεια)

<p>[64] Labetalol</p> <p>β-Ανταγωνιστής MRPL 500 ng mL⁻¹</p>	 <p>$C_{19}H_{24}N_2O_3$ 328,1787</p>	<p>[65] Levobunolol</p> <p>β-Ανταγωνιστής MRPL 500 ng mL⁻¹</p>	 <p>$C_{17}H_{25}NO_3$ 291,1834</p>	<p>[66] Metipranolol</p> <p>β-Ανταγωνιστής MRPL 500 ng mL⁻¹</p>	 <p>$C_{17}H_{27}NO_4$ 309,1940</p>
<p>[67] Metoprolol</p> <p>β-Ανταγωνιστής MRPL 500 ng mL⁻¹</p>	 <p>$C_{15}H_{25}NO_3$ 267,1834</p>	<p>[68] Nadolol</p> <p>β-Ανταγωνιστής MRPL 500 ng mL⁻¹</p>	 <p>$C_{17}H_{27}NO_4$ 309,1940</p>	<p>[69] Oxprenolol</p> <p>β-Ανταγωνιστής MRPL 500 ng mL⁻¹</p>	 <p>$C_{15}H_{23}NO_3$ 265,1678</p>
<p>[70] Pindolol</p> <p>β-Ανταγωνιστής MRPL 500 ng mL⁻¹</p>	 <p>$C_{14}H_{20}N_2O_2$ 248,1525</p>	<p>[71] Propranolol</p> <p>β-Ανταγωνιστής MRPL 500 ng mL⁻¹</p>	 <p>$C_{16}H_{21}NO_2$ 259,1572</p>	<p>[72] Sotalol</p> <p>β-Ανταγωνιστής MRPL 500 ng mL⁻¹</p>	 <p>$C_{13}H_{19}N_3O_3S$ 272,1195</p>
<p>[73] Timolol</p> <p>β-Ανταγωνιστής MRPL 500 ng mL⁻¹</p>	 <p>$C_{13}H_{24}N_4O_3S$ 316,1569</p>	<p>[74] Bambuterol</p> <p>β₂-Αγωνιστής MRPL 100 ng mL⁻¹</p>	 <p>$C_{18}H_{29}N_3O_5$ 367,2107</p>	<p>[75] Fenoterol</p> <p>β₂-Αγωνιστής MRPL 100 ng mL⁻¹</p>	 <p>$C_{17}H_{21}NO_4$ 303,1471</p>
<p>[76] Formoterol</p> <p>β₂-Αγωνιστής MRPL 100 ng mL⁻¹</p>	 <p>$C_{19}H_{24}N_2O_4$ 344,1736</p>	<p>[77] Ractopamine</p> <p>β₂-Αγωνιστής MRPL 100 ng mL⁻¹</p>	 <p>$C_{18}H_{23}NO_3$ 301,1678</p>	<p>[78] Salbutamol</p> <p>β₂-Αγωνιστής MRPL 100 ng mL⁻¹</p>	 <p>$C_{13}H_{21}NO_3$ 239,1521</p>
<p>[79] Salmeterol</p> <p>β₂-Αγωνιστής MRPL 100 ng mL⁻¹</p>	 <p>$C_{25}H_{37}NO_4$ 415,2723</p>	<p>[80] Terbutaline</p> <p>β₂-Αγωνιστής MRPL 100 ng mL⁻¹</p>	 <p>$C_{12}H_{19}NO_3$ 225,1365</p>	<p>[81] Beclomethasone</p> <p>Κορτικοστεροειδές MRPL 30 ng mL⁻¹</p>	 <p>$C_{22}H_{29}ClO_5$ 408,1704</p>

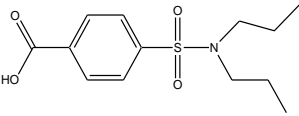
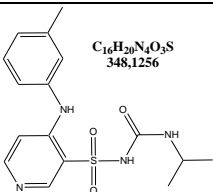
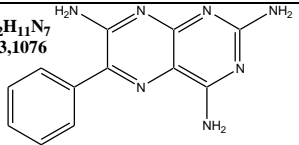

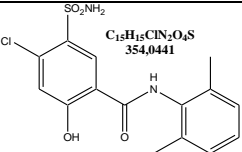
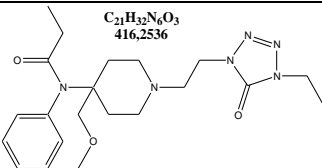
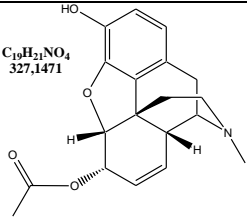
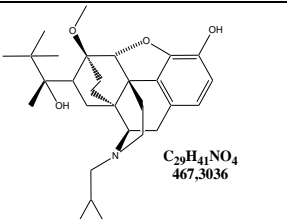
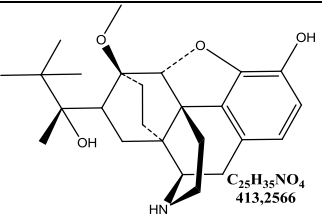
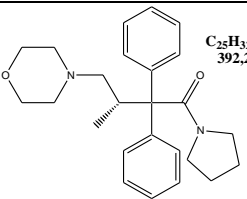
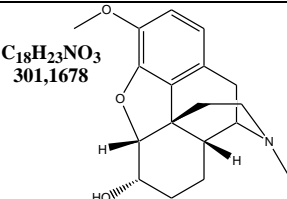
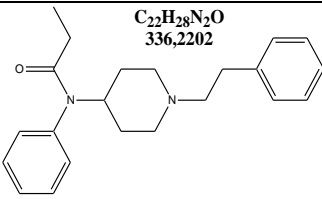
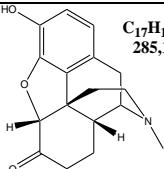
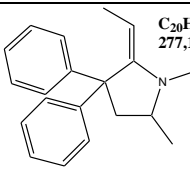
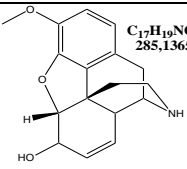
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1: Μέθοδος σάρωσης LC/TOF-MS: Ουσίες που μελετήθηκαν (συνέχεια)

<p>[82] Betamethasone Κορτικοστεροειδές MRPL 30 ng mL⁻¹</p>	 <p>$C_{22}H_{29}FO_5$ 392,1999</p>	<p>[83] Budesonide Κορτικοστεροειδές MRPL 30 ng mL⁻¹</p>	 <p>$C_{22}H_{34}O_6$ 430,2355</p>	<p>[84] Budesonide metabolite (16α-hydroxyprednisolone) Κορτικοστεροειδές MRPL 30 ng mL⁻¹</p>	 <p>$C_{21}H_{28}O_6$ 376,1886</p>
<p>[85] Desonide Κορτικοστεροειδές MRPL 30 ng mL⁻¹</p>	 <p>$C_{24}H_{32}O_6$ 416,2199</p>	<p>[86] Dexamethasone Κορτικοστεροειδές MRPL 30 ng mL⁻¹</p>	 <p>$C_{22}H_{29}FO_5$ 392,1999</p>	<p>[87] Fludrocortisone Κορτικοστεροειδές MRPL 30 ng mL⁻¹</p>	 <p>$C_{21}H_{29}FO_5$ 380,1999</p>
<p>[88] Flumethasone Κορτικοστεροειδές MRPL 30 ng mL⁻¹</p>	 <p>$C_{22}H_{28}F_2O_5$ 410,1905</p>	<p>[89] Flunisolide Κορτικοστεροειδές MRPL 30 ng mL⁻¹</p>	 <p>$C_{24}H_{31}FO_6$ 434,2105</p>	<p>[90] Fluocortolone Κορτικοστεροειδές MRPL 30 ng mL⁻¹</p>	 <p>$C_{23}H_{29}FO_4$ 376,2050</p>
<p>[91] Methylprednisolone Κορτικοστεροειδές MRPL 30 ng mL⁻¹</p>	 <p>$C_{22}H_{30}O_5$ 374,2093</p>	<p>[92] Prednisolone Κορτικοστεροειδές MRPL 30 ng mL⁻¹</p>	 <p>$C_{21}H_{28}O_5$ 360,1937</p>	<p>[93] Prednisone Κορτικοστεροειδές MRPL 30 ng mL⁻¹</p>	 <p>$C_{21}H_{26}O_5$ 358,1780</p>
<p>[94] Triamcinolone Acetonide Κορτικοστεροειδές MRPL 30 ng mL⁻¹</p>	 <p>$C_{24}H_{31}FO_6$ 434,2105</p>	<p>[95] Triamcinolone Κορτικοστεροειδές MRPL 30 ng mL⁻¹</p>	 <p>$C_{21}H_{27}FO_6$ 394,1792</p>	<p>[96] Acetazolamide Διουρητικό MRPL 250 ng mL⁻¹</p>	 <p>$C_4H_6N_4O_3S_2$ 221,9881</p>
<p>[97] Althiazide Διουρητικό MRPL 250 ng mL⁻¹</p>	 <p>$C_{11}H_{14}ClN_3O_4S_3$ 382,9835</p>	<p>[98] Amiloride Διουρητικό MRPL 250 ng mL⁻¹</p>	 <p>$C_6H_8ClN_7O$ 229,0479</p>	<p>[99] Bendroflumethiazide Διουρητικό MRPL 250 ng mL⁻¹</p>	 <p>$C_{15}H_{14}F_3N_3O_4S_2$ 421,0378</p>

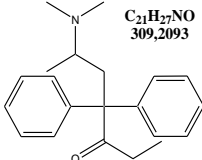
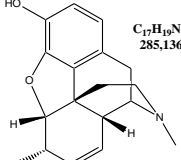
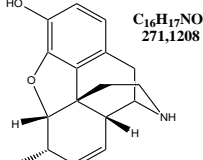
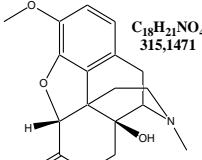
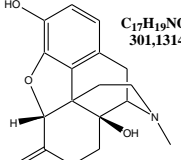
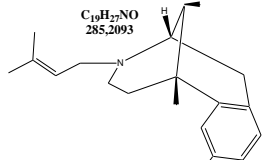
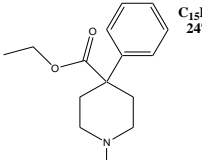
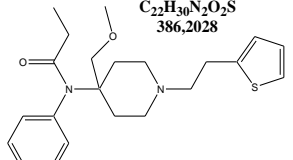
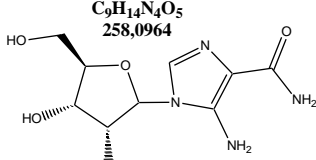
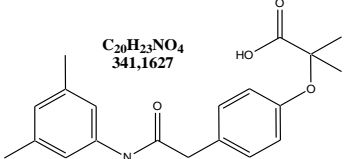
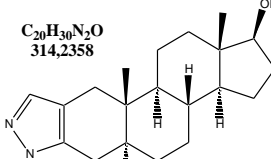
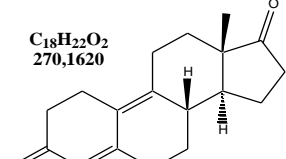
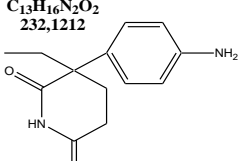
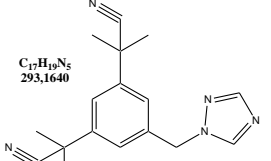
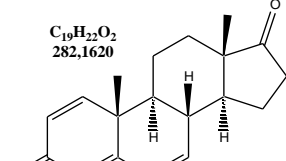
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1: Μέθοδος σάρωσης LC/TOF-MS: Ουσίες που μελετήθηκαν (συνέχεια)

<p>[100] Brinzolamide</p> <p>Διουρητικό MRPL 250 ng mL⁻¹</p>	 <p>C₁₂H₂₁N₃O₅S₃ 383,0643</p>	<p>[101] Bumetanide</p> <p>Διουρητικό MRPL 250 ng mL⁻¹</p>	 <p>C₁₇H₂₀N₂O₅S 364,1093</p>	<p>[102] Canrenone</p> <p>Διουρητικό MRPL 250 ng mL⁻¹</p>	 <p>C₂₂H₂₈O₃ 340,2038</p>
<p>[103] Chlorothiazide</p> <p>Διουρητικό MRPL 250 ng mL⁻¹</p>	 <p>C₇H₆ClN₃O₄S₂ 294,9488</p>	<p>[104] Chlorthalidone</p> <p>Διουρητικό MRPL 250 ng mL⁻¹</p>	 <p>C₁₄H₁₁ClN₂O₄S 338,0128</p>	<p>[105] Clopamide</p> <p>Διουρητικό MRPL 250 ng mL⁻¹</p>	 <p>C₁₄H₂₀ClN₃O₃S 345,0914</p>
<p>[106] Cyclothiazide</p> <p>Διουρητικό MRPL 250 ng mL⁻¹</p>	 <p>C₁₄H₁₆ClN₃O₄S₂ 389,0271</p>	<p>[107] Dichlorphenamide</p> <p>Διουρητικό MRPL 250 ng mL⁻¹</p>	 <p>C₆H₆Cl₂N₂O₄S₂ 303,9146</p>	<p>[108] Dorzolamide</p> <p>Διουρητικό MRPL 250 ng mL⁻¹</p>	 <p>C₁₂H₂₁N₃O₅S₃ 383,0643</p>
<p>[109] Ethacrynic acid</p> <p>Διουρητικό MRPL 250 ng mL⁻¹</p>	 <p>C₁₃H₁₂Cl₂O₄ 302,0113</p>	<p>[110] Furosemide</p> <p>Διουρητικό MRPL 250 ng mL⁻¹</p>	 <p>C₁₂H₁₁ClN₂O₅S 330,0077</p>	<p>[111] Hydrochlorothiazide</p> <p>Διουρητικό MRPL 250 ng mL⁻¹</p>	 <p>C₇H₈ClN₃O₄S₂ 296,9645</p>
<p>[112] Hydroflumethiazide</p> <p>Διουρητικό MRPL 250 ng mL⁻¹</p>	 <p>C₈H₈F₃N₃O₄S₂ 330,9908</p>	<p>[113] Indapamide</p> <p>Διουρητικό MRPL 250 ng mL⁻¹</p>	 <p>C₁₆H₁₆ClN₃O₃S 365,0601</p>	<p>[114] Methylchlorothiazide</p> <p>Διουρητικό MRPL 250 ng mL⁻¹</p>	 <p>C₉H₁₁Cl₂N₃O₄S₂ 358,9568</p>
<p>[115] Metolazone</p> <p>Διουρητικό MRPL 250 ng mL⁻¹</p>	 <p>C₁₆H₁₆ClN₃O₃S 365,0601</p>	<p>[116] Piretanide</p> <p>Διουρητικό MRPL 250 ng mL⁻¹</p>	 <p>C₁₇H₁₈N₂O₅S 362,0936</p>	<p>[117] Polythiazide</p> <p>Διουρητικό MRPL 250 ng mL⁻¹</p>	 <p>C₁₁H₁₃ClF₃N₃O₄S₃ 438,9709</p>

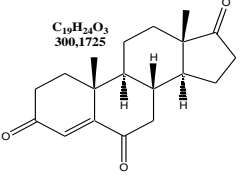
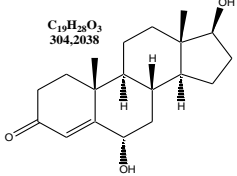
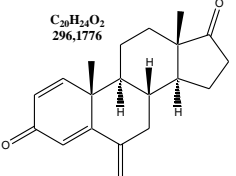
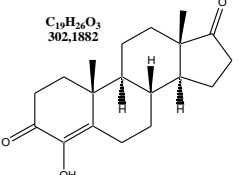
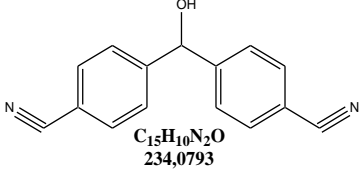
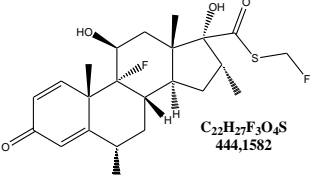
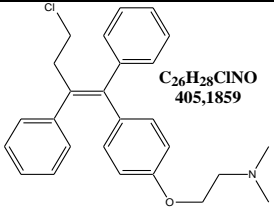
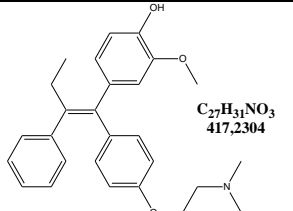
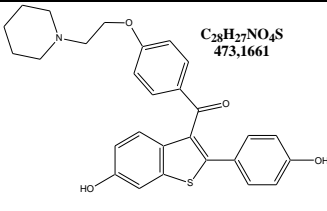
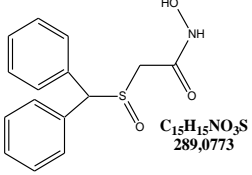
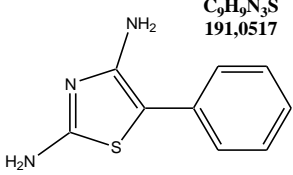
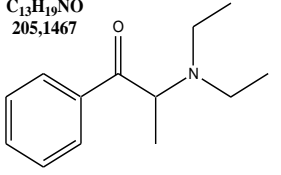
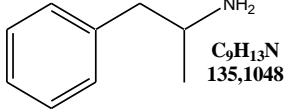
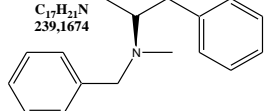
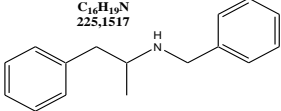
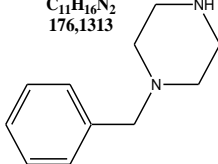
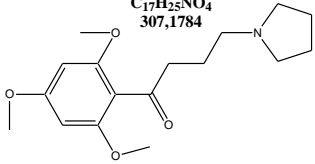
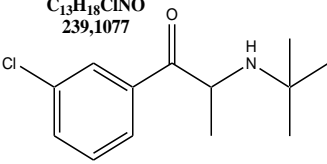
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1: Μέθοδος σάρωσης LC/TOF-MS: Ουσίες που μελετήθηκαν (συνέχεια)

<p>[118] Probenecid</p> <p>Καλυπτικός παράγοντας MRPL 250 ng mL⁻¹</p>	<p>$C_{13}H_{19}NO_4S$ 285,1035</p> 	<p>[119] Torasemide</p> <p>Διουρητικό MRPL 250 ng mL⁻¹</p>	 <p>$C_{16}H_{20}N_4O_3S$ 348,1256</p>	<p>[120] Triamterene</p> <p>Διουρητικό MRPL 250 ng mL⁻¹</p>	<p>$C_{12}H_{11}N_7$ 253,1076</p> 
<p>[121] Trichloromethiazide</p> <p>Διουρητικό MRPL 250 ng mL⁻¹</p>	<p>$C_8H_8Cl_3N_3O_4S_2$ 378,9022</p> 	<p>[122] Xipamide</p> <p>Διουρητικό MRPL 250 ng mL⁻¹</p>	 <p>$C_{15}H_{15}ClN_2O_4S$ 354,0441</p>	<p>[123] Alfentanyl</p> <p>Ναρκωτικό MRPL 10 ng mL⁻¹</p>	<p>$C_{21}H_{32}N_6O_3$ 416,2536</p> 
<p>[124] 6-Acetylmorphine (Heroin metabolite)</p> <p>Ναρκωτικό MRPL 200 ng mL⁻¹</p>	<p>$C_{19}H_{21}NO_4$ 327,1471</p> 	<p>[125] Buprenorphine</p> <p>Ναρκωτικό MRPL 10 ng mL⁻¹</p>	 <p>$C_{29}H_{41}NO_4$ 467,3036</p>	<p>[126] Norbuprenorphine (Buprenorphine metabolite)</p> <p>Ναρκωτικό MRPL 10 ng mL⁻¹</p>	<p>$C_{25}H_{35}NO_4$ 413,2566</p> 
<p>[127] Dextromoramide</p> <p>Ναρκωτικό MRPL 200 ng mL⁻¹</p>	<p>$C_{25}H_{32}N_2O_2$ 392,2464</p> 	<p>[128] Dihydrocodeine</p> <p>Ναρκωτικό MRPL 200 ng mL⁻¹</p>	<p>$C_{18}H_{23}NO_3$ 301,1678</p> 	<p>[129] Fentanyl</p> <p>Ναρκωτικό MRPL 10 ng mL⁻¹</p>	<p>$C_{22}H_{28}N_2O$ 336,2202</p> 
<p>[130] Hydromorphone</p> <p>Ναρκωτικό MRPL 200 ng mL⁻¹</p>	<p>$C_{17}H_{19}NO_3$ 285,1365</p> 	<p>[131] Methadone metabolite (EDDP)</p> <p>Ναρκωτικό MRPL 200 ng mL⁻¹</p>	<p>$C_{20}H_{23}N$ 277,1830</p> 	<p>[132] Norcodeine</p> <p>Ναρκωτικό MRPL 200 ng mL⁻¹</p>	<p>$C_{17}H_{19}NO_3$ 285,1365</p> 

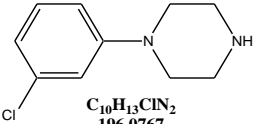
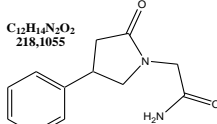
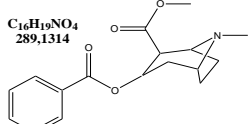
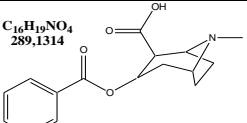
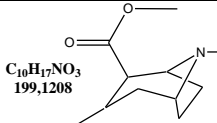
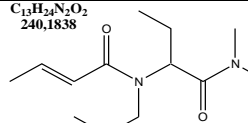
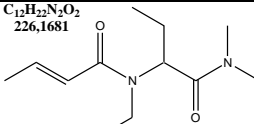
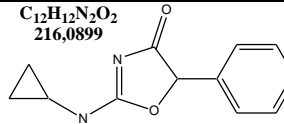
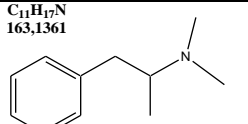
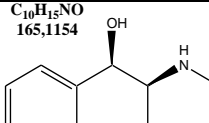
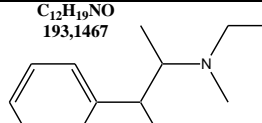
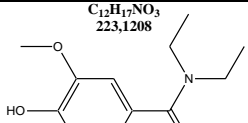
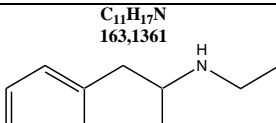
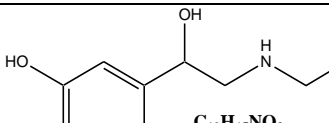
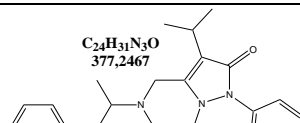
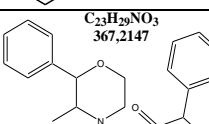
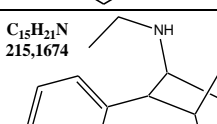
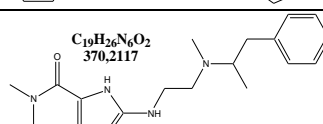
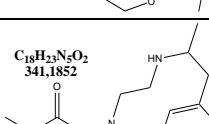
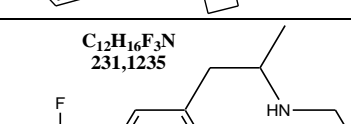
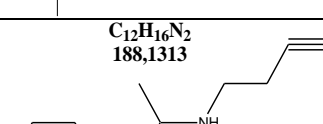
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1: Μέθοδος σάρωσης LC/TOF-MS: Ουσίες που μελετήθηκαν (συνέχεια)

<p>[133] Methadone</p> <p>Ναρκωτικό MRPL 200 ng mL⁻¹</p>	<p><chem>C21H27NO</chem> 309,2093</p> 	<p>[134] Morphine</p> <p>Ναρκωτικό MRPL 1000 ng mL⁻¹</p>	<p><chem>C17H19NO3</chem> 285,1365</p> 	<p>[135] Normorphine</p> <p>Ναρκωτικό MRPL 200 ng mL⁻¹</p>	<p><chem>C16H17NO3</chem> 271,1208</p> 
<p>[136] Oxycodone</p> <p>Ναρκωτικό MRPL 200 ng mL⁻¹</p>	<p><chem>C18H21NO4</chem> 315,1471</p> 	<p>[137] Oxymorphone (Oxycodone metabolite)</p> <p>Ναρκωτικό MRPL 200 ng mL⁻¹</p>	<p><chem>C17H19NO4</chem> 301,1314</p> 	<p>[138] Pentazocine</p> <p>Ναρκωτικό MRPL 200 ng mL⁻¹</p>	<p><chem>C19H27NO</chem> 285,2093</p> 
<p>[139] Pethidine</p> <p>Ναρκωτικό MRPL 200 ng mL⁻¹</p> <p>(Αναλύθηκε και μεταβολικό δείγμα)</p>	<p><chem>C12H17NO2</chem> 247,1572</p> 	<p>[140] Sulfentanyl</p> <p>Ναρκωτικό MRPL 10 ng mL⁻¹</p>	<p><chem>C22H30N2O2S</chem> 386,2028</p> 	<p>[141] AICAR</p> <p>Τροποποιητής γονιδιακής έκφρασης (MRPL δεν έχει καθοριστεί)</p>	<p><chem>C9H14N4O5</chem> 258,0964</p> 
<p>[142] Efavoxiral (RSR13)</p> <p>Ενισχυτής της μεταφοράς οξυγόνου (MRPL δεν έχει καθοριστεί)</p>	<p><chem>C20H23NO4</chem> 341,1627</p> 	<p>[143] Prostanazol</p> <p>Αναβολικό στεροειδές MRPL 10 ng mL⁻¹</p> <p>(Αναλύθηκε μεταβολικό δείγμα)</p>	<p><chem>C20H30N2O</chem> 314,2358</p> 	<p>[144] Estra-4,9-dien-3,17-dione</p> <p>Αναβολικό στεροειδές (Αναλύθηκε μεταβολικό δείγμα)</p>	<p><chem>C18H22O2</chem> 270,1620</p> 
<p>[145] Aminoglutethimide</p> <p>Αναστολέας αρωματάσης MRPL 50 ng mL⁻¹</p>	<p><chem>C13H16N2O2</chem> 232,1212</p> 	<p>[146] Anastrozole</p> <p>Αναστολέας αρωματάσης MRPL 50 ng mL⁻¹</p>	<p><chem>C17H19N5</chem> 293,1640</p> 	<p>[147] Androst-1,4,6-triene-3,17-dione</p> <p>Αναστολέας αρωματάσης MRPL 50 ng mL⁻¹ (Αναλύθηκε και μεταβολικό δείγμα)</p>	<p><chem>C19H22O2</chem> 282,1620</p> 

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1: Μέθοδος σάρωσης LC/TOF-MS: Ουσίες που μελετήθηκαν (συνέχεια)

<p>[148] 6-Oxoandrostenedione (4-Androsten-3,6,17-trione)</p> <p>Αναστολέας αρωματάσης MRPL 50 ng mL⁻¹</p>	 <p>C₁₉H₂₆O₃ 300,1725</p>	<p>[149] 6-Hydroxytestosterone (6-oxoandrostenedione metabolite)</p> <p>MRPL 50 ng mL⁻¹</p>	 <p>C₁₉H₂₆O₃ 304,2038</p>	<p>[150] Exemestane</p> <p>Αναστολέας αρωματάσης MRPL 50 ng mL⁻¹ (Αναλύθηκε και μεταβολικό δείγμα)</p>	 <p>C₂₀H₂₄O₂ 296,1776</p>
<p>[151] Formestane</p> <p>Αναστολέας αρωματάσης MRPL 50 ng mL⁻¹</p>	 <p>C₁₉H₂₆O₃ 302,1882</p>	<p>[152] Letrozol metabolite (Bis-(cyanophenyl)-methanol)</p> <p>Αναστολέας αρωματάσης MRPL 50 ng mL⁻¹</p>	 <p>C₁₅H₁₀N₂O 234,0793</p>	<p>[153] Fluticasone</p> <p>Κορτικοστεροειδές MRPL 30 ng mL⁻¹</p>	 <p>C₂₂H₂₇F₃O₄S 444,1582</p>
<p>[154] Toremifene</p> <p>Εκλεκτικός ρυθμιστής υποδοχέα οιστρογόνων (SERM) MRPL 50 ng mL⁻¹</p> <p>(Αναλύθηκε και μεταβολικό δείγμα)</p>	 <p>C₂₆H₂₈ClNO 405,1859</p>	<p>[155] Tamoxifene 3-hydroxy-4-methoxy metabolite</p> <p>Εκλεκτικός ρυθμιστής υποδοχέα οιστρογόνων (SERM) MRPL 50 ng mL⁻¹</p>	 <p>C₂₇H₃₁NO₃ 417,2304</p>	<p>[156] Raloxifene</p> <p>Εκλεκτικός ρυθμιστής υποδοχέα οιστρογόνων (SERM) MRPL 50 ng mL⁻¹</p>	 <p>C₂₈H₂₇NO₄S 473,1661</p>
<p>[157] Adrafinil</p> <p>Διεγερτικό MRPL 500 ng mL⁻¹</p>	 <p>C₁₅H₁₅NO₃S 289,0773</p>	<p>[158] Amiphenazole</p> <p>Διεγερτικό MRPL 500 ng mL⁻¹</p>	 <p>C₉H₉N₃S 191,0517</p>	<p>[159] Amphetamine</p> <p>Διεγερτικό MRPL 500 ng mL⁻¹</p> <p>(Αναλύθηκε και μεταβολικό δείγμα)</p>	 <p>C₁₁H₁₉NO 205,1467</p>
<p>[160] Amphetamine</p> <p>Διεγερτικό MRPL 500 ng mL⁻¹</p>	 <p>C₉H₁₃N 135,1048</p>	<p>[161] Benzphetamine</p> <p>Διεγερτικό MRPL 500 ng mL⁻¹</p>	 <p>C₁₇H₂₁N 239,1674</p>	<p>[162] Benzylamphetamine</p> <p>Διεγερτικό MRPL 500 ng mL⁻¹</p>	 <p>C₁₆H₁₉N 225,1517</p>
<p>[163] 1-Benzylpiperazine</p> <p>Διεγερτικό MRPL 500 ng mL⁻¹</p>	 <p>C₁₁H₁₆N₂ 176,1313</p>	<p>[165] Buflomedil</p> <p>Διεγερτικό MRPL 500 ng mL⁻¹</p>	 <p>C₁₇H₂₅NO₄ 307,1784</p>	<p>[166] Bupropion</p> <p>Διεγερτικό MRPL 500 ng mL⁻¹</p>	 <p>C₁₃H₁₈ClNO 239,1077</p>

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1: Μέθοδος σάρωσης LC/TOF-MS: Ουσίες που μελετήθηκαν (συνέχεια)

<p>[166] 1-(3-Chlorophenyl)piperazine</p> <p>Διεγερτικό MRPL 500 ng mL⁻¹</p>	 <p>C₁₀H₁₃ClN₂ 196,0767</p>	<p>[167] Carphedone Διεγερτικό MRPL 500 ng mL⁻¹ (Αναλύθηκε και μεταβολικό δείγμα)</p>	 <p>C₁₂H₁₄N₂O₂ 218,1055</p>	<p>[168] Cocaine Διεγερτικό MRPL 500 ng mL⁻¹</p>	 <p>C₁₆H₁₉NO₄ 289,1314</p>
<p>[169] Benzoylecgonine (Cocaine metabolite 1)</p> <p>Διεγερτικό MRPL 500 ng mL⁻¹</p>	 <p>C₁₆H₁₉NO₄ 289,1314</p>	<p>[170] Ecgonine methylester (Cocaine metabolite 2)</p> <p>Διεγερτικό MRPL 500 ng mL⁻¹</p>	 <p>C₁₀H₁₇NO₃ 199,1208</p>	<p>[171] Cropropamide Διεγερτικό MRPL 500 ng mL⁻¹</p>	 <p>C₁₃H₂₄N₂O₂ 240,1838</p>
<p>[172] Crotethamide Διεγερτικό MRPL 500 ng mL⁻¹</p>	 <p>C₁₂H₂₂N₂O₂ 226,1681</p>	<p>[173] Cyclazodone Διεγερτικό MRPL 500 ng mL⁻¹</p>	 <p>C₁₂H₁₂N₂O₂ 216,0899</p>	<p>[174] Dimethylamphetamine Διεγερτικό MRPL 500 ng mL⁻¹</p>	 <p>C₁₁H₁₇N 163,1361</p>
<p>[175] Ephedrine Διεγερτικό MRPL 500 ng mL⁻¹</p>	 <p>C₁₀H₁₅NO 165,1154</p>	<p>[176] Etafedrine Διεγερτικό MRPL 500 ng mL⁻¹</p>	 <p>C₁₂H₁₉NO 193,1467</p>	<p>[177] Ethamivan Διεγερτικό MRPL 500 ng mL⁻¹ Αναλύθηκε και μεταβολικό δείγμα</p>	 <p>C₁₂H₁₇NO₃ 223,1208</p>
<p>[178] Ethylamphetamine Διεγερτικό MRPL 500 ng mL⁻¹</p>	 <p>C₁₁H₁₇N 163,1361</p>	<p>[179] Etilefrine Διεγερτικό MRPL 500 ng mL⁻¹ (Αναλύθηκε και μεταβολικό δείγμα)</p>	 <p>C₁₀H₁₅NO₂ 181,1103</p>	<p>[180] Famprofazone Διεγερτικό MRPL 500 ng mL⁻¹</p>	 <p>C₂₄H₃₁N₃O 377,2467</p>
<p>[181] Fenbutrazate Διεγερτικό MRPL 500 ng mL⁻¹</p>	 <p>C₂₃H₂₉NO₃ 367,2147</p>	<p>[182] Fencamfamine Διεγερτικό MRPL 500 ng mL⁻¹</p>	 <p>C₁₅H₂₁N 215,1674</p>	<p>[183] Fencamine Διεγερτικό MRPL 500 ng mL⁻¹</p>	 <p>C₁₉H₂₆N₆O₂ 370,2117</p>
<p>[184] Fenethylline Διεγερτικό MRPL 500 ng mL⁻¹ (Αναλύθηκε και μεταβολικό δείγμα)</p>	 <p>C₁₈H₂₃N₅O₂ 341,1852</p>	<p>[185] Fenfluramine Διεγερτικό MRPL 500 ng mL⁻¹</p>	 <p>C₁₂H₁₆F₃N 231,1235</p>	<p>[186] Fenproporex Διεγερτικό MRPL 500 ng mL⁻¹ Αναλύθηκε και μεταβολικό δείγμα</p>	 <p>C₁₂H₁₆N₂ 188,1313</p>

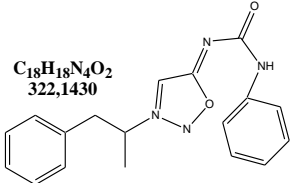
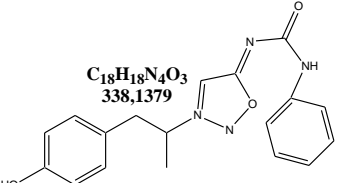
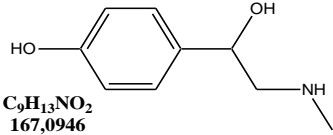
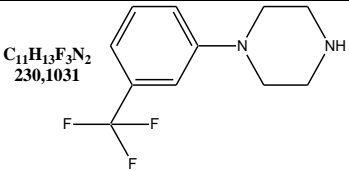
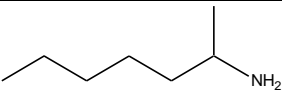
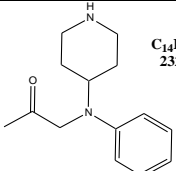
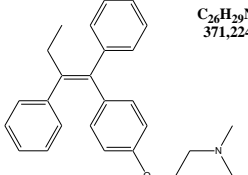
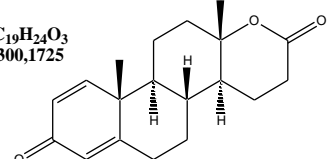
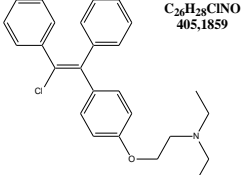
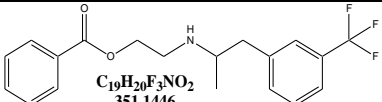
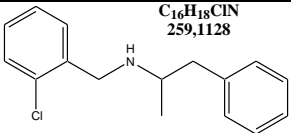
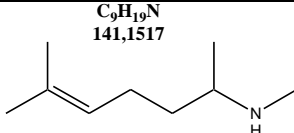
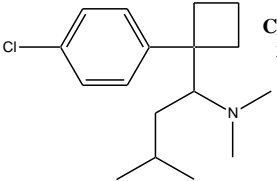
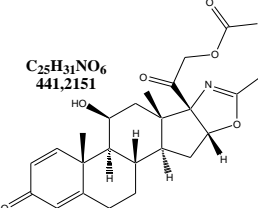
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1: Μέθοδος σάρωσης LC/TOF-MS: Ουσίες που μελετήθηκαν (συνέχεια)

[187] Flephedrone Διεγερτικό MRPL 500 ng mL ⁻¹	<chem>C10H12FNO</chem> 181,0903 	[188] Fluoroamphetamine Διεγερτικό MRPL 500 ng mL ⁻¹	<chem>C9H12FN</chem> 153,0954 	[189] Furfenorex Διεγερτικό MRPL 500 ng mL ⁻¹	<chem>C15H19NO</chem> 229,1467
[190] Heptaminol Διεγερτικό MRPL 500 ng mL ⁻¹	<chem>C8H19NO</chem> 145,1467 	[191] p-Hydroxyamphetamine Διεγερτικό MRPL 500 ng mL ⁻¹	<chem>C9H13NO</chem> 151,0997 	[192] 6-Hydroxybromantan (Bromantan metabolite) Διεγερτικό MRPL 500 ng mL ⁻¹	<chem>C16H20BrNO</chem> 321,0728
[193] MDMA (Methylenedioxyamphetamine) Διεγερτικό MRPL 500 ng mL ⁻¹ (Αναλύθηκε και μεταβολικό δείγμα)	<chem>C11H15NO2</chem> 193,1103 	[194] MDA (Methylenedioxyamphetamine) Διεγερτικό MRPL 500 ng mL ⁻¹	<chem>C10H13NO2</chem> 179,0946 	[195] Meclofenoxate Διεγερτικό MRPL 500 ng mL ⁻¹	<chem>C12H16ClNO3</chem> 257,0819
[196] Mefenorex Διεγερτικό MRPL 500 ng mL ⁻¹ (Αναλύθηκε και μεταβολικό δείγμα)	<chem>C12H18ClN</chem> 211,1128 	[197] Mephedrone Διεγερτικό MRPL 500 ng mL ⁻¹	<chem>C11H15NO</chem> 177,1154 	[198] Mephentermine Διεγερτικό MRPL 500 ng mL ⁻¹	<chem>C11H17N</chem> 163,1361
[199] Methamphetamine Διεγερτικό MRPL 500 ng mL ⁻¹	<chem>C10H15N</chem> 149,1204 	[200] Methoxyphenamine Διεγερτικό MRPL 500 ng mL ⁻¹	<chem>C11H17NO</chem> 179,1310 	[201] p-Methylamphetamine Διεγερτικό MRPL 500 ng mL ⁻¹	<chem>C10H15N</chem> 149,1204
[202] Methylenedioxypropylvalerone Διεγερτικό MRPL 500 ng mL ⁻¹	<chem>C16H21NO3</chem> 275,1521 	[203] Methylephedrine Διεγερτικό MRPL 500 ng mL ⁻¹	<chem>C11H17NO</chem> 179,1310 	[204] 4-Methyl-2-hexanamine Διεγερτικό MRPL 500 ng mL ⁻¹	<chem>C7H17N</chem> 115,1361
[205] Methylphenidate Διεγερτικό MRPL 500 ng mL ⁻¹	<chem>C14H19NO2</chem> 233,1416 	[206] Modafinil Διεγερτικό MRPL 500 ng mL ⁻¹	<chem>C15H15NO2S</chem> 273,0823 	[207] Nikethamide Διεγερτικό MRPL 500 ng mL ⁻¹ (Αναλύθηκε και μεταβολικό δείγμα)	<chem>C10H14N2O</chem> 178,1106

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1: Μέθοδος σάρωσης LC/TOF-MS: Ουσίες που μελετήθηκαν (συνέχεια)

[208] Norfenefrine Διεγερτικό MRPL 500 ng mL ⁻¹	<chem>C8H11NO2</chem> 153,0790 	[209] Norfenfluramine Διεγερτικό MRPL 500 ng mL ⁻¹	<chem>C10H12F3N</chem> 203,0922 	[210] Norpseudoephedrine Διεγερτικό MRPL 500 ng mL ⁻¹	<chem>C9H13NO</chem> 151,0997
[211] Octopamine Διεγερτικό MRPL 500 ng mL ⁻¹	<chem>C8H11NO2</chem> 153,0790 	[212] Ortetamine Διεγερτικό MRPL 500 ng mL ⁻¹	<chem>C10H15N</chem> 149,1204 	[213] Oxilofrine Διεγερτικό MRPL 500 ng mL ⁻¹	<chem>C10H15NO2</chem> 181,1103
[214] Pemoline Διεγερτικό MRPL 500 ng mL ⁻¹	<chem>C9H8N2O2</chem> 176,0586 	[215] Pentetrazol Διεγερτικό MRPL 500 ng mL ⁻¹ (Αναλύθηκε και μεταβολικό δείγμα)	<chem>C6H10N4</chem> 138,0905 	[216] Phendimetrazine Διεγερτικό MRPL 500 ng mL ⁻¹	<chem>C12H17NO</chem> 191,1310
[217] Phenmetrazine Διεγερτικό MRPL 500 ng mL ⁻¹	<chem>C11H15NO</chem> 177,1154 	[218] Phenpromethamine Διεγερτικό MRPL 500 ng mL ⁻¹	<chem>C10H15N</chem> 149,1204 	[219] Phentermine Διεγερτικό MRPL 500 ng mL ⁻¹	<chem>C10H15N</chem> 149,1204
[220] Phenylephrine Διεγερτικό MRPL 500 ng mL ⁻¹	<chem>C9H13NO2</chem> 167,0946 	[221] Pholedrine Διεγερτικό MRPL 500 ng mL ⁻¹	<chem>C10H15NO</chem> 165,1154 	[222] Pipradrol Διεγερτικό MRPL 200 ng mL ⁻¹	<chem>C18H21NO</chem> 267,1623
[223] Prenylamine Διεγερτικό MRPL 500 ng mL ⁻¹	<chem>C24H27N</chem> 329,2143 	[224] Prenylamine metabolite (3,3-diphenylpropylamine) Διεγερτικό MRPL 500 ng mL ⁻¹	<chem>C18H17N</chem> 211,1361 	[225] Prolintane Διεγερτικό MRPL 500 ng mL ⁻¹ (Αναλύθηκε και μεταβολικό δείγμα)	<chem>C15H23N</chem> 217,1830
[226] Propylhexedrine Διεγερτικό MRPL 500 ng mL ⁻¹ (Αναλύθηκε και μεταβολικό δείγμα)	<chem>C10H21N</chem> 155,1674 	[227] Ritalinic acid Διεγερτικό MRPL 500 ng mL ⁻¹	<chem>C13H17NO2</chem> 219,1259 	[228] Strychnine Διεγερτικό MRPL 200 ng mL ⁻¹	<chem>C21H22N2O2</chem> 334,1681

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1: Μέθοδος σάρωσης LC/TOF-MS: Ουσίες που μελετήθηκαν (συνέχεια)

<p>[229] Sydnocarb</p> <p>Διεγερτικό MRPL 500 ng mL⁻¹ (Αναλύθηκε και μεταβολικό δείγμα)</p>	<p>C₁₈H₁₈N₄O₂ 322,1430</p> 	<p>[230] Sydnocarb metabolite (p-Hydroxysydnocarb)</p> <p>MRPL 500 ng mL⁻¹</p>	<p>C₁₈H₁₈N₄O₃ 338,1379</p> 	<p>[231] Synephrine</p> <p>Διεγερτικό MRPL 500 ng mL⁻¹</p>	<p>C₉H₁₃NO₂ 167,0946</p> 
<p>[232] 1-(3-Trifluoro-methylphenyl)-piperazine</p> <p>Διεγερτικό MRPL 500 ng mL⁻¹</p>	<p>C₁₁H₁₃F₃N₂ 230,1031</p> 	<p>[233] Tuaminoheptane</p> <p>Διεγερτικό MRPL 500 ng mL⁻¹</p>	<p>C₇H₁₇N 115,1361</p> 	<p>[234] Norfentanyl</p> <p>Ναρκωτικό MRPL 10 ng mL⁻¹</p>	<p>C₁₄H₂₀N₂O 232,1576</p> 
<p>[235] Ταμοξιφene</p> <p>Εκλεκτικός ρυθμιστής υποδοχέα οιστρογόνων (SERM) MRPL 50 ng mL⁻¹ (Αναλύθηκε μεταβολικό δείγμα)</p>	<p>C₂₆H₂₉NO 371,2249</p> 	<p>[236] Testolactone</p> <p>Αναστολέας αρωματάσης MRPL 50 ng mL⁻¹ (Αναλύθηκε μεταβολικό δείγμα)</p>	<p>C₁₉H₂₄O₃ 300,1725</p> 	<p>[237] Clomiphene</p> <p>Αντι-οιστρογόνο MRPL 50 ng mL⁻¹ (Αναλύθηκε μεταβολικό δείγμα)</p>	<p>C₂₆H₂₈ClNO 405,1859</p> 
<p>[238] Βενφλουρεξ</p> <p>Διεγερτικό MRPL 500 ng mL⁻¹ (Αναλύθηκε μεταβολικό δείγμα)</p>	<p>C₁₉H₂₀F₃NO₂ 351,1446</p> 	<p>[239] Clobenzorex</p> <p>Διεγερτικό MRPL 500 ng mL⁻¹ (Αναλύθηκε μεταβολικό δείγμα)</p>	<p>C₁₆H₁₈ClN 259,1128</p> 	<p>[240] Isometheptene</p> <p>Διεγερτικό MRPL 500 ng mL⁻¹ (Αναλύθηκε μεταβολικό δείγμα)</p>	<p>C₉H₁₉N 141,1517</p> 
<p>[241] Sibutramine</p> <p>Διεγερτικό MRPL 500 ng mL⁻¹ (Αναλύθηκε μεταβολικό δείγμα)</p>	<p>C₁₇H₂₆ClN 279,1754</p> 	<p>[242] Deflazacort</p> <p>Κορτικοστεροειδές MRPL 30 ng mL⁻¹ (Αναλύθηκε μεταβολικό δείγμα)</p>	<p>C₂₅H₃₁NO₆ 441,2151</p> 		

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2: Μέθοδος σάρωσης LC/TOF-MS: Δεδομένα προέλευσης και καθαρότητας ουσιών αναφοράς

ΟΥΣΙΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ	ΠΡΟΜΗΘΕΥΤΗΣ	ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑ	ΟΥΣΙΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ	ΠΡΟΜΗΘΕΥΤΗΣ	ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑ	ΟΥΣΙΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ	ΠΡΟΜΗΘΕΥΤΗΣ	ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑ			
1	1-Androstenedione	A.G.N.M.I. ¹	98,5 %	2	Bolasterone	Steraloids	100 %	3	Bolasterone metabolite	NARL	99 %
4	Boldenone	LGC Standards	97,9 %	5	Boldenone metabolite	NARL	99 %	6	Boldione	Steraloids	100 %
7	Calusterone	NARL	98 %	8	Calusterone metabolite	NARL	99 %	9	Clenbuterol hydrochloride	Sigma	97,3 %
10	Clostebol metabolite	NARL	98 %	11	Drostanolone metabolite	NARL	99 %	12	Danazol metabolite	Sigma	100 %
13	Fluoxymesterone met. 1	NARL	99 %	14	Fluoxymesterone met. 2	NARL	100 %	15	Formebolone metabolite	NARL	96 %
16	Furazabol	Δ.Α ²	100 %	17	Furazabol metabolite	NARL	99 %	18	Gestrinone	Patheon UK	Δισκίο 20 mg
19	6α-Hydroxyandrostenedione	Steraloids	100 %	20	4-Hydroxytestosterone	Steraloids	100 %	21	Mesterolone metabolite	NARL	99 %
22	Methandienone met. 1	NARL	100 %	23	Methandienone met. 2	Steraloids	100 %	24	Methandienone met. 3	Δ.Α ²	Δ.Α ²
25	Methasterone	Δ.Α ²	Δ.Α ²	26	Methenolone	NARL	99 %	27	Methenolone metabolite	NARL	98 %
28	Methyl-1-testosterone	Steraloids	Δ.Α ²	29	Methyldienolone	A.G.N.M.I. ¹	Δ.Α ²	30	Methyltrienolone	Δ.Α ²	Δ.Α ²
31	17α-Methyltestosterone mt 1	NARL	99 %	32	17α-Methyltestosterone mt 2	NARL	99 %	33	Mibolerone	Δ.Α ²	Δ.Α ²
34	19-Norandrosterone	A.G.N.M.I. ¹	99,7 %	35	19-Noretiocholanolone	NARL	99,6 %	36	Norbolethone met. 1	NARL	99 %
37	Norbolethone met. 2	NARL	94,2 %	38	Norethandrolone met. 1	NARL	99 %	39	Norethandrolone met. 2	NARL	99 %
40	Oral Turinabol met.	NARL	98 %	41	Oxandrolone	Steraloids	100 %	42	17-Epiandrosterone	NARL	98 %
43	Oxymesterone	Δ.Α ²	Δ.Α ²	44	16β-Hydroxystanozolol	NARL	98 %	45	3-Hydroxystanozolol	NARL	99,5 %
46	Tetrahydrogestrinone	A.G.N.M.I. ¹	75,6 %	47	1-Testosterone	A.G.N.M.I. ¹ Λυοφιλοποιημένο δ/μα		48	5α-Tetrahydronorethisterone	Δ.Α ²	Δ.Α ²
49	Trenbolone	Sigma	95 %	50	17α-Epitrenbolone	NARL	100 %	51	Zilpaterol	Δ.Α ²	Δ.Α ²
52	α-Zearalanol	Promochem	95 %	53	β-Zearalanol	Promochem	100 %	54	17α-Methyltestosterone	Δ.Α ²	Δ.Α ²
55	Acebutolol hydrochloride	Sigma	100 %	56	Alprenolol hydrochloride	Sigma	100 %	57	Atenolol	Sigma	100 %
58	Betaxolol hydrochloride	Lavipharm	Δισκίο 20 mg	59	Bisoprolol fumarate	Merck	Δισκίο 20 mg	60	Carteolol hydrochloride	Φαρμανέλ	Διάλυμα
61	Carvedilol	Roche	Δισκίο 25 mg	62	Celiprolol hydrochloride	Sanofi-Aventis	Δισκίο 20 mg	63	Esmolol hydrochloride	Baxter Hellas	Ενέσιμο δ/μα
64	Labetalol hydrochloride	Sigma	100 %	65	Levobunolol hydrochloride	Allergan	Οφθαλμικό δ/μα	66	Metipranolol hydrochloride	Europhtha	Οφθαλμικό δ/μα
67	Metoprolol tartrate	Sigma	100 %	68	Nadolol	Sigma	Δ.Α ²	69	Oxprenolol hydrochloride	Sigma	100 %
70	Pindolol	Sigma	Δ.Α ²	71	Propranolol hydrochloride	Sigma	Δ.Α ²	72	Sotalol hydrochloride	Sigma	100 %
73	Timolol maleate	Sigma	Δ.Α ²	74	Bambuterol hydrochloride	E.P ³	100 %	75	Fenoterol hydrobromide	Sigma	100 %
76	Formoterol fumarate	Novartis	Εισπν. δ/μα	77	Ractopamine hydrochloride	Sigma	100 %	78	Salbutamol hemisulphate	Sigma	100 %
79	Salmeterol hydroxynaphthoate	E.P ³	99,7 %	80	Terbutaline hemisulphate	Sigma	Δ.Α ²	81	Beclomethasone	Sigma	99,4 %
82	Betamethasone	Sigma	99,8 %	83	Budesonide	Sigma	100 %	84	Budesonide metabolite	Astra Zeneca	99,7 %
85	Desonide	Sigma	95 %	86	Dexamethasone	Sigma	100 %	87	Fludrocortisone	Merck	99 %
88	Flumethasone	Sigma	98,5 %	89	Flunisolide	Sigma	98,2 %	90	Fluocortolone	Schering	99 %
91	Methylprednisolone	Sigma	99,9 %	92	Prednisolone	Sigma	99,4 %	93	Prednisone	Sigma	100 %

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2: Μέθοδος σαρώσης LC/TOF-MS: Δεδομένα προέλευσης και καθαρότητας ουσιών αναφοράς

	ΟΥΣΙΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ	ΠΡΟΜΗΘΕΥΤΗΣ	ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑ		ΟΥΣΙΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ	ΠΡΟΜΗΘΕΥΤΗΣ	ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑ		ΟΥΣΙΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ	ΠΡΟΜΗΘΕΥΤΗΣ	ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑ
94	Triamcinolone	Sigma	98,2 %	95	Triamcinolone Acetonide	Sigma	99,5 %	96	Acetazolamide	Sigma	99 %
97	Althiazide	Sigma	100 %	98	Amiloride hydrochloride	Sigma	Δ.Α ²	99	Bendroflumethiazide	Sigma	99,9 %
100	Canreonic potassium	Sigma	99 %	101	Bumetanide	Sigma	99 %	102	Brinzolamide	Alcon	Οφθαλμικό δ/μα
103	Chlorothiazide	Sigma	99 %	104	Chlorthalidone	Sigma	100 %	105	Clopidogrel	Sigma	100 %
106	Cyclothiazide	Sigma	99 %	107	Dichlorphenamide	Sigma	97,3 %	108	Dorzolamide hydrochloride	Βιανέξ	Οφθαλμικό δ/μα
109	Ethacrynic acid	E.P ³	100 %	110	Furosemide	Sigma	100 %	111	Hydrochlorothiazide	Δ.Α ²	100 %
112	Hydroflumethiazide	Sigma	100 %	113	Indapamide	Φαμάρ	Δισκίο 100 mg	114	Methylclothiazide	Δ.Α ²	100 %
115	Metolazone	Δ.Α ²	Δισκίο	116	Piretanide	Sanofi Aventis	Δισκίο	117	Polythiazide	Pfizer	Δισκίο 100 mg
118	Probenecid	Sigma	99,7 %	119	Torasemide	Menarini	Δισκίο	120	Triamterene	Sigma	99 %
121	Trichloromethiazide	Sigma	99 %	122	Xipamide	Δ.Α ²	Δ.Α ²	123	Alfentanil	Jansen Pharm.	Διάλυμα 99 %
124	6-Acetylmorphine hydrochloride hydrated	Lipomed	99,6 %	125	Buprenorphine	Sigma	100 %	126	Dextromoramide	Jansen Pharmaceutical	Δισκίο 100 mg
127	Dihydrocodeine tartrate	Bard Pharmac.	Δισκίο 60 mg	128	Fentanyl citrate	Jansen Pharm.	Διάλυμα	129	Hydromorphone hydrochloride	Sigma	99 %
130	Methadone hydrochloride	Lipomed	99,9 %	131	Methadone met. perchlorate	Radian Int.	99 %	132	Norcodeine hydrochloride	Sigma	Δ.Α ²
133	Morphine hydrochloride	Δ.Α ²	99 %	134	Normorphine hydrochloride	Sigma	100 %	135	Oxycodone hydrochloride	Sigma	99 %
136	Oxymorphone	Cerilliant	99 %	137	Pentazocine hydrochloride	Sterling Winthrop	Δισκίο	138	Pethidine	Δ.Α ²	100 %
139	Sulfentanyl citrate	Cerilliant	Διάλυμα	140	AICAR	Sigma	Δ.Α ²	141	Efaproxiral	WAADS	100 %
142	Aminoglutethimide	E.P ³	Δ.Α ²	143	Anastrozole	Astra Zeneca	Δισκίο 1 mg	144	Androst-1,4,6-triene-3,17-dione	Steraloids	Δ.Α ²
145	6-Oxoandrostenedione	Steraloids	Δ.Α ²	146	6-Hydroxytestosterone	Steraloids	Δ.Α ²	147	Exemestane	Pfizer	Δισκίο 25 mg
148	Formestane	Steraloids	98,9	149	Letrozol metabolite	A.G.N.M.I. ¹	Δ.Α ²	150	Fluticasone propionate	Glaxo	Εσπνεόμενο δ/μα
151	Toremifene	Orion Corporation	Δισκίο 60 mg	152	Tamoxifene 3-hydroxy-4-methoxy metabolite	NARL	85,7 %	153	Raloxifene hydrochloride	Φαρμασέρβ – Lilly AEBE	Δισκίο 60 mg
154	Adrafinil	Laboratoire L. Lapon	Δισκίο 300mg	155	Amiphenazole hydrobromide	Acros	97 %	156	Amphetamine hydrochloride	WYEKI control sample	100 %
157	Amphetamine hydrochloride	Lipomed	99,5 %	158	Benzphetamine hydrochloride	Sigma	99 %	159	Benzylamphetamine hydrochloride	Δ.Α ²	100 %
160	1-Benzylpiperazine	Fluka	100 %	161	Buflomedil hydrochloride	Sigma	100 %	162	Bupropion	Sigma	98 %
163	1-(3-Chlorphenyl)piperazine hydrochloride	Aldrich	100 %	164	Carphedone	NARL	98,5 %	165	Cocaine	Δ.Α ²	100 %
166	Benzoyllecgonine hydrated	Lipomed	99,8 %	167	Ecgonine methylester hydrochloride hydrated	Lipomed	99,5 %	168	Cropropamide	Novartis	Κάψουλα 50,5 mg
169	Crotethamide	Novartis	Κάψουλα 50,5 mg	170	Cyclazodone	A.G.N.M.I. ¹	99,6 %	171	Dimethylamphetamine hydrochloride	Δ.Α ²	100 %
172	Ephedrine hydrochloride	Lipomed	99,9 %	173	Etafedrine hydrochloride	Δ.Α ²	Δισκίο 100 mg	174	Ethamivan	Sigma	99 %
175	Ethylamphetamine hydrochloride	Δ.Α ²	100 %	176	Etilefrine hydrochloride	Boehringer Ingelheim	Δισκίο	177	Famprofazone	Sigma	100 %

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2: Μέθοδος σαρώσης LC/TOF-MS: Δεδομένα προέλευσης και καθαρότητας ουσιών αναφοράς

ΟΥΣΙΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ			ΠΡΟΜΗΘΕΥΤΗΣ	ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑ	ΟΥΣΙΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ			ΠΡΟΜΗΘΕΥΤΗΣ	ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑ	ΟΥΣΙΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ			ΠΡΟΜΗΘΕΥΤΗΣ	ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑ
175	Ethylamphetamine hydrochloride	Δ.Α ²	100 %	176	Etilefrine hydrochloride	Boehringer Ingelheim	Δισκίο	177	Famprofazone	Sigma	100 %			
178	Fenbutrazate hydrochloride	NARL	100 %	179	Fencamfamine hydrochloride	Δ.Α ²	100 %	180	Fencamine	A.G.N.M.I ¹	Δ.Α ²			
181	Fenethylline hydrochloride	Cartagon	Δισκίο	182	Fenfluramine hydrochloride	Servier Hellas	Δισκίο 100mg	183	Fenproporex hydrochloride	Laboratorios Lasa	Δισκίο			
184	Flephedrone	Cologne Doping Lab.	100 %	185	Fluoroamphetamine	Δ.Α ²	100 %	186	Furfenorex cyclohexyl sulfamate	Russel UCLAF	100 %			
187	Heptaminol hydrochloride	Sigma	100 %	188	p-Hydroxyamphetamine	Δ.Α ²	100 %	189	6-Hydroxybromantan	A.G.N.M. ¹	99,2 %			
190	MDMA hydrochloride	Lipomed	99,7 %	191	MDA hydrochloride	Lipomed	99,8 %	192	Meclofenoxate hydrochloride	Sigma	100 %			
193	Mefenorex hydrochloride	Roche	Δισκίο	194	Mephedrone	Cologne Doping Lab.	100 %	195	Mephentermine hemisulphate	Sigma	99 %			
196	Methamphetamine hydrochloride	Lipomed	99,9 %	197	Methoxyphenamine hydrochloride	Sigma	100 %	198	p-Methylamphetamine	NARL	99,6 %			
199	Methylenedioxypropylvalerone	Cologne Doping Lab.	100 %	200	Methylephedrine hydrochloride	Aldrich	99 %	201	4-Methyl-2hexanamine	Sigma	Υγρό 100 %			
202	Methylphenidate hydrochloride	Sigma	99 %	203	Modafinil	Laboratoires Macors	Δισκίο	204	Nikethamide	Fluka	Υγρό 99,8 %			
205	Norfenefrine	LCG	99,9 %	206	Norfenfluramine hydrochloride	Eutherapie Benelux	100 %	207	Norpseudoephedrine hydrochloride	Aldrich	98 %			
208	Octopamine hydrochloride	Sigma	99,7 %	209	Ortetamine hydrochloride	NARL	Δ.Α ²	210	Oxilofrine hydrochloride	A.G.N.M. ¹	100 %			
211	Pemoline	Δ.Α ²	Δ.Α ²	212	Pentetrazol	Sigma	99 %	213	Phendimetrazine	Gerot Pharmazeutika	Δισκίο 15 mg			
214	Phenmetrazine	Δ.Α ²	Δισκίο 30 mg	215	Phenpromethamine	Δ.Α ²	Δ.Α ²	216	Phentermine hydrochloride	Sigma	99 %			
217	Phenylephrine hydrochloride	Sigma	100 %	218	Pholedrine	Sigma	99 %	219	Pipradrol hydrochloride	Δ.Α ²	100 %			
220	Prenylamine	WAADS	Δ.Α ²	221	Prenylamine metabolite	Δ.Α ²	Δ.Α ²	222	Prolintane	Boehringer Ingelheim	Δισκίο 100 mg			
223	Propylhexedrine	A.G.N.M.I ¹	Δ.Α ²	224	Ritalinic acid	Δ.Α ²	Δ.Α ²	225	Strychnine hydrochloride	Sigma	99 %			
226	Sydnocarb	Δ.Α ²	Δ.Α ²	227	Sydnocarb metabolite	University of Helsinki	96,8 %	228	Synephrine	Sigma	100 %			
229	1-(3-Trifluoro-methylphenyl)-piperazine	Aldrich	Υγρό 99,7 %	230	Tuaminoheptane	Aldrich	Υγρό 99,6 %	231	Norfentanyl	Δ.Α ²	Δ.Α ²			
232	Norephedrine hydrochloride	Lipomed	100 %	233	Pseudoephedrine hydrochloride	Aldrich	99 %	234	Codeine (ISTD)	Sigma	99 %			

¹ Australian Government National Measurement Institute

² Δεν αναφέρεται (μη διαθέσιμο στοιχείο)

³ European Pharmacopoeia

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3: Μέθοδος σάρωσης LC/TOF-MS: Πρότυπα Διαλύματα Παρακαταθήκης και Εργασίας Αναλυτών

ΔΙΑΛΥΜΑ ΠΑΡΑΚΑΤΑΘΗΚΗΣ 1 (ΔΠ1)		
	Ουσία	C (μg mL ⁻¹)
1	Acebutolol	50
2	Alprenolol	50
3	Atenolol	50
4	Bisoprolol	50
5	Betaxolol	50
6	Carteolol	50
7	Carvedilol	50
8	Celiprolol	50
9	Esmolol	50
10	Levobunolol	50
11	Metipranolol	50
12	Metoprolol	50
13	Nadolol	50
14	Oxprenolol	50
15	Pindolol	50
16	Propranolol	50
17	Timolol	50

ΔΙΑΛΥΜΑ ΠΑΡΑΚΑΤΑΘΗΚΗΣ 2 (ΔΠ2)		
	Ουσία	C (μg mL ⁻¹)
1	Amiloride	12,5
2	Amiphenazole	25
3	Benzoylcegonine	25
4	Buprenorphine	0,5
5	Hydromorphone	10
6	Labetalol	25
7	Oxycodone	10
8	Pemoline	25
9	Sotalol	25
10	Triamterene	12,5

ΔΙΑΛΥΜΑ ΠΑΡΑΚΑΤΑΘΗΚΗΣ 3 (ΔΠ3)		
	Ουσία αναφοράς	C (μg mL ⁻¹)
1	Bambuterol	100
2	Clenbuterol	2
3	Fenoterol	100
4	Formoterol	100
5	Ractopamine	100
6	Salbutamol	100
7	Salmeterol	100
8	Terbutaline	100

ΔΙΑΛΥΜΑ ΠΑΡΑΚΑΤΑΘΗΚΗΣ 4 (ΔΠ4)		
	Ουσία αναφοράς	C (μg mL ⁻¹)
1	Beclomethasone	15
2	Budesonide	15
3	Budesonide met.	15
4	Desonide	15
5	Dexamethasone	15
6	Fludrocortisone	15
7	Flumethasone	15
8	Fluocortolone	15
9	Methylprednisolone	15
10	Prednisolone	15
11	Prednisone	15
12	Trenbolone	5
13	Triamcinolone	15
14	Triamcinolone Acetonide	15

ΔΙΑΛΥΜΑ ΠΑΡΑΚΑΤΑΘΗΚΗΣ 8 (ΔΠ8)		
	Ουσία	C (μg mL ⁻¹)
1	Betamethasone	15
2	17α-Epitrenbolone	5
3	Flunisolide	15

ΔΙΑΛΥΜΑ ΠΑΡΑΚΑΤΑΘΗΚΗΣ 5 (ΔΠ5)		
	Ουσία	C (μg mL ⁻¹)
1	Bolasterone	10
2	Bolasterone met.	10
3	Boldenone	10
4	Clostebol met.	10
5	Drostanolone met.	10
6	Furazabol	10
7	Gestrinone	10
8	Mesterolone met.	10
9	Methenolone	10
10	Methenolone met.	10
11	Norethandrolone met.1	10
12	17-Epioxandrolone	10
13	16-Hydroxystanozolol	10

ΔΙΑΛΥΜΑ ΠΑΡΑΚΑΤΑΘΗΚΗΣ 6 (ΔΠ6)		
	Ουσία	C (μg mL ⁻¹)
1	Fluoxymesterone met.1	10
2	Fluoxymesterone met.2	10
3	Formebolone met.	10
4	6-Hydroxyandrostenedione	10
5	4-Hydroxytestosterone	10
6	Methandienone met.1	10
7	Methandienone met.2	10
8	17α-Methyltestosterone met.2	10
9	19-Norandrosterone	10
10	19-Noretiocholanolone	10
11	Norethandrolone met.2	10
12	3-Hydroxystanozolol	10
13	α-Zearalanol	10
14	β-Zearalanol	10

ΔΙΑΛΥΜΑ ΠΑΡΑΚΑΤΑΘΗΚΗΣ 7 (ΔΠ7)		
	Ουσία	C (μg mL ⁻¹)
1	Boldenone met.	10
2	Calusterone	10
3	Calusterone met.	10
4	Danazol met.	10
5	Furazabol met.	10
6	17α-Methyltestosterone met.1	10
7	Norbolethone met.1	10
8	Norbolethone met.2	10
9	Oral Turinabol met.	10
10	Oxandrolone	10
11	Oxymesterone	10
12	Tetrahydrogestrinone	10
13	5α-Tetrahydronorethisterone	10

ΔΙΑΛΥΜΑ ΠΑΡΑΚΑΤΑΘΗΚΗΣ 10 (ΔΠ10)		
	Ουσία	C (μg mL ⁻¹)
1	Amphepamone	50
2	Amphetamine	50
3	Dimethylamphetamine	50
4	Heptaminol	50
5	Nikethamide	50
9	Pipradrol	50
7	Prolintane	20
8	Strychnine	20
9	Tuaminoheptane	50

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3: Μέθοδος σάρωσης LC/TOF-MS: πρότυπα διαλύματα παρακαταθήκης και εργασίας αναλυτών

ΔΙΑΛΥΜΑ ΠΑΡΑΚΑΤΑΘΗΚΗΣ 9 (ΔΠ9)		
	Ουσία	C (μg mL ⁻¹)
1	Aminoglutethimide	50
2	Anastrozole	50
3	1-Androstendione	10
4	Boldione	10
5	Efaproxiral	10
6	Exemestane	50
7	Formestane	50
8	Letrozol met.	50
9	Methyl-dienolone	10
10	Methyl-1-testosterone	10
11	Methyltrienolone	10
12	Mibolerone	10
13	Raloxifene	50
14	Tamoxifene met.	50
15	1-Testosterone	10
16	Toremifene	50
17	Zilpaterol	10

ΔΙΑΛΥΜΑ ΠΑΡΑΚΑΤΑΘΗΚΗΣ 14 (ΔΠ14)		
	Ουσία	C (μg mL ⁻¹)
1	Carphedone	50
2	Dihydrocodeine	20
3	Etafedrine	50
4	MDA	50
5	MDMA	50
6	Mephentermine	50
7	Methadone met.	20
8	Norcodeine	20
9	Pentetrazol	50
10	Phendimetrazine	50
11	Phenylephrine	50

ΔΙΑΛΥΜΑ ΠΑΡΑΚΑΤΑΘΗΚΗΣ 11 (ΔΠ11)		
	Ουσία	C (μg mL ⁻¹)
1	Amiphenazole	50
2	Ethamivan	50
3	Etilefrine	50
4	Methadone	20
5	Modafinil	50
6	Morphine	100
7	Pentazocine	20
8	Pethidine	20
9	Pholedrine	50
10	Sydnocarb	50

(ΔΠ16)		
	Ουσία	C (μg mL ⁻¹)
1	Acetazolamide	25
2	Althiazide	25
3	Bendroflumethiazide	25
4	Brinzolamide	25
5	Bumetanide	25
6	Canrenone	25
7	Chlorothiazide	25
8	Chlorthalidone	25
9	Clopamide	25
10	Cyclothiazide	25
11	Dichlorphenamide	25
12	Dorzolamide	25
13	Ethacrynic acid	25
14	Furosemide	25
15	Hydrochlorothiazide	25
16	Hydroflumethiazide	25
17	Indapamide	25
18	Methylchlorothiazide	25
19	Piretanide	25
20	Polythiazide	25
21	Probenecid	25
22	Torasemide	25
23	Trichloromethiazide	25
24	Xipamide	25
25	Adrafinil	25

ΔΙΑΛΥΜΑ ΠΑΡΑΚΑΤΑΘΗΚΗΣ 12 (ΔΠ12)		
	Ουσία	C (μg mL ⁻¹)
1	Benzphetamine	50
2	Benzylamphetamine	50
3	Cocaine	50
4	Cropropamide	50
5	Crotethamide	50
6	Ecgonine methylester	50
7	Ephedrine	50
8	Ethylamphetamine	50
9	Fencamfamine	50
10	Methylephedrine	50
11	Norephedrine	50
12	Norpseudoephedrine	50
13	Oxilofrine	50
14	Phentermine	50
15	Pseudoephedrine	50

(ΔΠ15)		
	Ουσία	C (μg mL ⁻¹)
1	1-Benzylpiperazine	50
2	Buflomedil	50
3	Bupropion	50
4	1-(3-Chlorophenyl)piperazine	50
5	Famprofazone	50
6	Furfenorex	50
7	6-Hydroxybromantan	50
8	Norfenfluramine	50
9	Octopamine	50
10	Phenmetrazine	50
11	1-(3-Trifluoro-methylphenyl)-piperazine	50
12	Propylhexedrine	50
13	Ritalinic acid	50
14	Synephrine	50

ΔΙΑΛΥΜΑ ΠΑΡΑΚΑΤΑΘΗΚΗΣ 13 (ΔΠ13)		
	Ουσία	C (μg mL ⁻¹)
1	6-Acetylmorphine	20
2	Dextromoramide	20
3	Fenethylline	50
4	Fenfluramine	50
5	Fenproporex	50
6	Mefenorex	50
7	Methamphetamine	50
8	Methoxyphenamine	50
9	Methylphenidate	50
10	Normorphine	20

(ΔΠ17)		
	Ουσία	C (μg mL ⁻¹)
1	Methandienone met.3	0,5
2	Methasterone	0,5
3	Metolazone	12,5
4	Alfentanil	0,5
5	Fentanyl	0,5
6	Sulfentanil	0,5
7	Norfentanyl	0,5
8	AICAR	10
9	Fenbutrazate	25
10	Fencamine	25
11	4-Methyl-2-hexanamine	25
12	Cyclazodone	25
13	Meclofenoxate	25
14	Norfenefrine	25
15	Ortetamine	25
16	Phenpromethamine	25
17	p-Methylamphetamine	25
18	Sydnocarb met.	25
19	Androst-1,4,6-triene-3,17-dione	2,5

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3: Μέθοδος σάρωσης LC/TOF-MS: πρότυπα διαλύματα παρακαταθήκης και εργασίας αναλυτών

Παρασκευή Διαλυμάτων Εργασίας

Διάλυμα παρακαταθήκης	Ληφθείς όγκος (μL)	Ογκομετρική φιάλη αραιώσης (mL)	Τελικό διάλυμα εργασίας	Συγκέντρωση διαλύματος εργασίας (μg mL ⁻¹)
ΔΠ(1)	400	2	ΔΕ(1)	10
ΔΠ(2)		Χρησιμοποιήθηκε χωρίς περεταίρω αραιώση		
ΔΠ(3)	250	5	ΔΕ(3)	5 0,1 (Clenbuterol)
ΔΠ(4)	500	5	ΔΕ(4)	1,5 0,5 (Trenbolone)
ΔΠ(5)	500	5	ΔΕ(5)	1
ΔΠ(6)	500	5	ΔΕ(6)	1
ΔΠ(7)	500	5	ΔΕ(7)	1
ΔΠ(8)	500	5	ΔΕ(8)	1,5 0,5 (Epi trenbolone)
ΔΠ(9)	500	5	ΔΕ(9)	5 1 (αναβολικές ουσίες)
ΔΠ(10)	400	2	ΔΕ(10)	10 4 (pipradrol, strychnine)
ΔΠ(11)	400	2	ΔΕ(11)	10 (διεγερτικά) 20 (morphine) 4 (ναρκωτικά)
ΔΠ(12)	400	2	ΔΕ(12)	10
ΔΠ(13)	400	2	ΔΕ(13)	10 (διεγερτικά) 4 (ναρκωτικά)
ΔΠ(14)	400	2	ΔΕ(14)	10 (διεγερτικά) 4 (ναρκωτικά)
ΔΠ(15)	400	2	ΔΕ(14)	10
ΔΠ(16)	400	2	ΔΕ(15)	5
ΔΠ(17)		Χρησιμοποιήθηκε χωρίς περεταίρω αραιώση		

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4: Μέθοδος σάρωσης LC/TOF-MS:
Χρόνοι Ανάσχεσης & Ιόντα Αναλυτών σε πρότυπα διαλύματα

	ΟΥΣΙΑ	ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΤΥΠΟΣ	RT (min)	ION	m/z _{θεωρ.}	m/z _{πειραμ.}	Σφάλμα Μαζας (ppm)
1	Acebutolol	C ₁₈ H ₂₈ N ₂ O ₄	4,44	[M+H] ⁺	337,2122	337,2119	-0,9
2	Alprenolol	C ₁₅ H ₂₃ NO ₂	5,94	[M+H] ⁺	250,1802	250,1804	0,8
3	Atenolol	C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O ₃	1,74	[M+H] ⁺	267,1703	267,1697	-2,2
4	Betaxolol	C ₁₈ H ₂₉ NO ₃	6,07	[M+H] ⁺	308,2220	308,2222	0,6
5	Bisoprolol	C ₁₈ H ₃₁ NO ₄	5,48	[M+H] ⁺	326,2326	326,2327	0,3
6	Carteolol	C ₁₆ H ₂₄ N ₂ O ₃	3,40	[M+H] ⁺	293,1860	293,1857	-1,0
7	Carvedilol	C ₂₄ H ₂₆ N ₂ O ₄	6,83	[M+H] ⁺	407,1965	407,1968	0,7
8	Celiprolol	C ₂₀ H ₃₃ N ₃ O ₄	5,05	[M+H] ⁺	380,2544	380,2542	-0,5
9	Esmolol	C ₁₆ H ₂₅ NO ₄	4,97	[M+H] ⁺	296,1856	296,1854	-0,7
10	Labetalol	C ₁₉ H ₂₄ N ₂ O ₃	5,43	[M+H] ⁺	329,1860	329,1854	-1,8
11	Levobunolol	C ₁₇ H ₂₅ NO ₃	4,70	[M+H] ⁺	292,1907	292,1910	1,0
12	Metipranolol	C ₁₇ H ₂₇ NO ₄	5,76	[M+H] ⁺	310,2013	310,2011	-0,6
13	Metoprolol	C ₁₅ H ₂₅ NO ₃	4,55	[M+H] ⁺	268,1907	268,1910	1,1
14	Nadolol	C ₁₇ H ₂₇ NO ₄	3,53	[M+H] ⁺	310,2013	310,2011	-0,6
15	Oxprenolol	C ₁₅ H ₂₃ NO ₃	5,25	[M+H] ⁺	266,1751	266,1754	1,1
16	Pindolol	C ₁₄ H ₂₀ N ₂ O ₂	3,66	[M+H] ⁺	249,1598	249,1600	0,8
17	Propranolol	C ₁₆ H ₂₁ NO ₂	5,84	[M+H] ⁺	260,1645	260,1640	-1,9
18	Sotalol	C ₁₂ H ₂₀ N ₂ O ₃ S	1,89	[M+H] ⁺	273,1267	273,1263	-1,5
19	Timolol	C ₁₃ H ₂₄ N ₃ O ₄ S	4,37	[M+H] ⁺	317,1642	317,1638	-1,3
20	Bambuterol	C ₁₈ H ₂₉ N ₃ O ₅	5,12	[M+H] ⁺	368,2180	368,2182	0,5
21	Fenoterol	C ₁₇ H ₂₁ NO ₄	2,95	[M+H] ⁺	304,1543	304,1532	-3,6
22	Formoterol	C ₁₉ H ₂₄ N ₂ O ₄	4,66	[M+H] ⁺	345,1809	345,1807	-0,6
23	Ractopamine	C ₁₈ H ₂₃ NO ₃	4,09	[M+H] ⁺	302,1751	302,1750	-0,3
24	Salbutamol	C ₁₃ H ₂₁ NO ₃	1,63	[M+H] ⁺	240,1594	240,1596	0,8
25	Salmeterol	C ₂₅ H ₃₇ NO ₄	7,41	[M+H] ⁺	416,2795	416,2798	0,8
26	Terbutaline	C ₁₂ H ₁₉ NO ₃	1,65	[M+H] ⁺	226,1438	226,1435	-1,3
27	Beclomethasone	C ₂₂ H ₂₉ ClO ₅	7,24	[M+H] ⁺	409,1776	409,1781	1,2
				[M+H] ⁺	411,1757	411,1758	0,2
				[2M+Na] ⁺	839,3299	839,3274	-3,0
				[2M+H] ⁺	817,3480	817,3446	-4,2
28	Betamethasone	C ₂₂ H ₂₉ FO ₅	6,98	[M+H] ⁺	393,2072	393,2076	1,0
				[M+H-HF] ⁺	373,2009	373,2005	-1,1
				[2M+H] ⁺	785,4071	785,4052	-2,4
				[2M+Na] ⁺	807,3890	807,3863	-3,3
29	Budesonide	C ₂₅ H ₃₄ O ₆	8,60	[M+H] ⁺	431,2428	431,2427	-0,2
30	Budesonide met.	C ₂₁ H ₂₈ O ₆	5,37	[M+H] ⁺	377,1959	377,1962	0,8
				[2M+H] ⁺	753,3845	753,3805	-5,3
				[2M+Na] ⁺	775,3664	775,3661	-0,4
31	Desonide	C ₂₄ H ₃₂ O ₆	7,44	[M+H] ⁺	417,2272	417,2270	-0,5
				[2M+H] ⁺	833,4471	833,4445	-3,1
				[2M+Na] ⁺	855,4290	855,4263	-3,2
32	Dexamethasone	C ₂₂ H ₂₉ FO ₅	7,04	[M+H] ⁺	393,2072	393,2080	2,0
				[M+H-HF] ⁺	373,2009	373,2013	1,1
				[2M+H] ⁺	785,4071	785,4060	-1,4
				[2M+Na] ⁺	807,3890	807,3875	-1,9

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4: Μέθοδος σάρωσης LC/TOF-MS: Χρόνοι ανάσχεσης & ιόντα αναλυτών σε διαλύματα

ΟΥΣΙΑ	ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΤΥΠΟΣ	RT (min)	ION	m/z _{θεωρ.}	m/z _{πειραμ.}	Σφάλμα Μαζας (ppm)
33	Fludrocortisone	C ₂₁ H ₂₉ FO ₅	[M+H] ⁺	381,2072	381,2074	0,5
			[2M+H] ⁺	761,4071	761,4038	-4,3
			[2M+Na] ⁺	783,3890	783,3877	-1,7
34	Fumethasone	C ₂₂ H ₂₈ F ₂ O ₅	[M+H] ⁺	411,1978	411,1982	1,0
			[2M+H] ⁺	821,3882	821,3858	-2,9
			[2M+Na] ⁺	843,3702	843,3683	-2,3
35	Flunisolide	C ₂₄ H ₃₁ FO ₆	[M+H] ⁺	435,2177	435,2182	1,1
			[2M+Na] ⁺	891,4102	891,4082	-2,2
			[2M+H] ⁺	869,4282	869,4255	-3,1
36	Fluocortolone	C ₂₂ H ₂₉ FO ₄	[M+H] ⁺	377,2123	377,2125	0,5
			[2M+H] ⁺	753,4173	753,4151	-2,9
			[2M+Na] ⁺	775,3992	775,3969	-3,0
37	Methylprednisolone	C ₂₂ H ₃₀ O ₅	[M+H] ⁺	375,2166	375,2173	1,9
			[M+H-H ₂ O] ⁺	357,2060	357,2054	-1,7
			[2M+H] ⁺	749,4259	749,4246	-1,7
38	Prednisolone	C ₂₁ H ₂₈ O ₅	[2M+Na] ⁺	771,4079	771,4062	-2,2
			[M+H] ⁺	361,2009	361,2013	1,1
			[2M+H] ⁺	721,3946	721,3927	-2,6
39	Prednisone	C ₂₁ H ₂₆ O ₅	[2M+Na] ⁺	743,3766	743,3742	-3,2
			[M+H] ⁺	359,1853	359,1857	1,1
			[2M+H] ⁺	717,3633	717,3618	-2,1
40	Triamcinolone	C ₂₁ H ₂₇ FO ₆	[2M+Na] ⁺	739,3453	739,3437	-2,2
			[M+H] ⁺	395,1864	395,1866	1,3
			[2M+H] ⁺	789,3656	789,3621	-0,9
41	Triamcinolone Acetonide	C ₂₄ H ₃₁ FO ₆	[2M+Na] ⁺	811,3476	811,3444	-0,2
			[M+H] ⁺	435,2177	435,2173	-0,9
			[2M+H] ⁺	869,4282	869,4246	-4,1
42	1-Androstendione	C ₁₉ H ₂₆ O ₂	[2M+Na] ⁺	891,4102	891,4078	-2,7
			[M+H] ⁺	287,2006	287,1996	-3,5
			[2M+H] ⁺	573,3938	573,3932	-1,0
43	Bolasterone	C ₂₁ H ₃₂ O ₂	[2M+Na] ⁺	633,4877	633,4878	0,2
			[M+H] ⁺	317,2475	317,2482	2,2
			[2M+H] ⁺	633,4877	633,4855	-3,5
44	Bolasterone met.	C ₂₁ H ₃₆ O ₂	[2M+Na] ⁺	655,4697	655,4666	-4,7
			[M+H-H ₂ O] ⁺	285,2577	285,2575	-0,7
			[M+H] ⁺	287,2006	287,2007	0,3
45	Boldenone	C ₁₉ H ₂₆ O ₂	[2M+H] ⁺	573,3938	573,3932	-1,0
			[2M+Na] ⁺	595,3758	595,3741	-0,3
			[M+H] ⁺	289,2162	289,2153	-3,1
46	Boldenone met.	C ₁₉ H ₂₈ O ₂	[M+H] ⁺	285,1849	285,1849	0,0
			[M+H] ⁺	317,2475	317,2474	-0,3
			[2M+H] ⁺	633,4877	633,4855	-3,5
47	Boldione	C ₁₉ H ₂₄ O ₂	[2M+Na] ⁺	655,4697	655,4666	-4,7
			[M+H] ⁺	285,1849	285,1849	0,0
			[2M+H] ⁺	633,4877	633,4855	-3,5
48	Calusterone	C ₂₁ H ₃₂ O ₂	[2M+Na] ⁺	655,4697	655,4666	-4,7
			[M+H] ⁺	317,2475	317,2474	-0,3
			[2M+H] ⁺	633,4877	633,4855	-3,5
49	Calusterone met.	C ₂₁ H ₃₆ O ₂	[2M+Na] ⁺	667,3291	667,3306	2,2
			[M+H-H ₂ O] ⁺	285,2577	285,2566	-3,9
			[M+H] ⁺	277,0869	277,0859	-3,6
50	Clenbuterol	C ₁₂ H ₁₈ N ₂ OCl ₂	[M+H] ⁺	279,0841	279,0832	-3,2
			[M+H] ⁺	277,0869	277,0859	-3,6
			[M+H] ⁺	279,0841	279,0832	-3,2
51	Clostebol met.	C ₁₉ H ₂₇ ClO ₂	[M+H-H ₂ O] ⁺	305,1667	305,1654	-4,3
			[M+H-H ₂ O] ⁺	307,1644	307,1642	-0,7
			[M+NH ₄ -H ₂ O] ⁺	322,1927	322,1924	-0,9
52	Danazol met.	C ₂₁ H ₂₈ O ₂	[2M+Na] ⁺	667,3291	667,3306	2,2
			[M+H] ⁺	313,2162	313,2157	-1,6
			[2M+H] ⁺	625,4251	625,4236	-2,4
53	Drostanolone met.	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	[2M+Na] ⁺	647,4071	647,4040	-4,8
			[M+NH ₄] ⁺	322,2735	322,2731	-1,2
			[2M+H] ⁺	631,4697	631,4674	-3,6
54	Fluoxymesterone met.1	C ₂₀ H ₂₇ FO ₂	[M+H] ⁺	305,2475	305,2471	-1,3
			[M+H] ⁺	319,2068	319,2065	-0,9
			[M+H-H ₂ O] ⁺	287,2369	287,2358	-3,8
54	Fluoxymesterone met.1	C ₂₀ H ₂₇ FO ₂	[2M+H] ⁺	637,4063	637,4052	-1,7
			[2M+Na] ⁺	659,3882	659,3859	-3,5
			[2M+Na] ⁺	659,3882	659,3859	-3,5

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4: Μέθοδος σάρωσης LC/TOF-MS: Χρόνοι ανάσχεσης & ιόντα αναλυτών σε διαλύματα

ΟΥΣΙΑ	ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΤΥΠΟΣ	RT (min)	ION	m/z _{θεωρ.}	m/z _{πειραμ.}	Σφάλμα Μαζας (ppm)	
55	Fluoxymesterone met.2	C ₂₀ H ₃₁ FO ₄	3,87	[M+H-H ₂ O] ⁺	337,2173	337,2168	-1,5
				[M+Na] ⁺	731,4305	731,4277	-3,8
				[2M+Na] ⁺	377,2099	377,2083	-4,2
56	Formebolone met.	C ₂₁ H ₃₀ O ₄	5,72	[M+H] ⁺	347,2217	347,2214	-0,9
				[2M+Na] ⁺	715,4180	715,4157	-3,2
				[M+Na] ⁺	369,2036	369,2024	-3,3
57	Furazabol met.	C ₂₀ H ₃₀ N ₂ O ₃	9,45	[M+NH ₄] ⁺	364,2589	364,2574	-3,6
				[2M+Na] ⁺	369,2149	369,2136	-3,5
58	Gestrinone	C ₂₁ H ₂₄ O ₂	8,65	[M+H] ⁺	309,1849	309,1848	-0,3
59	6-Hydroxyandrostenedione	C ₁₉ H ₂₆ O ₃	6,39	[M+H] ⁺	303,1955	303,1948	-2,3
				[2M+Na] ⁺	627,3656	627,3633	-3,7
60	4-Hydroxytestosterone	C ₁₉ H ₂₈ O ₃	8,47	[M+H] ⁺	305,2111	305,2101	-3,3
				[M+Na] ⁺	327,1931	327,1923	-2,4
61	Mesterolone met.	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	10,56	[M+NH ₄] ⁺	322,2735	322,2730	-1,6
				[2M+Na] ⁺	631,4697	631,4667	-4,8
				[M+H] ⁺	305,2475	305,2458	-5,6
				[M+H-H ₂ O] ⁺	287,2369	287,2355	-4,9
62	Methandienone met.1	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	10,94	[M+H-2H ₂ O] ⁺	269,2264	269,2255	-3,3
63	Methandienone met.2	C ₂₀ H ₂₈ O ₃	5,93	[M+H] ⁺	317,2111	317,2111	0,0
				[M+H-H ₂ O] ⁺	299,2006	299,2001	-1,7
				[2M+Na] ⁺	655,3969	655,3969	-5,0
				[M+H-2H ₂ O] ⁺	281,1900	281,1892	-2,8
64	Methandienone met.3	C ₂₀ H ₂₆ O ₂	8,46	[M+H] ⁺	299,2006	299,2002	-1,3
65	Methasterone	C ₂₁ H ₃₄ O ₂	6,75	[M+H] ⁺	319,2632	319,2636	1,3
				[M+NH ₄] ⁺	336,2892	336,2894	0,6
				[M+Na] ⁺	341,2451	341,2448	-0,9
				[2M+Na] ⁺	659,5010	659,5001	-1,4
66	Methenolone	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	8,73	[M+H] ⁺	303,2319	303,2312	-2,3
67	Methenolone met.	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	9,82	[M+NH ₄] ⁺	320,2579	320,2575	-1,2
				[M+H-H ₂ O] ⁺	285,2213	285,2202	-3,9
				[M+H] ⁺	303,2319	303,2313	-2,0
				[2M+Na] ⁺	627,4384	327,4361	-3,7
68	Methyl-1-testosterone	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	9,30	[M+H] ⁺	303,2319	303,2321	0,7
69	Methyldienolone	C ₂₀ H ₂₆ O ₂	7,89	[M+H] ⁺	287,2006	287,2002	-1,4
70	Methyltrienolone	C ₂₀ H ₂₄ O ₂	7,84	[M+H] ⁺	285,1849	285,1844	-1,8
71	17-Methyltestosterone met.1	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	9,45	[M+H-2H ₂ O] ⁺	271,2420	271,2416	-1,5
72	17-Methyltestosterone met.2	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	9,23	[M+H-2H ₂ O] ⁺	271,2420	271,2411	-3,3
73	Mibolerone	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	8,68	[M+H] ⁺	303,2319	303,2328	3,0
74	19-Norandrosterone	C ₁₈ H ₂₈ O ₂	9,51	[M+NH ₄] ⁺	294,2422	294,2420	-0,7
				[M+H] ⁺	277,2162	277,2154	-2,9
				[M+H-H ₂ O] ⁺	259,2056	259,2046	-3,9
				[2M+Na] ⁺	575,4071	575,4060	-1,9
75	19-Noretiocholanolone	C ₁₈ H ₂₈ O ₂	9,19	[M+NH ₄] ⁺	294,2422	294,2416	-2,0
				[M+H] ⁺	277,2162	277,2149	-4,7
				[M+H-H ₂ O] ⁺	259,2056	259,2047	-3,5
				[2M+Na] ⁺	575,4071	575,4049	-3,8
76	Norbolethone met.1	C ₂₁ H ₃₆ O ₂	11,08	[M+H-2H ₂ O] ⁺	285,2577	285,2557	-7,0
77	Norbolethone met.2	C ₂₁ H ₃₆ O ₂	10,68	[M+H-2H ₂ O] ⁺	285,2577	285,2566	-3,9
78	Norethandrolone met.1	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	10,03	[M+H-2H ₂ O] ⁺	271,2420	271,2406	-5,0
79	Norethandrolone met.2	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	9,64	[M+H-2H ₂ O] ⁺	271,2420	271,2401	-7,0
80	Normethandrolone	C ₁₉ H ₂₈ O ₂	8,26	[M+H] ⁺	289,2162	289,2181	6,6
				[2M+H] ⁺	577,4251	577,4253	0,3
				[2M+Na] ⁺	599,4071	599,4070	-0,2

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4: Μέθοδος σάρωσης LC/TOF-MS: Χρόνοι ανάσχεσης & ιόντα αναλυτών σε διαλύματα

ΟΥΣΙΑ	ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΤΥΠΟΣ	RT (min)	ION	m/z _{θεωρ.}	m/z _{πειραμ.}	Σφάλμα Μαζας (ppm)	
81	Oral Turinabol met.	C ₂₀ H ₂₇ ClO ₃	7,04	[M+H] ⁺	351,1721	351,1718	-0,9
				[M+H] ⁺	353,1700	353,1693	-2,0
				[2M+Na] ⁺	723,3190	723,3176	-1,9
				[M+H-H ₂ O] ⁺	333,1616	333,1609	-2,1
82	Oxandrolone	C ₁₉ H ₃₀ O ₃	8,13	[M+H] ⁺	307,2268	307,2262	-2,0
				[M+NH ₄] ⁺	324,2528	324,2523	-1,5
				[2M+Na] ⁺	635,4282	635,4273	-1,4
83	17-Epioxandrolone	C ₁₉ H ₃₀ O ₃	9,08	[M+H] ⁺	307,2268	307,2261	-2,3
				[2M+Na] ⁺	635,4282	635,4268	-2,2
				[M+NH ₄] ⁺	324,2528	324,2527	-0,3
84	Oxymesterone	C ₁₉ H ₃₀ O ₃	8,94	[M+H] ⁺	319,2268	319,2268	0,0
85	16-Hydroxystanozolol	C ₂₁ H ₃₂ N ₂ O ₂	7,25	[M+H] ⁺	345,2537	345,2535	-0,6
86	3-Hydroxystanozolol	C ₂₁ H ₃₂ N ₂ O ₂	6,87	[M+H] ⁺	345,2537	345,2530	-2,0
87	1-Testosterone	C ₁₉ H ₂₈ O ₂	8,86	[M+H] ⁺	289,2162	289,2164	0,7
				[2M+H] ⁺	577,4251	577,4245	-1,0
				[2M+Na] ⁺	599,4071	599,4064	-1,2
88	Tetrahydrogestrinone	C ₂₁ H ₂₈ O ₂	9,63	[M+H] ⁺	313,2162	313,2159	-1,0
				[2M+Na] ⁺	647,4071	647,4072	0,2
89	5α-Tetrahydronorethisterone	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	9,15	[M+NH ₄] ⁺	320,2579	320,2562	-5,3
90	Trenbolone	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	7,45	[M+H] ⁺	271,1693	271,1685	-3,0
				[2M+Na] ⁺	563,3132	563,3121	-2,0
91	17α-Epitrenbolone	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	7,71	[M+H] ⁺	271,1693	271,1691	-0,7
				[2M+Na] ⁺	563,3132	563,3122	-1,8
92	Zilpaterol	C ₁₄ H ₁₉ N ₃ O ₂	1,63	[M+H] ⁺	262,1550	262,1545	-1,9
93	α-Zearalanol	C ₁₈ H ₂₆ O ₅	8,02	[M+H] ⁺	323,1853	323,1850	-0,9
				[M+H-H ₂ O] ⁺	305,1747	305,1744	-1,0
				[M+Na] ⁺	345,1672	345,1669	-0,9
				[2M+K] ⁺	361,1412	361,1401	-3,0
94	β-Zearalanol	C ₁₈ H ₂₆ O ₅	7,38	[M+H] ⁺	323,1853	323,1845	-2,5
				[M+H-H ₂ O] ⁺	305,1747	305,1739	-2,6
				[M+Na] ⁺	345,1672	345,1666	-1,7
				[2M+K] ⁺	361,1412	361,1404	-2,2
95	Acetazolamide	C ₄ H ₆ N ₄ O ₆ S ₂	2,61	[M+H] ⁺	222,9954	222,9952	-0,9
				[M+Na] ⁺	244,9774	244,9767	-2,9
				[2M+Na] ⁺	466,9655	466,9666	2,4
96	Althiazide	C ₁₁ H ₁₄ N ₃ O ₄ S ₃ Cl	6,89	[M+NH ₄] ⁺	401,0168	401,0181	3,2
				[M+NH ₄] ⁺	403,0143	403,0147	1,0
				[2M+NH ₄] ⁺	784,0003	784,0014	1,4
				[2M+NH ₄] ⁺	785,9980	785,9986	0,8
97	Amiloride	C ₆ H ₈ N ₇ OCl	1,96	[M+H] ⁺	230,0552	230,0549	-1,3
				[M+H] ⁺	232,0523	232,0525	0,9
98	Bendroflumethiazide	C ₁₅ H ₁₄ N ₃ O ₄ S ₂ F ₃	7,93	[M+NH ₄] ⁺	439,0711	439,0721	2,3
				[2M+NH ₄] ⁺	860,1088	860,1088	0,0
				[2M+Na] ⁺	865,0648	865,0646	-0,2
99	Brinzolamide	C ₁₂ H ₁₁ N ₃ O ₅ S ₃	4,46	[M+H] ⁺	384,0716	384,0713	-0,8
				[2M+Na] ⁺	789,1179	789,1178	-0,1
100	Bumetanide	C ₁₇ H ₂₀ N ₂ O ₅ S	8,04	[M+H] ⁺	365,1166	365,1171	1,4
				[2M+Na] ⁺	751,2078	751,2077	-0,1
				[M+Na] ⁺	729,2259	729,2261	0,3
101	Canrenone	C ₂₂ H ₂₈ O ₃	9,10	[M+H] ⁺	341,2111	341,2118	2,1
				[M+NH ₄] ⁺	358,2371	358,2374	0,8
				[2M+Na] ⁺	703,3969	703,3961	-1,1
102	Chlorothiazide	C ₇ H ₆ N ₃ O ₄ S ₂ Cl	3,04	[M+NH ₄] ⁺	312,9821	312,9820	-0,3
				[M+NH ₄] ⁺	314,9797	314,9802	1,6
				[M+H] ⁺	295,9561	295,9563	0,7
				[2M+NH ₄] ⁺	607,9309	607,9312	0,5

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4: Μέθοδος σάρωσης LC/TOF-MS: Χρόνοι ανάσχεσης & ιόντα αναλυτών σε διαλύματα

ΟΥΣΙΑ	ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΤΥΠΟΣ	RT (min)	ION	m/z _{θεωρ.}	m/z _{πειραμ.}	Σφάλμα Μαζας (ppm)	
103	Chlorthalidone	C ₁₄ H ₁₁ N ₂ O ₄ SCI	5,20	[M+NH ₄] ⁺	356,0461	356,0466	1,4
				[M+H-H ₂ O] ⁺	321,0095	321,0093	-0,6
				[2M+Na] ⁺	699,0148	699,0146	-0,3
				[M+H] ⁺	339,0201	339,0196	-1,5
				[3M+Na] ⁺	1037,0276	1037,0256	-1,9
104	Clopamide	C ₁₄ H ₂₀ N ₃ O ₃ SCI	5,93	[M+H] ⁺	346,0987	346,0987	0,0
				[2M+H] ⁺	691,1901	691,1901	0,0
				[2M+Na] ⁺	713,1720	713,1702	-2,5
105	Cyclothiazide	C ₁₄ H ₁₆ N ₃ O ₄ S ₂ Cl	7,63	[M+NH ₄] ⁺	407,0604	407,0612	2,0
				[M+NH ₄] ⁺	409,0581	409,0584	0,7
				[2M+NH ₄] ⁺	796,0874	796,0881	0,9
				[2M+NH ₄] ⁺	798,0855	798,0845	-1,3
106	Dichlorphenamide	C ₆ H ₆ N ₂ O ₄ S ₂ Cl ₂	5,12	[2M+Na] ⁺	632,8155	632,8150	-0,8
				[2M+Na] ⁺	630,8184	630,8187	0,2
107	Dorzolamide	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₄ S ₃	2,61	[M+H] ⁺	325,0345	325,0340	-1,5
				[2M+Na] ⁺	671,0437	671,0439	0,3
108	Ethacrynic acid	C ₁₃ H ₁₂ Cl ₂ O ₄	7,22	[M+H] ⁺	303,0185	303,0185	0,0
				[M+H] ⁺	305,0158	305,0158	0,0
				[2M+Na] ⁺	629,0991	629,0996	0,6
				[2M+Na] ⁺	627,0117	627,0112	-0,8
109	Furosemide	C ₁₂ H ₁₁ N ₂ O ₅ SCI	6,26	[2M+Na] ⁺	683,0047	683,0043	-0,6
				[M+Na] ⁺	352,9969	352,9968	-0,3
				[M+K] ⁺	368,9709	368,9711	0,5
110	Hydrochlorothiazide	C ₇ H ₈ N ₃ O ₄ S ₂ Cl	3,37	[M+NH ₄] ⁺	314,9978	314,9979	0,3
				[2M+NH ₄] ⁺	611,9622	611,9624	0,3
				[2M+Na] ⁺	616,9182	616,9190	1,3
				[3M+Na] ⁺	913,8826	913,8799	-3,0
111	Hydroflumethiazide	C ₈ H ₈ N ₃ O ₄ S ₂ F ₃	4,53	[M+NH ₄] ⁺	349,0241	349,0250	2,6
				[2M+Na] ⁺	684,9709	684,9707	-0,3
				[2M+NH ₄] ⁺	680,0149	680,0149	0,0
				[3M+Na] ⁺	1015,9617	1015,9610	-0,8
112	Indapamide	C ₁₆ H ₁₆ N ₃ O ₃ SCI	7,27	[M+H] ⁺	366,0674	366,0674	0,0
				[2M+Na] ⁺	753,1094	753,1092	-0,3
				[2M+H] ⁺	731,1275	731,1269	-0,8
113	Methylchlorothiazide	C ₉ H ₁₁ N ₃ O ₄ S ₂ Cl ₂	6,38	[M+NH ₄] ⁺	376,9901	376,9909	2,1
				[2M+Na] ⁺	742,9000	742,9003	0,4
				[2M+NH ₄] ⁺	737,9446	737,9428	-2,4
114	Metolazone	C ₁₆ H ₁₆ N ₃ O ₃ SCI	6,73	[M+H] ⁺	366,0674	366,0680	1,6
				[2M+H] ⁺	731,1275	731,1266	-1,2
				[2M+Na] ⁺	753,1094	753,1076	-2,4
115	Piretanide	C ₁₇ H ₁₈ N ₂ O ₅ S	7,47	[M+H] ⁺	363,1009	363,1010	0,3
				[2M+Na] ⁺	747,1765	747,1762	-0,4
116	Polythiazide	C ₁₁ H ₁₃ N ₃ O ₄ S ₃ ClF	7,90	[M+NH ₄] ⁺	457,0042	457,0055	2,8
				[2M+NH ₄] ⁺	895,9728	895,9750	2,5
				[2M+Na] ⁺	900,9310	900,9353	4,8
117	Probenecid	C ₁₃ H ₁₉ NO ₄ S	7,86	[M+H] ⁺	286,1108	286,1110	0,7
				[2M+Na] ⁺	593,1692	593,1693	0,2
				[M+Na] ⁺	308,0927	308,0926	-0,3
118	Torasemide	C ₁₆ H ₂₀ N ₄ O ₃ S	5,77	[M+H] ⁺	349,1329	349,1324	-1,4
119	Triamterene	C ₁₂ H ₁₁ N ₇	3,86	[M+H] ⁺	254,1149	254,1143	-2,4
				[2M+H] ⁺	507,2225	507,2226	0,2
				[2M+Na] ⁺	529,2044	529,2039	-0,9
120	Trichloromethiazide	C ₈ H ₈ N ₃ O ₄ S ₂ Cl ₃	6,06	[M+NH ₄] ⁺	398,9331	398,9331	0,0
				[2M+Na] ⁺	782,7909	782,7905	-0,5
				[2M+NH ₄] ⁺	777,8353	777,8340	-1,7
121	Xipamide	C ₁₅ H ₁₅ N ₂ O ₄ SCI	8,01	[M+H] ⁺	355,0514	355,0516	0,6
				[M+H] ⁺	357,0488	357,0486	-0,6
122	Alfentanyl	C ₂₁ H ₃₂ N ₆ O ₃	6,15	[M+H] ⁺	417,2609	417,2605	-1,0

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4: Μέθοδος σάρωσης LC/TOF-MS: Χρόνοι ανάσχεσης & ιόντα αναλυτών σε διαλύματα

ΟΥΣΙΑ	ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΤΥΠΟΣ	RT (min)	ION	m/z _{θεωρ.}	m/z _{πειραμ.}	Σφάλμα Μαζας (ppm)	
123	6-Acetylmorphine	C ₁₅ H ₂₃ N	3,36	[M+H] ⁺	328,1543	328,1537	-1,8
124	Buprenorphine	C ₂₉ H ₄₁ NO ₄	6,75	[M+H] ⁺	468,3108	468,3118	2,1
125	Dextromoramide	C ₂₅ H ₃₂ N ₂ O ₂	7,23	[M+H] ⁺	393,2537	393,2539	0,5
126	Dihydrocodeine	C ₁₈ H ₂₃ NO ₃	2,64	[M+H] ⁺	302,1751	302,1744	-2,3
127	Fentanyl	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O	6,20	[M+H] ⁺	337,2274	337,2269	-1,5
128	Hydromorphone	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	1,79	[M+H] ⁺	286,1438	286,1431	-2,4
				[M+NH ₄] ⁺	303,1698	303,1706	2,6
				[2M+H] ⁺	571,2803	571,2790	-2,9
				[2M+Na] ⁺	593,2622	593,2611	-1,9
129	Methadone	C ₂₁ H ₂₇ NO	7,34	[M+H] ⁺	310,2165	310,2163	-0,6
130	Methadone met.	C ₂₀ H ₂₃ N	6,82	[M+H] ⁺	278,1903	278,1900	-1,1
131	Morphine	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	1,37	[M+H] ⁺	286,1438	283,1433	-1,7
132	Norbuprenorphine	C ₂₅ H ₃₅ NO ₄	5,40	[M+H] ⁺	414,2639	414,2643	1,0
133	Norcodeine	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	2,55	[M+H] ⁺	286,1438	286,1431	-2,4
				[2M+H] ⁺	571,2803	571,2810	1,2
				[2M+Na] ⁺	593,2622	593,2617	-0,8
134	Norfentanyl	C ₁₄ H ₂₀ N ₂ O	4,22	[M+H] ⁺	233,1648	233,1649	0,4
135	Normorphine	C ₁₆ H ₁₇ NO ₃	1,23	[M+H] ⁺	272,1281	272,1276	-1,8
				[2M+H] ⁺	543,2490	543,2488	-0,4
136	Oxycodone	C ₁₈ H ₂₁ NO ₄	3,27	[M+H] ⁺	316,1543	316,1541	-0,6
				[2M+Na] ⁺	653,2833	653,2829	-0,6
137	Oxymorphone	C ₁₇ H ₁₉ NO ₄	1,54	[M+H] ⁺	302,1387	302,1383	-1,3
				[2M+Na] ⁺	625,2520	625,2512	-1,3
138	Pentazocine	C ₁₉ H ₂₇ NO	5,61	[M+H] ⁺	286,2154	286,2160	2,1
139	Pethidine	C ₁₅ H ₂₁ NO ₂	5,09	[M+H] ⁺	248,1645	248,1640	-2,0
140	Sulfentanyl	C ₂₂ H ₃₀ N ₂ O ₂ S	7,11	[M+H] ⁺	387,2101	387,2118	4,4
141	AICAR	C ₉ H ₁₄ N ₄ O ₅	0,97	[M+H] ⁺	259,1037	259,1034	-1,2
				[2M+H] ⁺	281,0856	281,0855	-0,4
				[2M+Na] ⁺	539,1821	539,1818	-0,6
142	Efaproxiral	C ₂₀ H ₃₃ NO ₄	8,15	[M+H] ⁺	342,1700	342,1699	-0,3
143	Aminoglutethimide	C ₁₃ H ₂₆ N ₂ O ₂	4,95	[M+H] ⁺	233,1285	233,1285	0,0
				[M+Na] ⁺	255,1104	255,1105	0,4
				[2M+H] ⁺	465,2496	465,2501	1,1
				[2M+Na] ⁺	487,2316	487,2320	0,8
144	Anastrozole	C ₁₇ H ₁₇ N ₅	7,20	[M+H] ⁺	294,1713	294,1714	0,3
				[2M+H] ⁺	587,3354	587,3357	0,5
145	Androst-1,4,6-triene-3,17-dione	C ₁₉ H ₂₂ O ₂	8,00	[M+H] ⁺	283,1693	283,1694	0,4
				[2M+Na] ⁺	587,3132	587,3135	0,5
146	6-Oxoandrostenedione	C ₁₉ H ₂₄ O ₃	7,53	[M+H] ⁺	301,1798	301,1804	2,0
				[M+Na] ⁺	323,1618	323,1621	0,9
				[2M+Na] ⁺	623,3343	623,3354	1,8
147	6-Hydroxytestosterone	C ₁₉ H ₂₈ O ₃	5,63	[M+H] ⁺	305,2111	305,2129	5,9
				[2M+H] ⁺	609,4150	609,4148	-0,3
				[2M+Na] ⁺	631,3969	631,3985	2,5
148	Exemestane	C ₂₀ H ₂₄ O ₂	8,95	[M+H] ⁺	297,1849	297,1854	1,7
149	Formestane	C ₁₉ H ₂₆ O ₃	9,11	[M+H] ⁺	303,1955	303,1961	2,0
150	Raloxifene	C ₂₈ H ₂₇ NO ₄ S	6,34	[M+H] ⁺	474,1734	474,1737	0,6
151	Tamoxifene met.	C ₂₇ H ₃₁ NO ₃	8,58	[M+H] ⁺	418,2377	418,2385	1,9
152	Toremifene	C ₂₆ H ₂₈ NOCl	9,35	[M+H] ⁺	406,1932	406,1938	1,5
				[M+H] ⁺	408,1918	408,1916	-0,5
153	Adrafinil	C ₁₅ H ₁₅ NO ₃ S	5,93	C ₁₃ H ₁₀	167,0855	167,0856	0,6
				[2M+Na] ⁺	601,1438	601,1446	1,3
				[M+Na] ⁺	312,0665	312,0661	-1,3
				[M+K] ⁺	328,0404	328,0403	-0,3

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4: Μέθοδος σάρωσης LC/TOF-MS: Χρόνοι ανάσχεσης & ιόντα αναλυτών σε διαλύματα

ΟΥΣΙΑ	ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΤΥΠΟΣ	RT (min)	ION	m/z _{θεωρ.}	m/z _{πειραμ.}	Σφάλμα Μαζας (ppm)	
154	Amiphenazole	C ₉ H ₉ N ₃ S	2,35	[M+H] ⁺	192,0590	192,0587	-1,6
155	Amphepramone	C ₁₃ H ₁₉ NO	3,65	[M+H] ⁺	206,1539	206,1536	-1,5
156	Amphetamine	C ₉ H ₁₃ N	3,12	[M+H] ⁺	136,1121	136,1115	-4,4
			[M+H-NH ₃] ⁺	119,0855	119,0859	3,4	
157	Benzphetamine	C ₁₇ H ₂₁ N	6,00	[M+H] ⁺	240,1747	240,1746	-0,4
158	Benzylamphetamine	C ₁₆ H ₁₉ N	5,82	[M+H] ⁺	226,1590	226,1589	-0,4
159	1-Benzylpiperazine	C ₁₁ H ₁₆ N ₂	2,86	[M+H] ⁺	177,1386	177,1380	-3,4
160	Buflomedil	C ₁₇ H ₂₅ NO ₄	4,94	[M+H] ⁺	308,1856	308,1857	0,3
161	Bupropion	C ₁₃ H ₁₈ NOCl	5,39	[M+H] ⁺	240,1150	240,1143	-2,9
			[M+H] ⁺	242,1123	242,1120	-1,2	
162	1-(3-Chlorphenyl)piperazine	C ₁₀ H ₁₃ N ₂ Cl	4,71	[M+H] ⁺	197,0840	197,0831	-4,0
			[M+H] ⁺	199,0812	199,0804	-4,6	
163	Carphedone	C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₂	4,64	[M+H] ⁺	219,1128	219,1120	-3,7
			[2M+Na] ⁺	459,2003	459,2013	2,2	
			[M+H-H ₂ O] ⁺	202,0863	202,0862	-0,5	
164	Cocaine	C ₁₇ H ₂₁ NO ₄	5,04	[M+H] ⁺	304,1543	304,1542	-0,3
165	Benzoylcgonine	C ₁₆ H ₁₉ NO ₄	3,96	[M+H] ⁺	290,1387	290,1391	1,4
166	Ecgonine methylester	C ₁₀ H ₁₇ NO ₃	0,91	[M+H] ⁺	200,1281	200,1276	-2,5
167	Cropropamide	C ₁₃ H ₂₄ N ₂ O ₂	6,30	[M+H-C ₂ H ₅ NH ₂] ⁺	196,1332	196,1328	-2,0
			[2M+Na] ⁺	503,3568	503,3573	1,0	
			[M+H] ⁺	241,1911	241,1910	-0,4	
			[M+Na] ⁺	263,1730	263,1729	-0,4	
168	Crotethamide	C ₁₂ H ₂₂ N ₂ O ₂	5,40	[M+H-C ₂ H ₅ NH ₂] ⁺	182,1176	182,1169	-3,8
			[2M+Na] ⁺	475,3275	475,3256	-4,0	
			[M+H] ⁺	227,1754	227,1752	-0,9	
			[M+Na] ⁺	249,1573	249,1572	-0,4	
169	Cyclazodone	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O ₂	8,00	[M+H] ⁺	217,0972	217,0989	7,8
			[2M+H] ⁺	433,1870	433,1890	4,6	
			[2M+Na] ⁺	455,1690	455,1696	1,3	
170	Dimethylamphetamine	C ₁₁ H ₁₇ N	3,66	[M+H] ⁺	164,1434	164,1427	-4,3
171	Ephedrine	C ₁₀ H ₁₅ NO	2,56	[M+H] ⁺	166,1226	166,1220	-3,6
	Pseudoephedrine			[M+H-H ₂ O] ⁺	148,1121	148,1116	-3,4
172	Etafedrine	C ₁₂ H ₁₉ NO	3,35	[M+H] ⁺	194,1539	194,1534	-2,6
173	Ethamivan	C ₁₂ H ₁₇ NO ₃	5,51	[M+H] ⁺	224,1281	224,1274	-3,1
			[2M+H] ⁺	447,2490	447,2481	-2,0	
			[2M+Na] ⁺	469,2309	469,2307	-0,4	
174	Ethylamphetamine	C ₁₁ H ₁₇ N	3,90	[M+H] ⁺	164,1434	164,1429	-3,0
175	Etilefrine	C ₁₀ H ₁₅ NO ₂	1,35	[M+H] ⁺	182,1176	182,1166	-5,5
			[M+H-H ₂ O] ⁺	164,1070	164,1069	-0,6	
176	Famprofazone	C ₂₄ H ₃₁ N ₃ O	10,95	[M+H] ⁺	378,2540	378,2546	1,6
			[2M+H] ⁺	755,5007	755,5017	1,3	
			[2M+Na] ⁺	777,4826	777,4836	1,3	
177	Fenbutrazate	C ₂₃ H ₂₉ NO ₃	10,50	[M+H] ⁺	368,2220	368,2225	1,4
178	Fencamfamine	C ₁₅ H ₂₁ N	5,52	[M+H] ⁺	216,1747	216,1745	-0,9
179	Fencamine	C ₂₈ H ₂₆ N ₆ O ₂	4,35	[M+H] ⁺	385,2346	385,2352	9,3
180	Fenethyliline	C ₁₈ H ₂₃ N ₅ O ₂	4,65	[M+H] ⁺	342,1925	342,1917	-2,3
181	Fenfluramine	C ₁₂ H ₁₆ F ₃ N	5,69	[M+H] ⁺	232,1308	232,1304	-1,7
182	Fenproporex	C ₁₂ H ₁₆ N ₂	3,74	[M+H] ⁺	189,1386	189,1380	-3,2
183	Flephedrone	C ₁₀ H ₁₂ FNO ₃	3,09	[M+H] ⁺	182,0976	182,0968	-4,4
			[M+H-H ₂ O] ⁺	164,0870	164,0859	-6,7	
184	p-Fluoroamphetamine	C ₉ H ₁₂ FN	3,41- 3,64	[M+H] ⁺	154,1027	154,1021	-3,9
			[M+H-NH ₃] ⁺	137,0761	137,0763	1,5	
185	Furfenorex	C ₁₅ H ₁₉ NO	5,27	[M+H] ⁺	230,1539	230,1533	-2,6
186	Heptaminol	C ₈ H ₁₉ NO	1,49	[M+H] ⁺	146,1539	146,1532	-4,8
			[M+H-H ₂ O] ⁺	128,1434	128,1437	2,3	

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4: Μέθοδος σάρωσης LC/TOF-MS: Χρόνοι ανάσχεσης & ιόντα αναλυτών σε διαλύματα

ΟΥΣΙΑ	ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΤΥΠΟΣ	RT (min)	ΙΟΝ	m/z _{θεωρ.}	m/z _{πειραμ.}	Σφάλμα Μαζας (ppm)
187	p-Hydroxyamphetamine	C ₉ H ₁₃ NO	[M+H] ⁺	152,1070	152,1062	-5,3
			[M+H-NH ₃] ⁺	135,0804	135,0802	-1,5
188	6-Hydroxybromantan	C ₁₆ H ₂₀ NOBr	[M+H] ⁺	322,0801	322,0795	-1,9
			[M+H] ⁺	324,0785	324,0777	-2,5
189	MDA	C ₁₀ H ₁₃ NO ₂	[M+H] ⁺	180,1014	180,1010	-2,2
190	MDMA	C ₁₁ H ₁₅ NO ₂	[M+H] ⁺	194,1176	194,1171	-2,6
191	Meclofenoxate	C ₁₂ H ₁₆ NO ₃ Cl	[M+H] ⁺	258,0891	258,0897	2,1
			[M+H] ⁺	260,0866	260,0863	-1,0
192	Mefenorex	C ₁₂ H ₁₈ NCl	[M+H] ⁺	212,1201	212,1197	-1,9
			[M+H] ⁺	214,1173	214,1166	-3,3
193	Mephedrone	C ₁₁ H ₁₅ NO	[M+H] ⁺	178,1226	178,1224	-1,1
			[M+H-H ₂ O] ⁺	160,1121	160,1114	-4,4
194	Mephentermine	C ₁₁ H ₁₇ N	[M+H] ⁺	164,1434	164,1428	-3,7
195	Methamphetamine	C ₁₀ H ₁₅ N	[M+H] ⁺	150,1277	150,1273	-2,7
196	Methoxyphenamine	C ₁₁ H ₁₇ NO	[M+H] ⁺	180,1383	180,1306	-42,7
197	p-Methylamphetamine	C ₁₀ H ₁₅ N	[M+H] ⁺	150,1277	150,1280	2,0
			[M+H-NH ₃] ⁺	133,1012	133,1014	1,5
198	Methylenedioxypropylvalerone	C ₁₆ H ₂₁ NO ₃	[M+H] ⁺	276,1594	276,1590	-1,4
199	Methylephedrine	C ₁₁ H ₁₇ NO	[M+H] ⁺	180,1383	180,1377	-3,3
200	4-Methyl-2-hexanamine	C ₇ H ₁₇ N	[M+H] ⁺	116,1434	116,1436	1,7
201	Methylphenidate	C ₁₄ H ₁₉ NO ₂	[M+H] ⁺	234,1489	234,1486	-1,3
202	Modafinil	C ₁₅ H ₁₅ NO ₂ S	C ₁₃ H ₁₀	167,0855	167,0847	-4,8
			[2M+Na] ⁺	569,1539	569,1536	-0,5
			[M+Na] ⁺	296,0716	296,0709	-2,4
			[M+K] ⁺	312,0455	312,0450	-1,6
203	Nikethamide	C ₁₅ H ₁₅ NO ₂ S	[M+H] ⁺	179,1179	179,1159	-11,2
204	Norfenefrine	C ₈ H ₁₁ NO ₂	[M+H] ⁺	154,0863	154,0860	-1,9
			[M+H-H ₂ O] ⁺	136,0757	136,0753	-2,9
205	Norfenfluramine	C ₁₀ H ₁₂ NF ₃	[M+H] ⁺	204,0995	204,0986	-4,4
206	Norpseudoephedrine Norephedrine	C ₉ H ₁₃ NO	[M+H] ⁺	152,1070	152,1063	-4,6
			[M+H-H ₂ O] ⁺	134,0964	134,0963	-0,7
207	Octopamine	C ₈ H ₁₁ NO ₂	[M+H-H ₂ O] ⁺	136,0757	136,0757	0,0
			[M+H] ⁺	154,0863	154,0861	-1,3
208	Ortetamine	C ₁₀ H ₁₅ N	[M+H] ⁺	150,1277	150,1284	4,7
			[M+H-NH ₃] ⁺	133,1012	133,1021	6,8
209	Oxilofrine	C ₁₀ H ₁₅ NO ₂	[M+H] ⁺	182,1176	182,1177	0,5
			[M+H-H ₂ O] ⁺	164,1070	164,1068	-1,2
210	Pemoline	C ₉ H ₈ N ₂ O	[M+H] ⁺	177,0659	177,0651	-4,5
			[2M+H] ⁺	353,1244	353,1246	0,6
			[2M+Na] ⁺	375,1064	375,1063	-0,3
211	Pentetrazol	C ₆ H ₁₀ N ₄	[M+H] ⁺	139,0978	139,0974	-2,9
			[2M+H] ⁺	277,1884	277,1886	0,7
212	Phendimetrazine	C ₁₂ H ₁₇ NO	[M+H] ⁺	192,1383	192,1377	-3,1
213	Phenmetrazine	C ₁₁ H ₁₅ NO	[M+H] ⁺	178,1226	178,1224	-1,1
214	Phenpromethamine	C ₁₀ H ₁₅ N	[M+H] ⁺	150,1277	150,1280	2,0
215	Phentermine	C ₁₀ H ₁₅ N	[M+H] ⁺	150,1277	150,1271	-4,0
216	Phenylephrine	C ₉ H ₁₃ NO ₂	[M+H] ⁺	168,1019	168,1012	-4,2
			[M+H-H ₂ O] ⁺	150,0913	150,0912	-0,7
217	Pholedrine	C ₁₀ H ₁₅ NO	[M+H] ⁺	166,1226	166,1219	-4,2
			[M+H-CH ₃ NH ₂] ⁺	135,0804	135,0805	0,7
218	Pipradrol	C ₈ H ₁₉ N	[M+H] ⁺	268,1696	268,1692	-1,5
			[M+H-H ₂ O] ⁺	250,1590	250,1585	-2,0
219	Prenylamine	C ₂₄ H ₂₇ N	[M+H] ⁺	330,2216	330,2227	3,3
220	Prenylamine met	C ₁₅ H ₁₇ N	[M+H] ⁺	212,1434	212,1444	4,7
221	Prolintane	C ₁₅ H ₂₃ N	[M+H] ⁺	218,1903	218,1901	-0,9

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4: Μέθοδος σάρωσης LC/TOF-MS: Χρόνοι ανάσχεσης & ιόντα αναλυτών σε διαλύματα

ΟΥΣΙΑ	ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΤΥΠΟΣ	RT (min)	ION	m/z _{θεωρ.}	m/z _{πειραμ.}	Σφάλμα Μαζας (ppm)
222	Propylhexedrine	5,11	[M+H] ⁺	156,1747	156,1740	-4,5
223	Ritalinic acid	3,60	[M+H] ⁺	220,1332	220,1325	-3,2
			[2M+H] ⁺	439,2591	439,2594	0,7
			[2M+Na] ⁺	461,2411	461,2414	0,7
224	Strychnine	3,87	[M+H] ⁺	335,1754	335,1749	-1,5
			[2M+H] ⁺	669,3435	669,3424	-1,6
225	Sydnocarb	8,94	[M+H] ⁺	323,1503	323,1498	-1,5
226	Sydnocarb met	7,21	[M+H] ⁺	339,1452	339,1462	2,9
			[2M+Na] ⁺	699,2650	669,2648	-0,3
227	Synephrine	0,99	[M+H-H ₂ O] ⁺	150,0913	150,0911	-1,3
			[M+H] ⁺	168,1019	168,1015	-2,4
228	1-(3-Trifluoro-methylphenyl)-piperazine	5,44	[M+H] ⁺	231,1104	231,1100	-1,7
229	Tuaminoheptane	3,99	[M+H] ⁺	116,1434	116,1431	-2,6
230	Codeine (ISTD)	2,83	[M+H] ⁺	300,1594	300,1596	0,7
231	17α-Methyltestosterone (ISTD)	8,72	[M+H] ⁺	303,2319	303,2310	-3,0
			[2M+H] ⁺	605,4564	605,4566	0,3
			[2M+Na] ⁺	627,4384	627,4375	-1,4

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 5: Μέθοδος σάρωσης LC/TOF-MS: Πορεία παρασκευής εμβολιασμένων δειγμάτων ούρων για τη μελέτη ικανότητας ανίχνευσης των αναλυτών και τον προσδιορισμό του ορίου ανίχνευσης

Ομάδα Ουσιών	ΕΠΙΠΕΔΟ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ											
	0,1 x MRPL		0,2 x MRPL		0,5 x MRPL		MRPL		2 x MRPL		4 x MRPL	
	Διάλυμα*	Όγκος* δ/τος (μL)	Διάλυμα	Όγκος δ/τος (μL)	Διάλυμα	Όγκος δ/τος (μL)	Διάλυμα	Όγκος δ/τος (μL)	Διάλυμα	Όγκος δ/τος (μL)	Διάλυμα	Όγκος δ/τος (μL)
1	ΔΕ(1)	25	ΔΕ(1)	50	ΔΠ(1)	25	ΔΠ(1)	50	-	-	-	-
2	ΔΠ(2)	10	ΔΠ(2)	20	ΔΠ(2)	50	ΔΠ(2)	100	-	-	-	-
3	-	-	ΔΕ(3)	20	ΔΕ(3)	50	ΔΕ(3)	100	-	-	-	-
4	-	-	ΔΕ(4)	20	ΔΕ(4)	50	ΔΕ(4)	100	-	-	-	-
5	-	-	ΔΕ(5)	10	ΔΕ(5)	25	ΔΕ(5)	50	ΔΕ(5)	100	ΔΕ(5)	200
6	-	-	ΔΕ(6)	10	ΔΕ(6)	25	ΔΕ(6)	50	ΔΕ(6)	100	ΔΕ(6)	200
7	-	-	ΔΕ(7)	10	ΔΕ(7)	25	ΔΕ(7)	50	ΔΕ(7)	100	ΔΕ(7)	200
8	-	-	ΔΕ(8)	20	ΔΕ(8)	50	ΔΕ(8)	100	-	-	-	-
9	-	-	ΔΕ(9)	10	ΔΕ(9)	25	ΔΕ(9)	50	ΔΕ(9)	100	-	-
10	ΔΕ(10)	25	ΔΕ(10)	50	ΔΠ(10)	25	ΔΠ(10)	50	-	-	-	-
11	ΔΕ(11)	25	ΔΕ(11)	50	ΔΠ(11)	25	ΔΠ(11)	50	-	-	-	-
12	ΔΕ(12)	25	ΔΕ(12)	50	ΔΠ(12)	25	ΔΠ(12)	50	-	-	-	-
13	ΔΕ(13)	25	ΔΕ(13)	50	ΔΠ(13)	25	ΔΠ(13)	50	-	-	-	-
14	ΔΕ(14)	25	ΔΕ(14)	50	ΔΠ(14)	25	ΔΠ(14)	50	-	-	-	-
15	ΔΕ(15)	25	ΔΕ(15)	50	ΔΠ(15)	25	ΔΠ(15)	50	-	-	-	-
16	ΔΕ(16)	25	ΔΕ(16)	50	ΔΠ(16)	25	ΔΠ(16)	50	-	-	-	-
17	-	-	-	-	ΔΠ(17)	50	ΔΠ(17)	100	-	-	-	-

*Διάλυμα και όγκος διαλύματος που χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό 5 mL λευκού δείγματος ούρων

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 6: Αξιολόγηση μεθόδου σάρωσης LC/TOF-MS: Αποτελέσματα Επαναληψιμότητας, Ορίου Ανίχνευσης & Ακρίβειας μέτρησης λόγου m/z

ΟΥΣΙΑ	MRPL (ng mL ⁻¹)	% RSD		ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΥΡΗΜΑΤΩΝ						LOD (ng mL ⁻¹)	ΣΦΑΛΜΑ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΛΟΓΟΥ m/z (ppm)					
		RRT	RR	0.1 x MRPL	0.2 x MRPL	0.5 x MRPL	MRPL	2 x MRPL	4 x MRPL		0.1 x MRPL	0.2 x MRPL	0.5 x MRPL	MRPL	2 x MRPL	4 x MRPL
1-Androstendione	10	0,1			5/10	7/10	10/10			10		<15,3	<25,8	<37	<23,3	
Bolasterone	10	0,1	3,0		9/10	10/10	10/10	10/10	10/10	5		<27,7	<27,4	<6,9	<3,8	<2,5
Boldenone	10	0,2	2,8		10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	<2		<16,4	<6,6	<2,8	<2,8	<1,7
Boldione	10	0,1	4,4		10/10	10/10	10/10	10/10		<2		<47,0	<28,4	<16,8	<10,2	
Calusterone	10	0,1	2,6		10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	<2		<21,1	<3,5	<2,8	<2,8	<1,6
Calusterone met.	10	0,2	3,9		0/10	3/10	9/10	10/10	10/10	20			<41,4	<35,8	<48,7	<28,4
Clenbuterol	2	0,2	2,7			9/10	9/10	10/10	10/10	4						
Clostebol met.	10	0,2	9,3		0/10	1/10	7/10	7/10	10/10	40			47,8	<30,4	<20,5	<20,8
Danazol met.	10	0,1	1,7		9/10	10/10	10/10	10/10	10/10	5		<16,6	<20,8	<11,2	<10,2	<2,6
Drostanolone met.	10	0,2	4,6		8/10	8/10	10/10	10/10	10/10	10		<15,5	<5,3	<9,6	<3,1	<2,2
Fluoxymesterone met.1	10	0,2	4,4		10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	<2		<20,7	<8,1	<4,1	<3,8	<2,5
Fluoxymesterone met.2	10	0,4	2,4		4/10	6/10	10/10	10/10	10/10	10		<22,8	<16,6	<36,8	<13,9	<4,4
Formebolone met.	10	0,2	4,0		8/10	10/10	10/10	10/10	10/10	5		<44,1	<34,0	<17,9	<10,4	<1,7
Gestrinone	10	0,1	3,7		10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	<2		<8,7	<2,6	<2,9	<2,3	<2,6
6α-Hydroxyandrostenedione	10	0,2	2,3		5/10	8/10	10/10	10/10	10/10	10		<10,9	<39,6	<20,1	<12,9	
4-Hydroxytestosterone	10	0,1	4,7		6/10	9/10	10/10	10/10	10/10	10		<43,6	<34,7	<36,4	<14,4	<8,2
Mesterolone met.	10	0,2	4,2		10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	<2		<27,3	<11,2	<2,8	<1,9	<2,5
*Methandienone met.1	2	0,2	11,3		2 ppb 7/10	5 ppb 10/10	10 ppb 10/10	20 ppb 10/10	40 ppb 10/10	5		2 ppb <14,5	5 ppb <5,6	10 ppb <4,5	20 ppb <2,6	20 ppb <2,2
Methandienone met.2	10	0,2	2,2		6/10	10/10	10/10	10/10	10/10	5		<47,0	<48,5	<17,7	<6,9	<3,2
Methandienone met.3	10	0,1				8/10	10/10			10						
Methyl-1-testosterone	10	0,1			7/10	9/10	10/10	10/10		10		<27,4	<11,2	<5,9	<5,9	
Methyldienolone	10	0,1	5,4		10/10	10/10	10/10	10/10		<2		<11,1	<5,6	<4,5	<4,2	
Methyltrienolone	10	0,1	7,4		10/10	10/10	10/10			<2		<10,2	<6,7	<2,1		
*19-Norandrosterone	2	0,1	14,8		2 ppb 2/10	5 ppb 10/10	10 ppb 10/10	20 ppb 10/10	40 ppb 10/10	5		2 ppb <21,8	5 ppb <29,6	10 ppb <8,8	20 ppb <2,0	40 ppb <2,0
19-Noretiocholanolone	10	0,1	7,4		6/10	10/10	10/10	10/10	10/10	5		<50	<21,4	<8,8	<2,0	<1,7
Norbolethone met.2	10	0,2	8,4		0/10	0/10	4/10	9/10	10/10	40				<89,4	<93,6	<45,9
Norethandrolone met.2	10	0,4	6,8		4/10	7/10	10/10	10/10	10/10	10		<47,6	<45,3	<35,4	<21,8	<11,8
Oral Turinabol met.	10	0,3	1,7		0/10	2/10	5/10	8/10	10/10	40				<64,4	<70,3	<62,6
Oxandrolone	10	0,2	6,6		10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	<2		<39,4	<33,5	<14,0	<9,4	<4,9

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 6: Αξιολόγηση μεθόδου σάρωσης LC/TOF-MS: Αποτελέσματα επαναληψιμότητας, ορίου ανίχνευσης & ακρίβειας μέτρησης λόγου m/z

ΟΥΣΙΑ	MRPL (ng mL ⁻¹)	% RSD		ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΥΡΗΜΑΤΩΝ						LOD (ng mL ⁻¹)	ΣΦΑΛΜΑ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΛΟΓΟΥ m/z (ppm)					
		RRT	RR	0.1 x MRPL	0.2 x MRPL	0.5 x MRPL	MRPL	2 x MRPL	4 x MRPL		0.1 x MRPL	0.2 x MRPL	0.5 x MRPL	MRPL	2 x MRPL	4 x MRPL
16-Hydroxystanozolol	10	0,2	9,7		8/10	10/10	10/10	10/10	10/10	5	<28,4	<24,3	<9,6	<7,0	<4,9	
*3- Hydroxystanozolol	2	0,1	9,2		2 ppb 6/10	5 ppb 9/10	10 ppb 10/10	20 ppb 10/10	40 ppb 10/10	10	2 ppb <14,8	5 ppb <17,7	10 ppb <14,8	20 ppb <8,1	40 ppb <2,3	
Tetrahydrogestrinone (THG)	10	0,1	1,1		10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	<2	<3,5	<3,5	<2,9	<3,8	<2,2	
Trenbolone	10	0,2	1,6		10/10	10/10	10/10			<2	<15,9	<8,9	<5,5			
17α-Epitrenbolone	10	0,1	7,8		10/10	10/10	10/10			<2	<43,5	<14,4	<4,4			
α-Zearalanol	10	0,2	4,3		0/10	3/10	7/10	10/10	10/10	20		<28,2	<46,7	<31,9	<11,1	
β-Zearalanol	10	0,1	5,1		0/10	2/10	6/10	10/10	10/10	20		<48,9	<41,5	<49,5	<13,3	
Zilpaterol	10	0,5	9,8		10/10	10/10	10/10			<2	<16,4	<7,2	<3,4			
Acebutolol	500	0,2	4,3		10/10	10/10	10/10	10/10		<50	<3,0	<1,8	<0,9	<2,7		
Alprenolol	500	0,2	3,8		10/10	10/10	10/10	10/10		<50	<3,2	<4,4	<2,4	<3,6		
Atenolol	500	0,4	4,2		10/10	10/10	10/10	10/10		<50	<6,7	<3,4	<3,7	<2,2		
Betaxolol	500	0,1	4,0		10/10	10/10	10/10	10/10		<50	<4,9	<10,4	<8,8	<3,2		
Bisoprolol	500	0,2	4,2		10/10	10/10	10/10	10/10		<50	<3,1	<1,8	<1,8	<2,5		
Carteolol	500	0,2	3,6		10/10	10/10	10/10	10/10		<50	<3,1	<4,4	<5,5	<3,8		
Carvedilol	500	0,2	3,6		10/10	10/10	10/10	10/10		<50	<2,5	<1,2	<1,2	<1,7		
Celiprolol	500	0,2	4,0		10/10	10/10	10/10	10/10		<50	<2,1	<1,1	<1,6	<1,8		
Esmolol	500	0,1	3,8		10/10	10/10	10/10	10/10		<50	<2,7	<2,0	<1,7	<2,7		
Labetalol	500	0,3	6,5		10/10	10/10	10/10	10/10		<50	<2,1	<1,8	<2,4	<3,0		
Levobunolol	500	0,2	3,5		10/10	10/10	10/10	10/10		<50	<3,1	<3,4	<1,7	<2,7		
Metipranolol	500	0,2	3,9		10/10	10/10	10/10	10/10		<50	<3,2	<1,9	<1,0	<1,3		
Metoprolol	500	0,3	3,8		10/10	10/10	10/10	10/10		<50	<2,5	<3,0	<2,2	<1,9		
Nadolol	500	0,2	4,3		10/10	10/10	10/10	10/10		<50	<1,9	<2,3	<1,9	<3,2		
Oxprenolol	500	0,2	4,1		10/10	10/10	10/10	10/10		<50	<3,0	<2,3	<1,5	<2,6		
Pindolol	500	0,2	4,8		10/10	10/10	10/10	10/10		<50	<5,2	<4,4	<4,0	<3,6		
Propranolol	500	0,2	3,7		10/10	10/10	10/10	10/10		<50	<4,6	<3,5	<1,5	<3,1		
Sotalol	500	0,3	3,6		10/10	10/10	10/10	10/10		<50	<1,8	<1,5	<1,5	<4,0		
Timolol	500	0,2	4,0		10/10	10/10	10/10	10/10		<50	<1,6	<2,5	<1,6	<2,5		
Bambuterol	100	0,1	3,6			10/10	10/10	10/10		<20		<1,9	<1,1	<2,2		
Fenoterol	100	0,2	6,4			10/10	10/10	10/10		<20		<7,6	<5,6	<3,0		
Fenoterol artifact		0,4	8,9									<7,0	<6,0	<5,4		
Formoterol	100	0,1	3,9			10/10	10/10	10/10		<20		<10,0	<6,0	<5,0		
Ractopamine	100	0,2	3,9			10/10	10/10	10/10		<20		<6,5	<5,2	<5,0		
Salbutamol	100	0,7	5,0			10/10	10/10	10/10		<20		<4,6	<3,3	<2,5		
Salmeterol	100	0,2	3,5			10/10	10/10	10/10		<20		<2,9	<3,4	<1,9		
Terbutaline	100	0,6	4,1			10/10	10/10	10/10		<20		<3,1	<3,1	<2,7		
Beclomethasone	30	0,2	5,7			10/10	10/10	10/10		<6		<7,3	<5,6	<5,1		

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 6: Αξιολόγηση μεθόδου σάρωσης LC/TOF-MS: Αποτελέσματα επαναληψιμότητας, ορίου ανίχνευσης & ακρίβειας μέτρησης λόγου m/z

ΟΥΣΙΑ	MRPL (ng mL ⁻¹)	% RSD		ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΥΡΗΜΑΤΩΝ						LOD (ng mL ⁻¹)	ΣΦΑΛΜΑ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΛΟΓΟΥ m/z (ppm)					
		RRT	RR	0.1 x MRPL	0.2 x MRPL	0.5 x MRPL	MRPL	2 x MRPL	4 x MRPL		0.1 x MRPL	0.2 x MRPL	0.5 x MRPL	MRPL	2 x MRPL	4 x MRPL
Betamethasone	30	0,2	4,0		10/10	10/10	10/10		<6		<14,2	<5,3	<4,1			
Budesonide	30	0,2	2,6		10/10	10/10	10/10		<6		<0,9	<2,6	<3,5			
Budesonide met.	30	0,3	6,4		9/10	10/10	10/10		15		<9,5	<5,8	<2,9			
Desonide	30	0,1	1,7		10/10	10/10	10/10		<6		<1,4	<2,4	<3,6			
Dexamethasone	30	0,2	7,9		10/10	10/10	10/10		<6		<4,1	<3,1	<1,3			
Fludrocortisone	30	0,2	5,6		2/10	8/10	10/10		30		<20	<2,8	<23,6			
Flumethasone	30	0,2	6,7		10/10	10/10	10/10		<6		<4,6	<3,4	<2,2			
Flunisolide	30	0,1	1,1		10/10	10/10	10/10		<6		<20,9	<6,2	<4,4			
Fluocortolone	30	0,1	2,0		7/10	9/10	10/10		30		<27,0	<16,4	<17,0			
Methylprednisolone	30	0,2	4,7		10/10	10/10	10/10		<6		<8,0	<4,5	<1,6			
Prednisolone	30	0,2	4,0		9/10	10/10	10/10		15		<6,6	<17,7	<11,6			
Prednisone	30	0,2	4,0		10/10	10/10	10/10		<6		<7,8	<4,2	<2,2			
Triamcinolone Acetonide	30	0,1	3,0		10/10	10/10	10/10		<6		<2,3	<1,8	<3,4			
Triamcinolone	30	0,2	6,6		9/10	10/10	10/10		15		<22,6	<10,6	<5,1			
Acetazolamide	250	0,3	10	6/10	10/10	10/10	10/10		50		<8,1	<9,9	<6,3	<6,7		
Althiazide	250	0,3	6,2	10/10	10/10	10/10	10/10		<25		<4,0	<4,7	<5,0	<4,7		
Amiloride	250	0,3	6,3	10/10	10/10	10/10	10/10		<25		<6,5	<4,3	<3,0	<3,0		
Bendroflumethiazide	250	0,1	4,9	10/10	10/10	10/10	10/10		<25		<4,1	<3,0	<3,6	<3,0		
Brinzolamide	250	0,2	4,9	10/10	10/10	10/10	10/10		<25		<5,2	<3,4	<2,3	<3,1		
Bumetanide	250	0,1	4,7	10/10	10/10	10/10	10/10		<25		<2,7	<3,6	<2,7	<1,6		
Canrenone	250	0,1	7,5	10/10	10/10	10/10	10/10		<25		<24,3	<14,4	<6,2	<1,8		
Chlorothiazide	250	0,2	8,5	1/10	3/10	8/10	10/10		250		<40,6	<21,1	<24,6			
Chlorthalidone	250	0,1	7,6	10/10	10/10	10/10	10/10		<25		<4,5	<4,5	<5,1	<3,7		
Cloпамide	250	0,1	4,7	10/10	10/10	10/10	10/10		<25		<3,8	<3,5	<4,6	<2,6		
Cyclothiazide	250	0,1	5,9	10/10	10/10	10/10	10/10		<25		<4,4	<3,7	<2,9	<3,7		
Dorzolamide	250	0,4	5,1	10/10	10/10	10/10	10/10		<25		<2,2	<0,9	<1,8	<2,5		
Ethacrynic Acid	250	0,4	10,5	10/10	10/10	10/10	10/10		<25		<8,2	<7,2	<11,8	<5,6		
Hydrochlorothiazide	250	0,2	5,1	10/10	10/10	10/10	10/10		<25		<5,1	<3,8	<4,4	<3,8		
Hydroflumethiazide	250	0,1	5,6	10/10	10/10	10/10	10/10		<25		<3,7	<5,2	<3,7	<4,0		
Indapamide	250	0,1	5,7	10/10	10/10	10/10	10/10		<25		<3,3	<2,7	<3,6	<1,6		
Methylclothiazide	250	0,1	3,9	10/10	10/10	10/10	10/10		<25		<4,8	<3,4	<3,4	<2,4		
Metolazone	250	0,1				10/10	10/10		<125				<1,9	<2,8		
Piretanide	250	0,1	3,6	10/10	10/10	10/10	10/10		<25		<11,8	<9,6	<3,6	<3,0		
Polythiazide	250	0,1	5,2	10/10	10/10	10/10	10/10		<25		<4,2	<3,9	<4,4	<4,4		
Probenecid	250	0,1	3,5	10/10	10/10	10/10	10/10		<25		<18,5	<17,1	<14,0	<1,7		
Torasemide	250	0,1	5,0	10/10	10/10	10/10	10/10		<25		<3,2	<3,4	<3,2	<3,4		
Triamterene	250	0,4	4,0	10/10	10/10	10/10	10/10		<25		<10,0	<2,8	<1,7	<1,0		

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 6: Αξιολόγηση μεθόδου σάρωσης LC/TOF-MS: Αποτελέσματα επαναληψιμότητας, ορίου ανίχνευσης & ακρίβειας μέτρησης λόγου m/z

ΟΥΣΙΑ	MRPL (ng mL ⁻¹)	% RSD		ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΥΡΗΜΑΤΩΝ						LOD (ng mL ⁻¹)	ΣΦΑΛΜΑ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΛΟΓΟΥ m/z (ppm)					
		RRT	RR	0.1 x MRPL	0.2 x MRPL	0.5 x MRPL	MRPL	2 x MRPL	4 x MRPL		0.1 x MRPL	0.2 x MRPL	0.5 x MRPL	MRPL	2 x MRPL	4 x MRPL
Trichloromethiazide	250	0,1	4,6	10/10	10/10	10/10	10/10			<25	<3,5	<4,3	<5,5	<3,3		
Xipamide	250	0,1	3,2	10/10	10/10	10/10	10/10			<25	<2,8	<3,9	<1,7	<1,4		
6-Acetylmorphine	200	0,3	7,7	10/10	10/10	10/10	10/10			<20	<2,7	<2,4	<3,7	<4,9		
Alfentanyl	10	0,2	7,4			10/10	10/10	10/10		<5			<2,9	<1,7	<1,4	
Buprenorphine	10	0,1	4,2	10/10	10/10	10/10	10/10			<1	<6,8	<5,3	<1,9	<2,3		
Dextromoramide	200	0,2	4,5	10/10	10/10	10/10	10/10			<20	<2,8	<2,8	<2,0	<3,8		
Dihydrocodeine	200	0,4	7,9	10/10	10/10	10/10	10/10			<20	<1,3	<1,7	<2,6	<2,3		
Fentanyl	10	0,2	8,6			10/10	10/10	10/10		<5			<4,4	<2,4	<1,2	
Hydromorphone	200	0,5	6,4	10/10	10/10	10/10	10/10			<20	<2,8	<2,8	<1,0	<3,1		
Methadone	200	0,2	2,4	10/10	10/10	10/10	10/10			<20	<1,9	<1,9	<1,9	<5,8		
Methadone met.	200	0,2	9,4	10/10	10/10	10/10	10/10			<20	<9,0	<5,8	<3,2	<9,0		
Morphine	1000	0,7	0,7	10/10	10/10	10/10	10/10			<100	<1,4	<1,4	<2,1	<4,2		
Norcodeine	200	0,6	2,3	10/10	10/10	10/10	10/10			<20	<6,3	<6,6	<2,8	<4,5		
Normorphine	200	0,6	6,0		7/10	10/10	10/10	10/10		100		<31,2	<32,7	<9,2	<3,7	
Oxycodone	200	0,6	7,8	10/10	10/10	10/10	10/10			<20	<5,4	<5,4	<5,1	<2,5		
Pentazocine	200	0,3	2,1	10/10	10/10	10/10	10/10			<20	<4,9	<4,5	<5,2	<2,8		
Pethidine	200	0,2	2,2	10/10	10/10	10/10	10/10			<20	<1,2	<2,0	<2,0	<3,6		
Sulfentanil	10	0,2				10/10	10/10	10/10		<5			<6,8	<5,4	<3,7	
Aminoglutethimide	50	0,2			9/10	10/10	10/10	10/10		25	<17,2	<16,7	<6,0	<2,8		
Anastrozole	50	0,1	5,7		10/10	10/10	10/10	10/10		<10	<9,9	<7,8	<9,9	<6,1		
Androst-1,4,6-triene-3,17-dione	50	0,1				10/10	10/10			<25			<18,7	<12,5		
Exemestane	50	0,1	3,2		9/10	10/10	10/10	10/10		<25		<35,3	<37,4	<9,8	<4,7	
Formestane	50	0,2			6/10	8/10	10/10	10/10		50		<29,4	<26,7	<27,4	<11,9	
Raloxifene	50	0,2	3,1		10/10	10/10	10/10	10/10		<10		<2,7	>2,1	<4,2	<3,4	
Tamoxifene 3-hydroxy-4-methoxy metabolite	50	0,1	6,6		10/10	10/10	10/10	10/10		<10		<1,9	<1,9	<4,1	<3,1	
Toremifene	5	0,5	6,1		10/10	10/10	10/10	10/10		<10		<1,7	<3,0	<4,7	<3,4	
Adrafinil	500	0,1	5,7	10/10	10/10	10/10	10/10			<50	<3,0	<1,8	<1,8	<1,8		
Amiphenazole	500	0,6		9/10	10/10	10/10	10/10			100	<6,8	<3,1	<4,2	<6,2		
Amphepramone	500	0,3	7,2	10/10	10/10	10/10	10/10			<50	<10,8	<7,8	<8,2	<4,9		
Amphetamine	500	0,4	2,8	10/10	10/10	10/10	10/10			<50	<3,7	<3,7	<2,9	<7,3		
Benzphetamine	500	0,3	5,4	10/10	10/10	10/10	10/10			<50	<1,7	<2,5	<1,7	<3,7		
Benzylamphetamine	500	0,3	4,3	10/10	10/10	10/10	10/10			<50	<0,9	<1,8	<1,8	<3,1		
1-Benzylpiperazine	500	0,4	7,6	10/10	10/10	10/10	10/10			<50	<2,8	<3,4	<2,8	<5,6		
Buflomedil	500	0,2	7,7	10/10	10/10	10/10	10/10			<50	<1,3	<1,6	<2,6	<1,3		
Bupropion	500	0,1	8,1	10/10	10/10	10/10	10/10			<50	<1,7	<2,5	<1,7	<3,3		
1-(3-Chlorphenyl)piperazine	500	0,2	7,4	10/10	10/10	10/10	10/10			<50	<6,1	<9,1	<2,5	<5,1		

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 6: Αξιολόγηση μεθόδου σάρωσης LC/TOF-MS: Αποτελέσματα επαναληψιμότητας, ορίου ανίχνευσης & ακρίβειας μέτρησης λόγου m/z

ΟΥΣΙΑ	MRPL (ng mL ⁻¹)	% RSD		ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΥΡΗΜΑΤΩΝ						LOD (ng mL ⁻¹)	ΣΦΑΛΜΑ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΛΟΓΟΥ m/z (ppm)					
		RRT	RR	0.1 x MRPL	0.2 x MRPL	0.5 x MRPL	MRPL	2 x MRPL	4 x MRPL		0.1 x MRPL	0.2 x MRPL	0.5 x MRPL	MRPL	2 x MRPL	4 x MRPL
Carphedone	500	0,2	4,4	10/10	10/10	10/10	10/10		<50	<1,4	<2,3	<2,7	<4,6			
Benzoylecgonine	500	0,2	11,8	10/10	10/10	10/10	10/10		<50	<11,2	<6,9	<5,2	<3,8			
Ecgonine methylester	500	0,5	4,4	10/10	10/10	10/10	10/10		<50	<4,5	<5,5	<5,0	<9,0			
Cropropamide	500	0,1	4,2	10/10	10/10	10/10	10/10		<50	<2,0	<3,6	<2,0	<4,6			
Crotethamide	500	0,1	3,8	10/10	10/10	10/10	10/10		<50	<2,7	<4,4	<2,7	<5,5			
Cyclazodone	500	0,2				10/10	10/10		<250			<5,5	<6,8			
Dimethylamphetamine	500	0,4	7,5	10/10	10/10	10/10	10/10		<50	<3,0	<3,0	<3,0	<5,5			
*Ephedrine/ Pseudoephedrine	500	0,6	5,5	100 ppb 10/10	200 ppb 10/10	500 ppb 10/10	1000 ppb 10/10		<100	<2,7	<1,4	<1,4	<2,0			
Etafedrine	500	0,3	8,4	10/10	10/10	10/10	10/10		<50	<7,2	<4,6	<7,2	<6,7			
Ethamivan	500	0,1	1,8	10/10	10/10	10/10	10/10		<50	<2,2	<2,2	<2,2	<4,0			
Ethylamphetamine	500	0,3	3,4	10/10	10/10	10/10	10/10		<50	<3,7	<3,7	<3,7	<5,5			
Etilefrine	500	0,7	2,6	9/10	10/10	10/10	10/10		100	<42,3	<47,2	<11,0	<5,5			
Famprofazone	500	0,1	7,2	10/10	10/10	10/10	10/10		<50	<1,6	<2,9	<4,0	<0,8			
Fenbutrazate	500	0,1	4,2	10/10	10/10	10/10	10/10		<50	<1,9	<2,2	<2,2	<2,2			
Fencamfamine	500	0,2	4,1	10/10	10/10	10/10	10/10		<50	<1,4	<2,8	<1,4	<4,2			
Fencamine	500	0,2				10/10	10/10		<250			<8,3	<8,0			
Fenethylline	500	0,2	6,4	10/10	10/10	10/10	10/10		<50	<2,0	<1,5	<1,8	<2,3			
Fenfluramine	500	0,2	9,5	10/10	10/10	10/10	10/10		<50	<2,2	<2,6	<3,9	<8,2			
Fenproporex	500	0,2	8,1	10/10	10/10	10/10	10/10		<50	<3,2	<3,2	<3,2	<4,8			
Furfenorex	500	0,2	8,2	10/10	10/10	10/10	10/10		<50	<3,5	<1,7	<2,2	<2,2			
Heptaminol	500	0,6	9,8	10/10	10/10	10/10	10/10		<50	<3,4	<4,8	<2,1	<2,1			
6-Hydroxybromantan	500	0,1	4,0	10/10	10/10	10/10	10/10		<50	<1,6	<2,8	<4,3	<2,5			
MDMA	500	0,1	8,2	10/10	10/10	10/10	10/10		<50	<3,1	<3,6	<2,1	<3,6			
MDA	500	0,3	7,1	9/10	9/10	10/10	10/10		250	<3,3	<3,3	<44,4	<52,7			
Mefenorex	500	0,2	9,1	10/10	10/10	10/10	10/10		<50	<1,9	<3,3	<1,9	<4,7			
Mephentermine	500	0,2	7,9	10/10	10/10	10/10	10/10		<50	<3,7	<4,3	<3,0	<4,9			
Methamphetamine	500	0,2	10,1	10/10	10/10	10/10	10/10		<50	<3,3	<4,0	<2,0	<6,7			
Methoxyphenamine	500	0,2	8,9	10/10	10/10	10/10	10/10		<50	<23,3	<35,5	<56,6	<68,3			
p-Methylamphetamine	500	0,2				10/10	10/10		<250			<6,0	<6,8			
Methylephedrine	500	0,6	3,9	10/10	10/10	10/10	10/10		<50	<2,2	<3,3	<2,8	<5,0			
4-Methyl-2hexanamine	500	0,5				10/10	10/10		<250			<3,4	<4,8			
Methylphenidate	500	0,1	7,7	10/10	10/10	10/10	10/10		<50	<2,1	<2,1	<1,3	<3,8			
Modafinil	500	0,1	8,2	10/10	10/10	10/10	10/10		<50	<1,8	<1,8	<3,6	<9,6			
Nikethamide	500	0,2	7,7	10/10	10/10	10/10	10/10		<50	<3,3	<2,8	<3,3	<5,6			
Norfenfluramine	500	0,2	5,0	10/10	10/10	10/10	10/10		<50	<1,5	<2,4	<2,9	<4,9			
*Norpseudoephedrine/	500	0,2	4,1	100 ppb	200 ppb	500 ppb	1000 ppb		<100	<7,2	<4,6	<4,6	<3,3			

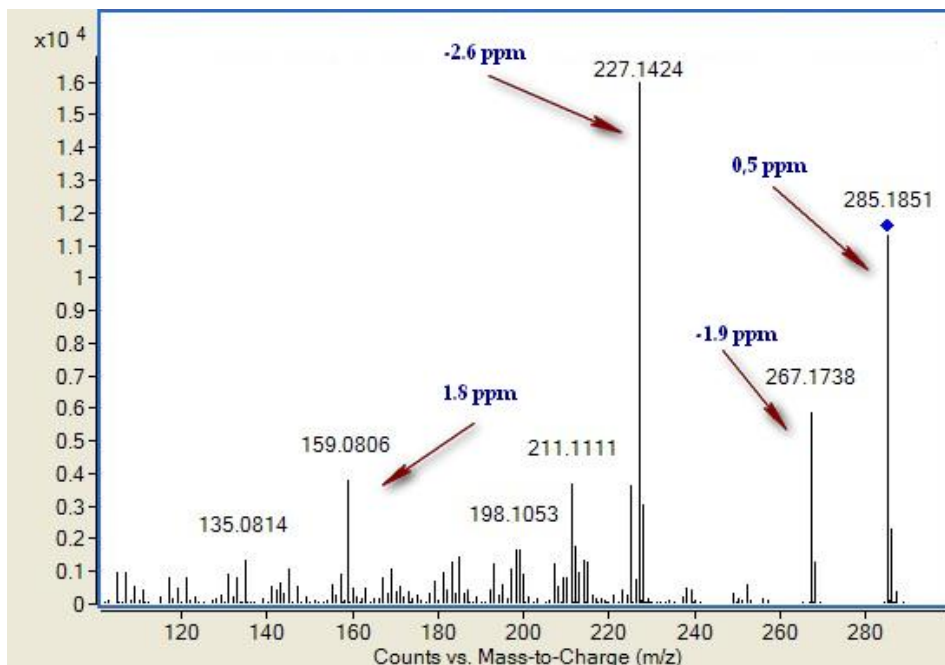
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 6: Αξιολόγηση μεθόδου σάρωσης LC/TOF-MS: Αποτελέσματα επαναληψιμότητας, ορίου ανίχνευσης & ακρίβειας μέτρησης λόγου m/z

ΟΥΣΙΑ	MRPL (ng mL ⁻¹)	% RSD		ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΥΡΗΜΑΤΩΝ						LOD (ng mL ⁻¹)	ΣΦΑΛΜΑ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΛΟΓΟΥ m/z (ppm)					
		RRT	RR	0.1 x MRPL	0.2 x MRPL	0.5 x MRPL	MRPL	2 x MRPL	4 x MRPL		0.1 x MRPL	0.2 x MRPL	0.5 x MRPL	MRPL	2 x MRPL	4 x MRPL
Norephedrine				10/10	10/10	10/10	10/10									
Ortetamine	500	0,3	6,5	10/10	10/10	10/10	10/10		<50	<2,0	<2,7	<4,0	<4,7			
Pemoline	500	0,5	5,3	10/10	10/10	10/10	10/10		<50	<4,0	<5,1	<5,1	<5,6			
Pentetrazol	500	0,1	5,6	10/10	10/10	10/10	10/10		<50	<3,6	<2,9	<2,9	<4,3			
Phendimetrazine	500	0,2	8,2	10/10	10/10	10/10	10/10		<50	<3,6	<3,1	<2,1	<7,8			
Phenmetrazine	500	0,5	6,9	10/10	10/10	10/10	10/10		<50	<9,0	<10,1	<6,2	<7,3			
Phenpromethamine	500	0,3		10/10	10/10				<50	<6,7	<5,8					
Phentermine	500	0,2	7,4	10/10	10/10	10/10	10/10		<50	<8,7	<6,0	<4,0	<4,7			
Phenylephrine	500	0,8	9,4	5/10	7/10	8/10	10/10		500	<20,2	<33,9	<41,0	<7,5			
Pholedrine	500	0,6	1,0	10/10	10/10	10/10	10/10		<50	<4,2	<3,0	<1,2	<5,4			
Pipradrol	200	0,2	7,5	10/10	10/10	10/10	10/10		<20	<2,2	<2,2	<2,2	<3,0			
Prolintane	500	0,2	8,3	10/10	10/10	10/10	10/10		<50	<10,9	<9,6	<6,9	<14,7			
Propylhexedrine	500	0,2	8,3	10/10	10/10	10/10	10/10		<50	<3,8	<2,6	<1,9	<4,5			
Strychnine	200	0,2	7,7	10/10	10/10	10/10	10/10		<20	<2,4	<3,0	<1,5	<3,0			
Sydnocarb	500	0,1	2,0	10/10	10/10	10/10	10/10		<50	<1,9	<0,9	<1,9	<3,1			
Sydnocarb metabolite	500	0,1				10/10	10/10		<50			<6,5	<8,2			
Synephrine	500	0,1	5,6	6/10	6/10	10/10	10/10		250	<19,3	<25,3	<18,7	<13,3			
1-(3-Trifluoro-methylphenyl)-piperazine	500	0,2	4,5	10/10	10/10	10/10	10/10		<250	<1,7	<2,5	<1,7	<3,5			
Tuaminoheptane	500	0,3	5,3	10/10	10/10	10/10	10/10		<50	<2,6	<2,6	<1,7	<3,4			
*Efaxproxiral (RSR13)	**	0,1	4,9	2 ppb 10/10	5 ppb 10/10	10 ppb 10/10			<2	2 ppb <2,3	5 ppb <1,5	10 ppb <2,6				

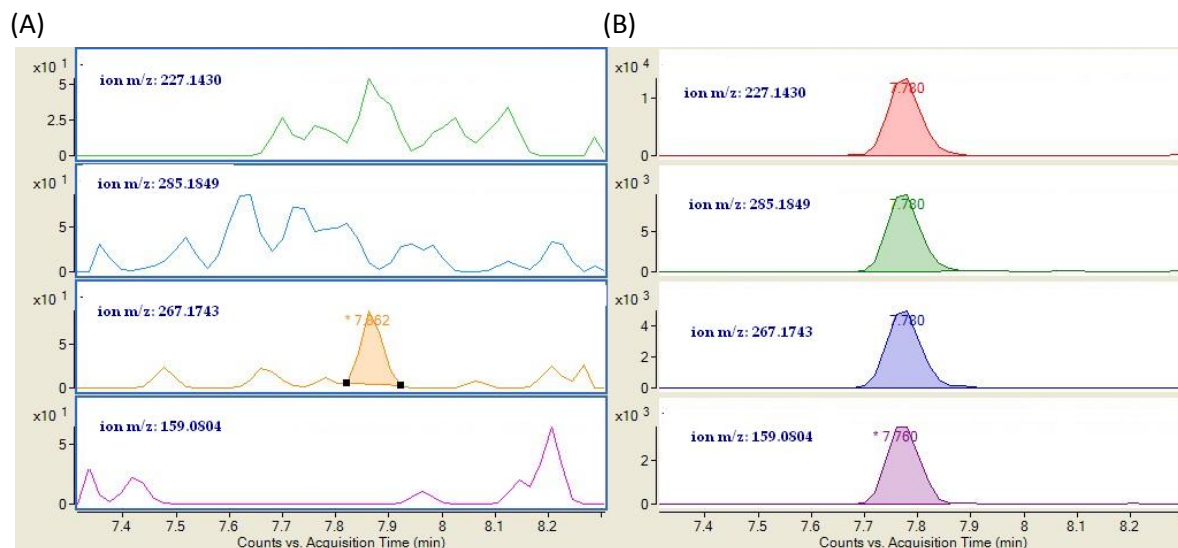
* Για τις ουσίες *epimetendiol*, *3-hydroxystanozolol*, *19-norandrosterone*, *ephedrine*, *norpseudoephedrine* και *efaproxiral*, μελετήθηκαν τα επίπεδα συγκέντρωσης που αναφέρονται πάνω από τα αντίστοιχα αποτελέσματα.

** μη καθορισμένο MRPL από το WADA

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 7: Μεθόδος σάρωσης LC/TOF-MS: επιβεβαιωτική LC/QTOF-MS/MS επανάλυση δειγμάτων ύποπτων δειγμάτων για την ουσία methyltrienolone



Φασμα σάρωσης θυγατρικών ιόντων (*product ion spectrum*) του πρωτονιωμένου μοριακού ιόντος της ουσίας methyltrienolone (m/z 285,1849) που έχει ληφθεί μετά από LC/QTOF MS/MS ανάλυση εμβολιασμένου δείγματος ούρων συγκέντρωσης 5 ng mL^{-1}



Χρωματογραφήματα που ελήφθησαν μετά από MS/MS ανάλυση λευκού δείγματος ούρων που κατά την ανάλυση LC/TOF-MS έδωσε ψευδώς θετικό σήμα για την ουσία methyltrienolone (A) και δείγματος ούρων που εμβολιάστηκε με την ουσία σε συγκέντρωση 5 μg mL^{-1}

**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 8: Μέθοδος σάρωσης LC/TOF-MS:
Ανάλυση μεταβολικών δειγμάτων**

ΜΗΤΡΙΚΗ ΟΥΣΙΑ	ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ				
	Όνομα	Μορ. τύπος	Ιόν	m/z	RT (min)
1 <u>Prostanozol</u>	Prostanozol-hydroxy-17-keto metabolites	C ₂₀ H ₂₈ N ₂ O ₂	[M+H] ⁺	329,2224	6,58
					6,85
					7,12
	Prostanozol-dihydroxy-17-keto metabolites	C ₂₀ H ₂₈ N ₂ O ₃	[M+H] ⁺	345,2173	5,31 5,53 5,67
2 <u>Androst-1,4,6-triene-3,17-dione</u>	Androst-1,4,6-triene-3,17-dione PC ¹	C ₁₉ H ₂₂ O ₂	[M+H] ⁺	283.1693	7,98
	Androst-4,6-diene-3,17-dione	C ₁₉ H ₂₄ O ₂	[M+H] ⁺	285,1849	8,50
	17β-hydroxy-androst-1,4,6-triene-3-one	C ₁₉ H ₂₄ O ₂	[M+H] ⁺	285,1849	7,46
3 <u>Exemestane</u>	Exemestane PC ¹	C ₂₀ H ₂₄ O ₂	[M+H] ⁺	297,1849	9,00
	Exemestane-17α-hydroxy metabolite	C ₂₀ H ₂₆ O ₂	[M+H] ⁺	299,2006	8,40
4 <u>Testolactone</u>	Testolactone PC ¹	C ₁₉ H ₂₄ O ₃	[M+H] ⁺	301,1798	6,76
	Testolactone-4,5-dihydro metabolite	C ₁₉ H ₂₈ O ₃	[M+H] ⁺ [M+H-H ₂ O] ⁺ [2M+Na] ⁺ [2M+H] ⁺	303,1955	7,80
				285,1849	
				627,3656	
				605,3837	
Testolactone-1,2,4,5-tetrahydro metabolite	C ₁₉ H ₂₆ O ₃	[M+H-H ₂ O] ⁺ [2M+H] ⁺ [M+H] ⁺	287,2006 609,4150 305,2111	8,07	
5 <u>Tamoxifene</u>	Tamoxifene-N-desmethyl hydroxy metabolite	C ₂₅ H ₂₇ NO ₂	[M+H] ⁺	374,2115	6,78
	Tamoxifene-N-desmethyl hydroxy-methoxy metabolite	C ₂₆ H ₂₉ NO ₃	[M+H] ⁺	404,2220	7,26
	Tamoxifene-dihydroxy metabolite	C ₂₆ H ₂₉ NO ₃	[M+H] ⁺	404,2220	5,17
	Tamoxifene-hydroxy-methoxy metabolite	C ₂₇ H ₃₁ NO ₃	[M+H] ⁺	418,2377	8,58
	Metabolite A ¹³⁴	C ₂₆ H ₂₇ NO ₃	[M+H] ⁺	402,2064	6,58
	Metabolite B ¹³⁴	C ₂₅ H ₂₅ NO ₃	[M+H] ⁺	388,1907	6,45
6 <u>Toremifene</u>	Toremifene PC ¹	C ₂₆ H ₂₈ NOCl	[M+H] ⁺	406,1932	9,39
	Toremifene-hydroxy metabolites	C ₂₆ H ₂₈ NO ₂ Cl	[M+H] ⁺	422,1881	7,49
					8,04
					8,35
	Toremifene-hydroxy-methoxy-desmethyl metabolite	C ₂₆ H ₂₈ NO ₃ Cl	[M+H] ⁺	438,1830	7,90
	Toremifene-hydroxy-methoxy-metabolite	C ₂₇ H ₃₀ NO ₃ Cl	[M+H] ⁺	452,1987	8,48
	Toremifene-hydroxy-desmethyl metabolite	C ₂₅ H ₂₆ NO ₂ Cl	[M+H] ⁺	408,1725	7,34
Toremifene-dehydro-dihydroxy metabolite	C ₂₆ H ₃₀ NO ₃ Cl	[M+H] ⁺	440,1987	6,57	

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 8: ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΑΡΩΣΗΣ LC/TOF-MS: Ανάλυση μεταβολικών δειγμάτων

ΜΗΤΡΙΚΗ ΟΥΣΙΑ	ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ				
	Όνομα	Μορ. τύπος	Ιόν	m/z	RT (min)
	Metabolite A	C ₂₆ H ₂₇ NO ₃	[M+H] ⁺	402,2064	6,59
	Metabolite C	C ₂₆ H ₂₉ NO ₃	[M+H] ⁺	404,2220	5,20
7 <u>Clomiphene</u>	Clomiphene-4-hydroxy metabolite	C ₂₆ H ₂₈ NO ₂ Cl	[M+H] ⁺	422,1881	8,00
	Clomiphene-hydroxy-methoxy-metabolite	C ₂₇ H ₃₀ NO ₃ Cl	[M+H] ⁺	452,1987	8,12
	Clomiphene-N-desethyl-hydroxy metabolite	C ₂₄ H ₂₄ NO ₂ Cl	[M+H] ⁺	394,1568	7,62
8 <u>Benfluorex</u>	Benfluorex PC ¹	C ₁₉ H ₂₀ NO ₂ F ₃	[M+H] ⁺	352,1519	8,79
	Benfluorex-desbenzaldehyde metabolite	C ₁₂ H ₁₆ NOF ₃	[M+H] ⁺	248,1257	5,04
	Benfluorex-desbenzaldehyde-carboxy metabolite	C ₁₂ H ₁₄ NO ₂ F ₃	[M+H] ⁺	262,1049	5,19
9 <u>Clobenzorex</u>	Clobenzorex PC ¹	C ₁₆ H ₁₈ NCl	[M+H] ⁺	260,1201	6,53
	Clobenzorex-hydroxy metabolites	C ₁₆ H ₁₈ NOCl	[M+H] ⁺	276,1150	5,08/5,39 5,66/5,95
	Clobenzorex-dihydroxy metabolites	C ₁₆ H ₁₈ NO ₂ Cl	[M+H] ⁺	292,1099	4,65/4,98 5,33
	Amphetamine	C ₉ H ₁₃ N	[M+H] ⁺ [M+H-NH ₃] ⁺	136,1121 119,0855	3,20
	Amphetamine-hydroxy metabolites	C ₉ H ₁₃ NO	[M+H] ⁺	152,1070	1,52 2,15 2,28
10 <u>MDMA</u> (3,4-methylenedioxy methamphetamine)	MDMA PC ¹	C ₁₁ H ₁₅ NO ₂	[M+H] ⁺	194,1176	3,62
	MDA (3,4-methylenedioxy amphetamine)	C ₁₀ H ₁₃ NO ₂	[M+H] ⁺	180,1019	3,42
	HMMA (4-hydroxy-3-methoxy methamphetamine)	C ₁₁ H ₁₇ NO ₂	[M+H] ⁺	196,1332	2,00
	HMA (4-hydroxy-3-methoxy amphetamine)	C ₁₀ H ₁₅ NO ₂	[M+H] ⁺	182,1176	1,86
11 <u>Carphedone</u>	Carphedone PC ¹	C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₂	[M+H] ⁺ [M+H-H ₂ O] ⁺ [M+H-H ₂ O-CO] ⁺	219,1128 202,0863 174,0913	4,68
	Carphedone-4-hydroxy metabolite	C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₃	[M+H] ⁺	235,1077	2,64
12 <u>Fenproporex</u>	Fenproporex PC ¹	C ₁₂ H ₁₆ N ₂	[M+H] ⁺	189,1386	3,70
	Fenproporex-hydroxy metabolite	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O	[M+H] ⁺	205,1335	1,73
	Amphetamine	C ₉ H ₁₃ N	[M+H] ⁺ [M+H-NH ₃] ⁺	136,1121 119,0855	3,18
	p-Hydroxyamphetamine	C ₉ H ₁₃ NO	[M+H] ⁺	152,1070	1,51
13 <u>Mefenorex</u>	Mefenorex PC ¹	C ₁₂ H ₁₈ NCl	[M+H] ⁺	212,1201	5,18
	Mefenorex-p-hydroxy metabolite	C ₁₂ H ₁₈ NOCl	[M+H] ⁺	228,1150	3,61
	Mefenorex-p-hydroxy-m-methoxy metabolite	C ₁₃ H ₂₀ NO ₂ Cl	[M+H] ⁺	258,1255	3,95
	Amphetamine	C ₉ H ₁₃ N	[M+H] ⁺ [M+H-NH ₃] ⁺	136,1121 119,0855	3,22

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 8: ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΑΡΩΣΗΣ LC/TOF-MS: Ανάλυση μεταβολικών δειγμάτων

ΜΗΤΡΙΚΗ ΟΥΣΙΑ	ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ				
	Όνομα	Μορ. τύπος	Ιόν	m/z	RT (min)
14 <u>Ethamivan</u>	Ethamivan PC ¹	C ₁₂ H ₁₇ NO ₃	[M+H] ⁺ [2M+H] ⁺ [2M+Na] ⁺	224,1281 447,2490 469,2306	5,54
	Ethamivan-N-desethyl metab.	C ₁₀ H ₁₃ NO ₃	[M+H] ⁺	196,0968	3,87
15 <u>Isometheptene</u>	Isometheptene PC ¹	C ₉ H ₁₉ N	[M+H] ⁺	142,1590	4,52
	Isometheptene-hydroxy metabolites	C ₉ H ₁₉ NO	[M+H] ⁺	158,1539	1,18 1,65 1,78
	Isometheptene-N-desmethyl metabolite	C ₈ H ₁₇ N	[M+H] ⁺	128,1434	4,32
16 <u>Amphetamine</u>	Amphetamine PC ¹	C ₁₃ H ₁₉ NO	[M+H] ⁺	206,1539	3,69
	Nordiethylpropion	C ₁₁ H ₁₅ NO	[M+H] ⁺	178,1226	3,13
	Norephedrine/ Norpseudoephedrine	C ₉ H ₁₃ NO	[M+H] ⁺ [M+H-H ₂ O] ⁺	152,1070 134,0964	2,08
	N,N-Diethylnorephedrine	C ₁₃ H ₂₁ NO	[M+H] ⁺	208,1696	3,72
	N-Ethylnorephedrine	C ₁₁ H ₁₇ NO	[M+H] ⁺	180,1383	3,20
17 <u>Sibutramine</u>	Sibutramine-N-desmethyl met.	C ₁₆ H ₂₄ NCl	[M+H] ⁺	266,1670	7,52
	Sibutramine-N-didesmethyl metabolite	C ₁₅ H ₂₂ NCl	[M+H] ⁺	252,1514	7,32
	Sibutramine-hydroxy-desmethyl metabolite	C ₁₆ H ₂₄ NOCl	[M+H] ⁺	282,1619	5,79 6,07 6,68
	Sibutramine-hydroxy-didesmethyl metabolite	C ₁₅ H ₂₂ NOCl	[M+H] ⁺	268,1463	5,34/5,59 6,02/6,48
18 <u>Prolintane</u>	Prolintane PC ¹	C ₁₅ H ₂₃ N	[M+H] ⁺	218,1903	5,79
	Prolintane-oxo metabolite	C ₁₅ H ₂₁ NO	[M+H] ⁺	232,1696	8,72
	Prolintane-hydroxy metabolite	C ₁₅ H ₂₃ NO	[M+H] ⁺	234,1852	4,34
	Prolintane-oxo-hydroxy metabolites	C ₁₅ H ₂₁ NO ₂	[M+H] ⁺	248,1645	5,88
	Prolintane-dihydroxy metabolites	C ₁₅ H ₂₃ NO ₂	[M+H] ⁺	250,1802	5,22
19 <u>Propylhexedrine</u>	Propylhexedrine PC ¹	C ₁₀ H ₂₁ N	[M+H] ⁺	156,1747	5,09
	Norpropylhexedrine	C ₉ H ₁₉ N	[M+H] ⁺	142,1590	4,99
	Propylhexedrine-hydroxy metabolites	C ₁₀ H ₂₁ NO	[M+H] ⁺	172,1696	1,02/1,17 1,60/2,00
20 <u>Pentetrazol</u>	Pentetrazol PC ¹	C ₆ H ₁₀ N ₄	[M+H] ⁺	139,0978	3,52
	Pentetrazol-hydroxy metabolites	C ₆ H ₁₀ N ₄ O	[M+H] ⁺	155,0927	1,28 2,20
21 <u>Fenethylamine</u>	Fenethylamine PC ¹	C ₁₈ H ₂₃ N ₅ O ₂	[M+H] ⁺	342,1925	4,70
	Amphetamine	C ₉ H ₁₃ N	[M+H] ⁺ [M+H-NH ₃] ⁺	136,1121 119,0855	3,18
	7-(2-hydroxyethyl)-theophylline	C ₉ H ₁₂ N ₄ O ₃	[M+H] ⁺	225,0982	2,65
22 <u>Nikethamide</u>	Nikethamide PC ¹	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O	[M+H] ⁺	179,1179	4,25
	N-Ethyl-nicotinamide	C ₈ H ₁₀ N ₂ O	[M+H] ⁺	151,0866	2,41

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 8: ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΑΡΩΣΗΣ LC/ΤΟF-MS: Ανάλυση μεταβολικών δειγμάτων

ΜΗΤΡΙΚΗ ΟΥΣΙΑ	ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ				
	Όνομα	Μορ. τύπος	Ιόν	m/z	RT (min)
24 <u>Bupropion</u>	Bupropion-dihydro metabolite	C ₁₃ H ₂₀ NOCl	[M+H] ⁺	242,1306	5,16
	Bupropion-hydroxy metabolites	C ₁₃ H ₁₈ NO ₂ Cl	[M+H] ⁺	256,1099	4,35 4,56 4,89
	Bupropion-dihydro-hydroxy metabolites	C ₁₃ H ₂₀ NO ₂ Cl	[M+H] ⁺	258,1255	3,70 4,03 4,76
25 <u>Pethidine</u>	Pethidine PC ¹	C ₁₅ H ₂₁ NO ₂	[M+H] ⁺	248,1645	5,09
	Norpethidine	C ₁₄ H ₁₉ NO ₂	[M+H] ⁺	234,1489	5,01
26 <u>Deflazacort</u>	Deflazacort- desacetyl metabolites	C ₂₃ H ₂₉ NO ₅	[M+H] ⁺	400,2118	5,15 6,28
	Deflazacort-desacetyl-hydroxy metabolites	C ₂₃ H ₂₉ NO ₆	[M+H] ⁺	416,2068	4,32/5,68 6,44/6,56
	Deflazacort-desacetyl-1,2-epoxy metabolites	C ₂₃ H ₃₁ NO ₆	[M+H] ⁺	418,2224	5,80 6,04
	Deflazacort-desacetyl-keto metabolites	C ₂₃ H ₂₇ NO ₅	[M+H] ⁺	398,1962	6,10 6,22
	Metabolite 1			420,2381	4,67 5,22
	Metabolite 2			422,2537	3,59 4,12
27 <u>Normethandrolone</u>	Normethandrolone-5β-3α-hydroxy metabolite	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	[M+H-2H ₂ O] ⁺ [M+H-H ₂ O] ⁺	257,2264 275,2369	8,74
	Normethandrolone-5α-3α-hydroxy metabolite	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	[M+H-2H ₂ O] ⁺	257,2264	9,05
	Normethandrolone-hydroxy metabolite	C ₁₉ H ₂₈ O ₃	[M+H] ⁺	305,2111	6,77
28 <u>Etilefrine</u>	Etilefrine	C ₁₀ H ₁₅ NO ₂	[M+H] ⁺	182,1176	1,37
29 <u>Sydnocarb</u>	Sydnocarb	C ₁₈ H ₁₈ N ₄ O ₂	[M+H] ⁺	323,1503	8,98
	Sydnocarb-p-hydroxy metabolite	C ₁₈ H ₁₈ N ₄ O ₃	[M+H] ⁺	339,1452	7,22
30 <u>4,9(10)-Estradiene-3,17-dione</u>	Estradienedione-17-hydroxy metabolite	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	[M+H] ⁺	273,1849	7,40/
			[2M+Na] ⁺	567,3445	8,11

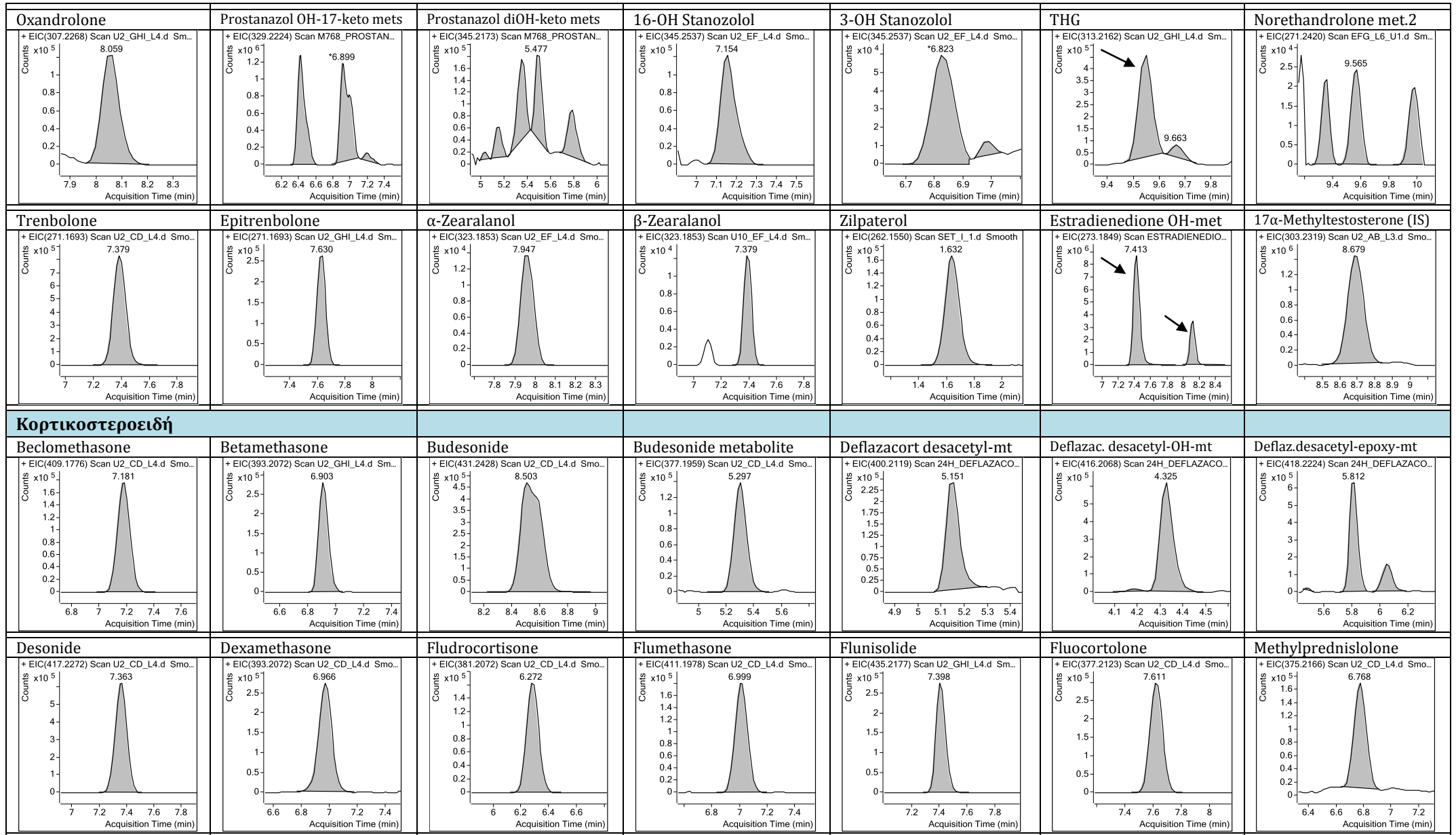
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 9: Μέθοδος σάρωσης LC/TOF-MS: Ιοντικά χρωματογραφήματα αναλυτών σε εμβολιασμένα δείγματα ούρων και μεταβολικά δείγματα

β ₂ -Ανταγωνιστές (β ₂ -Blockers)						
Acebutolol	Alprenolol	Atenolol	Bisoprolol	Betaxolol	Carteolol	Carvedilol
Celiprolol	Esmolol	Labetalol	Levobunolol	Metipranolol	Metoprolol	Nadolol
Oxprenolol	Pindolol	Propranolol	Sotalol	Timolol		

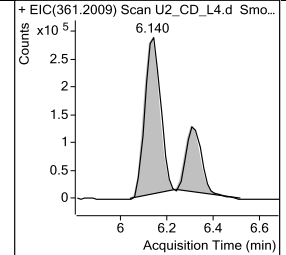
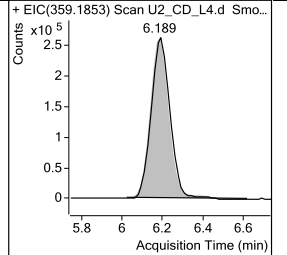
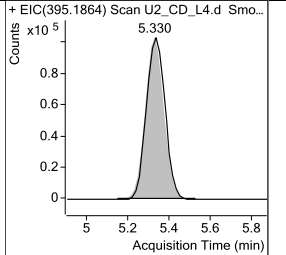
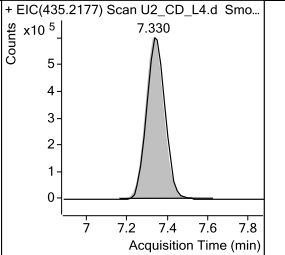
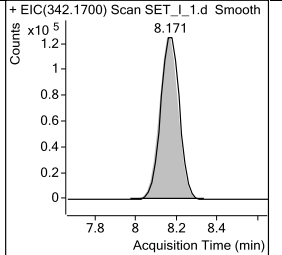
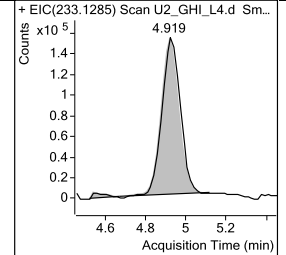
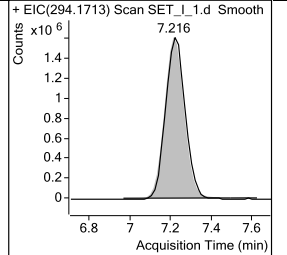
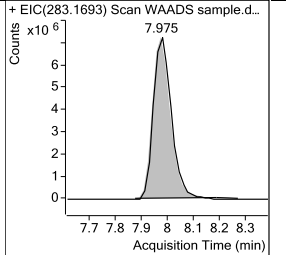
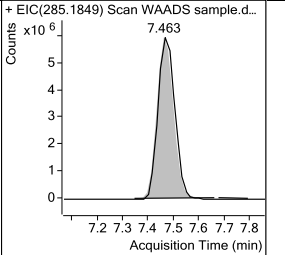
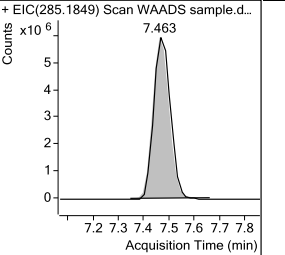
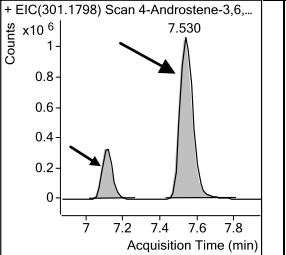
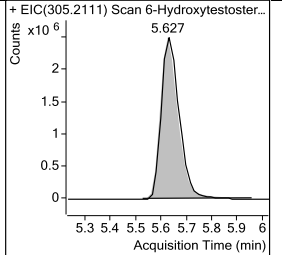
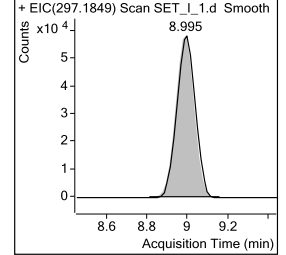
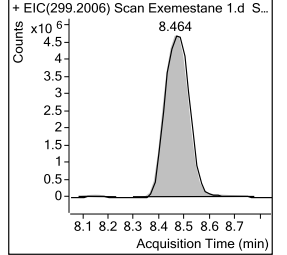
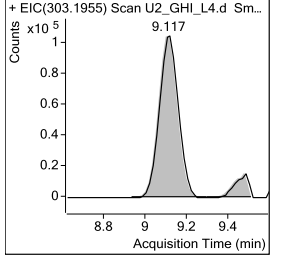
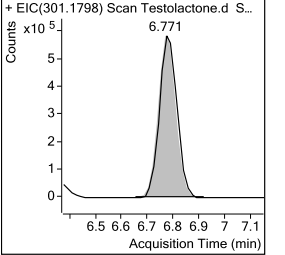
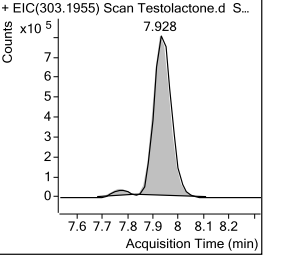
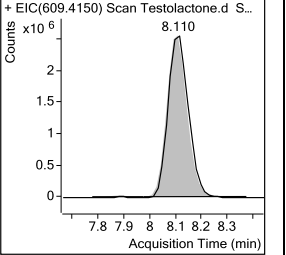
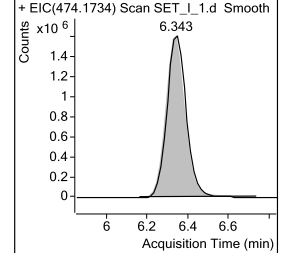
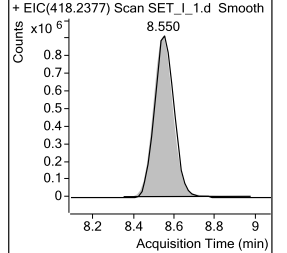
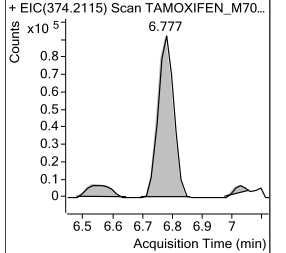
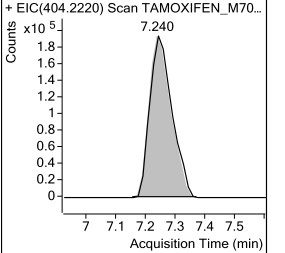
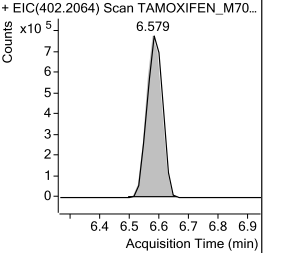
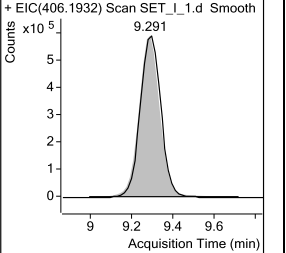
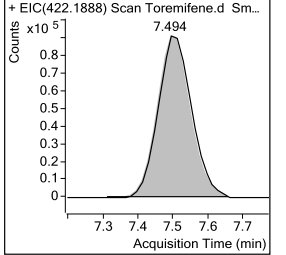
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 9: ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΑΡΩΣΗΣ LC/TOF-MS: Ιοντικά Χρωματογραφήματα Αναλυτών

Αναβολικοί Παράγοντες						
1-Androstenedione 	Bolasterone 	Boldenone 	Boldione 	Calusterone 	Calusterone metabolite 	Clenbuterol
Clostebol metabolite 	Danazol metabolite 	Drostanolone metabolite 	Fluoxymesterone met.1 	Fluoxymesterone met.2 	Formebolone metabolite 	Gestrinone
6α-OH-androstenedione 	4-OH-testosterone 	Mesterolone metabolite 	Methandienone met.1 	Methandienone met.2 	Methandienone met.3 	Methyl-1-testosterone
Methyldienolone 	Methyltrienolone 	19-NE/ 19-NA 	Norbolethone met.2 	Normethandrolone OH-met. 	Normethandrolone 4H-met. 	Oral Turinabol metabolite

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 9: ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΑΡΩΣΗΣ LC/TOF-MS: Ιοντικά Χρωματογραφήματα Αναλυτών



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 9: ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΑΡΩΣΗΣ LC/TOF-MS: Ιοντικά Χρωματογραφήματα Αναλυτών

Prednisolone/Cortisone 	Prednisone 	Triamcinolone 	Triamcinolone acetonide 	Ενισχυτής μεταφοράς O₂	Efaproxiral 
Αναστολείς αρωματάσης					
Aminoglutethimide 	Anastrozole 	Androstatrienedione 	Androst-4,6-dienedione 	17OHAndrostatriene-3one 	6-Oxo-androstenedione 
6OH-Testosterone 					
Exemestane 	Exemestane dihydro-mt 	Formestane 	Testolactone 	Testolactone dihydro-mt 	Testolact. tetrahydro-mt 
Εκλεκτικοί ρυθμιστές υποδοχών οιστρογόνων					
Raloxifene 	Tamoxifene OH-MeO-met. 	Tamoxifene-deMe-OH-met 	Tamox.deMe-OH-MeO-met 	Tamoxifene/Toremifenent 	Toremifene 
		Toremifene-OH-met 			

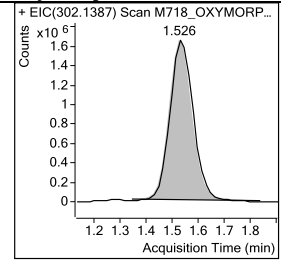
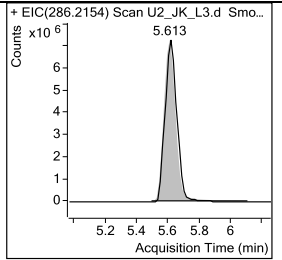
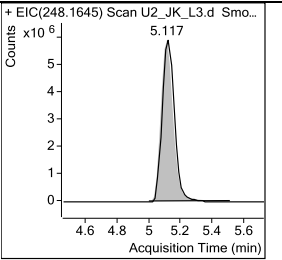
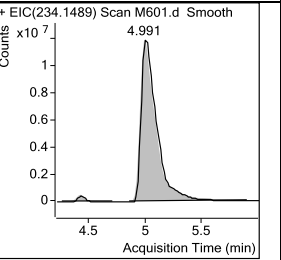
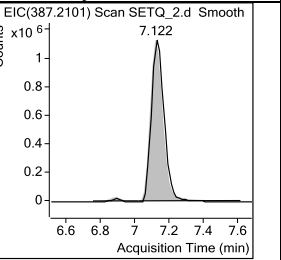
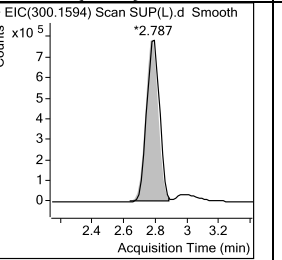
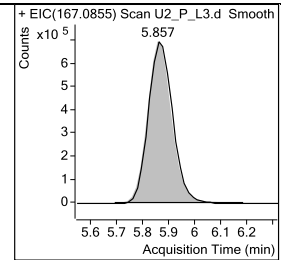
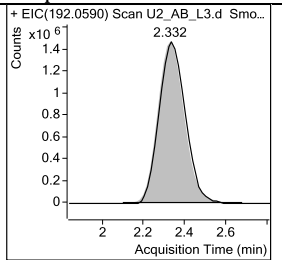
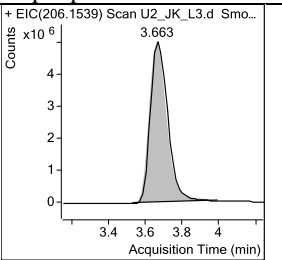
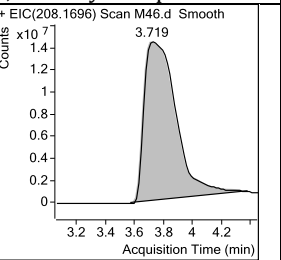
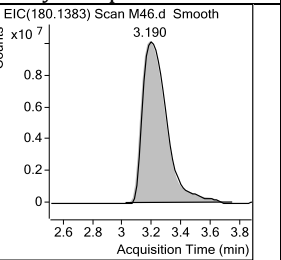
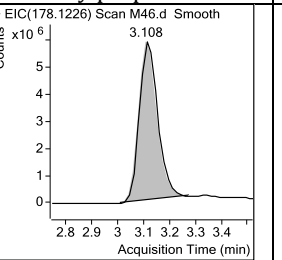
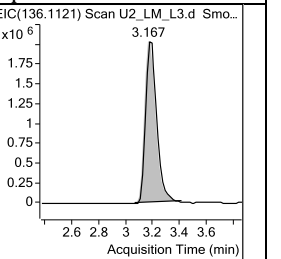
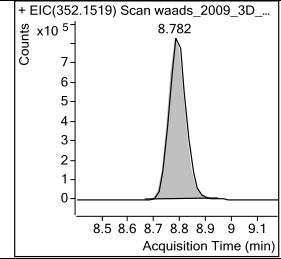
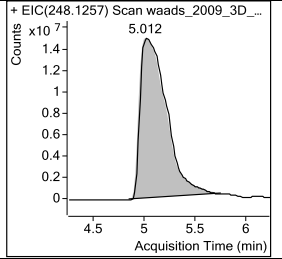
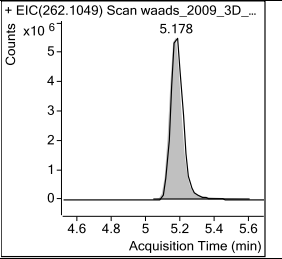
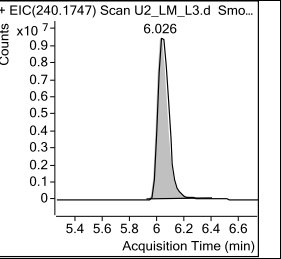
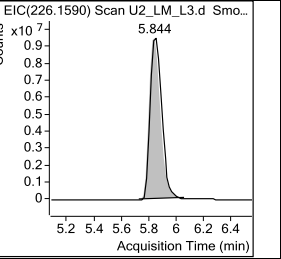
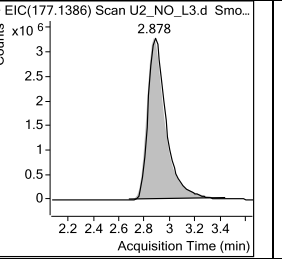
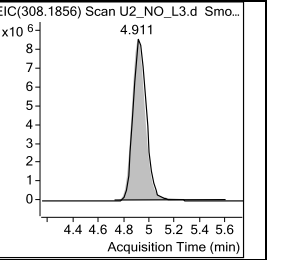
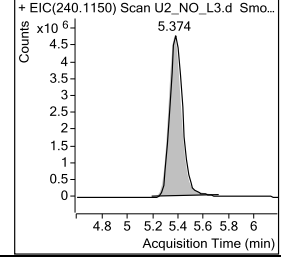
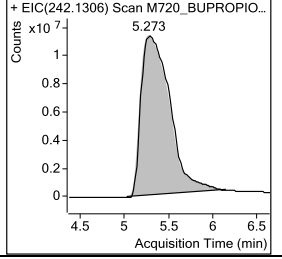
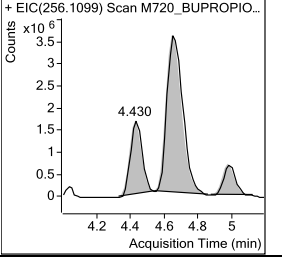
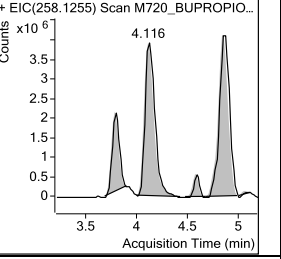
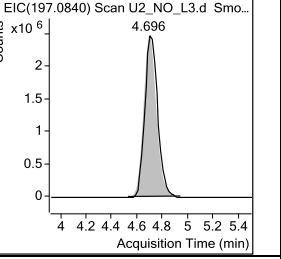
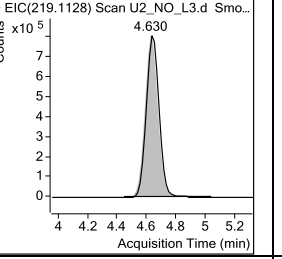
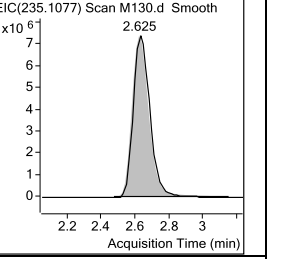
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 9: ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΑΡΩΣΗΣ LC/TOF-MS: Ιοντικά Χρωματογραφήματα Αναλυτών

Toremifene-deMe-OH-met 	Toremifene metabolite C 		Αντι-οιστρογόνα (Antiestrogens)	Clomiphene-OH-met 	Clomiphene-OH-MeO-mt 	Clomiphene-OH-desEt-mt
β2-Αγωνιστές (β2-Agonists)						
Bambuterol 	Fenoterol (artifact) 	Formoterol 	Ractopamine 	Salbutamol 	Salmeterol 	Terbutaline
Διουρητικά κ.α καλυπτικοί παράγοντες (Diuretics and other masking agents)						
Acetazolamide 	Althiazide 	Amiloride 	Bendroflumethiazide 	Brinzolamide 	Bumetanide 	Canrenone
Chlorothiazide 	Chlorthalidone 	Clopamide 	Cyclothiazide 	Dorzolamide 	Ethacrynic acid 	Hydrochlorothiazide

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 9: ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΑΡΩΣΗΣ LC/TOF-MS: Ιοντικά Χρωματογραφήματα Αναλυτών

<p>Hydroflumethiazide</p>	<p>Indapamide</p>	<p>Methylchlorothiazide</p>	<p>Metolazone</p>	<p>Piracetamide</p>	<p>Polythiazide</p>	<p>Probenecid</p>
<p>Torasetamide</p>	<p>Trichloromethiazide</p>	<p>Triamterene</p>	<p>Xipamide</p>			
Ναρκωτικά (Narcotics)						
<p>6-Acetylmorphine</p>	<p>Alfentanyl</p>	<p>Buprenorphine</p>	<p>Dextromoramide</p>	<p>Dihydrocodeine</p>	<p>Fentanyl</p>	<p>Hydromorphone</p>
<p>Methadone</p>	<p>Methadone metabolite</p>	<p>Morphine</p>	<p>Norcodeine</p>	<p>Norfentanyl</p>	<p>Normorphine</p>	<p>Oxycodone</p>

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 9: ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΑΡΩΣΗΣ LC/TOF-MS: Ιοντικά Χρωματογραφήματα Αναλυτών

Oxymorphone + EIC(302.1387) Scan M718_OXYMORP... 	Pentazocine + EIC(286.2154) Scan U2_JK_L3.d Smo... 	Pethidine + EIC(248.1645) Scan U2_JK_L3.d Smo... 	Pethidine metabolite + EIC(234.1489) Scan M601.d Smooth 	Sulfentanyl + EIC(387.2101) Scan SETQ_2.d Smooth 	Codeine (ISTD) + EIC(300.1594) Scan SUP(L).d Smooth 	
Διεγερτικά (Stimulants)						
Adrafinil + EIC(167.0855) Scan U2_P_L3.d Smooth 	Amiphenazole + EIC(192.0590) Scan U2_AB_L3.d Smo... 	Amphepramone + EIC(206.1539) Scan U2_JK_L3.d Smo... 	N,N-diethylnorephedrine + EIC(208.1696) Scan M46.d Smooth 	N-ethylnorephedrine + EIC(180.1383) Scan M46.d Smooth 	Nordiethylpropion + EIC(178.1226) Scan M46.d Smooth 	Amphetamine + EIC(136.1121) Scan U2_LM_L3.d Smo... 
Benfluorex + EIC(352.1519) Scan waads_2009_3D_... 	Benfl.desbenzaldehyde-mt + EIC(248.1257) Scan waads_2009_3D_... 	Benfl.desbenzalcarboxy-mt + EIC(262.1049) Scan waads_2009_3D_... 	Benzphetamine + EIC(240.1747) Scan U2_LM_L3.d Smo... 	Benzylamphetamine + EIC(226.1590) Scan U2_LM_L3.d Smo... 	1-Benzylpiperazine + EIC(177.1386) Scan U2_NO_L3.d Smo... 	Buflomedil + EIC(308.1856) Scan U2_NO_L3.d Smo... 
Bupropion + EIC(240.1150) Scan U2_NO_L3.d Smo... 	Bupropion diH-mt + EIC(242.1306) Scan M720_BUPROPIO... 	Bupropion OH-mts + EIC(256.1099) Scan M720_BUPROPIO... 	Bupropion diH-OH-mts + EIC(258.1255) Scan M720_BUPROPIO... 	1-(3-Chlorphenyl)piperazine + EIC(197.0840) Scan U2_NO_L3.d Smo... 	Carphedone + EIC(219.1128) Scan U2_NO_L3.d Smo... 	Carphedone 4OH-mt + EIC(235.1077) Scan M130.d Smooth 

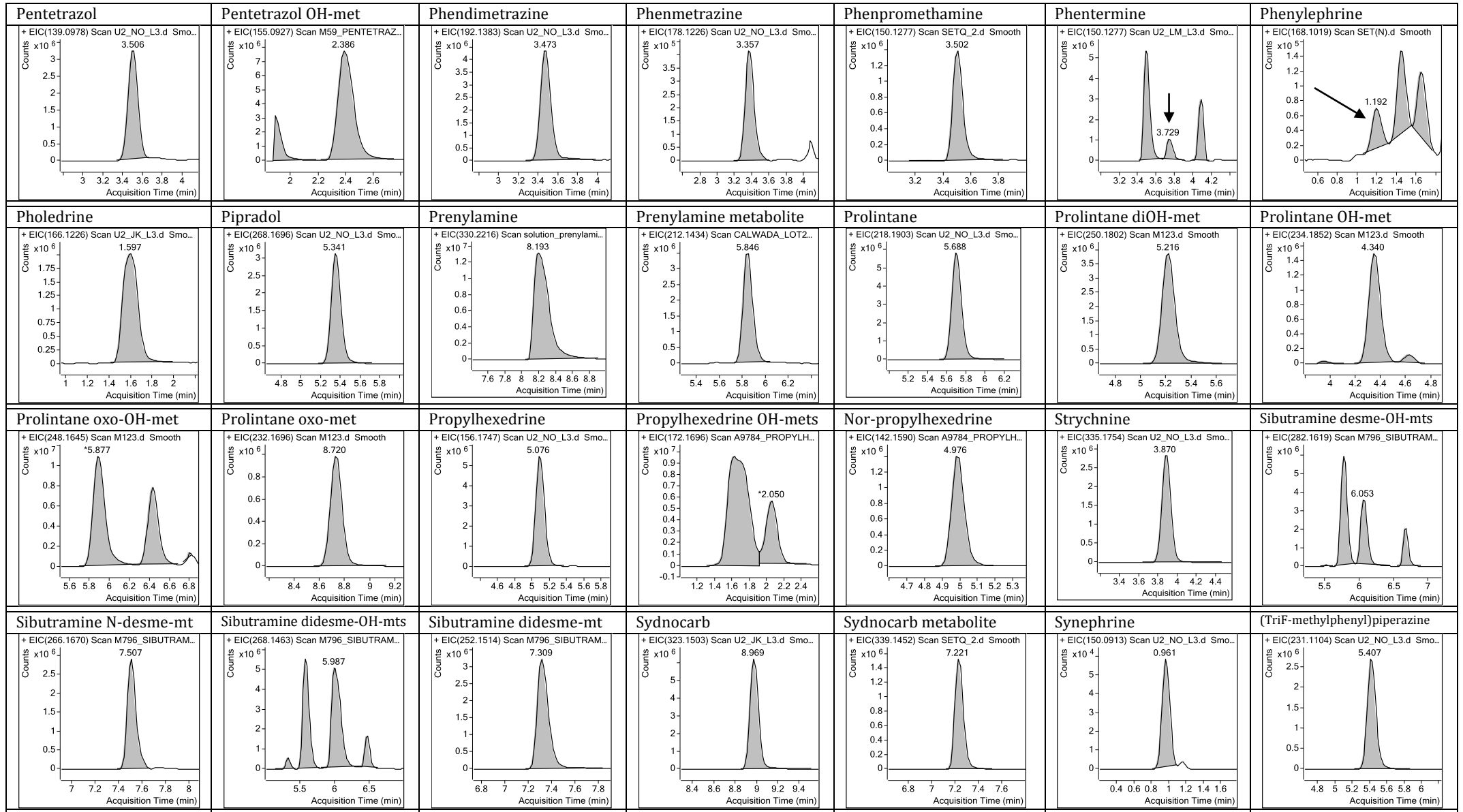
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 9: ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΑΡΩΣΗΣ LC/TOF-MS: Ιοντικά Χρωματογραφήματα Αναλυτών

<p>Clobenzorex</p>	<p>Clobenzorex diOH-mts</p>	<p>Clobenzorex OH-mts</p>	<p>Cocaine</p>	<p>Benzoylcegonine</p>	<p>Ecgonine methylester</p>	<p>Cropropamide</p>
<p>Crotethamide</p>	<p>Cyclazodone</p>	<p>Dimethylamphetamine</p>	<p>Ephedrine/Pseudoephedrine</p>	<p>Etafedrine</p>	<p>Ethamivan</p>	<p>Ethamivan desethyl-MT</p>
<p>Ethylamphetamine</p>	<p>Etilefrine</p>	<p>Famprofazone</p>	<p>Fenbutrazate</p>	<p>Fencamfamine</p>	<p>Fencamine</p>	<p>Fenethylline</p>
<p>Fenethylline metabolite</p>	<p>Fenfluramine</p>	<p>Fenproporex</p>	<p>Fenproporex OH-met</p>	<p>Flephedrone</p>	<p>Fluoroamphetamine</p>	<p>Furfenorex</p>

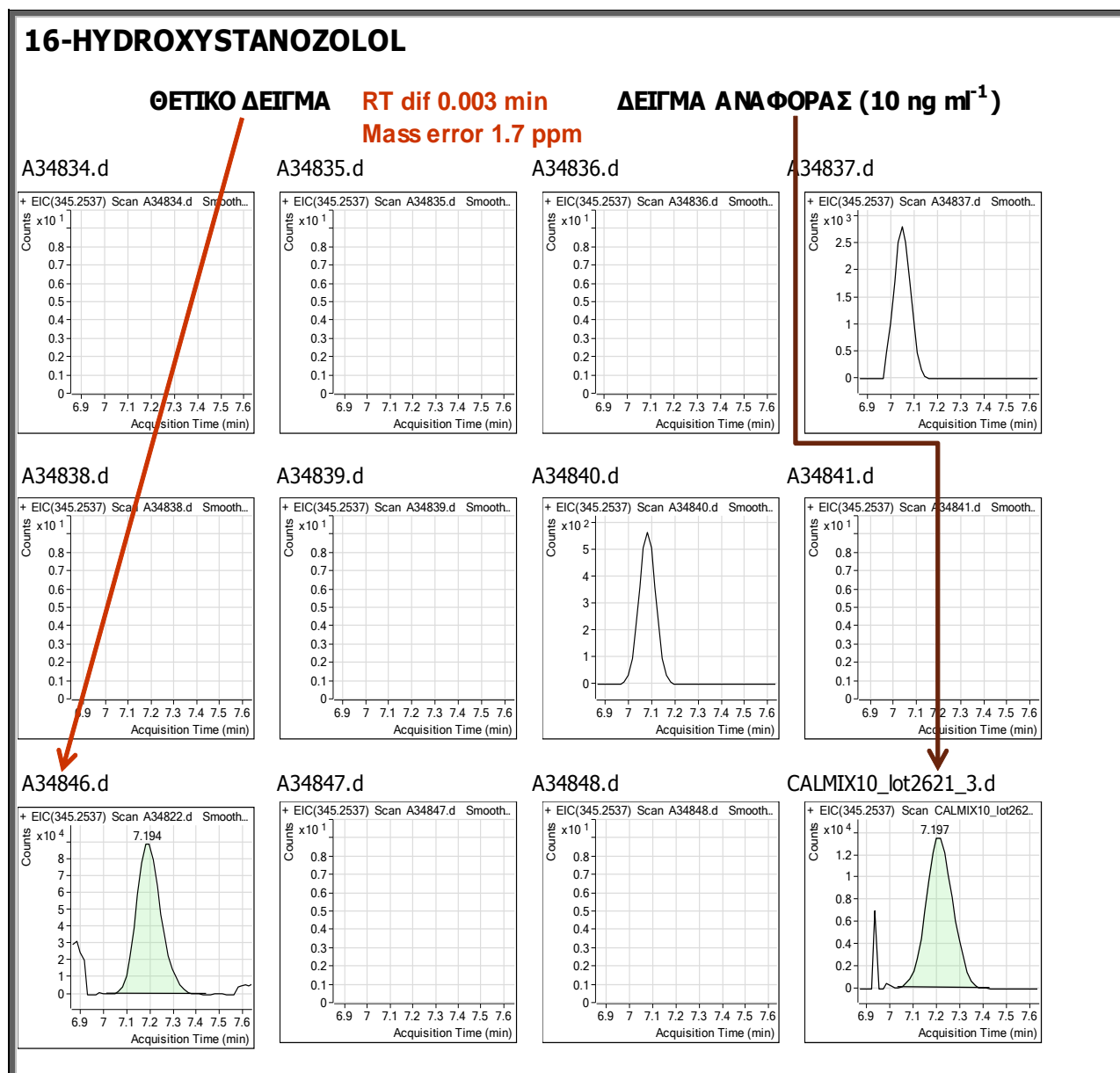
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 9: ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΑΡΩΣΗΣ LC/TOF-MS: Ιοντικά Χρωματογραφήματα Αναλυτών

<p>Heptaminol</p>	<p>p-Hydroxyamphetamine</p>	<p>6-Hydroxybromantan</p>	<p>Isometheptene</p>	<p>Isometheptene OH-mets</p>	<p>MDMA</p>	<p>HMA</p>
<p>HMMA</p>	<p>MDA</p>	<p>Mefenorex</p>	<p>Mefenorex p-OH-met</p>	<p>Mefenorex pOH-mMeo-met</p>	<p>Mephedrone</p>	<p>Mephentermine</p>
<p>Methamphetamine</p>	<p>Methoxyphenamine</p>	<p>p-Methylamphetamine</p>	<p>Methylenedioxypropylvalerone</p>	<p>Methylephedrine</p>	<p>Mehexanamine/2Aminoheptane</p>	<p>Methylphenidate</p>
<p>Modafinil</p>	<p>Niketamide</p>	<p>Nikethamide met</p>	<p>Norfenfluramine</p>	<p>Norpseudo-/Nor-ephedrine</p>	<p>Ortetamine/pME-amphetam.</p>	<p>Pemoline</p>

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 9: ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΑΡΩΣΗΣ LC/TOF-MS: Ιοντικά Χρωματογραφήματα Αναλυτών



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 10: Μέθοδος Σάρωσης LC/TOF-MS: έλεγχος ειδικότητας - παράδειγμα εκτύπωσης δειγμάτων ρουτίνας αθλητών για την ουσία 16-Hydroxystanozolol



RT_{dif} (min): διαφορά χρόνου ανάσχεσης της ουσίας σε ύποπτο δείγμα (A34846) σε σχέση με το εμβολιασμένο δείγμα αναφοράς της ίδιας παρτίδας δειγμάτων (Calmix10_lot2621_3)

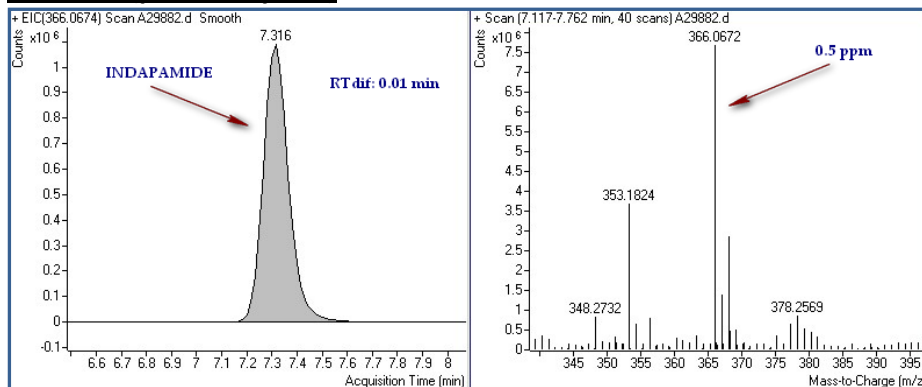
Mass error (ppm): σφάλμα μάζας για το διαγνωστικό ιόν του αναλύτη στο ύποπτο δείγμα σε σχέση με τη θεωρητική τιμή m/z του ιόντος

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 11: ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΑΡΩΣΗΣ LC/TOF-MS: Ανάλυση πραγματικών δειγμάτων

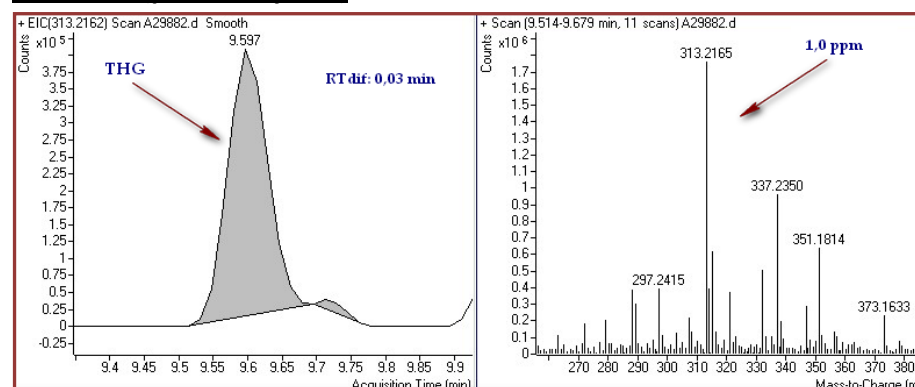
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 11: Μέθοδος Σάρωσης LC/TOF-MS:

Ανάλυση πραγματικών θετικών δειγμάτων

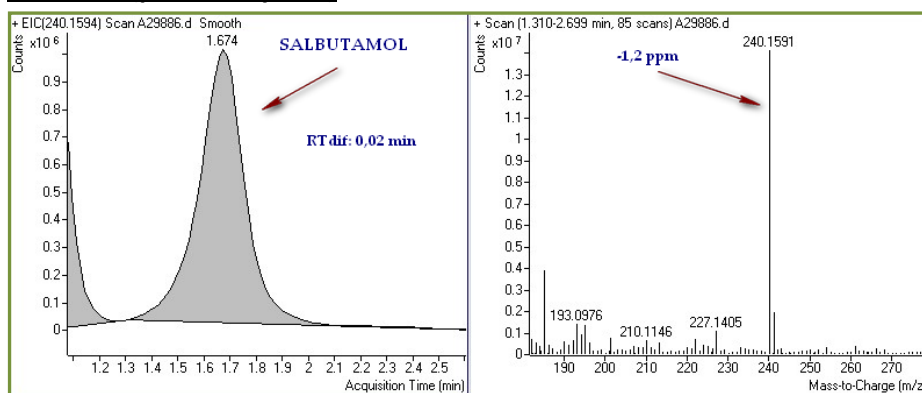
ΔΕΙΓΜΑ 1 (proficiency test): INDAPAMIDE



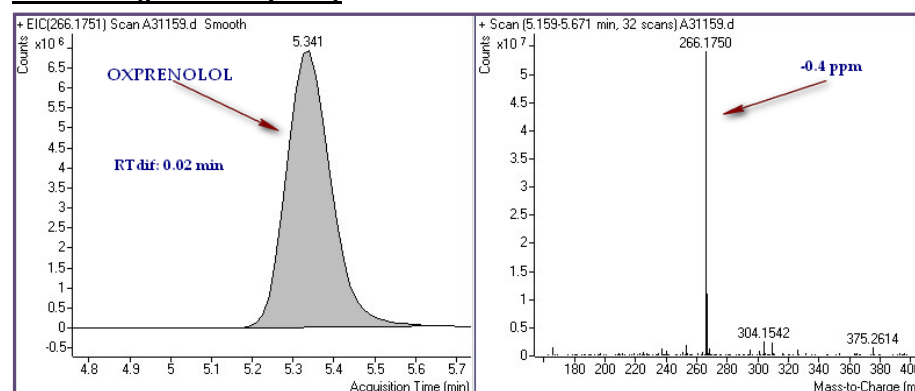
ΔΕΙΓΜΑ 3 (proficiency test): TETRAHYDROGESTRINONE



ΔΕΙΓΜΑ 2 (proficiency test): SALBUTAMOL

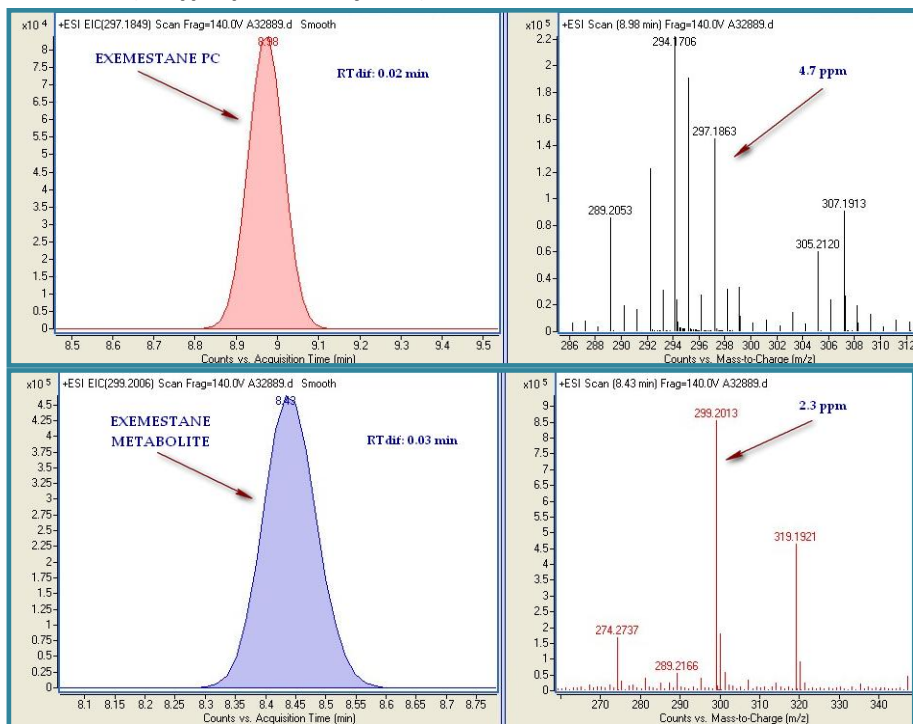


ΔΕΙΓΜΑ 4 (proficiency test): OXPRENOLOL

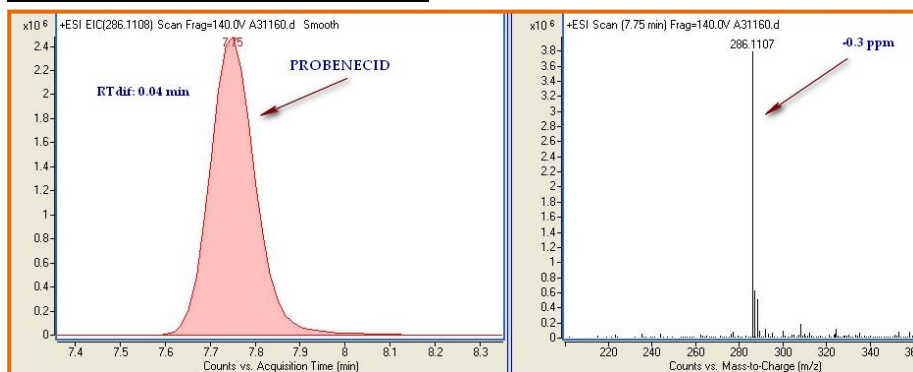


ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 11: ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΑΡΩΣΗΣ LC/TOF-MS: Ανάλυση πραγματικών δειγμάτων

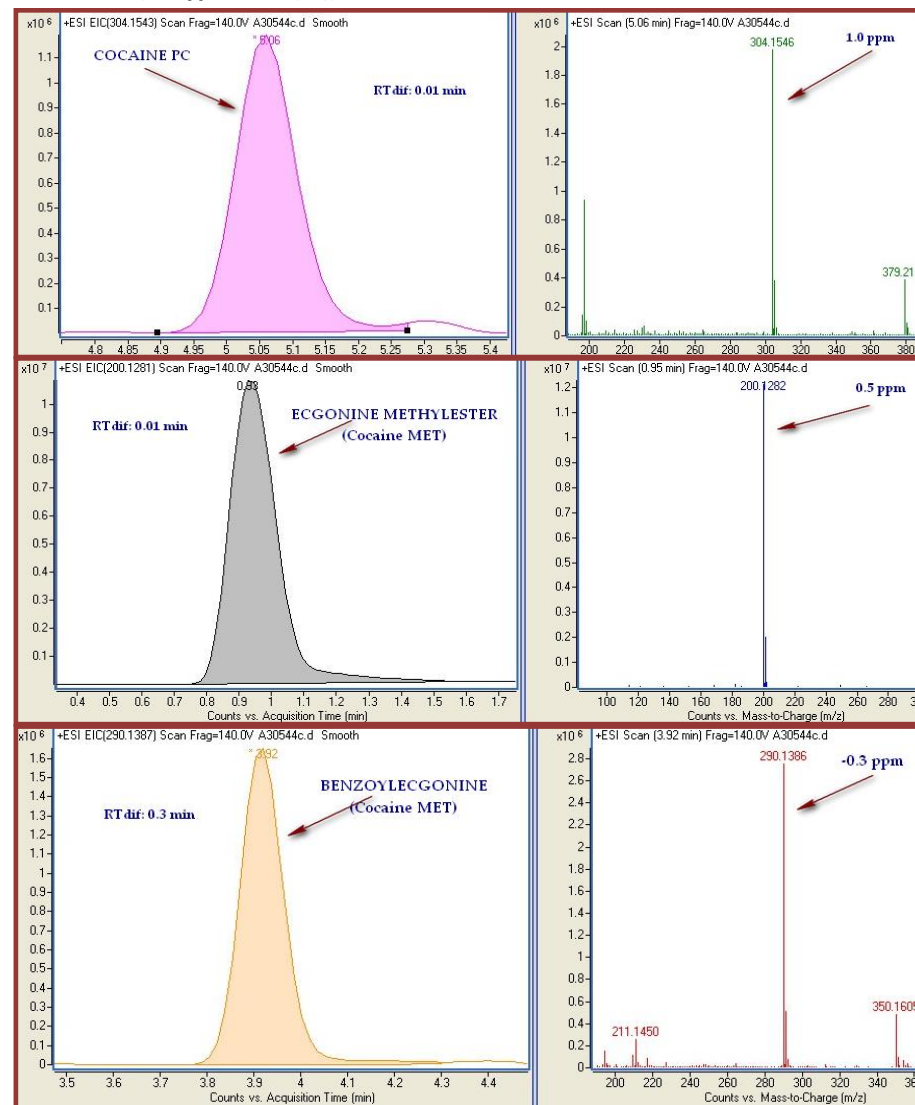
ΔΕΙΓΜΑ 5 (δείγμα proficiency test): EXEMESTANE



ΔΕΙΓΜΑ 6 (δείγμα proficiency test): PROBENECID

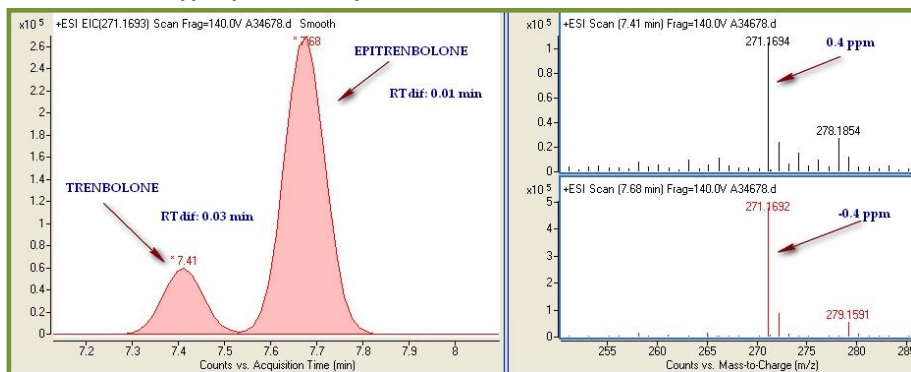


ΔΕΙΓΜΑ 7 (δείγμα αθλητή): COCAINE

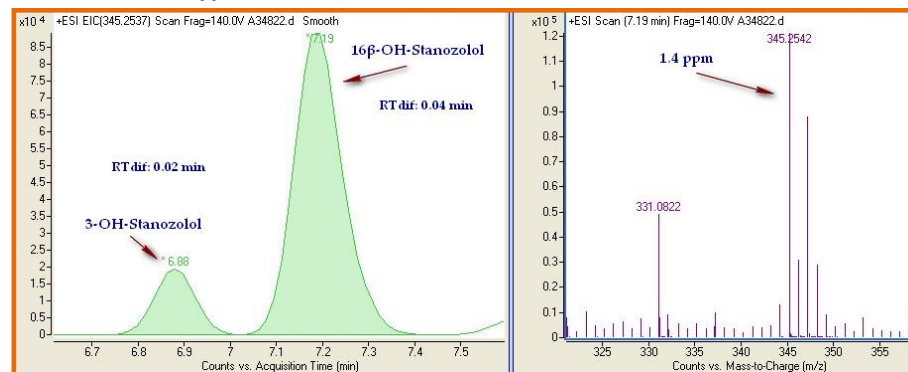


ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 11: ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΑΡΩΣΗΣ LC/TOF-MS: Ανάλυση πραγματικών δειγμάτων

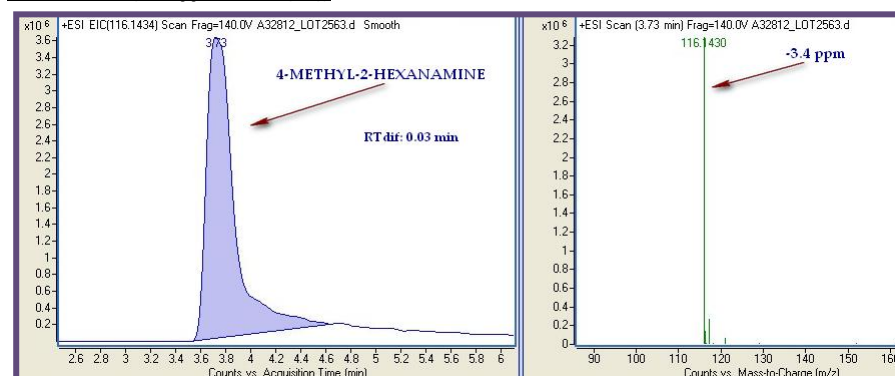
ΔΕΙΓΜΑ 8 (δείγμα proficiency test): TRENBOLONE



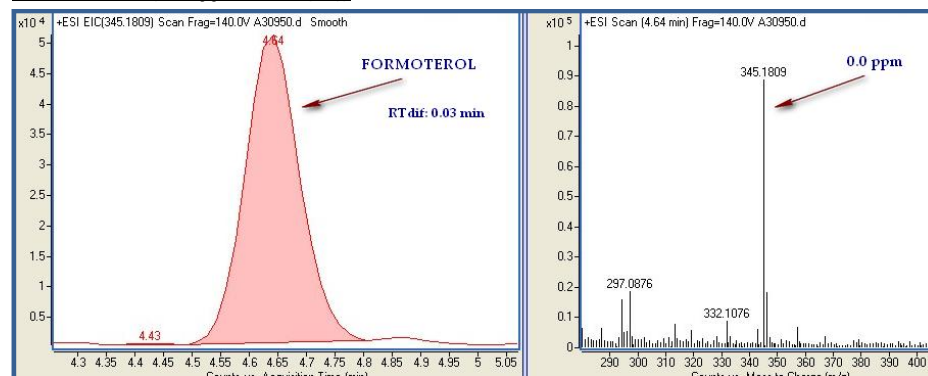
ΔΕΙΓΜΑ 11 (δείγμα αθλητή): STANOZOLOL



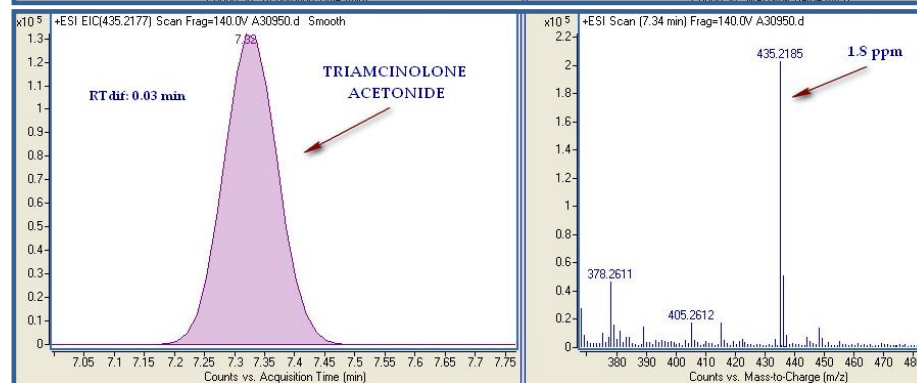
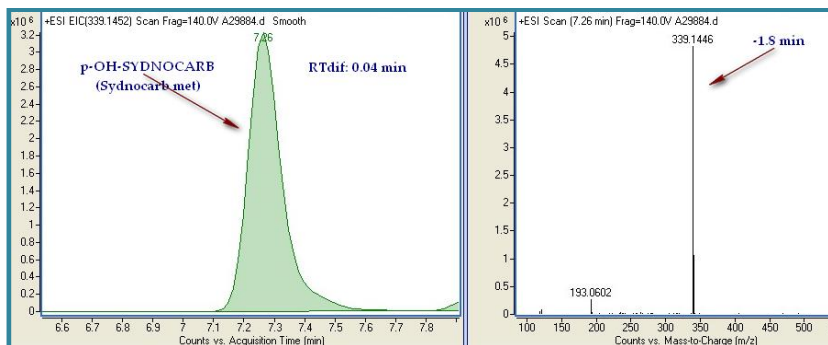
ΔΕΙΓΜΑ 9 (δείγμα αθλητή): 4-METHYL-2-HEXANAMINE



ΔΕΙΓΜΑ 12 (δείγμα αθλητή): FORMOTEROL – TRIAMCINOLONE ACETONIDE



ΔΕΙΓΜΑ 10 (δείγμα proficiency test): SYDNOCARB



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 12: Αξιολόγηση Μεθόδου Ποσοτικού Προσδιορισμού της Κορτιζόλης σε Ούρα Αλόγων – Καμπύλες Προσθήκης Γνωστών Ποσοτήτων

ΜΕΘΟΔΟΣ LC/IT-MS							
Αναλυτική Δοκιμασία	C ^{'blank'} (1) (μg mL ⁻¹)	Δείγμα - Μοντέλο 0,5 μg mL ⁻¹			Δείγμα - Μοντέλο 1,0 μg mL ⁻¹		
		Εξίσωση Συσχετίσεως	r ² (2)	C _{υπολογιζόμενη} (3) (μg mL ⁻¹)	Εξίσωση Συσχετίσεως	r ²	C _{υπολογιζόμενη} (μg mL ⁻¹)
Ημέρα 1	0,125	y = 0,642 x + 0,417	0,998	0,650	y = 0,671 x + 0,731	0,998	1,090
Ημέρα 2	0,109	y = 0,728 x + 0,462	0,998	0,634	y = 0,739 x + 0,851	0,9995	1,152
Ημέρα 3	0,136	y = 0,690 x + 0,452	0,99998	0,655	y = 0,670 x + 0,799	0,997	1,192
Ημέρα 4	0,006	y = 0,763 x + 0,455	0,998	0,596	y = 0,771 x + 0,780	0,997	1,012
Ημέρα 5	0,035	y = 0,850 x + 0,487	0,9996	0,573	y = 0,794 x + 0,870	0,998	1,096
ΜΕΘΟΔΟΣ LC/TOF-MS							
Αναλυτική Δοκιμασία	C ^{'blank'} (1) (μg mL ⁻¹)	ΔΕΙΓΜΑ – ΜΟΝΤΕΛΟ 0,5 μg mL ⁻¹			ΔΕΙΓΜΑ – ΜΟΝΤΕΛΟ 1,0 μg mL ⁻¹		
		Εξίσωση Συσχετίσεως	r ² (2)	C _{υπολογιζόμενη} (3) (μg mL ⁻¹)	Εξίσωση Συσχετίσεως	r ²	C _{υπολογιζόμενη} (μg mL ⁻¹)
Ημέρα 1	0,105	y = 0,967 x + 0,614	0,9990	0,635	y = 1,032 x + 1,132	0,9992	1,096
Ημέρα 2	0,084	y = 0,919 x + 0,552	0,99990	0,601	y = 0,923 x + 1,045	0,998	1,134
Ημέρα 3	0,117	y = 0,800 x + 0,469	0,9998	0,586	y = 0,769 x + 0,912	0,9993	1,187
Ημέρα 4	0,053	y = 0,961 x + 0,541	0,9996	0,563	y = 0,975 x + 1,031	0,998	1,057
Ημέρα 5	0,047	y = 0,878 x + 0,489	0,99990	0,558	y = 0,8471 x + 0,944	0,9990	1,115

(1) Συγκέντρωση της ενδογενούς κορτιζόλης στο δείγμα ούρων που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των δειγμάτων-μοντέλων

(2) Τετράγωνο συντελεστή συσχέτισης της ευθείας παλινδρόμησης της καμπύλης προσθήκης

(3) Πειραματικά υπολογιζόμενη συγκέντρωση της κορτιζόλης στο δείγμα-μοντέλο (πηλίκο τομής προς κλίση καμπύλης προσθήκης)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 13: Έλεγχος ειδικότητας μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού κορτιζόλης σε ούρα αλόγων – Εξεταζόμενες Ουσίες

ΔΕΙΓΜΑ	A/A	ΟΥΣΙΑ	ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ
SPEC1	1	Triamcinolone	Κορτικοστεροειδές
	2	Prednisolone	Κορτικοστεροειδές
	3	Prednisone	Κορτικοστεροειδές
	4	Methylprednisolone	Κορτικοστεροειδές
	5	Dexamethasone	Κορτικοστεροειδές
	6	Flumethasone	Κορτικοστεροειδές
	7	Beclomethasone	Κορτικοστεροειδές
	8	Triamcinolone acetonide	Κορτικοστεροειδές
	9	Fludrocortisone	Κορτικοστεροειδές
	10	Fluocortolone	Κορτικοστεροειδές
	11	Budesonide	Κορτικοστεροειδές
	12	16α-Hydroxyprednisolone	Κορτικοστεροειδές (Budesonide met.)
	13	Trenbolone	Αναβολικό στεροειδές
SPEC2	14	Salmeterol	β ₂ -Αγωνιστής
	15	Bolasterone	Αναβολικό στεροειδές
	16	Ethisterone	Αναβολικό στεροειδές (Danazol met.)
	17	16β-Hydroxyfurazabol	Αναβολικό στεροειδές (Furazabol met.)
	18	3-Hydroxystanozolol	Αναβολικό στεροειδές (Stanozolol met.)
	19	Buprenorphine	Ναρκωτικό
SPEC3	20	Amiloride	Διουρητικό
	21	Pemoline	Διεγερτικό
	22	Etiocholanolone	Ανδρογόνο (ενδογενές στους ανθρώπους)
	23	Boldenone	Αναβολικό στεροειδές
	24	Nandrolone	Αναβολικό στεροειδές
	25	Epitestosterone	Ενδογενές στεροειδές
	26	Estrone	Ενδογενές στεροειδές
	27	Mesterolone	Αναβολικό στεροειδές
	28	Ritodrine	α ₂ -Αγωνιστής
	29	Methenolone	Αναβολικό στεροειδές
	30	Methandriol	Αναβολικό στεροειδές
	31	Mibolerone	Αναβολικό στεροειδές
	32	Methandienone	Αναβολικό στεροειδές
	33	Calusterone	Αναβολικό στεροειδές
	34	Oxandrolone	Αναβολικό στεροειδές
	35	Triamterene	Διουρητικό
	36	Norethandrolone	Αναβολικό στεροειδές
	37	Benzoyllecgonine	Διεγερτικό (Cocaine met.)
	38	Probenecid	Καλυπτικός παράγοντας
	39	DHEA (dehydroepiandrosterone)	Ενδογενές στεροειδές

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 13: Έλεγχος ειδικότητας μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού κορτιζόλης σε ούρα αλόγων- Ουσίες που μελετήθηκαν (συνέχεια)

ΔΕΙΓΜΑ	A/A	ΟΥΣΙΑ	ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ
SPEC4	40	Betamethasone	Κορτικοστεροειδές
	41	Flunisolide	Κορτικοστεροειδές
	42	Epitrenbolone	Αναβολικό στεροειδές (Trenbolone met.)
SPEC5	43	Zeranol	Αναβολικός Παράγοντας
	44	19-Norandrosterone	Αναβολικό στεροειδές (Nandrolone met.)
	45	19-Norandrosterone	Αναβολικό στεροειδές (Nandrolone met.)
	46	Salbutamol	β ₂ -Αγωνιστής
	47	4-Hydroxytestosterone	Αναβολικό στεροειδές
	48	17α-methyl-5β-androstane-3α,17β-diol	Αναβολικό στεροειδές (17α-methyltestosterone met.)
	49	Epimetendiol	Αναβολικό στεροειδές (Methandienone met.)
	50	Formoterol	β ₂ -Αγωνιστής
	51	4-Hydroxy-4-androstene-3,17-dione	Αναβολικό στεροειδές
	52	9 ^α -Fluoro-17 ^α -methylandro-4-ene-3 ^α ,6 ^β ,11 ^β ,17 ^β -tetrol	Αναβολικό στεροειδές (Floxymesterone met.)
	53	9 ^α -Fluoro-18-nor-17,17-dimethyl-4,13-diene-11 ^β -ol-3-one	Αναβολικό στεροειδές (Floxymesterone met.)
	54	Formebolone metabolite	Αναβολικό στεροειδές
	55	6α-Hydroxyandrostenedione	Αναβολικό στεροειδές (5 ^α -androst-1-ene-3,17-dione met.)
	56	6β-Hydroxymethandienone	Αναβολικό στεροειδές (methandienone met.)
	57	Mibolerone	Αναβολικό στεροειδές
	58	17α-Ethyl-5β-estrane-3α,17β-diol	Αναβολικό στεροειδές (Norethandrolone met.)
	59	Aminoglutethimide	Αναστολέας αρωματάσης
60	6-Hydroxybromantane	Διεγερτικό (Bromantane met.)	
SPEC6	61	Oxandrolone	Αναβολικό στεροειδές
	62	5β-Androst-1-en-17β-ol-3-one	Αναβολικό στεροειδές (Boldenone met.)
	63	Fenoterol	β ₂ -Αγωνιστής
	64	Terbutaline	β ₂ -Αγωνιστής
	65	Clenbuterol	β ₂ -Αγωνιστής
	66	17α-methyl-5α-androstane-3α,17β-diol	Αναβολικό στεροειδές (17α-methyltestosterone met.)
	67	7β,17α-Dimethyl-5β-androstane-3α,17β-diol	Αναβολικό στεροειδές (Calusterone met.)
	68	13β,17α -diethyl-3α,17β-dihydroxy-5α-gonane	Αναβολικό στεροειδές (Norbolethone met.)
	69	13β,17α -diethyl-3α,17β-dihydroxy-5β-gonane	Αναβολικό στεροειδές (Norbolethone met.)
	70	5α-tetrahydronorethisterone	Αναβολικό στεροειδές (Norethisterone met.)
SPEC7	71	Methenolone	Αναβολικό Στεροειδές
	72	Furazabol	Αναβολικό Στεροειδές
	73	Bambuterol	β ₂ -Αγωνιστής
	74	4-Chloroandrosterone	Αναβολικό Στεροειδές (Clostebol met.)
	75	17-Epiandrosterone	Αναβολικό Στεροειδές (Oxandrolone met.)
	76	7α,17α-dimethyl-5β-androstane-3α,17β-diol	Αναβολικό Στεροειδές (Drostanolone met.)
	77	17α-Ethyl-5α-estrane-3α,17β-diol	Αναβολικό Στεροειδές (Norethandrolone met.)
	78	3α-Hydroxy-1α-methyl-5α-androstane-17-one	Αναβολικό Στεροειδές (Mesterolone met.)
	79	Gestrinone	Αναβολικό Στεροειδές
	80	17-Epimethandienone	Αναβολικό Στεροειδές (Methandienone met.)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 14: Αξιολόγηση Μεθόδου Ποσοτικού Προσδιορισμού της Θεοβρωμίνης σε Ούρα Αλόγων – Καμπύλες Προσθήκης Γνωστών Ποσοτήτων

ΜΕΘΟΔΟΣ LC/IT-MS

Αναλυτική Δοκιμασία	Δείγμα - Μοντέλο 1,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$			Δείγμα - Μοντέλο 3,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$			Δείγμα - Μοντέλο 4,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$		
	Εξίσωση Συσχετίσεως	r^2 (1)	$C_{\text{υπολογιζόμενη}}$ ($\mu\text{g mL}^{-1}$) (2)	Εξίσωση Συσχετίσεως	r^2	$C_{\text{υπολογιζόμενη}}$ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Εξίσωση Συσχετίσεως	r^2	$C_{\text{υπολογιζόμενη}}$ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Ημέρα 1	$y = 0,1069x + 0,1597$	0,998	1,494	$y = 0,1093x + 0,3355$	0,998	3,070	$y = 0,1158x + 0,5107$	0,995	4,408
Ημέρα 2	$y = 0,1345x + 0,2055$	0,9997	1,528	$y = 0,1548x + 0,4329$	0,996	2,796	$y = 0,1469x + 0,6234$	0,997	4,243
Ημέρα 3	$y = 0,1564x + 0,2400$	0,9998	1,535	$y = 0,1535x + 0,4478$	0,998	2,917	$y = 0,1456x + 0,6951$	0,998	4,776
Ημέρα 4	$y = 0,1284x + 0,1578$	0,998	1,369	$y = 0,1219x + 0,3390$	0,997	2,780	$y = 0,1220x + 0,5514$	0,997	4,520
Ημέρα 5	$y = 0,0984x + 0,1483$	0,998	1,506	$y = 0,1019x + 0,2937$	0,997	2,881	$y = 0,1020x + 0,4810$	0,998	4,714

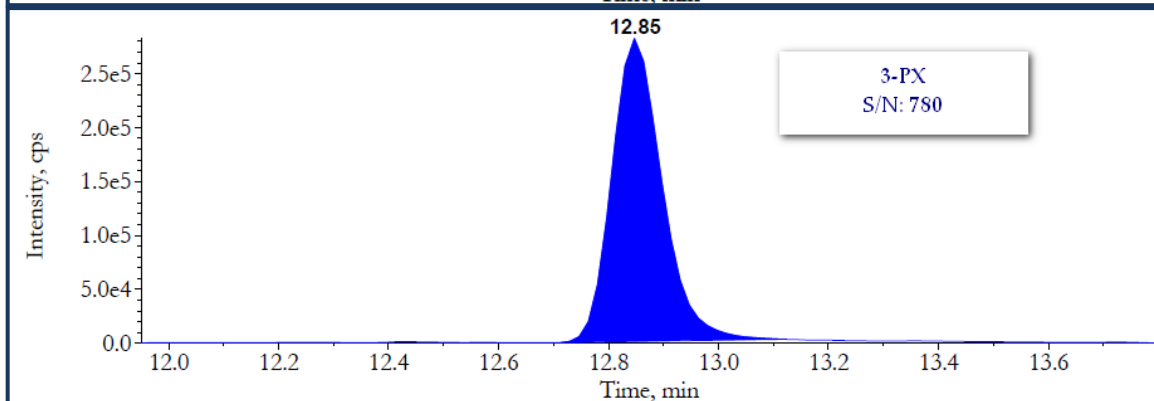
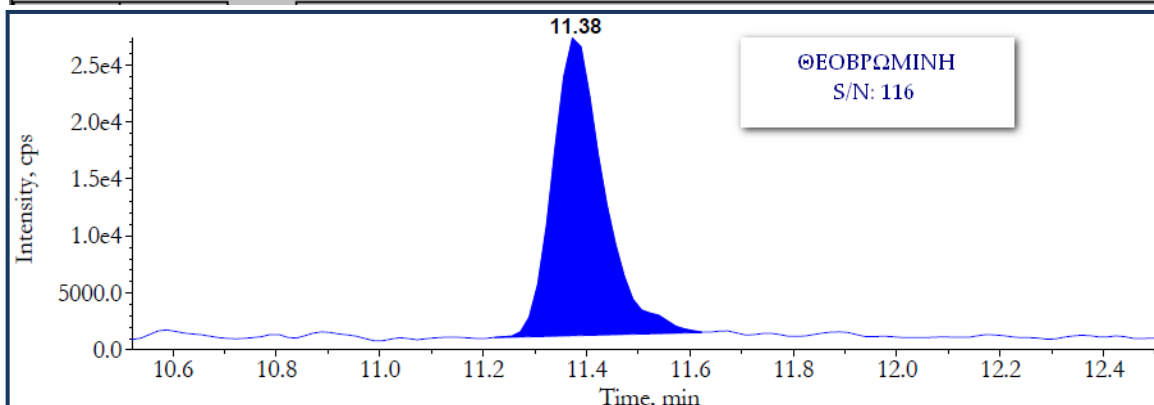
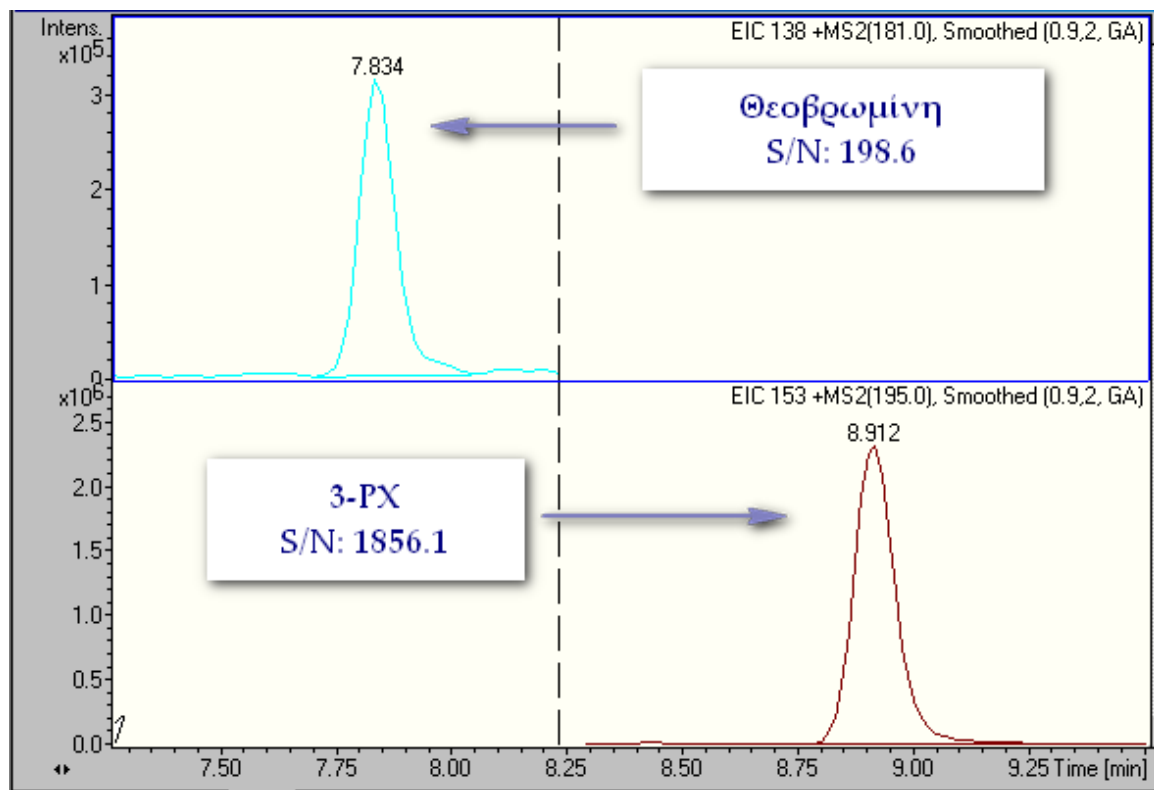
ΜΕΘΟΔΟΣ LC/TOF-MS

Αναλυτική Δοκιμασία	Δείγμα - Μοντέλο 1,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$			Δείγμα - Μοντέλο 3,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$			Δείγμα - Μοντέλο 4,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$		
	Εξίσωση Συσχετίσεως	r^2	$C_{\text{υπολογιζόμενη}}$ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Εξίσωση Συσχετίσεως	r^2	$C_{\text{υπολογιζόμενη}}$ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Εξίσωση Συσχετίσεως	r^2	$C_{\text{υπολογιζόμενη}}$ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Ημέρα 1	$y = 0,1522x + 0,2294$	0,9996	1,507	$y = 0,1607x + 0,4807$	0,9993	2,992	$y = 0,1600x + 0,7232$	0,997	4,521
Ημέρα 2	$y = 0,1656x + 0,2461$	0,9992	1,486	$y = 0,1207x + 0,3902$	0,9998	3,232	$y = 0,1170x + 0,5682$	0,9991	4,858
Ημέρα 3	$y = 0,1324x + 0,1856$	0,9994	1,402	$y = 0,1521x + 0,4216$	0,9993	2,772	$y = 0,1654x + 0,7445$	0,998	4,502
Ημέρα 4	$y = 0,1120x + 0,1781$	0,9994	1,591	$y = 0,1557x + 0,483$	0,9997	3,103	$y = 0,1672x + 0,7724$	0,998	4,620
Ημέρα 5	$y = 0,1778x + 0,2838$	0,9999	1,596	$y = 0,1762x + 0,5263$	0,998	2,988	$y = 0,1725x + 0,8045$	0,998	4,665

(1) Τετράγωνο συντελεστή συσχέτισεως της ευθείας παλινδρόμησης της καμπύλης προσθήκης

(2) Πειραματικά υπολογιζόμενη συγκέντρωση της θεοβρωμίνης στο δείγμα-μοντέλο (πηλίκo τομής προς κλίση καμπύλης προσθήκης)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 15: Αξιολόγηση μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού θεοβρωμίνης σε ούρα αλόγων - χρωματογραφικά χαρακτηριστικά (S/N) στο κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης



Ιοντικά χρωματογραφήματα LC/Ion Trap-MS και LC/TOF-MS εμβολιασμένου δείγματος αλόγου συγκέντρωσης $0,75 \mu\text{g mL}^{-1}$ (κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης θεοβρωμίνης)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 16: Αξιολόγηση μεθόδου LC/Ion Trap-MS για την ταυτοποίηση (επιβεβαίωση) της θεοβρωμίνης σε ούρα αλόγων

Δείγμα	C _{THB} (μg mL ⁻¹)	Χρόνοι Ανάσχεσης ¹			% Σχετ. Αναλογίες Διαγνωστικών Ιόντων ²			
		RT _{THB}	RT _{3-PX}	RRT	m/z 138	m/z 181	m/z 135	m/z 110
1	2	7,581	8,690	0,8724	100	12,7	11,3	9,2
2	2	7,634	8,715	0,8760	100	13,2	10,0	9,4
3	2	7,582	8,689	0,8726	100	13,9	12,9	9,0
4	2	7,581	8,700	0,8714	100	12,0	11,2	9,7
5	3	7,787	8,850	0,8799	100	13,0	10,7	9,0
6	3	7,805	8,884	0,8785	100	13,8	9,7	10,4
7	3	7,747	8,827	0,8776	100	14,2	10,4	10,0
8	3	7,814	8,890	0,8790	100	12,9	11,2	10,2
9	6	7,815	8,900	0,8781	100	14,8	11,9	9,9
10	6	7,806	8,874	0,8796	100	12,8	10,9	8,6
11	6	7,755	8,823	0,8790	100	13,6	10,5	10,3
12	6	7,746	8,815	0,8787	100	14,1	11,3	9,4
13	9	7,743	8,812	0,8787	100	14,0	10,9	10,3
14	9	7,800	8,870	0,8794	100	12,6	10,8	9,9
15	2	7,781	8,859	0,8783	100	12,8	10,8	11,5
16	5	7,746	8,817	0,8785	100	11,8	10,0	9,9
17	10	7,813	8,889	0,8790	100	12,7	10,8	9,3
18	10	7,767	8,835	0,8791	100	13,2	11,8	9,7
19	0,75	7,704	8,785	0,8769	100	17,4	12,6	11,4
20	0,75	7,690	8,793	0,8746	100	14,2	8,3	9,3
21	1,5	7,742	8,820	0,8778	100	14,1	10,9	12,2
22	3	7,825	8,886	0,8806	100	13,7	11,7	10,1
23	3	7,737	8,805	0,8787	100	12,5	9,3	9,5
24	6	7,790	8,849	0,8803	100	13,7	11,6	9,8
25	6	7,782	8,849	0,8794	100	14,2	12,6	10,3
26	9	7,761	8,832	0,8787	100	13,2	12,3	10,2
27	9	7,743	8,813	0,8786	100	13,2	11,1	11,1
28	12	7,743	8,823	0,8776	100	12,8	11,6	9,9
29	12	7,725	8,808	0,8774	100	13,5	10,8	10,0
30	15	7,775	8,835	0,8800	100	14,4	12,3	10,1
31	15	7,791	8,857	0,8796	100	14,1	11,9	9,8
32	2	7,798	8,882	0,8780	100	10,4	10,7	9,3
33	5	7,813	8,876	0,8802	100	11,5	11,4	8,9
34	10	7,751	8,828	0,8780	100	12,0	12,2	10,8
35	9	7,770	8,841	0,8789	100	12,8	9,8	9,1
36	12	7,672	8,780	0,8738	100	10,9	10,7	9,7
37	12	7,685	8,801	0,8732	100	11,5	9,5	10,4
38	15	7,784	8,865	0,8781	100	11,6	9,3	9,3
39	15	7,662	8,778	0,8729	100	11,8	10,0	9,9
40	5	7,696	8,809	0,8737	100	11,1	9,9	10,5
Mean		7,744	8,824	0,8776	100	13,1	10,9	9,9
SD		0,065	0,053	0,0025		1,3	1,0	0,7

¹Χρόνος ανασχεσης (RT, min) θεοβρωμίνης (THB) και εσωτερικού προτύπου (3-PX) και σχετικός χρόνος ανασχεσης (RRT) ²% Σχετ. αναλογία επιφάνειας διαγνωστικού ιόντος ως προς αυτή του κύριου ιόντος

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 17: Αξιολόγηση μεθόδου LC/TOF-MS για την ταυτοποίηση (επιβεβαίωση) της θεοβρωμίνης σε ούρα αλόγων

Δείγμα	C _{THB} (μg mL ⁻¹)	Χρόνοι Ανάσχεσης			m/z 181,0720		m/z 138,0662		m/z 138,0614	
		RT _{THB} ¹ (min)	RT _{3-PX} ¹ (min)	RRT ¹	% Σχετ. Αναλογία ²	Σφάλμα μαζας (ppm)	% Σχετ. Αναλογία ²	Σφάλμα μαζας (ppm)	% Σχετ. Αναλογία ²	Σφάλμα μαζας (ppm)
1	0,75	11,373	12,858	0,8845	100	0,7	98,0	0,9	14,7	>10
2	1,5	11,357	12,848	0,8840	100	1,5	92,6	2,3	14,9	>10
3	6	11,345	12,843	0,8834	100	1,4	86,0	0,7	14,1	4,7
4	9	11,318	12,838	0,8816	100	0,8	87,4	0,7	13,6	2,5
5	12	11,302	12,838	0,8804	100	0,5	80,3	1,0	12,8	0,8
6	15	11,316	12,840	0,8813	100	0,1	82,5	1,2	12,2	0,7
7	2	11,442	12,904	0,8867	100	2,1	89,0	1,6	14,5	8,5
8	5	11,304	12,834	0,8808	100	0,8	85,5	0,9	14,7	1,4
9	10	11,344	12,845	0,8831	100	0,2	84,1	0,1	12,2	1,9
10	2	11,358	12,858	0,8833	100	1,8	93,1	0,1	16,8	0,8
11	2	11,385	12,864	0,8850	100	0,1	76,5	2,1	14,5	8,4
12	2	11,396	12,885	0,8844	100	2,4	71,0	2,0	13,5	0,4
13	2	11,364	12,872	0,8828	100	1,3	82,3	0,8	12,9	8,1
14	2	11,337	12,868	0,8810	100	1,2	82,7	0,2	15,4	9,5
15	2	11,393	12,875	0,8849	100	0,6	73,2	0,5	14,7	>10
16	1,5	11,455	12,931	0,8859	100	0,5	79,0	0,7	14,4	4,7
17	3	11,505	12,960	0,8877	100	0,0	74,5	0,7	12,3	2,3
18	4,5	11,491	12,944	0,8877	100	0,6	73,7	0,2	10,8	1,4
19	4,5	11,49	12,932	0,8885	100	1,0	75,2	0,7	13,0	3,2
20	6	11,509	12,956	0,8883	100	0,5	73,1	0,2	11,6	0,3
21	6	11,529	12,967	0,8891	100	0,7	78,2	0,2	11,8	0,3
22	4,5	11,489	12,946	0,8875	100	0,2	72,8	0,9	11,6	0,6
23	6	11,528	12,958	0,8896	100	0,1	73,2	0,2	12,7	1,1
24	7,5	11,445	12,924	0,8856	100	0,6	72,2	0,4	12,2	0,1
25	7,5	11,487	12,936	0,8880	100	0,2	78,7	0,4	11,3	1,7
26	5	11,52	12,956	0,8892	100	0,6	71,4	0,2	12,6	2,2
27	4,5	11,495	12,924	0,8894	100	1,3	73,5	0,4	12,4	2,0
28	4,5	11,519	12,948	0,8896	100	0,9	81,2	1,0	10,3	0,2
29	6	11,464	12,930	0,8866	100	0,1	81,4	0,9	11,6	0,9
30	6	11,54	12,953	0,8809	100	1,0	85,3	1,3	11,2	0,0
31	7,5	11,477	12,935	0,8873	100	1,0	79,3	0,2	12,1	2,6
32	7,5	11,512	12,954	0,8887	100	0,6	74,9	0,1	13,4	1,5
33	9	11,525	12,962	0,8891	100	0,4	77,9	0,4	11,6	1,5
34	9	11,527	12,964	0,8892	100	0,6	77,2	1,5	12,3	0,8
35	6,5	11,525	12,948	0,8901	100	0,6	77,6	1,2	12,4	2,4
36	8,5	11,48	12,924	0,8883	100	0,1	70,4	0,6	13,1	1,4
37	1,2	11,506	12,940	0,8892	100	0,4	83,7	1,1	10,3	5,4
38	3	11,518	12,953	0,8892	100	0,7	84,5	0,7	11,4	3,2
39	4,5	11,476	12,922	0,8881	100	0,8	92,8	0,9	10,9	4,7
40	3	11,325	12,835	0,8824	100	1,3	96,5	1,0	12,1	8,5
Mean		11,442	12,909	0,8863	100	0,7	80,6	0,8	12,8	2,7
SD		0,079	0,047	0,0030		2,4	7,3	2,3	1,4	9,4

¹Χρόνος ανάλυσης (RT, min) θεοβρωμίνης (THB) και εσωτερικού προτύπου (3-PX) και σχετικός χρόνος ανάλυσης (RRT) ²% Σχετ. αναλογία επιφάνειας διαγνωστικού ιόντος ως προς αυτή του κύριου ιόντος

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 18: Ποσοτικός προσδιορισμός σαλικυλικού οξέος σε ούρα αλόγων με LC/QTOF-MS: πρότυπα διαλύματα παρακαταθήκης και εργασίας

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΠΑΡΑΚΑΤΑΘΗΚΗΣ (ΔΠ)						
Διάλυμα	Ουσία	Συγκέντρωση (μg mL ⁻¹)	Ζυγισθείσα ποσότητα (mg)	Όγκος (mL)	Διαλύτης Διάλυσης	Αποθήκευση
ΔΠ1	SA ¹	2297	23,2	10	Μεθανόλη	✓
ΔΠ2	SA ¹	2614	26,4	10	Μεθανόλη	✓
ΔΠ3	IS ²	4000	40,4	10	Μεθανόλη	✓
ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ (ΔΕ)						
Διάλυμα	Ουσία	Συγκέντρωση (μg mL ⁻¹)	Όγκος αρχικού διαλύματος (μL)	Τελικός όγκος (mL)	Διαλύτης Αραίωσης	Αποθήκευση
ΔΕ1	SA ¹	100	453 (ΔΠ1)	10	Κινητή Φάση ³	✗
ΔΕ2	SA ¹	100	765 (ΔΠ2)	20	Κινητή Φάση ³	✗
ΔΕ3	IS ²	200	500 (ΔΠ3)	10	Κινητή Φάση ³	✗

¹ SA: σαλικυλικό οξύ (*salicylic acid*)

² IS: εσωτερικό πρότυπο, 4-μεθυλοσαλικυλικό οξύ (*internal standard*)

³ κινητή φάση: ακετονιτρίλιο /νερό (60/40, v/v), 0.1% οξικό οξύ (v/v)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 19: Ποσοτικός προσδιορισμός σαλικυλικού οξέος σε ούρα αλόγων με LC/QTOF-MS: παρασκευή προτύπων εμβολιασμένων δειγμάτων καμπύλης αναφοράς και δειγμάτων ελέγχου

ΠΡΟΤΥΠΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ							
Δείγμα	Συγκέντρωση (μg mL ⁻¹)	Διάλυμα Εργασίας	Όγκος (μL) δ/τος εργασίας	Όγκος (mL) ούρων	Όγκος (μL) δ/τος εργασίας IS	Όγκος διαλύτη αραιώσης	Τελικός Όγκος Δείγματος (mL)
STD1	2,5	ΔΕ1	25	1,0	80	7 mL + 975 μL	9,08
STD2	5,0	ΔΕ1	50	1,0	80	7 mL + 950 μL	9,08
STD3	10,0	ΔΕ1	100	1,0	80	7 mL + 900 μL	9,08
STD4	20,0	ΔΕ1	200	1,0	80	7 mL + 800 μL	9,08
STD5	30,0	ΔΕ1	300	1,0	80	7 mL + 700 μL	9,08
STD6	40,0	ΔΕ1	400	1,0	80	7 mL + 600 μL	9,08
STD7	50,0	ΔΕ1	500	1,0	80	7 mL + 500 μL	9,08
ΠΡΟΤΥΠΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΛΕΓΧΟΥ							
Δείγμα	Συγκέντρωση (μg mL ⁻¹)	Διάλυμα Εργασίας	Όγκος (μL) δ/τος εργασίας	Όγκος (mL) ούρων	Όγκος (μL) δ/τος εργασίας IS	Όγκος διαλύτη αραιώσης	Τελικός Όγκος Δείγματος (mL)
QC1	3,0	ΔΕ2	30	1,0	80	7 mL + 970 μL	9,08
QC2	7,5	ΔΕ2	75	1,0	80	7 mL + 925 μL	9,08
QC3	25,0	ΔΕ2	250	1,0	80	7 mL + 750 μL	9,08
QC4	45,0	ΔΕ2	450	1,0	80	7 mL + 550 μL	9,08

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 20: Ποσοτικός προσδιορισμός σαλικυλικού οξέος σε ούρα αλόγων με LC/QTOF-MS: Πειραματικά αποτελέσματα καμπυλών αναφοράς

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 1^{ΗΞ} ΣΕΙΡΑΣ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ					
Θεωρητική Συγκέντρωση (μg mL ⁻¹)	Απόκριση ¹			Πειραματική Συγκέντρωση ² (μg mL ⁻¹)	
	Μέση Τιμή ³	SD	%RSD ⁴	Μέση Τιμή	%E _r ⁵
2,5	0,16369	0,00071	0,4	2,46	-1,6
5,0	0,317	0,012	3,8	5,14	4,1
10,0	0,601	0,012	1,9	10,11	1,1
20,0	1,173	0,023	2,0	20,10	2,0
30,0	1,760	0,024	1,4	30,36	1,2
40,0	2,264	0,011	0,5	39,18	-2,0
50,0	2,828	0,053	1,9	49,04	-1,9
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 2^{ΗΞ} ΣΕΙΡΑΣ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ					
Θεωρητική Συγκέντρωση (μg mL ⁻¹)	Απόκριση ¹			Πειραματική Συγκέντρωση ² (μg mL ⁻¹)	
	Μέση Τιμή ³	SD	%RSD ⁴	Μέση Τιμή	%E _r ⁵
2,5	0,1758	0,0040	2,3	2,495	-0,2
5,0	0,3179	0,0049	1,5	4,940	-1,2
10,0	0,627	0,011	1,7	10,25	2,5
20,0	1,234	0,016	1,3	20,70	1,3
30,0	1,761	0,019	1,1	29,78	-0,7
40,0	2,322	0,038	1,6	39,43	-1,4
50,0	2,865	0,041	1,4	48,78	-2,4
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 3^{ΗΞ} ΣΕΙΡΑΣ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ					
Θεωρητική Συγκέντρωση (μg mL ⁻¹)	Απόκριση ¹			Πειραματική Συγκέντρωση ² (μg mL ⁻¹)	
	Μέση Τιμή ³	SD	%RSD ⁴	Μέση Τιμή	%E _r ⁵
2,5	0,1700	0,0019	1,1	2,467	-1,3
5,0	0,3163	0,0085	2,7	5,07	1,4
10,0	0,611	0,010	1,6	10,32	3,2
20,0	1,157	0,019	1,6	20,03	0,2
30,0	1,705	0,018	1,0	29,80	-0,7
40,0	2,249	0,043	1,9	39,48	-1,3
50,0	2,798	0,022	0,8	49,25	-1,5
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 4^{ΗΞ} ΣΕΙΡΑΣ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ					
Θεωρητική Συγκέντρωση (μg mL ⁻¹)	Απόκριση ¹			Πειραματική Συγκέντρωση ² (μg mL ⁻¹)	
	Μέση Τιμή ³	SD	%RSD ⁴	Μέση Τιμή	%E _r ⁵
2,5	0,1655	0,0040	2,4	2,466	-1,4
5,0	0,3073	0,0027	0,9	5,031	0,6
10,0	0,607	0,017	2,7	10,46	4,6
20,0	1,141	0,022	1,9	20,12	0,6
30,0	1,690	0,021	1,2	30,04	0,1
40,0	2,193	0,043	2,0	39,14	-2,1
50,0	2,720	0,041	1,5	48,69	-2,6

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 20: Πειραματικά αποτελέσματα καμπυλών αναφοράς μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού σαλικυλικού οξέος (συνέχεια)

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 5^{ΗΣ} ΣΕΙΡΑΣ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ					
Θεωρητική Συγκέντρωση (μg mL ⁻¹)	Απόκριση ¹			Πειραματική Συγκέντρωση ² (μg mL ⁻¹)	
	Μέση Τιμή ³	SD	%RSD ⁴	Μέση Τιμή	%E _r ⁵
2,5	0,1630	0,0048	3,0	2,435	-2,6
5,0	0,3225	0,0038	1,2	5,227	4,5
10,0	0,606	0,011	1,9	10,19	1,9
20,0	1,181	0,029	2,4	20,27	1,3
30,0	1,708	0,048	2,8	29,50	-1,7
40,0	2,265	0,010	0,5	39,25	-1,9
50,0	2,830	0,032	1,1	49,14	-1,7
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 6^{ΗΣ} ΣΕΙΡΑΣ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ					
Θεωρητική Συγκέντρωση (μg mL ⁻¹)	Απόκριση ¹			Πειραματική Συγκέντρωση ² (μg mL ⁻¹)	
	Μέση Τιμή ³	SD	%RSD ⁴	Μέση Τιμή	%E _r ⁵
2,5	0,1537	0,0038	2,5	2,457	-1,7
5,0	0,301	0,011	3,8	5,094	1,9
10,0	0,5994	0,0035	0,3	10,44	4,4
20,0	1,128	0,010	0,9	19,91	-0,5
30,0	1,6975	0,0078	0,5	30,12	0,4
40,0	2,191	0,021	1,0	38,96	-2,6
50,0	2,7559	0,0065	0,2	49,083	-1,8

¹ Λόγος επιφάνειας χρωματογραφικής κορυφής σαλικυλικού οξέος προς εσωτερικού προτύπου

² Συγκέντρωση υπολογιζόμενη από την εξίσωση συμμεταβολής που εξαγεται με τη χρήση ζυγισμένης γραμμικής ανάλυσης παλιδρόμησης με συντελεστή στατιστικού βάρους 1/x²

³ Μέση απόκριση: κάθε πρότυπο της καμπύλης αναφοράς παρασκευάζεται και αναλύεται εις διπλούν (συνολικά 4 μετρήσεις για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης)

⁴ Επί τοις εκατό σχετική τυπική απόκλιση

⁵ Επί τοις εκατό σχετικό σφάλμα πειραματικά υπολογιζόμενης συγκέντρωσης σε σχέση με τη θεωρητική

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 21: Ποσοτικός προσδιορισμός σαλικυλικού οξέος σε ούρα αλόγων με LC/QTOF-MS: Έλεγχος ορθότητας και πιστότητας: πειραματικά υπολογιζόμενες συγκεντρώσεις εμβολιασμένων δειγμάτων ελέγχου (quality control samples, QC's)

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 1 ^{ΗΣ} ΣΕΙΡΑΣ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ								
Δείγμα	<i>C</i> _{θεωρ.} 3,0 μg mL ⁻¹		<i>C</i> _{θεωρ.} 7,5 μg mL ⁻¹		<i>C</i> _{θεωρ.} 25,0 μg mL ⁻¹		<i>C</i> _{θεωρ.} 45,0 μg mL ⁻¹	
	<i>C</i> _{πειραμ.} (μg mL ⁻¹)	%E _r	<i>C</i> _{πειραμ.} (μg mL ⁻¹)	%E _r	<i>C</i> _{πειραμ.} (μg mL ⁻¹)	%E _r	<i>C</i> _{πειραμ.} (μg mL ⁻¹)	%E _r
QC1	3,101	3,4	7,85	4,7	25,02	0,1	44,2	-1,7
QC2	3,059	2,0	7,76	3,5	24,39	-2,4	45,5	1,0
QC3	2,946	-1,8	7,48	-0,3	26,26	5,0	44,4	-1,2
QC4	3,121	4,0	7,97	6,2	24,73	-1,1	46,6	-3,1
QC5	3,000	0,0	7,93	5,8	24,66	-1,3	41,8	-7,0
QC6	3,027	0,9	7,70	2,6	25,56	2,2	43,7	-2,9

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 2 ^{ΗΣ} ΣΕΙΡΑΣ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ								
Δείγμα	<i>C</i> _{θεωρ.} 3,0 μg mL ⁻¹		<i>C</i> _{θεωρ.} 7,5 μg mL ⁻¹		<i>C</i> _{θεωρ.} 25,0 μg mL ⁻¹		<i>C</i> _{θεωρ.} 45,0 μg mL ⁻¹	
	<i>C</i> _{πειραμ.} (μg mL ⁻¹)	%E _r	<i>C</i> _{πειραμ.} (μg mL ⁻¹)	%E _r	<i>C</i> _{πειραμ.} (μg mL ⁻¹)	%E _r	<i>C</i> _{πειραμ.} (μg mL ⁻¹)	%E _r
QC1	3,008	0,3	7,662	2,2	25,21	0,8	47,4	5,2
QC2	3,040	1,3	7,710	2,8	25,48	1,9	50,7	12,7
QC3	2,910	-3,0	7,731	3,1	24,64	-1,4	47,8	6,2
QC4	2,931	-2,3	7,640	1,9	25,50	2,0	47,2	4,8
QC5	3,072	2,4	7,647	2,0	25,40	1,6	45,5	1,2
QC6	3,080	2,7	7,687	2,5	24,35	-2,6	44,5	-1,0

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 21: Έλεγχος ορθότητας και πιστότητας μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού σαλικυλικού οξέος
Πειραματικά υπολογιζόμενες συγκεντρώσεις εμβολιασμένων δειγμάτων ελέγχου (quality control samples, QC's) (συνέχεια)

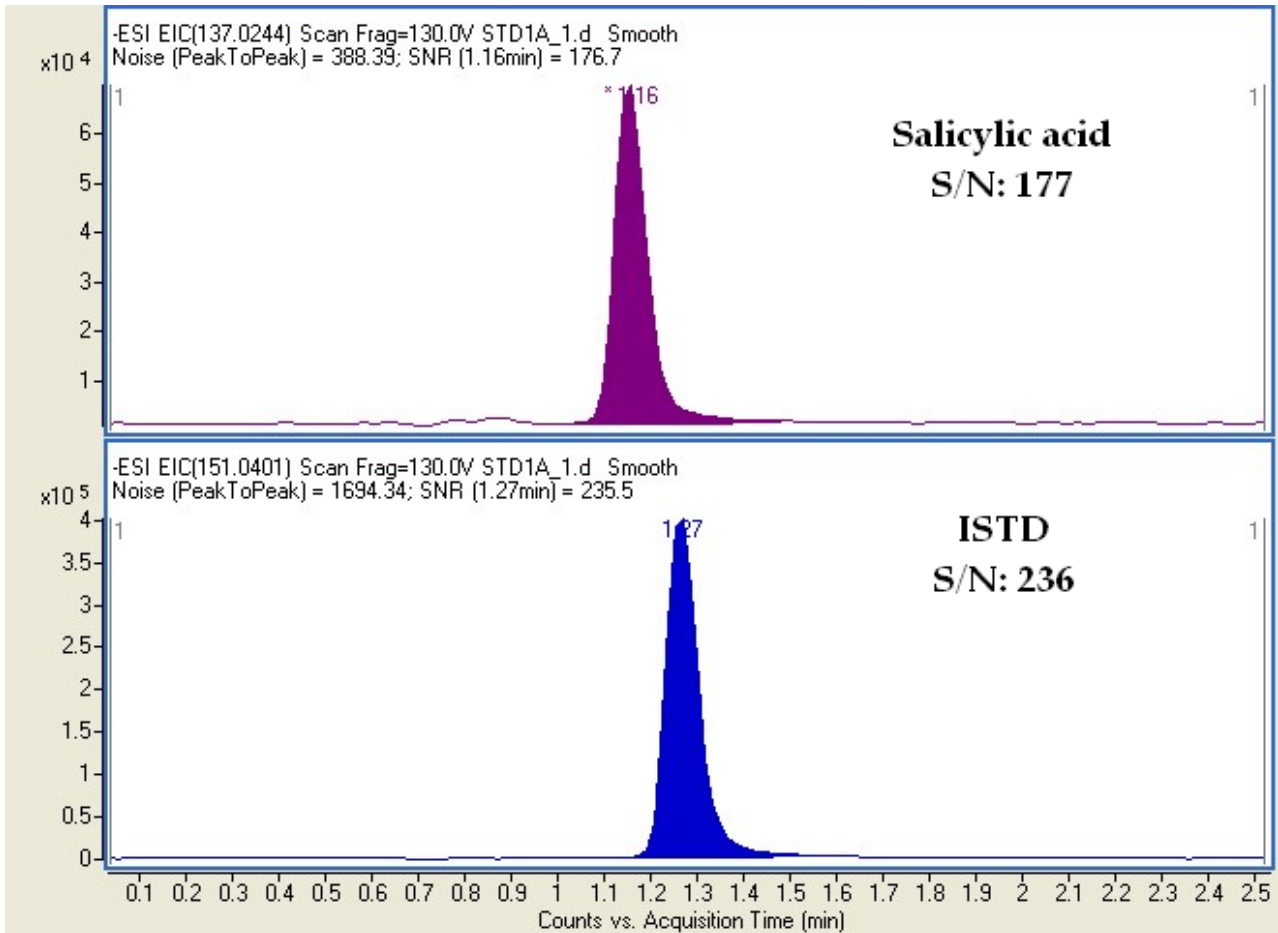
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 3^{ΗΣ} ΣΕΙΡΑΣ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ								
Δείγμα	C_{θεωρ.} 3,0 μg mL⁻¹		C_{θεωρ.} 7,5 μg mL⁻¹		C_{θεωρ.} 25,0 μg mL⁻¹		C_{θεωρ.} 45,0 μg mL⁻¹	
	C_{πειραμ.} (μg mL⁻¹)	%E_r	C_{πειραμ.} (μg mL⁻¹)	%E_r	C_{πειραμ.} (μg mL⁻¹)	%E_r	C_{πειραμ.} (μg mL⁻¹)	%E_r
QC1	2,951	-1,6	7,82	4,2	25,11	0,4	44,15	-1,9
QC2	2,835	-5,5	7,50	0,1	24,38	-2,5	45,00	0,0
QC3	3,009	0,3	7,73	3,1	25,65	2,6	44,65	-0,8
QC4	3,026	0,9	7,70	2,6	24,67	-1,3	44,45	-1,2
QC5	2,806	-6,5	7,54	0,5	24,76	-1,0	43,92	-2,4
QC6	2,865	-4,5	7,76	3,4	25,93	3,7	44,80	-0,5
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 4^{ΗΣ} ΣΕΙΡΑΣ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ								
Δείγμα	C_{θεωρ.} 3,0 μg mL⁻¹		C_{θεωρ.} 7,5 μg mL⁻¹		C_{θεωρ.} 25,0 μg mL⁻¹		C_{θεωρ.} 45,0 μg mL⁻¹	
	C_{πειραμ.} (μg mL⁻¹)	%E_r	C_{πειραμ.} (μg mL⁻¹)	%E_r	C_{πειραμ.} (μg mL⁻¹)	%E_r	C_{πειραμ.} (μg mL⁻¹)	%E_r
QC1	3,061	2,0	7,95	6,0	25,04	0,2	44,48	-1,1
QC2	2,935	-2,2	7,60	1,4	25,14	0,6	43,75	-2,8
QC3	2,957	-1,4	7,59	1,3	24,38	-2,5	44,94	-0,1
QC4	2,892	-3,6	7,49	-0,1	24,39	-2,4	43,18	-4,0
QC5	3,079	2,6	7,59	1,2	24,79	-0,8	44,89	-0,3
QC6	2,951	-1,6	7,60	1,3	24,92	-0,3	43,24	-3,9
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 5^{ΗΣ} ΣΕΙΡΑΣ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ								
Δείγμα	C_{θεωρ.} 3,0 μg mL⁻¹		C_{θεωρ.} 7,5 μg mL⁻¹		C_{θεωρ.} 25,0 μg mL⁻¹		C_{θεωρ.} 45,0 μg mL⁻¹	
	C_{πειραμ.} (μg mL⁻¹)	%E_r	C_{πειραμ.} (μg mL⁻¹)	%E_r	C_{πειραμ.} (μg mL⁻¹)	%E_r	C_{πειραμ.} (μg mL⁻¹)	%E_r
QC1	3,046	1,5	8,32	10,9	25,36	1,4	44,69	-0,7
QC2	3,020	0,7	8,08	7,8	24,42	-2,3	43,60	-3,1
QC3	2,998	-0,1	7,73	3,1	24,65	-1,4	43,35	-3,7
QC4	3,037	1,2	8,00	6,7	24,83	-0,7	43,52	-3,3
QC5	2,975	-0,8	7,59	1,2	24,48	-2,1	43,91	-2,4
QC6	3,051	1,7	7,98	6,4	24,69	-1,2	43,91	-2,4

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 21: Έλεγχος ορθότητας και πιστότητας μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού σαλικυλικού οξέος
Πειραματικά υπολογιζόμενες συγκεντρώσεις εμβολιασμένων δειγμάτων ελέγχου (quality control samples, QC's) (συνέχεια)

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 6 ^{ΗΣ} ΣΕΙΡΑΣ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ									
Δείγμα	<i>C</i> _{θεωρ.} 3,0 μg mL ⁻¹		<i>C</i> _{θεωρ.} 7,5 μg mL ⁻¹		<i>C</i> _{θεωρ.} 25,0 μg mL ⁻¹		<i>C</i> _{θεωρ.} 45,0 μg mL ⁻¹		
	<i>C</i> _{πειραμ.} (μg mL ⁻¹)	%E _r	<i>C</i> _{πειραμ.} (μg mL ⁻¹)	%E _r	<i>C</i> _{πειραμ.} (μg mL ⁻¹)	%E _r	<i>C</i> _{πειραμ.} (μg mL ⁻¹)	%E _r	
QC1	3,113	3,8	7,54	0,6	24,87	-0,5	43,77	-2,7	
QC2	3,043	1,4	7,64	1,8	24,68	-1,3	44,21	-1,8	
QC3	3,088	2,9	7,53	0,4	25,29	1,2	44,44	-1,3	
QC4	3,175	5,8	7,86	4,9	25,30	1,2	43,54	-3,3	
QC5	3,174	5,8	8,03	7,1	24,85	-0,6	43,71	-2,9	
QC6	3,103	3,4	7,86	4,9	25,19	0,8	42,45	-5,7	

%E_r: επί τοις εκατό σχετικό σφάλμα πειραματικά υπολογιζόμενης συγκέντρωσης σαλικυλικού οξέος (*C*_{πειραμ.}) σε σχέση με τη θεωρητική συγκέντρωση (*C*_{θεωρ.})

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 22: Αξιολόγηση μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού σαλικυλικού οξέος σε ούρα αλόγων με LC/QTOF-MS: χρωματογραφικά χαρακτηριστικά (S/N) στο κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης



Ιοντικό χρωματογράφημα LC/QTOF-MS εμβολιασμένου δείγματος αλόγου συγκέντρωσης 2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης σαλικυλικού οξέος)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 23: Έλεγχος ειδικότητας μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού σαλικυλικού σε ούρα αλόγων - Ουσίες που μελετήθηκαν

ΔΕΙΓΜΑ	A/A	ΟΥΣΙΑ	ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ
Spec(1)	1	Acetaminophen	Αντιφλεγμονώδες (ΜΣΑΦ)
	2	Alglufenac	Αντιφλεγμονώδες (ΜΣΑΦ)
	3	Amobarbital	Βαρβιτουρικό
	4	Caprofen	Αντιφλεγμονώδες (ΜΣΑΦ)
	5	Clanobutin sodium	Χολαιρετικό
	6	Diclofenac	Αντιφλεγμονώδες (ΜΣΑΦ)
	7	Diflunisal	Αντιφλεγμονώδες (ΜΣΑΦ)
	8	Etodolac	Αντιφλεγμονώδες (ΜΣΑΦ)
	9	Fenbufen	Αντιφλεγμονώδες (ΜΣΑΦ)
	10	Fenoprofen	Αντιφλεγμονώδες (ΜΣΑΦ)
	11	Flufenamic acid	Αντιφλεγμονώδες (ΜΣΑΦ)
	12	Flunixin	Αντιφλεγμονώδες (ΜΣΑΦ)
	13	Flurbiprofen	Αντιφλεγμονώδες (ΜΣΑΦ)
	14	Ibuprofen	Αντιφλεγμονώδες (ΜΣΑΦ)
	15	Indoprofen	Αντιφλεγμονώδες (ΜΣΑΦ)
	16	Ketoprofen	Αντιφλεγμονώδες (ΜΣΑΦ)
	17	Meclofenamic acid	Αντιφλεγμονώδες (ΜΣΑΦ)
	18	Mofebutazone	Αντιφλεγμονώδες (ΜΣΑΦ)
	19	Nabumetone	Αντιφλεγμονώδες (ΜΣΑΦ)
	20	Naproxene	Αντιφλεγμονώδες (ΜΣΑΦ)
	21	Niflumic acid	Αντιφλεγμονώδες (ΜΣΑΦ)
	22	Nimesulide	Αντιφλεγμονώδες (ΜΣΑΦ)
	23	Oxyphenbutazone	Αντιφλεγμονώδες (ΜΣΑΦ)
	24	Phenylbutazone	Αντιφλεγμονώδες (ΜΣΑΦ)
	25	Salicylamide	Αντιφλεγμονώδες (ΜΣΑΦ)
	26	Thiosalicylic acid	Αντιφλεγμονώδες (ΜΣΑΦ)
	27	Tolfenamic acid	Αντιφλεγμονώδες (ΜΣΑΦ)
	28	Zomepirac	Αντιφλεγμονώδες (ΜΣΑΦ)
	29	Cinchofen	Αναλγητικό
	30	Suprofen	Αντιφλεγμονώδες (ΜΣΑΦ)
	31	Indomethacine	Αντιφλεγμονώδες (ΜΣΑΦ)
	32	Famprofazone	Αντιφλεγμονώδες (ΜΣΑΦ)
	33	Nifenazone	Αντιφλεγμονώδες (ΜΣΑΦ)
	34	Suxibuzone	Αντιφλεγμονώδες (ΜΣΑΦ)
	35	Tolmetin	Αντιφλεγμονώδες (ΜΣΑΦ)
	36	Acemetacin	Αντιφλεγμονώδες (ΜΣΑΦ)
	37	Valdecocixib	Αντιφλεγμονώδες (ΜΣΑΦ)
	38	Celecoxib	Αντιφλεγμονώδες (ΜΣΑΦ)
	39	Mefenamic acid	Αντιφλεγμονώδες (ΜΣΑΦ)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 23: Έλεγχος ειδικότητας μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού σαλικυλικού οξέος - Ουσίες που μελετήθηκαν

ΔΕΙΓΜΑ	A/A	ΟΥΣΙΑ	ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ
Spec(2)	40	Atenolol	β-Ανταγωνιστής
	41	Betamethasone	Κορτικοστεροειδές
	42	Boldenone	Αναβολικό στεροειδές
	43	Dexamethasone	Κορτικοστεροειδές
	44	Triamcinolone acetonide	Κορτικοστεροειδές
Spec(3)	45	Meloxicam	Αντιφλεγμονώδες (ΜΣΑΦ)
	46	Flufenamic acid	Αντιφλεγμονώδες (ΜΣΑΦ)
	47	Flunixin	Αντιφλεγμονώδες (ΜΣΑΦ)
	48	Furosemide	Διουρητικό
	49	Ketoprofen	Αντιφλεγμονώδες (ΜΣΑΦ)
	50	Phenylbutazone	Αντιφλεγμονώδες (ΜΣΑΦ)
	51	Hydrochlorothiazide	Διουρητικό
	52	Phenobarbital	Βαρβιτουρικό
	53	Ethacrynic acid	Διουρητικό
	54	Bumetanide	Διουρητικό
Spec(4)	55	2,3-Dihydroxy-benzoic acid	
	56	2,5-Dihydroxy-benzoic acid	
	57	Benzoic acid	
	58	Nalidixic acid	

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 24: Αξιολόγηση μεθόδου LC/QTOF-MS για την ταυτοποίηση (επιβεβαίωση) του σαλικυλικού οξέος σε ούρα αλόγων

Δείγμα	C _{SA} (μg mL ⁻¹)	Χρόνοι Ανάσχεσης ¹			% Σχετ. Αναλογίες Διαγνωστικών Ιόντων ²		
		RT _{SA} ¹ (min)	RT _{IS} ¹ (min)	RRT ¹	m/z 137,0244	m/z 93,0346	m/z 65,0397
1	3,0	1,24	1,34	0,9254	100,0 %	35,1	10,5
2	3,0	1,24	1,34	0,9254	100,0 %	34,7	10,6
3	7,5	1,24	1,34	0,9254	100,0 %	34,7	10,4
4	7,5	1,24	1,34	0,9254	100,0 %	33,3	10,0
5	25	1,22	1,34	0,9104	100,0 %	33,9	10,0
6	25	1,23	1,34	0,9179	100,0 %	33,4	10,3
7	45	1,24	1,34	0,9254	100,0 %	39,1	11,2
8	45	1,23	1,34	0,9179	100,0 %	39,5	11,6
9	2,5	1,24	1,34	0,9254	100,0 %	34,8	11,2
10	2,5	1,23	1,34	0,9179	100,0 %	32,6	9,9
11	5	1,24	1,34	0,9254	100,0 %	34,7	10,0
12	5	1,23	1,34	0,9179	100,0 %	35,1	10,5
13	10	1,24	1,34	0,9254	100,0 %	34,4	10,0
14	10	1,23	1,34	0,9179	100,0 %	32,3	9,8
15	20	1,24	1,34	0,9254	100,0 %	32,5	9,7
16	20	1,23	1,34	0,9179	100,0 %	32,8	9,8
17	40	1,24	1,34	0,9254	100,0 %	43,3	12,9
18	40	1,23	1,34	0,9179	100,0 %	44,2	12,7
19	50	1,23	1,34	0,9179	100,0 %	39,3	11,5
20	50	1,24	1,34	0,9254	100,0 %	40,2	12,1
Mean				0,9216	100,0 %	36,0	10,7
SD				0,0045		3,6	1,0

Δείγμα	C _{SA} (μg mL ⁻¹)	Σφάλμα m/z / Ανάλυση MS		Σφάλμα m/z / Ανάλυση MS/MS		
		m/z 137,0244	m/z 151,0401	m/z 137,0244	m/z 93,0346	m/z 65,0397
1	3,0	2,2	0,0	8,0	6,4	18,5
2	3,0	1,5	0,1	7,3	6,4	15,4
3	7,5	1,5	0,0	6,6	6,4	10,8
4	7,5	0,0	0,0	7,3	6,4	12,3
5	25	2,2	0,2	4,4	5,4	9,2
6	25	1,5	0,0	5,1	6,4	12,3
7	45	1,5	0,0	4,4	4,3	12,3
8	45	2,2	0,0	4,4	5,4	9,2
9	2,5	1,5	0,0	0,7	1,1	4,6
10	2,5	2,2	0,2	5,8	10,7	6,2
11	5	0,0	0,1	4,4	5,4	9,2
12	5	1,5	0,0	9,5	11,8	3,1
13	10	0,7	0,0	5,1	8,6	6,2
14	10	0,7	0,0	5,1	8,6	10,8
15	20	1,5	0,1	3,6	8,6	13,8
16	20	1,5	0,1	5,8	5,4	13,8
17	40	2,2	0,1	3,6	6,4	12,3
18	40	2,2	0,1	5,1	6,4	12,3
19	50	2,2	0,0	2,9	4,3	12,3
20	50	3,6	0,1	2,9	4,3	10,8
Mean		1,6	0,0	5,1	6,4	10,3
SD		0,8	0,1	2,0	2,4	4,9

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 25: Ποσοτικός προσδιορισμός 3-Μεθοξυτυραμίνης σε Ούρα Αλόγων με HILIC/QTOF-MS: Πρότυπα Διαλύματα Παρακαταθήκης και Εργασίας

ΠΡΟΤΥΠΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΠΑΡΑΚΑΤΑΘΗΚΗΣ (ΔΠ)						
Διάλυμα	Ουσία	Συγκέντρωση (μg mL ⁻¹)	Ζυγισθείσα ποσότητα (μικτό βάρος) (g) ³	Ζυγισθείσα ποσότητα (καθαρό βάρος) (mg) ⁴	Διαλύτης Διάλυσης	Όγκος (mL)
ΔΠ(1)	3-MT ¹	3120	0,0192	15,60	μεθανόλη/νερό 50/50 (v/v)	5
ΔΠ(2)	3-MT ¹	2877	0,0177	14,38	μεθανόλη/νερό 50/50 (v/v)	5
ΔΠ(3)	3-MT-d ₄ ²	918	0,0056	4,59	μεθανόλη/νερό 50/50 (v/v)	5
ΠΡΟΤΥΠΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ (ΔΕ)						
Διάλυμα	Ουσία	Συγκέντρωση (μg mL ⁻¹)	Αρχικό Διάλυμα	Όγκος αρχικού διαλύματος (μL)	Διαλύτης Αραίωσης	Τελικός όγκος (mL)
ΔΕ(1)	3-MT ¹	250	ΔΠ(1)	801	μεθανόλη	10
ΔΕ(2)	3-MT ¹	250	ΔΠ(2)	869	μεθανόλη	10
ΔΕ(3)	3-MT-d ₄ ²	100	ΔΠ(3)	545	μεθανόλη	5

¹ 3-MT: 3-μεθοξυτυραμίνη (3-methoxytyramine), (μικτό μοριακό βάρος: 203,7 – καθαρό μοριακό βάρος: 167,2)

² 3-MT-d₄: 3-μεθοξυτυραμίνη-1,1,2,2-d₄ (εσωτερικό πρότυπο, IS) (μικτό μοριακό βάρος: 207,6 – καθαρό μοριακό βάρος: 171,1)

³ ζυγισθείσα ποσότητα στερεής πρότυπης ουσίας με τη μορφή υδροχλωρικού άλατος

⁴ υπολογίζεται λαμβάνοντας υπόψη την καθαρότητα του προτύπου και το καθαρό μοριακό βάρος της ουσίας

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 26: Ποσοτικός προσδιορισμός 3-Μεθοξυτυραμίνης σε Ούρα Αλόγων με HILIC/QTOF-MS: Παρασκευή προτύπων δειγμάτων καμπύλης αναφοράς και δειγμάτων ελέγχου

ΠΡΟΤΥΠΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ (STD's)							
Δείγμα	Συγκέντρωση (μg mL ⁻¹)	Διάλυμα Εργασίας	Όγκος (μL) δ/τος εργασίας	Όγκος (mL) ούρων	Όγκος (μL) δ/τος εργασίας IS	Όγκος (μL) νερού	Τελικός Όγκος Δείγματος (mL)
Blank	0	-	-	2,5	-	260	2,76
Zero	0	-	-	2,5	60	200	2,76
STD1	1	ΔΕ1	10	2,5	60	190	2,76
STD2	2,5	ΔΕ1	25	2,5	60	175	2,76
STD3	5	ΔΕ1	50	2,5	60	150	2,76
STD4	10	ΔΕ1	100	2,5	60	100	2,76
STD5	15	ΔΕ1	150	2,5	60	50	2,76
STD6	20	ΔΕ1	200	2,5	60	-	2,76
ΠΡΟΤΥΠΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΛΕΓΧΟΥ (QC's)							
Δείγμα	Συγκέντρωση (μg mL ⁻¹)	Διάλυμα Εργασίας	Όγκος (μL) δ/τος εργασίας	Όγκος (mL) ούρων	Όγκος (μL) δ/τος εργασίας IS	Όγκος διαλύτη αραιώσης	Τελικός Όγκος Δείγματος (mL)
QC1	2	ΔΕ2	20	2,5	60	180	2,76
QC2	4	ΔΕ2	40	2,5	60	160	2,76
QC3	12	ΔΕ2	120	2,5	60	80	2,76
QC4	18	ΔΕ1	180	2,5	60	20	2,76

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 27: Αξιολόγηση μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού 3-μεθοξυτυραμίνης σε ούρα αλόγων με HILIC/QTOF-MS: Αποτελέσματα καμπυλών αναφοράς

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 1^{ΗΣ} ΣΕΙΡΑΣ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ					
Θεωρητική Συγκέντρωση (μg mL ⁻¹)	Απόκριση ¹			Πειραματική Συγκέντρωση ² (μg mL ⁻¹)	
	Μέση Τιμή ³	SD	%RSD ⁴	Μέση Τιμή	%E _r ⁵
1	0,563	0,015	2,5	0,99	-0,6
2,5	1,314	0,034	2,6	2,46	-1,4
5	2,592	0,071	2,7	4,97	-0,6
10	5,248	0,074	1,4	10,17	1,7
15	7,65	0,20	2,6	14,89	-0,7
20	10,27	0,28	2,7	20,01	0,1
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 2^{ΗΣ} ΣΕΙΡΑΣ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ					
Θεωρητική Συγκέντρωση (μg mL ⁻¹)	Απόκριση ¹			Πειραματική Συγκέντρωση ² (μg mL ⁻¹)	
	Μέση Τιμή ³	SD	%RSD ⁴	Μέση Τιμή	%E _r ⁵
1	0,563	0,014	2,5	0,97	-2,9
2,5	1,371	0,026	1,9	2,48	-0,8
5	2,65	0,14	5,3	4,87	-2,6
10	5,55	0,15	2,7	10,29	2,9
15	8,07	0,24	3,0	15,00	0,0
20	10,69	0,46	4,3	19,90	-0,5
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 3^{ΗΣ} ΣΕΙΡΑΣ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ					
Θεωρητική Συγκέντρωση (μg mL ⁻¹)	Απόκριση ¹			Πειραματική Συγκέντρωση ² (μg mL ⁻¹)	
	Μέση Τιμή ³	SD	%RSD ⁴	Μέση Τιμή	%E _r ⁵
1	0,563	0,016	2,9	0,93	-7,1
2,5	1,369	0,036	2,6	2,47	-1,3
5	2,75	0,10	3,7	5,10	2,1
10	5,27	0,15	2,9	9,92	-0,8
15	8,04	0,31	3,9	15,22	1,5
20	10,47	0,12	1,1	19,86	-0,7
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 4^{ΗΣ} ΣΕΙΡΑΣ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ					
Θεωρητική Συγκέντρωση (μg mL ⁻¹)	Απόκριση ¹			Πειραματική Συγκέντρωση ² (μg mL ⁻¹)	
	Μέση Τιμή ³	SD	%RSD ⁴	Μέση Τιμή	%E _r ⁵
1	0,572	0,014	2,4	1,11	10,8
2,5	1,282	0,027	2,1	2,47	-1,1
5	2,564	0,092	3,6	4,94	-1,2
10	5,16	0,10	2,0	9,92	-0,8
15	7,81	0,13	1,7	15,02	0,1
20	10,42	0,22	2,1	20,04	0,2

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 27: Αξιολόγηση μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού 3-μεθοξυτυραμίνης - Αποτελέσματα καμπυλών αναφοράς

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 5^{ΗΣ} ΣΕΙΡΑΣ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ					
Θεωρητική Συγκέντρωση (μg mL ⁻¹)	Απόκριση ¹			Πειραματική Συγκέντρωση ² (μg mL ⁻¹)	
	Μέση Τιμή ³	SD	%RSD ⁴	Μέση Τιμή	%E _r ⁵
1	0,528	0,034	6,5	1,00	0,3
2,5	1,321	0,021	1,6	2,54	1,8
5	2,543	0,097	3,8	4,92	-1,6
10	5,21	0,17	3,3	10,12	1,2
15	7,64	0,16	2,1	14,83	-1,1
20	10,34	0,17	1,6	20,08	0,4

¹ Λόγος επιφάνειας χρωματογραφικής κορυφής 3-μεθοξυτυραμίνης προς εσωτερικού προτύπου

² Συγκέντρωση υπολογιζόμενη από την εξίσωση συμμεταβολής που εξάγεται με τη χρήση γραμμικής ανάλυσης παλιδρόμησης

³ Μέση απόκριση: κάθε πρότυπο της καμπύλης αναφοράς παρασκευάζεται και αναλύεται εις διπλούν (συνολικά 4 μετρήσεις για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης)

⁴ Επί τοις εκατό σχετική τυπική απόκλιση

⁵ Επί τοις εκατό σχετικό σφάλμα πειραματικά υπολογιζόμενης συγκέντρωσης της 3—μεθοξυτυραμίνης σε σχέση με τη θεωρητική

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 28: Αξιολόγηση μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού 3-μεθοξυτυραμίνης σε ούρα αλόγων με HILIC/QTOF-MS - Έλεγχος ορθότητας και πιστότητας: πειραματικά υπολογιζόμενες συγκεντρώσεις εμβολιασμένων δειγμάτων ελέγχου (quality control samples, QC's)

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 1 ^{ΗΣ} ΣΕΙΡΑΣ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ								
Δείγμα	<i>C</i> _{θεωρ.} 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$		<i>C</i> _{θεωρ.} 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$		<i>C</i> _{θεωρ.} 12 $\mu\text{g mL}^{-1}$		<i>C</i> _{θεωρ.} 18 $\mu\text{g mL}^{-1}$	
	<i>C</i> _{πειραμ.} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	%E _r	<i>C</i> _{πειραμ.} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	%E _r	<i>C</i> _{πειραμ.} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	%E _r	<i>C</i> _{πειραμ.} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	%E _r
QC1	1,761	-11,9	3,90	-2,6	11,95	-0,4	18,73	4,1
QC2	1,870	-6,5	3,85	-3,8	11,72	-2,3	17,93	-0,4
QC3	1,893	-5,4	4,11	2,9	11,73	-2,3	17,23	-4,3
QC4	1,929	-3,6	3,96	-1,0	11,28	-6,0	17,55	-2,5
QC5	1,936	-3,2	3,91	-2,3	11,62	-3,2	17,90	-0,6
QC6	2,142	7,1	3,77	-5,8	12,45	3,7	19,12	6,2

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 2 ^{ΗΣ} ΣΕΙΡΑΣ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ								
Δείγμα	<i>C</i> _{θεωρ.} 3,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$		<i>C</i> _{θεωρ.} 7,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$		<i>C</i> _{θεωρ.} 25,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$		<i>C</i> _{θεωρ.} 45,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$	
	<i>C</i> _{πειραμ.} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	%E _r	<i>C</i> _{πειραμ.} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	%E _r	<i>C</i> _{πειραμ.} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	%E _r	<i>C</i> _{πειραμ.} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	%E _r
QC1	1,930	-3,5	3,91	-2,3	11,62	-3,2	17,41	-3,3
QC2	1,967	-1,6	3,71	-7,1	11,45	-4,6	17,78	-1,2
QC3	1,929	-3,5	3,56	-10,9	10,80	-10,0	18,56	3,1
QC4	1,971	-1,5	3,76	-6,0	11,74	-2,1	16,86	-6,3
QC5	1,807	-9,7	3,72	-6,9	11,53	-3,9	17,82	-1,0
QC6	1,931	-3,4	3,85	-3,8	12,68	5,7	18,01	0,1

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 28: Αξιολόγηση μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού 3-μεθοξυτυραμίνης - Έλεγχος ορθότητας και πιστότητας Πειραματικά υπολογιζόμενες συγκεντρώσεις εμβολιασμένων δειγμάτων ελέγχου (quality control samples, QC's) (συνέχεια)

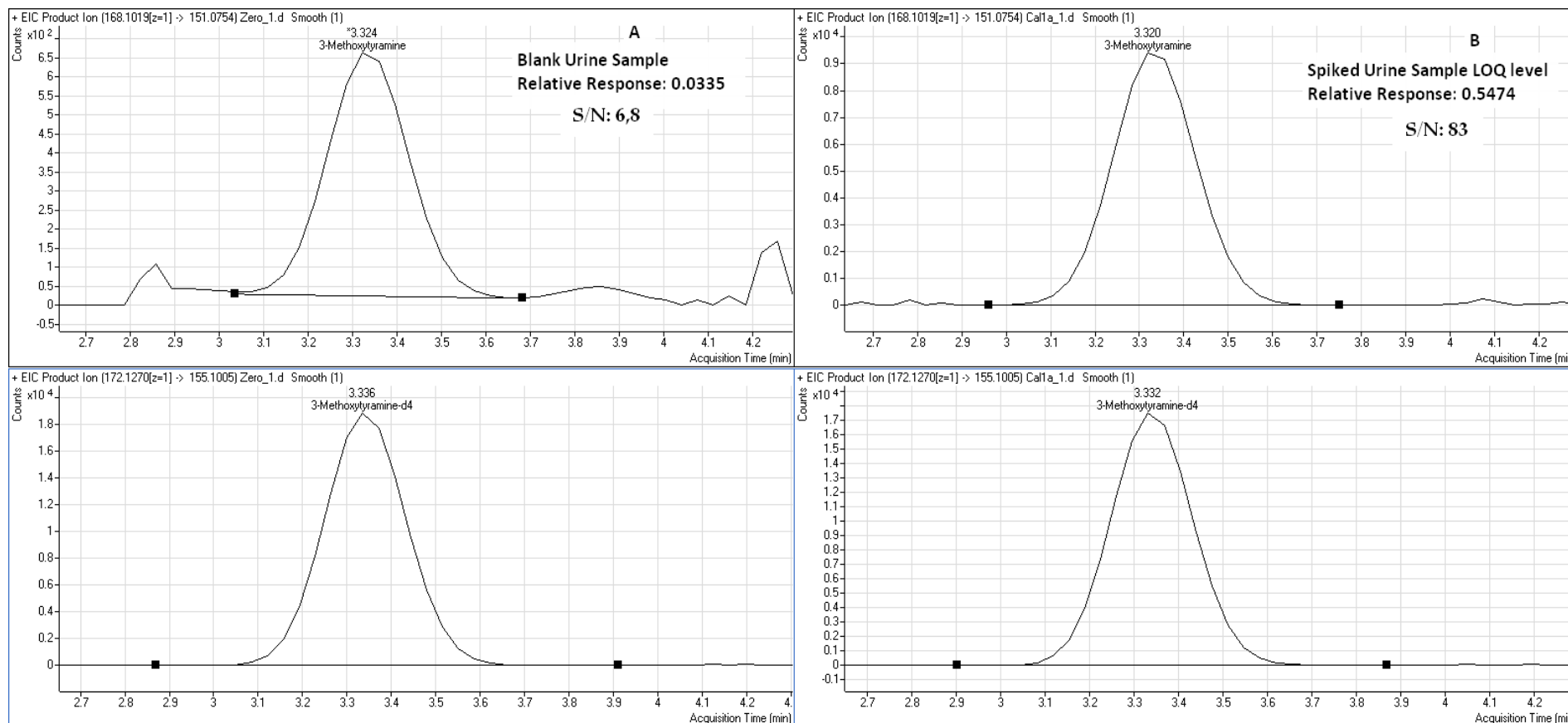
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 3 ^{ΗΣ} ΣΕΙΡΑΣ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ								
Δείγμα	<i>C</i> _{θεωρ.} 3,0 μg mL ⁻¹		<i>C</i> _{θεωρ.} 7,5 μg mL ⁻¹		<i>C</i> _{θεωρ.} 25,0 μg mL ⁻¹		<i>C</i> _{θεωρ.} 45,0 μg mL ⁻¹	
	<i>C</i> _{πειραμ.} (μg mL ⁻¹)	%E _r	<i>C</i> _{πειραμ.} (μg mL ⁻¹)	%E _r	<i>C</i> _{πειραμ.} (μg mL ⁻¹)	%E _r	<i>C</i> _{πειραμ.} (μg mL ⁻¹)	%E _r
QC1	2,102	5,1	3,76	-6,1	10,70	-10,8	17,54	-2,5
QC2	1,927	-3,6	3,91	-2,2	11,96	-0,3	16,41	-8,8
QC3	1,978	-1,1	3,95	-1,3	11,76	-2,0	17,56	-2,5
QC4	1,914	-4,3	3,86	-3,4	11,75	-2,1	19,10	6,1
QC5	1,960	-2,0	4,16	4,0	11,62	-3,2	18,47	2,6
QC6	1,881	-5,9	4,04	1,0	11,04	-8,0	17,84	-0,9

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 4 ^{ΗΣ} ΣΕΙΡΑΣ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ								
Δείγμα	<i>C</i> _{θεωρ.} 3,0 μg mL ⁻¹		<i>C</i> _{θεωρ.} 7,5 μg mL ⁻¹		<i>C</i> _{θεωρ.} 25,0 μg mL ⁻¹		<i>C</i> _{θεωρ.} 45,0 μg mL ⁻¹	
	<i>C</i> _{πειραμ.} (μg mL ⁻¹)	%E _r	<i>C</i> _{πειραμ.} (μg mL ⁻¹)	%E _r	<i>C</i> _{πειραμ.} (μg mL ⁻¹)	%E _r	<i>C</i> _{πειραμ.} (μg mL ⁻¹)	%E _r
QC1	2,076	3,8	4,11	2,6	11,44	-4,7	18,40	2,2
QC2	2,045	2,2	4,23	5,8	12,41	3,4	17,67	-1,8
QC3	1,989	-0,5	4,25	6,3	12,05	0,4	18,18	1,0
QC4	2,048	2,4	3,90	-2,5	11,71	-2,4	18,45	2,5
QC5	2,026	1,3	4,04	1,1	12,23	1,9	17,71	-1,6
QC6	2,026	1,3	4,14	3,4	12,02	0,2	17,98	-0,1

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 5 ^{ΗΣ} ΣΕΙΡΑΣ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ								
Δείγμα	<i>C</i> _{θεωρ.} 3,0 μg mL ⁻¹		<i>C</i> _{θεωρ.} 7,5 μg mL ⁻¹		<i>C</i> _{θεωρ.} 25,0 μg mL ⁻¹		<i>C</i> _{θεωρ.} 45,0 μg mL ⁻¹	
	<i>C</i> _{πειραμ.} (μg mL ⁻¹)	%E _r	<i>C</i> _{πειραμ.} (μg mL ⁻¹)	%E _r	<i>C</i> _{πειραμ.} (μg mL ⁻¹)	%E _r	<i>C</i> _{πειραμ.} (μg mL ⁻¹)	%E _r
QC1	2,121	6,1	4,11	2,7	11,27	-6,1	17,96	-0,2
QC2	2,108	5,4	3,98	-0,4	12,31	2,5	17,72	-1,5
QC3	1,969	-1,6	4,11	2,8	12,85	7,1	17,81	-1,0
QC4	2,088	4,4	4,05	1,2	12,22	1,8	17,48	-2,9
QC5	2,111	5,5	3,86	-3,6	11,92	-0,7	18,45	2,5
QC6	2,039	1,9	4,07	1,7	11,44	-4,6	17,36	-3,6

%E_r: επί τοις εκατό σχετικό σφάλμα της πειραματικά υπολογιζόμενης συγκέντρωσης της 3-μεθοξυτυραμίνης σε σχέση (*C*_{πειραμ.}) με τη θεωρητική συγκέντρωση (*C*_{θεωρ.})

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 29: Αξιολόγηση μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού 3-μεθοξυτυραμίνης σε ούρα αλόγων με HILIC/QTOF-MS: Έλεγχος ειδικότητας-παρεμποδίσεων από το υπόστρωμα



Χρωματογραφήματα HILIC/QTOF-MS λευκού (μη εμβολιασμένου) δείγματος ούρων (A) και προτύπου δείγματος εμβολιασμένου με 3-μεθοξυτυραμίνη στο χαμηλότερο όριο ποσοτικοποίησης της μεθόδου (STD1, 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Βιβλιογραφία

1. A. Κουτσελίνης, *Doping: Συνοπτική παρουσίαση του προβλήματος*, 1987.
2. A brief history of anti-doping <http://www.wada-ama.org/en/About-WADA/History/A-Brief-History-of-Anti-Doping/> (Τελευταία επίσκεψη Ιούλιος 2011).
3. WADA History <http://www.wada-ama.org/en/About-WADA/History/WADA-History/> (Τελευταία επίσκεψη Ιούλιος 2011).
4. L. Prokop, *The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*, 1970; **10**: 45-48
5. M.Thevis, W.Schänzer, *Mass Spectrometry Reviews*, 2007; **26**: 79-107
6. G. Trout, R. Kazlauskas, *Chemical Society Reviews*, 2004; **33**: 1-13
7. P. Hemmersbach, *Journal of Mass Spectrometry*, 2008; **43**: 829-853
8. C. Shackleton, *Steroids*, 2003; **74**: 288-295
9. R. K. Muller, History of doping and doping control, D. Thieme and P. Hemmersbach (eds.), *Doping in Sports, Handbook of Experimental Pharmacology 195*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010, 1-23.
10. L. D. Bowers, Science and the rules governing antidoping violations, D. Thieme and P. Hemmersbach (eds.), *Doping in Sports, Handbook of Experimental Pharmacology 195*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010, 513-531.
11. G. Lippi, M. Franchini, G. C. Guidi, *British Medical Bulletin*, 2008; **86**: 95-107
12. World Anti-Doping Agency, World Anti-doping Code http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-The_Code_/WADA_Anti_Doping_CODE2009_EN.pdf (Τελευταία επίσκεψη Ιούλιος 2011).
13. WADA, World Anti-Doping Program <http://www.wada-ama.org/en/World-Anti-Doping-Program/> (Τελευταία επίσκεψη Ιούλιος 2011).
14. WADA, International Standards, <http://www.wada-ama.org/en/World-Anti-Doping-Program/Sports-and-Anti-Doping-Organizations/International-Standards/> (Τελευταία επίσκεψη Ιούλιος 2011).
15. WADA, International Standard for Testing, http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-IS-Testing_/WADA_Int_Standard_Testing_2009_EN.pdf (Τελευταία επίσκεψη Ιούλιος 2011).
16. WADA, International Standard for Laboratories, http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-IS-Laboratories_/WADA_Int_Standard_Laboratories_2009_EN.pdf (Τελευταία επίσκεψη Ιούλιος 2011).

17. WADA, International Standard for TUE, http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-IS-TUE/2011_WADA_ISTUE_2011_EN.pdf (Τελευταία επίσκεψη Ιούλιος 2011).
18. WADA, International Standard for the protection of privacy and personal information, http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-IS-PPPI/WADA_IS_PPPI_2009_EN.pdf (Τελευταία επίσκεψη Ιούλιος 2011).
19. WADA, The 2011 Prohibited List International Standard, http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-Prohibited-list/To_be_effective/WADA_Prohibited_List_2011_EN.pdf (Τελευταία επίσκεψη Ιούλιος 2011).
20. WADA, Explanatory notes on the 2011 Prohibited List, http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-Prohibited-list/To_be_effective/WADA_Explanatory_Notes_Prohibited_List_EN.pdf (Τελευταία επίσκεψη Ιούλιος 2011).
21. Σ. Αθανασέλης, Ε. Καμπερίδου, Ι. Λαίος, Σ. Χαρίτου, Ντόπινγκ Σύγχρονη θεώρηση του προβλήματος, Ε.Σ.ΚΑ.Ν, <http://www.eskan.gr/pdfviewer.php?id=/res/file/pubs/monografia.pdf> (Τελευταία επίσκεψη Ιούλιος 2011).
22. Μ. Σκουρολιάκου, Αθλητισμός και Φάρμακα, Ινστιτούτο Φαρμακευτικής Έρευνας και Τεχνολογίας, 2005
23. WADA, Technical Document –TD2009EAAS, Endogenous Anabolic Androgenic Steroids: Testing, Reporting, Interpretive Guidance, http://www.wada-ama.org/Documents/News_Center/WADA_TD2009EAAS_Endogenous_Anabolic_Androgenic_Steroids_Oct2009.pdf (Τελευταία επίσκεψη Ιούλιος 2011).
24. Ολυμπιακό Αθλητικό Κέντρο Αθηνών 'Σπύρος Λούης', Διαδικασίες Ελέγχου Ντόπινγκ Αθλητών, http://www.oaka.com.gr/article_detail.asp?e_cat_serial=001006003002009002&e_cat_id=301&e_article_id=384 (Τελευταία επίσκεψη Ιούλιος 2011).
25. Μ. Τσιβου, Ν. Κιουκία-Fougia, Ε. Λυρίς, Υ. Αγγελίς, Α. Φραγκάκη, Χ. Κιουσί, Φ. Σιμίτσεκ, Η. Διμοπούλου, Ι.-Ρ. Λεοντίου, Μ. Στάμου, Μ.-Η. Σπυριδάκη, C. Γεοργακόπουλος, *Analytica Chimica Acta*, 2006; **555**: 1-13
26. R. Klaus Mueller, J. Grosse, R. Lang, D. Thieme, *Journal of Chromatography B*, 2006; **674**: 1-11
27. Μ.-Η. Σπυριδάκη, Ρ. Κιουσί, Α. Βοναπάρτι, Ρ. Βαλαβανί, Β. Ζονάρας, Μ. Ζαχαρίου, Ε. Σιάνος, Γ. Τσουπράς, C. Γεοργακόπουλος, *Analytica Chimica Acta*, 2006; **573-574**: 242-249
28. Α.Γ. Φραγκάκη, Ι.-Ρ. Λεοντίου, Ν. Κιουκία-Fougia, Μ. Τσιβου, Μ.-Η.Ε. Σπυριδάκη, C.Γ. Γεοργακόπουλος, *Technovation*, 2006; **264**: 1162-1169

29. WADA, Technical Document –TD2010MRPL, Minimum Required Performance Levels for Detection of prohibited Substances, [http://www.wada-ama.org/Documents/World Anti-Doping Program/WADP-IS-Laboratories/WADA_TD2010MRPLv1.0_Minimum%20Required%20Performance%20Levels_Sept%2001%202010_EN.pdf](http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-IS-Laboratories/WADA_TD2010MRPLv1.0_Minimum%20Required%20Performance%20Levels_Sept%2001%202010_EN.pdf) (Τελευταία επίσκεψη Ιούλιος 2011).
30. T.Tobin , *Drugs and the performance horse*, Charles C. Thomas Publisher. Springfield, Illinois, USA, 1981
31. E. Houghton, S. Maynard Some aspects of doping and medication control in equine sports, D. Thieme and P. Hemmersbach (eds.), *Doping in Sports, Handbook of Experimental Pharmacology 195*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010, 513-531.
32. Association of Official Racing Chemists, Historical background of Doping Control, <http://cobra.vdl.iastate.edu/aorc-2/history.htm;jsessionid=D344EB59A4C0A2A777273E7451F5411F>
33. P.M. Webbon, *Proceedings of the 13th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*, 2000, Cambridge, R&W Publications Ltd, New Market, UK, 34-35.
34. Smith R.L., *Proceedings of the 13th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*, 2000, Cambridge, R&W Publications Ltd, New Market, UK, 9-14.
35. J.P. Scarth, P. Teale, T. Kuuranne, *Drug Testing and Analysis*, 2011; **1**: 19-53
36. International Federation of Horseracing Authorities, International Agreement on breeding, racing and wagering, Article 6, March 2011, available on line at http://www.horseracingintfed.com/resources/2011_choose_eng.pdf (Τελευταία επίσκεψη Ιούλιος 2011).
37. International Laboratory Accreditation Cooperation, Accreditation requirements and operating criteria for horseracing laboratories, ILAC-G7:06/2009, available on line at http://www.ilac.org/documents/ILAC_G7_06_2009.pdf (Τελευταία επίσκεψη Ιούλιος 2011).
38. Association of Racing Commissioners International, Inc., Uniform classification guidelines for foreign substances and recommended penalties and model rule, Version 1.1- Revised January 2011, available on line at <http://www.arci.com/druglisting.pdf> (Τελευταία επίσκεψη Ιούλιος 2011).
39. Fédération Equestre Internationale, 2011 FEI Equine Prohibited Substances List, http://www.fei.org/sites/default/files/file/VETERINARY/Doping_and_Controlled_Medication/2011_Equine_Prohibited_List.pdf (Τελευταία επίσκεψη Ιούλιος 2011).
40. E. Houghton, D.L. Crone, *Proceedings of the 13th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*, 2000, Cambridge, R&W Publications Ltd, New Market, UK, 34-35.

41. Fédération Equestre Internationale, FEI Standard for laboratories, May 2011, [http://www.fei.org/sites/default/files/file/VETERINARY/Doping and Controlled Medication/FEI%20Standard%20for%20Laboratories%20-%20May%202011%20-%20CLEAN.pdf](http://www.fei.org/sites/default/files/file/VETERINARY/Doping_and_Controlled_Medication/FEI%20Standard%20for%20Laboratories%20-%20May%202011%20-%20CLEAN.pdf) (Τελευταία επίσκεψη Ιούλιος 2011).
42. Fédération Equestre Internationale, FEI Equine anti-doping and controlled medication regulations, April 2010, http://www.fei.org/sites/default/files/EADCMRs%201st%20edition%20effective%205%20April%202010_FINAL_0.pdf (Τελευταία επίσκεψη Ιούλιος 2011).
43. Association of Official Racing Chemists, AORC Guidelines for the Minimum Criteria for Identification by Chromatography and Mass Spectrometry, May 2011, available on line at: <http://www.aorc-online.org/documents/aorc-ms-criteria-may-2011/> (Τελευταία επίσκεψη Ιούλιος 2011).
44. Θ.Π. Χατζηγιάννου, Μ.Α. Κουμπάρης, Ενόργανη Ανάλυση, ΕΚΠΑ, 2000.
45. S.E. Van Bramer, An introduction to mass spectrometry, 1997, (<http://science.widener.edu/svb/massspec/massspec.pdf>).
46. E. De Hoffmann, J. Charette, V. Strooband, Mass Spectrometry: principles and applications, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK, 1996.
47. G. Siouzdak, Mass Spectrometry for Biotechnology, 1996, Academic Press, New York.
48. M. Guilhaus, *Journal of Mass Spectrometry*, 1995; **30**: 1519-1532.
49. W.E. Stephens. *Phys. Rev*, 1946; **69**: 691
50. W.C. Wiley, I.H. McLaren, *Review of Scientific Instruments*, 1955; **26**: 1150
51. B.A. Mamyryn, *International Journal of Mass Spectrometry*, 2001; **206**: 251-266.
52. N. Mirsaleh-Kohan, W.D. Robertson, R.N. Compton, *Mass Spectrometry Reviews*, 2008; **27**: 237-285.
53. J.R.Kimmel, Dissertation for the Degree of Doctor of Philosophy, Stanford University: "Continuous, Multiplexed Time-of-Flight Mass Spectrometry of Electrosprayed Ions, 2004.
54. C.Weickhardt, F. Moritz, J. Grotemeyer, *Mass Spectrometry Reviews*, 1996; **15**: 139.
55. Time-of-Flight Mass Spectrometry, *Agilent TOF Overview Tech Note*, Agilent Technologies, 2007, 1-17.
56. M. Guilhaus, V. Mlynski, D. Selby *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1997; **11**: 351-362.
57. JHJ. Dawson, M. Guilhaus, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1989; **3**: 155-159.
58. H. Wollnik, *Mass Spectrometry Reviews*, 1993; **12**: 89-114

59. J.H.J. Dawson, M. Guilhaus, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1989; **3**: 155-159.
60. M. Guilhaus, D. Selby, V. Mlynski, *Mass Spectrometry Reviews*, 2000; **19**: 65- 107.
61. J. Coles, M. Guilhaus, *Trends in Analytical Chemistry*, 1993; **12**: 203-213.
62. R.J. Cotter, Time of flight mass spectrometry: instrumentation and applications in biological research, ACS Professional Reference Books, American Chemical Society, Washington DC, 1997
63. M. Guilhaus, *Spectrochimica Acta part B*, 2000; **55**: 1511.
64. A.W.T Bristow, *Mass Spectrometry Reviews*, 2006; **25**: 99– 111.
65. I.V. Chernushevich, A.V. Loboda, B.A. Thomson, *Journal of Mass Spectrometry*, 2001; **36**: 849-865.
66. S. J. Gaskell, *Journal of Mass Spectrometry*, 1997; **32**: 677-688.
67. A.T. Blades, M.G. Ikononou, P. Kebarle, *Analytical Chemistry*, 1991; **63**: 2109-2114.
68. R.B. Cole, *Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals, instrumentation and applications*, 1997, Wiley, New York.
69. R.B. Cole, *Journal of Mass Spectrometry*, 2000; **35**: 763-772.
70. P. Kebarle, *Journal of Mass Spectrometry*, 2000; **35**: 804-817.
71. M.H. Amad, N.B. Cech, G.S. Jackson, C.G. Enke, *Journal of Mass Spectrometry*; 2000 **35**: 784-789.
72. A.J. Alpert, *Journal of Chromatography*, 1990; **499**: 177-196.
73. J.C. Linden, C.L. Lawhead, *Journal of Chromatography*, 1975; **105**: 125-133.
74. F.M. Rabel, A.G. Caputo, E.T. Butts, , 1976; **126**: 731-740.
75. SeQuant. *A Practical guide to HILIC: a tutorial and application book*, 2005-2008.
76. T. Ikegami, K. Tomomatsu, H. Takubo, K. Horie, N. Tanaka, *Journal of Chromatography A*, 2008; **1184**: 474-503.
77. P. Hemstrom, K. Irgum, , *Journal of Separation Science*, 2006; **29**: 1784-1821
78. X. Wang, W. Li, H.T. Rasmussen, *Journal of Chromatography A*, 2005; **1083**: 58-62.
79. W. Naidong, W.Z. Shou, T. Addison, S. Maleki, X. Jiang, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2002; **16**: 1965-1975.
80. D.V. McCalley, Hydrophilic Interaction Chromatography, <http://chromatographyonline.findanalytichem.com/lcgc/Articles/Hydrophilic-Interaction-Chromatography/ArticleStandard/Article/detail/512613>
81. E.S. Grumbach, D.M. Wagrowski-Diehl, J.R. Mazzeo, B. Alden, P.C. Iraneta, *LC GC North America*, 2004; **22**: 1010-1023.

82. W. Naidong *Journal of Chromatography B*, 2003; **796**: 209-224.
83. H.P. Nguyen, K.A. Schug, *Journal of Separation Science*, 2008; **31**: 1465-1480.
84. Y. Guo, S. Srinivasan, S. Gaiki, *Chromatographia*, 2007; **66**: 223-229.
85. W. Naidong, Y.L. Chen, W. Shou, X. Jiang, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2001; **26**: 753.
86. Y. Guo, S. Gaiki, *Journal of Chromatography A*, 2005; **1074**: 71-80.
87. P.J. Boersema, S. Mohammed, A.J. R. Heck, *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 2008; **391**: 151
88. L.A.Th. Verhaar, B.F.M. Kuster, *Journal of Chromatography A*, 1982; **234**: 57-64.
89. P. Orth and H. Engelhardt, *Chromatographia*, 1982; **15**: 91-96.
90. Z.L. Nikolov, P.J. Reilly *Journal of Chromatography A*, 1985; **325**: 287-293.
91. Y. Guo, S. Gaiki, *Journal of Chromatography A*, 2011, Article in press.
92. P. Jandera, *Journal of Separation Science*, 2008; **31**: 1421-1437.
93. Y. Hsieh, *Journal of Separation Science*, 2008; **31**: 1449-1464.
94. B.A. Olsen, *Journal of Chromatography A*, **2001**: 113-122.
95. Z. Hao, Polar Functional Groups for HILIC Method, Edited by P.G. Wang, W. He, *Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) and advanced applications*, CRC Press, Taylor & Francis Group, 2011.
96. B. Dejaegher, D. Mangelings, Y.V. Heyden, *Journal of Separation Science*, 2008; **31**: 1438-1448.
97. Z. Hao, B. Xiao, N. Weng, *Journal of Separation Science*, 2008; **31**: 1449-1464.
98. P.Kiefe, J.-C. Portais, J.A. Vorholt, *Analytical Biochemistry*, 2008; **382**: 94-100.
99. P.J. Boersema, N. Divecha, A.J.R. Heck, S. Mohammed, *Journal of Proteome Research*, 2007; **6**: 937
100. S. Cubbon, T. Bradbury, J. Wilson, J. Thomas-Oates, *Analytical Chemistry*, 2007; **79**: 8911-8918.
101. WADA, 2009 Adverse Analytical Findings and Atypical Findings Reported by Accredited Laboratories: Overview of Results http://www.nada.at/files/doc/Kontrollsystem/WADA_2009_LaboratoryStatisticsReport_Final.pdf
102. M. Thevis, Mario, W. Schänzer, *Journal of Chromatographic Science*, 2005; **43**: 22-31.
103. M-J Kang, Y.H. Hwang, W. Lee, D-H. Kim, , *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2007; **21**: 252-264.
104. A. Leinonen, T. Kuuranne, T. Kotiaho, R. Kostianen, *Steroids*, 2004; **69**: 101-109.
105. C. Goebel, G.J. Trout, R. Kazlauskas, *Analytica Chimica Acta*, 2004; **502**: 65-74.

106. S. Guddat, M. Thevis, W. Schänzer, *Biomedical Chromatography*, 2005; **19**: 743-750.
107. M. Thevis, W. Schänzer, **388**: 1351-1358.
108. M. Thevis, A. Thomas, W. Schänzer, *Analytical Bioanalytical chemistry*, 2011; **401**: 405-420.
109. C.A. Mueller, W. Weinmann, S. Dresen, A. Schreiber, M. Gergov, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2005; **19**: 1332-1338.
110. J. Feng, L. Wang, I. Dai, T. Harmon, J.T. Bernert, *Journal of Analytical Toxicology*, 2007; **31**: 359-368
111. R.N. Xu*, L. Fan, M.J. Rieser, T.A. El-Shourbagy, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2007; **44**: 342–355
112. M. Mazzarino, F. Botre, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2006; **20**: 3465-3476.
113. E.N.M. Ho, D.K.K. Leung, T.S.M. Wan, N.H. Yu, *Journal of Chromatography A*, 2006; **1120**: 38–53.
114. M. Kolmonen, A. Leinonen, A. Pelander, I. Ojanpera, *Analytica Chimica Acta*, 2007; **585**: 94.
115. J.O. Thorngren, F. Ostervall, M. Garle, *Journal of Mass Spectrometry*, 2008; **43**: 980-992.
116. E.D. Virus, T.G. Sobolevsky, G.M. *Journal of Mass Spectrometry*, 2008; **43**: 949-957.
117. M. Mazzarino, X. de la Torre, *Analytical Bioanalytical chemistry*, 2008; **392**: 681-698.
118. F. Badouda, E. Grataa, L. Perrenouda, L. Avoisa, M. Saugya, S. Rudazb, J.L. Veuthey, *Journal of Chromatography A*, 2009; **1216**: 4423–4433.
119. M. Kolmonen, A. Leinonen, T. Kuuranne, Anna Pelander, I. Ojanper, *Drug Testing Analysis*, 2009; **1**: 250–266.
120. R.J.B. Peters, J.E. Oosterink, A.A.M. Stolker, C. Georgakopoulos, M.W. F. Nielen, *Analytical Bioanalytical chemistry*, 2010; **396**: 2583-2598.
121. M.E. Toubert, M.C. van Engelen, C. Georgakopoulos, J.A. van Rhijn, M.W.F. Nielen, *Analytica Chimica Acta*, 2007; **586**: 137-146.
122. R.J.B. Peters, A.A.M. Stolker, J.G.J. Mol, A. Lommen, E. Lyris, Y. Angelis, A. Vonaparti, M. Stamou, C. Georgakopoulos, M.W.F. Nielen, *Trends in Analytical Chemistry*, article in press.
123. M. Gergov, B. Boucher, I. Ojanpera, E. Vuori, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2001; **15**: 521-526.
124. A. Pelander, I. Ojanpera, S. Laks, I. Rasanen, E. Vuori, *Analytical Chemistry*, 2003; **75**: 5710-5718.

125. S. Ojanpera, A. Pelander, M. Pelzing, I. Krebs, E. Vuori, I. Ojanpera, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2006; **20**: 1161-1167.
126. Nielsen MK, Johansen SS, Dalsgaard PW, Linnet K., *Forensic Science International*, 2010; **196**: 85-92.
127. M.W.F. Nielen, E.O. van Bennekom, H.H. Heskamp, J.(H.) A. van Rhijn, T.F.H. Bovee, L. (R.) A. P. Hoogenboom, *Analytical Chemistry*, 2004; **76**: 6600–6608.
128. D. Ortelli, E. Cognard, P. Jan, P. Edler, *Journal of Chromatography B*, 2009; **877**:2363–2374.
129. Wang J, Leung D, , *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009; **57**:2162-73.
130. Peters RJ, Bolck YJ, Rutgers P, Stolker AA, Nielen MW, *Journal of Chromatography A*, 2009; **1216**: 8206-8216.
131. Wang J, Chow W, Leung D, , *Analytical Bioanalytical chemistry*, 2010; **396**: 1513-1538
132. Canellas E, Nerín C, Moore R, Silcock P., *Analytica Chimica Acta*, 2010; **666**: 62-69.
133. P.R. Tiller, S. Yu, J. Castro-Perez, K.L. Fillgrove, T. A. Baillie, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2008; **22**: 1053-1061.
134. Mazzarino M, Fiacco I, de la Torre X, Botre F., *European Journal of Mass Spectrometry*, 2008; **14**: 171-180.
135. Rousu T, Pelkonen O, Tolonen A., *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2009; **23**: 843-855
136. Yao M, Ma L, Duchoslav E, Zhu M., *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2009; **23**: 1683-1693.
137. Rousu T, Herttuainen J, Tolonen A., *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2010; **24**: 939-957.
138. Lacorte S, Fernandez-Alba AR., *Mass Spectrometry Reviews*, 2006; **25**: 866-880
139. Hernández F, Grimalt S, Pozo OJ, Sancho JV, *Journal of Separation Science*, 2009; **32**: 12245-2261.
140. Petrovic M, Barceló D., *Journal of Mass Spectrometry*, 2006; **41**: 1259-1267.
141. Ibáñez M, Guerrero C, Sancho JV, Hernández F., *Journal of Chromatography A*, 2009; **1216**: 2529-2239.
142. Krauss M, Singer H, Hollender J., *Analytical Bioanalytical chemistry*, 2010; **397**: 943-951.
143. MI. Churchwell, N.C. Twaddle, L.R. Meeker, D.R. Doerge, , *Journal of Chromatography B*, 2005; **825**: 134–143
144. O.J. Pozo, P. Van Eenoo, K. Deventer, F.T. Delbeke, *Journal of Mass Spectrometry*, 2007; **42**: 497-516.

145. O.J. Pozo, K. Deventer, P. Van Eenoo, F.T. Delbeke, *Analytical Chemistry*, 2008; **80**: 1709-1720.
146. O.J. Pozo, P. Van Eenoo, K. Deventer, F.T. Delbeke, *Trends in Analytical Chemistry*, 2008; **27**:657-671.
147. A. Leinonen, T. Kuuranne, R. Kostianen, *Journal of Mass Spectrometry*, 2002; **37**: 693-698.
148. W. Van Thuyne , P. Van Eenoo, F.T. Delbeke, *Journal of Chromatography B*, 2007; **857**: 259–265.
149. T. Kelly, T.R. Graya, M.A. Huestis, *Journal of Chromatography B*, 2008; **867**: 194-204.
150. V. Ivanova, T. Boghosian, O. Rabin, The WADA Proficiency Testing Program as an integral part of the fight against doping in sport, *Accreditation and Quality Assurance*, 2007; **12** :491–493.
151. EURACHEM, The Fitness for Purpose of Analytical Methods A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, <http://www.eurachem.org/guides/pdf/valid.pdf>
152. Pozo OJ, Van Eenoo P, Deventer K, Delbeke FT., *Analytical Bioanalytical chemistry*, 2007; **389**: 1209.
153. K. Deventer, P. Van Eenoo and F. T. Delbeke, *Biomedical Chromatography*. 2006; **20**: 429–433.
154. I. Tavarneris, *Trends in Analytical Chemistry*, 2004; **23**: 535-552.
155. M. Careri, A. Mangia, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2006; **386**: 38-45
156. K. Ευσταθίου, Μ. Κουππάρη, Στατιστική Χημειομετρία. Διαπανεπιστημιακό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών «Παραγωγή και Έλεγχος Φαρμακευτικών Ενώσεων»
157. I. Marchi, S. Rudaz and J.-L. Veuthey, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2009; **49**: 459-467.
158. ADA Statement on First Worldwide Human Growth Hormone Case. Available: <http://www.wada-ama.org/en/News-Center/Articles/WADA-Statement-on-First-Worldwide-Human-Growth-Hormone-Case/> (τελευταία επίσκεψη Ιούλιος 2011)
159. Australian Government. Australian Sports Anti-Doping Authority, ASADA strengthens doping protection for Australian sport. MEDIA RELEASE 5 August 2009.
160. R.A. Harvey, P.C. Champe, *Φαρμακολογία* 2^η έκδοση, 1997, Εκδ. Παρισιάνος
161. Ralston JM, Stenhouse AM, Stenhouse NS, Buck GJ, Lucks SF, Reynoldson JA, Bolton JR., *Australian Veterinary Journal*, 1988; **65**:1.
162. M.A. Popot, E. Houghton, A. Gi, M. Jones, P. Teale, T. Samuels, V. Lassourdt, N. Dunnet, D.A. Cowan, Y. Bonnaire, P.L. Toutains, *Equine veterinary Journal*, 1997; **29**: 226-229.

163. Houghton E, Ginn A. *Proceedings of 9th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*, Vol. II, New Orleans, 1992; 209–222.
164. Caloni F, Spotti M, Villa R, Mariani C, Montana M, Pompa G., *Equine veterinary Journal*, 1999; **31**:273.
165. Gotzmann A, Schanzer W, Donike M. *Proceedings of 10th ICRAV*, Stockholm, 1994; 307–309.
166. Grippa E, Santini L, Castellano G, Gatto MT, Leone MG, Saso L. *Journal of Chromatography B*, 2000; **738**: 17.
167. Riveiro Neto LM, Salvadori MC, Spinosa HS. *Veterinary Research Communications* 2000; **24**: 239.
168. Schanzer W, Gotzmann A, Horning S, Donike M., *Proceedings of 10th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*, Stockholm, 1994; 140–145.
169. Bonnaire Y, Popot MA, Plou P, Aljabi D, Gueris J. *Proceedings of 9th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*, Vol. I, New Orleans, 1992; 93–102.
170. Samuels T, Teale P, Houghton E. *Proceedings of 10th ICRAV*, Stockholm, 1994; 115–118.
171. Tang PW, Law WC, Wan TSM. *Journal of Chromatography B*, 2001; **754**: 229.
172. Popot MA, Lacabaratz E, Garcia P, Laroute V, Bonnaire Y, Toutain PL, Cowan DA. *Equine Veterinary Journal*, 1999; **31**: 278.
173. Schubert B, Ingvast A, Andrén PE, Bondesson U. *Proceedings of 11th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*, Queensland, 1996; 203.
174. Ho ENM, Leung DKK, Wan TSM, Yu NH. *Journal of Chromatography A*, 2006; **1120**: 38.
175. Leung GNW, Chung EW, Ho ENM, KwokWH, Leung DKK, Tang FPW, Wan TSM, Yu NH. *Journal of Chromatography B*, 2005; **825**: 47.
176. Houghton E, Dumasia MC, Wellby JK. *Biomedical Mass Spectrometry*, 1981; **8**: 558.
177. Aguilera R, Becchi M, Mateus L, Popot MA, Bonnaire Y, Casabianca H, Hatton CK. *Journal of Chromatography B*, 1997; **702**: 85.
178. Dams R, Huestis MA, Lambert WE, Murphy CM. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2003; **14**: 1290.
179. Henion J, Brewer E, Rule G. *Analytical Chemistry* 1998; **70**: 650A.
180. Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM. *Analytical Chemistry* 1998; **70**: 882.
181. Esteban N, Yergey A, Liberato D, Loughlin T, Loriaux D. *Biomedical and Environmental Mass Spectrometry* 1998; **15**: 603

182. Association of Official Racing Chemists. AORC Guidelines for the Minimum Criteria for Identification by Chromatography and Mass Spectrometry. MS Criteria Working Group – 19 June 2002 Version. Internal communication to AORC members, 2002.
183. Van Eenoo P, Delbeke FT. *Chromatographia* 2004; **59**: S39
184. Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM. *Analytical Chemistry*, 2003; **75**: 3019.
185. Niessen WMA, Manini P, Andreoli R. *Mass Spectrometry Reviews* 2006; **25**: 881.
186. Wieling J. *Chromatographia Supplement* 2002; **55**: S107.
187. Stokvis E, Rosing H, Beijnen JH. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2005; **19**: 401.
188. Miller JC, Miller JN. *Statistics for Analytical Chemistry*. 2nd ed. Ellis Horwood: 1988; 117.
189. Basilicata P, Miraglia N, Pieri M, Acampora A, Soleo L, Sannolo N. *Journal of Chromatography B*, 2005; **818**: 293.
190. P.E. Haywood, P. Teale, M.S. Moss, *Equine veterinary Journal*, 1990; **22**: 244-246.
191. P. W. Taylor, A Method for the *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1982; **33**: 584-588.
192. Tarka, S.M. *CRC critical Reviews in Toxicology*, 1982: 275-312.
193. Nehlig, A., Daval, J.L. and Debry, G., *Brain Res.Rev.*, 1992; **17**: 139-170.
194. Fredholm, B.. *Prog Clin Biol Res.*, 1984; **158**: 303-30.
195. M.U Uteng, E.U. Eyong, E.O. Akpanyung, M.A. Agiang, C.Y. Aremu, *Plant Foods for Human Nutrition* 1997; **51**: 231–243.
196. Yesair, D.W., Branfman, A.R. and Callahan, M.M. 1984. G.A. Spiller (Ed.), A.R. Liss, Inc., New York, pp. 215-233.
197. Moss, M. S. (1977) The metabolism and urinary and salivary excretion of drugs in the horse and their relevance to detection of dope. In: Drug Metabolism from Microbe to Man. Eds D. V.Parke and R. L.Smith Taylor & Francis Ltd, London , pp 263–280.
198. Kelly, W. R., and Lambert, M.. *Br. Vet. J.* 1978; **134**: 171-180.
199. Moss, M.S. 1980. Methylxanthine Pharmacokinetics in the Horse. PhD Thesis. University of Bradford.
200. Moss, M.S., Hucklebridge, J.E., Jackson, P.J., Woodhead, S., Houghton, E. and Horner, M.W. 1980.. *Proceedngs of 3rd International Symposium Equine Medication Control*, The University of Kentucky, Lexington, Kentucky, 1979, p. 347-350.
201. Lambert, M.B.T., Miller, J., Kelly, R. and Evans, J.A. *Proceedings of the 6th International Conference of Racing Analysis and Veterinarians*, Hong Kong, 1985 pp. 137-141.

202. Haywood, P. E., Teale, P., and Moss, M. S., *Equine veterinary Journal*, 1990; **232**: 244-246.
203. Aramald, T., Suzuki, E., Ishidaka, O., Momose, A. And Umemura, K. *Chem. Pharm. Bull.* 1991; **39**: 2999-3002.
204. Delbeke, F.T. and Debackere, M.. *Veterinary Reasearch communications*, 1991; **15**: 107-116.
205. Salvadori, M. C., Rieser, E. M., Riheiro Neto, L. M. and Nascimento, E. S., *Analyst*.1997; **119**: 2701-2703.
206. Dyke, T.M. and Sams, R.A., *Journal of Analytical Toxicology* 1998; **22**: 112-116.
207. Xiao Rong Yang, Chuang Xing Ye, Jie Kun Xu, Yue Ming Jiang, *Food Chemistry*, 2007; **100** 1132–1136
208. C.W. Huck, W. Guggenbichler, G.K. Bonn, *Analytica Chimica Acta*, 2005; **538**: 195–203
209. X. Zhua, B. Chena, M. Maa, X. Luoa, F. Zhang, S. Yao, Z. Wan, D. Yang, H. Hang, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2004; **34**: 695–704.
210. E. Marchei, M. Pellegrini, R. Pacifici, I. Palmi, S. Pichini, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2005; **37**: 499–507.
211. A. Aresta, F. Palmisano, C.G. Zambonin, *Food Chemistry*, 2005; **93**:177–181
212. Schubert B. *Proceedings of 10th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*. Stockholm: Sweden, 1994; 364.
213. M.S. Bispo, M.C.C. Veloso, H.L.C. Pinheiro, R.F.S. De Oliveira, J.O.N. Reis, J.B. De Andrade, *Journal of Chromatographic Science*, 2002; **40**, 45.
214. M.C. Salvadori, E.M. Rieser, L.M. Ribeiro Neto, E.S. Nascimento, *Analyst*, 1994; **119**: 2701 – 2703.
215. C.G. Zambonin, A. Aresta, F. Palmisano *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2004; **36**:621–624
216. Georga KA, Samanidou VF, Papadoyannis IN. *Journal of Chromatography B*, 2001; **759**: 209.
217. Kress M, Meissner D, Kaiser P, Hanke R, Wood WG., *Clin. Lab.* 2002; **48**: 541
218. Houghton E. *Biomedical Mass Spectrometry*, 1982; **9**: 103.
219. Thevis M, Opfermann G, Krug O, Schanzer W., *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2004; **18**: 1553.
220. Schneider H, Ma L, Glatt H. *Journal of Chromatography B*, 2003; **789**: 227.
221. Caubet M-S, Comte B, Brazier J-L. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2004; **34**: 379.

222. Weimann A, Sabroe M, Poulsen HE. *Journal of Mass Spectrometry* 2005; **40**: 307.
223. Beaumier PM, Fenwick JD, Stevenson AJ, Weber MP, Young LM *Equine Veterinary Journal*, 1987; **19**:207–213.
224. Schulz R, Hagedorn HW, Böck M *Proceedings of the 9th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*, 1192, New Orland, pp. 223-227
225. Lakhani KH, Lambert M, Sluyter F, Devolz R, Maylin G, Higgins AJ *Proceedings of the 15th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*, 2004, Dubai, United Arab Emirates, pp. 67-77
226. M. S. Moss, P. Blay, E. Houghton, M. W. Horner, P. Teale, R. L. Smith, and T. Sloan, *Proceedings of the 6th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians* 1985, Hong Kong, 97–99
227. JP. Scarth, P. Teale and T. Kuuranne *Drug Testing Analysis*, 2011; **3**: 19–53
228. P. Beaumier, J. Fenwick, L. Young, S. Hazen, K. Hama, B. Laviolette, Z. Deocampo, H. Park, N. Sio, F. Timmings, and F. Todi, 1983, *Proceedings of the Fifth International Conference on the Control of the Use of Drugs in Racehorses* (Toronto), the Canadian Section Association of Official Racing Chemists: Toronto, Canada, 12–19.
229. M. V. Marsh, J. Caldwell, and R. L. Smith, *Xenobiotica*, 1981; **11**: 655.
230. F. Kees, D. Jehnich, H. Grobecker, *Journal of Chromatography B*, 1996; **677**: 172–177
231. SK. Bakar, S. Niazi, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1983; **72**: 1020–1023
232. Peng GW, Gadalla MA, Smith V, Peng A, Chiou WL *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1978; **67**:710–712
233. O’Kruk RJ, Adams MA, Philp RB., *Journal of Chromatography B*, 1984;**310**: 343–352
234. Pirola R, Bareggi SR, De Benedittis G. *Journal of Chromatography B*, 1998; **705**: 309–315
235. Battezzati A, Fiorillo G, Spadafranca A, Bertoli S, Testolin G., *Analytical Biochemistry* 2006; **354**: 274–278
236. Judefeind A, Van Rensburg P, Langelaar S, Du Plessis J., *Journal of Chromatography B*, 2007; **852**:300
237. Gonzátlez G, Ventura R, Smith AK, De La Torre R, Segura J., *Journal of Chromatography A*, 1996; **719**:251
238. Croubels S, Maes S, Baert K, De Backer P., *Analytica Chimica Acta*, 2005; **529**: 179–187
239. Wang N, Xu F, Zhang Z, Yang C, Sun X, Li J., *Biomedical Chromatography*, 2008; **22**: 149–156
240. Bae SK, Seo KA, Jung EJ, Kim HS, Yeo SW, Shon JH, Park KM, Liu KH, Shin JG, *Biomedical Chromatography*, 2008; **22**: 590–595

241. Segarra G, Jauregui O, Casanova E, Trillas I., *Phytochemistry*, 2006;**67**:395–401
242. Wilbert SM, Ericsson LH, Gordon MP, *Analytical Biochemistry*, 1998; **257**: 186–194
243. Pirker R, Hucka CW, Popp M, Bonn GK. *Journal of Chromatography B*, 2004; **809**:257–264
244. Vinci F, Fabbrocino S, Fiori M, Serpe L, Gallo P., *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2006; **20**: 3412–3420
245. Gallo P, Fabbrocino S, Vinci F, Fiori M, Danese V, Serpe L., *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2008;**22**:841–854
246. Van Hoof N, De Wasch K, Poelmans S, Noppe H, De Brabander H., *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2004; **18**: 2823–2829
247. P. K. Knight, C. Juann, *Proceedings of 15th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*, 2004, Dubai, United Arab Emirates, p. 255.
248. H. Vine, P.M. Wynne, R.G. Amiet, in: B. Laviolette, M.R. Koupai-Abyazani (Eds.), *Proceedings of the 12th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*, 1988 R&W Publications, Newmarket, p. 79.
249. P.M. Wynne, J.H. Vine, R.G. Amiet, in: R.B. Williams, E. Houghton, J. Wade (Eds.), *Proceedings of the 13th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*, R&W Publications, Newmarket, 2001, p. 64.
250. P.M. Wynne, J.H. Vine, R. G. Amiet, *Journal of Chromatography B*, 2004; **811**: 93–101
251. P. M. Wynne, J.H. Vine, R. G. Amiet, *Proceedings of the 13th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*, 2000, Cambridge, United Kingdom, p. 431
252. A. R. McKinney, A. Vandasz, C. Murphy, C. J. Suann, A. M. Stenhouse, *Proceedings of the 16th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*, 2006, Tokyo, p. 107
253. P. Appelblad, T. Jonsson, W. Jiang, K. Irgum, *Journal of Separation Science*, 2008; **31**: 1529.

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1.1: «Επιθυμητές» (για τον αθλητή) δράσεις και ανεπιθύμητες ενέργειες απαγορευμένων ουσιών.....	17
Πίνακας 1.2: Αναλυτικές διαδικασίες σάρωσης μικρομοριακών ουσιών.....	23
Πίνακας 1.3: Ελάχιστα απαιτούμενα όρια απόδοσης (MRPL) απαγορευμένων ουσιών.....	24
Πίνακας 1.4: Ταξινόμηση απαγορευμένων ουσιών στα άλογα σύμφωνα με τον ARCI.....	29
Πίνακας 1.5: Απαγορευμένες ουσίες ορίου και ανώτερα επιτρεπτά όρια συγκέντρωσης.....	31
Πίνακας 5.1: Βιβλιογραφικές αναφορές αναλύσεων σάρωσης απαγορευμένων ουσιών με την τεχνική της υδροχρωματογραφίας – φασματομετρίας μαζών.....	78
Πίνακας 5.2: Θεωρητικά δεδομένα και πειραματικά αποτελέσματα για τους αναλύτες που ανιχνεύθηκαν με την προτεινόμενη μεθοδολογία.....	100
Πίνακας 5.3: Αναλύτες που δεν ανιχνεύθηκαν με την προτεινόμενη μέθοδο σάρωσης.....	113
Πίνακας 6.1: Χαρακτηριστικά αναλυτικών μεθόδων προσδιορισμού της υδροκορτιζόνης σε ούρα αλόγων με LC/MS.....	120
Πίνακας 6.2: Βέλτιστες τιμές παραμέτρων–δυναμικών φασματομέτρου LC/ITMS.....	123
Πίνακας 6.3: Χρονικά παράθυρα μεθόδου LC/IT-MS για την παρακολούθηση της κορτιζόλης και του εσωτερικού προτύπου.....	123
Πίνακας 6.4: Αποτελέσματα στατιστικής επεξεργασίας των καμπυλών αναφοράς της υδροκορτιζόνης σε υδατικά δείγματα και σε δείγματα ούρων χαμηλού ('low'), μεσαίου ('medium') και υψηλού ('high') ειδικού βάρους (specific gravity, SG).....	132
Πίνακας 6.5: Αποτελέσματα μελέτης επίδρασης του μητρικού υλικού στην απόκριση μετά από παρασκευή και ανάλυση καμπυλών αναφοράς σε υδατικά δείγματα και σε δείγματα ούρων χαμηλού ('low'), μεσαίου ('medium') και υψηλού ('high') ειδικού βάρους (specific gravity, SG). Οι τιμές για τα δείγματα ούρων παρουσιάζονται κανονικοποιημένες ως προς τις αντίστοιχες των υδατικών δειγμάτων.....	133
Πίνακας 6.6: Αποτελέσματα αξιολόγησης της ορθότητας και επαναληψιμότητας της μεθόδου LC/IT-MS για την ποσοτικοποίηση της κορτιζόλης.....	137
Πίνακας 6.7: Αποτελέσματα αξιολόγησης της ορθότητας και επαναληψιμότητας της μεθόδου LC/TOF-MS για την ποσοτικοποίηση της κορτιζόλης.....	137
Πίνακας 6.8: Επαναληψιμότητα της σχετικής αναλογίας διαγνωστικών ιόντων κατά τον έλεγχο επιβεβαίωσης της κορτιζόλης σε δείγματα ούρων αλόγων.....	139
Πίνακας 7.1: Βέλτιστες τιμές παραμέτρων φασματομέτρου LC/Ion Trap-MS.....	150
Πίνακας 7.2: Χρονικά παράθυρα της μεθόδου LC/IT -MS για την παρακολούθηση της θεοβρωμίνης και της 3-προπυλοξανθίνης (εσωτερικό πρότυπο).....	152
Πίνακας 7.3: Αποτελέσματα μελέτης της επίδρασης του μητρικού υλικού στην απόκριση της θεοβρωμίνης, του εσωτερικού προτύπου και του λόγου των αποκρίσεων, μετά από εμβολιασμό και ανάλυση διαφορετικών δειγμάτων ούρων με το σύστημα LC/IT-MS.....	159
Πίνακας 7.4: Αποτελέσματα μελέτης της επίδρασης του μητρικού υλικού στην απόκριση της θεοβρωμίνης, του εσωτερικού προτύπου και του λόγου των αποκρίσεων, μετά από εμβολιασμό και ανάλυση διαφορετικών δειγμάτων ούρων με το σύστημα LC/TOF-MS.....	160
Πίνακας 7.5: Αποτελέσματα στατιστικής επεξεργασίας των καμπυλών αναφοράς της θεοβρωμίνης σε υδατικά δείγματα και σε δείγματα ούρων χαμηλού ('low'), μεσαίου	

(‘medium’) και υψηλού (‘high’) ειδικού βάρους (specific gravity, SG).....	163
Πίνακας 7.6: Αποτελέσματα αξιολόγησης της ορθότητας και πιστότητας της μεθόδου LC/IT-MS για την ποσοτικοποίηση της θεοβρωμίνης σε ούρα αλόγων.....	167
Πίνακας 7.7: Αποτελέσματα αξιολόγησης της ορθότητας και πιστότητας της μεθόδου LC/TOF-MS για την ποσοτικοποίηση της θεοβρωμίνης σε ούρα αλόγων.....	167
Πίνακας 8.1: Χαρακτηριστικά αναλυτικών μεθόδων υγροχρωματογραφίας για τον προσδιορισμό του σαλικυλικού οξέος.....	176
Πίνακας 8.2: Δοκιμασία F για τον έλεγχο ομοσκεδαστικότητας μεταξύ του πρώτου και του τελευταίου σημείου της καμπύλης βαθμονόμησης.....	187
Πίνακας 8.3: Ολικό άθροισμα του % σχετικού σφάλματος ($\Sigma\%E_r$) για κάθε παράγοντα ζύγισης.....	191
Πίνακας 8.4: Σύγκριση απλού και ζυγισμένου $1/x^2$ γραμμικού μοντέλου ως προς το % σχετικό σφάλμα ($\%E_r$) των υπολογιζόμενων από την εξίσωση συγκεντρώσεων για κάθε σημείο της καμπύλης βαθμονόμησης ποτελέσματα.....	191
Πίνακας 8.5: Αποτελέσματα στατιστικής επεξεργασίας των καμπυλών αναφοράς του σαλικυλικού οξέος σε εμβολιασμένα δείγματα ούρων για κάθε έναν από τους έξι προσδιορισμούς για τον έλεγχο γραμμικότητας της μεθόδου.....	192
Πίνακας 8.6: Έλεγχος διέλευσης των καμπυλών βαθμονόμησης του σαλικυλικού οξέος από την αρχή των αξόνων.....	193
Πίνακας 8.7: Αποτελέσματα στατιστικής επεξεργασίας μέσης καμπύλης σαλικυλικού οξέος ποτελέσματα.....	194
Πίνακας 8.8: Αποτελέσματα της μελέτης επίδρασης του μητρικού υλικού στην απόκριση μετά από παρασκευή και ανάλυση καμπυλών αναφοράς του σαλικυλικού οξέος σε υδατικά δείγματα και σε δείγματα ούρων χαμηλού (‘low’), μεσαίου (‘medium’) και υψηλού (‘high’) ειδικού βάρους (specific gravity, SG). Οι τιμές των απόλυτων και σχετικών αποκρίσεων για τα δείγματα ούρων παρουσιάζονται κανονικοποιημένες ως προς τις αντίστοιχες τιμές των υδατικών δειγμάτων.....	197
Πίνακας 8.9: Αξιολόγηση ορθότητας μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού του σαλικυλικού οξέος κατά την 1 ^η σειρά μετρήσεων.....	199
Πίνακας 8.10: Αξιολόγηση ορθότητας μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού του σαλικυλικού οξέος κατά την 2 ^η σειρά μετρήσεων.....	199
Πίνακας 8.11: Αξιολόγηση ορθότητας μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού του σαλικυλικού οξέος κατά την 3 ^η σειρά μετρήσεων.....	199
Πίνακας 8.12: Αξιολόγηση ορθότητας μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού του σαλικυλικού οξέος κατά την 4 ^η σειρά μετρήσεων.....	199
Πίνακας 8.13: Αξιολόγηση ορθότητας μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού του σαλικυλικού οξέος κατά την 5 ^η σειρά μετρήσεων.....	200
Πίνακας 8.14: Αξιολόγηση ορθότητας μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού του σαλικυλικού οξέος κατά την 6 ^η σειρά μετρήσεων.....	200
Πίνακας 8.15: Αξιολόγηση ορθότητας μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού του σαλικυλικού οξέος σε τέσσερα επίπεδα συγκεντρώσεων και για τις έξι αναλυτικές δοκιμασίες.....	200
Πίνακας 8.16: Αξιολόγηση πιστότητας μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού του σαλικυλικού οξέος σε ούρα αλόγων.....	202
Πίνακας 8.17: Εφαρμογή δοκιμασίας Q για την ανίχνευση έκτροπων τιμών.....	203
Πίνακας 8.18: Αποτελέσματα επιβεβαίωσης της ανίχνευσης του σαλικυλικού οξέος στα	

ύποπτα δείγματα ούρων	206
Πίνακας 9.1: Αποτελέσματα στατιστικής επεξεργασίας των καμπυλών αναφοράς της 3-μεθοξυτυραμίνης σε υδατικά δείγματα και σε δείγματα ούρων χαμηλού ('low'), μεσαίου ('medium') και υψηλού ('high') ειδικού βάρους (specific gravity, SG).....	224
Πίνακας 9.2: ΑΑποτελέσματα μελέτης επίδρασης του μητρικού υλικού στην απόκριση της 3-μεθοξυτυραμίνης (3MT) και του εσωτερικού προτύπου (3MT-d4) μετά από παρασκευή και ανάλυση καμπυλών αναφοράς σε υδατικά δείγματα και σε δείγματα ούρων χαμηλού ('low'), μεσαίου ('medium') και υψηλού ('high') ειδικού βάρους (specific gravity, SG). Οι τιμές των απόλυτων και σχετικών αποκρίσεων για τα δείγματα ούρων παρουσιάζονται κανονικοποιημένες ως προς τις αντίστοιχες τιμές των υδατικών δειγμάτων	224
Πίνακας 9.3: Δοκιμασία F για τον έλεγχο ομοσκεδαστικότητας μεταξύ του πρώτου και του τελευταίου σημείου της καμπύλης βαθμονόμησης.....	227
Πίνακας 9.4: Αποτελέσματα στατιστικής επεξεργασίας των καμπυλών αναφοράς του σαλικυλικού οξέος σε εμβολιασμένα δείγματα ούρων για κάθε έναν από τους έξι προσδιορισμούς για τον έλεγχο γραμμικότητας της μεθόδου.....	228
Πίνακας 9.5: Στατιστική επεξεργασία μέσης καμπύλης βαθμονόμησης της 3-μεθοξυτυραμίνης.....	229
Πίνακας 9.6: Αξιολόγηση ορθότητας μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού της 3-μεθοξυτυραμίνης κατά την 1 ^η σειρά μετρήσεων	231
Πίνακας 9.7: Αξιολόγηση ορθότητας μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού της 3-μεθοξυτυραμίνης κατά την 2 ^η σειρά μετρήσεων	231
Πίνακας 9.8: Αξιολόγηση ορθότητας μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού της 3-μεθοξυτυραμίνης κατά την 3 ^η σειρά μετρήσεων	231
Πίνακας 9.9: Αξιολόγηση ορθότητας μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού της 3-μεθοξυτυραμίνης κατά την 4 ^η σειρά μετρήσεων	231
Πίνακας 9.10: Αξιολόγηση ορθότητας μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού της 3-μεθοξυτυραμίνης κατά την 5 ^η σειρά μετρήσεων	232
Πίνακας 9.11: Αξιολόγηση ορθότητας μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού της 3-μεθοξυτυραμίνης σε τέσσερα επίπεδα συγκέντρωσης και για τις πέντε αναλυτικές διαδικασίες.....	232
Πίνακας 9.12: Αξιολόγηση πιστότητας μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού της 3-μεθοξυτυραμίνης σε ούρα αλόγων	234
Πίνακας 9.13: Εφαρμογή δοκιμασίας Q για την ανίχνευση έκτροπων τιμών	235
Πίνακας 9.14: Αποτελέσματα επιβεβαίωσης της ανίχνευσης της 3-μεθοξυτυραμίνης οξέος στα ύποπτα δείγματα ούρων	238

Κατάλογος Σχημάτων

Σχήμα 1.1: Το πρώτο σύστημα GC/MS με φασματόμετρο μαζών μαγνητικής εστίασης που χρησιμοποιήθηκε στον έλεγχο ντόπινγκ αθλητών στους Ολυμπιακούς Αγώνες του Μονάχου το 1972.....	8
Σχήμα 2.1: Διαγραμματική απεικόνιση των βασικών μονάδων ενός φασματομέτρου μαζών.....	34
Σχήμα 2.2: Αναλυτής χρόνου πτήσης: ιόντα με μικρότερη τιμή m/z κινούνται με μεγαλύτερη ταχύτητα και φτάνουν πιο γρήγορα στον ανιχνευτή ιόντων (μικρότερος χρόνος πτήσης) σε σχέση με τα ιόντα με μεγαλύτερη τιμή m/z	36
Σχήμα 2.3: Ορθογώνιας επιτάχυνσης αναλυτής χρόνου πτήσης (oa-TOF): Α. χωρίς ανακλαστικό κάτοπτρο, Β. με ανακλαστικό κάτοπτρο (reflectron).....	41
Σχήμα 2.4: Αρχή λειτουργίας ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστή.....	42
Σχήμα 2.5: Ανιχνευτής πλασκών πολλαπλής διέλευσης (MCP).....	43
Σχήμα 2.6: Σχηματική απεικόνιση πηγής ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό.....	45
Σχήμα 2.7: Σχηματισμός ιόντων με την τεχνική του ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI).....	46
Σχήμα 2.8: Σχηματική απεικόνιση του συστήματος LC/ESI-TOF-MS ορθογώνιας επιτάχυνσης με ανακλαστικό κάτοπτρο της εταιρίας Agilent Technologies, που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία.....	48
Σχήμα 3.1: Η HILIC συμπληρώνει το κενό μεταξύ διαφορετικών τεχνικών υγροχρωματογραφίας, ενώ ταυτόχρονα παρουσιάζει εν μέρει και κοινά σημεία με καθεμία από αυτές.....	50
Σχήμα 3.2: Πορεία παρασκευής στατικών φάσεων πολυσουξινιμιδίου και παραγώγων του.....	55
Σχήμα 3.3: Τρισδιάστατη μορφή μορίων α-κυκλοδεξτρίνης και β-κυκλοδεξτρίνης.....	56
Σχήμα 3.4: Η λειτουργική ομάδα σουλφοαλκυλοβταϊνης που συναντάται στις στατικές φάσεις ZIC®-HILIC και ZIC®-rHILIC.....	57
Σχήμα 3.5: Αντιπροσωπευτικές πολικές και βασικές ουσίες που έχουν αναλυθεί με εφαρμογή της τεχνικής HILIC.....	60
Σχήμα 4.1: Αποτέλεσμα αυτοματοποιημένης διαδικασίας βαθμονόμησης του φασματομέτρου TOF-MS σε συνθήκες λειτουργίας 2 GHz και εύρος σάρωσης μέχρι 1700 m/z . Η διαδικασία έχει ολοκληρωθεί με επιτυχία καθώς παρατηρούνται για τα ιόντα αναφοράς τυχαία καταναμημένες τιμές στα σφάλματα, που δεν υπερβαίνουν τα 2 ppm σε σχέση με τις αντίστοιχες θεωρητικές τιμές m/z	65
Σχήμα 4.2: Αποτέλεσμα αυτοματοποιημένης διαδικασίας tuning σε συνθήκες ESI(+)......	67
Σχήμα 4.3: Αποτέλεσμα αυτοματοποιημένης διαδικασίας tuning σε συνθήκες ESI(-)......	67
Σχήμα 5.1: Πορεία κατεργασίας δειγμάτων ούρων για την ανίχνευση απαγορευμένων ουσιών σε ούρα αθλητών με LC/TOF-MS.....	87
Σχήμα 6.1: Χημική δομή της υδροκορτιζόνης.....	119
Σχήμα 6.2: Πειραματική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε για τη διεξαγωγή μελετών βελτιστοποίησης των συνθηκών λειτουργίας του φασματομέτρου Ion Trap-MS.....	122
Σχήμα 6.3: Φάσματα σάρωσης θυγατρικών ιόντων (product ion spectra) των πρωτονιωμένων μοριακών ιόντων της υδροκορτιζόνης και του εσωτερικού προτύπου.....	

(δεσονίδη). Ελήφθησαν υπό τις βέλτιστες συνθήκες με απευθείας έγχυση στο φασματοόμετρο μαζών IT-MS προτύπων διαλυμάτων σε κινητή φάση συγκέντρωσης $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ και ροή $20 \mu\text{L min}^{-1}$	124
Σχήμα 6.4: Χρωματογραφήματα μαζών της κορτιζόλης και της δεσονίδης, που ελήφθησαν μετά από ανάλυση υπό τις βέλτιστες συνθήκες του συστήματος LC/Ion Trap-MS εμβολιασμένου δείγματος ούρων αλόγου σε συγκεντρώσεις $1,0$ και $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ για τον αναλύτη και το εσωτερικό πρότυπο, αντίστοιχα και επεξεργασία των δεδομένων για την εξαγωγή αποτελεσμάτων για την ποσοτικοποίηση (α) και την επιβεβαίωση (β) της κορτιζόλης.....	125
Σχήμα 6.5: Επίδραση του δυναμικού θραυσματοποίησης της πηγής ιοντισμού (fragmentor voltage) στην ένταση του πρωτονιωμένου μοριακού ιόντος και των σχηματιζόμενων από αυτό θραυσματοποιημένων διαγνωστικών ιόντων της κορτιζόλης.....	127
Σχήμα 6.6: Χρωματογραφήματα μαζών της κορτιζόλης και της δεσονίδης, που ελήφθησαν μετά από LC/TOF-MS ανάλυση εμβολιασμένου δείγματος ούρων αλόγου σε συγκεντρώσεις $1,0$ και $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ για τον αναλύτη και το εσωτερικό πρότυπο, αντίστοιχα, σε α) χαμηλή τιμή (170 V) του δυναμικού θραυσματοποίησης της πηγής (μέθοδος ποσοτικοποίησης) και β) υψηλή τιμή (220 V) του δυναμικού θραυσματοποίησης της πηγής (μέθοδος ταυτοποίησης).....	128
Σχήμα 6.7: Γραφική παράσταση της μεθόδου προσθήκης γνωστών ποσοτήτων.....	131
Σχήμα 6.8: Καμπύλες προσθήκης που ελήφθησαν με τις προτεινόμενες μεθόδους LC/IT-MS και LC/TOF-MS για την ποσοτικοποίηση της κορτιζόλης σε ύποπτο δείγμα αλόγου μετά από αραιώση.....	141
Σχήμα 7.1: Χημική δομή μεθυλο-ξανθινών.....	144
Σχήμα 7.2: Πορεία βιομετατροπής της θεοβρωμίνης.....	146
Σχήμα 7.3: Χημική δομή 3-προπυλοξανθίνης.....	147
Σχήμα 7.4: Συσκευή αντλίας σύριγγας (syringe pump) που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη βελτιστοποίησης των παραμέτρων λειτουργίας του φασματομέτρου LC/Ion Trap-MS.....	149
Σχήμα 7.5: Φάσμα σάρωσης θυγατρικών ιόντων (product ion scan spectrum) της θεοβρωμίνης μετά από ανάλυση πρότυπου διαλύματος συγκέντρωσης $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ υπό τις βέλτιστες συνθήκες του συστήματος LC/Ion Trap-MS.....	151
Σχήμα 7.6: Φάσμα σάρωσης θυγατρικών ιόντων (product ion scan spectrum) της 3-προπυλοξανθίνης (εσωτερικό πρότυπο) μετά από ανάλυση προτύπου διαλύματος συγκέντρωσης $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ υπό τις βέλτιστες συνθήκες του συστήματος LC/Ion Trap-MS.....	152
Σχήμα 7.7: Χρωματογραφήματα LC/Ion-Trap-MS των διαγνωστικών ιόντων της θεοβρωμίνης που ελήφθησαν μετά από ανάλυση λευκού δείγματος ούρων (α) και εμβολιασμένου δείγματος συγκέντρωσης $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (β).....	153
Σχήμα 7.8: Επίδραση του δυναμικού θραυσματοποίησης της πηγής ιοντισμού (fragmentor voltage) στην ένταση του πρωτονιωμένου μοριακού ιόντος και των σχηματιζόμενων από αυτό θραυσματοποιημένων διαγνωστικών ιόντων της θεοβρωμίνης.....	155
Σχήμα 7.9: Φάσματα πλήρους σάρωσης (full scan spectra) της θεοβρωμίνης και του εσωτερικού προτύπου μετά από ανάλυση πρότυπου εμβολιασμένου δείγματος συγκέντρωσης $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ υπό τις βέλτιστες συνθήκες του συστήματος LC/TOF-MS.....	156
Σχήμα 7.10: Χρωματογραφήματα LC/TOF-MS των διαγνωστικών ιόντων της θεοβρωμίνης που ελήφθησαν μετά από ανάλυση εμβολιασμένου δείγματος συγκέντρωσης $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (A) και λευκού δείγματος ούρων αλόγου (B).....	156

Σχήμα 7.11: Διαγραμματική απεικόνιση αποτελεσμάτων μελέτης της επίδρασης του μητρικού υλικού στις αποκρίσεις, οι οποίες παρουσιάζονται κανονικοποιημένες ως προς τις τιμές που ελήφθησαν από την ανάλυση υδατικών δειγμάτων	161
Σχήμα 7.12: Καμπύλες αναφοράς της θεοβρωμίνης σε νερό και διαφορετικά δείγματα ούρων	164
Σχήμα 7.13: Καμπύλες προσθήκης που ελήφθησαν με τις προτεινόμενες μεθόδους LC/Ion Trap-MS και LC/TOF-MS για την ποσοτικοποίηση της θεοβρωμίνης σε ύποπτο δείγμα αλόγου	170
Σχήμα 8.1: Βασικές οδοί βιομετατροπής του σαλικυλικού οξέος	175
Σχήμα 8.2: Χημική δομή 4-μεθυλοσαλικυλικού οξέος	178
Σχήμα 8.3: Πορεία θραυσματοποίησης του σαλικυλικού οξέος κατά τον αρνητικό ιοντισμό με μηχανισμό ηλεκτροψεκασμού (ESI-) και κάτω από σταδιακά αυξανόμενες τιμές του δυναμικού θραυσματοποίησης (collision energy) του συστήματος QTOF-MS	180
Σχήμα 8.4: Φάσμα πλήρους σάρωσης (full scan spectrum, A) και φάσμα σάρωσης θυγατρικών ιόντων (product ion scan spectrum, B) του σαλικυλικού οξέος που ελήφθησαν μετά από ανάλυση LC/QTOF-MS/MS ανάλυση πρότυπου εμβολιασμένου δείγματος συγκέντρωσης 7,5 μg mL ⁻¹ υπό τις βέλτιστες συνθήκες	180
Σχήμα 8.5: Φάσμα πλήρους σάρωσης (full scan spectrum) του εσωτερικού προτύπου μετά από ανάλυση πρότυπου εμβολιασμένου δείγματος συγκέντρωσης 7,5 μg mL ⁻¹ υπό τις βέλτιστες συνθήκες του συστήματος LC/QTOF-MS	181
Σχήμα 8.6: Χρωματογραφήματα LC/QTOF-MS των διαγνωστικών ιόντων του σαλικυλικού οξέος και του εσωτερικού προτύπου που ελήφθησαν μετά από ανάλυση λευκού δείγματος ούρων αλόγου και εμβολιασμένου δείγματος συγκέντρωσης 7,5 μg mL ⁻¹	183
Σχήμα 8.7: Διαγραμματική απεικόνιση της κατανομής των υπολοίπων απόκρισης συναρτήσει της συγκέντρωσης του σαλικυλικού οξέος (μη ζυγισμένο γραμμικό μοντέλο) για τον έλεγχο ομοσκεδαστικότητας	187
Σχήμα 8.8: Διάγραμμα % σχετικού σφάλματος υπολογιζόμενης συγκέντρωσης του σαλικυλικού οξέος συναρτήσει της θεωρητικής συγκέντρωσης για το μη ζυγισμένο γραμμικό μοντέλο	188
Σχήμα 8.9: Διάγραμμα % σχετικού σφάλματος της πειραματικά υπολογιζόμενης συγκέντρωσης του σαλικυλικού οξέος συναρτήσει της θεωρητικής συγκέντρωσης για το ζυγισμένο γραμμικό μοντέλο με παράγοντα ζύγισης 1/x	189
Σχήμα 8.10: Διάγραμμα % σχετικού σφάλματος της πειραματικά υπολογιζόμενης συγκέντρωσης του σαλικυλικού οξέος συναρτήσει της θεωρητικής συγκέντρωσης για το ζυγισμένο γραμμικό μοντέλο με παράγοντα ζύγισης 1/x ²	189
Σχήμα 8.11: Διάγραμμα % σχετικού σφάλματος της πειραματικά υπολογιζόμενης συγκέντρωσης του σαλικυλικού οξέος συναρτήσει της θεωρητικής συγκέντρωσης για το ζυγισμένο γραμμικό μοντέλο με παράγοντα ζύγισης 1/y	190
Σχήμα 8.12: Διάγραμμα % σχετικού σφάλματος της πειραματικά υπολογιζόμενης συγκέντρωσης του σαλικυλικού οξέος συναρτήσει της θεωρητικής συγκέντρωσης για το ζυγισμένο γραμμικό μοντέλο με παράγοντα ζύγισης 1/y ²	190
Σχήμα 8.13: Μέση καμπύλη βαθμονόμησης που προκύπτει από τις έξι αναλυτικές δοκιμασίες για το σαλικυλικό οξύ	194
Σχήμα 8.14: Καμπύλες αναφοράς σαλικυλικού οξέος σε νερό και διαφορετικά δείγματα	196

Σχήμα 9.1: Οδοί βιομετατροπής της ντοπαμίνης και της L-DOPA.....	209
Σχήμα 9.2: Επίδραση του δυναμικού θραυσματοποίησης της πηγής ιοντισμού στην ένταση του πρωτονιωμένου μοριακού ιόντος και του θραυσματοποιημένου ιόντος της 3-μεθοξυτυραμίνης.....	213
Σχήμα 9.3: Επίδραση του δυναμικού του τριχοειδούς (capillary voltage) στην ένταση του πρωτονιωμένου μοριακού ιόντος και του θραυσματοποιημένου ιόντος της 3-μεθοξυτυραμίνης.....	214
Σχήμα 9.4: Φάσμα πλήρους σάρωσης (a) και φάσματα σάρωσης θυγατρικών ιόντων μετά από θραυσματοποίηση του πρωτονιωμένου μοριακού ιόντος με ενέργεια θραυσματοποίησης (CE) 7.5 V (b) και 20 V (c). Ελήφθησαν με ανάλυση προτύπου διαλύματος της 3-μεθοξυτυραμίνης συγκέντρωσης 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ υπό τις βέλτιστες συνθήκες του συστήματος QTOF-MS.....	216
Σχήμα 9.5: Φάσμα πλήρους σάρωσης (a) και φάσματα σάρωσης θυγατρικών ιόντων 3-μεθοξυτυραμίνης-d4 μετά από θραυσματοποίηση του πρωτονιωμένου μοριακού ιόντος με ενέργεια (CE) 7.5 V (b) και 20 V (c). Ελήφθησαν με ανάλυση προτύπου διαλύματος συγκέντρωσης 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ υπό τις βέλτιστες συνθήκες του συστήματος QTOF-MS.....	217
Σχήμα 9.6: Ιοντικά χρωματογραφήματα του αναλύτη και του εσωτερικού προτύπου που ελήφθησαν από την ανάλυση δείγματος ούρων αλόγου εμβολιασμένο με τον αναλύτη σε συγκέντρωση 4,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$	219
Σχήμα 9.7: Πορεία κατεργασίας δειγμάτων ούρων για τον ποσοτικό προσδιορισμό και την επιβεβαίωση της 3-μεθοξυτυραμίνης.....	222
Σχήμα 9.8: Καμπύλες αναφοράς της 3-μεθοξυτυραμίνης σε νερό και διαφορετικά δείγματα ούρων.....	225
Σχήμα 9.9: Διαγραμματική απεικόνιση της κατανομής των υπολοίπων απόκρισης συναρτήσει της συγκέντρωσης της 3-μεθοξυτυραμίνης (μη ζυγισμένο γραμμικό μοντέλο) για τον έλεγχο ομοσκεδαστικότητας.....	226
Σχήμα 9.10: Μέση καμπύλη βαθμονόμησης που προκύπτει από τις πέντε αναλυτικές δοκιμασίες για την 3-μεθοξυτυραμίνη.....	229
Σχήμα 9.11: ΜΧρωματογραφήματα των διαγνωστικών ιόντων της 3-μεθοξυτυραμίνης που ελήφθησαν από την επιβεβαιωτική ανάλυση HILIC /QTOF-MS ενός θετικού δείγματος ούρων αλόγου (α) και ενός πρότυπου εμβολιασμένου δείγματος συγκέντρωσης 12 $\mu\text{g mL}^{-1}$	239

Περίληψη

Στην παρούσα μελέτη αναπτύχθηκαν, αξιολογήθηκαν μέθοδοι ανίχνευσης, επιβεβαίωσης ή/και ποσοτικοποίησης απαγορευμένων ουσιών κατά τους ελέγχους ντόπινγκ σε δείγματα ούρων αθλητών ή αλόγων με εφαρμογή της συνδυασμένης τεχνικής LC/TOF-MS. Το πρώτο μέρος της εργασίας αφορά στη χρησιμοποίηση της τεχνολογίας LC/TOF-MS στην πολλαπλή ανίχνευση σάρωσης απαγορευμένων ουσιών σε ούρα αθλητών. Στο δεύτερο μέρος, η ίδια τεχνολογία εφαρμόστηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό και την ταυτοποίηση τεσσάρων απαγορευμένων ουσιών ορίου με την τεχνική της απευθείας έγχυσης.

Η ενοποίηση διαφορετικών πρωτοκόλλων σάρωσης με στόχο την ανίχνευση ενός μεγάλου εύρους απαγορευμένων ουσιών αποτελεί πλέον σημαντική επιδίωξη για τα εργαστήρια ντόπινγκ που διενεργούν τους ελέγχους ντόπινγκ. Στην παρούσα εργασία αναπτύχθηκε μέθοδος πολλαπλής ανίχνευσης 266 απαγορευμένων ουσιών από όλες τις κατηγορίες απαγορευμένων ουσιών χαμηλού μοριακού βάρους που αναφέρονται στη Λίστα του WADA. Η προτεινόμενη μεθοδολογία βασίστηκε στην υδρόλυση των ούρων, την εφαρμογή απλής διαδικασίας υγρό-υγρό εκχύλισης και ανάλυση των κατεργασμένων δειγμάτων με σύστημα UHPLC /QTOF-MS, το οποίο ρυθμίστηκε σε λειτουργία λήψης φασμάτων πλήρους σάρωσης. Εφαρμόστηκε θετικός ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό. Η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση των προς ανάλυση ουσιών από τα ούρα εδαρμοζόταν ήδη στο Εργαστήριο του ΟΑΚΑ για την ανίχνευση αναβολικών παραγόντων και κορτικοστεροειδών. Στην παρούσα εργασία, ελέγχθηκε η αποδοτικότητα της παραπάνω μεθόδου προκατεργασίας στην ανίχνευση ουσιών από όλες τις κατηγορίες της Λίστας (διουρητικών, ναρκωτικών, διεγερτικών). Κατά τον έλεγχο αξιολόγησης της μεθόδου μελετήθηκε η ικανότητα ανίχνευσης, η ειδικότητα, η επιδραση υποστρώματος, η ανάκτηση, η επαναληψιμότητα, η ικανότητα ακριβούς μέτρησης μάζας και υπολογίστηκαν τα όρια ανίχνευσης. Από τα αποτελέσματα της αξιολόγησης της μεθόδου τέθηκαν κριτήρια ανίχνευσης μιας ουσίας με την προτεινόμενη μεθοδολογία, τα οποία βασίζονται στο χρόνο ανάσχεσης και στην ακρίβεια μέτρησης του λόγου m/z . Η καταλληλότητα της προτεινόμενης μεθόδου στον έλεγχο ντόπινγκ ελέγχθηκε περαιτέρω με εφαρμογή αυτής στην ανάλυση πραγματικών θετικών δειγμάτων ούρων. Η δυνατότητα λήψης φασμάτων ακριβούς μάζας πλήρους σάρωσης που παρέχεται με την τεχνολογία TOF/MS και εφαρμόζεται στην αναπτυχθείσα μεθοδολογία επιτρέπει ακόμη την αναδρομική επανεξέταση δειγμάτων που έχουν αναλυθεί στο παρελθόν προκειμένου να διαπιστωθεί η λήψη νέων ουσιών που εισάγονται μετέπειτα στη Λίστα του WADA, όπως και έγινε με την περίπτωση ανίχνευσης της ουσίας 4-methyl-2-hexanamine, που οδήγησε στην εκ νέου αναφορά αριθμού δειγμάτων ως θετικά ενώ αρχικά είχαν αναφερθεί ως αρνητικά στις αρμόδιες αρχές.

Η κορτιζόλη αποτελεί για τα άλογα ενδογενή ουσία και συχνά χορηγείται σε αυτά λόγω της αντιφλεγμονώδους δράσης της. Ο AORC έχει ορίσει ως ανώτατο επιτρεπτό όριο συγκέντρωσης της ελεύθερης κορτιζόλης σε ούρα αλόγων το $1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Αναπτύχθηκαν και αξιολογήθηκαν δύο απλές και ταχείες μέθοδοι LC/MS απευθείας έγχυσης για τον ποσοτικό προσδιορισμό και την ταυτοποίηση της κορτιζόλης σε ούρα αλόγων με κοινή πορεία κατεργασίας και τη χρησιμοποίηση δύο συστημάτων LC/MS (LC/IT-MS και LC/TOF-MS).

Κύριο πλεονέκτημα της προτεινόμενης μεθοδολογίας αποτελεί η απλοποιημένη πορεία κατεργασίας των δειγμάτων που βσιίζεται στην απευθείας έγχυση του φιλτραρισμένου και αραιωμένου δείγματος ούρων στο σύστημα LC/MS. Το εξεταζόμενο εύρος γραμμικότητας της μεθόδου ήταν 0,25 – 2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Κατά τον έλεγχο επιδράσεων από το υπόστρωμα των ούρων, παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν καμπύλες αναφοράς σε υδατικά δείγματα και δείγματα ούρων διαφορετικών αλόγων και μεγάλη διακύμανση των αποκρίσεων τόσο της κορτιζόλης όσο και του εσωτερικού προτύπου στα διαφορετικά υποστρώματα ούρων. Λαμβάνοντας υπόψη τις επιδράσεις από το υπόστρωμα, τη μη διαθεσιμότητα λευκών δειγμάτων και το υψηλό κόστος αγοράς ή παρασκευής δευτεριωμένου εσωτερικού προτύπου της κορτιζόλης, μελετήθηκε η δυνατότητα εφαρμογής της τεχνικής προσθήκης γνωστών ποσοτήτων για έναν αξιόπιστο ποσοτικό προσδιορισμό. Η μέθοδος αξιολογήθηκε ως προς τα κύρια χαρακτηριστικά ποιότητας (γραμμικότητα, ακρίβεια, επαναληψιμότητα, εκλεκτικότητα, έλεγχο επιμόλυνσης εκ μεταφοράς) και στα δύο οργανολογικά συστήματα. Τα αποτελέσματα της αξιολόγησης κρίνουν τη μέθοδο κατάλληλη για το σκοπό που αναπτύχθηκε. Η μέθοδος εφαρμόστηκε στην ανάλυση ενός πραγματικού θετικού δείγματος.

Η θεοβρωμίνη αποτελεί για τα άλογα απαγορευμένη ουσία σε συγκέντρωση μεγαλύτερη από 2 mg mL^{-1} και συχνά βρίσκεται στα ούρα των αλόγων ως μεταβολίτης της καφεΐνης ή ως συστατικό της τροφής τους. Αναπτύχθηκε και αξιολογήθηκε μέθοδος ποσοτικοποίησης και επιβεβαίωσης της θεοβρωμίνης σε ούρα αλόγων με την τεχνική LC-MS. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν δύο συστήματα LC-MS (LC/IT-MS και LC/TOF-MS). Και στις δύο περιπτώσεις πραγματοποιήθηκε απευθείας ανάλυση των δειγμάτων ούρων με ελάχιστη προκατεργασία των δειγμάτων χωρίς διαδικασία εκχύλισης για την απομόνωση του αναλύτη. Το εξεταζόμενο όριο γραμμικότητας της μεθόδου ήταν 0,75 – 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Κατά τον έλεγχο επιδράσεων από το υπόστρωμα των ούρων, παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν καμπύλες αναφοράς σε υδατικά δείγματα και δείγματα ούρων διαφορετικών αλόγων. Κατά τον έλεγχο αυτό διαπιστώθηκε μεγάλη διακύμανση των αποκρίσεων τόσο της θεοβρωμίνης όσο και του εσωτερικού προτύπου στα διαφορετικά υποστρώματα ούρων. Λαμβάνοντας υπόψη τις επιδράσεις από το υπόστρωμα, και τη μη διαθεσιμότητα στην αγορά δευτεριωμένου εσωτερικού προτύπου του αναλύτη, μελετήθηκε η δυνατότητα εφαρμογής της τεχνικής προσθήκης γνωστών ποσοτήτων για έναν αξιόπιστο ποσοτικό προσδιορισμό.

Η μέθοδος αξιολογήθηκε ως προς τα κύρια χαρακτηριστικά ποιότητας (γραμμικότητα, ακρίβεια, επαναληψιμότητα, εκλεκτικότητα, έλεγχο επιμόλυνσης εκ μεταφοράς) και στα δύο οργανολογικά συστήματα. Τα αποτελέσματα της αξιολόγησης κρίνουν τη μέθοδο κατάλληλη για το σκοπό που αναπτύχθηκε. Η μέθοδος εφαρμόστηκε στην ανάλυση δύο πραγματικών θετικών δειγμάτων. Τέλος πραγματοποιήθηκε σύγκριση των αποτελεσμάτων εφαρμογής της μεθόδου στα δύο συστήματα LCMS και δεν διαπιστώθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ τους.

Το σαλικυλικό οξύ έχει αναλγητικές, αντιφλεγμονώδεις και αντιυπερτικές ιδιότητες και συχνά βρίσκεται στα ούρα των αλόγων λαμβανόμενο είτε μέσω της τροφής είτε κατόπιν χορήγησης ακετυλοσαλικυλικού οξέος για θεραπευτικούς σκοπούς. Θεωρείται απαγορευμένη ουσία όταν η συγκέντρωσή του στα ούρα υπερβαίνει τα 750 mg mL^{-1} . Αναπτύχθηκε ταχεία μέθοδος ποσοτικοποίησης του σαλικυλικού οξέος. Η μεθοδολογία περιελάμβανε 900 φορές αραιώση των δειγμάτων ούρων, προσθήκη εσωτερικού προτύπου και ανάλυση με την τεχνολογία UHPLC/QTOF-MS. Ως τεχνική ιονισμού επιλέχθηκε ο

αρνητικός ιονισμός με ηλεκτροδιάχυση (ESI(-)). Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του σαλικυλικού οξέος επιλέχθηκε η τεχνική λειτουργίας πλήρους σάρωσης (full scan) του συστήματος QTOFMS. Για την επιβεβαίωση πραγματοποιήθηκε δεύτερη ανάλυση των ήδη κατεργασμένων δειγμάτων με την τεχνική σάρωσης προεπιλεγμένου ιόντος (MSMS ανάλυση). Η διάρκεια της ανάλυσης ήταν 2 min. Η μέθοδος αξιολογήθηκε ως προς τα κύρια χαρακτηριστικά ποιότητας και κρίθηκε κατάλληλη για το σκοπό που αναπτύχθηκε. Τέλος, εφαρμόστηκε στην ανάλυση δύο πραγματικών δειγμάτων ούρων αλόγων.

Η 3-μεθοξυτυραμίνη (3MT) αποτελεί έναν από τους μεταβολίτες της ντοπαμίνης και της λεβοντόπα, ουσιών που αποτελούν για τα θηλαστικά ενδογενείς ουσίες, αλλά ταυτόχρονα κυκλοφορούν και σε φαρμακευτικά σκευάσματα για την αντιμετώπιση της καταπληξίας (shock) και τη θεραπεία της νόσου του Parkinson, αντίστοιχα. Η συγκέντρωση της 3MT στα ούρα των αλόγων χρησιμοποιείται ως δείκτης χορήγησης της λεβοντόπα και της ντοπαμίνης. Ο AORC έχει θέσει ως ανώτατο επιτρεπόμενο όριο στη συγκέντρωση της 3MT στα ούρα των αλόγων τα $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ (ελεύθερης και συζευγμένης). Αναπτύχθηκε μέθοδος LC/QTOF-MS για την ποσοτικοποίηση και την επιβεβαίωση της 3MT σε ούρα αλόγων. Η προκατεργασία των δειγμάτων περιελάμβανε υδρόλυση, καταβύθιση των πρωτεϊνών με προσθήκη ακετονιτριλίου και υπερφυγοκέντρηση και φιλτράρισμα του υπερκείμενου υγρού. Ως εσωτερικό πρότυπο χρησιμοποιήθηκε 3MT-d4. Χρησιμοποιήθηκε η τεχνική HILIC, η οποία επιτρέπει τη συγκράτηση πολύ πολικών μορίων με τη χρησιμοποίηση πολικών στατικών φάσεων και κινητών φάσεων με υψηλή περιεκτικότητα οργανικού τροποποιητή. Για την ανίχνευση του αναλύτη και του εσωτερικού προτύπου επιλέχθηκε θετικός ιονισμός με την τεχνική της ηλεκτροδιάχυσης και η σάρωση θυγατρικών ιόντων προεπιλεγμένου ιόντος επιλέχθηκε ως τεχνική λειτουργίας του οργάνου QTOF-MS. Η μέθοδος αξιολογήθηκε ως προς τα κύρια χαρακτηριστικά ποιότητας και κρίθηκε κατάλληλη για το σκοπό που αναπτύχθηκε. Τέλος εφαρμόστηκε σε 3 πραγματικά θετικά δείγματα.

Summary

In the current study, new qualitative and quantitative methods were developed and validated for the doping control screening analysis, confirmation, and/or quantitative determination of prohibited substances using LC/TOF-MS technology. The first part of this work presents the use of LC/TOF-MS for the multiple detection of a great number of prohibited substances in athletes urine. In the second part, the same technology was applied for the quantification and identification of 4 threshold substances in horse urine using direct injection analysis.

Unification of screening protocols for a wide range of doping agents has become an important issue for doping control laboratories. In the present study, a high throughput screening method was developed for the multiple detection of 266 small molecule analytes from all categories of prohibited substances included in the WADA List. The proposed methodology is based on a single-step liquid-liquid extraction of hydrolyzed urine and the use of a rapid-resolution LC/TOF-MS system acquiring continuous full scan spectral data. Electrospray ionization in the positive mode was applied. The extraction protocol and sample preparation procedure used in this study was applied in the OACA doping control laboratory for the routine screening analysis of anabolic agents and corticosteroids. Our approach on sample preparation was to study the efficiency of this procedure for other classes of substances (stimulants, narcotics, diuretics). Validation parameters consisted of identification capability, limit of detection, specificity, ion suppression, extraction recovery, repeatability and mass accuracy. Detection criteria were established on the basis of retention time reproducibility and mass accuracy. The suitability of the methodology for doping control was demonstrated with positive urine samples. The preventive role of the method was proved by the case where full scan acquisition with accurate mass measurement allowed the retrospective reprocessing of acquired data from past doping control samples for the detection of a designer drug, the stimulant 4-methyl-2-hexanamine, which resulted in re-reporting a number of stored samples as positives for this particular substance, when, initially, they had been reported as negatives.

Hydrocortisone is the primary endogenous glucocorticosteroid and is used in equine veterinary medicine for its anti-inflammatory properties. As an endogenous substance, its control in equine sports is regulated by a threshold value of $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ free hydrocortisone in urine. Two simple and rapid LC/MS methods with direct injection analysis were developed and validated for the quantification and identification of hydrocortisone in equine urine using the same sample preparation but different mass spectrometric systems: IT-MS and TOF-MS. The main advantage of the proposed methodology is the minimal sample preparation procedure, as particle-free diluted urine samples were directly injected into both LC/MS systems. Desonide was used as internal standard (IS). The tested linear range was $0,25\text{--}2,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ for both methods. Matrix effects were evaluated by preparing and analyzing calibration curves in water solutions and different horse urine samples. A great variation of the signal both for hydrocortisone and the internal standard was observed in different matrices. To overcome matrix effects, the unavailability of blank matrix and the excessive cost of the isotopically labeled internal standard, standard additions calibration

method was applied. This work is an exploration of the performance of the standard additions approach in a method where neither non isotopic internal standards nor extensive sample preparation is utilized and no blank matrix is available. Validation results on linearity, accuracy and precision for both methods prove their suitability for the doping control analysis of hydrocortisone in horse urine. The above method was applied to a real sample, using both LC/MS methods.

In equine sport, theobromine is prohibited with a threshold level of $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ in urine. Two simple LC/MS methods for the identification and quantification of theobromine were developed and validated using the same sample preparation procedure but different mass spectrometric systems (IT-MS and TOF-MS). Particle-free diluted urine samples were directly injected into the LC/MS systems, avoiding the time-consuming extraction step. 3-Propylxanthine was used as the internal standard. The tested linear range was $0.75\text{--}15 \mu\text{g mL}^{-1}$. Matrix effects were evaluated analyzing calibration curves in water and different fortified horse urine samples. A great variation in the signal of theobromine and the internal standard was observed in different matrices. To overcome matrix effects, a standard additions calibration method was applied. The linearity, accuracy and precision for both methods prove their suitability for the doping control analysis of theobromine in horse urine. The methods were applied to two case samples, demonstrating simplicity, accuracy and selectivity.

Salicylates have analgesic, anti-inflammatory, and antipyretic properties. In horses, salicylates may derive both from feeding as well as from medication. In equine sport, salicylic acid is prohibited with a threshold level of $750 \mu\text{g mL}^{-1}$ in urine. A simple and rapid LC/MS method was developed and validated for the quantification and identification of salicylic acid. Urine samples after 900-fold dilution and addition of the internal standard (4-methylsalicylic acid) were directly injected to the LC/QTOF-MS system. Electrospray ionization in negative mode with full scan acquisition mode and product ion scan mode were chosen for the quantification and identification of salicylic acid, respectively. Run time was 2.0 min. The tested linear range was $2.5\text{--}50 \mu\text{g mL}^{-1}$ (after 100-fold sample dilution). The linearity, accuracy, and precision results prove the method's suitability for the doping control analysis of salicylic acid in horse urine. The area ratios of the diagnostic product ions of salicylic acid were found to be precise for confirmation purposes. The above method was applied to the quantitative and confirmatory analysis of two real samples.

The endogenous catecholamine dopamine and its pharmacologically inert precursor, L-dopa, are both available as human pharmaceutical preparations and can be used as performance enhancing drugs in horses. Urinary 3-methoxytyramine is used as an indicator of dopaminergic manipulation resulting from dopamine or levodopa administration and is prohibited with a urinary threshold of $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ (free and conjugated). A simple LC/MS method was developed and validated for the quantification and identification of 3-methoxytyramine in equine urine. Sample preparation involved enzymatic hydrolysis and protein precipitation. HILIC was selected as a separation technique that allows effective retention of polar substances like 3-methoxytyramine and efficient separation from matrix compounds. Electrospray ionization (ESI) in positive mode with product ion scan mode was chosen for the detection of the analytes. Studies on matrix effects showed ion suppression depending on the horse urine used. To overcome the variability of the results originating from the matrix effects, isotopic labelled internal standard was used and linear regression

calibration methodology was applied for the quantitative determination of the analyte. The linearity, accuracy and precision results prove the method's suitability for the doping control analysis of 3-methoxytyramine in horse urine. The above method was applied to the quantitative and confirmatory analysis of three case samples.