



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Ανάπτυξη μεθόδων ανίχνευσης απαγορευμένων ουσιών σε
ούρα αλόγων**

**ΜΑΡΟΥΛΑ Κ. ΚΙΟΥΣΗ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ

ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ 2016

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ανάπτυξη μεθόδων ανίχνευσης απαγορευμένων ουσιών σε ούρα αλόγων

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ
ΜΑΡΟΥΛΑ Κ. ΚΙΟΥΣΗ
A.M.: 102911

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Κουππάρης Μιχάλης, Καθηγητής Τμήματος Χημείας, ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ:

Μιχάηλ Κουππάρης, Καθηγητής Τμήματος Χημείας, ΕΚΠΑ

Νικόλαος Θωμαΐδης, Αναπλ. Καθηγητής Τμήματος Χημείας, ΕΚΠΑ

Ευάγγελος Μπακέας, Αναπλ. Καθηγητής Τμήματος Χημείας, ΕΚΠΑ

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Μιχάηλ Κουππάρης, Καθηγητής Τμήματος Χημείας, ΕΚΠΑ

Νικόλαος Θωμαΐδης, Αναπλ. Καθηγητής Τμήματος Χημείας, ΕΚΠΑ

Ευάγγελος Μπακέας, Αναπλ. Καθηγητής Τμήματος Χημείας, ΕΚΠΑ

Αντώνιος Καλοκαιρινός, Καθηγητής Τμήματος Χημείας, ΕΚΠΑ

Αναστάσιος Οικονόμου, Αναπλ. Καθηγητής Τμήματος Χημείας, ΕΚΠΑ

Ευάγγελος Γκίκας, Επικ. Καθηγητής Τμήματος Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ

Ιωάννης Ντότσικας, Επικ. Καθηγητής Τμήματος Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 05/07/2017

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή αναπτύσσεται μια γενικευμένη μέθοδος σάρωσης για τον ποιοτικό προσδιορισμό της ταυτότητας απαγορευμένων ουσιών και μεταβολιτών αυτών, με σκοπό τον έλεγχο ντόπινγκ στα ιππικά αθλήματα. Αυτή βασίζεται στο σχεδιασμό μιας ενοποιημένης παρασκευαστικής πορείας και στη συνδυασμένη εφαρμογή υγρο- και αεριοχρωματογραφίας – φασματομετρίας μαζών για την ανάλυση των προκατεργασμένων δειγμάτων ούρων αλόγων. Η προετοιμασία των δειγμάτων αρχίζει με δύο παράλληλα στάδια: ενζυμική υδρόλυση των εστέρων του γλυκουρονικού και του θειικού οξέος, και χημική υδρόλυση (μεθανόλυση), κυρίως, για τους 17β-θειικούς εστέρες των αναβολικών στεροειδών. Τα εκχυλίσματα επεξεργάζονται, καταλλήλως, για αναλύσεις LC-TOF-MS, GC-MS και GC-HRMS. Η πλειοψηφία των εξεταζόμενων ουσιών ανιχνεύονται χωρίς παραγωγοποίηση, μέσω της τεχνικής LC-TOF-MS, η οποία εμφανίζει την ικανότητα μέτρησης ακριβούς μάζας. Η προετοιμασία των δειγμάτων περιλαμβάνει σχηματισμό μεθυλο- και TMS-παραγώγων, τα οποία είναι πολύ διαδεδομένα στις τοξικολογικές βιβλιοθήκες GC-MS. Η μέθοδος σάρωσης ενισχύεται με την αναζήτηση απαγορευμένων ουσιών σε βιβλιοθήκες φασμάτων μαζών, χρησιμοποιώντας προγράμματα φασματικής αποσυνέλιξης, AMDIS και DRS. Η εν λόγω μεθοδολογία εμφανίζει την ικανότητα ταυτοποίησης περισσότερων των τριακοσίων πενήντα απαγορευμένων ουσιών σε ούρα αλόγων κι επιπλέον, μπορεί να ενσωματώσει νέες ουσίες, χωρίς αλλαγές στη χρωματογραφία. Επίσης, η ανάλυση σε λειτουργία πλήρους σάρωσης (LC-TOF-MS, GC-MS), επιτρέπει την αναδρομική εξέταση παλαιών δειγμάτων με επεξεργασία των δεδομένων που είχαν ληφθεί. Η επικύρωση πραγματοποιείται για εξήντα ουσίες και περιλαμβάνει προσδιορισμό ορίου ανίχνευσης, ανάκτησης από εκχύλιση, επίδρασης του υποστρώματος, επιμόλυνσης από προηγούμενο δείγμα, όπως επίσης, έλεγχο των παρεμποδίσεων από το υπόστρωμα και της ικανότητας μέτρησης ακριβούς μάζας. Η καταλληλότητα της μεθοδολογίας αποδείχτηκε και με την εφαρμογή αυτής σε αυθεντικά θετικά δείγματα ούρων, όπως επίσης και στα δείγματα του «Proficiency Test» του AORC του 2012.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Αναλυτική χημεία, έλεγχος ντόπινγκ

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Έλεγχος ντόπινγκ, ούρα αλόγων, μέθοδος σάρωσης, φασματομετρία μαζών, φασματική αποσυνέλιξη

ABSTRACT

In the present study a general screening protocol is developed to detect prohibited substances and metabolites for doping control purposes in equine sports. It is based on the establishment of a unified sample preparation and on the combined implementation of liquid and gas chromatographic MS analysis. The sample pretreatment begins with two parallel procedures: enzymatic hydrolysis of sulfate and glucuronide conjugates, and chemical hydrolysis (methanolysis) of the 17 β -sulfate steroid conjugates. The extracts are treated for LC-TOF-MS, GC-HRMS and GC-MS analyses. The majority of the prohibited substances are identified through a high mass accuracy technique, such as LC-TOF-MS, without prior derivatization. The sample preparation procedure includes the formation of methylated and trimethylsilylated derivatives common in toxicological GC-MS libraries. The screening method is enhanced by post-run library searching using automated mass spectral deconvolution and identification system (AMDIS) combined with Deconvolution Reporting Software (DRS), in order to identify banned compounds that are not targeted. The current methodology is able to detect the presence of more than three hundred and fifty target analytes in horse urine and may easily incorporate a lot of new substances without changes in chromatography. The full scan acquisition allows retrospective identification of prohibited substances in stored urine samples after reprocessing of the acquired data. Validation is performed for sixty representative compounds and includes limit of detection, matrix interference, extraction recovery, mass accuracy, matrix effect and carry over contamination. The suitability of the method was demonstrated with previously declared positive horse urine samples and with urine specimens from the proficiency test of Association of Official Racing Chemists 2012.

SUBJECT AREA: Analytical chemistry, doping control

KEYWORDS: Doping control, equine urine, screening method, mass spectrometry, spectra deconvolution

**Στους γονείς μου, στην αδελφή μου Χριστίνα
και
στη μνήμη του παππού μου Δημήτρη,
με όλη μου την αγάπη και την εκτίμηση**

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για τη διεκπεραίωση της παρούσας διδακτορικής διατριβής θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Μ.Κουππάρη για την τιμή που μου έκανε να είναι ο επιβλέπων καθηγητής μου. Τον ευχαριστώ πολύ για το ενδιαφέρον του, την επίβλεψη, τις παρατηρήσεις του, όπως επίσης, και για τον χρόνο που μου διέθεσε.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω πολύ τον κ. Κ.Γεωργακόπουλο, διευθυντή του Εργαστηρίου ελέγχου ντόπινγκ του ΟΑΚΑ έως το 2011, καθώς σε αυτόν, κυρίως, οφείλω την εκπόνηση της διδακτορικής μου διατριβής, με την τιμητική πρότασή του να συνεχίσω τις μεταπτυχιακές μου σπουδές στο εργαστήριο που διηύθυνε. Η καθοδήγηση και η συμβολή του ήταν καθοριστική και πολύ σημαντική.

Προς τον κ. Ε.Λυρή, διευθυντή του Εργαστηρίου ελέγχου ντόπινγκ το διάστημα 2011-2015, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες για το χρόνο που μου διέθεσε, είτε για λόγους εκπαίδευσης, είτε με αφορμή θέματα που προέκυπταν κατά την εκπόνηση της διατριβής. Οι συζητήσεις διεξάγονταν σε κλίμα ηρεμίας, συνεννόησης, κατανόησης και με εξαγωγή συγκεκριμένων συμπερασμάτων. Τον ευχαριστώ για τη βοήθεια και τη διακριτική του στήριξη σε κάποια κρίσιμη φάση της διατριβής.

Επιπλέον, οφείλω να ευχαριστήσω πολύ τον κ. Ι.Αγγελή για τη συμβολή του στη διδακτορική διατριβή, αλλά και για όσα έμαθα δίπλα του στη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Μ.Τσίβου, σημερινή διευθύντρια του Εργαστηρίου ελέγχου ντόπινγκ, για την πολύ καλή συνεργασία μας, την προθυμία της και τη θετική της στάση.

Γενικότερα, από το προσωπικό του Εργαστηρίου όπου εκπονήθηκε η διατριβή ευχαριστώ πολύ αυτούς, από τους οποίους εισέπραξα αληθινό ενδιαφέρον, θετική διάθεση και καλή φιλοξενία.

Επιπροσθέτως, ευχαριστώ πολύ την επταμελή επιτροπή για τα σχόλια και τις παρατηρήσεις τους που συνέβαλαν στη βελτιωμένη έκδοση της διατριβής.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω πολύ τον προϊστάμενο κ. Κ.Λιαπή και τους συναδέλφους μου στο Εργαστήριο υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων του

Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου. Η συμβολή τους από τον Οκτώβριο του 2014 ήταν έμμεση, αλλά σημαντική, καθώς, το ευχάριστο κλίμα εργασίας, η ενθαρρυντική τους στάση, η κατανόηση, η πάντα άμεση και θετική ανταπόκρισή τους σε αιτήματα άδειας με σκοπό τη συγγραφή, συνέβαλαν στην αποδοτική ενασχόλησή μου με τη συγγραφή της διδακτορικής διατριβής.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω πάρα πολύ τους γονείς μου και την αδελφή μου, από τους οποίους αντλούσα τη δύναμη για να ανταπεξέλθω στις υψηλές απαιτήσεις της διατριβής. Αυτοί ήταν πάντα το ακλόνητο στήριγμά μου. Θα τους ευγνωμονώ για την αδιάκοπη ηθική στήριξη και ψυχολογική συμπαράσταση, τον υποστηρικτικό τους λόγο, όπως επίσης και για την οικονομική τους στήριξη επί τουλάχιστον τρία χρόνια, σε μια δύσκολη οικονομική περίοδο.

Αθήνα, Δεκέμβριος 2016

Μαρούλα Κ. Κιούση

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	23
1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΝΤΟΠΙΝΓΚ - ΑΠΑΓΟΡΕΥΜΕΝΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΑΥΤΩΝ	24
1.1 Ιστορική αναδρομή	24
1.2 Διεθνής Ιππική Ομοσπονδία	26
1.3 Διεθνής Ομοσπονδία Ιπποδρομιακών Αρχών	26
1.4 Εργαστήριο Ελέγχου Ντόπινγκ.....	27
1.5 Ταξινόμηση απαγορευμένων ουσιών	28
1.6 Τρόπος δράσης και δομικά χαρακτηριστικά των απαγορευμένων ουσιών	30
1.6.1 Διεγερτικά.....	30
1.6.2 β2-Αδρενεργικοί αγωνιστές.....	31
1.6.3 β-Αδρενεργικοί αναστολείς.....	31
1.6.4 Ναρκωτικά και οπιοειδή αναλγητικά.....	32
1.6.5 Αναβολικά	33
1.6.6 Κορτικοστεροειδή.....	34
1.6.7 Διουρητικά.....	35
1.6.8 Μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη	36
1.7 Μεταβολισμός.....	37
1.7.1 Φάσεις μεταβολισμού.....	37
1.7.2 Μεταβολισμός διεγερτικών	39
1.7.3 Μεταβολισμός β2-αγωνιστών	40
1.7.4 Μεταβολισμός μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών	40
1.7.5 Μεταβολισμός αναβολικών στεροειδών	41
2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΥΓΡΟ- ΚΑΙ ΑΕΡΙΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ – ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΩΝ	43
2.1 Εισαγωγή.....	43

2.2	Υγροχρωματογραφία – φασματομετρία μαζών με αναλυτή χρόνου πτήσης (LC-TOF-MS).....	<u>43</u>
2.2.1	Υγροχρωματογραφία	<u>43</u>
2.2.2	Φασματομετρία μαζών χρόνου πτήσης.....	<u>46</u>
2.3	Αεριοχρωματογραφία – φασματομετρία μαζών με τετραπολικό αναλυτή (GC-MS)	<u>56</u>
2.3.1	Αεριοχρωματογραφία.....	<u>56</u>
2.3.2	Φασματομετρία μαζών τετραπολικού αναλυτή.....	<u>61</u>
2.4	Αεριοχρωματογραφία – φασματομετρία μαζών υψηλής διακριτικής ικανότητας (GC-HRMS)	<u>65</u>
2.4.1	Αρχή λειτουργίας.....	<u>65</u>
2.4.2	Πηγή ιοντισμού	<u>67</u>
2.4.3	Αναλυτής διπλής εστίασης	<u>67</u>
2.4.4	Ανιχνευτής	<u>69</u>
2.5	Αυτόματη ανίχνευση ουσιών μέσω προγράμματος αυτόματης φασματικής αποσυνέλιξης.....	<u>69</u>
3.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΠΟΛΥΔΥΝΑΜΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΑΠΑΓΟΡΕΥΜΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΕ ΟΥΡΑ ΑΛΟΓΩΝ.....	<u>72</u>
3.1	Εισαγωγή.....	<u>72</u>
3.2	Στάδια προκατεργασίας δειγμάτων ούρων αλόγων.....	<u>73</u>
3.2.1	Υδρόλυση μεταβολιτών.....	<u>73</u>
3.2.2	Εκχύλιση	<u>74</u>
3.2.3	Παραγωγοποίηση	<u>76</u>
3.3	Τεχνικές ανάλυσης δειγμάτων ούρων αλόγων για πολυδύναμες μεθόδους	<u>84</u>
3.4	Σύνοψη μεθοδολογιών	<u>86</u>
3.4.1	Ξεχωριστός προσδιορισμός όξινων - ουδέτερων και βασικών ουσιών με συλλογή των αντίστοιχων εκχυλισμάτων.....	<u>86</u>

3.4.2	Προσδιορισμός ουσιών με συλλογή ενός γενικευμένου οργανικού εκχυλίσματος.....	<u>87</u>
3.4.3	Προσδιορισμός ουσιών με συνδυασμό ενός υδρολυμένου και ενός μη υδρολυμένου οργανικού εκχυλίσματος.....	<u>88</u>
3.4.4	Προσδιορισμός ουσιών μέσω ανάλυσης LC-TOF-MS	<u>88</u>
4.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	<u>91</u>
4.1	Εισαγωγή - Πρόλογος	<u>91</u>
4.2	Σκοπός και πρωτοτυπία της διδακτορικής διατριβής.....	<u>92</u>
4.3	Αντιδραστήρια – Διαλύτες – Ρυθμιστικά διαλύματα	<u>93</u>
4.3.1	Υγρά αντιδραστήρια.....	<u>93</u>
4.3.2	Στερεά αντιδραστήρια	<u>93</u>
4.3.3	Διαλύτες.....	<u>94</u>
4.3.4	Διαλύματα	<u>94</u>
4.3.5	Ρυθμιστικά διαλύματα και στερεά ρυθμιστικά μίγματα	<u>95</u>
4.4	Πρότυπες ουσίες και πρότυπα διαλύματα	<u>95</u>
4.5	Υλικά	<u>95</u>
4.6	Εργαστηριακές συσκευές	<u>96</u>
4.7	Οργανολογία	<u>97</u>
4.7.1	LC/TOF/MS, οργανολογία – συνθήκες ανάλυσης	<u>97</u>
4.7.2	GC/High Resolution MS, οργανολογία – συνθήκες ανάλυσης	<u>99</u>
4.7.3	GC-MS, οργανολογία – συνθήκες ανάλυσης	<u>100</u>
5.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΑ ΣΤΑΔΙΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ ...	<u>102</u>
5.1	Εισαγωγή.....	<u>102</u>
5.2	Εφαρμοζόμενη μεθοδολογία σε βάση ρουτίνας.....	<u>102</u>
5.2.1	Διαδικασία II_IV αλόγων	<u>102</u>
5.2.2	Διαδικασία «NSAID» αλόγων.....	<u>105</u>
5.3	Επιλογή εξεταζόμενων ουσιών.....	<u>105</u>

5.4	Βιβλιογραφική μελέτη μεταβολισμού	<u>107</u>
5.5	Παρασκευή ποιοτικών και πολυσυστατικών διαλυμάτων	<u>110</u>
5.6	Ανάλυση LC-TOF-MS των πολυσυστατικών διαλυμάτων	<u>110</u>
5.6.1	Ανάλυση διαλυμάτων – Εύρεση χρόνων έκλουσης.....	<u>110</u>
5.6.2	Καταγραφή ιόντων	<u>111</u>
5.6.3	Δημιουργία μεθόδων εκτύπωσης.....	<u>112</u>
5.7	Δοκιμή σε ούρα αλόγων	<u>113</u>
5.8	Συμπεράσματα	<u>115</u>
6.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ.....	<u>117</u>
6.1	Εισαγωγή.....	<u>117</u>
6.2	Επιλεγμένες ουσίες για την ανάπτυξη μεθόδου	<u>117</u>
6.3	Κριτήρια επιλογής παρασκευαστικής διαδικασίας	<u>117</u>
6.4	Πρώτο μέρος ανάπτυξης μεθόδου.....	<u>120</u>
6.4.1	Παρασκευαστικές πορείες ξεχωριστής ανάλυσης των εκχυλισμάτων	<u>120</u>
6.4.2	Αποτελέσματα διαδικασιών Α' i, Α' ii, Α' iii.....	<u>124</u>
6.4.3	Αποτελέσματα διαδικασιών Β' i, Β' ii, Β' iii.....	<u>128</u>
6.4.4	Αποτελέσματα διαδικασιών Γ' i, Γ' ii, Γ' iii	<u>132</u>
6.4.5	Παρασκευαστική πορεία των διαδικασιών Β' 14.....	<u>134</u>
6.4.6	Αποτελέσματα διαδικασιών Β' 14i, Β' 14ii και Β' 14iii	<u>136</u>
6.4.7	Δοκιμή όξινης υδρόλυσης – παρασκευαστικά στάδια	<u>138</u>
6.4.8	Αποτελέσματα όξινης υδρόλυσης	<u>139</u>
6.4.9	Συμπεράσματα πρώτης φάσης ανάπτυξης μεθόδου	<u>140</u>
6.5	Δεύτερο μέρος ανάπτυξης μεθόδου	<u>141</u>
6.5.1	Εισαγωγή - Πρόλογος.....	<u>141</u>
6.5.2	Παρασκευαστικά στάδια διαδικασιών (Α'+Β') _{i,ii,iii}	<u>141</u>
6.5.3	Αποτελέσματα διαδικασιών (Α'+Β') _{i,ii,iii}	<u>143</u>

6.5.4	Διαδικασίες (A'+Γ')	i,ii,iii	146
6.5.5	Διαδικασίες (B'+Γ')	i,ii,iii	149
6.5.6	Διαδικασίες (A'+B'+Γ')	i,ii,iii	153
6.5.7	Συμπεράσματα δεύτερης φάσης ανάπτυξης μεθόδου		156
6.6	Αυτόματη ανίχνευση απαγορευμένων ουσιών μέσω των προγραμμάτων AMDIS-DRS		158
6.7	Τρίτο μέρος ανάπτυξης μεθόδου		159
6.7.1	Εισαγωγή - Πρόλογος		159
6.7.2	Παρασκευαστικές πορείες τρίτης φάσης ανάπτυξης μεθόδου		162
6.7.3	Αποτελέσματα τρίτης φάσης ανάπτυξης μεθόδου		162
6.7.4	Συμπεράσματα τρίτης φάσης ανάπτυξης μεθόδου		166
6.8	Επίλογος κεφαλαίου		167
7.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ		170
7.1	Εισαγωγή - Πρόλογος		170
7.2	Επιλογή ουσιών για επικύρωση		170
7.3	Προκαταρκτικό δοκιμαστικό στάδιο		171
7.3.1	Προετοιμασία προκαταρκτικού δοκιμαστικού σταδίου		171
7.3.2	Αποτελέσματα και συμπεράσματα δοκιμαστικού σταδίου		173
7.3.3	Αποτελέσματα αυτόματης ανίχνευσης μέσω AMDIS-DRS		175
7.4	Κριτήρια ανίχνευσης απαγορευμένων ουσιών		176
7.5	Σημεία ελέγχου μεθόδου		176
7.6	Σχεδιασμός επικύρωσης μεθόδου		178
7.7	Επικύρωση μεθόδου		179
7.7.1	Προσδιορισμός ορίου ανίχνευσης		179
7.7.2	Έλεγχος παρεμποδίσεων υποστρώματος		181
7.7.3	Χρωματογραφικά χαρακτηριστικά		182
7.7.4	Ανάκτηση από εκχύλιση		182

7.7.5	Ικανότητα μέτρησης ακριβούς μάζας	<u>187</u>
7.7.6	Επίδραση υποστρώματος.....	<u>188</u>
7.7.7	Πιστότητα μεθόδου	<u>192</u>
7.7.8	Έλεγχος επιμόλυνσης.....	<u>198</u>
7.7.9	Σύνοψη αποτελεσμάτων επικύρωσης.....	<u>198</u>
7.8	Προσδιορισμός ταυτότητας επιπλέον απαγορευμένων ουσιών.....	<u>201</u>
7.9	Εφαρμογή μεθόδου σε αυθεντικά θετικά δείγματα.....	<u>213</u>
7.9.1	Στοχευμένη ανίχνευση ουσιών.....	<u>213</u>
7.9.2	Αυτόματη ανίχνευση απαγορευμένων ουσιών	<u>217</u>
8.	ΕΠΙΛΟΓΟΣ	<u>220</u>
9.	ΠΡΟΟΠΤΙΚΗ.....	<u>222</u>
10.	ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ	<u>223</u>
	ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ	<u>226</u>
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι – Πρότυπες ουσίες	<u>228</u>
11.	ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....	<u>232</u>

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1.1: Δομή τριών διεγερτικών ουσιών.	31
Σχήμα 1.2: Γενική δομή β2-αγωνιστών.....	32
Σχήμα 1.3: Γενική δομή ορισμένων ναρκωτικών και οπιοειδών αναλγητικών.....	33
Σχήμα 1.4: α) Δομή τεστοστερόνης, β) στεροειδής σκελετός.....	34
Σχήμα 1.5: Δομή α) κορτιζόλης β) κορτιζόνης.	35
Σχήμα 1.6: α,β) Γενική δομή βενζοθειαδιαζινών γ) γενική δομή διουρητικών της αγκύλης με R ₁ ή R ₂ =-SO ₂ NH ₂	36
Σχήμα 1.7: Καταλυόμενη (UGT) αντίδραση γλυκουρονίωσης μεταξύ τεστοστερόνης και uridine-5'-diphosphoglucuronic acid (UDPGA).....	39
Σχήμα 1.8: Καταλυόμενη (SULT) αντίδραση σουλφονίωσης μεταξύ τεστοστερόνης και 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate (PAPS).	39
Σχήμα 2.1. Απεικόνιση της διαδικασίας θετικού ιοντισμού των αναλυτών στη μεσεπιφάνεια ηλεκτροψεκασμού.	50
Σχήμα 2.2. Διάταξη φασματομέτρου μαζών χρόνου πτήσης ορθογώνιας επιτάχυνσης ιόντων.....	53
Σχήμα 2.3. Πτήση δύο ιόντων ίδιου m/z, αλλά διαφορετικής κινητικής ενέργειας. Το ιόν χρώματος μπλε έχει μεγαλύτερη κινητική ενέργεια από το ιόν χρώματος πράσινου. Το μπλε ιόν φτάνει πρώτο στο ανακλαστικό κάτοπτρο, αλλά διεισδύει περισσότερο σε αυτό, σε σύγκριση με το πράσινο ιόν. Τελικά, τα δύο ιόντα φτάνουν ταυτοχρόνως στον ανιχνευτή.	55
Σχήμα 2.4. Ανιχνευτής πλακών πολλαπλής διέλευσης (Microchannel Plate).....	57
Σχήμα 2.5. Σχηματική απεικόνιση αεριοχρωματογράφου – φασματομέτρου μαζών.	58
Σχήμα 2.6. Σχηματική απεικόνιση φασματομέτρου μαζών με τετραπολικό αναλυτή μαζών.	64
Σχήμα 2.7. Σχηματική απεικόνιση αναλυτή μαζών διπλής εστίασης.....	66
Σχήμα 2.8. Σχηματική απεικόνιση της φασματικής αποσυνέλιξης μέσω του προγράμματος «AMDIS».	70

Σχήμα 3.1. Δομή των μορίων α) ναπροξενίου, β) διφλουνισαλίου, γ) φαινυλοβουταζόνης, δ) ιβουπροξανίου.....	79
Σχήμα 5.1. Παρασκευαστικά στάδια της διαδικασίας II_IV αλόγων που εφαρμόζονταν στο εργαστήριο ελέγχου ντόπινγκ της Αθήνας κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής.....	103
Σχήμα 5.2. Παρασκευαστικά στάδια της διαδικασίας NSAID αλόγων που εφαρμόζονταν στο εργαστήριο ελέγχου ντόπινγκ της Αθήνας κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής.....	106
Σχήμα 5.3. Υδρόλυση βενζοθειαδιαζινών προς "artefacts" α) χλωροαμιδοφαιναμίδιο και β) τριφθορομεθυλοαμιδοφαιναμίδιο.....	115
Σχήμα 6.1. Παρασκευαστικά στάδια των διαδικασιών Α' i, Α' ii, Α' iii, κατά την πρώτη φάση της ανάπτυξης μεθόδου.....	121
Σχήμα 6.2. Παρασκευαστικά στάδια των διαδικασιών Β' i, Β' ii, Β' iii, κατά την πρώτη φάση της ανάπτυξης μεθόδου.....	122
Σχήμα 6.3. Παρασκευαστικά στάδια των διαδικασιών Γ' i, Γ' ii, Γ' iii, κατά την πρώτη φάση της ανάπτυξης μεθόδου.....	123
Σχήμα 6.4. Χρωματογράφημα καφεΐνης σε α) λευκό δείγμα ούρων και β) εμβολιασμένο δείγμα ούρων, εφαρμόζοντας τη διαδικασία Α' i με ενζυμική υδρόλυση και την ανάλυση LC-TOF-MS.....	126
Σχήμα 6.5. Δομή των α) αιθακρινικού οξέος και β) παραγώγου-«artefact» του αιθακρινικού οξέος που σχηματίζεται κατά το στάδιο της TMS-παραγωγοποίησης. ...	127
Σχήμα 6.6. Δομή α) μορφίνης, β) κωδεΐνης και γ) του κοινού δι-TMS-παραγώγου.	128
Σχήμα 6.7. Χρωματογράφηματα των ουσιών δεξαμεθαζόνης, μορφίνης και ακετονιδίου τριαμκινολόνης σε λευκό και εμβολιασμένο δείγμα ούρων, εφαρμόζοντας τη διαδικασία Β' i με εκχύλιση στερεάς φάσης, μεθανόλυση και ανάλυση LC-TOF-MS.	131
Σχήμα 6.8. Χρωματογράφηματα των ουσιών δεξαμεθαζόνης και καφεΐνης σε λευκό και εμβολιασμένο δείγμα ούρων, εφαρμόζοντας τη διαδικασία Γ' i με βασική υδρόλυση, όξινη εκχύλιση και ανάλυση LC-TOF-MS.	134
Σχήμα 6.9. Παρασκευαστικά στάδια των διαδικασιών Β' 14i, Β' 14ii, Β' 14iii, κατά την πρώτη φάση της ανάπτυξης μεθόδου.	135

Σχήμα 6.10. Χρωματογράφημα ολικών ιόντων λευκών δειγμάτων, κατόπιν εφαρμογής των διαδικασιών α) B' i και β) B' 14i.	138
Σχήμα 6.11. Παρασκευαστικά στάδια των διαδικασιών (A'+B')i, (A'+B')ii, (A'+B')iii, κατά τη δεύτερη φάση της ανάπτυξης μεθόδου.	142
Σχήμα 6.12. Παρασκευαστικά στάδια των διαδικασιών (A'+Γ')i, (A'+Γ')ii, (A'+Γ')iii, κατά τη δεύτερη φάση της ανάπτυξης μεθόδου.	147
Σχήμα 6.13. Παρασκευαστικά στάδια των διαδικασιών (B'+Γ')i, (B'+Γ')ii, (B'+Γ')iii, κατά τη δεύτερη φάση της ανάπτυξης μεθόδου.	150
Σχήμα 6.14. Παρασκευαστικά στάδια των διαδικασιών (A'+B'+Γ')i, (A'+B'+Γ')ii, (A'+B'+Γ')iii, κατά τη δεύτερη φάση της ανάπτυξης μεθόδου.	154
Σχήμα 6.15. Παρασκευαστικά στάδια τελικής διαδικασίας ελέγχου ντόπινγκ αλόγων.	168
Σχήμα 7.1. Χρωματογραφήματα LC-TOF-MS διαγνωστικών ιόντων ακριβούς μάζας σε α) λευκό δείγμα ούρων αλόγου (πρώτη στήλη «ΛΕΥΚΟ»), β) πρότυπα δείγματα ούρων αλόγου, εμβολιασμένα, εκτός των άλλων, με amitriptyline (500 ng mL ⁻¹), clanobutin (200 ng mL ⁻¹), clenbuterol (4,0 ng mL ⁻¹), dexamethasone (50 ng mL ⁻¹), flunixin (200 ng mL ⁻¹), ketoprofen (200 ng mL ⁻¹), meperidine (50 ng mL ⁻¹), modafinil (500 ng mL ⁻¹), morphine (1,0 μg mL ⁻¹), nordiazepam (100 ng mL ⁻¹), oxazepam (100 ng mL ⁻¹) και procaine (500 ng mL ⁻¹) (δεύτερη στήλη «ΠΡΟΤΥΠΟ») και γ) αυθεντικά δείγματα ούρων αλόγων (τρίτη στήλη «ΔΕΙΓΜΑ»).	214
Σχήμα 7.2. Χρωματογραφήματα GC-MS διαγνωστικών ιόντων μεθυλο-παραγώγων (Me) σε α) λευκό δείγμα ούρων αλόγου (πρώτη στήλη «ΛΕΥΚΟ»), β) πρότυπα δείγματα ούρων αλόγου, εμβολιασμένα, εκτός των άλλων, με furosemide (500 ng mL ⁻¹), phenobarbital (100 ng mL ⁻¹), phenylbutazone (500 ng mL ⁻¹), oxyphenbutazone (2,0 ng mL ⁻¹), ketoprofen (200 ng mL ⁻¹) (δεύτερη στήλη «ΠΡΟΤΥΠΟ») και γ) αυθεντικά δείγματα ούρων αλόγων (τρίτη στήλη «ΔΕΙΓΜΑ»).	215
Σχήμα 7.3. Χρωματογραφήματα GC-HRMS διαγνωστικών ιόντων ακριβούς μάζας σε α) λευκό δείγμα ούρων αλόγου (πρώτη στήλη «ΛΕΥΚΟ»), β) πρότυπα δείγματα ούρων αλόγου, εμβολιασμένα, εκτός των άλλων, με bumetanide (20 ng mL ⁻¹), nandrolone (25 ng mL ⁻¹), 5α-estrane-3β,17α-diol (50 ng mL ⁻¹) (δεύτερη στήλη «ΠΡΟΤΥΠΟ») και γ) αυθεντικά δείγματα ούρων αλόγων (τρίτη στήλη «ΔΕΙΓΜΑ»).	216

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 5.1. Μεταβολίτες α' φάσης που εξετάστηκαν και σχόλια που τους αφορούν.	108
Πίνακας 5.2. Εναλλακτικά κύρια ιόντα εκτός του $[M+H]^+$ κατά την ανάλυση LC-TOF-MS και οι ουσίες που τα εμφανίζουν.	112
Πίνακας 6.1. Ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη της μεθόδου και οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις στα ούρα που καθορίζονται από τον κατάλογο του AORC για το Proficiency Test του 2011. Όπου *: προϊόν διάσπασης του methocarbamol.	119
Πίνακας 6.2. Αποτελέσματα ανάκτησης από εκχύλιση των διαδικασιών A' _i , A' _{ii} και A' _{iii} .	125
Πίνακας 6.3. Αποτελέσματα ανάκτησης από εκχύλιση των διαδικασιών B' _i , B' _{ii} και B' _{iii} .	129
Πίνακας 6.4. Αποτελέσματα ανάκτησης από εκχύλιση των διαδικασιών Γ' _i , Γ' _{ii} και Γ' _{iii} .	133
Πίνακας 6.5. Αποτελέσματα ανάκτησης από εκχύλιση διαδικασιών B' _{14i} , B' _{14ii} , B' _{14iii} .	137
Πίνακας 6.6. Συνολικά αποτελέσματα πρώτης φάσης ανάπτυξης μεθόδου που αφορούν α) στο συνολικό αριθμό των ανιχνευόμενων ουσιών από την κάθε διαδικασία, β) στο μέσο όρο της επί τοις εκατό ανάκτησης από εκχύλιση των ανιχνευόμενων ουσιών και γ) στο εύρος της επί τοις εκατό ανάκτησης από εκχύλιση.	141
Πίνακας 6.7. Αποτελέσματα ανάκτησης από εκχύλιση των διαδικασιών (A'+B') _i , (A'+B') _{ii} και (A'+B') _{iii} . Όπου *: Παρεμπόδιση από το υπόστρωμα, 0: Μηδενική ανάκτηση, -: Μη ανίχνευση της ουσίας, ούτε στο αρχικό, ούτε στο τελικό εμβολιασμένο δείγμα.	144
Πίνακας 6.8. Αποτελέσματα ανάκτησης από εκχύλιση των διαδικασιών (A'+Γ') _i , (A'+Γ') _{ii} και (A'+Γ') _{iii} . Όπου *: Παρεμπόδιση από το υπόστρωμα, 0: Μηδενική ανάκτηση, -: Μη ανίχνευση της ουσίας, ούτε στο αρχικό, ούτε στο τελικό εμβολιασμένο δείγμα.	148
Πίνακας 6.9. Αποτελέσματα ανάκτησης από εκχύλιση των διαδικασιών (B'+Γ') _i , (B'+Γ') _{ii} και (B'+Γ') _{iii} . Όπου *: Παρεμπόδιση από το υπόστρωμα, 0: Μηδενική ανάκτηση, -: Μη ανίχνευση της ουσίας ούτε στο αρχικό ούτε στο τελικό εμβολιασμένο δείγμα.	151

Πίνακας 6.10. Αποτελέσματα ανάκτησης από εκχύλιση των διαδικασιών (A'+B'+Γ') _i , (A'+B'+Γ') _{ii} και (A'+B'+Γ') _{iii} . Όπου *: Παρεμπόδιση από το υπόστρωμα, 0: Μηδενική ανάκτηση, -: Μη ανίχνευση της ουσίας, ούτε στο αρχικό, ούτε στο τελικό εμβολιασμένο δείγμα.	155
Πίνακας 6.11. Συνολικά αποτελέσματα δεύτερης φάσης ανάπτυξης μεθόδου που αφορούν α) στο συνολικό αριθμό των ανιχνευόμενων ουσιών από την κάθε διαδικασία, β) στο μέσο όρο της επί τοις εκατό ανάκτησης από εκχύλιση των ανιχνευόμενων ουσιών και γ) στο εύρος της επί τοις εκατό ανάκτησης από εκχύλιση.....	157
Πίνακας 6.12. Αποτελέσματα αυτόματης ανίχνευσης απαγορευμένων ουσιών μέσω των προγραμμάτων AMDIS-DRS, κατόπιν μεθυλο-παραγωγοποίησης και ανάλυσης GC-MS.	160
Πίνακας 6.13. Αποτελέσματα αυτόματης ανίχνευσης απαγορευμένων ουσιών μέσω των προγραμμάτων AMDIS-DRS, κατόπιν TMS-παραγωγοποίησης και ανάλυσης GC-MS.	161
Πίνακας 6.14. Αποτελέσματα ανάκτησης από εκχύλιση των διαδικασιών A' _i , A'(οα) _i και A'(οα:δχμ) _i με ανάλυση LC-TOF-MS. Όπου *: Παρεμπόδιση υποστρώματος.....	163
Πίνακας 6.15. Αποτελέσματα ανάκτησης από εκχύλιση των διαδικασιών A' _{ii} , A'(οα) _{ii} και A'(οα:δχμ) _{ii} με μεθυλο-παραγωγοποίηση και ανάλυση GC-MS.	165
Πίνακας 6.16. Αποτελέσματα ανάκτησης από εκχύλιση των διαδικασιών A' _{iii} , A'(οα) _{iii} και A'(οα:δχμ) _{iii} με TMS-παραγωγοποίηση και ανάλυση GC-HRMS.....	165
Πίνακας 7.1. Αποτελέσματα προκαταρκτικού δοκιμαστικού πειράματος για τη συγκέντρωση ανίχνευσης των ουσιών επικύρωσης σε δύο εμβολιασμένα δείγματα. ...	174
Πίνακας 7.2. Αποτελέσματα προσδιορισμού ορίου ανίχνευσης των εξεταζόμενων ουσιών σε δέκα διαφορετικά εμβολιασμένα δείγματα ούρων.....	180
Πίνακας 7.3. Θεραπευτική δράση, μοριακός τύπος, «adduct» / παράγωγο, διαγνωστικά ιόντα και χρόνος έκλυσης των εξεταζόμενων ουσιών.	183
Πίνακας 7.4. Αποτελέσματα προσδιορισμού ανάκτησης από εκχύλιση σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων για n=3 εργαστηριακές ημέρες. Όπου *: ουσία ορίου.....	185
Πίνακας 7.5. Μέσος όρος και τυπική απόκλιση σφαλμάτων μέτρησης ακριβούς μάζας των εξεταζόμενων ουσιών σε συγκέντρωση 10×LOD, κατά την ανάλυση LC-TOF-MS έξι υποστρωμάτων ούρων αλόγων σε τρεις εργαστηριακές ημέρες (EH).	189

Πίνακας 7.6. Αποτελέσματα προσδιορισμού επίδρασης υποστρώματος σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων για n=3 εργαστηριακές ημέρες. Όπου *: ουσία ορίου.....	191
Πίνακας 7.7. Επαναληψιμότητα σχετικών χρόνων ανάλυσης α) εντός εργαστηριακής ημέρας (n=6 υποδείγματα × 2 μετρήσεις) και β) μεταξύ ημερών (n=3 εργαστηρ. ημέρες).	194
Πίνακας 7.8. Επαναληψιμότητα εμβαδών κορυφών α) εντός εργαστηριακής ημέρας (n=6 υποδείγματα × 2 μετρήσεις) και β) μεταξύ ημερών (n=3 εργαστηρ. ημέρες).	196
Πίνακας 7.9. Σύνοψη αποτελεσμάτων ανάκτησης από την εκχύλιση για πενήντα πέντε απαγορευμένες από τρεις εργαστηριακές ημέρες.....	200
Πίνακας 7.10. Οι επιπλέον τριακόσιες ουσίες που ανιχνεύτηκαν μέσω της επικυρωμένης μεθόδου σάρωσης και η θεραπευτική δράση, ο μοριακός τύπος, ο χρόνος έκλουσης (RT), τα διαγνωστικά ιόντα και τα «adduct» ή τα παράγωγα αυτών.	202
Πίνακας 7.11. Έκθεση αυτόματης αναζήτησης απαγορευμένων ουσιών στις βιβλιοθήκες «AORC_R6» και «NIST05» μέσω των προγραμμάτων AMDIS και DRS, για το πρώτο θετικό δείγμα σε πεντοβαρβιτάλη, κατά τη διαδικασία εφαρμογής της μεθοδολογίας σε αυθεντικά θετικά δείγματα.....	218
Πίνακας 7.12. Έκθεση αυτόματης αναζήτησης απαγορευμένων ουσιών στις βιβλιοθήκες «AORC_R6» και «NIST05» μέσω των προγραμμάτων AMDIS και DRS, για το δεύτερο θετικό δείγμα σε πεντοβαρβιτάλη, κατά τη διαδικασία εφαρμογής της μεθοδολογίας σε αυθεντικά θετικά δείγματα.....	219
Πίνακας 7.13. Έκθεση αυτόματης αναζήτησης απαγορευμένων ουσιών στις βιβλιοθήκες «AORC_R6» και «NIST05» μέσω των προγραμμάτων AMDIS και DRS, για το λευκό δείγμα, κατά τη διαδικασία εφαρμογής της μεθοδολογίας σε αυθεντικά θετικά δείγματα.	219
Πίνακας 1: Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων.....	223
Πίνακας 2: Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους.....	226

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο πλαίσιο του προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών για την απόκτηση διδακτορικού διπλώματος του Τμήματος Χημείας (Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας) του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Το ερευνητικό μέρος της διατριβής διεξήχθη στο Εργαστήριο ελέγχου ντόπινγκ του Ολυμπιακού Αθλητικού Κέντρου Αθηνών (ΟΑΚΑ). Πρόκειται για ένα πολύ καλά εξοπλισμένο εργαστήριο με σύγχρονα αναλυτικά όργανα υγρο- και αεριοχρωματογραφίας - φασματομετρίας μαζών, και το οποίο είναι στελεχωμένο με καταρτισμένο και πολύ έμπειρο επιστημονικό και τεχνικό προσωπικό.

Ο έλεγχος ντόπινγκ, τόσο σε αθλητές, όσο και σε ίππους είναι ένα πολύ ενδιαφέρον και, συνεχώς, εξελισσόμενο πεδίο με υψηλές απαιτήσεις και απαιτεί διαρκή ενημέρωση. Η παρούσα διατριβή επικεντρώνεται στον έλεγχο ντόπινγκ σε ούρα αλόγων με μεθόδους σάρωσης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΝΤΟΠΙΝΓΚ - ΑΠΑΓΟΡΕΥΜΕΝΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΑΥΤΩΝ

1.1 Ιστορική αναδρομή

Υπάρχουν διάφορες εκδοχές για την προέλευση του όρου ντόπινγκ. Μια από αυτές είναι ότι προέρχεται από τη λέξη «dop», ένα απόσταγμα από φλοιούς σταφυλιού με διεγερτικές ιδιότητες που χρησιμοποιούσαν σε τελετουργικούς χορούς οι φυλές της Νοτίου Αφρικής τον 18^ο αιώνα. Παρόλο που οι προσπάθειες για αύξηση της αθλητικής απόδοσης είναι πολύ παλιές, ο όρος πρωτοεμφανίστηκε σε αγγλικό λεξικό το 1889, όπου προσδιορίστηκε ως ένα μίγμα από όπιο και άλλα είδη ναρκωτικών ουσιών για χρήση σε άλογα σε αγώνες ιπποδρόμου. Σήμερα, ο όρος περιγράφει τη χορήγηση ουσιών που βελτιώνουν την αθλητική απόδοση κατά τη διάρκεια των αγώνων ή κατά το στάδιο της προπονητικής προετοιμασίας.

Η προσπάθεια βελτίωσης της αθλητικής επίδοσης με τη χρήση διεγερτικών παυσίπονων και άλλων φαρμάκων χρονολογείται από την αρχαία εποχή, όπως προκύπτει από αναφορές στην Αίγυπτο και τη Ρώμη. Έχει αναφερθεί ότι μέχρι το 1533 ένα μίγμα από μέλι, αρσενικό και σπόρους γλυκάνισου χορηγείτο ως διεγερτικό σε άλογα που συμμετείχαν σε ιπποδρομίες, ώστε να τρέχουν πιο γρήγορα ¹. Η διευκρίνιση της δομής και ο καθορισμός των αλκαλοειδών όπως επίσης, και άλλων ενεργών φυτικών συστατικών συνέπεσαν με τη σύνθεση των πρώτων συνθετικών οργανικών φαρμάκων και αποτέλεσαν τα προαπαιτούμενα για την έναρξη της «σύγχρονης εποχής» στο ντόπινγκ τον 19^ο αιώνα. Αλκοόλ, κοκαΐνη, καφεΐνη, ηρωίνη, νιτρογλυκερόλη και στρυχνίνη χορηγούνταν, είτε μόνα τους, είτε σε συνδυασμό, με σκοπό τη φαρμακοδιέγερση ².

Το 1666 στο Worksop της Αγγλίας θεσπίστηκε το πρώτο διάταγμα που απαγόρευε τη χρήση διεγερτικών και άλλων ουσιών και μεθόδων που στόχευαν στη βελτίωση της επίδοσης των αλόγων που συμμετείχαν στις συγκεκριμένες ιπποδρομίες ³. Οι τιμωρίες ήταν τόσο αυστηρές που μέχρι και

η θανατική ποινή είχε επιβληθεί. Από το 1800 κι έπειτα, υπήρξαν αναφορές για άλογα των οποίων η συμμετοχή σε ιππικούς αγώνες απαγορεύτηκε για το συγκεκριμένο λόγο. Επίσης, στους μεγαλύτερους ιπποδρόμους της Αμερικής τοποθετήθηκαν ειδικοί επόπτες για την επίβλεψη των αλόγων, κατά την προετοιμασία τους πριν τον αγώνα έτσι, ώστε να αποτρέψουν την οποιαδήποτε χορήγηση φαρμακευτικών ουσιών, είτε αυτή στόχευε στη διέγερση του αλόγου, είτε στο αντίθετο. Το 1903 το ντόπινγκ στα άλογα απαγορεύτηκε δια νόμου στην Αγγλία και το 1968 η Διεθνής Ολυμπιακή Επιτροπή, ΔΟΕ, συνέστησε Ιατρική Επιτροπή και εισήγαγε νομοθεσία κατά του ντόπινγκ.

Εν τω μεταξύ, άρχισε η προσπάθεια εφαρμογής της χημικής ανάλυσης στον εργαστηριακό έλεγχο ντόπινγκ και το 1910 ο Πολωνός φαρμακοποιός A.Bukowski, προσκλήθηκε στη Βιέννη από τον ιππικό όμιλο της Αυστρίας, με σκοπό να ανιχνεύσει αλκαλοειδή σε σιέλο αλόγων ⁴. Προς την ίδια κατεύθυνση εργάστηκε, ακολούθως, ο S. Frenkel, καθηγητής του πανεπιστημίου της Βιέννης, αναπτύσσοντας, επιτυχώς, μια αντίστοιχη μέθοδο. Η συγκεκριμένη μέθοδος περιεγράφηκε αργότερα από τον επικεφαλής χημικό του ιππικού ομίλου της Αγγλίας, G.Lander, ο οποίος δημοσίευσε μια μέθοδο που περιελάμβανε διαδοχικές εκχυλίσεις, συμπυκνώσεις, αντιδράσεις καταβύθισης και χρωστικές αντιδράσεις ⁵. Έτσι, στο διάστημα 1910-1911 έλαβαν χώρα 218 αναλύσεις από τις οποίες προέκυψαν αρκετά θετικά ευρήματα σε σιέλο αλόγων. Μέχρι το 1912 πραγματοποιούνταν έλεγχοι ντόπινγκ σε όλες τις βασικότερες χώρες που διεξάγονταν ιππικοί αγώνες, ερευνώντας για αλκαλοειδή, όπως θεοβρωμίνη, καφεΐνη, κοκαΐνη, μορφίνη και στρυχνίνη. ⁶

Το 1933 η νομιμοποίηση του στοιχήματος, κατά τη διάρκεια των ιπποδρομιών στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής (ΗΠΑ), οδήγησε στην αύξηση του ντόπινγκ στα άλογα. Έτσι, το 1934 πρώτος ο ιππόδρομος στην πόλη Hialeah της Φλόριντα εφάρμοσε έλεγχο ντόπινγκ με συλλογή δειγμάτων σιέλου και αναλύσεις σε βάση ρουτίνας, ενώ σύντομα ακολούθησαν και άλλοι ιππόδρομοι στις ΗΠΑ. Η μέθοδος που εφαρμόστηκε τότε είχε αναπτυχθεί στη Γαλλία από τον Kaufman. Στα χρόνια που ακολούθησαν, αναπτύχθηκαν νέες, πιο εξελιγμένες μέθοδοι για την ανίχνευση απαγορευμένων ουσιών σε ούρα

αλόγων. Έτσι, η συλλογή δειγμάτων ούρων γινόταν, είτε εναλλακτικά, είτε συμπληρωματικά με τη συλλογή δειγμάτων σιέλου. Σήμερα ο έλεγχος ντόπινγκ στα άλογα πραγματοποιείται, κυρίως, σε ούρα ή πλάσμα αίματος.

1.2 Διεθνής Ιππική Ομοσπονδία

Το 1921 συγκροτήθηκε στη Λωζάνη της Ελβετίας η Διεθνής Ιππική Ομοσπονδία (Federation Equestre Internationale, FEI) με ιδρυτικά μέλη τις χώρες Γαλλία, Σουηδία, Βέλγιο, Δανία, Νορβηγία, Ιταλία, Ιαπωνία και ΗΠΑ. Η Διεθνής Ιππική Ομοσπονδία θέτει το πλαίσιο, μέσα στο οποίο πρέπει να διεξάγονται οι διεθνείς ιππικοί αγώνες ⁷. Πρωταρχικός σκοπός της είναι η ανάπτυξη και η προαγωγή του ιππικού αθλητισμού παγκοσμίως, ενισχύοντας, ρυθμίζοντας και εξασφαλίζοντας διεθνείς αγώνες υψηλού επιπέδου στα παραδοσιακά ιππικά αθλήματα που είναι αναγνωρισμένα από τη Διεθνή Ολυμπιακή Επιτροπή. Πρόκειται για την αποκλειστική συντονιστική αρχή των διεθνών αθλητικών γεγονότων που αφορούν στα άλογα. Το διοικητικό συμβούλιό της εγκρίνει ιππικά προγράμματα σε πρωταθλήματα, ολυμπιακούς, ηπειρωτικούς και εθνικούς αγώνες, κι επίσης, συντάσσει και τροποποιεί τους κανονισμούς, στους οποίους εντάσσονται και οι κανόνες αντι-ντόπινγκ. Το 1991 η Διεθνής Ιππική Ομοσπονδία υιοθέτησε τον Κώδικα Δεοντολογίας (Code of Conduct), ο οποίος είναι διατυπωμένος με τέτοιο τρόπο, ώστε να προστατεύονται τα άλογα που διαγωνίζονται.

1.3 Διεθνής Ομοσπονδία Ιπποδρομιακών Αρχών

Το 1961 οι ιπποδρομιακές αρχές της Γαλλίας, της Αγγλίας, της Ιρλανδίας και των ΗΠΑ αποφάσισαν να συντονίσουν τη δράση τους για τη διασφάλιση της ποιότητας και της ακεραιότητας των ιπποδρομιών και συγκρότησαν τη Διεθνή Ομοσπονδία Ιπποδρομιακών Αρχών (International Federation of Horseracing Authorities, IFHA) ⁸. Βασικός στόχος της ομοσπονδίας είναι να συντονίζει και να εναρμονίζει τους κανονισμούς σχετικά με τη συντήρηση και τη διατροφή των αλόγων, τις ιπποδρομίες και τα στοιχήματα για όλες τις χώρες-μέλη. Επιπλέον, στοχεύει στη οργάνωση των ιπποδρόμων και την ασφάλεια των ίππων, των αναβατών, και όσων συμμετέχουν και παρακολουθούν τις ιπποδρομίες. Επίσης, ενημερώνει για τις εξελίξεις σε θέματα τεχνικά, κοινωνικά και οικονομικά. Επιπροσθέτως, η ομοσπονδία διοργανώνει κάθε

χρόνο τη διεθνή σύσκεψη των ιπποδρομιακών αρχών, στην οποία ανανεώνεται και ενημερώνεται η διεθνής συμφωνία «International Agreement on Breeding, Racing and Wagering, IABRW» που είχε εγκριθεί στη σύσκεψη του 1974. Πρόκειται για ιπποδρομιακούς κανονισμούς που προορίζονται για την καθοδήγηση των αντίστοιχων αρχών παγκοσμίως ⁹. Στο έκτο άρθρο της διεθνούς συμφωνίας γίνεται αναφορά στον έλεγχο ντόπινγκ και την ανίχνευση απαγορευμένων ουσιών στα άλογα από τα αρμόδια εργαστήρια.

Η Διεθνής Ομοσπονδία Ιπποδρομιακών Αρχών απαριθμεί πενήντα εννέα μέλη, εκ των οποίων το ένα είναι η Φίλιππος Ένωση Ελλάδος που ιδρύθηκε το 1926 και έχει την ανώτατη εποπτεία της τεχνικής διεξαγωγής των ιπποδρομιών και τον έλεγχο όσων εμπλέκονται σε αυτές (ιδιοκτήτες ίππων, προπονητές, αναβάτες) ¹⁰. Βασική της αρμοδιότητα είναι η χορήγηση και η άρση αδειών λειτουργίας ιπποδρόμων στην Ελλάδα. Επίσης, αποσκοπεί α) στη βελτίωση της ποιότητας των καθαρόαιμων δρομώνων ίππων με κάθε επιστημονική και τεχνική μέθοδο και β) στην ίδρυση και τον έλεγχο των ιπποφορβείων ολόκληρης της χώρας και γενικότερα, της ιπποπαραγωγής, έχοντας ως στόχο τη διατήρηση της καθαροαιμίας. Παράλληλα με τα παραπάνω ελέγχει τις συνθήκες διαβίωσης και υγιεινής του ζωικού δυναμικού των ιπποπαραγωγικών μονάδων με επιθεωρήσεις σε τακτά χρονικά διαστήματα. Η Φίλιππος Ένωση Ελλάδος έχει συντάξει τον κώδικα ιπποδρομιών, στον οποίο υπάρχει ειδικό κεφάλαιο για τη φαρμακοδιέγερση και τον έλεγχο για χρήση απαγορευμένων ουσιών στους ίππους που συμμετέχουν στις ιπποδρομίες.

1.4 Εργαστήριο Ελέγχου Ντόπινγκ

Η «International Laboratory Accreditation Cooperation, ILAC» και η Διεθνής Ομοσπονδία IFHA μέσω του έκτου άρθρου της διεθνούς συμφωνίας IABRW ορίζουν τις προδιαγραφές που πρέπει να πληρούν τα εργαστήρια, τα οποία είναι αρμόδια για τον έλεγχο ντόπινγκ στα άλογα που συμμετέχουν σε ιππικά αθλήματα ¹¹. Παράλληλα η διεθνής ένωση «Association of Official Racing Chemists, AORC» παρέχει κατευθυντήριες γραμμές (AORC Guidelines) για α) την ταυτοποίηση απαγορευμένων ουσιών, μέσω χρωματογραφίας-

φασματομετρίας μαζών και β) την ανάλυση αντιδείγματος σε περίπτωση θετικού δείγματος αλόγου ^{12, 13}.

Στην Ελλάδα ο έλεγχος ντόπινγκ λαμβάνει χώρα στο Εργαστήριο Ελέγχου Ντόπινγκ του Ολυμπιακού Αθλητικού Κέντρου Αθηνών «Σπύρος Λούης», το οποίο ιδρύθηκε το 1986 προκειμένου να παρέχει ολοκληρωμένες υπηρεσίες ανάλυσης δειγμάτων ούρων αθλητών και αλόγων για τις εθνικές αθλητικές ομοσπονδίες στην Ελλάδα και το εξωτερικό. Το 2000 το εργαστήριο διαπιστεύτηκε από το Εθνικό Σύστημα Διαπίστευσης, σύμφωνα με το πρότυπο ποιότητας ISO/IEC17025 και έκτοτε, υπόκειται σε διαδικασίες επαναδιαπίστευσης, συμπεριλαμβανομένου του ετήσιου ελέγχου προόδου. Επίσης, από το 2004 το εργαστήριο συγκαταλέγεται στα τριάντα πέντε αναγνωρισμένα εργαστήρια από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Αντι-Ντόπινγκ (World Anti-Doping Agency, WADA). Επιπλέον, διαθέτει επαγγελματική αναγνώριση από τον AORC που είναι ο διεθνής επιστημονικός φορέας κατάρτισης των προδιαγραφών της ανάλυσης του ελέγχου ντόπινγκ των αλόγων.

1.5 Ταξινόμηση απαγορευμένων ουσιών

Η Διεθνής Ιππική Ομοσπονδία, FEI, έχει κυκλοφορήσει για τα ολυμπιακά ιππικά αθλήματα έναν κατάλογο απαγορευμένων ουσιών που περιλαμβάνει περίπου χίλιες διακόσιες ουσίες ¹⁴. Ο κατάλογος δεν είναι περιοριστικός, καθώς, σε αυτόν μπορούν να συμπεριληφθούν και ουσίες που έχουν παρόμοια χημική δομή και βιολογική δράση με τις ουσίες αυτού. Η Διεθνής Ιππική Ομοσπονδία κατατάσσει τις ουσίες σε απαγορευμένες (banned substances) και ελεγχόμενες που χορηγούνται για θεραπευτικούς σκοπούς (controlled medication substances). Επιπλέον, για ορισμένες από τις ουσίες του καταλόγου, δηλαδή, για τις ουσίες ορίου, «threshold substances», ορίζεται όριο συγκέντρωσης, κάτω από το οποίο το αναλυτικό εύρημα δε θεωρείται αντικανονικό ¹⁵.

Όσον αφορά στις ιπποδρομίες, σύμφωνα με το έκτο άρθρο της διεθνούς συμφωνίας «IABRW» της διεθνούς ομοσπονδίας IFHA ⁹, εύρεση απαγορευμένης ουσίας σημαίνει ανίχνευση της ίδιας της ουσίας ή κάποιου μεταβολίτη αυτής ή ισομερούς της ουσίας ή ισομερούς του μεταβολίτη. Ως

απαγορευμένες ουσίες θεωρούνται οι παράγοντες συγκάλυψης, όπως επίσης και όλες οι ουσίες που επιδρούν στον οργανισμό του αλόγου, δηλαδή, στο νευρικό, καρδιαγγειακό, αναπνευστικό, ουροποιητικό, πεπτικό, μυοσκελετικό, ανοσοποιητικό σύστημα, και μπορούν να επηρεάσουν τη φυσική του απόδοση. Επιπλέον, υιοθετούνται όρια συγκέντρωσης για τις ενδογενείς ουσίες πχ υδροκορτιζόνη, τεστοστερόνη και για τις ουσίες θεοβρωμίνη και σαλικυλικό οξύ που λαμβάνονται μέσω της τροφής. Τέλος, η Διεθνής Ομοσπονδία IFHA έχει ορίσει τα «International Screening Limits» για τις θεραπευτικές ουσίες. Έτσι, εύρημα των εν λόγω ουσιών με συγκέντρωση μικρότερη από τα όρια αυτά δεν θεωρείται παράβαση.

Επιπροσθέτως, η διεθνής ένωση «Association of Racing Commissioners International, ARCI» ταξινομεί τις απαγορευμένες ουσίες σε πέντε ομάδες ανάλογα με τη σοβαρότητα της παράβασης, λαμβάνοντας, επίσης, υπόψη τη φαρμακολογία, τον τρόπο χρήσης και την καταλληλότητα χρήσης ¹⁶. Έτσι, ουσίες που είναι γνωστά δραστικά διεγερτικά ή κατευναστικά και όσα δεν προορίζονται για θεραπευτική χρήση και επηρεάζουν την έκβαση του αγώνα, κατατάσσονται σε υψηλές τάξεις, πρώτη και δεύτερη. Αντίθετα, ουσίες που έχουν μικρή επίδραση στην έκβαση του αγώνα ή χρησιμοποιούνται σε θεραπευτική αγωγή, τοποθετούνται σε χαμηλές κατηγορίες, τέταρτη και πέμπτη. Αν, όμως, οι ουσίες που λαμβάνονται για ιατρικούς λόγους, επηρεάζουν την απόδοση του αλόγου, τότε αυτές ανήκουν σε ενδιάμεση (τρίτη) ή υψηλή τάξη (δεύτερη). Ενδεικτικά, στην πρώτη κατηγορία συγκαταλέγονται το όπιο και τα παράγωγα αυτού, συνθετικά οπιοειδή, ψυχοενεργά ναρκωτικά, αμφεταμίνες, διεγερτικά τύπου αμφεταμίνης και γενικότερα, όσα εμφανίζουν τη μεγαλύτερη επίδραση στην επίδοση του αλόγου. Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει ουσίες που ασκούν υψηλή επιρροή στο άλογο, αλλά μικρότερη από αυτές της πρώτης ομάδας, όπως για παράδειγμα, κατευναστικά και διεγερτικά του κεντρικού νευρικού και καρδιακού συστήματος. Στην τρίτη κατηγορία κατατάσσονται βρογχοδιαστολείς, αναβολικά στεροειδή, ορισμένα αντισταμινικά και διουρητικά. Η τέταρτη κατηγορία περιλαμβάνει λιγότερο ισχυρά διουρητικά, κορτικοστεροειδή, αντισταμινικά και μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη. Η πέμπτη και τελευταία κατηγορία περιέχει φάρμακα που χορηγούνται για ιατρικό

σκοπό, για τα οποία έχουν οριστεί όρια συγκέντρωσης. Επίσης, η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει διάφορους άλλους παράγοντες που έχουν τοπική δράση πχ για το έλκος και τις αλλεργίες.

1.6 Τρόπος δράσης και δομικά χαρακτηριστικά των απαγορευμένων ουσιών

1.6.1 Διεγερτικά

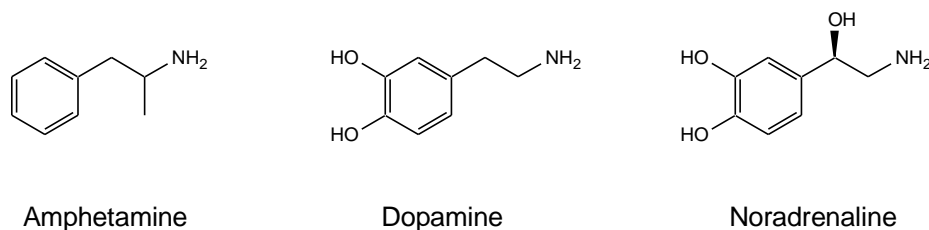
Τα διεγερτικά οδηγούν σε ψυχική συγκέντρωση, σε διέγερση της καρδιακής λειτουργίας και στην κινητοποίηση των ενζυμικών υποστρωμάτων. Επίσης, είναι ικανά να αυξήσουν την ετοιμότητα πριν τον αγώνα, να μειώσουν τη νευρική δραστηριότητα, το αίσθημα της κόπωσης και να συγκαλύψουν τον πόνο ¹⁷.

Η πλειοψηφία των διεγερτικών δρα στα μονοαμινοεργικά συστήματα, δηλαδή, στο αδρενεργικό-συμπαθητικό, στο ντοπαμινοεργικό και το σεροτονεργικό σύστημα, όπου οι νευροδιαβιβαστικές ουσίες είναι οι μονοαμίνες νοραδρεναλίνη, ντοπαμίνη και σεροτονίνη, αντίστοιχα. Έτσι, πολλά διεγερτικά επιδρούν στα επίπεδα των τριών μονοαμινών. Πιο συγκεκριμένα, η δράση των διεγερτικών ουσιών περιλαμβάνει: α) αναστολή της επαναπρόσληψης της νοραδρεναλίνης, της ντοπαμίνης ή/και της σεροτονίνης, με αποτέλεσμα η φυσική τους δράση να ενισχύεται, β) έμμεση απελευθέρωση των μονοαμινών, χωρίς την απευθείας ενεργοποίηση των αντίστοιχων αδρενοϋποδοχέων τους (έμμεσα συμπαθομιμητικά), γ) επιβράδυνση της ενζυμικής διάσπασης (μεταβολισμού) των μονοαμινών με αναστολή της μονοαμινοξειδάσης, δ) ενεργοποίηση, είτε των προσυναπτικών, είτε των μετασυναπτικών υποδοχέων που βρίσκονται στις νευρικές απολήξεις και ε) συνδυασμό των παραπάνω δράσεων ¹⁸⁻²¹.

Επιπροσθέτως, υπάρχουν και μικρότερες ομάδες διεγερτικών, όπως για παράδειγμα τα αναπνευστικά διεγερτικά πχ νικεταμίδιο, κροτεθαμίδιο, και οι νευροπροστατευτικοί παράγοντες που βελτιώνουν τη γνωστική λειτουργία.

Από χημικής πλευράς, τα διεγερτικά αποτελούν μια ετερογενή ομάδα βασικών, μικρών και πτητικών ουσιών που φέρουν ένα τουλάχιστον άτομο αζώτου στο μόριό τους. Η δομή τους σχετίζεται, κυρίως, με αυτή της

αμφεταμίνης και των ενδογενών νευροδιαβιβαστών ντοπαμίνης και νορ-αδρεναλίνης (σχήμα 1.1).



Σχήμα 1.1: Δομή τριών διεγερτικών ουσιών.

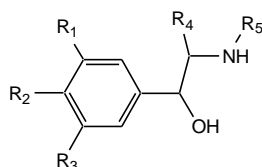
1.6.2 β2-Αδρενεργικοί αγωνιστές

Οι β2-αδρενεργικοί αγωνιστές ή αλλιώς β2-αγωνιστές αποτελούν μια κατηγορία διεγερτικών παραγόντων, τα έμμεσα συμπαθομιμητικά, που δρουν μέσω της σύνδεσής τους με τους β2-αδρενοϋποδοχείς χωρίς, όμως, να είναι κατεχολαμινικά φάρμακα ^{22, 23}. Η διέγερση των β2-αδρενοϋποδοχέων προσφέρει δυνατότητες ενίσχυσης της απόδοσης, αφού αυτοί εμφανίζουν βρογχοδιασταλτική και αναβολική δράση όπως επίσης, και ενίσχυση της αντιφλεγμονώδους δράσης των κορτικοστεροειδών ²⁴. Έτσι, οι εκλεκτικοί β2-αγωνιστές είναι βρογχοδιασταλτικά φάρμακα που χαλαρώνουν και ανοίγουν τους αεραγωγούς στους πνεύμονες, ώστε να φτάνει περισσότερος αέρας στους πνεύμονες, πχ σαλβουταμόλη και τερβουταλίνη. Επιπλέον, σε ψηλές δόσεις ή μετά από μακροχρόνια χρήση οι β2-αγωνιστές εμφανίζουν και αναβολικές ιδιότητες.

Ως προς τη δομή, οι συγκεκριμένες ουσίες αποτελούνται από έναν υποκατεστημένο φαίνυλο-δακτύλιο που φέρει ως πλευρική αλυσίδα μια αιθανολαμίνη, η οποία καταλήγει σε tert-βουτυλο ή ισοπρόπυλο ή άλλου είδους άλκυλο ομάδα (R_5) (σχήμα 1.2). Οι υποκαταστάτες R_1 , R_2 και R_3 ποικίλλουν και μπορεί να είναι -Br, -Cl, -OH, -H, -CH₂OH, -CN, -NH₂, -CF₃.

1.6.3 β-Αδρενεργικοί αναστολείς

Κοινό χαρακτηριστικό της συγκεκριμένης κατηγορίας απαγορευμένων ουσιών είναι ο αποκλεισμός των β-αδρενεργικών υποδοχέων που βρίσκονται στους καρδιακούς μύες, τα περιφερικά αγγεία, τους βρόγχους και άλλους ιστούς που



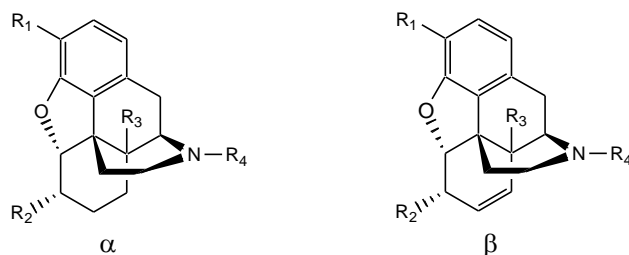
Σχήμα 1.2: Γενική δομή β2-αγωνιστών.

είναι τμήματα του συμπαθητικού νευρικού συστήματος. Οι β1-αναστολείς, πχ ατενολόλη, βηταξόλη, είναι καρδιοεκλεκτικοί, ενώ οι β2-αναστολείς είναι βρογχικοί. Ορισμένοι αναστολείς έχουν, συγχρόνως, και ενδογενή συμπαθομιμητική δράση που σημαίνει ότι έχουν την ικανότητα να διεγείρουν καθώς, και να αποκλείουν τους αδρενεργικούς υποδοχείς πχ οξπρενολόνη. Επίσης, πολλές ουσίες αυτής της κατηγορίας είναι μικτοί β1- και β2-αναστολείς, δηλαδή, μη εκλεκτικοί, πχ αλπρενολόνη, τιμολόλη. Οι β-αδρενεργικοί αναστολείς μπορεί να χορηγηθούν στην περίπτωση αθλημάτων που απαιτούν σταθερότητα και ακρίβεια, επειδή μειώνουν τον καρδιακό ρυθμό, την ισχύ της καρδιακής συστολής, την αρτηριακή πίεση, κι επειδή ανακουφίζουν από τα συμπτώματα της ανησυχίας. Ταυτόχρονα, εμποδίζουν την αγγειοδιαστολή, γεγονός που συμβάλλει στη μείωση του φόρτου εργασίας της καρδιάς.²²

1.6.4 Ναρκωτικά και οπιοειδή αναλγητικά

Τα ναρκωτικά θεωρούνται ουσίες ικανές να μεταβάλλουν την ψυχική και φυσική κατάσταση ενός οργανισμού σε ένα ευρύ πεδίο. Επίσης, τα ναρκωτικά και τα οπιοειδή αναλγητικά χρησιμοποιούνται για να ανακουφίσουν από τον πόνο που προκαλείται από κάποιο τραυματισμό ή ασθένεια ούτως, ώστε να είναι σε θέση το άτομο να συνεχίσει να αγωνίζεται ή να προπονείται με αποτέλεσμα, όμως, την υποτροπή του τραυματισμού. Οι ουσίες αυτές δρουν με οπιούχους υποδοχείς που εντοπίζονται, τόσο στο κεντρικό, όσο και στο περιφερικό νευρικό σύστημα. Τα οπιοειδή αναλγητικά ταξινομούνται με βάση τη δομή τους σε α) ενδογενή, πχ ενδορφίνες, β) ημισυνθετικά, πχ οξυκοτόνη, γ) συνθετικά, πχ βουτορφανόλη, φαιντανίλη, και δ) αλκαλοειδή, πχ κωδεΐνη και μορφίνη, τα οποία είναι φυσικά αλκαλοειδή φαιναντρίνης που εντοπίζονται στο όπιο και προέρχονται από τον πρώιμο θύλακα της παπαρούνας. Η δομή

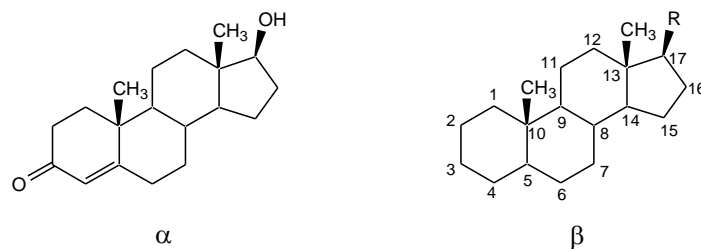
αρκετών ουσιών αυτής της κατηγορίας βασίζεται στις γενικές δομές που δίνονται στο σχήμα 1.3.^{21, 25, 26}



Σχήμα 1.3: Γενική δομή ορισμένων ναρκωτικών και οπιοειδών αναλγητικών.

1.6.5 Αναβολικά²⁷⁻³³

Οι δραστικές αναβολικές ουσίες υποδιαιρούνται στην ομάδα των αναβολικών ανδρογόνων στεροειδών και στην ομάδα των άλλων αναβολικών παραγόντων πχ τιβολόνη, κλενβουτερόλη, ζερανόλη. Τα ανδρογόνα αναβολικά στεροειδή διακρίνονται σε α) ενδογενή, τα οποία παράγονται από τον οργανισμό και β) συνθετικά, τα οποία λαμβάνονται εξωγενώς και είναι συνθετικά παράγωγα της τεστοστερόνης (σχήμα 1.4α). Η τεστοστερόνη εμφανίζει δύο σημαντικές δράσεις α) την ανδρογόνο δράση, δηλαδή, την ανάπτυξη των ανδρικών χαρακτηριστικών, όπως γεννητικά όργανα, μυϊκό σύστημα και β) την αναβολική δράση, δηλαδή, την προαγωγή της σύνθεσης πρωτεϊνών σε διάφορους ιστούς και όργανα. Τα συνθετικά ανδρογόνα αναβολικά στεροειδή διαμορφώνονται έτσι, ώστε να επιβραδύνουν τη διαδικασία του ορμονικού καταβολισμού κι επίσης, να διαχωρίζουν τις ανδρογόνες από τις αναβολικές επιδράσεις έτσι, ώστε να διατηρείται μόνο η αναβολική δράση, ενώ οι ανδρογόνες παρενέργειες να μειώνονται στο ελάχιστο. Η τεστοστερόνη και τα συνθετικά της ανάλογα ασκούν τη φαρμακολογική τους δράση σε κυτταρικό επίπεδο, συνδεόμενα με τους υποδοχείς ανδρογόνων. Στη συνέχεια, το σύμπλεγμα υποδοχέα-στεροειδές συνδέεται με το DNA στον πυρήνα, προκαλώντας μεταγραφή διαφόρων γονιδίων. Επίσης, διεγείρεται η παραγωγή mRNA, με τελικό αποτέλεσμα την αυξημένη πρωτεϊνοσύνθεση. Επιπλέον, τα αναβολικά αυξάνουν τη σύνθεση της ερυθροποιητίνης με συνέπεια, την καλύτερη οξυγόνωση των ιστών.



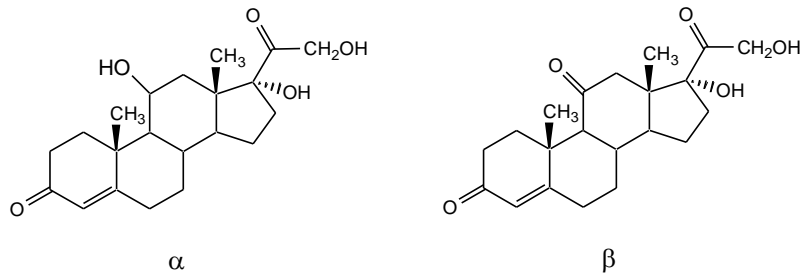
Σχήμα 1.4: α) Δομή τεστοστερόνης, β) στεροειδής σκελετός.

Τα στεροειδή είναι μόρια, των οποίων η δομή βασίζεται στο τετρακυκλικό σύστημα δακτυλίων που παρατίθεται στο σχήμα 1.4β. Τα ανδρογόνα αναβολικά στεροειδή αποτελούνται από δεκαεννιά άτομα άνθρακα με οξυγονούχες ομάδες, δηλαδή, υδροξυλομάδες, κετονομάδες στις θέσεις C3 και C17 και χωρίς πλευρική ανθρακική αλυσίδα στη θέση C17.

1.6.6 Κορτικοστεροειδή^{21, 34-37}

Τα κορτικοστεροειδή, είτε είναι φυσικά παραγόμενες στεροειδείς ορμόνες που εκκρίνονται στα επινεφρίδια, πχ κορτιζόλη, είτε είναι συνθετικές ουσίες. Η δράση τους είναι αναβολική στο ήπαρ (γλυκονεογένεση) και καταβολική στους μύες, στο δέρμα, στο λιπώδη και το συνδετικό ιστό. Ο τρόπος δράσης τους υποδηλώνει την παθητική τους διάχυση, δια μέσου της κυτταρικής μεμβράνης, και την κύρια αλληλεπίδραση με τον ενδοκυτταροπλασματικό τους υποδοχέα. Το σύμπλεγμα ορμόνης-υποδοχέα εισέρχεται στον πυρήνα και ρυθμίζει τη μεταγραφή ορισμένων γονιδίων. Έτσι, μειώνει τη σύνθεση των πρόδρομων μορίων της φλεγμονής. Πρόκειται, λοιπόν, για ισχυρούς αντιφλεγμονώδεις παράγοντες που ασκούν χαλαρωτική επίδραση στην αναπνευστική οδό, ενώ σε μεγαλύτερες δόσεις έχουν και αναλγητικές ιδιότητες. Χαρακτηριστικοί εκπρόσωποι της κατηγορίας αυτής είναι η κορτιζόλη και η κορτιζόνη (σχήματα 1.5α και 1.5β).

Τα κορτικοστεροειδή έχουν τον ίδιο κοινό στεροειδή σκελετό (σχήμα 1.4β) και αποτελούνται από είκοσι ένα άτομα άνθρακα, με υδροξυλομάδα ή κετονομάδα στις θέσεις C3 και C11 και μια πλευρική ανθρακική αλυσίδα που συνδέεται στη θέση C17, η οποία φέρει δύο ή τρεις οξυγονούχες ομάδες. Η παρασκευή των συνθετικών αναλόγων έγινε με τέτοιο τρόπο, ώστε να αυξηθεί η αντιφλεγμονώδης δράση και να μειωθεί η αλατοκορτικοειδής δράση τους.



Σχήμα 1.5: Δομή α) κορτιζόλης β) κορτιζόνης.

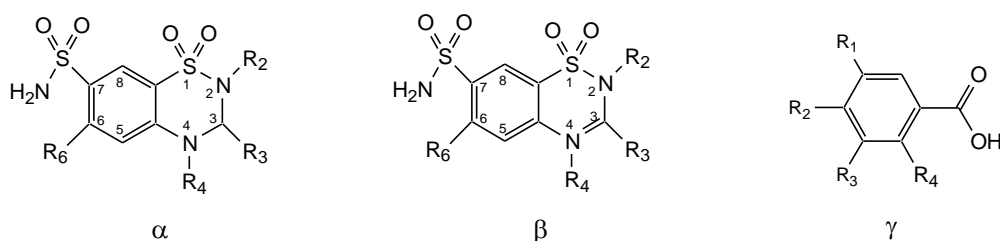
Αυτό επιτυγχάνεται προσθέτοντας, πχ ένα διπλό δεσμό μεταξύ των θέσεων C1-C2 (πρεδνιζολόνη) ή μια μέθυλο ομάδα στη θέση C6 (οξική μεθυλοπρεδνιζολόνη).

1.6.7 Διουρητικά ³⁸⁻⁴⁰

Τα διουρητικά βοηθούν στην αποβολή υγρών από το σώμα, επιτυγχάνουν τη ρύθμιση του σωματικού βάρους και αυξάνουν τη νεφρική απέκκριση του νατρίου (νατριουρητικά), και ορισμένα διουρητικά και του καλίου (καλιουρητικά). Οι συγκεκριμένες ουσίες μπορεί να θεωρηθούν και παράγοντες συγκάλυψης της παρουσίας άλλων απαγορευμένων ουσιών, αυξάνοντας, είτε το pH των ούρων, είτε τον ρυθμό παραγωγής και αποβολής των ούρων. Αραιώνοντας τα ούρα, μειώνεται η συγκέντρωση των διαφόρων ουσιών στα ούρα, γεγονός που καθιστά πιο δύσκολη την ανίχνευση των απαγορευμένων ουσιών. Επιπλέον, η αύξηση του pH που προκαλούν οι αναστολείς της καρβοανυδράσης, πχ ακεταζολαμίδιο και διχλωροφαιναμίδιο, οδηγούν σε μειωμένη απέκκριση των βασικών απαγορευμένων ουσιών στα ούρα, πχ των διεγερτικών.

Στα διουρητικά συμπεριλαμβάνονται ουσίες με διαφορετικές δομές και διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες. Έτσι, υπάρχουν τα βασικά διουρητικά, πχ αμιλορίδιο και τριαμετένη, τα ουδέτερα, πχ κανρενόνη, τα ασθενώς όξινα, πχ ακεταζολαμίδιο και βενζοθειαζίδιο, και τα ισχυρά όξινα διουρητικά, πχ βουμετανίδιο και αιθακρινικό οξύ. Παρακάτω αναφέρονται δύο χαρακτηριστικές κατηγορίες αυτών με τις αντίστοιχες δομές τους. Η πρώτη είναι οι βενζοθειαζιδιαζίνες, πχ υδροχλωροθειαζίδιο, που έχουν ως πυρήνα δύο συγχωνευμένους ετεροκυκλικούς δακτυλίους (1,1-διοξειδιο-1,2,4-

βενζοθειαδιαζίνη) με μια ομάδα σουλφοναμιδίου (-SO₂NH₂) στη θέση C7 και ένα άτομο χλωρίου ή μια ομάδα -CF₃ στη θέση C6 (σχήματα 1.6α, 1.6β). Πρόκειται για ήπια διουρητικά που δρουν στην αρχή του κατιόντος σκέλους της αγκύλης του Henle, προκαλώντας αυξημένη απέκκριση νατρίου και ύδατος. Επίσης, τα διουρητικά, όπως φουροσεμίδιο και βουμετανίδιο, ανήκουν στην ομάδα των διουρητικών της αγκύλης με γενική δομή το υποκατεστημένο σουλφοναμιδοβενζοϊκό οξύ (σχήμα 1.6γ). Πρόκειται για ισχυρά διουρητικά που ασκούν την κύρια δράση τους στο ανιόν σκέλος της αγκύλης του Henle, εμποδίζοντας την επαναρρόφηση του χλωριούχου νατρίου και του ύδατος.



Σχήμα 1.6: α,β) Γενική δομή βενζοθειαδιαζινών γ) γενική δομή διουρητικών της αγκύλης με R₁ ή R₂=-SO₂NH₂.

1.6.8 Μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη ⁴¹⁻⁴³

Η ίδια η ονομασία των μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών (Non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAID) αποκαλύπτει πως πρόκειται για φαρμακευτικά μόρια με αντιφλεγμονώδη δράση, τα οποία, όμως, δε διαθέτουν στεροειδή δακτύλιο στο στερεοχημικό τους τύπο, όπως τα κορτικοστεροειδή. Επιπλέον, παρουσιάζουν αντιπυρετική και αναλγητική δράση, χωρίς να είναι οπιοειδή. Τα NSAID θεωρούνται απαγορευμένες ουσίες, γιατί μπορεί να συγκαλύψουν την ύπαρξη μιας ερεθισμένης άρθρωσης ή ενός τραυματισμένου μυός, αυξάνοντας έτσι, την αθλητική απόδοση, αλλά επιβαρύνοντας, ταυτόχρονα, τον τραυματισμό. Οι συγκεκριμένες ουσίες είναι οι πιο συχνά ανιχνευόμενες σε ελέγχους ντόπινγκ στα ιππικά αθλήματα. Βάσει του χημικού τους τύπου, διακρίνονται σε κοξίμπες, πχ κελεκοξίβη, σε παράγωγα του σαλικυλικού οξέος, πχ διφλουνισάλιο, του οξικού οξέος, πχ τολμετίνη, του προπιονικού

οξέος, πχ κετοπροφαίνιο, του ανθραλινικού οξέος, πχ μεφαιναμικό οξύ, του ενολικού οξέος – οξικάμες - πχ μελοξικάμη, όπως επίσης, και σε διάφορα άλλα, πχ φλουφαιναμικό οξύ. Επιπροσθέτως, βάσει του μηχανισμού δράσης και της εκλεκτικότητας ως προς την αναστολή της κυκλοοξυγενάσης (COX-1, COX-2), τα NSAID διακρίνονται σε αυτά που αναστέλλουν και τις δύο κυκλοοξυγενάσες, και σε αυτά που έχουν ανασταλτική δράση μόνο ως προς την COX-2, χωρίς να επηρεάζουν την COX-1. Η αναστολή της COX-2 θεωρείται ο βασικός μηχανισμός για την αντιφλεγμονώδη δράση των NSAID.

1.7 Μεταβολισμός

1.7.1 Φάσεις μεταβολισμού

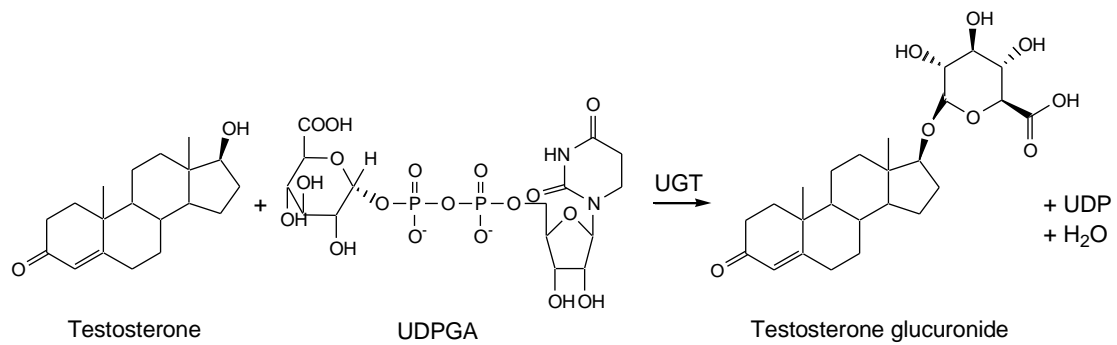
Ο έλεγχος ντόπινγκ στηρίζεται στην ανίχνευση της ίδιας της απαγορευμένης ουσίας ή/και του μεταβολίτη αυτής. Η παρουσία μεταβολιτών στα ούρα παρέχουν απόδειξη ή πρόσθετη πληροφορία που ενισχύει το συμπέρασμα ότι έχει χορηγηθεί απαγορευμένη ουσία στο άλογο. Η λαμβανόμενη ουσία υφίσταται, μέσω του μεταβολισμού, μια σειρά από αντιδράσεις με συνέπεια, το προϊόν που εκκρίνεται στα ούρα να είναι διαφορετικό από την αρχική ουσία. Υπάρχουν, βέβαια, και περιπτώσεις ουσιών, οι οποίες εκκρίνονται στα ούρα αμετάβλητες, δηλαδή, ως μητρική ουσία, πχ πιπραδόλη. Έτσι, ο αποτελεσματικός έλεγχος ντόπινγκ προϋποθέτει τη γνώση του μεταβολισμού των εξεταζόμενων ουσιών. Ο μεταβολισμός των ουσιών στα άλογα είναι διαφορετικός και πιο σύνθετος από αυτόν στους ανθρώπους. Αυτό έχει ως συνέπεια, οι μεταβολίτες που εκκρίνονται από τον ανθρώπινο οργανισμό και τον οργανισμό των αλόγων να μην είναι πάντα κοινοί. Επιπλέον, οι in-vivo και in-vitro μεταβολικές μελέτες στα άλογα είναι λιγότερες συγκριτικά με αυτές που έχουν πραγματοποιηθεί στους ανθρώπους.

Η βιομετατροπή των ουσιών λαμβάνει χώρα, κυρίως, στο ήπαρ και συνίσταται από δύο διαδοχικές φάσεις. Η πρώτη φάση περιλαμβάνει αντιδράσεις των δραστικών ομάδων, όπως οξειδωση, αναγωγή, υδροξυλίωση, επιμερείωση, υδρόλυση των εστέρων, καθώς επίσης, και N- και O-αποαλκυλίωση^{44, 45}. Η δεύτερη φάση περιλαμβάνει αντιδράσεις σύζευξης, όπως γλυκουρονίωση και σουλφονίωση^{44, 46}. Κατά τη δεύτερη φάση, πραγματοποιείται η αποτοξίνωση του οργανισμού, αφού τα προϊόντα αυτής θεωρούνται στην πλειοψηφία τους

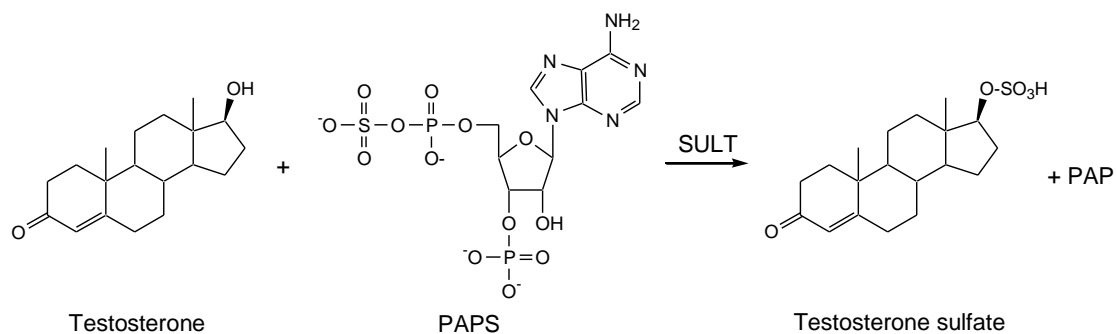
ανενεργά, πολικά και υδατοδιαλυτά κι έτσι, απεκκρίνονται εύκολα από τον οργανισμό. Οι χορηγούμενες ουσίες είναι δυνατόν να υποστούν μόνο τη μια από τις δύο φάσεις μεταβολισμού ή και τις δύο. Υπάρχουν, όμως, και ουσίες όπως προαναφέρθηκε, οι οποίες δεν μεταβολίζονται και συνεπώς, εκκρίνονται στα ούρα αμετάβλητες (free compounds).

Οι αντιδράσεις μεταβολισμού καταλύονται από ένζυμα εντοπισμένα στις μικροσωμικές μεμβράνες των ηπατικών κυττάρων, όπως είναι οι ισομορφές του κυτοχρώματος P450 (CYP) που καταλύουν τις αντιδράσεις οξειδωσης της πρώτης φάσης μεταβολισμού. Επίσης, στο μεταβολισμό συναντώνται οι μονοοξυγενάσες που περιέχουν φλαβίνες (FMOs) και καταλύουν τις αντιδράσεις οξειδωσης των ουσιών που φέρουν άτομα θείου, αζώτου και φωσφόρου. Όσον αφορά στη δεύτερη φάση μεταβολισμού, οι αντιδράσεις σύζευξης της απαγορευμένης ουσίας (υποστρώματος), με το uridine-5'-diphosphoglucuronic acid (UDPGA) προς το σχηματισμό γλυκουρονιδίων, καταλύονται από τα ένζυμα uridine diphosphoglucuronosyl transferases (UGT), τα οποία επιτρέπουν τη γλυκουρονίωση διαφόρων δραστικών ομάδων, όπως -OH, -COOH, -NH₂, -SH. Στο σχήμα 1.7 παρατίθεται ενδεικτικό παράδειγμα γλυκουρονίωσης ενός στεροειδούς (τεστοστερόνη). Επιπλέον, η σουλφονίωση, κατά την οποία μεταφέρεται η σουλφο-ομάδα (-SO₃) από το 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate (PAPS) στο υπόστρωμα, καταλύεται από τα ένζυμα σουλφοτρανσφεράσες (Sulfotransferases, SULTs). Στο σχήμα 1.8 παρατίθεται ενδεικτικό παράδειγμα σουλφονίωσης ενός αντιπροσωπευτικού στεροειδούς, της τεστοστερόνης.

Οι μέθοδοι σάρωσης για τον ποιοτικό προσδιορισμό απαγορευμένων ουσιών στον έλεγχο ντόπινγκ περιλαμβάνουν ανάλυση των αποσυζευγμένων μεταβολιτών της δεύτερης φάσης. Οι μέθοδοι που βασίζονται στην ανάλυση των συζευγμένων ουσιών είναι περιορισμένες, λόγω της έλλειψης των αντίστοιχων υλικών αναφοράς και της αδυναμίας ανίχνευσής τους, μέσω της τεχνικής GC-MS. Συνεπώς, η δεύτερη φάση μεταβολισμού των εξεταζόμενων ουσιών παίζει καθοριστικό ρόλο στην επιλογή της παρασκευαστικής πορείας, κατά τον έλεγχο ντόπινγκ. Ανάλογα με το είδος των μεταβολιτών που



Σχήμα 1.7: Καταλυόμενη (UGT) αντίδραση γλυκουρονίωσης μεταξύ τεστοστερόνης και uridine-5'-diphosphoglucuronic acid (UDPGA).⁴⁶



Σχήμα 1.8: Καταλυόμενη (SULT) αντίδραση σουλφονίωσης μεταξύ τεστοστερόνης και 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate (PAPS).⁴⁶

σχηματίζονται στη δεύτερη φάση μεταβολισμού, επιλέγονται και οι αντίστοιχες συνθήκες υδρόλυσης αυτών. Το στάδιο της υδρόλυσης, κατά την προκατεργασία των δειγμάτων ούρων, αναφέρεται λεπτομερέστερα στο εδάφιο 3.2.1.

1.7.2 Μεταβολισμός διεγερτικών

Διεγερτικά τύπου αμφεταμίνης και εφεδρίνης, δηλαδή, διεγερτικά με δομή φαινυλαλκυλαμίνης, μεταβολίζονται, εκτενώς, στο ήπαρ με τη συμμετοχή, κυρίως, των ενζύμων CYP450. Παρά το μικρό τους μέγεθος, οι ουσίες αυτές έχουν θέσεις διαθέσιμες για μεταβολικές αντιδράσεις, οι οποίες εντοπίζονται, τόσο στον αρωματικό δακτύλιο, όσο και στην πλευρική πρόπυλο-αλυσίδα. Οι επτά χημικές διαδικασίες που είναι σημαντικές στη βιομετατροπή των συγκεκριμένων ουσιών είναι οι: αρωματική υδροξυλίωση, κατεχολο-Ο-μεθυλίωση, αλειφατική υδροξυλίωση, N-αποαλκυλίωση, οξειδωτική

αποαμίνωση, N-οξυγόνωση και N-σύζευξη. Η συνηθέστερη θέση για αρωματική οξειδωση είναι η παρα-θέση (4') στον αρωματικό δακτύλιο. Η αλειφατική οξειδωση των αμφεταμινών λαμβάνει χώρα στο β' άτομο άνθρακα και αποτελεί μια δευτερεύουσα μεταβολική πορεία. Η N-οξυγόνωση των αλειφατικών πρωτοταγών και δευτεροταγών αμινών προς τις αντίστοιχες υδροξυλαμίνες δεν έχει μελετηθεί εκτενώς, πιθανόν, λόγω της χημικής αστάθειας των σχηματιζόμενων μεταβολιτών ή εξαιτίας της αναποτελεσματικότητας των εφαρμοζόμενων μεθόδων.^{44, 47}

1.7.3 Μεταβολισμός β2-αγωνιστών

Η πλειοψηφία των β2-αγωνιστών φέρουν μια υδροξυλομάδα στο φαινολικό τους δακτύλιο, δηλαδή, διαθέτουν θέση για απευθείας σύζευξη, κατά τη δεύτερη φάση μεταβολισμού. Επομένως, στις συγκεκριμένες ουσίες, πχ σαλβουταμόλη και σαλμετερόλη, κυριαρχούν οι μεταβολίτες της δεύτερης φάσης και συνεπώς, οι μητρικές ουσίες εκκρίνονται στα ούρα συζευγμένες.^{44, 48, 49}

Οι ουσίες, οι οποίες δεν φέρουν φαινολικό υδροξύλιο στο μόριό τους, πχ κλενβουτερόλη και μαβουτερόλη, δεν υφίστανται σύζευξη, δηλαδή μεταβολισμό δεύτερης φάσης. Οι συγκεκριμένες ουσίες εκκρίνονται στα ούρα, κυρίως, ασύζευκτες ως μητρική ουσία κι έτσι, είναι δυνατόν να ανιχνευτούν σε ούρα που δεν έχουν υποστεί υδρόλυση.^{44, 48}

Οι β2-αγωνιστές που έχουν δομή κατεχόλης, πχ ισοπροτερενόλη, υπόκεινται σε μεθυλίωση στην πρώτη φάση μεταβολισμού, μέσω του ενζύμου κατεχολο-Ο-μεθυλοτρανσφεράση και κατόπιν, σε σύζευξη, κατά τη δεύτερη φάση μεταβολισμού. Στις περιπτώσεις αυτές η μητρική ουσία εκκρίνεται στα ούρα συζευγμένη και σε μικρές ποσότητες.⁴⁴

1.7.4 Μεταβολισμός μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών

Η κυριότερη αντίδραση της πρώτης φάσης μεταβολισμού των μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών (NSAID) είναι η υδροξυλίωση, η οποία λαμβάνει χώρα σε ουσίες όπως βεδαπροφαίνιο, φενκλοφαινάκη, φαινυλοβουταζόνη και μεκλοφαιναμικό οξύ⁴⁴. Μια επίσης συνήθης αντίδραση μεταβολισμού είναι η αναγωγή των κετονομάδων προς υδροξυλομάδες, η οποία έχει αναφερθεί για

αρκετά NSAID όπως πχ το κετοπροφαίνιο ⁵⁰⁻⁵² και το φαινοϊκό οξύ. Τα NSAID που συζεύγνυνται, κατά τη δεύτερη φάση μεταβολισμού, εκκρίνονται στα ούρα, κυρίως, ως γλυκουρονίδια, οπότε σχηματίζονται: α) αιθέρες, πχ βεδαπροφαίνιο, β) εστέρες, πχ ετοδολάκη και γ) ακυλογλυκουρονίδια, πχ φενκλοφαινάκη. Ωστόσο, έχουν αναφερθεί και NSAID, για τα οποία δεν έχουν παρατηρηθεί μεταβολίτες της δεύτερης φάσης, πχ μιλοξικάμη ⁴⁴. Όσον αφορά στις ουσίες που μεταβολίζονται σε μικρό ποσοστό, η ανίχνευσή τους στηρίζεται στην ανίχνευση της μητρικής ουσίας που εκκρίνεται στα ούρα ασύζευκτη, πχ φλουιζίνη ⁵³⁻⁵⁵.

1.7.5 Μεταβολισμός αναβολικών στεροειδών

Τα αναβολικά στεροειδή μεταβολίζονται, εκτενώς, στα άλογα και ο μεταβολισμός τους έχει μελετηθεί περισσότερο από κάθε άλλη ομάδα απαγορευμένων ουσιών ^{45, 56-58}. Οι κυριότεροι στόχοι στην πρώτη φάση του μεταβολισμού των αναβολικών στεροειδών είναι οι δύο πρώτοι εξαμελείς δακτύλιοι Α και Β, και ο πενταμελής δακτύλιος Δ (σχήμα 1.4β). Γενικά, η βιολογική δράση των στεροειδών απενεργοποιείται με κορεσμό των διπλών δεσμών. Ο διπλός δεσμός μεταξύ των ατόμων C4 και C5 ανάγεται προς 5α- και 5β- ισομερή, πχ η τεστοστερόνη μεταβολίζεται προς ανδροστερόνη (5α-ανδροσταν-3α-ολη-17-όνη) και ετιοχολανολόνη (5β-ανδροσταν-3α-ολη-17-όνη). Επίσης, η κετονομάδα στον άνθρακα C3 ανάγεται εύκολα, δίνοντας, κυρίως, το 3β-υδροξυ-ισομερές. Στα στεροειδή, όμως, με δομή 1,4-διεν-3-όνη, ο εξαμελής δακτύλιος Α είναι ανθεκτικός σε αντιδράσεις αναγωγής πχ βολδενόνη. Επιπλέον, στον πενταμελή δακτύλιο Δ, το άτομο του οξυγόνου στη θέση C17 είναι πολύ ευαίσθητο σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις. Πολλά 17β-υδροξυ-στεροειδή οξειδώνονται προς 17-κετο-στεροειδή, ενώ στα στεροειδή με κετονομάδα στη θέση αυτή, η αναγωγή οδηγεί σε μίγμα 17α- και 17β-υδροξυ-στεροειδών. Επιπλέον, στη θέση C17 είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί επιμερίωση, όπως συμβαίνει στην τρενβολόνη. Επιπροσθέτως, στην πρώτη φάση μεταβολισμού λαμβάνουν χώρα αντιδράσεις υδροξυλίωσης, κυρίως, στις θέσεις C6, C15, και C16.

Οι αντιδράσεις σύζευξης που λαμβάνουν χώρα στη δεύτερη φάση του μεταβολισμού είναι η γλυκουρονίωση και η σουλφονίωση, με κυριότερη τη

δεύτερη, όσον αφορά στα άλογα. Η σύζευξη γίνεται στους δύο ακραίους δακτυλίους Α και Δ. Στα 17α-υδροξυ-στεροειδή επικρατεί η σύζευξη με γλυκουρονικό οξύ, ενώ στα 17β-υδροξυ-στεροειδή επικρατεί η σύζευξη με θειικό οξύ. Αντίθετα, στα 3-υδροξυ-στεροειδή είναι δυνατόν να γίνουν και οι δύο αντιδράσεις σύζευξης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΥΓΡΟ- ΚΑΙ ΑΕΡΙΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ – ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΩΝ

2.1 Εισαγωγή

Στην παρούσα εργασία ο ποιοτικός προσδιορισμός των απαγορευμένων ουσιών σε ούρα αλόγων πραγματοποιείται με δύο συμπληρωματικούς τρόπους. Αρχικά, λαμβάνει χώρα στοχευμένος έλεγχος συγκεκριμένων απαγορευμένων ουσιών που έχουν ενταχθεί στη λίστα των εξεταζόμενων ουσιών. Οι προς εξέταση ουσίες ελέγχονται στα ούρα αλόγων, δηλαδή, αποτελούν τμήμα ενός πολύπλοκου μίγματος. Τα συστατικά αυτού του σύνθετου μίγματος διαχωρίζονται με τις χρωματογραφικές τεχνικές υγρο- και αεριο-χρωματογραφία και ταυτοποιούνται μέσω της φασματομετρίας μαζών. Στα υποκεφάλαια 2.2 έως 2.4 γίνεται αναφορά στις τεχνικές αυτές που εφαρμόστηκαν στη διπλωματική εργασία.

Επιπροσθέτως, πραγματοποιήθηκε και αυτόματη ανίχνευση απαγορευμένων ουσιών, με αναζήτηση σε φασματικές βιβλιοθήκες, μέσω κατάλληλου προγράμματος. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η ανίχνευση επιπλέον ουσιών, οι οποίες δε συγκαταλέγονται στις εξεταζόμενες ουσίες που ελέγχονται από τους αναλυτές με τον στοχευμένο τρόπο. Η αυτόματη ανίχνευση απαγορευμένων ουσιών αναφέρεται στο υποκεφάλαιο 2.5.

2.2 Υγροχρωματογραφία – φασματομετρία μαζών με αναλυτή χρόνου πτήσης (LC-TOF-MS)

2.2.1 Υγροχρωματογραφία ⁵⁹⁻⁶¹

2.2.1.1 Εισαγωγή

Ο διαχωρισμός των εξεταζόμενων ουσιών με υγροχρωματογραφία στηρίζεται στη διαφοροποίηση του βαθμού αλληλεπίδρασης των ουσιών με τη στατική και την κινητή φάση, που προκαλείται από τις διαφορές που έχουν οι ουσίες στα χημικά χαρακτηριστικά, όπως είναι η πολικότητα. Το είδος της υγροχρωματογραφίας που εφαρμόστηκε στην παρούσα εργασία είναι αυτό της αντιστρόφου φάσεως με βαθμιδωτή έκλυση, με αποτέλεσμα οι πιο

πολικές ουσίες να εκκλύονται γρηγορότερα, συγκριτικά με τις λιγότερο πολικές και άπολες ουσίες.

2.2.1.2 Κινητή φάση και συστήματα επεξεργασίας διαλυτών

Η κινητική φάση θα πρέπει να διαλυτοποιεί, πλήρως, τα συστατικά του δείγματος και να μην αντιδρά με αυτά. Επίσης, η ρύθμιση του pH της κινητής φάσης για την επίτευξη του ιοντισμού των αναλύτων είναι προτιμότερο να γίνεται με πτητικά ρυθμιστικά διαλύματα, πχ $\text{HCOOH}/\text{HCOONH}_4$ έτσι, ώστε να προστατεύεται η μεσεπιφάνεια μεταξύ του χρωματογράφου και του φασματομέτρου μαζών. Επιπροσθέτως, το pH θα πρέπει να είναι τέτοιο, ώστε να μην καταστρέφεται η στατική φάση της χρωματογραφικής στήλης. Σε διαφορετική περίπτωση παρατηρείται αύξηση στο σήμα υποβάθρου και μείωση της απόδοσης του χρωματογράφου.

Για την ανάλυση πολύπλοκων δειγμάτων που περιέχουν συστατικά με διαφορετικές πολικότητες, ενδείκνυται η χρήση δύο ή τριών συστημάτων διαλυτών που διαφέρουν ως προς την πολικότητα. Η απόδοση διαχωρισμού ενισχύεται, σημαντικά, με τη βαθμιδωτή έκλυση, κατά την οποία η σύσταση της κινητής φάσης, δηλαδή, ο λόγος των διαλυτών μεταβάλλεται με προγραμματισμένο τρόπο, κατά τη διάρκεια της ανάλυσης έτσι, ώστε να επιτυγχάνονται α) ο διαχωρισμός των πολικών αναλύτων που εκκλύονται νωρίς και β) η έκλυση των ισχυρά κατακρατούμενων ουσιών από τη στατική φάση.

Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται ως κινητή φάση πρέπει να είναι υψηλής καθαρότητας και αποθηκεύονται σε υάλινα δοχεία, τα οποία να είναι εφοδιασμένα με μέσα απομάκρυνσης των διαλυμένων αερίων. Οι τυχόν σχηματιζόμενες φυσαλίδες στα κανάλια των διαλυτών πρέπει να απομακρύνονται, ώστε αυτές να μην εισέρχονται στη στήλη και να μην εμποδίζουν τη σωστή λειτουργία του ανιχνευτή. Στη διάταξη που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, η απομάκρυνση των φυσαλίδων πραγματοποιείται οδηγώντας τη ροή της κινητής φάσης προς τα απόβλητα και αυξάνοντας τη ροή στα 5 mL/min.

2.2.1.3 Σύστημα άντλησης

Η αντλία θα πρέπει να εξασφαλίζει σταθερή ταχύτητα ροής της κινητής φάσης, χωρίς παλμούς. Η ρύθμιση της ροής εξαρτάται από τη διάμετρο της στήλης και το είδος της μεσεπιφάνειας. Στην περίπτωση που η διάταξη LC-MS αποτελείται από μικροπορώδη στήλη και μεσεπιφάνεια ηλεκτροψεκασμού, τότε η ροή της κινητής φάσης είναι χαμηλή, πχ 0,3 mL/min. Στις αναλύσεις LC-TOF-MS της εν λόγω εργασίας εφαρμόστηκε βαθμιδωτή έκλουση με ανάμιξη δυο διαλυτών και χρησιμοποιήθηκε δυαδική αντλία (Binary Pump).

2.2.1.4 Σύστημα έγχυσης δείγματος

Το καταλληλότερο σύστημα για έγχυση του δείγματος είναι ο βρόχος δειγματοληψίας, οποίος επιτρέπει την εισαγωγή του δείγματος στη στήλη με επαναληψιμότητα και χωρίς να διακόπτεται η ροή της κινητής φάσης. Το σύστημα λειτουργεί ως εξής: ενώ ο βρόχος γεμίζει με δείγμα από τη σύριγγα (φόρτιση δείγματος), ταυτόχρονα, η κινητή φάση ρέει από την αντλία προς τη στήλη, την οποία διατηρεί σε ισορροπία. Κατά την έγχυση του δείγματος μια περιστροφική βαλβίδα μετακινείται και ο βρόχος παρεμβάλλεται μεταξύ αντλίας και στήλης, οπότε η ροή εκτρέπεται στο βρόχο κι έτσι, το περιεχόμενό του μεταφέρεται στη στήλη. Απαιτείται προσοχή, ώστε το φιαλίδιο που περιέχει το δείγμα να μην έχει φυσαλίδα αέρα, η οποία θα μεταφερθεί με την έγχυση του δείγματος στο όργανο, θα διακόψει τη ροή του υγρού έκλουσης και θα προκαλέσει αστάθεια στην απόκριση του ανιχνευτή.

2.2.1.5 Χρωματογραφική στήλη – Στατική φάση

Κατά την υδροχρωματογραφική ανάλυση δειγμάτων ελέγχου ντόπινγκ χρησιμοποιούνται οι αναλυτικές στήλες με υλικό πλήρωσης που αποτελείται από μικροπορώδη σωματίδια. Το συνηθέστερο υλικό πλήρωσης είναι η χημικώς τροποποιημένη πηκτή διοξειδίου του πυριτίου με αλυσίδα C18. Έτσι, προκύπτει η άπολη στήλη C18 που αποτελεί την επικρατέστερη επιλογή για χρωματογραφία αντιστρόφου φάσεως. Η θερμοκρασία της στήλης θα πρέπει να διατηρείται σταθερή εντός μερικών δεκάτων του βαθμού Κελσίου. Επίσης, προκειμένου να προστατευτεί η στήλη από ακαθαρσίες και προσμίξεις, τοποθετείται φίλτρο πριν από αυτή.

2.2.2 Φασματομετρία μαζών χρόνου πτήσης

2.2.2.1 Αρχή λειτουργίας

Ο συνδυασμός της υγροχρωματογραφίας με τη φασματομετρία μαζών αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο για την ταυτοποίηση μη πτητικών και θερμικά ασταθών συστατικών ενός πολύπλοκου μίγματος. Η σύζευξη των δύο συστημάτων δεν είναι άμεση, γιατί ο υγροχρωματογράφος λειτουργεί υπό ατμοσφαιρική πίεση, ενώ το φασματόμετρο μαζών λειτουργεί υπό κενό. Η ασυμβατότητά τους οφείλεται στο σχετικά μεγάλο όγκο της υγρής κινητής φάσης που χρησιμοποιείται στον υγροχρωματογράφο και στις συνθήκες υψηλού κενού που απαιτούνται στο φασματόμετρο μαζών. Για την επίλυση του προβλήματος αυτού έχουν προταθεί διάφορα σχήματα διασύνδεσης, μέσω των οποίων απομακρύνονται τα μόρια της κινητής φάσης. Στη διάταξη που χρησιμοποιείται στην παρούσα εργασία, ο τρόπος διασύνδεσης του υγροχρωματογράφου με το φασματόμετρο μαζών είναι η μεσεπιφάνεια ηλεκτροψεκασμού.

Η αρχή λειτουργίας του φασματομέτρου μαζών με αναλυτή χρόνου πτήσης (TOF-MS) είναι η ακόλουθη: Ένα πλήθος ιόντων με διαφορετικές μάζες που κινούνται προς την ίδια κατεύθυνση και έχουν, ιδανικά, την ίδια κινητική ενέργεια, θα κινούνται με διαφορετικές ταχύτητες. Όπως θα αποδειχτεί παρακάτω η ταχύτητα του κάθε ιόντος είναι αντιστρόφως ανάλογη της τετραγωνικής ρίζας του λόγου «μάζα προς φορτίο» (m/z). Στο συγκεκριμένο φασματόμετρο μαζών, τα ιόντα αρχίζουν ταυτόχρονα να επιταχύνονται υπό την επίδραση αναπαραγωγίμου ηλεκτρικού πεδίου και εισέρχονται στον χώρο πτήσης, ο οποίος είναι ελεύθερος από εφαρμοζόμενα πεδία. Τα ιόντα κινούνται στον χώρο αυτό με διαφορετικές ταχύτητες, ανάλογα με τη μάζα τους και διαχωρίζονται. Κατόπιν, υπολογίζεται ο χρόνος πτήσης που χρειάζεται το κάθε ιόν για να διανύσει διαδρομή ορισμένου μήκους στον σωλήνα πτήσης, δηλαδή τη διαδρομή από την πηγή ιόντων μέχρι τον ανιχνευτή. Τέλος, υπολογίζεται ο λόγος m/z με βάση το χρόνο πτήσης.^{62, 63}

Ιόν μάζας m και ολικού φορτίου $q = ze$, πριν εγκαταλείψει την πηγή ιόντων επιταχύνεται με δυναμικό V_s , οπότε η ηλεκτρική δυναμική του ενέργεια (E_{el}) μετατρέπεται σε κινητική ενέργεια (E_k) και θα ισχύει:

$$E_k = E_{el} \rightarrow \frac{1}{2} m u^2 = q V_s \rightarrow \frac{1}{2} m u^2 = z e V_s \quad (2-1)$$

Όπου e είναι το φορτίο του ηλεκτρονίου, δηλαδή, $1,6 \times 10^{-19}$ C, και u είναι η ταχύτητα του ιόντος, για την οποία με αναδιάταξη της σχέσης (2-1) θα ισχύει:

$$u = (2 z e V_s / m)^{1/2} \quad (2-2)$$

Εάν ο χρόνος πτήσης του ιόντος είναι t και το μήκος της διαδρομής πτήσης του είναι L , τότε η ταχύτητα του ιόντος δίνεται από τη σχέση:

$$u = L / t \quad (2-3)$$

Από τις σχέσεις (2-1) και (2-3) προκύπτει η βασική σχέση:

$$m/z = (2 e V_s / L^2) t^2 \quad (2-4)$$

Για δεδομένο φασματόμετρο μαζών η απόσταση L και το δυναμικό V_s είναι σταθερά, άρα ο όρος $2V_s e/L^2$ είναι σταθερός και κατά συνέπεια, ο λόγος m/z είναι ανάλογος του τετραγώνου του χρόνου πτήσης του ιόντος.

2.2.2.2 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα

Το φασματόμετρο TOF-MS παρουσιάζει εύκολη πρόσβαση στην πηγή ιοντισμού, μεγάλη ταχύτητα σάρωσης, θεωρητικά απεριόριστο εύρος ανιχνεύσιμων μαζών, υψηλή διακριτική ικανότητα και ικανότητα μέτρησης ακριβούς μάζας. Καθοριστικό ρόλο στη βελτίωση των δύο τελευταίων χαρακτηριστικών έχει παίξει η ορθογώνια επιτάχυνση των ιόντων και η τοποθέτηση ανακλαστικού κατόπτρου στο χώρο του αναλυτή μαζών. Ένα επιπλέον πλεονέκτημα είναι η δυνατότητα συζευγμένης φασματομετρίας μαζών (MS/MS) και πιο συγκεκριμένα το υβριδικό Q-TOF-MS.

Ως μειονεκτήματα του φασματομέτρου TOF-MS θεωρούνται η απαίτηση ακριβών και ταχύτατων ηλεκτρονικών και το μικρό δυναμικό εύρος σε ποσοτική ανάλυση. Επίσης, στο φασματόμετρο μαζών απαιτείται η λειτουργία ενός πολύπλοκου συστήματος παραγωγής κενού προκειμένου να διατηρείται η πίεση σε πολύ χαμηλά επίπεδα (10^{-4} - 10^{-8} Torr) στα διάφορα τμήματά του. Το υψηλό κενό είναι απαραίτητο, επειδή, έτσι, μειώνεται η πιθανότητα σύγκρουσης των ιόντων με άλλα μόρια, η οποία είναι δυνατόν να προκαλέσει εξουδετέρωση, σκέδαση ή θραυσματοποίηση των ιόντων. Επίσης, τα φορτισμένα σωματίδια αλληλεπιδρούν με τα συστατικά της ατμόσφαιρας και καταστρέφονται. Η μέση απόσταση που μπορεί να διανύσει ένα ιόν υπό

ατμοσφαιρική πίεση και μεταξύ συγκρούσεων είναι μόνο 10^{-8} m και συνεπώς, είναι αδύνατον να φτάσει στον ανιχνευτή, υπό αυτές τις συνθήκες. Μειώνοντας, όμως, την πίεση αυξάνεται η ελεύθερη διαδρομή των ιόντων, η οποία είναι απαλλαγμένη από συγκρούσεις, με αποτέλεσμα η δημιουργία κενού να κρίνεται αναγκαία.

2.2.2.3 Διακριτική ικανότητα

Η διακριτική ικανότητα του φασματομέτρου μαζών (Resolving Power, R) εξαρτάται από τον τύπο του αναλυτή μαζών και εκφράζει την ικανότητα να διακρίνει δύο ιόντα με σχεδόν ίσες μάζες, δηλαδή δύο μόλις διαχωριζόμενες κορυφές^{64, 65}. Το φασματομέτρο μαζών χρόνου πτήσης συγκαταλέγεται στα φασματομέτρα υψηλής διακριτικής ικανότητας, με τα οποία μπορούν να διαχωριστούν ιόντα με την ίδια ονομαστική μάζα (nominal mass), αλλά με διαφορετικές τιμές ακριβούς μάζας (exact mass) που διαφέρουν στο τρίτο και τέταρτο δεκαδικό ψηφίο. Η διακριτική ικανότητα του αναλυτή TOF δίνεται από τη σχέση (2-5), η οποία προκύπτει με διαφορίση της σχέσης (2-4):

$$R = m / \Delta m = t / 2 \Delta t \approx L / 2 \Delta x \quad (2-5)$$

όπου Δm και Δt είναι το πλάτος στο μέσο του μέγιστου της κορυφής του ιόντος (Full Width Half Maximum, FWHM) στον άξονα των μαζών και του χρόνου, αντιστοίχως, και Δx είναι το πάχος του πακέτου των ιόντων που προσπίπτουν στον ανιχνευτή.

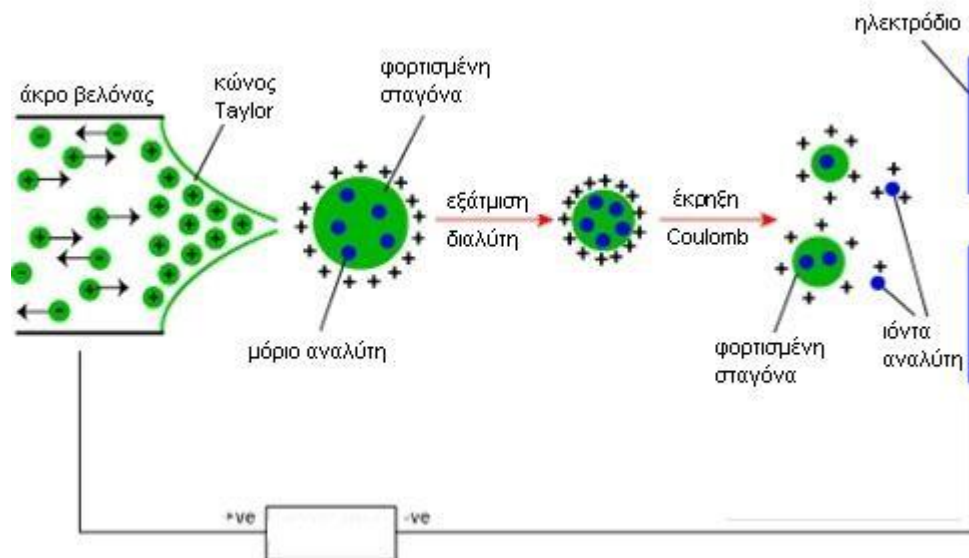
Σύμφωνα με την παραπάνω σχέση, η διακριτική ικανότητα είναι ανάλογη του χρόνου πτήσης και της διαδρομής πτήσης των ιόντων. Άρα, η αύξηση του μήκους του σωλήνα πτήσης συμβάλλει στη βελτίωση της διακριτικής ικανότητας. Η υπερβολική, όμως, αύξηση του μήκους μειώνει την απόδοση του αναλυτή, λόγω απώλειας ιόντων, εξαιτίας συγκρούσεων. Επιπλέον, η μείωση του δυναμικού επιτάχυνσης των ιόντων οδηγεί σε αύξηση του χρόνου πτήσης και συνεπώς, σε αύξηση της διακριτικής ικανότητας. Αυτή, όμως, η μείωση επιδρά αρνητικά στην ευαισθησία. Προκειμένου να επιτυγχάνεται παράλληλα υψηλή διακριτική ικανότητα και υψηλή ευαισθησία, πρέπει να χρησιμοποιείται σωλήνας πτήσης μήκους ενός έως δύο μέτρων και να εφαρμόζεται δυναμικό τουλάχιστον 20 kV.

Η διακριτική ικανότητα επηρεάζεται από παράγοντες που προξενούν διασπορά στον χρόνο πτήσης των ιόντων που έχουν τον ίδιο λόγο m/z . Πιο συγκεκριμένα η διακριτική ικανότητα περιορίζεται από τη διακύμανση στην αρχική κινητική ενέργεια των ιόντων και από τη διασπορά στην αρχική θέση και στον χρόνο σχηματισμού τους στην πηγή ιόντων πριν την επιτάχυνσή τους.^{66, 67}

2.2.2.4 Πηγή ιοντισμού / Μεσεπιφάνεια ηλεκτροψεκασμού

Αρχικά, πραγματοποιείται ο ιοντισμός του δείγματος με ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization, ESI), ο οποίος λαμβάνει χώρα σε ατμοσφαιρική πίεση (Atmospheric Pressure Ionization, API)⁶⁴. Το έκλουσμα από τη χρωματογραφική στήλη αντλείται προς το φασματόμετρο μαζών, μέσω μιας ανοξειδωτής τριχοειδούς βελόνας, η οποία βρίσκεται σε δυναμικό αρκετών kV ως προς ένα κυλινδρικό ηλεκτρόδιο που την περιβάλλει. Όταν πρόκειται για θετικό ιοντισμό, το εφαρμοζόμενο δυναμικό μετατρέπει το υγρό έκλουσμα της στήλης σε αερόλυμα διασπειρόμενων σταγόνων θετικά φορτισμένων, ενώ στον αρνητικό ιοντισμό εφαρμόζεται το ίδιο δυναμικό, αλλά αντίθετης πολικότητας, οπότε δημιουργούνται αρνητικά φορτισμένες σταγόνες. Στο σχηματισμό των σταγόνων συμμετέχει, επίσης, και το αέριο εκνέφωσης (N_2), το οποίο διέρχεται από έναν ομόκεντρο σωλήνα γύρω από το τριχοειδές που μεταφέρεται το δείγμα. Τη στιγμή που το υγρό έκλουσμα εξέρχεται από την άκρη της βελόνας, αρχικά παίρνει το σχήμα κώνου, γνωστός ως κώνος Taylor⁶⁸ και κατόπιν, διασπείρεται (σχήμα 2.1).

Στη συνέχεια, οι φορτισμένες σταγόνες ωθούνται υπό την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου, κατά μήκος του θαλάμου ιοντισμού. Καθώς αυτές διασχίζουν το θάλαμο ιοντισμού, το μέγεθός τους μειώνεται με βαθμιαία εξάτμιση του διαλύτη, η οποία συντελείται με τη βοήθεια ενός θερμού ρεύματος αερίου ξήρανσης (N_2). Η μείωση του μεγέθους και συνεπώς, η αύξηση της πυκνότητας του φορτίου συνεχίζεται μέχρι το σημείο, στο οποίο οι απωστικές δυνάμεις μεταξύ των φορτίων στην επιφάνεια της σταγόνας είναι τόσο ισχυρές, ώστε να υπερβούν τις συνεκτικές / ελκτικές δυνάμεις από την επιφανειακή τάση. Τότε η σταγόνα σπάει (Coulombic explosion), παράγοντας μικρότερες σταγόνες με ακτίνα περίπου στο 10% της αρχικής⁷⁰.



Σχήμα 2.1. Απεικόνιση της διαδικασίας θετικού ιοντισμού των αναλύτων στη μεσεπιφάνεια ηλεκτροψεκασμού. ⁶⁹

Για τον ακριβή μηχανισμό με τον οποίο παράγονται ⁷¹, τελικά, τα ιόντα του αναλύτη που θα εισέλθουν στο φασματόμετρο μαζών έχουν αναπτυχθεί οι θεωρίες i) «Ion evaporation» / Εξάτμιση ιόντων για ιόντα με χαμηλές τιμές m/z ⁷² και ii) «Charge residue model» / Μοντέλο υπολείμματος φορτίου για ιόντα με μεγάλες τιμές m/z ⁷³. Η εξάτμιση του διαλύτη ολοκληρώνεται με διέλευση των σταγόνων από ένα θερμαινόμενο γυάλινο τριχοειδές που είναι τοποθετημένο κατά μήκος του «spray shield» / ασπίδα εκνεφωτή και κάθετα προς την ανοξειδωτή τριχοειδή βελόνα. Τα μόρια από την κινητή φάση και το ρυθμιστικό διάλυμα, όπως επίσης και τα αποφορτισμένα ιόντα οδηγούνται προς τα απόβλητα από το κάτω τμήμα του θαλάμου ιοντισμού.

Ο τελικός διαχωρισμός της υγρής κινητής φάσης από την προσδιοριζόμενη ουσία επιτυγχάνεται με έναν διαχωριστή ορμής. Στην έξοδο του θερμαινόμενου τριχοειδούς υπάρχει ο μεταλλικός αποκορυφωτής, «skimmer», με μια μικρή οπή, μέσω της οποίας διέρχονται μόνο τα βαρύτερα ιόντα που έχουν μεγάλη ορμή. Έτσι, τα ελαφρύτερα μόρια του διαλύτη και του αζώτου αποκλίνουν και απομακρύνονται υπό την επίδραση χαμηλού κενού («rough pump»), ενώ τα βαρύτερα ιόντα συνεχίζουν τη διαδρομή τους και εισέρχονται στη δεύτερη περιοχή υψηλότερου κενού.

Η συγκεκριμένη πηγή ιοντισμού αποτελεί μια μαλακή πηγή εκρόφησης, η οποία προκαλεί περιορισμένη θραύση, με αποτέλεσμα το λαμβανόμενο φάσμα μαζών να περιέχει την κορυφή του πρωτονιωμένου μοριακού ιόντος με μικρό ποσοστό θραυσμάτων. Σε ορισμένες, όμως, περιπτώσεις που χρειάζεται να ληφθούν πληροφορίες για τη δομή της προσδιοριζόμενης ουσίας, ο περιορισμός αυτός στη θραύση οδηγεί στην απαίτηση συζευγμένης φασματομετρίας μαζών ή/και θραυσματοποίησης εντός της πηγής (in source fragmentation). Με τον δεύτερο τρόπο η θραυσματοποίηση λαμβάνει χώρα με την εφαρμογή κατάλληλης διαφοράς δυναμικού μεταξύ του άκρου του θερμαινόμενου τριχοειδούς και του αποκορυφωτή, γεγονός που επιφέρει αύξηση στην ταχύτητα και την ενέργεια των ιόντων. Όσον αφορά στη συζευγμένη φασματομετρία μαζών, αυτή αναφέρεται αναλυτικότερα παρακάτω (εδάφιο 2.2.2.6).

2.2.2.5 Εστίαση ιόντων

Στη δεύτερη περιοχή κενού (10^{-5} Torr) είναι τοποθετημένο ένα οκτάπολο για να επιτευχθεί η εστίαση των ιόντων που έχουν περάσει τον αποκορυφωτή. Το οκτάπολο αποτελείται από οκτώ παράλληλες μεταλλικές ράβδους που συνδέονται ηλεκτρικά μεταξύ τους. Το εφαρμοζόμενο δυναμικό με συχνότητα στην περιοχή των ραδιοσυχνοτήτων (RF) βοηθά τα ιόντα μιας ευρείας περιοχής μαζών να συγκλίνουν προς μια λεπτή δέσμη στον κεντρικό ανοιχτό χώρο που δημιουργούν οι ράβδοι.⁷⁴

2.2.2.6 Απομόνωση και θραυσματοποίηση επιλεγμένου ιόντος (Συζευγμένη φασματομετρία μαζών)⁷⁴

Μετά από το πρώτο οκτάπολο, τα επόμενα δύο τμήματα στη διάταξη αφορούν μόνο στις αναλύσεις MS/MS και ειδικότερα αυτές που πραγματοποιούνται με σάρωση του θυγατρικού ιόντος (Product-Ion Scan). Οι συγκεκριμένες αναλύσεις είναι χρήσιμες στις περιπτώσεις που πρέπει να προσδιοριστεί μια στοχευμένη ουσία, επιβεβαιώνοντας την ανίχνευση και τη δομή της, μέσω των θραυσμάτων που προκύπτουν. Η επιλογή του επιθυμητού πρωτονιωμένου μοριακού ιόντος λαμβάνει χώρα στο τετραπολικό φίλτρο μαζών (εδάφιο 2.3.2.3).

Ακολούθως, τα ιόντα που απομονώθηκαν στο τετράπολο εισάγονται στο θάλαμο προσκρούσεων (collision cell), όπου θραυσματοποιούνται με τη

βοήθεια αδρανούς αερίου (N_2), εφαρμόζοντας κάθε φορά την κατάλληλη ενέργεια (collision energy) με τιμές μεγαλύτερες από αυτή που εφαρμόζεται για την επιτάχυνση των ιόντων. Έτσι, στο σημείο αυτό συνεχίζεται ο ιοντισμός ως αποτέλεσμα, όμως, της σύγκρουσης των ταχέως κινούμενων πρωτονιωμένων μοριακών ιόντων με τα άτομα αζώτου. Ως κυψελίδα συγκρούσεων χρησιμοποιείται ένα εξάπολο μικρής διαμέτρου που λειτουργεί σε υψηλή συχνότητα. Η γεωμετρία του εξαπόλου παρέχει έναν αποτελεσματικό τρόπο εστίασης και μεταφοράς των ιόντων. Επίσης, η διαφορά δυναμικού, κατά μήκος του εξαπόλου εξασφαλίζει ότι τα πρόδρομα ιόντα από το τετράπολο και τα θραύσματα που παράγονται στην κυψελίδα συγκρούσεων θα εξέλθουν προς τον αναλυτή και δε θα προσκρούσουν στις ράβδους.

Για τις αναλύσεις της παρούσας εργασίας εφαρμόστηκε φασματομετρία μαζών πλήρους σάρωσης (Full Scan MS), άρα το τετράπολο και το εξάπολο χρησιμοποιήθηκαν μόνο για τη διέλευση των ιόντων και όχι για το σκοπό που εξυπηρετούν στις αναλύσεις MS/MS. Επομένως, εφαρμόστηκαν και οι κατάλληλες τιμές δυναμικού.

2.2.2.7 Επιτάχυνση και εστίαση ιόντων ⁷⁴

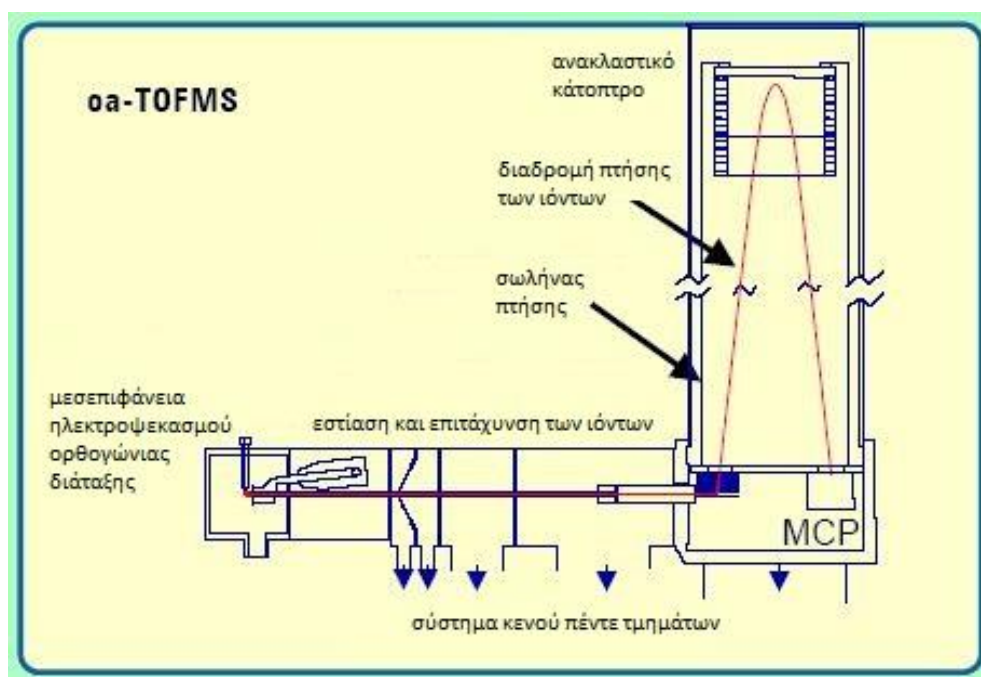
Είτε πρόκειται για πλήρη σάρωση ιόντων, είτε για σάρωση θυγατρικού ιόντος τα ιόντα που έχουν προκύψει εισέρχονται σε ένα δεύτερο οκτάπολο ίδιου σχηματισμού με το πρώτο, αλλά χαμηλότερου συνεχούς δυναμικού. Εντός αυτού τα ιόντα κατευθύνονται επιταχυνόμενα και μεταφέρονται στην επόμενη περιοχή υψηλότερου κενού (10^{-7} Torr), όπου λαμβάνει χώρα ο διαχωρισμός των ιόντων. Εν τω μεταξύ, οι φακοί εστίασης λειτουργούν έτσι, ώστε τα ιόντα να εισέλθουν στον αναλυτή χρόνου πτήσης ως παράλληλη δέσμη, κάθετα προς τη διεύθυνση πτήσης των ιόντων, γεγονός που αυξάνει τη διακριτική ικανότητα του φασματομέτρου μαζών.

2.2.2.8 Αναλυτής μαζών χρόνου πτήσης

Ορθογώνια Επιτάχυνση των ιόντων

Το πρώτο τμήμα του αναλυτή είναι η διάταξη επιτάχυνσης, «ion pulser», και αποτελείται από μια σειρά πλακών, καθεμία από τις οποίες, πλην της τελευταίας, έχει μια οπή στο κέντρο. Τα ιόντα εισέρχονται στο χώρο αυτό

παράλληλα προς την τελευταία πλάκα, στην οποία εφαρμόζεται σύντομος ηλεκτρικός παλμός (0,25 μ s) υψηλού δυναμικού, 10^3 - 10^4 V, με συνέπεια, τη δημιουργία ενός μικρού συνόλου από ιόντα, δηλαδή, ενός πακέτου ιόντων, στο οποίο ασκείται δύναμη κάθετη προς τον άξονα της δέσμης των ιόντων. Έτσι, ο εφαρμοζόμενος παλμός επιταχύνει τα ιόντα από την πηγή ιόντων προς τον ελεύθερο από πεδία χώρο πτήσης, σε διεύθυνση κάθετη προς την αρχική δέσμη. Πρόκειται, δηλαδή, για έναν αναλυτή ορθογώνιας επιτάχυνσης (orthogonal acceleration, oa-TOF) (σχήμα 2.2). Ο επιταχυντής εναλλάσσεται μεταξύ δύο λειτουργιών: Μόλις επιταχυνθεί το πρώτο πακέτο ιόντων τα ηλεκτρόδια ηρεμούν (field-free fill-up mode), ώστε να ξαναγεμίσει ο χώρος επιτάχυνσης με τα επόμενα ιόντα της δέσμης και ακολούθως, να εφαρμοστεί ο επόμενος παλμός (push-out mode) ⁷⁶.



Σχήμα 2.2. Διάταξη φασματομέτρου μαζών χρόνου πτήσης ορθογώνιας επιτάχυνσης ιόντων. ⁷⁵

Με τον τρόπο αυτό λαμβάνει χώρα η ελάχιστη διασπορά των ταχυτήτων στον άξονα επιτάχυνσης και συνεπώς, διενεργείται η ελάχιστη διασπορά της κινητικής ενέργειας. Επίσης, επιτυγχάνεται η βέλτιστη εστίαση των ιόντων στον άξονα του θαλάμου πτήσης και η αύξηση της διακριτικής ικανότητας.

Επομένως, η ορθογώνια επιτάχυνση των ιόντων συντελεί στη διόρθωση των διασπορών στο χώρο, στο χρόνο και στις ταχύτητες των ιόντων ίδιου m/z ^{67, 77}.

Διαχωρισμός των ιόντων

Ο διαχωρισμός των ιόντων πραγματοποιείται κατά την πτήση των ιόντων προς τον ανιχνευτή, ανάλογα με τη μάζα τους. Επειδή όλα τα ιόντα που εισέρχονται στον σωλήνα πτήσης έχουν, ιδανικά, την ίδια κινητική ενέργεια, και οι ταχύτητές τους κατά τη διαδρομή τους στο σωλήνα είναι αντιστρόφως ανάλογες προς τη μάζα τους, τότε τα ελαφρύτερα σωματίδια θα φθάνουν στον ανιχνευτή γρηγορότερα από τα βαρύτερα. Συνεπώς, ο χρόνος πτήσης των πρώτων είναι μικρότερος από τον χρόνο πτήσης των δεύτερων.

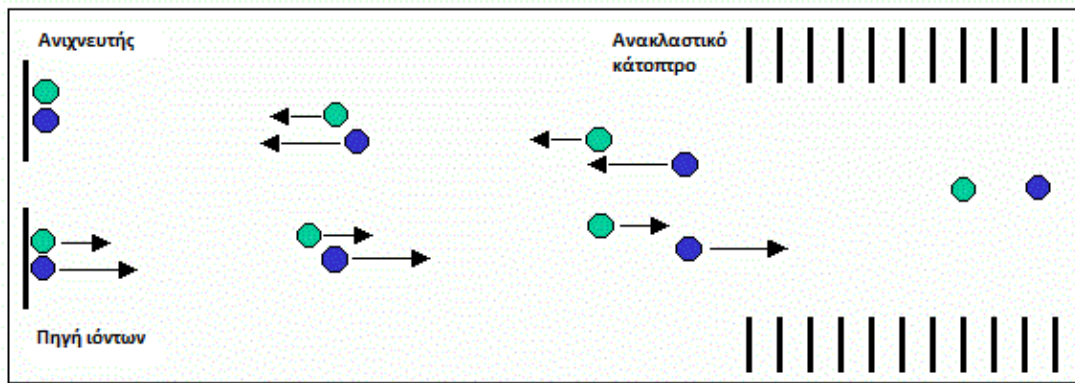
Στη συγκεκριμένη τεχνική, ο ακριβής υπολογισμός των χρόνων πτήσης των ιόντων παίζει καθοριστικό ρόλο, αφού οι τιμές αυτές θα χρησιμοποιηθούν για τον υπολογισμό της ακριβούς τιμής του λόγου m/z . Ως χρόνος έναρξης της πτήσης ($t=0$ s) λαμβάνεται η στιγμή εφαρμογής του ηλεκτρικού παλμού. Η πτήση για κάθε ιόν ολοκληρώνεται τη στιγμή που αυτό φτάνει στον ανιχνευτή και ο χρόνος αυτός πρέπει να είναι μοναδικός για κάθε ιόν.

Ανακλαστικό κάτοπτρο

Το ανακλαστικό κάτοπτρο τοποθετείται στο άνω άκρο του θαλάμου πτήσης απέναντι από την παλμική πηγή ιόντων, όχι ακριβώς παράλληλα με αυτή, αλλά σχηματίζοντας μια μικρή κλίση έτσι, ώστε τα ιόντα να οδηγούνται προς τον ανιχνευτή μετά την ανάκλασή τους. Ο ανιχνευτής βρίσκεται απέναντι από το κάτοπτρο σε παράλληλη διεύθυνση προς την πηγή ιόντων. Το κάτοπτρο αποτελείται από μια σειρά ηλεκτροδίων, ισοκατανεμημένα στο χώρο, στα οποία εφαρμόζονται διαφορετικές τιμές δυναμικού, με σκοπό την επιβράδυνση των ιόντων που προσπίπτουν σε αυτό. Τα ιόντα εισχωρούν σε τέτοιο βάθος μέχρι να μηδενιστεί η κινητική τους ενέργεια. Σε αυτό το σημείο τα ιόντα αρχίζουν πάλι να επιταχύνονται με αντεστραμμένες ταχύτητες και εξέρχονται από το κάτοπτρο κατευθυνόμενα προς τον ανιχνευτή (σχήμα 2.3).

79

Τα ιόντα με τη μεγαλύτερη κινητική ενέργεια διεισδύουν βαθύτερα στο κάτοπτρο, οπότε παραμένουν περισσότερο χρόνο μέσα σε αυτό. Άρα, τα



Σχήμα 2.3. Πτήση δύο ιόντων ίδιου m/z , αλλά διαφορετικής κινητικής ενέργειας. Το ιόν χρώματος μπλε έχει μεγαλύτερη κινητική ενέργεια από το ιόν χρώματος πράσινου. Το μπλε ιόν φτάνει πρώτο στο ανακλαστικό κάτοπτρο, αλλά δεισδύει περισσότερο σε αυτό, σε σύγκριση με το πράσινο ιόν. Τελικά, τα δύο ιόντα φτάνουν ταυτοχρόνως στον ανιχνευτή.⁷⁸

συγκεκριμένα ιόντα διανύουν μεγαλύτερη διαδρομή με αποτέλεσμα να φτάνουν στον ανιχνευτή σχεδόν ταυτόχρονα με τα βραδύτερα ιόντα ίδιου m/z .^{64, 80}

Συμπερασματικά, μέσω του ανακλαστικού κατόπτρου διορθώνεται η διασπορά στον χρόνο πτήσης των ιόντων ίδιου m/z , η οποία οφείλεται σε διαφορές στην κινητική τους ενέργεια και συνεπώς, και στην ταχύτητά τους. Επιπλέον, η χρήση της συγκεκριμένης διάταξης αυξάνει τη διαδρομή πτήσης των ιόντων, δηλαδή, τον χρόνο πτήσης τους, χωρίς να αυξάνεται το μήκος του σωλήνα πτήσης. Επομένως, το ανακλαστικό κάτοπτρο επιφέρει βελτίωση στη διακριτική ικανότητα του αναλυτή, μειώνοντας το Δt και αυξάνοντας το t . Προκειμένου να αυξηθεί κι άλλο η διακριτική ικανότητα, σε ορισμένα όργανα TOF-MS είναι ενσωματωμένα δύο ή τρία ανακλαστικά κάτοπτρα⁶⁷.

2.2.2.9 Ανιχνευτής

Στα φασματόμετρα TOF-MS, η χρονική κλίμακα των συμβάντων άφιξης των ιόντων στον ανιχνευτή (time arrival events) είναι πολύ μικρή, δηλαδή, της τάξης του ns, και συνεπώς, η διαδικασία ανίχνευσης αυτών είναι απαιτητική. Επίσης, ένα ζήτημα ιδιαίτερης σημασίας στην τεχνική oa-TOF-MS είναι η ανάγκη για μεγάλο μέγεθος των ανιχνευτών στη διάσταση που είναι παράλληλη προς τη δέσμη των ιόντων. Το μήκος του ανιχνευτή θα πρέπει να

είναι τουλάχιστον ίσο με το μήκος της δέσμης ιόντων που επιταχύνεται στο θάλαμο πτήσης.⁸¹

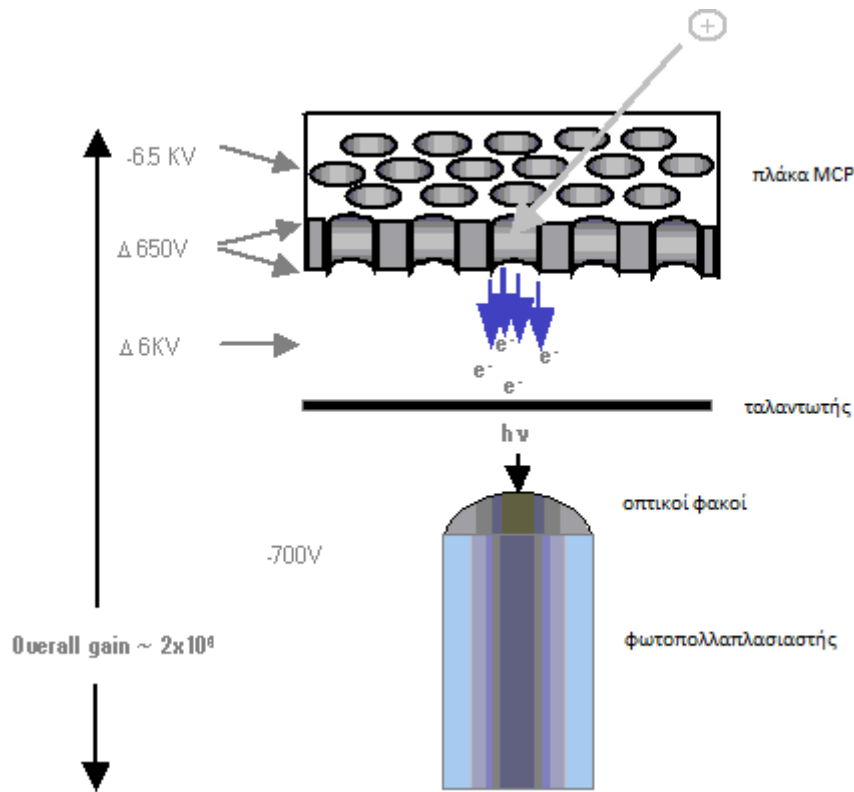
Η διάταξη της συγκεκριμένης διατριβής είναι εφοδιασμένη με ανιχνευτή πλακών πολλαπλής διέλευσης (Microchannel Plate, MCP), ο οποίος χαρακτηρίζεται από μεγάλη ταχύτητα απόκρισης και κρίνεται, ιδιαιτέρως, χρήσιμος σε παλμικές πηγές ιόντων. Ο συγκεκριμένος ανιχνευτής (σχήμα 2.4) συνίσταται, καταρχήν, από μια λεπτή πλάκα με μια συστοιχία από υάλινους τριχοειδείς σωλήνες που τη διαπερνούν. Τα εσωτερικά τοιχώματα είναι επιστρωμένα με κατάλληλο υλικό που έχει τη δυνατότητα εκπομπής δευτερογενών ηλεκτρονίων. Όταν ένα ιόν προσκρούσει στη μπροστινή επιφάνεια της πλάκας, ελευθερώνεται ένα ηλεκτρόνιο και τότε, αρχίζει η διαδικασία ενίσχυσης του σήματος. Καθώς το ηλεκτρόνιο συγκρούεται στα τοιχώματα των μικροσκοπικών σωλήνων, εκβάλλουν ηλεκτρόνια, τα οποία αναπηδούν κατά μήκος της επιφάνειας, προκαλώντας την αποδέσμευση περισσότερων ηλεκτρονίων, μετά από κάθε πρόσκρουση. Τελικά, δημιουργείται ένας καταρράχτης ηλεκτρονίων που φτάνει στο πίσω μέρος της πλάκας. Κατόπιν, τα ηλεκτρόνια αυτά προσκρούουν σε έναν ταλαντωτή, ο οποίος στη συνέχεια, εκπέμπει φωτόνια που ανιχνεύονται από τον φωτοπολλαπλασιαστή (Photomultiplier tube, PMT), ο οποίος τελικά παράγει το ενισχυμένο ηλεκτρικό σήμα.^{63, 83}

2.3 Αεριοχρωματογραφία – φασματομετρία μαζών με τετραπολικό αναλυτή (GC-MS)

2.3.1 Αεριοχρωματογραφία

2.3.1.1 Εισαγωγή

Η αεριοχρωματογραφία είναι κατάλληλη για τον διαχωρισμό ουσιών, οι οποίες α) είναι πτητικές ή καθίστανται πτητικές, πχ μέσω της παραγωγοποίησης και β) είναι θερμικά σταθερές, οπότε μεταβαίνουν στην αέρια φάση, χωρίς να διασπώνται. Με τη συγκεκριμένη τεχνική το υγρό δείγμα ενίεται στο σύστημα εισαγωγής δείγματος, το οποίο βρίσκεται σε θερμοκρασία υψηλότερη από αυτή της στήλης. Στον εισαγωγέα του δείγματος, το υγρό δείγμα μεταπίπτει στην αέρια φάση. Κατόπιν, το δείγμα διέρχεται από τη χρωματογραφική



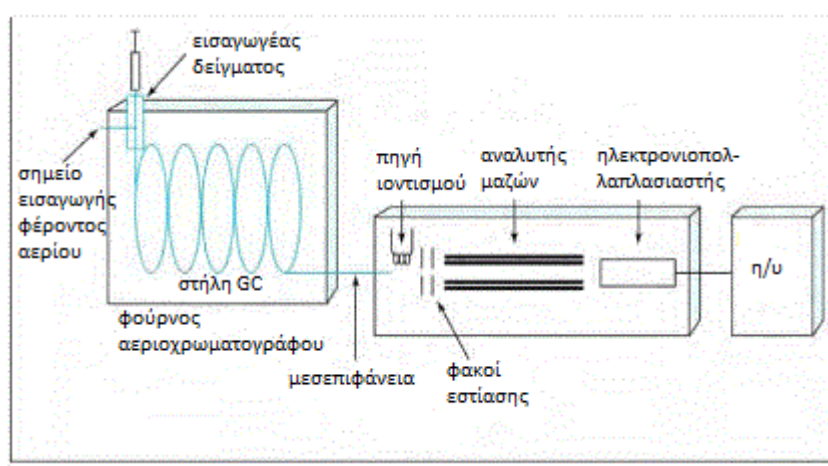
Σχήμα 2.4. Ανιχνευτής πλακών πολλαπλής διέλευσης (Microchannel Plate).⁸²

στήλη, όπου διαχωρίζεται στα συστατικά του. Η έκλυση των ουσιών λαμβάνει χώρα με τη ροή αδρανούς αερίου, το οποίο αποτελεί την κινητή φάση. Ο διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος βασίζεται στο σημείο βρασμού τους και στη χημική τους συγγένεια με τη στατική φάση. Γενικά, η πολικότητα της στατικής φάσης θα πρέπει να ταιριάζει με αυτή των διαχωριζόμενων ουσιών. Όταν το ταίριασμα αυτό είναι ικανοποιητικό, η σειρά έκλυσης καθορίζεται πλέον από το σημείο βρασμού των ουσιών. Όσον αφορά στις ουσίες με σημείο βρασμού μεγαλύτερο από τη θερμοκρασία της στήλης, αυτές τείνουν να βρίσκονται συμπυκνωμένες στην αρχή της στήλης. Ορισμένες από αυτές θα εξατμιστούν ή θα συμπυκνωθούν ξανά στην πορεία.

Επιπροσθέτως, ο χρόνος έκλυσης των ουσιών εξαρτάται από τη θερμοκρασία της στήλης. Ρυθμίζοντας το φούρνο σε υψηλή θερμοκρασία, τα συστατικά του δείγματος κατανέμονται περισσότερο στην αέρια κινητή φάση, οπότε διέρχονται γρήγορα από τη στήλη και δε διαχωρίζονται ικανοποιητικά. Αντίθετα, η χαμηλότερη θερμοκρασία μπορεί να εξασφαλίσει καλύτερο διαχωρισμό των ουσιών, αλλά αυτό οδηγεί σε αύξηση του χρόνου έκλυσης κι

επομένως, σε αύξηση του απαιτούμενου χρόνου για την ολοκλήρωση της ανάλυσης. Στην παρούσα εργασία, όπου τα δείγματα ούρων αποτελούνται από συστατικά με σημεία βρασμού που καλύπτουν ευρεία περιοχή τιμών, απαιτείται προγραμματισμός της θερμοκρασίας, κατά τον οποίο η θερμοκρασία της στήλης αυξάνει σε βήματα, κατά τη διάρκεια του διαχωρισμού.^{84, 85}

Στο σχήμα 2.5 παρουσιάζονται τα επιμέρους τμήματα ενός συστήματος GC-MS, τα οποία θα περιγραφούν παρακάτω.



Σχήμα 2.5. Σχηματική απεικόνιση αεριοχρωματογράφου – φασματομέτρου μαζών.⁸⁶

2.3.1.2 Κινητή φάση – φέρον αέριο

Ο ρόλος της κινητής φάσης ή αλλιώς του φέροντος αερίου είναι η διακίνηση των αναλύτων, κατά μήκος της χρωματογραφικής στήλης. Για το ρόλο αυτό επιλέγεται ένα χημικώς αδρανές αέριο, απαλλαγμένο από προσμίξεις, το οποίο δεν αντιδρά, ούτε με το υλικό πλήρωσης της στήλης, ούτε με τις υπό διαχωρισμό ουσίες. Επίσης, δεν πρέπει να περιέχει οξυγόνο, γιατί αυτό οξειδώνει τη στατική φάση που σημαίνει καταστροφή της στήλης, ιδιαίτερα, όταν αυτή είναι τριχοειδής και η ποσότητα της στατικής φάσης είναι ελάχιστη. Ίχνη υγρασίας, επίσης, απενεργοποιούν τη στατική φάση και γι' αυτό το φέρον αέριο πρέπει να είναι απαλλαγμένο από υγρασία. Το ήλιο είναι η κινητή φάση που επιλέχθηκε για τον αεριοχρωματογραφικό διαχωρισμό στην παρούσα εργασία. Το συγκεκριμένο αέριο έχει μεγάλη θερμική αγωγιμότητα

(πλεονέκτημα για τους ανιχνευτές θερμικής αγωγιμότητας) και μικρή πυκνότητα που επιτρέπει τις μεγάλες ταχύτητες ροής, με αποτέλεσμα να ελαττώνεται ο χρόνος διαχωρισμού.

Το σύστημα παροχής του φέροντος αερίου περιλαμβάνει ρυθμιστές της πίεσης εισόδου και εξόδου του αερίου από τη φιάλη φύλαξης, μανόμετρα και ροόμετρα. Κάτι τέτοιο είναι απαραίτητο, κατά την ταυτοποίηση των υπό εξέταση ουσιών, γιατί οι χρόνοι έκλουσης αυτών επηρεάζονται από την ταχύτητα ροής της κινητής φάσης. Σε συνθήκες προγραμματιζόμενης θερμοκρασίας, εάν η πίεση εισόδου του φέροντος αερίου παραμένει σταθερή, τότε η ταχύτητα ροής αυτού μεταβάλλεται ανάλογα με τη θερμοκρασία. Στην περίπτωση αυτή απαιτείται ρύθμιση της ροής του φέροντος αερίου.^{59, 84, 85, 87, 88}

2.3.1.3 Σύστημα εισαγωγής δείγματος

Ο συνηθέστερος τρόπος εισαγωγής υγρού δείγματος είναι η ένεση του δείγματος με μικροσύριγγα, διαμέσου ενός αυτοσφραγιζόμενου ελαστικού διαφράγματος σιλκόνης (septum), το οποίο είναι σταθερό στην υψηλή θερμοκρασία του εισαγωγέα. Το δείγμα διέρχεται από το στόμιο εισόδου στο χώρο ταχείας εξάτμισης, η θερμοκρασία του οποίου ελέγχεται και, συνήθως, είναι 50 °C πάνω από το σημείο βρασμού του λιγότερο πτητικού συστατικού του δείγματος. Έτσι, εξατμίζεται όλο το δείγμα και παρασύρεται μέσω του φέροντος αερίου προς τη χρωματογραφική στήλη σε αέρια κατάσταση. Ο θάλαμος εξάτμισης είναι ένας θερμαινόμενος υάλινος σωλήνας (liner) με υαλοβάμβακα στο κάτω τμήμα του που πρέπει να αντικαθίσταται τακτικά επειδή, τα μη πτητικά συστατικά του δείγματος και τα προϊόντα διάσπασης εναποτίθενται σε αυτόν. Οι τριχοειδείς στήλες μπορούν να δεχτούν μικρές ποσότητες δείγματος και γι' αυτό το λόγο οι σύγχρονοι αεριοχρωματογράφοι διαθέτουν εισαγωγείς που είναι δυνατόν να λειτουργούν με ή χωρίς διαμερισμό (split / splitless injection). Στις αναλύσεις των δειγμάτων της παρούσας εργασίας απαιτήθηκε σύστημα εισαγωγής διαμοιρασμού για την εισαγωγή μικρού μόνο κλάσματος του ενιόμενου δείγματος, ενώ το υπόλοιπο οδηγείται στα απόβλητα.^{59, 84, 85}

2.3.1.4 Χρωματογραφική στήλη – Στατική φάση ^{59, 85, 87, 88}

Οι τριχοειδείς στήλες χρησιμοποιούνται ευρέως, για την ανίχνευση απαγορευμένων ουσιών μέσω της αεριοχρωματογραφίας. Η στήλη αποτελείται από το υλικό του σωλήνα, πχ τηγμένη πυριτία, και από ένα λεπτό στρώμα στατικής φάσης. Οι τριχοειδείς στήλες τηγμένης πυριτίας κατασκευάζονται με εφελκυσμό τήγματος πυριτίας ειδικής καθαρότητας. Το υλικό αυτό είναι αδρανές, προσδίδει αυξημένη ελαστικότητα και δίνει τη δυνατότητα κατασκευής στηλών με υψηλή διαχωριστικότητα. Το πολυσιλοξάνιο είναι η πλέον συνηθισμένη στατική φάση. Το πολυσιλοξάνιο χαρακτηρίζεται από επαναλαμβανόμενα μονομερή, στα οποία το άτομο του πυριτίου συνδέεται με δύο δραστικές ομάδες, πχ μεθυλο- και φαινυλο-ομάδες. Η παρουσία της φαινυλο-ομάδας στη στατική φάση πολυσιλοξανίου μειώνει την πολικότητα της στατικής φάσης και τη σταθεροποιεί με αποτέλεσμα αυτή να διασπάται σε ψηλότερες θερμοκρασίες. Όσον αφορά στη στήλη που χρησιμοποιήθηκε στην εργασία, αυτή διαθέτει δεσμευμένη, «bonded», και διασταυρωμένη, «cross-linked», στατική φάση. Σκοπός της πρόσδεσης αυτής είναι η επαύξηση του χρήσιμου χρόνου ζωής της στατικής φάσης. Κατά τη δέσμευση, μια μονομοριακή στιβάδα στατικής φάσης συνδέεται με την επιφάνεια πυριτίας με χημική αντίδραση. Όσον αφορά στη διασταύρωση, αυτή πραγματοποιείται μετά την κάλυψη της στήλης με το πολυμερές, με διάφορους τρόπους. Όταν το υμένιο θερμανθεί, αρχίζει μια αντίδραση μεταξύ της μεθυλο-ομάδας των αλυσίδων του πολυμερούς με μηχανισμό ελευθέρων ριζών. Τότε τα μόρια των πολυμερών συνδέονται μεταξύ τους με δεσμούς άνθρακα-άνθρακα. Τα παραγόμενα υμένια είναι λιγότερο εκχυλίσιμα και είναι θερμοανθεκτικότερα, σε σχέση με τα μη επεξεργασμένα υμένια.

Η ταχύτητα και η ικανότητα του διαχωρισμού εξαρτώνται από τη θερμοκρασία. Γι' αυτό το λόγο η στήλη βρίσκεται σε ένα θερμοστατούμενο φούρνο. Έτσι, η θερμοκρασία της στήλης ελέγχεται με ακρίβεια και λαμβάνονται αναπαραγώγιμα αποτελέσματα. Εάν ο διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος γίνει σε σταθερή θερμοκρασία, τότε στο χρωματογράφημα, τα χαμηλού σημείου ζέσης συστατικά εμφανίζονται πρώτα και το ένα κοντά στο άλλο, ενώ τα λιγότερο πτητικά εμφανίζονται πολύ αργότερα με κορυφές

ασαφείς και μικρού ύψους. Η δυσκολία αυτή υπερνικάται αυξάνοντας τη θερμοκρασία βαθμιαία.

2.3.2 Φασματομετρία μαζών τετραπολικού αναλυτή

2.3.2.1 Αρχή λειτουργίας ^{59, 64}

Η αρχή λειτουργίας της φασματομετρίας μαζών στηρίζεται στη δημιουργία ιόντων στην αέρια φάση, στο διαχωρισμό τους στο χώρο με βάση το λόγο της μάζας προς φορτίο (m/z) και στην καταγραφή της ποσότητας των ιόντων κάθε λόγου m/z . Στη συγκεκριμένη εργασία, το φασματόμετρο μαζών αποτελείται από: α) το θάλαμο ιοντισμού, όπου η ένωση μετατρέπεται σε κατιόντα με απόσπαση ενός ηλεκτρονίου, β) τον τετραπολικό αναλυτή, όπου γίνεται διαχωρισμός των ιόντων με βάση το λόγο m/z και γ) τον ανιχνευτή, ο οποίος παράγει στην έξοδό του ηλεκτρικό σήμα ανάλογο του αριθμού και του φορτίου των ιόντων που φθάνουν σε αυτόν. Ο χώρος, όπου δημιουργούνται και επιταχύνονται τα ιόντα διατηρείται σε κατάσταση υψηλού κενού.

Ο αεριοχρωματογράφος και το φασματόμετρο μαζών συνδέονται, μέσω μιας μεσεπιφάνειας. Όταν ο αεριοχρωματογράφος είναι εφοδιασμένος με τριχοειδή στήλη, τότε η σύζευξή του με το φασματόμετρο μαζών είναι εύκολη. Η συνήθης πρακτική είναι το ελεύθερο άκρο της στήλης να βρίσκεται μέσα στο χώρο της πηγής ιοντισμού. Μεταξύ των δύο τμημάτων της διάταξης υπάρχει ένας θερμαινόμενος σωλήνας (μεσεπιφάνεια), ο οποίος περιβάλλει το τελευταίο τμήμα της στήλης και διατηρείται σε θερμοκρασία που είναι μεγαλύτερη από το σημείο βρασμού του πιο πτητικού συστατικού του δείγματος. Συνεπώς, το έκλουσμα από τον αεριοχρωματογράφο μεταφέρεται στο φασματόμετρο μαζών με τέτοιο τρόπο, ώστε, ούτε να έχει συμπυκνωθεί ούτε να έχει διασπαστεί πριν φτάσει στην πηγή ιοντισμού.

2.3.2.2 Πηγή ιοντισμού – ηλεκτρονικός ιοντισμός ^{64, 89}

Ο σχηματισμός των ιόντων λαμβάνει χώρα με ηλεκτρονικό ιοντισμό (Electron Impact, EI). Η πηγή πρόσκρουσης ηλεκτρονίων ανήκει στην κατηγορία των πηγών αέριας φάσης, όπου το δείγμα πρώτα εξαερώνεται και μετά ιοντίζεται. Το συγκεκριμένο είδος πηγής περιορίζεται σε θερμικώς σταθερές ενώσεις με σημεία βρασμού μικρότερα από 500 °C. Επίσης, η πηγή πρόσκρουσης ηλεκτρονίων θεωρείται σκληρή πηγή, επειδή μεταδίδει στα μόρια του αναλύτη

αρκετή ενέργεια, ώστε να παραμένουν σε έντονα διεγερμένη ενεργειακή κατάσταση. Στη συνέχεια, η αποδιέγερση περιλαμβάνει επιπλέον σπάσιμο δεσμών και παραγωγή ιοντικών θραυσμάτων με λόγους m/z μικρότερους από αυτόν του μοριακού ιόντος. Η εκτεταμένη θραύση και συνεπώς, ο μεγάλος αριθμός κορυφών στο λαμβανόμενο φάσμα μαζών παρέχει χρήσιμες πληροφορίες για τα είδη των δραστικών ομάδων και τη δομή των αναλύτων, κάνοντας έτσι, δυνατή την ταυτοποίηση μιας ουσίας.

Τα μόρια του δείγματος που βρίσκονται σε αέρια φάση βομβαρδίζονται με μια δέσμη ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας. Τα ηλεκτρόνια εκπέμπονται από ένα θερμαινόμενο νήμα (filament) βολφραμίου ή ρηνίου και επιταχύνονται με μια τάση, η οποία εφαρμόζεται μεταξύ του νήματος και της ανόδου. Τα ηλεκτρόνια και τα μόρια κινούνται σε κάθετη διεύθυνση και διασταυρώνονται στο κέντρο της πηγής, όπου γίνεται ο ιοντισμός. Τα ηλεκτρόνια μεγάλης ενέργειας πλησιάζουν τα μόρια τόσο, ώστε να προκαλέσουν την απόσπαση ηλεκτρονίων από αυτά, λόγω ηλεκτροστατικής άπωσης. Δεδομένου ότι η ενέργεια των ηλεκτρονίων είναι πολύ ψηλότερη από αυτή των μοριακών δεσμών, δεν παρατηρούνται μόνο φαινόμενα ιοντισμού, αλλά και διάσπασης των δεσμών και σχηματισμού θραυσμάτων.

Τα θετικά ιόντα που παράγονται, επιταχύνονται μέσω των επιταχυντικών πλακών, στις οποίες εφαρμόζονται υψηλές τάσεις, δίνοντας στα ιόντα την τελική τους ταχύτητα πριν εισέλθουν στον αναλυτή μαζών. Η κινητική ενέργεια E_k που αποκτά το ιόν ολικού φορτίου « $q=ze$ » στην πηγή είναι ανεξάρτητη από τη μάζα του και εξαρτάται μόνο από το φορτίο του και από την τάση επιτάχυνσης V . Όπως αναφέρθηκε και στο εδάφιο 2.2.2.1 ισχύει:

$$E_k = E_{el} \rightarrow E_k = q V \rightarrow E_k = z e V \quad (2-6)$$

Επίσης, για την ταχύτητα u των ιόντων ισχύει:

$$E_k = \frac{1}{2} m u^2 \rightarrow u = (2 E_k / m)^{1/2} \quad (2-7)$$

Επομένως, αν όλα τα ιόντα αποκτούν την ίδια κινητική ενέργεια, τότε τα ιόντα με τη μεγαλύτερη μάζα θα έχουν τη μικρότερη ταχύτητα.

Επειδή ο ιοντισμός με τον παραπάνω τρόπο δεν είναι πολύ αποδοτικός, την τελευταία δεκαετία έχουν γίνει προσπάθειες αύξησης της απόδοσης. Για το σκοπό αυτό έχει βελτιωθεί η γεωμετρία της πηγής και το υλικό κατασκευής

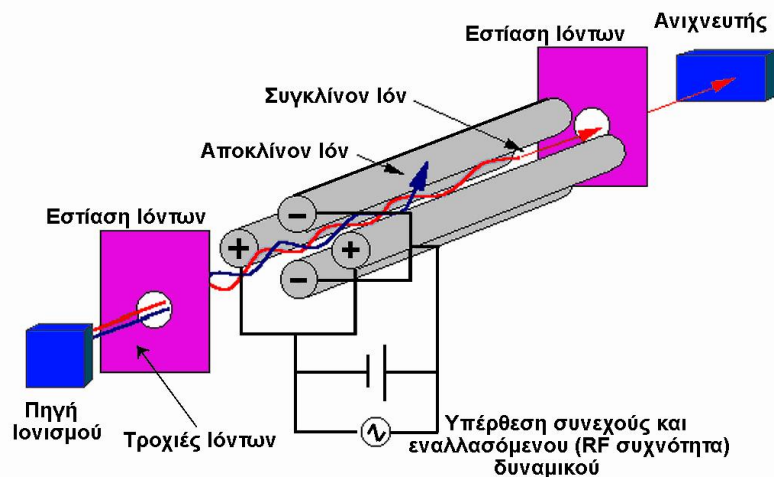
της. Τα τοιχώματα της πηγής είναι κατασκευασμένα από αδρανές υλικό, πχ ανοξείδωτο χάλυβα, ώστε να αποφεύγεται η απώλεια δείγματος, λόγω της πυρόλυσής του στη θερμή μεταλλική επιφάνεια.

2.3.2.3 Τετραπολικός αναλυτής μαζών

Ο γραμμικός τετραπολικός αναλυτής είναι ο πλέον διαδεδομένος αναλυτής που χρησιμοποιεί τη σταθερότητα της τροχιάς για να διαχωρίσει τα ιόντα με βάση το λόγο m/z . Στα πλεονεκτήματά του συμπεριλαμβάνεται η μεγάλη ταχύτητα σάρωσης, οι μέτριες απαιτήσεις κενού και τάσης λειτουργίας, το χαμηλό κόστος, το μικρό μέγεθος και η εύκολη χρήση του. Το τετράπολο θεωρείται αναλυτής χαμηλής διακριτικής ικανότητας, αφού μπορεί να διακρίνει ιόντα που διαφέρουν κατά μια μονάδα μάζας.

Ο τετραπολικός αναλυτής (σχήμα 2.6) αποτελείται από τέσσερις παράλληλες μεταλλικές ράβδους με κυκλική ή υπερβολική διατομή. Οι ράβδοι είναι τοποθετημένες συμμετρικά ως προς τη διερχόμενη δέσμη ιόντων και οι διαγώνιες ράβδοι συνδέονται ηλεκτρικά μεταξύ τους. Το ένα ζεύγος συνδέεται με τον θετικό πόλο μιας πηγής συνεχούς τάσης (Direct current, DC), ενώ το άλλο συνδέεται με τον αρνητικό πόλο της πηγής. Επιπλέον, σε κάθε ζεύγος ράβδων εφαρμόζονται και εναλλασσόμενες τάσεις (Alternative current, AC) που μεταξύ τους βρίσκονται σε διαφορά φάσης 180° , έχοντας συχνότητα στην περιοχή των ραδιοσυχνοτήτων (RF). Έτσι, σε κάθε ζεύγος ράβδων εφαρμόζεται συνολικά δυναμικό $\Phi_0 = +[U - V \cos(\omega t)]$ και $-\Phi_0 = -[U - V \cos(\omega t)]$, όπου U είναι το δυναμικό του συνεχούς πεδίου, V το μέγιστο του δυναμικού του εναλλασσόμενου πεδίου, ω η κυκλική συχνότητα του πεδίου RF. ⁶⁴

Ο συνδυασμός αυτός των ηλεκτρικών πεδίων αναγκάζει τα ιόντα που κινούνται στην κατεύθυνση του άξονα z (παράλληλος με τις ράβδους) να κινηθούν σε μια τροχιά ταλάντωσης ανάμεσα στους κάθετους άξονες x και y . Όταν το πλάτος της ταλάντωσης του ιόντος παραμένει σταθερό στο χρόνο, η τροχιά χαρακτηρίζεται ως σταθερή. Η σταθερή τροχιά έχει ως αποτέλεσμα τη δίοδο του ιόντος διαμέσου του χώρου σε όλο το μήκος των ράβδων. Αντίθετα, αν το πλάτος της ταλάντωσης αυξάνει με την πάροδο του χρόνου, τότε η τροχιά χαρακτηρίζεται ως ασταθής. Αν η τροχιά είναι ασταθής, το ιόν τελικά προσκρούει πάνω στις ράβδους, εξουδετερώνεται και δεν κατορθώνει να



Σχήμα 2.6. Σχηματική απεικόνιση φασματομέτρου μαζών με τετραπολικό αναλυτή μαζών.⁹⁰

φτάσει στον ανιχνευτή. Οι μεταβλητές που περιλαμβάνονται στις διαφορικές εξισώσεις που περιγράφουν τη συμπεριφορά των ιόντων στο τετράπολο είναι ο λόγος m/z , το δυναμικό DC, η συχνότητα και η τιμή του δυναμικού AC, και η απόσταση μεταξύ των ράβδων. Η διακριτική ικανότητα ενός τετράπολου προσδιορίζεται από το λόγο των δυναμικών AC προς DC. Για δεδομένη συχνότητα και δεδομένα δυναμικά DC και AC, μόνο ιόντα με ορισμένη τιμή m/z μεταφέρονται από τον διάυλο του τετράπολου προς τον ανιχνευτή. Για να σαρωθεί ένα φάσμα μαζών θα πρέπει, διατηρώντας σταθερή τη συχνότητα, να αυξάνονται, συγχρόνως, τα δυναμικά DC και AC με τέτοιο τρόπο, ώστε ο λόγος τους να παραμένει σταθερός. Επίσης, η σάρωση ενός φάσματος μαζών μπορεί να γίνει μεταβάλλοντας τη συχνότητα του εναλλασσόμενου ρεύματος και διατηρώντας σταθερές τις τιμές των δυναμικών DC και AC.^{59, 62, 89}

2.3.2.4 Ανιχνευτής ιόντων⁵⁹

Ο ανιχνευτής του εν λόγω φασματομέτρου μαζών είναι ο ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής (Electron multiplier). Τα ιόντα που εξέρχονται από τον αναλυτή μαζών προσπίπτουν σε δύνοδο μετατροπής και εκπέμπονται δευτερογενή ηλεκτρόνια. Στους ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστές διακριτών δυνόδων κάθε δύνοδος βρίσκεται σε υψηλότερο δυναμικό από την προηγούμενη. Η κάθοδος και οι πολλαπλές δύνοδοι έχουν επιφάνειες Cu/Be, από τις οποίες εκπέμπονται ριπές ηλεκτρονίων, όταν προσκρούουν σε αυτές

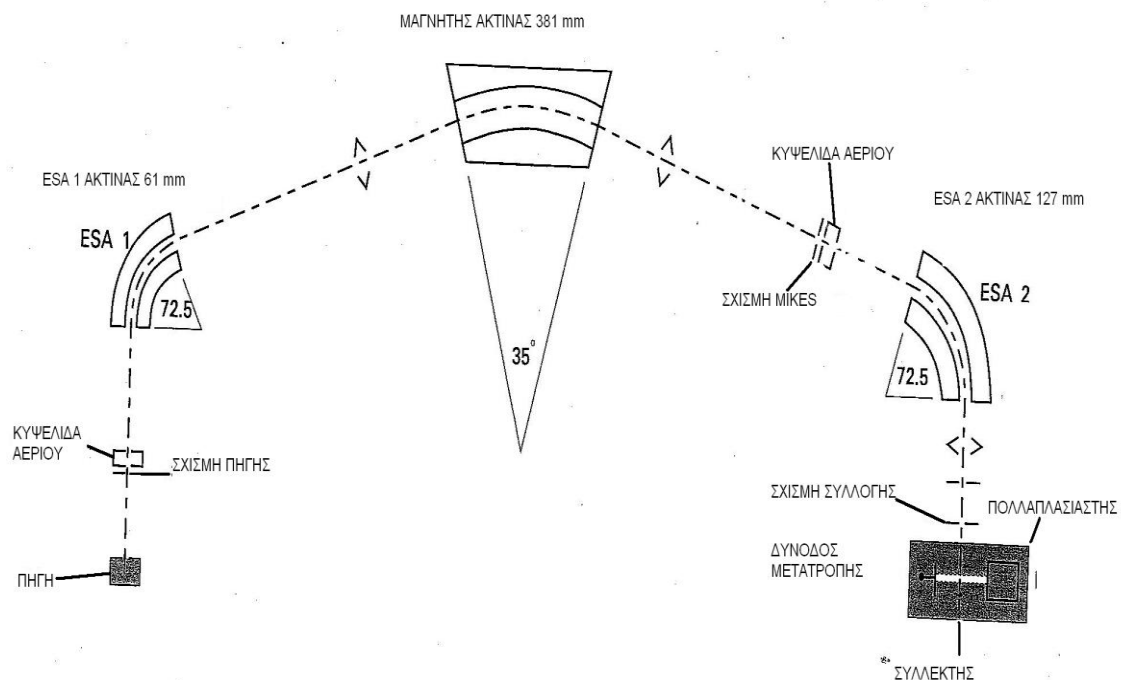
ιόντα ή ηλεκτρόνια υψηλών ενεργειών. Όσον αφορά στους ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστές συνεχούς δυνάδου, αυτοί έχουν σχήμα τρομπέτας και κατασκευάζονται από ύαλο υψηλής περιεκτικότητας σε μόλυβδο. Κατά μήκος του μεταλλάκτη εφαρμόζεται ένα δυναμικό 1,8 έως 2,0 kV. Ιόντα, τα οποία προσκρούουν στην επιφάνεια κοντά στην είσοδο, εκβάλλουν ηλεκτρόνια, τα οποία στη συνέχεια, αναπηδούν κατά μήκος της επιφάνειας, προκαλώντας την αποδέσμευση περισσότερων ηλεκτρονίων μετά από κάθε πρόσκρουση. Οι ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστές παρέχουν υψηλή ενίσχυση του ρεύματος, της τάξης των 10^5 - 10^7 . Επίσης, είναι αξιόπιστοι και ανθεκτικοί στη χρήση και χαρακτηρίζονται από χρόνους απόκρισης της τάξης του ns.

2.4 Αεριοχρωματογραφία – φασματομετρία μαζών υψηλής διακριτικής ικανότητας (GC-HRMS)

Η τεχνική της αεριοχρωματογραφίας έχει αναφερθεί στο εδάφιο 2.3.1, οπότε στο υποκεφάλαιο 2.4 θα γίνει αναφορά μόνο στη φασματομετρία μαζών υψηλής διακριτικής ικανότητας (High Resolution Mass Spectrometry, HRMS).

2.4.1 Αρχή λειτουργίας ^{59, 91}

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, εκτός από την τεχνική LC-TOF-MS χρησιμοποιήθηκε και μια δεύτερη τεχνική υψηλής διακριτικής ικανότητας. Η ικανότητα αυτή του φασματομέτρου μαζών αποδίδεται στον ακριβή γεωμετρικό σχεδιασμό του αναλυτή και στην υψηλού μηχανικού επιπέδου κατασκευή του. Στη μέτρηση ακριβούς μάζας σημαντικό ρόλο παίζει, επίσης, η χρήση ειδικά σχεδιασμένων φακών εστίασης που είναι τοποθετημένοι με ακρίβεια, κατά μήκος του οπτικού άξονα, ώστε η απόδοσή τους να είναι η βέλτιστη. Το φασματόμετρο μαζών είναι εφοδιασμένο με αναλυτή διπλής εστίασης που συνδυάζει δύο ηλεκτροστατικούς τομείς (electrostatic analyzer, ESA) και ένα μαγνητικό τομέα (magnetic analyzer, MA) με γεωμετρία τύπου «ESA-MA-ESA», όπως παρουσιάζεται στο σχήμα 2.7. Οι εντάσεις των ηλεκτροστατικών πεδίων (E) και του μαγνητικού πεδίου (B) παραμένουν σταθερές, κατά τη διάρκεια της ανάλυσης. Επίσης, οι διαστάσεις και η γεωμετρία του θαλάμου πτήσης των ιόντων είναι συγκεκριμένες. Δηλαδή, η



Σχήμα 2.7. Σχηματική απεικόνιση αναλυτή μαζών διπλής εστίασης. ⁹²

διαδρομή και η τροχιά που ακολουθούν τα ιόντα, τα οποία φτάνουν τελικά στον ανιχνευτή είναι καθορισμένη.

Τα ιόντα για να μπορέσουν να ολοκληρώσουν την κίνησή τους προς τον ανιχνευτή, χωρίς ενδιάμεσα να συγκρουστούν με τα τοιχώματα του θαλάμου πτήσης θα πρέπει να έχουν συγκεκριμένη κινητική ενέργεια. Η κινητική αυτή ενέργεια, E_k , καθορίζεται από την τιμή του δυναμικού επιτάχυνσης (accelerating voltage, V) που εφαρμόζεται παλμικά στα ιόντα που εξέρχονται από την πηγή ιοντισμού με ηλεκτρική δυναμική ενέργεια E_{el} (τύποι 2-1).

Το δυναμικό επιτάχυνσης μεταβάλλεται ανάλογα με τις μάζες των ιόντων που πρόκειται να επιταχυνθούν. Όσον αφορά στα ιόντα ίδιου φορτίου και διαφορετικής μάζας, τα οποία δέχονται το ίδιο δυναμικό επιτάχυνσης, αυτά θα έχουν την ίδια κινητική ενέργεια, αλλά θα κινούνται με διαφορετική ταχύτητα.

Ενώ στα αναλυτικά όργανα LC-TOF-MS και GC-MS που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, τα δείγματα αναλύθηκαν με πλήρη σάρωση του φάσματος μεταξύ προκαθορισμένων περιοχών μαζών m/z , στην περίπτωση,

του GC-HRMS η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με παρακολούθηση επιλεγμένων ιόντων (Selected Ion Recording, SIR).

2.4.2 Πηγή ιοντισμού

Το αέριο έκλουσμα από τη χρωματογραφική στήλη εισάγεται στην πηγή ιοντισμού, όπου οι αναλύτες ιοντίζονται με ηλεκτρονικό ιοντισμό (εδάφιο 2.3.2.2). Η πηγή έχει ενσωματωμένα δύο τμήματα. Το εσωτερικό τμήμα περιλαμβάνει τα μέρη που μπορούν να απομακρυνθούν για καθαρισμό ή αντικατάσταση, πχ θερμαινόμενο νήμα W/Re και απωθητής, ενώ το εξωτερικό τμήμα περιέχει τεμάχια που δεν απομακρύνονται, πχ θερμαντήρας και θερμοζεύγος.^{91, 92}

2.4.3 Αναλυτής διπλής εστίασης^{64, 87, 89, 91}

2.4.3.1 Ηλεκτροστατικός αναλυτής

Τα σχηματιζόμενα ιόντα εξερχόμενα από την πηγή ιοντισμού επιταχύνονται έτσι, ώστε να εισέλθουν στον αναλυτή, έχοντας την ίδια κινητική ενέργεια, η οποία θα τους επιτρέψει να φτάσουν στον ανιχνευτή. Στην πραγματικότητα, όμως, υπάρχει διασπορά στην κινητική ενέργεια των ιόντων, η οποία καθορίζεται από τυχόν ανομοιογένεια της πηγής και από την κατανομή Boltzmann των ενεργειών των μορίων, από τα οποία δημιουργούνται.

Προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν οι αποκλίσεις των κινητικών ενεργειών, η δέσμη ιόντων διέρχεται, πρώτα, μέσα από τον ηλεκτροστατικό αναλυτή που αποτελείται από δύο λείους καμπυλωτούς μεταλλικούς σπλισμούς, γωνίας 72,5° και ακτίνας 64 mm, μεταξύ των οποίων εφαρμόζεται δυναμικό DC (V). Η ταχύτητα των ιόντων είναι κάθετη στο ηλεκτροστατικό πεδίο έντασης E και η τροχιά κίνησης είναι κυκλική ακτίνας r. Η δύναμη που ασκείται στα ιόντα από το ηλεκτρικό πεδίο, F_{el}, ισούται με την κεντρομόλο δύναμη, F_c, και ισχύει:

$$F_{el} = F_c \rightarrow q E = m u^2 / r \quad (2-8)$$

Όπου r είναι η ακτίνα καμπυλότητας του ηλεκτρικού πεδίου. Επίσης, εισάγοντας στη σχέση (2-8) την κινητική ενέργεια, E_k, των ιόντων προκύπτει η σχέση:

$$q E = 2 E_k / r \rightarrow r = 2 E_k / q E \quad (2-9)$$

Σύμφωνα με τη σχέση 2-9, η ακτίνα της τροχιάς των ιόντων είναι ανεξάρτητη από τη μάζα των ιόντων που κινούνται σε ηλεκτροστατικό πεδίο σταθερής έντασης E . Επιπροσθέτως, μόνο τα ιόντα με συγκεκριμένη τιμή κινητικής ενέργειας θα διαγράψουν τροχιά με ακτίνα ίση με την ακτίνα του ηλεκτροστατικού πεδίου και, αφού εξέλθουν από αυτό, θα οδηγηθούν στον αναλυτή μαγνητικού τομέα. Τα ιόντα που έχουν κινητική ενέργεια μεγαλύτερη ή μικρότερη από αυτή την τιμή θα προσκρούουν στους οπλισμούς του ηλεκτρικού τομέα και θα εξουδετερώνονται. Έτσι, συντελείται περιορισμός των κινητικών ενεργειών σε ένα στενά καθορισμένο εύρος τιμών. Συνεπώς, ο ηλεκτροστατικός αναλυτής λειτουργεί σαν φίλτρο κινητικών ενεργειών, επιτρέποντας μόνο σε ιόντα με συγκεκριμένη κινητική ενέργεια να διέλθουν μέσα από το πεδίο, ανεξάρτητα από το λόγο m/z .

2.4.3.2 Αναλυτής μαζών μαγνητικού τομέα

Στον αναλυτή μαγνητικού τομέα πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των ιόντων με βάση τη μάζα τους. Τα ιόντα εισέρχονται στον αναλυτή, γωνίας 35° και ακτίνας 381 mm, με ταχύτητα (u) κάθετη στην ένταση του πεδίου. Το σταθερό μαγνητικό πεδίο δε μεταβάλλει την κινητική ενέργεια του ιόντος, δηλαδή δε μεταβάλλει το μέτρο της ταχύτητάς του. Μπορεί, όμως, να αλλάξει την κατεύθυνση της ταχύτητας, προκαλώντας κάμψη στη διεύθυνση της δέσμης των ιόντων. Τα ιόντα κινούνται σε κυκλική τροχιά, η οποία είναι αποτέλεσμα της ισοροπίας μεταξύ των δύο δυνάμεων που ασκούνται σε αυτά. Η μαγνητική δύναμη, F_M , δίνεται από τη σχέση:

$$F_M = q (u \times B) \rightarrow F_M = z e u B \quad (2-10)$$

Για τη μαγνητική δύναμη, F_M , και την αντισταθμιστική κεντρομόλο δύναμη, F_c , ισχύει:

$$F_M = F_c \rightarrow z e u B = m u^2 / r \rightarrow r = m u / z e B \quad (2-11)$$

Υπό σταθερή ένταση B , η ακτίνα της κυκλικής τροχιάς είναι ανάλογη προς την ορμή « mu » του ιόντος. Άρα, ιόντα με μεγάλη ορμή θα ακολουθούν τροχιά μεγαλύτερης ακτίνας. Επίσης, η ταχύτητα του ιόντος καθορίζεται από το δυναμικό επιτάχυνσης στην περιοχή της πηγής, V , και το λόγο m/z . Τελικά, λαμβάνεται η σχέση:

$$m/z = r^2 B^2 e / 2V \quad (2-12)$$

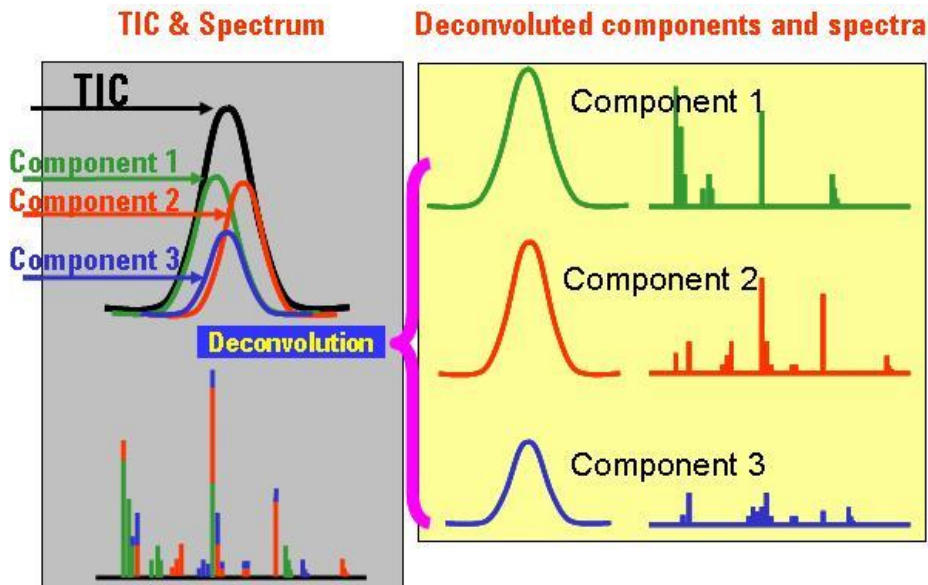
Από την εξίσωση 2-12 προκύπτει ότι τα φάσματα μαζών μπορούν να ληφθούν με μεταβολή ενός από τα τρία μεγέθη B , V ή r . Στην προκειμένη περίπτωση η παράμετρος που μεταβάλλεται είναι το δυναμικό επιτάχυνσης V , ενώ η ένταση του μαγνητικού πεδίου παραμένει σταθερή. Επίσης, η ακτίνα της τροχιάς των ιόντων που θα εξέλθουν από τον μαγνητικό αναλυτή πρέπει να είναι συγκεκριμένη και ίση με την ακτίνα του θαλάμου πτήσης (μαγνητικού τομέα), η οποία είναι καθορισμένη. Άρα, σε κάθε τιμή V αντιστοιχεί μόνο μια τιμή m/z , δηλαδή, μόνο τα ιόντα με τη συγκεκριμένη τιμή m/z θα εξέλθουν από το μαγνητικό πεδίο και θα κατευθυνθούν στο δεύτερο ηλεκτροστατικό αναλυτή, ESA, όπου πραγματοποιείται η εστίαση της δέσμης.

2.4.4 Ανιχνευτής

Ο ανιχνευτής των ιόντων συνίσταται από διακριτές δυνόδους μετατροπής και έναν φωτοπολλαπλασιαστή υψηλής απόδοσης και μεγάλης διάρκειας ζωής. Τα τμήματα αυτά του ανιχνευτή έχουν αναφερθεί σε προηγούμενα τμήματα του συγκεκριμένου κεφαλαίου (εδάφια 2.2.2.8 και 2.3.2.4).

2.5 Αυτόματη ανίχνευση ουσιών μέσω προγράμματος αυτόματης φασματικής αποσυνέλιξης

Ο όρος φασματική αποσυνέλιξη (spectral deconvolution) αναφέρεται στη διαδικασία διάκρισης, μερικώς, επικαλυπτόμενων χρωματογραφικών κορυφών και φασμάτων μαζών (σχήμα 2.8). Η συγκεκριμένη διαδικασία συνεισφέρει στην ταυτοποίηση ουσιών που καλύπτονται από συνεκλούμενες με αυτές ουσίες, οι οποίες προέρχονται από το υπόστρωμα του δείγματος. Για το σκοπό αυτό, στα αρχεία των δειγμάτων που έχουν αναλυθεί με την τεχνική GC-MS, εφαρμόζεται το πρόγραμμα «Automatic Mass Spectral Deconvolution and Identification System, AMDIS»⁹⁴. Παράλληλα, απαιτείται και η λειτουργία του προγράμματος «Deconvolution Reporting Software, DRS», το οποίο συνδυάζει τα αποτελέσματα από το GCMSD ChemStation, το AMDIS και το «NIST Mass Spectral Search Program», εξάγοντας τα αποτελέσματα σε μια έκθεση με μορφή πίνακα, εύκολα ερμηνεύσιμου⁹³. Η διαδικασία είναι, πλήρως, αυτοματοποιημένη και σύντομη, διάρκειας 1-2 min για κάθε χρωματογράφημα ολικών ιόντων (total ion chromatogram, TIC). Επίσης, η



Σχήμα 2.8. Σχηματική απεικόνιση της φασματικής αποσυνέλιξης μέσω του προγράμματος «AMDIS». ⁹³

διαδικασία περιλαμβάνει i) επεξεργασία του θορύβου, ii) διόρθωση της ολίσθησης της γραμμής βάσης, iii) εξαγωγή καθαρών φασμάτων μαζών (components) και σχετικών πληροφοριών, πχ χρόνου έκλουσης, iv) αναζήτηση σε φασματικές βιβλιοθήκες των εξαγόμενων καθαρών φασμάτων μαζών και v) αντιστοίχιση των φασμάτων και ταυτοποίηση των ουσιών.

Στην εν λόγω διατριβή χρησιμοποιήθηκαν, συνολικά, τρεις βιβλιοθήκες φασμάτων μαζών: i) η «NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, NIST05» που περιέχει 190.825 φάσματα ηλεκτρονικού ιοντισμού ⁹⁵, ii) η «AORC_R6 Mass Spectral Library» με 6.840 φάσματα και iii) μια ενδοεργαστηριακή βιβλιοθήκη που περιέχει τους χρόνους ανάσχεσης και τα φάσματα μαζών 377 απαγορευμένων ουσιών.

Η αυτόματη ανίχνευση πραγματοποιήθηκε εις διπλούν και αφορούσε μόνο στα δείγματα που αναλύονταν με την τεχνική GC-MS σε λειτουργία πλήρους σάρωσης (full scan mode). Καταρχήν, στα ληφθέντα αρχεία των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε ανάλυση απλού τύπου, σύμφωνα με τα προαναφερθέντα βήματα (i-v), όπου γινόταν σύγκριση των καθαρών φασμάτων μαζών (components) των δειγμάτων και των φασμάτων μαζών δύο βιβλιοθηκών, ορίζοντας ως ελάχιστο παράγοντα αντιστοίχισης («match factor») των φασμάτων την τιμή 70, χωρίς να λαμβάνεται υπόψη ο χρόνος έκλουσης. Σε

πρώτο στάδιο, τα καθαρά φάσματα μαζών συγκρίνονταν με αυτά της βιβλιοθήκης AORC_R6 και αποδίδονταν σε συγκεκριμένες ουσίες με τα αντίστοιχα «CAS Number» αυτών. Κατόπιν, τα αποτελέσματα αναζητούνταν και σε μια δεύτερη βιβλιοθήκη, τη NIST05. Αν και οι δύο βιβλιοθήκες είχαν ως πρώτη επιλογή την ίδια ουσία, τότε στην τελική έκθεση το «Hit Number» θα ήταν η μονάδα. Αν, όμως, η ουσία που προτείνεται από τη βιβλιοθήκη AORC_R6, βρισκόταν στη δεύτερη θέση σε σειρά προτεραιότητας στη βιβλιοθήκη NIST05, τότε το «Hit Number» θα ήταν δύο.

Επιπροσθέτως, έλαβε χώρα αυτόματη ανίχνευση ουσιών, όπου εξετάζονταν, ταυτοχρόνως, το καθαρό φάσμα μαζών και ο χρόνος έκλουσης, τα οποία αναζητούνταν σε μια βιβλιοθήκη που έχει αναπτυχθεί στο εργαστήριο ελέγχου ντόπινγκ του ΟΑΚΑ. Με το συγκεκριμένο τύπο ανάλυσης δεδομένων (use retention index calibration data) ενσωματώθηκε ο δείκτης κατακράτησης των ανιχνευόμενων ουσιών στον αλγόριθμο αναζήτησης και τέθηκαν δύο περιορισμοί: α) η ελάχιστη τιμή παράγοντα αντιστοίχισης «match factor» να είναι 30 και β) ο χρόνος έκλουσης του αναλύτη να είναι εντός του εύρους των ± 5 s ως προς το θεωρητικό χρόνο έκλουσης αυτού. Όταν η διαφορά μεταξύ των συγκεκριμένων χρόνων έκλουσης ήταν μεγαλύτερη από ± 5 s, αφαιρούνταν 70 βαθμοί από το «match factor». Έτσι, η τιμή του «match factor» γίνεται μικρότερη από 30, με αποτέλεσμα η συγκεκριμένη ουσία να μη συμπεριλαμβάνεται στις ανιχνευόμενες ουσίες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΠΟΛΥΔΥΝΑΜΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΑΠΑΓΟΡΕΥΜΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΕ ΟΥΡΑ ΑΛΟΓΩΝ

3.1 Εισαγωγή

Τα βιολογικά υλικά, στα οποία διενεργείται ο έλεγχος ντόπινγκ είναι τα ούρα ή το πλάσμα αίματος. Η σύσταση των ούρων ποικίλλει πολύ περισσότερο από τη σύσταση του αίματος, διότι στα ούρα εισάγονται σε μεγαλύτερη έκταση τα συστατικά των τροφίμων και των υγρών από ό,τι στα άλλα βιολογικά υλικά. Επίσης, στα ούρα παρατηρείται μεγαλύτερος αριθμός μεταβολιτών και σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, συγκριτικά με άλλα βιολογικά υλικά.

Ο αρχικός εργαστηριακός έλεγχος ντόπινγκ διεξάγεται σε βάση ρουτίνας και περιλαμβάνει την προκατεργασία των δειγμάτων και την ανάλυση αυτών με διαδικασίες σάρωσης (screening procedures), οι οποίες επιτρέπουν την ταυτόχρονη εξέταση πολλών απαγορευμένων ουσιών που ανήκουν, είτε στην ίδια κατηγορία ενώσεων (υποκεφάλαιο 1.6), είτε σε διαφορετικές. Για τα ύποπτα δείγματα που προκύπτουν από την ανάλυση σάρωσης ενεργοποιείται η επιβεβαιωτική διαδικασία προσδιορισμού της ύποπτης ουσίας, η οποία δε συμπεριλαμβάνεται στο πεδίο μελέτης της παρούσας διατριβής.

Παλαιότερα οι μέθοδοι σάρωσης αναπτύσσονταν με βάση την κατηγοριοποίηση των ουσιών ως προς τη φαρμακολογική τους δράση⁹⁶⁻¹⁰⁵. Αυτό, όμως, συνεπάγεται την εξέταση σχετικά μικρού αριθμού ενώσεων κάθε φορά. Έτσι, τα τελευταία χρόνια παρατηρείται η τάση διεύρυνσης του πεδίου ελέγχου και εξέτασης συγχρόνως, σε μια ανάλυση, πολλών ουσιών που ανήκουν σε διαφορετικές κατηγορίες. Αν και πρόκειται για μια απαιτητική και δύσκολη διαδικασία στην υλοποίησή της, η σημαντική πρόοδος που έχει σημειωθεί στην τεχνική LC-MS¹⁰⁶ έχει συμβάλει θετικά προς αυτή την κατεύθυνση.

Αξιόλογες μέθοδοι σάρωσης έχουν αναπτυχθεί για την ευρεία ανίχνευση απαγορευμένων ουσιών, τόσο σε δείγματα πλάσματος^{107, 108}, όσο και σε

δείγματα ούρων αλόγων. Ο αριθμός τους, όμως, είναι περιορισμένος. Το συγκεκριμένο κεφάλαιο επικεντρώνεται στην ανασκόπηση των γενικευμένων πολυδύναμων μεθόδων σε δείγματα ούρων αλόγων, με τις οποίες επιτυγχάνεται η παράλληλη ανίχνευση πολλών και διαφορετικών ουσιών ¹⁰⁹.

3.2 Στάδια προκατεργασίας δειγμάτων ούρων αλόγων

Η προκατεργασία των δειγμάτων ούρων αλόγων που είναι σχεδιασμένη για τον ποιοτικό προσδιορισμό απαγορευμένων ουσιών με διαδικασίες ανάλυσης ρουτίνας περιλαμβάνει απαραίτητα, το στάδιο της υδρόλυσης και της εκχύλισης. Όταν η ανάλυση των δειγμάτων εκτελείται με την τεχνική GC-MS, τότε στην προετοιμασία των δειγμάτων συμπεριλαμβάνεται και το στάδιο της παραγωγοποίησης, το οποίο δεν είναι αναγκαίο για τις αντίστοιχες αναλύσεις LC-MS.

3.2.1 Υδρόλυση μεταβολιτών

Το στάδιο της υδρόλυσης αφορά στις ουσίες που μεταβολίζονται, κατά τη δεύτερη φάση του μεταβολισμού και εκκρίνονται στα ούρα ως υδατοδιαλυτοί εστέρες του γλυκουρονικού και θειικού οξέος. Οι συζευγμένες ουσίες είναι πολικές, μη πτητικές και δεν είναι δυνατόν να ανιχνευτούν, μέσω της ανάλυσης GC-MS. Υπάρχουν αναφορές για την απευθείας ανίχνευση των συγκεκριμένων μεταβολιτών μέσω της τεχνικής LC-MS, χωρίς να έχει προηγηθεί υδρόλυση, αλλά αυτές αφορούν την ανίχνευση περιορισμένου αριθμού ενώσεων ^{110, 111}. Στις διαδικασίες ανάλυσης ρουτίνας εξετάζεται μεγάλος αριθμός απαγορευμένων ουσιών και αυτό προϋποθέτει την ύπαρξη των αντίστοιχων πρότυπων ουσιών αναφοράς που όταν πρόκειται για συζευγμένες ουσίες, αυτές έχουν υψηλό κόστος και μικρή διαθεσιμότητα. Έτσι, στις συγκεκριμένες μεθόδους οι μεταβολίτες προτιμάται να αποσυζεύγνυνται, μέσω της υδρόλυσης και οι ουσίες να ανιχνεύονται ασύζευκτες.

Το συνηθέστερο είδος υδρόλυσης που επιλέγεται στις μεθόδους που καλύπτουν μεγάλο εύρος απαγορευμένων ουσιών είναι η ενζυμική υδρόλυση. Τα επικρατέστερα ένζυμα που χρησιμοποιούνται για το σκοπό αυτό είναι η β-γλυκουρονιδάση, η πρωτεάση και η αρυλοσουλφατάση ¹¹²⁻¹¹⁸. Σε αυτό το είδος υδρόλυσης απαιτείται προσοχή στη σωστή ρύθμιση των συνθηκών,

όπου θα δράσει το ένζυμο, δηλαδή στο pH, στη θερμοκρασία και στο χρόνο επώασης. Ενώ οι εστέρες του γλυκουρονικού οξέος υδρολύονται αποτελεσματικά από τα προαναφερθέντα ένζυμα, δεν ισχύει το ίδιο και για τους θειικούς εστέρες. Η β-γλυκουρονιδάση υδρολύει μόνο τα γλυκουρονίδια, ενώ η σουλφατάση που περιέχεται στην *H. romatía* υδρολύει μόνο ένα μέρος των θειικών εστέρων. Ειδικότερα, η σουλφατάση δε θεωρείται κατάλληλη για τους 17β-θειικούς εστέρες των αναβολικών στεροειδών. Έτσι, για τα αναβολικά στεροειδή έχουν προταθεί και εναλλακτικοί τρόποι υδρόλυσης, όπως είναι η χημική υδρόλυση, δηλαδή η μεθανόλυση και η σολβόλυση ^{100, 102, 119-123}. Το αντιδραστήριο που χρησιμοποιείται στη μεθανόλυση είναι το μεθανολικό υδροχλώριο, ενώ στη σολβόλυση είναι το μίγμα οξικού αιθυλεστέρα – μεθανόλης - θειικού οξέος. Προκειμένου η αποσύζευξη των μεταβολιτών των στεροειδών να είναι ολοκληρωμένη, σε ορισμένες μεθοδολογίες συνδυάζεται η σολβόλυση με την ενζυμική υδρόλυση ^{100, 102}. Οι συγκεκριμένες χημικές υδρολύσεις συναντώνται σε μεθόδους που ανιχνεύουν αποκλειστικά αναβολικά στεροειδή και όχι σε πιο γενικευμένες μεθόδους.

3.2.2 Εκχύλιση

Κατά τη διενέργεια του ελέγχου ντόπινγκ σε ούρα αλόγων, η απομόνωση των απαγορευμένων ουσιών από το βιολογικό υγρό πραγματοποιείται με την υγρό-υγρό εκχύλιση ^{103, 124} ή/και την εκχύλιση στερεάς φάσης ¹²⁵. Στις δημοσιευμένες μεθόδους που παρέχουν ευρεία ανίχνευση απαγορευμένων ουσιών σε ούρα αλόγων, η εκλεκτική παραλαβή των προσδιοριζόμενων ουσιών από το υπόστρωμα γίνεται, κατά κύριο λόγο, με εκχύλιση στερεάς φάσης. Στην τεχνική αυτή χρησιμοποιείται στερεό προσροφητικό υλικό που συνήθως, είναι διοξειδίο του πυριτίου με χημικά συνδεδεμένες ομάδες, ώστε αυτό να αποκτά διάφορες προσροφητικές ιδιότητες. Η αρχή της τεχνικής στηρίζεται, καταρχήν, στην προσρόφηση των αναλύτων στα φυσίγγια που περιέχουν κατάλληλο προσροφητικό υλικό και στη συνέχεια, στην έκλουσή τους με κατάλληλο διαλύτη. Όταν το δείγμα έχει αιωρούμενα σωματίδια ή αυξημένο ιξώδες, τότε εμποδίζεται η ομαλή διέλευσή του, μέσω του προσροφητικού υλικού. Για να αποφευχθεί κάτι τέτοιο, πριν διαβιβαστούν στο φυσίγγιο τα δείγματα αραιώνονται με ρυθμιστικό διάλυμα ¹¹²⁻¹¹⁷ ή/και φυγοκεντρώνται ^{114, 115, 121}.

Τα στάδια που ακολουθούνται για την εκτέλεση μιας εκχύλισης στερεάς φάσης είναι τα εξής ^{126, 127}:

- i. Προετοιμασία και εξισορρόπηση του φυσιγγίου, δηλαδή, δημιουργία κατάλληλων συνθηκών, ώστε να αλληλεπιδράσει με το δείγμα. Αρχικά, γίνεται καθαρισμός του φυσιγγίου με έναν οργανικό διαλύτη, συνήθως μεθανόλη. Ακολουθεί η ενεργοποίηση των δραστικών ομάδων του προσροφητικού υλικού με διαβίβαση ενός διαλύτη, ο οποίος πρέπει να είναι όσο το δυνατόν παρόμοιος πολικότητας, ιοντικής ισχύος και παρόμοιου pH με το δείγμα. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα.
- ii. Διαβίβαση του δείγματος, οπότε οι επιθυμητές ουσίες και, ενδεχομένως, και άλλες ουσίες του δείγματος να κατακρατούνται στο υλικό προσροφησης, ενώ οι υπόλοιπες ουσίες να εξέρχονται.
- iii. Ξήρανση του στερεού προσροφητή με αέρα ή ρεύμα αζώτου.
- iv. Έκπλυση και αποδέσμευση των ανεπιθύμητων ουσιών που κατακρατούνται πάνω στο υλικό προσρόφησης, μέσω της διαβίβασης διαλύτη κατάλληλης πολικότητας.
- v. Εκλεκτική έκλουση των εξεταζόμενων ουσιών, με τη βοήθεια ενός δεύτερου διαλύτη κατάλληλης πολικότητας. Ο διαλύτης έκλουσης μπορεί να είναι και μίγμα δύο ή τριών οργανικών διαλυτών. Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται, εξαρτώνται από το είδος του προσροφητικού υλικού και των ουσιών που θα απομονωθούν.

Η γενική τάση που παρατηρείται στις μεθόδους που καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα απαγορευμένων ουσιών είναι οι ουσίες αυτές να παραλαμβάνονται από το υπόστρωμα ούρων, μέσω εκχύλισης στερεάς φάσης, είτε σε ένα γενικό /συνολικό εκχύλισμα ^{114, 115}, είτε σε ξεχωριστά κλάσματα, στα οποία διαχωρίζονται οι βασικές από τις όξινες και τις ουδέτερες ουσίες ^{112, 113, 128, 129}.

Στην τελευταία περίπτωση χρησιμοποιούνται φυσιγγία «mixed mode», στα οποία είναι δυνατή η ανάπτυξη πολλαπλών αλληλεπιδράσεων μεταξύ του προσροφητή και του αναλύτη. Πιο συγκεκριμένα, γι' αυτό το σχήμα εκχυλίσεως, δημοφιλή είναι τα φυσιγγία τύπου C8-SCX, όπου μεταξύ του προσροφητή και του αναλύτη είναι δυνατόν να αναπτυχθούν i) δυνάμεις Van

der Waals, εξαιτίας της μη πολικής ομάδας C8 και ii) δυνάμεις ηλεκτροστατικής φύσης μεταξύ του θετικά φορτισμένου αναλύτη και της αρνητικά φορτισμένης βενζυλοσουλφονικής ομάδας ($pK_a < 1$) του προσροφητή, η οποία αποτελεί έναν ισχυρό κατιονανταλλάκτη. Τα κλάσματα που συλλέγονται διαδοχικά από την εκχύλιση στερεάς φάσης προκύπτουν με τον εξής τρόπο: Στο φυσίγγιο, από το οποίο έχει διέλθει το δείγμα, προστίθεται οξύ, πχ οξικό οξύ. Στο όξινο περιβάλλον του προσροφητή, οι βασικοί αναλύτες πρωτονιώνονται με αποτέλεσμα να αλληλεπιδρούν με τη βενζυλοσουλφονική ομάδα. Αυτή η ισχυρή ιοντική αλληλεπίδραση επιτρέπει στις βασικές ουσίες να παραμένουν στο φυσίγγιο, όταν από αυτό διέλθει ο οργανικός διαλύτης για την απομάκρυνση και την παραλαβή των αδιάστατων όξινων και ουδέτερων ουσιών. Ακολούθως, για τη συλλογή του βασικού εκχυλίσματος, στο φυσίγγιο προστίθεται διάλυμα βάσης, πχ αμμωνίας, οπότε οι βασικές ουσίες αποπρωτονιώνονται και δεν αλληλεπιδρούν πλέον με τη βενζυλοσουλφονική ομάδα. Έτσι, με τη διέλευση του κατάλληλου οργανικού διαλύτη λαμβάνονται και οι βασικές ουσίες.

Επιπροσθέτως, έχει αναπτυχθεί μια μεθοδολογία, στην οποία διενεργούνται δύο διαφορετικές ανεξάρτητες εκχυλίσεις στερεάς φάσης σε ισάριθμα κλάσματα ενός δείγματος ούρων αλόγου, από όπου προκύπτουν ένα συνολικό και ένα βασικό εκχύλισμα. Στην προκειμένη περίπτωση το όξινο κλάσμα απορρίπτεται.^{116, 117}

3.2.3 Παραγωγοποίηση

3.2.3.1 Λόγοι χρήσης χημικών παραγώγων¹³⁰⁻¹³²

Βασική απαίτηση, κατά την αεριοχρωματογραφική ανάλυση είναι οι εξεταζόμενες ουσίες να είναι πτητικές ή να καθίστανται πτητικές, ώστε να μπορούν να μεταβούν στην αέρια φάση σε σύντομο χρόνο, και να διέλθουν από τη χρωματογραφική στήλη. Σε αντίθετη περίπτωση, οι ουσίες, είτε κατακρατούνται ισχυρά από τη στατική φάση και δεν εκλούνται από τη στήλη, είτε αργούν να εκλουστούν δίνοντας διευρυμένες χρωματογραφικές κορυφές. Επιπροσθέτως, οι ουσίες θα πρέπει να εμφανίζουν θερμική σταθερότητα στις θερμοκρασίες που αναπτύσσονται στα διάφορα τμήματα του συστήματος και ιδιαιτέρως, σε αυτό του εγχυτή, δηλαδή του σημείου

εισαγωγής του δείγματος, το οποίο διατηρείται σε υψηλή θερμοκρασία. Σε διαφορετική περίπτωση, προκύπτουν προϊόντα θερμικής διάσπασης ή αναδιάταξης της δομής του μορίου που δίνουν διάφορες κορυφές στο χρωματογράφημα. Για τις ουσίες που δεν πληρούν τις παραπάνω προϋποθέσεις, λαμβάνει χώρα παραγωγοποίηση που οδηγεί στο σχηματισμό πτητικών και θερμικά σταθερών χημικών παραγώγων.

Η χαμηλή πτητικότητα μιας ουσίας οφείλεται στη μεγάλη σχετική μοριακή μάζα της, στην παρουσία πολικών ομάδων στο μόριό της και στις ισχυρές ενδομοριακές δυνάμεις που τυχόν αναπτύσσονται, όπως είναι οι δεσμοί υδρογόνου ή οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις στις αμφολυτικές ενώσεις. Η ανάπτυξη των δεσμών υδρογόνου είναι δυνατόν να αποτραπεί με απομάκρυνση των ενεργών ατόμων υδρογόνου, το οποίο επιτυγχάνεται μέσω της αντίδρασης παραγωγοποίησης. Η συνηθέστερη αντίδραση παραγωγοποίησης είναι η αντικατάσταση του ενεργού υδρογόνου των πολικών ομάδων -OH, -SH, -NH₂ από μια άπολη ομάδα του αντιδραστηρίου παραγωγοποίησης, με αποτέλεσμα την ακυλίωση, ακυλίωση ή σιλανοποίηση της ουσίας. Έτσι, μειώνοντας τις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις και την πολικότητα των μορίων, οι ουσίες καθίστανται περισσότερο πτητικές και κατάλληλες για ανάλυση GC-MS.

Όπως προαναφέρθηκε, η θέρμανση μπορεί να προκαλέσει αναδιάταξη ή αποσύνθεση του μορίου. Επίσης, η θέρμανση αυξάνει την εσωτερική δονητική ενέργεια του μορίου. Άρα, όσο χαμηλότερη θερμοκρασία απαιτείται για την εξάτμιση του δείγματος, τόσο λιγότερο πιθανή είναι η αλλαγή της δομής ή η εκτεταμένη θραυσματοποίηση της εξεταζόμενης ουσίας, κατά τον ιοντισμό. Επομένως, είναι προτιμότερη η μετατροπή των ουσιών, και ιδιαίτερα των θερμοασταθών, σε πτητικά παράγωγα, τα οποία χρειάζονται λιγότερη θέρμανση για να εξατμιστούν. Η θερμική αστάθεια σχετίζεται με τα ενεργά άτομα υδρογόνου, τα οποία αποτελούν δραστικά κέντρα.

Επίσης, σημαντική είναι η συμβολή της παραγωγοποίησης στο διαχωρισμό ουσιών με παραπλήσια δομή, όπως για παράδειγμα σε ισομερή, όπως ενδεικτικά η τεστοστερόνη και η επιτεστοστερόνη. Επιπλέον, ο σχηματισμός παραγώγων που έχουν σταθερό μοριακό ιόν, το οποίο είναι εμφανές στο φάσμα μαζών μαζί με τα χαρακτηριστικά θραύσματα της ουσίας, συντελεί στη

διασάφηση της δομής των εξεταζόμενων ουσιών, δηλαδή, της ταυτότητας των ουσιών.

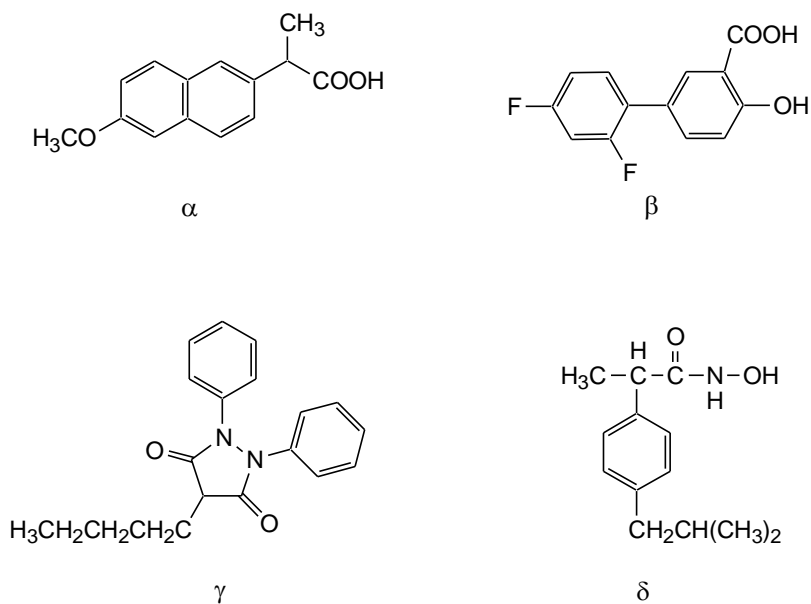
Συνοψίζοντας, η παραγωγοποίηση οδηγεί στο σχηματισμό πιο πτητικών και θερμικά πιο σταθερών ουσιών, οι οποίες παρουσιάζουν καλύτερα χρωματογραφικά χαρακτηριστικά, σχηματίζοντας χρωματογραφικές κορυφές με καλύτερο σχήμα, συμμετρία και διαχωριστικότητα.

3.2.3.2 Χημικές αντιδράσεις παραγωγοποίησης

3.2.3.2.1 Αλκυλίωση

Η αλκυλίωση των απαγορευμένων ουσιών που έχουν στο μόριό τους λειτουργικές ομάδες, όπως καρβονύλιο, καρβοξύλιο, υδροξύλιο και αμινομάδα, οδηγεί υπό τις κατάλληλες συνθήκες στο σχηματισμό ενολοαιθέρων, εστέρων, αιθέρων και αλκυλοαμινών, αντιστοίχως, με αντικατάσταση του ενεργού υδρογόνου. Η συνηθέστερη αντίδραση αλκυλίωσης που εφαρμόζεται στο στάδιο της παραγωγοποίησης σε μεθόδους ελέγχου ντοπινγκ είναι η μεθυλίωση. Αυτό το είδος αλκυλίωσης επιλέγεται στις μεθόδους ανίχνευσης όξινων ουσιών με την τεχνική GC-MS. Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα είναι:

- i. Η μεθυλίωση του καρβοξυλίου, πχ του ναπροξενίου (σχήμα 3.1α), προς το σχηματισμό μεθυλεστέρα.
- ii. Η μεθυλίωση του φαινολικού υδροξυλίου, πχ του διφλουνισαλίου (σχήμα 3.1β), προς το σχηματισμό μεθυλαιθέρα.
- iii. Η μεθυλίωση του καρβονυλίου, πχ της φαινυλοβουταζόνης (σχήμα 3.1γ), προς το σχηματισμό ενολομεθυλ-αιθέρα.
- iv. Η μεθυλίωση της υδροξυαμινομάδας, πχ του ιβουπροξανίου (σχήμα 3.1δ), προς το σχηματισμό του διμεθυλο-παραγώγου.

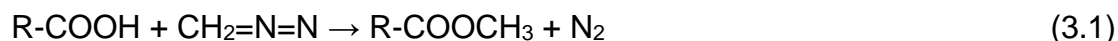


Σχήμα 3.1. Δομή των μορίων α) ναπροξενίου, β) διφλουνισαλίου, γ) φαινυλοβουταζόνης, δ) ιβουπροξανίου.

Οι συνηθέστερες μέθοδοι μεθυλίωσης που εφαρμόζονται στον έλεγχο ντόπινγκ είναι οι ακόλουθες ¹³³:

α) Μέθοδος Διαζωμεθανίου

Το διαζωμεθάνιο CH_2N_2 , είναι τοξικό, εκρηκτικά ασταθές αέριο και εξαιρετικό αντιδραστήριο μεθυλίωσης. Για τη διεξαγωγή της παραγωγοποίησης χρησιμοποιείται συγκεκριμένη πειραματική διάταξη, όπου προστίθεται, προσφάτως, παρασκευασμένο αιθερικό διάλυμα διαζωμεθανίου σε αιθερικό διάλυμα του δείγματος. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης 3.1 πρέπει να εξασφαλίζονται άνυδρες συνθήκες, γιατί το διαζωμεθάνιο αποσυντίθεται παρουσία νερού. ^{129, 134}

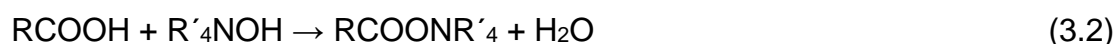


β) Εκχυλιστική μεθυλίωση (Extractive methylation)

Η εκχυλιστική μεθυλίωση (αντιδράσεις 3.2 και 3.3) περιλαμβάνει, συνοπτικά, την εκχύλιση του μορίου-στόχος με τη μορφή ζεύγους ιόντων από την αλκαλική υδατική φάση στον κατάλληλο οργανικό διαλύτη, στον οποίο λαμβάνει χώρα η αντίδραση της μεθυλίωσης. Για τη μεθυλίωση προστίθεται ένα αλκυλοβρωμίδιο με επικρατέστερο το μεθυλοϊωδίδιο. Ως αντιδραστήριο

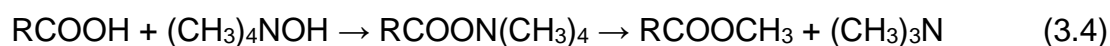
μεταφοράς του οργανικού μορίου μεταξύ των δύο φάσεων χρησιμοποιείται, είτε το υδροξείδιο του τετραεξυλοαμμωνίου, είτε το όξινο θειικό τετραεξυλοαμμώνιο. Το συγκεκριμένο, όμως, αντιδραστήριο οδηγεί σε παρεμποδίσεις κατά την ανάλυση GC και μπορεί να προκαλέσει μείωση της αποτελεσματικότητας της τριχοειδούς χρωματογραφικής στήλης, εξαιτίας της πυρόλυσης των αντίστοιχων αμινών στον εισαγωγέα του δείγματος. Επιπροσθέτως, η παρουσία των αντιδραστηρίων μεταφοράς μπορεί να οδηγήσουν σε δευτεροταγείς αντιδράσεις παραγωγοποίησης του μορίου-στόχος στον εισαγωγέα του δείγματος. Επομένως, κρίνεται απαραίτητη η απομάκρυνση αυτών των αντιδραστηρίων. Για το σκοπό αυτό διενεργείται εξάτμιση της οργανικής φάσης που χρησιμοποιείται για την εκχυλιστική μεθυλίωση, και επαναδιαλυτοποίηση των μεθυλο-παραγώγων σε άπολο διαλύτη, με χαμηλή διαλυτότητα των τεταρτοταγών αμμωνιακών αλάτων. Τέτοιοι διαλύτες είναι το κυκλοεξάνιο, το εξάνιο ή το μίγμα τολουολίου και εξανίου. Προς αυτή την κατεύθυνση συμβάλλει και η έκπλυση της οργανικής φάσης με κορεσμένο διάλυμα θειικού αργύρου ή η εκχύλιση στερεάς φάσης.

134-136



γ) Ταχεία («Flash») μεθυλίωση

Στην ταχεία μεθυλίωση οι ουσίες εκχυλίζονται από το βιολογικό δείγμα με υγρό-υγρό εκχύλιση και μετά την εξάτμιση, το ξηρό υπόλειμμα διαλυτοποιείται στο αντιδραστήριο μεθυλίωσης που συνήθως είναι διάλυμα υδροξειδίου του τεταρτοταγούς αμμωνίου. Για το σκοπό αυτό προστίθενται, επίσης, υδροξείδιο της τριμεθυλοανιλίνης, υδροξείδιο του τετραμεθυλοαμμωνίου ή μίγμα αυτών. Η αντίδραση παραγωγοποίησης πραγματοποιείται στον εισαγωγέα του δείγματος του αεριοχρωματογράφου, ο οποίος διατηρείται σε υψηλή θερμοκρασία. ¹³⁴⁻¹³⁶



δ) Μεθυλίωση με ιωδομεθάνιο σε ακετόνη

Ένας εναλλακτικός τρόπος μεθυλίωσης περιλαμβάνει τη διαλυτοποίηση με ακετόνη του ξηρού υπολείμματος του δείγματος, την προσθήκη άνυδρου

ανθρακικού καλίου και του αντιδραστηρίου μεθυλίωσης, CH₃I. Κατόπιν, το μίγμα επωάζεται στους 60 °C (αντίδραση 3.5).



Στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρονται διάφορα χρονικά διαστήματα επώασης. Επίσης, το ιωδομεθάνιο μπορεί να αντικατασταθεί και από άλλα αντιδραστήρια μεθυλίωσης, όπως είναι θειικά αλκύλια, χλωρομεθυλαιθέρες και α-βρωμοπενταφθοροτολουόλιο.¹³⁴⁻¹³⁶

3.2.3.2.2 Ακυλίωση

Τα άκυλο παράγωγα είναι συνήθη παράγωγα των ουσιών που έχουν υδροξυ-, αμινο- και θειολο-ομάδες στο μόριό τους και σχηματίζονται σύμφωνα με τις αντιδράσεις 3.6 έως 3.8.



Η παρασκευή αυτών είναι εύκολη και συνίσταται στην αντίδραση της ουσίας με το αντιδραστήριο ακυλίωσης (ανυδρίτης του αντίστοιχου οξέος) που βρίσκεται σε περίσσεια. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε διαλύτη, ο οποίος είναι ικανός να δεσμεύσει το οξύ που παράγεται, όπως είναι η πυριδίνη και το τετραϋδροφουράνιο. Ο χρόνος και η θερμοκρασία επώασης εξαρτώνται από τις ιδιότητες του υποστρώματος, τη δραστηριότητα του αντιδραστηρίου κι έτσι, διαφέρουν από μέθοδο σε μέθοδο. Τα συγκεκριμένα παράγωγα είναι ευαίσθητα στην υγρασία και συνεπώς, κρίνεται απαραίτητο να διατηρούνται άνυδρες οι συνθήκες.

Στις μεθόδους που εξετάζονται, συναντώνται οι ακόλουθες αντιδράσεις ακυλίωσης στη φάση της παραγωγοποίησης, μετά την εκχύλιση του δείγματος:

- i. Ακετυλίωση με προσθήκη μίγματος πυριδίνης και οξικού ανυδρίτη (2:1 v/v) και επώαση στους 80 °C για 20 min προς το σχηματισμό ακετυλο-παραγώγων¹²⁹.

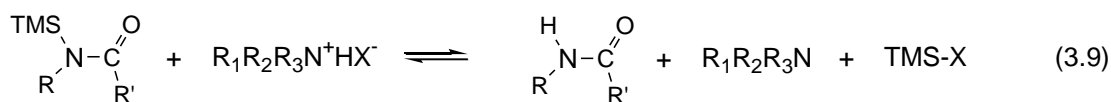
- ii. Επεξεργασία του δείγματος με διάλυμα πενταφθοροπρωπιονικού ανυδρίτη 20 % σε ακετονιτρίλιο και επώαση στους 60 °C για 15 min προς το σχηματισμό πενταφθοροπρωπιονυλο-παραγώγων ¹²⁹.
- iii. Τριφθοροακετυλίωση με προσθήκη τριφθοροοξικού ανυδρίτη και ακετονιτρίλιου, και κατόπιν, επώαση του μίγματος, είτε στους 80 °C για 20 min ¹²⁹, είτε στους 50 °C για 30 min ¹⁰¹ προς το σχηματισμό τριφθοροακέτυλο παραγώγων.

3.2.3.2.3 Σιλανοποίηση

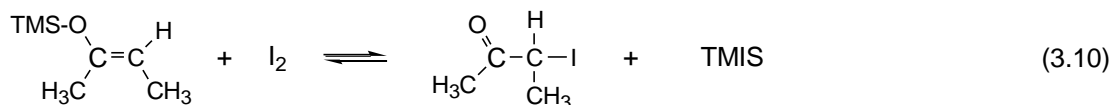
Η σιλανοποίηση είναι η συνηθέστερη αντίδραση παραγωγοποίησης στις αναλύσεις GC-MS ελέγχου ντόπινγκ, καθώς είναι αποτελεσματική για ένα μεγάλο μέρος απαγορευμένων ουσιών, όπως για παράδειγμα όσων ανήκουν στην κατηγορία των αναβολικών στεροειδών. Όσον αφορά, βέβαια, στην ανίχνευση των διουρητικών ουσιών, η εφαρμογή της συγκεκριμένης αντίδρασης παραγωγοποίησης είναι περιορισμένη, λόγω της αστάθειας των τριμεθυλοσιλυλο-παραγώγων, εξαιτίας της παρουσίας της ομάδας $-SO_2NH_2$ στο μόριό τους.

Στο πεδίο του αντι-ντόπινγκ το περισσότερο εφαρμοζόμενο είδος σιλανοποίησης είναι ο σχηματισμός των τριμεθυλοσιλυλο- $[(CH_3)_3Si-$, TMS] παραγώγων, χρησιμοποιώντας ως αντιδραστήριο παραγωγοποίησης τα αμινο-TMS-αμίδια, στα οποία συχνά προστίθεται καταλύτης. Είναι σημαντικό η παραγωγοποίηση να εξελίσσεται υπό άνυδρες συνθήκες, επειδή τα TMS-παραγωγα διασπώνται παρουσία ίχνων νερού. Τα εν λόγω παραγωγα σχηματίζονται, μέσω της αντίδρασης του αντιδραστήριου σιλανοποίησης με το ενεργό υδρογόνο των χαρακτηριστικών ομάδων των υπό εξέταση ουσιών. Με τη σιλανοποίηση τα οξέα μετατρέπονται σε TMS-εστέρες, οι αμίνες σε TMS-αμίδια και οι αλκοόλες σε TMS-αιθέρες. Επίσης, και οι κετονομάδες συγκαταλέγονται στις ομάδες που παραγωγοποιούνται, με τη σιλανοποίηση προς TMS-αιθέρες, μέσω του ενολικού τους ιόντος. Στις περισσότερες περιπτώσεις, για την παρασκευή των ενολο-TMS-αιθέρων απαιτείται καταλύτης, όπως για παράδειγμα το τριμεθυλοϊωδοσιλάνιο (TMIS) ή το οξικό νάτριο. Το τελευταίο δρα ως πολύ ισχυρή βάση που προωθεί το σχηματισμό του ενολικού ταυτομερούς. Επίσης, είναι αναγκαίος ο καταλύτης, όταν

στερεοχημικά παρεμποδισμένες ομάδες αντιδρούν με τα ογκώδη N-TMS-αμίδια. Γι' αυτό το λόγο, χρησιμοποιείται N-τριμεθυλο-σιλυλο-ιμιδαζόλιο (TMSImi) ή τριμεθυλο-ιωδο-σιλάνιο (TMIS). Τα N-TMS-αμίδια είναι ισχυρές βάσεις και αντιδρούν με αμινο-υδραλογόνα, παράγοντας τα αντίστοιχα τριμεθυλο-αλογονο-σιλάνια, TMS-X σύμφωνα με την αντίδραση 3.9.



Τέτοιου είδους αντιδράσεις εξυπηρετούν στην *in situ* παραγωγή λιγότερο σταθερών καταλυτών, όπως είναι το τριμεθυλο-ιωδο-σιλάνιο, TMIS, το οποίο είναι ένα από τα πιο δραστικά αντιδραστήρια σιλιανοποίησης που, όμως, η αποθήκευσή του δεν ενδείκνυται. Το TMIS είναι ευαίσθητο, και παρουσία φωτός και αέρα διασπάται σχηματίζοντας ιώδιο. Το ιώδιο, όμως, αντιδρά με τους ενολο-TMS αιθέρες προς α-ιωδο-κετόνες, γεγονός ανεπιθύμητο (αντίδραση 3.10). Άρα, κρίνεται αναγκαία, είτε η μείωση της παραγωγής του, είτε η απομάκρυνσή του.



Επιπλέον, επειδή το ιώδιο ανάγεται από θειόλες, κατά την παραγωγοποίηση προστίθενται θειόλες όπως διθειοερυθριτόλη (DTE), αιθανοθειόλη (EtSH), προπανοθειόλη (PrSH), οι οποίες οξειδώνονται προς δισουλφίδια, σύμφωνα με την αντίδραση 3.11.



Έτσι, για την ανίχνευση αναβολικών στεροειδών έχει προταθεί ως αντιδραστήριο παραγωγοποίησης το μίγμα MSTFA/NH₄I/DTE (1/2/4 v/w/w) με επώαση είτε στους 60 °C για 15 min¹³⁷, είτε στους 80 °C για 15 min¹³⁵. Με βάση τα παραπάνω το ιωδιούχο αμμώνιο προστίθεται για το σχηματισμό του TMIS σύμφωνα με την αντίδραση 3.9, ενώ η DTE δρα ως αναγωγικός παράγοντας για την αποφυγή της αντίδρασης 3.10. Επίσης, β-αγωνιστές έχουν ανιχνευτεί ως TMS-αιθερο-παράγωγα, μετά από επεξεργασία με MSTFA και τολουόλιο και θέρμανση στους 60 °C για 60 min^{96, 134, 138}.

3.2.3.2.4 Σχηματισμός οξιμών

Οξίμες είναι τα προϊόντα της αντίδρασης προσθήκης της υδροξυλαμίνης με καρβονυλικές ενώσεις και έχουν γενικό τύπο $>C=N-OH$. Στον έλεγχο ντόπινγκ ο σχηματισμός οξιμών εξυπηρετεί στην παραγωγοποίηση των καρβονυλικών κετο-ομάδων, ενώ με διαδοχική σιλανοποίηση παραγωγοποιούνται και οι διαθέσιμες υδροξυλομάδες του μορίου προς OTMS-αιθέρες. Τέτοιου είδους παραγωγοποίηση συναντάται, κυρίως, στις μεθόδους ανίχνευσης αναβολικών ουσιών ¹⁰⁰. Η διαδικασία σχηματισμού των οξιμών περιλαμβάνει κατεργασία του εκχυλίσματος του δείγματος με διάλυμα υδροχλωρικής υδροξυλαμίνης σε πυριδίνη και επώαση σε συνθήκες που διαφέρουν ανάλογα με τη μέθοδο, πχ επώαση στους 80 °C για 30 min ¹⁰⁰. Αφού ολοκληρωθεί η αντίδραση, η πυριδίνη απομακρύνεται με θέρμανση σε ρεύμα αζώτου και είτε ακολουθεί ανάλυση του ανασυσταμένου δείγματος, είτε συνεχίζεται η παραγωγοποίηση, δεσμεύοντας κι άλλες ομάδες του μορίου, μέσω σιλανοποίησης, πχ με κατεργασία με N-(tert-butyl dimethylsilyl)-N-methyl trifluoroacetamide (MTBSTFA) σε διάλυμα διαιθυλαμίνης-HCl με διμεθυλοφορμαμίδιο και επώαση στους 80 °C για 60 min. Επίσης, για το συγκεκριμένο είδος παραγωγοποίησης χρησιμοποιούνται και υποκατεστημένες υδροξυλαμίνες με μεθυλο- και βενζυλο-ομάδες προς το σχηματισμό μεθοξιμών και βενζυλοξιμών, αντίστοιχα ¹³⁹.

3.3 Τεχνικές ανάλυσης δειγμάτων ούρων αλόγων για πολυδύναμες μεθόδους

Η φασματομετρία μαζών έχει παίξει καθοριστικό ρόλο στην εξέλιξη του ελέγχου ντόπινγκ. Φασματόμετρα μαζών διαφόρων τύπων, συζευγμένα με υγρο- και αεριοχρωματογράφους, ανταποκρίνονται στις υψηλές απαιτήσεις του συγκεκριμένου χώρου και αποτελούν πλέον τον απαραίτητο εξοπλισμό των εργαστηρίων για τον προσδιορισμό των απαγορευμένων ουσιών στα σύνθετα υποστρώματα, όπως είναι τα ούρα αλόγων.

Η αεριοχρωματογραφία-φασματομετρία μαζών έχει εφαρμοστεί, εκτενώς, στον έλεγχο ντόπινγκ και έχει θεωρηθεί πολύτιμη τεχνική για πολυδύναμες μεθόδους. Αυτό αποδίδεται όχι μόνο στα αξιόπιστα δεδομένα που παρέχει, αλλά και στις μεγάλες διαθέσιμες βιβλιοθήκες με πρότυπα φάσματα μαζών που υπάρχουν. Η ανάγκη, όμως, για ξεχωριστές πορείες παραγωγοποίησης

πριν την ανάλυση GC-MS ανάλογα με τη χημική δομή των αναλύτων, οδήγησε σε διαφορετικές αναλυτικές μεθοδολογίες, οι οποίες εφαρμόζονταν, αντιστοίχως, στις διάφορες κατηγορίες των απαγορευμένων ουσιών. Αυτό έχει αρνητικές επιπτώσεις στον όγκο του δείγματος που καταναλώνεται και στο συνολικό χρονικό διάστημα που απαιτείται, μέχρι την έκδοση των τελικών αποτελεσμάτων.^{140, 141}

Με το πέρασμα των ετών η τεχνική LC-MS άρχισε να κερδίζει έδαφος και να υιοθετείται ευρύτατα σε πολυδύναμες μεθόδους. Σε αυτό συνέβαλε η σημαντική πρόοδος στην τεχνολογία της οργανολογίας της εν λόγω τεχνικής και, κυρίως, η ανάπτυξη των μαλακών πηγών ιοντισμού ESI και APCI. Επίσης, τα συστήματα με κοινούς αναλυτές μαζών, όπως ο γραμμικός τετραπολικός αναλυτής (Quadrupole, Q) και η τετραπολική παγίδα ιόντων (ion trap), άρχισαν σταδιακά να δίνουν τη θέση τους σε συζευγμένα φασματομέτρα μαζών με τριπλό τετραπολικό αναλυτή (Triple stage quadrupole, QqQ) και υβριδικό σύστημα με τετράπολο και παγίδα ιόντων (Q-Trap), τα οποία εξασφαλίζουν αναλύσεις με:

α) Καλύτερη ευαισθησία που συνεπάγεται τη δυνατότητα χρήσης μικρότερης ποσότητας δείγματος.

β) Μικρότερο χρόνο παραγωγής («dwell time») στην τεχνική παρακολούθησης επιλεγμένης μετάπτωσης (Selected Reaction Monitoring, SRM). Αυτό επιτρέπει την αύξηση του αριθμού των εξεταζόμενων αναλύτων στη μέθοδο. «Dwell time» είναι ο χρόνος που ο αναλυτής μαζών ολοκληρώνει ένα «scan event» και καταγράφει τις ιοντικές κρούσεις του.

γ) Δυνατότητα διάφορων λειτουργιών σάρωσης, όπως SRM, σάρωση πρόδρομου ιόντος (Precursor Ion Scan), σάρωση απώλειας ουδέτερου θραύσματος (Constant Neutral Loss Scan) και σάρωση θυγατρικού ιόντος (Product Ion Scan).^{141, 142}

Επιπροσθέτως, συστήματα LC-MS με αναλυτή μαζών χρόνου πτήσης και Orbitrap έχουν εισχωρήσει στις αναλύσεις ελέγχου ντόπινγκ, συμβάλλοντας στην πρόοδο των ελέγχων. Οι συγκεκριμένοι αναλυτές μαζών, μεταξύ άλλων, παρέχουν αναλύσεις με υψηλή διακριτική ικανότητα και μεγάλη ακρίβεια στον προσδιορισμό των μαζών. Επιπλέον, τα όργανα αυτά δουλεύουν σε

λειτουργία πλήρους σάρωσης, οπότε θεωρητικά ανιχνεύονται όλα τα συστατικά του δείγματος που εξέρχονται από τη χρωματογραφική στήλη και που ιοντίζονται. Η επιλογή των αναλυτών-στόχων λαμβάνει χώρα μετά το πέρας της ανάλυσης με κριτήρια το χρόνο ανάλυσης και την ακριβή μάζα των ιόντων. Έτσι, μπορούν εύκολα να εισάγονται νέες εξεταζόμενες ουσίες στην υπάρχουσα μέθοδο και να επιτρέπεται η επαναξιολόγηση των δειγμάτων για νέους αναλύτες, χωρίς να πρέπει να επαναληφθεί η προκατεργασία και η ανάλυση των δειγμάτων, αρκεί να έχουν αποθηκευτεί τα δεδομένα της πρώτης ανάλυσης^{141, 143}.

3.4 Σύνοψη μεθοδολογιών

Στο υποκεφάλαιο αυτό συνοψίζονται οι μεθοδολογίες της διεθνούς βιβλιογραφίας σχετικά με την ανίχνευση πολυάριθμων απαγορευμένων ουσιών σε ούρα αλόγων με προκατεργασία του δείγματος.

3.4.1 Ξεχωριστός προσδιορισμός όξινων - ουδέτερων και βασικών ουσιών με συλλογή των αντίστοιχων εκχυλισμάτων

Η μεθοδολογία που περιγράφεται παρακάτω περιλαμβάνει επιμέρους μεθόδους για τον προσδιορισμό ξεχωριστά των όξινων, των ουδέτερων και των βασικών ουσιών, χρησιμοποιώντας μόνο ένα υπόδειγμα από κάθε δείγμα. Τα ούρα υπόκεινται αρχικά σε ενζυμική υδρόλυση με μίγμα β-γλυκουρονιδάσης και προτεάσης και στη συνέχεια, σε εκχύλιση στερεάς φάσης με φυσίγγια «Mixed Mode C8-SCX», παραλαμβάνοντας δύο διαφορετικά κλάσματα. Το πρώτο κλάσμα περιέχει τις όξινες και ουδέτερες ουσίες, ενώ το δεύτερο κλάσμα συγκεντρώνει τις βασικές ουσίες. Για την παραλαβή του πρώτου εκχυλίσματος, το δείγμα που συγκρατείται στο φυσίγγιο οξινίζεται, και οι ουδέτερες μαζί με τις όξινες ουσίες παραλαμβάνονται με το μίγμα διχλωρομεθανίου:οξικού αιθυλεστέρα (4:1). Ακολουθεί βασική έκπλυση του εκλούσματος. Η οργανική στιβάδα που προκύπτει περιέχει τις ουδέτερες ουσίες, δηλαδή αναβολικά στεροειδή και κορτικοστεροειδή, ενώ στην υδατική στιβάδα μεταφέρονται οι όξινες ουσίες στην ιοντική τους μορφή, οι οποίες παραλαμβάνονται με διχλωρομεθάνιο, μετά από ρύθμιση του pH της υδατικής φάσης στην τιμή 6. Ο προσδιορισμός των ουδέτερων και όξινων ουσιών πραγματοποιείται με την τεχνική LC-QqQ-

MS σε λειτουργία παρακολούθησης επιλεγμένων ιόντων (Multi Reaction Monitoring, MRM) με διαφορετική μέθοδο ανάλυσης για κάθε ομάδα ουσιών. Τα αναβολικά ανιχνεύονται με θετικό ESI ιοντισμό ^{113, 128}, ενώ οι όξινες ουσίες με αρνητικό ESI ιοντισμό ¹¹³. Για τα κορτικοστεροειδή έχουν αναπτυχθεί δύο μέθοδοι που περιλαμβάνουν τόσο θετικό ¹¹³, όσο και αρνητικό ESI ιοντισμό ¹¹². Επίσης, για τα αναβολικά έχουν προταθεί δύο μέθοδοι, όπου στην πρώτη ο χρωματογραφικός διαχωρισμός λαμβάνει χώρα με στήλη αντιστρόφου φάσεως «Supelcosil LC-8-CB», μήκους 10 cm ¹²⁸, ενώ στη δεύτερη μέθοδο ο διαχωρισμός εκτελείται με στήλη μήκους 3,3 cm ¹¹³, χρησιμοποιώντας διαφορετική κινητή φάση στην κάθε μέθοδο. Στην πρώτη μέθοδο ο συνολικός χρόνος ανάλυσης είναι 15 min, ενώ στη δεύτερη είναι 10 min.

Όσον αφορά στις βασικές ουσίες, οι οποίες έχουν συγκρατηθεί στο φυσίγγιο πρωτονιωμένες, αυτές παραλαμβάνονται με μίγμα οξικού αιθυλεστέρα: διχλωρομεθανίου:ισοπροπανόλης (5:4:1) που περιέχει αμμωνία 2%. Το οργανικό εκχύλισμα χωρίζεται σε δύο μέρη κι έτσι, οι βασικές ουσίες ανιχνεύονται με δύο τρόπους. Το πρώτο εκχύλισμα προορίζεται για ανάλυση LC-QqQ-MS με θετικό ESI ιοντισμό, σε λειτουργία MRM και συνολικό χρόνο ανάλυσης 10 min ¹¹². Το δεύτερο μέρος του βασικού εκχυλίσματος υπόκειται σε TMS-παραγωγοποίηση με μίγμα MSTFA:NH₄I:DTE (1000:2:4 v/w/w) και κατόπιν, σε ανάλυση GC-MS προς στοχευμένη ανίχνευση βασικών απαγορευμένων ουσιών και αυτόματη ανίχνευση σε βάσεις δεδομένων, μέσω των αλγόριθμων AMDIS και «Probability Based Match» (PBM) ¹¹³.

3.4.2 Προσδιορισμός ουσιών με συλλογή ενός γενικευμένου οργανικού εκχυλίσματος

Η μέθοδος διαλογής που εφαρμόζεται σε βάση ρουτίνας στο Εργαστήριο Ελέγχου Ντόπινγκ της Γαλλίας καλύπτει περισσότερες από διακόσιες τριάντα πέντε απαγορευμένες ουσίες, οι οποίες παραλαμβάνονται σε ένα οργανικό εκχύλισμα ¹¹⁵. Επιγραμματικά, τα στάδια που ακολουθούνται είναι α) ενζυμική υδρόλυση με β-γλυκουρονιδάση σε pH 5,8, β) εκχύλιση στερεάς φάσης με φυσίγγια «Bond Elut C18-HF» με έκλουση των υπό εξέταση ουσιών με διχλωρομεθάνιο:αιθανόλη (99:1,v/v) και γ) ανάλυση με την τεχνική LC-Orbitrap-MS. Η ανάλυση πραγματοποιείται σε πλήρη σάρωση, με εναλλαγή

μεταξύ θετικού και αρνητικού ESI ιοντισμού παρέχοντας έτσι, ένα επιπλέον πλεονέκτημα στη μέθοδο, ώστε να ανιχνεύονται όξινες, βασικές και ουδέτερες ουσίες σε μία ανάλυση. Με τη συγκεκριμένη μέθοδο προσδιορίζεται μεγάλος αριθμός απαγορευμένων ουσιών, μέσω μιας εκχύλισης και μιας ανάλυσης. Η μέθοδος, όμως περιορίζεται στην ανίχνευση ουσιών που οι μεταβολίτες τους αποσυζεύγγονται με τη β-γλυκουρονιδάση, αποκλείοντας για παράδειγμα ορισμένα αναβολικά στεροειδή που δεν υδρολύονται με αυτό το ένζυμο.

3.4.3 Προσδιορισμός ουσιών με συνδυασμό ενός υδρολυμένου και ενός μη υδρολυμένου οργανικού εκχυλίσματος

Με την ακόλουθη μεθοδολογία είναι δυνατόν να ανιχνευτούν εκατόν σαράντα απαγορευμένες ουσίες, χρησιμοποιώντας δύο υποδείγματα από κάθε δείγμα ούρων. Το πρώτο υπόδειγμα υπόκειται αρχικά σε ενζυμική υδρόλυση με β-γλυκουρονιδάση και πρωτεάση και κατόπιν, σε εκχύλιση στερεάς φάσης με φυσίγγιο «Abs Elut Nexus» και διαλύτη έκλουσης χλωροφόρμιο. Το δεύτερο υπόδειγμα υποβάλλεται, κατευθείαν, σε εκχύλιση στερεάς φάσης σε ένα δεύτερο φυσίγγιο, όμοιο με το πρώτο, παρακάμπτοντας την ενζυμική υδρόλυση έτσι, ώστε να μπορέσουν να ανιχνευτούν και οι ουσίες που έχουν την τάση να αποσυντίθενται κατά το στάδιο αυτό. Στο έκλουσμα αυτό περιέχονται οι ουσίες που δε συζεύγγονται κατά τη δεύτερη φάση μεταβολισμού. Στη συνέχεια, τα δύο εκλούσματα αναμιγνύονται και ακολουθεί ανάλυση με την τεχνική UPLC-QqQ-MS. Η ανάλυση που διαρκεί 13 min, εκτελείται με εναλλαγή της πολικότητας της πηγής ESI και με λειτουργία MRM. Έτσι, με τον συνδυασμό δύο εκλουσμάτων και με μία ανάλυση LC-MS/MS προσδιορίζονται με πολύ καλή ευαισθησία εκατόν σαράντα απαγορευμένες ουσίες, με τριάντα από αυτές να έχουν όριο ανίχνευσης ίσο ή μικρότερο από 50 pg/mL.¹¹⁴

3.4.4 Προσδιορισμός ουσιών μέσω ανάλυσης LC-TOF-MS

Στο δέκατο έκτο «International Conference of Racing Analysts and Veterinarians» παρουσιάστηκαν δύο πολυδύναμες μέθοδοι που στηρίζονται στην ανάλυση LC-TOF-MS των ούρων¹¹⁶. Η πρώτη μέθοδος εφαρμόζεται για την ανίχνευση βασικών ουσιών, ενώ η δεύτερη μέθοδος είναι πιο γενική και καλύπτει μεγαλύτερο εύρος απαγορευμένων ουσιών. Στην πρώτη μέθοδο

ακολουθείται ενζυμική υδρόλυση με β-γλυκουρονιδάση κι έπειτα, εκχύλιση στερεάς φάσης με φυσίγγιο «Strata Screen C» και με διαλύτη έκλουσης το μίγμα διχλωρομεθάνιο: ισοπροπανόλη (4:1) που περιέχει αμμωνία 2%. Αρχικά, το δείγμα που συγκρατείται στο φυσίγγιο οξινίζεται και το πρώτο μεθανολικό έκλουσμα απορρίπτεται. Έπειτα, το περιβάλλον του φυσιγγίου καθίσταται βασικό, κι έτσι οι αποπρωτονιωμένες βασικές ουσίες παραλαμβάνονται με το παραπάνω μίγμα διαλυτών. Στη δεύτερη μέθοδο εκτελείται ενζυμική υδρόλυση με β-γλυκουρονιδάση και εκχύλιση στερεάς φάσης με πολυμερικό φυσίγγιο «Strata Screen X», λαμβάνοντας ένα γενικό εκχύλισμα με οξικό αιθυλεστέρα.

Και στις δύο περιπτώσεις τα δείγματα αναλύονται με την τεχνική LC-TOF-MS, εφαρμόζοντας δύο διαφορετικές μεθόδους ανάλυσης, αντιστοίχως. Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός πραγματοποιείται με διαφορετική χρωματογραφική στήλη στην κάθε μέθοδο και υπό διαφορετικές συνθήκες.

Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων συγκροτήθηκαν βάσεις δεδομένων που περιέχουν το μοριακό τύπο και το χρόνο έκλουσης των εξεταζόμενων ουσιών. Επιπλέον, το λογισμικό επεξεργασίας δεδομένων «Sigma Fit» αναπτύχθηκε έτσι, ώστε να ολοκληρώνει σε ένα στενό εύρος μαζών ± 10 mDa τα «Extracted Ion Chromatograms, EIC» των στοχευμένων ψευδομοριακών ιόντων που δημιουργεί. Έτσι, η εκτίμηση των αποτελεσμάτων, μέσω του λογισμικού πραγματοποιείται με κριτήρια το χρόνο έκλουσης, την ακριβή μάζα και το ισοτοπικό σχηματόγραμμα («pattern») του εξεταζόμενου αναλύτη, συγκρίνοντας τις μετρούμενες τιμές με τις θεωρητικές τιμές της βάσης δεδομένων. Η διαφορά μεταξύ θεωρητικού και πειραματικού - μετρούμενου ισοτοπικού «pattern» ποσοτικοποιείται και εκφράζεται αριθμητικά, μέσω της παραμέτρου «σ». Το όριο ανοχής είναι $\pm 0,3$ min για το χρόνο έκλουσης, ± 10 mDa για την ακρίβεια μάζας και 0,3 μονάδες για την παράμετρο σ.

Με την πρώτη μέθοδο ανιχνεύονται εκατόν δέκα βασικές ουσίες και με τη δεύτερη μέθοδο ανιχνεύονται εκατόν πενήντα επτά ουσίες. Το μειονέκτημα, όμως, των μεθόδων είναι τα ψευδώς θετικά δείγματα που παρατηρούνται σε αναλογία ένα προς δέκα αρνητικά δείγματα. Για την αντιμετώπιση αυτού του φαινομένου τροποποιήθηκαν οι μέθοδοι ανάλυσης εφαρμόζοντας επαγωγίμη διάσταση από σύγκρουση στην πηγή («In source collision induced

dissociation»). Με τον τρόπο αυτό παρέχεται η δυνατότητα ταυτόχρονης ανίχνευσης του ψευδομοριακού ιόντος της ουσίας στόχου και των θραυσμάτων αυτής, αποτρέποντας έτσι, τα ψευδώς θετικά ευρήματα και ενισχύοντας τη βεβαιότητα των αληθώς θετικών ευρημάτων ¹¹⁷.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.1 Εισαγωγή - Πρόλογος

Οι απαγορευμένες ουσίες στον έλεγχο ντόπινγκ είναι πολυάριθμες, παρουσιάζουν διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες και διαφορετική φαρμακολογική δράση και συνεπώς, ο ταυτόχρονος προσδιορισμός όλων αυτών με μια απλή παρασκευαστική πορεία και μια χρωματογραφική ανάλυση είναι δύσκολα εφικτός. Όπως αναφέρθηκε και στο τρίτο κεφάλαιο, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οι μέθοδοι που εφαρμόζονται για τον έλεγχο ντόπινγκ στα άλογα περιλαμβάνουν, σε γενικές γραμμές, είτε τις ξεχωριστές αναλύσεις του βασικού και του όξινου/ουδέτερου κλάσματος εκχύλισης, είτε την ανάλυση LC-Orbitrap-MS ή LC-TOF-MS ενός γενικού εκχυλίσματος, είτε την ανάλυση LC-MS/MS ενός μίγματος υδρολυμένου και μη υδρολυμένου εκχυλίσματος.

Οι τεχνικές GC-MS και LC-MS παρουσιάζουν πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα, κατά την εφαρμογή τους στον έλεγχο ντόπινγκ. Ενώ η GC-MS είναι η τεχνική, με την οποία προσδιορίζονται κατεξοχήν τα αναβολικά, εν τούτοις υπάρχουν και εξαιρέσεις, όπως είναι τα αναβολικά που διαθέτουν εκτενές συζυγιακό σύστημα και τα οποία προσδιορίζονται μέσω της τεχνικής LC-MS, πχ τρενβολόνη. Επίσης, η GC-MS δε θεωρείται η ιδανική τεχνική για τα διουρητικά βενζοθειαδιαζίνες, ακόμη και μετά από την παραγωγοποίησή τους. Ομοίως και για τα μη πτητικά κορτικοστεροειδή. Από την άλλη πλευρά, οι ουσίες που ανιχνεύονται μέσω της τεχνικής LC-MS με θετικό ESI ιοντισμό, θα πρέπει να εμφανίζουν τη δυνατότητα πρωτονίωσης. Έτσι, για τα κορεσμένα υδροξυ-αναβολικά, τα κετο-στεροειδή, και τα όξινα διουρητικά που δύσκολα ιοντίζονται θετικά μέσω ESI προτιμάται η τεχνική GC-MS. Άρα, σύμφωνα με τα παραπάνω, η συνδυαστική χρήση των τεχνικών GC-MS και LC-MS θα μπορούσε να προσφέρει τη μέγιστη δυνατή κάλυψη στην ανίχνευση των απαγορευμένων ουσιών κατά τον έλεγχο ντόπινγκ.

4.2 Σκοπός και πρωτοτυπία της διδακτορικής διατριβής

Η εν λόγω διδακτορική διατριβή σχετίζεται με τον έλεγχο ντόπινγκ σε δείγματα ούρων αλόγων, τα οποία συμμετέχουν σε ιππικά αθλήματα. Ο στόχος είναι ο έλεγχος αυτός να λαμβάνει χώρα με μια γενικευμένη μεθοδολογία, μέσω της οποίας να πραγματοποιείται ο προσδιορισμός της ταυτότητας όσο το δυνατόν περισσότερων απαγορευμένων ουσιών.

Προκειμένου να επιτευχθεί ο σκοπός για την ανάπτυξη μιας όσο το δυνατόν πληρέστερης μεθοδολογίας ελέγχου ντόπινγκ με ικανοποιητικά αναλυτικά χαρακτηριστικά, το προτεινόμενο πρωτόκολλο αυτής περιλαμβάνει μια γενικευμένη και ενοποιημένη παρασκευαστική πορεία που συνδυάζει διαφορετικές διαδικασίες αποσύζευξης και παραγωγοποίησης. Η ανάλυση των προκατεργασμένων δειγμάτων εκτελείται με τις τεχνικές LC-TOF-MS, GC-High Resolution MS και GC-MS που δρουν συμπληρωματικά μεταξύ τους, ώστε να καλύπτονται οι περιορισμοί που προκύπτουν από την κάθε τεχνική. Οι αναλύσεις με τις τεχνικές LC-TOF-MS και GC-MS εκτελούνται με λειτουργία πλήρους σάρωσης, γεγονός που επιτρέπει την αναδρομική επανεξέταση των δειγμάτων, χωρίς αυτά να πρέπει να παρασκευαστούν και να αναλυθούν ξανά. Επίσης, εφαρμόζονται δύο τεχνικές, LC-TOF-MS και GC-High Resolution MS, που παρέχουν τη δυνατότητα προσδιορισμού ακριβούς μάζας των αναλύτων, οι οποίοι βρίσκονται στο πολύπλοκο υπόστρωμα των ούρων αλόγων.

Επιπροσθέτως, η προτεινόμενη μεθοδολογία ενισχύεται με την αυτόματη ανίχνευση απαγορευμένων ουσιών, μέσω αναζήτησης σε βιβλιοθήκες φασμάτων μαζών μεθυλο- και TMS-παραγώγων με χρήση των προγραμμάτων AMDIS και DRS. Η αυτόματη ανίχνευση καλύπτει και ουσίες που δε συγκαταλέγονται στις εξεταζόμενες ουσίες κατά τη διαδικασία της σάρωσης, αυξάνοντας έτσι το εύρος των ανιχνευόμενων απαγορευμένων ουσιών.

Η πρωτοτυπία της διδακτορικής διατριβής συνίσταται στο γενικευμένο και ενοποιημένο χαρακτήρα της μεθοδολογίας που προτείνεται έτσι, ώστε να ανιχνεύεται ο μέγιστος αριθμός απαγορευμένων ουσιών που έχει αναφερθεί στη διεθνή βιβλιογραφία. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι συνδυάζονται α) δυο

διαφορετικές διαδικασίες υδρόλυσης των μεταβολιτών της δεύτερης φάσης, β) δύο διαφορετικά είδη παραγωγοποίησης, γ) υγρο-υγρο-εκχυλίσεις, δ) τριων ειδών αναλύσεις χρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών και ε) αυτόματη αναζήτηση επιπλέον απαγορευμένων ουσιών σε βιβλιοθήκες φασμάτων μαζών. Πρόκειται για κλασικές διαδικασίες που ακολουθούνται, συνήθως, μεμονωμένα στον έλεγχο ντόπινγκ αλόγων. Είναι η πρώτη φορά, όμως, που συνδυάζονται με τέτοιο τρόπο.

4.3 Αντιδραστήρια – Διαλύτες – Ρυθμιστικά διαλύματα

4.3.1 Υγρά αντιδραστήρια

- Μίγμα ενζύμων β-γλυκουρονιδάση και αρυλοσουλφατάση από *H. pomatia* τύπου HP-2 με 197114 units/mL β-γλυκουρονιδάση και 876 units/mL αρυλοσουλφατάση (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany).
- Άνυδρο μεθανολικό διάλυμα υδροχλωρίου, 3 M (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany).
- N-μεθυλο-N-τριμεθυλο-σιλυλο-τριφθορο-ακεταμίδιο, MSTFA, καθαρότητας 98-100% (Pierce Biotechnology, Rockford IL, USA).
- 1-προπανθειόλη, PrSH (Merck, Darmstadt, Germany).
- Ιωδομεθάνιο, CH₃I, καθαρότητας >99,0% (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany).
- Φορμικό (μυρμηκικό) οξύ, HCOOH, καθαρότητας 98-100% (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany).
- Παγόμορφο οξικό οξύ, glacial acetic acid, καθαρότητας >99,7% (Panreac).

4.3.2 Στερεά αντιδραστήρια

- Όξινο ανθρακικό νάτριο, NaHCO₃, καθαρότητας 99,7-100,3% (Panreac, Barcelona, Spain).
- Άνυδρο ανθρακικό νάτριο, Na₂CO₃, καθαρότητας 99,8% (Panreac, Barcelona, Spain).
- Άνυδρο θειικό νάτριο, Na₂SO₄, καθαρότητας >99% (Lanh-Ner, S.r.o., Neratovice, Czech Republic).

- Ανθρακικό κάλιο, K_2CO_3 , καθαρότητας 99-101% (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany).
- Ιωδιούχο αμμώνιο, NH_4I , καθαρότητας 99,999% (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany).
- Φορμικό (μυρμηκικό) αμμώνιο, $HCOONH_4$, καθαρότητας 97% (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany).
- Χλωριούχο Νάτριο, $NaCl$, καθαρότητας 99,5% (Panreac).
- Οξικό νάτριο, CH_3COONa , καθαρότητας 99,0-101,0% (Panreac).
- Γλυκουρονική επιχολανολόνη, καθαρότητας 99,9% (National Measurement Institute, Australian Government).

4.3.3 Διαλύτες

- Μεθανόλη, CH_3OH , καθαρότητας 99,8% (Labscan, Dublin, Ireland).
- κ-Εξάνιο, C_6H_{14} , καθαρότητας 95% (Labscan, Dublin, Ireland).
- Διαιθυλαιθέρας, $(C_2H_5)_2O$, καθαρότητας 99,5% (Labscan, Dublin, Ireland).
- Οξικός αιθυλεστέρας $CH_3COOC_2H_5$, καθαρότητας 99,8% (Labscan, Dublin, Ireland).
- Ακετόνη, CH_3COCH_3 , καθαρότητας 99,5% (Labscan, Dublin, Ireland).
- Ακετονιτρίλιο, CH_3CN , καθαρότητας LC-MS (Carlo Erba Reagenti SpA, Rodano, Italy).
- Υπερκάθαρο νερό λαμβανόμενο από συσκευή διήθησης Millipore (Billerica, MA, USA).

4.3.4 Διαλύματα

- Διάλυμα οξικού οξέος, CH_3COOH , 3 M σε διαλύτη οξικό αιθυλεστέρα.
- Διάλυμα χλωριούχου νατρίου, $NaCl$, 4 M σε διαλύτη απιονισμένο νερό.
- Μίγμα παραγωγοποίησης MSTFA/ NH_4I /PrSH 1000:2:3 (v/w/v).
- Διάλυμα οξικού οξέος, CH_3COOH , 1 M σε διαλύτη απιονισμένο νερό.
- Διάλυμα οξικού νατρίου, CH_3COONa , 1 M σε διαλύτη απιονισμένο νερό.

- Διαλύτης A1 κινητής φάσης LC-TOF-MS: Διάλυμα φορμικού αμμωνίου 5 mM και φορμικού οξέος 0,1 % (v/v) σε υπερκάθαρο νερό.
- Διαλύτης B1 κινητής φάσης LC-TOF-MS: Διάλυμα φορμικού αμμωνίου 5 mM και φορμικού οξέος 0,1 % (v/v) σε ακετονιτρίλιο / υπερκάθαρο νερό 90/10 (v/v).
- Διάλυμα ανασύστασης δειγμάτων: Διαλύτης A1 κινητής φάσης / Διαλύτης B1 κινητής φάσης 80/20 (v/v).

4.3.5 Ρυθμιστικά διαλύματα και στερεά ρυθμιστικά μίγματα

- Στερεό ρυθμιστικό μίγμα $\text{NaHCO}_3:\text{Na}_2\text{CO}_3$ 10:1 (w/w).
- Ρυθμιστικό διάλυμα οξικών 1 M, pH 5,2. Παρασκευή: Ανάμιξη 232 mL διαλύματος οξικού οξέος 1 M και 768 mL διαλύματος οξικού νατρίου 1 M.
- Ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών 30 % w/v. Παρασκευή: Ζυγίζονται 75 g ανθρακικού καλίου και διαλύονται σε 250 mL απιονισμένου νερού.

4.4 Πρότυπες ουσίες και πρότυπα διαλύματα

Οι πρότυπες στερεές και υγρές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς, και οι παρασκευαστές τους παρατίθενται στο Παράρτημα Ι. Πρότυπα διαλύματα ποιοτικού προσδιορισμού των παραπάνω ουσιών παρασκευάστηκαν ως επί το πλείστον σε διαλύτη μεθανόλη και σε συγκέντρωση 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, λαμβάνοντας υπόψη την καθαρότητα των πρότυπων στερεών ή υγρών ουσιών. Τα διαλύματα αυτά αποθηκεύτηκαν στους $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Για τις ουσίες ελέγχου ορίου παρασκευάστηκαν τα αντίστοιχα πρότυπα διαλύματα ποσοτικού προσδιορισμού. Λόγω του μεγάλου αριθμού των πρότυπων διαλυμάτων, αυτά ομαδοποιήθηκαν σε είκοσι τρία πολυσυστατικά διαλύματα και φυλάχτηκαν στους $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

4.5 Υλικά

- Γυάλινοι σωλήνες με βιδωτό πώμα.
- Γυάλινοι σωλήνες κωνικής βάσης με εσμύρισμα.
- Διαφανή φιαλίδια αυτόματου εισαγωγέα Crimp Neck ND-11 διαστάσεων $32 \times 11,6\text{ mm}$ και χωρητικότητας 1,5 mL.

- Micro-insert χωρητικότητας 0,1 mL, με κωνικό πυθμένα.
- Καπάκια Aluminum Cap Clear lacquered-11 mm, septum natural rubber/TEF, διαφανή, πάχους 1,0 mm.
- Πλαστικά βιδωτά πώματα.
- Εσφυρισμένα υάλινα πώματα.
- Γυάλινες πιπέτες παστέρ.
- Πεχαμετρικός χάρτης εύρους 4-7 και 7,5-14.
- Μεταλλικές σπάτουλες.
- Αυτόματες πιπέτες 5-40 μ L, 20-200 μ L, 200-1000 μ L, 1,0-5,0 mL και επαναληπτική πιπέττα.
- Αυτόματες πιπέτες Eppendorf 500-5000 μ L, 100-1000 μ L και 10-100 μ L για ποσοτικούς προσδιορισμούς.
- Πλαστικά ρύγχη αυτόματων πιπετών.
- Ψαλίδι ανοίγματος και κλεισίματος φιαλιδίων αυτόματου εισαγωγέα.
- Σωληνάκια RIA.
- Καπάκια για σωληνάκια RIA.
- Ογκομετρικές φιάλες παρασκευής ποιοτικών και ποσοτικών διαλυμάτων. Ογκομετρικές φιάλες φύλαξης διαλυμάτων.
- Γυάλινοι σωλήνες κωνικής βάσης με βιδωτό καπάκι.
- Φυσίγγια Biotage, Isolute C18(EC), 500 mg, 6 mL, SPE columns.
- Ογκομετρικοί κύλινδροι των 100 mL, 250 mL, 500 mL και 1000 mL.
- Πλαστικά σκαφίδια ζύγισης.
- Φίλτρα μεμβράνης Sartorius διαμέτρου 47 mm, διαμέτρου πόρων 0,45 μ m.

4.6 Εργαστηριακές συσκευές

- Αυτόματος αναδευτήρας τύπου περιδίνησης (vortex).
- Διανεμητής υγρών μέγιστου όγκου 10 mL (dispenser).

- Φυγόκεντροι Hermle τύπου Z510.
- Κλίβανος τύπου Shimaden SR 30, με εύρος λειτουργίας 0-400 °C.
- Ανακινητήρες Heidolph Reax 2.
- Διανεμητής αέριου N₂.
- Ξηραντήρας με P₂O₅ τύπου ILMABOR για ξήρανση υπό κενό με χρήση αντλίας κενού τύπου Vacuum manifold IST.
- Μεταλλόλουτρα θερμοκρασίας 60 °C και 110 °C.
- Συσκευή κενού Büchi για την εκχύλιση στερεάς φάσης.
- Φαρμακευτικοί ζυγοί τύπου CASBEE, MW 1200.
- Αναλυτικοί ζυγοί τύπου GR 200, AND τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων και μέγιστης ποσότητας 60 g.
- Συσκευή Millipore για την παραγωγή υπερκάθαρου νερού.
- Συσκευή φιλτραρίσματος διαλυτών, Sartorius.

4.7 Οργανολογία

4.7.1 LC/TOF/MS, οργανολογία – συνθήκες ανάλυσης

Το σύστημα υγροχρωματογραφίας είναι της σειράς Agilent 1200 Series Rapid Resolution LC system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) και συνίσταται από απαερωτή, δυαδική αντλία υψηλής πίεσης, αυτόματο δειγματολήπτη, ψυχόμενο δίσκο με υποδοχείς δειγμάτων που διατηρείται στους 12 °C και θερμοστατούμενο διαμέρισμα στους 35 °C, όπου είναι τοποθετημένη η στήλη. Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός έλαβε χώρα σε στήλη Zorbax Eclipse Plus C18 (Rapid Resolution HT, Agilent Technologies) με διαστάσεις 100×2,1 mm και διάμετρο σωματιδίων 1,8 μm. Η στήλη προστατεύεται με τη χρήση φίλτρου διαμέτρου σωματιδίων 0,5 μm.

Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με ταχύτητα ροής της κινητής φάσης 0,3 mL/min και με βαθμιαία μεταβολή της σύστασης της κινητής φάσης, ξεκινώντας από 10% διαλύτη B1 (t=0 min) και αυξάνοντας το ποσοστό αυτού στο 80% εντός 9 min. Το χρονικό διάστημα 9-10 min το ποσοστό του διαλύτη

B1 αυξάνεται στο 100%, όπου διατηρείται για 3 min. Κατόπιν, επανέρχονται οι αρχικές συνθήκες με 10% διαλύτη B1 εντός 0,5 min και το σύστημα εξισορροπείται για 3,5 min (postrun equilibrium time) πριν την επόμενη έγχυση δείγματος. Στο σύστημα εγχύονται 5 μ L προκατεργασμένου δείγματος.

Ο υγροχρωματογράφος είναι συζευγμένος με φασματοόμετρο μαζών, το οποίο είναι εξοπλισμένο με τετραπολικό αναλυτή μαζών και αναλυτή χρόνου πτήσης (6520 Accurate Mass QTOF/MS, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), όπου πραγματοποιείται ορθογώνια επιτάχυνση των ιόντων. Η σύζευξη των δύο συστημάτων γίνεται με μεσεπιφάνεια, όπου λαμβάνει χώρα θετικός ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό σε ορθογώνια κατεύθυνση. Ως αέριο εκνέφωσης χρησιμοποιείται το άζωτο σε πίεση 40 psi. Η ξήρανση που ακολουθεί πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 330 °C με αέριο άζωτο σε ροή 10 L/min. Όσον αφορά στα δυναμικά λαμβάνονται οι ακόλουθες τιμές:

- Δυναμικό τριχοειδούς (Capillary voltage): 3500 V
- Δυναμικό θραυσματοποίησης (Fragmentor voltage): 140 V
- Δυναμικό αποκορυφωτή (Skimmer voltage): 65 V
- Δυναμικό οκταπόλου 1 RF: 750 V

Οι υπόλοιπες παράμετροι του φασματομέτρου μαζών ρυθμίζονται αυτόματα στις βέλτιστες τιμές, κατά την αυτοματοποιημένη διαδικασία της ρύθμισης (tuning) που πραγματοποιείται μια φορά το μήνα.

Πριν την έναρξη ανάλυσης των δειγμάτων θα πρέπει να έχει πραγματοποιηθεί βαθμονόμηση του συστήματος με απευθείας εισαγωγή στο φασματοόμετρο μαζών, του διαλύματος βαθμονόμησης (calibrant B) που παρέχεται από τον κατασκευαστή (ESI-LLow Concentration Tuning Mix, G1969-85000, Agilent Technologies). Το διάλυμα αυτό περιέχει 10 πρότυπες ουσίες γνωστής ακριβούς μάζας που καλύπτουν το εύρος m/z : 118,0863 – 1521,9715.

Επιπροσθέτως, για την επίτευξη μετρήσεων μάζας υψηλής ακρίβειας, εκτός από τη διαδικασία της βαθμονόμησης, εφαρμόζεται και η διαδικασία της «Reference Mass Correction», κατά τη οποία εκτελείται αυτόματη διόρθωση των σφαλμάτων μάζας, καθόλη τη διάρκεια της ανάλυσης με τη συνεχή

εισαγωγή στο φασματόμετρο μαζών ενός διαλύματος που περιέχει δύο πρότυπες ουσίες (Reference Mass Solution): 1) Hexakis (1H,1H,3H-tetrafluoroproxy) phosphazine (Agilent Technologies) με m/z 922,0098 και 2) Benzyldimethylphenylammonium chloride (Sigma Aldrich) με m/z 212,1434. Το διάλυμα αυτό εισέρχεται στο χώρο της πηγής ESI, ταυτόχρονα, με το αναλυόμενο δείγμα, μέσω ενός δεύτερου ορθογώνιου εκνεφωτή.

Για τον έλεγχο της λειτουργίας του οργάνου και την επεξεργασία των δεδομένων χρησιμοποιείται το λογισμικό Agilent Mass Hunter.

4.7.2 GC/High Resolution MS, οργανολογία – συνθήκες ανάλυσης

Σύστημα αεριοχρωματογράφου (Agilent 6890N, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) με αυτόματο δειγματολήπτη HP που είναι συζευγμένο με ανιχνευτή φασματόμετρο μαζών υψηλής διαχωριστικής ικανότητας, το οποίο είναι εξοπλισμένο με αναλυτή διπλής εστίασης που αποτελείται από τρεις τομείς: ηλεκτροστατικό – μαγνητικό - ηλεκτροστατικό τομέα (Micromass AutoSpec-Ultima). Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε σε στήλη HP Ultra 1-33. Πρόκειται για μια τριχοειδή στήλη με ακινητοποιημένο διασταυρούμενο πολυμερές 100% διμεθυλο-πολυσιλοξανίου. Το μήκος της στήλης είναι 12 m, η εσωτερική διάμετρος είναι 0,2 mm και το πάχος της στατικής φάσης (film) είναι 0,33 μm . Ως κινητή φάση χρησιμοποιείται το ήλιο, το οποίο εισάγεται με σταθερή ροή που ρυθμίζεται έτσι, ώστε τα εσωτερικά πρότυπα ετιοχολανολόνη και ανδροστερόνη να εκλούνται σε χρόνο $7,93 \pm 0,1$ min και $7,98 \pm 0,1$ min, αντιστοίχως.

Η θερμοκρασία στον εισαγωγέα δείγματος είναι 250 °C, στη γραμμή μεταφοράς είναι 350 °C και στην πηγή ιοντισμού είναι 350 °C. Στον εισαγωγέα ενίεται 1,0 μL προκατεργασμένου δείγματος που υφίσταται διαμερισμό με αναλογία 40:1. Η στήλη είναι τοποθετημένη σε θερμοστατούμενο κλίβανο και το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που εφαρμόζεται είναι το εξής: αρχικά η θερμοκρασία του φούρνου είναι ρυθμισμένη στους 150 °C, όπου και διατηρείται για 0,5 min. Έπειτα, η θερμοκρασία αυξάνεται με ρυθμό 12,5 °C/min έως τους 310 °C και διατηρείται εκεί για 2,5 min.

Το φασματόμετρο μαζών λειτουργεί με την τεχνική «Selected Ion Recording» με έντεκα ομάδες ιόντων (function groups). Η ρύθμιση (tuning) του HRMS πραγματοποιείται σε κάθε παρτίδα δειγμάτων προς ανάλυση. Η ρύθμιση περιλαμβάνει το «tuning» της πηγής, των «slits» και των φακών για να επιτευχθεί το επιθυμητό αποτέλεσμα ευαισθησίας και διαχωρισμού. Ένα από τα κριτήρια αποδοχής του «tuning» είναι η διαχωριστικότητα (resolution) να είναι σταθερά μεγαλύτερη του 9500 σε όλο το διάστημα μαζών. Έπεται η βαθμονόμηση, για την οποία χρησιμοποιείται η ουσία pentafluorokerosene, PFK (Apollo, Manchester, UK) βαθμού καθαρότητας «mass spectrometric».

Για τον έλεγχο της λειτουργίας του οργάνου και την επεξεργασία των δεδομένων χρησιμοποιείται το λογισμικό MassLynx v4,0.

4.7.3 GC-MS, οργανολογία – συνθήκες ανάλυσης

Για την προτεινόμενη μεθοδολογία χρησιμοποιήθηκαν δύο συστήματα αεριοχρωματογράφου (6890N, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) με αυτόματο δειγματολήπτη και τα οποία συζεύγνυνται με ανιχνευτή φασματόμετρο μαζών (Agilent 5973) που είναι εξοπλισμένο με τετραπολικό αναλυτή μαζών. Και στα δύο συστήματα χρησιμοποιείται η ίδια τριχοειδής στήλη HP Ultra 2-33 με ακινητοποιημένο και διασταυρούμενο πολυμερές το 5% διφαινυλο / 95% διμεθυλο-σιλοξάνιο. Τα υπόλοιπα χαρακτηριστικά της στήλης είναι 12 m μήκος, 0,2 mm εσωτερική διάμετρος και 0,33 μm πάχος στατικής φάσης. Για τη βαθμονόμηση του συστήματος που πραγματοποιείται πριν από κάθε έναρξη ανάλυσης δειγμάτων, χρησιμοποιείται η πρότυπη ουσία perfluorotributylamine, PFTBA (Agilent Technologies), φασματομετρικής καθαρότητας.

Το πρώτο σύστημα GC-MS χρησιμοποιείται για την ανάλυση των δειγμάτων, μετά από μεθυλο-παραγωγοποίηση και το δεύτερο για την ανάλυση των δειγμάτων, μετά από TMS-παραγωγοποίηση με σκοπό την αυτόματη ανίχνευση απαγορευμένων ουσιών, μέσω αναζήτησης σε βιβλιοθήκες φασμάτων μαζών.

Στην πρώτη περίπτωση ενίονται 2,0 μL προκατεργασμένου δείγματος με διαμερισμό σε αναλογία 8:1. Η ροή της κινητής φάσης, δηλαδή του ηλίου, είναι τέτοια, ώστε το εσωτερικό πρότυπο, μεφρουσίδιο, να εκλούεται σε χρόνο

(11,90 ± 0,10) min. Ο εισαγωγέας του δείγματος, η γραμμή μεταφοράς, η πηγή ιοντισμού και το τετράπολο διατηρούνται σε θερμοκρασία 250, 310, 230 και 150 °C, αντίστοιχα. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα της μεθόδου περιλαμβάνει αύξηση της θερμοκρασίας από τους 110 °C στους 300 °C με ρυθμό αύξησης 15 °C min⁻¹ και διατήρηση της τελικής θερμοκρασίας για 3 min. Ο συνολικός χρόνος ανάλυσης είναι 15,67 min συμπεριλαμβανομένου και του χρόνου εξισορρόπησης του συστήματος. Πρόκειται για ανάλυση πλήρους σάρωσης από 50 έως 500 amu, με ταχύτητα 3,25 scans s⁻¹.

Όσον αφορά στο δεύτερο σύστημα GC-MS και στη μέθοδο για την ανίχνευση των TMS-παραγώγων, όγκος προκατεργασμένου δείγματος των 2,0 μL ενίονται στον εισαγωγέα του δείγματος, ο οποίος βρίσκεται σε θερμοκρασία 250 °C και σε λειτουργία διαμερισμού του δείγματος με αναλογία 15:1. Η ροή της κινητής φάσης είναι τέτοια, ώστε το εσωτερικό πρότυπο, (κωδεΐνη), να εκλούεται σε χρόνο 8,00±0,30 min. Επίσης, η αρχική θερμοκρασία στο φούρνο της στήλης είναι 100 °C και αυξάνεται έως τους 290 °C με ρυθμό 20 °C min⁻¹, όπου και διατηρείται για 5 min. Όσον αφορά στις θερμοκρασίες, η γραμμή μεταφοράς, η πηγή ιοντισμού και το τετράπολο διατηρούνται σε θερμοκρασία 300, 230 και 150 °C, αντίστοιχα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΑ ΣΤΑΔΙΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ

5.1 Εισαγωγή

Στο πρώτο τμήμα του συγκεκριμένου κεφαλαίου περιγράφονται οι μέθοδοι που εφαρμόζονταν στο εργαστήριο ελέγχου ντόπινγκ της Αθήνας σε βάση ρουτίνας για τον έλεγχο ντόπινγκ στα άλογα, κατά την έναρξη της διδακτορικής διατριβής.

Ακολούθως, το κεφαλαίο επικεντρώνεται στις διαδικασίες που ακολουθήθηκαν, κατά την έναρξη του πειραματικού μέρους της διδακτορικής διατριβής, οι οποίες περιλαμβάνουν:

- Επιλογή των εξεταζόμενων ουσιών.
- Βιβλιογραφική μελέτη του μεταβολισμού των ουσιών.
- Παρασκευή των ποιοτικών διαλυμάτων των εξεταζόμενων ουσιών και ομαδοποίηση σε πολυσυστατικά διαλύματα.
- Ανάλυση των πολυσυστατικών διαλυμάτων με την τεχνική LC-TOF-MS.

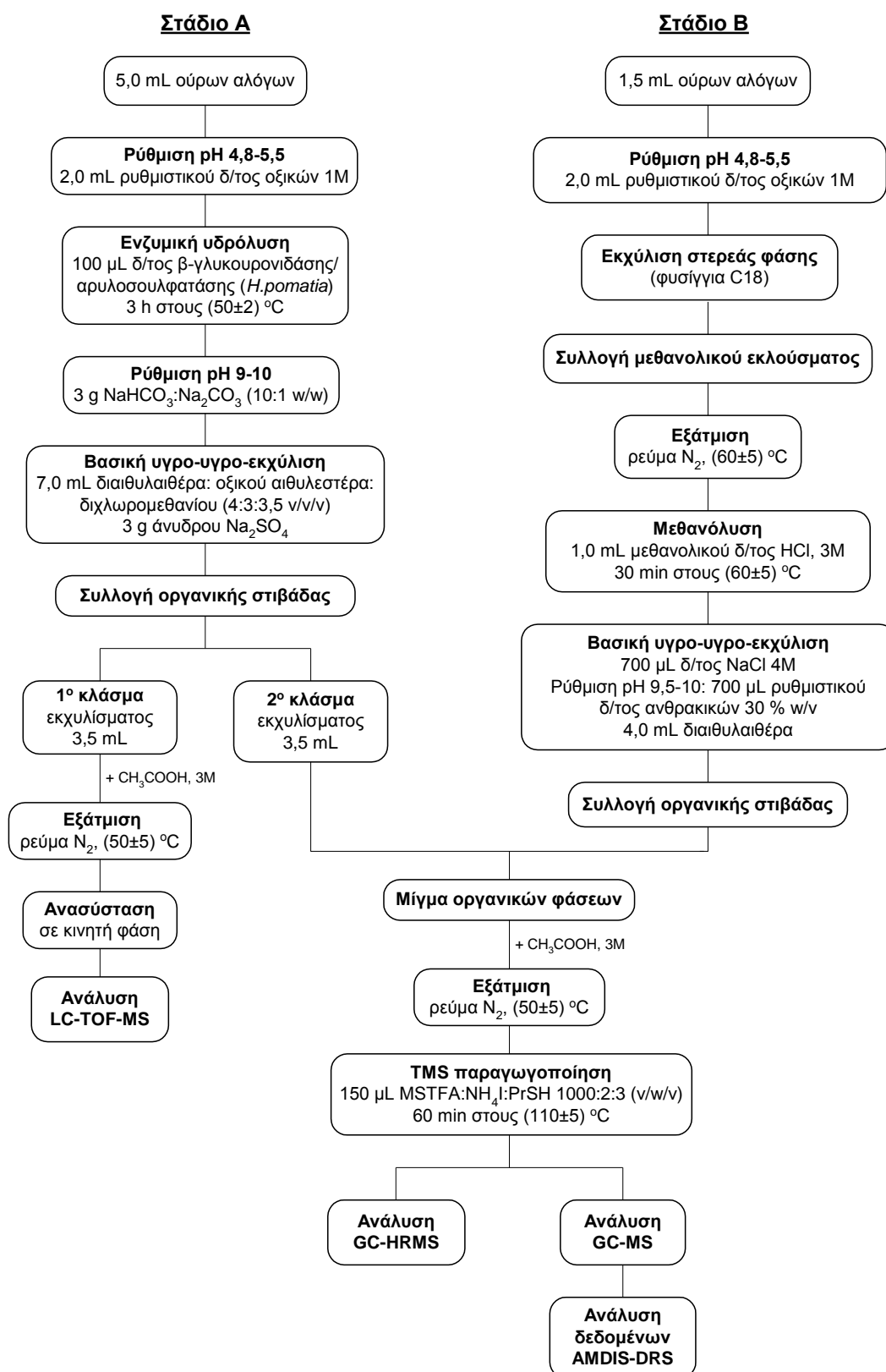
5.2 Εφαρμοζόμενη μεθοδολογία σε βάση ρουτίνας

Το διάστημα που πραγματοποιήθηκε η διδακτορική διατριβή, το εργαστήριο ελέγχου ντόπινγκ της Αθήνας πραγματοποιούσε ελέγχους σε ούρα αλόγων, ακολουθώντας τα παρασκευαστικά στάδια και τις αναλύσεις που περιγράφονται παρακάτω.

5.2.1 Διαδικασία II_IV αλόγων

Καταρχήν, εφαρμοζόταν η ονομαζόμενη «Διαδικασία II_IV αλόγων» που περιελάμβανε δύο παρασκευαστικά στάδια (σχήμα 5.1). Στο στάδιο A, όγκος 5,0 mL ούρων υπόκειτο σε ενζυμική υδρόλυση με προσθήκη 100 μ L ενζυμικού διαλύματος β-γλυκουρονιδάσης και αρυλοσουλφατάσης από *H. romatía* για διάστημα τριών ωρών και σε θερμοκρασία (50 ± 2) °C. Προηγουμένως, το pH των ούρων ρυθμιζόταν στην περιοχή δράσης των

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ II_IV



Σχήμα 5.1. Παρασκευαστικά στάδια της διαδικασίας II_IV αλόγων που εφαρμόζονταν στο εργαστήριο ελέγχου ντόπινγκ της Αθήνας στη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής.

ενζύμων, δηλαδή, στην περιοχή 4,8 έως 5,5 με προσθήκη 2,0 mL ρυθμιστικού διαλύματος οξικών 1 M (pH 5,2). Ακολουθεί αλκαλική υγρο-υγρο-εκχύλιση σε pH 9-10 με προσθήκη α) 3 g στερεού ρυθμιστικού μίγματος $\text{NaHCO}_3:\text{Na}_2\text{CO}_3$ 10:1 (w/w), β) 7,0 mL μίγματος οργανικών διαλυτών διαιθυλαιθέρα:οξικού αιθυλεστέρα:διχλωρομεθανίου 4:3:3,5 (v/v/v) και γ) 3 g άνυδρου Na_2SO_4 ως παράγοντα εξαλάτωσης. Στη συνέχεια, η οργανική φάση που συλλεγόταν, μοιραζόταν σε δύο ίσα μέρη. Το πρώτο μέρος του εκχυλίσματος εξατμιζόταν στους (50 ± 5) °C με ρεύμα αζώτου και στο στερεό υπόλειμμα γινόταν ανασύσταση με κινητή φάση και ακολουθούσε ανάλυση LC-TOF-MS (εδάφιο 4.7.1). Το δεύτερο μέρος του εκχυλίσματος ενωνόταν με το εκχύλισμα που προέκυπτε από το στάδιο B.

Όσον αφορά στο στάδιο B της διαδικασίας II-IV, όγκος 1,5 mL ούρων υπόκειται σε εκχύλιση στερεάς φάσης, αφού προηγουμένως το pH των ούρων είχε ρυθμιστεί σε τιμή μεταξύ 4,8 και 5,5 με προσθήκη 2,0 mL ρυθμιστικού διαλύματος οξικών 1 M (pH 5,2). Αρχικά, πραγματοποιείται εξισορρόπηση του φυσιγγίου με 5,0 mL μεθανόλης και 5,0 mL ρυθμιστικού διαλύματος οξικών (pH 5,2). Στη συνέχεια, τα ούρα διήρχοντο από το φυσίγγιο και ακολουθούσε έκπλυση του φυσιγγίου με 5,0 mL ρυθμιστικού διαλύματος οξικών (pH 5,2) και 5,0 mL κ-εξανίου. Οι προς εξέταση ουσίες παραλαμβάνονται με διέλευση 5,0 mL μεθανόλης από το φυσίγγιο και το έκλουσμα εξατμιζόταν στους (60 ± 5) °C με ρεύμα αζώτου. Έπειτα, εκτελείτο χημική υδρόλυση των μεταβολιτών της δεύτερης φάσης, με προσθήκη στο στερεό υπόλειμμα 1,0 mL μεθανολικού διαλύματος υδροχλωρίου, 3 M, και θέρμανση στους (60 ± 5) °C για 30 min (μεθανόλυση). Ακολουθούσε υγρο-υγρο-εκχύλιση σε pH 9,5-10 με προσθήκη α) 700 μL διαλύματος NaCl 4M, β) περίπου 700 μL ρυθμιστικού διαλύματος ανθρακικών 30% w/v για τη ρύθμιση του pH και γ) 4,0 mL διαιθυλαιθέρα ως οργανικό διαλύτη. Η οργανική φάση που προέκυπτε, συλλεγόταν στον κωνικό σωλήνα που περιείχε το δεύτερο τμήμα της οργανικής φάσης του σταδίου A και το μίγμα των εκλουσμάτων εξατμιζόταν στους (60 ± 5) °C με ρεύμα αζώτου. Το στερεό υπόλειμμα που προέκυπτε, τοποθετείτο στον ξηραντήρα για τουλάχιστον δώδεκα ώρες. Μετά την απομάκρυνση της υγρασίας, πραγματοποιείται TMS-παραγωγοποίηση με προσθήκη 150 μL μίγματος $\text{MSTFA}:\text{NH}_4\text{I}:\text{PrSH}$ 1000:2:3 (v/w/v) και επώαση στους (110 ± 5) °C για μια

ώρα. Στη συνέχεια, εκτελείτο α) ανάλυση GC-HRMS (εδάφιο 4.7.2) για τη στοχευμένη ανίχνευση απαγορευμένων ουσιών και β) ανάλυση GC-MS (εδάφιο 4.7.3) για την αυτόματη ανίχνευση επιπλέον απαγορευμένων ουσιών σε βιβλιοθήκες με τη χρήση των προγραμμάτων AMDIS-DRS.

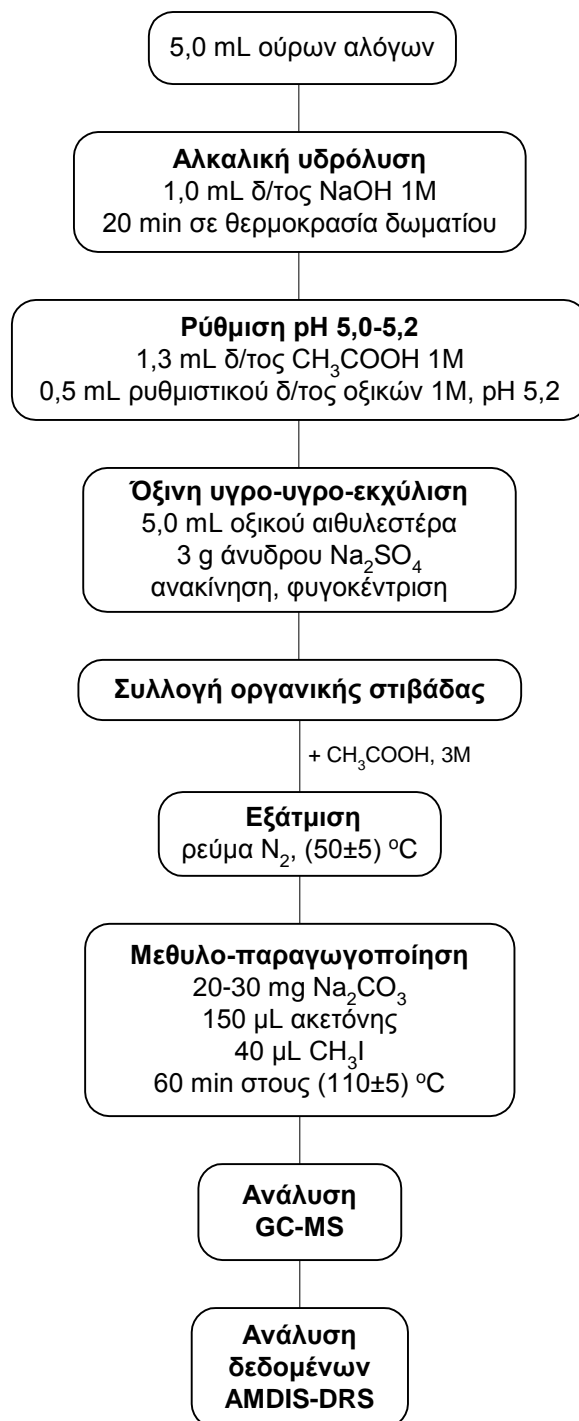
5.2.2 Διαδικασία «NSAID» αλόγων

Κατά τη διαδικασία «NSAID αλόγων» (σχήμα 5.2), όγκος 2,5 mL ούρων υπόκειται σε αλκαλική υδρόλυση με προσθήκη διαλύματος 1,0 mL NaOH 1 M και αναμονή σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 20 min. Κατόπιν, το pH των ούρων μειωνόταν στην περιοχή τιμών 5-5,2 με προσθήκη 1,3 mL διαλύματος οξικού οξέος 1M και 0,5 mL ρυθμιστικού διαλύματος οξικών. Έπειτα, πραγματοποιείτο όξινη υγρο-υγρο-εκχύλιση με 5,0 mL οξικού αιθυλεστέρα και 1 g άνυδρου θειϊκού νατρίου. Η οργανική φάση που λαμβανόταν, εξατμιζόταν μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού. Στο στερεό υπόλειμμα εκτελείτο μεθυλο-παραγωγοποίηση, προσθέτοντας 20-30 mg ανθρακικού καλίου, 150 μ L ακετόνης, 40 μ L ιωδομεθανίου και αφήνοντας το μίγμα προς επώαση στους (110 ± 5) °C για 30 min. Στη συνέχεια, διενεργείτο ανάλυση GC-MS (εδάφιο 4.7.3) τόσο για τη στοχευμένη ανίχνευση απαγορευμένων ουσιών, όσο και για την αυτόματη ανίχνευση επιπλέον απαγορευμένων ουσιών, με τη χρήση των προγραμμάτων AMDIS-DRS.

5.3 Επιλογή εξεταζόμενων ουσιών

Για τα ιππικά αθλήματα, η μόνη γνωστή λίστα απαγορευμένων ουσιών είναι αυτή που εκδίδεται από τη Διεθνή Ιππική Ομοσπονδία, FEI. Όπως αναφέρθηκε και στο υποκεφάλαιο 1.5, η λίστα δεν εξαντλείται μόνο στις περίπτωσης χίλιες διακόσιες ουσίες που περιλαμβάνει, αλλά και σε όσες έχουν παρόμοια χημική δομή και βιολογική δράση με αυτές. Είναι εύλογο ότι δεν είναι δυνατόν να εξεταστούν όλες οι παραπάνω ουσίες, για τις οποίες δεν υπάρχει περιορισμός στον αριθμό τους. Έτσι, έχουν επιλεγεί περίπου τριακόσιες από αυτές, με βάση τη φαρμακολογική τους δράση και τη διαθεσιμότητά τους στο εργαστήριο, όπου έλαβε χώρα η εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ NSAID



Σχήμα 5.2. Παρασκευαστικά στάδια της διαδικασίας NSAID αλόγων που εφαρμόζονταν στο εργαστήριο ελέγχου ντόπινγκ της Αθήνας κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής.

5.4 Βιβλιογραφική μελέτη μεταβολισμού

Από τη βιβλιογραφική μελέτη του μεταβολισμού προέκυψε ότι υπάρχουν ουσίες που δε μεταβολίζονται και συνεπώς, εκκρίνονται στα ούρα ως μητρικές-ελεύθερες ουσίες. Τέτοιες ουσίες είναι ενδεικτικά οι: κλενβουτερόλη⁴⁴, βηταμεθαζόνη^{144, 145}, φλουνιξίνη⁵³⁻⁵⁵, φουροσεμίδιο¹⁴⁶, τιμολόλη¹⁴⁷⁻¹⁴⁹ και μεθοκαρβαμόλη¹⁵⁰.

Από την άλλη πλευρά, υπάρχουν ουσίες που μεταβολίζονται, εκτενώς, στον οργανισμό των αλόγων κι έτσι, δε συναντώνται στα ούρα οι αρχικές μητρικές ουσίες. Τέτοιου είδους ουσίες είναι για παράδειγμα οι: δαναζόλη^{151, 152}, φλουοξυμεστερόνη^{153, 154}, μεθυλοτεστοστερόνη¹⁵⁵ και οξυμεθολόνη^{156, 157}. Δεδομένου ότι οι ουσίες αυτές μεταβολίζονται, πλήρως, κατά την πρώτη φάση του μεταβολισμού, δεν είναι απαραίτητο οι μητρικές ουσίες να συμπεριληφθούν στις εξεταζόμενες ουσίες, παρά μόνο οι μεταβολίτες αυτών.

Όταν, όμως, οι ουσίες συμμετέχουν, κυρίως, στη δεύτερη φάση μεταβολισμού, τότε οι αρχικές ελεύθερες ουσίες συμπεριλαμβάνονται στις εξεταζόμενες ουσίες, αφού κατά την προετοιμασία των δειγμάτων ούρων, οι μεταβολίτες της δεύτερης φάσης αποσυζεύγνυνται προς τις αρχικές ουσίες, κατά το στάδιο της υδρόλυσης (ενζυμικής ή χημικής). Ενδεικτικά αναφέρονται οι ουσίες: ρακτοπαμίνη⁴⁴, τερβουταλίνη⁴⁴, μορφίνη⁴⁴ και γεστρινόνη¹⁵⁸.

Ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στα αναβολικά στεροειδή, καθώς, αυτά μεταβολίζονται, εκτενώς, στα άλογα, τόσο κατά την πρώτη φάση, όσο και κατά τη δεύτερη φάση του μεταβολισμού. Από τους μεταβολίτες που συγκεντρώθηκαν από τη βιβλιογραφική μελέτη, επιλέγησαν οι κύριοι μεταβολίτες που εκκρίνονται από τον οργανισμό για μεγάλο χρονικό διάστημα και σε υψηλή συγκέντρωση, λαμβάνοντας υπόψη και τη διαθεσιμότητα που υπήρχε στο εργαστήριο στις αντίστοιχες πρότυπες ουσίες. Επειδή ο όγκος των πληροφοριών που συγκεντρώθηκε από τη βιβλιογραφική μελέτη ήταν μεγάλος, στον πίνακα 5.1 καταγράφονται μόνο οι μεταβολίτες της πρώτης φάσης που τελικά χρησιμοποιήθηκαν.

Πίνακας 5.1. Μεταβολίτες α΄ φάσης που εξετάστηκαν και σχόλια που τους αφορούν.

ΜΗΤΡΙΚΗ ΟΥΣΙΑ [ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ]	ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ Α΄ ΦΑΣΗΣ	ΣΧΟΛΙΑ-ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ
3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA) ⁴⁴	3,4-methylenedioxy-amphetamine (MDA)	<ul style="list-style-type: none"> • Προκύπτει από τη μητρική ουσία με N-αποαλκυλίωση.
7-keto dehydroepiandrosterone acetate ¹⁵⁹	7β-hydroxy-dehydroepiandrosterone	<ul style="list-style-type: none"> • Είναι ο κύριος μεταβολίτης που εκκρίνεται για 25 h μετά από τη χορήγηση. • Ανιχνεύεται μετά από ενζυμική υδρόλυση με β-γλυκουρονιδάση.
	7-keto-dehydroepiandrosterone	<ul style="list-style-type: none"> • Εκκρίνεται στα ούρα για δεκαπέντε ώρες μετά τη χορήγηση. • Ανιχνεύεται μετά από ενζυμική υδρόλυση με β-γλυκουρονιδάση.
Amitriptyline ^{44, 160}	Nortriptyline	<ul style="list-style-type: none"> • Εκκρίνεται στα ούρα, κυρίως, συζευγμένο. • Η μητρική ουσία ανιχνεύεται σε ίχνη, καθώς μεταβολίζεται εκτενώς κατά την πρώτη και δεύτερη φάση μεταβολισμού.
Caffeine ⁴⁴	Theophylline	<ul style="list-style-type: none"> • Κύριος μεταβολίτης που εκκρίνεται στα ούρα ασύζευκτος.
	Theobromine	<ul style="list-style-type: none"> • Δευτερεύων μεταβολίτης που εκκρίνεται στα ούρα ασύζευκτος και σε μικρότερη ποσότητα από τον κύριο μεταβολίτη.
Cocaine ^{161, 162}	Benzoylecgonine	<ul style="list-style-type: none"> • Κύριος μεταβολίτης που εκκρίνεται στα ούρα ασύζευκτος.
Danazol ^{151, 152}	Ethisterone	<ul style="list-style-type: none"> • Εκκρίνεται στα ούρα με τη συζευγμένη και την ασύζευκτη μορφή του. • Αποσυζεύγνυται με ενζυμική υδρόλυση (β-γλυκουρονιδάση) και μεθανόλυση. • Ανιχνεύεται έως και τρεις ημέρες μετά από τη χορήγηση. • Η μητρική ουσία δεν ανιχνεύεται.
Diazepam ⁴⁴	Nordiazepam	<ul style="list-style-type: none"> • Εκκρίνεται στα ούρα, κυρίως, συζευγμένο. • Ανιχνεύεται μετά από υδρόλυση με ένζυμα από <i>Helix pomatia</i>.
	Oxazepam	<ul style="list-style-type: none"> • Εκκρίνεται στα ούρα αποκλειστικά συζευγμένο και υδρολύεται ενζυμικά (<i>Helix pomatia</i>). • Το προφίλ έκκρισης του oxazepam είναι πιο αργό και ανιχνεύεται για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα συγκριτικά με το nordiazepam. • Το oxazepam θεωρείται και από μόνο του θεραπευτική ουσία. • Η μητρική ουσία εκκρίνεται στα ούρα, αλλά σε μικρότερη συγκέντρωση από τους μεταβολίτες.
Ethylestrenol ^{163, 164}	Norethandrolone	<ul style="list-style-type: none"> • Μεταβολίζεται, κυρίως, σε γλυκουρονίδιο. • Αποσυζεύγνυται με ενζυμική υδρόλυση. • Ανιχνεύεται έως και 24 h μετά τη χορήγηση. • Όταν ακολουθείται εκχύλιση στερεάς φάσης, η μητρική ουσία παραλαμβάνεται στο κλάσμα έκπλυσης με κ-εξάνιο, δηλαδή δε λαμβάνεται με το διαλύτη έκλουσης του δείγματος.

Fluoxymesterone ^{155, 156}	9α-fluoro-17,17-dimethyl-18-norandrostane-4,13-dien-11β-ol-3-one	<ul style="list-style-type: none"> • Εκκρίνεται στα ούρα, κυρίως, ασύζευκτο. • Ανιχνεύεται έως και 24 h μετά τη χορήγηση.
Mestanolone ^{156, 165}	17α-methyl-5α-androstane-3α,17β-diol	<ul style="list-style-type: none"> • Είναι δευτερεύων μεταβολίτης. • Ανιχνεύεται έως και 24 h μετά τη χορήγηση, κατόπιν, ενζυμικής υδρόλυσης με β-γλυκουρονιδάση. • Το mestanolone ανιχνεύεται και ως μητρική-ελεύθερη ουσία και ως συζευγμένη (γλυκουρονίδιο) μετά από ενζυμική υδρόλυση με β-γλυκουρονιδάση και συμπεριλαμβάνεται στις εξεταζόμενες ουσίες. • Ο κύριος μεταβολίτης δεν είναι διαθέσιμος.
Methandienone (Methandrostenolone) ^{157, 166, 167}	6β-hydroxy-methandienone	<ul style="list-style-type: none"> • Σημαντικός μεταβολίτης που εκκρίνεται στα ούρα και ασύζευκτος και συζευγμένος με γλυκουρονικό και θειικό οξύ
	17α-methyl-5β-androstane-3α,17β-diol	<ul style="list-style-type: none"> • Προκύπτει με αναγωγή της μητρικής ουσίας. • Ανιχνεύεται έως και 72 h μετά τη χορήγηση • Εκκρίνεται στα ούρα ως γλυκουρονίδιο και ως εστέρα του θειϊκού οξέος.
Methyltestosterone ¹⁵⁵	17α-methyl-5β-androstane-3α,17β-diol	<ul style="list-style-type: none"> • Στα ούρα εκκρίνεται συζευγμένο με θειϊκό και γλυκουρονικό οξύ. • Ανιχνεύεται έως και 24 h μετά τη χορήγηση. • Είναι δευτερεύων μεταβολίτης. • Οι κύριοι μεταβολίτες δεν ήταν διαθέσιμοι. • Η μητρική ουσία μεταβολίζεται εκτενώς κατά την πρώτη φάση μεταβολισμού και δεν ανιχνεύεται.
Nandrolone (19-nortestosterone) ⁴⁵	5α-estrane-3β,17α-diol	<ul style="list-style-type: none"> • Συζεύγνυται, κυρίως, με γλυκουρονικό οξύ και ελάχιστα με θειϊκό οξύ, καθώς φέρει 17α-υδροξυλομάδα. • Το nandrolone συζεύγνυται με θειϊκό οξύ, κατά τη β'φάση μεταβολισμού, καθώς φέρει 17β-OH και ανιχνεύεται αποσυσζευγμένο.
Oxymetholone ^{156, 157}	Mestanolone	<ul style="list-style-type: none"> • Είναι κύριος μεταβολίτης. • Εκκρίνεται στα ούρα ασύζευκτο για δύο έως τρεις ημέρες. • Εκκρίνεται στα ούρα συζευγμένο για τρεις μέρες και υδρολύεται με β-γλυκουρονιδάση. • Το oxymetholone δεν ανιχνεύεται.
	17α-methyl-5α-androstane-3α,17β-diol	<ul style="list-style-type: none"> • Ανιχνεύεται μετά από ενζυμική υδρόλυση με β-γλυκουρονιδάση, μέχρι και τρεις μέρες μετά από τη χορήγηση.
Phenylbutazone ⁴⁴	Oxyphenbutazone	<ul style="list-style-type: none"> • Εκκρίνεται στα ούρα ασύζευκτο. • Η ουσία εκκρίνεται στα ούρα, αλλά σε μικρότερη συγκέντρωση από τον μεταβολίτη
Stanozolol ^{168, 169}	16β-hydroxy-stanozolol	<ul style="list-style-type: none"> • Είναι κύριος μεταβολίτης που ανιχνεύεται μέχρι και 26 μέρες από τη χορήγηση. • Εκκρίνεται στα ούρα με τη μορφή θειϊκού εστέρα και γλυκουρονιδίου σε αναλογία 2:1.
Trenbolone ^{44,56}	17α-epitrenbolone	<ul style="list-style-type: none"> • Εκκρίνεται στα ούρα ως μίγμα γλυκουρονιδίου και θειϊκού εστέρα.

5.5 Παρασκευή ποιοτικών και πολυσυστατικών διαλυμάτων

Αφού συγκεντρώθηκαν οι εξεταζόμενες ουσίες, παρασκευάστηκαν τα πρότυπα ποιοτικά διαλύματα και κατόπιν, ομαδοποιήθηκαν σε πολυσυστατικά διαλύματα, όπως περιγράφεται στο υποκεφάλαιο 4.4.

5.6 Ανάλυση LC-TOF-MS των πολυσυστατικών διαλυμάτων

Στη διδακτορική διατριβή που παρουσιάζεται, έχει επιλεγεί η στρατηγική της ανίχνευσης όσο το δυνατόν περισσότερων ουσιών με την τεχνική LC-TOF-MS που θεωρητικά έχει τις μεγαλύτερες δυνατότητες για το σκοπό αυτό. Όσον αφορά στις ουσίες που δεν ανιχνεύονται με τη συγκεκριμένη τεχνική, αυτές θα καλυφθούν, μέσω των τεχνικών GC-MS και GC-HRMS. Έτσι, οι πρώτες δοκιμές αφορούν στην τεχνική LC-TOF-MS. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από αυτό το στάδιο ήταν μια πρώτη ένδειξη για το αν οι ουσίες μπορούν να ανιχνευτούν με τη συγκεκριμένη τεχνική, αν για παράδειγμα έχουν τη δυνατότητα να ιοντίζονται με θετικό ιοντισμό στη μεσεπιφάνεια ηλεκτροψεκασμού. Εκτός, όμως, από αυτό, σημαντικό ρόλο παίζει και η παρασκευαστική πορεία που θα ακολουθηθεί έτσι, ώστε οι ουσίες να εκχυλίζονται από τα ούρα. Αυτό θα διερευνηθεί σε επόμενο στάδιο.

5.6.1 Ανάλυση διαλυμάτων – Εύρεση χρόνων έκλουσης

Ποσότητα από τα πολυσυστατικά διαλύματα που παρασκευάστηκαν, αναμίχθηκε με το εσωτερικό πρότυπο μεθυλοτεστοστερόνη και το μίγμα εξατμίστηκε σε ρεύμα αζώτου. Ακολούθησε ανασύσταση στην κινητή φάση και ανάλυση με την τεχνική LC-TOF-MS. Η τεχνική LC-TOF-MS παρουσιάζει τη σημαντική ικανότητα μέτρησης ακριβούς μάζας. Έτσι, υπολογίστηκε η θεωρητική τιμή της ακριβούς μάζας των ιόντων $[M+H]^+$, μέσω του μοριακού τύπου των ουσιών. Στη συνέχεια, από τα ληφθέντα χρωματογραφήματα ολικών ιόντων, «Total Ion Chromatograms, TIC» επιλέχθηκε κάθε μια από τις ακριβείς μάζες που υπολογίστηκαν, ώστε να ληφθούν τα «Extracted Ion Chromatograms, EIC» με εύρος ± 20 ppm. Έτσι, ελήφθη η χρωματογραφική κορυφή του ιόντος $[M+H]^+$ της κάθε ουσίας και ο αντίστοιχος χρόνος έκλουσης. Όπου χρειάστηκε, εξετάστηκαν και άλλα ιόντα, όπως θα αναφερθεί και παρακάτω.

5.6.2 Καταγραφή ιόντων

Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, το κύριο ιόν στο φάσμα μαζών ήταν το πρωτονιωμένο μόριο $[M+H]^+$. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το δυναμικό θραυσματοποίησης είχε οριστεί στην τιμή 140 V με συνέπεια, η θραυσματοποίηση να είναι περιορισμένη. Επιπλέον, κατεγράφησαν και δευτερεύοντα ιόντα με χαμηλότερη αφθονία, όπου υπήρχαν, τα οποία αντιστοιχούσαν στα ιόντα $[M+Na]^+$, $[M+NH_4]^+$, $[2M+H]^+$, $[2M+Na]^+$, $[2M+NH_4]^+$ ή και σε θραύσματα του $[M+H]^+$. Τα ιόντα αυτά θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν όταν θα αναλύονταν τα δείγματα ούρων, με σκοπό να αντικαταστήσουν το κύριο ιόν, εάν αυτό δεν παρουσίαζε εκλεκτικότητα ή υπήρχε παρεμπόδιση από το υπόστρωμα των ούρων. Παρατηρήθηκε ότι πολλά από τα θραύσματα προέκυψαν μετά από διάσπαση του δεσμού του ατόμου άνθρακα με κάποιο πιο ηλεκτραρνητικό άτομο, όπως το οξυγόνο, το άζωτο ή και το θείο. Ενδεικτικά αναφέρονται τα:

- Φακετοπεράμη με θραύσμα το $[M+H-CH_3COOH]^+$.
- Μεθαδόνη με θραύσμα το $[M+H-NH(CH_3)_2]^+$.
- Αμφεταμίνη με θραύσμα το $[M+H-NH_3]^+$.

Αξίζει να σημειωθεί ότι σε ορισμένες ουσίες το κύριο ιόν αντιστοιχούσε στο ισότοπο ^{81}Br $[M+H]^+$ ή ^{37}Cl $[M+H]^+$. Σε άλλες περιπτώσεις το κύριο ιόν στο φάσμα μαζών προέκυπτε με αφαίρεση ενός μορίου νερού ή αμμωνίας από το ιόν $[M+H]^+$ ή με προσθήκη NH_4^+ στο μόριο της ουσίας. Παρακάτω αναφέρονται οι ουσίες που το κύριο ιόν τους προέκυπτε με αφαίρεση ενός μεγαλύτερου τμήματος:

- Κροπροπαμίδιο: $[M+H-NH(CH_3)_2]^+$.
- Μεπροβαμάτη: $[M+H-NH_2COOH]^+$.
- Μοδαφινίλη: $[M+H-S(OH)CHCONH_2]^+$.

Στις προαναφερθείσες περιπτώσεις το ιόν $[M+H]^+$, είτε απουσίαζε, είτε υπήρχε σε μικρότερη αναλογία. Τα παραπάνω αποτελέσματα συνοψίζονται στον πίνακα 5.2.

Πίνακας 5.2. Εναλλακτικά κύρια ιόντα εκτός του $[M+H]^+$ κατά την ανάλυση LC-TOF-MS και οι ουσίες που τα εμφανίζουν.

$[M+NH_4]^+$	$[M+H-H_2O]^+$	$[M+H-NH_3]^+$
Bendroflumethiazide	Bamethan	Chlorthalidone
Chlorothiazide	Methoxamine	
Cyclothiazide	Midodrine	
Hydrochlorothiazide	Pseudoephdrine	
Hydroflumethiazide		
Methylcolthiazide		
Oxandolone	⁸¹ Br Isotope $[M+H]^+$	³⁷ Cl Isotope $[M+H]^+$
Picrotin	Ambroxol	Guanabenze
Picrotoxinin	Benzbromarone	1-(3-Chlorophenyl)piperazine
Polythiazide	Bromhexine	
Thiazide artefacts 1 & 2		
Trichlorothiazide		

Επίσης, για τις ουσίες που ανήκαν στο ίδιο πολυσυστατικό και είχαν ίδιο μοριακό τύπο, δηλαδή, ίδιο ιόν $[M+H]^+$, αυτές αναλύθηκαν ξεχωριστά, ώστε να γίνει σωστή αντιστοίχιση του χρόνου έκλουσης τους. Σε ορισμένες ουσίες, όπως ναλβουφίνη και γλαφαινίνη αντιστοιχούσαν δύο χρωματογραφικές κορυφές που σημαίνει ότι οι ουσίες αυτές βρίσκονταν σε δύο μορφές, είτε λόγω ισομέρειας, πχ cis-trans, είτε λόγω συζυγίας των διπλών δεσμών. Μεταξύ των δύο κορυφών, επιλέχθηκε η ψηλότερη κορυφή προς παρακολούθηση.

5.6.3 Δημιουργία μεθόδων εκτύπωσης

Για τις ουσίες καθενός από τα πολυσυστατικά διαλύματα δημιουργήθηκε η αντίστοιχη μέθοδος εκτύπωσης με τα ιόντα που επιλέχθηκαν να παρακολουθηθούν. Έτσι, η διαδικασία του «Extract Ion Chromatogram» θα γινόταν πιο αυτοματοποιημένα και ταχύτερα. Στη συγκεκριμένη φάση, καταχωρήθηκαν όλα τα ιόντα που παρατηρήθηκαν κατά το στάδιο 5.6.2 με τους αντίστοιχους χρόνους έκλουσης αυτών. Επίσης, ορίστηκαν οι σχετικές παράμετροι έτσι, ώστε α) να προκύπτουν χρωματογραφικά παράθυρα με εύρος 0,8 min, β) οι χρωματογραφικές κορυφές να ολοκληρώνονται όταν

έχουν ύψος μεγαλύτερο των 1000 μονάδων, γ) να παρακολουθούνται τα ιόντα που έχουν τιμή m/z με εύρος ± 20 ppm από τη θεωρητική τιμή του m/z και δ) η εξομάλυνση («smoothing») της χρωματογραφικής κορυφής να είναι τύπου «Gaussian».

5.7 Δοκιμή σε ούρα αλόγων

Η πρώτη δοκιμή που πραγματοποιήθηκε σε ούρα αλόγων, αφορούσε στην εφαρμογή της μεθόδου ρουτίνας που σχετιζόταν με την ανάλυση LC-TOF-MS, δηλαδή, στη διαδικασία II_IV-στάδιο A (εδάφιο 5.2.1). Αυτή εφαρμόστηκε σε λευκό δείγμα ούρων αλόγων και σε λευκά δείγματα ούρων αλόγων εμβολιασμένα με τα πολυσυστατικά διαλύματα σε ένα επίπεδο συγκέντρωσης για κάθε διάλυμα, που κυμαινόταν από 0,2 έως 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, ανάλογα με τη συγκέντρωση του διαλύματος. Δεν εμβολιάστηκαν όλα τα πολυσυστατικά διαλύματα σε ένα λευκό δείγμα, αλλά μοιράστηκαν σε περισσότερα υποδείγματα του λευκού δείγματος. Τα πολυσυστατικά διαλύματα που περιείχαν αναβολικά στεροειδή δεν προστέθηκαν, κυρίως, γιατί αυτά αφορούσαν περισσότερο τη διαδικασία II_IV-στάδιο B, η οποία περιελάμβανε το κρίσιμο στάδιο της μεθανόλυσης. Παράλληλα με τα λευκά και τα εμβολιασμένα δείγματα, αναλύθηκαν και τα αντίστοιχα πολυσυστατικά διαλύματα στην ίδια συγκέντρωση με τα δείγματα.

Εφαρμόζοντας τις μεθόδους εκτύπωσης που δημιουργήθηκαν (εδάφιο 5.6.3), ελήφθησαν τα χρωματογραφήματα των επιλεγμένων ιόντων των ουσιών σε λευκό και εμβολιασμένο υπόστρωμα, αλλά και σε διαλύτη. Η αξιολόγηση των χρωματογραφημάτων περιελάμβανε τον έλεγχο ανίχνευσης των ουσιών που εμβολιάστηκαν στα ούρα σε σύγκριση με τις ουσίες που ανιχνεύτηκαν σε διαλύτη ελέγχοντας, παράλληλα, και τα αντίστοιχα χρωματογραφήματα του λευκού δείγματος. Τέλος, καταγράφηκε το ύψος των χρωματογραφικών κορυφών των εξεταζόμενων ιόντων. Οι χρωματογραφικές κορυφές με ένταση μικρότερη από 10^3 θεωρούνται θόρυβος.

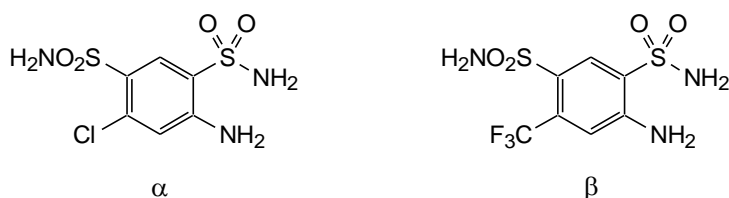
Καταρχήν, συγκρίνοντας τις χρωματογραφικές κορυφές των ουσιών στο διάλυμα και τις αντίστοιχες κορυφές των ουσιών στο υπόστρωμα, παρατηρήθηκε υποβάθμιση του σήματος έως και μια τάξη μεγέθους. Επίσης, κατά την ανάλυση των εμβολιασμένων δειγμάτων υπήρξαν ουσίες που δεν

ανιχνεύτηκαν, ενώ ανιχνεύτηκαν κατά την ανάλυση των διαλυμάτων. Αυτό παρατηρήθηκε, κυρίως, στις ουσίες που εκλούονταν νωρίς, στο 1^ο min της ανάλυσης, και σε ορισμένες από τις ουσίες που ανήκαν στην κατηγορία των διουρητικών και των NSAID. Στην πρώτη περίπτωση η αποτυχία ανίχνευσης αποδόθηκε στο γεγονός ότι στην αρχή της ανάλυσης εκλούνται πολλές ουσίες από τα ούρα, οι οποίες παρεμποδίζουν τον ιοντισμό και την ανίχνευση των εξεταζόμενων ουσιών. Έτσι, ουσίες όπως ετιλεφρίνη, οξιλοφρίνη, οκτοπαμίνη, συνεφρίνη, νορεπινεφρίνη και αλλαντοΐνη που εκλούονταν κοντά στο 1^ο min δεν ανιχνεύονταν. Επίσης, για τις ουσίες ισοπροτερενόλη, μεταραμινόλη και πιρακετάμη παρατηρήθηκε παρεμπόδιση από το υπόστρωμα, όπως προέκυψε από το χρωματογράφημα του λευκού δείγματος.

Στη δεύτερη περίπτωση η δυσκολία ανίχνευσης των διουρητικών και των NSAID αποδίδεται στο γεγονός ότι οι συνθήκες εκχύλισης κατά την παρασκευαστική πορεία δεν είναι οι καταλληλότερες για την παραλαβή των ουσιών αυτών. Επίσης, η οξύτητα ορισμένων από αυτές, πχ αιθακρινικό οξύ, δε διευκολύνει το θετικό ιοντισμό τους και την περαιτέρω ανίχνευσή τους με την εφαρμοζόμενη μέθοδο ανάλυσης LC-TOF-MS. Γενικότερα, διαπιστώθηκε ότι οι χαμηλότερες χρωματογραφικές κορυφές αντιστοιχούσαν στα διουρητικά και τα NSAID.

Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι οι ουσίες φαινοτερόλη και φαινυλεφρίνη δεν ανιχνεύτηκαν στα εμβολιασμένα δείγματα ούρων, ενώ ανιχνεύτηκαν στο διάλυμα. Αυτό οφείλεται στο σχηματισμό των «artefacts» που δημιουργούνται, λόγω της παρουσίας φορμαλδεΐδης στα ούρα. Ομοίως, «artefact» σχηματίζεται και για την τερβουταλίνη, με τη διαφορά ότι σε αυτήν την περίπτωση ανιχνεύεται και η αρχική ουσία. Τα «artefacts» σχηματίζονται σε pH 5,5-6,0 κατά την ενζυμική υδρόλυση, εξαιτίας της φορμαλδεΐδης. Αυτά σχηματίζονται μόνο υπό συγκεκριμένες συνθήκες, δηλαδή, μόνο κατά τη διαδικασία II_IV-στάδιο A. Πιο συγκεκριμένα, κατά την προκατεργασία του δείγματος δημιουργούνται παράγωγα της τετραϋδροϊσοκινολίνης, δηλαδή, στο μόριο των συγκεκριμένων β2-αγωνιστών (σχήμα 1.2) ενσωματώνεται μια μεθυλεν-ομάδα, -CH₂-, σχηματίζοντας δακτύλιο με την αιθανολοαμινοπλευρική αλυσίδα των β2-αγωνιστών ¹⁷⁰.

Επιπροσθέτως, οι βενζοθειαδιαζίνες (σχήμα 1.6α,β) υδρολύονται σε υδατικά μίγματα, με την πλειοψηφία αυτών να σχηματίζει το χλωροαμιδοφαιναμίδιο (thiazide artefact 1) (σχήμα 5.3α). Τέτοια διουρητικά είναι τα: αλθειαζίδιο, χλωροθειαζίδιο, κυκλοθειαζίδιο, υδροχλωροθειαζίδιο και τριχλωρομεθειαζίδιο. Αντίθετα, το πολυθειαζίδιο παραμένει σταθερό κατά την υδρόλυση και δε σχηματίζει «artefact». Επίσης, οι ουσίες όπως το υδροφλουμεθειαζίδιο και το βενδροφλουμεθειαζίδιο υδρολύονται προς τριφθορομεθυλοαμιδοφαιναμίδιο (thiazide artefact 2) (σχήμα 5.3β) ¹⁷¹. Έτσι, για τις παραπάνω βενζοθειαδιαζίνες παρακολουθούνται και τα ιόντα των δύο «artefacts», [M+H]⁺.



Σχήμα 5.3. Υδρόλυση βενζοθειαδιαζινών προς «artefacts» α) χλωροαμιδοφαιναμίδιο και β) τριφθορομεθυλοαμιδοφαιναμίδιο.

Επίσης, η μεθοτρεξάτη (C₂₀H₂₂N₈O₅) δεν ανιχνεύεται όταν βρίσκεται στα ούρα, ενώ ανιχνεύεται όταν αναλύεται το διάλυμά του. Πρόκειται για ένα πολύ πολικό μόριο με οκτώ άτομα αζώτου, δύο καρβοξύλια και ένα καρβονύλιο. Η αποτυχία στην ανίχνευσή του, πιθανόν να οφείλεται στη μεγάλη πολικότητά του, με αποτέλεσμα αυτό να παραμένει στην υδατική φάση και να μην εκχυλίζεται στην οργανική φάση.

Επιπροσθέτως, παρατηρήθηκε ότι στα ούρα, τα στερεοϊσομερή εφεδρίνη-ψευδοεφεδρίνη και νορεφεδρίνη-νορψευδοεφεδρίνη συνεκλούονταν κατά την ανάλυση LC-TOF-MS. Ομοίως και για τις ουσίες βηταμεθαζόνη και δεξαμεθαζόνη

5.8 Συμπεράσματα

Τα πρώτα δεδομένα που συνελλέγησαν, κατά τη έναρξη του πειραματικού μέρους της διδακτορικής διατριβής, φανέρωσαν τη δυνατότητα της τεχνικής LC-TOF-MS να ανιχνεύει μεγάλο αριθμό απαγορευμένων ουσιών. Παρόλα αυτά, υπήρχαν ουσίες που ανιχνεύονταν δύσκολα ή δεν ανιχνεύονταν

καθόλου με τη συγκεκριμένη τεχνική μέσω θετικού ιοντισμού ESI, και αυτές ήταν τα: διφλουνισάλιο, φαινοβαρβιτάλη, διχλωροφαιναμίδιο, κετοπροφαίνιο, φουροσεμίδιο, 5β-ανδροστανό-3β,17β-διόλη. Για την ανίχνευση των συγκεκριμένων ουσιών μέσω της ανάλυσης LC-TOF-MS θα ήταν προτιμότερος ο αρνητικός ιοντισμός ESI.

Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι ορισμένες ουσίες δεν ανιχνεύτηκαν με την εφαρμογή της μεθόδου LC-TOF-MS «Διαδικασία II_IV-στάδιο A» σε εμβολιασμένα δείγματα ούρων, ενώ αντίθετα ανιχνεύτηκαν, κατά την ανάλυση των διαλυμάτων τους. Αυτό αποδόθηκε, καταρχήν, στην επίδραση του υποστρώματος, κυρίως, για τις ουσίες που εκλούονταν μαζί με το επιβαρυμένο υπόστρωμα των ούρων, κοντά στο 1^ο min της ανάλυσης. Έπειτα, παρατηρήθηκε ότι ορισμένες από τις ουσίες που δεν ανιχνεύτηκαν σε αυτό το στάδιο ανήκουν στην κατηγορία των διουρητικών και των NSAID. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην εκχύλιση (pH και διαλύτης εκχύλισης), δηλαδή, στο γεγονός ότι αυτή δεν πραγματοποιείται υπό τις βέλτιστες συνθήκες για την παραλαβή των συγκεκριμένων ουσιών. Επιπλέον, η μέθοδος αυτή δεν ενδείκνυται για όσα αναβολικά στεροειδή δεν υδρολύονται, μέσω της ενζυμικής υδρόλυσης με β-γλυκουρονιδάση και αρυλοσουλφατάση.

Συνοψίζοντας, οι ουσίες που δεν ανιχνεύονται με την ανάλυση LC-TOF-MS και τη «Διαδικασία II_IV-στάδιο A» ανήκουν στην κατηγορία των NSAID, των βενζοθειαδιαζινών και των αναβολικών. Αυτό συνέβη, επειδή υπήρχε πρόβλημα, είτε στον ιοντισμό, είτε στην εκχύλιση, είτε στην υδρόλυσή τους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

6.1 Εισαγωγή

Η μέθοδος ελέγχου ντόπινγκ στα άλογα που παρουσιάζεται στην παρούσα διδακτορική διατριβή, αναπτύχθηκε λαμβάνοντας υπόψη α) τις μεθόδους που εφαρμοζόνταν στο εργαστήριο ελέγχου ντόπινγκ της Αθήνας την περίοδο διεξαγωγής της διατριβής και β) τον εξοπλισμό του εργαστηρίου. Η ανάπτυξη της μεθόδου αφορά στην παρασκευαστική πορεία και περιλαμβάνει την εξέταση διαφορετικών α) διαδικασιών υδρόλυσης, β) διαλυτών εκχύλισης και γ) συνδυασμών ανάμιξης των τελικών εκχυλισμάτων. Επιγραμματικά, η ανάπτυξη της μεθόδου αποτελείται από τρία μέρη.

Στο πρώτο μέρος, αναλύθηκαν και με τις τρεις τεχνικές LC-TOF-MS, GC-HRMS και GC-MS, καθένα από τα τρία εκχυλίσματα που προέκυψαν από τις πορείες «Διαδικασία II_IV – στάδιο A», «Διαδικασία II_IV – στάδιο B» και «Διαδικασία NSAID» (σχήματα 5.1 και 5.2), ακολουθώντας τις απαιτούμενες διαδικασίες παραγωγοποίησης ή ανασύστασης έτσι, ώστε να διαπιστωθεί ποιες ουσίες ανιχνεύονται στην κάθε περίπτωση, τόσο κατά τον στοχευμένο έλεγχο ντόπινγκ όσο και κατά την αυτόματη αναζήτηση σε βιβλιοθήκες φασμάτων μαζών. Εν τω μεταξύ, εξετάστηκε αν η όξινη υδρόλυση είναι αποτελεσματική για τα αναβολικά στεροειδή που είναι συζευγμένα με θειικό οξύ στη θέση 17β, κατά τη β' φάση μεταβολισμού. Μια επιπλέον δοκιμή που πραγματοποιήθηκε, αφορά στην πορεία με την εκχύλιση στερεάς φάσης και τη μεθανόλυση, όπου εξετάστηκε αν είναι δυνατόν να ληφθεί μια πιο καθαρή οργανική φάση με υγρο-υγρο-εκχύλιση σε pH 14.

Στη συνέχεια, προκειμένου να διευρυνθεί ο γενικευμένος χαρακτήρας της εκχύλισης της μεθοδολογίας, στο δεύτερο μέρος της ανάπτυξης μεθόδου αναμίχθηκαν ανά δύο, αλλά και όλα μαζί τα οργανικά εκχυλίσματα που προέκυψαν από τις εφαρμοζόμενες μεθόδους της ρουτίνας του εργαστηρίου. Τα μίγματα των οργανικών φάσεων αναλύθηκαν και με τις τρεις χρησιμοποιούμενες τεχνικές, κατόπιν κατάλληλης προκατεργασίας.

Τέλος, ελέγχθηκε αν είναι δυνατόν να εκχυλιστούν οι όξινες ουσίες σε αλκαλικό pH (9-10), με εξαλάτωση, χρησιμοποιώντας έναν πιο πολικό διαλύτη από αυτόν που χρησιμοποιείται στη διαδικασία II_IV-στάδιο A. Έτσι, θα μειώνονταν οι υγρο-υγρο-εκχυλίσεις από τρεις σε δύο και θα μπορούσε να παραληφθεί η διαδικασία NSAID.

6.2 Επιλεγμένες ουσίες για την ανάπτυξη μεθόδου

Για την ανάπτυξη της μεθόδου επιλέχθηκαν τριάντα έξι ουσίες, από τις οποίες οι τριάντα τέσσερις περιλαμβάνονται στον κατάλογο του AORC του «Proficiency Test» του 2011. Για τα πειράματα της ανάπτυξης μεθόδου οι ουσίες είχαν συγκεντρώσεις στα ούρα, αυτές που καθορίζονταν από τον κατάλογο (πίνακας 6.1) ¹⁷². Οι δύο επιπλέον ουσίες ήταν η αντιπυρίνη και η γουαϊφαινεσίνη. Πρόκειται για ουσίες που είναι αντιπροσωπευτικές των κατηγοριών που αναφέρθηκαν στο υποκεφάλαιο 1.6, και έχουν μεταξύ τους διαφορετική σχετική μοριακή μάζα, πολικότητα, χημική δομή, βιολογική δράση, καθώς και οξινοβασικές ιδιότητες. Οι ουσίες βηταμεθαζόνη και ψευδοεφεδρίνη παραλήφθηκαν, επειδή κατά την ανάλυση LC-TOF-MS συνεκλούνται με τις ουσίες δεξαμεθαζόνη και εφεδρίνη, αντίστοιχα, σύμφωνα με τις δοκιμές που περιγράφηκαν στο κεφάλαιο 5. Για τις ουσίες που επιλέχθηκαν, παρασκευάστηκε ένα πολυσυστατικό διάλυμα, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα της ανάπτυξης μεθόδου. Η γουαϊφαινεσίνη δεν προστέθηκε στο πολυσυστατικό διάλυμα, επειδή είναι το προϊόν διάσπασης της μεθοκαρβαμόλης.

6.3 Κριτήρια επιλογής παρασκευαστικής διαδικασίας

Το βασικό κριτήριο για την επιλογή της παρασκευαστικής πορείας ήταν ο αριθμός των ανιχνευόμενων ουσιών. Ένα επιπλέον κριτήριο ήταν η ανάκτηση από την εκχύλιση των εξεταζόμενων ουσιών. Επιπλέον, ελήφθη υπόψη ο αριθμός των ανιχνευόμενων ουσιών από την αυτόματη αναζήτηση σε βιβλιοθήκες, μέσω των προγραμμάτων AMDIS και DRS.

Πίνακας 6.1. Ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη της μεθόδου και οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις στα ούρα που καθορίζονται από τον κατάλογο του AORC για το Proficiency Test του 2011. Όπου *: προϊόν διάσπασης της μεθοκαρβαμόλης.

Ουσία	Συγκέντρωση (ng mL⁻¹)	Ουσία	Συγκέντρωση (ng mL⁻¹)
Amitriptyline	50	Hydrochlorothiazide	200
Amphetamine	100	Ketoprophen	200
Antipyrine	500	Lidocaine	50
Atenolol	100	Meloxicam	100
Benzoylcegonine	100	Mepivacaine	50
Bumetanide	20	Methocarbamol	500
Butorphanol	10	Methylphenidate	200
Caffeine	100	Morphine	100
Chlorpromazine	50	Nikethamide	100
Clenbuterol	4	Nordiazepam	100
Dexamethasone	10	Oxazepam	100
Ephedrine	100	Pethidine	50
5α-estrane-3β,17α-diol	50	Phenobarbital	100
Ethacrynic acid	100	Phenylbutazone	200
Flufenamic acid	200	Salbutamol	50
Flunixin	200	Terbutaline	50
Furosemide	500	Timolol	200
Guaifenesin*		Triamcinolone acetonide	20

6.4 Πρώτο μέρος ανάπτυξης μεθόδου

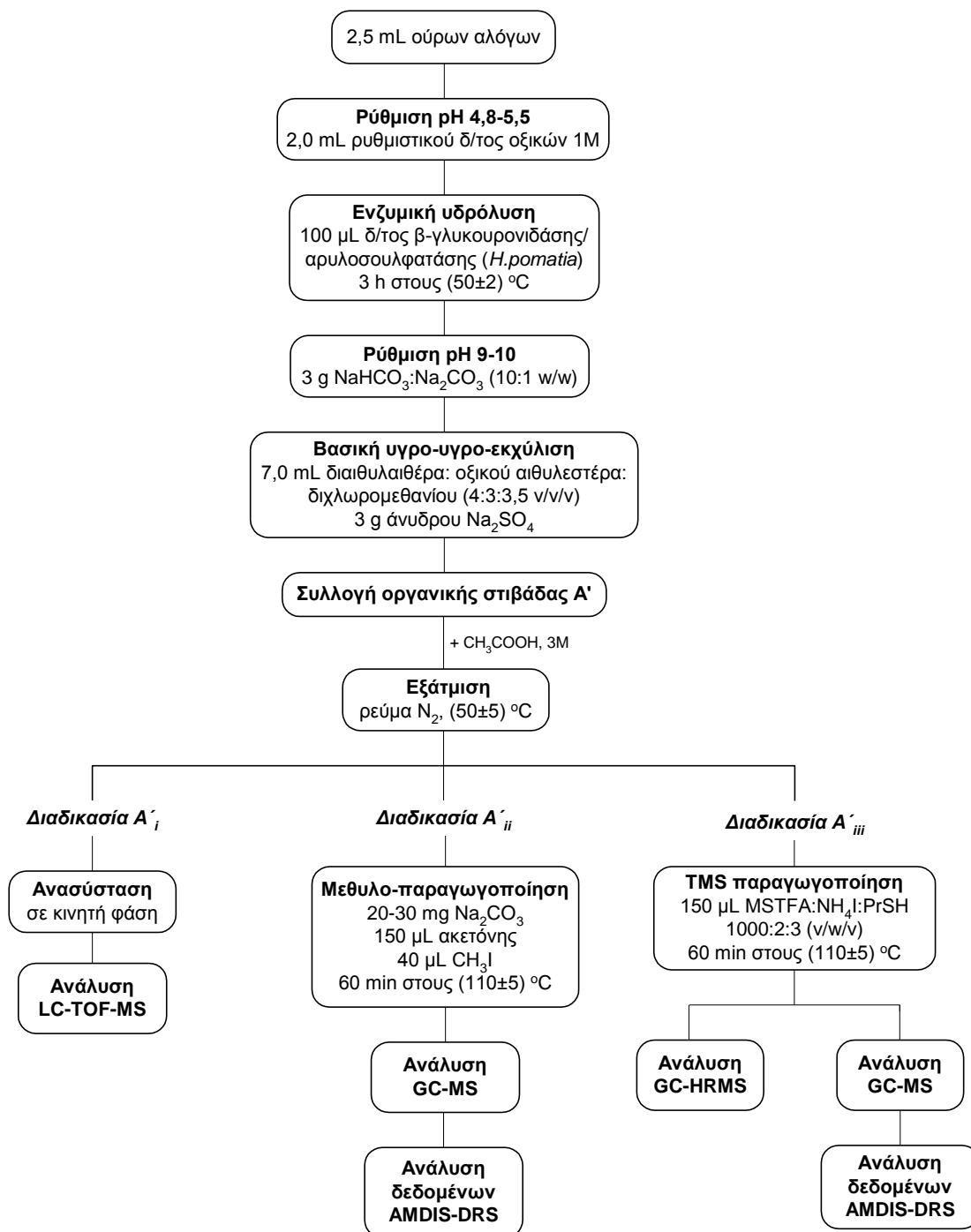
6.4.1 Παρασκευαστικές πορείες ξεχωριστής ανάλυσης των εκχυλισμάτων

Στο πρώτο μέρος της ανάπτυξης μεθόδου πραγματοποιήθηκαν οι δοκιμές που απεικονίζονται στα σχήματα 6.1, 6.2 και 6.3. Οι διαδικασίες Α'ἰ, Α'ἱἱ, Α'ἱἱἱ και Β'ἰ, Β'ἱἱ, Β'ἱἱἱ αποτελούν παραλλαγή της διαδικασίας II_IV-στάδιο Α και στάδιο Β, αντιστοίχως. Ομοίως οι διαδικασίες Γ'ἰ, Γ'ἱἱ, Γ'ἱἱἱ είναι παραλλαγή της διαδικασίας NSAID. Έχοντας ως βάση τις τρεις παραπάνω διαδικασίες, έλαβαν χώρα και περαιτέρω δοκιμές που θα αναφερθούν αναλυτικότερα σε επόμενο τμήμα του κεφαλαίου.

Σκοπός του πρώτου μέρους της ανάπτυξης μεθόδου ήταν να βρεθεί ποιες και πόσες ουσίες ανιχνεύονται με καθεμία από τις διαδικασίες Α'ἰ,ἱἱ,ἱἱἱ, Β'ἰ,ἱἱ,ἱἱἱ και Γ'ἰ,ἱἱ,ἱἱἱ, και με πόση ανάκτηση. Για το λόγο αυτό εκτελέστηκαν πειράματα ανάκτησης, χρησιμοποιώντας τρία υποδείγματα λευκού δείγματος ούρων αλόγου εκτομίας, εκ των οποίων το πρώτο εμβολιαζόταν με το πολυσυστατικό διάλυμα (υποκεφάλαιο 6.2) στην αρχή της παρασκευαστικής πορείας, το δεύτερο εμβολιαζόταν με τον ίδιο όγκο πολυσυστατικού, μετά την υγρο-υγρο-εκχύλιση, στην οργανική φάση, και το τρίτο παρέμενε λευκό. Επειδή στο τέλος ακολουθούσαν αναλύσεις με τρεις διαφορετικές τεχνικές, η παραπάνω σειρά δειγμάτων προετοιμαζόταν καταλλήλως εις τριπλούν, δηλαδή, η πρώτη σειρά, i, προετοιμαζόταν για την ανάλυση LC-TOF-MS, η δεύτερη σειρά, ii, για την ανάλυση GC-MS και η τρίτη σειρά, iii, για την ανάλυση GC-HRMS. Ο εμβολιασμός ήταν τέτοιος, ώστε οι συγκεντρώσεις των εξεταζόμενων ουσιών στα ούρα να είναι αυτές του πίνακα 6.1. Ο αρχικός όγκος ούρων ήταν 2,5 mL.

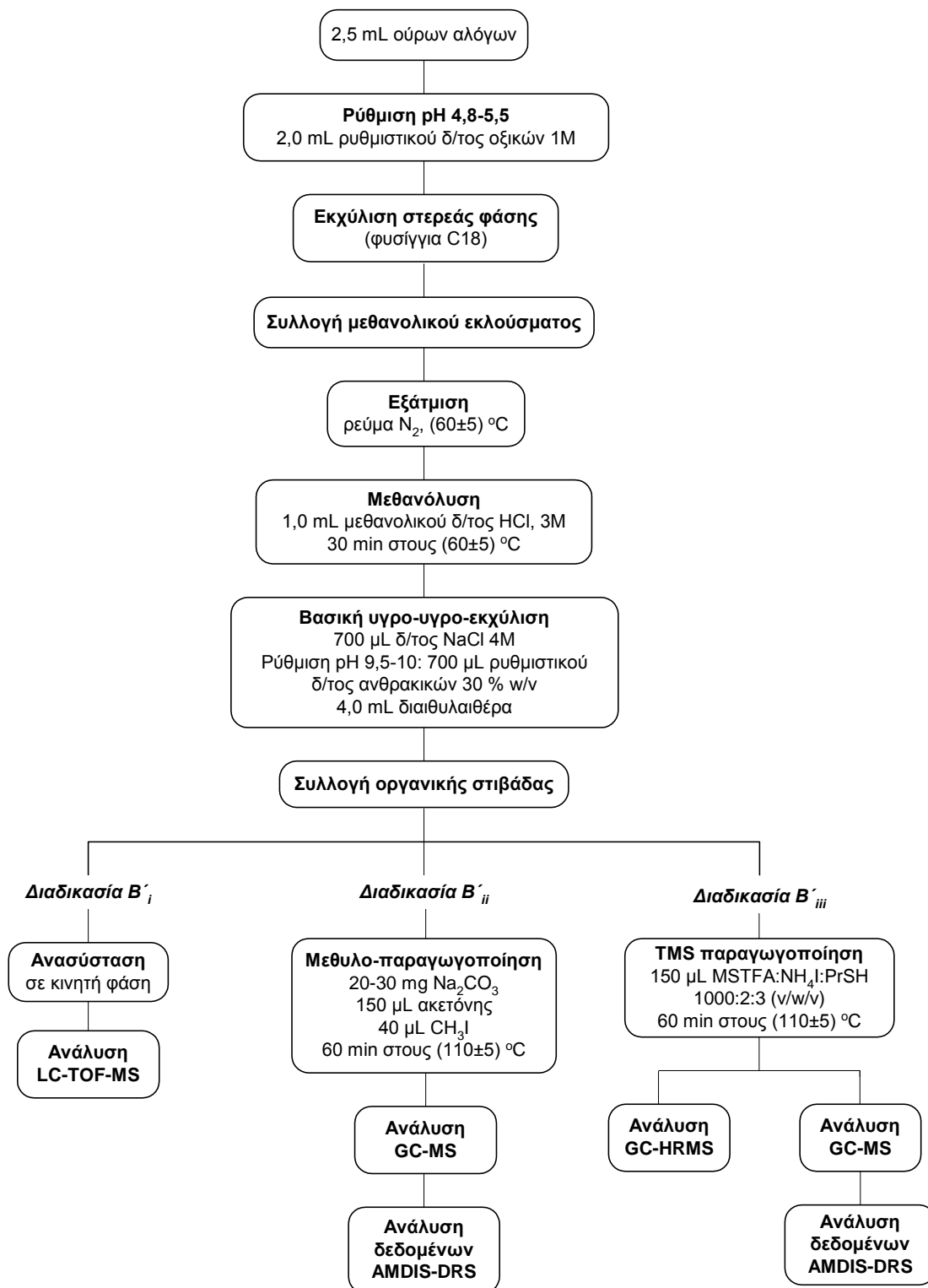
Για τις διαδικασίες Α'ἰ, Α'ἱἱ και Α'ἱἱἱ (σχήμα 6.1) ακολουθήθηκε, αρχικά, ενζυμική υδρόλυση με β-γλυκουρονιδάση και αρυλοσουλφατάση από *H. romatia* κι έπειτα, βασική υγρο-υγρο-εκχύλιση με το μίγμα διαλυτών διαιθυλαιθέρα : οξικό αιθυλεστέρα : διχλωρομεθάνιο, προσθέτοντας άνυδρο θειικό νάτριο, ως παράγοντα εξαλάτωσης. Στις διαδικασίες Β'ἰ, Β'ἱἱ και Β'ἱἱἱ (σχήμα 6.2) προηγήθηκε το στάδιο καθαρισμού του δείγματος με εκχύλιση στερεάς φάσης με φυσίγγια C18 και χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης του δείγματος

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ A[']_i, A[']_{ii}, A[']_{iii}



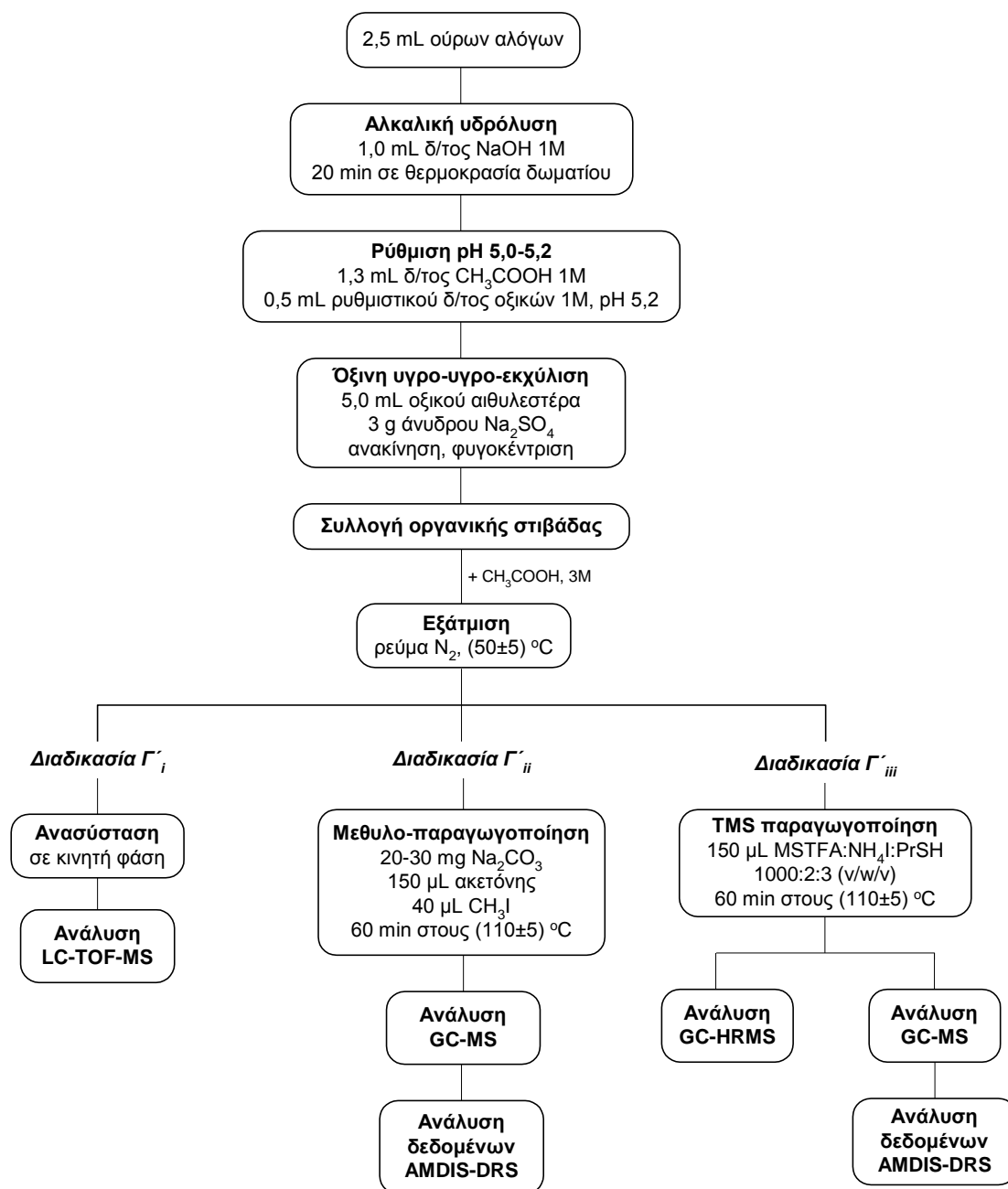
Σχήμα 6.1. Παρασκευαστικά στάδια των διαδικασιών A[']_i, A[']_{ii}, A[']_{iii}, κατά την πρώτη φάση της ανάπτυξης μεθόδου.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ B_i, B_{ii}, B_{iii}



Σχήμα 6.2. Παρασκευαστικά στάδια των διαδικασιών B_i, B_{ii}, B_{iii}, κατά την πρώτη φάση της ανάπτυξης μεθόδου.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ Γ' _i, Γ' _{ii}, Γ' _{iii}



Σχήμα 6.3. Παρασκευαστικά στάδια των διαδικασιών Γ' _i, Γ' _{ii}, Γ' _{iii}, κατά την πρώτη φάση της ανάπτυξης μεθόδου.

τη μεθανόλη. Ακολούθησε η μεθανόλυση ως στάδιο αποσύζευξης των μεταβολιτών της β' φάσης μεταβολισμού, με κυριότερο στόχο τα αναβολικά στεροειδή που είναι συζευγμένα με θειικό οξύ στη θέση 17β-OH. Κατόπιν, εκτελέστηκε βασική εκχύλιση σε pH 9,5-10 με διαιθυλαιθέρα και διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Οι διαδικασίες Γ' _i, Γ' _{ii} και Γ' _{iii} (σχήμα 6.3) αφορούσαν,

κυρίως, στις όξινες ουσίες, οι οποίες αποσυζεύγνυνται με βασική υδρόλυση με διάλυμα NaOH (1M) και παραλαμβάνονται με όξινη εκχύλιση σε pH 5,0-5,2 με οξικό αιθυλεστέρα. Οι λεπτομέρειες για την προκατεργασία των δειγμάτων έχουν αναφερθεί στο υποκεφάλαιο 5.2.

Στις οργανικές φάσεις των διαδικασιών Α'ἰ, Β'ἰ και Γ'ἰ εκτελέστηκαν διαδοχικά οι διεργασίες της εξάτμισης, της ανασύστασης του ξηρού υπολείμματος με κινητή φάση και της ανάλυσης LC-TOF-MS. Επίσης, στις οργανικές φάσεις των διαδικασιών Α'ἱἱ, Β'ἱἱ και Γ'ἱἱ πραγματοποιήθηκε εξάτμιση μέχρι ξηρού, μεθυλο-παραγωγοποίηση και ανάλυση GC-MS και κατόπιν, ανάλυση των δεδομένων με τα προγράμματα AMDIS και DRS. Τέλος, στις οργανικές φάσεις των διαδικασιών Α'ἱἱἱ, Β'ἱἱἱ και Γ'ἱἱἱ έλαβε χώρα εξάτμιση μέχρι ξηρού, TMS-παραγωγοποίηση, ανάλυση GC-HRMS και περαιτέρω ανάλυση GC-MS των δειγμάτων για την επεξεργασία των δεδομένων με τα προγράμματα AMDIS-DRS.

6.4.2 Αποτελέσματα διαδικασιών Α'ἰ, Α'ἱἱ, Α'ἱἱἱ

Τα αποτελέσματα που αφορούν στην εφαρμογή των διαδικασιών Α'ἰ, Α'ἱἱ και Α'ἱἱἱ, παρουσιάζονται στον πίνακα 6.2. Σχετικά με τις αναλύσεις GC-MS και GC-HRMS, από τις ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη της μεθόδου, αξιολογήθηκαν μόνο όσες σημειώνονται στον πίνακα, καθώς οι υπόλοιπες ανιχνεύονταν ικανοποιητικά μέσω της ανάλυσης LC-TOF-MS, λόγω της δομής τους και της ικανότητας ιοντισμού τους.

Από τη διαδικασία Α'ἰ και την ανάλυση LC-TOF-MS προέκυψε ότι ανιχνεύτηκε ένα μεγάλο μέρος των εξεταζόμενων ουσιών. Η ανάλυση των διαλυμάτων των ουσιών (κεφάλαιο 5) φανέρωσε τη δυσκολία που παρουσιάζουν οι ουσίες φουροσεμίδιο, 5α-εστραν-3β,17α-διόλη και φαινοβαρβιτάλη να ιοντιστούν θετικά κατά την ανάλυση LC-TOF-MS. Άρα, η μη ανίχνευσή τους μέσω των διαδικασιών που περικλείουν Ανάλυση LC-TOF-MS, αποδίδεται σε αυτό το γεγονός. Από τα αποτελέσματα της διαδικασίας Α'ἰ προέκυψε ότι οι όξινες ουσίες βουμετανίδιο (pK_a 3,6 και 7,7) και αιθακρινικό οξύ (pK_a 3,5) ανιχνεύτηκαν μόνο μετά από τον εμβολιασμό τους στην οργανική φάση, και δεν ανιχνεύτηκαν στο δείγμα που εμβολιάστηκε από την αρχή. Αυτό αποδόθηκε στους παράγοντες:

Πίνακας 6.2. Αποτελέσματα ανάκτησης από εκχύλιση των διαδικασιών Α' i, Α' ii και Α' iii.

Ουσία	% ΑΝΑΚΤΗΣΗ ΑΠΟ ΕΚΧΥΛΙΣΗ		
	Διαδικασία Α' i (LC-TOF-MS)	Διαδικασία Α' ii (GC-MS)	Διαδικασία Α' iii (GC-HRMS)
Amitriptyline	114		
Amphetamine	101		
Antipyrine	99		
Atenolol	96		-
Benzoyllecgonine	52		42
Bumetanide	0	-	0
Butorphanol	85		
Caffeine	*		
Chlorpromazine	138		
Clenbuterol	84		88
Dexamethasone	163		
Ephedrine	93		
5α-Estran-3β,17α-diol	-		59
Ethacrynic Acid	0	-	8,4
Flufenamic acid	32		62
Flunixin	82		83
Furosemide	-	0	6,8
Guaifenesin	90		
Hydrochlorothiazide	54	50	
Ketoprofen	39		28
Lidocaine	89		
Meloxicam	61		
Mepivacaine	87		
Methocarbamol	93		
Methylphenidate	41		
Morphine	102		
Nikethamide	95		
Nordiazepam	83		
Oxazepam	90		
Pethidine	67		
Phenobarbital	-	68	83
Phenylbutazone	13	53	78
Salbutamol	95		80
Terbutaline	65		47
Timolol	94		83
Triamcinolone acetonide	89		

0 : Μηδενική ανάκτηση, δηλαδή η ουσία ανιχνεύτηκε μόνο στο δείγμα που εμβολιάστηκε στην οργανική σιβάδα, και όχι στο δείγμα που εμβολιάστηκε αρχικά στα ούρα.

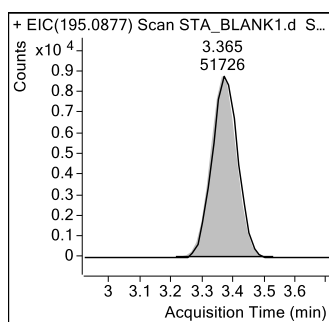
* : Παρεμπόδιση από το υπόστρωμα.

- : Η ουσία δεν ανιχνεύτηκε, ούτε στο αρχικώς εμβολιασμένο δείγμα στα ούρα, ούτε στο τελικώς εμβολιασμένο δείγμα στην οργανική σιβάδα.

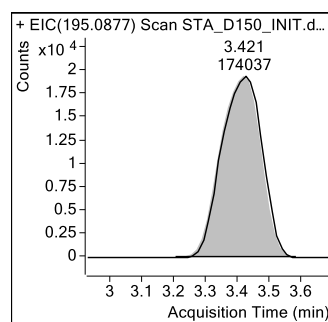
α) Η βασική εκχύλιση με τον τριπλό διαλύτη δεν ήταν η πιο κατάλληλη για την παραλαβή των όξινων ουσιών.

β) Ο θετικός ιοντισμός κατά την ανάλυση LC-TOF-MS δεν ήταν ο πιο κατάλληλος ιοντισμός για τις όξινες ουσίες.

Επίσης, οι ουσίες φαινυλοβουταζόνη και φλουφαιναμικό οξύ εκχυλίστηκαν με ανάκτηση 13 και 32%, αντιστοίχως, με ύψος χρωματογραφικής κορυφής ίσο με 5×10^3 στο δείγμα με τον αρχικό εμβολιασμό. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι για την καφεΐνη υπάρχει παρεμπόδιση από το υπόστρωμα, καθώς στο χρωματογράφημα του λευκού δείγματος της ουσίας υπάρχει κορυφή στο χρόνο έκλουσης, όπως φαίνεται και στο σχήμα 6.4.



α) Καφεΐνη σε λευκό δείγμα ούρων

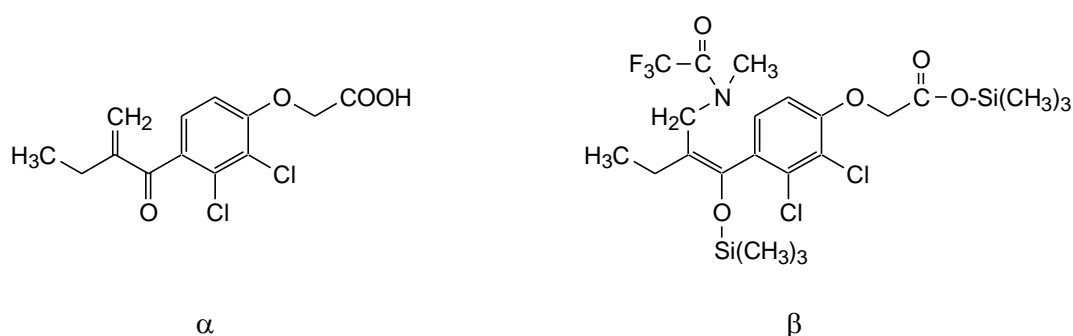


β) Καφεΐνη σε εμβολιασμένο δείγμα ούρων

Σχήμα 6.4. Χρωματογράφημα καφεΐνης σε α) λευκό δείγμα ούρων και β) εμβολιασμένο δείγμα ούρων, εφαρμόζοντας τη διαδικασία A_i με ενζυμική υδρόλυση και την Ανάλυση LC-TOF-MS.

Όσον αφορά στη διαδικασία A_{ii} και την ανάλυση GC-MS των μεθυλο-παραγωγοποιημένων ουσιών, εξετάστηκαν οι ουσίες βουμετανίδιο, αιθακρινικό οξύ, φουροσεμίδιο, υδροχλωροθειαζίδιο, φαινοβαρβιτάλη και φαινυλοβουταζόνη. Από αυτές, το βουμετανίδιο και το αιθακρινικό οξύ δεν ανιχνεύτηκαν καθόλου, δηλαδή, ούτε στο δείγμα με τον αρχικό εμβολιασμό ουσιών στα ούρα, ούτε στο δείγμα με τον εμβολιασμό των ουσιών στην οργανική φάση. Επιπλέον, το φουροσεμίδιο ανιχνεύτηκε μόνο στο δείγμα με τον εμβολιασμό των ουσιών στην οργανική φάση, δηλαδή, το φουροσεμίδιο δεν εκχυλίστηκε με τη συγκεκριμένη διαδικασία, η οποία, όμως, δεν ενδείκνυται για τις όξινες ουσίες, όπως προαναφέρθηκε.

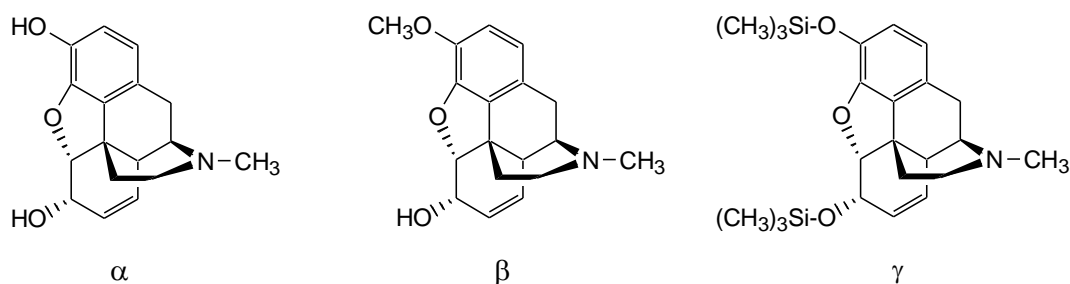
Σχετικά με τη διαδικασία Aⁱⁱⁱ και την ανάλυση GC-HRMS των TMS-παραγώγων, εξετάστηκαν δεκαέξι ουσίες. Η συγκεκριμένη μέθοδος εμφάνισε αδυναμία στην ανίχνευση της ατενολόνης και στην εκχύλιση του όξινου βουμετανιδίου. Η τελευταία ουσία ανιχνεύτηκε μόνο στο δείγμα που εμβολιάστηκε στην οργανική στιβάδα. Επίσης, οι όξινες ουσίες φουροσεμίδιο και αιθακρινικό οξύ εκχυλίστηκαν με ανάκτηση 6,8 και 8,4%, αντιστοίχως. Σημειώνεται ότι κατά την TMS-παραγωγοποίηση, το αιθακρινικό οξύ (σχήμα 6.5α) σχηματίζει το παράγωγο-«artefact» που εικονίζεται στο σχήμα 6.5β. Αυτό σχηματίζεται με την αντίδραση 1,4 προσθήκης του MSTFA στο τμήμα της συζυγιακής ενόνης του αιθακρινικού οξέος. Η αντίδραση ευνοείται από την υψηλή θερμοκρασία που επικρατεί κατά το στάδιο της TMS-παραγωγοποίησης. Έτσι, κατά την ανάλυση GC-HRMS και την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων, παρακολουθήθηκαν τα ιόντα του συγκεκριμένου παραγώγου, από κοινού με τα ιόντα του θεωρητικά αναμενόμενου bis-TMS-παραγώγου, το οποίο, όμως, όπως αποδείχτηκε δε σχηματίστηκε - ανιχνεύτηκε.



Σχήμα 6.5. Δομή των α) αιθακρινικό οξύ και β) παραγώγου-«artefact» του αιθακρινικού οξέος που σχηματίζεται κατά το στάδιο της TMS-παραγωγοποίησης.

Επιπροσθέτως, η κωδεΐνη προστέθηκε στα δείγματα ως εσωτερικό πρότυπο για την ανάλυση GC-MS των δειγμάτων για την αυτόματη ανίχνευση ουσιών με τα προγράμματα AMDIS-DRS. Λόγω των ισχυρών συνθηκών της TMS-παραγωγοποίησης, η κωδεΐνη είναι δυνατόν να παραγωγοποιηθεί όχι μόνο προς mono-TMS-παράγωγο, αλλά και προς bis-TMS-παράγωγο (σχήμα 6.6). Το τελευταίο, όμως, είναι το παράγωγο που προκύπτει και από την παραγωγοποίηση της μορφίνης. Μπορεί, δηλαδή, στο χρωματογραφικό

παράθυρο της μορφίνης να παρατηρηθεί σήμα, το οποίο να προέρχεται από την κωδεΐνη. Προκειμένου να αποφευχθεί αυτή η σύγχυση, η μορφίνη προτιμήθηκε να εξεταστεί μέσω της ανάλυσης LC-TOF-MS. Όπως φαίνεται και στο σχήμα 6.6 οι δύο ουσίες έχουν διαφορετική δομή, αλλά μπορεί να έχουν ίδιο παράγωγο, λόγω των συγκεκριμένων συνθηκών παραγωγοποίησης.



Σχήμα 6.6. Δομή α) μορφίνης, β) κωδεΐνης και γ) του κοινού bis-TMS-παράγωγου.

Άρα, με την εφαρμογή των διαδικασιών Aⁱ, Aⁱⁱ, Aⁱⁱⁱ προέκυψαν τα ακόλουθα συμπεράσματα:

α) Μέσω της διαδικασίας Aⁱ ανιχνεύτηκαν τριάντα από τις συνολικά τριάντα έξι εξεταζόμενες ουσίες. Παρά το μεγάλο αριθμό ουσιών που ανιχνεύτηκαν, η εν λόγω διαδικασία δε μπορεί να καλύψει, γενικότερα, όλες τις ουσίες, καθώς η εφαρμοζόμενη ενζυμική υδρόλυση δεν καλύπτει τα συζευγμένα με θειικό οξύ αναβολικά στεροειδή στη θέση 17β-OH που σχηματίζονται κατά τη β' φάση μεταβολισμού.

β) Οι όξινες ουσίες εκχυλίστηκαν με χαμηλή ανάκτηση ή δεν εκχυλίστηκαν καθόλου, μέσω της βασικής εκχύλισης με τον τριπλό διαλύτη.

γ) Το βουμετανίδιο δεν ανιχνεύτηκε με καμία από τις τρεις διαδικασίες.

δ) Στην ανίχνευση της καφεΐνης παρατηρήθηκε επίδραση από το υπόστρωμα κατά την ανάλυση LC-TOF-MS.

6.4.3 Αποτελέσματα διαδικασιών Bⁱ, Bⁱⁱ, Bⁱⁱⁱ

Τα αποτελέσματα από την εφαρμογή των διαδικασιών Bⁱ, Bⁱⁱ και Bⁱⁱⁱ παρουσιάζονται στον πίνακα 6.3. Οι ουσίες που ανιχνεύτηκαν μόνο στο

Πίνακας 6.3. Αποτελέσματα ανάκτησης από εκχύλιση των διαδικασιών Β' i, Β' ii και Β' iii.

Ουσία	% ΑΝΑΚΤΗΣΗ ΑΠΟ ΕΚΧΥΛΙΣΗ		
	Διαδικασία Β' i (LC-TOF-MS)	Διαδικασία Β' ii (GC-MS)	Διαδικασία Β' iii (GC-HRMS)
Amitriptyline	70		
Amphetamine	169		
Antipyrine	84		
Atenolol	13		-
Benzoylcegonine	1,2		3,8
Bumetanide	0	-	0
Butorphanol	92		
Caffeine	50		
Chlorpromazine	21		
Clenbuterol	0		0
Dexamethasone	*		
Ephedrine	251		
5α-Estran-3β,17α-diol	-		100
Ethacrynic Acid	0	54	-
Flufenamic acid	44		36
Flunixin	76		75
Furosemide	-	7,6	0
Guaifenesin	74		
Hydrochlorothiazide	0	-	
Ketoprofen	0		0
Lidocaine	82		
Meloxicam	45		
Mepivacaine	58		
Methocarbamol	79		
Methylphenidate	110		
Morphine	*		
Nikethamide	102		
Nordiazepam	58		
Oxazepam	2,7		
Pethidine	106		
Phenobarbital	-	43	19
Phenylbutazone	-	47	94
Salbutamol	0		0
Terbutaline	110		52
Timolol	92		92
Triamcinolone acetonide	*		

0 : Μηδενική ανάκτηση, δηλαδή η ουσία ανιχνεύτηκε μόνο στο δείγμα που εμβολιάστηκε στην οργανική σιβάδα, και όχι στο δείγμα που εμβολιάστηκε αρχικά στα ούρα.

* : Παρεμπόδιση από το υπόστρωμα.

- : Η ουσία δεν ανιχνεύτηκε ούτε στο αρχικώς εμβολιασμένο δείγμα στα ούρα ούτε στο τελικώς εμβολιασμένο δείγμα στην οργανική σιβάδα.

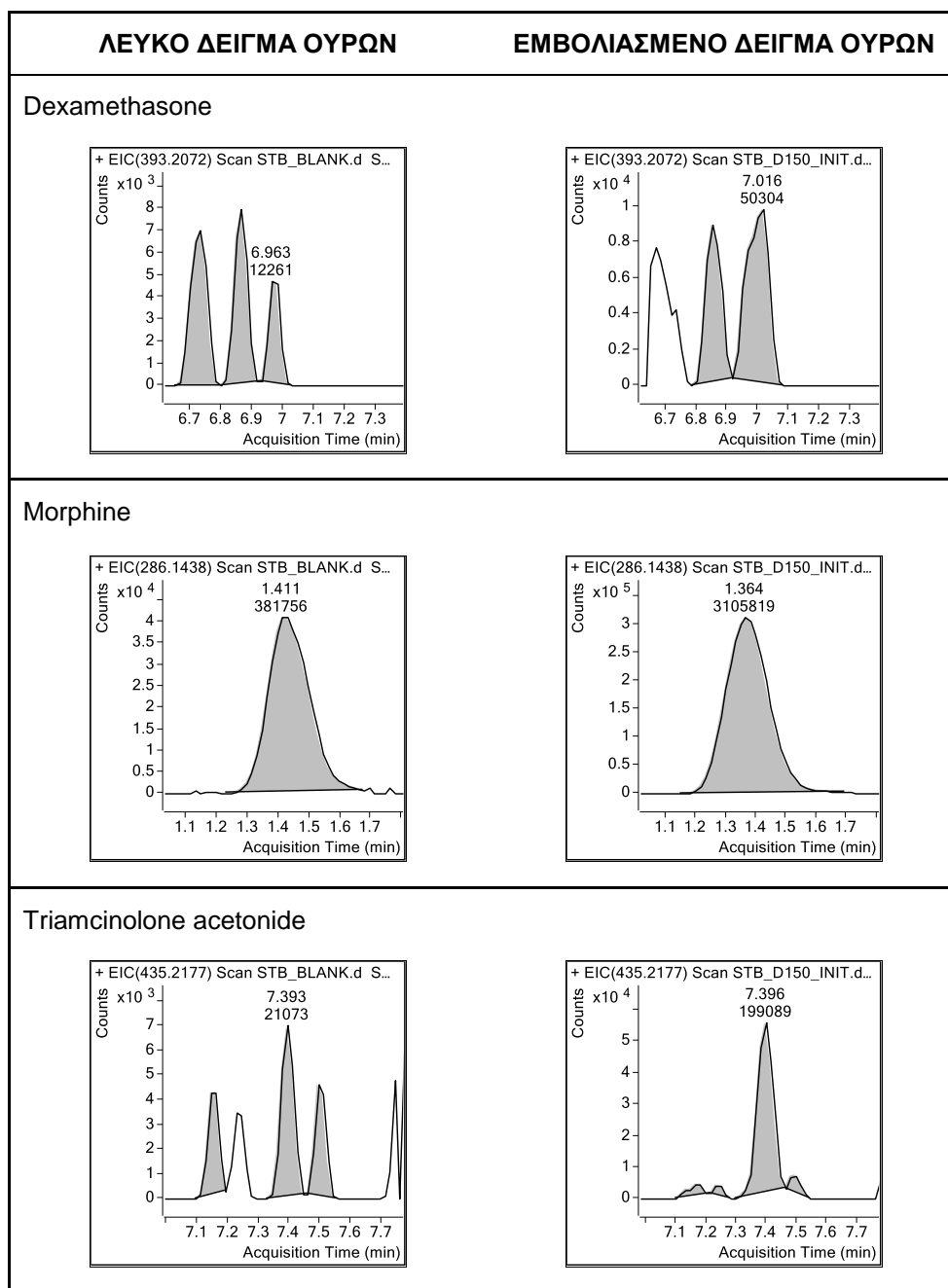
δείγμα που εμβολιάστηκε στην οργανική φάση και όχι στο δείγμα που εμβολιάστηκε, αρχικά, στα ούρα κατά τη διαδικασία Β'ί είναι οι εξής: βουμετανίδιο, κλενβουτερόλη, υδροχλωροθειαζίδιο, κετοπροφαίνιο, σαλβουταμόλη και αιθακρινικό οξύ. Άρα, με τη συγκεκριμένη διαδικασία δεν εκχυλίστηκαν έξι ουσίες. Βέβαια, η ανεπιτυχής ανίχνευση του αιθακρινικού οξέος αποδίδεται και στο θετικό ιοντισμό κατά την ανάλυση LC-TOF-MS. Επίσης, η βενζοϋλοεκγονίνη, η οξαζεπάμη και η ατενολόνη εκχυλίστηκαν με ανάκτηση 1,2, 2,7 και 13%, αντιστοίχως, δίνοντας, όμως, χρωματογραφικές κορυφές με ικανοποιητικό ύψος της τάξης του 10^4 και 10^5 . Επίσης, οι ουσίες δεξαμεθαζόνη, μορφίνη και ακετονίδιο τριαμκινολόνης εμφάνισαν παρεμπόδιση από το υπόστρωμα, όπως φαίνεται και στο σχήμα 6.7. Τέλος, οι ουσίες φουροσεμίδιο, 5α-εστρανο-3β,17α-διόλη, φαινοβαρβιτάλη και φαινυλοβουταζόνη δεν ανιχνεύτηκαν καθόλου μέσω της ανάλυσης LC-TOF-MS. Άρα, μέσω της διαδικασίας Β'ί δεν ανιχνεύτηκαν, επιτυχώς, δεκατέσσερις ουσίες κι επιπλέον, παρατηρήθηκε αυξημένη επίδραση από το υπόστρωμα.

Με τη διαδικασία Β'ii, από τις έξι ουσίες που εξετάστηκαν, δεν ανιχνεύτηκαν καθόλου το βουμετανίδιο και το υδροχλωροθειαζίδιο, ενώ το φουροσεμίδιο παρουσίασε 7,6% ανάκτηση από εκχύλιση. Το αιθακρινικό οξύ ανιχνεύτηκε εφαρμόζοντας μεθυλο-παραγωγοποίηση και ανάλυση GC-MS, με ανάκτηση 54%, σε αντίθεση με τις άλλες δύο διαδικασίες Β'ί και Β'iii, όπου δεν ανιχνεύτηκε.

Μέσω της διαδικασίας Β'iii, ανιχνεύτηκαν οκτώ ουσίες από τις δεκαπέντε που εξετάστηκαν. Ομοίως με τη διαδικασία Β'ί, δεν εκχυλίστηκαν οι ουσίες: βουμετανίδιο, κλενβουτερόλη, φουροσεμίδιο, κετοπροφαίνιο και σαλβουταμόλη. Επίσης, η βενζοϋλοεκγονίνη ανιχνεύτηκε με χαμηλή ανάκτηση (3,8%), όπως και κατά τη διαδικασία Β'ί.

Συνοψίζοντας, με την εφαρμογή των διαδικασιών Β'ί, Β'ii και Β'iii προέκυψαν τα ακόλουθα:

- α) Οκτώ ουσίες δεν ανιχνεύτηκαν επιτυχώς από καμία διαδικασία Β'.
- β) Στη διαδικασία Β'ί παρατηρήθηκε αυξημένη επίδραση από το υπόστρωμα.
- γ) Συνολικά, ανιχνεύτηκαν λιγότερες ουσίες σε σύγκριση με τις διαδικασίες Α'.



Σχήμα 6.7. Χρωματογράφηματα των ουσιών δεξαμεθαζόνη, μορφίνη και ακετονίδιο τριαμκινολόνης σε λευκό και εμβολιασμένο δείγμα ούρων, εφαρμόζοντας τη διαδικασία Β΄ με εκχύλιση στερεάς φάσης, μεθανόλυση και ανάλυση LC-TOF-MS.

Παρόλα τα παραπάνω μειονεκτήματα των διαδικασιών Β΄, το στάδιο της μεθανόλυσης καθιστούσε απαραίτητη την παρουσία τους στην τελική μέθοδο που επρόκειτο να επιλεγεί, και κυρίως της διαδικασίας Β΄_{iii} για την ανίχνευση των αναβολικών στεροειδών που συζεύγνυνται με θειικό οξύ στη θέση 17β-OH, κατά τη β΄ φάση μεταβολισμού.

6.4.4 Αποτελέσματα διαδικασιών Γ'ἰ, Γ'ἱἱ, Γ'ἱἱἱ

Τα αποτελέσματα από την εφαρμογή των διαδικασιών Γ'ἰ, Γ'ἱἱ και Γ'ἱἱἱ παρουσιάζονται στον πίνακα 6.4. Στη διαδικασία Γ'ἰ, ένα μεγάλο μέρος των εξεταζόμενων ουσιών παρουσίασε ανάκτηση από εκχύλιση μεγαλύτερη από 100%. Επίσης, οι βασικές ουσίες ατενολόνη (pK_a 9,6) και βενζοϋλοεκγονίνη δεν εκχυλίστηκαν με την όξινη εκχύλιση. Παρομοίως, οι βασικές ουσίες μεθυλοφαινιδάτη (pK_a 8,9), μορφίνη (pK_a 8,0 και 9,9) και τερβουταλίνη (pK_a 8,0, 10,0 και 11,0) εκχυλίστηκαν με ανάκτηση 3,3, 5,3 και 9,1%, αντιστοίχως. Το αιθακρινικό οξύ δεν ανιχνεύτηκε, λόγω μη κατάλληλου ιοντισμού κατά την ανάλυση LC-TOF-MS. Επιπροσθέτως, οι ουσίες καφεΐνη και δεξαμεθαζόνη εμφάνισαν παρεμπόδιση από το υπόστρωμα (σχήμα 6.8). Άρα, για τη διαδικασία Γ'ἰ, παρατηρήθηκε αύξηση της ανάκτησης των όξινων ουσιών και μείωση της ανάκτησης των βασικών ουσιών, σε σύγκριση με τις διαδικασίες Α'ἰ, και Β'ἰ.

Με τη διαδικασία Γ'ἱἱ, δεν ανιχνεύτηκαν καθόλου το αιθακρινικό οξύ και το υδροχλωροθειαζίδιο. Οι υπόλοιπες τέσσερις εξεταζόμενες ουσίες εκχυλίστηκαν με ανάκτηση μεγαλύτερη από 86%.

Μέσω της διαδικασίας Γ'ἱἱἱ, δεν ανιχνεύτηκε καθόλου η ατενολόνη. Οι βασικές ουσίες βενζοϋλοεκγονίνη, σαλβουταμόλη και τερβουταλίνη εκχυλίστηκαν με ανάκτηση 2,7, 2,9 και 8,9%, αντιστοίχως. Αντίθετα, οι υπόλοιπες εξεταζόμενες ουσίες παρουσίασαν ανάκτηση από εκχύλιση μεγαλύτερη από 78%. Επίσης, επειδή ο μεταβολίτης β' φάσης της ουσίας 5α-εστρανο-3β,17α-διόλη δεν αποσυζεύγνυται μέσω της αλκαλικής υδρόλυσης, η συγκεκριμένη ουσία δε συμπεριελήφθη στις ανιχνευόμενες ουσίες.

Άρα, μέσω των διαδικασιών Γ' οι όξινες ουσίες, όπως ορισμένα διουρητικά και τα NSAID ανιχνεύτηκαν έχοντας καλύτερη ανάκτηση σε σχέση με τις διαδικασίες Α' και Β'. Ενδεικτικό είναι το παράδειγμα του βουμετανιδίου, το οποίο εμφάνισε ανάκτηση μεγαλύτερη από 92% με τις διαδικασίες Γ', ενώ στις διαδικασίες Α' και Β' δεν ανιχνεύτηκε καθόλου. Επίσης, οι βασικές ουσίες εκχυλίστηκαν με χαμηλή ή μηδενική ανάκτηση.

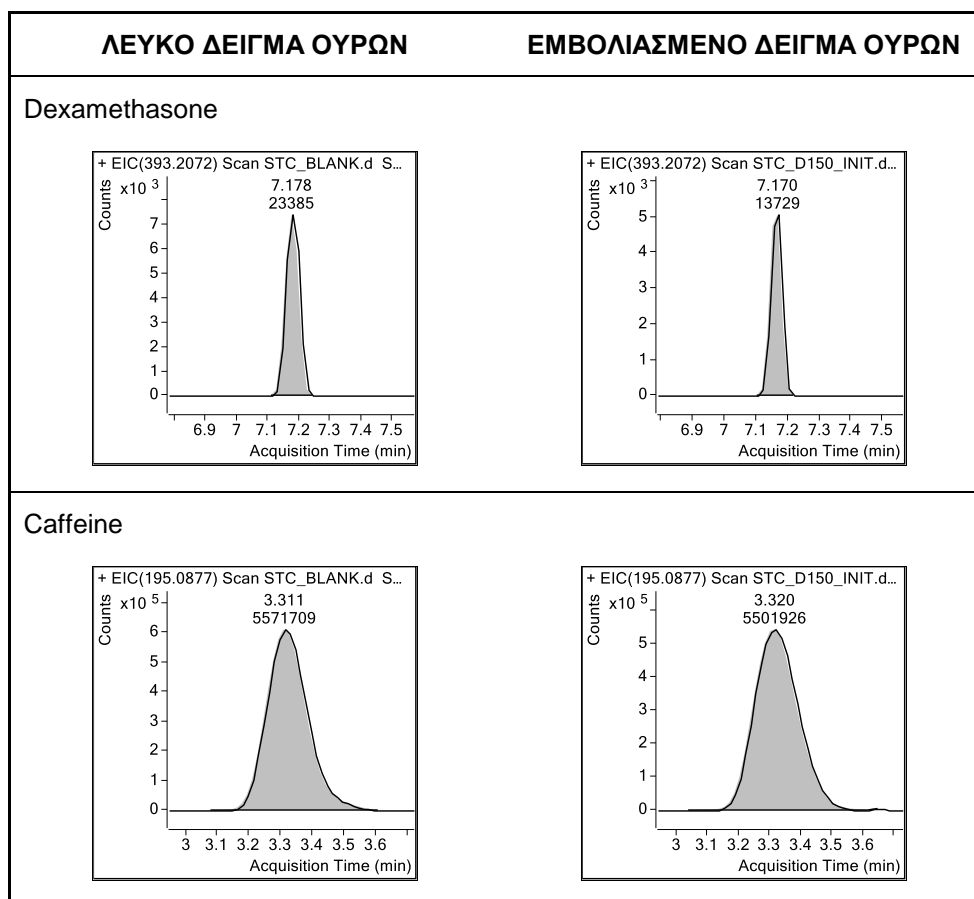
Πίνακας 6.4. Αποτελέσματα ανάκτησης από εκχύλιση των διαδικασιών Γ' i, Γ' ii και Γ' iii.

Ουσία	% ΑΝΑΚΤΗΣΗ ΑΠΟ ΕΚΧΥΛΙΣΗ		
	Διαδικασία Γ' i (LC-TOF-MS)	Διαδικασία Γ' ii (GC-MS)	Διαδικασία Γ' iii (GC-HRMS)
Amitriptyline	120		
Amphetamine	26		
Antipyrine	115		
Atenolol	0		-
Benzoylcegonine	0		2,7
Bumetanide	165	117	92
Butorphanol	127		
Caffeine	*		
Chlorpromazine	126		
Clenbuterol	257		78
Dexamethasone	*		
Ephedrine	-		
5α-Estran-3β,17α-diol	-		-
Ethacrynic Acid	0	-	64
Flufenamic acid	130		96
Flunixin	137		95
Furosemide	-	93	89
Guaifenesin	105		
Hydrochlorothiazide	87	-	
Ketoprofen	135		86
Lidocaine	136		
Meloxicam	130		
Mepivacaine	100		
Methocarbamol	115		
Methylphenidate	3,3		
Morphine	5,3		
Nikethamide	130		
Nordiazepam	143		
Oxazepam	147		
Pethidine	110		
Phenobarbital	-	114	79
Phenylbutazone	129	86	98
Salbutamol	-		2,9
Terbutaline	9,1		8,9
Timolol	88		46
Triamcinolone acetonide	115		

0 : Μηδενική ανάκτηση, δηλαδή η ουσία ανιχνεύτηκε μόνο στο δείγμα που εμβολιάστηκε στην οργανική σιβάδα, και όχι στο δείγμα που εμβολιάστηκε αρχικά στα ούρα.

* : Παρεμπόδιση από το υπόστρωμα.

- : Η ουσία δεν ανιχνεύτηκε ούτε στο αρχικώς εμβολιασμένο δείγμα στα ούρα ούτε στο τελικώς εμβολιασμένο δείγμα στην οργανική σιβάδα.

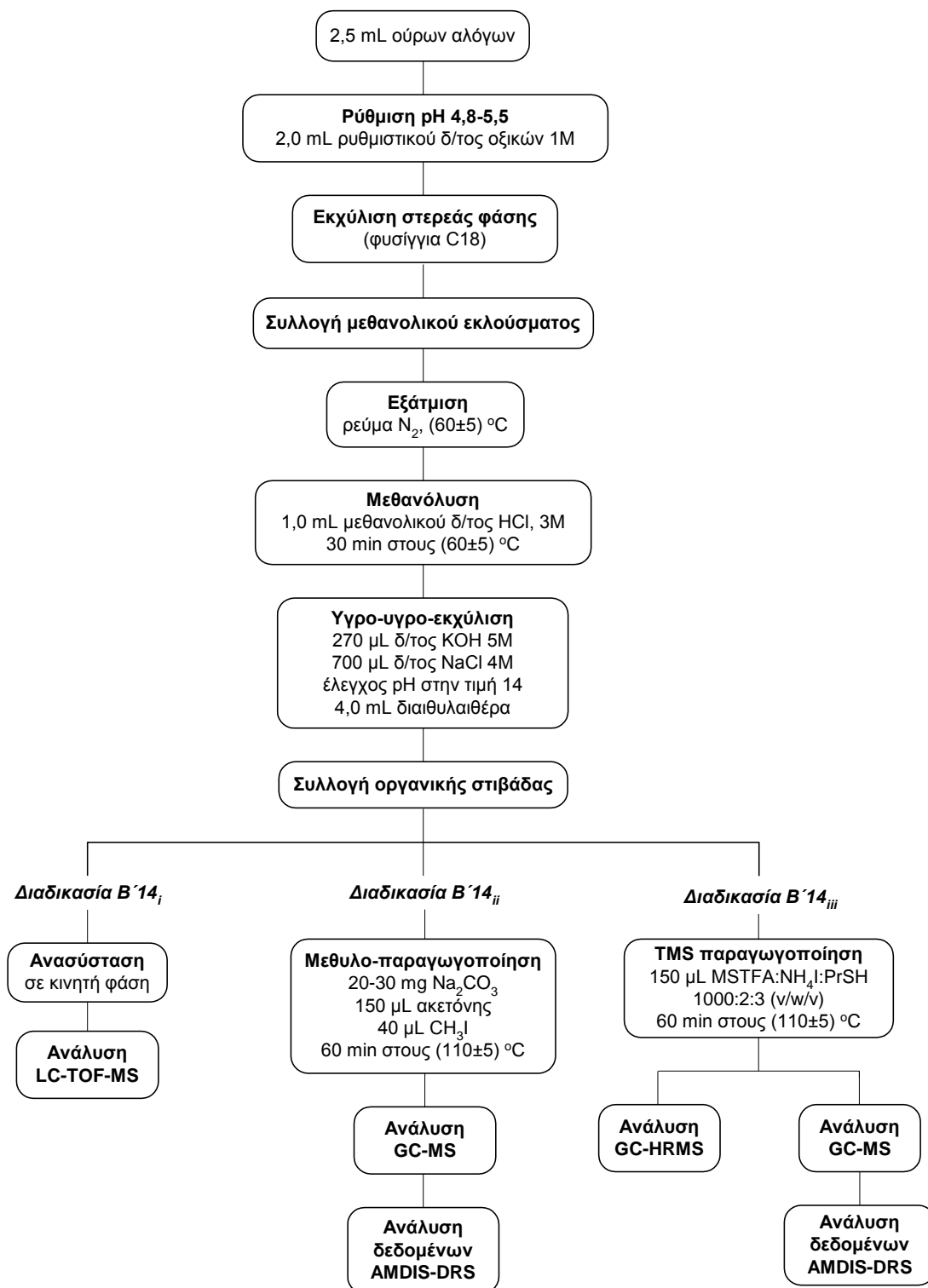


Σχήμα 6.8. Χρωματογράφηματα των ουσιών δεξαμεθαζόνη και καφεΐνη σε λευκό και εμβολιασμένο δείγμα ούρων, εφαρμόζοντας τη διαδικασία Γ΄ με βασική υδρόλυση, όξινη εκχύλιση και ανάλυση LC-TOF-MS.

6.4.5 Παρασκευαστική πορεία των διαδικασιών Β΄14

Σε επόμενο στάδιο, πραγματοποιήθηκε μια παραλλαγή των διαδικασιών Β΄, εκτελώντας την υγρο-υγρο-εκχύλιση με διαιθυλαιθέρα σε pH 14, αντί για pH 9,5-10, με προσθήκη διαλύματος KOH, 5 M¹²¹. Οι συγκεκριμένες διαδικασίες ονομάστηκαν Β΄14_i, Β΄14_{ii}, Β΄14_{iii}, και τα ακριβή παρασκευαστικά στάδια παρουσιάζονται στο σχήμα 6.9. Με την αύξηση του pH της εκχύλισης στην τιμή 14, δοκιμάστηκε να ληφθεί ένα πιο καθαρό εκχύλισμα έτσι, ώστε να μειωθεί η παρεμπόδιση από το υπόστρωμα κατά την ανάλυση των δειγμάτων, η οποία ενδεχομένως να βοηθούσε στην καλύτερη ανίχνευση των εξεταζόμενων ουσιών και ιδιαίτερως, των αναβολικών στεροειδών.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ B'14_i, B'14_{ii}, B'14_{iii}



Σχήμα 6.9. Παρασκευαστικά στάδια των διαδικασιών B'14_i, B'14_{ii}, B'14_{iii}, κατά την πρώτη φάση της ανάπτυξης μεθόδου.

6.4.6 Αποτελέσματα διαδικασιών B'14_i, B'14_{ii} και B'14_{iii}

Τα αποτελέσματα των διαδικασιών B'14_i, B'14_{ii} και B'14_{iii} παρουσιάζονται στον πίνακα 6.5. Κατά τη διαδικασία B'14_i, ανιχνεύτηκαν μόνο είκοσι δύο ουσίες. Επίσης, η καφεΐνη ανιχνεύτηκε, αλλά με παρεμπόδιση από το υπόστρωμα, οπότε η ανίχνευσή της θεωρήθηκε ανεπιτυχή. Επίσης, στο δείγμα που εμβολιάστηκε στην οργανική στιβάδα, οι ουσίες δεξαμεθαζόνη και μορφίνη δεν εμφάνισαν παρεμπόδιση από το υπόστρωμα, όπως στη διαδικασία B'1. Οι εν λόγω ουσίες, όμως, δεν κατέστη δυνατό να ανιχνευτούν και στο δείγμα που εμβολιάστηκε αρχικά στα ούρα, επειδή δεν εκχυλίστηκαν με την υγρο-υγρο-εκχύλιση σε pH 14. Αντίθετα, στο ακετονίδιο τριαμκινολόνης δεν παρατηρήθηκε παρεμπόδιση από το υπόστρωμα, όπως συνέβη κατά τη εφαρμογή της διαδικασίας B'1, και η ουσία ανιχνεύτηκε έχοντας εκχύλιση από ανάκτηση 60%. Επιπλέον, στο σχήμα 6.10 παρατίθενται τα χρωματογραφήματα ολικών ιόντων των λευκών δειγμάτων που ελήφθησαν από τις διαδικασίες B'1 και B'14_i, από όπου προκύπτει ότι εφαρμόζοντας τις δύο μεθόδους δεν υπάρχουν διαφορές στο υπόστρωμα. Άρα, δεν ελήφθησαν καλύτερα αποτελέσματα, μέσω της διαδικασίας B'14_i σε σύγκριση με την αντίστοιχη διαδικασία B'1.

Στη συνέχεια, μέσω της διαδικασίας B'14_{ii} ανιχνεύτηκαν δύο από τις έξι εξεταζόμενες ουσίες. Επίσης, μέσω της διαδικασίας B'14_{iii} ανιχνεύτηκαν επτά από τις δεκαπέντε εξεταζόμενες ουσίες. Και με τις δύο διαδικασίες ανιχνεύτηκαν λιγότερες ουσίες από αυτές που ανιχνεύτηκαν με τις αντίστοιχες διαδικασίες B'1_{ii} και B'1_{iii}.

Ομοίως προς τις διαδικασίες B', οι ουσίες βουμετανίδιο, κλενβουτερόλη, σαλβουταμόλη και υδροχλωροθειαζίδιο δεν ανιχνεύτηκαν, επιτυχώς, ούτε από τις διαδικασίες B'14. Αντίθετα, οι ουσίες οξαζεπάμη, φαινοβαρβιτάλη, τερβουταλίνη και φουροσεμίδιο δεν ανιχνεύτηκαν μέσω των διαδικασιών B'14, λόγω μηδενικής ανάκτησης, ενώ είχαν ανιχνευτεί μέσω των διαδικασιών B'. Όσον αφορά στο κετοπροφαίνιο, το οποίο δεν ανιχνεύτηκε μέσω των διαδικασιών B', ανιχνεύτηκε με τη διαδικασία B'14_{iii}, έχοντας, όμως, ανάκτηση από εκχύλιση 2,6%. Επίσης, η 5α-εστρανο-3β,17α-διόλη δεν ανιχνεύτηκε με αύξηση του pH της εκχύλισης και μέσω της ανάλυσης LC-TOF-MS.

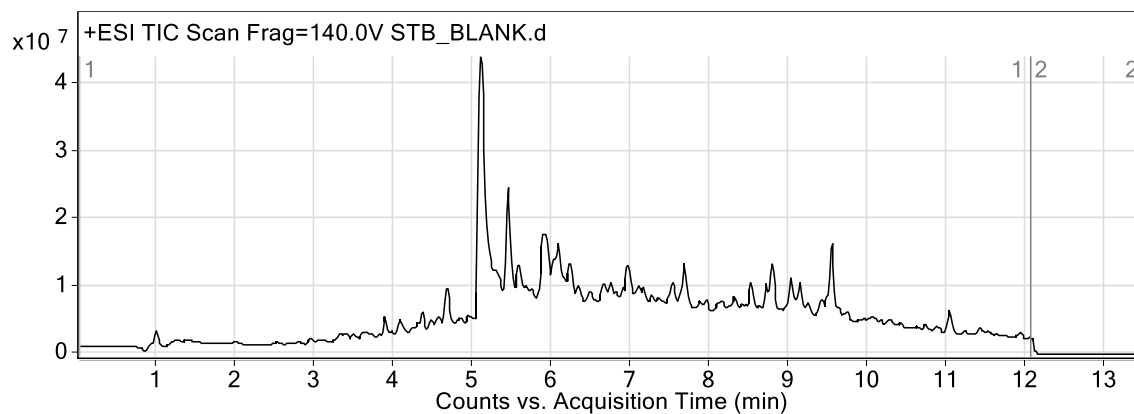
Πίνακας 6.5. Αποτελέσματα ανάκτησης από εκχύλιση διαδικασιών Β'14_i, Β'14_{ii}, Β'14_{iii}.

Ουσία	% ΑΝΑΚΤΗΣΗ ΑΠΟ ΕΚΧΥΛΙΣΗ		
	Διαδικασία Β'14 _i (LC-TOF-MS)	Διαδικασία Β'14 _{ii} (GC-MS)	Διαδικασία Β'14 _{iii} (GC-HRMS)
Amitriptyline	55		
Amphetamine	95		
Antipyrine	76		
Atenolol	22		
Benzoylcegonine	3,7		3,5
Bumetanide	0	-	0
Butorphanol	85		
Caffeine	*		
Chlorpromazine	30		
Clenbuterol	0		0
Dexamethasone	0		
Ephedrine	90		
5α-Estran-3β,17α-diol	-		81
Ethacrynic Acid	18	152	-
Flufenamic acid	52		57
Flunixin	89		68
Furosemide	-	0	0
Guaifenesin	59		
Hydrochlorothiazide	0	0	
Ketoprofen	0		2,6
Lidocaine	91		
Meloxicam	42		
Mepivacaine	87		
Methocarbamol	66		
Methylphenidate	93		
Morphine	0		
Nikethamide	88		
Nordiazepam	46		
Oxazepam	0		
Pethidine	88		
Phenobarbital	-	0	0
Phenylbutazone	0	75	38
Salbutamol	0		0
Terbutaline	0		-
Timolol	85		77
Triamcinolone acetonide	60		

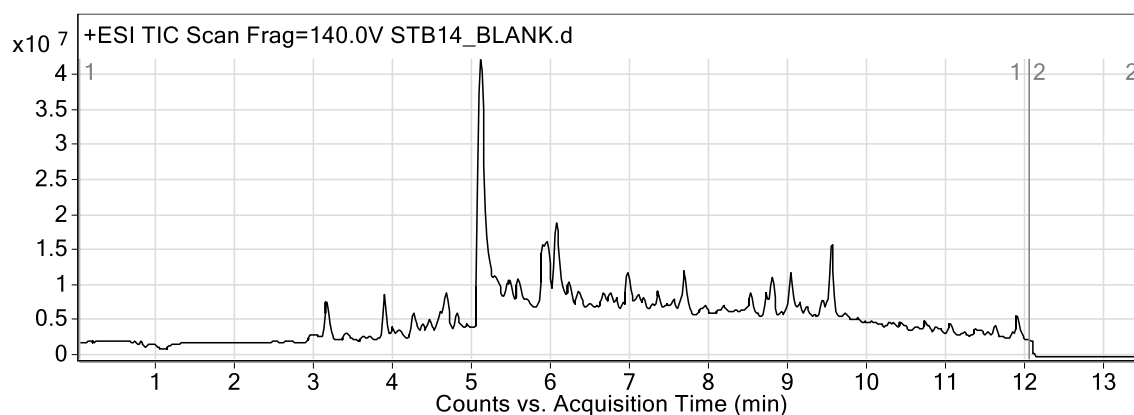
0 : Μηδενική ανάκτηση, δηλαδή η ουσία ανιχνεύτηκε μόνο στο δείγμα που εμβολιάστηκε στην οργανική σιβάδα, και όχι στο δείγμα που εμβολιάστηκε αρχικά στα ούρα.

* : Παρεμπόδιση από το υπόστρωμα.

- : Η ουσία δεν ανιχνεύτηκε ούτε στο αρχικώς εμβολιασμένο δείγμα στα ούρα ούτε στο τελικώς εμβολιασμένο δείγμα στην οργανική σιβάδα.



α



β

Σχήμα 6.10. Χρωματογράφημα ολικών ιόντων λευκών δειγμάτων, κατόπιν εφαρμογής των διαδικασιών α) Β' και β) Β'14_i.

Συνοψίζοντας, η αύξηση του pH της υγρο-υγρο εκχύλισης στις διαδικασίες Β'14 δεν είχε τα αναμενόμενα αποτελέσματα, καθώς δε μειώθηκε αποτελεσματικά η επίδραση από το υπόστρωμα, ώστε να ανιχνεύονται περισσότερες ουσίες. Αντίθετα, ανιχνεύτηκαν λιγότερες ουσίες συγκριτικά με τις διαδικασίες Β'. Έτσι, η συγκεκριμένη δοκιμή απορρίφθηκε.

6.4.7 Δοκιμή όξινης υδρόλυσης – παρασκευαστικά στάδια

Σε αυτό το τμήμα της ανάπτυξης μεθόδου δοκιμάστηκε να αντικατασταθεί η μεθανόλυση από την όξινη υδρόλυση. Εξετάστηκε, δηλαδή, αν είναι δυνατόν να υδρολυθούν με όξινη υδρόλυση οι εστέρες του θειικού οξέος που σχηματίζονται κατά τη β' φάση μεταβολισμού των αναβολικών στεροειδών. Η δοκιμή έλαβε χώρα σε τρία διαφορετικά δείγματα ούρων αλόγων, όγκου 2,5

mL, προσθέτοντας 100 μ L θειική ανδροστερόνη (5 μ g/mL). Η όξινη υδρόλυση περιελάμβανε προσθήκη 50 mg κυστεΐνης, 250 μ L διαλύματος HCl 6,0 M και επώαση στους (100 \pm 2) $^{\circ}$ C για 30 min. Μετά το πέρας της επώασης και αφού τα δείγματα επανήλθαν σε θερμοκρασία δωματίου, το pH των ούρων ρυθμίστηκε στην περιοχή 9,5 - 10, προσθέτοντας 250 μ L NaOH 6,0 M και 2 g στερεού ρυθμιστικού μίγματος NaHCO₃:Na₂CO₃ (10:1 w/w). Έπειτα, έλαβε χώρα υγρο-υγρο-εκχύλιση με 4,0 mL διαιθυλαιθέρα και 1,5 g άνυδρου Na₂SO₄. Ακολούθησε ανακίνηση και φυγοκέντρηση (2000 rpm) για 10 min. Στην οργανική φάση που συλλέχθηκε, προστέθηκαν 50 μ L διαλύματος μεθυλοτεστοστερόνης ως εσωτερικό πρότυπο και ακολούθησε εξάτμιση μέχρι ξηρού στους (50 \pm 5) $^{\circ}$ C. Στο ξηρό υπόλειμμα πραγματοποιήθηκε TMS-παραγωγοποίηση με προσθήκη 150 μ L μίγματος MSTFA:NH₄I:PrSH (1000:2:3 v/w/v) και επώαση στους (110 \pm 5) $^{\circ}$ C για 60 min. Τα παραγωγοποιημένα δείγματα υποβλήθηκαν σε ανάλυση GC-HRMS .

6.4.8 Αποτελέσματα όξινης υδρόλυσης

Η αποτελεσματικότητα της δοκιμής της όξινης υδρόλυσης αξιολογήθηκε, ελέγχοντας αν αποσυζεύκτηκε η θειική ανδροστερόνη που προστέθηκε στα ούρα. Καταρχήν, ελέγχθηκε το εσωτερικό πρότυπο bis-TMS-μεθυλοτεστοστερόνη, το οποίο εκλούστηκε στον αναμενόμενο χρόνο (9,30 min) και με ικανοποιητικό εμβαδόν χρωματογραφικής κορυφής (> 2,0 \times 10⁷). Στη συνέχεια, από τα λαμβανόμενα χρωματογραφήματα προέκυψε ότι η bis-TMS-ανδροστερόνη δεν ανιχνεύτηκε σε κανένα από τα τρία δείγματα ούρων. Ελέγχθηκε και η mono-TMS-ανδροστερόνη, η οποία, επίσης, δεν ανιχνεύτηκε. Άρα, η θειική ανδροστερόνη δεν αποσυζεύκτηκε με την εν λόγω διαδικασία. Έτσι, η όξινη υδρόλυση δεν κρίθηκε κατάλληλη για την αποσύζευξη των μεταβολικών των αναβολικών στεροειδών που ήταν συζευγμένα με θειικό οξύ. Άρα, η όξινη υδρόλυση δε θα μπορούσε να αντικαταστήσει τη μεθανόλυση.

6.4.9 Συμπεράσματα πρώτης φάσης ανάπτυξης μεθόδου

Τα αποτελέσματα του πρώτου τμήματος της ανάπτυξης μεθόδου συνοψίζονται στον πίνακα 6.6. Σε αυτόν παρατίθενται ο συνολικός αριθμός των εξεταζόμενων ουσιών που ανιχνεύτηκαν χωρίς παρεμπόδιση από το υπόστρωμα, στο δείγμα που εμβολιάστηκε αρχικά στα ούρα. Επιπλέον, παρουσιάζονται ο μέσος όρος της ανάκτησης των ανιχνευόμενων ουσιών της κάθε διαδικασίας, όπως επίσης και το εύρος της ανάκτησης στην κάθε διαδικασία.

Μεταξύ των διαδικασιών που περιελάμβαναν ανάλυση LC-TOF-MS, ξεχώρισε η διαδικασία Α'ἰ, καθώς με αυτήν ανιχνεύτηκαν, επιτυχώς, οι περισσότερες ουσίες (τριάντα). Οι αποτυχίες της εν λόγω διαδικασίας αφορούσαν, κυρίως, στις όξινες ουσίες που είτε εκχυλίζονταν δύσκολα υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες εκχύλισης (πχ βουμετανίδιο, αιθακρινικό οξύ) είτε ιοντίζονταν δύσκολα υπό θετικό ESI ιοντισμό (πχ αιθακρινικό οξύ, φουροσεμίδιο, φαινοβαρβιτάλη). Οι όξινες ουσίες ανιχνεύτηκαν μέσω της διαδικασίας Γ'ἰ, έχοντας αυξημένη ανάκτηση. Όπως αναφέρεται και στον πίνακα 6.6, στις διαδικασίες Α'ἰ, Β'ἰ και Γ'ἰ παρατηρήθηκαν αδικαιολόγητα υψηλά ποσοστά ανάκτησης σε μεμονωμένες ουσίες που αποδόθηκαν σε τυχαία σφάλματα.

Μεταξύ των διαδικασιών που περιλάμβαναν μεθυλο-παραγωγοποίηση και ανάλυση GC-MS, ξεχώρισε η διαδικασία Γ'ἱἱ, λόγω ψηλότερου ποσοστού ανάκτησης, καθώς τόσο στη διαδικασία αυτή όσο και στη διαδικασία Β'ἱἱ ανιχνεύτηκε ο ίδιος αριθμός ουσιών (τέσσερις).

Όσον αφορά στις διαδικασίες που περιελάμβαναν TMS-παραγωγοποίηση και ανάλυση GC-HRMS, ο μεγαλύτερος αριθμός ανιχνευόμενων ουσιών (δεκατρείς) παρατηρήθηκε στις διαδικασίες Α'ἱἱἱ και Γ'ἱἱἱ. Παρόλα αυτά, η πιο σημαντική διαδικασία ήταν η Β'ἱἱἱ, επειδή μόνο μέσω αυτής υδρολύονται ορισμένα αναβολικά στεροειδή, όπως έχει ήδη αναφερθεί. Για αυτό το λόγο, στο δεύτερο μέρος της ανάπτυξης μεθόδου, δοκιμάστηκε να αυξηθεί ο αριθμός των ανιχνευόμενων ουσιών της διαδικασίας Β'ἱἱἱ, με ανάμιξη των οργανικών φάσεων.

Πίνακας 6.6. Συνολικά αποτελέσματα πρώτης φάσης ανάπτυξης μεθόδου που αφορούν α) στο συνολικό αριθμό των ανιχνευόμενων ουσιών από την κάθε διαδικασία, β) στο μέσο όρο της επί τοις εκατό ανάκτησης από εκχύλιση των ανιχνευόμενων ουσιών και γ) στο εύρος της επί τοις εκατό ανάκτησης από εκχύλιση.

Διαδικασία	Αριθμός ανιχνευόμενων ουσιών (% μέση ανάκτηση) (εύρος % ανάκτησης)		
	i	ii	iii
A'	30 (78*) (13-114)	3 (57) (50-68)	13 (58) (6,8-88)
B'	23 (65**) (1,2-110)	4 (38) (7,6-54)	8 (59) (3,8-100)
B'14	22 (65) (3,7-95)	2 (114) (75-152)	7 (47) (2,6-81)
Γ'	26 (103***) (3,3-147)	4 (103) (86-117)	13 (64) (2,7-98)

i: Ανασύσταση του ξηρού υπολείμματος και ανάλυση LC-TOF-MS.

ii: Μεθυλο-παραγωγοποίηση και ανάλυση GC-MS .

iii: TMS-παραγωγοποίηση και ανάλυση GC-HRMS .

*Στον υπολογισμό του μέσου όρου ανάκτησης δε συμπεριελήφθησαν οι ουσίες χλωροπρομαζίνη και δεξαμεθαζόνη που εμφάνισαν ανάκτηση μεγαλύτερη από 138%.

**Στον υπολογισμό του μέσου όρου ανάκτησης δε συμπεριελήφθησαν οι ουσίες αμφεταμίνη και εφεδρίνη που εμφάνισαν ανάκτηση μεγαλύτερη από 169%.

***Στον υπολογισμό του μέσου όρου ανάκτησης δε συμπεριελήφθησαν οι ουσίες βουμετανίδιο και κλενβουτερόλη που εμφάνισαν ανάκτηση μεγαλύτερη από 165%.

6.5 Δεύτερο μέρος ανάπτυξης μεθόδου

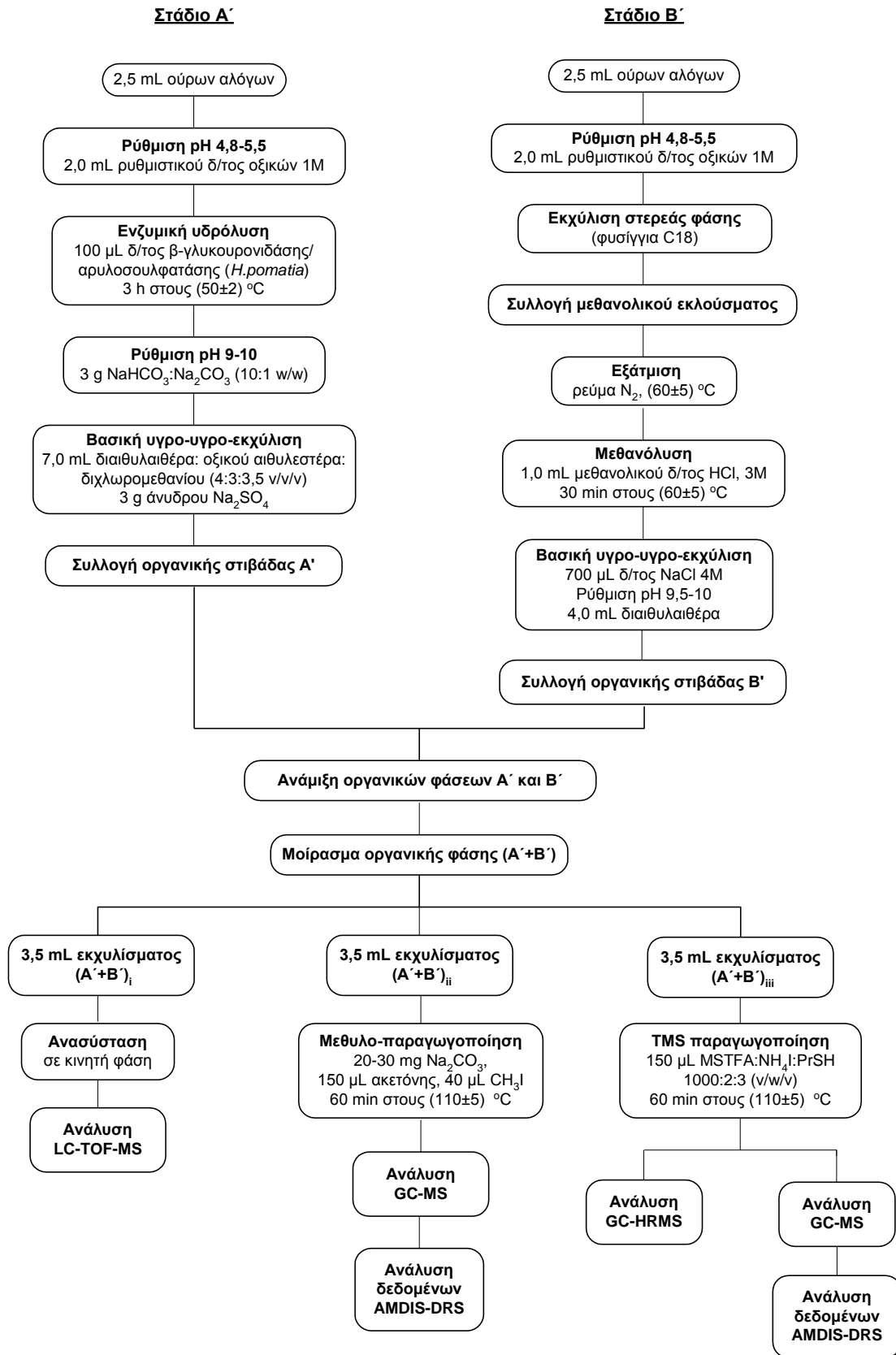
6.5.1 Εισαγωγή - Πρόλογος

Στο δεύτερο μέρος της ανάπτυξης μεθόδου συνδυάστηκαν οι πορείες που εξετάστηκαν στην πρώτη φάση, οπότε αναμίχθηκαν ανά δύο και όλες μαζί οι οργανικές φάσεις που προέκυψαν από τις υγρο-υγρο-εκχυλίσεις. Το μίγμα των οργανικών φάσεων μοιράστηκε σε τρία ίσα μέρη και το καθένα από αυτά προετοιμάστηκε καταλλήλως, ώστε να υποβληθεί αντιστοίχως στις τρεις αναλύσεις.

6.5.2 Παρασκευαστικά στάδια διαδικασιών (A'+B')_{i,ii,iii}

Τα παρασκευαστικά στάδια των διαδικασιών (A'+B') παρουσιάζονται στο σχήμα 6.11. Στις διαδικασίες (A'+B') εκτελέστηκαν οι διαδικασίες A' και B'

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ (A'+B')_{i,ii,iii}



Σχήμα 6.11. Παρασκευαστικά στάδια των διαδικασιών (A'+B')_i, (A'+B')_{ii}, (A'+B')_{iii}, κατά τη δεύτερη φάση της ανάπτυξης μεθόδου.

μέχρι το στάδιο της υγρο-υγρο-εκχύλισης. Κατόπιν, οι δύο οργανικές φάσεις αναμίχθηκαν και στη συνέχεια, μοιράστηκαν σε τρεις κωνικούς σωλήνες. Στη διαδικασία (A'+B')_i η οργανική φάση εξατμίστηκε σε ρεύμα αζώτου και ακολούθησε ανασύσταση σε 300 μL κινητής φάσης και ανάλυση LC-TOF-MS. Στη διαδικασία (A'+B')_{ii} έλαβε χώρα εξάτμιση της οργανικής φάσης σε ρεύμα αζώτου, μεθυλο-παραγωγοποίηση, ανάλυση GC-MS και τέλος, ανάλυση των δεδομένων, μέσω των προγραμμάτων AMDIS-DRS. Στη διαδικασία (A'+B')_{iii} πραγματοποιήθηκε εξάτμιση της οργανικής φάσης σε ρεύμα αζώτου, TMS-παραγωγοποίηση, ανάλυση GC-HRMS και τέλος, ανάλυση GC-MS για ανάλυση των δεδομένων, μέσω των προγραμμάτων AMDIS-DRS.

6.5.3 Αποτελέσματα διαδικασιών (A'+B')_{i,ii,iii}

Τα αποτελέσματα των διαδικασιών (A'+B')_i, (A'+B')_{ii} και (A'+B')_{iii} παρατίθενται στον πίνακα 6.7. Με τη διαδικασία (A'+B')_i δεν εκχυλίστηκαν το αιθακρινικό οξύ, η κλενβουτερόλη και η φαινυλοβουταζόνη. Οι δύο τελευταίες ουσίες είχαν ανιχνευτεί με τη διαδικασία A'_i, ενώ δεν είχαν ανιχνευτεί με τη διαδικασία B'_i. Άρα, η ανάμιξη των οργανικών φάσεων συνέβαλε αρνητικά στην ανίχνευσή τους, σε σχέση με την επικρατέστερη διαδικασία A'_i της πρώτης φάσης. Επίσης, το υδροχλωροθειαζίδιο ανιχνεύτηκε με 28% ανάκτηση, χωρίς όμως ικανοποιητικό σήμα ανιχνευτή, καθώς το ύψος της χρωματογραφικής κορυφής ήταν μόνο 8×10². Επιπλέον, η παρεμπόδιση από το υπόστρωμα για την καφεΐνη μειώθηκε, ενώ για τη μορφίνη αυξήθηκε, συγκρίνοντας με τα δεδομένα της διαδικασίας A'_i. Έπειτα, οι ουσίες βουμετανίδιο, 5α-εστρανο-3β,17α-διόλη, φουροσεμίδιο και φαινοβαρβιτάλη που δεν είχαν ανιχνευτεί, επιτυχώς, κατά τη διαδικασία A'_i, εξακολούθησαν να μην ανιχνεύονται και με τη διαδικασία (A'+B')_i. Άρα, με την ανάμιξη των οργανικών φάσεων μειώθηκε ο αριθμός των ανιχνευόμενων ουσιών κατά την ανάλυση LC-TOF-MS, σε σχέση με τη διαδικασία A'_i. Έγινε σύγκριση, κυρίως, με τη διαδικασία A'_i, επειδή από αυτή είχε προκύψει ο μεγαλύτερος αριθμός ανιχνευόμενων ουσιών, ενώ μέσω της διαδικασίας B'_i είχαν ανιχνευτεί οι λιγότερες ουσίες.

Μέσω της διαδικασίας (A'+B')_{ii} ανιχνεύτηκαν τέσσερις ουσίες, που ήταν οι ίδιες με αυτές που είχαν ανιχνευτεί και με τη διαδικασία B'_{ii}, με κάποιες

Πίνακας 6.7. Αποτελέσματα ανάκτησης από εκχύλιση των διαδικασιών (A'+B')_i, (A'+B')_{ii} και (A'+B')_{iii}. Όπου *: Παρεμπόδιση από το υπόστρωμα, 0: Μηδενική ανάκτηση, -: Μη ανίχνευση της ουσίας ούτε στο αρχικό ούτε στο τελικό εμβολιασμένο δείγμα.

Ουσία	% ΑΝΑΚΤΗΣΗ ΑΠΟ ΕΚΧΥΛΙΣΗ		
	Διαδικασία (A'+B') _i (LC-TOF-MS)	Διαδικασία (A'+B') _{ii} (GC-MS)	Διαδικασία (A'+B') _{iii} (GC-HRMS)
Amitriptyline	62		
Amphetamine	74		
Antipyrine	71		
Atenolol	52		-
Benzoyllecgonine	13		27
Bumetanide	-	-	-
Butorphanol	74		
Caffeine	61		
Chlorpromazine	51		
Clenbuterol	0		59
Dexamethasone	41		
Ephedrine	75		
5α-Estran-3β,17α-diol	-		70
Ethacrynic Acid	0	18	7,0
Flufenamic acid	52		70
Flunixin	63		74
Furosemide	-	13	10
Guaifenesin	65		
Hydrochlorothiazide	28	-	
Ketoprofen	13		18
Lidocaine	68		
Meloxicam	50		
Mepivacaine	67		
Methocarbamol	66		
Methylphenidate	55		
Morphine	*		
Nikethamide	99		
Nordiazepam	74		
Oxazepam	51		
Pethidine	58		
Phenobarbital	-	52	67
Phenylbutazone	0	36	66
Salbutamol	43		40
Terbutaline	64		43
Timolol	80		86
Triamcinolone acetonide	58		

διαφορές, βέβαια, στην ανάκτηση, λόγω της ανάμιξης των οργανικών φάσεων.

Με τη διαδικασία $(A'+B')_{iii}$ ανιχνεύτηκαν οι δεκατρείς ουσίες που είχαν ανιχνευτεί και με τη διαδικασία A'_{iii} , με μέσο όρο ανάκτησης 49% στην πρώτη περίπτωση και 58% στη δεύτερη. Επίσης, η ανάμιξη των οργανικών στιβάδων συνέβαλε στην ανίχνευση πέντε ουσιών περισσότερων σε σχέση με την αντίστοιχη διαδικασία B'_{iii} , στην οποία ο μέσος όρος ανάκτησης ήταν 59%.

Αν τα αποτελέσματα των διαδικασιών $(A'+B')_{i,ii,iii}$ αξιολογηθούν συμπληρωματικά, τότε προκύπτουν τα ακόλουθα συμπεράσματα: Η αποτυχία ανίχνευσης της κλενβουτερόλης και της 5α-εστρανο-3β,17α-διόλης, μέσω της διαδικασίας $(A'+B')_i$, θα μπορούσε να καλυφθεί από την ανίχνευσή τους, μέσω της διαδικασίας $(A'+B')_{iii}$. Επίσης, οι ουσίες αιθακρινικό οξύ, φουροσεμίδιο και φαινοβαρβιτάλη που δεν ανιχνεύονταν μέσω της διαδικασίας $(A'+B')_i$, θα μπορούσαν να ανιχνευτούν μέσω των διαδικασιών $(A'+B')_{ii}$ και $(A'+B')_{iii}$. Σε αντίθεση, όμως, με τα παραπάνω, το βουμετανίδιο δεν ανιχνεύτηκε από καμία διαδικασία $(A'+B')$. Επιπροσθέτως, η μορφίνη δεν ανιχνεύτηκε επιτυχώς, καθώς παρατηρήθηκε παρεμπόδιση από το υπόστρωμα κατά τη διαδικασία $(A'+B')_i$.

Από όλα τα παραπάνω προέκυψε το συμπέρασμα ότι η ανάμιξη των οργανικών φάσεων A' και B' δε συνέβαλε στην αύξηση του αριθμού των ανιχνευόμενων ουσιών μέσω της ανάλυσης LC-TOF-MS, συγκρίνοντας με τη διαδικασία A'_i , με την οποία είχαν ανιχνευτεί οι περισσότερες ουσίες. Αντίθετα, στην προκειμένη περίπτωση ανιχνεύτηκαν δύο ουσίες λιγότερες, σε σχέση με τη διαδικασία A'_i . Επίσης, με την ανάμιξη των οργανικών φάσεων και την ανάλυση GC-HRMS δεν ανιχνεύτηκαν περισσότερες ουσίες από αυτές που είχαν ανιχνευτεί με τη διαδικασία A'_{iii} , δηλαδή, περισσότερες από δεκατρείς. Σε μια πιο ευρεία προσέγγιση, όμως, με την ανάμιξη των εκχυλισμάτων, η οργανική φάση A' εμπλουτίζεται με την οργανική φάση B' , η οποία είναι δυνατόν να περιέχει αναβολικά στεροειδή, των οποίων οι μεταβολίτες β' φάσης αποσυζεύγνυνται μόνο μέσω της μεθανόλυσης. Άρα, η ανάμιξη είναι προτιμότερη για την ανάλυση GC-HRMS, λαμβάνοντας υπόψη και το γεγονός ότι από τη διαδικασία B'_{iii} ανιχνεύτηκαν μόνο οκτώ ουσίες από τις

δεκαπέντε. Τέλος, το βουμετανίδιο δεν ανιχνεύτηκε από καμία από τις τρεις διαδικασίες (A'+B').

6.5.4 Διαδικασίες (A'+Γ')_{i,ii,iii}

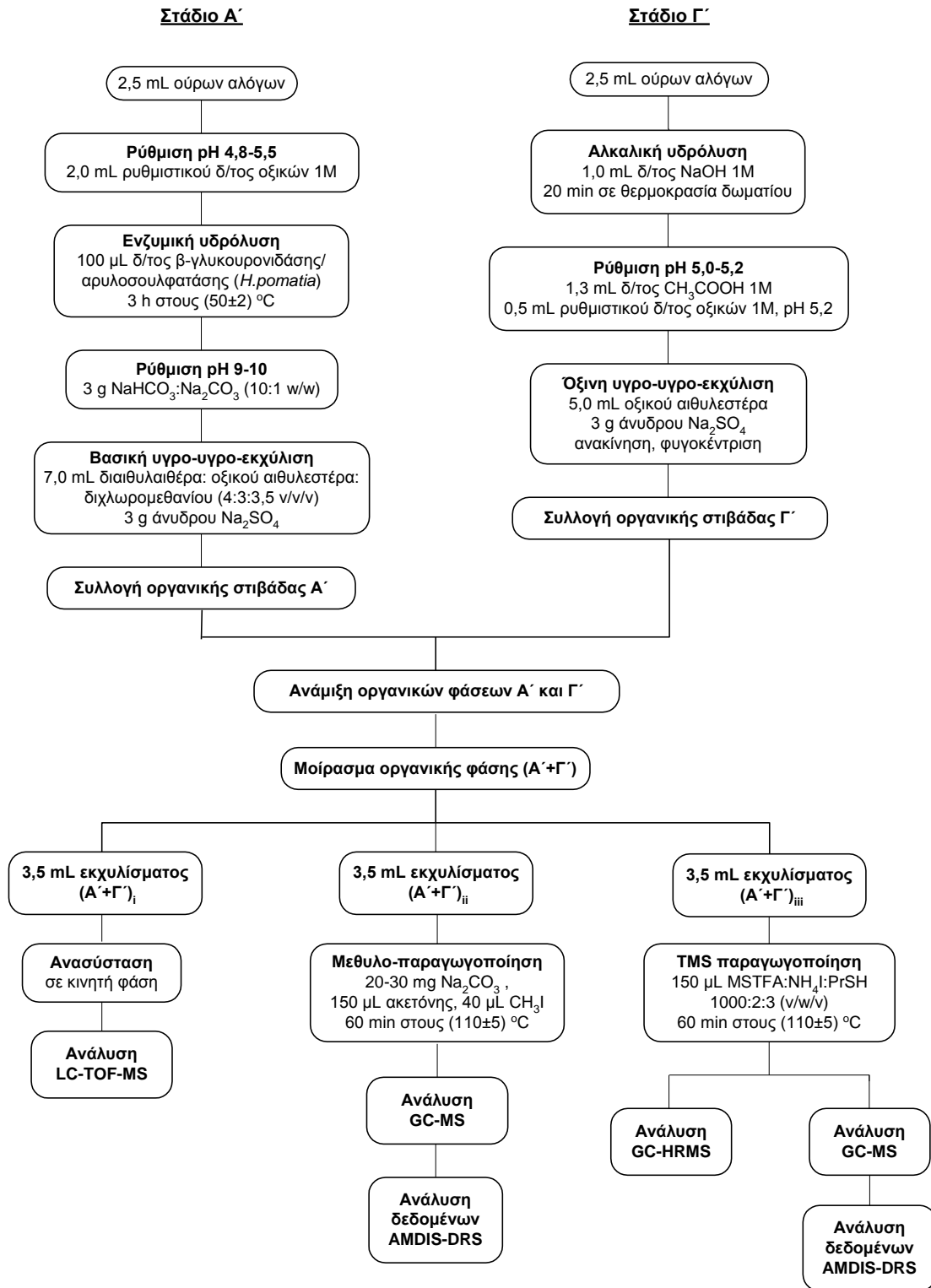
Στις διαδικασίες (A'+Γ') εκτελέστηκαν οι διαδικασίες A' και Γ' μέχρι το στάδιο της υγρο-υγρο-εκχύλισης και στη συνέχεια, ακολουθήθηκαν τα στάδια, όπως περιγράφονται στο σχήμα 6.12.

Τα αποτελέσματα των διαδικασιών (A'+Γ')_i, (A'+Γ')_{ii} και (A'+Γ')_{iii} παρατίθενται στον πίνακα 6.8. Στις διαδικασίες (A'+Γ') αναμίχθηκε α) ένα εκχύλισμα προερχόμενο από μια γενική εκχύλιση, μέσω της οποίας παραλαμβάνονταν απαγορευμένες ουσίες διαφόρων κατηγοριών και β) ένα εκχύλισμα λαμβανόμενο από όξινη εκχύλιση που στόχο είχε, κυρίως, τις όξινες ουσίες. Άρα, με την ανάμιξη αυτών αναμένεται να ενισχυθεί η ανίχνευση των όξινων ουσιών. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, από την εφαρμογή της διαδικασίας (A'+Γ')_i ανιχνεύτηκαν επιτυχώς τριάντα ουσίες, μεταξύ των οποίων ήταν οι όξινες ουσίες βουμετανίδιο με 34% ανάκτηση και φαινυλοβουταζόνη (pK_a 4,5) με 70% ανάκτηση. Η καφεΐνη ανιχνεύτηκε μέσω της τεχνικής LC-TOF-MS, με επίδραση, όμως, από το υπόστρωμα, όπως είχε παρατηρηθεί και σε άλλες διαδικασίες. Έτσι, η καφεΐνη δε συμπεριελήφθηκε στις επιτυχώς ανιχνευόμενες ουσίες, μέσω της διαδικασίας (A'+Γ')_i. Επίσης, με την ανάμιξη των εκχυλισμάτων παρατηρήθηκε μείωση στο ποσοστό της ανάκτησης ορισμένων βασικών ουσιών, όπως αμφεταμίνη (pK_a 9,9), ατενολόνη (pK_a 9,6), μορφίνη (pK_a 8,0 και 9,9) και σαλβουταμόλη, σε σχέση με τη διαδικασία A'_i. Επιπροσθέτως, το δεξαμεθαζόνη δεν ανιχνεύτηκε στο δείγμα που εμβολιάστηκε στην αρχή, ενώ είχε ανιχνευτεί κατά τη διαδικασία A'_i.

Μέσω της διαδικασίας (A'+Γ')_{ii} ανιχνεύτηκαν τρεις από τις έξι ουσίες. Το βουμετανίδιο δεν ανιχνεύτηκε με την ανάμιξη των εκχυλισμάτων, ενώ είχε ανιχνευτεί μέσω της διαδικασίας Γ'_{ii}. Άρα, η ανάμιξη των συγκεκριμένων εκχυλισμάτων εμπόδισε την ανίχνευση του βουμετανιδίου μέσω της τεχνικής GC-MS.

Όσον αφορά στη διαδικασία (A'+Γ')_{iii}, η ανάμιξη των οργανικών φάσεων συνέβαλε στην ανίχνευση περισσότερων ουσιών, σε σχέση με τις

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ (A'+Γ')_{i,ii,iii}



Σχήμα 6.12. Παρασκευαστικά στάδια των διαδικασιών (A'+Γ')_i, (A'+Γ')_{ii}, (A'+Γ')_{iii}, κατά τη δεύτερη φάση της ανάπτυξης μεθόδου.

Πίνακας 6.8. Αποτελέσματα ανάκτησης από εκχύλιση των διαδικασιών (A'+Γ')_i, (A'+Γ')_{ii} και (A'+Γ')_{iii}. Όπου *: Παρεμπόδιση από το υπόστρωμα, 0: Μηδενική ανάκτηση, -: Μη ανίχνευση της ουσίας ούτε στο αρχικό ούτε στο τελικό εμβολιασμένο δείγμα.

Ουσία	% ΑΝΑΚΤΗΣΗ ΑΠΟ ΕΚΧΥΛΙΣΗ		
	Διαδικασία (A'+Γ') _i (LC-TOF-MS)	Διαδικασία (A'+Γ') _{ii} (GC-MS)	Διαδικασία (A'+Γ') _{iii} (GC-HRMS)
Amitriptyline	76		
Amphetamine	55		
Antipyrine	81		
Atenolol	38		-
Benzoyllecgonine	21		26
Bumetanide	34	-	48
Butorphanol	77		
Caffeine	*		
Chlorpromazine	80		
Clenbuterol	92		78
Dexamethasone	0		
Ephedrine	47		
5α-Estran-3β,17α-diol	-		80
Ethacrynic Acid	0	0	9,4
Flufenamic acid	10		88
Flunixin	77		103
Furosemide	-	69	77
Guaifenesin	70		
Hydrochlorothiazide	58	-	
Ketoprofen	59		87
Lidocaine	77		
Meloxicam	73		
Mepivacaine	67		
Methocarbamol	74		
Methylphenidate	21		
Morphine	39		
Nikethamide	80		
Nordiazepam	82		
Oxazepam	79		
Pethidine	63		
Phenobarbital	-	71	178
Phenylbutazone	70	59	100
Salbutamol	42		38
Terbutaline	32		27
Timolol	73		77
Triamcinolone acetonide	43		

μεμονωμένες διαδικασίες A'_{iii} και Γ'_{iii} . Έτσι, από τις δεκαπέντε εξεταζόμενες ουσίες, μόνο η ατενολόνη δεν ανιχνεύτηκε.

Άρα, οι διαδικασίες $(A'+\Gamma')_i$, $(A'+\Gamma')_{ii}$ και $(A'+\Gamma')_{iii}$ θα μπορούσαν να λειτουργήσουν συμπληρωματικά για τον προσδιορισμό των εξεταζόμενων ουσιών, πλην μιας. Οι ουσίες, δηλαδή, που δεν ανιχνεύονταν από τη διαδικασία $(A'+\Gamma')_i$, ανιχνεύονταν από τις διαδικασίες $(A'+\Gamma')_{ii}$ και $(A'+\Gamma')_{iii}$, εκτός, όμως, από τη δεξαμεθαζόνη. Υπενθυμίζεται ότι με τις παραπάνω πορείες ανιχνεύονται όσες ουσίες έχουν μεταβολίτες που αποσυζεύγνυτο μέσω των συγκεκριμένων υδρολύσεων, δηλαδή, μέσω της ενζυμικής και της βασικής υδρόλυσης. Απουσία, όμως, της μεθανόλυσης (διαδικασίας B') δε μπορούν να καλυφθούν όλες οι περιπτώσεις ουσιών.

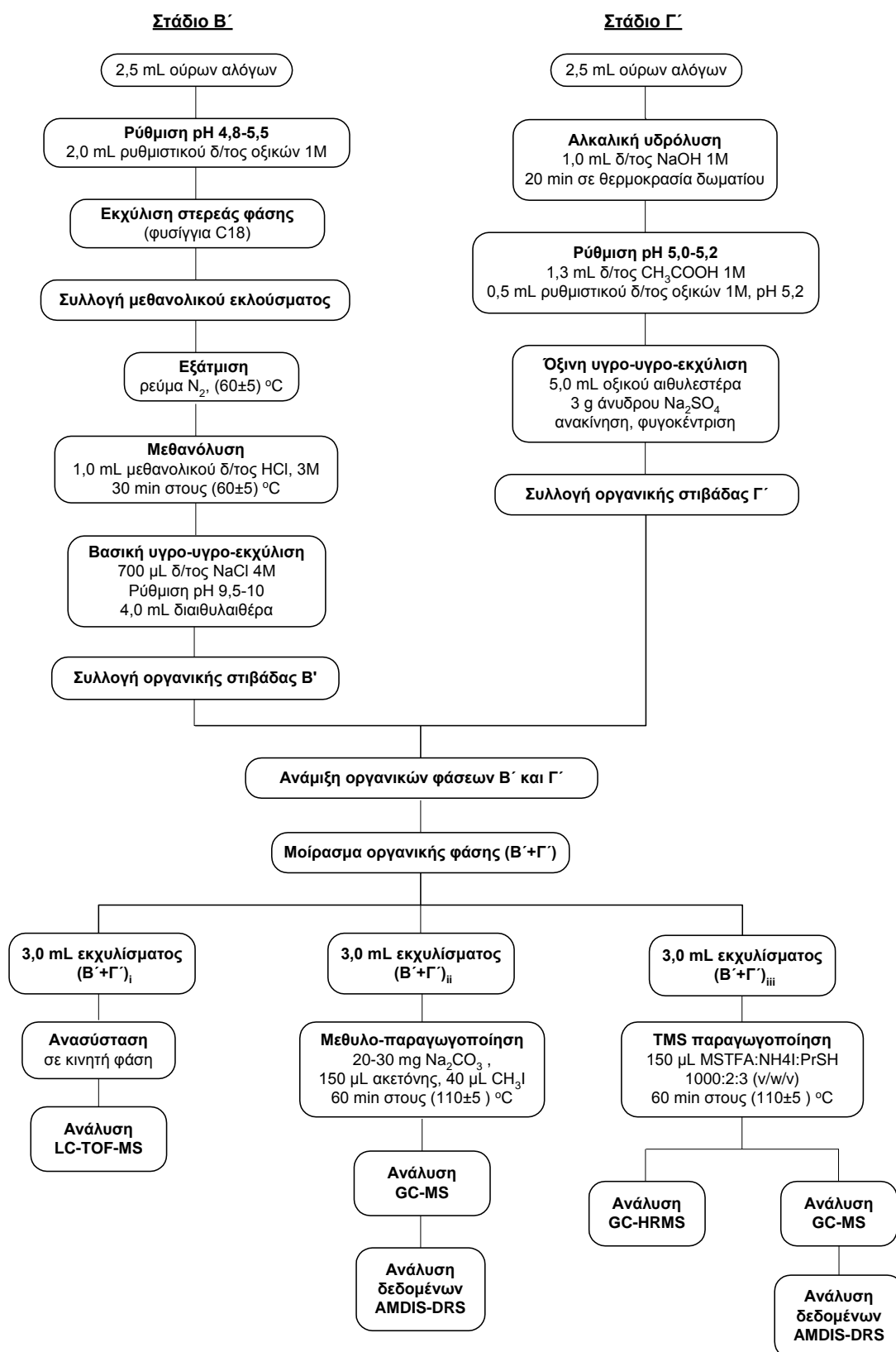
6.5.5 Διαδικασίες $(B'+\Gamma')_{i,ii,iii}$

Τα παρασκευαστικά στάδια των πορειών $(B'+\Gamma')_i$, $(B'+\Gamma')_{ii}$ και $(B'+\Gamma')_{iii}$ παρουσιάζονται στο σχήμα 6.13. Όπως φαίνεται στο σχήμα, εκτελούνται παράλληλα οι διαδικασίες B' και Γ' , και στο στάδιο της υγρο-υγρο-εκχύλισης αναμιγνύονται τα οργανικά εκχυλίσματα. Η προκύπτουσα οργανική φάση μοιράζεται σε τρία ίσα μέρη και ακολουθούν οι αντίστοιχες διαδικασίες για τις αναλύσεις LC-TOF-MS, GC-MS και GC-HRMS.

Τα αποτελέσματα των διαδικασιών $(B'+\Gamma')_i$, $(B'+\Gamma')_{ii}$ και $(B'+\Gamma')_{iii}$ παρουσιάζονται στον πίνακα 6.9. Όσον αφορά στη διαδικασία $(B'+\Gamma')_i$, ανιχνεύτηκαν είκοσι τέσσερις απαγορευμένες ουσίες, δηλαδή μια ουσία περισσότερη από την αντίστοιχη διαδικασία B' . Μέσω της διαδικασίας $(B'+\Gamma')_i$ ήταν δυνατή η ανίχνευση των ουσιών υδροχλωροθειαζίδιο και κετοπροφαίνιο, ενώ μέσω της διαδικασίας B'_i δεν ήταν δυνατή η ανίχνευσή τους, λόγω μηδενικής ανάκτησης. Αντίθετα, η ανάμιξη των εκχυλισμάτων στη διαδικασία $(B'+\Gamma')_i$ είχε αρνητική επίδραση στον προσδιορισμό των ουσιών βενζοϋλοεκγονίνη και καφεΐνη, καθώς αυτές ανιχνεύτηκαν μέσω της διαδικασίας B'_i , ενώ δεν ανιχνεύτηκαν, επιτυχώς, μέσω της διαδικασίας $(B'+\Gamma')_i$. Πιο συγκεκριμένα, η καφεΐνη ανιχνεύτηκε με παρεμπόδιση από το υπόστρωμα, κατά την ανάμιξη των εκχυλισμάτων.

Μέσω της διαδικασίας $(B'+\Gamma')_{ii}$ ανιχνεύτηκαν τέσσερις από τις έξι εξεταζόμενες ουσίες, με ανάκτηση από εκχύλιση μεγαλύτερη από 43%, η οποία

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ (B'+Γ')_{i,ii,iii}



Σχήμα 6.13. Παρασκευαστικά στάδια των διαδικασιών (B'+Γ')_i, (B'+Γ')_{ii}, (B'+Γ')_{iii}, κατά τη δεύτερη φάση της ανάπτυξης μεθόδου.

Πίνακας 6.9. Αποτελέσματα ανάκτησης από εκχύλιση των διαδικασιών (B'+Γ')_i, (B'+Γ')_{ii} και (B'+Γ')_{iii}. Όπου *: Παρεμπόδιση από το υπόστρωμα, 0: Μηδενική ανάκτηση, -: Μη ανίχνευση της ουσίας ούτε στο αρχικό ούτε στο τελικό εμβολιασμένο δείγμα.

Ουσία	% ΑΝΑΚΤΗΣΗ ΑΠΟ ΕΚΧΥΛΙΣΗ		
	Διαδικασία (B'+Γ') _i (LC-TOF-MS)	Διαδικασία (B'+Γ') _{ii} (GC-MS)	Διαδικασία (B'+Γ') _{iii} (GC-HRMS)
Amitriptyline	63		
Amphetamine	52		
Antipyrine	74		
Atenolol	5,4		-
Benzoyllecgonine	0		3,3
Bumetanide	-	-	48
Butorphanol	82		
Caffeine	*		
Chlorpromazine	55		
Clenbuterol	0		40
Dexamethasone	*		
Ephedrine	45		
5α-Estran-3β,17α-diol	-		76
Ethacrynic Acid	0	53	8,6
Flufenamic acid	79		71
Flunixin	91		77
Furosemide	-	43	30
Guaifenesin	62		
Hydrochlorothiazide	47	-	
Ketoprofen	40		46
Lidocaine	77		
Meloxicam	59		
Mepivacaine	67		
Methocarbamol	65		
Methylphenidate	49		
Morphine	*		
Nikethamide	77		
Nordiazepam	68		
Oxazepam	46		
Pethidine	69		
Phenobarbital	-	72	96
Phenylbutazone	-	71	69
Salbutamol	0		2,1
Terbutaline	44		28
Timolol	73		68
Triamcinolone acetonide	40		

αντιστοιχούσε στο φουροσεμίδιο. Το βουμετανίδιο ανήκει στις μη ανιχνεύσιμες ουσίες της διαδικασίας (B'+G')_{ii}, όπως επίσης, και της διαδικασίας B'_{ii}, ενώ είχε ανιχνευτεί μέσω της διαδικασίας Γ'_{ii}. Άρα, η ανάμιξη των οργανικών εκχυλισμάτων B' και Γ' επέδρασε αρνητικά στην ανίχνευση του βουμετανιδίου.

Όσον αφορά στη διαδικασία που περιλαμβάνει TMS-παραγωγοποίηση και ανάλυση GC-HRMS, η ανάμιξη των οργανικών φάσεων B' και Γ' συνέβαλε στη ανίχνευση περισσότερων ουσιών, σε σύγκριση με τις ξεχωριστές διαδικασίες B'_{iii} και Γ'_{iii}. Έτσι, με τη διαδικασία (B'+G')_{iii} ανιχνεύτηκαν οι ουσίες βουμετανίδιο, κλενβουτερόλη, αιθακρινικό οξύ, φουροσεμίδιο, κετοπροφαίνιο και σαλβουταμόλη, οι οποίες δεν είχαν ανιχνευτεί μέσω της διαδικασίας B'_{iii}, κυρίως, επειδή δεν είχαν εκχυλιστεί. Επιπλέον, η βενζουλοεκγονίνη και η σαλβουταμόλη παρουσίασαν εκχύλιση από ανάκτηση 3,3 και 2,1%, αντίστοιχα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, οι συγκεκριμένες ουσίες δε μπορούσαν να καλυφθούν από τη διαδικασία (B'+G')_i. Επίσης, η ατενολόνη δεν ανιχνεύτηκε από τη διαδικασία (B'+G')_{iii}, αλλά ανιχνεύτηκε μέσω της διαδικασίας (B'+G')_i, έχοντας, όμως, ανάκτηση από εκχύλιση 5,4%, αλλά ικανοποιητικό ύψος χρωματογραφικής κορυφής, 8×10^3 .

Συνοψίζοντας, η ανάμιξη των εκχυλισμάτων B' και Γ' και η ανάλυση LC-TOF-MS οδήγησε στην ανίχνευση περισσότερων ουσιών σε σύγκριση με την αντίστοιχη διαδικασία B'_i. Μέσω της διαδικασίας (B'+G')_i, όμως, παρουσιάστηκε αυξημένη παρεμπόδιση από το υπόστρωμα, καθώς τρεις ουσίες, καφεΐνη, δεξαμεθαζόνη και μορφίνη, παρουσίασαν παρεμπόδιση από το υπόστρωμα, κατά την ανίχνευσή τους, μέσω της συγκεκριμένης διαδικασίας. Εν τω μεταξύ, οι δύο από αυτές, δεξαμεθαζόνη και μορφίνη, ανιχνεύονταν, γενικά, μόνο με την τεχνική LC-TOF-MS. Αντίθετα, η καφεΐνη θα εξεταζόταν με την ανάλυση GC-HRMS, σε επόμενη φάση. Επίσης, η ανάμιξη των συγκεκριμένων οργανικών φάσεων οφέλησε και τη διαδικασία (B'+G')_{iii}, κατά την οποία ανιχνεύτηκε μεγαλύτερος αριθμός απαγορευμένων ουσιών, σε σχέση με τις μεμονωμένες διαδικασίες B'_{iii} και Γ'_{iii}.

6.5.6 Διαδικασίες ($A'+B'+\Gamma'$)_{i,ii,iii}

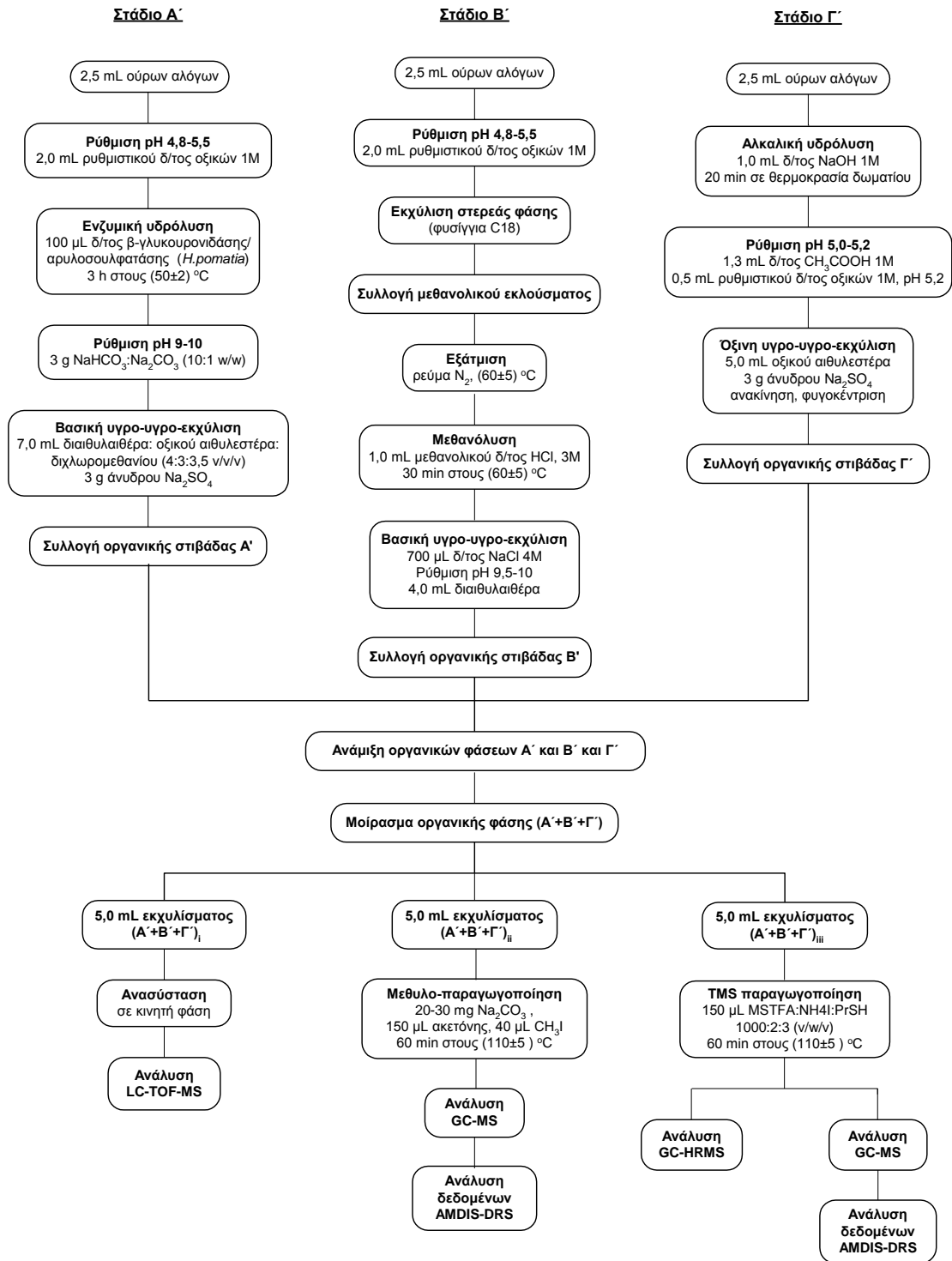
Στο τμήμα αυτό της ανάπτυξης μεθόδου, παρατηρήθηκε η επίδραση που έχει στην ανίχνευση των εξεταζόμενων ουσιών, η ανάμιξη τριών διαφορετικών οργανικών φάσεων, προς το σχηματισμό ενός γενικευμένου εκχυλίσματος. Στις διαδικασίες ($A'+B'+\Gamma'$), προχώρησαν παράλληλα οι διαδικασίες A' , B' και Γ' , μέχρι το στάδιο της υγρο-υγρο-εκχύλισης. Κατόπιν, τα τρία εκχυλίσματα που ελήφθησαν αναμίχθηκαν και στη συνέχεια, μοιράστηκαν σε τρία μέρη, ώστε να ακολουθήσουν οι αναλύσεις LC-TOF-MS, GC-MS και GC-HRMS, όπως φαίνεται και στο σχήμα 6.14.

Τα αποτελέσματα από τις εν λόγω διαδικασίες παρατίθενται στον πίνακα 6.8. Παρόλο που αναμίχθηκαν τρία διαφορετικά εκχυλίσματα, από τη διαδικασία ($A'+B'+\Gamma'$)_i ανιχνεύτηκαν είκοσι επτά ουσίες, δηλαδή, τρεις ουσίες λιγότερες από το μέγιστο αριθμό ουσιών που ανιχνεύτηκε, μέσω των διαδικασιών A' _i και ($A'+\Gamma'$)_i. Δεν ανιχνεύτηκε το βουμετανίδιο, το οποίο είχε ανιχνευτεί μόνο μέσω των αντίστοιχων διαδικασιών Γ' _i και ($A'+\Gamma'$)_i. Άρα, θετικό ρόλο στην ανίχνευση του βουμετανιδίου έπαιζε το εκχύλισμα Γ' κατά τις αναμίξεις. Επίσης, δεν ανιχνεύτηκαν η κλενβουτερόλη και η φαινυλοβουταζόνη, τα οποία, ομοίως, δεν ανιχνεύτηκαν με τις αντίστοιχες διαδικασίες B' _i, ($A'+B'$)_i και ($B'+\Gamma'$)_i. Άρα, αρνητικό ρόλο στην ανίχνευση τους έπαιζε το εκχύλισμα B' . Οι άλλες τρεις μη ανιχνεύσιμες ουσίες ήταν οι αναμενόμενες, δηλαδή, 5α-εστρανο-3β,17α-διόλη, φουροσεμίδιο και φαινοβαρβιτάλη. Επιπλέον, στον προσδιορισμό των ουσιών καφεΐνη, μορφίνη παρατηρήθηκε παρεμπόδιση από το υπόστρωμα.

Στη συνέχεια, μέσω της διαδικασίας ($A'+B'+\Gamma'$)_{ii} ανιχνεύτηκαν τέσσερις από τις έξι εξεταζόμενες ουσίες, με ανάκτηση από εκχύλιση μεγαλύτερη από 24%, η οποία αντιστοιχούσε στο φουροσεμίδιο. Ομοίως με τις προηγούμενες αντίστοιχες διαδικασίες ανάμιξης, ii, δεν ανιχνεύτηκαν το βουμετανίδιο και το υδροχλωροθειαζίδιο.

Τέλος, μέσω της διαδικασίας ($A'+B'+\Gamma'$)_{iii} ανιχνεύτηκαν όλες οι εξεταζόμενες ουσίες, εκτός από την ατενολόνη, όπως συνέβη και με τις διαδικασίες ($A'+\Gamma'$)_{iii} και ($B'+\Gamma'$)_{iii}. Η χαμηλότερη ανάκτηση παρατηρήθηκε για την κλενβουτερόλη και το αιθακρινικό οξύ, με αντίστοιχα ποσοστά 11 και 16%. Με την ανάμιξη των τριών εκχυλισμάτων παρατηρήθηκε μείωση του ποσοστού ανάκτησης της

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ (A'+B'+Γ')_{i,ii,iii}



Σχήμα 6.14. Παρασκευαστικά στάδια των διαδικασιών (A'+B'+Γ')_i, (A'+B'+Γ')_{ii}, (A'+B'+Γ')_{iii}, κατά τη δεύτερη φάση της ανάπτυξης μεθόδου.

Πίνακας 6.10. Αποτελέσματα ανάκτησης από εκχύλιση των διαδικασιών (A'+B'+Γ')_i, (A'+B'+Γ')_{ii} και (A'+B'+Γ')_{iii}. Όπου *: Παρεμπόδιση από το υπόστρωμα, 0: Μηδενική ανάκτηση, -: Μη ανίχνευση της ουσίας, ούτε στο αρχικό, ούτε στο τελικό εμβολιασμένο δείγμα.

Ουσία	% ΑΝΑΚΤΗΣΗ ΑΠΟ ΕΚΧΥΛΙΣΗ		
	Διαδικασία (A'+B'+Γ') _i (LC-TOF-MS)	Διαδικασία (A'+B'+Γ') _{ii} (GC-MS)	Διαδικασία (A'+B'+Γ') _{iii} (GC-HRMS)
Amitriptyline	55		
Amphetamine	59		
Antipyrine	75		
Atenolol	19		-
Benzoyllecgonine	12		30
Bumetanide	-	-	76
Butorphanol	68		
Caffeine	*		
Chlorpromazine	44		
Clenbuterol	0		11
Dexamethasone	57		
Ephedrine	58		
5α-Estran-3β,17α-diol	-		122
Ethacrynic Acid	0	31	16
Flufenamic acid	40		104
Flunixin	60		136
Furosemide	-	24	39
Guaifenesin	61		
Hydrochlorothiazide	39	-	
Ketoprofen	36		75
Lidocaine	72		
Meloxicam	51		
Mepivacaine	66		
Methocarbamol	60		
Methylphenidate	42		
Morphine	*		
Nikethamide	86		
Nordiazepam	63		
Oxazepam	49		
Pethidine	57		
Phenobarbital	-	64	129
Phenylbutazone	-	63	110
Salbutamol	25		48
Terbutaline	50		55
Timolol	72		119
Triamcinolone acetonide	48		

κλενβουτερόλης, σε σχέση με τις αντίστοιχες διαδικασίες $(A'+B')_{iii}$, $(A'+\Gamma')_{iii}$ και $(B'+\Gamma')_{iii}$.

6.5.7 Συμπεράσματα δεύτερης φάσης ανάπτυξης μεθόδου

Τα αποτελέσματα του δεύτερου τμήματος της ανάπτυξης μεθόδου συνοψίζονται στον πίνακα 6.11. Σε αυτόν παρατίθενται ο συνολικός αριθμός των εξεταζόμενων ουσιών που ανιχνεύτηκαν στο δείγμα που εμβολιάστηκε αρχικά στα ούρα, χωρίς παρεμπόδιση από το υπόστρωμα. Επιπλέον, παρουσιάζονται ο μέσος όρος της ανάκτησης των ανιχνευόμενων ουσιών της κάθε διαδικασίας, όπως επίσης και το εύρος της ανάκτησης στην κάθε διαδικασία.

Δεδομένου ότι ο σκοπός της διδακτορικής διατριβής ήταν να αναπτυχθεί μια γενικευμένη μέθοδο ελέγχου ντόπινγκ σε ούρα αλόγων, στη δεύτερη φάση δοκιμάστηκε να αναλυθούν μίγματα από τα εκχυλίσματα των τριών διαδικασιών A' , B' και Γ' . Όσον αφορά στις διαδικασίες της δεύτερης φάσης που σχετίζονταν με την ανάλυση LC-TOF-MS, τα καλύτερα αποτελέσματα ως προς το συνολικό αριθμό ανιχνευόμενων ουσιών προέκυψαν από τη διαδικασία $(A'+\Gamma')_i$, κατά την οποία αναμίχθηκαν ένα όξινο εκχύλισμα και ένα πιο γενικό εκχύλισμα. Έτσι, με τη διαδικασία $(A'+\Gamma')_i$ ανιχνεύτηκαν τριάντα απαγορευμένες ουσίες, με μέσο όρο ανάκτησης από εκχύλιση 60%. Αξίζει να σημειωθεί ότι με τη διαδικασία $(A'+B'+\Gamma')_i$ ανιχνεύτηκαν είκοσι επτά ουσίες. Η ανάμιξη, δηλαδή, των τριών διαφορετικών εκχυλισμάτων δεν οδήγησε στην ανίχνευση του μέγιστου αριθμού ουσιών μέσω της τεχνικής LC-TOF-MS. Άρα, η ανάμιξη των τριών εκχυλισμάτων είχε αρνητική επίδραση στην ανίχνευση ορισμένων ουσιών με τη συγκεκριμένη τεχνική. Συνυπολογίζοντας και τα αποτελέσματα της πρώτης φάσης, ξεχώρισαν οι διαδικασίες A'_i και $(A'+\Gamma')_i$ με τον ίδιο αριθμό ανιχνευόμενων ουσιών (τριάντα). Η διαδικασία $(A'+\Gamma')_i$ πλεονεκτεί έναντι της A'_i στην ανίχνευση του βουμετανιδίου και μειονεκτεί στην ανίχνευση της δεξαμεθαζόνης.

Όσον αφορά στις διαδικασίες της δεύτερης φάσης που περιελάμβαναν μεθυλο-παραγωγοποίηση και ανάλυση GC-MS, στις τρεις από αυτές ανιχνεύτηκε ο ίδιος αριθμός εξεταζόμενων ουσιών, οπότε η προτιμότερη διαδικασία κρίθηκε με βάση το μέσο όρο της ανάκτησης. Έτσι, καλύτερη

Πίνακας 6.11. Συνολικά αποτελέσματα δεύτερης φάσης ανάπτυξης μεθόδου που αφορούν α) στο συνολικό αριθμό των ανιχνευόμενων ουσιών από την κάθε διαδικασία, β) στο μέσο όρο της επί τοις εκατό ανάκτησης από εκχύλιση των ανιχνευόμενων ουσιών και γ) στο εύρος της επί τοις εκατό ανάκτησης από εκχύλιση.

Διαδικασία	Αριθμός ανιχνευόμενων ουσιών (% μέση ανάκτηση) (εύρος % ανάκτησης)		
	i	ii	iii
A'+B'	28 (58) (13-99)	4 (30) (13-52)	13 (49) (7,0-86)
A'+Γ'	30 (60) (10-92)	3 (66) (59-71)	14 (64*) (9,4-103)
B'+Γ'	24 (60) (5,4-91)	4 (60) (43-72)	14 (47) (2,1-96)
A'+B'+Γ'	27 (53) (12-86)	4 (46) (24-64)	14 (76) (11-136)

i: Ανασύσταση του ξηρού υπολείμματος και ανάλυση LC-TOF-MS.

ii: Μεθυλο-παραγωγοποίηση και ανάλυση GC-MS .

iii: TMS-παραγωγοποίηση και ανάλυση GC-HRMS .

*Στον υπολογισμό του μέσου όρου ανάκτησης δε συμπεριελήφθηκε η ουσία φαινοβαρβιτάλη που εμφάνισε ανάκτηση ίση με 178%.

θεωρήθηκε η διαδικασία (B'+Γ')_{ii} με τέσσερις ανιχνευόμενες ουσίες και 60% ανάκτηση κατά μέσο όρο, και κατόπιν η διαδικασία (A'+B'+Γ')_{ii} με ομοίως τέσσερις ανιχνευόμενες ουσίες και 46% ανάκτηση κατά μέσο όρο. Υπενθυμίζεται ότι στην πρώτη φάση της ανάπτυξης μεθόδου, διακρίθηκε η διαδικασία Γ'_{ii} με τέσσερις ανιχνευόμενες ουσίες και ποσοστό ανάκτησης 103%. Δεδομένου ότι με την ανάμιξη των εκχυλισμάτων α) δεν αυξήθηκε ο αριθμός των ανιχνευόμενων ουσιών και β) μειώθηκε ο μέσος όρος της ανάκτησης, εξήχθη το συμπέρασμα ότι δεν ήταν απαραίτητη η ανάμιξη των οργανικών φάσεων για τη συγκεκριμένη διαδικασία (ii), μέσω της οποίας ανιχνεύονταν, κυρίως, ουσίες που ανήκαν στην κατηγορία των NSAID και των διουρητικών. Άρα, από τις εν λόγω εφαρμοζόμενες διαδικασίες της πρώτης και δεύτερης φάσης επικρατέστερη ήταν η διαδικασία Γ'_{ii}.

Τέλος, οι διαδικασίες που περιελάμβαναν TMS-παραγωγοποίηση και ανάλυση GC-HRMS, αφορούσαν, κυρίως, τη διαδικασία B' και τις διαδικασίες ανάμιξης που την περιελάμβαναν, λόγω του κρίσιμου σταδίου της μεθανόλυσης, μέσω της οποίας αποσυζεύγγονται οι 17β-θειικοί εστέρες ορισμένων αναβολικών στεροειδών. Μέσω της διαδικασίας B'_{iii} ανιχνεύτηκαν

μόνο οκτώ ουσίες, ενώ μέσω των διαδικασιών ανάμιξης ανιχνεύονταν περισσότερες ουσίες. Άρα, για τη συγκεκριμένη διαδικασία, iii, ήταν προτιμότερη η ανάμιξη των οργανικών φάσεων και πιο συγκεκριμένα ξεχώρισε η διαδικασία (A'+B'+Γ')ⁱⁱⁱ με δεκατέσσερις ανιχνευόμενες ουσίες και 76% κατά μέσο όρο ανάκτηση από εκχύλιση.

Άρα σύμφωνα με τα συνολικά αποτελέσματα που αφορούσαν τη στοχευμένη ανάλυση, προέκυψαν τα ακόλουθα συμπεράσματα:

α) Για τη διαδικασία με την ανάλυση LC-TOF-MS ξεχώρισε, τόσο η διαδικασία A'ⁱ, όσο και η συνδυαστική διαδικασία (A'+Γ')ⁱ, μέσω της οποίας ενισχύθηκε η ανίχνευση των όξινων ουσιών.

β) Για τη διαδικασία με τη μεθυλο-παραγωγοποίηση και την ανάλυση GC-MS δεν κρίθηκε απαραίτητη η ανάμιξη των οργανικών φάσεων, καθώς η διαδικασία Γ'ⁱⁱ έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα.

γ) Για τη διαδικασία με την TMS-παραγωγοποίηση και την ανάλυση GC-HRMS θεωρήθηκε προτιμότερη η ανάμιξη των οργανικών φάσεων και συγκεκριμένα η διαδικασία (A'+B'+Γ')ⁱⁱⁱ.

6.6 Αυτόματη ανίχνευση απαγορευμένων ουσιών μέσω των προγραμμάτων AMDIS-DRS

Παράλληλα με τη στοχευμένη ανάλυση, η προτεινόμενη μέθοδος περιελάμβανε και αυτόματη ανίχνευση επιπλέον απαγορευμένων ουσιών, μέσω της αυτόματης αναζήτησης σε βιβλιοθήκες φασμάτων μαζών, με τη βοήθεια των προγραμμάτων AMDIS και DRS. Απαραίτητη προϋπόθεση για να πραγματοποιηθεί η ανίχνευση με αυτόν τον τρόπο ήταν να αναλυθούν τα δείγματα με την τεχνική GC-MS σε λειτουργία πλήρους σάρωσης. Έτσι, κατά την πρώτη και δεύτερη φάση της ανάπτυξης μεθόδου, τα εμβολιασμένα δείγματα, μετά την TMS-παραγωγοποίηση υπόκεινταν τόσο σε ανάλυση GC-HRMS για τον στοχευμένο έλεγχο, όσο και σε ανάλυση GC-MS για τον αυτόματο έλεγχο. Η ανάλυση GC-MS των μεθυλο-παραγωγοποιημένων δειγμάτων κάλυπτε, τόσο τον στοχευμένο έλεγχο, όσο και την αυτόματη ανίχνευση απαγορευμένων ουσιών που εκτελείτο σε επόμενη φάση μετά την ανάλυση. Η αυτόματη αναζήτηση σε βιβλιοθήκες φασμάτων μαζών πραγματοποιήθηκε για την ανεύρεση επιπλέον ουσιών που δεν εξετάζονταν,

κατά τον στοχευμένο έλεγχο. Στην προκειμένη περίπτωση, βέβαια, εξετάστηκαν οι ουσίες με τις οποίες εμβολιάστηκαν τα λευκά δείγματα.

Ο σκοπός ήταν να ελεγχθεί αν ο συνδυασμός των διαδικασιών και η ανάμιξη των εκχυλισμάτων θα συνέβαλε στην ανίχνευση περισσότερων ουσιών, μέσω της διαδικασίας της αυτόματης ανίχνευσης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους πίνακες 6.12 και 6.13, όπου παρατίθενται μόνο οι ουσίες που ανιχνεύονταν με αυτόν τον τρόπο. Επίσης, τα αποτελέσματα αφορούσαν στα δείγματα που εμβολιάστηκαν στην αρχή της παρασκευαστικής πορείας, δηλαδή, στα ούρα. Στα μεθυλο-παραγωγοποιημένα δείγματα, κατά τη διαδικασία της αυτόματης ανίχνευσης, έλαβε χώρα σύγκριση των φασμάτων μαζών και γι' αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι βιβλιοθήκες AORC_R6 και NIST05 (υποκεφάλαιο 2.5). Όσον αφορά στα TMS-παραγωγοποιημένα δείγματα, πραγματοποιήθηκε αυτόματη ανίχνευση ουσιών με δύο τρόπους, και γι' αυτό το λόγο στον πίνακα 6.13 υπάρχουν δύο στήλες για κάθε διαδικασία. Ο πρώτος τρόπος είναι όμοιος με αυτόν που περιγράφηκε για τα μεθυλο-παραγωγοποιημένα δείγματα. Ο δεύτερος τρόπος περιελάμβανε σύγκριση τόσο του φάσματος μαζών, όσο και του χρόνου έκλουσης των ουσιών, και για αυτό χρησιμοποιήθηκε μια εσωτερική βιβλιοθήκη του εργαστηρίου ελέγχου ντόπινγκ της Αθήνας (υποκεφάλαιο 2.5). Όπως προκύπτει από τον πίνακα 6.13, οι ουσίες που ανιχνεύονταν με τους δύο τρόπους δεν ήταν οι ίδιες σε όλες τις διαδικασίες.

Σύμφωνα με τα δεδομένα που ελήφθησαν, προέκυψε το τελικό συμπέρασμα ότι η ανάμιξη των οργανικών φάσεων δε βοήθησε στην ανεύρεση περισσότερων ουσιών, κατά την αυτόματη αναζήτησή τους μέσω των βιβλιοθηκών.

6.7 Τρίτο μέρος ανάπτυξης μεθόδου

6.7.1 Εισαγωγή - Πρόλογος

Στο τρίτο μέρος της ανάπτυξης μεθόδου δοκιμάστηκε να μειωθούν οι υγρο-υγρο-εκχυλίσεις της μεθοδολογίας, από τρεις σε δύο, δηλαδή να μειωθεί ο αριθμός των απαιτούμενων διαδικασιών, παραλείποντας τη διαδικασία NSAID και αλλάζοντας τον διαλύτη εκχύλισης στη διαδικασία Α'. Ελέγχθηκε, δηλαδή, αν είναι δυνατόν να εκχυλιστούν οι όξινες ουσίες, μέσω της διαδικασίας Α',

Πίνακας 6.12. Αποτελέσματα αυτόματης ανίχνευσης απαγορευμένων ουσιών μέσω των προγραμμάτων AMDIS-DRS, κατόπιν μεθυλο-παραγωγοποίησης και ανάλυσης GC-MS.

Ουσίες	Δ Ι Α Δ Ι Κ Α Σ Ι Ε Σ						
	A' _{ii}	B' _{ii}	Γ' _{ii}	(A'+B') _{ii}	(A'+Γ') _{ii}	(B'+Γ') _{ii}	(A'+B'+Γ') _{ii}
Amitriptyline	√			√			
Bumetanide					√		
Caffeine	√		√	√		√	√
Flufenamic acid	√	√	√	√	√	√	√
Flunixin	√	√	√	√	√	√	√
Furosemide			√				
Guaifenesin	√		√		√		
Ketoprofen	√	√	√	√	√	√	√
Nikethamide	√						
Phenobarbital	√	√	√		√	√	√
Phenylbutazone	√					√	√
Antipyrine	√		√	√	√	√	√
Αριθμός ανιχνευόμενων ουσιών	10	4	8	6	7	7	7

Πίνακας 6.13. Αποτελέσματα αυτόματης ανίχνευσης απαγορευμένων ουσιών μέσω των προγραμμάτων AMDIS-DRS, κατόπιν TMS-παραγωγοποίησης και ανάλυσης GC-MS .

Ουσίες	Δ Ι Α Δ Ι Κ Α Σ Ι Ε Σ													
	Α' _{iii}		Β' _{iii}		Γ' _{iii}		(Α'+Β') _{iii}		(Α'+Γ') _{iii}		(Β'+Γ') _{iii}		(Α'+Β'+Γ') _{iii}	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Amphetamine	-	√	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Flufenamic acid	√	√	-	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
Flunixin	-	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
Guaifenesin	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
Ketoprofen	-	√	-	-	-	√	-	-	-	-	-	-	√	√
Timolol	-	-	-	√	-	-	-	√	-	-	-	-	-	-
Αριθμός ανιχνευόμενων ουσιών	2	5	2	4	3	4	3	4	3	3	3	3	4	4

1: Ανίχνευση ουσιών με αυτόματη αναζήτηση στις βιβλιοθήκες AORC_R6 και NIST05

2: Ανίχνευση ουσιών με αυτόματη αναζήτηση στην εσωτερική βιβλιοθήκη του εργαστηρίου

υπό βασικές συνθήκες και με εξαλάτωση ¹⁷³, χρησιμοποιώντας έναν διαλύτη πιο πολικό από τον τριπλό διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε, λόγω της πολικής φύσης των ουσιών που ανιχνεύονταν μέσω της διαδικασίας NSAID. Έτσι, δοκιμάστηκαν οι διαλύτες α) οξικός αιθυλεστέρας και β) το μίγμα οξικού αιθυλεστέρα : διχλωρομεθανίου σε αναλογία 7:3 (v/v), το οποίο είναι λιγότερο πολικό από τον οξικό αιθυλεστέρα. Με τη χρήση, όμως, ενός πιο πολικού διαλύτη εκχύλισης θα αυξηθεί το υπόστρωμα στο εκχύλισμα, το οποίο ενδεχομένως θα επηρεάσει τις αντιδράσεις παραγωγοποίησης και τις αναλύσεις και συνεπώς, τον αριθμό των ανιχνευόμενων ουσιών.

Άρα, το συγκεκριμένο τμήμα της ανάπτυξης μεθόδου επικεντρώθηκε στη διαδικασία Α', δοκιμάζοντας παραλλαγές αυτής, με τη χρήση διαφορετικών διαλυτών εκχύλισης.

6.7.2 Παρασκευαστικές πορείες τρίτης φάσης ανάπτυξης μεθόδου

Η διαδικασία Α' με διαλύτη εκχύλισης τον οξικό αιθυλεστέρα ονομάστηκε Α'(οα), ενώ η διαδικασία Α' με διαλύτη εκχύλισης το μίγμα οξικού αιθυλεστέρα:διχλωρομεθανίου ονομάστηκε Α'(οα:δχμ). Στο τρίτο μέρος, λοιπόν, της ανάπτυξης μεθόδου εκτελέστηκαν παράλληλα οι διαδικασίες Α'_{i,ii,iii}, Α'(οα)_{i,ii,iii} και Α'(οα:δχμ)_{i,ii,iii} σύμφωνα με το σχήμα 6.1, χρησιμοποιώντας τον κατάλληλο διαλύτη εκχύλισης στην κάθε περίπτωση.

6.7.3 Αποτελέσματα τρίτης φάσης ανάπτυξης μεθόδου

Τα αποτελέσματα της τρίτης φάσης της ανάπτυξης μεθόδου, παρουσιάζονται στους πίνακες 6.14 έως 6.16, ανά τεχνική. Έτσι, στον πίνακα 6.14 παρατίθενται τα αποτελέσματα από την ανάλυση LC-TOF-MS των διαδικασιών Α'_i, Α'(οα)_i και Α'(οα:δχμ)_i. Με βάση τα αποτελέσματα, οι ουσίες που ανιχνεύτηκαν μέσω της διαδικασίας Α'_i, ανιχνεύτηκαν και από τις άλλες δύο διαδικασίες. Μέσω της διαδικασίας Α'(οα)_i, όμως, ανιχνεύτηκαν επιπλέον οι όξινες ουσίες, βουμετανίδιο (pK_a 3,6 και 7,7 και logP 0,12) και φουροσεμίδιο (pK_a 3,8 και 7,5 και logP -0,83), ενώ μέσω της διαδικασίας Α'(οα:δχμ)_i ανιχνεύτηκε επιπλέον η φαινυλοβουταζόνη (pK_a 4,5). Ωστόσο, η φαινυλοβουταζόνη είχε ανιχνευτεί από τη διαδικασία Α'_i, κατά την πρώτη φάση της ανάπτυξης μεθόδου, αλλά με ύψος χρωματογραφικής κορυφής

Πίνακας 6.14. Αποτελέσματα ανάκτησης από εκχύλιση των διαδικασιών Α_i, Α'(οα)_i και Α'(οα:δχμ)_i με ανάλυση LC-TOF-MS. Όπου *: Παρεμπόδιση υποστρώματος.

Ουσία	% ΑΝΑΚΤΗΣΗ ΑΠΟ ΕΚΧΥΛΙΣΗ		
	Διαδικασία Α _i	Διαδικασία Α'(οα) _i	Διαδικασία Α'(οα:δχμ) _i
Amitriptyline	35	52	40
Amphetamine	54	42	19
Antipyrine	64	75	60
Atenolol	56	55	48
Benzoylcegonine	25	19	27
Bumetanide	0	44	-
Butorphanol	53	64	48
Caffeine	*	*	*
Chlorpromazine	24	43	28
Clenbuterol	53	64	39
Dexamethasone	0	-	-
Ephedrine	104	57	42
5α-Estran-3β,17α-diol	-	-	-
Ethacrynic Acid	0	0	0
Flufenamic acid	98	64	61
Flunixin	55	68	58
Furosemide	0	41	0
Guaifenesin	61	74	60
Hydrochlorothiazide	29	69	46
Ketoprofen	34	49	33
Lidocaine	56	64	44
Meloxicam	54	63	53
Mepivacaine	59	69	51
Methocarbamol	60	76	60
Methylphenidate	49	55	31
Morphine	60	63	51
Nikethamide	73	63	35
Nordiazepam	63	66	52
Oxazepam	60	66	53
Pethidine	57	53	32
Phenobarbital	-	-	-
Phenylbutazone	0	-	24
Salbutamol	50	48	38
Terbutaline	23	49	36
Timolol	63	77	60
Triamcinolone acetonide	59	64	55
Αριθμός ανιχν. ουσιών	28	30	29
Μέσος όρος % ανάκτησης	55	61	45
Εύρος % ανάκτησης	23-104	19-77	19-61

5×10^3 και ανάκτηση 13%. Συνεπώς, οι χαμηλές αυτές τιμές δεν εξασφάλισαν τη συστηματική ανίχνευση της ουσίας. Επίσης, για την καφεΐνη παρατηρήθηκε παρεμπόδιση από το υπόστρωμα, όπως έχει ξανασυμβεί και σε άλλες διαδικασίες. Επιπλέον, η δεξαμεθαζόνη δεν ανιχνεύτηκε με καμία από τις τρεις διαδικασίες στη συγκέντρωση των 10 ng mL^{-1} . Για τις εν λόγω μεθόδους, το όριο ανίχνευσης της συγκεκριμένης ουσίας ήταν μεγαλύτερο από 10 ng mL^{-1} . Επιπροσθέτως, σε αυτόν τον κύκλο πειραμάτων, ο μέσος όρος της ανάκτησης κυμάνθηκε από 45% για τη διαδικασία $A'(oa:\delta\chi\mu)_i$ έως 61% για τη διαδικασία $A'(oa)_i$. Άρα, μεταξύ των τριών διαδικασιών που αφορούσαν στην ανάλυση LC-TOF-MS, καλύτερη θεωρήθηκε η διαδικασία $A'(oa)_i$, καθώς μέσω αυτής ανιχνεύτηκε ο μεγαλύτερος αριθμός ουσιών, κυρίως, επειδή βελτιώθηκε η εκχύλιση των πιο όξινων και πολικών ουσιών πχ βουμετανίδιο, φουροσεμίδιο και υδροχλωροθειαζίδιο (ασθενώς όξινο).

Όσον αφορά στην ανάλυση GC-MS των μεθυλο-παραγωγοποιημένων κλασμάτων, τα αποτελέσματα συγκεντρώνονται στον πίνακα 6.15. Μέσω της διαδικασίας A'_{ii} ανιχνεύτηκαν τρεις ουσίες, ενώ μέσω των διαδικασιών $A'(oa)_{ii}$ και $A'(oa:\delta\chi\mu)_{ii}$ ανιχνεύτηκαν τέσσερις ουσίες. Τα μεθυλο-παραγωγοποιημένα βουμετανίδιο και αιθακρινικό οξύ δεν ανιχνεύτηκαν από καμία από τις τρεις διαδικασίες. Για τη διαδικασία $A'(oa)$, όμως, το βουμετανίδιο καλυπτόταν τόσο από την ανάλυση LC-TOF-MS όσο και από την ανάλυση GC-HRMS. Ενώ, για τη διαδικασία $A'(oa:\delta\chi\mu)$ το βουμετανίδιο καλυπτόταν από την ανάλυση GC-HRMS. Όσον αφορά στο αιθακρινικό οξύ, αυτό ανιχνευόταν από την ανάλυση GC-HRMS των διαδικασιών $A'(oa)$ και $A'(oa:\delta\chi\mu)$. Επίσης, για τις διαδικασίες $A'(oa)_{ii}$ και $A'(oa:\delta\chi\mu)_{ii}$ ο μέσος όρος ανάκτησης ήταν 48 και 49%, αντίστοιχα. Άρα, οι επικρατέστερες διαδικασίες ήταν οι $A'(oa)_{ii}$ και $A'(oa:\delta\chi\mu)_{ii}$. Από την αντίστοιχη διαδικασία Γ'_{ii} της πρώτης φάσης είχαν ανιχνευτεί ομοίως τέσσερις ουσίες, με τη διαφορά ότι είχε ανιχνευτεί το βουμετανίδιο, ενώ δεν είχε ανιχνευτεί το υδροχλωροθειαζίδιο (pK_a 7,9 και 9,2 και $\log P$ -0,07), το οποίο στις διαδικασίες $A'(oa)_{ii}$ και $A'(oa:\delta\chi\mu)_{ii}$ ανιχνεύτηκε, λόγω της χρήσης ενός πιο πολικού διαλύτη εκχύλισης.

Στη συνέχεια, τα αποτελέσματα από την ανάλυση GC-HRMS των TMS-παραγωγοποιημένων κλασμάτων παρατίθενται στον πίνακα 6.16. Μέσω της

Πίνακας 6.15. Αποτελέσματα ανάκτησης από εκχύλιση των διαδικασιών A[']_{ii}, A['](οα)_{ii} και A['](οα:δχμ)_{ii} με μεθυλο-παραγωγοποίηση και ανάλυση GC-MS .

Ουσία	% ΑΝΑΚΤΗΣΗ ΑΠΟ ΕΚΧΥΛΙΣΗ		
	Διαδικασία A ['] _{ii}	Διαδικασία A ['] (οα) _{ii}	Διαδικασία A ['] (οα:δχμ) _{ii}
Bumetanide	-	-	-
Ethacrynic acid	-	-	-
Furosemide	0	41	27
Hydrochlorothiazide	43	58	58
Phenobarbital	66	58	71
Phenylbutazone	34	35	41
Αριθμός ανιχν. ουσιών	3	4	4
Μέσος όρος % ανάκτησης	39	48	49
Εύρος % ανάκτησης	34-66	35-58	27-71

Πίνακας 6.16. Αποτελέσματα ανάκτησης από εκχύλιση των διαδικασιών A[']_{iii}, A['](οα)_{iii} και A['](οα:δχμ)_{iii} με TMS-παραγωγοποίηση και ανάλυση GC-HRMS .

Ουσία	% ΑΝΑΚΤΗΣΗ ΑΠΟ ΕΚΧΥΛΙΣΗ		
	Διαδικασία A ['] _{iii}	Διαδικασία A ['] (οα) _{iii}	Διαδικασία A ['] (οα:δχμ) _{iii}
Atenolol	-	-	
Benzoylcegonine	34	13	32
Bumetanide	0	46	46
Clenbuterol	77	54	62
5α-Estran-3β,17α-diol	44	32	38
Ethacrynic acid	11	21	22
Flufenamic acid	69	54	55
Flunixin	73	48	61
Furosemide	3,9	33	20
Ketoprofen	44	35	40
Phenobarbital	63	44	54
Phenylbutazone	39	26	30
Salbutamol	64	35	44
Terbutaline	38	21	25
Timolol	77	50	64
Αριθμός ανιχν. ουσιών	13	14	14
Μέσος όρος % ανάκτησης	49	37	42
Εύρος % ανάκτησης	3,9-77	13-54	22-64

διαδικασίας A'iii ανιχνεύτηκαν δεκατρείς ουσίες, ενώ μέσω των διαδικασιών A'(οα)iii και A'(οα:δχμ)iii ανιχνεύτηκε μια επιπλέον όξινη ουσία, το βουμετανίδιο. Μέσω των δύο τελευταίων διαδικασιών ανιχνεύτηκαν οι ίδιες ουσίες (δεκατέσσερις). Άρα, με την αλλαγή του διαλύτη εκχύλισης αυξήθηκε ο αριθμός των ανιχνευόμενων ουσιών, κι επίσης, αυξήθηκε η ανάκτηση των όξινων ουσιών, όπως του αιθακρινικού οξέος (pK_a 3,5 και $\log P$ -0,83) και του φουροσεμιδίου. Τέλος, ο μέσος όρος της ανάκτησης ήταν 37 και 42% για τις διαδικασίες A'(οα)iii και A'(οα:δχμ)iii, αντιστοίχως.

6.7.4 Συμπεράσματα τρίτης φάσης ανάπτυξης μεθόδου

Κατά την τρίτη φάση της ανάπτυξης μεθόδου δοκιμάστηκε να ληφθούν οι όξινες ουσίες με βασική εκχύλιση και εξαλάτωση, χρησιμοποιώντας πιο πολικούς διαλύτες από τον τριπλό διαλύτη της διαδικασίας A'. Τα αποτελέσματα ήταν θετικά, καθώς, με την αλλαγή αυτή ανιχνεύτηκαν οι ουσίες που ανιχνεύτηκαν με τις διαδικασίες A'i,ii,iii, και επιπλέον ανιχνεύτηκαν και όξινες ουσίες. Δεν υπήρξαν, δηλαδή, απώλειες άπολων ουσιών, με τη χρήση πιο πολικού διαλύτη. Δεδομένου ότι:

α) στις διαδικασίες της ανάλυσης LC-TOF-MS ξεχώρισε η διαδικασία A'(οα) με διαλύτη εκχύλισης τον οξικό αιθυλεστέρα,

β) στις διαδικασίες της ανάλυσης GC-MS των μεθυλο-παραγώγων, οι διαδικασίες A'(οα)ii και A'(οα:δχμ)ii ήταν ισοδύναμες ως προς τον αριθμό των ανιχνευόμενων ουσιών και το μέσο όρο ανάκτησης,

γ) στις διαδικασίες της ανάλυσης GC-HRMS ανιχνεύτηκαν οι ίδιες ουσίες μέσω των διαδικασιών A'(οα)iii και A'(οα:δχμ)iii, ενώ ο μέσος όρος ανάκτησης αυτών ήταν κοντινός,

δ) το διχλωρομεθάνιο θεωρείται βλαβερός διαλύτης για την υγεία,

προέκυψε το συμπέρασμα ότι η προτιμότερη διαδικασία στην τρίτη φάση ήταν αυτή με διαλύτη εκχύλισης τον οξικό αιθυλεστέρα.

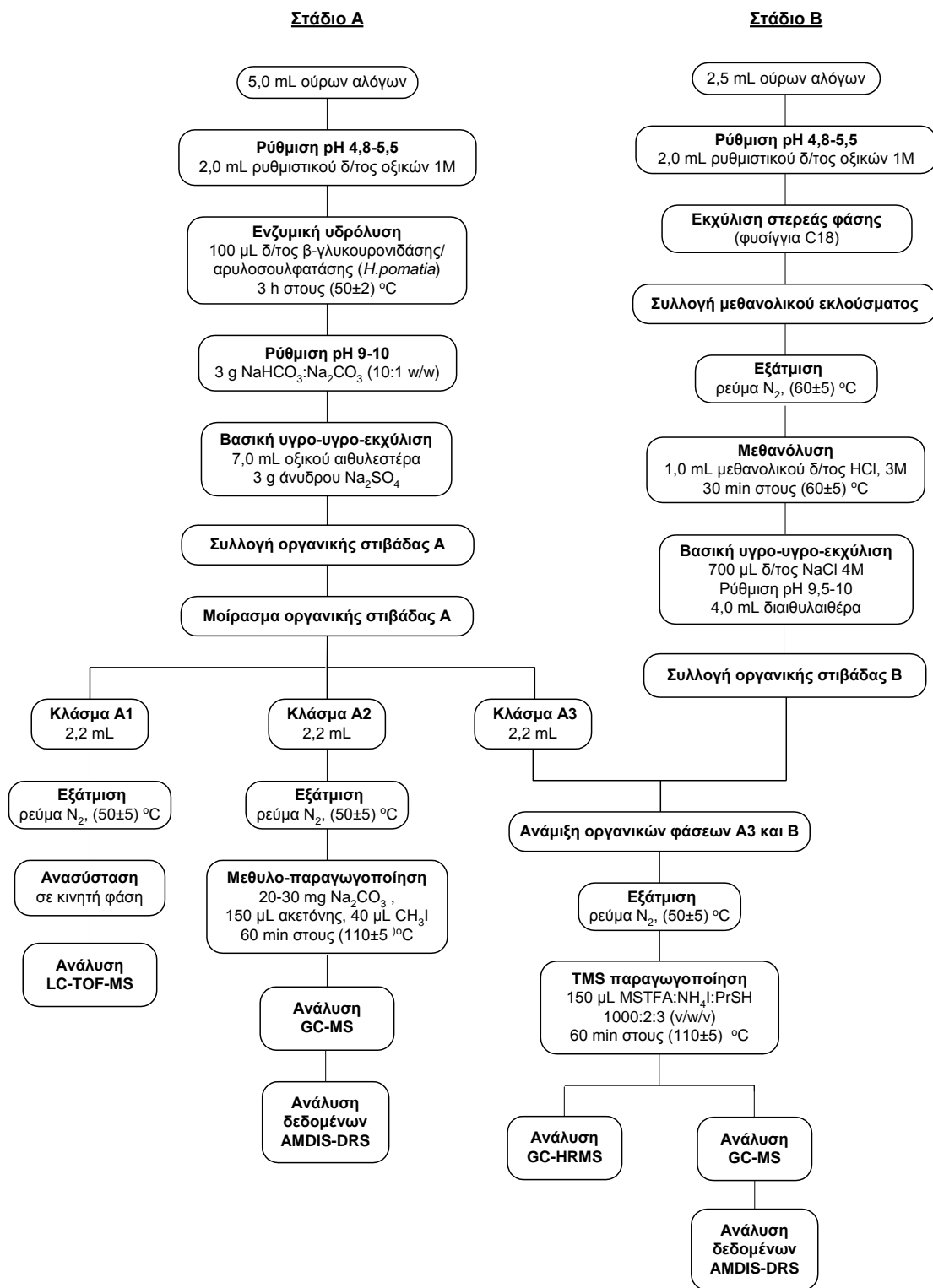
Οι ουσίες που δεν ανιχνεύονταν από τη διαδικασία A'(οα)i καλύπτονταν στην πλειοψηφία τους από τη διαδικασία A'(οα)ii ή/και τη διαδικασία A'(οε)iii. Όσον αφορά στη δεξαμεθαζόνη, αυτό θα ανιχνευόταν μέσω της τεχνικής LC-TOF-MS σε συγκέντρωση μεγαλύτερη των 10 ng mL⁻¹. Έτσι, σύμφωνα με τα

παραπάνω, η διαδικασία NSAID με την όξινη εκχύλιση ήταν δυνατόν να παραληφθεί και να αντικατασταθεί από τη διαδικασία Α΄(οα).

Άρα, στη μέθοδο που τελικά επιλέχθηκε, συμπεριελήφθηκε η διαδικασία Α΄(οα) με την ενζυμική υδρόλυση, και η διαδικασία Β΄ με τη μεθανόλυση, οι οποίες συνδυάστηκαν καταλλήλως.

6.8 Επίλογος κεφαλαίου

Οι δοκιμές που εκτελέστηκαν κατά την ανάπτυξη της μεθόδου οδήγησαν σε μια ενοποιημένη παρασκευαστική πορεία, την οποία διαδέχονται αναλύσεις μέσω των τεχνικών LC-TOF-MS, GC-MS και GC-HRMS που λειτουργούν συμπληρωματικά για την επίτευξη ενός ολοκληρωμένου ελέγχου ντόπινγκ σε ούρα αλόγων. Πιο συγκεκριμένα, η τελική παρασκευαστική πορεία (σχήμα 6.15) αποτελείται από δύο στάδια, τα οποία εκτελούνται ξεχωριστά στην αρχή σε δύο κλάσματα του δείγματος ούρων και στη συνέχεια, συνδυάζονται με τον τρόπο που περιγράφεται παρακάτω. Στο στάδιο Α εκτελείται ενζυμική υδρόλυση, κατόπιν, ρύθμισης του pH στην περιοχή 4,8-5,5, και ακολουθεί βασική εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα και προσθήκη θειικού νατρίου ως παράγοντα εξαλάτωσης. Το γενικό εκχύλισμα που λαμβάνεται χωρίζεται σε τρία ίσα μέρη και ακολουθεί εξάτμιση σε ρεύμα αζώτου. Στο πρώτο κλάσμα γίνεται ανασύσταση με κινητή φάση κι έπειτα, διενεργείται ανάλυση LC-TOF-MS σε λειτουργία πλήρους σάρωσης. Στο δεύτερο κλάσμα εκχυλίσματος πραγματοποιείται μεθυλο-παραγωγοποίηση και ακολουθεί ανάλυση GC-MS σε λειτουργία πλήρους σάρωσης. Το τρίτο κλάσμα του εκχυλίσματος ενώνεται με το κλάσμα που προκύπτει από το στάδιο Β, το οποίο, αρχικά, περιλαμβάνει καθαρισμό του δείγματος με εκχύλιση στερεάς φάσης με φυσίγγια C18. Έπειτα, το μεθανολικό έκλουσμα εξατμίζεται υπό ρεύμα αζώτου και στη συνέχεια, πραγματοποιείται το κρίσιμο στάδιο της μεθανόλυσης. Οι προς εξέταση ουσίες λαμβάνονται με βασική υγρο-υγρο-εκχύλιση με διαιθυλαιθέρα και προσθήκη διαλύματος χλωριούχου νατρίου. Έπειτα, πραγματοποιείται η ανάμιξη των εκχυλισμάτων των δύο σταδίων και αφού το μίγμα εξατμιστεί σε ρεύμα αζώτου, εκτελείται TMS-παραγωγοποίηση. Ακολούθως, εκτελούνται αναλύσεις GC-HRMS και GC-MS. Όπως είχε προκύψει από τη δεύτερη φάση της ανάπτυξης μεθόδου, η ανάμιξη των



Σχήμα 6.15. Παρασκευαστικά στάδια τελικής διαδικασίας ελέγχου ντόπινγκ αλόγων.

οργανικών φάσεων ήταν προτιμότερη στον έλεγχο ντόπινγκ, μέσω της ανάλυσης GC-HRMS.

Με την τελική μέθοδο που προτείνεται, η παρασκευαστική πορεία αποτελείται από λιγότερα στάδια, σε σύγκριση με αυτήν που περιγράφεται στα σχήματα 5.1 και 5.2, γεγονός το οποίο οδηγεί σε εξοικονόμηση χρόνου, μείωση του κόστους και της κατανάλωσης αντιδραστηρίων.

Στην παγκόσμια βιβλιογραφία είναι η πρώτη φορά που:

- 1) Η προκατεργασία των δειγμάτων πραγματοποιείται με μια ενοποιημένη διαδικασία που περιλαμβάνει δύο ειδών α) υδρολύσεις, β) εκχυλίσσεις και γ) αντιδράσεις παραγωγοποίησης.
- 2) Η ανάλυση των δειγμάτων εκτελείται, συμπληρωματικά, με τις τεχνικές LC-TOF-MS, GC-MS και GC-HRMS προς i) στοχευμένο έλεγχο ντόπινγκ και ii) αυτόματη αναζήτηση απαγορευμένων ουσιών σε βιβλιοθήκες φασμάτων μαζών, μέσω των προγραμμάτων AMDIS και DRS, προς έναν ολοκληρωμένο έλεγχο ντόπινγκ σε ούρα αλόγων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

7.1 Εισαγωγή - Πρόλογος

Το παρόν κεφάλαιο επικεντρώνεται στην αξιολόγηση της μεθόδου που αναπτύχθηκε, η οποία στοχεύει στον προσδιορισμό της ταυτότητας πολυάριθμων απαγορευμένων ουσιών σε ούρα αλόγων, με μια ενοποιημένη παρασκευαστική πορεία και περαιτέρω ανάλυση με τις τεχνικές LC-TOF-MS, GC-MS και GC-HRMS (σχήμα 6.15) που δρουν συμπληρωματικά καλύπτοντας, έτσι, απαγορευμένες ουσίες με διαφορετική φαρμακολογική δράση και διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες.

Στο πρώτο μέρος του κεφαλαίου περιγράφεται η διαδικασία επικύρωσης της μεθόδου, η οποία περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

- Επιλογή των εξήντα ουσιών για την εκτέλεση της επικύρωσης.
- Επιλογή των μεταβολιτών των εξεταζόμενων ουσιών.
- Εκτέλεση δοκιμαστικού προσανατολιστικού σταδίου.
- Σύνταξη πρωτοκόλλου με καθορισμό των παραμέτρων επικύρωσης.
- Εκτέλεση της επικύρωσης.

Στη συνέχεια, στο δεύτερο μέρος του κεφαλαίου παρατίθενται οι επιπλέον τριακόσιες απαγορευμένες ουσίες που ανιχνεύονται μέσω της προτεινόμενης μεθοδολογίας. Τέλος, το τρίτο μέρος του κεφαλαίου αφιερώνεται στα αποτελέσματα από την εφαρμογή της μεθόδου α) σε πραγματικά θετικά δείγματα ούρων αλόγων και β) στα δείγματα του «Proficiency Test» 2012 του AORC.

7.2 Επιλογή ουσιών για επικύρωση

Στην επιλογή των ουσιών για την επικύρωση δόθηκε προτεραιότητα στις ουσίες που εξετάστηκαν στο «Proficiency Test» 2011 του AORC, δηλαδή, στις ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάπτυξη της μεθόδου. Η επιλογή των υπόλοιπων ουσιών έγινε με βάση τη βιολογική τους δράση και με τέτοιο

τρόπο, ώστε να συμπεριληφθούν όσο το δυνατόν περισσότερες κατηγορίες από τον κατάλογο της διεθνούς ιππικής ομοσπονδίας, FEI, συνυπολογίζοντας και την τάξη, στην οποία ανήκουν στην κατάταξη της διεθνούς ένωσης ARCI. Ένα, επίσης, βασικό κριτήριο ήταν η διαθεσιμότητά τους ως υλικά αναφοράς στο εργαστήριο ελέγχου ντόπινγκ.

Παράλληλα με τις μητρικές ουσίες, οι μεταβολίτες της καφεΐνης (θεοφυλλίνη), της κοκαΐνης (βενζοϋλοεκγονίνη), της στανοζολόλης (16β-υδροξυστανοζολόλη), της αμιτριπτιλίνης (νορτριπτιλίνη) και της διαζεπάμης (οξαζεπάμη, νορδιαζεπάμη) θεωρήθηκαν ουσίες στόχοι.

Επιπροσθέτως, ανάμεσα στις επιλεγμένες ουσίες συγκαταλέχθηκαν και πέντε ουσίες ορίου που καθορίζονται στη διεθνή συμφωνία «IARBW» από τη διεθνή ομοσπονδία «IFHA». Οι ουσίες ορίου περιλαμβάνουν α) ενδογενείς ουσίες, όπως είναι οι: 5α-εστρανο-3β,17α-διόλη στα αρσενικά άλογα, τεστοστερόνη, υδροκορτιζόνη και 3-μεθοξυτυραμίνη και β) ουσίες που συναντώνται στην τροφή των αλόγων και συνεπώς, υφίστανται στα ούρα των αλόγων. Στην επικύρωση της μεθόδου οι συγκεκριμένες ουσίες εξετάστηκαν σε συγκέντρωση που αντιστοιχούσε στο προκαθορισμένο όριό τους. Σημειώνεται ότι στην πρώτη φάση αξιολόγησης των δειγμάτων, δηλαδή, κατά την εφαρμογή της μεθόδου σάρωσης, για τις ουσίες ορίου πραγματοποιείται ταυτοποίηση και μια πρώτη εκτίμηση της συγκέντρωσής τους και όχι ημιποσοτικός προσδιορισμός. Ο ημιποσοτικός προσδιορισμός διενεργείται σε επόμενη φάση με την εφαρμογή μιας πιο εξειδικευμένης μεθόδου και δεν αφορά το αντικείμενο μελέτης της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

7.3 Προκαταρκτικό δοκιμαστικό στάδιο

7.3.1 Προετοιμασία προκαταρκτικού δοκιμαστικού σταδίου

Πριν την έναρξη της επικύρωσης πραγματοποιήθηκε ένα προκαταρκτικό δοκιμαστικό στάδιο, με σκοπό να εκτελεστεί ολοκληρωμένη η τελική μέθοδος και να ληφθεί μια πρώτη εικόνα σχετικά με το ποιες ουσίες ανιχνεύονται στην κάθε τεχνική, σε ποιες συγκεντρώσεις και με ποιο ή ποια διαγνωστικά ιόντα (m/z).

Έτσι, χρησιμοποιήθηκαν δυο διαφορετικά λευκά υποστρώματα ούρων αλόγων εκτομένων, τα οποία εμβολιάστηκαν αρχικά στα ούρα με τις εξεταζόμενες ουσίες επικύρωσης σε επτά διαφορετικά επίπεδα συγκέντρωσης: 5, 10, 25, 50, 100, 250 και 500 ng mL⁻¹. Οι ουσίες ορίου εμβολιάστηκαν εις τριπλούν στο καθορισμένο όριο συγκέντρωσής τους. Άρα, για κάθε υπόστρωμα παρασκευάστηκαν ένα λευκό και επτά εμβολιασμένα δείγματα στο κάθε στάδιο, Α και Β, της μεθόδου. Οι εξεταζόμενες ουσίες, πλην των ουσιών ορίου, ομαδοποιήθηκαν σε δύο πολυσυστατικά διαλύματα συγκέντρωσης 12,5 μg mL⁻¹, τα οποία αραιώθηκαν σε συγκεντρώσεις τέτοιες, ώστε ο εμβολιασμός των δειγμάτων να γινόταν με όγκο 20-200 μL διαλύματος.

Όσον αφορά στα εσωτερικά πρότυπα χρησιμοποιήθηκαν τα εξής:

α) 5,0 μg γλυκουρονίδιο ετιοχολανολόνης στα 5,0 mL ούρων για την ανάλυση LC-TOF-MS.

β) 1,0 μg μεφρουσιδίου και 3,5 μg ναλιδιξικού οξέος στα 5,0 mL ούρων για την ανάλυση GC-MS των μεθυλο-παραγωγοποιημένων δειγμάτων.

γ) 0,5 μg θειικής ανδροστερόνης και 0,25 μg μεθυλοτεστοστερόνης στα 2,5 mL ούρων για την ανάλυση GC-HRMS των TMS-παραγωγοποιημένων δειγμάτων.

δ) 5,0 μg κωδεΐνης στα 2,5 mL ούρων για την ανάλυση των δεδομένων, μέσω των προγραμμάτων AMDIS-DRS, κατόπιν ανάλυσης GC-MS. Το συγκεκριμένο εσωτερικό πρότυπο προστέθηκε μόνο στο λευκό δείγμα ούρων, λόγω του κοινού TMS-παραγωγού με τη μορφίνη.

Τα εσωτερικά πρότυπα επιλέγησαν έτσι, ώστε:

α) η δομή τους να είναι παρόμοια με αυτή των ουσιών που εξετάζονταν, πχ μεφρουσίδιο, ναλιδιξικό οξύ και μεθυλοτεστοστερόνη.

β) να αποσυζεύγνυνται, μέσω των σταδίων της υδρόλυσης, πχ το γλυκουρονίδιο ετιοχολανολόνης στην ενζυμική υδρόλυση και η θειική ανδροστερόνη στη μεθανόλυση έτσι, ώστε να γίνεται έλεγχος των συγκεκριμένων σταδίων.

7.3.2 Αποτελέσματα και συμπεράσματα δοκιμαστικού σταδίου

Στο συγκεκριμένο προκαταρκτικό πείραμα εξετάστηκε μόνο η ικανότητα ανίχνευσης των ουσιών επικύρωσης. Έτσι, για κάθε ανάλυση καταγράφηκε η ελάχιστη συγκέντρωση, στην οποία ανιχνεύτηκε η κάθε ουσία στο κάθε υπόστρωμα ούρων, με λόγο «σήμα προς θόρυβο» μεγαλύτερο από δύο. Τελικά, για κάθε ουσία επιλέχθηκε η μεγαλύτερη από τις δύο ελάχιστες συγκεντρώσεις. Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα από τις τρεις αναλύσεις παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον πίνακα 7.1. Οι ουσίες ορίου δε συμπεριλαμβάνονται στο συγκεκριμένο πίνακα. Επιπλέον, στην περίπτωση που κάποια ουσία ανιχνευόταν ταυτόχρονα από δύο ή τρεις τεχνικές, τότε στην τελευταία στήλη του πίνακα καταγράφεται η μικρότερη συγκέντρωση ανίχνευσης, C_i , μεταξύ αυτών που καταγράφονται στις πρώτες στήλες και που προέκυψαν από τις δύο ή τρεις αναλύσεις. Επίσης, η συγκέντρωση C_i διευκόλυνε στη δημιουργία πιο εξατομικευμένων επιπέδων συγκέντρωσης, για τον προσδιορισμό του ορίου ανίχνευσης (LOD) κάθε ουσίας στην επικύρωση της μεθόδου.

Από τα δεδομένα που ελήφθησαν από την ανάλυση LC-TOF-MS του εκχυλίσματος A1 προέκυψε ότι το μεγαλύτερο μέρος των εξεταζόμενων ουσιών ανιχνευόταν μέσω αυτής. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι ο χρόνος έκλουσης των ουσιών ατενολόνη, μορφίνη, σαλβουταμόλη και τερβουταλίνη διέφεραν έως και 0,27 min μεταξύ των δύο υποστρωμάτων. Αυτό αποδόθηκε στο γεγονός ότι οι τέσσερις ουσίες εκλούονταν στα πρώτα 2,5 min της ανάλυσης, μαζί με τις πολικές ουσίες του υποστρώματος των ούρων, οι οποίες ενδεχομένως να μετακίνησαν τις κορυφές των εξεταζόμενων ουσιών που εκλούονταν νωρίς. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι σε ορισμένες ουσίες, η ελάχιστη συγκέντρωση ανίχνευσης ήταν διαφορετική σε κάθε υπόστρωμα. Ενδεικτικά, αναφέρεται η δεξαμεθαζόνη, η οποία στο ένα υπόστρωμα ανιχνεύτηκε σε συγκέντρωση 10 ng mL^{-1} , ενώ στο άλλο υπόστρωμα ανιχνεύτηκε στα 25 ng mL^{-1} . Αυτό δικαιολογεί και το γεγονός ότι στην πρώτη φάση της ανάπτυξης μεθόδου η δεξαμεθαζόνη ανιχνεύτηκε σε συγκέντρωση 10 ng mL^{-1} κατά τη διαδικασία A' i, ενώ στην τρίτη φάση δεν ανιχνεύτηκε μέσω αυτής της διαδικασίας στα 10 ng mL^{-1} . Επιπλέον, για την

Πίνακας 7.1. Αποτελέσματα προκαταρκτικού δοκιμαστικού πειράματος για τη συγκέντρωση ανίχνευσης των ουσιών επικύρωσης σε δύο εμβολιασμένα δείγματα.

Ουσίες	Συγκέντρωση ουσιών στο δείγμα ούρων (ng mL ⁻¹)			C _{test} (ng mL ⁻¹)
	Ανάλυση LC-TOF-MS	Ανάλυση GC-MS Μεθυλο-παραγώγων	Ανάλυση GC-HRMS TMS-παραγώγων	
1-(3-Chlorophenyl)piperazine	25			25
16β-hydroxystanozolol	25		5,0	5,0
Amitriptylline	5,0			5,0
Amphetamine	5,0			5,0
Anastrozole	5,0			5,0
Atenolol	5,0		-	5,0
Benzoylecgonine	10		50	10
Bumetanide	25	25	10	10
Butorphanol	5,0			5,0
Caffeine	25			25
Capsaicin	5,0	50		5,0
Celecoxib	5,0			5,0
Chlorpromazine	5,0			5,0
Clenbuterol	5,0		50	5,0
Clonidine	5,0			5,0
Dexamethasone	25			25
Diflunisal	-	10		10
Diphenhydramine	5,0			5,0
Ephedrine	10			10
Ergonovine	5,0			5,0
Ethacrynic acid	250	50	10	10
Fentanyl	5,0			5,0
Flufenamic acid	25		5	5,0
Flunixin	5,0		25	5,0
Fluphenazine	5,0			5,0
Furosemide	500	50	25	25
Hydrochlorothiazide	50	50		50
Imipramine	5,0			5,0
Isoxsuprine	5,0			5,0
Ketoprofen	25		10	10
Lidocaine	5,0			5,0
Meloxicam	5,0			5,0
Mepivacaine	5,0			5,0
Methocarbamol	10			10
Methylphenidate	5,0			5,0
Morphine	5,0			5,0
Nikethamide	5,0			5,0
Nordiazepam	5,0			5,0
Nortriptyline	5,0			5,0
Nylidrin	5,0			5,0
Oxazepam	5,0			5,0
Pethidine	5,0			5,0
Phenobarbital	-	5,0	5,0	5,0
Phentermine	5,0			5,0
Phenylbutazone	100	25	50	25
Pyrilamine	5,0			5,0
Ractopamine	5,0			5,0
Salbutamol	10		25	10
Terbutaline	10		25	10
Theophylline	250		50	50
Timolol	5,0		50	5,0
Trenbolone	5,0		-	5,0
Triamcinolone acetonide	5,0			5,0
Trifluoperazine	5,0			5,0
Verapamil	5,0			5,0

εξέταση της ουσίας 1-(3-χλωροφαινυλο) πιπεραζίνη, η οποία έχει μοριακό τύπο $C_{10}H_{13}N_2Cl$, προτιμήθηκε το ιόν $[M+H]^+$ του ισότοπου ^{37}Cl , καθώς μέσω αυτού η ουσία ανιχνευόταν σε χαμηλότερη συγκέντρωση. Στο χρωματογράφημα ολικών ιόντων παρατηρήθηκε ότι στο λευκό δείγμα ούρων υπήρχε κορυφή στο χρόνο έκλουσης της ουσίας, με ιόν 197,1158 στο φάσμα μαζών της, η οποία εμπόδιζε την ανίχνευση της 1-(3-χλωροφαινυλο) πιπεραζίνη σε χαμηλή συγκέντρωση, μέσω του ψευδομοριακού ιόντος $[M+H]^+ = 197,0840$. Επίσης, για την καφεΐνη παρατηρήθηκε και πάλι παρεμπόδιση από το υπόστρωμα, η οποία, όμως, ξεπεράστηκε με αλλαγή της παραμέτρου ολοκλήρωσης της χρωματογραφικής κορυφής σε «No smoothing». Έτσι, η κορυφή του υποστρώματος ξεχώρισε από την κορυφή της καφεΐνης. Όσον αφορά στις ουσίες ορίου 3-μεθοξυτυραμίνη, υδροκορτιζόνη και θεοβρωμίνη, αυτές θα προσδιορίζονταν μέσω της τεχνικής LC-TOF-MS, καθώς μέσω αυτής ανιχνεύτηκαν και στα τρία δείγματα που εμβολιάστηκαν.

Από τα αποτελέσματα της ανάλυσης GC-HRMS του TMS-παραγωγοποιημένου εκχυλίσματος (A3+B) προέκυψε ότι για την ουσία κλενβουτερόλη υπήρχε παρεμπόδιση από το υπόστρωμα. Αυτό, όμως, δεν αποτέλεσε πρόβλημα, καθώς οι συγκεκριμένες ουσίες ανιχνεύονταν μέσω της ανάλυσης LC-TOF-MS του εκχυλίσματος A1 και, μάλιστα, σε συγκεντρώσεις 5,0 και 10 ng mL⁻¹. Ωστόσο, στα πειράματα της ανάπτυξης μεθόδου δεν είχε παρατηρηθεί παρεμπόδιση υποστρώματος για την κλενβουτερόλη. Όσον αφορά στις ουσίες ορίου, οι 5α-εστρανο-3β,17α-διόλη και τεστοστερόνη θα προσδιορίζονταν μέσω της GC-HRMS ανάλυσης του εκχυλίσματος A3+B.

7.3.3 Αποτελέσματα αυτόματης ανίχνευσης μέσω AMDIS-DRS

Η εφαρμογή της ανάλυσης δεδομένων μέσω των προγραμμάτων AMDIS και DRS οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η αυτόματη ανίχνευση των εξεταζόμενων ουσιών πραγματοποιήθηκε στα εμβολιασμένα δείγματα υψηλότερων συγκεντρώσεων. Πιο συγκεκριμένα, στα TMS-παραγωγοποιημένα δείγματα, οι ουσίες που ανιχνεύτηκαν είχαν συγκέντρωση μεγαλύτερη ή ίση των 250 ng mL⁻¹. Επίσης, στα μεθυλο-παραγωγοποιημένα δείγματα, οι ουσίες ανιχνεύτηκαν σε συγκέντρωση μεγαλύτερη ή ίση των 50 ng mL⁻¹ και στα δύο

υποστρώματα ούρων. Άρα, η αυτόματη ανίχνευση απαγορευμένων ουσιών, μέσω αυτόματης αναζήτησης σε βιβλιοθήκες φασμάτων μαζών, επιτυγχάνεται σε ψηλότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με τη στοχευμένη ανίχνευση απαγορευμένων ουσιών την οποία διενεργεί ο αναλυτής.

7.4 Κριτήρια ανίχνευσης απαγορευμένων ουσιών

Για τη διαδικασία της επικύρωσης της μεθόδου, στην ανάλυση LC-TOF-MS, η ανίχνευση των εξεταζόμενων ουσιών στηριζόταν στο χρόνο έκλουσης της κάθε ουσίας και στην ακριβή μάζα ενός διαγνωστικού ιόντος, με εύρος ± 20 ppm από τη θεωρητικά υπολογιζόμενη τιμή της ακριβούς μάζας του ιόντος. Οι ουσίες που εξετάστηκαν στην επικύρωση της μεθόδου, ιοντίζονταν προς το πρωτονιωμένο μόριο $[M+H]^+$, κατά τον θετικό ESI ιοντισμό, με εξαίρεση την ουσία υδροχλωροθειαζίδιο, η οποία ταυτοποιήθηκε ως ένωση προσθήκης, δηλαδή, μέσω του αμμωνιακού «adduct», $[M+NH_4]^+$.

Όσον αφορά στην ανάλυση GC-MS των μεθυλο-παραγωγοποιημένων δειγμάτων, οι εξεταζόμενες ουσίες ανιχνεύονταν με βάση το χρόνο έκλουσης και την παρουσία δύο διαγνωστικών ιόντων, δηλαδή, του μοριακού ιόντος της ουσίας και ενός θραύσματος, τα οποία έπρεπε να είχαν τη σωστή αναλογία και τον ίδιο χρόνο έκλουσης.

Τέλος, στην ανάλυση GC-HRMS των TMS-παραγωγοποιημένων δειγμάτων, η ανίχνευση των εξεταζόμενων ουσιών βασίστηκε στο χρόνο έκλουσης και στην παρουσία ενός ή δύο διαγνωστικών ιόντων ακριβούς μάζας.

Περισσότερες σχετικές πληροφορίες παρέχονται στη συνέχεια του κεφαλαίου, στο εδάφιο 7.7.3.

7.5 Σημεία ελέγχου μεθόδου

Η εφαρμογή της προτεινόμενης μεθόδου περικλύει ελέγχους, τόσο της προκατεργασίας των δειγμάτων, όσο και της καλής λειτουργίας των συστημάτων ανάλυσης. Για τον έλεγχο των φασματομέτρων μαζών, πριν από την έναρξη των αναλύσεων των δειγμάτων, διενεργείται είτε ρύθμιση («tuning») είτε βαθμονόμηση («calibration»), όπως έχει αναφερθεί λεπτομερέστερα στο υποκεφάλαιο 4.7.

Όσον αφορά, στην προετοιμασία των δειγμάτων, στο υποδείγμα του σταδίου A προστίθεται γλυκουρονίδιο ετιοχολανολόνης και στο υποδείγμα του σταδίου B προστίθεται θειική ανδροστερόνη έτσι, ώστε να ελεγχθεί, αντιστοίχως, η ενζυμική υδρόλυση και η μεθανόλυση. Στην περίπτωση που η ενζυμική υδρόλυση διεξάγεται ικανοποιητικά, και η υπόλοιπη προετοιμασία του δείγματος διενεργείται σωστά, τότε η αποσυζευγμένη ετιοχολανολόνη ανιχνεύεται, μέσω της ανάλυσης LC-TOF-MS, με ύψος χρωματογραφικής κορυφής μεγαλύτερο από 5×10^4 . Υπό τις ισχύουσες χρωματογραφικές συνθήκες η ετιοχολανολόνη αναμένεται να εκκλύεται στα $(9,98 \pm 0,30)$ min.

Επιπροσθέτως, είναι δυνατόν, να ελεγχθεί η TMS-παραγωγοποίηση στο εκχύλισμα A3+B, μέσω των αποσυζευγμένων ετιοχολανολόνη και ανδροστερόνη. Στην περίπτωση, δηλαδή, που η TMS-παραγωγοποίηση δεν εκτελείται επιτυχώς, τότε μέσω της ανάλυσης GC-HRMS ανιχνεύεται το μονο-TMS-παράγωγο των δύο εσωτερικών προτύπων. Στην αντίθετη περίπτωση, κατά την οποία η TMS-παραγωγοποίηση εξελίσσεται επιτυχώς, τότε ανιχνεύεται μόνο το δισ-TMS-παράγωγο της ετιοχολανολόνης και της ανδροστερόνης.

Επίσης, στο υπόδειγμα του σταδίου B προστίθεται ως εσωτερικό πρότυπο και η μεθυλοτεστοστερόνη, η οποία θα πρέπει να ανιχνεύεται, μέσω της ανάλυσης GC-HRMS με εμβαδόν χρωματογραφικής κορυφής μεγαλύτερο από 7×10^5 . Σε διαφορετική περίπτωση λαμβάνονται διορθωτικά μέτρα, όπως αλλαγή «liner», διαφράγματος («septum») ή προστήλης. Υπό τις ισχύουσες χρωματογραφικές συνθήκες η δισ-TMS-μεθυλοτεστοστερόνη αναμένεται να ανιχνεύεται σε χρόνο $(9,28 \pm 0,10)$ min. Επιπροσθέτως, για την πορεία με την ανάλυση GC-HRMS, ελέγχεται ο λόγος του αθροίσματος του εμβαδού των κορυφών των ετιοχολανολόνης και ανδροστερόνης προς το εμβαδόν της κορυφής της μεθυλοτεστοστερόνης σε κάθε δείγμα. Ο συγκεκριμένος λόγος θα πρέπει να παραμένει σταθερός στη διάρκεια της ανάλυσης GC-HRMS της αλληλουχίας των δειγμάτων. Τέλος, η ανάλυση GC-HRMS ελέγχεται, παρακολουθώντας την ένταση του σήματος που δίνει το επιλεγμένο ιόν του κάθε κλάσματος («fraction») στη διάρκεια της ανάλυσης. Η ένταση θα πρέπει να παραμείνει σταθερή.

Τέλος, για την πορεία με τη μεθυλο-παραγωγοποίηση και την ανάλυση GC-MS προστίθεται το μεφρουσίδιο και το ναλιδιξικό οξύ, μέσω των οποίων ελέγχεται τόσο η προετοιμασία του δείγματος όσο και η ανάλυση των δειγμάτων.

7.6 Σχεδιασμός επικύρωσης μεθόδου

Η αξιολόγηση της μεθόδου προσδιορισμού ταυτότητας απαγορευμένων ουσιών σε ούρα αλόγων εκτελέστηκε σύμφωνα με α) τις οδηγίες της «Eurachem» για την επικύρωση ποιοτικών χρωματογραφικών μεθόδων ¹⁷⁴ και β) την Τυποποιημένη Μέθοδο Εργασίας (TME022) του εργαστηρίου ελέγχου ντόπινγκ: «Γενικές οδηγίες αξιολόγησης αναλυτικών μεθόδων και υλικά αναφοράς». Για τη διαδικασία της επικύρωσης εξετάστηκαν τα ακόλουθα αναλυτικά χαρακτηριστικά:

- Όριο ανίχνευσης («Limit of Detection», LOD).
- Παρεμπόδιση από το υπόστρωμα («Matrix Interference»).
- Ανάκτηση από την εκχύλιση («Extraction Recovery»).
- Ικανότητα μέτρησης ακριβούς μάζας («Mass Accuracy»).
- Επίδραση από το υπόστρωμα («Matrix Effect»).
- Πιστότητα εντός της ημέρας («Within a day precision») και μεταξύ ημερών («Between days precision»).
- Έλεγχος επιμόλυνσης («Carry over contamination»).

Η πειραματική εργασία της επικύρωσης σχεδιάστηκε έτσι, ώστε ορισμένα από τα παραπάνω αναλυτικά χαρακτηριστικά να εξετάζονται συγχρόνως, όπου αυτό ήταν δυνατόν. Έτσι, η πειραματική διαδικασία χωρίστηκε σε τρεις κύκλους. Μέσω της πρώτης ομάδας πειραμάτων προσδιορίστηκε το όριο ανίχνευσης κι επιπλέον, ελέγχθηκαν τυχόν παρεμποδίσεις από το υπόστρωμα. Από τη δεύτερη ομάδα πειραμάτων προσδιορίστηκε ο χρόνος έκλουσης των εξεταζόμενων ουσιών, η ανάκτηση από την εκχύλιση, η επίδραση από το υπόστρωμα κι επίσης, ελέγχθηκε η ικανότητα μέτρησης ακριβούς μάζας, κατά την ανάλυση LC-TOF-MS. Τέλος, μέσω της τρίτης ομάδας πειραμάτων ελέγχθηκε η πιστότητα της μεθόδου.

7.7 Επικύρωση μεθόδου

7.7.1 Προσδιορισμός ορίου ανίχνευσης

7.7.1.1 Εκτέλεση πειραμάτων προσδιορισμού ορίου ανίχνευσης

Ως όριο ανίχνευσης θεωρήθηκε η ελάχιστη συγκέντρωση, στην οποία η ουσία ανιχνεύτηκε και στα δέκα εμβολιασμένα δείγματα ούρων με λόγο «σήμα προς θόρυβο» S/N, μεγαλύτερο από τρία. Το όριο ανίχνευσης προσδιορίστηκε για τις πενήντα πέντε ουσίες, καθώς οι υπόλοιπες πέντε ήταν ουσίες ορίου και εξετάστηκαν στη συγκέντρωση ορίου. Για τον καθορισμό του ορίου ανίχνευσης των υπό αξιολόγηση ουσιών, δέκα διαφορετικά λευκά υποστρώματα ούρων αλόγων εμβολιάστηκαν με τα πολυσυστατικά διαλύματα των εξεταζόμενων ουσιών σε έξι διαφορετικά επίπεδα συγκέντρωσης $0,25 \times C_t$, $0,5 \times C_t$, $1 \times C_t$, $2,5 \times C_t$, $5 \times C_t$, $10 \times C_t$, και στη συνέχεια, παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν με τα αντίστοιχα λευκά δείγματα. Τα πολυσυστατικά διαλύματα παρασκευάστηκαν με βάση τις διαφορετικές συγκεντρώσεις (C_t) που ελήφθησαν για κάθε ουσία, κατά το προκαταρκτικό δοκιμαστικό στάδιο. Τα πολυσυστατικά διαλύματα παρασκευάστηκαν σε τέτοιες συγκεντρώσεις, ώστε τα δείγματα να εμβολιαστούν με τα διαλύματα σε όγκους από 25 έως 125 μL .

7.7.1.2 Αποτελέσματα – συμπεράσματα προσδιορισμού ορίου ανίχνευσης

Τα αποτελέσματα προσδιορισμού του ορίου ανίχνευσης παρέχονται στον πίνακα 7.2. Στις πρώτες στήλες του πίνακα καταγράφεται για κάθε ανάλυση, η ελάχιστη συγκέντρωση, στην οποία η ουσία ανιχνεύτηκε και στα δέκα δείγματα ούρων. Στην τελευταία στήλη παρατίθεται το όριο ανίχνευσης, το οποίο επιλέχθηκε από την ανάλυση, στην οποία ελήφθη η χαμηλότερη συγκέντρωση ανίχνευσης. Στην περίπτωση που για κάποια ουσία προέκυψε το ίδιο όριο ανίχνευσης από την ανάλυση LC-TOF-MS και την ανάλυση GC-MS ή και τη GC-HRMS, τότε η LC-TOF-MS ήταν η τεχνική της επιλογής, λόγω των πλεονεκτημάτων που εμφανίζει. Τέτοιες ουσίες ήταν η σαλβουταμόλη και η κλενβουτερόλη. Οι ουσίες φουροσεμίδιο και φαινυλοβουταζόνη ανιχνεύτηκαν μέσω της ανάλυσης GC-MS μετά από μεθυλοπαραγωγοποίηση, λόγω των μη σταθερών TMS-παραγώγων τους. Επίσης, το αιθακρινικό οξύ ανιχνεύτηκε με την τεχνική GC-HRMS, μέσω του δεύτερου

Πίνακας 7.2. Αποτελέσματα προσδιορισμού ορίου ανίχνευσης των εξεταζόμενων ουσιών σε δέκα διαφορετικά εμβολιασμένα δείγματα ούρων.

Ουσίες	Ελάχιστη συγκέντρωση ανίχνευσης (ng mL ⁻¹)			C _{Lod} (ng mL ⁻¹)
	Ανάλυση LC-TOF-MS	Ανάλυση GC-MS Μεθυλο-παραγώγων	Ανάλυση GC- HRMS TMS-παραγώγων	
1-(3-Chlorophenyl)piperazine	62,5			62,5
16β-hydroxystanozolol	12,5		50	12,5
Amitriptylline	1,25			1,25
Amphetamine	1,25			1,25
Anastrozole	2,5			2,5
Atenolol	2,5		-	2,5
Benzoyllecgonine	25		100	25
Bumetanide	50	50	25	25
Butorphanol	1,25			1,25
Caffeine	62,5			62,5
Capsaicin	1,25	25		1,25
Celecoxib	12,5			12,5
Chlorpromazine	5,0			5,0
Clenbuterol	2,5		2,5	2,5
Clonidine	1,25			1,25
Dexamethasone	12,5			12,5
Diflunisal	-	5,0		5,0
Diphenhydramine	1,25			1,25
Ephedrine	25			25
Ergonovine	12,5			12,5
Ethacrynic acid	-	50	50	50
Fentanyl	1,25			1,25
Flufenamic acid	25	5,0	*	5,0
Flunixin	5,0		12,5	5,0
Fluphenazine	2,5			2,5
Furosemide	-	125	125	125
Hydrochlorothiazide	12,5	125		12,5
Imipramine	1,25			1,25
Isoxsuprine	1,25			1,25
Ketoprofen	25	25	50	25
Lidocaine	1,25			1,25
Meloxicam	1,25			1,25
Mepivacaine	1,25			1,25
Methocarbamol	5,0			5,0
Methylphenidate	1,25			1,25
Morphine	2,5		12,5	2,5
Nikethamide	2,5			2,5
Nordiazepam	1,25			1,25
Nortriptyline	12,5			12,5
Nylidrin	12,5			12,5
Oxazepam	2,5			2,5
Pethidine	1,25			1,25
Phenobarbital	-	5,0	25	5,0
Phentermine	2,5			2,5
Phenylbutazone	250	62,5	62,5	62,5
Pyrilamine	1,25			1,25
Ractopamine	5,0			5,0
Salbutamol	25		25	25
Terbutaline	10		10	10
Theophylline	100		50	50
Timolol	1,25		50	1,25
Trenbolone	12,5			12,5
Triamcinolone acetonide	5,0			5,0
Trifluoperazine	5,0			5,0
Verapamil	1,25			1,25

Όπου *: παρεμπόδιση από το υπόστρωμα

παραγώγου («artefact») που σχηματίζει κατά την TMS-παραγωγοποίηση, το οποίο δίνει πλεονέκτημα έναντι της ανάλυσης GC-MS του μεθυλοπαραγώγου του. Όσον αφορά στις ουσίες αιθακρινικό οξύ και φουροσεμίδιο, αυτές δεν ανιχνεύτηκαν, μέσω της ανάλυσης LC-TOF-MS στα συγκεκριμένα πειράματα, επειδή ελέγχθηκαν οι συγκεντρώσεις έως 100 και 250 ng mL⁻¹, αντιστοίχως, για την κάθε ουσία. Στο προκαταρκτικό δοκιμαστικό στάδιο οι ουσίες αυτές είχαν ανιχνευτεί μέσω της ανάλυσης LC-TOF-MS σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, δηλαδή, το αιθακρινικό οξύ στα 250 ng mL⁻¹ και το φουροσεμίδιο στα 500 ng mL⁻¹.

Όλες οι προσδιοριζόμενες ουσίες ανιχνεύτηκαν σε συγκέντρωση ίση ή χαμηλότερη των 62,5 ng mL⁻¹ με εξαίρεση το φουροσεμίδιο που είχε όριο ανίχνευσης τα 125 ng mL⁻¹. Για το 64% των εξεταζόμενων ουσιών, δηλαδή για τριάντα πέντε αναλύτες, το όριο ανίχνευσης κυμάνθηκε από 1,25 ng mL⁻¹ έως 5,0 ng mL⁻¹, ενώ το 25% των ουσιών, δηλαδή δεκατέσσερις αναλύτες, είχαν όριο ανίχνευσης στην περιοχή 10-25 ng mL⁻¹. Τα όρια ανίχνευσης των εξεταζόμενων ουσιών είναι σύμφωνα με τις ελάχιστες συγκεντρώσεις που απαιτούνται από τις «International Federation of Horseracing Authorities, IFHA» και το έκτο άρθρο του «International Agreement on Breeding, Racing and Wagering, IABRW», με εξαίρεση τις ουσίες βενζουλοεκγονίνη (20 ng mL⁻¹), βουμετανίδιο (10 ng mL⁻¹) και δεξαμεθαζόνη (2,0 ng mL⁻¹).⁹

7.7.2 Έλεγχος παρεμποδίσεων υποστρώματος

7.7.2.1 Εκτέλεση πειραμάτων ελέγχου παρεμποδίσεων υποστρώματος

Για τον έλεγχο παρεμποδίσεων από το υπόστρωμα αναλύθηκαν δέκα διαφορετικά λευκά δείγματα ούρων από τρία αρσενικά άλογα, τρία θηλυκά και τέσσερις εκτομείς, ώστε να εξεταστεί η ύπαρξη παρεμποδίζουσων κορυφών από το υπόστρωμα στους χρόνους ανάσχεσης των προσδιοριζόμενων ουσιών για τα επιλεγμένα διαγνωστικά ιόντα. Όσον αφορά στις αναλύσεις GC-MS και GC-HRMS, όπου εξετάζονται δύο διαγνωστικά ιόντα της απαγορευμένης ουσίας τότε, εάν εμφανίζεται κορυφή στον εξεταζόμενο χρόνο ανάσχεσης θα πρέπει επιπλέον να ελεγχθεί και η αναλογία των δύο ιόντων. Ο έλεγχος παρεμποδίσεων από τη μήτρα του δείγματος περιλαμβάνει συγκριτική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των λευκών δειγμάτων με εκείνα

της ανάλυσης των αντίστοιχων εμβολιασμένων δειγμάτων με τις υπό προσδιορισμό ουσίες.

7.7.2.2 Αποτελέσματα – συμπεράσματα ελέγχου παρεμποδίσεων υποστρώματος

Η ανάλυση δέκα διαφορετικών αρνητικών δειγμάτων ούρων αλόγων απέδειξε ότι στους χρόνους έκλουσης των προσδιοριζόμενων ουσιών οι παρεμποδίσεις από το υπόστρωμα, όπου παρατηρήθηκαν ήταν αμελητέες, με εξαίρεση το TMS-παραγωγοποιημένο φλουφαιναμικό οξύ κατά την ανάλυση GC-HRMS. Έτσι, ο συγκεκριμένος αναλύτης ανιχνεύτηκε μέσω της ανάλυσης GC-MS, μετά από μεθυλο-παραγωγοποίηση.

7.7.3 Χρωματογραφικά χαρακτηριστικά

Στο συγκεκριμένο εδάφιο δε γίνεται αναφορά σε κάποια παράμετρο της επικύρωσης, αλλά παρέχονται πληροφορίες για τους αναλύτες, οι οποίες προήλθαν από τον προσδιορισμό των δύο προηγούμενων παραμέτρων. Έτσι, στον πίνακα 7.3 παρουσιάζονται οι ουσίες που προσδιορίζονταν από την κάθε τεχνική, όπως επίσης και τα διαγνωστικά ιόντα των εξεταζόμενων παραγώγων ή των «adducts» αυτών. Επιπροσθέτως, παρατίθεται η θεραπευτική δράση της κάθε ουσίας. Συμπληρωματικά, στον πίνακα 7.3 δίνεται ο χρόνος έκλουσης των αναλύτων, όπως αυτός προσδιορίστηκε από έξι διαφορετικά εμβολιασμένα υποστρώματα. Για τα εσωτερικά πρότυπα επιχοχολανολόνη, μεφρουσίδιο και μεθυλοτεστοστερόνη οι χρόνοι έκλουσης ήταν 9,98 min (LC-TOF-MS), 11,9 min (GC-HRMS) και 9,28 min (GC-MS), αντιστοίχως. Στοιχεία επαναληψιμότητας των σχετικών χρόνων έκλουσης παρουσιάζονται στο εδάφιο 7.7.7.1.

7.7.4 Ανάκτηση από εκχύλιση

7.7.4.1 Εκτέλεση πειραμάτων προσδιορισμού ανάκτησης από εκχύλιση

Η ανάκτηση από την εκχύλιση μελετήθηκε σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις ($5\times\text{LOD}$, $10\times\text{LOD}$, $20\times\text{LOD}$) για όλες τις εξεταζόμενες ουσίες, εκτός από της ουσίες ορίου, για τις οποίες η ανάκτηση προσδιορίστηκε στη συγκέντρωση ορίου. Επίσης, η συγκεκριμένη παράμετρος προσδιορίστηκε για τρεις διαφορετικές εργαστηριακές ημέρες, αναλύοντας εις διπλούν δύο σειρές

Πίνακας 7.3. Θεραπευτική δράση, μοριακός τύπος, «adduct» / παράγωγο, διαγνωστικά ιόντα και χρόνος έκλουσης των εξεταζόμενων ουσιών.

Ουσία	Θεραπευτική δράση	Μοριακός Τύπος	«Adduct» / Παράγωγο	Διαγνωστικό ιόν	RT (min)
Ανάλυση LC-TOF-MS					
1-(3-Chlorophenyl)piperazine	Ψυχοενεργό	C ₁₀ H ₁₃ N ₂ Cl	[M+H] ⁺ (³⁷ Cl)	199,0812	4,90
16β-Hydroxystanozolol	Αναβολικό στεροειδές	C ₂₁ H ₃₂ N ₂ O ₂	[M+H] ⁺	345,2537	7,41
3-Methoxytyramine	Νευροδιαβιβαστής	C ₉ H ₁₃ NO ₂	[M+H] ⁺	168,1019	1,43
Amitriptyline	Αντικαταθλιπτικό	C ₂₀ H ₂₃ N	[M+H] ⁺	278,1903	7,48
Amphetamine	Διεγερτικό	C ₉ H ₁₃ N	[M+H] ⁺	136,1121	3,55
Anastrozole	Αναστολέας αρωματάσης	C ₁₇ H ₁₉ N ₅	[M+H] ⁺	294,1713	7,37
Atenolol	β-Αναστολέας	C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O ₃	[M+H] ⁺	267,1703	2,05
Benzoylcegonine	Διεγερτικό	C ₁₆ H ₁₉ NO ₄	[M+H] ⁺	290,1387	4,08
Butorphanol	Οπιοειδές	C ₂₁ H ₂₉ N ₂ O	[M+H] ⁺	328,2271	5,58
Caffeine	Διεγερτικό-Διουρητικό	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	[M+H] ⁺	195,0877	3,39
Capsaicin	Τοπικό αναλγητικό	C ₁₈ H ₂₇ NO ₃	[M+H] ⁺	306,2064	9,46
Celecoxib	NSAID	C ₁₇ H ₁₄ F ₃ N ₃ O ₂ S	[M+H] ⁺	382,0832	10,4
Chlorpromazine	Ηρεμιστικό	C ₁₇ H ₁₉ ClN ₂ S	[M+H] ⁺	319,1030	7,81
Clenbuterol	Βρογχοδιαστολέας	C ₁₂ H ₁₆ Cl ₂ N ₂ O	[M+H] ⁺	277,0869	4,82
Clonidine	Αντιυπερτασικό	C ₉ H ₉ Cl ₂ N ₃	[M+H] ⁺	230,0246	3,26
Dexamethasone	Κορτικοστεροειδές	C ₂₂ H ₂₉ FO ₅	[M+H] ⁺	393,2072	7,19
Diphenhydramine	Ανισταμινικό	C ₁₇ H ₂₁ NO	[M+H] ⁺	256,1696	6,48
Ephedrine	Διεγερτικό	C ₁₀ H ₁₅ NO	[M+H] ⁺	166,1226	3,00
Ergonovine	Αγγειοσυστολέας	C ₁₉ H ₂₃ N ₃ O ₂	[M+H] ⁺	326,1863	3,65
Fentanyl	Οπιοειδές αναλγητικό	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O	[M+H] ⁺	337,2274	6,39
Flunixin	NSAID	C ₁₄ H ₁₁ F ₃ N ₂ O ₂	[M+H] ⁺	297,0845	8,27
Fluphenazine	Αντιψυχωτικό	C ₂₂ H ₂₆ F ₃ N ₃ OS	[M+H] ⁺	438,1821	8,27
Hydrochlorothiazide	Διουρητικό	C ₇ H ₈ ClN ₃ O ₄ S ₂	[M+NH ₄] ⁺	314,9978	3,51
Hydrocortisone	Κορτικοστεροειδές	C ₂₁ H ₃₀ O ₅	[M+H] ⁺	363,2166	6,43
Imipramine	Αντικαταθλιπτικό	C ₁₉ H ₂₄ N ₂	[M+H] ⁺	281,2012	7,27
Isoxsuprine	Αγγειοδιαστολέας	C ₁₈ H ₂₃ NO ₃	[M+H] ⁺	302,1751	5,40
Ketoprofen	NSAID	C ₁₆ H ₁₄ O ₃	[M+H] ⁺	255,1016	8,20
Lidocaine	Τοπικό αναισθητικό	C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O	[M+H] ⁺	235,1805	4,31
Meloxicam	NSAID	C ₁₄ H ₁₃ N ₃ O ₄ S ₂	[M+H] ⁺	352,0420	7,51
Mepivacaine	Τοπικό αναισθητικό	C ₁₅ H ₂₂ N ₂ O	[M+H] ⁺	247,1805	4,28
Methocarbamol	Μυοχαλαρωτικό	C ₁₁ H ₁₅ NO ₅	[M+H] ⁺	242,1023	5,06
Methylphenidate	Διεγερτικό	C ₁₄ H ₁₉ NO ₂	[M+H] ⁺	234,1489	4,87
Morphine	Οπιοαναλγητικό	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	[M+H] ⁺	286,1438	1,54
Nikethamide	Διεγερτικό	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O	[M+H] ⁺	179,1179	4,43
Nordiazepam	Ηρεμιστικό	C ₁₅ H ₁₁ ClN ₂ O	[M+H] ⁺	271,0633	8,22
Nortriptyline	Αντικαταθλιπτικό	C ₁₉ H ₂₁ N	[M+H] ⁺	264,1747	7,32
Nylidrin	Συμπαθομιμητικό	C ₁₉ H ₂₅ NO ₂	[M+H] ⁺	300,1958	5,85
Oxazepam	Αγχολυτικό	C ₁₅ H ₁₁ ClN ₂ O ₂	[M+H] ⁺	287,0582	7,33
Pethidine	Οπιοαναλγητικό	C ₁₅ H ₂₁ NO ₂	[M+H] ⁺	248,1645	5,30
Phentermine	Αντισπασμωδικό	C ₁₀ H ₁₅ N	[M+H] ⁺	150,1277	4,01
Pyrilamine	Ανισταμινικό	C ₁₇ H ₂₃ N ₃ O	[M+H] ⁺	286,1914	6,22
Ractopamine	β-Αγωνιστής	C ₁₈ H ₂₄ NO ₃	[M+H] ⁺	302,1751	4,25
Salbutamol	Βρογχοδιαστολέας	C ₁₃ H ₂₁ NO ₃	[M+H] ⁺	240,1594	1,86
Terbutaline	Βρογχοδιαστολέας	C ₁₂ H ₁₉ NO ₃	[M+H] ⁺	226,1438	1,87
Theobromine	Αγγειοδιαστολέας	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂	[M+H] ⁺	181,0720	1,75
Timolol	β-Αναστολέας	C ₁₃ H ₂₄ N ₄ O ₃ S	[M+H] ⁺	317,1642	4,56
Trenbolone	Αναβολικό στεροειδές	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	[M+H] ⁺	271,1693	7,63
Triamcinolone acetonide	Κορτικοστεροειδές	C ₂₄ H ₃₁ FO ₆	[M+H] ⁺	435,2177	7,57
Trifluoperazine	Αντιψυχωτικό	C ₂₁ H ₂₄ F ₃ N ₃ S	[M+H] ⁺	408,1716	8,72
Verapamil	Αντιαρρυθμικό	C ₂₇ H ₃₈ N ₂ O ₄	[M+H] ⁺	455,2904	7,46
Ανάλυση GC-MS μεθυλο-παραγώγων					
Diflunisal	Αναλγητικό	C ₁₃ H ₈ F ₂ O ₃	δισ-μεθυλο	247; 278	6,89
Flufenamic acid	NSAID	C ₁₄ H ₁₀ F ₃ NO ₂	μονο-μεθυλο	263; 295	6,21
Furosemide	Διουρητικό	C ₁₂ H ₁₁ ClN ₂ O ₅ S	τρι-μεθυλο	81; 372	11,7
Ketoprofen	NSAID	C ₁₆ H ₁₄ O ₃	μονο-μεθυλο	209; 268	7,74
Phenobarbital	Ηρεμιστικό	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O ₃	δισ-μεθυλο	232; 117	6,02
Phenylbutazone	NSAID	C ₁₉ H ₂₀ N ₂ O ₂	μονο-μεθυλο	322; 266	8,82
Ανάλυση GC-HRMS TMS-παραγώγων					
5α-estrane-3β,17α-diol	Αναβολικό στεροειδές	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	bis-TMS	332,2536; 407,2802	7,69
Bumetanide	Διουρητικό	C ₁₇ H ₂₀ N ₂ O ₅ S	bis-TMS	508,1884	10,5
Ethacrynic acid	Διουρητικό	C ₁₃ H ₁₂ Cl ₂ O ₄	mono-TMS	315,0375;	8,46
Testosterone	Αναβολικό στεροειδές	C ₁₉ H ₂₈ O ₂	bis-TMS	317,0375	8,76
Theophylline	Βρογχοδιαστολέας	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂	mono-TMS	432,2880	3,55

από έξι διαφορετικά υποστρώματα ούρων αλόγων. Η πρώτη σειρά δειγμάτων εμβολιάστηκε με τις υπό προσδιορισμό ουσίες αρχικά στα ούρα, πριν από το στάδιο της εκχύλισης, ενώ η δεύτερη σειρά δειγμάτων εμβολιάστηκε με τις υπό προσδιορισμό ουσίες μετά από την εκχύλιση, στην οργανική στιβάδα. Παράλληλα με τα παραπάνω, παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν τα αντίστοιχα λευκά δείγματα. Ο εμβολιασμός των λευκών υποστρωμάτων πραγματοποιήθηκε με νέα πολυσυστατικά διαλύματα που παρασκευάστηκαν, με βάση το όριο ανίχνευσης της κάθε ουσίας. Ο όγκος εμβολιασμού των δειγμάτων κυμάνθηκε από 20 έως 100 μL διαλύματος ανά 5,0 mL στο στάδιο A και ανά 2,5 mL στο στάδιο B.

7.7.4.2 Αποτελέσματα – συμπεράσματα προσδιορισμού ανάκτησης από εκχύλιση

Ο προσδιορισμός της ανάκτησης από εκχύλιση στηρίχθηκε στη σύγκριση α) του εμβαδού της χρωματογραφικής κορυφής κάθε ουσίας που εμβολιάστηκε στο δείγμα πριν από την εκχύλιση, και β) του εμβαδού της κορυφής της αντίστοιχης ουσίας που εμβολιάστηκε στην οργανική στιβάδα μετά την εκχύλιση, στην ίδια συγκέντρωση. Πιο συγκεκριμένα, η επί τοις εκατό ανάκτηση από την εκχύλιση για κάθε προσδιοριζόμενη ουσία υπολογίστηκε, σύμφωνα με τον ακόλουθο τύπο:

$$\% \text{ Ανάκτηση} = 100 \times \frac{(\text{εμβαδόν κορυφής αναλύτη})_{\text{εμβολιασμός πριν την εκχύλιση}}}{(\text{εμβαδόν κορυφής αναλύτη})_{\text{εμβολιασμός μετά την εκχύλιση}}} \quad (7.1)$$

Για τον υπολογισμό της ανάκτησης των ουσιών ορίου, οι οποίες παρευρίσκονται στα λευκά δείγματα ούρων (υποκεφάλαιο 7.2), πραγματοποιήθηκε διόρθωση του εμβαδού της κορυφής του αναλύτη του εμβολιασμένου δείγματος, ως προς το εμβαδόν της κορυφής του αναλύτη του λευκού δείγματος.

Καταρχήν, η συγκεκριμένη παράμετρος υπολογίστηκε για κάθε ένα από τα έξι υποστρώματα και κατόπιν, υπολογίστηκε ο μέσος όρος αυτών σε κάθε μια από τις τρεις συγκεντρώσεις. Αυτό έγινε και τις τρεις εργαστηριακές ημέρες. Επιπλέον, υπολογίστηκαν οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις της ανάκτησης μεταξύ των έξι διαφορετικών υποστρωμάτων και μεταξύ των τριών εργαστηριακών ημερών.

Πίνακας 7.4. Αποτελέσματα προσδιορισμού ανάκτησης από εκχύλιση σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων για n=3 εργαστηριακές ημέρες. Όπου *: ουσία ορίου.

Ουσίες	% Ανάκτηση από εκχύλιση (% RSD)		
	5×LOD	10×LOD	20×LOD
Ανάλυση LC-TOF-MS			
1-(3-Chlorophenyl)piperazine	72 (13)	74 (11)	82 (9,6)
16β-hydroxystanozolol	64 (8,8)	57 (15)	70 (8,6)
3-methoxytyramine*	26 (19)		
Amitriptyline	57 (6,9)	54 (8,8)	64 (9,9)
Amphetamine	55 (6,1)	58 (3,0)	74 (2,9)
Anastrozole	77 (0,89)	71 (7,7)	86 (6,2)
Atenolol	38 (38)	35 (41)	44 (38)
Benzoyllecgonine	13 (53)	14 (59)	18 (57)
Butorphanol	68 (6,7)	64 (5,7)	79 (4,4)
Caffeine	81 (13)	68 (2,6)	84 (1,3)
Capsaicin	61 (4,6)	58 (6,4)	72 (3,4)
Celecoxib	51 (6,7)	48 (17)	65 (15)
Chlorpromazine	48 (9,2)	47 (9,4)	59 (8,5)
Clenbuterol	73 (4,4)	71 (4,0)	89 (4,3)
Clonidine	79 (9,6)	71 (3,1)	83 (0,70)
Dexamethasone	74 (5,9)	70 (8,0)	87 (6,5)
Diphenhydramine	69 (5,8)	66 (11)	73 (9,0)
Ephedrine	57 (8,7)	60 (15)	69 (3,7)
Ergonovine	73 (7,4)	67 (2,7)	76 (7,6)
Fentanyl	65 (0,84)	57 (4,4)	68 (0,56)
Flunixin	74 (5,1)	71 (4,3)	90 (2,7)
Fluphenazine	53 (9,9)	45 (21)	51 (4,7)
Hydrochlorothiazide	68 (6,9)	68 (9,3)	83 (7,0)
Hydrocortisone*	75 (5,7)		
Imipramine	62 (9,6)	59 (12)	71 (11)
Isoxsuprine	77 (2,1)	70 (4,7)	83 (4,3)
Ketoprofen	50 (25)	52 (31)	63 (30)
Lidocaine	72 (9,4)	68 (4,6)	81 (0,15)
Meloxicam	63 (13)	61 (18)	80 (13)
Mepivacaine	76 (6,8)	71 (3,9)	89 (4,2)
Methocarbamol	78 (7,4)	73 (3,9)	92 (1,8)
Methylphenidate	63 (5,8)	62 (9,5)	73 (9,1)
Morphine	88 (0,62)	64 (9,4)	79 (11)
Nikethamide	68 (9,0)	61 (2,1)	82 (2,1)
Nordiazepam	64 (5,8)	63 (6,7)	80 (6,5)
Nortriptyline	62 (16)	60 (19)	68 (12)
Nylidrin	81 (0,64)	77 (2,9)	88 (2,7)
Oxazepam	71 (7,2)	72 (7,2)	89 (5,7)
Pethidine	72 (5,6)	69 (7,9)	80 (8,7)
Phentermine	74 (4,3)	75 (6,4)	84 (4,0)
Pyrilamine	69 (9,0)	66 (9,1)	78 (11)
Ractopamine	86 (3,0)	79 (3,1)	92 (3,2)
Salbutamol	37 (28)	43 (31)	54 (29)
Terbutaline	41 (27)	54 (31)	59 (29)
Theobromine*	46 (13)		
Timolol	77 (6,1)	72 (2,9)	89 (2,9)
Trenbolone	71 (8,2)	69 (1,1)	82 (3,3)
Triamcinolone acetonide	70 (8,0)	66 (5,3)	83 (3,9)
Trifluoperazine	46 (30)	37 (26)	40 (12)
Verapamil	54 (3,9)	51 (3,9)	61 (5,4)
Ανάλυση GC-MS μεθυλο-παραγώγων			
Diflunisal	68 (11)	61 (11)	75 (19)
Flufenamic acid	64 (5,7)	64 (14)	79 (12)
Furosemide	39 (15)	36 (34)	44 (16)
Ketoprofen	48 (28)	51 (37)	59 (34)
Phenobarbital	64 (14)	68 (15)	82 (21)
Phenylbutazone	22 (7,0)	20 (12)	27 (14)
Ανάλυση GC-HRMS TMS-παραγώγων			
5α-estrane-3β,17α-diol*	103 (6,3)		
Bumetanide	37 (6,4)	34 (18)	35 (15)
Ethacrynic acid	21 (20)	20 (45)	19 (9,7)
Testosterone*	118 (11)		
Theophylline	40 (17)	40 (28)	50 (29)

Ο μέσος όρος της επι τοις εκατό ανάκτησης από την εκχύλιση κάθε ουσίας, καθώς και οι αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις από τις τρεις εργαστηριακές ημέρες παρουσιάζονται στον πίνακα 7.4. Τα αποτελέσματα των ουσιών ορίου τοποθετήθηκαν στη στήλη της συγκέντρωσης 5×LOD παρόλο που αυτές εξετάστηκαν στη συγκέντρωση ορίου. Οι μέσοι όροι της εν λόγω παραμέτρου κυμαίνονται από 13% (βενζοϋλοεκγονίνη) έως 88% (μορφίνη), από 14% (βενζοϋλοεκγονίνη) έως 79% (ρακτοπαμίνη) και από 18% (βενζοϋλοεκγονίνη) έως 92% (ρακτοπαμίνη) στις συγκεντρώσεις 5×LOD, 10×LOD και 20×LOD, αντιστοίχως. Ο μέσος όρος των ανακτήσεων των πενήντα πέντε αναλύτων για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης, 5×LOD, 10×LOD και 20×LOD, είναι 62%, 59% και 71%, αντιστοίχως. Σχετικά με τις ουσίες ορίου, οι ληφθέντες μέσοι όροι κυμάνθηκαν από 26% (3-μεθοξυτυραμίνη) έως 118% (τεστοστερόνη). Τουλάχιστον σαράντα επτά από τις εξήντα ουσίες που εξετάστηκαν (78%) παρουσίασαν μέσες τιμές ανάκτησης πάνω από 50% και στα τρία επίπεδα συγκέντρωσης. Η υδρόφιλη και επαμφοτερίζουσα βενζοϋλοεκγονίνη ($pK_{a1}=2,3$, $pK_{a2}=11,2$), όπως επίσης και οι όξινες ουσίες φαινυλοβουταζόνη ($pK_a=4,5$) και αιθακρινικό οξύ ($pK_a=3,5$) εκχυλίστηκαν με ανάκτηση ίση ή μικρότερη από 20%. Η χαμηλή ανάκτηση από την εκχύλιση της βενζοϋλοεκγονίνης θα μπορούσε να αποδοθεί στην αποσύνθεσή της υπό βασικές συνθήκες, κατά την παρασκευαστική διαδικασία¹⁷⁵. Παρόλα αυτά, οι ουσίες αυτές ήταν ανιχνεύσιμες σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες από 63 ng mL⁻¹.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η ανάκτηση από την εκχύλιση εμφάνισε εξάρτηση από τη συγκέντρωση του αναλύτη καθώς, για τις περισσότερες ουσίες η ανάκτηση ήταν αυξημένη κατά 10% στην ψηλότερη συγκέντρωση 20×LOD, συγκριτικά με τις αντίστοιχες τιμές στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις 5×LOD και 10×LOD. Επιπλέον, οι πολικές ουσίες ατενολόνη, τριφθοροπιραζίνη, σαλβουταμόλη, τερβουταλίνη, κετοπροφαίνιο και βενζοϋλοεκγονίνη παρουσίασαν στη συγκεκριμένη παράμετρο διακύμανση μεταξύ των ημερών, επειδή η εκχύλισή τους επηρεάζεται πολύ από μικρές μεταβολές στο pH της εκχύλισης. Επίσης, η ανάκτηση από την εκχύλιση εξετάστηκε σε έξι διαφορετικά υποστρώματα ούρων αλόγων και τα αποτελέσματα απέδειξαν ότι αυτή δεν εξαρτάται από το υπόστρωμα, με

εξαίρεση τους αναλύτες φλουφenaζίνη, τριφθοροπιραζίνη, βουμετανίδιο και θεοφυλλίνη, για τους οποίους προέκυψε σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) μεγαλύτερη από 20%, για τουλάχιστον δύο εργαστηριακές ημέρες. Παρατηρήθηκε ότι οι τιμές %RSD της ανάκτησης για τις ουσίες που ανιχνεύτηκαν μέσω των GC-HRMS και GC-MS ήταν ψηλότερες από τις αντίστοιχες τιμές των ουσιών που ανιχνεύτηκαν μέσω του LC-TOF-MS, λόγω του πρόσθετου σταδίου της παραγωγοποίησης που απαιτείται στις αναλύσεις GC-MS.

7.7.5 Ικανότητα μέτρησης ακριβούς μάζας

7.7.5.1 Εκτέλεση πειραμάτων ελέγχου ικανότητας μέτρησης ακριβούς μάζας

Η ικανότητα μέτρησης ακριβούς μάζας αφορά μόνο στην ανάλυση LC-TOF-MS και εξετάστηκε σε έξι διαφορετικά υποστρώματα, στο επίπεδο συγκέντρωσης $10 \times \text{LOD}$ (πλην των ουσιών ορίου), για τρεις διαφορετικές εργαστηριακές ημέρες σε διάστημα τεσσάρων μηνών, χρησιμοποιώντας «lock mass correction» κατά την ανάλυση των δειγμάτων. Τα δείγματα εμβολιάστηκαν με τις εξεταζόμενες ουσίες αρχικά στα ούρα.

7.7.5.2 Αποτελέσματα – συμπεράσματα ελέγχου ικανότητας μέτρησης ακριβούς μάζας

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία ¹⁷⁶, όταν η ένταση της χρωματογραφικής κορυφής του αναλύτη είναι πολύ χαμηλή ($<1 \times 10^3$) ή πολύ ψηλή ($<1 \times 10^6$), τότε η ικανότητα μέτρησης της ακριβούς μάζας μειώνεται. Έτσι, η συγκεκριμένη παράμετρος επικύρωσης ελέγχθηκε στο ενδιάμεσο επίπεδο συγκέντρωσης, $10 \times \text{LOD}$, όπου οι εντάσεις των χρωματογραφικών κορυφών των προσδιοριζόμενων ουσιών ήταν στην πλειοψηφία τους στην περιοχή μεταξύ 1×10^4 και 5×10^5 . Για κάθε μια από τις προσδιοριζόμενες ουσίες υπολογίστηκε το σφάλμα μάζας, «mass error», σε ppm, το οποίο προέκυψε από τη σύγκριση της μάζας του διαγνωστικού ιόντος που ελήφθη από το φάσμα μαζών ($m/z_{\text{πειρ.}}$) και της θεωρητικά υπολογιζόμενης μάζας ($m/z_{\text{θεωρ.}}$) με βάση το μοριακό τύπο. Για τον υπολογισμό του σφάλματος μάζας χρησιμοποιήθηκε ο ακόλουθος τύπος:

$$\text{Σφάλμα μέτρησης ακριβούς μάζας (ppm)} = 10^6 \times \frac{m/z_{\text{πειρ.}} - m/z_{\text{θεωρ.}}}{m/z_{\text{θεωρ.}}} \quad (7.2)$$

Στον πίνακα 7.5 παρατίθενται οι μέσοι όροι και οι αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις των σφαλμάτων μέτρησης ακριβούς μάζας των προσδιοριζόμενων ουσιών, από την ανάλυση LC-TOF-MS έξι υποστρωμάτων ούρων αλόγων, για καθεμία από τις τρεις εργαστηριακές ημέρες. Στην τελευταία στήλη του πίνακα καταγράφεται ο μέσος όρος των σφαλμάτων από τις τρεις εργαστηριακές ημέρες, ενώ οι δύο τελευταίες γραμμές αφορούν αποτελέσματα για το σύνολο των προσδιοριζόμενων ουσιών της κάθε στήλης.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα σφάλματα μάζας κάθε εξεταζόμενης ουσίας ήταν και θετικά και αρνητικά, τόσο μεταξύ των έξι υποστρωμάτων, όσο και μεταξύ των ημερών. Βέβαια, ο μέσος όρος των σφαλμάτων όλων των ουσιών ήταν θετικός και τις τρεις εργαστηριακές ημέρες (1,2, 0,46 και 1,3 ppm). Οι μέσοι όροι μεταξύ των τριών ημερών (τελευταία στήλη πίνακα), κυμάνθηκαν από -2,8 ppm (διφαινυδραμίνη) έως 5,0 ppm (3-μεθοξυτυραμίνη), με 1,0 ppm συνολικό μέσο όρο από όλες τις εξεταζόμενες ουσίες (n=50). Η ουσία 3-μεθοξυτυραμίνη με το μεγαλύτερο σφάλμα μάζας είναι μικρό μόριο (MW=167) που εκλούεται νωρίς (RT=1,43 min) μαζί με άλλες ουσίες από το υπόστρωμα, οδηγώντας στο σχηματισμό λιγότερο οξείας και συμμετρικής κορυφής που είναι δυνατόν να οδηγεί σε αυξημένες τιμές m/z. Η τυπική απόκλιση των σφαλμάτων μάζας μεταξύ τριών ημερών ήταν μικρότερη από 4,1, αποδεικνύοντας σταθερότητα στη μέτρηση ακριβούς μάζας. Συμπερασματικά, οι τιμές των μέσων όρων και των τυπικών αποκλίσεων των σφαλμάτων μέτρησης ακριβούς μάζας, αποδεικνύουν την ικανότητα μέτρησης ακριβούς μάζας για το σύνολο των εξεταζόμενων ουσιών με τη συγκεκριμένη αναλυτική μέθοδο.

7.7.6 Επίδραση υποστρώματος

7.7.6.1 Εκτέλεση πειραμάτων προσδιορισμού επίδρασης υποστρώματος

Η επίδραση από το υπόστρωμα αφορά μόνο στην ανάλυση LC-TOF-MS και εξετάστηκε σε έξι διαφορετικά υποστρώματα, σε τρία επίπεδα συγκέντρωσης (5×LOD, 10×LOD, 20×LOD) και για τρεις διαφορετικές εργαστηριακές ημέρες.

Πίνακας 7.5. Μέσος όρος και τυπική απόκλιση σφαλμάτων μέτρησης ακριβούς μάζας των εξεταζόμενων ουσιών σε συγκέντρωση 10×LOD, κατά την ανάλυση LC-TOF-MS έξι υποστρωμάτων ούρων αλόγων σε τρεις εργαστηριακές ημέρες (ΕΗ).

Ουσία	Σφάλμα μάζας ^α (ppm) (τυπική απόκλιση)			Σφάλμα μάζας ^β (ppm)
	1 ^η ΕΗ	2 ^η ΕΗ	3 ^η ΕΗ	
1-(3-Chlorophenyl) piperazine	-1,2 (2,7)	1,0 (1,4)	0,84 (1,3)	0,22
16β-hydroxystanozolol	0,82 (0,74)	0,63 (0,62)	1,8 (0,44)	1,1
3-methoxytyramine	7,5 (4,5)	3,1 (1,2)	4,3 (0,80)	5,0
Amitriptylline	3,1 (2,9)	2,2 (3,2)	2,9 (2,5)	2,7
Amphetamine	4,0 (3,1)	1,8 (1,4)	-1,0 (1,9)	1,6
Anastrozole	1,2 (0,80)	0,11 (0,35)	1,5 (0,74)	0,94
Atenolol	1,2 (1,9)	-1,5 (1,6)	1,0 (1,9)	0,25
Benzoylecgonine	-1,7 (2,6)	-0,75 (1,1)	1,0 (0,86)	-0,50
Butorphanol	1,3 (1,4)	1,2 (1,1)	1,2 (0,59)	1,2
Caffeine	5,5 (0,70)	3,6 (1,6)	-2,4 (1,2)	2,2
Capsaicin	1,8 (1,5)	0,34 (0,29)	1,4 (0,56)	1,2
Celecoxib	1,0 (0,63)	-0,83 (0,45)	0,087 (0,81)	0,073
Chlorpromazine	2,6 (0,94)	1,9 (0,44)	2,6 (0,43)	2,4
Clenbuterol	-1,7 (2,5)	-0,42 (0,98)	1,0 (0,90)	-0,38
Clonidine	2,6 (1,1)	0,58 (0,94)	1,4 (0,51)	1,5
Dexamethasone	4,1 (1,2)	1,5 (0,68)	3,5 (0,91)	3,0
Diphenhydramine	-6,2 (3,9)	-2,0 (1,3)	-0,13 (0,53)	-2,8
Ephedrine	1,8 (2,3)	2,2 (0,62)	3,4 (0,98)	2,5
Ergonovine	1,2 (0,72)	-0,46 (0,69)	0,87 (0,81)	0,53
Fentanyl	1,1 (1,6)	0,89 (0,59)	1,7 (0,74)	1,2
Flunixin	3,5 (0,76)	1,9 (0,18)	3,5 (1,3)	2,9
Fluphenazine	1,6 (0,51)	1,2 (1,1)	2,0 (0,60)	1,6
Hydrochlorothiazide	2,1 (1,8)	-0,053 (1,5)	2,2 (2,3)	1,4
Hydrocortisone	-0,80 (2,84)	-0,10 (1,2)	2,1 (0,40)	0,4
Imipramine	0,71 (0,98)	1,2 (0,43)	1,0 (0,88)	1,0
Isoxsuprine	0,44 (1,0)	0,83 (0,41)	1,5 (0,40)	0,94
Ketoprofen	3,0 (0,47)	1,2 (0,55)	1,8 (0,33)	2,0
Lidocaine	-4,5 (3,6)	-1,3 (1,2)	-1,4 (1,8)	-2,4
Meloxicam	0,76 (1,1)	0,71 (1,3)	0,43 (0,86)	0,63
Mepivacaine	0,61 (1,6)	-0,47 (0,70)	0,00 (0,36)	0,045
Methocarbamol	0,69 (0,93)	0,00 (0,64)	0,83 (0,69)	0,50
Methylphenidate	-3,2 (3,1)	-0,78 (1,1)	0,28 (1,2)	-1,2
Morphine	2,7 (3,3)	0,23 (0,61)	1,6 (0,87)	1,5
Nikethamide	3,0 (2,4)	-0,47 (1,1)	1,1 (2,4)	1,2
Nordiazepam	0,92 (0,73)	0,55 (0,45)	0,43 (1,1)	0,64
Nortriptyline	-0,50 (1,5)	0,063 (0,50)	1,1 (0,68)	0,23
Nylidrin	-0,11 (2,3)	0,33 (0,82)	0,94 (0,68)	0,39
Oxazepam	1,4 (0,49)	-0,23 (1,1)	1,2 (0,90)	0,79
Pethidine	-0,20 (1,3)	0,13 (0,79)	0,54 (0,66)	0,16
Phentermine	-1,8 (1,2)	0,00 (1,4)	0,22 (1,8)	-0,52
Pyrilamine	1,4 (0,91)	0,52 (0,37)	1,4 (0,44)	1,1
Ractopamine	1,0 (0,97)	-1,0 (0,92)	0,50 (0,69)	0,17
Salbutamol	3,5 (1,4)	1,2 (0,53)	1,9 (0,57)	2,2
Terbutaline	2,2 (1,3)	0,74 (0,82)	0,66 (0,46)	1,2
Theobromine	3,8 (1,6)	1,9 (1,2)	1,9 (0,57)	2,5
Timolol	-0,053 (2,6)	0,11 (0,86)	1,6 (0,42)	0,56
Trenbolone	1,8 (1,8)	-3,6 (6,94)	1,5 (1,8)	-0,10
Triamcinolone acetonide	1,6 (0,46)	1,0 (0,49)	2,5 (0,31)	1,7
Trifluoperazine	1,7 (1,1)	0,45 (0,57)	1,9 (0,25)	1,3
Verapamil	1,5 (1,2)	1,4 (0,43)	1,6 (0,66)	1,5
Μέσος όρος σφάλματος^γ	1,2	0,46	1,3	1,0
Εύρος σφάλματος^γ	(-6,2) - (+7,5)	(-3,6) - (+3,6)	(-2,4) - (+4,3)	(-2,8) - (+5,0)

^α: Μέσος όρος από έξι διαφορετικά υποστρώματα ούρων αλόγων.

^β: Μέσος όρος από τρεις εργαστηριακές ημέρες.

^γ: Για το σύνολο των πενήντα εξεταζόμενων ουσιών.

Τα δείγματα εμβολιάστηκαν με τις εξεταζόμενες ουσίες μετά από την εκχύλιση, στην οργανική στιβάδα. Κάθε δείγμα παρασκευάστηκε εις διπλούν και αναλύθηκε εις διπλούν. Παράλληλα με τα δείγματα αναλύθηκαν και τα πρότυπα διαλύματα των υπό προσδιορισμό ουσιών μετά από εξάτμιση και ανασύστασή τους με το μίγμα των κινητών φάσεων.

7.7.6.2 Αποτελέσματα – συμπεράσματα προσδιορισμού επίδρασης υποστρώματος

Για τον προσδιορισμό της επίδρασης του υποστρώματος, το εμβαδόν της χρωματογραφικής κορυφής κάθε προσδιοριζόμενης ουσίας παρουσία υποστρώματος συγκρίθηκε με το εμβαδόν της κορυφής της αντίστοιχης ουσίας στην ίδια συγκέντρωση απουσία υποστρώματος. Ο υπολογισμός της συγκεκριμένης παραμέτρου έγινε με βάση τον ακόλουθο τύπο:

$$\% \text{επίδραση υποστρώματος} = 100 \times \frac{(\text{εμβαδόν κορυφής αναλύτη})_{\text{εμβολιασμός μετά την εκχύλιση}}}{(\text{εμβαδόν κορυφής αναλύτη})_{\text{διάλυμα αναλύτη, εξάτμιση \& ανασύσταση}}} \quad (7-3)$$

Όσον αφορά στις ουσίες ορίου που είναι συστατικά των λευκών δειγμάτων, προκειμένου οι υπολογισμοί να πραγματοποιηθούν στο όριο συγκέντρωσης, έγινε διόρθωση του εμβαδού της κορυφής του αναλύτη στο δείγμα, ως προς το εμβαδόν της κορυφής του αναλύτη στο λευκό δείγμα.

Η τιμή 100% υποδεικνύει ότι δεν υπάρχει επίδραση από το υπόστρωμα, καθώς το σήμα της ουσίας παρουσία και απουσία υποστρώματος είναι το ίδιο. Τιμές μεγαλύτερες από 100% φανερώνουν ενίσχυση του σήματος της προσδιοριζόμενης ουσίας, λόγω του υποστρώματος, ενώ τιμές μικρότερες από 100% δηλώνουν υποβάθμιση του σήματος της ουσίας. Επιπλέον, υπολογίστηκαν οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις της παραμέτρου μεταξύ των έξι διαφορετικών υποστρωμάτων και μεταξύ των τριών εργαστηριακών ημερών.

Οι μέσοι όροι της % επίδρασης του υποστρώματος, καθώς και οι αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις από τις τρεις εργαστηριακές ημέρες παρουσιάζονται στον πίνακα 7.6. Οι δύο τελευταίες γραμμές του πίνακα, αφορούν στο μέσο όρο και στο εύρος των τιμών της παραμέτρου από τις σαράντα επτά εξεταζόμενες ουσίες που παρατίθενται στον πίνακα. Οι ουσίες ορίου εξετάστηκαν στη συγκέντρωση ορίου και τα αποτελέσματά τους παρουσιάζονται στη στήλη της συγκέντρωσης 5×LOD. Στην πλειοψηφία των εξεταζόμενων ουσιών

Πίνακας 7.6. Αποτελέσματα προσδιορισμού επίδρασης υποστρώματος σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων για n=3 εργαστηριακές ημέρες. Όπου *: ουσία ορίου.

Ουσίες	% Επίδραση υποστρώματος (% RSD)		
	5×LOD	10×LOD	20×LOD
Ανάλυση LC-TOF-MS			
1-(3-Chlorophenyl)piperazine	51 (4,9)	58 (7,6)	60 (9,0)
16β-hydroxystanozolol	21 (30)	25 (32)	28 (19)
3-methoxytyramine*	76 (9,1)		
Amitriptylline	55 (4,9)	57 (8,5)	58 (3,0)
Amphetamine	47 (30)	69 (36)	52 (35)
Anastrozole	39 (26)	42 (27)	46 (27)
Atenolol	84 (4,3)	75 (11)	79 (5,9)
Benzoyllecgonine	35 (11)	39 (19)	46 (19)
Butorphanol	69 (1,6)	68 (9,7)	71 (8,0)
Caffeine	44 (24)	46 (25)	51 (17)
Capsaicin	53 (9,8)	50 (3,0)	51 (9,3)
Celecoxib	45 (18)	42 (13)	38 (21)
Chlorpromazine	55 (6,5)	82 (9,2)	136 (39)
Clenbuterol	61 (4,5)	61 (14)	68 (11)
Clonidine	69 (7,7)	71 (7,8)	72 (1,7)
Dexamethasone	47 (13)	45 (12)	47 (13)
Diphenhydramine	52 (20)	58 (24)	53 (19)
Ephedrine	78 (6,4)	86 (6,0)	87 (8,4)
Ergonovine	61 (17)	60 (17)	68 (18)
Fentanyl	65 (6,7)	63 (5,8)	63 (6,1)
Flunixin	35 (6,2)	37 (16)	40 (15)
Fluphenazine	55 (14)	100 (38)	108 (44)
Hydrochlorothiazide	61 (4,6)	68 (7,2)	76 (14)
Hydrocortisone*	72 (16)		
Imipramine	48 (9,7)	52 (10)	53 (3,6)
Isoxsuprine	63 (9,4)	58 (14)	61 (12)
Ketoprofen	60 (8,8)	64 (12)	69 (15)
Lidocaine	62 (3,1)	72 (12)	66 (6,2)
Meloxicam	42 (12)	45 (7,6)	49 (15)
Mepivacaine	64 (3,2)	68 (19)	68 (12)
Methocarbamol	55 (5,1)	58 (13)	63 (11)
Methylphenidate	63 (5,4)	76 (12)	67 (8,9)
Morphine	50 (17)	35 (34)	35 (26)
Nikethamide	49 (17)	77 (50)	57 (13)
Nordiazepam	53 (15)	62 (12)	69 (16)
Nortriptyline	43 (7,4)	48 (12)	52 (4,5)
Nylidrin	72 (8,9)	76 (10)	78 (7,3)
Oxazepam	159 (13)	166(12)	165(14)
Pethidine	63 (0,21)	72 (14)	60 (10)
Phentermine	18 (12)	24 (16)	19 (7,7)
Pyrilamine	89 (12)	90 (12)	83 (2,0)
Ractopamine	38 (17)	43 (18)	46 (20)
Salbutamol	85 (5,7)	87 (10)	97 (7,0)
Terbutaline	77 (6,5)	94 (14)	111 (12)
Theobromine*	58 (7,0)		
Timolol	62 (4,7)	61 (14)	66 (12)
Trenbolone	42 (7,8)	42 (5,3)	48 (5,5)
Triamcinolone acetonide	43 (13)	40 (16)	42 (12)
Trifluoperazine	56 (31)	115 (43)	107 (57)
Verapamil	59 (13)	58 (9,3)	59 (6,9)
Μέσος όρος (n=47)	57	64	66
Εύρος (n=47)	18-159	24-166	19-165

παρατηρήθηκε υποβάθμιση του σήματος, «ion suppression», όπως συνηθίζεται κατά την ανάλυση LC-ESI-MS. Η ψηλότερη καταστολή σήματος, 18-24%, συνέβη στη φαιντερμίνη ($M_r=149$), ενώ η μεγαλύτερη ενίσχυση σήματος «ion enhancement», 159-166%, παρατηρήθηκε στην οξαζεπάμη και στα τρία επίπεδα συγκέντρωσης. Παρόλη τη μεγάλη υποβάθμιση σήματος, η φαιντερμίνη ανιχνεύτηκε σε συγκέντρωση $2,5 \text{ ng mL}^{-1}$. Έχει αποδειχτεί ότι οι μικρές και πολικές ουσίες υφίστανται καταστολή στο σήμα τους^{177, 178}. Στις αντιψυχωτικές ουσίες φλουφαιναζίνη και τριφθοροπιραζίνη παρατηρήθηκε και καταστολή, αλλά και ενίσχυση του σήματος, τόσο μεταξύ των διαφορετικών επιπέδων συγκέντρωσης, όσο και μεταξύ των ημερών στις συγκεντρώσεις $10 \times \text{LOD}$ και $20 \times \text{LOD}$.

Επιπλέον, υπολογίστηκε η επί τοις εκατό σχετική τυπική απόκλιση (% RSD, $n=6$ υποστρώματα) των τιμών της επίδρασης έξι υποστρωμάτων, ώστε να εκτιμηθεί η διακύμανση μεταξύ διαφορετικών δειγμάτων. Οι τιμές αυτές απέδειξαν εξάρτηση της συγκεκριμένης παραμέτρου από το υπόστρωμα ($\text{RSD} > 20\%$) και ιδιαίτερα στις ουσίες ακετονίδιο τριαμκινολόνης, αμφεταμίνη, χλωροπρομαζίνη, φλουνιξίνη, μορφίνη, κελεκοξίβη, τρενβολόνη, φλουφαιναζίνη, τριφθοροπιραζίνη, νορτριπτυλίνη, φαιντερμίνη, εργονοβίνη και 16β-υδροξυστανοζολόλη. Επίσης, η επίδραση υποστρώματος εξετάστηκε σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις, διατηρώντας σταθερή την ποσότητα του υποστρώματος. Για ορισμένες ουσίες, όπως υδροχλωροθειαζίδιο και νορδιαζεπάμη αύξηση της συγκέντρωσης οδήγησε σε μείωση της καταστολής του σήματος. Αντίθετα, υπήρχαν ουσίες όπως οι βεραπαμίλιο, δεξαμεθαζόνη, φαιτανύλιο, για τις οποίες η επίδραση από το υπόστρωμα ήταν σταθερή και ανεξάρτητη από τη συγκέντρωση του αναλύτη.

7.7.7 Πιστότητα μεθόδου

7.7.7.1 Εκτέλεση πειραμάτων ελέγχου πιστότητας

Η πιστότητα της μεθόδου ελέγχθηκε σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις ($5 \times \text{LOD}$, $10 \times \text{LOD}$, $20 \times \text{LOD}$), αναλύοντας εις διπλούν έξι εμβολιασμένα υποδείγματα ενός λευκού δείγματος ούρων αλόγου εκτομέα, επί τρεις εργαστηριακές ημέρες σε διάστημα δύο μηνών υπό τις ίδιες συνθήκες. Οι ουσίες ορίου εξετάστηκαν στη συγκέντρωση ορίου και στους υπολογισμούς

αυτών πραγματοποιήθηκε η διόρθωση που διενεργήθηκε και στις προηγούμενες παραμέτρους επικύρωσης.

7.7.7.2 Αποτελέσματα – συμπεράσματα ελέγχου επαναληψιμότητας

Η εντός της ημέρας πιστότητα (επαναληψιμότητα) και η μεταξύ των ημερών πιστότητα (αναπαραγωγιμότητα) εκφράστηκε ως επί τοις εκατό σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) των σχετικών χρόνων ανάσχεσης (RRT) και των εμβαδών των χρωματογραφικών κορυφών. Όσον αφορά στην ανάλυση GC-HRMS, χρησιμοποιήθηκαν τα σχετικά εμβαδά των χρωματογραφικών κορυφών των προσδιοριζόμενων ουσιών ως προς το εσωτερικό πρότυπο 17α-μεθυλοτεστοστερόνη.

7.7.7.2.1 Πιστότητα - σχετικοί χρόνοι έκλουσης

Τα αποτελέσματα της πιστότητας των σχετικών χρόνων ανάσχεσης παρουσιάζονται στον πίνακα 7.7. Για τον υπολογισμό αυτών, ως εσωτερικά πρότυπα χρησιμοποιήθηκαν οι ουσίες ετιοχολανολόνη, μεφρουσίδιο και 17α-μεθυλοτεστοστερόνη για τις αναλύσεις LC-TOF-MS, GC-MS και GC-HRMS, αντιστοίχως.

Οι σχετικοί χρόνοι έκλουσης των πενήντα ουσιών που προσδιορίστηκαν μέσω της τεχνικής LC-TOF-MS παρουσίασαν σταθερότητα εντός μιας εργαστηριακής ημέρας, καθώς οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις για δώδεκα επαναλήψεις ($n = 6$ υποδείγματα $\times 2$ μετρήσεις) δεν υπερέβησαν την τιμή 1,1% στα τρία επίπεδα συγκεντρώσεων. Όσον αφορά στην αναπαραγωγιμότητα, οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις ($n=3$ ημέρες) ήταν μικρότερες από 1,4% και στις τρεις συγκεντρώσεις για τις σαράντα δύο προσδιοριζόμενες ουσίες, μέσω της τεχνικής LC-TOF-MS. Επίσης, για τις ουσίες εργονοβίνη, τερβουταλίνη και θεοβρομίνη η συγκεκριμένη παράμετρος κυμάνθηκε από 1,5 έως 2,7%. Οι υπόλοιπες πέντε ουσίες (αμφεταμίνη, 3-μεθοξυτυραμίνη, κλονιδίνη, εφεδρίνη και μορφίνη) εμφάνισαν σχετική τυπική απόκλιση ($n=3$ ημέρες) από 2,7 έως 7,0%. Η διακύμανση αυτή θα μπορούσε να αποδοθεί στο γεγονός ότι οι ουσίες εκλούνται νωρίς, στην αρχή της βαθμιδωτής έκλουσης (3-μεθοξυτυραμίνη, μορφίνη) κι επιπλέον στο σχήμα της χρωματογραφικής κορυφής, πχ όχι συμμετρική και οξεία χρωματογραφική κορυφή.

Πίνακας 7.7. Πιστότητα σχετικών χρόνων ανάλυσης α) επαναληψιμότητα (n=6 υποδείγματα × 2 μετρήσεις) και β) αναπαραγωγιμότητα (n=3 εργαστηριακές ημέρες).

Ουσίες	Επαναληψιμότητα (%RSD, n=12) & αναπαραγωγιμότητα (% RSD, n=3)		
	5×LOD	10×LOD	20×LOD
Ανάλυση LC-TOF-MS			
1-(3-Chlorophenyl)piperazine	0,091 (0,85)	0,13 (0,73)	0,087 (0,67)
16β-hydroxystanozolol	0,087 (0,27)	0,018 (0,20)	0,013 (0,17)
3-methoxytyramine*	0,66 (4,2)		
Amitriptyline	0,093 (0,47)	0,10 (0,41)	0,11 (0,42)
Amphetamine	0,16 (4,9)	0,24 (4,5)	0,16 (3,7)
Anastrozole	0,10 (0,15)	0,060 (0,16)	0,094 (0,13)
Atenolol	0,84 (1,3)	0,78 (1,2)	0,93 (1,2)
Benzoyllecgonine	0,12 (0,56)	0,15 (0,56)	0,13 (0,56)
Butorphanol	0,11 (0,77)	0,040 (0,72)	0,028 (0,69)
Caffeine	0,26 (1,0)	0,16 (1,0)	0,23 (1,0)
Capsaicin	0,032 (0,075)	0,0027 (0,093)	0,0019 (0,082)
Celecoxib	0,062 (0,21)	0,0019 (0,18)	0,0013 (0,17)
Chlorpromazine	0,092 (0,48)	0,10 (0,44)	0,10 (0,45)
Clenbuterol	0,12 (0,83)	0,092 (0,79)	0,14 (0,77)
Clonidine	0,28 (5,8)	0,34 (2,5)	0,31 (2,3)
Dexamethasone	0,079 (0,20)	0,019 (0,13)	0,014 (0,12)
Diphenhydramine	0,084 (0,57)	0,060 (0,53)	0,087 (0,51)
Ephedrine	0,29 (7,0)	0,33 (2,9)	0,41 (2,7)
Ergonovine	0,21 (2,4)	0,17 (2,4)	0,19 (2,3)
Fentanyl	0,085 (0,64)	0,028 (0,59)	0,020 (0,56)
Flunixin	0,090 (0,47)	0,087 (0,51)	0,091 (0,50)
Fluphenazine	0,093 (0,39)	0,070 (0,34)	0,074 (0,32)
Hydrochlorothiazide	0,16 (1,0)	0,16 (1,2)	0,13 (1,2)
Hydrocortisone*	0,084 (0,27)		
Imipramine	0,10 (0,48)	0,093 (0,42)	0,11 (0,43)
Isoxsuprine	0,11 (0,71)	0,14 (0,66)	0,12 (0,64)
Ketoprofen	0,090 (0,037)	0,073 (0,057)	0,092 (0,077)
Lidocaine	0,16 (0,61)	0,087 (0,51)	0,16 (0,51)
Meloxicam	0,085 (0,26)	0,074 (0,34)	0,088 (0,32)
Mepivacaine	0,12 (0,59)	0,15 (0,56)	0,12 (0,47)
Methocarbamol	0,12 (0,42)	0,049 (0,42)	0,034 (0,44)
Methylphenidate	0,12 (0,78)	0,053 (0,77)	0,11 (0,74)
Morphine	0,71 (3,5)	0,70 (3,5)	0,98 (3,8)
Nikethamide	0,12 (0,77)	0,16 (0,66)	0,16 (0,70)
Nordiazepam	0,071 (0,13)	0,011 (0,091)	0,0075 (0,066)
Nortriptyline	0,087 (0,48)	0,060 (0,43)	0,10 (0,40)
Nylidrin	0,11 (0,64)	0,10 (0,54)	0,11 (0,57)
Oxazepam	0,094 (0,20)	0,093 (0,14)	0,10 (0,13)
Pethidine	0,10 (0,70)	0,044 (0,65)	0,031 (0,64)
Phentermine	0,14 (0,94)	0,14 (0,84)	0,17 (0,24)
Pyrilamine	0,10 (0,54)	0,071 (0,69)	0,093 (0,66)
Ractopamine	0,12 (0,54)	0,068 (0,54)	0,10 (0,54)
Salbutamol	1,1 (1,1)	0,57 (1,3)	1,1 (1,4)
Terbutaline	0,97 (1,5)	0,94 (1,8)	1,1 (1,7)
Theobromine*	0,59 (2,7)		
Timolol	0,14 (0,75)	0,082 (0,68)	0,12 (0,63)
Trenbolone	0,085 (0,24)	0,016 (0,18)	0,011 (0,18)
Triamcinolone acetonide	0,085 (0,16)	0,016 (0,13)	0,082 (0,12)
Trifluoperazine	0,085 (0,39)	0,068 (0,32)	0,0052 (0,32)
Verapamil	0,076 (0,46)	0,017 (0,41)	0,012 (0,39)
Ανάλυση GC-MS μεθυλο-παραγώγων			
Diflunisal	0,044 (0,015)	0,065(0,057)	0,038 (0,016)
Flufenamic acid	0,073 (0,047)	0,046 (0,040)	0,038 (0,025)
Furosemide	0,055 (0,022)	0,045 (0,022)	0,041 (0,026)
Ketoprofen	0,075 (0,040)	0,00 (0,039)	0,038 (0,011)
Phenobarbital	0,048 (0,054)	0,048 (0,077)	0,082 (0,012)
Phenylbutazone	0,063 (0,015)	0,00 (0,024)	0,038 (0,012)
Ανάλυση GC-HRMS TMS-παραγώγων			
5α-estrane-3β,17α-diol*	0,069 (0,13)		
Bumetanide	0,029 (0,13)	0,058 (0,12)	0,042 (0,12)
Ethacrynic acid	0,031 (0,066)	0,056 (0,037)	0,055 (0,033)
Testosterone*	0,070 (0,0078)		
Theophylline	0,16 (0,36)	0,10 (0,35)	0,10 (0,27)

Όσον αφορά στην ανάλυση GC-MS του μεθυλο-παραγωγοποιημένου εκχυλίσματος A2 των δειγμάτων, παρατηρήθηκε αποδεκτή επαναληψιμότητα (n=12) και αναπαραγωγιμότητα (n=3), καθώς η σχετική τυπική απόκλιση των σχετικών χρόνων ανάσχεσης (RRT) των εξεταζόμενων ουσιών κυμάνθηκε μεταξύ 0,00 και 0,08% και στις δύο περιπτώσεις.

Ομοίως και στην ανάλυση GC-HRMS του TMS - παραγωγοποιημένου εκχυλίσματος A3+B των δειγμάτων, παρατηρήθηκε αποδεκτή επαναληψιμότητα (n=12) και αναπαραγωγιμότητα (n=3), καθώς η σχετική τυπική απόκλιση των σχετικών χρόνων ανάσχεσης των εξεταζόμενων ουσιών κυμάνθηκε από 0,031 έως 0,16%, και από 0,033 έως 0,36%, αντιστοίχως.

7.7.7.2.2 Πιστότητα - εμβαδό χρωματογραφικών κορυφών

Τα αποτελέσματα της πιστότητας των εμβαδών των χρωματογραφικών κορυφών των προσδιοριζόμενων ουσιών παρουσιάζονται στον πίνακα 7.8. Όσον αφορά στην ανάλυση LC-TOF-MS του εκχυλίσματος A1 των δειγμάτων, η επαναληψιμότητα των εμβαδών για δώδεκα επαναλήψεις (n = 6 υποδείγματα × 2 μετρήσεις) κυμάνθηκε από 2,6 (ρακτοπαμίνη) έως 14% (φλουφαιναζίνη), από 1,6 (ατενολόνη) έως 13% (φλουφαιναζίνη) και από 0,88 (τιμολόλη) έως 8,4% (φαιντερμίνη) για τις συγκεντρώσεις 5×LOD, 10×LOD και 20×LOD, αντιστοίχως. Εξάιρεση αποτέλεσε η ουσία τριφθοροπιραζίνη, για την οποία η σχετική τυπική απόκλιση υπολογίστηκε έως και 23% στις συγκεντρώσεις 5×LOD και 10×LOD. Οι μέσοι όροι των σχετικών τυπικών αποκλίσεων (n=50 ουσίες) ήταν ικανοποιητικοί και πιο συγκεκριμένα 7,8, 4,6 και 2,8% για τις συγκεντρώσεις 5×LOD, 10×LOD και 20×LOD, αντιστοίχως. Σχετικά με την αναπαραγωγιμότητα, οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις (n=3 ημέρες) των εμβαδών των χρωματογραφικών κορυφών κυμάνθηκαν από 2,7 (τιμολόλη) έως 41% (φαιντερμίνη), από 0,89 (τιμολόλη) έως 36% (φαιντερμίνη) και από 2,7 (νικεθαμίδιο) έως 34% (οξαζεπάμη) στις συγκεντρώσεις 5×LOD, 10×LOD και 20×LOD, αντιστοίχως, με αντίστοιχο συνολικό μέσο όρο σχετικών τυπικών αποκλίσεων (n=50 αναλύτες) 12, 11 και 14%. Η χαμηλότερη αναπαραγωγιμότητα παρατηρήθηκε για τη φαιντερμίνη, εξαιτίας της διπλής χρωματογραφικής κορυφής της την πρώτη και δεύτερη εργαστηριακή ημέρα.

Πίνακας 7.8. Πιστότητα εμβάδων κορυφών α) επαναληψιμότητα (n=6 υποδείγματα × 2 μετρήσεις) και β) αναπαραγωγιμότητα (n=3 εργαστηριακές ημέρες).

Ουσίες	Επαναληψιμότητα (%RSD, n=12) & αναπαραγωγιμότητα (% RSD, n=3)		
	5×LOD	10×LOD	20×LOD
Ανάλυση LC-TOF-MS			
1-(3-Chlorophenyl)piperazine	8,9 (13)	2,6 (12)	5,3 (13)
16β-hydroxystanozolol	14 (11)	6,3 (6,8)	3,5 (16)
3-methoxytyramine*	4,6 (1,9)		
Amitriptyline	8,0 (5,2)	4,6 (3,4)	2,6 (8,9)
Amphetamine	5,6 (20)	8,0 (19)	6,7 (23)
Anastrozole	6,2 (9,4)	3,9 (17)	1,9 (21)
Atenolol	8,7 (8,6)	1,6 (10)	2,8 (15)
Benzoylcegonine	5,2 (24)	2,5 (16)	4,2 (12)
Butorphanol	6,2 (8,3)	3,8 (3,4)	2,2 (9,2)
Caffeine	5,5 (9,0)	2,3 (6,1)	1,5 (11)
Capsaicin	9,7 (3,0)	6,8 (7,2)	2,9 (12)
Celecoxib	12 (19)	7,5 (10)	3,1 (15)
Chlorpromazine	10 (12)	6,9 (8,7)	2,6 (18)
Clenbuterol	5,3 (6,0)	2,4 (6,5)	1,6 (11)
Clonidine	4,4 (5,3)	2,9 (10)	1,9 (16)
Dexamethasone	8,4 (18)	2,8 (15)	1,1 (15)
Diphenhydramine	5,3 (8,7)	5,6 (5,8)	2,6 (12)
Ephedrine	8,6 (4,4)	4,1 (8,9)	4,0 (12)
Ergonovine	3,5 (18)	3,0 (17)	1,2 (14)
Fentanyl	9,1 (7,1)	5,7 (4,2)	2,3 (11)
Flunixin	5,6 (3,4)	2,3 (2,3)	1,9 (7,7)
Fluphenazine	14 (21)	13 (8,6)	2,7 (14)
Hydrochlorothiazide	9,6 (5,0)	3,7 (5,8)	3,9 (10)
Hydrocortisone*	8,4 (3,7)		
Imipramine	8,8 (6,8)	5,1 (13)	1,4 (16)
Isoxsuprine	6,0 (4,9)	3,0 (9,3)	1,1 (10)
Ketoprofen	5,6 (8,0)	2,8 (8,1)	1,7 (18)
Lidocaine	6,3 (11)	3,9 (3,8)	2,7 (4,1)
Meloxicam	8,3 (14)	5,2 (1,5)	2,2 (8,7)
Mepivacaine	5,6 (23)	1,8 (16)	0,9 (7,1)
Methocarbamol	8,6 (16)	2,5 (4,4)	1,3 (7,5)
Methylphenidate	4,7 (5,7)	2,6 (7,8)	2,5 (13)
Morphine	8,0 (3,0)	5,7 (6,5)	3,9 (11)
Nikethamide	13 (15)	6,8 (8,6)	7,2 (2,7)
Nordiazepam	5,6 (10)	4,1 (6,6)	1,4 (9,8)
Nortriptyline	7,3 (23)	3,9 (23)	2,3 (24)
Nylidrin	5,5 (5,6)	2,7 (9,9)	1,0 (11)
Oxazepam	6,8 (20)	2,8 (27)	2,2 (34)
Pethidine	5,3 (10)	2,8 (9,6)	2,5 (15)
Phentermine	9,6 (41)	3,2 (36)	8,4 (25)
Pyrilamine	6,8 (6,2)	4,5 (11)	1,2 (14)
Ractopamine	2,6 (28)	2,4 (19)	1,5 (9,7)
Salbutamol	7,5 (6,4)	2,5 (7,2)	2,1 (7,6)
Terbutaline	7,1 (21)	4,2 (25)	5,7 (22)
Theobromine*	5,7 (8,7)		
Timolol	4,5 (2,7)	2,1 (0,89)	0,88 (5,2)
Trenbolone	13 (5,6)	8,1 (16)	4,2 (19)
Triamcinolone acetonide	8,9 (9,9)	3,1 (15)	1,5 (19)
Trifluoperazine	23 (35)	22 (22)	5,3 (27)
Verapamil	6,1 (8,9)	5,2 (5,8)	2,6 (7,8)
Ανάλυση GC-MS μεθυλο-παραγώγων			
Diflunisal	12 (61)	17 (51)	30 (35)
Flufenamic acid	10 (26)	8,5 (26)	6,6 (27)
Furosemide	14 (39)	8,8 (32)	19 (31)
Ketoprofen	8,9 (27)	6,9 (25)	5,0 (24)
Phenobarbital	10 (32)	12 (30)	16 (22)
Phenylbutazone	9,0 (27)	6,5 (27)	6,4 (27)
Ανάλυση GC-HRMS TMS-παραγώγων			
5α-estrane-3β,17α-diol*	6,0 (46)		
Bumetanide	19 (31)	9,9 (37)	5,0 (49)
Ethacrynic acid	54 (58)	43 (39)	27 (39)
Testosterone*	11 (18)		
Theophylline	14 (14)	12 (13)	9,3 (18)

Επίσης, οι αυξημένες % RSD τιμές της τριφθοροπιραζίνης, θα μπορούσαν να συνδεθούν με την αυξημένη διακύμανση της επίδρασης του υποστρώματος για τη συγκεκριμένη ουσία, καθώς παρατηρήθηκε, τόσο καταστολή, όσο και ενίσχυση του σήματος στην προκειμένη περίπτωση. Τουλάχιστον για το 81% των προσδιοριζόμενων ουσιών μέσω της τεχνικής LC-TOF-MS, η επί τοις εκατό σχετική τυπική απόκλιση των εμβαδών των κορυφών μεταξύ των τριών ημερών ήταν μικρότερη από 20% και στα τρία επίπεδα συγκέντρωσης.

Όσον αφορά στην ανάλυση GC-MS του μεθυλο-παραγωγοποιημένου εκχυλίσματος A2 των δειγμάτων, η επαναληψιμότητα των εμβαδών για δώδεκα επαναλήψεις ($n = 6$ υποδείγματα \times 2 μετρήσεις) κυμάνθηκε από 8,9 (κετοπροφαίνιο) έως 14% (φουροσεμίδιο), από 6,5 (φαινυλοβουταζόνη) έως 17% (διφλουνισάλιο) και από 5,0 (κετοπροφαίνιο) έως 30% (διφλουνισάλιο) για τις συγκεντρώσεις $5\times\text{LOD}$, $10\times\text{LOD}$ και $20\times\text{LOD}$, αντιστοίχως. Άρα, οι τιμές των σχετικών τυπικών αποκλίσεων επαναληψιμότητας ήταν μικρότερες από 20% για το σύνολο των εξεταζόμενων ουσιών, με εξαίρεση το διφλουνισάλιο στη συγκέντρωση $20\times\text{LOD}$. Σχετικά με την αναπαραγωγιμότητα, οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις ($n=3$ ημέρες) των εμβαδών των χρωματογραφικών κορυφών κυμάνθηκαν από 26 (φλουφαιναμικό οξύ) έως 39% (φουροσεμίδιο), από 25 (κετοπροφαίνιο) έως 32% (φουροσεμίδιο) και από 22 (φαινοβαρβιτάλη) έως 31% (φουροσεμίδιο) στις συγκεντρώσεις $5\times\text{LOD}$, $10\times\text{LOD}$ και $20\times\text{LOD}$, αντιστοίχως. Εξαίρεση αποτελεί η ουσία διφλουνισάλιο, για την οποία η σχετική τυπική απόκλιση ήταν μεγαλύτερη από 35% και στις τρεις συγκεντρώσεις. Η χαμηλή αναπαραγωγιμότητα του διφλουνισαλίου αποδίδεται στη μη σταθερή μεθυλο-παραγωγοποίησή του προς δισ-μεθυλο-διφλουνισάλιο, καθώς σε ορισμένες περιπτώσεις σχηματιζόταν, επίσης, και το μονο-μεθυλο-διφλουνισάλιο.

Όσον αφορά στην ανάλυση GC-HRMS του TMS-παραγωγοποιημένου εκχυλίσματος (A3+B) των δειγμάτων, η επαναληψιμότητα για δώδεκα επαναλήψεις ($n = 6$ υποδείγματα \times 2 μετρήσεις) κυμάνθηκε από 5,0 έως 19% στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις, με εξαίρεση το αιθακρινικό οξύ, του οποίου η επαναληψιμότητα ξεπερασε το 27%. Επιπλέον, η αναπαραγωγιμότητα ($n=3$ ημέρες) κυμάνθηκε από 13 (θεοφυλλίνη) έως 58% (αιθακρινικό οξύ) στα εξεταζόμενα επίπεδα συγκέντρωσης. Οι υψηλές τιμές της σχετικής τυπικής

απόκλισης του αιθακρινικό οξύ αποδίδονται στο μη σταθερό σχηματισμό του «artefact» αυτού, κατά το στάδιο της TMS-παραγωγοποίησης.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, τα αποτελέσματα της πιστότητας από την νάλυση LC-TOF-MS των δειγμάτων ήταν καλύτερα, συγκριτικά με αυτά που προέκυψαν από τις αναλύσεις GC-MS και GC-HRMS. Αυτό οφείλεται στο επιπλέον στάδιο της παραγωγοποίησης που εκτελείται πριν τις αναλύσεις GC-MS και GC-HRMS, το οποίο συνεισφέρει αρνητικά στην πιστότητα της μεθόδου και ιδιαίτερα στην αναπαραγωγιμότητα.

7.7.8 Έλεγχος επιμόλυνσης

Ο έλεγχος επιμόλυνσης πραγματοποιήθηκε σε λευκά δείγματα ούρων αλόγων, τα οποία αναλύθηκαν διαδοχικά μετά από εμβολιασμένα δείγματα με τις εξεταζόμενες ουσίες σε υψηλή συγκέντρωση ($20 \times \text{LOD}$), με σκοπό να διαπιστωθεί ή όχι η παρουσία κορυφής στο λευκό δείγμα στο χρόνο έκλουσης της κάθε προσδιοριζόμενης ουσίας.

Επιμόλυνση από τα προηγούμενα δείγματα παρατηρήθηκε για τις ουσίες φουροσεμίδιο (2%) και βουμετανίδιο (1%), οι οποίες ανιχνεύτηκαν μέσω των τεχνικών GC-MS και GC-HRMS, αντιστοίχως. Και οι δύο αναλύτες ανιχνεύτηκαν στα λευκά δείγματα που αναλύθηκαν μετά από εμβολιασμένα δείγματα σε συγκέντρωση $20 \times \text{LOD}$.

7.7.9 Σύνοψη αποτελεσμάτων επικύρωσης

Παρακάτω παρουσιάζονται συνοπτικά τα χαρακτηριστικά επικύρωσης της μεθοδολογίας.

Όριο ανίχνευσης

Τα όρια ανίχνευσης των εξεταζόμενων ουσιών ήταν σύμφωνα με τις ελάχιστες συγκεντρώσεις που απαιτούνται από τις «International Federation of Horseracing Authorities, IFHA» και το έκτο άρθρο του «International Agreement on Breeding, Racing and Wagering, IABRW», με εξαίρεση τις ουσίες βενζούλοεκγονίνη, βουμετανίδιο και δεξαμεθαζόνη. Το όριο ανίχνευσης των εξεταζόμενων ουσιών της επικύρωσης κυμάνθηκε από 1,25 έως 62,5 ng mL⁻¹ με εξαίρεση το φουροσεμίδιο που είχε όριο ανίχνευσης τα 125 ng mL⁻¹. Το 64% των εξεταζόμενων ουσιών εμφάνισε όριο ανίχνευσης έως 5,0 ng mL⁻¹

ενώ στο 25% των ουσιών το όριο ανίχνευσης κυμάνθηκε από 10 έως 25 ng mL⁻¹.

Παρεμπόδιση υποστρώματος

Δεδομένου ότι η προτεινόμενη μεθοδολογία περιλαμβάνει δύο ενοποιημένα παρασκευαστικά στάδια και τρεις διαφορετικές αναλύσεις για κάθε δείγμα, υπάρχει η δυνατότητα αποφυγής ανίχνευσης μιας ουσίας μέσω της ανάλυσης, στην οποία παρατηρείται παρεμπόδιση από το υπόστρωμα, και επιλογής μιας εκ των δύο υπολοίπων. Έτσι, δεν παρατηρήθηκαν παρεμποδίσσεις από το υπόστρωμα.

Ανάκτηση από την εκχύλιση

Τα αποτελέσματα από την εκχύλιση του πίνακα 7.4, συνοψίζονται στον πίνακα 7.9, όπου παρουσιάζονται ο μέσος όρος και το εύρος των τιμών της παραμέτρου στα τρία επίπεδα συγκέντρωσης για τους πενήντα πέντε αναλύτες από τις τρεις εργαστηριακές ημέρες. Για το 93% του συνόλου των εξεταζόμενων ουσιών, η ανάκτηση από την εκχύλιση ήταν μεγαλύτερη από 34% και στα τρία επίπεδα συγκεντρώσεων. Επίσης, για το 78% των εξεταζόμενων ουσιών, η μετρούμενη παράμετρος ήταν μεγαλύτερη από 50%. Ο μέσος όρος της ανάκτησης από εκχύλιση κρίνεται ικανοποιητικός δεδομένου ότι η μεθοδολογία αφορά στον προσδιορισμό ταυτότητας ενός μεγάλου εύρους απαγορευμένων ουσιών που διαφέρουν ως προς την πολικότητα και τις φυσικοχημικές ιδιότητες.

Ικανότητα μέτρησης ακριβούς μάζας

Η ικανότητα μέτρησης ακριβούς μάζας κατά την ανάλυση LC-TOF-MS ελέγχθηκε σε τρεις εργαστηριακές ημέρες και ο μέσος όρος των σφαλμάτων από τους πενήντα αναλύτες κυμάνθηκε από 0,46 (δεύτερη εργαστηριακή ημέρα) έως 1,3 ppm (τρίτη εργαστηριακή ημέρα) με το μέγιστο σφάλμα, +7,5 ppm, να παρατηρείται την πρώτη εργαστηριακή ημέρα στην ουσία 3-μεθοξυτυραμίνη (πίνακας 7.5).

Πίνακας 7.9. Σύνοψη αποτελεσμάτων ανάκτησης από την εκχύλιση για πενήντα πέντε απαγορευμένες ουσίες από τρεις εργαστηριακές ημέρες.

	% Ανάκτηση από εκχύλιση		
	5×LOD	10×LOD	20×LOD
Μέσος Όρος (n=55)	62	59	71
Εύρος (n=55)	13 - 88	14 - 79	18 - 92

Επίδραση υποστρώματος

Η επίδραση από το υπόστρωμα οδήγησε στην καταστολή του σήματος για την πλειοψηφία των εξεταζόμενων ουσιών. Ο μέσος όρος της συγκεκριμένης παραμέτρου για το σύνολο των σαράντα επτά εξεταζόμενων ουσιών ήταν 57, 64 και 66% στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις 5×LOD, 10×LOD και 20×LOD. Επίσης, η επίδραση από το υπόστρωμα κυμάνθηκε από 18% (φαιντερμίνη) έως 166% (οξαζεπάμη) (πίνακας 7.6).

Πιστότητα

Οι σχετικοί χρόνοι έκλουσης παρουσίασαν σταθερότητα (RSD<1%), τόσο εντός μιας εργαστηριακής ημέρας (επαναληψιμότητα) όσο και μεταξύ των ημερών (αναπαραγωγιμότητα). Εξαίρεση αποτέλεσαν οι ουσίες τερβουταλίνη, αμφεταμίνη, εφεδρίνη, μορφίνη, κλονιδίνη, εργονοβίνη, 3-μεθοξυτυραμίνη και θεοβρομίνη, για τις οποίες η σχετική τυπική απόκλιση μεταξύ των ημερών κυμάνθηκε από 1,5 έως 7,0%. Η επαναληψιμότητα των εμβαδών των χρωματογραφικών κορυφών ήταν μικρότερη από 20% με εξαίρεση τις ουσίες τριφθοροπιραζίνη, διφλουνισάλιο και αιθακρινικό οξύ. Επίσης, για το 72% των προσδιοριζόμενων ουσιών η επί τοις εκατό σχετική τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητα των χρωματογραφικών κορυφών ήταν μικρότερη από 20% στα εξεταζόμενα επίπεδα συγκέντρωσης.

Έλεγχος επιμόλυνσης

Επιμόλυνση από τα προηγούμενα δείγματα υψηλής συγκέντρωσης παρατηρήθηκε για τις ουσίες φουροσεμίδιο (2%) και βουμετανίδιο (1%)

Σύμφωνα με όλα τα παραπάνω, εξάγεται το συμπέρασμα ότι η μέθοδος για τον προσδιορισμό της ταυτότητας των απαγορευμένων ουσιών είναι κατάλληλη για το σκοπό που έχει αναπτυχθεί.

7.8 Προσδιορισμός ταυτότητας επιπλέον απαγορευμένων ουσιών

Σκοπός της διδακτορικής διατριβής ήταν ο προσδιορισμός ταυτότητας όσο το δυνατόν μεγαλύτερου εύρους απαγορευμένων ουσιών σε δείγματα ούρων αλόγων. Για το λόγο αυτό, εξετάστηκε η ανίχνευση επιπλέον ουσιών, εκτός των εξήντα ουσιών επικύρωσης. Έτσι, λευκά δείγματα ούρων αλόγων εμβολιάστηκαν με τα πολυσυστατικά διαλύματα των απαγορευμένων ουσιών (υποκεφάλαιο 4.4) στις συγκεντρώσεις 100 ή 200 ng mL⁻¹ και κατόπιν, εφαρμόστηκε η προτεινόμενη μέθοδος του σχήματος 6.14.

Ο πίνακας 7.10 συγκεντρώνει πληροφορίες για τις επιπλέον τριακόσιες ανιχνευόμενες ουσίες που αφορούν στη φαρμακολογική δράση, το μοριακό τύπο, τα διαγνωστικά ιόντα, το χρόνο έκλουσης, τα «adduct» ή παράγωγα αυτών, καθώς, και το είδος της τεχνικής, μέσω της οποίας έλαβε χώρα η ανίχνευσή τους. Σύμφωνα με τα δεδομένα που ελήφθησαν, ένα μεγάλο μέρος των εξεταζόμενων ουσιών ανιχνεύτηκε μέσω της ανάλυσης LC-TOF-MS του εκχυλίσματος A1. Επίσης, μέσω της πορείας που περιελάμβανε μεθυλο-παραγωγοποίηση του εκχυλίσματος A2 και ανάλυση GC-MS, προσδιορίστηκαν ορισμένα από τα NSAID και τους αναστολείς της ανθρακικής ανυδράσης. Όσον αφορά στα αναβολικά στεροειδή, αυτά ανιχνεύτηκαν μέσω της ανάλυσης LC-TOF-MS του εκχυλίσματος A1 και μέσω της ανάλυσης GC-HRMS του TMS-παραγωγοποιημένου εκχυλίσματος A3+B. Μεταξύ των εξεταζόμενων ουσιών συμπεριλαμβάνονταν μητρικές ουσίες, μεταβολίτες της πρώτης φάσης και προϊόντα αποικοδόμησης, «artefacts», που σχηματίζονταν κατά την προκατεργασία των δειγμάτων.

Πίνακας 7.10. Οι επιπλέον τριακόσιες ουσίες που ανιχνεύτηκαν μέσω της επικυρωμένης μεθόδου σάρωσης και η φαρμακολογική δράση, ο μοριακός τύπος, ο χρόνος έκλουσης (RT), τα διαγνωστικά ιόντα και τα «adduct» ή τα παράγωγα αυτών.

No.	Ουσία	Φαρμακολογική δράση	Μοριακός τύπος	RT (min)	Διαγνωστικό ιόν	«Adduct» / παράγωγο
	Ανάλυση LC-TOF-MS					
1	1-(3-Trifluoro methylphenyl) piperazine	Διεγερτικό	C ₁₁ H ₁₃ N ₂ F ₃	5,62	231,1104	[M+H] ⁺
2	16α-Hydroxyprednisolone (Budesonide metabolite)	Κορτικοστεροειδές	C ₂₁ H ₂₈ O ₆	5,54	377,1959	[M+H] ⁺
3	17-Epitrenbolone (Trenbolone metabolite)	Αναβολικό στεροειδές	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	7,92	271,1693	[M+H] ⁺
4	1-Benzylpiperazine	Διεγερτικό	C ₁₁ H ₁₆ N ₂	3,09	177,1386	[M+H] ⁺
5	2-Aminoheptane	Αγγειοσυστολέας	C ₇ H ₁₇ N	4,25	116,1434	[M+H] ⁺
6	2-Ethylidene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine (EDDP, methadone metabolite)	Ναρκωτικό	C ₂₀ H ₂₃ N	6,99	278,1903	[M+H] ⁺
7	4-Dimethylaminoantipyrine	Αντιπυρετικό, αναλγητικό	C ₁₃ H ₁₇ N ₃ O	4,11	232,1444	[M+H] ⁺
8	4-Methyl-2-Hexanamine	Διεγερτικό	C ₇ H ₁₇ N	3,87	116,1434	[M+H] ⁺
9	6-Acetyl-morphine	Ναρκωτικό	C ₁₉ H ₂₁ NO ₄	3,54	328,1543	[M+H] ⁺
10	6-Hydroxybromantane	Διεγερτικό	C ₁₆ H ₂₀ NOBr	10,5	322,0801	[M+H] ⁺
11	6α-Hydroxy-androst-4-ene-3,17-dione (Androst-4-ene-3,6,17-trione metabolite)	Αναβολικό στεροειδές	C ₁₉ H ₂₆ O ₃	6,60	303,1955	[M+H] ⁺
12	6β-Hydroxymethandienone (Methandienone metabolite)	Αναβολικό στεροειδές	C ₂₀ H ₂₈ O ₃	6,14	317,2111	[M+H] ⁺
13	7-Amino-flunitrazepam	Αγχολυτικό	C ₁₆ H ₁₄ FN ₃ O	5,75	284,1194	[M+H] ⁺
14	7-keto-DHEA	Ενδογενές αναβολικό στεροειδές	C ₁₉ H ₂₆ O ₃	6,76	303,1955	[M+H] ⁺
15	7β-Hydroxy-DHEA (7-keto-DHEA metabolite)	Ενδογενές αναβολικό στεροειδές	C ₁₉ H ₂₈ O ₃	6,14	305,2111	[M+H] ⁺
16	9α-Fluoro-17,17-dimethyl-18-norandrostane-4,13-dien-11β-ol-3-one (Fluoxymesterone metabolite)	Αναβολικό στεροειδές	C ₂₀ H ₂₇ O ₂ F ₁	10,3	319,2068	[M+H] ⁺
17	Acebutolol	β-Αναστολέας	C ₁₈ H ₂₆ N ₂ O ₄	4,60	337,2122	[M+H] ⁺
18	Acemetacin	NSAID	C ₂₁ H ₁₈ ClNO ₆	8,60	416,0895	[M+H] ⁺
19	Acetohexamide	Διεγερτικό	C ₁₅ H ₂₀ N ₂ O ₄ S	8,02	325,1217	[M+H] ⁺
20	Acetopromazine	Ήρεμιστικό	C ₁₉ H ₂₂ N ₂ OS	6,81	327,1526	[M+H] ⁺
21	Adrafinil	Διεγερτικό	C ₁₅ H ₁₅ NO ₃ S	6,13	167,0855	«artefact» [C ₁₃ H ₁₁] ⁺
22	Alfentanyl	Ναρκωτικό	C ₂₁ H ₃₂ N ₆ O ₃	6,42	417,2609	[M+H] ⁺

No.	Ουσία	Φαρμακολογική δράση	Μοριακός τύπος	RT (min)	Διαγνωστικό ιόν	«Adduct» / παράγωγο
23	Alprazolam	Αγχολυτικό	C ₁₇ H ₁₃ ClN ₄	7,61	309,0901	[M+H] ⁺
24	Alprenolol	β-Αναστολέας	C ₁₅ H ₂₃ NO ₂	6,17	250,1802	[M+H] ⁺
25	Althiazide	Διουρητικό	C ₁₁ H ₁₄ ClN ₃ O ₄ S ₃	7,13	401,0168	[M+NH ₄] ⁺
26	Ambroxol	Βλεννολυτικό	C ₁₃ H ₁₈ Br ₂ N ₂ O	5,25	378,9839	⁸¹ Br isotope [M+H] ⁺
27	Amiloride	Διουρητικό	C ₆ H ₈ ClN ₇ O	2,06	230,0552	[M+H] ⁺
28	Amineptine	Αντικαταθλιπτικό	C ₂₂ H ₂₇ NO ₂	6,74	193,1012	«artefact» [C ₁₅ H ₁₂] ⁺
29	Aminoglutethimide	Αρωματικός αναστολέας	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O ₂	5,19	233,1285	[M+H] ⁺
30	Amiphenazole	Διεγερτικό	C ₉ H ₉ N ₃ S	2,44	192,0590	[M+H] ⁺
31	Amprone	NSAID	C ₁₁ H ₁₃ N ₃ O	4,29	204,1131	[M+H] ⁺
32	Androst-1,4,6-triene-3,17-dione	Αναβολικό στεροειδές	C ₁₉ H ₂₂ O ₂	8,27	283,1693	[M+H] ⁺
33	Antipyrine	NSAID	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O	4,48	189,1022	[M+H] ⁺
34	Apomorphine	Οπιώδες αναλγητικό	C ₁₇ H ₁₇ NO ₂	4,11	268,1332	[M+H] ⁺
35	Atropine	Αντιχολινεργικό	C ₁₇ H ₂₃ NO ₃	4,21	290,1751	[M+H] ⁺
36	Azaperone	Ήρεμιστικό	C ₁₉ H ₂₂ FN ₃ O	5,85	328,1820	[M+H] ⁺
37	Bambuterol	Βρογχοδιαστολέας	C ₁₈ H ₂₉ N ₃ O ₅	5,30	368,2180	[M+H] ⁺
38	Bamethan	Αγγειοδιαστολέας	C ₁₂ H ₁₉ NO ₂	3,00	192,1383	[M+H-H ₂ O] ⁺
39	Beclomethasone	Κορτικοστεροειδές	C ₂₂ H ₂₉ ClO ₅	7,44	409,1776	[M+H] ⁺
40	Bemegride	Διεγερτικό	C ₈ H ₁₃ NO ₂	4,77	156,1019	[M+H] ⁺
41	Bendroflumethiazide	Διουρητικό	C ₁₅ H ₁₄ N ₃ O ₄ S ₂ F ₃	8,21	439,0711	[M+NH ₄] ⁺
42	Benzbromarone	Ουρικοζουρικό	C ₁₇ H ₁₂ Br ₂ O ₃	11,4	424,9206	⁸¹ Br isotope [M+H] ⁺
43	Benzocaine	Τοπικό αναισθητικό	C ₉ H ₁₁ NO ₂	6,83	166,0863	[M+H] ⁺
44	Benzphetamine	Ανορεκτικό	C ₁₇ H ₂₁ N	6,23	240,1747	[M+H] ⁺
45	Benzylamphetamine	Διεγερτικό	C ₁₆ H ₁₉ N	6,03	226,1590	[M+H] ⁺
46	Betamethasone	Κορτικοστεροειδές	C ₂₂ H ₂₉ FO ₅	7,18	393,2072	[M+H] ⁺
47	Betaxolol	β-Αναστολέας	C ₁₈ H ₂₉ NO ₃	6,31	308,2220	[M+H] ⁺
48	Bisoprolol	β-Αναστολέας	C ₁₈ H ₃₁ NO ₄	5,71	326,2326	[M+H] ⁺
49	Bromazepam	Αγχολυτικό	C ₁₄ H ₁₀ BrN ₃ O	6,61	316,0080	[M+H] ⁺
50	Bromhexine	Βλεννολυτικό	C ₁₄ H ₂₀ Br ₂ N ₂	9,09	377,0046	⁸¹ Br isotope [M+H] ⁺
51	Budesonide	Κορτικοστεροειδές	C ₂₅ H ₃₄ O ₆	8,78	431,2428	[M+H] ⁺
52	Buflomedil	Αγγειοενεργός παραγοντας	C ₁₇ H ₂₅ NO ₄	5,12	308,1856	[M+H] ⁺
53	Bupivacaine	Τοπικό αναισθητικό	C ₁₈ H ₂₈ N ₂ O	5,93	289,2274	[M+H] ⁺
54	Buprenorphine	Οπιώδες	C ₂₉ H ₄₁ NO ₄	7,01	468,3108	[M+H] ⁺

No.	Ουσία	Φαρμακολογική δράση	Μοριακός τύπος	RT (min)	Διαγνωστικό ιόν	«Adduct» / παράγωγο
55	Buspirone	Αγχολυτικό	C ₂₁ H ₃₁ N ₅ O ₂	5,88	386,2551	[M+H] ⁺
56	Canrenic acid (Canrenone metabolite)	Διουρητικό	C ₂₂ H ₃₀ O ₄	7,38	359,2217	[M+H] ⁺
57	Carisoprodol	Μυοχαλαρωτικό	C ₁₂ H ₂₄ N ₂ O ₄	7,69	261,1809	[M+H] ⁺
58	Carphedon	Διεγερτικό	C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₂	4,86	219,1128	[M+H] ⁺
59	Carteolol	β-Αναστολέας	C ₁₆ H ₂₄ N ₂ O ₃	3,55	293,1860	[M+H] ⁺
60	Carvedilol	β-Αναστολέας	C ₂₄ H ₂₆ N ₂ O ₄	7,05	407,1965	[M+H] ⁺
61	Celiprolol	β-Αναστολέας	C ₂₀ H ₃₃ N ₃ O ₄	5,25	380,2544	[M+H] ⁺
62	Chlordiazepoxide	Αγχολυτικό	C ₁₆ H ₁₄ ClN ₃ O	7,19	300,0898	[M+H] ⁺
63	Chlorothiazide	Διουρητικό	C ₇ H ₆ ClN ₃ O ₄ S ₂	3,16	312,9821	[M+NH ₄] ⁺
64	Chlorpheniramine	Αντισταμινικό	C ₁₆ H ₁₉ ClN ₂	5,95	275,1310	[M+H] ⁺
65	Chlorphentermine	Διεγερτικό	C ₁₀ H ₁₄ ClN	5,12	184,0888	[M+H] ⁺
66	Chlorpropamide	Αντιδιαβητικό	C ₁₀ H ₁₃ ClN ₂ O ₃ S	7,61	277,0408	[M+H] ⁺
67	Chlorthalidone	Διουρητικό	C ₁₄ H ₁₁ ClN ₂ O ₄ S	5,41	321,9935	[M+H-NH ₃] ⁺
68	Cinchofen	NSAID	C ₁₆ H ₁₁ NO ₂	6,45	250,0863	[M+H] ⁺
69	Clanobutin	Choleretic	C ₁₈ H ₁₈ ClNO ₄	8,37	348,0997	[M+H] ⁺
70	Clobazam	Αγχολυτικό	C ₁₆ H ₁₃ ClN ₂ O ₂	8,44	301,0738	[M+H] ⁺
71	Clomipramine	Αντικαταθληπτικό	C ₁₉ H ₂₃ ClN ₂	7,98	315,1623	[M+H] ⁺
72	Clopramide	Ανταγωνιστής ντοπαμίνης	C ₁₄ H ₂₀ ClN ₃ O ₃ S	6,19	346,0987	[M+H] ⁺
73	Cloranolol	β-Αναστολέας	C ₁₃ H ₁₉ Cl ₂ NO ₂	6,34	292,0866	[M+H] ⁺
74	Cotinine (Nicotine metabolite)	Διεγερτικό	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O	2,20	177,1022	[M+H] ⁺
75	Cropropamide	Διεγερτικό	C ₁₃ H ₂₄ N ₂ O ₂	6,68	196,1332	«artefact» [C ₁₁ H ₁₈ NO ₂] ⁺
76	Crotethamide	Διεγερτικό	C ₁₂ H ₂₂ N ₂ O ₂	5,69	182,1176	«artefact» [C ₁₀ H ₁₆ NO ₂] ⁺
77	Cyclazodone	Διεγερτικό	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O ₂	5,79	217,0972	[M+H] ⁺
78	Cyclobenzaprine	Μυοχαλαρωτικό	C ₂₀ H ₂₁ N	7,25	276,1747	[M+H] ⁺
79	Cyclothiazide	Διουρητικό	C ₁₄ H ₁₆ ClN ₃ O ₄ S ₂	7,89	407,0604	[M+NH ₄] ⁺
80	Desipramine	Αντικαταθληπτικό	C ₁₈ H ₂₂ N ₂	7,12	267,1856	[M+H] ⁺
81	Desonide	Κορτικοστεροειδές	C ₂₄ H ₃₂ O ₆	7,63	417,2272	[M+H] ⁺
82	Dextromethorphan	Αντιβηχικό	C ₁₈ H ₂₅ NO	6,25	272,2009	[M+H] ⁺
83	Dextromoramide	Ναρκωτικό	C ₂₅ H ₃₂ N ₂ O ₂	7,50	393,2537	[M+H] ⁺
84	Diazepam	Αγχολυτικό	C ₁₆ H ₁₃ ClN ₂ O	9,14	285,0789	[M+H] ⁺
85	Diclofenac	NSAID	C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂	9,68	296,0240	[M+H] ⁺

No.	Ουσία	Φαρμακολογική δράση	Μοριακός τύπος	RT (min)	Διαγνωστικό ιόν	«Adduct» / παράγωγο
86	Dihydrocodeine	Οπιοδές αναλγητικό	C ₁₈ H ₂₃ NO ₃	2,81	302,1751	[M+H] ⁺
87	Dimefline	Αναπνευστικό Διεγερτικό	C ₂₀ H ₂₁ NO ₃	5,78	324,1594	[M+H] ⁺
88	Dimethylamphetamine	Διεγερτικό	C ₁₁ H ₁₇ N	3,84	164,1434	[M+H] ⁺
89	Dimetindene	Αντικνησμώδες	C ₂₀ H ₂₄ N ₂	6,44	293,2012	[M+H] ⁺
90	Diphenoxylate	Οπιοδής αγωνιστής	C ₃₀ H ₃₂ N ₂ O ₂	9,71	453,2537	[M+H] ⁺
91	Diprophylline	Βρογχοδιαστολέας	C ₁₀ H ₁₄ N ₄ O ₄	2,52	255,1088	[M+H] ⁺
92	Dipyron	NSAID	C ₁₃ H ₁₇ N ₃ O ₄ S	3,74	218,1288	[M+H] ⁺
93	Dobutamine	Συμπαθομιμητικό	C ₁₈ H ₂₃ NO ₃	4,26	302,1751	[M+H] ⁺
94	Doxapram	Διεγερτικό	C ₂₄ H ₃₀ N ₂ O ₂	5,80	379,2380	[M+H] ⁺
95	Doxepin	Αντικαταθληπτικό	C ₁₉ H ₂₁ NO	6,69	280,1696	[M+H] ⁺
96	Doxylamine	Αντισταμινικό	C ₁₇ H ₂₂ N ₂ O	5,17	271,1805	[M+H] ⁺
97	Drofenine	Αντισπασμωδικό	C ₂₀ H ₃₁ NO ₂	8,34	318,2428	[M+H] ⁺
98	Ecgonine methylester	Αγγειοσυστολέας	C ₁₀ H ₁₇ NO ₃	0,92	200,1281	[M+H] ⁺
99	Esmolol	β-Αναστολέας	C ₁₆ H ₂₅ NO ₄	5,18	296,1856	[M+H] ⁺
100	Etafedrine	Αδρενεργικό	C ₁₂ H ₁₉ NO	3,52	194,1539	[M+H] ⁺
101	Ethamivan	Αναπνευστικό διεγερτικό	C ₁₂ H ₁₇ NO ₃	5,75	224,1281	[M+H] ⁺
102	Ethoepazine	Οπιοδές αναλγητικό	C ₁₆ H ₂₃ NO ₂	5,57	262,1802	[M+H] ⁺
103	Ethylamphetamine	Διεγερτικό	C ₁₁ H ₁₇ N	4,07	164,1434	[M+H] ⁺
104	Ethylmorphine	Οπιοδές αναλγητικό	C ₁₉ H ₂₃ NO ₃	4,05	314,1751	[M+H] ⁺
105	Etilefrine	Διεγερτικό	C ₁₀ H ₁₅ NO ₂	1,39	182,1176	[M+H] ⁺
106	Etodolac	NSAID	C ₁₇ H ₂₁ NO ₃	9,55	288,1594	[M+H] ⁺
107	Exemestane	Αρωματικός αναστολέας	C ₂₀ H ₂₄ O ₂	9,21	297,1849	[M+H] ⁺
108	Famprofazone	Διεγερτικό	C ₂₄ H ₃₁ N ₃ O	11,5	378,2540	[M+H] ⁺
109	Fenbufen	NSAID	C ₁₆ H ₁₄ O ₃	8,67	255,1016	[M+H] ⁺
110	Fenbutrazate	Διεγερτικό	C ₂₃ H ₂₉ NO ₃	11,1	368,2220	[M+H] ⁺
111	Fencamfamine	Διεγερτικό	C ₁₅ H ₂₁ N	5,75	216,1747	[M+H] ⁺
112	Fencamine	Διεγερτικό	C ₂₀ H ₂₈ N ₆ O ₂	4,50	385,2346	[M+H] ⁺
113	Fenethylamine	Διεγερτικό	C ₁₈ H ₂₃ N ₅ O ₂	4,88	342,1925	[M+H] ⁺
114	Fenfluramine	Διεγερτικό	C ₁₂ H ₁₆ F ₃ N	5,92	232,1308	[M+H] ⁺
115	Fenoterol	Βρογχοδιαστολέας	C ₁₇ H ₂₁ NO ₄	3,11	304,1543	[M+H] ⁺
116	Fenoterol artefact		C ₁₈ H ₂₁ NO ₄	3,44	316,1543	[M+H] ⁺

No.	Ουσία	Φαρμακολογική δράση	Μοριακός τύπος	RT (min)	Διαγνωστικό ιόν	«Adduct» / παράγωγο
117	Fenproporex	Διεγερτικό	C ₁₂ H ₁₆ N ₂	3,93	189,1386	[M+H] ⁺
118	Fenspiride	NSAID	C ₁₅ H ₂₀ N ₂ O ₂	3,55	261,1598	[M+H] ⁺
119	Fludrocortisone	Κορτικοστεροειδές	C ₂₁ H ₂₉ FO ₅	6,53	381,2072	[M+H] ⁺
120	Flumethasone	Κορτικοστεροειδές	C ₂₂ H ₂₈ F ₂ O ₅	7,28	411,1978	[M+H] ⁺
121	Flunisolide	Κορτικοστεροειδές	C ₂₄ H ₃₁ FO ₆	7,61	435,2177	[M+H] ⁺
122	Flunitrazepam	Αγχολυτικό	C ₁₆ H ₁₂ FN ₃ O ₃	8,18	314,0935	[M+H] ⁺
123	Fluocinolone acetonide	Κορτικοστεροειδές	C ₂₄ H ₃₀ F ₂ O ₆	7,81	453,2083	[M+H] ⁺
124	Flucortolone	Κορτικοστεροειδές	C ₂₂ H ₂₉ FO ₄	8,04	377,2123	[M+H] ⁺
125	Fluorometholone	Κορτικοστεροειδές	C ₂₂ H ₂₉ FO ₄	8,04	377,2123	[M+H] ⁺
126	Fluoxetine	Αντικαταθλιπτικό	C ₁₇ H ₁₈ F ₃ NO	7,62	310,1413	[M+H] ⁺
127	Formebolone	Αναβολικό στεροειδές	C ₂₁ H ₂₈ O ₄	6,53	345,2060	[M+H] ⁺
128	Formoterol	Βρογχοδιαστολέας	C ₁₉ H ₂₄ N ₂ O ₄	4,82	345,1809	[M+H] ⁺
129	Furfenorex	Διεγερτικό	C ₁₅ H ₁₉ NO	5,49	230,1539	[M+H] ⁺
130	Gestrinone	Αναβολικό στεροειδές	C ₂₁ H ₂₄ O ₂	8,91	309,1849	[M+H] ⁺
131	Glafenine	Αναλγητικό	C ₁₉ H ₁₇ ClN ₂ O ₄	5,16	373,0950	[M+H] ⁺
132	Glimepiride	Αντιδιαβητικό	C ₂₄ H ₃₄ N ₄ O ₅ S	10,2	491,2323	[M+H] ⁺
133	Guaifenesin (degradation product of methocarbamol)	Αποχρεμπτικό	C ₁₀ H ₁₄ O ₄	4,71	199,0965	[M+H] ⁺
134	Guanabenz	Ηρεμιστικό	C ₈ H ₈ Cl ₂ N ₄	5,19	233,0170	³⁷ Cl isotope [M+H] ⁺
135	Haloperidol	Neuroleptic	C ₂₁ H ₂₃ ClFNO ₂	6,91	376,1474	[M+H] ⁺
136	Heptaminol	Διεγερτικό	C ₈ H ₁₉ NO	1,59	146,1539	[M+H] ⁺
137	Hydrocodone	Οπιώδες αναλγητικό	C ₁₈ H ₂₁ NO ₃	3,67	300,1594	[M+H] ⁺
138	Hydroflumethiazide	Διουρητικό	C ₈ H ₈ F ₃ N ₃ O ₄ S ₂	4,68	349,0241	[M+NH ₄] ⁺
139	Hydromorphone	Οπιώδες αναλγητικό	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	1,90	286,1438	[M+H] ⁺
140	Hydroxyzine	Ηρεμιστικό	C ₂₁ H ₂₇ ClN ₂ O ₂	7,26	375,1834	[M+H] ⁺
141	Hyoscine	Παρασυμπαθητικό	C ₁₇ H ₂₁ NO ₄	3,47	304,1543	[M+H] ⁺
142	Indapamide	Διουρητικό	C ₁₆ H ₁₆ N ₃ O ₃ SCI	7,54	366,0674	[M+H] ⁺
143	Indomethacin	NSAID	C ₁₉ H ₁₆ ClNO ₄	9,79	358,0841	[M+H] ⁺
144	Indoprofen	NSAID	C ₁₇ H ₁₅ NO ₃	7,51	282,1125	[M+H] ⁺
145	Irbesartan	Αντιυπερτασικό	C ₂₅ H ₂₈ N ₆ O	8,52	429,2397	[M+H] ⁺
146	Isoetharine	β2-αδρενεργικοί αγωνιστές	C ₁₃ H ₂₁ NO ₃	1,93	240,1594	[M+H] ⁺
147	Isometheptene	Συμπαθομιμητικό	C ₉ H ₁₉ N	4,63	142,1590	[M+H] ⁺

No.	Ουσία	Φαρμακολογική δράση	Μοριακός τύπος	RT (min)	Διαγνωστικό ιόν	«Adduct» / παράγωγο
148	Isopyrin	Καταπραϋντικό	C ₁₄ H ₁₉ N ₃ O	4,56	246,1601	[M+H] ⁺
149	Isoxicam	NSAID	C ₁₄ H ₁₃ N ₃ O ₅ S	8,11	336,0649	[M+H] ⁺
150	Ketamine	Αναισθητικό	C ₁₃ H ₁₆ CINO	4,33	238,0993	[M+H] ⁺
151	Labetalol	β-Αναστολέας	C ₁₉ H ₂₄ N ₂ O ₃	5,65	329,1860	[M+H] ⁺
152	Levobunolol	β-Αναστολέας	C ₁₇ H ₂₅ NO ₃	4,89	292,1907	[M+H] ⁺
153	Lobeline	Αναπνευστικό διεγερτικό	C ₂₂ H ₂₇ NO ₂	6,78	338,2115	[M+H] ⁺
154	Lorazepam	Αγχολυτικό	C ₁₅ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O ₂	7,59	321,0192	[M+H] ⁺
155	Lornoxicam	NSAID	C ₁₃ H ₁₀ CIN ₃ O ₄ S ₂	7,15	371,9874	[M+H] ⁺
156	Mazindol	Ανορεκτικό	C ₁₆ H ₁₃ CIN ₂ O	5,64	285,0789	[M+H] ⁺
157	Mebeverine	Αντισπασμωδικό	C ₂₅ H ₃₅ NO ₅	7,34	430,2588	[M+H] ⁺
158	Medazepam	Αγχολυτικό	C ₁₆ H ₁₅ CIN ₂	8,13	271,0997	[M+H] ⁺
159	Mefenamic acid	NSAID	C ₁₅ H ₁₅ NO ₂	10,6	242,1176	[M+H] ⁺
160	Mefenorex	Διεγερτικό	C ₁₂ H ₁₈ CIN	5,30	212,1201	[M+H] ⁺
161	Mephentermine	Διεγερτικό	C ₁₁ H ₁₇ N	4,07	164,1434	[M+H] ⁺
162	Meprobamate	Αγχολυτικό	C ₉ H ₁₈ N ₂ O ₄	5,60	158,1176	«artefact» [C ₈ H ₁₆ NO ₂] ⁺
163	Methadone	Οπιώδες αναλγητικό	C ₂₁ H ₂₇ NO	7,57	310,2165	[M+H] ⁺
164	Methamphetamine	Διεγερτικό	C ₁₀ H ₁₅ N	3,62	150,1277	[M+H] ⁺
165	Methapyrilene	Αντισταμινικό	C ₁₄ H ₁₉ N ₃ S	5,75	262,1372	[M+H] ⁺
166	Methasterone	Αναβολικό στεροειδές	C ₂₁ H ₃₄ O ₂	11,1	319,2632	[M+H] ⁺
167	Methotrimeprazine	Αντιψυχωτικό	C ₁₉ H ₂₄ N ₂ OS	7,49	329,1682	[M+H] ⁺
168	Methoxamine	Αγγειοσυστολέας	C ₁₁ H ₁₇ NO ₃	3,63	194,1176	[M+H-H ₂ O] ⁺
169	Methoxyphenamine	NSAID	C ₁₁ H ₁₇ NO	4,35	180,1383	[M+H] ⁺
170	Methylclothiazide	Διουρητικό	C ₉ H ₁₁ Cl ₂ N ₃ O ₄ S ₂	6,60	376,9901	[M+NH ₄] ⁺
171	Methyldienolone	Αναβολικό στεροειδές	C ₁₉ H ₂₆ O ₂	8,07	287,2006	[M+H] ⁺
172	Methylenedioxyamphetamine (MDA)	Διεγερτικό	C ₁₀ H ₁₃ NO ₂	3,52	163,0754	«artefact» [M+H-NH ₃] ⁺
173	Methylenedioxymethamphetamine (MDMA)	Διεγερτικό	C ₁₁ H ₁₅ NO ₂	3,77	194,1176	[M+H] ⁺
174	Methylephedrine	Διεγερτικό	C ₁₁ H ₁₇ NO	3,04	180,1383	[M+H] ⁺
175	Methylprednisolone	Κορτικοστεροειδές	C ₂₂ H ₃₀ O ₅	7,05	375,2166	[M+H] ⁺
176	Metipranolol	β-Αναστολέας	C ₁₇ H ₂₇ NO ₄	5,99	310,2013	[M+H] ⁺
177	Metoprolol	β-Αναστολέας	C ₁₅ H ₂₅ NO ₃	4,77	268,1907	[M+H] ⁺

No.	Ουσία	Φαρμακολογική δράση	Μοριακός τύπος	RT (min)	Διαγνωστικό ιόν	«Adduct» / παράγωγο
178	Mididrine	Vasopressor	C ₁₂ H ₁₈ N ₂ O ₄	3,30	237,1234	[M+H-H ₂ O] ⁺
179	Modafinil	Διεγερτικό	C ₁₅ H ₁₅ NO ₂ S	6,35	167,0855	«artefact» [C ₁₃ H ₁₁] ⁺
180	Morazon	Αναλγητικό, αντιφλεγμονώδες	C ₂₃ H ₂₇ N ₃ O ₂	5,45	378,2176	[M+H] ⁺
181	Nabumetone	NSAID	C ₁₅ H ₁₆ O ₂	9,84	229,1223	[M+H] ⁺
182	Nadolol	β-Αναστολέας	C ₁₇ H ₂₇ NO ₄	3,76	310,2013	[M+H] ⁺
183	Nafronyl	Vasodilator	C ₂₄ H ₃₃ NO ₃	7,75	384,2533	[M+H] ⁺
184	Nalbuphine	Οπιώδες αναλγητικό	C ₂₁ H ₂₇ NO ₄	4,10	358,2013	[M+H] ⁺
185	Naphazoline	Συμπαθομιμητικό	C ₁₄ H ₁₄ N ₂	4,71	211,1230	[M+H] ⁺
186	Naproxen	NSAID	C ₁₄ H ₁₄ O ₃	8,42	231,1016	[M+H] ⁺
187	Nefopam	Μη Οπιώδες αναλγητικό	C ₁₇ H ₁₉ NO	5,74	254,1539	[M+H] ⁺
188	Nicardipine	Αντιυπερτασικό	C ₂₆ H ₂₉ N ₃ O ₆	7,66	480,2129	[M+H] ⁺
189	Nicotine	Διεγερτικό	C ₁₀ H ₁₄ N ₂	1,05	163,1230	[M+H] ⁺
190	Nifenazone	Αναλγητικό, αντιπυρετικό	C ₁₇ H ₁₆ N ₄ O ₂	4,31	309,1346	[M+H] ⁺
191	Niflumic acid	NSAID	C ₁₃ H ₉ F ₃ N ₂ O ₂	8,83	283,0689	[M+H] ⁺
192	Nitrazepam	Αγχολυτικό	C ₁₅ H ₁₁ N ₃ O ₃	7,52	282,0873	[M+H] ⁺
193	Norcodeine (Codeine metabolite)	Διεγερτικό	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	2,73	286,1438	[M+H] ⁺
194	Norephedrine	Διεγερτικό	C ₉ H ₁₃ NO	2,11	152,1070	[M+H] ⁺
195	Norfenfluramine	Διεγερτικό	C ₁₀ H ₁₂ NF ₃	5,34	204,0995	[M+H] ⁺
196	Normethandrolone	Αναβολικό στεροειδές	C ₁₉ H ₂₈ O ₂	8,53	289,2162	[M+H] ⁺
197	Norpseudoephedrine	Διεγερτικό	C ₉ H ₁₃ NO	2,30	152,1070	[M+H] ⁺
198	Orphenadrine	Αντισταμινικό	C ₁₈ H ₂₃ NO	7,00	270,1852	[M+H] ⁺
199	Ortetamine	Διεγερτικό	C ₁₀ H ₁₅ N	4,28	150,1277	[M+H] ⁺
200	Oxandrolone	Αναβολικό στεροειδές	C ₁₉ H ₃₀ O ₃	8,37	324,2528	[M+NH ₄] ⁺
201	Oxaprozin	NSAID	C ₁₈ H ₁₅ NO ₃	9,16	294,1125	[M+H] ⁺
202	Oxilofrine	Διεγερτικό	C ₁₀ H ₁₅ NO ₂	1,06	182,1176	[M+H] ⁺
203	Oxprenolon	β-Αναστολέας	C ₁₅ H ₂₃ NO ₃	5,46	266,1751	[M+H] ⁺
204	Oxycodone	Οπιώδες αναλγητικό	C ₁₈ H ₂₁ NO ₄	3,44	316,1543	[M+H] ⁺
205	Oxymetazoline	Αποσυμφωρητικό	C ₁₆ H ₂₄ N ₂ O	6,29	261,1961	[M+H] ⁺
206	Paraxanthine	Βρογχοδιαστολέας	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂	2,34	181,0720	[M+H] ⁺
207	Pemoline	Διεγερτικό	C ₉ H ₈ N ₂ O ₂	3,89	177,0659	[M+H] ⁺
208	Pentazocine	Ναρκωτικό	C ₁₉ H ₂₇ NO	5,80	286,2165	[M+H] ⁺

No.	Ουσία	Φαρμακολογική δράση	Μοριακός τύπος	RT (min)	Διαγνωστικό ιόν	«Adduct» / παράγωγο
209	Pentoxifyline	Αγγειοδιαστολέας	C ₁₃ H ₁₈ N ₄ O ₃	4,97	279,1452	[M+H] ⁺
210	Pentylentetrazol	Διεγερτικό	C ₆ H ₁₀ N ₄	3,64	139,0978	[M+H] ⁺
211	Phacetoperan	Αντικαταθληπτικό	C ₁₄ H ₁₉ NO ₂	4,59	234,1489	[M+H] ⁺
212	Phendimetrazine	Διεγερτικό	C ₁₂ H ₁₇ NO	3,60	192,1383	[M+H] ⁺
213	Phenothiazine	Ανθελμινθικό	C ₁₂ H ₉ NS	10,6	200,0528	[M+H] ⁺
214	Pholcodine	Αντιβηχικό	C ₂₃ H ₃₀ N ₂ O ₄	1,02	399,2278	[M+H] ⁺
215	Pholedrine	Διεγερτικό	C ₁₀ H ₁₅ NO	1,67	166,1226	[M+H] ⁺
216	Picrotin	Διεγερτικό	C ₁₅ H ₁₈ O ₇	5,30	328,1385	[M+NH ₄] ⁺
217	Picrotoxinin	Διεγερτικό	C ₁₅ H ₁₆ O ₆	6,34	310,1280	[M+NH ₄] ⁺
218	Pindolol	β-Αναστολέας	C ₁₄ H ₂₀ N ₂ O ₂	3,81	249,1598	[M+H] ⁺
219	Pipradol	Διεγερτικό	C ₁₈ H ₂₁ NO	5,55	268,1696	[M+H] ⁺
220	Piretanide	Διουρητικό	C ₁₇ H ₁₈ N ₂ O ₅ S	7,66	363,1009	[M+H] ⁺
221	Piroxicam	NSAID	C ₁₅ H ₁₃ N ₃ O ₄ S	7,48	332,0700	[M+H] ⁺
222	Polythiazide	Διουρητικό	C ₁₁ H ₁₃ ClF ₃ N ₃ O ₄ S ₃	8,17	457,0042	[M+NH ₄] ⁺
223	Prednisolone	Κορτικοστεροειδές	C ₂₁ H ₂₈ O ₅	6,40	361,2009	[M+H] ⁺
224	Prednisone	Κορτικοστεροειδές	C ₂₁ H ₂₆ O ₅	6,44	359,1853	[M+H] ⁺
225	Prilocaine	Τοπικό αναισθητικό	C ₁₃ H ₂₀ N ₂ O	4,38	221,1648	[M+H] ⁺
226	Probenecid	Διουρητικό	C ₁₃ H ₁₉ NO ₄ S	8,02	286,1108	[M+H] ⁺
227	Procainamide	Αντι-αρρυθμικό	C ₁₃ H ₂₁ N ₃ O	1,63	236,1757	[M+H] ⁺
228	Procaine	Τοπικό αναισθητικό	C ₁₃ H ₂₀ N ₂ O ₂	2,81	237,1598	[M+H] ⁺
229	Prolintane	Διεγερτικό	C ₁₅ H ₂₃ N	5,88	218,1903	[M+H] ⁺
230	Promazine	Ηρεμιστικό	C ₁₇ H ₂₀ N ₂ S	6,80	285,1420	[M+H] ⁺
231	Promethazine	Αντισταμινικό	C ₁₇ H ₂₀ N ₂ S	6,90	285,1420	[M+H] ⁺
232	Propafenone	Αντι-αρρυθμικό	C ₂₁ H ₂₇ NO ₃	7,23	342,2064	[M+H] ⁺
233	Propionylpromazine	Ηρεμιστικό	C ₂₀ H ₂₄ N ₂ OS	7,50	341,1682	[M+H] ⁺
234	Propoxyphene	Οπιώδες αναλγητικό	C ₂₂ H ₂₉ NO ₂	7,47	340,2271	[M+H] ⁺
235	Propranolol	β-Αναστολέας	C ₁₆ H ₂₁ NO ₂	6,08	260,1645	[M+H] ⁺
236	Propylhexedrine	Διεγερτικό	C ₁₀ H ₂₁ N	5,30	156,1747	[M+H] ⁺
237	Pseudoephedrine	Διεγερτικό	C ₁₀ H ₁₅ NO	2,76	148,1121	[M+H-H ₂ O] ⁺
238	Pyrovalerone	Διεγερτικό	C ₁₆ H ₂₃ NO	5,95	246,1852	[M+H] ⁺
239	Raloxifene	Ρυθμιστής υποδοχέων ορμονών	C ₂₈ H ₂₇ O ₄ NS	6,50	474,1734	[M+H] ⁺
240	Ranitidine	Αντι-ελκώδες	C ₁₃ H ₂₂ N ₄ O ₃ S	2,15	315,1485	[M+H] ⁺

No.	Ουσία	Φαρμακολογική δράση	Μοριακός τύπος	RT (min)	Διαγνωστικό ιόν	«Adduct» / παράγωγο
241	Ritodrine	Τοκολυτικό	C ₁₇ H ₂₁ NO ₃	3,43	288,1594	[M+H] ⁺
242	Romifidine	Ηρεμιστικό	C ₉ H ₉ N ₃ BrF	2,63	258,0037	[M+H] ⁺
243	Salicylamide	NSAID	C ₇ H ₇ NO ₂	4,45	138,0550	[M+H] ⁺
244	Salmeterol	Βρογχοδιαστολέας	C ₂₅ H ₃₇ NO ₄	7,65	416,2795	[M+H] ⁺
245	Sotalol	β-Αναστολέας	C ₁₂ H ₂₀ N ₂ O ₃ S	1,98	273,1267	[M+H] ⁺
246	Stanozolol	Αναβολικό στεροειδές	C ₂₁ H ₃₂ N ₂ O	8,95	329,2587	[M+H] ⁺
247	Strychnine	Μυοχαλαρωτικό	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₂	4,10	335,1754	[M+H] ⁺
248	Sulindac	NSAID	C ₂₀ H ₁₇ FO ₃ S	7,54	357,0955	[M+H] ⁺
249	Sulphamethoxazole	Αντιβιοτικό	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S	5,55	254,0594	[M+H] ⁺
250	Suprofen	Αναλγητικό	C ₁₄ H ₁₂ O ₃ S	7,76	261,0580	[M+H] ⁺
251	Suxibuzone	Αναλγητικό, αντιπυρετικό, αντιφλεγμονώδες	C ₂₄ H ₂₆ N ₂ O ₆	9,63	439,1864	[M+H] ⁺
252	Sydnocarb	Ψυχοδιεγερτικό	C ₁₈ H ₁₈ N ₄ O ₂	9,27	323,1503	[M+H] ⁺
253	Temazepam	Ηρεμιστικό	C ₁₆ H ₁₃ ClN ₂ O ₂	8,23	301,0738	[M+H] ⁺
254	Tenoxicam	Καταπραύντικό	C ₁₃ H ₁₁ N ₃ O ₄ S ₂	5,68	338,0264	[M+H] ⁺
255	Terbutaline artefact		C ₁₃ H ₁₉ NO ₃	1,57	238,1438	[M+H] ⁺
256	Tetracaine	Τοπικό αναισθητικό	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O ₂	6,41	265,1911	[M+H] ⁺
257	Thiazide artefact_1		C ₆ H ₈ ClN ₃ O ₄ S ₂	2,77	302,9978	[M+NH ₄] ⁺
258	Thiazide artefact_2		C ₇ H ₈ N ₃ O ₄ S ₂ F ₃	4,29	337,0241	[M+NH ₄] ⁺
259	Thioridazine	Αντιψυχωτικό	C ₂₁ H ₂₆ N ₂ S ₂	8,40	371,1610	[M+H] ⁺
260	Torazemide	Διουρητικό	C ₁₆ H ₂₀ N ₄ O ₃ S	6,01	349,1329	[M+H] ⁺
261	Toremifene	Ρυθμιστής υποδοχέων ορμονών,	C ₂₆ H ₂₈ ClNO	9,49	406,1932	[M+H] ⁺
262	Triamcinolone	Κορτικοστεροειδές	C ₂₁ H ₂₇ FO ₆	5,56	395,1864	[M+H] ⁺
263	Triamterene	Διουρητικό	C ₁₂ H ₁₁ N ₇	4,11	254,1149	[M+H] ⁺
264	Trichlormethiazide	Διουρητικό	C ₈ H ₈ Cl ₃ N ₃ O ₄ S ₂	6,30	398,9331	³⁷ Cl isotope [M+NH ₄] ⁺
265	Trimeprazine	Αντικνησμώδες	C ₁₈ H ₂₂ N ₂ S	7,32	299,1576	[M+H] ⁺
266	Trimethoprim	Αντιμικροβιακό	C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃	3,95	291,1452	[M+H] ⁺
267	Tripelennamine	Αντισταμινικό	C ₁₆ H ₂₁ N ₃	6,13	256,1808	[M+H] ⁺
268	Valdecoxib	Καταπραύντικό	C ₁₆ H ₁₄ N ₂ O ₃ S	8,24	315,0798	[M+H] ⁺
269	Xipamide	Διουρητικό	C ₁₅ H ₁₅ N ₂ O ₄ SCI	8,25	355,0514	[M+H] ⁺

No.	Ουσία	Φαρμακολογική δράση	Μοριακός τύπος	RT (min)	Διαγνωστικό ιόν	«Adduct» / παράγωγο
270	Xylazine	Ηρεμιστικό	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ S	4,71	221,1107	[M+H] ⁺
271	Yohimbine	Διεγερτικό	C ₂₁ H ₂₆ N ₂ O ₃	5,19	355,2016	[M+H] ⁺
272	Zomepirac	NSAID	C ₁₅ H ₁₄ ClNO ₃	8,29	292,0735	[M+H] ⁺
	Etiocholanolone (IS)	Αναβολικό στεροειδές	C ₁₉ H ₃₀ O ₂	10,0	308,2584	[M+H] ⁺
Ανάλυση GC-MS μεθυλο-παραγώγων						
273	Acetazolamide	Αναστολέας ανθρακικής ανυδράσης	C ₄ H ₆ N ₄ O ₃ S ₂	7,39	249 & 264	tris-Me
274	Carprofen	NSAID	C ₁₅ H ₁₂ ClNO ₂	10,8	228 & 287	mono-Me
275	Dichlorphenamide	Αναστολέας ανθρακικής ανυδράσης	C ₆ H ₆ Cl ₂ N ₂ O ₄ S ₂	9,94	253 & 255	tetra-Me
276	Fenoprofen	NSAID	C ₁₅ H ₁₄ O ₃	6,36	197 & 256	mono-Me
277	Flurbiprofen	NSAID	C ₁₅ H ₁₃ FO ₂	6,45	199 & 258	mono-Me
278	Ibuprofen	Μουσκαρινικός ανταγωνιστής	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	3,77	161 & 177	mono-Me
279	Meclofenamic acid	NSAID	C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂	8,78	309 & 311	mono-Me
280	Mofebutazone	NSAID	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O ₂	6,06	260 & 204	bis-Me
281	Nimesulide	NSAID	C ₁₃ H ₁₂ N ₂ O ₅ S	10,0	243 & 322	mono-Me
282	Oxyphenbutazone (Phenylbutazone metabolite)	NSAID	C ₁₉ H ₂₀ N ₂ O ₃	10,3	352 & 213	bis-Me
283	Tolfenamic acid	NSAID	C ₁₄ H ₁₂ ClNO ₂	8,04	243 & 275	mono-Me
	Nalidixic acid (IS)	Αντιμικροβιακό	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O ₃	8,94	188 & 246	mono-Me
	Mefruside (IS)	Διουρητικό	C ₁₃ H ₁₉ ClN ₂ O ₅ S ₂	11,9	85	bis-Me
Ανάλυση GC-HRMS TMS-παραγώγων						
284	17α-Methyl-5α-androstane-3α,17β-diol (Mestanolone metabolite)	Αναβολικό στεροειδές	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	8,46	450,3349 & 360,2849	bis-TMS
285	17α-Methyl-5β-androstane-3α,17β-diol (Methandienone and methyltestosterone metabolite)	Αναβολικό στεροειδές	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	8,46	450,3349 & 360,2849	bis-TMS
286	5α-Androstan-17β-ol-3-one (DHT)	Ενδογενές αναβολικό στεροειδές	C ₁₉ H ₃₀ O ₂	8,57	434,3036	bis-TMS
287	5β-Androstane-3β,17β-diol		C ₁₉ H ₃₂ O ₂	8,46	436,3193 & 421,2958	bis-TMS
288	Androstenedione (4-androstene-3,17-dione)	Ενδογενές αναβολικό στεροειδές	C ₁₉ H ₂₆ O ₂	8,65	430,2723	bis-TMS
289	Bolasterone	Αναβολικό στεροειδές	C ₂₁ H ₃₂ O ₂	9,39	460,3193	bis-TMS
290	Calusterone	Αναβολικό στεροειδές	C ₂₁ H ₃₂ O ₂	9,33	460,3193	bis-TMS
291	Dehydroepiandrosterone (DHEA)	Ενδογενές αναβολικό	C ₁₉ H ₂₈ O ₂	8,33	432,2880	bis-TMS

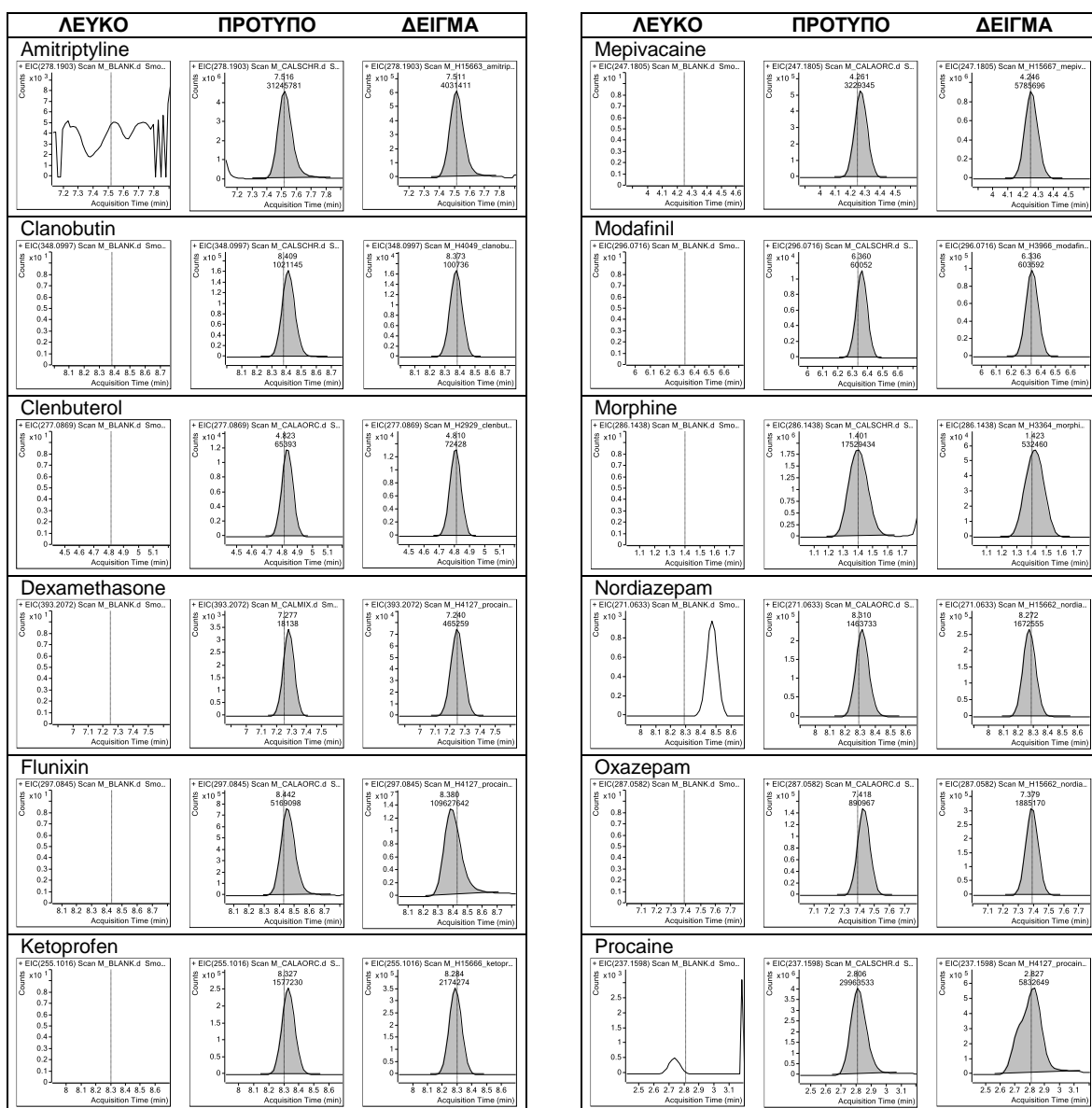
No.	Ουσία	Φαρμακολογική δράση	Μοριακός τύπος	RT (min)	Διαγνωστικό ιόν	«Adduct» / παράγωγο
		στεροειδές				
292	Digoxigenin	Cardiotonic glycoside	C ₂₃ H ₃₄ O ₅	11,5	588,3486 & 498,2985	tetra-TMS
293	Epitestosterone	Ενδογενές αναβολικό στεροειδές	C ₁₉ H ₂₈ O ₂	8,48	432,288	bis-TMS
294	Estrone	Oestrogen	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	8,54	414,2411	bis-TMS
295	Ethisterone (Danazol metabolite)	Progestogen	C ₂₁ H ₂₈ O ₂	9,39	456,2880	bis-TMS
296	Fluoxymesterone	Αναβολικό στεροειδές	C ₂₀ H ₂₉ FO ₃	10,3	552,3287 & 446,2786	tris-TMS
297	Furazabol	Αναβολικό στεροειδές	C ₂₀ H ₃₀ N ₂ O ₂	10,2	387,2468 & 297,1967	mono-TMS
298	Mestanolone	Αναβολικό στεροειδές	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	9,10	448,3193	bis-TMS
299	Methandriol	Αναβολικό στεροειδές	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	9,10	448,3193	bis-TMS
300	Mibolerone	Αναβολικό στεροειδές	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	9,09	446,3036 & 431,2802	bis-TMS
301	Nandrolone	Ενδογενές αναβολικό στεροειδές	C ₁₈ H ₂₆ O ₂	8,50	418,2723	mono-TMS
302	Norethandrolone (Ethylestrenol metabolite)	Αναβολικό στεροειδές	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	9,77	446,3036	bis-TMS
	Methyltestosterone (IS)	Αναβολικό στεροειδές	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	9,28	446,3036	bis-TMS

7.9 Εφαρμογή μεθόδου σε αυθεντικά θετικά δείγματα

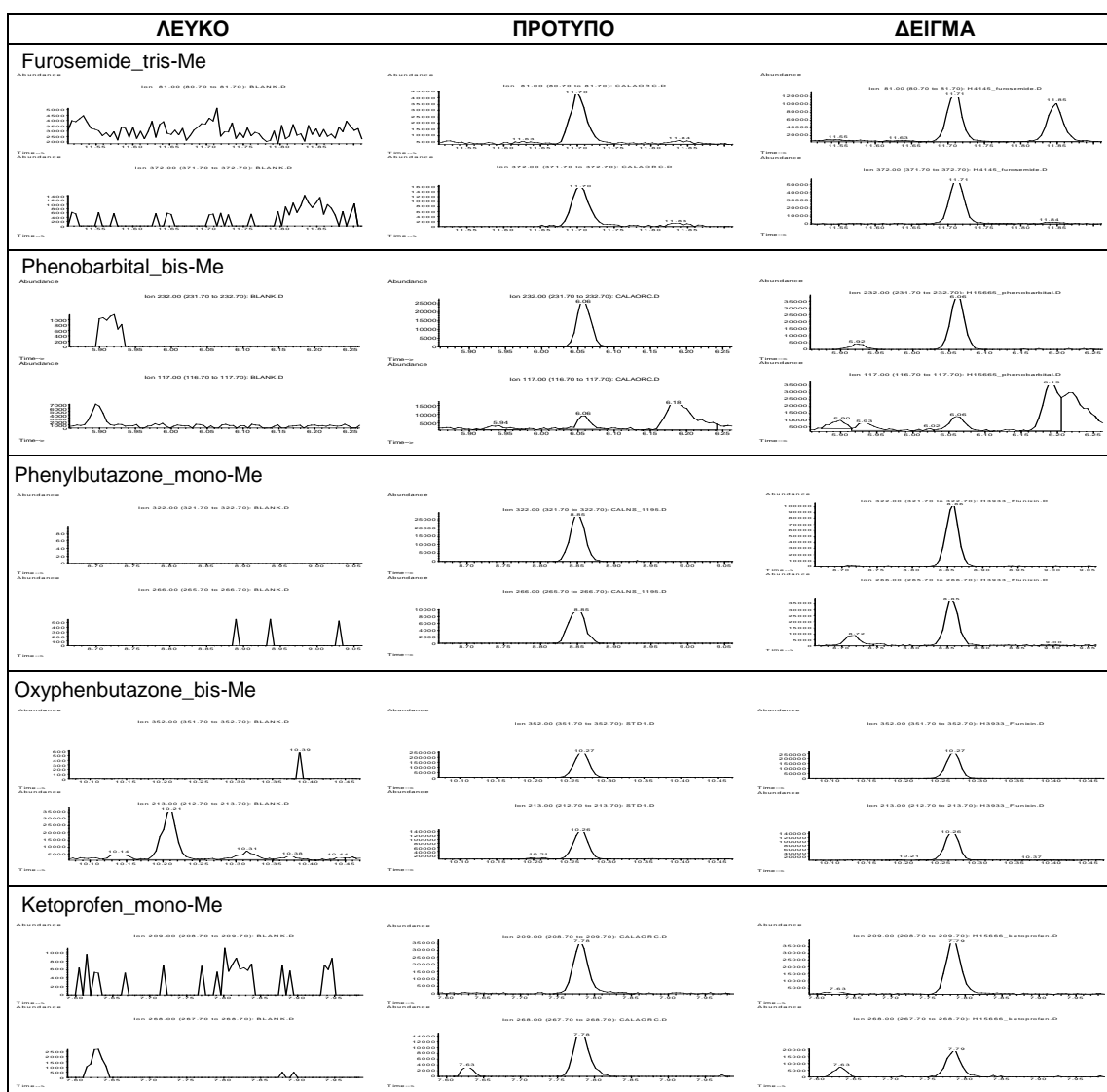
7.9.1 Στοχευμένη ανίχνευση ουσιών

Προκειμένου να επαληθευτεί η αποτελεσματικότητα της προτεινόμενης επικυρωμένης μεθόδου σε αυθεντικά θετικά δείγματα, δέκα θετικά δείγματα ούρων αλόγων που συμμετείχαν σε ιππικά αθλήματα και πέντε δείγματα ούρων αλόγων του «Proficiency Test» του AORC του 2012 επανεξετάστηκαν με τη νέα μεθοδολογία. Παράλληλα με τα δείγματα αυτά, προετοιμάστηκαν και αναλύθηκαν λευκό δείγμα ούρων και πρότυπα δείγματα, δηλαδή, λευκά δείγματα ούρων εμβολιασμένα με τις εξεταζόμενες ουσίες, με τα οποία θα συγκρίνονταν τα εξεταζόμενα δείγματα. Για τα συγκεκριμένα δείγματα είχε δηλωθεί η ταυτοποίηση των ουσιών: αμιτριπτυλίνη, βουμετανίδιο, κλανοβουτίνη, κλενβουτερόλη, δεξαμεθαζόνη, φλουνιξίνη, φουροσεμίδιο, κετοπροφαίνιο, μεπιβακαΐνη, μοδαφινίλη, μορφίνη, προκαΐνη, φαινοβαρβιτάλη, νορδιαζεπάμη, οξαζεπάμη, νανδρολόνη και ο μεταβολίτης της, 5α-εστρανο-3β,17α-διόλη, και τέλος, φαινυλοβουταζόνη και ο μεταβολίτης της, οξυφαινοβουταζόνη.

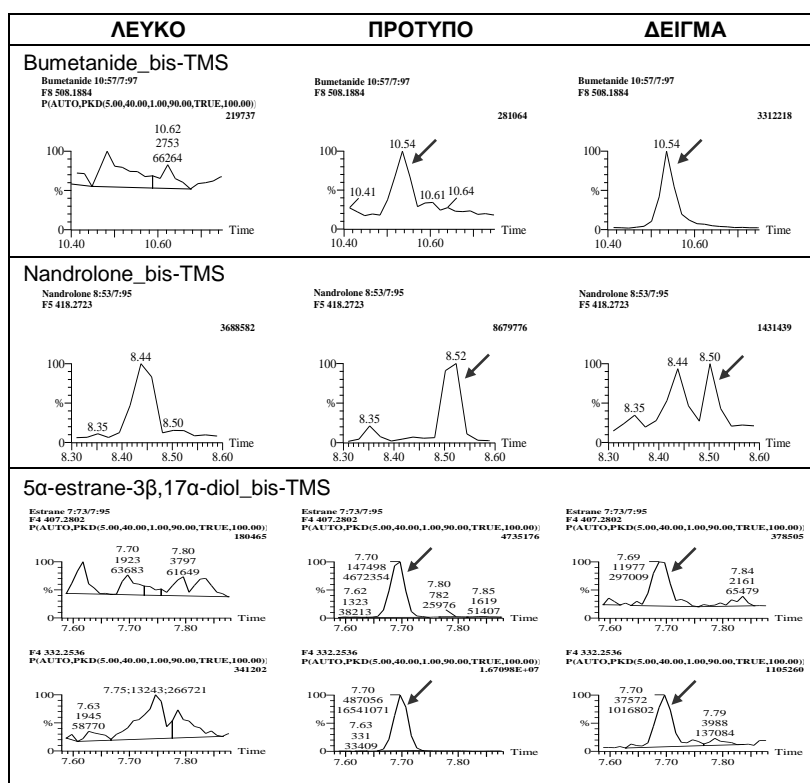
Με την επανεξέταση των επιλεγμένων θετικών δειγμάτων προσδιορίστηκαν οι ίδιες ουσίες που είχαν ταυτοποιηθεί και στο παρελθόν, μέσω της τότε εφαρμοζόμενης μεθόδου σάρωσης. Στα σχήματα 7.1-7.3 παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα των διαγνωστικών ιόντων των εξεταζόμενων ουσιών που ανιχνεύτηκαν, μέσω των αναλύσεων LC-TOF-MS, GC-MS και GC-HRMS, αντιστοίχως. Στα σχήματα παρατίθενται τα χρωματογραφήματα α) των λευκών δειγμάτων (πρώτη στήλη), β) των πρότυπων δειγμάτων ούρων (δεύτερη στήλη) και γ) των εξεταζόμενων θετικών δειγμάτων (τρίτη στήλη). Όπως φαίνεται στα σχήματα, τα χρωματογραφήματα του λευκού δείγματος δεν εμφανίζουν παρεμποδίζουσες κορυφές στο χρόνο έκλουσης των εξεταζόμενων ουσιών που ταυτοποιήθηκαν. Επίσης, οι εξεταζόμενες ουσίες ανιχνεύτηκαν στα θετικά δείγματα με λόγο σήμα προς θόρυβο πολύ μεγαλύτερο του τρία και με χρόνο έκλουσης που δε διέφερε περισσότερο από 1,6% (μορφίνη, σχήμα 7.1) από τον αντίστοιχο χρόνο στα πρότυπα δείγματα.



Σχήμα 7.1. Χρωματογραφήματα LC-TOF-MS διαγνωστικών ιόντων ακριβούς μάζας σε α) λευκό δείγμα ούρων αλόγου (πρώτη στήλη «ΛΕΥΚΟ»), β) πρότυπα δείγματα ούρων αλόγου, εμβολιασμένα, εκτός των άλλων, με amitriptyline (500 ng mL^{-1}), clonobutin (200 ng mL^{-1}), clenbuterol ($4,0 \text{ ng mL}^{-1}$), dexamethasone (50 ng mL^{-1}), flunixin (200 ng mL^{-1}), ketoprofen (200 ng mL^{-1}), mepivacaine (50 ng mL^{-1}), modafinil (500 ng mL^{-1}), morphine at ($1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$), nordiazepam (100 ng mL^{-1}), oxazepam (100 ng mL^{-1}) και procaine (500 ng mL^{-1}) (δεύτερη στήλη «ΠΡΟΤΥΠΟ») και γ) αυθεντικά δείγματα ούρων αλόγων (τρίτη στήλη «ΔΕΙΓΜΑ»).



Σχήμα 7.2. Χρωματογραφήματα GC-MS διαγνωστικών ιόντων μεθυλο-παραγώγων (Me) σε α) λευκό δείγμα ούρων αλόγου (πρώτη στήλη «ΛΕΥΚΟ»), β) πρότυπα δείγματα ούρων αλόγου, εμβολιασμένα, εκτός των άλλων, με furosemide (500 ng mL^{-1}), phenobarbital (100 ng mL^{-1}), phenylbutazone (500 ng mL^{-1}), oxyphenbutazone ($2,0 \text{ ng mL}^{-1}$), ketoprofen (200 ng mL^{-1}) (δεύτερη στήλη «ΠΡΟΤΥΠΟ») και γ) αυθεντικά δείγματα ούρων αλόγων (τρίτη στήλη «ΔΕΙΓΜΑ»).



Σχήμα 7.3. Χρωματογραφήματα GC-HRMS διαγνωστικών ιόντων ακριβούς μάζας σε α) λευκό δείγμα ούρων αλόγου (πρώτη στήλη «ΛΕΥΚΟ»), β) πρότυπα δείγματα ούρων αλόγου, εμβολιασμένα, εκτός των άλλων, με bumetanide (20 ng mL^{-1}), nandrolone (25 ng mL^{-1}), 5α -estrane- 3β , 17α -diol (50 ng mL^{-1}) (δεύτερη στήλη «ΠΡΟΤΥΠΟ») και γ) αυθεντικά δείγματα ούρων αλόγων (τρίτη στήλη «ΔΕΙΓΜΑ»).

Αξίζει να σημειωθεί ότι η ταυτοποίηση ορισμένων ευρημάτων διασταυρώθηκε, καθώς η ανίχνευσή τους κατέστη δυνατή, μέσω περισσότερων του ενός σταδίου, όπως για παράδειγμα στο βουμετανίδιο, το οποίο ανιχνεύτηκε και από τις τρεις τεχνικές της μεθοδολογίας, λόγω της υψηλής συγκέντρωσής του. Ομοίως, οι ουσίες φουροσεμίδιο και κλενβουτερόλη προσδιορίστηκαν, επιπλέον, και μέσω της ανάλυσης GC-HRMS του TMS-παραγωγοποιημένου εκχυλίσματος (A3+B). Επιπροσθέτως, οι ουσίες φαινυλοβουταζόνη και οξυφαιβουταζόνη, παράλληλα με την ανάλυση GC-MS του μεθυλοπαραγωγοποιημένου εκχυλίσματος A2, ταυτοποιήθηκαν και μέσω της ανάλυσης LC-TOF-MS του εκχυλίσματος A1.

Όσον αφορά στα θετικά δείγματα σε νανδρολόνη και φαινυλοβουταζόνη, οι κύριοι μεταβολίτες αυτών, 5α-εστρανο-3β,17α-διόλη και οξυφαινοβουταζόνη, ανιχνεύτηκαν παράλληλα με τη μητρική ουσία. Επίσης, η νανδρολόνη και ο μεταβολίτης της ταυτοποιήθηκαν σε ούρα θηλυκού αλόγου, οπότε η νανδρολόνη δεν θεωρήθηκε ουσία ορίου. Τέλος, η ανίχνευση των ουσιών οξαζεπάμη και νορδιαζεπάμη δηλώνει τη χορήγηση οξαζεπάμης.

Άρα, η νέα μέθοδος που αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε, εφαρμόστηκε, επιτυχώς, σε αυθεντικά θετικά δείγματα ούρων αλόγων και στα δείγματα του «Proficiency Test» του AORC του 2012, καθώς ταυτοποιήθηκαν όλες οι ουσίες που είχαν δηλωθεί.

7.9.2 Αυτόματη ανίχνευση απαγορευμένων ουσιών

Η λειτουργικότητα σε αυθεντικά θετικά δείγματα, του τμήματος της νέας μεθοδολογίας που αφορά στην αυτόματη ανίχνευση απαγορευμένων ουσιών, επαληθεύτηκε με την επανεξέταση δύο δειγμάτων ούρων αλόγων που είχαν δηλωθεί θετικά στην ουσία πεντοβαρβιτάλη. Η συγκεκριμένη ουσία δε συμπεριλαμβανόταν στις ουσίες που εξετάζονταν, κατά το στοχευμένο έλεγχο ντόπινγκ, οπότε αυτή δεν ήταν δυνατόν να ανιχνευτεί μέσω του στοχευμένου ελέγχου από τον αναλυτή.

Στα δύο θετικά δείγματα και σε ένα λευκό δείγμα ούρων αλόγων εφαρμόστηκε το τμήμα της μεθοδολογίας που περιελάμβανε μεθυλο-παραγωγοποίηση του εκχυλίσματος A2, ανάλυση GC-MS και αυτόματη αναζήτηση απαγορευμένων ουσιών σε βιβλιοθήκες φασμάτων μαζών, μέσω των προγραμμάτων AMDIS και DRS. Για εξοικονόμηση χώρου, στους πίνακες 7.11-7.13 παρατίθεται το μέρος της έκθεσης της αυτόματης αναζήτησης που αφορά στην ανίχνευση της πεντοβαρβιτάλης στα εξεταζόμενα δείγματα και στην απουσία αυτού στο λευκό δείγμα. Η ουσία ανιχνεύτηκε στα 4,5 και 4,7 min στα εξεταζόμενα δείγματα. Σύμφωνα με την έκθεση του πρώτου θετικού δείγματος (πίνακας 7.11), το «καθαρό» φάσμα μαζών («component») της ύποπτης ουσίας που προέκυψε από τη διαδικασία της φασματικής αποσυνέλιξης, ταιριάζει με το φάσμα μαζών της μεθυλο-παραγωγοποιημένης πεντοβαρβιτάλης της βιβλιοθήκης «AORC_R6», κατά 98% («match factor»). Από την περαιτέρω σύγκριση του «component» με τα φάσματα μαζών της δεύτερης βιβλιοθήκης

«NIST05», που πραγματοποιείται μέσω του «CAS number» της πεντοβαρβιτάλης στη βιβλιοθήκη «AORC_R6», προκύπτει ότι και η δεύτερη βιβλιοθήκη (NIST05) αντιστοιχεί το καθαρό φάσμα μαζών της ύποπτης ουσίας στο φάσμα μαζών της πεντοβαρβιτάλης (Hit number 1), με «match factor» 94%. Ομοίως, ερμηνεύεται και η έκθεση του δεύτερου θετικού δείγματος (πίνακας 7.12), σύμφωνα με την οποία το «καθαρό» φάσμα μαζών της ύποπτης ουσίας στο εξεταζόμενο δείγμα αντιστοιχεί στο φάσμα μαζών της μεθυλο-παραγωγοποιημένης πεντοβαρβιτάλης και στις δύο βιβλιοθήκες (Hit number 1), με μικρότερο «match factor», βέβαια, σε σύγκριση με το πρώτο δείγμα. Από την έκθεση του λευκού δείγματος (πίνακας 7.13) προέκυψε ότι το συγκεκριμένο δείγμα ούρων είναι αρνητικό σε πεντοβαρβιτάλη.

Άρα, το τμήμα της μεθόδου που αφορά στην αυτόματη ανίχνευση απαγορευμένων ουσιών, μέσω των προγραμμάτων AMDIS και DRS, εφαρμόστηκε, επιτυχώς, σε αυθεντικά θετικά δείγματα ούρων αλόγων, καθώς η ουσία πεντοβαρβιτάλη ταυτοποιήθηκε και στα δύο εξεταζόμενα θετικά δείγματα, χωρίς να ανιχνευτεί στο λευκό δείγμα ούρων.

Πίνακας 7.11. Έκθεση αυτόματης αναζήτησης απαγορευμένων ουσιών στις βιβλιοθήκες «AORC_R6» και «NIST05» μέσω των προγραμμάτων AMDIS και DRS, για το πρώτο θετικό δείγμα σε πεντοβαρβιτάλη, κατά τη διαδικασία εφαρμογής της μεθοδολογίας σε αυθεντικά θετικά δείγματα.

MSD Deconvolution Report

Sample Name:

Data File: C:\msdchem\1\DATA\120806_1196_Me\H16006.D

Date/Time: 11:30:31 PM Monday, January 21, 2013

The NIST library was searched for the components that were found in the AMDIS target library.

R.T.	Cas #	Compound Name	Amount (ppm)		AMDIS		NIST	
			Chem station	AMDIS	Match	R.T. Diff sec.	Reverse Match	Hit Num.
4.4867	AORC_R8a.MSPN1227	PENTOBARBITAL 1,3-DIMETHYL DERIVATIVE			98			
4.4867	57562999	Barbituric acid, 5-ethyl-1-methyl-5-(1-methylbutyl)-					94	1

Πίνακας 7.12. Έκθεση αυτόματης αναζήτησης απαγορευμένων ουσιών στις βιβλιοθήκες «AORC_R6» και «NIST05» μέσω των προγραμμάτων AMDIS και DRS, για το δεύτερο θετικό δείγμα σε πεντοβαρβιτάλη, κατά τη διαδικασία εφαρμογής της μεθοδολογίας σε αυθεντικά θετικά δείγματα.

MSD Deconvolution Report

Sample Name:

Data File: C:\msdchem\1\DATA\120806_1196_Me\H16011.D

Date/Time: 11:31:57 PM Monday, January 21, 2013

The NIST library was searched for the components that were found in the AMDIS target library.

R.T.	Cas #	Compound Name	Amount (ppm)		AMDIS		NIST	
			Chem station	AMDIS	Match	R.T. Diff sec.	Reverse Match	Hit Num.
4.7224	AORC_R8a.MSPN1227	PENTOBARBITAL 1,3-DIMETHYL DERIVATIVE			84			
4.7224	57562999	Barbituric acid, 5-ethyl-1-methyl-5-(1-methylbutyl)-					84	1

Πίνακας 7.13. Έκθεση αυτόματης αναζήτησης απαγορευμένων ουσιών στις βιβλιοθήκες «AORC_R6» και «NIST05» μέσω των προγραμμάτων AMDIS και DRS, για το λευκό δείγμα, κατά τη διαδικασία εφαρμογής της μεθοδολογίας σε αυθεντικά θετικά δείγματα.

MSD Deconvolution Report

Sample Name:

Data File: C:\msdchem\1

\DATA\120806_1196_Me\BLANK_1196_97.D

Date/Time: 11:28:28 PM Monday, January 21, 2013

The NIST library was searched for the components that were found in the AMDIS target library.

R.T.	Cas #	Compound Name	Amount (ng)		AMDIS		NIST	
			Chem station	AMDIS	Match	R.T. Diff sec.	Reverse Match	Hit Num.
4.3751	AORC_R8a.MSPN6228	Homovanillic acid di-methyl derivative			96			
4.3751	15964791	Benzeneacetic acid, 3,4-dimethoxy-, methyl ester					89	1
4.4166	122849	1-(para-methoxyphenyl)-2-propanone			74		77	17
4.4425	607910	1,3-Benzodioxole, 4-methoxy-6-(2-propenyl)-			72		73	6
4.8218	AORC_R8a.MSPN6231	Hippuric acid di-methyl derivative			88			
4.8218	71533216	Hippuric acid N,O-d-methyl derivative					90	1

ΕΠΙΛΟΓΟΣ

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε μια γενικευμένη μέθοδος για τον έλεγχο ντόπινγκ σε ούρα αλόγων που στοχεύει στον προσδιορισμό ταυτότητας του μέγιστου δυνατού αριθμού απαγορευμένων ουσιών με την καλύτερη δυνατή ευαισθησία ¹⁷⁹. Για το λόγο αυτό σχεδιάστηκε μια ενοποιημένη παρασκευαστική πορεία, όπου οι μεταβολίτες της δεύτερης φάσης αποσυζεύγγονται μέσω δύο ειδών υδρολύσεις, ενώ οι ουσίες στόχοι απομονώνονται από το πολύπλοκο υπόστρωμα των ούρων με δύο ειδών εκχυλίσεις. Η ανάλυση των προκατεργασμένων δειγμάτων λαμβάνει χώρα, συνδυάζοντας αεριο- και υγροχρωματογραφία, μέσω των τριών αναλυτικών τεχνικών LC-TOF-MS, GC-MS και GC-High Resolution MS που δρουν συμπληρωματικά για τη μεγαλύτερη κάλυψη των απαγορευμένων ουσιών. Έτσι, για τις ουσίες που εμφανίζουν δυσκολία ή αδυναμία θετικού ιοντισμού, μέσω του ηλεκτροψεκασμού της τεχνικής LC-TOF-MS, εφαρμόζεται η πορεία με τις αναλύσεις GC-MS. Επιπλέον, οι θερμοευαίσθητες και οι μη πτητικές ουσίες, όπως επίσης, και όσες εμφανίζουν οριακή συμπεριφορά, κατά την αεριοχρωματογραφική ανάλυση, ακόμη και μετά από παραγωγοποίηση (πχ βενζοθειαδιαζίνες), είναι δυνατόν να ανιχνευτούν μέσω της πορείας με την ανάλυση LC-TOF-MS.

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι αναλύσεις LC-TOF-MS και GC-MS διενεργούνται σε λειτουργία πλήρους σάρωσης, το οποίο διευκολύνει την επανεξέταση παλαιών δειγμάτων, χωρίς να πρέπει να παρασκευαστούν και να αναλυθούν ξανά τα δείγματα αυτά. Επιπροσθέτως, χρησιμοποιούνται δύο αναλυτικά όργανα, LC-TOF-MS και GC-HRMS, τα οποία επιτρέπουν προσδιορισμούς με μέτρηση ακριβούς μάζας σε λειτουργία υψηλής διακριτικής ικανότητας, διακρίνοντας έτσι, τις ουσίες στόχους από τα υπόλοιπα συστατικά του πολύπλοκου υποστρώματος.

Επιπροσθέτως, οι αντιδράσεις παραγωγοποίησης που λαμβάνουν χώρα πριν τις αναλύσεις GC-MS, οδηγούν στο σχηματισμό TMS- και μεθυλοπαραγώγων, τα φάσματα μαζών των οποίων είναι πολύ συνηθισμένα και

συναντώνται στις βιβλιοθήκες GC-MS φασμάτων μαζών. Έτσι, η προτεινόμενη μεθοδολογία ενισχύεται με την αυτόματη ανίχνευση επιπλέον απαγορευμένων ουσιών, μέσω αυτόματης αναζήτησης σε βιβλιοθήκες φασμάτων μαζών με τη χρήση του προγράμματος φασματικής αποσυνέλιξης AMDIS σε συνδυασμό με το πρόγραμμα DRS για την εξαγωγή της τελικής έκθεσης. Στην προτεινόμενη μεθοδολογία, δηλαδή, πραγματοποιείται α) στοχευμένος έλεγχος ντόπινγκ για συγκεκριμένες ουσίες που συνθέτουν τον κατάλογο των ουσιών στόχων που ελέγχει ο αναλυτής και β) συμπληρωματικός μη στοχευμένος έλεγχος, μέσω αυτόματης αναζήτησης σε βιβλιοθήκες φασμάτων μαζών, για την ανίχνευση επιπλέον ουσιών που δε συμπεριλαμβάνονται στον παραπάνω κατάλογο.

Η επικύρωση της μεθόδου και η επιτυχής εφαρμογή της σε αυθεντικά θετικά δείγματα ούρων αλόγων, όπως επίσης και στα δείγματα του «Proficiency Test» του AORC του 2012, αποδεικνύουν την καταλληλότητά της για το σκοπό που έχει αναπτυχθεί. Με τη συγκεκριμένη μεθοδολογία παρέχεται η δυνατότητα ταυτοποίησης περισσότερων των τριακοσίων πενήντα ουσιών.

Με τη νέα μέθοδο α) μειώθηκε η προκατεργασία των δειγμάτων, καθώς, παραλήφθηκε η αλκαλική υδρόλυση και η υγρο-υγρο εκχύλιση-της πορείας των NSAID (σχήμα 5.2), και β) ο τριπλός διαλύτης εκχύλισης (σχήμα 5.1) αντικαταστάθηκε από έναν διαλύτη, τον οξικό αιθυλεστέρα. Έτσι, μειώθηκε ο απαιτούμενος όγκος κάθε δείγματος ούρων, η κατανάλωση αντιδραστηρίων – διαλυτών και συνεπώς, το κόστος, και τέλος ο χρόνος προκατεργασίας των δειγμάτων και συνεπώς, ο φόρτος εργασίας.

Συνοψίζοντας, στην παρούσα διδακτορική διατριβή αναπτύχθηκε μια γενικευμένη, πολυδύναμη και αξιόπιστη μέθοδος ελέγχου ντόπινγκ στα άλογα, που εκτός από τον στοχευμένο έλεγχο, διευρύνει την ανίχνευση απαγορευμένων ουσιών με αυτόματη αναζήτηση σε βιβλιοθήκες φασμάτων μαζών. Επίσης, επιτρέπεται η γρήγορη επαναξιολόγηση, ήδη, αναλυθέντων δειγμάτων και η εύκολη ενσωμάτωση νέων απαγορευμένων ουσιών στις μεθόδους ανάλυσης.

ΠΡΟΟΠΤΙΚΗ

Η μέθοδος που παρουσιάστηκε στην παρούσα διδακτορική διατριβή θα μπορούσε να εξελιχθεί προς δύο διαφορετικές κατευθύνσεις:

α) Η πρώτη κατεύθυνση περιλαμβάνει περαιτέρω μείωση της παρασκευαστικής διαδικασίας με παράλειψη του σταδίου της μεθυλοπαραγωγοποίησης. Έτσι, δεν εκτελείται η ανάλυση GC-MS των μεθυλοπαραγωγοποιημένων δειγμάτων και συνεπώς, και η αυτόματη ανίχνευση απαγορευμένων ουσιών με αναζήτηση σε βιβλιοθήκες φασμάτων μαζών. Στο τέλος, δηλαδή, θα προκύπτουν δύο σειρές από τα προκατεργασμένα δείγματα, όπου η πρώτη θα υπόκειται σε δύο διαφορετικές αναλύσεις LC-TOF-MS, η πρώτη με θετικό ιοντισμό και η δεύτερη με αρνητικό ιοντισμό. Στη δεύτερη σειρά δειγμάτων (TMS-παραγωγοποιημένων) θα διενεργείται μόνο ανάλυση GC-HRMS. Η προοπτική αυτή στηρίζεται, κυρίως, στο γεγονός ότι στην προτεινόμενη μεθοδολογία της διδακτορικής διατριβής ο τριπλός διαλύτης εκχύλισης αντικαταστάθηκε με τον οξικό αιθυλεστέρα, μέσω του οποίου εκχυλίστηκαν και όξινες ουσίες, οι οποίες θα μπορούν να ανιχνεύονται, μέσω της ανάλυσης LC-TOF-MS σε αρνητικό ιοντισμό.

β) Η δεύτερη κατεύθυνση αφορά στην ενίσχυση της μεθοδολογίας της διδακτορικής διατριβής με ανίχνευση επιπλέον απαγορευμένων ουσιών, μέσω της διαδικασίας πρόβλεψης σχετικών χρόνων έκλουσης που είναι δυνατόν να υπολογιστούν με μαθηματικά μοντέλα που προκύπτουν από μελέτες QSRR (Quantitative Structure Retention Relationships, Ποσοτικές σχέσεις δομής – χρωματογραφικής ανάσχεσης).

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Πίνακας 1: Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός Όρος
Adduct	Ένωση προσθήκης
Artefact	Τεχνούργημα (προϊόν παρασκευαστικής ή εξεταστικής διαδικασίας)
Atmospheric Pressure Ionization	Ιοντισμός υπό ατμοσφαιρική πίεση
Automatic Mass Spectral Deconvolution and Identification System	Σύστημα αυτόματης φασματικής αποσυνέλιξης και ταυτοποίησης
Between days precision	Αναπαραγωγιμότητα
Carry over contamination	Επιμόλυνση (μεταφοράς από προηγούμενα αναλυθέντα δείγματα
Code of Conduct	Κώδικας δεοντολογίας
Collision cell	Θάλαμος προσκρούσεων
Component	Καθαρό φάσμα μαζών, κατόπιν, φασματικής αποσυνέλιξης
Constant Neutral Loss Scan	Σάρωση απώλειας ουδέτερου θραύσματος
Controlled medication substances	Ελεγχόμενες θεραπευτικές ουσίες
Deconvolution Reporting Software	Λογισμικό έκθεσης αποσυνέλιξης
Electron Impact	Ηλεκτρονικός ιοντισμός
Electrospray Ionization	Ιοντισμός με ηλεκτροψεκάσμο
Extraction Recovery	Ανάκτηση από εκχύλιση
Federation Equestre Internationale	Διεθνής Ιππική Ομοσπονδία
Full Scan MS	Φασματομετρία μαζών πλήρους σάρωσης

Full Width Half Maximum	Πλάτος στο μέσο του μέγιστου της κορυφής του ιόντος
Gas Chromatography	Αεριοχρωματογραφία
International Agreement on Breeding, Racing and Wagering	Διεθνής συμφωνία για την αναπαραγωγή, τους αγώνες δρόμου και το στοίχημα.
International Federation of Horseracing Authorities	Διεθνής Ομοσπονδία Ιπποδρομιακών Αρχών
International Screening Limits	Διεθνή όρια σάρωσης
Limit of Detection	Όριο ανίχνευσης
Liquid Chromatography	Υγροχρωματογραφία
Mass Accuracy	Ικανότητα μέτρησης ακριβούς μάζας
Mass Spectrometry	Φασματομετρία μαζών
Matrix Effect	Επίδραση υποστρώματος
Matrix Interference	Παρεμπόδιση υποστρώματος
Microchannel Plate	Πλάκα πολλαπλής διέλευσης
Multi Reaction Monitoring	Παρακολούθηση επιλεγμένων ιόντων
Non-steroidal anti-inflammatory drugs	Μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη ναρκωτικά
Photomultiplier Tube	Φωτοπολλαπλασιαστής
Precursor Ion Scan	Σάρωση πρόδρομου ιόντος
Product Ion Scan	Σάρωση θυγατρικού ιόντος
Product-Ion Scan	Σάρωση θυγατρικού ιόντος
Resolving Power	Διακριτική ικανότητα
Screening procedure	Διαδικασία σάρωσης - διαλογής
Selected Ion Recording	Παρακολούθηση επιλεγμένων ιόντων
Septum	Διάφραγμα (σιλικόνης)
Spectral Deconvolution	Φασματική αποσυνέλιξη

Split / Splitless Injection	Έγχυση με / χωρίς διαμερισμό
Time of Flight Analyzer	Αναλυτής χρόνου πτήσης
Total Ion Chromatogram	Χρωματογράφημα ολικών ιόντων
Within a day precision	Επαναληψιμότητα
World Anti-Doping Agency	Παγκόσμιος Οργανισμός Αντι-Ντόπινγκ
Accelerating Voltage	Δυναμικό επιτάχυνσης
Banned Substances	Απαγορευμένες ουσίες
Electrostatic Analyzer	Αναλυτής ηλεκτροστατικού τομέα
Exact Mass	Ακριβής μάζα
In Source Fragmentation	Θραυσματοποίηση εντός της πηγής
Magnetic Analyzer	Αναλυτής μαγνητικού τομέα
Nomimal Mass	Ονομαστική μάζα
Orthogonal Acceleration Analyser	Αναλυτής ορθογώνιας επιτάχυνσης
Threshold Substances	Ουσίες ορίου

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

Πίνακας 2. Ακρωνύμια και ανάπτυξη τους

AC	Alternative Current
AMDIS	Automatic Mass Spectral Deconvolution and Identification System
AORC	Association of Official Racing Chemists
API	Atmospheric Pressure Ionization
ARCI	Association of Racing Commissioners International
DC	Direct Current
DRS	Deconvolution Reporting Software
DTE	Dithioerythritol
EI	Electron Impact
EIC	Extracted Ion Chromatogram
ESA	Electrostatic Analyzer
ESI	Electrospray Ionization
FEI	Federation Equestre Internationale
FWHM	Full Width Half Maximum
GC-HRMS	Gas Chromatography – High Resolution Mass Spectrometry
GC-MS	Gas Chromatography - Mass Spectrometry
IABRW	International Agreement on Breeding, Racing and Wagering
IFHA	International Federation of Horseracing Authorities
ILAC	International Laboratory Accreditation Cooperation
LC-TOF-MS	Liquid Chromatography - Time of Flight - Mass Spectrometry
LOD	Limit of Detection
MA	Magnetic Analyzer
MCP	Microchannel Plate
Me-derivative	Methyl-derivative
MRM	Multi Reaction Monitoring
MSTFA	N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide
NSAID	Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs
oa	orthogonal acceleration
PAPS	3'-Phosphoadenosine-5'-phosphosulfate

PBM	Probability Based Match
PFK	Pentafluorokerosene
PFTBA	Perfluorotributylamine
PMT	Photomultiplier Tube
PrSH	1-Propanethiol
QqQ	Triple stage quadrupole
Q-Trap	Quadrupole - Ion trap
RRT	Relative Retention Time
RSD	Relative Standard Deviation
SIR	Selected Ion Recording
SRM	Selected Reaction Monitoring
SULTs	Sulfotransferases
TIC	Total Ion Chromatogram
TMIS	Trimethyl-iodo-silane
TMS-	(CH ₃) ₃ Si-
TMSImi	N-trimethylsilyl-imidazole
TMS-X	Trimethylsilyl-halosilane
UDPGA	Uridine-5'-diphosphoglucuronic acid
UGT	Uridine diphosphoglucuronosyl transferases
WADA	World Anti-Doping Agency
ΔΟΕ	Διεθνής Ολυμπιακή Επιτροπή
δχμ	Διχλωρομεθάνιο
ΕΚΠΑ	Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
ΗΠΑ	Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής
σα	Οξικός αιθυλεστέρας
ΟΑΚΑ	Ολυμπιακό Αθλητικό Κέντρο Αθηνών

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι – Πρότυπες ουσίες

Οι παρακάτω πρότυπες ουσίες προμηθεύτηκαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany): 1-(3-chlorophenyl)-piperazine hydrochloride, 1-(3-trifluoromethylphenyl) piperazine, 1-benzylpiperazine, 3-methoxytyramine hydrochloride, 4-dimethylaminoantipyrine, acebutolol hydrochloride, acemetacine, acetazolamide, acetohexamide, acetopromazine maleate, alprenolol hydrochloride, althiazide, ambroxol hydrochloride, amiloride hydrochloride, amitriptyline hydrochloride, ampyrone, antipyrine, apomorphine hydrochloride hemihydrate, atenolol, atropine sulfate, bamethan sulfate salt, beclomethasone, bendroflumethiazide, benzbromarone, benzocaine, benzphetamine hydrochloride, betamethasone, bromhexine hydrochloride, budesonide, buflomedil hydrochloride, bumetanide, bupivacaine hydrochloride, buspirone hydrochloride, caffeine, canrenoic potassium, carisoprodol, carprofen, chlordiazepoxide hydrochloride, chlorothiazide, chlorpheniramine maleate, chlorpromazine hydrochloride, chlorpropamide, chlorthalidone, cinchofen, clenbuterol hydrochloride, clobazam, clomipramine hydrochloride, clonidine hydrochloride, clopamide, hydrocortisone, cotinine, cyclobenzaprine hydrochloride, cyclothiazide, desipramine hydrochloride, dexamethasone, dextromethorphan hydrobromide hydrate, dichlorphenamide, diflunisal, digoxigenine, diphenhydramine hydrochloride, dipyrone, doxepin hydrochloride, doxylamine succinate salt, drofenine hydrochloride, ephedrine hydrochloride, epitestosterone, estrone, ethacrynic acid, ethamivan, ethisterone, ethylmorphine, etodolac, famprofazone, fenbufen, fenoprofen calcium salt, fenoterol hydrobromide, fenspiride hydrochloride, flufenamic acid, flumethasone, flunisolide, flunitrazepam, fluocinolone acetonide, fluorometholone, fluoxetine hydrochloride, fluphenazine hydrochloride, furosemide, glafenine, glimepiride, guaifenesin, guanabenz acetate, haloperidol, heptaminol hydrochloride, hydrochlorothiazide, hydrocodone bitartrate salt, hydrocortisone, hydroflumethiazide, hydromorphone hydrochloride, hydroxyzine hydrochloride, hyoscine hydrochloride, imipramine hydrochloride, indomethacin, indoprofen, isoetharine mesylate, isopyrine

hydrochloride, isoxicam, isoxsuprine hydrochloride, ketamine hydrochloride, ketoprofen, labetalol hydrochloride, lobeline hydrochloride, mazindol, mebeverine hydrochloride, meclofenamic acid sodium salt, mefenamic acid, meloxicam, mephentermine hemisulphate, mepivacaine hydrochloride, meprobamate, methapyrilene hydrochloride, methocarbamol, methotrimeprazine maleate salt, methoxamine hydrochloride, methoxyphenamine hydrochloride, methylephedrine, methylphenidate hydrochloride, methylprednisolone, metoprolol tartrate, midodrine hydrochloride, marazone, nabumetone, nafronyl oxalate salt, nandrolone, naphazoline hydrochloride, naproxen, nefopam hydrochloride, nicardipine hydrochloride, nicotine, nifenazone, nimesulide, nor-ephedrine hydrochloride, nor-pseudoephedrine hydrochloride, nor-triptyline hydrochloride, nylidrin hydrochloride, orphenadrine hydrochloride, oxprenolol hydrochloride, oxycodone hydrochloride, oxymetazoline hydrochloride, oxyphenbutazone, pentoxifylline, pentylenetetrazol, phenothiazine, phentermine hydrochloride, phenylbutazone, picrotoxin, pindolol, piroxicam, prednisolone, prednisone, prilocaine hydrochloride, probenecid, procainamide hydrochloride, procaine hydrochloride, promazine hydrochloride, promethazine hydrochloride, propafenone hydrochloride, prorionyl promazine hydrochloride, propranolol hydrochloride, pseudoephedrine hydrochloride, pyrilamine maleate, ractopamine hydrochloride, ranitidine hydrochloride, ritodrine hydrochloride, salbutamol hemisulphate, salicylamide, salicylic acid, sotalol hydrochloride, stanozolol, strychnine hydrochloride, sulindac, sulphamethoxazole, surprofen, suxibuzone, tenoxicam, terbutaline hemisulfate, testosterone, tetracaine hydrochloride, thioridazine hydrochloride, timolol maleate, tolfenamic acid, trenbolone, triamcinolone, triamcinolone acetonide, triamtere, trichlormethiazide, trifluoperazine hydrochloride, trimeprazine hemitartrate, tripelennamine citrate, verapamil hydrochloride, xylazine, yohimbine hydrochloride και zomepirac sodium salt.

Οι ακόλουθες πρότυπες ουσίες αποκτήθηκαν από την εταιρεία Lipomed (Arlesheim, Switzerland): 6-acetylmorphine hydrochloride hydrate, 7-amino-flunitrazepam, alprazolam, amphetamine hydrochloride, benzoylecgonine hydrate, diazepam, ecgoninemethylester hydrochloride hydrate, lidocaine,

methylenedioxyamphetamine hydrochloride,
methylenedioxymethamphetamine hydrochloride, methadone hydrochloride,
methamphetamine hydrochloride, nordiazepam, phenobarbital και
temazepam.

Οι παρακάτω πρότυπες ουσίες προήλθαν από το «National Measurement Institute» (Sydney, Australia): 16β-hydroxystanozolol, 17α-methyl-5α-androstane-3α,17β-diol, 17α-methyl-5β-androstane-3α,17β-diol, 6β-hydroxymethandienone, 7-ketodehydroepiandrosterone, calusterone, fencamine, fenbutrazate hydrochloride, fluoxymesterone metabolite, methyldienolone, ortetamine hydrochloride, oxandrolone, oxilofrine hydrochloride και salmeterol.

Οι ουσίες που ακολουθούν προμηθεύτηκαν από την εταιρεία Steraloids (Newport, RI, USA): 1,4-androstadiene-3,17-dione, 1-testosterone, 4-androstene-3,6,17-trione, 5α-estrane-3β, 17α-diol, 5β-androstane-3β,17β-diol (S), 6α-hydroxyandrostenedione, androst-1,4,6-triene-3,17-dione, androstenedione, bolasterone, desonide, mibolerone, normethandrolone.

Η ουσία levobunolol hydrochloride προμηθεύτηκε από την εταιρεία Allergan SA (Madrid, Spain). Ομοίως, anastrozole και 16α-hydroxyprednisolone από Astra Zeneca UK Limited (Cheshire, UK), piretanide από Aventis Pharma Deutschland GmbH (Frankfurt am Main, Germany), dihydrocodeine tartrate από Bard Pharmaceuticals (Cambridge, UK), metipranolol hydrochloride από Dr. Mann Pharma (Berlin, West Germany), esmolol hydrochloride από Faulding Puerto Rico Inc (Aguadilla, Puerto Rico), etilefrine hydrochloride και prolintane από Boehringer Ingelheim (Italy), ibuprofen από Boots Company PLC (Nottingham, UK), butorphanol tartate από Bristol- Myers Squibb Australia Pty (Victoria, Australia), fenethylline από Cartagon (Madrid, Spain), carvedilol από Boehringer Mannheim (Milan, Italy), nalbuphine hydrochloride από DuPont Pharmaceuticals INC (Wilmington, DE, USA), aminoglutethimide από European Pharmacopeia (Strasbourg, France), norfenfluramine από Eutherapie Benelux S.A. (Brussels, Belgium), diclofenac από Farchemia (Treviglio, Italy), propoxyphene hydrochloride από Galenica (Athens, Greece), ergonovine maleate από GAP-GA Pharmaceuticals S.A. (Athens, Greece), phendimetrazine από S.A. BYK BELGA N.V., Gerot Pharmazeutika Wien

(Bruxells, Belgium), diphenoxylate hydrochloride από Janssen Pharmaceutica (Beerse, Belgium), modafinil από Laboratoires Macors (La Plain, France), fenproporex hydrochloride από Laboratorios LASA, Sant Feliu De Llobregat (Barcelona, Spain), adrafinil από Laboratoire L. Lafon (Maisous-Alfort, France), betaxolol hydrochloride από Synthelabo S.A. (France), celiprolol hydrochloride από Rorer Pharmaceuticals (Eastbourne, UK), dobutamine και raloxifen hydrochloride από Lilly France S.A. (Fegersheim, France), fenfluramine hydrochloride από Les Laboratoires Servier (Orleans Gidy, France), clostebol acetate από Farmitalia Carlo Erba (Milan, Italy), mefenorex hydrochloride από Roche S.A. (Madrid, Spain), bisoprolol fumarate και fludrocortisone από Merck KGaA (Darmstadt, Germany), carteolol hydrochloride από Laboratoires CHAUVIN S.A. (Aubenas, France), torasemide από Malesci Istituto Farmacobiologico S.p.A (Florence, Italy), toremifen από Orion Corporation (Turku, Finland), gestrinone από Patheon (United Kingdom), valdecoxib από Pharmacia Limited (Northumberland, United Kingdom), exemestane από Pfizer Italia S.r.L. (Ascoli Piceno, Italy), flurbiprofen από Pharmathen (Athens, Greece), furfenorex cyclohexylsulfamate από Roussel uclaf (Romainville, France), clanobutin sodium, fluorocortolone και trimethoprim από Schering-Plough Sante Animale (France), dehydroepiandrosterone (DHEA) και theophylline hydrate από Serva Feinbiochemica (NYC, USA), pholcodine από Slovakofarma A.S. (Hlohovec, Slovakia), pentazocine hydrochloride από Sterling Winthrop SA. (Madrid, Spain), cropropamide-crotethamide από Face Laboratori Farmaceutici S.r.l. (Genova Bolzaneto, Italy), niflumic acid από Laboratories UPSA (Paris, France), amineptine από Eutherapie (Neuilly-sur-Seine, France), diprophylline από Minerva Pharmaceutical (Athens, Greece), formoterol fumarate από Novartis Pharma AG (Stein, Switzerland), lornoxicam από Nycomed Danmark (Hvidovre, Denmark), irbesartan από Sanofi Winthrop Industrie (France). Τα υπόλοιπα πρότυπα υλικά προήλθαν από ελληνικά νοσοκομεία και άλλα διεθνή εργαστήρια ελέγχου ντόπινακ διαπιστευμένα από τον WADA.

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. E.G. Clarke, The doping of racehorses. *Medico-Legal Journal*, vol. 30 1962, pp.180-195.
2. A.J. Higgins, From ancient Greece to modern Athens: 3000 years of doping in competition horses, *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, vol. 29, 2006, pp.4-8 (Suppl.1).
3. L. Prokop, The struggle against doping and its history, *J. Sports Med. Phys. Fitness*, vol. 10, 1970, pp.45-48.
4. W. Roeske and A. Bukowski, *Archiwum Historii Medycyny*, vol. 31, 1968, pp.167-191.
5. G.D. Lander, The micro detection of alkaloids, *Analyst*, vol. 55, 1930, pp.474-476.
6. The chemical horse, Drugs in Horse racing, <http://www.horsefund.org/the-chemical-horse-part-3.php> (Τελευταία επίσκεψη Δεκέμβριος 2015).
7. Federation Equestre Internationale (FEI): <http://www.fei.org/fei/cleansport> (Τελευταία επίσκεψη Δεκέμβριος 2015).
8. International Federation of Horseracing Authorities: <http://www.horseracingintfed.com> (Τελευταία επίσκεψη Δεκέμβριος 2015).
9. International Federation of Horseracing Authorities. International Agreement on Breeding, Racing and Wagering, 2015. Available at: <http://www.horseracingintfed.com/resources/2015Agreement.pdf> (Τελευταία επίσκεψη Δεκέμβριος 2015).
10. Φίλιππος Ένωση Ελλάδος: <http://www.fee.gr> (Τελευταία επίσκεψη Δεκέμβριος 2015).
11. International Laboratory Accreditation Cooperation (ILAC), ILAC G7: 06/2009 Accreditation Requirements and Operating Criteria for

- Horseracing Laboratories: <http://ilac.org/publications-and-resources/ilac-documents/guidance-series/> (Τελευταία επίσκεψη Δεκέμβριος 2015).
12. Association of Official Racing Chemists (AORC): <http://www.aorc-online.org/documents/aorc-ms-criteria-jan-2015/> (Τελευταία επίσκεψη Δεκέμβριος 2015).
 13. Association of Official Racing Chemists (AORC): <http://www.aorc-online.org/documents/guidelines-for-referee-analysis/> (Τελευταία επίσκεψη Δεκέμβριος 2015).
 14. Federation Equestre Internationale (FEI) prohibited substances list: <http://www.fei.org/fei/cleansport/ad-h/prohibited-list> (Τελευταία επίσκεψη Δεκέμβριος 2015).
 15. Federation Equestre Internationale (FEI), threshold substances list: http://www.fei.org/system/files//2013_Threshold_Substances_List.pdf (Τελευταία επίσκεψη Δεκέμβριος 2015).
 16. Association of Racing Commissioners International, Inc. (ARCI). Uniform Classification Guidelines for Foreign Substances and Recommended Penalties and Model Rule, Revised December 2015: <http://www.arcicom.businesscatalyst.com/index.html> (Τελευταία επίσκεψη Δεκέμβριος 2015).
 17. L. Avois, N Robinson, C. Soudan, N. Baume, P. Mangin and M. Saugy, Central nervous system stimulants and sport practice, *Br. J. Sports Med.*, vol. 40, 2006, pp. i16-i20.
 18. J.R. Docherty, Pharmacology of stimulants prohibited by the World Anti-Doping Agency (WADA), *Brit. J. Pharmacol.*, vol. 154, 2008, pp.606-622.
 19. P. Van Eenoo and F.T. Delbeke, β -Adrenergic stimulation, *Doping in Sports, Handbook of experimental pharmacology*, D. Thieme, P. Hemmersbach, eds. vol. 195, 2010, pp.227-249.
 20. Stimulants, www.doping-prevention.sp.tum.de/el/substances-and-methods/stimulants/stimulants.html (Τελευταία επίσκεψη Δεκέμβριος 2015).

21. S.G. Kamerling and S.A. Barker, Stimulants: Effects on behaviour and performance, *Proceedings of the 10th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*, P. Kallings, U. Bondesson, E. Houghton eds., R & W Publications, Newmarket, 1994, pp. 45-50.
22. E. Davis, R. Loiacono and R.J. Summers, The rush to adrenaline: drugs in sport acting on the β -adrenergic system, *Brit. J. Pharmacol.*, vol. 154, 2008, pp.584-597.
23. D.J. Morgan, Clinical pharmacokinetics of β -agonists, *Clin. Pharmacokinet.*, vol 18, 1990, pp.270-294.
24. M. Kaur, J.E. Chivers, M.A. Giembycz and R. Newton, Long-acting β 2-adrenoceptor agonists synergistically enhance glucocorticoid-dependent transcription in human airway epithelial and smooth muscle cells. *Mol. Pharmacol.*, vol.73, 2008, pp.203-214.
25. Narcotics, www.doping-prevention.sp.tum.de/el/substances-and-methods/narcotics/narcotics.html (Τελευταία επίσκεψη Δεκέμβριος 2015).
26. S. Kamerling, T. Wood, D. De Quick, T.J. Weckman, C. Tai, J.W. Blake and T. Tobin, Narcotic analgesics, their detection and pain measurement in the horse: A review, *Equine Vet. J.*, vol.21, 1989, pp.4-12.
27. A.T.Kickman, Review, Pharmacology of anabolic steroids, *Br. J. Pharmacol.*, vol. 154, 2008, pp.502-521.
28. E.Nieschlag, H.M.Behre and S.Nieschlag, *Testosterone Action, Deficiency, Substitution*, Cambridge University Press, 3rd Edition, 2006.
29. W.Gao, C.E.Bohl and J.T.Dalton, Chemistry and structural biology of androgen receptor, *Chemical Reviews*, vol. 105, 2005, pp.3352-3370.
30. A.Leinonen, *Novel mass spectrometric analysis methods for anabolic androgenic steroids in sports drug testing*, Helsinki University Printing House, Helsinki, 2006.
31. D.H. Snow, Anabolic steroids, *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.*, vol. 9, 1993, pp.563-576.

32. H. Kuipers, Anabolic steroids and sport performance, *Proceedings of the 10th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*, P. Kallings, U. Bondesson, E. Houghton eds., R & W Publications, Newmarket, 1994, pp.177-179.
33. S. Hyppa, L.A. Rasanen, S.G.B. Persson and A.R. Poso, Anabolic steroids and exercise performance in finnhorse trotters, *Proceedings of the 10th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*, P. Kallings, U. Bondesson, E. Houghton eds., R & W Publications, Newmarket, 1994, pp.180-181.
34. C.W. McIWrath, The use of intra-articular corticosteroids in the horse: What is known on a scientific basis?, *Equine Vet. J.*, vol. 42, 2010, pp.563-571.
35. J.D. Harkins, J.M. Carney and T. Tobin, Clinical use and characteristics of the corticosteroids, *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.*, vol. 9, 1993, pp.543-562.
36. K.A. Hart and M.H. Barton, Adrenocortical insufficiency in horses and foals, *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.*, vol. 27, 2011, pp.19-34.
37. Γλυκοκορτικοστεροειδή, <http://www.doping-prevention.sp.tum.de/substances-and-methods/glucocorticosteroids/glucocorticosteroids.html> (Τελευταία επίσκεψη Δεκέμβριος 2015).
38. Διουρητικά και παράγοντες συγκάλυψης, <http://www.doping-prevention.sp.tum.de/substances-and-methods/diuretics-and-other-masking-agents/diuretics-and-other-masking-agents.html> (Τελευταία επίσκεψη Δεκέμβριος 2015).
39. Διουρητικά φάρμακα, http://www.incardiology/farmaka/ypertasi_diouritika.html (Τελευταία επίσκεψη Δεκέμβριος 2015)
40. R.Ventura and J.Segura, Masking and manipulation, *Doping in Sports, Handbook of experimental pharmacology*, vol. 195, D. Thieme, P. Hemmersbach, eds., 2010, pp.327-354.

41. P. Kallings and B. Ranheim, Non-steroidal anti-inflammatory drugs- A review of recent pharmacology, effects on performance and contamination risks in the horse, *Proceedings of the 17th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*, E. Houghton, F. Ipek Keskin, J. F. Wade, N. Yazicioglu eds., R & W Publications, Newmarket, 2008, pp.326-328.
42. H. Maurer, Systematic toxicological analysis procedures for acidic drugs and/or metabolites relevant to clinical and forensic toxicology and/or doping control, *J. Chromatogr. B*, vol. 733, 1999, pp.3-25.
43. P. Lees and A.J. Higgins, Clinical pharmacology and therapeutic uses of non-steroidal anti-inflammatory drugs in the horse, *Equine vet. J.*, vol. 17, 1985, pp.83-96.
44. J.P. Scarth, P. Teale and T. Kuuranne, Drug metabolism in the horse: a review, *Drug Test. Anal.*, vol. 3, no. 1, 2011, pp.19-53.
45. E. Houghton and S. Maynard, Some aspects of doping and medication control in equine Sports. *Doping in Sports: Biochemical principles, affects and analysis, Handbook of experimental Pharmacology*, D. Thieme, P. Hemmersbach eds., Springer, vol. 195, 2010, pp.369-409.
46. T. Kuuranne, Phase-II metabolism of androgens and its relevance for doping control analysis. *Doping in Sports: Biochemical principles, affects and analysis, Handbook of experimental Pharmacology*, D. Thieme, P. Hemmersbach eds., Springer, vol. 195, 2010, pp.65-75.
47. M.C. Dumasia, Drug metabolism in the horse: some interesting pathways, *Proceedings of the 13th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*, R.B. Williams, E. Houghton, J.F. Wade eds., R & W Publications, Newmarket, 2000, pp.155-161.
48. M.C. Dumasia, The biotransformation and detection of some β -adrenergicmimetic drugs in the horse, *Proceedings of the 9th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*, C.R. Short eds., New Orleans, Louisiana, vol. 2, 1992, pp.75-90.

49. P. van Eenoo, K. Deventer and F.T. Delbeke, Excretion studies with salbutamol and salmeterol after inhalation, *Proceedings of the 14th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*, D.W. Hill, W.T. Hill eds., R & W Publications, Newmarket, 2002, pp.364-367.
50. E. Benoit, P. Jaussaud, S. Besse, B. Videmann, D. Courtot, P. Delatour and Y. Bonnaire, Identification of a benzhydrolic metabolite of ketoprofen in horses by gas chromatography-mass spectrometry and high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, vol. 583, 1992, pp.167-173.
51. M. Kurosawa, S. Yamashita, T. Tsuji and I. Ohtake, The metabolic fate of ketoprofen in the horse after oral and intramuscular administration, *Proceedings of the 10th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*, P. Kallings, U. Bondesson, E. Houghton eds., R & W Publications, Newmarket, 1994, pp.17-22.
52. C. Hannan, M. O'Connor and T. Barragry, Controlling therapeutic substances – a European harmonized approach: determination of the detection time for ketoprofen following iv administration to horses, *Proceedings of the 16th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*, E. Houghton, I. Kijima-Suda, R. Wada and J.F. Wade eds., R & W Publications, Newmarket, 2006, pp.447-450.
53. P. Jaussaud, D. Courtot, J.L. Guyot and J. Paris, Identification of a flunixin metabolite in the horse by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, vol. 423, 1987, pp.123-130.
54. S.M.R. Stanley, N.A. Owens and J.P. Rodgers, Detection of flunixin in equine urine using high-performance liquid chromatography with particle beam and atmospheric pressure ionization mass spectrometry after solid-phase extraction, *J. Chromatogr. B*, vol. 667, 1995, pp.95-103.
55. A. Norgren, C. Ingvast-Larsson, P. Kallings, E. Fredriksson and U. Bondesson, Contamination and urinary excretion of flunixin after repeated administration in the horse, *Proceedings of the 13th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*, R.B.

- Williams, E. Houghton, J.F. Wade eds., R & W Publications, Newmarket, 2000, pp.377-380.
56. P. Teale and E Houghton, Metabolism of anabolic steroids and their relevance to drug detection in horseracing, *Bioanalysis*, Vol. 2, No. 6, 2010, pp.1085-1107.
 57. A.T. Kicman, E. Houghton and D.B. Gower, Anabolic steroids: Metabolism, doping and detection in human and equestrian sports, *Steroid Analysis*, H.L.J. Makin, D.B. Gower eds., Springer Science and Business Media B.V., 2010, pp.743-836.
 58. E.Houghton, Anabolic steroids in the horse – A review of current knowledge, *Proceedings of the 9th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*, C.R. Short eds, New Orleans, Louisiana, 1992, pp.3-15.
 59. A. Skoog, F. Holler and T.A. Nieman, Απόδοση στα ελληνικά Μ.Ι. Καραγιάννης, Κ.Η. Ευσταθίου, Ν. Χανιωτάκης, *Αρχές ενόργανης ανάλυσης*, Εκδόσεις Κωσταράκη, Αθήνα, 5^η έκδοση, 2002.
 60. L.R. Snyder, J.J. Kirkland and J.W. Dolan, *Introduction to modern liquid chromatography*, John Wiley & Sons Inc. Publication, New Jersey, 3rd Edition, 2010.
 61. R.E. Ardrey, *Liquid chromatography-mass spectrometry: An introduction*, John Wiley & Sons Inc. Publication, UK, 2003.
 62. M. Thevis, *Mass Spectrometry in sports drug testing, Characterization of prohibited substances and doping control analytical assays*, John Wiley & Sons Inc. Publication, New Jersey, 2010.
 63. M. Guilhaus, Principles and instrumentation in time-of-flight mass spectrometry, Physical and instrumental concepts, *J. Mass Spectrom.*, vol. 30, 1995, pp.1519-1532.
 64. E. de Hoffmann and V. Stroobant, *Mass Spectrometry, Principles and Applications*, John Wiley & Sons Inc. Publication, England, 3rd Edition, 2007.

65. I.V. Chernushevich, A.V. Loboda and B.A. Thomson, An introduction to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.*, vol. 36, 2001, pp.849-865.
66. R.J.Cotter, *Time of flight mass spectrometry, Instrumentation and applications in biological research*, ACS Professional Reference Books, American Chemical Society, Washington DC, 1997.
67. M. Guilhaus, *Time-of-flight, Encyclopedia of Analytical Science*, Elsevier, 2005, pp.412-423.
68. M.S Wilm and M. Mann, Electrospray and Taylor-Cone theory, Dole's beam of macromolecules at last?, *Int. J. Mass Spectrom.*, vol. 136, 1994, pp.167-180.
69. Σχήμα ESI: <http://www.chem.pitt.edu/facilities/mass-spectrometry/introduction>. (Τελευταία επίσκεψη Δεκέμβριος 2015).
70. A. El-Aneed, A. Cohen and J. Banoub, Mass Spectrometry, Review of basics: Electrospray, MALDI and commonly used mass analyzers, *Appl. Spectrosc. Rev.*, vol. 44, 2009, pp.210-230.
71. P. Kebarle, A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.*, vol. 35, 2000, pp.804-817.
72. J.V. Iribarne and B.A. Thomson, Evaporation of small ions from charged droplets, *J. Chem. Phys.*, vol. 64, 1976, pp.2287-2294.
73. G. Schmelzeisen-Redeker, L. Büttfering and F.W. Röllgen, Desolvation of ions and molecules in thermospray mass spectrometry, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, vol. 90, 1989, pp.139-150.
74. Agilent 6200 series TOF and 6500 series Q-TOF LC/MS System, Concept Guide, The big picture, Agilent Technologies, 2007.
75. Σχήμα οα-TOFMS: <http://www.epa.gov/esd/chemistry/ice/asms05mz/asms05mz.htm> (Τελευταία επίσκεψη Δεκέμβριος 2015).

76. J.H.J. Dawson and M. Guilhaus, Orthogonal-acceleration time-of-flight mass spectrometer, *Rapid Commun. Mass Sp.*, vol. 3, 1989, pp.155-159.
77. M. Guilhaus, V.Mlynski and D. Selby, Perfect timing: Time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Sp.*, vol. 11, 1997, pp.951-962.
78. Σχήμα ανακλαστικού κατόπτρου: <http://msr.dom.wustl.edu/reflectrons-ion-mirrors/> (Τελευταία επίσκεψη Δεκέμβριος 2015).
79. C. Weickhardt, F. Moritz and J. Grotemeyer, Time-of-flight mass spectrometry: State-of-the-art in chemical analysis and molecular science, *Mass Spectrom Rev.*, vol. 15, 1996, pp.139-162.
80. R.J. Cotter, Time-of-flight mass spectrometry for the structural analysis of biological molecules, *Anal. Chem.*, vol. 64, 1992, pp.1027A-1039A.
81. M. Guilhaus, D. Selby and V Mlynski, Orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometry, *Mass Spectrom Rev.*, vol. 19, 2000, pp.65-107.
82. Agilent 6200 Series TOF and 6500 Series QTOF LC/MS System.
83. A.W.T. Bristow, Accurate mass measurement for the determination of elemental formula – A tutorial, *Mass Spectrom Rev.*, vol. 25, 2006, pp.99-111.
84. Αεριοχρωματογραφία:
www.chemguide.co.uk/analysis/chromatography/gas.html (Τελευταία επίσκεψη Δεκέμβριος 2015).
85. F.G. Kitson, B.S. Larsen and C.N. Mc Ewen, *Gas chromatography and mass spectrometry, A practical guide*, Academic Press, California USA, 1996.
86. Σχήμα GC-MS: <http://www.fao.org/docrep/009/a0691e/a0691e05.htm> (Τελευταία επίσκεψη Δεκέμβριος 2015).
87. Gary D. Christian, *Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons Inc. Publication, United States of America, 6th Edition, 2004.

88. Π.Α.Σίσκος και Δ.Π.Νικολέλης, *Αναλυτικές μέθοδοι διαχωρισμού*, ΕΚΠΑ, Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Χημείας, Αθήνα, 1991.
89. I. Lavagnini, F. Magno, R. Seraglia and P. Traldi, *Qualitative applications of mass spectrometry*, John Wiley & Sons Inc. Publication, England, 2006.
90. Σχήμα τετραπλόου:
http://tccc.iesl.forth.gr/AMS_EPEAEK/courses/LazPap/MSLab_AMS.htm
 (Τελευταία επίσκεψη Δεκέμβριος 2015).
91. S.E.Van Bramer, *An introduction to mass spectrometry*, Widener University Department of Chemistry, Chester, 1997.
92. Autospec Operator Manual, Micromass, Code Number 6666395, p. 4-6.
93. Deconvolution Reporting Software, DRS :
[http://www.chem.agilent.com/en-US/products-services/Software-Informatics/Deconvolution-Reporting-Software-\(DRS\)/Pages/default.aspx](http://www.chem.agilent.com/en-US/products-services/Software-Informatics/Deconvolution-Reporting-Software-(DRS)/Pages/default.aspx) (Τελευταία επίσκεψη Δεκέμβριος 2015).
94. Automatic Mass Spectral Deconvolution and Identification System, AMDIS: <http://chemdata.nist.gov/mass-spc/amdis/> (Τελευταία επίσκεψη Δεκέμβριος 2015).
95. NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, NIST05:
<http://www.sisweb.com/software/ms/nist.htm> (Τελευταία επίσκεψη Δεκέμβριος 2015).
96. M.C. Dumacia and E.Houghton, Screening and confirmatory analysis of β -agonists and β -antagonists and their metabolites in horse urine by capillary gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. Biomed. Applic.*, vol. 564, 1991, pp.503-513.
97. H.-W. Hagedorn and R. Schulz, Detection of diuretics in horse urine by GC/MS, *J. Anal. Toxicol.*, vol. 16, no. 3, 1992, pp.194-198.
98. G. Gonzalez, R. Ventura, A.K. Smith, R. de la Torre and J. Segura, Detection of non-steroidal anti-inflammatory drugs in equine plasma and urine by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, vol. 719, 1996, pp.251-264.

99. A.K. Singh, B. Gordon, D. Hewetson, K. Granley, M. Ashraf, U. Mishra and D. Dombrovskis, Screening of steroids in horse urine and plasma by using electron impact and chemical ionization gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr.*, vol. 479, no. 2, 1989, pp.233-242.
100. P. Teale and E. Houghton, The development of a gas chromatographic/mass spectrometric screening procedure to detect the administration of anabolic steroids to the horse, *Biol. Mass Spectrom.*, vol. 20, no. 3, 1991, pp.109-114.
101. M.H. Choi, J.Y. Kim and B.C. Chung, Detection of anabolic steroids by GC/SIM/MS with trifluoroacetylation in equine plasma and urine, *Anal. Lett.*, vol. 32, no. 7, 1999, pp.1313-1322.
102. S.M.R. Stanley, R.L. Brooksbank and J.P. Rodgers, A mixed mode solid phase extraction of conjugated anabolic steroids from equine urine *Proceedings of the 10th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*, P. Kallings, U. Bondesson, E. Houghton eds., R & W Publications, Newmarket, 1994, pp.350-353.
103. P.W. Tang, W.C. Law and T.S.M. Wan, Analysis of corticosteroids in equine urine by liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. B*, vol. 754, 2001, pp.229-244.
104. M. Thevis, G. Opfermann and W. Schanzer, Liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometric screening and confirmation methods for β 2-agonists in human or equine urine, *J. Mass Spectrom.*, vol. 38, 2003, pp.1197-1206.
105. P. Van Eenoo, F.T. Delbeke, K.Roels, K.De Cock and P. De Backer, Screening for diuretics in urine by LC-MS, *Proceedings of the 13th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*, R.B. Williams, E. Houghton, J.F. Wade eds., R & W Publications, Newmarket, 2000, pp.214-221.
106. M. Holcapek, R. Jirasko and M. Lisa, Recent developments in liquid chromatography - mass spectrometry and related techniques, *J. Chromatogr. A*, vol. 1259, 2012, pp.3-15.

107. Y. Liu, C.E. Uboh, L.R. Soma, X. Li, F. Guan, Y. You and J.-W. Chen, Efficient use of retention time for the analysis of 302 drugs in equine plasma by liquid chromatography-MS/MS with scheduled multiple reaction monitoring and instant library searching for doping control, *Anal. Chem.*, vol. 83, 2011, pp.6834-6841.
108. E.N.M. Ho, W.H. Kwok, A.S.Y. Wong and T.S.M. Wan, High resolution accurate mass screening of prohibited substances in equine plasma using liquid chromatography-orbitrap mass spectrometry, *Drug Test. Analysis*, vol. 2012, no.5, 2013, pp.509-528.
109. A.G. Fragkaki, N. Kioukia-Fougia, P. Kioussi, M. Kioussi and M. Tsivou, Challenges in detecting substances for equine anti-doping, *Drug Test. Analysis*, 2017, DOI 10.1002/dta.2162.
110. M.C. Dumasia, P. Teale, R. Armstrong and E. Houghton, LC/MS analysis of intact steroid conjugates: a preliminary study on the quantification of testosterone sulphate in equine urine, *Proceedings of the 11th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*, Queensland, Australia, D.E. Auer, E. Houghton eds., R & W Publications, Newmarket, 1996, pp.188-195.
111. E.N.M. Ho, K.C.H. Yiu, F.P.W. Tang, L. Dehennin, P. Plou, Y. Bonnaire and T.S.M. Wan, Detection of endogenous boldenone in the entire male horses, *J. Chrom. B Analyt. Technol. Biomed Life Sci.*, vol. 808, 2004, pp.287-294.
112. G.N.W. Leung, E.W. Chung, E.N.M. Ho, W.H. Kwok, D.K.K. Leung, F.P.W. Tang, T.S.M. Wan and N.H. Yu, High-throughput screening of corticosteroids and basic drugs in horse urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B*, vol. 825, 2005, pp.47-56.
113. E.N.M. Ho, D.K.K. Leung, T.S.M. Wan and N.H. Yu, Comprehensive screening of anabolic steroids, corticosteroids and acidic drugs in horse urine by solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, vol. 1120, 2006, pp.38-53.
114. C.H.F. Wong, F.P.W. Tang and T.S.M. Wan, A broad-spectrum equine urine screening method for free and enzyme-hydrolyzed conjugated

- drugs with ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta*, vol. 697, 2011, pp.48-60.
115. Y. Moulard, L. Bailly-Chouriberry, S. Boyer, P. Garcia, M.-A. Popot and Y. Bonnaire, Use of benchtop exactive high resolution and high mass accuracy orbitrap mass spectrometer for screening in horse doping control, *Anal. Chim. Acta*, vol. 700, 2011, pp.126-136.
116. R.G. Howitt, M. Pelzing and G.D. Beresford, Routine drug screening by accurate mass using Liquid Chromatography/Time of Flight Mass Spectrometry, *Proceedings of the 16th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*, E. Houghton, I. Kijima-Suda, R. Wada and J.F. Wade eds., R & W Publications, Newmarket, 2006, pp.222-230.
117. R.G. Howitt, G.D. Beresford, M. Pelzing and I. Krebs, Routine drug screening by accurate mass using Liquid Chromatography/Time of Flight Mass Spectrometry-Part 2, *Proceedings of the 17th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*, E. Houghton, F. Ipek Keskin, J.F.Wade and N. Yazicioglu eds., R & W Communications, Newmarket, 2008, pp.191-198.
118. S.R.M. Stanley and H.C. Foo, Screening for basic drugs in equine urine using direct injection differential-gradient LC-LC coupled to hybrid MS/MS, *J. Chromatogr. B*, vol. 836, 2006, pp.1-14.
119. P.W. Tang and D.L. Crone, A new method for hydrolyzing sulphate and glucuronyl conjugates of steroids, *Anal. Biochem.*, vol. 182, 1989, pp.289-294.
120. E. Houghton, L. Grainger, M.C. Dumasia, P. Teale, L.S. Jackson and M. Close, Some recent developments in steroid analysis: a comparison of enzyme hydrolysis/solvolyis vs methanolysis for the hydrolysis of conjugates, *Proceedings of the 8th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*, J.P. Rodgers, T. Toms eds., R & W Communications, Newmarket, 1990, pp.137-140.
121. M. Yamada, S. Aramaki, M. Kurosawa, I. Kijima-Suda, K. Saito and H. Nakazawa, Simultaneous doping analysis of main urinary metabolites of

- anabolic steroids in horse by ion-trap gas chromatography – tandem mass spectrometry, *Anal. Sci.*, vol. 24, 2008, pp.1199-1204.
122. C.H.F. Wong, D.K.K. Leung, F.P.W. Tang, J.K.Y. Wong, N.H. Yu and T.S.M. Wan, Rapid screening of anabolic steroids in horse urine with ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry after chemical derivatisation, *J. Chromatogr. A*, vol. 1232, 2012, pp.257-265.
123. M.H. Choi, J.Y. Kim and B.C. Chung, Detection of anabolic steroids by GC/SIM/MS with trifluoroacetylation in equine plasma and urine, *Anal. Lett.*, vol. 32, no. 7, 1999, pp.1313-1322.
124. M. Thevis, G. Opfermann and W. Schanzer, Liquid chromatography / electrospray ionization tandem mass spectrometric screening and confirmation methods for β 2-agonists in human or equine urine, *J. Mass Spectrom.*, vol. 38, 2003, pp.1197-1206.
125. P.M. Wynne, D.C. Batty, J.H. Vine and NJK Simpson, Approaches to the solid phase extraction of equine urine, *Chromatographia*, vol. 59, 2004, pp.S51-S60.
126. R.D. McDowall, Sample preparation for biomedical analysis, Review, *J. Chrom. Biomed. Applic.*, vol. 492, 1989, pp.3-58.
127. Θ.Π.Χατζηγιάννου και Μ.Α. Κουππάρης, *Ενόργανη Ανάλυση*, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2000.
128. N.H. Yu, E.N.M. Ho, D.K.K. Leung and T.S.M. Wan, Screening anabolic steroids in horse urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Applic.*, vol. 37, 2005, pp.1031-1038.
129. D.C Batty, P.M Wynne and J.H. Vine, Comprehensive drug screening using a single solid-phase extraction cartridge. *Proceedings of the 11th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*, D.E. Auer, E. Houghton eds., R & W Publications, Newmarket, 1996, pp.197-202.
130. M.E.Rose and R.A.W. Johnstone, *Mass spectrometry for chemists and biochemists*, Cambridge University Press, Cambridge, 1982, pp.84-95.

131. J.Drozd, Chemical derivatization in gas chromatography, *J. Chrom. Library*, Elsevier scientific publishing company, Amsterdam, vol.19, 1981, pp.1-6.
132. C-F.Poole and S.K.Poole, *Chromatography today*, Elsevier, Amsterdam 1991, pp.848-849.
133. Hans H. Maurer, Systematic toxicological analysis procedures for acidic drugs and/or metabolites relevant to clinical and forensic toxicology and/or doping control, *J. Chrom. B*, vol. 733, 1999, pp.3-25.
134. J. Drozd, Chemical derivatization in gas chromatography, *J. Chrom. Library*, vol. 19, 1981, pp.53-78.
135. R. Ventura and J. Segura, Detection of diuretic agents in doping control, *J. Chromatogr. B*, vol. 687, 1996, pp.127-144.
136. D.Carreras, C. Imaz, R. Navajas, M.A. Garcia, C. Rodriguez, A.F. Rodriguez and R. Cortes, Comparison of derivatization procedures for the determination of diuretics in urine by GC-MS, *J. Chromatogr. A*, vol. 683, 1994, pp.195-202.
137. SMR Stanley, RL Brooksbank and JP Rogers, A mixed mode SPE of conjugated anabolic steroids from equine urine, *Proceedings of the 10th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*, Stockholm, Sweden, Eds: P. Kallings, U. Bondesson, E. Houghton, R & W Publications, Newmarket, 1994, pp.350-353.
138. G.Opfermann and W.Shanzer, Trimethylsilylation- Aspects of derivatization, *Recent advances in doping analysis (4)*, 1997.
139. A.R. McKinney, S.D. Wise and A.M. Duffield, Update on steroid detection, *Proceedings of the 11th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*, Queensland, Australia, D.E. Auer, E. Houghton eds., R & W Publications, Newmarket, 1996, pp.97-101.
140. M. Thevis and W. Schänzer, Mass Spectrometry in sports drug testing: structure characterization and analytical assays, *Mass Spectrom. Reviews*, vol. 26, 2007, pp.79-107.

141. O.J. Pozo, J. Marcos, J. Segura and R. Ventura, Recent developments in MS for small molecules: application to human doping control analysis, *Bioanalysis*, vol. 4, no.2, 2012, pp.197-212.
142. M. Thevis and W. Schänzer, Current role of LC-MS(/MS) in doping control, *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 388, 2007, pp.1351-1358.
143. I. Ojanperä, M. Kolmonen and A. Pelander, Current use of high-resolution mass spectrometry in drug screening relevant to clinical and forensic toxicology and doping control, *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 403, 2012, pp.1203-1220.
144. D.S. Skrabalak and J.D. Henion, Identification of betamethasone and a major metabolite in equine urine, *J. Pharmaceut. & Biomed. Anal.*, vol. 4, no. 3, 1986, pp.327-331.
145. J.H. Vine, N.S. Selvadurai, L.L. Glowacki, D. Krstevska, P.W. Zahra and P.O'Callaghan, The metabolism and excretion of betamethasone sodium phosphate and betamethasone acetate in the horse after intra-articular injection, *Proceedings of the 16th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*, E. Houghton, I. Kijima-Suda, R. Wada and J.F. Wade eds, R & W Publications, Newmarket, 2006, pp.167-171.
146. C.M. Pearce, G. Beamon, L.Grainger, K. Woodward, L Hillyer and E. Houghton, Controlling therapeutic substances - a European harmonised approach: determination of a detection time for furosemide following iv administration to horses, *Proceedings of the 16th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*, E. Houghton, I. Kijima-Suda, R. Wada and J.F. Wade eds., R & W Publications, Newmarket, 2006, pp.442-446.
147. A.M. Duffield, P.J. Reilly, S. Martyr, S. Wise and C.J. Suann, An equine urinary metabolite of oral timolol and detection of etorphine in urine by NICI GC/MS, *Proceedings of the 9th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*, C.R. Short eds., New Orleans, Louisiana, vol. 1, 1992, pp.159-163.

148. W.C. Law, K.K. Leung and D.L. Crone, Timolol metabolites, *Proceedings of the 9th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*, C.R. Short eds., New Orleans, Louisiana, vol. 1, 1992, pp.159-163.
149. M.C. Dumasia, The biotransformation and detection of some β -adrenergicmimetic drugs in the horse, *Proceedings of the 9th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*, C.R. Short eds., New Orleans, Louisiana, vol. 2, 1992, pp.159-163.
150. M.R. Koupai-Abyazani, B. Esaw and B. Laviolette, Concentrations of methocarbamol in equine serum and urine following a five day regimen treatment with robaxin, *Proceedings of the 11th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*, D.E. Auer, E. Houghton eds., R & W Publications, Newmarket, 1996, pp.427-432.
151. P.W. Tang, K.L. Watkins and T.S.M. Wan, Metabolic studies of oral anabolic steroids in horses. Part 2: Danazol. *Proceedings of the 13th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*, R.B. Williams, E. Houghton, J.F. Wade eds., R & W Publications, Newmarket, 2000, pp 171-178.
152. J.Y. Kim, M.H. Choi, S.J. Kim, J.B. Kyong and B.C. Chung, GC-MS characterization of urinary metabolites and changes of ethisterone and testosterone profile after oral administration of danazol in equine, *J. vet. Pharmacol. Therap.*, vol. 24, 2001, pp.147-153.
153. S.M.R. Stanley, S. Kent and J.P. Rodgers, Biotranformation of 17-alkyl steroids in the equine: high-performance liquid chromatography - mass spectrometric and gas chromatography - mass spectrometric analysis of fluoxymesterone metabolites in urine samples, *J Chromatogr. B*, vol. 704, 1997, pp.119-128.
154. M. Yamada, S. Aramaki, T. Hosoe, M. Kurosawa, I. Kijima-Suda, K. Saito and H. Nakazawa, Characterization and quantification of fluoxymesterone metabolite in horse urine by Gas Chromatography / Mass Spectrometry, *Anal. Sci.*, vol. 24, 2008, pp.911-914.

155. A.R. McKinney, C.J. Suann and A.M. Stenhouse, A stereochemical examination of the equine metabolism of 17 α -methyltestosterone, *Anal. Chim. Acta*, vol. 581, 2007, pp.377-387.
156. P.W. Tang, W.C Law, T.S.M. Wan and D.L. Crone, Metabolic studies of some oral anabolic steroids in horses: Part 1. Oxymetholone and Mestanolone, *Proceedings of the 12th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*, B. Laviolette, M.R Koupai-Abyazani eds., R & W Publications, Newmarket, 1998, pp.118-124.
157. M. Yamada, S. Aramaki, M. Kurosawa, K. Saito and H. Nakazawa, Detection of urinary metabolites common to structurally related 17 α -alkyl anabolic steroids in horses and application to doping tests in racehorses: methandienone, methandriol and oxymetholone, *J. Anal. Toxicol.*, vol. 32, **2008**, pp.387-391.
158. M. Machnik, M. Thevis, C. Von Kuk, S. Guddat and W. Schänzer, Gestrinone analysis in equine urine by LC-MS/MS. *Recent Advances in Doping Analysis (12)*, W. Schänzer, H. Geyer, A. Gotzmann, U. Mareck eds., Sport and Buch Strauß, Cologne, 2004b, pp.149-157.
159. N.H. Yu, E.W. Chung, E.N.M. Ho, W.H. Kwok, D.K.K. Leung, G.N.W. Leung, F.P.W. Tang, C.H.F. Wong and T.S.M. Wan, Metabolic studies of 7-keto-dehydroepiandrosterone acetate in horses, Poster Presentation at the 53rd ASMS Conference on Mass Spectrometry, 5-9 June, WP03-051, San Antonio, Texas, 2005, p.2.
160. P. Sarkar, M. Shelley, A Marland and R. Leavitt, Equine metabolism of tricyclic anti-depressants, *Proceedings of the 11th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*, D.E. Auer, E. Houghton eds., R & W Publications, Newmarket, 1996, pp.420-423.
161. T.M. Dyke and R.A. Sams, Urinary excretion of cocaine and metabolites in horses, *Proceedings of the 10th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*, P. Kallings, U. Bondesson, E. Houghton eds., R & W Publications, Newmarket, 1994, pp.55-57.
162. A.F. Lehner, C.G. Hughes, W.E. Woods, W. Karpiesiuk, J.D. Harkins, L. Dirikolu, C. Holtz, J. Bosken, W.G. Carter, J. Boyles, R.Booze, C.

- Mactutus, M. Fisher and T. Tobin, A liquid chromatographic-electrospray tandem MS/MS method for quantitation of equine cocaine metabolites, *Proceedings of the 13th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*, Eds: R.B. Williams, E. Houghton, J.F. Wade, R & W Publications, Newmarket, 2000, pp.413-419.
163. T.A. Gourdie and G.D. Beresford, The detection of ethylestrenol and its metabolites in the horse, *Proceedings of the 10th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*, P. Kallings, U. Bondesson, E. Houghton eds., R & W Publications, Newmarket, 1994, pp.214-217.
164. C.S. Kim, T. Whittema and G.D. Beresford, Detection of ethylestrenol in equine urine and plasma. *Proceedings of the 11th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*, D.E. Auer, E. Houghton, R & W Publications, Newmarket, 1996, pp.172-178.
165. M. Yamada, S. Aramaki, T. Okayasu, T. Hosoe, M. Kurosawa, I. Kijima-Suda, K. Saito and H. Nakazawa, Identification and quantification of metabolites common to 17 α -methyltestosterone and mestanolone in horse urine, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, vol. 45, 2007, pp.125-133.
166. H.-W. Hagedorn, R. Schulz and A. Friedrich, Detection of methandienone (methandrostenolone) and metabolites in horse urine by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, vol. 577, 1992, pp.195-203.
167. A.R. McKinney, D.D. Ridley and C.J. Suann, Metabolism of methandrostenolone in the horse: a gas chromatographic-mass spectrometric investigation of phase I and phase II metabolism, *J. Chromatogr. B*, vol. 765, 2001, pp.71-79.
168. A.R. McKinney, C.J. Suann, A.J. Dunstan, S.L. Mulley, D.D. Ridley and A.M Stenhouse, Detection of stanozolol and its metabolites in equine urine by liquid chromatography-electrospray ionization ion trap mass spectrometry, *J. Chromatogr. B*, vol. 811, 2004, pp.75-83.
169. J.P. Scarth, H.A. Spencer, S.C. Hudson, P. Teale, B.P. Gray and L.L. Hillyer, The application of in vitro technologies to study the metabolism

- of the androgenic/anabolic steroid stanozolol in the equine, *Steroids*, vol. 75, 2010, pp.57-69.
170. M. Thevis, G. Opfermann and W. Schanzer, Liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometric screening and confirmation methods for β 2-agonists in human or equine urine, *J. Mass Spectrom.*, vol. 38, 2003, pp.1197-1206.
171. C. Goebel, G.J. Trout and R. Kazlauskas, Rapid screening method for diuretics in doping control using automated solid phase extraction and liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta*, vol. 502, 2004, pp.65-74.
172. AORC Proficiency Testing Drug List 2011. Διαθέσιμη στην ιστοσελίδα: <http://www.aorc-online.org/documents/aorc-proficiency-testing-drug-list-2011>. (Τελευταία επίσκεψη Δεκέμβριος 2015)
173. R. Ventura, T. Nadal, P. Alcalde, J.A. Pascual and J. Segura, Fast screening method for diuretics, probenecin and other compounds of doping interest, *J. Chromatogr. A*, vol. 655, 1993, pp.233.
174. Eurachem Guide, The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, Eurachem Teddington, 1998. Available at: <http://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/valid.pdf> (Τελευταία επίσκεψη Δεκέμβριος 2015)
175. M. Kolmonen, A. Leinonen, T. Kuuranne, A. Pelander and I. Ojanperä, Generic sample preparation and dual polarity liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry for high-throughput screening in doping analysis, *Drug Test. Anal.*, vol. 1, 2009, pp.250-266.
176. T. Bristow, J. Constantine, M. Harrison and F. Cavoit, Performance optimisation of a new-generation orthogonal-acceleration quadrupole-time-of-flight mass spectrometer, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 22, 2008, pp.1213-1222.
177. R. Bonfiglio, R.C. King, T.V. Olah and K. Merkle. The effect sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization

response for model drug compounds. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 13, 1999, pp.1175-1185.

178. A. Kloefer, J. Quintana and T. Reemtsma, Operational options to reduce matrix effects in liquid chromatography - electrospray ionization - mass spectrometry analysis of aqueous environmental samples, *J. Chromatogr. A*, vol. 1067, 2005, pp.153-160.
179. M.K. Kioussi, E.M. Lyris, Y.S. Angelis, M. Tsivou, M.A. Koupparis and C.G. Georgakopoulos, A generic screening methodology for horse doping control by LC-TOF-MS, GC-HRMS and GC-MS, *J. Chromatogr. B*, vol. 941, 2013, pp.69-80.