



ΕΘΝΙΚΟΝ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΝ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΝ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

**ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΤΗΣ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ
ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΩΝ (LC-MS/MS) ΣΕ
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥΣ ΨΥΧΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΕ ΟΛΙΚΟ ΑΙΜΑ ΚΑΙ
ΜΗ ΣΥΜΒΑΤΙΚΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΣΕΒΑΣΤΗ ΚΑΡΑΜΠΕΛΑ

ΑΘΗΝΑ 2020

“Η έγκριση της διατριβής ειδίκευσης από το τμήμα Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει την αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα”. (Ν. 5343/1932, άρθρ. 202)

Στην Άλκηστη

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΕΙΡ. ΠΑΝΤΕΡΗ	ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ, ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ, ΕΚΠΑ	Μέλος τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής - Επιβλέπουσα
Ν. ΘΩΜΑΪΔΗΣ	ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ, ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ, ΕΚΠΑ	Μέλος τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής
Β. ΣΑΜΑΝΙΔΟΥ	ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ, ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ, ΑΠΘ	Μέλος τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής
Ι. ΛΟΥΚΑΣ	ΑΝΑΠΛ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ, ΕΚΠΑ	
Ι. ΝΤΟΤΣΙΚΑΣ	ΕΠΙΚ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ, ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ, ΕΚΠΑ	
Α. ΟΙΚΟΝΟΜΟΥ	ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ, ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ, ΕΚΠΑ	
Ε. ΓΚΙΚΑΣ	ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ, ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ, ΕΚΠΑ	

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Τοξικολογίας του Τμήματος Δικαστικών Επιστημών της Πολιτείας του Ντέλαγουερ των Η.Π.Α., σε συνεργασία με το Εργαστήριο Φαρμακευτικής Ανάλυσης του Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας του Τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Φτάνοντας στο τέλος μίας μεγάλης αλλά σίγουρα και εποικοδομητικής διαδικασίας, αισθάνομαι την ανάγκη να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όσους συνέβαλαν με οποιοδήποτε τρόπο και σε οποιοδήποτε βαθμό στην περάτωσή της.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ολόθερμες ευχαριστίες μου στην επιβλέπουσα της διατριβής, Καθηγήτρια κα Ειρήνη Παντερή για την ανάθεση του θέματος και την επίβλεψή του. Την ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου, την καθοδήγησή της, καθώς και το συνεχές και ουσιαστικό ενδιαφέρον της σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής. Η πολλαπλή βοήθεια που μου προσέφερε ήταν καθοριστική για την περάτωση της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής τον Καθηγητή κ. Νικόλαο Θωμαΐδη και την Καθηγήτρια κα Βικτωρία Σαμανίδου, για τις συμβουλές και τις παρατηρήσεις τους κατά τη διάρκεια της εκπόνησης αλλά και κατά τη συγγραφή της διατριβής. Επίσης, ευχαριστώ θερμά τον Αναπλ. Καθηγητή κ. Ιωάννη Λουκά, τον Επίκ. Καθηγητή κ. Ιωάννη Ντότσικα, τον Καθηγητή κ. Αναστάσιο Οικονόμου και τον Καθηγητή κ. Ευάγγελο Γκίκα, μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, για τις πολύτιμες συμβουλές τους κατά την αξιολόγηση της παρούσας εργασίας.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στην κα Jessica Smith, Υπεύθυνη Δικαστική Τοξικολόγο της Μονάδας Τοξικολογίας της πολιτείας του Ντέλαγουερ των Η.Π.Α., γιατί ενέκρινε την εκπόνηση της παρούσας διατριβής στο Εργαστήριο Τοξικολογίας αλλά και για τη στήριξή της, τις πολύτιμες συμβουλές αλλά και τη συμπαράσταση που μου έδειξε σε όλη τη διάρκεια των πειραμάτων, όπως και για τις χρήσιμες επιστημονικές συζητήσεις που είχαμε. Η βοήθεια που μου προσέφερε ήταν καταλυτική για την περάτωση της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Ευχαριστώ επίσης την κα Heather Maldonado, υπεύθυνη της Μονάδας Τοξικολογίας, για τη στήριξη και τις πολύτιμες επιστημονικές συζητήσεις μας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ επίσης στον κ. John Evans, Διευθυντή καθώς και στη Δρ. Rebecca Walker, πρώην Αναπληρώτρια Διευθύντρια, για την έγκρισή τους να εκπονήσω τη διατριβή στο εργαστήριο καθώς και για την εμπιστοσύνη που έδειξαν στο πρόσωπό μου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης τους υπόλοιπους συναδέφους του Εργαστηρίου Τοξικολογίας, για την άριστη συνεργασία και τη φιλική διάθεση με την οποία με περιέβαλλαν.

Επίσης ευχαριστώ την πολιτεία του Ντέλαγουερ για την έγκριση προκειμένου εκπονήσω τη διατριβή μου στο εργαστήριο τοξικολογίας της πολιτείας.

Τέλος ευχαριστώ θερμά τους δικούς μου ανθρώπους, την οικογένεια και τους φίλους μου για την αγάπη, την ενθάρρυνση, την κατανόηση και την ανεκτίμητη καθημερινή βοήθειά τους. Χωρίς την αγάπη των δικών μου ανθρώπων θα ήταν αδύνατη η εκπόνηση της παρούσας διατριβής και για αυτό το λόγο τους αφιερώνω την εργασία.

Ιούλιος 2020

Preface

The present work was carried out at the Laboratory of Toxicology of the Division of Forensic Science (DFS) of the State of Delaware in the USA, in collaboration with the Laboratory of Pharmaceutical Analysis of the Department of Pharmacy of the National and Kapoditrian University of Athens. Approaching to the end of a long but certainly productive process, I feel the need to express my sincere thanks to those who contributed in any way and to any degree, to its completion.

I would like to express my warmest thanks to the supervisor of this PhD thesis, Professor Eirini Panteri, for assigning the topic to me and supervising me. I thank her for the trust she has shown in me, her guidance, and her constant and substantial interest throughout the dissertation. The multiple help she offered to me was crucial for completing this doctoral dissertation.

I would also like to warmly thank the other two members of the three-member Advisory Committee, Professor Nikolaos Thomaidis and Professor Victoria Samanidou, for their advice and remarks during the elaboration but also during the writing process of the dissertation.

I warmly thank Associate Professor Ioannis Loukas, Assistant Professor Ioannis Dotsikas, Professor Anastasios Oikonomou and Professor Evangelos Gikas, members of the seven-member examination committee, for their valuable advice in evaluating this dissertation.

I would like to express my special and sincere thanks to Jessica Smith, Chief Forensic Toxicologist at the DFS in Delaware, USA, for her approval in order to elaborate my thesis in the laboratory as well as for her support during my dissertation, her valuable advice and the useful scientific discussions we had. The help that she offered to me was catalytic for completing this doctoral dissertation.

I would also like to thank Heather Maldonado, Supervisor of Forensic Toxicology, for her support and our valuable scientific discussions.

Special thanks also to John Evans, Director and Dr. Rebecca Walker, former Deputy Director, for their approval to elaborate my dissertation in the laboratory as well as the confidence they showed in my person.

I would also like to thank all other colleagues of the laboratory for the excellent cooperation and friendly disposition with which I was surrounded.

I would also like to thank the state of Delaware for approving my request to elaborate my thesis at DFS.

Finally, I would like to thank my family and friends for their love, encouragement, understanding and invaluable daily help. Without the love of my own people, it would be impossible to prepare this dissertation and for this reason I dedicate my work to them.

July 2020

Περίληψη

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή αναπτύχθηκαν και επικυρώθηκαν νέες αναλυτικές μέθοδοι με την τεχνική LC-MS/MS για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό ψυχοδραστικών ουσιών σε προθανάτιο και μεταθανάτιο ολικό αίμα, ούρα και επιλεγμένα “εναλλακτικά” βιολογικά δείγματα όπως η χολή, ο σπλήνας, το ήπαρ, ο εγκέφαλος, ο σκελετικός μυς, και το ενδοφθάλμιο υγρό. Οι αναπτυχθείσες μέθοδοι εφαρμόστηκαν σε αναλύσεις πραγματικών δειγμάτων από τοξικολογικές υποθέσεις.

Το θεωρητικό μέρος της διατριβής περιλαμβάνει το κεφάλαιο 1 στο οποίο αναφέρονται οι ορισμοί των ναρκωτικών ουσιών σύμφωνα με Ελληνική και την Αμερικανική Νομοθεσία, και επιπλέον γίνεται αναφορά στη σημασία του ποσοτικού προσδιορισμού των εξαρτησιογόνων ουσιών σε βιολογικά δείγματα, το κεφάλαιο 2 στο οποίο γίνεται αναφορά στις μεγαλύτερες χημικές κατηγορίες ψυχοδραστικών ουσιών και περιγράφονται τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και οι φαρμακολογικές και φαρμακοκινητικές ιδιότητες των ουσιών που μελετήθηκαν και το κεφάλαιο 3 στο οποίο περιγράφονται τα “παραδοσιακά” και “εναλλακτικά” βιολογικά δείγματα που χρησιμοποιούνται στη συστηματική τοξικολογική ανάλυση, και επιπλέον αναφέρονται οι κατευθυντήριες οδηγίες για την επικύρωση των αναλυτικών μεθόδων με εφαρμογή σε τοξικολογικές αναλύσεις.

Το πειραματικό μέρος της διατριβής περιλαμβάνει το κεφάλαιο 4 στο οποίο περιγράφεται αναλυτικά ο εργαστηριακός εξοπλισμός, τα αντιδραστήρια και οι πρότυπες ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν στις μελέτες. Ακολουθεί το κεφάλαιο 5 όπου περιγράφεται η ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου LC-MS/MS για τη σάρωση 19 ψυχοδραστικών ουσιών σε προθανάτιο και μεταθανάτιο ολικό αίμα. Στην παρούσα διατριβή αναλύθηκαν οι εξής 19 ψυχοδραστικές ουσίες: amphetamine, methamphetamine, phenylpropranolamine, ephedrine, pseudoephedrine, MDA, MDMA, MDEA, phentermine, methylphenidate, bupropion, hydroxy bupropion, alpha-PVP, ethylone, MDPV, mephedrone, methcathinone, methedrone και methylone. Για την κατεργασία των δειγμάτων αναπτύχθηκε μέθοδος κατεργασίας των βιολογικών δειγμάτων με την τεχνική της εκχύλισης στερεάς φάσης. Η μέθοδος σάρωσης αξιολογήθηκε ως προς τα κύρια χαρακτηριστικά ποιότητάς της, σύμφωνα με την οδηγία SWGTOX, και για το σκοπό αυτό ελέγχθηκε η ειδικότητα, η εκλεκτικότητα, η επιμόλυνση εκ μεταφοράς, η επίδραση του υλικού μήτρας, καθορίστηκε το κατώτατο όριο ανίχνευσης, υπολογίστηκε η % ανάκτηση για κάθε αναλύτη και η μέθοδος εφαρμόστηκε σε αναλύσεις πραγματικών δειγμάτων μεταθανάτιου ολικού αίματος. Στο κεφάλαιο 6 περιγράφεται η ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου UHPLC-ESI/MS/MS για τον ποσοτικό προσδιορισμό 12 ψυχοδραστικών ουσιών στις οποίες υπάρχει μηδενική ανοχή σε δείγματα μεταθανάτιου και προθανάτιου ολικού αίματος. Η μέθοδος ποσοτικοποίησης αξιολογήθηκε ως προς τα κύρια χαρακτηριστικά ποιότητάς της, σύμφωνα με την οδηγία SWGTOX, και για το σκοπό αυτό ελέγχθηκε η γραμμικότητα, ορθότητα, επαναληψιμότητα, ειδικότητα, εκλεκτικότητα, επιμόλυνση εκ μεταφοράς, τόσο σε προθανάτιο και μεταθανάτιο ολικό αίμα. Η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε σε αναλύσεις διεργαστηριακών δειγμάτων και πραγματικών δειγμάτων ολικού αίματος και έχει ενταχθεί στις μεθόδους ρουτίνας του τοξικολογικού εργαστηρίου. Στο κεφάλαιο 7, μελετήθηκε η επίδραση των ούρων και επιλεγμένων εναλλακτικών βιολογικών δειγμάτων στην καταστολή/ενίσχυση του σήματος στο φασματόμετρο μαζών καθώς και στην % ανάκτηση των αναλυτών. Αξιολογώντας τα αποτελέσματα της καταστολής/ενίσχυσης του σήματος στα εναλλακτικά βιολογικά δείγματα παρατηρήθηκε ότι για τους περισσότερους αναλύτες το είδος του βιολογικού δείγματος δεν επηρέασε σημαντικά την καταστολή/ενίσχυση του σήματος, αντίθετα η % ανάκτηση των περισσότερων αναλυτών επηρεάστηκε σημαντικά από το είδος του υποστρώματος. Στην προτεινόμενη μέθοδο αναπτύχθηκε σχεδόν κοινή κατεργασία για όλα τα εναλλακτικά βιολογικά δείγματα που μελετήθηκαν και αυτό αποτελεί σημαντική απλούστευση στα αναλυτικά πρωτόκολλα ενός τοξικολογικού εργαστηρίου στο οποία υπάρχει πληθώρα δειγμάτων που πρέπει να αναλυθούν, με αποτέλεσμα να μειώνεται ο χρόνος καθώς και το κόστος ανάλυσης.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφική ανασκόπηση, δεν υπάρχει αναφορά που να περιγράφει την ταυτόχρονη μελέτη της επίδρασης του υποστρώματος και της % ανάκτησης των δεκαεννέα αναλυτών σε ούρα και στα επιλεγμένα βιολογικά δείγματα.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: ΨΥΧΟΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ, ΟΛΙΚΟ ΑΙΜΑ, ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ, ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ, ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ, ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ, ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ, ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Title: Application of liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) to the determination of psychoactive substances in whole blood and alternative biological samples

Author: Sevasti Karampela

Abstract

In this dissertation, new LC-MS/MS analytical methods were developed and validated for identification and quantitation of psychoactive substances in antemortem and postmortem whole blood, urine and selected "alternative" biological materials such as bile, spleen, liver, brain, skeletal muscle, and vitreous fluid. The developed and validated methods can be used for systemic toxicological analysis.

In the theoretical part of this thesis, chapter 1 provides the definition of narcotics and a detailed description of Greek and American legislation regarding the control of these substances. The importance of quantifying psychoactive substances is also described. Chapter 2 analyzes the chemical, pharmacological and pharmacokinetic properties of the studied substances. An introduction is also made to the derivatives of phenethylamine and for each of the substances studied, a description is presented of their chemical characteristics, as well as of their pharmacological and pharmacokinetic properties. Chapter 3 describes the "traditional" and "alternative" biological samples used in systemic toxicological analysis, the UHPLC-MS/MS system, and the process of systemic toxicological analysis. Finally, a detailed description is made of the guidelines applied in this dissertation for the acceptance of mass spectra data as well as the validation of the methods. Specifically, reference is made to the guidelines of the Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX), the guidelines of the Organization of Scientific Area Committees of Forensic Science (OSAC), as well as the European Directive 2002/657/EC.

In the experimental part of this thesis, chapter 4 describes the laboratory equipment, reagents, buffer solutions, and reference standards which were used. In chapter 5, a method was developed and validated for the screening and the identification of amphetamine, methamphetamine, phenylpropanolamine, ephedrine, pseudoephedrine, MDA, MDMA, MDEA, phentermine, methylphenidate, bupropion, hydroxy bupropion, alpha-PVP, ethylone, MDPV, mephedrone, methcathinone, methedrone and of methylone in samples of antemortem and postmortem whole blood, using LC-MS/MS and electrospray ionization. The method was evaluated according to the SWGTOX guideline for the main quality characteristics, such as specificity, selectivity, carry-over, matrix effect, LOD and recovery in both antemortem and postmortem whole blood. Comparing the results of antemortem with those of postmortem whole blood, no significant differences were found between them. The method has been applied successfully in Proficiency Testing Scheme and real blood samples. In chapter 6, a method was developed and validated for the quantitative determination of 12 analytes in samples of antemortem and postmortem whole blood, using LC-MS/MS and electrospray ionization. The method was evaluated according to the SWGTOX guideline for the main quality characteristics, such as linearity, accuracy, repeatability, specificity, selectivity, carry-over, both in antemortem and postmortem whole blood. Comparing the results of antemortem with those of postmortem whole blood, no significant differences were found between them. The method has been applied successfully in Proficiency Testing Scheme and real blood samples and it has already been included in the routine testing protocol of the toxicological laboratory. In chapter 7, the effect of urine and selected alternative biological samples in ion suppression/enhancement as well as the % recovery of the 19 analytes using the LC-MS/MS method, were studied. The urine and the selected alternative biological samples (liver, brain, bile, spleen, skeletal muscle, gastric content, and vitreous fluid) were used after first being

tested for the presence or absence of the above substances. For most of the analytes, the nature of biological matrix did not significantly affect the suppression/enhancement of their signal, it was also observed that the matrix was an important factor affecting the results for most of the analytes. The % recovery of many analytes was affected by the nature of the matrix with a representative example of phenylpropanolamine for which the recovery ranged from 39% in bile samples to 99% in vitreous fluid.

Keywords: Psychoactive substances; whole blood; alternative biological samples; chromatography; mass spectrometry; solid phase extraction; pharmaceutical analysis; toxicological analysis.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	VII
Abstract.....	IX
Σκοπός της εργασίας	5
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΝΟΜΟΘΕΣΙΕΣ ΕΞΑΡΤΗΣΙΟΓΟΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ	7
1.1 Ορισμοί ναρκωτικών ουσιών.....	7
1.2 Κατηγορίες ναρκωτικών ουσιών με βάση τη φαρμακολογική τους δράση	7
1.3 Ελληνική νομοθεσία.....	8
1.4 Νομοθεσία στις Η.Π.Α.....	8
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΧΗΜΙΚΕΣ, ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ.....	15
2.1 Κατηγορίες ψυχοδραστικών ουσιών που μελετήθηκαν	15
2.2 Ψυχοδραστικές ουσίες που μελετήθηκαν	15
2.3 Phenylethylamine	17
2.3.1 Νευροδιαβιβαστική δράση	17
2.4 Παράγωγα phenethylamine (PEAs)	18
2.5 Ephedrine και pseudoephedrine	19
2.6 Αμφεταμίνη.....	19
2.7 Αμφεταμινικά παράγωγα	20
2.8 MDA, MDMA και MDEA.....	22
2.9 Phentermine (PHRM)	23
2.10 Methylphenidate.....	24
2.11 Phenylpropranolamine.....	24
2.12 Καθινόνη.....	25
2.13 Παράγωγα της καθινόνης	25
2.14 Methcathinone (Ephedrone)	28
2.15 Methylone ή bk-MDMA	29
2.16 Mephedrone	30
2.17 Methedrone	31
2.18 Ethylone	31
2.19 Methylenedioxypropylone (MDPV)	32
2.20 alpha-Pyrrolidinopentiophenone (alpha-PVP)	33

2.21 Bupropion και hydroxy-bupropion	34
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	36
3.1 Επιλογή δειγμάτων για μεταθανάτια τοξικολογική ανάλυση	36
3.4.1.2. Διαχωριστικές τεχνικές ανάλυσης.....	42
3.4.2 Τεχνικές επιβεβαίωσης (confirmatory techniques)	42
3.5. Επικύρωση Μεθόδων	43
3.5.1. Τυποποιημένες πρακτικές για την επικύρωση μεθόδων στην Ιατροδικαστική Τοξικολογία	43
3.5.2. Κριτήρια ταυτοποίησης αγνώστων ουσιών με φασματομέτρο μαζών	48
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ.....	50
4.1 Εργαστηριακές συσκευές.....	50
4.2 Υάλινα σκεύη και αναλώσιμα	51
4.3 Πρότυπες ουσίες	51
4.5 Αντιδραστήρια.....	52
4.6 Ρυθμιστικά διαλύματα.....	52
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΑΡΩΣΗΣ ΥΗPLC-ESI/MS/MS ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ 19 ΕΞΑΡΤΗΣΙΟΓΟΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΕ ΠΡΟΘΑΝΑΤΙΟ ΚΑΙ ΜΕΤΑΘΑΝΑΤΙΟ ΟΛΙΚΟ ΑΙΜΑ	53
5.1 Εισαγωγή.....	53
5.1.1 Ψυχοδραστικές ουσίες που μελετήθηκαν	56
5.2 Εξοπλισμός- Οργανολογία	60
5.2.1 Σύστημα ΥΗPLC-ESI-MS/MS	60
5.3 Διαλύματα παρακαταθήκης και διαλύματα εργασίας.....	62
5.3.1 Διαλύματα παρακαταθήκης.....	62
5.3.2 Διάλυμα Εργασίας	63
5.3.3 Διάλυμα εργασίας εσωτερικών προτύπων	64
5.3.4 Εμβολιασμένα δείγματα προθανάτιου και μεταθανάτιου ολικού αίματος	64
5.4 Βελτιστοποίηση χρωματογραφικού διαχωρισμού	64

5.5 Εφαρμογή της μεθόδου UHPLC-ESI/MS/MS στον ποιοτικό προσδιορισμό και ταυτοποίηση των αναλυτών σε προθανάτιο και μεταθανάτιο ολικό αίμα	66
5.5.1 Προεργασία ολικού αίματος	66
5.5.2 Αξιολόγηση της μεθόδου.....	69
5.6 Εφαρμογή της μεθόδου σε αναλύσεις πραγματικών δειγμάτων	82
5.7 Συμπεράσματα	87
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ UHPLC-ESI/MS/MS ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ 12 ΕΞΑΡΤΗΣΙΟΓΟΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΕ ΠΡΟΘΑΝΑΤΙΟ ΚΑΙ ΜΕΤΑΘΑΝΑΤΙΟ ΟΛΙΚΟ ΑΙΜΑ	88
6.1 Εισαγωγή- Σκοπός της εργασίας.....	88
6.1.2 Αναλυτικές τεχνικές για τον ποσοτικό προσδιορισμό παραγώγων του phenethylamine ..	89
6.2 Εξοπλισμός- Οργανολογία	91
6.2.1 Σύστημα UHPLC/ESI-MS/MS	91
6.3 Διαλύματα παρακαταθήκης και διαλύματα εργασίας.....	94
6.3.1 Διαλύματα παρακαταθήκης.....	94
6.3.2 Διάλυμα εργασίας	94
6.3.3 Διάλυμα εργασίας εσωτερικών προτύπων	94
6.3.4 Εμβολιασμένα δείγματα ολικού αίματος.....	94
6.4 Κατεργασία δείγματος	95
6.5 Επικύρωση μεθόδου UHPLC-ESI/MS/MS για τον ποσοτικό προσδιορισμό των αναλυτών σε προθανάτιο και μεταθανάτιο ολικό αίμα.....	95
6.5.1 Όριο ποσοτικοποίησης	96
6.5.2 Έλεγχος γραμμικότητας - καμπύλες βαθμονόμησης.....	102
6.5.3 Έλεγχος ορθότητας και πιστότητας.....	116
6.5.4 Δείγματα ελέγχου ποιότητας	123
6.5.5 Άλλοι έλεγχοι	124
6.5.6 Μελέτη σταθερότητας δειγματολήπτη	124

6.5.7 Εφαρμογή της μεθόδου	124
6.6 Συμπεράσματα	128
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ 19 ΨΥΧΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΕ ΟΥΡΑ ΚΑΙ ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ UHPLC-ESI/MS/MS.....	130
7.1 Εισαγωγή.....	130
7.2 Μέθοδοι προεργασίας βιολογικών δειγμάτων	133
7.2.1 Μέθοδοι προεργασίας δειγμάτων ήπατος, εγκεφάλου, σπλήνας και σκελετικού μυ.....	133
7.2.2 Μέθοδοι προεργασίας δειγμάτων ούρων, χολής και ενδοφθάλμιου υγρού	134
7.3 Αξιολόγηση της μεθόδου	135
7.3.1 Έλεγχος καταστολής/ενίσχυσης σήματος σε δείγματα ούρων και εναλλακτικών βιολογικών δειγμάτων.....	135
7.3.2 Έλεγχος % ανάκτησης των αναλυτών σε δείγματα ούρων και εναλλακτικών βιολογικών δειγμάτων	145
7.4 Συμπεράσματα	161
8. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ.....	162
9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	180

Σκοπός της εργασίας

Η συστηματική τοξικολογική ανάλυση (Systematic Toxicological Analysis, SA), στηρίζεται στην ανάλυση «παραδοσιακών» βιολογικών δειγμάτων, όπως το ολικό αίμα (προθανάτιο και μεταθανάτιο) και τα ούρα, καθώς και στη χρήση «εναλλακτικών» βιολογικών δειγμάτων, όπως το ήπαρ, οι νεφροί, ο εγκέφαλος, τα οστά, οι τρίχες, τα νύχια, το ενδοφθάλμιο υγρό, η χολή, το περικαρδιακό υγρό, ο σπλήνας, ο σκελετικός μυς, το στοματικό υγρό, ο ιδρώτας, το μητρικό γάλα, το αμνιακό υγρό και το μηκόνιο, για την ταυτοποίηση ή/και τον ποσοτικό προσδιορισμό ψυχοδραστικών ουσιών. Η συνδυαστική τεχνική της υγροχρωματογραφίας- φασματομετρίας μαζών αποτελεί τα τελευταία χρόνια βασικό εργαλείο για τα διαπιστευμένα τοξικολογικά εργαστήρια που διενεργούν ελέγχους, παρέχοντας πλεονεκτήματα όπως υψηλή ευαισθησία και η εκλεκτικότητα, μειωμένο χρόνο ανάλυσης καθώς και απλούστευση διαδικασία κατεργασίας των βιολογικών δειγμάτων. Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η ανάπτυξη και αξιολόγηση νέων αναλυτικών μεθόδων ταυτοποίησης και ποσοτικού προσδιορισμού «παραδοσιακών» και «νέων» ψυχοδραστικών ουσιών σε προθανάτιο και μεταθανάτιο ολικό αίμα, σε ούρα και σε επιλεγμένα «εναλλακτικά» υλικά με την τεχνική της υγροχρωματογραφίας υπερυψηλής απόδοσης σε συνδυασμό με δίδυμη φασματομετρία μαζών.

Το **πρώτο μέρος** της διατριβής είναι προσανατολισμένο στην ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου σάρωσης UHPLC-ESI/MS/MS, για την ταυτοποίηση 19 ψυχοδραστικών ουσιών σε προθανάτιο και μεταθανάτιο ολικό αίμα. Μελετήθηκαν οι ακόλουθες ψυχοδραστικές ουσίες και μεταβολίτες: amphetamine, methamphetamine, 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA), 3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA), 3,4-methylenedioxy-N-ethylamphetamine (MDEA), mephedrone, methedrone, methylone, ethylone, methcathinone, methylenedioxypropylone (MDPV), Alpha- pyrrolidinovalerophenone (Alpha-PVP), ephedrine, pseudoephedrine, methylphedinate, phentermine, phenylpropanolamine, bupropion, και ο μεταβολίτης του bupropion το hydroxybupropion. Λαμβάνοντας υπόψη τις βιοχημικές αλλοιώσεις στις οποίες υπόκειται ποιοτικά το μεταθανάτιο ολικό αίμα, έγινε προσπάθεια ανάπτυξης ενός διευρυμένου αναλυτικού πρωτοκόλλου για την ταυτοποίηση μεγάλου αριθμού ψυχοδραστικών ουσιών με στόχο την ανάπτυξη κοινής κατεργασίας σε προθανάτιο και μεταθανάτιο ολικό αίμα. Αυτό συμβάλει σημαντικά στη μείωση του χρόνου ανάλυσης και του κόστους των αναλύσεων σε ένα τοξικολογικό εργαστήριο.

Το **δεύτερο μέρος** της διατριβής περιλαμβάνει την ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού 12 ψυχοδραστικών ουσιών σε προθανάτιο και μεταθανάτιο ολικό αίμα, με την τεχνική UHPLC-MS/MS. Ο ποσοτικός προσδιορισμός αυτών των ουσιών σε ολικό αίμα είναι

ιδιαίτερης σημασίας ώστε να κριθεί εάν βρίσκονται σε θεραπευτικά ή τοξικά επίπεδα στον ανθρώπινο οργανισμό, και μπορεί επίσης να συμβάλει στη διερεύνηση περιστατικών οδήγησης υπό την επήρεια φαρμάκων (Driving Under the Influence of Drugs, DUI), λόγω της εφαρμογής της νομοθεσίας ορίων (per se limits) από διάφορες χώρες και σταδιακά από διάφορες πολιτείες των Η.Π.Α. Αναλυτικά οι ψυχοδραστικές ουσίες και οι μεταβολίτες τους που μελετήθηκαν στο 2^ο μέρος της διατριβής είναι οι εξής: amphetamine, methamphetamine, MDA, MDMA, MDEA, methylphenidate, phenylpropanolamine, phentermine, ephedrine, pseudoephedrine, bupropion, και hydroxybupropion.

Το **τρίτο μέρος** της διατριβής περιλαμβάνει την ανάπτυξη και αξιολόγηση μεθόδου εκχύλισης των 19 ψυχοδραστικών ουσιών από ούρα και ορισμένα επιλεγμένα “εναλλακτικά” βιολογικά υλικά όπως η χολή, ο σπλήνας, το ήπαρ, ο εγκέφαλος, ο σκελετικός μυς, και το ενδοφθάλμιο υγρό. Η ανάπτυξη ενός πρωτοκόλλου για αναλύσεις εναλλακτικών βιολογικών δειγμάτων είναι ιδιαίτερα σημαντική για τη συστηματική τοξικολογική ανάλυση ειδικά για τις περιπτώσεις στις οποίες το ολικό αίμα ή και τα ούρα δεν είναι διαθέσιμα, ή είναι δύσκολη η συλλογή τους λόγω της αποσύνθεσης του σώματος, ή είναι διαθέσιμα σε περιορισμένη ποσότητα. Η ανίχνευση ψυχοδραστικών ουσιών σε εναλλακτικά βιολογικά υλικά είναι συχνά κύριος παράγοντας για τον καθορισμό της αιτίας και των συνθηκών θανάτου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΝΟΜΟΘΕΣΙΕΣ ΕΞΑΡΤΗΣΙΟΓΟΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

1.1 Ορισμοί ναρκωτικών ουσιών

Σύμφωνα με την Ελληνική νομοθεσία, με τον όρο «ναρκωτικά», νοούνται ουσίες με διαφορετική χημική δομή και διαφορετική δράση στο κεντρικό νευρικό σύστημα και με κοινά χαρακτηριστικά γνωρίσματα τη μεταβολή της θυμικής κατάστασης του χρήστη και την πρόκληση εξάρτησης διαφορετικής φύσης, ψυχικής ή και σωματικής και ποικίλου βαθμού, καθώς και την ανακούφιση των χρονίως πασχόντων από τα συμπτώματα συγκεκριμένης νόσου, για την οποία αυτές κρίνονται ιατρικά επιβεβλημένες [1,2]. Οι ουσίες που υπάγονται στα ναρκωτικά κατατάσσονται στους πίνακες Α', Β', Γ' και Δ', οι οποίοι αναφέρονται στην παρ. 2 του άρθρου 1 του ν. 3459/2006 [3]. Στις παραπάνω ουσίες δεν περιλαμβάνονται τα ακατέργαστα συγκομιζόμενα προϊόντα που προκύπτουν από την καλλιέργεια ποικιλιών κάνναβης του είδους Cannabis Sativa L χαμηλής περιεκτικότητας σε τετραϋδροκανναβινόλη (THC) μέχρι 0,2%, σύμφωνα με τη νομοθεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας στην καθομιλουμένη και στη νομική διάλεκτο ο όρος «ναρκωτικά» χρησιμοποιείται πολλές φορές ασαφώς με την έννοια των παράνομων ουσιών, ανεξάρτητα από τις φαρμακολογικές τους ιδιότητες [4]

1.2 Κατηγορίες ναρκωτικών ουσιών με βάση τη φαρμακολογική τους δράση

Τα «ναρκωτικά» ταξινομούνται στις παρακάτω κατηγορίες, σύμφωνα με τη φαρμακολογική τους δράση:

I. Ψευδαισθησιογόνα ή παραισθησιογόνα

Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται ουσίες με ψευδαισθησιογόνο δράση, μεταξύ των οποίων α) τα δραστικά συστατικά ορισμένων φυτών, όπως της κάνναβης και διαφόρων μυκήτων και β) ορισμένες ημισυνθετικά ή συνθετικά παρασκευαζόμενες ουσίες, όπως το διαιθυλαμίδιο του λυσεργικού οξέος (LSD), ορισμένα παράγωγα της τρυπταμίνης, της φαινυλαιθυλαμίνης, και η φαινυλκυκλιδίνη (PCP).

II. Διεγερτικά του ΚΝΣ

Στην κατηγορία αυτή υπάγονται πολλές φαρμακευτικές ουσίες, φυτικής ή συνθετικής προέλευσης, μεταξύ των οποίων προέχουσα θέση κατέχουν η κοκαΐνη και οι αμφεταμίνες.

III. Κατασταλτικά του ΚΝΣ

Στην κατηγορία αυτή υπάγονται επίσης πολλές φαρμακευτικές ουσίες, συνθετικής ως επί το πλείστον, προελεύσεως, μεταξύ των οποίων ιδιαίτερας σημασίας είναι τα βαρβιτουρικά και τα άλλα υπνωτικά, τα αγχολυτικά, όπως οι βενζοδιαζεπίνες κλπ.

IV. Εισπνεόμενες ουσίες (οργανικοί διαλύτες και ατμοί)

Περιλαμβάνονται διάφορες χημικές ουσίες που ασκούν κάποια ευφοριστική και εξαρτησιογόνο δράση, όπως π.χ. συμβαίνει με τους υδρογονάνθρακες της αρωματικής ή/και της αλειφατικής σειράς.

V. Κατεχοξήν «ναρκωτικά» - οπιοειδή

Περιλαμβάνονται ουσίες φυσικής ή συνθετικής προελεύσεως. Κύριο προϊόν είναι το όπιο από το οποίο λαμβάνονται φυσικά αλκαλοειδή και μία σειρά ημισυνθετικών και συνθετικών παραγώγων με παρόμοια δράση.

1.3 Ελληνική νομοθεσία

Όπως προαναφέρθηκε, στην Ελλάδα οι ουσίες που υπάγονται στα ναρκωτικά κατατάσσονται στους πίνακες Α', Β', Γ' και Δ':

Πίνακας Α':

Περιλαμβάνει τα άλατα και τα ισομερή ουσιών όπως η ηρωΐνη, η ινδική κάνναβη, το γ-υδροξυβουτυρικό οξύ (GHB), το διαιθυλαμίδιο του λυσεργικού οξέος (LSD), η καθινόνη, η μεθακινόνη, και η μεθυλενοδιοξυμεθαμφεταμίνη.

Πίνακας Β':

Περιλαμβάνει τα άλατα και τα ισομερή ουσιών όπως η μορφίνη, η κοκαΐνη και η μεθαδόνη εκτός αν ορίζεται διαφορετικά σε άλλη διάταξη της νομοθεσίας.

Πίνακας Γ':

Περιλαμβάνει τα άλατα και τα ισομερή ουσιών όπως η αμφεταμίνη, μεθαμφεταμίνη, κωδεΐνη, διυδροκωδεΐνη, διυδρομορφίνη, φύλλα του φυτού ερυθρόξυλου κόκα, μεθακουαλόνη, οξυκωδόνη, υδροκωδόνη, οξυμορφόνη, υδρομορφόνη, φαινυλκυκλιδίνη (PCP), φαιντανύλη, και κεταμίνη, εκτός εάν ορίζεται διαφορετικά σε άλλη διάταξη της νομοθεσίας.

Πίνακας Δ':

Περιλαμβάνει τα άλατα και τα ισομερή ουσιών όπως οι βενζοδιαζεπίνες (π.χ. αλπραζολάμη, βρωμαζεπάμη, διαζεπάμη, κλοναζεπάμη, οξαζεπάμη), τα βαρβιτουρικά (π.χ. πεντοβαρβιτάλη, αμοβαρβιτάλη) και η πυροβαλερόνη (PVP) εκτός εάν ορίζεται διαφορετικά σε άλλη διάταξη της νομοθεσίας.

1.4 Νομοθεσία στις Η.Π.Α.

Στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής (Η.Π.Α.), υπεύθυνη για τον έλεγχο της διακίνησης των εξαρτησιογόνων ουσιών είναι η Υπηρεσία Δίωξης Ναρκωτικών (Drug Enforcement

Administration, DEA), που υπάγεται στο Τμήμα Δικαιοσύνης (U.S. Department of Justice). Σύμφωνα με την τελευταία έκδοση του DEA [5] για τις εξαρτησιογόνες ουσίες, ο νόμος Controlled Substances Act (CSA) κατηγοριοποιεί όλες τις ουσίες οι οποίες ελέγχονται από την ομοσπονδιακή νομοθεσία σε συνολικά πέντε κατηγορίες. Αυτή η κατηγοριοποίηση βασίζεται στη φαρμακευτική χρήση της ουσίας, τη δυνατότητα κατάχρησης, την ασφάλεια και την ικανότητα εξάρτησης.

Ενώ ο όρος «δυνατότητα κατάχρησης» δεν ορίζεται στον CSA, χρησιμοποιούνται οι πιο κάτω δείκτες προκειμένου μία ουσία να χαρακτηριστεί με «δυνατότητα κατάχρησης»:

- 1) Υπάρχει απόδειξη ότι άτομα λαμβάνουν την ουσία σε ποσότητες ικανοποιητικές για να προκαλέσουν κακό στην υγεία τους ή στην ασφάλεια άλλων ατόμων ή στην κοινωνία.
- 2) Όταν υπάρχει σημαντική παρεκτροπή στο κανάλια διακίνησης της ουσίας εκτός των νόμιμων.
- 3) Όταν άτομα λαμβάνουν μία ουσία με δική τους πρωτοβουλία παρά μετά από τη συμβουλή του γιατρού τους.
- 4) Όταν η ουσία είναι νέα και η δράση της σχετίζεται με μία άλλη ουσία η οποία ήδη έχει χαρακτηριστεί με «δυνατότητα κατάχρησης», καθιστώντας έτσι την ουσία δυνητικά ίδια όπως αυτές, υποθέτοντας ότι μπορεί να ακολουθούνται μη νόμιμα κανάλια διακίνησής της, ότι γίνεται σημαντική χρήση χωρίς ιατρική συμβουλή, ή ότι έχει τη δυνατότητα να προκαλέσει ζημιά στην υγεία του χρήστη ή στην ασφάλεια της κοινωνίας.

Επιπλέον, οι παρακάτω παράγοντες περιγράφονται στην παράγραφο 201 (C), [21 U.S.C. § 811 (C)] του CSA και καθορίζουν σε ποια κατηγορία ταξινομούνται οι ουσίες ή κατά πόσο μία ουσία θα αλλάξει κατηγορία ή θα αποχαρακτηριστεί ως ελεγχόμενη:

- 1) Η πραγματική ή σχετική δυνατότητα κατάχρησης της ουσίας.
- 2) Επιστημονική τεκμηρίωση της φαρμακολογικής δράσης της ουσίας, εάν υπάρχει.
- 3) Η τρέχουσα επιστημονική γνώση σχετικά με την ουσία.
- 4) Το ιστορικό και το τρέχον προφίλ κατάχρησης της ουσίας.
- 5) Ο σκοπός, η διάρκεια και η σημασία της κατάχρησης.
- 6) Ποιος είναι, εάν υπάρχει, ο κίνδυνος για τη δημόσια υγεία.
- 7) Η ψυχική ή φυσιολογική δυνατότητα εξάρτησης από την ουσία.
- 8) Εάν η ουσία αποτελεί πρόδρομο ουσία άλλης ήδη ελεγχόμενης ουσίας.

Με βάση τα πιο πάνω κριτήρια στις Η.Π.Α. οι εξαρτησιογόνες ουσίες κατατάσσονται σε μία από τις πιο κάτω κατηγορίες:

Κατηγορία I (Schedule I):

Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει οποιοδήποτε φάρμακο ή άλλη ουσία που:

1. Έχει υψηλή δυνατότητα κατάχρησης.
2. Δεν είναι εγκεκριμένο για θεραπευτική χρήση στις Η.Π.Α.
3. Δεν υπάρχει αποδεκτή ασφάλεια για χρήση του υπό ιατρική παρακολούθηση.

Παραδείγματα ουσιών που ανήκουν στην κατηγορία I είναι η ηρωΐνη, το γ-υδροξυ βουτυρικό οξύ (GHB), το διαιθυλαμίδιο του λυσεργικού οξέος (LSD), η μεθυλενδιοξυμεθαμφεταμίνη, μεθακουαλόνη, και η κάνναβη.

Κατηγορία II (Schedule II):

Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει φάρμακο ή άλλη ουσία που:

1. Έχει υψηλή δυνατότητα κατάχρησης.
2. Το φάρμακο ή η ουσία είναι εγκεκριμένο για ιατρική χρήση στις Η.Π.Α. ή εγκεκριμένο για ιατρική χρήση με σοβαρούς περιορισμούς.
3. Κατάχρηση του φαρμάκου ή της ουσίας μπορεί να οδηγήσει σε ψυχολογική ή φυσική εξάρτηση.

Παραδείγματα ουσιών που ανήκουν στην κατηγορία II είναι η μορφίνη, η υδρομορφόνη, κωδεΐνη, οξυκωδόνη, η φαινυλκυκλιδίνη (PCP), η κοκαΐνη, η μεθαδόνη, η υδροκωδόνη, η φεντανύλη, η αμφεταμίνη, η μεθαμφεταμίνη και η μεθυλφενιδάτη.

Κατηγορία III (Schedule III):

Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει φάρμακο ή άλλη ουσία που:

1. Έχει χαμηλότερη δυνατότητα κατάχρησης σε σχέση με τα φάρμακα ή τις ουσίες των κατηγοριών I και II.
2. Το φάρμακο ή η ουσία είναι εγκεκριμένο για ιατρική χρήση στις Η.Π.Α.
3. Κατάχρηση του φαρμάκου ή της ουσίας μπορεί να οδηγήσει σε φυσική εξάρτηση χαμηλού ή μετρίου βαθμού, ή υψηλή ψυχολογική εξάρτηση.

Παραδείγματα ουσιών που ανήκουν στην κατηγορία III είναι τα αναβολικά στεροειδή, σκευάσματα κωδεΐνης με ακετυλοσαλικυλικό οξύ και ακεταμινοφαΐνη, βουπρενορφίνη, κεταμίνη, και κάποια βαρβιτουρικά.

Κατηγορία IV (Schedule IV):

Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει φάρμακο ή άλλη ουσία που:

1. Έχει χαμηλή δυνατότητα κατάχρησης σε σχέση με τα φάρμακα ή τις ουσίες της κατηγορίας III.

2. Το φάρμακο ή η ουσία είναι εγκεκριμένο για ιατρική χρήση στις Η.Π.Α.
3. Κατάχρηση του φαρμάκου ή της ουσίας μπορεί να οδηγήσει σε περιορισμένη φυσική ή ψυχολογική εξάρτηση συγκρινόμενα με τα φάρμακα ή άλλες ουσίες της κατηγορίας III.

Παραδείγματα ουσιών που ανήκουν στην κατηγορία III είναι η αλπραζολάμη, η κλοναζεπάμη, και η διαζεπάμη.

Κατηγορία V (Schedule V):

Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει φάρμακο ή άλλη ουσία που:

1. Έχει χαμηλή δυνατότητα κατάχρησης σε σχέση με τα φάρμακα ή τις ουσίες της κατηγορίας IV.
2. Το φάρμακο ή η ουσία είναι εγκεκριμένο για ιατρική χρήση στις Η.Π.Α.
3. Κατάχρηση του φαρμάκου ή της ουσίας μπορεί να οδηγήσει σε περιορισμένη φυσική ή ψυχολογική εξάρτηση συγκρινόμενα με τα φάρμακα ή άλλες ουσίες της κατηγορίας IV.

Παραδείγματα ουσιών που ανήκουν στην κατηγορία III είναι τα κωδεϊνούχα σκευάσματα για το βήχα.

1.5 Σημασία ποσοτικού προσδιορισμού των εξαρτησιογόνων ουσιών

Για πολλά χρόνια ο προσδιορισμός των εξαρτησιογόνων ουσιών γινόταν με αναλύσεις δειγμάτων ούρων. Τα δείγματα ανθρώπινων ούρων λαμβάνονται χωρίς καταπόνηση του σώματος (μη επεμβατική τεχνική δειγματοληψίας) και επιπλέον σε αυτό το βιολογικό υλικό οι περισσότερες εξαρτησιογόνες ουσίες και οι μεταβολίτες τους βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις. Ωστόσο αν και η ανίχνευση εξαρτησιογόνων ουσιών στα ούρα, παρέχει πληροφορίες σχετικά με την προηγούμενη χρήση τους από το άτομο, δεν παρέχει πληροφορίες σχετικά με το κατά πόσο το άτομο, βρισκόταν τη στιγμή του περιστατικού υπό την επήρεια αυτών των ουσιών. Αυτή η πληροφορία παρέχεται αποκλειστικά από την ανάλυση δείγματος ορού, ή πλάσματος ή ολικού αίματος. Λαμβάνοντας υπόψη όμως ότι σε άτομο το οποίο έχει καταλήξει, η φυγοκέντρηση του δείγματος για την παραλαβή του ορού ή του πλάσματος δεν είναι εφικτή, είναι αναγκαία η ολοκλήρωση της ανάλυσης σε ολικό αίμα. Η συσχέτιση της συγκέντρωσης μίας ουσίας στο ολικό αίμα σε σχέση με την επήρεια της στο άτομο κατά τη στιγμή ενός συμβάντος, εμφανίζει επιπλέον ιδιαίτερη σημασία σε περιστατικά τροχαίων ατυχημάτων και στο κατά πόσο ο οδηγός βρισκόταν υπό την επήρεια εξαρτησιογόνων ουσιών κατά τη διάρκεια της οδήγησης.

Μία από τις σημαντικότερες μελέτες (DRUID project; Driving Under the Influence of Drugs) συσχέτισης της επήρειας των ψυχοδραστικών ουσιών ως προς τη συγκέντρωσή τους στο αίμα σε περιστατικά τροχαίων ατυχημάτων, πραγματοποιήθηκε με χρηματοδότηση της Ευρωπαϊκής Ένωσης κατά την περίοδο 2006-2011. Σε αυτή η μελέτη συμμετείχαν 13 ευρωπαϊκές χώρες και

ένα από τα σημαντικότερα ευρήματα ήταν η κατάταξη των αμφεταμινών ως η πρώτη ουσία πλην οινόπνεύματος με τη μεγαλύτερη χρήση σε θανατηφόρα τροχαία ατυχήματα [6]. Η ίδια μελέτη έδειξε ότι ο κίνδυνος τροχαίων ατυχημάτων είναι μεγαλύτερος όταν γίνεται χρήση παρανόμως διακινούμενων ουσιών σε σχέση με τη χρήση συνταγογραφούμενων φαρμάκων [7], και ενίσχυσε τα ευρήματα μελέτης που πραγματοποιήθηκε στις Η.Π.Α [8,9]. Οι Σκανδιναβικές χώρες ήταν από τις πρώτες παγκοσμίως που εστίασαν στο πρόβλημα της οδήγησης υπό την επήρεια συνταγογραφούμενων φαρμάκων/ψυχοδραστικών ουσιών και παράνομων ψυχοδραστικών ουσιών. Η Σουηδία το 1999, η Φινλανδία το 2003, η Δανία το 2007 και Νορβηγία το 2012, πρωτοπόρησαν στη θέσπιση νόμων για την οδήγηση υπό την επήρεια ουσιών πλην οινόπνεύματος. Ακολούθησαν χώρες όπως το Ηνωμένο Βασίλειο το 2015, και η Ολλανδία το 2017. Στη Σουηδία για τις παρανόμως διακινούμενες ουσίες, εφαρμόστηκε η πολιτική της μηδενικής ανοχής, που σημαίνει οποιαδήποτε ανιχνεύσιμη ποσότητα επιφέρει ποινή. Δεν υπάρχουν παράλλα αυτά προκαθορισμένα όρια συγκεντρώσεων στο αίμα. Για τα συνταγογραφούμενα φάρμακα δεν υπάρχει ποινή όταν χρησιμοποιούνται σύμφωνα με τις οδηγίες του ιατρού [10]. Οι ίδιοι κανόνες ισχύουν και στη Φινλανδία, με την εξαίρεση των συνταγογραφούμενων φαρμάκων. Σε αυτές τις περιπτώσεις, ο οδηγός εξετάζεται από ιατρό για να εξακριβωθεί η επήρεια με κλινικό τρόπο [11]. Στη Δανία έχουν θεσμοθετηθεί όρια συγκεντρώσεων στο αίμα για μια σειρά από συνταγογραφούμενα φάρμακα και παρανόμως διακινούμενες ουσίες [12]. Στη Νορβηγία θεσμοθετήθηκαν όρια συγκεντρώσεων που συσχετίζονται με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις οινόπνεύματος στο αίμα και προκαλούν επήρεια. Για την ουσία amphetamine το όριο θεσπίστηκε στα 41 ng/mL, η συγκέντρωση αυτή αντιστοιχεί στην επήρεια που προκαλεί συγκέντρωση 0,20% οινόπνεύματος στο αίμα σύμφωνα με τη Νορβηγική νομοθεσία. Για την ουσία methamphetamine το αντίστοιχο όριο ήταν 45 ng/mL. Σύμφωνα με τη Νορβηγική νομοθεσία το όριο συγκέντρωσης σε ολικό αίμα για την ουσία methylphenidate είναι 3,5 ng/mL και αντιστοιχεί στην επήρεια που προκαλεί συγκέντρωση 0,50% οινόπνεύματος στο αίμα [13]. Στο Ηνωμένο Βασίλειο, το όριο συγκεντρώσεων των ουσιών methamphetamine και methylenedioxyamphetamine (MDA) θεσμοθετήθηκε στα 10 ng/mL και για την ουσία amphetamine, η οποία είναι συνταγογραφούμενη, στα 250 ng/mL [14]. Στην Ολλανδία το όριο συγκεντρώσεων των ουσιών amphetamine και methamphetamine σε ολικό αίμα ορίστηκε στα 50 ng/mL, με την υποσημείωση ότι το άθροισμα των συγκεντρώσεων των ουσιών amphetamine, methamphetamine, methylenedioxyamphetamine (MDMA), methylenedioxy-ethamphetamine (MDEA) και methylenedioxyamphetamine (MDA), πρέπει να είναι μικρότερο από 50 ng/mL [15]. Στην Ελλάδα, η χρήση παράνομων ή μη, ναρκωτικών και ψυχοτρόπων φαρμάκων κατά την οδήγηση, ιδιαίτερα όταν συνδυάζεται με αλκοόλ αλλά και

ξεχωριστά, απαγορεύεται κατά το άρθρο 42 του Κώδικα Οδικής Κυκλοφορίας (ΚΟΚ) [16] λόγω της επίδρασής τους στον ανθρώπινο οργανισμό και στην οδηγική ικανότητα του χρήστη. Ειδικότερη διάταξη ρυθμίζεται με το άρθρο 25 Ν.4139/2013, περί εξαρτησιογόνων ουσιών και την οδήγηση μεταφορικών μέσων, για αυτόν που κυβερνά ή οδηγεί το οποιοδήποτε πλωτό, χερσαίο ή εναέριο μεταφορικό μέσο. Σύμφωνα με τη Ελληνική νομοθεσία, εφαρμόζεται η πολιτική της μηδενικής ανοχής. Στον Πίνακα 1.1 παρουσιάζονται οι νομοθεσίες σε επιλεγμένες ευρωπαϊκές χώρες σχετικά με την οδήγηση υπό την επήρεια παρανόμως διακινούμενων ουσιών και συνταγογραφούμενων φαρμάκων. Στις Η.Π.Α. η πολιτεία της Αριζόνα, ήταν η πρώτη που το 1990 θέσπισε όρια στη συγκέντρωση ουσιών στο αίμα θεσπίζοντας την πολιτική της μηδενικής ανοχής. Στις επόμενες δύο δεκαετίες, 12 επιπλέον πολιτείες θέσπισαν την ίδια πολιτική, ενώ τέσσερις πολιτείες θέσπισαν συγκεκριμένα όρια ουσιών στο αίμα, πάνω από τα οποία επιβάλλονται ποινές. Στην πολιτεία του Ντέλαγουερ, από το 2007, εφαρμόζεται η πολιτική της μηδενικής ανοχής.

Πίνακας 1.1: Νομοθετικές ρυθμίσεις ευρωπαϊκών χωρών σχετικά με την οδήγηση υπό την επήρεια παρανόμως διακινούμενων ουσιών και συνταγογραφούμενων φαρμάκων.

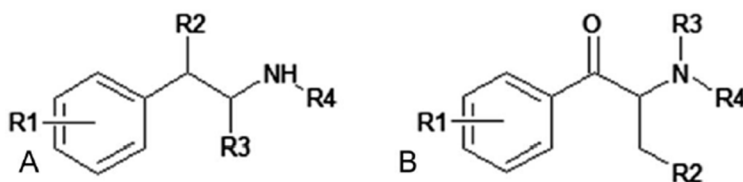
Χώρα	Νομοθεσία	Έτος
Ελλάδα	Παρανόμως διακινούμενες ουσίες: Μηδενική ανοχή	1999
	Συνταγογραφούμενα φάρμακα: Όταν σύμφωνα με τις οδηγίες τους ενδέχεται να επηρεάζουν την ικανότητα οδήγησης.	
Σουηδία	Παρανόμως διακινούμενες ουσίες: Μηδενική ανοχή	1999
	Συνταγογραφούμενα φάρμακα: Δεν υπάρχει ποινή όταν χρησιμοποιούνται σύμφωνα με τις οδηγίες του ιατρού	
Φιλανδία	Παρανόμως διακινούμενες ουσίες: Μηδενική ανοχή	2003
	Συνταγογραφούμενα φάρμακα: Ο οδηγός εξετάζεται από ιατρό για να εξακριβωθεί η επήρεια με κλινικό τρόπο	
Δανία	Παρανόμως διακινούμενες ουσίες και συνταγογραφούμενα φάρμακα: Υπάρχουν όρια συγκεντρώσεων στο αίμα	2007
Νορβηγία	Θεσπίστηκαν όρια συγκεντρώσεων τα οποία αντιστοιχούν σε συγκέντρωση οινόπνεύματος: Για το amphetamine το όριο συγκέντρωσης θεσπίστηκε στα 41 ng/mL που αντιστοιχεί στην επήρεια που προκαλεί συγκέντρωση 0.20% οινόπνεύματος στο αίμα. Για το methamphetamine το αντίστοιχο όριο συγκέντρωσης είναι 45 ng/mL. Για το methylphenydate, το όριο συγκέντρωσης είναι 3,5 ng/mL που αντιστοιχεί στην επήρεια που προκαλεί συγκέντρωση 0,5 % οινόπνεύματος.	2012
Ηνωμένο Βασίλειο	Παρανόμως διακινούμενες ουσίες: το όριο για τη μεθαμφεταμίνη και το MDA ορίστηκε στα 10 ng/mL	2015
	Για τα συνταγογραφούμενα φάρμακα: το όριο για την ουσία amphetamine ορίστηκε στα 250 ng/mL.	
Ολλανδία	Το όριο συγκέντρωσης σε ολικό αίμα για τις ουσίες amphetamine και methamphetamine ορίστηκε στα 50 ng/mL, με την υποσημείωση ότι το άθροισμα των συγκεντρώσεων των ουσιών amphetamine, methamphetamine, MDMA, MEA και MDA πρέπει να είναι μικρότερο από 50 ng/mL.	2017

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΧΗΜΙΚΕΣ, ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ

2.1 Κατηγορίες ψυχοδραστικών ουσιών που μελετήθηκαν

Τα παράγωγα του phenethylamine (PEAs) μαζί με τα παράγωγα του tryptamine, piperazine και cathinone, είναι από τις μεγαλύτερες κατηγορίες ψυχοδραστικών ουσιών και αποτελούν τη βάση για τη σύνθεση νέων ψυχοδραστικών ουσιών [17]. Τα PEAs είναι ενώσεις δομικά ανάλογες του phenethylamine (PEA) ή του amphetamine. Τα cathinones είναι β -ketophenethylamines δομικά ανάλογα του cathinone, ή άλλων φυσικών αλκαλοειδών.

Σε αυτή τη διατριβή μελετήθηκαν «παραδοσιακές» αλλά και νέες ψυχοδραστικές ουσίες που αποτελούν παράγωγα του PEA και του cathinone (Σχήμα 2.1).



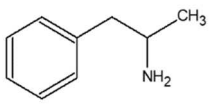
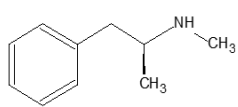
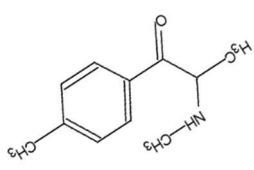
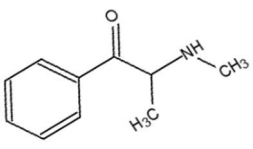
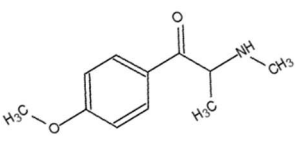
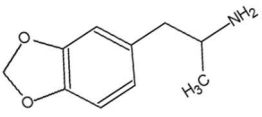
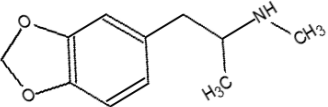
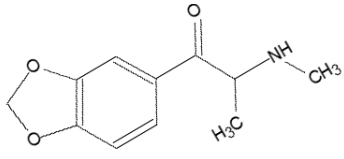
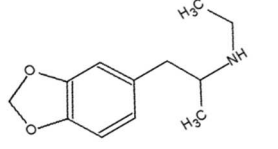
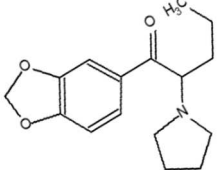
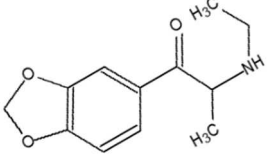
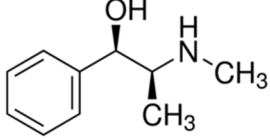
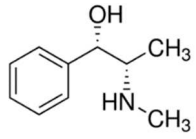
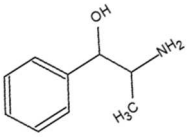
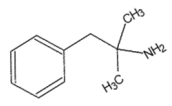
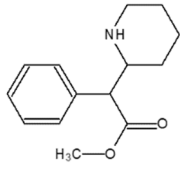
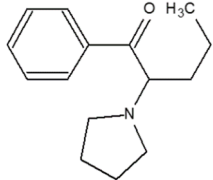
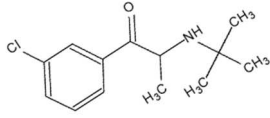
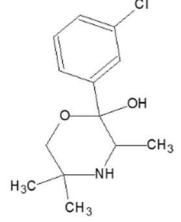
Σχήμα 2.1: Γενικές χημικές δομές των ουσιών A) phenethylamine και B) cathinone

Οι νέες ψυχοδραστικές ουσίες είναι γνωστές στη διεθνή βιβλιογραφία ως εναλλακτικά «νόμιμα» ναρκωτικά (legal highs) ή ως «άλατα μπάνιου» (bath salts) [18] και διακινούνται «νόμιμα» μέσω του διαδικτύου.

2.2 Ψυχοδραστικές ουσίες που μελετήθηκαν

Στον πίνακα 2.1 παρουσιάζονται οι χημικές δομές των ενώσεων που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή.

Πίνακας 2.1 Χημικές δομές των αναλυτών

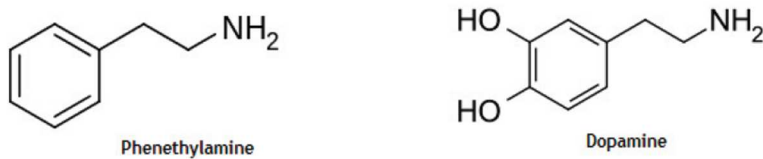
<p>Amphetamine</p> 	<p>Methamphetamine</p> 	<p>Mephedrone</p> 	
<p>Ephedrone (Methcathinone)</p> 	<p>Methoxyphedrine (Methedrone)</p> 	<p>3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA)</p> 	
<p>3,4-methylene-dioxy-methamphetamine (MDMA)</p> 	<p>Methylone</p> 	<p>3,4-methylenedioxy-N-ethylamphetamine (MDEA)</p> 	
<p>Methylenedioxypropylone (MDPV)</p> 	<p>Ethylone</p> 	<p>Ephedrine</p> 	
<p>Pseudoephedrine</p> 	<p>Phenylpropanolamine (Norephedrine)</p> 	<p>Phentermine</p> 	
<p>Methylphenidate</p> 	<p>Alpha-pyrrolidinovalerophenone (Alpha-PVP)</p> 	<p>Bupropion</p> 	<p>Hydroxy bupropion</p> 

2.3 Phenylethylamine

Σύμφωνα με την IUPAC η ορθότερη ονομασία του phenylethylamine είναι 2-phenylethylamine με μοριακό τύπο $C_8H_{11}N$ [19], αν και είναι επίσης γνωστή με διάφορα άλλα ονόματα όπως β -phenylethylamine και β -phenethylamine. Έχει μοριακό βάρος 121.17964 g/mol, μεγάλη διαλυτότητα στο νερό, χαμηλή διαλυτότητα στο λίπος [20,21], και μικρό χρόνο ημίσειας ζωής.

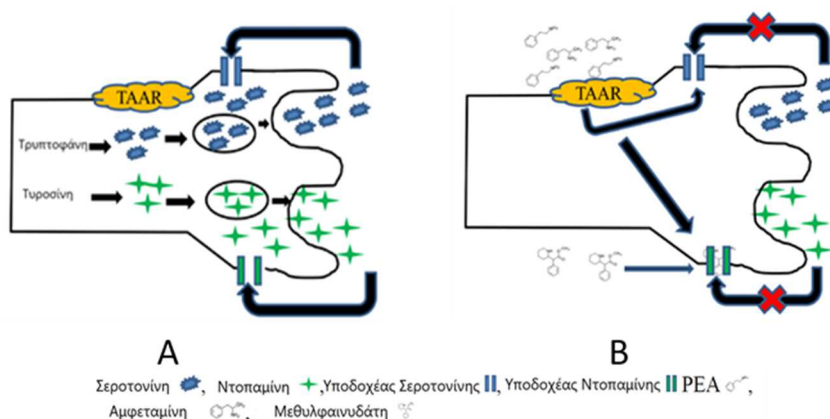
2.3.1 Νευροδιαβιβαστική δράση

Η ουσία phenylethylamine συνδέεται άμεσα με τη ντοπαμίνη, η δομική αναλογία των οποίων φαίνεται στο σχήμα 2.2. Είναι μέλος ομάδας αμινών οι οποίες βρίσκονται σε πολύ χαμηλότερες ενδο- και έξω- κυτταρικές συγκεντρώσεις σε σχέση με άλλες χημικά και λειτουργικά ανάλογες βιογενείς αμίνες και νευροδιαβιβαστές όπως η αδρεναλίνη, η νορ-αδρεναλίνη, η σεροτονίνη, η ντοπαμίνη, και η ισταμίνη[22].



Σχήμα 2.2: Χημικές δομές των ουσιών phenylethylamine και dopamine

Το σχήμα 2.3 παρουσιάζει τη φυσιολογική οδό της φαινεθυλαμίνης για την αύξηση της συγκέντρωσης των βιογενών αμινών και των νευροδιαβιβαστών ντοπαμίνη και σεροτονίνη. Περιλαμβάνονται επίσης η δράση της αμφεταμίνης και της μεθυλφαινουδάτης.



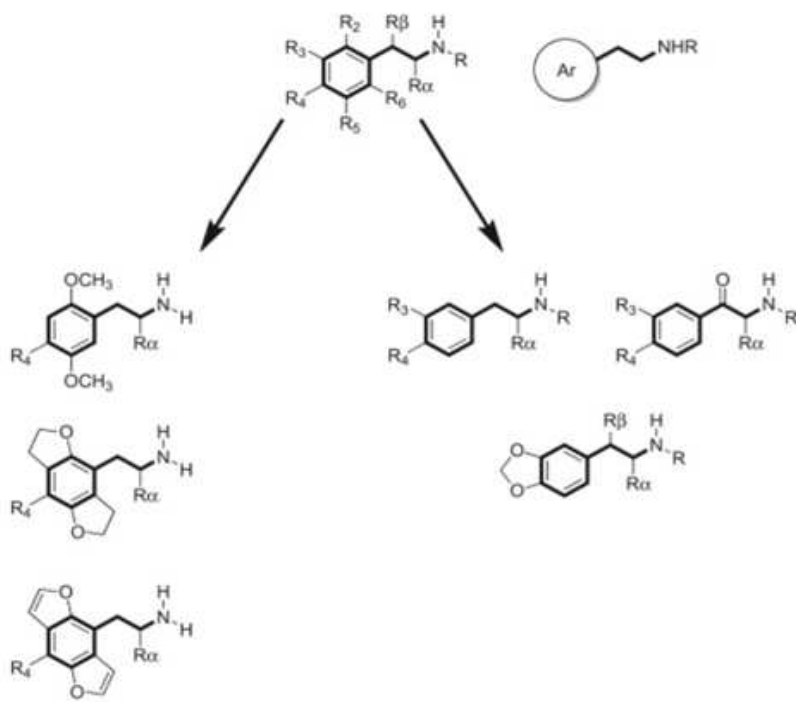
Σχήμα 2.3: Σχηματική αναπαράσταση της αναστολής των μεταφορέων ντοπαμίνης και σεροτονίνης από τη φαινεθυλαμίνη, την αμφεταμίνη και τη μεθυλφαινουδάτη. Α) Φυσιολογική δράση της αποδέσμευσης και επαναπρόσληψης των βιογενών αμινών ντοπαμίνη και σεροτονίνη. Β) Μεταβολή των υποδοχέων επαναπρόσληψης μονοαμινών από τη φαινεθυλαμίνη και την αμφεταμίνη μέσω των υποδοχέων TAAR, και αναστολή των μεταφορέων ντοπαμίνης από τη φαινεθυλαμίνη ΠΗΓΗ: Iffeld et al (Webmedcentral 4 (2013) 4409 [20].

Ο μηχανισμός δράσης των παραγώγων της φαινυλαιθυλαμίνης και της καθινόνης, περιλαμβάνει σύνδεση τους με τον υποδοχέα TAAR (Trace Amine Associated Receptor) [23]. Χωρίς να έχει πλήρως διασαφηνιστεί[24], πιστεύεται ότι αυτή η σύνδεση οδηγεί σε μεταβολή των λειτουργιών του μεταφορέα των μονοαμινών, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της επαναπρόσληψης ντοπαμίνης, σεροτονίνης και νοραδρεναλίνης [25], και σε αύξηση της συγκέντρωσης αυτών των νευροδιαβιβαστών στις συνάψεις. Παρόμοια αύξηση της συγκέντρωσης της ντοπαμίνης επιτυγχάνεται μέσω της άμεσης αναστολής του μεταφορέα ντοπαμίνης[26].

2.4 Παράγωγα phenethylamine (PEAs)

Τα PEAs αποτελούν μία μεγάλη κατηγορία φυσικών (ephedrine, pseudoephedrine, mescaline) και συνθετικών ουσιών (amphetamine, methamphetamine, methylenedioxyamphetamine (MDA), methylenedioxymethamphetamine (MDMA), methylenedioxyethamphetamine (MDEA), phenylpropanolamine (PPA), phentermine (PHRM), methylphenidate. Τα amphetamine, methamphetamine, mescaline, MDMA και MDEA ελέγχονται βάσει της Σύμβασης των Ηνωμένων Εθνών του 1971 για τις ψυχοτρόπες ουσίες. Τα MDMA, MDEA και mescaline ανήκουν στην κατηγορία I και τα amphetamine, metamphetamine στην κατηγορία II. [27]. Τα PEAs κατηγοριοποιούνται ως διεγερτικά τύπου αμφεταμίνης (Amphetamine Type Stimulants), και ψυχεδελικά. Η τελευταία κατηγορία περιλαμβάνει ουσίες υποκατεστημένες στο δακτύλιο, όπως η σειρά «2C-X», υποκατεστημένες αμφεταμίνες όπως η «σειρά D» (π.χ. DOM, DOB, DOI, DOC), βενζοδιφουράνια (π.χ. Bromo-Dragonfly, 2C-B-Fly) και άλλες ουσίες όπως π.χ. p-methoxyamphetamine p-methoxymethamphetamine [28]. Η σειρά «2C» διαφέρει από τη σειρά «D» μόνο μέσω μίας ελαφράς τροποποίησης της χημικής δομής. Η ψυχοτρόπος δράση του εξαρτάται από τη δόση, και κυμαίνεται από απλή διεγερτική δράση σε χαμηλότερες δόσεις έως παραισθησιογόνο δράση σε υψηλότερες δόσεις. Τα περισσότερα από τα παράγωγα των σειρών «2C» και «D», ελέγχονται βάσει της Σύμβασης των Ηνωμένων Εθνών του 1971 [29].

Τα συνθετικά παράγωγα είναι πολύ εύκολο να συντεθούν με απλή τροποποίηση του αρωματικού δακτυλίου του μορίου του phenethylamine. Επιπλέον, ανάλογα με τους υποκαταστάτες στον αρωματικό δακτύλιο, η ψυχοτρόπος δράση τους ποικίλει (Σχήμα 2.4).



Σχήμα 2.4: Γενικό παράδειγμα που αναπαριστά τον τρόπο με τον οποίο το μόριο του phenethylamine, μπορεί να τροποποιηθεί εύκολα προκειμένου να συντεθούν ψευδιασθησιογόνα (αριστερό μέρος του σχήματος), ή μόρια που έχουν δράση στους μεταφορείς μονοαμινών (δεξιό μέρος του σχήματος) ΠΗΓΗ: Nichols et al Emerging Designer Drugs David E. Nichols, William E. Fantegrossi, in The Effects of Drug Abuse on the Human Nervous System, 204, Chapter 2.1.1 Phenethylamines^[30].

2.5 Ephedrine και pseudoephedrine

Οι χημικές δομές των ουσιών ephedrine και pseudoephedrine παρουσιάζονται στον πίνακα 2.1. Οι ενώσεις αυτές ανήκουν στην κατηγορία των συμπαθομιμητικών αμινών, έχουν περιφερική δράση και διεγείρουν τους α-αδρενεργικούς υποδοχείς στους λείους μυς, προκαλώντας αγγειοσύσπαση, αλλαγές στην πίεση του αίματος, και ρινική αποσυμφόρηση, ενώ φέρουν κάποιες β-αδρενεργικές δράσεις. Απορροφώνται ικανοποιητικά όταν χορηγούνται από το στόμα, ενώ απεκκρίνονται σχετικά γρήγορα λόγω του χαμηλού όγκου κατανομής τους (4 L/Kg). Όλες αυτές οι ουσίες απεκκρίνονται κυρίως ως μητρικές ουσίες στα ούρα. Το ephedrine και το pseudoephedrine μεταβολίζονται σε μικρό βαθμό (<10% της χορηγούμενης δόσης) στο ήπαρ μέσω N-απομεθυλίωσης σε phenylpropranolamine.

2.6 Αμφεταμίνη

Αντιπροσωπευτική ουσία της κατηγορίας των παραγώγων του phenethylamine (PEAs) είναι η ουσία amphetamine, η οποία εμφανίζει διαφορετικού βαθμού συμπαθομιμητική δράση, έχοντας

διεγερτική δράση στο ΚΝΣ σε μεγαλύτερο βαθμό από το ephedrine. Το amphetamine συναντάται σε δύο οπτικά ενεργές μορφές που παρουσιάζονται στο σχήμα 2.5.

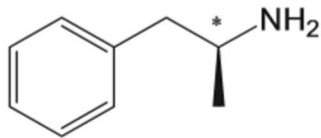


Σχήμα 2.5: Χημικές δομές του δεξιόστροφου- (ή d-) και αριστερόστροφου (ή l) ισομερούς του amphetamine.

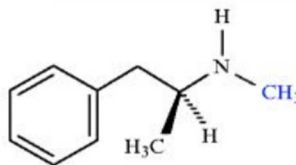
Η αμφεταμίνη ανακαλύφθηκε το 1910, εντούτοις μόλις το 1927 συντέθηκε για πρώτη φορά το ρακεμικό της μίγμα και προτάθηκε ως ένα λιγότερο δαπανηρό και πιο εύκολα συνθετικό υποκατάστατο της εφεδρίνης [31,32]. Το 1935 ξεκίνησε η εμπορία του φαρμακευτικού σκευάσματος “Benedrine” ως θεραπεία για τη ναρκοληψία (για την οποία εξακολουθεί να χρησιμοποιείται μέχρι σήμερα), για την ήπια κατάθλιψη και άλλες διαταραχές [33]. Το 1937 κυκλοφόρησε το φαρμακευτικό σκεύασμα “Dexedrine” που περιείχε ως δραστική ουσία το d-amphetamine και που ήταν δραστικότερο από το προηγούμενο. Σε βιβλιογραφικές αναφορές τονίζεται η ικανότητα του φαρμακευτικού σκευάσματος “Benedrine” στη βελτίωση της απόδοσης σε τεστ νοημοσύνης, κάτι που οδήγησε στην ευρεία χρήση του για τη βελτίωση της συγκέντρωσης και της πνευματικής απόδοσης, για τη μείωση του άγχους, καθώς και ως θεραπεία επιλογής για τη θεραπεία του συνδρόμου υπερκινητικότητας και διάσπασης της προσοχής [34]. Η μεγάλη δημοσιότητα που απέκτησε το σκεύασμα αυτό στα πρώτα χρόνια της κυκλοφορίας του, υπερκάλυψε αναφορές την ίδια περίοδο για τη δυνατότητα του παράλληλα να προκαλέσει εξάρτηση [34]. Το 1970 στις Η.Π.Α. κατατάσσεται στην κατηγορία II των εξαρτησιογόνων ουσιών.

2.7 Αμφεταμινικά παράγωγα

Μία σειρά από μεθοξυλιωμένα αμφεταμινικά παράγωγα έχουν συντεθεί από το mescaline το οποίο απομονώθηκε από το φυτό *peyote cactus* και παραδοσιακά χρησιμοποιείτο μασώμενο από Ινδιάνους στο Μεξικό σε διάφορα θρησκευτικά μυστήρια [35]. Το mescaline αποτελεί την πρωτότυπη ουσία των PEAs. Σε αντίθεση με το d-amphetamine, η σύνθεση του d-methamphetamine (Σχήμα 2.6) είναι ευκολότερη και απαιτεί χαμηλότερο κόστος.



A

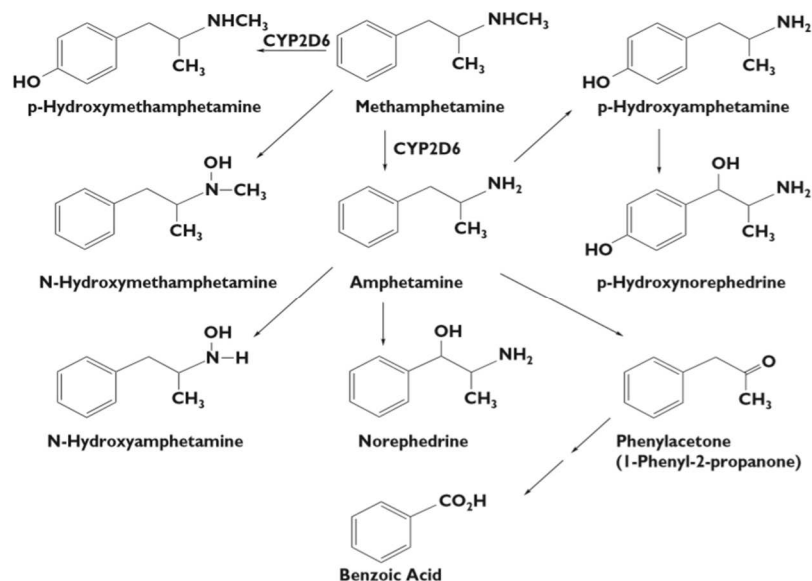


B

Σχήμα 2.6: Χημική δομή του A) d-amphetamine και B) d-methamphetamine

Σύμφωνα με το DEA, περισσότερα από το 50% των παρανόμων εργαστηρίων συνθέτουν d-methamphetamine αντί του d-amphetamine. Το d-methamphetamine επίσης εμφανίζει μεγαλύτερη διέγερση του ΚΝΣ σε σχέση με το d-amphetamine, πιθανόν λόγω της μεγαλύτερης ικανότητας να διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Είναι λευκή κρυσταλλική σκόνη διαλυτή στο νερό που είναι γνωστή στην παράνομη αγορά ναρκωτικών ως “speed”, “crank”, “go”, “crystal”, ή απλά “meth”. Απορροφάται σε μεγάλο βαθμό από το γαστρεντερικό σωλήνα με βιοδιαθεσιμότητα 67% και όγκο κατανομής 3-7 L/Kg. Η μέγιστη συγκέντρωση του methamphetamine μετά από απλή χορήγηση παρατηρείται περίπου στις 3,6 ώρες με μέσο χρόνο ημίσειας ζωής 10 ώρες. Απεκρίνεται στα ούρα σε μεγάλο ποσοστό (μέχρι 45%) ως μητρική ουσία σε 24 ώρες. Περίπου 7% της χορηγούμενης δόσης υπόκειται σε N-απομεθυλίωση προς αμφεταμίνη. Οι αμφεταμίνες μεταβολίζονται επίσης στο ήπαρ μέσω αρωματικής υδροξυλίωσης. Τα υδροξυλιωμένα παράγωγα των αμφεταμινών έχουν συνδεθεί με την ανάπτυξη ψύχωσης μετά από χρήση αμφεταμινών. Αναλυτικό διάγραμμα μεταβολισμού του methamphetamine παρουσιάζεται στο σχήμα 2.7.

Σταδιακά, με τροποποίηση του μορίου του amphetamine και του methamphetamine, μία σειρά από άλλα αμφεταμινικά παράγωγα έχουν συντεθεί, όπως τα methylenedioxyamphetamine (MDA), methylenedioxymethamphetamine (MDMA), methylenedioxyethamphetamine (MDEA), phenylpropanolamine (PPA), phentermine (PHRM), και methylphenidate. Τα παράγωγα αυτά διεγείρουν το ΚΝΣ μέσω της αποδέσμευσης ντοπαμίνης από αποθηκευτικούς χώρους στις τελικές νευρικές απολήξεις, με τρεις βασικούς μηχανισμούς. Αποτελούν υπόστρωμα για τον μεταφορέα ντοπαμίνης, ο οποίος τελικά αναστέλλει ανταγωνιστικά την επαναπρόσληψη της ντοπαμίνης προσυναπτικά. Επιπλέον διευκολύνουν την απέκκριση της ντοπαμίνης από τα αποθηκευτικά της κυστίδια στο κυτταρόπλασμα, και προάγουν την αντίστροφη μεταφορά ντοπαμίνης στις συναπτικές απολήξεις μέσω του μεταφορέα ντοπαμίνης, μέσω μηχανισμού ανεξάρτητου από τη φυσιολογική κυτταρική απελευθέρωση της ντοπαμίνης [36,37].



Σχήμα 2.7: Μεταβολικές οδοί του methamphetamine ΠΗΓΗ: Li et al (Br. J. Clin. Pharmacol. 69(2010)187-192^[38])

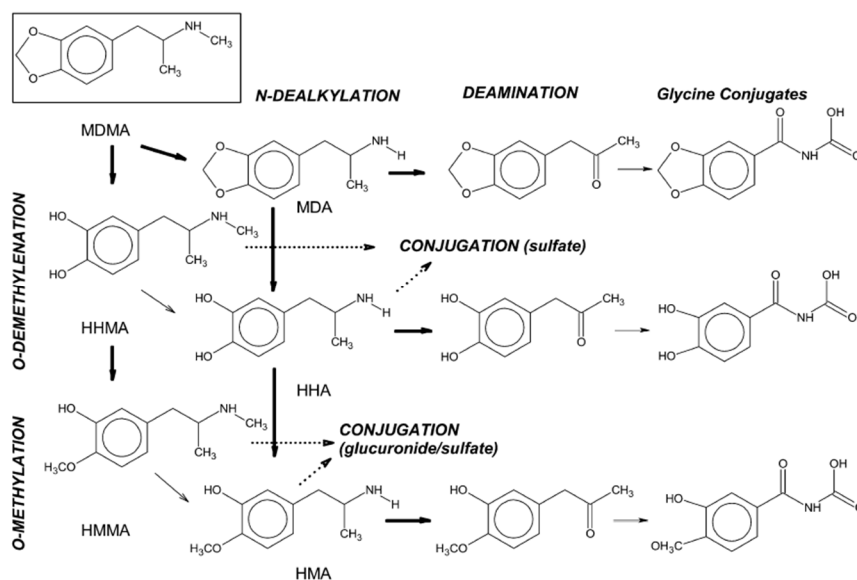
Τα αμφεταμινικά παράγωγα αποτελούν επίσης υποστρώματα για τους νευροδιαβιβαστές 5-hydroxy tyramine (5-HT, serotonin) και norepinephrine, που με παρόμοιους μηχανισμούς επάγουν την αύξηση της συγκέντρωσης τους στις νευρικές συνάψεις.

2.8 MDA, MDMA και MDEA

Η ομάδα των 3,4-μεθυλενοδιοξυφαινυλαιθυλαμινών περιλαμβάνει το methylenedioxyamphetamine (MDMA), και δομικά ανάλογα του όπως το methylenedioxyamphetamine (MDA) και το methylenedioxyethamphetamine (MDEA), τα οποία έχουν εισέλθει στην παράνομη αγορά ναρκωτικών εδώ και δύο δεκαετίες ^[39].

Το MDA και το MDMA είναι από τα παλιότερα συνθετικά ναρκωτικά, τα οποία είχαν συντεθεί νόμιμα στις αρχές του 1900, και χρησιμοποιήθηκαν για θεραπευτικούς σκοπούς. Το MDMA, γνωστό επίσης με τις ονομασίες “Ecstasy”, “Adam”, “XTC”, συντέθηκε από τη Merck το 1914 ως κατασταλτικό της όρεξης αλλά δεν πήρε ποτέ έγκριση για τη χρήση αυτή. Επίσης τις δεκαετίες του '70 και του '80 το MDMA έγινε γνωστό για τη χρήση του ως βοηθητικό στη ψυχοθεραπεία, αλλά δεν εγκρίθηκε ποτέ αυτή η χρήση του. Την 1^η Ιουλίου 1985, το DEA, κατέταξε το MDMA στην κατηγορία I της λίστας ελεγχόμενων ουσιών ^[40]. Το MDA έχει χημική ομοιότητα με το mescaline και συντέθηκε για πρώτη φορά το 1920. Παρόλο που δεν εγκρίθηκε ποτέ για θεραπευτική χρήση, κατά τις δεκαετίες '60 και '70 έγινε κατάχρηση του, λόγω των ψευδαισθησιογόνων και ψυχοδραστικών του δράσεων.

Οι ενώσεις αυτές εμφανίζουν συμπαθομιμητική δράση όμοια με αυτή της αμφεταμίνης και προκαλούν περιφερική αγγειοσυστολή, ταχυκαρδία, μυδρίαση κλπ. Επιπλέον προκαλούν αλλοίωση της αντίληψης, ένταση των συναισθημάτων, επιθυμία επικοινωνίας, και ευφορία. Η δράση του d-MDA προσομοιάζει με αυτή του amphetamine, ενώ το l-MDA έχει ψευδαισθησιογόνο δράση. Και τα δύο ισομερή του MDMA έχουν ήπια ψευδαισθησιογόνο δράση και προκαλούν εκλεκτική νευροτοξικότητα στους υποδοχείς της σεροτονίνης, εντούτοις η νευροτοξική δράση του d-ισομερούς είναι εντονότερη σε σχέση με το l-ισομερές του [41]. Στο σχήμα 2.8 παρουσιάζεται οι μεταβολικές οδοί του MDMA [41] ενώ αντίστοιχες είναι και οι μεταβολικές οδοί του MDEA [42].



Σχήμα 2.8: Μεταβολικές οδοί του MDMA. ΠΗΓΗ: de la Torre et al (Ther Drug Monit. 26(2004)137-144[43] Αυτές οι ουσίες αρχικά μέσω απομεθυλίωσης μεταβολίζονται στα αντίστοιχα διυδροξυ παράγωγα ακολουθούμενα από ο-μεθυλίωση σε οποιοδήποτε από τις δύο υδροξυ ομάδες, και β) N-απαλκίωση καθώς και οξειδωτική απαμίνωση [44]. Οι υδροξυ μεταβολίτες των ενώσεων αυτής της ομάδας απεκκρίνονται στα ούρα ως παράγωγα του γλυκουρονικού οξέος [45].

2.9 Phentermine (PHRM)

Το phentermine αποτελεί παράγωγο του phenethylamine, με σημαντικά μικρότερη συμπαθομιμητική και διεγερτική δράση ως προς το amphetamine. Η δράση του οφείλεται στην αύξηση της συγκέντρωσης του norepinephrine και του dopamine στο ΚΝΣ, σε μικρότερο βαθμό από τα amphetamines, ενώ δεν παρουσιάζει κάποια δράση στο 5-hydroxytyramine (serotonin). Αποροφάται ικανοποιητικά από το λεπτό έντερο, εμφανίζοντας τη μέγιστη συγκέντρωση στο πλάσμα 8 ώρες μετά από του στόματος χορήγηση. Ο χρόνος ημίσειας ζωής του είναι 20-24 ώρες [41].

2.10 Methylphenidate

Το methylphenidate είναι παράγωγο του phenethylamine και του benzylpiperazine. Συντέθηκε το 1944, κατοχυρώθηκε με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας το 1954, και κυκλοφόρησε για πρώτη φορά από την εταιρία Ciba-Geigy με την εμπορική ονομασία Ritalin. Προκαλεί διεγερτική δράση στο ΚΝΣ και αποτελεί το φάρμακο επιλογής στη θεραπεία του Συνδρόμου Υπερκινητικότητας και Διάσπασης Προσοχής (ΣΥΔΠ) στα παιδιά [46]. Έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία της κατάθλιψης, της ναρκοληψίας, βοηθητική θεραπεία για συμπτώματα ασθενών με καρκίνο και ασθενών με λοίμωξη από τον ιό HIV [47] και ανήκει στην κατηγορία II της λίστας ελεγχόμενων ουσιών του DEA [48].

Ο μηχανισμός δράσης του methylphenidate είναι διαφορετικός από αυτόν των αμφεταμινών. Η χορήγησή του προκαλεί δράση και κλινική εικόνα ανάλογη με αυτή της χρήσης κοκαΐνης [47]. Το συνολικό αποτέλεσμα της δράσης του είναι η αύξηση της συγκέντρωσης της ντοπαμίνης στις νευρικές συνάψεις η οποία προκαλεί υποκειμενικά αποτελέσματα στιγμιαίας «υψηλής» και έντονης ευφορίας. Κατά τη χορήγηση από το στόμα απορροφάται γρήγορα και πλήρως από το γαστρεντερικό σωλήνα. Οι μέγιστες συγκεντρώσεις στο πλάσμα εμφανίζονται 1 έως 2 ώρες μετά τη χορήγηση της δόσης [49] και ο χρόνος ημιζωής του είναι περίπου 2 ώρες και κυμαίνεται από 2 έως 7 ώρες [50]. Μεταβολίζεται στο ήπαρ μέσω υδρόλυσης της εστερικής ομάδας οδηγώντας σε μη δραστικό μεταβολίτη (ritalinic acid) [51].

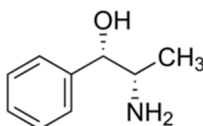
2.11 Phenylpropanolamine

Το phenylpropanolamine, είναι μεταβολίτης του pseudoephedrine, και ανήκει στην κατηγορία των συμπαθομιμητικών αμινών. Το phenylpropanolamine χρησιμοποιήθηκε, μέχρι το 2000 στις Η.Π.Α., ως αποσυμφορητικό του ρινικού βλεννογόνου και για τη μείωση της όρεξης (Dexatrim, Acutrim). Το Νοέμβριο του 2000, ο οργανισμός FDA των ΗΠΑ το χαρακτήρισε ως μη ασφαλές και αναποτελεσματικό. Ακολούθως το 2005 το phenylpropanolamine αφαιρέθηκε από τη λίστα των μη συνταγογραφούμενων φαρμάκων.

Το phenylpropanolamine δρα διεγείροντας κυρίως τους α-αδρενεργικούς υποδοχείς, με παρόμοια δράση όπως τα ephedrine και pseudoephedrine, ενώ η περιφερική του δράση οφείλεται κυρίως στη διέγερση, μέσω β-αδρενεργικών υποδοχέων, της απελευθέρωσης της νοραδρεναλίνης. Απορροφάται αμέσως από το γαστρεντερικό σωλήνα, και η μέγιστη συγκέντρωση παρατηρείται μετά από 1-2 ώρες, ενώ ο χρόνος ημίσειας ζωής είναι περίπου 3-4 ώρες, παρουσιάζοντας τον ίδιο όγκο κατανομής (4L/Kg) όπως το ephedrine και το pseudoephedrine. Απεκκρίνεται αναλλοίωτο στα ούρα (σε ποσοστό 80-90%), ενώ μικρή ποσότητά του μεταβολίζεται στο ήπαρ σε δραστικούς υδροξυλιωμένους μεταβολίτες.

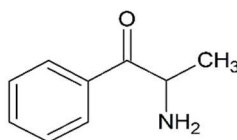
2.12 Καθινόνη

Το cathinone είναι φυσικό διεγερτικό που συναντάται στο φυτό Khat (*Catha edulis*). Τα φρέσκα φύλλα του θάμνου *Catha edulis* μασούνται ή παρασκευάζονται περιστασιακά ως τσάι στην αραβική χερσόνησο και σε ορισμένες περιοχές της Ανατολικής Αφρικής λόγω των κεντρικών διεγερτικών δράσεων τους [52]. Η πρώτη αναφορά χρήσης του khat ήταν το 14^ο αιώνα ενώ η χρήση του συνεχίζεται μέχρι σήμερα [53]. Από το φυτό Khat, αρχικά απομονώθηκε το d-noradrenaline (cathine, Σχήμα 2.9) [54]. Ωστόσο, λίγο μετά αποδείχθηκε ότι το cathine δεν είχε τόσο κεντρική διεγερτική δράση όσο το «εκχύλισμα khat» [55].



Σχήμα 2.9: Χημική δομή του cathine

Αυτό οδήγησε στην υπόθεση ότι το khat μπορεί να περιέχει και άλλες ψυχοδιεγερτικές ουσίες. Το 1975, μια ομάδα εργασίας του ΟΗΕ απομόνωσε το l-α-αμινοπροϋορφονη από φρέσκα φύλλα khat και έδωσε στην ουσία την ονομασία cathinone (Document, 1975) (Σχήμα 2.10).



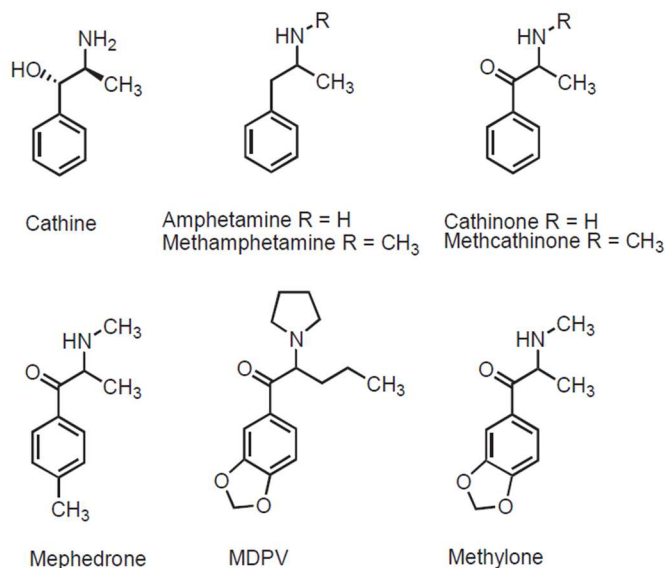
Σχήμα 2.10: Χημική δομή του cathinone

Αρχικά ο όρος cathinone αφορούσε μόνο το l-cathinone, πλέον ο όρος cathinone αναφέρεται στο ρακεμικό μίγμα. Μελέτες έδειξαν ότι το l-cathinone είναι πιο ισχυρό από το ρακεμικό μίγμα του cathinone [53].

2.13 Παράγωγα της καθινόνης

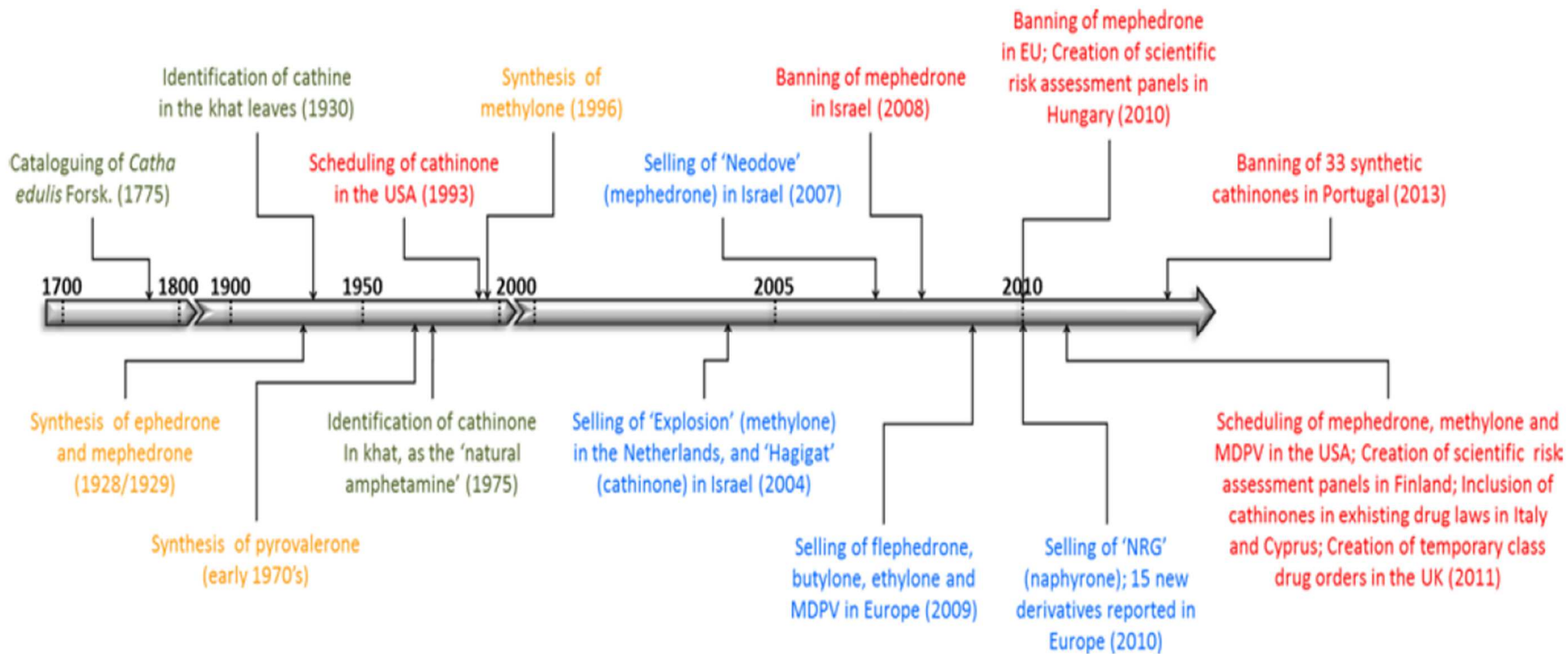
Τα παράγωγα του cathinone [56,57] κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες ουσιών: (α) ουσίες που δρουν ως υποστρώματα της ντοπαμίνης και της σεροτονίνης και ως μεταφορείς της νοραδρεναλίνης, (β) ουσίες που δρουν ως υποστρώματα για τους μεταφορείς μονοαμινών, σε αυτή την κατηγορία ανήκουν ουσίες όπως το naphyrone και το 1-naphyrone οι οποίες έχουν ισχυρή δράση και κάποιο βαθμό εκλεκτικότητας για τη ντοπαμίνη και (γ) ουσίες που δρουν ως αναστολείς μεταφορέων, για παράδειγμα το methylenedioxypropylone (MDPV) [58]. Τα μόνα παράγωγα του cathinone που βρίσκονται υπό διεθνή έλεγχο ως ψυχότροπες ουσίες είναι το amfepramone, cathine, cathinone, mephedrone, methcathinone, και pyrovalerone.

Τα συνθετικά παράγωγα του cathinone αντιπροσωπεύουν τη δεύτερη μεγαλύτερη ομάδα απαγορευμένων ουσιών με περίπου 100 παράγωγα σύμφωνα με το Ευρωπαϊκό Κέντρο Παρακολούθησης για τα Ναρκωτικά και την Τοξικομανία (ΕΚΠΝΤ, EMCDDA) [32]. Το ενδιαφέρον των κανονισμών για τα συνθετικά παράγωγα του cathinone ήταν αρχικά μειωμένο, ώσπου το 2010 ο Iversen υπέβαλε έκθεση στο Υπουργείο Εσωτερικών του Ηνωμένου Βασιλείου με τίτλο «Εξέταση των συνθετικών παραγώγων του cathinone» [59,60]. Πράγματι, η χρήση του mephedrone στο Ηνωμένο Βασίλειο και την Ευρώπη προηγήθηκε της χρήσης του methylenedioxypropylamphetamine (MDPV) στις ΗΠΑ. Περίπου την ίδια περίοδο, τα «bath salts» γίνονταν πρόβλημα στις ΗΠΑ, με αποτέλεσμα το 2011 να ενταχθούν στην κατηγορία I της λίστας ελεγχόμενων ουσιών του DEA (Σχήμα 2.11). Από τότε έχει δοθεί προσοχή στους συνδυασμούς αυτών των εξαρτησιογόνων ουσιών που είναι γνωστοί ως «bath salts», που μπορεί να περιλαμβάνουν τα MDPV, mephedrone, και methylone (MDMC) είτε μόνα τους, σε συνδυασμό μεταξύ τους, ή σε συνδυασμό με άλλα χημικά σχετικά ή άσχετα φάρμακα [61,62,63].



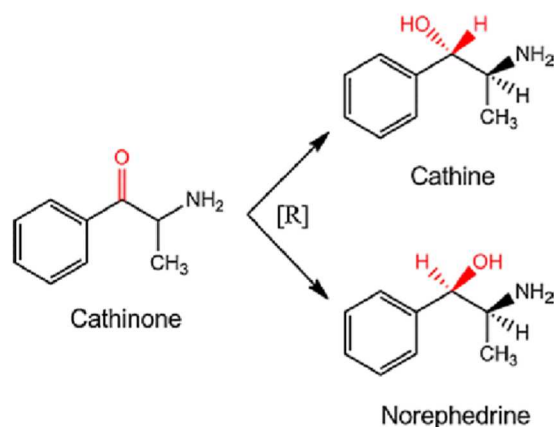
Σχήμα 2.11: Χημικές δομές συνθετικών παραγώγων της καθινόνης.

Ο χρήση των συνθετικών παραγώγων του cathinone στην παράνομη αγορά ναρκωτικών συνεχίζει να αυξάνεται και μια πρόσφατη αναφορά δείχνει τουλάχιστον 44 νέες ενώσεις που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία [64]. Στο σχήμα 2.12 παρουσιάζεται η ιστορική πορεία των παραγώγων της καθινόνης ξεκινώντας από τη χρήση του φυτού Khat καθώς και τα συνθετικά παράγωγα αυτής.



Σχήμα 2.12: Σημαντικότερα γεγονότα για το φυτό Khat και τα συνθετικά παράγωγα του cathinone ΠΗΓΗ: Valente et al (Arch Toxicol. 88(2014)15-45)^[65]

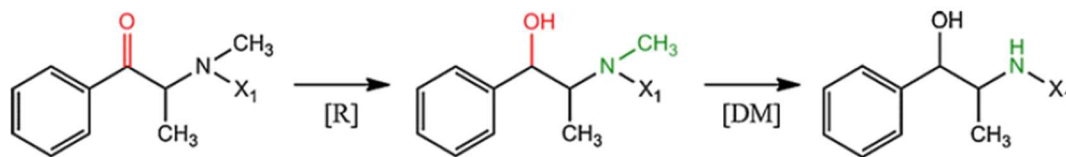
Οι πιο συχνές ανεπιθύμητες ενέργειες των παραγώγων του cathinone είναι η ανησυχία και το άγχος, που κυμαίνονται από ήπια διέγερση έως σοβαρή ψύχωση. Επιπλέον, μπορούν να παρατηρηθούν ταχυκαρδία, υπέρταση, κοιλιακός πόνος, ρίγη, έξαψη, εφίδρωση, υπερθερμία, νεφρική ανεπάρκεια, διαταραχή των κυττάρων του μυϊκού ιστού (ραβδομύολυση) και επιληπτικές κρίσεις. [66,67]. Σε χρόνιους χρήστες φυσικών και συνθετικών καθινονών, έχουν παρατηρηθεί επίσης παρανοϊκός ιδεασμός και διαταραχές της διάθεσης [68], όπως επίσης ανάπτυξη ανοχής, εξάρτηση και συμπτώματα στέρησης [69]. Το cathinone όπως όλα τα συνθετικά cathinones, μετά την απορρόφηση υφίσταται μεταβολισμό φάσης I, δηλαδή αναγωγή της β-κετο ομάδας σε αλκοόλη που καταλύεται από τα μικροσωμικά ένζυμα ήπατος [70,71], παράγοντας cathine και norephedrine (Σχήμα 2.13).



Σχήμα 2.13: Μεταβολισμός φάσης I του cathinone, ΠΗΓΗ: Brenneisen et al (Arch. Toxicol. 88 (2014) 15-45) [72]

2.14 Methcathinone (Ephedrone)

Το methcathinone ή ephedrone, συντέθηκε με το σκεπτικό ότι το methamphetamine παρέχει αυξημένη διεγερτική δράση [73] και χρησιμοποιήθηκε ως ναρκωτικό με τις ονομασίες “Jeff,” “Cat,” “Mulka,” και “Russian cocktail” στην Ανατολική Ευρώπη, ενώ έχουν επίσης αναφερθεί περιστατικά στη Δυτική και Νότια Ευρώπη και στον Καναδά. Έχει παρόμοια διεγερτική δράση με το methamphetamine δρώντας μέσω της απελευθέρωσης της ντοπαμίνης [53], και ο μεταβολισμός του παρουσιάζεται στο σχήμα 2.14.



X₁ = -H, ephedrone

X₁ = -H, ephedrine

X₁ = -H, norephedrine

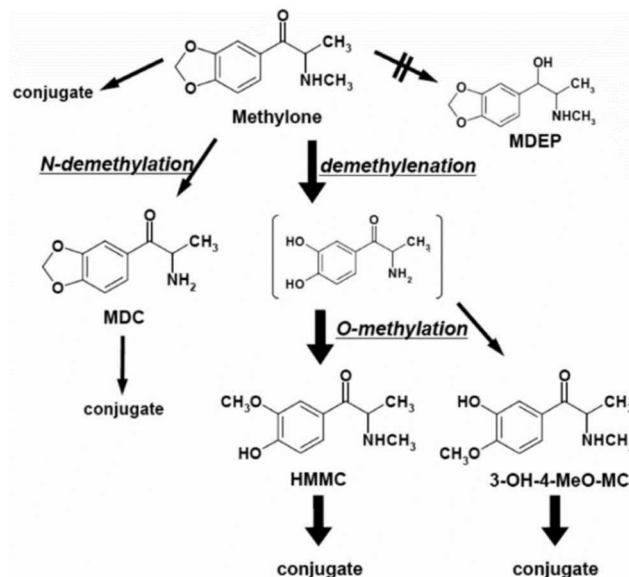
Σχήμα

Σχήμα 2.14: Χημική δομή και μεταβολικοί οδοί του ephedrone ΠΗΓΗ: Markantonis et al (Biochem Pharmacol 35 (1986) 529-532)^[74].

2.15 Methylone ή bk-MDMA

Το methylenedioxy-methylcathinone (MDMC, bk-MDMA, μεθυλόνη) είναι ισχυρό διεγερτικό του ΚΝΣ με ψυχεδελική, νευροτοξική και ηπατοτοξική δράση ^[75] και συντέθηκε από δύο διαφορετικές ερευνητικές ομάδες στα μέσα της δεκαετίας του 1990 ^[76,77]. Η δράση του είναι περίπου έξι φορές μικρότερη από αυτή του ρακεμικού μίγματος του methylcathinone ^[77], ενώ είναι εξίσου ισχυρό με το methamphetamine και το MDMA στην αναστολή της επαναπρόσληψης της νορεπινεφρίνης και της ντοπαμίνης λόγω της αναστολής των μεταφορέων πρόσληψης μονοαμινών ^[78,79]. Υπάρχει ωστόσο διαμάχη στη διεθνή βιβλιογραφία σχετικά με τη δραστηριότητά του MDMC στην αναστολή επαναπρόσληψης της σεροτονίνης σε σύγκριση με άλλα παράγωγα της αμφεταμίνης, με αρκετές μελέτες να βρίσκουν μειωμένη δράση και τουλάχιστον μία μελέτη να μη βρίσκει καμία διαφορά ^[80,81].

Το methylone μεταβολίζεται μέσω δύο μεταβολικών οδών (σχήμα 2.15) που περιλαμβάνουν (1) την απομεθυλίωση της πλευρικής αλυσίδας μέσω N-απομεθυλίωσης, για την παραγωγή της πρωτοταγούς αμίνης methylenedioxy-methylcathinone (MDC), μερικώς συζευγμένη και (2) την απομεθυλίωση ακολουθούμενη από την ο-μεθυλίωση της 3- ή της 4-OH ομάδας επί του βενζολικού δακτυλίου για την παραγωγή του 4-hydroxy-3-methoxymethylcathinone (HMMC) ή του 3-hydroxy-4-methoxymethylcathinone (3-OH-4-MeO-MC), αντίστοιχα, κατά κύριο λόγο ως συζευγμένα ^[82].

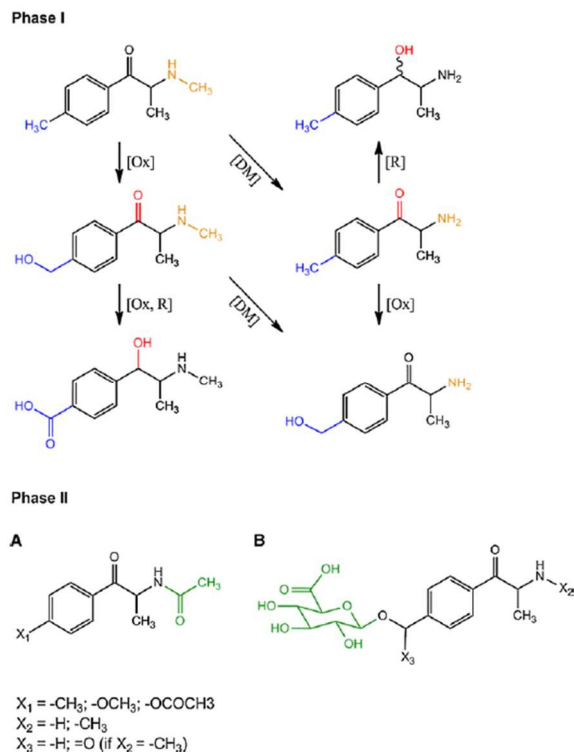


Σχήμα 2.15: Μεταβολικές οδοί του methylone ΠΗΓΗ: Kamata et al (Xenobiotica 36(2006 709-723) [83].

2.16 Mephedrone

Το mephedrone (Σχήμα 2.16), είναι παράγωγο του methcathinone και ένα σχετικά ασθενές κεντρικό διεγερτικό με γνωστές ιδιότητες κατάχρησης. Η πρώτη αναφορά χρήσης του mephedrone στην Ευρωπαϊκή Ένωση ως νέα ψυχοδραστική ουσία έγινε στα τέλη του 2007. Σε μια έρευνα σχετικά με τη χρήση του mephedrone στο Ηνωμένο Βασίλειο που διεξήχθη το 2009, περισσότερο πάνω από το 90% των ερωτηθέντων ανέφεραν την αίσθηση αυξημένης ενέργειας, ευφορίας, ομιλητικότητας και παρόρμησης [83]. Ανεπιθύμητες ενέργειες που περιλάμβαναν εφίδρωση, αυξημένο καρδιακό ρυθμό, ανησυχία, υπερθέρμανση, τρόμος, πανικός, διέγερση, πονοκέφαλο, δύσπνοια και θολή όραση αναφέρθηκαν από το 30% των συμμετεχόντων. Το mephedrone ελέγχεται από το 2010 στην Ε.Ε. και από το 2011 στις Η.Π.Α.

Το mephedrone ακολουθεί μεταβολισμό φάσης I και φάσης II. Ο μεταβολισμός μέσω φάσης I περιλαμβάνει α) απομεθυλίωση σε πρωτοταγή αμίνη, και β) αναγωγή της κετο ομάδας προς αλκοόλη, ενώ μέσω της φάσης II περιλαμβάνει γ) οξείδωση της τολυλ ομάδας [84,85].



Σχήμα 2.16: Χημική δομή και μεταβολικοί οδοί του methedrone (R: Αναγωγή, Ox: Οξειδωση, DM: N-απομεθυλίωση) ΠΗΓΗ: Meyer et al (Anal. Bioanal. Chem. 397(2010)1225-1233), Khreut et al (J Pharm Biomed Anal. 72(2012)177-185) [86, 88].

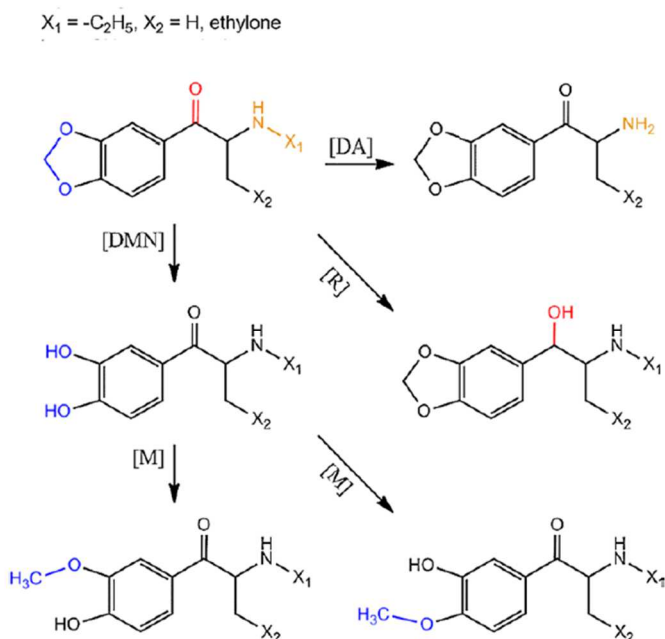
2.17 Methedrone

Το methedrone εμφανίστηκε ως υποκατάστατο του methedrone και υπάρχουν περιορισμένα στοιχεία στη βιβλιογραφία [66]. Τα πρώτα περιστατικά αναφέρθηκαν στη Σουηδία το 2009, τα οποία συνέβαλαν στην απόφαση της σουηδικής κυβέρνησης να κατατάξει το methedrone στις ελεγχόμενες ουσίες, μέχρι το τέλος του ίδιου έτους [71]. Οι χρήστες περιγράφουν ψυχοδραστικά συμπτώματα παρόμοια με το Ecstasy, συμπεριλαμβανόμενα αυτά της ήπιας ευφορίας και της αυξημένης εγρήγορσης. Ωστόσο, οι χρήστες αισθάνονται ότι αυτές οι δράσεις μειώνονται γρήγορα και αισθάνονται την ανάγκη να επαναλάβουν τη δόση. Η τοξικότητα του methedrone σχετίζεται με υπέρταση και την ταχυκαρδία [87]. Πληροφορίες για το μεταβολισμό της ουσίας δεν είναι γνωστές στη διεθνή βιβλιογραφία.

2.18 Ethylone

Το ethylone εμφανίζει παρόμοιο φαρμακολογικό και τοξικολογικό προφίλ με το methylone και το butylone [88]. Έχει εμφανιστεί πρόσφατα στην παράνομη αγορά ναρκωτικών [89] και είναι ελάχιστα στοιχεία γνωστά σχετικά με τις φαρμακολογικές του δράσεις. Ο μεταβολισμός του περιλαμβάνει τρεις μεταβολικές οδούς (Σχήμα 2.17): α) Σε μικρό βαθμό τη N-απαλκυλίωση, β) την αναγωγή της

β-κετο ομάδας σε αλκοόλη και γ) την απομεθυλίωση η οποία ακολουθείται από ο-μεθυλίωση. Η τελευταία αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο catechol O-methyltransferase (COMT) [66].

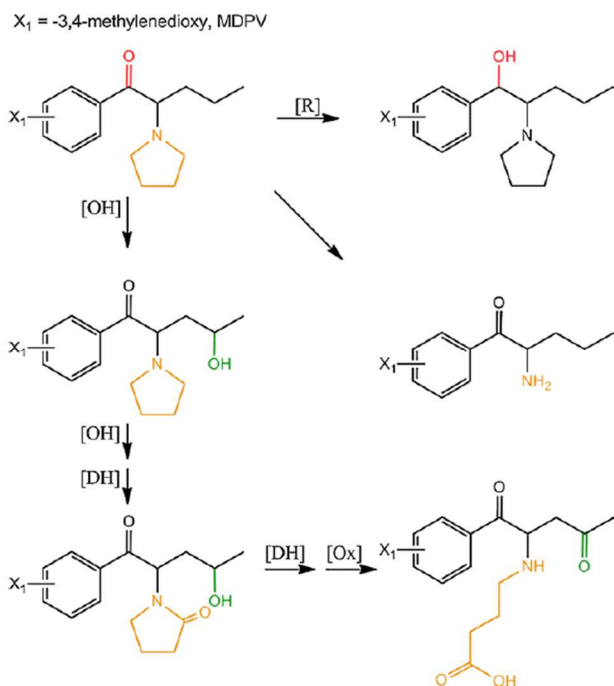


Σχήμα 2.17: Χημική δομή και μεταβολικές οδοί του ethylone (R: Αναγωγή, DA: N-απαλκυλίωση, DMN: απομεθυλίωση, M: Ο-μεθυλίωση) ΠΗΓΗ: Kamata et al (Xenobiotica 36(2006) 709-723), Zaitzu et al (Forensic Sci Int. 188(2009)131-139) [83,90].

2.19 Methylenedioxypropylone (MDPV)

Το MDPV αποτελεί ανάλογο του propylone [91], μια ουσία που είχε χρησιμοποιηθεί στις δεκαετίες του '60 και του 70 για τη θεραπεία της χρόνιας κόπωσης, του λήθαργου και της παχυσαρκίας, αλλά από τότε η χρήση του είχε περιοριστεί [92] λόγω του κινδύνου κατάχρησης και εξάρτησης [93]. Η πρώτη αναφορά σχετικά με την πιθανή κατάχρηση του MDPV (Σχήμα 21) εμφανίστηκε το 2007. Ωστόσο, σχεδόν 40 χρόνια νωρίτερα η εταιρία Boehringer Ingelheim κατοχύρωσε με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας αυτό που σήμερα είναι γνωστό ως MDPV, μαζί με μία σειρά από άλλα δομικά ανάλογα. Το MDPV έχει γίνει πολύ δημοφιλές στην ΕΕ από το 2010 με ονομασίες όπως «ivory wave/bath salts, research chemicals» [94,95], λόγω της απαγόρευσης των τότε γνωστών παραγώγων του cathinone και κυρίως του mephedrone [96,97]. Ωστόσο, από το 2005 έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία ως μία δυναμικά ψυχοδραστική ουσία [98]. Σε αντίθεση με άλλα παράγωγα του cathinone, το MDPV είναι πιο λιπόφιλο και πολύ περισσότερο ικανό να διαπεράσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, αυξάνοντας έτσι σημαντικά τη ψυχοδραστική του δράση. Λειτουργεί ως ισχυρό διεγερτικό μέσω της αναστολής της νοραδρεναλίνης και

επαναπρόσληψης ντοπαμίνης παρεμποδίζοντας τη λειτουργία του μεταφορέα αυτών των μονοαμινών. Αναφορές υποδηλώνουν ότι οι διεγερτικές του επιδράσεις μπορεί να είναι ακόμη μεγαλύτερες από κοκαΐνη και αμφεταμίνη [99,78]. Ο μεταβολισμός του MDPV (Σχήμα 2.18) είναι παρόμοιος με αυτόν των άλλων συνθετικών παραγώγων του cathinone και παρουσιάζεται στο σχήμα 2.18 [100].



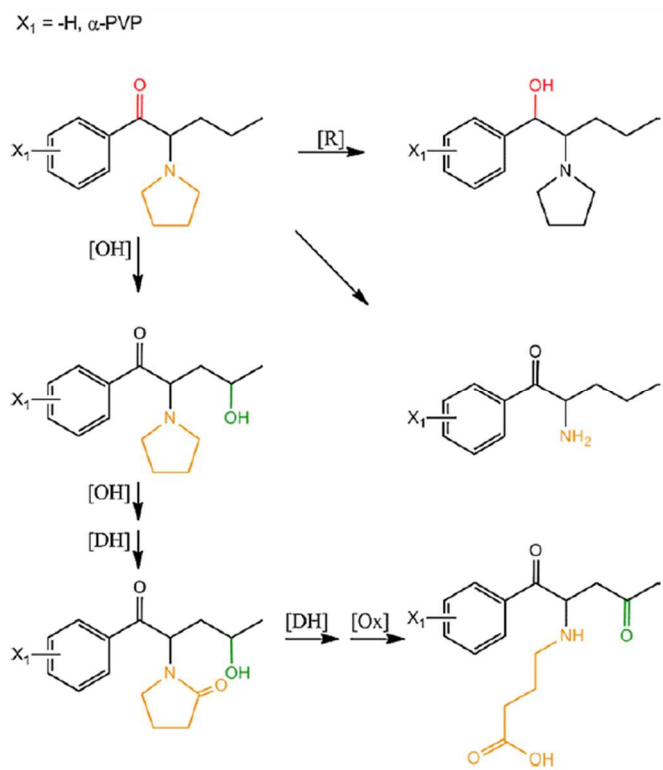
Σχήμα 2.18: Χημική δομή και μεταβολική οδός του MDPV (R: Αναγωγή, OH: Υδροξυλίωση, DH: Αφυδρογόνωση, Ox: Οξειδωση, N-απαλκυλίωση, DMN: απομεθυλίωση, M: O-μεθυλίωση) ΠΗΓΗ: Meyer et al (J Mass Spectrom. 45(2010)1426-1442) [101].

2.20 alpha-Pyrrolidinopentiophenone (alpha-PVP)

Το α-PVP (σχήμα 2.19) όπως και το MDPV είναι διεγερτικό του ΚΝΣ το οποίο δρα ως αναστολέας της επαναπρόσληψης μονοαμινών [102,103]. Μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν αναφορές στη βιβλιογραφία για τις δράσεις του. Έχει συνδεθεί με περιστατικά αυτοκτονιών και υπερδοσολογία [104]. Τρία περιστατικά θανάτων που σχετίζονται με το α-PVP αναφέρονται από τους Richards-Waugh et al. [105], με συγκεντρώσεις 0,1, 0,5 και 0,29 mg/L, και στα τρία αυτά περιστατικά ο θάνατος συνδέθηκε είτε άμεσα είτε σε μεγάλο βαθμό με τη χρήση α-PVP. Ένα επιπλέον περιστατικό αναφέρει ιστορικό βίαιης επιθετικής συμπεριφοράς [104].

Το α-PVP μεταβολίζεται εκτενώς μέσω πολλαπλών μεταβολικών οδών και έχουν προσδιοριστεί επτά μεταβολίτες φάσης I με σημαντικότερους το hydroxy-α-PVP το οποίο συντίθεται με αναγωγή

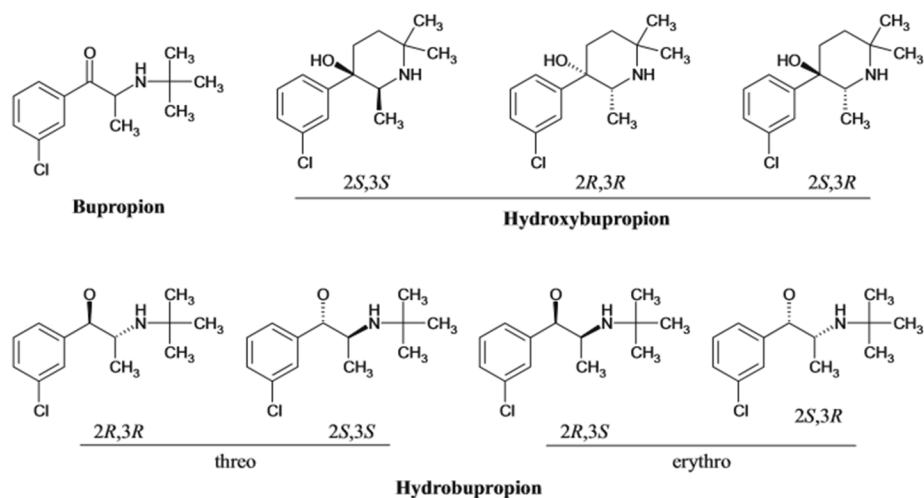
της β-κετο ομάδας, και το οποίο ανιχνεύεται και Ο μεταβολίτης επίσης ανιχνεύεται ως συζευγμένος μεταβολίτης με το glucuronic acid [106,107].



Σχήμα 2.19: Χημική δομή και μεταβολική οδός του α-PVP (R: Αναγωγή, OH: Υδροξυλίωση, DH: Αφυδρογόνωση, Ox: Οξειδωση, N-απαλκυλίωση, DMN: απομεθυλίωση, M: Ο-μεθυλίωση) ΠΗΓΗ: Sauer et al (L Mass Spectrom. 44(2009) 952-964)[108].

2.21 Bupropion και hydroxy-bupropion

Το *m*-chloro-*N*-*tert*-butyl-cathinone (bupropion) (Σχήμα 2.20) είναι το μοναδικό ανάλογο του cathinone, που κυκλοφορεί νόμιμα στην ΕΕ και στις Η.Π.Α και συνταγογραφείται για τη θεραπεία της κατάθλιψης καθώς και ως βοήθημα στη διακοπή του καπνίσματος [109,66]. Διοχετεύθηκε και στην παράνομη αγορά για ψυχαγωγικούς σκοπούς [110] με μικρή όμως ικανότητα εξάρτησης.



Σχήμα 2.20: Χημική δομή και μεταβολικοί οδοί του bupropion

Το Bupropion μεταβολίζεται μέσω οξειδωσης από το κυτόχρωμα P450s α) σε OH-bupropion και 4-OH-bupropion [111,112,113, 114,115,116 114,117,118].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

3.1 Επιλογή δειγμάτων για μεταθανάτια τοξικολογική ανάλυση

Το ολικό αίμα και τα ούρα θεωρούνται “παραδοσιακά” βιολογικά δείγματα επιλογής για την τοξικολογική ανάλυση [119], ενώ το ενδοφθάλμιο υγρό, το γαστρικό περιεχόμενο, η χολή, ο σπλήνας, το ήπαρ, οι νεφροί, ο εγκέφαλος, οι πνεύμονες, οι τρίχες, ο σίελος/στοματικό υγρό, ο ιδρώτας, το μηκόνιο και οι σκελετικοί μύες θεωρούνται “εναλλακτικά” βιολογικά δείγματα. Τα τελευταία έχουν ιδιαίτερη χρησιμότητα κατά την τοξικολογική ανάλυση, ιδιαίτερα σε περιστατικά όπου το σώμα βρίσκεται σε αποσυντεθειμένη, αποσκελετωμένη ή βαλασσωμένη κατάσταση. Τέτοια περιστατικά αποτελούν πρόκληση για μία τοξικολογική ανάλυση.

3.2. Παραδοσιακά δείγματα για την τοξικολογική ανάλυση

3.2.1 Αίμα

Το αίμα είναι το βιολογικό δείγμα επιλογής για την ανίχνευση, την ποσοτικοποίηση και την ερμηνεία των συγκεντρώσεων των φαρμάκων σε περιστατικά με τοξικολογικό ενδιαφέρον. Ένα αρνητικό αποτέλεσμα στο αίμα κάτω από ένα καθορισμένο όριο ανίχνευσης για μία ουσία μπορεί να ερμηνευθεί είτε ως απουσία οξείας έκθεσης σε αυτή ή μη ανταπόκριση σε θεραπεία. Αντίθετα, όταν οι συγκεντρώσεις φαρμάκων στο αίμα υπερβαίνουν τις θεραπευτικές είναι συνήθως συνυφασμένες με τη δηλητηρίαση ή το θάνατο. Επιπλέον, όσο μεγαλύτερος είναι ο λόγος μητρικής ουσίας ως προς το μεταβολίτη τόσο πιθανότερη είναι η οξεία δηλητηρίαση. Η ερμηνεία γίνεται δυσκολότερη σε περιπτώσεις όπου φάρμακα τα οποία είναι γνωστά για τη μεταθανάτια ανακατανομή τους στον οργανισμό ανιχνεύονται στο καρδιακό αίμα σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται μεταξύ του ανώτερου θεραπευτικού και του χαμηλότερου τοξικού ορίου. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η ανάλυση ενός περιφερικού δείγματος αίματος μπορεί να είναι κρίσιμη για τον καθορισμό του ρόλου που είχε το φάρμακο στο θάνατο του ατόμου [120]. Γενικά, συνίσταται η δειγματοληψία να γίνεται τόσο από την καρδιά όσο και από την περιφέρεια έτσι που να προκύπτουν πιο αξιόπιστα αποτελέσματα. Συνήθως, λόγω του ότι το καρδιακό αίμα είναι συνήθως πιο άφθονο από το περιφερικό αίμα, πολλά εργαστήρια εκτελούν τις αρχικές τοξικολογικές δοκιμές στο καρδιακό αίμα, διατηρώντας τα περιφερικά δείγματα αίματος για τις περιπτώσεις όπου απαιτείται επιπρόσθετη ανάλυση για την ερμηνεία του αποτελέσματος.

3.2.2. Ούρα

Τα ούρα, έχουν τη μέγιστη δυνατότητα από κάθε άλλο βιολογικό δείγμα να παρέχουν στην ανάλυση τις ποιοτικές πληροφορίες που χρειάζεται για την προθανάτια έκθεση σε ένα φάρμακο ή εξαρτησιογόνο ουσία. Τα ούρα είναι απαλλαγμένα από την παρουσία πρωτεϊνών, λιπιδίων και

άλλων μεγάλων ενώσεων μοριακού βάρους λόγω της νεφρικής διήθησης, η οποία απλοποιεί την προκατεργασία του δείγματος για την ανάλυση. Η συσσώρευση των φαρμάκων και των μεταβολιτών τους στα ούρα οδηγεί σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις φαρμάκων, που διευκολύνουν την ανίχνευση μιας προηγούμενης έκθεσης σε μία ουσία. Οι χρόνοι ανίχνευσης για τα φάρμακα στα ούρα μπορούν να ποικίλουν από 24 ώρες μέχρι ένα μήνα, ανάλογα με το φάρμακο. Κατά συνέπεια, εκτός από τους οξείς θανάτους φαρμάκων όπου ο χρόνος επιβίωσης είναι μέσα σε πολύ λίγες ώρες και τα φάρμακα δεν έχουν απεκκριθεί, τα ούρα παρέχουν ένα ιδανικό υπόστρωμα για την ανίχνευση του μεγαλύτερου εύρους των ουσιών. Η θετική ανίχνευση μίας ουσίας στα ούρα δείχνει την προηγούμενη χρήση της, αλλά δε δείχνει πότε ή σε ποια ποσότητα λήφθηκε αυτή. Προκειμένου αυτό να ερμηνευθεί πρέπει να αναλυθεί το αίμα για την ουσία που έχει ανιχνευθεί στα ούρα.

3.3. «Εναλλακτικά» βιολογικά δείγματα για την τοξικολογική ανάλυση

3.3.1 *Ιστοί*

Οι ιστοί που συλλέγονται συνήθως περιλαμβάνουν το ήπαρ, τους νεφρούς, τον εγκέφαλο, τους πνεύμονες και το σπλήνα. Οι ιστοί μπορούν να είναι τα μόνα δείγματα διαθέσιμα σε ένα αποσυντεθειμένο σώμα. Στη βιβλιογραφία υπάρχουν αρκετά δεδομένα για ευρεθείσες συγκεντρώσεις ουσιών στους ιστούς κυρίως για το ήπαρ και τους νεφρούς και σε μικρότερο βαθμό για τον εγκέφαλο και τους πνεύμονες. Σε περιπτώσεις δηλητηρίασης με βαρέα μέταλλα, τα νεφρά είναι πολύ χρήσιμο δείγμα δεδομένου ότι τα βαρέα μέταλλα έχουν την τάση να αθροίζονται σε αυτούς. Ο σπλήνας, ένα όργανο πλούσιο σε αίμα, είναι χρήσιμη για την ανάλυση των ενώσεων που δεσμεύονται στην αιμογλοβίνη, όπως το μονοξειδίο του άνθρακα. Οι πνεύμονες είναι ιδιαίτερα χρήσιμοι σε περιπτώσεις εισπνοής πτητικών ουσιών. Ο εγκέφαλος, λόγω του πλούσιου σε λίπη περιεχομένου του συσσωρεύει λιπόφιλες ουσίες, και επειδή βρίσκεται σε προστατευμένο περιβάλλον (κρανιακή κοιλότητα) είναι ανθεκτικότερος στη μεταθανάτια αποσύνθεση.

3.3.2 *Χολή*

Η χολή είναι ένα ιδιαίτερα χρήσιμο εναλλακτικό βιολογικό δείγμα καθώς αρκετά φάρμακα αλλά και οι μεταβολίτες τους αποβάλλονται από τον οργανισμό μέσω αυτής της οδού^[121,122]. Η ποιοτική ανίχνευση μίας ουσίας ή/και των μεταβολιτών της στη χολή είναι σημαντική για την τεκμηρίωση της μακροχρόνιας χρήσης ουσιών. Ιστορικά, η χολή έχει χρησιμοποιηθεί συχνά για προσδιορισμό των οπιούχων και ειδικότερα της μορφίνης^[123,124].

3.3.3 Ενδοφθάλμιο Υγρό

Η ανάλυση του ενδοφθάλμιου υγρού είναι ιδιαίτερα σημαντική για την επίλυση διαφόρων ζητημάτων σε μια μεταθανάτια εξέταση. Το ενδοφθάλμιο υγρό, λόγω του προστατευόμενου περιβάλλοντός στο μάτι, είναι λιγότερο εκτεθειμένο στις βακτηριακές μολύνσεις. Κατά συνέπεια μπορεί να χρησιμοποιηθεί ώστε να διακρίνει την προθανάτια κατανάλωση οιοπνεύματος από το μεταθανάτιο ενδογενή σχηματισμό αιθανόλης και μπορεί να παρέχει τη μόνη δυνατότητα να προσδιορισθεί η προθανάτια συγκέντρωση αιθανόλης μετά την αποσύνθεση του σώματος [125,126]. Επιπλέον, επειδή το ενδοφθάλμιο υγρό βρίσκεται σε ένα περιφερικό διαμέρισμα, παρατηρείται καθυστέρηση στην κατανομή αλλά και την απομάκρυνση των ουσιών από αυτό. Έχει παρατηρηθεί ότι συγκεντρώσεις φαρμάκων στο ενδοφθάλμιο υγρό απεικονίζουν συχνά τις συγκεντρώσεις του αίματος 1 έως 2 ώρες πριν από το θάνατο και ότι οποιοδήποτε φάρμακο εντοπιστεί στο αίμα θα ανιχνευθεί στο ενδοφθάλμιο υγρό σε αντίστοιχες συγκεντρώσεις εάν και εφόσον υπάρχει η κατάλληλη αναλυτική μεθοδολογία με ικανοποιητική ευαισθησία.

3.3.4 Γαστρικό περιεχόμενο

Η από του στόματος λήψη (*per os*) είναι η κυριότερη οδός χορήγησης φαρμάκων και επομένως η ανάλυση του γαστρικού περιεχομένου είναι συχνά καθοριστική για τη διερεύνηση πιθανής δηλητηρίασης. Οι τυχαίες ή ηθελημένες υπερδοσολογίες φαρμάκων, μπορούν εύκολα να ανακαλυφθούν μέσω της ανάλυσης του γαστρικού περιεχομένου.

3.3.5 Τρίχες

Παραδοσιακά, οι τρίχες μαζί με τα νύχια, είναι το δείγμα της επιλογής στον καθορισμό της χρόνιας δηλητηρίασης από βαρέα μέταλλα όπως το αρσενικό, ο υδράργυρος και ο μόλυβδος. Τα βαρέα μέταλλα δεσμεύουν στις σουλφυδρυλικές ομάδες του μορίου της κυστεΐνης σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων από την ανάλυση των τριχών μπορεί να διευκολυνθεί από την κατάτμηση των τριχών βοηθώντας στον καθορισμό του χρόνου έκθεσης [127,128]. Οι τρίχες έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για τον καθορισμό της μακροχρόνιας χρήσης φαρμάκων [129,130] και εξαρτησιογόνων ουσιών [131,132]. Σε εξαιρετικά αποσυντεθειμένα ή αποσκελετωμένα σώματα όπου κανένα άλλο δείγμα δεν υπάρχει, οι τρίχες μπορούν τουλάχιστον να επιβεβαιώσουν ή όχι το ιστορικό χρήσης μίας ουσίας.

3.3.6 Σκελετικοί μύες

Οι σκελετικοί μύες είναι δείγματα με πολλές πιθανές εφαρμογές στη μεταθανάτια τοξικολογική ανάλυση αλλά παρόλα αυτά δε χρησιμοποιούνται συχνά. Η ανάλυση σκελετικού μυ ικανοποιεί πολλά από τα κριτήρια ενός ιδανικού δείγματος καθώς είναι σχετικά ομοιογενές βιολογικό υλικό,

σχεδόν πάντα διαθέσιμο και δεν επιμολύνεται εύκολα. Μελέτες έχουν δείξει ότι οι συγκεντρώσεις φαρμάκων στους μύες των μηρών απεικονίζουν τις συγκεντρώσεις φαρμάκων στο αίμα για πολλά κοινά ναρκωτικά και το οινόπνευμα, εκτός από τις περιπτώσεις αιφνίδιου θανάτου όπου οι συγκεντρώσεις των φαρμάκων στους μύες μπορούν να είναι χαμηλότερες από το αίμα λόγω του ανεπαρκούς χρόνου για την κατανομή τους στους ιστούς^[133].

3.3.7. Μηκόνιο

Πρόσφατα έχει δοθεί ιδιαίτερη σημασία στο μηκόνιο, το πρώτο περιπρωματικό υλικό από ένα νεογνό, επειδή είναι ένα χρήσιμο δείγμα από το οποίο μπορεί να καθοριστεί η εμβρυϊκή έκθεση σε φάρμακα ή/και εξαρτησιογόνες ουσίες ^[134].

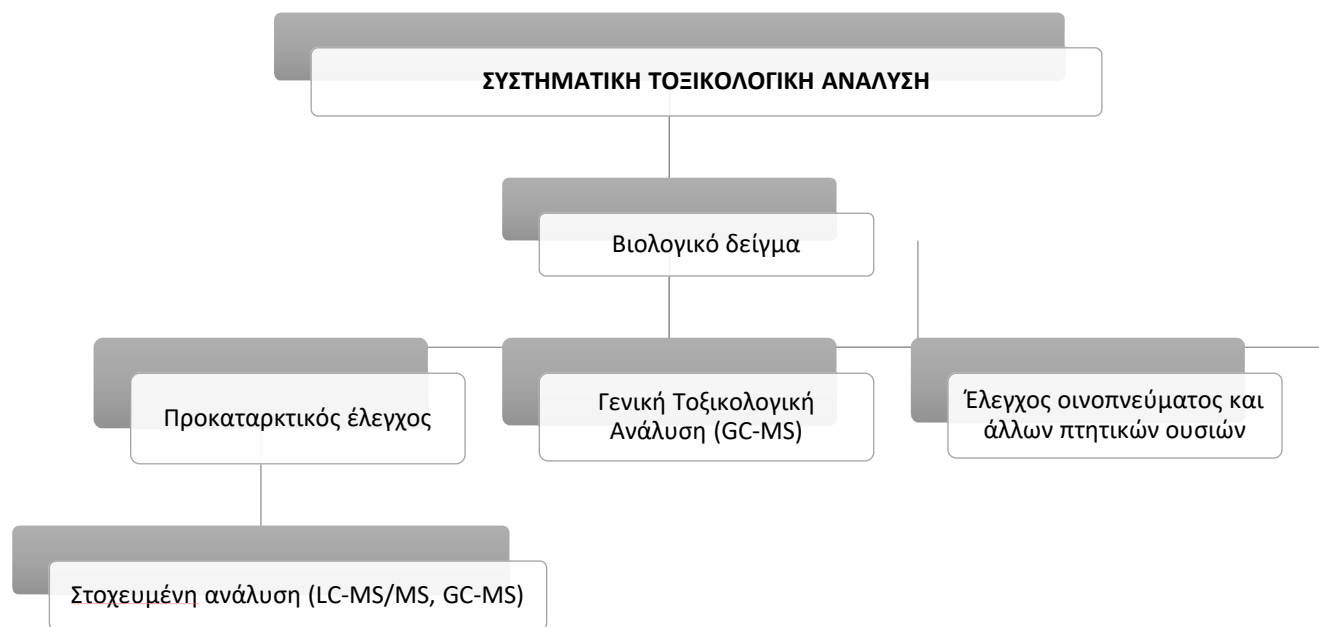
3.3.8. Στοματικό υγρό

Το στοματικό υγρό (σίελος) είναι το προϊόν απέκκρισης που προέρχεται από τρία ζεύγη μεγάλων σιελογόνων αδένων (παρωτίδα, υπογνάθια και υπογλώσσια), ένα μεγάλο αριθμό μικρών σιελογόνων αδένων, το στοματικό βλεννογόνο και τις ουλές των ούλων. Λαμβάνοντας υπόψη ότι ο σίελος είναι στην πραγματικότητα ένα υγρό μίγμα, ο όρος «στοματικό υγρό» είναι καταλληλότερος, αντί για τους όρους «σίελος» ή «ολικός σίελος» ^[135]. Το νερό (99%) είναι το κύριο συστατικό του στοματικού υγρού μαζί με άλλα συστατικά όπως πρωτεΐνες (βλέννες, ένζυμα πέψης) και ανόργανα άλατα. Ένα από τα πλεονεκτήματα αυτού του εναλλακτικού δείγματος είναι ότι συλλέγεται κάτω από άμεση επίβλεψη. Κατά συνέπεια, ο κίνδυνος μη έγκυρου δείγματος, ή αλλοίωση του δείγματος ή/και αντικατάσταση του δείγματος (που είναι πιθανό να συμβούν κατά τη λήψη δείγματος ούρων) είναι μειωμένος. Επιπλέον, οι συγκεντρώσεις ουσιών στο στοματικό υγρό σχετίζονται με τη συγκέντρωση των ελεύθερων ουσιών στο πλάσμα και τη φαρμακολογική τους δράση. Από την άλλη πλευρά, ουσίες που λαμβάνονται από το στόμα καθώς επίσης και εκείνες που καπνίζονται μπορούν να εντοπιστούν σε υψηλές συγκεντρώσεις στο στοματικό υγρό μετά από πρόσφατη χρήση, λόγω υπολειπόμενων ποσοτήτων της ουσίας που παραμένουν στη στοματική κοιλότητα. Επομένως, για αυτές τις ουσίες, τα αποτελέσματα μπορεί να μην είναι ακριβή επειδή η συγκέντρωση της ουσίας στο στοματικό υγρό μπορεί να μην αντικατοπτρίζει αυτή του αίματος. Ένα άλλο μειονέκτημα της χρήσης του στοματικού υγρού είναι ότι οι άνθρωποι μερικές φορές αδυνατούν να παράγουν επαρκή ποσότητα του υλικού για ανάλυση. Επιπλέον, το στοματικό υγρό περιέχει πολλά μακρομόρια (βλεννοπολυσακχαρίτες και βλεννοπρωτεΐνες), που το καθιστούν λιγότερο εύκολο να συλλεχθεί με χρήση πιπέτας, απ' ό,τι για παράδειγμα τα ούρα και ενδέχεται να μην είναι διαθέσιμο από όλα τα άτομα ανά πάσα στιγμή, καθώς υπάρχουν ουσίες που μπορούν να αναστέλλουν την έκκριση σιέλου και να προκαλούν ξηροστομία. Επί πλέον, επειδή η συγκέντρωση ουσιών στο στοματικό υγρό εξαρτάται από τη συγκέντρωσή τους στο

πλάσμα, ουσίες που έχουν μικρό χρόνο ημίσειας ζωής στο πλάσμα και απεκκρίνονται γρήγορα από το σώμα είναι ανιχνεύσιμες στο στοματικό υγρό μόνο για μικρό χρονικό διάστημα, το οποίο αντιπροσωπεύει ένα πιθανό μειονέκτημα σε σχέση με άλλα «εναλλακτικά» δείγματα όπως οι τρίχες, ο ιδρώτας, ή τα ούρα. Στην πραγματικότητα, το στοματικό υγρό μαζί με το αίμα έχουν το μικρότερο χρόνο ανίχνευσης [136]. Εντούτοις, δεν υπάρχει αμφιβολία ότι μία από τις μεγαλύτερες εφαρμογές του στοματικού υγρού αποτελεί η αξιολόγηση της οδήγησης υπό την επήρεια εξαρτησιογόνων ουσιών, η οποία επιτυγχάνεται λόγω της εύκολης και μη επεμβατικής διαδικασίας συλλογής δειγμάτων [137].

3.4 Συστηματική Τοξικολογική Ανάλυση (Systematic Toxicological Analysis, STA)

Στην τοξικολογική ανάλυση, υπάρχουν δύο τύποι δοκιμών: οι προκαταρκτικές δοκιμές σάρωσης (screening) και οι δοκιμές επιβεβαίωσης (confirmatory). Στο σχήμα 3.1 παρουσιάζονται διαγραμματικά οι διαδικασίες της συστηματικής τοξικολογικής ανάλυσης



Σχήμα 3.1 Συστηματική τοξικολογική ανάλυση

Τα δείγματα συνήθως ελέγχονται προκαταρκτικά για την παρουσία φαρμάκων ή/και εξαρτησιογόνων ουσιών, και στη συνέχεια με τη χρήση μίας πιο ειδικής μεθόδου επιβεβαιώνεται το αποτέλεσμα και ταυτοποιούνται με ορθότητα οι υπάρχουσες ουσίες. Η επιβεβαίωση πρέπει να γίνεται χρησιμοποιώντας μια διαφορετική μεθοδολογία από αυτήν του προκαταρκτικού ελέγχου και πρέπει εάν αυτό είναι δυνατό να γίνει σε ένα διαφορετικό δείγμα. Πριν από κάθε δοκιμή το πρώτο βήμα είναι συνήθως η κατεργασία του δείγματος. Για πολλές μεθοδολογίες, τα φάρμακα πρέπει πρώτα να απομονωθούν από το υπόστρωμα μέσω της καταβύθισης πρωτεϊνών, την υγρό-υγρό εκχύλιση, ή την εκχύλιση στερεάς φάσης¹³⁸.

3.4.1 Τεχνικές για τον προκαταρκτικό έλεγχο σάρωσης (screening techniques)

Λόγω του μεγάλου αριθμού ψυχοδραστικών ουσιών απαιτούνται αναλυτικές μέθοδοι ικανές να ανιχνεύουν συγχρόνως μεγάλο αριθμό ενώσεων ή/και των μεταβολιτών τους, οι οποίες εμφανίζουν παρόμοιες φυσικοχημικές ιδιότητες. Αυτές οι μέθοδοι ονομάζονται μέθοδοι σάρωσης (screening procedure) και πραγματοποιούνται με σκοπό την ανάδειξη των ύποπτων δειγμάτων, θετικών, και τη διάκριση των αρνητικών δειγμάτων. Στις μεθόδους σάρωσης γίνεται ανίχνευση του μοριακού ιόντος στο ελάχιστο απαιτούμενο επίπεδο απόδοσης ή κάτω από αυτό.

3.4.1.1. Ανοσοενζυμικές τεχνικές

Οι ανοσοενζυμικές τεχνικές στηρίζονται στην ειδική αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος. Αντιγόνο είναι η προς προσδιορισμό ουσία, η οποία δεσμεύεται σε ειδικό μονοκλωνικό ή πολυκλωνικό αντίσωμα. Για τον καθορισμό της έκτασης της ανοσο-αντίδρασης, το σημασμένο αντιδραστήριο, το οποίο δεν έχει δεσμευτεί, πρέπει, είτε να διαχωριστεί από το δεσμευμένο σε ένα στάδιο διαχωρισμού, ή η ενζυμική δραστηριότητα του ιχνηθέτη (η ουσία σήμανσης είναι ένζυμο) να διαφοροποιείται στην πορεία της αντίδρασης, έτσι ώστε τελικά να διαχωρίζονται το ελεύθερο από το δεσμευμένο αντιδραστήριο. Με βάση το παραπάνω σκεπτικό οι ανοσοενζυμικές μέθοδοι έχουν ταξινομηθεί σε ομογενείς τεχνικές και ετερογενείς τεχνικές. Οι ανοσοενζυμικές τεχνικές χρησιμοποιούνται για τον προκαταρκτικό έλεγχο μεγάλου αριθμού ουσιών και μπορεί να χρησιμοποιηθούν για ποιοτικούς ή ημιποσοτικούς προσδιορισμούς. Τα ούρα είναι το βιολογικό υπόστρωμα επιλογής για τις ανοσοενζυμικές τεχνικές δεδομένου ότι περιέχουν μικρότερο ποσοστό πρωτεϊνών και άλλων ενδογενών συστατικών σε σχέση με το αίμα. Στην περίπτωση των τοξικολογικών αναλύσεων η βασική αρχή της τεχνικής περιλαμβάνει συνήθως ένα αντίσωμα το οποίο αντιδρά σε ένα συγκεκριμένο φάρμακο ή μια κατηγορία ουσιών (αντιγόνα). Το αντίσωμα προστίθεται στο δείγμα, δεσμεύει το φάρμακο παράγοντας θετική απόκριση. Εάν το δείγμα συνδυάζεται με ένα επισημασμένο αντιγόνο γνωστής ποσότητας, αναπτύσσεται ανταγωνισμός για τις θέσεις σύνδεσης μεταξύ του αντισώματος, του επισημασμένου αντιγόνου και της άγνωστης

ποσότητας του φαρμάκου. Στη συνέχεια η αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος μετρείται, επιτρέποντας τον ημιποσοτικό προσδιορισμό της υπάρχουσας ποσότητας του φαρμάκου. Τέτοια είδη ανοσοενζυμικών τεχνικών αποτελούν οι RIA (Radioimmunoassay), EMIT (Enzyme multiplied immunoassay), FPIA (Fluorescent polarization immunoassays), KIMS (Kinetic interaction of microparticles in solution), ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay). Οι ανοσοενζυμικές τεχνικές είναι σχετικά εύκολες στη χρήση, δεν απαιτούν συνήθως καμία προκατεργασία του δείγματος, έχουν καλή ευαισθησία ακόμη και στις χαμηλές συγκεντρώσεις ενώ μπορούν να εκτελεσθούν χρησιμοποιώντας πολύ μικρή ποσότητα δείγματος. Εμφανίζουν περιορισμένη ειδικότητα λόγω πιθανής διασταυρούμενης αντίδρασης μεταξύ του αντισώματος και άλλων φαρμάκων, ή άλλων δομικά παρόμοιων ενώσεων ή άλλα συστατικά του υποστρώματος οδηγώντας είτε σε ψευδώς θετικά είτε σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα.

3.4.1.2. Διαχωριστικές τεχνικές ανάλυσης

Η δυνατότητα διασύνδεσης της φασματομετρίας μαζών με άλλες διαχωριστικές τεχνικές ανάλυσης όπως η αεριοχρωματογραφία ή υγροχρωματογραφία οδηγούν σε διαχωριστικές τεχνικές συνδυασμού που χαρακτηρίζονται από αυξημένη ευαισθησία, υψηλή ειδικότητα και εκλεκτικότητα με δυνατότητα εφαρμογής σε μεγάλο εύρος μαζών. Λόγω των πλεονεκτημάτων τους αυτές οι τεχνικές βρίσκουν εφαρμογή σε ένα ευρύ επιστημονικό πεδίο και επομένως και για τον προκαταρκτικό έλεγχο ενός μεγάλου αριθμού ψυχοδραστικών ουσιών. Χρησιμοποιούνται τόσο κατά την ποιοτική ανάλυση, στη 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. Στην παρούσα εργασία για χρησιμοποιήθηκε σύστημα UHPLC-MS/MS για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση ψυχοδραστικών ουσιών.

3.4.2 Τεχνικές επιβεβαίωσης (confirmatory techniques)

Στην περίπτωση που ανιχνευτεί κάποια ουσία σε ένα δείγμα κατά τη διαδικασία της ανάλυσης σάρωσης, ενεργοποιείται η αναλυτική διαδικασία επιβεβαίωσης (confirmation procedure) του ύποπτου δείγματος. Οι δοκιμές επιβεβαίωσης πρέπει να είναι περισσότερο ειδικές από τις δοκιμές που χρησιμοποιούνται κατά τον προκαταρκτικό έλεγχο. Οι καταλληλότερες τεχνικές επιβεβαίωσης σε ένα τοξικολογικό εργαστήριο είναι οι συνδυαστικές τεχνικές ανάλυσης GC-MS/MS και LC-MS/MS.

3.5. Επικύρωση Μεθόδων

Για την επικύρωση των μεθόδων στην παρούσα διατριβή εφαρμόστηκε η οδηγία του Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) η οποία περιγράφει τη διαδικασία επικύρωσης μεθόδων στην Ιατροδικαστική Τοξικολογία [139]. Για την ταυτοποίηση των ουσιών εφαρμόστηκαν επίσης α) η Ευρωπαϊκή οδηγία [140] για τη διαδικασία επικύρωσης των αναλυτικών μεθόδων και αξιολόγησης των αποτελεσμάτων, β) το προσχέδιο της οδηγίας του OSAC (Organization of Scientific Area Committees for Forensic Science) για τα κριτήρια ταυτοποίησης στην Ιατροδικαστική Τοξικολογία [141], γ) το προσχέδιο της οδηγίας του OSAC για την αποδοχή δεδομένων φασματομέτρου μαζών στην Ιατροδικαστική Τοξικολογία [142] και δ) αναφορές από τη διεθνή βιβλιογραφία [143]. Όλες οι παραπάνω αναφορές περιγράφουν μία κοινή διαδικασία για τα κριτήρια ταυτοποίησης μίας ουσίας σε φασματομέτρο μαζών.

3.5.1. Τυποποιημένες πρακτικές για την επικύρωση μεθόδων στην Ιατροδικαστική Τοξικολογία

Η οδηγία Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) αποτελεί τη συχνότερα εφαρμοζόμενη οδηγία από τα εργαστήρια τοξικολογικής ανάλυσης των Η.Π.Α. Η οδηγία περιγράφει μεταξύ άλλων τα χαρακτηριστικά επίδοσης που πρέπει να επαληθεύονται ανάλογα με το σκοπό της μεθόδου (προκαταρκτικός έλεγχος με χρήση ανοσοενζυμικών μεθόδων, ποιοτικός ή ποσοτικός προσδιορισμός). Στον Πίνακα 3.1 παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά επίδοσης μεθόδων που πρέπει να αξιολογούνται για ποιοτικούς και ποσοτικούς προσδιορισμούς σύμφωνα με τη SWGTOX.

	Ποιοτικός προσδιορισμός	Ποσοτικός προσδιορισμός
Επιμόλυνση εκ μεταφοράς (carry-over)	+	+
Εκλεκτικότητα /ειδικότητα	+	+
Επίδραση του υλικού μήτρας (Matrix effect)	+	+
Όριο ανίχνευσης	+	+
Μοντέλο βαθμονόμησης	-	+
Όριο ποσοτικοποίησης	-	+
Ορθότητα / Πιστότητα	-	+

Στις επόμενες παραγράφους περιγράφεται συνοπτικά ο τρόπος εκτίμησης των ανωτέρω παραμέτρων σύμφωνα με τη SWGTOX:

Μελέτη επιμόλυνσης εκ μεταφοράς (carry-over)

Για την αξιολόγηση της πιθανής μεταφοράς (ή επιμόλυνσης) ουσιών από δείγμα σε δείγμα, λευκά δείγματα αναλύονται μετά από ένα δείγμα υψηλής συγκέντρωσης, ή ένα πρότυπο διάλυμα. Η συγκέντρωση (πάνω από το όριο ανίχνευσης) για την οποία δεν ανιχνεύεται ουσία στο επόμενο δείγμα, θεωρείται ως η συγκέντρωση για την οποία η μέθοδος δεν εμφανίζει επιμόλυνση μεταξύ των δειγμάτων. Αυτή η συγκέντρωση πρέπει να επιβεβαιώνεται επαναλαμβάνοντας την ανάλυση τρεις φορές.

Μελέτες παρεμπόδισης

Εκλεκτικότητα

Για τις αναλυτικές μεθόδους έχει σημασία η ικανότητα διάκρισης ανάμεσα στον αναλύτη και σε συγγενικές ουσίες (π.χ. ενδογενή συστατικά υποστρώματος, μεταβολίτες, κ.λ.π.). Για τον έλεγχο της εκλεκτικότητας και της ειδικότητας είναι απαραίτητες δύο προσεγγίσεις προκειμένου να ελέγξουμε τυχόν παρεμποδίσεις. Πρέπει να επιλέγονται οι δυνητικά παρεμποδίζουσες ουσίες και να αναλύονται τα αντίστοιχα λευκά δείγματα του υλικού μήτρας (π.χ. αίμα, πλάσμα, ούρα) ώστε να ανιχνεύεται η παρουσία τυχόν παρεμποδίσεων και να υπολογίζεται η επίδρασή τους. Για την αξιολόγηση της εκλεκτικότητας, επεξεργάζονται λευκά δείγματα από τουλάχιστον 10 διαφορετικούς δότες, χωρίς την προσθήκη εσωτερικού προτύπου ώστε να αποδειχθεί ότι τα συστατικά του υλικού μήτρας δεν εμφανίζουν παρεμποδίσεις που να επηρεάζουν την ανάλυση.

Ειδικότητα

Για τις αναλυτικές μεθόδους έχει σημασία η ικανότητα διάκρισης ανάμεσα στον αναλύτη και σε μία σειρά χημικά συγγενών ενώσεων (μητρικές ουσίες, μεταβολίτες, παράγωγα, κ.λ.π.). Για τον έλεγχο της ειδικότητας απαιτείται η ανάλυση μίγματος ουσιών που δυνητικά μπορούν να συνυπάρχουν στο υπό εξέταση δείγμα και να παρεμποδίζουν την ανίχνευση των αναλυτών, και ακολούθως υπολογίζεται η επίδραση τους στην ανάλυση.

Επίδραση του υλικού μήτρας (Matrix effect-Ionization suppression/Enhancement)

Όταν η μέση καταστολή ή η αύξηση του σήματος υπερβαίνει το 25% ή η % σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) της καταστολής ή της αύξησης του σήματος υπερβαίνει το 15%, το εργαστήριο πρέπει να αξιολογήσει αν αυτή επηρεάζει άλλες κρίσιμες παραμέτρους της επικύρωσης, αυξάνοντας τον αριθμό των λευκών δειγμάτων που χρησιμοποιούνται για αυτή την αξιολόγηση. Η μελέτη καταστολής/αύξησης του σήματος πραγματοποιείται είτε μέσω της τεχνικής της συνεχούς έγχυσης της ουσίας μετά τη στήλη είτε μέσω της τεχνικής της προσθήκης της ουσίας

στο δείγμα μετά την εκχύλιση. Η τελευταία τεχνική εφαρμόστηκε στην παρούσα διατριβή. Ετοιμάζονται δύο ομάδες δειγμάτων και συγκρίνεται το εμβαδό των κορυφών μεταξύ προτύπων διαλυμάτων με το εμβαδόν κορυφών δειγμάτων ενοφθαλμισμένων με πρότυπα διαλύματα μετά την εκχύλιση. Η πρώτη ομάδα των προτύπων διαλυμάτων ετοιμάζεται σε δύο συγκεντρώσεις (χαμηλή και υψηλή). Κάθε ένα από αυτά τα πρότυπα διαλύματα αναλύονται κατ' ελάχιστον 6 φορές ώστε να υπολογιστεί ο μέσος όρος του εμβαδού κορυφής για κάθε συγκέντρωση. Η δεύτερη ομάδα αποτελείται από δέκα λευκά δείγματα από διαφορετικούς δότες, εάν είναι εφικτό. Κάθε λευκό δείγμα από διαφορετικό δότη εκχυλίζεται εις διπλούν. Μετά την εκχύλιση, κάθε δείγμα εμβολιάζεται με τη χαμηλή ή την υψηλή συγκέντρωση του προτύπου διαλύματος. Η μέση τιμή των εμβαδών κορυφών για κάθε ομάδα δειγμάτων, χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της καταστολής ή της αύξησης του σήματος για κάθε συγκέντρωση σύμφωνα με την πιο κάτω εξίσωση:

$$\% \text{ Καταστολή ή αύξηση του σήματος} = \left(\frac{[\text{Εμβαδόν κορυφής}]_{\text{samplespiked}}}{[\text{Εμβαδόν κορυφής}]_{\text{waterspiked}}} - 1 \right) \times 100$$

Όριο ανίχνευσης (LOD)

Ο υπολογισμός του ορίου ανίχνευσης υπολογίζεται α) με τη χρήση του χαμηλότερου μη μηδενικού εμβολιασμένου πρότυπου διαλύματος, ή β) με τη χρήση του ορίου απόφασης ως το όριο ανίχνευσης, ή γ) με υπολογισμό του σήματος υποβάθρου. Η τελευταία τεχνική μπορεί να πραγματοποιηθεί με χρήση προτύπου ουσίας, ή στατιστικής ανάλυσης του σήματος υποβάθρου ή μέσω της καμπύλης βαθμονόμησης. Στην παρούσα διατριβή για τον καθορισμό του ορίου ανίχνευσης χρησιμοποιήθηκαν οι τεχνικές του καθορισμού του ορίου απόφασης και ο υπολογισμός του σήματος υποβάθρου.

Χρήση του ορίου απόφασης ως όριο ανίχνευσης

Η SWGTOX περιγράφει ότι το όριο ανίχνευσης μπορεί να είναι μία συγκέντρωση η οποία έχει οριστεί από τη διοίκηση του εργαστηρίου ως όριο απόφασης. Όταν επιλέγεται αυτή η μέθοδος, πρέπει να αναλύονται κατ' ελάχιστον τρία δείγματα σε τρεις αναλυτικές μέρες εμβολιασμένα στη συγκέντρωση του ορίου απόφασης και να αποδεικνύεται ότι τηρούνται όλα τα κριτήρια ταυτοποίησης.

Υπολογισμός του σήματος υποβάθρου με χρήση προτύπου ουσίας

Το όριο ανίχνευσης υπολογίζεται επίσης από το λόγο σήμα αναλύτη προς το σήμα του θορύβου, χρησιμοποιώντας το λογισμικό του οργάνου.

Μοντέλο βαθμονόμησης

Το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο μοντέλο βαθμονόμησης είναι το απλό μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης χρησιμοποιώντας τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων. Ωστόσο, αυτό το μοντέλο εφαρμόζεται μόνο όταν υπάρχει σταθερή διακύμανση σε ολόκληρο το εύρος συγκέντρωσης. Η SWGTOX αναφέρει πως όταν υπάρχει μια αξιοσημείωτη διαφορά μεταξύ των διακυμάνσεων στις χαμηλότερες και υψηλότερες συγκεντρώσεις, ένα μοντέλο σταθμισμένων ελαχίστων τετραγώνων ή άλλο κατάλληλο μη γραμμικό μοντέλο πρέπει να εφαρμόζεται όπως το πολυωνυμικό. Αυτό γενικά συμβαίνει όταν το εύρος συγκέντρωσης υπερβαίνει τη μία τάξη μεγέθους. Η οδηγία καταλήγει πως η καλύτερη προσέγγιση είναι η χρησιμοποίηση του απλούστερου μοντέλου βαθμονόμησης που ταιριάζει καλύτερα στη σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης. Η καμπύλη βαθμονόμησης πρέπει να γίνεται για κάθε αναλύτη στο βιολογικό δείγμα. Χρησιμοποιείται κατάλληλος αριθμός προτύπων διαλυμάτων για τον καθορισμό της συσχέτισης (μοντέλο βαθμονόμησης, μαθηματικό μοντέλο) μεταξύ συγκεντρώσεως και απόκρισης του ανιχνευτή ή συγκεντρώσεως και του λόγου μεταξύ των αποκρίσεων αναλύτη/εσωτερικού προτύπου. Η καμπύλη βαθμονόμησης πρέπει να ετοιμάζεται στο ίδιο βιολογικό υπόστρωμα όπως και οι αναλύτες οι οποίοι θα προσδιοριστούν με εμβολιασμό του βιολογικού υποστρώματος με γνωστές συγκεντρώσεις των αναλυτών. Ο αριθμός και οι συγκεντρώσεις των προτύπων διαλυμάτων που θα χρησιμοποιηθούν για το σχηματισμό της καμπύλης αναφοράς πρέπει να καλύπτουν το εύρος των αναλυτικών συγκεντρώσεων για τον προσδιορισμό αγνώστων δειγμάτων. Η καμπύλη βαθμονόμησης πρέπει να αποτελείται από ένα λευκό δείγμα (κατεργασμένο δείγμα αποτελούμενο από το βιολογικό υπόστρωμα χωρίς την παρουσία αναλύτη/εσωτερικού προτύπου) και έξι τουλάχιστον δείγματα εμβολιασμένα με πρότυπα διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων που να καλύπτουν το αναμενόμενο αναλυτικό εύρος συγκεντρώσεων, εκτός του τυφλού δείγματος και περιλαμβανομένου του LOQ. Κάθε δείγμα αναλύεται μία φορά. Η καμπύλη βαθμονόμησης θα πρέπει να επαναληφθεί κατ' ελάχιστον πέντε φορές σε διαφορετικές ημέρες. Σύμφωνα με την οδηγία, κριτήρια για την καταλληλότητα του επιλεγθέντος μοντέλου βαθμονόμησης αποτελούν ο συντελεστής προσδιορισμού και η οπτική αξιολόγηση των διαγραμμάτων υπολοίπων (residual plots). Τα διαγράμματα υπολοίπων επιτρέπουν α) την ανίχνευση αποκλινοσών τιμών με στατιστικά σημαντική διαφορά (π.χ. μεγαλύτερη του ± 3 τυπικές αποκλίσεις) οι οποίες πρέπει να βελτιωθούν και β) να εκτιμηθεί εάν η διασπορά είναι σταθερή σε όλη τη δυναμική περιοχή συγκεντρώσεων με όμοιο βαθμό σκέδασης. Τα διαγράμματα υπολοίπων δίνουν μία εκτίμηση, εάν το επιλεγμένο μοντέλο βαθμονόμησης ταιριάζει επαρκώς με τα δεδομένα.

Όριο ποσοτικοποίησης (LOQ)

Ο υπολογισμός του ορίου ποσοτικοποίησης υπολογίζεται α) με τη χρήση του χαμηλότετου μη μηδενικού εμβολιασμένου πρότυπου διαλύματος, ή β) με τη χρήση του ορίου απόφασης ως το όριο ποσοτικοποίησης, ή γ) με χρήση προτύπου ουσίας. Στην παρούσα διατριβή για τον καθορισμό του ορίου ποσοτικοποίησης χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του καθορισμού του ορίου απόφασης. Η SWGTOX περιγράφει ότι το όριο ποσοτικοποίησης μπορεί να είναι μία συγκέντρωση η οποία έχει οριστεί από τη διοίκηση του εργαστηρίου ως όριο απόφασης. Όταν επιλέγεται αυτή η μέθοδος, πρέπει να αναλύονται κατ' ελάχιστον τρία δείγματα σε τρεις αναλυτικές μέρες εμβολιασμένα στη συγκέντρωση του ορίου απόφασης και να αποδεικνύεται ότι τηρούνται όλα τα κριτήρια ταυτοποίησης, σφάλματος, και επαναληψιμότητας.

Ορθότητα

Η ορθότητα αποτελεί μέτρο της εγγύτητας της πειραματικά μετρούμενης τιμής προς την πραγματική συγκέντρωση του αναλύτη (αληθή τιμή). Ως μέτρο έκφρασης της ορθότητας χρησιμοποιείται το επί τους εκατό σχετικό σφάλμα (Er%). Το Er% πρέπει να προσδιορίζεται με χρήση ενοφθαλμισμένων δειγμάτων χρησιμοποιώντας τρία διαφορετικά δείγματα για κάθε συγκέντρωση, σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις εφάπαξ προετοιμασμένων δειγμάτων χαμηλής, μεσαίας και υψηλής συγκέντρωσης, για πέντε διαφορετικές ημέρες. Το μέγιστο επιτρεπτό εύρος αποδοχής του σφάλματος ορίζεται στο $\pm 20\%$.

Πιστότητα

Η πιστότητα εκφράζει την εγγύτητα των αποτελεσμάτων μιας σειράς ανεξάρτητων εφαρμογών της μεθόδου υπό αυστηρά καθορισμένες συνθήκες και εκφράζεται συνήθως με την τυπική απόκλιση (SD), με τη σχετική τυπική απόκλιση %RSD, ή με το εύρος του διαστήματος εμπιστοσύνης. Για ποσοτικούς προσδιορισμούς η πιστότητα πρέπει να αξιολογηθεί κατά την επικύρωση με δύο διαφορετικούς τρόπους, εντός της ίδιας ημέρας ανάλυσης και μεταξύ διαφορετικών ημερών ανάλυσης. Ο προσδιορισμός πρέπει να γίνεται με χρήση εμβολιασμένων δειγμάτων κατ'ελάχιστον με τρία διαφορετικά δείγματα για κάθε συγκέντρωση, σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις εφάπαξ προετοιμασμένων δειγμάτων χαμηλής, μεσαίας και υψηλής συγκέντρωσης, για πέντε διαφορετικές ημέρες. Το μέγιστο επιτρεπτό εύρος αποδοχής του σφάλματος ορίζεται στο $\pm 20\%$.

Εντός της ημέρας πιστότητα

Η εντός της ημέρας επαναληψιμότητα υπολογίζεται για κάθε συγκέντρωση σε κάθε μία από τις πέντε διαφορετικές ημέρες ανάλυσης. Ο υπολογισμός γίνεται χρησιμοποιώντας τις τιμές ποσοτικοποίησης των τριών δειγμάτων ανά συγκέντρωση σύμφωνα με την πιο κάτω εξίσωση:

$$\% \text{ RSD}_{\text{εντός της ίδιας ημέρας}} = (\text{SD}/\text{Mean}) \times 100$$

Όπου SD = Τυπική απόκλιση ανά συγκέντρωση από μία αναλυτική ημέρα, Mean=Μέσος όρος των τριών δειγμάτων από μία αναλυτική ημέρα.

Δια των ημερών πιστότητα

Η διά των ημερών πιστότητα υπολογίζεται για κάθε συγκέντρωση και για όλες τις πέντε ημέρες ανάλυσης. Ο υπολογισμός μπορεί να γίνει συνδυάζοντας της ποσοτικοποιημένες τιμές όλων των ημερών ανά συγκέντρωση, σύμφωνα με την πιο κάτω εξίσωση:

$$\% \text{RSD}_{\text{διά των ημερών}} = (\text{SD}/\text{Mean}) \times 100$$

Όπου SD = Τυπική απόκλιση ανά συγκέντρωση από όλες τις διαφορετικές ημέρες ανάλυσης, Mean= Μέσος όρος των τριών δειγμάτων από όλες τις διαφορετικές ημέρες ανάλυσης.

3.5.2. Κριτήρια ταυτοποίησης αγνώστων ουσιών με φασματόμετρο μαζών

Στην παρούσα διατριβή, για την ταυτοποίηση των αγνώστων ουσιών, εφαρμόστηκαν κριτήρια τα οποία περιγράφονται στην Ευρωπαϊκή οδηγία (2002/657/EC), στο προσχέδιο οδηγίας του OSAC για τα κριτήρια ταυτοποίησης στην Ιατροδικαστική Τοξικολογία, στο προσχέδιο οδηγίας του OSAC για την αποδοχή δεδομένων φασματομέτρου μαζών στην Ιατροδικαστική Τοξικολογία καθώς και στη βιβλιογραφία. Οι παραπάνω αναφορές περιγράφουν μία κοινή διαδικασία για τα κριτήρια ταυτοποίησης μίας άγνωστης ουσίας σε δείγμα όταν χρησιμοποιείται το φασματόμετρο μαζών. Τα κριτήρια περιλαμβάνουν ένα σύστημα ταυτοποίησης συλλογής μονάδων (identification point system) ανάλογα με την τεχνική ταυτοποίησης η οποία χρησιμοποιείται. Σύμφωνα με τις οδηγίες και τη βιβλιογραφία, η ελάχιστη ταυτοποίηση των αγνώστων αναλυτών όταν χρησιμοποιείται χρωματογραφική τεχνική σε συνδυασμό με φασματόμετρο μαζών χαμηλής διαχωριστικής ικανότητας όπως το τριπλό τετράπολο (με διαχωριστική ικανότητα μονάδας), επιτυγχάνεται όταν συλλεγούν τουλάχιστον 4 σημεία ταυτοποίησης. Αυτά τα σημεία ταυτοποίησης πρέπει να προέρχονται από το χρωματογραφικό διαχωρισμό (χρόνο συγκράτησης) των αναλυτών (1 σημείο ταυτοποίησης), και τουλάχιστον δύο μεταπτώσεις του μητρικού ιόντος σε δύο θυγατρικά ιόντα (2 σημεία ταυτοποίησης για κάθε μετάπτωση). Επιπλέον γενικές προϋποθέσεις για την εφαρμογή των πιο πάνω κριτηρίων περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων:

A) Ότι ο χρωματογραφικός διαχωρισμός ο οποίος επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας την ίδια στατική φάση σε συνδυασμό με δύο διαφορετικές τεχνικές ανίχνευσης, αποδίδει ένα σημείο ταυτοποίησης για το χρωματογραφικό διαχωρισμό και επιπλέον σημεία ταυτοποίησης για κάθε τεχνική ανίχνευσης.

Β) Ότι ο χρωματογραφικός διαχωρισμός μπορεί να πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας χρωματογραφική στήλη με διαφορετική πολικότητας. Για κάθε διαφορετική στήλη αποδίδεται ένα σημείο ταυτοποίησης.

Γ) Τη χρήση τουλάχιστον τεσσάρων σημείων ταυτοποίησης όταν χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό λιγότερες από τρεις διαφορετικές τεχνικές.

Δ) Πως όταν δύο ή περισσότερα ιόντα μαζών ανιχνεύονται, ο λόγος ιόντων πρέπει να πληρεί συγκεκριμένα κριτήρια αποδοχής, τα οποία περιγράφονται στο προσχέδιο της οδηγίας του OSAC για την αποδοχή δεδομένων φασματομέτρου μαζών στην Ιατροδικαστική Τοξικολογία..

Ε) Πως δύναται η χρήση βιβλιοθηκών μαζών και τα αποτελέσματα πρέπει να συμπίπτουν ή να υπερτερούν του προκαθορισμένου παράγοντας ταύτισης, ο οποίος περιγράφεται στο προσχέδιο της οδηγίας του OSAC για την αποδοχή δεδομένων φασματομέτρου μαζών στην Ιατροδικαστική Τοξικολογία.

ΣΤ) Ότι διαφορετικές τεχνικές ιονισμού των αναλυτών στη φασματομετρία μαζών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να αυξηθεί ο αριθμός των μονάδων ταυτοποίησης.

Επίσης, ανάλογα με το λόγο της σχετικής έντασης των ιόντων μετάπτωσης (Qualifier MRM) για την ταυτοποίηση ως προς τα ιόντα μετάπτωσης για την ποσοτικοποίηση (Quantifier MRM) το μητρικό ιόν, ο οποίος υπολογίζεται με χρήση ενός εμβολιασμένου διαλύματος, καθορίζονται τα μέγιστα επιτρεπτά όρια τους, που καθορίζουν στη συνέχεια εάν ένα άγνωστο δείγμα είναι θετικό ή αρνητικό.

Για τον ανιχνευτή μαζών οι αποδεκτές αποκλίσεις των λόγων των ιόντων περιγράφονται στον Πίνακα 3.2.

Πίνακας 3.2: Εύρος αποκλίσεων των λόγων των ιόντων για διαφορετικές τεχνικές σε σχέση με τη σχετική τους ένταση		
% Σχετική ένταση ¹ (%)	EI-GC-MS	CI-GC-MS, GC-MS/MS ⁿ , LC-MS, LC-MS/MS ⁿ
>50%	± 10%	± 20%
> 20%-50%	± 15%	± 25%
>10%-20%	± 20%	± 30%
≤10%	± 50%	± 50%

¹Λόγος της σχετικής έντασης των ιόντων μετάπτωσης για την ταυτοποίηση (Qualifier MRM) ως προς τα ιόντα μετάπτωσης για την ποσοτικοποίηση (Quantifier MRM).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφονται οι εργαστηριακές συσκευές, τα υλικά, οι διαλύτες και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία.

4.1 Εργαστηριακές συσκευές

- Αυτόματος αναδευτήρας τύπου δύνης, Vortex Genie 2, Scientific Industries, Inc., (Bohemia, NY, USA), για την ανάδευση δειγμάτων και διαλυμάτων.
- Αυτόματος αναδευτήρας, Ultra Turrax® Tube Drive, IKA (Staufen, Germany) για την ομογενοποίηση των βιολογικών υλικών.
- Αυτόματες πιπέττες τύπου E4XLS,-Rainin, Mettler Toledo (Columbus, OH, USA), μεταβλητού όγκου 5-10 µL, 10-20 µL, 100-200 µL και 100-1000 µL.
- Αυτόματη επαναληπτική πιπέττα τύπου AutoRepE, Rainin, Mettler Toledo (Columbus, OH, USA) μεταβλητού όγκου 1 µL-50 mL.
- Διακριβωμένος αναλυτικός ζυγός τύπου ML 204T, Mettler Toledo (Columbus, OH, USA), τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων με μέγιστο όριο ζύγισης 220 g, για τη ζύγιση αντιδραστηρίων.
- Αναλυτικός ζυγός τύπου CPA 223S, Sartorius, (Goettingen Germany), τριών δεκαδικών ψηφίων, για τη ζύγιση των βιολογικών υλικών.
- Ομογενοποιητής μοντέλο Ultra Turrax® Tube Drive, IKA (Staufen, Germany).
- Διανεμητής υγρών (dispenser) μέγιστου όγκου 50 mL, SOCOREX SWISS (Millville, NJ, USA), για την προσθήκη του διαλύτη στα δείγματα κατά τη διαδικασία της στερεής εκχύλισης.
- Φυγόκεντρος υψηλών σωλήνων 68 θέσεων, τύπου accuspin 3, Fischer Scientific (Fair Lawn, NJ, USA).
- Βαθμονομημένο χρονόμετρο τύπου traceable.
- Συσκευή εξάτμισης, μοντέλο Turbo Vap LV, Biotage (Uppsala, Sweden),. Ο διανεμητής αερίου αζώτου ποικίλει και μπορεί να φέρει έως και 48 θέσεις με δυνατότητα χρήσης όλων ή μερικών θέσεων, ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων.
- Συσκευή παραγωγής νερού υψηλής καθαρότητας (HPLC grade) τύπου Arora (USA).
- Σύστημα εκχύλισης στερεάς φάση θετικής πίεσης, της εταιρίας UCT, (Bristol, PA, USA) που χρησιμοποιείται κατά τη διαδικασία της στερεής εκχύλισης, 48 θέσεων.
- Εργαλεία κλεισίματος και ανοίγματος φιαλιδίων αυτόματου εισαγωγέα.

4.2 Υάλινα σκεύη και αναλώσιμα

- Ογκομετρικοί κύλινδροι χωρητικότητας 25, 100, 200, 250, 500, 1000 και 2000 mL.
- Υάλινοι σωλήνες κωνικής βάσης με βιδωτό πώμα, χωρητικότητας 5 mL. (Disposable Centrifuge tube screw Threal Finish)
- Υάλινες και πλαστικές πιπέτες Pasteur.
- Πλαστικά ρύγχη αυτόματων πιπετών και επαναληπτικής πιπέτας.
- Εργαστηριακές μεταλλικές σπάτουλες.
- Εργαστηριακά κουτάλια.
- Πλαστικά ταψάκια ζύγισης.
- Υάλινες σκουρόχρωμες φιάλες διαλυτών και αντιδραστηρίων με βιδωτό πώμα, χωρητικότητας 200, 500, 1000 και 4000 mL.
- Βαθμονομημένες ογκομετρικές φιάλες παρασκευής διαλυμάτων χωρητικότητας 25, 50, 100, 250, 500 και 1000 mL.
- Πλαστικά δοχεία ομογενοποίησης, χωρητικότητας 15 mL.
- Υάλινα σκουρόχρωμα φιαλίδια με βιδωτό πώμα για την φύλαξη των πρότυπων διαλυμάτων, χωρητικότητας 50 mL.
- Υάλινα διαφανή φιαλίδια αυτόματου εισαγωγέα (vials) με ενσωματωμένα υάλινα μικρο-ενθέματα (micro-inserts), διαφανή, με κωνικό πυθμένα, 11 mm.
- Πώματα Alluminium Thermo Scientific seal 11 mm TFE/RUB.
- Υάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες, χωρητικότητας 16x125mm

4.3 Πρότυπες ουσίες

Τα πρότυπα διαλύματα παρακαταθήκης των αναλυτών και των εσωτερικών τους προτύπων αγοράστηκαν από την εταιρία Cerilliant Corp. (Round Rock, TX, USA).

4.4 Διαλύτες

- Μεθανόλη (CH₃OH), καθαρότητας HPLC (Fisher Chemical).
- Μεθανόλη (CH₃OH), καθαρότητας Optima LC-MS (Fisher Chemical)
- Ακετονιτρίλιο (CH₃CN, ACN), καθαρότητας Optima LC-MS (Fisher Chemical).
- Ισοπροπανόλη (C₃H₇OH), καθαρότητας HPLC (Fisher Chemical).
- Διχλωρομεθάνιο (CH₂Cl₂), καθαρότητας HPLC (Fisher Chemical).
- Αιθανικός αιθυλεστέρας (EtOAc), καθαρότητας HPLC (Fisher Chemical).
- Νερό (H₂O), καθαρότητας HPLC.

4.5 Αντιδραστήρια

- Μυρμηκικό οξύ (HCOOH), καθαρότητας 98-100% LC-MS (Lichropur, Merck, Germany).
- Υδροχλωρικό οξύ (HCl) Certified ACS Plus (Fisher Chemical).
- Οξικό Οξύ (CH₃COOH), καθαρότητας ≥ 99,7% HPLC (Fisher Chemical).
- Διβασικό φωσφορικό νάτριο (Na₂HPO₄) (Fisher Chemical).
- Υδροξείδιο του νατρίου (NaOH) (Fisher Chemical).
- Όξινο φωσφορικό νάτριο (NaH₂PO₄·H₂O), καθαρότητας 98% (Honeywell Fluka).
- Υδροξείδιο του αμμωνίου (NH₄OH) Certified ACS Plus, αναλυτικής καθαρότητας 28-30%.

4.6 Ρυθμιστικά διαλύματα

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 6,0

Ζυγίζονται 6,80 g Na₂HPO₄, και 48,56 g NaH₂PO₄·H₂O και διαλύονται σε 2 L νερού HPLC, σε υάλινο ογκομετρικό κύλινδρο 2 L. Ακολουθεί ήπια μαγνητική ανάδευση του διαλύματος, μεταφορά αυτού σε σκουρόχρωμη υάλινη αναλόγως επισημασμένη φιάλη 4 L και προσθήκη επιπλέον 2 L νερού HPLC. Γίνεται ρύθμιση του pH στην τιμή 6,0 ± 0,1 (εφόσον χρειάζεται), με την προσθήκη μονοβασικού φωσφορικού νατρίου 0,1 M (μείωση του pH) ή με προσθήκη διβασικού φωσφορικού νατρίου 0,1M (αύξηση του pH). Φυλάσσεται στο ψυγείο για έξι μήνες και χρησιμοποιείται κατά την παρασκευαστική πορεία κατεργασίας των δειγμάτων που περιγράφεται στα κεφάλαια 5, 6 και 7.

Υδατικό διάλυμα Na₂HPO₄, 0,1 M

Ζυγίζονται 2,84 g Na₂HPO₄, μεταφέρονται σε υάλινη ογκομετρική φιάλη 200 mL και διαλύονται προσεκτικά με 200 mL νερού HPLC. Ακολουθεί πωματισμός της φιάλης και ανάδευση του μίγματος. Το διάλυμα μεταφέρεται σε αναλόγως επισημασμένο σκουρόχρωμο υάλινο δοχείο 200 mL και φυλάσσεται στο ψυγείο για τρεις μήνες. Χρησιμοποιείται για τη ρύθμιση του pH του ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH 6,0.

Υδατικό διάλυμα NaH₂PO₄·H₂O, 0,1 M

Ζυγίζονται 2,76 g NaH₂PO₄·H₂O, μεταφέρονται σε υάλινη ογκομετρική φιάλη 200 mL και διαλύονται προσεκτικά με 200 mL νερού HPLC. Ακολουθεί πωματισμός της φιάλης και ανάδευση του μίγματος. Το διάλυμα μεταφέρεται σε αναλόγως επισημασμένο σκουρόχρωμο υάλινο δοχείο 200 mL και φυλάσσεται στο ψυγείο για τρεις μήνες. Χρησιμοποιείται για τη ρύθμιση του pH του ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH 6,0.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΑΡΩΣΗΣ UHPLC-ESI/MS/MS ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ 19 ΕΞΑΡΤΗΣΙΟΓΟΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΕ ΠΡΟΘΑΝΑΤΙΟ ΚΑΙ ΜΕΤΑΘΑΝΑΤΙΟ ΟΛΙΚΟ ΑΙΜΑ

5.1 Εισαγωγή

Την τελευταία δεκαετία, η τάση στη χρήση εξαρτησιογόνων ουσιών έχει αλλάξει, με αποτέλεσμα ένας μεγάλος αριθμός νέων ψυχοδραστικών ουσιών να εμφανιστούν ως «νόμιμες» ουσίες εναλλακτικές των παραδοσιακών εξαρτησιογόνων ουσιών. Το καινούργιο αυτό φαινόμενο συνοδεύτηκε με αυξημένα περιστατικά ατόμων στις μονάδες εντατικής θεραπείας νοσοκομείων μετά από χρήση ουσιών με άγνωστη φαρμακολογική ή/και τοξικολογική δράση. Η οξεία και χρόνια επίδραση αυτών των ουσιών δεν είναι πάντα γνωστή, ενώ δεδομένα ασφαλείας σχετικά με την τοξικότητά τους συνήθως δεν είναι διαθέσιμα. Η καταγραφή περισσότερων από 800 νέων ψυχοδραστικών ουσιών από το 2009 μέχρι σήμερα, δημιουργεί καινούργια επιστημονικά δεδομένα και ανάγκη για την ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό αυτών των ουσιών σε βιολογικά υλικά. Σύμφωνα με την τελευταία έκθεση των Ηνωμένων Εθνών¹, οι συνθετικές καθιόνες αποτελούν μία από τις δύο μεγαλύτερες κατηγορίες ουσιών μαζί με τα συνθετικά κανναβινοειδή.

Οι ανοσοενζυμικές τεχνικές μαζί με τη φασματομετρία μαζών συνδυασμένη είτε με αεριοχρωματογραφία (GC-MS) είτε με υγροχρωματογραφία (LC-MS/MS) αποτελούν τις κύριες τεχνικές ανάλυσης που χρησιμοποιούν τα τοξικολογικά εργαστήρια είτε για τον προκαταρκτικό έλεγχο (ανοσοενζυμικές τεχνικές) είτε για τον ταυτόχρονο ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό (GC-MS, LC-MS/MS), για την πιθανή ύπαρξη κάποιας εξαρτησιογόνου ουσίας. Στις αναλύσεις αυτές το ολικό αίμα (προθανάτιο ή/και μεταθανάτιο) και τα ούρα αποτελούν τα βιολογικά δείγματα επιλογής, που ελέγχονται για την ύπαρξη μητρικών ουσιών ή/και προϊόντων μεταβολισμού αυτών. Τα τοξικολογικά εργαστήρια για να επιτύχουν την ανίχνευση τόσο διαφορετικών και πολλών μορίων μεταξύ τους, χρησιμοποιούν περισσότερα του ενός αναλυτικών πρωτοκόλλων ποιοτικού προσδιορισμού, προσαρμοσμένα σε ομάδες ουσιών, παρά σε ξεχωριστές αναλύσεις ουσιών, με αποτέλεσμα να χρησιμοποιούνται α) διαφορετικοί τρόποι κατεργασίας των δειγμάτων προσαρμόζοντας παραμέτρους όπως το pH, το διαλύτη κατά την υγρή-υγρή εκχύλιση και το υπόστρωμα της εκχύλισης στερεάς φάσης όταν οι τελευταίες δύο διαδικασίες χρησιμοποιούνται, και β) διαφορετικές τεχνικές ανάλυσης. Λαμβάνοντας υπόψη το συνεχώς αυξανόμενο αριθμό εξαρτησιογόνων ουσιών και αναλυόμενων δειγμάτων, αλλά και τις συνεχώς αυξανόμενες απαιτήσεις στο χρόνο έκδοσης των αποτελεσμάτων, και το υψηλό κόστος των αναλύσεων, η ανάπτυξη αναλυτικών διαδικασιών ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού που να επιτυγχάνουν

την ταυτόχρονη ανίχνευση μεγάλου αριθμού ουσιών καθίσταται πρωτεύουσας σημασίας για τα τοξικολογικά εργαστήρια.

Για πολλά χρόνια ο συνδυασμός της αεριοχρωματογραφίας με τη φασματομετρία μαζών αποτελούσε την κύρια εφαρμοζόμενη αναλυτική τεχνική για τον ποιοτικό προσδιορισμό εξαρτησιογόνων ουσιών. Παρολ' αυτά, αυτή η τεχνική παρουσιάζει το μειονέκτημα της αδυναμίας ανάλυσης θερμοευαίσθητων ουσιών, ενώ η επίπονη παρασκευαστική προκατεργασία που απαιτείται για την ανάλυση πολικών και μη πτητικών ουσιών, καθιστά δύσκολη την εφαρμογή της για την ανάλυση αυτού του είδους ουσιών. Την τελευταία δεκαπενταετία, ο συνδυασμός της δίδυμης φασματομετρίας μαζών με την υγροχρωματογραφία υπερυψηλής απόδοσης, βρίσκει όλο και περισσότερες εφαρμογές στην τοξικολογική ανάλυση, αφού επιτρέπει την ταυτόχρονη ανίχνευση πολλών ουσιών με εξαιρετική ευαισθησία και εκλεκτικότητα σε σύντομο χρονικό διάστημα.

Τα τελευταία χρόνια έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία ένας σημαντικός αριθμός εργασιών που αφορούν στον ταυτόχρονο ποιοτικό προσδιορισμό μεγάλου αριθμού εξαρτησιογόνων ουσιών, γεγονός που υποστηρίζει την ανάγκη για την ανάπτυξη τέτοιων αναλυτικών πρωτοκόλλων. Στις εργασίες αυτές ο συνδυασμός υγροχρωματογραφίας υπερυψηλής απόδοσης-δίδυμης φασματομετρίας μαζών αποτελεί την κατεξοχήν χρησιμοποιούμενη αναλυτική τεχνική ανίχνευσης των εξαρτησιογόνων ουσιών σε προ-θανάτιο και μεταθανάτιο ολικό αίμα καθώς και σε ούρα. Οι σχετικές βιβλιογραφικές αναφορές για το ολικό αίμα παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.1, όπου παρουσιάζονται πληροφορίες για τα αναλυτικά πρωτόκολλα που ακολουθήθηκαν.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφική ανασκόπηση, ο συνδυασμός της υγροχρωματογραφίας υπερυψηλής απόδοσης με συστήματα δίδυμης φασματοφωτομετρίας μαζών τριπλού τετραπλού, έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για τον ποιοτικό προσδιορισμό μεγάλου αριθμού εξαρτησιογόνων ουσιών, επιτυγχάνοντας εξαιρετική ευαισθησία και ταχεία ανάλυση των δειγμάτων. Η χρησιμοποίηση πληρωτικών υλικών χρωματογραφίας με μικρό μέγεθος σωματιδίων, οδηγεί στον ταχύ και ικανοποιητικό διαχωρισμό των αναλυτών επιτυγχάνοντας σημαντική μείωση του χρόνου ανάλυσης σε σχέση με τη συμβατική υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης. Επίσης, ενώ το εύρος των χρωματογραφικών κορυφών ελαττώνεται η χρήση αναλυτών ταχείας σάρωσης όπως ο αναλυτής τριπλού τετραπλού επιτρέπει τη λήψη ικανοποιητικού αριθμού μετρήσεων για τον ορθή καταγραφή μιας χρωματογραφικής κορυφής. Προϋπόθεση είναι να έχει προεπιλεγεί η απομόνωση των ουσιών, η θραύση και η παρακολούθηση επιλεγμένων μητρικών και θυγατρικών ιόντων στον αναλυτή τριπλού τετραπλού.

Πίνακας 5.1: Βιβλιογραφικές αναφορές αναλύσεων με την τεχνική LC-MS/MS ψυχοδιεγερτικών ενώσεων σε ολικό αίμα.

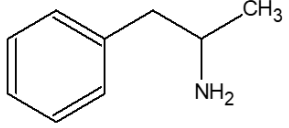
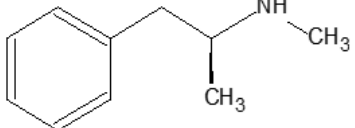
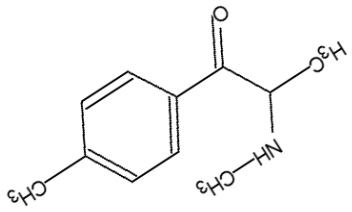
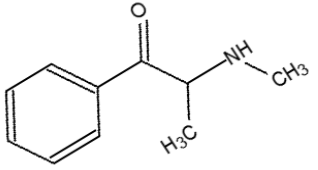
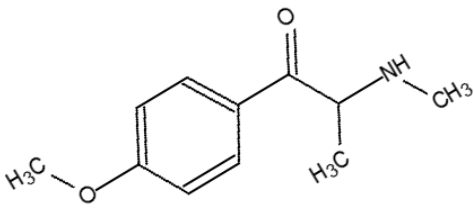
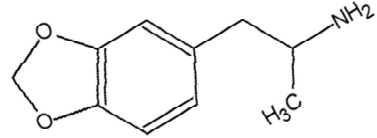
Αναλύτες	Αναλυτική μέθοδος	Βιβλιογραφία
<i>amphetamines, tryptamines, piperazines</i>	LC-MS/MS, αναλυτική στήλη: Synergi Polar RP 150 x 2 mm, μέγεθος σωματιδίων 4 μm, κινητή φάση: μυρμηκικό αμμώνιο 1,0 mM με 0,1 % μυρμηκικού οξέος/μεθανόλη με 0,1 % μυρμηκικού οξέος, βαθμιδωτή έκλυση, ταχύτητα ροής: 0,25 mL/min	Μέθοδος σάρωσης LC-MS/MS συνθετικών αμφεταμινών, τρυπταμινών και πιπεραζινών σε δείγματα ορού [144]
<i>amphetamine, methamphetamine, MDA, MDMA, cannabinoids, benzodiazepines, opioids, cocaine, methadone</i>	LC-MS/MS, αναλυτική στήλη: Luna C18 (2) 100 A, 150 x 2 mm, 5 μm, κινητή φάση: (A): Νερό/ μεθανόλη 95/5 (v/v) με 10 mM οξικό αμμώνιο και 0,1 % οξικού οξέος/ (B): Νερό/ μεθανόλη 3/97 (v/v) με 10 mM οξικό αμμώνιο και 0,1 % οξικού οξέος, βαθμιδωτή έκλυση, ταχύτητα ροής: 0,2 mL/min	Μέθοδος σάρωσης LC-MS/MS συνθετικών αμφεταμινών, κανναβινοειδών, οπιούχων, βενζοδιαζεπινών, cocaine και methadone σε δείγματα ορού, ούρων και καρδιακό αίμα [145]
<i>amphetamine, methamphetamine, ephedrine/pseudoephedrine, Methylone, ethylone, Methedrone, mephedrone, phentermine, MDA, MDMA, alpha-PVP και άλλων ουσιών</i>	LC-MS/MS, αναλυτική στήλη: Poroshell EC-C18 3 x 50 mm, μέγεθος σωματιδίων 2,7 μm, κινητή φάση: μυρμηκικό αμμώνιο 5,0 mM με 0,01 % μυρμηκικού οξέος/μεθανόλη με 0,01 % μυρμηκικού οξέος, βαθμιδωτή έκλυση, ταχύτητα ροής: 0,5 mL/min	Μέθοδος σάρωσης LC-MS/MS συνθετικών αμφεταμινών σε δείγματα μεταθανάτιου ολικού αίματος, καρδιακού αίματος και ούρων [146]
<i>Mephedrone/methylcathinone και MDPV</i>	LC-MS, αναλυτική στήλη Waters Xbridge C18, κινητή φάση: μυρμηκικό αμμώνιο 5,0 mM pH 3 με μυρμηκικό οξύ /ακετονιτρίλιο με 0,01% μυρμηκικού οξέος (95/5 v/v), βαθμιδωτή έκλυση, ταχύτητα ροής: 0,2 mL/min	Μέθοδος σάρωσης LC-MS συνθετικών καθινονών και σύγκριση των αποτελεσμάτων με αυτά της ELISA σε δείγματα ούρων [147]

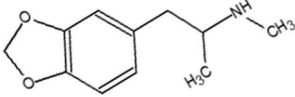
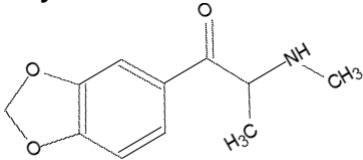
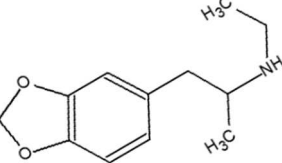
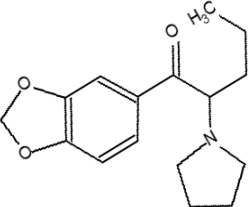
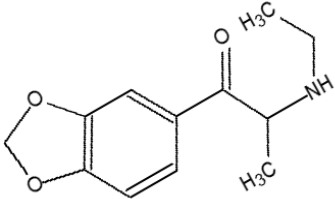
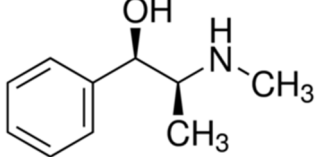
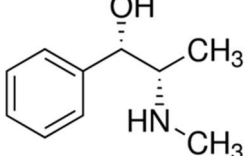
Αντικείμενο της παρούσας εργασίας ήταν η ανάπτυξη μεθόδου σάρωσης UHPLC-ESI/MS/MS την ταυτοποίηση εξαρτησιογόνων ουσιών, παραγώγων του phenethylamine, σε προθανάτιο και μεταθανάτιο ολικό αίμα. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε σύστημα υγροχρωματογραφίας υπερυψηλής απόδοσης συζευγμένο με δίδυμη φασματομετρία μαζών τριπλού τετραπλού (UHPLC-MS/MS) της εταιρίας Agilent Technologies. Η αναπτυχθείσα μέθοδος επικυρώθηκε και έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα για τις ουσίες που μελετήθηκαν.

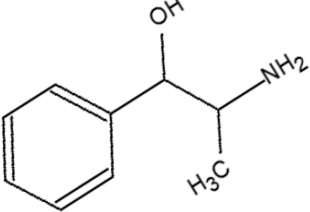
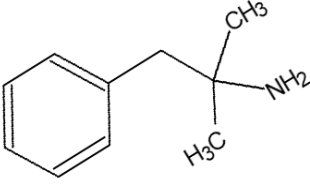
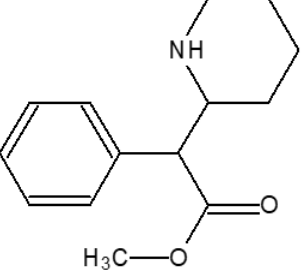
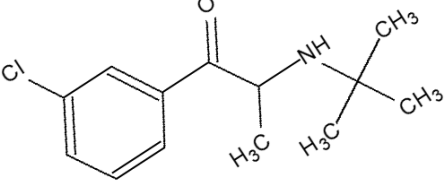
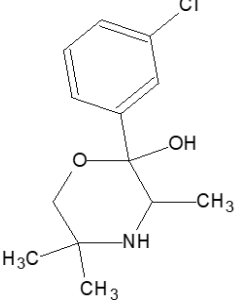
5.1.1 Ψυχοδραστικές ουσίες που μελετήθηκαν

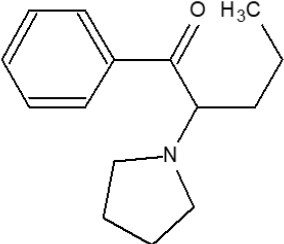
Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν ουσίες που ανήκουν στην ομάδα των παραγώγων του phenethylamine με διεγερτική δράση, λαμβάνοντας υπόψη τις πληροφορίες για το μεταβολισμό και τη φαρμακοκινητική της κάθε ουσίας. Οι εξαρτησιογόνες ουσίες και οι μεταβολίτες αυτών που μελετήθηκαν ήταν τα amphetamine, methamphetamine, 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA), 3,4-methylene-dioxy-methamphetamine (MDMA), 3,4-methylenedioxy-N-ethylamphetamine (MDEA), mephedrone, methedrone, methylone, ethylone, methcathinone, methylenedioxypropylone (MDPV), Alpha- pyrrolidinovalerophenone (Alpha-PVP), ephedrine, pseudoephedrine, methylphedinate, phentermine, phenylpropanolamine, bupropion, και ο μεταβολίτης του bupropion, το hydroxybupropion. Οι χημικές δομές και ορισμένες φυσικοχημικές ιδιότητες των αναλυτών παρουσιάζονται στον πίνακα 5.2.

Η γνώση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των ενώσεων με φαρμακολογική δράση είναι μεγάλης σημασίας κατά τη διαδικασία της ανάπτυξης μίας αναλυτικής μεθοδολογίας. Πληροφορίες για τις ιδιότητες μπορεί να συλλεχθούν είτε μέσω κατάλληλων λογισμικών προγραμμάτων που παράγουν τις κατάλληλες πληροφορίες είτε μέσω βιβλιογραφικής έρευνας. Πληροφορίες σχετικές με τις σταθερές διάστασης, τους συντελεστές κατανομής, την πτητικότητα, τη χρωματογραφική συμπεριφορά και τη διαλυτότητα, είναι χρήσιμες και μπορούν να επισπεύσουν την πορεία της ανάπτυξης της αναλυτικής μεθόδου. Η σταθερά διάστασης και οι συντελεστές κατανομής μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη αποδοτικών διαδικασιών υγρής/υγρής εκχύλισης και εκχύλισης στερεάς φάσης, ενώ οι πληροφορίες σχετικές με την πτητικότητα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την επιλογή της καλύτερης τεχνικής ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης του αναλύτη που μας ενδιαφέρει. Η γνώση αυτών των παραμέτρων είναι πολύ σημαντική τόσο κατά το στάδιο απομόνωσης τους από τα βιολογικά δείγματα όσο και κατά το στάδιο του χρωματογραφικού διαχωρισμού και προσδιορισμού τους.

Πίνακας 5.2: Χημικές δομές και ορισμένες φυσικοχημικές ιδιότητες των αναλυτών	
<p>Amphetamine</p> 	<p>Μοριακό βάρος: 135,21 g mol⁻¹ Μοριακός τύπος: C₉H₁₃N Log P= 1,76 pKa: 9,7 (Strongest Basic) IUPAC: 1-phenylpropan-2-amine</p>
<p>Methamphetamine</p> 	<p>Μοριακό βάρος: 149,23 g mol⁻¹ Μοριακός τύπος: C₁₀H₁₅N Log P= 2,07 pKa: 9,7 (Strongest Basic) IUPAC: (2S)-N-methyl-1-phenylpropan-2-amine</p>
<p>Mephedrone</p> 	<p>Μοριακό βάρος: 177,24 g mol⁻¹ Μοριακός τύπος: C₁₁H₁₅NO Log P= 2,39 pKa: 7,6 (Strongest Basic) IUPAC: 2-(methylamino)-1-(4-methylphenyl) propan-1-one</p>
<p>Ephedrone (Methcathinone)</p> 	<p>Μοριακό βάρος: 163,22 g mol⁻¹ Μοριακός τύπος: C₁₀H₁₃NO Log P= 2,39 pKa: 7,6 (Strongest Basic) IUPAC: 2-(methylamino)-1-phenylpropan-1-one</p>
<p>Methoxyphedrine (Methedrone)</p> 	<p>Μοριακό βάρος: 193,240 g mol⁻¹ Μοριακός τύπος: C₁₁H₁₅NO₂ Log P= 1,8 pKa: 7,6 (Strongest Basic) IUPAC: 1-(4-methoxyphenyl)-2-(methylamino) propan-1-one</p>
<p>3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA)</p> 	<p>Μοριακό βάρος: 179,22 g mol⁻¹ Μοριακός τύπος: C₁₀H₁₃NO₂ Log P= 1,64 pKa: 8,8 (Strongest Basic) IUPAC: 1-(1,3-benzodioxol-5-yl) propan-2-amine</p>

<p>3,4-methylene-dioxy-methamphetamine (MDMA)</p> 	<p>Μοριακό βάρος: 193,24 g mol⁻¹ Μοριακός τύπος: C₁₁H₁₅NO₂ Log P= 2,15 pKa: 8,8 (Strongest Basic) IUPAC: 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-N-methylpropan-2-amine</p>
<p>Methylone</p> 	<p>Μοριακό βάρος: 207,230 g mol⁻¹ Μοριακός τύπος: C₁₁H₁₃NO₃ Log P= 1,91 pKa: 7,6 (Strongest Basic) IUPAC: 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-(methylamino) propan-1-one</p>
<p>3,4-methylenedioxy-N-ethylamphetamine (MDEA)</p> 	<p>Μοριακό βάρος: 207,270 g mol⁻¹ Μοριακός τύπος: C₁₂H₁₇NO₂ Log P= 2,5 pKa: 8,8 (Strongest Basic) IUPAC: 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-N-ethylpropan-2-amine</p>
<p>Methylenedioxypropylone (MDPV)</p> 	<p>Μοριακό βάρος: 275,340 g mol⁻¹ Μοριακός τύπος: C₁₆H₂₁NO₃ Log P= 1,9 pKa: 7,6 (Strongest Basic) IUPAC: 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-pyrrolidin-1-ylpentan-1-one</p>
<p>Ethylone</p> 	<p>Μοριακό βάρος: 221,250 g mol⁻¹ Μοριακός τύπος: C₁₂H₁₅NO₃ Log P= 1,8 pKa: 7,6 (Strongest Basic) IUPAC: 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-(ethylamino) propan-1-one</p>
<p>Ephedrine</p> 	<p>Μοριακό βάρος: 165,23 g mol⁻¹ Μοριακός τύπος: C₁₀H₁₅NO Log P= 1,13 pKa: 9,2 (Strongest Basic) IUPAC: (1R,2S)-2-(methylamino)-1-phenylpropan-1-ol</p>
<p>Pseudoephedrine</p> 	<p>Μοριακό βάρος: 165,23 g mol⁻¹ Μοριακός τύπος: C₁₀H₁₅NO Log P= 0,89 pKa: 9,2 (Strongest Basic) IUPAC: (1S,2S)-2-(methylamino)-1-phenylpropan-1-ol</p>

<p>Phenylpropanolamine (Norephedrine)</p> 	<p>Μοριακό βάρος: 151,21 g mol⁻¹ Μοριακός τύπος: C₉H₁₃NO Log P= 0,67 pKa: 9,2 (Strongest Basic) IUPAC: (1S,2R)-2-amino-1-phenylpropan-1-ol</p>
<p>Phentermine</p> 	<p>Μοριακό βάρος: 149,23 g mol⁻¹ Μοριακός τύπος: C₁₀H₁₅N Log P= 1,9 pKa: 9,7 (Strongest Basic) IUPAC: 2-methyl-1-phenylpropan-2-amine</p>
<p>Methylphenidate</p> 	<p>Μοριακό βάρος: 233,31 g mol⁻¹ Μοριακός τύπος: C₁₄H₁₉NO₂ Log P= 0,2 pKa: 8,9 (Strongest Basic) IUPAC: methyl 2-phenyl-2-piperidin-2-ylacetate</p>
<p>Bupropion</p> 	<p>Μοριακό βάρος: 239,740 g mol⁻¹ Μοριακός τύπος: C₁₃H₁₈ClNO Log P= 1,9 pKa: 7,6 (Strongest Basic) IUPAC: 2-(tert-butylamino)-1-(3-chlorophenyl)propan-1-one</p>
<p>Hydroxy bupropion</p> 	<p>Μοριακό βάρος: 255,740 g mol⁻¹ Μοριακός τύπος: C₁₃H₁₈ClNO₂ Log P= 1,9 pKa: 9,6 (Strongest Basic) IUPAC: 2-(3-chlorophenyl)-3,5,5-trimethylmorpholin-2-ol</p>

<p>Alpha- pyrrolidinovalerophenone (Alpha-PVP)</p> 	<p>Μοριακό βάρος: 231,330 g mol⁻¹ Μοριακός τύπος: C₁₅H₂₁NO Log P= 2,7 pKa: 7,6 (Strongest Basic) IUPAC: 1-phenyl-2-pyrrolidin-1-ylpentan-1-one</p>
---	--

Η μέθοδος αξιολογήθηκε ως προς τα κύρια χαρακτηριστικά ποιότητας (όριο ανίχνευσης, επίδραση υποστρώματος, ανάκτηση, ειδικότητας/εκλεκτικότητα και έλεγχος επιμόλυνσης εκ μεταφοράς), χρησιμοποιώντας εμβολιασμένα δείγματα ανθρώπινου ολικού αίματος. Η μέθοδος εφαρμόστηκε σε δείγματα ολικού αίματος τοξικολογικών υποθέσεων.

5.2 Εξοπλισμός- Οργανολογία

5.2.1 Σύστημα UHPLC-ESI-MS/MS

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε σύστημα UHPLC-MS/MS της εταιρίας Agilent Technologies, Inc, (Η.Π.Α.). Το σύστημα UHPLC αποτελείται από αντλία βαθμιδωτής έκλουσης μοντέλο G1312B, με on-line σύστημα απαέρωσης μοντέλο G1379B, θερμοστάτης χρωματογραφικών στηλών μοντέλο G1316A και αυτόματο δειγματολήπτη μοντέλο G1367E με θερμοστάτη μοντέλο G1330B αντίστοιχα. Το φασματόμετρο μαζών διαθέτει πηγή ιοντισμού ESI μοντέλο G1948B (ESI) και τριπλό τετραπολικό αναλυτή μαζών, γεννήτρια αζώτου της εταιρίας RJM Sales Inc, μοντέλο N2-14. Η επεξεργασία των φασμάτων και των χρωματογραφημάτων μαζών πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό MassHunter (version B.07.01./Build 7.1.524.0 for QQQ).

5.2.2 Συνθήκες λειτουργίας του συστήματος UHPLC

Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε σε αναλυτική στήλη Poroshell 120EC-C18, 2,1 x 75 mm, μεγέθους σωματιδίων 2,7 μm, της εταιρίας Agilent Technologies, Inc (U.S.A). Η κινητή φάση αποτελούταν από υδατικό διάλυμα μυρμηκικού οξέος 0.1% (A) και ακετονιτριλίου με προσθήκη μυρμηκικού οξέος 0.1% (B). Πραγματοποιήθηκε βαθμιδωτό πρόγραμμα έκλουσης όπως φαίνεται στον Πίνακα 5.3.

Πίνακας 5.3: Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλυσης της κινητής φάσης

Χρόνος (min)	Κινητή Φάση Α	Κινητή Φάση Β
2,0	98%	2%
4,0	90%	10%
7,0	70%	30%
9,0	10%	90%
10,50	10%	90%
11,0	98%	2%

Η ταχύτητα ροής στο χρωματογραφικό σύστημα ρυθμίστηκε στα 0,4 mL min⁻¹. Η θερμοκρασία της στήλης κατά τη διάρκεια των πειραμάτων ρυθμίστηκε στους 45 °C ενώ η θερμοκρασία του αυτόματου δειγματολήπτη ρυθμίστηκε στους 5 °C. Ο όγκος έγχυσης ρυθμίστηκε στο 1 μL και ο χρόνος ανάλυσης για κάθε ένεση ήταν 11 λεπτά με επιπλέον δύο λεπτά (post-run) ώστε να σταθεροποιηθεί η στήλη με την αρχική σύσταση της κινητής φάσης.

5.2.1.2 Συνθήκες λειτουργίας του φασματομέτρου μαζών

Η ανίχνευση των αναλυτών πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροψεκασμό, σε θετικό ιοντισμό ESI(+). Η θερμοκρασία της πηγής ιοντισμού και η ταχύτητα ροής του αερίου αζώτου ρυθμίστηκαν στους 350°C και 10 L min⁻¹, αντίστοιχα. Η πίεση του αερίου στη βελόνα νεφελοποίησης ρυθμίστηκε στα 45 psi, ενώ το δυναμικό του τριχοειδούς ρυθμίστηκε στα 3,0 kV. Το δυναμικό της πηγής ιοντισμού που μπορεί να οδηγήσει σε θραύση των ιόντων των αναλυτών (fragmentor voltage), η ενέργεια θραύσης (collision energy) καθώς και τα ιόντα των θυγατρικών ιόντων για κάθε ένα αναλύτη χωριστά επιλέχθηκαν ύστερα από βελτιστοποίηση των συνθηκών με τη χρήση του λογισμικού συστήματος βελτιστοποίησης παραμέτρων του οργάνου. Στον πίνακα 5.4 παρουσιάζονται οι χρόνοι έκλυσης των αναλυτών και οι βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας του φασματομέτρου μαζών. Στη συνέχεια, με τη χρήση του αλγόριθμου δυναμικού παρακολούθησης επιλεγμένων αντιδράσεων θραύσης ιόντων (dynamic MRM) έγινε μετατροπή της παρακολούθησης επιλεγμένων αντιδράσεων θραύσης ιόντων (MRM) σε dMRM. Πιο συγκεκριμένα, η επιλογή dMRM επιτρέπει στο φασματομέτρο μαζών να αποκτά δεδομένα MRM μόνο κατά τη διάρκεια ενός καθορισμένου χρονικού διαστήματος, μειώνοντας έτσι τον αριθμό των ταυτόχρονων μεταπτώσεων. Τα πλεονεκτήματα αυτής της διαδικασίας είναι η βελτιωμένη ευαισθησία, η καλύτερη συμμετρία των χρωματογραφικών κορυφών καθώς και η μέχρι δέκα φορές αύξηση της αναλογίας σήμα προς θόρυβο (S/N) [148].

Πίνακας 5.4: Βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας του φασματομέτρου μαζών

Αναλύτης	tR (min)	Μητρικό ιόν (Q1, m/z)	Θυγατρικά ιόντα (Q3, m/z)*	Δυναμικό θραύσης (V)	Δυναμικό ιοντισμού (V)	πηγής
<i>Amphetamine</i>	4,81	136,1	91,1 119,1	17 6	70	
<i>Bupropion</i>	7,71	240,1	184,1 139	10 26	80	
<i>Ephedrine</i>	3,9	166,1	148,1 91,1	10 38	75	
<i>Hydroxy bupropion</i>	6,96	256,1	238,1 139	6 30	70	
<i>MDA</i>	5,35	180,1	163,1 105,1	6 22	70	
<i>MDEA</i>	6,21	208,1	163 135	20 10	90	
<i>MDMA</i>	5,69	194,1	163,1 105,1	10 26	80	
<i>Methamphetamine</i>	5,35	150,1	91,1 119,1	21 6	80	
<i>Methylphenidate</i>	7,05	234,2	84,1 56,1	18 54	90	
<i>Phentermine</i>	5,94	150,1	91,1 65,1	22 46	65	
<i>Phenylpropanolamine</i>	2,81	152,1	134,1 91,1	6 34	60	
<i>Pseudoephedrine</i>	4,25	166,1	148,1 91,1	10 34	70	
<i>alpha-PVP</i>	7,15	232,2	91,1 126,1	22 26	115	
<i>Ethylone</i>	5,48	222,1	174,1 91,1	18 46	80	
<i>MDPV</i>	7,33	276,2	126,1 135	30 30	95	
<i>Mephedrone</i>	6,09	178,1	160,1 145,1	10 22	85	
<i>Methcathinone</i>	3,99	164,1	146,1 51,1	10 73	90	
<i>Methedrone</i>	5,54	194,1	176,1 161,1	10 22	80	
<i>Methylone</i>	4,78	208,1	160,1 132,1	14 30	90	
<i>Amphetamine -d11</i>	4,69	174,2	98,1	18	65	
<i>Methamphetamine -d11</i>	5,25	161,2	97,1	18	75	
<i>Ephedrine -d3</i>	3,9	169,1	151,1	10	70	
<i>Pseudoephedrine -d3</i>	4,23	169,1	151,1	10	75	
<i>MDA -d5</i>	5,32	185,1	168,1	6	65	
<i>MDEA -d5</i>	6,2	213,2	163,1	10	80	
<i>Norpseudoephedrine -d3</i>	3,22	155,1	137,1	6	60	
<i>MDMA -d5</i>	5,67	199,2	165,1	10	85	
<i>Phentermine -d5</i>	5,89	155,2	96,1	22	65	
<i>Hydroxybupropion -d6</i>	6,94	262,1	244,1	6	80	
<i>Bupropion -d9</i>	7,68	249,2	185	10	70	
<i>Methylphenidate -d9</i>	7,03	243,2	93,2	20	90	
<i>Mephedrone-d3</i>	6,09	181,1	163,1	10	75	
<i>Methylone- d3</i>	4,78	211,1	163,1	14	75	

5.3 Διαλύματα παρακαταθήκης και διαλύματα εργασίας

5.3.1 Διαλύματα παρακαταθήκης

Τα διαλύματα παρακαταθήκης των αναλυτών και των εσωτερικών τους προτύπων προμηθεύτηκαν από την εταιρία Cerilliant (USA). Τα διαλύματα παρακαταθήκης φυλάσσονται σε

σκουρόχρωμα φιαλίδια σε θερμοκρασία -20°C και παραμένουν σταθερά σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρίας. Η συγκέντρωση των διαλυμάτων παρακαταθήκης για τους αναλύτες είναι 1 mg/mL ενώ αυτή των εσωτερικών προτύπων 100 µg/mL.

5.3.2 Διάλυμα Εργασίας

Για τον εμβολιασμό των δειγμάτων ελέγχου που χρησιμοποιήθηκαν για την επικύρωση της προτεινόμενης μεθόδου, παρασκευάστηκαν μικτά διαλύματα εργασίας λαμβάνοντας κατάλληλους όγκους από τα πρότυπα διαλύματα παρακαταθήκης, και αραιώνοντας με χρήση μεθανόλης καθαρότητας HPLC, σε ογκομετρική φιάλη των 50 mL (Πίνακας 5.5 και 5.6)

Πίνακας 5.5: Μικτό διάλυμα εργασίας Α			
Αναλύτης	Συγκέντρωση Προτύπου (mg/mL)	Προστιθέμενος όγκος προτύπου διαλύματος (µL)	Τελική Συγκέντρωση (µg/mL)
Amphetamine	1	500	10
Methamphetamine	1	500	10
Phenylpropanolamine	1	500	10
Ephedrine	1	500	10
Pseudoephedrine	1	500	10
MDA	1	500	10
MDMA	1	500	10
Phentermine	1	500	10
MDEA	1	500	10
Hydroxybupropion	1	500	10
Methylphenidate	1	500	10
Bupropion	1	500	10

Πίνακας 5.6: Μικτό διάλυμα εργασίας Β			
Αναλύτης	Συγκέντρωση Προτύπου (mg/mL)	Προστιθέμενος όγκος προτύπου διαλύματος (µL)	Τελική Συγκέντρωση (µg/mL)
alpha-PVP	1	500	10
Ethylone	1	500	10
MDPV	1	500	10
Mephedrone	1	500	10
Methcathinone	1	500	10
Methedrone	1	500	10
Methylone	1	500	10

5.3.3 Διάλυμα εργασίας εσωτερικών προτύπων

Λαμβάνοντας κατάλληλους όγκους από τα πρότυπα διαλύματα παρακαταθήκης των εσωτερικών προτύπων αραιώνονται με χρήση μεθανόλης καθαρότητας HPLC, σε ογκομετρική φιάλη των 50 mL (Πίνακας 5.7)

Πίνακας 5.7: Μικτό διάλυμα εργασίας εσωτερικών προτύπων			
Αναλύτης	Συγκέντρωση προτύπου διαλύματος (µg/mL)	Προστιθέμενος όγκος προτύπου διαλύματος (µL)	Τελική Συγκέντρωση (µg/mL)
Amphetamine-d11	100	500	1
Methamphetamine-d11	100	500	1
MDA-d5	100	500	1
MDMA-d5	100	500	1
Phentermine-d5	100	500	1
Pseudoephedrine-d3	100	500	1
Bupropion-d9	100	500	1
Hydroxybupropion-d6	100	500	1
Ephedrine-d3	100	500	1
MDEA-d5	100	500	1
Nor pseudoephedrine-	100	500	1
Methylphenidate-d9	100	500	1
Mephedrone-d3	100	500	1
Methylone- d3	100	500	1

5.3.4 Εμβολιασμένα δείγματα προθανάτιου και μεταθανάτιου ολικού αίματος που χρησιμοποιήθηκαν για την επικύρωση της προτεινόμενης μεθόδου

Η επικύρωση της μεθόδου πραγματοποιήθηκε με αναλύσεις εμβολιασμένων μεταθανάτιων και προθανάτιων δειγμάτων ολικού αίματος σε τρεις διαφορετικές συγκενρώσεις: 10, 60 και 1600 ng mL⁻¹.

5.4 Βελτιστοποίηση χρωματογραφικού διαχωρισμού

Η ιδανική χρωματογραφική στήλη πρέπει να εξασφαλίζει εκλεκτικότητα, αποδοτικότητα και αναπαραγωγιμότητα ώστε να εξασφαλίζεται καλός διαχωρισμός. Τα παραπάνω χαρακτηριστικά εξαρτώνται από τη διαδικασία κατασκευής της στήλης και από το πληρωτικό υλικό, που συνήθως είναι γέλη πυριτίου. Ορισμένες από τις ιδιότητες του διοξειδίου του πυριτίου, όπως είναι η περιεκτικότητά του σε μέταλλα και η δραστηκότητα των ομάδων σιλανόλης καθορίζουν και τις ιδιότητες της τελικά συνδεδεμένης φάσης επηρεάζοντας έτσι την αναπαραγωγιμότητα της

ανάλυσης και τη συμμετρία των χρωματογραφικών κορυφών. Οι κοινά χρησιμοποιούμενες στήλες αντίστροφης φάσης αποτελούνται από στατική φάση χημικά τροποποιημένης πηκτής πυριτίας με C₁₈, C₈, φαινύλιο και νιτρίλιο. Οι ιδιότητές τους διαφέρουν ανάλογα με τον κατασκευαστή, ωστόσο με την ανάπτυξη της τεχνολογίας κατέστη δυνατό να διασφαλίζεται ο έλεγχος καλής αναπαραγωγιμότητας σε όλο το σύνολο της παραγωγής. Για παράδειγμα, δύο στήλες C₁₈ δεν είναι ποτέ απόλυτα ίδιες, καθώς διαφέρουν ανάλογα με τον κατασκευαστή στον όγκο των πόρων, το μέγεθος των πόρων, την επιφάνεια επαφής, το μέγεθος των σωματιδίων, και το ποσοστό επικάλυψης των ελεύθερων ομάδων σιλανόλης. Η γεωμετρία της στήλης (μήκος, εσωτερική διάμετρος, μέγεθος σωματιδίων) επηρεάζει σημαντικά το χρωματογραφικό διαχωρισμό [149].

Στη συγκεκριμένη μέθοδο μελετήθηκαν δύο χρωματογραφικές στήλες της εταιρίας Agilent Technologies. Η αναλυτική στήλη Zorbax RRHD Eclipse Plus C-8, διαστάσεων (2,1 x 50 mm) με μεγέθους σωματιδίων 1,8 μm και η αναλυτική στήλη Poroshell 120 EC-C18, διαστάσεων (2,1 x 75 mm) με μέγεθος σωματιδίων 2,7 μm [150]. Καλύτερη διαχωριστική ικανότητα και συμμετρία κορυφών παρατηρήθηκε με τη χρήση της δεύτερης χρωματογραφικής στήλης η οποία και επιλέχθηκε για τη συγκεκριμένη μέθοδο. Η επιλεγείσα στήλη φέρει ως πληρωτικό υλικό σωματίδια Poroshell τα οποία έχουν λεία επιφάνεια και είναι ομοιόμορφα, βελτιώνοντας την αναλυτική απόδοση και την αναπαραγωγιμότητα των χρωματογραφημάτων.

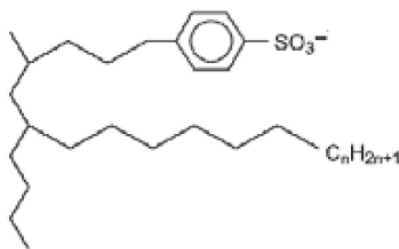
Στη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης το είδος του οργανικού τροποποιητή (π.χ. μεθανόλη, ακετονιτρίλιο) επηρεάζει την εκλεκτικότητα για ουδέτερους και ιοντικούς αναλύτες. Η επιλογή μεταξύ μεθανόλης και ακετονιτρίλιου εξαρτάται από τη διαλυτότητα του αναλύτη και από το χρησιμοποιούμενο ρυθμιστικό διάλυμα. Η τιμή του pH της κινητής φάσης ελέγχεται συνήθως χρησιμοποιώντας κάποιο ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο ευνοεί επίσης τον ιοντισμό των ουσιών. Συνεπώς, για την επιλογή του κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι ακόλουθες παράμετροι: α) η ρυθμιστική χωρητικότητα του διαλύματος και β) η συμβατότητά του με την τεχνική της UHPLC-MS/MS. Συνήθη ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιούνται στην υδροχρωματογραφία - φασματομετρία μαζών αποτελούν το μυρμηκικό αμμώνιο, το οξικό αμμώνιο, ενώ σε αρκετές περιπτώσεις ο ιοντισμός των ουσιών επιτυγχάνεται με απλή προσθήκη μυρμηκικού οξέος και οξικού οξέος (όταν εκτελείται η ανίχνευση θετικών ιόντων) ή διαλύματος αμμωνίας ή τριαιθυλαμίνης (όταν εκτελείται η ανίχνευση θετικών ιόντων). Άλλες ιδιότητες που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη είναι η διαλυτότητα και η σταθερότητα του ρυθμιστικού διαλύματος, καθώς και η δραστηριότητά του με τον αναλύτη και άλλα συστατικά του μίγματος. Η συγκέντρωσή του και η ιοντική ισχύς επηρεάζουν επίσης την εκλεκτικότητα και την

απόκριση. Επιπλέον του ρυθμιστικού διαλύματος, η σύσταση της κινητής φάσης (ποσοστό υδατικής φάσης και οργανικού τροποποιητή) και η εκλουστική ισχύς των διαλυτών επιδρούν στην εκλεκτικότητα (α) και στον παράγοντα χωρητικότητας (k'). Διαλύτες που αλληλεπιδρούν ισχυρά με τον αναλύτη, αυξάνουν τη διαλυτότητά του και μειώνουν τη συγκράτηση. Στην παρούσα εργασία η επιλογή του οργανικού διαλύτη καθώς και η σύστασή του κατά τη διάρκεια της ανάλυσης ήταν καθοριστικής σημασίας κυρίως για το χρόνο έκλουσης του phenylpropranolamine καθώς και για τον επιτυχή διαχωρισμό μεταξύ του ephedrine και του pseudoephedrine. Μελετήθηκαν τόσο η μεθανόλη όσο και το ακετονιτρίλιο καθώς επίσης και η σύστασή τους κατά τη διάρκεια της ανάλυσης. Η χρήση του ακετονιτρίλιου έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα και ως εκ τούτου επιλέχθηκε για την προτεινόμενη χρωματογραφική μέθοδο.

5.5 Εφαρμογή της μεθόδου UHPLC-ESI/MS/MS στον ποιοτικό προσδιορισμό και ταυτοποίηση των αναλυτών σε προθανάτιο και μεταθανάτιο ολικό αίμα

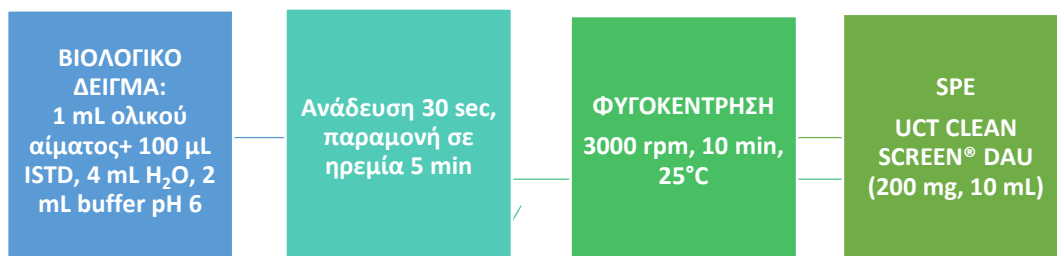
5.5.1 Προεργασία ολικού αίματος

Για την προεργασία των βιολογικών δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE). Τα προκαταρκτικά πειράματα έγιναν σε εμβολιασμένα δείγματα ολικού αίματος συγκέντρωσης 500 ng mL^{-1} σε όλους τους αναλύτες. Για την εκχύλιση στερεάς φάσης χρησιμοποιήθηκαν μικροφυσίγγια εκχύλισης UCT CLEAN SCREEN® DAU. Τα συγκεκριμένα μικροφυσίγγια περιέχουν πολυμερές πληρωτικό υλικό μικτού τύπου σε υπόστρωμα πηκτής πυριτίας υψηλής καθαρότητας. Οι δύο λειτουργικές ομάδες του πληρωτικού υλικού περιλαμβάνουν μηχανισμό αντίστροφης φάσης και ιοντανταλλαγής (ομάδα βενζοσουλφονικού οξέος). Στο σχήμα 5.1 παρουσιάζονται οι λειτουργικές ομάδες του πληρωτικού υλικού των μικροφυσιγγίων εκχύλισης στερεάς φάσης που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

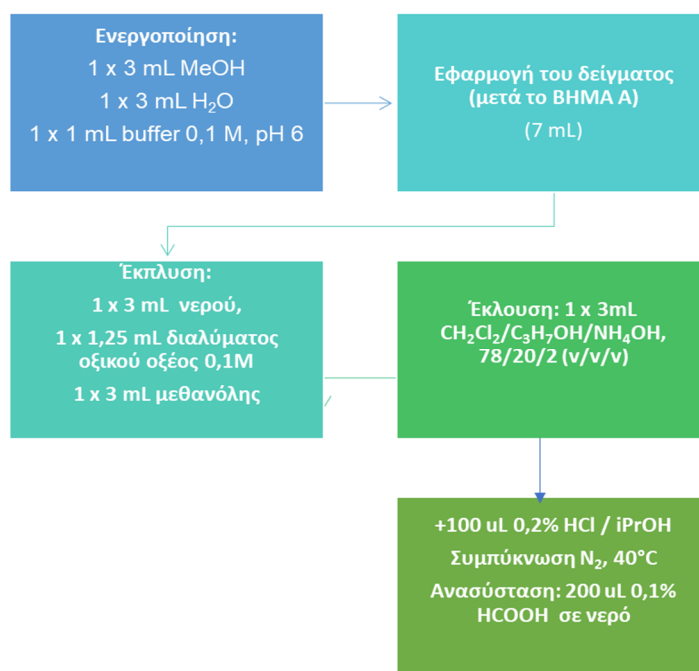


Σχήμα 5.1: Λειτουργικές ομάδες του πληρωτικού υλικού των μικροφυσιγγίων UCT CLEAN SCREEN® DAU. Αυτό το πληρωτικό υλικό μικτού τύπου ευνοεί την ανάπτυξη μη πολικών και κατιοντικών αλληλεπιδράσεων, με αποτέλεσμα τη συγκράτηση λιπόφιλων ενώσεων και ασθενών βάσεων. Η προεργασία του αίματος γίνεται σε δύο στάδια. Στο Σχήμα 5.2 παρουσιάζεται το πρώτο στάδιο

(Βήμα A) της πορείας προεργασίας και στο σχήμα 5.3 παρουσιάζεται το δεύτερο στάδιο (Βήμα B) που περιλαμβάνει την τεχνική εκχύλισης στερεάς φάσης.



Σχήμα 5.2 Διαγραμματική παρουσίαση του αρχικού σταδίου (Βήμα A) της πορείας προεργασίας δειγμάτων προθανάτιου και μεταθανάτιου ολικού αίματος



Σχήμα 5.3: Διαγραμματική παρουσίαση της εκχύλισης στερεάς φάσης (Βήμα B) για την προκατεργασία δειγμάτων προθανάτιου και μεταθανάτιου ολικού αίματος

Διαπιστώθηκε ότι προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (0,1 M, pH 6) στο στάδιο ενεργοποίησης της στήλης, ευνοεί τον ιοντισμό της βενζοσουλφονικής ομάδας (pKa) του πληρωτικού υλικού των μικροφουσιγγίων. Η προσθήκη οξικού οξέος στο στάδιο έκπλυσης της στήλης, ευνοεί τόσο τη διατήρηση του ιοντισμού της βενζοσουλφονικής ομάδας του πληρωτικού υλικού των μικροφουσιγγίων, όσο και τον ιοντισμό των αναλυτών οι οποίοι στο σύνολο τους είναι ασθενείς βάσεις φέροντας είτε πρωτοταγείς, είτε δευτεροταγείς είτε τριτοταγείς αμίνες με τιμές $pK_a \leq 7,6$. Αντίθετα, στο στάδιο της έκλουσης χρησιμοποιείται διαλύτης σε αλκαλικό pH ούτως ώστε οι αναλύτες να είναι ουδέτεροι και να εκλουστούν.

Επιπλέον μελετήθηκε η προστιθέμενη ποσότητα υδροχλωρικού οξέος σε ισοπροπανόλη πριν την εξάτμιση του οργανικού εκχυλίσματος. Η προσθήκη αυτή κρίθηκε αναγκαία για την αποφυγή της ολικής ή της μερικής απώλειας των υψηλής πτητικότητας αζωτούχων μικρομοριακών ενώσεων (amphetamine, methamphetamine, MDA, MDMA, και MDEA) κατά το στάδιο της εξάτμισης του οργανικού εκχυλίσματος. Τα καλύτερα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν με την προσθήκη 100 μ L διαλύματος 0,2% υδροχλωρικού οξέος σε ισοπροπανόλη [145]. Ακολούθως, μελετήθηκαν διάφορα διαλύματα ανασύστασης του δείγματος μεταξύ των οποίων:

- Διάλυμα ανασύστασης 0,1% μυρμηκικού οξέος
- Διάλυμα ανασύστασης μίγματος νερού/ ακετονιτριλίου
- Διάλυμα ανασύστασης μίγματος νερού/ ακετονιτριλίου/ μυρμηκικού οξέος
- Διάλυμα ανασύστασης μεθανόλης
- Διάλυμα ανασύστασης μίγματος μεθανόλης/νερού
- Διάλυμα ανασύστασης μίγματος μεθανόλης/νερού/ μυρμηκικού οξέος.

Το διάλυμα ανασύστασης που τελικά επιλέχθηκε ήταν 0,1% μυρμηκικό οξύ σε νερό, καθώς έδωσε καλύτερα αποτελέσματα όσον αφορά στην ευαισθησία και στο σχήμα των χρωματογραφικών κορυφών.

Αναλυτικά η πορεία της απομόνωσης των αναλυτών από το βιολογικό δείγμα περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:

Μεταφορά 1 mL εμβολιασμένου με τους αναλύτες αίματος σε γυάλινο σωλήνα και εμβολιασμό με 100 μ L από το διάλυμα εργασίας του μίγματος των εσωτερικών προτύπων. Προστέθηκαν 4 mL νερού καθαρότητας HPLC και 2 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (0,1 M, pH 6), και ακολούθησε ανάδευση με αναδευτήρα vortex για περίπου 10 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια το δείγμα αίματος παρέμεινε σε ηρεμία για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια

ακολούθησε η φυγοκέντρωση του δείγματος για 10 λεπτά στις 3,000 στροφές. Στη συνέχεια όλα τα δείγματα πριν τη χρωματογραφική ανάλυση υποβλήθηκαν σε προκατεργασία με εκχύλιση στερεάς φάσης με σκοπό:

- τον καθαρισμό του δείγματος προς ανάλυση
- την απομόνωση και παραλαβή των ουσιών ενδιαφέροντος και
- τη συμπύκνωση του δείγματος

Η καταλληλότερη διαδικασία SPE η οποία έδωσε τη βέλτιστη ευαισθησία και τον κατάλληλο ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των υπό μελέτη ουσιών, περιγράφεται πιο κάτω:

ο **Μικροφυσίγγια εκχύλισης στερεάς φάσης: UCT CLEAN SCREEN® DAU**

I. Ενεργοποίηση της στήλης με διαδοχική χρήση των ακόλουθων διαλυτών:

- ο 1 x 3 mL μεθανόλης,
- ο 1 x 3 mL νερού,
- ο 1 x 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (0,1 M, pH 6).

II. Εφαρμογή του δείγματος,

III. Έκπλυση στήλης με:

- ο 1 x 3 mL νερού,
- ο 1 x 1,25 mL διαλύματος οξικού οξέος 0,1M
- ο 1 x 3 mL μεθανόλης

IV. Ξήρανση στήλης με εφαρμογή υψηλού κενού για 5 λεπτά

V. Έκλουση με:

- ο 1 x 3 mL CH₂Cl₂/C₃H₇OH/NH₄OH, 78/20/2 (v/v/v)

VI. Προσθήκη στο δείγμα 100 μL διαλύματος υδροχλωρικού οξέος σε ισοπροπανόλη και συμπύκνωση μέχρι ξηρού, με διαβίβαση ρεύματος αερίου αζώτου (N₂) σε θερμοκρασία 40 °C

VII. Ανασύσταση με προσθήκη 200 μL διαλύματος 0,1% μυρμηκικού οξέος

VIII. Ανάλυση με UHPLC-MS/MS.

5.5.2 Αξιολόγηση της μεθόδου

Η μέθοδος επικυρώθηκε ξεχωριστά στο προθανάτιο και μεταθάνατιο ολικό αίμα σύμφωνα με την οδηγία του Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX). Η επικύρωση μίας μεθόδου σάρωσης σύμφωνα με την οδηγία SWGTOX περιλαμβάνει τον καθορισμό των ορίων ανίχνευσης των αναλυτών, τις μελέτες επίδρασης του υλικού μήτρας (matrix effect), τον υπολογισμό της επί τοις εκατό ανάκτησης, τη μελέτη της επιμόλυνσης εκ μεταφοράς (carry over effect), καθώς και τον έλεγχο της ειδικότητας και εκλεκτικότητας της μεθόδου.

5.5.2.1 Όριο ανίχνευσης/απόφασης

Σύμφωνα με την οδηγία SWGTOX, το όριο ανίχνευσης μπορεί να καθοριστεί ως η τιμή του ορίου απόφασης που ορίζεται από το εκάστοτε εργαστήριο, αρκεί να πληρούνται τα κριτήρια ανίχνευσης

και ταυτοποίησης. Το όριο ανίχνευσης καθορίστηκε με μετρήσεις σε τρεις διαφορετικές ημέρες ανάλυσης χρησιμοποιώντας λευκά δείγματα από 3 διαφορετικές πηγές.

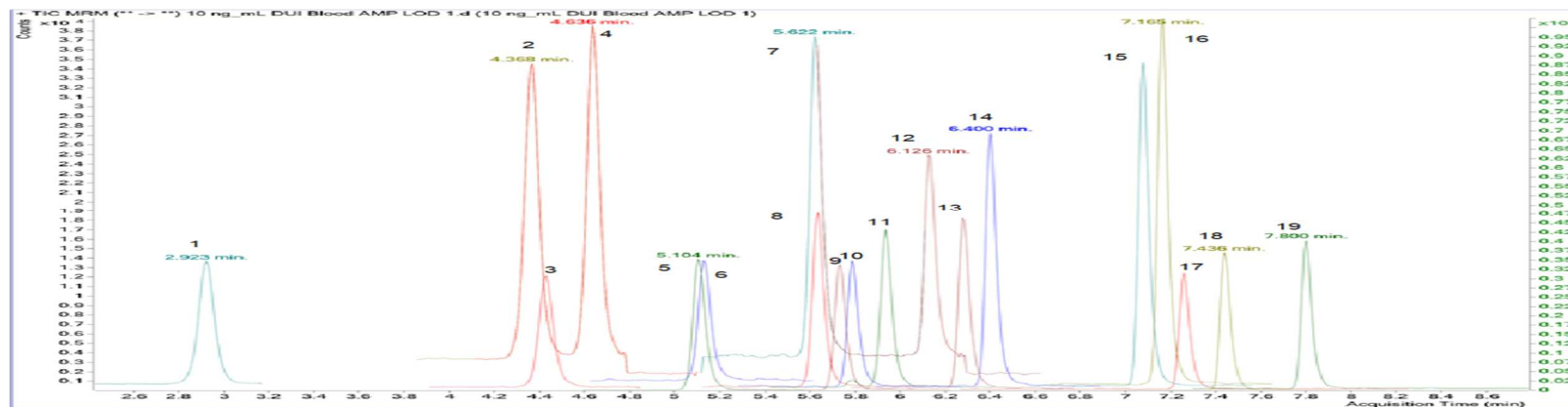
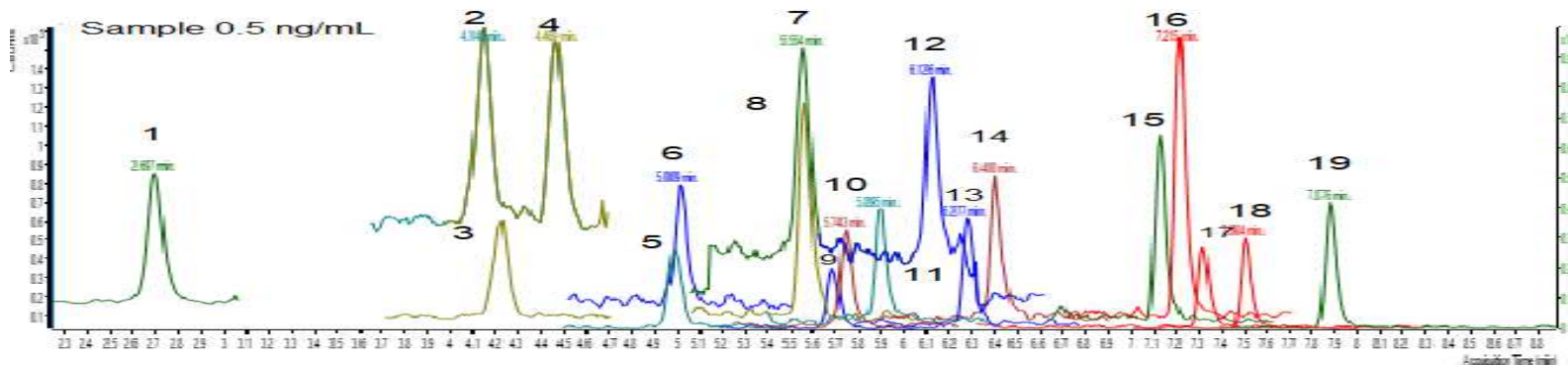
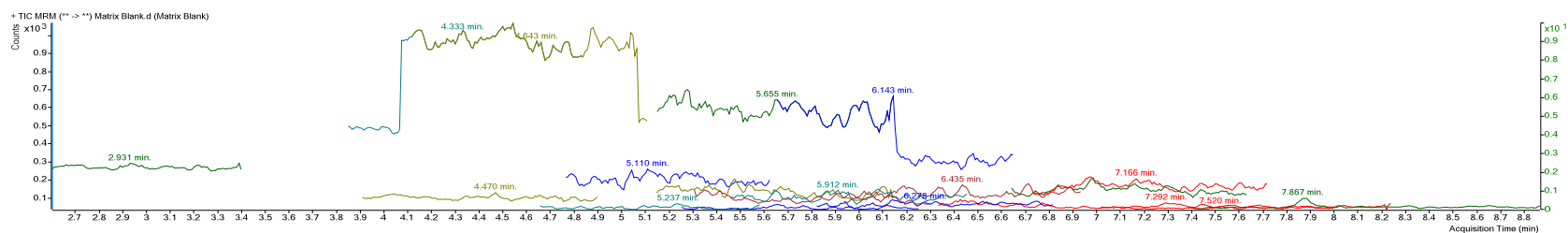
Μεταθανάτιο ολικό αίμα

Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου σε μεταθανάτιο ολικό αίμα βρέθηκε ίσο με 0.5 ng mL^{-1} για όλους τους αναλύτες, όπως υπολογίστηκε με το λόγο σήματος προς θόρυβο (Signal to Noise, S/N) με τη χρήση του λογισμικού προγράμματος MassHunter. Στη συνέχεια καθορίστηκε ως επιθυμητό όριο απόφασης από τη διοίκηση του εργαστηρίου η συγκέντρωση 10 ng mL^{-1} . Παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν τρία εμβολιασμένα δείγματα μεταθανάτιου ολικού αίματος συγκέντρωσης 10 ng mL^{-1} για τρεις διαφορετικές εργαστηριακές ημέρες και βρέθηκε ότι ο λόγος σήματος προς το θόρυβο είναι μεγαλύτερος από 3,3. Για τον υπολογισμό του S/N χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος θορύβου Root-Mean-Square (RMS). Το λογισμικό υπολογίζει τη μεταβλητότητα του σήματος root-mean-square για κάθε περιοχή θορύβου και λαμβάνει τις μέγιστες τιμές των RMS τιμών για όλες τις περιοχές.

Προθανάτιο ολικό αίμα

Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου σε προθανάτιο ολικό αίμα βρέθηκε ίσο με 0.5 ng mL^{-1} για όλους τους αναλύτες, όπως υπολογίστηκε με το λόγο σήματος προς θόρυβο (Signal to Noise, S/N) με τη χρήση του λογισμικού προγράμματος MassHunter. Στη συνέχεια καθορίστηκε ως επιθυμητό όριο απόφασης από τη διοίκηση του εργαστηρίου η συγκέντρωση 10 ng mL^{-1} . Παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν τρία εμβολιασμένα δείγματα προθανάτιου ολικού αίματος συγκέντρωσης 10 ng mL^{-1} για τρεις διαφορετικές εργαστηριακές ημέρες και βρέθηκε ότι ο λόγος σήματος προς το θόρυβο είναι μεγαλύτερος από 3,3. Για τον υπολογισμό του S/N χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος θορύβου Root-Mean-Square (RMS). Το λογισμικό υπολογίζει τη μεταβλητότητα του σήματος root-mean-square για κάθε περιοχή θορύβου και λαμβάνει τις μέγιστες τιμές των RMS τιμών για όλες τις περιοχές.

Στο σχήμα 5.4 παρουσιάζεται αντιπροσωπευτικό UHPLC-MS/MS χρωματογράφημα που προκύπτει από την ανάλυση λευκού δείγματος προθανάτιου ολικού αίματος με παρακολούθηση των ιόντων μετάπτωσης ποιοτικού προσδιορισμού και ταυτοποίησης των αναλυτών (MRM), ενώ στο σχήμα 5.5 παρουσιάζεται αντιπροσωπευτικό UHPLC-MS/MS χρωματογράφημα που προκύπτει από την ανάλυση εμβολιασμένων δειγμάτων προθανάτιου ολικού αίματος στο όριο ανίχνευσης και στο όριο απόφασης των αναλυτών.



Σχήμα 5.4: Αντιπροσωπευτικά UHPLC-MS/MS χρωματογραφήματα που προκύπτουν από την ανάλυση λευκού δείγματος προθανάτιου ολικού αίματος (επάνω), εμβολιασμένων δειγμάτων προθανάτιου ολικού αίματος στο όριο ανίχνευσης των αναλυτών $0,5 \text{ ng mL}^{-1}$ (μέσο) και στο όριο απόφασης του εργαστηρίου 10 ng mL^{-1} (κάτω) 1: Phenylpropanolamine, 2: Ephedrine, 3: Methcathinone, 4: Pseudoephedrine, 5: Methylone, 6: Amphetamine, 7: Methamphetamine, 8: MDA, 9: Ethylone 10: Methedrone, 11: MDMA, 12: Phentermine, 13: Mephedrone, 14: MDEA, 15: Hydroxybupropion, 16: Methylphenidate, 17: Alpha-PVP 18: MDPV 19: Bupropion

5.5.2.2 Επίδραση του υλικού μήτρας (matrix effect)

Η αναλυτική τεχνική UHPLC-MS/MS διακρίνεται για την υψηλή ευαισθησία και εκλεκτικότητα της. Ωστόσο, η καταστολή ή ενίσχυση του σήματος του αναλυτή μαζών από ουσίες του υποστρώματος που συνεκλούνται και εισέρχονται ταυτόχρονα με τις υπό ανάλυση ουσίες στην πηγή ιοντισμού, μπορεί να οδηγήσει σε δραστική μείωση της ευαισθησίας της αναλυτικής μεθόδου, και αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα κατά τη χρησιμοποίηση των συστημάτων UHPLC-MS, με κίνδυνο ακόμα την εσφαλμένη εξαγωγή ψευδώς-αρνητικού ή ψευδώς-θετικού αποτελέσματος. Η ένταση του φαινομένου μπορεί να διαφέρει από το ένα δείγμα στο άλλο.

Η καταστολή/ενίσχυση σήματος (matrix effect) αξιολογείται χρησιμοποιώντας οποιαδήποτε από τις δύο πιο κάτω προσεγγίσεις:

- i. Έγχυση μετά τη στήλη για την αξιολόγηση της καταστολής/ενίσχυσης του σήματος
- ii. Προσθήκη των αναλυτών μετά την εκχύλιση για αξιολόγηση της καταστολής/ενίσχυσης του επιλεγθέντος σήματος

Όταν η μέση καταστολή ή ενίσχυση σήματος υπερβαίνει το $\pm 25\%$ ή το επί τοις εκατό CV της καταστολής ή της ενίσχυσης υπερβαίνει το 15%, πρέπει να αποδειχθεί ότι δεν υπάρχει επίδραση σε άλλες κρίσιμες παραμέτρους επικύρωσης. Η καταστολή ή η ενίσχυση του σήματος είναι πιθανότερο να επηρεάσει το όριο ανίχνευσης μιας ποιοτικής μεθόδου.

Προθανάτιο ολικό αίμα

Στη παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση του υλικού μήτρας σε κάθε αναλύτη συγκρίνοντας το σήμα που λαμβάνεται από την ανάλυση κατεργασμένων λευκών δειγμάτων προθανάτιου ολικού αίματος, τα οποία εμβολιάστηκαν με τους αναλύτες μετά την προκατεργασία, με το σήμα των αναλυτών σε διάλυμα αντίστοιχης συγκέντρωσης προπαρασκευασμένο σε διαλύτη ανασύστασης (υδατικό διάλυμα μυρμηκικού οξέος 0,1%). Για τη μελέτη του φαινομένου της επίδρασης του υλικού μήτρας αναλύθηκαν δείγματα σε δυο επίπεδα συγκεντρώσεων για κάθε αναλύτη 60 και 1600 ng mL⁻¹ σε δέκα διαφορετικά προθανάτια δείγματα ολικού αίματος και για τα εσωτερικά πρότυπα που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη μέθοδο, σε συγκέντρωση 100 ng mL⁻¹. Τα δείγματα αναλύθηκαν με τις χρωματογραφικές παραμέτρους και συνθήκες του φασματομέτρου μαζών που παρουσιάζονται στις παραγράφους 5.2.1.1 και 5.2.1.2 με θετικό ιοντισμό με ηλεκτροψεκασμό.

Η επίδραση από το υπόστρωμα (Matrix Effect) του δείγματος για κάθε αναλύτη μπορεί να υπολογιστεί με σύγκριση των εμβαδών των κορυφών (peak areas) κάθε αναλύτη σε δέκα

δείγματα ολικού αίματος που εμβολιάστηκαν με τους αναλύτες μετά την κατεργασία και του αντίστοιχου εμβადού κορυφής προτύπου υδατικού διαλύματος στην ίδια συγκέντρωση. Για τον υπολογισμό χρησιμοποιείται η πιο κάτω εξίσωση, η οποία περιγράφεται στην οδηγία SWGTOX:

$$\left(\frac{[\text{Εμβαδόν κορυφής}]_{\text{bloodspiked}}}{[\text{Εμβαδόν κορυφής}]_{\text{waterspiked}}} - 1 \right) \times 100$$

Στους πίνακες 5.8 και 5.9 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της επί τοις εκατό επίδρασης του υποστρώματος στους αναλύτες και στα εσωτερικά πρότυπα, αντίστοιχα. Δεν παρατηρήθηκε σημαντική καταστολή του σήματος για τους περισσότερους αναλύτες. Εξάιρεση αποτελεί το bupropion στη συγκέντρωση 1600 ng mL⁻¹, εντούτοις η καταστολή αυτή του σήματος για το bupropion δεν επηρεάζει το όριο ανίχνευσής του σε προθανάτιο ολικό αίμα. Όπως διαπιστώνεται από τους παρακάτω πίνακες η % καταστολή/ενίσχυση σήματος όλων των αναλυτών στις συγκεντρώσεις 60 και 1600 ng mL⁻¹, πλην αυτή του bupropion, κυμαίνεται από -20% έως 3% και για τα εσωτερικά πρότυπα αυτών από -21,2% έως 0,9% σε συγκέντρωση 100 ng mL⁻¹.

Πίνακας 5.8: Επίδραση υποστρώματος για την ταυτοποίηση των αναλυτών σε δείγματα προθανάτιου ολικού αίματος

Συγκέντρωση (ng mL⁻¹)	Επίδραση από το υπόστρωμα, (μέση τιμή ± τυπική απόκλιση) _{n= 10}	
	60	1600
<i>Amphetamine</i>	-6,4 ± 7,4	-10,5 ± 6,9
<i>Methamphetamine</i>	-7,8 ± 5,5	-11,2 ± 9,0
<i>MDA</i>	-1,1 ± 4,5	-1,4 ± 1,8
<i>MDMA</i>	0,6 ± 5,1	-2,4 ± 1,2
<i>Phentermine</i>	-10,4 ± 5,8	-9,3 ± 5,7
<i>Pseudoephedrine</i>	-9,7 ± 5,7	-11,1 ± 2,9
<i>Bupropion</i>	-21,6 ± 5,9	-31 ± 10
<i>Hydroxy bupropion</i>	-0,2 ± 4,9	-1,33 ± 0,81
<i>Ephedrine</i>	-1,8 ± 5,4	-3,1 ± 1,4
<i>MDEA</i>	1,2 ± 5,9	-1,3 ± 1,2
<i>Phenylpropanolamine</i>	-4,7 ± 4,0	-11,24 ± 0,68
<i>Methylphenidate</i>	0,4 ± 5,2	-2,5 ± 1,7
<i>alpha-PVP</i>	-9,5 ± 4,4	-14,4 ± 10
<i>Ethylone</i>	-0,2 ± 5,0	-2,6 ± 1,5
<i>MDPV</i>	3,0 ± 5,1	-1,66 ± 0,95
<i>Mephedrone</i>	-6,0 ± 4,2	-11,1 ± 8,9
<i>Methcathinone</i>	-13,4 ± 4,5	-20 ± 12
<i>Methedrone</i>	-0,2 ± 4,4	-3,6 ± 2,4
<i>Methylone</i>	1,4 ± 4,3	-0,84 ± 0,77

Πίνακας 5.9: Επίδραση υποστρώματος των χρησιμοποιούμενων εσωτερικών προτύπων για την ταυτοποίηση των αναλυτών σε δείγματα προθανάτιου αίματος

Εσωτερικό πρότυπο	Επίδραση από το υπόστρωμα, (μέση τιμή ± τυπική απόκλιση)_{n= 10}
Συγκέντρωση	100 (ng mL⁻¹)
<i>Amphetamine-d11</i>	-7,1 ± 2,4
<i>Methamphetamine-d11</i>	-6,0 ± 2,2
<i>MDA-d5</i>	-2,1 ± 1,9
<i>MDMA-d5</i>	0,3 ± 1,2
<i>Phentermine -d5</i>	-7,5 ± 2,7
<i>Pseudoephedrine-d3</i>	-9,8 ± 3,6
<i>Bupropion-d9</i>	-21,2 ± 4,7
<i>Hydroxybupropion-d6</i>	0,1 ± 1,8
<i>Ephedrine-d3</i>	-0,8 ± 2,4
<i>MDEA-d5</i>	0,9 ± 1,6
<i>Nor pseudoephedrine -d3</i>	-10,2 ± 3,0
<i>Methylphenidate -d9</i>	0,1 ± 1,3
<i>Methylone-d3</i>	0,1 ± 2,1
<i>Mephedrone-d3</i>	-4,9 ± 2,3

Μεταθανάτιο ολικό αίμα

Μελετήθηκε επίσης η επίδραση του υποστρώματος σε κάθε αναλύτη συγκρίνοντας το σήμα που λαμβάνεται μετά την ανάλυση κατεργασμένων λευκών δειγμάτων μεταθανάτιου ολικού αίματος, τα οποία εμβολιάστηκαν με τους αναλύτες μετά την κατεργασία, με το σήμα των αναλυτών σε διάλυμα αντίστοιχης συγκέντρωσης προπαρασκευασμένο σε διαλύτη ανασύστασης (υδατικό διάλυμα μυρμηκικού οξέος 0,1%). Η μελέτη της επίδρασης του υποστρώματος πραγματοποιήθηκε σε δύο επίπεδα συγκεντρώσεων 60 και 1600 ng mL⁻¹ για όλους τους αναλύτες σε δέκα διαφορετικά μεταθανάτια δείγματα ολικού αίματος και για τα εσωτερικά πρότυπα που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη μέθοδο, σε συγκέντρωση 100 ng mL⁻¹. Υπολογίστηκε η επίδραση του υποστρώματος από το λόγο της απόκρισης του κάθε αναλύτη στα δείγματα μεταθανάτιου ολικού αίματος μετά την κατεργασία προς την απόκριση του κάθε αναλύτη στα διαλύματα ελέγχου παρασκευασμένα σε διαλύτη ανασύστασης. Στον πίνακα 5.10 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της επίδρασης του υποστρώματος στους αναλύτες και στον πίνακα 5.11 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της επίδρασης του υποστρώματος στα εσωτερικά πρότυπα αυτών. Σημαντική καταστολή του σήματος δεν παρατηρείται για όλους τους αναλύτες με εξαίρεση αυτής του bupropion στη συγκέντρωση 1600 ng mL⁻¹. Εντούτοις, η καταστολή αυτή του σήματος για το bupropion δεν επηρεάζει το κατώτατο όριο ανίχνευσης του συγκεκριμένου αναλύτη σε μεταθανάτιο ολικό αίμα. Όπως διαπιστώνεται

από τους παρακάτω πίνακες η επι τοις εκατό καταστολή/ενίσχυση σήματος όλων των αναλυτών στις συγκεντρώσεις 60 και 1600 ng mL⁻¹, πλην αυτή της bupropion, κυμαίνεται από -22,2% έως 11% και για τα εσωτερικά πρότυπα αυτών από -23,5% έως 5,4% σε συγκέντρωση 100 ng mL⁻¹.

Πίνακας 5.10: Επίδραση υποστρώματος για την ταυτοποίηση των αναλυτών σε δείγματα μεταθανάτιου ολικού αίματος

Αναλύτης	% Καταστολή/ ενίσχυση σήματος (μέση τιμή ± τυπική απόκλιση) _{n= 10}	
	60	1600
Συγκέντρωση (ng mL⁻¹)		
<i>Amphetamine</i>	-3,4 ± 8,1	-10,5 ± 8,6
<i>Methamphetamine</i>	-2,0 ± 9,4	-14 ± 11
<i>MDA</i>	6 ± 10	-1,9 ± 1,8
<i>MDMA</i>	10 ± 10	-1,6 ± 0,7
<i>Phentermine</i>	-5,6 ± 8,5	-8,9 ± 8,9
<i>Pseudoephedrine</i>	-4,5 ± 11	-9,1 ± 1,5
<i>Bupropion</i>	-20,6 ± 8,2	-33 ± 16
<i>Hydroxy bupropion</i>	8,0 ± 11	-1,17 ± 0,59
<i>Ephedrine</i>	7,0 ± 11	-2,1 ± 1,1
<i>MDEA</i>	11 ± 12	1,4 ± 1,3
<i>Phenylpropanolamine</i>	4,0 ± 10	9,51 ± 0,67
<i>Methylphenidate</i>	8,0 ± 11	-1,3 ± 1,3
<i>alpha-PVP</i>	-13,9 ± 5,2	-14 ± 11
<i>Ethylone</i>	-3,0 ± 5,4	-3,3 ± 2,1
<i>MDPV</i>	-2,6 ± 5,5	-2,0 ± 1,0
<i>Mephedrone</i>	-12,2 ± 6,7	-11 ± 10
<i>Methcathinone</i>	-22,2 ± 9,5	-22 ± 17
<i>Methedrone</i>	-5,9 ± 5,5	-3,9 ± 2,1
<i>Methylone</i>	-3,1 ± 5,4	-1,3 ± 1,3

Πίνακας 5.11: Επίδραση υποστρώματος των χρησιμοποιούμενων εσωτερικών προτύπων για την ταυτοποίηση των αναλυτών σε δείγματα μεταθανάτιου αίματος

Εσωτερικό πρότυπο	Επίδραση από το υπόστρωμα (μέση τιμή ± τυπική απόκλιση) _{n= 10}	
	100 ng mL ⁻¹	
Συγκέντρωση		
<i>Amphetamine-d11</i>	-5,8 ± 4,2	
<i>Methamphetamine-d11</i>	-6,3 ± 4,7	
<i>MDA-d5</i>	-1,6 ± 1,9	
<i>MDMA-d5</i>	3,1 ± 1,5	
<i>Phentermine-d5</i>	-8,3 ± 4,6	
<i>Pseudoephedrine-d3</i>	-7,8 ± 3,8	
<i>Bupropion-d9</i>	-23,5 ± 5,8	
<i>Hydroxybupropion-d6</i>	1,8 ± 1,4	
<i>Ephedrine-d3</i>	0,6 ± 2,1	
<i>MDEA-d5</i>	5,4 ± 1,5	
<i>Nor-Pseudoephedrine -d3</i>	-7,2 ± 3,3	
<i>Methylphenidate -d9</i>	1,6 ± 1,9	
<i>Methylone-d3</i>	2,5 ± 1,4	
<i>Mephedrone-d3</i>	-4,8 ± 3,2	

5.5.2.3 Ανάκτηση της μεθόδου UHPLC-ESI/MS/MS

Προθανάτιο ολικό αίμα

Ως ανάκτηση νοείται το ποσοστό της αληθινής συγκέντρωσης μιας ουσίας, που ανακτάται κατά την αναλυτική διαδικασία. Για τον έλεγχο της ανάκτησης της μεθόδου, παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν, σύμφωνα με την πορεία κατεργασίας που περιγράφηκε σε προηγούμενη παράγραφο, δέκα εμβολιασμένα διαφορετικά δείγματα προθανάτιου ολικού αίματος σε δύο επίπεδα συγκεντρώσεων 60 και 1600 ng mL⁻¹ για όλες τις ουσίες και για τα εσωτερικά πρότυπα αυτών σε συγκέντρωση 100 ng mL⁻¹. Ταυτόχρονα αναλύθηκαν λευκά δείγματα προθανάτιου ολικού αίματος, τα οποία εμβολιάστηκαν με τους αναλύτες στα ίδια επίπεδα συγκεντρώσεων κατά τη φάση της συλλογής του οργανικού εκχυλίσματος, δηλαδή πριν το στάδιο της εξάτμισης των εκλουσμάτων. Η εκατοστιαία ανάκτηση για κάθε αναλύτη υπολογίστηκε από το λόγο της επιφανείας της χρωματογραφικής κορυφής του αναλύτη σε κάθε δείγμα προθανάτιου ολικού αίματος που εμβολιάστηκε πριν την έναρξη της εκχύλισης προς την επιφάνεια της κορυφής του ίδιου αναλύτη και στο ίδιο υπόστρωμα (προθανάτιο ολικό αίμα) που εμβολιάστηκε μετά την εκχύλιση του δείγματος.

Πίνακας 5.12: Εκατοστιαία ανάκτηση των αναλυτών για την ταυτοποίηση σε δείγματα προθανάτιου ολικού αίματος

Αναλύτης	% Ανάκτηση (μέση τιμή ± τυπική απόκλιση) _{n=10}	
	60	1600
Συγκέντρωση (ng mL⁻¹)		
<i>Amphetamine</i>	91 ± 10	91 ± 12
<i>Methamphetamine</i>	92 ± 10	91 ± 16
<i>MDA</i>	89,4 ± 6,4	90,9 ± 1,8
<i>MDMA</i>	89,1 ± 6,9	89,9 ± 2,3
<i>Phentermine</i>	90,5 ± 9,7	90 ± 10
<i>Pseudoephedrine</i>	79,9 ± 7,2	87,1 ± 3,6
<i>Bupropion</i>	89 ± 14	81 ± 24
<i>Hydroxy bupropion</i>	88,9 ± 6,9	92,6 ± 1,9
<i>Ephedrine</i>	87,5 ± 6,9	90,0 ± 1,6
<i>MDEA</i>	89,2 ± 7,9	90,7 ± 1,9
<i>Phenylpropanolamine</i>	86,1 ± 5,8	86,7 ± 1,6
<i>Methylphenidate</i>	88,7 ± 7,1	93,2 ± 2,4
<i>Methcathinone</i>	98,5 ± 14,9	90 ± 28
<i>Methylone</i>	97,1 ± 9,0	92,9 ± 1,5
<i>Methedrone</i>	96,1 ± 9,6	91,6 ± 3,7
<i>Ethylone</i>	97,5 ± 10,2	92,2 ± 2,6
<i>Mephedrone</i>	97 ± 12	91 ± 15
<i>MDPV</i>	96,5 ± 9,8	90,1 ± 2,1
<i>Alpha-PVP</i>	98 ± 13	88 ± 20

Τα αποτελέσματα για κάθε αναλύτη και για τις δύο συγκεντρώσεις συνοψίζονται στον πίνακα 5.12 όπου και διαπιστώνεται ότι η επί τοις εκατό ανάκτηση για το pseudoephedrine είναι μεγαλύτερη από 79,9%, για το bupropion είναι μεγαλύτερη από 81%, για το phenylpropranolamine είναι μεγαλύτερη από 86,1%, για το amphetamine είναι μεγαλύτερη από 91%, για το ephedrine είναι μεγαλύτερη από 87,5%, για το Alpha-PVP είναι μεγαλύτερη από 88%, για το MDEA είναι μεγαλύτερη από 89,2%, για το MDMA είναι μεγαλύτερη από 89,1%, για το hydroxy bupropion είναι μεγαλύτερη από 88,9%, για το MDA είναι μεγαλύτερη από 89,4%, για το methylphenidate είναι μεγαλύτερη από 88,7%, για τα methcathinone είναι μεγαλύτερη από 90%, για το MDPV είναι μεγαλύτερη από 90,1%, για το methamphetamine είναι μεγαλύτερη από 91%, για το phentermine είναι μεγαλύτερη από 90%, για το mephedrone είναι μεγαλύτερη από 91%, για το methedrone είναι μεγαλύτερη από 91,6%, για το ethylone είναι μεγαλύτερη από 92,2% και τέλος για το methylone είναι μεγαλύτερη από 92,9%.

Πίνακας 5.13: Εκατοστιαία ανάκτηση των χρησιμοποιούμενων εσωτερικών προτύπων για την ταυτοποίηση των αναλυτών σε δείγματα προθανάτιου ολικού αίματος

Εσωτερικό πρότυπο	%Ανάκτηση (μέση τιμή ± τυπική απόκλιση) _{n=10}
Συγκέντρωση	100 ng mL⁻¹
<i>Amphetamine-d11</i>	91,3 ± 4,8
<i>Methamphetamine-d11</i>	92,7 ± 6,3
<i>MDA-d5</i>	91,1 ± 2,3
<i>MDMA-d5</i>	91,3 ± 2,0
<i>Phentermine-d5</i>	90,3 ± 8,0
<i>Pseudoephedrine-d3</i>	77,8 ± 4,6
<i>Bupropion-d9</i>	90 ± 10
<i>Hydroxybupropion-d6</i>	90,8 ± 1,7
<i>Ephedrine-d3</i>	88,2 ± 3,1
<i>MDEA-d5</i>	89,9 ± 3,3
<i>Nor pseudoephedrine -d3</i>	78,9 ± 2,6
<i>Methylphenidate -d9</i>	90,5 ± 2,7
<i>Methylone-d3</i>	92,2 ± 2,6
<i>Mephedrone-d3</i>	91,7 ± 4,9

Στον πίνακα 5.13 συνοψίζονται τα αποτελέσματα για κάθε εσωτερικό πρότυπο που χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη μέθοδο όπου και διαπιστώνεται ότι η χαμηλότερη επί τοις εκατό ανάκτηση εμφανίζεται στο δευτεριωμένο εσωτερικό πρότυπο της pseudoephedrine (pseudoephedrine-d3) σε ποσοστό 77,8%.

Μεταθανάτιο ολικό αίμα

Για τον έλεγχο της ανάκτησης της μεθόδου, παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν 10 εμβολιασμένα διαφορετικά δείγματα μεταθανάτιου ολικού αίματος σε δύο επίπεδα συγκεντρώσεων 60 και 1600

ng mL⁻¹ για όλες τις ουσίες και για τα εσωτερικά πρότυπα αυτών σε συγκέντρωση 100 ng mL⁻¹. Ταυτόχρονα, παρασκευάστηκαν λευκά δείγματα μεταθανάτιου ολικού αίματος, τα οποία εμβολιάστηκαν με τους αναλύτες στα ίδια επίπεδα συγκεντρώσεων κατά τη φάση της συλλογής του οργανικού εκχυλίσματος, δηλαδή πριν το στάδιο της εξάτμισης των εκλουσμάτων. Η εκατοστιαία ανάκτηση για κάθε αναλύτη υπολογίστηκε από το λόγο της επιφανείας της χρωματογραφικής κορυφής του αναλύτη σε κάθε δείγμα μεταθανάτιου ολικού αίματος που εμβολιάστηκε πριν την έναρξη της εκχύλισης προς την επιφάνεια της κορυφής του ίδιου αναλύτη και στο ίδιο υπόστρωμα (μεταθανάτιο ολικό αίμα) που εμβολιάστηκε μετά την εκχύλιση του δείγματος. Τα αποτελέσματα για κάθε αναλύτη και για τις δύο συγκεντρώσεις συνοψίζονται στον πίνακα 5.14.

Πίνακας 5.14: Εκατοστιαία ανάκτηση σε δείγματα μεταθανάτιου ολικού αίματος

<i>Συγκέντρωση (ng mL⁻¹)</i>	% Ανάκτηση (μέση τιμή ± τυπική απόκλιση) _{n=10}	
	60	1600
<i>Amphetamine</i>	93,0 ± 8,1	90 ± 16
<i>Methamphetamine</i>	93,5 ± 9,7	91 ± 23
<i>MDA</i>	87,2 ± 7,8	92,6 ± 2,7
<i>MDMA</i>	88,2 ± 7,7	92,1 ± 1,9
<i>Phentermine</i>	93,1 ± 6,5	90 ± 16
<i>Pseudoephedrine</i>	84,9 ± 9,6	90,3 ± 2,2
<i>Bupropion</i>	91,5 ± 8,1	87 ± 55
<i>Hydroxy bupropion</i>	87,7 ± 8,4	93,4 ± 1,3
<i>Ephedrine</i>	87,2 ± 7,4	91,6 ± 2,3
<i>MDEA</i>	87,4 ± 8,2	91,1 ± 1,6
<i>Phenylpropanolamine</i>	85,4 ± 7,6	86,2 ± 2,4
<i>Methylphenidate</i>	87,9 ± 8,1	93,1 ± 4,3
<i>Methcathinone</i>	95,6 ± 16	89,7 ± 52
<i>Methylone</i>	93 ± 14	95,0 ± 1,4
<i>Methedrone</i>	93 ± 14	93,9 ± 3,1
<i>Ethylone</i>	92 ± 13	94,3 ± 2,6
<i>Mephedrone</i>	94 ± 15	91,6 ± 20
<i>MDPV</i>	91 ± 14	92,7 ± 0,8
<i>Alpha-PVP</i>	93 ± 12	90 ± 22

Από τα αποτελέσματα διαπιστώνεται ότι η επί τοις εκατό ανάκτηση για το pseudoephedrine είναι μεγαλύτερη από 84,9%, για το phenylpropanolamine είναι μεγαλύτερη από 85,4%, για το MDA είναι μεγαλύτερη από 87,2%, για το bupropion είναι μεγαλύτερη από 87%, για το ephedrine είναι μεγαλύτερη από 87,2%, για το MDEA είναι μεγαλύτερη από 87,4%, για το MDMA είναι μεγαλύτερη από 88,2%, για το hydroxy bupropion είναι μεγαλύτερη από 87,7%, για το methylphenidate είναι μεγαλύτερη από 87,9%, για το amphetamine είναι μεγαλύτερη από 90%, για το phentermine είναι

90%, για το methcathinone είναι μεγαλύτερη από 89,7%, για το alpha-PVP είναι μεγαλύτερη από 90%, για τα methamphetamine και MDPV είναι μεγαλύτερη από 91%, για το ethylone είναι μεγαλύτερη από 92, για το mephedrone είναι μεγαλύτερη από 91,6%% και τέλος για τα methylone και methedrone είναι μεγαλύτερη από 93%.

Πίνακας 5.15: Ανάκτηση των χρησιμοποιούμενων εσωτερικών προτύπων για την ταυτοποίηση των αναλυτών σε δείγματα μεταθανάτιου ολικού αίματος

<i>Εσωτερικό πρότυπο</i>	% Ανάκτηση (μέση τιμή ± τυπική απόκλιση) _{n= 10}
Συγκέντρωση	100 ng mL⁻¹
<i>Amphetamine-d11</i>	90,2 ± 4,8
<i>Methamphetamine-d11</i>	91,9 ± 6,1
<i>MDA-d5</i>	89,8 ± 2,9
<i>MDMA-d5</i>	90,2 ± 2,5
<i>Phentermine-d5</i>	91,5 ± 5,3
<i>Pseudoephedrine-d3</i>	81,8 ± 2,1
<i>Bupropion-d9</i>	91,0 ± 4,2
<i>Hydroxybupropion-d6</i>	88,8 ± 2,5
<i>Ephedrine-d3</i>	88,6 ± 2,9
<i>MDEA-d5</i>	90,0 ± 2,5
<i>Nor pseudoephedrine -d3</i>	82,0 ± 2,0
<i>Methylphenidate -d9</i>	90,1 ± 2,4
<i>Methylone-d3</i>	91,7 ± 1,4
<i>Mephedrone-d3</i>	91,0 ± 3,2

Στον πίνακα 5.15 συνοψίζονται τα αποτελέσματα για κάθε εσωτερικό πρότυπο που χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη μέθοδο όπου και διαπιστώνεται ότι η χαμηλότερη επί τοις εκατό ανάκτηση εμφανίζεται στο δευτεριωμένο εσωτερικό πρότυπο του pseudoephedrine (pseudoephedrine-d3) σε ποσοστό 81,8%.

5.5.2.4 Έλεγχος ειδικότητας /εκλεκτικότητας της μεθόδου

Για την αξιολόγηση της ειδικότητας της μεθόδου παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν πρότυπα διαλύματα διαφόρων φαρμακευτικών και εξαρτησιογόνων ουσιών. Πιο συγκεκριμένα αναλύθηκαν οι παρακάτω ουσίες:

- methadone και ο μεταβολίτης της 2-Ethylidene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine (EDDP) σε συγκέντρωση 4 μg mL⁻¹
- phencyclidine (PCP) σε συγκέντρωση 2 μg mL⁻¹
- tramadol σε συγκέντρωση 4 μg mL⁻¹
- codeine, morphine, hydrocodone, hydromorphone, oxycodone και oxymorphone σε συγκέντρωση 4 μg mL⁻¹ και η 6-acetylmorphine σε συγκέντρωση 2 μg mL⁻¹

- ecgonine methyl ester, anhydroecgonine methyl ester, cocaethylene και benzoylecgonine σε συγκέντρωση $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ και cocaine σε συγκέντρωση $0,4 \mu\text{g mL}^{-1}$
- fentanyl σε συγκέντρωση 100 ng mL^{-1} , norfentanyl, U47700, AH-7921, MT-45, U-4990, U-50488, n-phenethyl-4-piperidinone (4-ANPP), sufentanil, carfentanyl, butyryl fentanyl, ortho-fluorofentanyl, para-fluorofentanylisobutyryl fentanyl, 3- methylfentanyl, acetyl fentanyl, 4-methyl acetyl fentanyl, para-methoxy-butyryl fentanyl, β -hydroxythiofentanyl, para-fluorobutyryl fentanyl (PFBF), acryl fentanyl, valeryl fentanyl, 4-Fluoroisobutyrfentanyl (FIBF), σε συγκέντρωση $0,5 \text{ ng mL}^{-1}$
- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) σε συγκέντρωση 200 ng mL^{-1} , 11-hydroxy- Δ^9 -THC και 11-nor-9 carboxy- Δ^9 -THC σε συγκέντρωση 500 ng mL^{-1}
- Cyclobenzaprine σε συγκέντρωση $4 \mu\text{g mL}^{-1}$
- diphenhydramine σε συγκέντρωση $4 \mu\text{g mL}^{-1}$
- diazepam, nordiazepam και alprazolam σε συγκέντρωση $4 \mu\text{g mL}^{-1}$
- mirtazapine, venlafaxine, desmethylvenlafaxine, citalopram, desmethylcitalopram, doxepine, desmethyldoxepin, imipramine, paroxetine, amitriptyline, nortriptyline, duloxetine, fluoxetine, norfluoxetine και sertraline σε συγκέντρωση $4 \mu\text{g mL}^{-1}$, και η trazodone σε συγκέντρωση $40 \mu\text{g mL}^{-1}$
- primidone, phenylethylmalonamide, levetiracetam, butabarbital, pentobarbital, phenobarbital και phenytoin σε συγκέντρωση 4 ng mL^{-1}
- acetaminophen σε συγκέντρωση 10 ng mL^{-1}
- topiramate σε συγκέντρωση 2 ng mL^{-1}
- valproic acid σε συγκέντρωση 20 ng mL^{-1}
- ibuprofen σε συγκέντρωση 10 ng mL^{-1}
- butalbital, meprobromate, carisoprodol, glutethimide, theophylline και carbamazepine σε συγκέντρωση 4 ng mL^{-1}
- amobarbital σε συγκέντρωση 2 ng mL^{-1} , και τέλος
- secobarbital σε συγκέντρωση 1 ng mL^{-1} .

Αξιολογώντας τα χρωματογραφικά δεδομένα των παραπάνω ουσιών δεν διαπιστώθηκε παρεμπόδιση αυτών των ουσιών στο χρόνο έκλουσης των αναλυτών.

Για την αξιολόγηση της εκλεκτικότητας της μεθόδου, αναλύθηκαν συνολικά 70 διαφορετικά λευκά δείγματα μεταθανάτιου και προθανάτιου ολικού αίματος από πραγματικές υποθέσεις, με σκοπό να ελεγχθεί η ύπαρξη τυχόν παρεμποδίσεων στους χρόνους έκλουσης των αναλυτών. Τα δείγματα αυτά βρέθηκαν να είναι αρνητικά για τους αναλύτες που συμπεριλαμβάνονται στην

προτεινόμενη μέθοδο με χρήση ανοσοενζυμικής μεθόδου ανάλυσης ELISA. Για την πλειοψηφία των αναλυτών δεν διαπιστώθηκαν κορυφές παρεμπόδισης από το υπόστρωμα και για τα 70 διαφορετικά δείγματα ολικού αίματος που αναλύθηκαν. Εξάριση σε αυτό αποτελούν δύο δείγματα προθανάτιου ολικού αίματος στα οποία παρατηρήθηκε κορυφή παρεμπόδισης στο χρόνο έκλουσης του amphetamine, δύο δείγματα μεταθανάτιου και ένα δείγμα προθανάτιου ολικού αίματος στα οποία παρατηρήθηκε κορυφή παρεμπόδισης στο χρόνο έκλουσης του methamphetamine, ενός μεταθανάτιου ολικού αίματος όπου παρατηρήθηκε κορυφή παρεμπόδισης στο χρόνο έκλουσης του pseudoephedrine και ενός μεταθανάτιου ολικού αίματος όπου παρατηρήθηκε κορυφή παρεμπόδισης στο χρόνο έκλουσης του bupropion και του hydroxy bupropion. Οι παρεμποδίσσεις που παρατηρούνται στα παραπάνω δείγματα αντιστοιχούν στους αναλύτες και όχι στην επίδραση από το υπόστρωμα. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα δείγματα αυτά είχαν συγκέντρωση μικρότερη του ορίου απόφασης (cut off) το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην ELISA. Τα συγκεκριμένα δείγματα δε χρησιμοποιήθηκαν περαιτέρω για την επικύρωση της μεθόδου.

Για την αξιολόγηση των παρεμποδίσσεων από τα δευτεριωμένα εσωτερικά πρότυπα των αναλυτών παρασκευάστηκε λευκό δείγμα υποστρώματος το οποίο εμβολιάστηκε μόνο με το μίγμα των εσωτερικών προτύπων και αναλύθηκε σύμφωνα με την προτεινόμενη μέθοδο. Αξιολογώντας τα χρωματογραφικά δεδομένα του παραπάνω δείγματος δε διαπιστώθηκε παρεμβολή των δευτεριωμένων εσωτερικών προτύπων στο χρόνο έκλουσης των αναλυτών.

5.5.2.5 Έλεγχος επιμόλυνσης εκ μεταφοράς (carry-over)

Για να αξιολογηθεί η επιμόλυνση εκ μεταφοράς (carry over effect) ως μέρος της επικύρωσης της μεθόδου, λευκά δείγματα αναλύονται αμέσως μετά από δείγμα υψηλής συγκέντρωσης. Υπολογίζεται υψηλότερη συγκέντρωση κάθε αναλύτη στην οποία δεν παρατηρείται επιμόλυνση εκ μεταφοράς σε λευκό δείγμα που αναλύεται αμέσως μετά από το δείγμα αυτής της υψηλής συγκέντρωσης. Η συγκέντρωση αυτή επιβεβαιώνεται σε τρεις διαφορετικές ημέρες ανάλυσης.

Ο έλεγχος επιμόλυνσης εκ μεταφοράς πραγματοποιήθηκε αναλύοντας χρωματογραφικά ένα λευκό δείγμα προθανάτιου ολικού αίματος μετά από ένα πρότυπο διάλυμα των αναλυτών σε συγκέντρωση 4000 ng mL^{-1} . Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε σε τρεις διαφορετικές εργαστηριακές ημέρες. Όταν η απόκριση των αναλυτών στα λευκά δείγματα είναι πάνω από το 10% της απόκρισης των αναλυτών σε δείγματα συγκέντρωσης στο LOD της μεθόδου τότε θεωρείται ότι υπάρχει επιμόλυνση εκ μεταφοράς για τον αντίστοιχο αναλύτη. Κατά την αξιολόγηση των χρωματογραφικών δεδομένων στα παραπάνω λευκά δείγματα ολικού αίματος δεν παρατηρήθηκε επιμόλυνση εκ μεταφοράς για κανένα από τους αναλύτες.

5.6 Εφαρμογή της μεθόδου σε αναλύσεις πραγματικών δειγμάτων

Η προτεινόμενη μεθοδολογία ταυτοποίησης των αναλυτών σε μεταθανάτιο και προθανάτιο ολικό αίμα, εφαρμόστηκε σε δύο πραγματικά δείγματα υποθέσεων (ένα προθανάτιο δείγμα και ένα μεταθανάτιο δείγμα) και ένα διεργαστηριακό δείγμα.

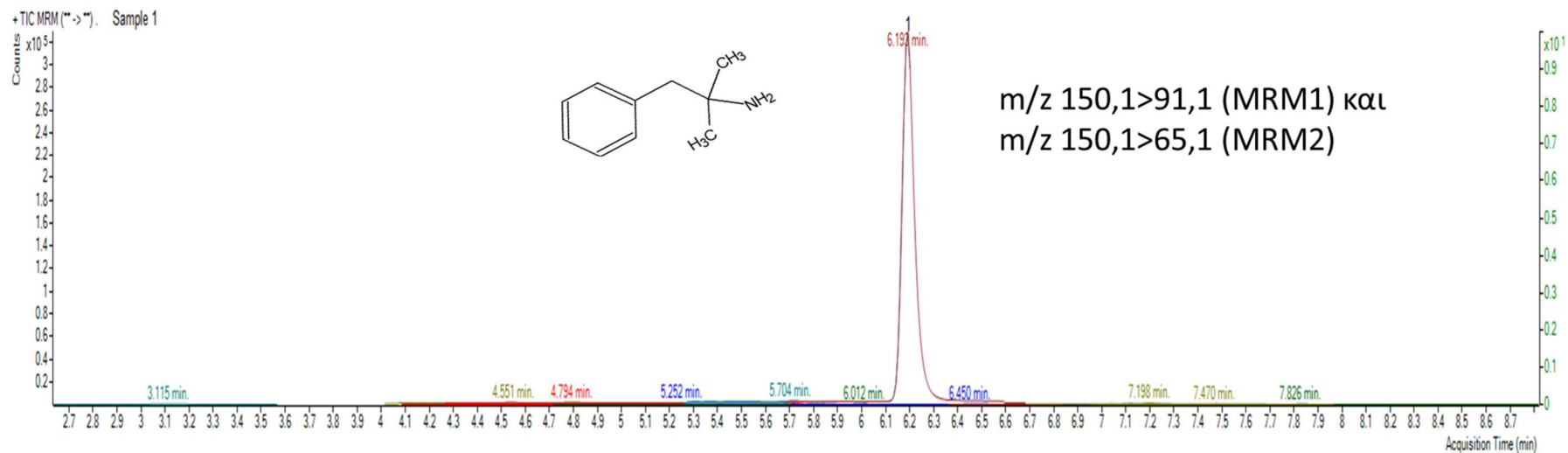
Για την ταυτοποίηση των αναλυτών στα πραγματικά δείγματα, ακολουθήθηκαν οδηγίες του OSAC, της Ευρωπαϊκής Ένωσης και οδηγίες από τη διεθνή βιβλιογραφία. Οι παραπάνω αναφορές περιγράφουν μία κοινή διαδικασία για τα κριτήρια ταυτοποίησης μίας ουσίας σε φασματομέτρο μαζών. Τα σημεία ταυτοποίησης καθορίζονται ανάλογα με την αναλυτική τεχνική και σύμφωνα με τις οδηγίες, η ταυτοποίηση των αναλυτών σε ένα σύστημα LC-tandem MS επιτυγχάνεται όταν συλλεγούν τουλάχιστον 4 σημεία ταυτοποίησης. Αυτά τα σημεία ταυτοποίησης πρέπει να προέρχονται από το χρόνο συγκράτησης των αναλυτών (1 σημείο ταυτοποίησης), και δύο μεταπτώσεις του μητρικού ιόντος σε δύο θυγατρικά ιόντα (2 σημεία ταυτοποίησης για κάθε μετάπτωση). Επιπλέον υπολογίζεται, μετά από ανάλυση εμβολιασμένου δείγματος, ο λόγος της σχετικής έντασης των ιόντων θραύσης (Qualifier MRM) για την ταυτοποίηση προς τη σχετική ένταση των ιόντων θραύσης για την ποσοτικοποίηση (Quantifier MRM) και ακολούθως καθορίζεται το μέγιστο εύρος αποδοχής του λόγου αυτού σύμφωνα με το οποίο ένα άγνωστο δείγμα είναι θετικό. Στην παρούσα εργασία υπολογίστηκε ο λόγος της σχετικής έντασης των ιόντων θραύσης για την ταυτοποίηση (Qualifier MRM) ως προς τα ιόντα θραύσης για την ποσοτικοποίηση (Quantifier MRM) και καθορίστηκε το όριο του $\pm 20\%$ του παραπάνω λόγου ως το μέγιστο εύρος αποδοχής ενός αγνώστου δείγματος ως θετικό.

Το πραγματικό δείγμα προθανάτιου ολικού αίματος που αναλύθηκε, αφορούσε άντρα περίπου 50 ετών με ιστορικό τροχαίου ατυχήματος. Κατά το ατύχημα, η αστυνομία προέβη σε κλινική εξέταση του ασθενούς ο οποίος ήταν σε σύγχυση με ληθαργική εικόνα και συστολικές κόρες οφθαλμών. Η ομιλία του ήταν μη κατανοητή (άτονη και αργή) και δε μπορούσε να κατανοήσει τις οδηγίες που δίνονταν από την αστυνομία. Κατά τον προκαταρκτικό έλεγχο του δείγματος ολικού αίματος με ανοσοενζυμική τεχνική ELISA, το δείγμα βρέθηκε θετικό σε amphetamine και phencyclidine. Η ανάλυση με GC-MS επιβεβαίωσε την ύπαρξη phentermine και phencyclidine, ενώ η ανάλυση με LC-MS/MS έδειξε ότι το δείγμα ήταν θετικό σε phentermine, χωρίς να επιβεβαιώνεται η παρουσία του amphetamine. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί λαμβάνοντας υπόψη ότι η ουσία phentermine εμφανίζει διασταυρούμενη δραστικότητα (cross reactivity) με το amphetamine σε ποσοστό 89%. Για το phentermine, χρησιμοποιήθηκαν οι μεταπτώσεις m/z 150,1>91,1 (MRM1) και m/z 150,1>56,1 (MRM2) οι οποίες βρέθηκαν να είναι εντός του αποδεκτού ορίου $\pm 20\%$. Ο χρόνος συγκράτησης του phentermine ήταν 6,19 λεπτά.

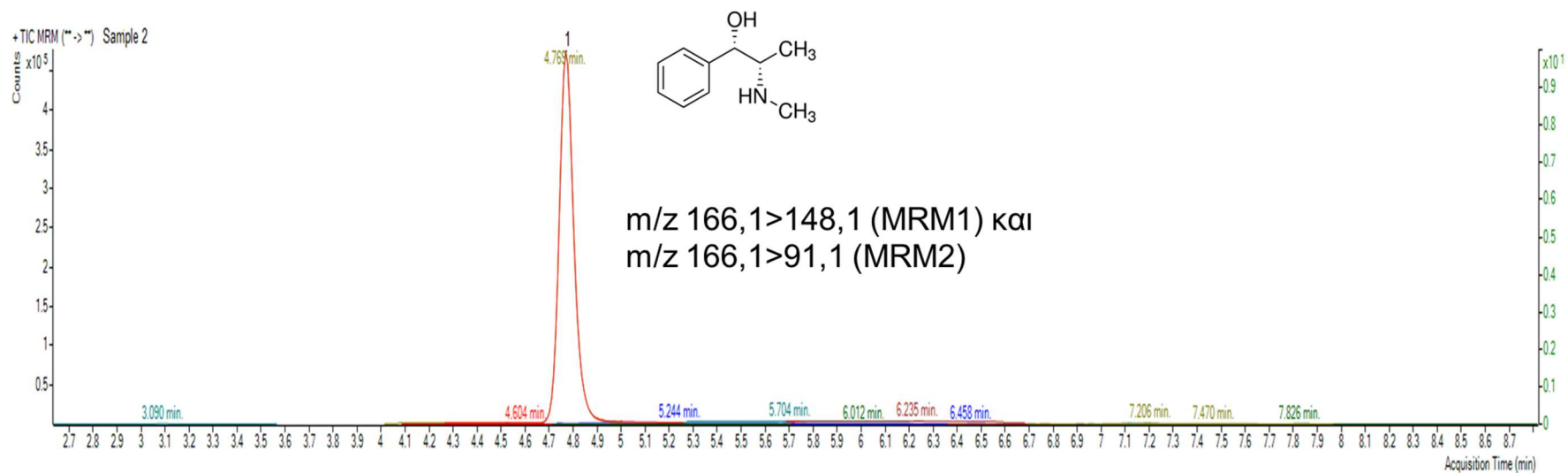
Αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα του δείγματος προθανάτιου ολικού αίματος παρουσιάζεται στο σχήμα 5.5.

Το πραγματικό δείγμα μεταθανάτιου ολικού αίματος που αναλύθηκε, αφορούσε γυναίκα περίπου 46 ετών. Κατά τον προκαταρκτικό έλεγχο με ανοσοενζυμική τεχνική ELISA, το δείγμα βρέθηκε θετικό σε methamphetamine, cannabinoids, benzodiazepines και buprenorphine. Η ανάλυση με LC-MS/MS έδειξε ότι το δείγμα ήταν θετικό σε pseudoephedrine. Για το pseudoephedrine, χρησιμοποιήθηκαν οι μεταπτώσεις m/z 166,1>148,1 (MRM1) και m/z 166,1>91,1 (MRM2) οι οποίες βρέθηκαν να είναι εντός του αποδεκτού ορίου $\pm 20\%$. Ο χρόνος συγκράτησης του pseudoephedrine ήταν 4,77 λεπτά. Αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα του μεταθανάτιου δείγματος φαίνεται στο σχήμα 5.6.

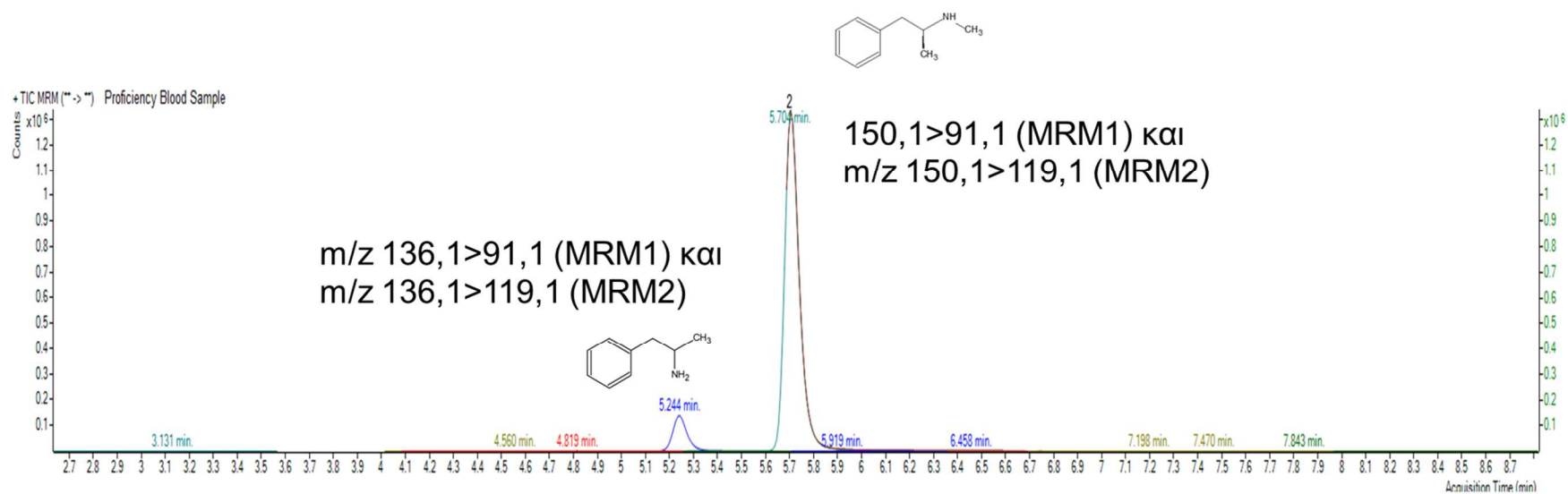
Το διεργαστηριακό δείγμα προήλθε από την εταιρία College of American Pathologists (Illinois, USA) και αφορούσε άντρα 34 ετών χρονών με ιστορικό χρήσης ηρωίνης ο οποίος βρέθηκε νεκρός στην οικία του. Κατά τον προκαταρκτικό έλεγχο με ανοσοενζυμική τεχνική ELISA, το δείγμα βρέθηκε θετικό σε amphetamine, methamphetamine και fentanyl. Κατά το στάδιο της επιβεβαίωσης, το δείγμα αναλύθηκε με GC-MS καθώς και με την προτεινόμενη μέθοδο σε LC-MS/MS. Η ανάλυση με GC-MS έδειξε ότι το δείγμα ήταν θετικό σε fentanyl, ενώ η ανάλυση με LC-MS/MS έδειξε ότι το δείγμα ήταν θετικό σε amphetamine και methamphetamine. Για το amphetamine, χρησιμοποιήθηκαν οι μεταπτώσεις m/z 136,1>91,1 (MRM1) και m/z 136,1>119,1 (MRM2) οι οποίες βρέθηκαν να είναι εντός του αποδεκτού ορίου $\pm 20\%$. Ο χρόνος συγκράτησης του amphetamine ήταν 5,24 λεπτά. Για το methamphetamine, χρησιμοποιήθηκαν οι μεταπτώσεις m/z 150,1>91,1 (MRM1) και m/z 150,1>119,1 (MRM2) οι οποίες βρέθηκαν να είναι εντός του αποδεκτού ορίου $\pm 20\%$. Ο χρόνος συγκράτησης του methamphetamine ήταν 5,70 λεπτά. Αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα του διεργαστηριακού δείγματος φαίνεται στο σχήμα 5.7.



Σχήμα 5.5: UHPLC-MS/MS χρωματογράφημα (MRM) που προκύπτει από την ανάλυση πραγματικού δείγματος σε προθανάτιο ολικό αίμα. 1: Phentermine.



Σχήμα 5.6: UHPLC-MS/MS χρωματογράφημα (MRM) που προκύπτει από την ανάλυση πραγματικού δείγματος σε μεταθανάτιο ολικό αίμα. 1: Pseudoephedrine



Σχήμα 5.7: UHPLC-MS/MS χρωματογράφημα (MRM) που προκύπτει από την ανάλυση του διεργαστηριακού δείγματος. 1: Amphetamine, 2: Methamphetamine

5.7 Συμπεράσματα

Στην κεφάλαιο αυτό αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε μέθοδος για τον ποιοτικό προσδιορισμό και την ταυτοποίηση 19 εξαρτησιογόνων ουσιών σε δείγματα μεταθανάτιου και προθανάτιου ολικού αίματος, με χρήση συστήματος UHPLC-MS/MS και της τεχνικής ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό. Η διάρκεια κάθε χρωματογραφικής ανάλυσης δεν ξεπερνά τα 13 λεπτά. Η μέθοδος αξιολογήθηκε σύμφωνα με την οδηγία SWGTOX ως προς τα κύρια χαρακτηριστικά ποιότητας, όπως ειδικότητα, εκλεκτικότητα, επιμόλυνση εκ μεταφοράς, επίδραση του υλικού μήτρας, κατώτατο όριο ανίχνευσης και ανάκτησης της μεθόδου τόσο σε μεταθανάτιο όσο και σε προθανάτιο ολικό αίμα. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα του μεταθανάτιου με αυτά του προθανάτιου ολικού αίματος δε διαπιστώθηκαν σημαντικές αποκλίσεις μεταξύ τους. Τα αποτελέσματα αυτών κρίθηκαν ικανοποιητικά καθιστώντας τη μέθοδο αυτή κατάλληλη για το ποιοτικό προσδιορισμό και ταυτοποίηση των αναλυτών τόσο σε μεταθανάτιο όσο και προθανάτιο ολικό αίμα. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία σε διεργαστηριακά και πραγματικά δείγματα ολικού αίματος.

Ένα από τα πλεονεκτήματα της προτεινόμενης μεθόδου σε σχέση με άλλες μεθόδους που περιγράφονται στη βιβλιογραφία είναι η δυνατότητα της ταυτόχρονης ανίχνευσης δεκαεννέα αναλυτών, για τα οποία, σύμφωνα με τη βιβλιογραφική ανασκόπηση που έγινε, δεν υπάρχει αντίστοιχη μέθοδος που να περιλαμβάνει όλα τα παραπάνω παράγωγα. Επιπλέον η προτεινόμενη μέθοδος επιτρέπει την ταυτόχρονη ανίχνευση σε προθανάτιο και μεταθανάτιο ολικό αίμα με κοινή κατεργασία του δείγματος. Λαμβάνοντας υπόψη τα προβλήματα που εμφανίζονται κατά την ανάλυση μεταθανάτιου ολικού αίματος λόγω της αποσύνθεσης του σώματος, η χρήση κοινής μεθόδου προεργασίας είναι σημαντική. Οι περισσότερες μέθοδοι που περιγράφονται στη διεθνή βιβλιογραφία αφορούν προθανάτιο ολικό αίμα ενώ μία βιβλιογραφία περιγράφει την ανίχνευση οκτώ αναλυτών [¹⁵¹], από τους δεκαεννέα που περιγράφονται στην προτεινόμενη μέθοδο σε αυτή τη διατριβή, ταυτόχρονα σε προθανάτιο και μεταθανάτιο ολικό αίμα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ UHPLC-ESI/MS/MS ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ 12 ΕΞΑΡΤΗΣΙΟΓΟΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΕ ΠΡΟΘΑΝΑΤΙΟ ΚΑΙ ΜΕΤΑΘΑΝΑΤΙΟ ΟΛΙΚΟ ΑΙΜΑ

6.1 Εισαγωγή- Σκοπός της εργασίας

Στην παρούσα εργασία αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού 12 εξαρτησιογόνων ουσιών παραγώγων του phenethylamine σε προθανάτιο και μεταθανάτιο ολικό αίμα. Τα παράγωγα του phenethylamine χρησιμοποιούνται τόσο θεραπευτικά όσο και για σκοπούς ψυχαγωγίας με συχνή όμως κατάληξη την κατάχρηση και την εξάρτηση [152]. Εμφανίζουν παρόμοια φαρμακολογική δράση και τοξικολογικές επιδράσεις, που περιλαμβάνουν αγγειοσύσπαση, ανορεξία, διέγερση του ΚΝΣ ή/και ψευδαισθήσεις. Οι τοξικολογικές επιδράσεις περιλαμβάνουν επιπρόσθετα υπέρταση, αρρυθμία, διέγερση, επιθετικότητα, ψύχωση, κώμα και θάνατο. Η ουσία d-amphetamine συνταγογραφήθηκε για πολλά χρόνια σε χαμηλή δοσολογία, ως θεραπεία επιλογής για τη θεραπεία του Συνδρόμου Υπερκινητικότητας και Διάσπασης Προσοχής (ΣΥΔΠ), ενώ τα τελευταία χρόνια το dextroamphetamine έχει αντικατασταθεί από το methylphenidate. Το amphetamine sulphate για πολλά χρόνια συνταγογραφήθηκε για τη θεραπεία της ναρκοληψίας. Το methamphetamine hydrochloride χορηγείται για τη θεραπεία της παχυσαρκίας. Αναλυτικά οι εξαρτησιογόνες ουσίες και οι μεταβολίτες τους που μελετήθηκαν στην εργασία είναι το amphetamine, το methamphetamine, το MDA, το MDMA, το MDEA, το methylphenidate, το phenylpropranolamine, το phentermine, το ephedrine, το pseudoephedrine, το bupropion, και ο μεταβολίτης του bupropion, το hydroxybupropion. Ο ποσοτικός προσδιορισμός αυτών των ουσιών σε ολικό αίμα είναι ιδιαίτερης σημασίας ώστε να κριθεί εάν βρίσκονται σε θεραπευτικά ή όχι επίπεδα. Οι συνήθεις δοσολογίες των αμφεταμινικών αναλόγων που χρησιμοποιούνται για θεραπευτικούς σκοπούς παρουσιάζονται πιο κάτω^[153]:

1. Amphetamine sulphate: 5-60 mg/ημέρα.
2. Methamphetamine hydrochloride: 2.5-20 mg/ημέρα, 10-15 mg ενδοφλεβίως/ημέρα
3. Dextroamphetamine: 10 mg/ημέρα
4. Methylphenidate: 5-10 mg/ημέρα, αυξανόμενη μέχρι 60 mg/ημέρα, το μέγιστο.

Η ανάπτυξη βιοαναλυτικών μεθόδων ποσοτικού προσδιορισμού εξαρτησιογόνων ουσιών, επιπρόσθετα της ταυτοποίησης, είναι σημαντική και μπορεί να συμβάλει στη διερεύνηση περιστατικών οδήγησης υπό την επήρεια φαρμάκων (Driving Under the Influence of Drugs, DUI), λόγω της εφαρμογής της νομοθεσίας ορίων (per se limits) από διάφορες χώρες και σταδιακά από διάφορες πολιτείες των Η.Π.Α. Σε σύγκριση με το οινόπνευμα, για το οποίο εδώ και πολλές δεκαετίες υπάρχει νομοθεσία η οποία καθορίζει τα αποδεκτά όρια για την οδήγηση, η

οδήγηση υπό την επήρεια ψυχοδραστικών ουσιών αποτελεί ένα νέο αντικείμενο έρευνας και σταδιακά αυξανόμενος αριθμός χωρών εφαρμόζει όρια ψυχοδραστικών ουσιών στο αίμα.

Για την ανάπτυξη της μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού χρησιμοποιήθηκε σύστημα υγροχρωματογραφίας υπερυψηλής απόδοσης συζευγμένο με δίδυμη φασματομετρία μαζών τριπλού τετραπόλου (UHPLC-MS/MS). Η αναπτυχθείσα μέθοδος αξιολογήθηκε ως προς τα κύρια χαρακτηριστικά ποιότητας (όριο ανίχνευσης, επίδραση υποστρώματος, ανάκτηση, έλεγχος ειδικότητας/εκλεκτικότητας, έλεγχος επιμόλυνσης μεθόδου, όριο ποσοτικοποίησης, μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης, ορθότητα και πιστότητα), χρησιμοποιώντας εμβολιασμένα δείγματα ανθρώπινου προθανάτιου και μεταθανάτιου ολικού αίματος. Για την ποσοτικοποίηση μελετήθηκαν ενώσεις που δεν εμπίπτουν στη νομοθεσία μηδενικής ανοχής της πολιτείας Ντέλαγουερ (Η.Π.Α.) καθώς και άλλες ενώσεις που επιλέχθηκαν από τη διοίκηση του εργαστηρίου. Η μέθοδος εφαρμόστηκε σε αναλύσεις πραγματικών δειγμάτων ολικού αίματος τα οποία προήλθαν από διάφορες τοξικολογικές υποθέσεις.

6.1.2 Αναλυτικές τεχνικές για τον ποσοτικό προσδιορισμό παραγώγων του phenethylamine

Για πολλά χρόνια, η αεριοχρωματογραφία συζευγμένη φασματομετρία μαζών (GC-MS) αποτελούσε την τεχνική επιλογής για τον ποσοτικό προσδιορισμό αμφεταμινών και παραγώγων της σε βιολογικά δείγματα. Ωστόσο, για να επιτευχθεί ικανοποιητική ευαισθησία στον προσδιορισμό των ενώσεων αυτών με την τεχνική GC-MS είναι απαραίτητο να παρεμβληθεί το στάδιο της παραγωγής των αναλυτών [154]. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι τρόπος εισαγωγής του δείγματος στον αεριοχρωματογράφο μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στη δομή των αμφεταμινών και να οδηγήσει σε παρερμηνεία των αποτελεσμάτων [155, 152]. Προκειμένου να ξεπεραστούν αυτά τα προβλήματα, η τεχνική LC-MS/MS έχει αποδειχθεί ότι είναι ιδανική εναλλακτική επιλογή καθώς μειώνει το χρόνο προεργασίας του δείγματος και αυξάνει την ευαισθησία και αξιοπιστία των μεθόδων. Στον πίνακα 6.1 παρουσιάζονται οι κυριότερες βιβλιογραφικές αναφορές και παρουσιάζονται πληροφορίες για τα αναλυτικά πρωτόκολλα που ακολουθήθηκαν για τον προσδιορισμό εξαρτησιογόνων ουσιών παραγώγων του phenethylamine με την τεχνική LC-MS/MS.

Πίνακας 6.1: Βιβλιογραφικές αναφορές αναλύσεων των αναλυτών

Αναλύτες	Αναλυτική μέθοδος	Βιβλιογραφία
<i>amphetamine, methamphetamine, ephedrine, MDA, MDMA, MDEA, 4-methoxyamphetamine</i>	LC-MS/MS με εκχύλιση στερεάς φάσης σε σειρά, αναλυτική στήλη: Nucleodur Sphinx RP, 120x2 mm, μέγεθος σωματιδίων 3 μm, κινητή φάση: μυρμηκικό αμμώνιο 10 mM/ακετονιτρίλιο, βαθμιδωτή έκλουση, ταχύτητα ροής: 0,25 mL/min	Προσδιορισμός αμφεταμινών σε ανθρώπινα δείγματα αίματος και ούρων με εκχύλιση στερεάς φάσης σε σειρά [156]
<i>Αμφεταμινών, καθινονών</i>	LC-MS/MS χειρόμορφης ανάλυσης, αναλυτική στήλη: Astec Chirobiotic V2 2,1 x 150 mm, μέγεθος σωματιδίων 5 μm, κινητή φάση: μυρμηκικό αμμώνιο 50 mM με 0,01% μυρμηκικού οξέος/μεθανόλη (5:95, v/v), ισοκρατική έκλουση, ταχύτητα ροής: 0,45 mL/min	Χειρόμορφη μέθοδος ανάλυσης αμφεταμινών και καθινονών σε δείγματα ούρων και πλάσματος ίππων [157]
<i>MDA, MDMA, MDEA</i>	LC-MS/APCI, αναλυτική στήλη: LiChroCART 55 x 4 mm με Purospher STAR RP-18e, κινητή φάση: νερό με 0,1% μυρμηκικού οξέος /ακετονιτρίλιο με 0,1% μυρμηκικού οξέος, βαθμιδωτή έκλουση, ταχύτητα ροής: 0,8 mL/min	Προσδιορισμός της MDA, MDMA και MDEA σε δείγματα ολικού αίματος [158]
<i>19 εξαρτησιογόνων ουσιών και μεταβολιτών μεταξύ των οποίων amphetamine, methamphetamine, MDA, MDMA και MDEA</i>	LC-MS/MS, αναλυτική στήλη: Varian Pursuit 3 C ₁₈ 100 x 3 mm, μέγεθος σωματιδίων 3 μm, κινητή φάση: 2 mM μυρμηκικό αμμώνιο με 8% ακετονιτρίλιο pH 5,3/ μεθανόλη, βαθμιδωτή έκλουση, ταχύτητα ροής: 0,3 mL/min	Προσδιορισμός 19 εξαρτησιογόνων ουσιών και μεταβολιτών σε δείγματα ολικού αίματος [159]
<i>αμφεταμίνες</i>	LC-ESI-MS/MS εναντιοεκλεκτική ανάλυση, αναλυτική στήλη: Kinetex C18 2,1 x 100 mm, μέγεθος σωματιδίων 2,6 μm, ισοκρατική έκλουση, κινητή φάση: 60%νερό/40% μεθανόλη, ταχύτητα ροής: 0,3 mL/min	Χειρόμορφη μέθοδος ανάλυσης αμφεταμινών σε δείγματα πλάσματος[160]
<i>ephedrine, pseudoephedrine και caffeine</i>	LC-MS/MS, αναλυτική στήλη Waters Xbridge phenyl 150 x 2,1 mm, μέγεθος σωματιδίων 2,1 μm, κινητή φάση: οξικό αμμώνιο 10 mM/ μεθανόλη, βαθμιδωτή έκλουση, ταχύτητα ροής: 0,3 mL/min	Προσδιορισμός ephedrine, pseudoephedrine και caffeine σε δείγματα πλάσματος ποντικών[161]

<i>Bupropion και οι τρεις κύριοι μεταβολίτες αυτού</i>	LC-MS/MS, αναλυτική στήλη: Waters Symmetry C18, 150 x 4,6 mm, μέγεθος σωματιδίων 5 μm, κινητή φάση: νερό με 0,04% μυρμηκικό οξύ/ μεθανόλη, ισοκρατική έκλουση, ταχύτητα ροής 1 mL/min.	Προσδιορισμός bupropion και των τριών κύριων μεταβολιτών αυτού σε πλάσμα του ομφαλίου λώρου και σε ιστό από πλακούντα [162]
<i>methylphenidate</i>	LC-MS/MS, αναλυτική στήλη: Eclipse Plus C18, 2,1 x 100 mm, μέγεθος σωματιδίων 1,8 μm, κινητή φάση: μυρμηκικό αμμώνιο 2 mM με 0,2% μυρμηκικό οξύ / μυρμηκικό αμμώνιο 2 mM με 0,2% μυρμηκικό οξύ σε ακετονιτρίλιο, βαθμιδωτή έκλουση, ταχύτητα ροής: 0,3 mL/min	Προσδιορισμός methylphenidate σε ανθρώπινες τρίχες [163]
<i>methylphenidate</i>	LC-MS/MS, αναλυτική στήλη: Zorbax C18, 2,1 x 50 mm, μέγεθος σωματιδίων 3,5 μm, κινητή φάση: 5 mM μυρμηκικό αμμώνιο με 0,1% μυρμηκικό οξύ/ακετονιτρίλιο (80:20 v/v), ισοκρατική έκλουση, ταχύτητα ροής: 0,5 mL/min	Προσδιορισμός της methylphenidate σε ξηρά κηλίδα αίματος [164]
<i>amphetamine, methamphetamine, MDMA, methylphenidate</i>	LC-MS/MS, αναλυτική στήλη: Acquity HSS T3, κινητή φάση: 10 mM μυρμηκικό αμμώνιο pH 3,1/ μεθανόλη, βαθμιδωτή έκλουση, ταχύτητα ροής: 0,5 mL/min, κατεργασία δείγματος: SPE ChemElute	Μέθοδος σάρωσης LC-MS/MS amphetamine, methamphetamine, MDMA, methylphenidate σε δείγματα αίματος [165]

6.2 Εξοπλισμός- Οργανολογία

6.2.1 Σύστημα UHPLC/ESI-MS/MS

Το σύστημα UHPLC/ESI-MS/MS περιγράφεται στο κεφάλαιο 5, πεδίο 5.2.1.

6.2.1.1 Συνθήκες λειτουργίας του συστήματος UHPLC

Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε με την αναλυτική στήλη Poroshell 120EC-C18, 2,1 x 75 mm, μεγέθους σωματιδίων 2,7 μm, της εταιρίας Agilent Technologies, Inc (Η.Π.Α). Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε 0,1% υδατικό διάλυμα μυρμηκικού οξέος (Α) και 0,1% μυρμηκικό οξύ σε ακετονιτρίλιο (Β). Πραγματοποιήθηκε βαθμιδωτό πρόγραμμα έκλουσης όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 5.3 (κεφάλαιο 5). Η ταχύτητα ροής στο χρωματογραφικό σύστημα ρυθμίστηκε στα 0,4 mL min⁻¹. Η θερμοκρασία της στήλης κατά τη διάρκεια των πειραμάτων ρυθμίστηκε στους 45 °C ενώ η θερμοκρασία του αυτόματου δειγματολήπτη ρυθμίστηκε στους 5

°C. Ο όγκος έγχυσης ρυθμίστηκε στο 1 μL και ο χρόνος ανάλυσης για κάθε εισαγωγή δείγματος ήταν 11 λεπτά με δύο λεπτά (post-run) για να σταθεροποιηθεί η στήλη με την αρχική σύσταση της κινητής φάσης.

6.2.1.2 Συνθήκες λειτουργίας του φασματομέτρου μαζών

Η ανίχνευση των αναλυτών πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροψεκασμό, σε θετικό ιοντισμό ESI(+). Η θερμοκρασία της πηγής ιοντισμού και η ταχύτητα ροής του αερίου αποδιαλύτωσης (άζωτο) ρυθμίστηκαν στους 350 °C και 10 L min^{-1} , αντίστοιχα. Η πίεση του αερίου στη βελόνα νεφελοποίησης ρυθμίστηκε στα 45 psi, ενώ το δυναμικό του τριχοειδούς ρυθμίστηκε στα 3,0 kV. Το δυναμικό της πηγής ιοντισμού που μπορεί να οδηγήσει σε θραύση των ιόντων των αναλυτών (fragmentor voltage), η ενέργεια θραύσης (collision energy) καθώς και τα ιόντα των θυγατρικών ιόντων για κάθε ένα αναλύτη επιλέχθηκαν ύστερα από βελτιστοποίηση των συνθηκών αυτών, τόσο για τους αναλύτες όσο και για τα εσωτερικά τους πρότυπα, με τη βοήθεια του λογισμικού συστήματος βελτιστοποίησης των παραμέτρων του φασματομέτρου μαζών για κάθε έναν αναλύτη χωριστά (optimizer).

Για κάθε αναλύτη παρακολουθούνταν δύο ιόντα θραύσης. Τα ιόντα θραύσης με τη μεγαλύτερη ευαισθησία χρησιμοποιήθηκαν ως ιόντα για την ποσοτικοποίηση (Quantifier MRM), ενώ τα ιόντα θραύσης με τη χαμηλότερη ευαισθησία χρησιμοποιήθηκαν ως ιόντα για την ταυτοποίηση (Qualifier MRM). Στον πίνακα 6.2 παρουσιάζονται οι χρόνοι έκλυσης των αναλυτών και των εσωτερικών προτύπων μαζί με τις βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας του φασματομέτρου μαζών. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε επιπλέον η τεχνική της δυναμικής παρακολούθησης επιλεγμένων ιόντων (dynamic Multiple Reaction monitoring, dMRM). Η δυναμική παρακολούθηση επιλεγμένων ιόντων επιτρέπει τη χρήση μίας νέας και ταχείας τεχνικής για τη βελτιστοποίηση μεθόδων με μεγάλο αριθμό αναλυτών στο LC-MS/MS. Το λογισμικό dMRM χρησιμοποιεί τους χρόνους συγκράτησης, τα παράθυρα ανίχνευσης (Delta rt), και ένα σταθερό χρόνο κύκλου σάρωσης, και αυτόματα δημιουργεί πίνακες χρόνων dMRM για την ακριβή ανίχνευση των πολλαπλών αναλυτών όπως αυτοί εκλούνται από τη χρωματογραφική στήλη. Με κάθε πίνακα χρόνων dMRM, όλες οι μεταπτώσεις των ιόντων έχουν τον ίδιο χρόνο καταγραφής, αλλά αυτοί οι χρόνοι διαφέρουν για κάθε πίνακα χρόνων προκειμένου να διασφαλιστεί η καταγραφή ικανοποιητικού αριθμού σημείων για κάθε κορυφή.

Πίνακας 6.2: Βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας του φασματομέτρου μαζών

Αναλύτης	Χρόνος έκλουσης (min)	Μητρικό ιόν (Q1, m/z)	Θυγατρικά ιόντα (Q3, m/z)*	Δυναμικό θραύσης (Collision energy)/ (V)	Δυναμικό πηγής ιοντισμού (V)
<i>Amphetamine</i>	4,81	136,1	91,1 119,1	17 6	70
<i>Bupropion</i>	7,71	240,1	184,1 139	10 26	80
<i>Ephedrine</i>	3,9	166,1	148,1 91,1	10 38	75
<i>Hydroxy bupropion</i>	6,96	256,1	238,1 139	6 30	70
<i>MDA</i>	5,35	180,1	163,1 105,1	6 22	70
<i>MDEA</i>	6,21	208,1	163 135	20 10	90
<i>MDMA</i>	5,69	194,1	163,1 105,1	10 26	80
<i>Methamphetamine</i>	5,35	150,1	91,1 119,1	21 6	80
<i>Methylphenidate</i>	7,05	234,2	84,1 56,1	18 54	90
<i>Phentermine</i>	5,94	150,1	91,1 65,1	22 46	65
<i>Phenylpropanolamine</i>	2,81	152,1	134,1 91,1	6 34	60
<i>Pseudoephedrine</i>	4,25	166,1	148,1 91,1	10 34	70
<i>Amphetamine -d11</i>	4,69	174,2	98,1	18	65
<i>Methamphetamine -d11</i>	5,25	161,2	97,1	18	75
<i>Ephedrine -d3</i>	3,9	169,1	151,1	10	70
<i>Pseudoephedrine -d3</i>	4,23	169,1	151,1	10	75
<i>MDA -d5</i>	5,32	185,1	168,1	6	65
<i>MDEA -d5</i>	6,2	213,2	163,1	10	80
<i>Norpseudoephedrine -d3</i>	3,22	155,1	137,1	6	60
<i>MDMA -d5</i>	5,67	199,2	165,1	10	85
<i>Phentermine -d5</i>	5,89	155,2	96,1	22	65
<i>Hydroxybupropion -d6</i>	6,94	262,1	244,1	6	80
<i>Bupropion -d9</i>	7,68	249,2	185	10	70
<i>Methylphenidate -d9</i>	7,03	243,2	93,2	20	90

Με έντονο μαύρο χρώμα φαίνονται τα ιόντα ποσοτικοποίησης.

6.3 Διαλύματα παρακαταθήκης και διαλύματα εργασίας

6.3.1 Διαλύματα παρακαταθήκης

Τα διαλύματα παρακαταθήκης των αναλυτών και των εσωτερικών προτύπων ήταν της εταιρίας Cerilliant (Η.Π.Α). Τα διαλύματα παρακαταθήκης φυλάσσονται σε σκουρόχρωμα φιαλίδια σε θερμοκρασία - 20°C και παραμένουν σταθερά σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρίας. Η συγκέντρωση των διαλυμάτων παρακαταθήκης για τους αναλύτες είναι 1 mg/mL ενώ αυτή των εσωτερικών προτύπων 100 µg/mL.

6.3.2 Διάλυμα εργασίας

Για τον εμβολιασμό των δειγμάτων ελέγχου που χρησιμοποιήθηκαν για την επικύρωση της προτεινόμενης μεθόδου, παρασκευάστηκαν μικτά διαλύματα εργασίας λαμβάνοντας κατάλληλους όγκους από τα πρότυπα διαλύματα παρακαταθήκης, και αραιώνοντας τα σε μεθανόλη καθαρότητας HPLC, με χρήση ογκομετρικής φιάλης των 50 mL ώστε να προκύψει μεικτό διάλυμα εργασίας των αναλυτών συγκέντρωσης 10 µg/mL.

6.3.3 Διάλυμα εργασίας εσωτερικών προτύπων

Λαμβάνοντας κατάλληλους όγκους από τα πρότυπα διαλύματα παρακαταθήκης των εσωτερικών προτύπων αραιώνονται σε μεθανόλη καθαρότητας HPLC, με χρήση ογκομετρικής φιάλης των 50 mL ώστε να προκύψει μεικτό διάλυμα εργασίας των αναλυτών συγκέντρωσης 1 µg/mL.

6.3.4 Εμβολιασμένα δείγματα ολικού αίματος

6.3.4.1 Παρασκευή εμβολιασμένων δειγμάτων ολικού αίματος για τις καμπύλες βαθμονόμησης

Για την κατασκευή των καμπυλών βαθμονόμησης των αναλυτών παρασκευάζονται εμβολιασμένα δείγματα προθανάτιου ολικού αίματος, αφού πρώτα έχει ελεγχθεί ότι τα δείγματα αυτά δεν περιέχουν κανένα αναλύτη. Το εύρος της καμπύλης βαθμονόμησης για όλους τους αναλύτες κυμάνθηκε από 20 έως 2000 ng mL⁻¹. Στον πίνακα 6.3 παρουσιάζεται ο τρόπος παρασκευής και οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις των δειγμάτων που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης.

Πίνακας 6.3: Παρασκευή εμβολιασμένων δειγμάτων προθανάτιου ολικού αίματος για τις καμπύλες βαθμονόμησης			
Όγκος ολικού αίματος (mL)	Όγκος μεικτού διαλύματος εργασίας 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (μL)	Όγκος μεικτού δ/τος εσωτερικών προτύπων 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (μL)	Τελική συγκέντρωση (ng mL^{-1})
1	2	100	20
1	5	100	50
1	10	100	100
1	30	100	300
1	50	100	500
1	100	100	1000
1	150	100	1500
1	200	100	2000

6.3.4.2 Εμβολιασμένα δείγματα ελέγχου (QC samples) προθανάτιου και μεταθανάτιου ολικού αίματος

Τα εμβολιασμένα δείγματα ελέγχου προθανάτιου και μεταθανάτιου ολικού αίματος παρασκευάζονται σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις: 60, 800 και 1600 ng mL^{-1} .

6.4 Κατεργασία δείγματος

Η κατεργασία των δειγμάτων περιγράφεται στο κεφάλαιο 5, πεδίο 5.5.1.

6.5 Επικύρωση μεθόδου UHPLC-ESI/MS/MS για τον ποσοτικό προσδιορισμό των αναλυτών σε προθανάτιο και μεταθανάτιο ολικό αίμα

Η μέθοδος επικυρώθηκε ξεχωριστά στο προθανάτιο και μεταθανάτιο ολικό αίμα σύμφωνα με την οδηγία του SWGTOX. Η επικύρωση μιας μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού σύμφωνα με την οδηγία SWGTOX περιλαμβάνει μεταξύ άλλων, τον καθορισμό των ορίων ανίχνευσης και των ορίων ποσοτικοποίησης, τον έλεγχο γραμμικότητας, τους ελέγχους ορθότητας και πιστότητας, τη μελέτη επίδρασης του υλικού μήτρας (matrix effect), τον έλεγχο της ειδικότητας και εκλεκτικότητας της μεθόδου και τέλος τον έλεγχο επιμόλυνσης εκ μεταφοράς.

Ο καθορισμός των ορίων ανίχνευσης/απόφασης, η μελέτη επίδρασης του υλικού μήτρας, ο έλεγχος της ανάκτησης καθώς και ο έλεγχος της ειδικότητας και εκλεκτικότητας της μεθόδου περιγράφονται στο κεφάλαιο 5.2. Τα όρια ποσοτικοποίησης καθορίστηκαν σύμφωνα με την οδηγία SWGTOX χρησιμοποιώντας τη συγκέντρωση του ορίου απόφασης ως όριο ποσοτικοποίησης. Ο έλεγχος του ορίου ποσοτικοποίησης πραγματοποιείται σε τουλάχιστον τρεις διαφορετικές ημέρες ανάλυσης χρησιμοποιώντας τρεις διαφορετικές λευκές μήτρες υποστρώματος εμβολιασμένες στο κατώτατο όριο ποσοτικοποίησης για να αποδειχθεί ότι

πληρούνται όλα τα κριτήρια ανίχνευσης, ταυτοποίησης, σφάλματος και ορθότητας. Τα αποδεκτά όρια σφάλματος και ορθότητας είναι $\pm 20\%$.

6.5.1 Όριο ποσοτικοποίησης

Το όριο ποσοτικοποίησης της μεθόδου σε μεταθανάτιο ολικό αίμα βρέθηκε ίσο με 2 ng mL^{-1} για όλους τους αναλύτες, όπως υπολογίστηκε από τις καμπύλες αναφοράς. Στη συνέχεια καθορίστηκε ως επιθυμητό όριο απόφασης από τη διοίκηση του εργαστηρίου η συγκέντρωση 20 ng mL^{-1} . Ως όριο ποσοτικοποίησης της μεθόδου ορίστηκαν τα 20 ng mL^{-1} για όλους τους αναλύτες. Σε αυτή τη συγκέντρωση, παρασκευάστηκαν εμβολιασμένα δείγματα, τόσο σε μεταθανάτιο όσο και σε προθανάτιο ολικό αίμα. Παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν τρία δείγματα σε κάθε σειρά ανάλυσης για τέσσερις συνεχόμενες, διαφορετικές μέρες, και σειρές ανάλυσης (12 μετρήσεις συνολικά σε μεταθανάτιο και 12 μετρήσεις συνολικά σε προθανάτιο ολικό αίμα). Υπολογίστηκε η επί τοις εκατό σχετική τυπική απόκλιση και βρέθηκε να είναι μικρότερη από 20% που συμφωνεί με τα κριτήρια αποδοχής της οδηγίας SWGTOX.

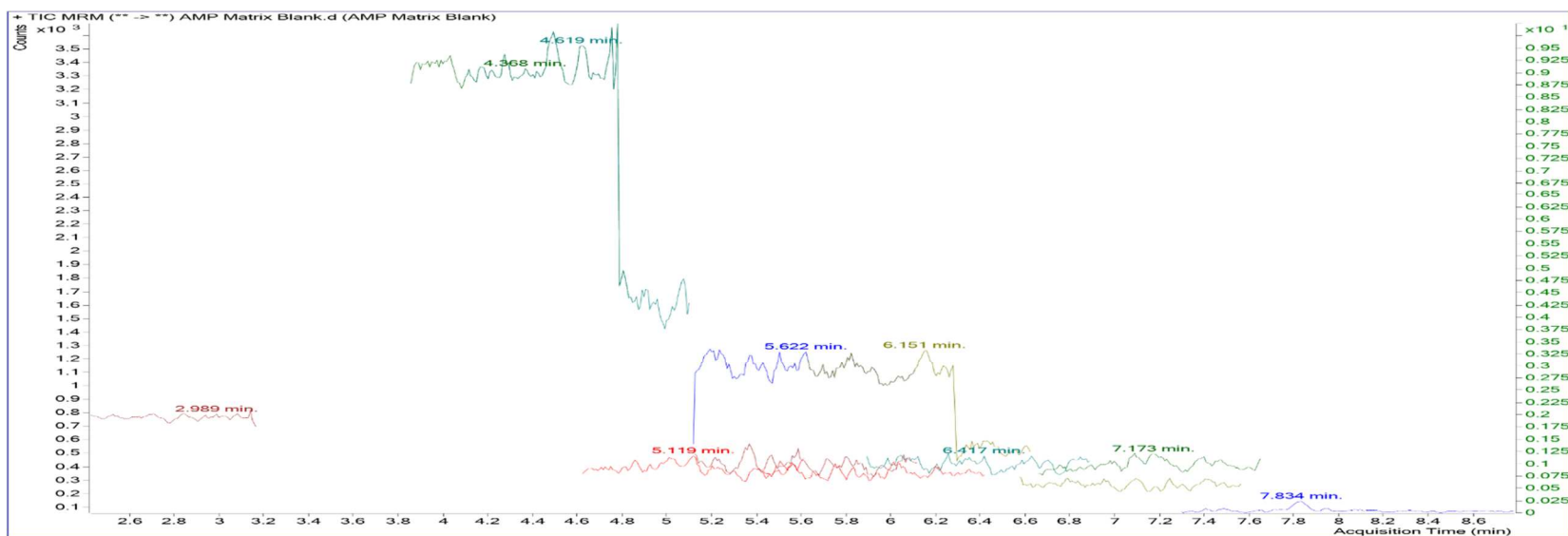
Προθανάτιο ολικό αίμα

Τα αποτελέσματα της αξιολόγησης του ορίου ποσοτικοποίησης στο προθανάτιο ολικό αίμα για όλους τους αναλύτες παρουσιάζονται συνοπτικά στον πίνακα 6.4

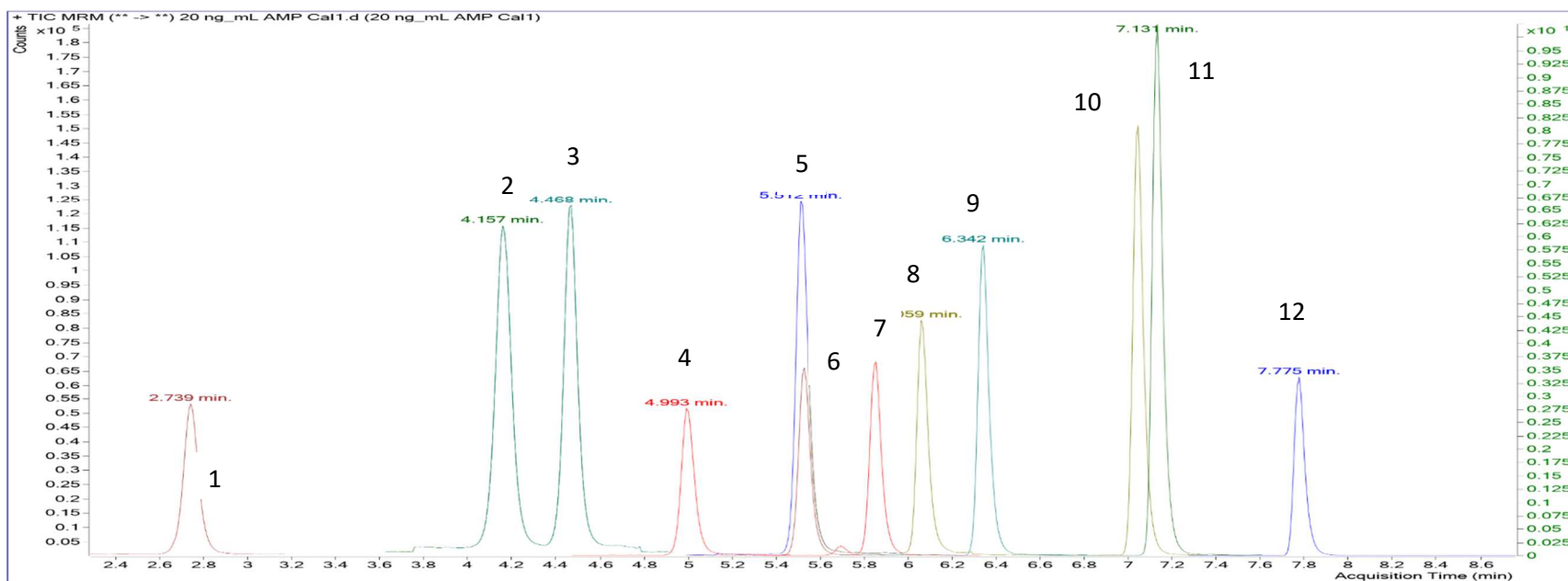
Πίνακας 6.4: Αξιολόγηση του ορίου ποσοτικοποίησης (LOQ) των αναλυτών σε εμβολιασμένο προθανάτιο ολικό αίμα

Προθανάτιο ολικό αίμα			
Συγκέντρωση LOQ= 20 ng mL^{-1}	Μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση _(n=10) (ng mL^{-1})	%RSD	% Er
<i>Amphetamine</i>	$20,1 \pm 1,4$	6,7	0,3
<i>Methamphetamine</i>	$18,9 \pm 1,9$	10,5	-5,3
<i>MDA</i>	$19,9 \pm 1,9$	9,3	-0,1
<i>MDMA</i>	$20,0 \pm 1,9$	9,4	0,2
<i>Phentermine</i>	$18,0 \pm 2,7$	14,8	-9,9
<i>Pseudoephedrine</i>	$19,7 \pm 1,7$	8,6	-1,4
<i>Bupropion</i>	$19,9 \pm 1,7$	8,5	-0,6
<i>Hydroxybupropion</i>	$20,3 \pm 1,7$	8,2	1,4
<i>Ephedrine</i>	$20,5 \pm 1,6$	7,6	2,4
<i>MDEA</i>	$20,9 \pm 1,9$	9,4	4,7
<i>Phenylpropanolamine</i>	$18,9 \pm 1,9$	10,5	-5,6
<i>Methylphenidate</i>	$20,9 \pm 2,2$	10,4	4,9

Όπως διαπιστώνεται από τα αποτελέσματα, η επί τοις εκατό σχετική τυπική απόκλιση δεν ξεπερνά το $14,8\%$ και το επί τοις εκατό σχετικό σφάλμα δεν ξεπερνά σε απόλυτη τιμή το $9,9\%$ για όλους τους αναλύτες στο προθανάτιο ολικό αίμα.



Σχήμα 6.1: Αντιπροσωπευτικό UHPLC-MS/MS χρωματογράφημα που προκύπτει από την ανάλυση λευκού προθανάτιου δείγματος ολικού αίματος με παρακολούθηση των ιόντων ποιοτικού προσδιορισμού και ταυτοποίησης των αναλυτών (MRM)



Σχήμα 6.2: Αντιπροσωπευτικό UHPLC-MS/MS χρωματογράφημα που προκύπτει από την ανάλυση εμβολιασμένων δειγμάτων προθανάτιου ολικού αίματος στο κατώτατο όριο ποσοτικοποίησης των αναλυτών, με παρακολούθηση των ιόντων ποσοτικού προσδιορισμού και ταυτοποίησης (MRM). 1: Phenylpropranolamine, 2: Ephedrine, 3: Pseudoephedrine, 4: Amphetamine, 5: Methamphetamine, 6: MDA, 7: MDMA, 8: Phentermine, 9: MDEA, 10: Hydroxybupropion, 11: Methylphenidate, 12: Bupropion.

Στο σχήμα 6.1 και στο παράρτημα 14 παρουσιάζονται χρωματογραφήματα ιόντων λευκού δείγματος προθανάτιου ολικού αίματος ενώ στο σχήμα 6.2 και στο παράρτημα 15 παρουσιάζονται χρωματογραφήματα ιόντων των αναλυτών σε δείγμα προθανάτιου ολικού αίματος στο κατώτατο όριο ποσοτικοποίησης της μεθόδου.

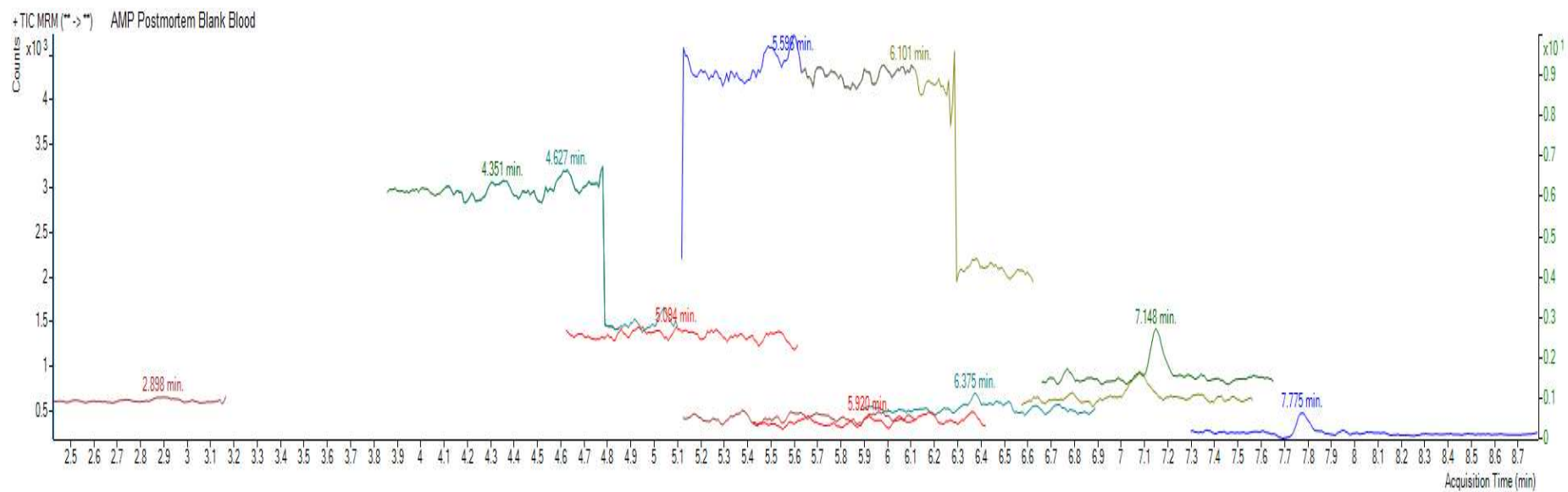
Μεταθανάτιο ολικό αίμα

Τα αποτελέσματα της αξιολόγησης του ορίου ποσοτικοποίησης στο μεταθανάτιο ολικό αίμα για όλους τους αναλύτες παρουσιάζονται συνοπτικά στον πίνακα 6.5. Στο σχήμα 6.3 παρουσιάζεται ιοντικό χρωματογράφημα που προκύπτει από την ανάλυση τυφλού δείγματος μεταθανάτιου ολικού αίματος ενώ στο σχήμα 6.4 παρουσιάζεται ιοντικό χρωματογράφημα των αναλυτών σε δείγμα μεταθανάτιου ολικού αίματος στο κατώτατο όριο ποσοτικοποίησης της μεθόδου.

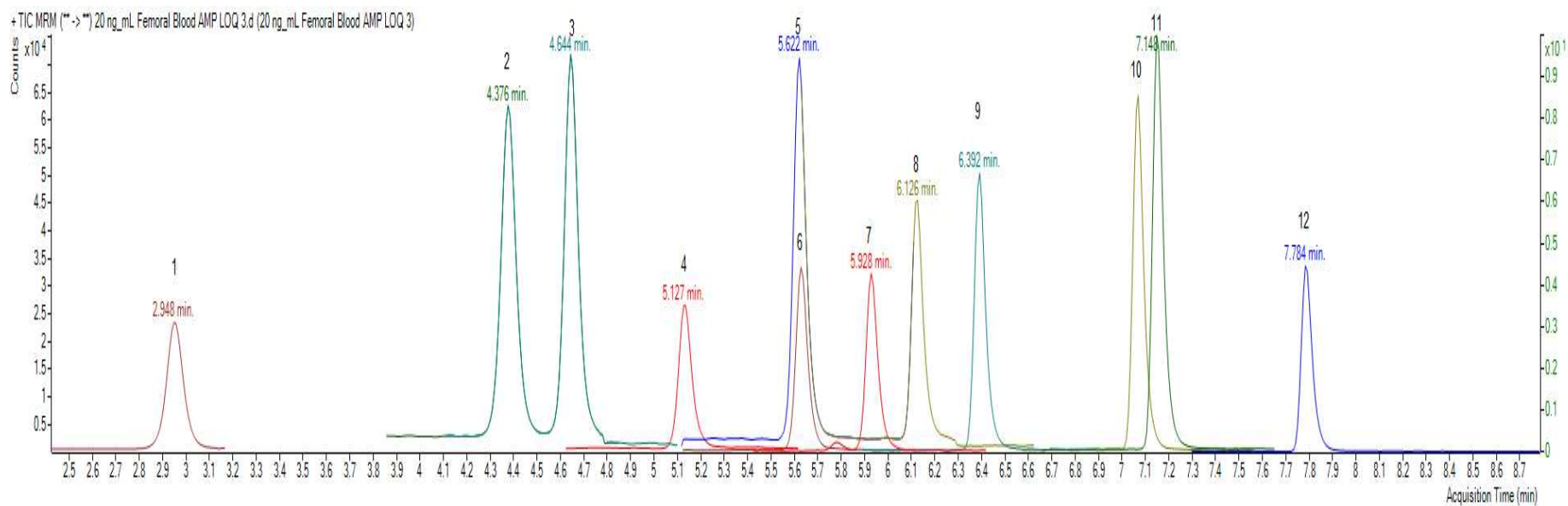
Πίνακας 6.5: Αξιολόγηση του ορίου ποσοτικοποίησης των αναλυτών (LOQ) σε εμβολιασμένο μεταθανάτιο ολικό αίμα

Μεταθανάτιο ολικό αίμα			
<i>Συγκέντρωση LOQ= 20 ng mL⁻¹</i>	Μέση τιμή ± τυπική απόκλιση _(n=10) (ng mL ⁻¹)	%RSD	% σχετικό σφάλμα
<i>Amphetamine</i>	20,9 ± 3,6	17,1	4,5
<i>Methamphetamine</i>	19,5 ± 3,4	17,3	-2,3
<i>MDA</i>	20,8 ± 3,1	14,9	4,1
<i>MDMA</i>	20,9 ± 2,9	14,3	4,6
<i>Phentermine</i>	19,3 ± 3,2	16,7	-3,4
<i>Pseudoephedrine</i>	20,9 ± 3,2	15,2	4,6
<i>Bupropion</i>	20,9 ± 2,8	13,3	4,7
<i>Hydroxybupropion</i>	21,2 ± 3,0	14,2	6,2
<i>Ephedrine</i>	21,5 ± 2,7	12,6	7,4
<i>MDEA</i>	21,8 ± 3,5	16,1	8,8
<i>Phenylpropanolamine</i>	19,5 ± 3,5	17,7	-2,3
<i>Methylphenidate</i>	21,8 ± 3,8	17,4	8,8

Όπως διαπιστώνεται από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον πίνακα 6.5, η επί τοις εκατό σχετική τυπική απόκλιση δεν ξεπερνά το 17,7% και το επί τοις εκατό σχετικό σφάλμα δεν ξεπερνά σε απόλυτη τιμή το 8,8% για όλους τους αναλύτες στο μεταθανάτιο ολικό αίμα.



Σχήμα 6.3: Αντιπροσωπευτικό UHPLC-MS/MS χρωματογράφημα που προκύπτει από την ανάλυση λευκού μεταθανάτιου δείγματος ολικού αίματος με παρακολούθηση των ιόντων ποιοτικού προσδιορισμού και ταυτοποίησης των αναλυτών (MRM)



Σχήμα 6.4: Αντιπροσωπευτικό UHPLC-MS/MS χρωματογράφημα που προκύπτει από την ανάλυση εμβολιασμένων δειγμάτων μεταθανάτιου ολικού αίματος στο κατώτατο όριο ποσοτικοποίησης των αναλυτών, με παρακολούθηση των ιόντων ποσοτικού προσδιορισμού και ταυτοποίησης (MRM). 1: Phenylpropanolamine, 2: Ephedrine, 3: Pseudoephedrine, 4: Amphetamine, 5: Methamphetamine, 6: MDA, 7: MDMA, 8: Phentermine, 9: MDEA, 10: Hydroxybupropion, 11: Methylphenidate, 12: Bupropion

6.5.2 Έλεγχος γραμμικότητας - καμπύλες βαθμονόμησης

Η γραμμικότητα της μεθόδου ελέγχθηκε με την παρασκευή και την ανάλυση καμπυλών βαθμονόμησης σε πέντε διαφορετικές εργαστηριακές ημέρες. Η γραμμικότητα ελέγχθηκε σε εμβολιασμένα δείγματα προθανάτιου ολικού αίματος με εύρος συγκεντρώσεων από 20 έως 2000 ng mL⁻¹ για όλες τις ουσίες. Ο ποσοτικός προσδιορισμός έγινε με βάση το λόγο του εμβαδού της χρωματογραφικής κορυφής του κάθε αναλύτη (E_a) προς το εμβαδόν της χρωματογραφικής κορυφής του αντίστοιχου εσωτερικού προτύπου ($E_{επ}$). Στον πίνακα 6.6 παρουσιάζονται τα εσωτερικά πρότυπα που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε αναλύτη.

Πίνακας 6.6: Εσωτερικά πρότυπα που χρησιμοποιήθηκαν για την επικύρωση της μεθόδου

Εσωτερικό Πρότυπο	Αναλύτης
<i>Amphetamine-d11</i>	Amphetamine
<i>Methamphetamine-d11</i>	Methamphetamine
<i>MDA-d5</i>	MDA
<i>MDMA-d5</i>	MDMA
<i>Phentermine-d5</i>	Phentermine
<i>Pseudoephedrine-d3</i>	Pseudoephedrine
<i>Bupropion-d9</i>	Bupropion
<i>Hydroxybupropion-d6</i>	Hydroxybupropion
<i>Ephedrine-d3</i>	Ephedrine
<i>MDEA-d5</i>	MDEA
<i>Norpseudoephedrine-d3</i>	Phenylpropanolamine
<i>Methylphenidate-d9</i>	Methylphenidate

6.5.2.1 Μελέτη ανάλυσης παλινδρόμησης και επιλογή του βέλτιστου παράγοντα ζύγισης

Για όλους τους αναλύτες μελετήθηκε και αξιολογήθηκε η ανάλυση παλινδρόμησης χρησιμοποιώντας γραμμικό και πολυωνυμικό μοντέλο και τη χρήση συντελεστών στατιστικού βάρους $1/x$ και $1/x^2$. Στο πρώτο στάδιο χρησιμοποιήθηκε για την επιλογή του βέλτιστου μοντέλου παλινδρόμησης, το λογισμικό πρόγραμμα GraphPad Prism (ver. 6) το οποίο δίνει τη δυνατότητα αυτοματοποιημένης σύγκρισης μεταξύ των αποτελεσμάτων της γραμμικής και πολυωνυμικής ανάλυσης παλινδρόμησης προτείνοντας το βέλτιστο μοντέλο. Στο δεύτερο στάδιο, μετά την ανάλυση των διαγραμμάτων των υπολοίπων και την αξιολόγηση του r^2 επιλέγεται ο βέλτιστος συντελεστής στατιστικού βάρους για κάθε αναλύτη.

Για το amphetamine, ο συντελεστής προσδιορισμού (r^2) ήταν μεγαλύτερος από 0,996 σε όλες τις περιπτώσεις. Στο πρώτο στάδιο επιλέχθηκε το πολυωνυμικό μοντέλο παλινδρόμησης δεύτερου

βαθμού και στο δεύτερο στάδιο, μετά την ανάλυση των διαγραμμάτων υπολοίπων και την αξιολόγηση του r^2 επιλέχθηκε ως βέλτιστος ο συντελεστής στατιστικού βάρους $1/x$ αντί του $1/x^2$.

Πίνακας 6.7: Μέσες πειραματικές συγκεντρώσεις για το amphetamine σε όλο το εύρος της καμπύλης αναφοράς με γραμμική (ΓΑΠ) και πολυωνυμική ανάλυση παλινδρόμησης δευτέρου βαθμού (ΠΑΠ) (συντελεστής στατιστικού βάρους $1/x$)

	Μοντέλο ανάλυσης Παλινδρόμησης			
	ΓΑΠ (1/x)		ΠΑΠ (1/x)	
Θεωρητική συγκέντρωση (ng mL ⁻¹)	Μέση πειραματική συγκέντρωση (n=5) (ng mL ⁻¹)	% σχετικό σφάλμα	Μέση πειραματική συγκέντρωση (n=5) (ng mL ⁻¹)	% σχετικό σφάλμα
20	15,1	-24,5	20,4	2,1
50	49,7	-0,5	49,9	-0,1
100	111	10,7	102	2,5
300	318	6,0	285	-4,8
500	534	6,9	484	-3,1
1000	1074	7,4	1024	2,4
1500	1536	2,4	1555	3,7
2000	1832	-8,4	1944	-2,8

Στον πίνακα 6.7 παρουσιάζονται οι μέσες πειραματικές συγκεντρώσεις για το amphetamine σε όλο το εύρος της καμπύλης αναφοράς με γραμμική και πολυωνυμική ανάλυση παλινδρόμησης δευτέρου βαθμού (συντελεστής στατιστικού βάρους $1/x$). Όταν χρησιμοποιήθηκε η πολυωνυμική ανάλυση παλινδρόμησης δευτέρου βαθμού, η ορθότητα στο κατώτατο σημείο της καμπύλης αναφοράς ήταν καλύτερη σε σχέση με τη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης.

Πίνακας 6.8: Μέσες πειραματικές συγκεντρώσεις για το methamphetamine σε όλο το εύρος της καμπύλης αναφοράς με γραμμική (ΓΑΠ) και πολυωνυμική ανάλυση παλινδρόμησης δευτέρου βαθμού (ΠΑΠ) (συντελεστής στατιστικού βάρους $1/x$)

	Μοντέλο ανάλυσης Παλινδρόμησης			
	ΓΑΠ (1/x)		ΠΑΠ (1/x)	
Θεωρητική συγκέντρωση (ng mL ⁻¹)	Μέση πειραματική συγκέντρωση (n=5) (ng mL ⁻¹)	% σχετικό σφάλμα	Μέση πειραματική συγκέντρωση (n=5) (ng mL ⁻¹)	% σχετικό σφάλμα
20	14,7	-26,5	19,1	-4,6
50	50,2	0,4	50,3	0,6
100	114	13,9	107	6,9
300	320	6,7	294	-2,1
500	529	5,8	489	-2,1
1000	1055	5,5	1016	1,6
1500	1493	-0,4	1501	0,1
2000	1894	-5,3	1993	-0,3

Για το methamphetamine, ο συντελεστής προσδιορισμού (r^2) ήταν μεγαλύτερος από 0,998 σε όλες τις περιπτώσεις. Στο πρώτο στάδιο επιλέχθηκε το πολυωνυμικό μοντέλο παλινδρόμησης δευτέρου βαθμού και στο δεύτερο στάδιο επιλέχθηκε ως βέλτιστος ο συντελεστής στατιστικού βάρους $1/x$ αντί του $1/x^2$. Ενδεικτικά στον Πίνακα 6.8 παρουσιάζονται οι μέσες πειραματικές συγκεντρώσεις για το methamphetamine σε όλο το εύρος της καμπύλης αναφοράς με γραμμική και πολυωνυμική ανάλυση παλινδρόμησης δευτέρου βαθμού (συντελεστής στατιστικού βάρους $1/x$). Όταν χρησιμοποιήθηκε η πολυωνυμική ανάλυση παλινδρόμησης δευτέρου βαθμού, η ορθότητα στο κατώτατο σημείο της καμπύλης αναφοράς ήταν καλύτερη σε σχέση με τη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης.

Για το MDA, ο συντελεστής προσδιορισμού (r^2) ήταν μεγαλύτερο του 0,998 σε όλες τις περιπτώσεις. Στο πρώτο στάδιο για το MDA, επιλέχθηκε το πολυωνυμικό μοντέλο παλινδρόμησης δευτέρου βαθμού και στο δεύτερο στάδιο επιλέχθηκε ως βέλτιστος ο συντελεστής στατιστικού βάρους $1/x$ αντί του $1/x^2$.

Πίνακας 6.9: Μέσες πειραματικές συγκεντρώσεις για το MDA σε όλο το εύρος της καμπύλης αναφοράς με γραμμική (ΓΑΠ) και πολυωνυμική ανάλυση παλινδρόμησης δευτέρου βαθμού (ΠΑΠ) (συντελεστής στατιστικού βάρους $1/x$)				
	Μοντέλο ανάλυσης Παλινδρόμησης			
	ΓΑΠ ($1/x$)		ΠΑΠ ($1/x$)	
Θεωρητική συγκέντρωση (ng mL ⁻¹)	Μέση πειραματική συγκέντρωση (n=5) (ng mL ⁻¹)	% σχετικό σφάλμα	Μέση πειραματική συγκέντρωση (n=5) (ng mL ⁻¹)	% σχετικό σφάλμα
20	24,1	20,3	20,1	0,7
50	49,6	-0,7	49,4	-1,2
100	98	-2,2	104	3,9
300	267	-11,1	291	-3,0
500	451	-9,9	487	-2,6
1000	949	-1,5	1021	2,1
1500	1517	1,1	1510	0,6
2000	2079	4,0	1988	-0,6

Στον Πίνακα 6.9 παρουσιάζονται οι μέσες πειραματικές συγκεντρώσεις για το MDA σε όλο το εύρος της καμπύλης αναφοράς με γραμμική και πολυωνυμική ανάλυση παλινδρόμησης δευτέρου βαθμού (συντελεστής στατιστικού βάρους $1/x$). Όταν χρησιμοποιήθηκε η πολυωνυμική ανάλυση παλινδρόμησης δευτέρου βαθμού, η ορθότητα στο κατώτατο σημείο της καμπύλης αναφοράς ήταν καλύτερη σε σχέση με τη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης.

Για το MDMA, ο συντελεστής προσδιορισμού (r^2) ήταν μεγαλύτερο του 0,9991 σε όλες τις περιπτώσεις. Στο πρώτο στάδιο επιλέχθηκε το πολυωνυμικό μοντέλο παλινδρόμησης δευτέρου

βαθμού και στο δεύτερο στάδιο, μετά την ανάλυση των διαγραμμάτων υπολοίπων και την αξιολόγηση του r^2 , επιλέχθηκε ο βέλτιστος συντελεστής στατιστικού βάρους $1/x$ αντί του $1/x^2$.

Πίνακας 6.10: Μέσες πειραματικές συγκεντρώσεις για το MDMA σε όλο το εύρος της καμπύλης αναφοράς με γραμμική (ΓΑΠ) και πολυωνυμική ανάλυση παλινδρόμησης δευτέρου βαθμού (ΠΑΠ) (συντελεστής στατιστικού βάρους $1/x$)

	Μοντέλο ανάλυσης Παλινδρόμησης			
	ΓΑΠ (1/x)		ΠΑΠ (1/x)	
Θεωρητική συγκέντρωση (ng mL ⁻¹)	Μέση πειραματική συγκέντρωση (n=5) (ng mL ⁻¹)	%Er	Μέση πειραματική συγκέντρωση (n=5) (ng mL ⁻¹)	%Er
20	22,82	14,1	20,54	2,7
50	49,82	-0,4	49,70	-0,6
100	98,46	-1,5	101,93	1,9
300	279,05	-9,0	287,23	-4,3
500	465,07	-7,0	486,72	-2,7
1000	1009,52	1,0	1030,67	3,1
1500	1513,86	0,9	1509,54	0,6
2000	2037,39	1,9	1983,40	-0,8

Στον Πίνακα 6.10 παρουσιάζονται οι μέσες πειραματικές συγκεντρώσεις για το MDMA σε όλο το εύρος της καμπύλης αναφοράς με γραμμική και πολυωνυμική ανάλυση παλινδρόμησης δευτέρου βαθμού (συντελεστής στατιστικού βάρους $1/x$). Όταν χρησιμοποιήθηκε η πολυωνυμική ανάλυση παλινδρόμησης δευτέρου βαθμού, η ορθότητα στο κατώτατο σημείο της καμπύλης αναφοράς ήταν καλύτερη σε σχέση με τη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης.

Πίνακας 6.11: Μέσες πειραματικές συγκεντρώσεις για το phentermine σε όλο το εύρος της καμπύλης αναφοράς με γραμμική (ΓΑΠ) και πολυωνυμική ανάλυση παλινδρόμησης δευτέρου βαθμού (ΠΑΠ) (συντελεστής στατιστικού βάρους $1/x$)

	Μοντέλο ανάλυσης Παλινδρόμησης			
	ΓΑΠ (1/x)		ΠΑΠ (1/x)	
Θεωρητική συγκέντρωση (ng mL ⁻¹)	Μέση πειραματική συγκέντρωση (n=5) (ng mL ⁻¹)	%Er	Μέση πειραματική συγκέντρωση (n=5) (ng mL ⁻¹)	%Er
20	18,9	-5,3	19,4	-3,0
50	49,8	-0,3	49,8	-0,3
100	106	6,5	106	5,7
300	297	-1,0	294	-1,9
500	495	-1,0	491	-1,9
1000	1026	2,6	1022	2,2
1500	1485	-1,0	1485	-1,0
2000	1992	-0,4	2003	0,2

Για το phentermine, ο συντελεστής προσδιορισμού (r^2) ήταν μεγαλύτερο του 0,9995 σε όλες τις περιπτώσεις. Στο πρώτο στάδιο επιλέχθηκε το πολυωνυμικό μοντέλο παλινδρόμησης δευτέρου βαθμού και στο δεύτερο στάδιο επιλέχθηκε ο βέλτιστος συντελεστής στατιστικού βάρους $1/x$ αντί

του $1/x^2$. Στον Πίνακα 6.11 παρουσιάζονται οι μέσες πειραματικές συγκεντρώσεις για το phentermine σε όλο το εύρος της καμπύλης αναφοράς με γραμμική και πολυωνυμική ανάλυση παλινδρόμησης δευτέρου βαθμού (συντελεστής στατιστικού βάρους $1/x$).

Για το pseudoephedrine, ο συντελεστή προσδιορισμού (r^2) ήταν μεγαλύτερο του 0,998 σε όλες τις περιπτώσεις. Στο πρώτο στάδιο επιλέχθηκε το πολυωνυμικό μοντέλο παλινδρόμησης δευτέρου βαθμού και στο δεύτερο στάδιο, μετά την ανάλυση των διαγραμμάτων υπολοίπων και την αξιολόγηση του r^2 , επιλέχθηκε ο βέλτιστος συντελεστής στατιστικού βάρους $1/x^2$ αντί του $1/x$.

Πίνακας 6.12: Μέσες πειραματικές συγκεντρώσεις για το pseudoephedrine σε όλο το εύρος της καμπύλης αναφοράς με γραμμική (ΓΑΠ) και πολυωνυμική ανάλυση παλινδρόμησης δευτέρου βαθμού (ΠΑΠ) (συντελεστής στατιστικού βάρους $1/x^2$)

	Μοντέλο ανάλυσης Παλινδρόμησης			
	ΓΑΠ ($1/x^2$)		ΠΑΠ ($1/x^2$)	
Θεωρητική συγκέντρωση (ng mL ⁻¹)	Μέση πειραματική συγκέντρωση (n=5) (ng mL ⁻¹)	%Er	Μέση πειραματική συγκέντρωση (n=5) (ng mL ⁻¹)	%Er
20	20,4	2,2	19,9	-0,2
50	48,6	-2,8	50,1	0,3
100	96	-3,5	101	1,2
300	280	-6,6	293	-2,2
500	476	-4,7	492	-1,6
1000	1046	4,6	1038	3,8
1500	1553	3,6	1491	-0,6
2000	2145	7,2	1986	-0,7

Στον Πίνακα 6.12 παρουσιάζονται οι μέσες πειραματικές συγκεντρώσεις για το pseudoephedrine σε όλο το εύρος της καμπύλης αναφοράς με γραμμική και πολυωνυμική ανάλυση παλινδρόμησης δευτέρου βαθμού (συντελεστής στατιστικού βάρους $1/x^2$).

Πίνακας 6.13: Μέσες πειραματικές συγκεντρώσεις για το bupropion σε όλο το εύρος της καμπύλης αναφοράς με γραμμική (ΓΑΠ) και πολυωνυμική ανάλυση παλινδρόμησης δευτέρου βαθμού (ΠΑΠ) (συντελεστής στατιστικού βάρους $1/x$)

	Μοντέλο ανάλυσης Παλινδρόμησης			
	ΓΑΠ ($1/x$)		ΠΑΠ ($1/x$)	
Θεωρητική συγκέντρωση (ng mL ⁻¹)	Μέση πειραματική συγκέντρωση (n=5) (ng mL ⁻¹)	%Er	Μέση πειραματική συγκέντρωση (n=5) (ng mL ⁻¹)	%Er
20	22,5	12,4	20,4	1,9
50	49,5	-1,0	49,3	-1,4
100	100	-1,0	102	2,1
300	277	-7,6	290	-3,2
500	472	-5,6	492	-1,6
1000	1007	0,7	1026	2,6
1500	1498	-0,1	1496	-0,2
2000	2044	2,2	1993	-0,4

Για το bupropion, ο συντελεστή προσδιορισμού (r^2) ήταν μεγαλύτερο του 0,998 σε όλες τις περιπτώσεις. Στο πρώτο στάδιο επιλέχθηκε το πολυωνυμικό μοντέλο παλινδρόμησης δευτέρου βαθμού και στο δεύτερο στάδιο επιλέχθηκε ο βέλτιστος συντελεστής στατιστικού βάρους $1/x$ αντί του $1/x^2$. Στον Πίνακα 6.13 παρουσιάζονται οι μέσες πειραματικές συγκεντρώσεις για το bupropion σε όλο το εύρος της καμπύλης αναφοράς με γραμμική και πολυωνυμική ανάλυση παλινδρόμησης δευτέρου βαθμού (συντελεστής στατιστικού βάρους $1/x$).

Για το hydroxybupropion, ο συντελεστή προσδιορισμού (r^2) ήταν μεγαλύτερο του 0,9972 σε όλες τις περιπτώσεις. Στο πρώτο στάδιο επιλέχθηκε το πολυωνυμικό μοντέλο παλινδρόμησης δευτέρου βαθμού και στο δεύτερο στάδιο επιλέχθηκε ο βέλτιστος συντελεστής στατιστικού βάρους $1/x^2$ αντί του $1/x$.

Πίνακας 6.14: Μέσες πειραματικές συγκεντρώσεις για το hydroxybupropion σε όλο το εύρος της καμπύλης αναφοράς με γραμμική (ΓΑΠ) και πολυωνυμική ανάλυση παλινδρόμησης δευτέρου βαθμού (ΠΑΠ) (συντελεστής στατιστικού βάρους $1/x^2$)

	Μοντέλο ανάλυσης Παλινδρόμησης			
	ΓΑΠ ($1/x^2$)		ΠΑΠ ($1/x^2$)	
Θεωρητική συγκέντρωση (ng mL^{-1})	Μέση πειραματική συγκέντρωση (n=5) (ng mL^{-1})	%Er	Μέση πειραματική συγκέντρωση (n=5) (ng mL^{-1})	%Er
20	20,5	2,5	20,3	1,4
50	47,5	-5,0	48,2	-3,6
100	98,7	-1,3	100	0,9
300	282	-5,9	289	-3,6
500	493	-1,3	501	0,3
1000	1074	7,4	1067	6,7
1500	1553	3,5	1519	1,3
2000	2000	-0,01	1929	-3,5

Στον Πίνακα 6.14 παρουσιάζονται οι μέσες πειραματικές συγκεντρώσεις για την υδροξυ bupropion σε όλο το εύρος της καμπύλης αναφοράς με γραμμική και πολυωνυμική ανάλυση παλινδρόμησης δευτέρου βαθμού (συντελεστής στατιστικού βάρους $1/x^2$).

Για το ephedrine, ο συντελεστή προσδιορισμού (r^2) ήταν μεγαλύτερο του 0,9994 σε όλες τις περιπτώσεις. Στο πρώτο στάδιο επιλέχθηκε το πολυωνυμικό μοντέλο παλινδρόμησης δευτέρου βαθμού και στο δεύτερο στάδιο, μετά την ανάλυση των διαγραμμάτων υπολοίπων και την αξιολόγηση του r^2 , επιλέχθηκε ο βέλτιστος συντελεστής στατιστικού βάρους $1/x$ αντί του $1/x^2$.

Στον Πίνακα 6.15 παρουσιάζονται οι μέσες πειραματικές συγκεντρώσεις για το ephedrine σε όλο το εύρος της καμπύλης αναφοράς με γραμμική και πολυωνυμική ανάλυση παλινδρόμησης δευτέρου βαθμού (συντελεστής στατιστικού βάρους $1/x$).

Πίνακας 6.15: Μέσες πειραματικές συγκεντρώσεις για το ephedrine σε όλο το εύρος της καμπύλης αναφοράς με γραμμική (ΓΑΠ) και πολυωνυμική ανάλυση παλινδρόμησης δευτέρου βαθμού (ΠΑΠ) (συντελεστής στατιστικού βάρους $1/x$)

	Μοντέλο ανάλυσης Παλινδρόμησης			
	ΓΑΠ (1/x)		ΠΑΠ (1/x)	
Θεωρητική συγκέντρωση (ng mL ⁻¹)	Μέση πειραματική συγκέντρωση (n=5) (ng mL ⁻¹)	%Er	Μέση πειραματική συγκέντρωση (n=5) (ng mL ⁻¹)	%Er
20	22,3	11,4	20,9	4,7
50	49,4	-1,2	49,3	-1,4
100	99	-0,8	101	1,3
300	276	-7,9	285	-5,0
500	473	-5,5	486	-2,9
1000	1019	1,9	1032	3,2
1500	1524	1,6	1521	1,4
2000	2007	0,3	1975	-1,3

Για το MDEA, ο συντελεστή προσδιορισμού (r^2) ήταν μεγαλύτερο του 0,9935 σε όλες τις περιπτώσεις. Στο πρώτο στάδιο επιλέχθηκε το πολυωνυμικό μοντέλο παλινδρόμησης δευτέρου βαθμού και στο δεύτερο στάδιο, μετά την ανάλυση των διαγραμμάτων υπολοίπων και την αξιολόγηση του r^2 , επιλέχθηκε ο βέλτιστος συντελεστής στατιστικού βάρους $1/x$ αντί του $1/x^2$.

Πίνακας 6.16: Μέσες πειραματικές συγκεντρώσεις για το MDEA σε όλο το εύρος της καμπύλης αναφοράς με γραμμική (ΓΑΠ) και πολυωνυμική ανάλυση παλινδρόμησης δευτέρου βαθμού (ΠΑΠ) (συντελεστής στατιστικού βάρους $1/x$)

	Μοντέλο ανάλυσης Παλινδρόμησης			
	ΓΑΠ (1/x)		ΠΑΠ (1/x)	
Θεωρητική συγκέντρωση (ng mL ⁻¹)	Μέση πειραματική συγκέντρωση (n=5) (ng mL ⁻¹)	%Er	Μέση πειραματική συγκέντρωση (n=5) (ng mL ⁻¹)	%Er
20	24,2	21,0	20,2	1,0
50	49,7	-0,6	49,3	-1,3
100	96	-3,9	102	2,3
300	267	-11,1	292	-2,7
500	456	-8,9	493	-1,4
1000	997	-0,3	1032	3,3
1500	1481	-1,3	1481	-1,2
2000	2099	5,0	1999	-0,03

Στον Πίνακα 6.16 παρουσιάζονται οι μέσες πειραματικές συγκεντρώσεις για το MDEA σε όλο το εύρος της καμπύλης αναφοράς με γραμμική και πολυωνυμική ανάλυση παλινδρόμησης (συντελεστής στατιστικού βάρους $1/x$). Όταν χρησιμοποιήθηκε η πολυωνυμική ανάλυση παλινδρόμησης, η ορθότητα στο κατώτατο σημείο της καμπύλης αναφοράς ήταν καλύτερη σε σχέση με τη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης δευτέρου βαθμού.

Για το rhenylpropranolamine, ο συντελεστή προσδιορισμού (r^2) ήταν μεγαλύτερο του 0,9985 σε όλες τις περιπτώσεις. Στο πρώτο στάδιο επιλέχθηκε το πολυωνυμικό μοντέλο παλινδρόμησης δευτέρου βαθμού και στο δεύτερο στάδιο, μετά την ανάλυση των διαγραμμάτων υπολοίπων και την αξιολόγηση του r^2 , επιλέχθηκε ο βέλτιστος συντελεστής στατιστικού βάρους $1/x^2$ αντί του $1/x$.

Πίνακας 6.17: Μέσες πειραματικές συγκεντρώσεις για το rhenylpropranolamine σε όλο το εύρος της καμπύλης αναφοράς με γραμμική (ΓΑΠ) και πολυωνυμική ανάλυση παλινδρόμησης δευτέρου βαθμού (ΠΑΠ) (συντελεστής στατιστικού βάρους $1/x^2$)

	Μοντέλο ανάλυσης Παλινδρόμησης			
	ΓΑΠ ($1/x^2$)		ΠΑΠ ($1/x^2$)	
Θεωρητική συγκέντρωση ($ng mL^{-1}$)	Μέση πειραματική συγκέντρωση (n=5) ($ng mL^{-1}$)	%Er	Μέση πειραματική συγκέντρωση (n=5) ($ng mL^{-1}$)	%Er
20	18,9	-5,6	19,6	-2,1
50	50,3	7,7	51,6	3,1
100	114	13,6	106	6,7
300	303	1,1	286	-4,7
500	494	-1,2	473	-5,5
1000	995	-0,5	1002	0,2
1500	1425	-5,0	1516	1,1
2000	1797	-10,1	2030	1,5

Στον Πίνακα 6.17 παρουσιάζονται οι μέσες πειραματικές συγκεντρώσεις για το rhenylpropranolamine σε όλο το εύρος της καμπύλης αναφοράς με γραμμική και πολυωνυμική ανάλυση παλινδρόμησης δευτέρου βαθμού (συντελεστής στατιστικού βάρους $1/x^2$).

Πίνακας 6.18: Μέσες πειραματικές συγκεντρώσεις για το methylphenidate σε όλο το εύρος της καμπύλης αναφοράς με γραμμική (ΓΑΠ) και πολυωνυμική ανάλυση παλινδρόμησης δευτέρου βαθμού (ΠΑΠ) (συντελεστής στατιστικού βάρους $1/x$)

	Μοντέλο ανάλυσης Παλινδρόμησης			
	ΓΑΠ ($1/x$)		ΠΑΠ ($1/x$)	
Θεωρητική συγκέντρωση ($ng mL^{-1}$)	Μέση πειραματική συγκέντρωση (n=5) ($ng mL^{-1}$)	%Er	Μέση πειραματική συγκέντρωση (n=5) ($ng mL^{-1}$)	%Er
20	17,9	-10,1	21,5	7,4
50	48,2	-3,5	48,6	-2,9
100	105	4,7	99	-0,7
300	305	1,5	282	-5,8
500	525	5,1	491	-1,8
1000	1078	7,8	1045	4,5
1500	1500	0,01	1507	0,5
2000	1891	-5,4	1974	-1,3

Για το methylphenidate, ο συντελεστή προσδιορισμού (r^2) ήταν μεγαλύτερο του 0,9966 σε όλες τις περιπτώσεις. Στο πρώτο στάδιο επιλέχθηκε το πολυωνυμικό μοντέλο παλινδρόμησης δευτέρου βαθμού και στο δεύτερο στάδιο, μετά την ανάλυση των διαγραμμάτων υπολοίπων και την αξιολόγηση του r^2 , επιλέχθηκε ο βέλτιστος συντελεστής στατιστικού βάρους $1/x$ αντί του $1/x^2$.

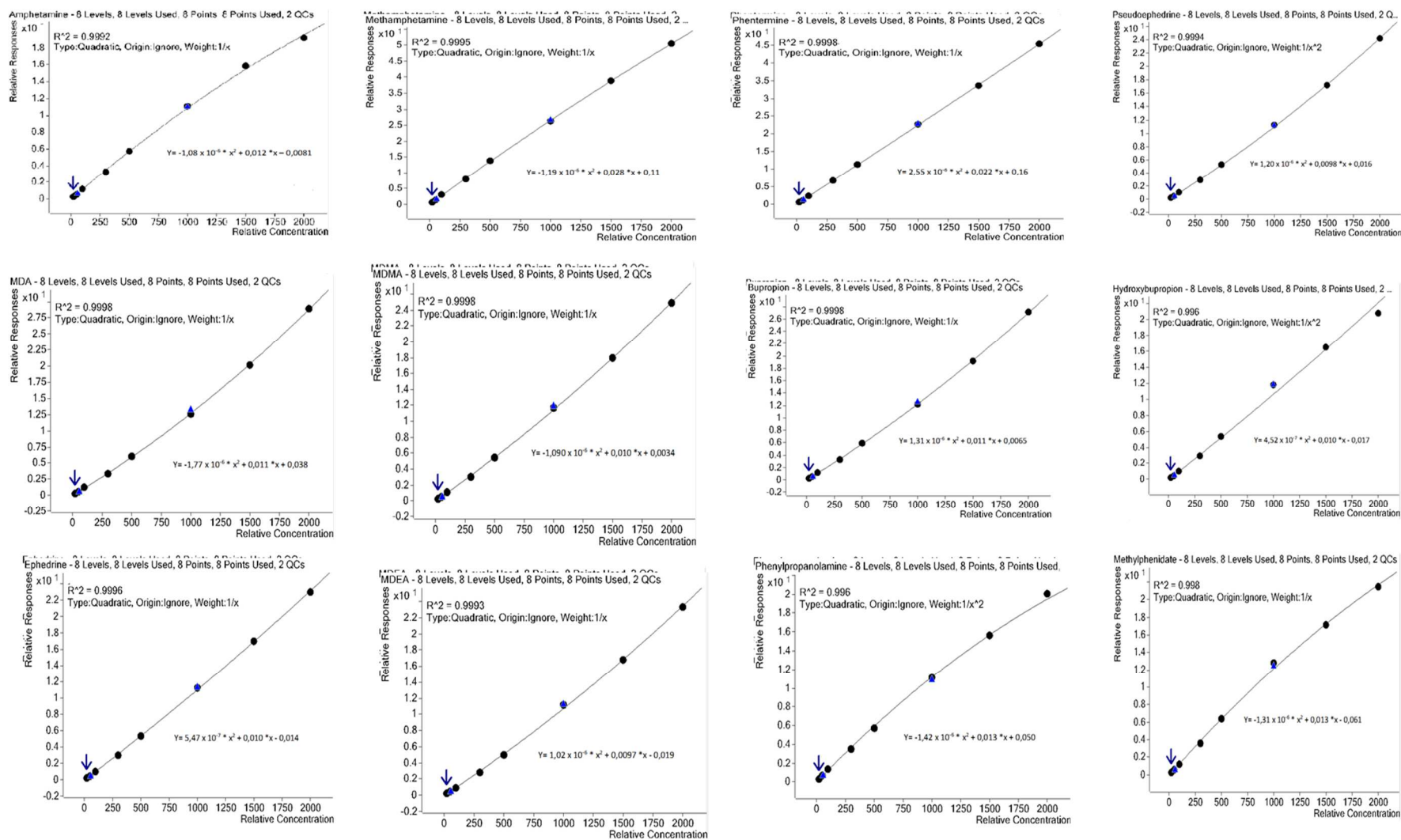
Στον Πίνακα 6.18 παρουσιάζονται οι μέσες πειραματικές συγκεντρώσεις για το methylphenidate σε όλο το εύρος της καμπύλης αναφοράς με γραμμική και πολυωνυμική ανάλυση παλινδρόμησης δευτέρου βαθμού (συντελεστής στατιστικού βάρους $1/x$).

6.5.2.2 Καμπύλες βαθμονόμησης

Για την κατασκευή των καμπυλών αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν εμβολιασμένα δείγματα ανθρώπινου αίματος σε εύρος συγκεντρώσεων 20-2000 ng mL⁻¹ για όλους τους αναλύτες. Τα αποτελέσματα για κάθε μία από τις πέντε σειρές μετρήσεων για κάθε έναν αναλύτη παρουσιάζονται στα παραρτήματα 1 έως 12 ενώ στους πίνακες 6.19 έως 6.21 παρουσιάζονται οι πολυωνυμικές εξισώσεις αυτών μαζί με τις αντίστοιχες τιμές των συντελεστών προσδιορισμού και του βέλτιστου παράγοντα ζύγισης για κάθε ένα αναλύτη και στο σχήμα 6.4 παρουσιάζονται οι γραφικές παραστάσεις των καμπυλών βαθμονόμησης των αναλυτών.

Πίνακας 6.19: Αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας των καμπυλών βαθμονόμησης το amphetamine, bupropion, ephedrine, και hydroxybupropion σε εμβολιασμένο ολικό αίμα με τη χρήση LC-ESI/MS/MS

Αναλύτης	Εξίσωση Πολυωνυμικής Παλινδρόμησης	r ²	Βέλτιστος συντελεστής στατιστικού βάρους
Amphetamine	$R_{\text{amph}} = -1,18 \times 10^{-6} (\pm 0,22 \times 10^{-6}) x^2 + 0,01135 (\pm 0,00035) x - 0,056 (\pm 0,036)$ $R_{\text{amph}} = -1,20 \times 10^{-6} (\pm 0,26 \times 10^{-6}) x^2 + 0,0118 (\pm 0,00041) x - 0,045 (\pm 0,041)$ $R_{\text{amph}} = -1,08 \times 10^{-6} (\pm 0,21 \times 10^{-6}) x^2 + 0,01195 (\pm 0,00035) x - 0,008 (\pm 0,035)$ $R_{\text{amph}} = -1,18 \times 10^{-6} (\pm 0,29 \times 10^{-6}) x^2 + 0,01141 (\pm 0,00046) x + 0,008 (\pm 0,046)$ $R_{\text{amph}} = -1,20 \times 10^{-6} (\pm 0,21 \times 10^{-6}) x^2 + 0,01141 (\pm 0,00035) x + 0,0039 (\pm 0,035)$	0,9991 0,998 0,9993 0,998 0,9992	1/x
Bupropion	$R_{\text{bupr}} = 0,58 \times 10^{-6} (\pm 0,26 \times 10^{-6}) x^2 + 0,01174 (\pm 0,00042) x - 0,069 (\pm 0,042)$ $R_{\text{bupr}} = 1,16 \times 10^{-6} (\pm 0,28 \times 10^{-6}) x^2 + 0,01168 (\pm 0,00046) x - 0,038 (\pm 0,046)$ $R_{\text{bupr}} = 1,31 \times 10^{-6} (\pm 0,12 \times 10^{-6}) x^2 + 0,01092 (\pm 0,00020) x - 0,0066 (\pm 0,020)$ $R_{\text{bupr}} = -0,078 \times 10^{-6} (\pm 0,0028 \times 10^{-6}) x^2 + 0,01222 (\pm 0,00044) x - 0,021 (\pm 0,044)$ $R_{\text{bupr}} = 0,077 \times 10^{-6} (\pm 0,0019 \times 10^{-6}) x^2 + 0,01214 (\pm 0,00031) x - 0,022 (\pm 0,031)$	0,9993 0,9993 0,9998 0,9992 0,9996	1/x
Ephedrine	$R_{\text{eph}} = 3,87 \times 10^{-7} (\pm 2,34 \times 10^{-7}) x^2 + 0,01022 (\pm 0,00038) x - 0,066 (\pm 0,038)$ $R_{\text{eph}} = 6,27 \times 10^{-7} (\pm 2,15 \times 10^{-7}) x^2 + 0,01031 (\pm 0,00034) x - 0,041 (\pm 0,035)$ $R_{\text{eph}} = 5,47 \times 10^{-7} (\pm 1,75 \times 10^{-7}) x^2 + 0,01049 (\pm 0,00028) x - 0,014 (\pm 0,028)$ $R_{\text{eph}} = 1,14 \times 10^{-7} (\pm 3,67 \times 10^{-7}) x^2 + 0,01118 (\pm 0,00059) x - 0,026 (\pm 0,059)$ $R_{\text{eph}} = 1,79 \times 10^{-7} (\pm 1,86 \times 10^{-7}) x^2 + 0,01070 (\pm 0,00030) x - 0,023 (\pm 0,030)$	0,9993 0,9997 0,9996 0,998 0,9995	1/x
Hydroxybupropion	$R_{\text{hydroxybupr}} = 12,8 \times 10^{-7} (\pm 5,0 \times 10^{-7}) x^2 + 0,00965 (\pm 0,00059) x - 0,042 (\pm 0,022)$ $R_{\text{hydroxybupr}} = 11,2 \times 10^{-7} (\pm 3,6 \times 10^{-7}) x^2 + 0,01041 (\pm 0,00042) x - 0,044 (\pm 0,016)$ $R_{\text{hydroxybupr}} = 4,52 \times 10^{-7} (\pm 4,26 \times 10^{-7}) x^2 + 0,01019 (\pm 0,00050) x - 0,017 (\pm 0,018)$ $R_{\text{hydroxybupr}} = -5,85 \times 10^{-7} (\pm 2,43 \times 10^{-7}) x^2 + 0,01046 (\pm 0,00029) x - 0,019 (\pm 0,010)$ $R_{\text{hydroxybupr}} = -3,20 \times 10^{-7} (\pm 2,11 \times 10^{-7}) x^2 + 0,01020 (\pm 0,00025) x - 0,0105 (\pm 0,0091)$	0,995 0,998 0,996 0,998 0,9990	1/x ²



Σχήμα 6.4: Γραφικές παραστάσεις των καμπυλών βαθμονόμησης των 12 ψυχοδραστικών ουσιών που αναλύθηκαν στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιώντας πολυωνυμική ανάλυση παλινδρόμησης δευτέρου βαθμού, μετά από ανάλυση των εμβολιασμένων δειγμάτων ολικού αίματος

Πίνακας 6.20: Αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας των καμπυλών βαθμονόμησης το MDA, MDEA, MDMA και methamphetamine σε εμβολιασμένο ολικό αίμα με τη χρήση LC-ESI/MS/MS

Αναλύτης	Εξίσωση Πολυωνυμικής Παλινδρόμησης	r ²	Βέλτιστος συντελεστής στατιστικού βάρους
MDA	$R_{mda}=9,95 \times 10^{-7} (\pm 2,05 \times 10^{-7}) x^2+0,01120 (\pm 0,00033) x-0,043 (\pm 0,033)$ $R_{mda}=12,0 \times 10^{-7} (\pm 2,6 \times 10^{-7}) x^2+0,01166 (\pm 0,00042) x-0,031 (\pm 0,042)$ $R_{mda}=17,7 \times 10^{-7} (\pm 1,3 \times 10^{-7}) x^2+0,01089 (\pm 0,00020) x+0,038 (\pm 0,020)$ $R_{mda}=9,48 \times 10^{-7} (\pm 3,67 \times 10^{-7}) x^2+0,01162 (\pm 0,00059) x+0,0092 (\pm 0,059)$ $R_{mda}=8,11 \times 10^{-7} (\pm 1,81 \times 10^{-7}) x^2+0,01131 (\pm 0,00029) x+0,0070 (\pm 0,029)$	0,9995 0,9994 0,9998 0,998 0,9996	1/x
MDEA	$R_{mdea}=2,88 \times 10^{-6} (\pm 0,63 \times 10^{-6}) x^2+0,0080 (\pm 0,0010) x+0,0096 (\pm 0,10)$ $R_{mdea}=0,992 \times 10^{-6} (\pm 0,29 \times 10^{-6}) x^2+0,01049 (\pm 0,00046) x-0,056 (\pm 0,046)$ $R_{mdea}=1,018 \times 10^{-6} (\pm 0,22 \times 10^{-6}) x^2+0,00973 (\pm 0,00035) x-0,019 (\pm 0,035)$ $R_{mdea}=-0,327 \times 10^{-6} (\pm 0,242 \times 10^{-6}) x^2+0,01018 (0,00039) x-0,023 (\pm 0,039)$ $R_{mdea}=0,368 \times 10^{-6} (\pm 0,211 \times 10^{-6}) x^2+0,00985 (\pm 0,00021) x-0,011 (\pm 0,021)$	0,996 0,9991 0,9994 0,9991 0,9997	1/x
MDMA	$R_{mdma}=5,71 \times 10^{-7} (\pm 2,23 \times 10^{-7}) x^2+0,01061 (\pm 0,00036) x-0,065 (\pm 0,035)$ $R_{mdma}=9,20 \times 10^{-7} (\pm 1,99 \times 10^{-7}) x^2+0,01068 (\pm 0,00032) x-0,037 (\pm 0,032)$ $R_{mdma}=1,090 \times 10^{-7} (\pm 1,31 \times 10^{-7}) x^2+0,01036 (\pm 0,00021) x-0,0034 (\pm 0,021)$ $R_{mdma}=1,84 \times 10^{-7} (\pm 3,19 \times 10^{-7}) x^2+0,01114 (\pm 0,00051) x-0,022 (\pm 0,051)$ $R_{mdma}=2,71 \times 10^{-7} (\pm 1,68 \times 10^{-7}) x^2+0,01077 (\pm 0,00027) x-0,015 (\pm 0,027)$	0,9994 0,9995 0,9998 0,998 0,9996	1/x
Methamphetamine	$R_{methaph}=-2,26 \times 10^{-6} (\pm 0,52 \times 10^{-6}) x^2+0,02823 (\pm 0,00083) x-0,057 (\pm 0,084)$ $R_{methaph}=-1,85 \times 10^{-6} (\pm 0,33 \times 10^{-6}) x^2+0,02899 (\pm 0,00054) x-0,019 (\pm 0,054)$ $R_{methaph}=-1,19 \times 10^{-6} (\pm 0,44 \times 10^{-6}) x^2+0,02764 (\pm 0,00070) x+0,107 (\pm 0,071)$ $R_{methaph}=-3,39 \times 10^{-6} (\pm 0,63 \times 10^{-6}) x^2+0,0309 (\pm 0,0010) x+0,1050 (\pm 0,1013)$ $R_{methaph}=-3,29 \times 10^{-6} (\pm 0,32 \times 10^{-6}) x^2+0,02995 (\pm 0,00051) x+0,077 (\pm 0,052)$	0,9992 0,9997 0,9995 0,9990 0,9997	1/x

Πίνακας 6.21: Αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας των καμπυλών βαθμονόμησης το methylphenidate, phentermine, amphetamine, phenylpropranolamine και pseudoephedrine σε εμβολιασμένο ολικό αίμα με τη χρήση LC-ESI/MS/MS

Αναλύτης	Εξίσωση Πολυωνυμικής Παλινδρόμησης	r ²	Βέλτιστος συντελεστής στατιστικού βάρους
Methylphenidate	$R_{\text{methylphen}} = -6,55 \times 10^{-7} (\pm 4,44 \times 10^{-7}) x^2 + 0,01362 (\pm 0,00071) x - 0,115 (\pm 0,072)$	0,998	1/x
	$R_{\text{methylphen}} = -7,40 \times 10^{-7} (\pm 4,37 \times 10^{-7}) x^2 + 0,01431 (\pm 0,00070) x - 0,106 (\pm 0,070)$	0,998	
	$R_{\text{methylphen}} = -13,1 \times 10^{-7} (\pm 3,4 \times 10^{-7}) x^2 + 0,01350 (\pm 0,00055) x - 0,061 (\pm 0,055)$	0,998	
	$R_{\text{methylphen}} = -12,7 \times 10^{-7} (\pm 1,6 \times 10^{-7}) x^2 + 0,01251 (\pm 0,00026) x - 0,0012 (\pm 0,026)$	0,9996	
	$R_{\text{methylphen}} = -7,19 \times 10^{-7} (\pm 1,83 \times 10^{-7}) x^2 + 0,01247 (\pm 0,00029) x - 0,0035 (\pm 0,029)$	0,9996	
Phentermine	$R_{\text{phent}} = -4,60 \times 10^{-7} (\pm 2,69 \times 10^{-7}) x^2 + 0,02196 (\pm 0,00043) x - 0,061 (\pm 0,043)$	0,9997	1/x
	$R_{\text{phent}} = -1,47 \times 10^{-7} (\pm 3,48 \times 10^{-7}) x^2 + 0,02226 (\pm 0,00056) x - 0,016 (\pm 0,056)$	0,9996	
	$R_{\text{phent}} = 2,55 \times 10^{-7} (\pm 1,89 \times 10^{-7}) x^2 + 0,02221 (\pm 0,00030) x + 0,155 (\pm 0,030)$	0,9998	
	$R_{\text{phent}} = -4,16 \times 10^{-7} (\pm 4,32 \times 10^{-7}) x^2 + 0,02228 (\pm 0,00069) x + 0,077 (\pm 0,070)$	0,9993	
	$R_{\text{phent}} = -2,93 \times 10^{-7} (\pm 4,52 \times 10^{-7}) x^2 + 0,02169 (\pm 0,00073) x + 0,066 (\pm 0,073)$	0,9993	
Phenylpropranolamine	$R_{\text{phenylprop}} = -0,91 \times 10^{-6} (\pm 0,25 \times 10^{-6}) x^2 + 0,01202 (\pm 0,00029) x - 0,005 (\pm 0,011)$	0,998	1/x ²
	$R_{\text{phenylprop}} = -0,97 \times 10^{-6} (\pm 0,38 \times 10^{-6}) x^2 + 0,01247 (\pm 0,00044) x + 0,0064 (\pm 0,016)$	0,997	
	$R_{\text{phenylprop}} = -1,42 \times 10^{-6} (\pm 0,43 \times 10^{-6}) x^2 + 0,01256 (\pm 0,00051) x + 0,050 (\pm 0,019)$	0,996	
	$R_{\text{phenylprop}} = -1,25 \times 10^{-6} (\pm 0,55 \times 10^{-6}) x^2 + 0,01119 (\pm 0,00064) x + 0,032 (\pm 0,024)$	0,994	
	$R_{\text{phenylprop}} = -1,22 \times 10^{-6} (\pm 0,31 \times 10^{-6}) x^2 + 0,01180 (\pm 0,00036) x + 0,028 (\pm 0,013)$	0,998	
Pseudoephedrine	$R_{\text{pseudoeph}} = 1,01 \times 10^{-6} (\pm 0,27 \times 10^{-6}) x^2 + 0,00948 (\pm 0,00032) x - 0,011 (\pm 0,012)$	0,998	1/x ²
	$R_{\text{pseudoeph}} = 1,22 \times 10^{-6} (\pm 0,28 \times 10^{-6}) x^2 + 0,00988 (\pm 0,00034) x - 0,029 (\pm 0,012)$	0,998	
	$R_{\text{pseudoeph}} = 1,19 \times 10^{-6} (\pm 0,17 \times 10^{-6}) x^2 + 0,00976 (\pm 0,00019) x + 0,0162 (\pm 0,0072)$	0,9995	
	$R_{\text{pseudoeph}} = 0,317 \times 10^{-6} (\pm 0,368 \times 10^{-6}) x^2 + 0,01074 (\pm 0,00043) x - 0,013 (\pm 0,016)$	0,997	
	$R_{\text{pseudoeph}} = 0,275 \times 10^{-7} (\pm 0,195 \times 10^{-6}) x^2 + 0,01051 (\pm 0,00023) x - 0,0162 (\pm 0,0084)$	0,9993	

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα διαπιστώθηκε ότι η τιμή του συντελεστή προσδιορισμού είναι > 0,998 για το amphetamine, >0,999 για το methamphetamine, >0,998 για το MDA, >0,998 για το MDMA, >0,9993 για το phentermine, >0,997 για το pseudoephedrine, >0,9992 για το bupropion, >0,995 για το hydroxybupropion, >0,998 για το ephedrine, >0,996 για το MDEA, >0,994 για το phenylpropranolamine και >0,998 για το methylphenidate. Επίσης, το % σχετικό σφάλμα των πειραματικά υπολογιζόμενων συγκεντρώσεων κυμάνθηκε από -6,6 έως 8,9% για το amphetamine, -9,0 έως 11,9% για το methamphetamine, -5,1 έως 9,4% για το MDA, -4,4 έως 7,6% για το MDMA, -9,0 έως 12,8% για το phentermine, -7,7 έως 6,7% για το pseudoephedrine, -6,9 έως 10,7% για το bupropion, -11,8 έως 10,2% για το hydroxybupropion, -7,9 έως 10,7% για το ephedrine, -10,1 έως 7,8% για το MDEA, -8,6 έως 11,4% για το phenylpropranolamine και -8,3 έως 17,9% για το methylphenidate.

6.5.2.2.1 Στατιστική αξιολόγηση του πολυωνυμικού μοντέλου παλινδρόμησης δευτέρου βαθμού

Μελετήθηκε η δια των ημερών διακύμανση των καμπυλών βαθμονόμησης με χρήση αμφίδρομης ANOVA, χρησιμοποιώντας ως διάστημα εμπιστοσύνης 95%.

Πίνακας 6.22: Στατιστική αξιολόγηση πολυωνυμικού μοντέλου παλινδρόμησης δευτέρου βαθμού	
	Σύγκριση πειραματικών συγκεντρώσεων πολυωνυμικού μοντέλου δια των ημερών Τιμή p^1
Amphetamine	1
Methamphetamine	1
Phenylpropranolamine	0,99
Ephedrine	1
Pseudoephedrine	0,99
MDA	0,99
MDMA	1
MDEA	0,99
Phentermine	0,93
Methylphenidate	1
Bupropion	1
Hydroxybupropion	0,17

¹ p , Όταν η τιμή p είναι μεγαλύτερη του 0,05 τότε δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά. Όταν η τιμή p είναι μικρότερη του 0,05 τότε υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά.

Για το σκοπό αυτό, διερευνήθηκε η ύπαρξη στατιστικά σημαντικής διαφοράς μεταξύ των δια των ημερών συγκεντρώσεων των αναλυτών που υπολογίστηκαν για το σύνολο (πέντε) των καμπυλών αναφοράς που αναλύθηκαν. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δια των ημερών συγκεντρώσεων των βαθμονομητών. Οι παραπάνω αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με χρήση του λογισμικού *Excel* (Microsoft Office 365). Τα αποτελέσματα των τιμών p για τις πιο πάνω επεξεργασίες παρουσιάζονται στο πίνακα 6.22.

6.5.3 Έλεγχος ορθότητας και πιστότητας

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος της ορθότητας και της πιστότητας της προτεινόμενης μεθόδου, τόσο κατά τη διάρκεια μιας εργαστηριακής ημέρας (within-day ή intra-day accuracy and precision), όσο και δια των ημερών (within-day ή inter-day accuracy and precision) τόσο σε μεταθανάτιο όσο και προθανάτιο ολικό αίμα. Ο έλεγχος αυτός πραγματοποιήθηκε με τη παρασκευή εμβολιασμένων δειγμάτων σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων (χαμηλή, μεσαία και υψηλή) τα οποία κατεργάστηκαν και αναλύθηκαν όπως ακριβώς και τα εμβολιασμένα δείγματα των καμπυλών αναφοράς. Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων αυτών ήταν 60, 800 και 1600 ng mL⁻¹ για όλους τους αναλύτες όπου παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν τρία δείγματα κάθε επιπέδου σε κάθε σειρά ανάλυσης για πέντε συνεχόμενες, διαφορετικής μέρας, και σειρές ανάλυσης (15 μετρήσεις συνολικά ανά επίπεδο σε μεταθανάτιο και 15 μετρήσεις συνολικά σε προθανάτιο ολικό αίμα).

6.5.3.1 Ορθότητα

Ως μέτρο της ορθότητας χρησιμοποιείται το επί τοις εκατό σχετικό σφάλμα (% Relative Error, %E_r), που υπολογίστηκε ως εξής:

$$\% E_r = [(C_{\text{πειραματικό}} - C_{\text{θεωρητικό}}) / C_{\text{θεωρητικό}}] \times 100$$

όπου $C_{\text{πειραματικό}}$ είναι η πειραματική μετρούμενη συγκέντρωση του εκάστοτε αναλύτη

$C_{\text{θεωρητικό}}$, η πραγματική συγκέντρωση του εκάστοτε αναλύτη

Προθανάτιο ολικό αίμα

Τα αποτελέσματα για την ορθότητα στο προθανάτιο ολικό αίμα της μεθόδου LC-ESI/MS/MS για τις πέντε εργαστηριακές ημέρες συνοψίζονται στον πίνακα 6.23.

Πίνακας 6.23: Αξιολόγηση της ορθότητας της μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού των αναλυτών σε εμβολιασμένα δείγματα προθανάτιου ολικού αίματος		
Προθανάτιο ολικό αίμα		
Θεωρητική τιμή (ng mL ⁻¹)	Μέση τιμή ± τυπική απόκλιση(n=5) (ng mL ⁻¹)	% E _r
Amphetamine		
60	59,3 ± 2,6	-1,1
800	783 ± 23	-2,2
1600	1709 ± 120	6,8
Methamphetamine		
60	60,3 ± 3,1	0,6
800	769 ± 34	-3,8
1600	1579 ± 80	-1,3
MDA		
60	60,2 ± 2,7	0,3
800	809 ± 31	1,2
1600	1657 ± 80	3,5
MDMA		
60	59,1 ± 2,3	-1,5
800	799 ± 25	-0,2
1600	1634 ± 71	2,2
Phentermine		
60	62,1 ± 3,2	3,4
800	796 ± 15	-0,5
1600	1618 ± 75	1,1
Pseudoephedrine		
60	59,1 ± 2,8	-1,5
800	795 ± 38	-0,7
1600	1608 ± 64	0,4
Bupropion		
60	60,2 ± 2,9	0,4
800	821 ± 30	2,7
1600	1655 ± 75	3,5
Hydroxybupropion		
60	58,9 ± 2,2	-1,8
800	857 ± 64	7,2
1600	1601 ± 36	3,8
Ephedrine		
60	58,6 ± 2,4	-2,4
800	796 ± 29	-0,6
1600	1642 ± 72	2,6
MDEA		
60	61,4 ± 2,1	2,5
800	832 ± 26	4,0
1600	1630 ± 69	1,9
Phenylpropanolamine		
60	60,7 ± 3,2	1,2
800	766 ± 40	-4,2
1600	1606 ± 91	0,4
Methylphenidate		
60	59,3 ± 2,4	-1,1
800	842 ± 35	5,3
1600	1670 ± 40	4,4

Από τα αποτελέσματα διαπιστώνεται ότι για το amphetamine το επί τοις εκατό σχετικό σφάλμα στο προθανάτιο ολικό αίμα κυμαίνεται από -2,2 έως 6,8%, για το methamphetamine κυμαίνεται από -3,8 έως 0,6%, για το MDA κυμαίνεται από 0,3 έως 3,5%, για το MDMA κυμαίνεται από -1,5 έως 2,2%, για το phentermine κυμαίνεται από -0,5 έως 3,4%, για το pseudoephedrine κυμαίνεται από -1,5 έως 0,4%, για το bupropion κυμαίνεται από 0,4 έως 3,5%, για το hydroxybupropion κυμαίνεται από -1,7 έως 8,2%, για το ephedrine κυμαίνεται από -2,4 έως 2,6%, για το MDEA κυμαίνεται από 1,9 έως 4,0%, για το phenylpropranolamine κυμαίνεται από -4,2 έως 1,2% και τέλος για το methylphenidate κυμαίνεται από -1,1 έως 5,3%.

Μεταθανάτιο ολικό αίμα

Τα αποτελέσματα για την ορθότητα στο μεταθανάτιο ολικό αίμα της μεθόδου LC-ESI/MS/MS για τις πέντε εργαστηριακές ημέρες συνοψίζονται στον πίνακα 6.27. Παρατηρώντας τον παραπάνω πίνακα διαπιστώνεται ότι για το amphetamine το επί τοις εκατό σχετικό σφάλμα στο μεταθανάτιο ολικό αίμα κυμαίνεται από -3,3 έως 6,8%, για το methamphetamine κυμαίνεται από -2,6 έως -0,8%, για το MDA κυμαίνεται από -0,3 έως 2,6%, για το MDMA κυμαίνεται από -2,5 έως 2,5%, για το phentermine κυμαίνεται από -1,1 έως 2,2%, για το pseudoephedrine κυμαίνεται από -4,2 έως 2,2%, για το bupropion κυμαίνεται από -1,2 έως 5,8%, για το hydroxybupropion κυμαίνεται από -3,5 έως 8,7%, για το ephedrine κυμαίνεται από -3,8 έως 2,4%, για το MDEA κυμαίνεται από -0,4 έως 5,8%, για το phenylpropranolamine κυμαίνεται από -2,2 έως 1,1% και για το methylphenidate κυμαίνεται από -3,9 έως 7,2%.

Πίνακας 6.27: Αξιολόγηση της ορθότητας της μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού των αναλυτών σε εμβολιασμένα δείγματα μεταθανάτιου ολικού αίματος

Μεταθανάτιο αίμα		
Μέση τιμή (ng mL ⁻¹) (n=15)	Μέση τιμή ± τυπική απόκλιση (ng mL ⁻¹) (n=15)	% E _r
Amphetamine		
60	58,0 ± 2,7	-3,3
800	804 ± 29	0,5
1600	1709 ± 110	6,8
Methamphetamine		
60	58,4 ± 3,7	-2,6
800	793 ± 25	-0,9
1600	1588 ± 90	-0,8
MDA		
60	59,8 ± 2,9	-0,3
800	819 ± 28	2,4
1600	1641 ± 115	2,6
MDMA		
60	58,5 ± 2,8	-2,5
800	820 ± 28	2,5
1600	1637 ± 68	2,3
Phentermine		
60	59,4 ± 3,4	-1,1
800	818 ± 28	2,2
1600	1623 ± 69	1,4
Pseudoephedrine		
60	57,5 ± 2,8	-4,2
800	818 ± 35	2,2
1600	1606 ± 69	0,4
Bupropion		
60	59,3 ± 3,0	-1,2
800	846 ± 37	5,8
1600	1665 ± 80	4,1
Hydroxybupropion		
60	57,9 ± 3,1	-3,5
800	869 ± 38	8,7
1600	1671 ± 72	4,4
Ephedrine		
60	57,7 ± 3,1	-3,8
800	814 ± 30	1,8
1600	1638 ± 76	2,4
MDEA		
60	59,8 ± 3,9	-0,4
800	847 ± 27	5,8
1600	1639 ± 83	2,5
Phenylpropanolamine		
60	60,6 ± 3,7	1,1
800	783 ± 32	-2,2
1600	1611 ± 78	0,7
Methylphenidate		
60	57,7 ± 2,2	-3,9
800	857 ± 39	7,2
1600	1674 ± 62	4,6

6.5.3.2 Πιστότητα

Για την αξιολόγηση της πιστότητας της μεθόδου LC-ESI/MS/MS χρησιμοποιήθηκε μονόδρομη ανάλυση διακύμανσης (one way ANOVA). Υπολογίστηκε η εντός της ημέρας % σχετική τυπική απόκλιση και η μεταξύ των ημερών % σχετική τυπική απόκλιση τόσο σε μεταθανάτιο όσο και σε προθανάτιο ολικό αίμα.

Προθανάτιο ολικό αίμα

Τα αποτελέσματα της εντός της ημέρας και εντός των ημερών πιστότητας στο προθανάτιο ολικό αίμα για όλους τους αναλύτες παρουσιάζονται στον πίνακα 6.28.

Όπως διαπιστώνεται από τον πίνακα 6.28 η τιμή της επί τοις εκατό σχετικής τυπικής απόκλισης εντός της ημέρας στο προθανάτιο ολικό αίμα κυμαίνεται από 1,8 έως 4,6% για το amphetamine, για το methamphetamine κυμαίνεται από 1,7 έως 5,5%, για το MDA κυμαίνεται από 2,1 έως 4,3%, για το MDMA κυμαίνεται από 1,8 έως 3,8%, για το phentermine κυμαίνεται από 2,0 έως 4,3%, για το pseudoephedrine κυμαίνεται από 1,7 έως 4,2%, για το bupropion κυμαίνεται από 1,9 έως 4,1%, για το hydroxybupropion κυμαίνεται από 1,5 έως 7,1%, για το ephedrine κυμαίνεται από 1,8 έως 4,1%, για το MDEA κυμαίνεται από 1,4 έως 3,3%, για το phenylpropranolamine κυμαίνεται από 2,0 έως 4,3% και για το methylphenidate κυμαίνεται από 2,0 έως 3,0%. Ενώ, η τιμή της επί τοις εκατό σχετικής τυπικής απόκλισης μεταξύ των ημερών στο προθανάτιο ολικό αίμα κυμαίνεται από 3,1 έως 7,3% για το amphetamine, για το methamphetamine κυμαίνεται από 4,6 έως 5,5%, για το MDA κυμαίνεται από 3,9 έως 5,1%, για το MDMA κυμαίνεται από 3,3 έως 4,6%, για το phentermine κυμαίνεται από 1,8 έως 5,3%, για το pseudoephedrine κυμαίνεται από 4,3 έως 5,1%, για το bupropion κυμαίνεται από 3,8 έως 5,1%, για το hydroxybupropion κυμαίνεται από 2,2 έως 7,5%, για το ephedrine κυμαίνεται από 3,9 έως 4,7%, για το MDEA κυμαίνεται από 3,2 έως 4,5%, για το phenylpropranolamine κυμαίνεται από 5,3 έως 6,1% και για το methylphenidate κυμαίνεται από 2,4 έως 4,2%.

Πίνακας 6.28: Αξιολόγηση της πιστότητας της μεθόδου εντός της ημέρας και δια των ημερών (n=5) υπολογίζοντας την % σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) των μετρήσεων των αναλυτών σε εμβολιασμένα δείγματα προθανάτιου ολικού αίματος χρησιμοποιώντας one way ANOVA

Προθανάτιο αίμα			
	% RSD (60 ng mL⁻¹)	% RSD (800 ng mL⁻¹)	% RSD (1600 ng mL⁻¹)
Amphetamine			
Εντός της ημέρας	4,6	1,8	2,2
Δια των ημερών	4,3	3,1	7,3
Methamphetamine			
Εντός της ημέρας	5,5	3,0	1,7
Δια των ημερών	4,9	4,6	5,5
MDA			
Εντός της ημέρας	4,3	2,8	2,1
Δια των ημερών	4,6	3,9	5,1
MDMA			
Εντός της ημέρας	3,8	2,5	1,8
Δια των ημερών	4,0	3,3	4,6
Phentermine			
Εντός της ημέρας	2,0	2,0	4,3
Δια των ημερών	4,9	1,8	5,3
Pseudoephedrine			
Εντός της ημέρας	4,2	2,8	1,7
Δια των ημερών	4,9	5,1	4,3
Bupropion			
Εντός της ημέρας	4,1	2,3	1,9
Δια των ημερών	5,1	3,8	4,8
Hydroxybupropion			
Εντός της ημέρας	3,8	7,1	1,5
Δια των ημερών	3,8	7,5	2,2
Ephedrine			
Εντός της ημέρας	4,1	2,3	1,8
Δια των ημερών	4,2	3,9	4,7
MDEA			
Εντός της ημέρας	3,3	2,9	1,4
Δια των ημερών	3,3	3,2	4,5
Phenylpropanolamine			
Εντός της ημέρας	4,3	2,3	2,0
Δια των ημερών	5,3	5,6	6,1
Methylphenidate			
Εντός της ημέρας	3,0	2,7	2,0
Δια των ημερών	4,2	4,4	2,4

Μεταθανάτιο ολικό αίμα

Τα αποτελέσματα της εντός της ημέρας και εντός των ημερών πιστότητας στο μεταθανάτιο ολικό αίμα για όλους τους αναλύτες παρουσιάζονται στον πίνακα 6.29.

Πίνακας 6.29: Αξιολόγηση της πιστότητας της μεθόδου εντός της ημέρας και δια των ημερών (n=5) υπολογίζοντας την % σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) των μετρήσεων των αναλυτών σε εμβολιασμένα δείγματα μεταθανάτιου ολικού αίματος χρησιμοποιώντας one way ANOVA			
Μεταθανάτιο αίμα			
	% RSD (60 ng mL⁻¹)	% RSD (800 ng mL⁻¹)	% RSD (1600 ng mL⁻¹)
Amphetamine			
Εντός της ημέρας	3,3	2,1	2,8
Δια των ημερών	4,8	3,7	6,9
Methamphetamine			
Εντός της ημέρας	3,9	2,6	2,7
Δια των ημερών	6,6	3,4	6,0
MDA			
Εντός της ημέρας	3,4	2,3	2,9
Δια των ημερών	5,2	3,6	7,3
MDMA			
Εντός της ημέρας	3,0	2,5	2,1
Δια των ημερών	5,0	3,5	4,4
Pentermine			
Εντός της ημέρας	3,6	3,5	2,1
Δια των ημερών	6,0	3,4	4,5
Pseudoephedrine			
Εντός της ημέρας	3,0	3,3	1,9
Δια των ημερών	5,2	4,4	4,6
Bupropion			
Εντός της ημέρας	3,4	3,6	3,1
Δια των ημερών	5,1	4,5	5,1
Hydroxybupropion			
Εντός της ημέρας	4,2	2,7	3,4
Δια των ημερών	5,4	4,5	4,5
Ephedrine			
Εντός της ημέρας	3,5	2,7	1,8
Δια των ημερών	5,6	3,8	4,9
MDEA			
Εντός της ημέρας	4,0	2,5	2,1
Δια των ημερών	6,8	3,2	5,4
Phenylpropanolamine			
Εντός της ημέρας	4,2	2,6	2,7
Δια των ημερών	6,4	4,3	5,1
Methylphenidate			
Εντός της ημέρας	3,5	3,0	3,0
Δια των ημερών	4,0	4,8	3,8

Όπως διαπιστώνεται από τα αποτελέσματα του πίνακα 6.29, η τιμή της επί τοις εκατό σχετικής τυπικής απόκλισης εντός της ημέρας στο μεταθανάτιο ολικό αίμα κυμαίνεται από 2,1 έως 3,3% για το amphetamine, για το methamphetamine κυμαίνεται από 2,6 έως 3,9%, για το MDA κυμαίνεται από 2,3 έως 3,4%, για το MDMA κυμαίνεται από 2,1 έως 3,0%, για το pentermine κυμαίνεται από 2,1 έως 3,6%, για το pseudoephedrine κυμαίνεται από 1,9 έως 3,3%, για το bupropion κυμαίνεται από 3,1 έως 3,6%, για το hydroxybupropion κυμαίνεται από 2,7 έως 4,2%,

για το ephedrine κυμαίνεται από 1,8 έως 3,5%, για το MDEA κυμαίνεται από 2,1 έως 4,0%, για το phenylpropranolamine κυμαίνεται από 2,6 έως 4,2% και για το methylphenidate κυμαίνεται από 3,0 έως 3,5%. Ενώ, η τιμή της επί τοις εκατό σχετικής τυπικής απόκλισης μεταξύ των ημερών στο μεταθανάτιο ολικό αίμα κυμαίνεται από 3,7 έως 6,9% για το amphetamine, για το methamphetamine κυμαίνεται από 3,4 έως 6,6%, για το MDA κυμαίνεται από 3,6 έως 7,3%, για το MDMA κυμαίνεται από 3,5 έως 5,0%, για το phentermine κυμαίνεται από 3,4 έως 6,0%, για το pseudoephedrine κυμαίνεται από 4,4 έως 5,2%, για το bupropion κυμαίνεται από 4,5 έως 5,1%, για το hydroxybupropion κυμαίνεται από 4,5 έως 5,4%, για το ephedrine κυμαίνεται από 3,8 έως 5,6%, για το MDEA κυμαίνεται από 3,2 έως 6,8%, για το phenylpropranolamine κυμαίνεται από 4,3 έως 6,4% και για το methylphenidate κυμαίνεται από 3,8 έως 4,8%.

6.5.4 Δείγματα ελέγχου ποιότητας

Τα αποτελέσματα κάθε σειράς ανάλυσης αξιολογούνταν για την ορθότητα τους με τη χρήση δειγμάτων ελέγχου. Τα δείγματα αυτά αποτελούνταν από εμβολιασμένα δείγματα ολικού αίματος σε δύο συγκεντρώσεις 60 και 1000 ng mL⁻¹ και τα οποία ακολουθούσαν την ίδια διαδικασία εκχύλισης και χρωματογραφικής ανάλυσης όπως αυτή των υπολοίπων δειγμάτων. Η παρασκευή του διαλύματος εργασίας, έγινε από διαφορετικό αναλυτή.

Στον πίνακα 6.30 συνοψίζονται τα αποτελέσματα αυτών σε δέκα διαφορετικές σειρές ανάλυσης.

Πίνακας 6.30: Αποτελέσματα του %E _r και του %RSD των δειγμάτων ελέγχου για τους αναλύτες σε εμβολιασμένα δείγματα ολικού αίματος (n=10).						
Αναλύτης	Μέσος όρος πειραματικών μετρήσεων ± τυπική απόκλιση		% E _r		%Σχετική Τυπική απόκλιση (RSD)	
	60 ng mL ⁻¹	1000 ng mL ⁻¹	60 ng mL ⁻¹	1000 ng mL ⁻¹	60 ng mL ⁻¹	1000 ng mL ⁻¹
Amphetamine	59 ± 2,9	996 ± 38	-1,7	-0,4	4,9	3,8
Methamphetamine	59 ± 1,7	977 ± 49	-1,7	-2,3	2,9	5,0
MDA	58 ± 1,7	1003 ± 43	-3,3	0,3	2,9	4,3
MDMA	57 ± 3,1	1001 ± 40	-5,0	0,1	5,5	4,0
Phentermine	62 ± 3,5	1012 ± 35	3,3	1,2	5,7	3,5
Pseudoephedrine	57 ± 1,9	1002 ± 47	-5,0	0,2	3,5	4,7
Bupropion	59 ± 2,8	1007 ± 23	-1,7	0,7	4,8	2,3
Hydroxybupropion	57 ± 2,3	1025 ± 62	-5,0	2,5	4,0	6,1
Ephedrine	57 ± 3,4	998 ± 38	-5,0	-0,2	5,9	3,8
MDEA	59 ± 4,3	1019 ± 45	-1,7	1,9	7,3	4,4
Phenylpropranolamine	59 ± 3,4	966 ± 36	-1,7	-3,4	5,7	3,7
Methylphenidate	57 ± 2,6	1025 ± 57	-5,0	2,5	4,5	5,6

Όπως διαπιστώνεται από τον παραπάνω πίνακα το %E_r για όλους τους αναλύτες και στις δύο συγκεντρώσεις δεν ξεπερνά το 7,3%. Να σημειωθεί ότι για το methamphetamine ο αριθμός των μετρήσεων στη συγκέντρωση 60 ng mL⁻¹ είναι 9 αντί 10 που είναι των υπολοίπων, και αυτό γιατί

χρειάστηκε να αποκλειστεί από τα αποτελέσματα ένα από τα δείγματα λόγω αστοχίας κατά την διάρκεια της ανάλυσης.

6.5.5 Άλλοι έλεγχοι

Οι μελέτες επίδρασης του υλικού μήτρας, ο υπολογισμός της % ανάκτησης για κάθε αναλύτη, ο έλεγχος ειδικότητας και εκλεκτικότητας και ο έλεγχος της επιμόλυνσης εκ μεταφοράς περιγράφονται αναλυτικά στο κεφάλαιο 5.

6.5.6 Μελέτη σταθερότητας δειγματολήπτη

Δείγματα ολικού αίματος εμβολιάστηκαν με τους αναλύτες της προτεινόμενης μεθόδου σε συγκεντρώσεις 60 ng mL^{-1} και 1000 ng mL^{-1} . Κατεργάστηκαν και αναλύθηκαν σε τέσσερις διαδοχικές εργαστηριακές ημέρες εις τριπλούν. Κατά την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων παρατηρήθηκε ότι όλοι οι προσδιοριζόμενοι αναλύτες παραμένουν σταθεροί έως και τέσσερις ημέρες.

6.5.7 Εφαρμογή της μεθόδου

Η προτεινόμενη μεθοδολογία ποσοτικού προσδιορισμού των amphetamine, methamphetamine, phenylpropranolamine, ephedrine, pseudoephedrine, MDA, MDMA, MDEA, phentermine, methylphenidate, bupropion και hydroxybupropion σε μεταθανάτιο και προθανάτιο ολικό αίμα εφαρμόστηκε σε διεργαστηριακό δείγμα, πραγματικά δείγματα υποθέσεων και προπαρασκευασμένων δειγμάτων αίματος γνωστής συγκέντρωσης από εξωτερικό προμηθευτή. Το διεργαστηριακό δείγμα αξιολογήθηκε ως προς την απόκλιση της ευρεθείσας τιμής από το μέσο όρο ευρεθεισών τιμών από άλλα εργαστήρια. Τα πραγματικά δείγματα αξιολογήθηκαν ως προς τα αποτελέσματα που έδωσαν τα δείγματα με άλλες εσωτερικές μεθόδους ή/και εξωτερικού εργαστηρίου. Τα προπαρασκευασμένα δείγματα αξιολογήθηκαν ως προς τις θεωρητικές τιμές αναφοράς που δόθηκαν από την καρασκευάστρια εταιρία. Αξίζει να σημειωθεί πως για κάθε ημέρα ανάλυσης των δειγμάτων, ετοιμαζόταν καινούργια καμπύλη βαμονόμησης.

Το προθανάτιο πραγματικό δείγμα που αναλύθηκε, αφορούσε άντρα περίπου 50 ετών με ιστορικό τροχαίου ατυχήματος. Κατά το ατύχημα, η αστυνομία προέβη σε κλινική εξέταση του αντρός ο οποίος βρέθηκε να ήταν σε σύγχυση με ληθαργική εικόνα και συστολικές κόρες οφθαλμών. Η ομιλία του ήταν μη κατανοητή (άτονη και αργή) και δεν μπορούσε να κατανοήσει τις οδηγίες που δίνονταν από την αστυνομία. Κατά τον προκαταρκτικό έλεγχο με ανοσοενζυμική τεχνική ELISA, το δείγμα βρέθηκε θετικό σε amphetamine και phencyclidine. Η ανάλυση με GC-MS επιβεβαίωσε την ύπαρξη phentermine και phencyclidine, ενώ η ανάλυση με LC-MS/MS έδειξε ότι το δείγμα ήταν θετικό σε phentermine σε συγκέντρωση $255,62 \text{ ng mL}^{-1}$, χωρίς να επιβεβαιώνεται η

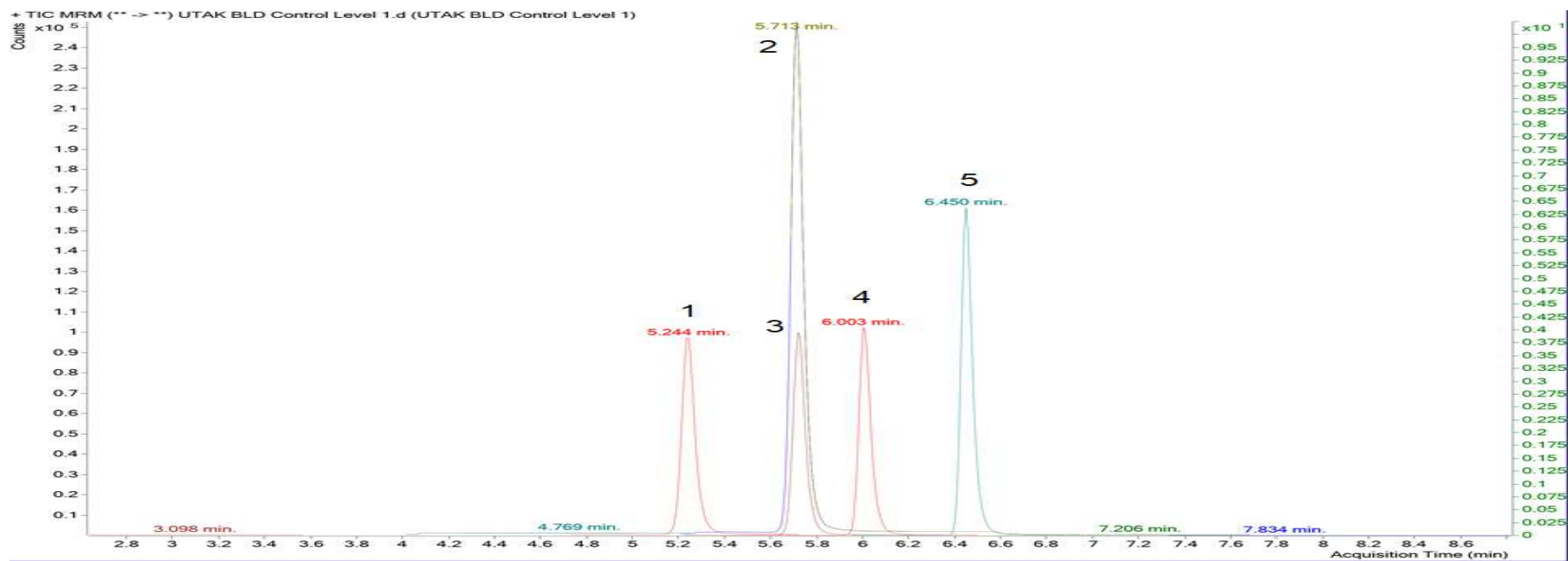
παρουσία του amphetamine. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί λαμβάνοντας υπόψη ότι η ουσία phentermine εμφανίζει διασταυρούμενη δραστικότητα (cross reactivity) με το amphetamine σε ποσοστό 89%. Αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα του προθανάτιου δείγματος παρουσιάζεται στο κεφάλαιο 5. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων αυτών συνοψίζονται στον πίνακα 6.30.

Το μεταθανάτιο πραγματικό δείγμα που αναλήθηκε, αφορούσε γυναίκα περίπου 46 ετών. Κατά τον προκαταρκτικό έλεγχο με ανοσοενζυμική τεχνική ELISA, το δείγμα βρέθηκε θετικό σε methamphetamine, cannabinoids, benzodiazepines και buprenorphine. Η ανάλυση με LC-MS/MS έδειξε ότι το δείγμα ήταν θετικό σε pseudoephedrine σε συγκέντρωση 1508,26 ng mL⁻¹. Αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα του μεταθανάτιου δείγματος παρουσιάζεται στο κεφάλαιο 5. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων αυτών συνοψίζονται στον πίνακα 6.30.

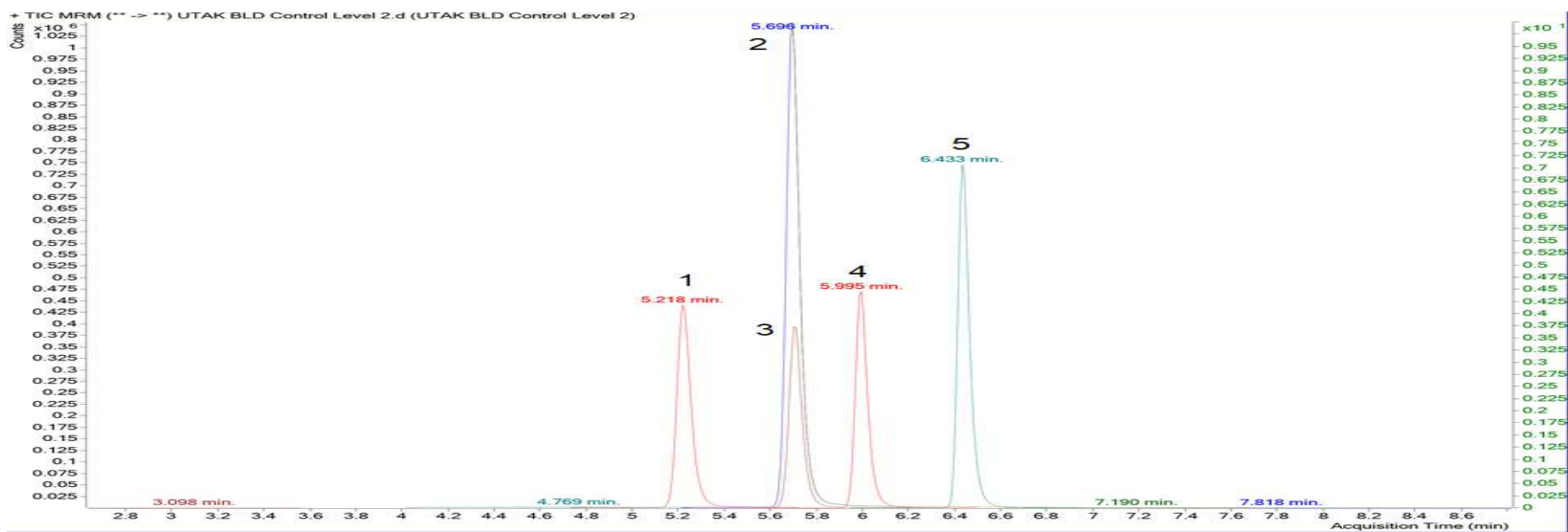
Το διεργαστηριακό δείγμα προήλθε από την εταιρία College of American Pathologists (Illinois, USA) και αφορούσε άντρα 34 ετών χρονών με ιστορικό χρήσης ηρωίνης ο οποίος βρέθηκε νεκρός στην οικία του. Κατά τον προκαταρκτικό έλεγχο με ανοσοενζυμική τεχνική ELISA, το δείγμα βρέθηκε θετικό σε amphetamine, methamphetamine και fentanyl. Κατά το στάδιο της επιβεβαίωσης, το δείγμα αναλύθηκε με GC-MS καθώς και με την προτεινόμενη μέθοδο σε LC-MS/MS. Η ανάλυση με GC-MS επιβεβαίωσε ότι το δείγμα ήταν θετικό σε fentanyl, ενώ η ανάλυση με LC-MS/MS έδειξε ότι το δείγμα ήταν θετικό σε amphetamine και methamphetamine σε συγκεντρώσεις 156,39 ng mL⁻¹ και 760,91 ng mL⁻¹, αντίστοιχα. Αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα του μεταθανάτιου δείγματος παρουσιάζεται στο κεφάλαιο 5. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων αυτών συνοψίζονται στον πίνακα 6.30.

Στο πρώτο προπαρασκευασμένο δείγμα αίματος βρέθηκαν οι ουσίες amphetamine, methamphetamine, MDMA, MDA και MDEA σε συγκεντρώσεις 102,97 ng mL⁻¹, 109,15 ng mL⁻¹, 96,91 ng mL⁻¹, 99,51 ng mL⁻¹ και 101,81 ng mL⁻¹, αντίστοιχα (Πίνακας 6.30). Αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα του πρώτου προπαρασκευασμένου δείγματος φαίνεται στο σχήμα 6.10.

Στο δεύτερο προπαρασκευασμένο δείγμα αίματος βρέθηκαν οι ουσίες amphetamine, methamphetamine, MDMA, MDA και MDEA σε συγκεντρώσεις 469,53 ng mL⁻¹, 479,86 ng mL⁻¹, 475,27 ng mL⁻¹, 466,01 ng mL⁻¹ και 483,88 ng mL⁻¹, αντίστοιχα (Πίνακας 6.40). Αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα του δεύτερου προπαρασκευασμένου δείγματος φαίνεται στο σχήμα 6.11.



Σχήμα 6.10: UHPLC-MS/MS χρωματογράφημα (MRM) που προκύπτει από την ανάλυση του πρώτου προπαρασκευασμένου δείγμα αίματος. 1: Amphetamine, 2: Methamphetamine, 3: MDA και 4: MDMA, 5: MDEA



Σχήμα 6.11: UHPLC-MS/MS χρωματογράφημα (MRM) που προκύπτει από την ανάλυση του δεύτερου προπαρασκευασμένου δείγματος αίματος. 1: Amphetamine, 2: Methamphetamine, 3: MDA και 4: MDMA, 5: MDEA

Πίνακας 6.30: Αποτελέσματα εφαρμογής της μεθόδου σε διεργαστηριακά δείγματα, πραγματικά δείγματα υποθέσεων και προκατασκευασμένα δείγματα

	Προθανάτιο δείγμα		Μεταθανάτιο δείγμα		Διεργαστηριακό δείγμα		Προπαρασκευασμένο δείγμα 1		Προπαρασκευασμένο δείγμα 2	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Phentermine	255	Θετικό	-	-	-	-	-	-	-	-
Pseudoephedrine	-	-	1508	1400	-	-	-	-	-	-
Amphetamine	-	-	-	-	156	154	103	100	470	500
Methamphetamine	-	-	-	-	761	785	109	100	480	500
MDMA	-	-	-	-	-	-	97	100	475	500
MDA	-	-	-	-	-	-	100	100	466	500
MDEA	-	-	-	-	-	-	102	100	484	500

A: Ευρεθείσα συγκέντρωση με την προτεινόμενη μέθοδο (ng mL^{-1}), B: Ευρεθείσα τιμή με άλλη μέθοδο (ng mL^{-1}).

6.6 Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε μέθοδος για τον ποσοτικό προσδιορισμό 12 ψυχοδιεγερτικών ουσιών σε δείγματα μεταθανάτιου και προθανάτιου ολικού αίματος, με χρήση συστήματος LC-MS/MS και της τεχνικής ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό. Η διάρκεια της χρωματογραφικής ανάλυσης κάθε δείγματος δε ξεπερνά τα 13 λεπτά. Η μέθοδος αξιολογήθηκε ως προς τα κύρια χαρακτηριστικά ποιότητας, όπως γραμμικότητα, ορθότητα, πιστότητα, ειδικότητα, εκλεκτικότητα, επιμόλυνση εκ μεταφοράς, τόσο σε μεταθανάτιο όσο και σε προθανάτιο ολικό αίμα. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα του μεταθανάτιου με αυτά του προθανάτιου ολικού αίματος δε διαπιστώθηκαν σημαντικές αποκλίσεις μεταξύ τους. Τα αποτελέσματα κρίθηκαν ικανοποιητικά καθιστώντας τη μέθοδο αυτή κατάλληλη για το ποσοτικό προσδιορισμό των αναλυτών τόσο σε μεταθανάτιο όσο και προθανάτιο ολικό αίμα. Η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε σε διεργαστηριακά και πραγματικά δείγματα ολικού αίματος και εντάχθηκε στις μεθόδους ρουτίνας του τοξικολογικού εργαστηρίου.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφική ανασκόπηση δεν υπάρχει άλλη αναφορά που να περιλαμβάνει τον ταυτόχρονο ποσοτικό προσδιορισμό των δώδεκα επιλεγμένων αναλυτών σε προθανάτιο και μεταθανάτιο ολικό αίμα. Επιπλέον στην προτεινόμενη μέθοδο ποσοτικοποίησης γίνεται χρήση του αλγόριθμου δυναμικού παρακολούθησης επιλεγμένων αντιδράσεων θραύσης ιόντων (dynamic MRM) ο οποίος προσδίδει στη μέθοδο βελτιωμένη ευαισθησία και καλύτερη συμμετρία των χρωματογραφικών κορυφών. Η εφαρμογή της μεθόδου dMRM δεν έχει βρεθεί να αναφέρεται στη βιβλιογραφία συχνά και ειδικότερα για τις ουσίες που περιλαμβάνονται στην προτεινόμενη μέθοδο ποσοτικοποίησης. Η χρήση επίσης του πολυωνυμικού μοντέλου για τον ποσοτικό

προσδιορισμό αποτελεί διαφορά σε σχέση με άλλες αναφορές στη βιβλιογραφία που κατά κύριο λόγο χρησιμοποιούν γραμμικό μοντέλο παλινδρόμησης. Η εφαρμογή της μεθόδου σε διεργαστηριακό δείγμα, πραγματικά δείγματα υποθέσεων και προπαρασκευασμένων δειγμάτων αίματος γνωστής συγκέντρωσης από εξωτερικό προμηθευτή, έδειξαν ότι το πολυωνυμικό μοντέλο παρουσιάζει παρόμοια ποσοτικά δεδομένα όπως και το γραμμικό μοντέλο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ 19 ΨΥΧΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΕ ΟΥΡΑ ΚΑΙ ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ UHPLC-ESI/MS/MS

7.1 Εισαγωγή





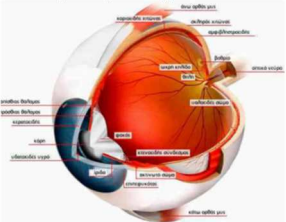
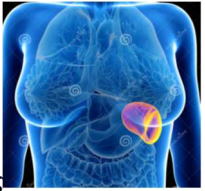

Τα βιολογικά υγρά είναι σύνθετα δείγματα που περιέχουν ένα μεγάλο αριθμό συστατικών, τα οποία συνεισφέρουν σε μικρότερο ή μεγαλύτερο βαθμό σε παρεμποδίσεις κατά την ανάλυση, καλύπτοντας την πιθανή παρουσία ουσιών στο δείγμα ή αυξάνοντας ή μειώνοντας την απόκρισή του σήματος λόγω αλλαγών στο pH ή διάσπασης τους λόγω ενζυμικής υδρόλυσης [166].

Τα διαθέσιμα μεταθανάτια βιολογικά υγρά για τη διερεύνηση τοξικολογικών ποικίλων, μπορούν να επιλεγούν ανάλογα με το ιστορικό της υπόθεσης, την εντολή για ανάλυση, νομικούς λόγους και τη διαθεσιμότητα του δείγματος σε κάθε υπόθεση [167,168,169]. Εντούτοις, ανάλογα με τον αναλύτη, κάποια βιολογικά υγρά μπορεί να μην είναι κατάλληλα για την ανάλυση και την ανίχνευση εξαρτησιογόνων ουσιών [170,171]. Συνήθως, κατά την αυτοψία, λαμβάνονται δείγματα βιολογικών υγρών και ιστών για τη διενέργεια συμπληρωματικών αναλύσεων. Το ολικό αίμα και τα ούρα είναι τα βιολογικά υγρά επιλογής για τέτοιου είδους αναλύσεις και χαρακτηρίζονται ως «συμβατικά» δείγματα. Από την άλλη η συλλογή «εναλλακτικών» δειγμάτων κρίνεται απαραίτητη όταν το ολικό αίμα και τα ούρα δεν είναι διαθέσιμα λόγω αποσύνθεσης του σώματος, ή σε περιπτώσεις που ο όγκος ολικού αίματος που μπορεί να συλλεχθεί είναι περιορισμένος, ή είναι δύσκολο να συλλεχθεί ή είναι δύσκολο να κατεργαστεί σε περιπτώσεις αποσύνθεσης ενός πτώματος [172,173]. Ένα ιδανικό «εναλλακτικό» δείγμα πρέπει να επιτρέπει την ανίχνευση των αναλυτών όπως αυτοί θα ανιχνεύονταν σε δείγμα ολικού αίματος [174, 175,176]. Η ανίχνευση των ουσιών σε εναλλακτικά βιολογικά υλικά είναι σημαντική για τον καθορισμό της αιτίας και των συνθηκών θανάτου ενός περιστατικού.

Το πρώτο μη συμβατικό δείγμα που χρησιμοποιήθηκε στην τοξικολογική ανάλυση ήταν οι τρίχες στις δεκαετίες '60 και '70, για την ανίχνευση βαρέων μετάλλων όπως το αρσενικό, ο μόλυβδος και ο υδράργυρος [177,178]. Έκτοτε, ένας μεγάλος αριθμός αναφορών περιγράφει τον προσδιορισμό διαφόρων κατηγοριών ουσιών, συνήθως εξαρτησιογόνων ουσιών και θεραπευτικών φαρμάκων. Σήμερα, τα συνήθη «εναλλακτικά» υλικά περιλαμβάνουν το ήπαρ, οι νεφροί, ο εγκέφαλος, τα οστά, ο μυελός των οστών, οι τρίχες, τα νύχια, το ενδοφθάλμιο υγρό, η χολή, το περικαρδιακό υγρό, ο σπλήνας, ο σκελετικός μυς, το στοματικό υγρό, ο ιδρώτας, το μητρικό γάλα, το αμνιακό υγρό και το μηκόνιο [179,180,181,182].

Στον πίνακα 7.1 παρουσιάζονται τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα των εναλλακτικών βιολογικών δειγμάτων που αναλύθηκαν στην παρούσα μελέτη.

Πίνακας 7.1 Εναλλακτικά βιολογικά δείγματα για την τοξικολογική ανάλυση

Δείγμα	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
<p>Ήπαρ</p> 	<p>Κυριότερο όργανο μεταβολισμού Επιτρέπει την εύκολη ποιοτική ανίχνευση Όταν απαιτείται ποσοτικός προσδιορισμός, αποτελεί το καταλληλότερο εναλλακτικό βιολογικό υλικό</p>	<p>Δεν υπάρχουν ποσοτικά δεδομένα συσχέτισης με το ολικό αίμα για πολλούς αναλύτες Περιέχει υψηλά ποσοστά πρωτεϊνών και λιπιδίων τα οποία μπορεί να προκαλέσουν παρεμποδίσσεις κατά την ανάλυση</p>
<p>Εγκέφαλος</p> 	<p>Μεγάλη σταθερότητα σε συνθήκες αποσύνθεσης του σώματος. Οι αναλύτες διασπώνται με μεγάλη καθυστέρηση Ο μεταβολισμός είναι βραδύς Η συγκέντρωση των αναλυτών δεν επηρεάζεται από μεταθανάτια ανακατανομή από το στομάχι</p>	<p>Οι συγκεντρώσεις των αναλυτών μπορεί να διαφέρουν σημαντικά ανάλογα με το σημείο δειγματοληψίας Κατάλληλο για ποιοτική ανάλυση.</p>
<p>Χολή</p> 	<p>Ιδιαίτερα χρήσιμο δείγμα όταν τα ούρα δεν είναι διαθέσιμα.</p>	<p>Κατάλληλη μόνο για ποιοτικό προσδιορισμό. Το δείγμα περιέχει μεταξύ άλλων χολικά άλατα τα οποία μπορεί να παρεμποδίσουν την ανάλυση. Οι συγκεντρώσεις μπορεί να αλλοιωθούν από μεταθανάτια διάχυση από το ήπαρ και το στομάχι.</p>
<p>Γαστρικό περιεχόμενο</p> 	<p>Χρήσιμο σε περιστατικά υπερδοσολογίας</p>	<p>Ακατάλληλο στις περιπτώσεις παρεντερικής χορήγησης</p>
<p>Ενδοφθάλμιο υγρό</p> 	<p>Απουσία εστερασών. Εύκολη δειγματοληψία Παραμένει διαυγές μέχρι 3 ημέρες ή και περισσότερο μετά το θάνατο. Καλή συσχέτιση της συγκέντρωσης αναλυτών ως προς το αίμα. Χρήσιμο για την αξιολόγηση της συγκέντρωσης στο αίμα όταν το αίμα δεν είναι διαθέσιμο. Δεν επηρεάζεται από επιμόλυνση, αποσύνθεση ή μεταθανάτια ανακατανομή των αναλυτών.</p>	<p>Περιορισμένος όγκος δείγματος</p>
<p>Σπλήνας</p> 	<p>Χρήσιμο δείγμα όταν το αίμα δεν είναι διαθέσιμο</p>	<p>Κατάλληλο μόνο για ταυτοποίηση.</p>
<p>Σκελετικός μυς</p> 	<p>Χρήσιμο σε περιστατικά εκτεταμένης αποσύνθεσης, λόγω του ότι είναι πολύ ανθεκτικός ιστός Μεγάλη ποσότητα δείγματος</p>	<p>Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων είναι δύσκολη. Δειγματοληψία από διαφορετικά σημεία μπορεί να οδηγήσουν σε διαφορετικά αποτελέσματα.</p>

Πίνακας 7.2: Βιβλιογραφικές αναφορές αναλύσεων με την τεχνική LC-MS/MS ψυχοδιεγερτικών ενώσεων σε εναλλακτικά βιολογικά δείγματα.

<i>Επιλεγμένες αμφεταμίνες</i>	LC-MS/MS, αναλυτική στήλη: Atlantis dC18, 2,1 x 20 mm, μέγεθος σωματιδίων 3 μm, κινητή φάση: μυρμηκικό αμμώνιο pH 3,0/ ακετονιτρίλιο, βαθμιδωτή έκλουση, ταχύτητα ροής: 0,5 mL/min	Προσδιορισμός επιλεγμένων αμφεταμινών σε δείγματα ούρων [42]
<i>Methamphetamine, 3,4-methylenedioxy-N-methylamphetamine, 3,4-methylenedioxy-N-ethylamphetamine, N,N-dimethylamphetamine</i>	LC-ESI-MS/MS, αναλυτική στήλη: Carcell Pak MG-II C18, 150 x 2,0 mm, μέγεθος σωματιδίων 5 μm, κινητή φάση: μυρμηκικό αμμώνιο 5 mM/ακετονιτρίλιο, βαθμιδωτή έκλουση, ταχύτητα ροής: 0,23 mL/min, κατεργασία δείγματος: SPE Oasis HLB	Προσδιορισμός επιλεγμένων αμφεταμινών και μεταβολιτών σε δείγματα ούρων [183]
<i>amphetamine</i>	GC-MS, κατεργασία δείγματος: SPE C ₈ -SCX, SCX, C ₈ και C1 ₈	Μελέτη ανάκτησης των ουσιών amphetamine και methamphetamine σε δείγματα ούρων [184]
<i>methylphenidate, amphetamine και οι μεταβολίτες αυτών</i>	LC-MS/MS, με απευθείας έγχυση, αναλυτική στήλη: Carcell Pak MG-II, 150 x 2,0 mm, μέγεθος σωματιδίων 5 μm, κινητή φάση: νερό με 0,2% μυρμηκικό οξύ/ακετονιτρίλιο, βαθμιδωτή έκλουση, ταχύτητα ροής: 0,4 mL/min	Προσδιορισμός των ουσιών methylphenidate, amphetamine και των μεταβολιτών αυτών σε ούρα [185]
<i>Methamphetamine, ketamine, οπιούχων και των μεταβολιτών αυτών</i>	LC-MS/MS, αναλυτική στήλη: Zorbax SB-Aq, 100 x 2,1 mm, μέγεθος σωματιδίων 1,8 μm, κινητή φάση: νερό με 0,1% μυρμηκικό οξύ/μεθανόλη, βαθμιδωτή έκλουση, ταχύτητα ροής: 0,32 mL/min, κατεργασία	Προσδιορισμός των ουσιών methamphetamine και ketamine καθώς και των μεταβολιτών αυτών σε ούρα [186]

	δείγματος: SPE ACCUBOND EVIDEX	
<i>Selegiline, Desmethylselegiline, R/S-methamphetamine και R/S-amphetamine</i>	LC-MS/MS, αναλυτική στήλη: Chirobiotic™ V2 2,1 x 250mm, μέγεθος σωματιδίων 5 μm, κινητή φάση: μεθανόλη με 0,1% (v/v) παγόμορφου οξικού οξέος/0,02% (v/v) υδροξείδιο του αμμωνίου, ισοκρατική έκλυση, ταχύτητα ροής: 0,33 mL/min	Προσδιορισμός των Selegiline, Desmethylselegiline, R/S-methamphetamine και R/S-amphetamine σε ξηρές κηλίδες ούρων [¹⁸⁷]

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η δυνατότητα ανίχνευσης των παραγώγων του phenethylamine σε ούρα και επιλεγμένα «εναλλακτικά» υλικά. Στον πίνακα 7.2 συνοψίζονται ορισμένες βιβλιογραφικές αναφορές αναλύσεων με την τεχνική LC-MS/MS.

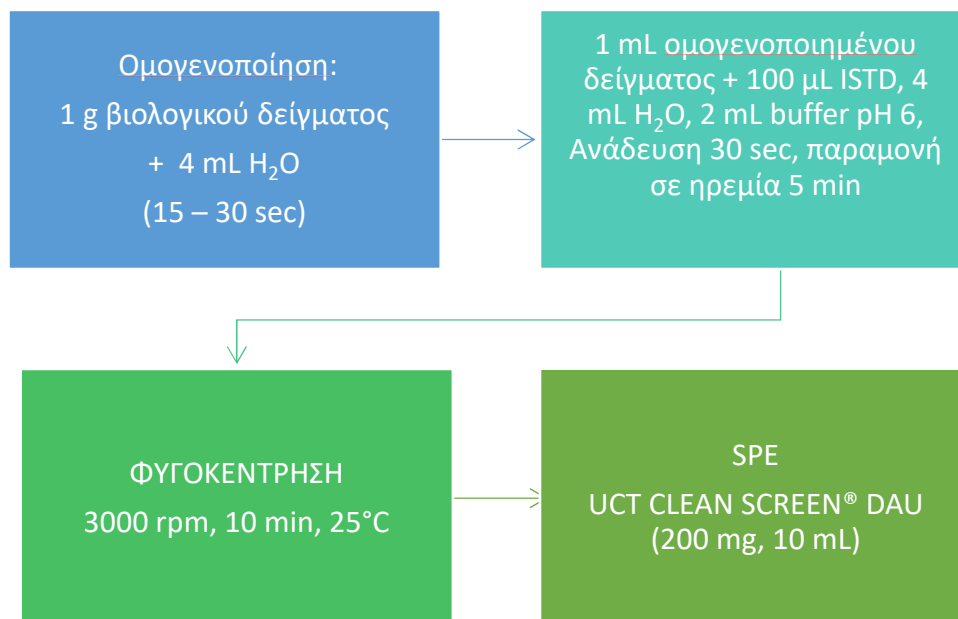
7.2 Μέθοδοι προεργασίας βιολογικών δειγμάτων

7.2.1 Μέθοδοι προεργασίας δειγμάτων ήπατος, εγκεφάλου, σπλήνας και σκελετικού μυ

Η πορεία της απομόνωσης των αναλυτών από βιολογικό δείγμα ήπατος, εγκεφάλου, σπλήνα ή σκελετικού μυ περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:

Ζύγιση 1 g βιολογικού δείγματος ήπατος, εγκεφάλου, σπλήνα ή σκελετικού μυ σε κατάλληλου τύπου πλαστικά δοχεία ομογενοποίησης χωρητικότητας 15 mL και προσθήκη σε αυτό 4 mL νερού καθαρότητας HPLC. Ακολουθεί ομογενοποίηση του δείγματος με τη χρήση κατάλληλου ομογενοποιητή, η διάρκεια της κυμαίνεται από 15 δευτερόλεπτα όταν το βιολογικό δείγμα αποτελείται από εγκέφαλο ή δείγμα σπλήνα έως 30 δευτερόλεπτα όταν το βιολογικό δείγμα αποτελείται από ήπαρ ή σκελετικό μυ. Ακριβώς 1 mL ομογενοποιημένου δείγματος μεταφέρεται σε επισημασμένο υάλινο φιαλίδιο και εμβολιάζεται με 100 μL από το διάλυμα εργασίας του μίγματος των εσωτερικών προτύπων συγκέντρωσης 1 μg mL⁻¹. Ακολουθεί η προσθήκη 4 mL νερού καθαρότητας HPLC, 2 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (0,1 M, pH 6) και ανάδευση με χρήση αναδευτήρα vortex για περίπου 10 δευτερόλεπτα. Το δείγμα αφήνεται σε ηρεμία για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 3000 στροφές για 10 λεπτά (Βήμα Α). Στο σχήμα 7.1 παρουσιάζεται διαγραμματικά το αρχικό στάδιο (Βήμα Α) της πορείας προεργασίας των παραπάνω δειγμάτων. Όλα τα δείγματα πριν την χρωματογραφική ανάλυση υποβάλλονται σε προεργασία με εκχύλιση στερεάς φάσης.

Η διαδικασία SPE η οποία επιλέχθηκε έπειτα από σειρά δοκιμών προκειμένου το βιολογικό δείγμα να είναι στην κατάλληλη μορφή προς ανάλυση, ώστε να μπορέσει να χρησιμοποιηθεί για τον ποιοτικό προσδιορισμό των αναλυτών είναι αυτή που περιγράφεται στο κεφάλαιο 5 και παράγραφο 5.1.

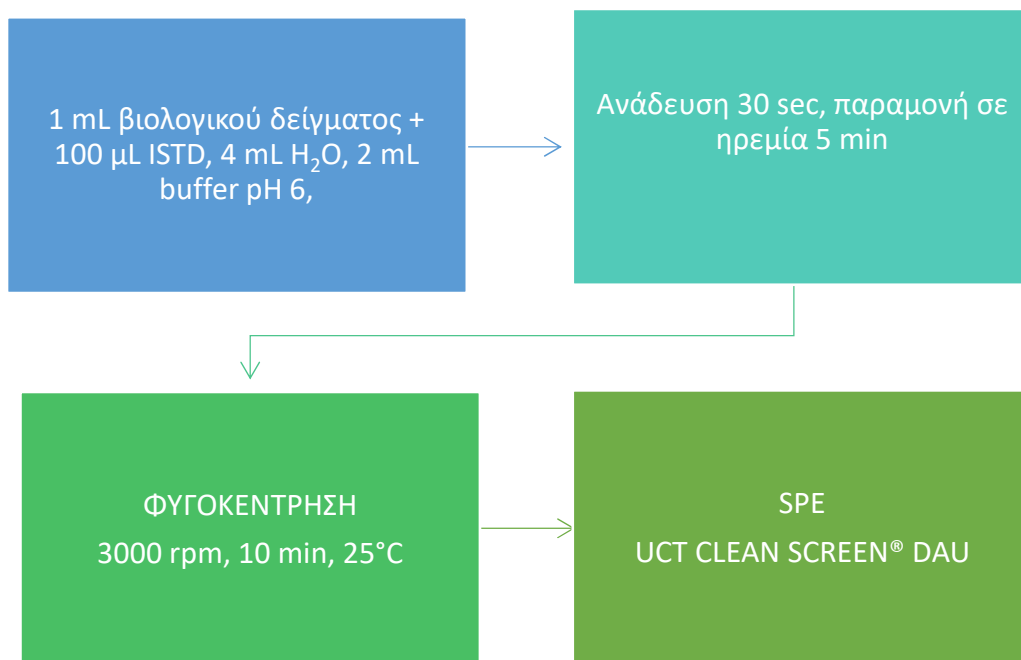


Σχήμα 7.1: Διαγραμματική παρουσίαση του αρχικού σταδίου (Βήμα Α) της πορείας προεργασίας δειγμάτων ήπαρ, σπλήνα, εγκεφάλου και σκελετικού μυ.

7.2.2 Μέθοδοι προεργασίας δειγμάτων ούρων, χολής και ενδοφθάλμιου υγρού

Η πορεία της απομόνωσης των αναλυτών από βιολογικό δείγμα ούρων, χολής ή ενδοφθάλμιου υγρού περιλαμβάνει τα ίδια βήματα όπως πιο πάνω, με τη μόνη διαφορά ότι τα δείγματα ούρων, χολής και ενδοφθάλμιου υγρού, δεν ομογενοποιούνται. Πιο συγκεκριμένα:

Ακριβώς 1 mL βιολογικού δείγματος ούρων, χολής ή ενδοφθάλμιου υγρού σε κατάλληλα επισημασμένα υάλινα φιαλίδια, εμβολιάζεται με 100 μL από το διάλυμα εργασίας του μίγματος των εσωτερικών προτύπων συγκέντρωσης 1 μg mL⁻¹. Ακολουθεί η προσθήκη 4 mL νερού καθαρότητας HPLC, 2 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (0,1 M, pH 6) και ανάδευση με χρήση αναδευτήρα vortex για περίπου 10 δευτερόλεπτα. Το δείγμα αφήνεται σε ηρεμία για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 3000 στροφές για 10 λεπτά (Βήμα Α). Στο σχήμα 7.2 παρουσιάζεται διαγραμματικά το αρχικό στάδιο (Βήμα Α) της πορείας προεργασίας των παραπάνω δειγμάτων.



Σχήμα 7.2: Διαγραμματική παρουσίαση του αρχικού σταδίου (Βήμα Α) της πορείας προεργασίας δειγμάτων ούρων χολής, ενδοφθάλμιου υγρού και γαστρικού περιεχομένου

Όλα τα δείγματα πριν την χρωματογραφική ανάλυση υποβάλλονται σε προεργασία με εκχύλιση στερεάς φάσης. Η διαδικασία SPE η οποία επιλέχθηκε είναι η είναι αυτή που περιγράφεται στο κεφάλαιο 5 και παράγραφο 5.1.

7.3 Αξιολόγηση της μεθόδου

Ο έλεγχος της επίδρασης του υλικού μήτρας στην καταστολή του σήματος καθώς και η επί τοις εκατό ανάκτηση των αναλυτών πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την οδηγία του SWGTOX.

7.3.1 Έλεγχος καταστολής/ενίσχυσης σήματος σε δείγματα ούρων και εναλλακτικών βιολογικών δειγμάτων

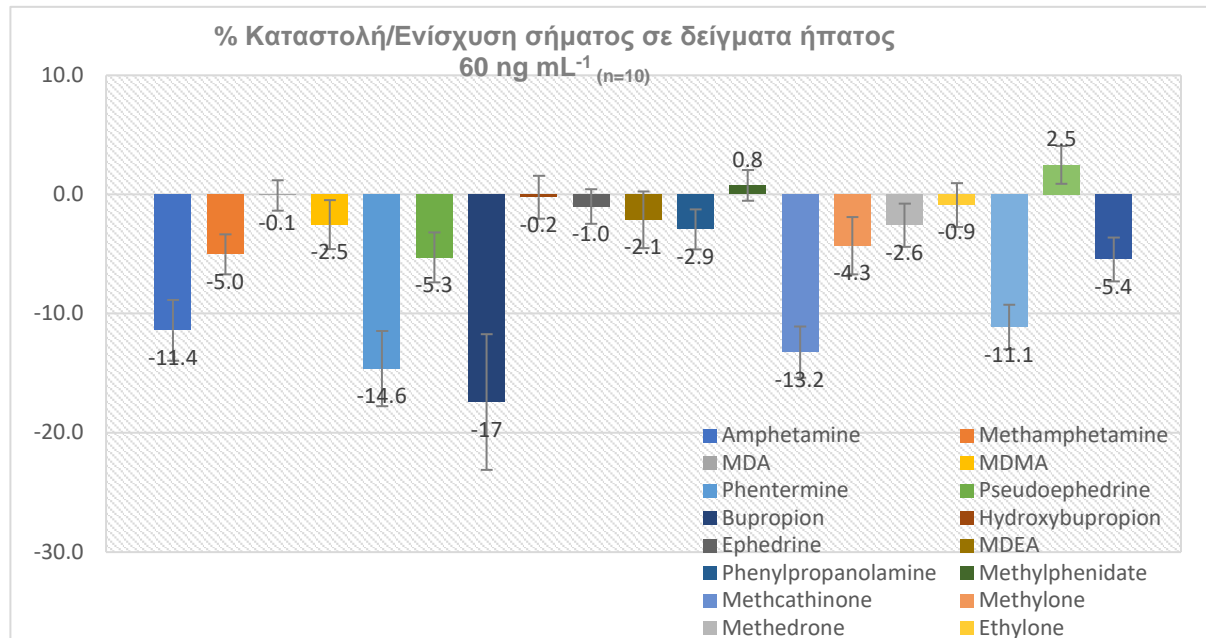
Υπολογίσθηκε η επίδραση του υποστρώματος σε κάθε αναλύτη συγκρίνοντας το σήμα που λαμβάνεται μετά την ανάλυση κατεργασμένων λευκών δειγμάτων ήπατος, εγκεφάλου, σπλήνα, σκελετικού μυ, ούρων, χολής, γαστρικού περιεχομένου και ενδοφθάλμιου υγρού, τα οποία εμβολιάστηκαν με τους αναλύτες μετά την κατεργασία, με το σήμα των αναλυτών σε διάλυμα αντίστοιχης συγκέντρωσης προπαρασκευασμένο σε διαλύτη ανασύστασης (υδατικό διάλυμα μυρμηκικού οξέος 0,1%). Η μελέτη της επίδρασης του υποστρώματος πραγματοποιήθηκε σε δύο επίπεδα συγκεντρώσεων 60 και 1600 ng mL⁻¹ για όλους τους αναλύτες σε δέκα διαφορετικά αρνητικά, ως προς τους αναλύτες ενδιαφέροντος, δείγματα ήπατος, εγκεφάλου, σπλήνας,

σκελετικού μυ, ούρων, χολής, γαστρικού περιεχομένου και ενδοφθάλμιου υγρού και για τα εσωτερικά πρότυπα που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη μέθοδο, σε συγκέντρωση 100 ng mL⁻¹. Υπολογίστηκε η επί τοις εκατό επίδραση του υποστρώματος από το λόγο της απόκρισης του κάθε αναλύτη στα παραπάνω βιολογικά δείγματα εμβολιασμένα μετά την κατεργασία προς την απόκριση του κάθε αναλύτη στα διαλύματα ελέγχου παρασκευασμένα σε διαλύτη ανασύστασης, σύμφωνα με την πιο κάτω εξίσωση που περιγράφεται στην οδηγία SWGTOX :

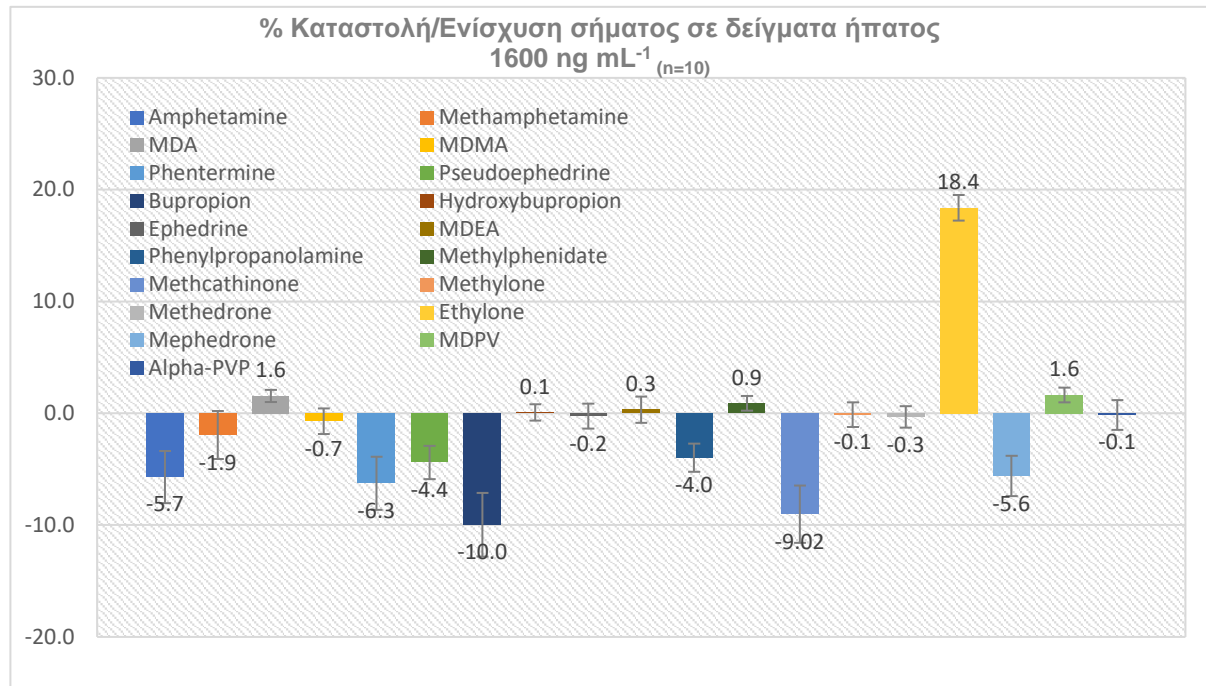
$$\left(\frac{[\text{Εμβλαδόν κορυφής}]_{\text{bloodspiked}}}{[\text{Εμβλαδόν κορυφής}]_{\text{waterspiked}}} - 1 \right) \times 100$$

Στους πίνακες 7.3 έως 7.5 καθώς και στα σχήματα 7.3 έως και 7.10 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της επί τοις εκατό επίδρασης του υποστρώματος στους αναλύτες και στα εσωτερικά πρότυπα.

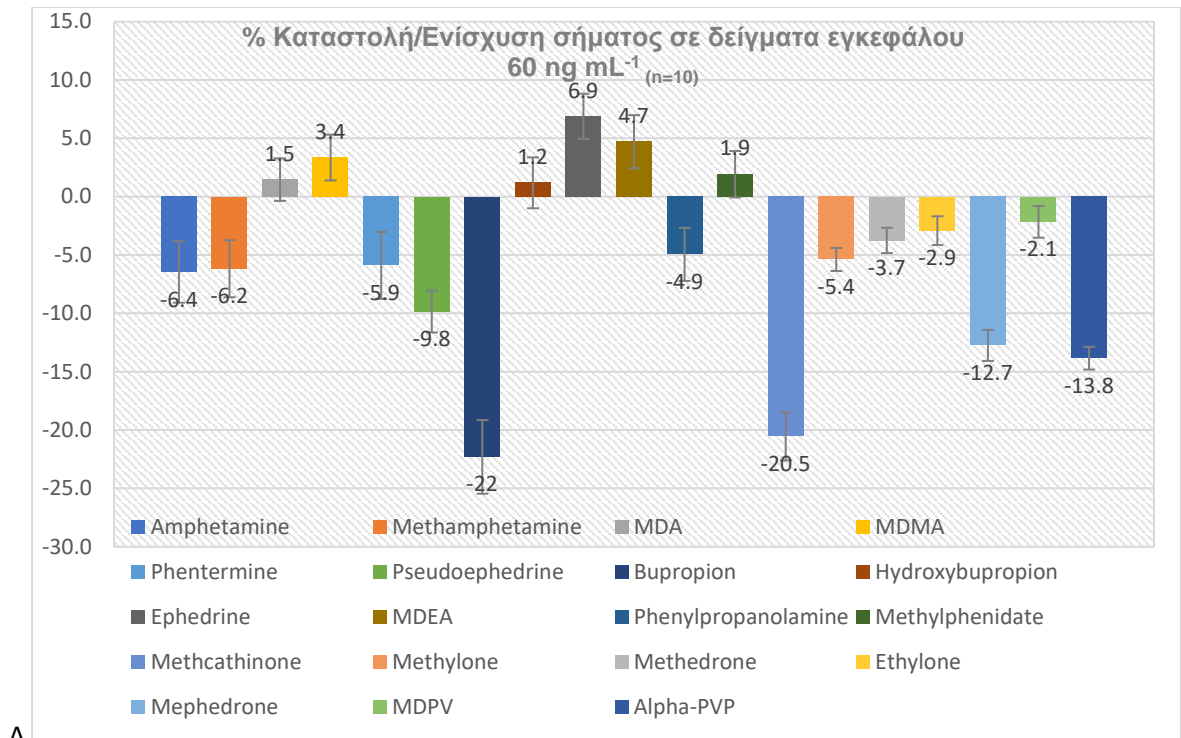
A



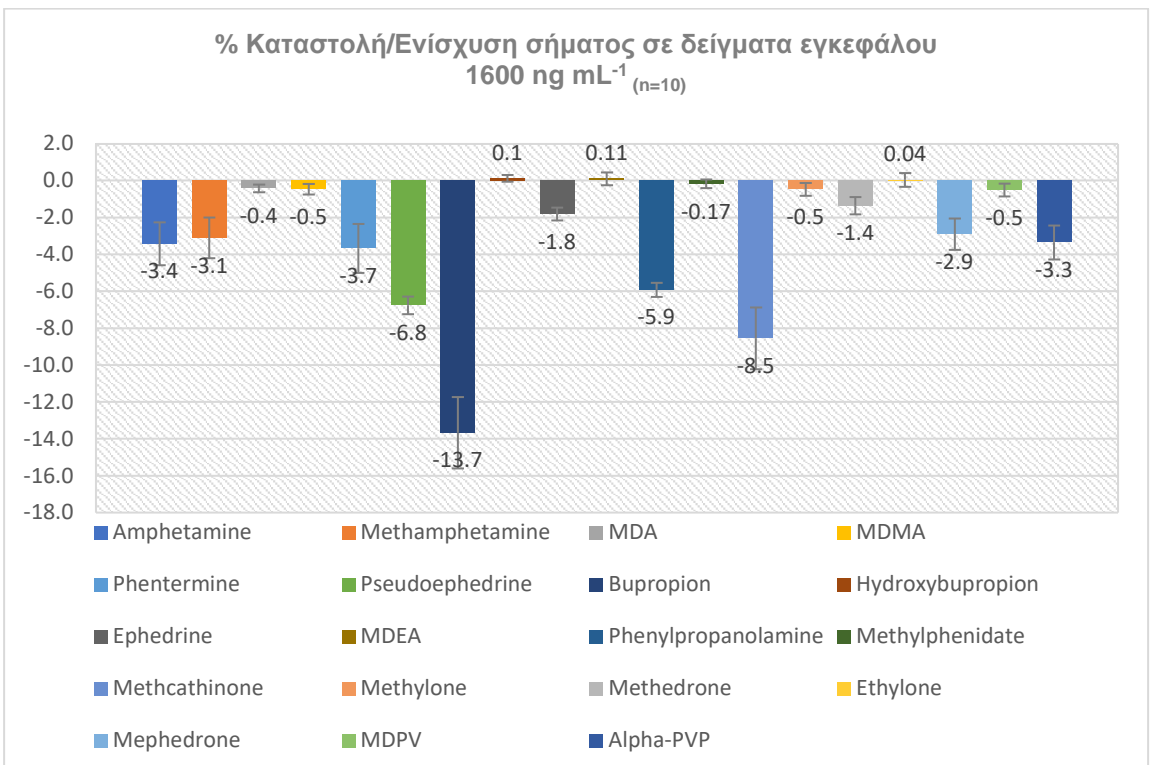
B



Σχήμα 7.3: Επίδραση υποστρώματος σε δείγματα ήπατος σε συγκέντρωση 60 ng mL⁻¹ (A) και 1600 ng mL⁻¹ (B).

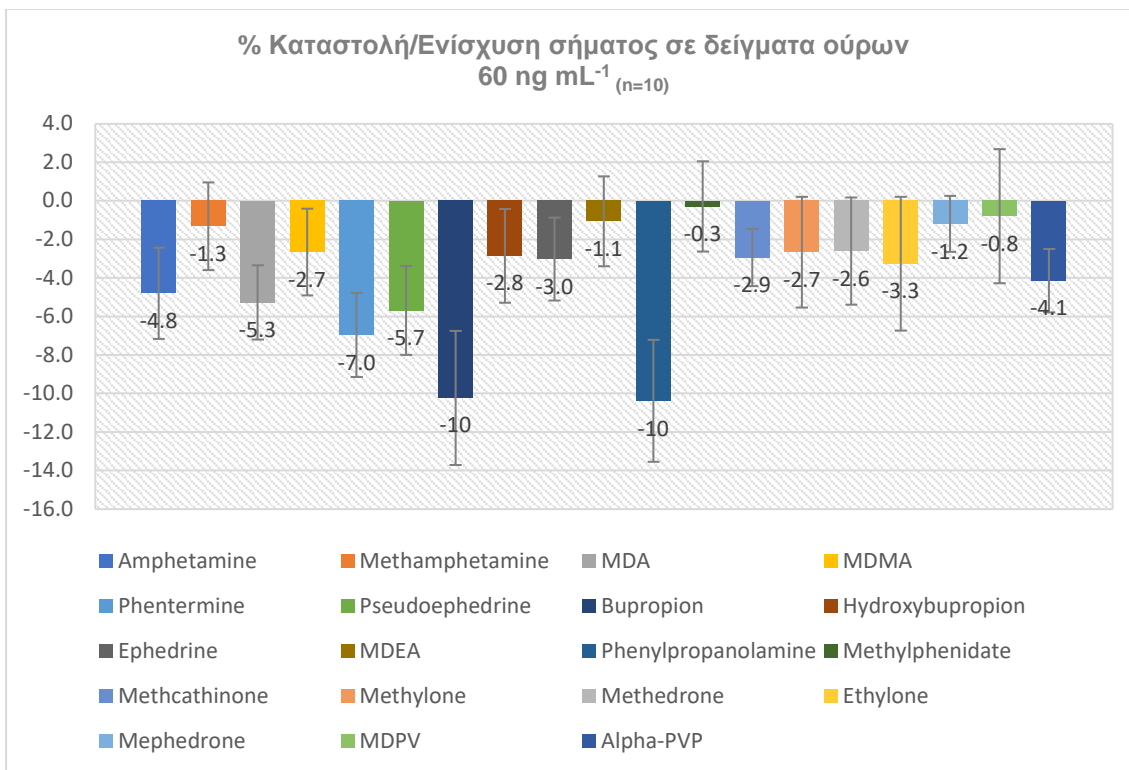


A

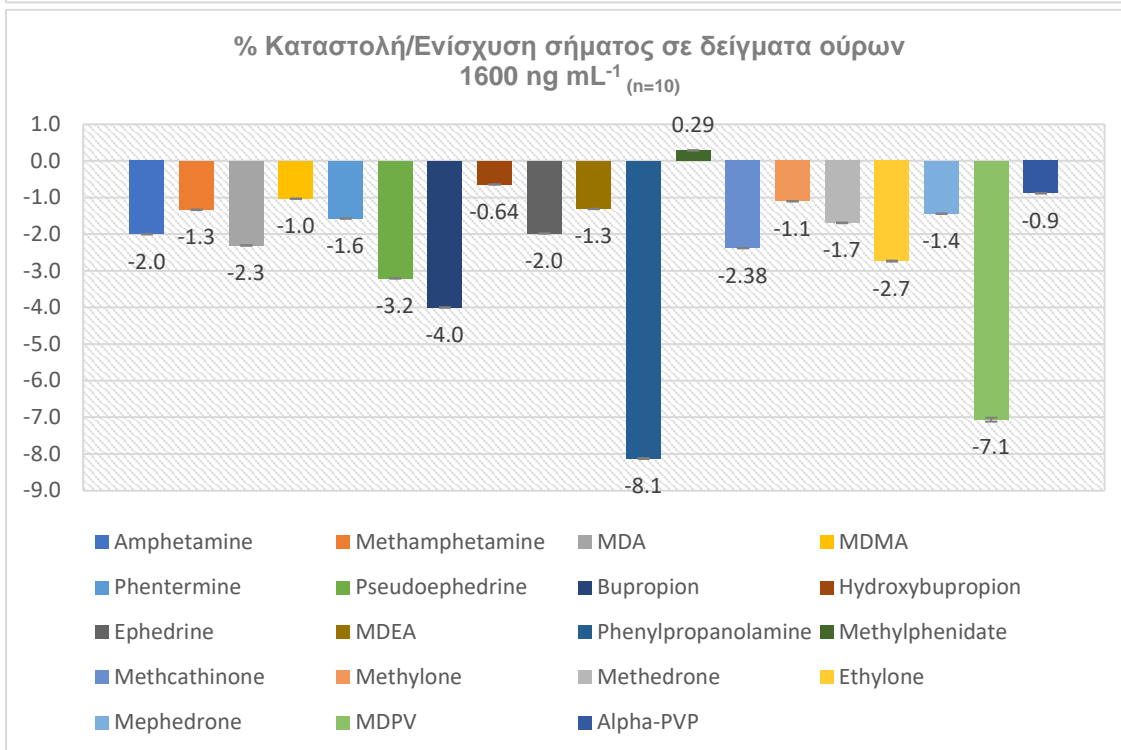


B

Σχήμα 7.4: Επίδραση υποστρώματος σε δείγματα εγκεφάλου σε συγκέντρωση 60 ng mL⁻¹ (A) και 1600 ng mL⁻¹ (B)

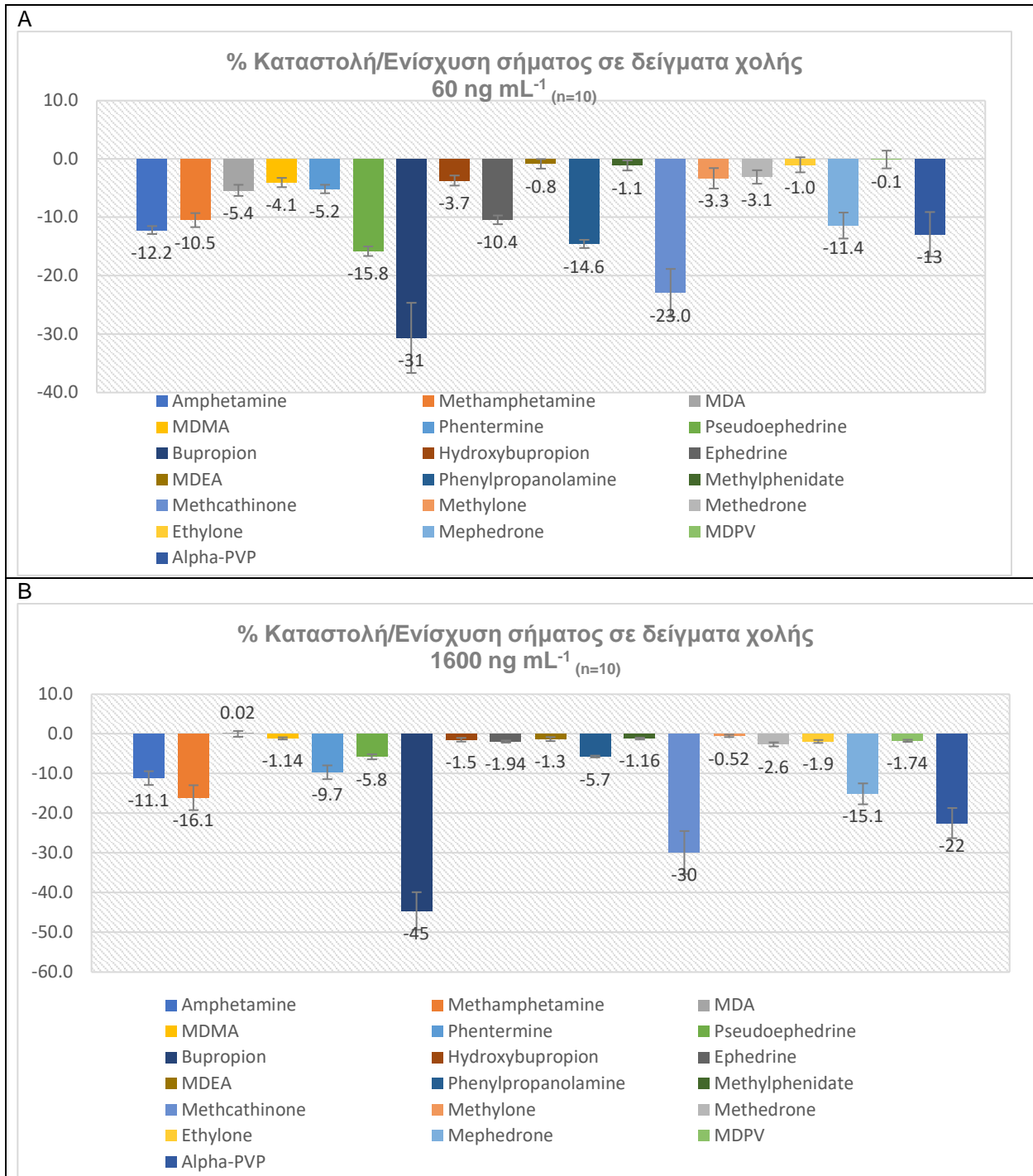


A

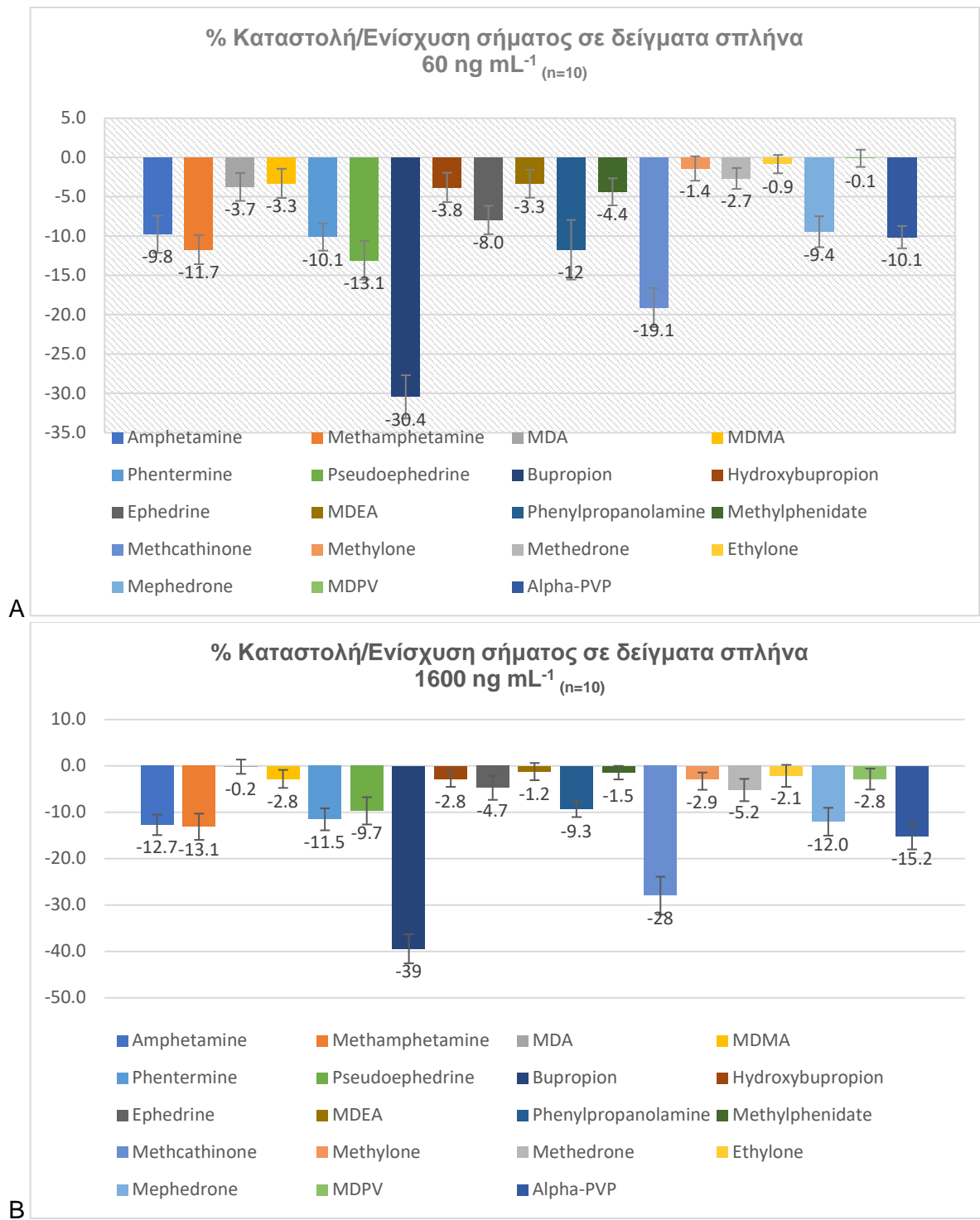


B

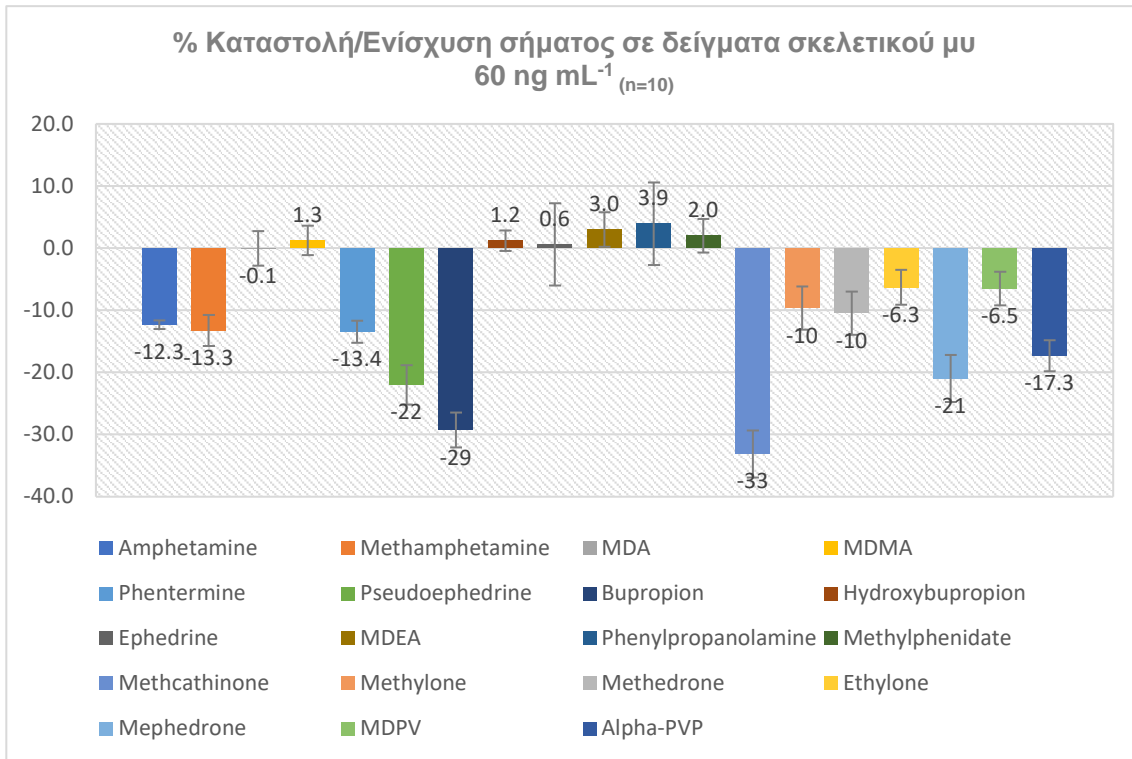
Σχήμα 7.5: Επίδραση υποστρώματος σε δείγματα ούρων σε συγκέντρωση 60 ng mL⁻¹ (επάνω) και 1600 ng mL⁻¹ (κάτω)



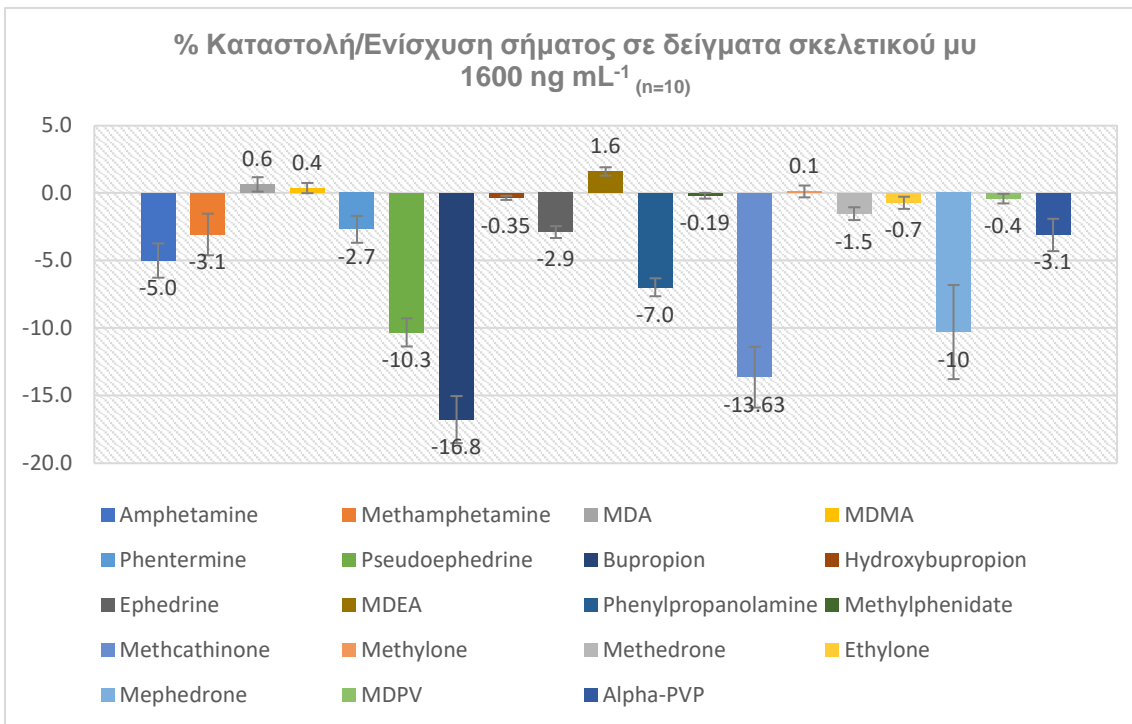
Σχήμα 7.6: Επίδραση υποστρώματος σε δείγματα χολής σε συγκέντρωση 60 ng mL⁻¹ (A) και 1600 ng mL⁻¹ (B).



Σχήμα 7.7: Επίδραση υποστρώματος σε δείγματα σπλήνα σε συγκέντρωση 60 ng mL⁻¹ (επάνω) και 1600 ng mL⁻¹ (κάτω)

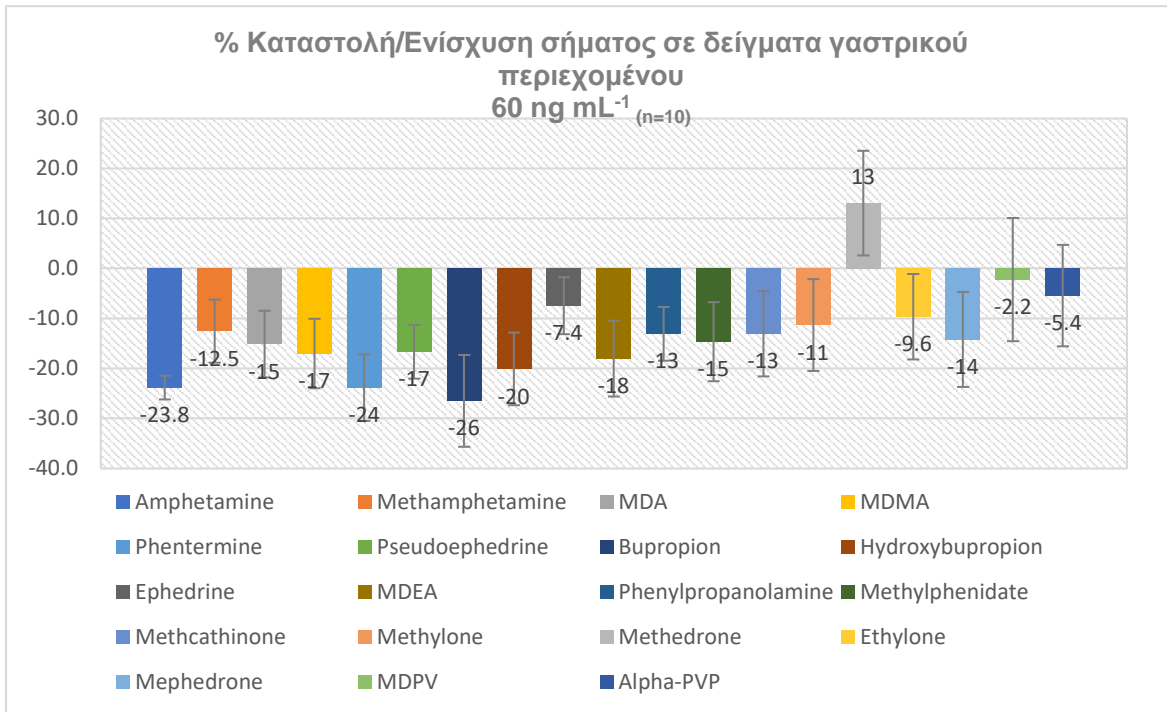


A

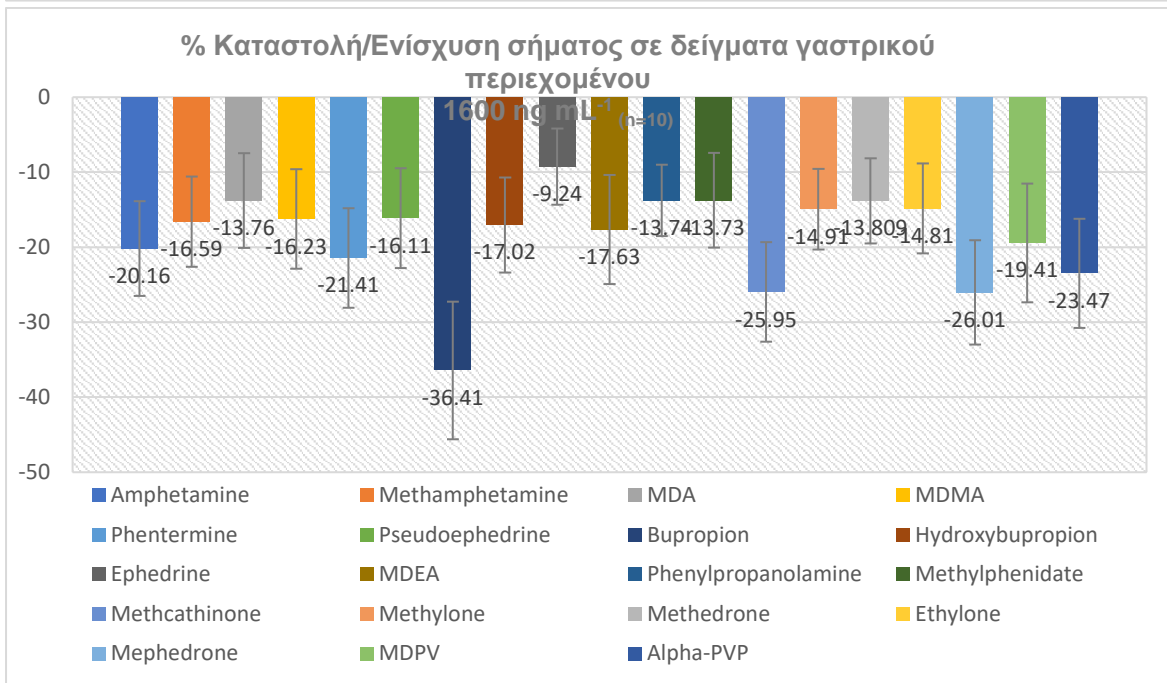


B

Σχήμα 7.8: Επίδραση υποστρώματος σε δείγματα σκελετικού μυ σε συγκέντρωση 60 ng mL⁻¹ (A) και 1600 ng mL⁻¹ (B).

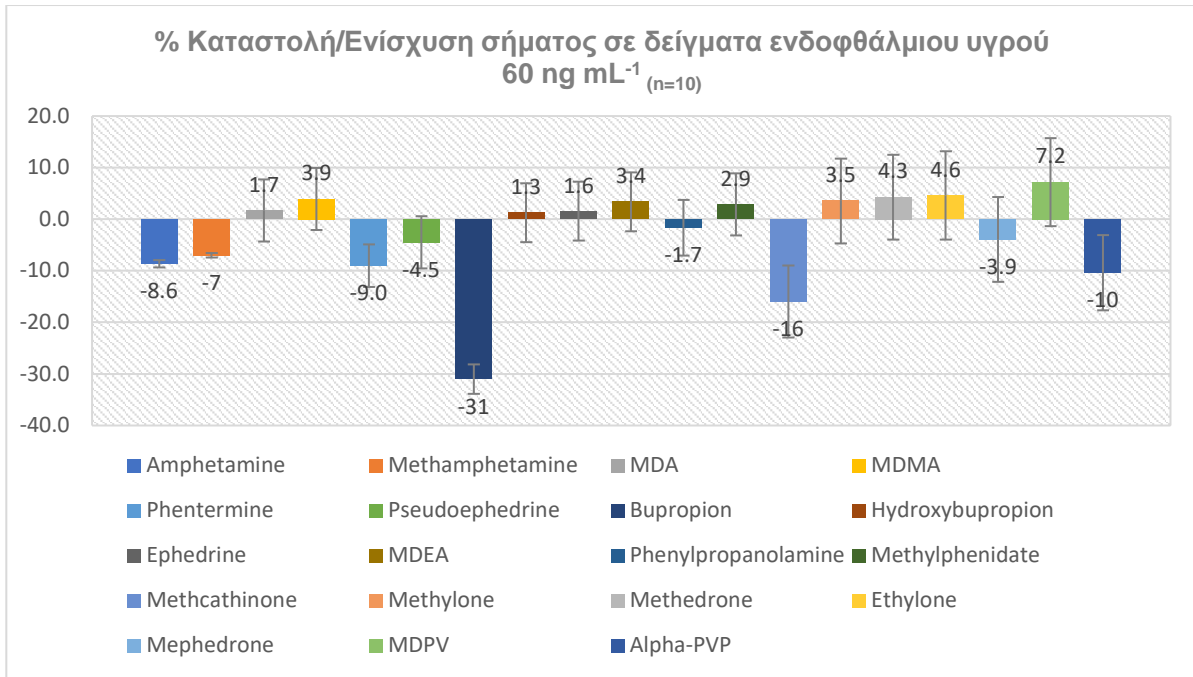


A

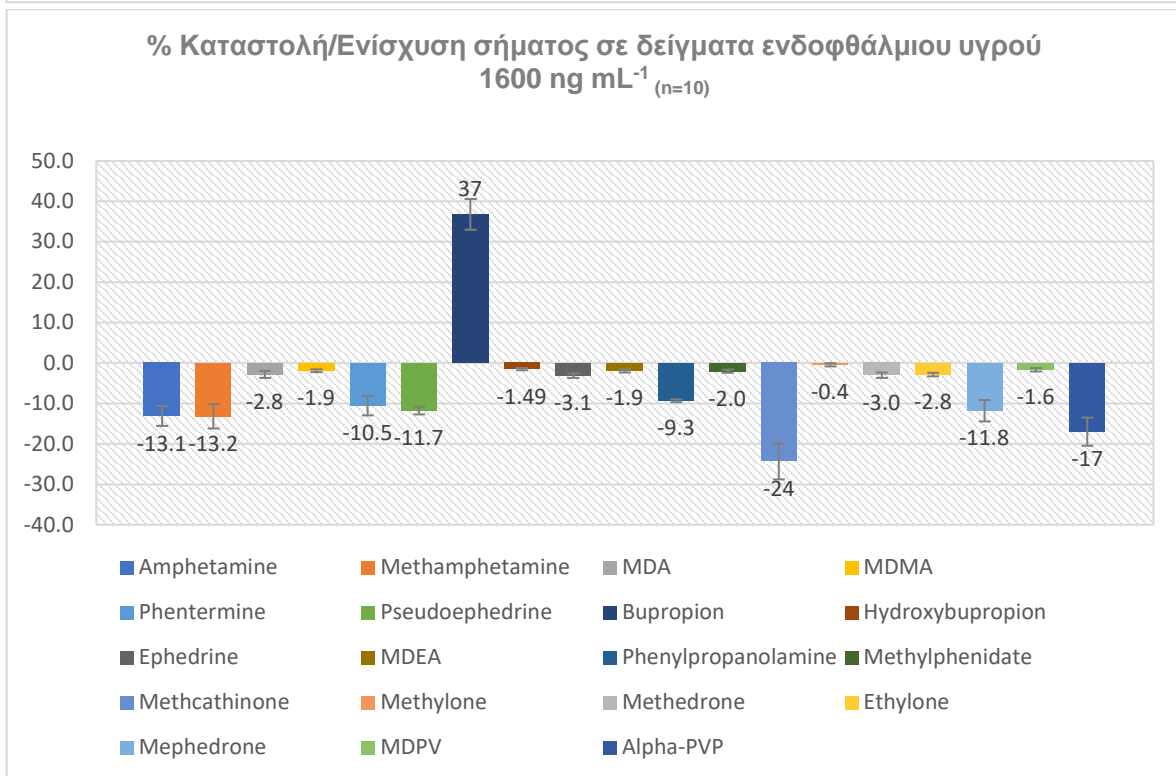


B

Σχήμα 7.9: Επίδραση υποστρώματος σε δείγματα γαστρικού περιεχομένου σε συγκέντρωση 60 ng mL⁻¹ (A) και 1600 ng mL⁻¹ (B).



A



B

Σχήμα 7.10: Επίδραση υποστρώματος σε δείγματα ενδοφθάλμιου υγρού σε συγκέντρωση 60 ng mL⁻¹ (A) και 1600 ng mL⁻¹ (B)

Σημαντικότερη καταστολή σήματος παρατηρείται για το bupropion στα δείγματα χολής, σπλήνα, γαστρικού περιεχομένου, ενδοφθάλμιου υγρού και σκελετικού μυ, σε ποσοστό που κυμαίνεται από -45% έως -26%. Επίσης, παρατηρείται καταστολή σήματος για το methcathinone στα βιολογικά δείγματα χολής σκελετικού μυ, σπλήνα και γαστρικού περιεχομένου σε ποσοστό που κυμαίνεται από -33% έως -26%. Για τους υπόλοιπους αναλύτες δεν παρατηρείται σημαντική καταστολή ή ενίσχυση σήματος σε όλα τα εναλλακτικά βιολογικά δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη μέθοδο. Στα βιολογικά δείγματα χολής και ενδοφθάλμιου υγρού παρατηρήθηκε για το δευτεριωμένο εσωτερικό πρότυπο του bupropion καταστολή σήματος σε ποσοστό -29% και -32,3% αντίστοιχα, ενώ για το δευτεριωμένο εσωτερικό πρότυπο του MDMA παρατηρείται καταστολή σήματος στα δείγματα σκελετικού μυ σε ποσοστό -41,2%. Για τα υπόλοιπα εσωτερικά πρότυπα δεν παρατηρείται σημαντική καταστολή ή ενίσχυση σήματος σε όλα τα εναλλακτικά βιολογικά δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη μέθοδο.

7.3.2 Έλεγχος % ανάκτησης των αναλυτών σε δείγματα ούρων και εναλλακτικών βιολογικών δειγμάτων

Για τον έλεγχο της % ανάκτησης, παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν δέκα εμβολιασμένα διαφορετικά δείγματα ούρων και εναλλακτικών βιολογικών δειγμάτων σε δύο επίπεδα συγκεντρώσεων 60 και 1600 ng mL⁻¹ για όλες τις ουσίες και για τα εσωτερικά πρότυπα αυτών σε συγκέντρωση 100 ng mL⁻¹. Ταυτόχρονα, κατεργάστηκαν τα αντίστοιχα λευκά δείγματα ούρων και εναλλακτικών βιολογικών δειγμάτων, τα οποία εμβολιάστηκαν με τους αναλύτες στα ίδια επίπεδα συγκεντρώσεων κατά τη φάση της συλλογής του οργανικού εκχυλίσματος, δηλαδή πριν το στάδιο της εξάτμισης. Η εκατοστιαία ανάκτηση για κάθε αναλύτη υπολογίστηκε από το λόγο της επιφανείας της χρωματογραφικής κορυφής του αναλύτη σε κάθε δείγμα εναλλακτικού βιολογικού δείγματος που εμβολιάστηκε πριν την κατεργασία προς την επιφάνεια της κορυφής του ίδιου αναλύτη και στο ίδιο υπόστρωμα που εμβολιάστηκε με τους αναλύτες μετά την κατεργασία του λευκού δείγματος. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στους πίνακες 7.2 έως 7.4 και στα σχήματα 7.11 έως και 7.18.

Πίνακας 7.3: Επίδραση υποστρώματος και % ανάκτηση των 19 ψυχοδιεγερτικών ουσιών μετά από ανάλυση με τη μέθοδο UHPLC-MS/MS εμβολιασμένων δειγμάτων σε συγκέντρωση 60 ng mL⁻¹ σε ούρα και εναλλακτικά βιολογικά δείγματα

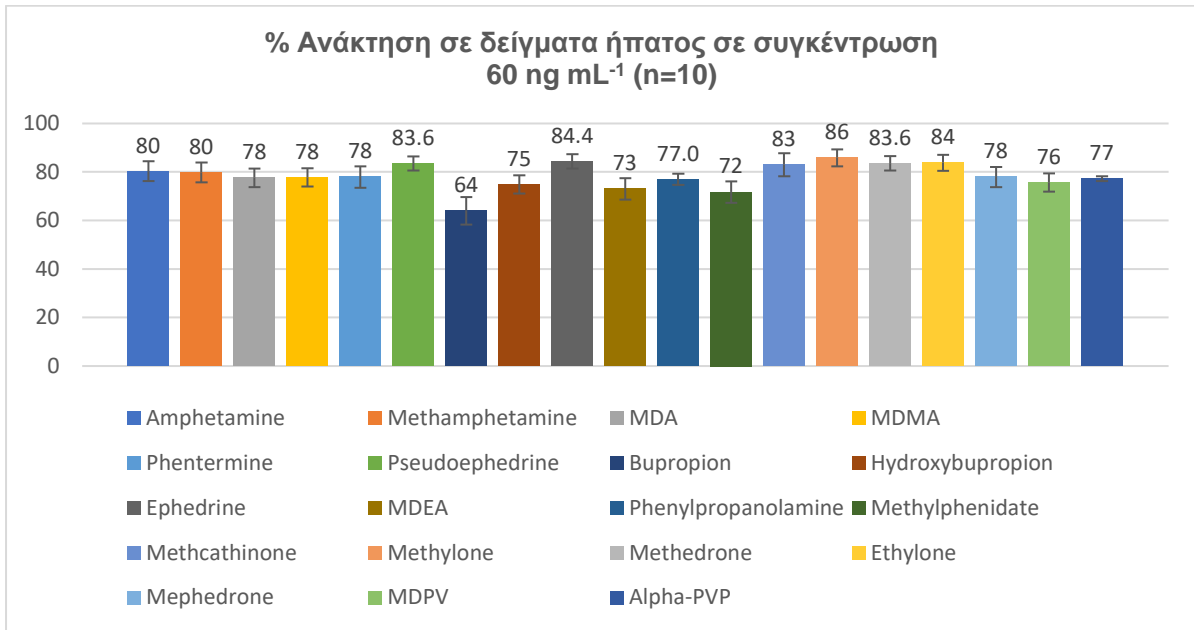
Συγκέντρωση 60 ng mL ⁻¹	Ήπαρ	Εγκέφαλος	Ούρα	Χολή	Σπλήνας	Σκελετικός Μύς	Γαστρικό Περιεχόμενο	Ενδοφθάλμιο Υγρό
Amphetamine % Ανάκτηση	80 ± 12	84,4 ± 7,8	97,2 ± 5,4	65 ± 29	102,6 ± 5,4	93,9 ± 29	92,8 ± 5,4	101 ± 29
% Καταστολή/ ενίσχυση σήματος	-11,4 ± 8,1	-6,4 ± 8,3	-4,8 ± 7,5	-12,2 ± 2,2	-9,8 ± 7,5	-12,3 ± 2,2	-23, 8 ± 7,5	-8,6 ± 2,2
Methamphetamine % Ανάκτηση	80 ± 13	85,3 ± 7,7	95,8 ± 5,3	87 ± 16	103,3 ± 8,7	95,3 ± 7,2	96 ± 15	101,7 ± 15
% Καταστολή/ ενίσχυση σήματος	-5,0 ± 5,3	-6,2 ± 7,7	-1,3 ± 7,1	-10,5 ± 3,8	-11,7 ± 5,9	-13,3 ± 7,9	-12 ± 20	-7 ± 14
MDA % Ανάκτηση	78 ± 11	83,4 ± 5,8	93,8 ± 5,3	63 ± 27	99,2 ± 8,5	89,3 ± 6,0	91,9 ± 16	95 ± 15
% Καταστολή/ ενίσχυση σήματος	-0,1 ± 4,0	1,5 ± 6,3	-5,3 ± 6,1	-5,4 ± 3,0	-3,7 ± 5,5	-0,1 ± 8,8	-15 ± 20	1,7 ± 18
MDMA % Ανάκτηση	78 ± 12	83,7 ± 5,9	93,0 ± 4,8	82 ± 16	98,4 ± 9,0	88,5 ± 6,1	95 ± 16	95 ± 14
% Καταστολή/ ενίσχυση σήματος	-2,5 ± 6,5	3,4 ± 6,2	-2,6 ± 7,1	-4,1 ± 2,5	-3,3 ± 5,9	1,3 ± 7,5	-17 ± 21	3,9 ± 18
Phentermine % Ανάκτηση	78 ± 13	82,8 ± 8,1	99,3 ± 6,3	64 ± 27	101,8 ± 8,6	95,7 ± 7,5	96 ± 14	102 ± 13
% Καταστολή/ ενίσχυση σήματος	-14,6 ± 9,8	-5,9 ± 9,1	-6,9 ± 6,9	-5,2 ± 2,3	-10,1 ± 5,4	-13,5 ± 5,6	-24 ± 21	-9,0 ± 13
Pseudoephedrine % Ανάκτηση	83,6 ± 9,3	71,4 ± 8,6	79,1 ± 5,6	58 ± 27	95,1 ± 8,0	78 ± 10	83 ± 22	88 ± 13
% Καταστολή/ ενίσχυση σήματος	-5,3 ± 6,6	-9,8 ± 5,7	-5,7 ± 7,3	-15,8 ± 2,6	-13,1 ± 7,8	-22 ± 10	-17 ± 16	-4,5 ± 16
Bupropion % Ανάκτηση	64 ± 17	81 ± 10	99,9 ± 9,9	75 ± 33	99 ± 11	87,40 ± 0,12	90 ± 49	110 ± 19
% Καταστολή/ ενίσχυση σήματος	-17 ± 11	-22 ± 10	-10 ± 10	-31 ± 18	-30,4 ± 8,7	-29,3 ± 8,9	-26 ± 28	-31,50 ± 8,97
Hydroxybupropion % Ανάκτηση	75 ± 11	80,5 ± 6,3	94,6 ± 5,5	46 ± 29	95,8 ± 9,5	88,4 ± 5,2	93 ± 18	97 ± 15
% Καταστολή/ ενίσχυση σήματος	-0,2 ± 5,7	1,2 ± 6,9	-2,8 ± 7,7	-3,7 ± 2,7	-3,8 ± 5,9	1,2 ± 7,5	-20 ± 22	1,3 ± 18
Ephedrine % Ανάκτηση	84,4 ± 9,3	84,1 ± 7,6	88,1 ± 4,1	60 ± 28	101,3 ± 9,6	82 ± 14	87 ± 20	95 ± 14
% Καταστολή/ ενίσχυση σήματος	-1,0 ± 4,6	6,9 ± 6,1	-3,0 ± 6,8	-10,4 ± 2,4	-8,0 ± 5,7	0,6 ± 20	-7,4 ± 18	1,6 ± 18
MDEA % Ανάκτηση	73 ± 19	83,1 ± 6,0	93,1 ± 4,9	75 ± 19	98,3 ± 9,6	87,6 ± 5,8	94 ± 19	96 ± 15
% Καταστολή/ ενίσχυση σήματος	-2,1 ± 7,5	4,7 ± 7,2	-1,1 ± 7,4	-0,8 ± 2,6	-3,3 ± 5,6	3,0 ± 8,8	-18 ± 23	3,4 ± 18
Phenylpropanolamine % Ανάκτηση	77,0 ± 7,3	85,1 ± 6,4	89,2 ± 4,3	39 ± 29	94,7 ± 7,9	80 ± 13	76 ± 27	94 ± 14
% Καταστολή/ ενίσχυση σήματος	-2,9 ± 5,3	-4,9 ± 7,1	-10 ± 10	-14,6 ± 2,2	-12 ± 12	3,9 ± 21	-13 ± 17	-1,7 ± 16
Methylphenidate % Ανάκτηση	72 ± 14	84,9 ± 6,0	93,7 ± 4,7	75 ± 19	97,1 ± 9,9	86,6 ± 6,3	92 ± 18	96 ± 16
% Καταστολή/ ενίσχυση σήματος	0,8 ± 4,1	1,9 ± 6,3	-0,3 ± 7,4	-1,1 ± 2,7	-4,4 ± 5,4	2,0 ± 8,6	-15 ± 25	2,9 ± 19
Methcathinone % Ανάκτηση	83 ± 15	92,7 ± 7,6	92,0 ± 7,1	82 ± 22	96,3 ± 6,3	99 ± 22	84 ± 20	93 ± 21
% Καταστολή/ ενίσχυση σήματος	-13,2 ± 6,8	-20,5 ± 6,5	-2,9 ± 4,7	-23 ± 13	-19,1 ± 7,8	-33 ± 11	-13 ± 27	-16 ± 22
Methylone % Ανάκτηση	86 ± 10	90,4 ± 5,0	91,3 ± 6,2	77 ± 20	90,0 ± 5,9	94 ± 12	84 ± 16	87 ± 17
% Καταστολή/ ενίσχυση σήματος	-4,3 ± 7,6	-5,4 ± 3,1	-2,7 ± 9,1	-3,3 ± 5,5	-1,4 ± 4,8	-10 ± 10	-11 ± 28	3,5 ± 25
Methedrone % Ανάκτηση	83,6 ± 9,4	88,2 ± 5,7	91,6 ± 6,3	78,7 ± 17,9	89,7 ± 5,6	93 ± 12	83 ± 15	86 ± 17
% Καταστολή/ ενίσχυση σήματος	-2,6 ± 5,7	-3,7 ± 3,3	-2,6 ± 8,8	-3,1 ± 3,7	-2,7 ± 4,2	-10 ± 10	13 ± 32	4,3 ± 26
Ethylone % Ανάκτηση	84 ± 10	89,0 ± 5,4	90,8 ± 6,8	71 ± 22	89,1 ± 5,2	92 ± 11	85,06 ± 0,16	86,40 ± 0,18
% Καταστολή/ ενίσχυση σήματος	-0,9 ± 5,8	-2,9 ± 3,9	-3,3 ± 11	-1,0 ± 4,1	-0,9 ± 3,7	-6,3 ± 8,9	-9,6 ± 0,3	4,6 ± 0,3
Mephedrone % Ανάκτηση	78 ± 13	89,2 ± 3,9	91,2 ± 5,5	81 ± 18	91,4 ± 5,6	96 ± 17	82 ± 19	89 ± 20
% Καταστολή/ ενίσχυση σήματος	-11,1 ± 5,9	-12,7 ± 4,2	-1,2 ± 4,6	-11,4 ± 7,0	-9,4 ± 6,2	-21 ± 11	-14 ± 30	-3,9 ± 26
MDPV % Ανάκτηση	76 ± 12	88,1 ± 5,5	91,1 ± 7,0	83 ± 13	86,3 ± 7,0	86 ± 14	80 ± 16	86 ± 17
% Καταστολή/ ενίσχυση σήματος	2,5 ± 5,0	-2,1 ± 4,3	-0,8 ± 11	-0,1 ± 4,7	-0,1 ± 3,5	-6,5 ± 8,5	-2,2 ± 38	7,2 ± 27
Alpha-PVP % Ανάκτηση	77 ± 12	89,3 ± 4,4	93,6 ± 6,6	93 ± 13	90,1 ± 6,7	90 ± 12	83 ± 17,	91 ± 19
% Καταστολή/ ενίσχυση σήματος	-5,4 ± 5,7	-13,8 ± 3,1	-4,1 ± 5,2	-13 ± 12	-10,1 ± 4,4	-17,3 ± 7,8	-5,4 ± 32	-10 ± 23

Πίνακας 7.4: Επίδραση υποστρώματος και % ανάκτηση των εσωτερικών προτύπων μετά από ανάλυση εμβολιασμένων δειγμάτων σε ούρα και εναλλακτικά βιολογικά δείγματα.

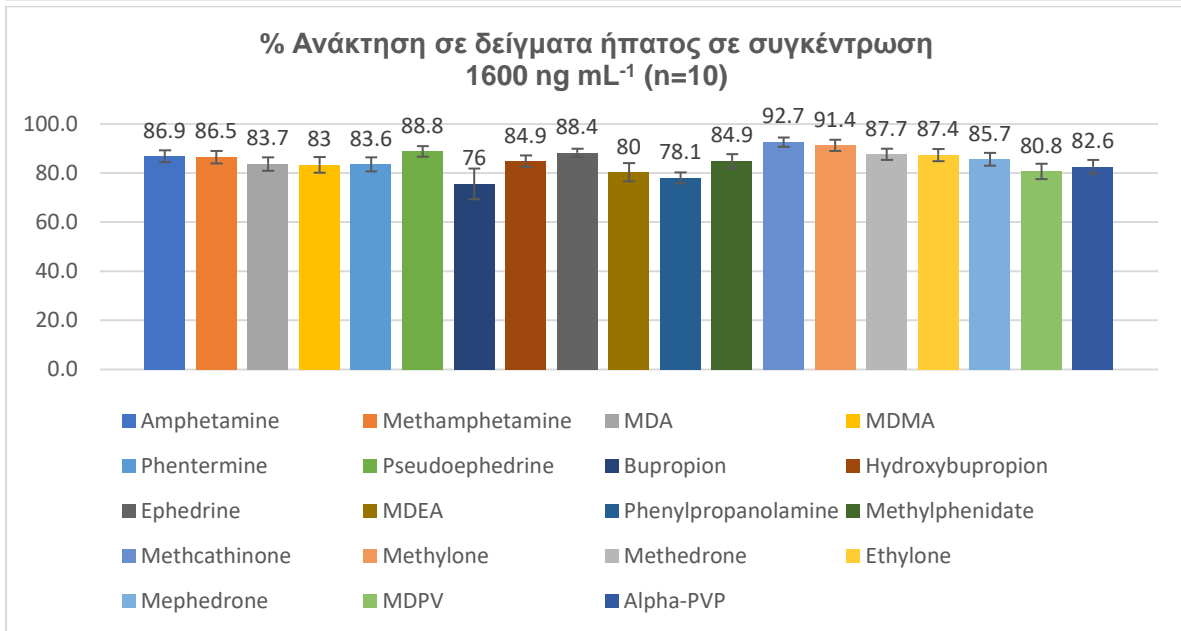
Συγκέντρωση 100 ng mL ⁻¹	Ήπαρ	Εγκέφαλος	Ούρα	Χολή	Σπλήνας	Σκελετικός Μύς	Γαστρικό Περιεχόμενο	Ενδοφθάλμιο Υγρό
Amphetamine-d11 % Ανάκτηση	81 ± 10	84,1 ± 2,9	98,3 ± 17,7	61 ± 26	95,7 ± 2,4	92,9 ± 5,8	84 ± 14	96,8 ± 5,2
% Καταστολή/ ενίσχυση σήματος	-5,4 ± 4,5	-9,5 ± 4,4	-8,4 ± 9,3	-8,4 ± 2,2	-7,4 ± 6,1	8,3 ± 4,7	-14 ± 20	-9,6 ± 2,9
Methamphetamine-d11 % Ανάκτηση	81 ± 10	85,4 ± 5,1	94,1 ± 2,5	83 ± 14	94,7 ± 5,1	92,8 ± 6,5	87 ± 12	98,9 ± 7,3
% Καταστολή/ ενίσχυση σήματος	-2,8 ± 4,7	-8,4 ± 4,6	-0,8 ± 2,0	-8,6 ± 3,8	-5,7 ± 2,9	7,5 ± 5,4	-12 ± 20	-9,9 ± 3,9
MDA- d5 % Ανάκτηση	78,8 ± 9,9	82,4 ± 3,4	95,4 ± 3,7	61 ± 25	90,9 ± 5,5	89 ± 2,0	86 ± 14	95,6 ± 1,7
% Καταστολή/ ενίσχυση σήματος	-0,1 ± 3,5	-1,8 ± 1,7	-6,3 ± 4,6	-7,1 ± 1,1	0,4 ± 1,5	20,0 ± 2,3	-15 ± 20	-5,3 ± 1,6
MDMA-d5 % Ανάκτηση	80 ± 10	83,2 ± 1,3	94,4 ± 3,0	79 ± 14	91,7 ± 5,3	88,9 ± 3,2	86 ± 14	96,1 ± 1,4
% Καταστολή/ ενίσχυση σήματος	-1,2 ± 4,5	-0,5 ± 1,1	-2,2 ± 3,9	-6,0 ± 1,7	0,6 ± 1,1	41,2 ± 2,7	-14 ± 21	-1,5 ± 1,5
Phentermine-d5 % Ανάκτηση	77 ± 129	82,8 ± 3,7	96,0 ± 2,0	68 ± 28	93,0 ± 6,2	92,4 ± 7,9	88 ± 13	99 ± 7,0
% Καταστολή/ ενίσχυση σήματος	-7,9 ± 7,1	-9,5 ± 3,9	-2,8 ± 2,3	-8,8 ± 1,9	-7,2 ± 3,2	6,8 ± 6,0	-22 ± 20	-13,4 ± 3,9
Pseudoephedrine-d3 % Ανάκτηση	76 ± 16	67,2 ± 2,5	76,3 ± 4,4	52 ± 24	81,9 ± 4,8	75,1 ± 8,2	73 ± 17	83,1 ± 3,0
% Καταστολή/ ενίσχυση σήματος	-1,4 ± 6,1	-9,7 ± 2,5	-3,2 ± 1,6	-11,6 ± 2,0	-7,0 ± 5,6	6,3 ± 9,0	-11 ± 18	-10,2 ± 3,5
Bupropion-d9 % Ανάκτηση	66 ± 16	79,3 ± 9,2	99,1 ± 6,5	71,2 ± 29	92,2 ± 7,5	95 ± 34	78 ± 43	104 ± 13
% Καταστολή/ ενίσχυση σήματος	-16 ± 11	-23,0 ± 7,9	-9,1 ± 7,3	-29 ± 18	-23,4 ± 7,2	-14,3 ± 7,5	-18 ± 41	-32,3 ± 5,4
Hydroxybupropion-d6 % Ανάκτηση	77,8 ± 9,5	81,0 ± 6,7	95,7 ± 1,4	44 ± 26	88,2 ± 5,7	88,1 ± 2,9	84,6 ± 14	96,3 ± 1,5
% Καταστολή/ ενίσχυση σήματος	14,7 ± 5,4	-3,1 ± 6,1	-1,4 ± 2,3	-4,3 ± 2,6	3,4 ± 1,2	20,5 ± 2,1	-20 ± 23	-5,3 ± 1,0
Ephedrine-d3 % Ανάκτηση	85,7 ± 6,8	82,2 ± 2,3	85,80 ± 2,5	55 ± 26	90,8 ± 4,4	85,8 ± 2,9	79 ± 21	100,5 ± 1,9
% Καταστολή/ ενίσχυση σήματος	-1,4 ± 4,3	-3,7 ± 1,9	-0,9 ± 1,6	-8,1 ± 1,3	-2,4 ± 3,2	13,0 ± 3,5	-9,0 ± 18	-3,4 ± 1,7
MDEA-d5 % Ανάκτηση	76 ± 12	84,2 ± 1,9	99 ± 22	68 ± 20	89,5 ± 6,2	89,4 ± 5,3	87 ± 18	98,1 ± 1,8
% Καταστολή/ ενίσχυση σήματος	-1,6 ± 6,8	-1,19 ± 0,78	-5,5 ± 13	-0,7 ± 1,1	3,1 ± 1,2	19,6 ± 3,9	-19 ± 23	-3,9 ± 1,7
Norpseudoephedrine-d3 % Ανάκτηση	79,9 ± 5,0	71,7 ± 2,1	79,0 ± 3,9	36 ± 26	83,6 ± 5,5	74,7 ± 2,7	67 ± 23	84,4 ± 2,0
% Καταστολή/ ενίσχυση σήματος	-3,7 ± 5,1	-10,1 ± 2,6	-6,8 ± 2,0	-6,2 ± 1,4	-6,9 ± 3,6	7,8 ± 2,1	-13 ± 17	-9,6 ± 2,2
Methylphenidate-d9 % Ανάκτηση	75 ± 13	84,9 ± 3,1	95,3 ± 1,1	74 ± 21	89,4 ± 6,7	87,8 ± 4,1	85,2 ± 15	96,0 ± 3,1
% Καταστολή/ ενίσχυση σήματος	13,4 ± 3,5	-2,1 ± 3,4	-0,6 ± 1,6	-3,3 ± 7,2	0,6 ± 1,2	20,4 ± 1,2	-14 ± 25	-5,5 ± 1,4
Methylone-d3 % Ανάκτηση	85,5 ± 8,5	87,3 ± 1,5	95,8 ± 1,1	74 ± 16	93,7 ± 4,5	91,0 ± 4,2	89 ± 14	95,2 ± 5,3
% Καταστολή/ ενίσχυση σήματος	-2,8 ± 6,5	-2,5 ± 2,5	-2,0 ± 6,4	-3,67 ± 3,0	-0,4 ± 1,0	19,1 ± 4,4	-16 ± 17	-4,8 ± 1,2
Mephedrone-d3 % Ανάκτηση	78 ± 11	84,9 ± 6,7	95,65 ± 1,5	78 ± 16	94,8 ± 3,7	92 ± 14	87,4 ± 18	98,4 ± 5,9
% Καταστολή/ ενίσχυση σήματος	-8,3 ± 5,0	-9,4 ± 6,4	-1,1 ± 1,7	-15,6 ± 6,6	-7,0 ± 4,6	5,4 ± 11	-5,9 ± 24	-9,4 ± 3,6

Πίνακας 7.5: Επίδραση υποστρώματος και η επί τις εκατό ανάκτηση σε συγκέντρωση 1600 ng/mL για τον προσδιορισμό των αναλυτών σε ούρα και εναλλακτικά βιολογικά δείγματα

Συγκέντρωση 1600 ng mL⁻¹	Ήπαρ	Εγκέφαλος	Ούρα	Χολή	Σπλήνας	Σκελετικός Μύς	Γαστρικό Περιεχόμενο	Ενδοφθάλμιο Υγρό
Amphetamine % Ανάκτηση	86,9 ± 7,7	86,8 ± 4,8	95,5 ± 1,1	83 ± 16	93,7 ± 8,2	92,8 ± 7,3	94,6 ± 7,0	101 ± 17
% Καταστολή/ ενίσχυση σήματος	-5,7 ± 7,4	-3,4 ± 3,7	-2,0 ± 1,1	-11,1 ± 5,4	-12,7 ± 7,0	-5,0 ± 3,9	-20 ± 20	-13,1 ± 7,7
Methamphetamine % Ανάκτηση	86,5 ± 8,0	86,9 ± 5,4	95,0 ± 2,1	106 ± 14	93,3 ± 8,5	91,9 ± 8,3	96,5 ± 7,1	100 ± 21
% Καταστολή/ ενίσχυση σήματος	-1,9 ± 6,8	-3,1 ± 3,5	-1,3 ± 2,3	-16,1 ± 9,8	-13,1 ± 8,9	-3,1 ± 4,9	-16 ± 18	-13,2 ± 9,5
MDA % Ανάκτηση	83,7 ± 8,8	86,4 ± 2,8	96,8 ± 0,8	73 ± 15	95,0 ± 2,7	98 ± 18	95 ± 16	99,9 ± 2,8
% Καταστολή/ ενίσχυση σήματος	1,5 ± 1,7	-0,42 ± 0,77	-2,30 ± 0,77	0,02 ± 2,3	-0,2 ± 4,8	0,6 ± 1,7	-14 ± 20	-2,8 ± 1,7
MDMA % Ανάκτηση	83 ± 10	85,5 ± 2,4	95,2 ± 1,5	93,6 ± 2,9	93,6 ± 2,0	91,0 ± 3,6	96 ± 15	99,7 ± 1,2
% Καταστολή/ ενίσχυση σήματος	-0,7 ± 3,6	-0,5 ± 0,9	-1,0 ± 1,7	-1,14 ± 0,84	-2,8 ± 6,1	0,4 ± 1,2	-16 ± 20	-1,9 ± 1,0
Phentermine % Ανάκτηση	83,6 ± 9,0	85,5 ± 5,2	96,3 ± 1,2	80 ± 30	91,9 ± 7,5	91,3 ± 7,5	97 ± 16	99 ± 15
% Καταστολή/ ενίσχυση σήματος	-6,2 ± 7,5	-3,7 ± 4,2	-1,6 ± 1,2	-9,7 ± 5,5	-11,5 ± 7,9	-2,7 ± 4,4	-21 ± 20	-10,5 ± 7,5
Pseudoephedrine % Ανάκτηση	88,8 ± 6,8	81,9 ± 2,1	82,1 ± 2,9	68 ± 15	94,3 ± 4,5	83,7 ± 3,3	88 ± 15	96,7 ± 3,4
% Καταστολή/ ενίσχυση σήματος	-4,4 ± 4,7	-6,8 ± 1,5	-3,2 ± 1,0	-5,8 ± 2,1	-9,7 ± 9,3	-10,3 ± 3,3	-16 ± 18	-11,7 ± 2,6
Bupropion % Ανάκτηση	76 ± 20	76 ± 11	92,5 ± 3,3	103 ± 18	83 ± 12	85 ± 11	92 ± 12	96 ± 39
% Καταστολή/ ενίσχυση σήματος	-10,0 ± 9,0	-13,7 ± 6,1	-4,0 ± 1,6	-45 ± 15	-39 ± 10	-16,8 ± 5,5	-36 ± 29	-37 ± 12
Hydroxybupropion % Ανάκτηση	84,9 ± 7,4	86,9 ± 1,9	97,1 ± 0,5	51 ± 22	94,9 ± 1,6	94,4 ± 2,5	97 ± 22	99,11 ± 0,96
% Καταστολή/ ενίσχυση σήματος	0,1 ± 2,2	0,13 ± 0,60	-0,64 ± 0,55	-1,5 ± 1,5	-2,8 ± 5,3	-0,35 ± 0,55	-17 ± 20	-1,55 ± 0,99
Ephedrine % Ανάκτηση	88,4 ± 5,1	86,6 ± 2,05	87,6 ± 1,7	69 ± 15	95,1 ± 1,8	89,5 ± 2,9	87 ± 13	100,3 ± 1,7
% Καταστολή/ ενίσχυση σήματος	-0,2 ± 3,5	-1,8 ± 1,1	-1,98 ± 0,56	-1,94 ± 0,91	-4,7 ± 8,2	-2,9 ± 1,4	-9,2 ± 16	-3,1 ± 1,7
MDEA % Ανάκτηση	80 ± 11	84 ± 11	95,85 ± 0,95	88,6 ± 6,5	93,2 ± 4,1	92,1 ± 3,2	96 ± 17	100,90 ± 0,93
% Καταστολή/ ενίσχυση σήματος	0,3 ± 3,7	0,11 ± 1,09	-1,3 ± 1,0	-1,3 ± 1,5	-1,2 ± 5,9	1,6 ± 0,9	-18 ± 23	-1,9 ± 1,3
Phenylpropanolamine % Ανάκτηση	78,1 ± 7,2	85,2 ± 4,3	88,7 ± 2,4	39 ± 20	86,6 ± 5,7	88,7 ± 6,6	71 ± 20	98,7 ± 1,4
% Καταστολή/ ενίσχυση σήματος	-4,0 ± 3,9	-5,9 ± 1,2	-8,1 ± 4,1	-5,7 ± 0,8	-9,3 ± 5,4	-7,0 ± 2,1	-14 ± 15	-9,3 ± 1,1
Methylphenidate % Ανάκτηση	84,9 ± 9,0	93,0 ± 1,8	97,07 ± 0,55	93,4 ± 4,0	95,4 ± 3,1	95,3 ± 2,8	96 ± 11	100,8 ± 1,7
% Καταστολή/ ενίσχυση σήματος	0,9 ± 2,1	-0,17 ± 0,74	0,29 ± 0,38	-1,16 ± 0,77	-1,5 ± 4,6	-0,19 ± 0,69	-14 ± 20	-2,0 ± 1,2
Methcathinone % Ανάκτηση	92,7 ± 6,0	86,5 ± 9,8	94,6 ± 3,1	116,14 ± 22,56	94 ± 11	93 ± 13,	96 ± 11	100 ± 39
% Καταστολή/ ενίσχυση σήματος	-9,0 ± 8,0	-8,5 ± 5,3	-2,38 ± 0,95	-30 ± 17	-28 ± 13	-13,63 ± 7,05	-26 ± 21	-24 ± 14
Methylone % Ανάκτηση	91,4 ± 7,2	90,4 ± 2,4	97,5 ± 1,7	95,1 ± 3,5	96,1 ± 1,9	94,6 ± 2,1	96,6 ± 8,3	99,7 ± 2,1
% Καταστολή/ ενίσχυση σήματος	-0,1 ± 3,5	-0,5 ± 1,1	-1,1 ± 1,6	-0,52 ± 0,99	-2,9 ± 7,1	0,1 ± 1,4	-14 ± 16	-0,4 ± 13
Methedrone % Ανάκτηση	87,7 ± 7,2	88,3 ± 2,3	97,1 ± 1,4	94,1 ± 4,0	95,9 ± 1,6	93,8 ± 3,0	96,8 ± 9,3	99,9 ± 2,2
% Καταστολή/ ενίσχυση σήματος	-0,3 ± 3,0	-1,3 ± 1,5	-1,7 ± 2,0	-2,6 ± 1,5	-5,2 ± 7,6	-1,5 ± 1,5	-14 ± 18	-3,0 ± 1,7
Ethylone % Ανάκτηση	87,4 ± 7,9	89,8 ± 1,5	97,3 ± 1,5	79 ± 20	94,8 ± 1,5	94,1 ± 3,0	96,6 ± 8,5	100,5 ± 1,6
% Καταστολή/ ενίσχυση σήματος	18,4 ± 3,6	0,04 ± 1,2	-2,7 ± 3,9	-1,9 ± 1,1	-2,1 ± 7,5	-0,7 ± 1,4	-15 ± 19	-2,8 ± 1,4
Mephedrone % Ανάκτηση	85,7 ± 8,2	87,1 ± 4,5	96,1 ± 1,3	102,7 ± 9,8	94,7 ± 5,8	94 ± 22	98 ± 11	101 ± 16
% Καταστολή/ ενίσχυση σήματος	-5,6 ± 5,6	-2,9 ± 2,7	-1,4 ± 1,0	-15,1 ± 8,3	-12,0 ± 9,5	-10 ± 10	-26 ± 22	-11,8 ± 8,4
MDPV % Ανάκτηση	80,8 ± 9,9	88,1 ± 2,5	102 ± 29	96,6 ± 2,1	92,6 ± 2,4	91,3 ± 3,4	95 ± 15	98,9 ± 1,4
% Καταστολή/ ενίσχυση σήματος	1,6 ± 2,1	-0,5 ± 1,1	-7,0 ± 15	-1,74 ± 0,8	-2,8 ± 7,2	-0,4 ± 1,1	-19 ± 25	-1,6 ± 1,2
Alpha-PVP % Ανάκτηση	82,6 ± 8,7	85,8 ± 5,0	95,1 ± 1,4	112 ± 13	90,5 ± 8,9	92,0 ± 6,6	97 ± 11	100 ± 25
% Καταστολή/ ενίσχυση σήματος	-0,1 ± 4,2	-3,3 ± 2,9	-0,9 ± 0,7	-22 ± 12	-15,2 ± 9,4	-3,1 ± 3,8	-23 ± 23	-17 ± 11

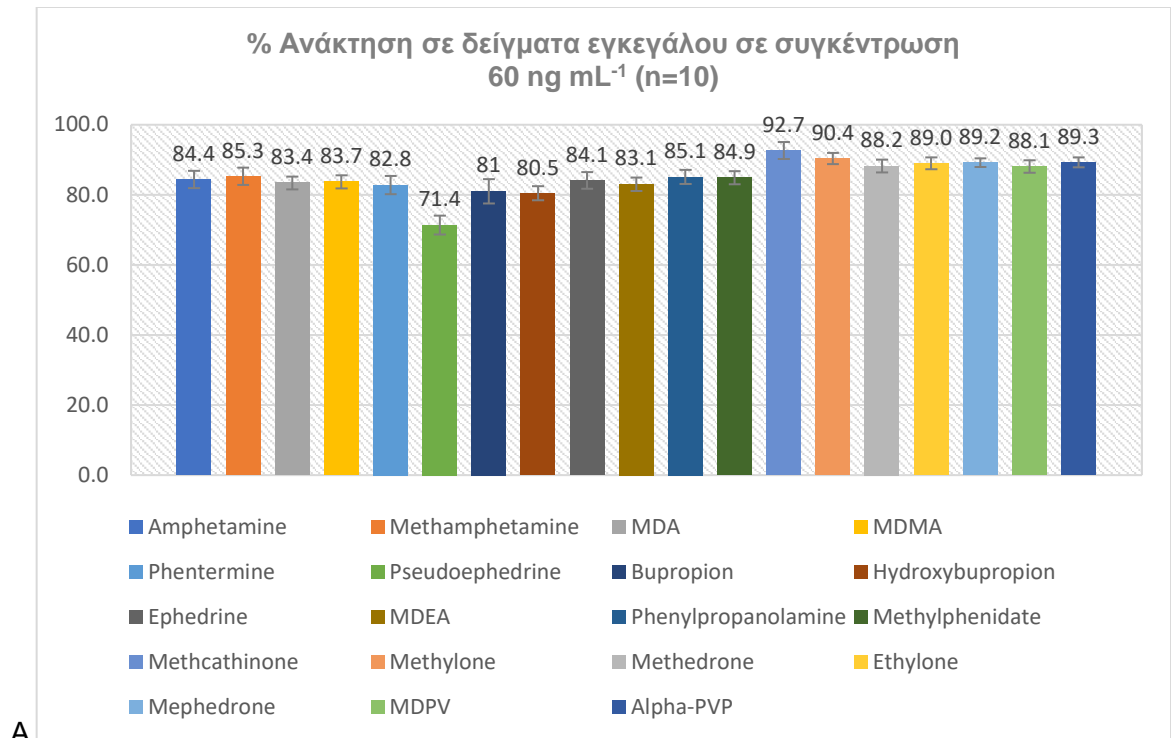


A

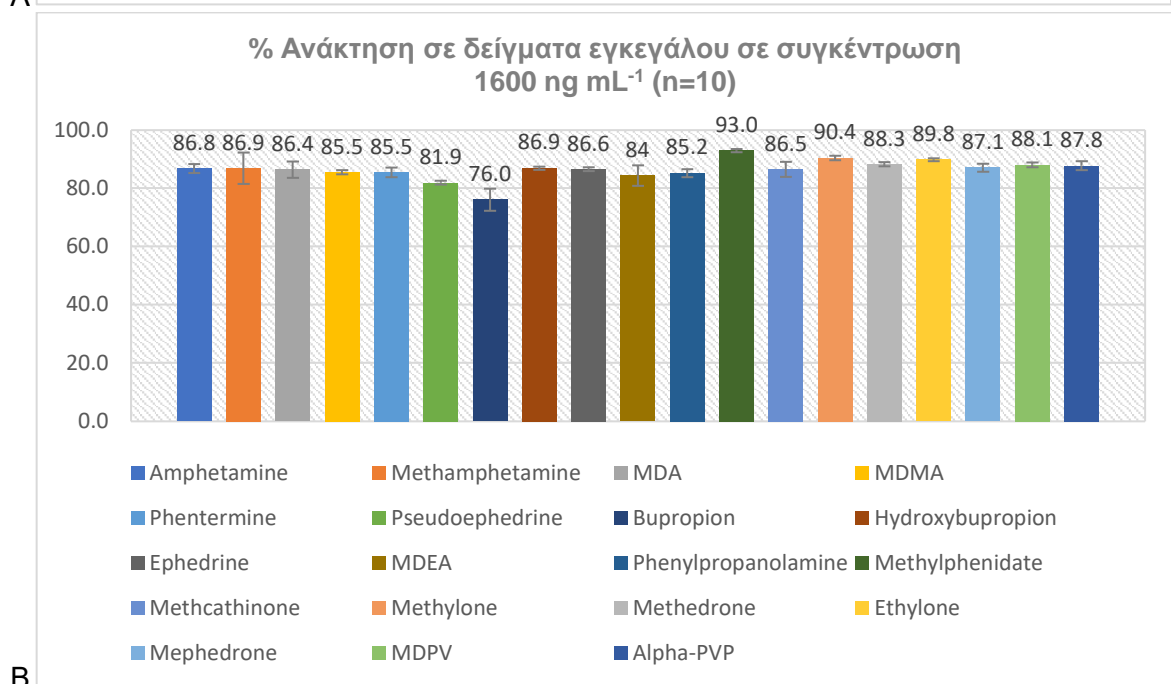


B

Σχήμα 7.11.: % Ανάκτηση σε δείγματα ήπατος σε συγκέντρωση 60 ng mL⁻¹ (A) και 1600 ng mL⁻¹ (B).

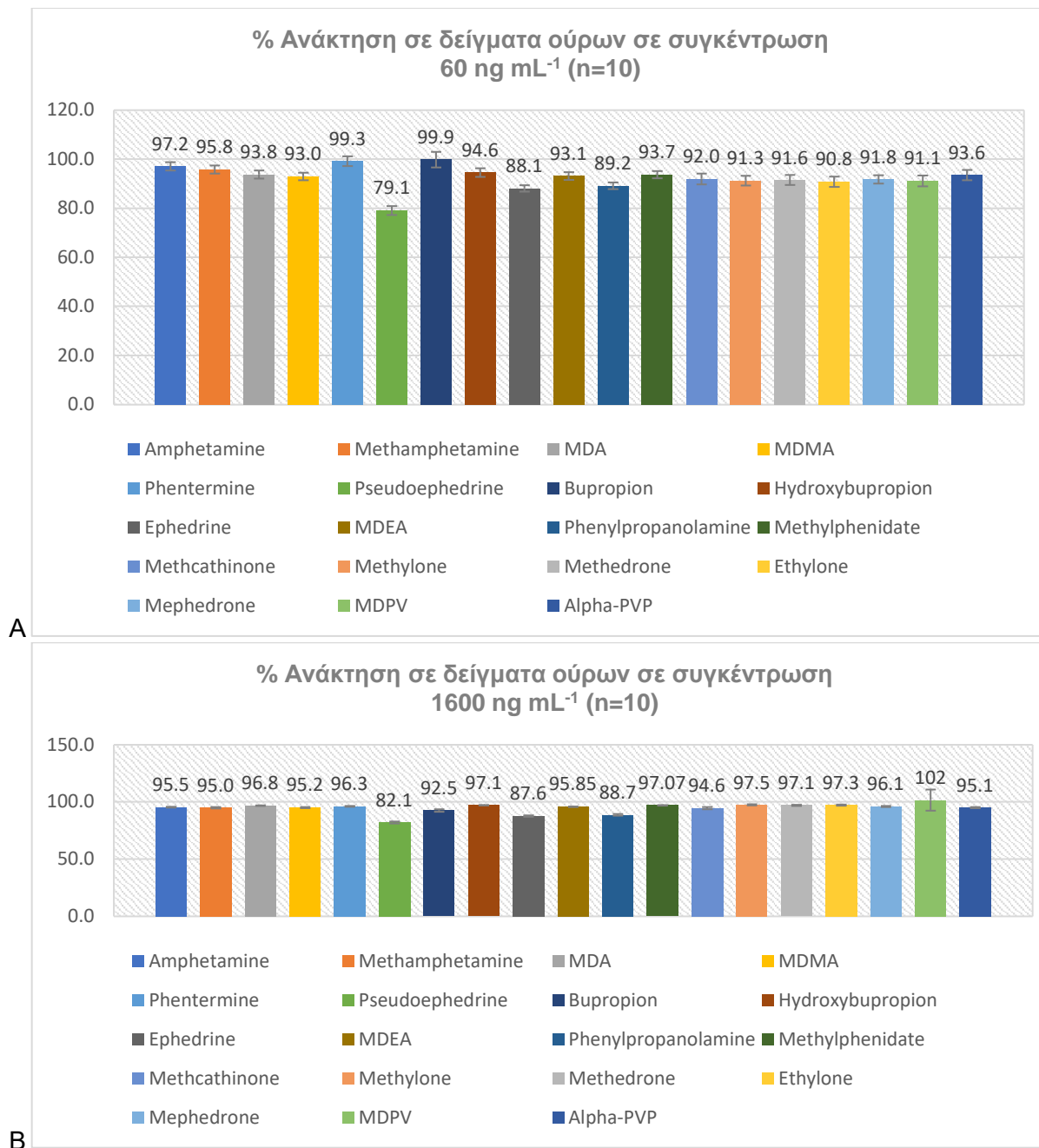


A



B

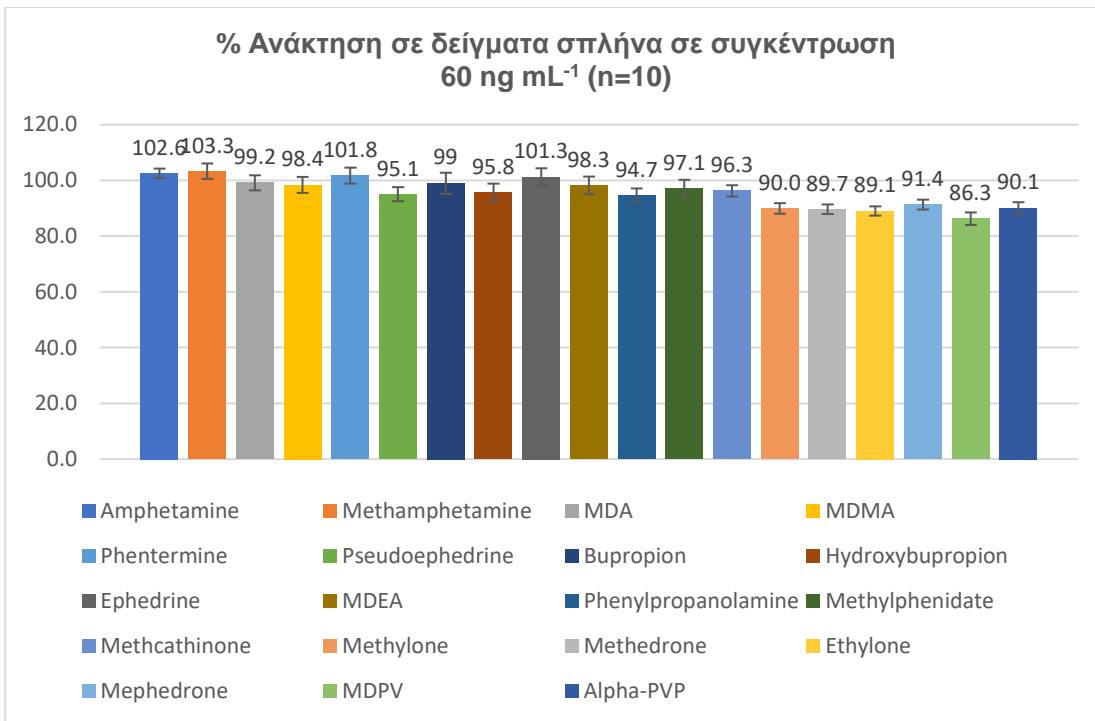
Σχήμα 7.12.: % Ανάκτηση σε δείγματα εγκεφάλου σε συγκέντρωση 60 ng mL⁻¹ (A) και 1600 ng mL⁻¹ (B).



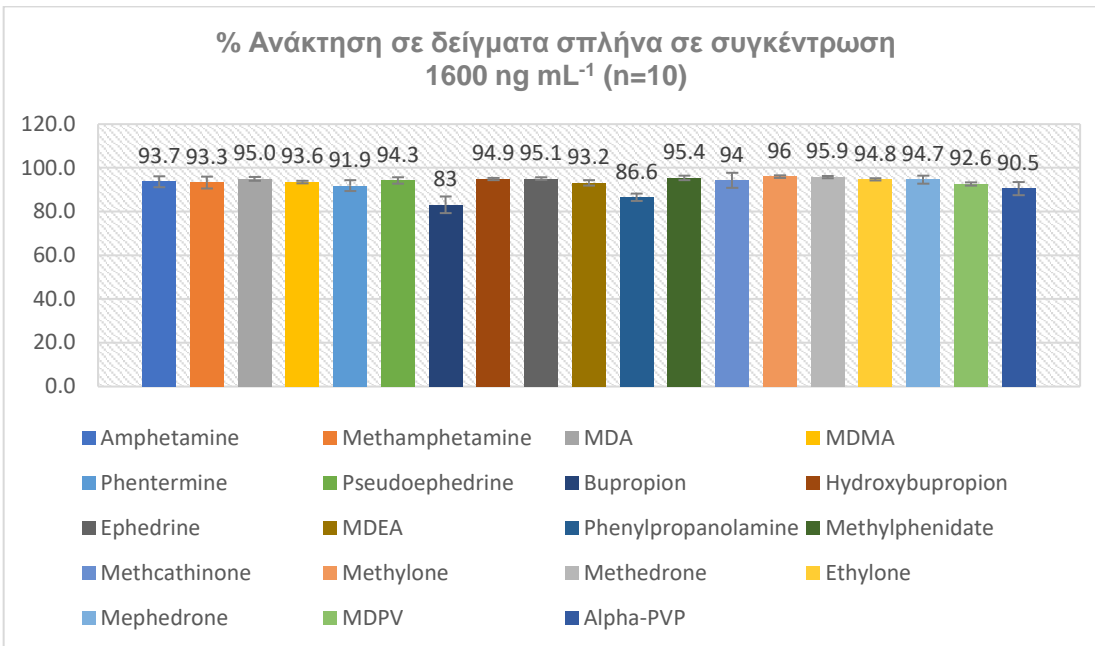
Σχήμα 7.13: % Ανάκτηση σε δείγματα ούρων σε συγκέντρωση 60 ng mL⁻¹ (A) και 1600 ng mL⁻¹ (B).



Σχήμα 7.14: % Ανάκτηση σε δείγματα χολής σε συγκέντρωση 60 ng mL⁻¹ (επάνω) και 1600 ng mL⁻¹ (κάτω)

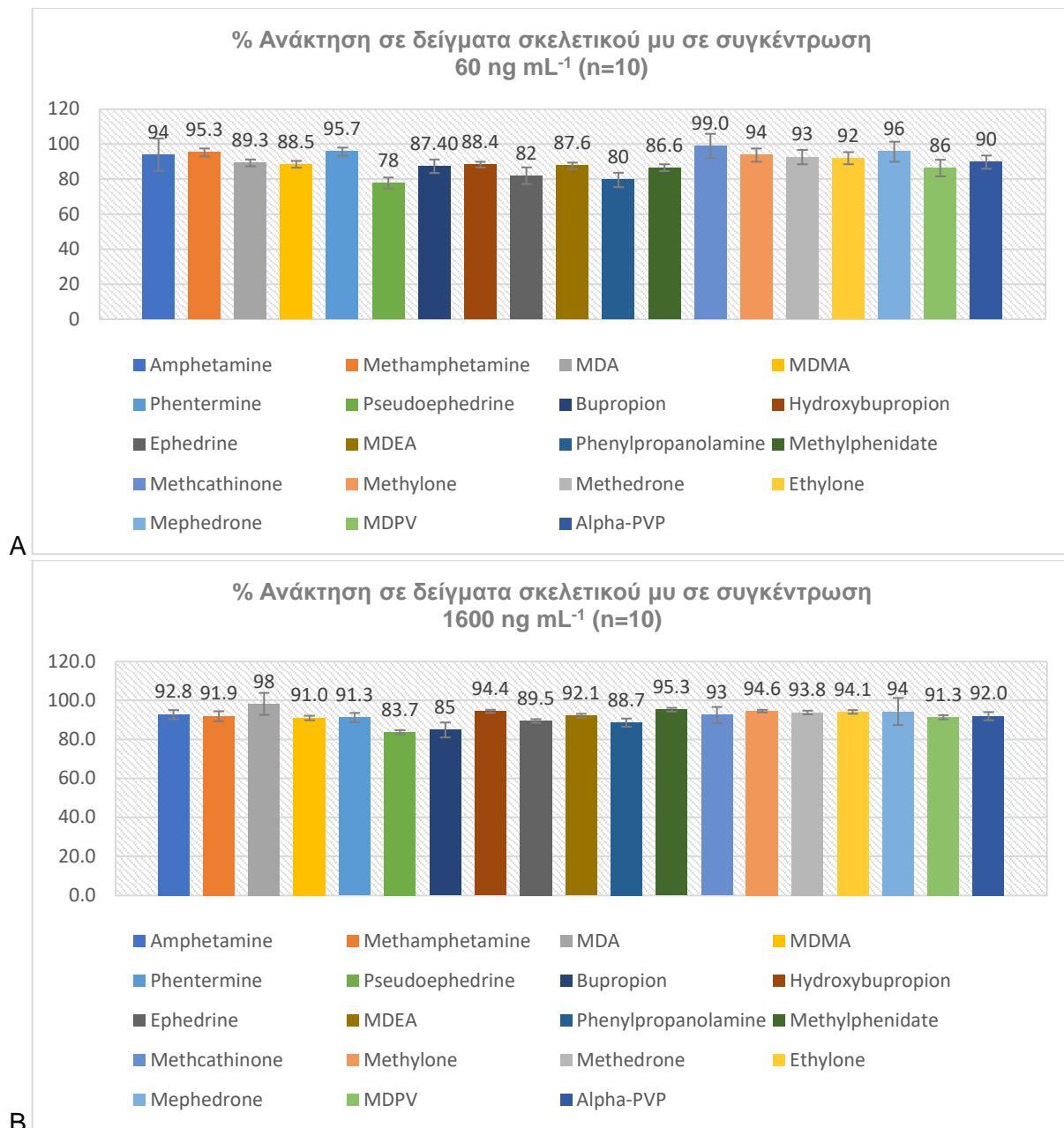


A

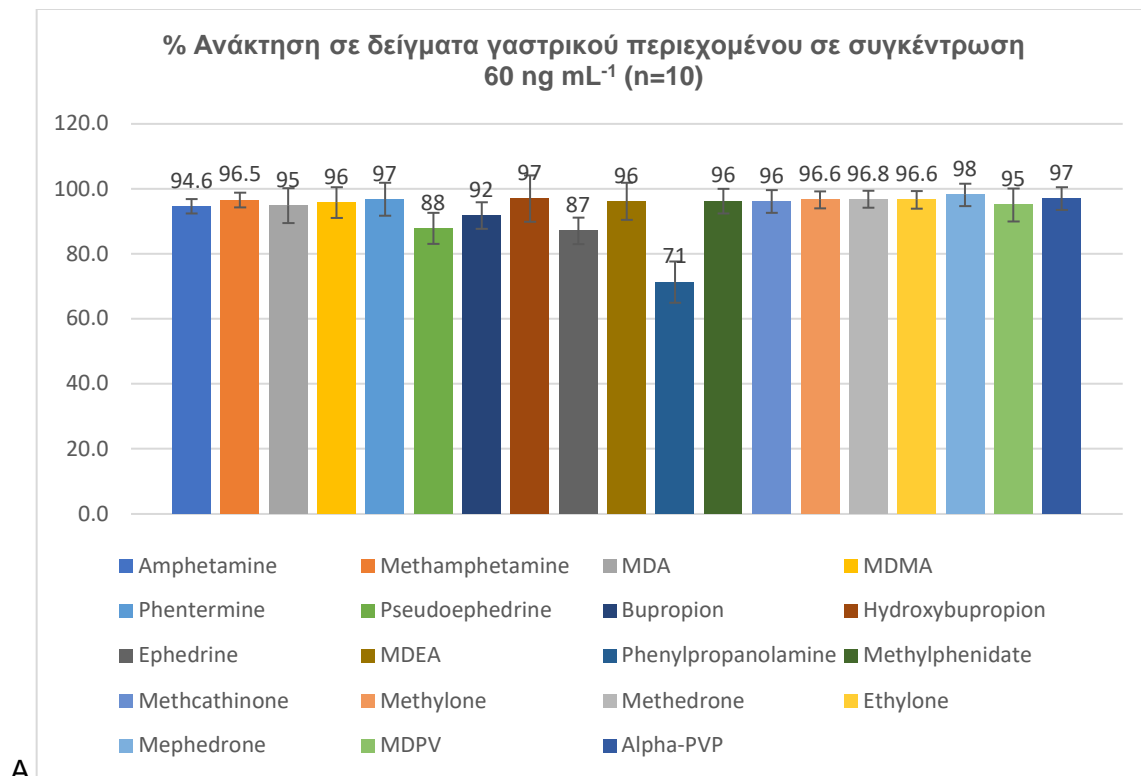


B

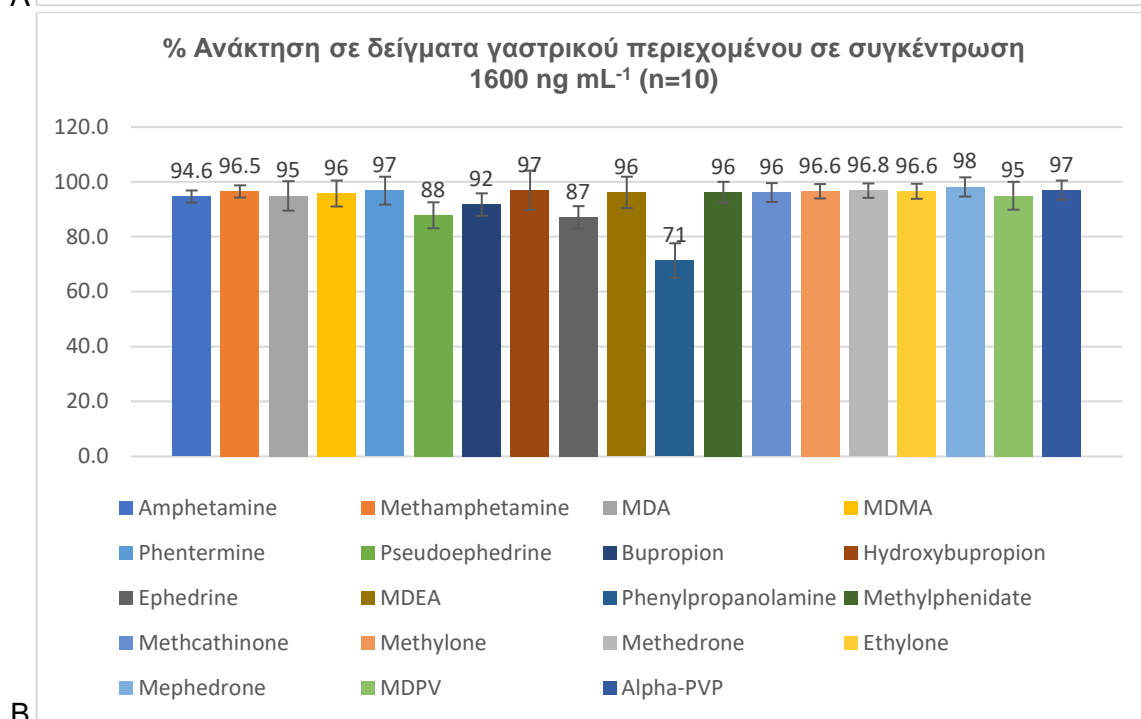
Σχήμα 7.15: % Ανάκτηση σε δείγματα σπλήνα σε συγκέντρωση 60 ng mL⁻¹ (A) και 1600 ng mL⁻¹ (B).



Σχήμα 7.16: % Ανάκτηση σε δείγματα σκελετικού μυ σε συγκέντρωση 60 ng mL⁻¹ (A) και 1600 ng mL⁻¹ (B).

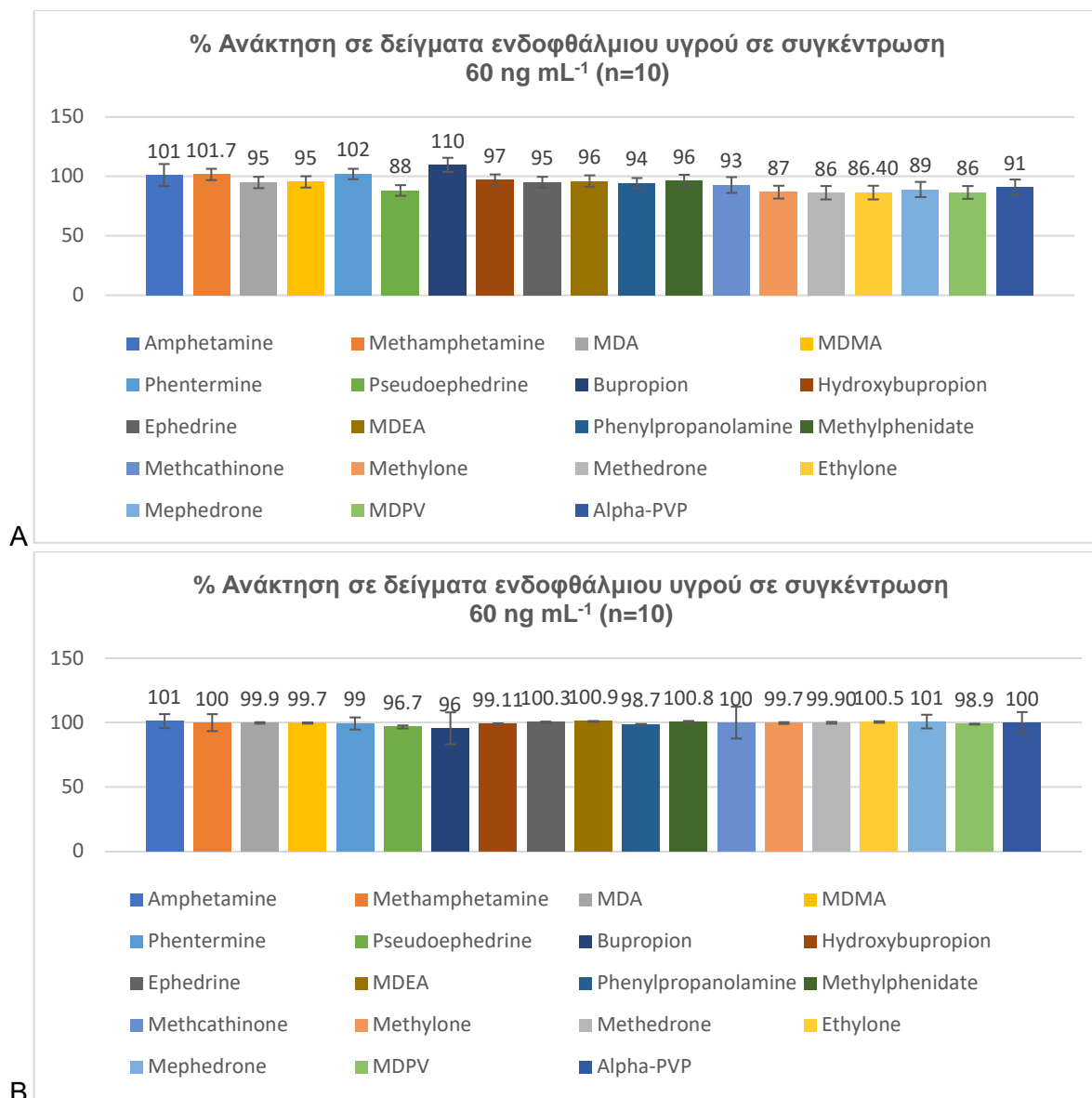


A



B

Σχήμα 7.17: % Ανάκτηση σε δείγματα γαστρικού περιεχομένου σε συγκέντρωση 60 ng mL⁻¹ (A) και 1600 ng mL⁻¹ (B).

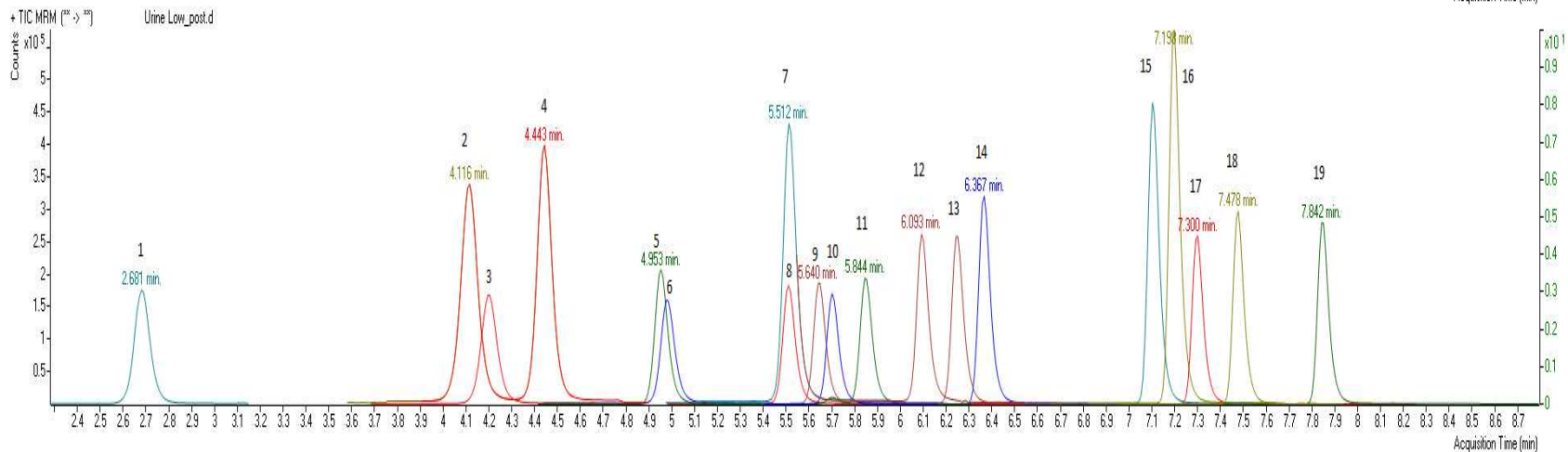
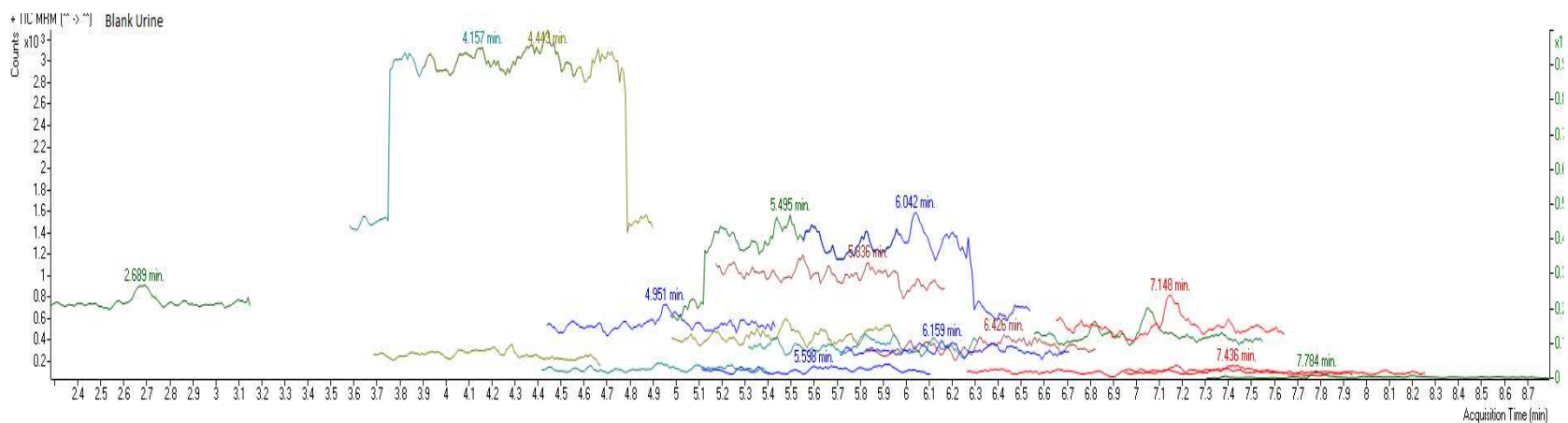


Σχήμα 7.18: % Ανάκτηση σε δείγματα ενδοφθάλμιου υγρού σε συγκέντρωση 60 ng mL⁻¹ (A) και 1600 ng mL⁻¹ (B).

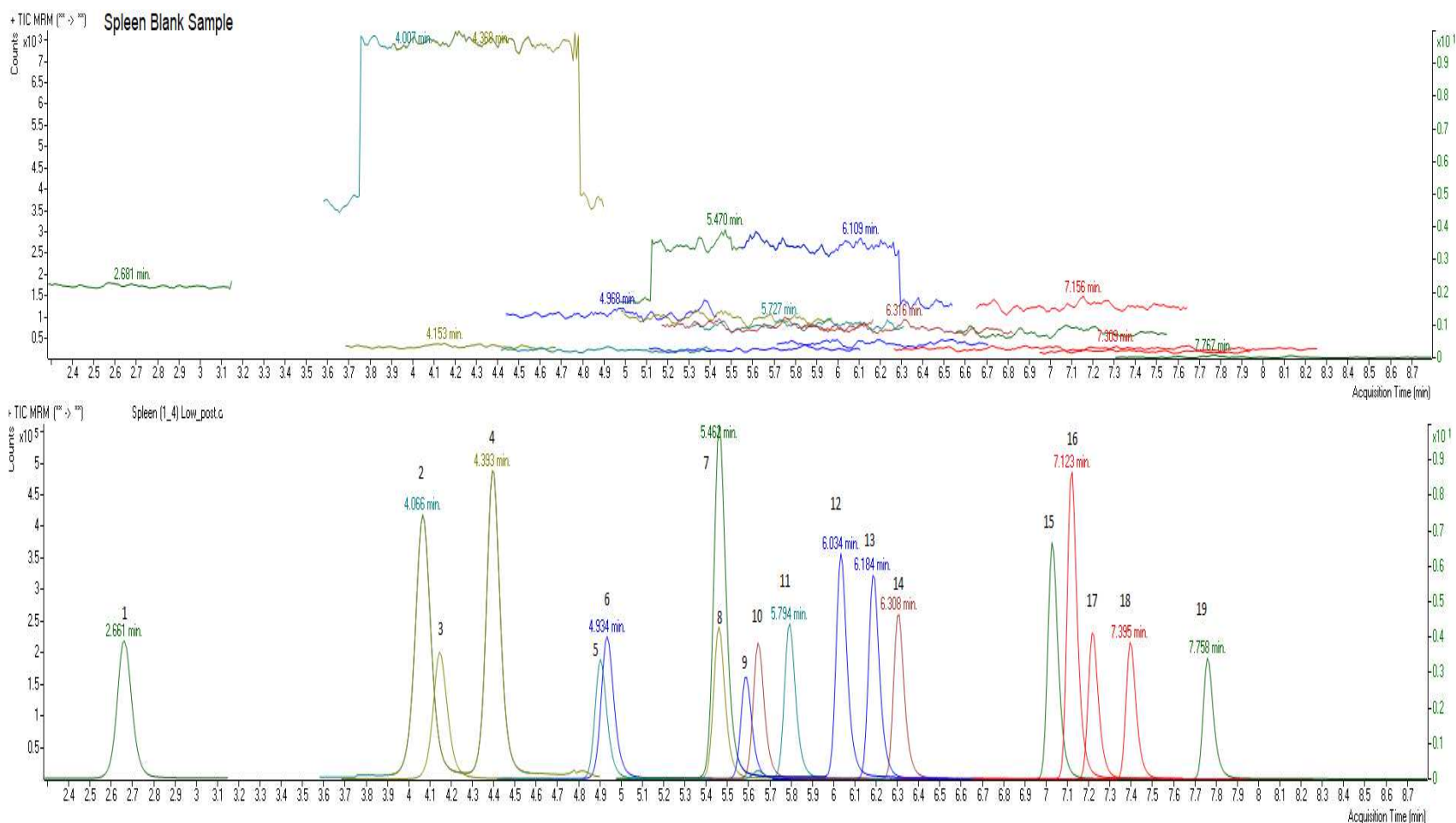
Στα πειράματα ανάκτησης των αναλυτών στα διάφορα εναλλακτικά βιολογικά δείγματα παρατηρήθηκε ότι το υπόστρωμα ήταν σημαντικός παράγοντας στα αποτελέσματα της % ανάκτησης. Η % ανάκτηση των περισσότερων αναλυτών επηρεάστηκε από το είδος του υποστρώματος με ενδεικτικό παράδειγμα το phenylpropanolamine όπου η ανάκτησή του κυμάνθηκε από 39% στα δείγματα χολής έως 99% στα δείγματα ενδοφθάλμιου υγρού. Από τα αποτελέσματα διαπιστώθηκε ότι η χαμηλότερη τιμή % ανάκτησης για το amphetamine παρατηρείται στα δείγματα χολής με τιμή 65%, ενώ η υψηλότερη επί τοις εκατό τιμή ανάκτηση παρατηρείται στα δείγματα σπλήνα με τιμή 102,5%. Αντίστοιχα για το methamphetamine η

χαμηλότερη τιμή παρατηρείται στα δείγματα ήπατος με τιμή 80% και υψηλότερη τιμή στα δείγματα χολής σε τιμή 106%. Για το MDA η χαμηλότερη τιμή παρατηρείται στα δείγματα χολής με τιμή 63% και υψηλότερη τιμή στα δείγματα ενδοφθάλμιου υγρού σε τιμή 99,9%. Για το MDMA η χαμηλότερη τιμή παρατηρείται στα δείγματα ήπατος με τιμή 78% και υψηλότερη τιμή στα δείγματα ενδοφθάλμιου υγρού σε τιμή 99,7%. Για το phentermine η χαμηλότερη τιμή παρατηρείται στα δείγματα χολής με τιμή 64% και υψηλότερη τιμή στα δείγματα ενδοφθάλμιου υγρού σε τιμή 102%. Για το pseudoephedrine η χαμηλότερη τιμή παρατηρείται στα δείγματα χολής με τιμή 58% και υψηλότερη τιμή στα δείγματα ενδοφθάλμιου υγρού σε τιμή 96,7%. Για το bupropion η χαμηλότερη τιμή παρατηρείται στα δείγματα ήπατος με τιμή 64% και υψηλότερη τιμή στα δείγματα ενδοφθάλμιου υγρού σε τιμή 110%. Για το hydroxybupropion η χαμηλότερη τιμή παρατηρείται στα δείγματα χολής με τιμή 46% και υψηλότερη τιμή στα δείγματα ενδοφθάλμιου υγρού σε τιμή 99,1%. Για το ephedrine η χαμηλότερη τιμή παρατηρείται στα δείγματα χολής με τιμή 60% και υψηλότερη τιμή στα δείγματα σπλήνα 100,3%. Για το MDEA η χαμηλότερη τιμή παρατηρείται στα δείγματα ήπατος, στη χαμηλή συγκέντρωση, με τιμή 73% και υψηλότερη τιμή στα δείγματα ενδοφθάλμιου υγρού, σε υψηλή συγκέντρωση, σε τιμή 100,90%. Για το phenylpropranolamine η χαμηλότερη τιμή παρατηρείται στα δείγματα χολής με τιμή 39% και υψηλότερη τιμή στα δείγματα ενδοφθάλμιου υγρού σε τιμή 98,7%. Για το methylphenidate η χαμηλότερη τιμή παρατηρείται στα δείγματα ήπατος με τιμή 72% και υψηλότερη τιμή στα δείγματα ενδοφθάλμιου υγρού σε τιμή 100,8%. Για το methcathinone η χαμηλότερη τιμή παρατηρείται στα δείγματα χολής στη χαμηλή συγκέντρωση με τιμή 82% και υψηλότερη τιμή στα δείγματα χολής στην υψηλή συγκέντρωση σε τιμή 116,4%. Για το methylone η χαμηλότερη τιμή παρατηρείται στα δείγματα χολής με τιμή 77% και υψηλότερη τιμή στα δείγματα ενδοφθάλμιου υγρού σε τιμή 99,7%. Για το methedrone η χαμηλότερη τιμή παρατηρείται στα δείγματα χολής με τιμή 78,7% και υψηλότερη τιμή στα δείγματα ενδοφθάλμιου υγρού σε τιμή 99,9%. Για το ethylone η χαμηλότερη τιμή παρατηρείται στα δείγματα χολής με τιμή 71% και υψηλότερη τιμή στα δείγματα ενδοφθάλμιου υγρού σε τιμή 100,5%. Για το mephedrone η χαμηλότερη τιμή παρατηρείται στα δείγματα ήπατος με τιμή 78% και υψηλότερη τιμή στα δείγματα χολής σε τιμή 102,7%. Για το MDPV η χαμηλότερη τιμή παρατηρείται στα δείγματα ήπατος με τιμή 76% και υψηλότερη τιμή στα δείγματα ούρων σε τιμή 102% και τέλος για το Alpha-PVP η χαμηλότερη τιμή παρατηρείται στα δείγματα ήπατος με τιμή 77% και υψηλότερη τιμή στα δείγματα χολής σε τιμή 112%.

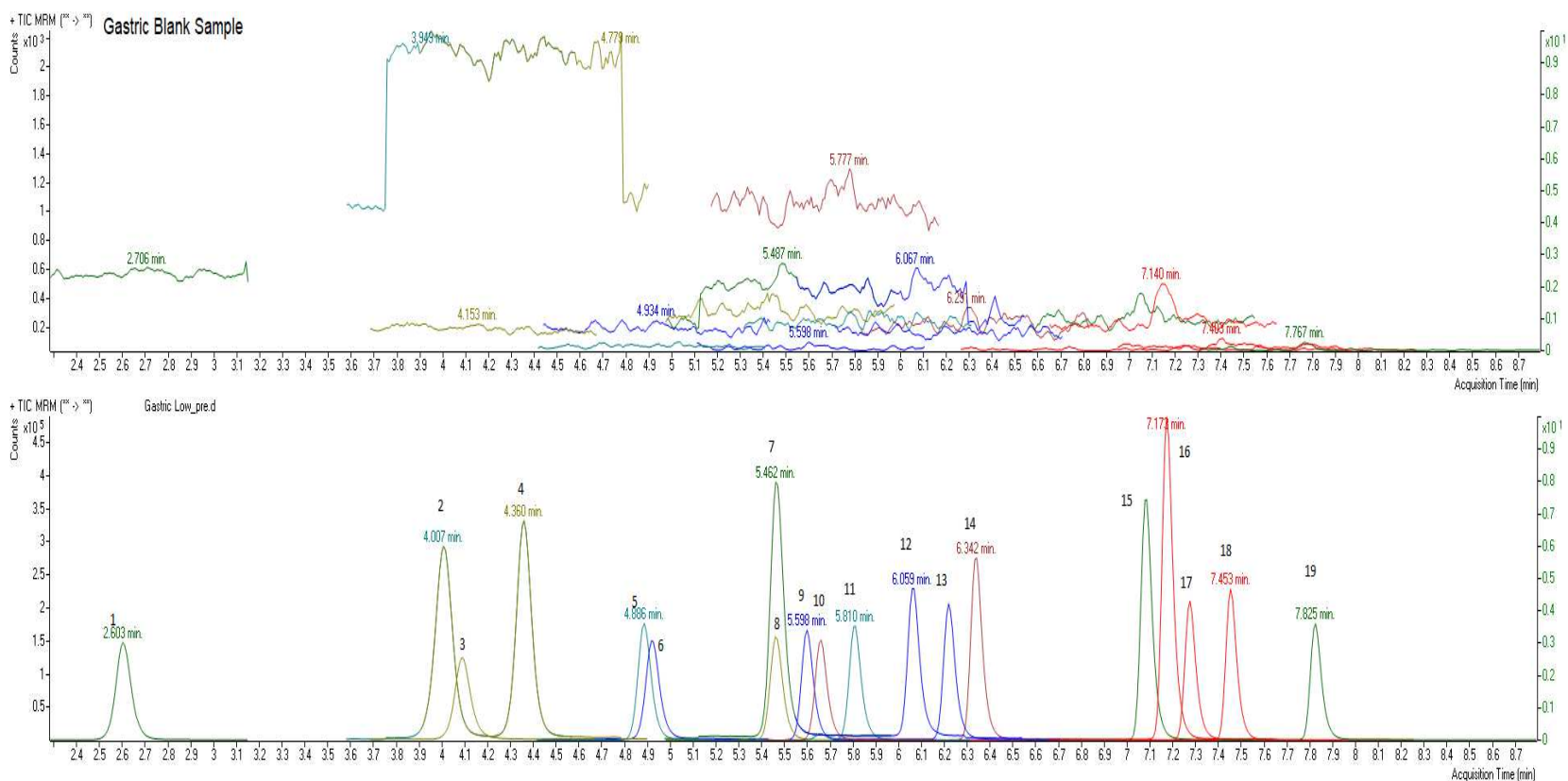
Ενδεικτικά στα σχήματα 7.19, 7.21 και 7.23 παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά UHPLC-MS/MS χρωματογραφήματα που προκύπτουν από την ανάλυση λευκών δειγμάτων και εμβολιασμένων δειγμάτων ούρων, σπλήνα και γαστρικού περιεχομένου.



Σχήμα 7.19: Αντιπροσωπευτικό UHPLC-MS/MS χρωματογράφημα που προκύπτει από την ανάλυση λευκού δείγματος (επάνω) και εμβολιασμένων δειγμάτων ούρων (κάτω) με παρακολούθηση των ιόντων ποιοτικού προσδιορισμού. 1: Phenylpropranolamine, 2: Ephedrine, 3: Methcathinone, 4: Pseudoephedrine, 5: Methylone, 6: Amphetamine, 7: Methamphetamine, 8: MDA, 9: Ethylone 10: Methedrone, 11: MDMA, 12: Phentermine, 13: Mephedrone, 14: MDEA, 15: Hydroxybupropion, 16: Methylphedinate, 17: Alpha-PVP 18: MDPV 19: Bupropion.



Σχήμα 7.21: Αντιπροσωπευτικό UHPLC-MS/MS χρωματογράφημα που προκύπτει από την ανάλυση λευκού δείγματος σπλήνα (επάνω) και εμβολιασμένων δειγμάτων σπλήνα (κάτω) με παρακολούθηση των ιόντων ποιοτικού προσδιορισμού. 1: Phenylpropranolamine, 2: Ephedrine, 3: Methcathinone, 4: Pseudoephedrine, 5: Methylone, 6: Amphetamine, 7: Methamphetamine, 8: MDA, 9: Ethylone 10: Methedrone, 11: MDMA, 12: Phentermine, 13: Mephedrone, 14: MDEA, 15: Hydroxybupropion, 16: Methylphenidate, 17: Alpha-PVP 18: MDPV 19: Bupropion



Σχήμα 7.23: Αντιπροσωπευτικό UHPLC-MS/MS χρωματογράφημα που προκύπτει από την ανάλυση λευκού δείγματος γαστρικού περιεχομένου (επάνω) και από την ανάλυση εμβολιασμένων δειγμάτων γαστρικού περιεχομένου με τους αναλύτες (κάτω). 1: Phenyproporanolamine, 2: Ephedrine, 3: Methcathinone, 4: Pseudoephedrine, 5: Methylone, 6: Amphetamine, 7: Methamphetamine, 8: MDA, 9: Ethylone 10: Methedrone, 11: MDMA, 12: Phentermine, 13: Mephedrone, 14: MDEA, 15: Hydroxybupropion, 16: Methylphedinate, 17: Alpha-PVP 18: MDPV 19: Bupropion.

7.4 Συμπεράσματα

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η επίδραση των ούρων και επιλεγμένων εναλλακτικών βιολογικών δειγμάτων στην καταστολή/ενίσχυση του σήματος καθώς και στην % ανάκτηση των αναλυτών με χρήση της προτεινόμενης σε αυτή τη διατριβή μεθόδου UHPLC-ESI-MS/MS. Οι αναλύτες που μελετήθηκαν είναι οι: amphetamine, methamphetamine, phenylpropanolamine, ephedrine, pseudoephedrine, MDA, MDMA, phentermine, MDEA, hydroxybupropion, methylphenidate, bupropion, Alpha-PVP, ethylone, MDPV, mephedrone, methcathinone, methedrone και methylone. Τα ούρα και τα εναλλακτικά βιολογικά δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν δείγματα ήπατος, εγκεφάλου, χολής, σπλήνας, σκελετικού μυ, γαστρικού περιεχομένου και ενδοφθάλμιου υγρού, αφού πρώτα ελέγχθηκαν για την ύπαρξη ή όχι των παραπάνω ουσιών. Χρησιμοποιήθηκε η χρωματογραφική μέθοδος όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 5 για τον ποιοτικό προσδιορισμό των αναλυτών σε προθανάτιο και μεταθανάτιο ολικό αίμα. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφική ανασκόπηση, δεν υπάρχει αναφορά που να περιγράφει την ταυτόχρονη μελέτη επίδρασης του υποστρώματος και της ανάκτησης των δεκαεννέα αναλυτών της προτεινόμενης μεθόδου, σε ούρα και στα επιλεγμένα βιολογικά δείγματα. Επιπλέον, στην προτεινόμενη μέθοδο αναπτύχθηκε σχεδόν κοινή κατεργασία όλα τα εναλλακτικά βιολογικά δείγματα που μελετήθηκαν και αυτό αποτελεί σημαντική απλούστευση στα αναλυτικά πρωτόκολλα ενός τοξικολογικού εργαστηρίου στο οποία υπάρχει πληθώρα δειγμάτων που πρέπει να αναλυθούν, με αποτέλεσμα να μειώνεται ο χρόνος καθώς και το κόστος ανάλυσης.

8. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1:

Πειραματικά δεδομένα των μετρήσεων για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης του amphetamine με πολυωνυμική ανάλυση παλινδρόμησης

Θεωρητική συγκέντρωση (ng mL ⁻¹) το Amphetamine	Λόγος επιφανειών	Πειραματική συγκέντρωση (ng mL ⁻¹)	% Σχετικό αναλυτικό σφάλμα
20	0,190	21,8	8,9
	0,197	20,5	2,6
	0,239	20,7	3,6
	0,229	19,2	-3,8
	0,226	19,8	-0,9
50	0,475	47,1	-5,8
	0,562	51,5	3,0
	0,580	49,4	-1,2
	0,592	50,8	1,5
	0,581	51,2	2,3
100	1,064	100	-0,1
	1,110	98	-1,5
	1,201	102	2,1
	1,248	108	8,3
	1,168	104	3,5
300	3,133	290	-3,3
	3,267	288	-4,0
	3,258	280	-6,6
	3,216	285	-4,9
	3,142	284	-5,4
500	5,162	485	-3,1
	5,341	478	-4,4
	5,673	498	-0,5
	5,268	478	-4,5
	5,248	485	-3,0
1000	10,334	1024	2,4
	10,946	1038	3,8
	11,028	1017	1,7
	10,514	1015	1,5
	10,448	1027	2,7
1500	14,781	1557	3,8
	15,421	1552	3,5
	15,881	1546	3,1
	15,250	1578	5,2
	14,762	1547	3,1
2000	17,595	1943	-2,8
	18,384	1941	-2,9
	19,216	1955	-2,2
	17,835	1934	-3,3
	17,665	1950	-2,5

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2:

Πειραματικά δεδομένα των μετρήσεων για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης του methamphetamine με πολυωνυμική ανάλυση παλινδρόμησης

Συγκέντρωση (ng mL ⁻¹) το Methamphetamine	Λόγος επιφανειών	Πειραματική συγκέντρωση (ng mL ⁻¹)	% Σχετικό αναλυτικό σφάλμα
20	0,519	20,4	2,2
	0,540	19,3	-3,5
	0,625	18,8	-6,1
	0,667	18,2	-9,0
	0,631	18,7	-6,6
50	1,289	47,9	-4,3
	1,451	50,9	1,8
	1,470	49,4	-1,1
	1,680	51,2	2,5
	1,626	52,1	4,2
100	2,863	104	4,3
	2,954	103	3,2
	3,131	110	9,9
	3,522	112	11,9
	3,189	105	5,1
300	8,243	302	0,4
	8,416	296	-1,2
	7,977	288	-3,9
	8,766	289	-3,5
	8,571	293	-2,4
500	12,750	471	-5,7
	13,819	493	-1,5
	13,931	511	2,3
	14,113	478	-4,3
	14,056	493	-1,4
1000	26,677	1032	3,2
	27,714	1023	2,3
	26,157	984	-1,6
	28,147	1022	2,2
	27,156	1018	1,8
1500	37,530	1515	1,0
	38,692	1473	-1,8
	38,981	1504	0,3
	39,336	1524	1,6
	37,354	1488	-0,8
2000	46,926	1977	-1,2
	50,818	2011	0,5
	50,673	2003	0,2
	47,889	1974	-1,3
	46,829	2004	0,1

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3:

Πειραματικά δεδομένα των μετρήσεων για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης του MDA με πολυωνυμική ανάλυση παλινδρόμησης

Συγκέντρωση (ng mL ⁻¹) το MDA	Λόγος επιφανειών	Πειραματική συγκέντρωση (ng mL ⁻¹)	% Σχετικό αναλυτικό σφάλμα
20	0,195	21,2	6,0
	0,209	20,5	2,7
	0,245	18,9	-5,1
	0,239	19,8	-1,2
	0,236	20,2	1,2
50	0,493	47,6	-4,7
	0,567	51,0	2,1
	0,581	49,5	-1,0
	0,589	49,7	-0,7
	0,565	49,2	-1,7
100	1,101	101	1,3
	1,123	98	-2,0
	1,227	107	7,4
	1,292	109	9,4
	1,188	104	3,7
300	3,366	297	-1,1
	3,478	292	-2,6
	3,394	294	-1,9
	3,326	279	-7,0
	3,385	293	-2,5
500	5,563	480	-3,9
	5,896	484	-3,2
	5,990	505	1,0
	5,824	481	-3,7
	5,677	485	-3,1
1000	12,422	1020	2,1
	13,423	1042	4,2
	12,670	998	-0,2
	12,786	1015	1,5
	12,488	1028	2,8
1500	19,286	1521	1,4
	19,930	1485	-1,0
	20,210	1491	-0,6
	20,327	1552	3,5
	18,774	1499	-0,1
2000	26,030	1980	-1,0
	28,012	1996	-0,2
	29,026	2006	0,3
	26,465	1962	-1,9
	25,747	1992	-0,4

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4:

Πειραματικά δεδομένα των μετρήσεων για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης του MDMA με πολυωνυμική ανάλυση παλινδρόμησης

Θεωρητική συγκέντρωση (ng mL ⁻¹) το MDMA	Λόγος επιφανειών	Πειραματική συγκέντρωση (ng mL ⁻¹)	% Σχετικό αναλυτικό σφάλμα
20	0,164	21,5	7,6
	0,180	20,3	1,4
	0,205	20,1	0,6
	0,208	20,6	3,0
	0,202	20,2	1,1
50	0,444	47,8	-4,4
	0,519	51,8	3,6
	0,511	49,4	-1,2
	0,524	49,0	-2,0
	0,528	50,4	0,9
100	0,999	100	-0,3
	1,020	98	-1,8
	1,085	104	3,9
	1,165	106	6,4
	1,080	101	1,4
300	3,115	295	-1,7
	3,124	289	-3,7
	3,057	287	-4,4
	3,056	275	-8,2
	3,133	290	-3,3
500	5,140	478	-4,4
	5,406	489	-2,2
	5,430	499	-0,3
	5,382	482	-3,7
	5,286	486	-2,8
1000	11,446	1028	2,8
	12,008	1036	3,6
	11,642	1016	1,6
	11,808	1044	4,4
	11,365	1030	3,0
1500	17,463	1526	1,7
	17,951	1493	-0,5
	17,985	1500	0,02
	17,384	1524	1,6
	16,804	1505	0,3
2000	23,120	1974	-1,3
	24,904	1993	-0,3
	24,988	1995	-0,3
	22,624	1968	-1,6
	22,445	1987	-0,7

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 5:

Πειραματικά δεδομένα των μετρήσεων για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης του phentermine με πολυωνυμική ανάλυση παλινδρόμησης

Θεωρητική συγκέντρωση (ng mL ⁻¹) το Phentermine	Λόγος επιφανειών	Πειραματική συγκέντρωση (ng mL ⁻¹)	% Σχετικό αναλυτικό σφάλμα
20	0,383	20,2	1,3
	0,414	19,1	-4,7
	0,619	20,9	4,9
	0,482	18,2	-9,0
	0,468	18,5	-7,3
50	1,004	48,6	-2,9
	1,162	52,2	4,4
	1,184	46,5	-6,9
	1,198	50,4	0,7
	1,184	51,6	3,1
100	2,214	104	3,8
	2,296	102	2,4
	2,422	103	2,5
	2,583	113	12,8
	2,384	107	7,0
300	6,418	297	-1,0
	6,674	297	-1,1
	6,704	295	-1,5
	6,527	291	-3,0
	6,364	292	-2,8
500	10,469	485	-3,1
	10,906	485	-3,0
	11,366	504	0,9
	10,773	484	-3,1
	10,730	495	-1,0
1000	21,871	1021	2,1
	23,115	1031	3,1
	22,633	1006	0,6
	22,371	1020	2,0
	22,131	1032	3,1
1500	31,976	1507	0,4
	33,127	1481	-1,3
	33,652	1491	-0,6
	32,417	1493	-0,4
	30,996	1454	-3,0
2000	41,781	1988	-0,6
	44,643	2003	0,1
	45,445	2004	0,2
	42,951	1999	-0,03
	42,711	2021	1,0

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 6:

Πειραματικά δεδομένα των μετρήσεων για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης του pseudoephedrine με πολυωνυμική ανάλυση παλινδρόμησης

Θεωρητική συγκέντρωση (ng mL ⁻¹) το Pseudoephedrine	Λόγος επιφανειών	Πειραματική συγκέντρωση (ng mL ⁻¹)	% Σχετικό αναλυτικό σφάλμα
	0,1837	20,5	2,6
20	0,1683	19,9	-0,4
	0,2121	20,4	0,2
	0,1968	19,1	-2,3
	0,2107	19,8	-1,1
50	0,4289	46,5	-7,0
	0,4913	51,3	2,6
	0,4989	49,2	-1,6
	0,5452	51,9	3,8
100	0,5350	51,7	3,4
	0,9385	100	0,1
	0,9572	96	-3,8
	1,0349	103	3,1
300	1,1363	107	6,7
	1,0262	100	-0,2
	2,9746	308	2,7
	3,1547	300	1,0
500	2,9372	289	-3,6
	2,9860	277	-7,7
	2,9846	289	-3,6
	4,8906	496	-0,9
1000	5,1325	483	-3,5
	5,2287	503	0,7
	5,2323	481	-3,7
	5,1756	497	-0,7
1500	10,9483	1047	4,7
	11,9641	1062	6,2
	11,2315	1022	2,2
	11,2808	1021	2,1
2000	11,1156	1037	3,7
	16,2005	1484	-1,1
	17,3059	1480	-1,3
	17,1817	1488	-0,8
2000	17,1246	1527	1,8
	16,1960	1478	-1,5
	22,5703	1974	-1,3
	24,1364	1978	-1,1
2000	24,2624	1996	-0,2
	22,5519	1985	-0,8
2000	22,5037	1999	-0,1

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 7:

Πειραματικά δεδομένα των μετρήσεων για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης του Βυρρορίου με πολυωνυμική ανάλυση παλινδρόμησης

Θεωρητική συγκέντρωση (ng mL ⁻¹) το Βυρρορίο	Λόγος επιφανειών	Πειραματική συγκέντρωση (ng mL ⁻¹)	% Σχετικό αναλυτικό σφάλμα
20	0,190	22,1	10,7
	0,196	20,0	0,3
	0,222	19,7	-1,7
	0,222	19,9	-0,5
	0,223	20,2	1,0
50	0,478	46,5	-6,9
	0,565	51,4	2,8
	0,533	48,0	-4,0
	0,588	49,8	-0,3
	0,595	50,9	1,7
100	1,102	99	-0,6
	1,109	97	-2,7
	1,181	106	6,2
	1,286	107	7,0
	1,201	101	0,8
300	3,401	292	-2,8
	3,502	295	-1,8
	3,359	296	-1,2
	3,403	281	-6,5
	3,491	289	-3,7
500	5,703	480	-3,97
	6,115	502	0,4
	5,881	507	1,4
	5,882	484	-3,1
	5,901	487	-2,7
1000	12,756	1039	3,9
	13264	1033	3,3
	12,188	996	-0,4
	12,529	1033	3,3
	12,568	1031	3,1
1500	19,011	1511	0,8
	19,387	1453	-3,1
	19,146	1487	-0,8
	18,402	1521	1,4
	18,456	1508	0,6
2000	25,463	1979	-1,0
	28,271	2019	0,9
	27,232	2009	0,5
	23,817	1974	-1,3
	24,350	1983	-0,8

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 8:

Πειραματικά δεδομένα των μετρήσεων για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης του hydroxybupropion με πολυωνυμική ανάλυση παλινδρόμησης

Θεωρητική συγκέντρωση (ng mL ⁻¹) το Hydroxybupropion	Λόγος επιφανειών	Πειραματική συγκέντρωση (ng mL ⁻¹)	% Σχετικό αναλυτικό σφάλμα
20	0,160	20,9	4,4
	0,166	20,2	0,7
	0,191	20,4	2,2
	0,189	19,9	-0,3
	0,193	20,0	-0,2
50	0,386	44,1	-11,8
	0,478	49,9	-0,3
	0,470	47,7	-4,6
	0,498	49,6	-0,8
	0,496	49,6	-0,7
100	0,945	100	0,9
	0,979	97	-2,8
	0,989	98	-1,7
	1,071	105	4,8
	1,044	103	3,5
300	2,965	300	-0,1
	3,069	290	-3,3
	2,940	286	-4,5
	2,890	282	-5,9
	2,914	287	-4,3
500	5,131	502	0,5
	5,441	500	0,01
	5,325	512	2,5
	5,058	499	-0,2
	5,009	493	-1,4
1000	11,904	1082	8,2
	12,579	1085	8,6
	11,759	1102	10,2
	10,055	1021	2,1
	10,606	1044	4,4
1500	17,802	1536	2,4
	18,070	1499	-0,1
	16,503	1519	1,2
	14,721	1543	2,8
	15,233	1502	0,1
2000	22,904	1899	-5,1
	24,317	1937	-3,2
	20,872	1891	-5,5
	18,125	1948	-2,6
	19,967	1971	-1,5

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 9:

Πειραματικά δεδομένα των μετρήσεων για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης του ephedrine με πολυωνυμική ανάλυση παλινδρόμησης

Θεωρητική συγκέντρωση (ng mL ⁻¹) το Ephedrine	Λόγος επιφανειών	Πειραματική συγκέντρωση (ng mL ⁻¹)	% Σχετικό αναλυτικό σφάλμα
20	0,159	22,1	10,7
	0,169	20,9	4,3
	0,204	20,8	3,9
	0,202	20,4	1,8
	0,197	20,5	2,7
50	0,415	47,0	-5,9
	0,482	50,7	1,4
	0,496	48,5	-3,0
	0,535	50,1	0,3
	0,515	50,2	0,4
100	0,944	98	-1,7
	0,979	98	-2,0
	1,077	103	3,4
	1,159	105	5,9
	1,059	101	0,8
300	2,960	292	-2,5
	2,996	287	-4,3
	2,978	281	-6,3
	3,072	276	-7,9
	3,074	288	-4,1
500	4,918	478	-4,3
	5,167	486	-2,7
	5,380	501	0,2
	5,327	476	-4,7
	5,225	486	-2,8
1000	10,929	1036	3,6
	11,429	1040	4,0
	11,274	1021	2,1
	11,658	1034	3,4
	11,159	1027	2,7
1500	16,340	1522	1,5
	16,885	1500	0,001
	17,029	1506	0,4
	17,665	1557	3,8
	16,658	1520	1,4
2000	21,495	1972	-1,4
	22,914	1986	-0,7
	23,014	1988	-0,6
	22,212	1950	-2,5
	21,819	1977	-1,2

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 10:

Πειραματικά δεδομένα των μετρήσεων για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης του MDEA με πολυωνυμική ανάλυση παλινδρόμησης

Θεωρητική συγκέντρωση (ng mL ⁻¹) το MDEA	Λόγος επιφανειών	Πειραματική συγκέντρωση (ng mL ⁻¹)	% Σχετικό αναλυτικό σφάλμα
20	0,155	18,0	-10,1
	0,166	21,1	5,6
	0,190	21,4	7,1
	0,184	20,2	1,3
	0,187	20,2	0,9
50	0,396	47,3	-5,5
	0,485	51,3	2,6
	0,458	48,8	-2,4
	0,480	49,4	-1,2
	0,481	49,9	-0,3
100	0,910	108	7,8
	0,963	96	-3,7
	0,958	99	-0,5
	1,058	106	6,3
	0,993	102	1,6
300	2,878	320	6,6
	3,019	285	-4,9
	3,349	283	-5,6
	2,812	279	-7,1
	2,906	293	-2,4
500	4,897	513	2,6
	5,219	481	-3,8
	5,017	492	-1,6
	4,929	487	-2,5
	4,921	492	-1,7
1000	11,229	1021	2,1
	12,059	1050	5,0
	11,207	1040	4,0
	10,377	1025	2,5
	10,500	1028	2,8
1500	16,796	1392	-7,2
	17,902	1499	-0,1
	16,784	1493	-0,5
	15,543	1537	2,5
	15,446	1487	-0,9
2000	28,751	2056	2,8
	24,666	1984	-0,8
	23,397	1991	-0,4
	19,847	1965	-1,7
	21,157	2000	-0,02

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 11:

Πειραματικά δεδομένα των μετρήσεων για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης του phenylpropranolamine με πολυωνυμική ανάλυση παλινδρόμησης

Θεωρητική συγκέντρωση (ng mL ⁻¹) το Phenylpropranolamine	Λόγος επιφανειών	Πειραματική συγκέντρωση (ng mL ⁻¹)	% Σχετικό αναλυτικό σφάλμα
20	0,235	20,0	0,3
	0,248	19,4	-3,0
	0,296	19,6	-2,1
	0,262	19,4	-3,2
	0,257	19,5	-2,3
50	0,578	48,7	-2,5
	0,668	53,5	6,9
	0,687	51,0	2,0
	0,651	52,2	4,5
	0,642	52,4	4,7
100	1,241	104	4,5
	1,287	103	3,4
	1,409	110	9,6
	1,343	111	11,4
	1,249	105	4,7
300	3,541	302	0,7
	3,499	286	-4,6
	3,488	283	-5,8
	3,206	274	-8,6
	3,283	284	-5,2
500	5,501	475	-4,9
	5,649	469	-6,2
	5,678	473	-5,3
	5,292	464	-7,2
	5,419	481	-3,8
1000	11,171	1007	0,7
	11,774	1025	2,5
	11,087	989	-1,1
	10,541	984	-1,7
	10,671	1007	0,7
1500	16,431	1550	3,3
	16,571	1504	0,3
	15,587	1486	-0,9
	15,523	1553	3,6
	14,856	1485	-1,0
2000	20,056	1962	-1,9
	21,195	2017	0,8
	20,096	2088	4,4
	19,101	2035	1,8
	19,087	2051	2,5

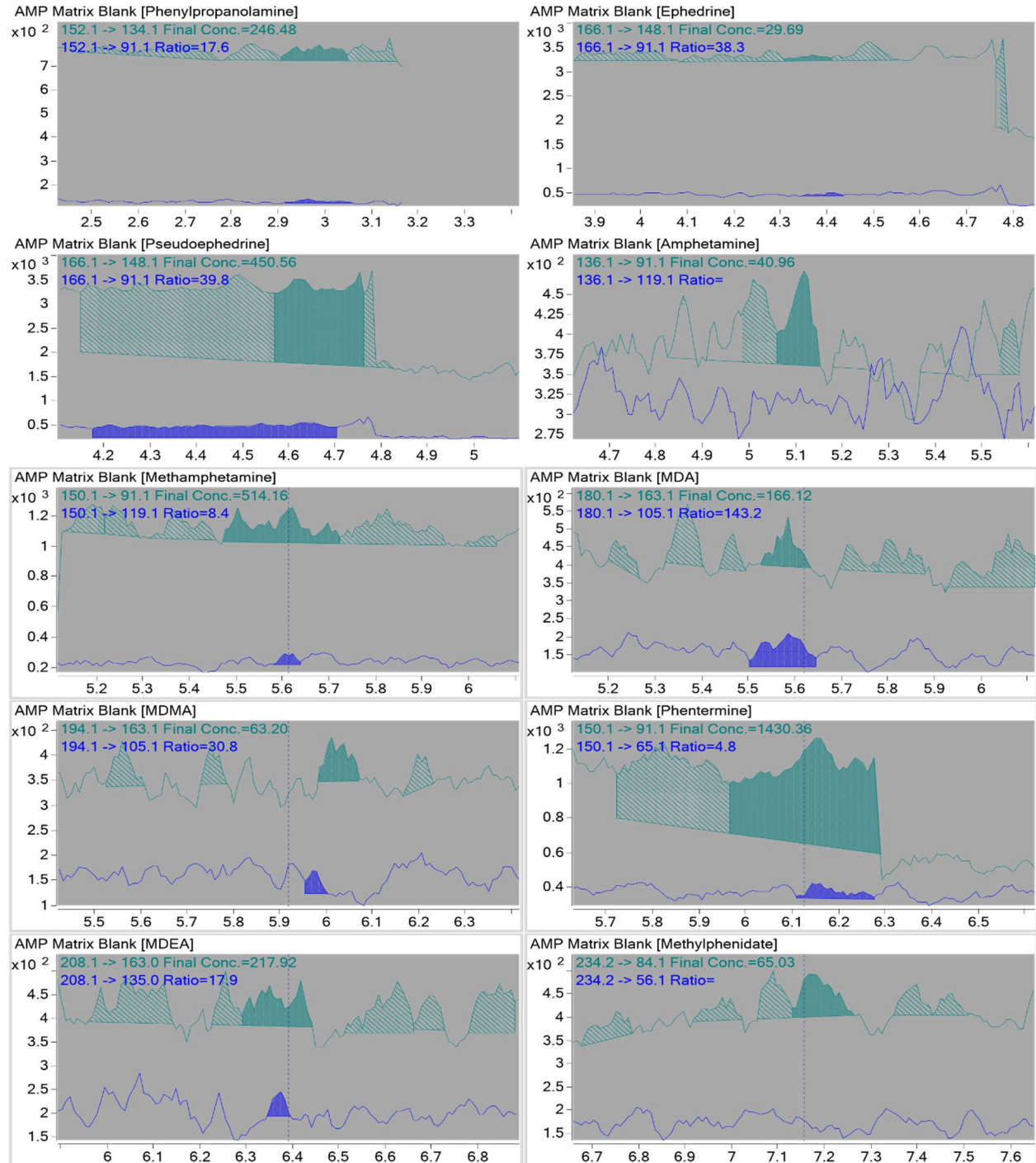
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 12:

Πειραματικά δεδομένα των μετρήσεων για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης του methylphenidate με πολυωνυμική ανάλυση παλινδρόμησης

Θεωρητική συγκέντρωση (ng mL ⁻¹) το Methylphenidate	Λόγος επιφανειών	Πειραματική συγκέντρωση (ng mL ⁻¹)	% Σχετικό αναλυτικό σφάλμα
20	0,206	23,5	17,9
	0,217	22,6	13,0
	0,241	22,4	12,1
	0,237	19,1	-4,6
	0,243	19,8	-1,2
50	0,512	46,1	-7,8
	0,603	49,7	-0,7
	0,572	47,2	-5,7
	0,617	49,7	-0,7
	0,620	50,2	0,4
100	1,167	94	-5,5
	1,211	92	-7,6
	1,247	98	-2,2
	1,345	109	8,6
	1,277	103	3,3
300	3,654	280	-6,5
	3,785	276	-8,1
	3,552	275	-8,3
	3,510	289	-3,7
	3,593	293	-2,2
500	6,256	479	-4,3
	6,715	489	-2,2
	6,360	500	-0,02
	5,947	500	0,1
	5,899	487	-2,6
1000	13,659	1066	6,6
	14,334	1068	6,8
	12,794	1061	6,1
	11,197	996	-0,4
	12,130	1035	3,5
1500	19,229	1533	2,2
	19,834	1511	0,8
	17,139	1489	-0,7
	16,081	1521	1,4
	16,881	1481	-1,3
2000	23,927	1947	-2,6
	25,114	1961	-2,0
	21,508	1976	-1,2
	19,799	1986	-0,7
	22,062	2001	0,03

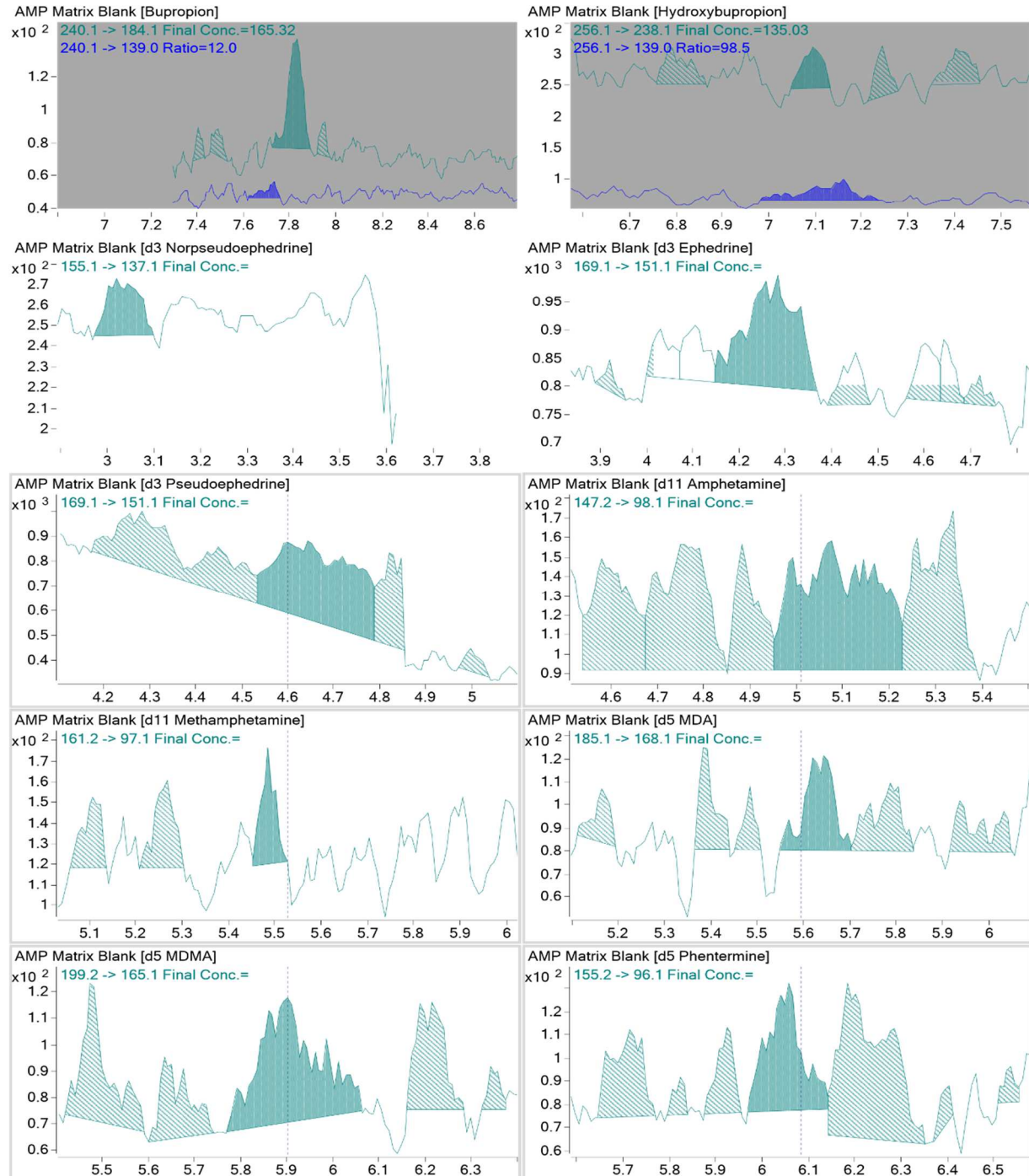
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 13:

Ιοντικά χρωματογραφήματα αναλυτών σε λευκό δείγμα προθανάτιου ολικού αίματος



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 14:

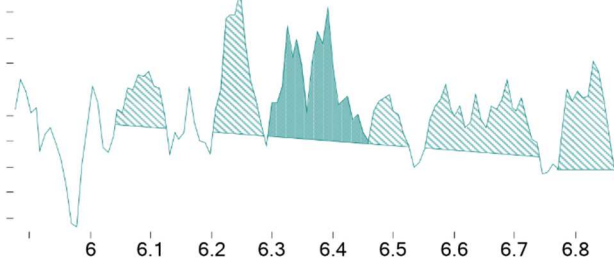
Ιοντικά χρωματογραφήματα αναλυτών σε λευκό δείγμα προθανάτιου ολικού αίματος



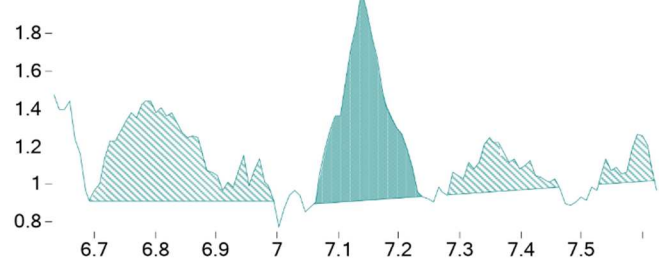
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 15:

Ιοντικά χρωματογραφήματα αναλυτών σε λευκό δείγμα προθανάτιου ολικού αίματος

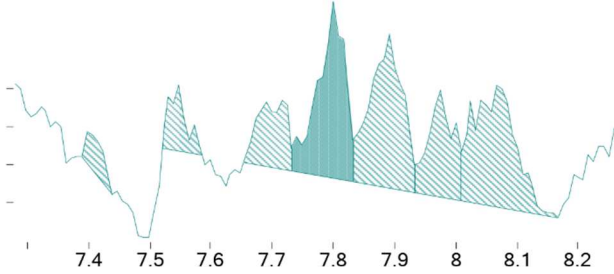
AMP Matrix Blank [d5 MDEA]
 $\times 10^2$ 213.2 \rightarrow 163.1 Final Conc.=



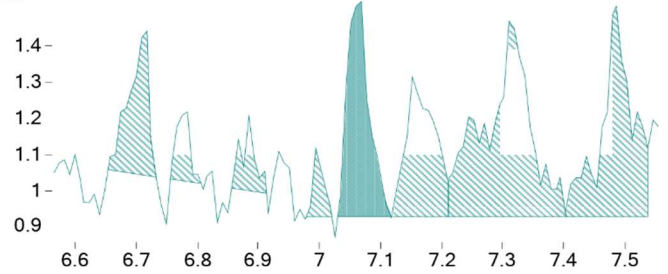
AMP Matrix Blank [d9 Methylphenidate]
 $\times 10^2$ 243.2 \rightarrow 93.2 Final Conc.=



AMP Matrix Blank [d9 Buproion]
 $\times 10^2$ 249.2 \rightarrow 185.0 Final Conc.=

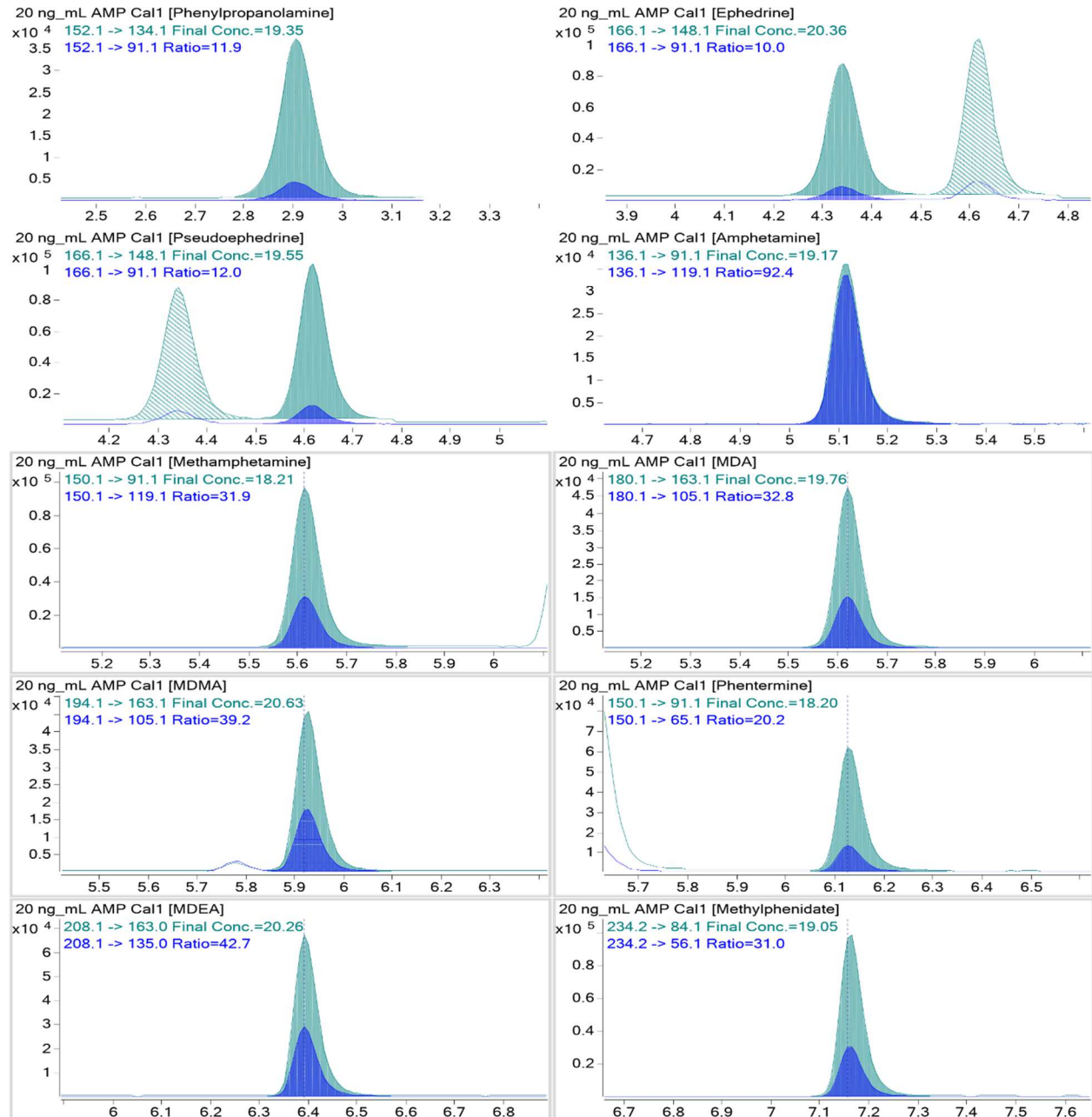


AMP Matrix Blank [d6 Hydroxybupropion]
 $\times 10^2$ 262.2 \rightarrow 244.1 Final Conc.=



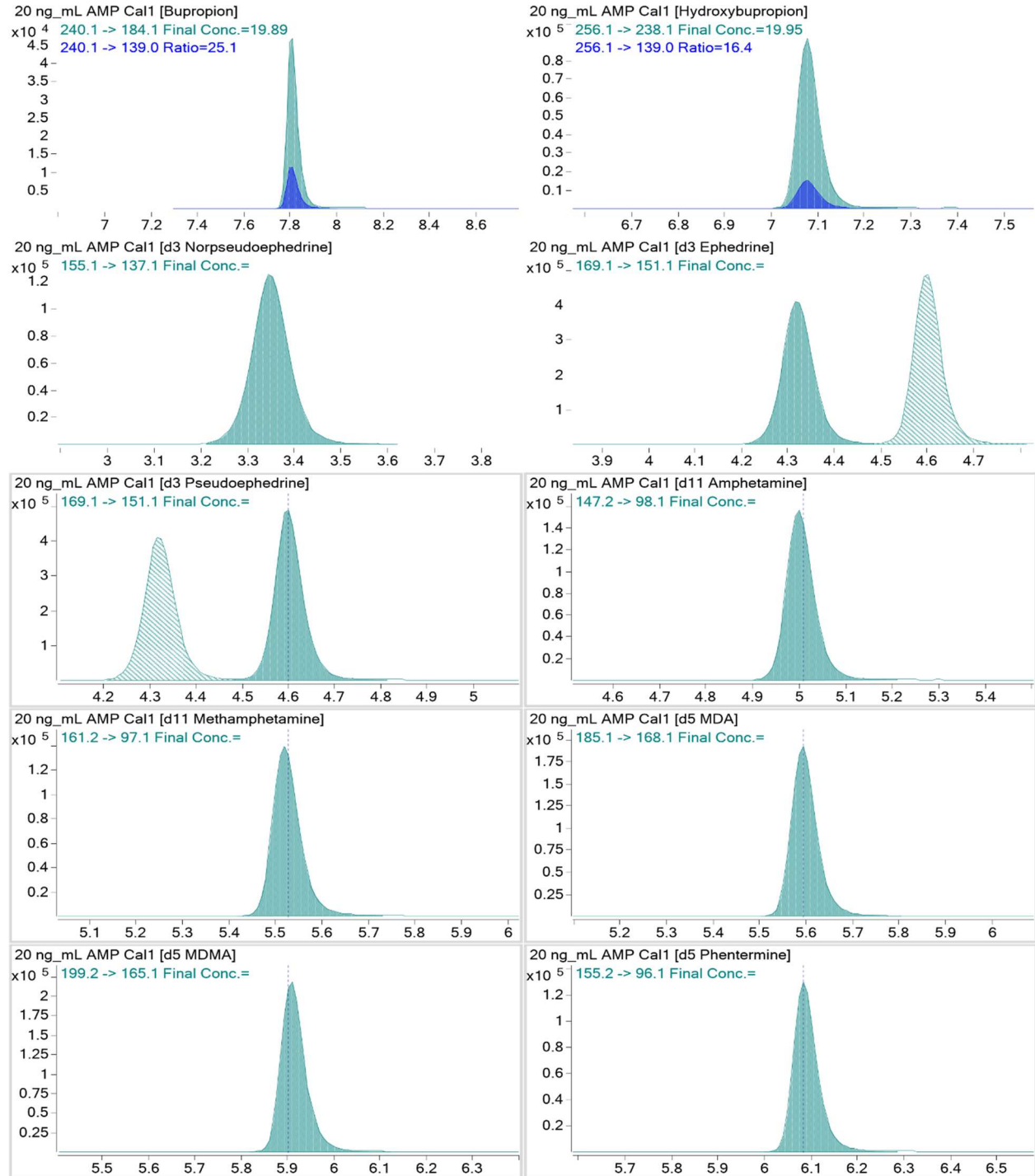
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 16:

Ιοντικά χρωματογραφήματα αναλυτών και των εσωτερικών τους προτύπων σε εμβολιασμένο δείγμα προθανάτιου ολικού αίματος στο όριο ποσοτικοποίησης της μεθόδου (20 ng mL⁻¹).



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 17:

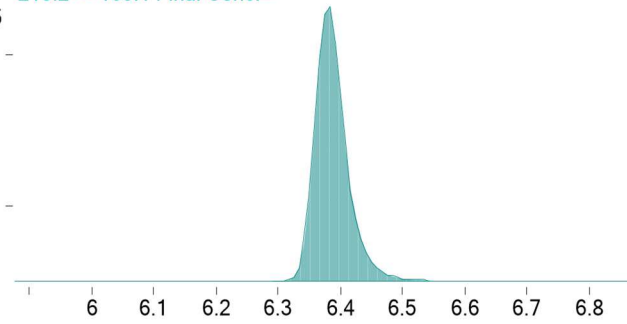
Ιοντικά χρωματογραφήματα αναλυτών και των εσωτερικών τους προτύπων σε εμβολιασμένο δείγμα προθανάτιου ολικού αίματος στο όριο ποσοτικοποίησης της μεθόδου (20 ng mL^{-1}).



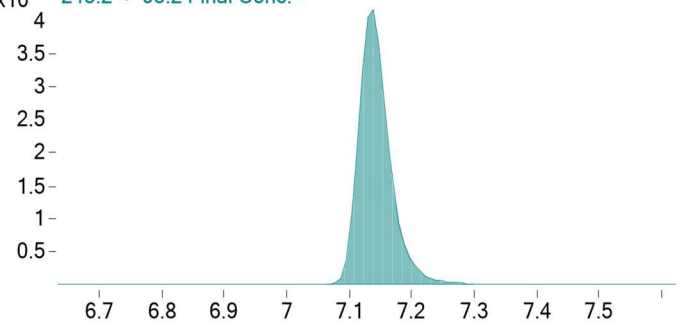
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 18:

Ιοντικά χρωματογραφήματα αναλυτών και των εσωτερικών προτύπων σε εμβολιασμένο δείγμα προθανάτιου ολικού αίματος στο όριο ποσοτικοποίησης της μεθόδου (20 ng mL^{-1}).

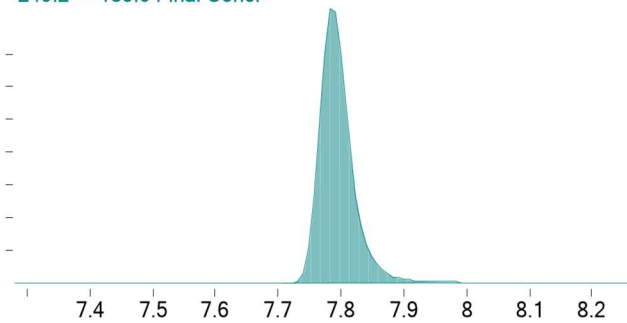
20 ng_mL AMP Cal1 [d5 MDEA]
 $\times 10^5$ 213.2 -> 163.1 Final Conc.=
3.5



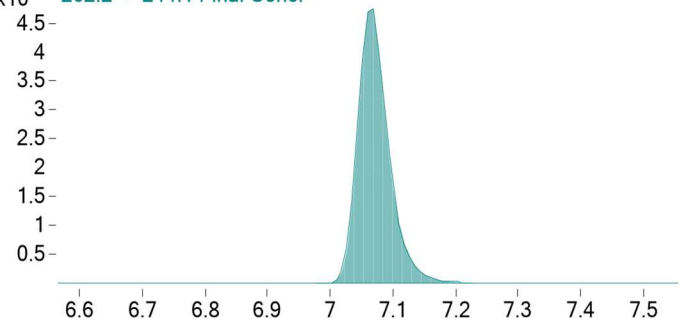
20 ng_mL AMP Cal1 [d9 Methylphenidate]
 $\times 10^5$ 243.2 -> 93.2 Final Conc.=



20 ng_mL AMP Cal1 [d9 Buproion]
 $\times 10^5$ 249.2 -> 185.0 Final Conc.=



20 ng_mL AMP Cal1 [d6 Hydroxybupropion]
 $\times 10^5$ 262.2 -> 244.1 Final Conc.=



9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1 Casarett, Doull's: (1991), Toxicology, The Basic Science of Poisons, 4th Ed Pergamon Press, New York.
- 2 ΝΟΜΟΣ 4139/2013, Νόμος περί εξαρτησιογόνων ουσιών και άλλες διατάξεις.
- 3 ΝΟΜΟΣ 3459/2006 - ΦΕΚ Α'/103/25.5.2006, Κώδικας Νόμων για τα Ναρκωτικά (Κ.Ν.Ν.).
- 4 Μ. Μ Μαλλιώρα: (2010), Λεξικό για το αλκοόλ και τις λοιπές ψυχοδραστικές ουσίες, Ελληνική Έκδοση του από την αγγλική που εκδόθηκε από τον ΠΟΥ το 1994 με τον τίτλο Lexicon of alcohol and drug terms, ΒΗΤΑ Ιατρικές Εκδόσεις ΜΕΠΕ, Αθήνα.
- 5 U.S Department of Justice, Drug Enforcement Administration (DEA), Drug of Abuse, 2017 Edition.
- 6 S.A. Legrand, H. Gjerde, C.Isalberti, T. Van der Linden, P. Lillsunde, M.J. Dias, S.Gustafsson, G. Ceder, A.G. Verstraete, Prevalence of Alcohol, Illicit Drugs and Psychoactive Medicines in Killed Drivers in Four European Countries, *Int J Inj Contr Saf Promot.*, (2014);**21**(1):17-28.
- 7 A. G. Verstraete, S. A. Legrand: (2014), Drug Use, Impaired Driving and Traffic Accidents, 2nd ed, Publications Office of the European Union, Luxembourg.
- 8 H. Gjerde, A.S. Christophersen, P.T. Normann, J. Mørland, Toxicological Investigations of Drivers Killed in Road Traffic Accidents in Norway During, 2006-2008 *Forensic Sci Int.*, (2011);**212**(1-3):102-109.
- 9 A.W. Jones, A. Holmgren, J. Ahlner, High prevalence of previous arrests for illicit drug use and/or impaired driving among drivers killed in motor vehicle crashes in Sweden with amphetamine in blood at autopsy, *Int J Drug Policy*, (2015);**26**(8):790-793.
- 10 M. Schulz, A. Schmoltdt, Therapeutic and Toxic Blood Concentrations of More Than 800 Drugs and Other Xenobiotics, *Pharmazie*, (2003);**58**(7):447-474.
- 11 P. Lillsunde, T.Gunnar, Drugs and driving: The Finnish perspective, *Bull Narc.*, (2005);**57**:213-229.
- 12 A. Steentoft, K.W. Simonsen, K. Linnet, The frequency of drugs among Danish drivers before and after the introduction of fixed concentration limits, *Traffic Inj Prev.*, (2010);**11**(4):329-333.
- 13 A. W. Jones, J. G. Mørland, R. H. Liu, Driving under the influence of psychoactive substances --A historical review, *Forensic Sci Rev.*, (2019);**31**:103–140.
- 14 K. Wolff, R. Brimblecombe, J. C. Forfar, A. R. Forrest, E. Gilvarry, A. Johnston, J. Morgan, M. D. Osselton, L. Read, D. Taylor; (2013), Driving Under the Influence of Drugs Report from the Expert Panel on Drug Driving, Department of Transportation: London, UK..

-
- 15 A. W. Jones, J. G. Mørland, R. H. Liu, Driving under the influence of psychoactive substances - A Historical Review, *Forensic Sci Rev.*, 2019;**31**(2);103–140.
- 16 ΝΟΜΟΣ 2696 ΦΕΚ Α' 57 /23.3.1999, Κύρωση του Κώδικα Οδικής Κυκλοφορίας.
- 17 D. Zuba, Identification of cathinones and other active components of “legal highs” by mass spectrometric methods, *Trends in Analytical Chemistry*, 2012;**32**:15-30.
- 18 J. R. Neifeld, L. E. Regester, J. M. Holler, S. P. Vorce, J. Magluilo Jr, G. Ramos, Th. Z. Bosy, Ultrafast screening of synthetic cannabinoids and synthetic cathinones in urine by rapid fire-tandem mass spectrometry, *J Anal Toxicol.*, 2016;**40**(5):379–387.
- 19 M. Irsfeld, M. Spadafore, B.M. Prüß BM. β -phenylethylamine, a small molecule with a large impact, *Webmedcentral BIOCHEMISTRY* 2013;4(12): WMC004459.
- 20 C.H. Cashin, Effect of sympathomimetic drugs in eliciting hypertensive responses to reserpine in the rat, after pretreatment with monoamineoxidase inhibitors, *Br J Pharmacol.*, 1972;**44**(2):203–209.
- 21 H.E. Shannon, E.J. Cone, D. Yousefnejad, Physiologic effects and plasma kinetics of β -phenylethylamine and its N-methyl homolog in the dog, *J Pharmacol Exp Ther.*, 1982;**223**(1):190–196.
- 22 R. T. Premont, R. R. Gainetdinov, M. G. Caron, Following the trace of elusive amines, *Proc Natl Acad Sci USA.*, 2001;**98**:9474–9475.
- 23 B. Borowsky, N. Adham, K.A. Jones, R. Raddatz, R. Artymyshyn, K.L. Ogozalek, M.M. Durkin, P.P. Lakhlani, J.A. Bonini, S. Pathirana, N. Boyle, X. Pu, E. Kouranova, H. Lichtblau, F.Y. Ochoa, T.A. Branchek, C. Gerald, Trace amines: Identification of a family of mammalian G protein-coupled receptors, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001;**98**(16):8966–8971.
- 24 R. Zucchi, G. Chiellini, T.S. Scanlan, D.K. Grandy, Trace amine-associated receptors and their ligands, *Br J Pharmacol.*, 2006;**149**(8):967–978.
- 25 Z. Xie, G.M. Miller, Beta-phenylethylamine alters monoamine transporter function via trace amine-associated receptor 1: Implication for modulatory roles of trace amines in brain, *J Pharmacol Exp Ther.*, 2008;**325**(2):617–628.
- 26 S.J. Gatley, N.D. Volkow, A.N. Gifford, J.S. Fowler, S.L. Dewey, Y.S. Ding, J. Logan, Dopamine-transporter occupancy after intravenous doses of cocaine and methylphenidate in mice and humans, *Psychopharmacology (Berl)*, 1999;**146**(1):93–100.
- 27 L.A. King, New Phenethylamines in Europe, *Drug Test Analysis*, 2014;**6**(7-8):808–818.
- 28 E. Tyrkkö, M. Andersson, R. Kronstrand, The toxicology of new psychoactive substances: synthetic cathinones and phenylethylamines, *Ther Drug Monit.*, 2016, **38**(2):190-216.

-
- 29 United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC), The International Drug Control Conventions, (2013), 168,
https://www.unodc.org/documents/commissions/CND/Int_Drug_Control_Conventions/Ebook/The_International_Drug_Control_Conventions_E.pdf (πρόσβαση:26/06/2020)
- 30 D. E. Nichols, W. E. Fantegrossi; (2014), Emerging Designer Drugs in The Effects of Drug Abuse on the Human Nervous System, 1st Ed., Academic Press..
- 31 W.R. Bett, Benzedrine sulphate in clinical medicine: A survey of the literature, *Postgrad Med J.*, 1946;**22**(250):205–218.
- 32 E. Guttman, W. Sargent, Observations on Benzedrine, *Br Med J.*, 1937;**1**(3984):1013–1015.
- 33 H.L. Tidy, Discussion on benzedrine: Uses and abuses, *Proc R Soc Med.*, 1938;**32**(4): 385–398.
- 34 D.J. Heal, S.L. Smith, J. Gosden, D.J. Nutt, Amphetamine, past and present--A pharmacological and clinical perspective, *J Psychopharmacol.*, 2013;**27**(6):479-496. doi:10.1177/0269881113482532.
- 35 F. Schifano, G. D. Papanti, L. Orsolini, J. M. Corkery, Novel psychoactive substances: the pharmacology of stimulants and hallucinogens, *Expert Rev Clin Pharmacol.*, 2016;**9**(7):943-954..
- 36 A.E. Fleckenstein, T.J. Volz, E.L. Riddle, J.W. Gibb, G.R. Hanson, New insights into the mechanism of action of amphetamines, *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, 2007;**47**: 681–698.
- 37 E. S. Calipari, M. J. Ferris, Amphetamine mechanisms and actions at the dopamine terminal revisited, *J. Neurosci.*, 2013;**33**(21):8923–8925.
- 38 L. Li, T. Everhart, P. Jacob III, R. Jones, J. Mendelson, Stereoselectivity in the human metabolism of methamphetamine, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 2010;**69**(2):187-192.
- 39 E. Tyrkkö, M. Andersson, R. Kronstrand, The toxicology of new psychoactive substances: Synthetic cathinones and phenylethylamines, *Ther Drug Monit.*, 38 (2), 2016.
- 40 K. A. Moore; (2006), Amphetamines/Sympathomimetic amines in principles of forensic toxicology, 3rd edition Ed. B.Levine, AACCC Press, Washington, DC.
- 41 R. de la Torre, M. Farre, P.N. Roset, N. Pizarro, S. Abanades, M. Segura, J. Segura, J. Cami, Human pharmacology of MDMA pharmacokinetics, metabolism, and disposition, *Ther Drug Monit.*, 2004;**26**(2):137-144.
- 42 H.K. Ensslin, K.A. Kovar, H.H. Maurer, Toxicological detection of the designer drug 3,4-methylenedioxyethylamphetamine (MDE, “Eve”) and its metabolites in urine by gas chromatography-mass spectrometry and fluorescence polarization immunoassay, *J Chromatogr B Biomed Appl.*, 1996;**683**(2):189–197.

-
- 43 R. de la Torre, M. Farre, P. N. Roset, N. Pizarro, S. Abanades, M. Segura, J. Segura, J. Cami, Human Pharmacology of MDMA Pharmacokinetics, Metabolism, and Disposition, *Ther Drug Monit.*, 2004;**26**(2):137-144.
- 44 H. H. Maurer, On the metabolism and the toxicological analysis of methylenedioxyphenylalkylamine designer drugs by gas chromatography mass spectrometry, *Ther Drug Monit.*, 1996;**18**(4):465–470.
- 45 N. Shima, M. Katagi, H. Kamata, K. Zaitso, T. Kamata, M. Nishikawa, A. Miki, H. Tsuchihashi, T. Sakuma, N. Nemoto, Urinary excretion of the main metabolites of 3, 4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA), including the sulfate and glucuronide of 4-hydroxy-3-methoxymethamphetamine (HMMA), in humans and rats., *Xenobiotica*. 2008;**38**(3):314–324.
- 46 W.A. Morton, G.G. Stockton, Methylphenidate abuse and psychiatric side effects, *Prim Care Companion J Clin Psychiatry*, 2000;**2**(5):159-164.
- 47 T. D. Challman, J. J. Lipsky, Methylphenidate: its pharmacology and uses, *Mayo Clin Proc.*, 2000;**75**(7):711–721.
- 48 Drug Enforcement Administration. Schedule II. Drugs of abuse. https://www.deadiversion.usdoj.gov/schedules/orangebook/c_cs_alpha.pdf. Πρόσβαση 11/5/2020.
- 49 K. S. Patrick, R. A. Mueller, C. T. Gualtieri; (1987), Pharmacokinetics and actions of methylphenidate, in: Meltzer HY(Ed.), *Psychopharmacology: The Third Generation of Progress*, 3rd ed., Raven Press, New York.
- 50 A. M. Fox, M. J. Rieder, Risks and benefits of drugs used in the management of the hyperactive child, *Drug Saf.*, 1993;**9**(1):38-50.
- 51 C. Verghese, S. Abdijadid, Methylphenidate; (2020),, StatPearls Publishing, Treasure Island, FL.
- 52 L.J. De Felice, R.A. Glennon, S.S. Negus, Synthetic cathinones: Chemical phylogeny, physiology, and neuropharmacology, *Life Sci.*, 2014;**97**(1):20–26.
- 53 G. A. Alles, M. D. Fairchild, M. Jensen, Chemical pharmacology of *Catha edulis*, *J Med Pharm Chem.*, 1961;**3**:323–352.
- 54 O. Wolfes, Über das Vorkommen von d-nor-iso-Ephedrine in *Catha edulis*, *Arch Pharm.*, 1930;**268**:81–83.
- 55 H. Friebel, R. Brilla, Über den zentralerregenden Wirkstoff der frischen Blätter und Zweigspitzen von *Catha edulis*, *Naturwissenschaften*, 1963;**50**:354–354.
- 56 J.B. Zawilska, J. Wojcieszak, Designer cathinones--an emerging class of novel recreational drugs., *Forensic Sci. Int.*, 2013;**231**(1-3):42–53.

-
- 57 L. Li, I.S. Lurie, Regioisomeric and enantiomeric analyses of 24 designer cathinones and phenethylamines using ultra high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis with added cyclodextrins, *Forensic Sci. Int.*, 2015;**254**:148–57.
- 58 L. D. Simmler, T. A. Buser, M. Donzelli, L-H Dieu, J. Huwyler, S. Chaboz, M. C. Hoener, M. E. Liechti, Pharmacological characterization of designer cathinones in vitro, *Br J Pharmacol.*, 2013;**168**(2):458–470.
- 59 L. E. Iversen; (2010a), A report submitted to the Home Secretary of the UK. Consideration of the cathinones. Advisory Council on the Misuse of Drugs. .
- 60 L. Iversen; (2010b), Consideration of the cathinones, Advisory Council on the Misuse of Drugs (ACMD).
- 61 H.A. Spiller, M.L. Ryan, R.G. Weston, J. Jansen, Clinical experience with and analytical confirmation of ‘bath salts’ and ‘legal highs’ (synthetic cathinones) in the United States, *Clin Toxicol (Phila.)*, 2011;**49**(6):499–505.
- 62 K.G. Shanks, T. Dahn, G. Behonick, A. Terrel, Analysis of first and second generation legal highs for synthetic cannabinoids and synthetic stimulants by ultra-performance liquid chromatography and time of flight mass spectrometry, *J Anal Toxicol.*, 2012;**36**(6):360–371.
- 63 L.J. Marinetti, H. M. Antonides, Analysis of synthetic cathinones commonly found in bath salts in human performance and postmortem toxicology: method development, drug distribution and interpretation of results, *J Anal Toxicol.*, 2013;**37**(3):135–146.
- 64 UNODC; (2013), The challenge of new psychoactive substances,: United Nations Office on Drugs and Crime, Vienna, Austria. https://www.unodc.org/documents/scientific/NPS_2013_SMART.pdf (Πρόσβαση 26/06/2020).
- 65 M. J. Valente, P. G. de Pinho, M. de Lourdes Bastos, F. Carvalho, M. Carvalho, Khat and synthetic cathinones: a review, *Arch Toxicol.*, 2014;**88**(1):15-45.
- 66 F. Schifano, L. Orsolini, G.D. Papanti, John M Corkery, Novel psychoactive substances of interest for psychiatry, *World Psychiatry*, 2015;**14**(1):15–26.
- 67 F. Schifano; (2014), Novel psychoactive substances also known as ‘legal highs’. Annual report of the Chief Medical Officer 2013. Public mental health priorities: investing in the evidence, Department of Health, London.; https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/413196/CMO_w_e_b_doc.pdf (Πρόσβαση 26/06/2020).
- 68 F. Chifano, J. Corkery, A.H. Ghodse, Suspected and confirmed fatalities associated with mephedrone (4-methylmethcathinone; ‘meow meow’) in the UK, *J Clin Psychopharmacol.*, 2012;**32**(5):710–714.

-
- 69 F. Schifano, A. Albanese, S. Fergus, J. L. Stair, P. Deluca, O. Corazza, Z. Davey, J. Corkery, H. Siemann, N. Scherbaum, M.' Farre', M. Torrens, Z. Demetrovics, A Hamid Ghodse, Psychonaut Web Mapping; ReDNet Research Groups, Mephedrone (4-methylmethcathinone; 'meow meow'): chemical, pharmacological and clinical issues, *Psychopharmacology (Berl)*., 2011;**214**(3):593–602
- 70 R. Brenneisen, S. Geissshusler, X. Schorno, Metabolism of cathinone to (–)-norephedrine and (–)-norpseudoephedrine, *J Pharm Pharmacol*, 1986;**38**(4):298–300.
- 71 A.N. Guantai, C.K. Maitai, Metabolism of cathinone to d-norpseudoephedrine in humans, *J Pharm Sci.*, 1983;**72**(10):1217–1218.
- 72 R. Brenneisen, S. Geissshusler, X. Schorno, Metabolism of cathinone to (–)-norephedrine and (–)-norpseudoephedrine. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 1986;**38**(4):298–300x.
- 73 R.A. Glennon, M. Yousif, N.A. Naiman, P. Kalix, Methcathinone: a new and potent amphetamine-like agent, *Pharmacol Biochem Behav.*, 1987;**26**:547-551.
- 74 S. L. Markantonis, A. Kyroudis, A. H. Beckett, The stereoselective metabolism of dimethylpropion and monomethylpropion, *Biochem Pharmacol.*, 1986;**35**(3):529–532.
- 75 P. Bilinski, P. Hołownia, L. Kapka-Skrzypczak, A. Wojtyła, Designer Drug (DD) abuse in Poland; a review of the psychoactive and toxic properties of substances found from seizures of illegal drug products and the legal consequences thereof. Part 1 – Cannabinoids and Cathinones, *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 2012;**19**(4):857-870.
- 76 P. Jacob, A.T. Shulgin, Novel N-substituted 2-amino-3',4'-methylenedioxy-propiofenone, WO Patent 9639133, 1996.
- 77 T.A. Dal Cason, R. Young, R. A. Glennon, Cathinone: an investigation of several N-alkyl and methylenedioxy-substituted analogs, *Pharmacol Biochem Behav.*, 1997;**58**(4): 1109–1116.
- 78 N. V. Cozzi, M. K. Sievert, A.T. Shulgin, P. Jacob 3rd, A. E. Ruoho, Inhibition of plasma membrane monoamine transporters by beta-ketoamphetamines, *Eur J Pharmacol.*, 1999;**381**(1):63–69.
- 79 C. Sogawa, N. Sogawa, K. Ohyama, R. Kikura-Hanajiri, Y. Goda, I. Sora, S. Kitayama, Methylone and monoamine transporters: correlation with toxicity, *Curr Neuropharmacol.*, 2011;**9**(1):58–62.
- 80 F. Nagai, R. Nonaka, K. Satoh Hisashi Kamimura, The effects of non-medically used psychoactive drugs on monoamine neurotransmission in rat brain, *Eur J Pharmacol.*, 2007;**559**(2–3):132–137.
- 81 J. M. Prosser, L. S. Nelson, The Toxicology of Bath Salts: A Review of Synthetic Cathinones, *J. Med. Toxicol.*, (2012);**8**(1):33–42.

-
- 82 H. T. Kamata, N. Shima, K. Zaitso, T. Kamata, A. Miki, M. Nishikawa, M. Katagi, H. Tsuchihashi, Metabolism of the recently encountered designer drug, methylone, in humans and rats, *Xenobiotica.*, 2006;**36**(8):709– 723.
- 83 A. Winstock, L. Mitcheson, J. Ramsey, S. Davies, M. Puchnarewicz, J. Marsden, Mephedrone: use, subjective effects and health risks, *Addiction.*, 2011;**106**(11):1991–1996.
- 84 M.R. Meyer, J. Wilhelm, F.T. Peters, H.H. Maurer, Beta-keto amphetamines: studies on the metabolism of the designer drug mephedrone and toxicological detection of mephedrone, butylone, and methylone in urine using gas chromatography-mass spectrometry, *Anal Bioanal Chem.*, 2010;**397**(3):1225–1233.
- 85 O. I. Khreit, M. H. Grant, T. Zhang, C. Henderson, D. G. Watson, O. B. Sutcliffe, Elucidation of the Phase I and Phase II metabolic pathways of (±)-4'-methylmethcathinone (4-MMC) and (±)-4'-(trifluoromethyl)methcathinone (4-TFMMC) in rat liver hepatocytes using LC-MS and LC-MS2, *J Pharm Biomed Anal.*, 2013;**72**:177–185.
- 86 M. R. Meyer, J. Wilhelm, F. T. Peters, H. H. Maurer, Beta-keto amphetamines: studies on the metabolism of the designer drug mephedrone and toxicological detection of mephedrone, butylone, and methylone in urine using gas chromatography-mass spectrometry., *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010;**397**(3):1225–1233.
- 87 M. Wilkstrom, G. Thelander, I. Nystrom, R. Kronstrand, Two fatal intoxications with the new designer drug methedrone (4-methoxymethcathinone), *J Anal Toxicol.*, 2010;**34**(9), 594 – 598.
- 88 M. R. Meyer, H. H. Maurer, Metabolism of designer drugs of abuse: an updated review, *Curr Drug Metab.*, 2010;**11**(5):468-482.
- 89 M. G. Bossong, J. P. Van Dijk, R. J. Niesink, Methylone and mCPP, two new drugs of abuse?, *Addict Biol.*, 2005;**10**(4):321-323.
- 90 K. Zaitso, M. Katagi, H.T. Kamata, T. Kamata, N. Shima, A. Miki, H. Tsuchihashi, Y. Mori, Determination of the metabolites of the new designer drugs bk-MBDB and bk- MDEA in human urine. *Forensic Sci Int.*, 2009;**188**(1–3):131–139.
- 91 J. C. Yohannan, J. S. Bozenko Jr., The characterization of 3, 4-methylenedioxypropylvalerone (MDPV), *Microgram J.*, 2010;**7**(1):12-15.
- 92 G. Gardos, J. O. Cole, Evaluation of pyrovalerone in chronically fatigued volunteers, *Curr Ther Res Clin Exp.*, 1971;**13**(10): 631-635.
- 93 S. Ross, E. Peselow, The neurobiology of addictive disorders, *Clin Neuropharmacol.*, 2009;**32**(5):269-276.
- 94 S. D. Brandt, H. R. Sumnall, F. Measham, J. Cole, Analyses of second generation 'legal highs' in the UK: initial findings, *Drug Test Anal.*, 2010;**2**(8):377-382.

-
- 95 M. Durham, Ivory wave: the next mephedrone? *Emerg Med J.*, 2011;**28**(12):1059-1060.
- 96 L. Regan, M. Mitchelson, C. Macdonald, Mephedrone toxicity in a Scottish emergency department, *Emerg. Med J.*, 2011;**28**:1055-1058.
- 97 G. C. Hadlock, K. M. Webb, L. M. McFadden, P. W. Chu, J. D. Ellis, S.C. Allen, D. M. Andrenyak, P. L. Vieira-Brock, C. L. German, K. M. Conrad, A. J. Hoonakker, J. W. Gibb, D. G. Wilkins, G. R. Hanson, A. E. Fleckenstein, 4-Methylmethcathinone (Mephedrone): Neuropharmacological effects of a designer stimulant of abuse, *J Pharmacol Exp Ther.*, 2011;**339**(2):530-536.
- 98 P. C. Meltzer, D. Butler, J. R. Deschamps, B. K. Madras, 1-(4-Methylphenyl)-2-pyrrolidin-1-yl-pentan-1-one (Pyrovalerone) analogues: a promising class of monoamine uptake inhibitors, *J Med Chem.*, 2006;**49**(4):1420-1432.
- 99 M. Coppola, R. Mondola, 3,4-methylenedioxypropylpyrovalerone (MDPV): chemistry, pharmacology and toxicology of a new designer drug of abuse marketed online, *Toxicol Lett.*, 2012;**208**(1):12-15.
- 100 S. Strano-Rossi, A. B. Cadwallader, X. de la Torre, F. Botre, Toxicological determination and in vitro metabolism of the designer drug methylenedioxypropylpyrovalerone (MDPV) by gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry., *Rapid Commun Mass Spectrom.*, 2010; **24**(18):2706–2714.
- 101 M. R. Meyer, P. Du, F. Schuster, H. H. Maurer, Studies on the metabolism of the alpha-pyrrolidinophenone designer drug methylenedioxy-propylpyrovalerone (MDPV) in rat and human urine and human liver microsomes using GC-MS and LC-high-resolution MS and its detectability in urine by GC-MS, *J Mass Spectrom.*, 2010; **45**(12):1426–1442.
- 102 P. C. Meltzer, D. Butler, J. R. Deschamps, B. K. Madras, 1-(4-Methylphenyl)-2pyrrolidin-1-yl-pentan-1-one (Pyrovalerone) analogues: a promising class of monoamine uptake inhibitors, *J Med Chem.*, 2006;**49**(4),1420-1432.
- 103 B. K. Logan; (2013), SOFT Designer Drug Committee Monographs vers. 1.1; Emerging Designer Drug Monograph. https://www.soft-tox.org/files/designer_drugs/Alpha-PVP.pdf (Πρόσβαση 26/06/2020).
- 104 L. J. Marinetti, H. M. Antonides, Analysis of synthetic cathinones commonly found in bath salts in human performance and postmortem toxicology: method development, drug distribution and interpretation of results, *J Anal Toxicol.*, 2013;**37**(3),135-146.
- 105 L. L. Richards-Waugh, K. M. Bailey, D. J. Clay, M. A. Gebhardt, Ch. L. Newsome-Sparks, H. E. Mahmoud, S. E. Venuti, and J. C. Kraner (2013) Proceedings of the AAFS, Abstract K16, Deaths Involving the Recreational Use of α -PVP (α -pyrrolidinopentiophenone). Σελ. 521

https://aafs.org/common/Uploaded%20files/Resources/Proceedings/2013_Proceedings.pdf

(πρόσβαση: 26/06/2020).

106 E. Tyrkko, A. Pelander, R. A. Ketola, I. Ojanperä, In silico and in vitro metabolism studies support identification of designer drugs in human urine by liquid chromatography/quadrupole-time-of-flight mass spectrometry, *Anal Bioanal Chem.*, 2013;**405**(21):6697–6709.

107 N. Shima, M. Katagi, H. Kamata, S. Matsuta, K. Sasaki, T. Kamata, H. Nishioka, A. Miki, M. Tatsuno, K. Zaitso, A. Ishii, T. Sato, H. Tsuchihashi, K. Suzuki, Metabolism of the newly encountered designer drug α -pyrrolidinovalerophenone in humans: identification and quantitation of urinary metabolites, *Forensic Toxicol.*, 2014;**32**: 59–67.

108 C. Sauer, F. T. Peters, C. Haas, M. R. Meyer, G. Fritschi, H. H. Maurer, New designer drug α -pyrrolidinovalerophenone (PVP): studies on its metabolism and toxicological detection in rat urine using gas chromatographic/mass spectrometric techniques, *J Mass Spectrom.*, 2009;**44**(6):952–964. 1

109 Advisory Council on the Misuse of Drugs. Consideration of the cathinones. <http://www.homeoffice.gov.uk/publications/alcoholdrugs/drugs/acmd1/acmd-cathinodes-report-2010?view=Binary>, 13 Ιουλίου 2020.

110 H. Canning, D. Goff, M. J. Leach, A. A. Miller, J. E. Tateson, P. L. Wheatley, The involvement of dopamine in the central actions of bupropion, a new antidepressant [proceedings]. *Br J Pharmacol.*, 1979;**66**(1):104P–105P.

111 S. R. Faucette, R. L. Hawke, E. L. Lecluyse, S. S. Shord, B. Yan, R. M. Laethem, C. M. Lindley, Validation of bupropion hydroxylation as a selective marker of human cytochrome P450 2B6 catalytic activity, *Drug Metab Dispos*, 2000;**28**(10):1222–1230.

112 N. L. Benowitz, A. Z. X. Zhu, R. F. Tyndale, D. Dempsey, P. Jacob 3rd, Influence of CYP2B6 genetic variants on plasma and urine concentrations of bupropion and metabolites at steady state, *Pharmacogenet Genomics.*, 2013;**23**(3):135–141.

113 J. E. Sager, J. R. Choiniere, J. Chang, A. Stephenson-Famy, W. L. Nelson, N. Isoherranen, Identification and structural characterization of three new metabolites of bupropion in humans, *ACS Med Chem Lett.*, 2016;**7**(8):791–796.

114 A. Meyer, A. Vuorinen, A. E. Zielinska, P. Strajhar, G. G. Lavery, D. Schuster, A. Odermatt, Formation of threohydrobupropion from bupropion is dependent on 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1, *Drug Metab Dispos.*, 2013;**41**(9):1671–1678.

-
- 115 L. Skarydova, R. Tomanova, L. Havlikova, H. Stambergova, P. Solich, V. Wsol, Deeper insight into the reducing biotransformation of bupropion in the human liver, *Drug Metab Pharmacokinet.*, 2014;**29**(2):177–184.
- 116 J. N. Connarn, X. Zhang, A. Babiskin, D. Sun, Metabolism of bupropion by carbonyl reductases in liver and intestine, *Drug Metab Dispos.*, 2015;**43**(7):1019–1027.
- 117 B. T. Gufford, J. B. L. Lu, I. F. Metzger, D. R. Jones, Z. Desta, Stereoselective Glucuronidation of Bupropion Metabolites In Vitro and In Vivo, *Drug Metab Dispos.*, 2016;**44**(4):544–553.
- 118 L.P. Dvoskin, A.S. Rauhut, K.A. King-Pospisil, M.T. Bardo, Review of the Pharmacology and Clinical Profile of Bupropion, an Antidepressant and Tobacco Use Cessation Agent, *CNS Drug Rev.*, 2006;12(3-4):178–207.
- 119 B. S. Levine, M. L. Smith, R. C. Froede, Postmortem forensic toxicology, *Clinics in Laboratory Medicine*, 1990;**10**(3):571-589.
- 120 T. Launiainen, I. Ojanperä, Drug concentrations in post-mortem femoral blood compared with therapeutic concentrations in plasma, *Drug Test. Anal.*, 2014;**6**(4):308-316.
- 121 E. G. C. Clarke, A. C. Moffat,; (1986), *Clark's Isolation and Identification of Drugs in Pharmaceuticals, Body Fluids and Postmortem Material*, 2nd Ed., The Pharmaceutical Press, London..
- 122** D. J. DiMaio, V. J. M. DiMaio; (1993), *Forensic Pathology*, CRC Press, Boca Raton, FL.
- 123 Stajic, M., (1981), The general unknown, in *Introduction to Forensic Toxicology*, Cravey, R. C. and Baselt, R. C., Eds., Biomedical Publications, Davis. CA.
- 124 A. Agarwal, M. Lemos, Significance of bile analysis in drug-induced deaths, *J Analytical Tox.*, 1996;20:61-63.
- 125 D. R. Harper, J. E. L. Couy; (1988) Collection and storage of specimens for alcohol analysis, in *Medicolegal Aspects of Alcohol Determination in Biological Samples*, Garriott, J. C., ed., Year Book Medical Publishers, Boca Raton, FL.
- 126 Y. H. Caplan; (1988), Blood, urine and other fluid and tissue specimens for alcohol analysis, in *Medicolegal Aspects of Alcohol Determination in Biological Samples*, Garriott, J.C., ed., Year Book Medical Publishers, Boca Raton, FL.
- 127 P. Grandjean, Lead poisoning: Hair analysis shows the calendar of events, *Human Toxicol.*, 1984;**3**:223-228.
- 128 A. Poklis, J. J. Saady, Arsenic poisoning: Acute or chronic? Suicide or Murder?, *Am J Forensic Med Pathol.*, 1990;**11**(3):236-232.
- 129 R. L. DuPont, W. A. Baumgartner, Drug testing by urine and hair analysis: complementary features and scientific issues, *Forensic Science Int.*, 1995;**70**(1-3):63-76.

-
- 130 F. J. Couper, I. M. McIntyre, O. H. Drummer, Detection of antidepressant and antipsychotic drugs in postmortem human scalp hair, *J Forensic Sci.*, 1995;**40**:87-90.
- 131 W. A. Baumgartner, C. Cheng, T. D. Donahue, G. F. Hayes, V. A. Hill, H. Scholtz; (1995), Forensic drug testing by mass spectrometric analysis in hair, in *Forensic Applications of Mass Spectrometry*, Yinon, J., ed., CRC Press, Boca Raton, FL.
- 132 M. R. Harkey, G. L. Henderson; (1989), Hair analysis for drugs of abuse, in *Advances in Analytical Toxicology*, Volume II, Chapter 10, Baselt, R.C., ed., Yearbook Medical Publishers, Chicago. ,.
- 133 J. C. Garriott, Skeletal muscle as an alternative specimen for alcohol and drug analysis, *J Forensic Sci.*, 1991;**36**(1):60-69.
- 134 C. Moore, A. Negrusz, Drugs of abuse in meconium, *Forensic Sci Rev.*, 1995;**7**(2):103-118.
- 135 D. Malamud, Guidelines for saliva nomenclature and collection, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1993;**694**(1):xi-xii.
- 136 V. Spihler; (2004), *Drugs in Saliva. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*, Pharmaceutical Press: London.
- 137 E. Gallardo, J. A. Queiroz, The role of alternative specimens in toxicological analysis, *Biomed Chromatogr.*, 2008;**22**(8):795-821.
- 138 Methodology; (2010),, In *Handbook of FORENSIC TOXICOLOGY for MEDICAL EXAMINERS*, D. K. Molina, CRC press, Boca Raton, FL.
- 139 Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology, *Journal of Analytical Toxicology*, (2013);**37**(7):452-474.
- 140 Ευρωπαϊκή Οδηγία 2002/657/EC, Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results.
- 141 Standard for Identification Criteria in Forensic Toxicology, https://www.nist.gov/system/files/documents/2019/04/22/chsac_-_tox_-_identification_in_forensic_toxicology_-_for_asb_and_website_1.pdf (πρόσβαση: 26/06/2020)
- 142 Standard for Mass Spectral Data Acceptance in Forensic Toxicology, https://www.nist.gov/system/files/documents/2019/03/20/standard_for_mass_spec_spectral_data_acceptance_-_asb.pdf (πρόσβαση: 26/06/2020).
- 143 C. Yuan, D. Chen, S. Wang, Drug confirmation by mass spectrometry: Identification criteria and complicating factors, *Clinica Chimica Acta.*, 2015;**438**:19-125.
- 144 A. Wohlfart, W. Weinmann, S. Dresen, LC-MS/MS screening method for designer amphetamines, tryptamines, and piperazines in serum, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, (2010);**396**(7): 2403-2414.

-
- 145 M. Dziadosz, J. Teske, K. Henning, M. Klintschar, F. Nordmeier, LC–MS/MS screening strategy for cannabinoids, opiates, amphetamines, cocaine, benzodiazepines and methadone in human serum, urine and post-mortem blood as an effective alternative to immunoassay based methods applied in forensic toxicology for preliminary examination, *Forensic Chem.*, 2018;**7**:33-37.
- 146 M. Fagiola, T. Hahn, J. Avella, Screening of Novel Psychoactive Substances in Postmortem Matrices by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS-MS), *J. Anal Toxicol.*, (2018);**42**(8):562-569.
- 147 E. Roda, E. Buscaglia, P. Papa, L. Rocchi, C.A. Locatelli, T. Coccini, Evaluation of two different screening ELISA assays for synthetic cathinones (mephedrone/methcathinone and MDPV) with LC-MS method in intoxicated patients, *J Clin Toxicol.*, 2016;**6**(3), DOI: 10.4172/2161-0495. 1000302.
- 148 S. Rajagopalan, R. Gudihal, Dynamic MRM: A clear advantage for high-throughput protein quantitation, (Application note), Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA. https://www.agilent.com/cs/library/applications/5990-5092en_lo%20CMS.pdf (πρόσβαση: 26/06/2020).
- 149 A. Marin, E. Garcia, A. Garcia, C. Barbas, Validation of a HPLC quantification of acetaminophen, phenylephedrine and chlorphenitamine in pharmaceutical formulations: capsules and sachets, *Pharm. Biomed. Anal.*, 2002;**29**(4):701-714.
- 150 Perform Rugged, Fast LC with Confidence, Agilent infinityLab. https://www.agilent.com/cs/library/brochures/5991-8750EN_InfinityLab_Poroshell120_brochure.pdf (πρόσβαση: 26/06/2020).
- 151 L. K.Sørensen, Determination of cathinones and related ephedrine in forensic whole-blood samples by liquid-chromatography-electrospray tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.*, 2011;**879**(11-12), 727-736.
- 152 R.A. Middleberg, J. Homan, Quantitation of amphetamine stimulants by LC-MS/MS, *Methods Mol Biol.*, (2012);**902**:105-14.
- 153 K. Wolff, R. Brimblecombe, J.C. Forfar, A.R. Forrest, E. Gilvarry, A. Johnston, J. Morgan, M.D. Osselton, L. Read, D. Taylor: Driving Under the Influence of Drugs Report from the Expert Panel on Drug Driving; Department of Transportation: London, UK; 2013
- 154 P. Marquet, E. Lacassie, C. Battu, H. Faubert, G. Lachâtre, Simultaneous determination of amphetamine and its analogs in human whole blood by gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.*, 1997; **24**, 77–82.

-
- 155 C. L. Hornbeck, J. E. Carrig, R. J. Czarny, Detection of a GC/MS artifact peak as methamphetamine. *J. Anal. Toxicol.*, 1993;**17**:257–263.
- 156 M. M. R. Fernández, S. M. R. Wille, N. Samyn, M. Wood, M. López-Rivadulla, G. De Boeck, High-throughput analysis of amphetamines in blood and urine with online solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J Anal Toxicol.*, 2009;**33**(9):578-587.
- 157 C.C Wang, P. Hartmann-Fischbach, T.R. Krueger, A. Lester, A. Simonson, T.L. Wells, M.O. Wolk, N.J. Hidlay, Fast and Sensitive Chiral Analysis of Amphetamines and Cathinones in Equine Urine and Plasma Using Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry, *American Journal of Analytical Chemistry*, (2015);**6**(13):995-1003.
- 158 W. Lechowicz, A. Parczewski, Rapid LC-MS/APCI method for quantitation of MDMA, MDA and MDEA in whole blood, *Problems of Forensic Sciences*, (2004);**60**(LX): 42-57.
- 159 M.K. Bjørk, M.K.K. Nielsen, L.Ø. Markussen, H.B. Klinker, K. Linnet, Determination of 19 drugs of abuse and metabolites in whole blood by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, (2010);**396**(7):2393-2401.
- 160 M.N. Newmeyer, M. Concheiro, M.A. Huestis, Rapid Quantitative Chiral Amphetamines Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry: Method in Plasma and Oral Fluid With a Cost-Effective Chiral Derivatizing Reagent, *Journal of Chromatography A*, (2014);**1358**:68-74.
- 161 S.D. Cooper, B.L. Fletcher, M.A.R. Silinski, S.S. Brown, J.W. Lodge, R.A. Fernando, B. J. Collins, Determination of L-ephedrine, Pseudoephedrine, and Caffeine in Rat Plasma by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, *J Anal Toxicol*, 2011;**35**(6):341-348.
- 162X. Wang, D.I. Vernikovskaya, D.R. Adbelrahman, G.D.V. Hankins, M.S. Ahmed, T.N. Nanovskaya, Simultaneous quantitative determination of bupropion and its three major metabolites in human umbilical cord plasma and placental tissue using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Pharmaceutical and Biochemical Analysis*, (2012);**70**: 320-329.
- 163 M. Jang, J. Kim, I. Shin, S. Kang, H. Choi, W. Yang, Simultaneous Determination of Methylphenidate and Ritalinic Acid in Hair Using LC-MS/MS, *Forensic Sci Int.*, (2019);**294**:183-188.
- 164 A. Gandhi, C. Beekman, R. Parker, L. Fang, A. Babiskin, M.K Matta, Novel and rapid LC–MS/MS method for quantitative analysis of methylphenidate in dried blood spots, *Bioanalysis*, (2018);**10**(11):839-850.
- 165 E.L. Øiestad, U. Johansen, Å.M.L. Øiestad, A.S. Christophersen, Drug screening of whole blood by Ultra-Performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Analytical Toxicology*, (2011); **35**(5):280-293.

-
- 166 J. Chamberlain; (1987), *Analysis of Drugs in Biological Fluids*, 1st Ed., CRC Press, Inc., Boca Raton, FL.
- 167 G. Skopp, Preanalytic aspects in post-mortem toxicology, *Forensic Science International*, (2004);**142**(2-3):75–100.
- 168 S. B. Karch, ed., (1998), *Drug Abuse Handbook*, 1st edition, CRC Press LLC.
- 169 O.H. Drummer, Requirements for bioanalytical procedures in postmortem toxicology, *Anal Bioanal Chem.*, (2007);**388**(7):1495–1503.
- 170 O.H. Drummer, Postmortem toxicology of drugs of abuse, *Forensic Sci. Int.*, (2004);**142**(2-3):101–113.
- 171 A.J. Jenkins; (2008), *Drug Testing in Alternate Biological Specimens*, Humana Press, Totowa, NJ.
- 172 C. Margalho, J. Franco, F. Corte-Real, D.N. Vieira, Illicit drugs in alternative biological specimens: A case report, *J Forensic Leg Med.*, (2011);**18**(3):132–135.
- 173 R. W. Byard; (2005), Neonaticide in *Encyclopedia of Forensic and Legal Medicine*, 3ος τόμος, Elsevier Academic Press, J. Payne-James, R. W. Byard, T. S. Corey, C. Henderson, eds., United Kingdom.
- 174 F. Bevalot, N. Cartiser, C. Bottinelli, L. Fanton, J. Guitton, Vitreous humor analysis for the detection of xenobiotics in forensic toxicology, *Forensic Toxicol.*, (2016); **34**:12–40.
- 175 R.J. Dinis-Oliveira, F. Carvalho, J.A. Duarte, F. Remião, A. Marques, A. Santos, T. Magalhães, Collection of Biological Samples in Forensic Toxicology, *Toxicol Mech Method.*, (2010);**20**(7):363–414.
- 176 R.J. Dinis-Oliveira, T. Magalhaes, Forensic toxicology in drug-facilitated sexual assault, *Toxicol Mech Method.*, (2013);**23**(7):471–478.
- 177 D.I. Hammer, J.F. Finklea, R.H. Hendricks, C.M. Shy, R.J. Horton, Hair trace metal levels and environmental exposure, *Am J of Epidemiol.*, (1971);**93**(2):84– 92.
- 178 L. Kopito, R.K. Byers, H. Shwachman, Lead in hair of children with chronic lead poisoning, *N Engl J Med.*, (1967);**276**(17): 949–953.
- 179 B. S. Levine, R.A. Jufer; (2008), *Drugs-of-Abuse Testing in Vitreous Humor*, in *Alternative Biological Specimens*, Humana Press LLC, Totowa, NJ .
- 180 A. Pelander, J. Ristimaa, I. Ojanpera, Vitrus humor as an alternative matrix for comprehensive drug screening in postmortem toxicology by liquid chromatography—time-of-flight mass spectrometry, *J. Anal. Toxicol.*, (2010);**34**(6):312–318.
- 181 K.M. Clauwaert, J.F. Van Bocxlaer, E.A. De Letter, S. Van Calenbergh, W.E. Lambert, A.P. De Leenheer, Determination of the designer drugs 3,4-methylenedioxymethamphetamine , **34**

methylenedioxyethylamphetamine and 3,4-methylenedioxyamphetamine with HPLC and fluorescence in whole blood, serum, vitreous humor, and urine, *Clin. Chem.*, (2000);**46**(12):1968–1977.

182 C. Margalho, E. Gallardo, A. Castanheira, D.N. Vieira, M. Lopez-Rivadulla, F.C. Real, A validated procedure for detection and quantitation of salvinorin a in pericardial fluid, vitreous humor, whole blood and plasma using solid phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry, *J Chromatogr A.*, (2013);**1304**:203–213.

183 J.Y. Kim, J.C. Cheong, B.J. Ko, S.K. Lee, H.H. Yoo, C. Jin, M.K. In, Simultaneous determination of methamphetamine, 3,4-methylenedioxy-*N*-methylamphetamine, 3,4-methylenedioxy-*N*-ethylamphetamine, *N,N*-dimethylamphetamine, and their metabolites in urine by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry, *Arch Pharm Res.*, (2008);**31**(12):1644-1651.

184 M.R. Lee, S.C. Yu, C.L. Lin, Y.C. Yeh, Solid-phase extraction in amphetamine and methamphetamine analysis of urine, *J Anal Toxicol.*, (1997);**21**(4): 278-282.

185 W. Kwon, S. Suh, M.K. In, J.Y. Kim, Simultaneous determination of methylphenidate, amphetamine and their metabolites in urine using direct injection liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Mass Spectrometry Letters*, (2014);**5**(4): 104-109.

186 C. Yang, H. Liu, D. Lin, R.H. Liu, Y. Hsieh, S. Wu, Simultaneous Quantitation of Methamphetamine, Ketamine, Opiates and Their Metabolites in Urine by SPE and LC-MS-MS, *J Anal Toxicol.*, 2017;**41**(8): 679-68.

187 L. Chen, Y. Yu, G. Duan, X. Wang, B. Shen, P. Xiang, Simultaneous Determination of Selegiline, Desmethylselegiline, R/S-methamphetamine, and R/S-amphetamine on Dried Urine Spots by LC/MS/MS: Application to a Pharmacokinetic Study in Urine, *Front Chem.*, (2019);**7**:248.