



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

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ  
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ  
**Μ.Δ.Ε.: ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ - ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ**

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΑΡΩΣΗΣ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ  
ΜΙΚΡΟΥ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΒΑΡΟΥΣ ΣΕ ΟΥΡΑ ΑΘΛΗΤΩΝ  
ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ UPLC/Q-TOF-MS**

---

ΓΕΩΡΓΟΠΑΝΟΥ ΕΥΤΥΧΙΑ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ  
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ  
**ΑΘΗΝΑ 2018**

*"Η έγκριση διατριβής ειδίκευσης από το Φαρμακευτικό Τμήμα του Πανεπιστημίου Αθηνών, δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα."*

*(N. 5343/1932, άρθρο 202)*

## ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΠΑΝΤΕΡΗ ΕΙΡΗΝΗ ( ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ) ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΛΟΥΚΑΣ ΙΩΑΝΝΗΣ

ΑΝΑΠΛ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΓΚΙΚΑΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ

ΕΠΙΚ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

*Η παρούσα ερευνητική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Αναλυτικού Ελέγχου Ντόπινγκ του Ολυμπιακού Αθλητικού Κέντρου Αθηνών (Ο.Α.Κ.Α.) σε συνεργασία με το Εργαστήριο Φαρμακευτικής Ανάλυσης, του Τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών κατά την περίοδο 2017-2018. Η ανάθεση του θέματος έγινε από την επιβλέπουσα Καθηγήτρια κ. Ειρήνη Παντερή σε συνεργασία με την τέως Διευθύντρια του Εργαστηρίου Ελέγχου Ντόπινγκ Δρ. Μαρία Τσίβου.*

*Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια κ. Ειρήνη Παντερή για τη δυνατότητα που μου παρείχε να πραγματοποιήσω την εργασία αυτή σε ένα χώρο διεθνώς διακεκριμένο όπως είναι το Εργαστήριο Ελέγχου Ντόπινγκ του Ο.Α.Κ.Α, για την ανάθεση του θέματος, την επίβλεψη και τη συνεργασία που είχαμε καθ' όλη τη διάρκεια της προσπάθειας αυτής. Επιπλέον την ευχαριστώ για τα όσα μου προσέφερε σε όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών μου, αλλά και για τη δυνατότητα που μου έδωσε ώστε να συνεργαστούμε στο συγκεκριμένο μεταπτυχιακό πρόγραμμα.*

*Ευχαριστώ θερμά τα υπόλοιπα μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ιωάννη Λουκά και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Ευάγγελο Γκίκα για το χρόνο που διέθεσαν στην αξιολόγηση της παρούσας εργασίας.*

*Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την τέως Διευθύντρια του Εργαστηρίου Ελέγχου Ντόπινγκ Δρ. Μαρία Τσίβου για τη δυνατότητα που μου έδωσε να εκπονήσω αυτή την εργασία σε έναν διεθνώς διακεκριμένο χώρο όπως το Εργαστήριο Ελέγχου Ντόπινγκ του Ο.Α.Κ.Α.*

*Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα το Δρ. Ιωάννη Αγγελή Διευθυντή του Εργαστηρίου Ελέγχου Ντόπινγκ του Ο.Α.Κ.Α. και επιβλέποντα μου στο εργαστήριο καθ' όλη τη διάρκεια της παραμονής μου σ αυτό για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου, για όλα όσα μου έμαθε, για την μεγάλη υπομονή του κάθε φορά που έδειχνα να αποκλίνω από τον στόχο μου, καθώς και το χρόνο που διέθετε όποτε του το ζητούσα.*

*Ευχαριστώ τη Δρ. Πολυξένη Κιούση και τη Δρ. Αργυρώ Φραγκάκη υπεύθυνες του οργάνου στο Εργαστήριο για όλη τους την βοήθεια κατά την διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο, για όσα μου έμαθαν πάνω στην οργανολογία LC-qTOF/MS και στην εκτίμηση των αποτελεσμάτων αλλά και για το χρόνο που μου διέθεσαν απαντώντας σε όποια απορία είχα.*

*Επιπλέον, ευχαριστώ θερμά όλο το προσωπικό του εργαστηρίου για το φιλικό και ευχάριστο κλίμα συνεργασίας και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν. Ευχαριστώ την κα Στέλλα Λούη και την κα. Φωτεινή Χλαπάνα για την εκπαίδευσή μου στο παρασκευαστικό κομμάτι του εργαστηρίου, την καθημερινή βοήθειά τους αλλά και την καλή τους διάθεση*

*Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Βιολόγο κ. Παναγιώτη Σακελλαρίου για την πολύτιμη βοήθειά και στήριξή του από τις πρώτες μου μέρες στο εργαστήριο μέχρι και την τελευταία.*

*Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά μου την οικογένειά μου για όλη τη στήριξη που μου έδωσαν και που δεν μου αρνήθηκαν ποτέ και τίποτα και που είναι πάντα δίπλα μου και τους φίλους μου για όλη τη στήριξη και βοήθεια που είχα, για την υπομονή τους σε όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών μου και κυρίως για την επιμονή τους κάθε φορά που ήθελα να τα παρατήσω. Χωρίς αυτούς δεν θα ήμουν εδώ αυτή τη στιγμή γιατί οι φίλοι είναι η οικογένεια που διαλέγουμε.*

## Πίνακας περιεχομένων

<b>ΣΚΟΠΟΣ</b> .....	9
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΝΤΟΠΙΝΓΚ - ΦΑΡΜΑΚΟΔΙΕΓΕΡΣΗ</b> .....	10
1.1 ΟΡΙΣΜΟΣ ΝΤΟΠΙΝΓΚ.....	10
1.2. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ.....	12
1.3 ΠΑΓΚΟΣΜΙΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΑΝΤΙΝΤΟΠΙΝΓΚ.....	16
1.4 ΤΕΧΝΙΚΑ ΕΓΓΡΑΦΑ.....	17
1.5 ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΑΠΑΓΟΡΕΥΜΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ.....	20
1.6 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΝΤΟΠΙΝΓΚ.....	28
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ-ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ ΧΡΟΝΟΥ ΠΤΗΣΗΣ</b> .....	31
2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	31
2.2 ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ.....	31
2.2.1 ΕΙΔΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ.....	32
2.2.2 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΗΡΛC .....	33
2.3 ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ .....	36
2.4 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΟΥ ΜΑΖΩΝ .....	37
2.4.1 ΣΥΣΤΗΜΑ ΕΙΣΑΓΩΓΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ.....	37
2.4.2 ΠΗΓΗ ΙΟΝΤΙΣΜΟΥ.....	37
2.4.3 ΑΝΑΛΥΤΗΣ ΜΑΖΩΝ .....	38
2.4.3.1 ΤΕΤΡΑΠΟΛΙΚΟΣ ΑΝΑΛΥΤΗΣ ΜΑΖΩΝ.....	39
2.4.3.2 ΑΝΑΛΥΤΗΣ ΧΡΟΝΟΥ ΠΤΗΣΗΣ.....	40
2.4.3.3 ΑΝΑΚΛΑΣΤΙΚΟ ΚΑΤΟΠΤΡΟ.....	43
2.4.3.4 ΟΡΘΟΓΩΝΙΑ ΕΠΙΤΑΧΥΝΣΗ ΙΟΝΤΩΝ.....	44
2.5 ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ ΙΟΝΤΩΝ.....	45
2.6 ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟΣ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΗΣ.....	46
2.7 ΤΕΧΝΙΚΗ LC/QTOF-MS .....	46
2.8 ΔΙΔΥΜΗ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ.....	48
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΠΕΠΤΙΔΙΑ ΚΑΙ ΝΤΟΠΙΝΓΚ</b> .....	50
3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	50
3.2 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ.....	51
3.2.1 ΑΥΞΗΤΙΚΗ ΟΡΜΟΝΗ.....	51
3.2.1.1 ΕΚΚΡΙΜΑΤΑΓΩΓΟΙ ΑΥΞΗΤΙΚΗΣ ΟΡΜΟΝΗΣ.....	51
3.2.1.2 ΠΕΠΤΙΔΙΑ ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗΣ ΑΥΞΗΤΙΚΗΣ ΟΡΜΟΝΗΣ.....	52
3.2.1.3 GHRP-2.....	54
3.2.1.4 GHRP-3.....	54
3.2.1.5 GHRP-6 FREE ACID.....	54
3.2.1.6 IBUTAMOREN.....	55
3.2.1.7 ANAMORELIN.....	55
3.2.1.8 CAPROMORELIN.....	55
3.2.1.9 AOD – 9604.....	55
3.2.1.10 VASOPRESSIN.....	56
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ</b> .....	58

4.1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ-ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ.....	58
4.2 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΜΕΘΟΔΟΥ.....	59
4.3 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ.....	59
4.4.ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΚΙΝΗΤΗΣ ΦΑΣΗΣ.....	59
4.5 ΔΕΙΓΜΑΤΑ-ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΟΥΣ.....	60
4.6 ΜΙΚΡΟΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ.....	61
4.6.1 ΙΟΝΑΝΤΑΛΛΑΚΤΙΚΑ ΦΥΣΙΓΓΙΑ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ.....	61
4.7 ΑΝΑΛΥΤΙΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ .....	62
4.7.1 ΣΥΣΤΗΜΑ LC/QTOF-MS.....	62
4.7.2 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ.....	63
4.8 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ LC/QTOF-MS.....	64
4.8.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ.....	64
4.8.2 ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ LC/QTOF-MS.....	64
4.8.3 ΡΥΘΜΙΣΗ LC/QTOF-MS.....	65
4.8.4 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΔΙΟΡΘΩΣΗΣ ΜΑΖΑΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ .....	65
4.8.5 ΕΚΠΛΥΣΗ ΣΤΗΛΗΣ ΚΑΙ ΔΙΑΔΡΟΜΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ.....	66
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ LC/QTOF-MS ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ GHRPs.....</b>	<b>67</b>
5.1 ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΟΥ ΜΑΖΩΝ.....	67
5.2 ΕΠΙΛΟΓΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗΣ ΣΤΗΛΗΣ.....	68
5.2.1 ΣΤΗΛΗ ZORBAX C8 50mm.....	69
5.2.2. ΣΤΗΛΗ INFINITY POROSHELL 120 EC-C18.....	70
5.2.3 ΣΤΗΛΗ ZORBAX C18.....	71
5.3 ΔΟΚΙΜΕΣ ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	74
5.3 ΤΕΛΙΚΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ .....	74
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ.....</b>	<b>77</b>
6.1 ΣΧΕΤΙΚΟΣ ΧΡΟΝΟΣ ΑΝΑΣΧΕΣΗΣ.....	77
6.2 ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ.....	78
6.3 ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΠΙΜΟΛΥΣΗΣ.....	83
6.4 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΗΤΡΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΚΑΙ ΑΝΑΚΤΗΣΗ.....	90
6.5 ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΠΑΓΟΡΕΥΜΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ.....	91
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....</b>	<b>92</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>93</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>94</b>

## ΣΚΟΠΟΣ

Στην παρούσα εργασία έγινε ανάπτυξη μεθόδου με την τεχνική UPLC/QTOF-MS μετά από εκχύλιση στερεάς φάσης για την ποιοτική ανίχνευση μικρών πεπτιδίων απελευθέρωσης αυξητικής ορμόνης (GHRPs) σε ούρα αθλητών. Συγκεκριμένα, αξιολογήθηκαν τα ακόλουθα πεπτίδια : GHRP-2, GHRP-3, GHRP-6\_Free Acid, Anamorelin, Capromorelin, Ibutamoren, AOD-9604. Η μέθοδος σάρωσης αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας ως εσωτερικό πρότυπο το πεπτίδιο βασοπρεσσίνη-λυσίνη και το ενδογενές πεπτίδιο βασοπρεσσίνη – αργινίνη.

Η μέθοδος αξιολογήθηκε ως προς τα ακόλουθα αναλυτικά χαρακτηριστικά:

1. το σχετικό χρόνο ανάσχεσης (Relative Retention Time, RRT)
2. την ειδικότητα της αναλυτικής μεθόδου για κάθε ανιχνευόμενη ουσία (Specificity)
3. την ικανότητα προσδιορισμού απαγορευμένων ουσιών (Identification capability) στο 1 ng/mL.
4. την ανθεκτικότητα της μεθόδου (Robustness)
5. τον έλεγχο επιμόλυνσης (Carryover)
6. τις παρεμποδίσεις από το υπόστρωμα (Matrix Interferences)
7. την επίδραση από το υπόστρωμα (Matrix effect)



## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1**

### **ΝΤΟΠΙΝΓΚ – ΦΑΡΜΑΚΟΔΙΕΓΕΡΣΗ**

#### **1.1 ΟΡΙΣΜΟΣ ΝΤΟΠΙΝΓΚ**

Στα ελληνικά δεν υπάρχει όρος που να περιγράφει με ακρίβεια την λέξη doping ωστόσο, ο όρος που είναι ο πλησιέστερος σ αυτή είναι ο όρος φαρμακοδιέγερση. Για λόγους κάλυψης όλων των μορφών ντόπινγκ έχει καθιερωθεί η χρήση του αγγλικού όρου. Στην ιστορία του ντόπινγκ κατά καιρούς υπήρξαν πολλοί ορισμοί . Σήμερα ο Παγκόσμιος Κώδικας Αντιντόπινγκ ( World Anti-doping Code) ορίζει ως ντόπινγκ την εκδήλωση μίας ή περισσότερων παραβάσεων κανόνων αντιντόπινγκ, όπως αυτές ορίζονται στα Άρθρα 2.1 έως 2.10 του Κώδικα. Το Άρθρο 2 του Κώδικα προσδιορίζει τις συνθήκες και ορίζει τι αποτελεί παράβαση των κανόνων αντιντόπινγκ. Όλοι λοιπόν οι εκτενείς αυτοί κανονισμοί αναφέρονται κυρίως στην παρουσία απαγορευμένης ουσίας ή μεταβολιτών αυτής, ή δεικτών σε ένα δείγμα προερχόμενο από το σώμα αθλητή, καθώς και σε άλλες παραβάσεις , όπως η άρνηση του αθλητή να συμμετάσχει σε δειγματοληψία, η κατοχή απαγορευμένων ουσιών κ.α. Ο παραπάνω ορισμός γίνεται ακόμα πιο σαφής λόγω του ότι συνοδεύεται από έναν κατάλογο απαγορευμένων ουσιών και διαδικασιών ( Prohibited List), ο οποίος εκδίδεται από την Παγκόσμια Ομοσπονδία Αντιντόπινγκ (World Anti-Doping Agency, WADA) και αναθεωρείται κάθε χρόνο.

Κάθε περίπτωση ντόπινγκ επισύρει ποινή τόσο για τον αθλητή όσο και για τον προπονητή του. Οι ποινές που επιβάλλονται σε κάθε περίπτωση ποικίλλουν και μπορεί να είναι από απλή προειδοποίηση – επίπληξη μέχρι αποκλεισμό του αθλητή από συμμετοχή σε αγώνες δια παντός και του προπονητή από την επαγγελματική του ιδιότητα.

Όπως είπαμε και νωρίτερα στην ιστορία του ντόπινγκ υπήρξαν πολλοί ορισμοί. Ο πρώτος που υιοθετήθηκε από το Συμβούλιο της Ευρωπαϊκής Επιτροπής για την Εξωσχολική Εκπαίδευση, το 1963, ανέφερε μεταξύ άλλων ότι ντόπινγκ θεωρείται η χορήγηση ή η χρήση από ένα υγιές άτομο οποιουδήποτε παράγοντα ή ουσίας που φυσιολογικά δεν εντοπίζεται στον ανθρώπινο οργανισμό και/ή οποιουδήποτε παράγοντα ή ουσίας όταν χορηγείται σε αντικανονικές επιπρόσθετες ποσότητες και/ή μέσω αντικανονικής οδού και/ή με αντικανονικό τρόπο με σκοπό την τεχνητή και με αθέμιτο τρόπο αύξηση της απόδοσης του ατόμου κατά την διάρκεια του αγώνα.

Σήμερα λοιπόν μετά την ίδρυση της Παγκόσμιας Ομοσπονδίας Αντιντόπινγκ (World Anti-Doping Agency, WADA) το 1999 και σύμφωνα με τον καθιερωμένο

πλέον Παγκόσμιο Κώδικα Αντιντόπινγκ οι παραβάσεις των κανονισμών αντιντόπινγκ είναι οι εξής :

- Η παρουσία Απαγορευμένης ουσίας ή μεταβολιτών ή δεικτών αυτής σε δείγμα αθλητή. Εξαιρούνται οι ουσίες για τις οποίες έχει οριστεί συγκεκριμένο ποσοτικό όριο. Οι αθλητές είναι υπεύθυνοι για οποιαδήποτε απαγορευμένη ουσία ή μεταβολίτες ή δείκτες βρεθεί στα προσωπικά τους δείγματα . Αντιστοίχως, δεν είναι απαραίτητο να υφίσταται πρόθεση, Υπαιτιότητα, αμέλεια ή εσκεμμένη χρήση εκ μέρους του Αθλητή προκειμένου να στοιχειοθετηθεί παράβαση κανόνα αντιντόπινγκ ενώ υπάρχουν συγκεκριμένα κριτήρια με τα οποία γίνεται η εκτίμηση των ουσιών που είναι δυνατόν να παραχθούν ενδογενώς.
- Η χρήση ή απόπειρα χρήσης απαγορευμένης ουσίας ή απαγορευμένης μεθόδου από αθλητή η οποία, στοιχειοθετείται από άλλα αξιόπιστα μέσα, όπως η παραδοχή εκ μέρους του αθλητή, μαρτυρικές καταθέσεις, έγγραφα αποδεικτικά στοιχεία, συμπεράσματα από μακροχρόνια μελέτη συμπεριφοράς, περιλαμβανομένων και δεδομένων που έχουν συλλεχθεί στα πλαίσια του Βιολογικού Διαβατηρίου του αθλητή ή άλλες αναλυτικές πληροφορίες που διαφορετικά δεν ικανοποιούν όλες τις απαιτήσεις προκειμένου να στοιχειοθετηθεί παρουσία απαγορευμένης ουσίας .
- Η αποφυγή, άρνηση ή μη υποβολή σε δειγματοληψία χωρίς επαρκή αιτιολόγηση μετά από ειδοποίηση , όπως προβλέπεται στους ισχύοντες κανόνες αντιντόπινγκ.
- Η παραβίαση των ισχυόντων κανονισμών περί διαθεσιμότητας του αθλητή για έλεγχο εκτός αγώνων, συμπεριλαμβανομένων της αποτυχίας υποβολής απαιτούμενων πληροφοριών διαμονής, όπως αυτές ορίζονται από το Διεθνές Πρότυπο Ελέγχων και Ερευνών, και της μη εμφάνισης του αθλητή για έλεγχο. Οποιοσδήποτε συνδυασμός τριών άκαρπων ελέγχων και/ή ανεπαρκών υποβολών πληροφοριών εντοπισμού, όπως αυτές ορίζονται στο Διεθνές Πρότυπο Ελέγχων και Ερευνών, εντός περιόδου δώδεκα μηνών από έναν Αθλητή εγγεγραμμένο στον Κατάλογο Ελεγχόμενων Αθλητών.
- Η παραποίηση ή απόπειρα παραποίησης οποιουδήποτε μέρους του ελέγχου ντόπινγκ και η συμπεριφορά που υπονομεύει τη διαδικασία ελέγχου ντόπινγκ, παραδείγματος χάριν τροποποίηση των αριθμών ταυτοποίησης ενός εντύπου ελέγχου ντόπινγκ κατά την διάρκεια του ελέγχου, την θραύση του δοχείου Β κατά την ανάλυση του Δείγματος Β ή την τροποποίηση ενός δείγματος μέσω προσθήκης ξένης ουσίας.
- Η εντός αγώνα κατοχή από έναν αθλητή ή ένα μέλος του προσωπικού υποστήριξής του, οποιασδήποτε απαγορευμένης ουσίας ή απαγορευμένης μεθόδου ή η εκτός αγώνα κατοχή οποιασδήποτε απαγορευμένης ουσίας ή απαγορευμένης μεθόδου εκτός αν ο αθλητής μπορεί να αποδείξει ότι η κατοχή είναι σύμφωνη με την κατ' εξαίρεση χρήση για θεραπευτικούς σκοπούς (ΕΧΘΣ) που παραχωρείται σύμφωνα με το Άρθρο 4.4 ή δώσει άλλη αποδεκτή δικαιολογία.

- Η διακίνηση ή απόπειρα διακίνησης οποιασδήποτε απαγορευμένης ουσίας ή απαγορευμένης μεθόδου.
- Η εντός αγώνα χορήγηση ή η απόπειρα χορήγησης προς αθλητή οποιασδήποτε απαγορευμένης ουσίας ή απαγορευμένης μεθόδου ή η εκτός αγώνα χορήγηση ή η απόπειρα χορήγησης προς αθλητή οποιασδήποτε απαγορευμένης μεθόδου ή απαγορευμένης ουσίας που απαγορεύεται εκτός αγώνα.
- Η συνδρομή, ενθάρρυνση, βοήθεια, προτροπή, συνωμοσία, συγκάλυψη ή οποιαδήποτε άλλη μορφή εσκεμμένης συνέργειας που περιλαμβάνει παράβαση κανόνα ντόπινγκ.
- Η σύμπραξη από έναν αθλητή ή άλλο πρόσωπο υποκείμενο στη δικαιοδοσία ενός Οργανισμού Αντιντόπινγκ υπό την επαγγελματική ή αθλητική του ιδιότητα με οποιοδήποτε μέλος προσωπικού υποστήριξης του αθλητή. Οι αθλητές και άλλα πρόσωπα δεν πρέπει να συνεργάζονται με προπονητές, ιατρούς ή άλλο προσωπικό υποστήριξης αθλητών που τελούν υπό αποκλεισμό λόγω παράβασης κανονισμού αντιντόπινγκ ή που έχουν καταδικαστεί ποινικά ή τους έχει επιβληθεί ποινή σε επαγγελματικό επίπεδο σχετικά με το ντόπινγκ.

## 1.2 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Το ντόπινγκ σίγουρα δεν είναι ένας σύγχρονος όρος. Σύμφωνα με αρχαίες πηγές που αναφέρονται στη Νορβηγική Μυθολογία, η χρήση ουσιών για την αύξηση της δύναμης ήταν ήδη γνωστή μεταξύ των Berserkers. Αναφέρεται ότι λάμβαναν Bufotenin, που θεωρείται ότι βελτιώνει τη φυσική απόδοση και δύναμη. Το Bufotenin προέρχεται από το δέρμα ενός είδους βατράχων καθώς και από ταμανιτάρια Amanita.

Στην Αρχαία Ελλάδα, ειδικοί περιγράφεται να προσφέρουν στους αθλητές διατροφικά συστατικά προκειμένου να βελτιώσουν τη φυσική τους απόδοση και αυτό θεωρούνταν απολύτως απαραίτητο. Επιπλέον, αναφέρεται πως οι αθλητές προσπαθούσαν να αυξήσουν τη φυσική τους δύναμη καταναλώνοντας διαφόρων ειδών κρέας ή ζωμό αίματος πριν από τους αγώνες. Κατά τη διάρκεια των Ολυμπιακών Αγώνων τον Τρίτο Αιώνα π. Χ. οι αθλητές προσπαθούσαν να αυξήσουν την απόδοσή τους χρησιμοποιώντας μανιτάρια. Τον 1ο αιώνα μ. Χ., αναφέρεται επίσης ότι οι Έλληνες δρομείς έπιναν ένα αφέψημα βοτάνων για να αυξήσουν τη δύναμή τους και να είναι ικανοί να αποδώσουν σε αθλήματα μεγάλης διάρκειας. Η χρήση ουσιών έχει επίσης καταγραφεί και στη Ρωμαϊκή ιστορία. Οι αρματοδρομείς έτρεφαν τα άλογά τους με διάφορα μείγματα προκειμένου να τα κάνουν να τρέχουν γρηγορότερα. Περιγράφεται, επίσης, ότι οι μονομάχοι χρησιμοποιούσαν παράγοντες ντόπινγκ για την αύξηση της δύναμης.

Το ντόπινγκ στο σύγχρονο αθλητισμό καταγράφεται αξιόπιστα πλέον από το δεύτερο μισό του 19<sup>ου</sup> αιώνα. Το 1865 εμφανίζεται η πρώτη καταγεγραμμένη

περίπτωση στην κολύμβηση κατά τον αγώνα στο κανάλι του Άμστερνταμ. Το 1867 στους δημοφιλείς αγώνες ποδηλασίας 6 ημερών, οι Γάλλοι αθλητές προτιμούσαν μείγματα με βάση την καφεΐνη, οι Βέλγοι χρησιμοποιούσαν ζάχαρη αναμειγμένη με αιθέρα ενώ άλλοι χρησιμοποιούσαν αλκοολούχα αφεψήματα ή ακόμα και νιτρογλυκερίνη. Το 1896 ωστόσο, έχουμε τον πρώτο καταγεγραμμένο θάνατο από ντόπινγκ. Ο Άγγλος ποδηλάτης A. Linton πεθαίνει, κατά την διάρκεια του αγώνα Παρίσι - Μπορντό λόγω λήψης εφεδρίνης. Το 1904 στο μαραθώνιο του St. Louis, ο T. Hicks, κατέρρευσε αφότου είχε κερδίσει τον αγώνα και οι γιατροί διαπίστωσαν την λήψη στρυχνίνης και κονιάκ πριν από τον αγώνα. Το 1910 έχουμε την πρώτη περίπτωση κατηγορίας ντοπαρισμένων αθλητών αφού ο James Jeffrie ισχυρίστηκε ότι το τσάι του Jack Johnson είχε μολυνθεί / ντοπαριστεί προκειμένου να τον νικήσει. Το 1920 παρασκευάζονται για πρώτη φορά οι αμφεταμίνες. Το 1952 προκαλείται σάλος κατά την διάρκεια των παγοδρομιών του Όσλο λόγω της ανακάλυψης αμπουλών και συρίγγων στα αποδυτήρια αθλητών.

Η δραματική αύξηση χρήσης ουσιών ντόπινγκ ξεκίνησε την δεκαετία του 1960. Η κοινωνία της εποχής πίστευε ότι υπήρχαν φάρμακα που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε απόλυτη επιτυχία. Σημαντικό να αναφερθεί είναι ένα συστηματικό πρόγραμμα χρήσης επικίνδυνων εργογενών ουσιών με την κωδική ονομασία Εθνικό πρόγραμμα 1425 (State Program 1425) που λειτούργησε στην Ανατολική Γερμανία. Το πρόγραμμα αυτό εισήγαγε περίπου 10.000 αθλητές, στις ακαδημίες όπου έκαναν «προπόνηση», στις φαρμακευτικές ουσίες, με σκοπό να βελτιώσουν τις επιδόσεις τους. Όταν διαλύθηκε το κράτος της Ανατολικής Γερμανίας οι αποκαλύψεις ήταν συνταρακτικές. Το 1988, κατά τη διάρκεια των Ολυμπιακών Αγώνων της Σεούλ, ο Καναδός Ben Johnson κατάφερε να γίνει το θετικό και αρνητικό κέντρο της δημοσιότητας, σε διάστημα ολίγων ωρών. Αρχικά κέρδισε την κούρσα των 100 μέτρων και αργότερα, στον έλεγχο ντόπινγκ, αποκαλύφθηκε ότι είχε κάνει χρήση στεροειδών και συγκεκριμένα στανοζολόλης. Το συγκεκριμένο περιστατικό έδωσε πολύ μεγάλη δημοσιότητα στο ντόπινγκ και ανάγκασε τα κράτη και τους αθλητικούς φορείς και οργανισμούς να καταβάλουν μεγαλύτερη και συστηματικότερη προσπάθεια αντιμετώπισής του. Το 1998, ο ποδηλατικός Γύρος της Γαλλίας παραλίγο να διακοπεί όταν οι αστυνομικές/ τελωνιακές αρχές στην πόλη Neuville-en-Ferrain, στα Γάλλο-Βελγικά σύνορα, ανακάλυψαν στα αυτοκίνητα της Γαλλικής Επαγγελματικής Ποδηλατικής ομάδας Festina μεγάλη ποσότητα απαγορευμένων ουσιών (EPO, αυξητική ορμόνη, τεστοστερόνη, κορτικοειδή, αμφεταμίνες κ.α). Η προσαγωγή για ανάκριση του προσωπικού της ομάδας, καθώς και των αθλητών, έστρεψαν όλα τα φώτα της δημοσιότητας σ' αυτό το ιστορικό αθλητικό γεγονός. Οι καταθέσεις του Willy Voet καθώς και του Bruno Rossel , διευθυντή της ομάδας και του ιατρού της ομάδας, Eric Ryckaert έδειξαν στο κοινό ότι το ντόπινγκ των αθλητών ήταν μία πολύ καλά οργανωμένη λειτουργία, από το επιτελείο της ομάδας. Συνολικά, τα γεγονότα αυτά έγιναν η αφορμή για να αποφασίσει η Δ.Ο.Ε. να οργανώσει το 1999, μία Παγκόσμια Συνδιάσκεψη για την αντιμετώπιση του φαινομένου και, στη συνέχεια, να δημιουργήσει τη WADA, η οποία αργότερα ανεξαρτητοποιήθηκε από τη ΔΟΕ.

Δυστυχώς όμως, το ντόπινγκ δεν ανήκει στο παρελθόν αλλά συνεχίζει να εξελίσσεται με νέες ουσίες και νέες τεχνικές και τεχνολογίες και ραγδαίους ρυθμούς αφήνοντας το αντιντόπινγκ πάντα ένα βήμα πιο πίσω. Το ευτύχημα είναι βέβαια ότι τόσο η πρόοδος στις τεχνολογίες του αντιντόπινγκ όσο και η δυνατότητα που δίνεται για επανέλεγχο παλαιών κατεψυγμένων δειγμάτων με τις νέες μεθόδους έχουν σαν αποτέλεσμα την αποκάλυψη μαζικών κρουσμάτων ντόπινγκ τα τελευταία χρόνια. Τα πιο γνωστά και πρόσφατα από αυτά είναι το σκάνδαλο με πρωταγωνιστές αθλητές και αθλήτριες από την Εθνική Ομάδα της Ρωσίας (2016) και η περίπτωση του Κενυάτη χρυσού Ολυμπιονίκη Asbel Kiprop ο οποίος βρέθηκε θετικός σε δειγματοληψία που πραγματοποιήθηκε τον τελευταίο μήνα του 2017.

Σε αυτό το σημείο βέβαια υπάρχει η εύλογη απορία για ποιο λόγο να στραφεί κάποιος στο ντόπινγκ και ποια είναι τα κίνητρα που ωθούν τους αθλητές στην χρήση απαγορευμένων ουσιών. Οι πιο προφανείς από τους λόγους είναι οι εξής :

- Πολλοί υποστηρίζουν ότι η πλήρης επαγγελματοποίηση του αθλητισμού καθιστά αδύνατη την καταπολέμηση του ντόπινγκ, καθώς τα οικονομικά κίνητρα είναι πολύ μεγάλα και λειτουργούν δελεαστικά προς όλους τους αθλητές. Οικονομικά οφέλη, χρηματικά έπαθλα στους αγώνες, υπογραφή συμβολαίων με χορηγούς, κάλυψη οδοιπορικών από αθλητικές ομοσπονδίες, και οδοιπορικά και χρηματικά έπαθλα από κράτη και εθνικές ολυμπιακές επιτροπές είναι ορισμένα μόνο κίνητρα που μπορούν να οδηγήσουν έναν αθλητή στο ντόπινγκ.
- Πέρα από τα οικονομικά οφέλη βέβαια υπάρχει πάντα και το αβέβαιο μέλλον τους και κατ' επέκταση η μετααθλητική τους επαγγελματική αποκατάσταση. Στους αθλητές υπάρχει μια έντονη ανησυχία για το τι θα κάνουν μετά το τέλος της αθλητικής τους καριέρας και αυτό συμβαίνει κυρίως λόγω του ότι αφοσιωμένοι καθώς είναι από μικρή ηλικία στον πρωταθλητισμό έχουν μείνει πίσω σε επίπεδο σπουδών και επαγγελματικής προϋπηρεσίας σε κάποιον άλλο τομέα πέρα του αθλητισμού. Συνεπώς στόχος τους είναι η εξασφάλιση μιας «σίγουρης» εργασίας για όταν αποφασίσουν να αποσυρθούν από τον αθλητισμό.
- Σοβαρό ρόλο παίζει και η προσωπική αμφισβήτηση των αθλητικών τους δυνατοτήτων. Καθώς ο χρόνος που μεσολαβεί μέχρι τους αγώνες μικραίνει και η πρόοδος, δεν είναι η αναμενόμενη, αρχίζουν να αμφισβητούν τις προσωπικές τους δυνατότητες και συνεπώς, θεωρούν ότι χρειάζονται να λάβουν ουσίες για να βελτιωθούν και να πετύχουν το στόχο τους.
- Ο φόβος της αποτυχίας. Ο Βέλγος αθλητής της ορεινής ποδηλασίας Philip Maerthagge ήταν ένα από τα μεγαλύτερα φαβορί για το χρυσό μετάλλιο στους Ολυμπιακούς Αγώνες της Αθήνας. Σε έλεγχο που του έγινε, πριν από την συμμετοχή του σε αγώνα του Παγκοσμίου Κυπέλλου, διαπιστώθηκε ότι είχε κάνει χρήση ερυθροποιητίνης. Όταν ανακοινώθηκε το αποτέλεσμα του εργαστηριακού ελέγχου ο ίδιος παραδέχθηκε το γεγονός και δήλωσε ότι

επιθυμούσε παρά πολύ το μετάλλιο και έκανε λήψη EPO διότι “φοβόταν μην αποτύχει”.

- Σημαντικός παράγοντας είναι η πίεση που δέχονται από τους προπονητές. Πολλές φορές οι προπονητές προτείνουν επίμονα τη λήψη ουσιών από τους αθλητές τους. Σε άλλες περιπτώσεις οι προπονητές προπονούν τόσο σκληρά τους αθλητές και προκειμένου εκείνοι να ανταπεξέλθουν καταφεύγουν στην λήψη απαγορευμένων ουσιών.
- Επιθυμία για γρήγορο αποτέλεσμα και επιτυχία. Το ντόπινγκ έχει ανατρέψει την προπονητική διαδικασία και μεταξύ των άλλων δίνει τη δυνατότητα στους αθλητές να έχουν μία ταχύτερη αθλητική εξέλιξη, καθώς, μεταξύ των άλλων, ουσίες όπως τα στεροειδή προσφέρουν πιο γρήγορη αποκατάσταση μεταξύ των προπονήσεων. Σε πολλά αθλήματα οι καμπύλες αθλητικής εξέλιξης παρουσιάζουν μεγάλες αποκλίσεις, οι οποίες δημιουργούν υπόνοιες για χρήση απαγορευμένων ουσιών.
- Έλλειψη οργανωμένης αθλητιατρικής και προπονητικής υποστήριξης. Όταν δεν υπάρχει αθλητιατρική και προπονητική υποστήριξη στους αθλητές, ο αθλητής πιστεύει ότι δεν έχει δυνατότητα να διακριθεί σε διεθνές επίπεδο δίχως τη χρήση απαγορευμένων ουσιών. Η σωστή υποστήριξη του αθλητή, τόσο προπονητικά όσο και αθλητιατρικά, συντελεί στο να αποβληθεί η σκόπιμα υπάρχουσα πεποίθηση ότι δίχως ντόπινγκ δεν μπορεί κάποιος να διακριθεί σε παγκόσμιο επίπεδο.
- Οργανωμένο κρατικό σύστημα φαρμακευτικής υποστήριξης. Αναφέρθηκε η περίπτωση της ανατολικής Γερμανίας, όμως δεν είναι η μοναδική. Μπορεί τη δεκαετία του 1970 να μιλούσαν όλοι για την Ανατολική Γερμανία, τη δεκαετία του 1980 για την Κούβα, αλλά τη δεκαετία του 1990, η Κίνα συγκέντρωνε τις περισσότερες υποψίες. Τα κράτη που έχουν οργανωμένο σύστημα φαρμακευτικής υποστήριξης υποχρεώνουν τους αθλητές τους να ενταχθούν στο πρόγραμμα και να λάβουν συγκεκριμένες ουσίες.
- Ανεξέλεγκτη λήψη συμπληρωμάτων. Οι αθλητές, επηρεασμένοι από διαφημίσεις καθώς και από την, στόμα με στόμα, προώθηση σκευασμάτων διατροφής ή αθλητικών συμπληρωμάτων, όπως ονομάζονται, ανάλογα με την περίπτωση, καταλήγουν να χρησιμοποιούν απαγορευμένες ουσίες. Σε πολλές περιπτώσεις τα σκευάσματα αναγράφουν την ύπαρξη ουσίας που εμπεριέχουν και η οποία βρίσκεται στη λίστα των απαγορευμένων ουσιών, υπάρχουν όμως και περιπτώσεις που η πραγματική σύνθεση του σκευάσματος δεν αναγράφεται, με αποτέλεσμα ο αθλητής, εν αγνοία του, να χρησιμοποιεί απαγορευμένες ουσίες.
- Ανεξέλεγκτη λήψη φαρμάκων. Στους Ολυμπιακούς Αγώνες του Σίδνεϋ η Ρουμάνια νικήτρια του σύνθετου της ενόργανης γυμναστικής, βρέθηκε θετική για την ουσία ψευδοεφεδρίνη, καθώς ο προπονητής της χορήγησε σιρόπι, για ιατρικούς λόγους, δίχως να προσέξει ότι στη σύνθεση του σκευάσματος εμπεριείχε την απαγορευμένη ουσία, με αποτέλεσμα η αθλήτρια να ενοχοποιηθεί.

- Πιο «αθλητικό» σώμα. Σε πολλές περιπτώσεις, οι άνθρωποι χρησιμοποιούν απαγορευμένες ουσίες απλά και μόνο για να έχουν λιγότερο λίπος ή γενικότερα για να «κτίσουν» αθλητικό σώμα, ακόμη και εάν αυτό δεν συνεισφέρει στη βελτιστοποίηση της αθλητικής τους επίδοσης.
- Να επισπεύσουν την αποκατάσταση. Την αποκατάσταση, δηλαδή, τόσο μεταξύ των προπονήσεων όσο και μετά τους αγώνες.
- Να προπονηθούν και να αγωνιστούν τραυματισμένοι. Το φαινόμενο είναι πολύ έντονο στα ομαδικά αθλήματα όπου οι προπονητές δίνουν εντολές στο ιατρικό επιτελείο της ομάδας να «κάνει τα αδύνατα δυνατά για να ετοιμάσει τον τραυματισμένο αθλητή» για τον επόμενο σημαντικό αγώνα της ομάδας.
- Εσωτερική επιθυμία για διάκριση και πρωτιά. Υπάρχουν στοιχεία ερευνών που δείχνουν ότι συχνά οι αθλητές χρησιμοποιούν απαγορευμένες ουσίες απλά για να διακριθούν. Καταγεγραμμένα περιστατικά αναφέρουν χρήση ουσιών για συμμετοχή σε τοπικούς και ερασιτεχνικούς αγώνες.

### 1.3 ΠΑΓΚΟΣΜΙΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΑΝΤΙΝΤΟΠΙΝΓΚ

Το παγκόσμιο πρόγραμμα αντιντόπινγκ περιλαμβάνει όλα εκείνα τα στοιχεία που απαιτούνται για να διασφαλιστεί η βέλτιστη εναρμόνιση και εφαρμογή των παγκόσμιων και εθνικών προγραμμάτων αντιντόπινγκ και δομείται στα ακόλουθα τρία επίπεδα:

- Παγκόσμιος Κώδικας Αντιντόπινγκ (World Anti-Doping Code)
- Διεθνή Πρότυπα (International Standards)
- Οδηγίες Βέλτιστης Πρακτικής ( Model of Best Practice and Guidelines)

Ο Παγκόσμιος Κώδικας Αντιντόπινγκ, που αποτελεί το θεμελιώδες κείμενο πάνω στο οποίο στηρίζεται το παγκόσμιο πρόγραμμα αντιντόπινγκ, και τα διεθνή πρότυπα που καθορίζουν τις λεπτομέρειες εγγραφής του κώδικα, είναι δεσμευτικά και υποχρεωτικά κείμενα. Οι οδηγίες βέλτιστης πρακτικής είναι συνιστώμενες και η εφαρμογή τους είναι προαιρετική. Ο Κώδικας Αντιντόπινγκ, παρέχει ουσιαστικά το πλαίσιο εναρμόνισης των πολιτικών, των κανονισμών και των ρυθμίσεων σχετικά με το αντιντόπινγκ εντός των αθλητικών οργανισμών και μεταξύ των δημοσίων φορέων. Όσον αφορά τα Διεθνή Πρότυπα, αυτά περιλαμβάνουν έξι κείμενα που εκδίδει η WADA και είναι τα εξής :

- ❖ **Ο Κατάλογος Απαγορευμένων Ουσιών (List of Prohibited Substances)**, που καθορίζει τις απαγορευμένες ουσίες και κατηγορίες απαγορευμένων ουσιών και τις απαγορευμένες μεθόδους εντός και εκτός αγώνων.

- ❖ **Το Διεθνές Πρότυπο για τους Ελέγχους (International Standard for Testing)**, που περιγράφει τη διαδικασία προγραμματισμού των ελέγχων.
- ❖ **Το Διεθνές Πρότυπο για τα εργαστήρια (International Standard for Laboratories, ISL)**, που έχει σκοπό να διασφαλίσει την εξαγωγή αξιόπιστων και ομοιόμορφα εναρμονισμένων αποτελεσμάτων και αναφορών από όλα τα διαπιστευμένα από τη WADA, εργαστήρια ανά τον κόσμο. Περιλαμβάνει τις απαιτήσεις για την απόκτηση και τη διατήρηση της διαπίστευσης των εργαστηρίων από τη WADA, τις προδιαγραφές λειτουργίας τους και περιγραφή της διαδικασίας απόκτησης της διαπίστευσης.
- ❖ **Το Διεθνές Πρότυπο για τις εξαιρέσεις χρήσης για θεραπευτικούς σκοπούς (International Standard for Therapeutic Use Exceptions, TUE's)**, που έχει σκοπό να διασφαλίσει την εναρμονισμένη χορήγηση TUE μεταξύ διαφορετικών αθλημάτων και χωρών.
- ❖ **Το Διεθνές Πρότυπο για την προστασία των προσωπικών δεδομένων (International Standard for the Protection of Privacy and Personal Information)**, που έχει σκοπό να διασφαλίσει την τήρηση προφυλάξεων από μέρους των εμπλεκόμενων φορέων στο αντινόπινγκ, κατά τη συλλογή και διαχείριση προσωπικών πληροφοριών που αφορούν τον αθλητή.
- ❖ **Το Διεθνές Πρότυπο για την εναρμόνιση των Υπογραφόντων Μερών με τον Κώδικα ( International Standard for Code Compliance by Signatories, ISCCS)** που έχει σκοπό να διασφαλιστεί η εφαρμογή των ισχυρών κανόνων και προγραμμάτων καταπολέμησης του ντόπινγκ σταθερά και αποτελεσματικά σε όλα τα αθλήματα και σε όλες τις χώρες, ούτως ώστε οι «καθαροί» αθλητές να έχουν την αυτοπεποίθηση ότι υπάρχει ισότιμος ανταγωνισμός σε όλα τα επίπεδα του αθλητισμού και να υπάρχει εμπιστοσύνη του κοινού στην ακεραιότητα του αθλητισμού.

Ο Κώδικας, καθώς και όλα τα επίσημα έγγραφα της WADA ανανεώνονται ετησίως (ή κάποια ανά τακτά χρονικά διαστήματα), ώστε να περιλαμβάνουν όλες τις αλλαγές τόσο στις διαδικασίες ελέγχου, ανάλυσης δειγμάτων και εκτίμησης αποτελεσμάτων, όσο και στις διαδικασίες λειτουργίας και διαπίστευσης των εργαστηρίων.

## 1.4 ΤΕΧΝΙΚΑ ΕΓΓΡΑΦΑ

Κατά καιρούς εκδίδονται από την WADA τεχνικά έγγραφα (Technical Documents, TD's ), τα οποία είναι μέρος των Διεθνών Προτύπων για εργαστήρια, και αφορούν τον τρόπο διαχείρισης συγκεκριμένων θεμάτων που αφορούν τα εργαστήρια, όπως π.χ. τα κριτήρια ανίχνευσης απαγορευμένων ουσιών για ποιοτικές μεθόδους που βασίζονται στη χρωματογραφία και την φασματομετρία μάζας, τα όρια



απόφασης για επιβεβαιωτικές διαδικασίες ποσοτικού προσδιορισμού ουσιών ορίου, τα ελάχιστα απαιτούμενα όρια απόδοσης κ.α.

Για την εναρμόνιση του τρόπου έκδοσης αποτελεσμάτων από τα εργαστήρια αντιντόπινγκ, η WADA έχει καθορίσει ελάχιστα επίπεδα ανίχνευσης για κάθε κατηγορία απαγορευμένων ουσιών. Αυτά τα Ελάχιστα Απαιτούμενα Επίπεδα Απόδοσης (Minimum Required Performance Level, MRPL), υποχρεωτικά για όλα τα Εργαστήρια, δεν αποτελούν όρια ανίχνευσης ή ποσοτικοποίησης, αλλά αναλυτικές προδιαγραφές τεχνικής απόδοσης των εργαστηρίων κατά την πραγματοποίηση ελέγχων ρουτίνας, και δίνονται στον Πίνακα 1.1.

<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 1.1</b> Ελάχιστα Απαιτούμενα Επίπεδα Απόδοσης-MRPL (2018)		
<b>ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΑΠΑΓΟΡΕΥΜΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ</b>	<b>ΕΙΔΙΚΑ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ &amp; ΕΞΑΙΡΕΣΕΙΣ</b>	<b>MRPL (ng/mL)</b>
Εξωγενή Αναβολικά, Ανδρογόνα Στεροειδή		5
	Διυδροξυχλωρομεθυλτεστοστερόνη	2
	Μεθανδιενόνη	2
	Μεθυλτεστοστερόνη	2
	Στανοζολόλη	2
Ενδογενή Αναβολικά χορηγούμενα εξωγενώς	19- Νορανδροστερόνη (19-NA)	2
	19-Νορετιοχολανολόνη (19-NE)	5
	Μπολδενόνη	
Άλλοι Αναβολικοί Παράγοντες		2
	Κλενβουτερόλη	0,2
Αυξητική Ορμόνη, Παράγοντες απελευθέρωσης της και ανάλογα	AOD 9604, Hh 176-191	2
	Σερμορελίνη, Τεσαμορελίνη, CJC-1295, CJC-1293	1
	Αναμορελίνη, Ιπαμορελίνη, Ταμπιμορελίνη	2

Πεπτίδια αυξητικής ορμόνης	Απελευθέρωσης Αλεξαμορελίνη, GHRP 1-2-3-4-5-6, Εξαρελίνη	2
Άλλοι παράγοντες	TB-500	2
Παράγοντες που προκαλούν υποξία	σταθεροποίησης Roxadustat (FG-4592) Molidustat	2
Ορμόνη Γοναδοτροπίνης	απελευθέρωσης Μπουσερελίνη, Γοναδορελίνη, Λευπρορελίνη, Τριπτορελίνη, Οξική Γοσερελίνη, Ναρφαρελίνη, Δεσλορελίνη	2
β2 αγωνιστές		20
Ορμονικοί ανταγωνιστές και Ρυθμιστές	Αναστολείς αρωματάσης, SERMs και άλλες αντιοιστρογονικές ουσίες	20
	Φορμεστάνη	50
	Meldonium	200
	Ινσουλίνες	50pg/mL
Διουρητικά και άλλοι παράγοντες κάλυψης		200
	Δεσμοπρεσίνη και ανάλογα	2
Διεγερτικά		100
Ναρκωτικά	Οκτοπαμίνη	1000
		50
	Βουπρενορφίνη	5
	Φεντανύλη (και παράγωγα)	2
Κανναβινοειδή		1
Γλυκοκορτικοστεροειδή		30
	Βουνεσονίδη	30

## 1.5 ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΑΠΑΓΟΡΕΥΜΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

Ο Κατάλογος Απαγορευμένων Ουσιών ορίζει τις ουσίες και τις μεθόδους που ανά πάσα στιγμή απαγορεύονται ως ντόπινγκ (τόσο εντός όσο και εκτός αγώνα) λόγω της δυνατότητας τους να αυξήσουν την απόδοση σε μελλοντικούς αγώνες ή να ενεργούν ως παράγοντες συγκάλυψης, καθώς και τις ουσίες και τις μεθόδους που απαγορεύονται μόνο εντός αγώνα. Η WADA δημοσιεύει τον Κατάλογο ως Διεθνές Πρότυπο κατά την συχνότητα που η ίδια κρίνει σκόπιμο και τουλάχιστον σε ετήσια βάση. Το προτεινόμενο περιεχόμενο του Καταλόγου Απαγορευμένων Ουσιών και όλες οι αναθεωρήσεις του παρέχονται εγγράφως και εγκαίρως σε όλα τα Υπογράφοντα Μέρη και τις κυβερνήσεις για σχολιασμό και διαβουλεύσεις. Κάθε ετήσια έκδοση του Καταλόγου Απαγορευμένων Ουσιών και όλες οι αναθεωρήσεις του διανέμονται εγκαίρως από τον W.A.D.A. σε όλα τα Υπογράφοντα Μέρη, τα εργαστήρια που φέρουν διαπίστευση ή έγκριση από τον W.A.D.A. και τις κυβερνήσεις, και αναρτώνται στην ιστοσελίδα του W.A.D.A. Κάθε Υπογράφον Μέρος προβαίνει στις κατάλληλες ενέργειες για τη διανομή του Καταλόγου Απαγορευμένων Ουσιών στα μέλη και τους αρμόδιους φορείς-μέλη του. Εάν δεν προβλέπεται διαφορετικά στον Κατάλογο ή τις αναθεωρήσεις αυτού, οι κανόνες κάθε Οργανισμού Αντιντόπινγκ ορίζουν ότι ο Κατάλογος Απαγορευμένων Ουσιών και οι αναθεωρήσεις του τίθενται σε ισχύ βάσει των κανόνων του Οργανισμού Αντιντόπινγκ, τρεις μήνες μετά τη δημοσίευση του Καταλόγου Απαγορευμένων Ουσιών από τον W.A.D.A., χωρίς να απαιτείται οποιαδήποτε περαιτέρω ενέργεια από τον Οργανισμό Αντιντόπινγκ.

Η WADA λαμβάνει υπόψη της τα κάτωθι κριτήρια, πιο συγκεκριμένα θα πρέπει η ουσία ή μέθοδος να πληροί δυο από τα τρία παρακάτω κριτήρια, προκειμένου να συμπεριληφθεί στον Κατάλογο Απαγορευμένων ουσιών:

- Ύπαρξη οποιασδήποτε ιατρικής ή άλλης επιστημονικής απόδειξης, φαρμακολογικής επίδρασης ή εμπειρίας ότι η ουσία ή η μέθοδος, από μόνη της ή σε συνδυασμό με άλλες ουσίες ή μεθόδους, έχει τη δυνατότητα να βελτιώσει ή βελτιώνει την αθλητική απόδοση.
- Ύπαρξη οποιασδήποτε ιατρικής ή άλλης επιστημονικής απόδειξης, φαρμακολογικής επίδρασης ή εμπειρίας ότι η χρήση της ουσίας ή της μεθόδου αποτελεί πραγματικό ή ενδεχόμενο κίνδυνο για την υγεία του αθλητή.
- Η χρήση της ουσίας ή της μεθόδου παραβιάζει το πνεύμα του αθλητισμού που περιγράφεται στην Εισαγωγή του Κώδικα.

Επιπλέον, μια ουσία ή μέθοδος θα πρέπει να περιληφθεί στον Κατάλογο Απαγορευμένων Ουσιών εάν η WADA καθορίσει ότι υπάρχει ιατρική ή άλλη

επιστημονική απόδειξη, φαρμακολογική επίδραση ή εμπειρία ότι η ουσία ή η μέθοδος έχει τη δυνατότητα να καλύψει τη χρήση άλλων Απαγορευμένων Ουσιών και Απαγορευμένων Μεθόδων. Για παράδειγμα, το Αμερικάνικο εργαστήριο BALCO παρήγαγε τετραϋδρογεστρινόνη (tetrahydrogestrinone, THG) μόνο για τις «ανάγκες» αθλητών. Η άμεση αντίδραση της WADA ήταν η τοποθέτηση της THG μεταξύ των απαγορευμένων ουσιών στον αθλητισμό.

Η απόφαση του παγκόσμιου οργανισμού αντιντόπινγκ ως προς τις απαγορευμένες ουσίες και μεθόδους που θα συμπεριληφθούν στον κατάλογο, η κατάταξη των ουσιών σε κατηγορίες του Καταλόγου και η κατάταξη μίας ουσίας ως απαγορευμένης ανά πάσα στιγμή ή μόνο εντός αγώνα, είναι οριστική και μπορεί να αμφισβητηθεί από αθλητή ή άλλο πρόσωπο βάσει του επιχειρήματος ότι η ουσία ή μέθοδος δεν ήταν παράγοντας συγκάλυψης ή δεν είχε τη δυνατότητα αύξησης της απόδοσης, δεν αποτελεί κίνδυνο για την υγεία ή δεν παραβαίνει το πνεύμα του αθλητισμού.

Η ενσωμάτωση μιας φαρμακευτικής ουσίας σε μια από τις απαγορευμένες ουσίες του Καταλόγου κρίνεται με βάση τη δράση ή τη χημική δομή της από την επιτροπή εργασίας του καταλόγου των απαγορευμένων ουσιών. Στον Κατάλογο Απαγορευμένων Ουσιών του 2018, οι ουσίες (S) και οι μέθοδοι (M) ταξινομούνται σε κατηγορίες και χωρίζονται σε τρεις ομάδες. Αυτές που απαγορεύονται και εντός και εκτός αγώνων (A), αυτές που απαγορεύονται μόνο εντός αγώνων (B) και όσες απαγορεύονται μόνο σε συγκεκριμένα αθλήματα (P) (Γ).

## **A. Ουσίες που απαγορεύονται εντός και εκτός αγώνων**

### **S0. Μη εγκεκριμένες ουσίες**

Οποιαδήποτε φαρμακευτική ουσία η οποία δεν περιλαμβάνεται σε κάποιο από τα επόμενα τμήματα του Καταλόγου και η οποία δεν έχει μέχρι στιγμής εγκριθεί από οποιαδήποτε κυβερνητική ρυθμιστική Αρχή Υγείας για θεραπευτική χρήση σε ανθρώπους (για παράδειγμα φάρμακα σε στάδιο προ-κλινικών ή κλινικών μελετών ή αποσυρθέντα από την κυκλοφορία, νέες ψυχοδραστικές ουσίες (συνθετικά ναρκωτικά, designer drugs), φάρμακα που έχουν εγκριθεί μόνο για κτηνιατρική χρήση) απαγορεύονται σε κάθε περίπτωση.

### **S1. Αναβολικοί Παράγοντες**

Οι αναβολικοί παράγοντες είναι χημικά συστατικά ικανά να ενισχύσουν την αναβολική διεργασία στον οργανισμό. Επηρεάζουν το μεταβολισμό των πρωτεϊνών διεγείροντας την πρωτεϊνοσύνθεση (αναβολική επίδραση) και αναστέλλοντας τη διάσπαση των πρωτεϊνών (καταβολική δράση). Οι δραστικές αναβολικές ουσίες που περιλαμβάνονται στον Κατάλογο Απαγορευμένων Ουσιών του 2018 υποδιαιρούνται στην ομάδα των αναβολικών ανδρογόνων στεροειδών και στην ομάδα των άλλων αναβολικών παραγόντων.

#### **S1.1 Αναβολικά Ανδρογόνα Στεροειδή**

Η ομάδα των αναβολικών ανδρογόνων στεροειδών (Anabolic Androgenic Steroids, AAS) περιλαμβάνει τις ενδογενώς παραγόμενες τεστοστερόνη (testosterone) και διυδροτεστοστερόνη (dehydrotestosterone, DHT), προορμόνες τεστοστερόνης και τους μεταβολίτες τους, καθώς και εξωγενή αναβολικά ανδρογόνα στεροειδή, τα οποία είναι συνθετικά παράγωγα της τεστοστερόνης.

Για τα ενδογενώς παραγόμενα AAS, θετικό αποτέλεσμα σε έλεγχο ντόπινγκ δίνεται όταν η συγκέντρωση της ουσίας ή των μεταβολιτών της ή των δεικτών της και/ή οποιονδήποτε άλλων σχετικών αναλογιών στο δείγμα αυτό, παρεκκλίνει από το εύρος των φυσιολογικών τιμών που προκύπτουν ενδογενώς, εκτός αν ο αθλητής μπορεί να αποδείξει ότι η συγκέντρωση οφειλόταν σε μια φυσιολογική ή παθολογική κατάσταση.

### **S1.2 Άλλοι Αναβολικοί Παράγοντες**

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

### **S2 Πεπτιδικές Ορμόνες, Αυξητικοί Παράγοντες και Σχετικές Ουσίες και Μιμητές**

Οι ορμόνες πραγματοποιούν την ενδοκρινή ρύθμιση των λειτουργιών του σώματος. Είναι χημικοί αγγελιοφόροι που παράγονται από τους ενδοκρινείς αδένες και/ή από ενδοκρινικά κύτταρα σε άλλα όργανα (νεφρούς, καρδία, κ.λπ.) των οποίων οι εκκρίσεις απελευθερώνονται άμεσα στο κυκλοφορικό σύστημα και μεταφέρονται στα κύτταρα στόχους, όπου οι ορμόνες, αφότου δεσμευτούν με τους υποδοχείς των πρωτεϊνικών κυττάρων, ασκούν τις συγκεκριμένες επιδράσεις τους. Οι κύριοι ενδοκρινείς αδένες στο σώμα είναι η υπόφυση, ο θυρεοειδής αδένας, οι παραθυρεοειδείς αδένες, τα επινεφρίδια, το πάγκρεας, οι ωθήκες και οι όρχεις. Ο υποθάλαμος αποτελεί βασικό τμήμα του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος, αλλά επίσης, παράγει και ορμόνες και θεωρείται ως νευροενδοκρινικό όργανο. Ο υποθάλαμος εμφανίζει άμεση αγγειακή σύνδεση με τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης. Τα υποθαλαμικά νευρικά κύτταρα εκκρίνουν μέσα σε αυτή την πυλαία κυκλοφορία διάφορες εκλυτικές και ανασταλτικές ορμόνες που ρυθμίζουν την υποφυσιακή έκκριση. Κάθε μία από τις αρχικές ορμόνες του προσθίου λοβού της υπόφυσης έχει μια υποθαλαμική εκλυτική ορμόνη, συχνά αποκαλούμενη ως εκλυτικός παράγοντας (η εκλυτική ορμόνη της γοναδοτροπίνης διεγείρει την έκκριση ταυτόχρονα και των

δύο γοναδοτροπινών του προσθίου λοβού της υπόφυσης, της ωχρινοτρόπου και της ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης).

Η ερυθροποιητίνη (erythropoietin, EPO) είναι μια γλυκοπρωτεϊνική ορμόνη που απελευθερώνεται από τους νεφρούς (85%) και το ήπαρ (15%) ενώ η έκκριση της διεγείρεται υπό συνθήκες υποξίας. Η ανθρώπινη αυξητική ορμόνη (human Growth Hormone, hGH) είναι μια πεπτιδική ορμόνη που εκκρίνεται από τον αδένα του προσθίου λοβού της υπόφυσης. Η υποθαλαμική εκλυτική ορμόνη της αυξητικής ορμόνης (Growth Hormone Releasing Hormone, GHRH) και πιθανώς η γκρελίνη (ghrelin) διεγείρουν την έκκριση hGH. Εκτός των άλλων άμεσων επιδράσεων της στα κύτταρα στόχους, η hGH διεγείρει τη σύνθεση του αυξητικού παράγοντα 1 της ινσουλίνης (Insulin Growth Factor-1, IGF-1) σε όλους τους ιστούς. Στους περισσότερους ιστούς ο IGF-1 ασκεί τοπικές δράσεις, αλλά από το ήπαρ εκκρίνεται μέσα στην κυκλοφορία. Ο μηχανο-αυξητικός παράγοντας (MechanoGrowthFactor, MGF) προέρχεται από το γονίδιο του IGF-1 με εναλλακτική σύνδεση και εκφράζεται στους σκελετικούς μύες. Η ινσουλίνη εκκρίνεται από τα β-κύτταρα των νησιδίων του Langerhans στο ενδοκρινές πάγκρεας. Κυρίως δρα στο μεταβολισμό των υδατανθράκων, των λιπιδίων και των πρωτεϊνών. Επιτρέπεται μόνο για τη θεραπεία αθλητών με βεβαιωμένο ινσουλινο-εξαρτώμενο σακχαρώδη διαβήτη. Οι γοναδοτροπίνες οι οποίες είναι απαγορευμένες μόνο στους άνδρες είναι η ωχρινοτρόπος ορμόνη (Luteinizing Hormone, LH) και η ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη (human Chorionic Gonadotrophin, hCG). Η LH είναι μια γλυκοπρωτεϊνή που εκκρίνεται από τον αδένα του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης, η οποία ρυθμίζει τις εκκριτικές και γαμετογενετικές λειτουργίες των όρχεων και των ωοθηκών. Η υποθαλαμική εκλυτική ορμόνη των γοναδοτροπινών (Gonadotropin Releasing Hormone, GnRH) διεγείρει την έκκριση της LH. Η HCG είναι μια ορμόνη του πλακούντα και η παρουσία της στο πλάσμα και τα ούρα αποτελεί μια από τις πιο πρώιμες ενδείξεις για εγκυμοσύνη και συνιστά τη βάση για τα τεστ εγκυμοσύνης. Μικρές ποσότητες HCG εκκρίνονται επίσης από διάφορες νεοπλασίες και στα δύο φύλα (καρκινικός δείκτης). Η κορτικοτροπίνη (φλοιοεπινεφριδιοτρόπος ορμόνη, Adrenocorticotrophic Hormone, ACTH) παράγεται στον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης και ρυθμίζει την έκκριση των στεροειδών ορμονών από το φλοιό των επινεφριδίων. Κάτω από την επίδραση ποικίλων στρεσογόνων παραγόντων, ο υποθάλαμος εκκρίνει την εκλυτική ορμόνη της κορτικοτροπίνης (Corticotropin Releasing Hormone, CRH), η οποία διεγείρει την απελευθέρωση της ACTH. Οι παραπάνω ορμόνες και οι εκλυτικοί τους παράγοντες καθώς και άλλες ουσίες με παρόμοια χημική δομή ή παρόμοιες βιοϊατρικές επιπτώσεις απαγορεύονται.

### **S3 B-2 Αγωνιστές**

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

#### **S4. Ορμονικοί και μεταβολικοί ρυθμιστές**

Οι ορμόνες είναι αγγελιοφόρα μόρια που απελευθερώνονται από ενδοκρινείς αδένες για να ρυθμίσουν συγκεκριμένες σωματικές λειτουργίες όπως τα επίπεδα της γλυκόζης του αίματος ή τη μυϊκή ανάπτυξη. Οι ορμόνες δεσμεύονται από τους υποδοχείς στην κυτταρική μεμβράνη ή από τους υποδοχείς στον κυτταρικό πυρήνα. Έτσι, λοιπόν, οι ανταγωνιστές ορμονών και οι ρυθμιστές είναι ουσίες που επηρεάζουν αυτές τις δράσεις αναστέλλοντας ή διεγείροντας συγκεκριμένους υποδοχείς και περαιτέρω επιταχύνοντας ή επιβραδύνοντας συγκεκριμένες αντιδράσεις από τα ένζυμα. Βασικές κατηγορίες τέτοιων ρυθμιστών είναι οι αναστολείς της αρωματάσης (π.χ. εξεμεστάνη, φορμεστάνη, εκλεκτικοί τροποποιητές υποδοχέων οιστρογόνων (Selective Estrogen Receptor Modulators, SERMs, π.χ. ραλοξιφένη, ταμοξιφένη, αντί-οιστρογονικές ουσίες, παράγοντες που τροποποιούν τη λειτουργία της μυοστατίνης και μεταβολικοί ρυθμιστές όπως η τριμεταζιδίνη.

#### **S5. Διουρητικά και παράγοντες κάλυψης**

Τα διουρητικά είναι προϊόντα που βοηθούν στην αποβολή των υγρών από το σώμα. Προκαλούν απώλεια νερού αναστέλλοντας μερικώς την επαναρρόφηση του νερού, δηλαδή αυξάνουν το ρυθμό της ούρησης. Ισχυρά διουρητικά μπορούν να αυξήσουν τη ροή των ούρων ως 6 περίπου λίτρα ανά ημέρα. Τα διουρητικά περιέχουν ουσίες όπως ακεταζολαμίδη, αμιλορίδη, κανρενόνη, φουροσεμίδη, ινδαπαμίδη, τριαμετερένη και θειαζίδες όπως βενδροφλουμεθειαζίδη, χλωροθειαζίδη, υδροχλωροθειαζίδη και άλλες ουσίες με παρόμοια χημική δομή ή παρόμοιες βιολογικές επιδράσεις. Τα διουρητικά απαγορεύονται εντός και εκτός αγώνων εκτός από ελάχιστα (π.χ. δροσπερινόνη) που είναι νόμιμα. Τα διουρητικά και οι άλλοι παράγοντες συγκάλυψης ως κατηγορία φαρμάκων βρίσκονται στην πέμπτη θέση στη συχνότητα εμφάνισης κρουσμάτων ντόπινγκ με ποσοστό της τάξης του 6,7% στο σύνολο των θετικών δειγμάτων παγκοσμίως. Οι παράγοντες συγκάλυψης είναι συστατικά που λαμβάνονται με σκοπό να κρύψουν ή να καλύψουν την παρουσία συγκεκριμένων παράνομων φαρμάκων που εξετάζονται στον έλεγχο ντόπινγκ. Οι παράγοντες συγκάλυψης έχουν τη δυνατότητα να μειώσουν ή να αποκρύψουν την απαγορευμένη ουσία στα ούρα. Τα διουρητικά μπορούν να θεωρηθούν ως παράγοντες συγκάλυψης εξαιτίας της προκαλούμενης αραίωσης των ούρων που οδηγεί σε χαμηλότερα επίπεδα έκκρισης της απαγορευμένης ουσίας από το σώμα.

#### **M1 Χειρισμός του Αίματος και των Συστατικών του**

Απαγορεύεται το ντόπινγκ αίματος συμπεριλαμβανομένης της χρήσης αυτόλογου, ομόλογου ή ετερόλογου αίματος ή παραγώγων ερυθρών αιμοσφαιρίων οποιασδήποτε προέλευσης. Επιπλέον, απαγορεύεται η τεχνητή ενίσχυση της πρόσληψης, μεταφοράς και απόδοσης του οξυγόνου, με υπερφθοριομένες χημικές ουσίες, και τροποποιημένα παράγωγα αιμοσφαιρίνης χωρίς όμως να περιορίζεται μόνο σε αυτά.

## **M2 Χημικός και Φυσικός Χειρισμός**

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

## **M3 Γονιδιακό Ντόπινγκ**

Απαγορεύεται η μεταφορά πολυμερών νουκλεϊνικών οξέων ή αναλόγων νουκλεϊνικών οξέων και η χρήση φυσιολογικών ή γενετικά τροποποιημένων κυττάρων.

## **B. Ουσίες και Μέθοδοι που Απαγορεύονται Μόνο Εντός Αγώνων**

### **S6 Διεγερτικά**

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



## S7 Ναρκωτικά

Τα ναρκωτικά θεωρούνται ως ουσίες και φάρμακα ικανά να μεταβάλουν τη ψυχική και φυσική κατάσταση του οργανισμού σε ένα ευρύ πεδίο από τον ύπνο και την πλήρη ακινητοποίηση έως την ευφορία και τη διέγερση. Αυτός ο ευρέως αποδεκτός ορισμός των ναρκωτικών είναι, επομένως, περισσότερο σχετικός με τα συμπτώματα που παρατηρούνται παρά με τη συγκεκριμένη δράση των ναρκωτικών ουσιών. Οι επιδράσεις των διαφόρων ναρκωτικών ουσιών προσδιορίζονται ακριβέστερα με βάση τη χημική τους δομή και τους βιολογικούς μηχανισμούς που διεγείρουν προκαλώντας μεταβολές στον ανθρώπινο οργανισμό. Τα ναρκωτικά προκαλούν εθισμό, μειώνουν τον πόνο, προκαλούν υπνηλία και μπορεί να μεταβάλουν τη διάθεση ή τη συμπεριφορά. Τα οπιοειδή είναι αναλγητικά ναρκωτικά και ταξινομούνται στον κατάλογο των απαγορευμένων ουσιών και μεθόδων της WADA ως ναρκωτικά. Τα οπιοειδή δρουν σε υποδοχείς που εντοπίζονται τόσο στο κεντρικό όσο και στο περιφερικό νευρικό σύστημα. Ωστόσο, η κύρια δράση των οπιοειδών είναι η μεταβολή της λειτουργίας του κεντρικού νευρικού συστήματος. Η περιφερική δράση των αναλγητικών ναρκωτικών συνδέεται μερικώς με τις επιδράσεις της απελευθέρωσης της ισταμίνης που ακολουθεί τη λήψη ναρκωτικών. Σε κάποιες χώρες, το όνομα ναρκωτικά αφορά επίσης την κοκαΐνη, η οποία χημικά δεν είναι ναρκωτικό. Τα συμπαθομιμητικά ταξινομούνται στον κατάλογο της WADA ως διεγερτικά, όπως προαναφέρθηκε. Η τρίτη ομάδα αποτελείται από ουσίες ικανές να προκαλέσουν ψυχικές μεταβολές, όπως αυτές που εκδηλώνονται στην πορεία της ψύχωσης. Αυτές οι ουσίες αποκαλούνται ψυχομιμητικά, ή ψυχεδελικά, ή παραισθησιογόνα. Μεταξύ των ψυχομιμητικών μόνο τα κανναβινοειδή τοποθετήθηκαν στον κατάλογο του WADA ως ξεχωριστή ομάδα ουσιών.

## S8 Κανναβινοειδή

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

## **S9. Γλυκοκορτικοστεροειδή**

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

### **Γ. Ουσίες που απαγορεύονται σε συγκεκριμένα αθλήματα**

#### **P1. Αλκοόλ**

Το αλκοόλ ή χημικώς οριζόμενα η αιθανόλη είναι μια εξωγενής ουσία που περιλαμβάνεται στον κατάλογο από το 2008. Απαγορεύεται σε ορισμένα αθλήματα και επί του παρόντος μόνο εντός αγώνων και αυτά είναι η αεροναυτική, η τοξοβολία, το αυτοκίνητο, ο μοτοσυκλετισμός και η λεμβοδρομία ισχύος. Η ανίχνευση γίνεται με ανάλυση του εκπνεόμενου αέρα και/ή του αίματος. Το όριο συγκέντρωσης αλκοόλης (στο αίμα), υπέρβαση του οποίου συνιστά παράβαση ντόπινγκ, είναι τα 0,10 g/L. Το αλκοόλ είναι ένα κατασταλτικό του κεντρικού νευρικού συστήματος που επιβραδύνει τις λειτουργίες του εγκεφάλου και του σώματος. Σκοπός της χρήσης του αλκοόλ είναι η μείωση της νευρικότητας, η μείωση της υπερκινητικότητας και η χαλάρωση. Συνεπώς, η χρήση του αλκοόλ προτιμάται σε αθλήματα που χρειάζονται αυξημένη συγκέντρωση, όπως η τοξοβολία. Το αλκοόλ δεν οδηγεί σε βελτίωση της φυσικής απόδοσης. Ο συνδυασμός του αλκοόλ με άλλες ουσίες μπορεί να μεγεθύνει την επίδραση του αλκοόλ ή των άλλων ταυτόχρονα χορηγούμενων ουσιών. Γενικά, το αλκοόλ απαγορεύεται σε αθλήματα όπου η χρήση του μπορεί να θεωρηθεί επιζήμια για την απόδοση του αθλητή ή επικίνδυνη για την ασφάλεια, όπως στον μηχανοκίνητο αθλητισμό.

#### **P2. Β-Αναστολείς**

Οι ουσίες αυτές επιβραδύνουν τους ρυθμούς της καρδιάς και χρησιμοποιούνται σε αθλήματα που στηρίζονται στην ηρεμία του αγωνιζόμενου, για την εκτέλεση λεπτών και ακριβών κινήσεων. Οι β-αναστολείς απαγορεύονται μόνο εντός αγώνων, εκτός εάν καθορίζεται διαφορετικά, στα παρακάτω αθλήματα:

τοξοβολία, αυτοκίνητο, μπιλιάρδο, βελάκια, γκολφ, σκοποβολή, σκι, χιονοσανίδα και υποθαλάσσια σπορ. Οι σημαντικότεροι β-αναστολείς είναι η ατενολόλη, η καρτεολόλη, η κελιπρολόλη, η λαβηταλόλη, η ναδολόλη, η προπρανολόλη κ.α. Η χρήση συμπληρωμάτων διατροφής είναι διαδεδομένη στον αθλητισμό παγκοσμίως και δεν αφορά αποκλειστικά αθλητές υψηλού επιπέδου. Οι κύριοι λόγοι για τη χρήση διατροφικών συμπληρωμάτων είναι η βελτίωση της φυσικής απόδοσης, η προαγωγή της υγείας, η μείωση του κινδύνου για εκδήλωση ασθενειών και το λιγότερο ο έλεγχος του σωματικού βάρους. Ένας από τους κύριους παράγοντες κινδύνου των συμπληρωμάτων διατροφής εκτός από την πιθανότητα θετικού ελέγχου ντόπινγκ από «μολυσμένα» συμπληρώματα είναι το γεγονός ότι πολλοί αθλητές χρησιμοποιούν συμπληρώματα χωρίς τη γνώση των παρενεργειών και των συνιστώμενων επιπέδων πρόσληψης. Στο πλαίσιο της τεράστιας αγοράς των συμπληρωμάτων διατροφής, το όριο μεταξύ της συνιστώμενης και της εσφαλμένης χρήσης δεν είναι ξεκάθαρο. Αξίζει να αναφερθεί ότι τα περισσότερα από τα συμπληρώματα διατροφής δεν απαγορεύονται από τη WADA. Τα συμπληρώματα διατροφής είναι ουσίες που υπάρχουν φυσικά στο σώμα και που καταναλώνονται επιπρόσθετα με τη φυσιολογική καθημερινή διατροφή. Οι ουσίες αυτές είναι εν μέρει απαραίτητες για την αύξηση και την ανάπτυξη ενός πολυκύτταρου οργανισμού, όπως το ανθρώπινο σώμα. Η πρόσθετη λήψη συμπληρωμάτων διατροφής για ιατρικούς λόγους έγκειται σε περιπτώσεις σχετικής ανεπάρκειας στο σώμα λόγω υποσιτισμού ή ασθένειας.

## 1.6 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΝΤΟΠΙΝΓΚ

Οι διαδικασίες ελέγχου ντόπινγκ ρυθμίζονται από τα Διεθνή Πρότυπα Ελέγχου του Παγκόσμιου Κώδικα Αντιντόπινγκ και βάσει αυτών ο έλεγχος πραγματοποιείται με έναν από τους δύο τρόπους:

- ✓ Εντός αγώνων έλεγχος (σε μια αθλητική διοργάνωση)
- ✓ Εκτός αγώνων έλεγχος (στις συγκεντρώσεις ομάδων, στο σπίτι ή στο χώρο προπόνησης)

Και οι δύο τρόποι ακολουθούν τις ίδιες βασικές διαδικασίες συλλογής δειγμάτων, χρησιμοποιούν τον ίδιο εξοπλισμό δειγματοληψίας και ακολουθούν τα ίδια πρότυπα για τον έλεγχο, όπως ορίζεται στον Παγκόσμιο Κώδικα Αντιντόπινγκ. Σύμφωνα με αυτό το έγγραφο υπάρχει επιλογή αθλητή, ανακοίνωση, δειγματοληψία και εργαστηριακή ανάλυση. Για την εξασφάλιση της ανωνυμίας του αθλητή, παγκοσμίως τα Εργαστήρια Αντιντόπινγκ και το προσωπικό των εργαστηρίων αυτών δεν εμπλέκονται στις άλλες διαδικασίες πέραν της εργαστηριακής ανάλυσης. Για τη δειγματοληψία έχουν καταρτιστεί λεπτομερείς διαδικασίες, οι οποίες είναι ενσωματωμένες, τόσο στο Διεθνές Πρότυπο για τους Ελέγχους, όσο και στη νομοθεσία κάθε χώρας. Στην Ελλάδα ο θεσμοθετημένος εθνικός φορέας που φέρει την ευθύνη για τη διαδικασία της δειγματοληψίας και την εφαρμογή και διαχείριση αποτελεσματικής πολιτικής αντιντόπινγκ στη χώρα είναι το Εθνικό Συμβούλιο Καταπολέμησης Ντόπινγκ (Ε.Σ.ΚΑ.Ν.).

Ένα αποτελεσματικό πρόγραμμα αρχίζει με ένα πλάνο συλλογής δειγμάτων, το οποίο περιλαμβάνει ελέγχους κατάλληλα σχεδιασμένους ως προς τον χρόνο τέλεσης σε όλη τη διάρκεια του έτους και χωρίς προηγούμενη προειδοποίηση. Οι οργανισμοί αντιντόπινγκ διασφαλίζουν τη διενέργεια δειγματοληψίας σε περιόδους αυξημένου κινδύνου για ντόπινγκ και δρουν αποτρεπτικά προς την χρήση φαρμάκων σε όλα τα αθλήματα. Στους αγώνες, τα κριτήρια επιλογής ποικίλλουν από άθλημα σε άθλημα ή από διοργάνωση σε διοργάνωση. Συνήθως, δεν επιλέγονται για έλεγχο συγκεκριμένοι αθλητές αλλά οι θέσεις κατάταξης. Εκτός αγώνων, οι επιλογές πραγματοποιούνται συνήθως με τη διαδικασία μιας αυτοματοποιημένης κλήρωσης ή και κατ' επιλογήν.

Οι αθλητές ειδοποιούνται προσωπικά για την επιλογή τους προς εξέταση από τον υπεύθυνο έλεγχου ντόπινγκ (Ε.Σ.ΚΑ.Ν.). Μετά από τη γνωστοποίηση τόσο για τους εντός όσο και για τους εκτός αγώνων ελέγχους, οι δειγματολήπτες (Ε.Σ.ΚΑ.Ν.) συνοδεύουν συνεχώς τον αθλητή έως ότου ληφθεί και σφραγιστεί το δείγμα. Εντός αγώνων, οι αθλητές ειδοποιούνται συνήθως στον αγωνιστικό χώρο και έχουν 60 λεπτά από τη στιγμή της ανακοίνωσης για να προσέλθουν στο σταθμό ελέγχου ντόπινγκ. Ο αθλητής μπορεί να χρησιμοποιήσει το χρονικό όριο των 60 λεπτών για αποθεραπεία, για να παρευρεθεί στην τελετή απονομής επάθλων, για να εκπληρώσει τις υποχρεώσεις του προς τα ΜΜΕ, να βρει έναν εκπρόσωπο των αθλητών, να βρει τη διαπίστευσή του κ.λπ. Η ανακοίνωση για έλεγχο εκτός αγώνων πραγματοποιείται συνήθως στο σπίτι ή στο χώρο προπόνησης του αθλητή. Αντίθετα, από ό,τι συμβαίνει στον έλεγχο εντός αγώνων, δεν υπάρχει κάποιο χρονικό όριο προσέλευσης στο σταθμό ελέγχου ντόπινγκ δεδομένου ότι ο έλεγχος πραγματοποιείται συνήθως στον τόπο της ειδοποίησης. Οι συνήθεις επιλογές δειγμάτων είναι ούρα και αίμα και σπανιότερα σάλιο ή τρίχες.

Για την ανίχνευση των περισσότερων απαγορευμένων φαρμακευτικών ουσιών επιλέγεται το δείγμα ούρων, λόγω της ευκολίας λήψης του, του σχετικά μεγάλου λαμβανόμενου όγκου και κυρίως επειδή η συγκέντρωση των φαρμάκων αναμένεται να είναι υψηλότερη από ότι στο αίμα. Η διαδικασία συλλογής δειγμάτων ούρων ελέγχεται προσεκτικά για να διασφαλιστεί η ακεραιότητα της διαδικασίας ελέγχου ντόπινγκ. Οι υπεύθυνοι για τον έλεγχο ντόπινγκ εργάζονται ώστε να εξασφαλιστεί η επιτυχής εξέταση των αθλητών, να μειωθούν οι πιθανότητες επιμόλυνσης του δείγματος και να διατηρηθεί η ασφάλεια του δείγματος. Όλοι οι αθλητές επιτηρούνται συνεχώς κατά τη διάρκεια της παροχής δείγματος από δειγματολήπτη του ίδιου φύλου (αν είναι διαφορετικού φύλου ο αθλητής έχει δικαίωμα αν επιθυμεί να αρνηθεί να δώσει δείγμα). Οι αθλητές ενθαρρύνονται να έχουν έναν αντιπρόσωπο αθλητών που θα τους συνοδεύει σε όλη τη διαδικασία ελέγχου ντόπινγκ, εκτός από τη διάρκεια παροχής του δείγματος. Αφού ολοκληρωθεί η δειγματοληψία και ληφθούν τα Δείγματα Α και Β, αυτά μαζί με τα απαραίτητα συνοδευτικά έγγραφα τοποθετούνται μέσα σε σάκους μεταφοράς, ασφαλιζονται και μεταφέρονται στο εργαστήριο που θα πραγματοποιήσει την ανάλυση.

Όλα τα δείγματα αποστέλλονται στα διαπιστευμένα από την WADA εργαστήρια, ώστε τα αποτελέσματα να αναγνωρίζονται ως έγκυρα από τις αθλητικές αρχές. Η αναγνώριση των εργαστηρίων στα πλαίσια του εξωτερικού ελέγχου ποιότητας περιλαμβάνει μεταξύ άλλων συνεχείς ελέγχους ικανότητας και τυφλούς ελέγχους. Τα διαπιστευμένα από την WADA εργαστήρια, συνολικά 33, βρίσκονται υπό διαρκή έλεγχο και είναι υποχρεωμένα να υποβάλλονται στην δοκιμασία εξωτερικού ελέγχου ποιότητας τουλάχιστον 3 φορές το χρόνο (EQAS Proficiency Test). Αν ένα εργαστήριο αποτύχει στην ανάλυση των παραπάνω δειγμάτων, χάνει τη διαπίστευση μέχρι να επιτύχει ή μεταπίπτει σε κατάσταση περιορισμένης δικαιοδοσίας. Το Εργαστήριο Ελέγχου Ντόπινγκ του Ολυμπιακού Αθλητικού Κέντρου Αθηνών (Ο.Α.Κ.Α.) διαπιστεύτηκε από τη Διεθνή Ολυμπιακή Επιτροπή το 1990. Επίσης, τα εργαστήρια πρέπει να είναι διαπιστευμένα από τον Εθνικό Φορέα Διαπίστευσης της εκάστοτε χώρας, στην Ελλάδα είναι το Εθνικό Σύστημα Διαπίστευσης (Ε.ΣΥ.Δ.), σύμφωνα με το πρότυπο ISO 17025. Η αξιοπιστία του εργαστηρίου ελέγχου ντόπινγκ του Ο.Α.Κ.Α αυξάνει σημαντικά με τη διαπίστευσή του από το Ε.ΣΥ.Δ. Επίσης, το εργαστήριο του Ο.Α.Κ.Α. είναι διαπιστευμένο για ανάλυση δειγμάτων αλόγων από τον A.O.R.C. (Association of Official Racing Chemists).

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2**

### **ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ-ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ ΜΕ ΑΝΑΛΥΤΗ ΧΡΟΝΟΥ ΠΤΗΣΗΣ**

#### **2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Οι αναλυτικές τεχνικές που εφαρμόζονται από τα εργαστήρια διαφοροποιούνται ανάλογα με τον τύπο του δείγματος, την χημική δομή των εξεταζόμενων αναλυτών, τις φυσικοχημικές ιδιότητες τους και τέλος ανάλογα με την πορεία μεταβολισμού τους στον ανθρώπινο οργανισμό. Μια από τις κυριότερες αναλυτικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται είναι η Υγροχρωματογραφία με ανιχνευτή UV/Vis ή φασματομετρία μαζών (MS) και δίδυμη φασματομετρία μαζών (MS/MS), ή οποία χρησιμοποιείται κατά κόρον για την ανίχνευση γλυκοκορτικοστεροειδών, διεγερτικών, ναρκωτικών, διουρητικών κ.α.

#### **2.2 ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ**

Η τεχνική της υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης ( HPLC) είναι η συχνότερα χρησιμοποιούμενη αναλυτική τεχνική σύμφωνα με την οποία επιτυγχάνονται διαχωρισμοί μίγματος αναλυτών με βάση τη διαφορά κατανομής των ενώσεων σε δύο φάσεις μη αναμιγνύομενες μεταξύ τους, μιας στατικής και μιας κινητής φάσης ( η κινητή φάση αποτελείται από ένα διαλύτη ή μίγμα διαλυτών). Ο συνδυασμός της υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή UV/Vis παρέχει μια ακριβή, επαναλήψιμη και ανθεκτική μέθοδο επιλογής για την ποσοτική ανάλυση των φαρμακευτικών προϊόντων και αποτελεί τη μέθοδο της βιομηχανίας για το σκοπό αυτό.

Η τεχνική χρησιμοποιείται επίσης, στην παρακολούθηση της σταθερότητας καθαρών φαρμακευτικών ουσιών και φαρμάκων σε σκευάσματα, με ποσοτικοποίηση τυχόν προϊόντων αποικοδόμησης. Υπάρχουν αρκετές εφαρμογές σχετικές με τον υπολογισμό της συγκέντρωσης φαρμάκων και των μεταβολιτών τους σε βιολογικά υγρά. Έχει επίσης χρησιμοποιηθεί στον προσδιορισμό των συντελεστών μερισμού και τιμών pKa των φαρμάκων και σε μελέτες πρωτεϊνικής σύνδεσης φαρμάκων. Η HPLC διαθέτει πολλές δυνατότητες. Αρχικά είναι εύκολα ελεγχόμενη και επαναλήψιμη η εισαγωγή του δείγματος πράγμα το οποίο εξασφαλίζει επαναληψιμότητα ποσοτικοποίησης. Είναι η χρωματογραφική τεχνική που παρουσίασε την πλέον έντονη ανάπτυξη τα τελευταία χρόνια πράγμα το οποίο οδήγησε σε βελτιωμένες χρωματογραφικές στήλες , ανιχνευτές και λογισμικά ελέγχου. Η μεγάλη ποικιλία στηλών και ανιχνευτών σημαίνει ότι η εκλεκτικότητα της μεθόδου μπορεί εύκολα πλέον να ρυθμιστεί. Τέλος, μπορεί να γίνει εύκολη αυτοματοποίηση.

## 2.2.1 ΕΙΔΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΥ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ

Οι κυριότεροι μηχανισμοί διαχωρισμού που χρησιμοποιούνται στην υγροχρωματογραφία υψηλής αποδόσεως παρουσιάζονται συνοπτικά παρακάτω. Κάθε είδος χρωματογραφίας στηρίζεται σε ένα διαφορετικό μηχανισμό, ενώ επίσης σε πολλές περιπτώσεις λαμβάνει χώρα παραπάνω από ένας μηχανισμός.

- ✓ **Χρωματογραφία Προσρόφησης :** Τα συστατικά του μίγματος προσροφώνται σε ορισμένες θέσεις της επιφάνειας της στερεής στατικής φάσης, με αποτέλεσμα την αποκατάσταση ισορροπίας μεταξύ των προσροφημένων σωματιδίων και των σωματιδίων στην κινητή φάση. Η ισορροπία αυτή είναι που επιτυγχάνει τον διαχωρισμό. Ως στατική φάση χρησιμοποιούνται κυρίως πολικά μόρια όπως πηκτή πυριτίας ( $\text{SiO}_2$ ), αλούμινα ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) ή μαγνησία ( $\text{MgO}_2$ ). Η κινητή φάση είναι μη πολική (εξάνιο, επτάνιο ή τετραϋδροφουράνιο)
- ✓ **Χρωματογραφία Κατανομής :** Η χρωματογραφία κατανομής είναι ο περισσότερο χρησιμοποιούμενος τύπος χρωματογραφίας και διακρίνεται σε 2 υποομάδες:
  - Χρωματογραφία Κατανομής Υγρού-Υγρού : Η υγρή στατική φάση συγκρατείται στην επιφάνεια του υλικού πλήρωσης με προσρόφηση. Τα συστατικά ενός μίγματος κατανέμονται μεταξύ δύο μη μειγνυόμενων υγρών φάσεων. Η μία υγρή φάση αποτελεί την κινητή φάση, ενώ η άλλη υγρή φάση αποτελεί την στατική φάση. Όσο μεγαλύτερη η διαλυτότητα των αναλυτών στην υγρή στατική φάση, τόσο μεγαλύτερη είναι η συγκράτησή τους στην στήλη.
  - Χρωματογραφία Χημικά Συνδεδεμένης Φάσης: η στατική φάση δεσμεύεται χημικά στην επιφάνεια του υλικού πλήρωσης. Τα συστατικά ενός μίγματος κατανέμονται μεταξύ μιας υγρής κινητής φάσης και της στερεής στατικής φάσης. Στην χρωματογραφία Χημικά Συνδεδεμένης φάσης κανονικής φάσης, χρησιμοποιούνται πληρωτικά υλικά με πολική επίστρωση και πρώτος εκλύεται ο λιγότερο πολικός αναλυτής, ενώ στην χρωματογραφία αντίστροφης φάσης χρησιμοποιούνται πληρωτικά υλικά με μη πολική επίστρωση και πρώτος εκλύεται ο περισσότερο πολικός αναλυτής.
- ✓ **Χρωματογραφία Ιονανταλλαγής:** Στη χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής (ion-exchange chromatography) η στατική φάση είναι ένας ιοντοανταλλάκτης, δηλαδή ένα στερεό υπόστρωμα που συνδέεται ομοιοπολικά με χαρακτηριστικές ομάδες που είναι ιοντισμένες. Οι χαρακτηριστικές αυτές ομάδες φέρουν ένα σταθερό αρνητικό ή θετικό φορτίο και ευκίνητα ιόντα αντίθετου φορτίου έτσι ώστε το περιβάλλον να είναι ηλεκτρικά ουδέτερο. Η μέθοδος είναι χρήσιμη για το διαχωρισμό πχ αμινοξέων, ιοντικών προϊόντων μεταβολισμού και οργανικών ιόντων.
- ✓ **Χρωματογραφία Ζεύγους Ιόντων :** αποτελεί σημαντική χρωματογραφική τζινική κυρίως για την ανάλυση ιοντισμένων. Η ανάλυση ιοντισμένων

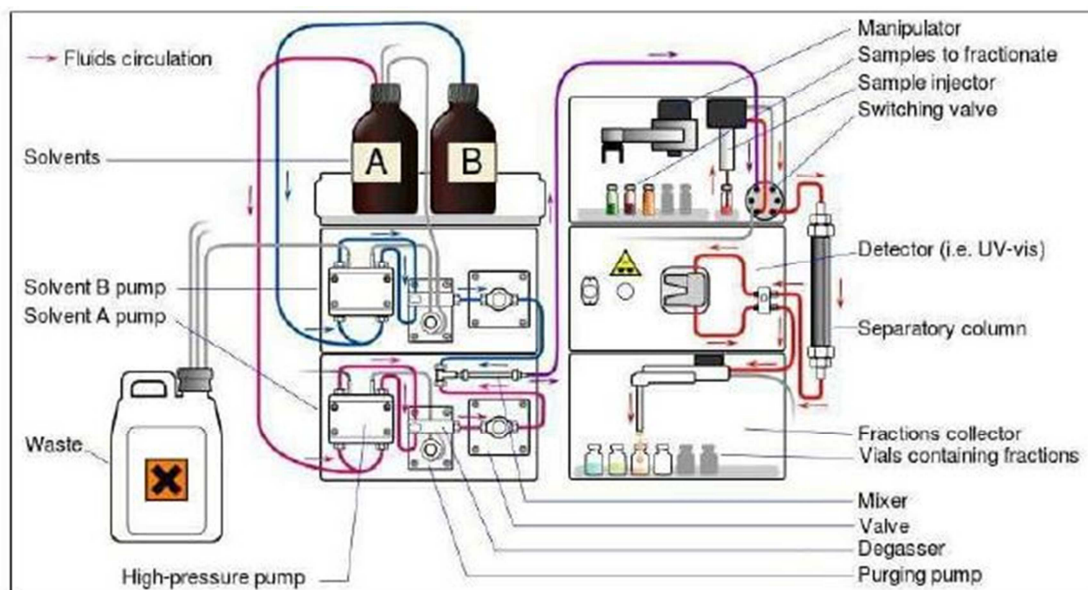
αναλυτών είναι ιδιαίτερα δύσκολη με τις κλασσικές μεθόδους υγροχρωματογραφίας λόγω της αυξημένης πολικότητας τους με αποτέλεσμα να παρουσιάζονται προβλήματα όσον αφορά την ειδικότητα και την ακρίβεια της μεθόδου. Η αρχή της τεχνικής βασίζεται στο σχηματισμό συμπλόκου ανάμεσα στον ιοντισμένο αναλύτη και ένα αντισταθμιστικό ιόν κατάλληλου χημικού αντιδραστηρίου που διοχετεύεται με την κινητή φάση. Το σύμπλοκο αυτό ορίζεται ως «ζεύγος ιόντων» (ion-pair) και έχει ουδέτερο φορτίο. Με τη ραγδαία ανάπτυξη της υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης σε συνδυασμό με τις νέες στατικές φάσεις χημικά συνδεδεμένης πηκτής πυριτίας και τη μεγάλη διαθεσιμότητα σε χημικά αντιδραστήρια και διαλύτες υψηλής καθαρότητας, η χρωματογραφία ζεύγους ιόντων καθιερώθηκε ως τεχνική επιλογής στη φαρμακευτική ανάλυση για αναλύτες που φέρουν χαρακτηριστικές ομάδες που μπορούν να ιοντιστούν (ασθενή οξέα ή βάσεις).

- ✓ **Χρωματογραφία Αντίστροφης Φάσης :** Εδώ, η στατική φάση είναι μικρότερης πολικότητας έναντι της κινητής. Επομένως, οι πολικοί αναλύτες διαλύονται ισχυρά στην κινητή φάση και δε συγκρατούνται ισχυρά στη στατική φάση, με αποτέλεσμα να εμφανίζουν μικρότερους χρόνους συγκράτησης. Το αντίθετο, προφανώς, συμβαίνει με τους λιγότερο πολικούς αναλύτες. Έτσι, η αύξηση της πολικότητας της κινητής φάσης επιταχύνει την έκλυση των πολικών ενώσεων, ενώ επιβραδύνει την έκλυση των μη πολικών. Οι κινητές φάσεις στη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης αποτελούνται από μίγματα νερού ή ρυθμιστικού διαλύματος με άλλους οργανικούς διαλύτες (οργανικοί τροποποιητές), οι οποίοι πρέπει να αναμιγνύονται με το νερό. Οι διαλύτες θα πρέπει να είναι μεγίστης καθαρότητας ειδική για χρήση HPLC.

## 2.2.2 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ HPLC

Ένα χρωματογραφικό σύστημα HPLC αποτελείται από ένα σύστημα παροχής κινητής φάσης, μια αντλία, ένα σύστημα εισαγωγής του δείγματος, τη χρωματογραφική στήλη που αποτελεί τη στατική φάση, έναν ανιχνευτή που ανιχνεύει τους αναλύτες μετά τον διαχωρισμό τους στη στατική φάση, έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή ο οποίος ρυθμίζει με το κατάλληλο λογισμικό ολόκληρη τη λειτουργία του συστήματος HPLC και ένα σύστημα συλλογής των αποβλήτων ( Εικόνα 2.1).





**ΕΙΚΟΝΑ 2.1 :** Οργανολογία Συστήματος HPLC

Το σύστημα παροχής κινητής φάσης περιλαμβάνει τα δοχεία αποθήκευσης των διαλυτών, το θάλαμο ανάμιξης τους και μια αντλία υψηλής πίεσης. Συνήθως, χρησιμοποιούνται περισσότεροι από έναν διαλύτες προκειμένου να επιτευχθεί ο διαχωρισμός, βασικό χαρακτηριστικό των οποίων είναι να είναι αναμιγνύσιμοι και να απαερώνονται με διήθηση μέσω ειδικών φίλτρων ή μεμβρανών υπό κενό πριν την εισαγωγή τους στην στήλη. Η χρωματογραφική διαδικασία μπορεί να είναι ισοκρατικής έκλουσης (isocratic elution), όπου η κινητή φάση παραμένει σταθερή σε όλη τη διάρκεια της λήψης του χρωματογραφήματος ή βαθμιδωτής έκλουσης (gradient elution) όπου η κινητή φάση αλλάζει βαθμιαία ή ανά τακτά χρονικά διαστήματα κατά τη διάρκεια της λήψης ενός χρωματογραφήματος. Στη χρωματογραφία βαθμιδωτής έκλουσης, οι διαλύτες αναμιγνύονται στο θάλαμο ανάμιξης και απαέρωσης των διαλυτών πριν την προώθησή τους από την αντλία. Η επίτευξη της βαθμιδωτής έκλουσης απαιτεί μονάδα προγραμματισμού του συστήματος παροχής ελεγχόμενη από ηλεκτρονικό υπολογιστή.

Η αντλία του συστήματος θα πρέπει να επιτυγχάνει υψηλές πιέσεις 70-400 atm, σταθερές ταχύτητες ροής που να κυμαίνονται μεταξύ 10μL/min και 5 mL/min με επαναληψιμότητα τουλάχιστον 0,5%.

Οι ιδανικές στήλες για την HPLC είναι οι ευθύγραμμοι σωλήνες από χάλυβα. Η πλήρωση των στηλών αυτών είναι δύσκολο να γίνει από τον αναλυτή για το λόγο αυτό αγοράζονται έτοιμες από τις κατασκευάστριες εταιρείες. Ανάλογα με το μηχανισμό συγκράτησης στην HPLC διατίθενται από τις εταιρείες και οι κατάλληλες στήλες. Μεγάλης σημασίας είναι τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά της στήλης (μήκος, εσωτερική διάμετρος, διάμετρος σωματιδίων). Αυτά ανήκουν στους μηχανικούς παράγοντες και επηρεάζουν την αποδοτικότητα της στήλης. Το είδος της στατικής φάσης είναι επίσης ιδιαίτερα σημαντικό και ανήκει στους χημικούς παράγοντες που επηρεάζουν την εκλεκτικότητα, τον παράγοντα χωρητικότητας και το βαθμό

διαχωρισμού. Για την ελαχιστοποίηση των κενών χώρων στην στήλη απαιτείται άριστη πλήρωσή της, δηλαδή οι πόροι του υλικού στηρίξεως πρέπει να γεμίζουν τελείως με την υγρή στατική φάση. Τα υλικά στηρίξεως ή πληρώσεως της στήλης είναι κυρίως μικροπορώδη σωματίδια διαμέτρου 3-10  $\mu\text{m}$  (5  $\mu\text{m}$ ) με πόρους διαμέτρου 20 nm και διαθέτουν μεγάλη επιφάνεια επαφής. Αποτελούνται από διοξείδιο του πυριτίου ( $\text{SiO}_2$ ), αλουμίνα, πολυμερή στυρενίου-διβινυλοβενζολίου ή ιονανταλλακτικές ρητίνες και επικαλύπτονται με λεπτό οργανικό στρώμα, συνδεδεμένο με φυσικό ή χημικό τρόπο. Η υγρή στατική φάση συνδέεται ομοιοπολικά στην επιφάνεια της πηκτής διοξειδίου του πυριτίου. Πολλές φορές η κινητή φάση μπορεί να διαλύει μερικώς την υγρή στατική φάση, με αποτέλεσμα την βαθμιαία καταστροφή της στήλης. Για τον λόγο αυτό συχνά απαιτείται η χρήση μιας μικρής στήλης (προστήλη) πριν την κύρια αναλυτική στήλη. Η προστήλη είναι πληρωμένη με σφαιρικά, μη πορώδη σωματίδια από πολυμερές ή γυαλί, στα οποία αποτίθεται λεπτό πορώδες στρώμα και λεπτή υγρή στατική φάση. Έτσι, η κινητή φάση φτάνει στην κύρια στήλη κορεσμένη με την υγρή στατική φάση. Ακόμη, η προστήλη προστατεύει την στήλη από τα συστατικά του δείγματος που συνδέονται μη αντιστρεπτά με τη στατική φάση. Επιπρόσθετα, μπορεί να απαιτείται θερμοστάτηση της στήλης. Η αύξηση της θερμοκρασίας της στήλης μέχρι τους  $100^\circ\text{C}$  μειώνει το ιξώδες της κινητής φάσης και συνεπώς την πίεση στα άκρα της στήλης, επιτρέποντας έτσι μεγαλύτερες ταχύτητες ροής της κινητής φάσης, αυξάνει τη διαχωριστικότητα μεταξύ γειτονικών κορυφών και αυξάνει τη μεταφορά μάζας του αναλύτη, αυξάνοντας την απόδοση της στήλης σε μεγαλύτερες ταχύτητες ροής της κινητής φάσης. Ωστόσο, η χρήση υψηλότερης θερμοκρασίας στη στήλη περιορίζεται λόγω της πιθανής θερμικής διάσπασης του αναλύτη, της πιθανής θερμικής διάσπασης της στατικής φάσης και του σημείου ζέσης της κινητής φάσης.

Ο ανιχνευτής είναι όργανα ζωτικής σημασίας του χρωματογραφικού συστήματος, γιατί κάνει «ορατό» τον διαχωρισμό που γίνεται στην στήλη και επιτρέπει την αξιοποίηση του στην ανάλυση. Τα ιδανικά χαρακτηριστικά ενός ανιχνευτή είναι η ικανοποιητική ευαισθησία με χαμηλά όρια ανίχνευσης (ng- $\mu\text{g}$ ) και χαμηλό θόρυβο, η σταθερότητα και αναπαραγωγιμότητα, η γραμμική απόκριση για μεγάλη περιοχή συγκεντρώσεων, η ανεξαρτησία από μεταβολές θερμοκρασίας και ταχύτητας ροής της κινητής φάσης, ο μικρό χρόνο απόκρισης, η μη απόκριση στην κινητή φάση, η ομοιόμορφη απόκριση για όλες τις ουσίες (γενικός ανιχνευτής) ή η εκλεκτικότητα απόκρισης (ειδικός ανιχνευτής) και ο αμελητέος νεκρός όγκος, ώστε να μη συμμετέχει στη διεύρυνση της ζώνης (κορυφής) κάθε συστατικού. Όπως είναι φυσικό κανένας ανιχνευτής δεν συγκεντρώνει όλα τα παραπάνω χαρακτηριστικά σε άριστο βαθμό. Σήμερα το πλέον αξιόπιστο και χρησιμοποιούμενο είδος ανιχνευτή είναι το φασματοόμετρο μαζών. Στην περίπτωση αυτού του ανιχνευτή προκύπτει η συνδυασμένη τεχνική LC-MS, η οποία θα αναλυθεί εκτενώς στην συνέχεια.

Σε παλιότερα συστήματα HPLC υπήρχε καταγραφέας που κατέγραφε την εμφάνιση του χρωματογραφήματος με απλό τρόπο. Οι απαραίτητες ιδιότητες του καταγραφέα ήταν η ταχεία απόκριση και η δυνατότητα επιλογής ενίσχυσης του

σήματος. Τα σύγχρονα συστήματα HPLC διαθέτουν ηλεκτρονικό υπολογιστή εφοδιασμένο με κατάλληλα λογισμικά προγράμματα τα οποία ελέγχουν όλο το σύστημα. Μέσω των λογισμικών προγραμμάτων επιτυγχάνεται ο έλεγχος της αντλίας, του αυτόματου δειγματολήπτη, του ανιχνευτή όπως και η αποθήκευση των λαμβανόμενων χρωματογραφημάτων με την μέθοδο του οργάνου (instrument method), ενώ η ολοκλήρωση των χρωματογραφημάτων, η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων της ανάλυσης και η παρουσίαση τους επιτυγχάνεται με τη μέθοδο επεξεργασίας (process and report).

## 2.3 ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ

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

## 2.4 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΟΥ ΜΑΖΩΝ

Τα κυριότερα τμήματα ενός φασματομέτρου μαζών που θα αναλυθούν στη συνέχεια είναι το σύστημα εισαγωγής του δείγματος, η πηγή ιοντισμού, ο αναλυτής μάζας και ο ανιχνευτής. Τα σύγχρονα φασματομέτρα μάζας περιλαμβάνουν ηλεκτρονικό υπολογιστή, ο οποίος με το κατάλληλο λογισμικό πρόγραμμα είναι υπεύθυνος τόσο για τον καθολικό έλεγχο της λειτουργίας τους, όσο και για την ταχεία επεξεργασία, παρουσίαση και ερμηνεία του φάσματος. Σημειώνεται ότι όλη η διάταξη ενός φασματομέτρου μάζας πρέπει να λειτουργεί υπό κενό, ώστε να αποφευχθεί η σύγκρουση των ιόντων με άλλα μόρια κατά τη διάρκεια της αλληλεπίδρασής τους με ηλεκτρικά ή μαγνητικά πεδία. Συνεπώς χρησιμοποιείται σύστημα δημιουργίας υψηλού κενού ( $10^{-5}$ - $10^{-9}$  Torr), οπότε δημιουργείται επαρκής ποσότητα ατμών για τη λήψη του φάσματος. Η παραμικρή διαρροή ατμοσφαιρικού αέρα θα έχει ως αποτέλεσμα την μείωση παραγωγής ιόντων του δείγματος και την εμφάνιση σημάτων που αντιστοιχούν στον ιονισμό των συστατικών της ατμόσφαιρας.

### 2.4.1 ΣΥΣΤΗΜΑ ΕΙΣΑΓΩΓΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Ο σκοπός του είναι η προετοιμασία του δείγματος για την εισαγωγή του στο χώρο ιοντισμού (πηγή ιόντων), κάτω από συνθήκες σταθερής ροής και σε αέρια πάντα κατάσταση. Στην περίπτωση δειγμάτων ενώσεων με περιορισμένη πτητικότητα ή στερεών, η εξαέρωση τους διευκολύνεται με θέρμανση σε συνθήκες υψηλού κενού. Το δοχείο δείγματος έχει όγκο 1-5 L και η πίεση που επικρατεί σε αυτό είναι της τάξης του  $10^{-2}$  Torr. Με κατάλληλο στόμιο εισαγωγής, το αέριο δείγμα εισάγεται σε ενδιάμεσο χώρο με ακόμα μικρότερη πίεση ( $10^{-5}$  Torr) από όπου με σταθερή παροχή εισάγεται στον χώρο ιοντισμού όπου επικρατεί ακόμη χαμηλότερη πίεση ( $10^{-7}$  Torr), ώστε να αποφεύγονται οι συγκρούσεις μεταξύ των ιόντων.

### 2.4.2 ΠΗΓΗ ΙΟΝΤΙΣΜΟΥ

Τα φασματομέτρα μαζών που είναι σήμερα εμπορικά διαθέσιμα συνδυάζονται με μια ποικιλία πηγών ιοντισμού. Ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization, ESI) αποτελεί τη συχνότερη σε χρήση πηγή ιοντισμού, η οποία χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα εργασία. Η αρχή της τεχνικής στηρίζεται στο σχηματισμό ιόντων σε αέρια κατάσταση απευθείας από ένα υγρό διάλυμα. Για το σκοπό αυτό, το διάλυμα του προς ανάλυση δείγματος διέρχεται από τριχοειδές με μικρή ροή και με τη βοήθεια αερίου αποδιαλύτωσης και αερίου νεφελοποίησης (συνήθως αζώτου) μετατρέπεται σε αερόλυμα. Παράλληλα, με την εφαρμογή διαφοράς δυναμικού 3 - 6 kV μεταξύ του τριχοειδούς και ενός αντιηλεκτροδίου δημιουργείται ισχυρό ηλεκτρικό πεδίο.

Διάφορες θεωρίες έχουν προταθεί για το μηχανισμό σχηματισμού των ιόντων κατά τον ιοντισμό ESI. Ξηραντικό αέριο, θέρμανση ή και τα δύο εφαρμόζονται στα σταγονίδια, σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης, προκαλώντας την εξάτμιση του διαλύτη. Σύμφωνα με μια θεωρία, το ηλεκτρικό πεδίο προκαλεί συσσώρευση του φορτίου στην επιφάνεια του υγρού στην άκρη του τριχοειδούς, γεγονός που οδηγεί στο σχηματισμό φορτισμένων σταγονιδίων (αερόλυμα φορτισμένων σταγονιδίων). Η εφαρμογή ξηραντικού αερίου ή/και θέρμανσης στα σταγονίδια, σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης οδηγούν στην εξάτμιση του διαλύτη. Καθώς το μέγεθος των σταγονιδίων μειώνεται, αυξάνεται η πυκνότητα φορτίου στην επιφάνεια τους. Οι απωστικές δυνάμεις Coulomb υπερνικούν τις δυνάμεις συνοχής των σταγονιδίων, με αποτέλεσμα τη διάσπαση τους σε ολοένα και μικρότερα σταγονίδια, από τα οποία τελικά εκροφώνται τα ιόντα, που κατευθύνονται μέσω ηλεκτροστατικών φακών προς τον αναλυτή μάζας. Ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό επηρεάζεται από μια ποικιλία παραγόντων που σχετίζονται τόσο με τη γεωμετρία της πηγής, όσο και με τη σύσταση του προς ανάλυση δείγματος. Σε αυτούς περιλαμβάνονται η φύση του διαλύτη της κινητής φάσης, η παρουσία ρυθμιστικών διαλυμάτων και το pH της κινητής φάσης, η ταχύτητα ροής, η φύση και η δομή του αναλύτη και η συγκέντρωση του στο δείγμα, η πολυπλοκότητα του δείγματος και η πορεία προκατεργασίας του, η γεωμετρία της πηγής ιοντισμού κ.λπ. Η τεχνική ESI είναι σχετικά ήπια τεχνική ιοντισμού. Τα φάσματα μαζών περιέχουν κυρίως το πρωτονιωμένο μοριακό ιόν και μικρό ποσοστό θραυσμάτων. Ο σχηματισμός πολλαπλά φορτισμένων ιόντων δίνει τη δυνατότητα υπολογισμού του μοριακού βάρους ενώσεων χωρίς περιορισμό και την ανάλυση πρωτεϊνών και άλλων βιομορίων. Μπορεί να εφαρμοστεί για την ανάλυση πολικών μορίων μικρού μοριακού βάρους και μεγαλομορίων με ιονισμένες ομάδες. Ο ιοντισμός των αναλυτών πραγματοποιείται σε σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες, γεγονός που καθιστά δυνατή την ανάλυση θερμοευαίσθητων ουσιών. Η τεχνική χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία και είναι κατάλληλη για ποσοτικούς προσδιορισμούς. Τέλος, σημειώνεται ότι υπάρχει δυνατότητα εφαρμογής θετικού ή αρνητικού δυναμικού, λαμβάνοντας θετικά ή αρνητικά φορτισμένα ιόντα αντίστοιχα.

### 2.4.3 ΑΝΑΛΥΤΗΣ ΜΑΖΩΝ

Τα ιόντα εξερχόμενα από την πηγή ιοντισμού επιταχύνονται με τη βοήθεια ηλεκτρικού πεδίου, ευθυγραμμίζονται και κατευθύνονται (με τη βοήθεια εξάπολου, οκτάπολου ή συστήματος φακών) προς τον αναλυτή μαζών. Βασική λειτουργία του αναλυτή μαζών είναι ο διαχωρισμός των ιόντων ανάλογα με τις διαφορετικές τιμές των λόγων  $m/z$ . Ο διαχωρισμός είναι απαραίτητος ούτως ώστε το μετρούμενο ιοντικό ρεύμα στον ανιχνευτή ιόντων να αντιστοιχεί σε συγκεκριμένο  $m/z$ . Από τον τύπο του αναλυτή μαζών καθορίζεται η διαχωριστική ικανότητα (Resolution, R) του οργάνου που είναι και το σπουδαιότερο χαρακτηριστικό ποιότητας ενός φασματόμετρου μαζών. Η διαχωριστική ικανότητα R του αναλυτή μαζών ορίζεται από τη σχέση  $R=m/\Delta m$ , όπου  $\Delta m$  είναι η διαφορά μάζας μεταξύ δύο μόλις διαχωριζόμενων

κορυφών και  $m$  είναι η τιμή της μάζας της πρώτης κορυφής. Κατά συνθήκη, ικανοποιητικός διαχωρισμός θεωρείται ότι επιτυγχάνεται όταν οι περίπου ισοϋψείς κορυφές επικαλύπτονται σε ύψος, που δεν υπερβαίνει το 10% του ύψους των κορυφών. Τα φασματομέτρα μαζών διαχωρίζονται σε χαμηλής και υψηλής διαχωριστικής ικανότητας. Η κύρια διαφορά μεταξύ των διάφορων φασματομέτρων μαζών έγκειται στους αναλυτές που χρησιμοποιούν για τον διαχωρισμό των ιόντων.

Οι συνηθέστεροι τύποι αναλυτών μαζών είναι απλής εστίασεως με μαγνητική εκτροπή (Magnetic-Electric Sector), διπλής εστίασεως (Double Focusing), τετραπολικοί αναλυτές μαζών (Quadrupole), τετραπολική παγίδα ιόντων (Quadrupole Ion Trap) και χρόνου πτήσης (Time of Flight, TOF). Οι αναλυτές διακρίνονται σε συνεχείς αναλυτές μαζών, και σε παλμικούς αναλυτές μαζών. Οι πρώτοι μεταφέρουν επιλεγμένο  $m/z$  προς τον ανιχνευτή και το φάσμα μαζών λαμβάνεται με σάρωση του αναλυτή οπότε ιόντα διαφορετικού  $m/z$  ανιχνεύονται σε κάθε χρονική στιγμή. Στην κατηγορία αυτή ανήκει μεταξύ άλλων ο τετραπολικός αναλυτής. Οι δε παλμικοί αναλυτές συλλέγουν ολόκληρο το φάσμα από παλμό ιόντων. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι αναλυτές χρόνου πτήσης. Οι δύο αυτοί αναλυτές μάζας χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία και για αυτό θα αναλυθούν περαιτέρω.

### 2.4.3.1 ΤΕΤΡΑΠΟΛΙΚΟΣ ΑΝΑΛΥΤΗΣ ΜΑΖΩΝ

Ο τετραπολικός αναλυτής μαζών ( quadrupole mass analyzer) ή τετράπολο αποτελεί τον πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο αναλυτή μαζών, εξαιτίας του μικρού του μεγέθους, του χαμηλού κόστους που έχει, της ανθεκτικότητας του και της μεγάλης ταχύτητας σάρωσης του ( 500-1000 amu/s). Είναι ιδανικός για σύζευξη με HPLC, δεν έχει απαιτήσεις κενού, ενώ παρέχει δυνατότητα χρήσης συζευγμένης φασματομετρίας MS/MS.

Αποτελείται από τέσσερις παράλληλες μεταλλικές ράβδους με κυκλική ή υπερβολική διατομή. Οι ράβδοι είναι τοποθετημένες συμμετρικά ως προς τη διερχόμενη δέσμη ιόντων και διαγωνίως συνδεδεμένες ηλεκτρικά μεταξύ τους. Κάθε ζεύγος ράβδων συνδέεται με τον πόλο πηγής τάσης που παρέχει μια συνεχή και μία εναλλασσόμενη υψίσυχη, στην περιοχή των ραδιοσυχνοτήτων, συνιστώσα. Για δεδομένη συχνότητα, και δεδομένα  $U$  και  $V$  μόνο ιόντα με ορισμένη τιμή  $m/z$  μεταφέρονται προς τον ανιχνευτή. Η μεταβολή των τιμών  $m/z$  γίνεται μεταβάλλοντας τη συχνότητα του εναλλασσόμενου ρεύματος και διατηρώντας σταθερές τις τιμές των δυναμικών  $U$  και  $V$ , είτε διατηρώντας σταθερή τη συχνότητα και μεταβάλλοντας τις τιμές των δυναμικών  $U$  και  $V$ , με τέτοιο τρόπο ώστε ο λόγος  $U/V$  να παραμένει σταθερός. Ιόντα με άλλες τιμές  $m/z$  έχουν ασταθείς τροχιές και δεν μπορούν να περάσουν το φίλτρο μαζών, προσκρούουν στις ράβδους και χάνουν το φορτίο τους. Ο χρόνος ζωής ενός ιόντος από τη στιγμή του σχηματισμού τους μέχρι και την ανίχνευση του είναι 50-100 microsecond. Με τα τετράπολα μπορούν να διακριθούν ιόντα που διαφέρουν κατά μία μονάδα μάζας (χαμηλή διακριτική ικανότητα) και ως

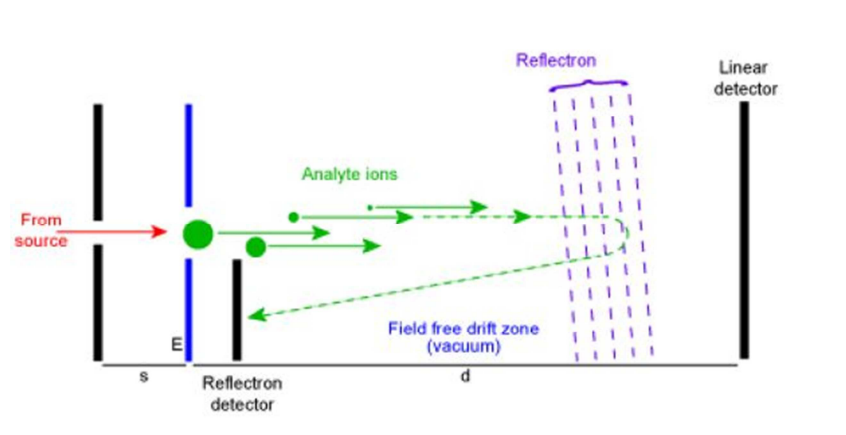
εκ τούτου είναι ανέφικτο να γίνει ταυτοποίηση μιας ένωσης. Τα τετράπολα είναι ορθότερο να χαρακτηριστούν ως ‘φίλτρα’ μάζας παρά ως φασματόμετρα μάζας. Η μέγιστη διαχωριστική ικανότητα που πετυχαίνεται με τους τετραπολικούς αναλυτές μάζας είναι περίπου 2000, σπάνια όμως ξεπερνά την τιμή 700-800, ενώ οι μάζες που μπορούν να αναλυθούν έχουν συνήθως μέγιστη τιμή  $m/z = 1200$ .

### **2.4.3.2 ΑΝΑΛΥΤΗΣ ΜΑΖΩΝ ΧΡΟΝΟΥ ΠΤΗΣΗΣ**

Το πρώτο φασματόμετρο μαζών με αναλυτή χρόνου πτήσης (TimeOfFlight, TOF) κατασκευάστηκε στα τέλη της δεκαετίας του 1940, άρχισε όμως να χρησιμοποιείται ευρέως από τη δεκαετία του 1990 και μετά. Αιτία ήταν η απουσία διαθέσιμων τεχνολογιών καταγραφής και επεξεργασίας φασμάτων σε χρονικό εύρος της τάξης των msec. Τώρα πια οι τεχνικές αυτές είναι διαθέσιμες και σε συνδυασμό με τη χρήση τεχνικών ιοντισμού τύπου ESI και MALDI, η χρήση των αναλυτών TOF έχει αποκτήσει μεγάλη εφαρμογή ιδιαίτερα στην ανάλυση βιομορίων. Παράλληλα, η εισαγωγή τεχνολογιών, όπως τα ανακλαστικά κάτοπτρα μέσα στους αναλυτές TOF έχει συμβάλλει σημαντικά στην αύξηση της διαχωριστικής τους ικανότητας.

#### **Αρχή Λειτουργίας**

Η λειτουργία του φασματομέτρου μαζών με αναλυτή χρόνου πτήσης (TOF/MS) βασίζεται στην αρχή ότι ένα πλήθος ιόντων με διαφορετική τιμή λόγου  $m/z$  που κινούνται προς την ίδια κατεύθυνση με την ίδια κινητική ενέργεια, θα έχουν αντίστοιχα και διαφορετική ταχύτητα, η οποία θα είναι αντιστρόφως ανάλογη της τετραγωνικής ρίζας του λόγου  $m/z$ . Έτσι, στο φασματόμετρο TOF τα σχηματιζόμενα στην πηγή ιοντισμού ιόντα μετά την εφαρμογή καθορισμένου δυναμικού από ηλεκτροστατικό πεδίο επιταχύνονται και αποκτούν υψηλή κινητική ενέργεια, οπότε μετράται ο χρόνος που απαιτείται για να διανύσουν καθορισμένη απόσταση απουσία εφαρμοζόμενου πεδίου και οι χρόνοι πτήσης που καταγράφονται, χρησιμοποιούνται στον υπολογισμό των λόγων  $m/z$  των αντίστοιχων ιόντων (Εικόνα 2.2).



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

### Περιγραφή Τεχνικής TOF-MS

Ανεξάρτητα από τη μέθοδο ιοντισμού που εφαρμόστηκε προηγουμένως, είναι απαραίτητο όλα τα ιόντα που σχηματίζονται να εισέρχονται στον αναλυτή χρόνου πτήσης στον ίδιο αρχικό χρόνο έτσι, ώστε οι χρόνοι πτήσης τους, άρα και οι λόγοι  $m/z$  τους, να μπορούν να μετρηθούν με ακρίβεια. Για αυτό το λόγο χρησιμοποιείται ηλεκτρικός παλμός  $10^3$ - $10^4$  V, ο οποίος σε δεδομένο χρόνο  $t$  δημιουργεί έναν πακέτο ιόντων τα οποία είναι τόσο κοντά μεταξύ τους σαν να είχαν προέλθει από ακτινοβολία laser. Η εφαρμογή του ηλεκτρικού παλμού που δημιουργεί τα πακέτα ιόντων ορίζεται ως χρόνος έναρξης της πτήσης ( $t = 0$ ). Μετά τον σχηματισμό τους τα πακέτα ιόντων επιταχύνονται με τη βοήθεια υψηλού δυναμικού έτσι, ώστε να αποκτήσουν την επιθυμητή ενέργεια και να μπορέσουν να εισέλθουν μέσα στο σωλήνα πτήσης του TOF. Ο σωλήνας πτήσης έχει δεδομένο μήκος (έως και 4 m), είναι ελεύθερος πεδίων και ορίζεται ως η απόσταση μεταξύ πηγής ιόντων και ανιχνευτή. Τα ιόντα εισέρχονται σε αυτόν με την κατάλληλη ενέργεια και κατεύθυνση, ώστε να φθάσουν στον ανιχνευτή. Ο σωλήνας πτήσης λειτουργεί στη μέγιστη επιτρεπόμενη για τον ανιχνευτή πίεση, η οποία συνήθως δεν πρέπει να υπερβαίνει τα  $10^{-5}$  Torr. Για δεδομένη κινητική ενέργεια, τα ιόντα που έχουν μικρή μάζα, θα κινούνται με μεγαλύτερη ταχύτητα μέσα στο σωλήνα πτήσης, ενώ αυτά που έχουν μεγαλύτερη μάζα θα κινούνται με μικρότερη ταχύτητα. Συνεπώς μετά από κάποιο χρονικό διάστημα πτήσης, τα ιόντα που βρίσκονταν στο ίδιο αρχικό πακέτο θα διαχωριστούν σε μικρότερα πακέτα βάσει του λόγου  $m/z$  τους και έτσι θα φθάνουν στον ανιχνευτή. Είναι σημαντικό ο χρόνος μεταξύ διαδοχικών παλμών κατά τη δημιουργία των πακέτων ιόντων να είναι μεγαλύτερος από το χρόνο πτήσης του ιόντος με το μεγαλύτερο  $m/z$ , αλλιώς θα υπάρχει ασάφεια στη μέτρηση των χρόνων πτήσης.



Για την κατανόηση της τεχνικής μπορούμε να προσεγγίσουμε με μαθηματικό τρόπο. Αρχικά εφαρμόζεται στα ιόντα δυναμικό  $V$  ώστε να εξέλθουν από την πηγή. Εάν το φορτίο του ιόντος είναι  $z$  για την αρχική του ενέργεια ( $E$ ) θα ισχύει η σχέση:

$$E = zV \quad (2.1)$$

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

$$zV = \frac{1}{2} m u^2 \quad (2.2)$$

Για το χρόνο πτήσης  $t$  και την απόσταση που ισοδυναμεί με το μήκος του σωλήνα πτήσης  $D$ , δεδομένου ότι  $u=D/t$ , λαμβάνουμε την σχέση:

$$zV = \frac{1}{2} m \left( \frac{D}{t} \right)^2 \quad (2.3)$$

Επομένως, λύνοντας τη σχέση 2.3 ως προς  $m/z$  προκύπτει η σχέση 2.4 που αποτελεί και την βάση λειτουργίας του φασματομέτρου TOF/MS:

$$\frac{m}{z} = \frac{2Vt^2}{D^2} \quad (2.4)$$

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

Ο αναλυτής χρόνου πτήσης εμφανίζει πολλά πλεονεκτήματα. Συνδυάζει απλότητα, υψηλή διαχωριστική ικανότητα  $R=20.000$ , καθώς και τη μεγαλύτερη ταχύτητα σάρωσης σε σχέση με κάθε άλλο ανιχνευτή ( $v = 10^6 \text{ m/z} \cdot \text{s}^{-1}$ ). Ειδικά η μεγάλη ταχύτητα σάρωσης οφείλεται στο γεγονός ότι για κάθε εφαρμογή παλμού καταγράφεται ένα φάσμα, χωρίς να χρειάζεται σάρωση κάποιου δυναμικού ή ρεύματος όπως σε άλλους αναλυτές. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα του αναλυτή TOF είναι το απεριόριστο εύρος μάζας που μπορεί να ανιχνεύει, αφού στον ανιχνευτή του φθάνουν τελικά όλα τα ιόντα που σχηματίζονται σε κάθε παλμό. Το απεριόριστο αυτό εύρος μάζας ευνοεί την ανάλυση βιομορίων και πρωτεϊνών. Στα πλεονεκτήματα του αναλυτή TOF συγκαταλέγονται επίσης η μηχανική του ανθεκτικότητα, η εύκολη πρόσβαση στην πηγή ιόντων, η επίτευξη χαμηλών ορίων ανίχνευσης της τάξης των pg και fmol, καθώς και η υψηλή του ακρίβεια. Στα μειονεκτήματα της τεχνικής TOF συγκαταλέγονται το υψηλό κόστος των ηλεκτρονικών που απαιτούνται για τόσο υψηλές ταχύτητες σάρωσης, οι υψηλές απαιτήσεις κενού και η περιορισμένη χρήση στην ποσοτική ανάλυση.

### Διαχωριστική Ικανότητα

Η διαχωριστική ικανότητα (resolution,  $R$ ) του αναλυτή χρόνου πτήσης υπολογίζεται με την εφαρμογή των εξισώσεων που ακολουθούν:

$$\frac{m}{z} = \left(\frac{2V}{D^2}\right) t^2 \quad (2.4) \quad \frac{1}{z} dm = \left(\frac{2V}{D^2}\right) 2t dt \quad (2.5) \quad R = \frac{m}{\Delta m} = \frac{t}{2\Delta t} \quad (2.6)$$

Όπου  $m$  και  $t$ , η μάζα και ο χρόνος πτήσης του ιόντος αντίστοιχα και  $\Delta m$  και  $\Delta t$ , το εύρος των κορυφών μετρούμενο στο ημιύψος (full width half maximum, FWHM) στους άξονες μάζας και χρόνου, αντίστοιχα. Εφόσον η διαχωριστική ικανότητα είναι ανάλογη του χρόνου πτήσης και του μήκους που διανύουν τα ιόντα, ένας τρόπος για να αυξηθεί η διαχωριστική ικανότητα είναι να αυξηθεί το μήκος του σωλήνα πτήσης. Όμως υπερβολική αύξηση του σωλήνα πτήσης, δεν κάνει το όργανο μόνο δύσχρηστο, αλλά παράλληλα μειώνει την απόδοση του, αφού αυξάνει τις συγκρούσεις των ιόντων στο εσωτερικό του σωλήνα πτήσης. Ένας άλλος τρόπος αύξησης της διαχωριστικής ικανότητας μπορεί να επιτευχθεί με αύξηση του χρόνου πτήσης των ιόντων, μειώνοντας το δυναμικό επιτάχυνσης. Αυτό όμως επιδρά αρνητικά στην ευαισθησία του οργάνου. Ο μόνος τρόπος να επιτευχθεί ταυτοχρόνως καλή διαχωριστική ικανότητα και ευαισθησία είναι η χρήση ενός σωλήνα μήκους 1-2 m και ενός δυναμικού τουλάχιστον 20 kV.

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

1. Η διασπορά του χρόνου σχηματισμού των ιόντων στην πηγή ιοντισμού
2. Η διασπορά ταχυτήτων και κινητικής ενέργειας
3. Turn around time : ο χρόνος που μεσολαβεί ούτως ώστε τα ιόντα που κινούνται σε κατεύθυνση αντίθετη προς τον ανιχνευτή να επιβραδυνθούν σε μηδενική ταχύτητα και στη συνέχεια να επιταχυνθούν περνώντας ξανά από την αρχική τους θέση
4. Η διασπορά στο χώρο
5. Η ανομοιόμορφη επιτάχυνση

Δύο από τις κυριότερες τεχνικές που εφαρμόζονται προς ελαχιστοποίηση των παραπάνω παραγόντων που θα εξεταστούν στη συνέχεια είναι α) η χρήση του ανακλαστικού κατόπτρου (reflectron) και β) χρήση ορθογώνιας επιτάχυνσης ιόντων (orthogonal acceleration).

### Ευαισθησία

Η ευαισθησία του αναλυτή χρόνου πτήσης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον «Παράγοντα Κύκλου Λειτουργίας», που αναφέρεται στο λόγο του αριθμού των ιόντων που εξέρχεται από το πεδίο επιτάχυνσης σε σχέση με τον αριθμό των ιόντων φτάνουν σε αυτό. Πιο αυστηρά, θα μπορούσε να οριστεί ως ποσοστό χρόνου της συνολικής διάρκειας του παλμού που απαιτείται ώστε τα ιόντα με δεδομένη τιμή  $m/z$  να φτάσουν στον ανιχνευτή και να καταγραφούν, δηλαδή μέτρο του ποσοστού των ιόντων που ανιχνεύονται σε σχέση με αυτά που επιταχύνονται. Το βέλτιστο αποτέλεσμα λαμβάνεται όταν ο χρόνος που απαιτείται για την πλήρωση του

επιταχυντή με ένα πακέτο ιόντων είναι ίδιος με το χρόνο που χρειάστηκε το προηγούμενο πακέτο να φθάσει από τον επιταχυντή στον ανιχνευτή, οπότε και εξασφαλίζεται ότι τα ελαφρύτερα ιόντα του νέου πακέτου δε θα φθάσουν στον αναλυτή μαζί με τα βαρύτερα ιόντα του προηγούμενου πακέτο.

### 2.4.3.3 ΑΝΑΚΛΑΣΤΙΚΟ ΚΑΤΟΠΤΡΟ

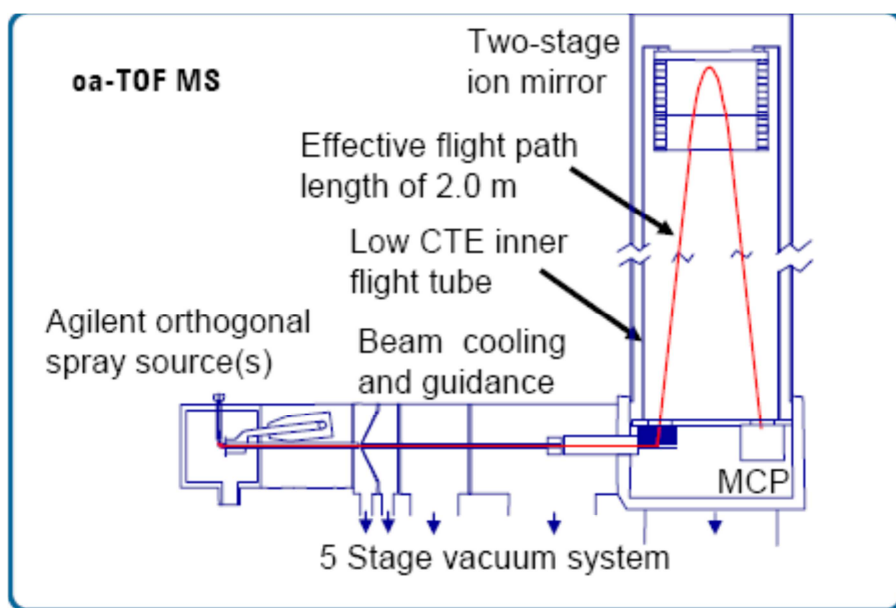
Το ανακλαστικό κάτοπτρο αποτελεί μια διάταξη που χρησιμοποιήθηκε στους αναλυτές χρόνου πτήσης για να περιορίσει τη διασπορά των ταχυτήτων που παρατηρείται κατά την πτήση ιόντων με την ίδια, τιμή λόγου  $m/z$  και να βελτιώσει τη διαχωριστική ικανότητα. Αποτελείται από ένα ηλεκτροστατικό κάτοπτρο που δημιουργεί ένα ή περισσότερα πεδία επιβράδυνσης και τοποθετείται στο τέλος της διαδρομής του θαλάμου πτήσης. Τα ιόντα που φτάνουν στο κάτοπτρο διεισδύουν σε αυτό για χρόνο που είναι αντιστρόφως ανάλογος της ενέργειας πτήσης τους, δηλαδή ιόντα που κινούνται ταχύτερα με μεγαλύτερη ενέργεια εισέρχονται σε μεγαλύτερο βάθος στο κάτοπτρο και επομένως απαιτείται μεγαλύτερο χρονικό διάστημα για την ανάκλαση τους. Έτσι, ανακλώνται ταυτόχρονα με τα βραδύτερα ιόντα του ίδιου  $m/z$  που εισέρχονται λιγότερο βαθιά στο κάτοπτρο. Επομένως, με κατάλληλη ρύθμιση του επιβραδυντικού πεδίου γίνεται απόσβεση των διασπορών ταχύτητας και χωροδιάταξης, με αποτέλεσμα τα ιόντα με την ίδια τιμή  $m/z$  να προσπίπτουν ταυτόχρονα στον ανιχνευτή. Η γωνία εισόδου των ιόντων στο κάτοπτρο αποκλίνει λίγο από τις  $90^\circ$  και έτσι τα ιόντα που αναδύονται από το κάτοπτρο ακολουθούν ανεστραμμένη διαδρομή διαφορετική από την προηγούμενη και έτσι είναι δυνατή η τοποθέτηση του ανιχνευτή σε σημείο που δεν παρεμβάλλεται στον άξονα πορείας της αρχικής δέσμης των ιόντων που εξέρχονται από τον επιταχυντή.

Επίσης η τοποθέτηση του κατόπτρου αυξάνει (σχεδόν διπλασιάζει) τη διαδρομή πτήσης των ιόντων χωρίς να αυξάνεται το μέγεθος του οργάνου, γεγονός που συντελεί στην βελτίωση της διαχωριστικής ικανότητας του αναλυτή χρόνου πτήσης. Η ικανότητα του ανακλαστικού κατόπτρου να διορθώνει τη διασπορά μέχρι και 20 eV στις κινητικές ενέργειες ιόντων με ίδιο  $m/z$ , είναι σημαντικότερη από την αύξηση του χρόνου πτήσης που επίσης επιτυγχάνεται. Πρέπει να σημειωθεί ότι πολλά σύγχρονα όργανα TOF έχουν πάνω από ένα ανακλαστικά κάτοπτρα. Άλλωστε το ολοένα αυξανόμενο ενδιαφέρον για μελέτη ιόντων με λόγο  $m/z$  πάνω και από 50000, απαιτεί την επίτευξη όσο το δυνατόν καλύτερης διαχωριστικής ικανότητας.

### 2.4.3.4 ΟΡΘΟΓΩΝΙΑ ΕΠΙΤΑΧΥΝΣΗ ΙΟΝΤΩΝ

Καθοριστικής σημασίας για τη βελτίωση του «Παράγοντα Κύκλου Λειτουργίας» των αναλυτών χρόνου πτήσης αποτέλεσε η τροποποίηση των συστημάτων για την επίτευξη ορθογωνίας επιτάχυνσης των ιόντων (orthogonal acceleration, oa), η οποία βασίστηκε στο γεγονός ότι τα ιόντα που οι αρχικές τους

ταχύτητες είναι κάθετες προς τη φορά πτήσης παρουσιάζουν μικρότερη διασπορά χρόνων πτήσης. Στα συστήματα αυτά η δέσμη των ιόντων που προέρχεται από την πηγή ιοντισμού αφήνεται αρχικά να γεμίσει ένα χώρο του επιταχυντή των ιόντων, στον οποίο δεν υπάρχει επίδραση πεδίου. Στη συνέχεια, με την εφαρμογή παλμού δυναμικού (10-100 nsec) μεταξύ των ηλεκτροδίων του επιταχυντή δημιουργείται αναπαραγωγίμο ηλεκτρικό πεδίο, υπό την επίδραση του οποίου όλα τα ιόντα που βρίσκονται στο χώρο του επιταχυντή εισέρχονται μέσω λεπτής σχισμής σε ένα δεύτερο χώρο, στον οποίο υφίστανται ταυτόχρονα την ίδια επιτάχυνση και με φορά κάθετη προς την αρχική διεύθυνση κίνησης εισέρχονται στο θάλαμο πτήσης. Το ηλεκτροστατικό πεδίο στο χώρο αυτό είναι έτσι σχεδιασμένο ούτως ώστε η εφαρμοζόμενη δύναμη να είναι αυστηρά κάθετη στον άξονα της δέσμης των ιόντων και καθώς αυτά κινούνται σχεδόν παράλληλα χωρίς διασπορά ταχύτητας στον κάθετο άξονα, επιτυγχάνεται η βέλτιστη εστίαση των ιόντων στον άξονα του θαλάμου πτήσης. Όλα τα παραπάνω συμβάλλουν ώστε να αυξηθεί η διαχωριστική ικανότητα (Εικόνα 2.3).



**ΕΙΚΟΝΑ 2.3:** Αναλυτής Ορθογώνιας Επιτάχυνσης Χρόνου Πτήσης (oa-TOF)

## 2.5 ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ ΙΟΝΤΩΝ

Ο ανιχνευτής ιόντων παράγει στην έξοδό του ηλεκτρικό σήμα ανάλογο του αριθμού ιόντων και του φορτίου τους, που δέχεται στην είσοδό του στη χρονική μονάδα. Οι συνηθέστεροι ανιχνευτές ιόντων είναι το φαρανταϊκό κύπελλο, ο ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής και η φωτογραφική πλάκα. Ο ανιχνευτής φασματομέτρου μαζών λειτουργεί με δύο κύριους τρόπους, η επιλογή των οποίων καθορίζεται από την φύση και τον αντικειμενικό σκοπό της ανάλυσης. Αυτοί οι

τρόποι είναι αφενός η ολική σάρωση (Full Scan) και αφετέρου η σάρωση επιλεγμένων ιόντων (Selected Ion Monitoring, SIM). Συγκεκριμένα, ολική σάρωση γίνεται όταν ο ανιχνευτής σαρώνει πάνω από μια περιοχή τιμών μάζας  $m/z$ . Ο χρόνος που απαιτείται είναι τυπικά 1s για να σαρώσει μια περιοχή  $m/z$  50-500. Η ολική σάρωση είναι απαραίτητη όταν θέλουμε να προσδιορίσουμε τη δομή μιας άγνωστης ένωσης. Επιπρόσθετα, το φάσμα ολικής σάρωσης μπορεί να συγκριθεί με πρότυπα φάσματα της βιβλιοθήκης, καθώς πολλά φάσματα παραγώγων έχουν δημοσιευθεί για το σκοπό αυτό. Η ευαισθησία της ανίχνευσης μπορεί να αυξηθεί σημαντικά με τη σάρωση επιλεγμένων ιόντων, 1000 φορές περισσότερο σε ορισμένες περιπτώσεις, επιτρέποντας στον ανιχνευτή να παρακολουθεί μόνο ένα, δύο ή και περισσότερα ιόντα. Η σάρωση επιλεγμένων ιόντων είναι κατάλληλη όταν το φάσμα μαζών και τα χαρακτηριστικά ανίχνευσης της υπό προσδιορισμό ουσίας είναι γνωστά.

Συγκριτικά με την ανίχνευση ιόντων σε αναλυτές σάρωσης, η ανίχνευση ιόντων σε εφαρμογές TOF/MS είναι απαιτητική λόγω της μικρής χρονικής κλίμακας των συμβάντων άφιξης των ιόντων. Οι ανιχνευτές πρέπει να έχουν μεγάλο μέγεθος στη διάστασή τους που είναι παράλληλη στη δέσμη ιόντων διότι το μήκος τους πρέπει να είναι τουλάχιστον ίσο με το πλάτος της επιταχυνόμενης ιοντικής δέσμης στην περιοχή πτήσης.

Μια από τις προδιαγραφές των φασματομέτρων με αναλυτή χρόνου πτήσης ιόντων στην οποία δίνεται έμφαση είναι ο αριθμός φασμάτων που καταγράφονται ανά sec. Αν υποθεθεί μέγιστος χρόνος πτήσης 50  $\mu\text{sec}$  τότε ο ρυθμός σάρωσης είναι 20 kHz, που σημαίνει ότι 20000 φάσματα λαμβάνονται κάθε sec. Στην πραγματικότητα, ένα σύνολο από πρακτικούς και θεμελιώδεις περιορισμούς μειώνουν σημαντικά τον αριθμό «χρήσιμων» φασμάτων που καταγράφονται στα 100 φάσματα/sec, μέγεθος που εξακολουθεί να είναι σημαντικά υψηλότερο σε σχέση με τα φασματομέτρα σάρωσης. Η τρέχουσα διαθέσιμη τεχνολογία ηλεκτρονικών υπολογιστών έχει τη δυνατότητα επεξεργασίας φασμάτων που λαμβάνονται σε αυτό το ρυθμό, αλλά οι μέθοδοι ψηφιοποίησης παλμού που είναι διαθέσιμες δεν καλύπτουν πλήρως τις ανάγκες των σημερινών αναλυτών TOF/MS.

## 2.6 ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟΣ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΗΣ

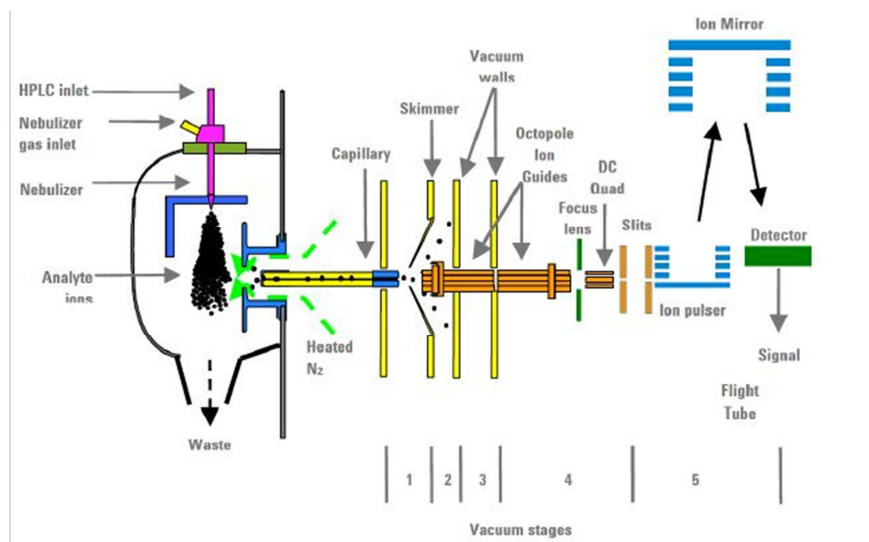
Η ερμηνεία των φασμάτων διευκολύνεται σημαντικά με τη χρησιμοποίηση ηλεκτρονικού υπολογιστή, ο οποίος εκτός από σύστημα καταχώρησης και παρουσίασης των δεδομένων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταχύτατη βαθμονόμηση του οργάνου και τον προσδιορισμό της ταυτότητας των ιοντικών θραυσμάτων από την ακριβή τιμή  $m/z$  ή τις σχετικές τιμές των ισοτοπικών κορυφών. Επιπλέον, με εφαρμογή κατάλληλου λογισμικού, ο υπολογιστής μπορεί, από τα φασματικά δεδομένα, να κάνει προκαταρκτικές υποδείξεις στο χρήστη για την ταυτότητα της εξεταζόμενης ένωσης. Τέλος, ο υπολογιστής μπορεί να λειτουργήσει ως μια βιβλιοθήκη φασμάτων ώστε ο χρήστης να είναι σε θέση να συγκρίνει το

φάσμα μαζών που έχει με αποθηκευμένα στη μνήμη του H/Y φάσματα και να αποφανθεί έτσι αν το εξεταζόμενο φάσμα μαζών αποδίδεται σε μια ένωση ή σε μείγμα ενώσεων και ποιών. Από τη στιγμή που το φάσμα μαζών βρίσκεται στην μνήμη του υπολογιστή, μπορεί να αναπαραχθεί με τον επιζητούμενο βαθμό ευαισθησίας και οι σχετικές τιμές εντάσεως κάθε κορυφής να παρουσιασθούν σε εκτυπωτές.

## 2.7 ΤΕΧΝΙΚΗ LC/QTOF-MS

Η συνδυαστική τεχνική της υγροχρωματογραφίας με τετραπολικό αναλυτή χρόνου πτήσης ιόντων (LC/QTOF-MS) αποτελεί συνδυασμό ενός τετράπολου για την επιλογή των πρόδρομων ιόντων και ενός αναλυτή χρόνου πτήσης ιόντων για την ανίχνευση των παραγόμενων ιόντων, δηλαδή των θραυσμάτων, έτσι καθιστά εύκολο τον υπολογισμό της μάζας με μόνο δύο σημεία αναφοράς. Ο συνδυασμός της υγροχρωματογραφίας με την τεχνική QTOF-MS παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα και βρίσκει ολοένα αυξανόμενη εφαρμογή σε ποιοτικές και ποσοτικές αναλύσεις φαρμακευτικών ουσιών και βιομορίων (πρωτεΐνες, DNA ) σε πολύπλοκα βιολογικά δείγματα. Η τεχνική LC/QTOF-MS βρίσκει ευρεία εφαρμογή σε τομείς όπως είναι η τοξικολογία, ο περιβαλλοντικός έλεγχος, και ο έλεγχος ντόπινγκ, όπου υπάρχει η ανάγκη ταυτόχρονης σάρωσης εκατοντάδων ή χιλιάδων ουσιών με ακρίβεια και αξιοπιστία. Η τεχνική LC/QTOF-MS ανταποκρίνεται σε αυτές τις απαιτήσεις, τόσο για την ανίχνευση, όσο και για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των ουσιών αυτών. Οι αναλύσεις γίνονται κυρίως σε δείγματα ούρων στα οποία οι ανιχνευόμενες ουσίες (μητρικές ουσίες ή μεταβολίτες) μπορούν να ανιχνευθούν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από ό,τι στο αίμα. Επίσης επιτρέπει τον απευθείας προσδιορισμό πολικών αναλυτών που εκκρίνονται στα ούρα. Η ανίχνευση των ουσιών πραγματοποιείται με μεγάλη εκλεκτικότητα και ευαισθησία με την εξέταση των λαμβανόμενων φασμάτων μαζών και τη χρήση χρωματογραφημάτων ακριβούς μάζας με αφαίρεση του υποβάθρου, τη χρήση ουσίας βαθμονόμησης και τη σύγκριση με χρωματογραφήματα και φάσματα προτύπων ουσιών.

Σήμερα η τεχνική LC/QTOF-MS θεωρείται μια από τις καλύτερες τεχνικές από άποψη κόστους-αποτελεσματικότητας για την ανίχνευση μη πτητικών ουσιών σε αναλύσεις ρουτίνας. Τα κυριότερα πλεονεκτήματά της είναι η εξαιρετικά καλή διαχωριστική ικανότητα ( $R > 20.000$ ), το μεγάλο εύρος μαζών (2-25.000 amu), η υψηλή ευαισθησία και η μεγάλη ταχύτητα σάρωσης (106 amu/s). Τα φασματομέτρα μαζών με τετραπολικούς αναλυτές χρόνου πτήσης ιόντων παρέχουν το φάσμα μάζας ταχύτατα (μπορούν να ληφθούν περισσότερα από 1000 φάσματα/s).



**ΕΙΚΟΝΑ 2.4 :** Σχηματική απεικόνιση του συστήματος LC/ESI-TOF-MS ορθογώνιας επιτάχυνσης με ανακλαστικό κάτοπτρο

## 2.8 ΔΙΔΥΜΗ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ (MS/MS)

Πολλές φορές για την ταυτοποίηση ενώσεων σε πολύπλοκα μίγματα χρειάζονται πρόσθετες πληροφορίες που λαμβάνονται με την εφαρμογή συζευγμένης ή δίδυμης φασματομετρίας μαζών (Tandem Mass Spectrometry, MS/MS). Η δίδυμη φασματομετρία μαζών περιλαμβάνει δύο ή περισσότερα στάδια φασματομετρικής ανάλυσης. Στη δίδυμη φασματομετρία μαζών, τα ιόντα και ενώ έχουν αποκτήσει αρκετή εσωτερική ενέργεια μπορούν να θραυσματοποιηθούν ώστε να δώσουν παραγόμενα ιόντα και ουδέτερα θραύσματα. Αυτά τα θραύσματα μπορούν να διακριθούν σύμφωνα με το χώρο όπου έγιναν οι θραυσματοποιήσεις. Εάν ο χρόνος ζωής του ιόντος είναι μεγαλύτερος από το χρόνο πτήσης, τότε το ιόν φτάνει στον ανιχνευτή χωρίς να πραγματοποιηθεί θραυσματοποίηση. Ενώ, εάν ο χρόνος ζωής του ιόντος είναι μικρότερος από το χρόνο που ξοδεύει το ιόν πριν την επιτάχυνση, το ιόν θραυσματοποιείται πριν να εκδιωχθεί από την πηγή. Οι θραυσματοποιήσεις διαχωρίζονται στις θραυσματοποιήσεις εντός της πηγής (In Source Decay, ISD) και εκτός της πηγής (Post Source Decay, PSD). Το πρόδρομο ιόν και τα θραύσματα ιόντων έχουν την ίδια κινητική ενέργεια μετά την επιτάχυνση και έτσι φτάνουν στον ανιχνευτή ξεχωριστά, ανάλογα με το λόγο  $m/z$ . Ο χρόνος ζωής ενός ιόντος μπορεί να είναι ενδιάμεσος του χρόνου που ξοδεύει στην πηγή και στο χρόνο πτήσης του. Τα συγκεκριμένα αυτά ιόντα είναι αρκετά σταθερά ώστε να «αφήσουν» την πηγή αλλά περιέχουν αρκετή περίσσεια ενέργεια ώστε να επιτρέψουν τη θραυσματοποίηση τους στην ελεύθερη περιοχή του σωλήνα πτήσης, πριν να φτάσουν στον ανιχνευτή. Αυτό αντιστοιχεί στη θραυσματοποίηση μετασταθών ιόντων.

Σε ένα σύστημα MS/MS το μίγμα-στόχος ιοντίζεται επιλεκτικά και τα χαρακτηριστικά του ιόντα διαχωρίζονται από τα άλλα του μίγματος. Τα επιλεγμένα πρωταρχικώς ιόντα συγκρούονται κατόπιν με μόρια ενός αδρανούς αερίου σε μια

ενδιάμεση περιοχή αντιδράσεων (collision cell), ώστε να παραχθούν θραύσματα τα οποία χωρίζονται και ταυτοποιούνται στο δεύτερο φασματομέτρο. Κάθε αναλυτής μαζών σαρώνει, και επιτρέπει τη διόδο ενός μόνο ιόντος ή όλων των διερχομένων ιόντων. Στο ενδιάμεσο δύο φασματομετρήσεων τα ιόντα υποβάλλονται σε ορισμένες από τις παρακάτω διαδικασίες: συγκρούσεις με ουδέτερα ή αδρανή αέρια (π.χ. He), συγκρούσεις με επιφάνειες, αλληλεπίδραση με φωτόνια, ηλεκτρόνια ή άλλα ιόντα, επιτάχυνση ή επιβράδυνση, εξουδετέρωση, αποσύνθεση - διάσπαση. Η πολλαπλότητα των επιλογών αυτών επιτρέπει απεριόριστες επιλογές ως προς τον τρόπο λήψης των φασμάτων δίδυμης φασματομετρίας μαζών. Ενδεικτικά οι κυριότερες είναι οι εξής:

- **Σάρωση του θυγατρικού ιόντος:** Αποτελεί την πιο διαδεδομένη μέθοδο σάρωσης σε MS/MS. Επιλέγεται συγκεκριμένο ιόν στον πρώτο αναλυτή και διοχετεύεται υψηλή ή χαμηλή ενέργεια σε αυτό. Ακολουθεί θραυσματοποίηση στην ενδιάμεση περιοχή αντιδράσεων και τα παραγόμενα ιόντα οδηγούνται στο δεύτερο αναλυτή, όπου διαχωρίζονται σύμφωνα με το λόγο  $m/z$ . Λαμβάνεται έτσι το φάσμα μάζας των παραγόμενων ιόντων.
- **Σάρωση του πρόδρομου ιόντος**
- **Παρακολούθηση προεπιλεγμένου ιόντος/ιόντων (Single/Multiple Reaction Monitoring, SRM/MRM):** Προεπιλέγεται συγκεκριμένο ιόν με λόγο  $m/z$  στον πρώτο αναλυτή, ακολουθεί θραυσματοποίηση στην ενδιάμεση περιοχή αντιδράσεων και κατόπιν επιλέγεται συγκεκριμένο ιόν. Τα παραγόμενα ιόντα οδηγούνται στο δεύτερο αναλυτή, απ' όπου εξέρχεται ιόν προεπιλεγμένου λόγου  $m/z$ .
- **Σάρωση σταθερής απώλειας ή σταθερής προσθήκης ουδέτερου θραύσματος.**



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

### ΠΕΠΤΙΔΙΑ ΚΑΙ ΝΤΟΠΙΝΓΚ

#### 3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Με τον όρο πεπτίδια ορίζουμε τα μόρια εκείνα που προκύπτουν από την αμιδική συμπύκνωση δύο ή περισσότερων αμινοξέων μέσω ενός αμιδικού ή αλλιώς πεπτιδικού δεσμού. Δημιουργούνται όταν η α-καρβοξυλική ομάδα του ενός αμινοξέος συνδεθεί με την α-αμιδική ομάδα ενός γειτονικού αμινοξέος με πεπτιδικό δεσμό. Όταν μια σειρά αμιξέων συνδέονται κατ'αυτόν τον τρόπο τότε έχουμε την δημιουργία μιας πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Τα πεπτίδια με μικρό αριθμό αμινοξέων ονομάζονται ολιγοπεπτίδια ή απλά πεπτίδια. Μια πολυπεπτιδική αλυσίδα αποτελείται από ένα σταθερά επαναλαμβανόμενο τμήμα, το οποίο ονομάζεται κύρια αλυσίδα ή κορμός, και ένα μεταβλητό τμήμα που αποτελείται από τις διάφορες πλευρικές ομάδες. Τα πεπτίδια διακρίνονται από τις πρωτεΐνες με βάση το μέγεθος, και ως αυθαίρετο σημείο αναφοράς μπορεί να γίνει κατανοητό να περιέχουν περίπου 50 ή λιγότερα αμινοξέα. Οι πεπτιδικές και πρωτεΐνες ορμόνες είναι ορμόνες των οποίων τα μόρια είναι πεπτίδια ή πρωτεΐνες, αντίστοιχα. Οι τελευταίες έχουν μεγαλύτερα μήκη αλυσίδων αμινοξέων από τις πρώτες. Οι ορμόνες αυτές έχουν επίδραση στο ενδοκρινικό σύστημα των ζώων, συμπεριλαμβανομένων και των ανθρώπων.

Οι ενδογενείς ενδοκρινείς ορμόνες διεγείρουν μια ποικιλία φυσιολογικών διαδικασιών του οργανισμού, όπως ο μεταβολισμός, η ανάπτυξη, η ισορροπία του νερού στον οργανισμό, η καρδιαγγειακή λειτουργία και η αναπαραγωγή. Τόσο τα πεπτίδια όσο και οι πρωτεΐνες στόχοι που έχουν ιδιότητες που προάγουν την ανάπτυξη και είναι παρόμοιες με ορμόνες που εμφανίζονται ήδη στον ανθρώπινο οργανισμό δύνανται να χρησιμοποιηθούν για αθέμιτους σκοπούς σαν ενισχυτικά απόδοσης στον αθλητισμό και για τον λόγο αυτό, είναι και αυτές που ανιχνεύονται στην ανάλυση ελέγχου ντόπινγκ. Η WADA εδώ και αρκετά χρόνια έχει συμπεριλάβει στον Κατάλογο Απαγορευμένων Ουσιών μια πλειάδα πεπτιδικών ορμονών και συναφών ουσιών, οι περισσότερες από τις οποίες μάλιστα εμφανίζονται φυσικά στον ανθρώπινο οργανισμό. Σύμφωνα λοιπόν με τον Κατάλογο Απαγορευμένων Ουσιών της WADA, μια ποικιλία από πεπτιδικά φάρμακα και υποψήφια φάρμακα απαγορεύονται στον αθλητισμό, καθώς μπορεί να έχουν άμεσες ή έμμεσες επιπτώσεις στην ανάπτυξη μυών. Η πλειοψηφία των ενώσεων αυτών ανήκει στην κατηγορία S2 (πεπτιδικές ορμόνες, αυξητικοί παράγοντες, σχετικές ουσίες και μιμητικά), αλλά και σε άλλες κατηγορίες, όπως «ορμόνες και ρυθμιστές του μεταβολισμού» (S4) και «διουρητικά και παράγοντες συγκάλυψης» (S5), πεπτίδια και πρωτεΐνες όπως ινσουλίνες, λευκωματίνη, η δεσμοπρεσσίνη.

## **3.2 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ**

### **3.2.1 ΑΥΞΗΤΙΚΗ ΟΡΜΟΝΗ**

Η αυξητική ορμόνη (Growth Hormone, GH) ή σωματοτροπίνη, είναι μία πολυπεπτιδική ορμόνη που υπάρχει φυσικά στον ανθρώπινο οργανισμό και εκκρίνεται από τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης. Η παράνομη χρήση της GH ή η αύξηση της ενδογενούς έκκρισής της μέσω χρήσης των εκκριματογωγών αυξητικής ορμόνης (GHS) από τους αθλητές έχει απαγορευτεί από τη WADA. Η αυξητική ορμόνη (GH) είναι ένας προαγωγός ανάπτυξης ιστού σε παιδιά και κατά κύριο λόγο χρησιμοποιείται ιατρικά σε παιδιά με έλλειψη ή ανεπάρκεια αυξητικής ορμόνης και μικρή ανάπτυξη λόγω νεφρικής ανεπάρκειας είτε σε παιδιά με σύνδρομο Turner, ή με σύνδρομο Prader-Willi. Μετά την εφηβεία είναι κατά κύριο λόγο μια μεταβολική ορμόνη ενώ στους ενήλικες έχει εγκριθεί η χρήση της για απώλεια ιστών ή έλλειψη αυξητικής ορμόνης λόγω AIDS ή όγκου στην υπόφυση. Η έκκριση της GH στην υπόφυση ελέγχεται από ένα διπλό μηχανισμό υποθαλάμου, με μια διεγερτική δράση από την εκλυτική ορμόνη της GH (GHRH) και ενός ανασταλτικού αποτελέσματος από τη σωματοστατίνη. Η αυξητική ορμόνη επιταχύνει την ανάρρωση από αθλητικούς τραυματισμούς και διεγείρει την ανάπτυξη των μυών. Εκτός από τα γνωστά αποτελέσματά της να αυξήσει την παραγωγή γάλακτος στις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής, η ανασυνδυασμένη GH (rGH) μπορεί να είναι ιδιαίτερα ελκυστική για τους αθλητές που αναζητούν ευκαιρίες για να ενισχύσουν την αθλητική τους απόδοση, καθώς και για τους κτηνοτρόφους οι οποίοι αναζητούν ευκαιρίες για να ενισχύσουν την ανάπτυξη των μυών και / ή την παραγωγή γάλακτος. Η αναβολική της δράση την κάνει ελκυστική για μια πληθώρα παθήσεων όπως είναι τα σοβαρά εγκαύματα, η κυστική ίνωση, η οστεοπόρωση, το σύνδρομο Down καθώς και τα προβλήματα γονιμότητας.

Ο έλεγχος εξωγενούς GH στηρίζεται στη μέτρηση του λόγου των δύο ισομορφών της GH 20 kDa/22 kDa. Η χρήση ανασυνδυασμένης GH αλλοιώνει τον λόγο αυτό και συνεπώς είναι δυνατή η ανίχνευση της χρήσης GH. Για να ξεπεράσουν αυτό το εμπόδιο γίνεται χρήση πεπτιδίων απελευθέρωσης GH (Growth Hormone Releasing Peptides, GHRPs). Αυτό έχει σαν συνέπεια η GH που εκκρίνεται να είναι ενδογενής και συνεπώς να μην ανιχνεύεται από την προηγούμενη μέθοδο ανίχνευσης.

#### **3.2.1.1 ΕΚΚΡΙΜΑΤΑΓΩΓΟΙ ΑΥΞΗΤΙΚΗΣ ΟΡΜΟΝΗΣ**

Την τελευταία δεκαετία έχει αυξηθεί ιδιαίτερα το ενδιαφέρον για τους εκκριματογωγούς αυξητικής ορμόνης (GHS) λόγω της πολλά υποσχόμενης χρήσης τους στην ιατρική και την κατάχρησή τους ως ντόπινγκ στον αθλητισμό. Οι εκκριματογωγοί της αυξητικής ορμόνης (GHS) διεγείρουν τη ενδογενή παραγωγή και έκκριση της αυξητικής ορμόνης μέσω άμεσης δράσης στην υπόφυση. Θα μπορούσαν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες: 1) ορμόνες έκκρισης αυξητικής ορμόνης (GHRH)

και 2) πεπτίδια απελευθέρωσης αυξητικής ορμόνης (GHRPs). Με την ενεργοποίηση της πλήρους αλληλουχίας της GH και ως εκ τούτου, όλων των σχετικών με την GH λειτουργιών, οι GHS έχουν μεγάλες δυνατότητες για κατάχρηση στον αθλητισμό ή τα ζώα εκτροφής. Επιπλέον, οι GHS μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως παράγοντες συγκάλυψης στην απαγορευμένη χορήγηση ανασυνδυασμένης GH (rGH) διότι η διεγερμένη έκκριση όλων των φυσικών ισομορφών της υπόφυσης θα μειώσει την αναλογία ανασυνδυασμένης / υποφυσικής GH που χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση της GH. Ένα άλλο "πλεονέκτημα" της χρήσης GHS σε συνδυασμό με rGH είναι η συνεχής διέγερση της ενδογενούς έκκρισης της GH που ξεπερνά το μηχανισμό αρνητικής ανάδρασης που συνδέεται με τη χορήγηση μόνο της rGH.

Η GHRH είναι ένα γραμμικό πεπτίδιο που αποτελείται από τα κατάλοιπα 40-ή 44-αμινοξέων. Αρκετά ανάλογα της GHRH (π.χ. Σερμορελίνη, Τεσαμορελίνη και CJC-1295) έχουν αναπτυχθεί και διατίθενται στο εμπόριο για τη θεραπεία και τη διάγνωση της ανεπάρκειας της GH στον άνθρωπο. Τα GHRPs, από την άλλη πλευρά, είναι συνθετικά, μικρά (<1 kDa) πεπτίδια που αποτελούνται από τέσσερα έως επτά υπολείμματα αμινοξέων, συμπεριλαμβανομένων των GHRP-2 (πραμορελίνη) GHRP-3, GHP-6\_freeAcid, Ibutamoren (MK-677), Anamorelin, Capromorelin και AOD-9604.

### **3.2.1.2 ΠΕΠΤΙΔΙΑ ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗΣ ΑΥΞΗΤΙΚΗΣ ΟΡΜΟΝΗΣ**

Τα πεπτίδια απελευθέρωσης αυξητικής ορμόνης (GHRPs) είναι συνθετικά, μη φυσικά πεπτίδια με υψηλή διεγερτική επίδραση στην έκκριση της σωματοτροπίνης σε ανθρώπους και ζώα. Δεν είναι δομικά ομόλογα των ορμονών απελευθέρωσης αυξητικής ορμόνης και δρουν μέσω συγκεκριμένων υποδοχέων είτε στην υπόφυση είτε στον υποθάλαμο και των ανθρώπων και των ζώων. Ο μηχανισμός επίδρασης των GHRPs είναι ακόμα ασαφής, ωστόσο σήμερα αρκετά δεδομένα ευνοούν την υπόθεση ότι τα πεπτίδια αυτά θα μπορούσαν να δράσουν αντισταθμίζοντας την δράση της σωματοστατίνης τόσο σε επίπεδο υπόφυσης όσο και σε επίπεδο υποθαλάμου ή τουλάχιστον εν μέρει μέσω ενός μηχανισμού με την μεσολάβηση μιας ορμόνης έκκρισης της αυξητικής ορμόνης.

Τα πρώτα συνθετικά GHRPs ανακαλύφθηκαν σχεδόν πριν από 40 χρόνια, πολύ πριν από τα φυσικά GHRP. Ένα GHRP μήκους 28 αμινοξέων που ονομάστηκε γκρελίνη (ghrelin), ανακαλύφθηκε το 1999. Τα GHRPs περιλαμβάνονται στον Κατάλογο Απαγορευμένων Ουσιών της WADA ως «απελευθερωτικοί παράγοντες» από το Μάρτιο του 2016. Έχει αποδειχθεί ότι τα GHRPs αποβάλλονται ταχέως από το αίμα μετά από ενδοφλέβια χορήγηση. Το GHRP-6 ήταν το πρώτο εξαπεπτίδιο που μελετήθηκε εκτενώς σε ανθρώπους. Πιο πρόσφατα ένα επταπεπτίδιο, GHRP-1 και δύο ακόμα εξαπεπτίδια, GHRP-2 και Hexarelin, συντέθηκαν και είναι διαθέσιμα και αυτά προς μελέτη. Επιπλέον, έχουν αναπτυχθεί και μη-πεπτιδικά GHRP τα οποία

μιμούνται την δράση των GHRPs και δρουν μέσω των υποδοχέων των πεπτιδίων αυτών. Μεταξύ των μη-πεπτιδικών GHRP είναι το Ibutamoren (MK-677) το οποίο παρουσιάζει ένα ιδιαίτερο ενδιαφέρον.

Μετά τη χορήγηση σε ανθρώπους τα GHRP μεταβολίζονται σε διαφορετικά προϊόντα τα οποία συχνά έχουν υψηλότερα ποσά αποβολής στα ούρα. Προφανώς η μέθοδος για αξιόπιστη ανίχνευση δεν πρέπει να περιλαμβάνει μόνο τη μητρική ουσία αλλά και στοχευμένους μεταβολίτες έτσι ώστε να ελαττωθούν τα όρια ανίχνευσης και να βελτιωθεί η ακρίβεια της ταυτοποίησης. Επίσης έχει αναφερθεί σε μελέτες *in vitro* και *in vivo* ότι έχουν ανιχνευθεί πιθανοί μεταβολίτες των GHRPs σε ανθρώπους και αρουραίους. Ενδεικτικά έχει προκύψει ότι τα πεπτίδια μπορούν εύκολα να μεταφερθούν μέσω του ρινικού επιθήλιου και να διεγείρουν την έκκριση GH σε υγιή άτομα μετά από ρινική χορήγηση, η οποία σαν μέθοδος είναι πολλά υποσχόμενη και μπορεί να χρησιμοποιηθεί από αθλητές ως μια μη επεμβατική μέθοδος ντόπινγκ. Εκτός από τη γενική ικανότητά τους να αυξάνουν την hGH, τα GHRP φέρεται να διαθέτουν το δυναμικό να συγκαλύψουν μια πρόσφατη ένεση ανασυνδυασμένης hGH (rhGH), αντιδρώντας στην επίδραση καταστολής της εγχεόμενης αυξητικής ορμόνης επί της φυσικής παραγωγής και έκκρισης της hGH. Μπορούν, επίσης, και μιμούνται τη βιολογική δράση της ενδογενούς ορμόνης γκρελίνης (ghrelin) με αποτέλεσμα να επάγουν την έκκριση της αυξητικής ορμόνης (GH) από την υπόφυση. Τα GHRP και GHRH ενεργούν διαφορετικά στην έκκριση της GH της υπόφυσης. Τα GHRP, για παράδειγμα, επιδεικνύουν μεγαλύτερη δραστικότητα στην έκκριση της GH, ενώ ταυτόχρονη χορήγηση GHRH και GHRPs δείχνει μια συνεργιστική αύξηση στην έκλυση της GH. Η προκύπτουσα απόκριση GH μετά τη χορήγηση GHS εξαρτάται από την δραστικότητα των διαφόρων GHS.

Οι διαδικασίες ελέγχου ντόπινγκ επικεντρώνονται σ αυτή την οικογένεια μικρών πεπτιδίων καθώς αυτά αποτελούν μια νέα στρατηγική εξαπάτησης των κανονισμών από τους αθλητές. Τα GHRPs μπορούν να ληφθούν από το στόμα και να προκαλέσουν μια μεγάλη παραγωγή από ενδογενή αυξητική ορμόνη. Έτσι, όταν ο καθιερωμένος έλεγχος για GH αποτυγχάνει, η χρήση αυτών των απαγορευμένων ουσιών παραμένει μη ανιχνεύσιμη. Μελέτες παρέχουν πληροφορίες για την αποτελεσματική ανίχνευση των απαγορευμένων πεπτιδίων όπως τα GHRP-2, GHRP-3, GHRP-6\_freeAcid, Ibutamoren, Anamorelin, Capromorelin και AOD-9604 με χρήση υδροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης συζευγμένης με φασματομετρία μαζών. Η μέθοδος αυτή δίνει την δυνατότητα αναδρομικής αξιολόγησης των ήδη υπαρχόντων δεδομένων για άγνωστους μέχρι στιγμής μεταβολίτες με τη βοήθεια της μη στοχευμένης προσέγγισης υψηλής ανάλυσης και ακρίβειας με λειτουργία πλήρους σάρωσης φασματομετρίας μαζών και επιπρόσθετα πειράματα χρήσης μεγαλύτερης ενέργειας σύγκρουσης .

Οι συνεχείς βελτιώσεις των αναλυτικών μεθόδων στα εργαστήρια ντόπινγκ, αναγκάζουν τους αθλητές να αναζητούν και να στρέφονται σε νέες στρατηγικές για να βελτιώσουν τις επιδόσεις τους. Η ύδροχρωματογραφία σε συνδυασμό με τη φασματομετρία μαζών είναι η καλύτερη τεχνική για τον προσδιορισμό των πεπτιδίων

σε βιολογικά δείγματα. Η χρήση της φασματομετρίας μαζών υψηλής ανάλυσης και υψηλής ακρίβειας, επιτρέπει το χαρακτηρισμό ουσιών με έναν άκρως εξελιγμένο τρόπο και προσφέρει πληροφορίες για άγνωστες ουσίες ή άγνωστους μεταβολίτες.

### **3.2.1.3 GHRP-2**

Το συνθετικό εξαπεπτίδιο GHRP-2 ή αλλιώς pralmorelin (D-Ala-D-(β-naphthyl)-Ala-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>) ανήκει στην οικογένεια των εκκριματογωγών της αυξητικής ορμόνης τα οποία ανακαλύφθηκαν την δεκαετία του '80 και είναι ένα ισχυρό πεπτίδιο απελευθέρωσης GH. Η κλινική χρήση του GHRP-2 είναι επί του παρόντος εγκεκριμένη στην Ιαπωνία για διαγνωστικές δοκιμές της ανεπάρκειας GH. Η χρήση του GHRP-2 ως θεραπευτική αγωγή της ανεπάρκειας GH μπορεί να γίνει με μορφή εναιωρήματος αντί για ενέσιμο. Επιπλέον, γίνεται κατάχρησή του από τους αθλητές σε συμπληρώματα διατροφής που περιέχουν αναβολικά στεροειδή και διεγερτικά. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι το GHRP-2 βρέθηκε σε συμπληρώματα διατροφής στην Κύπρο, τα οποία διατίθενται μέσω του διαδικτύου. Αυτό δείχνει ότι το GHRP-2 κατέχει σημαντική θέση στον συγκεκριμένο τομέα. Παρ' όλα αυτά όμως, όλα τα άλλα GHRPs αποτελούν έναν εύλογο κίνδυνο και μπορεί να γίνει κατάχρηση αυτών από τους αθλητές.

### **3.2.1.4. GHRP-3**

Το GHRP-3 είναι ένα νέο συντηθέν ((Aib)-(D-Trp)-D-Pro)-(D-Ile)-Arg-NH<sub>2</sub>) πεπτίδιο, χημικά και βιολογικά σταθερό και ισχυρό πεπτίδιο απελευθέρωσης GH, τρεις έως 5 φορές πιο ισχυρό από το GHRP-2.

### **3.2.1.5 GHRP-6 FREE ACID**

Το GHRP-6 Free Acid είναι ένας μεταβολίτης του πεπτιδίου GHRP-6 μείον μία καρβοξυλική ομάδα. Το GHRP-6 είναι ένα εξαπεπτίδιο απελευθέρωσης της αυξητικής ορμόνης. Λειτουργεί με σηματοδότηση προς την υπόφυση για να αρχίσει έκκριση αυξητικής ορμόνης. Μία από τις χρήσεις του πεπτιδίου αυτού είναι μέσα στις αρθρώσεις ή σε περιοχές που είχαν οποιοδήποτε τραυματισμό οδηγώντας σε ανάπτυξη του κολλαγόνου που χαρακτηρίζεται ως εκπληκτική.

### **3.2.1.6 IBUTAMOREN**

Το Ibutamoren ή αλλιώς MK-677 είναι ένα μόριο με μεγάλο ενδιαφέρον. Είναι ένας ισχυρός, αργής αποδέσμευσης με χορήγηση δια στόματος, εκλεκτικός μη-πεπτιδικός αγωνιστής του υποδοχέα της γκρελίνης και εκκριματογωγός αυξητικής ορμόνης, ο οποίος μιμείται την διεγερτική δράση της αυξητικής ορμόνης. Μελέτες δείχνουν ότι αυξάνει την έκκριση αρκετών ορμονών συμπεριλαμβανομένης και την αυξητικής ορμόνης και του ινσουλινομιμητικού αυξητικού παράγοντα-1 (IGF-1) και προκαλεί σημαντικές αυξήσεις των επιπέδων αυτών των ορμονών στο πλάσμα του αίματος χωρίς να επηρεάζει τα επίπεδα κορτιζόλης. Το Ibutamoren έχει αποδειχθεί ότι βοηθάει παιδιά με χαμηλά επίπεδα αυξητικής ορμόνης και στους ενήλικες φαίνεται πως αυξάνει τόσο την μυϊκή μάζα όσο και την οστική πυκνότητα κάνοντας το μια υποψήφια θεραπεία για την οστεοπόρωση των ηλικιωμένων.

### **3.2.1.7 ANAMORELIN**

Το Anamorelin είναι ένας εκλεκτικός μη-πεπτιδικός αγωνιστής του υποδοχέα της γκρελίνης και εκκριματογωγός αυξητικής ορμόνης, ο οποίος δρα στο κεντρικό νευρικό σύστημα και η αναβολική του δράση ελέγχεται για την θεραπεία της ανορεξίας και της καχεξίας. Το Anamorelin αυξάνει σημαντικά τα επίπεδα GH και IGF-1 στο πλάσμα του αίματος στους ανθρώπους χωρίς να επηρεάζει τα επίπεδα της προλακτίνης, της κορτιζόλης, της ινσουλίνης, της ωχρινοτρόπου ορμόνης (LH) και της θυρεοτρόπου ορμόνης. Επιπρόσθετα, αυξάνει σημαντικά την όρεξη, το συνολικό βάρος του σώματος και την μυϊκή δύναμη.

### **3.2.1.8 CAPROMORELIN**

Το Capromorelin λειτουργεί σαν εκκριματογωγός της αυξητικής ορμόνης και σαν μιμητής της γκρελίνης γεγονός το οποίο προκαλεί έκκριση της ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης με τρόπο ο οποίος είναι συνήθως εμφανής κατά την εφηβεία ή την νεαρή ενηλικίωση. Αρχικές μελέτες έδειξαν το φάρμακο να αυξάνει άμεσα τα επίπεδα αυξητικής ορμόνης και ινσουλινομιμητικού παράγοντα-1. Το capromorelin χρησιμοποιείται για την θεραπευτική του αξία στους ηλικιωμένους ανθρώπους καθώς η συγκεκριμένη ομάδα εμφανίζουν χαμηλά επίπεδα αυξητικής ορμόνης και λιγότερη μυϊκή μάζα, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε αδυναμία και σαρκωπενία.

### **3.2.1.9 AOD-9604**

Το AOD 9604 είναι ένα τροποποιημένο ανάλογο της ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης (rGH), το οποίο αρχικά συντέθηκε στην Αυστραλία την δεκαετία του '90. Η

αρχική ιδέα ήταν να βρεθεί ένα φάρμακο το οποίο θα είχε την καταβολική δράση της αυξητικής ορμόνης χωρίς την αναβολική της επίδραση (ανάπτυξη μυών). Αντίθετα με την αυξητική ορμόνη το AOD9604 δεν διεγείρει την παραγωγή του IGF-1, ο οποίος παίζει ρόλο στην ανάπτυξη. Άλλες μελέτες έδειξαν ότι το AOD9604 διεγείρει την λιπόλυση (καύση λίπους) και αναστέλλει την λιπογένεση, εμποδίζοντας την μετατροπή των λιπαρών οξέων σε σωματικό λίπος τόσο σε ανθρώπους όσο και σε ζώα. Επίσης, μειώνει τα ποσοστά σωματικού λίπους στην κοιλιακή περιοχή σε παχύσαρκους, υπέρβαρους και μέσου βάρους ανθρώπους.

### 3.2.1.10 VASOPRESSIN

Η βασοπρεσσίνη είναι πεπτιδική ορμόνη αποτελούμενη από εννέα αμινοξέα. Η αλληλουχία αμινοξέων της βασοπρεσσίνης-αργινίνης είναι Cys-Tyr- Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub>, με τα κατάλοιπα κυστεΐνης σχηματίζουν ένα δισουλφιδικό δεσμό και το C-άκρο της αλληλουχίας να μετατρέπεται σε ένα πρωτοταγές αμίδιο. Η λυσίνη-βασοπρεσσίνη έχει μία λυσίνη στη θέση της αργινίνης ως το όγδοο αμινοξύ και μπορεί να βρεθεί σε χοίρους και σε παρόμοια ζώα, ενώ η αργινίνη-βασοπρεσσίνη βρίσκεται μόνο σε ανθρώπους.

Η βασοπρεσσίνη επίσης γνωστή ως αντιδιουρητική ορμόνη (ADH) είναι μία νευροϋποφυσιακή ορμόνη που βρίσκεται στα περισσότερα θηλαστικά. Στα περισσότερα είδη περιέχεται και αργινίνη και γι' αυτό είναι επίσης γνωστή ως αργινίνη βασοπρεσσίνη (AVP). Οι δύο βασικές της λειτουργίες είναι η διατήρηση του νερού στο σώμα και η συστολή των αιμοφόρων αγγείων. Η βασοπρεσσίνη ρυθμίζει την κατάσταση νερού στο σώμα, αυξάνοντας την απορρόφησή του από τα νεφρά. Είναι μια πεπτιδική ορμόνη η οποία αυξάνει την περιφερική αγγειακή αντίσταση, η οποία με τη σειρά της αυξάνει την αρτηριακή πίεση του αίματος. Παίζει καθοριστικό ρόλο στην ομοιόσταση με τη ρύθμιση του νερού, της γλυκόζης και των αλάτων στο αίμα. Προέρχεται από μία πρόδρομη προορμόνη η οποία συντίθεται στον υποθάλαμο και αποθηκεύεται σε κυστίδια του οπίσθιου λοβού της υπόφυσης και έπειτα απελευθερώνεται στην κυκλοφορία του αίματος ωστόσο, μπορεί επίσης να απελευθερωθεί και στον εγκέφαλο. Τέλος, έχει πολύ μικρό χρόνο ημιζωής μεταξύ 16-24 min.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

#### 4.1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ-ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα παρακαταθήκης σε νερό για κάθε ουσία που προσδιορίζεται, χωριστά σε συγκέντρωση 1000 µg/ml, τα οποία αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία -20°C.

Για την αξιολόγηση της μεθόδου, χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα εργασίας διαλύματα εργασίας (working solutions) των οποίων η συγκέντρωση κυμαίνεται μεταξύ 100 ng/ml έως 10 µg/ml , και τα οποία παρασκευάστηκαν κατόπιν διαδοχικών αραιώσεων των διαλυμάτων παρακαταθήκης.

Χρησιμοποιήθηκαν οι εξής διαλύτες :

- Μεθανόλη (CH<sub>3</sub>OH), αναλυτικού βαθμού καθαρότητας 99,8% (merck, Darmstadt, Germany)
- Νερό (H<sub>2</sub>O) , δισαπεσταγμένο και περαιτέρω καθαρισμένο με συσκευή Millipore, βαθμού καθαρότητας HPLC
- Ακετονιτρίλιο ( ACN ), βαθμού καθαρότητας LC/MS (...)
- Διάλυμα Ισοπροπανόλης – Νερού αναλογίας 50/50 (v/v) για τον καθαρισμό του θαλάμου ψεκασμού του οργάνου
- Φορμικό Αμμώνιο (HCOONH<sub>4</sub>), καθαρότητας 97,0 % (Sigma-Aldrich)
- Φορμικό Οξύ (HCOOH), καθαρότητας 98,0% (...)
- Διάλυμα βαθμονόμησης και ρύθμισης φασματομέτρου QTOF-MS (ESI-L Low Concentration Tuning Mix, P/N G1969/85000, Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA). Πρόκειται για μίγμα 13 ουσιών (βηταΐνη, αμμωνιακό άλας τριφθοροξικού οξέος, εξαμεθόνη-φωσφαζίνη και πολυφθοριωμένα παράγωγα φωσφαζίνης και τριαζίνης) διαλυμένες σε μίγμα ακετονιτρίλιου/ νερού 95/5 (v/v).
- Πακέτο παρασκευής διαλύματος διόρθωσης και βαθμονόμησης φασματομέτρου qTOF ( API-TOF Reference Mass Solution Kit, P/N G1969-85001, Agilent Technologies) που αποτελείται από 2 αμπούλες (2,2 ml) διαλύματος εξάκις-1H,1H,3H-τετραφλουοροπροποξυ-)φωσφαζίνης 2,5mM σε ακετονιτρίλιο.
- Διαλύτης ανασύστασης LC/TOF-MS με απλή ανάμιξη των διαλυτών κινητής φάσης με αναλογία A/B 80/20 (v/v).
- Διάλυμα 4% φωσφορικού οξέος
- Διάλυμα 2% οξικού οξέος



## 4.2 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΜΕΘΟΔΟΥ

- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων
- Διάλυμα 5% μυρμηκικού οξέος σε μεθανόλη (HCOOH/CH<sub>3</sub>OH). Παρασκευάστηκε με αραιώση 2,5 ml μυρμηκικού οξέος σε 50ml μεθανόλης. Παρασκευάζεται πάντα την ημέρα που παρασκευάζονται και τα δείγματα και στο τέλος απορρίπτεται.
- Διαλύτης ανασύστασης 2% οξικό οξύ σε νερό (CH<sub>3</sub>COOH/H<sub>2</sub>O). Παρασκευάζεται με ανάμιξη 100ml δισαπεσταγμένου νερού από συσκευή Millipore (M51) και 2ml παγόμορφου οξικού οξέος.

## 4.3 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ (ISTD)

Η παρουσία του εσωτερικού προτύπου (ISTD) είναι απαραίτητη κατά την ανάλυση ουσιών σε βιολογικά δείγματα, λόγω του σταδίου της προκατεργασίας κυρίως για να έχουν όσο το δυνατόν καλύτερη και πιο αξιόπιστη ποσοτικοποίηση των αναλυόμενων ουσιών. Το εσωτερικό πρότυπο είναι μια ουσία με παρόμοιες τόσο φυσικές όσο και χημικές ιδιότητες με αυτές τις προσδιοριζόμενης ουσίας, καθώς επίσης και παρόμοια χρωματογραφική συμπεριφορά. Το εσωτερικό πρότυπο προστίθεται σε γνωστή συγκέντρωση, τόσο στα δείγματα που πρόκειται να αναλυθούν, όσο και στα πρότυπα δείγματα βαθμονόμησης αλλά και στα δείγματα ελέγχου. Το ιδανικό εσωτερικό πρότυπο είναι ένα ισοτοπικά επισημασμένο ανάλογο του αναλύτη και συνήθως αποτελεί την πρώτη επιλογή σε βιοαναλυτικές μεθόδους ποσοτικού προσδιορισμού με την τεχνική LC/MS επειδή διορθώνουν διακυμάνσεις στην απόκριση του αναλύτη που αφορούν την προκατεργασία των δειγμάτων. Επιπλέον, το ιδανικό εσωτερικό πρότυπο θα πρέπει να έχει υψηλή καθαρότητα, η κορυφή του να είναι ευδιάκριτη ( $R_s > 1.5$ ) από τους αναλύτες και να εκλύεται κοντά στον χρόνο έκλουσης των αναλυτών αλλά να μην αντιδρά με τα συστατικά του υπό ανάλυση δείγματος. Λόγω του ότι οι ουσίες αυτές όπως είναι αναμενόμενο συνεκλούνται με τον αναλύτη, είναι απαραίτητο να διαφέρουν με αυτόν κατά 3 μονάδες μάζας καθώς σε αντίθετη περίπτωση το σήμα του εσωτερικού προτύπου θα επηρεαστεί από το σήμα του αναλύτη. Στην προκειμένη περίπτωση ως εσωτερικό πρότυπο για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το πεπτίδιο Βασοπρεσίνη-Λυσίνη (Δ838).

## 4.4 ΔΙΑΛΥΤΕΣ ΚΙΝΗΤΗΣ ΦΑΣΗΣ

**ΔΙΑΛΥΤΗΣ Α:** Υδατικό διάλυμα μυρμηκικού αμμωνίου (HCOONH<sub>4</sub>) 5mM και μυρμηκικού οξέος (HCOOH) 0,01 % (v/v). Για την παρασκευή του ζυγίζονται 0,315 gr μυρμηκικού αμμωνίου και μεταφέρονται σε γυάλινη φιάλη με βιδωτό πώμα, τα οποία διαλύονται σε 1L δισαπεσταγμένο νερό και προστίθενται 100μL μυρμηκικού οξέος. Η φιάλη πωματίζεται και ανακινείται καλά.

**ΔΙΑΛΥΤΗΣ Β:** Διάλυμα μυρμηκικού αμμωνίου ( $\text{HCOONH}_4$ ) 5mM και μυρμηκικού οξέος ( $\text{HCOOH}$ ) 0,01 % (v/v) σε μίγμα ακετονιτριλίου/νερού ( $\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}$ ) σε αναλογία 90/10 (v/v). Για την Παρασκευή του ζυγίζονται 0,315 gr μυρμηκικού αμμωνίου και μεταφέρονται σε γυάλινη φιάλη με βιδωτό πώμα, τα οποία διαλύονται σε 100 ml δισαπεσταγμένο νερό. Κατόπιν προστίθενται 100 μl μυρμηκικού οξέος και τέλος προστίθενται 900ml ακετονιτρίλιο LC/MS. Η φιάλη πωματίζεται και ανακινείται καλά.

**ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΕΚΠΛΥΣΗΣ:** Διάλυμα ακετονιτριλίου/νερού σε αναλογία  $\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}$  80/20 (v/v) για την έκπλυση του συστήματος εισαγωγής δείγματος του υγροχρωματογράφου. Το ακετονιτρίλιο που χρησιμοποιήθηκε για την κινητή φάση ήταν βαθμού καθαρότητας LC/MS. Το νερό της κινητής φάσης προέρχεται από το σύστημα παραγωγής υπερκάθαρου νερού Milli-Q Academic (MS2) της Millipore (MA,USA). Όλα τα αντιδραστήρια και οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικής καθαρότητας ή υψηλότερης καθαρότητας.

## 4.5 ΔΕΙΓΜΑΤΑ – ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΟΥΣ

- **Δείγμα Ελέγχου QC\_P\_B:** Παρασκευάζεται από τα δείγματα Ελέγχου QC\_P\_A σε κάθε διαφορετική παρτίδα δειγμάτων σύμφωνα με την φόρμα παρασκευαστικών σταδίων. Πρόκειται για δείγμα ελέγχου ποιότητας της μεθόδου ( LCQTOFMS), το οποίο απορρίπτεται μετά από κάθε παρασκευαστική ημέρα.
- **QC\_P\_A1 (10ppm) (Δ856) :** Περιέχει τα πεπτίδια Ghpr-2, Ghpr-3, Ghpr-6 free acid, Ibutamoren και νερό.
- **QC\_P\_A2 (10ppm) (Δ918):** Περιέχει τα πεπτίδια Αναμορελίνη, Καπρομορελίνη, Ibutamoren και AOD-9604 και νερό.
- **Διάλυμα Εσωτερικού Προτύπου (Δ838) (10ppm):** Περιέχει το πεπτίδιο Βασοπρεσσίνη-Λυσίνη και νερό.
- **Δείγμα Ελέγχου 045B04( 10ppm ):** Περιέχει το ενδογενές πεπτίδιο Βασοπρεσσίνη-Αργινίνη και νερό. Η τελική συγκέντρωση στα ούρα είναι 10ng/ml.
- **Λευκό:** Πρόκειται για ούρα από άτομα απουσία απαγορευμένων πεπτιδίων. Παρασκευάζεται σε κάθε εργαστηριακή ημέρα.
- **Δείγματα Προς Ανάλυση:** Για την προετοιμασία των προς ανάλυση δειγμάτων, το άτομο που θα εκτελέσει την διαδικασία ακολουθεί την Φόρμα Παρασκευαστικών Σταδίων Ανίχνευσης Μικρών Πεπτιδίων , την οποία και συμπληρώνει. Τα δείγματα παραδίδονται σε κατάλληλα εκπαιδευμένο μέλος του τομέα MS, μαζί με την φόρμα Διαδικασίας προσδιορισμού Μικρών

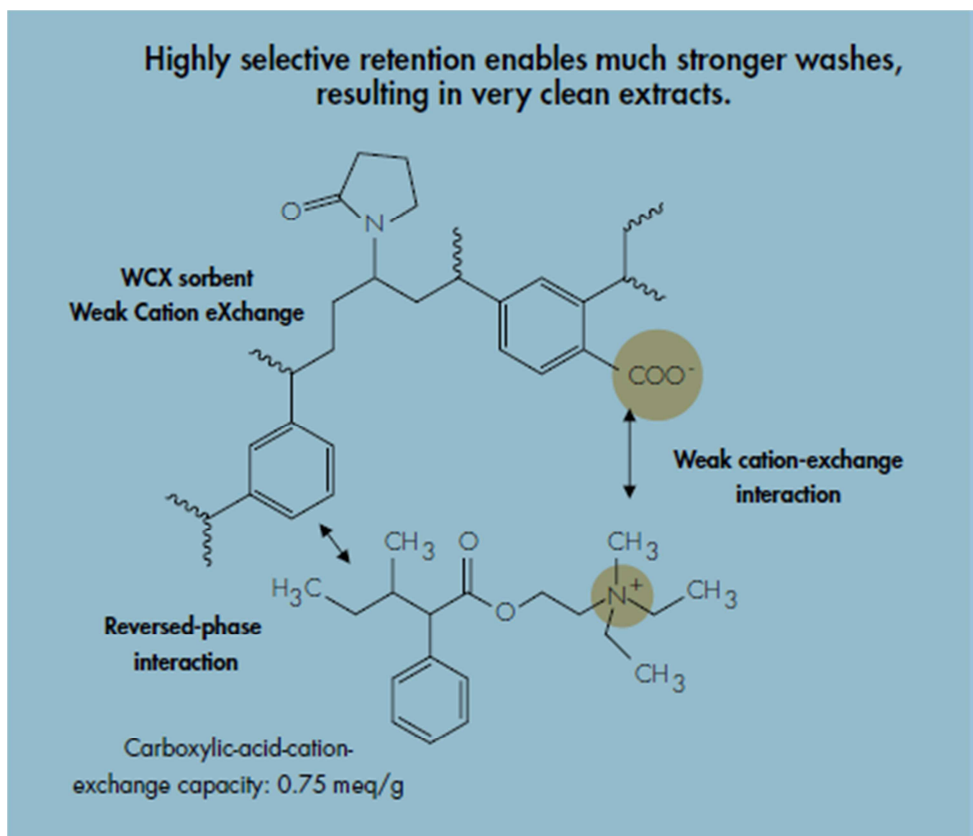
πεπτιδίων καθώς και την φόρμα παρασκευαστικών σταδίων συμπληρωμένες και υπογεγραμμένες από το άτομο που παρασκεύασε τα δείγματα.

## 4.6 ΜΙΚΡΟΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

- ✓ Ιονανταλλακτικά φυσιγγια εκχύλισης στερεάς φάσης, OasisWCX 1mL, 30mg
- ✓ Φιαλίδια Crimp Neck ND-11 , διαφανή , χωρητικότητας 1,5 ml
- ✓ Εσωτερικό φιαλίδιο χωρητικότητας 0,1ml, διαφανή, με κωνικό πυθμένα
- ✓ Φιαλίδια erpendorf χωρητικότητας 2 ml
- ✓ Φιαλίδια erpendorf με χαμηλή ικανότητα προσκόλλησης χωρητικότητας 1,5 ml
- ✓ Αυτόματες πιπέτες 5-40μl, 40-200μl, 200-1000μl και 1-5ml
- ✓ Πλαστικά ρύγχη 250-1000μl
- ✓ Πλαστικά ρύγχη με χαμηλή ικανότητα προσκόλλησης έως 250μl

### 4.6.1 ΙΟΝΑΝΤΑΛΛΑΚΤΙΚΑ ΦΥΣΙΓΓΙΑ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ

Στην παρασκευαστική πορεία ανίχνευσης μικρών πεπτιδίων χρησιμοποιήθηκαν τα ιοντανταλλακτικά φυσιγγια Oasis WCX 1cc cartridge, 30mg προσροφητικού ανά φυσιγγιο, 30μm μέγεθος σωματιδίων, για την εκχύλιση στερεάς φάσης. Τα φυσιγγια προμηθεύτηκαν από την εταιρεία Waters. Το πληρωτικό υλικό διαθέτει ένα άπολο άκρο και μια καρβοξυλική ομάδα. Σε pH μεγαλύτερο του 5,5 η καρβοξυλική ομάδα ιονίζεται ( $\text{COO}^-$ ) ενώ σε pH μικρότερο του 9 οι αμινομάδες των πεπτιδίων πρωτονιώνονται. Σύμφωνα με την παρασκευαστική πορεία τα ούρα ρυθμίζονται σε pH  $7 \pm 0,5$  επομένως καθώς τα ούρα περνούν από τα φυσιγγια, τα πεπτίδια προσκολλώνται στην καρβοξυλική ομάδα μέσω ιοντικών αλληλεπιδράσεων. Η έκπλυση των φυσιγγίων με νερό απομακρύνει τα άλατα που δημιουργούνται και η έκπλυση με μεθανόλη απομακρύνει όλα τα όξινα και ουδέτερα υπολείμματα που έχουν κατακρατηθεί στο άπολο άκρο του πληρωτικού υλικού. Η παραλαβή του εκλούσματος γίνεται με διάλυμα μεθανόλης/φορμικού οξέος με pH περίπου 3,5, pH στο οποίο οι καρβοξυλικές ομάδες είναι πρωτονιωμένες ( $\text{COOH}$ ). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να αναιρούνται οι διπολικές αλληλεπιδράσεις και τα πεπτίδια να εκλούνται. Ο μηχανισμός λειτουργίας των φυσιγγίων φαίνεται στην εικόνα 4.1.



**ΕΙΚΟΝΑ 4.1:** Απεικόνιση μηχανισμού φυσιγγίων WCX

## 4.7 ΑΝΑΛΥΤΙΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

### 4.7.1 ΣΥΣΤΗΜΑ LC/Q TOF-MS

Τα δείγματα αναλύθηκαν σε σύστημα Υγροχρωματογραφίας Υπερυψηλής Απόδοσης (UPLC) της εταιρείας Agilent Technologies με αυτόματο δειγματολήπτη (1200 series) σε συνδυασμό με το φασματομέτρο μαζών με τετραπολικό αναλυτή μαζών συζευγμένο με αναλυτή χρόνου πτήσης (6520 Accurate Mass LC/qTOF-MS, Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA).

Το χρωματογραφικό σύστημα αποτελούνταν από αυτόματο σύστημα απαέρωσης για την απομάκρυνση του αέρα από τα κανάλια διόδου της κινητής φάσης, αντλία υψηλής πίεσης βαθμιδωτής έκλουσης με δυνατότητα παροχής διαλυτών από τέσσερα διαφορετικά κανάλια (binary pump). Η αντλία του συστήματος λειτουργεί σε εύρος ταχύτητας ροής 0,05-5,00ml\*min<sup>-1</sup> και η μέγιστη πίεση που μπορεί να αναπτυχθεί στο σύστημα είναι 600bar. Το σύστημα διέθετε επίσης, αυτόματο δειγματολήπτη (autosampler) με δυνατότητα ρύθμισης του όγκου ένεσης και ψυχόμενη πλάκα τοποθέτησης των δειγμάτων 108 θέσεων (tray). Για την αποφυγή επιμόλυνσης εκ μεταφοράς δείγματος (carry over), το σύστημα επιτρέπει την συνεχή έκπλυση της βελόνας ένεσης τόσο εξωτερικά με κατάλληλο μίγμα διαλυτών, όσο και εσωτερικά κατά τη διάρκεια της ανάλυσης από τη ροή της κινητής φάσης, ενώ

η μέγιστη πίεση που μπορεί να αναπτυχθεί σ αυτόν είναι 600bar. Τέλος, το σύστημα διέθετε και θερμοστατούμενο θάλαμο τοποθέτησης της χρωματογραφικής στήλης με το εύρος θερμοκρασίας να ρυθμίζεται μεταξύ 20-100°C και με κατάλληλη συνδεσμολογία για την ταυτόχρονη τοποθέτηση και εναλλακτική λειτουργία δύο διαφορετικών στηλών.

Το παραπάνω σύστημα συνδεόταν με σύστημα δίδυμης φασματομετρίας μαζών QTOF-MS, (6520 Accurate Mass LC/qTOF-MS, Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA), με ορθογώνιας διάταξης πηγή ιοντισμού με ηλεκτροσπασμό (ESI) με δυνατότητα ρύθμισης της λειτουργίας της σε θετικό ή αρνητικό ιοντισμό. Το σύστημα διέθετε τετραπολικό αναλυτή μαζών (quadrupole) συζευγμένο με αναλυτή χρόνου πτήσης (TOF-MS) ορθογώνιας επιτάχυνσης, ενώ υψηλής καθαρότητας αέριο άζωτο χρησιμοποιήθηκε τόσο στην πηγή ιοντισμού ως αέριο εκνέφωσης (nebulizing gas) και ξήρανσης (drying gas), όσο και στο θάλαμο συγκρούσεων (collision cell) ως αέριο σύγκρουσης (collision gas). Ο ανιχνευτής του συστήματος ήταν αναλογικός ψηφιοποιητής τύπου ADC (Analogue-to-Digital converter) σε συχνότητα 2Hz με δυνατότητα επιλογής σάρωσης σε χαμηλό (50-1700 m/z) ή υψηλό (50-3200 m/z) εύρος τιμών m/z. Ως προς τον τρόπο λήψης φασμάτων στο σύστημα LC/QTOF-MS υπάρχουν 3 τρόποι: α) η λήψη φάσματος πλήρους σάρωσης (full scan MS mode), β) η λήψη φασμάτων σάρωσης θυγατρικών ιόντων προεπιλεγμένων μητρικών ιόντων για την ανάλυση γνωστών ουσιών (targeted MS/MS mode) και γ) ο αυτοματοποιημένος τρόπος λήψης φασμάτων MS/MS στην περίπτωση αγνώστων αναλυτών (auto MS/MS mode).

Ο έλεγχος καλής λειτουργίας του οργάνου, η επεξεργασία και ανάλυση των δεδομένων και η αυτοματοποιημένη λήψη και εκτύπωση των αποτελεσμάτων έγινε με την χρήση τριών επιμέρους λογισμικών Mass Hunter Workstation Software της εταιρείας Agilent Technologies: 1) Mass Hunter Data Acquisition for QTOF, 2) Mass Hunter Qualitative Analysis και 3) Mass Hunter Quantitative Analysis.

Τέλος, στην ανάλυση χρησιμοποιήθηκε στήλη Υγροχρωματογραφίας Zorbax Eclipse Plus C18 (Rapid Resolution HT) (100\*2.1mm i.d., 1.8μm, Agilent Technologies).

#### **4.7.2 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ**

- Αυτόματος αναδευτήρας τύπου δύνης, Vortex Genie, Scientific Industries, για την ανάδευση δειγμάτων και διαλυμάτων
- Φυγόκεντρος Hettich Zentrifugen Micro 20, με κεφαλή προσαρμοζόμενη για την φυγοκέντρωση φιαλιδίων eppendorf χωρητικότητας 1,5ml και μέγιστη ταχύτητα φυγοκέντρωσης 14000rpm.
- Συσκευή Εκχύλισης Στερεάς Φάσης 40 θέσεων τοποθέτησης φυσιγγίων WCX

- Σύστημα θερμαινόμενης φυγοκέντρου υπό κενό (spread vac), ThermoLab, 32 θέσεων φυγοκέντρωσης φιαλιδίων eppendorf χωρητικότητας 1,5ml

## 4.8 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ LC/QTOF-MS

Πριν από την ανάλυση των δειγμάτων με το σύστημα LC/QTOF-MS γίνεται προετοιμασία των αναλυτικών οργάνων, η οποία αποτελείται από τα εξής στάδια:

### 4.8.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

- Παρασκευή επαρκούς ποσότητας διαλυτών κινητής φάσης και ενημέρωση του λογισμικού του οργάνου με τον ακριβή όγκο διαλύτη σε κάθε έναν από τους τέσσερις περιέκτες
- Ξέπλυμα της διαδρομής του δείγματος με διαλύτη υψηλής περιεκτικότητας σε οργανικό τροποποιητή ( μίγμα ακετονιτριλίου/νερού 90/10 v/v)
- Σταθεροποίηση της χρωματογραφικής στήλης με την κινητή φάση της μεθόδου ανάλυσης και καταγραφή της πίεσης του συστήματος και του αριθμού των προς ανάλυση δειγμάτων

### 4.8.2 ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ LC/QTOF-MS

Η βαθμονόμηση του συστήματος (calibration) ως προς τις τιμές  $m/z$  (με ακρίβεια μέτρησης τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων) με βάση τις τιμές  $m/z$  γνωστών προτύπων ουσιών γίνεται καθημερινά πριν από την έναρξη της ανάλυσης των δειγμάτων σύμφωνα πάντα με τις προδιαγραφές του οργάνου και τις υποδείξεις του κατασκευαστή ( Agilent Technologies). Έτσι, εισάγεται με απευθείας έγχυση στην πηγή ιοντισμού του φασματομέτρου μάζων μίγμα 13 ουσιών (ESI-L low concentration tuning mix, Agilent Technologies) που στην λειτουργία θετικού ιοντισμού σχηματίζουν δέκα πρωτονιωμένα ιόντα με τιμές  $m/z$  μεταξύ 118,0863 και 2721,8950, ενώ στην λειτουργία αρνητικού ιοντισμού σχηματίζουν ιόντα αποπρωτονιωμένα και ιόντα προσθήκης τριφθοροξικού οξέος με τιμές  $m/z$  μεταξύ 112,9856 και 2833,8731.

Η βαθμονόμηση του άξονα των τιμών  $m/z$  πραγματοποιείται αυτόματα από το λογισμικό του οργάνου με την βοήθεια πολωνυμικής εξίσωσης και υπολογίζονται έτσι οι ακριβείς τιμές  $m/z$  των ιόντων αναφοράς καθώς και τα σφάλματά τους. Το κριτήριο με βάση το οποίο αποδεχόμαστε την διαδικασία της βαθμονόμησης είναι η εμφάνιση τυχαία κατανεμημένων θετικών και

αρνητικών σφαλμάτων για τα ιόντα , ενώ η απόλυτη τιμή του σφάλματος δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 0,5 ppm.

### 4.8.3 ΡΥΘΜΙΣΗ LC/QTOF-MS

Η διαδικασία ρύθμισης ή καλύτερα βελτιστοποίησης των παραμέτρων του συστήματος ονομάζεται αλλιώς και tuning και αφορά την αυτοματοποιημένη διαδικασία που γίνεται μέσω του λογισμικού του οργάνου, κατά την οποία όλες οι παράμετροι του φασματομέτρου μαζών, τόσο του αναλυτή χρόνου πτήσης ιόντων όσο και του τετραπόλου βελτιστοποιούνται και ρυθμίζονται στις κατάλληλες τιμές με απώτερο σκοπό να επιτευχθεί η μέγιστη δυνατή απόκριση διατηρώντας παράλληλα την διαχωριστικότητα σε ικανοποιητικό επίπεδο αλλά και το αντίστροφο.

Η διαδικασία αυτή για τον αναλυτή χρόνου πτήσης πραγματοποιείται μια με δυο φορές το μήνα ενώ για το τετράπολο μια φορά το εξάμηνο αλλά και κατόπιν εργασιών συντήρησης ή διορθωτικών επεμβάσεων σ' αυτό, επομένως και για τον αναλυτή χρόνου πτήσης διαφοροποιείται ο αριθμός των εξεταζόμενων παραμέτρων καθώς και το εύρος τιμών για κάθε παράμετρο ανάλογα με την περίπτωση ( quick tune, standard tune, initial tune). Η διαδικασία γίνεται με τον ίδιο τρόπο που γίνεται και η βαθμονόμηση του συστήματος, δηλαδή με απευθείας έγχυση στο φασματόμετρο μαζών του διαλύματος αναφοράς. Τα αποδεκτά κριτήρια της διαδικασίας αυτής είναι η εμφάνιση σφαλμάτων μάζας μικρότερων των 2ppm σε κάθε ιόν αναφοράς, η λήψη ικανοποιητικής μορφής κορυφών για τα ιόντα με τιμές m/z 118,0862, 1521,9714 και 2721,9848 και των ισοτοπικών κορυφών αυτών (και στην περίπτωση αρνητικού ιοντισμού των ιόντων με τιμές m/z 112,9856 , 1633,9950 και 2833,8731 αντίστοιχα), η επίτευξη ικανοποιητικού διαχωρισμού της κορυφής που αντιστοιχεί στο ιόν με τιμή m/z 2721,8948 από τις κορυφές των ισοτοπικών ιόντων και τέλος η επίτευξη διαχωριστικής ικανότητας του οργάνου σε συνθήκες λειτουργίας 4GHz μεγαλύτερης από 10000 και 18000 για τα ιόντα με τιμές m/z 118,0863 και 1521,9715 αντίστοιχα.

### 4.8.4 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΔΙΟΡΘΩΣΗΣ ΜΑΖΑΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Για την επίτευξη υψηλής ακρίβειας μετρήσεων τιμών m/z εκτός της βαθμονόμησης του συστήματος qTOF-MS που προηγείται της ανάλυσης των δειγμάτων υπάρχει και η δυνατότητα της συνεχούς διόρθωσης της καμπύλης βαθμονόμησης κατά την διάρκεια της ανάλυσης (reference mass correction). Αυτό γίνεται με την συνεχή εισαγωγή στο φασματόμετρο μαζών διαλύματος αναφοράς ( reference mix), το οποίο περιέχει εξάκις-(1H,1H,3H-τετραφλουοροπροποξυ-φωσφαζίνη). Η διοχέτευση του διαλύματος γίνεται

αυτόματα από το σύστημα και ενεργοποιείται από τον χειριστή του οργάνου πριν ξεκινήσει η ανάλυση των δειγμάτων.

#### **4.8.5 ΕΚΠΛΥΣΗ ΣΤΗΛΗΣ ΚΑΙ ΔΙΑΔΡΟΜΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ**

Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται καθημερινά. Πιο συγκεκριμένα, η χρωματογραφική στήλη και η διαδρομή που ακολουθεί το δείγμα ξεπλένονται με χρήση μίγματος ακετονιτριλίου/ νερού (ACN/H<sub>2</sub>O) (90/10 v/v) για 30 λεπτά με ροή 0,3 ml/min. Σε περίπτωση αλλαγής διαλυτών κινητής φάσης, οι διαδρομές θα πρέπει να ξεπλυθούν εναλλάξ και με τους 2 διαλύτες (100% διαλύτης A, 100% διαλύτης B) με ροή σταδιακά αυξανόμενη από 0 έως 5 ml /min και στην συνέχεια σταδιακά μειούμενη από 5 μέχρι 0 ml/min.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

### ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ LC/QTOF-MS ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ GHRPs

#### 5.1 ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΟΥ ΜΑΖΩΝ

Τα πεπτίδια που εξετάστηκαν έχουν την ικανότητα ανάλογα με την δομή τους, την σύσταση της κινητής φάσης και τις συνθήκες ιονισμού (ESI) να δίνουν μονοϊονισμένους και διϊονισμένους αναλύτες. Επίσης, λόγω της ύπαρξης του ισοτόπου  $C^{13}$  στην φύση σε αφθονία 1,07% περίπου μας δίνεται η δυνατότητα να εξετάσουμε και τους αναλύτες που προκύπτουν και διαθέτουν το ισότοπο. Έτσι, οι τελικές συνθήκες της μεθόδου ανίχνευσης των πεπτιδίων παρατίθενται στον πίνακα 5.1 και στον πίνακα 5.2 παρατίθενται τα ιόντα των πεπτιδίων που ανιχνεύθηκαν .

**ΠΙΝΑΚΑΣ 5.1:** Παράμετροι λειτουργίας φασματομέτρου μαζών

Πολικότητα ESI (+)	Skimmer : 65V
Gas Temperature: 330 °C	Fragmentor : 160V
Drying Gas : 10L/min	CID : 25eV
Nebulizer : 40psi	Oct1 RF : 750Vpp
Capillary : 3500V	Scan Range : 100-1100 m/z
Cycle : 1 scan/sec	

**ΠΙΝΑΚΑΣ 5.2 :** Ιόντα Πεπτιδίων

ΟΝΟΜΑ	m/z	ION
GHRP-2_2H	409,7213	M + 2H
GHRP-3_H	655,4038	M + H
GHRP-3_i	656,4072	Mi + H
GHRP-6-FREE ACID_2H	437,7226	M + 2H
ANAMORELIN_H	547,3391	M + H
ANAMORELIN_i	548,3425	Mi + H
ANAMORELIN_Na	569,3211	M + Na
ANAMORELIN_K	585,2950	M + K
ANAMORELIN_Ki	586,2950	Mi + K
CAPROMORELIN_H	506,2762	M + H
CAPROMORELIN_i	507,2795	Mi + H
IBUTAMOREN_H	529,2479	M + H
AOD-9604_2H	907.9349	M + 2H

AOD-9604_2Hi	908,4355	Mi + 2H
AOD-9604_2Hii	908,9361	Mii + 2H

Όπου : M : Μοριακό ιόν,

Mi : Μοριακό ιόν + ισότοπο  $^{13}\text{C}$ ,

Mii : Μοριακό Ιόν + ισότοπο  $^{13}\text{C}$  + ισότοπο  $^{13}\text{C}$

## 5.2 ΕΠΙΛΟΓΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗΣ ΣΤΗΛΗΣ

Τα πεπτίδια σήμερα ανιχνεύονται με στήλη C18 συγκεκριμένων χαρακτηριστικών. Ωστόσο κάποια από τα πεπτίδια εκλούνται με ουρά πράγμα το οποίο σημαίνει ότι η στήλη δεν είναι η κατάλληλη για όλα τα πεπτίδια. Για τον λόγο αυτό έγιναν δοκιμές χρησιμοποιώντας μια στήλη C8 (Zorbax SB-C8 Rapid Resolution HD, 2.1\*50mm, 1.8μm) και μια στήλη C18 (Infinity Lab Poroshell 120 EC-C18, 2.1\*50mm, 2.7μm). Χρησιμοποιήθηκε βαθμιδωτή έκλυση 90% Διαλύτης A και 10% Διαλύτης B σε t=0min. Στον πίνακα 5.3 αναφέρονται οι χρόνοι και το ποσοστό του Διαλύτη B. Οι τελικές παράμετροι της χρωματογραφικής ανάλυσης δίνονται στον Πίνακα 5.4

**Πίνακας 5.3 :** Χρόνοι και επι τοις εκατό ποσοστό Διαλύτη B

Χρόνος (minutes)	Ποσότητα Διαλύτη B %
0	10
9	80
10	100
13	100
13,5	10

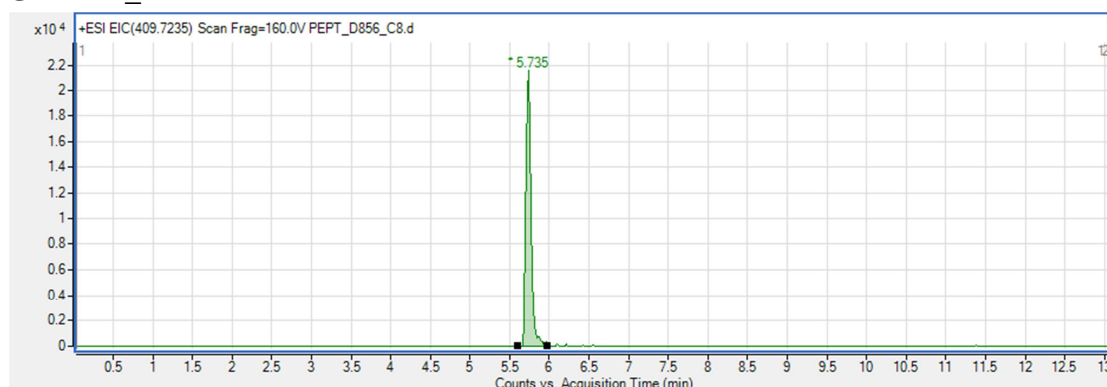
**Πίνακας 5.4 :** Παράμετροι Χρωματογραφικής Ανάλυσης

Ενέσιμος Όγκος Δείγματος	15MI
Θερμοκρασία Στήλης	35 ± 0,8°C
Ροή Κινητής Φάσης	0,3 ml/min
Χρόνος Ανάλυσης	13,5 min
Χρόνος Εξισορρόπησης	3,5 min
Διαλύτης A (t=0 min)	90%
Διαλύτης B (t=0 min)	10%
Όρια Πίεσης	0-450 bar

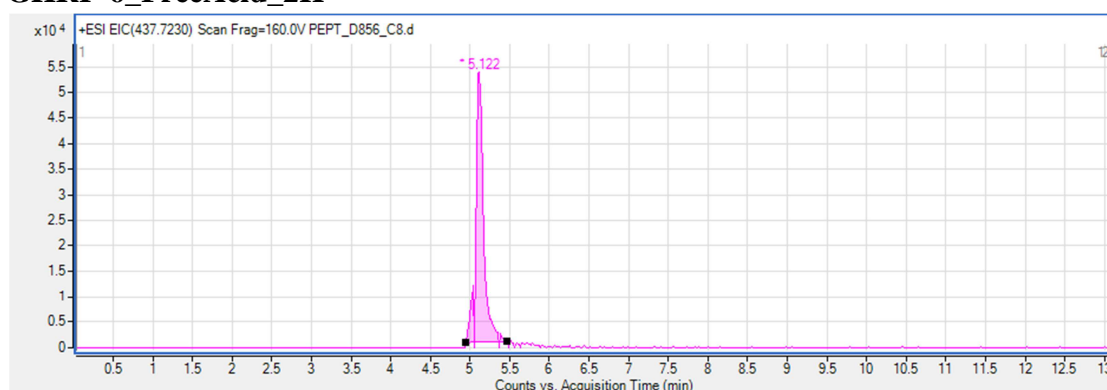
## 5.2.1 ΣΤΗΛΗ Zorbax C8 50mm

Αρχικά έγινε δοκιμή μιας χρωματογραφικής στήλης Zorbax C8. Τα χαρακτηριστικά της στήλης αυτής ήταν Rapid Resolution HD StableBond 80A C8, με διαστάσεις 2,1 \* 50mm, 1.8μm. Έγινε ανάλυση ενός δείγματος CAL ώστε να διαπιστωθεί η συμπεριφορά των πεπτιδίων με τη στήλη αυτή. Το δείγμα CAL περιείχε 10μL Δ856 και 10μL Δ918 και 100 μL H<sub>2</sub>O. Τα διαλύματα Δ856 και Δ918 είναι διαλύματα ελέγχου που αναφέρθηκαν στην παράγραφο 4.5. Ενδεικτικά παρατίθενται 2 χρωματογραφήματα από πεπτίδια.

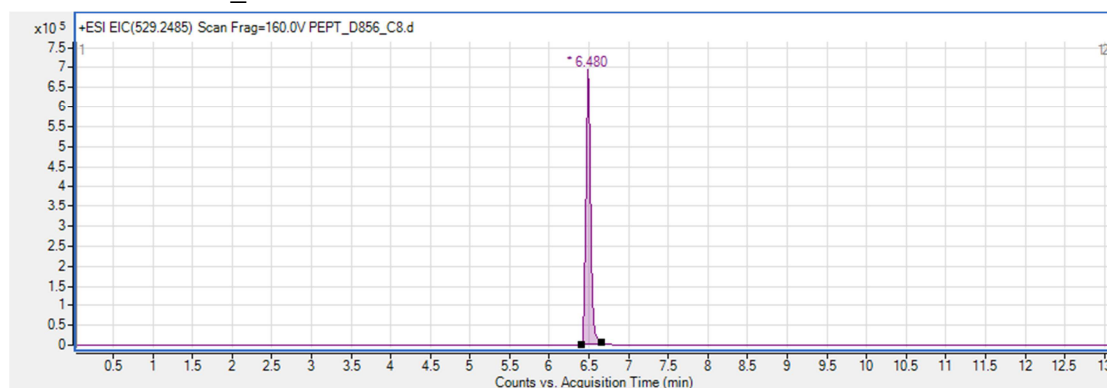
### GHRP-2\_2H



### GHRP-6\_FreeAcid\_2H



### IBUTAMOREN\_H

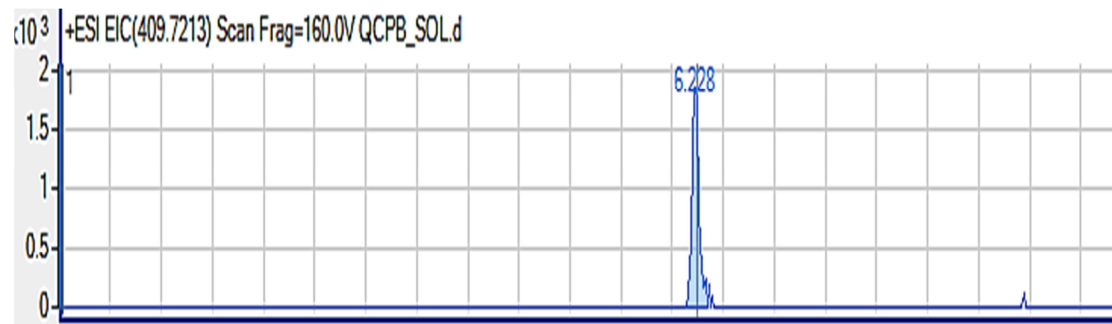


Εικόνα 5.1 : Χρωματογραφήματα πεπτιδίων με στήλη SB-C8

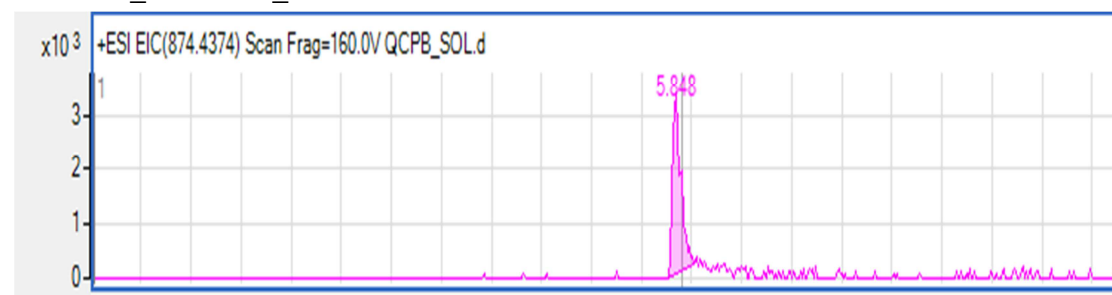
## 5.2.2 ΣΤΗΛΗ INFINITY LAB POROSHELL 120 EC-C18

Τα χαρακτηριστικά της στήλης αυτής ήταν 120 Å EC-C18 με διαστάσεις 2,1\*50mm, 2,7μm. Και εδώ έγινε ανάλυση ενός μόνο δείγματος CAL το οποίο περιείχε 10μL Δ856 και 10μL Δ918 και 100 μL H<sub>2</sub>O. Ενδεικτικά, παρατίθενται τα χρωματογραφήματα κάποιων πεπτιδίων .

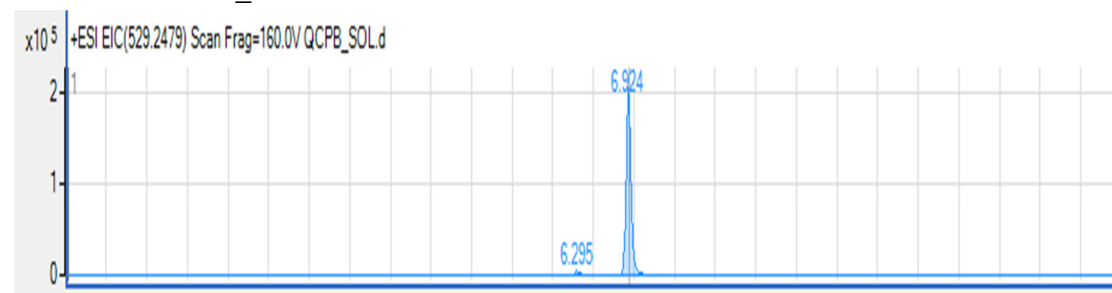
### GHRP-2\_2H



### GHRP-6\_FreeAcid\_2H



### IBUTAMOREN\_H



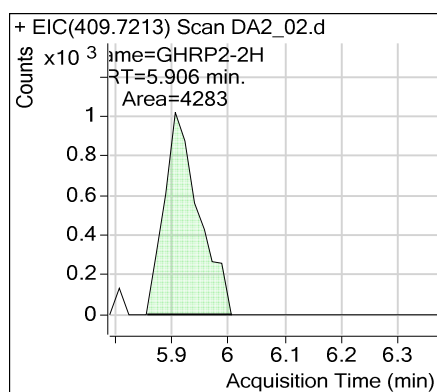
**Εικόνα 5.2 :** Χρωματογραφήματα πεπτιδίων με Στήλη Infinity Lab Poroshell

Συμπερασματικά, για τις δοκιμές που έγιναν μπορούμε να πούμε ότι στο σύνολο τους τα αποτελέσματα δεν ήταν ικανοποιητικά. Οι στήλες αυτές μπορούν να ανιχνεύουν κάποια πεπτίδια με ικανοποιητικά χρωματογραφήματα ωστόσο αυτό δεν συμβαίνει για το σύνολο των υπό εξέταση πεπτιδίων. Για το λόγο αυτό και απορρίφθηκαν.

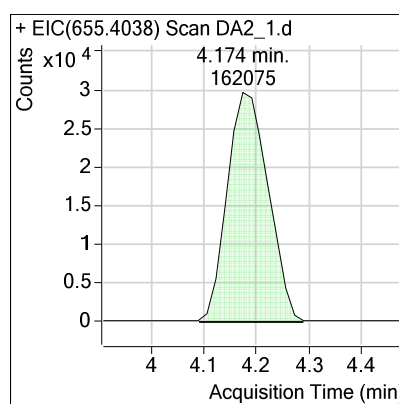
## 5.2.3 ΣΤΗΛΗ ZORBAX C18

Η στήλη η οποία εν τέλει επιλέχθηκε καθώς στο σύνολο τους τα χρωματογραφήματα ήταν ικανοποιητικά ήταν η υγροχρωματογραφική στήλη Zorbax Eclipse Plus C18 (Rapid Resolution HD) με διαστάσεις 100\*2,1 mm i.d., 1,8μm από την Agilent Technologies. Τα χρωματογραφήματα μιας πειραματικής ημέρας με τις τελικές συνθήκες ανάλυσης ελήφθησαν από εμβολιασμένα δείγματα ούρων συγκέντρωσης 2ng/ml και παρατίθενται παρακάτω

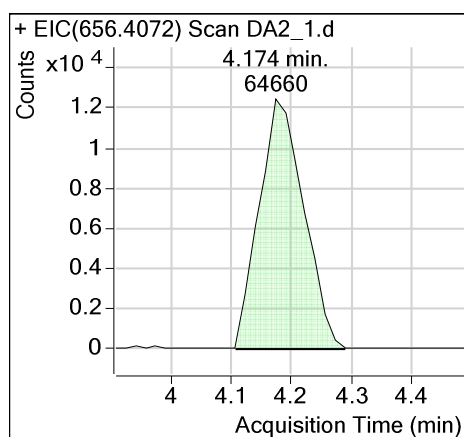
### GHRP-2\_2H



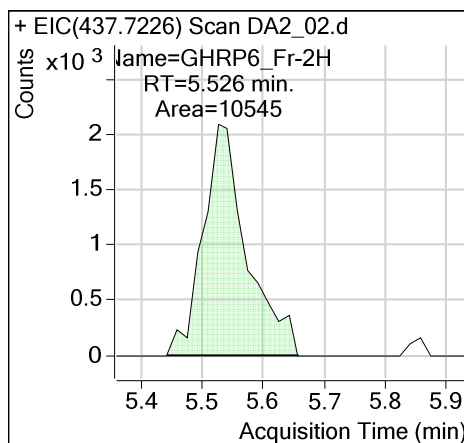
### GHRP-3\_H



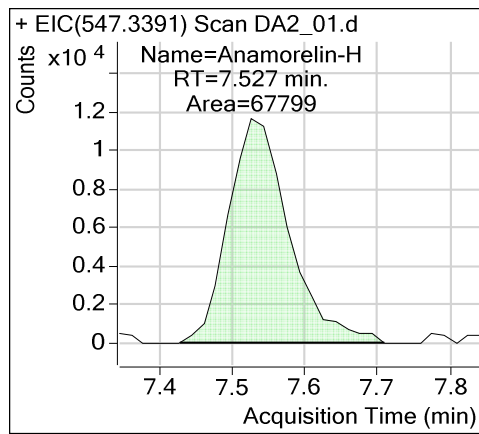
### GHRP-3\_Hi



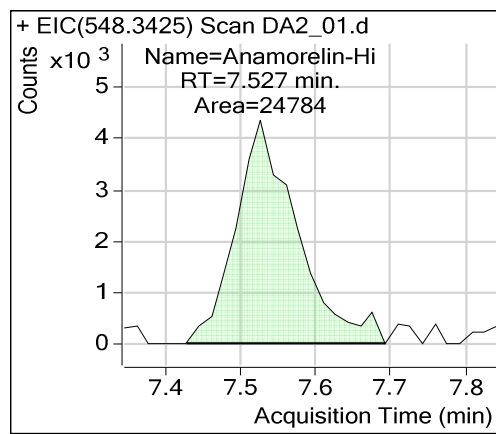
### GHRP-6\_FreeAcid\_H



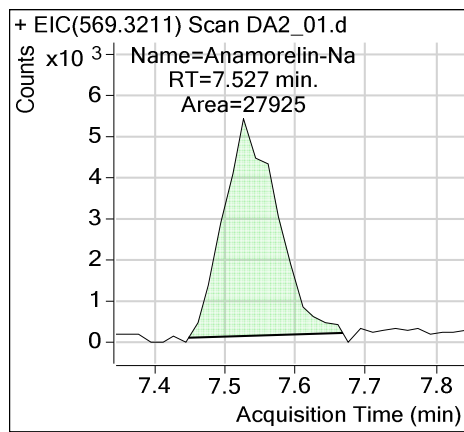
### ANAMORELIN\_H



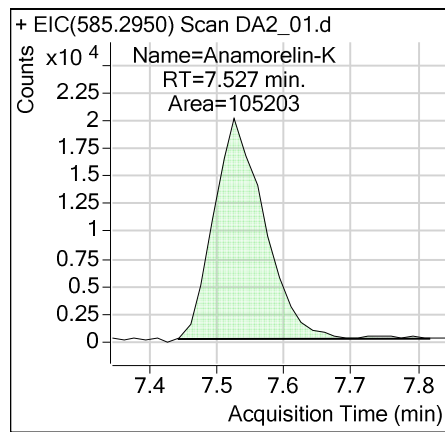
### ANAMORELIN\_Hi



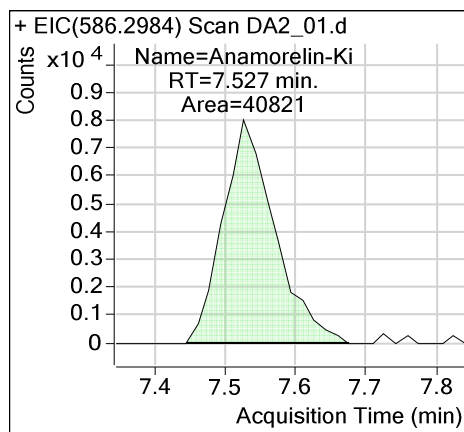
### ANAMORELIN\_Na



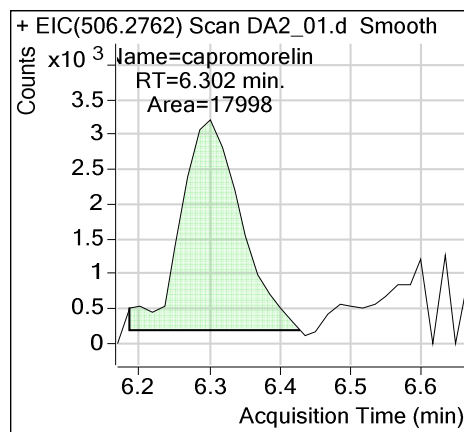
### ANAMORELIN\_K



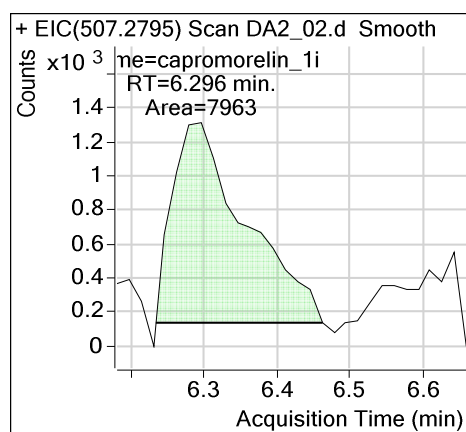
### ANAMORELIN\_Ki



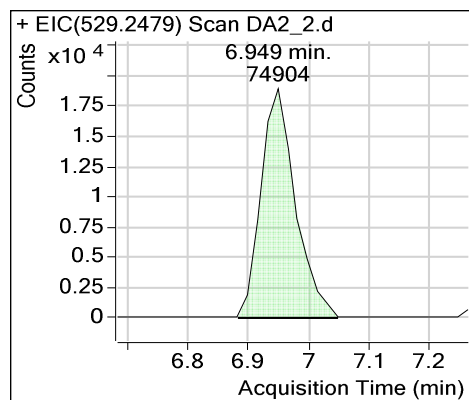
### CAPROMORELIN\_H



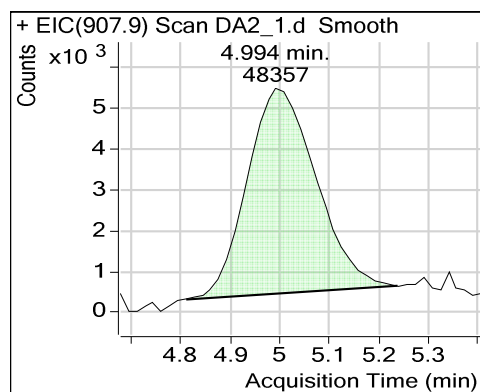
### CAPROMORELIN\_Hi



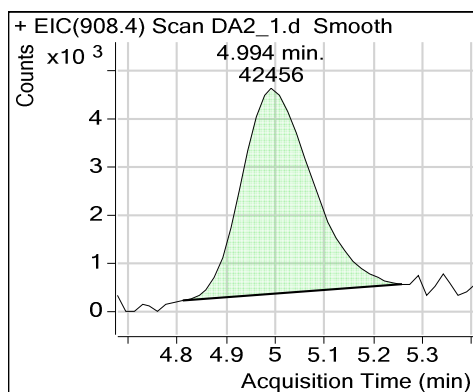
### IBUTAMOREN\_H



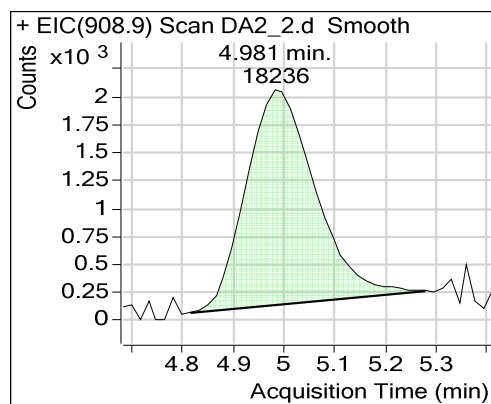
### AOD9604\_2H



### AOD9604\_2Hi



### AOD9604\_2Hii



## 5.3 ΔΟΚΙΜΕΣ ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Κατά την διαδικασία ανάπτυξης της μεθόδου έγιναν διάφορες τροποποιήσεις στην κατεργασία των δειγμάτων ούτως ώστε να καταλήξουμε στην τελική μορφή της πειραματικής μεθόδου που δίνει τα βέλτιστα αποτελέσματα για την ανίχνευση των πεπτιδίων απελευθέρωσης αυξητικής ορμόνης. Συγκεκριμένα έγιναν οι παρακάτω δοκιμές :

- Έγινε ρύθμιση του pH των ούρων με διάλυμα  $\text{NH}_3$  (10%) σε αλκαλικό pH ( $\text{pH}=11\pm 0,5$ ), χρησιμοποιήθηκαν φυσίγγια C18 ενώ η έκπλυση του φυσιγγίου έγινε με 4ml διαλύματος  $\text{NH}_3$  (10%) και 4ml δισαπεσταγμένο νερό. Η έκλυση του αναλύτη έγινε με 2ml διαλύματος 5% μυρμηκικού οξέος σε μεθανόλη (Δ848).
- Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και με φυσίγγια MAX (ισχυροί ανιοντανταλλάκτες, εκλεκτικά για οξέα και σταθερά σε οργανικούς διαλύτες)
- Έγινε δοκιμή σε ουδέτερο pH ούρων να χρησιμοποιηθούν φυσίγγια C18
- Ακολουθήθηκε η ήδη υπάρχουσα πειραματική πορεία με παράλειψη όμως του σταδίου της έκπλυσης με  $\text{MeOH}$ .

Ωστόσο, καμία από τις δοκιμές που κάναμε που πραγματοποιήθηκαν σε απέδωσαν τα βέλτιστα αποτελέσματα που αναμέναμε και υπήρχε έντονο το φαινόμενο της επίδρασης του μητρικού υλικού.

### 5.3.1 ΤΕΛΙΚΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Αφού πραγματοποιήθηκαν οι παραπάνω δοκιμές προκατεργασίας δειγμάτων, αποφασίστηκε ότι η τελική παρασκευαστική πορεία που παρέχει τα βέλτιστα αποτελέσματα ανίχνευσης είναι αυτή που παρατίθεται στον πίνακα 5.5. τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται και τα δείγματα ελέγχου έχουν ήδη αναφερθεί στο κεφάλαιο 4.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 5.5 :** Τελική παρασκευαστική πορεία ανίχνευσης μικρών πεπτιδίων με χρήση LC/QTOF-MS

α/α	ΣΤΑΔΙΟ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ
1	<b>Προετοιμασία Δειγμάτων</b>
1.1	Προσθήκη σε σωληνάκια RIA 2 mL ούρων. Προσθήκη 200μL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH 7.0 και ακολουθεί ανακίνηση. Έλεγχος pH να είναι $7\pm 0,5$



1.2	Παρασκευή διαλύματος 5% μυρμηκικού οξέος σε μεθανόλη. Αραίωση 2,5ML μυρμηκικού οξέος σε 50ml MeOH
1.3	Μετάγγιση 2 * 1,5 ml ούρων σε eppendorf. Φυγοκέντρηση στις 10000 rpm για 10min
2	<b>Εκχύλιση Στερεάς Φάσης</b>
2.1	Φορτώνουμε στην συσκευή εκχύλισης στερεάς φάσης τα φυσίγγια Oasis, 30 mg, 30 μm.
	<b>Ενεργοποίηση των φυσιγγίων SPE</b>
2.2	Διέλευση από τα φυσίγγια 2,0 mL μεθανόλης
2.3	Διέλευση από τα φυσίγγια 2,0 mL νερού HPLC.
	<b>Διέλευση ούρων</b>
2.4	Τοποθέτηση 1 mL ούρων στα αντίστοιχα φυσίγγια.
2.5	Ξεπάγωμα Δ838 (ISTD_A). Προσθήκη 920 μL νερού millipore και 80 μL Δ838 (ISTD_A) σε φιαλίδιο χαμηλής ικανότητας προσκόλλησης 1,5 mL και ανακίνηση για 20 s. Προσοχή χρήση tips χαμηλής ικανότητας προσκόλλησης για την μεταφορά του Δ838 (ISTD_A). Το νέο διάλυμα ονομάζεται Δ839 (ISTD_B). Η τελική συγκέντρωση του Δ839 (ISTD_B) είναι 784 ng/mL. Προσθήκη 25 μL από το Δ839 (ISTD_B) σε όλα τα δείγματα πάνω στα φυσίγγια άμεσα.
2.6	Ξεπάγωμα τα διαλυμάτων Δ856 (QC_P_A1), Δ857 (QC_P_A2). Προσθήκη 980 μL νερού HPLC και 10 μL από τα διαλύματα Δ856, Δ857 σε φιαλίδιο χαμηλής ικανότητας προσκόλλησης 1,5 ml και ανακίνηση για 20 s. Χρήση tips χαμηλής ικανότητας προσκόλλησης για την μεταφορά των Δ856-Δ857. Το αραιό διάλυμα ονομάζεται QC_P_B. Τελική συγκέντρωση QC_P_B είναι 100 ng/ml. Προσθήκη 10, 20, 40 μL, σύμφωνα με την φόρμα παρασκευαστικών εκκρεμοτήτων, στα δείγματα πάνω στα φυσίγγια άμεσα.
2.7	Τα δείγματα των ούρων περνάνε με ροή περίπου 1 mL/min.
2.8	Τοποθέτηση του υπόλοιπου 1 mL ούρων στα αντίστοιχα φυσίγγια.
2.9	Τα δείγματα των ούρων περνάνε με ροή περίπου 1 mL/min.
	<b>Έκπλυση φυσιγγίου SPE</b>
	<b>1° Στάδιο Έκπλυσης</b>
2.10	Διέλευση από τα φυσίγγια 1,0 mL νερό HPLC.
	<b>2° Στάδιο Έκπλυσης</b>

2.11	Διέλευση από τα φυσίγγια 1,0 mL μεθανόλης. Η ροή να είναι περίπου 1 mL/min. Εφαρμόζεται κενό για 2 min.
	<b>Παραλαβή πεπτιδίων από τα φυσίγγια SPE</b>
2.12	Τοποθέτηση στο χώρο συλλογής των δειγμάτων της συσκευής εκχύλισης στερεάς φάσης επισημασμένα φιαλίδια 1,5 mL, χαμηλής ικανότητας προσκόλλησης erpendorf
2.13	Διέλευση από τα φυσίγγια 1,25 mL 5% μυρμηκικού οξέος. Η ροή να είναι περίπου 1 mL/min.
2.14	Προσθήκη σε όλα τα erpendorf της σειράς 5 µL 045B04.
<b>3</b>	<b>Εξάτμιση</b>
3.1	Εξάτμιση των δειγμάτων στην φυγόκεντρο υπό κενό στους 45 °C για 1,5 ώρες. Προσοχή να μην εξατμιστεί όλο το έκλουσμα και να παραμένει ποσότητα ίση με 10-50 µL στο erpendorf.
<b>4</b>	<b>Ανασύσταση</b>
4.1	Προσθήκη 50 µL διαλύτη ανασύστασης (2% οξικό οξύ σε νερό). Ανακίνηση για 30 s.
4.2	Παραλαβή υπερκειμένου υγρού και μετάγγιση σε γυάλινα φιαλίδια εφοδιασμένα με μικρά εσωτερικά γυάλινα φιαλίδια.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

### ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

#### 6.1 ΣΧΕΤΙΚΟΣ ΧΡΟΝΟΣ ΑΝΑΣΧΕΣΗΣ

Ο σχετικός χρόνος ανάσχεσης είναι το πηλίκο του χρόνου ανάσχεσης της ουσίας προς προσδιορισμό, προς τον χρόνο ανάσχεσης του εσωτερικού προτύπου (Vasopressin lysine).

**ΠΙΝΑΚΑΣ 6.1 :** Χρόνοι Ανάσχεσης, σχετικοί χρόνοι ( ως προς το ISTD) και κ'ρια διαγνωστικά ιόντα.

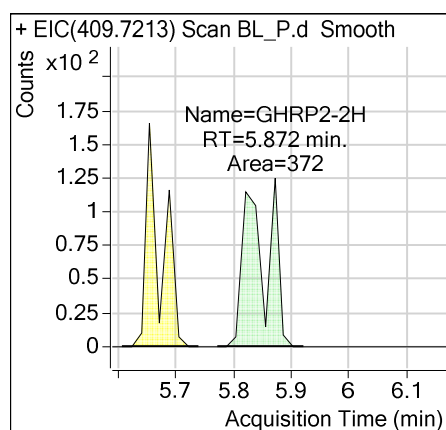
ΟΥΣΙΑ	RT,min	RT (ISTD), min	RRT	m/z
GHRP2_H	6,12	3,56	1,72	409,7213
GHRP-3_H	4.33	3,56	1.22	655,4038
GHRP-3_i	4.33	3,56	1.22	656,4072
GHRP-6-FREE ACID_2H	5.67	3,56	1.59	437,7226
ANAMORELIN_H	7,71	3,56	2.16	547,3391
ANAMORELIN_i	7,71	3,56	2,16	548,3425
ANAMORELIN_Na	7,71	3,56	2,16	569,3211
ANAMORELIN_K	7,71	3,56	2,16	585,2950
ANAMORELIN_Ki	7,71	3,56	2,16	586,2950
CAPROMORELIN_H	6,45	3,56	1,81	506,2762
CAPROMORELIN_i	6,45	3,56	1,81	507,2795
IBUTAMOREN_H	7,19	3,56	2,02	529,2479
AOD-9604_2H	5,12	3,56	1,44	907.9349
AOD-9604_2Hi	5,12	3,56	1,44	908,4355
AOD-9604_2Hii	5,12	3,56	1,44	908,9361

## 6.2 ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ

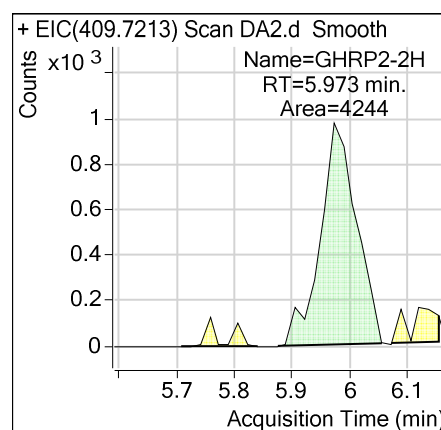
Για τον έλεγχο της ειδικότητας της μεθόδου αναλύθηκε δείγμα που περιείχε 7 πεπτίδια διαφορετικής δομής από τα αναλυόμενα μαζί με λευκό δείγμα ώστε να εξεταστεί η ύπαρξη παρεμποδίζουσών κορυφών στα εξαγόμενα ιοντικά χρωματογραφήματα στους χρόνους ανάλυσης των προσδιοριζόμενων ουσιών. Η ανάλυση των αρνητικών δειγμάτων σύρων έδειξε ότι για τις προσδιοριζόμενες ουσίες δεν εμφανίστηκαν παρεμποδίζουσες κορυφές για τα ιόντα που αναφέρονται στον πίνακα με τους χρόνους ανάλυσης. Στους πίνακες που ακολουθούν φαίνονται τα ενδεικτικά χρωματογραφήματα:

### GHRP-2\_H

A) Λευκό Δείγμα



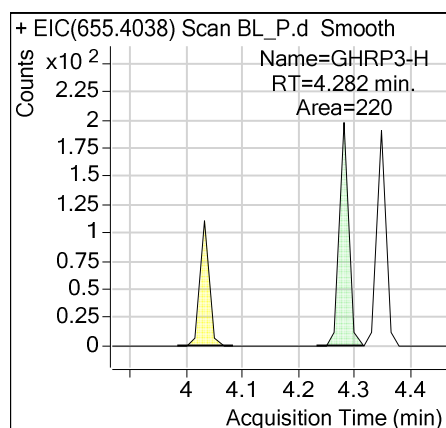
B) Εμβολιασμένο Δείγμα



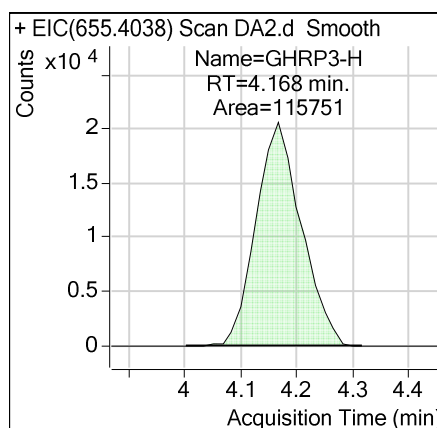
**ΕΙΚΟΝΑ 6.1 :** α) λευκό δείγμα και β) εμβολιασμένο δείγμα συγκέντρωσης 2 ng/mL

### GHRP-3\_H

A) Λευκό Δείγμα



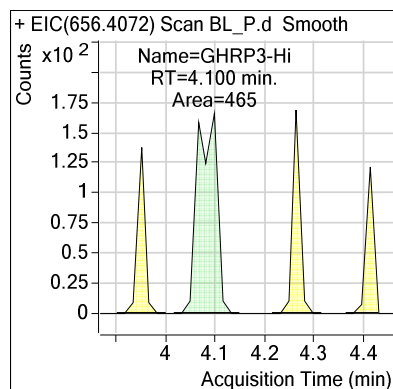
B) Εμβολιασμένο Δείγμα



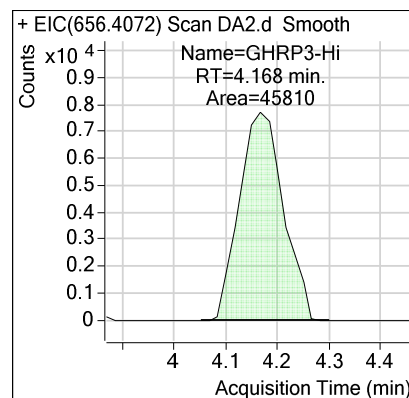
**ΕΙΚΟΝΑ 6.2 :** α) λευκό δείγμα και β) εμβολιασμένο δείγμα συγκέντρωσης 2 ng/mL

## GHRP-3\_Hi

A) Λευκό Δείγμα



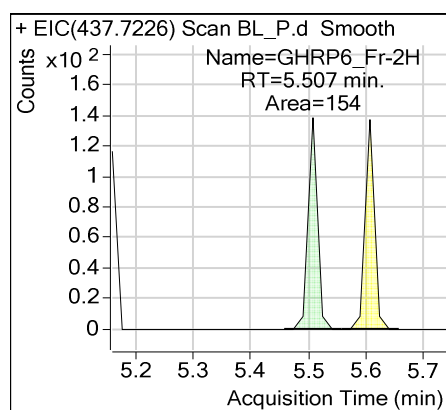
B) Εμβολιασμένο Δείγμα



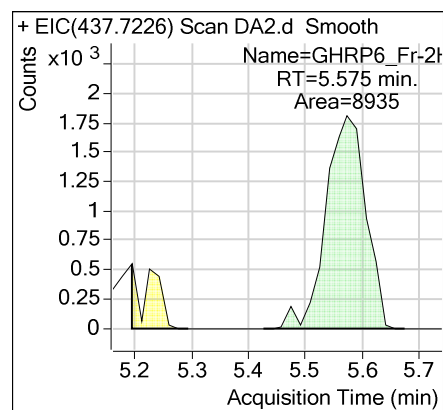
**ΕΙΚΟΝΑ 6.3 :** α) λευκό δείγμα και β) εμβολιασμένο δείγμα συγκέντρωσης 2 ng/mL

## GHRP-6\_FreeAcid\_2H

A) Λευκό Δείγμα



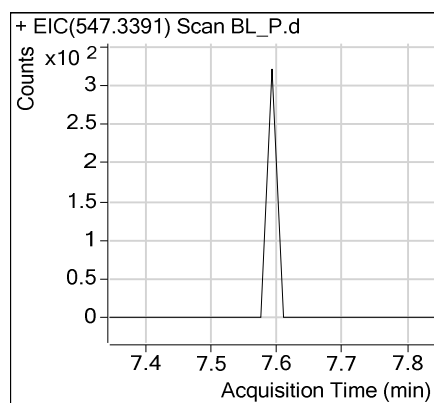
B) Εμβολιασμένο Δείγμα



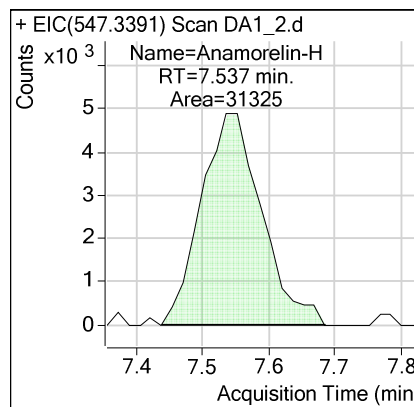
**ΕΙΚΟΝΑ 6.4 :** α) λευκό δείγμα και β) εμβολιασμένο δείγμα συγκέντρωσης 2 ng/mL

## Anamorelin\_H

A) Λευκό Δείγμα



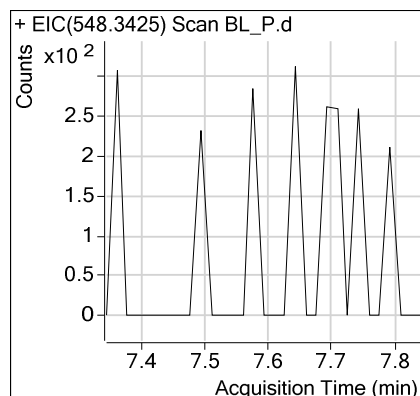
B) Εμβολιασμένο Δείγμα



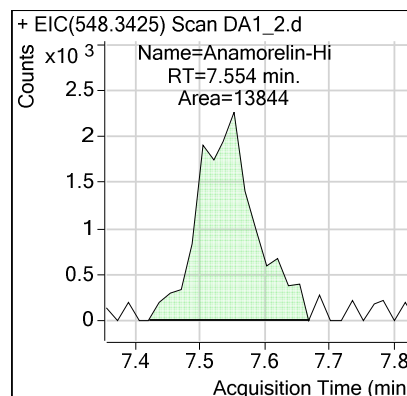
**ΕΙΚΟΝΑ 6.5 :** α) λευκό δείγμα και β) εμβολιασμένο δείγμα συγκέντρωσης 2 ng/mL

### Anamorelin\_Hi

A) Λευκό Δείγμα



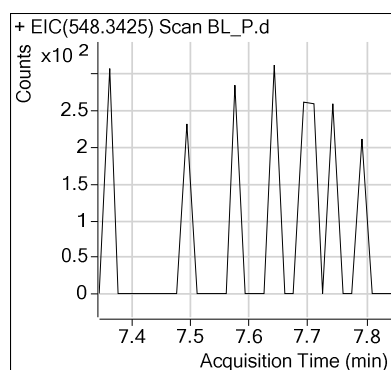
B) Εμβολιασμένο Δείγμα



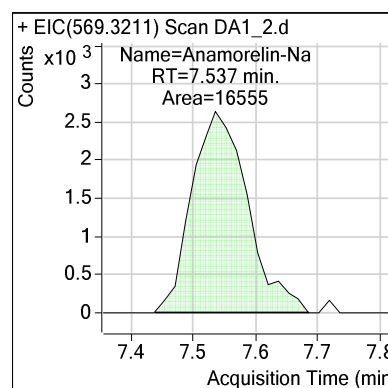
**ΕΙΚΟΝΑ 6.6 :** α) λευκό δείγμα και β) εμβολιασμένο δείγμα συγκέντρωσης 2 ng/mL

### Anamorelin\_Na

A) Λευκό Δείγμα



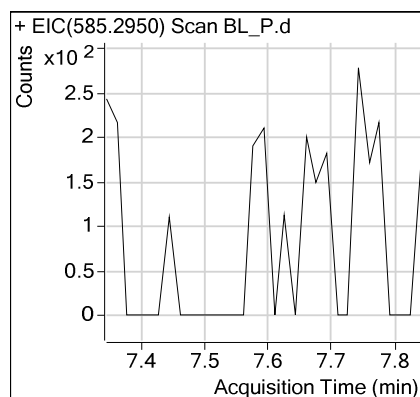
B) Εμβολιασμένο Δείγμα



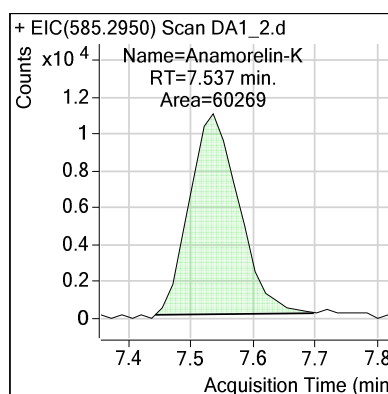
**ΕΙΚΟΝΑ 6.7 :** α) λευκό δείγμα και β) εμβολιασμένο δείγμα συγκέντρωσης 2 ng/mL

### Anamorelin\_K

A) Λευκό Δείγμα



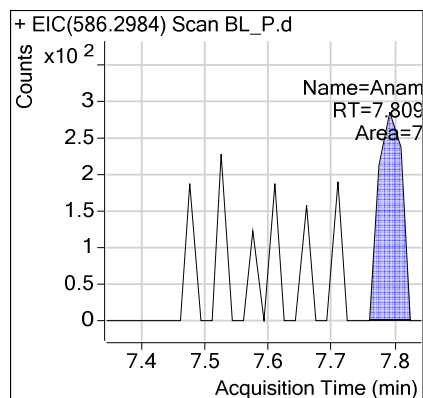
B) Εμβολιασμένο Δείγμα



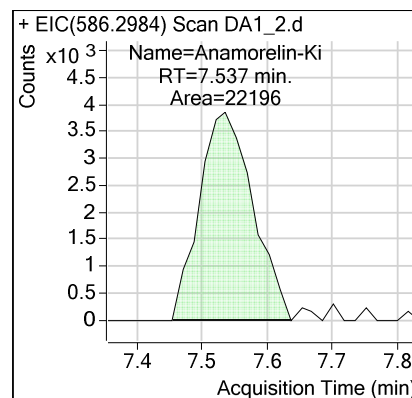
**ΕΙΚΟΝΑ 6.8 :** α) λευκό δείγμα και β) εμβολιασμένο δείγμα συγκέντρωσης 2 ng/mL

## Anamorelin\_Ki

A) Λευκό Δείγμα



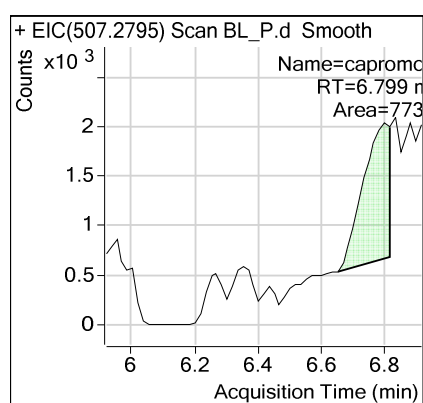
B) Εμβολιασμένο Δείγμα



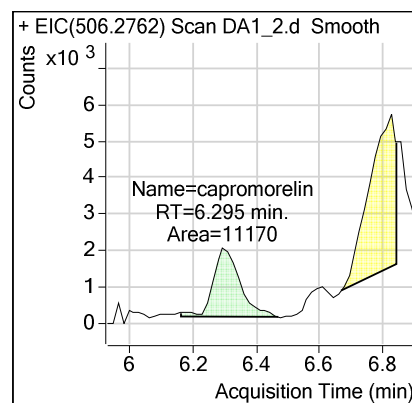
**ΕΙΚΟΝΑ 6.10 :** α) λευκό δείγμα και β) εμβολιασμένο δείγμα συγκέντρωσης 2 ng/mL

## Capromorelin\_H

A) Λευκό Δείγμα



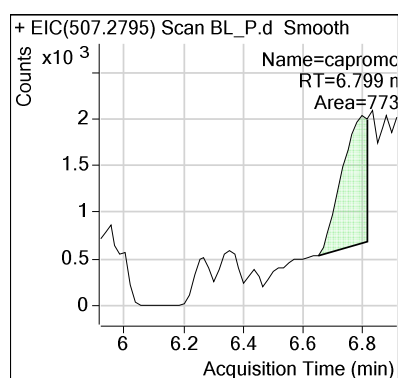
B) Εμβολιασμένο Δείγμα



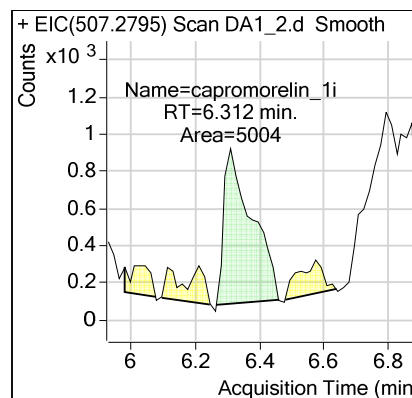
**ΕΙΚΟΝΑ 6.11 :** α) λευκό δείγμα και β) εμβολιασμένο δείγμα συγκέντρωσης 2 ng/mL

## Capromorelin\_Hi

A) Λευκό Δείγμα



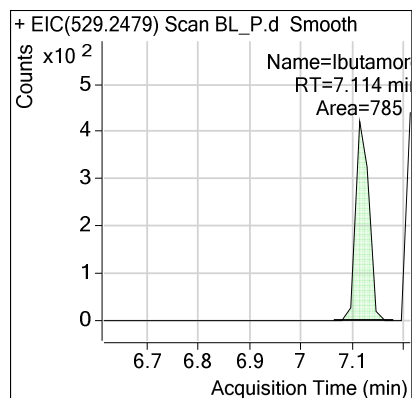
B) Εμβολιασμένο Δείγμα



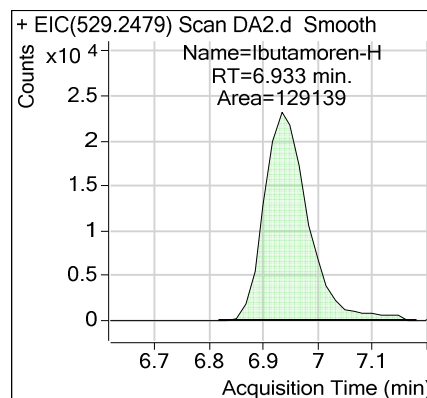
**ΕΙΚΟΝΑ 6.12 :** α) λευκό δείγμα και β) εμβολιασμένο δείγμα συγκέντρωσης 2 ng/mL

## Ibutamoren\_H

A) Λευκό Δείγμα



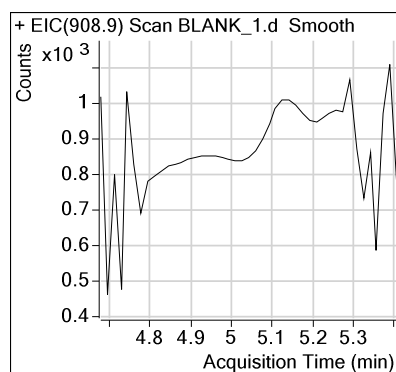
B) Εμβολιασμένο Δείγμα



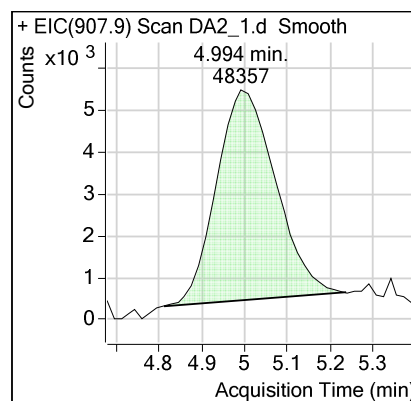
**ΕΙΚΟΝΑ 6.13 :** α) λευκό δείγμα και β) εμβολιασμένο δείγμα συγκέντρωσης 2 ng/mL

## AOD9604\_2H

A) Λευκό Δείγμα



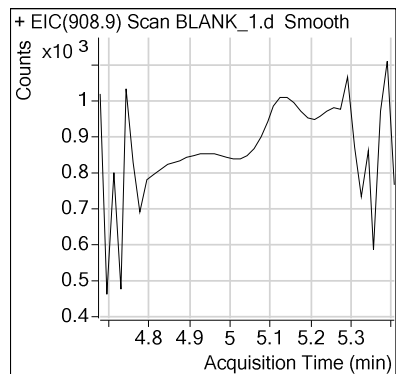
B) Εμβολιασμένο Δείγμα



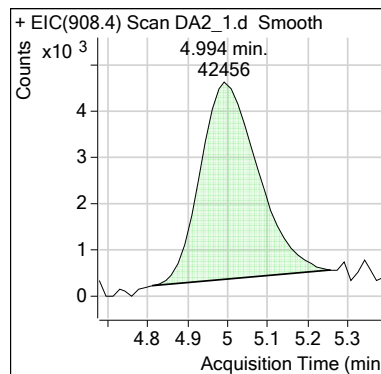
**ΕΙΚΟΝΑ 6.14 :** α) λευκό δείγμα και β) εμβολιασμένο δείγμα συγκέντρωσης 2 ng/mL

## AOD9604\_2Hi

A) Λευκό Δείγμα



B) Εμβολιασμένο Δείγμα

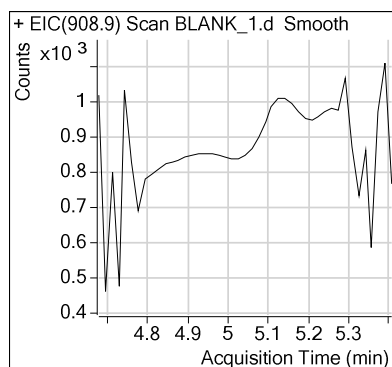


**ΕΙΚΟΝΑ 6.15 :** α) λευκό δείγμα και β) εμβολιασμένο δείγμα συγκέντρωσης 2 ng/mL

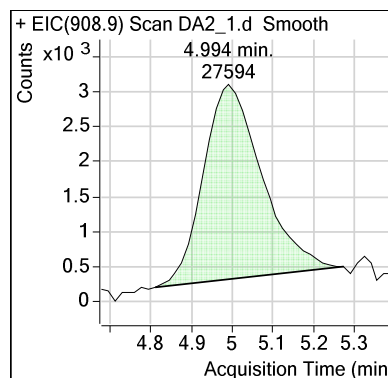


## AOD9604\_2Hii

A) Λευκό Δείγμα



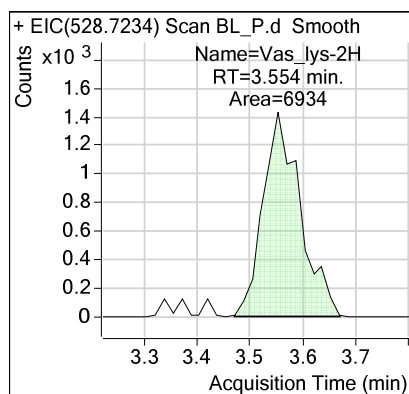
B) Εμβολιασμένο Δείγμα



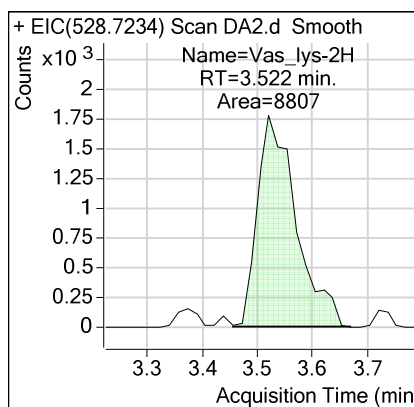
**ΕΙΚΟΝΑ 6.16 :** α) λευκό δείγμα και β) εμβολιασμένο δείγμα συγκέντρωσης 2 ng/mL

## VAS-LYS\_2H (ISTD)

A) Λευκό Δείγμα



B) Εμβολιασμένο Δείγμα



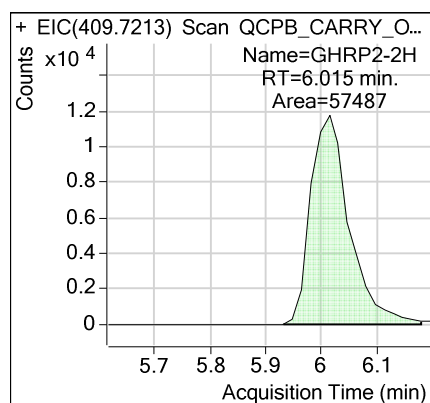
**ΕΙΚΟΝΑ 6.17 :** α) λευκό δείγμα και β) εμβολιασμένο δείγμα συγκέντρωσης 2 ng/mL για το εσωτερικό πρότυπο

## 6.3 ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗΣ

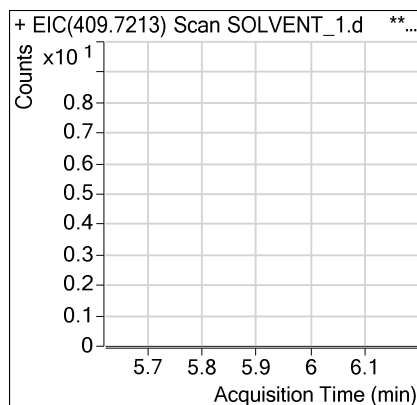
Για τον έλεγχο τυχόν επιμόλυνσης αναλύθηκε ένα διάλυμα που περιέχει τις υπό ανάλυση ουσίες σε συγκέντρωση 100 ng/mL πριν από ένα δείγμα που περιέχουν μόνο διαλύτη ανασύστασης. Ακολουθούν τα ενδεικτικά χρωματογραφήματα:

## GHRP-2\_H

A)



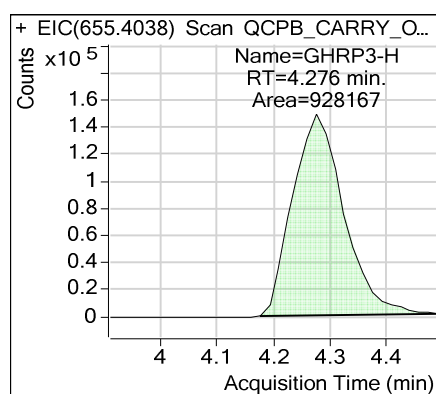
B)



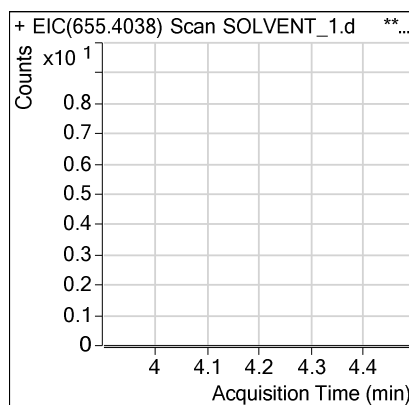
**ΕΙΚΟΝΑ 6.18 :** α) Διάλυμα συγκέντρωσης 100 ng/ml και β) Διάλυμα με διαλύτη ανασύστασης

## GHRP-3\_H

A)



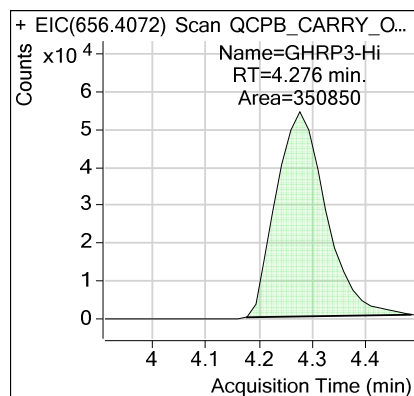
B)



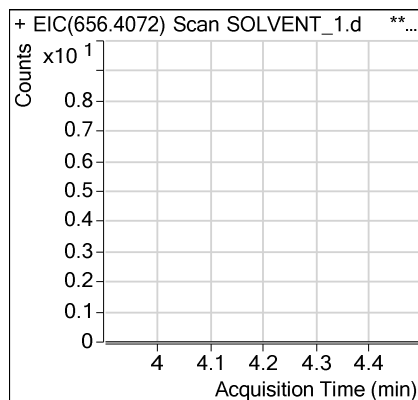
**ΕΙΚΟΝΑ 6.19 :** α) Διάλυμα συγκέντρωσης 100 ng/ml και β) Διάλυμα με διαλύτη ανασύστασης

## GHRP-3\_Hi

A)



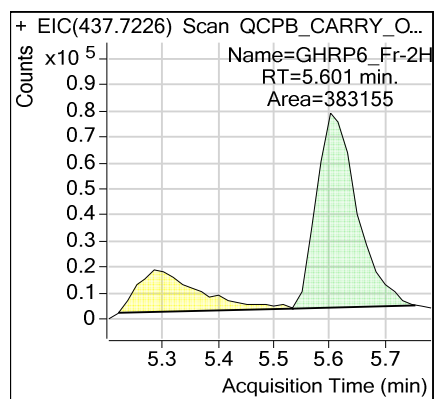
B)



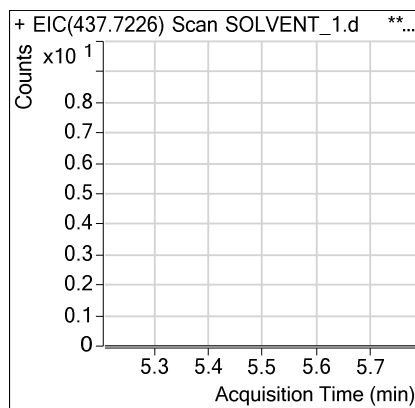
**EIKONA 6.20** : α) Διάλυμα συγκέντρωσης 100 ng/ml και β) Διάλυμα με διαλύτη ανασύστασης

### GHRP-6\_FreeAcid\_2H

A)



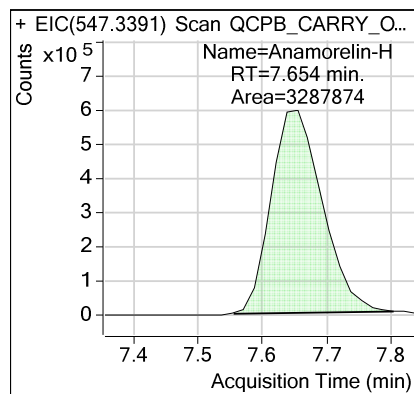
B)



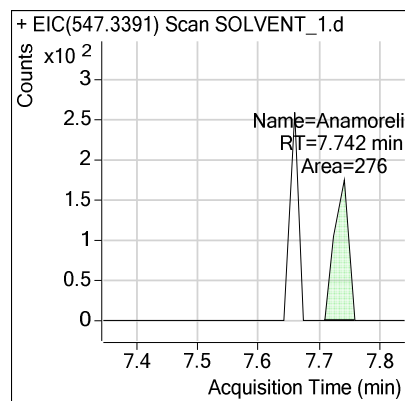
**EIKONA 6.21** : α) Διάλυμα συγκέντρωσης 100 ng/ml και β) Διάλυμα με διαλύτη ανασύστασης

### Anamorelin\_H

A)



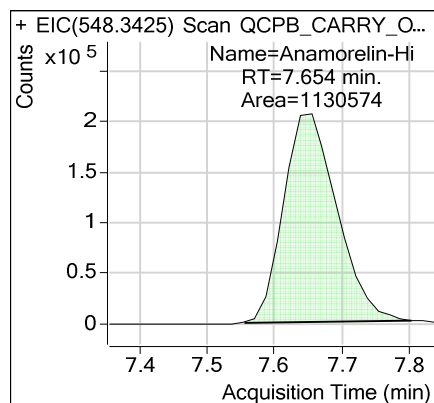
B)



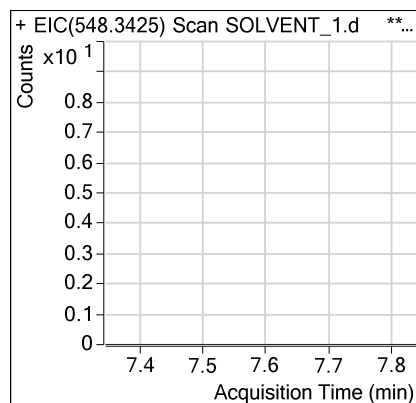
**EIKONA 6.22** : α) Διάλυμα συγκέντρωσης 100 ng/ml και β) Διάλυμα με διαλύτη ανασύστασης

## Anamorelin\_Hi

A)



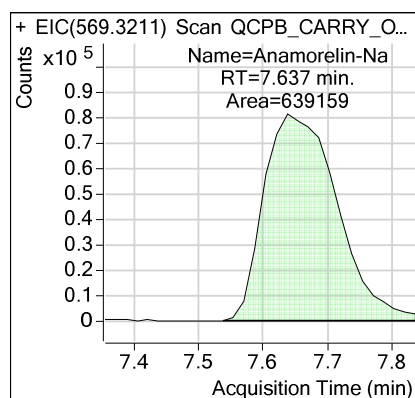
B)



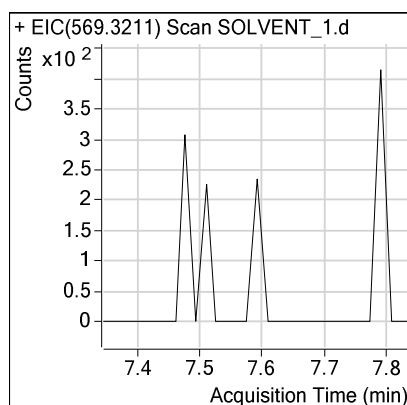
**EIKONA 6.23 :** α) Διάλυμα συγκέντρωσης 100 ng/ml και β) Διάλυμα με διαλύτη ανασύστασης

## Anamorelin\_Na

A)



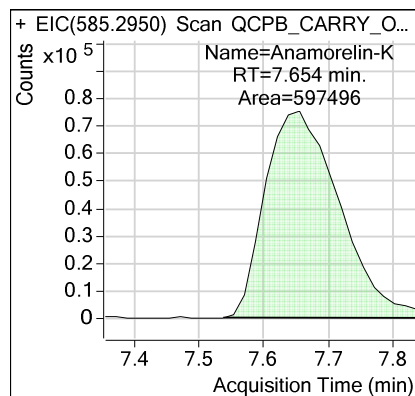
B)



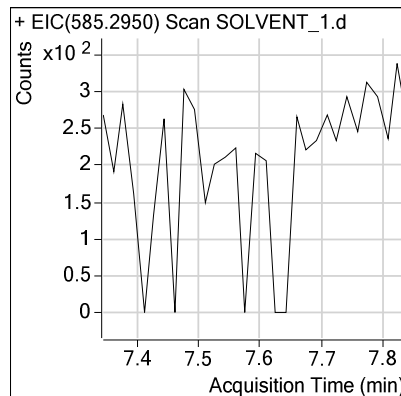
**EIKONA 6.24 :** α) Διάλυμα συγκέντρωσης 100 ng/ml και β) Διάλυμα με διαλύτη ανασύστασης

## Anamorelin\_K

A)



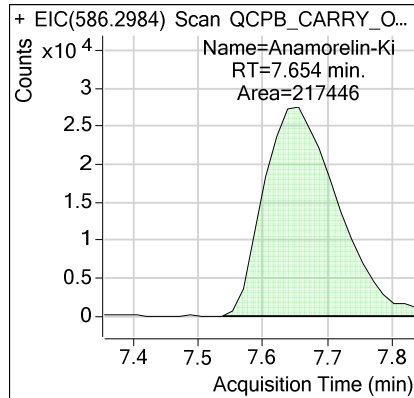
B)



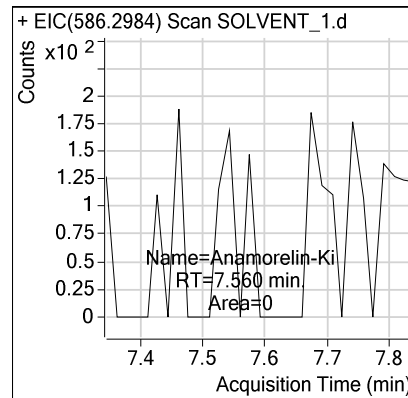
**EIKONA 6.25 :** α) Διάλυμα συγκέντρωσης 100 ng/ml και β) Διάλυμα με διαλύτη ανασύστασης

### Anamorelin\_Ki

A)



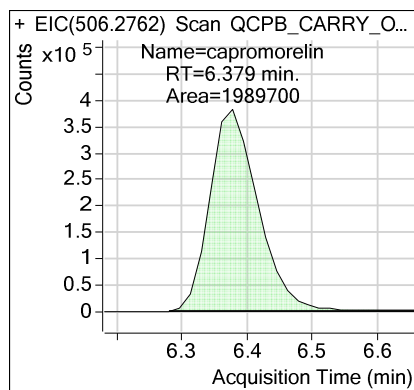
B)



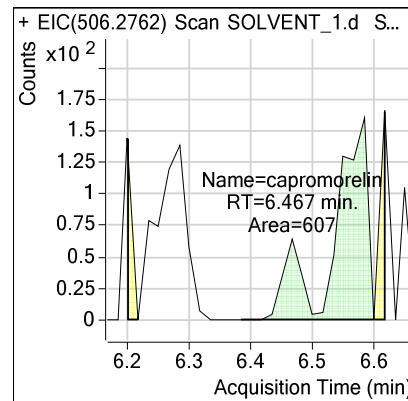
**EIKONA 6.26 :** α) Διάλυμα συγκέντρωσης 100 ng/ml και β) Διάλυμα με διαλύτη ανασύστασης

### Capromorelin\_H

A)



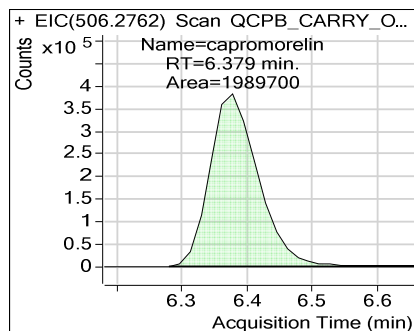
B)



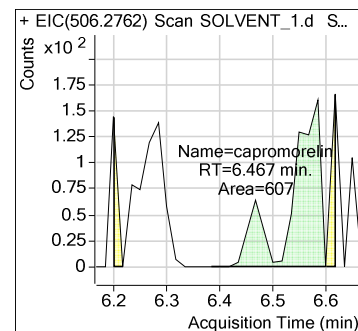
**EIKONA 6.27 :** α) Διάλυμα συγκέντρωσης 100 ng/ml και β) Διάλυμα με διαλύτη ανασύστασης

### Capromorelin\_Hi

A)



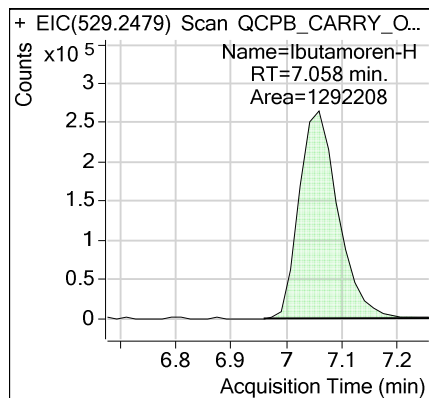
B)



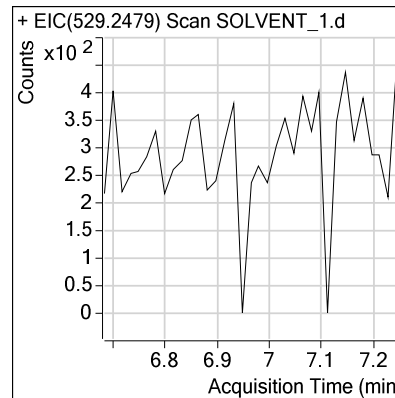
**ΕΙΚΟΝΑ 6.28 :** α) Διάλυμα συγκέντρωσης 100 ng/ml και β) Διάλυμα με διαλύτη ανασύστασης

### Ibutamoren\_H

A)



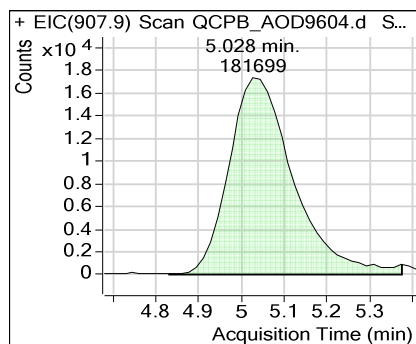
B)



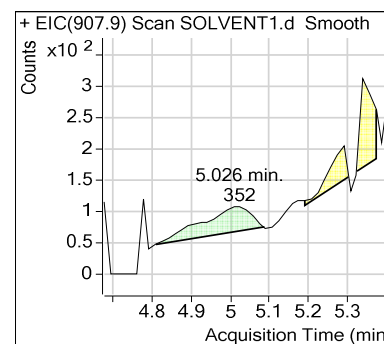
**ΕΙΚΟΝΑ 6.29 :** α) Διάλυμα συγκέντρωσης 100 ng/ml και β) Διάλυμα με διαλύτη ανασύστασης

### AOD9604\_2H

A)



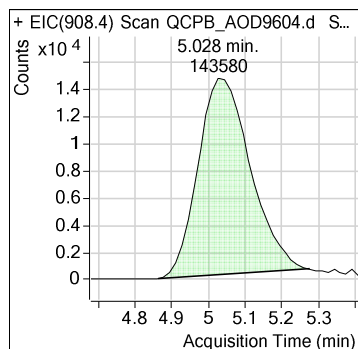
B)



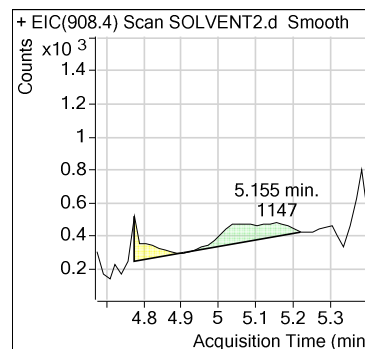
**ΕΙΚΟΝΑ 6.30 :** α) Διάλυμα συγκέντρωσης 100 ng/ml και β) Διάλυμα με διαλύτη ανασύστασης

### AOD9604\_2Hi

A)



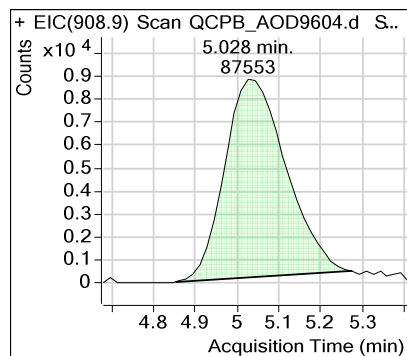
B)



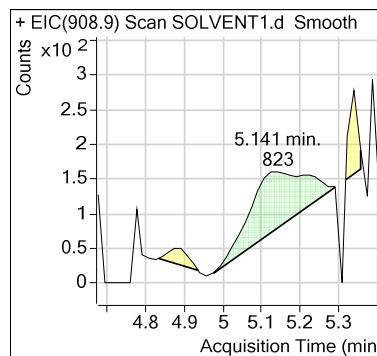
**ΕΙΚΟΝΑ 6.31 :** α) Διάλυμα συγκέντρωσης 100 ng/ml και β) Διάλυμα με διαλύτη ανασύστασης

**AOD9604\_2Hii**

A)



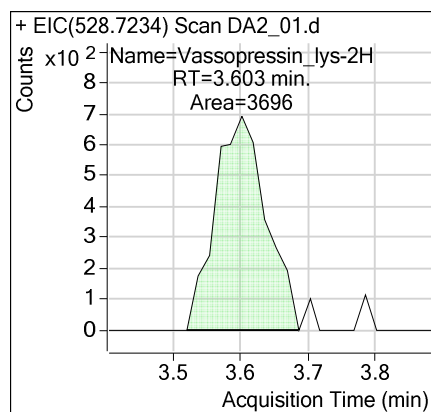
B)



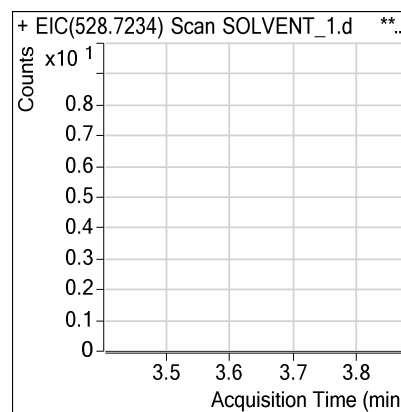
**ΕΙΚΟΝΑ 6.32 :** α) Διάλυμα συγκέντρωσης 100 ng/ml και β) Διάλυμα με διαλύτη ανασύστασης

**Vas-Lys\_2H (ISTD)**

A)



B)



**ΕΙΚΟΝΑ 6.33 :** α) Διάλυμα συγκέντρωσης 100 ng/ml και β) Διάλυμα με διαλύτη ανασύστασης για το εσωτερικό πρότυπο

## 6.4 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΗΤΡΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ - % ΑΝΑΚΤΗΣΗ

Η επίδραση από το μητρικό υλικό του δείγματος για κάθε προσδιοριζόμενη ουσία υπολογίστηκε με σύγκριση των εμβαδών των κορυφών κάθε ουσίας σε τρία δείγματα ούρων που εμβολιάστηκαν και των αντίστοιχων εμβαδών των κορυφών προτύπων υδατικών διαλυμάτων στην ίδια συγκέντρωση, σύμφωνα με τον ακόλουθο τύπο:

$$\left(1 - \frac{[PeakArea]urinespiked}{[PeakArea]waterspiked}\right) * 100$$

Υπολογίστηκαν οι τυπικές αποκλίσεις της επίδρασης του μητρικού υλικού, ώστε να αξιολογηθούν οι διαφορές από τα τρία διαφορετικά υποστρώματα ούρων. Οι μέσες τιμές της % επίδρασης από το υπόστρωμα, παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.2. Τα υπό εξέταση πεπτίδια παρουσιάζουν διαφορετικές τιμές για την επίδραση από το υπόστρωμα με διακυμάνσεις από -24,0% έως 91,6%.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 6.2:** Μέσες τιμές της % Επίδρασης του Μητρικού Υλικού και της % Ανάκτησης

ΟΥΣΙΑ	m/z	ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΗΤΡΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ	% ΑΝΑΚΤΗΣΗ
GHRP-2_H	409,7213	7,3	87,0
GHRP-3_H	655,4038	-24,0	87,9
GHRP-3_Hi	656,4072	-23,3	89,2
GHRP-6_ FreeAcid_2H	437,7226	57,0	37,5
ANAMORELIN_H	547,3391	75,1	22,0
ANAMORELIN_Hi	548,3425	73,6	24,3
ANAMORELIN_Na	569,3211	34,8	35,8
ANAMORELIN_K	585,2950	27,0	29,5
ANAMORELIN_Ki	586,2950	22,2	31,8
CAPROMORELIN_H	506,2762	91,6	10,0
CAPROMORELIN_Hi	507,2795	88,8	12,8
IBUTAMOREN_H	529,2479	48,6	50,9
AOD9604_2H	907.9349	64,1	103,8



AOD9604_2Hi	908,4355	62,1	102,7
AOD9604_2Hii	908,9361	55,2	107,0

## 6.5 ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΠΑΓΟΡΕΥΜΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

Για την εκτίμηση της ικανότητας προσδιορισμού των υπό αξιολόγηση ουσιών (Identification capability) αναλύθηκαν 10 διαφορετικά λευκά δείγματα ούρων, στα οποία είχαν εμβολιαστεί πρότυπα διαλύματα εργασίας σε συγκέντρωση 1, 2 και 4 ng/mL μαζί με τα αντίστοιχα λευκά δείγματα χωρίς εμβολιασμό. Σε όλες τις περιπτώσεις επετεύχθη η ανίχνευση των προσδιοριζόμενων ουσιών. Τα υπό εξέταση πεπτίδια είναι ανιχνεύσιμα σε συγκέντρωση 2 ng/mL και τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 6.3.

**Πίνακας 6.3:** Αποτελέσματα Ικανότητας Προσδιορισμού Απαγορευμένων Ουσιών

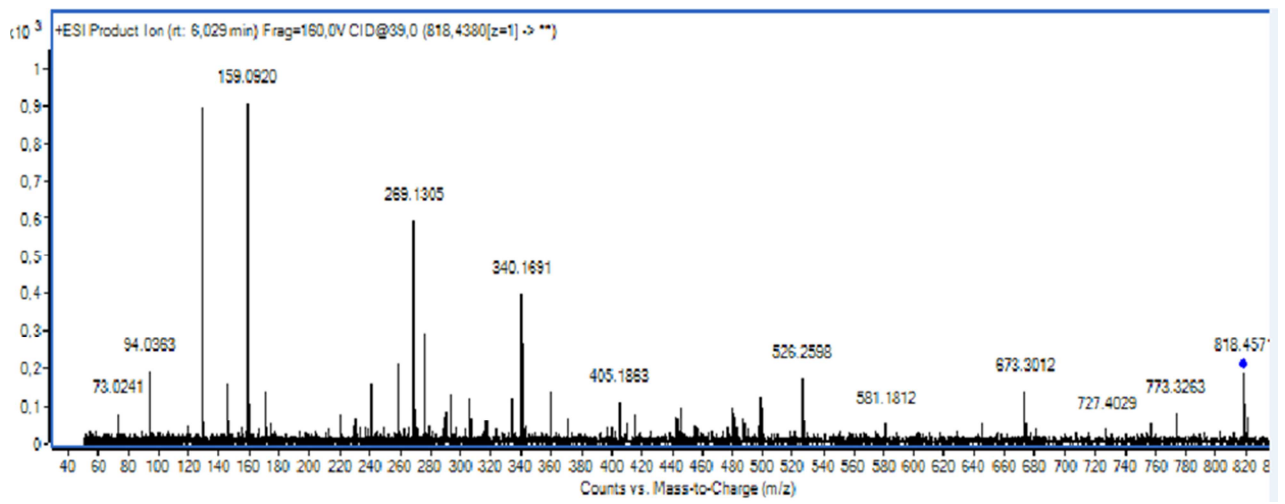
ΠΕΠΤΙΔΙΑ	MRPL (ng/ml)	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΟΥΣΙΑΣ		
		0.5xMRPL	MRPL	2xMRPL
GHRP-2_2H	2	10/10	10/10	10/10
GHRP-3_H	2	10/10	10/10	10/10
GHRP-3_i	2	10/10	10/10	10/10
GHRP-6-FREE ACID_2H	2	10/10	10/10	10/10
ANAMORELIN_H	2	10/10	10/10	10/10
ANAMORELIN_i	2	10/10	10/10	10/10
ANAMORELIN_Na	2	10/10	10/10	10/10
ANAMORELIN_K	2	10/10	10/10	10/10
ANAMORELIN_Ki	2	10/10	10/10	10/10
CAPROMORELIN_H	2	10/10	10/10	10/10
CAPROMORELIN_i	2	10/10	10/10	10/10
IBUTAMOREN_H	2	10/10	10/10	10/10
AOD-9604_2H	2	10/10	10/10	10/10
AOD-9604_2Hi	2	10/10	10/10	10/10
AOD-9604_2Hii	2	10/10	10/10	10/10

## 6.6 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ (MS/MS)

Για την ταυτοποίηση ενώσεων σε πολύπλοκα μίγματα χρειάζονται πρόσθετες πληροφορίες που λαμβάνονται με την εφαρμογή συζευγμένης ή δίδυμης φασματομετρίας μαζών. Για τον λόγο αυτό έγινε ανάπτυξη επιβεβαιωτικών μεθόδων τα αποτελέσματα των οποίων φαίνονται στον Πίνακα 6.4 ενώ στην Εικόνα 6.34 παρατίθεται το Φάσμα MS/MS για το GHRP-2.

**Πίνακας 6.4:** Αποτελέσματα Ανάπτυξης Επιβεβαιωτικών Μεθόδων

ΟΥΣΙΑ	ΠΡΟΔΡΟΜΟ ΙΟΝ	ΘΡΑΥΣΜΑΤΑ	ΕΝΕΡΓΕΙΑ ΣΥΓΚΡΟΥΣΗΣ
GHRP-2_2H	409,7213	343,1724 317,1316 258,125 196,1081	30eV
GHRP-3_H	655,4038	610,3584 570,3538 491,2792 350,2213	45eV
GHRP-6-FREE ACID_2H	437,7226	395,1710 324,1401 279,1307 195,0927	30eV
ANAMORELIN_H	547,3391	462,285 371,1786 276,2057 202,1213	25eV
CAPROMORELIN_H	506,2762	421,2234 334,1914 244,1444 166,0975	35eV
IBUTAMOREN_H	529,2479	444,1928 394,1809 267,1149 190,1213	30eV



**Εικόνα 6.34:** Φάσμα MS/MS του GHRP-2

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της εργασίας ήταν η ανάπτυξη μεθόδου με την τεχνική UPLC/QTOF-MS μετά από εκχύλιση στερεάς φάσης για την ποιοτική ανίχνευση μικρών πεπτιδίων απελευθέρωσης αυξητικής ορμόνης (GHRPs) σε ούρα αθλητών. Συγκεκριμένα, αξιολογήθηκαν τα ακόλουθα πεπτίδια : GHRP-2, GHRP-3, GHRP-6\_Free Acid, Anamorelin, Capromorelin, Ibutamoren, AOD-9604. Για την επεξεργασία των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν ιοντανταλλακτικά φασίγια εκχύλισης στερεάς φάσης. Το υλικό πλήρωσης έχει ένα άπολο άκρο και μία καρβοξυλική ομάδα.

Η ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με υδροχρωματογραφικό σύστημα υπερυψηλής απόδοσης (UPLC) σε συνδυασμό με το φασματομέτρο μαζών με τετραπολικό αναλυτή μαζών συζευγμένο με αναλυτή χρόνου πτήσης (LC/QTOF-MS). Για τον ιοντισμό των ουσιών, έγινε χρήση ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό θετικής πολικότητας (electrospray ionization, (+) ESI).

Για την ανίχνευση των πεπτιδίων απαραίτητη ήταν η επίτευξη μείωσης της επίδρασης του μητρικού υλικού έτσι ώστε να λαμβάνουμε χρωματογραφήματα με εμφανείς και καθαρές κορυφές των μονοϊονισμένων και δισιονισμένων ενώσεων. Έγιναν διάφορες δοκιμές με αλλαγή στήλης και αλλαγή στην πειραματική διαδικασία μέχρι να υπάρξουν οι βέλτιστες συνθήκες για την ανίχνευση των πεπτιδίων απελευθέρωσης αυξητικής ορμόνης.

Η μέθοδος αξιολογήθηκε ως προς τη σάρωση των συγκεκριμένων πεπτιδίων, χρησιμοποιώντας ως εσωτερικό πρότυπο το πεπτίδιο Βασοπρεσσίνη-Λυσίνη και ελέγχθηκαν και αξιολογήθηκαν οι εξής παράμετροι:

- Σχετικός Χρόνος Ανάσχεσης
- Ειδικότητα της μεθόδου για κάθε αναλύομενη ουσία
- Έλεγχος επιμόλυνσης
- Επίδραση μητρικού υλικού και % ανάκτηση
- Ικανότητα Προσδιορισμού Απαγορευμένων Ουσιών

Συμπερασματικά, η μέθοδος αξιολογήθηκε ως επαρκής και κατάλληλη για την ανίχνευση πεπτιδίων απελευθέρωσης της αυξητικής ορμόνης.

## ABSTRACT

The purpose of this Master Thesis was the development and validation of a UPLC/QTOF-MS method after solid phase extraction for the qualitative detection of growth hormone releasing peptides (GHRPs) in urine of athletes. Specifically, the peptides that were studied were: GHRP-2, GHRP-3, GHRP-6\_Free Acid, Anamorelin, Capromorelin, Ibutamoren, AOD-9604. For the sample processing ion-exchange cartridges were utilized. The filler material has a nonpolar end and a caboxyl group.

The analysis of the samples was performed by Liquid Chromatography- High Performance System (UPLC) combined with Mass Spectrometer Detector and the use of a Time of Flight mass analyzer coupled with a quadrupole (LC / QTOF-MS) analyzer. Analytes where ionized with an electrospray ionization, performed in the positive mode [(+)ESI].

For the detection of the peptides it was necessary to achieve a minimization of the matrix effect phenomenon so as to obtain chromatograms with obvious and clear peaks of monoionized and deionized compouds. Various modifications were tested by changing the column and the experimental procedure and until the best conditions for the detection of growth hormone releasing peptides were reached.

This method was evaluated and validated for the scanning of specific peptides using as internal standard the peptide Vasopressin-Lysine and the parameters that were examined are

- Relative Retention Time
- Specificity of the method for each peptide
- Carry over
- Matrix Effect and Recovery
- Identification Capability of Prohibited peptides

In conclusion, the method was evaluated as efficient and suitable for the detection of growth hormone releasing peptides.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. 6200 Series Accurate-Mass Time-of-Flight (TOF) LC/MS | Agilent. (n.d.). Retrieved December 2, 2018, from [https://www.agilent.com/en/products/mass-spectrometry/lc-ms-instruments/6200-series-accurate-mass-time-of-flight-\(tof\)-lc-ms](https://www.agilent.com/en/products/mass-spectrometry/lc-ms-instruments/6200-series-accurate-mass-time-of-flight-(tof)-lc-ms)
2. Advani, S. M., Advani, P. G., VonVille, H. M., & Jafri, S. H. (2018). Pharmacological management of cachexia in adult cancer patients: a systematic review of clinical trials. *BMC Cancer*, *18*(1), 1174. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-5080-4>
3. Anamorelin. (2018). In *Wikipedia*. Retrieved from <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Anamorelin&oldid=844851392>
4. AOD9604 | Peptide Sciences. (n.d.). Retrieved December 2, 2018, from <https://www.peptidesciences.com/aod9604>
5. Capromorelin. (2017). In *Wikipedia*. Retrieved from <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Capromorelin&oldid=815348738>
6. Cox, H. D., Smeal, S. J., Hughes, C. M., Cox, J. E., & Eichner, D. (2015). Detection and in vitro metabolism of AOD9604. *Drug Testing and Analysis*, *7*(1), 31–38. <https://doi.org/10.1002/dta.1715>
7. Cuervo, D., Loli, C., Fernández-Álvarez, M., Muñoz, G., & Carreras, D. (2017). Determination of doping peptides via solid-phase microelution and accurate-mass quadrupole time-of-flight LC–MS. *Journal of Chromatography B*, *1065–1066*, 134–144. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.08.044>
8. Doping Prevention: Substances and methods. (n.d.). Retrieved December 2, 2018, from <http://www.doping-prevention.com/substances-and-methods.html>

9. E. Hoffman and V. Stroobant. (n.d.). *Mass Spectrometry: Principles and Applications 3rd ed.*
10. Esposito, S., Deventer, K., T'Sjoen, G., Vantilborgh, A., & Van Eenoo, P. (2013). Doping control analysis of desmopressin in human urine by LC-ESI-MS/MS after urine delipidation. *Biomedical Chromatography: BMC*, 27(2), 240–245. <https://doi.org/10.1002/bmc.2782>
11. Handelsman, D. J. (2016). Chapter 24 - Performance Enhancing Hormones in Sports Doping. In J. L. Jameson, L. J. De Groot, D. M. de Kretser, L. C. Giudice, A. B. Grossman, S. Melmed, ... G. C. Weir (Eds.), *Endocrinology: Adult and Pediatric (Seventh Edition)* (p. 441–454.e4). Philadelphia: W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-18907-1.00024-X>
12. Ibutamoren (MK-677): Top 9 Uses + Side Effects. (2016, September 5). Retrieved from <https://www.selfhacked.com/blog/ibutamoren/>
13. International Standard for Code Compliance by Signatories (ISCCS) | World Anti-Doping Agency. (n.d.). Retrieved December 2, 2018, from <https://www.wada-ama.org/en/resources/code-compliance/international-standard-for-code-compliance-by-signatories-isccs>
14. International Standard for Laboratories (ISL) | World Anti-Doping Agency. (n.d.). Retrieved December 2, 2018, from <https://www.wada-ama.org/en/resources/laboratories/international-standard-for-laboratories-isl>
15. International Standard for Testing and Investigations (ISTI) | World Anti-Doping Agency. (n.d.). Retrieved December 2, 2018, from <https://www.wada-ama.org/en/resources/world-anti-doping-program/international-standard-for-testing-and-investigations-isti-0>

16. International Standard for the Protection of Privacy and Personal Information (ISPPPI) | World Anti-Doping Agency. (n.d.). Retrieved December 2, 2018, from <https://www.wada-ama.org/en/resources/data-protection/international-standard-for-the-protection-of-privacy-and-personal>
17. International Standard for Therapeutic Use Exemptions (ISTUE) | World Anti-Doping Agency. (n.d.). Retrieved December 2, 2018, from <https://www.wada-ama.org/en/resources/therapeutic-use-exemption-tue/international-standard-for-therapeutic-use-exemptions-istue>
18. J. Throck Watson , O. David Sparkman. (n.d.). *Introduction to Mass Spectrometry: Instrumentation, Applications, and Strategies for Data Interpretation, 4th Edition*.
19. Judák, P., Van Eenoo, P., & Deventer, K. (2017). Adsorption effects of the doping relevant peptides Insulin Lispro, Synachten, TB-500 and GHRP 5. *Analytical Biochemistry*, 537, 69–71. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.09.003>
20. Okano, M., Sato, M., Ikekita, A., & Kageyama, S. (2010). Determination of growth hormone secretagogue pralmorelin (GHRP-2) and its metabolite in human urine by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM*, 24(14), 2046–2056. <https://doi.org/10.1002/rcm.4619>
21. Organic Chemistry [8th Edition] - Leroy G. Wade.pdf. (n.d.). Retrieved from [https://drive.google.com/file/d/0B0k31bamGzF6US1wbXVtTWpUbUk/view?usp=sharing&usp=embed\\_facebook](https://drive.google.com/file/d/0B0k31bamGzF6US1wbXVtTWpUbUk/view?usp=sharing&usp=embed_facebook)
22. Peters, R. J. B., Stolker, A. A. M., Mol, J. G. J., Lommen, A., Lyris, E., Angelis, Y., ... Nielen, M. W. F. (2010). Screening in veterinary drug analysis and sports doping control based on full-scan, accurate-mass spectrometry.



- TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 29(11), 1250–1268.  
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.07.012>
23. Robert E. Ardrey. (n.d.). *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry: An Introduction*.
24. Schänzer, W., & Thevis, M. (2017). Human sports drug testing by mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 36(1), 16–46.  
<https://doi.org/10.1002/mas.21479>
25. Semenistaya, E., Zvereva, I., Thomas, A., Thevis, M., Krotov, G., & Rodchenkov, G. (2015). Determination of growth hormone releasing peptides metabolites in human urine after nasal administration of GHRP-1, GHRP-2, GHRP-6, Hexarelin, and Ipamorelin. *Drug Testing and Analysis*, 7(10), 919–925. <https://doi.org/10.1002/dta.1787>
26. Sevigny, J. J., Ryan, J. M., van Dyck, C. H., Peng, Y., Lines, C. R., Nessly, M. L., & MK-677 Protocol 30 Study Group. (2008). Growth hormone secretagogue MK-677: no clinical effect on AD progression in a randomized trial. *Neurology*, 71(21), 1702–1708.  
<https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000335163.88054.e7>
27. Technical Documents - Index | World Anti-Doping Agency. (n.d.). Retrieved December 2, 2018, from <https://www.wada-ama.org/en/resources/science-medicine/technical-documents-index>
28. The Prohibited List | World Anti-Doping Agency. (n.d.). Retrieved December 2, 2018, from <https://www.wada-ama.org/en/what-we-do/the-prohibited-list>
29. Thevis, M., Thomas, A., & Schänzer, W. (2011). Doping control analysis of selected peptide hormones using LC-MS(/MS). *Forensic Science International*, 213(1–3), 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2011.06.015>

30. Thevis, M., Thomas, A., & Schänzer, W. (2014). Detecting peptidic drugs, drug candidates and analogs in sports doping: current status and future directions. *Expert Review of Proteomics*, *11*(6), 663–673.  
<https://doi.org/10.1586/14789450.2014.965159>
31. Thomas, A., Görgens, C., Guddat, S., Thieme, D., Dellanna, F., Schänzer, W., & Thevis, M. (2016). Simplifying and expanding the screening for peptides <2 kDa by direct urine injection, liquid chromatography, and ion mobility mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, *39*(2), 333–341.  
<https://doi.org/10.1002/jssc.201501060>
32. Thomas, A., Höppner, S., Geyer, H., Schänzer, W., Petrou, M., Kwiatkowska, D., ... Thevis, M. (2011). Determination of growth hormone releasing peptides (GHRP) and their major metabolites in human urine for doping controls by means of liquid chromatography mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *401*(2), 507–516.  
<https://doi.org/10.1007/s00216-011-4702-3>
33. Thomas, A., Solymos, E., Schänzer, W., Baume, N., Saugy, M., Dellanna, F., & Thevis, M. (2011). Determination of Vasopressin and Desmopressin in urine by means of liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry for doping control purposes. *Analytica Chimica Acta*, *707*(1), 107–113. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.09.027>
34. Thomas, A., Walpurgis, K., Krug, O., Schänzer, W., & Thevis, M. (2012). Determination of prohibited, small peptides in urine for sports drug testing by means of nano-liquid chromatography/benchtop quadrupole orbitrap tandem-mass spectrometry. *Journal of Chromatography. A*, *1259*, 251–257.  
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.07.022>

35. wada-2015-world-anti-doping-code.pdf. (n.d.). Retrieved from <https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/wada-2015-world-anti-doping-code.pdf>
36. World Anti-Doping Agency (WADA). (n.d.). Retrieved December 2, 2018, from <https://www.wada-ama.org/en>
37. Βοναπάρτη, Α. (2011). *Εφαρμογή της τεχνικής της υγροχρωματογραφίας / φασματομετρίας μαζών με αναλυτή χρόνου πτήσης (LC/TOF-MS) στον έλεγχο ντόπινγκ φαρμακευτικών ουσιών σε ούρα αθλητών και αλόγων* (Διδακτορική Διατριβή). Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ). Σχολή Επιστημών Υγείας. Τμήμα Φαρμακευτικής. Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας. Retrieved from <http://hdl.handle.net/10442/hedi/35048>
38. Ε. Παντερή, Μ. Παρίση-Πούλου. (n.d.). *ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ ΠΡΟΧΩΡΗΜΕΝΗΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ*.
39. ΕΣΚΑΝ ΑΡΧΙΚΗ. (n.d.). Retrieved December 2, 2018, from <http://www.0069.syzefxis.gov.gr/>
40. Θ.Π. Χατζηγιάννου, Μ.Α. Κουμπάρης. (n.d.). *Ενόργανη Ανάλυση*.
41. Ντόπινγκ: Ιστορία και εξέλιξη - ΑΠΟΚΑΛΥΨΗ. (n.d.). Retrieved December 2, 2018, from <http://apocalypsejohn.com/doping-istoria-kai-ekseliksh/>
42. Ολυμπιακή χρονιά ντόπινγκ | Αθλητισμός | Η ΚΑΘΗΜΕΡΙΝΗ. (n.d.). Retrieved December 2, 2018, from <http://www.kathimerini.gr/962634/article/epikairothta/a8lhtismos/olympiakh-xronia-ntopingk>
43. Το Ντόπινγκ στον Αθλητισμό και την Κοινωνία. Triathlon – Τρίαθλο Triathlon - Τρίαθλο. (n.d.). Retrieved December 2, 2018, from <http://www.triathlonworld.gr/doping-sports-and-society/>