



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

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ, ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥ
GC-MS ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΔΙΕΓΕΡΤΙΚΩΝ ΤΥΠΟΥ
ΑΜΦΕΤΑΜΙΝΗΣ, ΣΥΝΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΘΙΝΟΝΩΝ ΚΑΙ
ΦΑΙΝΑΙΘΥΛΑΜΙΝΩΝ ΣΕ ΟΛΙΚΟ ΑΙΜΑ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Χριστόφορος Μπουζούκας
Φαρμακοποιός ΕΚΠΑ

Αθήνα 2023

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης : Φαρμακευτική Ανάλυση – Έλεγχος Ποιότητας

Τίτλος εργασίας: Ανάπτυξη, επικύρωση και εφαρμογές μεθόδου GC-MS για τον προσδιορισμό διεγερτικών τύπου αμφεταμίνης, συνθετικών καθινονών και φαιραιθυλαμινών σε ολικό αίμα.

Χριστόφορος Μπουζούκας

A.M. 201103

Επιβλέπων καθηγητής:

Ιωάννης Παπουτσής

Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

Τριμελής επιτροπή:

Ιωάννης Παπουτσής, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

Ειρήνη Παντερή, Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

Ιωάννης Ντότσικας, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ στο πλαίσιο των μεταπτυχιακών μου σπουδών στο ΠΜΣ ‘‘Φαρμακευτική Ανάλυση – Έλεγχος Ποιότητας’’. Με την ολοκλήρωση αυτής της εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που συνέβαλλαν, ο καθένας με τον τρόπο του, στην άρτια ολοκλήρωση της.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κύριο Ιωάννη Παπουτσή, για την ανάθεση του θέματος, την καθοδήγηση, τις χρήσιμες υποδείξεις του και την υπομονή του σε όλη μου την πορεία στο εργαστήριο. Η συμβολή του ήταν θεμελιώδης όχι μόνο για την ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας αλλά και για την προσωπική μου εξέλιξη στην επιστημονική σκέψη.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κυρία Αρτεμήσια Ντονά, την υποψήφια διδάκτωρ Τάνια Ντούπα, τις αναλύτριες Γεωργία Πετροπούλου και Αρετή Μήνα για την εξοικείωση μου με το εργαστήριο, και την αρμονική συνεργασία μας σε όλα τα επίπεδα.

Ακόμα θέλω να ευχαριστήσω θερμά τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής, τους καθηγητές κυρία Ειρήνη Παντερή και κύριο Ιωάννη Ντότσικα για τον πολύτιμο χρόνο που διέθεσαν για την αξιολόγηση του παρόντος έργου και τις χρήσιμες παρατηρήσεις τους.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και τους φίλους για την στήριξη τους σε όλη την διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

I would rather have questions that can't be answered than answers that can't be questioned.

Richard Feynman

Περιεχόμενα

Πρόλογος.....	ii
Περίληψη.....	vii
Abstract	viii
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΔΙΕΓΕΡΤΙΚΑ ΤΥΠΟΥ ΑΜΦΕΤΑΜΙΝΗΣ.....	1
1.1 Εισαγωγή.....	1
1.2 Ιστορική αναδρομή.....	2
1.3 Δομικά χαρακτηριστικά και χημική ταξινόμηση	4
1.4 Φαρμακολογία διεγερτικών τύπου αμφεταμίνης.....	6
1.5 Τοξικολογία διεγερτικών τύπου αμφεταμίνης.....	9
1.7 Θεραπευτική αντιμετώπιση τοξίκωσης σχετιζόμενης με την χρήση διεγερτικών τύπου αμφεταμίνης	11
1.8 Τοξικοκινητική διεγερτικών τύπου αμφεταμίνης.....	12
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΝΕΕΣ ΨΥΧΟΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ: ΣΥΝΘΕΤΙΚΕΣ ΚΑΘΙΝΟΝΕΣ ΚΑΙ ΦΑΙΝΑΙΘΥΛΑΜΙΝΕΣ.....	14
2.1 Εισαγωγή στις Νέες Ψυχοδραστικές Ουσίες.....	14
2.1.1 Τάσεις και εξελίξεις.....	14
2.2 Συνθετικές καθιόνες	16
2.2.1 Δομικά χαρακτηριστικά συνθετικών καθινονών.....	18
2.2.2 Φαρμακολογία συνθετικών καθινονών	20
2.2.3 Τοξικολογία συνθετικών καθινονών	21
2.2.4 Τοξικοκινητική συνθετικών καθινονών	22
2.3 Φαιναιθυλαμίνες.....	24
2.3.1 Δομικά στοιχεία φαιναιθυλαμινών.....	24
2.3.2 Φαρμακολογία φαιναιθυλαμινών	26
2.3.3 Τοξικολογία φαιναιθυλαμινών	27
2.3.4 Τοξικοκινητική φαιναιθυλαμινών	27
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΒΙΟΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΔΙΕΓΕΡΤΙΚΩΝ ΤΥΠΟΥ ΑΜΦΕΤΑΜΙΝΗΣ, ΣΥΝΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΘΙΝΟΝΩΝ ΚΑΙ ΦΑΙΝΑΙΘΥΛΑΜΙΝΩΝ	29
3.1 Εισαγωγή.....	29
3.2 Προκατεργασία δειγμάτων.....	29
3.2.1 Υγρό-υγρό εκχύλιση.....	30
3.2.2 Εκχύλιση στερεάς φάσης.....	30
3.2.3 Τεχνικές μικροεκχύλισης	31
3.2.4 Παραγωγοποίηση	31
3.3 Χρωματογραφικές τεχνικές συζευγμένες με φασματομετρία μαζών.....	32
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ.....	39
4.1 Αεριοχρωματογράφος-Φασματόμετρο Μαζών (GC-MS).....	39

4.2 Εργαστηριακός εξοπλισμός.....	40
4.3 Αντιδραστήρια, διαλύτες και στήλες εκχύλισης	41
4.4 Βιολογικό υπόστρωμα.....	42
4.5 Πρότυπες ουσίες αναφοράς.....	42
4.6. Διαλύματα παρακαταθήκης.....	44
4.7 Διαλύματα εργασίας.....	45
4.8 Πρότυπα διαλύματα βαθμονόμησης.....	46
4.9 Ρυθμιστικά διαλύματα	50
4.10 Μίγματα διαλυτών.....	51
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ	53
5.1 Προκαταρκτική ανάλυση	53
5.2 Βελτιστοποίηση παραγωγοποίησης.....	53
5.3 Επιλογή εσωτερικού προτύπου	62
5.4 Χρωματογραφικές συνθήκες.....	63
5.5 Βελτιστοποίηση της εκχύλισης	65
5.5.1 Bond Elut C18.....	65
5.5.2 Bond Elut Certify	67
5.4.3 Σύγκριση Bond Elut C18 vs Bond Elut Certify.....	69
5.5 Περιγραφή αναπτυχθείσας μεθόδου.....	72
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗΣ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΧΘΕΙΣΑΣ ΜΕΘΟΔΟΥ	74
6.1 Εκλεκτικότητα.....	74
6.2 Ειδικότητα	74
6.3 Κατώτατα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης	75
6.5 Γραμμικότητα.....	75
6.6 Επαναποσοτικοποίηση των δειγμάτων βαθμονόμησης.....	76
6.7 Επαναληψιμότητα και ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα	76
6.8 Ορθότητα εντός της ημέρας και δια των ημερών.....	77
6.9 Απόλυτη ανάκτηση.....	77
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗΣ ΑΝΑΠΤΥΧΘΕΙΣΑΣ ΜΕΘΟΔΟΥ	78
7.1 Εκλεκτικότητα.....	78
7.2 Ειδικότητα	78
7.3 Κατώτατα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης	79
7.4 Γραμμικότητα.....	85
7.5 Επαναποσοτικοποίηση των δειγμάτων βαθμονόμησης.....	93
7.6 Επαναληψιμότητα και ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα	93
7.7 Ορθότητα εντός της ημέρας και δια των ημερών.....	94
7.8 Απόλυτη ανάκτηση.....	108

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΕ ΑΓΝΩΣΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΟΛΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ	110
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9: ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΟΥΡΩΝ	112
9.1 Έλεγχος γραμμικότητας	112
9.2 Επαναποσοτικοποίηση των δειγμάτων βαθμονόμησης.....	113
9.3 Επαναληψιμότητα εντός της ημέρας	113
9.4 Ορθότητα εντός της ημέρας	113
9.5 Απόλυτη ανάκτηση.....	113
9.6 Ανάλυση άγνωστων δειγμάτων ούρων.....	113
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ	115
Βιβλιογραφία.....	118

Περίληψη

Τα διεγερτικά τύπου αμφεταμίνης και ειδικά τα νεότερα υποκατάστατα αυτών· οι συνθετικές καθιόνες και οι φαιναιθυλαμίνες αποτελούν πρόκληση για τα τοξικολογικά εργαστήρια. Η ευρεία χρήση τους, ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια, έχει οδηγήσει σε αύξηση των δηλητηριάσεων αλλά και των θανατηφόρων περιστατικών στα οποία εμπλέκονται. Για το λόγο, αυτό η ανάπτυξη και επικύρωση νέων αναλυτικών μεθόδων για τον προσδιορισμό τους σε βιολογικά υλικά είναι υψίστης σημασίας, για όλα τα τοξικολογικά εργαστήρια παγκοσμίως, για την ορθότερη διερεύνηση των περιστατικών αυτών.

Σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης ήταν ο προσδιορισμός 9 διεγερτικών τύπου αμφεταμίνης, 7 συνθετικών καθιόνων και 5 φαιναιθυλαμινών σε ολικό αίμα με την χρήση της αεριοχρωματογραφίας συζευγμένη με φασματομέτρο μαζών.

Η προκατεργασία των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με εκχύλιση στερεάς φάσης με χρήση μικτού τύπου στήλης και στη συνέχεια παραγωγοποίηση με πεντάφθοροπροπιονικό ανυδρίτη (PFPA). Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός των 21 αναλυτών επιτεύχθηκε σε κάτω από 11 min. Εν συνεχεία η μέθοδος επικυρώθηκε σύμφωνα με τις διεθνείς κατευθυντήριες οδηγίες ως προς την ειδικότητα, την εκλεκτικότητα, το εύρος της γραμμικότητας, το κατώτατο όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης, την επαναληψιμότητα, την ορθότητα και την ανάκτηση της μεθόδου. Τα όρια ανίχνευσης των αναλυτών κυμάνθηκαν από 0.7-7 ng/mL και οι τιμές των ορίων ποσοτικοποίησης από 2-20 ng/mL. Η γραμμικότητα των 21 αναλυτών αναλόγως την ουσία ήταν 2-200 ng/mL, 5-500 ng/mL, 10-500 ng/mL και 20-500 ng/mL με τιμές $r^2 > 0.99$. Τα ποσοστά ανάκτησης της εκχύλισης ήταν $>80\%$ για το σύνολο των αναλυτών. Η ορθότητα και η επαναληψιμότητα της μεθόδου τόσο εντός όσο και δια των ημερών ήταν εντός των ορίων. Επιπροσθέτως η μέθοδος εκτιμήθηκε ως προς τα χαρακτηριστικά της επικύρωσης του ολικού αίματος και σε δείγματα ούρων σε μία μέρα ανάλυσης.

Η αναπτυχθείσα μέθοδος εφαρμόστηκε σε μεταθανάτια δείγματα αίματος και ούρων 40 δικαστικών υποθέσεων που είχαν αποσταλεί για τοξικολογική διερεύνηση στο Εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών. Από τα αποτελέσματα των αναλύσεων διαπιστώθηκε η παρουσία των διεγερτικών τύπου αμφεταμίνης, ψευδοεφεδρίνη, φαινυλοπροπανολαμίνη, αμφεταμίνη, μεθαμφεταμίνη και MBDB.

Λέξεις Κλειδιά: Διεγερτικά Τύπου Αμφεταμίνης, Συνθετικές Καθιόνες, Φαιναιθυλαμίνες, Αίμα, Αεριοχρωματογραφία- Φασματομετρία Μαζών.

Abstract

Amphetamine-type stimulants and mostly their newer substitutes; synthetic cathinones and phenethylamines pose a challenge to toxicology laboratories. Their extensive use and misuse has led to an increase of intoxications and fatal incidents. So the need for the development and validation of new analytical methods for their determination in biological samples is crucial for all toxicology laboratories worldwide for a better investigation of these cases.

The aim of this study was the determination of 9 amphetamine-type stimulants, 7 synthetic cathinones and 5 phenethylamines in whole blood using gas chromatography coupled with mass spectrometry.

The samples were pretreated by solid-phase extraction using a mixed mode column and then derivatized with pentafluoropropionic anhydride (PFPA). Chromatographic separation of the 21 analytes was achieved in less than 11 min. The method was then validated according to international guidelines for specificity, selectivity, range of linearity, limits of detection and quantification, precision, accuracy and recovery of the method. The LOD of the analytes ranged from 0.7-7 ng/mL and the values of the LOQ ranged from 2-20 ng/mL. The linearity of the 21 analytes depending on the substance were 2-200 ng/mL, 5-500 ng/mL, 10-500 ng/mL and 20-500 ng/mL with r^2 values > 0.99 . Extraction recovery rates were $>80\%$ for all analytes. Intra and inter day accuracy and precision of the method were within accepted limits. In addition, the method was also evaluated in urine samples on a single day of analysis for validation characteristics of whole blood.

The developed method was applied to post-mortem blood and urine samples of 40 forensic cases sent for toxicological investigation to the Department of Forensic Medicine and Toxicology, University of Athens. The results of the analyses revealed the presence of the stimulants amphetamine, pseudoephedrine, phenylpropanolamine, amphetamine, methamphetamine and MBDB.

Keywords: Amphetamine Type Stimulants, Synthetic Cathinones, Phenethylamines, Blood, Gas Chromatography-Mass Spectrometry.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΔΙΕΓΕΡΤΙΚΑ ΤΥΠΟΥ ΑΜΦΕΤΑΜΙΝΗΣ

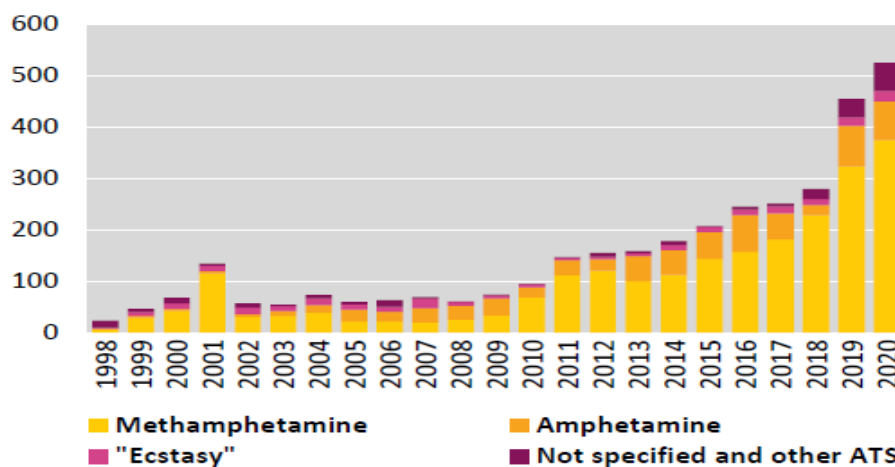
1.1 Εισαγωγή

Η ονομασία διεγερτικά τύπου αμφεταμίνης (ΔΤΑ), (*Amphetamine-Type Stimulants* ή ‘ATS’), εμφανίστηκε για πρώτη φορά το Νοέμβριο του 1996, σε σύσκεψη του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO) στην Γενεύη¹. Οι συμμετέχοντες της συνάντησης, υιοθέτησαν τον όρο αυτό προκειμένου να περιγράψουν τις αμφεταμίνες όπως η αμφεταμίνη και η μεθαμφεταμίνη, την 3,4 μεθυλενοδιόξυμεθαμφεταμίνη (MDMA) και άλλες ψυχοδραστικές ουσίες. Εν συνεχεία ο όρος αυτός ακολουθήθηκε και από άλλες διεθνείς οργανώσεις όπως το Γραφείο των Ηνωμένων Εθνών για τα Ναρκωτικά και το Έγκλημα (UNODC)². Σήμερα τα ΔΤΑ ή αλλιώς τα παράγωγα αμφεταμίνης είναι συνήθως συνθετικά μόρια, παράγωγα της β-φαινυλαιθυλαμίνης και φαρμακολογικά ανήκουν στα διεγερτικά του κεντρικού νευρικού συστήματος. Στα ΔΤΑ περιλαμβάνονται ουσίες όπως οι αμφεταμίνες (αμφεταμίνη και μεθαμφεταμίνη), φαρμακευτικά προϊόντα που γίνονται αντικείμενο κατάχρησης (φαιντερμίνη, μεθυλφαινιδάτη, δεξτρο-αμφεταμίνη κ.α.), τα φυσικά αλκαλοειδή όπως η εφεδρίνη, η ψευδοεφεδρίνη και η καθινόνη και τα τύπου έκστασι ναρκωτικά όπως το MDMA και άλλα δομικά ανάλογα του (π.χ. MDA, MDEA, MBDB κ.α.)^{3,4}.

Οι αμφεταμίνες κατέχουν σημαντική θέση στην θεραπευτική για την αντιμετώπιση ασθενειών όπως η διαταραχή ελλειμματικής προσοχής και υπερκινητικότητας (ΔΕΠΥ) ενηλίκων και παιδών, η ναρκοληψία και βραχυπρόθεσμα στον έλεγχο βάρους σε περιπτώσεις παχυσαρκίας⁵. Η αμφεταμίνη είναι διαθέσιμη στην φαρμακευτική αγορά με τα σκευάσματα Adderal® και Vyvanse® και η μεθαμφεταμίνη με το σκεύασμα Desoxyn®^{6,7}. Η διάθεση τους απαιτεί ειδική συνταγή από ειδικευμένο ιατρό αφού πρόκειται για ουσίες που βρίσκονται στον πίνακα II των ναρκωτικών ουσιών. Επιπλέον τα παράγωγα της αμφεταμίνης είναι ουσίες ελεγχόμενες από τις διεθνείς συμβάσεις για τα ναρκωτικά. Από την άλλη πλευρά, λόγω των διεγερτικών και ψυχοτρόπων δράσεων τους γίνονται συχνά αντικείμενο κατάχρησης για ψυχαγωγικούς σκοπούς ή για την απώλεια βάρους ή για την βελτίωση των νοητικών ικανοτήτων⁸.

Ανάμεσα στα παράγωγα της αμφεταμίνης, εκείνα με τον υψηλότερο βαθμό κατάχρησης σε παγκόσμια κλίμακα κατά φθίνουσα σειρά είναι η μεθαμφεταμίνη, η αμφεταμίνη και το MDMA^{3,9}. Η κυριάρχηση αυτών των ουσιών στην παγκόσμια αγορά οφείλεται στην απλή και ευέλικτη παραγωγική διαδικασία τους, στην διαθεσιμότητα των πρώτων υλών, στο μεγάλο κέρδος για τους παραγωγούς και τις χαμηλές τιμές για τους χρήστες σε σχέση με άλλα διεγερτικά όπως η κοκαΐνη¹⁰. Σύμφωνα με την παγκόσμια αναφορά για τα ναρκωτικά του έτους 2020, 525 τόνοι ΔΤΑ κατασχέθηκαν το 2020 σε παγκόσμιο επίπεδο, διατηρώντας τον ρυθμό

της κατά 15% αύξησης των κατασχέσεων ετησίως. Την δεκαετία 2010-2020 οι κατασχέσεις σε μεθαμφεταμίνη πενταπλασιάστηκαν, σε αμφεταμίνη σχεδόν τετραπλασιάστηκαν και σε MDMA τουλάχιστον τριπλασιάστηκαν³(Εικόνα 1.1).



Εικόνα 1.1: Κατασχέσεις σε ΔΤΑ παγκοσμίως

1.2 Ιστορική αναδρομή

Η δρόγη Ephedra (*ma-huang*) χρησιμοποιείται περισσότερο από 5000 χρόνια στην κινεζική ιατρική για την θεραπεία του άσθματος και του πυρετού^{11,12}. Τα αλκαλοειδή εφεδρίνη και ψευδοεφεδρίνη είναι συστατικά του εκχυλίσματος των φύλλων και του στελέχους του φυτού Ephedra spp. (οικογένεια Ephedraceae). Η έρευνα γύρω από την ανάπτυξη συνθετικών μορίων που θα μιμούνται της φαρμακολογικές δράσεις της εφεδρίνης οδήγησε στην ανάπτυξη των διεγερτικών τύπου αμφεταμίνης¹³. Το 1887 συντέθηκε η αμφεταμίνη από τον Lazăr Edeleanu ο οποίος και την ονόμασε φαινυλοισοπροπυλαμίνη ενώ λίγα χρόνια αργότερα το 1919 ο Akira Ogata συνέθεσε την μεθαμφεταμίνη χρησιμοποιώντας την εφεδρίνη ως πρόδρομο μόριο¹⁴.

Η σκυτάλη στην εξέλιξη της αμφεταμίνης δόθηκε στον Gordon Alles, οπότε το 1929 πραγματοποίησε τις πρώτες κλινικές μελέτες σε ανθρώπους και πειραματόζωα. Η έρευνά του κατάφερε να προσδιορίσει τις συμπαθομιμητικές δράσεις των αμφεταμινών και έθεσε τα θεμέλια για την φαρμακευτική εμπορευματοποίηση της δραστικής ουσίας. Η πρώτη φαρμακοτεχνική μορφή της αμφεταμίνης απαντάται το 1930 από την εταιρία *Smith Kline and French* (SKF) στο ρινικό αποσυμφορητικό *Benzedrine*[®] και 4 χρόνια αργότερα υπό την μορφή δισκίου ως *Benzedrine Sulfate*^{®14}. Ωστόσο, η εκτεταμένη κατάχρηση του ρινικού σκευάσματος *Benzedrine* για ψυχαγωγικούς σκοπούς, οδήγησε τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των Η. Π. Α. (FDA) στην οριστική ανάκληση του το 1959¹¹. Η ίδια εταιρία το 1939 έβγαλε στην αγορά το φάρμακο *Dexedrine*[®] ως πιο δραστικό από το *Benzedrine*, αποτελούμενη από δεξτροαμφεταμίνη⁵.

Το 1959 η εταιρία *S. Pfeiffer* ανέπτυξε το προϊόν *Valo*[®], ένα εισπνεόμενο σκεύασμα περιεκτικότητας 150-200mg μεθαμφεταμίνης¹³. Στην συνέχεια εγκρίθηκαν πολλά φάρμακα με δραστική ουσία την μεθαμφεταμίνη όπως το *Desoxyn*[®] για την θεραπεία της διαταραχής ελλειμματικής προσοχής και υπερκινητικότητας (ΔΕΠΥ), το *Pervitin*[®], το *Obetrol*[®] αποτελούμενο από αμφεταμίνη και μεθαμφεταμίνη για την αντιμετώπιση της παχυσαρκίας και το *Philorpon*[®] στην Ιαπωνία¹⁵.

Κατά την διάρκεια του Β Π.Π., οι αμφεταμίνες άφησαν το αποτύπωμα τους και στις δύο πλευρές του πολέμου. Οι στρατιώτες κατανάλωναν δισκία αμφεταμίνης και μεθαμφεταμίνης ώστε να είναι σε κατάσταση ετοιμότητας με θάρρος και αυτοπεποίθηση στην μάχη, να μην εμφανίζουν εύκολα σημάδια κόπωσης και να καταστέλλουν την πείνα τους. Ιδιαίτερη ήταν η χρήση τους στους πιλότους των μαχητικών αεροσκαφών ώστε να αντέχουν περισσότερες ώρες πτήσης στο πεδίο¹⁵ (Εικόνα 1.2). Σε ανασκόπηση του Bett το 1946, αναφέρει πώς 150 εκατομμύρια δισκία *Benzedrine* διατέθηκαν σε Άγγλους και Αμερικάνους στρατιώτες κατά την διάρκεια των συγκρούσεων στο Β Π.Π.¹⁶.

Οι αρωματικά υποκατεστημένες αμφεταμίνες ή αλλιώς τύπου έκστασι όπως το MDMA και το MDA συντέθηκαν το 1912 και 1910 αντίστοιχα¹¹. Το MDMA αναπτύχθηκε αρχικά ως ένα πρόδρομο μόριο για την σύνθεση νέων ανάλογων με αιμοστατικές ιδιότητες από την Merck¹⁷. Το 1970-1980 διερευνήθηκε η χρήση του στην ψυχιατρική ως επικουρικό μέσο κατά την διάρκεια των ψυχοθεραπειών¹⁸, χωρίς όμως να τεκμηριωθεί η αξία του στην θεραπευτική κι έτσι το 1985 αποφασίστηκε η κατάταξη του στα ναρκωτικά του πίνακα Ι¹⁹. Το MDA, το 1960 πατενταρίστηκε ως δραστική ουσία για την καταστολή του βήχα και ως ανορεξιογόνος παράγοντας με την εμπορική ονομασία *Amphedoxamine*[®]. Η κατάχρηση του λόγω της ψυχοδραστικής του φύσης από το ευρύ κοινό οδήγησε στην κατάταξη του στον πίνακα Ι των ναρκωτικών το 1970¹¹.

Μετά την απαγόρευση του MDMA και του MDA, νεότερες αρωματικά υποκατεστημένες αμφεταμίνες, γνωστές ως 'designers drugs' αναπτύχθηκαν και διείσδυσαν στην παράνομη αγορά ναρκωτικών ουσιών. Τέτοια παραδείγματα είναι το MDEA στα τέλη του 1980 και το MBDB στις αρχές του 1990¹⁷.

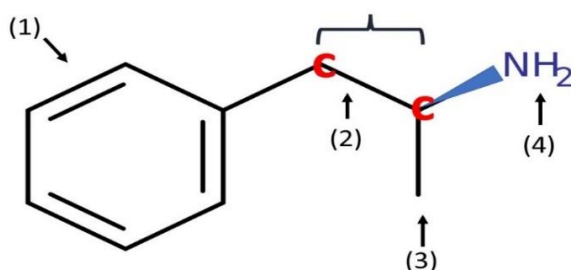


Εικόνα 1.2: Διαφήμιση του Benzedrine inh. με ειδική αναφορά στους πιλότους μάχης

1.3 Δομικά χαρακτηριστικά και χημική ταξινόμηση

Η μελέτη της χημικής δομής των παραγώγων αμφεταμίνης αποδεικνύει ότι αποτελούνται από τον σκελετό της β-φαινυλοισοπροπυλαμίνης, ένα κοινό δομικό χαρακτηριστικό που εμφανίζουν οι βιογενείς νευροδιαβιβαστές ντοπαμίνη και αδρεναλίνη⁵. Όσον αφορά τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες είναι ασθενείς βάσεις με τιμές $pK_a \sim 9.9$, έχουν σχετικά χαμηλά μοριακά βάρη, είναι πτητικές ουσίες, λιπόφιλες και εμφανίζουν χειρόμορφα κέντρα και κατά συνέπεια απαντώνται ως δεξιόστροφα (D) και ως αριστερόστροφα (L) εναντιομερή^{20,21}. Η χαρακτηριστική αυτή δομή, τους επιτρέπει αφενός να διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (ΑΕΦ) και τον πλακούντα²² και αφετέρου να αντιστέκονται στην βιοδιάσπαση τους, ώστε εν τέλει να διεγείρουν την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών από τις νευρικές απολήξεις των κυττάρων²³. Όλα αυτά τα δομικά χαρακτηριστικά στα οποία οφείλονται οι βιολογικές δράσεις των ΔΤΑ συνοψίζονται στον ορισμό που δόθηκε αρχικά από τους Biel και Borp²⁴. Σύμφωνα με τον ορισμό τους, απαιτούνται τα εξής χαρακτηριστικά σε ένα μόριο ώστε να θεωρηθεί αμφεταμίνη:

- 1) Ένας μη υποκατεστημένος φαινολικός δακτύλιος.
- 2) Μια αλυσίδα μήκους δύο ατόμων άνθρακα που λειτουργεί ως συνεκτικό μέσο ανάμεσα στον δακτύλιο της φαινόλης και το άζωτο.
- 3) Η ομάδα του μεθυλίου στην θέση α. Μάλιστα η α-μέθυλο υποκατάσταση είναι υπεύθυνη τόσο για την προστασία έναντι της οξειδωσης ασκώντας στερεοχημική παρεμπόδιση στο ένζυμο MAO-A²⁵ όσο και για την αύξηση της λιποφιλίας του μορίου ώστε να διαπερνά τον ΑΕΦ.
- 4) Μια πρωτατοταγής αμίνη.



Εικόνα 1.3: Βασικά δομικά χαρακτηριστικά αμφεταμινών

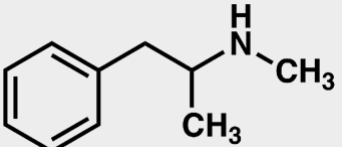
Ωστόσο ο ορισμός αυτός φάνηκε στην συνέχεια απλοϊκός αφού τα φυσικά αλκαλοειδή όπως η εφεδρίνη, η ψευδοεφεδρίνη καθώς και λοιπά συνθετικά αμφεταμινικά παράγωγα παραβιάζουν τον κανόνα υποδηλώνοντας την δομική ποικιλομορφία που παρουσιάζουν οι αμφεταμίνες η οποία αντανακλάται και στην δραστικότητα τους²⁶.

Από την Εικόνα 1.3, παρατηρείται ότι η απλή δομή της αμφεταμίνης επιτρέπει αρκετές χημικές τροποποιήσεις με αποτέλεσμα την δημιουργία ενός πλήθους νέων ενώσεων. Οι δυνητικές χημικές τροποποιήσεις είναι υποκαταστάσεις στους α και β άνθρακες της αλειφατικής αλυσού, στον φαινολικό δακτύλιο και στο αμινικό άκρο. Οι μη υποκατεστημένες αμφεταμίνες επι του φαινολικού δακτυλίου, έχουν την τάση να προκαλούν κυρίως ψυχοκινητική διέγερση δρώντας ως συμπομιμητικά προκαλώντας στον λήπτη αίσθημα ευεξίας και παραγωγικότητας²⁵. Οι υποκαταστάσεις στην πλευρική αλυσίδα ενισχύουν κυρίως τις ψυχοκινητική διέγερση ή την ανορεξία ενώ υποκαταστάσεις στο άζωτο του αμινικού άκρου φέρνει ψυχοκινητική διέγερση σε χαμηλές δόσεις και παρασθησιογόνες σε υψηλότερες δόσεις²⁷.

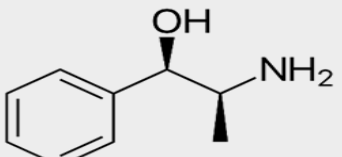
Στον Πίνακα 1.1 ταξινομούνται οι αμφεταμίνες που μελετώνται στην παρούσα διπλωματική εργασία σε συνάρτηση με την χημική τους δομή και την φύση τους αναφορικά με την αμφεταμίνη.

Πίνακας 1.1: Χημική ταξινόμηση ΔΤΑ της διπλωματικής εργασίας

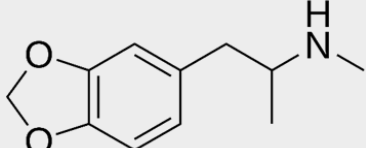
IUPAC	Κοινόχρηστο όνομα	Χημική δομή
1-φαίνυλο-2-προπανολαμίνη	Αμφεταμίνη	
N-μέθυλο υποκατεστημένες αμφεταμίνες		

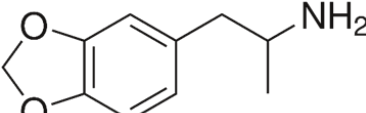
N-μέθυλ-1-φαίνυλο-2-προπανολαμίνη	Μεθαμφεταμίνη	
-----------------------------------	---------------	--

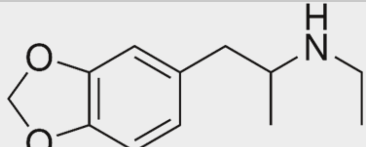
α-άλκυλο υποκατεστημένα παράγωγα

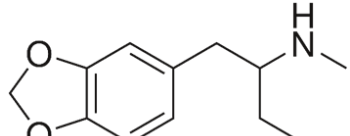
2-άμινο-1-φαίνυλο-1-προπανόλη	Φαινυλοπροπυλαμίνη	
-------------------------------	--------------------	--

3,4-μεθυλενοδιόξυ παράγωγα αμφεταμίνης

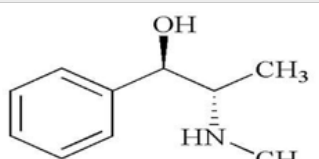
N-μέθυλ-1-(3,4-μεθυλενοδιόξυφαινυλ)-2-προπανολαμίνη	MDMA	
---	------	--

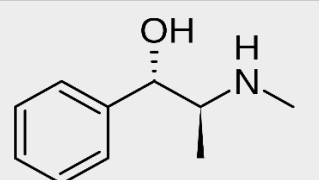
1-(3,4-μεθυλενοδιόξυφαινυλ)-2-προπανολαμίνη	MDA	
---	-----	--

1-(1,3-βένζοδιόξυ-5-υλ)-N-αιθυλο-2-προπανολαμίνη	MDEA	
--	------	---

N-μέθυλ-1-(1,3-βενζοδιόξο-5-υλ)-2-βουτυλαμίνη	MBDB	
---	------	--

Φυσικά αλκαλοειδή αμφεταμίνης

(1R,2S)-2-(μεθυλάμινο)-1-φαίνυλοπροπαν-1-όλη	Εφεδρίνη	
--	----------	---

(1S,2S)-2-(μεθυλάμινο)-1-φαίνυλοπροπαν-1-όλη	Ψευδοεφεδρίνη	
--	---------------	---

1.4 Φαρμακολογία διεγερτικών τύπου αμφεταμίνης

Η αμφεταμίνη και τα παράγωγα της, φαρμακολογικά κατατάσσονται στα διεγερτικά του κεντρικού και του περιφερικού νευρικού συστήματος²⁸. Είναι χειρόμορφες ενώσεις με κάθε

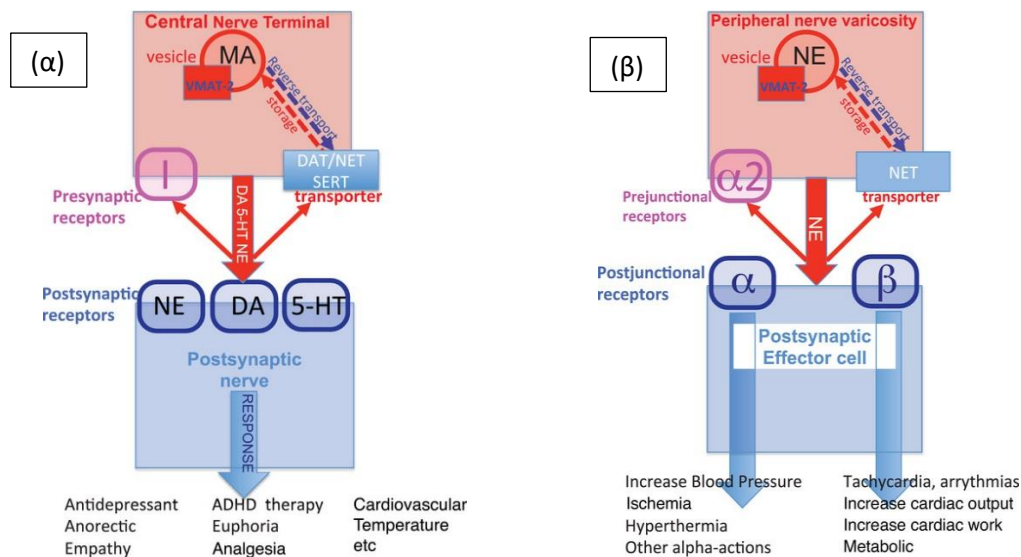
εναντιομερή μορφή να εμφανίζει διαφορετικό τύπο και ένταση δράσης²⁹. Τα δεξιόστροφα εναντιομερή έχουν κυρίως κεντρική δράση με 5 φορές ισχυρότερη ψυχοδιεγερτική επίδραση από ότι τα αριστερόστροφα εναντιομερή· τα οποία ασκούν μεγαλύτερη δράση στο περιφερικό νευρικό σύστημα^{10,21}.

Η δομική ομοιότητα της αμφεταμίνης με τους μονοάμινο νευροδιαβιβαστές όπως η ντοπαμίνη (DA), η νορεπινεφρίνη (NE) και η σεροτονίνη (5-HT), διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο μηχανισμό δράσης των αμφεταμινών, ο οποίος στηρίζεται στην ρύθμιση του μονοαμινοεργικού συστήματος⁵. Πιο συγκεκριμένα, επιδρούν στις αντλίες των μονοαμινών (SERT, DAT, SERT), στα κυστίδια αποθήκευσης αυτών, στο μεταβολισμό τους από τις μονοαμινοοξειδάσες (MAO-A, MAO-B) και σε μετασυναπτικούς υποδοχείς³⁰⁻³².

Οι βασικοί μοριακοί στόχοι των αμφεταμινών είναι οι αντλίες της σεροτονίνης (SERT), της νορεπινεφρίνης (NET) και κυρίως της ντοπαμίνης (DAT) στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) και στο περιφερικό νευρικό σύστημα²⁶. Οι αντλίες αυτές είναι υπεύθυνες για την επαναπρόσληψη των νευροδιαβιβαστών με ενεργή μεταφορά, εντοπίζονται περισυναπτικά και είναι μέλη μιας ευρύτερης οικογένειας αντλιών, που η λειτουργία τους εξαρτάται από την συγκέντρωση των ιόντων Na^+ ^{33,34}. Κατά την επαναπρόσληψη των μονοαμινών μέσω αυτών των αντλιών, οι νευροδιαβιβαστές μεταφέρονται από το συναπτικό χάσμα στα κυτοσόλια του προσυναπτικού νευρώνα. Έπειτα, οι νευροδιαβιβαστές μεταφέρονται από το κυτοσόλιο στα ειδικά κυστίδια αποθήκευσης μέσω του μεμβρανικού μεταφορέα μονοαμινών (VMAT2) ή μεταβολίζονται από τις μονοαμινοοξειδάσες τύπου A (MAO-A) ή τύπου B (MAO-B)²⁶.

Οι αμφεταμίνες μιμούνται τους νευροδιαβιβαστές και δρουν ως υποστρώματα για τις αντλίες SERT, NET και DAT. Επομένως μεταφέρονται μέσω αυτών στα κυτοσόλια αντί των νευροδιαβιβαστών, αναστέλλοντας έτσι την επαναπρόσληψη τους στον προσυναπτικό νευρώνα. Η αναστολή της επαναπρόσληψης των μονοαμινών οδηγεί στην αυξημένη συγκέντρωσή τους στο συναπτικό χάσμα με αποτέλεσμα την αύξηση της έντασης και της διάρκειας της διέγερσης του μετασυναπτικού νευρώνα²⁶. Επιπλέον οι αμφεταμίνες συνδέονται με τον VMAT2 προκαλώντας αντιστροφή της λειτουργίας του, δηλαδή την μεταφορά των μονοαμινών από τα κυστίδια αποθήκευσης στο κυτόπλασμα και την μετέπειτα απελευθέρωση τους στο συναπτικό χάσμα^{28,35}. Άλλος ένας μηχανισμός δράσης κυρίως των 3,4-μεθυλονοδιόξυ παραγώγων της αμφεταμίνης, είναι η αναστολή του ενζύμου MAO με συνέπεια την περεταίρω αύξηση της συγκέντρωσης των διαθέσιμων νευροδιαβιβαστών που είναι ικανές να απελευθερωθούν στο συναπτικό χάσμα³⁶.

Είναι άξιο παρατήρησης ότι ενώ στο ΚΝΣ οι αδρενεργικές, οι σεροτονινεργικές και οι νοτοπαμινεργικές συνάψεις αποτελούν μοριακό στόχο των αμφεταμινών, στο περιφερικό νευρικό σύστημα, ο κύριος μοριακός στόχος των αμφεταμινών είναι μόνο οι αντλίες νορεπινεφρίνης NET^{28,29} (Εικόνα 1.4).



Εικόνα 1.4: Μηχανισμός δράσης αμφεταμινών στο κεντρικό νευρικό σύστημα (α) και στο περιφερικό νευρικό σύστημα (β).

Στον Πίνακα 1.2 συνοψίζονται οι δράσεις των παραγώγων αμφεταμίνης ανάλογα με το είδος της νευρικής σύναψης.

Πίνακας 1.2: Κλινικές εκδηλώσεις παραγώνων αμφεταμίνης²⁹

	Νοραδρενεργικό	Σεροτονινεργικό	Ντοπαμινεργικό
Επιθυμητές δράσεις	• Βελτίωση μνήμης • Αυξημένο επίπεδο διέγερσης • Μείωση κόπωσης • Υπνηλία • Καταστολή όρεξης	• Παραισθησιογόνες επιδράσεις • Τροποποίηση της αντίληψης του πόνου • Αυξημένο επίπεδο γνωστικών λειτουργιών • Σεξουαλική διέγερση	• Αίσθημα ευφορίας • Εντακτογόνος δράση • Αίσθημα ανταμοιβής
Ανεπιθύμητες δράσεις	• Ταχυκαρδία • Υπέρταση • Ταχύπνοια • Υπερθερμία • Υπονατρίαμια • Αγγειοσυστολή • Αϋπνία • Ευερεθιστότητα • Μυδρίαση	• Υπερθερμία • Παρατεταμένη αγγειοσυστολή • Σπασμοί • Αύξηση επιθετικότητας • Μείωση χρόνου αντίδρασης • Σεροτονινεργικό σύνδρομο	• Αδράνεια • Αργή απόκριση στην επίλυση νέων προβλημάτων • Ψυχοκινητικές επιδράσεις (γρήγορες και ακανόνιστες κινήσεις) • Απώλεια μνήμης • Οξύ ψυχωτικό επεισόδιο • Παράνοια • Εθισμός
	• Νευροτοξικότητα • Ανοχή		

1.5 Τοξικολογία διεγερτικών τύπου αμφεταμίνης

Μολονότι οι αμφεταμίνες χρησιμοποιούνται στο πλαίσιο της κατάχρησης για τις ευφορικές τους ιδιότητες και την αυξημένη ενέργεια, η χρήση τους συνοδεύεται με πολλές ανεπιθύμητες ενέργειες, οι οποίες μπορούν να αποβούν θανατηφόρες³⁷. Μάλιστα η αμφεταμίνη συσχετίστηκε για πρώτη φορά με αιφνίδιο θάνατο σε ένα νεαρό άτομο το 1939³⁸. Οι αιφνίδιοι

θάνατοι οφείλονται κατά πρώτον στην καρδιοτοξικότητα και δευτερογενώς σε αγγειακά προβλήματα ενώ σε κάθε περίπτωση ο κίνδυνος αυξάνεται από την υπερθερμία²⁸.

Η καρδιοτοξικότητα οφείλεται στην υπεραδρενεργική κατάσταση που προκαλούν οι αμφεταμίνες και εξαρτάται από το είδος της αμφεταμίνης, την οδό χορήγησης αλλά και φαρμακογενετικούς παράγοντες³⁹. Αξίζει ακόμα να σημειωθεί ότι η ένταση των αδρενεργικών επιπτώσεων στο περιφερικό νευρικό σύστημα έχει άμεση σχέση και με την νεύρωση του εκάστοτε ιστού· για παράδειγμα ο καρδιακός ιστός έχει μεγαλύτερη νεύρωση από τις λείες μυϊκές ίνες των αγγείων, οπότε μια χαμηλή δόση ενός διεγερτικού αμφεταμίνης θα προκαλέσει ισχυρότερη ταχυκαρδία από ότι αύξηση της αρτηριακής πίεσης⁴⁰. Η δράση των αμφεταμινών στο ΚΝΣ και ειδικά των 3,4-μεθυλενοδιόξυ παραγώγων της αμφεταμίνης συνεπάγεται την πρόκληση υπερθεμίας, μέσω επίδρασης της σεροτονίνης στο κέντρο ρύθμισης της θερμοκρασίας στον υποθάλαμο. Η ανεπιθύμητη κατάσταση της υπερθερμίας αποτελεί το προστάδιο της υπερπυρεξίας, μια κατάσταση δυνητικά θανατηφόρα⁴¹.

Στο περιφερικό νευρικό σύστημα προκαλείται υπεραδρενεργική απόκριση με αποτελέσματα όπως η ταχυκαρδία και οι αρρυθμίες. Απότοκο είναι η αύξηση της αιματικής εγκεφαλικής ροής κατά 30%, ειδικά στον αριστερό μετωπιαίο λοβό και η πρόκληση εσωτερικής αιμορραγίας και εγκεφαλικών επεισοδίων⁴². Επιπλέον προκαλείται αγγειοσυστολή των περιφερικών αγγείων που αιματώνουν την καρδιά με συνέπεια την αύξηση της περιφερικής αγγειακής αντίστασης, την αύξηση της αρτηριακής πίεσης και την αύξηση του καρδιακού έργου. Επιπροσθέτως, αγγειοσυστολή συμβαίνει στα στεφανιαία αγγεία και στα αγγεία του δέρματος με επακόλουθο την μειωμένη απώλεια θερμότητας και την πρόκληση υπερθερμίας²⁸. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η λήψη αμφεταμινικών παραγώγων έχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την στεφανιαία νόσο και την υπαραχνοειδή αιμορραγία εγκεφάλου, ενώ η χρόνια λήψη τους συνδέεται με ραβδομυόλυση, μυοκαρδιοπάθεια και έμφραγμα του μυοκαρδίου⁴³. Μια ακόμα σημαντική παρατήρηση είναι ότι το MDMA έχει την τάση να επηρεάζει σε μεγαλύτερο βαθμό την αρτηριακή πίεση στις γυναίκες από ότι στους άνδρες^{44,45}.

Ακόμα μια ανεπιθύμητη ενέργεια των αμφεταμινών ειδικά του MDMA είναι η διέγερση της αντιδιουρητικής ορμόνης (ADH), γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρή υπονατρίαμια⁴⁶. Η υπονατρίαμια σε συνέργεια με την υπερθερμία ειδικά σε κλειστούς χώρους συνωστισμού όπως νυχτερινά κέντρα διασκέδασης, οδηγεί τους χρήστες στην υπερβολική κατανάλωση νερού και σε επερχόμενη δηλητηρίαση από το νερό, γεγονός που έχει συσχετιστεί με θανάτους λόγω εγκεφαλικού οίδηματος⁴⁶.

Εξίσου σημαντικές είναι και οι επιδράσεις στην ψυχική υγεία των χρηστών αμφεταμινών. Η κλινική εικόνα κυμαίνεται από ταραχή σε πιο βαριά ψυχωτικά επεισόδια, παράνοια, αυτοκτονικούς ιδεασμούς και σπασμούς. Τα πιο συνήθη συμπτώματα είναι παράνοια, εχθρικότητα, επιθετικότητα και πολλές φορές συνδυάζονται με αυτοκτονικές και ανθρωποκτονικές τάσεις⁴².

1.7 Θεραπευτική αντιμετώπιση τοξίκωσης σχετιζόμενης με την χρήση διεγερτικών τύπου αμφεταμίνης

Τα δεδομένα από τα τμήματα επείγοντων περιστατικών των νοσοκομείων της Ευρώπης, τα οποία παρακολουθούνται από το πρόγραμμα *Euro Den plus* του Ευρωπαϊκού Κέντρου Παρακολούθησης Ναρκωτικών και Τοξικομανίας (EMCDDA), υποδηλώνουν ότι κάθε χρόνο χιλιάδες άνθρωποι βιώνουν επεισόδια οξείας τοξίκωσης λόγω της χρήσης ψυχοδραστικών ουσιών με αποτέλεσμα την επείγουσα εισαγωγή τους στο νοσοκομείο^{47,48}. Η τοξικότητα των αμφεταμινικών παραγώγων οδηγεί τους χρήστες στα επείγοντα περιστατικά με εκδηλώσεις ψυχοκινητικής διέγερσης και υπεραδρενεργικής κατάστασης⁴⁹. Σε αντίθεση με άλλες ουσίες όπως τα οπιοειδή και οι βενζοδιαζεπίνες, στην περίπτωση των ΔΤΑ δεν υπάρχει ειδικό αντίδοτο και στόχος είναι η συμπτωματική αντιμετώπιση και η μείωση των επιπτώσεων στο ΚΝΣ και στο καρδιαγγειακό⁵⁰.

Η αντιμετώπιση της ψυχοκινητικής διέγερσης εξαρτάται από την βαρύτητα της κλινικής εικόνας του ασθενή. Σε ήπια ψυχοκινητική διέγερση με φυσιολογικά ζωτικά σημεία, αρκεί ο εφησυχασμός, η συζήτηση με τον ασθενή και η μείωση της έντασης (ήρεμο περιβάλλον, κατανόηση, ασφαλές κλίμα). Σε αυξημένη ψυχοκινητική διέγερση με ανησυχία και μυϊκή υπερδραστηριότητα επιλέγεται η καταστολή του ασθενούς. Επομένως χορηγούνται βενζοδιαζεπίνες βραχείας δράσεως I.V. όπως η μιδαζολάμη και συμπληρωματικά ως δεύτερης γραμμής θεραπεία αντιψυχωτικά φάρμακα όπως η αλοπεριδόλη ή αλλά. Τα αντιψυχωτικά είναι δεύτερης γραμμής λόγω του κινδύνου παράτασης του διαστήματος QT και λοιπών εξωπυραμικών συμπτωμάτων⁵¹. Για την περίπτωση εμφάνισης επιληπτικών κρίσεων χορηγούνται ενδοφλέβια βενζοδιαζεπίνες όπως διαζεπάμη ή λοραζεπάμη, ενώ αν δεν ανταποκριθεί σε αυτές ο ασθενής ή εμφανιστεί νέα επιληπτική κρίση, τότε δίνεται φαινοβαρβιτάλη ή ένα ταχείας δράσης βαρβιτουρικό όπως η θειοπεντάλη⁵⁰.

Για τις καρδιαγγειακές επιπλοκές όπως η ισχαιμία μυοκαρδίου, χορηγούνται ως φάρμακα πρώτης γραμμής ασπιρίνη, νιτρογλυκερίνη και βενζοδιαζεπίνες. Σαν δεύτερης γραμμής επιλέγονται οι αναστολείς διαύλων Ca^{2+} όπως η βεραπαμίλη και α-αποκλειστές όπως η φαινοτολαμίνη. Όσον αφορά τις αρρυθμίες οι συχνότερα εμφανιζόμενες είναι η κολπική

ταχυκαρδία και έκτακτες κοιλιακές συστολές, οι οποίες είναι συνήθως παροδικές και ανταποκρινόμενες στη χορήγηση βενζοδιαζεπινών. Αντενδείκνυται η χορήγηση αντιαρρυθμικών τύπου Ia (προκαϊναμίδη, κινιδίνη, δισοπυραμίδη) και εφόσον κρίνεται αναγκαίο προτιμάται η χρήση β-αποκλειστών σαν την λαμπεταλόλη. Η υπέρταση σπάνια χρήζει επείγουσας αντιμετώπισης γιατί είναι παροδική και ανταποκρίνεται στην ηρεμιστική δράση των βενζοδιαζεπινών. Ωστόσο σε κλινική εικόνα με αρτηριακή πίεση ανώτερη από 230/150 mmHg χορηγείται νιτροπρωσσικό νάτριο I.V. και αν συνυπάρχει κλινικά σημαντική ταχυκαρδία χορηγείται λαμπεταλόλη I.V.⁵⁰.

Σε άλλες καταστάσεις όπως η υπερθερμία, ο στόχος είναι η πτώση της θερμοκρασίας κάτω από τους 40 °C. Η χρήση της δαντρολένης πλέον αμφισβητείται ενώ τα αντιπυρετικά δεν είναι αποτελεσματικά. Έτσι, γίνεται τοποθέτηση πάγου στις μηροβουβωνικές πτυχές και στις μασχालιαίες κοιλότητες και άφθονη χορήγηση υγρών.

Η ραβδομύλωση είναι μια επείγουσα κατάσταση καθώς υπάρχει κίνδυνος οξείας νεφρικής ανεπάρκειας. Απαιτείται άμεση νεφρολογική εκτίμηση και στην συνέχεια άφθονη χορήγηση κρυσταλλοειδών διαλυμάτων ενδοφλεβίως. Επίσης, χρήσιμη είναι η οξίνιση των ούρων καθώς σε αλκαλικό pH οι αμφεταμίνες ως ασθενείς βάσεις βρίσκονται στην μοριακή μορφή τους και μπορούν να υποστούν σωληναριακή επαναπορρόφηση^{50,52}.

1.8 Τοξικοκινητική διεγερτικών τύπου αμφεταμίνης

Τα ΔΤΑ εμφανίζουν ποικιλία ως προς την φαρμακοτεχνική μορφή και την οδό χορήγησης τους με τις πιο συνηθισμένες να είναι η από του στόματος λήψη δισκίων ή καψουλών (p.o), μέσω καπνίσματος με χρήση ειδικής υαλώδους πίπας ή ρινική εμφύσηση κοινώς “σνιφάρισμα” της σκόνης, ενδοφλέβια (IV) από διάλυμα, ορθικά ή κολπικά με χρήση υπόθετου²³. Η ενδοφλέβια οδός επιτυγχάνει πιο γρήγορα C_{max} επίπεδα στο αίμα, μετά ακολουθεί το κάπνισμα, η χρήση υπόθετου μέσω κολπικής ή ορθικής οδού, το “σνιφάρισμα” και τέλος η από του στόματος λήψη⁵³.

Από τοξικοκινητικής πλευράς, οι αμφεταμίνες είναι μια ομοιογενής ομάδα ουσιών, με τα εξής χαρακτηριστικά⁵⁴:

- υψηλή βιοδιαθεσιμότητα όταν λαμβάνονται από του στόματος (p.o)
- υψηλό όγκο κατανομής (V_m= 4L)
- χαμηλή πρωτεϊνική σύνδεση (συνήθως < 20%)
- ο χρόνος ημιζωής τους είναι 6-12 h

Οι περισσότερες αμφεταμίνες μεταβολίζονται στο ήπαρ, όμως ένα σημαντικό ποσοστό από αυτές απεκκρίνονται από τους νεφρούς αμετάβλητες. Οι φυσικοχημικές τους ιδιότητες επιτρέπουν σε αυτά τα μόρια να διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, τις κυτταρικές διπλοστοιβάδες και τον πλακούντα. Επιπλέον κατανέμονται σε βιολογικά υγρά με pH μικρότερο από το αίμα όπως το σάλιο και ο ιδρώτας⁵⁴. Η απέκκρισή τους λαμβάνει χώρα κυρίως μέσω των νεφρών, με το pH των ούρων να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε αυτή τη διαδικασία. Ως ασθενείς βάσεις, σε όξινο pH είναι ιοντισμένες και απεκκρίνονται περισσότερο ενώ σε βασικό pH συμβαίνει το αντίστροφο⁵⁵⁻⁵⁷. Για το λόγο αυτό υπάρχει μια διακύμανση στο χρόνο ημίσειας ζωής τους μεταξύ των χρηστών και δεύτερον έτσι αιτιολογείται η κατανάλωση διττανθρακικών από τους χρήστες, ώστε να παρατείνουν την διάρκεια δράσης των ΔΤΑ.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΝΕΕΣ ΨΥΧΟΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ: ΣΥΝΘΕΤΙΚΕΣ ΚΑΘΙΝΟΝΕΣ ΚΑΙ ΦΑΙΝΑΙΘΥΛΑΜΙΝΕΣ

2.1 Εισαγωγή στις Νέες Ψυχοδραστικές Ουσίες

Σύμφωνα με απόφαση συμβουλίου (2005/387/JHA) του EMCDDA, νέες ψυχοδραστικές ουσίες (ΝΨΟ) ονομάζονται όλες οι ψυχοτρόπες ουσίες στην καθαρή τους μορφή ή μορφοποιημένες, οι οποίες δεν ελέγχονται από την Ενιαία Σύμβαση των Ηνωμένων Εθνών περί Ναρκωτικών του 1961, όπως τροποποιήθηκε με το πρωτόκολλο του 1972, ή από τη Σύμβαση των Ηνωμένων Εθνών περί Ψυχοτρόπων Ουσιών του 1971 αλλά ενδέχεται να συνιστούν κινδύνους για την υγεία ή την κοινωνία παρόμοιους με εκείνους από τις ουσίες οι οποίες περιλαμβάνονται στις εν λόγω Συμβάσεις. Επιπλέον διευκρινίζεται ότι με τον όρο “νέα”, δεν σημαίνει απαραίτητα μια νέα ανακάλυψη ουσίας αλλά μια πρόσφατη προσθήκη ουσίας στην παράνομη διακίνηση ουσιών⁵⁸.

Η σύνθεση των ΝΨΟ οφείλεται σε δομικές τροποποιήσεις των ήδη υπαρχόντων παράνομων ουσιών που ελέγχονται από την σύμβαση των Ηνωμένων Εθνών για τα ναρκωτικά. Επομένως η νέα ουσία αφενός μιμείται την δράση της παράνομης ουσίας κι αφετέρου δεν περιορίζεται από νομοθετικούς φραγμούς⁵⁹. Οι ουσίες αυτές εμφανίζουν ποικιλία ως προς την χημική δομή, την προέλευση (φυσικές είτε συνθετικές) και ως προς την φαρμακολογική δράση τους (παραισθησιογόνα, διεγερτικά και κατασταλτικά)⁶⁰. Λαμβάνοντας υπόψη τη χημική δομή τους, το UNODC κατηγοριοποιεί τις ΝΨΟ σε 9 ομάδες: συνθετικά κανναβινοειδή, φαιραιθυλαμίνες, συνθετικές καθιόνες, πιπεραζίνες, τρυπταμίνες, κεταμίνη, φυτικής προέλευσης ουσίες, αμινοϊνδάνες και ουσίες τύπου φαινκυκλιδίνης⁶¹. Μεταξύ των ΝΨΟ οι συνθετικές καθιόνες και οι φαιραιθυλαμίνες μοιάζουν ως προς την χημική δομή τους με τα ΔΤΑ¹⁰ και αποτελούν την δεύτερη και την τρίτη μεγαλύτερη ομάδα ΝΨΟ αντίστοιχα⁴⁸.

2.1.1 Τάσεις και εξελίξεις

Η πρώτη εμφάνιση ΝΨΟ στην παράνομη αγορά της Ευρώπης χρονολογείται στις αρχές του 2000 με την βενζυλοπιπεραζίνη (BZP), τη ναφυρόνη και αργότερα τη μεφεδρόνη να προωθούνται ως νόμιμες εναλλακτικές ουσίες ή ως ίδιες για την αμφεταμίνη και το MDMA. Η εμφάνιση τους ενισχύθηκε κι από το γεγονός ότι κάλυπταν το κενό που είχε δημιουργηθεί στην αγορά λόγω χαμηλής διαθεσιμότητας των γνωστών παράνομων ουσιών⁵⁹.

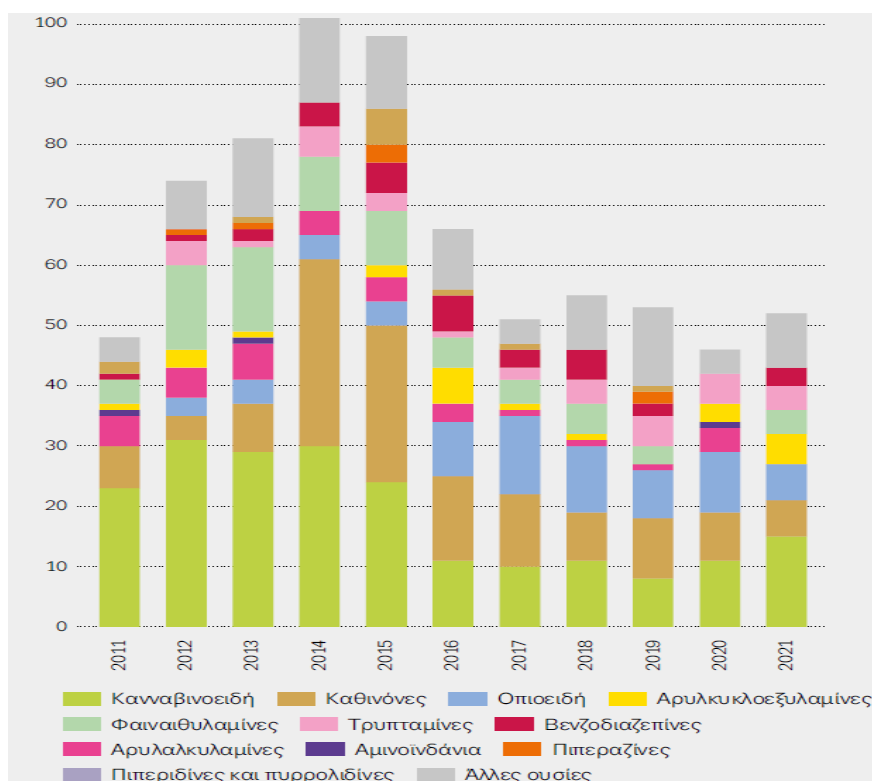
Τα πρώτα συνθετικά μόρια ήταν γνωστά ως “*designers drugs*” και η παραγωγή τους γινόταν από εγκληματικές ομάδες σε αυτοσχέδια παράνομα εργαστήρια, όπου μπορούσαν να επιτύχουν

παραγωγή μικρής κλίμακας. Η ανάπτυξη πολλών ΝΨΟ στα παράνομα εργαστήρια οφείλεται στη μη χρήση κατάλληλων πρώτων υλών είτε από λάθος είτε επίτηδες για την παραγωγή μιας νέας ουσίας. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι το PMMA από την παρασκευή του MDMA και η 4-μέθυλαμφεταμίνη από την παρασκευή της αμφεταμίνης⁶².

Η παραγωγική διαδικασία απέκτησε διαστάσεις βιομηχανικής κλίμακας με την εμπλοκή φαρμακευτικών και χημικών εργοστασίων σε Ινδία και Κίνα, παράγοντας τεράστιες ποσότητες. Από εκεί μεταφέρονταν στην Ευρώπη για την μορφοποίηση, την τελική συσκευασία και την περαιτέρω διανομή τους στα σημεία πώλησης. Η προώθηση των ΝΨΟ στην αγορά πλέον γίνεται με τις ονομασίες *“legal highs”* και *“research chemicals”* σε προϊόντα που φέρουν την επισήμανση *“δεν προορίζεται για ανθρώπινη χρήση”*. Έτσι, πωλούνται στο διαδίκτυο και σε συμβατικά καταστήματα χωρίς να έχουν την υποχρέωση για έλεγχο από τις ρυθμιστικές αρχές⁵⁹. Ενίοτε, οι ΝΨΟ προωθούνται κι ως συμπληρώματα διατροφής στοχεύοντας στο καταναλωτικό κοινό που αναζητά την ενίσχυση των νοητικών και σωματικών ικανοτήτων⁶².

Τα τελευταία χρόνια ιδιαίτερη ανησυχία προκαλεί το φαινόμενο διασταύρωσης των παράνομων ουσιών με τις ΝΨΟ. Έχουν παρατηρηθεί προϊόντα κάνναβης πτωχά σε THC, να είναι νοθευμένα με συνθετικά καναβινοειδή. Επιπροσθέτως, ψευδεπίγραφα φάρμακα όπως δισκία οξυκοδόνης, στα οποία διαπιστώθηκε περιεκτικότητα σε ισχυρά βενζιμιδαζόλια και δισκία αλπραζολάμης (Xanax) και διαζεπάμης (Stedon) θετικά σε έλεγχο για νέες συνθετικές βενζοδιαζεπίνες. Απότοκο είναι η έκθεση των ατόμων που κάνουν χρήση αυτών των προϊόντων εν αγνοία τους, σε ΝΨΟ και κατ'έκταση σε κίνδυνο την υγεία τους⁴⁸.

Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή έκθεση για τα Ναρκωτικά του EMCDDA για το έτος 2022, ο ρυθμός εισαγωγής ΝΨΟ στην αγορά έχει σταθεροποιηθεί τα τελευταία χρόνια με κατά μέσο όρο 50 ΝΨΟ να εντοπίζονται για πρώτη φορά κάθε χρόνο από το σύστημα έγκαιρης προειδοποίησης της ΕΕ. Σήμερα βρίσκονται υπό έλεγχο 884 ΝΨΟ με τις 52 εξ αυτών να παρατηρούνται για πρώτη φορά το 2021⁴⁸ (Εικόνα 2.1).

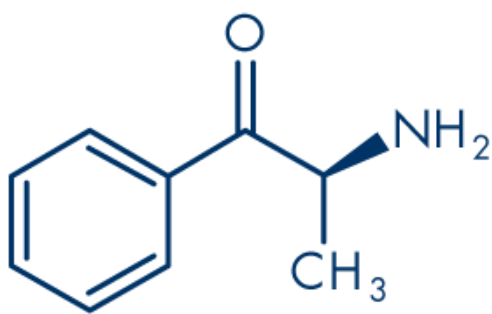


Εικόνα 2.1: Αριθμός και κύριες ομάδες νέων ψυχοδραστικών ουσιών που αναφέρθηκαν μέσω του συστήματος έγκαιρης προειδοποίησης της ΕΕ για πρώτη φορά, 2011–2021

Για τις ΝΨΟ υπάρχουν ελάχιστες ή και καθόλου πληροφορίες σχετικά με την φαρμακοκινητική-φαρμακοδυναμική συμπεριφορά και την τοξικότητα τους. Επιπλέον οι διαδικασίες παραγωγής τους δεν υπόκεινται σε πρακτικές και ελέγχους ποιότητας με αποτέλεσμα να μην είναι γνωστή η ποιοτική και ποσοτική σύσταση τους⁶³. Ως άμεση συνέπεια αυτού, είναι η σταθερή αύξηση των καταγεγραμμένων περιστατικών οξείας τοξικότητας στα τμήματα επειγόντων περιστατικών αλλά και οι θάνατοι σε ορισμένες περιπτώσεις^{37,47}.

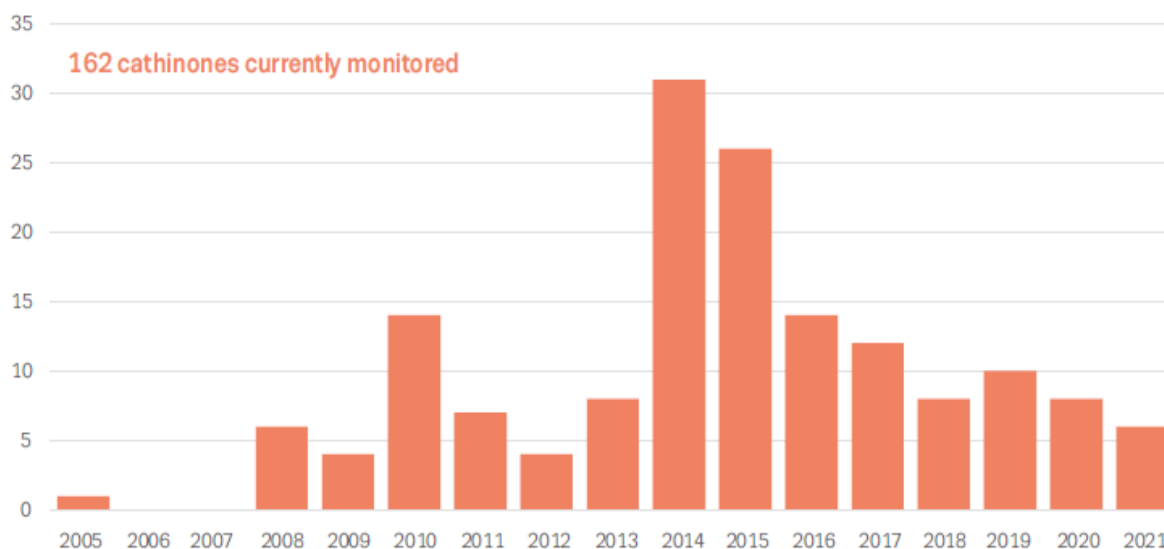
2.2 Συνθετικές καθινόνες

Οι συνθετικές καθινόνες είναι παράγωγα της καθινόνης, η οποία είναι ένα αλκαλοειδές, ανάλογο β-κετόνης της αμφεταμίνης και εντοπίζεται ως δευτερογενής μεταβολίτης στα νωπά φύλλα του φυτού *Catha edulis* (*khat*)⁶⁴ (Εικόνα 2.2). Στις χώρες της Μέσης Ανατολής και ειδικά στην Υεμένη είναι ιδιαίτερα δημοφιλές φυτό καθώς το μάσημα των φύλλων του προσφέρει ψυχοδραστικές ιδιότητες⁶⁵. Για τα συνθετικά ανάλογα της καθινόνης υπάρχουν αναφορές από τα τέλη του 1920, με πολλά από αυτά τα παράγωγα να έχουν δοκιμαστεί σε κλινικές μελέτες ως υπονήφια φάρμακα⁶⁶. Ωστόσο, μόνο η βουπροπιόνη έχει εγκριθεί σήμερα ως φάρμακο σε Ευρώπη και Η.Π.Α. με ενδείξεις ως άτυπο αντικαταθλιπτικό και επικουρικά στην διακοπή του καπνίσματος⁶⁷.



Εικόνα 2.2. : α) Χημική δομή καθινόνης β) Φύλλα από το φυτό *Catha edulis*

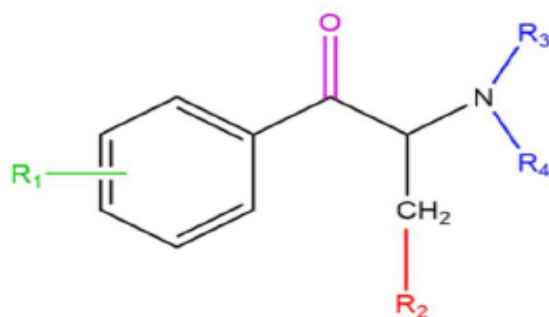
Στην Ευρώπη, οι συνθετικές καθινόνες πρωτοεμφανίστηκαν το 2005 στην παράνομη αγορά ως νόμιμα εναλλακτικά για τα ελεγχόμενα διεγερτικά ναρκωτικά όπως την αμφεταμίνη, το MDMA και την κοκαΐνη⁵⁹. Σύμφωνα με τα στοιχεία του EMCDDA μέχρι το 2021, 162 συνθετικές καθινόνες βρίσκονται υπό έλεγχο και έτσι οι συνθετικές καθινόνες είναι η δεύτερη μεγαλύτερη ομάδα υπό παρακολούθηση μετά τα συνθετικά καναβινοειδή⁴⁸ (Εικόνα 2.3). Σχετικά με το νομοθετικό πλαίσιο για τις συνθετικές καθινόνες η καθινόνη, η μεθκαθινόνη, η αμφεπραμόνη και η πυροβαλερόνη έχουν ενταχθεί στην Ενιαία Σύμβαση των Ψυχοδραστικών Ουσιών του 1971 ενώ για τις υπόλοιπες ουσίες η ρύθμιση τους εξαρτάται από το ρυθμιστικό πλαίσιο της εκάστοτε χώρας⁶⁸.



Εικόνα 2.3: Αριθμός συνθετικών καθινονών που παρατηρήθηκαν για πρώτη φορά κατά το διάστημα 2005-2021.

2.2.1 Δομικά χαρακτηριστικά συνθετικών καθινονών

Οι συνθετικές καθινόνες είναι παράγωγα των φαινυλαλκυλαμινών και συχνά αναφέρονται ως βκ-αμφεταμίνες εξαιτίας της κετονομάδας που φέρουν στην αμινοαλκυλομάδα του φαινολικού δακτυλίου (Εικόνα 2.4). Η παρουσία της β-κετονομάδας είναι η ειδοποιός διαφορά των αμφεταμινών από τις καθινόνες^{69,70}. Όπως οι αμφεταμίνες έτσι και οι συνθετικές καθινόνες εμφανίζουν ασύμμετρο κέντρο στον α άνθρακα και έτσι απαντώνται σε δύο στερεοϊσομερείς μορφές με διαφορετική φαρμακοδυναμική συμπεριφορά^{63,71}. Η γενική δομή των καθινονών δίνει την δυνατότητα χημικών τροποποιήσεων σε 4 σημεία⁶⁸.



Εικόνα 2.4: Γενική δομή συνθετικών καθινονών

Πιο αναλυτικά, χημικές παρεμβάσεις επιτρέπονται στο φαινολικό δακτύλιο (R₁), στην πλευρική αλυσίδα (R₂), και στα ελεύθερα υδρογόνα της αμινομάδας (R₃, R₄). Η ευελιξία της βασικής δομής των καθινονών για δομικές τροποποιήσεις έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ενός μεγάλου αριθμού διαφορετικών μορίων γεγονός που επιβεβαιώνεται και από την αναφορά του EMCDA του 2022, με 162 συνθετικές καθινόνες να έχουν ήδη παρατηρηθεί⁴⁸.

Ανάλογα με τις τροποποιήσεις που γίνονται στον βασικό σκελετό των καθινονών, οι συνθετικές καθινόνες ομαδοποιούνται στις παρακάτω 4 χαρακτηριστικές υποκατηγορίες.

- N-αλκυλιωμένες καθινόνες, οι οποίες χαρακτηρίζονται από υποκατάσταση αλκυλομάδας στην αμινομάδα (R₃ ή και R₄).
- N-πυρρολίδινο καθινόνες, οι οποίες χαρακτηρίζονται από την προσθήκη πυρρολίδινομάδας στο αμινικό άκρο (R₃ ή R₄).
- 3,4-μεθύλενοδιοξυ-N-άλκυλ καθινόνες, οι οποίες χαρακτηρίζονται από την προσθήκη μεθύλενοδιόξυ ομάδας στον αρωματικό δακτύλιο (R₁) και άλκυλο υποκατάσταση στην πλευρική αμινομάδα (R₃ ή R₄).

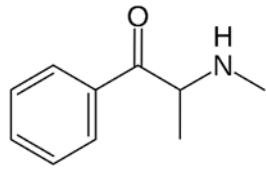
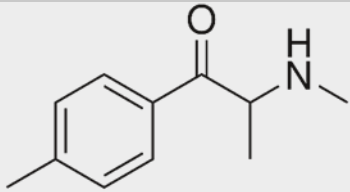
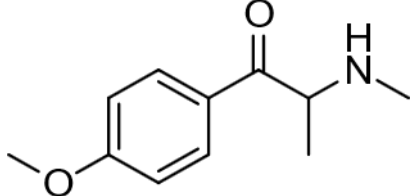
- 3,4-μεθύλενοδιοξυ-N-πυρρολίδινο καθιόνες , οι οποίες χαρακτηρίζονται από την προσθήκη μεθύλενοδιοξυ ομάδας στον αρωματικό δακτύλιο (R₁) και από την προσθήκη πυρρολίδινομάδας στο αμινικό άκρο (R₃ ή R₄).

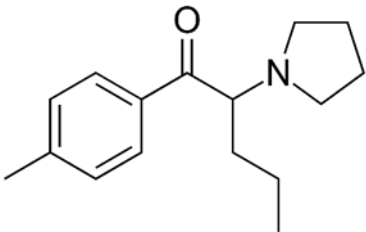
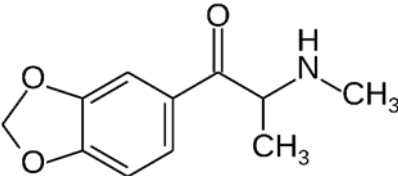
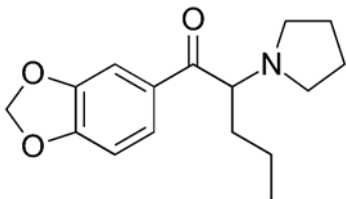
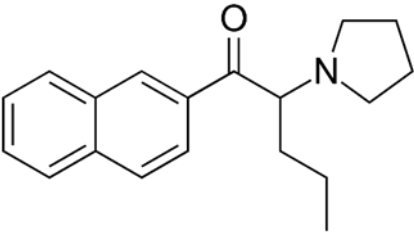
Στις προαναφερθείσες χημικές υποκατηγορίες, για τις N-αλκυλιωμένες καθιόνες και τις N-πυρρολίδινο καθιόνες ταυτόχρονα είναι πιθανή η προσθήκη ακυλομάδας ή αλογονομάδας ή μεθόξυ ομάδας στον αρωματικό δακτύλιο (R₁) ή και προσθήκη αλκυλομάδας στον α άνθρακα της πλευρικής αλυσίδας (R₂). Όσον αφορά τις 3,4-μεθύλενοδιοξυ-N-άλκυλ καθιόνες και τις 3,4-μεθύλενοδιοξυ-N-πυρρολίδινο καθιόνες είναι πιθανό να υπάρχει άλκυλο υποκατάσταση στον α άνθρακα (R₂) και στον αρωματικό δακτύλιο (R₁). Η προσθήκη μεθυλίων στον α άνθρακα ως προς το άζωτο (R₂) αποσκοπεί στην προστασία των καθιόνων από την μεταβολική δραστηριότητα των μονοάμινοοξειδασών (MAO)⁶⁸.

Λόγω της ποικιλίας που εμφανίζουν οι χημικές δομές των συνθετικών καθιόνων, υπάρχουν συνθετικές καθιόνες που δεν εντάσσονται σε καμία από τις παραπάνω χημικές υποκατηγορίες. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η ναφυρόνη, στην οποία ο αρωματικός δακτύλιος έχει αντικατασταθεί από τον δακτύλιο της ναφθαλίνης⁶⁸.

Στον Πίνακα 2.1 παρουσιάζεται η ταξινόμηση των συνθετικών καθιόνων που μελετώνται στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή βάσει των δομικών τους χαρακτηριστικών.

Πίνακας 2.1: Χημική ταξινόμηση συνθετικών καθιόνων

IUPAC	Κοινόχρηστο όνομα	Χημική δομή
N-αλκυλιωμένες καθιόνες		
2-μεθυλάμινο-1-φαινυλοπροπαν-1-όνη	Μεθκαθιόνη	
2-μεθυλάμινο-1-(4-μεθυλφαινυλ)προπαν-1-όνη	4-μεθυλμεθκαθιόνη ή μεφεδρόνη	
2-μεθυλάμινο-1-(4-μεθυλφαινυλ)προπάν-1-όνη	Μεθεδρόνη	

N-πυρρολίδινο καθιनोंες		
1-(4-μεθυλφαινυλ)-2-(1-πυρρολιδινο)πενταν-1-όνη	Πυροβαλερόνη	
3,4-μεθύλενοδιοξυ-N-άλκυλ καθιनोंες		
1-(1,3-βενζοδιοξυ-5υλ)-2-(μεθυλάμινο)προπάν-1-όνη	Μεθυλόνη ή βκ-MDMA	
3,4-μεθύλενοδιοξυ-N-πυρρολίδινο καθιनोंες		
1-(βένζο[d][1,3]διόξυ-5υλ)-2(1-πυρρολιδινο)πενταν-1-όνη	Μεθυλενοδιοξυπυροβαλερόνη ή MDPV	
Άλλες συνθετικές καθιनोंες		
1-(2-ναφθαλενο)-2-(1-πυρρολιδινο)πενταν-1-όνη	Ναφυρόνη	

2.2.2 Φαρμακολογία συνθετικών καθιनोंών

Οι συνθετικές καθιनोंες λόγω της δομικής τους ομοιότητας με τις αμφεταμίνες εμφανίζουν κι αυτές συμπαθομιμητική δράση με κλινικές εκδηλώσεις όπως η υπέρταση και η ταχυκαρδία αλλά και ψυχοδραστικές εκδηλώσεις όπως ευφορία και διέγερση⁶⁸. Συγκριτικά με τις αμφεταμίνες είναι ασθενέστερα διεγερτικά του ΚΝΣ πιθανώς λόγω της αυξημένης πολικότητας που οφείλεται στην β-κετονομάδα κι ως εκ τούτου είναι περιορισμένη η ικανότητα τους να διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό⁶⁶. Ωστόσο οι N-πυρρολίδινο καθιनोंες λόγω του υδρόφοβου χαρακτήρα του πυρρολιδινικού δακτυλίου διαπερνούν σε μεγαλύτερο βαθμό τον ΑΕΦ συγκριτικά με τα υπόλοιπα παράγωγα της καθιनोंης⁷².

Ο μηχανισμός δράσης τους είναι ίδιος με αυτόν των αμφεταμινών· δηλαδή επιδρούν στις αντλίες DAT, NET και SERT προκαλώντας υπερέκκριση των μονοαμινεργικών νευροδιαβιβαστών στο συναπτικό χάσμα και ως απότοκο προκαλείται υπερδιέγερση του μετασυναπτικού νευρώνα⁷³⁻⁷⁵. Γενικά έχουν μικρότερη συγγένεια με τους υποδοχείς των

μονοαμινών σε σχέση με τις αντλίες μεταφοράς τους και συγκριτικά με τις αμφεταμινές έχουν μικρότερη συγγένεια για τον VMAT2.⁶⁸

2.2.3 Τοξικολογία συνθετικών καθινονών

Η γνώση μας γύρω από την τοξικότητα των καθινονών είναι περιορισμένη και αντλείται κυρίως μέσα από αναφορές χρηστών και από κλινικές παρατηρήσεις σε τμήματα επειγόντων περιστατικών⁶⁶. Αρκετές ανεπιθύμητες ενέργειες έχουν παρατηρηθεί σε πολλά συστήματα του οργανισμού σε περιπτώσεις οξείας ή χρόνιας τοξικότητας ή σε περίπτωση υπερδοσολογίας. Τα πιο συχνά συμπτώματα αφορούν το καρδιαγγειακό σύστημα όπως θωρακικό άλγος, υπέρταση και ταχυκαρδία, το νευρικό σύστημα και ψυχιατρικές διαταραχές⁶⁸. Ανοχή και εθισμός συνδέονται άμεσα με τις συνθετικές καθιόνες εξαιτίας της διέγερσης του ντοπαμινεργικού συστήματος με αποτέλεσμα την εμφάνιση στερητικού συνδρόμου και κατ' επέκταση την λήψη επαναλαμβανόμενων υψηλών δόσεων⁷⁶.

Στον Πίνακα 2.2 αναφέρεται λεπτομερώς το σύνολο των παρενεργειών που έχει παρατηρηθεί στην διεθνή βιβλιογραφία από την χρήση συνθετικών καθινονών⁷⁷⁻⁸⁰.

Πίνακας 2.2: Ανεπιθύμητες ενέργειες από την χρήση συνθετικών καθινονών στα συστήματα του οργανισμού

Καρδιαγγειακό	Αίσθημα παλμών, δύσπνοια, θωρακικό άλγος
Ωτορινολαρυγγικό	Ξηροστομία, ρινορραγία, ρινικό άλγος, αίσθημα καύσου στην μύτη, στοματοφαρυγγικό άλγος, εμβοές
Γαστρεντερικό	Κοιλιακό άλγος, ανορεξία, ναυτία, έμετος
Ουρογεννητικό	Ανοργασμία, στυτική δυσλειτουργία, αυξημένη λίμπιντο
Μυοσκελετικό	Αρθραλγίες, αλλαγές στο χρώμα του δέρματος και παγωμένα άκρα, μούδιασμα, μυρμήγκιασμα, μυϊκή ένταση και κράμπες
Νευρολογικό	Επιθετικότητα, βρουξισμός, ζάλη, πονοκέφαλος, ίλιγγος, ζαλάδα με τάση λιποθυμίας, απώλεια μνήμης, τρόμος, επιληπτικές κρίσεις
Οφθαλμολογικό	Θολή όραση, μυδρίαση, νυσταγμός
Αναπνευστικό	Δύσπνοια
Ψυχιατρικό	Θυμός, άγχος, ψευδαισθήσεις, κατάθλιψη, δυσφορία, ενσυναίσθηση, ευφορία, κόπωση,

	παρασιτική αυταπάτη, αυξημένη ενέργεια, αυξημένη και μειωμένη συγκέντρωση, ευφροσύνη, πανικός, παράνοια, αντιληπτικές διαστρεβλώσεις, ανησυχία
Άλλες	Δυσοσμία σώματος, εφίδρωση, πυρετός, αϋπνία, εφιάλτες, δερματικό εξάνθημα

Η θεραπευτική αντιμετώπιση επεισοδίων τοξικότητας από συνθετικές καθινόνες είναι συμπτωματική και ακολουθεί την ίδια προσέγγιση με την τοξικότητα από αμφεταμίνες⁵⁰.

2.2.4 Τοξικοκινητική συνθετικών καθινονών

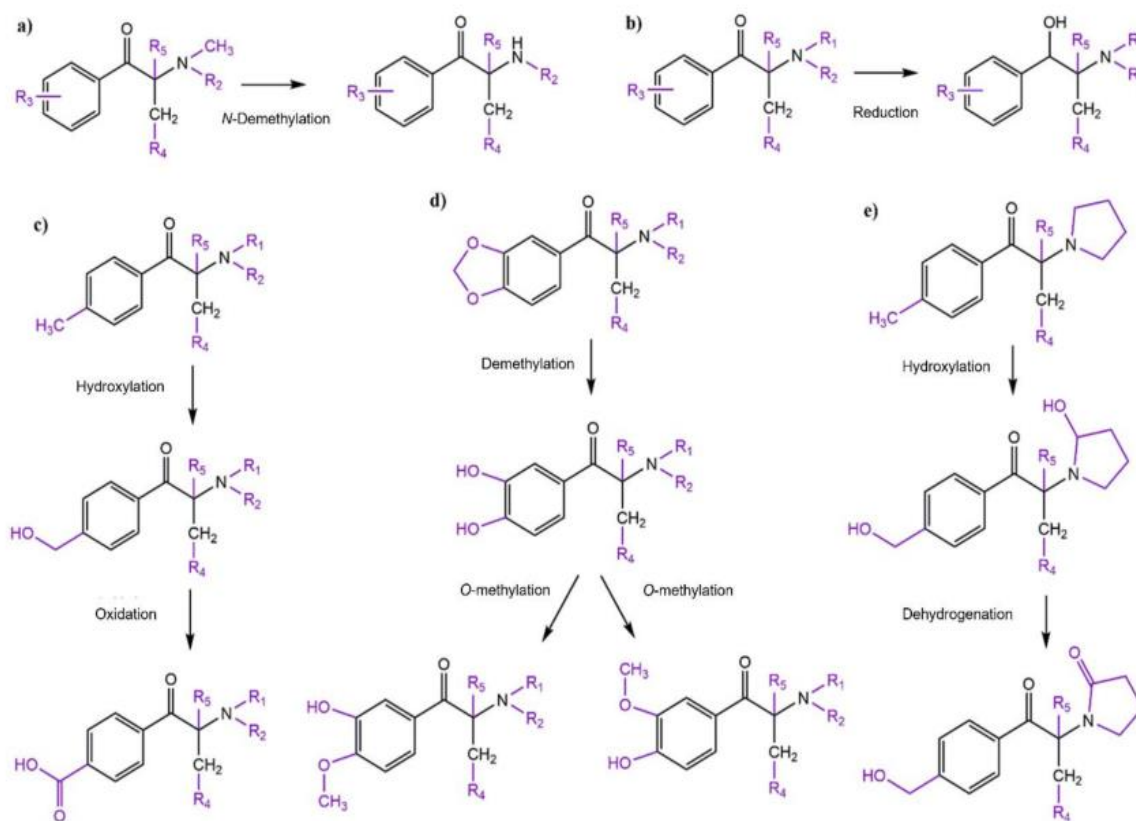
Ο τρόπος λήψης των συνθετικών καθινονών είναι κυρίως από του στόματος με την μορφή δισκίων ή καψουλών. Υπό την μορφή σκόνης είναι δυνατό είτε να καπνιστούν, είτε να καταναλωθούν ως πόσιμη μορφή με αραίωση της σκόνης σε κάποιο ποτό αλλά και μέσω εισπνοής της σκόνης από την μύτη. Επιπλέον υπάρχουν αναφορές για την λήψη τους μέσω ενδοφλέβιας οδού (I.V)⁷¹. Η λήψη δια μέσω της ρινικής οδού χαρακτηρίζεται από ταχύτερη έναρξη δράσης και μικρότερες δόσεις σε σχέση με την από του στόματος λήψη. Η χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα όταν λαμβάνεται *p.o.* πιθανώς να ερμηνεύεται από εκτεταμένο μεταβολισμό πρώτης διόδου κι γι' αυτό τον λόγο να προτιμάται η εισπνοή τους από μερικούς χρήστες^{81,82}. Μέσα από αναφορές χρηστών γίνεται γνωστό ότι απαιτείται επανάληψη δόσεων και μεγαλύτερες δόσεις συγκριτικά με τις αμφεταμίνες για την απόκτηση ισοδύναμων δράσεων^{66,83}.

Επειδή δεν υπάρχουν πολλά δεδομένα από μελέτες σε ανθρώπους τα τοξικοκινητικά δεδομένα των συνθετικών καθινονών περιορίζονται σε *in vivo* πειράματα σε πειραματόζωα⁸⁴. Μετά την απορρόφηση τους, οι συνθετικές καθινόνες κατανέμονται πρωτίστως σε όργανα με υψηλή αιμάτωση όπως ο εγκέφαλος, οι πνεύμονες, το ήπαρ και τα νεφρά. Η κατανομή τους σε αυτά τα όργανα είναι υπεύθυνη για την έναρξη των δράσεων τους. Κατόπιν, κατανέμονται στα υπόλοιπα διαμερίσματα όπως στον μυϊκό, στον λιπώδη και στο δερματικό ιστό⁸⁵. Βάση της χημικής δομής τους, θεωρείται πως όσο αυξάνεται το μήκος της αλκυλικής αλυσίδας αυξάνεται η βιοδιαθεσιμότητα και ο χρόνος ημίσειας ζωής τους⁸⁶. Γενικά οι συνθετικές καθινόνες έχουν μικρή πρωτεϊνική σύνδεση στο πλάσμα κι έτσι εμφανίζουν μεγάλους όγκους κατανομής⁶⁸.

Ο μεταβολισμός των συνθετικών καθινονών υπόκειται σε αντιδράσεις φάσεις I ή και φάσης II. Ένα κοινό μεταβολικό μονοπάτι όλων των συνθετικών καθινονών είναι η αναγωγή της β κετονομάδας σε αλκοόλη (Εικόνα 2.5b). Οι N-αλκυλιωμένες καθινόνες υφίστανται N-

απομεθυλίωση ως κύρια μεταβολική οδό (Εικόνα 2.5a) ενώ οι συνθετικές καθιόνες με μέθυλο υποκατάσταση στον αρωματικό δακτύλιο υπόκειται σε αλειφατική υδροξυλίωση στη μεθυλομάδα, η οποία οξειδώνεται περαιτέρω προς τον σχηματισμό καρβοξυλομάδας (Εικόνα 2.5c). Οι 3,4-μεθυλενοδιόξυ καθιόνες υφίστανται απομεθυλίωση μέσω των ενζύμων των κυτοχρωμάτων *CYP2D6* και *CYP2C19* και μετά O-μεθυλίωση από το ένζυμο κατεχολ-O-μεθυλοτρανσφεράση (Εικόνα 2.5d). Για τις N-πυρρολίδινο καθιόνες, συμβαίνει υδροξυλίωση και αφυδρογόνωση προς τον σχηματισμό της αντίστοιχης λακτάμης⁸⁷ (Εικόνα 2.5e).

Στις αντιδράσεις φάσεις II, τα μεταβολικά προϊόντα που προκύπτουν από τις παραπάνω μεταβολικές διεργασίες συζευγνύονται με γλυκουρονίδια και σουλφονικά οξέα και απεκκρίνονται στα ούρα. Ωστόσο ένα μικρό ποσοστό των συνθετικών καθιόνων απεκκρίνεται αμετάβλητο στα ούρα⁸⁷.

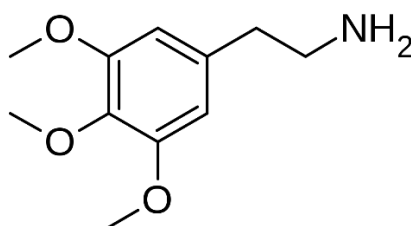


Εικόνα 2.5: Γενικές μεταβολικές πορείες συνθετικών καθιόνων

2.3 Φαιναιθυλαμίνες

Οι φαιναιθυλαμίνες ανήκουν στις πρώτες νέες ψυχοδραστικές ουσίες που εμφανίστηκαν στην παράνομη αγορά από τα τέλη του 1980⁸⁸. Σήμερα οι φαιναιθυλαμίνες αποτελούν την τρίτη μεγαλύτερη ομάδα νέων ψυχοδραστικών ουσιών μετά τα κανναβινοειδή και τις συνθετικές καθιόνες με 106 φαιναιθυλαμίνες να παρακολουθούνται από το σύστημα έγκαιρης προειδοποίησης της ΕΕ⁴⁸.

Η ομάδα των φαιναιθυλαμινών είναι αρκετά διευρυμένη περιέχοντας τόσο ουσίες που είναι ήδη αναγνωρισμένες από τις συμβάσεις του 1961 και του 1971 όσο και ουσίες που έχουν εμφανιστεί τα τελευταία χρόνια στην διακίνηση και δεν έχουν ενταχθεί στις διεθνείς συμβάσεις⁸⁹. Στην πρώτη ομάδα ανήκουν οι κλασσικές αμφεταμίνες όπως αναφέρθηκαν στο κεφάλαιο 1⁹⁰. Στην δεύτερη ομάδα ανήκουν οι νέες ψυχοδραστικές φαιναιθυλαμίνες με κυριότερους εκπροσώπους να είναι τα παράγωγα της μεσκαλίνης (3,4,5-τριμεθοξυφαινοαιθυλαμίνη, (Εικόνα 2.5), ενός ψυχεδελικού αλκαλοειδούς που απαντάται ως δευτερογενής μεταβολίτης στον κάκτο πεγιότ (*Lophophora williamsii*)^{91,92}.



Εικόνα 2.5: Χημική δομή μεσκαλίνης

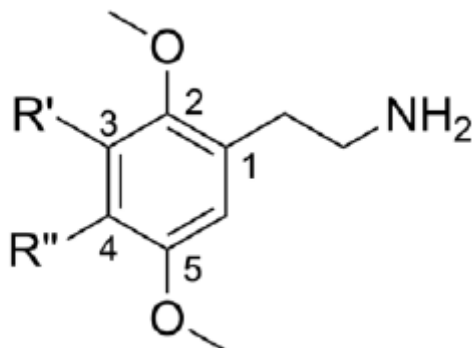
Οι πρώτες φαιναιθυλαμίνες συντέθηκαν από τον Alexander Shulgin τις δεκαετίες του 1970 και του 1980 όπως και περιγράφονται στο βιβλίο του “*Phenethylamines I Have Known and Loved*” (PiHKAL)⁹³.

Η κατάχρησή τους γίνεται για ψυχαγωγικούς σκοπούς και λειτουργούν ως υποκατάστατα των κλασσικών αμφεταμινών καθώς εμφανίζουν παρόμοιες δράσεις¹⁰. Μάλιστα το PMMA σε περίοδο έλλειψης του MDMA προωθήθηκε υπό την εμφάνιση του έκστασι και πωλούνταν ως MDMA στους χρήστες⁶². Στις διεθνείς συμβάσεις για τα ναρκωτικά έχουν ήδη ενταχθεί ορισμένα 2C-X ανάλογα ωστόσο νέα ανάλογα δημιουργούνται συνεχώς αντικαθιστώντας εκείνα που υπάγονται σε νομοθετικές ρυθμίσεις⁹⁰.

2.3.1 Δομικά στοιχεία φαιναιθυλαμινών

Οι κυριότεροι εκπρόσωποι των ψυχοδραστικών φαιναιθυλαμινών είναι οι 2,5 διμεθοξύ φαιναιθυλαμίνες, γνωστές ως 2C-X ανάλογα και τα N-βενζυλομεθοξύ παράγωγα των 2C-X , γνωστά ως NBOMes⁹⁴.

Τα 2C-X οφείλουν την ονομασία τους στον αριθμό των 2 ανθράκων ανάμεσα στο βενζολικό δακτύλιο και την αμινομάδα⁹⁵ (Εικόνα 2.6). Η δομή τους χαρακτηρίζεται από μεθόξυ ομάδα στις θέσεις 2 και 5 και λιπόφιλο υποκαταστάτη συνήθως αλογόνο (χλώριο ή βρώμιο ή ιώδιο) στην θέση 4 του αρωματικού δακτυλίου⁹⁴.



Εικόνα 2.6: Γενική δομή “2C” φαιναιθυλαμινών

Από την σειρά των “2C” αντικείμενο μελέτης της παρούσας εργασίας είναι το βρωμιούχο ανάλογο 2C-B (2-(4-βρώμο-2,5-διμεθοξυφαινυλ)αιθαναμίνη (Πίνακας 2.3).

Πίνακας 2.3: Χημική δομή 2C-B

IUPAC	Κοινόχρηστο όνομα	Χημική δομή
(2-(4-βρωμο-2,5-διμεθοξυφαινυλ)αιθαναμίνη	2C-B	

Τα NBOMes είναι τα N-βένζυλομεθόξυ παράγωγα των αναλόγων 2C-X. Προκύπτουν από την προσθήκη της βένζυλομεθόξυ ομάδας στο αμινικό άκρο των 2C-X⁹⁴. Τα NBOMes που μελετήθηκαν ως αναλύτες παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.4.

Πίνακας 2.4: Χημικές δομές NBOMes αναλόγων

IUPAC	Κοινόχρηστο όνομα	Χημική δομή
4-ιώδο-2,5-διμεθοξυ- N-((2- μεθόξυφαινυλ)μεθυλ)- βενζυλοαιθαναμίνη	25I-NBOMe	
4-χλώρο-2,5- διμεθοξυ-N-((2- μεθόξυφαινυλ)μεθυλ)- βενζυλοαιθαναμίνη	25C-NBOMe	
4-βρώμο-2,5- διμεθοξυ-N-((2- μεθόξυφαινυλ)μεθυλ)- βενζυλοαιθαναμίνη	25B-NBOMe	

Υπάρχουν κι άλλες φαιραιθυλαμίνες, οι οποίες δεν συγκαταλέγονται στις παραπάνω δύο ομάδες, όπως η N-μέθυλ-1-4-(μεθόξυφαινυλ)-2-προπαναμίνη (PMMA)⁹⁶.

Πίνακας 2.5: Χημική δομή PMMA

Ονομασία IUPAC	Κοινόχρηστο όνομα	Χημική δομή
N-μέθυλ-1-4- (μεθόξυφαινυλ)-2- προπαναμίνη	PMMA	

2.3.2 Φαρμακολογία φαιραιθυλαμινών

Οι φαιραιθυλαμίνες συμπεριφέρονται φαρμακολογικά ως διεγέρτες του ΚΝΣ μέσω αναστολής της επαναπρόσληψης των νευροδιαβαστών της νορεπινεφρίνης (NET) της ντοπαμίνης (DAT) και της σεροτονίνης (SERT) ή του VMAT2. Επομένως μιμούνται τις δράσεις των κλασσικών αμφεταμινών. Επιπλέον είναι παραισθησιογόνα λόγω της αγωνιστικής δράσης τους σε συγκεκριμένους σεροτονινεργικούς υποτύπους όπως οι 5-HT_{2A,B,C}^{85,90,90,97-99}.

Το 2C-B συντέθηκε το 1974 από τον Alexander Shulgin και θεωρείται μερικός αγωνιστής στους σεροτονινεργικούς υποδοχείς 2A (5-HT_{2A}) και 2C (5-HT_{2C}), καθώς και αγωνιστής στους

α₁ αδρενεργικούς υποδοχείς. Ο Π.Ο.Υ πρότεινε την ένταξη του υπό διεθνή έλεγχο και έτσι έχει καταταχθεί από το 2001 στον πίνακα II των ναρκωτικών της σύμβασης του 1971¹⁰⁰.

Τα NBOMes συντέθηκαν το 2003 από τον Ralph Heim στο Βερολίνο⁹³. Είναι πολύ δραστικά ακόμα και σε μικρές δόσεις αφού η Ν-βένζυλο υποκατάσταση αυξάνει δραματικά την συγγένεια των NBOMes με τον υποδοχέα 5-HT_{2A}^{101,102}. Επιπλέον τα NBOMes είναι αγωνιστές των α-αδρενεργικών υποδοχέων με αποτέλεσμα να εμφανίζουν σεροτονινεργικές και συμπαθομιμητικές δράσεις¹⁰³.

2.3.3 Τοξικολογία φαιραιθυλαμινών

Οι φαιραιθυλαμίνες είναι διεγερτικά και παραισθησιογόνα, ωστόσο μπορούν να προκαλέσουν ανεπιθύμητες ενέργειες στους χρήστες όπως παραισθήσεις, ναυτία, έμετος, ζάλη, διάρροια, πονοκεφάλους, πόνους στο σώμα, κατάθλιψη και σύγχυση. Η χρήση του 2C-B έχει συσχετιστεί με εγκεφαλική αγγειοπάθεια πιθανώς λόγω της αγγειοσυσπαστικής του δράσης⁹⁰. Όπως αναφέρθηκε, τα NBOMes έχουν υψηλή συγγένεια με τους σεροτονινεργικούς υποδοχείς, γι' αυτό απαιτούν δόσεις μικρογραμμαρίων, καθώς μεγαλύτερες δόσεις συχνά οδηγούν στην εκδήλωση σεροτονινεργικού συνδρόμου⁹⁷.

Από κλινικές παρατηρήσεις επεισοδίων τοξικότητας από φαιραιθυλαμίνες έχουν καταγραφεί συμπαθομιμητικές δράσεις όπως ταχυκαρδία, υπερθερμία και υπέρταση. Διαταραχές της συμπεριφοράς είναι πολύ συχνές όπως σύγχυση και επιθετικότητα. Άλλα συμπτώματα είναι η εκδήλωση σπασμών και η ραβδομυόλυση. Αρκετές είναι οι περιπτώσεις κατάληξης των χρηστών από την χρήση φαιραιθυλαμινών λόγω καρδιακής ανακοπής^{93,95,104-107}.

Η αντιμετώπιση τέτοιων περιστατικών από μονάδες φροντίδας υγείας γίνεται συμπτωματικά καθώς δεν υπάρχει ειδικό αντίδοτο για την τοξικότητα τους⁵⁰.

2.3.4 Τοξικοκινητική φαιραιθυλαμινών

Το 2C-B είναι διαθέσιμο στην μορφή δισκίου ή σκόνης και η χρήση του γίνεται συνήθως από του στόματος σε δόσεις 10-50 mg και εμφανίζει διάρκεια δράσης 4-7 h¹⁰⁸. Εναλλακτικός τρόπος λήψης του 2C-B είναι μέσω εισπνοής της σκόνης όπου σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιείται το 1/3 της δόσης σε σχέση με την p.o χρήση⁹⁴.

Κατά τον μεταβολισμό του 2C-B λαμβάνει χώρα κυρίως Ο-απομεθυλίωση στις θέσεις 2 και 5 του αρωματικού δακτυλίου και ακολουθεί η απαμίνωση μέσω των ενζύμων MAO-A και MAO-B. Εν συνεχεία γίνεται οξείδωση προς το σχηματισμό του αντίστοιχου καρβοξυλικού οξέος, το οποίο συζευγνύεται με σουλφονικά οξέα ή γλυκουρονίδια και απεκκρίνεται στα ούρα. Αξίζει να σημειωθεί ότι η συγχορήγηση ουσιών που δρουν ως αναστολείς των MAO-A και

MAO-B, οδηγεί στην αυξημένη συγκέντρωση του 2C-B, κατ' επέκταση την εκδήλωση τοξίκωσης. Επίσης, τα ένζυμα του κυτοχρώματος CYP2D6 έχουν ήσσονος σημασία στον μεταβολισμό του 2C-B^{90,95,108}.

Η χημική κατηγορία των NBOMes διατίθεται κυρίως υπό την μορφή διαμοιρασμένων δόσεων σε στυπτόχαρτα (*blotters*) (Εικόνα 2.7), υπάρχουν ωστόσο και σε σκόνη, διάλυμα και δισκία⁹⁴. Έχει παρατηρηθεί ότι η p.o. λήψη τους έχει περιορισμένη βιοδιαθεσιμότητα, ως εκ τούτου συνηθίζεται να λαμβάνονται υπογλώσσια ή παρειικά⁸⁵.



Εικόνα 2.7: Διαμοιρασμένη δόση 25C-NBOMe σε στυπτόχαρτο (*blotter*)

Οι πιθανές μεταβολικές αντιδράσεις των NBOMes που λαμβάνουν χώρα κατά την φάση I είναι η O-απομεθυλίωση, η O,O-δισ απομεθυλίωση και η υδροξυλίωση¹⁰⁹. Η N-απομεθυλίωση θεωρείται ότι είναι υπεύθυνη για την χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα των NBOMes, αφού οδηγεί στον σχηματισμό των λιγότερο ισχυρών πρόδρομων μορίων τους, τα 2C-X ανάλογα⁸⁵. Στον μεταβολισμό τους εμπλέκονται αρκετοί υπότυποι των ενζύμων του κυτοχρώματος C. Στις αντιδράσεις της φάσης II, οι μεταβολίτες συζευγνύονται με σουλφονικά ή γλυκουρονίδια και απεκκρίνονται στα ούρα¹⁰⁹.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΒΙΟΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΔΙΕΓΕΡΤΙΚΩΝ ΤΥΠΟΥ ΑΜΦΕΤΑΜΙΝΗΣ, ΣΥΝΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΘΙΝΟΝΩΝ ΚΑΙ ΦΑΙΝΑΙΘΥΛΑΜΙΝΩΝ

3.1 Εισαγωγή

Για τον προσδιορισμό ΔΤΑ και ΝΨΟ όπως οι συνθετικές καθιόνες και οι φαιναιθυλαμίνες τα κύρια βιολογικά υλικά που χρησιμοποιούνται είναι το ολικό αίμα¹¹⁰⁻¹¹², ο ορός¹¹³, το πλάσμα¹¹⁴ και τα ούρα^{29,115-117}. Ως εναλλακτικά βιολογικά υλικά χρησιμοποιούνται το σάλιο^{118,119}, ο ιδρώτας^{120,121}, το υαλοειδές υγρό¹²², οι αποξηραμένες κηλίδες αίματος επί χάρτου^{123,124} (Dried blood spot ή DBS), νύχια^{125,126}, οι τρίχες¹²⁷⁻¹³¹, το μηκόνιο¹³²⁻¹³⁴, το εγκεφαλονωτιαίο υγρό¹³⁵ καθώς και σε ιστούς όπως το ήπαρ, ο εγκέφαλος, οι νεφροί, η χολή¹³⁶⁻¹⁴¹.

Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες του UNODC και της ομάδας ειδικών εμπειρογνόμων των Βρυξελλών, το πλέον κατάλληλο βιολογικό υλικό για την ανίχνευση παράνομων ουσιών είναι τα ούρα σε κλινικά περιστατικά και σε ελέγχους για χρήση ουσιών. Τα βασικά πλεονεκτήματα είναι: η μη παρεμβατική δειγματοληψία του, συγκεντρώνει το πλήθος των μεταβολιτών και της μητρικής ουσίας και το μεγαλύτερο χρονικό παράθυρο ανίχνευσης τους σε σχέση με το αίμα¹⁴². Στα μειονεκτήματα είναι η πιθανότητα νοθευμένου δείγματος γι' αυτό και απαιτείται η επίβλεψη κατά την δειγματοληψία και η προϋπόθεση της γνώσης των μεταβολικών προϊόντων της εκάστοτε ουσίας προς ανάλυση. Ειδικά για τις ΝΨΟ η γνώση γύρω από τον μεταβολισμό τους είναι ιδιαίτερα περιορισμένη¹⁴³.

Από την άλλη, το αίμα αποτελεί το πλέον κατάλληλο βιολογικό υλικό για τον προσδιορισμό ουσιών σε άτομα που βρίσκονται υπό την επήρεια της εξεταζόμενης ουσίας ή σε περιστατικά δηλητηριάσεων και θανάτων¹⁴⁴. Η παρεμβατική μέθοδος δειγματοληψίας, το στενό παράθυρο ανίχνευσης, η πολυπλοκότητα του μητρικού υλικού και η αναγκαία χρήση αντιπηκτικών και συντηρητικών παραγόντων με πιθανότητα αλληλεπίδρασης με τους αναλύτες είναι τα βασικά μειονεκτήματα του ολικού αίματος¹⁴⁵.

Η βιοανάλυση των ΔΤΑ, των συνθετικών καθινονών και των φαιναιθυλαμινών βασίζεται κυρίως σε τεχνικές προκατεργασίας όπως η υγρό-υγρό εκχύλιση και η εκχύλιση στερεάς φάσης. Έπειτα, τα δείγματα αναλύονται κυρίως με τεχνικές υγροχρωματογραφίας (LC) και αεριοχρωματογραφίας (GC) συζευγμένες με φασματομετρία μαζών (MS)^{29,146,147}.

3.2 Προκατεργασία δειγμάτων

Η προκατεργασία των δειγμάτων περιλαμβάνει αρκετά στάδια, ειδικά όταν πρόκειται για βιολογικά δείγματα με πολύπλοκο μητρικό υπόστρωμα. Ειδικότερα απαιτείται ο καθαρισμός

του μητρικού υποστρώματος και των προσμίξεων, η εκχύλιση των αναλυτών και η παραγωγοποίηση τους, στην περίπτωση της αεριοχρωματογραφίας. Κάθε στάδιο κατά την προκατεργασία των δειγμάτων αποσκοπεί στην βελτίωση της ανάκτησης των αναλυτών, της ευαισθησίας και της ειδικότητας της μεθόδου. Μετά την εκχύλιση του δείγματος ακολουθεί το στάδιο της εξάτμισης, συνήθως με παροχή ρεύματος N_2 και ανασύσταση του υπολείμματος με τον κατάλληλο διαλύτη, ώστε να πετύχουμε την προσυγκέντρωση των προσδιοριζόμενων ουσιών¹²⁸.

3.2.1 Υγρό-υγρό εκχύλιση

Η υγρό-υγρό εκχύλιση (LLE) είναι μια από τις πιο διαδεδομένες μεθόδους εκχύλισης λόγω της απλότητας της, της ταχύτητας της, είναι οικονομική και προσφέρει καθαρά εκχυλίσματα για ένα πλήθος ουσιών. Βασικό μειονέκτημα της είναι η ανάγκη για χρήση μεγάλων όγκων οργανικών διαλυτών. Η αρχή λειτουργίας της στηρίζεται στην κατανομή των αναλυτών μεταξύ δυο μη μιγνυόμενων φάσεων, ενός υδατικού διαλύματος που συνήθως είναι το βιολογικό δείγμα με τον κατάλληλο οργανικό διαλύτη που επιλέγεται.

Οι κύριοι διαλύτες που έχουν χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση των ΔΤΑ, των συνθετικών καθινονών και των φαιραιθυλαμινών είναι ο οξικός αιθυλεστέρας^{110,122,148}, ο *tert*-βουτυλομεθυλαιθέρας (TBME)^{114,149} το κυκλοεξάνιο¹⁵⁰ και το τολουόλιο¹¹⁵, λόγω της μη ανάμιξης τους με υδατικά διαλύματα και της υψηλής τους αποτελεσματικότητας στην εκχύλιση αμινικών οργανικών μορίων. Επιπροσθέτως, βασικές συνθήκες pH απαιτούνται για τα παράγωγα των αμφοταμινών, τις συνθετικές καθιόνες και τις φαιραιθυλαμίνες. Ως εκ τούτου NaOH, αμμωνιακά και διττανθρακικά ρυθμιστικά διαλύματα προστίθενται στο δείγμα.

3.2.2 Εκχύλιση στερεάς φάσης

Η εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος στα εργαστήρια τοξικολογίας για τον καθαρισμό των δειγμάτων. Η διαδικασία της SPE, αποτελείται από 4 στάδια: ενεργοποίηση στηλών, φόρτωση δείγματος, έκπλυση στηλών και έκλουση αναλυτών. Η ειδικότητα της εκχύλισης εξαρτάται από την φύση των αναλυτών, το είδος της στήλης και τα διαλύματα που συμμετέχουν σε κάθε στάδιο.

Για την εκχύλιση των ΔΤΑ, των συνθετικών καθινονών και των φαιραιθυλαμινών από βιολογικά δείγματα, χρησιμοποιούνται κυρίως μικτές στήλες που συνδυάζουν μη πολικό χαρακτήρα (C_8 ή C_{18}) με ισχυρούς κατιοανταλλακτικούς μηχανισμούς (SCX). Τέτοιες στήλες είναι η Oasis MCX^{112,151–153}, η Clean Screen DAU^{116,117,119}, η Agilent SPEC DAU¹⁵⁴. Πιο σπάνια χρησιμοποιούνται στήλες με μη πολικό μηχανισμό συγκράτησης όπως για παράδειγμα η Sep-pak C18, η οποία χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση 9 NBOMes παραγώγων στο

πλάσμα¹⁵⁵. Για την έκλυση των αναλυτών, χρησιμοποιούνται συνήθως μίγματα οργανικών διαλυτών με κυριότερο, το διχλωρομεθάνιο-ισοπροπανόλη με προσθήκη μικρής ποσότητας αμμωνίας^{112,116,117,151-154}, ενώ έχει χρησιμοποιηθεί και το μίγμα διχλωρομεθάνιο-ισοπροπανόλη σε αναλογία 25:75 (v/v) για την απομόνωση φαινυλαλκυλαμινών από στοματικά υγρά¹¹⁹.

3.2.3 Τεχνικές μικροεκχύλισης

Ως μικροεκχύλιση ονομάζουμε την τεχνική εκχύλισης κατά την οποία η φάση της εκχύλισης είναι (υγρή ή στερεά) είναι πολύ μικρότερη από τον όγκο του δείγματος, τυπικά να είναι μικρότερη από 100 μL (ή 10 mg). Τα πλεονεκτήματα της έναντι των συμβατικών μεθόδων εκχύλισης είναι τα εξής: μικρότερη κατανάλωση αντιδραστηρίων, μικρός χρόνος εκχύλισης, απαιτείται ελάχιστος όγκος δείγματος και η πιθανότητα αυτοματοποίηση σε ορισμένες περιπτώσεις¹⁴³.

Τα τελευταία χρόνια αναδύονται όλο και περισσότερες δημοσιεύσεις όπου χρησιμοποιούνται οι τεχνικές μικροεκχύλισης για τον προσδιορισμό νέων ψυχοδραστικών ουσιών κυρίως σε στοματικά υγρά όπως ο σίελος. Τέτοιες τεχνικές είναι τα μοριακά αποτυπωμένα πολυμερή (MEPS)¹⁵⁶⁻¹⁵⁹, η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (SPME)^{117,120}, η υγρή-υγρή μικροεκχύλιση διασποράς (DLLME)¹²³ και η μικροεκχύλιση υγρής φάσης σωληνοειδούς ίνας δύο φάσεων (HF-LPME)¹⁶⁰.

3.2.4 Παραγωγοποίηση

Η παραγωγοποίηση είναι μια απαραίτητη διαδικασία όταν αναλύονται βιολογικά δείγματα με την τεχνική της αεριοχρωματογραφίας. Μέσω της παραγωγοποίησης επιτυγχάνεται αυξημένη ευαισθησία της μεθόδου, βελτίωση των χρωματογραφικών κορυφών και της διαχωριστικότητας τυχόν γειτονικών κορυφών και φυσικά μείωση της πολικότητας των αναλυτών ώστε να γίνουν περισσότερο πτητικές. Επιπλέον με την παραγωγοποίηση παίρνουμε περισσότερο χαρακτηριστικά μοριακά θραύσματα για τους αναλύτες και επιτυγχάνεται ο χρωματογραφικός διαχωρισμός ισομερών μορφών μιας ένωσης¹⁶¹. Οι αντιδράσεις παραγωγοποίησης διακρίνονται σε 3 βασικές ομάδες, τις ακυλιωτικές, τις αλκυλιωτικές και τις αντιδράσεις σιλανοποίησης¹⁶².

Στην περίπτωση των παραγώγων της αμφεταμίνης, των συνθετικών καθινονών και των φαινυλαλκυλαμινών η παρουσία της αμινομάδας στην δομή τους, δημιουργεί προβλήματα κατά την χρωματογραφική ανάλυση τους, όπως η διεύρυνση των κορυφών εξαιτίας μη ειδικών αλληλεπιδράσεων με την στήλη. Ως εκ τούτου πραγματοποιείται συνήθως η παραγωγοποίηση πριν την ανάλυση τους¹⁶³.

Οι ακυλιωτικοί παράγοντες πενταφθοροπροπιονικός ανυδρίτης (PFPA), ο τρίφθοροξικός ανυδρίτης (TFA), ο δίφθοροχλωροξικός ανυδρίτης (ClF₂AA), ο επταφθοροβουτυρικός ανυδρίτης (HFBA), ο οξικός ανυδρίτης (AA) και ο προπιονικός ανυδρίτης (PA)· μελετήθηκαν ως μέσο παραγωγοποίησης 9 συνθετικών καθινονών από τους Alsenedi και Morrison. Το συμπέρασμα τους ήταν ότι το PFPA, το HFBA και λιγότερο το TFA είναι ιδανικοί παράγοντες παραγωγοποίησης για τις μελετούμενες συνθετικές καθινόνες¹⁶². Μία παρόμοια έρευνα από τους Mohamed και Bakdash, στην οποία συγκρίθηκαν τα αντιδραστήρια TFA, PFPA και HFBA για την παραγωγοποίηση 10 συνολικά μορίων ΔΤΑ και συνθετικών καθινονών από δείγματα σιέλου, είχε ως συμπέρασμα την εκλογή του PFPA ως το βέλτιστο αντιδραστήριο¹⁶⁴. Οι Dodos κ.α μελέτησαν τα αντιδραστήρια HFBA, PFPA, TFA, AA και το Ν-μέθυλ-δισ(τριφθοροακεταμίδιο) (MBTFA) για την παραγωγοποίηση 4 ΔΤΑ σε δείγματα ούρων με το συμπέρασμα τους να αναφέρει το AA ως το βέλτιστο αντιδραστήριο¹⁶⁵. Σε μία ακόμα εργασία παρατηρείται η σύγκριση των αντιδραστηρίων πεντάφθοροβενζουλο χλωρίδιο (PFBCl) και HFBA για τον προσδιορισμό ΔΤΑ, συνθετικών καθινονών και φαιλαιθυλαμινών σε ορό και ούρα· το συμπέρασμα αναφέρει το PFBCl ως βέλτιστο¹⁵⁰.

Άλλα αντιδραστήρια που έχουν χρησιμοποιηθεί είναι το χλωροφορμικό εξύλιο για την ανάλυση ΔΤΑ, καθινονών, φαιλαιθυλαμινών και αναλόγων κεταμίνης σε ούρα και αίμα¹²³, το οπτικά καθαρό αντιδραστήριο L-TPC: (S)-(-)-(τρίφθοροακέτυλο)πυρρολίδινο-2-καρβονυλοχλωρίδιο το οποίο μετατρέπει τα στερεοϊσομερή της καθινόνης σε διαστερεοϊσομερή και έτσι επιτρέπει τον χειρόμορφο διαχωρισμό τους σε μη χειρομόρφους στήλες¹¹⁶. Τα αντιδραστήρια σιλανοποίησης MTBSTFA (N-tert-βουτυλδιμεθυλοσιλανο-N-μέθυλτριφθοροακεταμίδιο)¹⁶⁶, MSTFA (N-μέθυλο-N-(τριμέθυλοσιλανο)τριφθοροακεταμίδιο)¹⁶⁷ και MBTFA N-μέθυλο-δισ(τριφθοροακεταμίδιο)¹¹² για την ανάλυση καθινονών και φαιλαιθυλαμινών. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η χρήση της τεχνικής των μικροκυμάτων στην παραγωγοποίηση παρέχοντας μεγαλύτερη ταχύτητα, απόδοση και αναπαραγωγικότητα^{112,153}.

3.3 Χρωματογραφικές τεχνικές συζευγμένες με φασματομετρία μαζών

Η φασματομετρία μαζών (MS) αποτελεί μία από τις σημαντικότερες τεχνικές προσδιορισμού δομής και ποσοτικοποίησης ενώσεων με τοξικολογικό ενδιαφέρον, ειδικά για τα ΔΤΑ και τις ΝΥΟ. Η αρχή της τεχνικής αυτής στηρίζεται στον ιοντισμό μορίων ή την παραγωγή ιοντικών θραυσμάτων των μορίων και την καταγραφή του λόγου μάζας προς φορτίο (m/z) σε συνθήκες κενού. Τα θεμελιώδη μέρη ενός φασματόμετρου μαζών είναι η πηγή ιονισμού η οποία προκαλεί τον ιονισμό των μορίων, τον αναλυτή μαζών που διαχωρίζει τα διάφορα ιόντα ανάλογα με τον λόγο m/z και τον ανιχνευτή¹⁶⁸⁻¹⁷².

Οι τεχνικές για τον προσδιορισμό ψυχοδραστικών ουσιών με MS διακρίνονται σε στοχευμένη ανάλυση (*targeted analysis*) και σε μη στοχευμένη ανάλυση (*untargeted analysis*). Κατά την στοχευμένη ανάλυση χρησιμοποιείται η επιλογή SIM (*selective ion monitoring*) για την αεριοχρωματογραφία ή η επιλογή SRM (*selected reaction monitoring*) για την υγροχρωματογραφία. Η στοχευμένη ανάλυση γίνεται με φασματόμετρα μαζών χαμηλής διακριτικής ικανότητας όπως τα τετράπολα (MS)ⁿ με σκοπό τον εντοπισμό μόνο ενός συνόλου προκαθορισμένων. Τα πλεονεκτήματα της είναι η καλύτερη ευαισθησία, ειδικότητα και η δυνατότητα ποσοτικοποίησης. Απότοκο όλων αυτών είναι ότι χρησιμοποιείται κατά κόρον στις αναλύσεις ρουτίνας των τοξικολογικών εργαστηρίων¹⁷³. Στην μη στοχευμένη ανάλυση χρησιμοποιούνται φασματόμετρα μαζών υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRMS) σε λειτουργία πλήρους σάρωσης, καταγράφοντας όλα τα μοριακά θραύσματα που εντοπίζονται στο δείγμα. Έτσι είναι δυνατή η ανάλυση οποιασδήποτε ουσίας με γνωστή δομή αλλά και η ένδειξη για ουσίες με άγνωστη δομή από τα τυχόν γνωστά μοριακά θραύσματα της¹²⁶.

Το φασματόμετρο μαζών είναι συνήθως συζευγμένο με χρωματογραφικές τεχνικές όπως GC και LC, με αποτέλεσμα τα συστατικά του βιολογικού δείγματος πρώτα να διαχωρίζονται στην χρωματογραφική στήλη και κατόπιν να αναλύονται από το MS¹⁴³.

Αυτές οι χρωματογραφικές τεχνικές έχουν ως κοινό τον διαχωρισμό των ουσιών μέσω της κατανομής τους ανάμεσα στην στατική φάση και την κινητή φάση. Οι διαφορές τους απαντώνται στην φύση της κινητής φάσης, όπου στην GC είναι αέριο (He, Ar, N₂) ενώ στην LC είναι ένα σύστημα διαλυτών. Όσον αφορά τη φύση των αναλυτών, στην GC προσδιορίζονται ευχερέστερα μόρια χαμηλού μοριακού βάρους, μη θερμοευαίσθητα, μη πολικά και πτητικά ενώ στην LC μόρια μεγαλύτερου μοριακού βάρους και πολικά^{172,174}.

Ανάλογα με το είδος της χρωματογραφικής τεχνικής που χρησιμοποιείται, επιλέγεται και η κατάλληλη πηγή ιονισμού. Έτσι στην περίπτωση της GC-MS ο ιονισμός των αναλυτών λαμβάνει χώρα σε περιοχή υψηλού κενού με τις εξής τεχνικές: πρόσκρουση ηλεκτρονίων (EI), χημικός ιοντισμός θετικού ιόντος (PCI) και χημικός ιοντισμός αρνητικού ιόντος (NCI)^{172,175}. Στην LC-MS, ο ιονισμός γίνεται με διάφορες τεχνικές όπως ιονισμός με ηλεκτροψεκάσμο (ESI), χημικό ιονισμό σε ατμοσφαιρική πίεση (APCI) και φωτοιονισμό σε ατμοσφαιρική πίεση (APPI)¹⁷².

Η GC σε σύζευξη με απλό τετράπολο MS είναι η πιο εδραιωμένη τεχνική στα περισσότερα τοξικολογικά εργαστήρια και χρησιμοποιείται για την επιβεβαίωση των θετικών ευρημάτων σε δείγματα όπως αυτά προκύπτουν από άλλες τεχνικές σάρωσης όπως οι ανοσοχημικοί ή ανοσοενζυμικοί προσδιορισμοί.

Στα πλεονεκτήματα της GC-MS είναι η δυνατότητα σάρωσης ενός μεγάλου αριθμού ουσιών με μία ένεση, η διαφοροποίηση ουσιών με παρόμοιες δομές και ισομερείς μορφές και η υψηλή διαχωριστική ικανότητα των αναλυτών εξ αιτίας του μεγάλου μήκους της τριχοειδούς στήλης (~30m). Επιπλέον συμφωνεί με τις αρχές της πράσινης χημείας αφού απαιτεί ελάχιστο οργανικό διαλύτη. Το κύριο μειονέκτημα της τεχνικής αυτής είναι το περιορισμένο πεδίο εφαρμογής της, στις πολικές μη πτητικές ουσίες. Εφόσον η κινητή φάση είναι σε αέρια κατάσταση μόνο ουσίες μη πολικές, θερμοσταθερές και πτητικές σε θερμοκρασίες έως 300°C μπορούν να αναλυθούν με GC-MS^{123,176}.

Στον Πίνακα 3.1 παρουσιάζονται μέθοδοι προσδιορισμού παραγώγων αμφεταμίνης, συνθετικών καθινονών και φαιναιθυλαμινών με την τεχνική της αεριοχρωματογραφίας από την διεθνή επιστημονική βιβλιογραφία

Πίνακας 3.1: Μέθοδοι προσδιορισμού παραγώγων αμφεταμίνης, συνθετικών καθινόνων και φαιραιθυλαμινών με την τεχνική της αεριοχρωματογραφίας

Αναλύτες	Μήτρα	Προκατεργασία δείγματος	Αντιδραστήριο Παραγωγιοποίησης	Ανιχνευτής	LOD	LOQ	Εύρος γραμμικότητας	Ανάκτηση Εκχύλισης(%)	Εσωτερικό πρότυπο	Β.Π.
11 ΔΤΑ και 34 καθινόνες	Αίμα	LLE με EtOAc	PFPA (50°C, 20min)	EI-(MS) ^a	0.02-0.72 ng/mL	1-2.5 ng/mL	1–250 ng/mL 2.5–250 ng/mL	83.2-106	AP-d5, Cat-d5	110
6 ΔΤΑ, 4 φαιραιθυλαμίνες και 13 καθινόνες και άλλες ΝΨΟ	Αίμα, Ούρα	DILLME	Χλωροφορμικό εξύλιο	EI-MS	1-10 ng/mL	2-50 ng/mL	5–1000 ng/mL	92-115	Μεφεδρόνη D ₃	123
14 συνθετικές καθινόνες, 4 2C-X ανάλογα, 2 ΔΤΑ και 2 φαιραιθυλαμίνες	Ορός Ούρα	LLE με cHex + Et ₃ N	PFBCl (10 min)	EI-MS	0.06-1.2 ng/mL	0.2-8.33 ng/mL	20–1.000 ng/mL	Δεν αναφέρεται	MA-d9	150
Μεφεδρόνη	Πλάσμα, Ούρα	LLE με μέθυλ-tert-βουτυλαιθέρας(TBME)	MSTFA (60°C, 70min)	EI-MS	1.1 ng/mL 4.5 ng/mL	5 ng/mL 20 ng/mL	5-300 ng/mL 20-1,500 ng/mL	55 92	Μεφεδρόνη D ₃	114
4-MMC Μεθυλόνη Βουτυλόνη Αιθυλόνη Πεντυλόνη MDPV	Ούρα	SPE: SPEC [®] DAU, εκλούση με CH ₂ Cl ₂ /ISO/NH ₃ 80:20:2	HFBA (90°C, 15min)	EI-MS	5ng/mL (MDPV=20 ng/mL)	20ng/mL (MDPV=50 ng/mL)	50-2000 ng/mL	82 - 104	4-MMC-d ₃ Μεθυλόνη-d ₃ Βουτυλόνη-d ₃ Αιθυλόνη-d ₅	154
18 καθινόνες και 4-FA	Ούρα	LLE με TBME	TFAA (65°C, 30min)	EI-MS	10 - 30 ng/mL	30 - 100 ng/mL	100–1000 ng/mL	Δεν αναφέρεται	Αμφεταμίνη d ₅ , Διφαιραιθυλαμίνη	149
AP, MAP,PMA,MDMA,4-MMC, Βουφεδρίνη, 4μεθυλεφεδρίνη, Πεντυλόνη	Ούρα	SPME (PDMS/DVB)	PFPA (60°C, 10min)	EI-MS	5–25 ng/mL	25–100 ng/mL	50 -2000 ng/ mL	2–80	Αμφεταμίνη d ₁₁ , Πεντυλόνη d ₆	117
12 καθινόνες	Πλάσμα, Ούρα	SPE: Clean screen DAU, εκλούση με CH ₂ Cl ₂ /ISO/NH ₃ (80:20:2)	L-TPC (25°C, 20min)	EI-MS	0.1–0.7 0.29–2.14 μg/mL	0.17–1.33 0.50–4.01 μg/mL	5-200 μg/mL	>80	Νικεταμίδη	116
3 ΔΤΑ, 6 φαιραιθυλαμίνες και 3 καθινόνες	Υαλοειδές υγρό, Περικάρδιο υγρό, Αίμα	SPE:Oasis MCX, εκλούση με CH ₂ Cl ₂ /ISO/NH ₃ (80:20:2)	MTBSTFA (900 W,90 sec), με τεχνική μικροκυμμάτων	EI-MS	5 ng/mL	5 ng/mL	5 - 600 ng/mL	76.6 -112.8	AP-d6 Εφεδρίνη d3 4-MMC-d3	166
Μεθυλόνη, MDPV, άλλες 5 καθινόνες και 3 φαιραιθυλαμίνες	Αίμα	SPE: Oasis MCX, εκλούση με CH ₂ Cl ₂ /ISO/NH ₃	MBTFA (900 W,90 sec)	EI-MS	Μεθυλόνη: 5 ng/mL	Μεθυλόνη: 5 ng/mL MDPV: 40	Μεθυλόνη 10-500 ng/mL MDPV	70.3 - 116.6	AP-d6 MAP-d9 MDMA-d5	112

		(78:20:2)	, με τεχνική μικροκυμμάτων		MDPV: 40 ng/mL	ng/mL	40-500 ng/mL		MDEA-d5 Mbdb-d5	
7 ΔΤΑ και 22 καθιόνες	Ούρα	SPE: Clean Screen, έκλουση με CH ₂ Cl ₂ /ISO/NH ₃ (80:20:2)	PFPA (10°C, 60min)	EI-MS	0.5 -10 ng/ml	5 - 50 ng/ml	50-2000 ng/mL	54-120	AP-d ₁₁ MDA-d ₅ Βουτυλόνη-d ₃	177
4-CEC, a-PVP, 5-Cl-PVP, MDPV	Αίμα	SPE: Oasis MCX, έκλουση με CH ₂ Cl ₂ /ISO/NH ₃ (78:20:2)	MSTFA (80°C, 25 min)	EI-MS	5-25 ng/mL	25 ng/mL	25-800 ng/mL	87.25 -116.54	COC-d ₃	152
MDPV, 4-MMC, μεθυλόνη, ναφυρόνη,(25B, 25C, 25I)-NBOMes και 16 άλλες ΝΨΟ	Αίμα Ούρα	SPE: Clean Screen, έκλουση με CH ₂ Cl ₂ /ISO/NH ₃ (80:20:2)	PFPA (70°C, 40 min)	EI-MS	0.5-20 0.2-1.0 μg/L	0.5-10 0.5-50 μg/L	NBOMes: 0.5–50 μg/L, οι υπόλοιπες: 50–2,000 μg/L	31-115 64-105	4-MMC-d ₃ Αιθυλόνη-d ₅ MDPV-d ₈ 25INBOMe-d ₃	153
AP, MAP, MDMA, MDPV	Ούρα	LLE με τολουόλιο	HFBA (50°C, 15 min).	EI-MS	MDPV: 20 ng/mL AP, MAP, MDMA: 50 ng/mL	Δεν αναφέρεται	20-200 ng/mL 50-5000 ng/mL	87 - 113	Δευτεριωμένο ανάλογο για κάθε ουσία	115
AP, PMA, MAP, MDA, MDMA, MDEA	Αίμα	LLE με EtOAc	TFAA (20°C, 55 min)	Τριπλό τετράπολο MS, (EI)	0.22-0.81 ng/mL	0.65-2.4 ng/mL	1-500 ng/mL	91-104	AP-D5 MAP-D5	148
AP, MA, MDA, FEN, MDMA, MDEA	Αίμα	HF-LPME	TFAA (70°C, 15 min)	EI-MS	1-3 ng/mL	2-5 ng/mL	5-500 ng/mL	68-110	Δευτεριωμένο ανάλογο για κάθε ουσία	160
MDA. MDEA, MDMA	Υαλοειδές υγρό	LLE με EtOAc	HFBA (40°C, 20 min)	EI-ion trap MS	1-2.5 ng/mL	10 ng/mL	10-400 ng/mL	44.4-81.5	MDA-d ₅	122
AP, MAP, MDMA, MDEA, MBDB	Ιδρώτας	HS-SPME	AA (90°C, 3 min)	EI-MS	0.09-0.27 ng/επίθεμα	0.29-0.81 ng/επίθεμα	Δεν αναφέρεται	95-103	MDPA	120
AP, MA, MDA, MDMA, KT, NKT	Νύχια χεριών	Επώαση σε διάλυμα NaOH (95 °C, 30 min), LLE με EtOAc	HFBA (60°C, 30 min)	EI-MS	0.094 ng/mg	0.314 ng/mg	0.1-20 AP,MDMA,NKT 0.2–20 MA, MDMA 0.4-20 KT	72.3–94.9	Δευτεριωμένο ανάλογο για κάθε ουσία	125
AP, MA, MDA, MDMA, NKT	Νύχια ποδιών	Επώαση σε MeOH (50°C ,1h), LLE με EtOAc	HFBA (60°C, 30 min)	EI-MS	0.024 ng/mg	0.08 ng/mg	0.05–15.0 ng/mg AP, MDA, MDMA,NKT 0.08–15.0 ng/mg	80.6 – 87.5	Δευτεριωμένο ανάλογο για κάθε ουσία	126

							MA			
AP, MAP, MDMA, MDA, PT, FFA, KT	Σιέλος	SPE: Clean Screen, έκχύλιση με CH ₂ Cl ₂ /i-PrOH (25:75)	TFAA (65 °C, 15 min)	EI-MS	2.5 ng/mL	5 ng/mL	5–200 ng/mL	80.9 - 96.8	Δευτεριωμένο ανάλογο για κάθε ουσία	¹¹⁹
4-MMC	Τρίχες	Επώαση σε Ρ.Δ φωσφορικών pH=7, LLE με EtOAc	HFBA (60 °C, 30 min)	EI-MS	0.08 ng/mg	0.2 ng/mg	0.2 - 50.0 ng/mg	>76	MDMA-d5	¹³¹
Συντμήσεις: ΔΤΑ: Διεγερτικά τύπου αμφεταμίνης, ΝΨΟ: Νέες Ψυχοδραστικές Ουσίες, ΑΡ: αμφεταμίνη, ΜΑΡ: μεθαμφεταμίνη, ΡΜΑ: παράμεθοξυαμφεταμίνη, 4-FA: 4-φθόρο-αμφεταμίνη, FEN: φαινπροπορέξη, ΜDΡΑ: 3,4-μεθυλενοδιόξυπροπυάμφεταμίνη, COC: Κοκαΐνη, PT: Φαιντερμίνη, FFA: Φαινφλουραμίνη, KT: Κεταμίνη, NKT: Νορκεταμίνη, AA : οξικός αιθυλεστέρας, PFBCl: Πεντάφθοροβενζουλο χλωρίδιο, Β.Π.: Βιβλιογραφική Πηγή.										

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Στο κεφάλαιο αυτό γίνεται αναφορά στον οργανολογικό και υλικοτεχνικό εξοπλισμό που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη, την βελτιστοποίηση και την επικύρωση της μεθόδου για τον προσδιορισμό των αναλυτών.

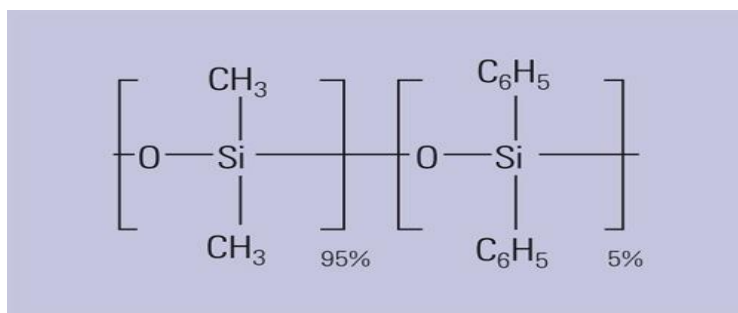
4.1 Αεριοχρωματογράφος-Φασματόμετρο Μαζών (GC-MS)

Η χρωματογραφική ανάλυση, η ανίχνευση και η ποσοτικοποίηση των αναλυτών έλαβε χώρα σε σύστημα αεριοχρωματογράφου συζευγμένου με φασματόμετρο μαζών. Το σύστημα αποτελούνταν από τον αεριοχρωματογράφο, μοντέλο Agilent 6890N, σε σύζευξη με το φασματόμετρο μαζών, μοντέλο MSD5975 (Εικόνα 4.1).



Εικόνα 4.1: Χρωματογραφικό σύστημα GC-MS

Το MS ήταν εξοπλισμένο με πηγή ιονισμού πρόσκρουσης ηλεκτρονίων ((Electron impact ionization, EI)), αναλυτή μαζών απλό τετράπολο και αντλία κενού Edwards. Η χρωματογραφική στήλη του GC ήταν η τριχοειδής DB-5 MS, με γεωμετρικά χαρακτηριστικά: 30m μήκος $\times$ 0,25mm διάμετρος στήλης, 0,25 μ m πάχος υλικού πλήρωσης στήλης. Η στατική φάση της στήλης αποτελείτο από (διφαινύλιο)₅%(διμέθυλο)₉₅%πολυσιλοξάνιο (Εικόνα 4.2), ενώ ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε το ήλιο.



Εικόνα 4.2: Δομή στατικής φάσης DB-5 MS

Οι ενέσεις των δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση αυτόματου δειγματολήπτη μοντέλου Agilent 7683B και η έγχυση του δείγματος στον αεροχρωματογράφο γινόταν σε λειτουργία *splitless*. Η επεξεργασία των χρωματογραφημάτων και των φασμάτων μάζων έγινε με την βοήθεια του λογισμικού Chemstation της εταιρίας Hewlett Packard.

4.2 Εργαστηριακός εξοπλισμός

Ο απαραίτητος εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε για την της ερευνητικής αυτής μελέτης είναι ο ακόλουθος :

- Αναλυτικός ζυγός, min= 10mg, max= 60g, 4 σημαντικά ψηφία, Rawag, μοντέλο WAS 60/C/2
- Ψηφιακό πεχάμετρο με ηλεκτρόδιο υάλου, Metrohm 691 pH Meter
- Ατομικός αναδευτήρας περιδίνησης (Vortex), Chiltren & Labinco
- Σύστημα παρασκευής υπερκάθαρου νερού, SynergyUV, Merck
- Σύστημα εκχύλισης στερεάς φάσης 20 θέσεων, Varian
- Αντλία κενού, ROCKER 400
- Σύστημα εξάτμισης 9 θέσεων συνδεδεμένο με φιάλη N₂ (Reacti-Vap), Pierce
- Φυγόκεντρος Labofuge 400R, Thermo Fisher
- Αναλυτική πιπέτα μεταβλητού όγκου 2-20 μL, Thermo Fisher
- Αναλυτική πιπέτα μεταβλητού όγκου 20-200 μL, Gilson
- Αναλυτική πιπέτα μεταβλητού όγκου 100-1000 μL, Gilson
- Ρύγχη πιπετών (tips) (2-200 μL)
- Ρύγχη πιπετών (tips) (200-1000 μL)
- Πλαστικές πιπέτες Pasteur
- Γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες
- Γυάλινοι κωνικοί δοκιμαστικοί σωλήνες
- Γυάλινοι εσφυρισμένοι κωνικοί δοκιμαστικοί σωλήνες

- Ογκομετρικοί κύλινδροι
- Γυάλινα φιαλίδια autosampler 2 mL με βιδωτό πώμα για χρωματογραφία, Agilent
- Γυάλινα σωληνάκια προσυγκέντρωσης (flat glass inserts), 400 uL

4.3 Αντιδραστήρια, διαλύτες και στήλες εκχύλισης

Οι διαλύτες και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στο πειραματικό μέρος είναι τα εξής:

- Απιονισμένο ύδωρ (H_2O), καθαρότητας HPLC
- Διάλυμα μεθανόλης (CH_3OH), καθαρότητας HPLC, Merck
- Διάλυμα ακετονιτριλίου (ACN), καθαρότητας HPLC, Merck
- Διάλυμα διχλωρομεθανίου (CH_2Cl_2), καθαρότητας HPLC, Merck
- Διάλυμα οξικού αιθυλεστέρα (EtOAc), καθαρότητας HPLC, Merck
- Διάλυμα ισοπροπανόλης (iso- C_3H_7OH), καθαρότητας HPLC, Merck
- Διάλυμα αμμωνίας (NH_3), 25% w/v, Merck
- Διάλυμα HCl 37% (v/v), καθαρότητας HPLC, Merck
- Διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου (NaOH), αναλυτικής καθαρότητας, Ferak
- Διάλυμα οξικού οξέος (CH_3COOH), αναλυτικής καθαρότητας, Merck
- Στερεό διένυδρο, δισόξινο φωσφορικό νάτριο ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$), αναλυτικής καθαρότητας, Merck
- Πενταφθοροπροπιονικός ανυδρίτης (pentafluoropropionic anhydride, PFPA), καθαρότητας 99%, SigmaAldrich
- Τριφθοροξικός ανυδρίτης (trifluoroacetic anhydride, TFAA), καθαρότητας 99%, Fluka
- Επταφθοροξικός ανυδρίτης (heptafluorobutyric acid anhydride, HFBA), καθαρότητας $\geq 99.5\%$, Fluka
- N,O-δισ(τριμεθυλοσιλνυλ)-τριφθοροακεταμίδιο (N,O-bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide, BSTFA) με 1% τριμεθυλοχλωροσιλάνιο (trimethylchlorsilane, TMCS), Sigma-Aldrich
- N-μεθυλ-N-τερτ-βουτυλοδιμεθυλοσιλνυλ-τριφθοροακεταμίδιο (N-methyl-N-tertbutyldimethylsilyl-trifluoroacetamide, MTBSTFA) με 1% τερτβουτυλοδιμεθυλοσιλνυλοχλωρίδιο (tert-butyldimethylsilylchloride, TBDMSCl), Fluka

Οι στήλες εκχύλισης που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

- Bond Elut LRC Certify, 130mg, 50/pk, Agilent
- Bond Elut C18, 130mg, 50/pk, Agilent

4.4 Βιολογικό υπόστρωμα

Για τις ανάγκες της ανάπτυξης της μεθόδου, αξιοποιήθηκαν φιάλες οι οποίες προήλθαν από το κέντρο αιμοδοσίας του νοσοκομείου 'ΓΝΑ Λαϊκό'. Οι εν λόγω φιάλες ήταν ελεύθερες φαρμάκων (drug free blood) και αναμίχθηκαν μεταξύ τους για την δημιουργία δεξαμενών αίματος (pooled blood).

Οι εφαρμογές της μεθόδου στα ούρα έλαβαν χώρα σε ούρα από εθελοντές. Τα συγκεκριμένα δείγματα εκλέχθηκαν πρωτίστως για την παρουσία φαρμάκων και εξαρτησιογόνων ουσιών και ήταν αρνητικά.

Τα άγνωστα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν αποτελούσαν δείγματα από δικαστικές υποθέσεις που ελήφθησαν στο Εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ για το διάστημα 01/2022-12/2022 και υπήρχε ένδειξη από το ιστορικό ή την ανοσοενζυμική μέθοδο (viva) για παρουσία εξαρτησιογόνων ουσιών.

4.5 Πρότυπες ουσίες αναφοράς

Ως πρότυπες ουσίες χρησιμοποιήθηκαν τα διεγερτικά τύπου αμφεταμίνης: αμφεταμίνη, μεθαμφεταμίνη, φαινυλοπροπανολαμίνη (PPA), εφεδρίνη, ψευδοεφεδρίνη, 3,4-μεθυλενοδιόξυμεθαμφεταμίνη (MDMA), 3,4-μεθυλενοδιόξυαμφεταμίνη (MDA), 3,4-μεθυλενοδιόξυ-N-αίθυλοαμφεταμίνη (MDEA) και βένζοδιοξολυλβουταναμίνη (MBDB). Από την σειρά των καθινονών: μεθκαθινόνη, 4-μεθυλμεθκαθινόνη, μεθεδρόνη, πυροβαλερόνη, μεθυλενοδιόξυπυροβαλερόνη (MDPV), μεθυλόνη και ναφυρόνη. Από την σειρά των φαιναυθλαμινών: 2C-B, 25B-NBOMe, 25C-NBOMe, 25I-NBOMe και παραμεθόξυαμφεταμίνη (PMMA).

Ως εσωτερικά πρότυπα χρησιμοποιήθηκαν τα δευτερωμένα ανάλογα d10-αμφεταμίνη, d5-μεθαμφεταμίνη και d5-3,4-μεθυλενοδιόξυμεθαμφεταμίνη (d5-MDMA).

Όλες οι πρότυπες ουσίες που περιγράφονται παραπάνω, είναι υψηλής καθαρότητας $\geq 98\%$ και προμηθεύτηκαν από τη εταιρία LGC Standards Ltd, πλην της σειράς των NBOMEs, τα οποία ήταν διαθέσιμα στο εργαστήριο ως πιστοποιημένα υλικά αναφοράς (CRM), στο πλαίσιο διενέργειας διεργασιολογικών ελέγχων. Για τα στερεά δείγματα, παρασκευάστηκαν μεθανολικά διαλύματα συγκέντρωσης 1 mg/mL και αποθηκεύτηκαν σε σκουρόχρωμα φιαλίδια των 2 mL. Το σύνολο των πρότυπων διαλυμάτων επισημάνθηκε με την κατάλληλη ετικέτα και αποθηκεύτηκε σε συνθήκες απλής ψύξης 4°C σύμφωνα με τις οδηγίες των πιστοποιητικών ανάλυσής τους.

Πίνακας 4.1: Πρότυπες ουσίες διπλωματικής εργασίας

Χημική τάξη	Ονομασία(INN)	Αριθμός CAS	Μορφή	Πηγή προέλευσης
Διεγερτικά τύπου αμφεταμίνης	Υδροχλωρική αμφεταμίνη	2706-50-5	Διάλυμα μεθανόλης C=1mg/mL, 1mL, (ως ελεύθερη βάση)	LGC Standards Ltd.
	Υδροχλωρική μεθαμφεταμίνη	300-42-5	Διάλυμα μεθανόλης C=1mg/mL, 1mL, (ως ελεύθερη βάση)	LGC Standards Ltd.
	Υδροχλωρικό MDMA	64057-70-1	Διάλυμα μεθανόλης C=1mg/mL, 1mL, (ως ελεύθερη βάση)	LGC Standards Ltd.
	Υδροχλωρικό MDA	4764-17-4	Διάλυμα μεθανόλης C=1mg/mL, 1mL, (ως ελεύθερη βάση)	LGC Standards Ltd.
	Υδροχλωρικό MDEA	74341-78-9	Διάλυμα μεθανόλης C=1mg/mL, 1mL, (ως ελεύθερη βάση)	LGC Standards Ltd.
	Υδροχλωρικό MBDB	128767-12-4	Διάλυμα μεθανόλης C=1mg/mL, 1mL, (ως ελεύθερη βάση)	LGC Standards Ltd.
	Υδροχλωρική φαινυλοπροπανολαμίνη	154-41-6	Διάλυμα μεθανόλης C=1mg/mL, 1mL, (ως ελεύθερη βάση)	LGC Standards Ltd.
	Υδροχλωρική Εφεδρίνη	24221-86-1	Διάλυμα μεθανόλης C=1mg/mL, 1mL, (ως ελεύθερη βάση)	LGC Standards Ltd.
	Υδροχλωρική ψευδοεφεδρίνη	321-97-1	Διάλυμα μεθανόλης C=1mg/mL, 1mL, (ως ελεύθερη βάση)	LGC Standards Ltd.
Συνθετικές Καθιόνες	Υδροχλωρική μεθκαθινόνη	49656-78-2	Διάλυμα μεθανόλης C=1mg/mL, 1mL, (ως ελεύθερη βάση)	LGC Standards Ltd.
	Υδροχλωρική 4-MMC	1189726-22-4	Διάλυμα μεθανόλης C=1mg/mL, 1mL, (ως ελεύθερη βάση)	LGC Standards Ltd.
	Υδροχλωρική μεθεδρόνη	879665-92-6	Διάλυμα μεθανόλης C=1mg/mL, 1mL, (ως ελεύθερη βάση)	LGC Standards Ltd.
	Υδροχλωρική πυροβαλερόνη	3563-49-3	Διάλυμα μεθανόλης C=1mg/mL, 1mL,	LGC Standards Ltd.

			(ως ελεύθερη βάση)	
	Υδροχλωρικό MDPV	24622-62-6	Διάλυμα μεθανόλης C=1mg/mL, 1mL, (ως ελεύθερη βάση)	LGC Standards Ltd.
	Υδροχλωρική μεθυλόνη	186028-80-8	Διάλυμα μεθανόλης C=1mg/mL, 1mL, (ως ελεύθερη βάση)	LGC Standards Ltd.
	Υδροχλωρική ναφυρόνη	850352-11-3	Διάλυμα μεθανόλης C=1mg/mL, 1mL, (ως ελεύθερη βάση)	LGC Standards Ltd.
Φαιναιθολαμίνες	Υδροχλωρικό 2C-B	56281-37-9	Διάλυμα μεθανόλης C=1mg/mL, 1mL, (ως ελεύθερη βάση)	LGC Standards Ltd.
	Υδροχλωρικό PMMA	3398-68-3	Διάλυμα μεθανόλης C=1mg/mL, 1mL, (ως ελεύθερη βάση)	LGC Standards Ltd.
	Υδροχλωρικό 25B-NBOMe	1026511-90-9	Λευκή κρυσταλλική σκόνη, 10mg	UNODC (CRM)
	Υδροχλωρικό 25C-NBOMe	1539266-19-7	Λευκή κρυσταλλική σκόνη, 10mg	UNODC (CRM)
	Υδροχλωρικό 25I-NBOMe	1043868-97-8	Λευκή κρυσταλλική σκόνη, 10mg	UNODC (CRM)
Εσωτερικά πρότυπα	Υδροχλωρική d10-αμφεταμίνη	169565-17-7	Διάλυμα μεθανόλης C=1mg/mL, 1mL, (ως ελεύθερη βάση)	LGC Standards Ltd.
	Υδροχλωρική d5-μεθαμφεταμίνη	60124-88-1	Διάλυμα μεθανόλης C=1mg/mL, 1mL, (ως ελεύθερη βάση)	LGC Standards Ltd.
	Υδροχλωρικό d5-MDMA	136765-43-0	Διάλυμα μεθανόλης C=1mg/mL, 1mL, (ως ελεύθερη βάση)	LGC Standards Ltd.

4.6. Διαλύματα παρακαταθήκης

Από τα διαλύματα των πρότυπων ουσιών παρασκευάστηκαν τα κάτωθι διαλύματα παρακαταθήκης:

- Διαλύματα παρακαταθήκης των πρότυπων ουσιών: αμφεταμίνη, μεθαμφεταμίνη, φαινυλοπροπανολαμίνη, εφεδρίνη, ψευδοεφεδρίνη, MDMA, MDA, MDEA και MBDB, μεθκαθινόνη, 4-MMC, μεθεδρόνη, πυροβαλερόνη, MDPV, μεθυλόνη, ναφυρόνη, 2C-B, 25B-NBOMe, 25C-NBOMe, 25I-NBOMe και PMMA συγκέντρωσης

100 $\mu\text{g/mL}$. Η παρασκευή των διαλυμάτων έγινε λαμβάνοντας 100 μL με αναλυτική πιπέτα από το εκάστοτε διάλυμα 1mg/mL και αραιώση με μεθανόλη έως τελικού όγκου 1 mL.

- Μικτό διάλυμα παρακαταθήκης των εσωτερικών προτύπων d10-αμφεταμίνη, d5-μεθαμφεταμίνη και d5-MDMA συγκέντρωσης 50 $\mu\text{g/mL}$. Η παρασκευή του μικτού διαλύματος έγινε λαμβάνοντας 50 μL από το αντίστοιχο διάλυμα $C=1 \text{ mg/mL}$ και συμπλήρωση με 850 μL μεθανόλης έως τελικού όγκου 1 mL.

Τα διαλύματα παρακαταθήκης που προέκυψαν, φυλάχθηκαν σε σκουρόχρωμα φιαλίδια με βιδωτό πώμα. Αφού επισημάνθηκαν καταλλήλως αποθηκεύτηκαν σε συνθήκες απλής ψύξης 4°C.

4.7 Διαλύματα εργασίας

Κατά το στάδιο ανάπτυξης και βελτιστοποίησης της προκείμενης μεθόδου χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω διαλύματα:

- Διαλύματα εργασίας των πρότυπων ουσιών, $C=10 \mu\text{g/mL}$.

Για κάθε μία από τις ουσίες αμφεταμίνη, μεθαμφεταμίνη, φαινυλοπροπανολαμίνη (PPA), εφεδρίνη, ψευδοεφεδρίνη, MDMA, MDA, MDEA και MBDB, μεθκαθινόνη, 4-MMC, μεθεδρόνη, πυροβαλερόνη, MDPV, μεθυλόνη, ναφυρόνη, 2C-B, 25B-NBOMe, 25C-NBOMe, 25I-NBOMe και PMMA παρασκευάστηκε διάλυμα $C=10 \mu\text{g/mL}$. Η παρασκευή του εκάστοτε διαλύματος έγινε με την παραλαβή 100 μL για κάθε ουσία από το αντίστοιχο διάλυμα παρακαταθήκης της με $C=100 \mu\text{g/mL}$ και αραιώση με μεθανόλη έως τελικού όγκου 1 mL (Διάλυμα Δ).

- Μικτό διάλυμα εργασίας αναλυτών, $C=2 \mu\text{g/mL}$.

Παρασκευάστηκε μικτό διάλυμα εργασίας των 21 αναλυτών της μεθόδου συγκέντρωσης 2 $\mu\text{g/mL}$ και τελικού όγκου 10mL. Για τον σκοπό αυτό, λήφθηκε με ρυθμιζόμενη αναλυτική πιπέτα όγκος 20 μL από κάθε διάλυμα παρακαταθήκης των 21 αναλυτών με $C=1 \text{ mg/mL}$ και συμπλήρωση με μεθανόλη μέχρι τελικού όγκου 10mL.

- Μικτό διάλυμα εργασίας αναλυτών, $C=0.1 \mu\text{g/mL}$.

Παρασκευάστηκε επιπλέον το μικτό διάλυμα εργασίας των 21 αναλυτών της μεθόδου συγκέντρωσης 0.1 $\mu\text{g/mL}$ και τελικού όγκου 1mL. Για το σκοπό αυτό, αραιώθηκε το μικτό διάλυμα εργασίας των αναλυτών με $C=2 \mu\text{g/mL}$. Πιο συγκεκριμένα, λήφθηκαν 50 μL από το εν λόγω διάλυμα και συμπληρώθηκε ο όγκος με μεθανόλη έως τελικού όγκου 1 mL.

- Μικτό διάλυμα εργασίας των εσωτερικών προτύπων $C=2 \mu\text{g/mL}$.

Για τα εσωτερικά πρότυπα d10-αμφεταμίνη, d5-μεθαμφεταμίνη και d5-MDMA παρασκευάστηκε διάλυμα μίγματος αυτών με $C=2 \mu\text{g/mL}$. Η παρασκευή του έγινε με προσθήκη 40 μL από το μικτό διάλυμα εργασίας των εσωτερικών προτύπων $C=50 \mu\text{g/mL}$ και συμπλήρωση με 950 μL μεθανόλης έως τελικού όγκου 1 mL (Διάλυμα Ε.Π.).

- Μικτό διάλυμα εργασίας των εσωτερικών προτύπων $C=0.6 \mu\text{g/mL}$

Παρασκευάστηκε επιπλέον το μικτό διάλυμα εργασίας των εσωτερικών προτύπων με $C=0.6 \mu\text{g/mL}$ όγκου 1 mL. Για το σκοπό αυτό, αραιώθηκε το μικτό διάλυμα εργασίας των εσωτερικών προτύπων $C=2 \mu\text{g/mL}$. Πιο συγκεκριμένα, λήφθηκαν 300 μL από το εν λόγω διάλυμα και συμπληρώθηκε ο όγκος με μεθανόλη έως τελικού όγκου 1 mL.

4.8 Πρότυπα διαλύματα βαθμονόμησης

Για τον σκοπό της επικύρωσης της αναπτυχθείσας μεθόδου παρασκευάστηκαν τα εξής διαλύματα:

Μικτό διάλυμα εργασίας (Διάλυμα B₁)

Στο διάλυμα B₁ με τελικό όγκο 5 mL, οι αναλύτες βρίσκονταν στις εξής συγκεντρώσεις:

- ✓ Φαινυλοπροπανολαμίνη, εφεδρίνη, ψευδοεφεδρίνη, MDA, μεθεδρόνη, μεθυλόνη, 25C-NBOMe, 25B-NBOMe, 25I-NBOMe : $C= 0,4 \mu\text{g/mL}$.
- ✓ Αμφεταμίνη, μεθαμφεταμίνη, μεθκαθινόνη, PMMA, MDMA, MDEA, 2C-B : $C= 1 \mu\text{g/mL}$.

Το διάλυμα B₁ παρασκευάστηκε ως εξής:

- i. Προσθήκη 20 μL από κάθε διάλυμα $C=100 \mu\text{g/mL}$ για τις ουσίες: φαινυλοπροπανολαμίνη, εφεδρίνη, ψευδοεφεδρίνη, MDA, μεθεδρόνη, μεθυλόνη, 25C-NBOMe, 25B-NBOMe, 25I-NBOMe.
- ii. Προσθήκη 50 μL από κάθε διάλυμα $C=100 \mu\text{g/mL}$ για τις ουσίες: αμφεταμίνη, μεθαμφεταμίνη, μεθκαθινόνη, PMMA, MDMA, MDEA, 2C-B.
- iii. Προσθήκη 4470 μL μεθανόλης μέχρι τελικό όγκο 5 mL.

Μικτό διάλυμα εργασίας (Διάλυμα B₂)

Στο διάλυμα B₂ με τελικό όγκο 2 mL, οι αναλύτες βρίσκονταν στις εξής συγκεντρώσεις:

- ✓ 4-MMC, MBDB : $C = 2 \text{ } \mu\text{g/mL}$
- ✓ Πυροβαλερόνη, ναφυρόνη, MDPV : $C = 3.2 \text{ } \mu\text{g/mL}$

Το διάλυμα B₂ παρασκευάστηκε ως εξής:

- i. Προσθήκη 40 μL από κάθε διάλυμα $C = 100 \text{ } \mu\text{g/mL}$ για τις ουσίες: 4-MMC, MBDB.
- ii. Προσθήκη 64 μL από κάθε διάλυμα $C = 100 \text{ } \mu\text{g/mL}$ για τις ουσίες: πυροβαλερόνη, ναφυρόνη, MDPV.
- iii. Προσθήκη 1728 μL μεθανόλης μέχρι τελικό όγκο 2 mL.

Μικτό διάλυμα εργασίας (Διάλυμα A)

Στο διάλυμα A με τελικό όγκο 2 mL, οι αναλύτες βρίσκονταν στις εξής συγκεντρώσεις:

- ✓ Φαινυλοπροπανολαμίνη, εφεδρίνη, ψευδοεφεδρίνη, MDA, μεθεδρόνη, μεθυλόνη, 25C-NBOMe, 25B-NBOMe, 25I-NBOMe : $C = 0.1 \text{ } \mu\text{g/mL}$
- ✓ Αμφεταμίνη, μεθαμφεταμίνη, μεθκαθινόνη, PMMA, MDMA, MDEA, 2C-B : $C = 0.25 \text{ } \mu\text{g/mL}$.
- ✓ 4-MMC, MBDB : $C = 0.5 \text{ } \mu\text{g/mL}$
- ✓ Πυροβαλερόνη, ναφυρόνη, MDPV : $C = 1 \text{ } \mu\text{g/mL}$

Το διάλυμα A παρασκευάστηκε ως εξής:

- i. Προσθήκη 500 μL από το διάλυμα B₁.
- ii. Προσθήκη 10 μL από κάθε διάλυμα $C = 100 \text{ } \mu\text{g/mL}$ για τις ουσίες: 4-MMC, MBDB.
- iii. Προσθήκη 20 μL από κάθε διάλυμα $C = 100 \text{ } \mu\text{g/mL}$ για τις ουσίες: πυροβαλερόνη, ναφυρόνη, MDPV.
- iv. Προσθήκη 1420 μL μεθανόλης μέχρι τελικό όγκο 2 mL.

Μικτό διάλυμα εργασίας (Διάλυμα C)

Στο διάλυμα C με τελικό όγκο 4 mL, οι αναλύτες βρίσκονταν στις εξής συγκεντρώσεις:

- ✓ Φαινυλοπροπανολαμίνη, εφεδρίνη, ψευδοεφεδρίνη, MDA, μεθεδρόνη, μεθυλόνη, 25C-NBOMe, 25B-NBOMe, 25I-NBOMe : $C = 2 \text{ } \mu\text{g/mL}$
- ✓ Αμφεταμίνη, μεθαμφεταμίνη, S-καθινόνη, μεθκαθινόνη, PMMA, MDMA, MDEA, 2C-B, 4-MMC, MBDB, πυροβαλερόνη, ναφυρόνη, MDPV : $C = 5 \text{ } \mu\text{g/mL}$.

Το διάλυμα C παρασκευάστηκε ως εξής:

- i. Προσθήκη 80 μL από κάθε διάλυμα $C=100 \mu\text{g/mL}$ για τις ουσίες: φαινυλοπροπανολαμίνη, εφεδρίνη, ψευδοεφεδρίνη, MDA, μεθεδρόνη, μεθυλόνη, 25C-NBOMe, 25B-NBOMe, 25I-NBOMe.
- ii. Προσθήκη 200 μL από κάθε διάλυμα $C=100 \mu\text{g/mL}$ για τις ουσίες: αμφεταμίνη, μεθαμφεταμίνη, μεθκαθινόνη, PMMA, MDMA, MDEA, 2C-B, 4-MMC, MBDB, πυροβαλερόνη, ναφυρόνη, MDPV.
- iii. Προσθήκη 880 μL μεθανόλης μέχρι τελικό όγκο 4 mL.

Τα παραπάνω παρασκευασθέντα διαλύματα χρησιμοποιήθηκαν στην συνέχεια για τον εμβολιασμό των βιολογικών δειγμάτων ολικού αίματος (spiked samples) ώστε να δημιουργηθούν τα πρότυπα βιολογικά δείγματα βαθμονόμησης (calibration samples, cal). Τα ίδια δείγματα παρασκευάστηκαν εκ νέου (A', B1', B2' και C') με σκοπό τον εμβολιασμό των βιολογικών δειγμάτων για την δημιουργία των βιολογικών δειγμάτων ελέγχου ποιότητας (quality control samples, QC's).

Ο εμβολιασμός των δειγμάτων βαθμονόμησης και ελέγχου ποιότητας έγινε σε 1 mL ολικού αίματος όπως παρουσιάζεται στους Πίνακες 4.2 και 4.3 αντίστοιχα.

Πίνακας 4.2 Παρασκευή προτύπων βιολογικών δειγμάτων ολικού αίματος για τη βαθμονόμηση (calibration samples, Cal).

Όγκος εμβολιασμού (μL) σε 1 mL ολικού αίματος	Μικτό διάλυμα εργασίας (συγκέντρωση, $\mu\text{g/mL}$)			Συγκέντρωση πρότυπου βιολογικού δείγματος (ng/mL)	Κωδικός προτύπου βιολογικού δείγματος
20	A	Φαινυλοπροπανολαμίνη, εφεδρίνη, ψευδοεφεδρίνη, MDA, μεθεδρόνη, μεθυλόνη, 25C-NBOMe, 25B-NBOMe, 25I-NBOMe	0.1	2	Cal 1
		Αμφεταμίνη, μεθαμφεταμίνη, μεθκαθινόνη, PMMA, MDMA, MDEA, 2C-B	0.25	5	
		4-MMC, MBDB	0.5	10	
		Πυροβαλερόνη, ναφυρόνη, MDPV	1	20	
40	A	Φαινυλοπροπανολαμίνη, εφεδρίνη, ψευδοεφεδρίνη, MDA, μεθεδρόνη, μεθυλόνη, 25C-NBOMe, 25B-NBOMe, 25I-NBOMe	0.1	4	Cal 2
		Αμφεταμίνη, μεθαμφεταμίνη, μεθκαθινόνη, PMMA, MDMA, MDEA, 2C-B	0.25	10	
		4-MMC, MBDB	0.5	20	
		Πυροβαλερόνη, ναφυρόνη, MDPV	1	40	

30	B₁	Φαινυλοπροπανολαμίνη, εφεδρίνη, ψευδοεφεδρίνη, MDA, μεθεδρόνη, μεθυλόνη, 25C-NBOMe, 25B-NBOMe, 25I-NBOMe	0.4	12	Cal 3
		Αμφεταμίνη, μεθαμφεταμίνη, μεθκαθινόνη, PMMA, MDMA, MDEA, 2C-B	1	30	
25	B₂	4-MMC, MBDB	2	50	
		Πυροβαλερόνη, ναφυρόνη, MDPV	3.2	80	
100	B₁	Φαινυλοπροπανολαμίνη, εφεδρίνη, ψευδοεφεδρίνη, MDA, μεθεδρόνη, μεθυλόνη, 25C-NBOMe, 25B-NBOMe, 25I-NBOMe	0.4	40	Cal 4
		Αμφεταμίνη, μεθαμφεταμίνη, μεθκαθινόνη, PMMA, MDMA, MDEA, 2C-B	1	100	
50	B₂	4-MMC, MBDB	2	100	
		Πυροβαλερόνη, ναφυρόνη, MDPV	3.2	160	
50	C	Φαινυλοπροπανολαμίνη, εφεδρίνη, ψευδοεφεδρίνη, MDA, μεθεδρόνη, μεθυλόνη, 25C-NBOMe, 25B-NBOMe, 25I-NBOMe,	2	100	Cal 5
		Αμφεταμίνη, μεθαμφεταμίνη, μεθκαθινόνη, PMMA, MDMA, MDEA, 2C-B, 4-MMC, MBDB, Πυροβαλερόνη, ναφυρόνη, MDPV	5	250	
100	C	Φαινυλοπροπανολαμίνη, εφεδρίνη, ψευδοεφεδρίνη, MDA, μεθεδρόνη, μεθυλόνη, 25C-NBOMe, 25B-NBOMe, 25I-NBOMe,	2	200	Cal 6
		Αμφεταμίνη, μεθαμφεταμίνη, μεθκαθινόνη, PMMA, MDMA, MDEA, 2C-B, 4-MMC, MBDB, Πυροβαλερόνη, ναφυρόνη, MDPV	5	500	

Πίνακας 4.3: Παρασκευή προτύπων δειγμάτων ελέγχου ποιότητας (QC samples).

Όγκος εμβολιασμού (μL) σε 1 mL ολικού αίματος	Μικτό διάλυμα εργασίας (συγκέντρωση, μg/mL)		Συγκέντρωση πρότυπου βιολογικού δείγματος (ng/mL)	Κωδικός πρότυπου βιολογικού δείγματος
	Φαινυλοπροπανολαμίνη, εφεδρίνη, ψευδοεφεδρίνη, MDA, μεθεδρόνη, μεθυλόνη, 25C-NBOMe, 25B-NBOMe, 25I-NBOMe	0.1	6	

60	A'	Αμφεταμίνη, μεθαμφεταμίνη, μεθκαθινόνη, PMMA, MDMA, MDEA, 2C-B	0.25	15	QC 1
		4-MMC, MBDB	0.5	30	
		Πυροβαλερόνη, ναφυρόνη, MDPV	1	60	
150	B₁'	Φαινυλοπροπανολαμίνη, εφεδρίνη, ψευδοεφεδρίνη, MDA, μεθεδρόνη, μεθυλόνη, 25C-NBOMe, 25B-NBOMe, 25I-NBOMe	0.4	60	QC 2
		Αμφεταμίνη, μεθαμφεταμίνη, μεθκαθινόνη, PMMA, MDMA, MDEA, 2C-B	1	150	
62.5	B₂'	4-MMC, MBDB	2	125	
		Πυροβαλερόνη, ναφυρόνη, MDPV	3.2	200	
80	C'	Φαινυλοπροπανολαμίνη, εφεδρίνη, ψευδοεφεδρίνη, MDA, μεθεδρόνη, μεθυλόνη, 25C-NBOMe, 25B-NBOMe, 25I-NBOMe,	2	160	QC 3
		Αμφεταμίνη, μεθαμφεταμίνη, μεθκαθινόνη, PMMA, MDMA, MDEA, 2C-B, 4-MMC, MBDB, Πυροβαλερόνη, ναφυρόνη, MDPV	5	400	

4.9 Ρυθμιστικά διαλύματα

Τα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διάρκεια ανάπτυξης και βελτιστοποίησης της μεθόδου όπως και ο τρόπος παρασκευής τους περιγράφονται παρακάτω.

- Ρυθμιστικό διάλυμα οξικών 100mM, pH=4

Σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL, μεταφέρονται 80 mL υπερκάθαρο νερό, προστίθενται 570 μ L πυκνό διάλυμα CH_3COOH και 1.6 mL KOH 1 M. Το pH ρυθμίζεται περίπου στο 4.0 (± 0.5) με προσθήκη στάγδην διαλύματος KOH 1M.

- Ρυθμιστικό διάλυμα οξικών, pH=5

Ζυγίζονται 13.6 g οξικού νατρίου και διαλύονται σε 6 mL πυκνού οξικού οξέος. Στη συνέχεια προστίθεται υπερκάθαρο νερό έως τελικού όγκου 1 L. Το pH ρυθμίζεται περίπου στο 5.0 (± 0.5) με προσθήκη στάγδην διαλύματος NaOH 1M.

- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0.1M, pH=6

Ζυγίζονται 7.8 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ και διαλύονται σε 500 mL απιονισμένου νερού. Στη συνέχεια το pH ρυθμίζεται στο 6.0 με προσθήκη στάγδην NaOH (1.0 M), με τη βοήθεια ψηφιακού πεχαμέτρου.

- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0.1M, pH=7

Ζυγίζονται 3.58 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ και 3.54 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, τα οποία διαλύονται σε 100 mL απιονισμένου νερού αντίστοιχα, διάλυμα I και διάλυμα II. Εν συνεχεία 19.5 mL διάλυμα I αναμιγνύονται με 30.5 mL διάλυμα II και συμπληρώνονται μέχρι τα 100 mL με υπερκάθαρο νερό. Τέλος το pH ρυθμίζεται στο 7.0 με προσθήκη στάγδην NaOH (1.0 M), με τη βοήθεια ψηφιακού πεχαμέτρου.

Τα παραπάνω ρυθμιστικά διαλύματα φυλάχθηκαν σε συνθήκες απλής ψύξης στους 4 °C.

4.10 Μίγματα διαλυτών

Τα παρασκευασθέντα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη, βελτιστοποίηση και επικύρωση της μεθόδου περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω.

Από τα αναφερόμενα διαλύματα, τα διαλύματα έκλουσης που εφαρμόστηκαν, ετοιμαζόντουσαν κάθε φορά όταν η εκχύλιση βρισκόταν στο στάδιο εφαρμογής κενού. Επιπλέον για την αμμωνία εξαιτίας της πτητικότητας της, χρησιμοποιούνταν κάθε φορά νέο διάλυμα εργασίας της.

Πίνακας 4.4: Τρόπος παρασκευής διαλυμάτων έκλουσης

Διάλυμα έκλουσης	Σύσταση διαλύματος	Παρασκευαστική διαδικασία
$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{i-PrOH}/\text{NH}_3$	85:15:2	Σε 7.5 mL i-PrOH προστίθεται 1 mL NH_3 25% v/v και το μίγμα αναδεύεται για 10 sec. Έπειτα γίνεται προσθήκη υπό ανάδευση 42.5 mL CH_2Cl_2 .
	80:20:2	Σε 10 mL i-PrOH προστίθεται 1 mL NH_3 25% v/v και το μίγμα αναδεύεται για 10 sec. Έπειτα γίνεται προσθήκη υπό ανάδευση 40 mL CH_2Cl_2 .
	75:25:2	Σε 12.5 mL i-PrOH προστίθεται 1 mL NH_3 25% v/v και το μίγμα αναδεύεται για 10 sec. Έπειτα γίνεται προσθήκη υπό ανάδευση 37.5 mL CH_2Cl_2 .
EtOAc/NH_3	98:2	Σε 49 mL EtOAc προστίθεται 1 mL NH_3 25% v/v και το μίγμα αναδεύεται για 10 sec.

- Μεθανολικό διάλυμα HCl 1%

Σε 50 mL CH_3OH σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL γίνεται σταδιακή προσθήκη 1 mL πυκνού HCl 37% v/v και το μίγμα αναδεύεται. Στην συνέχεια προστίθεται όγκος CH_3OH μέχρι την χαραγή. Το διάλυμα φυλάχθηκε σε σκιερό μέρος σε θερμοκρασία δωματίου.

- Διάλυμα οξικού οξέος (AcOH) 0.1 N

Προστίθενται 0.29 mL παγόμερφου οξικού οξέος σε ογκομετρική φιάλη των 50 mL και συμπληρώνεται μέχρι την χαραγή με υπερκάθαρο νερό. Το διάλυμα που προέκυψε, φυλάχθηκε σε θερμοκρασία δωματίου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

5.1 Προκαταρκτική ανάλυση

Αρχικά, αναγκαίο κρίθηκε να γίνει η ταυτοποίηση των χρόνων ανάσχεσης και των αντίστοιχων φασμάτων μαζών, για τους υπό μελέτη αναλύτες και τα υποψήφια εσωτερικά πρότυπά τους. Για το σκοπό αυτό ποσότητα από τα διαλύματα Δ και Ε.Π., ενέθηκε στο GC-MS το οποίο βρισκόταν σε λειτουργία πλήρους σάρωσης ιόντων (scan mode) σε περιοχή μαζών (40-800) m/z. Πιο αναλυτικά 50 μL από κάθε ένα από τα διαλύματα Δ και 50 μL από το διάλυμα Ε.Π. μεταφέρθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες, εξατμίστηκαν με διαβίβαση $\text{N}_{2(g)}$, το ξηρό υπόλειμμα ανασυστάθηκε με 100 μL EtOAc και τέλος 1 μL ενέθηκε στο σύστημα GC-MS.

Από την επεξεργασία των ληφθέντων χρωματογραφημάτων διαπιστώθηκε ο χρόνος κατακράτησης (t_R) των ουσιών και από την επεξεργασία των φασμάτων μαζών κρίθηκαν τα πιο χαρακτηριστικά θραύσματα για την κάθε ουσία, τα οποία και χρησιμοποιήθηκαν στις επόμενες δοκιμασίες για την παρακολούθηση επιλεγμένων ιόντων (SIM mode).

Άξιο παρατήρησης είναι ότι οι περισσότερες χρωματογραφικές κορυφές παρουσίασαν ασυμμετρία (tailing), γεγονός που μπορεί να δικαιολογηθεί από την παρουσία της αμινομάδας ή και υδροξυλομάδας στις δομές των αναλυτών. Οι λειτουργικές αυτές ομάδες αλληλοεπιδρούν με τα συστατικά της στήλης κυρίως με δεσμούς H_2 , οδηγώντας σε κατακράτηση των ουσιών και κατ' επέκταση στην λήψη κακής ποιότητας χρωματογραφικών κορυφών.

Επιπροσθέτως, παρατηρήθηκε ότι στα ΔΤΑ, υπήρχε σημαντική διακύμανση των τιμών της ολοκλήρωσης των χρωματογραφικών κορυφών τους ως συνέπεια της πτητικότητας τους κατά την διάρκεια της εξάτμισης τους. Για τον περιορισμό του φαινομένου αυτού, εφαρμόστηκε ως διορθωτική κίνηση η προσθήκη 100 μL 1% π. HCl σε μεθανόλη σε κάθε διάλυμα, για την μετατροπή των αναλυτών από ελεύθερες βάσεις σε άλατα υδροχλωρίου.

5.2 Βελτιστοποίηση παραγωγοποίησης

Η κακής ποιότητας χρωματογραφική συμπεριφορά των περισσοτέρων αναλυτών κατά την διάρκεια της ανάλυσης τους με GC-MS και η ανάγκη για υψηλή ευαισθησία της μεθόδου είναι οι λόγοι που κρίνουν αναγκαία την παραγωγοποίηση των ουσιών αυτών.

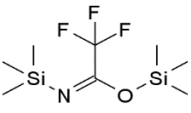
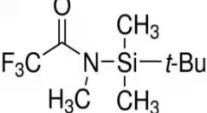
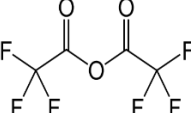
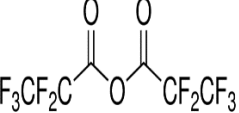
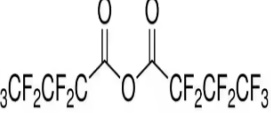
Η παραγωγοποίηση είναι η χημική αντίδραση που λαμβάνει χώρα μεταξύ του αναλύτη και ενός αντιδραστήριου παραγωγοποίησης προς τον σχηματισμό ενός προϊόντος με βελτιωμένη χρωματογραφική συμπεριφορά και αυξημένη σταθερότητα. Οι αντιδράσεις της

παραγωγοποίησης στηρίζονται στην ύπαρξη τουλάχιστον ενός ελεύθερου ατόμου υδρογόνου στο μόριο του αναλύτη, το οποίο βρίσκεται δίπλα σε ένα ηλεκτραρνητικό άτομο όπως στις ομάδες COOH , $-\text{OH}$, $-\text{NH}$ και $-\text{SH}$. Το ελεύθερο υδρογόνο αντικαθίσταται από ένα ακύλιο ή αλκύλιο ή σιλάνιο με αποτέλεσμα να προκύπτει το παράγωγο του αναλύτη με αυξημένη μοριακή μάζα και τροποποιημένη δομή. Η αύξηση της μοριακής μάζας οδηγεί στην θραυσματοποίηση του μορίου σε μεγαλύτερης μάζας μοριακά ιόντα που είναι περισσότερο χαρακτηριστικά. Επομένως εκτός από την βελτίωση της χρωματογραφικής συμπεριφοράς και της σταθερότητας, με την παραγωγοποίηση επιτυγχάνεται και η αύξηση της ευαισθησίας της μεθόδου.

Για την διερεύνηση του καταλληλότερου αντιδραστηρίου παραγωγοποίησης εξετάστηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια (Πίνακας 5.1):

1. N,O-δισ-τριμεθυλοσιλυν-τριφθοροακεταμίδιο (BSTFA) με 1% τριμεθυλοχλωροσιλάνιο (TMCS)
2. N-τερτ-βουτυλοδιμεθυλοσιλυν-N-μεθυλτριφθοροακεταμίδιο (MTBSTFA) με 1% τερτ-βουτυλοδιμεθυλοσιλυνχλωρίδιο (TBDMSCl)
3. τριφθοροοξικός ανυδρίτης (TFAA)
4. πενταφθοροπροπιονικός ανυδρίτης (PFPA)
5. επταφθοροοξικός ανυδρίτης (HFBA).

Πίνακας 5.1: Χημικές δομές των υπό εξέταση αντιδραστηρίων παραγωγοποίησης και οι αντίστοιχες μεταβολές στο μοριακού βάρους.

BSTFA	MTBSTFA	TFAA	PFPA	HFBA
				
+ 72 g/mol	+ 114 g/mol	+ 96 g/mol	+ 146 g/mol	+ 196 g/mol

Από κάθε διάλυμα Π, λήφθηκαν 50 μL και μεταφέρθηκαν σε εσφυρισμένα κωνικά φιαλίδια. Επιπλέον έγινε προσθήκη 100 μL μεθανολικού διαλύματος 1% π HCl . Ακολούθησε εξάτμιση με διαβίβαση $\text{N}_{2(g)}$ μέχρι πλήρους εξάτμισης του δείγματος. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε η παραγωγοποίηση των δειγμάτων με τα υπό μελέτη αντιδραστήρια όπως περιγράφεται στον πίνακα 5.2. Η λειτουργία του MS, ήταν ρυθμισμένη σε σάρωση πλήρους φάσματος ιόντων με εύρος (40-800) m/z με σκοπό τον εντοπισμό των νέων χρόνων έκλυσης και των φασμάτων μάζας για κάθε μία από τις πλέον παραγωποποιημένες ουσίες.

Πίνακας 5.2 Πειραματικές διεργασίες δοκιμασιών παραγωγοποίησης

Αντιδραστήρια σιλανοποίησης BSTFA, MTBSTFA		Αντιδραστήρια ακετυλίωσης TFAA, PFPA, HFBA	
i.	50 μ L ακετονιτρίλιο + 50 μ L BSTFA με 1% TMCS / MTBSTFA με 1% TBDMSCl	i.	50 μ L EtOAc + 50 μ L TFAA / PFPA / HFBA
ii.	Τοποθέτηση στην άμμο στους 70 °C για 30 min	ii.	Τοποθέτηση στην άμμο στους 70 °C για 30 min
iii.	Αφέθηκαν για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να γίνει συμπύκνωση του διαλύματος	iii.	Αφέθηκαν για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να γίνει συμπύκνωση του διαλύματος
iv.	Παραλαβή δείγματος και μεταφορά σε γυάλινα φιαλίδια autosampler εξοπλισμένα με γυάλινα σωληνάκια προσυγκέντρωσης (glass inserts)	iv.	Εξάτμιση μέχρι ξηρού υπό N _{2(g)} , επανασύσταση με 100 μ L EtOAc και ανάδευση σε αναδευτήρα περιδίνισης για 10 sec.
v.	Τοποθέτηση όλων των φιαλιδίων στον αυτόματο δειγματολήπτη και έγχυση 1 μ L στο χρωματογραφικό σύστημα	v.	Παραλαβή δείγματος και μεταφορά σε γυάλινα φιαλίδια autosampler εξοπλισμένα με γυάλινα σωληνάκια προσυγκέντρωσης (glass inserts)
		vi.	Τοποθέτηση όλων των φιαλιδίων στον αυτόματο δειγματολήπτη και έγχυση 1 μ L στο χρωματογραφικό σύστημα

Από τα ληφθέντα χρωματογραφήματα διαπιστώθηκαν τα εξής:

1. Τα N-πυρρολιδίνο παράγωγα της καθινόνης όπως η ναφυρόνη, η πυροβαλερόνη και το MDPV ήταν अपαραγωγοποίητα σε κάθε δοκιμή αντιδραστηρίου. Φυσικά αυτό ήταν αναμενόμενο αφού δεν διαθέτουν λειτουργική ομάδα.
2. Σχετικά με το αντιδραστήριο σιλανοποίησης MBTSTFA, οι δευτεροταγείς αμίνες δεν παραγωγοποιούνταν, πιθανώς αυτό να συμβαίνει λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης. Το εύρημα αυτό οδήγησε στην απόρριψη του συγκεκριμένου αντιδραστηρίου.
3. Σχετικά με το αντιδραστήριο BSTFA, το 2C-B εμφάνισε προϊόντα παραγωγοποίησης μόνης και διπλής υποκατάστασης και τα NBOMes δεν αντιδρούσαν πλήρως με

αποτέλεσμα να υπάρχει και παραγωγοποιήτο ποσοστό από αυτές. Επομένως το BSTFA απορρίφθηκε στο σημείο αυτό.

4. Για τα υπόλοιπα αντιδραστήρια, οι παραγωγοποιήσεις ήταν επιτυχείς για το σύνολο των παραγωγοποιήσιμων αναλυτών, παρέχοντας οξείες και συμμετρικές κορυφές αλλά και πιο χαρακτηριστικά θραύσματα ταυτοποίησης των ουσιών. Τα συγκεκριμένα θραύσματα ελήφθησαν υπόψη για την δημιουργία μεθόδων επιλεγμένων ιόντων (SIM) για κάθε αντιδραστήριο.

Στην συνέχεια προκειμένου να επιλέξουμε το καταλληλότερο αντιδραστήριο παραγωγοποίησης ανάμεσα στους ακετυλιωτικούς παράγοντες TFAA, PFPA και HFBA τέθηκε ως κριτήριο η ευαισθησία. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το μικτό διάλυμα των 21 αναλυτών με $C=0,1 \mu\text{g/mL}$, από το οποίο ορισμένη ποσότητα λαμβανόταν κάθε φορά για την μελέτη των αντιδραστηρίων σε 5 επίπεδα συγκεντρώσεων όπως φαίνεται στον Πίνακα 5.3. Η λειτουργία του MS ρυθμίστηκε στην επιλογή παρακολούθησης συγκεκριμένων ιόντων (SIM) για κάθε ένα από τα αντιδραστήρια παραγωγοποίησης.

Πίνακας 5.3: Ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της ευαισθησίας των ακετυλιωτικών αντιδραστηρίων παραγωγοποίησης

Λαμβανόμενη ποσότητα (μL) από το διάλυμα Π ($0.1 \mu\text{g/mL}$)	Συγκέντρωση διαλύματος έγχυσης (ppb)
10	10
20	20
50	50
100	100
200	200

Από τα αποτελέσματα της δοκιμασίας αυτής το αντιδραστήριο PFPA παρείχε χαμηλότερα όρια ανίχνευσης σύμφωνα με τον Πίνακα 5.4 για το σύνολο των αναλυτών κι έτσι επιλέχθηκε ως το αντιδραστήριο παραγωγοποίησης της αναπτυχθείσας μεθόδου.

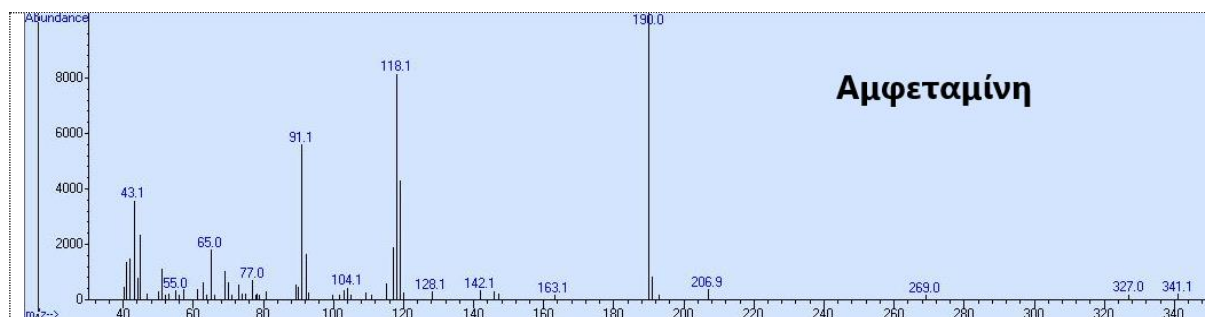
Έπειτα ακολούθησε η βελτιστοποίηση των πειραματικών παραμέτρων της παραγωγοποίησης. Με αλλαγή ενός παράγοντα την φορά (one factor at the time, OFAT) μελετήθηκαν οι παράγοντες χρόνος αντίδρασης (20 min, 30 min και 40 min) και η θερμοκρασία της άμμου (40 °C, 50 °C , 60 °C και 70 °C). Ως απόκριση επιλέχθηκε το εμβαδόν της κορυφής του κύριου ιόντος για κάθε έναν από τους 21 αναλύτες. Από την αξιολόγηση των χρωματογραφημάτων οι βέλτιστες συνθήκες παραγωγοποίησης ήταν:

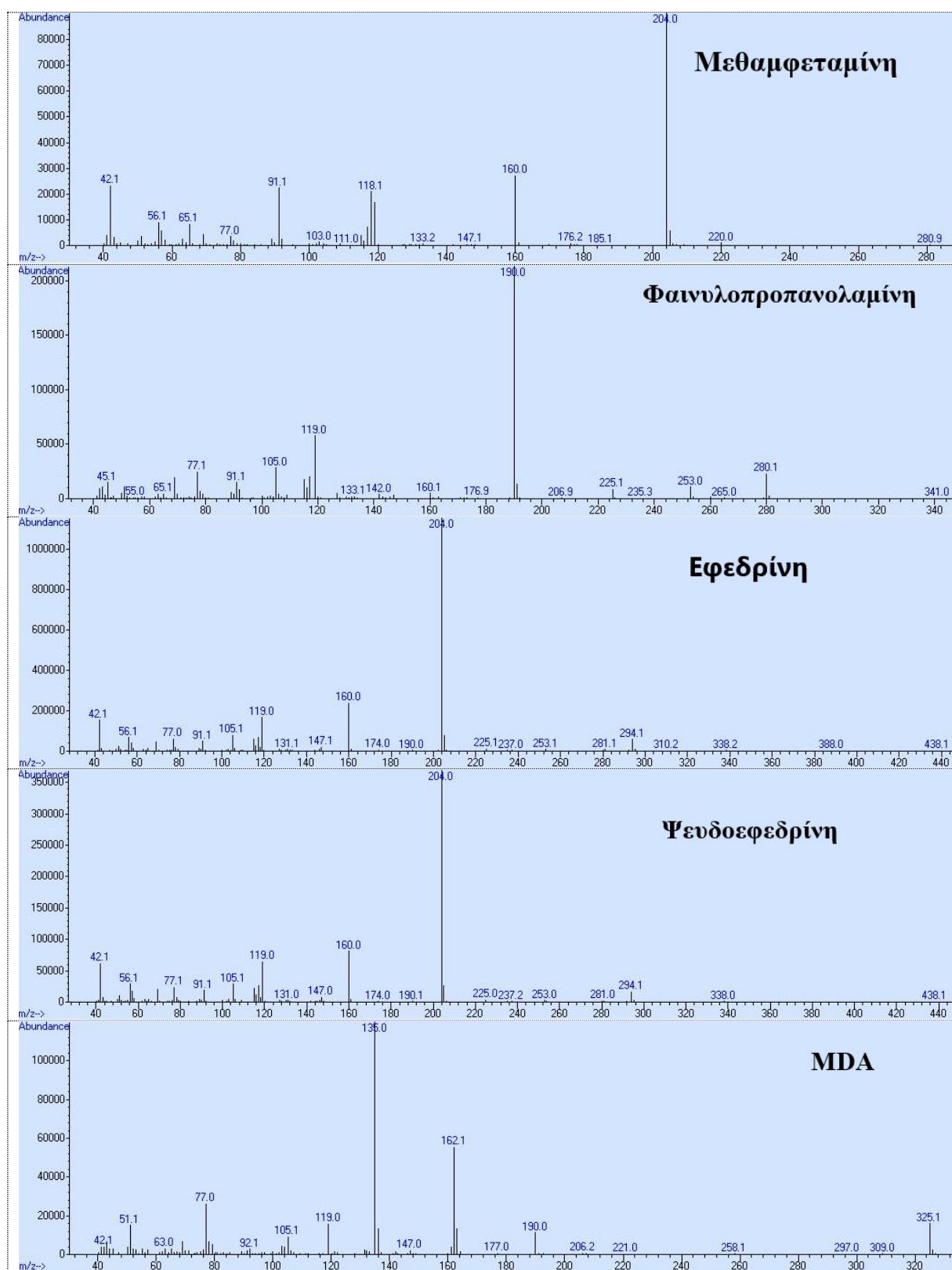
- Θερμοκρασία άμμου: 40 °C
- Χρόνος αντίδρασης: 20 min

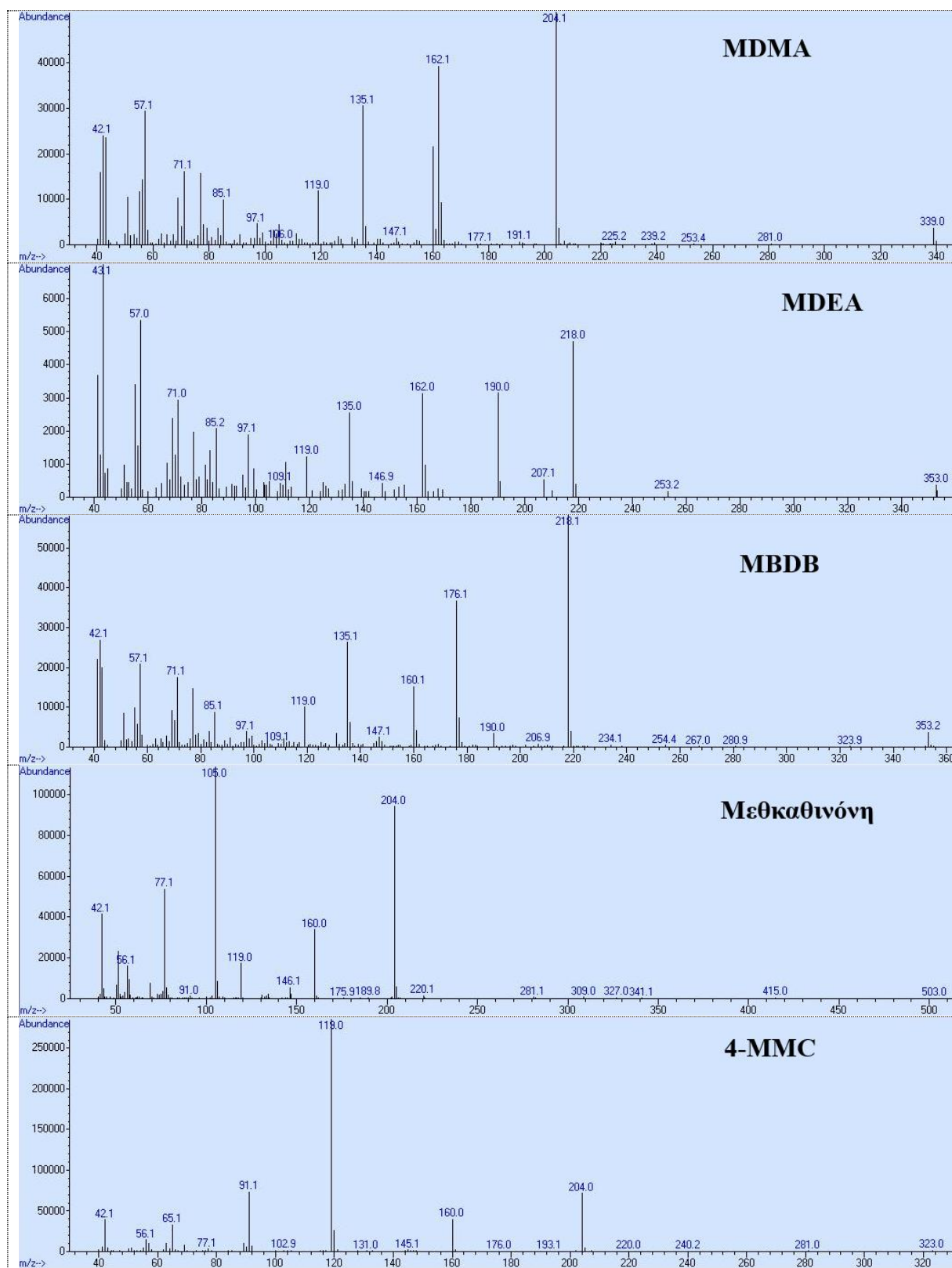
Πίνακας 5.4: Ευαισθησία της μεθόδου για τα υποψήφια αντιδραστήρια παραγωγοποίησης

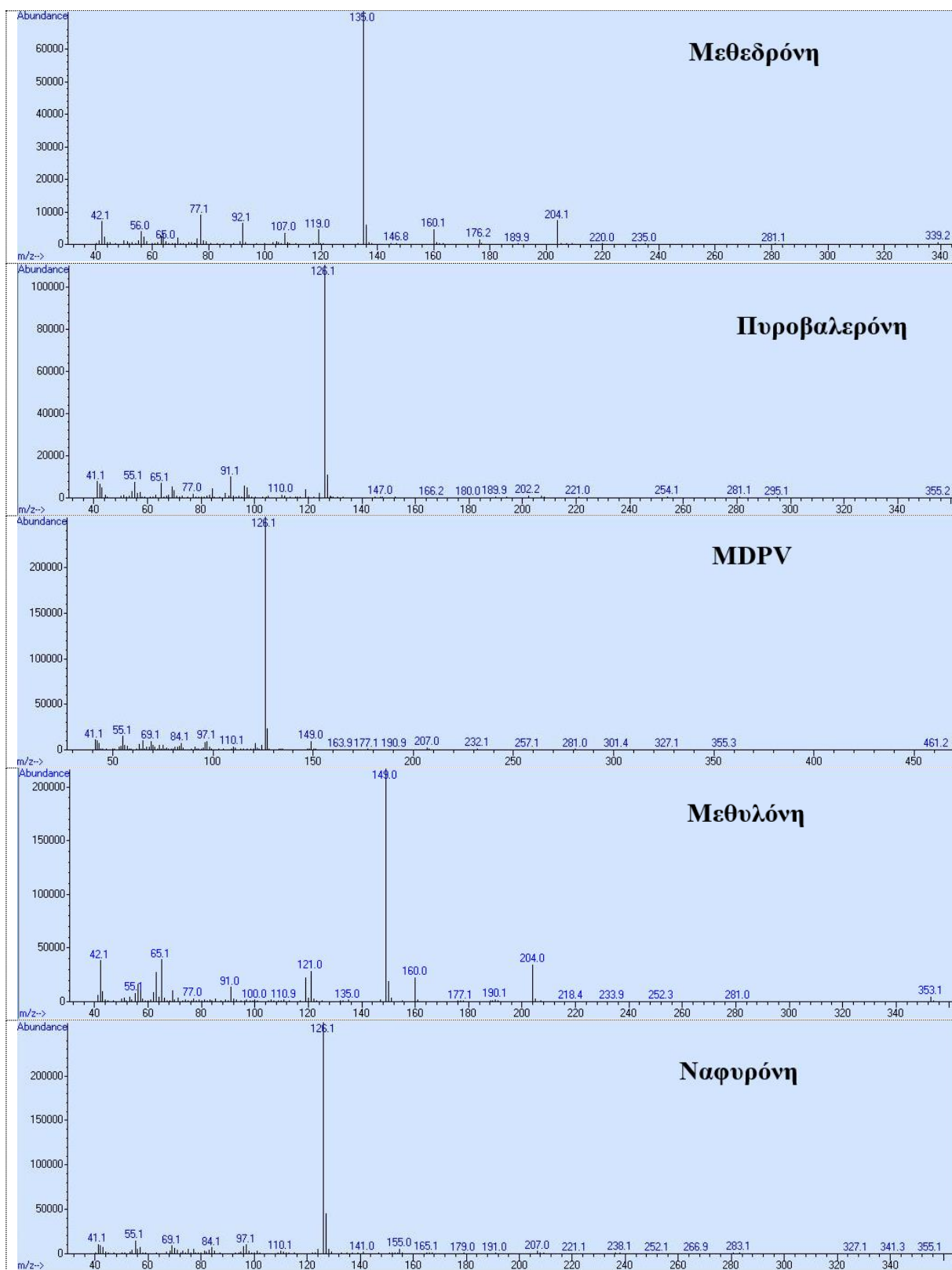
Αναλύτης	TFAA	PFPA	HFBA
	Ευαισθησία στο GC/MS (ppb)		
Αμφεταμίνη	10	10	50
Μεθαμφεταμίνη	10	10	50
Φαινυλοπροπανολαμίνη	10	10	10
Εφεδρίνη	10	10	10
Ψευδοεφεδρίνη	10	10	10
MDA	10	10	10
MDMA	10	10	20
MDEA	20	10	20
MBDB	50	10	20
μεθκαθινόνη	20	10	10
4-MMC	20	10	10
μεθεδρόνη	20	10	10
πυροβαλερόνη	10	20	10
MDPV	20	20	20
μεθυλόνη	20	10	10
ναφυρόνη	50	20	100
2C-B	10	10	20
PMMA	10	10	10
25B-NBOMe	10	10	20
25C-NBOMe	10	10	20
25I-NBOMe	10	10	20

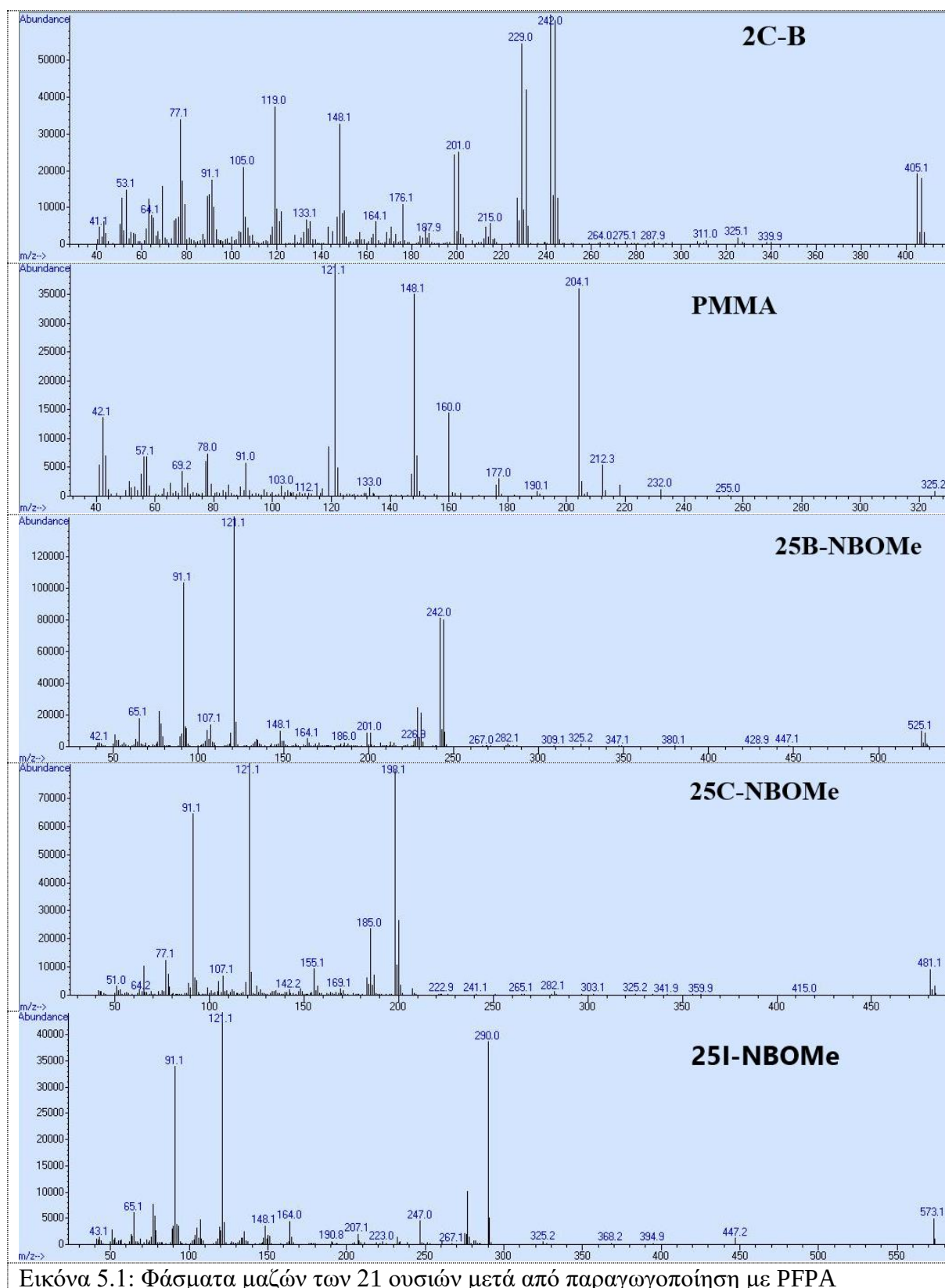
Στην Εικόνα 5.1 εμφανίζονται τα φάσματα μαζών των 21 αναλυτών όπως προέκυψαν μετά από την παραγωγοποίηση τους με το αντιδραστήριο PFPA.











Εικόνα 5.1: Φάσματα μαζών των 21 ουσιών μετά από παραγωγοποίηση με PFPA

Με εξέταση των φασμάτων μαζών για κάθε μία από τις 21 ουσίες, επιλέχθηκαν 3 χαρακτηριστικά θραύσματα ταυτοποίησης για κάθε ουσία εκ των οποίων 1 χρησιμοποιήθηκε ως ιόν ποσοτικοποίησης (quantifier ion) και τα υπόλοιπα 2 ως ιόντα ταυτοποίησης (qualifier

ions). Στον Πίνακα 5.5 παρουσιάζονται τα 3 χαρακτηριστικά θραύσματα και ο χρόνος ανάσχεσης για κάθε ουσία.

Πίνακας 5.5: Ιόντα ποσοτικοποίησης και ταυτοποίησης και χρόνοι ανάσχεσης για κάθε αναλύτη

Αναλύτης	Ιόν ποσοτικοποίησης (quantifier ion)	Ιόντα ταυτοποίησης (qualifier ions)	Χρόνος ανάσχεσης tr (min)
Αμφεταμίνη	190	118, 91	4.78
Μεθαμφεταμίνη	204	160, 118	5.32
Φαινυλοπροπανολαμίνη	190	280, 253	4.87
Εφεδρίνη	204	160, 105	5.17
Ψευδοεφεδρίνη	204	160, 294	5.43
MDA	135	162, 325	6.22
MDMA	204	162, 135	6.69
MDEA	218	162, 135	6.83
MBDB	218	176, 135	6.92
μεθκαθινόνη	105	204, 77	5.52
4-MMC	119	204, 160	5.97
μεθεδρόνη	135	204, 160	6.58
πυροβαλερόνη	126	127, 91	7.33
MDPV	126	127, 149	8.21
μεθυλόνη	149	121, 204	6.94
ναφυρόνη	126	127, 96	8.82
2C-B	244	231, 405	7.36
PMMA	121	148, 204	6.29
25C-NBOMe	198	121, 200	9.59
25B-NBOMe	121	242, 244	9.98
25I-NBOMe	290	277, 573	10.51

5.3 Επιλογή εσωτερικού προτύπου

Ως εσωτερικό πρότυπο ορίζεται η χημική ουσία που προστίθεται σε σταθερή ποσότητα σε όλα τα δείγματα βαθμονόμησης, έλεγχου ποιότητας αλλά και στα άγνωστα δείγματα. Ιδανικά, η

χημική ουσία πρέπει να έχει παρόμοιες φυσικοχημικές ιδιότητες και χρωματογραφική συμπεριφορά με τις υπό ανάλυση ουσίες, να μην υπάρχει φυσιολογικά στα άγνωστα δείγματα και να μην εκλούεται στον ίδιο χρόνο με τους αναλύτες. Το εσωτερικό πρότυπο είναι η μέθοδος εκλογής για ποσοτικούς προσδιορισμούς σε βιολογικά υγρά καθώς εξυπηρετεί στην εξομάλυνση των διαφοροποιήσεων από δείγμα σε δείγμα, στα στάδια προκατεργασίας τους.

Στην παρούσα εργασία λόγω του μεγάλου πλήθους των αναλυτών επιλέχθηκαν 3 διαφορετικά εσωτερικά πρότυπα. Αυτά είναι η d₁₀-αμφεταμίνη, η d₅-μεθαμφεταμίνη και το d₅-MDMA. Από την πορεία προκατεργασίας των δειγμάτων διαπιστώθηκε ότι :

- Η d₁₀-αμφεταμίνη είναι η πλέον κατάλληλη για την αμφεταμίνη,
- Η d₅-μεθαμφεταμίνη είναι η πλέον κατάλληλη για τις μεθαμφεταμίνη, εφεδρίνη και ψευδοεφεδρίνη την φαινυλοπροπανολαμίνη και την μεθκαθινόνη.
- Το d₅-MDMA είναι η πλέον κατάλληλη για τις ουσίες : MDMA, MDA, MDEA, MBDB, PMMA, MDPV, μεθεδρόνη, 4-MMC, μεθυλόννη, πυροβαλερόνη, ναφυρόνη, 2C-B, 25B-NBOMe, 25C-NBOMe και 25I-NBOMe.

Η ποσότητα που προστέθηκε σε όλα τα δείγματα ήταν (30 ng) 50 μ L από μικτό διάλυμα εργασίας των εσωτερικών προτύπων C=0,6 ng/mL.

5.4 Χρωματογραφικές συνθήκες

Για τον προσδιορισμό των βέλτιστων χρωματογραφικών συνθηκών στον αεριοχρωματογράφο χρησιμοποιήθηκε το μικτό διάλυμα εργασίας των 21 αναλυτών με C=0.1 μ g/mL. Οι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την απόδοση μιας αεριοχρωματογραφικής ανάλυσης είναι η θερμοκρασία του σημείου έγχυσης και του ανιχνευτή, το θερμοκρασιακό πρόγραμμα της στήλης (αρχική, ενδιάμεση και τελική θερμοκρασία, ο ρυθμός αύξησης της θερμοκρασίας) και η ροή φέροντος αερίου. Επιπλέον, σημειώνεται πως η θερμοκρασία του σημείου έγχυσης πρέπει να είναι τέτοια ώστε να προκαλεί την άμεση και ποσοτική εξάτμιση του δείγματος χωρίς να προκαλεί θερμική διάσπαση των θερμοευαίσθητων αναλυτών. Στην προκειμένη περίπτωση η θερμοκρασία του σημείου έγχυσης ήταν 260 °C, η ροή φέροντος αερίου 1.0 mL/min, η θερμοκρασία της γραμμής μεταφοράς του ανιχνευτή 280 °C και η θερμοκρασία της πηγής ιονισμού 230 °C. Η βελτιστοποίηση των χρωματογραφικών τεχνικών έγινε με την δοκιμή 4 διαφορετικών θερμοκρασιακών προγραμμάτων :

- A. Αρχική θερμοκρασία 80 °C για 1 min, αύξηση της θερμοκρασίας με ρυθμό 30 °C/min έως τους 300 °C και παραμονή για 3 min.

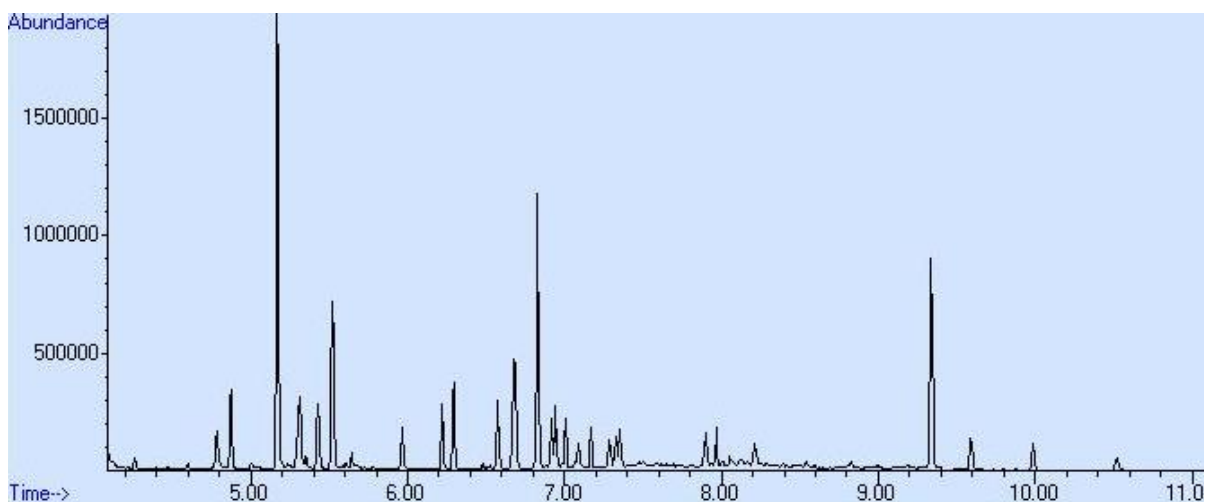
- B. Αρχική θερμοκρασία 80 °C για 2 min, αύξηση της θερμοκρασίας με ρυθμό 20 °C/min έως τους 300 °C και παραμονή για 3 min.
- C. Αρχική θερμοκρασία 80 °C για 2 min, αύξηση της θερμοκρασίας με ρυθμό 10 °C/min έως τους 120 °C και ξανά αύξηση της θερμοκρασίας με ρυθμό 30 °C/min έως τους 300 °C με παραμονή 3 min.
- D. Αρχική θερμοκρασία 70 °C για 2 min, αύξηση της θερμοκρασίας με ρυθμό 10 °C/min έως τους 120 °C και ξανά αύξηση της θερμοκρασίας με ρυθμό 30 °C/min έως τους 300 °C με παραμονή 3 min.

Κριτήριο επιλογής ήταν η ευαισθησία, η διαχωριστική ικανότητα των κορυφών (R_s) και ο συνολικός χρόνος του χρωματογραφήματος. Για τον σκοπό αυτό σε κάθε δοκιμασία, 3 διαφορετικά διαλύματα όγκου 50 μ L από το μικτό διάλυμα εργασίας, εξατμίζονταν μέχρι ξηρού, παραγωγοποιούνταν με 50 μ L PFPA και 50 μ L EtOAc και στη συνέχεια γινόταν έγχυση 1 μ L στο χρωματογραφικό σύστημα.

Στην δοκιμασία (A) συγκριτικά με τις άλλες 3, είχαμε καλύτερο διαχωρισμό των 21 αναλυτών και το μικρότερο χρόνο ανάλυσης στα 11.33 min. Συγκεντρωτικά οι βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.6, ενώ στην Εικόνα 5.3 παρουσιάζεται χρωματογράφημα των 21 αναλυτών στο GC/MS.

Πίνακας 5.6: Βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες.

Βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες	
Θερμοκρασία σημείου έγχυσης	260 °C
Θερμοκρασία πηγής ιοντισμού	230 °C
Θερμοκρασία γραμμής μεταφοράς ανιχνευτή	280 °C
Ταχύτητα ροής φέροντος αερίου	1.0 mL/min
Αρχική θερμοκρασία στήλης (χρόνος παραμονής)	80 °C (1 min)
Ρυθμός ανόδου θερμοκρασίας	30 °C/min
Τελική θερμοκρασία στήλης (χρόνος παραμονής)	300 °C (3 min)
Συνολικός χρόνος χρωματογραφήματος : 11.33 min	



Εικόνα 5.3: Χρωματογράφημα των 21 αναλυτών (1ppm) με το βέλτιστο θερμοκρασιακό πρόγραμμα.

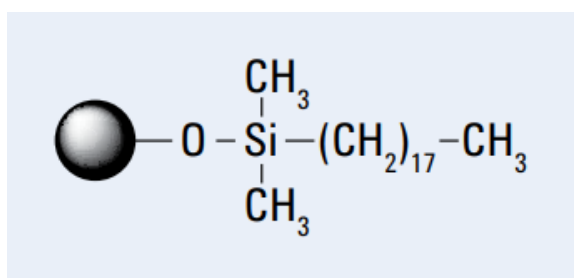
5.5 Βελτιστοποίηση της εκχύλισης

Ένα από τα σημαντικότερα σημεία της προκατεργασίας των βιολογικών δειγμάτων είναι η διαδικασία της εκχύλισης. Ο σκοπός της εκχύλισης είναι η παραλαβή ενός καθαρού εκχυλίσματος που θα αποτελείται από όσο το δυνατόν μεγαλύτερο ποσοστό από τους αναλύτες και όσο το δυνατόν λιγότερο παρεμποδίσει από το μητρικό υλικό του βιολογικού δείγματος.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE) με την δοκιμασία δυο διαφορετικών στηλών. Έτσι, δοκιμάστηκε η στήλη Bond Elute C18 με υπόστρωμα μη πολικό/υδροφοβικό και η Bond Elute Certify με προσροφητικό υλικό μικτού τύπου, η οποία συνδυάζει τον κατιοανταλλακτικό με τον μη πολικό χαρακτήρα. Παρακάτω αναφέρονται οι δοκιμασίες που πραγματοποιήθηκαν σε κάθε στήλη και η σύγκριση τους για την επιλογή της βέλτιστης.

5.5.1 Bond Elut C18

Η Bond Elute C18 είναι μια στήλη συγκράτησης αντίστροφης φάσης κατά την οποία οι αναλύτες συγκρατούνται μέσω μη πολικών αλληλεπιδράσεων με το στερεό υπόστρωμα της στήλης (Εικόνα 5.1). Η χρήση της συνίσταται στην εκχύλιση μη πολικών συστατικών από υδατικά διαλύματα και βιολογικά υγρά.



Εικόνα 5.1: Σωματίδιο πληρωτικού υλικού στήλης Bond Elut C18

Για την βελτιστοποίηση της εκχύλισης με τη στήλη Bond Elute C18 μελετήθηκαν οι παράμετροι όπως το pH των ρυθμιστικών διαλυμάτων και το διάλυμα έκλουσης. Οι παράμετροι αυτοί μελετήθηκαν με την χρήση της παραδοσιακής μεθόδου, αλλαγή ενός παράγοντα την φορά (OFAT) και τριπλή επανάληψη της κάθε δοκιμασίας για την στατιστική επεξεργασία των αποκρίσεων. Η απόκριση που λήφθηκε υπόψιν για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων ήταν η εκατοστιαία απόλυτη ανάκτηση (%A), όπως υπολογίστηκε από την εξίσωση:

$$\%A = \frac{E_1}{E_2} * 100$$

όπου E_1 το εμβαδόν της επιφάνειας του αναλύτη μετά από την εκχύλιση και την παραγωγopoίηση του δείγματος και E_2 το εμβαδόν της επιφάνειας του αναλύτη μετά από την απ' ευθείας έγχυση κατόπιν παραγωγopoίησης ίδιας ποσότητας αναλύτη.

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής :

1. Σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται 1 mL ολικού αίματος και 50 μ L από το μικτό διάλυμα εργασίας των προτύπων ουσιών ($C=2 \mu\text{g/mL}$). Το δείγμα αναδευέται στον ατομικό αναδευτήρα για 10 sec περίπου.
2. Προσθήκη σταγδών 4 mL ρυθμιστικού διαλύματος (X) χρησιμοποιώντας γυάλινη ρυθμιζόμενη πιπέτα, με ταυτόχρονη ανάδευση.
3. Φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 3000 rpm για 5 min.
4. Παραλαβή της υπερκείμενης στοιβάδας των δειγμάτων
5. Ενεργοποίηση της στήλης εφαρμόζοντας κατά σειρά με γυάλινες βαθμονομημένες πιπέτες :
 - i. 2 mL MeOH
 - ii. 2 mL ρυθμιστικού διαλύματος (X)
6. Μεταφορά του δείγματος στις στήλες εκχύλισης στερεής φάσης Bond Elute C18 χρησιμοποιώντας πλαστικές πιπέτες μίας χρήσης.
7. Έκπλυση της στήλης εφαρμόζοντας κατά σειρά :
 - i. 2 mL H_2O
 - ii. Κενό ($\geq 10\text{mmHg}$) σε κάθε στήλη για 10 sec περίπου
 - iii. 50 μ L εξάνιο
8. Εφαρμογή κενού ($\geq 10\text{mmHg}$) για 10 min

9. Έκλουση των αναλυτών εφαρμόζοντας στις στήλες 2×1.5 mL διαλύματος έκλουσης (Ψ) χρησιμοποιώντας γυάλινη βαθμονομημένη πιπέτα.
10. Τα εκλούσματα στην συνέχεια εξατμίζονταν μέχρι ξηρού υπο ρεύμα N_2
11. Παραγωγοποίηση των δειγμάτων με PFPA όπως αναφέρθηκε προηγουμένως.

Παράλληλα με τα δείγματα των δοκιμασιών, σε κάθε δοκιμασία αναλύονταν 3 μεθανολικά διαλύματα (50 μ L από το μικό διάλυμα εργασίας των προτύπων ουσιών ($C=2$ μ g/mL)) για τον υπολογισμό της ανάκτησης και τυφλό δείγμα (blank) για τον έλεγχο τυχόν παρεμποδίσεων.

Όσον αφορά το ρυθμιστικό διάλυμα (X), εξετάστηκαν τα εξής διαλύματα:

- A. Ρυθμιστικό διάλυμα οξικών pH=4
- B. Ρυθμιστικό διάλυμα οξικών pH=5
- C. Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=6
- D. Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=7

Από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων όσον αφορά τις ανακτήσεις των ουσιών, οι βέλτιστες συνθήκες pH ήταν με το **ρυθμιστικό διάλυμα οξικών pH=5**.

Όσον αφορά το διάλυμα έκλουσης (Ψ), εξετάστηκαν τα εξής διαλύματα:

- A. $CH_2Cl_2/i-PrOH/NH_3$ σε αναλογία 85:15:2
- B. $CH_2Cl_2/i-PrOH/NH_3$ σε αναλογία 80:20:2
- C. $CH_2Cl_2/i-PrOH/NH_3$ σε αναλογία 75:25:2
- D. EtOAc/ NH_3 σε αναλογία 98:2

Από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων όσον αφορά τις ανακτήσεις των ουσιών, το βέλτιστο διάλυμα εκχύλισης ήταν το **$CH_2Cl_2/i-PrOH/NH_3$ σε αναλογία 80:20:2**.

5.5.2 Bond Elut Certify

Η Bond Elute Certify είναι μια στήλη εκχύλισης μικτού τύπου, δηλαδή συνδυάζει τον μηχανισμό των μη πολικών αλληλεπιδράσεων και της κατιοανταλλαγής (strong cation exchange- SCX) για την απομόνωση ασθενών βάσεων (RNH_2 , R_2NH , NR_3) από βιολογικά υλικά όπως το αίμα και τα ούρα. Επομένως οι αναλύτες συγκρατούνται τόσο με μη πολικές αλληλεπιδράσεις με το υδρόφοβο τμήμα της στήλης όσο και με ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της θετικά φορτισμένης αμινομάδας του αναλύτη και της αρνητικά φορτισμένης ομάδας του πληρωτικού υλικού. Εφόσον το φορτίο ευθύνεται για την ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση τότε μεγάλη προσοχή απαιτείται στην επιλογή του pH έτσι ώστε οι υπο προσδιορισμό αμίνες να βρίσκονται στην κατιοντική μορφή. Επιπλέον εξίσου

σημαντικό ρόλο διαδραματίζει και η σύσταση του διαλύματος έκλουσης, αφού πρέπει να περιέχει αλκαλικό περιέχομενο έτσι ώστε οι αναλύτες να μετατραπούν από την κατιοντική μορφή τους στην αδιάστατη και έτσι να μπορέσουν να παρασυρθούν από το οργανικό μέρος του διαλύτη έκλουσης.

Όπως προηγουμένως, για την στήλη Bond Elute Certify μελετήθηκαν το pH του ρυθμιστικού διαλύματος και η σύσταση του διαλύματος έκλουσης με την τεχνική OFAT, ενώ ταυτόχρονα με κάθε δοκιμασία αναλυόταν μεθανολικό διάλυμα με απευθείας παραγωγοποίηση και τυφλό δείγμα.

Πιο αναλυτικά, η πειραματική διαδικασία περιγράφεται ακολούθως:

1. Σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται 1 mL ολικού αίματος και 50 μ L από το μικτό διάλυμα εργασίας των προτύπων ουσιών ($C=2 \mu\text{g/mL}$). Το δείγμα αναδευόταν στον ατομικό αναδευτήρα για 10 sec περίπου.
2. Προσθήκη σταγδών 4 mL ρυθμιστικού διαλύματος (X') χρησιμοποιώντας γυάλινη ρυθμιζόμενη πιπέτα, με ταυτόχρονη ανάδευση.
3. Φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 3000 rpm για 5 min
4. Παραλαβή της υπερκείμενης στοιβάδας των δειγμάτων
5. Ενεργοποίηση της στήλης εφαρμόζοντας κατά σειρά με γυάλινες βαθμονομημένες πιπέτες :
 - i. 3 mL CH_3OH
 - ii. 3 mL H_2O
 - iii. 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος (X')
6. Μεταφορά του δείγματος στις στήλες εκχύλισης στερεής φάσης Bond Elut Certify χρησιμοποιώντας πλαστικές πιπέτες μίας χρήσης.
7. Έκπλυση της στήλης εφαρμόζοντας κατά σειρά :
 - i. 3 mL H_2O
 - ii. 1 mL διαλύματος AcOH 0,1 N
 - iii. 3 mL CH_3OH
8. Εφαρμογή κενού ($\geq 10\text{mmHg}$) για 10 min
9. Έκλουση των αναλυτών εφαρμόζοντας στις στήλες $2 \times 1.5 \text{ mL}$ διαλύματος έκλουσης (Ψ) χρησιμοποιώντας γυάλινη βαθμονομημένη πιπέτα.
10. Τα εκλούσματα στην συνέχεια εξατμίζονταν μέχρι ξηρού υπο ρεύμα N_2
11. Παραγωγοποίηση των δειγμάτων με PFPA όπως περιεγράφηκε στην παράγραφο 5.3.

Όσον αφορά το pH του ρυθμιστικού διαλύματος, επειδή οι αναλύτες είναι βάσεις με $pK_a \sim 9$, δοκιμάστηκαν ρυθμιστικά διαλύματα με τιμές pH τουλάχιστον 2 μονάδες χαμηλότερα από την τιμή 9, έτσι ώστε όλοι οι αναλύτες να βρίσκονται πλήρως στην κατιοντική μορφή τους. Έτσι λοιπόν τα υποψήφια ρυθμιστικά διαλύματα ήταν :

- A. Ρυθμιστικό διάλυμα οξικών pH=4
- B. Ρυθμιστικό διάλυμα οξικών pH=5
- C. Ρυθμιστικό διάλυμα pH=6

Από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων όσον αφορά τις ανακτήσεις των ουσιών, οι βέλτιστες συνθήκες pH ήταν με το **ρυθμιστικό διάλυμα οξικών pH=5**.

Όσον αφορά το διαλύτη έκλουσης (Ψ'), εξετάστηκαν τα εξής διαλύματα:

- A. $CH_2Cl_2/i-PrOH/NH_3$ σε αναλογία 85:15:2
- B. $CH_2Cl_2/i-PrOH/NH_3$ σε αναλογία 80:20:2
- C. $CH_2Cl_2/i-PrOH/NH_3$ σε αναλογία 75:25:2

Από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων όσον αφορά τις ανακτήσεις των ουσιών, το βέλτιστο διάλυμα εκχύλισης ήταν το **$CH_2Cl_2/i-PrOH/NH_3$ σε αναλογία 80:20:2**.

5.4.3 Σύγκριση Bond Elut C18 vs Bond Elut Certify

Αφού βελτιστοποιήθηκαν οι συνθήκες της προκατεργασίας των δειγμάτων με εκχύλιση στερεάς φάσης και για τις δυο υπο διερεύνηση στήλες, οι ανακτήσεις των αναλυτών ήταν ικανοποιητικές με ποσοστά $\geq 80\%$. Από τα αποτελέσματα όπως φαίνονται στον Πίνακα 5.6 διαπιστώθηκε ότι οι δυο στήλες είναι σχετικά ισοδύναμες μεταξύ τους πλην ορισμένων περιπτώσεων που συνηγορούν υπέρ της στήλης Bond Elut C18.

Πίνακας 5.6: % Ανακτήσεις των αναλυτών μετά από βελτιστοποίηση της κάθε στήλης

Αναλύτης	% Ανάκτηση (Recovery)	
	Bond Elut C18	Bond Elut Certify
Αμφεταμίνη	89	84
Μεθαμφεταμίνη	85	81

Φαινυλοπροπανολαμίνη	89	82
Εφεδρίνη	87	80
Ψευδοεφεδρίνη	84	82
MDA	93	87
MDMA	92	95
MDEA	96	98
MBDB	93	89
S-καθινόνη	81	84
μεθκαθινόνη	85	87
4-MMC	88	80
μεθεδρόνη	93	85
πυροβαλερόνη	96	82
MDPV	85	87
μεθυλόνη	87	91
ναφυρόνη	85	88
2C-B	86	82
PMMA	96	93
25B-NBOMe	89	85
25C-NBOMe	92	87
25I-NBOMe	90	89

Εντούτοις αποφασίστηκε οι δυο στήλες να δοκιμαστούν και σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις με σκοπο να ελεγχθεί ποια από τις δύο στήλες παρέχει υψηλότερου βαθμού απομάκρυνση των επιδράσεων του μητρικού υλικού με άμεσο αντίκτυπο την επιδίωξη της βέλτιστης ευαισθησίας της μεθόδου.

Για τον σκοπό αυτό, δοκιμαστηκαν οι αναλύτες υπο την μορφή μικτού διαλύματος σε συγκεντρώσεις 2, 5, 10, 20 και 50 ng/mL με εμβολιασμό της κατάλληλης ποσότητας διαλύματος κάθε φορά σε 1 mL ολικού αίματος. Αναλυτικότερα οι ποσότητες που ελήφθησαν και το είδος των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την εμβολιασμό του μητρικού υλικού παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 5.7: Μεθοδολογία εμβολιασμού βιολογικού υλικού

Συγκέντρωση μικτού διαλύματος εργσίας (μg/mL)	Λαμβανόμενη ποσότητα (μL)	Τελική συγκέντρωση εμβολιασμένου δείγματος (ng/mL)
0,1	20	2
	50	5

	100	10
2	10	20
	25	50

Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε με τις βέλτιστες συνθήκες για κάθε στήλη όπως περιεγράφηκε στα υποκεφάλαια 5.5.1 και 5.5.2, τα εκλούσματα εξατμίστηκαν ακολούθως με διαβίβαση ρευματος N₂ και παραγωγοποιήθηκαν σύμφωνα με την αναπτυχθείσα μέθοδο με PFPA. Παράλληλα με τα εμβολιασμένα δείγματα, με κάθε στήλη εκχυλίστηκε και τυφλό δείγμα βιολογικού υλικού ώστε να εκτιμηθεί η ευαισθησία της μεθόδου με την μέθοδο S/N>10, δηλαδή το σήμα που οφείλεται στον αναλύτη να είναι τουλάχιστον 10 φορές ισχυρότερο από τον θόρυβο.

Μετά από εξέταση των χρωματογραφημάτων που προέκυψαν από τα δείγματα μετά από εμβολισμό διαβαθμισμένων συγκεντρώσεων και των τυφλών δειγμάτων για κάθε στήλη, τα αποτελέσματα που ελήφθησαν παρουσιάζονται στον επόμενο πίνακα.

Πίνακας 5.8: Ευαισθησία μεθόδων εκχύλισης με τις 2 υποψήφιες στήλες

Αναλύτης	Συγκέντρωση (ng/mL)	
	Bond Elut C18	Bond Elut Certify
Αμφεταμίνη	10	5
Μεθαμφεταμίνη	5	5
Φαινυλοπροπανολαμίνη	2	2
Εφεδρίνη	2	2
Ψευδοεφεδρίνη	5	2
MDA	5	2
MDMA	5	5
MDEA	5	5
MBDB	10	10
μεθκαθινόνη	20	5
4-MMC	20	10
μεθεδρόνη	5	2
πυροβαλερόνη	20	20
MDPV	50	20
μεθυλόνη	5	2
ναφυρόνη	20	20
2C-B	5	5
PMMA	5	5
25B-NBOMe	2	2
25C-NBOMe	2	2
25I-NBOMe	2	2

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 5.8 διαπιστώνεται ότι η στήλη Bond Elut Certify υπερτερεί από την Bond Elut C18, αφού παρέχει σημαντικά αυξημένη ευαισθησία για τις ουσίες αμφεταμίνη, ψευδοεφεδρίνη, MDA, μεθκαθιρόνη, 4-MMC, μεθεδρόνη, MDPV και μεθυλόνη. Επιπλέον στο πλαίσιο της δικαστικής τοξικολογίας για την διερεύνηση των υποθέσεων ρουτίνας, τα χαμηλά όρια ευαισθησίας είναι θεμελιώθης σημασίας. Ως εκ τούτου η επιλεγθείσα στήλη για την ανάπτυξη της μεθόδου ήταν η **μικτού τύπου μη πολική/κατιοανταλλαγής Bond Elut Certify**.

5.5 Περιγραφή αναπτυχθείσας μεθόδου

Η βελτιστοποιημένη τεχνική για τον προσδιορισμό 9 Δ.Τ.Α., 7 συνθετικών καθινονών και 5 φαιραιθυλαμινών σε ολικό αίμα αποτελείται από τα εξής στάδια:

1. Τοποθέτηση κατάλληλου αριθμού γυάλινων δοκιμαστικών σωλήνων σε στατό και ανάλογη επισήμανση σύμφωνα με τον χαρακτηρισμό των δειγμάτων.
2. Προσθήκη 1 mL ολικού αίματος με χρήση αναλυτικής ρυθμιζόμενης πιπέτας.
3. Εμβολιασμός με κατάλληλο όγκο από τα μικτά διαλύματα εργασίας A, B₁, B₂, C, A', B'₁, B'₂ και C' για την παρασκευή των δειγμάτων βαθμονόμησης και ελέγχου ποιότητας όπως περιγράφεται στους πίνακες 4.2 και 4.3.
4. Προσθήκη 50 µL από το μικτό διάλυμα εσωτερικών προτύπων C=0.6 µg/mL με ρυθμιζόμενη αναλυτική πιπέτα σε όλα τα δείγματα.
5. Προσθήκη σταγδών 4 mL ρυθμιστικού διαλύματος pH=5, χρησιμοποιώντας γυάλινη ρυθμιζόμενη πιπέτα, με ταυτόχρονη ανάδευση στον ατομικό αναδευτήρα.
6. Φυγοκέντρωση των δειγμάτων στις 3000 rpm για 5 min
7. Παραλαβή της υπερκείμενης στοιβάδας των δειγμάτων
8. Ενεργοποίηση της στήλης εφαρμόζοντας κατά σειρά με γυάλινες βαθμονομημένες πιπέτες :
 - i. 3 mL CH₃OH
 - ii. 3 mL H₂O
 - iii. 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος pH=5
9. Μεταφορά του δείγματος στις στήλες εκχύλισης στερεής φάσης Bond Elut Certify χρησιμοποιώντας πλαστικές πιπέτες μίας χρήσης.
10. Έκπλυση της στήλης εφαρμόζοντας κατά σειρά :
 - i. 3 mL H₂O

- ii. 1 mL διαλύματος AcOH 0,1 N
 - iii. 3 mL CH₃OH
11. Εφαρμογή κενού (≥ 10 mmHg) για 10 min.
 12. Έκλυση των αναλυτών εφαρμόζοντας στις στήλες 2×1.5 mL πρόσφατα παρασκευασθέντος διαλύματος έκλυσης CH₂Cl₂/i-PrOH/NH₃ σε αναλογία 80:20:2, χρησιμοποιώντας γυάλινη βαθμονομημένη πιπέτα. Τα εκλούσματα παραλαμβάνονταν σε γυάλινα εσμυρισμένα σωληνάκια.
 13. Προσθήκη 100 μ L μεθανολικού διαλύματος 1% π. HCL σε όλα τα εκλούσματα και ανάδευση για 10 sec στον ατομικό αναδευτήρα.
 14. Εξάτμιση μέχρι ξηρού με διαβίβαση N₂(g).
 15. Προσθήκη 50 μ L EtOAc και 50 μ L PFPA. Τα εσμυρισμένα σωληνάκια σφραγίζονταν αμέσως με τα κατάλληλα γυάλινα καπάκια και το μίγμα αναδευόταν για 10 sec στον ατομικό αναδευτήρα.
 16. Τα δείγματα τοποθετούνταν στην άμμο στους 40°C για 20 min. Μετά το πέρας των 20 min, απομακρύνονταν από την άμμο και αφήνονταν μέχρι να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου.
 17. Τα δείγματα τοποθετούνταν ξανά για εξάτμιση έως ξηρού με διαβίβαση ρεύματος N₂(g). Στην συνέχεια γινόταν ανασύσταση του υπολλείματος με 100 μ L EtOAc και ανάδευση για 10 sec.
 18. Παραλαβή δειγμάτων και μεταφορά σε γυάλινα φιαλίδια *autosampler* εξοπλισμένα με γυάλινα σωληνάκια προσυγκέντρωσης (glass inserts).
 19. Τοποθέτηση όλων των φιαλιδίων στον αυτόματο δειγματολήπτη και έγχυση 1 μ L στο χρωματογραφικό σύστημα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗΣ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΧΘΕΙΣΑΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Ως επικύρωση (validation) αναλυτικής μεθόδου ονομάζεται η εξέταση των χαρακτηριστικών ποιότητας της μεθόδου μέσω πειραματικής τεκμηρίωσης και η εξέταση της ανταπόκρισής της προς προδιαγραφές (specifications) για να αποδειχθεί ότι είναι κατάλληλη για τον σκοπό για τον οποίο προορίζεται (fitness for purpose). Η επικύρωση προηγείται πάντα από την ποσοτικοποίηση των άγνωστων δειγμάτων έτσι ώστε να εξασφαλίζεται η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Λόγω της πολυπλοκότητας των βιολογικών δειγμάτων και της υποχρεωτικής προκατεργασίας τους, οι προδιαγραφές των εξεταζόμενων χαρακτηριστικών ποιότητας μίας βιοαναλυτικής μεθόδου είναι πιο ελαστικές από τις άλλες μεθόδους ανάλυσης.

Το πρωτόκολλο επικύρωσης της αναπτυχθείσας μεθόδου βασίστηκε στις διεθνείς κατευθυντήριες οδηγίες όπως του EMA (European Medicines Agency)¹⁷⁸, του FDA (Food and Drug Administration)¹⁷⁹ του ICH (International Council for Harmonization)¹⁸⁰ και του SWGTOX (Scientific Working Group for Forensic Toxicology)¹⁸¹. Τα υπό εξέταση χαρακτηριστικά ποιότητας στο πλαίσιο της επικύρωσης της αναπτυχθείσας μεθόδου ήταν η εκλεκτικότητα (selectivity), η ειδικότητα (specificity), η γραμμικότητα (linearity), ο προσδιορισμός του κατώτατου ορίου ανίχνευσης (Limit of Detection - LOD) και ποσοτικοποίησης (Limit of Quantification - LOQ), η εντός της ημέρας επαναληψιμότητα (intraday precision), η μεταξύ ημερών επαναληψιμότητα (interday precision), η ορθότητα εντός των ημερών (intraday accuracy) και δια των ημερών (interday accuracy) και η απόλυτη ανάκτηση (absolute recovery).

6.1 Εκλεκτικότητα

Η εκλεκτικότητα προσδιορίστηκε με την ανάλυση 6 τυφλών δειγμάτων (blank) ολικού αίματος διαφορετικής προέλευσης χωρίς την προσθήκη εσωτερικών προτύπων όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο 5.6. Στην συνέχεια έγινε έλεγχος των χρωματογραφημάτων στους χρόνους ανάσχεσης των αναλυτών και των εσωτερικών προτύπων της μεθόδου προκειμένου να διαπιστωθούν τυχόν παρεμποδίσεις από τυχόν ενδογενή συστατικά της βιολογικού υλικού¹⁷⁹.

6.2 Ειδικότητα

Η ειδικότητα της μεθόδου εξετάστηκε με την παρασκευή ενός μικτού διαλύματος εργασίας συγκέντρωσης 10 µg/mL στο οποίο περιλαμβάνονται ουσίες που συχνά λαμβάνονται από τους χρήστες στο πλαίσιο της κατάχρησης (polydrug abuse) και έτσι είναι πιθανό να συνυπάρχουν με τους αναλύτες της μεθόδου στα εξεταζόμενα δείγματα ολικού αίματος^{179,180}. Στο εν λόγω διάλυμα περιλαμβάνονται νόμιμες, παράνομες ουσίες και ορισμένοι μεταβολίτες αυτών. Πιο

αναλύτικά το περιεχόμενο του μικτού διαλύματος αποτελείτο από: διαζεπάμη, νορδιαζεπάμη, αλπραζολάμη, βρωμαζεπάμη, 7-αμινοφλουνιτραζεπάμη, λοραζεπάμη, νορτρυπτιλίνη, κουετιαπίνη, ολανζαπίνη, ρισπεριδόνη, υδροξυριςπεριδόνη, σερτραλίνη, νορσερτραλίνη, παροξετίνη, βενλαφαξίνη, νορβενλαφαξίνη, μιρταζαπίνη, νορμιρταζαπίνη, μαπροτιλίνη, νορμαπροτιλίνη, παρακεταμόλη, σιταλοπράμη, φλουοξετίνη, κεταμίνη, νορκεταμίνη, Δ9-τετραϋδροκανναβινόλη, 11-nor-Δ9-τετραϋδροκανναβινοϊκό οξύ, βουπρενορφίνη, νορβουπρενορφίνη, μεθαδόνη, μορφίνη, κωδεΐνη, 6-μονοακετυλομορφίνη, φαιντανύλη, νορφαιντανύλη, κοκαΐνη, βενζοϋλοεκγονίνη και μεθυλεστέρας της εκγονίνης.

Σε 6 βιολογικά δείγματα ολικού αίματος έγινε εμβολιασμός 50 μL από το παραπάνω μίγμα, χωρίς προσθήκη των εσωτερικών προτύπων και τα δείγματα κατεργάστηκαν και αναλύθηκαν σύμφωνα με την αναπτυχθείσα μέθοδο. Από την μελέτη των αντίστοιχων χρωματογραφημάτων διερευνήθηκαν τυχόν παρεμποδίσεις από τα συστατικά του μίγματος στους χρόνους ανάσχεσης των αναλυτών και των εσωτερικών προτύπων.

6.3 Κατώτατα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης

Τα κατώτατα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης προσδιορίστηκαν με βάση τον λόγο σήμα προς θόρυβο (signal to noise ratio, S/N), δηλαδή με σύγκριση των σημάτων τυφλού δείγματος (θόρυβος) και δειγμάτων με γνωστές χαμηλές συγκεντρώσεις. Για λόγο $S/N = 3$ δηλώνεται το LOD και για λόγο $S/N = 10$ το LOQ¹⁷⁸⁻¹⁸¹.

6.5 Γραμμικότητα

Η γραμμικότητα της μεθόδου προσδιορίστηκε με την παρασκευή περιοχής προτύπων 6 διαφορετικών συγκεντρώσεων σε 4 διαφορετικές μέρες. Οι 6 διαφορετικές συγκεντρώσεις προέκυψαν από 6 διαφορετικά δείγματα βαθμονόμησης (cal_{1-6}) όπως παρουσιάζονται στον πίνακα 4.2. Ακολούθως, κατασκευάζονταν οι καμπύλες βαθμονόμησης για κάθε αναλύτη και υπολογίζονταν οι εξισώσεις παλινδρόμησης, οι οποίες ήταν της μορφής $y=ax+b$ με τη μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων και διόρθωση των τιμών με την χρήση του παράγοντα $1/x^2$, όπου x είναι η θεωρητική τιμή της συγκέντρωσης του κάθε αναλύτη, εκφραζόμενη σε ng/mL και y ο λόγος της απόκρισης του αναλύτη προς την απόκριση του αντίστοιχου εσωτερικού προτύπου. Παράλληλα υπολογίστηκε ο συντελεστής προσδιορισμού (r^2) για κάθε καμπύλη αναφοράς, για τον οποίο πρέπει να ισχύει: $r^2 \geq 0.98$ ¹⁸⁰.

6.6 Επαναποσοτικοποίηση των δειγμάτων βαθμονόμησης

Τα δείγματα βαθμονόμησης κατεργάστηκαν και αναλύθηκαν εφαρμόζοντας την αναπτυχθείσα μέθοδο για τον ποσοτικό προσδιορισμό των 21 αναλυτών σε ολικό αίμα και χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή των αντίστοιχων διαγραμμάτων βαθμονόμησης. Στη συνέχεια, έγιναν επαναποσοτικοποιήσεις των βαθμονομητών με την αντίστοιχη εξίσωση παλινδρόμησης, σε όλα τα επίπεδα συγκεντρώσεων για την κάθε ημέρα και υπολογίστηκε το σχετικό σφάλμα (% Er) των τιμών αυτών, σύμφωνα με τη μαθηματική σχέση:

$$\% \text{ Er} = \frac{x - \mu}{\mu} \times 100 \quad .$$

όπου x είναι η πειραματική τιμή της συγκέντρωσης που υπολογίστηκε κατά την επαναποσοτικοποίηση και μ η αντίστοιχη θεωρητική συγκέντρωση. Σύμφωνα με τις οδηγίες του FDA, τα αποδεκτά όρια αποκλίσεων από τις αναμενόμενες συγκεντρώσεις έπρεπε να ήταν έως $\pm 15\%$ για όλα τα επίπεδα και έως $\pm 20\%$ για το κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης^{180,181}.

6.7 Επαναληψιμότητα και ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα

Η επαναληψιμότητα εντός της ημέρας (intraday precision) και η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (interday precision), αξιολογήθηκαν με επαναλαμβανόμενες αναλύσεις δειγμάτων ελέγχου ποιότητας (QC). Τα δείγματα ελέγχου ποιότητας παρασκευάστηκαν σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων, ένα χαμηλό QC1 με συγκέντρωση $3 \times \text{LOQ}$, ένα μεσαίο QC2 και ένα υψηλό επίπεδο QC3 με συγκέντρωση $80\% \times \text{ULOQ}$. Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας (QC) που επιλέχθηκαν για το ολικό αίμα αναφέρονται στον Πίνακα 4.3. Αναλύθηκαν έξι δείγματα ελέγχου ποιότητας ανά επίπεδο σε κάθε μία από τις τέσσερις ημέρες ανάλυσης (συνολικά 24 δείγματα ελέγχου ποιότητας ανά επίπεδο) σύμφωνα με την αναπτυχθείσα μέθοδο. Η συγκέντρωση του κάθε αναλύτη στα δείγματα ελέγχου ποιότητας υπολογιζόταν από την αντίστοιχη εξίσωση παλινδρόμησης του διαγράμματος βαθμονόμησης της κάθε ημέρας και στη συνέχεια υπολογιζόταν η μέση τιμή της συγκέντρωσης και η τυπική απόκλιση των μετρήσεων.

Η επαναληψιμότητα και η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα αποτελούν μέτρο του τυχαίου σφάλματος των μεθόδων και εκτιμήθηκαν από το ποσοστό % της σχετικής τυπικής απόκλισης (%RSD) των μετρήσεων δειγμάτων ελέγχου ποιότητας της ίδιας συγκέντρωσης που αναλύθηκαν την ίδια ημέρα και σε 4 διαφορετικές ημέρες. Σύμφωνα με τις οδηγίες του FDA, οι τιμές της % RSD, που εκφράζουν την επαναληψιμότητα και την ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα, έπρεπε να βρίσκονται εντός των αποδεκτών ορίων έως $\pm 15\%$ για όλα τα επίπεδα ελέγχου ποιότητας¹⁷⁹. Επίσης, η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα, που εκφράζει την μεταξύ των ημερών επαναληψιμότητα των μεθόδων, εκτιμήθηκε και από το %

ποσοστό της σχετικής τυπικής απόκλισης (% RSD) των κλίσεων των διαγραμμάτων βαθμονόμησης, που ελήφθησαν σε διαφορετικές ημέρες ανάλυσης¹⁷⁸.

6.8 Ορθότητα εντός της ημέρας και δια των ημερών

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

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

Η παραπάνω εξίσωση εφαρμόστηκε στα δείγματα ελέγχου ποιότητας που αναλύθηκαν την ίδια ημέρα και στο σύνολο των ημερών, αντίστοιχα. Το % Er εκφράζει το πόσο απέχει η πειραματική τιμή (x) των μετρήσεων των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας, από την θεωρητική τιμή (μ), δηλαδή την συγκέντρωση του κάθε αναλύτη στο εμβολιασμένο δείγμα ελέγχου ποιότητας. Σύμφωνα με τις οδηγίες του FDA, οι τιμές του % Er, που εκφράζουν την ορθότητα της μεθόδου, πρέπει να βρίσκονται εντός των αποδεκτών ορίων $\pm 15\%$ για όλα τα επίπεδα ελέγχου ποιότητας¹⁸⁰.

6.9 Απόλυτη ανάκτηση

Η απόλυτη ανάκτηση για τις υπό προσδιορισμό ουσίες εκτιμήθηκε στα τρία επίπεδα συγκεντρώσεων των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας. Αναλύθηκαν από έξι εμβολιασμένα πρότυπα δείγματα για κάθε επίπεδο συγκεντρώσεων των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας, χαμηλό QC1, μεσαίο QC2 και υψηλό QC3, με βάση την αναπτυχθείσα μέθοδο. Για τον υπολογισμό της απόλυτης ανάκτησης των αναλυτών γινόταν παράλληλα απευθείας έγχυση έξι μικτών μεθανολικών διαλυμάτων αντίστοιχων συγκεντρώσεων μετά από παραγωγοποίηση¹⁷⁹. Η απόλυτη ανάκτηση (%A) υπολογίστηκε με βάση την παρακάτω μαθηματική σχέση:

$$\%A = \frac{E1}{E2} \times 100$$

Όπου:

- E1: το εμβαδόν επιφάνειας των κορυφών του κάθε αναλύτη μετά από την εκχύλιση του βιολογικού δείγματος και παραγωγοποίηση.
- E2: το μέσο εμβαδόν επιφάνειας των κορυφών του κάθε αναλύτη μετά από απευθείας έγχυση παραγωγοποιημένου μικτού διαλύματος αντίστοιχης συγκέντρωσης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗΣ ΑΝΑΠΤΥΧΘΕΙΣΑΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Τα διεγερτικά τύπου αμφεταμίνης αμφεταμίνη, μεθαμφεταμίνη, εφεδρίνη, ψευδοεφεδρίνη, φαινυλοπροπανολαμίνη, MDA, MDMA, MDEA και MBDB, οι συνθετικές καθιόνες μεθκαθιόνη, μεφεδρόνη, 4-MMC, MDPV, πυροβαλερόνη, ναφυρόνη και μεθυλόνη και οι φαιναυλαμίνες 2C-B, 25I-NBOMe, 25Cl-NBOMe, 25B-NBOMe και PMMA αποτελούν τους αναλύτες στους οποίους αναπτύχθηκε, βελτιστοποιήθηκε και επικυρώθηκε η βιοαναλυτική μέθοδος GC-MS με πεδίο εφαρμογής το ολικό αίμα. Πιο αναλυτικά, οι αναλύτες αυτοί εκχυλίστηκαν από το ολικό αίμα με την χρήση της στήλης Bond Elut Certify με την οποία παραλήφθηκαν τα καθαρά εκχυλίσματα τους με ικανοποιητικά ποσοστά ανάκτησης. Στην συνέχεια τα εκλούσματα εξατμίστηκαν έως ξηρού με διαβίβαση ρεύματος N_2 και ακολούθησε η παραγωγοποίηση τους με PFPA στους $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 20 min. Τέλος, οι παραγωγοποιημένοι αναλύτες εγχύθηκαν στον αεριοχρωματογράφο συζευγμένο με φασματοόμετρο μαζών, για την ανάλυσή τους με την λειτουργία της παρακολούθησης επιλεγμένων ιόντων.

Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της επικύρωσης της αναπτυχθείσας μεθόδου σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες των FDA, EMA, ICH και SWGTOX .

7.1 Εκλεκτικότητα

Για τον έλεγχο της εκλεκτικότητας, χρησιμοποιήθηκαν 6 τυφλά δείγματα ολικού αίματος, ελεύθερα φαρμάκων, τα οποία προήλθαν από 6 διαφορετικά υγιή άτομα. Η κατεργασία των 6 αυτών δειγμάτων έλαβε χώρα σύμφωνα με την αναπτυχθείσα μέθοδο χωρίς την προσθήκη του διαλύματος των εσωτερικών προτύπων. Από τα χρωματογραφήματα των 6 αυτών δειγμάτων (blank samples) διαπιστώθηκε ότι τα ενδογενή συστατικά του μητρικού υλικού του αίματος δεν ασκούν παρεμπόδιση στους χρόνους έκλουσης των 21 αναλυτών της μεθόδου.

7.2 Ειδικότητα

Για την μελέτη της ειδικότητας, χρησιμοποιήθηκε διάλυμα εργασίας 39 ουσιών με $C = 10\text{ }\mu\text{g/mL}$, με ουσίες που ενδέχεται να συνυπάρχουν με τους υπό προσδιορισμό αναλύτες στα άγνωστα δείγματα ολικού αίματος, στο πλαίσιο της κατάχρησης ουσιών. Από το εν λόγω μικτό διάλυμα λαμβανόταν με ρυθμιζόμενη αναλυτική πιπέτα $50\text{ }\mu\text{L}$, τα οποία εμβολιάστηκαν σε 6 τυφλά δείγματα ολικού αίματος ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 500 ng/mL . Τα 6 εμβολιασμένα δείγματα έπειτα κατεργάστηκαν και αναλύθηκαν ακολουθώντας τα βήματα της αναπτυχθείσας μεθόδου. Από τα χρωματογραφήματα που προέκυψαν δεν παρατηρήθηκε καμία παρεμπόδιση στους χρόνους ανάσχεσης των αναλυτών.

7.3 Κατώτατα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης

Τα κατώτατα όρια ανίχνευσης της μεθόδου για τους 21 αναλύτες στο ολικό αίμα, προσδιορίστηκαν με βάση το λόγο της απόκρισης του κάθε αναλύτη προς το θόρυβο τυφλού δείγματος ολικού αίματος στο χρόνο ανάλυσης του αναλύτη, που πρέπει να είναι τουλάχιστον 3 ($S/N \geq 3:1$).

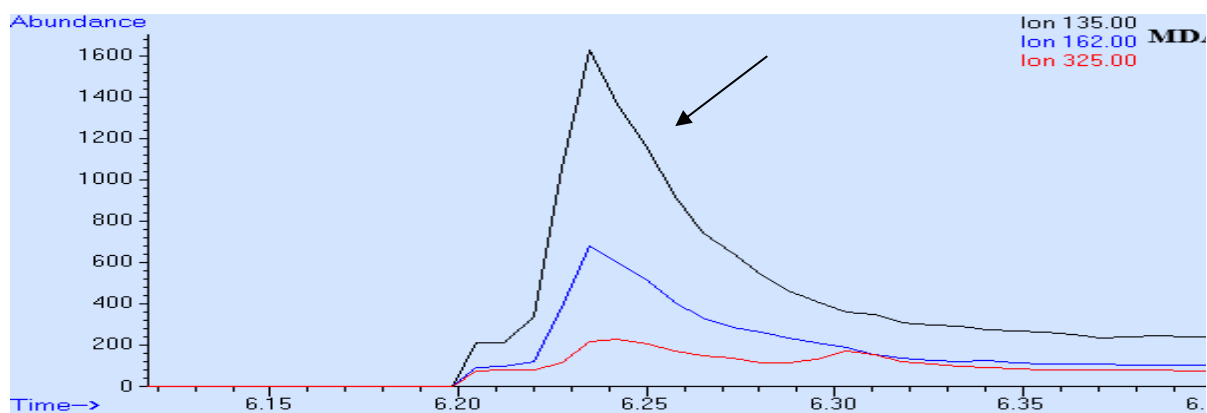
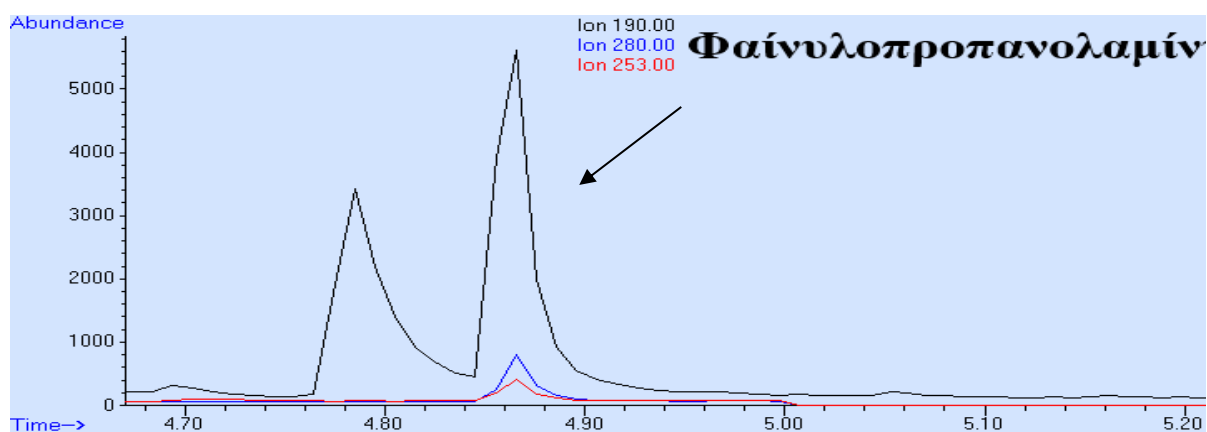
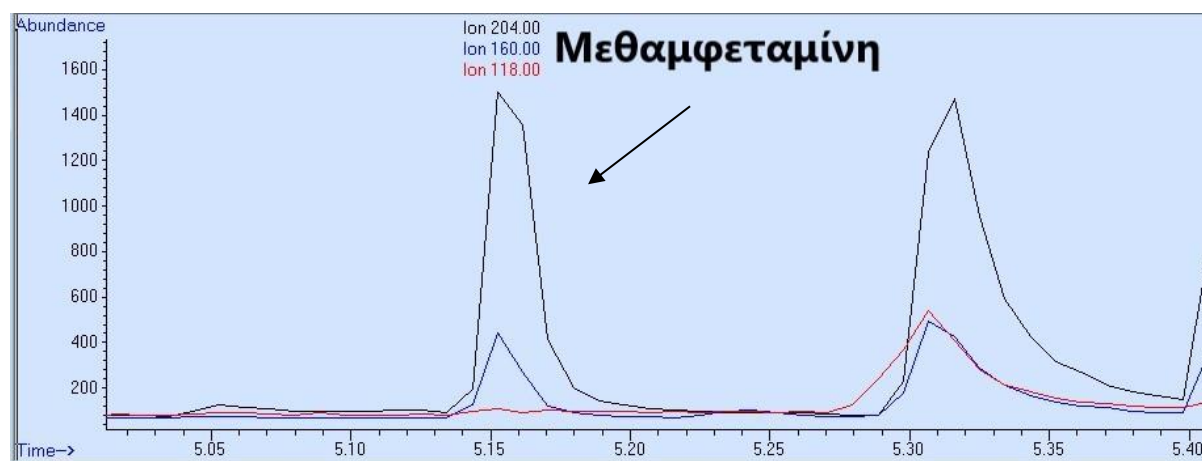
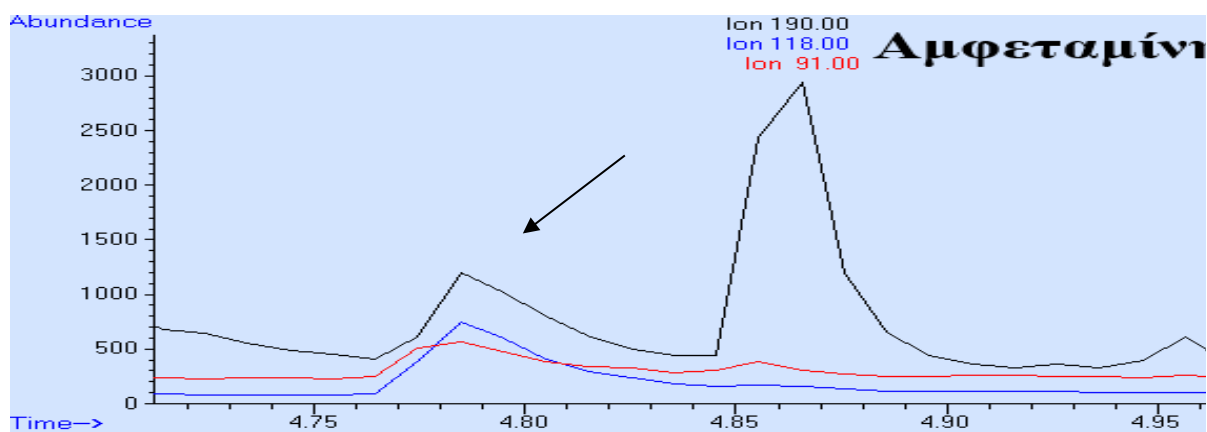
Τα κατώτατα όρια ανίχνευσης της μεθόδου για τους 21 αναλύτες στο ολικό αίμα, προσδιορίστηκαν με βάση το λόγο της απόκρισης του κάθε αναλύτη προς το θόρυβο τυφλού δείγματος ολικού αίματος στο χρόνο ανάλυσης του αναλύτη, που πρέπει να είναι τουλάχιστον 10 ($S/N \geq 10:1$).

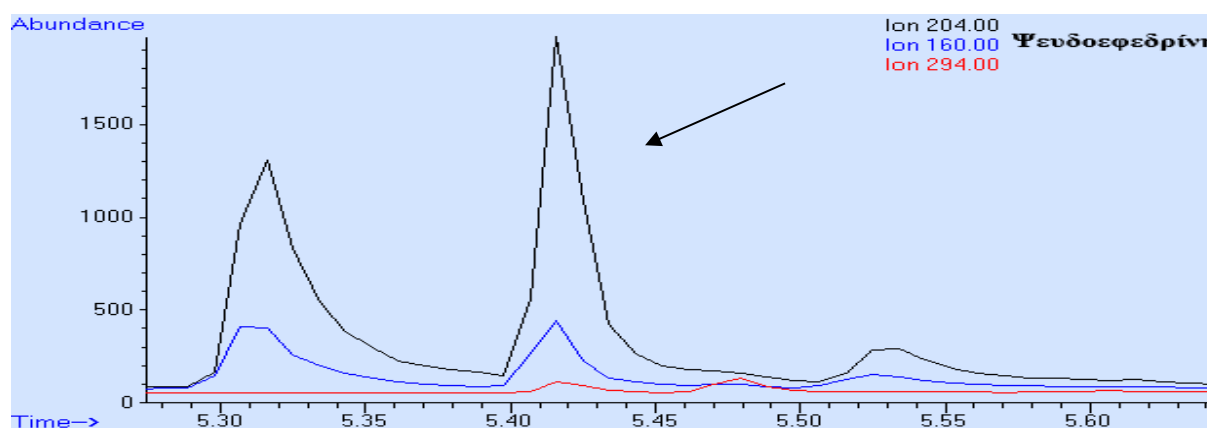
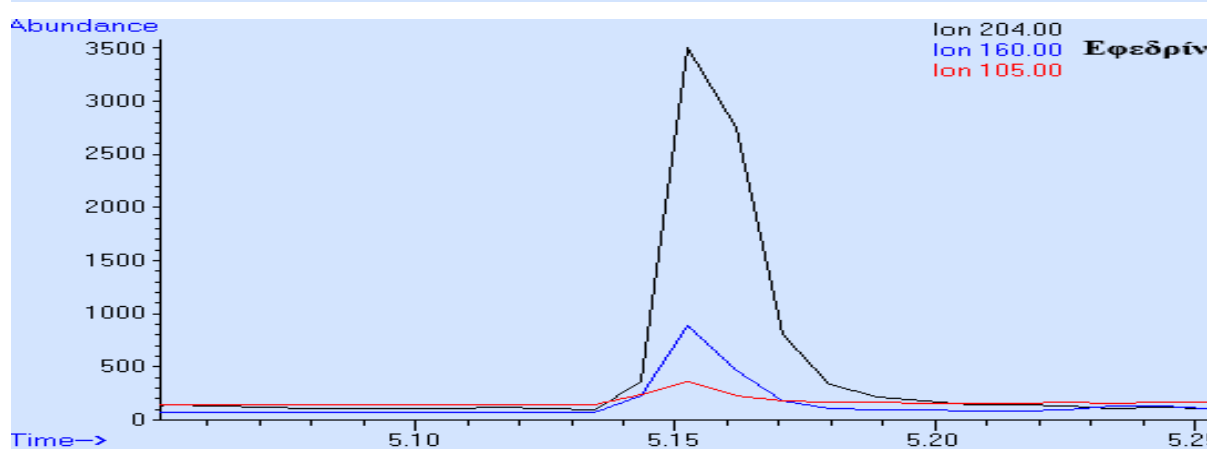
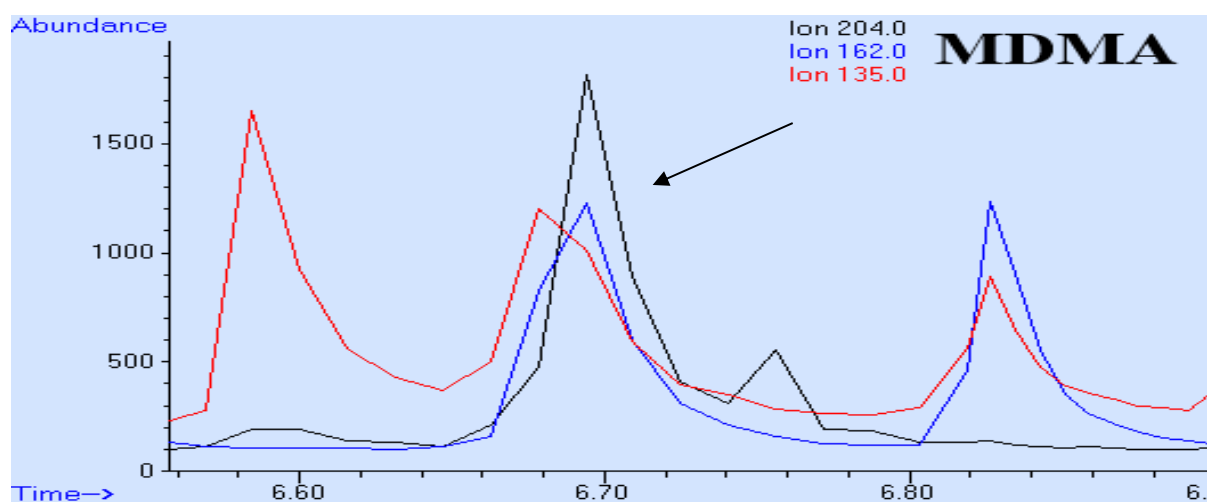
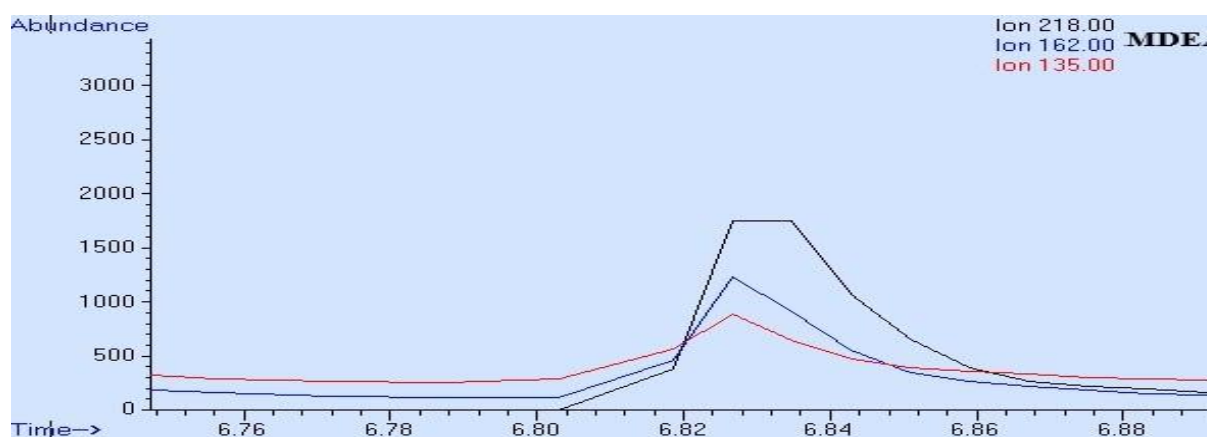
Για τον προσδιορισμό των τιμών LOD και LOQ παρασκευάστηκαν 6 εμβολιασμένα δείγματα ολικού αίματος, τα οποία κατεργάστηκαν και αναλύθηκαν σύμφωνα με την αναπτυχθείσα μέθοδο. Οι τιμές LOD και LOQ για κάθε αναλύτη παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.1.

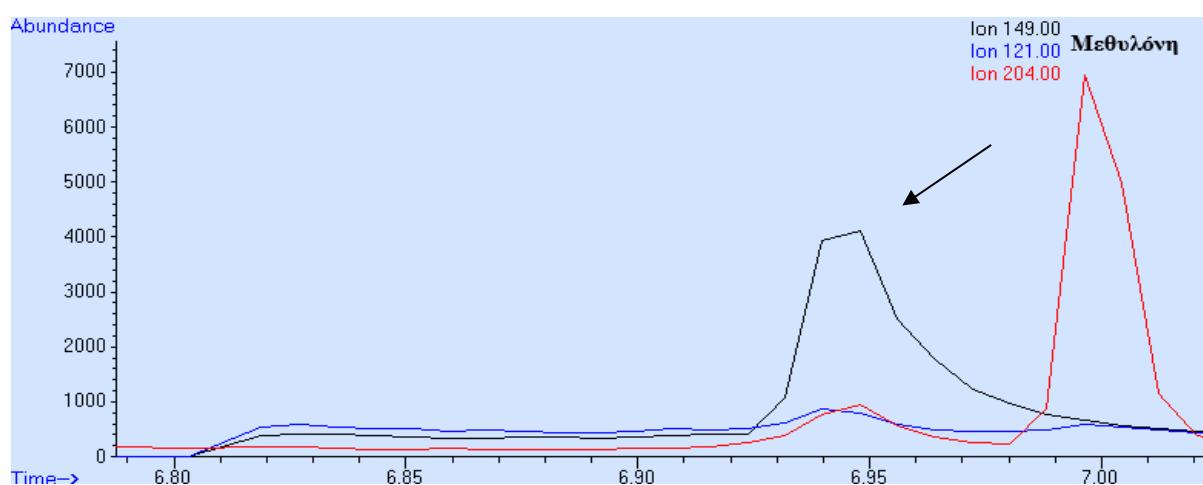
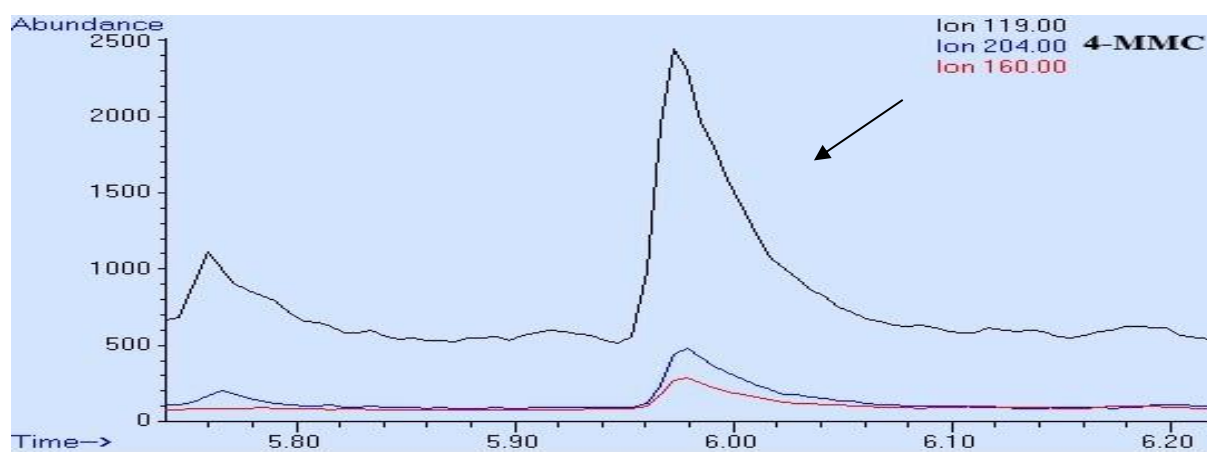
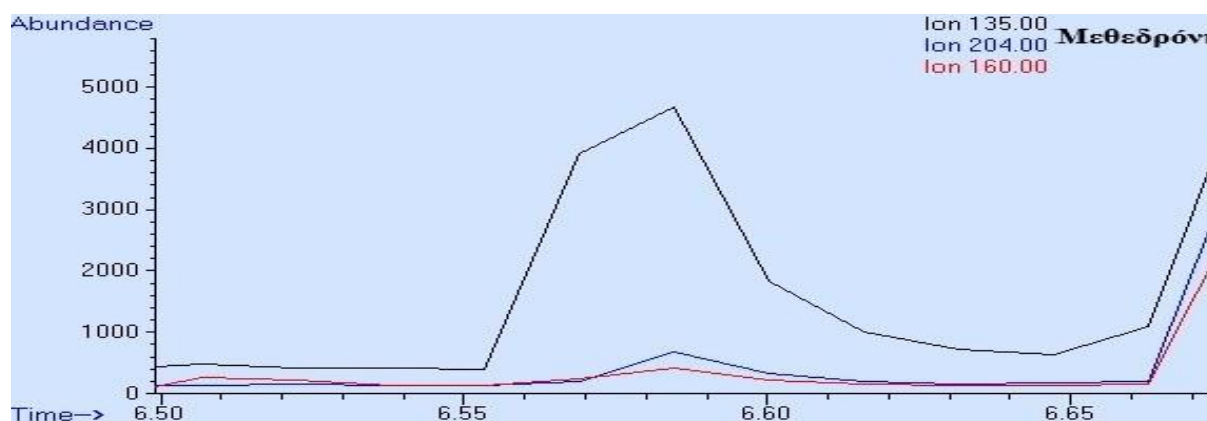
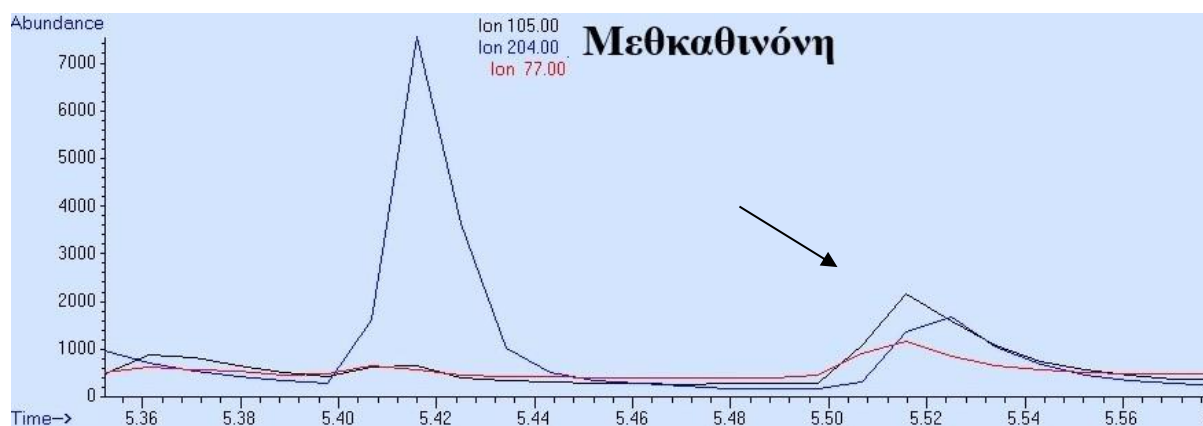
Πίνακας 7.1: Τιμές LOD και LOQ της μεθόδου προσδιορισμού των 21 αναλυτών σε ολικό αίμα

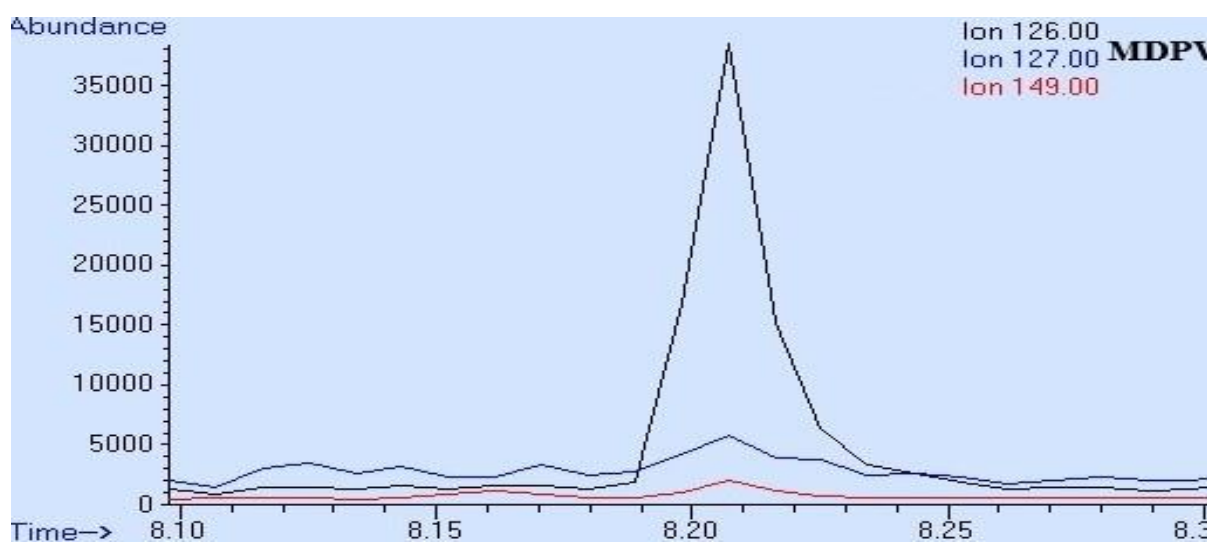
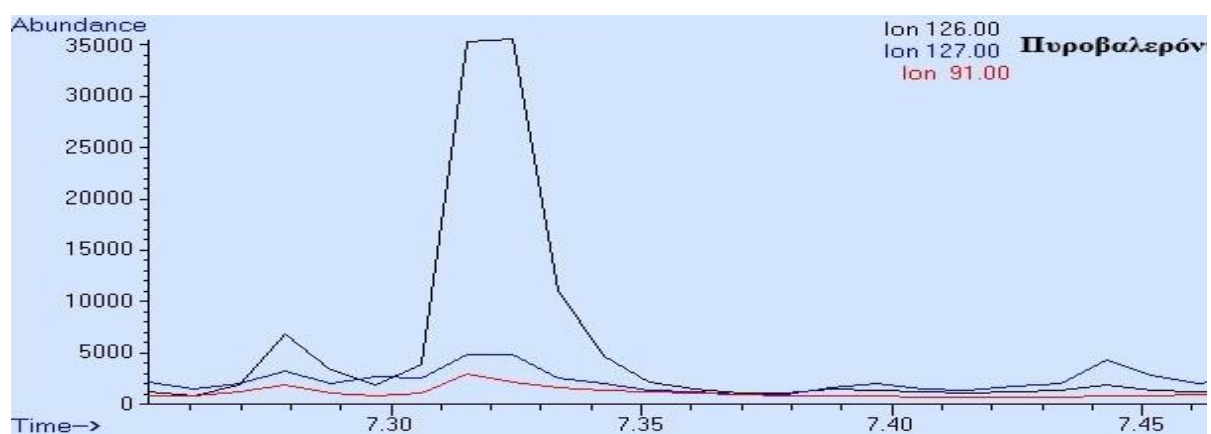
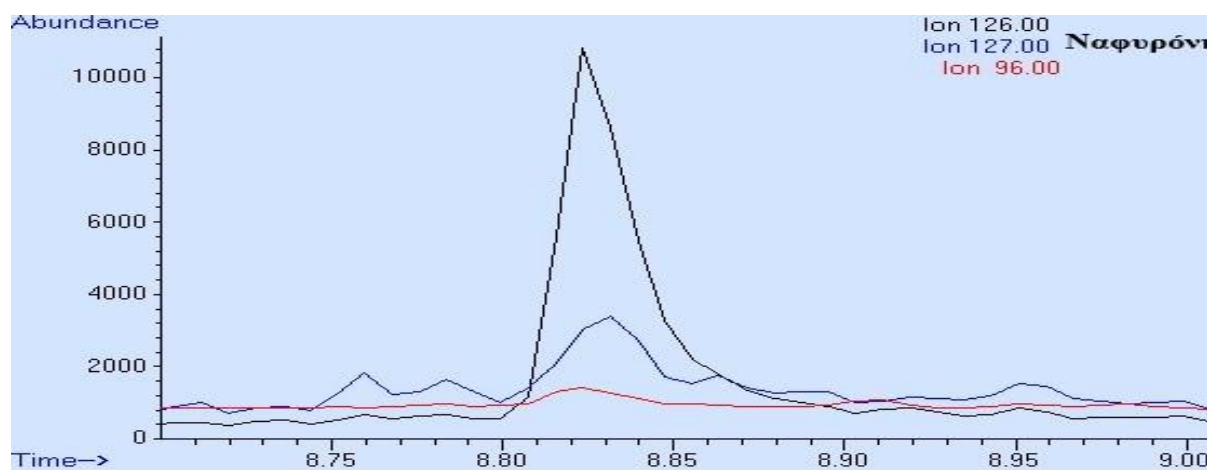
Αναλύτης	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
Αμφεταμίνη	1.7	5
Μεθαμφεταμίνη	1.7	5
Φαινυλοπροπανολαμίνη	0.7	2
Εφεδρίνη	0.7	2
Ψευδοεφεδρίνη	0.7	2
MDA	0.7	2
MDMA	1.7	5
MDEA	1.7	5
MBDB	3.5	10
μεθκαθινόνη	1.7	5
4-MMC	3.5	10
μεθεδρόνη	0.7	2
πυροβαλερόνη	7.0	20
MDPV	7.0	20
μεθυλόνη	0.7	2
ναφυρόνη	7.0	20
2C-B	1.7	5
PMMA	1.7	5
25B-NBOMe	0.7	2
25C-NBOMe	0.7	2
25I-NBOMe	0.7	2

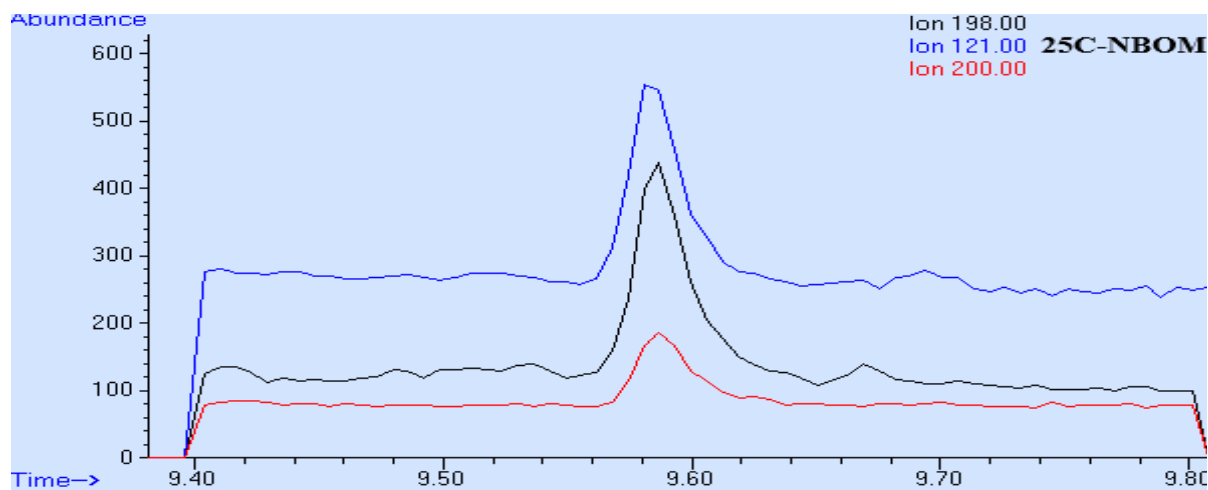
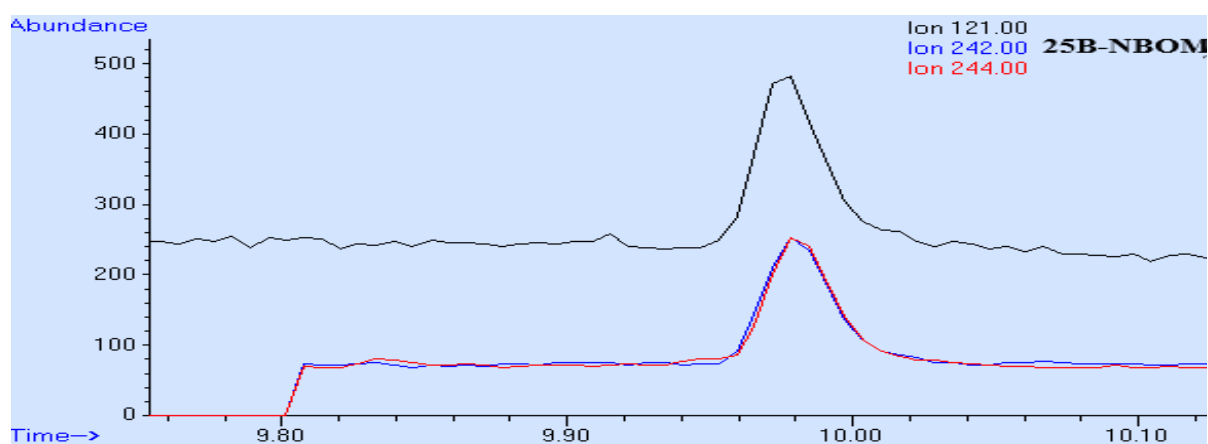
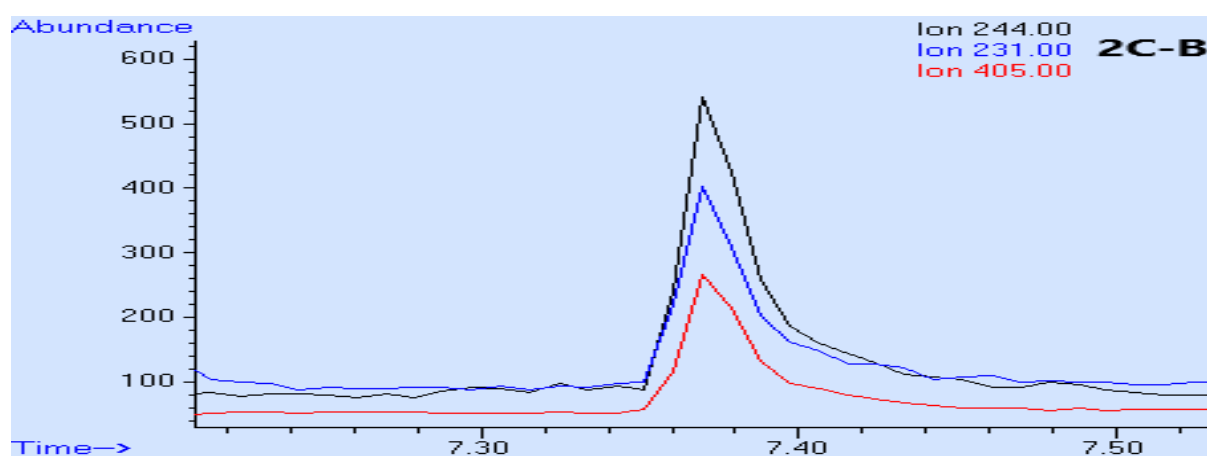
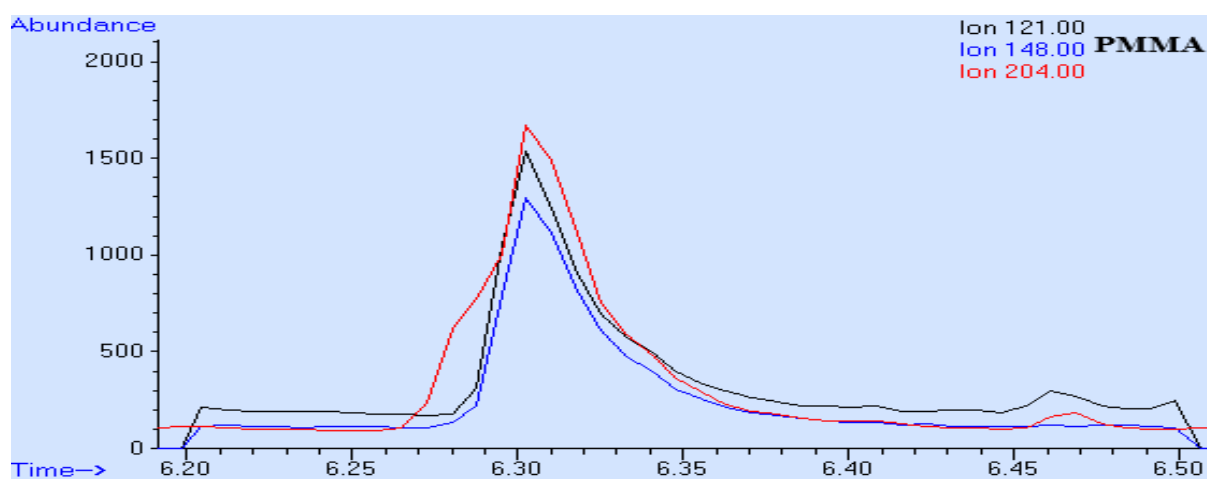
Στην συνέχεια ακολουθούν αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα των εμβολιασμένων δειγμάτων ολικού αίματος με τους 21 αναλύτες στο κατώτατο όριο ποσοτικοποίησης, που ελήφθησαν με την λειτουργία παρακολούθησης επιλεγμένων ιόντων (Εικόνα 7.1).

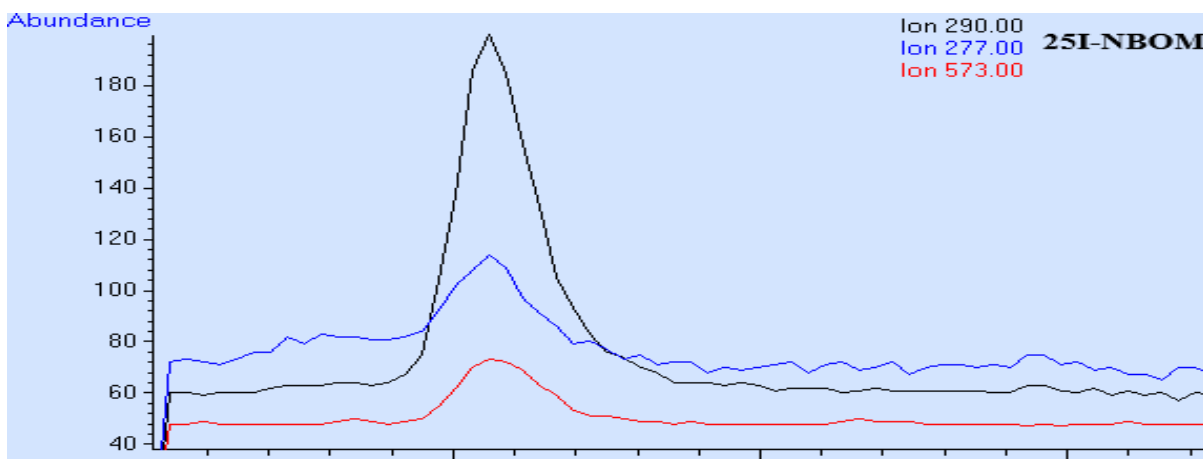












Εικόνα 7.1: Χρωματογραφήματα 3 επιλεγμένων ιόντων για τους 21 αναλύτες στο επίπεδο συγκέντρωσης LOQ.

7.4 Γραμμικότητα

Η μελέτη της γραμμικότητας της μεθόδου για τους 21 αναλύτες έγινε σε 4 διαφορετικές μέρες με την αντίστοιχη κατασκευή 4 διαφορετικών καμπύλων βαθμονόμησης με 6 σημεία, οι οποίες παρουσίασαν γραμμική συσχέτιση. Οι τιμές της καμπύλης βαθμονόμησης διορθώθηκαν με τη χρήση του παράγοντα ζύγισης $1/x^2$, με το x να είναι η θεωρητική τιμή της συγκέντρωσης του κάθε αναλύτη εκφρασμένη σε ng/mL. Ο λόγος για τον οποίο χρησιμοποιήθηκε ο παράγοντας ζύγισης είναι ώστε να αποφευχθούν οι σημαντικές αποκλίσεις στις τιμές των πολύ χαμηλών συγκεντρώσεων. Οι εξισώσεις παλινδρόμησης για όλες τις ουσίες είναι της μορφής $y=ax+b$, όπου :

- y: ο λόγος του εμβαδού της κορυφής του αναλύτη προς το εμβαδό της κορυφής του αντίστοιχου εσωτερικού του προτύπου. Δηλαδή :

$$y = \frac{Area(analyte)}{Area(IS)}$$

- x: η τιμή της συγκέντρωσης του κάθε αναλύτη εκφρασμένη σε ng/mL.

Από τις εξισώσεις παλινδρόμησης των 21 ουσιών των 4 ημερών, υπολογίστηκε η μέση εξίσωση παλινδρόμησης και η επί τοις εκατό σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) των κλίσεων (slope) για την κάθε ουσία. Το μέτρο της τιμής %RSD αποτέλεσε το κριτήριο της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας της μεθόδου. Για τις 21 ουσίες παρατηρήθηκε γραμμική συσχέτιση σε περιοχή εύρους συγκεντρώσεων:

- 2-200 ng/mL για τις ουσίες φαινυλοπροπανολαμίνη, εφεδρίνη, ψευδοεφεδρίνη, MDA, μεθεδρόνη, μεθυλόνη, 25C-NBOMe, 25B-NBOMe και 25I-NBOMe.
- 5-500 ng/mL για τις ουσίες αμφεταμίνη, μεθαμφεταμίνη, μεθακθινόνη, PMMA, MDMA, MDEA και 2C-B.

- 10-500 ng/mL για τις ουσίες 4-MMC και MBDB
- 20-500 ng/mL για τις ουσίες πυροβαλερόνη, MDPV και ναφυρόνη.

Ο συντελεστής προσδιορισμού (r^2) είναι ≥ 0.990 για όλες τις καμπύλες βαθμονόμησης των 21 αναλυτών (Πίνακες 7.2-7.22)

Πίνακας 7.2: Εξισώσεις καμπυλών βαθμονόμησης για την αμφεταμίνη

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος	r^2
1 ^η	$y = 0.0305 \cdot x + 0.0202$	0.992
2 ^η	$y = 0.0337 \cdot x + 0.0171$	0.994
3 ^η	$y = 0.0310 \cdot x + 0.0132$	0.992
4 ^η	$y = 0.0321 \cdot x + 0.0176$	0.995
Μέση εξίσωση	$y = (0.0318 \pm 0.0014) \cdot x + (0.0170 \pm 0.0029)$	
%RSD κλίσεων	4.4	

Πίνακας 7.3: Εξισώσεις καμπυλών βαθμονόμησης για την μεθαμφεταμίνη

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος	r^2
1 ^η	$y = 0.0339 \cdot x + 0.0398$	0.998
2 ^η	$y = 0.0331 \cdot x + 0.0690$	0.993
3 ^η	$y = 0.0313 \cdot x + 0.0036$	0.996
4 ^η	$y = 0.0317 \cdot x + 0.0380$	0.992
Μέση εξίσωση	$y = (0.0325 \pm 0.0012) \cdot x + (0.0376 \pm 0.0267)$	
%RSD κλίσεων	3.7	

Πίνακας 7.3: Εξισώσεις καμπυλών βαθμονόμησης για την φαινυλοπροπανολαμίνη

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος	r^2
1 ^η	$y = 0.0574 \cdot x - 0.0125$	0.991
2 ^η	$y = 0.0618 \cdot x - 0.0566$	0.994
3 ^η	$y = 0.0584 \cdot x + 0.0336$	0.990
4 ^η	$y = 0.0596 \cdot x + 0.0464$	0.990
Μέση εξίσωση	$y = (0.0593 \pm 0.0019) \cdot x + (0.0027 \pm 0.0470)$	
%RSD κλίσεων	3.2	

Πίνακας 7.4: Εξισώσεις παλινδρόμησης 4 ημερών για το MDA

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος	r^2
1 ^η	$y = 0.0298 \cdot x + 0.0315$	0.997
2 ^η	$y = 0.0328 \cdot x - 0.0150$	0.991
3 ^η	$y = 0.0296 \cdot x + 0.0079$	0.996
4 ^η	$y = 0.0312 \cdot x + 0.0004$	0.996
Μέση εξίσωση	$y = (0.0309 \pm 0.0015) \cdot x + (0.0062 \pm 0.0194)$	
%RSD κλίσεων	4.9	

Πίνακας 7.5: Εξισώσεις καμπύλων βαθμονόμησης για το MDMA.

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος	r^2
1 ^η	$y = 0.0231 \cdot x + 0.0093$	0.998
2 ^η	$y = 0.0218 \cdot x - 0.0054$	0.994
3 ^η	$y = 0.0230 \cdot x + 0.0274$	0.993
4 ^η	$y = 0.0240 \cdot x - 0.0252$	0.991
Μέση εξίσωση	$y = (0.0230 \pm 0.0009) \cdot x + (0.0015 \pm 0.0223)$	
%RSD κλίσεων	4.0	

Πίνακας 6.7: Εξισώσεις καμπύλων βαθμονόμησης για το MDEA

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος	r^2
1 ^η	$y = 0.0211 \cdot x + 0.0590$	0.992
2 ^η	$y = 0.0197 \cdot x - 0.0013$	0.993
3 ^η	$y = 0.0210 \cdot x + 0.0086$	0.990
4 ^η	$y = 0.0217 \cdot x + 0.0170$	0.990
Μέση εξίσωση	$y = (0.0209 \pm 0.0009) \cdot x + (0.0208 \pm 0.0266)$	
%RSD κλίσεων	4.1	

Πίνακας 7.7: Εξισώσεις καμπύλων βαθμονόμησης για το MBDB

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος	r^2
1 ^η	$y = 0.0212 \cdot x + 0.0446$	0.992
2 ^η	$y = 0.0232 \cdot x + 0.0622$	0.997
3 ^η	$y = 0.0215 \cdot x + 0.0123$	0.993
4 ^η	$y = 0.0217 \cdot x + 0.0050$	0.990
Μέση εξίσωση	$y = (0.0219 \pm 0.0009) \cdot x + (0.0310 \pm 0.0270)$	
%RSD κλίσεων	4.0	

Πίνακας 7.8: Εξισώσεις καμπύλων βαθμονόμησης για την εφεδρίνη

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος	r^2
1 ^η	$y = 0.0464 \cdot x + 0.0675$	0.991
2 ^η	$y = 0.0461 \cdot x + 0.0615$	0.991
3 ^η	$y = 0.0456 \cdot x + 0.0282$	0.991
4 ^η	$y = 0.0435 \cdot x + 0.0353$	0.991
Μέση εξίσωση	$y = (0.0454 \pm 0.0013) \cdot x + (0.0481 \pm 0.0193)$	
%RSD κλίσεων	2.9	

Πίνακας 7.9: Εξισώσεις καμπύλων αναφοράς για την ψευδοεφεδρίνη

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος	r^2
1 ^η	$y = 0.0667 \cdot x + 0.0022$	0.990
2 ^η	$y = 0.0688 \cdot x + 0.0684$	0.991
3 ^η	$y = 0.0652 \cdot x + 0.0378$	0.991
4 ^η	$y = 0.0687 \cdot x + 0.0525$	0.992
Μέση εξίσωση	$y = (0.0674 \pm 0.0017) \cdot x + (0.0452 \pm 0.0199)$	
%RSD κλίσεων	2.6	

Πίνακας 7.10: Εξισώσεις καμπυλών βαθμονόμησης για την μεθκαθινόνη

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος	r^2
1 ^η	$y = 0.0182 \cdot x - 0.0463$	0.991
2 ^η	$y = 0.0188 \cdot x - 0.0675$	0.990
3 ^η	$y = 0.0181 \cdot x - 0.0593$	0.993
4 ^η	$y = 0.0189 \cdot x - 0.0526$	0.993
Μέση εξίσωση	$y = (0.0185 \pm 0.0004) \cdot x - (0.0564 \pm 0.0091)$	
%RSD κλίσεων	2.4	

Πίνακας 7.11: Εξισώσεις καμπυλών βαθμονόμησης για την μεθεδρόνη

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος	r^2
1 ^η	$y = 0.0520 \cdot x - 0.0078$	0.991
2 ^η	$y = 0.0536 \cdot x - 0.0341$	0.992
3 ^η	$y = 0.0507 \cdot x + 0.0740$	0.996
4 ^η	$y = 0.0505 \cdot x - 0.0132$	0.992
Μέση εξίσωση	$y = (0.0517 \pm 0.0014) \cdot x - (0.0120 \pm 0.0172)$	
%RSD κλίσεων	2.8	

Πίνακας 7.12: Εξισώσεις καμπυλών βαθμονόμησης για το 4-MMC

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος	r^2
1 ^η	$y = 0.0230 \cdot x - 0.0028$	0.992
2 ^η	$y = 0.0243 \cdot x - 0.0153$	0.991
3 ^η	$y = 0.0232 \cdot x - 0.0402$	0.992
4 ^η	$y = 0.0249 \cdot x + 0.0251$	0.997
Μέση εξίσωση	$y = (0.0238 \pm 0.0009) \cdot x - (0.0083 \pm 0.0272)$	
%RSD κλίσεων	3.8	

Πίνακας 7.13: Εξισώσεις καμπυλών βαθμονόμησης για την μεθυλόνη

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος	r^2
1 ^η	$y = 0.0316 \cdot x + 0.0177$	0.992
2 ^η	$y = 0.0340 \cdot x + 0.0125$	0.994
3 ^η	$y = 0.0310 \cdot x + 0.0054$	0.994
4 ^η	$y = 0.0331 \cdot x - 0.0033$	0.992
Μέση εξίσωση	$y = (0.0324 \pm 0.0014) \cdot x + (0.0081 \pm 0.0091)$	
%RSD κλίσεων	4.2	

Πίνακας 7.14: Εξισώσεις καμπυλών βαθμονόμησης για την ναφυρόνη

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος	r^2
1 ^η	$y = 0.0087 \cdot x + 0.0779$	0.993
2 ^η	$y = 0.0090 \cdot x + 0.0461$	0.995
3 ^η	$y = 0.0081 \cdot x + 0.0027$	0.995
4 ^η	$y = 0.0084 \cdot x - 0.0399$	0.992
Μέση εξίσωση	$y = (0.0085 \pm 0.0004) \cdot x + (0.0217 \pm 0.0514)$	
%RSD κλίσεων	4.4	

Πίνακας 7.15: Εξισώσεις καμπυλών βαθμονόμησης για την πυροβαλερόνη

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος	r^2
1 ^η	$y = 0.0210 \cdot x + 0.0600$	0.991
2 ^η	$y = 0.0219 \cdot x - 0.1617$	0.995
3 ^η	$y = 0.0205 \cdot x - 0.1035$	0.993
4 ^η	$y = 0.0212 \cdot x - 0.1491$	0.992
Μέση εξίσωση	$y = (0.0211 \pm 0.0006) \cdot x - (0.0886 \pm 0.1022)$	
%RSD κλίσεων	4.7	

Πίνακας 7.17: Εξισώσεις καμπυλών βαθμονόμησης για το MDPV

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος	r^2
1 ^η	$y = 0.0210 \cdot x - 0.0600$	0.990
2 ^η	$y = 0.0223 \cdot x - 0.0882$	0.992
3 ^η	$y = 0.0202 \cdot x - 0.0958$	0.990
4 ^η	$y = 0.0208 \cdot x + 0.0158$	0.991
Μέση εξίσωση	$y = (0.0211 \pm 0.0009) \cdot x - (0.0214 \pm 0.1210)$	
%RSD κλίσεων	4.2	

Πίνακας 7.18: Εξισώσεις καμπυλών βαθμονόμησης για το PMMA

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος	r^2
1 ^η	$y = 0.0204 \cdot x + 0.0480$	0.991
2 ^η	$y = 0.0208 \cdot x + 0.0211$	0.993
3 ^η	$y = 0.0192 \cdot x + 0.0252$	0.991
4 ^η	$y = 0.0216 \cdot x + 0.0019$	0.994
Μέση εξίσωση	$y = (0.0205 \pm 0.0010) \cdot x + (0.0241 \pm 0.0190)$	
%RSD κλίσεων	4.7	

Πίνακας 7.19: Εξισώσεις βαθμονόμησης για το 2C-B

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος	r^2
1 ^η	$y = 0.0056 \cdot x + 0.0056$	0.993
2 ^η	$y = 0.0059 \cdot x + 0.0037$	0.992
3 ^η	$y = 0.0054 \cdot x + 0.0016$	0.991
4 ^η	$y = 0.0061 \cdot x - 0.0058$	0.990
Μέση εξίσωση	$y = (0.0058 \pm 0.0003) \cdot x + (0.0014 \pm 0.0051)$	
%RSD κλίσεων	4.9	

Πίνακας 7.20 Εξισώσεις βαθμονόμησης για το 25C-NBOMe

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος	r^2
1 ^η	$y = 0.0107 \cdot x + 0.0010$	0.994
2 ^η	$y = 0.0102 \cdot x + 0.0004$	0.995
3 ^η	$y = 0.0103 \cdot x - 0.0002$	0.993
4 ^η	$y = 0.0096 \cdot x + 0.0058$	0.991
Μέση εξίσωση	$y = (0.0102 \pm 0.0005) \cdot x + (0.0024 \pm 0.0029)$	
%RSD κλίσεων	4.4	

Πίνακας 7.21: Εξισώσεις καμπυλών βαθμονόμησης για το 25B-NBOMe

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος	r^2
1 ^η	$y = 0.0098 \cdot x + 0.0129$	0.996
2 ^η	$y = 0.0096 \cdot x + 0.010$	0.991
3 ^η	$y = 0.0091 \cdot x - 0.0020$	0.991
4 ^η	$y = 0.0090 \cdot x + 0.0051$	0.993
Μέση εξίσωση	$y = (0.0094 \pm 0.0004) \cdot x + (0.0066 \pm 0.0066)$	
%RSD κλίσεων	4.3	

Πίνακας 7.22: Εξισώσεις καμπυλών βαθμονόμησης για το 25I-NBOMe

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος	r^2
1 ^η	$y = 0.0080 \cdot x - 0.0080$	0.994
2 ^η	$y = 0.0080 \cdot x + 0.0005$	0.991
3 ^η	$y = 0.072 \cdot x - 0.0032$	0.995
4 ^η	$y = 0.0078 \cdot x - 0.0036$	0.992
Μέση εξίσωση	$y = (0.0077 \pm 0.0004) \cdot x - (0.0036 \pm 0.0034)$	
%RSD κλίσεων	4.8	

7.5 Επαναποσοτικοποίηση των δειγμάτων βαθμονόμησης

Στο σημείο αυτό πραγματοποιήθηκε η επαναποσοτικοποίηση των δειγμάτων βαθμονόμησης σε όλα τα επίπεδα συγκεντρώσεων (cal_{1-6}) για τις 4 ημέρες και εκτιμήθηκε το επί τοις εκατό σχετικό σφάλμα για τον προσδιορισμό της σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση

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

όπου x ήταν η ευρεθείσα συγκέντρωση ενώ μ η αντίστοιχη θεωρητική τιμή της για κάθε ένα από τα επίπεδα των 6 συγκεντρώσεων. Συνολικά τα αποτελέσματα που ελήφθησαν και για τους 21 αναλύτες, εμφάνιζαν εύρος τιμών $\%Er$ από -14.2 έως 14.9% με τα μεγαλύτερα σφάλματα κατά απόλυτη τιμή να εμφανίζονται στις υψηλές συγκεντρώσεις των δειγμάτων βαθμονόμησης (cal_5 και cal_6). Οι τιμές αυτές των $\%Er$ είναι συμμορφούμενες με τις απαιτήσεις του πρωτοκόλλου επικύρωσης για $< |15\%|$ και $< |20\%|$ για το κατώτατο όριο ποσοτικοποίησης (LOQ).

Επιπλέον, είναι άξιο αναφοράς ότι σε κάθε επίπεδο συγκέντρωσης των δειγμάτων βαθμονόμησης παρατηρούνταν τόσο θετικά όσο και αρνητικά σφάλματα, γεγονός που αποδίδεται σε τυχαία σφάλματα και όχι σε συστηματικά.

7.6 Επαναληψιμότητα και ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα

Η επαναληψιμότητα και η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου, εκτιμήθηκαν στα 3 επίπεδα συγκεντρώσεων των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας, ένα χαμηλό (QC1), ένα μεσαίο (QC2) και ένα υψηλό (QC3) για κάθε αναλύτη. Πιο συγκεκριμένα, για τους αναλύτες:

- φαινυλοπροπανολαμίνη, εφεδρίνη, ψευδοεφεδρίνη, MDA, μεθεδρόνη, μεθυλόνη, 25C-NBOMe, 25B-NBOMe και 25I-NBOMe τα 3 επίπεδα ελέγχου ποιότητας είναι:
 - i. QC1 = 6 ng/mL
 - ii. QC2 = 60 ng/mL
 - iii. QC3 = 160 ng/mL
- αμφεταμίνη, μεθαμφεταμίνη, μεθκαθινόνη, PMMA, MDMA, MDEA και 2C-B, τα 3 επίπεδα ελέγχου ποιότητας είναι :
 - i. QC1 = 15 ng/mL
 - ii. QC2 = 150 ng/mL
 - iii. QC3 = 400 ng/mL
- 4-MMC και MBDB τα 3 επίπεδα ελέγχου ποιότητας είναι:
 - i. QC1 = 30 ng/mL
 - ii. QC2 = 125 ng/mL

- iii. QC3 = 400 ng/mL
- πυροβαλερόνη, MDPV και ναφυρόνη τα 3 επίπεδα ελέγχου ποιότητας είναι:
 - i. QC1 = 60 ng/mL
 - ii. QC2 = 200 ng/mL
 - iii. QC3 = 400 ng/mL

Η επαναληψιμότητα και ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου εκτιμήθηκε από την τιμή της RSD, και ήταν εντός των αποδεκτών ορίων $< |15\%|$ στις 4 ημέρες, στα 3 επίπεδα συγκεντρώσεων δειγμάτων QC για τους 21 αναλύτες. Τα αποτελέσματα της επαναληψιμότητας της μεθόδου παρουσιάζονται αναλυτικά στους Πίνακες 7.23-7.43, ενώ της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας στον Πίνακα 7.44.

7.7 Ορθότητα εντός της ημέρας και δια των ημερών

Η ορθότητα εντός της ημέρας, εκτιμήθηκε στα 3 επίπεδα συγκεντρώσεων των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας, από τον υπολογισμό των επί τοις εκατό σχετικών σφαλμάτων ($\%E_r$) των τιμών των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας στα τρία επίπεδα για τις 4 ημέρες. Η τιμή $\%E_r$ παρουσίαζε θετικές και αρνητικές τιμές και οι τιμές τους ήταν εντός των αποδεκτών ορίων $< |15\%|$. Αναλυτικότερα, τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους πίνακες 7.23-7.43 για την ορθότητα εντός της ημέρας και στον Πίνακα 7.44 για την ορθότητα δια των ημερών

Πίνακας 7.23: Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της μεθόδου για την αμφεταμίνη σε ολικό αίμα.

Ημέρα	QC1 (15 ng/mL)			QC2 (150 ng/mL)			QC3 (400 ng/mL)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%Er)
1	14.4 $\pm$ 0.9	6.5	-4.0	140.5 $\pm$ 11.0	7.8	-6.3	393.2 $\pm$ 32.0	8.1	-1.7
2	14.6 $\pm$ 0.7	5.0	-2.5	144.6 $\pm$ 15.8	10.9	-3.6	389.5 $\pm$ 41.9	10.8	-2.6
3	14.5 $\pm$ 0.9	6.5	-3.4	150.9 $\pm$ 15.4	10.2	0.6	381.1 $\pm$ 21.9	5.8	-4.7
4	14.9 $\pm$ 0.5	3.07	-0.5	154.1 $\pm$ 8.5	5.51	2.75	401.6 $\pm$ 32.4	8.1	0.4

Πίνακας 7.24: Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της μεθόδου για την μεθαμφεταμίνη σε ολικό αίμα

Ημέρα	QC1 (15 ng/mL)			QC2 (150 ng/mL)			QC3 (400 ng/mL)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%Er)
1	16.6 $\pm$ 0.5	3.2	10.4	139.8 $\pm$ 8.8	6.3	-6.8	387.7. $\pm$ 35.5	9.2	-3.1
2	15.7 $\pm$ 0.8	4.8	4.4	143.3 $\pm$ 10.9	7.6	-4.4	371.6 $\pm$ 43.5	11.7	-7.1
3	14.2 $\pm$ 0.8	5.7	-5.4	159.5 $\pm$ 6.3	4.0	6.3	372.3 $\pm$ 25.7	6.9	-6.7
4	15.0 $\pm$ 0.6	4.1	-0.2	151.3 $\pm$ 4.8	3.2	0.9	377.0 $\pm$ 24.9	6.6	-7.8

Πίνακας 7.25: Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της μεθόδου για το MDA σε ολικό αίμα

Ημέρα	QC1 (6 ng/mL)			QC2 (60 ng/mL)			QC3 (160 ng/mL)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%Er)
1	6.3 $\pm$ 0.4	6.9	4.5	53.8 $\pm$ 3.8	7.1	-10.4	168.7 $\pm$ 14.8	8.8	5.4
2	5.7 $\pm$ 0.6	10.9	-5.9	56.3 $\pm$ 5.2	9.2	-6.2	146.3 $\pm$ 10.2	7.0	-8.6
3	5.6 $\pm$ 0.4	7.4	-7.3	56.8 $\pm$ 5.2	9.2	-5.4	169.3 $\pm$ 12.0	7.1	5.8
4	6.1 $\pm$ 0.3	4.9	2.2	62.4 $\pm$ 3.1	5.0	4.1	176.8 $\pm$ 10.2	5.8	10.5

Πίνακας 7.26: Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της μεθόδου για το MDMA σε ολικό αίμα

Ημέρα	QC1 (15 ng/mL)			QC2 (150 ng/mL)			QC3 (400 ng/mL)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%Er)
1	14.4 $\pm$ 0.8	5.8	-4.2	154.3 $\pm$ 12.4	8.1	2.9	387.3 $\pm$ 32.1	8.3	-3.2
2	15.6 $\pm$ 1.0	6.4	4.0	157.1 $\pm$ 9.6	6.1	4.7	456.1 $\pm$ 6.6	1.5	14.0
3	15.5 $\pm$ 1.3	8.1	3.5	157.9 $\pm$ 5.2	3.3	5.3	382.9 $\pm$ 26.8	7.0	-4.3
4	15.3 $\pm$ 0.94	6.1	-14.7	155.5 $\pm$ 8.9	5.7	-13.6	371.6 $\pm$ 32.3	8.7	-7.1

Πίνακας 7.27: Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της μεθόδου για το MDEA σε ολικό αίμα

Ημέρα	QC1 (15 ng/mL)			QC2 (150 ng/mL)			QC3 (400 ng/mL)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%Er)
1	16.0 $\pm$ 1.4	8.5	6.8	143.4 $\pm$ 12.4	8.6	-4.4	426.9 $\pm$ 37.3	8.7	6.7
2	13.5 $\pm$ 0.9	6.5	-10.2	160.5 $\pm$ 11.7	7.3	7.0	429.2 $\pm$ 28.9	6.7	7.3
3	16.1 $\pm$ 1.1	7.1	7.4	159.4 $\pm$ 10.9	6.9	6.3	374.7 $\pm$ 30.5	8.2	-6.3
4	14.9 $\pm$ 0.8	5.4	-0.9	147.2 $\pm$ 13.2	8.9	-1.9	424.4 $\pm$ 29.0	6.8	6.1

Πίνακας 7.28: Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της μεθόδου για το MBDB σε ολικό αίμα

Ημέρα	QC1 (30 ng/mL)			QC2 (125 ng/mL)			QC3 (400 ng/mL)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%Er)
1	28.4 $\pm$ 2.1	7.2	-5.3	131.1 $\pm$ 11.7	8.9	4.8	374.6 $\pm$ 31.5	8.4	-6.4
2	28.4 $\pm$ 3.2	11.2	-5.5	112.3 $\pm$ 9.5	8.5	-10.2	378.9 $\pm$ 27.3	7.2	-5.3
3	31.3 $\pm$ 2.8	9.0	4.4	130.2 $\pm$ 8.3	6.4	4.2	373.6 $\pm$ 25.7	6.9	-6.6
4	31.0 $\pm$ 1.9	6.1	3.2	126.6 $\pm$ 6.7	5.3	1.3	424.4 $\pm$ 29.0	6.8	6.1

Πίνακας 7.29: Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της μεθόδου για την εφεδρίνη σε ολικό αίμα

Ημέρα	QC1 (6 ng/mL)			QC2 (60 ng/mL)			QC3 (160 ng/mL)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%Er)
1	5.7 $\pm$ 0.4	7.5	-4.4	55.9 $\pm$ 4.7	8.4	-6.9	171.2 $\pm$ 13.8	8.1	7.0
2	5.6 $\pm$ 0.5	9.2	-6.4	64.6 $\pm$ 6.2	9.5	7.7	148.1 $\pm$ 14.1	9.5	-7.4
3	6.4 $\pm$ 0.5	8.3	7.5	58.4 $\pm$ 5.4	9.2	2.7	174.1 $\pm$ 9.7	5.6	8.8
4	6.3 $\pm$ 0.5	8.3	7.5	59.7 $\pm$ 3.6	6.1	-0.5	143.9 $\pm$ 11.7	8.2	-10.1

Πίνακας 7.30: Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της μεθόδου για την ψευδοεφεδρίνη σε ολικό αίμα

Ημέρα	QC1 (6 ng/mL)			QC2 (60 ng/mL)			QC3 (160 ng/mL)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%Er)
1	5.7 $\pm$ 0.4	6.7	-5.8	64.6 $\pm$ 5.3	8.1	7.7	170.4 $\pm$ 8.0	4.7	6.5
2	6.5 $\pm$ 0.5	7.8	7.5	65.2 $\pm$ 4.3	6.6	8.6	177.4 $\pm$ 9.5	5.3	10.9
3	6.6 $\pm$ 0.3	4.9	10.2	58.4 $\pm$ 5.4	9.2	-2.6	169.3 $\pm$ 11.1	6.5	5.8
4	5.9 $\pm$ 0.3	4.9	-2.3	58.2 $\pm$ 3.8	6.6	.-3.0	151.5 $\pm$ 11.0	7.3	-5.3

Πίνακας 7.31: Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της μεθόδου για την φαινυλοπροπανολαμίνη σε ολικό αίμα

Ημέρα	QC1 (6 ng/mL)			QC2 (60 ng/mL)			QC3 (160 ng/mL)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%Er)
1	6.4 $\pm$ 0.4	7.0	6.7	56.3 $\pm$ 5.5	8.4	-7.2	173.5 $\pm$ 10.7	6.1	8.5
2	5.7 $\pm$ 0.6	10.5	-5.9	56.3 $\pm$ 5.5	9.8	-6.2	172.8 $\pm$ 18.1	10.5	8.0
3	5.7 $\pm$ 0.5	8.5	-4.4	66.2 $\pm$ 3.5	5.2	10.3	167.0 $\pm$ 11.4	6.8	5.6
4	6.1 $\pm$ 0.2	3.9	1.9	61.4 $\pm$ 4.8	7.9	2.3	143.9 $\pm$ 11.7	8.2	-10.1

Πίνακας 7.32: Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της μεθόδου για την μεθαθινόνη σε ολικό αίμα

Ημέρα	QC1 (15 ng/mL)			QC2 (150 ng/mL)			QC3 (400 ng/mL)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%Er)
1	15.7 $\pm$ 0.9	5.8	4.8	138.5 $\pm$ 15.5	11.2	-7.7	395.7 $\pm$ 21.9	6.1	-10.1
2	16.1 $\pm$ 1.2	7.2	7.3	165.1 $\pm$ 8.7	5.3	10.1	383.8 $\pm$ 55.1	14.4	-4.1
3	13.4 $\pm$ 0.8	6.3	-10.4	134.5 $\pm$ 8.1	6.0	-10.3	409.7 $\pm$ 44.3	10.8	2.4
4	15.3 $\pm$ 0.5	3.2	1.9	147.4 $\pm$ 6.5	4.4	-1.7	474.5 $\pm$ 37.0	9.9	-6.4

Πίνακας 7.33: Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της μεθόδου για την μεθεδρόνη σε ολικό αίμα

Ημέρα	QC1 (6 ng/mL)			QC2 (60 ng/mL)			QC3 (160 ng/mL)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%Er)
1	5.5 $\pm$ 0.3	6.0	-8.6	62.2 $\pm$ 5.5	8.8	3.7	143.3 $\pm$ 7.1	5.0	-10.4
2	5.6 $\pm$ 0.5	9.1	-6.3	56.7 $\pm$ 7.0	12.3	-5.5	172.8 $\pm$ 8.9	5.1	8.0
3	6.2 $\pm$ 0.7	11.5	4.1	63.5 $\pm$ 5.9	9.2	5.8	167.9 $\pm$ 17.8	10.6	5.0
4	6.1 $\pm$ 0.3	5.6	1.7	59.9 $\pm$ 4.8	8.0	-0.2	173.1 $\pm$ 9.0	5.2	8.2

Πίνακας 7.34: Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της μεθόδου για το 4-MMC σε ολικό αίμα

Ημέρα	QC1 (30 ng/mL)			QC2 (125 ng/mL)			QC3 (400 ng/mL)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%Er)
1	28.7 $\pm$ 2.4	8.5	-4.4	125.3 $\pm$ 15.4	12.3	0.2	383.0 $\pm$ 39.3	10.3	-4.3
2	28.1 $\pm$ 3.6	12.9	-6.2	116.7 $\pm$ 10.5	9.0	-6.6	376.5 $\pm$ 39.4	10.5	-5.9
3	33.0 $\pm$ 1.8	5.5	10.11	124.0 $\pm$ 12.7	10.3	-0.8	440.9 $\pm$ 17.2	3.9	10.2
4	30.8 $\pm$ 2.6	8.5	2.8	123.5 $\pm$ 3.9	3.2	-1.2	379.0 $\pm$ 33.0	8.7	-5.3

Πίνακας 7.35: Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της μεθόδου για την μεθυλόνη σε ολικό αίμα

Ημέρα	QC1(6 ng/mL)			QC2 (60 ng/mL)			QC3 (160 ng/mL)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%Er)
1	5.8 $\pm$ 0.6	10.7	-3.6	55.2 $\pm$ 3.6	6.5	-8.0	144.0 $\pm$ 12.0	8.4	-10.0
2	5.7 $\pm$ 0.5	7.9	-4.8	56.8 $\pm$ 2.8	5.0	-5.4	149.8 $\pm$ 14.3	9.5	-6.4
3	6.3 $\pm$ 0.7	10.6	4.7	56.0 $\pm$ 3.8	6.7	-6.6	172.6 $\pm$ 9.7	5.6	7.9
4	6.1 $\pm$ 0.4	6.8	2.0	63.9 $\pm$ 2.7	4.3	6.5	176.5 $\pm$ 11.1	6.3	10.3

Πίνακας 7.36: Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της μεθόδου για την ναφυρόνη σε ολικό αίμα

Ημέρα	QC1 (60 ng/mL)			QC2 (200 ng/mL)			QC3 (400 ng/mL)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%Er)
1	64.7 $\pm$ 3.8	5.8	7.8	211.3 $\pm$ 14.5	6.8	5.7	422.9 $\pm$ 35.6	8.4	5.7
2	55.5 $\pm$ 4.8	8.6	-7.5	190.1 $\pm$ 14.9	7.8	-5.0	361.2 $\pm$ 28.2	7.8	-9.7
3	64.6 $\pm$ 5.8	9.0	7.6	190.7 $\pm$ 22.0	11.6	-4.7	416.4 $\pm$ 33.9	8.1	4.1
4	59.0 $\pm$ 2.2	3.8	-1.7	196.8 $\pm$ 9.3	4.7	-1.6	426.6 $\pm$ 30.7	7.2	6.7

Πίνακας 7.37: Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της μεθόδου για την πυροβαλερόνη σε ολικό αίμα

Ημέρα	QC1 (60 ng/mL)			QC2 (200 ng/mL)			QC3 (400 ng/mL)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%Er)
1	66.1 $\pm$ 2.4	3.7	10.1	189.1 $\pm$ 19.3	10.2	-5.5	426.2 $\pm$ 36.3	8.5	6.6
2	53.6 $\pm$ 3.8	7.1	-10.6	186.0 $\pm$ 12.9	7.0	-7.0	425.5 $\pm$ 26.0	6.1	6.4
3	65.2 $\pm$ 3.6	5.6	8.6	210.2 $\pm$ 19.8	9.4	5.1	359.4 $\pm$ 21.4	6.0	-10.2
4	65.2 $\pm$ 3.6	4.0	-2.5	206.4 $\pm$ 12.5	6.1	3.2	428.1 $\pm$ 25.8	6.0	7.0

Πίνακας 7.38: Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της μεθόδου για το MDPV σε ολικό αίμα

Ημέρα	QC1 (60 ng/mL)			QC2 (200 ng/mL)			QC3 (400 ng/mL)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%Er)
1	64.2 $\pm$ 4.7	7.4	7.0	189.8 $\pm$ 14.4	7.6	-5.1	414.0 $\pm$ 43.0	10.4	3.5
2	56.2 $\pm$ 4.4	7.8	-6.4	179.9 $\pm$ 4.8	2.7	-10.1	424.8 $\pm$ 26.7	6.3	6.2
3	62.8 $\pm$ 6.6	10.6	4.6	188.9 $\pm$ 14.9	7.9	-5.6	374.4 $\pm$ 31.9	8.5	-6.4
4	60.8 $\pm$ 2.6	4.2	1.4	208.8 $\pm$ 12.2	5.8	4.4	369.7 $\pm$ 23.7	6.4	-7.6

Πίνακας 7.39: Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της μεθόδου για το PMMA σε ολικό αίμα

Ημέρα	QC1 (15 ng/mL)			QC2 (150 ng/mL)			QC3 (400 ng/mL)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%Er)
1	16.1 $\pm$ 0.7	4.4	7.0	165.0 $\pm$ 8.1	4.9	10.0	387.0 $\pm$ 45.6	12.0	-5.3
2	14.1 $\pm$ 1.2	8.2	-6.1	140.6 $\pm$ 16.1	11.4	-6.3	359.1 $\pm$ 30.5	8.5	-10.2
3	15.8 $\pm$ 1.3	8.4	5.6	165.4 $\pm$ 5.2	3.1	10.3	424.5 $\pm$ 26.5	6.2	6.1
4	15.5 $\pm$ 0.8	4.9	3.4	158.4 $\pm$ 10.8	6.8	5.6	433.9 $\pm$ 27.3	6.3	8.5

Πίνακας 7.40: Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της μεθόδου για το 2C-B σε ολικό αίμα

Ημέρα	QC1 (15 ng/mL)			QC2 (150 ng/mL)			QC3 (400 ng/mL)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%Er)
1	14.4 $\pm$ 1.2	8.1	-3.7	160.4 $\pm$ 10.6	6.7	7.0	377.6 $\pm$ 43.7	11.6	-5.6
2	14.1 $\pm$ 1.2	8.5	-6.4	156.6 $\pm$ 12.7	8.2	4.4	388.0 $\pm$ 38.0	9.8	-3.0
3	14.0 $\pm$ 0.7	24.9	-6.8	141.0 $\pm$ 15.2	10.8	-6.0	371.3 $\pm$ 37.3	10.0	-7.2
4	15.3 $\pm$ 0.8	5.3	2.1	148.1 $\pm$ 9.5	6.4	-1.3	439.0 $\pm$ 11.1	6.3	10.3

Πίνακας 7.41: Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της μεθόδου για το 25C-NBOMe σε ολικό αίμα

Ημέρα	QC1 (6 ng/mL)			QC2 (60 ng/mL)			QC3 (160 ng/mL)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%Er)
1	6.4 $\pm$ 0.4	5.5	6.0	57.7 $\pm$ 4.9	8.5	-3.8	153.9 $\pm$ 14.8	9.6	-3.8
2	5.7 $\pm$ 0.3	5.7	-5.8	64.5 $\pm$ 6.5	10.0	7.4	171.3 $\pm$ 14.0	8.2	7.1
3	6.3 $\pm$ 0.3	5.4	5.5	63.4 $\pm$ 5.2	8.2	5.7	143.6 $\pm$ 6.1	4.3	-10.2
4	5.9 $\pm$ 0.3	4.8	-1.2	62.3 $\pm$ 5.0	8.1	3.8	171.5 $\pm$ 9.2	5.4	7.2

Πίνακας 7.42: Επαναληψιμότητα και ορθότητα της ημέρας της μεθόδου για το 25B-NBOMe

Ημέρα	QC1 (6 ng/mL)			QC2 (60 ng/mL)			QC3 (160 ng/mL)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%Er)
1	6.1 $\pm$ 0.6	10.1	1.4	59.8 $\pm$ 6.3	10.4	-0.4	154.6 $\pm$ 17.6	11.4	-3.4
2	5.7 $\pm$ 0.6	9.9	-4.3	62.4 $\pm$ 5.3	8.5	4.0	151.7 $\pm$ 11.5	7.6	-5.2
3	6.3 $\pm$ 0.5	8.4	5.5	63.1 $\pm$ 5.0	8.0	5.2	150.4 $\pm$ 11.4	7.6	-6.0
4	5.9 $\pm$ 0.4	7.2	-1.0	61.6 $\pm$ 4.2	6.8	2.6	170.7 $\pm$ 16.3	9.5	6.7

Πίνακας 7.43: Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της μεθόδου για το 25I-NBOMe σε ολικό αίμα

Ημέρα	QC1 (6 ng/mL)			QC2 (60 ng/mL)			QC3 (160 ng/mL)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%Er)
1	6.3 $\pm$ 0.7	10.7	4.5	57.6 $\pm$ 6.1	10.5	-4.0	154.7 $\pm$ 16.8	10.9	-3.3
2	5.6 $\pm$ 0.6	10.2	-6.2	63.8 $\pm$ 4.6	7.2	6.3	170.5 $\pm$ 12.4	7.3	6.6
3	6.3 $\pm$ 0.3	4.6	5.8	63.5 $\pm$ 5.3	8.3	5.9	152.9 $\pm$ 11.0	7.1	-4.4
4	5.8 $\pm$ 0.4	6.2	-3.1	59.2 $\pm$ 3.7	6.2	-1.3	150.9 $\pm$ 14.7	9.8	-5.7

Πίνακας 7.44: Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα και ορθότητα δια των ημερών

Αναλύτης	Θεωρητική συγκέντρωση (ng/mL)	Μέση Πειραματική συγκέντρωσης (ng/mL), (n=24)	Ορθότητα δια των ημερών (%E _r)	Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (%RSD)
Αμφεταμίνη	15	14.4 ± 0.8	-3.8	5.7
	150	146.7 ± 13.3	-2.2	9.1
	400	396.1 ± 37.4	-1.0	9.5
Μεθαμφεταμίνη	15	15.4 ± 1.1	2.3	7.2
	150	148.5 ± 10.8	-1.0	7.3
	400	377.4 ± 31.7	-5.7	8.4
Φαινυλοπροπανολαμίνη	6	6.0 ± 0.5	-0.5	8.8
	60	59.9 ± 6.2	-0.2	10.3
	160	164.8 ± 17.6	3.0	10.7
Εφεδρίνη	6	6.0 ± 0.6	0.3	9.5
	60	59.6 ± 5.7	-0.6	9.6
	160	167.0 ± 15.8	4.4	9.5
Ψευδοεφεδρίνη	6	6.1 ± 0.5	2.4	8.8
	60	61.6 ± 5.6	0.3	9.0
	160	167.2 ± 13.5	4.5	8.1
MDA	6	5.9 ± 0.5	-1.6	8.9
	60	57.3 ± 5.2	-4.5	9.1
	160	165.2 ± 16.1	3.3	9.8
MDMA	15	15.2 ± 1.1	1.4	7.1
	150	156.2 ± 8.9	4.2	5.7
	400	399.5 ± 42.1	-0.1	10.5
MDEA	15	15.1 ± 1.5	0.9	9.8
	150	152.6 ± 13.6	1.7	8.9
	400	413.8 ± 37.5	3.5	9.1
	30	28.8 ± 2.8	-0.8	9.3
	125	125.0 ± 11.6	0.1	9.2

MBDB	400	376.5 ± 26.1	-5.9	7.0
Μεθκαθινόνη	15	15.1 ± 1.3	0.9	8.8
	150	146.4 ± 15.4	-2.4	10.5
	400	381.9 ± 42.8	-4.5	11.2
4-MMC	30	30.2 ± 3.2	0.6	10.6
	125	122.4 ± 11.2	-2.1	9.2
	400	394.8 ± 41.4	-1.3	10.5
Μεθεδρόνη	6	5.9 ± 0.6	-2.3	9.7
	60	60.6 ± 6.1	1.0	10.0
	160	164.3 ± 16.5	2.3	10.0
Πυροβαλερόνη	60	60.9 ± 6.0	1.4	9.8
	200	197.9 ± 18.8	-1.0	9.5
	400	409.8 ± 39.5	2.5	9.6
MDPV	60	61.0 ± 5.5	1.7	8.9
	200	191.8 ± 15.7	-4.1	8.2
	400	395.7 ± 38.9	-1.1	9.8
Μεθυλόνη	6	6.0 ± 0.6	-0.5	9.5
	60	58.0 ± 4.7	-3.4	8.1
	160	160.7 ± 18.1	0.5	11.3
Ναφυρόνη	60	61.0 ± 6.0	1.6	9.3
	200	197.2 ± 17.2	-1.4	8.7
	400	406.8 ± 40.5	1.7	10.0
2C-B	15	14.4 ± 1.1	-3.7	7.4
	150	151.5 ± 13.8	1.0	9.1
	400	394.0 ± 43.7	-1.5	11.1
PMMA	15	15.4 ± 1.2	2.5	8.0
	150	157.3 ± 14.4	4.9	9.2
	400	399.2 ± 44.4	-0.2	11.1
25B-NBOMe	6	6.0 ± 0.6	0.4	9.1
	60	61.7 ± 5.1	2.9	8.2
	160	156.9 ± 15.8	-2.0	10.1
	6	6.1 ± 0.4	1.1	7.1

25C-NBOMe	60	62.0 ± 5.7	3.3	9.2
	160	160.1 ± 16.2	0.1	10.2
25I-NBOMe	6	6.0 ± 0.6	0.3	9.3
	60	61.0 ± 5.4	1.7	8.9
	160	157.3 ± 15.2	-1.7	9.7

7.8 Απόλυτη ανάκτηση

Η απόλυτη ανάκτηση για τους 21 αναλύτες της μεθόδου υπολογίστηκε στα 3 επίπεδα συγκέντρωσης των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον πίνακα 7.45.

Πίνακας 7.45: Αποτελέσματα απόλυτης ανάκτησης για τους 21 αναλύτες σε 3 επίπεδα συγκεντρώσεων

Αναλύτης	Επίπεδο συγκέντρωσης (ng/mL)	% Απόλυτη ανάκτηση (± SD)
Αμφεταμίνη	15	88.1 ± 4.6
	150	86.9 ± 3.1
	400	91.0 ± 4.7
Μεθαμφεταμίνη	15	88.6 ± 3.1
	150	93.0 ± 3.5
	400	91.9 ± 5.4
Φαινυλοπροπανολαμίνη	6	89.9 ± 6.4
	60	86.1 ± 3.5
	160	90.7 ± 4.3
Εφεδρίνη	6	85.5 ± 6.1
	60	83.6 ± 9.7
	160	81.5 ± 6.3
Ψευδοεφεδρίνη	6	84.5 ± 8.1
	60	86.7 ± 8.8
	160	84.0 ± 4.6
MDA	6	89.6 ± 6.0
	60	91.7 ± 4.6
	160	93.8 ± 7.2
MDMA	15	97.9 ± 3.3
	150	93.5 ± 6.8
	400	96.7 ± 7.4
MDEA	15	97.8 ± 7.1
	150	98.8 ± 4.5
	400	94.6 ± 7.2
MBDB	30	91.0 ± 5.1
	200	92.3 ± 4.8
	400	91.1 ± 6.1
Μεθκαθινόνη	15	84.5 ± 4.6
	150	80.3 ± 2.0
	400	86.9 ± 4.5

4-MMC	30	83.6 ± 6.6
	125	83.8 ± 3.4
	400	85.8 ± 5.5
Μεθεδρόνη	6	91.5 ± 5.1
	60	81.2 ± 4.6
	160	85.5 ± 8.8
Πυροβαλερόνη	60	82.0 ± 4.9
	200	85.0 ± 2.8
	400	92.0 ± 6.4
MDPV	60	87.6 ± 6.7
	200	91.1 ± 6.0
	400	88.2 ± 7.0
Μεθυλόνη	6	91.8 ± 6.7
	60	92.0 ± 3.0
	160	90.2 ± 6.9
Ναφυρόνη	60	88.6 ± 3.9
	200	87.1 ± 3.6
	400	82.1 ± 5.6
2C-B	15	84.1 ± 5.6
	150	83.8 ± 3.0
	400	86.9 ± 8.0
PMMA	15	93.1 ± 2.8
	150	95.2 ± 2.3
	400	89.4 ± 8.3
25B-NBOMe	6	88.1 ± 5.8
	60	85.1 ± 4.0
	160	83.7 ± 9.2
25C-NBOMe	6	88.5 ± 5.8
	60	83.5 ± 4.7
	160	87.8 ± 7.9
25I-NBOMe	6	88.8 ± 6.3
	60	85.6 ± 12.5
	160	87.9 ± 8.4

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΕ ΑΓΝΩΣΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΟΛΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ

Η μέθοδος GC-MS για τον προσδιορισμό παραγώγων αμφεταμίνης, συνθετικών καθινονών και φαιραιθυλαμινών στο ολικό αίμα, αφού αναπτύχθηκε, βελτιστοποιήθηκε και επικυρώθηκε, εν συνεχεία εφαρμόστηκε σε άγνωστα δείγματα αίματος. Τα αναφερόμενα βιολογικά υλικά προέρχονταν από 40 υποθέσεις δικαστικού ενδιαφέροντος για το διάστημα 06/2022-02/2023 και αφορούσαν χρήστες εξαρτησιογόνων ουσιών, τροχαία ατυχήματα, αυτοκτονίες, θανάτους όπου είχε διαπιστωθεί πνευμονικό οίδημα, εγκεφαλική αιμορραγία αλλά και απροσδιόριστους. Σε αυτές τις δικαστικές υποθέσεις υπήρχε ιστορικό λήψης εξαρτησιογόνων ουσιών ή θετική ένδειξη από την ανοσοενζυμική εξέταση τους σε αμφεταμίνες ή/και έκσταση. Στον Πίνακα 8.1 παρουσιάζονται οι 7 υποθέσεις με θετικά αποτελέσματα ως προς τους αναλύτες της μεθόδου. Τα δείγματα αίματος αναλύθηκαν μετά την επικύρωση της μεθόδου χρησιμοποιώντας τη μέση καμπύλη αναφοράς για τον κάθε αναλύτη.

Πίνακας 8.1: Αποτελέσματα θετικών δειγμάτων ολικού αίματος

Θετικό δείγμα	Φύλλο/Ηλικία	Ιστορικό	Εύρημα	Συγκέντρωση (ng/mL)
#1	Θήλυ/89 ετών	Απροσδιόριστος θάνατος	Ψευδοεφεδρίνη Φαινυλοπροπανολαμίνη	754.9 48.5
#2	Άρρεν/47 ετών	Απροσδιόριστος θάνατος	Αμφεταμίνη Μεθαμφεταμίνη Ψευδοεφεδρίνη Φαινυλοπροπανολαμίνη	12.5 27.42 88.7 54.2
#3	Άρρεν/34 ετών	Χρήστης ουσιών	Αμφεταμίνη Μεθαμφεταμίνη	20.78 547
#4	Άρρεν/άγνωστης ηλικίας	Χρήστης ουσιών	Αμφεταμίνη Μεθαμφεταμίνη	252 1446.6
#5	Θήλυ/29 ετών	Κλινικό περιστατικό	Αμφεταμίνη Μεθαμφεταμίνη	106 1592.7
#6	Άρρεν/ 35 ετών	Χρήστης ουσιών	Αμφεταμίνη Μεθαμφεταμίνη	566.3 36.6
#7	Άρρεν/34 ετών	Χρήστης ουσιών	MBDB	115.9

Από την ανάλυση των 40 δειγμάτων ολικού αίματος μόνο 7 βρέθηκαν θετικές ως προς τις εξεταζόμενες ουσίες της μεθόδου. Οι ουσίες που εντοπίστηκαν ανήκουν στην κατηγορία των διεγερτικών τύπου αμφεταμίνης και συγκεκριμένα η ψευδοεφεδρίνη, η φαινυλοπροπανολαμίνη, η αμφεταμίνη, η μεθαμφεταμίνη και από το προϊόν τύπου έκστασι MBDB. Άξιο παρατήρησης είναι ότι η αμφεταμίνη συνυπήρχε με την μεθαμφεταμίνη σε όλα τα θετικά δείγματα, γεγονός που αποδίδεται στο ότι η αμφεταμίνη είναι προϊόν μεταβολισμού της μεθαμφεταμίνης. Αντίστοιχα στις περιπτώσεις που διαπιστώθηκε η παρουσία ψευδοεφεδρίνης, ανιχνεύτηκε παράλληλα και ο μεταβολίτης της φαινυλοπροπανολαμίνη.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9: ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΟΥΡΩΝ

Για την εφαρμογή της μεθόδου σε άγνωστα δείγματα ούρων προηγήθηκε ο έλεγχος των χαρακτηριστικών ποιότητας της μεθόδου σε μία πειραματική μέρα, ως προς την γραμμικότητα της καμπύλης βαθμονόμησης, την ειδικότητα, την εντός της ημέρας επαναληψιμότητα, την ορθότητα και την απόλυτης ανάκτηση της μεθόδου για τον κάθε αναλύτη. Επισημαίνεται ότι ο έλεγχος αυτός δεν αποτελεί επικύρωση της μεθόδου στα ούρα αλλά εκτίμηση της απόδοσης της μεθόδου στα ούρα με σκοπό την εφαρμογή της σε άγνωστα δείγματα ούρων.

9.1 Έλεγχος γραμμικότητας

Όπως και στην περίπτωση του ολικού αίματος, αναλύθηκαν 6 δείγματα ούρων, καταλλήλως εμβολιασμένων όπως περιγράφονται στον Πίνακα 4.2. Ακολούθησε η γραμμική συσχέτιση των ανεξάρτητων μεταβλητών x (συγκέντρωση) με τις εξαρτημένες y ($\text{Area}_{\text{αναλύτη}}/\text{Area}_{\text{εσωτερικού προτύπου}}$) με γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης. Επιπλέον έγινε διόρθωση των τιμών της καμπύλης με χρήση του παράγοντα ζύγισης $1/x^2$. Οι εξισώσεις που προέκυψαν είναι γραμμικές της μορφής $y=a \cdot x+b$ με συντελεστή προσδιορισμού $r^2 > 0.99$. Στον Πίνακα 9.1 παρατίθενται οι εξισώσεις βαθμονόμησης για τους 21 αναλύτες.

Πίνακας 9.1: Εξισώσεις βαθμονόμησης για τους 21 αναλύτες στα ούρα.

Αναλύτης	Εξίσωση καμπύλης αναφοράς	r^2
Αμφεταμίνη	$y = 0.0350 \cdot x + 0.0470$	0.995
Μεθαμφεταμίνη	$y = 0.0358 \cdot x + 0.0168$	0.993
Φαίνυλοπροπανολαμίνη	$y = 0.0360 \cdot x + 0.0156$	0.990
MDA	$y = 0.0360 \cdot x + 0.0732$	0.998
MDMA	$y = 0.0247 \cdot x + 0.0239$	0.997
MDEA	$y = 0.0320 \cdot x + 0.0047$	0.990
MBDB	$y = 0.0239 \cdot x + 0.1185$	0.991
Εφεδρίνη	$y = 0.0373 \cdot x + 0.0862$	0.991
Ψευδοεφεδρίνη	$y = 0.0475 \cdot x + 0.0365$	0.991
Μεθκαθινόνη	$y = 0.0173 \cdot x - 0.0379$	0.992
Μεθεδρόνη	$y = 0.0622 \cdot x - 0.0250$	0.992
4-MMC	$y = 0.0329 \cdot x - 0.0400$	0.991
Μεθυλόνη	$y = 0.0354 \cdot x + 0.0024$	0.994
Ναφυρόνη	$y = 0.0069 \cdot x - 0.0245$	0.990

Πυροβαλερόνη	$y = 0.0256 \cdot x - 0.1421$	0.992
MDPV	$y = 0.0209 \cdot x - 0.0648$	0.991
PMMA	$y = 0.0249 \cdot x - 0.0633$	0.996
2C-B	$y = 0.0075 \cdot x - 0.0207$	0.998
25C-NBOMe	$y = 0.0192 \cdot x - 0.0460$	0.996
25B-NBOMe	$y = 0.0192 \cdot x - 0.0394$	0.995
25I-NBOMe	$y = 0.0142 \cdot x - 0.0259$	0.999

9.2 Επαναποσοτικοποίηση των δειγμάτων βαθμονόμησης

Κατά αναλογία με το ολικό αίμα, έγινε επαναποσοτικοποίηση των 6 σημείων της καμπύλης. Η επαναποσοτικοποίηση των δειγμάτων βαθμονόμησης φανέρωσε τις αποκλίσεις των πειραματικών τιμών από τις θεωρητικές να είναι $< |15\%|$.

9.3 Επαναληψιμότητα εντός της ημέρας

Παράλληλα με τα δείγματα βαθμονόμησης, αναλύθηκαν και 6 εμβολιασμένα δείγματα ελέγχου ποιότητας, ένα χαμηλό, ένα μεσαίο και ένα υψηλό επίπεδο συγκέντρωσης, όπως και στην περίπτωση του ολικού αίματος. Η επαναληψιμότητα εκφράστηκε από την τιμή %RSD των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης. Το εύρος των τιμών %RSD που ελήφθησαν ήταν 3.8-14.7%. Επομένως η επαναληψιμότητα εντός της ημέρας συμμορφώνεται με τις απαιτήσεις των ορίων $< |15\%|$.

9.4 Ορθότητα εντός της ημέρας

Η ορθότητα εντός της ημέρας υπολογίστηκε ομοίως με το ολικό αίμα. Οι τιμές των %E_r για το σύνολο των αναλυτών εμφάνισαν εύρος τιμών από -11.8 έως 8.3, αποτέλεσμα συμμορφούμενο με τις απαιτήσεις των οδηγιών για %E_r $< |15\%|$.

9.5 Απόλυτη ανάκτηση

Για τον υπολογισμό της απόλυτης ανάκτησης, αναλύθηκαν επιπλέον 3 μεθανολικά δείγματα για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης των δειγμάτων βαθμονόμησης. Έπειτα υπολογίστηκε η % απόλυτη ανάκτηση. Το εύρος των συγκεντρώσεων για τους 21 αναλύτες ήταν (83.6-113.2)%.

9.6 Ανάλυση άγνωστων δειγμάτων ούρων

Η μέθοδος εφαρμόστηκε σε όσα από τα 40 δείγματα που αναφέρονται στο προηγούμενο κεφάλαιο, υπήρχε και δείγμα ούρων. Τα θετικά αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 9.2.

Πίνακας 9.2: Αποτελέσματα θετικών δειγμάτων στα ούρα

Θετικό δείγμα	Φύλλο/Ηλικία	Ιστορικό	Εύρημα	Συγκέντρωση (ng/mL)
≠1'	Θήλυ/89 ετών	Απροσδιόριστος θάνατος	Ψευδοεφεδρίνη Φαινυλοπροπανολαμίνη	22278 4013
≠5'	Θήλυ/29 ετών	Κλινικό περιστατικό	Αμφεταμίνη Μεθαμφεταμίνη	52943 1829
≠6'	Άρρεν/35 ετών	Χρήστης ουσιών	Αμφεταμίνη Μεθαμφεταμίνη	17297 799
≠8	Άρρεν/31 ετών	Χρήστης ουσιών	Αμφεταμίνη Μεθαμφεταμίνη	192 4620

Τα δείγματα ≠1', ≠5' και ≠6' βρίσκονται σε συμφωνία όσον αφορά την ποιοτική τους σύσταση με τα ομόλογα δείγματα αίματος ενώ ποσοτικά οι τιμές των αναλυτών είναι σημαντικά υψηλότερες στα ούρα, ενδεχομένως λόγω της διαδικασίας απέκκρισής τους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα διεγερτικά τύπου αμφεταμίνης ή παράγωγα αμφεταμίνης περιλαμβάνουν ένα σύνολο από ουσίες που συχνά γίνονται αντικείμενο κατάχρησης λόγω των ευφορικών τους ιδιοτήτων. Από αυτές, τα πιο δημοφιλή είναι οι κλασσικές αμφεταμίνες, αμφεταμίνη και μεθαμφεταμίνη, και τα τύπου έκστασι ναρκωτικά, τα οποία είναι απαγορευμένες ουσίες από τις διεθνείς συμβάσεις των ναρκωτικών. Τα τελευταία χρόνια εισέρχονται στην παράνομη αγορά περίπου 50 νέες ψυχοδραστικές ουσίες ετησίως. Πρόκειται για ουσίες που δεν έχουν αναγνωριστεί από τις διεθνείς συμβάσεις για τα ναρκωτικά και πωλούνται κυρίως μέσω του διαδικτύου ως νόμιμες εναλλακτικές των παράνομων ουσιών. Από αυτές, οι συνθετικές καθιόνες και οι φαιναυλαμίνες λόγω της χημικής και φαρμακολογικής τους ομοιότητας με τα παράγωγα της αμφεταμίνης συχνά προωθούνται ως υποκατάστατα αυτών.

Η χρήση διεγερτικών ουσιών όπως τα παράγωγα αμφεταμίνης, οι συνθετικές καθιόνες και οι φαιναυλαμίνες αποτελούν κίνδυνο για την δημόσια υγεία. Η οξεία τοξικότητα αυτών των ουσιών συχνά οδηγεί τους χρήστες στα τμήματα επειγόντων περιστατικών των νοσοκομείων ενώ άλλοτε ακόμα και σε θάνατο. Το πρόβλημα μεγενθύνεται από το γεγονός ότι για τις νέες ψυχοδραστικές ουσίες η γνώση γύρω από την τοξικοκινητική, φαρμακοδυναμική και την τοξικότητά τους είναι ιδιαίτερα περιορισμένη.

Το φαινόμενο αυτό αποτελεί πρόκληση για τα τοξικολογικά εργαστήρια αφού απαιτούνται νέες αναλυτικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό των νέων αυτών ουσιών στα διάφορα βιολογικά υλικά. Η πρόκληση αυτή οφείλεται στην ολοένα προσθήκη νέων ουσιών στην αγορά με άγνωστες χημικές δομές και τοξικοκινητικά χαρακτηριστικά αλλά και στην έλλειψη διαλυμάτων αναφοράς για τις ουσίες αυτές ώστε να γίνει η ταυτοποίηση τους. Ως απότοκο είναι να υπάρχουν περιορισμένες επικυρωμένες μέθοδοι ικανές να παρέχουν αξιόπιστα αποτελέσματα με την κατάλληλη ευαισθησία και ειδικότητα στο σύνθετο μητρικό υλικό των βιολογικών δειγμάτων.

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας που εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ, έγινε ανάπτυξη, βελτιστοποίηση και επικύρωση μεθόδου GC-MS για τον προσδιορισμό 9 διεγερτικών τύπου αμφεταμίνης, 7 συνθετικών καθιονών και 5 φαιναυλαμινών σε ολικό αίμα. Η προκατεργασία των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση μικτού τύπου, μη πολικής/κατιοανταλλακτικής στήλης Bond Elut LRC Certify και στη συνέχεια παραγωγοποίηση με το αντιδραστήριο PFPA στους 40 °C για 20 min.

Η μέθοδος είναι πρωτότυπη ως προς το ότι δεν υπάρχει άλλη δημοσιευμένη μέθοδος για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των 21 ουσιών. Επιπλέον, ο προσδιορισμός των συνθετικών καθινονών και των φαιραιθυλαμινών με την τεχνική της GC-MS, μίας τεχνικής διαθέσιμης σε κάθε τοξικολογικό εργαστήριο ρουτίνας, παρέχει την δυνατότητα στην διερεύνηση υποθέσεων κλινικής ή δικαστικής τοξικολογίας για τις συγκεκριμένες νέες ψυχοδραστικές ουσίες. Ειδικότερα, στην κλινική τοξικολογία είναι χρήσιμη ως επικουρικό μέσο που θα προσφέρει χρήσιμες απαντήσεις σε περιστατικά οξείας τοξίκωσης σχετιζόμενων με τις υπο μελέτη ουσίες, ενώ στην περίπτωση της δικαστικής τοξικολογίας για την αποσαφήνιση υποθέσεων που μέχρι σήμερα ήταν αδύνατο να διευκρινιστούν.

Η αναπτυχθείσα μέθοδος διαθέτει τα εξής χαρακτηριστικά:

- Είναι επικυρωμένη σύμφωνα με τα διεθνή πρωτόκολλα παρέχοντας έτσι αξιόπιστα αναλυτικά δεδομένα.
- Παρέχει εκλεκτικότητα και ειδικότητα για τους αναλύτες
- Υψηλά ποσοστά ανάκτησης των ουσιών
- Χαμηλά όρια ανίχνευσης των ουσιών
- Ευρύ και δυναμικό γραμμικό εύρος συγκεντρώσεων
- Ταχεία μέθοδος ανάλυσης και οικονομική
- Δίνει την δυνατότητα να προστεθούν περαιτέρω ουσίες, ειδικά μόρια που είναι παράγωγα της φαιραιθυλαμίνης.

Συγκριτικά με άλλες δημοσιευμένες στη διεθνή επιστημονική βιβλιογραφία μεθόδους πλεονεκτεί στο ότι περιλαμβάνει 21 αναλύτες από τρεις κατηγορίες διεγερτικών ουσιών (διεγερτικά τύπου αμφεταμίνης, συνθετικές καθινονές και φαιραιθυλαμίνες) σε αντίθεση με τις περισσότερες εργασίες που περιλαμβάνουν μία ουσία¹⁸², ή μόνο μία κατηγορία ουσιών όπως παράγωγα αμφεταμίνης^{110,160} ή καθινονές¹¹⁶. Επιπλέον, κατά την παραγωγοποίηση των αναλυτών με PFPA χρησιμοποιήθηκαν μικρότεροι χρόνοι αντίδρασης και ηπιότερες συνθήκες θερμοκρασίας συγκριτικά με άλλες δημοσιευμένες μελέτες^{110,149,153,177} οδηγώντας σε μειωμένο χρόνο ανάλυσης. Κατά την βελτιστοποίηση του σταδίου της παραγωγοποίησης έγινε για πρώτη φορά η σύγκριση διαφορετικών τύπων αντιδραστηρίων όπως αντιδραστηρίων σιλιανοποίησης (BSTFA, MTBSTFA) και αντιδραστηρίων ακετυλίωσης (TFAA, PFPA, HFBA) ενώ στη διαθέσιμη διεθνή βιβλιογραφία γίνεται η σύγκριση μόνο ακετυλιωτικών αντιδραστηρίων. Το στάδιο αυτό είναι ιδιαίτερα κρίσιμο δεδομένου ότι με την επιλογή του κατάλληλου αντιδραστηρίου επιτυγχάνεται βελτιστοποίηση του ορίου ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου, κάτι ιδιαίτερα σημαντικό στην περίπτωση των αναλυτών της παρούσας μελέτης, οι

περισσότερες εκ των οποίων βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις στα βιολογικά υλικά. Η επιλογή του PFPA στη μελέτη αυτή ως βέλτιστο αντιδραστήριο παραγωγοποίησης έρχεται σε πλήρη συμφωνία με τα αποτελέσματα της μελέτης των Alsendi κ.α.¹⁶² και Mohamed κ.α.¹⁶⁴ που συμπέραναν ότι το PFPA είναι καταλληλότερο αντιδραστήριο παραγωγοποίησης σε σχέση με τα αντιδραστήρια TFPA και HFBA τα οποία και ελέγχθησαν στις μελέτες αυτές, χωρίς όμως παράλληλη εκτίμηση των αντιδραστηρίων σιλιανοποίησης. Από την άλλη, στη μελέτη των Dodos κ.α.¹⁶⁵ διαπιστώθηκε ως βέλτιστο αντιδραστήριο παραγωγοποίησης ο οξικός ανυδρίτης (AA) συγκριτικά με τα HFBA, PFPA, TFA και MTBSTFA, που έρχεται σε διαφωνία με τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής αλλά και με τους Alsendi κ.α. και Mohamed κ.α.. Με την παραγωγοποίηση με το αντιδραστήριο PFPA πραγματοποιείται επίσης ικανοποιητικός διαχωρισμός ισομερών παραγώγων όπως της ουσίας εφεδρίνης με την ουσία ψευδοεφεδρίνη που χρησιμοποιείται θεραπευτικά ως αποσυμφορητικό σε διάφορα φαρμακευτικά σκευάσματα, κάτι που συμβάλει στην ορθότερη διερεύνηση κλινικών ή δικαστικών υποθέσεων όπου κάποια από τις ουσίες αυτές εμπλέκεται.

Επιπλέον, συγκριτικά με άλλες εργασίες που περιέχουν μεγάλο αριθμό ουσιών που χρησιμοποιούν τετραπολικό ανιχνευτή MS, η αναπτυχθείσα μέθοδος παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία αφού έχει χαμηλότερα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης για τις ουσίες αμφεταμίνη, μεθαμφεταμίνη, MDA, MDMA, MDEA, MBDB, μεθυλόνη, 2C-B και MDPV συγκριτικά με άλλες δημοσιευμένες εργασίες^{112,115,117,123,150,154,160,177}. Ακόμα, διαθέτει μεγαλύτερο εύρος γραμμικής περιοχής σε σχέση με άλλες εργασίες όπου το εύρος τους είναι πιο περιορισμένο^{110,116,153}. Όσον αφορά τα ποσοστά ανάκτησης της μεθόδου, κατέχει σημαντικά υψηλότερα συγκριτικά με άλλες μεθόδους^{117,153,160,177,182}.

Η αναπτυχθείσα μέθοδος, μετά την επικύρωσή της, εφαρμόστηκε επιτυχώς σε μεταθανάτια δείγματα αίματος και ούρων στα οποία έγινε ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των ουσιών αμφεταμίνη, μεθαμφεταμίνη, ψευδοεφεδρίνη, φαινυλοπροπανολαμίνη και MBDB. Από τις νέες ψυχοδραστικές ουσίες της μεθόδου δεν εντοπίστηκε καμία ουσία, γεγονός που μπορεί να αποδοθεί στο μικρό αριθμό αναλυθέντων δειγμάτων και στο ότι οι νέες ψυχοδραστικές ουσίες δεν είναι σε μεγάλο βαθμό διαδεδομένες στον ελλαδικό χώρο.

Η νέα αναπτυχθείσα GC/MS αναλυτική μέθοδος, πλήρως επικυρωποιημένη για τις 21 ουσίες που ανήκουν στις κατηγορίες των διεγερτικών τύπου αμφεταμίνης, συνθετικών καθινονών και φαιναιθυλαμινών και η επιτυχής εφαρμογή της στα άγνωστα βιολογικά υλικά αίματος και ούρων μπορεί να αποδειχθεί ένα χρήσιμο εργαλείο για κάθε τοξικολογικό εργαστήριο για την ορθότερη διερεύνηση κλινικών και δικαστικών υποθέσεων.

Βιβλιογραφία

1. WHO Meeting on Amphetamines, M. and other P. (1996: G. & Abuse, W. H. O. D. of M. H. and P. of S. *Amphetamine-type stimulants : a report from the WHO Meeting on Amphetamines, MDMA and other Psychostimulants, Geneva, 12-15 November 1996*. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/63849> (1997).
2. *Global illicit drug trends*. (United Nations, 1999).
3. UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME & DIVISION FOR TREATY AFFAIRS. *WORLD DRUG REPORT 2022*. (UNITED NATIONS, 2022).
4. *Amphetamine: a European Union perspective in the global context*. (Office for Official Publ. of the European Communities, 2011). doi:10.2810/49525.
5. Heal, D. J., Smith, S. L., Gosden, J. & Nutt, D. J. Amphetamine, past and present – a pharmacological and clinical perspective. *J. Psychopharmacol. (Oxf.)* **27**, 479–496 (2013).
6. United States Food and & Drug Administration. Desoxyn Prescribing Information. (2013).
7. Hart, C. L., Marvin, C. B., Silver, R. & Smith, E. E. Is Cognitive Functioning Impaired in Methamphetamine Users? A Critical Review. *Neuropsychopharmacology* **37**, 586–608 (2012).
8. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. *Problem amphetamine and methamphetamine use in Europe : EMCDDA Selected issues*. (Publications Office, 2010).
9. EMCDA & EUROPOL. *EU Drug Market: Methamphetamine*. (2022).
10. Chung, H. & Choe, S. Amphetamine-type Stimulants in Drug Testing. *Mass Spectrom. Lett.* **10**, 1–10 (2019).
11. Greene, S. L., Kerr, F. & Braitberg, G. Review article: Amphetamines and related drugs of abuse. *Emerg. Med. Australas.* **20**, 391–402 (2008).
12. Laccourreye, O. *et al.* Benefits, limits and danger of ephedrine and pseudoephedrine as nasal decongestants. *Eur. Ann. Otorhinolaryngol. Head Neck Dis.* **132**, 31–34 (2015).
13. Vearrier, D., Greenberg, M. I., Miller, S. N., Okaneku, J. T. & Haggerty, D. A. Methamphetamine: History, Pathophysiology, Adverse Health Effects, Current Trends, and Hazards Associated with the Clandestine Manufacture of Methamphetamine. *Dis. Mon.* **58**, 38–89 (2012).

14. Rasmussen, N. Amphetamine-Type Stimulants. in *International Review of Neurobiology* vol. 120 9–25 (Elsevier, 2015).
15. Morelli, M. & Tognotti, E. Brief history of the medical and non-medical use of amphetamine-like psychostimulants. *Exp. Neurol.* **342**, 113754 (2021).
16. Bett, W. R. Benzedrine sulphate in clinical medicine; a survey of the literature. *Postgrad. Med. J.* **22**, 205–218 (1946).
17. Freudenmann, R. W. & Spitzer, M. The Neuropsychopharmacology and Toxicology of 3,4-methylenedioxy-N-ethyl-amphetamine (MDEA). *CNS Drug Rev.* **10**, 89–116 (2004).
18. Sessa, B., Higbed, L. & Nutt, D. A Review of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA)-Assisted Psychotherapy. *Front. Psychiatry* **10**, (2019).
19. Mead, J. & Parrott, A. Mephedrone and MDMA: A comparative review. *Brain Res.* **1735**, 146740 (2020).
20. de la Torre, R. *et al.* Clinical pharmacokinetics of amphetamine and related substances: monitoring in conventional and non-conventional matrices. *Clin. Pharmacokinet.* **43**, 157–185 (2004).
21. Langman, L. J. & Snozek, C. L. H. Chapter 6 - Introduction to Drugs of Abuse. in *Critical Issues in Alcohol and Drugs of Abuse Testing (Second Edition)* (ed. Dasgupta, A.) 71–78 (Academic Press, 2019). doi:10.1016/B978-0-12-815607-0.00006-X.
22. Panenka, W. J. *et al.* Methamphetamine use: A comprehensive review of molecular, preclinical and clinical findings. *Drug Alcohol Depend.* **129**, 167–179 (2013).
23. Carvalho, M. *et al.* Toxicity of amphetamines: an update. *Arch. Toxicol.* **86**, 1167–1231 (2012).
24. Biel, J. H. & Bopp, B. A. Amphetamines: Structure-Activity Relationships. in *Stimulants* (eds. Iversen, L. L., Iversen, S. D. & Snyder, S. H.) 1–39 (Springer US, 1978). doi:10.1007/978-1-4757-0510-2_1.
25. Young, R. & Glennon, R. A. Discriminative stimulus properties of amphetamine and structurally related phenalkylamines. *Med. Res. Rev.* **6**, 99–130 (1986).
26. Sitte, H. H. & Freissmuth, M. Amphetamines, new psychoactive drugs and the monoamine transporter cycle. *Trends Pharmacol. Sci.* **36**, 41–50 (2015).
27. Kleven, M. S. & Seiden, L. S. Methamphetamine-induced neurotoxicity: structure activity relationships. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **654**, 292–301 (1992).
28. Docherty, J. R. & Alsufyani, H. A. Pharmacology of Drugs Used as Stimulants. *J. Clin. Pharmacol.* **61**, (2021).

29. Dragan, A.-M. *et al.* Analytical techniques for the detection of amphetamine-type substances in different matrices: A comprehensive review. *TrAC Trends Anal. Chem.* **145**, 116447 (2021).
30. Capela, J. P. *et al.* Molecular and Cellular Mechanisms of Ecstasy-Induced Neurotoxicity: An Overview. *Mol. Neurobiol.* **39**, 210–271 (2009).
31. Green, A. R., Mehan, A. O., Elliott, J. M., O'Shea, E. & Colado, M. I. The Pharmacology and Clinical Pharmacology of 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "Ecstasy"). *Pharmacol. Rev.* **55**, 463–508 (2003).
32. Yamamoto, B. K., Moszczynska, A. & Gudelsky, G. A. Amphetamine toxicities: Classical and emerging mechanisms. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1187**, 101–121 (2010).
33. Aggarwal, S. & Mortensen, O. V. Overview of Monoamine Transporters. *Curr. Protoc. Pharmacol.* **79**, 12.16.1-12.16.17 (2017).
34. Yamazaki, T., Akiyama, T., Kitagawa, H., Takauchi, Y. & Kawada, T. Elevation of either axoplasmic norepinephrine or sodium level induced release of norepinephrine from cardiac sympathetic nerve terminals. *Brain Res.* **737**, 343–346 (1996).
35. Courtney, K. E. & Ray, L. A. Chapter 15 - Clinical neuroscience of amphetamine-type stimulants: From basic science to treatment development. in *Progress in Brain Research* (eds. Ekhtiari, H. & Paulus, M.) vol. 223 295–310 (Elsevier, 2016).
36. Leonardi, E. T. K. & Azmitia, E. C. MDMA (Ecstasy) Inhibition of MAO Type A and Type B: Comparisons with Fenfluramine and Fluoxetine (Prozac). *Neuropsychopharmacology* **10**, 231–238 (1994).
37. Drug-related deaths and mortality in Europe.
38. Smith, L. C. COLLAPSE WITH DEATH FOLLOWING THE USE OF AMPHETAMINE SULFATE. *J. Am. Med. Assoc.* **113**, 1022–1023 (1939).
39. De La Torre, R., Yubero-Lahoz, S., Pardo-Lozano, R. & Farre, M. MDMA, methamphetamine, and CYP2D6 pharmacogenetics: what is clinically relevant? *Front. Genet.* **3**, (2012).
40. Alsufyani, H. A. & Docherty, J. R. Investigation of gender differences in the cardiovascular actions of direct and indirect sympathomimetic stimulants including cathinone in the anaesthetized rat. *Auton. Autacoid Pharmacol.* **36**, 14–19 (2016).
41. Parrott, A. C. MDMA and temperature: A review of the thermal effects of 'Ecstasy' in humans. *Drug Alcohol Depend.* **121**, 1–9 (2012).
42. Vasan, S. & Olango, G. J. Amphetamine Toxicity. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, 2023).

43. Bernaskova, K., Tomkova, S. & Slamberova, R. Are changes in excitability in the hippocampus of adult male rats induced by prenatal methamphetamine exposure or stress? *Epilepsy Res.* **137**, 132–138 (2017).
44. Liechti, M. E., Gamma, A. & Vollenweider, F. X. Gender differences in the subjective effects of MDMA. *Psychopharmacology (Berl.)* **154**, 161–168 (2001).
45. Ogeil, R. P., Rajaratnam, S. M. W. & Broadbear, J. H. Male and female ecstasy users: differences in patterns of use, sleep quality and mental health outcomes. *Drug Alcohol Depend.* **132**, 223–230 (2013).
46. Docherty, J. R. & Alsufyani, H. A. Cardiovascular and temperature adverse actions of stimulants. *Br. J. Pharmacol.* **178**, 2551–2568 (2021).
47. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. *Drug-related hospital emergency presentations in Europe: update from the Euro DEN Plus expert network : technical report.* (Publications Office, 2020).
48. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. *Ευρωπαϊκή έκθεση για τα ναρκωτικά 2022: Τάσεις και εξελίξεις.* (Publications Office, 2022).
49. Richards, J. R. *et al.* Treatment of toxicity from amphetamines, related derivatives, and analogues: A systematic clinical review. *Drug Alcohol Depend.* **150**, 1–13 (2015).
50. Κάκια Νικολάου, Κώστας Κοκκώλης, & Χρύσα Μπότση. *ΕΓΧΕΙΡΙΔΙΟ Ιατρικής Αντιμετώπισης Επείγουσων Καταστάσεων Σχετιζόμενων με Χρήση Ψυχοδραστικών Ουσιών.* (ΕΘΝΙΚΟΣ ΣΥΝΤΟΝΙΣΤΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΩΝ ΝΑΡΚΩΤΙΚΩΝ, 2022).
51. Leelahanaj, T., Kongsakon, R. & Netrakom, P. A 4-week, double-blind comparison of olanzapine with haloperidol in the treatment of amphetamine psychosis. *J. Med. Assoc. Thail. Chotmai het Thangphaet* **88 Suppl 3**, S43-52 (2005).
52. Gunne, L.-M. & Ånggård, E. Pharmacokinetic studies with amphetamines-relationship to neuropsychiatric disorders. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* **1**, 481–495 (1973).
53. Lile, J. A. *et al.* Comparison of the behavioral and cardiovascular effects of intranasal and oral d-amphetamine in healthy human subjects. *J. Clin. Pharmacol.* **51**, 888–898 (2011).
54. Kraemer, T. & Maurer, H. H. Toxicokinetics of amphetamines: metabolism and toxicokinetic data of designer drugs, amphetamine, methamphetamine, and their N-alkyl derivatives. *Ther. Drug Monit.* **24**, 277–289 (2002).
55. Cook, C. E. *et al.* Pharmacokinetics of methamphetamine self-administered to human subjects by smoking S-(+)-methamphetamine hydrochloride. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* **21**, 717–723 (1993).

56. Kim, I., Oyler, J. M., Moolchan, E. T., Cone, E. J. & Huestis, M. A. Urinary pharmacokinetics of methamphetamine and its metabolite, amphetamine following controlled oral administration to humans. *Ther. Drug Monit.* **26**, 664–672 (2004).
57. Quinn, D. I., Wodak, A. & Day, R. O. Pharmacokinetic and pharmacodynamic principles of illicit drug use and treatment of illicit drug users. *Clin. Pharmacokinet.* **33**, 344–400 (1997).
58. Council Decision 2005/387/JHA of 10 May 2005 on the information exchange, risk-assessment and control of new psychoactive substances. (2005).
59. Morais, J. *et al.* New psychoactive substances: 25 years of early warning and response in Europe. An update from the EU Early Warning System. *Toxicol. Anal. Clin.* **34**, S29–S30 (2022).
60. Zapata, F., Matey, J. M., Montalvo, G. & García-Ruiz, C. Chemical classification of new psychoactive substances (NPS). *Microchem. J.* **163**, 105877 (2021).
61. United Nations Office of Drugs and Crime. *Categories of new psychoactive substances sold in the market*. 1 <https://www.unodc.org/unodc/en/scientists/categories-of-new-psychoactive-substances-sold-in-the-market.html> (2014).
62. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. *Ευρωπαϊκή έκθεση για τα ναρκωτικά 2015: Τάσεις και εξελίξεις*. (Publications Office, 2015).
63. Almeida, A. S., Silva, B., Pinho, P. G. de, Remião, F. & Fernandes, C. Synthetic Cathinones: Recent Developments, Enantioselectivity Studies and Enantioseparation Methods. *Molecules* **27**, 2057 (2022).
64. German, C. L., Fleckenstein, A. E. & Hanson, G. R. Bath salts and synthetic cathinones: An emerging designer drug phenomenon. *Life Sci.* **97**, 2–8 (2014).
65. Al-Motarreb, A., Al-Habori, M. & Broadley, K. J. Khat chewing, cardiovascular diseases and other internal medical problems: the current situation and directions for future research. *J. Ethnopharmacol.* **132**, 540–548 (2010).
66. Prosser, J. M. & Nelson, L. S. The Toxicology of Bath Salts: A Review of Synthetic Cathinones. *J. Med. Toxicol.* **8**, 33–42 (2012).
67. Advisory Council on the Misuse of Drugs. Consideration of the cathinones. (2010).
68. Soares, J., Costa, V. M., Bastos, M. de L., Carvalho, F. & Capela, J. P. An updated review on synthetic cathinones. *Arch. Toxicol.* **95**, 2895–2940 (2021).
69. The newest cathinone derivatives as designer drugs: an analytical and toxicological review | SpringerLink. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11419-017-0385-6>.

70. Prevalence and co-existence of active components of 'legal highs' - Zuba - 2013 - Drug Testing and Analysis - Wiley Online Library.
<https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/dta.1365>.
71. Paillet-Loilier, M., Cesbron, A., Boisselier, R. L., Bourguine, J. & Debruyne, D. Emerging drugs of abuse: current perspectives on substituted cathinones. *Subst. Abuse Rehabil.* **5**, 37–52 (2014).
72. Coppola, M. & Mondola, R. Synthetic cathinones: Chemistry, pharmacology and toxicology of a new class of designer drugs of abuse marketed as “bath salts” or “plant food”. *Toxicol. Lett.* **211**, 144–149 (2012).
73. 'Legal Highs'--An Emerging Epidemic of Novel Psychoactive Substances - PubMed.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26070762/>.
74. Valente, M. J., Guedes de Pinho, P., de Lourdes Bastos, M., Carvalho, F. & Carvalho, M. Khat and synthetic cathinones: a review. *Arch. Toxicol.* **88**, 15–45 (2014).
75. Dasgupta, A. Designer drugs including bath salts and spices. in *Alcohol, Drugs, Genes and the Clinical Laboratory* 53–73 (Elsevier, 2017). doi:10.1016/B978-0-12-805455-0.00003-8.
76. Baumann, M. H. *et al.* Powerful Cocaine-Like Actions of 3,4-Methylenedioxypyrovalerone (MDPV), a Principal Constituent of Psychoactive 'Bath Salts' Products. *Neuropsychopharmacology* **38**, 552–562 (2013).
77. Winstock, A. R. *et al.* Mephedrone, new kid for the chop? *Addict. Abington Engl.* **106**, 154–161 (2011).
78. Mephedrone: still available and twice the price - The Lancet.
[https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(10\)62021-1/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(10)62021-1/fulltext).
79. *Report on the risk assessment of mephedrone in the framework of the Council decision on new psychoactive substances.* (Off. for Off. Publ. of the Europ. Communities, 2011). doi:10.2810/40800.
80. F, S. *et al.* Mephedrone (4-methylmethcathinone; 'meow meow'): chemical, pharmacological and clinical issues. *Psychopharmacology (Berl.)* **214**, (2011).
81. Dose and Time-Dependent Selective Neurotoxicity Induced by Mephedrone in Mice | PLOS ONE. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0099002>.
82. Rouxinol, D., Carmo, H., Carvalho, F., Bastos, M. de L. & Dias da Silva, D. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and toxicity of the new psychoactive substance 3,4-dimethylmethcathinone (3,4-DMMC). *Forensic Toxicol.* **38**, 15–29 (2020).
83. Kelly, J. P. Cathinone derivatives: A review of their chemistry, pharmacology and toxicology. *Drug Test. Anal.* **3**, 439–453 (2011).

84. Contrucci, R. R., Brunt, T. M., Inan, F., Franssen, E. J. F. & Hondebrink, L. Synthetic Cathinones and Their Potential Interactions with Prescription Drugs. *Ther. Drug Monit.* **42**, 75–82 (2020).
85. *Neuropharmacology of New Psychoactive Substances (NPS): The Science Behind the Headlines*. (Springer International Publishing : Imprint: Springer, 2017).
doi:10.1007/978-3-319-52444-3.
86. Calinski, D. M., Kisor, D. F. & Sprague, J. E. A review of the influence of functional group modifications to the core scaffold of synthetic cathinones on drug pharmacokinetics. *Psychopharmacology (Berl.)* **236**, 881–890 (2019).
87. Almeida, A. S., Silva, B., Pinho, P. G. de, Remião, F. & Fernandes, C. Synthetic Cathinones: Recent Developments, Enantioselectivity Studies and Enantioseparation Methods. *Mol. Basel Switz.* **27**, 2057 (2022).
88. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. *Η ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΝΑΡΚΩΤΙΚΩΝ ΣΤΗΝ ΕΥΡΩΠΗ*. (Υπηρεσία Εκδόσεων της Ευρωπαϊκής Ένωσης, 2009).
89. Hill, S. L. & Thomas, S. H. L. Clinical toxicology of newer recreational drugs. *Clin. Toxicol.* **49**, 705–719 (2011).
90. Nelson, M. E., Bryant, S. M. & Aks, S. E. Emerging drugs of abuse. *Emerg. Med. Clin. North Am.* **32**, 1–28 (2014).
91. UNODC Laboratory and Scientific Section Portals. Phenethylamines.
<https://www.unodc.org/LSS/SubstanceGroup/Details/275dd468-75a3-4609-9e96-cc5a2f0da467>.
92. Huang, H. H. & Bai, Y. M. Persistent psychosis after ingestion of a single tablet of ‘2C-B’. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **35**, 293–294 (2011).
93. Nikolaou, P., Papoutsis, I., Stefanidou, M., Spiliopoulou, C. & Athanaselis, S. 2C-I-NBOMe, an “N-bomb” that kills with “Smiles”. Toxicological and legislative aspects. *Drug Chem. Toxicol.* **38**, 113–119 (2015).
94. Papoutsis, I., Nikolaou, P., Stefanidou, M., Spiliopoulou, C. & Athanaselis, S. 25B-NBOMe and its precursor 2C-B: modern trends and hidden dangers. *Forensic Toxicol.* **33**, 1–11 (2015).
95. 2C or Not 2C: Phenethylamine Designer Drug Review | SpringerLink.
<https://link.springer.com/article/10.1007/s13181-013-0295-x>.
96. Cocchi, V. *et al.* Novel Psychoactive Phenethylamines: Impact on Genetic Material. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 9616 (2020).

97. Miliano, C. *et al.* Neuropharmacology of New Psychoactive Substances (NPS): Focus on the Rewarding and Reinforcing Properties of Cannabimimetics and Amphetamine-Like Stimulants. *Front. Neurosci.* **10**, 153 (2016).
98. Eshleman, A. J. *et al.* Neurochemical pharmacology of psychoactive substituted N-benzylphenethylamines: High potency agonists at 5-HT_{2A} receptors. *Biochem. Pharmacol.* **158**, 27–34 (2018).
99. Nichols, D. E. Hallucinogens. *Pharmacol. Ther.* **101**, 131–181 (2004).
100. World Health Organization. *Thirty-second report.* (WHO, 2001).
101. Nichols, D. E. *et al.* High Specific Activity Tritium-Labeled N-(2-methoxybenzyl)-2,5-dimethoxy-4-iodophenethylamine (INBMeO): A High Affinity 5-HT_{2A} Receptor-Selective Agonist Radioligand. *Bioorg. Med. Chem.* **16**, 6116–6123 (2008).
102. Ettrup, A. *et al.* Preclinical safety assessment of the 5-HT_{2A} receptor agonist PET radioligand [¹¹C]Cimbi-36. *Mol. Imaging Biol.* **15**, 376–383 (2013).
103. Tang, M. H. Y., Ching, C. K., Tsui, M. S. H., Chu, F. K. C. & Mak, T. W. L. Two cases of severe intoxication associated with analytically confirmed use of the novel psychoactive substances 25B-NBOMe and 25C-NBOMe. *Clin. Toxicol. Phila. Pa* **52**, 561–565 (2014).
104. Kamińska, K., Świt, P. & Malek, K. 2-(4-Iodo-2,5-dimethoxyphenyl)-N-[(2-methoxyphenyl)methyl]ethanamine (25I-NBOMe): A Harmful Hallucinogen Review. *J. Anal. Toxicol.* **44**, 947–956 (2020).
105. Zawilska, J. B., Kacela, M. & Adamowicz, P. NBOMes—Highly Potent and Toxic Alternatives of LSD. *Front. Neurosci.* **14**, (2020).
106. Halberstadt, A. L. Pharmacology and Toxicology of N-Benzylphenethylamine (“NBOMe”) Hallucinogens. in *Neuropharmacology of New Psychoactive Substances (NPS): The Science Behind the Headlines* (eds. Baumann, M. H., Glennon, R. A. & Wiley, J. L.) 283–311 (Springer International Publishing, 2017). doi:10.1007/7854_2016_64.
107. Bosak, A., LoVecchio, F. & Levine, M. Recurrent seizures and serotonin syndrome following ‘2C-I’ ingestion. *J. Med. Toxicol. Off. J. Am. Coll. Med. Toxicol.* **9**, 196–198 (2013).
108. Inan, F., Brunt, T. M., Contrucci, R. R., Hondebrink, L. & Franssen, E. J. F. Novel Phenethylamines and Their Potential Interactions With Prescription Drugs: A Systematic Critical Review. *Ther. Drug Monit.* **42**, 271–281 (2020).

109. Rodrigues, C. H. P. *et al.* Acute, chronic, and post-mortem toxicity: a review focused on three different classes of new psychoactive substances. *Forensic Toxicol.* (2023) doi:10.1007/s11419-022-00657-3.
110. Woźniak, M. K. *et al.* Development and validation of a GC–MS/MS method for the determination of 11 amphetamines and 34 synthetic cathinones in whole blood. *Forensic Toxicol.* **38**, 42–58 (2020).
111. Mercieca, G., Odoardi, S., Cassar, M. & Strano Rossi, S. Rapid and simple procedure for the determination of cathinones, amphetamine-like stimulants and other new psychoactive substances in blood and urine by GC–MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **149**, 494–501 (2018).
112. Cláudia, M., Pedro, A., Tiago, R., Francisco, C. R. & Eugenia, G. Determination of New Psychoactive Substances in Whole Blood Using Microwave Fast Derivatization and Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* **44**, 92–102 (2020).
113. Lehmann, S., Kieliba, T., Beike, J., Thevis, M. & Mercer-Chalmers-Bender, K. Determination of 74 new psychoactive substances in serum using automated in-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **1064**, 124–138 (2017).
114. GC–MS Quantification Method for Mephedrone in Plasma and Urine: Application to Human Pharmacokinetics | Journal of Analytical Toxicology | Oxford Academic. <https://academic.oup.com/jat/article/41/2/100/2333832>.
115. Ojanperä, I. A., Heikman, P. K. & Rasanen, I. J. Urine analysis of 3,4-methylenedioxypyrovalerone in opioid-dependent patients by gas chromatography-mass spectrometry. *Ther. Drug Monit.* **33**, 257–263 (2011).
116. Alremeithi, R. H., Meetani, M. A. & Khalil, S. A. A validated gas chromatography mass spectrometry method for simultaneous determination of cathinone related drug enantiomers in urine and plasma. *RSC Adv.* **6**, 80576–80584 (2016).
117. A. Alsenedi, K. & Morrison, C. Determination of amphetamine-type stimulants (ATs) and synthetic cathinones in urine using solid phase micro-extraction fibre tips and gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Methods* **10**, 1431–1440 (2018).
118. Jhang, C.-S., Lee, H., He, Y.-S., Liu, J.-T. & Lin, C.-H. Rapid screening and determination of 4-chloroamphetamine in saliva by paper spray-mass spectrometry and capillary electrophoresis-mass spectrometry. *ELECTROPHORESIS* **33**, 3073–3078 (2012).

119. Choi, H. *et al.* Simultaneous analysis of psychotropic phenylalkylamines in oral fluid by GC–MS with automated SPE and its application to legal cases. *Forensic Sci. Int.* **215**, 81–87 (2012).
120. Gentili, S., Mortali, C., Mastrobattista, L., Berretta, P. & Zaami, S. Determination of different recreational drugs in sweat by headspace solid-phase microextraction gas chromatography mass spectrometry (HS-SPME GC/MS): Application to drugged drivers. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **129**, 282–287 (2016).
121. Zhang, T., Chen, X., Yang, R. & Xu, Y. Detection of methamphetamine and its main metabolite in fingerprints by liquid chromatography–mass spectrometry. *Forensic Sci. Int.* **248**, 10–14 (2015).
122. Ishikawa, A. A. *et al.* A Gas Chromatography–Mass Spectrometry Method for Toxicological Analysis of MDA, MDEA and MDMA in Vitreous Humor Samples from Victims of Car Accidents. *J. Anal. Toxicol.* **42**, 661–666 (2018).
123. Mercieca, G., Odoardi, S., Cassar, M. & Strano Rossi, S. Rapid and simple procedure for the determination of cathinones, amphetamine-like stimulants and other new psychoactive substances in blood and urine by GC–MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **149**, 494–501 (2018).
124. Odoardi, S., Anzillotti, L. & Strano-Rossi, S. Simplifying sample pretreatment: Application of dried blood spot (DBS) method to blood samples, including postmortem, for UHPLC–MS/MS analysis of drugs of abuse. *Forensic Sci. Int.* **243**, 61–67 (2014).
125. Kim, J. Y., Shin, S. H. & In, M. K. Determination of amphetamine-type stimulants, ketamine and metabolites in fingernails by gas chromatography–mass spectrometry. *Forensic Sci. Int.* **194**, 108–114 (2010).
126. Kim, J. Y., Cheong, J. C., Lee, J. I., Son, J. H. & In, M. K. Rapid and Simple GC–MS Method for Determination of Psychotropic Phenylalkylamine Derivatives in Nails Using Micro-Pulverized Extraction*. *J. Forensic Sci.* **57**, 228–233 (2012).
127. Lendoiro, E. *et al.* An LC-MS/MS methodological approach to the analysis of hair for amphetamine-type-stimulant (ATS) drugs, including selected synthetic cathinones and piperazines. *Drug Test. Anal.* **9**, 96–105 (2017).
128. Argente-García, A., Moliner-Martínez, Y., Campíns-Falcó, P., Verdú-Andrés, J. & Herráez-Hernández, R. Determination of amphetamines in hair by integrating sample disruption, clean-up and solid phase derivatization. *J. Chromatogr. A* **1447**, 47–56 (2016).

129. Gottardo, R. *et al.* Hair analysis for illicit drugs by using capillary zone electrophoresis-electrospray ionization-ion trap mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1159**, 185–189 (2007).
130. Gottardo, R. *et al.* Analysis of drugs of forensic interest with capillary zone electrophoresis/time-of-flight mass spectrometry based on the use of non-volatile buffers. *ELECTROPHORESIS* **33**, 599–606 (2012).
131. Martin, M., Muller, J. F., Turner, K., Duez, M. & Cirimele, V. Evidence of mephedrone chronic abuse through hair analysis using GC/MS. *Forensic Sci. Int.* **218**, 44–48 (2012).
132. Pichini, S. *et al.* Neonatal withdrawal syndrome after chronic maternal consumption of 4-methylethcathinone. *Forensic Sci. Int.* **245**, e33–e35 (2014).
133. Nemeškalová, A. *et al.* Salting out assisted liquid-liquid extraction for liquid chromatography tandem-mass spectrometry determination of amphetamine-like stimulants in meconium. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **172**, 42–49 (2019).
134. López-Rabuñal, Á. *et al.* A LC-MS/MS method for the determination of common synthetic cathinones in meconium. *J. Chromatogr. B* **1124**, 349–355 (2019).
135. Thornton, S. L., Lo, J., Clark, R. F., Wu, A. H. B. & Gerona, R. R. Simultaneous detection of multiple designer drugs in serum, urine, and CSF in a patient with prolonged psychosis. *Clin. Toxicol.* **50**, 1165–1168 (2012).
136. Hasegawa, K. *et al.* Postmortem distribution of MAB-CHMINACA in body fluids and solid tissues of a human cadaver. *Forensic Toxicol.* **33**, 380–387 (2015).
137. Sklerov, J., Levine, B., Moore, K. A., King, T. & Fowler, D. A Fatal Intoxication Following the Ingestion of 5-Methoxy-N,N-Dimethyltryptamine in an Ayahuasca Preparation*. *J. Anal. Toxicol.* **29**, 838–841 (2005).
138. Andreasen, M. F., Telving, R., Birkler, R. I. D., Schumacher, B. & Johannsen, M. A fatal poisoning involving Bromo-Dragonfly. *Forensic Sci. Int.* **183**, 91–96 (2009).
139. Poklis, J. L. *et al.* Postmortem detection of 25I-NBOMe [2-(4-iodo-2,5-dimethoxyphenyl)-N-[(2-methoxyphenyl)methyl]ethanamine] in fluids and tissues determined by high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry from a traumatic death. *Forensic Sci. Int.* **234**, e14–e20 (2014).
140. Marinetti, L. J. & Antonides, H. M. 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.* **37**, 135–146 (2013).
141. Bottinelli, C., Cartiser, N., Gaillard, Y., Boyer, B. & Bévalot, F. A fatal case of 3-methylmethcathinone (3-MMC) poisoning. *Toxicol. Anal. Clin.* **29**, 123–129 (2017).

142. Meyer, M. R. & Maurer, H. H. Metabolism of designer drugs of abuse: An updated review. *Curr. Drug Metab.* **11**, 468–482 (2010).
143. Esteve-Turrillas, F. A., Armenta, S. & de la Guardia, M. Sample preparation strategies for the determination of psychoactive substances in biological fluids. *J. Chromatogr. A* **1633**, 461615 (2020).
144. UNODC's Laboratory and Scientific Section. Guidelines for testing drugs under international control in hair, sweat and oral fluid—MANUAL FOR USE BY NATIONAL DRUG ANALYSIS LABORATORIES. (2014).
145. Silva, A. T. M. da, Bessa, C. D. P. B., Borges, W. de S. & Borges, K. B. Bioanalytical methods for determining ecstasy components in biological matrices: A review. *TrAC Trends Anal. Chem.* **108**, 323–346 (2018).
146. Simão, A. Y. *et al.* Recent bionalytical methods for the determination of new psychoactive substances in biological specimens. *Bioanalysis* **12**, 1557–1595 (2020).
147. Chen, X., Wu, X., Luan, T., Jiang, R. & Ouyang, G. Sample preparation and instrumental methods for illicit drugs in environmental and biological samples: A review. *J. Chromatogr. A* **1640**, 461961 (2021).
148. Woźniak, M. K. *et al.* Application of gas chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of amphetamine-type stimulants in blood and urine. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **148**, 58–64 (2018).
149. Gerace, E., Caneparo, D., Borio, F., Salomone, A. & Vincenti, M. *J. Sep. Sci.* **42**, 1577–1584 (2019).
150. Ondra, P., Válka, I., Knob, R., Ginterová, P. & Maier, V. Analysis of Amphetamine-Derived Designer Drugs by Gas Chromatography with Mass Spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* **40**, 78–85 (2016).
151. Margalho, C., Castanheira, A., Real, F. C., Gallardo, E. & López-Rivadulla, M. Determination of “new psychoactive substances” in postmortem matrices using microwave derivatization and gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **1020**, 14–23 (2016).
152. Antunes, M. *et al.* Determination of Selected Cathinones in Blood by Solid-Phase Extraction and GC-MS. *J. Anal. Toxicol.* **45**, 233–242 (2021).
153. Nisbet, L. A., Wylie, F. M., Logan, B. K. & Scott, K. S. Gas Chromatography-Mass Spectrometry Method for the Quantitative Identification of 23 New Psychoactive Substances in Blood and Urine. *J. Anal. Toxicol.* **43**, 346–352 (2019).

154. Determination of Synthetic Cathinones in Urine Using Gas Chromatography–Mass Spectrometry Techniques | Journal of Analytical Toxicology | Oxford Academic.
<https://academic.oup.com/jat/article/40/1/12/2363856>.
155. Seo, H., Yoo, H. H., Kim, Y.-H., Hong, J. & Sheen, Y. Y. Simultaneous Quantitative Determination of Nine Hallucinogenic NBOMe Derivatives in Human Plasma Using Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Mass Spectrom. Lett.* **10**, 18–26 (2019).
156. Sorribes-Soriano, A., Sánchez-Martínez, S., Arráez-González, R., Esteve-Turrillas, F. A. & Armenta, S. Methylone determination in oral fluid using microextraction by packed sorbent coupled to ion mobility spectrometry. *Microchem. J.* **153**, 104504 (2020).
157. Rocchi, R. *et al.* Analysis of new psychoactive substances in oral fluids by means of microextraction by packed sorbent followed by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug Test. Anal.* **10**, 865–873 (2018).
158. Ares, A. M. *et al.* A fast bioanalytical method based on microextraction by packed sorbent and UPLC-MS/MS for determining new psychoactive substances in oral fluid. *Talanta* **174**, 454–461 (2017).
159. Bianchi, F. *et al.* Novel sample-substrates for the determination of new psychoactive substances in oral fluid by desorption electrospray ionization-high resolution mass spectrometry. *Talanta Int. J. Pure Appl. Anal. Chem.* **202**, 136–144 (2019).
160. Bombana, H. S., dos Santos, M. F., Muñoz, D. R. & Leyton, V. Hollow-fibre liquid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometric determination of amphetamines in whole blood. *J. Chromatogr. B* **1139**, 121973 (2020).
161. Kranenburg, R. F. *et al.* Benefits of derivatization in GC–MS-based identification of new psychoactive substances. *Forensic Chem.* **20**, 100273 (2020).
162. Alsenedi, K. A. & Morrison, C. Comparison of six derivatizing agents for the determination of nine synthetic cathinones using gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Methods* **9**, 2732–2743 (2017).
163. United Nations Office on Drugs and Crime. *Recommended Methods for the Identification and Analysis of Amphetamine, Methamphetamine and their ringsubstituted analogues in seized materials.* (2006).
164. Mohamed, K. M. & Bakdash, A. Comparison of 3 Derivatization Methods for the Analysis of Amphetamine-Related Drugs in Oral Fluid by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Anal. Chem. Insights* **12**, 1177390117727533 (2017).

165. Dobos, A., Hidvégi, E. & Somogyi, G. P. Comparison of five derivatizing agents for the determination of amphetamine-type stimulants in human urine by extractive acylation and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* **36**, 340–344 (2012).
166. Determination of “new psychoactive substances” in postmortem matrices using microwave derivatization and gas chromatography–mass spectrometry | Elsevier Enhanced Reader.
<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1570023216301325?token=250D13FBEBFF3A64A5F7B6FA3CA458345A733DA47982D3243F5EC42E882667D2FAAC57CDE2A8DF167B54B083FACB0016&originRegion=eu-west-1&originCreation=20230404213942> doi:10.1016/j.jchromb.2016.03.001.
167. Antunes, M. *et al.* Determination of Selected Cathinones in Blood by Solid-Phase Extraction and GC-MS. *J. Anal. Toxicol.* **45**, 233–242 (2021).
168. Kind, T. *et al.* Identification of small molecules using accurate mass MS/MS search. *Mass Spectrom. Rev.* **37**, 513–532 (2018).
169. Mogollón, N. G. S. *et al.* New Advances in Toxicological Forensic Analysis Using Mass Spectrometry Techniques. *J. Anal. Methods Chem.* **2018**, e4142527 (2018).
170. Rentsch, K. M. Knowing the unknown – State of the art of LCMS in toxicology. *TrAC Trends Anal. Chem.* **84**, 88–93 (2016).
171. Gröger, T. M., Käfer, U. & Zimmermann, R. Gas chromatography in combination with fast high-resolution time-of-flight mass spectrometry: Technical overview and perspectives for data visualization. *TrAC Trends Anal. Chem.* **122**, 115677 (2020).
172. Zhang, Y. V., Wei, B., Zhu, Y., Zhang, Y. & Bluth, M. H. Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry: An Emerging Technology in the Toxicology Laboratory. *Clin. Lab. Med.* **36**, 635–661 (2016).
173. Liu, L. *et al.* Newly Emerging Drugs of Abuse and Their Detection Methods: An ACLPS Critical Review. *Am. J. Clin. Pathol.* **149**, 105–116 (2018).
174. Pauk, V. & Lemr, K. Forensic applications of supercritical fluid chromatography – mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **1086**, 184–196 (2018).
175. Li, D.-X., Gan, L., Bronja, A. & Schmitz, O. J. Gas chromatography coupled to atmospheric pressure ionization mass spectrometry (GC-API-MS): Review. *Anal. Chim. Acta* **891**, 43–61 (2015).
176. Zavahir, J. S., Nolvachai, Y. & Marriott, P. J. Molecular spectroscopy – Information rich detection for gas chromatography. *TrAC Trends Anal. Chem.* **99**, 47–65 (2018).

177. Alsenedi, K. A. & Morrison, C. Determination and long-term stability of twenty-nine cathinones and amphetamine-type stimulants (ATS) in urine using gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **1076**, 91–102 (2018).
178. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Guideline on bioanalytical method validation. (2015).
179. Food and Drug Administration. Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry. (2018).
180. ICH Expert Working Group. Bioanalytical method validation and study sample analysis M10. (2022).
181. Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology. *J. Anal. Toxicol.* **37**, 452–474 (2013).
182. Olesti, E. *et al.* GC–MS Quantification Method for Mephedrone in Plasma and Urine: Application to Human Pharmacokinetics. *J. Anal. Toxicol.* **41**, 100–106 (2017).