

**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**



**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ**

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ, ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΓΙΑ ΤΟΝ  
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΦΑΙΝΤΑΝΥΛΗΣ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΗΣ ΣΤΟ ΟΛΙΚΟ ΑΙΜΑ ΜΕ  
ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΑΕΡΙΑΣ  
ΦΑΣΕΩΣ ΣΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ  
ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ-ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ**

**Νεκταρία Γ. Μισαηλίδη**  
Χημικός

Αθήνα 2018



## **ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ, ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ  
ΦΑΙΝΤΑΝΥΛΗΣ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΗΣ ΣΤΟ ΟΛΙΚΟ ΑΙΜΑ ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ  
ΑΕΡΙΑΣ ΦΑΣΕΩΣ ΣΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ**

**ΜΙΣΑΗΛΙΔΗ ΝΕΚΤΑΡΙΑ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:**

Ι. Παπουτσή, Επίκουρος Καθηγητής, ΕΚΠΑ

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:**

Ι. Παπουτσή, Επίκουρος Καθηγητής, ΕΚΠΑ

Ε. Γκίκας, Επίκουρος Καθηγητής, ΕΚΠΑ

Ι. Ντότσικας, Επίκουρος Καθηγητής, ΕΚΠΑ



*Στη γιαγιά μου*



*Ένα πράγμα πρέπει να έχει κανείς: Είτε μια ψυχή που είναι εκ φύσεως χαρούμενη, είτε μια ψυχή που την κάνει χαρούμενη η δουλειά, η αγάπη, η τέχνη και η γνώση.*

***Νίτσε Φρήντριχ***





# Περιεχόμενα

<b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ</b> .....	xii
<b>ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Εισαγωγή</b>	
Ιστορική αναδρομή .....	2
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Φαιντανύλη</b>	
2.1 Χημικές ιδιότητες.....	6
2.2 Σύνθεση.....	6
2.3 Τρόποι χορήγησης.....	8
2.4 Φαρμακοκινητική.....	9
2.5 Φαρμακοδυναμική – Μηχανισμός δράσης .....	13
2.6 Θεραπευτικές ενδείξεις .....	13
2.7 Ανεπιθύμητες ενέργειες .....	14
2.8 Αλληλεπιδράσεις με άλλα φάρμακα .....	16
2.9 Κατάχρηση-Εξαρτησιογόνος δράση .....	16
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Παράγωγα φαιντανύλης</b>	
<b>ΥΠΟΚΕΦΑΛΑΙΟ 3Α: Ρεμφαιντανύλη</b> .....	20
<b>ΥΠΟΚΕΦΑΛΑΙΟ 3Β: Παράγωγα φαιντανύλης χωρίς θεραπευτική χρήση</b>	
3Β.1 Χημικές ιδιότητες.....	25
3Β.2 Σύνθεση .....	26
3Β.3 Τρόποι λήψης .....	29
3Β.4 Τοξικοκινητική .....	30
3Β.5 Μηχανισμός δράσης.....	34

3B.6 Ανεπιθύμητες ενέργειες.....	36
3B.7 Κατάχρηση-Εξαρτησιογόνος δράση .....	2937

<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Μέθοδοι ανάλυσης της φαιτανύλης και των παραγώγων της σε βιολογικά δείγματα και κατασχεθέντα υλικά.....</b>	<b>42</b>
--	-----------

## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

Σκοπός.....	599
-------------	-----

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Εργαστηριακός εξοπλισμός**

5.1 Χρωματογράφος αέριας φάσεως συνδεδεμένος με φασματόμετρο μαζών (GC/MS).....	61
5.2 Υλικοτεχνικός εξοπλισμός .....	62
5.3 Διαλύτες, αντιδραστήρια και στήλες εκχύλισης .....	63
5.4 Βιολογικό υπόστρωμα.....	64
5.5 Πρότυπες ουσίες αναφοράς, διαλύματα παρακαταθήκης . .....	64
5.6 Διαλύματα εργασίας και παρασκευή προτύπων δειγμάτων ολικού αίματος .....	65
5.7 Ρυθμιστικά διαλύματα.....	69
5.8 Μίγματα διαλυτών.....	70

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Ανάπτυξη και βελτιστοποίηση της μεθόδου**

6.1 Εσωτερικό πρότυπο .....	73
6.2 Προκαταρκτική ανάλυση .....	73
6.3 Βελτιστοποίηση παραγωγοποίησης.....	74
6.4 Βελτιστοποίηση χρωματογραφικών συνθηκών.....	82
6.5 Βελτιστοποίηση προκατεργασίας δειγμάτων .....	83
6.5.1 Υγρό-υγρό εκχύλιση .....	84
6.5.2 Εκχύλιση στερεάς φάσεως .....	91
6.6 Αναπτυχθείσα μέθοδος.....	94

<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: Πρωτόκολλο επικύρωσης της αναπτυχθείσας μεθόδου.....</b>	<b>99</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: Αποτελέσματα επικύρωσης της αναπτυχθείσας μεθόδου προσδιορισμού της φαιτανύλης και παραγώγων της σε ολικό αίμα</b>	
8.1 Εκλεκτικότητα.....	105
8.2 Ειδικότητα.....	1088
8.3 Κατώτατα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης.....	1088
8.4 Γραμμικότητα.....	11112
8.5 Επαναποσοτικοποίηση δειγμάτων βαθμονόμησης .....	11414
8.6 Επαναληψιμότητα και ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα .....	11717
8.7 Ορθότητα εντός της ημέρας και δια των ημερών .....	1188
8.8 Απόλυτη ανάκτηση .....	12525
8.9 Ανθεκτικότητα .....	12626
8.10 Σταθερότητα των ουσιών σε εμβολιασμένα πρότυπα δείγματα ολικού αίματος.....	12626
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9: Εφαρμογές της αναπτυχθείσας μεθόδου .....</b>	<b>105129</b>
<b>Συζήτηση .....</b>	<b>13131</b>
<b>Περίληψη .....</b>	<b>13135</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>13737</b>
<b>Πίνακας με συντμήσεις.....</b>	<b>1399</b>
<b>Βιβλιογραφία .....</b>	<b>14141</b>



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα Διπλωματική Έργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας, της Ιατρικής Σχολής Αθηνών του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, στο πλαίσιο του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών του Τμήματος Φαρμακευτικής, του Ε.Κ.Π.Α., «Ανάλυση και Έλεγχος Ποιότητας Φαρμάκων». Ο τίτλος της εργασίας είναι «Ανάπτυξη, Επικύρωση και Εφαρμογές Μεθοδολογίας για τον προσδιορισμό φαιτανύλης και παραγώγων της στο ολικό αίμα με Χρωματογραφία Αέριας Φάσεως σε συνδυασμό με Φασματομετρία Μαζών».

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την Διευθύντρια του Εργαστηρίου Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας της Ιατρικής Σχολής, Καθηγήτρια κ. Χαρά Σπηλιοπούλου η οποία με δέχτηκε στο χώρο του εργαστηρίου,

Ιδιαίτερες ευχαριστίες για αυτή τη δουλειά θα ήθελα να αποδώσω στον υπεύθυνο καθηγητή μου κ. Ιωάννη Παπουτσή για την πολύτιμη βοήθεια του και καθοδήγηση του καθ' όλη τη διάρκεια διενέργειας των πειραμάτων καθώς και κατά την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. Η εκπόνηση αυτής της διπλωματικής δεν θα ήταν εφικτή χωρίς την επικούρηση του καθηγητή μου ο οποίος μου έδειξε τις αρχές λειτουργίας βάσει των οποίων λειτουργεί ένα τοξικολογικό εργαστήριο και με βοήθησε να ενσωματωθώ στο χώρο. Οι συμβουλές του και η καθοδήγησή του, ήταν ιδιαίτερα πολύτιμες τόσο σε επιστημονικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Καθηγητή κ. Σωτήρη Αθανασέλη για την αμέριστη συμβολή του καθ' όλη την πορεία της μελέτης αυτής καθώς και στην συγγραφή των επιστημονικών εργασιών, την Καθηγήτρια κ. Μαρία Στεφανίδου, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Αρτεμησία Ντονά, τη Διδάκτορα Παναγιώτα Νικολάου αλλά και τη Διδάκτορα και φίλη μου Μαρία Κατσέλου για την βοήθεια και τη στήριξη τους.

Προς όλα τα υπόλοιπα μέλη του Εργαστηρίου Ιατροδικαστικής Τοξικολογίας, εκφράζω τις ευχαριστίες μου για την αρμονική συνεργασία σε όλα τα επίπεδα όλο αυτό το διάστημα.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου και την οικογένεια μου για την ψυχολογική και ηθική υποστήριξη καθ' όλη τη διάρκεια διετέλεσης των Μεταπτυχιακών μου σπουδών. Τους ευχαριστώ έναν-έναν προσωπικά από καρδιάς για την κατανόηση και για την βοήθεια τους σε όλη μου αυτή την προσπάθεια. Ο ρόλος τους ήταν ο πλέον σημαντικός όλο αυτό το χρονικό διάστημα.



# **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**





# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Εισαγωγή

## Ιστορική αναδρομή

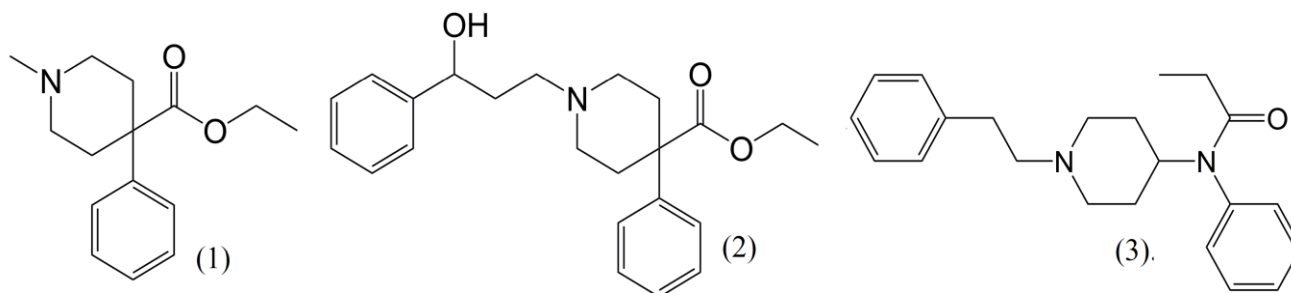
Η σύνθεση της φαιντανύλης χρονολογείται στις αρχές της δεκαετίας του 1950. Το 1953, ο Paul Janssen αποφάσισε να σχεδιάσει το πιο ισχυρό ναρκωτικό αναλγητικό που μπορούσε, όταν ανακάλυψε τη δεξτρομοραμίδη, μία 3,3-διφαινυλοπροπυλαμίνη η οποία ήταν πιο δραστική από οποιοδήποτε αναλγητική ουσία υπήρχε μέχρι τότε. Οι μελέτες οι οποίες οδήγησαν τον Janssen στη σύνθεση της φαιντανύλης το 1960, έθεσαν τις βάσεις για την καλύτερη κατανόηση της ποσοτικής σχέσης δομής-δράσης των ναρκωτικών- αναλγητικών ουσιών και αύξησε το ενδιαφέρον σχετικά με το σχεδιασμό ενώσεων με ακόμα υψηλότερη δραστικότητα και με πιο διευρυμένα όρια ασφαλείας σε σχέση με τις ήδη υπάρχουσες [1-3].

Πρακτικά, οι επιστήμονες γνώριζαν ήδη ότι η παρουσία ή η απουσία της αναλγητικής ιδιότητας των ναρκωτικών είναι εξ 'ολοκλήρου συσχετισμένη με την στερεοχημική τους δομή. Συνεπώς, μικρές αλλαγές στην διαμόρφωση του μορίου τους μπορεί να αποφέρει μεγάλες αλλαγές στην φαρμακολογική τους δράση. Η παραπάνω γνώση είναι που ώθησε στο σχεδιασμό και στην ανάπτυξη νέων δραστικότερων ενώσεων, καθώς η μορφίνη διαπιστώθηκε ότι δομικά, είναι λιγότερο ιδανικό μόριο όσον αφορά την προσέγγιση και ενεργοποίηση του μ-υποδοχέα [4-9].

Την ίδια περίοδο μία διαπίστωση έλαβε χώρα η οποία είχε ως αποτέλεσμα την ανακάλυψη του πρώτου συνθετικού οπιοειδούς, της μεπεριδίνης. Η μεπεριδίνη, μία α-4-φαινυλοπιπεριδίνη εμφανίστηκε στην αγορά το 1939 ως αντισπασμωδικό καθώς είχε δομή παρόμοια με της ατροπίνης. Η αναλγητική της δράση διαπιστώθηκε αργότερα κατά τύχη και διερευνήθηκε αλλά διαπιστώθηκε ότι δεν είχε μεγάλη δραστικότητα [10, 11]. Η δυνατότητα των μορίων να διαπεράσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό σχετίζεται με τη λιποδιαλυτότητα τους. Η μεπεριδίνη είναι 30 με 35 φορές πιο λιπόφιλο μόριο από ότι η μορφίνη και ως εκ τούτου οι επιστήμονες, στο πλαίσιο της αναζήτησης καλύτερων αναλγητικών ουσιών, ξεκίνησαν να πειραματίζονται, πρωτίστως με ομοειδή της μεπεριδίνης [12]. Αντικατέστησαν λοιπόν ένα από τα υδρογόνα του μεθυλίου, το οποίο συνδέεται με το άζωτο στο μόριο της μεπεριδίνης, με έναν φαινολικό δακτύλιο, προκειμένου να αυξήσουν την λιποδιαλυτότητα του μορίου. Παρόλο που οι τροποποιήσεις αυτές στο μόριο έγιναν στα σημεία τα οποία συνδέονται με τον μ- υποδοχέα των οπιοειδών, οι διαφορές στην δραστικότητα του μορίου δεν ήταν αξιόλογες. Αργότερα συντέθηκε η φαινοπεριδίνη, η οποία απεδείχθηκε ότι έχει 20 φορές μεγαλύτερη δραστικότητα από ότι η μορφίνη και 200 φορές μεγαλύτερη δραστικότητα από ότι η μεπεριδίνη (**Εικ.1**) [5].

Οι συνεχιζόμενες προσπάθειες να βελτιστοποιήσουν την διαμόρφωση των παραπάνω μορίων οδήγησαν στην ανακάλυψη της φαιντανύλης, μίας ένωσης με 100 έως 300 φορές μεγαλύτερη

δραστηριότητα από ότι η μορφίνη [5-6, 9]. Εκτός από αυξημένη δραστηριότητα, η φαιντανύλη σαν αναλγητικό έχει θεραπευτικούς δείκτες τέσσερις φορές μεγαλύτερους σε σχέση με τη μορφίνη (277 και 70 αντίστοιχα) και 50 φορές μεγαλύτερους από ότι η μεπεριδίνη (277 και 5 αντίστοιχα) [1].



**Εικόνα 1.** Χημικές δομές των μορίων της μεπεριδίνης (1), της φαινοπεριδίνης (2) και της φαιντανύλης (3).

Το 1969, ο Lowenstein και οι συνάδελφοι του φέρνουν στο προσκήνιο την πιθανότητα σε επαρκείς δόσεις, τα οπιοειδή να λειτουργούν ως παράγοντες αναισθησίας [13]. Η έναρξη της πραγματοποίησης χειρουργικών επεμβάσεων ανοιχτής καρδιάς, συνέβαλλαν κατά πολύ στην δημοτικότητα της παραπάνω έρευνας. Οι κλινικοί γιατροί βρίσκονταν σε αναζήτηση για μία ουσία που να επιτρέπει την αναισθητοποίηση και την περάτωση χειρουργικών επεμβάσεων σε ασθενείς με εμφανώς μειωμένες τις καρδιαγγειακές και πνευμονικές λειτουργίες. Οι κλινικοί γιατροί ξεκινούν να χρησιμοποιούν μορφίνη (1-3 mg/kg) συνδυαστικά με οξυγόνο (100%). Με τον καιρό όμως, άρχισαν να διαφαίνονται σημαντικά προβλήματα με την χρήση της, όπως αμνησία, υπόταση, βρογχόσπασμος και μετεγχειρητική αναπνευστική καταστολή [14-18].

Εξαιτίας αυτών των προβλημάτων με τη μορφίνη, οι επιστήμονες άρχισαν να ψάχνουν για μία εναλλακτική λύση ανάμεσα στα ήδη υπάρχοντα οπιοειδή. Πρώτη μελετήθηκε η μεπεριδίνη η οποία εν καιρώ θεωρήθηκε ακατάλληλη καθώς προκαλούσε διάφορα προβλήματα όπως καρδιαγγειακή καταστολή και ταχυκαρδία [20-23]. Οι ερευνητές ξεκίνησαν τότε να μελετούν την φαιντανύλη. Από μελέτες που έγιναν σε ζώα εκτιμήθηκε ότι η χρήση της φαιντανύλης ως αναισθητικός παράγοντας μπορεί να έχει εφαρμογή και στον άνθρωπο [24-27]. Η φαιντανύλη (50-100 mg/kg) συνδυαστικά με οξυγόνο (100%) μελετήθηκε σαν αναισθητικό και σε ασθενείς οι οποίοι επρόκειτο να κάνουν εγχείριση μιτροειδούς βαλβίδας ή στεφανιαίας αρτηρίας. Μετά τις μελέτες αυτές η φαιντανύλη κατέστη δημοφιλής ανάμεσα στα ναρκωτικά-αναισθητικά. Έκτοτε, καθιερώθηκε, η χρήση της φαιντανύλης τόσο ως ισχυρό αναλγητικό όσο και στην αναισθησία [26, 28-32].

Με αφετηρία την χημική δομή της φαιντανύλης έχουν παρασκευαστεί μέχρι τώρα 1400 παράγωγα φαιντανύλης, εκ των οποίων περισσότερα από 200 έχουν μελετηθεί και περιγραφεί βιβλιογραφικά. Οι επιδράσεις στον ανθρώπινο οργανισμό, έχουν περιγραφεί μόνο για πολύ λίγες απ' αυτές τις ουσίες. Παρόλο που όλες αυτές οι ουσίες έχουν αποδεδειγμένα, μεγάλη συγγένεια με τον μ- υποδοχέα των οπιοειδών και είναι σε θέση να ανακουφίσουν από τον πόνο, μόνο τρεις από αυτές

έχουν εγκεκριμένη ιατρική χρήση, η ρεμφαιντανύλη (remifentanil), η αλφαιντανύλη (alfentanil) και η σουφαιντανύλη (sufentanil).

Με κίνητρο το κέρδος, τα παράνομα κυκλώματα εμπορίας ναρκωτικών, παράγουν σε μεγάλη κλίμακα, δομικά ανάλογα της φαιντανύλης (παράγωγα) και τα διακινούν μέσα από τη μαύρη αγορά προς τους χρήστες. Η πρώτη παράνομη χρήση της φαιντανύλης και των αναλόγων της εντοπίζεται στα μέσα της δεκαετίας του 1970. Το πρόβλημα έκτοτε λάβει μεγάλες διαστάσεις. Η κατάσταση έχει οξυνθεί τα τελευταία χρόνια, δεδομένου του ότι τα υλικά και ο εξοπλισμός για την παράνομη σύνθεση τους, είναι πλέον διαθέσιμα στο διαδίκτυο. Τα τελευταία 5 χρόνια, περισσότερο από 12 τέτοια παράγωγα φαιντανύλης έχουν περάσει στο παράνομο εμπόριο ναρκωτικών. Μια πληθώρα τέτοιων ουσιών πωλείται στους δρόμους, ως συνθετική ηρωίνη με την εμπορική ονομασία «China White», αλλά παρόλα αυτά διαφέρει σε ισχύ και διάρκεια δράσης από ότι η ηρωίνη [33-34].

Η συζήτηση και η παράθεση πληροφοριών σχετικά με την φαρμακολογία και την τοξικολογία γνωστών νεοεμφανισθέντων παραγώγων της φαιντανύλης, είναι εξαιρετικά χρήσιμη στις μελέτες και στην έρευνα που γίνεται πάνω σε αυτές τις ουσίες. Τα σημαντικότερα και πιο συχνά εμφανιζόμενα παράγωγα της φαιντανύλης τα οποία μελετήθηκαν στο πλαίσιο αυτής της μελέτης είναι η βουτυρυλοφαιντανύλη, η οκφαιντανύλη, η φουρανυλοφαιντανύλη και η ακετυλοφαιντανύλη



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Φαιντανύλη

### 2.1 Χημικές ιδιότητες

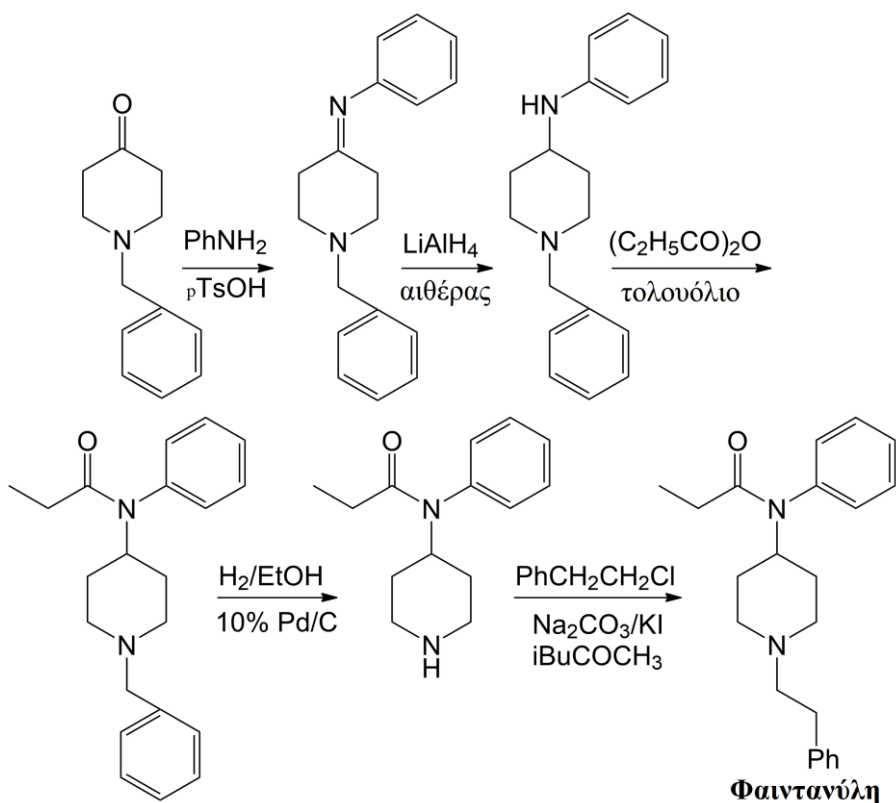
Η IUPAC ονομασία της φαιντανύλης είναι *N*-φαινυλ-*N*-[1-(2-φαινυλαιθυλο)πιπεριдино-4-υλο]προπαναμίδιο και ο μοριακός της τύπος είναι  $C_{22}H_{28}N_2O$ , με μοριακό βάρος 336.471 g/mol. Άλλες γνωστές ονομασίες είναι 1-φαινυλαιθυλο-4-*N*-προπιονυλανιλινοπιπεριδίνη, *N*-(1-φαινυλαιθυλο-4-πιπεριδινυλο)-*N*-φαινυλπροπιοναμίδιο, *N*-(1-φαινυλαιθυλο-4-πιπεριδινυλο)προπιονανιλίδιο, fentanil, fentanilo, fentanylum και phentanyl. Εμπορικά είναι διαθέσιμη είτε με τη μορφή του υδροχλωρικού αλατός της με μοριακό τύπο  $C_{22}H_{28}N_2O \cdot HCl$  και μοριακό βάρος 371.937 g/mol είτε με τη μορφή κιτρικού άλατος με τον μοριακό τύπο  $C_{22}H_{28}N_2O \cdot C_6H_8O_7$  και μοριακό βάρος 528.602 g/mol. Σε όλες τις περιπτώσεις η ουσία αποτελεί ένα κρυσταλλικό στερεό ενώ αν αποθηκευτεί σωστά είναι σταθερή σε όλες τις μορφές της. Το σημείο τήξης της φαιντανύλης είναι 83-84 ° C, η διαλυτότητα της στο νερό είναι 200 mg/L σε θερμοκρασία δωματίου, το logP της είναι 4.05 και τέλος το pKa σε θερμοκρασία δωματίου είναι 8.77 [35-43].

### 2.2 Σύνθεση

Ο Janssen ακολούθησε την ίδια συνθετική οδό που ακολουθήθηκε για την μεπεριδίνη. Η συνθετική της πορεία ξεκινάει με συμπύκνωση της 1-βενζυλο-4-πιπεριδίνης (2) με ανιλίνη παρουσία οξικού ανυδρίτη. Ακολουθεί αναγωγή με τετραϋδραργλικό λίθιο ( $LiAlH_4$ ) ή βοροϋδρίδιο του νατρίου ( $NaBH_4$ ) της ενδιάμεσης βάσης Schiff (3) που οδηγεί στην (4). Μετέπειτα ακυλίωση με προπιονικό ανυδρίτη [ $(C_2H_5CO)_2O$ ] σε τολουόλιο, ακολουθούμενη από υδρογονόλυση και αλκυλίωση δίνει την επιθυμητή ένωση της φαιντανύλης σε απόδοση μεγαλύτερη από 90%. Η συνθετική οδός περιγράφεται σχηματικά στην **Εικόνα 2** [44-47]. Με την λήξη της πατέντας που κατοχύρωσε ο Paul Janssen, άλλες μέθοδοι σύνθεσης άρχισαν σταδιακά να αναπτύσσονται για την φαιντανύλη. Από το 1964 και έπειτα πολλές παραλλαγές και τροποποιήσεις της αρχικής συνθετικής πορείας έχουν αναφερθεί και περιλαμβάνουν είτε την χρήση του 2-φαινεθυλ-αναλόγου αντί για την 1-βενζυλο-4-πιπεριδίνης είτε διαφορετικό αντιδραστήριο αναγωγής [48-56].

Η μέθοδος που σχεδιάστηκε και εφαρμόστηκε από τον Janssen, είχε πολλά μειονεκτήματα. Το πρώτο μειονέκτημα της πορείας είναι ότι αποτελείτο από πολλά βήματα και ως εκ τούτου απαιτούσε μεγάλη διάρκεια με αποτέλεσμα να δίνει μειωμένη απόδοση. Ένα άλλο μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι απαιτούσε αυστηρές συνθήκες, όπως για παράδειγμα θερμοκρασία βρασμού, γεγονός που την έκανε, από οικονομικής άποψης, ασύμφορη. Επιπροσθέτως η χρήση οργανικών διαλυτών σε κάθε στάδιο της διαδικασίας όχι μόνο την καθιστούσε περιβαλλοντικά μη ασφαλή αλλά προσέθετε στην όλη πορεία και το στάδιο της απομάκρυνσης των διαλυτών. Καθώς ορισμένα από τα στάδια

της πορείας είναι ευαίσθητα σε υγρασία, απαιτείται να λαμβάνονται προφυλάξεις, ιδιαίτερα σε παραγωγή μεγάλης κλίμακας. Άλλα προβλήματα πάνω στην μέθοδο σχετίζονται με τα χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια. Το τετραϋδραργλικό λίθιο, για παράδειγμα, αντιδρά βίαια με το νερό και απελευθερώνει υδρογόνο το οποίο είναι πολύ πιθανόν να προκαλέσει ανάφλεξη στα υπόλοιπα υλικά, ενώ το παλλάδιο που χρησιμοποιείται στο στάδιο της υδρογόνωσης/αποβενζυλίωσης αυξάνει κατά πολύ το κόστος της διαδικασίας. Σε γενικά πλαίσια, η πορεία αυτή είναι ενεργειακά ασύμφορη, χρονοβόρα, απαιτεί εξεζητημένες υποδομές προκειμένου να διατηρεί αυστηρά τις συνθήκες λειτουργίας της, ειδικά εκπαιδευμένο προσωπικό, είναι ακατάλληλη για παραγωγή μεγάλης κλίμακας και είναι πολύ πιθανό να βλάπτει το περιβάλλον, τα οικοσυστήματα αλλά και τον ίδιο τον άνθρωπο, δηλαδή αποτελεί μία μέθοδο εμπορικά και βιομηχανική μη βιώσιμη.



**Εικόνα 2.** Σύνθεση της φαιντανύλης όπως περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Janssen και συν. το 1960 [Stanley, 1992].

Δεδομένων των πολλών προβλημάτων που υπήρχαν, ξεκίνησε από τότε η αναζήτηση για πιο συμφέρουσες διαδικασίες με συνέπεια να κυκλοφορεί πλέον ένας μεγάλος αριθμός από τέτοιες μεθόδους, με την πιο πρόσφατη πατενταρισμένη, να χρονολογείται το 2013. Η καινοτομία της εφεύρεσης αυτής έγκειται στην αντικατάσταση των επικίνδυνων αντιδραστηρίων, όπως τετραϋδραργλικό λίθιο και αιθέρας, και την εξάλειψη της χρήσης οργανικών αντιδραστηρίων. Παρόλο που η πορεία ξεκινά με την *N*-φαινηθλοπιπεριδόνη, διαφέρει από την αρχική στο ότι

αποφεύγει να χρησιμοποιήσει ως αντιδραστήριο αναγωγής το τετραϋδραργλικό λίθιο, περιορίζοντας έτσι τις εξώθερμες αντιδράσεις. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η όλη διαδικασία να καθίσταται οικονομική και περιβαλλοντικά ασφαλής. Επιπροσθέτως δεν χρησιμοποιούνται επικίνδυνα αντιδραστήρια όπως εύφλεκτοι διαλύτες, η χρήση παλλαδίου, που είναι ασύμφορο από οικονομικής άποψης, και η χρήση αυστηρών συνθηκών λειτουργίας [48].

## 2.3 Τρόποι χορήγησης

### Ενδοφλέβια Χορήγηση

Η ενδοφλέβια φαιντανύλη χρησιμοποιείται συχνά στην αναισθησία και στην αναλγησία. Επίσης μπορεί να συμπεριληφθεί σε διάλυμα μαζί με ένα τοπικό αναισθητικό για νευροαξονική χορήγηση (επισκληρίδιο ή ενδορραχιαία/νωτιαία). Τέλος ενδοφλέβια χορήγηση εφαρμόζεται σε περιπτώσεις χρόνιου πόνου συμπεριλαμβανομένων και περιπτώσεων καρκινοπαθών στο τελευταίο στάδιο της ασθένειας [57-59].

### Διαδερμική Χορήγηση

Η χρήση διαδερμικών επιθεμάτων φαιντανύλης (Duragesic) εγκρίθηκε για πρώτη φορά στις 17 Ιουλίου του 1995. Κυκλοφόρησε σε σκευάσματα των 25, 50, 75 και 100  $\mu\text{g}/\text{h}$ , ύστερα από μία σειρά κλινικών δοκιμών, ενώ στις 27 Οκτωβρίου του 2004 εγκρίθηκε και η σύνθεση 120  $\mu\text{g}/\text{h}$ . Στις 28 Ιανουαρίου του 2005 η Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) των Η.Π.Α. ενέκρινε για πρώτη φορά την δημιουργία γενόσημων σκευασμάτων με διαδερμικά συστήματα χορήγησης σε παρασκευάσματα των 25, 50, 75 και 100  $\mu\text{g}/\text{h}$  [60].

Τα διαδερμικά επιθέματα φαιντανύλης χρησιμοποιούνται για την διαχείριση του χρόνιου πόνου. Λειτουργούν, απελευθερώνοντας το φάρμακο μέσω του δέρματος προς την κυκλοφορία του αίματος, σε διάστημα από 48 έως 72 ώρες. Η δοσολογία εξαρτάται από το μέγεθος του επιθέματος, δεδομένου ότι ο ρυθμός απορρόφησης είναι σταθερός για δεδομένη θερμοκρασία δέρματος [61].

Ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να ληφθεί ώστε ο ασθενής να μένει μακριά από εξωγενείς πηγές θέρμανσης όπως το ηλιακό φως, καθώς κάτι τέτοιο μπορεί να προκαλέσει υπέρμετρη απελευθέρωση φαρμάκου προς το αίμα και να οδηγήσει σε επιπλοκές [60].

### Ρινική χορήγηση

Η ρινική φαιντανύλη είναι διαθέσιμη σε δόσεις των 50, 100 και 200 μικρογραμμαρίων. Χρησιμοποιείται σε έκτακτα περιστατικά αλλά και στο πλαίσιο της παρηγορητικής φροντίδας. Στα παιδιά η ρινική φαιντανύλη είναι χρήσιμη για τη θεραπεία του μέτριου και έντονου πόνου και φαίνεται να είναι αρκετά ανεκτή [62-63].

## Από του στόματος χορήγηση

Η φαιντανύλη ως υπογλώσσιο δισκίο, διαλύεται εύκολα και απορροφάται μέσω του υπογλώσσιου βλεννογόνου παρέχοντας ταχεία αναλγησία. Λόγω της μεγάλης λιποφιλικότητας απορροφάται γρήγορα και αρκετά ικανοποιητικά μέσω του στόματος και φαίνεται να είναι αρκετά ανεκτή [64-65]. Η υπογλώσσια χορήγηση είναι αρκετά χρήσιμη για την αντιμετώπιση του παροξυσμικού πόνου που εμφανίζεται στις περιπτώσεις των καρκινοπαθών, ο οποίος είναι τις περισσότερες φορές βραχείας διάρκειας και μεγάλης έντασης [66].



Εικόνα 3. Παστίλιες φαιντανύλης.

Οι «παστίλιες φαιντανύλης» (Εικ.3), είναι μία μορφή στερεής κιτρικής φαιντανύλης πάνω σε ένα ραβδί. Διαλύεται αρκετά αργά στο στόμα και απορροφάται μέσω του βλεννογόνου. Οι παστίλιες φαιντανύλης προορίζονται για οργανισμούς ανεκτικούς στη χρήση οπιοειδών και χρησιμοποιούνται στις περιπτώσεις καρκινοπαθών για την αντιμετώπιση του παροξυσμικού πόνου [67].

## Άλλοι τρόποι χορήγησης

Η φαιντανύλη ορισμένες φορές χορηγείται ενδορραχιαία ως μέρος της ενδορραχιαίας αναισθησίας ή επισκληρίδια για αναισθησία και αναλγησία στις εγκυμονούσες.

Ένα σύστημα διαδερμικής χορήγησης ελεγχόμενο από τον ασθενή βρίσκεται ακόμα στην ανάπτυξη του ώστε να επιτρέπει στον ασθενή να ελέγχει την απελευθέρωση του φαρμάκου, κατά τη διάρκεια της θεραπείας περιεγχειρητικού πόνου [68-69].

## 2.4 Φαρμακοκινητική

### Απορρόφηση

Σε υπογλώσσια χορήγηση η φαιντανύλη φαίνεται να απορροφάται πολύ γρήγορα. Το 25% της δόσης φαίνεται ότι απορροφάται μέσω του στοματικού βλεννογόνου ενώ το υπόλοιπο 75% καταπίνεται και απορροφάται αργά από την γαστροεντερική οδό [70-71]. Ταχεία απορρόφηση λαμβάνει χώρα για περίπου 30 λεπτά μετά τη χορήγηση του φαρμάκου. Η βιοδιαθεσιμότητα του δισκίου δεν έχει μελετηθεί αλλά εκτιμάται γύρω στο 70 %. Μετά τη χορήγηση δισκίου 100-800 µg φαιντανύλης, οι μέγιστες συγκεντρώσεις στο πλάσμα επιτυγχάνονται στα 22.5 έως 240 λεπτά και κυμαίνονται από 0.2 έως 1.3 ng/mL [72].

Κλινικά στοιχεία δείχνουν ότι η φαιντανύλη απορροφάται σχεδόν εξ' ολοκλήρου και πολύ γρήγορα μέσω του ρινικού βλεννογόνου. Η ρινική χορήγηση χαρακτηρίζεται από περίπου 89% βιοδιαθεσιμότητα. Μετά τη ρινική χορήγηση 50 έως 200 µg φαιντανύλης, η μέγιστες συγκεντρώσεις στο αίμα επιτυγχάνονται σε 10 έως 15 λεπτά και κυμαίνονται από 0.35 έως 1.2 ng/mL [73].



Στην αλκαλοειδή της μορφή, ως βάση, η φαιντανύλη καταφέρει και διαπερνά την κεράτινη στιβάδα του δέρματος. Το επίπεδο της επιδερμίδας αποτελεί το πρώτο σημαντικό φραγμό κατά την είσοδο της φαιντανύλης στην κυκλοφορία του αίματος, μέσω του δέρματος. Μόνο ουσίες όπως η φαιντανύλη με μεγάλη λιποδιαλυτότητα μπορούν να διαπεράσουν τα κηρώδη λιπίδια αυτής της στιβάδας και να φτάσουν στο επίπεδο της δερμίδας που είναι υδατικό. Ως εκ τούτου το φάρμακο απαιτείται να είναι ταυτόχρονα υδρόφιλο και λιπόφιλο ώστε να θεωρείται ότι μπορεί να χορηγείται μέσω του δέρματος. Η σχέση μεταξύ της λιπιδικής και της υδατικής διαλυτότητας αποδεικνύεται μέσα από μελέτες σε πρότυπα συστήματα οκτανόλης-νερού οι οποίες οδήγησαν στην εύρεση των αντίστοιχων συντελεστών κατανομής της ουσίας. Στη **διαδερμική** χορήγηση το φάρμακο διαχέεται παθητικά, μέσω του δέρματος προς την κυκλοφορία του αίματος, παρακάμπτοντας τον εντεροηπατικό κύκλο. Πρόκειται για μία απλή, καλά ανεκτή μέθοδο χορήγησης, η οποία εξασφαλίζει σταθερά επίπεδα φαρμάκου στο πλάσμα, αυξημένη βιοδιαθεσιμότητα καθώς παρακάμπτεται η εντεροηπατική οδός και μία πολύ καλή λύση σε περιπτώσεις μακροχρόνιας χορήγησης. Ο ρυθμός απορρόφησης εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Μερικοί από αυτούς είναι η θερμοκρασία του σώματος, ο τύπος του δέρματος, το ποσοστό του σμήγματος και η διαδικασία τοποθέτησης του σκευάσματος. Οι διαφορετικοί τρόποι διανομής του φαρμάκου που διαφοροποιούνται από τον έναν κατασκευαστή στον άλλο, μπορούν επίσης να επηρεάσουν τους ατομικούς συντελεστές απορρόφησης. Υπό κανονικές συνθήκες ο χρόνος για να επιτευχθεί η μέγιστη συγκέντρωση στο πλάσμα κυμαίνεται από 27.5 έως 36.8 ώρες και οι ανάλογες συγκεντρώσεις κυμαίνονται από 0.3 έως 2.5 ng/ml ανάλογα με την ισχύ του επιθέματος. Μετά την αφαίρεση του επιθέματος τα επίπεδα στον ορό πέφτουν στο 50% σε 20-27 ώρες, επειδή ακόμα και τότε το φάρμακο απελευθερώνεται αργά από τις στιβάδες του δέρματος. Οι συγκεντρώσεις στο πλάσμα, στον ορό και στο αίμα που επιτυγχάνονται 8 έως 12 ώρες μετά την εφαρμογή του επιθέματος, είναι ίδιες με αυτές που καταφέρονται με συνεχή ενδοφλέβια έγχυση της ουσίας [74-77].

Στις **παστίλιες φαιντανύλης** 25% του φαρμάκου απορροφάται μέσω του στοματικού βλεννογόνου και ξεκινά αμέσως η δράση του, ενώ το υπόλοιπο φάρμακο καταπίνεται και απορροφάται μέσω του λεπτού εντέρου. Η παστίλια είναι λιγότερο αποτελεσματική και δρα πιο αργά όταν καταπίνεται ολόκληρη καθώς, παρόλο το ότι απορροφάται επαρκώς μέσω του λεπτού εντέρου, υπόκειται σε εκτεταμένο μεταβολισμό πρώτης φάσης, γεγονός που οδηγεί σε βιοδιαθεσιμότητα 33% σε αντίθεση με το 50% που προκύπτει από σωστή χρήση (25% μέσω του στόματος και 25% μέσω του εντέρου) [67].

## Κατανομή

Περίπου 80-85% του φαρμάκου συνδέεται με τις πρωτεΐνες του πλάσματος. Κυρίως συνδέεται με την α1-γλυκοπρωτεΐνη αλλά και σε μικρότερο βαθμό με την λευκοματίνη και την λιποπρωτεΐνη [72-74]. Τέσσερις έρευνες αναφέρουν ότι τα κλάσματα της φαιντανύλης που δεν συνδέονται με τις πρωτεΐνες του πλάσματος κυμαίνονται από 13 έως 21% [78].

Η φαιντανύλη είναι εξαιρετικά λιπόφιλη και κατανέμεται καλά πέραν του αγγειακού συστήματος, με μεγάλο φαινομενικό όγκο κατανομής (3,2-4,0 L/kg σε σταθεροποιημένη κατάσταση). Η ουσία έχει 100 φορές μεγαλύτερη διαπερατότητα στο ΚΝΣ από την μορφίνη, γεγονός που οφείλεται στην μεγάλη λιποδιαλυτότητα της. Πιο συγκεκριμένα, η φαιντανύλη έχει συντελεστή κατανομής σε σύστημα νερού-οκτανόλης 9550. Ως εκ τούτου, η πρώτη διαχέεται ταχέως μέσω των μεμβρανών συμπεριλαμβανομένου και του αιματοεγκεφαλικού φραγμού καθώς και κυτταρικών διαμερισμάτων πλούσιων σε λιπίδια. Στοιχεία από ζώα δείχνουν ότι μετά από ενδοφλέβια χορήγηση, η φαιντανύλη διαχέεται ταχέως (μέσα σε περίπου 1.7 λεπτά) σε ιστούς όπως ο εγκέφαλος, η καρδιά, οι πνεύμονες, οι νεφροί και ο σπλήνας ακολουθούμενη από βραδύτερη ανακατανομή σε μύες και λίπος 30 λεπτά μετά τη χορήγηση. Η ταχεία κατανομή της εντός των ιστών, οδηγεί σε ταχεία πτώση των επιπέδων της στο πλάσμα του αίματος, με το 98.6% του φαρμάκου να αποβάλλεται από το πλάσμα εντός της πρώτης ώρας. Σε **ενδοφλέβια χορήγηση**, ο χρόνος ημίσειας ζωής της πρώτης κατανομής είναι περίπου 6 λεπτά. Ο χρόνος ημίσειας ζωής της δεύτερης κατανομής είναι 1 ώρα και ο τελικός χρόνος ημίσειας ζωής είναι 13 ώρες. Παρόμοιος χρόνος ημίσειας ζωής παρατηρείται μετά τη **ρινική χορήγηση** [80-84, 74].

## Βιομετατροπή

Η βιομετατροπή της φαιντανύλης περιλαμβάνει βιομετατροπή πρώτης φάσεως και λαμβάνει χώρα στα ένζυμα του κυτοχρώματος P450 (CYP). Η πορεία βιομετατροπής της, περιλαμβάνει *N*-απαλκυλίωση πιπεριδίνης προς νορφαιντανύλη, υδρόλυση του αμιδικού δεσμού προς δισπροπιονυλοφαιντανύλη, υδροξυλίωση του μεθυλίου προς υδροξυφαιντανύλη και υδροξυνορφαιντανύλη (**Εικ.4**).

Ο Labroo και συν., διερεύνησαν τα μεταβολικά μονοπάτια της φαιντανύλης *in vitro* και *in vivo*. Η νορφαιντανύλη ήταν ο κύριος μεταβολίτης της φαιντανύλης αντιπροσωπεύοντας το 99% της μεταβολικής πορείας της ουσίας. Πρόκειται για έναν ανενεργό μεταβολίτη, ο οποίος μετά το σχηματισμό του στο ήπαρ, ακολουθεί την οδό απέκκρισης μέσω των ούρων. Η δισπροπιονυλοφαιντανύλη και η υδροξυφαιντανύλη βρέθηκαν σε πολύ μικρά ποσοστά ενώ η υδροξυνορφαιντανύλη ανιχνεύθηκε μετά από επώαση 90 λεπτών ή και περισσότερων και όχι στην αρχή. Επώαση των μεταβολιτών πρώτης φάσης με ηπατικά μικροσώματα έδειξαν σχηματισμό της

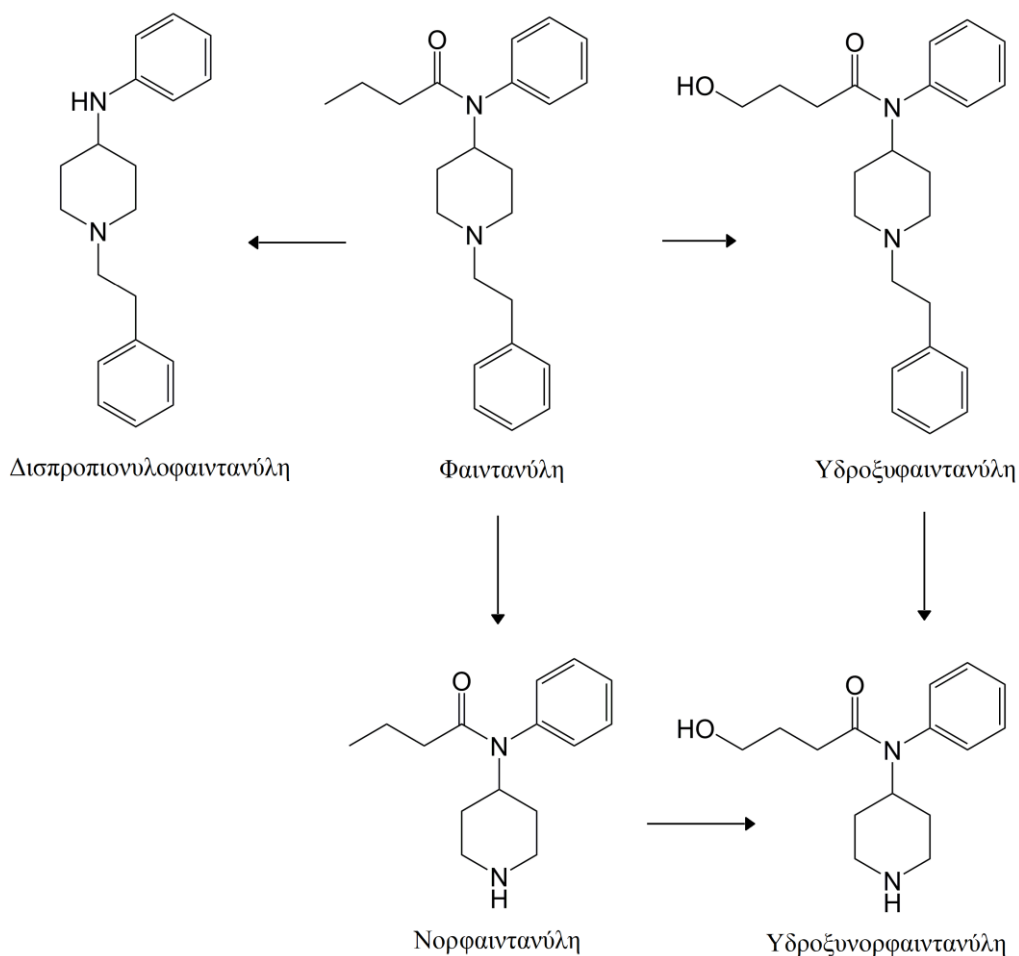
υδροξυνορφαιτανύλης από την υδροξυφαιτανύλη και όχι από την νορφαιτανύλη. Κατά συνέπεια η δευτερογενής παραγωγή της υδροξυνορφαιτανύλης ελέγχεται από την πρωτογενή παραγωγή της υδροξυφαιτανύλης και απουσία της πρώτης, υπό ηπιότερες συνθήκες επώασης, πιθανόν να προκύπτει από χαμηλό ρυθμό σχηματισμού της δεύτερης.

Τα αποτελέσματα από τις *in vitro* μελέτες συνεκτιμήθηκαν με αυτά από *in vivo* μελέτες. Η νορφαιτανύλη ήταν ο μεγαλύτερος σε αφθονία μεταβολίτης σε ούρα και πλάσμα σε όλους τους ασθενείς. Η δισπροπιονυλοφαιτανύλη δεν ανιχνεύθηκε στα ανθρώπινα ούρα αλλά βρέθηκε σε διάφορα ποσοστά στο ανθρώπινο πλάσμα. Η υδροξυνορφαιτανύλη ανιχνεύθηκε επίσης σε ούρα σε *in vivo* μελέτες.

Η πορεία βιομετατροπής της φαιτανύλης μεταβάλλεται σε μία πληθυσμιακή κατανομή ανάλογα με την ηλικία, το φύλο και την εθνικότητα. Αναφορικά με την φαιτανύλη έχει καταγραφεί μειωμένο ποσοστό απέκκρισης σε γηραιότερους ανθρώπους, ενώ η φαρμακοκινητική της δεν φαίνεται να επηρεάζεται από παραμέτρους όπως το φύλο και η εθνικότητα [85].

### **Απέκκριση**

Η φαιτανύλη και οι μεταβολίτες της απεκκρίνονται κυρίως μέσω των νεφρών. Περίπου το 75% της φαιτανύλης απεκκρίνεται στα ούρα, κυρίως ως ανενεργοί μεταβολίτες, με λιγότερο από το 10% αυτής ως αμετάβλητη δραστική ουσία. Περίπου το 9% της δόσης απεκκρίνεται στα κόπρανα κυρίως ως μεταβολίτες. Η νεφρική κάθαρση μετρήθηκε στα 11,2 ml/min.kg. [86-87].



**Εικόνα 4.** Πρωτογενείς και δευτερογενείς μεταβολίτες φαιντανύλης [Labroo et al., 1997].

## 2.5 Φαρμακοδυναμική – Μηχανισμός δράσης

Η δράση της φαιντανύλης όπως και όλων των ομοειδών οφείλεται στη σύνδεση της φαιντανύλης με τους μ-υποδοχείς των οπιοειδών. Αυτό το είδος αλληλεπιδράσεων λαμβάνουν χώρα πρωτίστως στο ΚΝΣ, μέσω του εγκεφάλου, του νωτιαίου μυελού και άλλων ιστών. Η δράση της φαιντανύλης εντοπίζεται υπερνωτιαία, σε υποδοχείς οπιοειδών που έχουν σχέση με τον πόνο αλλά και σε περιοχές που έχουν σχέση με την αναπνοή, το καρδιαγγειακό και το κέντρο της ναυτίας και του εμετού. Στο Νωτιαίο Μυελό βρίσκεται οι μ-υποδοχείς στον οποίο δρα άμεσα η φαιντανύλη μειώνοντας την έκλυση των νευροδιαβιβαστών [88-89].

## 2.6 Θεραπευτικές ενδείξεις

Η χρήση της φαιντανύλης ως γενικό αναισθητικό εγκρίθηκε για πρώτη φορά το 1968 από τις Ηνωμένες Πολιτείες. Μετέπειτα, με την ανάπτυξη των διαδερμικών επιθεμάτων εγκρίθηκε και η χρήση της για την αντιμετώπιση του έντονου πόνου και πλέον έχει καταστεί το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο συνθετικό οπιοειδές για την αντιμετώπιση του πόνου, στην κλινική Ιατρική.

Σήμερα, η φαιτανύλη χρησιμοποιείται ως αναλγητικό συμπλήρωμα στην γενική ή τοπική αναισθησία (ενδοφλέβια, επισκληρίδια ή ενδορραχιαία) και για την αντιμετώπιση του μέτριου έως παροξυσμικού πόνου σε περιπτώσεις όπου η θεραπεία δεν ανταποκρίνεται σε μη οπιοειδή αναλγητικά. Επίσης χρησιμοποιείται ως αναισθητικός παράγοντας μαζί με οξυγόνο σε ασθενείς υψηλού κινδύνου που πρόκειται να υποστούν μεγάλης διάρκειας χειρουργικές επεμβάσεις. Τέλος, μπορεί να χορηγηθεί μαζί με αλοπεριδόλη, ως προαναισθητικός παράγοντας για εισαγωγή στην αναισθησία. Διατίθεται σε πολλές μορφές όπως ενέσιμα διαλύματα διαφόρων συγκεντρώσεων για την αναισθησία ή την διαχείριση του πόνου, διαδερμικά επιθέματα, δισκία, παστίλιες και ρινικά σπρέι (βλέπε 2.3) [87].

## **2.7 Ανεπιθύμητες ενέργειες**

### **Επιδράσεις στο Καρδιαγγειακό Σύστημα**

Οι πιο συχνές επιδράσεις της φαιτανύλης στο καρδιαγγειακό σύστημα είναι ταχυκαρδία, σε ποσοστό 1 έως 10% καθώς και πόνο στο στήθος, υπέρταση, υπόταση και αίσθημα παλμών σε ποσοστό από 0.1 έως 1%. Σε κάποιες άλλες πιο σπάνιες περιπτώσεις έχουν αναφερθεί αρρυθμίες, καρδιακή ανακοπή, αγγειοδιαστολή, βραδυκαρδία, αμφιβληστροειδοπάθεια, έμφραγμα του μυοκαρδίου και κυκλοφορική καταστολή [90-94].

### **Επιδράσεις στο αναπνευστικό σύστημα**

Η φαιτανύλη, όπως και άλλοι αγωνιστές οπιοειδών, μπορεί να προκαλέσει δόσοεξαρτώμενη αναπνευστική καταστολή. Ειδικότερα σε ενδοφλέβια χορήγηση δόσεων άνω των 200 μg, η καταστολή μπορεί να διαρκέσει περισσότερο από την αναλγησία. Επίσης, η αναισθησία με φαιτανύλη μπορεί μετεγχειρητικά να προκαλέσει παρατεταμένη ή καθυστερημένη αναπνευστική καταστολή. Όταν η φαιτανύλη χορηγείται για την επίτευξη αναισθησίας είναι επίσης πολύ πιθανόν να προκληθεί ακαμψία ή σπασμός των αναπνευστικών μυών [95].

Ο κίνδυνος αναπνευστικής καταστολής που σχετίζεται με την επισκληρίδιο χορήγηση φαιτανύλης, φαίνεται να είναι σχετικά μικρός και σε δόσεις μεγαλύτερες των 50 μg. Παρόλα αυτά έχουν αναφερθεί δύο περιστατικά επισκληριδίου αναλγησίας σε δύο γυναίκες, προορισμένες για χειρουργείο καισαρικής τομής, στις οποίες προκλήθηκε αναπνευστική καταστολή 100 και 80 λεπτά, αντίστοιχα μετά την χορήγηση 100 μg φαιτανύλης [96-98].

Η αναπνευστική καταστολή αποτελεί επίσης κίνδυνο και στην περίπτωση της διαδερμικής χορήγησης. Σημαντικός υποαερισμός μπορεί να προκληθεί, που μπορεί να οδηγήσει ακόμα και σε θάνατο, σε ασθενείς όπου η φαιτανύλη έχει χορηγηθεί διαδερμικά με την μορφή επιθεμάτων για μείωση του πόνου [99].

### **Επιδράσεις στη Νοητική Λειτουργία**

Η φαιτανύλη φαίνεται πως έχει κάποιες δοσοσυσχετιζόμενες επιδράσεις στις νοητικές και κινητικές λειτουργίες των ασθενών. Η βραχυπρόθεσμη και μακροπρόθεσμη μνήμη τους, παρόλα αυτά δεν δείχνει να επηρεάζεται. Οποιαδήποτε μείωση στην ικανότητα αποστήθισης και εκμάθησης έχει να κάνει με τη μειωμένη εγρήγορση και ικανότητα εστίασης και προσοχής του ασθενούς. Μελέτες δείχνουν ότι η αντιληπτική ικανότητα και η ταχύτητα των ασθενών εξακολουθεί να διατηρείται άριστη με τη χορήγηση φαιτανύλης, αν και έχει παρατηρηθεί μείωση της ικανότητας συντονισμού και ελέγχου των κινήσεων των άκρων. Σε άλλες μελέτες σε ανθρώπους, έχει αναφερθεί μειωμένη νοητική ικανότητα σε περιπτώσεις χορήγησης μεγάλων δόσεων. Σε μία άλλη περίπτωση ενός δεκατετράχρονου αγοριού, καταγράφηκε οξύ τοξικό παραλήρημα μετά από διαδερμική χορήγηση φαιτανύλης [100-101].

### **Επιδράσεις στο Νευρικό Σύστημα**

Υπάρχουν αναφορές για περιπτώσεις επιληπτικών σπασμών (κρίσεων) σε χαμηλές αλλά και υψηλές δόσεις φαιτανύλης. Παρόλα αυτά στα αντίστοιχα ηλεκτροεγκεφαλογραφήματα δεν υπάρχει κανένα στοιχείο για δραστηριότητα σπασμού στο τμήμα του εγκεφαλικού φλοιού μετά από χορήγηση φαιτανύλης. Ο ασθενής φαίνεται να εμφανίζει κινητικότητα στους μύες, παρόμοια με αυτή που συμβαίνει κατά τη διάρκεια ενός σπασμού, καθώς και ακαμψία του θωρακικού τοιχώματος. Η κινητικότητα αυτή τελικώς, αποδόθηκε σε τοξικό μυόκλονο, που δημιουργήθηκε από αναστολή των ανώτατων υποδοχέων του ΚΝΣ λόγω υπερδοσολογίας του φαρμάκου [102-103].

### **Επιδράσεις στο γαστρεντερικό σύστημα**

Η ναυτία, ο εμετός και η δυσκοιλιότητα αναφέρονται ως οι πιο συχνές επιδράσεις της φαιτανύλης στο γαστρεντερικό σύστημα. Άλλα συχνά συμπτώματα που παρατηρούνται είναι ξηροστομία, γαστρίτιδα, δυσφαγία, δυσπεψία, γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση, αιματέμεση, διαστροφή γεύσης, κοιλιακό άλγος, αφυδάτωση, ανορεξία, καχεξία, στοματίτιδες και ασκίτης. Λιγότερο συχνά έως σπάνια είναι ο μετεωρισμός και ο σπασμός σπειροειδούς σπειρώματος [91, 104-107].

### **Επιδράσεις στο δέρμα**

Η πιο συχνή επίδραση της φαιτανύλης που ακολουθεί της διαδερμικής χορήγησης είναι ο ερεθισμός στο σημείο εφαρμογής και ο κνησμός. Λιγότερο συχνά συμπτώματα είναι η υπερίδρωση και τα εξανθήματα ενώ αναφέρονται επίσης κυστίδια, φλύκταινες, ξηρό και λεπιοειδές δέρμα και φλεγμονή στο σημείο εφαρμογής του επιθέματος [108-110].

## **Επιδράσεις στους αιμοδυναμικούς δείκτες**

Οι πιο συχνές επιδράσεις που παρατηρούνται σε ποσοστό 1 έως 10% είναι η αναιμία, η λεμφαδενοπάθεια, η ουδετεροπενία, η θρομβοκυτταροπενία, η λευκοπενία, τα αυξημένα επίπεδα ασπαρτικής αμινοτρανσφεράσης, τα αυξημένα επίπεδα αλκαλικής φωσφατάσης του αίματος, τα αυξημένα επίπεδα γλυκόζης του αίματος, η υποαλβουμιναιμία, η αγγειοδιαστολή και τα αυξημένα επίπεδα γαλακτικού οξέος του αίματος. Η αιμόλυση που ορισμένες φορές παρατηρείται, αποδίδεται σε ταχεία ένεση μεγάλων όγκων υποτονικού διαλύματος φαιντανύλης. Έτσι προτείνεται βραδύτερος ρυθμός έγχυσης και/ή έγχυση ισοτονικού υγρού [91, 111].

## **Άλλες Επιδράσεις**

Σε πολύ σπάνιες περιπτώσεις (0.1 %) έχουν αναφερθεί συμπτώματα όπως αναφυλαξία ενώ έχουν επίσης αναφερθεί περιπτώσεις στοματικής καντιντίασης, κυτταρίτιδας, πνευμονίας, μόλυνσης ουροφόρων αγγείων, στοματικού έρπητα και λαρυγγίτιδας. Σε μία περίπτωση επισκληριδίου χορήγησης φαιντανύλης παρατηρήθηκε επαναλαμβανόμενη πρόκληση απλού έρπητος. Άλλα συμπτώματα περιλαμβάνουν πόνο στην πλάτη, αρθραλγία, οίδημα των αρθρώσεων, μυϊκή αδυναμία, μυόκλωνο, ακούσιες μυϊκές συσπάσεις και μυϊκή δυσκαμψία ενώ σε πιο σπάνιες περιπτώσεις έχουν αναφερθεί μυαλγία και κράμπες στα πόδια. Κατάθλιψη, σύγχυση, ψευδαισθήσεις, αϋπνία, άγχος, διέγερση, ανησυχία, αποπροσανατολισμός, συναισθηματική αστάθεια, ευφορία, παραλήρημα και νευρικότητα όπως και επιδράσεις του φαρμάκου στο ενδοκρινολογικό και στα μάτια έχουν επίσης καταγραφεί [91, 108, 112-113].

## **2.8 Αλληλεπιδράσεις με άλλα φάρμακα**

Βενζοδιαζεπίνες, βαρβιτουρικά, νευροληπτικά, άλλα ναρκωτικά και γενικά αναισθητικά μπορούν να οξύνουν το πρόβλημα της αναπνευστικής καταστολής και έτσι η χορηγούμενη δόση φαιντανύλης θα πρέπει να προσαρμόζεται σε μικρότερα επίπεδα. Η ιτρακοναζόλη, αναστέλλει σημαντικά το ένζυμο CYP3A4 το οποίο συμμετέχει στον μεταβολισμό της φαιντανύλης, και σε συγκεκριμένη δόση μπορεί να επιδράσει στη φαρμακοκινητική της. Δια του στόματος χορήγηση ριτοναβίρης επίσης επηρεάζει την απέκκριση του φαρμάκου. Η προηγούμενη χορήγηση σιμετιδίνης μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση των επιπέδων της φαιντανύλης στο πλάσμα ενώ συγχορήγηση με βεκουρόνιο μπορεί να ενισχύσει τη δράση της. Τέλος, τα αντιεπιληπτικά φάρμακα μπορούν να αυξήσουν τις ανάγκες για φαιντανύλη [87].

## **2.9 Κατάχρηση-Εξαρτησιογόνος δράση**

Εκτός από τις χρήσεις της στην κλινική ιατρική, τα τελευταία χρόνια η φαιντανύλη έχει γίνει μία πολύ δημοφιλής ουσία μεταξύ των παράνομα διακινούμενων και χρησιμοποιούμενων ναρκωτικών.

Παράνομη χρήση της φαιντανύλης και των ομοειδών της εμφανίστηκε για πρώτη φορά στα μέσα της δεκαετίας του 1970 [33]. Από το 2000 έως τώρα έχει θεωρηθεί υπεύθυνη για χιλιάδες θανάτους από παράνομη χρήση αλλά και από μη σωστή ιατρική χρήση. Παράνομη χρήση φαιντανύλης μπορεί να γίνει είτε με προϊόν που παράχθηκε παράνομα είτε με προϊόν που εκτράπηκε από την ορθή ιατρική του χρήση. Όσον αφορά την εκτροπή από την ορθή κλινική χρήση των φαρμάκων, μπορεί να γίνει με πολλούς τρόπους. Αναφορές δείχνουν ότι μπορεί να λάβει χώρα με κλοπές από φαρμακεία, συλλογή από απόβλητα νοσοκομείων ή μονάδων προστασίας ηλικιωμένων, αχρησιμοποίητα επιθέματα τα οποία αντί να επιστραφούν πωλήθηκαν από συγγενείς ή τους ίδιους τους ασθενείς, ατελή χρήση και πώληση από το ιατρικό προσωπικό και τέλος ακατάλληλη ή μη απαραίτητη συνταγογράφηση από γιατρούς, είναι κάποιοι από αυτούς [114-115].

Σύμφωνα με την Υπηρεσία Δίωξης Ναρκωτικών (DEA) των Η.Π.Α., η παράνομη διακίνηση και παραγωγή της φαιντανύλης οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην επιδημία που έχει ξεσπάσει τα τελευταία χρόνια αναφορικά με την χρήση οπιοειδών. Ένα αξιοσημείωτο πρόβλημα σχετικά με την παράνομη σύνθεση της είναι πως δεν απαιτεί ιδιαίτερες επιστημονικές γνώσεις και ως εκ τούτου είναι εύκολη και προσεγγίσιμη από τον καθένα. Ως αποτέλεσμα αυτού, «πρωτόκολλα» σύνθεσης φαιντανύλης διατίθενται ανοιχτά στο διαδίκτυο σε σχετικές ιστοσελίδες [116]. Οι πρώτες ύλες και τα υλικά τα οποία χρησιμοποιούνται στην σύνθεση της, είναι φθηνά και αγοράζονται εύκολα και μέσω του διαδικτύου. Τα παραπάνω, πυροδοτούν την μικρής κλίμακας παραγωγή της ουσίας. Οι μεγαλύτερες ποσότητες φαιντανύλης που κατάσχονται στις Ηνωμένες Πολιτείες δεν προέρχονται από παράνομη εκτροπή της ουσίας αλλά από παράνομα συντιθέμενη φαιντανύλη σύμφωνα με τη μέθοδο Siegfried, η οποία περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1980 και είναι σχετικά εύκολη στην εφαρμογή [117]. Σε παγκόσμια κλίμακα υπάρχουν λίγες αναφορές για την ύπαρξη εργαστηρίων παράνομης παραγωγής και διακίνησης φαιντανύλης. Τα περισσότερα εργαστήρια παράνομης παραγωγής της φαιντανύλης αλλά και παράγωγών αυτής, εδρεύουν στην Κίνα [118].

Η μη κλινική χρήση της φαιντανύλης και των αναλόγων της έχει ως αποτέλεσμα χιλιάδες θανάτους παγκοσμίως [34]. Στην βόρεια Αμερική, η φαιντανύλη και τα παράγωγα της έχουν προκαλέσει αρκετές επιδημίες οι οποίες έχουν οδηγήσει στο θάνατο χιλιάδων ανθρώπων από τα μέσα του 1970 έως σήμερα [119]. Στον Καναδά, η φαιντανύλη ήταν η αιτία 655 θανάτων οι οποίοι έλαβαν χώρα από το 2009 έως το 2014 [120]. Στην Ευρωπαϊκή Ένωση οι πρώτοι θάνατοι οι οποίοι ενέπλεκαν ουσίες από την ομάδα των παραγώγων της φαιντανύλης, καταγράφηκαν τη δεκαετία του 1990 στην Ιταλία και τη Σουηδία, ενώ τη δεκαετία του 2000 η ουσία επανεμφανίζεται στην Εσθονία χώρα που είναι και ιδιαίτερα δημοφιλής, ανάμεσα στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης, για την κατάχρηση φαιντανύλης. Η φαιντανύλη έχει επίσης αναφερθεί και σε άλλες Ευρωπαϊκές χώρες όπως η Φινλανδία, η Γερμανία και το Ηνωμένο Βασίλειο [115, 121-124], ενώ έχει κάνει την εμφάνιση της



σε σχετικές υποθέσεις και στην Ελλάδα [114]. Στην Αυστραλία έχουν καταγραφεί 123 περιστατικά θανάτων από χρήση φαινανύλης στο διάστημα 2000-2012 [125]. Τέλος, σχετικές υποθέσεις θανάτων έχουν καταγραφεί στο Μαρόκο [126] και στην Αλγερία [127].

Οι έμποροι ναρκωτικών ξεκίνησαν να πουλάνε φαινανύλη ως ηρωίνη ή ως πρόσμιξη με ηρωίνη από τη δεκαετία του 1970. Η «τάση» αυτή συνεχίζεται μέχρι και σήμερα καθώς η φαινανύλη είναι μία ουσία χαμηλότερου κόστους και σε ορισμένες περιπτώσεις ευκολότερο να διακινηθεί από ότι η ηρωίνη. Τα «προϊόντα» αυτά πωλούνται στην αγορά με τις ονομασίες “china white”, “tango & cash” και “συνθετική ηρωίνη” και ευθύνονται για έναν εξαιρετικά μεγάλο αριθμό δηλητηριάσεων και θανάτων. Πολλά περιστατικά θανάτου με φαινανύλη είχαν αρχικά εκτιμηθεί ως περιπτώσεις δηλητηριάσεων από ηρωίνη. Περιπτώσεις όπου η φαινανύλη πωλούνταν στην μαύρη αγορά ως ηρωίνη αναφέρονται σε Αμερική, Ευρώπη και Ασία [34, 128-129]. Η πιο πρόσφατη σχετικά τάση είναι πλαστά χάπια τα οποία πωλούνται ως συνταγογραφούμενα (όπως για παράδειγμα οξυκωδόνη, Χανακ κ.α) και στην πραγματικότητα περιέχουν φαινανύλη ή κάποιο από τα παράγωγα της [34]. Οι παστίλιες φαινανύλης πωλούνται επίσης παράνομα στους δρόμους της Νέας Υόρκης με την εμπορική ονομασία «percopor». Παράνομα παρασκευασμένη σκόνη έχει επίσης εντοπιστεί στις Η.Π.Α. [130].

Η φαινανύλη ως ναρκωτικό καταναλώνεται από το στόμα, καπνίζεται, εισπνέεται ή χορηγείται ενδοφλεβίως. Σε ορισμένες περιπτώσεις επιθέματα φαινανύλης, που εκτρέπονται από την ορθή ιατρική χρήση, πωλούνται στην μαύρη αγορά για παράνομη χρήση. Η γέλη η οποία εμπεριέχεται σε αυτά μπορεί είτε να καταπωθεί, είτε να εγχυθεί με ένεση στο αίμα, είτε να χρησιμοποιηθεί μέσω του ορθού (πρωκτική οδός) από τους χρήστες. Επίσης το σκεύασμα, χρησιμοποιείται διαδερμικά αφού έχει θερμανθεί ώστε να απελευθερωθεί με τη θερμότητα το υπόλοιπο φάρμακο, ενώ μπορεί να γίνει εισπνοή των παραγόμενων ατμών. Τέλος, ορισμένοι χρήστες παράγουν, χρησιμοποιώντας τα επιθέματα, «αφεψήματα φαινανύλης», τα οποία και καταναλώνουν. Το φαινόμενο της κατάχρησης των διαδερμικών παρασκευασμάτων δεν είναι ευρέως γνωστό και διαδεδομένο στη χώρα μας. Έτσι, πολλές φορές το σκεύασμα απορρίπτεται από τον ασθενή στον κάδο απορριμμάτων, ο οποίος αγνοεί ότι το επίθεμα εξακολουθεί να περιέχει σε ένα ποσοστό το φάρμακο και μπορεί να γίνει προϊόν κατάχρησης αργότερα [131-136].



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Παράγωγα φαιντανύλης

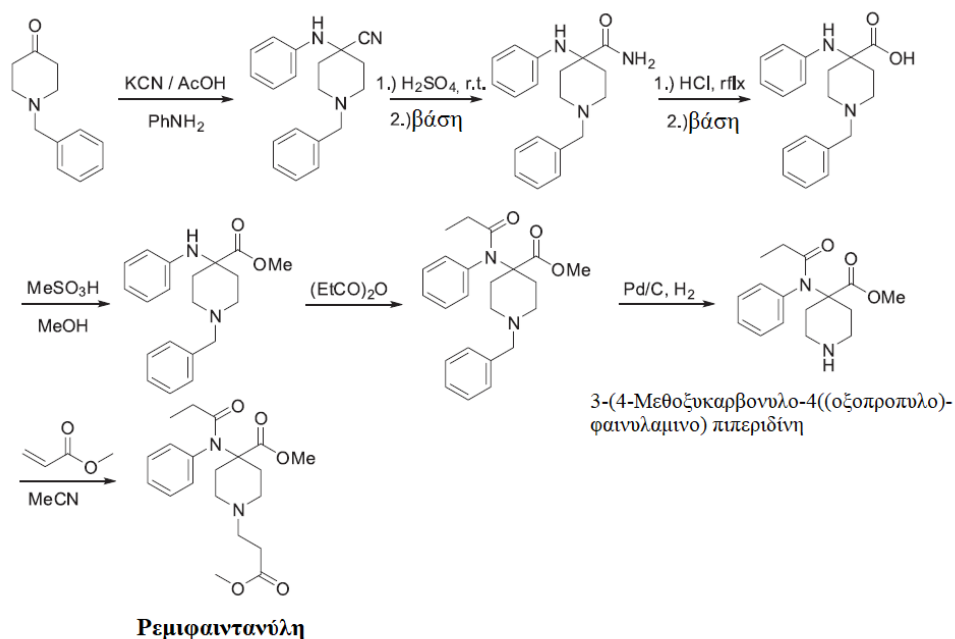
### ΥΠΟΚΕΦΑΛΑΙΟ 3Α: Ρεμφαιντανύλη

#### Χημικές ιδιότητες

Η ρεμφαιντανύλη (Εικ.7) είναι ένα δομικό ανάλογο της φαιντανύλης που ανήκει στην κατηγορία των φαινυλοπιπεριδινών. Η IUPAC ονομασία της είναι μεθυλ-1-(2-μεθοξυκαρβονυλαιθυλο)-4-(φαινυλοπροπανοϋλαμινο)-πιπεριδινό-4 καρβοξυλικός εστέρας ενώ άλλες εμπορικές ονομασίες είναι, μεθυλεστέρας του 3-(4-μεθοξυκαρβονυλο-4[(οξοπροπυλο)-φαινυλαμινο]-1-πιπεριδινό]-προπανοϊκού οξέος, GI 87084B, remifentanil κ.α.. Η ουσία είναι εμπορικά διαθέσιμη είτε σαν βάση με το μοριακό τύπο  $C_{20}H_{28}N_2O_5$  (με μοριακό βάρος 376.453 g/mol), είτε με τη μορφή του υδροχλωρικού της άλατος με μοριακό τύπο  $C_{20}H_{28}N_2O_5 \cdot HCl$  (μοριακό βάρος 412.91 g/mol), είτε με τη μορφή του τριφθοροξικού άλατος της με μοριακό τύπο  $C_{19}H_{26}N_2O_5 \cdot CF_3COOH$  (μοριακό βάρος 476.4 g/mol). Η ρεμφαιντανύλη είναι λευκό κρυσταλλικό στερεό και η διαλυτότητα της ουσίας είναι 0.591 g/l. Η ουσία διαλύεται εύκολα σε νερό, φυσιολογικό ορό και σε διάλυμα λακτόζης Ringer. Οι φυσικοχημικές ιδιότητες της ρεμφαιντανύλης έχουν εξαιρετικές εφαρμογές στην κλινική ιατρική. Όπως και τα υπόλοιπα παράγωγα της φαιντανύλης έτσι και η ρεμφαιντανύλη είναι μια ασθενής βάση που έχει μεγάλη λιποδιαλυτότητα (συντελεστής κατανομής οκτανόλης/νερού 19.9 σε pH 7.4). Η ουσία σε φυσιολογικό pH, βρίσκεται κυρίως στη μη ιονισμένη μορφή της ( $pK_a=7.51$ ) [137-142].

#### Σύνθεση

Η συνθετική πορεία της ρεμφαιντανύλης περιγράφηκε για πρώτη φορά στην Ευρωπαϊκή πατέντα με αριθμό EP0383579, το 1990. Ξεκινάει με την *N*-βενζυλοπιπεριδ-4-όνη και την εισαγωγή στη θέση 4 του ετεροκυκλικού σκελετού, μίας *N*-φαινυλαμίνης και μίας ομάδας νιτριλίου. Ακολουθεί υδρόλυση του νιτριλίου με μία πορεία δύο σταδίων προκειμένου να αποφευχθεί ο σχηματισμός του αδιάλυτου και μη δραστικού θειϊκού προϊόντος. Το αμίδιο που προκύπτει, από το πρώτο στάδιο, υπόκειται σε όξινη υδρόλυση και δίνει το αντίστοιχο καρβοξυλικό οξύ, το οποίο αντιδρά με μεθανοσουλφονικό οξύ και δίνει τον μεθυλεστέρα του οξέος. Η ενδιάμεση διαμίνη αντιδρά με οξικό ανυδρίτη και ακολουθεί υδρογόνωση με παλλάδιο. Η πορεία κλείνει με αντίδραση της 3-(4-μεθοξυκαρβονυλο-4((οξοπροπυλο)-φαινυλαμινο)-πιπεριδίνης με ακρυλικό μεθύλιο και δίνει την ρεμφαιντανύλη με σημείο τήξης 212-214 ° C και απόδοση 97% (Εικ.5) [143-144].



**Εικόνα 5.** Συνθετική πορεία ρεμφαιντανύλης όπως περιγράφεται στην Ευρωπαϊκή πατέντα EP0383579 [Mathia et al., 2012].

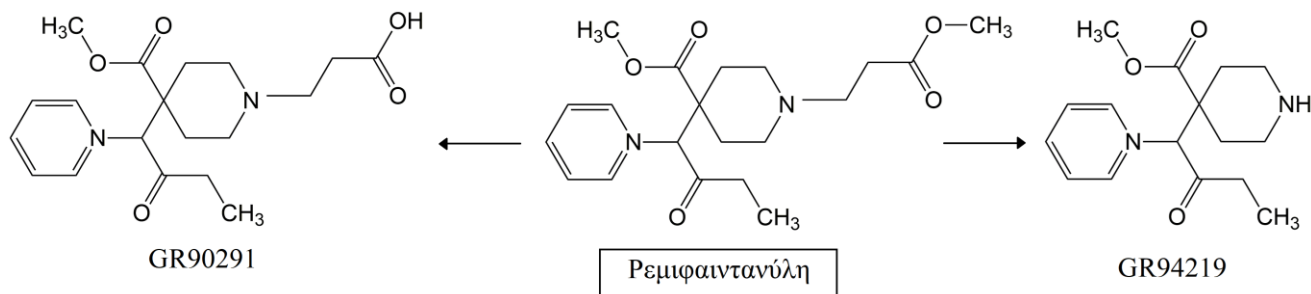
## Τρόποι χορήγησης

Η ρεμφαιντανύλη χορηγείται στους ενήλικες σε μορφή υδροχλωρικής ρεμφαιντανύλης, μόνο με ενδοφλέβια έγχυση, σε δόσεις κυμαινόμενες από 0.1 (μg/kg)/min έως 0.5 (μg/kg)/min. Οι ρυθμοί έγχυσης που χρησιμοποιούνται για την επαγωγή της αναισθησίας είναι 0.05-1 (μg/kg)/min, συνδυαστικά με έναν υπνωτικό παράγοντα (ανάλογα με την ηλικία του ασθενούς, την σοβαρότητα της ασθένειας και την επιθετικότητα της χειρουργικής επέμβασης). Οι κλινικά χρησιμοποιούμενοι ρυθμοί έγχυσης της ρεμφαιντανύλης για τη διατήρηση της αναισθησίας ποικίλουν αλλά κυμαίνονται συνήθως από 0.1 έως 1 (μg/kg)/min. Τέλος για την μετεγχειτηρική αναλγησία ο κλινικά προτεινόμενος ρυθμός έγχυσης βρίσκεται στο 0.1 (μg/kg)/min [145-146].

## Φαρμακοκινητική

Ο απαιτούμενος χρόνος για επίτευξη της μέγιστης συγκέντρωσης στο αίμα και της μέγιστης επίδρασης βρέθηκε ότι είναι 1.6 λεπτά. Η ρεμφαιντανύλη σε ενδοφλέβια χορήγηση εμφανίζει χρόνο ημιζωής 3-10 λεπτά. Περίπου το 70 % του φαρμάκου συνδέεται με τις πρωτεΐνες του πλάσματος ενώ κατανάμεται καλά πέραν του αγγειακού συστήματος με φαινομενικό όγκο κατανομής 100 mL/kg. Σε αντίθεση με άλλα οπιοειδή που υφίστανται εκτεταμένη βιομετρατοπή στο ήπαρ, η βιομετρατοπή της ρεμφαιντανύλης επάγεται με υδρόλυση του εστερικού δεσμού του προπανοϊκού οξέος και του μεθυλεστέρα, από μη ειδικές εστεράσες των ιστών και του πλάσματος. Αυτή η πορεία αποτελεί την κύρια πορεία βιομετρατοπής της ρεμφαιντανύλης (>95%) και ο μεταβολίτης του καρβοξυλικού οξέος που απελευθερώνεται ονομάζεται GR90291. Σύμφωνα με μελέτες ο GR90291 είναι σχετικά

ανενεργός καθώς έχει το 1/4600 της δραστηριότητας της μητρικής ένωσης. Ο μεταβολίτης αυτός, αποβάλλεται αμετάβλητος στα ούρα και ως εκ τούτου εξαρτάται από μηχανισμούς νεφρικής κάθαρσης. Η ρεμφαιντανύλη υφίσταται επίσης *N*-απαλκυλίωση προς το μεταβολίτη GR94219 (Εικ. 6) [147-155].



Εικόνα 6. Οι δύο κυριότεροι μεταβολίτες της ρεμφαιντανύλης [Egan, 1998].

### Φαρμακοδυναμική – Μηχανισμός δράσης

Η ρεμφαιντανύλη έχει αποδειχθεί ότι *in vitro* αλληλεπιδρά στερεοειδικά με τον  $\mu$ - υποδοχέα των οπιοειδών στον εγκέφαλο. Επίσης έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να αναστρέψει την σύνδεση της ναλοξόνης με τον  $\mu$ -υποδοχέα των οπιοειδών στον εγκέφαλο σε μελέτες που έγιναν σε πειραματόζωα αλλά και σε ανθρώπους. Ως αγωνιστής του  $\mu$ -υποδοχέα, η ρεμφαιντανύλη μπορεί να παραγάγει όλες τις επιδράσεις που παράγονται από τα οπιοειδή. Ως εκ τούτου μπορεί να προκαλέσει δόσοεξαρτώμενη αναλγησία και καταστολή. Ικανοποιητικότερη αναλγησία επιτυγχάνεται καλύτερα σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις φαρμάκου (0.4  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ) από ότι σε μικρότερες (0.2  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ), ενώ η μέση αποτελεσματική δόση ( $\text{ED}_{50}$ ) του φαρμάκου προκειμένου να κατασταλούν όλα τα ερεθίσματα του ασθενούς, είναι 0.52  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  [156-161].

### Θεραπευτικές Ενδείξεις

Η ρεμφαιντανύλη χρησιμοποιείται ως αναλγητικό κατά την επαγωγή και την διατήρηση της γενικής αναισθησίας σε χειρουργικές επεμβάσεις. Επίσης χρησιμοποιείται για την διατήρηση της αναλγησίας κατά την μετεγχειρητική περίοδο σε ενήλικες ασθενείς, υπό την άμεση ιατρική επίβλεψη και ως αναλγητικό στο πλαίσιο της παρηγορητικής φροντίδας. Η ουσία χρησιμοποιείται στην αναλγησία, λόγω του ταχέος χρόνου έναρξης δράσης και του ταχέος χρόνου αποκατάστασης του ασθενούς. Η χορήγηση ρεμφαιντανύλης εφαρμόζεται κλινικά σε περιπτώσεις όπου είτε απαιτείται γρήγορη ανάρρωση του ασθενούς, είτε υπάρχει άμεση ανάγκη για αναισθησία. Η ρεμφαιντανύλη λόγω της φαρμακοκινητικής της μπορεί να εγχυθεί σε αξιόλογα επίπεδα στο αίμα χωρίς να απαιτείται μετά μηχανική υποστήριξη της αναπνοής του ασθενούς [154, 162-163].

Η ρεμφαιντανύλη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως συμπλήρωμα στη γενική αναισθησία σε συνδυασμό με υπνωτικές ουσίες όπως η προποφόλη. Σε συνδυασμό με τη προποφόλη μπορεί να

δώσει ικανοποιητικές συνθήκες για την τραχειακή διασωλήνωση του ασθενούς χωρίς την χρήση μυοχαλαρωτικών. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί επίσης σε χαμηλές δόσεις ως συμπλήρωμα μαζί με εισπνεόμενο αναισθητικό χωρίς τη χρήση μυοχαλαρωτικών [164-170].

Μία μελέτη έχει καταδείξει την χρήση της ρεμφαιντανύλης στη μαιευτική αναισθησία. Η μελέτη αυτή τεκμηριώνει την ασφάλεια της ενδοφλέβιας έγχυσης ρεμφαιντανύλης κατά τη διάρκεια καισαρικής τομής με επισκληρίδιο. Μια άλλη έρευνα υποστηρίζει ότι η ρεμφαιντανύλη μπορεί χρησιμοποιηθεί ως συμπληρωματικό αναλγητικό κατά τη διαδικασία του τοκετού με έγχυση ή και με καθετηριασμό. Παρόλα αυτά η ουσία δεν έχει εγκριθεί για χρήση στην μαιευτική αναισθησία από τον FDA [171-172].

Η ρεμφαιντανύλη έχει επίσης εγκριθεί για την αντιμετώπιση του οξέος μετεγχειρητικού πόνου στην μονάδα εντατικής φροντίδας. Έχει χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά για τη διενέργεια κρανιοτομών, χειρουργείων σπονδυλικής στήλης, καρδιοχειρουργικών επεμβάσεων και σε χειρουργεία γαστρεντερικής παράκαμψης. Γενικά η ρεμφαιντανύλη πλεονεκτεί έναντι άλλων οπιοειδών, λόγω της γρήγορης μετεγχειρητικής ανάκαμψης του ασθενούς [173-179].

### **Ανεπιθύμητες ενέργειες**

Οι ανεπιθύμητες ενέργειες της ουσίας στον άνθρωπο είναι δοσο-εξαρτώμενες και παρόμοιες με αυτές άλλων οπιοειδών. Οι φαρμακολογικές επιδράσεις της ουσίας εξαρτώνται από τη συγκέντρωσή της στο αίμα, γεγονός που επιτρέπει μία πολύ καλή συσχέτιση μεταξύ δόσης φαρμάκου, επιπέδων στο αίμα και απόκρισης.

Η ρεμφαιντανύλη προκαλεί αναπνευστική καταστολή με άμεση επίδραση στα αναπνευστικά κέντρα του εγκεφάλου. Η καταστολή αυτή συνεπάγεται μείωση της απόκρισης των αναπνευστικών κέντρων του εγκεφάλου. Η ουσία προκαλεί μύση, ακόμα και στο απόλυτο σκοτάδι ενώ μπορεί να προκαλέσει μυδρίαση σε περιπτώσεις υπερδοσολογιών.

Η ρεμφαιντανύλη προκαλεί αύξηση της κινητικότητας του γαστρεντερικού σωλήνα που μπορεί να συνδέεται με αύξηση των σπασμών των μυών του στομάχου και του δωδεκαδάχτυλου. Η πέψη του φαγητού στο λεπτό έντερο καθυστερείται και μειώνονται τα προωθητικά περισταλτικά κύματα στο κόλον, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε δυσκοιλιότητα. Άλλες επιδράσεις μπορεί να περιλαμβάνουν μείωση των χολικών και παγκρεατικών εκκρίσεων, σπασμό του σφιγκτήρα Oddi και αυξήσεις στα επίπεδα της αμυλάσης του ορού.

Παράγει περιφερική αγγειοδιαστολή που μπορεί να οδηγήσει σε ορθοστατική υπόταση ή λιποθυμία. Η απελευθέρωση ισταμίνης και η αγγειοδιαστολή μπορεί να οδηγήσει σε κνησμό, έξαψη, ερεθισμό ματιών, εφίδρωση και/ή ορθοστατική υπόταση.

Η ρεμφαιντανύλη αναστέλλει την έκκριση της φλοιοεπινεφριδιοτρόπου ορμόνης (ACTH), της κορτιζόλης και της ωχρινοτρόπου ορμόνης (LH) σε ανθρώπους. Μπορεί επίσης να διεγείρει την προλακτίνη, την έκκριση της αυξητικής ορμόνης (GH), και την έκκριση της παγκρεατικής ινσουλίνης και γλυκαγόνης.

Αλλαγές στις αιμοδυναμικές μεταβλητές παρατηρούνται από 3 έως 5 λεπτά μίας εφάπαξ δόσης της ουσίας ή μίας απότομης αύξησης στο ρυθμό έγχυσης. Όπου κρίνεται σκόπιμο, η βραδυκαρδία και η υπόταση αναστέλλονται με μείωση του ρυθμού έγχυσης ή ταυτόχρονη χορήγηση αγγειοσυσπαστικών

### **Αλληλεπιδράσεις με άλλα φάρμακα**

Η ταυτοχρονή λήψη βενζοδιαζεπινών, άλλων κατασταλτικών του ΚΝΣ και αιθανόλης μαζί με ρεμφαιντανύλη, αντενδείκνυται καθώς αυξάνουν τον κίνδυνο υπότασης, αναπνευστικής καταστολής, κώματος και θανάτου. Λήψη σεροτονινεργικών νευροδιαβιβαστών ή αναστολών της μονοαμινοοξειδάσης μαζί με οπιοειδή όπως η ρεμφαιντανύλη μπορεί να προκαλέσει σεροτονινεργικό σύνδρομο. Συγχορήγηση με άλλους αγωνιστές των μ-, κ- και σ- υποδοχέων του ΚΝΣ όπως η βουτορφανόλη, η ναλβουφίνη, η πενταζοκίνη και η βουπρενορφίνη μπορεί να προκαλέσει μείωση της αναλγητικής δράσης της ρεμφαιντανύλης. Σε κάθε περίπτωση οι ασθενείς θα πρέπει να βρίσκονται υπό διαρκή παρακολούθηση ώστε να διαπιστωθούν τυχόν σημάδια αναπνευστικής καταστολής και να αποφεύγεται η κατανάλωση αλκοολ για 24 ώρες μετά την περάτωση του χειρουργείου και τη χορήγηση της ρεμφαιντανύλης. Αν υπάρχει η υποψία για ύπαρξη συνδρόμου σεροτονίνης διακόπτεται αμέσως η χορήγηση της ουσίας [151, 154].

### **Εξαρτησιογόνος δράση**

Η ρεμφαιντανύλη ως αγωνιστής των μ-υποδοχέων των οπιοειδών μπορεί να προκαλέσει ευφορία και ως εκ τούτου μπορεί να χρησιμοποιηθεί στα παράνομα κυκλώματα διακίνησης και χρήσης ναρκωτικών ουσιών. Παρόλα αυτά, λόγω του γρήγορου μεταβολισμού της υπάρχουν ελάχιστες αναφορές για παράνομη χρήση της ουσίας.

## ΥΠΟΚΕΦΑΛΑΙΟ 3B: Παράγωγα φαιντανύλης χωρίς θεραπευτική χρήση

### 3B.1 Χημικές ιδιότητες

#### Βουτυρυλοφαιντανύλη

Η βουτυρυλοφαιντανύλη είναι ένας ισχυρός, μικρής διάρκειας, αγωνιστής των  $\mu$ - υποδοχέων των οπιοειδών με μία *N*-προπιονυλο-ομάδα στην θέση της ακυλομάδας της φαιντανύλης. Η IUPAC ονομασία της είναι *N*-φαινυλ-*N*-[1-(2-φαινυλαιθυλ)πιπεριδιν-4-υλο]βουταναμίδιο αλλά συναντάται και με άλλες ονομασίες όπως *N*-(1-φαινυλαιθυλοπιπεριδιν-4-υλο)-*N*-φαινυλοβουταναμίδιο, *N*-(1-φαινυλαιθυλοπιπεριδιν-4-υλο)-*N*-φαινυλοβουταναμίδιο, NIH 10486 και επίσης τα bf ή b-f. Πωλείται σαν βάση με τον μοριακό τύπο  $C_{23}H_{30}N_2O$  (με μοριακό βάρος 350.503 g/mol) και σαν υδροχλωρικό άλας με τον μοριακό τύπο  $C_{23}H_{30}N_2O \cdot HCl$  (με μοριακό βάρος 386.9639 g/mol). Η φυσική κατάσταση της ουσίας είναι μια λευκή ή υποκίτρινη κρυσταλλική σκόνη. Δεν υπάρχουν δεδομένα σχετικά με το σημείο τήξης, το σημείο βρασμού και την διαλυτότητα της ουσίας. Η βουτυρυλοφαιντανύλη δεν περιλαμβάνεται στις συνήθεις προκαταρκτικές τοξικολογικές αναλύσεις (screening tests) που γίνονται για ναρκωτικές ουσίες, οπότε μπορεί σε πολλές περιπτώσεις να μην ανιχνεύεται [180-184].

#### Ακετυλοφαιντανύλη

Η ακετυλοφαιντανύλη είναι ένα ισχυρό συνθετικό οπιοειδές που ανήκει στην οικογένεια των φαινυλοπιπεριδινών. Δομικά μοιάζει με την φαιντανύλη, όπου η ομάδα του φαινυλοπροπαναμίδιου έχει αντικατασταθεί από μία ομάδα φαινυλοακεταμίδιου. Η IUPAC ονομασία της είναι *N*-[1-(2-φαινυλαιθυλ)-4-πιπεριδυλο]-φαινυλακεταμίδιο, ενώ άλλες ονομασίες που χρησιμοποιούνται είναι *N*-(1-φαινυλαιθυλ-4-πιπεριδυλ)-ακετανιλίδιο, *N*-φαινυλ-*N*-[1-(2-φαινυλαιθυλ)-4-πιπεριδυλο]-ακεταμίδιο, δισμεθυλοφαιντανύλη, ακετυλο- ανάλογο της φαιντανύλης, NIH 10485 κ.α. Πωλείται είτε ως βάση με μοριακό τύπο  $C_{21}H_{26}N_2O$  (με μοριακό βάρος 322.44 g/mol και σημείο βρασμού 453.8 ° C) είτε ως το υδροχλωρικό της άλας με μοριακό τύπο  $C_{21}H_{26}N_2O \cdot HCl$  (με μοριακό βάρος 358.9 g/mol και σημείο τήξης 256.6 ° C). Η ακετυλοφαιντανύλη ως βάση είναι ελαφρώς διαλυτή σε διμεθυλοσουλφοξείδιο στα 5 mg/mL, όταν θερμανθεί [185-188].

#### Οκφαιντανύλη

Η οκφαιντανύλη είναι ένα δομικό ανάλογο της φαιντανύλης το οποίο έχει μία μεθοξυ- ομάδα αντί για μία μεθυλο- ομάδα και ένα άτομο φθορίου στην ortho- θέση του δακτυλίου της ανιλίνης. Η IUPAC ονομασία της είναι *N*-(2-φθοροφαινυλ)-2-μεθοξυ-*N*-[1-(2-φαινυλαιθυλ)πιπεριδιν-4-υλο]ακεταμίδιο, ενώ άλλες ονομασίες είναι 1-(2-φαινυλαιθυλ)-4-[*N*-(2-



φθοροφαινυλ)μεθοξυακεταμίδιο]πιπεριδίνη, ofentanilum, UNII-MX52WBC8EV κ.α. Πωλείται είτε σαν βάση με το μοριακό τύπο  $C_{22}H_{27}FN_2O_2$  (με μοριακό βάρος 370.206 g/mol) είτε με τη μορφή του υδροχλωρικού άλατος της με τον μοριακό τύπο  $C_{22}H_{27}FN_2O_2 \cdot HCl$  (με μοριακό βάρος 406.9 g/mol) ως μία λευκή ή καφέ μεταλλική σκόνη. Το σημείο τήξης της είναι 183-184 °C και δεν υπάρχουν δεδομένα που να προσδιορίζουν το σημείο βρασμού της. Η ουσία είναι διαλυτή σε υδατικά μέσα με pH κάτω από 7 ( $pK_a=7.82$ ) και δεν διασπάται υπό συνθήκες μέτριας θερμότητας και φωτός αν αποθηκευτεί σωστά [189-195].

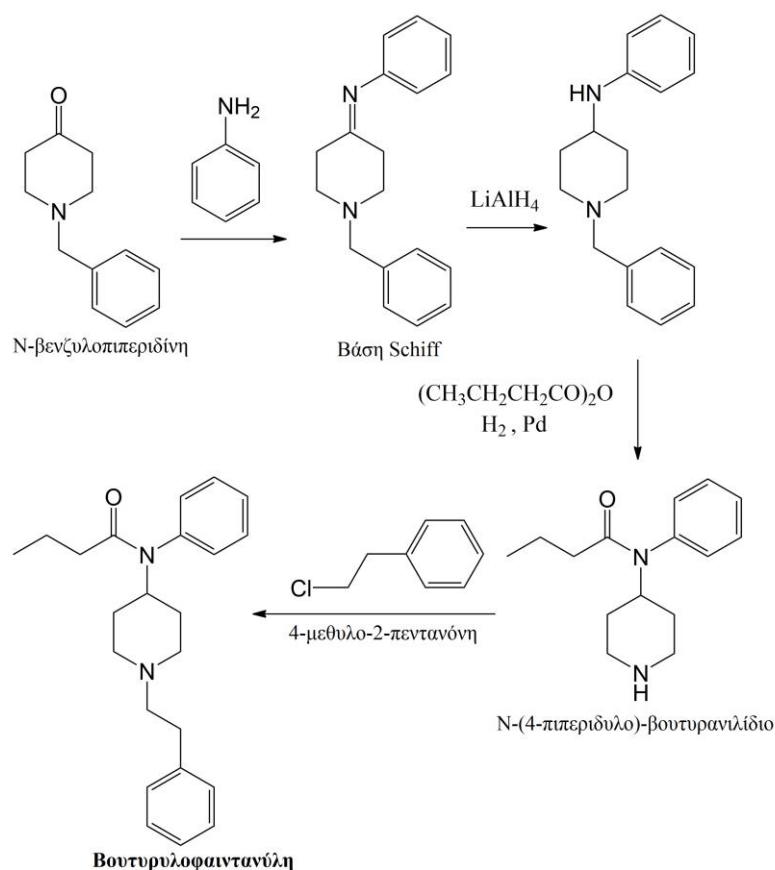
### Φουρανυλοφαιτανύλη

Η IUPAC ονομασία της φουρανυλοφαιτανύλης είναι *N*-φαινυλ-*N*-[1-(2-φαινυλαιθυλ)πιπεριδιν-4-υλο]φουραν-2-καρβοξαμίδιο. Άλλες χημικές ή εμπορικές ονομασίες είναι UNII-3F7C9J1LS7, 3F7C9J1LS7 και Fu-F. Πωλείται είτε σαν βάση με το μοριακό τύπο  $C_{24}H_{26}N_2O_2$  (με μοριακό βάρος, 374.484 g/mol) είτε σαν υδροχλωρικό άλας με μοριακό τύπο  $C_{24}H_{26}N_2O_2 \cdot HCl$  (με μοριακό βάρος, 411 g/mol), σαν λευκή ή υπόλευκη σκόνη. Το σημείο τήξης του υδροχλωρικού άλατος της έχει βρεθεί στους 235 °C. Δεν υπάρχουν διαθέσιμες πληροφορίες σχετικά με το φυσικοχημικές της ιδιότητες [196-200].

## 3B.2 Σύνθεση

### Βουτυρυλοφαιτανύλη

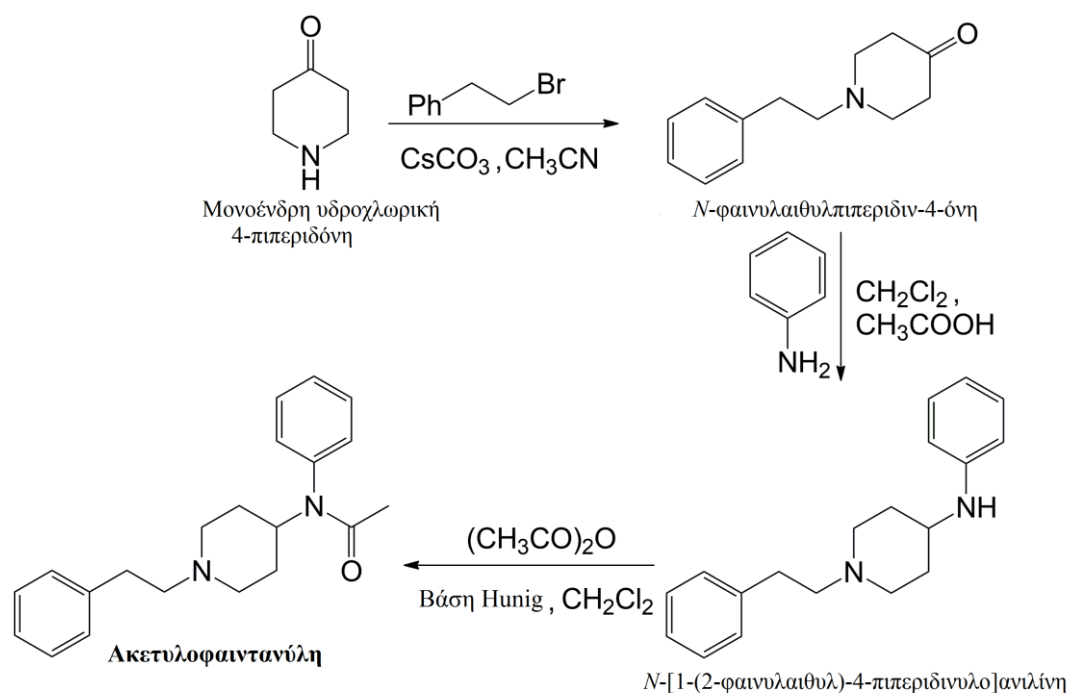
Η σύνθεση της βουτυρυλοφαιτανύλης περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1961 από τον Paul Janssen σε μία πατέντα των Ηνωμένων Πολιτειών. Η διαδικασία περιλαμβάνει αντίδραση μίας *N*-βενζυλοπιπεριδίνης με μία αρυλαμίνη που δίνει μία βάση Schiff με την μοριακή δομή που φαίνεται στην **Εικόνα 7** και αναγωγή του διπλού δεσμού με  $LiAlH_4$  (τετραϋδραργλικό λίθιο) που οδηγεί στην αντίστοιχη διαμίνη. Η προκύπτουσα διαμίνη αντιδρά με βουτυρικό ανυδρίτη προς ένα αμίδιο. Ακολουθεί υδρογόνωση σε παλλάδιο και αποβενζυλίωση (Εικ.7). Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε 4-μεθυλο-2-πεντανόνη, όπου το *N*-(4-πιπεριδυλο)-βουτυρανιλίδιο σχηματίζει ένα τεταρτοταγές αμμωνιακό άλας. Το διάλυμα θερμαίνεται για 80 ώρες, διηθείται και διαλύεται σε δισοπροπυλαιθέρα. Αέριο υδροχλώριο εισάγεται μέσα στο διάλυμα αποδίδοντας το υδροχλωρικό άλας της ουσίας με σημείο τήξης 210-211 °C. Η βουτυρυλοφαιτανύλη μπορεί επίσης να συντεθεί με τη μέθοδο Siegfried από την *N*-φαινυλαιθυλο-πιπεριδίνη (NPP) και την 4-ανιλινο-*N*-φαινυλαιθυλο-πιπεριδίνη (4-ANPP) [201-202].



Εικόνα 7. Συνθετική πορεία βουτυρυλοφαιτανύλης όπως περιγράφηκε από τον Janssen και συν. [Janssen et al., 1961].

## Ακετυλοφαιτανύλη

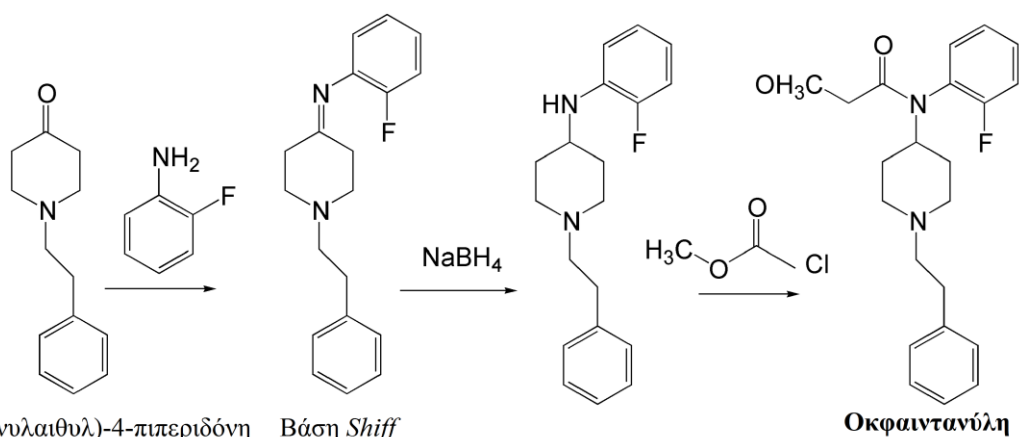
Πολλές συνθετικές πορείες έχουν περιγραφεί μέχρι τώρα για την ακετυλοφαιτανύλη με πρώτη αυτή του Janssen ο οποίος το συνέθεσε από την *N*-βενζυλ-4-πιπεριδόνη. Η πιο πρόσφατη συνθετική οδός αποτελεί μία πορεία 3 σταδίων με μεγάλες αποδόσεις. Ξεκινάει με μία αλκυλίωση του εμπορικά διαθέσιμου υδροχλωρικού άλατος της μονοένυδρης 4-πιπεριδόνης, με 2-(βρωμοαιθυλο)-βενζόλιο, παρουσία ανθρακικού καυσίου ( $\text{CS}_2\text{CO}_3$ ). Η αντίδραση δίνει την αλκυλιωμένη πιπεριδίνη, *N*-φαινυλαιθυλπυπεριδιν-4-όνη, με απόδοση 88%. Στην συνέχεια ακολουθεί αναγωγική αμίνωση της τελευταίας με βοροϋδρίδιο του νατρίου ( $\text{NaBH}_4$ ), παρουσία οξικού οξέος, που δίνει την *N*-[1-(2-φαινυλαιθυλ)-4-πιπεριδινυλο]-ανιλίνη με εξαιρετική απόδοση 91%. Τελικώς, η *N*-[1-(2-φαινυλαιθυλ)-4-πιπεριδινυλο]-ανιλίνη ακυλιώνεται με οξικό ανυδρίτη παρουσία της βάσης Hunig και δίνει την ακετυλοφαιτανύλη με απόδοση 98%, ως ένα ελαφρώς κίτρινο ελαιώδες υγρό. Η ακετυλοφαιτανύλη επίσης ταυτοποιείται ως πρόσμιξη, κατά τη διάρκεια της σύνθεσης της φαιτανύλης. Θεωρητικά σχηματίζεται κατά τη διάρκεια ακυλίωσης του αζώτου της ανιλίνης, με τον προπιονικό ανυδρίτη, όταν αυτός έχει ρυπανθεί με οξικό ανυδρίτη (Εικ.8) [203-207].



Εικόνα 8. Συνθετική πορεία ακετολοφαιντανύλης όπως περιγράφηκε από τον Valdez και συν. [Valdez et al., 2014].

## Οκφαιντανύλη

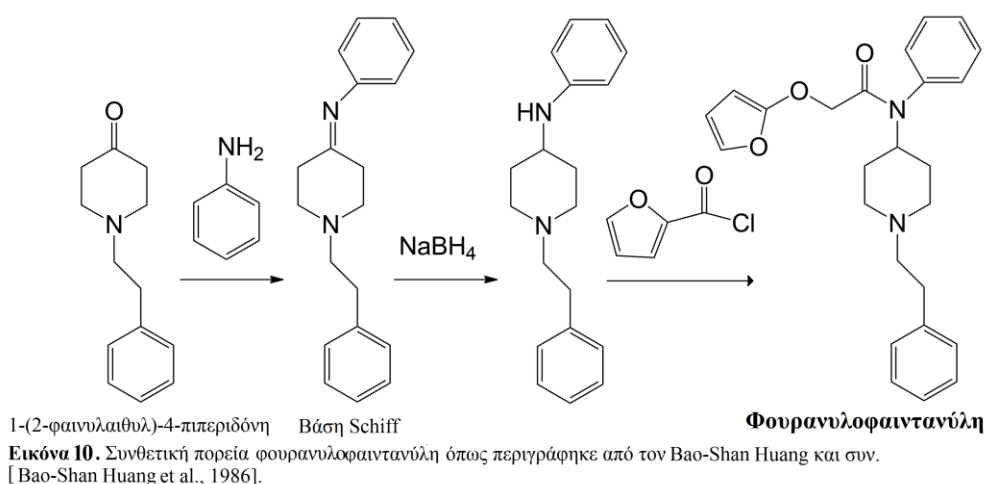
Η σύνθεση της οκφαιντανύλης, είχε αρχικά περιγραφεί σε μία πατέντα των Ηνωμένων Πολιτειών, με αριθμό 4,584,303, από τον Bao-Shan Huang και τους συνεργάτες του το 1986. Η συνθετική πορεία ξεκινά με αντίδραση της 1-(2-φαινυλαιθυλ)-4-πιπεριδόνης με την 2-φθοροανιλίνη και εισαγωγή μίας ομάδας φθορίου στην ορθο- θέση. Η προκύπτουσα ένωση είναι μία βάση Schiff που στην συνέχεια ανάγεται στην αντίστοιχη διαμίνη, με τετραϋδροβορικό νάτριο ( $\text{NaBH}_4$ ) ή τετραϋδραργλικό λίθιο ( $\text{LiAlH}_4$ ). Στο τελευταίο στάδιο η δευτεροταγής αμίνη αντιδρά με το 2-μεθοξυακετολογλωρίδιο και δίνει την οκφαιντανύλη με σημείο τήξης 183-184 °C (Εικ.9) [190, 194].



Εικόνα 9. Συνθετική πορεία οκφαιντανύλης όπως περιγράφηκε από τον Bao-Shan Huang και συν. [Bao-Shan Huang et al., 1986].

## Φουραυλοφαιντανύλη

Η σύνθεση της φουραυλοφαιντανύλης περιγράφηκε για πρώτη φορά μαζί με την οκφαιντανύλη, το 1986 από τον Bao-Shan Huang και τους συνεργάτες του. Ξεκινάει με αντίδραση της 1-(2-φαινυλαιθυλ)-4-πιπεριδόνης με μία ανιλίνη. Η προκύπτουσα βάση Schiff ανάγεται με τετραϋδροβορικό νάτριο ( $\text{NaBH}_4$ ) και δίνει μία διαμίνη, η οποία αντιδρά στη συνέχεια με το 2-φουροϋλοχλωρίδιο. Η αντίδραση δίνει την φουραυλοφαιντανύλη με σημείο τήξης  $235\text{ }^\circ\text{C}$  (Εικ.10). Η φουραυλοφαιντανύλη μπορεί επίσης να συντεθεί και με τη μέθοδο Siegfried, όπως και η φαιντανύλη και η βουτυρυλοφαιντανύλη ξεκινώντας με NPP ή ANPP [34, 194, 202].



### 3B.3 Τρόποι λήψης

Η βουτυρυλοφαιντανύλη χρησιμοποιείται κυρίως με τη μορφή ρινικού σπρέι ή εισπνέεται με τη μορφή λευκής ή υποκίτρινης σκόνης. Ρινικά σπρέι και στυπόχαρτα βουτυρυλοφαιντανύλης είναι διαθέσιμα προς αγορά από λιανοπωλητές στην Ευρώπη, σε δόσεις από 0.5 έως 3 mg. Σχετικά forums επίσης αναφέρουν και άλλες τρόπους χορήγησης όπως, πρωκτικώς, ενδοφλεβίως και υπογλώσσια, ενώ παρέχεται επίσης και σε υγρή μορφή ως αλατούχο διάλυμα (για ενέσιμη χρήση ή ρινική), ως καπνιστικό υλικό, ως φυτικό υλικό εμποτισμένο με την ουσία και με τη μορφή δισκίων [117, 208-214].

Οι πιο συχνά αναφερόμενοι τρόποι χορήγησης για την ακετυλοφαιντανύλη είναι η δια του στόματος λήψη, η ενδοφλέβια ένεση, υπό μορφή σπρέι και με το κάπνισμα. Συγκεκριμένα στην Ρωσία έχει αναφερθεί υπόθεση, όπου η ακετυλοφαιντανύλη χρησιμοποιείται ως συστατικό σε μίγματα καπνού. Αναφορές όπου η ακετυλοφαιντανύλη πωλείται ως συστατικό καπνιστικού μίγματος (γνωστό ως «μπαχαρικό»), εντός της Ρώσικης Ομοσπονδίας, δίνονται και από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) εντός του 2015 [184, 215-217].

Η οκφαιντανύλη έχει αναφερθεί ότι έχει πολλές οδούς χορήγησης. Όπως έχει αναφερθεί σε υποθέσεις δηλητηριάσεων που εμπλέκουν την οκφαιντανύλη όπως και σχετικές συζητήσεις σε

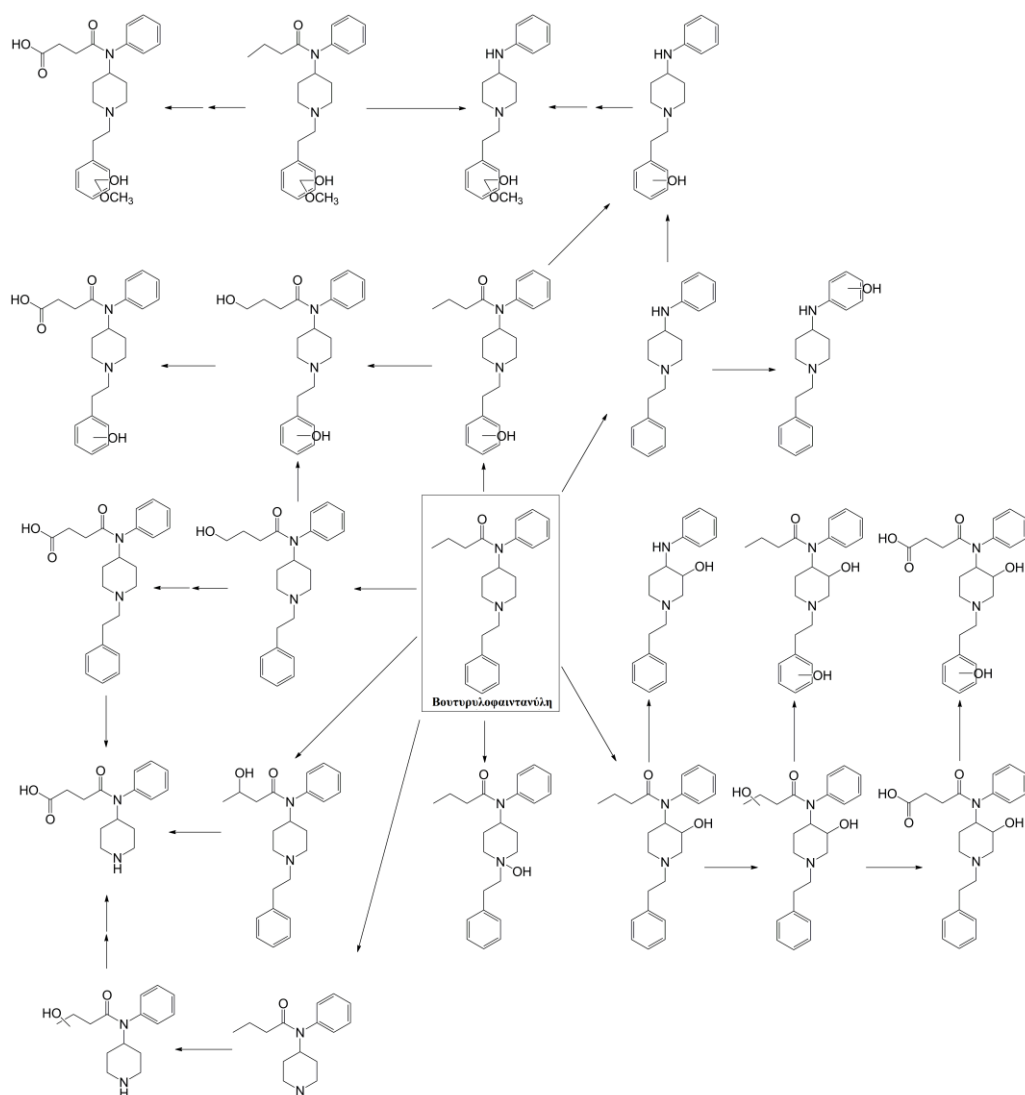
forums χρηστών, η οκφαιτανύλη μπορεί να χορηγηθεί σε ενέσιμη μορφή, να καταποθεί, να χρησιμοποιηθεί ως συστατικό καπνιστικού μίγματος αλλά και μέσω της ρινικής οδού με «σνιφάρισμα» [218-222].

Η **φουρανυλοφαιτανύλη** έχει κατασχεθεί περισσότερο σαν σκόνη ή οποία μπορεί είτε να γίνει καπνιστικό υλικό είτε ενέσιμο διάλυμα μόνη της ή ως μίγμα με άλλες ουσίες όπως φαιτανύλη, ηρωίνη, κοκαΐνη, βουτυρυλοφαιτανύλη, αλπραζολάμη, οξυκωδόνη, ακεταμινοφαΐνη, καρφαιτανύλη και την νεοεμφανισθείσα ουσία U-47700. Έχει βρεθεί επίσης ότι διακινείται υπό μορφή πλαστών χαπιών, όπως και η βουτυρυλοφαιτανύλη. Επιπροσθέτως λαμβάνεται μέσω της ρινικής οδού με τη χρήση ρινικών σπρέι. Το περιεχόμενο στο σπρέι είναι συνήθως υδατικό διάλυμα φουρανυλοφαιτανύλης σε σκόνη. Σε μια άλλη περίπτωση η φουρανυλοφαιτανύλη ταυτοποιήθηκε σε ένα μπουκάλι ρινικού σπρέι και ένα με οφθαλμικές σταγόνες. Η φουρανυλοφαιτανύλη πωλείται επίσης σε ενέσιμες μορφές, μόνη της ή σε μίγμα με μαννιτόλη ή καφεΐνη. Αυτά τα διαλύματα είναι κυρίως φουρανυλοφαιτανύλη σε μορφή σκόνης διαλυμένη σε νερό μαζί με άλλα δύο συστατικά. Ένας άλλος χρήστης έχει επίσης αναφέρει ότι δοκίμασε «γλειφιτζούρι» φουρανυλοφαιτανύλης, το οποίο του προκάλεσε αίσθημα ευφορίας εντός 15 λεπτών [223-232].

### **3B.4 Τοξικοκινητική**

#### **Βουτυρυλοφαιτανύλη**

Ο Steuer και συν. διεξήγαγαν μελέτες προκειμένου να προσδιορίσουν *in vivo* και *in vitro* τους Φάσης I και Φάσης II, μεταβολίτες της βουτυρυλοφαιτανύλης. Ένας αξιόλογος αριθμός μεταβολιτών Φάσης II ταυτοποιήθηκε, εκ των οποίων οι περισσότεροι ήταν γλυκουρονίδια ενώ ταυτοποιήθηκε και ένα προϊόν σύζευξης με θειικό οξύ. Από τους μεταβολίτες που εξήχθησαν ο Steuer και συν. κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η βουτυρυλοφαιτανύλη ακολουθεί 6 μεταβολικές οδούς οι οποίες φαίνονται στην **Εικόνα 11**. Οι οδοί αυτές είναι οι υδροξυλίωση της βουτυναμιδικής αλυσίδας σε δύο θέσεις, στο φαιναιθύλιο και στον δακτύλιο της πιπεριδίνης, ο σχηματισμός *N*-οξειδίων, η *N*-απαλκυλίωση σε νορβουτυρυλοφαιτανύλη και εξάλειψη της βουτυραλδεΐδης. Συνδυασμοί όλων αυτών των οδών μπορούν να παρατηρηθούν. *In vitro*, η υδροξυλίωση και η *N*-απαλκυλίωση βρέθηκαν να είναι οι επικρατέστερες μεταβολικές οδοί, ενώ *in vivo*, η υδροξυλίωση της βουτυναμιδικής αλυσίδας ακολουθούμενη από οξείδωση προς καρβοξυλικό οξύ, βρέθηκε πως επικράτησε. Ο μεταβολισμός της βουτυρυλοφαιτανύλης βρέθηκε ότι λαμβάνει χώρα κυρίως στα ένζυμα CYP2D6 και CYP3A4 [233].

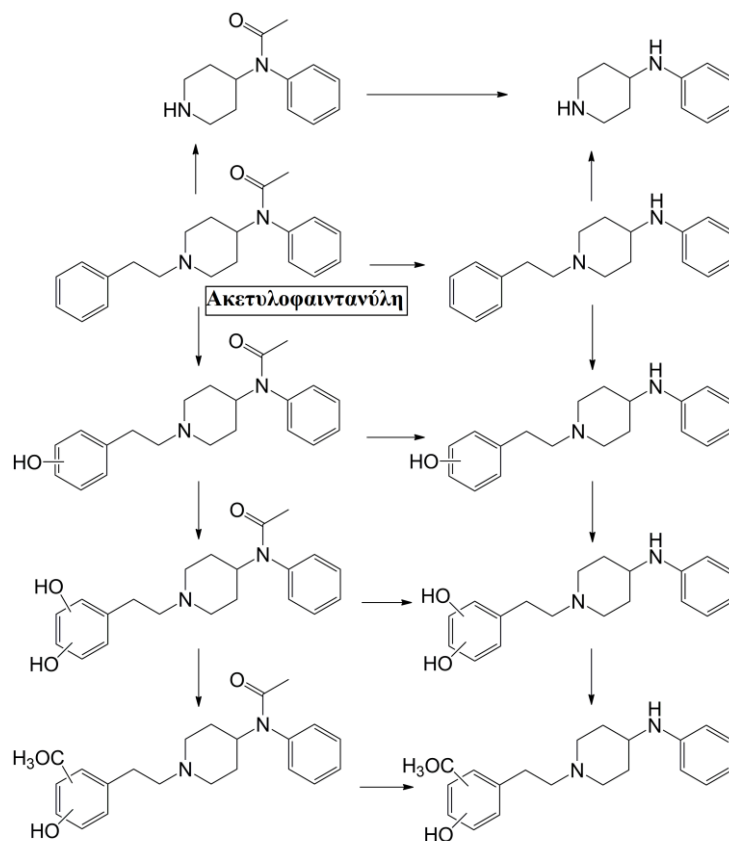


**Εικόνα 11.** Οι πορείες βιομετατροπής της βουτυροφαινανύλης όπως προκύπτουν από *in vivo* και *in vitro* μελέτες του Steuer και συν. [Steuer et al., 2016].

## Ακετυλοφαινανύλη

Ο Patton και συν., διεξήγαγαν προκαταρκτικές μεταβολικές μελέτες σχετικά με την βιομετατροπή της ακετυλοφαινανύλης και κατέληξαν στο ότι η ακετυλοφαινανύλη βιομετατρέπεται σε ακετυλονορφαινανύλη με τη βοήθεια του κυτοχρώματος P450 (**Εικ.12**). Ως εκ τούτου η τελευταία θεωρήθηκε ο κυριότερος μεταβολίτης της ουσίας. Παρόλα αυτά απαιτούνται επιπρόσθετες τοξικοκινητικές μελέτες προκειμένου να προσδιοριστούν οι μεταβολικές οδοί που είναι υπεύθυνες για την κάθαρση και απέκκριση του φαρμάκου [234].

Ο Melent'ev και συν., προσδιόρισαν τους μεταβολίτες της ακετυλοφαινανύλης σε ούρα ανθρώπων και πρότειναν πιθανά μεταβολικά μονοπάτια. Η *N*-απαλκυλιωμένη και η δισακετυλιωμένη ακετυλοφαινανύλη, βρέθηκαν ότι είναι οι κύριοι μεταβολίτες, στην πρώτη φάση μεταβολισμού της ουσίας. Στην δεύτερη φάση, λαμβάνει χώρα σύζευξη των υδροξυλιωμένων μεταβολιτών της ακετυλοφαινανύλης με την φαινυλαιθυλο- ομάδα [217].



Εικόνα 12. Πορείες βιομετατροπής ακετυλοφαιντανύλης όπως περιγράφηκαν από τον Melent ' ev και συν. [Melent ' ev et al., 2015].

## Οκφαιντανύλη

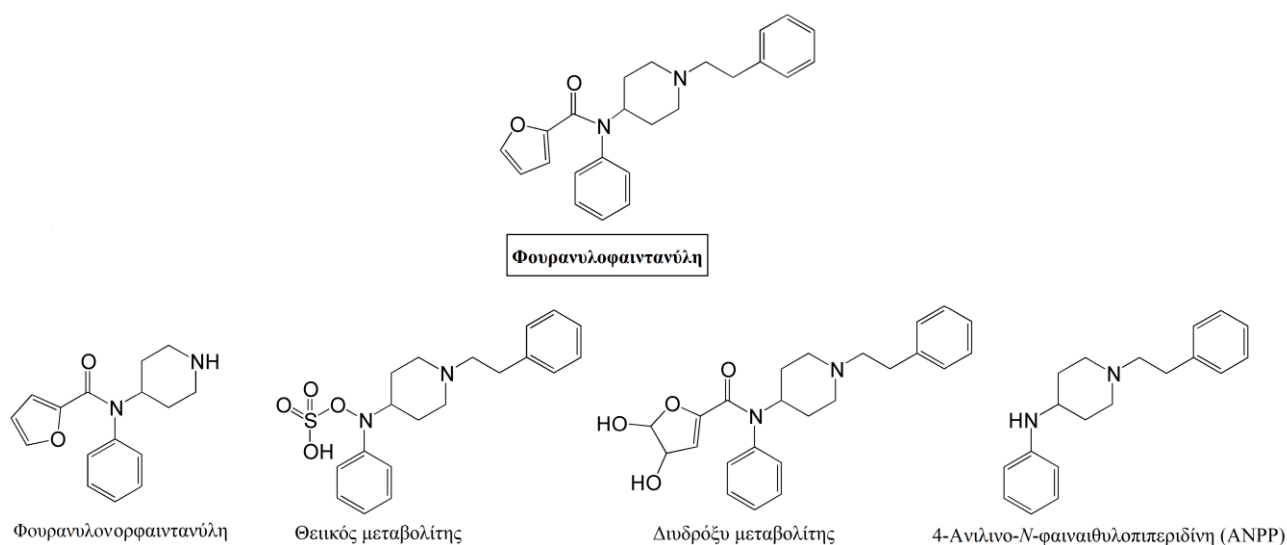
Η πορεία βιομετατροπής της οκφαιντανύλης δεν έχει μελετηθεί μέχρι πρόσφατα και ως εκ τούτου δεν μπορούν να παρατεθούν πληροφορίες σχετικά με τις μεταβολικές οδούς της

## Φουρανυλοφαιντανύλη

Ο Goggin και συν., διεξήγαγαν μεταβολικές μελέτες της φουρανυλοφαιντανύλης σε δείγματα ούρων στα οποία ταυτοποιήθηκε. Ανάμεσα στον Απρίλιο και το Σεπτέμβριο του 2016, 51 δείγματα ούρων βρέθηκαν θετικά σε φουρανυλοφαιντανύλη ύστερα από ανάλυση με LC-MS/MS. Ο *N*-απαλκυλιωμένος νορ- μεταβολίτης της βρέθηκε σε μερικά από αυτά σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις. Ως εκ τούτου τα δείγματα αναλύθηκαν περαιτέρω με UPLC-TOF MS προκειμένου να βρεθούν οι άλλοι μεταβολίτες. Ο θειϊκο- μεταβολίτης και ο διϋδροξυ- μεταβολίτης βρέθηκαν σε περισσότερο από 80% των δειγμάτων. Επιπροσθέτως, η ουσία 4-ANPP ανιχνεύθηκε στο 80% των δειγμάτων, αλλά δεν ήταν σαφές αν επρόκειτο για μεταβολίτη ή για πρόσμιξη. Οι πιθανοί μεταβολίτες της φουρανυλοφαιντανύλης παρουσιάζονται στην **Εικόνα 13** [235].

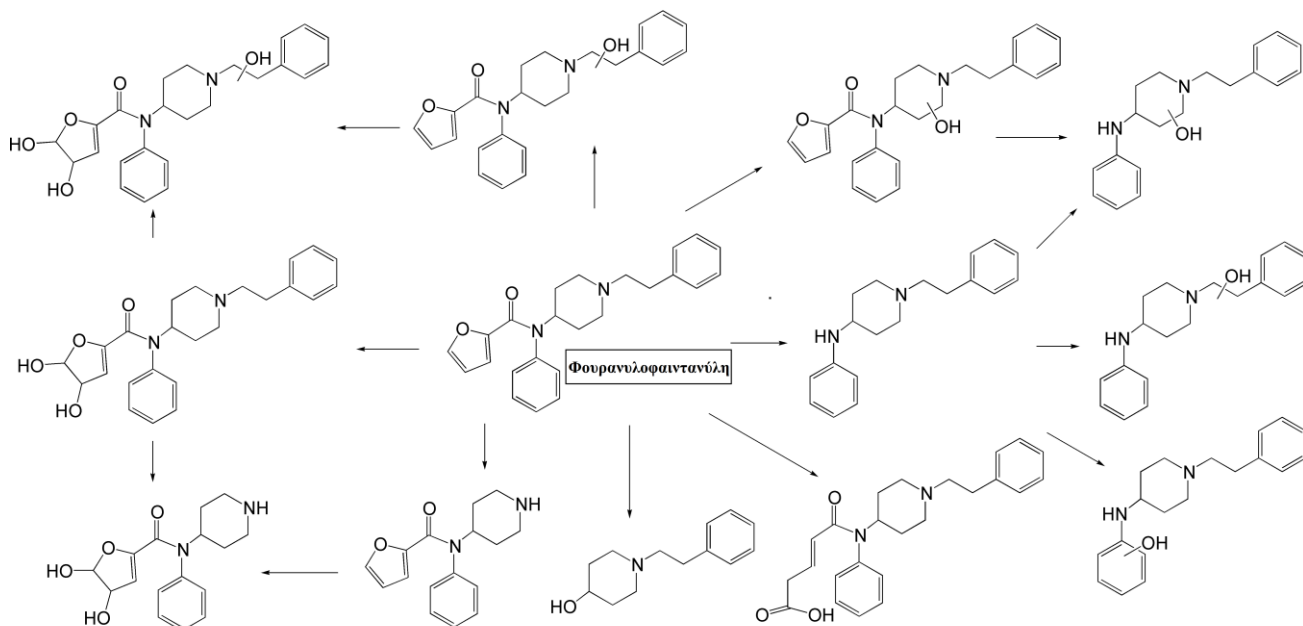
Ο Watanabe και συν., διεξήγαγαν *in vivo* και *in vitro* μεταβολικές μελέτες για τη φουρανυλοφαιντανύλη και 3 άλλα παράγωγα της φαιντανύλης. Τέσσερα δείγματα ούρων

αναλύθηκαν, με ή χωρίς ενζυμική υδρόλυση, σε χρωματογραφικό σύστημα LC-QTOF MS. Ανθρώπινα ηπατοκύτταρα επώαστηκαν με φουρανυλοφαιτανύλη και αναλύθηκαν υπό τις ίδιες χρωματογραφικές συνθήκες. Οι μεταβολίτες  $2^{75}$  φάσης, διερευνήθηκαν μετά από επώαση των ούρων με  $\beta$ -γλυκουρονιδάση/σουλφατάση. Στα μη υδρολυμένα ούρα ανιχνεύθηκαν 14 μεταβολίτες Φάσης I και Φάσης II οι οποίοι προέκυψαν από *N*-απαλκυλίωση, υδροξυλίωση, υδρόλυση αμιδίου, υδρόλυση αμιδίου ακολουθούμενη από υδροξυλίωση, υδρόλυση αμιδίου ακολουθούμενη από υδροξυλίωση και γλυκουρονιδίωση, υδρόλυση αμιδίου ακολουθούμενη από υδροξυλίωση και σουλφονιλίωση, σχηματισμός διϋδροδιόλης, σχηματισμός διϋδροδιόλης ακολουθούμενος από υδροξυλίωση, σχηματισμό διϋδροδιόλη ακολουθούμενο από *N*-απαλκυλίωση, οξειδωτική *N*-απαλκυλίωση και αναγωγή της κετο- ομάδας και τελικώς άνοιγμα του δακτυλίου της φουρανοϋλ- ομάδας και καρβοξυλίωση (Εικ.14). Ο μεταβολίτης με την μεγαλύτερη αφθονία στα δείγματα ούρων βρέθηκε πως είναι ο μεταβολίτης της φάσης I που προέκυψε από την υδρόλυση αμιδίου ενώ ο δεύτερος επικρατέστερος είναι το προϊόν σχηματισμού της διϋδροδιόλης. Στα υδρολυμένα ούρα βρέθηκαν 9 μεταβολίτες. Στα ηπατοκύτταρα, το προϊόν της *N*-απαλκυλίωσης ήταν το δεύτερο επικρατέστερο μετά από αυτό της υδρόλυσης αμιδίου ενώ δεν σχηματίστηκε το προϊόν υδρόλυσης αμιδίου/υδροξυλίωσης/γλυκουρονιδίωσης[236].



**Εικόνα 13.** Η δομή της φουρανυλοφαιτανύλης και των προτεινόμενων μεταβολιτών της σύμφωνα με τον Goggin και συν. [Goggin et al., 2017].





Εικόνα 14. Πορείες βιομετατροπής φουρανυλοφαιντανύλης σύμφωνα με τον Watanabe και συν. [Watanabe et al., 2017].

### 3B.5 Μηχανισμός δράσης

#### Βουτυρυλοφαιντανύλη

Η μέση δραστική δόση ( $ED_{50}$ ) στους αρουραίους είναι 0.220 mg/kg ενώ η τιμή της θανατηφόρας δόσης δεν έχει διερευνηθεί. Σε μελέτες που διεξήγαγαν οι Woods και συν., η βουτυρυλοφαιντανύλη φαίνεται πως εκτοπίζει την [ $^3H$ ]-ετορφίνη από τους υποδοχείς της, με μέση θεραπευτική συγκέντρωση ( $EC_{50}$ ), 58.7nM. Η βουτυρυλοφαιντανύλη αποτελεί επίσης ένα πολύ αποτελεσματικό αγωνιστή των  $\mu$ - υποδοχέων των οπιοειδών, όπως και η μορφίνη καθώς σε αντίστοιχες μελέτες βρέθηκε ότι στο μέγιστο της δράσης της είναι 10-20 φορές πιο ισχυρή από ότι η μορφίνη. Σε μία πιο πρόσφατη *in vitro* μελέτη, η βουτυρυλοφαιντανύλη βρέθηκε ότι συνδέεται με τους  $\mu$ - υποδοχείς των οπιοειδών με  $EC_{50}$ , 37 nM, έναντι 42 nM της μορφίνης. Η βουτυρυλοφαιντανύλη βρέθηκε ότι συνδέεται εκλεκτικά με τους  $\mu$ - υποδοχείς με συγκέντρωση αναστολής ( $IC_{50}$ ) 2.34 nM σε σχέση με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις στους  $\delta$ - υποδοχείς και στους  $\kappa$ - υποδοχείς, 469 nM και 429 nM. Σε μία άλλη μελέτη από τον Alburges, όπου χρησιμοποιήθηκε η [ $^3H$ ] φαιντανύλη ως επισημασμένος δείκτης, η βουτυρυλοφαιντανύλη φαίνεται πως έχει μικρή συγγένεια προς τον υποδοχέα της [ $^3H$ ]-φαιντανύλης με σταθερά σύνδεσης  $K_i$  32±4.1 nM. Πριν την διενέργεια αυτών των πειραμάτων, μελέτες είχαν δείξει ότι η *N*-προπιονυλο ομάδα στην φαιντανύλη και στα παράγωγα της, παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην σύνδεση με τον υποδοχέα. Στην βουτυρυλοφαιντανύλη η *N*-προπιονυλο ομάδα έχει αντικατασταθεί από μία *N*-βουτυρυλο ομάδα, γεγονός που συνεπάγεται φτωχή σύνδεση με τον υποδοχέα. Έτσι, η βουτυρυλοφαιντανύλη βρέθηκε ότι είναι 30 φορές λιγότερο δραστική από ότι η φαιντανύλη [237-243].

## Ακετυλοφαιτανύλη

Η ακετυλοφαιτανύλη συνδέεται *in vivo* και *in vitro* με τους μ-υποδοχείς των οπιοειδών. *In vivo* μελέτες σε ζώα, έδειξαν, ότι η αναλγητική δράση της ακετυλοφαιτανύλης είναι 17.5 φορές μεγαλύτερη από ότι της μορφίνης και 3 φορές μικρότερη από ότι της φαιτανύλης. Οι αντίστοιχοι δείκτες ED<sub>50</sub> προσδιορίστηκαν και βρέθηκαν 0.021, 0.0061 και 0.33 mg/kg για την ακετυλοφαιτανύλη, τη φαιτανύλη και τη μορφίνη αντίστοιχα.

Μελέτες οξείας τοξικότητας σε μύες έδωσαν τιμές θανατηφόρας δόσης (LD<sub>50</sub>) 9.3 mg/kg, δηλαδή 7 και 50 φορές πιο πάνω από τις αντίστοιχες της φαιτανύλης και της μορφίνης. Ο λόγος LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>, βρέθηκε 442.9, δηλαδή πολύ μικρότερος από ότι της μορφίνης (1424.2) ή της φαιτανύλης (10,163.9), γεγονός που υποδεικνύει ότι η ουσία αυτή έχει πολύ μικρότερο θεραπευτικό εύρος από ότι οι άλλες δύο [184-185,237, 243].

## Οκφαιτανύλη

Η οκφαιτανύλη συντέθηκε και αξιολογήθηκε αρχικά από τους Bao-Shan Huang και συν., το 1986. Η ED<sub>50</sub> μετρήθηκε σε μία δοκιμασία rat hot-plate και βρέθηκε 0.0077 mg/kg ποντικού. Υπολογίστηκε ότι είναι 2.5 φορές πιο ισχυρή από ότι η φαιτανύλη. Παρόλο που έχει μελετηθεί για την αναλγητική της δράση, δεν υπάρχουν διαθέσιμα δεδομένα που να περιγράφουν την φαρμακοκινητική της [194-195, 219].

Η οκφαιτανύλη αξιολογήθηκε αρχικά στους ανθρώπους από τους Glass και συν., το 1989. Η θεραπευτική του δόση στον άνθρωπο υπολογίστηκε και βρέθηκε να είναι 0.5-1.25 μg/kg δηλαδή 200 φορές πιο μεγάλη από αυτή της μορφίνης. Η δόση αυτή βρέθηκε ότι προκαλεί αναλγησία η οποία διαρκεί από 20 έως 40 λεπτά [244].

Αργότερα η φαρμακευτική εταιρεία Anaquest ανέπτυξε και μελέτησε την οκφαιτανύλη ανάμεσα σε άλλα ισχυρά οπιοειδή-αναστολείς της ναλοξόνης, με σκοπό να καταφέρει να φτιάξει ένα φάρμακο με καλύτερους θεραπευτικούς δείκτες από την φαιτανύλη, όσον αφορά τις καρδιαγγειακές και αναπνευστικές επιδράσεις των φαρμάκων. Η οκφαιτανύλη έδειξε φαρμακοδυναμικά πλεονεκτήματα σε σχέση με την φαιτανύλη όσον αφορά την διάρκεια της υπνωτικής δράσης. Η ED<sub>50</sub> βρέθηκε 8 με 16 φορές πιο μεγάλη από ότι της φαιτανύλης. Οι Flecher και συν., σχεδίασαν μία μελέτη με σκοπό να προσδιορίσουν την αποτελεσματικότητα της οκφαιτανύλης σε σχέση με την φαιτανύλη όταν οι ενώσεις αυτές χρησιμοποιούνται σαν συμπληρώματα στην γενική αναισθησία. Η έρευνα κατέληξε στο ότι η οκφαιτανύλη δεν έχει κάποιο εμφανές πλεονέκτημα σε σχέση με την φαιτανύλη και ότι δόση οκφαιτανύλης 3 μg/kg, είναι φαρμακοδυναμικά ίση με δόση φαιτανύλης, 5 μg/kg [245].

Σε μία άλλη μελέτη, οι Ebrahim και συν. αξιολόγησαν την οκφαιτανύλη για την αποτελεσματικότητα της στην επίτευξη μετεγχειρητικής αναλγησίας. Οι ερευνητές κατέληξαν στο ότι 0.5 και 0.75 μg/kg οκφαιτανύλης παράγουν ασφαλή και αποτελεσματική αναλγησία, ανάλογη με αυτή που παράγεται από 0.07 μg/kg μορφίνης [246].

### **Φουρανυλοφαιτανύλη**

Η φουρανυλοφαιτανύλη μελετήθηκε μαζί με άλλες ουσίες για την αναλγητική της ιδιότητα στην πατέντα των Ηνωμένων Πολιτειών στην οποία περιγράφηκε για πρώτη φορά η συνθετική της πορεία. Η ED<sub>50</sub> μετρήθηκε και βρέθηκε 0.02 mg/kg\*. Η δραστηριότητα της έχει βρεθεί ότι είναι 50 με 100 φορές μεγαλύτερη από ότι αυτή της μορφίνης. [194, 199].

### **3B.6 Ανεπιθύμητες ενέργειες**

Πληροφορίες σχετικά με τις επιδράσεις των παραγώγων της φαιτανύλης στον άνθρωπο έχουν συλλεχθεί από σχετικά περιστατικά δηλητηριάσεων και διαδικτυακές συζητήσεις χρηστών. Για τη **βουτυρυλοφαιτανύλη** οι χρήστες αναφέρουν ότι οι επιδράσεις στον οργανισμό βρίσκονται κάπου μεταξύ της ηρωίνης και της φαιτανύλης. Αναφέρουν ότι η καταστολή είναι πιο ήπια αλλά το αίσθημα ευφορίας δυνατότερο και παρόμοιο με αυτό της ηρωίνης ενώ η διάρκεια δράσης της χαρακτηρίζεται ως βραχεία. Οι αναφερθείσες ανεπιθύμητες ενέργειες είναι απώλεια συνείδησης, άπνοια, αναπνευστική καταστολή, διέγερση, δυσάρεστα συναισθήματα και καρδιακή ανακοπή. Άλλα κλινικά συμπτώματα τα οποία έχουν καταγραφεί είναι, μύση, υποθερμία, ταχυκαρδία, υπέρταση και μυϊκό κλόνο. Σε μία περίπτωση δηλητηρίασης στην Μινεσότα της Αμερικής η οποία αφορούσε έναν 18-χρονο άντρα, αναφέρονται ως συμπτώματα πνευμονικό οίδημα και διάχυτη κυψελιδική αιμορραγία [180, 208, 210-212, 247-249].

Οι διαθέσιμες πληροφορίες, σχετικά με την χρήση και τις επιδράσεις της **ακετυλοφαιτανύλης** προέρχονται κυρίως από το διαδίκτυο, από φόρουμ χρηστών καθώς και από έναν περιορισμένο αριθμό υποθέσεων δηλητηριάσεων. Οι φαρμακολογικές επιδράσεις που έχουν αναφερθεί περιλαμβάνουν αλλαγές στη διάθεση, ξηρότητα βλεννογόνων, ευφορία, αναπνευστική καταστολή, καταστολή του αντανακλαστικού του βήχα, μύση και διαταραχές στην κινητικότητα του γαστρεντερικού σωλήνα [].

Οι χρήστες αναφέρουν ότι η **οκφαιτανύλη** παρουσιάζει μικρότερο χρόνο έναρξης δράσης (3 λεπτά) και μικρότερη διάρκεια δράσης (3 ώρες) από ότι η ηρωίνη. Ως εκ τούτου τα συμπτώματα στέρησης εμφανίζονται νωρίτερα. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες της οκφαιτανύλης είναι ίδιες με αυτές της φαιτανύλης και περιλαμβάνουν κνησμό, ναυτία και πιθανόν επικίνδυνη δοσοεξαρτώμενη αναπνευστική καταστολή. Άλλες αναφερθείσες ανεπιθύμητες επιδράσεις είναι ο πόνος στο στήθος,

η ψύχωση και ο τρόμος, παρόλο που αυτά τα συμπτώματα θα μπορούσαν σε πολλές περιπτώσεις να αποδοθούν σε συνχορηγούμενες ουσίες [129, 195, 244-245, 252-254].

Η **φουρανυλοφαιτανύλη** λαμβάνεται σε μικρογραμμάρια και είναι μια πολύ επικίνδυνη ουσία καθώς οι επιδράσεις της ουσίας δεν εμφανίζονται αμέσως έτσι οι χρήστες αυξάνουν τη δόση προκειμένου να πετύχουν μέγιστες φαρμακολογικές επιδράσεις, με αποτέλεσμα πολλές φορές να οδηγούνται σε δηλητηριάσεις από κατάχρηση. Ο θάνατος μπορεί να επέλθει από αναπνευστικές δυσλειτουργίες ακολουθούμενες από καρδιακή ανακοπή. Από του στόματος, δόσεις από 300 έως 500 μg θεωρούνται ήπιες, από 500 έως 900 μg κανονικές και από 900 έως 1600 μg, δυνατές δόσεις. Όταν η ουσία λαμβάνεται μέσω της ρινικής οδού, δόσεις από 200 έως 400 μg, θεωρούνται ήπιες δόσεις, δόσεις από 400 έως 800 μg κανονικές και δόσεις από 800 έως 1600 μg δυνατές δόσεις. Σε μια περίπτωση ενδοφλέβιας χορήγησης ο χρήστης αναφέρει ότι δοκίμασε 1 mg ουσίας και δεν παρατήρησε επιδράσεις στον ίδιο. Όταν αύξησε την δόση στα 2 mg λιποθύμησε και οι αισθήσεις του επανήλθαν 45 λεπτά αργότερα [199, 255-257].

### **3B.7 Κατάχρηση-Εξαρτησιογόνος δράση**

Η παραγωγή της **βουτυρυλοφαιτανύλης** έχει την έδρα της κυρίως στην Κίνα όπου υπάρχει σημαντική πρόσβαση σε επιστημονικό εξοπλισμό, εξειδικευμένο προσωπικό και γνώση. Η εξαγωγή της προς άλλες χώρες αντί της φαιτανύλης ξεκίνησε επειδή ως νέα ουσία δεν είχε υπαχθεί στις ελεγχόμενες υπό του νόμου ουσίες σε πολλές περιοχές του κόσμου και το εμπόριο της ήταν ακόμα νόμιμο. Κάποια άλλα στοιχεία δείχνουν ότι τα Κινέζικα εργαστήρια τα οποία παράγουν και εξάγουν βουτυρυλοφαιτανύλη ταυτόχρονα λειτουργούν και ως νόμιμες. Η παραγόμενη βουτυρυλοφαιτανύλη από αυτά τα εργαστήρια εξάγεται στις Ηνωμένες Πολιτείες, στον Καναδά, στο Μεξικό και στην Ευρώπη σε μορφή σκόνης ή δισκίων. Οι χρήστες προμηθεύονται την ουσία αυτή κυρίως μέσω του διαδικτύου. [117, 199, 257-262].

Το 2015, η βουτυρυλοφαιτανύλη αναφέρεται για πρώτη φορά στο Συμβουλευτικό Σύστημα Έγκαιρης Προειδοποίησης (EWA) του Γραφείου των Ηνωμένων Εθνών για τα Ναρκωτικά και το Έγκλημα (UNODC). Το EWA αναφέρει ότι η ουσία βρίσκεται ανάμεσα στα 17 παράγωγα φαιτανύλης τα οποία έχουν καταγραφεί σε Ευρώπη (Γερμανία, Σουηδία, Φινλανδία, Πολωνία), Ασία και Βόρεια Αμερική το διάστημα 2012-2016 και ανάμεσα στα 8 μη-ελεγχόμενα παράγωγα τα οποία έχουν καταγραφεί μέσα στο 2016. Η ουσία κατάσχεται κυρίως σε μορφή σκόνης και δισκίων. Μπορεί να συναντηθεί ως καθαρή ουσία ή και ως μίγμα με άλλες ουσίες όπως φαιτανύλη, ακετυλοφαιτανύλη, δισπροπιονυλοφαιτανύλη, ηρωίνη, κοκαΐνη, μεθαμφεταμίνη, καφεΐνη και τέλος με λακτόζη [34, 214, 258].

Στις Ηνωμένες Πολιτείες κατασχεθείσα βουτυρυλοφαινανύλη αναλύεται για πρώτη φορά, το Μάρτιο του 2014, στο Κάνσας. Άλλες 7 αναφορές της ουσίας καταγράφονται το 2014 σε Μινεσότα, Ιλινόις, Κάνσας και Πενσυλβανία στις οποίες η ουσία ταυτοποιήθηκε σε κατασχεθέντα υλικά. Το 2015, η βουτυρυλοφαινανύλη ταυτοποιήθηκε σε 81 περιπτώσεις κατασχέσεων σε Καλιφόρνια, Κονέκτικατ, Φλόριντα, Ιντιάνα, Β. Ντακότα, Νέα Υόρκη, Οχάιο, Όρεγκον, Τεννεσί, Βιρτζίνια, και Γουισκόνσιν. Έχει ανιχνευθεί σε καπάκια από μπουκάλια, σε κουτάλια, ψηφιακούς ζυγούς και σε άλλα πειστήρια που υποδεικνύουν την κατάχρηση της ουσίας. Η DEA καταγράφει την εμπλοκή της σε θανατηφόρες και μη θανατηφόρες δηλητηριάσεις και πιο συγκεκριμένα, σε 40 υποθέσεις θανάτου στην Αμερική που έχουν επιβεβαιωθεί ότι σχετίζονται με την βουτυρυλοφαινανύλη στις περιοχές Φλόριντα, Βιρτζίνια, Μέριλαντ, Μινεσότα, Νέα Υόρκη και Όρεγκον, το 2015.

Στην Ευρώπη η βουτυρυλοφαινανύλη καταγράφηκε για πρώτη φορά τον Ιούλιο του 2013 σε μία κατάσχεση στην Πολωνία και αργότερα τον Απρίλιο του 2014 σε μία κατάσχεση στην Σουηδία. Τον Μάιο του 2014 εμφανίζονται τα πρώτα στοιχεία από το Ευρωπαϊκό Σύστημα Έγκαιρης Προειδοποίησης (EU EWS) που την συσχετίζουν με υποθέσεις δηλητηριάσεων στη Σουηδία. Τον Οκτώβριο του 2014, το Σουηδικό Εθνικό Σημείο Επαφής (SNFP), εκδίδει σχετική προειδοποίηση. [208-209, 214, 247-249, 258, 263].

Στο πλαίσιο του Σουηδικού προγράμματος STRIDA αναφέρονται επίσης κάποιες υποθέσεις δηλητηριάσεων που απεδείχθησαν ότι ήταν αποτέλεσμα ψευδούς επισήμανσης της συσκευασίας, καθώς οι χρήστες νόμιζαν ότι καταλάωναν βουτυρυλοφαινανύλη, ενώ στην πραγματικότητα το περιεχόμενο της σακούλας ήταν φαινανύλη που είναι 30 φορές πιο δραστική. Ψευδώς επισημασμένα χάπια φαινανύλης, ακετυλοφαινανύλης και βουτυρυλοφαινανύλης έχουν επίσης κατασχεθεί σε φορτία που ξεκίνησαν από Κίνα με προορισμό τις βορειοανατολικές Ηνωμένες Πολιτείες [208].

Η **ακετυλοφαινανύλη** χρησιμοποιείται ως απευθείας υποκατάστατο της ηρωίνης και άλλων οπιοειδών. Το όνομα της στη μαύρη αγορά είναι, «fake heroin», «China White» ή «White China» και ως «acetylfentanyl» που συναντάται συχνότερα. Τα σκευάσματα που φέρουν ακετυλοφαινανύλη συχνά έχουν ως ετικέτα, «όχι για ανθρώπινη κατανάλωση», «potpourri», «καθαριστικά», «τροφή για φυτά», «άλατα μπάνιου» και «AF-βάμμα», ενώ στις Ηνωμένες Πολιτείες έχει αναφερθεί και η ονομασία «απωθητικό εντόμων». Συχνά χρησιμοποιείται για τη νόθευση της ηρωίνης είτε πωλείται στους χρήστες ως ηρωίνη, ενώ υπάρχουν περιπτώσεις όπου διακινείται ως οξυκωδόνη, με τη μορφή δισκίων. Μέχρι πρόσφατα η ακετυλοφαινανύλη δεν είχε υπαχθεί στις ελεγχόμενες υπό το νόμο ουσίες και έτσι χρησιμοποιείτο ευρέως με σκοπό να νοθεύσει άλλες παράνομες και ελεγχόμενες ουσίες ή σαν υποκατάστατο αυτών των ουσιών [184, 216, 264-266].

Οι αναφερθείσες παράνομες δραστηριότητες που περιλαμβάνουν την ακετυλοφαιτανύλη, σχετίζονται με την παράνομη διακίνηση της στο διαδίκτυο, όπου πωλείται από εταιρείες που εδρεύουν κυρίως στην Κίνα. Πωλείται σε καταστήματα λιανικής ή καπνοπωλεία σε διάφορες πολιτείες των Η.Π.Α. όπως Κολοράντο, Φλόριντα, Τζόρτζια, Ροντ Άιλαντ και Ουάσινγκτον. Σύμφωνα με την DEA η ακετυλοφαιτανύλη έχει εντοπιστεί επίσης σε παράνομα εργαστήρια στο Μεξικό. Η παράνομη χρήση της ουσίας αναφέρθηκε αρχικά το 2013 σε 8 υποθέσεις, σε Φλόριντα, Οχάιο, Ιλινόις, Λουιζιάνα, Νιου Τζέρσεϊ, Όρεγκον, Πενσυλβανία και Βιρτζίνια. Σε έρευνα που διεξήχθη το 2015, σχετικά με την διακίνηση της ουσίας στο διαδίκτυο, εντοπίστηκαν τουλάχιστον 23 πωλητές της ουσίας, 12 εκ των οποίων ισχυρίστηκαν ότι την προμηθεύτηκαν από αποθήκες στην Κίνα, τρεις από την Ευρωπαϊκή Ένωση, τέσσερις από τις Ηνωμένες Πολιτείες και ένας από την Ινδία [184, 215-216, 264-267].

Στην Ευρώπη, η εμφάνιση της ουσίας κοινοποιήθηκε για πρώτη φορά, μετά από μία κατάσχεση που έλαβε χώρα τον Μάρτιο του 2014, στην Πολωνία. Η χρήση της έχει επίσης καταγραφεί σε 4 άλλες Ευρωπαϊκές χώρες, την Φινλανδία, την Σουηδία, τη Γαλλία και το Ηνωμένο Βασίλειο [216].

Η **οκφαιτανύλη** ήταν ανάμεσα στις 81 Νέες Ψυχοδραστικές Ουσίες (Novel Psychoactive Substances/NPS) που αναφέρθηκαν στο EWS από το Ευρωπαϊκό Κέντρο Παρακολούθησης Ναρκωτικών και Τοξικομανίας (EMCDDA) το 2013, μετά από την ταυτοποίησή της σε ένα προϊόν κατάσχεσης. Μια προειδοποίηση σχετικά με την ουσία εκδόθηκε την ίδια χρονιά από την Europol και το EMCDDA [268-269].

Σύμφωνα με τη UNODC EWA, η οκφαιτανύλη είναι ανάμεσα στα 14 παράγωγα φαιτανύλης των οποίων η παρουσία καταγράφεται στην Ευρώπη στο διάστημα 2012-2016 και είναι ανάμεσα στα 15 διαφορετικά συνθετικά οπιοειδή τα οποία είχαν αναφερθεί στο EMCDDA μεταξύ του 2009 και 2015. Το Εθνικό Σύστημα Έγκαιρης Προειδοποίησης Ναρκωτικών (NDEWS) εξέδωσε επίσης προειδοποίηση σχετική με την οκφαιτανύλη και άλλα παράγωγα φαιτανύλης. Η ουσία έχει συσχετισθεί με σημαντικό αριθμό δηλητηριάσεων αλλά και θανάτων, περισσότερο στην Ευρώπη (Φινλανδία, Γαλλία, Ιρλανδία, Λουξεμβούργο, Ισπανία, Σουηδία και Ηνωμένο Βασίλειο). Επιπλέον βρίσκεται ανάμεσα στις ουσίες κατάχρησης στις Ηνωμένες Πολιτείες και στον Καναδά [34, 129, 218-219, 222, 253, 270-275].

Η οκφαιτανύλη κατάσχεεται περισσότερο με τη μορφή λευκής ή καφέ σκόνης. Έχει αναφερθεί και μία περίπτωση κατάσχεσης ροζ σκόνης. Η οκφαιτανύλη έχει επίσης βρεθεί σε μίγματα με άλλα ναρκωτικά ή ουσίες όπως ηρωίνη, μεθαμφεταμίνη, ακεταμινοφαίνη, καφεΐνη, μαννιτόλη ή βενζοϊκό οξύ. Σε πολλές περιπτώσεις η οκφαιτανύλη χρησιμοποιείται για την νόθευση ηρωίνης και ως εκ τούτου οι χρήστες λαμβάνουν την ουσία χωρίς να το γνωρίζουν. Σε κάποιες περιπτώσεις η

οκφαιτανύλη πωλείται στο διαδίκτυο ως ηρωίνη ή «συνθετική ηρωίνη» [129, 189, 218-219, 253-254, 276-280].

Η **φουρανυλοφαιτανύλη** διακινείται επίσης στην παράνομη αγορά και έχει αναφερθεί σε έναν σημαντικό αριθμό περιστατικών κατάχρησης και σχετικών δηλητηριάσεων τα τελευταία χρόνια. Η παρουσία της έχει καταγραφεί μαζί με 17 άλλα παράγωγα φαιτανύλης σε Ασία, Ευρώπη και Αμερική στο διάστημα 2012-2016 και ανάμεσα σε 8 μη ελεγχόμενα παράγωγα μέσα στο έτος 2016 [34, 224-225, 281].

Παράγεται κυρίως στην Κίνα, όπως και πολλά άλλα παράγωγα φαιτανύλης. Η παραγόμενη φουρανυλοφαιτανύλη εξάγεται στις Ηνωμένες Πολιτείες, στον Καναδά, στο Μεξικό και στην Ευρώπη σε μορφή σκόνης ή χαπιών. Οι χρήστες μπορούν να την παραγγείλουν διαδικτυακά ή να το παραλάβουν από τον έμπορο στην παράνομη αγορά [117, 257, 260-262].

Δημοσιευμένες εργασίες, στοιχεία που έχουν συλλεχθεί από τον οργανισμό DEA και διαδικτυακές πηγές έχουν δώσει πληροφορίες σχετικά με υποθέσεις δηλητηριάσεων στις Ηνωμένες Πολιτείες. Έχει επίσης ανιχνευτεί σε πολλά κατασχεθέντα υλικά στις Η.Π.Α. όπως σκόνες, χάπια, μπουκαλάκια οφθαλμικών σταγόνων ή ρινικά σπρέι και σε άλλα κατασχεθέντα πειστήρια. Στην Ευρώπη, η παρουσία της φουρανυλοφαιτανύλης κοινοποιήθηκε για πρώτη φορά στην Φινλανδία, τον Νοέμβριο του 2015. Η παρουσία του ναρκωτικού αυτού στην Ευρώπη-μέσα από σχετικές περιπτώσεις καταχρήσεων και κατασχέσεων-φαίνεται μέσα από δημοσιευμένες εργασίες, διαδικτυακές πηγές και στοιχεία του UNODC. Πιο συγκεκριμένα έχει καταγραφεί στην Σουηδία, την Εσθονία, την Σλοβενία και την Νορβηγία. Η παρουσία της έχει επίσης αναφερθεί στο Darwin της Αυστραλίας σε μία περίπτωση κατάσχεσης [223-225, 259, 282-297].





## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Μέθοδοι ανάλυσης της φαιντανύλης και των παραγώγων της σε βιολογικά δείγματα και κατασχεθέντα υλικά**

Η παράνομη διακίνηση και χρήση της φαιντανύλης και των παραγώγων της, έχει οδηγήσει στην ανάγκη για ανάπτυξη διάφορων μεθόδων για τον προσδιορισμό αυτών των ουσιών σε βιολογικά δείγματα. Οι μέθοδοι αυτές χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των ουσιών σε διάφορα βιολογικά υλικά όπως το αίμα, τα ούρα αλλά και άλλα βιολογικά υποστρώματα στο πλαίσιο της διάγνωσης μιας δηλητηρίασης ή στη διερεύνηση της αιτίας θανάτου. Για την φαιντανύλη, οι συγκεντρώσεις στο αίμα ή στο πλάσμα, είναι 0.3-3.0 μg/L σε άτομα που τη χρησιμοποιούν θεραπευτικά, 1.0-10.0 μg/L σε περιπτώσεις υπερδοσολογιών και 3.0-30.0 μg/L, σε θύματα οξείας δηλητηρίασης.

Οι εμπορικά διαθέσιμες ανοσοδοκιμασίες χρησιμοποιούνται κυρίως ως προκαταρκτικές μέθοδοι (screening tests). Ανάμεσα σε αυτές τις δοκιμασίες βρίσκονται η ELISA [298], ο ραδιοανοσοπροσδιορισμός (Radioimmunoassay/RIA) [299-301], η δοκιμασία με τη χρήση ραδιουποδοχέα (RRA) [301], η ενζυμική ανοσοδοκιμασία χημειοφωταύγειας [302] και η μη ραδιενεργή ενζυμική ανοσοδοκιμασία (EIAs) [303]. Τα παράγωγα της φαιντανύλης όμως σε πολλές περιπτώσεις δεν μπορούν να ανιχνευθούν και να ταυτοποιηθούν με τις προκαταρκτικές μεθόδους είτε γιατί υπάρχουν στα βιολογικά υλικά σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις, είτε γιατί δεν υπάρχουν διαθέσιμες μέθοδοι που να τα διαχωρίζουν από την φαιντανύλη.

Οι χρωματογραφικές τεχνικές είναι αυτές που χρησιμοποιούνται κυρίως προκειμένου να επιβεβαιωθεί η παρουσία των ουσιών αυτών στα δείγματα και να γίνει ποσοτικοποίησή τους [304]. Η πρώτη χρωματογραφική τεχνική που αναπτύχθηκε για την ανάλυση της φαιντανύλης σε βιολογικά υγρά, εντοπίζεται το 1981 στο Αμστερνταμ. Η μέθοδος αναπτύχθηκε από τον Van Rooy και Vermeulen με σκοπό να προσδιορίζει την φαιντανύλη και τους μεταβολίτες της σε πλάσμα ασθενών με τη χρήση GC-MS και GC με ανιχνευτή ιοντισμού φλόγας (FID). Η προκατεργασία των δειγμάτων περιελάμβανε εκχύλιση των ουσιών τρεις φορές με NaOH (4 N) και βενζόλιο, παραγωγοποίηση με οξικό ανυδρίτη και πυριδίνη και τέλος επανασύσταση σε βενζόλιο με προσθήκη ως εσωτερικού προτύπου παπαβερίνη. Για την ανάλυση με GC-FID χρησιμοποιήθηκε γυάλινη στήλη 3% OV-17 (120 cm x 2 mm), ενώ για την ανάλυση με GC-MS τριχοειδής στήλη Carbowax 20M (10 m x 0.5 mm). Για το GC-FID Το όριο ανίχνευσης (LOD) υπολογίστηκε ως 3.3 ng/mL πλάσματος για την φαιντανύλη ενώ η μέθοδος βρέθηκε γραμμική έως τα 8.5 μg/mL [305].

Αναζητώντας τη βιβλιογραφία από το 1981 και έπειτα αναφέρεται μία πληθώρα χρωματογραφικών τεχνικών. Έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι για την ανάλυση της φαιντανύλης σε φαρμακευτικά σκευάσματα, σε κατασχεθέντα υλικά [34, 115, 123-124, 207, 268, 272] αλλά και για

την ανάλυση φαιτανύλης και παραγώγων της σε βιολογικά δείγματα [306-346]. Οι πιο δημοφιλείς χρωματογραφικές μέθοδοι που εφαρμόζονται για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση της φαιτανύλης και των αναλόγων της σε βιολογικά δείγματα, είναι η Χρωματογραφία Αέριας φάσης [306-325] και η Υγροχρωματογραφία (LC) [326-346] συνήθως σε συνδυασμό είτε με ανιχνευτή μαζών (MS ή MS/MS) [306, 308-311, 313-320, 322-325, 328-346], είτε με ανιχνευτή υπεριώδους (UV) [326-327], είτε με ανιχνευτή αζώτου-φωσφόρου (NPD) [307, 321]. Οι τεχνικές εκχύλισης και προκατεργασίας που χρησιμοποιούνται είναι κατά κύριο λόγο υγρό-υγρό εκχύλιση (LLE) [306-312, 319-320, 323-327, 336, 340, 343-344], αλλά και εκχύλιση στερεά φάσεως [331, 332].

Όσον αφορά τα υπό μελέτη παράγωγα, οι γνωστές, μέχρι τώρα, μέθοδοι προσδιορισμού σε βιολογικά υποστρώματα, είναι απόρροια αναλύσεων δειγμάτων σχετικών με υποθέσεις κατάχρησης καθώς και αναλύσεων δειγμάτων σχετικών με μεταβολικές μελέτες των ουσιών αυτών. Ο αριθμός των μεθόδων αυτών είναι πιο περιορισμένος καθώς ο προσδιορισμός των εν λόγω αναλόγων έγινε ιδιαίτερα σημαντικός τα τελευταία χρόνια λόγω της πρόσφατης παρουσίας τους στα παράνομα κυκλώματα ναρκωτικών. Μερικές από τις χρωματογραφικές μεθόδους προσδιορισμού της φαιτανύλης και της ρεμφαιτανύλης σε βιολογικά υλικά συνοψίζονται στους **Πίνακες 1** και **2** ενώ παρακάτω ακολουθεί περιγραφή των μεθόδων ανάλυσης των υπολοίπων παραγώγων.

**Πίνακας 1.** Συνοπτική παράθεση αναλυτικών μεθόδων προσδιορισμού της φαιτανύλης με χρήση Χρωματογραφίας Αέριας Φάσης και Υγροχρωματογραφίας

Β.Π.	Ουσία	Βιολογικό Υλικό	Μέθοδος Εκχύλισης	Στήλη	Κινητή Φάση	Ανιχνευτής	LOD/LOQ (ng mL <sup>-1</sup> )	Γραμμικότητα (ng mL <sup>-1</sup> )	Εσωτερικό Πρότυπο
<b>Χρωματογραφία Αέριας Φάσης (GC)</b>									
306	Φαιτανύλη	Αίμα	LLE: 1) ρυθμιστικό διάλυμα βορικών (pH 9), 2) εκχύλιση: <i>n</i> -χλωροβουτάνιο, 3) H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (1 N) 4) εξάνιο, 5) NaOH, 6) επανεκχύλιση: : <i>n</i> -χλωροβουτάνιο	Τριχοειδής στήλη με 5% φαινυλομεθυλοσιλοξάνιο (12.5 m x 0.32 mm x 0.5 μm)	He <sub>2</sub>	MS(EI)	0.05/ –	0.25 – 2.5	R38527
307	Φαιτανύλη, σουφαιτανύλη, αφαιτανύλη, καρφαιτανύλη, λοφαιτανύλη, νορφαιτανύλη, δισπροπιουλοφαιτανύλη	Πλάσμα	LLE: 1) ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (pH 9.2), 2) εκχύλιση: χλωροφόρμιο: <i>n</i> -επτάνιο/2-προπανόλη (50:33:17, v/v/v)	Γυάλινη στήλη με 3% OV-17 (1.8 m x 2 mm)	N <sub>2</sub>	NPD	F: 0.08/– SF: 0.0/– AF: 0.32/– CF: 0.19/– LF: 0.14/– NF: 0.07/– DPF: 0.1/–	0.4 – 100	SKF 525A
308	Φαιτανύλη	Ούρα	LLE: : 1) ρυθμιστικό διάλυμα βορικών (pH 9), 2) εκχύλιση: <i>n</i> -χλωροβουτάνιο, 3) H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (1 N), 4) εξάνιο, 5) NaOH, 6) επανεκχύλιση: : <i>n</i> -χλωροβουτάνιο	Τριχοειδής στήλη πυριτίας 19091S-003 με 5% φαινυλομεθυλοσιλικόνη (10.0 m x 0.15 mm x 0.34 μm)	H <sub>2</sub>	MS (EI)	0.05 / –	0 – 200	R38527
309	Φαιτανύλη	Αίμα	LLE: 1) εκχύλιση: <i>n</i> -βουτυλοχλωρίδιο/ αιθέρας (3:1, v/v), 2) H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0.5 M), 3) επανεκχύλιση: NH <sub>4</sub> OH, μεθυλενοχλωρίδιο	Τριχοειδής στήλη πυριτίας DB-1 (12 m x 0.20 mm)	He <sub>2</sub>	MS (EI)	0.5 / –	–	–
310	Φαιτανύλη	Πλάσμα	LLE: 1) NaOH (1 M), 2) εκχύλιση: διχλωρομεθάνιο + TEA (0.5 M)	Τριχοειδής στήλη Ultra-2-cross-linked με 5% φαινυλομεθυλοσιλοξάνιο (25 m x 0.2 mm x 0.33 μm)	He <sub>2</sub>	MS (EI)	– / 0.05	–	Σουφαιτανύλη
311	Φαιτανύλη	Πλάσμα	LLE: 1) <i>n</i> -χλωροβουτάνιο, 2) επανεκχύλιση: τολουόλιο	Τριχοειδής στήλη με 5% φαινυλομεθυλοσιλοξάνιο (30.0 m x 0.25 mm x 0.25 μm)	He <sub>2</sub>	MS (EI)	0.2 / –	0.25 – 2.5	Σουφαιτανύλη
312	Νορφαιτανύλη, νορσουφαιτανύλη, νοραλφαιτανύλη	Ούρα	LLE: 1) NH <sub>4</sub> OH (pH 12.0) 2) εκχύλιση: Οξικός αιθυλεστέρας/ <i>n</i> -βουτανόλη (80:2, v/v)	Τριχοειδής στήλη με 5% φαινυλομεθυλοσιλοξάνιο (15.0 m x 0.20 mm x 0.33 μm)	He <sub>2</sub>	MS (EI)	0.3/ –	–	Φαιτανύλη-d <sup>5</sup>

313	Φαιντανύλη, μιδαζολάμη	Πλάσμα	SPME: 1) NaOH, 2) PDMS/DVB 65-mm	Τριχοειδής στήλη με 5% μεθυλοσιλοξάνιο (0.30 mm x 0.25 mm x 0.50 μm)	He <sub>2</sub>	MS (EI)	F: - / 0.8 M: - / 1	0.25 – 7.5	Σουφαιντανύλη
314	Φαιντανύλη, σουφαιντανύλη, αλφαιντανύλη	Ούρα	SPE (EXTrelut®NT1): 1) NaOH, 2) <i>n</i> -επτάνιο/ <i>n</i> -ισοαμυλο-αλκοόλη (98.5:1.5, v/v)	Τριχοειδής στήλη DB 35-MS (30 m x 0.25 mm x 0.15 μm)	He <sub>2</sub>	MS (EI)	F, SF: < 0.025/- AF: 0.075/-	-	Φαιντανύλη-d <sup>5</sup> , νορφαιντανύλη, νορσουφαιντανύλη, νοραλφαιντανύλη
315	Φαιντανύλη + άλλα ναρκωτικά	Σάλιο	SPE: 1) ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (pH 4.1), 2) ACN/NH <sub>3</sub> (aq) (100:4, v/v)	Τριχοειδής στήλη DB 35-MS (30 m x 0.32 mm x 0.25 μm)	He <sub>2</sub>	MS (EI)	- / 2	2 – 200	6-MAM-d6-TMS
316	Φαιντανύλη + άλλα φάρμακα	Τρίχες	1) Ακετόνη, 2) τεμαχισμός, 3) ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (0.025 M) 4) υπέρηχοι (75 ° C, 3 h)	Δύο διαστάσεων GC : Στήλη 1: DB-17 (15 m x 0.25 mm x 0.25 μm) Στήλη 2: DB-5 (15 m x 0.25 mm x 0.25 μm)	-	MS (EI)	- / 0.005 (ng mg <sup>-1</sup> )	0.005-0.2 (ng mg <sup>-1</sup> )	Φαιντανύλη-d <sup>5</sup>
317	Φαιντανύλη	Εκπνεόμενο αέρα	SPME: PDMS/DVB	Τριχοειδής στήλη Rtx-MS (30m x 0.32 mm x 0.25)	He <sub>2</sub>	MS (EI)	0.01/0.03	0.05 – 0.8	-
318	Φαιντανύλη	Πλάσμα	HD-SPME:1) Αποδέσμευση του φαρμάκου από πρωτεΐνες: HCl (37%), 2) TCA (100%, w/v) 3) PDMS coating fiber	Τριχοειδής στήλη με 100% διμεθυλοπολυσιλοξάνιο (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm)	He <sub>2</sub>	MS (EI)	0.0.3/0.1	0.1 – 2000	-
319	Φαιντανύλη, νορφαιντανύλη, σουφαιντανύλη, αλφαιντανύλη	Ούρα	LLE: 1) NaOH (2 M), 2) <i>tert</i> -βουτυλ-μεθυλαιθέρας	Τριχοειδής στήλη με 5% φαινυλομεθυλοσιλοξάνιο (30 m x 0.25 mm x 0.50 μm)	He <sub>2</sub>	MS (EI)	F, SF, NF: 0.08/0.5 (LLOQ) AF: 0.04 / 0.5 (LLOQ)	0.5 – 50	Φαιντανύλη-d <sup>5</sup>
320	Φαιντανύλη, νορφαιντανύλη-TMS, σουφαιντανύλη, αλφαιντανύλη, + άλλα ναρκωτικά	Ούρα	LLE: 1) ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (0.02 M) (pH 7.4), 2) β-γλυκουρονιδάση, 3) στερεό ρυθμιστικό ανθρακικών (pH 9) 4) εκχύλιση: χλωροφόρμιο/ισοπροπανόλη (90/10, v/v)	Τριχοειδής στήλη με 5% φαινυλομεθυλοσιλοξάνιο (10 m x 0.18 mm x 0.18 μm)	He <sub>2</sub>	MS (EI)	F: 5 / 10, NF: 10 / 25, SF: 2 / 5, AF: 5 / 10	2 – 400	Φαιντανύλη-d <sup>5</sup>

321	Φαιντανύλη, σουφαιντανύλη, αλφαιντανύλη	Πλάσμα, ούρα	LLE: εκχύλιση: οξικός εξυλεστεράς	Τριχοειδής στήλη DB-35MS (30 m x 0.25 mm x 0.15 μm)	N <sub>2</sub>	NPD	F: 8/- SF: 15/- AF: 12/-	0.1 – 50	Τροκτυλαμίνη
322	Φαιντανύλη	Ουρά	DLLME: 1) 2- propanol (διαλύτης διασποράς), 2) γλωροβενζόλιο	Τριχοειδής στήλη DB-1MS (25 m x 0.25 x 0.4 μm)	He <sub>2</sub>	MS (EI)	- /0.3 (LLOQ)	-	Φαιντανύλη-d <sup>5</sup>
<b>Υγροχρωματογραφία (LC)</b>									
326	Φαιντανύλη, αλφαιντανύλη	Πλάσμα	LLE:1) NaOH (0.5 M), 2) επτάνιο/ισοαμυλο-αλκοόλη (98:2, v/v)	Econosphere CN (250 mm x 4.6 mm, 5 μm) Προστατευτική στήλη: Cyano, Newguard (15 mm x 3.2 mm, 7 μm)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0.01 M) (pH 2.8) + 85% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> /Far-UV-HPLC-grade ACN (65:35, v/v)	UV	F: 0.25/2 AF: 0.25/2	F: 2 – 100 AIF: 2 – 2000	Παπαβερίνη
327	Φαιντανύλη	Πλάσμα	LLE: 1) KOH (0.5 M), 2) εκχύλιση: κυκλοεξάνιο	Spherisorb (250 mm x 4.6 mm, 5 μm)	0.02 υπερχλωρικό οξύ (70%) + MeOH	UV (200 nm)	- /0.2	-	Φλοραζεπάμη
328	Φαιντανύλη, νορφαιντανύλη	Πλάσμα	LLE: 1) NaOH (1M), 2) εκχύλιση: 2-προπανολ-τολουόλιο	Στήλη zircon-PBD (50 mm x 2.1 mm, 3 μm)	ACN + οξικό αμμώνιο (10 mM)/ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών (0.1 mM) (pH 4.4) (45:55, v/v/)	MS	F: - / 0.025 NF: - / 0.05	-	Φαιντανύλη-d <sup>5</sup>
329	Φαιντανύλη, νορφαιντανύλη	Πλάσμα, ούρα	<u>Ούρα</u> LLE: 1) IS 2) NaOH (1 M) 3) εκχύλιση: n-επτάνιο/οξικό αιθυλεστερα/ACN (48:48:2, v/v/v), 4) μυρμηκικό οξύ (5 mM) σε νερό.	YMC Pro C18 (50 mm x 2mm) Προστατευτική στήλη: OptiGuard C18 (1 mm) ή SecurityGuard C28 (4 mm x 2 mm)	<u>Ούρα</u> Βαθμιδωτή έκλυση: MP 1: ACN, MP 2: μυρμηκικό οξύ (5 mM) <u>Πλάσμα</u> 18% ACN + μυρμηκικό οξύ (5 mM)	MS/MS (PI)	F: - / 0.100 (LLOQ) (O) - / 0.020 (LLOQ) (PI) NF: - / 0.102 (LLOQ) (O)	F: 0.02-10 (PI) 0.1-50 (O) NF: 0.102-153 (O)	Φαιντανύλη-d <sup>5</sup> Νορφαιντανύλη-d <sup>5</sup>
330	Φαιντανύλη νορφαιντανύλη	Αίμα, ούρα, ήπαρ	LLE: Εκχύλιση: n-εξάνιο/ οξικός αιθυλεστεράς (70:30, v/v)	Xterra® MS C18 (100 mm x 2.1 mm, 3.5 μm) Προστατευτική στήλη: Xterra® MS C18 (10 mm x 2.1 mm, 3.5 μm)	<u>Βαθμιδωτή έκλυση:</u> MP 1: 0.15% μυρμηκικό οξύ, MP 2: 0.15% μυρμηκικό οξύ + ACN	MS/MS (ESI)	NF: 1 / -	5 – 150	Φαιντανύλη-d <sup>5</sup> Νορφαιντανύλη-d <sup>5</sup>

331	Φαιτανύλη	Πλάσμα	SPE: 1) νερό, 2) NH <sub>3</sub> (0.5%) (pH > 8.5), 3) 20% ACN/παπαβερίνη · HCl (20 ng/mL), 4) εκχύλιση: ACN	TSKgel ODS-100V (75 mm x 2 mm, 3μm) Προστατευτική στήλη: TSKguardgel ODS-100V (10 mmx x2 mm, 2 μm)	25% ACN + οξικό αμμόνιο (pH 3.5)	MS/MS (ESI)	- / 0.05	0.05–7.2	Φαιτανύλη-d <sup>5</sup>
332	Φαιτανύλη, νορφαιτανύλη	Αίμα, ούρα	<u>Αίμα + Ούρα</u> SPE: 1) IS 2) ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (0.1 M) (pH 6) 3) εκχύλιση: ισοπροπανόλη/διγλωρο μεθάνιο/NH <sub>4</sub> OH (20:78:2, v/v/v), 4) MeOH/H <sub>2</sub> O (25:73, v/v)	Acquity C18 (50 mm x 2.1 mm, 1.7 μm)	<u>Βαθμιδωτή έκλουση:</u> MP 1: νερό + διττανθρακικό αμμόνιο (10 mM) (pH 9), MP 2: MeOH	MS/MS (ESI)	F: 0.0025 / - (O) 0.005 / - (A) NF: 0.025 / - (O) 0.005 / - (A)	F: 0.0025-5 (O) 0.01-20 (A) NF: 0.005-10 (O) 0.01-20 (A)	Φαιτανύλη-d <sup>5</sup> Νορφαιτανύλη-d <sup>5</sup>
333	Φαιτανύλη, νορφαιτανύλη, διπροπιονυλοφαιτανύλη	Αίμα, πλάσμα, DBS	<u>Αίμα, Πλάσμα:</u> Διάλυμα καθίζησης πρωτεϊνών + IS <u>DBS:</u> 1) ανασύσταση με νερό HPLC, 2) διάλυμα καθίζησης πρωτεϊνών + IS	Eclipse XDB-C8 (150 mm x 4.6 mm, 3.5 μm)	<u>Βαθμιδωτή έκλουση:</u> MP 1: 0.1% μυρμηκικό οξύ + νερό, MP 2: 100% MeOH	MS/MS (API)	F: - / 0.1 NF, DPF: - / 0.25	F: 0.1-100 NF,DPF: 0.25-100	Σουφαιτανύλη
334	Φαιτανύλη, νορφαιτανύλη + άλλες ουσίες	Πλάσμα	SPE: 1) IS, 2) ρυθμιστικό οξικό αμμόνιο (50 mM) (pH 9.25)	X-Terra® MS C18 (150 mm x 2.1 mm, 5 μm) Προστατευτική στήλη: Phenomenex Security Guard C18	<u>Βαθμιδωτή έκλουση:</u> MP 1: 0.1% μυρμηκικό οξύ + νερό, MP 2: ACN	MS/MS (ESI)	F: - /0.5 (LLOQ) NF: - /0.5 (LLOQ)	0.5-100	Μορφίνη-d <sup>3</sup>
335	Φαιτανύλη	Πλάσμα, σάλιο	<u>Πλάσμα:</u> 1) IS, 2) φυγοκέντρηση, 3) ξήρανση, 4) επανασύσταση: MB 2 Σάλιο: Είτε όπως το πλάσμα είτε εκχύλιση από CDB (Cotton Dental Bud)	Alltima C18 (50 mm x 2.1 mm, 3 μm) Προστατευτική στήλη: Alltima C18 (7.5 mm x 2.1 mm, 3 μm)	<u>Βαθμιδωτή έκλουση:</u> MP 1: 0.1% μυρμηκικό οξύ + νερό, MP 2: 15% MeOH σε (ACN + 0.1% μυρμηκικό οξύ)	MS/MS (API)	F,NF: -/0.03 (Π), -/0.045 (Σ)	0.02-10	Φαιτανύλη-d <sup>5</sup> νορφαιτανύλη-d <sup>5</sup>

336	Φαιντανύλη, νορφαιντανύλη, δισπροπιονυλοφαιντανύλη, υδροξυνορφαιντανύλη	Πλάσμα, ούρα	<u>Πλάσμα:</u> LLE: 1) IS, 2) NH <sub>4</sub> OH + οξικός αιθυλεστέρας, 3) Εκχύλιση: MP <u>Ούρα:</u> LLE: 1) IS, 2) ACN, 3) F, NF, DPF: εκχύλιση με NaOH και οξικό αιθυλεστέρα OHNF: εκχύλιση με NH <sub>4</sub> OH και τολουένιο/3-μέθυλο-1-βουτανόλη (95:5, v/v)	<u>Ανάλυση F, NF, DPF:</u> Luna C18 αντιστρόφου φάσεως (2 mm x 150 mm, 5 μm) Προστατευτική στήλη: (όμοια) <u>Ανάλυση OHNF:</u> Luna phenyl-hexyl (2 mm x 150 mm, 5 μm)	Μεθανόλη/ACN/οξικό αμμώνιο (4 mM) (pH 4.2) (13:52:35, v/v/v)	MS/MS (API)	<u>Πλάσμα:</u> F: 0.01/0.05, NF: 0.02/0.07, DPF: 0.01/0.02, OHNF: 0.19/0.67 <u>Ούρα:</u> F: 0.03/0.09, NF: 0.05/0.17, DPF: 0.02/0.08, OHNF: 0.36/1.28	<u>Πλάσμα:</u> F: 0.05-10, NF: 0.07-0.5, DPF: 0.02-1.0, OHNF: 0.67-3.0 <u>Ούρα:</u> F: 0.09-10, NF: 0.7-50.0, DPF: 0.08-1.0, OHNF: 1.0-5.0	Φαιντανύλη-d <sup>5</sup> , NF-d <sup>5</sup> , OHNF-d <sup>5</sup>
337	Φαιντανύλη, σουφαιντανύλη, αλφαιντανύλη, νορφαιντανύλη + άλλα ναρκωτικά	Αίμα (DBS)	DBS (Agilent): 1) IS, 2) 30 μL στυ. (x 3) : ξήρανση, 3) εκχύλιση: μεθανόλη/0.1% μυρμηκικό οξύ, 4) ξήρανση, 5) απανασύσταση: 0.1% μυρμηκικό οξύ	Kinetex C18 (100 mm x 2.1 mm, 2.6 μm)	<u>Βαθμιδωτή έκλυση:</u> MP 1: μυρμηκικό αμμώνιο (5 mM) + 0.1% μυρμηκικό οξύ, MP 2: μεθανόλη/ACN (1:1, v/v) + 0.1% μυρμηκικό οξύ	MS/MS (ESI)	0.05/0.2 (για όλες τις ουσίες)	0.2 – 50	Φαιντανύλη-d <sup>5</sup>
338	Φαιντανύλη + άλλα οπιοειδή	Αίμα (DBS)	DBS-SPE: 1) έκλυση από κάρτες DBS με 0.1% μυρμηκικό οξύ, 2) εκχύλιση από στήλες SPE με 0.1% NH <sub>4</sub> OH	Raptor Biphenyl (2.1 mm x 50 mm, 2.7 μm) Προστατευτική στήλη: Restek (2.1 mm x 5 mm, 2.7 μm)	<u>Βαθμιδωτή έκλυση:</u> MP 1:μυρμηκικό αμμώνιο (5 mM) + 0.1% μυρμηκικό οξύ, MP 2: μεθανόλη	MS/MS (ESI)	-/0.1 (LLOQ)	0.1 – 50	Φαιντανύλη-d <sup>5</sup>
339	Βουτυρυλοφαιντανύλη, ακετυλοφαιντανύλη, cis-3-μεθυλοφαιντανύλη, trans-3-μεθυλοφαιντανύλη + άλλες ψυχοδραστικές ουσίες	Τρίχες	1) IS, 2) HCl (0.1 M) σε MeOH	Kinetex C18 (4.6 mm x 50 mm, 2.6 μm)	<u>Βαθμιδωτή έκλυση:</u> MP 1:μυρμηκικό αμμώνιο (5 mM) (pH 3.5) + μυρμηκικό οξύ, MP 2: ACN + 0.1% μυρμηκικό οξύ	MS/MS (ESI)	AcF: 0.05/- BF: 0.001/- cis-3MF: 0.001/- trans-3MF: 0.001/-	-	Φαιντανύλη-d <sup>5</sup>

Όπου, **B.II.**: Βιβλιογραφική Πηγή, **IS**: Internal standard, **F**: Φαιντανύλη, **RF**: Ρέμφαιντανύλη, **SF**: Σουφαιντανύλη, **BF**: Βουτυρυλοφαιντανύλη, **CF**: Καρφαιντανύλη, **LF**: Λοφαιντανύλη, **AcF**: Ακετυλοφαιντανύλη, **AIF**: Αλφαιντανύλη, **NF**: Νορφαιντανύλη, **DPF**: Δισπροπιονυλοφαιντανύλη, **OHNF**: Υδροξυνορφαιντανύλη, **cis-3MF**: cis-3-μεθυλοφαιντανύλη, **trans-3MF**: trans-3-μεθυλοφαιντανύλη, **p-FF**: p-φλουοροφαιντανύλη, **MS**: Mass Spectrometer, **NPD**: Nitrogen phosphorus detector, **UV**: Ultra violet, **LLE**: Liquid liquid extraction, **SPE**: Solid phase extraction, **HS-SPE**: Head space-Solid phase extraction, **DLLME**: Dispersed liquid liquid microextraction, **DBS**: Dry blood spot, **MEPS**: Micro extraction in packed syringe, **API**: Atmospheric pressure ionization, **EI**: Electron ionization, **ESI**: Electrospray ionization, **MRM**: Multiple reaction monitoring, **SRM**: Single reaction monitoring, **SIM**: Single ion monitoring, **MP**: Mobile phase

**Πίνακας 2.** Συνοπτική παράθεση αναλυτικών μεθόδων προσδιορισμού της ρεμφαιντανύλης με χρήση Χρωματογραφίας Αέριας Φάσης και Υγροχρωματογραφίας.

Β.Π.	Φάρμακα	Βιολογικό Υλικό	Μέθοδος Εκχύλισης	Στήλη	Κινητή Φάση	Ανιχνευτής	LOD/LOQ (ng mL <sup>-1</sup> )	Γραμμικότητα (ng mL <sup>-1</sup> )	Εσωτερικό Πρότυπο
<b>Χρωματογραφία Αέριας Φάσης (GC)</b>									
323	Ρεμφαιντανύλη	Αίμα	LLE: 1) καταβύθιση πρωτεϊνών με ACN, 2) εκχύλιση: μεθυλενοχλωρίδιο	Τριχοειδής στήλη Rt <sub>x</sub> -1 με 100% διμεθυλοπολυσιλοξάνιο (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm)	He <sub>2</sub>	HRMS (EI)	- / 0.1	0.1-250	Ρεμφαιντανύλη-d <sup>4</sup>
324	Ρεμφαιντανύλη	Αίμα	LLE: 1) IS, 2) MeOH, 3) εκχύλιση: <i>n</i> -χλωροβουτάνιο, 4) Φυγοκεντρηση, 5) υδ. φάση: MeOH, ρυθμιστικό KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (10 mM) (pH 4.2), 6) επανεκχύλιση: <i>n</i> -χλωροβουτάνιο, 7) επανασύσταση: MeOH	Τριχοειδής στήλη BPX-5 (25 m x 0.22 mm x 0.25 μm)	He <sub>2</sub>	NPD	- / 0.2	-	Φαιντανύλη
325	Ρεμφαιντανύλη	Αίμα	LLE: 1) IS, 2) εκχύλιση: επτάνιο/ισοαμυλοαλκοόλη, 3) επανασύσταση: ACN/MeOH (1:9)	Τριχοειδής στήλη InerCap-17MS (15 m x 0.25 mm)	He <sub>2</sub>	MS (EI)	-	-	Φαιντανύλη
<b>Υγροχρωματογραφία (LC)</b>									
340	Ρεμφαιντανύλη	Αίμα	LLE: 1) IS, 2) HCl, 3) ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (pH 7.4), 4) εκχύλιση: διχλωρομεθάνιο, 5) επανα/σταση: MP	Pecosphere, Perkin–Elmer, C18 (3.3 cm x 4.6 mm)	ACN/χλωροφόρμιο (1:1, v/v) + οξικό αμμώνιο	MS/MS (ESI)	-/0.1	0.1-50	Ρεμφαιντανύλη-d <sup>4</sup>
341	Φαιντανύλη, ρεμφαιντανύλη, σουφαιντανύλη, αλφαιντανύλη + μεταβολίτες	Ούρα	SPE: 1) IS, 2) ρυθμιστικό CH <sub>3</sub> COONa (1 M) (pH 5.2), 3) αρυλσουλφαταση/β-γλυκουρονιδαση, 4) εκχύλιση: MeOH, 5) επανασύσταση: ACN/ CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> (aq) σε 0.1% οξικό οξύ	Macherey–Nagel Pyramid C18 (4 mm × 70 mm, 5 μm)	Βαθμιδωτή έκλυση: MP 1: οξικό αμμώνιο (5 mM) + 0.1 % οξικό οξύ, MP 2: ACN	MS/MS (ESI)	0.5/-	-	Νορφαιντανύλη-d <sup>5</sup>



342	Ρεμφαιτανύλη	Μητρικό + νεογνικό πλάσμα	SPE (Waters Oasis®): 1) αποδέσμευση του φαρμάκου από πρωτεΐνες: φωσφορικό οξύ (85%), 2) εκχύλιση: MeOH (60%) + CH <sub>3</sub> COOH (2%)	X-Terra C8 (150 mm x 2.1 mm, 5 μm)	Νερό/MeOH/ACN (86:10:4, v/v/v) + 0.1% μυρμηκικό οξύ	MS (ESI)	0.18/0.5	0.5-48	Πεθιδίνη
343	Φαιτανύλη, ρεμφαιτανύλη, σουφαιτανύλη, αλφαιτανύλη, <i>p</i> -φλουοροφαιτανύλη, <i>cis</i> -3-μεθυλοφαιτανύλη, <i>trans</i> -3-μεθυλοφαιτανύλη νορφαιτανύλη + άλλα ναρκωτικά	Αίμα, ούρα	LLE: 1) IS, 2) ρυθμιστικό Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (pH9), 3) HCl (1M), 4) εκχύλιση: οξικό βουτύλιο, 5) απαναύσταση: ρυθμιστικό διάλυμα CH <sub>2</sub> COONH <sub>4</sub> + 0.1% μυρμηκικό οξύ (pH 3.2)	Genesis C18 αντιστρώφου φάσης	<u>Βαθμιδωτή έκλουση:</u> MP 1: ACN + 0.1 % μυρμηκικό οξύ, MP 2: οξικό αμμώνιο	MS (ESI)	F: 0.08/- RF: 0.05/- SF: 0.05/- AF: 0.05/- pFF: 0.06/- <i>cis</i> -3MF: 0.02/- <i>trans</i> -3MF: 0.04/- NF: 1.0/-	F: 0.1-530 RF: 0.2-30 SF: 0.2-200 AF: 0.05-250 pFF: 0.1-60 <i>cis</i> -3MF: 0.03-300 <i>trans</i> -3MF: 0.04-80 NF: 7-2400	Φαιτανύλη-d <sup>5</sup>
344	Φαιτανύλη, ρεμφαιτανύλη, σουφαιτανύλη, αλφαιτανύλη, 3-μεθυλοφαιτανύλη, νορφαιτανύλη	Πλάσμα, ούρα	LLE: 1) IS, 2) K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (13.6 %) (pH 12.3), 3) εκχύλιση: <i>n</i> -εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας (7:3, v/v), 4) επαναύσταση: νερό/ ACN + 15% μυρμηκικό οξύ (90:10, v/v)	Xterra® MS C18 column (150 mm x 2.1 mm, 3.5 μm) Προστατευτική στήλη: Xterra® MS C18 (10 mm x 2.1 mm, 3.5 μm)	<u>Βαθμιδωτή έκλουση:</u> MP 1: 0.15 % μυρμηκικό οξύ + νερό, MP 2: 0.15% μυρμηκικό οξύ + ACN	MS (ESI)	F, RF, AF, 3-MF, NF: -/0.1  SF: -/0.2	F, RF, AF, 3-MF, NF: 0.1-50 SF: 0.2-50	Φαιτανύλη-d <sup>5</sup> νορφαιτανύλη-d <sup>5</sup>
345	Ρεμφαιτανύλη	Πλάσμα	MEPS (mixed phase sorbent M1): 1) IS + 0.1% μυρμηκικό οξύ, 2) έκλουση: MeOH/νερό + 0.1% μυρμηκικό οξύ (90:10, v/v)	Kinetex C18 column (50mm x 2.1mm, 2.6 μm) Προστατευτική στήλη: Hypersil Gold C8 (10mm×2.1mm)	<u>Βαθμιδωτή έκλουση:</u> MP 1: 0.1 % μυρμηκικό οξύ + νερό, MP 2: MeOH	MS (ESI)	0.015/0.05	0.05-50	Ρεμφαιτανύλη- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>
346	Ρεμφαιτανύλη, προποφόλη	Πλάσμα	LLE: 1) IS, 2) εκχύλιση: οξικό αιθυλεστέρας/ εξάνιο	Hypersil Gold C18 (100 mm x 2.1 mm, 1.9 μm)	<u>Βαθμιδωτή έκλουση:</u> MP 1: νερό, MP 2: ACN	MS/MS (ESI)	RF: 0.03/20 P: 0.03/20 (μg/mL)	RF: 0.1-20 P: 0.1-20 (μg/mL)	Ρεμφαιτανύλη- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> , προποφόλη-d <sup>18</sup>

## Μέθοδοι προσδιορισμού βουτυρυλοφαιτανύλης

Ο Ruangyuttikarn και συν. [298], ανέπτυξαν μία ανοσοδοκιμασία ELISA με σκοπό την ανίχνευση της φαιτανύλης, της βουτυρυλοφαιτανύλης και κάποιων άλλων παραγώγων της φαιτανύλης στα ούρα. Σε τυφλά δείγματα ανθρώπινων ούρων προστέθηκε φαιτανύλη συγκέντρωσης από 0.03 έως 100 ng/mL και από 0.1 έως 500 ng/mL για το κάθε παράγωγο. Στην συνέχεια τα δείγματα αυτά προστέθηκαν πάνω σε μικροπλάκες στις οποίες είχε προσκολληθεί αντίσωμα φαιτανύλης προκειμένου να επιτευχθεί σύνδεση αντισώματος-αντιγόνου. Το μίγμα επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 90 λεπτά. Ακολούθησε ποσοτικοποίηση με χρήση επισημασμένου ενζύμου φωσφατάσης που συνδέεται εκλεκτικά στο σύμπλοκο. Η ευαισθησία και η πιστότητα της δοκιμής ελέγχθηκαν και η βουτυρυλοφαιτανύλη βρέθηκε ότι δίνει ικανοποιητικότερη εκτόπιση του ιχνηθέτη σε σχέση με τη φαιτανύλη (77% για 2 ng φαιτανύλης) [298]. Σε μία άλλη περίπτωση οι Alburges και συν. [301], σχεδίασαν μία δοκιμασία ραδιουποδοχέα προκειμένου να ανιχνεύουν την φαιτανύλη και τα παράγωγα της σε βιολογικά υλικά. Σε αυτή τη δοκιμασία, το IC<sub>50</sub> της βουτυρυλοφαιτανύλης που προκαλεί ανταγωνιστική εκτόπιση του 50% του ιχνηθέτη του αντισώματος της φαιτανύλης (διασταυρούμενη δραστικότητα) βρέθηκε 0.54±0.06 nM έναντι αυτής της φαιτανύλης, 0.90±0.10 nM [301].

Οι Al-Saffar και συν., ανέπτυξαν και επικύρωσαν μία μέθοδο UPLC σε συνδυασμό με δίδυμη φασματομετρία μαζών (MS/MS) με σκοπό τη δημιουργία μίας μεθόδου ικανής να αναλύσει ταυτόχρονα, έναν μεγάλο αριθμό ψυχοδραστικών ουσιών. Πραγματοποιήθηκε παράλληλη ανάλυση των δειγμάτων σε σύστημα LC με φασματομετρία μαζών υψηλής διαχωριστικής ικανότητας (HRMS) προκειμένου να εξετασθούν μία σειρά από βιολογικά δείγματα σχετικά με 4 υποθέσεις δηλητηριάσεων από βουτυρυλοφαιτανύλη. Οι παραπάνω έλεγχοι έγιναν στο πλαίσιο του Σουηδικού προγράμματος STRIDA και περιελάμβαναν προκατεργασία των δειγμάτων με κάποια διαδικασία εκχύλισης, όπως SPE, στην συνέχεια παραγωγοποίηση των ουσιών και τέλος έγχυση στο χρωματογραφικό σύστημα. Η ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση της βουτυρυλοφαιτανύλης έγινε σε δείγματα ούρων και πλάσματος με τη χρήση αυτών των μεθόδων και το όριο ποσοτικοποίησης για τα παράγωγα της φαιτανύλης υπολογίστηκε 0.5 ng/mL ενώ η μέθοδος βρέθηκε γραμμική για τις ουσίες που αναλύθηκαν στην περιοχή 0.5-1000 ng/mL. Η μέθοδος που αναπτύχθηκε από τον Al-Saffar βρέθηκε ότι είναι μία καλή διαδικασία επιβεβαίωσης για τις δοκιμασίες ανοσοπροσδιορισμού, οι οποίες μπορούν να δώσουν ψευδώς αρνητικά ή θετικά αποτελέσματα ιδίως σε περιπτώσεις όπου η υπό εξέταση ουσία, έχει δομικές ομοιότητες με γνωστές ναρκωτικές ουσίες [347-348].

Σε μία άλλη περίπτωση μία UHPLC-MS/MS μέθοδος χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να αναλυθούν δείγματα από ένα θανατηφόρο περιστατικό υπερδοσολογίας από βουτυρυλοφαιτανύλη. Αίμα και άλλα βιολογικά υλικά συλλέχθηκαν σε δύο διαφορετικούς χρόνους μετά τον θάνατο.

Πρωτότερα τα όργανα και οι ιστοί ομογενοποιήθηκαν και όλα τα δείγματα εκχυλίστηκαν δύο φορές με βουτυλεστέρα/αιθυλεστέρα (1:1, v/v). Στην συνέχεια τα εκχυλίσματα εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού, έγινε ανασύσταση στην κινητή φάση και ενέθηκαν στο χρωματογράφο. Το χρωματογραφικό σύστημα ήταν ρυθμισμένο σε λειτουργία βαθμιδωτής έκλουσης (κινητή φάση 1: 10 mM ρυθμιστικό διάλυμα μυρμηκικό αμμώνιο/ διάλυμα νερού και 0.1% v/v φορμικού οξέος, κινητή φάση 2: ακετονιτρίλιο/0.1% v/v μυρμηκικό οξύ). Η μέθοδος επικυρώθηκε και προσδιορίστηκε η εκλεκτικότητα, η ακρίβεια, η πιστότητα, η επίδραση της μήτρας και το όριο ποσοτικοποίησης το οποίο βρέθηκε 1 ng/mL για την βουτυρυλοφαινανύλη [209].

Ο McIntyre και συν. [248], ανέπτυξαν και επικύρωσαν μία μέθοδο ανάλυσης της βουτυρυλοφαινανύλης για να αναλύσουν τα βιολογικά δείγματα ενός 44χρονου, μετά από περιστατικό θανάτου. Τα βιολογικά υλικά που εξετάστηκαν ήταν ολικό αίμα, ήπαρ, ούρα και γαστρικό υγρό. Η μέθοδος περιελάμβανε την χρήση GC-MS και βασίστηκε σε μία μέθοδο η οποία είχε αναπτυχθεί πρωτότερα για την φαινανύλη και στην οποία έγιναν μερικές τροποποιήσεις. Η βουτυρυλοφαινανύλη ανιχνεύθηκε αρχικά με δοκιμασία ELISA. Στην συνέχεια τα δείγματα εκχυλίστηκαν με LLE. Ο χρωματογράφος ρυθμίστηκε σε splitless λειτουργία και η θερμοκρασία στον εισαγωγέα στους 250 °C. Το He<sub>2</sub> χρησιμοποιήθηκε ως φέρον αέριο με ροή 1.1 mL/min. Το φάσμα μαζών συγκρίθηκε με αυτό της καθαρής ουσίας, βρέθηκε ο χρόνος ανάλυσης της βουτυρυλοφαινανύλης (8.98 min) και τα σημαντικότερα θραύσματα και η ανάλυση επαναλήφθηκε σε ρύθμιση παρακολούθησης επιλεγμένου ιόντος (SIM) προκειμένου να γίνει η ποσοτικοποίηση. Η μέθοδος επικυρώθηκε και βρέθηκε το LOD, 2 ng/mL, το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ), 10 ng/mL, η επίδραση μήτρας και η τυπική απόκλιση [248].

Τέλος, μία UHPLC-qTOF MS μέθοδος χρησιμοποιήθηκε από τον Steuer και συν. για τον προσδιορισμό των μεταβολιτών της βουτυρυλοφαινανύλης σε βιολογικά υγρά. Η μέθοδος αυτή αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε από τον Roemmelt και τους συνεργάτες του με σκοπό την ταυτόχρονη ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση μικρών μορίων κατά την διάρκεια ενός αναλυτικού κύκλου. Η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε συνδυαστικά με μία μέθοδο ταχείας απόκτησης δεδομένων (Data Independent Acquisition), που ονομάζεται SWATH. Τα βιολογικά δείγματα ελήφθησαν από ένα περιστατικό υπερδοσολογίας με βουτυρυλοφαινανύλη στην οποία το άτομο κατέληξε. Περιελάμβαναν ούρα και ολικό αίμα, στα οποία έγινε καταβύθιση πρωτεϊνών και εκχύλιση με SPE και τα οποία στην συνέχεια αποθηκεύτηκαν στους -20 °C μέχρι την ανάλυση. Η επικύρωση της μεθόδου περιλάμβανε την εξέταση παραμέτρων όπως, η % ανάκτηση, η επίδραση μήτρας, η εκλεκτικότητα, η ακρίβεια, η πιστότητα και η σταθερότητα [233, 349].

## Μέθοδοι προσδιορισμού ακετυλοφαιτανύλης

Η ακετυλοφαιτανύλη δεν μπορεί να ταυτοποιηθεί με ανοσοδοκιμασίες όπως η ELISA καθώς δεν μπορεί να διακριθεί από την φαιτανύλη. Έτσι οι θετικές προκαταρκτικές αναλύσεις ακολουθούνται από επαλήθευση, με τη χρήση μίας πληθώρας χρωματογραφικών τεχνικών σε συνδυασμό κυρίως με αναλυτή μαζών [350, 351]. Ο Ruangyuttikarn και συν. [298] έδειξαν ότι η ακετυλοφαιτανύλη εμφανίζει υψηλή διασταυρούμενη δραστικότητα με τη φαιτανύλη, καθώς το ποσοστό πρόσδεσης με τον υποδοχέα (2 ng/mL) του προτύπου φαιτανύλης ήταν συγκρίσιμο με αυτό της ακετυλοφαιτανύλης (1.8 ng/mL). Ο Wang και συν. [351] χρησιμοποίησαν μια ανοσοδοκιμασία για την φαιτανύλη προκειμένου να ανιχνεύσουν την φαιτανύλη, τους μεταβολίτες της, την ακετυλοφαιτανύλη και άλλα παράγωγα φαιτανύλης σε ούρα σε έναν πληθυσμό στο Σαν Φρανσίσκο. Η ακετυλοφαιτανύλη έδειξε διασταυρούμενη δραστικότητα με τη φαιτανύλη σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 2.5 ng/mL.

Οι Patton και συν., [352] ανέπτυξαν και επικύρωσαν πρώτοι μία χρωματογραφική μέθοδο LC–MS/MS με σκοπό την ταυτόχρονη ποσοτικοποίηση της ακετυλοφαιτανύλης και του μεταβολίτη της σε δείγματα ούρων. Πριν την ανάλυση τα δείγματα υποβλήθηκαν σε κατεργασία με β-γλυκουρονιδάση και εκχυλίστηκαν με μεθανόλη/ακετονιτρίλιο/υδροξείδιο του αμμωνίου (50:50:2 v/v/v) σε SPE στήλες. Η μέθοδος παρείχε πολύ καλή ακρίβεια, δια- και ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (%CV<20%) και χαμηλά LOD (1 ng/ml) για την ακετυλοφαιτανύλη και τον μεταβολίτη της [352].

Μία άλλη UPLC–MS/MS, αναπτύχθηκε από τον Roklis και συν. [353], με σκοπό τον προσδιορισμό της ακετυλοφαιτανύλης, της φαιτανύλης και των νορ- μεταβολιτών τους σε βιολογικά υγρά και ιστούς. Η μέθοδος αναπτύχθηκε με σκοπό να εφαρμοστεί σε μεταθανάτια βιολογικά δείγματα, ιατροδικαστικών υποθέσεων στις Ηνωμένες Πολιτείες και να δώσει πληροφορίες σχετικά με την κατανομή της ουσίας αυτής στους ιστούς. Τα δείγματα στην μέθοδο αυτή κατεργάστηκαν με SPE με εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο/ισοπροπανόλη/αμμωνία (78:20:2, v/v/v). Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν Allure Biphenyl (100 mm x 2.5 mm, 5 μm) και η έκλουση ήταν βαθμιδωτή (κινητή φάση 1: 10 mM ρυθμιστικό διάλυμα μυρμηκικό αμμώνιο + 0.1% v/v μυρμηκικό οξύ/απιονισμένο νερό, κινητή φάση 2: μεθανόλη). Η μέθοδος επικυρώθηκε και βρέθηκε ότι έχει πολύ καλή γραμμικότητα για την περιοχή 1-100 ng/ml, ενώ το LOQ προσδιορίστηκε 1 ng/ml για την ακετυλοφαιτανύλη [353].

Μία μέθοδος GC–MS αναπτύχθηκε από τον Zhang και συν. [354] για τον προσδιορισμό της ακετυλοφαιτανύλης σε βιολογικά υγρά και ιστούς. Τα δείγματα εκχυλίστηκαν με LLE με *n*-βουτυλοχλωρίδιο/αιθέρας μετά επανεκχυλίστηκαν με H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, αλκαλοποιήθηκαν και τέλος επανεκχυλίστηκαν με μεθυλενοχλωρίδιο. Η μέθοδος αυτός χαρακτηρίζεται από καλή γραμμικότητα

στην περιοχή 25 ng/ml έως 800 ng/ml ενώ το LOQ της μεθόδου ήταν 25 ng/ml. Εφαρμόστηκε με επιτυχία σε μεταθανάτια βιολογικά δείγματα ιατροδικαστικών υποθέσεων όπως, καρδιακό αίμα, αίμα από την περιοχή του μηριαίου οστού, ούρα, ήπαρ, νεφρά και υαλοειδές υγρό. Μέχρι στιγμής έχει εφαρμοστεί σε τρεις περιπτώσεις θανάτων στο Μέριλαντ [354].

Μία άλλη GC–MS/MS μέθοδος αναπτύχθηκε από τον McIntyre για τον προσδιορισμό της ακετυλοφαινανύλης σε βιολογικά υγρά και ιστούς. Τα δείγματα κατεργάστηκαν με LLE πριν την ανάλυση με 1-χλωροβουτάνιο. Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε σε στήλη Zebtron ZB-5MS (15 m x 0.25 mm x 0.25 μm). Το φέρον αέριο ήταν He<sub>2</sub>. Η μέθοδος επικυρώθηκε και βρέθηκαν τα χαρακτηριστικά ποιότητας της με, LOD 50 ng/ml και LOQ 100 ng/ml. Η μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί σε βιολογικά δείγματα όπως, αίμα, υαλοειδές υγρό, ούρα και ήπαρ, σε περιστατικά ιατροδικαστικής φύσεως, σχετικά με θανάτους από υπερδοσολογίες ακετυλοφαινανύλης [355].

Οι Melent'ev και συν. [Melent'ev et al., 2014], χρησιμοποίησαν σύστημα HPLC–MS και GC–MS προκειμένου να προσδιορίσουν τους μεταβολίτες της ακετυλοφαινανύλης. Τα δείγματα κατεργάστηκαν με SPE. Επίσης προηγήθηκαν ακυλίωση (πενταφλουορο-παράγωγα) των εκχυλισμάτων από τα ούρα, προκειμένου να ανιχνευθούν και οι υδροξυλιωμένοι μεταβολίτες και τα *N*-απακετυλιωμένα παράγωγα τους στην GC–MS [217].

Σε μία άλλη περίπτωση, οι Hitsatune και συν. [356] χρησιμοποίησαν ένα σύστημα LC–qTOF MS προκειμένου να ανιχνεύσουν την ακετυλοφαινανύλη και την *α*-πυρρολιδινωεξινοφαινόνη (*α*-PHP) σε μεταθανάτια δείγματα αίματος. Ο διαχωρισμός έλαβε χώρα σε στήλη L-2 ODS, με χρήση δύο κινητών φάσεων (κινητή φάση 1: 95% μεθανόλη + 10 mM ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου, κινητή φάση 2: 5% μεθανόλη + 10 mM ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου). Η χρήση LC–qTOF MS τεχνικής προσδίδει υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία στην ανάλυση και καθιστά εφικτή την ανίχνευση πολύ μικρών συγκεντρώσεων στα βιολογικά υγρά που με άλλες τεχνικές θα ήταν αδύνατο να ανιχνευθούν. Η ποσοτικοποίηση της ακετυλοφαινανύλης έγινε με GC–MS, ύστερα από εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα. Τα επίπεδα των ουσιών στο αίμα βρέθηκαν 69 ng/mL και 413 ng/mL, για την ακετυλοφαινανύλη και την *α*-PHP, αντίστοιχα. Ακριβείς μετρήσεις μάζας για αναζήτηση των βασικών μεταβολιτών των ουσιών αυτών, οδήγησε στην εξακρίβωση των μεταβολικών οδών της ακετυλοφαινανύλης [356].

### **Μέθοδοι προσδιορισμού οκφαινανύλης**

Οι Coorpan και συν. ανέπτυξαν μία UPLC–MS/MS μέθοδος προκειμένου να προσδιορίσουν την οκφαινανύλη σε βιολογικά υγρά, στο πλαίσιο της διερεύνησης μίας σειράς υποθέσεων δηλητηριάσεων στο Βέλγιο. Αυτή είναι η πρώτη μέθοδος που περιλαμβάνει δεδομένα επικύρωσης.

Διαφορετικά βιολογικά δείγματα (μηριαίο και καρδιακό αίμα, υαλοειδές υγρό, ούρα, στομαχικό περιεχόμενο, ήπαρ, νεφρά, εγκεφαλικός ιστός και χολή) υποβλήθηκαν σε τοξικολογική ανάλυση. Όλα τα δείγματα προκατεργάστηκαν με *n*-εξάνιο:οξικός αιθυλεστέρας (7:3, v/v) (LLE) αφού όλοι οι ιστοί είχαν ομογενοποιηθεί πριν την εκχύλιση. Η φαιντανύλη- $d^5$  χρησιμοποιήθηκε ως IS. Το UPLC–MS/MS σύστημα χρησιμοποιήθηκε σε λειτουργία βαθμιδωτής έκλουσης (κινητή φάση 1:0.15% μυρμηκικό οξύ, κινητή φάση 2:0.15% ακετονιτρίλιο) και ρυθμό ροής κινητής φάσης (FR) στα 0.400 mL/min. Η οκφαιντανύλη ανιχνεύθηκε σε όλα τα βιολογικά υλικά μαζί με άλλες ουσίες [218]. Η καφέ σκόνη η οποία βρέθηκε δίπλα στο ένα από τα περιστατικά αναλύθηκε με μία HPLC μέθοδο με ανιχνευτή συστοιχία φωτοδιόδων (PDA) και μια μέθοδο GC–MS, οι οποίες είχαν αναπτυχθεί και περιγραφεί σε παλαιότερες δημοσιεύσεις από τον Coorpan και τους συνεργάτες του [357].

Οι Dussy και συν. λίγο μετά [Dussy et al., 2016], τροποποίησαν μία LC–MS/MS και μία HPLC–PDA μέθοδο, η οποία είχε αναπτυχθεί και επικυρωθεί για τον προσδιορισμό βενζοδιαζεπινών και μεταβολιτών τους στο αίμα και στον ορό [219]. Η ελαφρώς τροποποιημένη μέθοδος χρησιμοποιήθηκε ώστε να αναλυθούν μία σειρά από δείγματα αίματος και ούρων τα οποία είχαν συλλεχθεί από μία υπόθεση δηλητηρίασης. Η οκφαιντανύλη ταυτοποιήθηκε με την χρήση LC–MS/MS μεθόδου. Η ποσοτικοποίηση των αναλυτών που βρέθηκαν στα ούρα έγινε στο περιφερικό αίμα με τη χρήση LC–MS/MS μεθόδου και την φαιντανύλη ως IS. Τα δείγματα εκχυλίστηκαν με *n*-χλωροβουτάνιο και φυγοκεντρήθηκαν. Η ποσοτικοποίηση της οκφαιντανύλης στη σκόνη που βρέθηκε δίπλα στο σώμα έγινε με την ίδια LC–MS/MS μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε για την τοξικολογική ανάλυση των βιολογικών δειγμάτων [358].

Μία άλλη LC–MS/MS μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση της οκφαιντανύλης σε βιολογικά δείγματα, στο πλαίσιο της διερεύνησης ενός θανάτου στην Γαλλία. Όλα τα δείγματα προκατεργάστηκαν με σουλφοακυλικό οξύ το οποίο περιείχε φαιντανύλη- $d^5$  σαν IS. Έπειτα τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν και το υπερκείμενο υποβλήθηκε σε SPE πριν την χρωματογραφική ανάλυση [279].

### **Μέθοδοι προσδιορισμού φουρανυλοφαιντανύλης**

Οι Mohr και συν. [224], ανέπτυξαν και επικύρωσαν μία μέθοδο για την ανάλυση μίας σειράς δειγμάτων σχετικών με 19 υποθέσεις θανάτων από υπερδοσολογία με φουρανυλοφαιντανύλη. Δείγματα αίματος συλλέχθηκαν από όλες τις υποθέσεις και εκχυλίστηκαν με SPE. Η ανάλυση έλαβε χώρα σε σύστημα HPLC–MS/MS με αναλυτή τριπλό τετράπολο και θετικό ESI. Ο διαχωρισμός έλαβε χώρα σε λειτουργία βαθμιδωτής έκλουσης (κινητή φάση 1:μυρμηκικό οξύ/νερό, κινητή φάση 2:μυρμηκικό οξύ/μεθανόλη) και FR, 0.5 mL/min. Κατά την επικύρωση της μεθόδου αξιολογήθηκαν, η γραμμικότητα, το συστηματικό σφάλμα, το όριο ανίχνευσης, η ακρίβεια και η πιστότητα μετά το

πέρασ 3 ημερών. Η μέθοδος βρέθηκε γραμμική σε εύρος συγκεντρώσεων 1-100 ng/mL και το κατώτατο όριο ανίχνευσης για την φουράνυλ-φαιτανύλη βρέθηκε 0.5 ng/mL [224].

Μια άλλη μέθοδος ναπτύχθηκε για την ανάλυση ενός μεγάλου εύρους ψυχοδραστικών ουσιών και περιλαμβάνει ανάλυση με UPLC-MS/MS και LC-HRMS. Στην συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε για να αναλύσει επίσης μία σειρά δειγμάτων σχετικές με δηλητηριάσεις από υπερδοσολογίες, στο πλαίσιο και πάλι του Σουηδικού προγράμματος STRIDA. Τα βιολογικά δείγματα που αναλύθηκαν ήταν ορός αίματος και ούρα και σε μία μόνο από τις εξετασθείσες περιπτώσεις βρέθηκε φουρανυλοφαιτανύλη. Το χαμηλότερο όριο ποσοτικοποίησης αναφορικά με την φουρανυλοφαιτανύλη ήταν <0.5 ng/mL και η μέθοδος βρέθηκε γραμμική στην περιοχή 0.5-1000 ng/mL [281, 348].

Οι Goggin και συν. [235], ανέπτυξαν μία LC-MS/MS μέθοδο με σκοπό να προσδιορίσουν τους μεταβολίτες της φουρανυλοφαιτανύλης στα ούρα. Πριν την ανάπτυξη της μεθόδου, 500 δείγματα ούρων είχαν υποβληθεί αρχικά σε προκαταρκτικό έλεγχο (routine screening test) και είχαν βρεθεί θετικά για 6-μονοακετυλομορφίνη (6-MAM). Στην συνέχεια τα δείγματα εκχυλίστηκαν με ακετονιτρίλιο/μεθανόλη (90:10, v/v) (LLE), αφού προστέθηκε σε αυτά ως IS η φαιτανύλη-d<sup>5</sup>. Το χρωματογραφικό σύστημα είχε ρυθμιστεί να λειτουργεί σε βαθμιδωτή έκλουση (10% ακετονιτρίλιο σε 10 mM οξικό αμμώνιο – 75% μυρμηκικό οξύ). Πενήντα ένα από τα πεντακόσια δείγματα που αναλύθηκαν βρέθηκαν ότι περιέχουν φουρανυλοφαιτανύλη. Τμήματα από τα δείγματα ούρων αναλύθηκαν περαιτέρω με μια μη-στοχευμένη UHPLC-qTOF μέθοδο. Το χρωματογραφικό σύστημα ήταν σε λειτουργία βαθμιδωτής έκλουσης (κινητή φάση 1: ακετονιτρίλιο/10 mM οξικό αμμώνιο, κινητή φάση 2: 0.1% μυρμηκικό οξύ). Η μέθοδος επικυρώθηκε και βρέθηκε γραμμική σε περιοχή συγκεντρώσεων 0.50-50.0 ng/mL για την φουρανυλοφαιτανύλη. Αυτή η μέθοδος είναι η πρώτη επικυρωμένη μέθοδος που περιγράφεται στην βιβλιογραφία για τον προσδιορισμό των μεταβολιτών της φουρανυλοφαιτανύλης [235].

Μία LC-HRMS μέθοδος χρησιμοποιήθηκε από τον Watanabe και συν. [236] προκειμένου να προσδιοριστούν *in vivo* και *in vitro* οι μεταβολίτες της φουρανυλοφαιτανύλης. Για αυτό το σκοπό πέντε δείγματα ούρων από υποθέσεις δηλητηριάσεων, αναλύθηκαν με και χωρίς ενζυματική υδρόλυση. Στα δείγματα προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου και 1 μL από το κάθε διάλυμα ενέθηκε στο χρωματογραφικό σύστημα. Το σύστημα είχε ρυθμιστεί σε λειτουργία βαθμιδωτής έκλουσης (κινητή φάση 1: 10 mM οξικό αμμώνιο/0.05% v/v μυρμηκικό οξύ, κινητή φάση 2: 0.05% v/v μυρμηκικό οξύ/ακετονιτρίλιο) και το FR είχε ρυθμιστεί στα 0.5 mL/min. Η φουρανυλοφαιτανύλη επώαστηκε με 10 mM ανθρώπινων ηπατοκυττάρων για 1.3 και 5 ώρες. Το υπερκείμενο του μέσου της *in vitro* επώασης, συλλέχθηκε μετά από φυγοκέντρηση και ενέθηκε στο χρωματογραφικό σύστημα, το οποίο λειτουργούσε στις ίδιες χρωματογραφικές συνθήκες [236].

## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**





## Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας, η οποία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ιαροδικαστικής και Τοξικολογίας της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, ήταν η ανάπτυξη και επικύρωση μίας αναλυτικής μεθόδου για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό της φαιντανύλης, του μεταβολίτη της, νορφαιντανύλης, καθώς και των παραγώγων αυτής ρεμφαιντανύλη, ακετυλοφαιντανύλη, βουτυροφαιντανύλη, οκφαιντανύλη και φουρανυλοφαιντανύλη στο ολικό αίμα, με την τεχνική της χρωματογραφίας αέριας φάσεως σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών (GC-MS).

Το ολικό αίμα αποτελεί ένα ιδιαίτερα σημαντικό βιολογικό υλικό για τον προσδιορισμό ναρκωτικών ουσιών καθώς παρέχει άμεσα πληροφορίες για την παρουσία και τη συγκέντρωσή τους στον οργανισμό, για το αν το άτομο βρίσκεται υπό την επήρειά τους, για τον χρόνο λήψης αλλά και το φαρμακοκινητικό τους προφίλ, η δε συγκέντρωση των διαφόρων ουσιών σε αυτό σχετίζεται άμεσα με την κλινική εικόνα του ασθενή ή με την αιτία θανάτου.

Η αναπτυχθείσα μέθοδος θα πρέπει να έχει τη δυνατότητα ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού των ουσιών αυτών σε συγκεντρώσεις που να καλύπτουν τα θεραπευτικά και τα υποθεραπευτικά επίπεδα για την φαιντανύλη και τη ρεμφαιντανύλη αλλά και τα χαμηλά επίπεδα όλων των άλλων παραγώγων φαιντανύλης. Στο πλαίσιο των σύγχρονων απαιτήσεων η μέθοδος αυτή θα πρέπει να συνδυάζει υψηλή ευαισθησία, ακρίβεια, ειδικότητα και εκλεκτικότητα, αναπαραγωγιμότητα και ευκολία στην εφαρμογή ταυτόχρονα με χαμηλό κόστος ανάλυσης ώστε να μπορεί να εφαρμόζεται άμεσα και επιτυχώς για την αντιμετώπιση ανάλογων περιστατικών.

Η μέθοδος αυτή θα μπορεί να εφαρμοστεί στη τοξικολογική διερεύνηση δικαστικών υποθέσεων αλλά και κλινικών περιστατικών δηλητηριάσεων. Ακόμα θα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την διερεύνηση του φαρμακοκινητικού προφίλ των νέων παραγώγων της φαιντανύλης αλλά και για την παρακολούθηση ασθενών που βρίσκονται υπό φαρμακευτική αγωγή με φαιντανύλη.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Εργαστηριακός και υλικοτεχνικός εξοπλισμός

Ο οργανολογικός και υλικοτεχνικός εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε στο εργαστήριο κατά την ανάπτυξη και βελτιστοποίηση της μεθόδου προσδιορισμού της φαιτανύλης και των αναλόγων της σε ολικό αίμα, είναι ο ακόλουθος.

### 5.1 Χρωματογράφος αέριας φάσεως συνδεδεμένος με φασματόμετρο μαζών (GC/MS)

Στα τοξικολογικά εργαστήρια η βασική τεχνική που χρησιμοποιείται είναι η χρωματογραφία αέριας φάσης συζευγμένη συνήθως με φασματόμετρο μαζών. Για αυτό κρίθηκε σκόπιμο να γίνει η ανάπτυξη μίας μεθόδου που να βασίζεται σε αυτή την τεχνική η οποία εξακολουθεί να αποτελεί μία αξιόπιστη και αποτελεσματική τεχνική. Επιπροσθέτως αποτελεί μία οικονομική και φιλική προς το περιβάλλον τεχνική καθώς ως κινητή φάση χρησιμοποιείται ένα φέρον αέριο και αποφεύγεται η χρήση, ακριβών και τοξικών προς το περιβάλλον, διαλυτών.

Η ανάπτυξη της μεθόδου προσδιορισμού της φαιτανύλης, του μεταβολίτη της και των υπό εξέταση αναλόγων (ρεμφαιτανύλη, ακετυλοφαιτανύλη, βουτυροφαιτανύλη, οκφαιτανύλη, φουρανυλοφαιτανύλη) έλαβε χώρα με τη χρήση αναλυτικού οργάνου αέριας χρωματογραφίας της εταιρείας Shimadzu σε σύζευξη με τετραπολικό φασματόμετρο μαζών επίσης της εταιρείας Shimadzu (**Εικ. 15**). Τα βασικά μέρη από τα οποία αποτελείται είναι, ένα θερμαινόμενο στόμιο εισαγωγής δείγματος, μία τριχοειδής στήλη, ένας αναλυτής μαζών και ένας ανιχνευτής. Η στήλη βρίσκεται εσωτερικά σε θάλαμο του οργάνου υπό σταθερή θερμοκρασία. Μέσω υπολογιστή και με τη βοήθεια λογισμικού προγράμματος υπάρχει η δυνατότητα ρύθμισης της θερμοκρασίας του θαλάμου ώστε να επιτυγχάνεται καλύτερος διαχωρισμός. Η στατική φάση της στήλης αποτελείται από πολύ(διμεθυλοσιλοξυ)πολυ-1,4-δις(διμεθυλοσιλοξυ)φαινυλο-σιλοξάνιο, ενώ ως φέρον αέριο χρησιμοποιείται το ήλιο το οποίο μεταφέρει τις ενώσεις από το σημείο έγχυσης, μέσα στη στήλη και τέλος στον ανιχνευτή. Οι παράμετροι λειτουργίας του οργάνου ρυθμίζονται μέσω υπολογιστή.

Το παραπάνω χρωματογραφικό σύστημα περιλαμβάνει τα παρακάτω:

1. Χρωματογράφος αέριας φάσης Shimadzu, GC-2010 (**Εικ. 15**)
2. Φασματόμετρο μαζών Shimadzu, QP-2010S (εξοπλισμένος με πηγή ιονισμού πρόσκρουσης ηλεκτρονίων, electron impact, EI)
3. Αυτόματο δειγματολήπτη Shimadzu, AOC-20i
4. Αντλία κενού, Edwards
5. Χρωματογραφική στήλη: DB-5 MS (J & W Scientific), 30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 μm
6. Λογισμικό πρόγραμμα: GCMS Solutions της εταιρείας Shimadzu.

## 7. Λογισμικό πρόγραμμα: IBM SPSS Statistics 23



Εικόνα 15. Χρωματογράφος αέριας φάσεως Shimadzu, GC-2010.

### 5.2 Υλικοτεχνικός εξοπλισμός

Ο υλικοτεχνικός εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε είναι ο παρακάτω:

1. Ατομικός αναδευτήρας περιδίνησης (Vortex), Chiltren & Labinco
2. Σύστημα εξάτμισης συνδεδεμένο με άζωτο 9 θέσεων (Reacti-Vap), Pierce
3. Σύστημα εκχύλισης στερεάς φάσης 20 θέσεων, Varian
4. Σύστημα παρασκευής υπερκάθαρου νερού, Merck
5. Ρυθμιζόμενη μηχανική πιπέτα (2-20  $\mu\text{L}$ ), Thermo
6. Ρυθμιζόμενη μηχανική πιπέτα (20-200  $\mu\text{L}$ ), Gilson
7. Ρυθμιζόμενη μηχανική πιπέτα (100-1000  $\mu\text{L}$ ), Gilson
8. Ρύγχη πιπετών (2-200  $\mu\text{L}$ )
9. Ρύγχη πιπετών (200-1000  $\mu\text{L}$ )
10. Πλαστικές πιπέτες μίας χρήσης
11. Γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες
12. Γυάλινοι κωνικοί δοκιμαστικοί σωλήνες
13. Γυάλινοι εσφυρισμένοι κωνικοί δοκιμαστικοί σωλήνες

14. Ογκομετρικοί κύλινδροι
15. Γυάλινα φιαλίδια, 2 mL
16. Γυάλινα σωληνάκια προσυγκέντρωσης (glass inserts), 400 uL
17. Ψηφιακό πεχάμετρο, Metrohm
18. Αναλυτικός ζυγός, Rawwag
19. Φυγόκεντρος, Alresa

### 5.3 Διαλύτες, αντιδραστήρια και στήλες εκχύλισης

Οι διαλύτες και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα παρακάτω:

1. Υπερκάθαρο νερό, Merck
2. Μεθανόλη καθαρότητας HPLC, Merck
3. Ακετονιτρίλιο καθαρότητας HPLC, Merck
4. Διχλωρομεθάνιο καθαρότητας HPLC, Merck
5. Εξάνιο καθαρότητας HPLC, Merck
6. Οξικός αιθυλεστέρας καθαρότητας HPLC, Merck
7. Ισοπροπανόλη καθαρότητας HPLC, Merck
8. Αμμωνία αναλυτικής καθαρότητας, περιεκτικότητας 25%, Merck
9. Υδροξείδιο του νατρίου αναλυτικής καθαρότητας, Ferak
10. Υδροξείδιο του καλίου αναλυτικής καθαρότητας, Ferak
11. Διενυδρο, δισοξίνο φωσφορικό νάτριο αναλυτικής καθαρότητας, Merck
12. Διενυδρο, μονόξινο φωσφορικό νάτριο αναλυτικής καθαρότητας, Merck
13. Οξικό οξύ αναλυτικής καθαρότητας, Merck
14. Πενταφθοροπροπιονικός ανυδρίτης 99% (pentafluoropropionic anhydride, PFPA), Sigma-Aldrich
15. Τριφθοροξικός ανυδρίτης 99% (trifluoroacetic anhydride, TFAA), Fluka
16. Οξικός ανυδρίτης 97% (acetic anhydride), Sigma-Aldrich
17. *N,O*-δισ(τριμεθυλοσιλυλ)-τριφθοροακεταμίδιο (*N,O*-bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide, BSTFA) με 1% τριμεθυλοχλωροσιλάνιο (trimethylchlorosilane, TMCS), Sigma-Aldrich
18. *N*-μεθυλ-*N*-τερτ-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλ-τριφθοροακεταμίδιο (*N*-methyl-*N*-tert-butyl-dimethylsilyl-trifluoroacetamide, MTBSTFA) με 1% τερτ-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοχλωρίδιο (tert-butyl-dimethylsilylchloride, TBDMSCl), Fluka

Δοκιμάστηκαν οι εξής στήλες εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE):

1. τύπου Bond Elut Certify, Agilent
2. τύπου Bond Elut Certify II, Agilent

### 3. τύπου Bond Elut C18, Agilent

## 5.4 Βιολογικό υπόστρωμα

Για την παρασκευή προτύπων εμβολιασμένων δειγμάτων ολικού αίματος, χρησιμοποιήθηκαν μονάδες αίματος, διαφόρων ομάδων αίματος ελεύθερων φαρμάκων, οι οποίες προσφέρθηκαν από τις Μονάδες Αιμοδοσίας των Νοσοκομείων «Παιδων-Αγία Σοφία» και «Λαϊκό» της Αθήνας. Οι διάφορες μονάδες αίματος αναμήχθησαν, δημιουργώντας δεξαμενές αίματος, ελεύθερου φαρμάκων (pooled drug free blood).

Τα άγνωστα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για την εφαρμογή της αναλυτικής μεθόδου που αναπτύχθηκε, ήταν δείγματα από περιστατικά κλινικού και δικαστικού ενδιαφέροντος του εργαστηρίου στα οποία, είτε είχε ανιχνευθεί κάποια από τις εξετασθείσες ουσίες κατά τον γενικό τοξικολογικό έλεγχο, είτε υπήρχε η υποψία λήψης ουσιών αυτής της κατηγορίας.

## 5.5 Πρότυπες ουσίες αναφοράς, διαλύματα παρακαταθήκης

Στο πλαίσιο της παρούσας διδακτορικής διατριβής χρησιμοποιήθηκαν ως πρότυπες ουσίες αναφοράς οι υπό μελέτη ναρκωτικές ουσίες φαιντανύλη, νορφαιντανύλη, ρεμφαιντανύλη, βουτυρυλοφαιντανύλη, ακετυλοφαιντανύλη, οκφαιντανύλη, φουράνυλοφαιντανύλη και μεθαδόνη-d<sup>3</sup>.

1. Φαιντανύλη, μεθανολικό διάλυμα (1.0 mg/mL), 1 mL (LGC Promo Chem India Pvt Ltd)
2. Νορφαιντανύλη (οξαλική), μεθανολικό διάλυμα (1.0 mg/mL), 1 mL (LGC Promo Chem India Pvt Ltd)
3. Ρεμφαιντανύλη (υδροχλωρική), μεθανολικό διάλυμα (1.0 mg/mL), 1 mL (LGC Promo Chem India Pvt Ltd)
4. Βουτυρυλοφαιντανύλη (υδροχλωρική), λευκή κρυσταλλική σκόνη, 1 mg (Cayman Chemical Company), καθαρότητας  $\geq 98.00\%$
5. Ακετυλοφαιντανύλη (υδροχλωρική), λευκή κρυσταλλική σκόνη, 5 mg (LGC Promo Chem India Pvt Ltd), καθαρότητας  $\geq 98.00\%$
6. Οκφαιντανύλη (υδροχλωρική), λευκή κρυσταλλική σκόνη, 1 mg (Cayman Chemical Company), καθαρότητας  $\geq 98.00\%$
7. Φουράνυλοφαιντανύλη (υδροχλωρική), λευκή κρυσταλλική σκόνη, 1 mg (Cayman Chemical Company), καθαρότητας  $\geq 98.00\%$
8. Μεθαδόνη-d<sup>3</sup>, μεθανολικό διάλυμα (1.0 mg/mL), 1 mL (LGC Promo Chem India Pvt Ltd)
9. Κωδεΐνη-d<sup>6</sup>, μεθανολικό διάλυμα (1.0 mg/mL), 1 mL (LGC Promo Chem India Pvt Ltd)
10. Διαζεπάμη-d<sup>5</sup>, μεθανολικό διάλυμα (1.0 mg/mL), 1 mL (LGC Promo Chem India Pvt Ltd)

Οι πρότυπες ουσίες αναφοράς και τα πρότυπα διαλύματα των ουσιών αναφοράς και του εσωτερικού προτύπου φυλάσσονταν σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας ή του φορέα από όπου προμηθεύτηκαν και μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναφερόταν στο πιστοποιητικό τους. Για τις υπό μελέτη ουσίες που παραλήφθησαν σε στερεή μορφή, παρασκευάστηκαν πυκνά πρότυπα διαλύματα παρακαταθήκης για την κάθε ουσία συγκέντρωσης 1.0 mg/mL σε μεθανόλη. Όλα τα διαλύματα παρακαταθήκης φυλάσσονταν σε θερμοκρασία 4°C και έφεραν ετικέτες με την αναγραφή των στοιχείων τους.

## 5.6 Διαλύματα εργασίας και παρασκευή προτύπων δειγμάτων ολικού αίματος

Κατά το στάδιο ανάπτυξης και βελτιστοποίησης της μεθόδου προσδιορισμού της φαιτανύλης και των παραγώγων της για την διενέργεια των απαραίτητων δοκιμασιών χρησιμοποιήθηκαν:

- Διαλύματα εργασίας της φαιτανύλης, της νορφαιτανύλης, της ρεμφαιτανύλης, της βουτυρυλοφαιτανύλης, της ακετυλοφαιτανύλης, της οκφαιτανύλης και της φουραυλοφαιτανύλης σε συγκέντρωση 10.0  $\mu\text{g/mL}$  τα οποία παρασκευάστηκαν με παραλαβή 10  $\mu\text{L}$  από το διάλυμα παρακαταθήκης της κάθε ουσίας με συγκέντρωση 1.0 mg/mL και αραιώση με μεθανόλη μέχρι όγκου 1 mL.
- Διάλυμα εργασίας της νορφαιτανύλης σε επίπεδο συγκέντρωσης 3.0  $\mu\text{g/mL}$  (**Διάλυμα Π<sub>1</sub>**), το οποίο παρασκευάστηκε με παραλαβή 300  $\mu\text{L}$  από το διάλυμα εργασίας της νορφαιτανύλης με συγκέντρωση 10.0  $\mu\text{g/mL}$  και αραιώση με μεθανόλη μέχρι όγκου 1 mL.
- Διάλυμα εργασίας της νορφαιτανύλης σε επίπεδο συγκέντρωσης 0.1  $\mu\text{g/mL}$  (**Διάλυμα Π<sub>2</sub>**), το οποίο παρασκευάστηκε με παραλαβή 10  $\mu\text{L}$  από το διάλυμα εργασίας της νορφαιτανύλης με συγκέντρωση 10.0  $\mu\text{g/mL}$  και αραιώση με μεθανόλη μέχρι όγκου 1 mL.
- Διάλυμα εργασίας της νορφαιτανύλης σε επίπεδο συγκέντρωσης 0.010  $\mu\text{g/mL}$  (**Διάλυμα Π<sub>3</sub>**), το οποίο παρασκευάστηκε με παραλαβή 100  $\mu\text{L}$  από το διάλυμα Π<sub>2</sub> και αραιώση με μεθανόλη μέχρι όγκου 1 mL.
- Μικτό διάλυμα εργασίας της φαιτανύλης, της νορφαιτανύλης, της ρεμφαιτανύλης, της βουτυρυλοφαιτανύλης, της ακετυλοφαιτανύλης, της οκφαιτανύλης και της φουραυλοφαιτανύλης συγκεντρώσεως 1.0  $\mu\text{g/mL}$  (**Διάλυμα P**) που παρασκευάστηκε ως εξής:
  - a. Προσθήκη 100  $\mu\text{L}$  διαλύματος φαιτανύλης συγκέντρωσης 10  $\mu\text{g/mL}$



- b. Προσθήκη 100  $\mu\text{L}$  διαλύματος νορφαιτανύλης συγκέντρωσης 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$
  - c. Προσθήκη 100  $\mu\text{L}$  διαλύματος ρεμφαιτανύλης συγκέντρωσης 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$
  - d. Προσθήκη 100  $\mu\text{L}$  διαλύματος βουτυρυλοφαιτανύλης συγκέντρωσης 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$
  - e. Προσθήκη 100  $\mu\text{L}$  διαλύματος ακετυλοφαιτανύλης συγκέντρωσης 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$
  - f. Προσθήκη 100  $\mu\text{L}$  διαλύματος οκφαιτανύλης συγκέντρωσης 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$
  - g. Προσθήκη 100  $\mu\text{L}$  διαλύματος φουρανυλοφαιτανύλης συγκέντρωσης 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$
  - h. Προσθήκη 300  $\mu\text{L}$  μεθανόλης μέχρι τελικό όγκο διαλύματος 1 mL
- Διάλυμα εργασίας μεθαδόνης- $\text{d}^3$  συγκέντρωσης 2.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , κωδεΐνη- $\text{d}^6$  συγκέντρωσης 2.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  και διαζεπάμης- $\text{d}^5$  συγκέντρωσης 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (**Διάλυμα ΕΠ**), που παρασκευάστηκε ως εξής:
    - a. Προσθήκη 200  $\mu\text{L}$  από διάλυμα 10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  μεθαδόνης- $\text{d}^3$  το οποίο παρασκευάστηκε με αραιώσεις από το αρχικό διάλυμα παρακαταθήκης 1 mg/mL.
    - b. Προσθήκη 200  $\mu\text{L}$  από διάλυμα 10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  κωδεΐνη- $\text{d}^6$  το οποίο παρασκευάστηκε με αραιώσεις από το αρχικό διάλυμα παρακαταθήκης 1 mg/mL.
    - c. Προσθήκη 100  $\mu\text{L}$  από διάλυμα 10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  διαζεπάμης- $\text{d}^5$  το οποίο παρασκευάστηκε με αραιώσεις από το αρχικό διάλυμα παρακαταθήκης 1 mg/mL.
    - d. Προσθήκη 500  $\mu\text{L}$  μεθανόλης μέχρι τελικού όγκου 1 mL

Για την επικύρωση της αναπτυχθείσας μεθόδου προσδιορισμού της φαιτανύλης και των παραγώγων της, παρασκευάστηκε μικτό διάλυμα εργασίας, όγκου 1 mL (**Διάλυμα Α<sub>1</sub>**), στο οποίο οι υπό ανάλυση ουσίες βρίσκονταν στις εξής συγκεντρώσεις:

- Φαιτανύλη, νορφαιτανύλη, ρεμφαιτανύλη, βουτυρυλοφαιτανύλη και ακετυλοφαιτανύλη: 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$
- Οκφαιτανύλη και φουρανυλοφαιτανύλη: 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$

Τα Διάλυμα Α<sub>1</sub> παρασκευάστηκε ως εξής:

- a. Προσθήκη 50  $\mu\text{L}$  διαλύματος φαιτανύλης συγκέντρωσης 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$
- b. Προσθήκη 50  $\mu\text{L}$  διαλύματος νορφαιτανύλης συγκέντρωσης 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$
- c. Προσθήκη 50  $\mu\text{L}$  διαλύματος ρεμφαιτανύλης συγκέντρωσης 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$
- d. Προσθήκη 50  $\mu\text{L}$  διαλύματος βουτυρυλοφαιτανύλης συγκέντρωσης 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$
- e. Προσθήκη 50  $\mu\text{L}$  διαλύματος ακετυλοφαιτανύλης συγκέντρωσης 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$
- f. Προσθήκη 100  $\mu\text{L}$  διαλύματος οκφαιτανύλης συγκέντρωσης 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$
- g. Προσθήκη 100  $\mu\text{L}$  διαλύματος φουρανυλοφαιτανύλης συγκέντρωσης 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$
- h. Προσθήκη 550  $\mu\text{L}$  μεθανόλης μέχρι τελικό όγκο 1 mL

Από το Διάλυμα A<sub>1</sub> παρασκευάστηκαν άλλα δύο πιο αραιά μικτά διαλύματα εργασίας, το **Διάλυμα A<sub>2</sub>**, όγκου 1 mL στο οποίο οι υπό εξέταση ουσίες βρίσκονται στις εξής συγκεντρώσεις:

- Φαιτανύλη, νορφαιτανύλη, ρεμφαιτανύλη, βουτυρυλοφαιτανύλη και ακετυλοφαιτανύλη: 0.1 μg/mL
- Οκφαιτανύλη και φουραυλοφαιτανύλη: 0.2 μg/mL

και το **Διάλυμα A<sub>3</sub>**, όγκου 1 mL στο οποίο οι υπό εξέταση ουσίες βρίσκονται στις εξής συγκεντρώσεις:

- Φαιτανύλη, νορφαιτανύλη, ρεμφαιτανύλη, βουτυρυλοφαιτανύλη και ακετυλοφαιτανύλη: 0.025 μg/mL
- Οκφαιτανύλη και φουραυλοφαιτανύλη: 0.050 μg/mL

Το Διάλυμα A<sub>2</sub> παρασκευάστηκε ως εξής:

- a. Παραλαβή 200 μL από το Διάλυμα A<sub>1</sub>
- b. Αραίωση μέχρι τα 1 mL με μεθανόλη

Το Διάλυμα A<sub>3</sub> παρασκευάστηκε ως εξής:

- a. Παραλαβή 250 μL από το Διάλυμα A<sub>2</sub>
- b. Αραίωση μέχρι τα 1 mL με μεθανόλη

Τα διαλύματα A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> και A<sub>3</sub> χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να παρασκευαστούν τα πρότυπα βιολογικά δείγματα βαθμονόμησης (calibration samples/ Cal). Για την παρασκευή των πρότυπων βιολογικών δειγμάτων ελέγχου ποιότητας (quality control/ QC) χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά **Διαλύματα A1'** και **A3'** από εκείνα που χρησιμοποιήθηκαν για τα δείγματα βαθμονόμησης, τα οποία, όμως, είχαν τις ίδιες συγκεντρώσεις με τα **Διαλύματα A1** και **A3**, αντίστοιχα.

Η συγκέντρωση του κάθε αναλύτη στα διαλύματα εργασίας που παρασκευάστηκαν, οι όγκοι που χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό βιολογικών δειγμάτων ολικού αίματος 1 mL, καθώς και οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις των προτύπων βιολογικών δειγμάτων που προέκυψαν παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3**.

**Πίνακας 3.** Παρασκευή προτύπων βιολογικών δειγμάτων ολικού αίματος για τη βαθμονόμηση (calibration samples, Cal), τον έλεγχο ποιότητας (quality control samples, QC).

Όγκος εμβολιασμού (μL) σε 1 mL ολικού αίματος	Μικτό διάλυμα εργασίας (συγκέντρωση, μg/mL)		Συγκέντρωση πρότυπου βιολογικού δείγματος (ng/mL)	Κωδικός προτύπου βιολογικού δείγματος	
20	A <sub>3</sub>	Φαιντανύλη, νορφαιντανύλη, ρεμφαιντανύλη, βουτυρυλοφαιντανύλη, ακετυλοφαιντανύλη	0.0250	0.5	Cal1
		Οκφαιντανύλη, φουρανυλοφαιντανύλη	0.0500	1.0	
40	A <sub>3</sub>	Φαιντανύλη, νορφαιντανύλη, ρεμφαιντανύλη, βουτυρυλοφαιντανύλη, ακετυλοφαιντανύλη	0.0250	1.0	Cal2
		Οκφαιντανύλη, φουρανυλοφαιντανύλη	0.0500	2.0	
60	A <sub>3</sub> '	Φαιντανύλη, νορφαιντανύλη, ρεμφαιντανύλη, βουτυρυλοφαιντανύλη, ακετυλοφαιντανύλη	0.0250	1.5	QC1
		Οκφαιντανύλη, φουρανυλοφαιντανύλη	0.0500	3.0	
30	A <sub>2</sub>	Φαιντανύλη, νορφαιντανύλη, ρεμφαιντανύλη, βουτυρυλοφαιντανύλη, ακετυλοφαιντανύλη	0.1	3.0	Cal3
		Οκφαιντανύλη, φουρανυλοφαιντανύλη	0.2	6.0	
100	A <sub>2</sub>	Φαιντανύλη, νορφαιντανύλη, ρεμφαιντανύλη, βουτυρυλοφαιντανύλη, ακετυλοφαιντανύλη	0.1	10.0	Cal4
		Οκφαιντανύλη, φουρανυλοφαιντανύλη	0.2	20.0	
30	A <sub>1</sub> '	Φαιντανύλη, νορφαιντανύλη, ρεμφαιντανύλη, βουτυρυλοφαιντανύλη, ακετυλοφαιντανύλη	0.5	15.0	QC2
		Οκφαιντανύλη, φουρανυλοφαιντανύλη	1.0	30.0	
40	A <sub>1</sub>	Φαιντανύλη, νορφαιντανύλη, ρεμφαιντανύλη, βουτυρυλοφαιντανύλη, ακετυλοφαιντανύλη	0.5	20.0	Cal5
		Οκφαιντανύλη, φουρανυλοφαιντανύλη	1.0	40.0	
80	A <sub>1</sub> '	Φαιντανύλη, νορφαιντανύλη, ρεμφαιντανύλη, βουτυρυλοφαιντανύλη, ακετυλοφαιντανύλη	0.5	40.0	QC3
		Οκφαιντανύλη, φουρανυλοφαιντανύλη	1.0	80.0	
100	A <sub>1</sub>	Φαιντανύλη, νορφαιντανύλη, ρεμφαιντανύλη, βουτυρυλοφαιντανύλη, ακετυλοφαιντανύλη	0.5	50.0	Cal6
		Οκφαιντανύλη, φουρανυλοφαιντανύλη	1.0	100.0	

Κατά το στάδιο επικύρωσης της μεθόδου προσδιορισμού της φαιντανύλης και των παραγώγων της σε ολικό αίμα, ελέγχθηκε η ειδικότητα της μεθόδου και χρησιμοποιήθηκε διάλυμα εργασίας φαρμάκων ή ναρκωτικών ουσιών και των μεταβολιτών τους, που μπορούσαν εν δυνάμει να συνυπάρχουν με τις υπό μελέτη ουσίες στο δείγμα. Το διάλυμα αυτό περιελάμβανε τις ουσίες διαζεπάμη, νορδιαζεπάμη, αλπραζολάμη, βρωμαζεπάμη, 7-αμινοφλουνιτραζεπάμη, λοραζεπάμη, νορτρυπτιλίνη, κουετιαπίνη, ολανζαπίνη, ρισπεριδόνη, υδροξυρισπεριδόνη, σερτραλίνη, δεσμεθυλοσερτραλίνη, παροξετίνη, βενλαφαξίνη, δισμεθυλοβενλαφαξίνη, μιρταζαπίνη, δισμεθυλομιρταζαπίνη, μαπροτιλίνη, δισμεθυλομαπροτιλίνη, παρακεταμόλη, σιταλοπράμη, φλουοξετίνη, ζολπιδέμη, αμφεταμίνη, μεθαμφεταμίνη, MDMA, MDA, MBDB, MDEA, κεταμίνη, νορκεταμίνη, Δ9-τετραϋδροκανναβινόλη, 11-nor-Δ9-τετραϋδροκανναβινοϊκό οξύ, βουπρενορφίνη, νορβουπρενορφίνη, μεθαδόνη, μορφίνη, κωδεΐνη, 6-μονοακετυλομορφίνη, κοκαΐνη, βενζοϋλοεκγονίνη και μεθυλεστέρας της εκγονίνης. Το διάλυμα αυτό περιείχε τις παραπάνω ουσίες σε συγκέντρωση 10.0  $\mu\text{g/mL}$ .

## 5.7 Ρυθμιστικά διαλύματα

Τα ρυθμιστικά διαλύματα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια ανάπτυξης και βελτιστοποίησης της μεθόδου καθώς και ο τρόπος παρασκευής τους παρουσιάζεται παρακάτω.

### 1. Ρυθμιστικό διάλυμα οξικών pH 4.0 (0.1 M)

- a. Προσθήκη 80 mL απιονισμένου νερού
- b. Προσθήκη 570  $\mu\text{L}$  π.  $\text{CH}_3\text{COOH}$
- c. Προσθήκη 1.6 mL  $\text{KOH}$  1.0 M
- d. Προσθήκη 100 mL απιονισμένου νερού

### 2. Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 6.0 (0.1 M)

- a. 7.8 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  διαλύθηκαν σε 500 mL απιονισμένου νερού
- b. το pH ρυθμίζεται στο 6.0 με τη βοήθεια ψηφιακού πεχαμέτρου και σταγόνων  $\text{NaOH}$  (1.0 M)

### 3. Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7.0 (0.1 M)

- a. 3.58 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  διαλύθηκαν σε 100 mL απιονισμένου νερού (διάλυμα I)
- b. 3.54 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  διαλύθηκαν σε 100 mL απιονισμένου νερού (διάλυμα II)
- c. 19.5 mL διάλυμα I αναμιγνύονται με 30.5 mL διάλυμα II και συμπληρώνονται μέχρι τα 100 mL με υπερκάθαρο νερό
- d. το pH ρυθμίζεται στο 7.0 με τη βοήθεια ψηφιακού πεχαμέτρου και σταγόνων  $\text{NaOH}$  (1.0 M)

#### 4. Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 8.0 (0.1 M)

- a. 1.42 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  διαλύθηκαν σε 100 mL απιονισμένου νερού
- b. 95.51 mL του παραπάνω διαλύματος αναμιγνύονται με 4.49 mL HCl (0.1 M)
- c. το pH ρυθμίζεται στο 8.0 με τη βοήθεια ψηφιακού πεχαμέτρου και σταγόνων HCl (0.1 M)

#### 5. Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 9.0 (0.1 M)

- a. 44.5 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  διαλύθηκαν σε 500 mL απιονισμένου νερού
- b. το pH ρυθμίζεται στο 9.0 με τη βοήθεια ψηφιακού πεχαμέτρου και σταγόνων NaOH (1.0 M)

#### 6. Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 10.0 (0.1 M)

- a. 1.42 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  διαλύθηκαν σε 100 mL απιονισμένου νερού
- b. 96.64 mL του παραπάνω διαλύματος αναμιγνύονται με 3.36 mL NaOH (0.1 M)
- c. το pH ρυθμίζεται στο 10.0 με τη βοήθεια ψηφιακού πεχαμέτρου και σταγόνων NaOH (0.1 M)

### 5.8 Μίγματα διαλυτών

Τα μίγματα των διαλυτών εκχύλισης που χρησιμοποιήθηκαν για τις δοκιμασίες της υγρό-υγρό εκχύλισης, παρασκευάζονταν την ίδια ημέρα με την ημέρα της εκχύλισης και σε ποσότητες τέτοιες ώστε να επαρκούν για όλες τις δοκιμασίες εκχύλισης. Επειδή οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν, σε μικρότερο ή μεγαλύτερο βαθμό ήταν τοξικοί, η παρασκευή των μιγμάτων γινόταν στον απαγωγό. Τα βήματα παρασκευής καθενός από τα μίγματα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν στην υγρό-υγρό εκχύλιση, φαίνονται παρακάτω:

- Εξάνιο:Οξικός αιθυλεστέρας (70:30, v/v)
  - 4.5 mL οξικό αιθυλεστέρα + 10.5 mL εξάνιο
- Εξάνιο:Οξικός αιθυλεστέρας:Ισοπροπανόλη (49:49:2, v/v/v)
  - 0.3 mL 2-προπανόλη + 7.35 mL οξικό αιθυλεστέρα + 7.35 mL εξάνιο
- Εξάνιο:Ισοπροπανόλη (98:2, v/v)
  - 0.3 mL 2-προπανόλη + 14.7 mL εξάνιο
- Διχλωρομεθάνιο:Ισοπροπανόλη (90:10, v/v)
  - 1.5 mL 2-προπανόλη + 13.5 mL διχλωρομεθάνιο
- Διχλωρομεθάνιο:Εξάνιο:Ισοπροπανόλη (49:49:2, v/v/v)
  - 0.3 mL 2-προπανόλη + 7.35 mL εξάνιο + 7.35 mL διχλωρομεθάνιο
- Διχλωρομεθάνιο:Οξικός αιθυλεστέρας (20:80, v/v)

- 12.0 mL οξικό αιθυλεστέρα + 3.0 mL διχλωρομεθάνιο

Το μόνο μίγμα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκε στις δοκιμασίες της εκχύλισης στερεάς φάσεως είναι το εκλουστικό μίγμα διχλωρομεθάνιο:ισοπροπανόλη:αμμωνία (85:15:2, v/v/v). Το μίγμα παρασκευαζόταν την ίδια ημέρα με την ημέρα της εκχύλισης και σε ποσότητα τέτοια ώστε να επαρκεί για όλες τις δοκιμασίες εκχύλισης. Για όγκο εκλουστικού μίγματος, 30 mL, οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής:

- 4.5 mL 2-προπανόλη + 600  $\mu$ L αμμωνία + 25.5 mL διχλωρομεθάνιο



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Ανάπτυξη και βελτιστοποίηση της μεθόδου

Κατά την ανάπτυξη της μεθόδου, έλαβε χώρα βελτιστοποίηση των παραμέτρων της μεθόδου ώστε να ληφθούν τα βέλτιστα αποτελέσματα και να παρέχουν στη μέθοδο καλύτερη απόκριση. Η τεχνική βελτιστοποίησης που ακολουθήθηκε ήταν μονοπαραμετρική, δηλαδή έλαβε χώρα με διαδοχική μεταβολή μίας παραμέτρου τη φορά, και διατήρηση των υπολοίπων παραμέτρων, σταθερών (single-factor-at-a-time sequential optimization).

### 6.1 Εσωτερικό πρότυπο

Στην διαδικασία ανάπτυξης και βελτιστοποίησης μίας μεθόδου προσδιορισμού μίας ή περισσοτέρων ουσιών, περιλαμβάνεται και η επιλογή του καταλληλότερου εσωτερικού προτύπου για την πορεία της ανάλυσης. Το εσωτερικό πρότυπο είναι μία ουσία η οποία εισάγεται στο δείγμα μαζί με τους αναλύτες προκειμένου να διορθώσει τις διακυμάνσεις που μπορεί να προκύψουν στα διάφορα στάδια της ανάλυσης των δειγμάτων. Το εσωτερικό πρότυπο πρέπει να έχει τις ίδιες φυσικοχημικές ιδιότητες με τους αναλύτες, την ίδια χρωματογραφική συμπεριφορά με αυτούς καθώς και να διαχωρίζεται ικανοποιητικά από τις άλλες ουσίες στο χρωματογράφημα ώστε να μην παρατηρείται συνέκλουση καθώς επίσης παρόμοια συμπεριφορά με τους αναλύτες και κατά το στάδιο προκατεργασίας των δειγμάτων. Στο πλαίσιο της βελτιστοποίησης της μεθόδου προσδιορισμού των υπό μελέτη ουσιών, δοκιμάστηκαν ως εσωτερικά πρότυπα η δευτεριωμένη μεθαδόνη (μεθαδόνη-d<sup>3</sup>), η δευτεριωμένη κωδεΐνη (κωδεΐνη-d<sup>6</sup>) και η δευτεριωμένη διαζεπάμη (διαζεπάμη-d<sup>5</sup>). Η κωδεΐνη-d<sup>6</sup> απορρίφθηκε ως εσωτερικό πρότυπο καθώς η παραγωγοποίηση του μορίου της παρουσίαζε διακυμάνσεις ακολουθώντας διαφορετική συμπεριφορά από τους άλλους αναλύτες. Η διαζεπάμη-d<sup>5</sup> δεν εκχυλιζόταν ικανοποιητικά με την επιλεγθείσα μέθοδο εκχύλισης οπότε απορρίφθηκε ως εσωτερικό πρότυπο. Η μεθαδόνη-d<sup>3</sup> εκχυλίζεται ικανοποιητικά με την επιλεγθείσα μέθοδο εκχύλισης (ποσοστό ανάκτησης 89%), δεν παραγωγοποιείται και ακολουθεί ικανοποιητικά τους αναλύτες καθ'όλη την πορεία της ανάλυσης. Ως εκ τούτου ως εσωτερικό πρότυπο επιλέχθηκε η μεθαδόνη-d<sup>3</sup>.

### 6.2 Προκαταρκτική ανάλυση

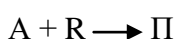
Πριν το στάδιο βελτιστοποίησης της μεθόδου, συγκεκριμένος όγκος από τα Διαλύματα Ρ και ΕΠ ενέθηκε στο χρωματογράφο αέριας φάσεως συνδεδεμένο με φασματόμετρο μαζών, προκειμένου να εξαχθούν τα φάσματα μαζών των υπό εξέταση ουσιών. Τα φάσματα αυτά ελήφθησαν με την τεχνική της πλήρους σάρωσης ιόντων σε περιοχή μαζών 50  $m/z$  – 500  $m/z$ . Πιο συγκεκριμένα 50  $\mu\text{L}$  από το Διάλυμα Ρ εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού υπό ρεύμα  $\text{N}_2$  και ακολούθησε ανασύσταση με 50  $\mu\text{L}$  οξικού



αιθυλεστέρα και έγχυση 1  $\mu\text{L}$  στο χρωματογραφικό σύστημα. Από την επεξεργασία των φασμάτων πλήρους σάρωσης λήφθηκαν τα σημαντικότερα θραύσματα για την κάθε ουσία τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τις επόμενες δοκιμασίες, οι οποίες έλαβαν χώρα με παρακολούθηση επιλεγμένων ιόντων (SIM). Για την φαιντανύλη, την ρεμφαιντανύλη, την βουτυρυλοφαιντανύλη, την ακετυλοφαιντανύλη, την οκφαιντανύλη και την φουρανυλοφαιντανύλη οι χρωματογραφικές κορυφές ήταν συμμετρικές και δεν παρουσίαζαν tailing. Η νορφαιντανύλη παρουσίαζε ασυμμετρία (tailing) και δεδομένου του ότι περιέχει μια δευτεροταγή αμινομάδα στο μόριο της θεωρήθηκε απαραίτητο να γίνει παραγωγοποίηση προκειμένου να βελτιωθεί η χρωματογραφική της συμπεριφορά και εικόνα.

### 6.3 Βελτιστοποίηση της παραγωγοποίησης

Η βιβλιογραφία περιέχει μία πληθώρα δεδομένων σχετικά με την παραγωγοποίηση. Στην χρωματογραφία αέριας φάσης πολλές φορές οι υπό εξέταση ενώσεις δεν μπορούν να αναλυθούν στη μορφή που βρίσκονται. Πολλές ουσίες από αυτές για παράδειγμα δεν είναι πτητικές ή είναι ασταθείς και διασπώνται σε υψηλή θερμοκρασία. Η μετατροπή αυτών των μορίων σε ουσίες κατάλληλες για ανάλυση λαμβάνει χώρα με την διαδικασία της παραγωγοποίησης. Κατά την αντίδραση παραγωγοποίησης ο αναλύτης (A) και το αντιδραστήριο παραγωγοποίησης (R) αντιδρούν προς σχηματισμό ενός προϊόντος (Π), με καλύτερη χρωματογραφική συμπεριφορά από το αρχικό.



Στην χρωματογραφία αέριας φάσης, για τις ενώσεις που περιέχουν λειτουργικές ομάδες όπως –COOH, –OH, –NH και –SH η παραγωγοποίηση είναι πρωταρχικής σημασίας καθώς είναι πιο επιρρεπείς στη δημιουργία δεσμών υδρογόνου μεταξύ τους και με τα συστατικά της στήλης. Αλκυλίωση, ακυλίωση ή σιλανοποίηση τέτοιων ενώσεων χρησιμοποιείται προκειμένου να τροποποιηθεί η δομή αυτών των μορίων και να καταστεί δυνατή η ανάλυση τους με τη χρήση GC. Η νορφαιντανύλη περιέχει μία δευτεροταγή αμινομάδα (–NH–) και ως εκ τούτου μπορεί να παραγωγοποιηθεί με αντίδραση με κατάλληλο αντιδραστήριο παραγωγοποίησης σε κατάλληλες συνθήκες.

Πριν το στάδιο της βελτιστοποίησης της παραγωγοποίησης προηγήθηκε αναζήτηση στη διεθνή επιστημονική βιβλιογραφία, των συνθηκών εκείνων που χρησιμοποιούνται συχνότερα για την παραγωγοποίηση της νορφαιντανύλης. Τα αντιδραστήρια παραγωγοποίησης, οι χρόνοι και οι θερμοκρασίες που δοκιμάστηκαν, επιλέχθηκαν βάσει των αποτελεσμάτων της αναζήτησης. Για την επιλογή βέλτιστου αντιδραστήριου παραγωγοποίησης δοκιμάστηκαν τα εξής αντιδραστήρια παραγωγοποίησης:

1. τριφθοροοξικός ανυδρίτης (TFAA),
2. πενταφθοροπροπιονικός ανυδρίτης 99% (PFPA),
3. *N,O*-δισ-τριμεθυλοσιλυλ-τριφθοροακεταμίδιο (BSTFA) με 1% τριμεθυλοχλωροσιλάνιο (TMCS)
4. *N-tert*-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλ-*N*-μεθυλτριφθοροακεταμίδιο (MTBSTFA) με 1% τερτ-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοχλωρίδιο (TBDMSCl)
5. οξικός ανυδρίτης (Ac<sub>2</sub>O).

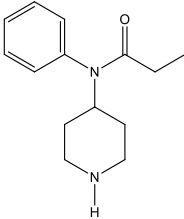
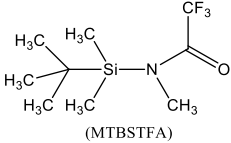
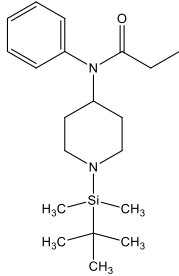
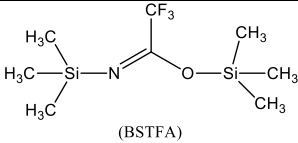
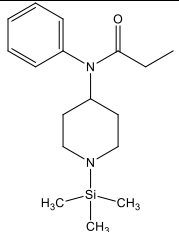
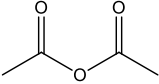
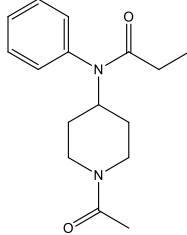
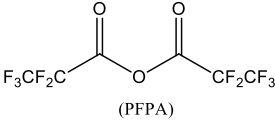
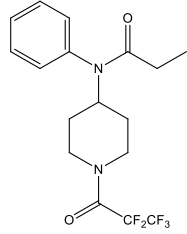
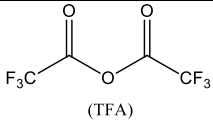
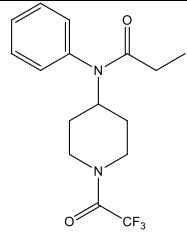
Η παραγωγοποίηση της νορφαιτανύλης με καθένα από τα παραπάνω αντιδραστήρια προκαλεί αλλαγές στο μοριακό βάρος της ουσίας και ως εκ τούτου αλλαγές στη θραυσματοποίηση της στο GC. Προκειμένου να αποφασιστεί ποιο από τα δοκιμαζόμενα αντιδραστήρια αυξάνει την ευαισθησία της μεθόδου προσδιορισμού και δίνει τη δυνατότητα χαμηλότερων ορίων ανίχνευσης για την νορφαιτανύλη, συγκεκριμένος όγκος νορφαιτανύλης (Διάλυμα Π<sub>1</sub>), παραγωγοποιήθηκε με κάθε ένα από τα αντιδραστήρια και ενέθηκε στο χρωματογράφο αέριας φάσεως συνδεδεμένο με φασματόμετρο μαζών, προκειμένου να εξαχθούν τα φάσματα μαζών της νορφαιτανύλης και να καταγραφούν τα χαρακτηριστικότερα θράυσματα αυτής, ανά αντιδραστήριο. Στην συνέχεια, κατά τις δοκιμασίες επιλογής βέλτιστου αντιδραστήριου, οι προσδιορισμοί γινόντουσαν με παρακολούθηση επιλεγμένου ιόντος (SIM).

Στον **Πίνακα 4** παρατίθενται οι μεταβολές στο μοριακό βάρος της νορφαιτανύλης με κάθε ένα από τα αντιδραστήρια παραγωγοποίησης που δοκιμάστηκαν.

Η διαδικασία βελτιστοποίησης της παραγωγοποίησης που ακολουθήθηκε ήταν μονοπαραμετρική και περιελάμβανε την βελτιστοποίηση μίας παραμέτρου τη φορά:

- Παραγωγοποίηση με όλα τα αντιδραστήρια σε διαφορετικά επίπεδα συγκεντρώσεων και ένεση στο GC/MS.
- Ολοκλήρωση χρωματογραφικών κορυφών, αξιολόγηση και επιλογή βέλτιστου αντιδραστήριου παραγωγοποίησης.
- Παραγωγοποίηση με το βέλτιστο αντιδραστήριο σε διαφορετικές θερμοκρασίες και ένεση στο GC/MS.
- Ολοκλήρωση χρωματογραφικών κορυφών, αξιολόγηση και επιλογή βέλτιστης θερμοκρασίας.
- Παραγωγοποίηση με το βέλτιστο αντιδραστήριο σε διαφορετικούς χρόνους και ένεση στο GC/MS.
- Ολοκλήρωση χρωματογραφικών κορυφών, αξιολόγηση και επιλογή βέλτιστου χρόνου παραγωγοποίησης.

**Πίνακας 4.** Μεταβολές στο μοριακό βάρος της νορφαιντανύλης μετά από την παραγωγοποίηση.

Νορφαιντανύλη	+	Αντιδραστήριο παραγωγοποίησης	→	Παραγωγοποιημένη NF
 <p>M.B. = 232</p>		 <p>(MTBSTFA)</p> <p>(+115) – 1 (M.B. H<sup>+</sup>)</p>	→	 <p>M.B. = 346</p>
		 <p>(BSTFA)</p> <p>(+73) – 1 (M.B. H<sup>+</sup>)</p>	→	 <p>M.B. = 304</p>
		 <p>(Ac<sub>2</sub>O)</p> <p>(+43) – 1 (M.B. H<sup>+</sup>)</p>	→	 <p>M.B. = 274</p>
		 <p>(PFPA)</p> <p>(+147) – 1 (M.B. H<sup>+</sup>)</p>	→	 <p>M.B. = 378</p>
		 <p>(TFA)</p> <p>(+97) – 1 (M.B. H<sup>+</sup>)</p>	→	 <p>M.B. = 328</p>

Για τη εύρεση βέλτιστου αντιδραστηρίου παραγωγοποίησης χρησιμοποιήθηκαν τα Διαλύματα Π<sub>1</sub>, Π<sub>2</sub> και Π<sub>3</sub>. Ξεκινώντας από αυτά τα διαλύματα με εμβολιασμό κάθε φορά διαφορετικού όγκου έγινε παραγωγοποίηση και με τα 5 αντιδραστήρια παραγωγοποίησης σε 6 διαφορετικά επίπεδα συγκεντρώσεων όπως φαίνεται στον **Πίνακα 5** προκειμένου να εκτιμηθεί η πιο ευαίσθητη διαδικασία παραγωγοποίησης και κατά συνέπεια το πόσο χαμηλά μας επιτρέπεται να πέσουμε σε επίπεδα ανίχνευσης.

**Πίνακας 5.** Χρησιμοποιούμενα διαλύματα εργασίας και όγκοι εμβολιασμού κατά το στάδιο επιλογής βέλτιστου αντιδραστηρίου παραγωγοποίησης.

Όγκος ( $\mu\text{L}$ )	Διάλυμα εργασίας (συγκέντρωση, $\mu\text{g/mL}$ )	
10	$\Pi_1$	3
150	$\Pi_2$	0.1
75		
40		
200	$\Pi_3$	0.01
100		

Η διαδικασία παραγωγοποίησης που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

1. Σε 5 δοκιμαστικούς σωλήνες τοποθετήθηκε όγκος  $V \mu\text{L}$  (βλέπε **Πίνακα 5**) του εκάστοτε διαλύματος εργασίας.
2. Προσθήκη  $50 \mu\text{L}$  Διαλύματος ΕΠ.
3. Ανάδευση σε αναδευτήρα περιδίνισης (vortex) για 15 sec.
4. Εξάτμιση μέχρι ξηρού υπό ρεύμα  $\text{N}_2$  σε θερμοκρασία  $T = 40^\circ\text{C}$ .
5. Προσθήκη αντιδραστηρίου παραγωγοποίησης, στον απαγωγό, ως εξής:

Σωλήνας	Αντιδραστήριο παραγωγοποίησης
1	$50 \mu\text{L}$ ακετονιτρίλιο + $50 \mu\text{L}$ BSTFA με 1% TMCS
2	$50 \mu\text{L}$ ακετονιτρίλιο + $50 \mu\text{L}$ MTBSTFA με 1% TBDMSCI
3	$50 \mu\text{L}$ $\text{Ac}_2\text{O}$
4	$50 \mu\text{L}$ PFFA
5	$50 \mu\text{L}$ TFAA

6. Μεταφορά σε αμμόλουτρο σε θερμοκρασία  $70^\circ\text{C}$  για χρόνο 30 min
7. Μετά το πέρας του χρόνου τα διαλύματα παρέμειναν για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να γίνει συμπύκνωση του διαλύματος.
8. Τα διαλύματα στους σωλήνες 1 και 2 μεταφέρθηκαν σε γυάλινα φιαλίδια (vials) που περιείχαν γυάλινα σωληνάκια προσυγκέντρωσης (glass inserts).
9. Στα υπόλοιπα έγινε εξάτμιση μέχρι ξηρού υπό  $\text{N}_2$ , επανασύσταση με  $100 \mu\text{L}$  οξικό αιθυλεστέρα και ανάδευση σε αναδευτήρα περιδίνισης για 30 sec.

10. Στην συνέχεια τα διαλύματα μεταφέρθηκαν σε γυάλινα φιαλίδια (vials) που περιείχαν γυάλινα σωληνάκια προσυγκέντρωσης (glass inserts).
11. Ακολούθησε τοποθέτηση όλων των φιαλιδίων στον αυτόματο δειγματολήπτη και έγχυση 1  $\mu\text{L}$  στο χρωματογραφικό σύστημα
12. Ελήφθησαν τα χρωματογραφήματα και έγιναν οι ολοκληρώσεις των κορυφών των θραυσμάτων της νορφαιτανύλης, για όλα τα αντιδραστήρια παραγωγοποίησης, καθώς και για το εσωτερικό πρότυπο
13. Υπολογίστηκαν οι λόγοι (ratio) των εμβαδών των κορυφών (AUC) των θραυσμάτων της νορφαιτανύλης με τα AUC του εσωτερικού προτύπου και έγινε αξιολόγηση του αποτελέσματος.

Για την επιλογή του βέλτιστου αντιδραστηρίου παραγωγοποίησης λήφθηκαν υπόψιν η εικόνα των κορυφών (παράγοντας ασυμμετρίας  $A_s$ , παράγοντας tailining  $T_s$ ), η ευαισθησία της παραγωγοποίησης και ως εκ τούτου τα επίπεδα ανίχνευσης στα οποία καταφέραμε να φτάσουμε. Τα αντιδραστήρια που απορρίφθηκαν δίνανε ασύμμετρες ή σπασμένες κορυφές, με tailing, κοντά στη γραμμή βάσης που σε ορισμένες περιπτώσεις ήταν αδύνατον να ολοκληρωθούν και να δώσουν εικόνα. Το αντιδραστήριο παραγωγοποίησης BSTFA με 1% TMCS έδινε σπασμένη κορυφή για την νορφαιτανύλη οπότε υπήρχε αδυναμία ολοκλήρωσης, ενώ το αντιδραστήριο παραγωγοποίησης MTBSTFA με 1% TBDMSCl παρουσίαζε τη μικρότερη ευαισθησία απ' όλα τα αντιδραστήρια. Τα αντιδραστήρια PFPA και TFAA παρουσίαζαν την υψηλότερη ευαισθησία, αλλά στην περίπτωση του TFAA η εικόνα των χρωματογραφικών κορυφών ήταν πολύ καλύτερη καθώς ο παράγοντας ασυμμετρίας ήταν πολύ μικρότερος. Σύμφωνα με τα παραπάνω, το αντιδραστήριο που έδινε καλύτερη ευαισθησία στη μέθοδο και καλύτερη εικόνα χρωματογραφικών κορυφών και επιλέχθηκε τελικά ως αντιδραστήριο παραγωγοποίησης είναι το TFAA.

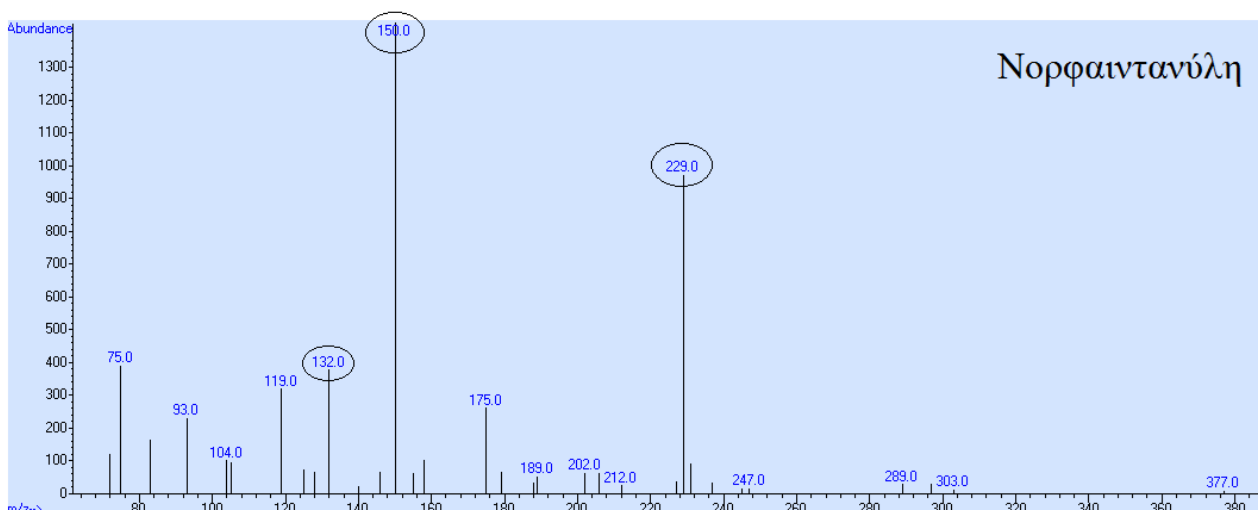
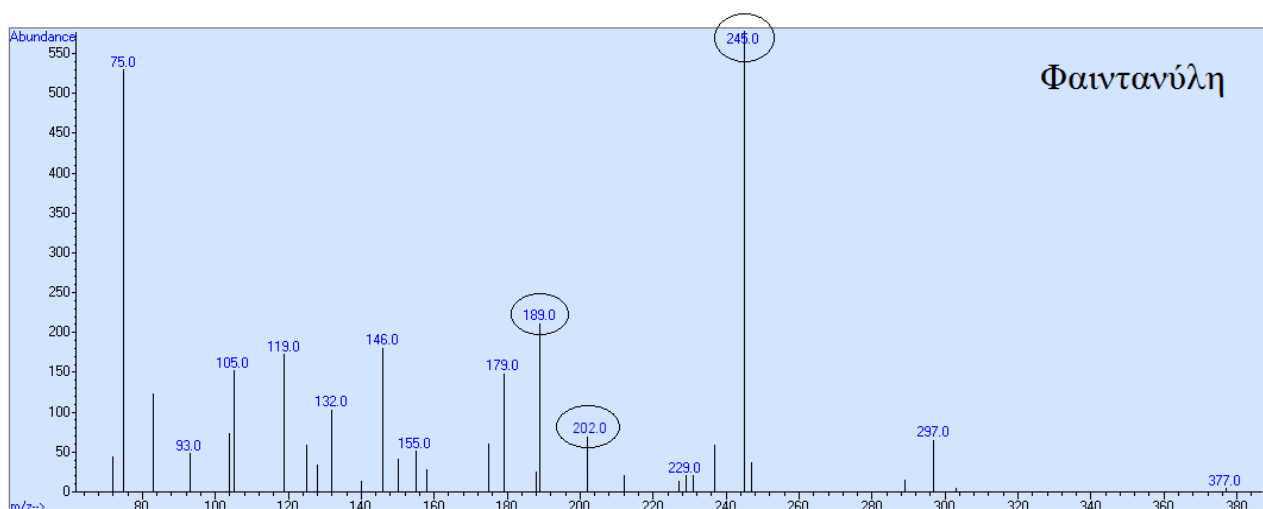
Για το TFAA, το αντιδραστήριο παραγωγοποίησης που επιλέχθηκε τελικά, δοκιμάστηκαν 6 διαφορετικές θερμοκρασίες (25 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C και 90 °C) και 4 διαφορετικοί χρόνοι παραγωγοποίησης (10 min, 20 min, 30 min και 40 min). Από την αξιολόγηση των χρωματογραφημάτων, αποφασίστηκε ότι η βέλτιστη θερμοκρασία παραγωγοποίησης είναι η  $T = 70$  °C και ο βέλτιστος χρόνος παραγωγοποίησης ο  $t = 30$  min. Οι παράγοντες που λήφθηκαν υπόψιν για την επιλογή της θερμοκρασίας και του χρόνου είναι ίδιοι με αυτούς που αναφέρονται στην επιλογή βέλτιστου αντιδραστηρίου. Στην επιλογή της θερμοκρασίας παρατηρήθηκε μία γραμμικά αυξανόμενη τάση στις αποκρίσεις της νορφαιτανύλης για τις θερμοκρασίες 50 °C, 60 °C και 70 °C χωρίς περαιτέρω αύξηση μετά τους 70 °C. Έτσι αποφασίστηκε να χρησιμοποιηθεί η θερμοκρασία 70 °C ως βέλτιστη θερμοκρασία παραγωγοποίησης.

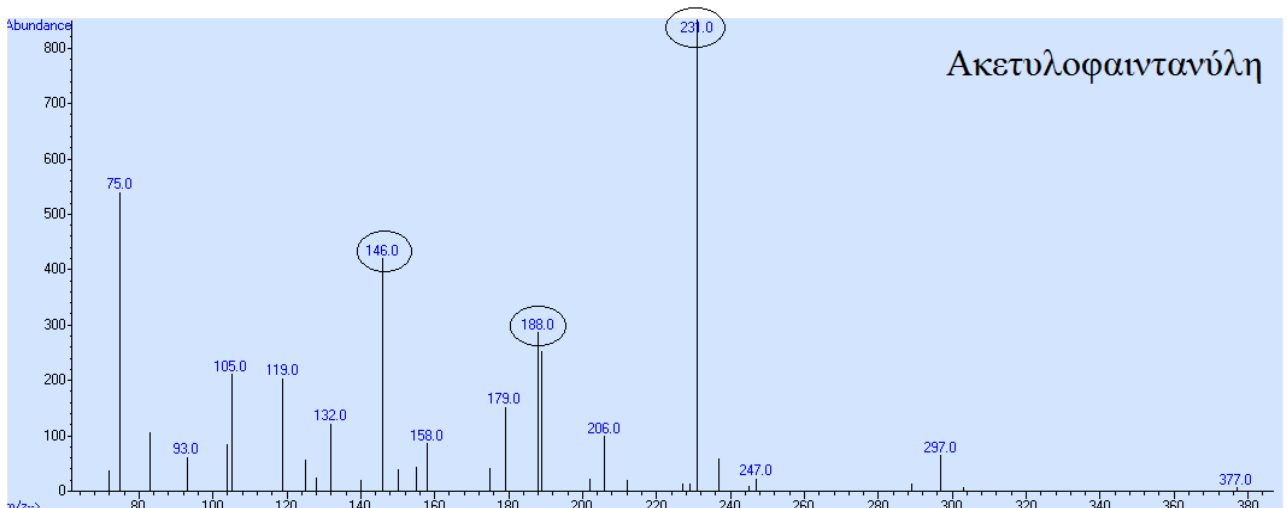
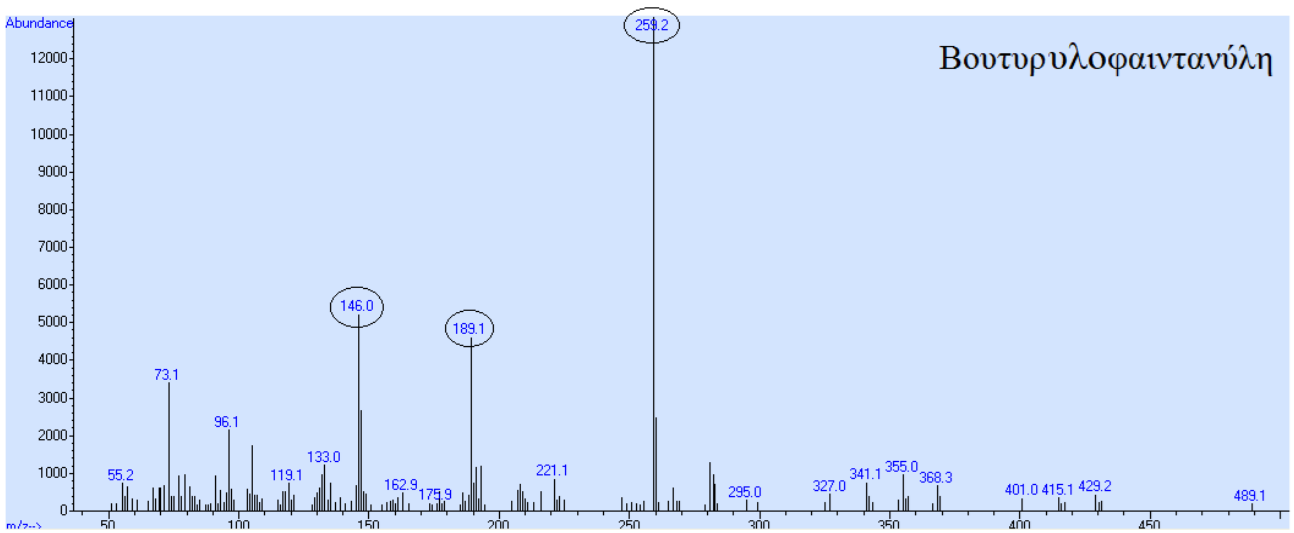
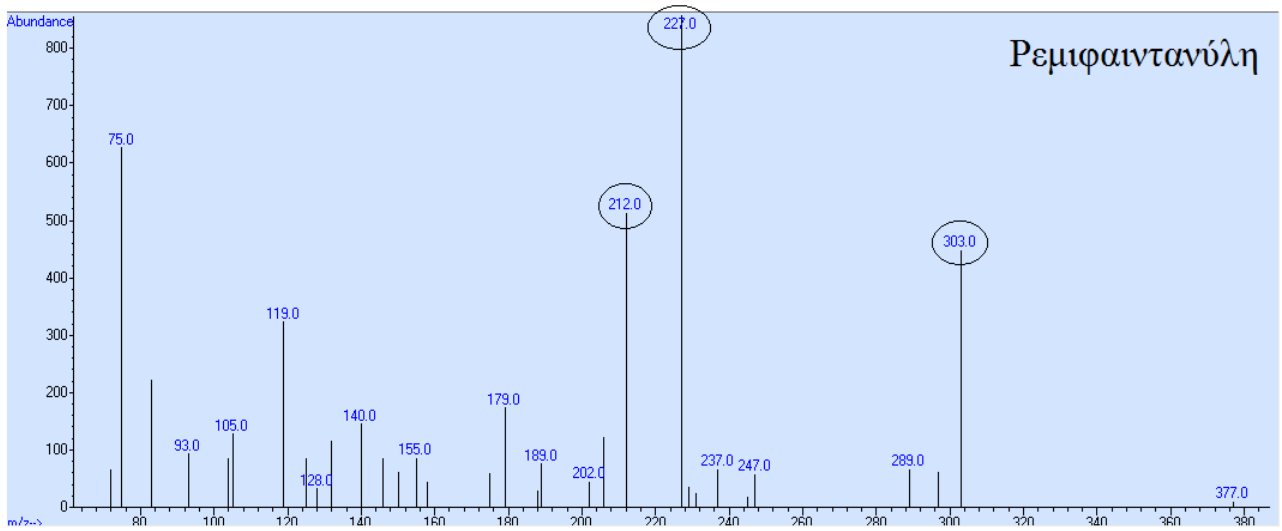
Οι βέλτιστες συνθήκες παραγωγοποίησης συνοψίζονται στον **Πίνακα 6**.

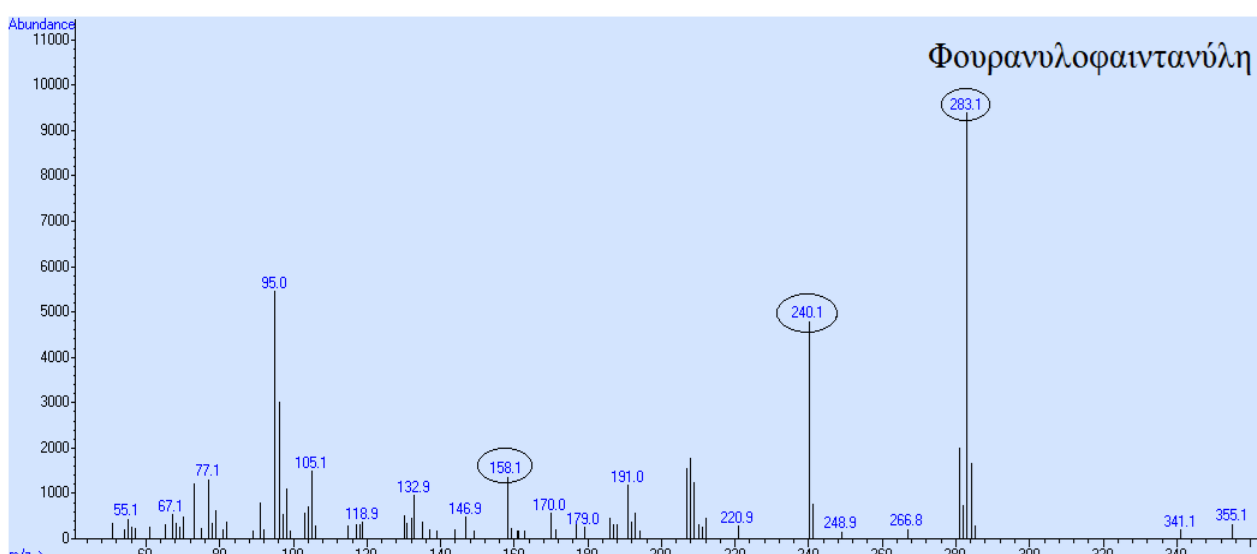
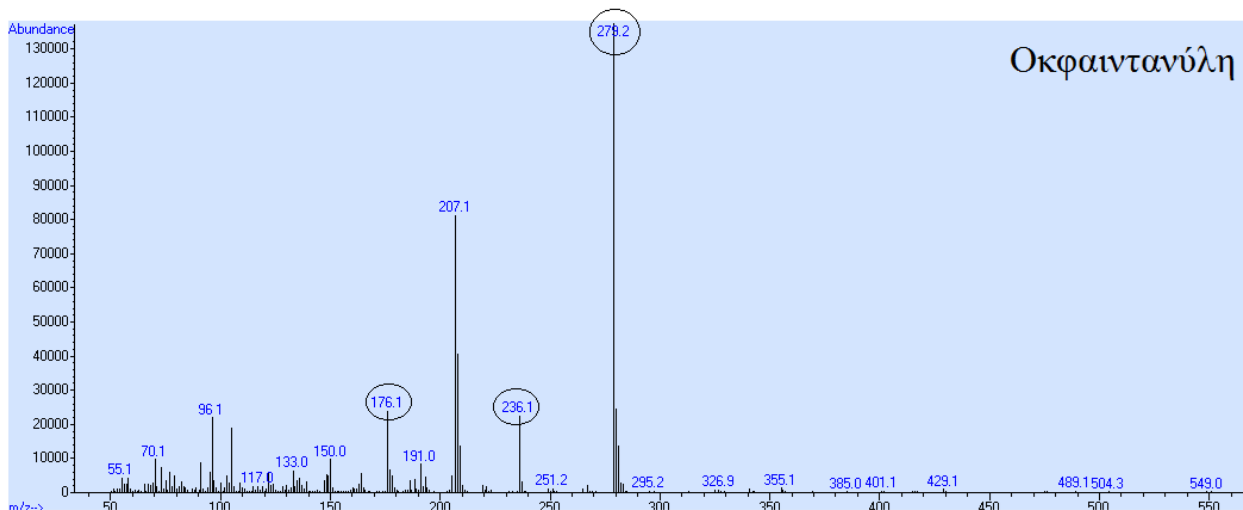
**Πίνακας 6.** Βέλτιστες συνθήκες παραγωγοποίησης

Αντιδραστήριο παραγωγοποίησης	TFAA
Θερμοκρασία παραγωγοποίησης	70 °C
Χρόνος παραγωγοποίησης	30 min

Τα φάσματα μαζών όλων των ουσιών, συμπεριλαμβανομένης και της παραγωγοποιημένης νορφαιντανύλης με παραγωγοποίηση επιλεχθείσες συνθήκες παραγωγοποίησης, παρουσιάζονται συγκεντρωτικά παρακάτω:







Στη συνέχεια καταγράφηκαν τα 3 σημαντικότερα θραύσματα για κάθε μία από τις 7 υπό εξέταση ουσίες και οι δοκιμασίες που ακολούθησαν πραγματοποιήθηκαν με παρακολούθηση επιλεγμένου ιόντος (SIM) ώστε να εξασφαλίζεται βέλτιστη ευαισθησία της μεθόδου. Τα χαρακτηριστικότερα θραύσματα για την κάθε ουσία παρουσιάζονται στον **Πίνακα 7**. Στην περίπτωση της φαιντανύλης παρόλο που το θραύσμα 146 αποτελούσε χαρακτηριστικό θραύσμα για την ουσία, στην συνέχεια και κατά την πορεία της βελτιστοποίησης απορρίφθηκε γιατί παρατηρήθηκε παρεμπόδιση στον ίδιο χρόνο του χρωματογραφήματος.



**Πίνακας 7.** Χαρακτηριστικά θραύσματα ( $m/z$ ) των εξεταζόμενων ουσιών καθώς και χρόνοι κατακράτησης.

Ουσία	Θραύσμα ποσοτικοποίησης	Υπόλοιπα θραύσματα	Χρόνος κατακράτησης ( $R_t$ , min)
Φαιντανύλη	245	189, 202	9.570
Νορφαιντανύλη-TFA	150	229, 132	7.230
Ρεμφαιντανύλη	227	212, 303	8.763
Βουτυρυλοφαιντανύλη	259	146, 189	9.925
Ακετυλοφαιντανύλη	231	146, 188	9.342
Οκφαιντανύλη	279	176, 236	10.031
Φουρανυλοφαιντανύλη	283	240,158	11.762
Μεθαδόνη-d <sup>3</sup>	297	72, 161	7.461

#### 6.4 Χρωματογραφικές συνθήκες

Οι χρωματογραφικές συνθήκες που επηρεάζουν την ανάλυση των ουσιών με την τεχνική της χρωματογραφίας αέριας φάσης και ελέγχθησαν είναι η θερμοκρασία του σημείου έγχυσης, η ροή του φέροντος αερίου και το θερμοκρασιακό πρόγραμμα της στήλης. Το πρόγραμμα θερμοκρασίας της στήλης ρυθμίζεται από το λογισμικό στον υπολογιστή και ελέγχει παραμέτρους όπως η αρχική θερμοκρασία, η ενδιάμεση θερμοκρασία και η τελική καθώς και ο ρυθμός αύξησης της θερμοκρασίας της στήλης. Η βελτιστοποίηση κάθε μίας από τις παραπάνω παραμέτρους πραγματοποιήθηκε διατηρώντας κάθε φορά σταθερή την βέλτιστη τιμή της παραμέτρου που ελέγχθηκε τελευταία. Για τον προσδιορισμό των βέλτιστων χρωματογραφικών παραμέτρων γινόταν σε κάθε έλεγχο, στο μηχάνημα, 3 εγχύσεις διαλύματος το οποίο είχε παρασκευαστεί ως εξής:

- Παραλαβή 50  $\mu$ L από το διάλυμα P
- Εξάτμιση μέχρι ξηρού υπό ρεύμα  $N_2$
- Παραγωγοποίηση με τις συνθήκες που συνοψίζονται στον **Πίνακα 6**
- Εξάτμιση μέχρι ξηρού υπό ρεύμα  $N_2$
- Επανασύσταση με 50  $\mu$ L οξικού αιθυλεστέρα και ένεση 1  $\mu$ L στο χρωματογραφικό σύστημα

Αρχικά οι ουσίες αναλύθηκαν με τις εξής συνθήκες: θερμοκρασία σημείου έγχυσης 280 °C, ταχύτητα ροής φέροντος αερίου 0.8 mL/min, αρχική θερμοκρασία στήλης, 100 °C, τελική θερμοκρασία στήλης 300 °C και ρυθμός αύξησης θερμοκρασίας 15 °C/min. Στην συνέχεια ελέγχθηκαν μία προς μία οι παρακάτω παράμετροι:

- **Θερμοκρασία σημείου έγχυσης του δείγματος**  
Δοκιμάστηκαν οι εξής θερμοκρασίες: 220 °C, 230 °C, 240 °C, 250 °C, 260 °C και 280 °C
- **Ταχύτητα ροής φέροντος αερίου**

Δοκιμάστηκαν οι εξής ταχύτητες ροής: 0.8 mL/min, 0.9 mL/min, 1.0 mL/min, 1.1 mL/min, 1.2 mL/min και 1.5 mL/min

- **Αρχική θερμοκρασία στήλης**

Δοκιμάστηκαν οι εξής θερμοκρασίες : 60 °C, 70 °C, 80 °C, 90 °C, 100 °C και 110 °C

- **Τελική θερμοκρασία στήλης**

Δοκιμάστηκαν οι εξής θερμοκρασίες: 270 °C, 280 °C, 290 °C και 300 °C

- **Ρυθμός αύξησης θερμοκρασίας**

Δοκιμάστηκαν οι εξής ρυθμοί άυξησης: 20 °C/min, 30 °C/min, 40 °C/min, και 50 °C/min

Οι βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες οι οποίες εξήχθησαν από τις παραπάνω δοκιμασίες παρουσιάζονται στον **Πίνακα 8**. Ο συνολικός χρόνος της χρωματογραφικής ανάλυσης ήταν 12.67 min.

**Πίνακας 8.** Χρωματογραφικές συνθήκες που επιλέχθηκαν ως βέλτιστες για τον προσδιορισμό της φαιτανύλης, του μεταβολίτη της και των υπό εξέταση παραγώγων.

Θερμοκρασία σημείου έγχυσης	240 °C
Αρχική θερμοκρασία στήλης	100 °C (παραμονή 1 min)
Ρυθμός ανόδου θερμοκρασίας	30 °C/min
Τελική θερμοκρασία στήλης	300 °C (παραμονή 5 min)
Ταχύτητα ροής φέροντος αερίου	1.0 mL/min
Θερμοκρασία ανιχνευτή	300 °C
Θερμοκρασία πηγής ιονισμού	200 °C

## 6.5 Βελτιστοποίηση προκατεργασίας βιολογικών δειγμάτων

Ένα από τα σημαντικότερα στάδια στην πορεία ανάλυσης μιας ουσίας είναι η απομόνωση της και ο διαχωρισμός της από τα ενδογενή συστατικά της μήτρας και από τυχόν προσμίξεις. Το στάδιο αυτό της προκατεργασίας των βιολογικών δειγμάτων είναι ιδιαίτερα σημαντικό για την πορεία του πειράματος καθώς η επιτυχία της παραγωγοποίησης των ουσιών σε επόμενο στάδιο, εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την καθαρότητα των μιγμάτων που παραγωγοποιούνται. Για αυτό ακριβώς το σκοπό έχουν αναπτυχθεί μία πληθώρα τεχνικών εκχύλισης, εκ των οποίων οι δύο συνηθέστερες είναι η υγρό-υγρό εκχύλιση (LLE) και η εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE). Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας, δοκιμάστηκαν και οι δύο τρόποι εκχύλισης, LLE και SPE. Κριτήριο για την αξιολόγηση των τεχνικών και των επι μέρους συνθηκών εκχύλισης αποτελούσε κάθε φορά η % ανάκτηση της μεθόδου. Ο υπολογισμός της ανάκτησης γινόταν με βάση τη μαθηματική σχέση:

$$\% A = E_1/E_2 \times 100 \quad (1)$$

,όπου % A η % ανάκτηση, E<sub>1</sub> το εμβαδόν της επιφάνειας του αναλύτη μετά από την εκχύλιση και την παραγωγοποίηση του δείγματος και τέλος E<sub>2</sub> το εμβαδόν της επιφάνειας του αναλύτη μετά από την απ' ευθείας έγχυση μετά από παραγωγοποίηση ίδιας ποσότητας αναλύτη.

Οι τεχνικές αλλά και οι επιμέρους δοκιμασίες που πραγματοποιήθηκαν παρουσιάζονται αναλυτικότερα παρακάτω, όπως και η πορεία βελτιστοποίησης τους.

### **Δοκιμασίες προκατεργασίας δειγμάτων ολικού αίματος**

Για την ανάπτυξη της μεθόδου προσδιορισμού της φαιτανύλης και των παραγώγων της χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα δείγματα ολικού αίματος.

Στο πρώτο στάδιο των δοκιμασιών λάμβανε χώρα κατεργασία με ακετονιτρίλιο ώστε να γίνει καταβύθιση των πρωτεϊνών. Σε 1 mL αίματος εμβολιασμένου με 50  $\mu$ L από το Διάλυμα εργασίας P (1 $\mu$ g/mL) προστίθετο 2 mL ακετονιτρίλιο υπό ανάδευση και ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 3000 rpm για 5 λεπτά. Μετά την φυγοκέντρηση γινόταν παραλαβή της υπερκείμενης στιβάδας και ακολουθούσε εξάτμιση μέχρις όγκου περίπου 500  $\mu$ L, ώστε να εξατμιστεί πλήρως το ακετονιτρίλιο. Ακολουθούσε ρύθμιση του pH, με χρήση κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος, ανάλογα με την τεχνική εκχύλισης. Μετά την εκχύλιση και την παραλαβή του εκχυλίσματος, ακολουθούσε το στάδιο της παραγωγοποίησης, η οποία ελάμβανε χώρα στις βέλτιστες συνθήκες παραγωγοποίησης (Πίνακας 6). Μαζί με τα εκχυλισθέντα δείγματα αίματος ετοιμαζόταν και μεθανολικά μικτά διαλύματα εργασίας ίδιας συγκέντρωσης των ουσιών τα οποία υποβάλλονταν σε παραγωγοποίηση υπό τις ίδιες συνθήκες. Τα δείγματα αυτά εγχέονταν στο χρωματογραφικό σύστημα και χρησιμοποιούνταν για υπολογισμό της απόλυτης ανάκτησης κατά το στάδιο της επεξεργασίας των αποτελεσμάτων, σύμφωνα με την μαθηματική σχέση (1) της προηγούμενης παραγράφου. Παράλληλα εγχέονταν στο χρωματογράφο και τυφλά δείγματα αίματος για έλεγχο παρεμποδίσεων από τα ενδογενή συστατικά της μήτρας.

#### **6.5.1 Υγρό-υγρό εκχύλιση (LLE)**

Η μέθοδος υγρό-υγρό εκχύλισης αποτελεί μία παραδοσιακή μέθοδο εκχύλισης. Πραγματοποιείται για την απομόνωση των αναλυτών από το δείγμα με κατάλληλο σύστημα διαλυτών σε κατάλληλο pH. Η κατανομή των ουσιών μεταξύ του οργανικού διαλύτη και του μίγματος γίνεται σε συγκεκριμένη αναλογία που εξαρτάται από το διαλύτη εκχύλισης, το pH και την αναλογία δείγματος-οργανικού διαλύτη.

Η υγρό-υγρό εκχύλιση λαμβάνει χώρα με διαμέριση της ουσίας μεταξύ της οργανικής και της υδατικής φάσης. Έτσι επιτυγχάνεται μία κατανομή ισορροπίας, μεταξύ των δύο φάσεων. Αυτό που μας ενδιαφέρει στο πλαίσιο της ανάπτυξης της μεθόδου, είναι η ποσοτική μεταφορά όσο το δυνατόν μεγαλύτερης ποσότητας των υπό εξέταση ουσιών από την υδατική στην οργανική φάση.

Προκειμένου να επιτύχουμε κάτι τέτοιο πρέπει να δεσμεύσουμε όσο το δυνατόν καλύτερα τις ενώσεις στην ουδέτερη μορφή τους, ώστε να αποφευχθεί τυχόν ιοντισμός και διαμέριση της ουσίας στην υδατική φάση. Ως εκ τούτου, ιδιαίτερα σημαντικό, πριν το στάδιο των εκχυλίσεων, είναι το στάδιο ρύθμισης του pH. Η ρύθμιση του pH, επιτυγχάνεται με την προσθήκη κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος. Εξίσου σημαντικό ρόλο στην αποτελεσματικότητα της εκχύλισης παίζει και η αναλογία των όγκων των δύο φάσεων.

Ως εκ τούτου πριν το στάδιο της βελτιστοποίησης των εκχυλίσεων προηγήθηκε αναζήτηση στη διεθνή επιστημονική βιβλιογραφία, των συνθηκών εκείνων που χρησιμοποιούνται συχνότερα. Οι διαλύτες ή τα μίγματα διαλυτών, καθώς και τα pH που χρησιμοποιήθηκαν, επιλέχθηκαν βάσει των αποτελεσμάτων της αναζήτησης.

### Επιλογή βέλτιστου pH

Στο αρχικό στάδιο της βελτιστοποίησης έλαβαν χώρα δοκιμασίες για τον προσδιορισμό της καταλληλότερης τιμής pH για την εκχύλιση. Όλες οι μελετηθείσες ουσίες είναι ισχυρά βασικές καθώς το  $pK_a$  τους κυμαίνεται από 7.51-10.03 (Πιν. 9). Οπότε είναι σημαντικό να διατηρήσουμε το pH του διαλύματος σε υψηλές τιμές ώστε να αποφευχθεί τυχόν ιοντισμός. Στο πλαίσιο ανάπτυξης της δικής μας μεθόδου δοκιμάστηκαν εκχυλίσεις σε τιμές pH 7, 8, 9 και 10, με χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων φωσφορικών. Η βελτιστοποίηση της υγρό-υγρό εκχύλισης ήταν μονοπαραμετρική. Ως εκ τούτου για την επιλογή βέλτιστου pH, ως διαλύτης εκχύλισης χρησιμοποιήθηκε αρχικά ο οξικός αιθυλεστέρας. Αφού καταγράφηκαν τα ποσοστά ανάκτησης για την εκχύλιση σε διαφορετικά pH, αξιολογήθηκαν τα αποτελέσματα και με συγκριτική μελέτη, αποφασίστηκε ποιο pH χαρακτηρίζεται ως βέλτιστο για την εκχύλιση των ουσιών με την τεχνική της υγρό-υγρό εκχύλισης. Στην συνέχεια με διατήρηση της παραμέτρου του pH σταθερή επιλέχθηκε ο καταλληλότερος διαλύτης εκχύλισης/ εκχυλιστικό μίγμα διαλυτών. Παράλληλα με τα εκχυλισθέντα δείγματα αναλύθηκαν με τις χρωματογραφικές συνθήκες και μεθανολικά δείγματα (50  $\mu$ L διαλύματος P) καθώς και τυφλά δείγματα για έλεγχο τυχόν παρεμποδίσεων.

**Πίνακας 9.** Τιμές  $pK_a$  των υπό εξέταση ουσιών.

<b>Φαιτανύλη</b>	8.77
<b>Νορφαιτανύλη</b>	10.03
<b>Ρεμφαιτανύλη</b>	7.51
<b>Βουτυρυλοφαιτανύλη</b>	8.77
<b>Ακετυλοφαιτανύλη</b>	8.4
<b>Οκφαιτανύλη</b>	7.82
<b>Φουρανυλοφαιτανύλη</b>	Δεν αναφέρεται στη βιβλιογραφία

Τα στάδια της υγρό-υγρό εκχύλισης συμπεριλαμβανομένης και της καταβύθισης των πρωτεϊνών του αίματος που προηγήθηκε φαίνονται παρακάτω:

1. Προσθήκη σε δοκιμαστικό σωλήνα 1 mL ολικού αίματος.
2. Εμβολιασμός με 50  $\mu$ L μικτού διαλύματος εργασίας (Διάλυμα P, 1 $\mu$ g/mL) και ανάδευση για 1 min σε σύστημα περιδίνισης (vortex).
3. Προσθήκη 2 mL ακετονιτριλίου υπό ανάδευση.
4. Φυγοκέντρηση στις 3000 rpm για 5 λεπτά.
5. Παραλαβή της υπερκείμενης στιβάδας και εξάτμιση υπό ρεύμα αζώτου μέχρις όγκου περίπου 500  $\mu$ L.
6. Ρύθμιση του pH με την προσθήκη 250  $\mu$ L ρυθμιστικού διαλύματος.
7. Προσθήκη 3 mL οξικού αιθυλεστέρα υπό ανάδευση και ανάδευση του κάθε δείγματος για επιπλέον 2 λεπτά.
8. Φυγοκέντρηση στις 3000 rpm για 5 λεπτά.
9. Παραλαβή της υπερκείμενης στιβάδας.
10. Εξάτμιση υπό ρεύμα N<sub>2</sub> μέχρι ξηρού σε θερμοκρασία T= 40 °C.
11. Παραγωγοποίηση με τις συνθήκες που περιγράφονται στον **Πίνακα 6**.
12. Τα δείγματα αφήνονταν σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να γίνει συμπύκνωση του διαλύματος για 10 λεπτά.
13. Στην συνέχεια γινόταν εξάτμιση μέχρι ξηρού υπό N<sub>2</sub>, επανασύσταση με 50  $\mu$ L οξικό αιθυλεστέρα και ανάδευση σε αναδευτήρα περιδίνισης, για 30 sec.
14. Τα διαλύματα μεταφέρονταν σε γυάλινα φιαλίδια (vials) που περιείχαν γυάλινα σωληνάκια προσυγκέντρωσης (glass inserts).
15. Ακολουθούσε τοποθέτηση των φιαλιδίων στον αυτόματο δειγματολήπτη και έγχυση 1  $\mu$ L στο χρωματογραφικό σύστημα με τις χρωματογραφικές συνθήκες που περιγράφονται στον **Πίνακα 8**.
16. Λαμβάνονταν τα χρωματογραφήματα και γίνονταν οι ολοκληρώσεις των κορυφών για τα θράυσματα των εξεταζόμενων ουσιών.
17. Υπολογίζονταν οι επι τοις εκατό (%) ανακτήσεις των εκχυλίσεων και γινόταν αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

Τα επί τοις εκατό (%) ποσοστά απόλυτης ανάκτησης της μεθόδου υγρό-υγρό εκχύλισης για τις 7 υπό προσδιορισμό ουσίες, με την εφαρμογή 4 διαφορετικών τιμών pH, παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον **Πίνακα 10**.

**Πίνακας 10.** Επί τοις εκατό (%) ποσοστά απόλυτης ανάκτησης για τις 7 ουσίες με την τεχνική της υγρό-υγρό εκχύλισης σε διαφορετικές τιμές pH σε εμβολιασμένα δείγματα ολικού αίματος.

	pH 7.0	pH 8.0	pH 9.0	pH 10.0
<b>Φαιντανύλη</b>	74	77	78	73
<b>Νορφαιντανύλη</b>	44	68	111	150
<b>Ρεμφαιντανύλη</b>	69	73	74	73
<b>Βουτυρυλοφαιντανύλη</b>	65	78	82	75
<b>Ακετυλοφαιντανύλη</b>	71	73	78	76
<b>Οκφαιντανύλη</b>	72	76	80	78
<b>Φουρανυλοφαιντανύλη</b>	74	79	80	77

Από τις τιμές των ανακτήσεων που συνοψίζονται στον **Πίνακα 10**, συμπεραίνουμε ότι το ιδανικότερο pH για την έκλυση των παραπάνω ουσιών είναι το pH 9.0. Βάσει αυτού, στις δοκιμασίες που ακολούθησαν για την επιλογή βέλτιστου συστήματος διαλυτών εκχύλισης, στο στάδιο ρύθμισης του pH χρησιμοποιείτο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 9.0. Στο pH 10, στην περίπτωση της νορφαιντανύλης, εκχυλίζονται σε μεγάλο ποσοστό και ουσίες προερχόμενες από τη μήτρα γεγονός που φαίνεται από τα αδικαιολόγητα υψηλό ποσοστό ανάκτησης.

### **Επιλογή βέλτιστου συστήματος διαλυτών εκχύλισης**

Σε δεύτερο στάδιο πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες εκχύλισης με τη χρησιμοποίηση διαφορετικών διαλυτών ή μιγμάτων διαλυτών εκχύλισης, προκειμένου να προσδιοριστεί ο διαλύτης εκείνος ο οποίος δίνει τις βέλτιστες τιμές ανάκτησης για τις ουσίες. Η επιλογή των διαλυτών βασίστηκε, όπως και στην περίπτωση του pH, στην αναζήτηση που έγινε στη διεθνή επιστημονική βιβλιογραφία. Η διαδικασία εκχύλισης που ακολουθήθηκε ήταν ίδια με αυτήν για την επιλογή του βέλτιστου pH. Στο στάδιο της ρύθμισης του pH χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 9.0, που στις προηγούμενες δοκιμασίες βρέθηκε ως καταλληλότερο για την εκχύλιση. Για τον υπολογισμό της ανάκτησης και τον έλεγχο των παρεμποδίσεων αναλύθηκαν επίσης μεθανολικά δείγματα (50  $\mu$ L διαλύματος P) και τυφλά δείγματα. Οι διαλύτες ή τα μίγματα διαλυτών που δοκιμάστηκαν ήταν τα παρακάτω:

1. Εξάνιο:Οξικός αιθυλεστέρας (70:30, v/v)
2. Εξάνιο:Οξικός αιθυλεστέρας:Ισοπροπανόλη (49:49:2, v/v/v)
3. Εξάνιο:Ισοπροπανόλη (98:2, v/v)
4. Οξικός αιθυλεστέρας

5. Διχλωρομεθάνιο:Ισοπροπανόλη (90:10, v/v)
6. Διχλωρομεθάνιο:Εξάνιο:Ισοπροπανόλη (49:49:2, v/v/v)
7. Διχλωρομεθάνιο:Οξικός αιθυλεστέρας (20:80, v/v)

Παράλληλα δοκιμάστηκε και η εκχύλιση με τη χρήση στηλών Chem Elut οι οποίες αποτελούν μία εναλλακτική δοκιμασία υγρό-υγρό εκχύλισης με χρήση μίγματος διαλυτών έκλουσης διχλωρομεθάνιο:ισοπροπανόλη (90%:10%, v/v). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την εκχύλιση με Chem Elut στήλες περιελάμβανε καταβύθιση πρωτεϊνών με ACN και στη συνέχεια:

1. Προσθήκη 4,5 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH 9.0.
2. Μετάγγιση στις στήλες Chem Elut.
3. Αναμονή για 5 min μέχρι να διαβραχεί πλήρως το πληρωτικό υλικό.
4. Προσθήκη 2x6 mL μίγματος διχλωρομεθάνιο:ισοπροπανόλη (90%:10%, v/v) και παραλαβή του εκχυλίσματος.
5. Εξάτμιση του εκχυλίσματος υπό ρεύμα N<sub>2</sub> σε θερμοκρασία T= 40 ° C.
6. Παραγωγοποίηση με τις συνθήκες που περιγράφονται στον **Πίνακα 6**.
7. Τα δείγματα αφήνονταν σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να γίνει συμπύκνωση του διαλύματος για 10 λεπτά.
8. Στην συνέχεια γινόταν εξάτμιση μέχρι ξηρού υπό N<sub>2</sub>, επανασύσταση με 50 µL οξικό αιθυλεστέρα και ανάδευση σε αναδευτήρα περιδίνισης, για 30 sec.
9. Τα διαλύματα μεταφέρονταν σε γυάλινα φιαλίδια (vials) που περιείχαν γυάλινα σωληνάκια προσυγκέντρωσης (glass inserts).
10. Ακολουθούσε τοποθέτηση των φιαλιδίων στον αυτόματο δειγματολήπτη και έγχυση 1 µL στο χρωματογραφικό σύστημα με τις χρωματογραφικές συνθήκες που περιγράφονται στον **Πίνακα 8**.
11. Λαμβάνονταν τα χρωματογραφήματα και γίνονταν οι ολοκληρώσεις των κορυφών για τα θράυσματα των εξεταζόμενων ουσιών.
12. Υπολογίζονταν οι επι τοις εκατό (%) ανακτήσεις των εκχυλίσεων και γινόταν αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

Τα επί τοις εκατό (%) ποσοστά απόλυτης ανάκτησης της μεθόδου υγρό-υγρό εκχύλισης για τις 7 υπό προσδιορισμό ουσίες, με τους διάφορους διαλύτες και μίγματα διαλυτών εκχύλισης παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον **Πίνακα 11**. Από τα αποτελέσματα συμπεραίνονται τα εξής.

- a. Τα εκχυλιστικά μίγματα εξάνιο:ισοπροπανόλη (98:2), εξάνιο:οξικός αιθυλεστέρας (70:30) και η εκχύλιση με ChemElut κρίθηκαν ακατάλληλα καθώς δεν εκχυλίζουν την νορφαινανύλη ή την εκχυλίζουν με εξαιρετικά μικρά ποσοστά ανάκτησης.

- b.** Τα εκχυλιστικά μίγματα διχλωρομεθάνιο:ισοπροπανόλη (90:10), διχλωρομεθάνιο:εξάνιο:ισοπροπανόλη (49:49:2) και διχλωρομεθάνιο:οξικός αιθυλεστέρας (20:80) εκχυλίζουν μεν καλά τις περισσότερες από τις ουσίες αλλά στην περίπτωση της νορφαιτανύλης εκχυλίζουν σε μεγάλο ποσοστό και ουσίες προερχόμενες από τη μήτρα γεγονός που φαίνεται από τα αδικαιολόγητα υψηλά ποσοστά ανάκτησης.
- c.** Το εκχυλιστικό μίγμα εξάνιο:οξικός αιθυλεστέρας:ισοπροπανόλη (49:49:2) φαίνεται ότι είναι το πιο κατάλληλο για την εκχύλιση των ουσιών αν και για την νορφαιτανύλη το ποσοστό ανάκτησης είναι σχετικό μικρό.



**Πίνακας 11.** Επί τοις εκατό (%) ποσοστά απόλυτης ανάκτησης για τις υπό προσδιορισμό ουσίες με την τεχνική της υγρό-υγρό εκχύλισης με διαφορετικά συστήματα διαλυτών εκχύλισης, σε εμβολιασμένα δείγματα ολικού αίματος.

	<b>Φαιτανύλη</b>	<b>Νορφαιτανύλη</b>	<b>Ρεμφαιτανύλη</b>	<b>Βουτυρολοφαιτανύλη</b>	<b>Ακετυλοφαιτανύλη</b>	<b>Οκφαιτανύλη</b>	<b>Φουρανυλοφαιτανύλη</b>
<b>Εξάνιο: Οξικός αιθυλεστέρας (70:30, v/v)</b>	103	18	92	82	88	95	107
<b>Εξάνιο: Οξικός αιθυλεστέρας: Ισοπροπανόλη</b>	106	73	90	94	95	106	108
<b>Εξάνιο: Ισοπροπανόλη (98:2, v/v)</b>	84	-	16	90	67	52	73
<b>Οξικός αιθυλεστέρας</b>	78	111	73	78	78	80	80
<b>Διχλωρομεθάνιο: Ισοπροπανόλη (90:10, v/v)</b>	89	145	86	90	90	91	93
<b>Διχλωρομεθάνιο:Εξάνιο: Ισοπροπανόλη (49:49:2, v/v/v)</b>	86	141	83	87	87	88	91
<b>Διχλωρομεθάνιο: Οξικός αιθυλεστέρας (20:80, v/v)</b>	87	164	85	88	88	88	91
<b>Chem Elut</b>	74	-	75	72	80	81	77

### 6.5.2 Εκχύλιση στερεάς φάσεως (SPE)

Η SPE χρησιμοποιείται για την εκλεκτική εκχύλιση, προσυγκέντρωση και καθαρισμό των αναλυτών πριν από την ανάλυση με έγχυση στο χρωματογραφικό σύστημα. Αποτελεί μία τεχνική προκατεργασίας δειγμάτων που προσφέρει αρκετά πλεονεκτήματα συγκρινόμενη με παραδοσιακές μεθόδους. Μία πορεία SPE βασίζεται στην εφαρμογή ενός πρωτοκόλλου το οποίο περιλαμβάνει τρία στάδια.

1. Κατακράτηση του αναλύτη στο προσροφητικό υλικό.
2. Απομάκρυνση ανεπιθύμητων προσμίξεων.
3. Έκλυση του αναλύτη με επιλογή κατάλληλου διαλύτη έκλυσης.

Στη μελέτη αυτή δοκιμάστηκαν 3 διαφορετικές στήλες εκχύλισης στερεάς φάσης, οι οποίες παρουσιάζονται στον **Πίνακα 12**.

**Πίνακας 12.** Στήλες εκχύλισης που χρησιμοποιήθηκαν για την SPE.

<b>Bond Elut LRC Certify, Agilent</b>	Μικτού τύπου, κατιοανταλλακτικές / μη πολικές
<b>Bond Elut LRC Certify II, Agilent</b>	Μικτού τύπου, ανιοανταλλακτικές / μη πολικές
<b>HF Bond Elut C18, Agilent</b>	Μη πολικές / υδροφοβικές στήλες

Αρχικά 1 mL ολικού αίματος εμβολιάστηκε με 50  $\mu$ L από το Διάλυμα P (1  $\mu$ g/mL). Στην συνέχεια όπως και στις δοκιμασίες της υγρό-υγρό εκχύλισης, ελάμβανε χώρα ένα στάδιο προκατεργασίας του αίματος με ACN με σκοπό την καταβύθιση των πρωτεϊνών. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την καταβύθιση είναι η ίδια όπως και στην υγρό-υγρό εκχύλιση (βλέπε **Παράγραφο 6.5.1**). Πριν την εφαρμογή του δείγματος στη στήλη προστίθετο επίσης σε κάθε δείγμα 3 mL ρυθμιστικό διάλυμα διαφορετικού από στήλη σε στήλη και ανάλογα με τις εκάστοτε προδιαγραφές χρήσης των στηλών. Στα εμβολιασμένα δείγματα που προορίζονταν για εκχύλιση με τις στήλες Certify I, προστέθηκαν 3 mL ρυθμιστικού διαλύματος pH 6.0, στα εμβολιασμένα δείγματα που προορίζονταν για εκχύλιση με τις στήλες Certify II, προστέθηκαν 3 mL πρόσφατα παρασκευασμένου μίγματος ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (0.1 M) pH 7.0 : μεθανόλης (95:5, v/v) και τέλος στα εμβολιασμένα δείγματα που προορίζονταν για εκχύλιση με τις στήλες Certify C18, προστέθηκαν 3 mL ρυθμιστικού διαλύματος pH 6.0. Μαζί με τα εκχυλισθέντα δείγματα αναλύθηκαν και μεθανολικά δείγματα 50  $\mu$ L διαλύματος P στα οποία είχε προηγηθεί παραγωγοποίηση με τις συνθήκες του **Πίνακα 6**, καθώς και τυφλά δείγματα για τον έλεγχο τυχόν παρεμποδίσεων.

**Για τις στήλες Bond Elut LRC Certify, οι δοκιμασίες που ακολουθήθηκαν ήταν οι εξής:**

- A.** Ενεργοποίηση των στηλών:
  - 1. Προσθήκη 3 mL μεθανόλης.
  - 2. Προσθήκη 3 mL νερού.
  - 3. Προσθήκη 1 mL ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 6.0.
- B.** Εφαρμογή του δείγματος.
- C.** Έκπλυση των στηλών:
  - 1. Προσθήκη 3 mL νερού.
  - 2. Προσθήκη 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος pH 4.0.
  - 3. Προσθήκη 3 mL μεθανόλης.
- D.** Εφαρμογή κενού > 10 mm Hg, για 10 λεπτά.
- E.** Έκλυση των υπό προσδιορισμό ουσιών:
  - 1. Προσθήκη 1.5 mL μίγματος διχλωρομεθάνιο:ισοπροπανόλη:αμμωνία (85%:15%:2%, v/v/v).
  - 2. Επανάκλυση με προσθήκη 1.5 mL του ίδιου μίγματος.

**Για τις στήλες Bond Elut LRC Certify II, οι δοκιμασίες που ακολουθήθηκαν ήταν οι εξής:**

- A.** Ενεργοποίηση των στηλών:
  - 1. Προσθήκη 2 mL μεθανόλης.
  - 2. Προσθήκη 2 mL μίγματος ρυθμιστικού διαλύματος pH 7.0:μεθανόλης (95%:5%, v/v).
- B.** Εφαρμογή του δείγματος.
- C.** Έκπλυση των στηλών με 2 mL μίγματος ρυθμιστικού διαλύματος pH 7.0:μεθανόλης (95%:5%, v/v).
- D.** Εφαρμογή κενού > 10 mm Hg, για 30 sec.
- E.** Προσθήκη 75  $\mu$ L εξάνιο.
- F.** Εφαρμογή κενού > 10 mm Hg, για 10 λεπτά.
- G.** Έκλυση των υπό προσδιορισμό ουσιών:
  - 1. Προσθήκη 1.5 mL μίγματος διχλωρομεθάνιο:ισοπροπανόλη:αμμωνία (85%:15%:2%, v/v/v).
  - 2. Επανάκλυση με προσθήκη 1.5 mL του ίδιου μίγματος.

**Για τις στήλες HF Bond Elut C18, οι δοκιμασίες που ακολουθήθηκαν ήταν οι εξής:**

- A.** Ενεργοποίηση των στηλών:
  - 1. Προσθήκη 2 mL μεθανόλης.

2. Προσθήκη 2 mL νερού.
- B. Εφαρμογή του δείγματος.
- C. Έκπλυση των στηλών με 2 mL νερού.
- D. Εφαρμογή κενού > 10 mm Hg, για 30 sec.
- E. Προσθήκη 75  $\mu$ L εξάνιο.
- F. Εφαρμογή κενού > 10 mm Hg, για 10 λεπτά.
- G. Έκλυση των υπό προσδιορισμό ουσιών:
  1. Προσθήκη 1.5 mL μίγματος διχλωρομεθάνιο:ισοπροπανόλη:αμμωνία (85%:15%:2%, v/v/v).
  2. Επανάκλυση με προσθήκη 1.5 mL του ίδιου μίγματος.

Μετά την εκχύλιση των δειγμάτων με τη χρήση των στηλών, ακολούθησε παραγωγοποίηση των δειγμάτων ως εξής:

1. Εξάτμιση υπό ρεύμα  $N_2$  μέχρι ξηρού σε θερμοκρασία  $T=40\text{ }^\circ\text{C}$ .
2. Παραγωγοποίηση με τις συνθήκες που παρουσιάζονται στον **Πίνακα 6**.
3. Τα δείγματα αφήνονταν σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να γίνει συμπύκνωση του διαλύματος για 10 λεπτά.
4. Στην συνέχεια γινόταν εξάτμιση μέχρι ξηρού υπό  $N_2$ , επανασύσταση με 50  $\mu$ L οξικό αιθυλεστέρα και ανάδευση σε αναδευτήρα περιδίνισης, για 30 sec.
5. Τα διαλύματα μεταφέρονταν σε γυάλινα φιαλίδια (vials) που περιείχαν γυάλινα σωληνάκια προσυγκέντρωσης (glass inserts).
6. Ακολουθούσε τοποθέτηση των φιαλιδίων στον αυτόματο δειγματολήπτη και έγχυση 1  $\mu$ L στο χρωματογραφικό σύστημα με τις χρωματογραφικές συνθήκες που περιγράφονται στον **Πίνακα 8**.
7. Λαμβάνονταν τα χρωματογραφήματα και γίνονταν οι ολοκληρώσεις των κορυφών για τα θράυσματα των εξεταζόμενων ουσιών.
8. Υπολογίζονταν οι επι τοις εκατό (%) ανακτήσεις των εκχυλίσεων και γινόταν αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

Οι τιμές των % ανακτήσεων για τις υπό μελέτη ουσίες, συνοψίζονται στον **Πίνακα 13**. Από την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων που συλλέχθηκαν αποφασίστηκε ότι οι στήλες Bond Elut Certify I της εταιρείας Agilent είναι οι πλέον κατάλληλες για την εκχύλιση των δειγμάτων, καθώς τα δείγματα τα οποία συλλέχθησαν ήταν τα πλέον καθαρά και οι τιμές των % ανακτήσεων που προέκυψαν ήταν οι πλέον ικανοποιητικές για το σύνολο των υπό μελέτη ενώσεων. Στην εκχύλιση με τις στήλες Bond Elut Certify II και HF Bond Elut C18, στο χρόνο της φουράνυλφαιντανύλης

παρατηρήθηκε συνέκλωση ενός άλλου συστατικού προερχόμενου από την μήτρα. Επιπροσθέτως, στην περίπτωση των στηλών HF Bond Elut C18, παρατηρήθηκε σημαντική συνέκλωση ενδογενών συστατικών της μήτρας στον ίδιο περίπου χρόνο με την έκλωση της νορφαινανύλης, για τα τρία βασικότερα θραύσματα ποσοτικοποίησης.

**Πίνακας 13.** Επί τοις εκατό (%) ποσοστά απόλυτης ανάκτησης για τις υπό προσδιορισμό ουσίες με την τεχνική της εκχύλισης υγρού-υγρού με διαφορετικές στήλες εκχύλισης, σε εμβολιασμένα δείγματα ολικού αίματος.

	<b>Bond Elut Certify</b>	<b>Bond Elut Certify II</b>	<b>Bond Elut C18</b>
<b>Φαινανύλη</b>	98	89	84
<b>Νορφαινανύλη</b>	106	87	145
<b>Ρεμφαινανύλη</b>	90	89	82
<b>Βουτυρυλοφαινανύλη</b>	96	88	84
<b>Ακετυλοφαινανύλη</b>	100	90	85
<b>Οκφαινανύλη</b>	100	90	86
<b>Φουρανυλοφαινανύλη</b>	95	91	86

Από το σύνολο των εκχυλιστικών μέσων που δοκιμάστηκαν τα καλύτερα ποσοστά ανάκτησης εξήχθησαν με αυτή της εκχύλισης στερεάς φάσεως με τις στήλες Bond Elut Certify . Ως εκ τούτου επιλέχθηκε ως η τεχνική εκχύλισης των υπό ανάλυση ουσιών κατά την προκατεργασία του δείγματος.

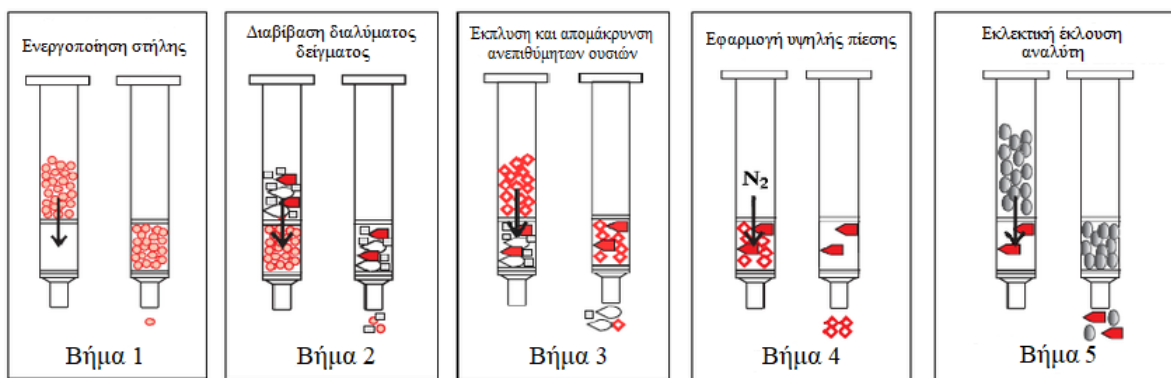
## 6.6 Αναπτυχθείσα μέθοδος

Η τεχνική η οποία αναπτύχθηκε και βελτιστοποιήθηκε αποτελείται από τα εξής στάδια:

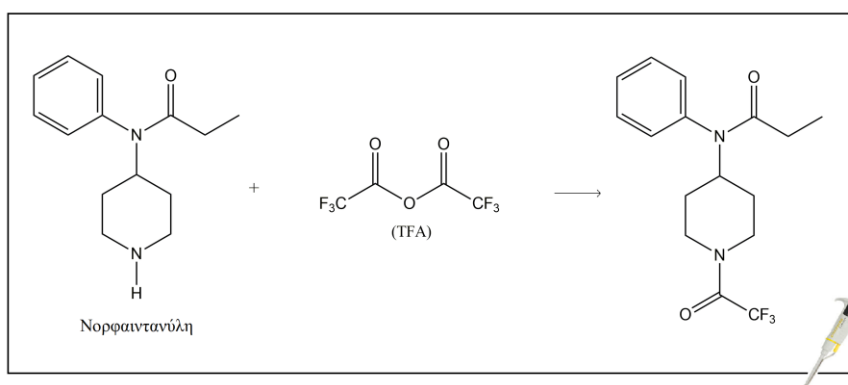
### 1. Δειγματοληψία



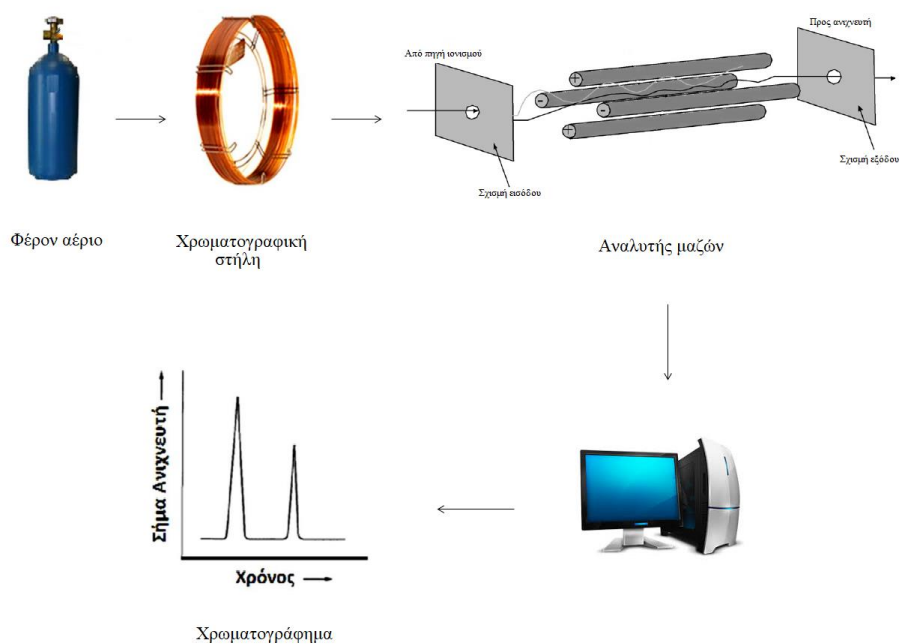
### 2. Εκχύλιση και απομόνωση των ουσιών από το αίμα με την τεχνική της Εκχύλισης Στερεάς Φάσης σε στήλες Certify I



3. Αντίδραση του μίγματος με TFAA προς παραγωγή της νορφαιντανύλης σε θερμοκρασία 70 °C για 30 min



4. Έγχυση των ουσιών στο χρωματογράφο + ανάλυση με τις επιλεχθείσες χρωματογραφικές συνθήκες (Πίνακας 8) + ληψη των χρωματογραφημάτων



## 5. Διεξαγωγή αποτελεσμάτων και αξιολόγηση τους



Αναλυτικότερα, η μέθοδος που αναπτύχθηκε και βελτιστοποιήθηκε περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

### Προκατεργασία

- A. Παραλαβή 1 mL αίματος (αγνωστο ή εμβολιασμένο) και προσθήκη 50  $\mu\text{L}$  διαλύματος μεθαδόνης- $\text{d}^3$ , συγκέντρωσης 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$
- B. Ανάδευση σε αναδευτήρα περιδίνισης για 30 sec.
- C. Προσθήκη 2 mL ACN υπό ανάδευση
- D. Φυγοκέντρωση στους 3000 rpm για 5 λεπτά
- E. Παραλαβή της υπερκείμενης στιβάδας και εξάτμιση μέχρις όγκου περίπου 500  $\mu\text{L}$
- F. Προσθήκη 3 mL ρυθμιστικού διαλύματος pH 6.0

### Εκχύλιση

- G. Ενεργοποίηση των στηλών Bond Elut Certify I:
  - 1. Προσθήκη 3 mL μεθανόλης.
  - 2. Προσθήκη 3 mL υπερκάθαρο νερό.
  - 3. Προσθήκη 1 mL ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 6.0.
- H. Εφαρμογή του δείγματος.
- I. Έκπλυση των στηλών:
  - 1. Προσθήκη 3 mL υπερκάθαρο νερό.
  - 2. Προσθήκη 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος pH 4.0.
  - 3. Προσθήκη 3 mL μεθανόλης.
- J. Εφαρμογή κενού > 10 mm Hg, για 10 λεπτά.
- K. Έκλουση των υπό προσδιορισμό ουσιών:
  - 3. Προσθήκη 1.5 mL μίγματος διχλωρομεθάνιο:ισοπροπανόλη:αμμωνία (85%:15%:2%, v/v/v).
  - 4. Επανεκλούση με προσθήκη 1.5 mL του ίδιου μίγματος.

5. Παραλαβή του εκχυλίσματος σε εσφυρισμένα σωληνάριο.

#### **Παραγωγή**

- L.** Εξάτμιση του εκλούσματος μέχρι ξηρού υπό ρεύμα  $N_2$  σε αμμόλουτρο σε  $T=40\text{ }^\circ\text{C}$
- M.** Προσθήκη 50  $\mu\text{L}$  TFAA
- N.** Παραμονή για 30 min σε θερμοκρασία  $T=70\text{ }^\circ\text{C}$
- O.** Παραμονή του δείγματος για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να γίνει συμπύκνωση
- P.** Εξάτμιση μέχρι ξηρού υπό ρεύμα  $N_2$
- Q.** Ανασύσταση με 50  $\mu\text{L}$  οξικού αιθυλεστέρα και ανάδευση σε αναδευτήρα περιδίνισης για 30 sec.
- R.** Μεταφορά σε γυάλινα φιαλίδια (vials) που περιέχουν γυάλινα σωληνάκια προσυγκέντρωσης (glass inserts).

#### **Ανάλυση στο GC/MS**

- S.** Τοποθέτηση των φιαλιδίων στον αυτόματο δειγματολήπτη και έγχυση 1  $\mu\text{L}$  στο χρωματογραφικό σύστημα με τις χρωματογραφικές συνθήκες που περιγράφονται στον **Πίνακα 7**.





## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: Πρωτόκολλο επικύρωσης της αναπτυχθείσας μεθόδου**

### **Εισαγωγή**

Η επικύρωση (validation) των μεθόδων προσδιορισμού των υπό μελέτη ουσιών σε ολικό αίμα πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του FDA (Food and Drug Administration) [359], της Ευρωπαϊκής Ένωσης [361], του ICH (International Conference on Harmonization) [362] και της EURACHEM [360]. Το πρωτόκολλο επικύρωσης περιελάμβανε τη μελέτη της εκλεκτικότητας (selectivity), της ειδικότητας (specificity) και της γραμμικότητας (linearity), τον προσδιορισμό των κατώτατων ορίων ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD) και ποσοτικοποίησης (Limit of Quantification, LOQ), τον υπολογισμό της επαναληψιμότητας (within day precision), της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας (between days precision), της ορθότητας εντός της ημέρας (intraday accuracy) και δια των ημερών (interday accuracy), της απόλυτης ανάκτησης (absolute recovery) και της ανθεκτικότητας (robustness), καθώς και της σταθερότητας (stability) των αναλυτών σε εμβολιασμένα πρότυπα βιολογικά δείγματα.

### **Εκλεκτικότητα**

Η μελέτη της εκλεκτικότητας πραγματοποιήθηκε με την ανάλυση έξι τυφλών βιολογικών δειγμάτων ολικού αίματος διαφορετικής προέλευσης και τον έλεγχο των χρωματογραφημάτων, προκειμένου να διαπιστωθούν τυχόν παρεμποδίσεις από ενδογενή συστατικά του αίματος στους χρόνους ανάλυσης των αναλυτών και των εσωτερικών προτύπων [359-360]. Τα δείγματα κατεργάστηκαν χωρίς την προσθήκη κάποιου αναλύτη ή εσωτερικού προτύπου, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 6.6.

### **Ειδικότητα**

Η μελέτη της ειδικότητας πραγματοποιήθηκε με την παρασκευή μικτού διαλύματος εργασίας 43 διαφορετικών ουσιών συγκέντρωσης 10  $\mu\text{g/mL}$ . Το εν λόγω διάλυμα εργασίας περιείχε ουσίες ή μεταβολίτες αυτών που μπορεί να λαμβάνονται, νόμιμα ή παράνομα, από άτομα που λαμβάνουν αγωγή ή ενδέχεται να κάνουν χρήση των υπό μελέτη παραγώγων της φαιτανύλης και πιθανόν να συνυπάρχουν στα υπό εξέταση μεταθανάτια δείγματα ή βιολογικά δείγματα των ασθενών αυτών. Οι ουσίες αυτές, καθώς, επίσης, και οι μεταβολίτες που περιέχονταν στο διάλυμα ήταν οι παρακάτω: διαζεπάμη, νορδιαζεπάμη, αλπραζολάμη, βρωμαζεπάμη, 7-αμινοφλουνιτραζεπάμη, λοραζεπάμη, νορτρυπτιλίνη, κουετιαπίνη, ολανζαπίνη, ρισπεριδόνη, υδροξυρισπεριδόνη, σερτραλίνη, νορσερτραλίνη, παροξετίνη, βενλαφαξίνη, νορβενλαφαξίνη, μιρταζαπίνη, νορμιρταζαπίνη, μαπροτιλίνη, νορμαπροτιλίνη, παρακεταμόλη, σιταλοπράμη, φλουοξετίνη, ζολπιδέμη, αμφεταμίνη,

μεθαμφεταμίνη, 3,4-μεθυλενοδιοξυμεθαμφεταμίνη (MDMA), 3,4-μεθυλενοδιοξυαμφεταμίνη (MDA), *N*-μεθυλ-1,3-βενζοδιοξολυλβουταναμίνη (MBDB), 3,4-μεθυλενοδιοξυ-*N*-αιθυλαμφεταμίνη (MDEA), κεταμίνη, νορκεταμίνη, Δ9-τετραϋδροκανναβινόλη, 11-*nor*-Δ9-τετραϋδροκανναβινοϊκό οξύ, βουπρενορφίνη, νορβουπρενορφίνη, μεθαδόνη, μορφίνη, κωδεΐνη, 6-μονοακετυλομορφίνη, κοκαΐνη, βενζοϋλοεκγονίνη και μεθυλεστεράς της εκγονίνης. Παρασκευάστηκαν έξι εμβολιασμένα πρότυπα βιολογικά δείγματα ολικού αίματος των παραπάνω 43 προτύπων ουσιών συγκέντρωσης 500 ng/mL και χωρίς την προσθήκη της φαιντανύλης και των υπό εξέταση παραγώγων της. Τα δείγματα κατεργάστηκαν και αναλύθηκαν εφαρμόζοντας τις αναπτυχθείσες μεθόδους για τον ποσοτικό προσδιορισμό της φαιντανύλης και των παραγώγων της σε ολικό αίμα, προκειμένου να διερευνηθεί η ύπαρξη τυχόν παρεμποδίσεων στους χρόνους ανάσχεσης των αναλυτών και του εσωτερικού προτύπου τους [359-360].

### **Κατώτατα όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ)**

Ως κατώτατο όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης θεωρήθηκε η συγκέντρωση του κάθε αναλύτη που είχε απόκριση μεγαλύτερη από το θόρυβο ενός τυφλού δείγματος τουλάχιστον κατά τρεις (LOD,  $S/N \geq 3:1$ ) και δέκα φορές (LOQ,  $S/N \geq 10:1$ ), αντίστοιχα (ICH, 2005).

### **Γραμμικότητα**

Η μελέτη της γραμμικότητας πραγματοποιήθηκε με την κατασκευή διαγραμμάτων βαθμονόμησης επτά σημείων σε 4 διαφορετικές ημέρες. Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων βαθμονόμησης που επελέγησαν παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3**. Οι εξισώσεις παλινδρόμησης ( $y=a \cdot x+b$ ) των διαγραμμάτων βαθμονόμησης υπολογίστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων και με συντελεστή βαρύτητας  $1/x^2$ , όπου το  $x$  αντιστοιχεί στην ονομαστική (θεωρητική) τιμή της συγκέντρωσης του κάθε αναλύτη εκφρασμένη σε ng/mL, ενώ το  $y$  αντιστοιχεί στο λόγο της απόκρισης του αναλύτη προς την απόκριση του αντίστοιχου εσωτερικού προτύπου. Στο πλαίσιο της μελέτης της γραμμικότητας της μεθόδου υπολογίστηκε το τετράγωνο του συντελεστή συσχέτισης ( $R^2$ ) για κάθε εξίσωση παλινδρόμησης και έπρεπε να ισχύει ότι  $R^2 \geq 0.98$  [360, 362].

### **Επαναποσοτικοποίηση των δειγμάτων βαθμονόμησης**

Τα δείγματα βαθμονόμησης κατεργάστηκαν και αναλύθηκαν εφαρμόζοντας την αναπτυχθείσα μέθοδο για τον ποσοτικό προσδιορισμό της φαιντανύλης και των υπό εξέταση παραγώγων της σε ολικό αίμα και χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή των αντίστοιχων διαγραμμάτων βαθμονόμησης. Στη συνέχεια, έγιναν επαναποσοτικοποιήσεις των βαθμονομητών με την αντίστοιχη εξίσωση παλινδρόμησης, σε όλα τα επίπεδα συγκεντρώσεων για την κάθε ημέρα και υπολογίστηκε το σχετικό σφάλμα (% Er) των τιμών αυτών, σύμφωνα με τη μαθηματική σχέση:

$$\%E_r = \frac{x - \mu}{\mu} \times 100$$

όπου  $x$  είναι η τιμή της συγκέντρωσης που υπολογίστηκε κατά την επαναποσοτικοποίηση και  $\mu$  η αντίστοιχη αναμενόμενη συγκέντρωση. Σύμφωνα με τις οδηγίες του FDA, τα αποδεκτά όρια αποκλίσεων από τις αναμενόμενες συγκεντρώσεις έπρεπε να ήταν έως  $\pm 15\%$  για όλα τα επίπεδα και έως  $\pm 20\%$  για το κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης [359-360].

### **Επαναληψιμότητα και ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα**

Η επαναληψιμότητα (εντός της ημέρας, within day precision) και η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (δια των ημερών, between days precision), ελέγχθηκαν με επαναλαμβανόμενες αναλύσεις δειγμάτων ελέγχου ποιότητας (QC). Τα δείγματα ελέγχου ποιότητας παρασκευάστηκαν σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων, ένα χαμηλό (συγκέντρωσης 3πλάσιας του πρώτου σημείου του διαγράμματος βαθμονόμησης), ένα μεσαίο (συγκέντρωσης περίπου στο μέσο του δυναμικού εύρους του διαγράμματος βαθμονόμησης του κάθε αναλύτη) και ένα υψηλό (συγκέντρωσης ίσης με το 80% της συγκέντρωσης του τελευταίου σημείου του διαγράμματος βαθμονόμησης του κάθε αναλύτη) επίπεδο. Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας (QC) που επιλέχθηκαν για το ολικό αίμα αναφέρονται στον **Πίνακα 3**. Αναλύθηκαν έξι δείγματα ελέγχου ποιότητας ανά επίπεδο σε κάθε μία από τις τέσσερις ημέρες ανάλυσης (συνολικά 24 δείγματα ελέγχου ποιότητας ανά επίπεδο) σύμφωνα με την αναπτυχθείσα μέθοδο. Η συγκέντρωση του κάθε αναλύτη στα δείγματα ελέγχου ποιότητας υπολογιζόταν από την αντίστοιχη εξίσωση παλινδρόμησης του διαγράμματος βαθμονόμησης της κάθε ημέρας και στη συνέχεια υπολογιζόνταν η μέση τιμή της συγκέντρωσης και η τυπική απόκλιση των μετρήσεων.

Η επαναληψιμότητα και η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα αποτελούν μέτρο του τυχαίου σφάλματος των μεθόδων και εκτιμήθηκαν από το ποσοστό % της σχετικής τυπικής απόκλισης (% RSD) των μετρήσεων δειγμάτων ελέγχου ποιότητας της ίδιας συγκέντρωσης που αναλύθηκαν την ίδια ημέρα και σε 4 διαφορετικές ημέρες. Σύμφωνα με τις οδηγίες του FDA, οι τιμές της % RSD, που εκφράζουν την επαναληψιμότητα και την ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα, έπρεπε να βρίσκονται εντός των αποδεκτών ορίων έως  $\pm 15\%$  για όλα τα επίπεδα ελέγχου ποιότητας [359].

Επίσης, η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα, που εκφράζει την μεταξύ των ημερών επαναληψιμότητα των μεθόδων, εκτιμήθηκε και από το % ποσοστό της σχετικής τυπικής απόκλισης (% RSD) των κλίσεων των διαγραμμάτων βαθμονόμησης, που ελήφθησαν σε διαφορετικές ημέρες ανάλυσης [360].

## Ορθότητα εντός της ημέρας και δια των ημερών

Η συγκέντρωση του κάθε αναλύτη στα δείγματα ελέγχου ποιότητας της κάθε ημέρας υπολογιζόταν από την αντίστοιχη εξίσωση παλινδρόμησης του διαγράμματος βαθμονόμησης και υπολογιζόταν η μέση τιμή των μετρήσεων για τα έξι δείγματα ελέγχου ποιότητας της ίδιας συγκέντρωσης. Η ορθότητα εντός της ημέρας και δια των ημερών, αποτελεί μέτρο του συστηματικού σφάλματος μίας μεθόδου και εκτιμήθηκε από το % σχετικό σφάλμα (% Er), που υπολογίστηκε σύμφωνα με τη μαθηματική σχέση:

$$\%E_r = \frac{x - \mu}{\mu} \times 100$$

για δείγματα ελέγχου ποιότητας που αναλύθηκαν την ίδια ημέρα και στο σύνολο των ημερών, αντίστοιχα. Το % Er δείχνει πόσο απέχει η τιμή (x) των μετρήσεων των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας, από την ονομαστική (θεωρητική) τιμή (μ), δηλαδή την συγκέντρωση του κάθε αναλύτη στο εμβολιασμένο δείγμα ελέγχου ποιότητας. Σύμφωνα με τις οδηγίες του FDA, οι τιμές του % Er, που εκφράζουν την ορθότητα της μεθόδου, έπρεπε να βρίσκονται εντός των αποδεκτών ορίων  $\pm 15\%$  για όλα τα επίπεδα ελέγχου ποιότητας [359-360].

## Απόλυτη ανάκτηση

Η απόλυτη ανάκτηση για τις υπό προσδιορισμό ουσίες εκτιμήθηκε στα τρία επίπεδα συγκεντρώσεων των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας. Αναλύθηκαν από έξι εμβολιασμένα πρότυπα δείγματα για κάθε επίπεδο συγκεντρώσεων των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας, χαμηλό, μεσαίο και υψηλό με βάση την αναπτυχθείσα μέθοδο. Για τον υπολογισμό της απόλυτης ανάκτησης των αναλυτών γινόταν παράλληλα απευθείας έγχυση έξι μικτών μεθανολικών διαλυμάτων αντίστοιχων συγκεντρώσεων μετά από παραγωγοποίηση. Η απόλυτη ανάκτηση υπολογίστηκε με βάση την παρακάτω μαθηματική σχέση:

$$\% \text{ Απόλυτη Ανάκτηση} = \frac{E_1}{E_2} \times 100$$

όπου:

–E1 είναι το εμβαδόν επιφάνειας των κορυφών του κάθε αναλύτη μετά από την εκχύλιση του βιολογικού δείγματος και παραγωγοποίηση (post-spiked), και E2 είναι το μέσο εμβαδόν επιφάνειας των κορυφών του κάθε αναλύτη μετά από απευθείας έγχυση παραγωγοποιημένου μικτού διαλύματος αντίστοιχης συγκέντρωσης (pre-spiked) [359-360].

## Ανθεκτικότητα

Η ανθεκτικότητα εκτιμήθηκε προκαλώντας σκόπιμα μεταβολές, εντός συγκεκριμένων ορίων, σε παραμέτρους της μεθόδου που είναι δυνατόν να επηρεάσουν την αξιοπιστία της ανάλυσης. Η μελέτη της ανθεκτικότητας πραγματοποιήθηκε στο μεσαίο επίπεδο συγκέντρωσης των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας (QC2).

Στη μελέτη ανθεκτικότητας, οι παράμετροι της μεθόδου πρέπει να μεταβάλλονται στην τάξη μεγέθους των αποκλίσεων που μπορεί να συμβούν, όπως μεταβολές  $\pm 0.5$  μονάδες στο pH,  $\pm 3-5$  °C στις θερμοκρασίες και  $\pm 3\%$  της αριθμητικής τιμής σε άλλες παραμέτρους που χρησιμοποιούνται σε μία μέθοδο [361-362]. Συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν να μεταβληθούν τρεις παράμετροι από το στάδιο κατεργασίας των βιολογικών δειγμάτων και τέσσερις παράμετροι από τις χρωματογραφικές συνθήκες των αναπτυχθέντων μεθόδων. Οι μεταβολές που πραγματοποιήθηκαν αφορούσαν:

- στο pH του ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών από 6.0 σε 6.5,
- στη θερμοκρασία παραγωγοποίησης των δειγμάτων, μετά την έκλουση και εξάτμιση υπό N<sub>2</sub>, από 70 °C σε 65 °C,
- στην αναλογία του μίγματος διαλυτών έκλουσης των αναλυτών (διχλωρομεθάνιο:ισοπροπανόλη:αμμωνία, v/v/v) από 85:15:2 σε 80:15:2,
- στην ταχύτητα ροής φέροντος αερίου από 1.00 mL/min σε 0.96 mL/min,
- στην αρχική θερμοκρασία της χρωματογραφικής στήλης από 100 °C σε 105 °C,
- στη θερμοκρασία του σημείου έγχυσης του δείγματος από 240 °C σε 235 °C, και
- στο δυναμικό λειτουργίας (voltage) του φασματόμετρου μαζών το οποίο αυξήθηκε κατά 3% της τιμής του δυναμικού λειτουργίας που ελήφθη από την τελευταία ρύθμιση του φασματόμετρου μαζών (tuning).

Στη μελέτη ανθεκτικότητας, οι υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν με το λόγο των αποκρίσεων του αναλύτη προς την αντίστοιχη του εσωτερικού προτύπου. Στη συνέχεια, έγινε σύγκριση της μέσης τιμής του λόγου των αποκρίσεων από δείγματα που αναλύθηκαν με τις αναπτυχθείσες μεθόδους (χωρίς μεταβολές), με τη μέση τιμή του λόγου των αποκρίσεων από δείγματα με τις τροποποιημένες μεθόδους με τις μεταβολές που προαναφέρθηκαν, και υπολογίστηκε η διαφορά τους ( $D_i$ ) κάθε φορά. Στη συνέχεια, υπολογίστηκε η τυπική απόκλιση ( $SD_i$ ) σύμφωνα με την παρακάτω μαθηματική εξίσωση:

$$SD_i = \sqrt{2 \times \sum (D_i^2 / n)}$$

όπου n, το πλήθος των μεταβολών που πραγματοποιήθηκαν [361].

## Σταθερότητα εμβολιασμένων προτύπων βιολογικών δειγμάτων

Μελετήθηκε η σταθερότητα εμβολιασμένων προτύπων βιολογικών δειγμάτων σε:

- a. θερμοκρασία φύλαξης 4 °C για 24 ώρες, μία εβδομάδα και δύο εβδομάδες,
- b. σε θερμοκρασία φύλαξης -20 °C για 2 εβδομάδες και 1 μήνα και
- c. για 3 κύκλους ψύξης-απόψυξης.

Η μελέτη σταθερότητας προτύπων βιολογικών δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στο υψηλό επίπεδο συγκέντρωσης των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας (QC3) τα οποία αποθηκεύονταν σε πλαστικά σωληνάρια που περιείχαν 3 mg NaF ως συντηρητικό [359, 362]. Την ημέρα της ανάλυσης παρασκευάστηκαν επίσης «πρόσφατα» εμβολιασμένα βιολογικά δείγματα και συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχης συγκέντρωσης εμβολιασμένα βιολογικά δείγματα που είχαν παρασκευαστεί και φυλαχτεί στις συνθήκες της μελέτης σταθερότητας («γερασμένα» δείγματα).

Όλα τα πρότυπα δείγματα ποσοτικοποιήθηκαν βάσει της αντίστοιχης εξίσωσης παλινδρόμησης του διαγράμματος βαθμονόμησης της ημέρας ανάλυσής τους και συγκρίθηκαν οι μέσες τιμές των συγκεντρώσεων των αναλυτών μεταξύ «γηρασμένων» και πρόσφατων εμβολιασμένων βιολογικών δειγμάτων. Για τη μελέτη σταθερότητας των προτύπων βιολογικών δειγμάτων υπολογίστηκε η % απώλεια ή η απόκλιση με βάση την παρακάτω μαθηματική σχέση:

$$\% \text{ Απώλεια ή Απόκλιση} = \frac{A - B}{B} \times 100$$

A: Μέση τιμή συγκέντρωσης «γερασμένου» δείγματος

B: Μέση τιμή συγκέντρωσης πρόσφατου δείγματος

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: Αποτελέσματα επικύρωσης της αναπτυχθείσας μεθόδου προσδιορισμού φαιτανύλης και παραγώγων της σε ολικό αίμα**

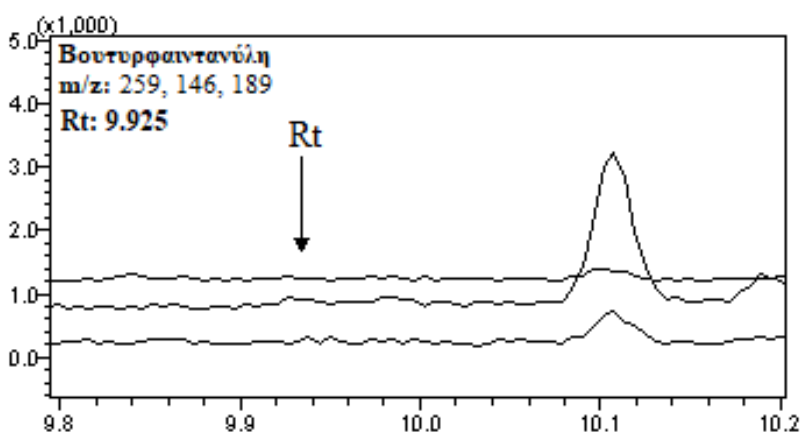
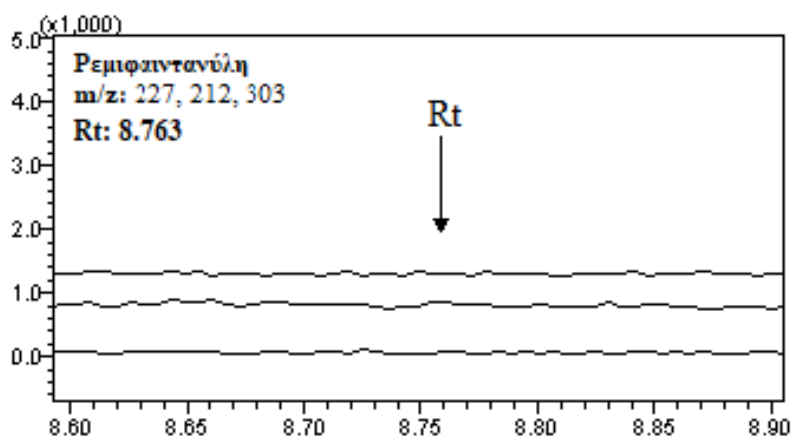
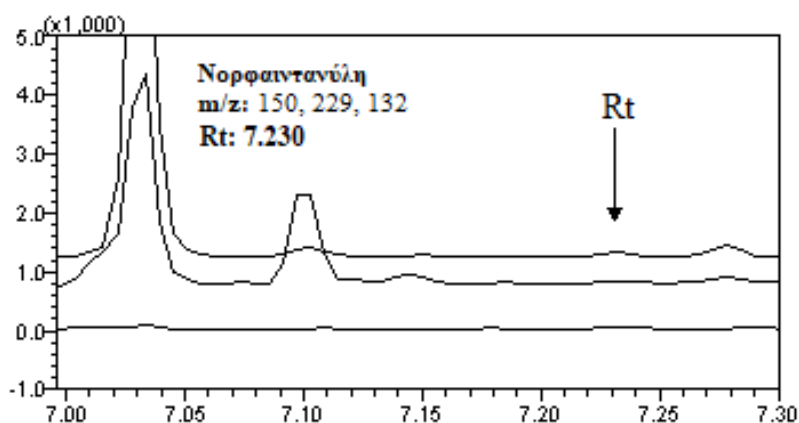
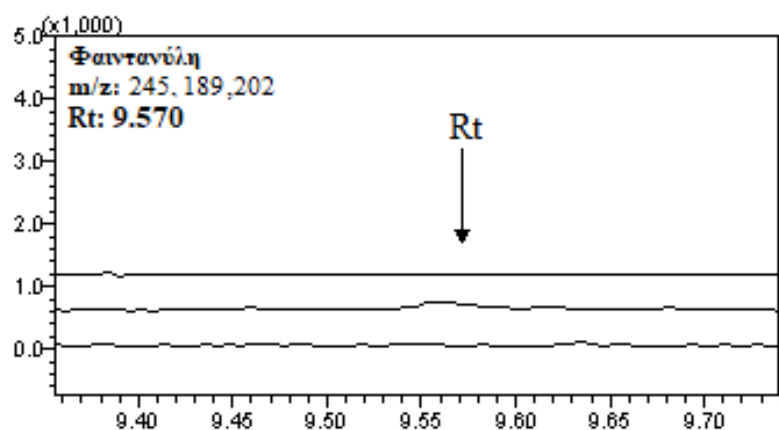
Η μέθοδος η οποία αναπτύχθηκε και βελτιστοποιήθηκε στο πλαίσιο αυτής της διπλωματικής εργασίας, περιελάμβανε απομόνωση της φαιτανύλης, της νορφαιτανύλης, της ρεμφαιτανύλης, της ακετυλοφαιτανύλης, της οκφαιτανύλης, της βουτυρυλοφαιτανύλης και της φουρανυλοφαιτανύλης από ολικό αίμα και ανάλυση με χρήση Χρωματογραφίας Αέριας Φάσεως σε συνδυασμό με Φασματομετρία Μαζών. Πιο συγκεκριμένα, τα δείγματα αίματος κατεργάστηκαν με ACN προκειμένου να γίνει καταβύθιση πρωτεϊνών, υποβλήθηκαν σε εκχύλιση στερεάς φάσης με τη χρήση στηλων Bond Elut Certify I, παραγωγοποιήθηκαν με τη χρήση ΤFΑΑ ως αντιδραστήριο παραγωγοποίησης, στους 70 °C και τέλος εγχύθηκαν σε σύστημα χρωματογράφου αέριας φάσης συζευγμένο με αναλυτή φασματόμετρο μαζών και αναλύθηκαν σε λειτουργία παρακολούθησης επιλεγμένου ιόντος (Single Ion Monitoring/SIM). Η αναπτυχθείσα μέθοδος και οι επιμέρους δοκιμασίες που πραγματοποιήθηκαν παρουσιάζονται αναλυτικά στο αντίστοιχο κεφάλαιο.

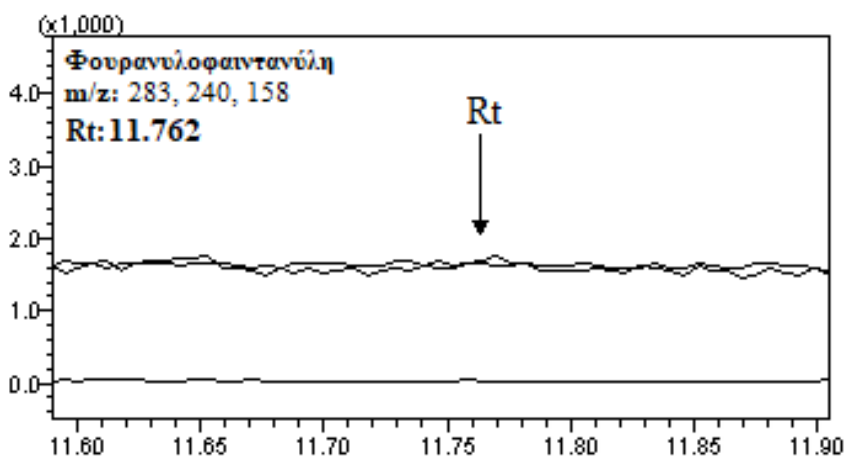
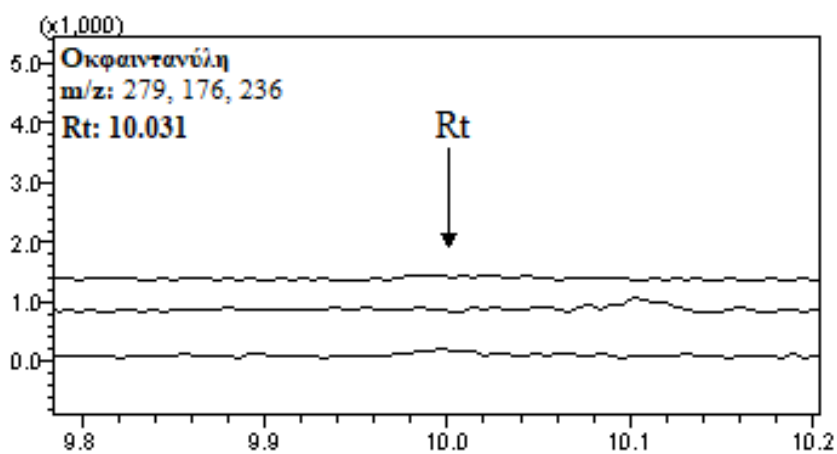
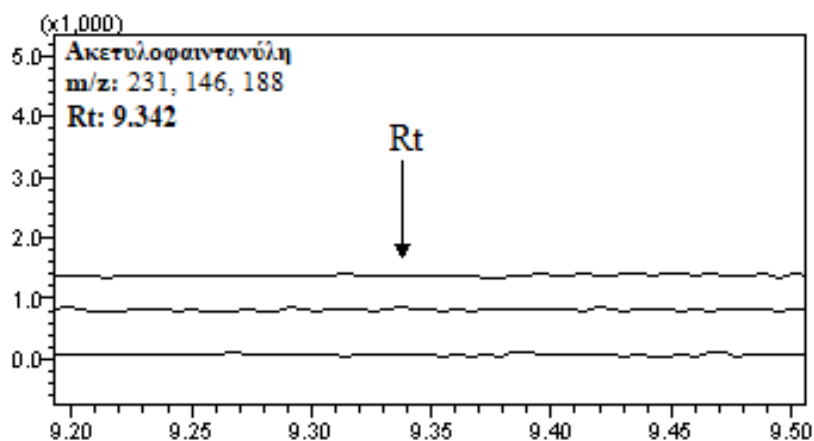
Στην συνέχεια η μέθοδος αυτή επικυρώθηκε πλήρως σύμφωνα με τις οδηγίες του FDA (Food and Drug Administration) [359], της Ευρωπαϊκής Ένωσης [361], του ICH (International Conference on Harmonization) [362] και της EURACHEM [360]. Τα αποτελέσματα της επικύρωσης παρουσιάζονται αναλυτικότερα στις επόμενες παραγράφους.

### **8.1 Εκλεκτικότητα**

Έξι τυφλά δείγματα αίματος τα οποία προσφέρθηκαν από έξι υγιείς εθελοντές από διαφορετικές μονάδες αιμοδοσίας, κατεργάστηκαν όπως έχει περιγραφεί στο αντίστοιχο κεφάλαιο της μεθόδου προσδιορισμού φαιτανύλης και παραγώγων της σε ολικό αίμα, χωρίς την προσθήκη κάποιου αναλύτη ή εσωτερικού προτύπου. Σύμφωνα με τα ληφθέντα χρωματογραφήματα, δεν παρατηρήθηκε καποια παρεμπόδιση από κάποια από τα συστατικά του αίματος στους χρόνους ανάλυσης των 7 αναλυτών. Στην **Εικόνα 16**, παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα παρακολούθησης επιλεγμένων ιόντων των αναλυτών που ελήφθησαν από ένα τυφλό δείγμα ολικού αίματος.







**Εικόνα 16.** Αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα που εξήχθησαν από την ανάλυση τυφλού δείγματος ολικού αίματος για την μελέτη της εκλεκτικότητας της μεθόδου προσδιορισμού της φαιντανύλης και των παραγώγων της.

## 8.2 Ειδικότητα

Για την μελέτη της ειδικότητας, παρασκευάστηκε διάλυμα εργασίας 43 διαφορετικών ουσιών συγκέντρωσης 10.0 µg/mL, που ενδέχεται να συνυπάρχουν σε δείγματα ολικού αίματος ασθενών ή θανόντων που ελάμβαναν φαιντανύλη ή ρεμφαιντανύλη στο πλαίσιο κάποιας φαρμακευτικής αγωγής ή ατόμων που ενδεχομένως να κάνουν χρήση των υπό εξέταση ουσιών. Στη συνέχεια η διαδικασία περιελάμβανε:

- a. εξάτμιση 50 µL από το παραπάνω διάλυμα εργασίας μέχρι ξηρού υπό ρεύμα αζώτου,
- b. παραγωγοποίηση με 50 µL TFAA σε θερμοκρασία 70 °C για 30 λεπτά,
- c. εξάτμιση μέχρι ξηρού υπό ρεύμα αζώτου
- d. ανασύσταση με 50 µL οξικού αιθυλεστέρα και
- e. έγχυση 1 µL από το διάλυμα στο χρωματογραφικό σύστημα υπό τις χρωματογραφικές συνθήκες που παρατίθενται στον **Πίνακα 8**.

Σύμφωνα με τα χρωματογραφήματα τα οποία ελήφθησαν καμία παρεμπόδιση δεν παρατηρήθηκε στους χρόνους ανάσχεσης των υπό μελέτη ουσιών και του εσωτερικού τους προτύπου.

Ακολούθησε εμβολιασμός έξι τυφλών δειγμάτων ολικού αίματος με 50 µL από το παραπάνω μικτό διάλυμα εργασίας των 43 αυτών ουσιών, συγκέντρωσης 10.0 µg/mL, ώστε η τελική συγκέντρωση να φτάσει 500 ng/mL. Τα δείγματα αυτά κατεργάστηκαν και αναλύθηκαν σύμφωνα με την αναπτυχθείσα μέθοδο, που παρουσιάζεται στο αντίστοιχο κεφάλαιο, ώστε να διερευνηθεί η ύπαρξη τυχόν παρεμπόδισης. Σύμφωνα με τα χρωματογραφήματα που ελήφθησαν, δεν παρατηρήθηκε καμία παρεμπόδιση στους χρόνους ανάσχεσης των αναλυτών.

## 8.3 Κατώτατα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης

Τα κατώτατα όρια ανίχνευσης (LOD) της αναπτυχθείσας μεθόδου προσδιορισμού των 7 υπό μελέτη αναλυτών σε ολικό αίμα υπολογίστηκαν από το λόγο της απόκρισης του κάθε αναλύτη προς το θόρυβο τυφλού δείγματος ολικού αίματος στο χρόνο της ανάσχεσης, που πρέπει να είναι τουλάχιστον 3 ( $S/N \geq 3:1$ ).

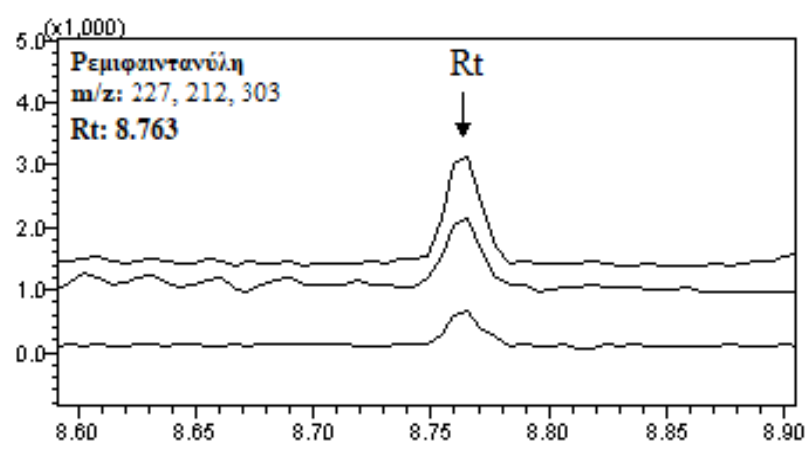
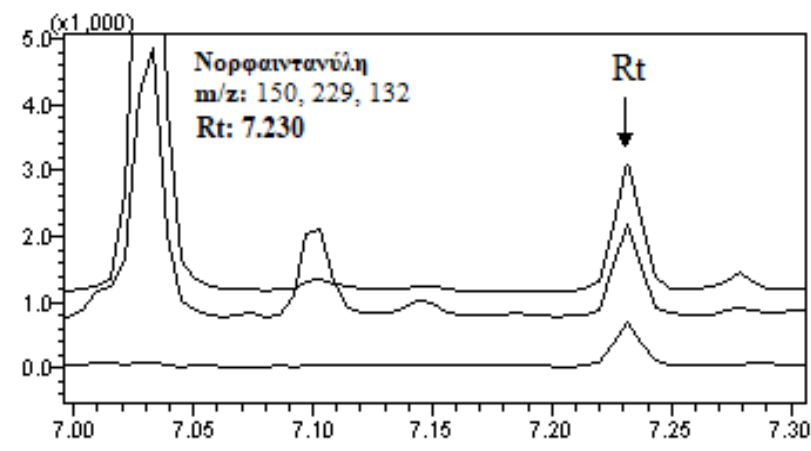
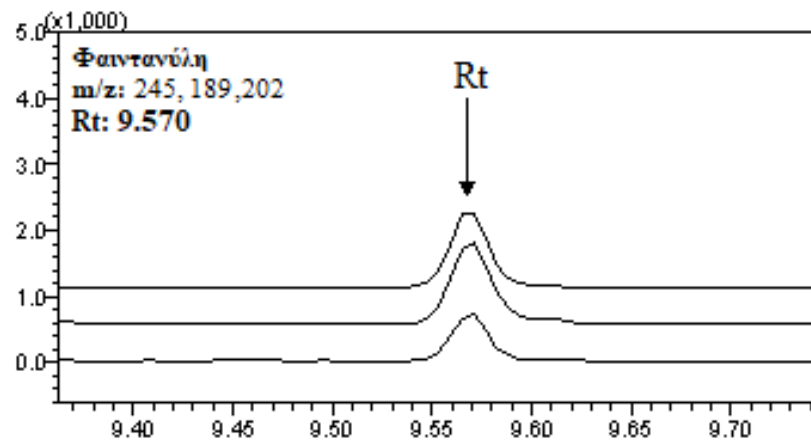
Τα κατώτατα όρια ποσοτικοποίησης (LOQ) της αναπτυχθείσας μεθόδου προσδιορισμού των 7 υπό μελέτη αναλυτών σε ολικό αίμα υπολογίστηκαν από το λόγο της απόκρισης του κάθε αναλύτη προς το θόρυβο τυφλού δείγματος ολικού αίματος στο χρόνο της ανάσχεσης, που πρέπει να είναι τουλάχιστον 10 ( $S/N \geq 10:1$ ).

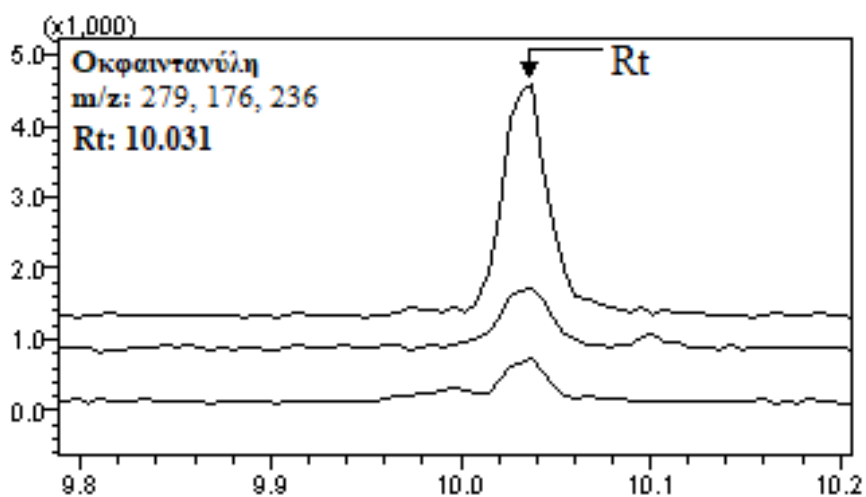
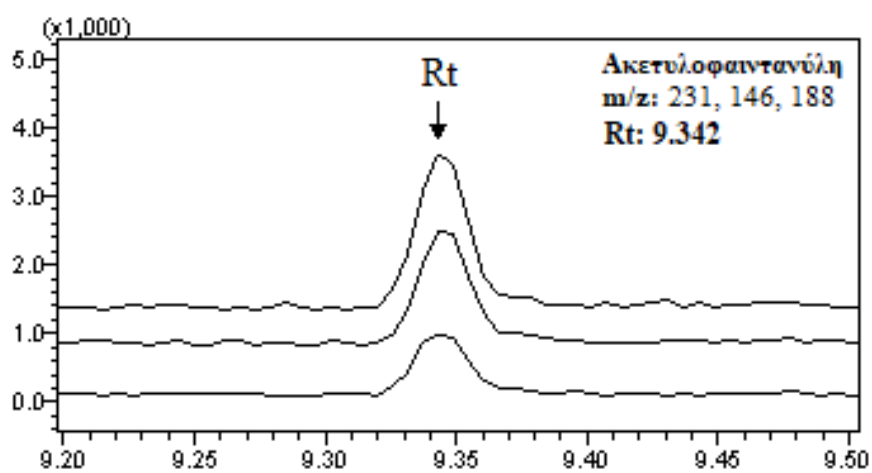
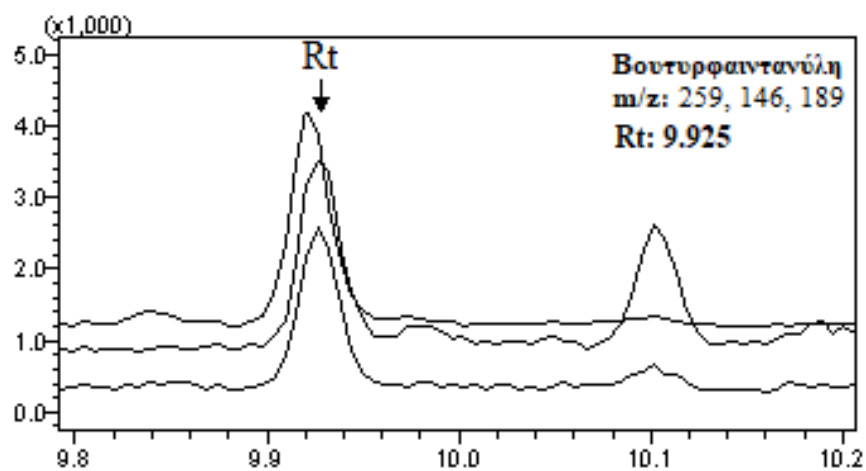
Οι τιμές των LOD και LOQ των υπό εξέταση ουσιών συνοψίζονται στον **Πίνακα 14**. Παρασκευάστηκαν 6 δείγματα αίματος εμβολιασμένα στη συγκέντρωση των LOQ και αναλύθηκαν με την αναπτυχθείσα μέθοδο. Αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα των 7 αναλυτών σε

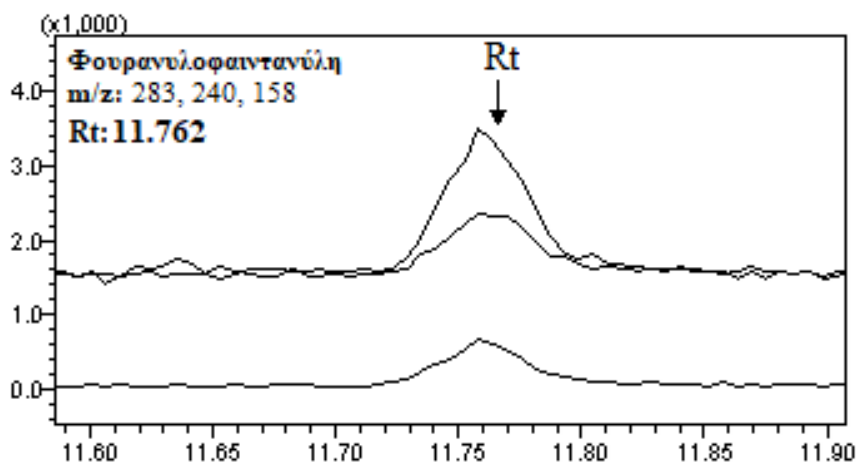
εμβολιασμένα δείγματα ολικού αίματος, που ελήφθησαν με παρακολούθηση επιλεγμένου ιόντος, παρουσιάζονται στην **Εικόνα 17**.

**Πίνακας 14.** Κατώτα όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ) της μεθόδου προσδιορισμού των 7 αναλυτών σε ολικό αίμα.

	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
	(S/N $\geq$ 3:1)	(S/N $\geq$ 10:1)
<b>Φαιντανύλη</b>	0.15	0.50
<b>Νορφαιντανύλη</b>	0.15	0.50
<b>Ρεμφαιντανύλη</b>	0.15	0.50
<b>Βουτυρυλοφαιντανύλη</b>	0.15	0.50
<b>Ακετυλοφαιντανύλη</b>	0.15	0.50
<b>Οκφαιντανύλη</b>	0.30	1.00
<b>Φουρανυλοφαιντανύλη</b>	0.30	1.00







**Εικόνα 17.** Αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα της φαιντανύλης και των παραγώγων της που ελήφθησαν από εμβολιασμένο δείγμα ολικού αίματος στο κατώτατο όριο ποσοτικοποίησης της κάθε ουσίας.

#### 8.4 Γραμμικότητα

Η μελέτη της γραμμικότητας της αναπτυχθείσας μεθόδου προσδιορισμού των 7 υπό μελέτη αναλυτών σε ολικό αίμα πραγματοποιήθηκε σε 4 διαφορετικές μέρες με την κατασκευή ισάριθμων διαγραμμάτων βαθμονόμησης 6 σημείων που παρουσίαζαν γραμμική συσχέτιση. Για την κατασκευή των διαγραμμάτων βαθμονόμησης χρησιμοποιήθηκε συντελεστής βαρύτητας  $1/x^2$ , όπου το  $x$  αντιστοιχεί στην ονομαστική (θεωρητική) τιμή της συγκέντρωσης του κάθε αναλύτη εκφρασμένη σε ng/mL. Οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων εργασίας που χρησιμοποιήθηκαν για τα σημεία της καμπύλης καθώς και ο τρόπος παρασκευής του αναφέρονται στον **Πίνακα 3**. Οι εξισώσεις παλινδρόμησης για όλες τις ουσίες είναι της μορφής  $y=a \cdot x + b$ , όπου:

$y$ , ο λόγος της επιφάνειας της κορυφής του αναλύτη προς επιφάνεια κορυφής του αντίστοιχου εσωτερικού προτύπου ( $AUC_{\text{analyte}}/AUC_{\text{I.S.}}$ ),

$x$ , η συγκέντρωση του κάθε αναλύτη, εκφρασμένη σε ng/mL ( $C_{\text{analyte}}$ ).

Οι εξισώσεις παλινδρόμησης των διαγραμμάτων βαθμονόμησης σε ολικό αίμα για τις 4 μέρες, η μέση εξίσωση παλινδρόμησης, καθώς και η % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) των κλίσεων για την κάθε ουσία παρουσιάζονται στους **Πίνακες 15-21**. Η % RSD αποτέλεσε κριτήριο της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας της αναπτυχθείσας μεθόδου. Παρατηρήθηκε γραμμική συσχέτιση σε εύρος συγκεντρώσεων 0.5–50 ng/mL για την φαιντανύλη, την νορφαιντανύλη, την ρεμφαιντανύλη, την βουτυρυλοφαιντανύλη και την ακετυλοφαιντανύλη και για εύρος συγκεντρώσεων 1.0–100 ng/mL για την οκφαιντανύλη και την φουρανυλοφαιντανύλη. Το

τετράγωνο του μέσου συντελεστή συσχέτισης ήταν εντός αποδεκτών ορίων και για τις 7 ουσίες, σε όλες τις σειρές ανάλυσης ( $R^2 \geq 0.990$ ).

**Πίνακας 15.** Οι εξισώσεις παλινδρόμησης των διαγραμμάτων βαθμονόμησης για 4 ημέρες και η μέση εξίσωση παλινδρόμησης για την φαιντανύλη καθώς και η % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) των κλίσεων.

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος	$R^2$
1 <sup>η</sup>	$y = 0.1062 \cdot x + 0.0064$	0.995
2 <sup>η</sup>	$y = 0.1151 \cdot x + 0.0012$	0.990
3 <sup>η</sup>	$y = 0.1153 \cdot x + 0.0080$	0.992
4 <sup>η</sup>	$y = 0.1095 \cdot x + 0.0128$	0.991
<b>Μέση εξίσωση</b>	$y = 0.1115 (\pm 0.0045) \cdot x + 0.0071 (\pm 0.0048)$	
<b>% RSD κλίσεων</b>	4.0%	

**Πίνακας 16.** Οι εξισώσεις παλινδρόμησης των διαγραμμάτων βαθμονόμησης για 4 ημέρες και η μέση εξίσωση παλινδρόμησης για την νορφαιντανύλη καθώς και η % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) των κλίσεων.

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος	$R^2$
1 <sup>η</sup>	$y = 0.3060 \cdot x + 0.0173$	0.993
2 <sup>η</sup>	$y = 0.3264 \cdot x + 0.0113$	0.994
3 <sup>η</sup>	$y = 0.3196 \cdot x + 0.0190$	0.993
4 <sup>η</sup>	$y = 0.3445 \cdot x + 0.0503$	0.997
<b>Μέση εξίσωση</b>	$y = 0.3241 (\pm 0.016) \cdot x + 0.0245 (\pm 0.0175)$	
<b>% RSD κλίσεων</b>	4.9%	

**Πίνακας 17.** Οι εξισώσεις παλινδρόμησης των διαγραμμάτων βαθμονόμησης για 4 ημέρες και η μέση εξίσωση παλινδρόμησης για την ρεμφαιντανύλη καθώς και η % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) των κλίσεων.

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος	$R^2$
1 <sup>η</sup>	$y = 0.0605 \cdot x + 0.0053$	0.998
2 <sup>η</sup>	$y = 0.0665 \cdot x + 0.0017$	0.996
3 <sup>η</sup>	$y = 0.0655 \cdot x + 0.0089$	0.993
4 <sup>η</sup>	$y = 0.0675 \cdot x + 0.0165$	0.994
<b>Μέση εξίσωση</b>	$y = 0.0650 (\pm 0.0031) \cdot x + 0.0081 (\pm 0.0063)$	
<b>% RSD κλίσεων</b>	4.8%	

**Πίνακας 18.** Οι εξισώσεις παλινδρόμησης των διαγραμμάτων βαθμονόμησης για 4 ημέρες και η μέση εξίσωση παλινδρόμησης για την βουτυρορφαιντανύλη καθώς και η % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) των κλίσεων.

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος	$R^2$
1 <sup>η</sup>	$y = 0.1206 \cdot x + 0.0135$	0.997
2 <sup>η</sup>	$y = 0.1276 \cdot x + 0.0084$	0.995
3 <sup>η</sup>	$y = 0.1275 \cdot x + 0.0097$	0.997
4 <sup>η</sup>	$y = 0.1152 \cdot x + 0.0004$	0.995
<b>Μέση εξίσωση</b>	$y = 0.1227 (\pm 0.0060) \cdot x + 0.0080 (\pm 0.0055)$	
<b>% RSD κλίσεων</b>	4.9%	



**Πίνακας 19.** Οι εξισώσεις παλινδρόμησης των διαγραμμάτων βαθμονόμησης για 4 ημέρες και η μέση εξίσωση παλινδρόμησης για την ακετυλοφαιντανύλη καθώς και η % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) των κλίσεων.

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος	R <sup>2</sup>
1 <sup>η</sup>	$y = 0.0983 \cdot x + 0.0077$	0.996
2 <sup>η</sup>	$y = 0.1067 \cdot x + 0.0089$	0.996
3 <sup>η</sup>	$y = 0.1024 \cdot x + 0.0184$	0.995
4 <sup>η</sup>	$y = 0.0982 \cdot x + 0.0020$	0.994
<b>Μέση εξίσωση</b>	$y = 0.1009 (\pm 0.0046) \cdot x + 0.0093 (\pm 0.0068)$	
<b>% RSD κλίσεων</b>	4.6%	

**Πίνακας 20.** Οι εξισώσεις παλινδρόμησης των διαγραμμάτων βαθμονόμησης για 4 ημέρες και η μέση εξίσωση παλινδρόμησης για την οκφαιντανύλη καθώς και η % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) των κλίσεων.

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος	R <sup>2</sup>
1 <sup>η</sup>	$y = 0.0820 \cdot x + 0.0394$	0.994
2 <sup>η</sup>	$y = 0.0865 \cdot x + 0.0085$	0.994
3 <sup>η</sup>	$y = 0.0865 \cdot x + 0.0303$	0.991
4 <sup>η</sup>	$y = 0.0784 \cdot x + 0.0316$	0.991
<b>Μέση εξίσωση</b>	$y = 0.0834 (\pm 0.0039) \cdot x + 0.0275 (\pm 0.0133)$	
<b>% RSD κλίσεων</b>	4.7%	

**Πίνακας 21.** Οι εξισώσεις παλινδρόμησης των διαγραμμάτων βαθμονόμησης για 4 ημέρες και η μέση εξίσωση παλινδρόμησης για την φουρανυλοφαιντανύλη καθώς και η % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) των κλίσεων.

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος	R <sup>2</sup>
1 <sup>η</sup>	$y = 0.0406 \cdot x + 0.0119$	0.990
2 <sup>η</sup>	$y = 0.0430 \cdot x + 0.0188$	0.998
3 <sup>η</sup>	$y = 0.0389 \cdot x + 0.0050$	0.993
4 <sup>η</sup>	$y = 0.0409 \cdot x + 0.0062$	0.993
<b>Μέση εξίσωση</b>	$y = 0.0409 (\pm 0.0017) \cdot x + 0.0105 (\pm 0.0063)$	
<b>% RSD κλίσεων</b>	4.1%	

## 8.5 Επαναποσοτικοποίηση δειγμάτων βαθμονόμησης

Οι επαναποσοτικοποιήσεις των δειγμάτων βαθμονόμησης ολικού αίματος σε όλα τα επίπεδα συγκεντρώσεων και οι αποκλίσεις τους παρουσιάζονται στους **Πίνακες 22-28**. Οι αποκλίσεις των αποτελεσμάτων επαναποσοτικοποίησης των δειγμάτων βαθμονόμησης κυμάνθηκαν μεταξύ των τιμών -15% έως 12% για όλους τους αναλύτες, σε όλα τα επίπεδα συγκεντρώσεων και για το σύνολο των ημερών. Οι τιμές αυτές ήταν όλες εντός των αποδεκτών ορίων  $\pm 15\%$  και  $\pm 20\%$  για το LOQ.

**Πίνακας 22.** Αποτελέσματα επαναποσοτικοποίησης των δειγμάτων βαθμονόμησης για τη φαιντανύλη σε ολικό αίμα.

Ημέρα	Δείγματα βαθμονόμησης	Cal1	Cal2	Cal3	Cal4	Cal5	Cal6
		Αναμενόμενη συγκέντρωση (ng/mL)	0.50	1.00	3.00	10.00	20.00
1 <sup>η</sup>	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	0.53	1.01	3.00	10.02	20.36	47.69
	% E <sub>r</sub>	6.0	1.0	0.0	0.2	1.8	-4.6
2 <sup>η</sup>	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	0.50	1.08	2.62	9.09	20.67	50.95
	% E <sub>r</sub>	0.0	8.0	-13	-9.1	3.4	1.9
3 <sup>η</sup>	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	0.50	1.00	2.69	9.51	20.81	50.01
	% E <sub>r</sub>	0.0	0.0	-10	-4.9	4.0	0.0
4 <sup>η</sup>	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	0.53	0.95	2.65	9.62	20.54	53.37
	% E <sub>r</sub>	6.0	-5.0	-12	-3.8	2.7	6.7

**Πίνακας 23.** Αποτελέσματα επαναποσοτικοποίησης των δειγμάτων βαθμονόμησης για τη νορφαιντανύλη σε ολικό αίμα.

Ημέρα	Δείγματα βαθμονόμησης	Cal1	Cal2	Cal3	Cal4	Cal5	Cal6
		Αναμενόμενη συγκέντρωση (ng/mL)	0.50	1.00	3.00	10.00	20.00
1 <sup>η</sup>	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	0.46	0.93	2.74	9.99	19.25	44.72
	% E <sub>r</sub>	-8.0	-7.0	-8.7	-0.1	-3.80	-11
2 <sup>η</sup>	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	0.45	1.00	3.00	9.68	21.02	45.53
	% E <sub>r</sub>	-10	0.0	0.0	-3.2	5.1	-8.9
3 <sup>η</sup>	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	0.53	0.92	2.89	10.52	19.55	47.99
	% E <sub>r</sub>	6.0	-8.0	-3.7	5.2	-2.3	-4.0
4 <sup>η</sup>	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	0.50	0.99	3.02	9.97	20.03	50.44
	% E <sub>r</sub>	0.0	-1.0	0.7	-0.3	0.2	0.9

**Πίνακας 24.** Αποτελέσματα επαναποσοτικοποίησης των δειγμάτων βαθμονόμησης για τη ρεμφαιντανύλη σε ολικό αίμα.

Ημέρα	Δείγματα βαθμονόμησης	Cal1	Cal2	Cal3	Cal4	Cal5	Cal6
		Αναμενόμενη συγκέντρωση (ng/mL)	0.50	1.00	3.00	10.00	20.00
1 <sup>η</sup>	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	0.49	1.01	2.56	10.16	20.94	52.14
	% E <sub>r</sub>	-2.0	1.0	-15	1.6	4.7	4.3
2 <sup>η</sup>	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	0.44	1.05	2.78	9.30	21.55	48.58
	% E <sub>r</sub>	-12	5.0	-7.3	-7.0	7.8	-2.8
3 <sup>η</sup>	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	0.53	1.03	2.67	9.38	21.8	52.25
	% E <sub>r</sub>	6.0	3.0	-11	-6.2	9.0	4.5
4 <sup>η</sup>	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	0.49	1.03	2.99	9.93	20.84	50.53
	% E <sub>r</sub>	-2.0	3.0	-0.3	-0.7	4.2	1.1

**Πίνακας 25.** Αποτελέσματα επαναποσοτικοποίησης των δειγμάτων βαθμονόμησης για τη βουτυρυλοφαιτανύλη σε ολικό αίμα.

Ημέρα	Δείγματα βαθμονόμησης	Cal1	Cal2	Cal3	Cal4	Cal5	Cal6
		Αναμενόμενη συγκέντρωση (ng/mL)	0.50	1.00	3.00	10.00	20.00
1 <sup>η</sup>	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	0.52	1.07	2.70	10.05	21.12	55.90
	% E <sub>r</sub>	4.0	7.0	-10	0.5	5.6	12
2 <sup>η</sup>	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	0.50	1.02	2.60	8.61	21.37	51.73
	% E <sub>r</sub>	0.0	2.0	-13	-14	6.9	3.5
3 <sup>η</sup>	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	0.50	1.03	2.73	10.56	20.23	52.83
	% E <sub>r</sub>	0.0	3.0	-9.0	5.6	1.2	5.7
4 <sup>η</sup>	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	0.55	1.07	3.05	10.11	20.66	48.57
	% E <sub>r</sub>	10	7.0	1.7	1.1	3.3	-2.9

**Πίνακας 26.** Αποτελέσματα επαναποσοτικοποίησης των δειγμάτων βαθμονόμησης για τη ακετυλοφαιτανύλη σε ολικό αίμα.

Ημέρα	Δείγματα βαθμονόμησης	Cal1	Cal2	Cal3	Cal4	Cal5	Cal6
		Αναμενόμενη συγκέντρωση (ng/mL)	0.50	1.00	3.00	10.00	20.00
1 <sup>η</sup>	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	0.50	0.94	3.02	9.99	20.61	56.18
	% E <sub>r</sub>	0.0	-6.0	0.7	-0.1	3.1	12
2 <sup>η</sup>	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	0.52	1.02	3.07	9.70	21.57	51.67
	% E <sub>r</sub>	4.0	2.0	2.3	-3.0	7.9	3.3
3 <sup>η</sup>	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	0.52	0.98	2.62	9.38	20.77	51.08
	% E <sub>r</sub>	4.0	-2.0	-13	-6.2	3.9	2.2
4 <sup>η</sup>	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	0.56	0.92	2.74	9.90	20.70	51.80
	% E <sub>r</sub>	12	-8.0	-8.7	-1.0	3.5	3.6

**Πίνακας 27.** Αποτελέσματα επαναποσοτικοποίησης των δειγμάτων βαθμονόμησης για τη οκφαιτανύλη σε ολικό αίμα.

Ημέρα	Δείγματα βαθμονόμησης	Cal1	Cal2	Cal3	Cal4	Cal5	Cal6
		Αναμενόμενη συγκέντρωση (ng/mL)	1.00	2.00	6.00	20.00	40.00
1 <sup>η</sup>	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	1.07	1.97	5.53	20.16	42.68	101.42
	% E <sub>r</sub>	7.0	-1.5	-7.8	0.8	6.7	1.4
2 <sup>η</sup>	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	1.08	2.00	5.54	18.69	38.74	112.21
	% E <sub>r</sub>	8.0	0.0	-7.7	-6.5	-3.2	12.2
3 <sup>η</sup>	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	1.10	1.94	5.22	18.76	41.78	107.81
	% E <sub>r</sub>	10	-3.0	-13	-6.2	4.5	7.8
4 <sup>η</sup>	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	1.03	1.99	5.58	20.05	42.73	99.97
	% E <sub>r</sub>	3.0	-0.5	-7.0	0.3	6.8	0.0

**Πίνακας 28.** Αποτελέσματα επαναποσοτικοποίησης των δειγμάτων βαθμονόμησης για την φουρανυλοφαιτανύλη σε ολικό αίμα.

Ημέρα	Δείγματα βαθμονόμησης	Cal1	Cal2	Cal3	Cal4	Cal5	Cal6
	Αναμενόμενη συγκέντρωση (ng/mL)	1.00	2.00	6.00	20.00	40.00	100.00
1 <sup>η</sup>	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	0.94	2.23	5.61	20.87	42.66	99.35
	% E <sub>r</sub>	-6.0	12	-6.5	4.4	6.6	-0.7
2 <sup>η</sup>	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	1.00	2.01	5.89	20.23	39.42	105.69
	% E <sub>r</sub>	0.0	0.5	-1.8	1.2	-1.5	5.7
3 <sup>η</sup>	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	1.07	2.13	5.44	17.81	36.57	107.20
	% E <sub>r</sub>	7.0	6.5	-9.3	-11	-8.6	7.2
4 <sup>η</sup>	Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)	0.93	2.00	6.00	19.7	39.95	95.05
	% E <sub>r</sub>	-7.0	0.0	0.0	-1.5	-0.1	-5.0

## 8.6 Επαναληψιμότητα και ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγισιμότητα

Η επαναληψιμότητα και η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγισιμότητα της μεθόδου προσδιορισμού των 7 υπό μελέτη ουσιών στο αίμα εκτιμήθηκαν στα τρία επίπεδα συγκέντρωσης των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας.

Για την φαιτανύλη, την νορφαιτανύλη, την ρεμφαιτανύλη, την βουτυρυλοφαιτανύλη και την ακέτυλοφαιτανύλη στα επίπεδα:

- 1.50 ng/mL (QC<sub>1</sub>, χαμηλό επίπεδο)
- 15.00 ng/mL (QC<sub>2</sub>, μεσαίο επίπεδο)
- 40.00 ng/mL (QC<sub>3</sub>, υψηλό επίπεδο)

Για την οκφαιτανύλη και την φουρανυλοφαιτανύλη στα επίπεδα:

- 3.00 ng/mL (QC<sub>1</sub>, χαμηλό επίπεδο)
- 30.00 ng/mL (QC<sub>2</sub>, μεσαίο επίπεδο)
- 80.00 ng/mL (QC<sub>3</sub>, υψηλό επίπεδο)

Τα αποτελέσματα της επαναληψιμότητας της μεθόδου για τις 4 ημέρες και στα 3 επίπεδα των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας, παρουσιάζονται αναλυτικά στους **Πίνακες 29-35**. Οι τιμές της επαναληψιμότητας ήταν εντός των αποδεκτών ορίων ( $\pm 15\%$ ) για όλες τις ουσίες.

Τα αποτελέσματα της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγισιμότητας της μεθόδου στα τρία επίπεδα συγκέντρωσης των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας παρουσιάζονται στον **Πίνακα 36**. Η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγισιμότητα επίσης εκτιμήθηκε από την % RSD των κλίσεων των διαγραμμάτων βαθμονόμησης της κάθε ουσίας: 4.0% (για την φαιτανύλη), 4.9% (για την νορφαιτανύλη), 4.8% (για την ρεμφαιτανύλη), 4.9% (για την βουτυρυλοφαιτανύλη), 4.6% (για

την ακετυλοφαινανύλη), 4.7% (για την οκφαινανύλη) και 4.1% (για την φουραυλοφαινανύλη). Οι τιμές της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας ήταν εντός των αποδεκτών ορίων ( $\pm 15\%$ ) για όλες τις ουσίες.

## 8.7 Ορθότητα εντός της ημέρας και δια των ημερών

Η ορθότητα εντός της ημέρας εκτιμήθηκε στα τρία επίπεδα συγκέντρωσης των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας, με υπολογισμό των % σχετικών σφαλμάτων ( $\%E_r$ ) της επαναποσοτικοποίησης των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας στις 4 μέρες και οι μεγαλύτερες κατά απόλυτη τιμή, μέσες τιμές του % σφάλματος ( $\%E_r$ ) ήταν:

- **Για την φαινανύλη:** 4.7 στο επίπεδο συγκέντρωσης QC1 (από -11 έως 10.0), 6.9 στο επίπεδο συγκέντρωσης QC2 (από -13 έως 6.4), 4.7 στο επίπεδο συγκέντρωσης QC3 (από -6.7 έως 7.7).
- **Για την νορφαινανύλη:** 2.2 στο επίπεδο συγκέντρωσης QC1 (από -10 έως 10), 11 στο επίπεδο συγκέντρωσης QC2 (από -10 έως 14), 10 στο επίπεδο συγκέντρωσης QC3 (από -14 έως 5.2).
- **Για τη ρεμφαινανύλη:** 2.2 στο επίπεδο συγκέντρωσης QC1 (από -7.9 έως 10), 8.2 στο επίπεδο συγκέντρωσης QC2 (από -12 έως 7.8), 9.8 στο επίπεδο συγκέντρωσης QC3 (από -13 έως 9.6).
- **Για τη βουτυρυλοφαινανύλη:** 3.3 στο επίπεδο συγκέντρωσης QC1 (από -12 έως 9.0), 7.2 στο επίπεδο συγκέντρωσης QC2 (από -9.7 έως 12), 3.4 στο επίπεδο συγκέντρωσης QC3 (από -7.6 έως 9.4).
- **Για την ακετυλοφαινανύλη:** 3.3 στο επίπεδο συγκέντρωσης QC1 (από -12 έως 7.9), 8.7 στο επίπεδο συγκέντρωσης QC2 (από -11 έως 11), 4.2 στο επίπεδο συγκέντρωσης QC3 (από -10 έως 8.4).
- **Για την οκφαινανύλη:** 4.6 στο επίπεδο συγκέντρωσης QC1 (από -13 έως 6.0), 3.7 στο επίπεδο συγκέντρωσης QC2 (από -10 έως 9.9), 1.4 στο επίπεδο συγκέντρωσης QC3 (από -10 έως 7.1).
- **Για την φουραυλοφαινανύλη:** 9.1 στο επίπεδο συγκέντρωσης QC1 (από -12 έως 8.0), 5.5 στο επίπεδο συγκέντρωσης QC2 (από -12 έως 13), 3.7 στο επίπεδο συγκέντρωσης QC3 (από -7.0 έως 7.1).

Τα αποτελέσματα της ορθότητας εντός της ημέρας για την φαινανύλη, την νορφαινανύλη, την ρεμφαινανύλη, την βουτυρυλοφαινανύλη, την ακετυλοφαινανύλη, την οκφαινανύλη και την φουραυλοφαινανύλη για τις 4 μέρες ανάλυσης στα 3 επίπεδα συγκέντρωσης των δειγμάτων ελέγχου, παρουσιάζονται αναλυτικά στους Πίνακες 29-35, ενώ τα αποτελέσματα της ορθότητας δια

των ημερών για τους 7 αναλύτες, τις 4 μέρες ανάλυσης στα 3 επίπεδα συγκέντρωσης των δειγμάτων ελέγχου, παρουσιάζονται αναλυτικά στον **Πίνακα 36**. Οι τιμές για την ορθότητα εντός της ημέρας και εντός των ημερών βρέθηκαν να είναι εντός των αποδεκτών ορίων ( $\pm 15\%$ ).

**Πίνακας 29.** Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της αναπτυχθείσας μεθόδου για την φαινανύλη σε ολικό αίμα.

Ημέρα	QC <sub>1</sub> (1.50 ng/mL)			QC <sub>2</sub> (15.00 ng/mL)			QC <sub>3</sub> (40.00 ng/mL)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση (±SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%E <sub>r</sub> )	Ευρεθείσα συγκέντρωση (±SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%E <sub>r</sub> )	Ευρεθείσα συγκέντρωση (±SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%E <sub>r</sub> )
1 <sup>η</sup>	1.571±0.091	5.8	4.7	15.55±0.44	2.8	3.6	40.8±1.8	4.5	2.0
2 <sup>η</sup>	1.490±0.085	5.7	-0.067	13.97±0.75	5.4	-6.9	38.1±1.2	3.2	-4.7
3 <sup>η</sup>	1.48±0.10	6.5	-1.1	14.63±0.46	3.1	-2.5	41.3±1.2	2.9	3.4
4 <sup>η</sup>	1.495±0.061	4.1	-0.33	15.14±0.83	5.5	0.93	41.1±1.5	3.7	2.8

**Πίνακας 30.** Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της αναπτυχθείσας μεθόδου για την νορφαινανύλη σε ολικό αίμα.

Ημέρα	QC <sub>1</sub> (1.50 ng/mL)			QC <sub>2</sub> (15.00 ng/mL)			QC <sub>3</sub> (40.00 ng/mL)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση (±SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%E <sub>r</sub> )	Ευρεθείσα συγκέντρωση (±SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%E <sub>r</sub> )	Ευρεθείσα συγκέντρωση (±SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%E <sub>r</sub> )
1 <sup>η</sup>	1.514±0.063	4.2	0.93	14.61±0.43	2.9	-2.6	40.3±1.0	2.5	0.64
2 <sup>η</sup>	1.509±0.090	5.9	0.62	13.93±0.49	3.5	-7.2	36.0±1.1	3.0	-10
3 <sup>η</sup>	1.50±0.10	6.4	-0.28	16.58±0.53	3.2	11	39.49±0.90	2.3	-1.3
4 <sup>η</sup>	1.53±0.10	6.7	2.2	15.15±0.59	3.9	1.0	39.9±1.3	3.2	-0.17

**Πίνακας 31.** Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της αναπτυχθείσας μεθόδου για την ρεμφαινανύλη σε ολικό αίμα.

Ημέρα	QC <sub>1</sub> (1.50 ng/mL)			QC <sub>2</sub> (15.00 ng/mL)			QC <sub>3</sub> (40.00 ng/mL)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση (±SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%E <sub>r</sub> )	Ευρεθείσα συγκέντρωση (±SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%E <sub>r</sub> )	Ευρεθείσα συγκέντρωση (±SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%E <sub>r</sub> )
<b>1<sup>η</sup></b>	1.533±0.063	4.1	2.2	15.34±0.69	4.5	2.3	42.4±1.4	3.4	6.0
<b>2<sup>η</sup></b>	1.493±0.087	5.8	-0.44	13.77±0.67	4.8	-8.2	36.1±1.0	2.8	-9.8
<b>3<sup>η</sup></b>	1.495±0.088	5.9	-0.34	14.56±0.91	6.2	-2.9	41.2±1.2	2.9	3.0
<b>4<sup>η</sup></b>	1.492±0.062	4.2	-0.52	14.53±0.83	5.7	-3.1	39.1±1.6	4.0	-2.3

**Πίνακας 32.** Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της αναπτυχθείσας μεθόδου για την βουτυρφαινανύλη σε ολικό αίμα.

Ημέρα	QC <sub>1</sub> (1.50 ng/mL)			QC <sub>2</sub> (15.00 ng/mL)			QC <sub>3</sub> (40.00 ng/mL)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση (±SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%E <sub>r</sub> )	Ευρεθείσα συγκέντρωση (±SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%E <sub>r</sub> )	Ευρεθείσα συγκέντρωση (±SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%E <sub>r</sub> )
<b>1<sup>η</sup></b>	1.550±0.056	3.6	3.3	15.90±0.81	5.1	6.0	41.2±1.5	3.7	3.1
<b>2<sup>η</sup></b>	1.473±0.070	4.8	-1.8	13.97±0.30	2.2	-6.9	39.6±1.7	4.4	-0.96
<b>3<sup>η</sup></b>	1.480±0.075	5.0	-1.3	14.87±0.65	4.4	-0.87	41.4±1.2	3.0	3.4
<b>4<sup>η</sup></b>	1.451±0.077	5.3	-3.3	16.08±0.67	4.2	7.2	41.3±2.8	6.7	3.3



**Πίνακας 33.** Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της αναπτυχθείσας μεθόδου για την ακετυλοφαινανύλη σε ολικό αίμα.

Ημέρα	QC <sub>1</sub> (1.50 ng/mL)			QC <sub>2</sub> (15.00 ng/mL)			QC <sub>3</sub> (40.00 ng/mL)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση (±SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%E <sub>r</sub> )	Ευρεθείσα συγκέντρωση (±SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%E <sub>r</sub> )	Ευρεθείσα συγκέντρωση (±SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%E <sub>r</sub> )
<b>1<sup>η</sup></b>	1.516±0.050	3.3	1.1	15.41±0.90	5.8	2.7	41.7±1.4	3.5	4.2
<b>2<sup>η</sup></b>	1.461±0.051	3.5	-2.6	13.70±0.52	3.8	-8.7	38.5±2.2	5.7	-3.7
<b>3<sup>η</sup></b>	1.550±0.050	3.3	3.3	15.38±0.68	4.4	2.5	40.8±1.6	4.0	1.9
<b>4<sup>η</sup></b>	1.48±0.10	6.8	-1.3	16.10±0.72	4.5	7.3	41.5±2.0	4.7	3.7

**Πίνακας 34.** Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της αναπτυχθείσας μεθόδου για την οκφαινανύλη σε ολικό αίμα.

Ημέρα	QC <sub>1</sub> (3.00 ng/mL)			QC <sub>2</sub> (30.00 ng/mL)			QC <sub>3</sub> (80.00 ng/mL)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση (±SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%E <sub>r</sub> )	Ευρεθείσα συγκέντρωση (±SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%E <sub>r</sub> )	Ευρεθείσα συγκέντρωση (±SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%E <sub>r</sub> )
<b>1<sup>η</sup></b>	3.05±0.11	3.6	1.8	30.27±0.96	3.2	0.91	78.9±1.8	2.2	-1.4
<b>2<sup>η</sup></b>	2.86±0.16	5.5	-4.6	28.9±2.1	7.4	-3.7	79.9±2.0	2.6	-0.078
<b>3<sup>η</sup></b>	2.953±0.094	3.2	-1.6	30.1±1.7	5.6	0.24	80.2±5.1	6.4	0.24
<b>4<sup>η</sup></b>	2.87±0.17	6.0	-4.2	31.0±1.30	4.4	3.3	80.9±2.7	3.3	1.1

**Πίνακας 35.** Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της αναπτυχθείσας μεθόδου για την φουρανυλφαινανύλη σε ολικό αίμα.

Ημέρα	QC <sub>1</sub> (3.00 ng/mL)			QC <sub>2</sub> (30.00 ng/mL)			QC <sub>1</sub> (80.00 ng/mL)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση (±SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%E <sub>r</sub> )	Ευρεθείσα συγκέντρωση (±SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%E <sub>r</sub> )	Ευρεθείσα συγκέντρωση (±SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%E <sub>r</sub> )
<b>1<sup>η</sup></b>	2.89±0.14	4.9	-3.5	29.2±1.8	6.0	-2.7	79.5±3.2	4.0	-0.61
<b>2<sup>η</sup></b>	2.99±0.20	6.8	-0.28	31.3±1.8	5.7	4.4	83.0±3.1	3.7	3.7
<b>3<sup>η</sup></b>	3.07±0.25	8.3	2.4	30.9±2.3	7.4	3.2	79.0±3.6	4.6	-1.2
<b>4<sup>η</sup></b>	2.73±0.13	4.9	-9.1	31.7±1.6	4.9	5.5	79.5±2.0	2.6	-0.61

**Πίνακας 36.** Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα και ορθότητα δια των 4 ημερών, της αναπτυχθείσας μεθόδου προσδιορισμού των 7 αναλυτών σε ολικό αίμα, στα τρία επίπεδα συγκέντρωσης των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας.

<b>Ουσία</b>	<b>Αναμενόμενη Συγκέντρωση (ng/mL)</b>	<b>Ευρεθείσα συγκέντρωση (ng/mL)</b>	<b>Ορθότητα δια των ημερών (%E<sub>T</sub>)</b>	<b>Ενδοεργαστηριακή Αναπαραγωγικότητα (%RSD, n=24)</b>
<b>Φαιντανύλη</b>	1.50	1.510±0.087	0.65	5.7
	15.00	14.82±0.85	-1.2	5.7
	40.00	40.3±1.9	0.87	4.7
<b>Νορφαιντανύλη</b>	1.50	1.513±0.084	0.87	5.6
	15.00	15.1±1.1	0.45	7.3
	40.00	38.9±2.0	-2.7	5.2
<b>Ρεμφαιντανύλη</b>	1.50	1.503±0.073	0.22	4.9
	15.00	14.55±0.92	-3.0	6.4
	40.00	39.7±2.7	-0.77	6.9
<b>Βουτυρυλοφαιντανύλη</b>	1.50	1.489±0.075	-0.76	5.1
	15.00	15.2±1.1	1.4	6.9
	40.00	40.9±1.9	2.2	4.7
<b>Ακετυλοφαιντανύλη</b>	1.50	1.502±0.071	0.12	4.7
	15.00	15.1±1.1	0.98	7.4
	40.00	40.6±2.1	1.5	5.3
<b>Οκφαιντανύλη</b>	3.00	2.94±0.15	-2.1	5.1
	30.00	30.1±1.7	0.18	5.6
	80.00	80.0±3.1	-0.023	3.8
<b>Φουρανυλοφαιντανύλη</b>	3.00	2.92±0.22	-2.6	7.5
	30.00	30.8±2.0	2.6	6.5
	80.00	80.3±3.3	0.33	4.1

## 8.8 Απόλυτη ανάκτηση

Η απόλυτη ανάκτηση για την φαιτανύλη, την νορφαιτανύλη, την ρεμφαιτανύλη, την βουτυρυλοφαιτανύλη, την ακετυλοφαιτανύλη, την οκφαιτανύλη και την φουρανυλοφαιτανύλη υπολογίστηκαν στα 3 επίπεδα συγκέντρωσης των δειγμάτων ελέγχου και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον **Πίνακα 37**. Οι τιμές των ανακτήσεων κυμάνθηκαν από 85% έως 115.6%.

**Πίνακας 37.** Επί τοις εκατό (%) ποσοστά απόλυτης ανάκτησης της αναπτυχθείσας μεθόδου προσδιορισμού των 7 παραγώγων της φαιτανύλης σε ολικό αίμα.

Αναλύτης	Συγκέντρωση (ng/mL) (n=6)	% απόλυτη ανάκτηση ( $\pm$ SD)
Φαιτανύλη	1.50	101 $\pm$ 13
	15.00	104 $\pm$ 10
	40.00	108 $\pm$ 12
Νορφαιτανύλη	1.50	92 $\pm$ 13
	15.00	95.8 $\pm$ 6.7
	40.00	97.9 $\pm$ 2.4
Ρεμφαιτανύλη	1.50	97.4 $\pm$ 8.3
	15.00	102.8 $\pm$ 7.2
	40.00	106.1 $\pm$ 7.6
Βουτυρυλοφαιτανύλη	1.50	115.6 $\pm$ 4.3
	15.00	103.3 $\pm$ 7.9
	40.00	97.4 $\pm$ 5.1
Ακετυλοφαιτανύλη	1.50	85 $\pm$ 9
	15.00	113 $\pm$ 12
	40.00	89.3 $\pm$ 5.0
Οκφαιτανύλη	3.00	97.1 $\pm$ 5.9
	30.00	107 $\pm$ 11
	80.00	113.8 $\pm$ 5.1
Φουρανυλοφαιτανύλη	3.00	85.2 $\pm$ 8.1
	30.00	106 $\pm$ 11
	80.00	114.3 $\pm$ 6.7

## 8.9 Ανθεκτικότητα

Η ανθεκτικότητα της μεθόδου εκτιμήθηκε μεταβάλλοντας σκόπιμα τις επτά παραμέτρους που επιλέχθηκαν από τα στάδια της κατεργασίας των δειγμάτων και της αεριοχρωματογραφικής ανάλυσης. Παρασκευάστηκαν 15 εμβολιασμένα δείγματα ελέγχου ποιότητας μεσαίου επιπέδου (QC2) και κατεργάστηκαν σύμφωνα με την αναπτυχθείσα μέθοδο προσδιορισμού των 7 ουσιών σε ολικό αίμα. Τα τρία δείγματα αναλύθηκαν με τις χρωματογραφικές παραμέτρους της αναπτυχθείσας μεθόδου ενώ τα υπόλοιπα δείγματα αναλύθηκαν ανα τρία με την μέθοδο τροποποιημένη ως προς:

- a. την ταχύτητα ροής του φέροντος αερίου
- b. την αρχική θερμοκρασία της χρωματογραφικής στήλης
- c. την θερμοκρασία του σημείου έγχυσης το δείγματος
- d. το δυναμικό λειτουργίας (voltage) του φασματομέτρου μαζών (1.23 αντί 1.27 kV)

Επιπλέον, παρασκευάστηκαν άλλα 9 εμβολιασμένα δείγματα ελέγχου ποιότητας μεσαίου επιπέδου (QC2), εκ των οποίων 3 δείγματα κατεργάστηκαν μεταβάλλοντας το pH του ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών από 6 σε 6.5, 3 δείγματα τα όποια μετά την έκλυση των αναλυτών και την εξάτμιση (υπό N<sub>2</sub>) παραγωγοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 65 °C και τέλος 3 δείγματα κατεργάστηκαν μεταβάλλοντας την αναλογία του μίγματος διαλυτών έκλυσης (από 85:15:2 σε 80:15:2). Όλα τα δείγματα που αναλύθηκαν συγκρίθηκαν με τα 3 δείγματα που αναλύθηκαν με τις συνθήκες της αναπτυχθείσας μεθόδου για τον προσδιορισμό των 7 αναλυτών σε ολικό αίμα.

Οι τιμές των τυπικών αποκλίσεων που υπολογίστηκαν, βάσει των αποτελεσμάτων που ελήφθησαν για τη φαιντανύλη, την νορφαιντανύλη, τη ρεμφαιντανύλη, την βουτυρυλοφαιντανύλη, την ακετυλοφαιντανύλη, την οκφαιντανύλη και την φουρανυλοφαιντανύλη ήταν 0.0604, 0.0714, 0.0580, 0.0805, 0.0484, 0.0608 και 0.0791 αντίστοιχα για κάθε μία από τις παραπάνω τα οποία θεωρούνται ότι δεν επηρεάζουν σημαντικά τα αποτελέσματα της μεθόδου.

## 8.10 Σταθερότητα εμβολιασμένων προτύπων δειγμάτων ολικού αίματος

Μελετήθηκε η σταθερότητα εμβολιασμένων δειγμάτων ολικού αίματος με φαιντανύλη, νορφαιντανύλη, ρεμφαιντανύλη, βουτυρυλοφαιντανύλη, ακετυλοφαιντανύλη, οκφαιντανύλη

και φουρανυλοφαιτανύλη, στο επίπεδο συγκέντρωσης QC3. Οι μελέτες σταθερότητας περιελάμβαναν συντήρηση των δειγμάτων στους:

- στους  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  για δύο βδομάδες και έναν μήνα,
- στους  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  για δύο βδομάδες, μία βδομάδα και 24 ώρες
- και για 3 κύκλους ψύξης απόψυξης

Συγκεκριμένα παρασκευάστηκαν 3 εμβολιασμένα δείγματα αίματος με τους 7 αναλύτες στο επίπεδο συγκέντρωσης QC3 και φυλάχθηκαν στους  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  για ένα μήνα. Μετά την πάροδο δύο βδομάδων παρασκευάστηκαν άλλα 6 δείγματα εμβολιασμένου αίματος στο επίπεδο συγκέντρωσης QC3 από τα οποία:

- 3 δείγματα επιπέδου συγκέντρωσης QC3 φυλάχθηκαν στους  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  για δύο βδομάδες
- 3 δείγματα επιπέδου συγκέντρωσης QC3 φυλάχθηκαν στους  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  για δύο βδομάδες.

Στη συνέχεια, μετά την πάροδο μίας βδομάδας παρασκευάστηκαν 3 εμβολιασμένα δείγματα των ουσιών στο επίπεδο συγκέντρωσης QC3 και φυλάχθηκαν στους  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  για μία βδομάδα. Μία μέρα πριν την ανάλυση παρασκευάστηκαν 3 εμβολιασμένα δείγματα των ουσιών και φυλάχθηκαν στους  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  για μία ημέρα. Τέλος, την ημέρα της ανάλυσης παρασκευάστηκαν 6 δείγματα εκ των οποίων 3 υποβλήθησαν σε 3 κύκλους ψύξης απόψυξης και 3 αναλύθηκαν ως δείγματα ημέρας.

Όλα τα παραπάνω δείγματα αναλύθηκαν την ίδια ημέρα με την αναπτυχθείσα μέθοδο για τον προσδιορισμό των αναλυτών σε ολικό αίμα και ποσοτικοποιήθηκαν βάσει της εξίσωσης παλινδρόμησης, η οποία κατασκευάστηκε την ημέρα της ανάλυσης τους. Ακολούθησε σύγκριση των μέσων τιμών των συγκεντρώσεων των «παλαιών» και των «πρόσφατων» δειγμάτων. Οι απώλειες για όλες τις ουσίες κυμαίνονταν από  $-30\%$  έως  $-0.53\%$ . Τα αποτελέσματα από τις δοκιμασίες σταθερότητας παρουσιάζονται αναλυτικά στον **Πίνακα 38**.

Επίσης ελέγχθηκε και η σταθερότητα των ουσιών κατά την παραμονή τους πάνω στον δειγματολήπτη για 24h και σε όλες τις περιπτώσεις οι απώλειες ήταν μικρότερες από  $5\%$ .

**Πίνακας 38.** Αποτελέσματα μελέτης σταθερότητας (% απώλεια) στο επίπεδο συγκεντρώσεων (QC3), των υπό μελέτη ουσιών σε εμβολιασμένα δείγματα ολικού αίματος, υπό διαφορετικές συνθήκες.

Αναλύτης	Συγκέντρωση (ng/mL)	% Απώλεια					
		4 ° C 24 ώρες	4 ° C 1 βδομάδα	4 ° C 2 βδομάδες	-20 ° C 2 βδομάδες	-20 ° C 1 μήνας	3 κύκλοι ψύξης/απόψυξης
Φαιτανύλη	40	-0.59	-1.0	-1.2	-1.6	-2.7	-1.7
Νορφαιτανύλη	40	-4.2	-8.0	-16	-15	-17	-23
Ρεμφαιτανύλη	40	-3.3	-8.0	-17	-14	-18	-30
Βουτυρυλοφαιτανύλη	40	-1.5	-3.7	-7.8	-5.2	-8.7	-14
Ακετυλοφαιτανύλη	40	-0.80	-3.6	-13	-13	-18	-18
Οκφαιτανύλη	80	-0.53	-1.5	-7.6	-7.4	-12	-9.2
Φουρατυλοφαιτανύλη	80	-1.0	-3.4	-13	-12	-15	-17

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9: Εφαρμογές της αναπτυχθείσας μεθόδου

Η μέθοδος προσδιορισμού φαιτανύλης και παραγώγων της που αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε, εφαρμόστηκε και σε προθανάτια και μεταθανάτια δείγματα ολικού αίματος που αφορούσαν σε υποθέσεις κλινικού και δικαστικού ενδιαφέροντος. Έτσι, επιβεβαιώθηκε η εφαρμοσιμότητα της μεθόδου. Στο πλαίσιο της μελέτης αυτής αναλύθηκαν συνολικά 13 δείγματα αίματος που ελήφθησαν από περιπτώσεις θανάτων ασθενών που ακολουθούσαν φαρμακευτική αγωγή με φαιτανύλη ή περιπτώσεις όπου η παρουσία της φαιτανύλης διαπιστώθηκε κατά την προκαταρκτική γενική τοξικολογική ανάλυση των ούρων, καθώς επίσης και σε δείγματα αίματος ασθενούς που είχε λάβει ρεμφαιντανύλη ως αναισθητικό.

Στοιχεία όπως το φύλο και η ηλικία του θανόντος καθώς και οι συγκεντρώσεις της φαιτανύλης και του μεταβολίτη της που προσδιορίστηκαν με βάση την καμπύλη αναφοράς που έγινε την ημέρα της ανάλυσης των δειγμάτων παρουσιάζονται, στον **Πίνακα 39**. Από τα περιστατικά αυτά που παρουσιάζονται στον Πίνακα, τα περιστατικά 1, 4 και 5 αφορούν περιπτώσεις τοξικομανών ενώ τα 2, 3, 6, 7 και 8 αφορούν περιπτώσεις ασθενών όπου υπέφεραν από χρόνια πόνο και ελάμβαναν φαιτανύλη για την αντιμετώπιση του.

Η μέθοδος εφαρμόστηκε επίσης σε πέντε δείγματα αίματος ασθενούς που έλαβε ρεμφαιντανύλη και προποφόλη κατά τη διαδικασία χειρουργικής επέμβασης. Ο ρυθμός έγχυσης της ρεμφαιντανύλης ήταν 0.25 μg/kg/min. Δείγματα αίματος ελήφθησαν στα εξής χρονικά διαστήματα:

1. 5 min μετά την έναρξη χορήγησης (Δείγμα 1)
2. Δύο ώρες μετά την έναρξη της χορήγησης (Δείγμα 2)
3. 2.5 ώρες μετά την έναρξη της χορήγησης (Δείγμα 3)
4. Μισή ώρα μετά την διακοπή της χορήγησης (Δείγμα 4)
5. Μία ώρα μετά τη διακοπή της χορήγησης (Δείγμα 5)

Οι συγκεντρώσεις ρεμφαιντανύλης που βρέθηκαν στα αντίστοιχα δείγματα αίματος ήταν οι εξής:

1. Δείγμα 1: 0.92 ng/mL
2. Δείγμα 2: 2.18 ng/mL
3. Δείγμα 3: 3.14 ng/mL
4. Δείγμα 4: 0.74 ng/mL
5. Δείγμα 5: 0.0 ng/mL



**Πίνακας 39.** Περιστατικά δικαστικού ενδιαφέροντος που διερευνήθηκαν με την αναπτυχθείσα μέθοδο προσδιορισμού φαιντανύλης και παραγώγων της σε ολικό αίμα με χρωματογραφία αέριας φάσεως σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών.

<b>α/α</b>	<b>Φύλο/Ηλικία</b>	<b>Ανιχνευθείσα ουσία</b>	<b>Συγκέντρωση στο αίμα (ng/mL)</b>	<b>Άλλες ανιχνευθείσες ουσίες</b>
<b>1</b>	Άρρεν/52	Φαιντανύλη	29.1	Δεν ανευρέθηκαν
		Νορφαιντανύλη	23.6	
<b>2</b>	Θήλυ/75	Φαιντανύλη	14.8	Παροξετίνη, αμιτριπτυλίνη, λεβομεπρομαζίνη, 7-αμινοφλουνιτραζεπάμη
		Νορφαιντανύλη	11.1	
<b>3</b>	Άρρεν/67	Φαιντανύλη	14	Παρακεταμόλη, ψευδοεφεδρίνη, μετοκλοπραμίδη, δικλοφαινάκη
		Νορφαιντανύλη	7.2	
<b>4</b>	Θήλυ/45	Φαιντανύλη	8.03	Σιταλοπράμη, μιτραζαπίνη, βιπεριδένη, νορδιαζεπάμη, αλπραζολάμη
		Νορφαιντανύλη	4.6	
<b>5</b>	Άρρεν/24	Φαιντανύλη	17.6	Βρωμαζεπάμη, 7-αμινοφλουνιτραζεπάμη, Δ9-τετραϋδροκανναβινόλη και μεταβολίτης της
		Νορφαιντανύλη	13	
<b>6</b>	Άρρεν/31	Φαιντανύλη	11.3	Διαζεπάμη, νορδιαζεπάμη
		Νορφαιντανύλη	5.7	
<b>8</b>	Θήλυ/91	Φαιντανύλη	22.7	Διαζεπάμη, νορδιαζεπάμη
		Νορφαιντανύλη	16.2	

## Συζήτηση

Η φαιντανύλη είναι ένας ισχυρός αναλγητικός παράγοντας ο οποίος αρχικά σχεδιάστηκε, προκειμένου να αντιμετωπίσει τον παροξυσμικό πόνο σε περιπτώσεις όπου άλλες αναλγητικές ουσίες είχαν αποδειχθεί ανεπαρκείς. Στη συνέχεια δοκιμάστηκε ως αναισθητικό και σήμερα χρησιμοποιείται συμπληρωματικά στην γενική ή τοπική αναισθησία μαζί με άλλες ανάλογης δράσης ουσίες. Με αφετηρία τη δομή της φαιντανύλης και χρησιμοποιώντας την παραδοχή ότι η δομή μίας ουσίας σχετίζεται άμεσα με τη δράση της, οι επιστήμονες άρχισαν να σχεδιάζουν ουσίες δομικά ανάλογες με την φαιντανύλη (παράγωγα) με σκοπό να παρασκευάσουν περισσότερο ασφαλή και ενδεχομένως πιο δραστικά μόρια.

Τα παράγωγα φαιντανύλης επιδρούν στον άνθρωπο με τρόπο σχετικά όμοιο με αυτόν της μορφίνης καθώς δρουν στους ίδιους υποδοχείς των οπιοειδών. Στο γεγονός αυτό οφείλεται το ότι η φαιντανύλη καθώς και τα περισσότερα από τα παράγωγα της σήμερα βρίσκονται ανάμεσα στις πιο συχνά, παράνομα διακινούμενες και χρησιμοποιούμενες ουσίες. Η κατάχρηση αυτών των ουσιών από τους τοξικομανείς, μόνων τους ή σε συνδυασμό με άλλες εξαρτησιογόνες ουσίες, έχει οδηγήσει, ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια, σε μία πληθώρα δηλητηριάσεων και θανάτων. Η ένταξη αυτών των ουσιών στις υπό του νόμου ελεγχόμενες ουσίες προϋποθέτει την εκτίμηση της βλαπτικότητάς της μέσω της ανίχνευσής της σε περιστατικά δηλητηριάσεων ή θανάτων. Για να επιτευχθεί αυτό απαιτείται η ταυτοποίησή τους σε βιολογικά υλικά που σχετίζονται με υποθέσεις δηλητηριάσεως ή θανάτων. Έτσι, καθίσταται απαραίτητη η ανάπτυξη κατάλληλης μεθόδολογίας με σκοπό την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό, της φαιντανύλης και των παραγώγων της, σε βιολογικά υλικά. Η εφαρμογή αυτών των μεθόδων, εν συνεχεία, σε πραγματικά περιστατικά, συμβάλλει καθοριστικά στη διερεύνηση των περιστατικών αυτών, ενώ παράλληλα διευκολύνει την ένταξή τους στις ελεγχόμενες ουσίες αφού είναι κοινά αποδεκτό ότι δεν έχει νόημα η ένταξη κάποιας ουσίας στις ελεγχόμενες εφόσον δεν υπάρχει μέθοδος ταυτοποίησης της.

Στο πλαίσιο αυτής της διπλωματικής εργασίας που εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας, της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, έγινε ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου ταυτόχρονου προσδιορισμού της φαιντανύλης, του κύριου μεταβολίτη της, νορφαιντανύλης και 5 παραγώγων της σε ολικό αίμα με την τεχνική της GC/MS. Τα παράγωγα αυτά είναι η ρεμφαιντανύλη, η βουτυρυλοφαιντανύλη, η ακετυλοφαιντανύλη, η οκφαιντανύλη και η φουρανυλοφαιντανύλη. Με εξαίρεση τη ρεμφαιντανύλη, της οποίας η χρήση περιορίζεται στην Κλινική Ιατρική, τα υπόλοιπα παράγωγα αποτελούν ουσίες νεομφανισθείσες στην παράνομη αγορά των ναρκωτικών και έχουν γίνει η αιτία για πολλούς θανάτους και δηλητηριάσεις τοξικομανών, ειδικότερα τα τελευταία 5 χρόνια, σε όλο τον κόσμο. Στη χώρα μας δεν υπάρχουν

καταγεγραμμένα περιστατικά που να αποδίδονται στις παραπάνω ουσίες. Έτσι θεωρήθηκε απαραίτητη η ανάπτυξη και επικύρωση μίας μεθόδου για τη διερεύνηση σχετικών περιστατικών.

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε περιλαμβάνει καταβύθιση των πρωτεϊνών του αίματος με ακετονιτρίλιο, απομόνωση των αναλυτών από το αίμα με εκχύλιση στερεάς φάσεως χρησιμοποιώντας στήλες Bond Elute Certify I, και παραγωγοποίηση με τριφθοροοξικό ανυδρίτη σε θερμοκρασία 70 °C για 30 min.

Η μέθοδος αυτή πρωτοτυπεί στο ότι δεν υπάρχει άλλη δημοσιευμένη μέθοδος η οποία να μπορεί να προσδιορίζει ταυτόχρονα και τις 7 αυτές ουσίες. Επιπροσθέτως ο προσδιορισμός αυτών των ουσιών με την τεχνική της GC/MS δίνει στη μέθοδο τη δυνατότητα εφαρμογής της από τα περισσότερα τοξικολογικά εργαστήρια, τόσο στο πλαίσιο της Κλινικής όσο και της Δικαστικής Τοξικολογίας, καθώς αποτελεί μία ευρέως χρησιμοποιούμενη και γνωστή τεχνική. Επιπροσθέτως, πρωτοπορεί ως προς το ότι αποτελεί την πρώτη μέθοδο προσδιορισμού της οκφαινανύλης και της φουρανυλοφαινανύλης με την τεχνική της GC/MS. Οι μέχρι τώρα δημοσιευμένες μέθοδοι για αυτές τις 2 ουσίες περιλαμβάνουν την χρήση υγροχρωματογραφίας.

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης, διαθέτει:

- πλήρη επικύρωσή της,
- εκλεκτικότητα ως προς του αναλύτες σε σχέση με τα ενδογενή συστατικά του αίματος,
- ειδικότητα ως προς τους αναλύτες σε σχέση με εξωγενείς ουσίες,
- εξαιρετικά ποσοστά απόλυτης ανάκτησης για όλες τις ουσίες που ξεπερνούν το 85%
- χαμηλά όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης και συνεπώς υψηλή ευαισθησία (0.5 ng/mL για την φαινανύλη, την νορφαινανύλη, την ρεμφαινανύλη, την βουτυρυλοφαινανύλη και την ακετυλοφαινανύλη και 1.0 ng/mL για την οκφαινανύλη και την φουρανυλοφαινανύλη)
- μεγάλο δυναμικό εύρος συγκεντρώσεων που για την φαινανύλη και την ρεμφαινανύλη καλύπτει τα υποθεραπευτικά, τα θεραπευτικά καθώς και τα τοξικά ή/και τα θανατηφόρα επίπεδα,
- σημαντική ανθεκτικότητα σε μεταβολές ορισμένων χρωματογραφικών συνθηκών και παραμέτρων προκατεργασίας του δείγματος

Συγκριτικά με άλλες δημοσιευμένες μεθόδους που χρησιμοποιούν την τεχνική της χρωματογραφίας αέριας φάσεως, η αναπτυχθείσα μέθοδος πλεονεκτεί στα παρακάτω:

- Επιτυγχάνει τον ταυτόχρονο προσδιορισμό της φαινανύλης, του μεταβολίτη της και 5 εκ των παραγώγων της σε αντίθεση με τις περισσότερες μεθόδους που οποίες περιλαμβάνουν τον προσδιορισμό κυρίως της φαινανύλης και των μεταβολιτών της [312, 319, 320].

- Περιλαμβάνει τον ταυτόχρονο προσδιορισμό 4 παραγώγων τα οποία χρησιμοποιούνται από τοξικομανείς σε αντίθεση με άλλες δημοσιευμένες μεθόδους που
  - δεν προσδιορίζουν πάνω από ένα ή δύο τέτοια παράγωγα και γίνεται στοχευμένος προσδιορισμός αυτών [354, 355].
  - προσδιορίζουν ταυτόχρονα πάνω από ένα παράγωγο φαιντανύλης αλλά περιορίζονται σε παράγωγα με κλινική χρήση όπως η ρεμφαιντανύλη, η σουφαιντανύλη και η αλφαιντανύλη [307, 314, 319, 320].
- Έχει επικυρωθεί πλήρως, σε αντίθεση με άλλες δημοσιευμένες μεθόδους οι οποίες έχουν αναπτυχθεί για λόγους διερεύνησης φαρμακοκινητικών παραμέτρων των ενώσεων και δεν έχουν επικυρωθεί καθόλου ή με άλλες που δεν έχουν επικυρωθεί πλήρως [217, 307].
- Παρουσιάζει αυξημένη ευαισθησία καθώς έχει χαμηλά όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης σε σχέση με άλλες δημοσιευμένες μεθόδους.
  - Για την βουτυρυλοφαιντανύλη η αναπτυχθείσα μέθοδος πλεονεκτεί έναντι άλλων καθώς παρουσιάζει χαμηλότερα όρια ποσοτικοποίησης ακόμα και από μεθόδους που χρησιμοποιούν την τεχνική της υδροχρωματογραφίας σε συνδυασμό με τη δίδυμη φασματομετρία μαζών [208, 247].
  - Για την ακετυλοφαιντανύλη η αναπτυχθείσα μέθοδος παρουσιάζει πολύ χαμηλότερα όρια ποσοτικοποίησης σε σχέση με άλλες δημοσιευμένες μεθόδους [354] ακόμα και σε σύγκριση με άλλες που χρησιμοποιούν την τεχνική της υδροχρωματογραφίας σε συνδυασμό με δίδυμη φασματομετρία μαζών [233, 353].
  - Για την φουρανυλοφαιντανύλη και την οκφαιντανύλη η αναπτυχθείσα μέθοδος είναι η πρώτη επικυρωμένη μέθοδος η οποία χρησιμοποιεί την τεχνική της χρωματογραφίας αέριας φάσεως.
- Παρουσιάζει μεγάλο δυναμικό εύρος συγκεντρώσεων σε αντίθεση με άλλες δημοσιευμένες μεθόδους όπου το εύρος είναι πιο περιορισμένο [306, 311, 313].
- Δεν υπάρχουν μέχρι τώρα δημοσιευμένες εργασίες στις οποίες να γίνεται μελέτη σταθερότητας για την βουτυρυλοφαιντανύλη, την ακετυλοφαιντανύλη, την οκφαιντανύλη και την φουρανυλοφαιντανύλη.



**ΑΝΑΠΤΥΞΗ, ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΓΙΑ ΤΟΝ  
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΦΑΙΝΤΑΝΥΛΗΣ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΗΣ ΣΤΟ ΟΛΙΚΟ ΑΙΜΑ ΜΕ  
ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΑΕΡΙΑΣ ΦΑΣΕΩΣ ΣΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ  
ΜΑΖΩΝ**

## **Περίληψη**

Η φαιντανύλη και τα παράγωγα της συγκαταλέγονται σε μία κατηγορία ενώσεων η οποία είναι αρκετά δημοφιλής τα τελευταία χρόνια, λόγω της παρουσίας της στο κύκλωμα παράνομης διακίνησης και χρήσης ναρκωτικών ουσιών σε πολλά μέρη του κόσμου. Ειδικότερα την τελευταία δεκαετία καταγράφεται μία έξαρση στην παράνομη χρήση παραγώγων της φαιντανύλης. Ως εκ τούτου ολοένα και περισσότερα νέα παράγωγα της φαιντανύλης αναδύονται προκειμένου να προλάβουν τις «ανάγκες» της παράνομης αγοράς. Οι νεοεμφανισθείσες αυτές ουσίες αποτελούν συχνά την αιτία για μία πληθώρα περιστατικών δηλητηριάσεων και θανάτων σε όλο τον κόσμο. Κατά συνέπεια καθίσταται απαραίτητη η ανάπτυξη νέων μεθόδων προσδιορισμού για αυτές τις ουσίες.

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής ήταν η ανάπτυξη, βελτιστοποίηση και επικύρωση μίας μεθόδου για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό της φαιντανύλης, της νορφαιντανύλης, της ρεμφαιντανύλης, της βουτυρυλοφαιντανύλης, της ακετυλοφαιντανύλης, της οκφαιντανύλης και της φουρανυλοφαιντανύλης σε ολικό αίμα, με την τεχνική της χρωματογραφίας αέριας φάσεως σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών. Η κατεργασία των δειγμάτων αίματος περιελάμβανε αρχικά καταβύθιση πρωτεϊνών με ακετονιτρίλιο, στην συνέχεια εκχύλιση των ουσιών με εκχύλιση στερεάς φάσης, με τις στήλες Certify I και τέλος παραγωγοποίηση με το αντιδραστήριο τριφθοροξικός ανυδρίτης (TFAA) σε θερμοκρασία 70 °C για 30 λεπτά. Για τον προσδιορισμό των υπό εξέταση ουσιών, χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο μεθαδόνη-d<sup>3</sup>. Κατά την επικύρωση της παραπάνω μεθόδου η οποία έλαβε χώρα σύμφωνα με τις διεθνείς κατευθυντήριες οδηγίες ελέγχθησαν τα παρακάτω χαρακτηριστικά ποιότητας της μεθόδου: εκλεκτικότητα, ειδικότητα, γραμμικότητα, κατώτατα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης, επαναληψιμότητα, ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα, ορθότητα εντός και διά των ημερών, απόλυτη ανάκτηση, ανθεκτικότητα και σταθερότητα εμβολιασμένων δειγμάτων.

Η αναπτυχθείσα μέθοδος έχει σημαντικά πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλες δημοσιευμένες μεθόδους που χρησιμοποιούν σαν τεχνική χρωματογραφία αέριας φάσεως καθώς περιλαμβάνει τον ταυτόχρονο προσδιορισμό 7 ουσιών, έχει πολύ καλή ευαισθησία, περιλαμβάνει δυναμικό εύρος συγκεντρώσεων και έχει επικυρωθεί πλήρως. Η αναπτυχθείσα μέθοδος εφαρμόστηκε σε περιστατικά κλινικού και δικαστικού ενδιαφέροντος που αφορούσαν τον έλεγχο ύπαρξης των παραπάνω ουσιών

σε προθανάτια και μεταθανάτια δείγματα αίματος στο πλαίσιο διερεύνησης των περιστατικών αυτών.

**Λέξεις-κλειδιά:** παράγωγα φαιτανύλης, ολικό αίμα, χρωματογραφία αέριας φάσεως, φασματομετρία μαζών

# DEVELOPMENT, VALIDATION AND APPLICATIONS OF AN ANALYTICAL METHOD FOR THE DETERMINATION OF FENTANYL AND ITS ANALOGUES IN WHOLE BLOOD WITH GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY

## Abstract

Fentanyl and its analogues are among a class of compounds that has been popular in recent years because of its presence in the illicit drug trafficking in many parts of the world. In particular, during the last decade, an outburst was recorded in the illicit use of fentanyl analogues. Therefore, more and more fentanyl analogues are emerging in order to fulfil the “needs” of the illegal market. These substances are often the cause of many overdoses and lethal cases around the world. It is therefore necessary new methods to be developed for the determination of these substances.

The aim of this study was the development and validation of a suitable GC–MS methodology for the simultaneous determination of fentanyl, its metabolite, norfentanyl and 5 of its analogues in whole blood. The treatment procedure of the biological samples included initially precipitation of the proteins with acetonitrile, followed by solid phase extraction and derivatization of the analytes with trifluoroacetic anhydride at 70°C for 30 minutes. The quantification of fentanyl, norfentanyl, remifentanyl, butyrylfentanyl, acetylfentanyl, ocfentanyl and furanylfentanyl was performed using methadone-d<sup>3</sup> as the internal standard. During the validation process that were performed according to the international guidelines, the parameters studied were: selectivity, specificity, linearity, limits of detection and quantification, intra- and inter-day accuracy and precision, absolute recovery of the method, as well as the robustness of the method and the stability of analytes in spiked whole blood samples.

The developed method presents considerable advantages over the already published methods using gas chromatography, in terms of the number of the fentanyl analogues analyzed, the sensitivity, the dynamic range of concentrations, but also the fact it is fully validated. The developed method was applied to real ante mortem and post mortem blood samples during the investigation of clinical and forensic cases

**Key-words:** fentanyl analogues, whole blood, gas chromatography, mass spectrometry





## Πίνακας με συντμήσεις

Σύντμηση	Αγγλικός όρος	Ελληνικός όρος
<b>qTOF</b>	Time of flight	Αναλυτής Χρόνου-Πτήσης
<b>4-ANPP</b>	4-Anilino- <i>N</i> -phenylethyl-	4-Ανιλινο- <i>N</i> -φαινυλαιθυλο-πιπεριδίνη
<b>NPD</b>	Nitrogen-phosphorus detector	Ανιχνευτής αζώτου-φωσφόρου
<b>FID</b>	Flame ionization detector	Ανιχνευτής Ιοντισμού Φλόγας
<b>UV</b>	Ultra Violet	Ανιχνευτής υπεριώδους
<b>UNODC</b>	United Nations Office on Drug and Dependence	Γραφείο Ηνωμένων Εθνών για τα Ναρκωτικά και την Εγκληματικότητα
<b>MS/MS</b>	Tandem mass spectrometry	Δίδυμη φασματομετρία μαζών
<b>RRA</b>	Radio receptor assay	Δοκιμασία με χρήση ραδιουποδοχέα
<b>NDEWS</b>	National Drug Early Warning System	Εθνικό Σύστημα Έγκαιρης Προειδοποίησης για τα Ναρκωτικά
<b>SPE</b>	Solid phase extraction	Εκχύλιση στερεάς φάσης
<b>LLE</b>	Liquid-liquid extraction	Εκχύλιση υγρού-υγρού
<b>ELISA</b>	Enzyme-linked immunosorbent	Ενζυμικός ανοσοπροσροφητικός
<b>EIA</b>	Enzyme immunoassay	Ενζυμικός ανοσοπροσδιορισμός
<b>ECDD</b>	Expert Committee on Drug Dependence	Επιτροπή Εμπειρογνομώνων Εξάρτησης Ναρκωτικών
<b>IS</b>	Internal standard	Εσωτερικό πρότυπο
<b>EMCDDA</b>	European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction	Ευρωπαϊκό Κέντρο Παρακολούθησης Ναρκωτικών και Τοξικομανίας
<b>LD<sub>50</sub></b>	Leathal dose	Θανατηφόρα δόση (η δόση που προκαλεί θάνατο στο 50% του εξεταζόμενου)
<b>ED<sub>50</sub></b>	Effective dose	Θεραπευτική δόση (η δόση που δίνει θεραπευτικό αποτέλεσμα στο 50% του εξεταζόμενου πλυθησμού)
<b>EC<sub>50</sub></b>	Effective concentration	Θεραπευτική συγκέντρωση (η συγκέντρωση του φαρμάκου που δίνει θεραπευτικό αποτέλεσμα στο 50% του εξεταζόμενου)
<b>ESI</b>	Electrospray ionization	Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό
<b>MBDB</b>	<i>N</i> -methyl-1,3-benzodioxolylbutanamine	<i>N</i> -μεθυλ-1,3-βενζοδιοξολυλβουταναμίνη
<b>MDEA</b>	3,4-Methylenedioxy- <i>N</i> -ethylamphetamine	3,4-Μεθυλενοδιοξυ- <i>N</i> -αιθυλαμφεταμίνη
<b>MDA</b>	3,4-methylenedioxyamphetamine	3,4-μεθυλενοδιοξυαμφεταμίνη
<b>MDMA</b>	3,4-methylenedioxymethamphetamine	3,4-μεθυλενοδιοξυμεθαμφεταμίνη
<b>LOD</b>	Limit of detection	Όριο ανίχνευσης
<b>LOQ</b>	Limit of Quantification	Όριο ποσοτικοποίησης

<b>SIM</b>	Single ion monitoring	Παρακολούθηση επιλεγμένου ιόντος
<b><i>α</i>-PHP</b>	<i>α</i> -Pyrrolidinohexiophenone	<i>α</i> -πυρρολιδινοεξινοφαινόνη
<b>FR</b>	Flow rate	Ρυθμός ροής κινητής φάσης
<b>SNFP</b>	Swedish National Focal Point	Σουηδικό Εθνικό Σημείο Επαφής
<b>IC<sub>50</sub></b>	Inhibition concentration	Συγκέντρωση αναστολής (η συγκέντρωση του φαρμάκου που απαιτείται για την κατάληψη του 50% των θέσεων πρόσδεσης με τον υποδοχέα)
<b>EWA</b>	Early Warning Advisory	Συμβουλευτική Επιτροπή Έγκαιρης Προειδοποίησης
<b>EWS</b>	Early Warning System	Σύστημα Έγκαιρης Προειδοποίησης
<b>PDA</b>	Photodiode array	Συστοιχία φωτοδιόδων
<b>LC</b>	Liquid chromatography	Υγροχρωματογραφία
<b>UHPLC</b>	Ultra high performance liquid chromatography	Υγροχρωματογραφία εξαιρετικά υψηλής απόδοσης
<b>FTIR</b>	Fourier transform Infrared spectroscopy	Υπέρυθρη φασματοσκοπία μετασχηματισμού Fourier
<b>DEA</b>	Drug Enforcement Administration	Υπηρεσία Δίωξης Ναρκωτικών των Η.Π.Α.
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration	Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων των Η.Π.Α.
<b>NPP</b>	<i>N</i> -phenylethyl-piperidone	<i>N</i> -φαινυλαιθυλο-πιπεριδόνη
<b>MS</b>	Mass spectrometry	Φασματομετρία μαζών
<b>NMR</b>	Nuclear magnetic resonance	Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού
<b>GC</b>	Gas chromatography	Χρωματογραφία αέριας φάσεως

## Βιβλιογραφία

1. Van Bever WFM, Niemegeers CJE, Schellekens KHL (1973) “N-4 substituted 1(2-aryl-rthyl) 4-pipetidcnyl-N-phenylproanamides, a novel series of extremely potent analgesics with unusually high safety margin”. *Atzneimittelforsch.* **26**:1548
2. Niemegeers CJE, Schellekens KHL, Janssen PAJ (1976) “Sufentanil, a very potent and extremely safe intravenous morphine-like compound in mice, rats and dogs”. *Drug Res.* **26**:1551
3. Janssen PAJ (1962). “A review of the chemical features associated with strong morphine-like activity”. *Br J Anaesth.* **34**:260
4. Foldes FF, Swerdlow M, Siker ES (1954) “Chemistry of narcotics and narcotic antagonists”. In: Foldes FF, Swerdlow M, Siker ES, eds. “Narcotics and narcotic antagonists”. Springfield, IL: Charles C Thomas. 10-26
5. Beckett AH, Casey AF (1954) “Synthetic analgesics, stereochemical considerations”. *J Pharm Pharmacol.* **6**:986
6. Beckett AH (1956) “Analgesics and their antagonists: some steric and chemical considerations. Part I. The dissociation constants of some tertiary amines and synthetic analgesics, the conformations of methadone-type compounds”. *J Pharm Pharmacol.* **8**:848
7. Meuldermans WEG, Hurkmans RMA, Heykants JJP (1982) “Plasma protein binding and distribution of fentanyl, sufentanil, alfentanil and lofentanil in blood”. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* **257**:4-19
8. Leysen JE, Gommeren W, Niemegeers CJE (1983) “[H<sup>3</sup>] Sufentanil, a superior ligand for p-opiate receptors: binding properties and regional distribution in rat brain and spinal cord”. *Eur J Pharmacol.* **87**:209-225
9. Cookson RF, Towse GDW (1981) “The search for new analgesics”. *Clin Res Rev.* **1**:219
10. Eisleb O, Shaumann O (1939) “Dolantin, a new antispasmodic and analgesic”. *Dtsch Med Wochschr.* **65**:967
11. Hsu FL, Banks HD (1992) “Fentanyl synthetic methodology: a comparative study”. Chemical research development engineering center. Research directorate. CRDEC-TR-334, March 1992

12. Cousins, MJ, Mather LE (1984) "Intrathecal and epidural administration of opioids". *Anaesthesiology*. **61**:276
13. Lowenstein E, Hallowell P, Levine FH, Dagget WM, Austen WG, Laver MB (1969) "Cardiovascular response to large doses of intravenous morphine in man". *N Engl J Med*. **281**:1389
14. Stoelting RK, Gibbs PS (1973) "Hemodynamic effects of morphine and morphine-nitrous oxide in valvular heart disease and coronary artery disease". *Anaesthesiology*. **38**:45
15. Arens JT, Benbow BP, Ochsner JL, Theard R (1972) "Morphine anaesthesia for aorto-coronary by-pass procedures". *Anesth Analg*. **51**:901-909
16. Stanley TH, Gray NJ, Stafford W, Armstrong R (1973) "The effects of high-dose morphine on fluid and blood requirements in open-heart operations". *Anaesthesiology*. **38**:536
17. Hasbrouck JD (1970) "Morphine anaesthesia for open heart surgery". *Ann Thorac Surg*. **10**:364-369
18. McDermott RW, Stanley TH (1974) "Cardiovascular effects of low concentrations of nitrous oxide during morphine anaesthesia". *Anaesthesiology* **41**:89-91
19. Lowenstein E (1971) "Morphine "anaesthesia"-a perspective". *Anaesthesiology*. **35**:563
20. Freye E (1974) "Cardiovascular effects of high dosages of fentanyl, meperidine and naloxone in dogs". *Anesth Analg*. **53**:40-47
21. Stanley TH, Bidwai AV, Lunn JK, Hodges MR (1977) "Cardiovascular effects of nitrous oxide during meperidine infusion in the dog". *Anesth Analg*. **56**:836-841
22. De Castro J, van de Water A, Wouters L, Khonneux R, Renenan R, Kay B (1979) "Comparative study of cardiovascular, neurological and metabolic side effects of eight narcotics in dogs". *Acta Anaesthesiol kelg*. **30**:5
23. Stanley TH, Liu WS (1977) "Cardiovascular effects of meperidine-N<sub>2</sub>O anaesthesia before and after pancuronium". *Anesth Analg*. **56**:659-673
24. Patshe D, Gethmann JW, Hess W, Tarnow J, Waibel H (1976) "Effect of high dosages of fentanyl and piritramide upon haemodynamics, coronary blood flow and myocardial oxygen consumption". *Anaesthesist*. **25**:309
25. Freye E (1974) "Effects of high doses of fentanyl on myocardial infarction and cardiogenic shock in the dog". *Resuscitation*. **3**:105
26. Liu WS, Bidwai AV, Stanley TH, Isern-Amaral S (1976) "Cardiovascular dynamics after large doses of fentanyl and fentanyl plus N<sub>2</sub>O in the dog". *Anesth Analg*. **55**:168-172
27. Eisele JH, Reitan J, Torten M, Miller CH (1975) "Myocardial sparing effect of fentanyl during halothane anaesthesia in dogs". *Br J Anaesth*. **47**:937

28. Lunn JK, Stanley TH, Webster LB., Eisele J, Woodward A (1979) "High dose fentanyl anaesthesia for coronary artery surgery: plasma fentanyl concentration and influence of nitrous oxide on cardiovascular responses". *Anesth Analg.* **58**:390
29. Bailey PL, Stanley TH (1990) "Narcotic intravenous anaesthetics. In: Miller RD (ed.) *Anaesthesia*". New York: Churchill Livingstone. 281-366
30. Robinson S, Gregory GA (1981) "Fentanyl-air-oxygen anaesthesia for ligation of patent ductus arteriosus in preterm infants". *Anesth Analg.* **60**:331-334
31. Stanley TH, Berman L, Green O, et al (1980) "Plasma catecholamine and cortisol responses to fentanyl-oxygen anaesthesia for coronary-artery operations". *Anesthesiology.* **53**:250
32. Sebel PS, Bovill JG, Wauquier A, Rog P (1981) "Effects of high dose fentanyl anaesthesia on the electroencephalogram". *Anesthesiology.* **55**:203-211
33. Skulska A, Kala M, Parczewski A (2004). "Fentanyl and its Analogues in the Forensic Laboratory. Medical and Analytical Problems.". *Problems of Forensic Sciences.* **236**:127-142
34. United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC) (2017) "Fentanyl and its analogues—50 years on". *Global Smart Update* 17: 1–12. [https://www.unodc.org/documents/scientific/Global\\_SMART\\_Update\\_17\\_web.pdf](https://www.unodc.org/documents/scientific/Global_SMART_Update_17_web.pdf). (Accessed 14.04.2017)
35. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00813> (Accessed 15.08.2017)
36. [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/fentanyl\\_citrate#section=Spectral-Properties](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/fentanyl_citrate#section=Spectral-Properties) . (Accessed 31.072017)
37. [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Fentanyl\\_hydrochloride#section=Wikipedia](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Fentanyl_hydrochloride#section=Wikipedia) . (Accessed 31.072017)
38. <https://www.caymanchem.com/msdss/22659m.pdf> (Accessed 31.072017)
39. <https://www.caymanchem.com/msdss/14719m.pdf> . (Accessed 31.072017)
40. Janssen PAJ (1964) "Method for Producing Analgesia". Patent US3141823, Part of US application Ser. No. 221,936 filed Sep 4, 1962
41. Roy SD, Flynn GL (1988) "Solubility and related physicochemical properties of narcotic analgesics". *Pharm Res.* **5**:580-586
42. Sangster J (1993). LOGKOW Databank. Sangster Res Lab. Montreal Quebec. Canada
43. <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/r?dbs+hsdb:@term+@rn+@rel+437-38-7>
44. Soudijn W (1978) "The Pharmacology and Pharmacokinetics of Fentanyl". *Int Cong Symp Ser R Soc Med.* **3**:3-10
45. Janssen PAJ (1964) "Method for Producing Analgesia". Patent US3141823, Part of US application Ser. No. 221,936 filed Sep 4, 1962

46. Janssen PAJ (1965) "1-Aralkyl-4-(n-Aryl-Carbonylamino)-piperidines and Related Compounds". Patent US3164000, Part of US application Ser. No. 192,686 filed May 7, 1962
47. Casy AF, Hassan MA, Simmonds AB, Staniforth D (1969) "Structure activity Relations in Analgesics Based on 4-Anilinopiperidine". *J Pharm Pharmacol*. **21**:434-440
48. Gupta PK, Manral L, Ganesan K, Malhotra RC, Sekhar K (2013) "Method for the preparation of fentanyl". US8399677 B2, Part of US application Ser. No. 12/922,906 filed Mar 9, 2009
49. Gupta PK, Manral L, Ganesan K, Malhotra RC, Sekhar K (2011) "Method for the preparation of fentanyl". US2011/0021781 A1, Part of US application Ser. No. 12/922,906 filed Mar 9, 2009
50. Zee SH, Lai CL, Wu YM, Chen GS (1981) "Preparation of fentanyl from phenethylamine and methyl acrylate". *Nati Sci Counc Monthly*. **9**:387-397
51. Benke B (1970) "*N*-[1-(2-substituted-ethyl)-4-piperidyl]carboxamides". Hung. Patent 157,325. *Chem Abstr*. **73**:25305y
52. Jonczyk A (1976) "*N*-(2-phenethyl)-4-*N*-propionylanilinopiperidine". Pol. Patent 72,416. *Chem Abstr*. **84**:43865n
53. Jonczyk A, Jawdosiuk J, Makosza M (1978) "Poszukiwanie nowej metody syntezy srodka analgetycznego 'fentanyl' ". *Przem Chem*. **57**:131-134,180-182
54. Zong RS, Yin DX, Ji RY (1979) "Synthetic studies of potential analgesics. II. Synthesis of fentanyl". *Yao Hsueh Pao*. **14**:362-367
55. Zee SH, Wang WK (1980) "A new process for the synthesis of fentanyl". *Chin Chem Soc*. **27**:147-149
56. Banks HD, von Ostwalden P, Hsu FL (1989) "An improved synthesis of 4-anilinopiperidines". In proceedings of the 1988 US Army CRDEC Scientific Conference on Chemical Defense Research, 15-18 November, CRDEC-SP-013, US Army Chemical Research, Development and Engineering Center, Aberdeen Proving Ground, MD, August 1989, UNCLASSIFIED Report: 775-780
57. Godwin SA, Burton JH, Gerardo CJ, Hatten BW, Mace SE, Silvers SM, Fesmire FM (2014) "Clinical policy: procedural sedation and analgesia in the emergency department". *Annals of Emergency Medicine*. **63**:247-258
58. Smith HS, Colson J, Sehgal N (2013) "An update of evaluation of intravenous sedation on diagnostic spinal injection procedures". *Pain Physician*. **16**:SE217-SE228
59. Plante GE, VanItallie TB (2010) "Opioids for cancer pain: the challenge of optimizing treatment". *Metabolism: Clinical and Experimental*. **59**:S47-S52

60. Duragesic (2016) “Prescribing information”. [https://www.duragesic.com/assets/pdf/duragesic\\_0.pdf](https://www.duragesic.com/assets/pdf/duragesic_0.pdf). (Accessed 31.07.2017)
61. Jasek, W (2007) “Austria-Codex (in German) (62nd ed.)”. Österreichischer Apothekerverlag. 2621f
62. Karlsen AP, Pedersen DM, Trautner S, Dahl JB, Hansen MS (2014) “Safety of intranasal fentanyl in the out-of-hospital setting: A prospective observational study”. *Ann Emerg Med.* **63**:699–703
63. Murphy A, O'Sullivan R, Wakai A, Grant TS, Barrett MJ, Cronin J, McCoy SC, Hom J, Kandamany N (2014) “Intranasal fentanyl for the management of acute pain in children”. *Cochrane Database Syst Rev.* **10**:CD009942
64. UK Electronic Medicines Compendium (EMC) (2016) “Abstral Sublingual Tablets - Summary of Product Characteristics”. <https://www.medicines.org.uk/emc/medicine/21371>. (Accessed 31.07.2017)
65. (2011) “Abstral (Fentanyl Sublingual Tablets for Breakthrough Cancer Pain)”. *PT.* **36**:2–28. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3086091/>. (Accessed 31.07.2017)
66. Ward J, Laird B, Fallon M (2011) “The UK breakthrough cancer pain registry: origin, methods and preliminary data”. *BMJ Support Palliat Care.* **1**:A24–A24
67. Jasek, W (2007) “Austria-Codex (in German) (62nd ed.)”. Österreichischer Apothekerverlag. 89–92
68. Murphy A, O'Sullivan R, Wakai A, Grant TS, Barrett MJ, Cronin J, McCoy SC, Hom J, Kandamany N (2014) "Intranasal fentanyl for the management of acute pain in children". *The Cochrane Database of Systematic Reviews.* **10**: CD009942
69. Peter J.S. Koo (2005) "Postoperative Pain Management With a Patient-Controlled Transdermal Delivery System for Fentanyl". *American Journal of Health-System Pharmacy.* **62**: 1171–1176
70. Mather LE (1983) “Clinical pharmacokinetics of fentanyl and its newer derivatives”. *Clin Pharmacokinet.* **8**:422-446
71. Scholz J, Steinfath M, Schulz M (1996) “Clinical pharmacokinetics of alfentanil, fentanyl and sufentanyl: an update”. *Clin Pharmacokinet.* **31**:275-292
72. Rapinyl. “Περίληψη των χαρακτηριστικών του προϊόντος”. [https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2008/2008091149691/anx\\_49691\\_el.pdf](https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2008/2008091149691/anx_49691_el.pdf). (Accessed 31.07.2017)
73. Instanyl. “Περίληψη των χαρακτηριστικών του προϊόντος”. [http://www.ema.europa.eu/docs/el\\_EL/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/000959/WC500033141.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/el_EL/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000959/WC500033141.pdf). (Accessed 31.07.2017)



74. Ionsys. “Περίληψη των χαρακτηριστικών του προϊόντος”.  
[https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2015/20151119133230/anx\\_133230\\_el.pdf](https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2015/20151119133230/anx_133230_el.pdf). (Accessed 31.07.2017)
75. Nelson L, Schwaner R (2009) “Transdermal fentanyl: Pharmacology and toxicology”. *J Med Toxicol.* **5**:230-241
76. Goyrlay GK, Kowalski RR, Plummer JL, Cherry DA, Gaukroger P, Cousins MJ (1989) “The transdermal administration of fentanyl in the treatment of postoperative pain: pharmacokinetic and pharmacodynamic effects”. *Pain.* **37**:193-202
77. Poklis A (1995) “Fentanyl: A review for clinical and analytical toxicologists”. *Clin Toxicol.* **33**:439-447
78. Mather LE (1983) “Clinical pharmacokinetics of fentanyl and its newer derivatives”. *Clin Pharmacokinet.* **8**:422-446
79. Hess R, Herz A, Friedel K (1971) “Pharmacokinetics of fentanyl in rabbits in view of the importance for limiting the effect”. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* **179**:474-484
80. Hess R, Stiebler G, Herz A (1972) “Pharmacokinetics of fentanyl in man and the rabbit”. *European Journal of Clinical Pharmacology.* **4**:135-141
81. Hug CC Jr, Murphy MR, Rigel EP, Olson WA (1981) “Pharmacokinetics of morphine injected intravenously into the anesthetized dog”. *Anesthesiology.* **54**:38-47
82. Medscape (2005) “The Pharmacology of Fentanyl and Its Impact on the Management of Pain: Lipid Solubility”. *Medscape Neurology.* **7**(2). [http://www.medscape.org/viewarticle/518441\\_2](http://www.medscape.org/viewarticle/518441_2). (Accessed 31.07.2017)
83. Hug JR, Murphy MR (1979) “Fentanyl disposition in cerebrospinal fluid and plasma and its relationship to ventilator depression in the dog”. *Anesthesiology.* **50**:342-349
84. McClain DA, Hug CC (1980) “Intravenous fentanyl kinetics”. *Clin Pharmacol Ther.* **28**:106-114
85. Labroo RB, Paine MF, Thummel KE, Kharasch ED (1997) “Fentanyl Metabolism by Human Hepatic and Intestinal Cytochrome P4503A3: Implications for Interindividual Variability in Desposition, Efficacy and Drug Interactions”. *Drug Metabolism and Desposition.* **25**:1072-1079
86. Koehntop DE, Rodman JH (1997) “Fentanyl pharmacokinetics in patients undergoing renal transplantation”. *Pharmacotherapy.* **17**:746-752
87. Fentanyl. Κιτρική Φαιντανύλη. “Περίληψη των Χαρακτηριστικών του Προϊόντος (SPC)”.

<http://docplayer.gr/11566958-Perilipsi-ton-haraktiristikon-toy-proiontos-spc-fentanyl-kitriki-faintanyli.html>. (Accessed 31.07.2017)

88. Suzuki Saria El-Haddad J (2016) “A review: Fentanyl and Non-pharmaceutical fentanyls ”. *Drug and Alcohol Dependence*.
89. Μάτση Κυριακή, Μανωλοπούλου Ελένη-Παρασκευή. (2014) “Οπιοειδή”. *Θέματα Αναισθησιολογίας και Εντατικής Κλινικής*. **24**:113-118
90. Weinger MB, Swerdlow NR, Millar WL (1988) “Acute postoperative delirium and extrapyramidal signs in a previously healthy parturient”. *Anesth Analg*. **67**:291-295
91. Cerner Multum, Inc. “UK Summary of Product Characteristics”.
92. Oden RV, Karagianes TG (1991) “Postoperative myocardial ischemia possibly masked by epidural fentanyl analgesia”. *Anesthesiology* **74**:941-943
93. Freeman AB, Steinbrook RA (1985) “Recurrence of pulsus alternans after fentanyl injection in a patient with aortic stenosis and congestive heart failure”. *Can Anaesth Soc J*. **32**:654-657
94. Hilgenberg JC, Johantgen WC (1980) “Bradycardia after intravenous fentanyl during subarachnoid anesthesia”. *Anesth Analg*. **59**: 162-163
95. Bennet MRD, Adams AP (1983) “Postoperative Respiratory Complications of Opiates”. *Clin Anesthesiol*. **1**:41-56
96. Morisot P, Dessanges JF, Regnard J, Lockhart A (1989) “Ventilatory Response to carbon dioxide during extradural anaesthesia with lignocaine and fentanyl”. *Br J Anaesth*. **63**:97-102
97. Brockway MS, Noble DW, Sharwood-Smith GH, McClure JH (1990) “Profound Respiratory Depression after extradural fentanyl”. *Br J Anaesth*. **64**:243-245
98. Wang CY (1992) “Respiratory Depression after Extradural Fentanyl”. *Br J Anaesth*. **69**:544
99. FDC (1994) Reports Pink Sheet. January. **24**:12
100. Scamman FL, Ghoneim MM, Korttila K (1984) “Ventilatory and Mental Effects of alfentanil and fentanyl”. *Acta Anaesthesiol Scand*. **28**:63-67
101. Kuzma PJ, Kline MD, Stamatos JM, Auth DA (1995) “Acute Toxic Delirium: an uncommon reaction to transdermal fentanyl”. *Anesthesiology*. **83**:869-871
102. Zaccara G, Muscas GC, Messori A (1990) “Clinical features, pathogenesis and management of drug-induced seizures”. *Drug Safety*. **5**:109-151
103. Scott JC, Sarnquist FH (1985) “Seizure-like Movements during a Fentanyl Infusion with absence of seizure activity in a simultaneous EEG recording”. *Anesthesiology*. **62**:812-814
104. Sosis M (1985) “Fentanyl and emesis”. *Can Anaesth Soc J*. **32**:314-315

105. McCammon RL, Viegas OJ, Stoelting RK, Dryden GE (1978) “Naloxone reversal of choledochoduodenal sphincter spasm associated with narcotic administration”. *Anesthesiology*. **48**:437
106. White MJ, Berghausen EJ, Dumont SW, Tsueda K, Schroeder JA, Vogel RL, Heine MF, Huang KC (1992) “Side effects during continuous epidural infusion of morphine and fentanyl”. *Can J Anaesth*. **39**:576-582
107. Gaskey NJ, Ferriero L, Pournaras L, Seecof J (1986) “Use of fentanyl markedly increases nausea and vomiting in gynecological short stay patients”. *AANA J*. **54**:309-11
108. Drugs.com (2017) “Ionsys (fentanyl)”. Ortho McNeil Pharmaceutical, Raritan, NJ. <https://www.drugs.com/sfx/ionsys-side-effects.html>. (Accessed 31.07.2017)
109. White MJ, Berghausen EJ, Dumont SW, Tsueda K, Schroeder JA, Vogel RL, Heine MF, Huang KC (1992) “Side effects during continuous epidural infusion of morphine and fentanyl”. *Can J Anaesth*. **39**:576-582
110. Stoukides CA, Stegman M (1992) “Diffuse rash associated with transdermal fentanyl”. *Clin Pharm*. **11**:222
111. Furuya H, Okumura F (1986) “Hemolysis after administration of high-dose fentanyl”. *Anesth Analg*. **65**:207-208
112. Bennett MJ, Anderson LK, McMillan JC, Ebertz JM, Hanifin JM, Hirshman CA(1986) “Anaphylactic reaction during anaesthesia associated with positive intradermal skin test to fentanyl”. *Can Anaesth Soc J*. **33**:75-78
113. Zucker-Pinchoff B, Ramanathan S (1989) “Anaphylactic reaction to epidural fentanyl”. *Anesthesiology*. **71**: 599-601
114. Papoutsis I, Nikolaou P, Athanasellis S, Vardakou I, Spiliopoulou C, Stefanidou M (2016) “Fentanyl-related cases. The situation in Greece”. *European Journal of Forensic Sciences*. **3**:1-5
115. European Monitoring Centre for Drugs and Drugs Addiction (EMCDDA). Fentanyl in Europe- EMCDDA Trends potter Study. Report form an EMCDDA Expert Meeting 9 to 10 October 2012
116. Drug Enforcement Administration (DEA), U.S. Department of Justice (2007) “Control of a chemical precursor used in the illicit manufacture of fentanyl as a List I chemical. Interim rule with request for comments”. *Fed Regist*. **72**:20039-20047

117. Drug Enforcement Administration (DEA) (2016) Counterfeit prescription pills containing fentanyl: a global threat. DEA-DCT-DIB-021-16, July 2016. [https://content.govdelivery.com/attachments/USDOJDEA/2016/07/22/file\\_attachments/590360/fentanyl%2Bpills%2Breport.pdf](https://content.govdelivery.com/attachments/USDOJDEA/2016/07/22/file_attachments/590360/fentanyl%2Bpills%2Breport.pdf). (Accessed 07.04.2017)
118. UNODC (2011-2015) “Annual Reports Questionnaires”.
119. Green TC, Gilbert M (2016) “Counterfeit medications and fentanyl”. *JAMA Intern Med.* **176**:1555-1557
120. Canadian Centre on Substance Abuse (2015) “Deaths involving fentanyl in Canada, 2009-2014”. CCENDU Bulletin, Ottawa, ON
121. Mounteney J, Giradon I, Denissov G, Griffiths P (2015) “Fentanyls: Are we missing the signs? Highly potent and on the rise in Europe”. *Int J Drug Policy.* **26**:626-631
122. Centers for Disease and Control Prevention (CDC) (2008) “Non-pharmaceutical fentanyl-related deaths: multiple states, April 2005-March 2007”. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* **57**:793-796
123. European Monitoring Centre for Drug and Drug Addiction (EMCDDA) (2008) “Annual report 2008”. The State of Drugs Problem in Europe
124. European Monitoring Centre for Drug and Drug Addiction (EMCDDA) (2014) “European drug report. Trends and Developments”. <http://www.emcdda.europa.eu/publications/edr/trendsdevelopments/2014>. (Accessed 02.07.2015)
125. NCIS (2016) “Deaths related to fentanyl misuse – An update: Fact Sheet”.
126. Seghini I (2015) “Fentanyl intoxication: case report”. *Reactions.* **1539**:148-221
127. Salmi A (2015) “Fentanyl patch... The bad use”. *J Clin Toxicol.* **5**:266
128. Lucyk SN, Nelson LS (2017) “Novel synthetic opioids: an opioid epidemic within an opioid epidemic”. *Annals of emergency medicine.* **69**:91-93
129. Quintana P, Ventura M, Griffel M, Palma A, Galindo L, Fornís I, Gil C, Carbón X, Caudevilla F, Farré M, Torrens M (2016) “The hidden web and the fentanyl problem: detection of ocfentanil as an adulterant in heroin”. *Int J Drug Policy.* **40**:78-83
130. Mims B (2004) “Painkiller is topic of inquiry”. *The Salt Lake Tribune.*
131. Barrueto FJ, Howland MA, Hoffman RS, Nelson LS (2004) “The fentanyl tea bag”. *Vet Hum Toxicol.* **46**:30-31
132. Coon TP, Miller M, Kaylor D, Jones-Spagle K (2005) “Rectal insertion of fentanyl patches. A new route of toxicity”. *Ann Emerg Med.* **46**:473

133. Lilleng PK, Mehlum LI, Bachs L, Morild I (2004) “Deaths after intravenous misuse of transdermal fentanyl”. *J Psychopharmacol.* **18**:277-280
134. Tharp AM, Winecker RE, Winston DC (2004) “Fatal intravenous fentanyl abuse: four cases involving extraction of fentanyl from transdermal patches”. *Am J Forensic Med Pathol.* **25**:178-181
135. Thomas S, Winecker R, Pestaner JP (2008) “Unusual fentanyl patch administration”. *Am J Forensic Med Pathol.* **29**:162-163
136. Woodall KL, Martin TL, McLellan BA (2008) “Oral abuse of fentanyl patches(Duragesic): seven case reports”. *J Forensic Sci.* **53**:222-225
137. Pubchem (2005) “Remifentanil. Compound Summary for CID 60815”. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/remifentanil#section=Top>. (Accessed 26.03.2017)
138. <http://www.commonchemistry.org/ChemicalDetail.aspx?ref132875-61-7>. (Accessed 15.08.2017)
139. <https://www.caymanchem.com/msdss/19291m.pdf>. (Accessed 15.08.2017)
140. <https://www.caymanchem.com/msdss/21926m.pdf>. (Accessed 15.08.2017)
141. <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB15036>. (Accessed 15.08.2017)
142. Egan TD “The clinical pharmacology of remifentanil”. *J Anesth.* **12**:195-204
143. Mathia F, Marchalin S, Vegh D, Bobosikova D, Halinkovicova M (2012). “Laboratory and industrial synthesis of remifentanil”. Institute of Organic Chemistry. Catalysis and Petrochemistry. Faculty of Chemical and Food Technology. Slovak University of Technology.
144. European Patent Application EP0383579 A1. Application number: 90301586.5. Date of filing: 14.02.1990. Example 10. pg.23. lines 20-40.
145. Patel SS, Spencer CM (1996) “Remifentanil”. *Drugs.* **52**:417-427
146. Weale NK, Rogers CA, Cooper R, Nolan J, Wolf AR (2004) “Effect of remifentanil infusion rate on stress response to the pre-bypass phase of paediatric cardiac surgery”. *Br J Anaesth.* **92**:187–194
147. Egan TD (1995) “Remifentanil pharmacokinetics and pharmacodynamics. A priliminary appraisal”. *Clin Pharmacokinet.* **29**:80-94
148. Feldman PL, James MK, Brackmeen MF, Bilotta JM, Schuster SV, Lahey AP, Lutz MW, Johnson MR, Leighton HJ (1991) “Design synthesis and pharmacological evaluation of ultrashort- to long-acting opioid analgetics”. *J Med Chem.* **34**:2202–2208

149. Hoke JF, Cunningham F, James MK, Muir KT, Hoffman WE (1997) “Comparative Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Remifentanil, Its Principle Metabolite (GR90291) and Alfentanil in Dogs”. *JPET*. **281**:226-281
150. Patel SS, Spenser CM (1996) “Remifentanil”. *Drugs*. **52**:417-427
151. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00899>. (Accessed 15.08.2017)
152. James MK (1994) “Remifentanil and anesthesia for the future”. *Exp Opin Invest Drugs* **3**:331–340
153. <https://www.drugs.com/ppa/remifentanil.html>. (Accessed 15.08.2017)
154. <https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?setid=dbc63b6e-f8c5-4fd0-8ec3-4f5e19125313>. (Accessed 15.08.2017)
155. Selinger K, Nation RL, Smith A (1995) “Enzymatic and chemical hydrolysis of remifentanil”. *Anesthesiology* **83**:A385
156. Glass PSA, Hardman O, Kamiyama Y (1993) “Preliminary pharmacokinetics and pharmacodynamics of an ultra-short -acting opioid: remifentanil (GI87084B)”. *Anesth Analg*. **77**:1031-40
157. James MK, Feldman PL, Schuster SV(1991) “Opioid receptor activity of GI 87084B, a novel ultra-short acting analgesic, in isolated tissues”. *J Pharmacol Exp Ther*. **259**:712-8
158. Amin HM, Sopchak AM, Esposito BF (1995) “Naloxone-induced and spontaneous reversal of depressed ventilatory responses to hypoxia during and after continuous infusion of remifentanil or alfentanil”. *J Pharmacol Exp Ther*. **274**: 34-9
159. Egan TO, Minto CF, Hermann OJ (1996) “Remifentanil versus alfentanil: comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics in healthy adult male volunteers”. *Anesthesiology*. **84**: 821-33
160. Kapila A, Glass PSA, Jacobs JR (1995) “Measured context-sensitive half-times of remifentanil and alfentanil”. *Anesthesiology*. **83**: 968-75
161. Camu F, Sneyd JR, Holgersen O. “An open, randomised comparison of remifentanil and fentanyl in patients during major abdominal surgery”. *Proceedings of the 11<sup>th</sup> World Congress of Anaesthesiologists; 1996 Apr 14-20; Sydney, Australia*, 397
162. <http://www.ultima.com/>. (Accessed 20.08.2017)
163. Vuyk J, Mertens M J, Olofsen E, Burro AG, Bovilt JG (1997) “Propofol anesthesia and rational opioid selection: determination of optimal EC50-EC95 propofol-opioid concentrations that assure adequate anesthesia and a rapid return of consciousness”. *Anesthesiology*. **87**:1549-1562

164. Schuttler J, Albrecht S, Breivik H, Osnes S, Prys Roberts C, Holder K, Chauvin M, Viby Mogensen J, Mogensen T, Gustafson I, Lof L, Noronha D, Kirkham AJ (1997) "A comparison of remifentanil and alfentanil in patients undergoing major abdominal surgery". *Anaesthesia* **52**:307-317
165. Cartwright DP, Kvalsvik O, Cassuto J, Jansen JP, Wall C, Remy B, Knape JT, Noronha D, Upadhyaya BK (1997) "A randomized, blind comparison of remifentanil and alfentanil during anesthesia for outpatient surgery". *Anesth Analg.* **85**:1014-1019
166. Kovac AL, Azad SS, Steer P, Witkowski T, Batenhorst R, McNeal S (1997) "Remifentanil versus alfentanil in a balanced anesthetic technique for total abdominal hysterectomy". *J Clin Anesth.* **9**:532-541
167. Stevens JB, Wheatley L (1998) "Tracheal intubation in ambulatory surgery patients: using remifentanil and propofol without muscle relaxants". *Anesth Analg.* **86**:45-49
168. Munday IT, Ward PM, Sorooshian S, Stafford MA, Jones RM, Hull CJ, Shaikh S (1995) "Interaction between remifentanil and isoflurane in spontaneously breathing patients during ambulatory surgery". *Anesthesiology.* **83**:A23
169. Jhaveri R, Joshi P, Batenhorst R, Baughman V, Glass PS (1997) "Dose comparison of remifentanil and alfentanil for loss of consciousness". *Anesthesiology.* **87**:253-259
170. Lynn AM (1996) "Remifentanil: the pediatric anaesthetist's opiate?". *Paediatr Anaesth.* **6**:433-435
171. Kan RE, Hughes SC, Rosen MA, Kessin C, Preston PG, Lobo EP (1998) "Intravenous remifentanil: placental transfer, maternal and neonatal effects". *Anesthesiology.* **88**:1467-1474
172. Brada SA, Egan TD, Viscomi CM (1998) "The use of remifentanil infusion to facilitate epidural catheter placement in a parturient: a case report with pharmacokinetic simulations". *Int J Obstet Anesth.* **7**:124-127
173. Bowdle TA, Ready LB, Kharasch ED, Nichols WW, Cox K (1997) "Transition to post-operative epidural or patient-controlled intravenous analgesia following total intravenous anaesthesia with remifentanil and propofol for abdominal surgery". *Eur J Anaesthesiol.* **14**:374-379
174. Bowdle TA, Camporesi EM, Maysick L, Hogue CW Jr, Miguel RV, Pitts M, Streisand JB (1996) "A multicenter evaluation of remifentanil for early postoperative analgesia". *Anesth Analg.* **83**:1292-1297
175. Gesztesz Z, Mootz BL, White PF (1999) "The use of a remifentanil infusion for hemodynamic control during intracranial surgery". *Anesth Analg.* **89**:1282-1287

- 176.** Grottke O, Dietrich PJ, Wiegels S, Wappler F (2004) “Intraoperative wake-up test and postoperative emergence in patients undergoing spinal surgery: a comparison of intravenous and inhaled anesthetic techniques using short-acting anesthetics”. *Anesth Analg.* **99**:1521-1527
- 177.** Knapik M, Knapik P, Nadziakiewicz P, Misiólek H, Saucha W, Walaszczyk M, Dyaczyńska-Herman A (2006) “Comparison of remifentanyl or fentanyl administration during isoflurane anesthesia for coronary artery bypass surgery”. *Med Sci Monit.* **12**:P133-P138
- 178.** De Baerdemaeker LEC, Jacobs S, Pattyn P, Mortier EP, Struys MMRF (2007) “Influence of intraoperative opioid on postoperative pain and pulmonary function after laparoscopic gastric banding: remifentanyl TCI vs sufentanyl TCI in morbid obesity”. *Br J Anaesth.* **99**:404-411
- 179.** Guy J, Hindman BJ, Baker KZ, Borel CO, Maktabi M, Ostapkovich N, Kirchner J, Todd MM, Fogarty-Mack P, Yancy V, Sokoll MD, McAllister A, Roland C, Young WL, Warner DS (1997) “Comparison of remifentanyl and fentanyl in patients undergoing craniotomy for supratentorial space-occupying lesions”. *Anesthesiology.* **86**:514-524
- 180.** World Health Organization (WHO) (2016) “Butyrfentanyl. Critical Review Report”.  
[http://www.who.int/medicines/access/controlled-substances/4.2\\_Butyrfentanyl\\_CritReview.pdf?ua=1](http://www.who.int/medicines/access/controlled-substances/4.2_Butyrfentanyl_CritReview.pdf?ua=1) (Accessed 25.07.2017)
- 181.** Pubchem (2017) “Butyrfentanyl”.  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/621174#section=3D-Conformer> (Accessed 25.07.2017)
- 182.** CaymanChem (2014) “Butyrfentanyl (hydrochloride), Safety data sheet, Revision:03/12/2014”.  
<https://www.caymanchem.com/msdss/14728m.pdf> (Accessed 25.07.2017)
- 183.** RCWATCH (2015) “Summary of RC opioids – W-15, W-18, MT-45, AH-7921, U-47700, Butyr-fentanyl, Acetyl-fentanyl, Parafluorobutyrfentanyl”.  
<https://rcwatch.wordpress.com/2015/02/02/summary-of-rc-opioids-w-15-w-18-mt-45-ah-7921-u-47700-butyr-fentanyl-acetyl-fentanyl-parafluorobutyrfentanyl/> (Accessed 25.07.2017)
- 184.** World Health Organization (WHO) (2015) “Acetylfentanyl. Critical review report”. Agenda item 5.2. Expert Committee on Drug Dependence 37th Meeting. Geneva 16–20 November 2015.  
<http://www.who.int/medicines/access/controlled-substances/ecdd/en/>. (Accessed 10.03.2017).
- 185.** U.S. Department of Justice. Drug Enforcement Administration (DEA). Office of Diversion Control Drug & Chemical Evaluation Section (2015). “Acetyl fentanyl (N-(1-



phenethylpiperidin-4-yl)-N-phenylacetamide)". Drug Enforcement Administration OoDC, Drug & Chemical Evaluation Section, Arlington

- 186.** Wikipedia (2015). "Acetylfentanyl".  
<http://en.wikipedia.org/wiki/Acetylfentanyl>. (Accessed 10.03.2017).
- 187.** Forendex (2015).  
<http://forendex.southernforensic.org/index.php/detail/index/1250>. (Accessed 10.03.2017).
- 188.** Drug Enforcement Administration (DEA) (2013) "Acetyl Fentanyl. Latest Revision: 12/16/2013". SWGDRUG.org/monographs.html. (Accessed 10.03.2017).
- 189.** Blanckaert P (2015) "Ocfentanil. Fact sheet". <https://www.me-assist.com/wp-content/uploads/2015/09/Fact-Sheet-Ocfentanil.pdf>. (Accessed 20.04.2017)
- 190.** Petrov RR (2007) "Part I. Application of 2-hydroxymethylacrylic acid, a product of baylis-hillman reaction, for the synthesis of novel N-backbone-to-side-chain cyclic peptide analogs: strategies and side reactions part II. Synthesis and biological activities of chimeric bioactive peptides featuring amino acids coupled to 4-anilino-N-phenethyl-piperidine". The University of Arizona. Department of Chemistry.  
<http://search.proquest.com/openview/43d04debe7ef79bd76dda645e6553f46/1?pq-origsite=gscholar&cbl=18750&diss=y>. (Accessed 30.12.2016)
- 191.** Pubchem (2016) "Ocfentanil".  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ocfentanil#section=Top>. (Accessed 24.10.2016)
- 192.** Cayman Chemical (2016) "Ocfentanil (hydrochloride), Safety data sheet, revision: 02/09/2016". <https://www.caymanchem.com/msdss/18583m.pdf>. (Accessed 20.05.2017)
- 193.** Wikipedia (2016) "Ocfentanil". <https://en.wikipedia.org/wiki/Ocfentanil>. (Accessed 24.10.2016)
- 194.** Huang BS, Terrell RC, Deutsche KH, Kudzma LV, Lalinde NL (1986) "N-Aryl-N-(4-piperidinyl) amides and pharmaceutical compositions and method employing such compounds". Patent US4584303, Part of U.S. application Ser. No. 598,769 filed Apr. 9, 1984
- 195.** Flecher JE, Sebel PS, Murphy MR, Mick SA, Fein S (1991) "Comparison of ocfentanil and fentanyl as supplements to general anesthesia". *Anesth Analg* 73: 622-626
- 196.** Wikipedia (2016) "Furanylfentanyl". <https://en.wikipedia.org/wiki/Furanylfentanyl>. (Accessed 02.11.2016)

- 197.** Pubchem (2016) “Furanylfentanil”.  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/13653606#section=Top>. (Accessed 02.11.2016)
- 198.** Cayman Chemical (2016) “Furanylfentanyl (hydrochloride), Safety data sheet, revision: 02/09/2016”. <https://www.caymanchem.com/msdss/18705m.pdf>. (Accessed 02.11.2016)
- 199.** Media.graytvinc.com (2017) “Furanyl fentanyl parent letter”.  
<http://media.graytvinc.com/documents/Furanyl+Fentanyl+Parent+Letter.pdf>. (Accessed 02.11.2016)
- 200.** <http://www.swgdrug.org/Monographs/furanyl%20fentanyl.pdf>
- 201.** Janssen PAJ (1965) “1-Aralkyl-4-(N-aryl-carbonyl amino) piperidines and related compounds”. Patent US3164600, Part of US application Ser. No. 144,059 filed Oct. 10, 1961.
- 202.** Erowid (2017) “Synthesis of fentanyl by Siegfried”.  
<https://erowid.org/archive/rhodium/chemistry/fentanyl.html>. (Accessed 20.07.2017)
- 203.** Garg A, Solas DW, Takahashi LH, Cassella JV (2010). “Forced degradation of fentanyl: identification and analysis of impurities and degradants”. *J Pharm Biomed Anal.* **53**:352–354
- 204.** Soine WH (1986). “Clandestine drug synthesis”. *Med Res Rev.* **6**:41–74.  
<https://www.erowid.org/archive/rhodium/chemistry/ clandestine.drug.synthesis.html>. (Accessed 10.03.2017)
- 205.** Valdez CA, Leif RN, Mayer BP (2014). “An efficient, optimized synthesis of fentanyl and related analogs”. *PLoS ONE* 9:e108250.
- 206.** Janssen PAJ (1964) “N-(1-aralkyl-4piperidyl)alkanoic acid anilides”. N. V. Research Laboratorium, Dr. C. Janssen. FRM 2430.
- 207.** European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA) (2015). “Fentanyl drug Profile”. <http://www.emcdda.eu/publications/drug-profiles/fentanyl-headersection>. (Accessed 10.03.2017)
- 208.** Bäckberg M, Beck O, Jönsson KH, Helander A (2015) “Opioid intoxications involving butyrfentanyl, 4-fluorobutyrfentanyl, and fentanyl from the Swedish STRIDA project”. *Clin Toxicol.* **53**:609-617
- 209.** Staeheli SN, Baumgartner MR, Gauthier S, Gascho D, Jarmer J, Kraemer T, Steuer AE (2016) “Time-Dependent post-mortem redistribution of butyrfentanyl and its metabolites in blood and alternative matrices in a case of butyrfentanyl intoxication”. *Forensic Sci Int.* **266**:170-177

- 210.** Bluelight (2012) “The Big and Dandy Fentanyl Thread-Acetylfentanyl/Butyrfentanyl” . <http://www.bluelight.org/vb/threads/615138-The-Big-and-Dandy-Fentanyl-Analogues%20-Thread-Acetylfentanyl-Btyrfentanyl> (Accessed 20.07.2017)
- 211.** Drugs-Forum (2012) “Butyr-fentanyl Drug Info”. <https://drugs-forum.com/threads/butyrfentanyl-drug-info.183677/> (Accessed 20.07.2017)
- 212.** Drugs-Forum (2012) “Butyr-fentanyl Drug Info (page\_2)”. <https://drugs-forum.com/threads/butyrfentanyl-drug-info.183677/page-2> (Accessed 20.07.2017)
- 213.** Flashback (2012) “BUTYR FENTANYL N-(1-(2-phenylethyl)-4-piperidinyl)-N-phenylbutyranamide NY RC BILLIG”. <https://www.flashback.org/t1961523> (Accessed 20.07.2017)
- 214.** Drug Enforcement Administration (DEA) Department of Justice (2016) “Schedules of Controlled Substances: Temporary Placement of Butyryl Fentanyl and Beta-Hydroxythiofentanyl Into Schedule I”. Fed Regist **81**:15485–15489
- 215.** Jorge R (2015) “Deaths in Europe associated with acetylfentanyl”. EU Early Warning System Alert, EMCDDA. [https://ednd.emcdda.europa.eu/html.cfm/index7246EN.html?LayoutFormat=print&ALE\\_ID=133](https://ednd.emcdda.europa.eu/html.cfm/index7246EN.html?LayoutFormat=print&ALE_ID=133). (Accessed 10.03.2017).
- 216.** Evans-Brown M (2015). “Subject: 2 deaths associated with acetyl fentanyl in the United Kingdom”. EU Early Warning System Alert. EMCDDA. Lisbon.
- 217.** Melent’ev AB, Kataev SS, Dvorshaya ON (2015). “Identification and analytical properties of acetyl fentanyl metabolites”. J Anal Chem. **70**:240–248
- 218.** Coopman V, Cordonnier J, De Leeuw M, Cirimele V (2016) “Ocfentanyl overdose fatality in the recreational drug scene”. Forensic Sci Int. 266:469-473
- 219.** Dussy FE, Hangartner S, Hamberg C, Berchtold C, Scherer U, Schlotterbeck G, Wyler D, Briellmann TA (2016) “An acute Ocfentanyl Fatality: A case Report with Postmortem Concentrations”. J Anal Toxicol. 40: 761-766
- 220.** Wedinos Quarterly Newsletter (2015) “Synthetic opioids. PHILTRE Bull 6: 3”. [http://www.wedinos.org/resources/downloads/Philtre\\_Issue\\_6.pdf](http://www.wedinos.org/resources/downloads/Philtre_Issue_6.pdf). (Accessed 09.11.2016)
- 221.** Reddit (2016) “GC-MS Marquis mecke mandelin froehde liebermann gallic acid”. [https://www.reddit.com/r/DNMAvengers/comments/3bp1kv/frenchconnection\\_nucleus\\_1g\\_heroin\\_4\\_gcms\\_marquis](https://www.reddit.com/r/DNMAvengers/comments/3bp1kv/frenchconnection_nucleus_1g_heroin_4_gcms_marquis). (Accessed 10.11.2015)

- 222.** McCarthy J (2015) “Deadly fake heroin drug ofentanal is on sale on Wales’ streets”. <http://www.walesonline.co.uk/news/wales-news/deadly-fake-heroin-drug-ocfentanal-10398564>. (Accessed 21.04.2017)
- 223.** Drug Enforcement Administration (DEA) Department of Justice (2016) “Schedules of controlled substances: temporary placement of furanyl fentanyl into schedule I”. Fed Regist **81**:66224–66227
- 224.** Mohr ALA, Friscia M, Papsun D, Kacinko SL, Buzby D, Logan BK (2016) “Analysis of novel synthetic opioids U-47700, U-50488 and furanyl fentanyl by LC–MS/MS in postmortem casework”. J Anal Toxicol. **40**:709–717
- 225.** Klar SA, Brodtkin E, Gibson E, Padhi S, Predy C, Green C, Lee V (2016) “Furanyl-fentanyl overdose events caused by smoking contaminated crack cocaine—British Columbia”. Canada, July 15–18, 2016. Health Promot Chronic Dis Prev Can. **36**:200–201
- 226.** Drug Enforcement Administration (DEA) (2016) (U) “Fentanyl: a complex and expanding threat in the United States”. DEA-DCT-BUL-016-17, October 2016. <http://mddre.maryland.gov/wp-content/uploads/sites/17/2016/12/Bulletin-Fentanyl-A-Complex-Expanding-Threat-in-the-US-1.pdf>. (Accessed 07.04.2017)
- 227.** Drugs-Forum (2016) “Creating a fu-F (fent analog) nasal spray”. <https://drugs-forum.com/threads/creating-a-fu-f-fent-analognasal-spray.281744/>. (Accessed 07.04.2017)
- 228.** Amistadi B (2016) “Furanyl fentanyl used by West Fargo students”. <http://mixfargo.com/news/articles/2016/may/06/furanyl-fentanylused-by-some-west-fargo-students-130pm-news-conf-planned/>. (Accessed 07.04.2017)
- 229.** Bluelight (2016) “Furanyl-fentanyl guide question for newbie”. <http://www.bluelight.org/vb/threads/794713-Furanyl-fentanylguide-question-for-newbie>. (Accessed 07.04.2017)
- 230.** Reddit (2016) “furanylfentanyl differences: water soluble or alcohol?”. [https://www.reddit.com/r/researchchemicals/comments/4jsb3o/furanylfentanyl\\_differences\\_water\\_solsolu\\_or/](https://www.reddit.com/r/researchchemicals/comments/4jsb3o/furanylfentanyl_differences_water_solsolu_or/). (Accessed 07.04.2017)
- 231.** Bluelight (2016) “Furanyl-fentanyl powder-what to do”. <http://www.bluelight.org/vb/threads/797325-Furanyl-fentanyl-powderwhat-to-do>. (Accessed 07.04.2017)

- 232.** Plant Feed Shop (2016) “Furanylfentanyl new opioid, similar to morphine”. <http://www.plantfeedshop.com/blog/furanylfentanylnew-opioid-similar-to-morphine/>. (Accessed 07.04.2017)
- 233.** Steuer AE, Williner E, Staeheli S, Kraemer T (2016) “Studies on the metabolism of the fentanyl-derived designer drug butyrfentanyl in human in vitro liver preparations and authentic human samples using liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (LC-HRMS)”. *Drug Test Anal.* **9**:1085-1092
- 234.** Patton AL, Seely KA, Pulla S, Rusch NJ, Moran CL, Fantegrossi WE, Knight LD, Marraffa JM, Kennedy PD, James LP, Endres GW, Moran JH (2014). “Quantitative measurement of acetyl fentanyl and acetyl norfentafyl in human urine by LC–MS/MS”. *Anal Chem.* **86**:1760–1766
- 235.** Goggin MM, Nguyen A, Janis GC (2017) “Identification of unique metabolites of the designer opioid furanyl fentanyl”. *J Anal Toxicol.* **41**:367–375
- 236.** Watanabe S, Vikingsson S, Roman M, Green H, Kronstrand R, Wohlfarth A (2017) “In vitro and in vivo metabolite identification studies for the new synthetic opioids acetylfentanyl, acrylfentanyl, furanylfentanyl, and 4-fluoro-isobutyrylfentanyl”. *AAPS J.* doi:10.1208/s12248-017-0070-z
- 237.** Higashikawa Y, Suzuki S (2008) “Studies on 1-(2-phenethyl)-4-(N-propionylanilino)piperidine (fentanyl) and its related compounds. VI. Structure-analgesic activity relationship for fentanyl, methyl-substituted fentanyls and other analogues”. *Forensic Toxicol.* **26**:1-5
- 238.** Woods J, Medzihradsky F, Smith C, Winger G, Gmerek D (1987) “Evaluation of new compounds for opioid activity: 1987 Annual report”. *Problems of drug dependence, 1987:Proceedings of the 49<sup>th</sup> annual scientific meeting, The Committee on Problems on Drugs Dependence, Inc., National Institute on Drug Abuse, 543-590*
- 239.** Drug Enforcement Administration (2016) “Butyryl fentanyl and beta-hydroxythiofentanyl: Background information and evaluation of 'three factor analysis' (factors 4, 5 and 6) for temporary scheduling”. Springfield, VA, U.S.A.: Drug and Chemical Evaluation Section, Office of Diversion Control
- 240.** Aceto M, Bowman E, Harris L, May E (1987) “Dependence studies of new compounds in the rhesus monkey, rat, and mouse, 1987”. *Problems of drug dependence, 1987:Proceedings of the 49<sup>th</sup> annual scientific meeting, The Committee on problems on drugs dependence, Inc., National Institute on Drug Abuse, 543-590*
- 241.** Alburges ME (1988) “Radioreceptor assay for analysis of fentanyl and its analogues in biological samples. Thesis”. The University of Utah, Salt Lake City

- 242.** Alburges ME, Hanson GR, Gibb JW, Sakashita CO, Rollins DE (1992) “Fentanyl receptor assay II. Utilization of a radioreceptor assay for the analysis of fentanyl analogs in urine”. *J Anal Toxicol.* **16**:36-41
- 243.** Aceto M, Bowman E, Harris L, May E (1988). “Dependence studies of new compounds in the rhesus monkey, rat, and mouse”. *NIDA Res Monogr.* **81**:485–542
- 244.** Glass P, Camporesi EM, Martel D, Afifi MS (1989) “The analgesic efficacy of A3217”. *Anaesthesiology.* **71**: A321
- 245.** Leslie JB, Hawks SJ (1990) “Hemodynamic observations of ocfentanil (A-3217) in patients with ischemic heart disease”. *Anesth Analg.* **70**:234
- 246.** Ebrahim Z, Shoenwald P, Grimes-Rice M, Damask MC, Khairallah PA (1991) “Multiple dose evaluation of the efficacy of ocfentanil HCl (A-3217) to produce postoperative analgesia”. *Anesth Analg.* **72**:S63-S64
- 247.** Cole JB, Dunbar JF, McIntire SA, Regelman WE, Slusher TM (2015) “Butyrfentanyl overdose resulting in diffuse alveolar hemorrhage”. *Pediatrics.* 135:e740-e743
- 248.** McIntyre IM, Trochta A, Gary RD, Wright J, Mena O (2016) “An acute butyr-fentanyl fatality: A case report with postmortem concentrations”. *J Anal Toxicol.* 40:162-6
- 249.** European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA) “Europol 2014: annual report on the implementation of council decision 2005/387/JHA”. ISSN 1977-7841. doi: 10.2810/112317
- 250.** Bagley JR, Wynn RL, Rudo FG, Doorley BM, Spenser HK, Spaulding T (1989) “New 4-(heteroanilido)piperidines, structurally related to the pure opioid agonist fentanyl, with agonist and/or antagonist properties” . *J Med Chem.* **32**:663–671
- 251.** Centers for Disease and Control and Prevention (CDC) Health Advisory (2013). “Emergency preparedness and response. Recommendations for laboratory testing for acetyl fentanyl and patient evaluation and treatment for overdose with synthetic opioid”. <http://emergency.cdc.gov/han/han00350.asp>. (Accessed 10.03.2017).
- 252.** Bagley RJ, Kudzma LV, Lalinde NL, Colapret JA, Huang BS, Lin BS, Jerussi TP, Benvenga MJ, Doorley BM, Ossipov MH, Spaulding TC, Spencer HK (1991) “Evolution of the 4-Anilidopiperidine class of opioid analgesics” . *Med Res Rev.* **11**:403-436
- 253.** World Health Organization (WHO) (2016) “Substances under surveillance, section 1: New psychoactive substances”. <http://www.who.int/medicines/access/controlled-substances/substancesundersurveillance.pdf?ua=1>. (Accessed 25.05.2017)

- 254.** Wedinos (2014-2015) “PHILTRE: annual report 2014-2015”.  
[http://www.wedinos.org/resources/downloads/WN\\_Annual\\_Report\\_1415\\_final.pdf](http://www.wedinos.org/resources/downloads/WN_Annual_Report_1415_final.pdf). (Accessed 24.05.2017)
- 255.** TripSit, Factsheets Beta (2016) “Furanylfentanyl”. <http://drugs.tripsit.me/furanylfentanyl>.  
 (Accessed 20.12.2016)
- 256.** Erowid (2016) “Extinguishing the light within furanylfentanyl”.  
<https://erowid.org/experiences/exp.php?ID=109044>. (Accessed 15.11.2016)
- 257.** State of New Hampshire Department of Safety, J.J. Barthelmes, Commissioner (2016) “CLINICAL BULLETIN”.  
<https://www.nh.gov/safety/divisions/fstems/ems/bulletins/documents/bulletin35.pdf>. (Accessed 20.07.2017)
- 258.** World Health Organization (2016) “Butyrfentanyl(Butyrylfentanyl) Critical review report”.  
 Agenda item 4.2, Expert Committee on Drug Dependence, Thirty-eighth Meeting, Geneva, 14-18 November 2016
- 259.** Armstrong D (2016) “Chinese labs modify deadly fentanyl to circumvent ban on sales to US”.  
<https://www.statnews.com/2016/04/26/chinese-sell-modified-fentanyl/>. (Accessed 20.07.2017)
- 260.** WLWT5 (2017) “Fentanyl, designer drugs shipped from China seized in Cincinnati”.  
<http://www.wlwt.com/article/fentanyl-designer-drugs-shipped-from-china-seized-in-cincinnati/9202086>. (Accessed 20.07.2017)
- 261.** DeMio T (2017) “Huge drug shipment intercepted in Cincinnati”.  
<http://www.cincinnati.com/story/news/2017/03/29/huge-drugshipment-intercepted-cincinnati/99771142/>. (Accessed 20.07.2017)
- 262.** Aliens C (2017) “Furanylfentanyl vendor duo arrested in Norway”.  
<https://www.deepdotweb.com/2017/04/11/furanylfentanyl-vendor-duo-arrested-norway/>.  
 (Accessed 20.07.2017)
- 263.** Poklis J, Poklis A, Wolf C, Hathaway C, Arbefeville E, Chrostowski L, Devers K, Hair L, Mainland M, Merves M, Pearson J (2016) “Two fatal intoxications involving butyryl fentanyl”.  
*J Anal Toxicol.* **40**:703-708
- 264.** Erowid (2015). “Acetylfentanyl”.  
<http://www.erowid.org/chemicals/acetylfentanyl/acetylfentanyl.shtml>. (Accessed 10.03.2017).

- 265.** Drug Enforcement Administration (DEA) Department of Justice (2015). “Schedules of controlled substances: temporary placement of acetyl fentanyl into Schedule I”. Fed Regist. **80**:42381–42385
- 266.** Stogner JM (2014). “The potential threat of acetyl fentanyl: legal issues, contaminated heroin, and acetyl fentanyl “disguised” as other opioids”. *Ann Emerg Med.* **64**:637–639
- 267.** Collier R (2013). “Street versions of opioids more potent and dangerous”. *Can Med Assoc J.* **185**:1027
- 268.** European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA) (2013) “Europol 2013: annual report on the implementation of Council Decision 2005/387/JHA”. ISSN 1977-7841. (Accessed 31.05.2017)
- 269.** The Health Foundation Inspiring Improvement (2015) “Guidance on the clinical management of acute and chronic harms of club drugs and novel psychoactive substances”. Novel psychoactive treatment UK network. Neptune.  
<http://neptune-clinical-guidance.co.uk/wp-content/uploads/2015/03/NEPTUNE-Guidance-March-2015.pdf>. (Accessed 31.05.2017)
- 270.** Sustkova M (2015) “Synthetic opioids, (re) emerging problem in Europe and North America”. Department of Pharmacology, Third Faculty of Medicine, Charles University, Czech Republic. *Int J Emerg Ment Health.* **17**: 694-695
- 271.** National Drug Early Warning System (NDEWS) (2015) “NDEWS: special report. Fentanyl and fentanyl analogs”.  
<https://ndews.umd.edu/sites/ndews.umd.edu/files/NDEWSSpecialReportFentanyl112072015.pdf>. (Accessed 24.05.2017)
- 272.** European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA) (2015) “Europol 2015: annual report on the implementation of council decision 2005/387/JHA”. ISSN 1977-7841. (Accessed 31.05.2017)
- 273.** Health Service Executive, Feidhmeannacht na seirbhíse sláinte (2016) “Fentanyl implicated in overdose deaths”. <http://www.hse.ie/eng/services/news/media/pressrel//Fentanyldeaths.html> (Accessed 24.05.2017)
- 274.** Czech Republic Government, JUSTIFICATION, General Part (2016) “Explanation of the need for the draft legislation, justification of its main principles, assessment of the current legal situation, and justification of the need to change it”. IND- 2016 0565 CZ- EN- 20161102 IMPACT



- 275.** European Commission, Growth, Single Market and Standards, Tools and Databases, TRIS, Notification Detail (2015) “Government decree amending annex IV to the government decree on substances, preparations and plants to be classified as narcotics. Two new substances – acetylfentanyl and ocfentanil – will be classified as narcotics”. <http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/tris/en/search/?trisation=search.detail&year=2015&num=361>. (Accessed 12.12.2016)
- 276.** Darknetpages (2016) “Darknet heroes league marketplace bans the sale of fentanyl”. <http://darknetpages.com/darknet-heroes-league-marketplace-bans-the-sale-of-fentanyl/>. (Accessed 28.05.2017)
- 277.** Christie R (2015) “Death in Belgium associated with ocfentanil (N-(2-fluorophenyl)-2-methoxy-N-[1-(2-phenylethyl)-4-piperidyl]acetamide)”. EU Early Warning System alert, European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA)
- 278.** Bluelight (2015) “WARNING DEEP WEB Ocfentanil cutting heroin”. <http://www.bluelight.org/vb/archive/index.php/t-772520.html>. (Accessed 10.11.2015)
- 279.** Allibe N, Eysseric H, Chiron F, Sam-Laï NF, Barret A, Paysant F, Mallaret M (2017) “Ocfentanil, un nouveau produit de synthèse mortel découvert grâce à l’analyse d’une poudre”. *ATA*. doi:10.1016/j.toxac.2017.03.011
- 280.** Rooster (2016) “Darknet MDMA is fire for the same reason AirBnB is cool”. <http://www.therooster.com/blog/darknet-mdma-fire-same-reason-airbnb-cool>. (Accessed 26.05.2017)
- 281.** Helander A, Backberg M, Beck O (2016). “Intoxications involving the fentanyl analogs acetylfentanyl, 4-methoxybutyrfentanyl and furanylfentanyl: results from the Swedish STRIDA project”. *Clin Toxicol.* **28**:1-9
- 282.** North Carolina Health News (2016) “Potent opioid causing overdose deaths in NC”. <http://www.northcarolinahealthnews.org/2016/03/23/potent-opioid-causing-overdose-deaths-in-nc/>. (Accessed 27.12.2016)
- 283.** Hernandez SL (2017) “Connecticut medical examiner warns of dangerous designer drug: furanylfentanyl”. *New Haven Register Health*, January 01, 2017. <http://www.nhregister.com/health/20170101/connecticut-medical-examiner-warns-of-dangerousdesigner-drug-furanyl-fentanyl>. (Accessed 03.01.2017)

- 284.** Sanchick M (2017) “Dangerous substance:10 recent deaths in Milwaukee County attributed to furanyl fentanyl”. <http://fox6now.com/2017/02/16/10-recent-deaths-in-milwaukee-county-attributed-to-furanyl-fentanyl/>. (Accessed 10.04.2017)
- 285.** Will County Illinois (2017) “2016 Accidental overdoses”. Updated 27.2.2017. <http://www.willcountyillinois.com/County-Offices/Judicial-Services/Coroner/2016-Overdose-Statistics>. (Accessed 10.04.2017)
- 286.** Department of Justice, U.S. Attorney’s Office, Northern District of Ohio (2017) “Highland Heights man indicted for selling furanyl fentanyl that resulted in fatal overdose of Cleveland teen”. <https://www.justice.gov/usao-ndoh/pr/highland-heights-man-indicted-selling-furanyl-fentanyl-resulted-fatal-overdose>. (Accessed 14.04.2017)
- 287.** Marrazzo A (2017) “New form of synthetic heroin showing up in Chicago-area deaths”. McHenry County, Chicago Tribune. <http://www.chicagotribune.com/suburbs/mchenry-county/news/ct-heroin-fentanyl-deaths-mchenry-met-20170203-story.html>. (Accessed 23.04.2017)
- 288.** Daily Herald (2016) “Chicago area sees rise in overdose deaths linked to fentanyl”. <http://www.dailyherald.com/article/20160419/news/304199739>. (Accessed 23.04.2017)
- 289.** Cossette MA (2016) Man charged after RCMP seize furanylfentanyl from Orle’ans home. CBC News, Ottawa. <http://www.cbc.ca/news/canada/ottawa/ottawa-arrest-furanylfentanyl-1.3901131>. (Accessed 13.04.2017)
- 290.** Julie A (2016) “Tablets containing furanylfentanyl found on Calgary streets”. News Talk 770, Dec 12, 2016. <http://www.newstalk770.com/2016/12/12/tablets-containing-furanylfentanylfound-on-calgary-streets-police/>. (Accessed 13.04.2017)
- 291.** The Brooklyn District Attorney’s Office (2017) “Thirty-four defendants charged with operating, sprawling narcotics distribution ring that sold furanyl fentanyl, heroin and cocaine”. <http://www.brooklynda.org/2017/03/29/thirty-four-defendants-charged-with-operating-sprawling-narcotics-distribution-ring-that-sold-furanyl-fentanyl-heroin-and-cocaine/>. (Accessed 10.04.2017)
- 292.** Welland Tribune, News Local (2017) “Furanyl-fentanyl powder investigation leads to Welland arrest”. <http://www.wellandtribune.ca/2016/11/29/furanyl-fentanyl-powder-investigation-leads-to-welland-arrest>. (Accessed 13.04.2017)
- 293.** The State of New Jersey, Department of Law and Public Safety, Office of the Attorney General (2017) “Alleged drug dealers indicated on first-degree conspiracy and money laundering

- charges in seizure of furanyl fentanyl and \$ 732,000 cash”.  
<http://www.nj.gov/oag/newsreleases17/pr20170126c.html>. (Accessed 14.04.2017)
- 294.** CNW(2016) “Londonmale charged with importing furanyl-fentanyl”.  
<http://www.newswire.ca/news-releases/london-male-charged-withimporting-furanyl-fentanyl-600410201.html>. (Accessed 14.04.2017)
- 295.** Grand Forks Herald (2017) “Furanyl fentanyl”.  
<http://www.grandforksherald.com/taxonomy/term/331901>. (Accessed 13.04.2017)
- 296.** Hill C (2017) “Furanyl fentanyl drug bust”. <http://www.myndnow.com/news/bismarck-news/furanyl-fentanyl-drug-bust/674392128>. (Accessed 13.04.2017)
- 297.** Banks K (2016) “Synthetic opioid drug furanylfentanyl seized in Darwin for first time”. NT News. <http://www.ntnews.com.au/news/northern-territory/opioid-drug-furanylfentanyl-first-seizurein-darwin-for-first-time/news-story/30373e3d02c7d71a6d5714cc97814220>. (Accessed 13.04.2017)
- 298.** Ruangyuttikarn W, Law MY, Rollins DE, Moody DE (1990) “Detection of fentanyl and its analogs by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”. *J Anal Toxicol.* **14**:160–164
- 299.** Henderson GL, Harkey MR, Jones AD (1990) “Rapid screening of fentanyl (China White) powder samples by Solid-Phase Radioimmunoassay”. *J Anal Toxicol.* **14**:172–175
- 300.** Watts VW, Caplan YH (1990) “Evaluation of the Coat-A-Count 125I fentanyl RIA: comparison of 125I RIA and GC/MS-SIM for quantification of fentanyl in case urine specimens”. *J Anal Toxicol.* **14**:266–272
- 301.** Alburges ME, Hanson GR, Gibb JW, Shakashita CO, Rollins DE (1992) “Fentanyl receptor assay. II. Utilization of a radioreceptor assay for the analysis of fentanyl analogues in urine”. *J Anal Toxicol.* **16**:36–41
- 302.** Dotsikas Y, Loukas LY, Siafaka I (2002) “Determination of umbilical cord and maternal plasma concentrations of fentanyl by using novel spectrophotometric and chemiluminescence enzyme immunoassays”. *Analytica Chimica Acta.* **459**:177–185
- 303.** Käferstein H, Sticht G (2000) “Comparison of nonradioactive microtiter plate enzyme immunoassays for the sensitive detection of fentanyl”. *Forensic Sci Int.* **113**:353–357
- 304.** Baselt, R. (2017) “Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man”. 11th edition, Biomedical Publications, Foster City, CA, 883–886
- 305.** Van Rooy HH, Vermeulen MP, Bovill JG (1981) “The assay of fentanyl and its metabolites in plasma of patients using gas chromatography with alkali flame ionisation detection and gas chromatography-mass spectrometry”. *J Chromatogr.* **223**:85-93

- 306.** Watts V & Caplan Y (1988) “Determination of Fentanyl in Whole Blood at Subnanogram Concentrations by Dual Capillary Column Gas Chromatography with Nitrogen Sensitive Detectors and Gas Chromatography/Mass Spectrometry”. *J Anal Toxicol.* **12**:246-254
- 307.** Kintz P, Mangin P, Lugnier AA, Chaumont AJ (1989) “Simultaneous determination of fentanyl and its major metabolites and fentanyl analogues using gas chromatography and nitrogen-selective detection”. *J Chromatogr.* **489**:459-461
- 308.** Watts VW, Caplan YH (1990) “Evaluation of the Coat-A-Count 125I fentanyl RIA: comparison of 125I RIA and GC/MS-SIM for quantification of fentanyl in case urine specimens”. *J Anal Toxicol.* **14**:266–272
- 309.** Smialek JE, Levine B, Chin L, Wu SC, Jenkins AJ (1994) “A fentanyl epidemic in Maryland 1992”. *J Forensic Sci.* **39**:159–164
- 310.** Szeitz A, Riggs KW, Harvey-Clark C (1996) “Sensitive and selective assay for fentanyl using gas chromatography with mass selective detection”. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* **675**:33–42
- 311.** Fryirsa B, Woodhouse A, Huang JL, Dawson M, Mather LE (1997) “Determination of subnanogram concentrations of fentanyl in plasma by gas chromatography-mass spectrometry: comparison with standard radioimmunoassay”. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* **688**:79–85
- 312.** Valaer AK, Huber T, Andurkar SV, Clark CR, DeRuiter J (1997) “Development of a gas chromatographic-mass spectrometric drug screening method for the N-dealkylated metabolites of fentanyl, sufentanil, and alfentanil”. *J Chromatogr Sci.* **35**:461-466
- 313.** Dufrense C, FavetTa P, Gonin R, Bureau J, Guitton J (2002) “Simultaneous determination of fentanyl and midazolam in plasma using direct solid-phase microextraction before gas chromatography-mass spectrometry analysis”. *Analytical Letters.* **9**:1575-1590
- 314.** Van Nimmen NFJ, Poels KLC, Veulemans HAF (2004) “Highly sensitive gas chromatographic—mass spectrometric screening method for the determination of picogram levels of fentanyl, sufentanil and alfentanil and their major metabolites in urine of opioid exposed workers”. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* **804**:375–387
- 315.** Gunnard T, Ariniemi K, Lillsunde P (2005) “Validated toxicological determination of 30 drugs of abuse as optimized derivatives in oral fluid by long column fast gas chromatography/electron impact mass spectrometry”. *J Mass Spectrom.* **40**:739-753
- 316.** Moore C, Marinetti L, Coulter C, Crompton K (2008) “Analysis of pain management drugs, specifically fentanyl, in hair: application to forensic specimens”. *Forensic Sci Int.* **176**:47-50

- 317.** Wang C, Li E, Hu G, Wang H, Gong Y, Li I, Liu S, He Y (2009) “Determination of fentanyl in human breath by solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry”. *Microchemical Journal*. **91**:149–152
- 318.** Bagheri H, Es-haghi A, Khalilian F, Rouini MR (2010) “Determination of fentanyl in human plasma by head-space solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry”. *J Pharm Biomed Anal*. **43**:1763-1768
- 319.** Strano-Rossi S, Álvarez I, Tabernero MJ, Cabarcos P, Fernández P, Bermejo AM (2010) “Determination of fentanyl, metabolite and analogs in urine by GC/MS”. *J Appl Toxicol*. **31**:649-654
- 320.** Strano-Rossi S, Bermejo AM, de la Torre X, Botrè F (2011) “Fast GC-MS method for the simultaneous screening of THC-COOH, cocaine, opiates and analogues including buprenorphine and fentanyl, and their metabolites in urine”. *Anal Bioanal Chem*. **399**:1623-1630
- 321.** Saraji M, Boroujeni MK (2011) “Analysis of narcotic drugs in biological samples using hollow fiber liquid–phase microextraction and gas chromatography with nitrogen phosphorus detection”. *Springer*. **174**:159-166
- 322.** Gardner MA, Sampsel S, Jenkins WW, Owens JE (2014) “Analysis of fentanyl in urine by DLLME-GC-MS”. *J Anal Toxicol*. **39**:118-125
- 323.** Grosse CM, Davis IM, Arrendale RF, Jersey J, Amin J (1994) “Determination of remifentanil in human blood by liquid-liquid extraction and capillary GC-HRMS-SIM using a deuterated internal standard”. *J Pharm Biomed Anal*. **12**:195-203
- 324.** Bjorksten AR, Chan C, Crankshaw DP (2002) “Determination of remifentanil in human blood by capillary gas chromatography with nitrogen-selective detection”. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. **775**:97-101
- 325.** Kudo T, Kimura F, Kudo T, Kudo M, Hirota K (2014) “Quantitative measurement of blood remifentanil concentration: development of a new method and clinical application”. *J Anesth*. **27**:615-617
- 326.** Kumar K, Ballantyne JA, Baker AB (1996) “A sensitive assay for simultaneous measurement of alfentanil and fentanyl in plasma”. *J Pharmaceutical Biomedical Analysis*. **14**:667–673
- 327.** Portier EJG, de Blok K, Butter JJ, van Boxtel CJ (1999) “Simultaneous determination of fentanyl and midazolam using high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection”. *J Chromatogr B* . **723**:313–318

- 328.** Koch DE, Isaza R, Carpenter JW, Hunter RP (2004) “Simultaneous extraction and quantitation of fentanyl and norfentanyl from plasma with LC/MS detection”. *J Pharm Biomed Anal.* **34**:577–584
- 329.** Huynh NH, Tyrefors N, Ekman L, Johansson M (2005) “Determination of fentanyl in human plasma and fentanyl and norfentanyl in human urine using LC–MS/MS”. *J Pharm Biomed Anal.* **37**:1095–1100
- 330.** Coopman V, Cordonnier J, Pien K, Van Varenbergh D (2007) “LC-MS/MS analysis of fentanyl and norfentanyl in a fatality due to application of multiple Durogesic transdermal therapeutic systems”. *Forensic Sci Int.* **169**:223-227
- 331.** Takashina Y, Naito T, Mino Y, Kagawa Y, Kawakami J (2009) “Validated LC coupled to ESI-MS/MS analysis for fentanyl in human plasma and UV analysis in applied reservoir transdermal patches using a simple and rapid procedure”. *J Clin Pharm Ther.* **34**:523-529
- 332.** Verplaetse R, Tytgat J (2010) “Development and validation of a sensitive ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the analysis of fentanyl and its major metabolite norfentanyl in urine and whole blood in forensic context”. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* **878**:1987-1996
- 333.** Clavijo CF, Thomas JJ, Cromie M, Schniedewind B, Hoffman KL, Christians U, Galinkin JL (2011) “A low blood volume LC-MS/MS assay for the quantification of fentanyl and its major metabolites norfentanyl and despropionyl fentanyl in children”. *J Sep Sci.* **34**:3568-3577
- 334.** Ghassabian S, Moosavi SM, Valero YG, Shekar K, Fraser JF, Smith MT (2012) “High-throughput assay for simultaneous quantification of the plasma concentrations of morphine, fentanyl, midazolam and their major metabolites using automated SPE coupled to LC-MS/MS”. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* **903**:126-133
- 335.** Bista SR, Lobb M, Haywood A, Hardy J, Tapuni A, Norris R (2014) “Development, validation and application of an HPLC-MS/MS method for the determination of fentanyl and nor-fentanyl in human plasma and saliva”. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* **960**:27-33
- 336.** Mahlke NS, Ziesenitz V, Mikus G, Skopp G (2014) “Quantitative low-volume assay for simultaneous determination of fentanyl, norfentanyl, and minor metabolites in human plasma and urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)”. *Int J Legal Med.* **128**:771-778
- 337.** Odoardi S, Anzillotti L, Strano-Rossi S (2014) “Simplifying sample pretreatment: application of dried blood spot (DBS) method to blood samples, including postmortem, for UHPLC-MS/MS analysis of drugs of abuse”. *Forensic Sci Int.* **243**:61-67

- 338.** Verplaetse R, Henion J (2015) “Quantitative determination of opioids in whole blood using fully automated dried blood spot desorption coupled to on-line SPE-LC-MS/MS”. *Drug Test Anal.* **8**:30-38
- 339.** Boumba VA, Di Rago M, Peka M, Drummer OH, Gerostamoulos D (2017) “The analysis of 132 novel psychoactive substances in human hair using a single step extraction by tandem LC/MS”. *Forensic Sci Int.* **279**:192-20
- 340.** Bender J, van den Elshout J, Selinger K, Broeders G, Dankers J, van der Heiden C (1999) “Determination of remifentanyl in human heparinised whole blood by tandem mass spectrometry with short-column separation”. *J Pharm Biomed Anal.* **21**:559–567
- 341.** Thevis M, Geyer H, Bahr D, Schänzer W (2005) “Identification of fentanyl, alfentanil, sufentanil, remifentanil and their major metabolites in human urine by liquid chromatography/tandem mass spectrometry for doping control purposes”. *Eur J Mass Spectrom (Chichester).* **11**:419-427
- 342.** Bossù E, Montinaro A, Lecce R, Farina A, Suppa E, Draisci G, Gostoli G (2006) “LC-MS Determination of remifentanil in maternal and neonatal plasma”. *J Pharm Biomed Anal.* **42**:367-371
- 343.** Gergov M, Nokua P, Vuori E, Ojanperä I (2009) “Simultaneous screening and quantification of 25 opioid drugs in post-mortem blood and urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry”. *Forensic Sci Int.* **186**:36-43
- 344.** Cooreman S, Deprez C, Martens F, Van Bocxlaer J, Croes K (2010) “A comprehensive LC-MS-based quantitative analysis of fentanyl-like drugs in plasma and urine”. *J Sep Sci.* **33**:2654-2662
- 345.** Said R, Pohanka A, Andersson M, Beck O, Abdel-Rehim M (2011) “Determination of remifentanil in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry utilizing micro extraction in packed syringe (MEPS) as sample preparation”. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* **879**:815-818
- 346.** Alvarez JC, Abe E, Etting I, Le Guen M, Devillier P, Grassin-Delyle S (2014) “Quantification of remifentanil and propofol in human plasma: a LC-MS/MS assay validated according to the EMA guideline”. *Bioanalysis.* **7**:1675-1684
- 347.** Backberg M, Beck O, Jonsson KH, Helander A (2015) “Opioid intoxications involving butyrfentanyl, 4-fluorofentanyl and fentanyl from Swedish STRIDA project”. *Clin Toxicol.* **53**:609-617

- 348.** Al-Saffar Y, Stephanson NN, Beck O (2013) “Multicomponent LC-MS/MS screening method for detection of new psychoactive drugs, legal highs, in urine-experience from the Swedish population”. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* **930**:112-120
- 349.** Roemmelt AT, Steuer AE, Poetzsch M, Kraemer T (2014) “Liquid chromatography, in combination with a quadrupole time-of-flight instrument (LC QTOF), with sequential window acquisition of all theoretical fragment-ion spectra (SWATH) acquisition: systematic studies on its use for screenings in clinical and forensic toxicology and comparison with information-dependent acquisition (IDA)”. *Anal Chem.* **86**:11742
- 350.** Stogner JM (2015) “Predictions instead of panics: the framework and utility of systematic forecasting of novel psychoactive drug trends”. *Am J Drug Alcohol Abuse.* **41**:519–526
- 351.** Wang B-T, Colby JM, Wu AHB, Lynch KL (2014) “Cross-reactivity of acetyl fentanyl and risperidone with a fentanyl immunoassay”. *J Anal Toxicol.* **38**:672–675
- 352.** Patton AL, Seely KA, Pulla S, Rusch NJ, Moran CL, Fantegrossi WE, Knight LD, Marraffa JM, Kennedy PD, James LP, Endres GW, Moran JH (2014) “Quantitative measurement of acetyl fentanyl and acetyl norfentanyl in human urine by LC-MS/MS”. *Anal Chem.* **86**:1760-1766
- 353.** Poklis J, Poklis A, Wolf C, Mainland M, Hair L, Devers K, Chrostowski L, Arbefeville E, Merves M, Pearson J (2015) “Postmortem tissue distribution of acetyl fentanyl, fentanyl and their respective nor-metabolites analyzed by ultra-high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry”. *Forensic Sci Int.* **257**:435-441
- 354.** Zhang X, Jufer Phipps R, Levine BS, Aronica P, Locke J, Brassel MA, Warren WS, Ripple MG, Fowler DR (2015) “Post-mortem distribution of acetyl fentanyl”. 67<sup>th</sup> Annual Meeting of AAFS, Orlando, Florida, 2015
- 355.** McIntyre IM, Trochta A, Gary RD, Malamatos M, Lucas JR (2015) “An acute acetyl fentanyl fatality; a case report with post-mortem concentrations”. *J Anal Toxicol.* **39**:490-494
- 356.** Hisatsune K, Zaitso K, Yamanaka M, Nakajima J, Moriyasu T, Ishiba A, Hida M, Tsuchihashi H, Ishii A (2015) “Determination of newly encountered designer drugs a-PHP and acetylfentanyl in an acute intoxication case by LC/Q–TOF MS”. 53rd TIAFT Meeting, Firenze 2015
- 357.** Coopman V, Coordonier J (2012) “Counterfeit drugs and pharmaceutical preparations seized from the black market among bodybuilders”. *Ann Toxicol Anal.* **24**:73-80
- 358.** Dussy FE, Hamberg C, Briellmann TA (2006) “Quantification of benzodiazepines in whole blood and serum”. *Int J Legal Med.* **120**:323–330



- 359.** Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, Food and Drug Administration (FDA), 2001.
- 360.** The Fitness for Purpose of Analytical Methods, A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, 2nd edition, EURACHEM Guide, 2014
- 361.** Ευρωπαϊκή Οδηγία 2002/657/EK, σχετικά με την επίδοση των αναλυτικών μεθόδων και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων, 2002.
- 362.** International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, ICH harmonized tripartite guideline, Validation of Analytical procedures Text and methodology Q2(R1), step 4, 2005.