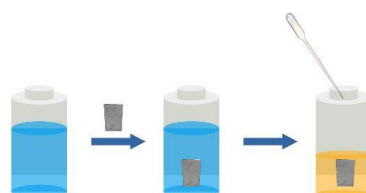




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ
ΨΥΧΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΣΤΟΜΑΤΙΚΟΥ
ΥΓΡΟΥ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ FPSE
ΚΑΙ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ**



ΘΑΛΕΙΑ ΒΛΑΧΟΥ
Χημικός
Μεταπτυχιακή Διατριβή Ειδίκευσης
ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2023

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ορισμός Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής από τη Γ.Σ.Ε.Σ.: 1063/20-07-2022

Επιβλέπων Καθηγητής: Σακκάς Βασίλειος

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 20-07-2022

ΘΕΜΑ : «ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ
ΨΥΧΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΣΤΟΜΑΤΙΚΟΥ ΥΓΡΟΥ ΜΕΤΑ ΑΠΟ
ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ FPSE ΚΑΙ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ
ΑΝΑΛΥΣΗ»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ από τη Γ.Σ.Ε.Σ.: 1063/20-07-2022

1. Αναπληρωτής Καθηγητής Βασίλειος Σακκάς
2. Καθηγήτρια Μπούμπα Βασιλική
3. Καθηγητής Κωνσταντίνος Σταλίκας

Έγκριση Μεταπτυχιακής Διατριβής στις

Ο Πρόεδρος του Τμήματος Χημείας
Πλακατούρας Ιωάννης

Η Γραμματέας του Τμήματος Χημείας
Τουτουνζόγλου Ξανθή

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Τελειώνοντας το επιστημονικό μου ταξίδι θα ήθελα πρωτίστως να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Αναλυτικής Χημείας κ. Σακκά Βασίλειο για την άριστη συνεργασία, την καθοδήγησή και τις συμβουλές του καθώς επίσης και την Καθηγήτρια Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας κ. Μπούμπα Βασιλική για την παραχώρηση της Μονάδας Τοξικολογίας του Εργαστηρίου Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας για τη διεξαγωγή των πειραμάτων και την αμέριστη βοήθειά της για την υλοποίησή τους. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συνεργάτες και εν τέλει φίλους που απέκτησα στα δύο εργαστήρια Μερίνα Καλαμπόκα, Χριστόφορο Χρηματόπουλο, Λουκία Λυπήρου, Δήμητρα Φλώρου, Βασίλειο Παπαχαρίση, Φωτεινή Αλβανοπούλου και Γλυκερία Βελιβάση. Το μεγαλύτερο ευχαριστώ, βέβαια, το οφείλω στους φίλους και στην οικογένειά μου, ειδικά στη μαμά μου, που με στήριξαν τόσο στις εύκολες όσο και στις δύσκολες στιγμές.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το φαινόμενο των εξαρτησιογόνων ουσιών αποτελεί μείζονα απειλή για την κοινωνία. Οι παράνομες ουσίες είναι ευρέως προσβάσιμες και μπορούν να επηρεάσουν τους πάντες άμεσα (μέσω της χρήσης τους) και έμμεσα (μέσω των επιπτώσεών τους στις οικογένειες και στις κοινότητες). Είναι λοιπόν ζωτικής σημασίας η διενέργεια τοξικολογικών εξετάσεων και ιδιαίτερα η εφαρμογή τους σε νέα βιολογικά υποστρώματα, για τον εντοπισμό αυτών των ουσιών και την προστασία της δημόσιας υγείας. Το στοματικό υγρό αποτελεί εναλλακτικό υπόστρωμα για την ανίχνευση και την ανάλυση εξαρτησιογόνων ουσιών και χρησιμοποιείται ευρέως για εγκληματολογικούς και τοξικολογικούς σκοπούς. Η εκχύλιση μέσω προσρόφησης σε δίκτυο επικαλυμμένων ινών, Fabric Phase Sorptive Extaction (FPSE) είναι μια απλή, οικονομική, γρήγορη και ευαίσθητη σύγχρονη αναλυτική τεχνική που αναπτύχθηκε πρόσφατα. Η παρούσα διατριβή παρουσιάζει την ανάπτυξη και την επικύρωση μεθόδου που στηρίζεται στην εφαρμογή της FPSE και της υγρής χρωματογραφίας συζευγμένης με διαδοχική φασματομετρία μάζας (LC-MS/MS), για τον προσδιορισμό εξαρτησιογόνων ουσιών και μεταβολιτών τους στο στοματικό υγρό, συγκεκριμένα: κοκαΐνη, κωδεΐνη, αμφεταμίνη, μεθαμφεταμίνη, μεθαδόνη, 3,4-μεθυλενοδιοξαμφεταμίνη (MDA), βενζοϋλεκγονίνη, μεθυλεστέρας της εκγονίνης, μορφίνη και 6 μονοακέτυλο μορφίνη (6-MAM). Εξετάστηκαν δύο διαφορετικά υποστρώματα (φίλτρο ινών κυτταρίνης Whatman και φίλτρο μικρο-υαλοϊνών Whatman) και βελτιστοποιήθηκαν οι παράμετροι που επηρεάζουν την απόδοση της εκχύλισης (pH δείγματος, χρόνος εκχύλισης, χρόνος έκλουσης, μέσο έκλουσης, διαλύτης έκλουσης). Η προτεινόμενη μεθοδολογία εμφανίζει γραμμικότητα ($R^2 = 0.9897-0.9973$ για όλες τις ουσίες), με απόλυτες τιμές ανάκτησης που κυμαίνονται από 10 - 93 %, δείκτες CV % από 2 - 17 % και LOQ μεταξύ 0.03 και 6 ng/mL. Η σταθερότητα των αναλυτών μετά από μία και επτά μέρες κυμάνθηκε από 84 – 99 % ενώ δεν παρατηρήθηκαν επιδράσεις από τα συστατικά του υποστρώματος και από άλλα κοινά φάρμακα/μεταβολίτες καθώς και φαινόμενα μεταφοράς ποσότητας αναλυτών από έγχυση σε έγχυση. Η εργασία αυτή που συνδυάζει την FPSE με την τεχνική LC-MS/MS για τον προσδιορισμό των συγκεκριμένων ουσιών στο στοματικό υγρό, αποτελεί μια ευαίσθητη, αποτελεσματική και αξιόπιστη μεθοδολογία που μπορεί να εφαρμοστεί με επιτυχία στην ανάλυση Νέων Ψυχοδραστικών Ουσιών (New Psychoactive Substances).

ABSTRACT

The phenomenon of addictive substances is a major threat to society. Illegal substances are widely accessible and can affect everyone directly (through their use) and indirectly (through their effects on families and communities). It is therefore vital to perform toxicological tests and especially their application to new biological substrates, to identify these substances and protect public health. Oral fluid is an alternative substrate for the detection and analysis of addictive substances and is widely used for forensic and toxicological purposes. Fabric Phase Sorptive Extraction (FPSE) is a recently developed simple, economical, rapid and sensitive modern analytical technique. This thesis presents the development and validation of a method based on the application of FPSE and liquid chromatography - tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), for the determination of drugs of abuse and their metabolites in oral fluid, specifically: cocaine, codeine, amphetamine, methamphetamine, methadone, 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA), benzoylecgonine, ecgonine methyl ester, morphine, and 6-monoacetyl morphine (6-MAM). Two different substrates (Whatman cellulose fiber filter and Whatman micro-glass fiber filter) were tested and the parameters affecting the extraction performance (sample pH, extraction time, time of back extraction, solvent of back extraction, mean of back extraction) were optimized. The proposed methodology shows linearity ($R^2 = 0.9897-0.9973$ for all substances), with absolute recovery values ranging from 10 - 93 %, CV % indices from 2 - 17 % and LOQ between 0.03 and 6 ng/mL. The stability of the analytes after one and seven days ranged from 84 – 99 % while no matrix interferences, interferences from other common drugs/metabolites and carry over between runs were observed. This work, which combines FPSE with the LC-MS/MS technique for the determination of these substances in oral fluid, is a sensitive, efficient and reliable methodology that can be successfully applied to the analysis of New Psychoactive Substances.

Περιεχόμενα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	iii
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	iv
ABSTRACT	v
ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΙΣ	ix
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.Η Επιστήμη της Τοξικολογίας	4
1.1.Κλάδοι της Τοξικολογίας.....	5
1.2.Τοξικότητα μιας ουσίας και οι παράμετροι που τη διαφοροποιούν.....	6
1.3.Βιοδιαθεσιμότητα των τοξικών ουσιών	7
1.4. Κατηγορίες τοξικών ουσιών.....	9
2.Εξαρτησιογόνες ουσίες	10
2.1.Ορισμός.....	10
2.2. Η εξάπλωση της αγοράς εξαρτησιογόνων ουσιών – Αίτια χρήσης	10
2.3. Επιδημιολογικά στοιχεία για τη χρήση των εξαρτησιογόνων ουσιών	13
2.4. Συνέπειες χρήσης εξαρτησιογόνων ουσιών	14
2.5. Μέτρα πρόληψης και σωστής ενημέρωσης.....	15
2.6. Κορωνοϊός (COVID-19) και εξαρτησιογόνες ουσίες	16
3.Κατηγορίες εξαρτησιογόνων ουσιών	19
3.1.Κατάχρηση ουσιών	19
3.2. Εξάρτηση.....	20
3.3. Εθισμός	20
3.4. Ανοχή	21
3.5. Αντίστροφη ανοχή.....	21
3.6. Κατηγοριοποίηση των εξαρτησιογόνων ουσιών σε Πίνακες.....	21
3.7. Κατηγοριοποίηση των εξαρτησιογόνων ουσιών με βάση τη φαρμακολογική δράση τους	22
3.8. Μελετώμενες ουσίες στην παρούσα εργασία.....	24
3.8.1.Οπιούχα: μορφίνη, 6-μονοακέτυλο μορφίνη, κωδεΐνη	24
3.8.2.Οπιοειδή: μεθαδόνη	29
3.8.3.Αμφεταμίνες-μεθαμφεταμίνες: αμφεταμίνη, μεθαμφεταμίνη,.....	31
3,4-μεθυλενοδιοξυαμφεταμίνη.....	31
3.8.4.Αλκαλοειδή της κόκας: κοκαΐνη και μεταβολίτες.....	36
3.9.Νέες ψυχοδραστικές ουσίες (NPSs).....	39
4. Στάδια αναλυτικής διαδικασίας	42

4.1. Βιολογικό δείγμα-Στοματικό υγρό.....	44
4.1.1 Το στοματικό υγρό ως διαγνωστικό υλικό.....	44
4.1.2 Πλεονεκτήματα χρήσης του στοματικού υγρού έναντι άλλων υποστρωμάτων.....	45
4.1.3. Σύσταση	45
4.1.4. Ποσότητα και ταχύτητα ροής του στοματικού υγρού.....	47
4.1.5. Λειτουργία.....	47
4.1.6. Μηχανισμοί μεταφοράς αναλυτών από το αίμα στο στοματικό υγρό.....	48
4.1.7. Μέθοδοι συλλογής στοματικού υγρού	49
4.2. Προετοιμασία δείγματος	51
4.2.1. Καταβύθιση πρωτεϊνών.....	51
4.2.2.Εκχύλιση υγρού-υγρού (Liquid-Liquid Extraction, LLE).....	52
4.2.3.Εκχύλιση στερεής φάσης (Solid Phase Extraction, SPE).....	53
4.2.4.Μικροεκχύλιση στερεής φάσης (Solid Phase MicroExtraction, SPME)	55
4.2.5. Εκχύλιση μέσω προσρόφησης σε δίκτυο επικαλυμμένων ινών (Fabric Phase Sorptive Extraction, FPSE).....	57
4.3. Τεχνικές ανάλυσης δείγματος	63
4.3.1. Ανοσοδοκιμασίες	63
4.3.2. Αέρια Χρωματογραφία (Gas Chromatography, GC)	64
4.3.3. Υγρή Χρωματογραφία (Liquid Chromatography, LC)	66
4.3.4. Φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry, MS)	69
ΣΚΟΠΟΣ.....	81
5.Πειραματικό μέρος.....	82
5.1.Σκεύη, χημικά αντιδραστήρια, οργανολογία.....	82
5.2.Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων.....	84
5.3.Δειγματοληψία και αποθήκευση δείγματος	84
5.4. Σύνθεση του FPSE μέσου επικαλυμμένο με το διάλυμα κολλοειδούς -γέλης.....	84
5.5.Προκαταρκτικά πειράματα.....	87
5.6. Διαδικασία εκχύλισης FPSE	87
5.8. Συνθήκες χρωματογραφικής ανάλυσης.....	89
5.8. Συνθήκες συζευγμένης Φασματομετρίας Μάζας (MS/MS).....	91
5.9. Επικύρωση μεθόδου.....	94
6.Αποτελέσματα και συζήτηση	98
6.1. Χρωματογραφήματα και φάσματα μάζας	98
6.2. Καθορισμός της θερμοκρασίας της πηγής ιοντισμού	104
6.3. Επιλογή υποστρώματος.....	104
6.4. Βελτιστοποίηση των πειραματικών συνθηκών	105

6.4.1 Βελτιστοποίηση του pH του δείγματος.....	105
6.4.2. Βελτιστοποίηση του χρόνου προσρόφησης	107
6.4.3. Βελτιστοποίηση του διαλύτη έκλουσης.....	108
6.4.4.Βελτιστοποίηση του μέσου έκλουσης.....	109
6.4.5 Βελτιστοποίηση του χρόνου έκλουσης	110
6.5. Αναλυτικά χαρακτηριστικά.....	111
6.5.1 Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης.....	111
6.5.2 Καμπύλη βαθμονόμησης σε προσομοιωμένη μήτρα (matrix matched).....	111
6.5.3. Γραμμικότητα.....	113
6.5.4. Συμπαράσυρση (carry-over).....	115
6.5.5 Εκλεκτικότητα (selectivity/ interference studies)	115
6.5.6. Επίδραση υποστρώματος (matrix effect)	115
6.5.7. Ανάκτηση	115
6.5.8. Πιστότητα.....	116
6.5.9. Σταθερότητα.....	116
7.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	120
ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	121
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	133

ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΙΣ

6-MAM: 6-monoacetylmorphine, 6 μονοακέτυλο μορφίνη

BE: Benzoylecgonine, βενζοϋλεκγονίνη

COVID-19: Κορωνοϊός 2019

CUR: Curtain gas

CE: Collision energy

CES1: Καρβοξυλεστεράση 1

CES2: Καρβοξυλεστεράση 2

CV: Coefficient of variation, συντελεστής μεταβλητότητας

CXP: Collision cell exit potential

DEA: Drug Enforcement Administration

DP: Declustering potential

EMCDA: European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (Ευρωπαϊκό Κέντρο Παρακολούθησης Ναρκωτικών και Τοξικομανίας)

EME: Ecgonine methyl ester, Μεθυλεστέρας της εκγονίνης

EP: Entrance potential

ESI: Electrospray, Ηλεκτροψεκασμός

FPSE: Fabric Phase Sorptive Extraction, Εκχύλιση μέσω προσρόφησης σε δίκτυο επικαλυμμένων ινών

GS1: Gas source 1, GAS 1

GS2: Gas source 2, GAS 2

GC: Gas Chromatography, Αέρια χρωματογραφία

GC-MS: Αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας

HPLC: High Performance Liquid Chromatography, Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης

IS: Ion Spray Voltage

LC: Liquid Chromatography, Υγρή Χρωματογραφία

LC-MS/MS: Liquid Chromatography tandem Mass spectrometry, Υγρή Χρωματογραφία συζευγμένη με διαδοχική φασματομετρία μάζας

LC-MS: Υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας

LLE: Liquid-Liquid Extraction, Εκχύλιση υγρού-υγρού

LSD: Διαιθυλαμίδιο του λυσεργικού οξέος

LOD: Limit of Detection, όριο ανίχνευσης

LOQ: Limit of Quantitation, όριο ποσοτικοποίησης

MDA: 3,4 methylenedioxyamphetamine, 3,4-μεθυλενοδιοξαμφεταμίνη

MDMA: 3,4-Methylenedioxymethamphetamine, 3,4- μεθυλενοδιοξυμεθαμφεταμίνη

MRM: Multiple Reaction Monitoring

m/z: Λόγος μάζας προς φορτίο

NIDA: National Institute on Drugs Abuse

MTMS: Μεθυλτριμεθοξυσιλάνιο,

NPSs: New psychoactive substances, Νέες ψυχοδραστικές ουσίες

PEG: Πολυαιθυλενογλυκόλη

SLE: Supported Liquid Extraction

SPME: Solid Phase Micro Extraction, Μικροεκχύλιση στερεής φάσης

SPE: Solid Phase Extraction, Εκχύλιση στερεής φάσης

TEM: Temperature

TIC: Total Ion Chromatography

TFA: Τριφθοραιθανικό οξύ

WHO (Π.Ο.Υ): World Health Organization, Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας

XIC: Extracted Ion Chromatography

UHPLC-MS: Ultra High Performance Liquid Chromatography-Mass spectrometry

UNODC: United Nations Office on Drugs and Crime, Γραφείο Ηνωμένων Εθνών για τα Ναρκωτικά και το Έγκλημα

ΔΕΠΥ: Διαταραχή ελλειμματικής προσοχής και υπερκινητικότητας

ΔΜΣ: Διαταραχή μετατραυματικού στρες

ΕΚΤΕΠΝ: Εθνικό Κέντρο Τεκμηρίωσης και Πληροφόρησης για τα Ναρκωτικά

ΣΟΔΝ-ΕΜΠ. Συντονιστικό Όργανο Δίωξης Ναρκωτικών – Εθνική Μονάδα Πληροφοριών

ΚΝΣ: Κεντρικό Νευρικό Σύστημα

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι εξαρτησιογόνες ουσίες δεν αποτελούν απλά ένα σύγχρονο φαινόμενο. Ορισμένες από αυτές έχουν χρησιμοποιηθεί από τους ανθρώπους χιλιάδες χρόνια πριν (π.χ. ίχνη μαριχουάνας και κοκαΐνης σε αιγυπτιακές μούμιες). Οι λόγοι που οδήγησαν στην κατανάλωσή τους, ίσως να μη διαφέρουν πολύ από κάποιους σύγχρονους παράγοντες που ωθούν τα άτομα στη χρήση εξαρτησιογόνων ουσιών. Οι άνθρωποι τότε, ενδεχομένως για να πραγματοποιήσουν θρησκευτικές τελετές και τελετές μύησης, να ανακουφίσουν τον πόνο τους, να επουλώσουν τις πληγές τους, να χαλαρώσουν και να τονωθούν από τις δύσκολες συνθήκες και την κόπωση της σκληρής δουλειάς, κατέφευγαν στην κατανάλωσή τους (Kane, 2007).

Η κατάχρηση εξαρτησιογόνων ουσιών ειδικά στους νέους πληθυσμούς αποτελεί μείζον πρόβλημα για τη δημόσια υγεία με σημαντικά επίπεδα νοσηρότητας και θνησιμότητας. Η έναρξη και η κατάχρηση ουσιών οφείλεται σε διάφορους παράγοντες όπως κοινωνικούς, οικονομικούς και πολιτιστικούς. Οι επιπτώσεις χρήσης και κατάχρησης ουσιών δεν είναι μόνο υγειονομικές αλλά και κοινωνικές εφόσον η αγορά παράνομων ναρκωτικών καταλαμβάνει σημαντικό μέρος της εγκληματικής δραστηριότητας παγκοσμίως (Sprooner & Hetherington, 2004).

Έτσι, είναι ύψιστης σημασίας η διερεύνηση της παρουσίας μίας ουσίας από τη Δικαστική Τοξικολογία σε βιολογικά υποστρώματα σε διάφορες ύποπτες υποθέσεις (π.χ. έρευνες θανάτων). Παραδοσιακά, έχουν χρησιμοποιηθεί δείγματα ολικού αίματος, πλάσματος, ορού και ούρων. Η αυξημένη ευαισθησία των σύγχρονων αναλυτικών οργανολογιών έδωσε τη δυνατότητα ανάλυσης εναλλακτικών υποστρωμάτων όπως είναι το στοματικό υγρό, το οποίο παρουσιάζει πολυάριθμα πλεονεκτήματα σε σχέση με τα συμβατικά υποστρώματα (De Campos et al, 2021).

Το στοματικό υγρό είναι το ολικό υγρό της στοματικής κοιλότητας που εκκρίνεται από τους κύριους και δευτερεύοντες σιελογόνους αδένες αλλά περιλαμβάνει και διάφορα άλλα συστατικά όπως βρογχικές και ρινικές εκκρίσεις, αίμα από στοματικά τραύματα, βακτήρια, ιούς, μύκητες, αποκολλημένα επιθηλιακά κύτταρα και άλλα κυτταρικά συστατικά και υπολείμματα τροφών (Cruz et al., 2011). Τα σίελα αποτελούν μόνο τις εκκρίσεις των σιελογόνων αδένων και είναι απαλλαγμένα από τα άλλα συστατικά (Crouch et al., 2005). Στην παρούσα εργασία οι όροι σίελα και στοματικό υγρό χρησιμοποιούνται ταυτόσημα.

Τα βιολογικά υλικά όμως είναι αρκετά περίπλοκα και δεν μπορούν να αναλυθούν στην αρχική τους κατάσταση. Έτσι απαιτείται μία τεχνική προκατεργασίας πριν την έγχυσή τους

στην ενόργανη διάταξη. Η σωστή τεχνική προκατεργασίας είναι σημαντική για τον τελικό προσδιορισμό των αναλυτών. Παραδοσιακά έχουν χρησιμοποιηθεί η εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE), η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (SPME) και η εκχύλιση υγρού-υγρού (LLE) οι οποίες όμως έχουν συγκεκριμένους περιορισμούς (Ruan et al, 2020).

Ο Chong και οι συνεργάτες του το 1997 ανέπτυξαν μία νέα τεχνολογία επικάλυψης sol-gel (κολλοειδούς-γέλης) για να εκχυλίσουν πολύπλοκα δείγματα (Chong et al., 1997). Το 2014, οι Kabir και Furton χρησιμοποίησαν αυτήν την τεχνολογία και ανέπτυξαν μία νέα απλή, γρήγορη και πράσινη τεχνική εκχύλισης δείγματος η οποία καλείται Fabric Phase Sorptive Extraction (FPSE) (Kabir & Furton, 2014).

Στη βιβλιογραφία έχουν δημοσιευτεί διάφορες μελέτες για την ανίχνευση εξαρτησιογόνων ουσιών σε βιολογικά υποστρώματα με διάφορες τεχνικές ανάλυσης όπως η αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (GC-MS) και η υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (LC-MS). Η πρώτη τεχνική είναι πιο δαπανηρή, απαιτεί παραγωγοποίηση και περιορίζεται στην ανάλυση πτητικών ενώσεων. Έτσι, η υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας έχει πλέον επικρατήσει για την ανάλυση ουσιών σε βιολογικά υποστρώματα (Ruan et al., 2020).

Η παρούσα εργασία δομείται σε επτά κεφάλαια. Συγκεκριμένα, στο πρώτο κεφάλαιο αναπτύσσεται η έννοια της επιστήμης της τοξικολογίας, των τοξικών ουσιών και οι κατηγορίες τους. Στη συνέχεια, στο δεύτερο κεφάλαιο αναπτύσσεται ο ορισμός των εξαρτησιογόνων ουσιών και αναλύονται τα αίτια και οι επιπτώσεις της κατάχρησης ουσιών καθώς και μέτρα πρόληψης. Στο τρίτο κεφάλαιο δίνονται τα χαρακτηριστικά και οι κατηγορίες των εξαρτησιογόνων ουσιών καθώς και οι αναλύτες της παρούσας διατριβής. Στο τέταρτο κεφάλαιο αναφέρονται τα στάδια μιας αναλυτικής μεθοδολογίας στα οποία περιλαμβάνονται η επιλογή του υποστρώματος, η προκατεργασία του δείγματος και η αναλυτική τεχνική με έμφαση στο στοματικό υγρό, στην FPSE και στην τεχνική LC-MS/MS αντίστοιχα. Στο πέμπτο κεφάλαιο παρουσιάζεται το πειραματικό μέρος της συγκεκριμένης εργασίας με τα χημικά αντιδραστήρια, την οργανολογία και την πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε. Στο έκτο κεφάλαιο παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μεταπτυχιακής διατριβής όπου περιλαμβάνουν τα δεδομένα της βελτιστοποίησης της αναλυτικής τεχνικής και της επικύρωσης της μεθόδου. Τέλος, στο έβδομο κεφάλαιο αναφέρονται τα συμπεράσματα της έρευνας και η δυνατότητα χρησιμοποίησής της για την ανίχνευση και τον

προσδιορισμό Νέων Ψυχοδραστικών Ουσιών (New Psychoactive Substances, NPSs) στο στοματικό υγρό.

1. Η Επιστήμη της Τοξικολογίας

Η Τοξικολογία είναι μία εφαρμοσμένη επιστήμη που συνεισφέρει στην κοινωνία με πολλούς τρόπους. Η μελέτη της προστατεύει τους ανθρώπους και το περιβάλλον από επιβλαβή τοξικά και παράλληλα βοηθάει στην ανάπτυξη επιλεκτικών τοξικών όπως αντικαρκινικά φάρμακα και φυτοφάρμακα ενισχύοντας την ποιότητα ζωής. Ήδη από την εποχή του Γαληνού (131–200 μ.Χ.) και του Παράκελσου (1493–1541 μ.Χ.) είχε σημειωθεί πρόοδος στην τοξικολογία. Ο Παράκελσος θεωρείται ο πατέρας της Τοξικολογίας καθώς έθεσε τα θεμέλια για την μετέπειτα ανάπτυξή της. Το 1853 προέβη στην ιστορική φράση: «Όλες οι ουσίες είναι δηλητήρια · δεν υπάρχει καμία που να μην είναι δηλητήριο. Η κατάλληλη δόση διαφοροποιεί ένα δηλητήριο και ένα φάρμακο», δίνοντας έτσι ιδιαίτερη σημασία στη σχέση δόσης-απόκρισης (Hodgson, 2004).

Η εξέλιξη της Τοξικολογίας είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με τη Χημεία. Η ανάπτυξη νέων αναλυτικών τεχνικών στο χώρο της Χημείας έδωσε τη δυνατότητα απομόνωσης και προσδιορισμού τοξικών από βιολογικά υποστρώματα. Ταυτόχρονα, η εξέλιξη της Βιοχημείας, της Βιολογίας, της Παθολογίας, της Φυσιολογίας, της Επιδημιολογίας, της Ανοσολογίας, της Οικολογίας και των Βιομαθηματικών συνέβαλε στην αλματώδη πρόοδο της τοξικολογίας (Κουτσελίνης, 1997· Hodgson, 2004).

Γενικά, Τοξικολογία είναι ο κλάδος της επιστήμης που ασχολείται με τα δηλητήρια. Συγκεκριμένα, μελετά τη φύση και τις ιδιότητες των δηλητηρίων, τις επιπτώσεις και τη διαχείρισή τους και τέλος τις μεθόδους ανίχνευσής τους στα βιολογικά υποστρώματα και σε διάφορα άλλα πειστήρια (Κουτσελίνης, 1997). Επιπροσθέτως, αντικείμενο της Τοξικολογίας είναι και η μελέτη των επιπτώσεων που προέρχονται από φυσικά φαινόμενα, όπως η ακτινοβολία (Hodgson, 2004).

Ως δηλητήριο, μπορεί να χαρακτηριστεί οποιαδήποτε ουσία η οποία εισερχόμενη στον οργανισμό μπορεί να επιφέρει επιβλαβές αποτέλεσμα. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες μπορούν να αφορούν τη διατάραξη των φυσιολογικών λειτουργιών του οργανισμού με αποτέλεσμα τη νόσηση ή/και το θάνατο. Η πρόκληση των ανεπιθύμητων ενεργειών μπορεί να επιφέρει βιολογικές, οικολογικές, οικονομικές, κοινωνικές και νομικές συνέπειες (Κουτσελίνης, 1997).

Το δηλητήριο μπορεί να προέρχεται από το φυτικό, το ορυκτό ή το ζωικό βασίλειο. Μπορεί να είναι οργανικής ή ανόργανης φύσης, δεν πρέπει να είναι κάτι ζωντανό και οργανωμένο και δρα με τις χημικές και όχι με τις φυσικές του ιδιότητες (Κουτσελίνης, 1997).

1.1.Κλάδοι της Τοξικολογίας

Οι τοξικολόγοι εμπλέκονται σε τρεις βασικούς τομείς, λόγω της ποικιλίας των τοξικών ουσιών στο περιβάλλον και των πολυάριθμων επιπτώσεών τους:

- Τη Μηχανιστική Τοξικολογία, στην οποία διερευνώνται οι κυτταρικοί, βιοχημικοί και μοριακοί μηχανισμοί δράσης των τοξικών ουσιών στους ζώντες οργανισμούς.
- Την Περιγραφική Τοξικολογία, η οποία συνδέεται με την επιδημιολογία, την τοξικότητα και τη βιολογική ποσοτικοποίηση των τοξικών. Συντελείται με τη βοήθεια των βιοπροσδιορισμών, των μελετών δομής-δραστικότητας, της αναλυτικής χημείας και των εφαρμοσμένων μαθηματικών.
- Τη Ρυθμιστική Τοξικολογία, στην οποία αξιολογούνται τα αποτελέσματα της Περιγραφικής και Μηχανιστικής Τοξικολογίας. Η αξιολόγηση πραγματοποιείται από ή για λογαριασμό κυβερνητικών ή διεθνών οργανισμών. Επίσης, η Ρυθμιστική Τοξικολογία ασχολείται με τη θέσπιση ασφαλών οριακών τιμών για τα διάφορα χημικά. Έτσι, προστατεύονται οι εργαζόμενοι, οι καταναλωτές, ο γενικότερος πληθυσμός και το περιβάλλον (Costa & Teixeira, 2014).

Εξειδικευμένη κατηγορία της Τοξικολογίας αποτελεί η Δικαστική Τοξικολογία η οποία ασχολείται με ιατρικές και νομικές πτυχές του αντικειμένου της (Costa & Teixeira, 2014). Η κατηγορία αυτή εξυπηρετεί το έργο της Δικαιοσύνης σε περιπτώσεις διερεύνησης της αιτίας θανάτου (Κουτσελίνης, 1997). Έτσι, η συγκέντρωση του δηλητηρίου, η οποία είναι ικανή στα βιολογικά υποστρώματα να προκαλέσει οξεία και χρόνια δηλητηρίαση, ταυτοποιείται και αξιολογείται (Κουτσελίνης, 1997).

Κάθε τομέας είναι διαφορετικός αλλά και συμπληρωματικός στον άλλον. Όλοι οι τομείς συνεισφέρουν στη διαδικασία εκτίμησης κινδύνου. Πρώτα, πραγματοποιείται η αναγνώριση του κινδύνου και έτσι διερευνάται η πιθανότητα πρόκλησης δυσμενών επιπτώσεων σε έναν οργανισμό. Στη συνέχεια, αναλύεται η σχέση δόσης-απόκρισης, στην οποία διερευνάται η σχέση μεταξύ της ληφθείσας ποσότητας ενός παράγοντα από έναν οργανισμό και των αλλαγών που μπορεί να επιφέρει σε αυτόν. Τέλος, η διαδικασία εκτίμησης κινδύνου περιλαμβάνει την αξιολόγηση της έκθεσης. Έτσι, αξιολογούνται η ένταση, η συχνότητα, η διάρκεια και οι οδοί έκθεσης με σκοπό την ποσοτικοποίηση της ποσότητας που έχει ληφθεί από συγκεκριμένους πληθυσμούς (Costa & Teixeira, 2014).

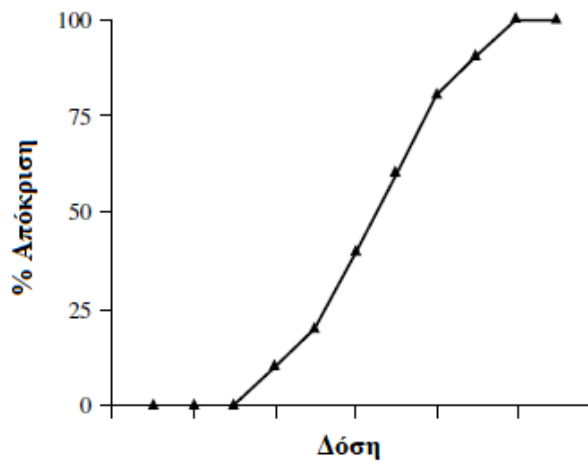
1.2.Τοξικότητα μιας ουσίας και οι παράμετροι που τη διαφοροποιούν

Η τοξικότητα αναφέρεται στην ικανότητα μιας ουσίας να επηρεάζει τις λειτουργίες ενός οργανισμού. Η ουσία αυτή ή οι μεταβολίτες ή τα προϊόντα βιομετατροπής της πρέπει να φτάσουν στον κατάλληλο υποδοχέα του οργανισμού έχοντας μία υψηλή συγκέντρωση καθ' όλη την παραμονή τους εκεί (Κουτσελίνης, 1997).

Κάθε ουσία μπορεί να είναι επιβλαβής σε συγκεκριμένες δόσεις αλλά χωρίς να προκαλεί κάποιο επιβλαβές αποτέλεσμα σε κάποια χαμηλότερη ενώ ταυτόχρονα να είναι τοξική για ένα συγκεκριμένο είδος και σχετικά αβλαβής για ένα άλλο (Hodgson, 2004).

Η τοξικότητα μπορεί να είναι οξεία ή χρόνια, και μπορεί να ποικίλλει από ένα βιολογικό σύστημα στο άλλο. Εξαρτάται από τον τοξικό παράγοντα (π.χ. χημική σύσταση, προσμίξεις, διαλυτότητα, φυσικά χαρακτηριστικά), τις συνθήκες έκθεσης (π.χ. δόση, απορρόφηση-κατανομή-απέκκριση, βιομετατροπή, οδό χορήγησης, διάρκεια, συχνότητα έκθεσης), τους ενδογενείς παράγοντες του βιολογικού συστήματος (π.χ. βάρος, ορμονική κατάσταση, ηλικία, φύλο, διατροφή, κατάσταση υγείας) και τους εξωγενείς (περιβαλλοντικοί) παράγοντες του βιολογικού συστήματος (Κουτσελίνης, 1997· Hodgson, 2004).

Όπως έχει αναφερθεί, η τοξικότητα είναι σχετική και εξαρτάται και από τη χορηγούμενη δόση. Δόση είναι η ποσότητα της ουσίας η οποία μετά την είσοδο στον οργανισμό μπορεί να οδηγήσει στην πρόκληση κάποιας βιολογικής αντίδρασης. Η δόση και η αντίδραση του συστήματος συνδέονται με μία σχέση ανάλογη της ποσότητας, της θέσης και του τρόπου χορήγησης της ουσίας. Η κλασική καμπύλη δόσης-απόκρισης δίνεται στην εικόνα 1. Η δόση κάτω από την οποία δεν παρατηρείται καμία επίδραση ή απόκριση ονομάζεται ελάχιστη δόση. Στην εικόνα παρατηρείται επίσης μία υψηλή συγκέντρωση της τοξικής ουσίας η οποία δεν επιφέρει περαιτέρω αύξηση της τοξικής δράσης λόγω της κατάληψης όλων των θέσεων του υποδοχέα που έχει αλληλεπιδράσει με την ουσία (Κουτσελίνης, 1997· Hodgson, 2004).



Εικόνα 1. Τυπική καμπύλη δόσης-απόκρισης (Hodgson, 2004).

1.3.Βιοδιαθεσιμότητα των τοξικών ουσιών

Διάφορες δραστηριότητες (περιβαλλοντική έκθεση, έκθεση κατά την εργασία, σκόπιμη ή τυχαία δηλητηρίαση) είναι υπεύθυνες για την έκθεση των οργανισμών σε τοξικούς παράγοντες. Η είσοδος κάθε ουσίας σε ένα βιολογικό σύστημα ακολουθεί κυρίως τέσσερις φάσεις: Απορρόφηση→Κατανομή→Μεταβολισμός→Απέκκριση οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους. Η εικόνα 2 απεικονίζει την τύχη των τοξικών στον οργανισμό (Κουτσελίνης, 1997· Σπυρόπουλος, 2016).

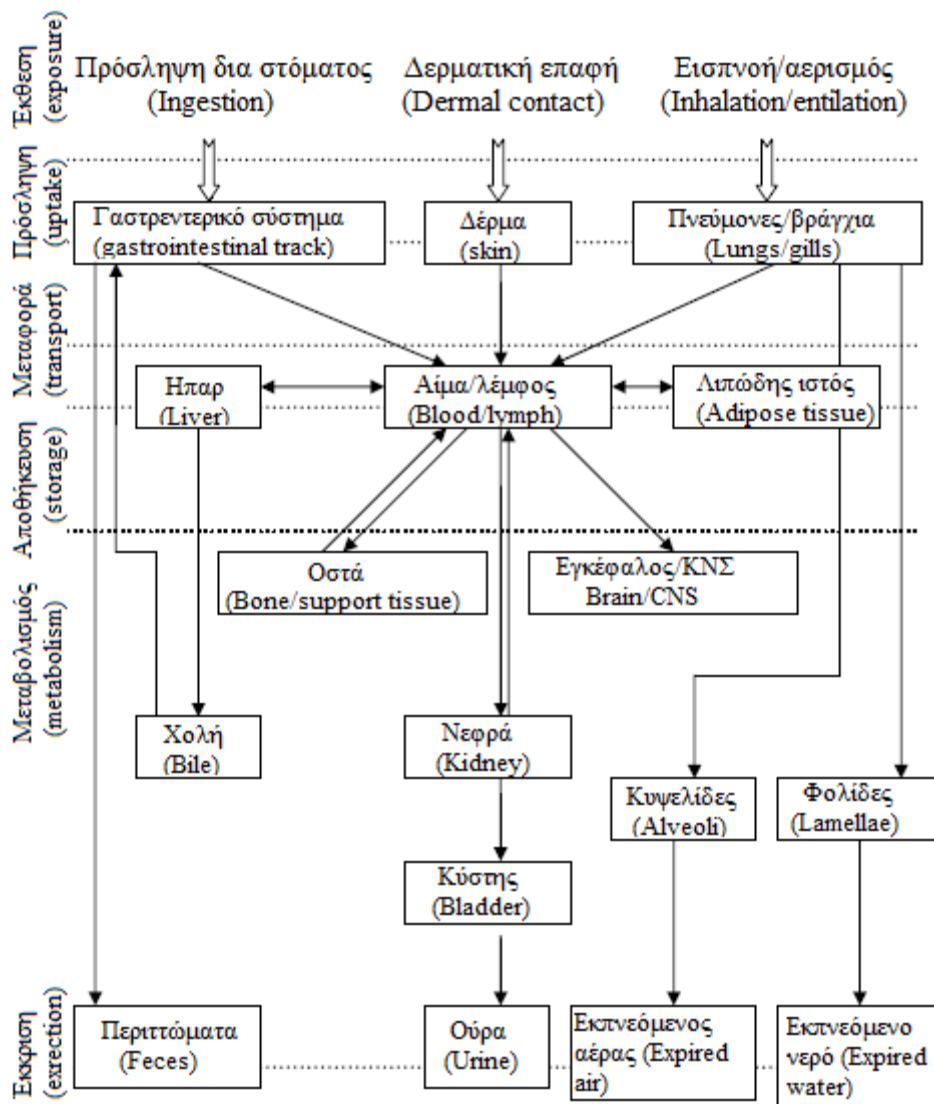
Μία ουσία μπορεί να εισέρθει στο σώμα μέσω του γαστρεντερικού συστήματος, του δέρματος και των πνευμόνων. Επίσης, ποικίλλουν οι μέθοδοι χορήγησης μιας ένεσης. Υπάρχει η ενδοφλέβια (Intravenous, IV), η ενδοπεριτοναϊκή (Intraperitoneal, IP), η ενδομυϊκή (Intramuscular, IM) και η υποδόρια (Subcutaneous, SC) χορήγηση, μεταβάλλοντας παράλληλα και την τοξικότητα της χορηγούμενης ουσίας (Κουτσελίνης, 1997· Hodgson, 2004).

Μετά την απορρόφηση η ουσία θα εισέλθει στην κυκλοφορία του αίματος. Η απορρόφηση από το γαστρεντερικό σύστημα θα καταλείψει την ουσία στην πυλαία φλέβα και από εκεί στο ήπαρ ενώ η απορρόφηση από το δέρμα στην περιφερική κυκλοφορία και η δια του αναπνευστικού συστήματος στην πνευμονική κυκλοφορία. Η ουσία που θα προσληφθεί θα μεταφερθεί σε ολόκληρο τον οργανισμό και η κατανομή της στους διάφορους ιστούς θα πραγματοποιηθεί ανάλογα με τα φυσικοχημικά της χαρακτηριστικά (Κουτσελίνης, 1997).

Ο οργανισμός αρχικά προωθεί τις ουσίες αυτές στο ήπαρ για αποτοξίνωση, προκειμένου να μειωθούν οι τοξικές συνέπειες που προκύπτουν από την απορρόφηση και την κατανομή των ουσιών. Διάφοροι μετασχηματισμοί λαμβάνουν χώρα στο ήπαρ για να διευκολυνθεί η διαδικασία της απέκκρισης. Έτσι, οι ουσίες είτε βιομετατρέπονται σε χρήσιμα συστατικά είτε

εξουδετερώνονται με την ταχεία απέκκριση μέσω των νεφρών στα ούρα ή μέσω της χολής στα κόπρανα. Ο βιομετασχηματισμός των ουσιών μπορεί να γίνει και από άλλα όργανα ή ομάδες κυττάρων. Συχνά, μεγαλύτερες βλάβες μπορούν να προκληθούν από ορισμένους μεταβολίτες καθώς έχουν μεγαλύτερη τοξικότητα (Σπυρόπουλος, 2016).

Εκτός από τα ούρα και τα κόπρανα, η απέκκριση μπορεί να γίνει και από άλλες οδούς όπως την εκπνοή αερίων για πτητικές ενώσεις, τα σίελα, τον ιδρώτα του δέρματος, το μητρικό γάλα με το θηλασμό, τα νύχια, τα μαλλιά, το δέρμα και το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (Σπυρόπουλος, 2016).



Εικόνα 2. Είσοδος και πορεία των τοξικών παραγόντων στο σώμα (Σπυρόπουλος, 2016).

1.4. Κατηγορίες τοξικών ουσιών

Τα χημικά είδη που ενδιαφέρουν την τοξικολογία είναι :

- γεωργικές χημικές ουσίες (π.χ. εντομοκτόνα, ζιζανιοκτόνα, μυκητοκτόνα),
- κλινικά φάρμακα (ανεπιθύμητες ενέργειες φαρμακευτικών παραγόντων),
- **εξαρτησιογόνες ουσίες (ναρκωτικές ουσίες),**
- πρόσθετα τροφίμων (π.χ. συντηρητικά),
- βιομηχανικές χημικές ουσίες (π.χ. διαλύτες, απολιπαντικά),
- φυσικά απαντώμενες ουσίες (φυτοτοξίνες, μυκοτοξίνες, μέταλλα, συμπληρώματα διατροφής) και
- προϊόντα καύσης (παράγονται από καύσιμα και άλλα βιομηχανικά χημικά) (Hodgson, 2004).

2.Εξαρτησιογόνες ουσίες

2.1.Ορισμός

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (Π.Ο.Υ.) ψυχτρόπες είναι οι ουσίες οι οποίες μετά τη λήψη ή τη χορήγηση στο σύστημα κάποιου, επηρεάζουν τις ψυχικές διεργασίες, π.χ. γνώση ή θυμική διάθεση. Αυτός ο όρος και το αντίστοιχο, ψυχοτρόπο φάρμακο, είναι πιο ουδέτεροι και περιγραφικοί (WHO, 2023).

Ένα φαρμακευτικό παρασκεύασμα ή μια φυσική ουσία που χρησιμοποιείται κυρίως για να επιφέρει αλλαγή σε μια υπάρχουσα διαδικασία ή κατάσταση (φυσιολογική, σωματική, διανοητική, ψυχολογική ή βιοχημική) ονομάζεται ψυχοτρόπος ουσία. Οι ουσίες αυτές μπορούν να επηρεάσουν την αντίληψη, τη σκέψη, τη συνείδηση και το συναίσθημα. Σε υψηλότερες δόσεις μπορεί να προκαλέσουν δηλητηρίαση και να έχουν απειλητικές για τη ζωή αποτελέσματα (Kane, 2007· Sahu K.K & Sahu M., 2012).

Εξαρτησιογόνες είναι οι ουσίες οι οποίες δεν χρησιμοποιούνται για ιατρικούς σκοπούς, μπορούν να προκαλέσουν προβλήματα στην υγεία και να οδηγήσουν σε σωματική και ψυχική εξάρτηση (McLellan, 2017).

Ναρκωτικά είναι οι εξαρτησιογόνες ουσίες οι οποίες έχουν κατασταλτική δράση (Κουτσελίνης, 1997). Στην καθημερινότητα όμως, ο όρος αυτός αναφέρεται σε όλες τις εξαρτησιογόνες ουσίες. Είναι ένας μη δόκιμος όρος ο οποίος όμως έχει επικρατήσει (Sahu K.K & Sahu M., 2012).

Ο έλεγχος ή η απαγόρευση της παραγωγής, της διανομής και της πώλησης των εξαρτησιογόνων ουσιών υπόκειται σε διεθνείς συμβάσεις. Σε αυτές περιλαμβάνονται : η Ενιαία Σύμβαση για τις Ναρκωτικές Ουσίες του 1961, η οποία τροποποιήθηκε με πρωτόκολλο το 1972, η Σύμβαση του 1971 για τις Ψυχοτρόπες Ουσίες και η Σύμβαση του 1988 κατά της παράνομης διακίνησης Ναρκωτικών και Ψυχοτρόπων ουσιών (WHO, 2023).

2.2. Η εξάπλωση της αγοράς εξαρτησιογόνων ουσιών – Αίτια χρήσης

Τις τελευταίες δύο δεκαετίες είναι εμφανής η επέκταση της αγοράς των εξαρτησιογόνων ουσιών. Η αύξηση του συνολικού αριθμού των ατόμων που κάνουν χρήση ουσιών, η αυξητική τάση της παράνομης παραγωγής του οπίου και της κοκαΐνης και η μεγάλη ποσότητα των ουσιών που κατάσχονται μπορούν να δικαιολογήσουν την επέκταση αυτή (UNODC, 2020).

Η αύξηση του πληθυσμού, η αστικοποίηση και η αύξηση του πλούτου ευθύνονται ως έναν βαθμό για την εξάπλωση των εξαρτησιογόνων ουσιών. Η χρήση τους είναι υψηλότερη στις αστικές και στις αναπτυγμένες περιοχές παρά στις αγροτικές και στις αναπτυσσόμενες (με εξαίρεση ορισμένες μεγάλες αγροτικές περιοχές παραγωγής εξαρτησιογόνων ουσιών). Αυτό αποδίδεται στο γεγονός ότι περισσότερο από το ήμισυ του παγκόσμιου πληθυσμού ζει τώρα σε αστικές περιοχές και συγκεκριμένες κατηγορίες εξαρτησιογόνων ουσιών όπως η κοκαΐνη και τα οπιοειδή συνδέονται με χώρες με υψηλότερο εισόδημα. Συγκεκριμένα, το 2018 το 90% των οπιοειδών είχε διατεθεί στις χώρες με μεγαλύτερο εισόδημα. Όμως, τα φτωχότερα στρώματα αντιμετωπίζουν μεγαλύτερο κίνδυνο διαταραχών από χρήση εξαρτησιογόνων ουσιών καθώς βιώνουν σε μεγάλο βαθμό την ανέχεια, τις περιορισμένες εκπαιδευτικές ευκαιρίες και την κοινωνική περιθωριοποίηση (UNODC, 2020).

Πολλοί είναι οι πιθανοί παράγοντες που μπορούν να οδηγήσουν τα άτομα στη χρήση παράνομων ουσιών. Γενικά, η χρήση τους οφείλεται σε κοινωνικούς, συναισθηματικούς, οικογενειακούς, οικονομικούς, ατομικούς, πολιτιστικούς και γενετικούς παράγοντες. Στους νέους πληθυσμούς παρατηρείται ο μεγαλύτερος κίνδυνος κατάχρησης ουσιών (18-25 ετών). Στην ηλικία αυτή παρατηρούνται αλλαγές στον εγκέφαλο καθώς και φυσιολογική, φυσική, γνωστική και συναισθηματική ανάπτυξη (Pourallahvirdi et al., 2016· UNODC, 2018).

Στις κοινωνικές αιτίες ανήκουν οι διαδοχικές αποτυχίες στη ζωή (π.χ. εργασιακά προβλήματα) και η διαφυγή από τα καθημερινά προβλήματα. Η λήψη εξαρτησιογόνων ουσιών παροδικά θα τονώσει την αυτοπεποίθηση, θα προσφέρει αίσθημα χαλάρωσης, ευφορίας, ενέργειας, χαράς και θα ανακουφίσει από οποιαδήποτε μορφή πόνου (Pourallahvirdi et al., 2016).

Σημαντική φαίνεται να είναι η επιρροή που ασκούν οι συνομήλικοι μεταξύ τους, ειδικά σε ομάδες νέων και αυτός είναι ένας από τους κυριότερους παράγοντες στη χρήση εξαρτησιογόνων ουσιών. Υπάρχουν περιπτώσεις που η χρήση μίας ουσίας παρουσιάζεται ως «απαίτηση» μιας παρέας, για την αποδοχή ενός νέου μέλους στην ομάδα τους. Έτσι, η απόρριψη, οι πιέσεις από φίλους και συνομήλικους, η δημοφιλία, ο εκφοβισμός και η συσχέτιση με συμμορίες μπορούν να ωθήσουν στην κατανάλωση ουσιών (Whitesell et al., 2013).

Καθοριστικό ρόλο για τον πειραματισμό με παράνομες ουσίες διαδραματίζουν και παράγοντες που σχετίζονται με την παθολογία της οικογένειας. Η οικογένεια θεωρείται πρωταρχικός παράγοντας κοινωνικοποίησης, ο οποίος θα επηρεάσει τη συμπεριφορά των

ατόμων και θα συμβάλει στη δημιουργία προτύπων. Η κακοποίηση στην παιδική ηλικία, η παραμέληση καθώς και ο εθισμός σε ουσίες σε άλλα μέλη της οικογένειας είναι ενδεικτικοί παράγοντες που μπορούν να οδηγούν τους νέους στην κατάχρηση ουσιών. Επιπροσθέτως, το επίπεδο εκπαίδευσης των γονέων, οι οικογενειακές σχέσεις μεταξύ των γονέων αλλά και των γονέων-παιδιών και η κοινωνική και οικονομική θέση της οικογένειας μπορούν να επηρεάσουν τους νέους και να τους ωθήσουν στις εξαρτησιογόνες ουσίες (Whitesell et al., 2013).

Γενικά, η σεξουαλική και σωματική κακοποίηση συνδέεται, σύμφωνα με έρευνες, με αυξημένη χρήση εξαρτησιογόνων ουσιών όπως κοκαΐνη, ηρωίνη και βαρβιτουρικά. Ο κίνδυνος κατάχρησης ουσιών είναι διπλάσιος ακόμα και τετραπλάσιος σε εφήβους θύματα σωματικής και σεξουαλικής κακοποίησης. Παράλληλα, η συναισθηματική κακοποίηση, δημιουργεί προβλήματα στην ανάπτυξη του παιδιού, και οδηγεί τους εφήβους στην κατάχρηση ουσιών, σε μικρότερο βέβαια βαθμό σε σχέση με τη σεξουαλική και σωματική κακοποίηση (Whitesell et al., 2013).

Στους ατομικούς παράγοντες που ωθούν στη χρήση ουσιών περιλαμβάνονται διάφορες παθήσεις, όπως η διαταραχή ελλειμματικής προσοχής και υπερκινητικότητας (ΔΕΠΥ) και η διαταραχή μετατραυματικού στρες (ΔΜΣ). Συγκεκριμένα, τα παιδιά με ΔΕΠΥ εμφανίζουν έως τρεις φορές μεγαλύτερη πιθανότητα να χρησιμοποιήσουν κάποια παράνομη ουσία, κατά τη διάρκεια της ζωής τους. Επιπλέον, η κατάθλιψη, η εθνικότητα και ο σεξουαλικός προσανατολισμός έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία ως αιτίες κατάχρησης ουσιών (Whitesell et al., 2013).

Τέλος, σύμφωνα με τη Παγκόσμια Έκθεση για τις εξαρτησιογόνες ουσίες το 2020 από το Γραφείο Ηνωμένων Εθνών για τα Ναρκωτικά και το Έγκλημα (UNODC), οι γενετικοί παράγοντες αυξάνουν την ευπάθεια σε διαταραχές χρήσης ουσιών και μπορούν να ωθήσουν κυρίως τους έφηβους στην κατάχρηση. Τα γονίδια, τα περιβαλλοντικά χαρακτηριστικά και οι επιγενετικοί μηχανισμοί αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και καθορίζουν την ευπάθεια ενός ατόμου στις εξαρτησιογόνες ουσίες με τα περιβαλλοντικά χαρακτηριστικά να είναι υπεύθυνα για τον έλεγχο των έμφυτων παραγόντων, οι οποίοι μπορούν να οδηγήσουν τα άτομα σε αυτές. Έτσι, η μείωση της πιθανότητας έκφρασης του γενετικού δυναμικού των διαταραχών χρήσης εξαρτησιογόνων ουσιών μπορεί να επιτευχθεί εάν τα άτομα προστατευτούν από δυσμενείς εμπειρίες (UNODC, 2020).

2.3. Επιδημιολογικά στοιχεία για τη χρήση των εξαρτησιογόνων ουσιών

Τα αποτελέσματα της παγκόσμιας έκθεσης για τις εξαρτησιογόνες ουσίες το 2023 από το UNODC, έδειξαν ότι το 2021 296 εκατομμύρια άνθρωποι παγκοσμίως, ηλικίας 15–64 ετών, έκαναν χρήση ουσιών. Αυτό αντιστοιχεί στο 5.8 τοις εκατό (%) του παγκόσμιου πληθυσμού ηλικίας 15–64. Το ποσοστό αυτό αυξήθηκε κατά 23% σε σχέση με το αντίστοιχο του 2011 (240 εκατομμύρια χρήστες) (UNODC, 2023a).

Η έκθεση αποκαλύπτει ότι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη εξαρτησιογόνος ουσία σε παγκόσμιο επίπεδο είναι η κάνναβη, με 219 εκατομμύρια χρήστες. Στη συνέχεια, ακολουθούν τα οπιοειδή, με 60 εκατομμύρια χρήστες εκ των οποίων 31.5 εκατομμύρια είχαν κάνει χρήση ηρωίνης. Ο αριθμός αυτός αντιστοιχεί στην μη ιατρική χρήση των οπιοειδών. Οι αμφεταμίνες καταλαμβάνουν την τρίτη θέση, με 36 εκατομμύρια χρήστες. Τέλος, η κοκαΐνη με 22 εκατομμύρια χρήστες και η έκσταση με 20 εκατομμύρια χρήστες (UNODC, 2023a).

Στην Ευρώπη, σύμφωνα με την έκθεση για τις εξαρτησιογόνες ουσίες του 2022, το πρόβλημα είναι αισθητό με περίπου 83.4 εκατομμύρια ενήλικες (ηλικίας 15–64 ετών) να έχουν κάνει χρήση κάποιας παράνομης ουσίας έστω και μια φορά στη ζωή τους. Ο αριθμός αυτός αντιστοιχεί σε ποσοστό της τάξης του 29% (EMCDA, 2022).

Η έκθεση αναδεικνύει ότι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη εξαρτησιογόνος ουσία είναι η κάνναβη (22 εκατομμύρια χρήστες) και ακολουθούν οι διεγερτικές ουσίες. Η κοκαΐνη διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στο πρόβλημα των εξαρτησιογόνων ουσιών στην Ευρώπη, με 3.5 εκατομμύρια χρήστες. Στην κατηγορία των διεγερτικών ακολουθούν η έκσταση με 26 εκατομμύρια χρήστες και οι αμφεταμίνες με 2 εκατομμύρια. Τέλος, τα οπιοειδή με 1 εκατομμύριο χρήστες (κυρίως ηρωίνη) είναι υπεύθυνα για τις περισσότερες βλάβες που προκύπτουν από τη χρήση εξαρτησιογόνων ουσιών (EMCDA, 2022).

Σύμφωνα με την ετήσια έκθεση για τις εξαρτησιογόνες ουσίες του Συντονιστικού Οργάνου Δίωξης Ναρκωτικών – Εθνική Μονάδα Πληροφοριών (ΣΟΔΝ-ΕΜΠ) στην Ελλάδα αναφέρθηκαν 131 θάνατοι από τη χρήση ουσιών το 2022. Τα οπιοειδή και κυρίως η ηρωίνη είναι υπεύθυνα για την πλειονότητα των θανάτων (ΣΟΔΝ – ΕΜΠ, 2022).

Σύμφωνα με την ετήσια έκθεση του Εθνικού Κέντρου Τεκμηρίωσης και Πληροφόρησης για τα Ναρκωτικά (ΕΚΤΕΠΝ) το 2022, δεν υπάρχει σαφή εικόνα στην Ελλάδα για τη χρήση των εξαρτησιογόνων ουσιών στον πληθυσμό λόγω απουσίας πανελλήνιας έρευνας. Από διαδικτυακές έρευνες προκύπτει ότι κατά την πρώτη περίοδο της πανδημίας (2020) η χρήση κάνναβης και άλλων παράνομων ουσιών στον πληθυσμό παρέμεινε αμετάβλητη. Το 2021, οι

αναλύσεις σε λύματα της Αθήνας έδειξαν ότι η χρήση της κάνναβης, της μεθαμφεταμίνης και της έκστασης μειώθηκε σε αντίθεση με την κοκαΐνη και τις αμφεταμίνες. Η αποκορύφωση για την κοκαΐνη ήρθε τον Μάρτιο του 2021, όπου το νούμερο αυτό σχεδόν πενταπλασιάστηκε μέσα σε δύο χρόνια. Τέλος, η έκθεση αναδεικνύει το πρόβλημα των οπιοειδών με 1.5 έως 2.3 άτομα ανά 1000 άτομα πληθυσμού ηλικίας 15-64 ετών να κάνουν χρήση, αριθμός που αντιστοιχεί περίπου σε 12351 άτομα (ΕΚΤΕΠΝ, 2022).

2.4. Συνέπειες χρήσης εξαρτησιογόνων ουσιών

Η υγεία, η κοινωνική ανάπτυξη, η ευημερία και οι στόχοι βιώσιμης ανάπτυξης απειλούνται από τη χρήση των εξαρτησιογόνων ουσιών σε ατομικό, κοινοτικό και παγκόσμιο επίπεδο. Η εκπαίδευση, οι υγιείς προσωπικές και οικογενειακές σχέσεις, η αποδοτικότητα της εργασίας και η νόμιμη αγορά εργασίας επηρεάζονται και οι κοινωνικές και ηθικές αξίες καταστρατηγούνται. Η κατάσταση αυτή, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της εγκληματικότητας και την κυριαρχία της κοινωνικής αποδιοργάνωσης και της οικονομικής δυσχέρειας (Sahu K.K & Sahu M., 2012· Hill & Thomas, 2020· UNODC, 2020).

Η έκθεση από το UNODC το 2023 έδειξε ότι από τα 296 εκατομμύρια που έκαναν χρήση εξαρτησιογόνων ουσιών το 13.3% υπέφερε από διαταραχές χρήσης. Τα περισσότερα προβλήματα οφειλόταν σε κανναβινοειδή και οπιοειδή (UNODC, 2023a).

Οι διαταραχές ψυχικής υγείας, η κατάθλιψη, η λοίμωξη από HIV, η ηπατίτιδα που σχετίζεται με καρκίνο και κίρρωση του ήπατος, οι χρόνιες πνευμονικές παθήσεις, τα καρδιαγγειακά προβλήματα και οι τυχαίοι τραυματισμοί είναι ενδεικτικές βλάβες που προκαλούνται στην υγεία από την κατάχρηση ουσιών (Hill & Thomas, 2020).

Η κατάχρηση εξαρτησιογόνων ουσιών θα οδηγήσει τους χρήστες σε επικίνδυνες συμπεριφορές και καταστάσεις, σε νομικά προβλήματα καθώς και σε δυσκολία υλοποίησης των σημαντικών υποχρεώσεων. Επίσης, μπορεί να οδηγήσει τους χρήστες στην επικίνδυνη κατάσταση του εθισμού με την ανάπτυξη αισθήματος ανοχής και εξάρτησης. Εάν ένας εξαρτημένος χρήστης επιχειρήσει να διακόψει απότομα τη λήψη της ουσίας, τότε θα εμφανιστούν συμπτώματα στέρησης. Το σώμα βρίσκεται τότε σε κατάσταση σύγχυσης και διαμαρτύρεται για την έλλειψη της ουσίας. Τα συμπτώματα που βιώνουν τα άτομα κυμαίνονται από ήπια (π.χ. δυσφορία) μέχρι και πολύ σοβαρά (π.χ. σπασμοί) και η σοβαρότητά τους, εξαρτάται από τη φυσική κατάσταση του χρήστη, το είδος και την ποσότητα της ουσίας που καταναλώθηκε. Συνήθως, στα συμπτώματα στέρησης

περιλαμβάνονται τα αντίθετα αποτελέσματα, από αυτά που θα είχαν προκληθεί από την παρουσία της ουσίας στο σώμα. Ο χρήστης έτσι συνεχίζει την κατάχρηση, προκειμένου να αποφύγει αυτά τα συμπτώματα (Sahu, K.K & Sahu, M., 2012).

Αξιίζει να τονιστεί ότι παγκοσμίως 13.2 εκατομμύρια άνθρωποι κάνουν χρήση ενέσιμων ουσιών. Τα άτομα αυτά είναι επιρρεπή σε μολυσματικές ασθένειες, καθώς χρησιμοποιούν κοινές βελόνες και σύριγγες και στον κίνδυνο υπερδοσολογίας. Έχει αποδειχτεί ότι περίπου 1 στα 8 άτομα και κάθε δεύτερο άτομο (6.6 εκατομμύρια άνθρωποι) που κάνουν χρήση ενέσιμων ουσιών ζουν με τον ιό HIV και με ηπατίτιδα C αντίστοιχα (UNODC, 2023a).

Είναι φανερό ότι η πιο σοβαρή συνέπεια της μακροχρόνιας χρήσης είναι ο θάνατος. Υπάρχουν θάνατοι που σχετίζονται άμεσα με διαταραχές χρήσης εξαρτησιογόνων ουσιών κυρίως από υπερβολική δόση και θάνατοι που σχετίζονται έμμεσα με τη χρήση εξαρτησιογόνων ουσιών καθώς οφείλονται σε αυτοτραυματισμούς ή σε μολύνσεις του ιού HIV και της ηπατίτιδας C. Το 2019 υπήρχαν 500000 θάνατοι που οφείλονταν σε εξαρτησιογόνες ουσίες. Ο αριθμός αυτός δείχνει μία αύξηση της τάξης του 17.5% από το 2009. Περισσότεροι από 250000 θάνατοι σχετιζόταν με ηπατικές ασθένειες και συγκεκριμένα με την ηπατίτιδα C. Η υπερβολική δόση ήταν υπεύθυνη για το ένα τέταρτο των θανάτων, με τα οπιοειδή να παραμένουν η κυρίαρχη αιτία θανάτων από υπερβολική δόση (κρίση των οπιοειδών) (UNODC, 2023a).

Στην Ευρώπη το 2021, σύμφωνα με την έκθεση για τις εξαρτησιογόνες ουσίες του 2023, σημειώθηκαν 18.3 θάνατοι ανά εκατομμύριο πληθυσμού, ηλικίας 15-64 ετών λόγω υπερβολικής δόσης. Το υψηλότερο ποσοστό θνησιμότητας παρατηρήθηκε στην ηλικιακή ομάδα 25-44 ετών. Η πλειονότητα των θανάτων, αποδόθηκε στα οπιοειδή, κυρίως στην ηρωίνη και στους μεταβολίτες της, συχνά σε συνδυασμό με άλλες ουσίες. Οι οφειλόμενοι στα διεγερτικά (κοκαΐνη, αμφεταμίνες, MDA) θάνατοι στην Ευρώπη παρατηρήθηκαν σε μικρότερο ποσοστό σε σχέση με τα οπιοειδή (EMCDDA, 2023).

2.5. Μέτρα πρόληψης και σωστής ενημέρωσης

Το φαινόμενο των εξαρτησιογόνων ουσιών είναι ένα κοινωνικό ζήτημα που έχει επιπτώσεις τόσο για το άτομο και την οικογένεια, όσο και το ευρύτερο κοινωνικό περιβάλλον και απαιτεί μια ενιαία στρατηγική για την αποφασιστική αντιμετώπισή του. Η συνεργασία, ο συντονισμός των αρμόδιων φορέων και η διαμόρφωση μιας συνολικής εθνικής πολιτικής που

θα θέτει κοινούς στόχους και προοπτικές είναι απαραίτητα βήματα για τη διαχείριση του προβλήματος των εξαρτησιογόνων ουσιών (ΣΟΔΝ – ΕΜΠ, 2019).

Η παγκόσμια κοινότητα δεν έχει μείνει αδρανής μπροστά στις εξελίξεις. Έχει θέσει βασικό στόχο την ευαισθητοποίηση των ανθρώπων και κυρίως των νέων για την απειλή των εξαρτησιογόνων ουσιών. Μία τέτοια κίνηση ήταν και η θέσπιση της 26^{ης} Ιουνίου, ως παγκόσμια μέρα κατά της κατάχρησης ουσιών και της παράνομης διακίνησης τους, με πρωτοβουλία της Γενικής Συνέλευσης του Οργανισμού Ηνωμένων Εθνών (Barerah, 2018).

Από τη μεριά του, το κράτος σε συνεργασία με διάφορες κυβερνητικές και μη κυβερνητικές υπηρεσίες διαθέτει μια ολοκληρωμένη στρατηγική με σκοπό τη μείωση των επιπέδων κατάχρησης των εξαρτησιογόνων ουσιών και την προώθηση της ευημερίας των πολιτών. Η στρατηγική αυτή περιλαμβάνει αποτελεσματικά προληπτικά μέτρα, εκστρατείες και εκπαιδευτικά προγράμματα, συμβουλευτική θεραπεία και προγράμματα αποκατάστασης με σκοπό την εκπαίδευση, την ενημέρωση και αποθάρρυνση των πολιτών από την κατάχρηση. Τα μέτρα ελέγχου και πρόληψης στοχεύουν άμεσα και έμμεσα στην υγεία των πολιτών, στην αύξηση της παραγωγικότητας και στη δημιουργία καλών θέσεων εργασίας (Pourallahvirdi et al., 2016· Barerah, 2018· Mohammadnezhad et al., 2020).

Η οικογένεια επίσης μπορεί να συμβάλλει στην πρόληψη των νέων από αυτήν την απειλή. Η γονική επίβλεψη, ο διάλογος, οι συμβουλές, η παρακολούθηση και ένα υγιές οικογενειακό περιβάλλον είναι απαραίτητα για την εξάλειψη αυτού του προβλήματος. Σύμφωνα με έρευνες, τα προγράμματα πρόληψης και η συνεισφορά της οικογένειας, του σχολείου και των μέσων ενημέρωσης είναι ουσιώδη για μείωση ή ακόμα και πρόληψη της κατάχρησης εξαρτησιογόνων ουσιών (Barerah, 2018).

2.6. Κορωνοϊός (COVID-19) και εξαρτησιογόνες ουσίες

Κατά τη διάρκεια συγγραφής της παρούσας διπλωματικής, όλος ο πλανήτης ήρθε αντιμέτωπος με μία νέα απειλή, την εξαιρετικά μεταδοτική και παθογόνο ιογενή λοίμωξη COVID-19, η οποία είχε αλλάξει δραματικά τον κόσμο. Έτσι, θα αποτελούσε παράλειψη να μην αναφερθεί ο αντίκτυπος της νόσου αυτής στο πρόβλημα των εξαρτησιογόνων ουσιών.

Η πανδημία αποκάλυψε πολλές ελλείψεις στα υπάρχοντα συστήματα υγειονομικής περίθαλψης τα οποία ήρθαν αντιμέτωπα με πολλές νέες προκλήσεις. Η προμήθεια φαρμάκων και υγειονομικών προϊόντων υπέστη κρίση λόγω του κλεισίματος των συνόρων των χωρών

και λόγω του γεγονότος ότι κύριο μέλημα ήταν η θεραπεία ασθενών με COVID-19. Έτσι, οι οργανωμένες εγκληματικές ομάδες εκμεταλλεύτηκαν αυτή την κατάσταση, προσαρμόστηκαν γρήγορα στις εξελίξεις και προχώρησαν στη διακίνηση ψευδεπίγραφων προϊόντων και παράνομων ουσιών (Ziavrou et al., 2022).

Η κατάσταση των εξαρτησιογόνων ουσιών περιπλέχθηκε αρκετά κατά την έξαρση και την ταχεία εξάπλωση της πανδημικής νόσου. Για τη μείωση της μετάδοσης του ιού, θεσπίστηκαν διάφορα περιοριστικά μέτρα τα οποία επηρέασαν όλους τους τομείς της σύγχρονης ζωής, συμπεριλαμβανομένων της κατανάλωσης ουσιών, της αγοράς εξαρτησιογόνων ουσιών, της εφαρμογής μέτρων επιβολής του νόμου καθώς και των υγειονομικών και κοινωνικών παρεμβάσεων για την αντιμετώπιση του προβλήματος των εξαρτησιογόνων ουσιών (EMCDDA, 2020· UNODC, 2020).

Αξίζει να τονιστεί, ότι τα άτομα που κάνουν χρήση ουσιών αντιμετωπίζουν πρόσθετους κινδύνους σε σχέση με το γενικό πληθυσμό αναφορικά με την πανδημία. Το ασθενές ανοσοποιητικό σύστημα, τους καθιστά πιο ευάλωτους στη λοίμωξη από κορωνοϊό. Ορισμένες συμπεριφορές των χρηστών, όπως είναι η από κοινού χρήση των τσιγάρων κάνναβης, αποδεικνύονται επικίνδυνες, όσο αφορά τον κίνδυνο μόλυνσης και μετάδοσης του ιού (EMCDDA, 2020)

Αυτή η υγειονομική κρίση οδήγησε σε επιδείνωση της ψυχικής υγείας και ευεξίας. Ο Taylor και οι συνεργάτες του, το 2021 πραγματοποίησαν μία έρευνα σε ένα δείγμα πληθυσμού 3075 ενηλίκων από την Αμερική και τον Καναδά, με σκοπό να συνδέσουν την κατάχρηση ουσιών με το άγχος που προκαλείται από την πανδημία. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το άγχος, η αγωνία και η αυτό-απομόνωση που συνοδεύονται με τον COVID-19 οδήγησαν σε αύξηση χρήσης ουσιών. Επίσης, παρατηρήθηκε, ότι τα άτομα τα οποία και στο παρελθόν κατανάλωναν ψυχαγωγικές εξαρτησιογόνες ουσίες κι αλκοόλ, αύξησαν την περίοδο αυτή τη χρήση τους (Taylor et al., 2021).

Κατά τη διάρκεια της πανδημίας, η ζήτηση της ηρωίνης παρέμεινε ανεπηρέαστη αλλά μειώθηκε η διαθεσιμότητά της. Έτσι, παρατηρήθηκε αντικατάστασή της, από άλλες ουσίες, όπως συνθετικά οπιοειδή, συνθετικές καθινόνες και αμφεταμίνη. Το εμπόριο και η προμήθειά της κοκαΐνης στην Ευρώπη, δεν υπέστησαν καμία διαταραχή. Όμως, η ζήτησή της ενδεχομένως να υπέστη μείωση, λόγω των κλειστών χώρων αναψυχής, στους οποίους χρησιμοποιείται η κοκαΐνη και άλλες διεγερτικές ουσίες. Η ζήτηση των συνθετικών εξαρτησιογόνων ουσιών βραχυπρόθεσμα μειώθηκε λόγω των κλειστών χώρων αναψυχής

(κυρίως MDMA). Οι χρήστες λόγω αύξησης των τιμών ορισμένων ουσιών, οδηγήθηκαν στην κατανάλωση αλκοόλ, σε λιγότερο ακριβές ουσίες και σε ενέσιμες. Προτιμήθηκαν ουσίες όπως οπιοειδή, νέα συνθετικά οπιοειδή και νέες βενζοδιαζεπίνες, οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν ένα χαλαρωτικό αποτέλεσμα και να καταναλωθούν στην απομόνωση (Zaami, et al., 2020).

3.Κατηγορίες εξαρτησιογόνων ουσιών

Οι εξαρτησιογόνες ουσίες διαφέρουν ως προς τη μεταβολική οδό, τον μηχανισμό δράσης, την πιθανότητα κατάχρησης, το είδος και την έκταση των επιδράσεων που προκαλούν στον ανθρώπινο οργανισμό (Room, 2001).

Αρχικά, οι εξαρτησιογόνες ουσίες κατανέμονται σε νόμιμες (νομικά αποδεκτές) και παράνομες (απαγορευμένες). Το αλκοόλ και το τσιγάρο θεωρούνται νόμιμες ενώ ουσίες όπως η κάνναβη και η κοκαΐνη παράνομες (Room, 2001). Η κατανομή τους μπορεί να γίνει και με βάση την ιατρική χρήση και την εθιστική τους ικανότητα (κατηγοριοποίηση σε Πίνακες) καθώς και με τον τρόπο αλληλεπίδρασης με τον οργανισμό (φαρμακολογική δράση). Στην παρούσα εργασία η κατηγοριοποίηση των μελετώμενων ουσιών γίνεται με βάση τη χημική δομή και τον μηχανισμό δράσης τους σε οπιούχα, οπιοειδή, αλκαλοειδή της κόκας και αμφεταμίνες-μεθαμφεταμίνες.

Οι ουσίες που βρίσκονται σε μία ίδια κατηγορία προκαλούν παρόμοια αποτελέσματα και κάθε κατηγορία έχει ξεχωριστές ιδιότητες (DEA, 2020). Η ακριβής ταξινόμηση όμως είναι συχνά δύσκολη, καθώς ορισμένες επιδράσεις συχνά αλληλεπικαλύπτονται.

Όταν η λήψη μίας εξαρτησιογόνου ουσίας δεν είναι σύμφωνη με τις ιατρικές πρακτικές αλλά με τρόπο και συχνότητα που μπορεί να επιφέρει βλάβες στη σωματική και πνευματική λειτουργία ενός ατόμου τότε γίνεται κατάχρηση ουσιών. Η κατάχρηση οδηγεί σε εθισμό με την ανάπτυξη εξάρτησης (σωματικής και ψυχικής) και ανοχής. Η απότομη διακοπή της λήψης της ουσίας, μετά την εγκατάσταση της εξάρτησης έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση συμπτωμάτων στέρησης, όπου ο οργανισμός «δυσανασχετεί» για την απουσία του φαρμάκου (Sahu K.K. & Sahu M., 2012). Παρακάτω ακολουθεί η εξήγηση αυτών των όρων:

3.1.Κατάχρηση ουσιών

Όλες οι εξαρτησιογόνες ουσίες μπορούν να προκαλέσουν κατάχρηση ή να αποτελέσουν άμεσους προδρόμους ουσιών που μπορούν να οδηγήσουν σε κατάχρηση. Οι ουσίες καταχρώνται για να προκαλέσουν αλλαγή στη διάθεση, στη σκέψη και στα συναισθήματα. Αυτό είναι εφικτό καθώς δρουν στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (εγκέφαλος και νωτιαίος μυελός). Ορισμένες ουσίες προσφέρουν ανακούφιση από τον πόνο, το άγχος ή την κατάθλιψη, αλλά τα ευχάριστα συναισθήματα και η ευφορία που προκαλούν συμβάλλουν στην κατάχρησή τους. Έτσι, όταν οι ουσίες δεν χρησιμοποιούνται με βάση τη νόμιμη ιατρική

πρακτική αλλά με ασύμβατο και μη επιτρεπόμενο τρόπο, τότε νοείται κατάχρηση ουσιών. Οι νέοι αποτελούν τον πιο ευάλωτο πληθυσμό για κατάχρηση ουσιών (DEA, 2020).

3.2. Εξάρτηση

Οι διάφορες ουσίες μπορούν να προκαλέσουν σωματική και ψυχική εξάρτηση. Η εξάρτηση προκύπτει από την επίδραση μιας ουσίας σε έναν οργανισμό. Τα άτομα νιώθουν συνεχώς την ανάγκη να λαμβάνουν ένα φάρμακο για να εκδηλωθεί εκ νέου η δράση και τα αποτελέσματά του ή για να αποφύγουν τα δυσάρεστα συμπτώματα που θα προέκυπταν με τη διακοπή λήψης του φαρμάκου. Ο βαθμός και το είδος της εξάρτησης καθορίζονται από το είδος της δραστικής ουσίας που τα εγκατέστησε (Κουτσελίνης, 1997).

Σωματική (φυσική) εξάρτηση

Όταν διακοπεί η λήψη μιας ουσίας η οποία χορηγείται επανειλημμένα μπορεί να προκληθούν αλλαγές στο σώμα (έντονες σωματικές διαταραχές) (Κουτσελίνης, 1997). Τα άτομα για να αποφύγουν το σύνδρομο στέρησης (έπειτα από διακοπή λήψης της ουσίας) προβαίνουν στη συνεχή χορήγηση φαρμάκου. Το σύνδρομο στέρησης κυμαίνεται από ελαφρώς δυσάρεστο έως απειλητικό για τη ζωή και εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως το είδος του φαρμάκου, τη δόση, τον τρόπο χορήγησης, τη συχνότητα, την ταυτόχρονη χρήση άλλων ουσιών, την ηλικία, τη φυσική κατάσταση και το φύλο του χρήστη. Η σωματική εξάρτηση μπορεί να εξαφανιστεί μετά κάποιες μέρες ή εβδομάδες από τη διακοπή της χρήσης της ουσίας (DEA, 2020).

Ψυχική εξάρτηση

Με τον όρο ψυχική εξάρτηση νοείται η ανάγκη ή η λαχτάρα των ατόμων για λήψη ενός φαρμάκου με σκοπό να βιώσουν ξανά μία ευχάριστη διέγερση (Κουτσελίνης, 1997). Τα άτομα αισθάνονται αδύναμα να λειτουργήσουν χωρίς να χρησιμοποιούν συνεχώς ένα συγκεκριμένο φάρμακο (DEA, 2020). Η ψυχολογική εξάρτηση διαρκεί περισσότερο από τη σωματική και έτσι τα άτομα αναγκάζονται να αρχίσουν ξανά τη λήψη μίας ουσίας (DEA, 2020).

3.3. Εθισμός

Στον εθισμό, μεταβάλλεται προοδευτικά η ευαισθησία ενός οργανισμού σε ένα φάρμακο το οποίο λαμβάνεται συνεχώς και του οποίου το αποτέλεσμα θα επιτευχθεί μόνο με σταδιακή αύξηση της χορηγούμενης δόσης. Οι χρήστες αναζητούν συνεχώς εξαρτησιογόνες ουσίες και

η αναζήτηση αυτή γίνεται η πιο σημαντική δραστηριότητα στη ζωή τους. Αδυνατούν να ελέγξουν και να περιορίσουν τη χρήση και συνεχίζουν τη λήψη παρά τις συνέπειες που προκύπτουν (Κουτσελίνης, 1997·DEA, 2020).

3.4. Ανοχή

Η ανοχή είναι μία προσαρμοστική κατάσταση, στην οποία ο οργανισμός χαρακτηρίζεται από μειωμένη ανταπόκριση στη λήψη της ίδιας ποσότητας μιας ουσίας που λαμβανόταν προηγουμένως. Με άλλα λόγια, χρειάζεται μεγαλύτερη ποσότητα από μία ουσία για να επιτευχθεί ο ίδιος βαθμός επίδρασης. Το φαινόμενο αυτό είναι πιο σύνηθες στις ουσίες που προκαλούν σωματική εξάρτηση. Ο όρος είναι πιο ευρύς από τον εθισμό (Κουτσελίνης, 1997).

3.5. Αντίστροφη ανοχή

Αντίστροφη ανοχή παρατηρείται όταν εκδηλωθεί εξάρτηση σε μια ουσία και η δράση και τα αποτελέσματά της, μπορούν να εκδηλωθούν με τη χορήγηση μικρότερης δόσης από της συνηθισμένης (Κουτσελίνης, 1997).

3.6. Κατηγοριοποίηση των εξαρτησιογόνων ουσιών σε Πίνακες

Το 1970 οι Ηνωμένες Πολιτείες θέσπισαν το νόμο περί ελεγχόμενων ουσιών (Controlled Substance Act, CSA) για την προστασία του κοινού από δυνητικά επικίνδυνες και εθιστικές εξαρτησιογόνες ουσίες (Ortiz & Preuss, 2023). Οι ελεγχόμενες ουσίες κατηγοριοποιούνται ανάλογα με την ιατρική τους χρήση, την πιθανότητα κατάχρησης και την εθιστική τους ικανότητα. Έτσι, οι ουσίες κατηγοριοποιούνται σε πέντε πίνακες (Schedules):

Πίνακας I

Στην κατηγορία αυτή ανήκουν ουσίες οι οποίες έχουν μεγάλη πιθανότητα κατάχρησης, δεν έχουν αποδεκτή ιατρική χρήση στις Ηνωμένες Πολιτείες και δεν υπάρχει αποδεκτή ασφάλεια στη χρήση τους. Περιλαμβάνονται ενώσεις όπως ηρωίνη, γ-υδροξυβουτυρικό οξύ (GHB), διαιθυλαμίδιο του λυσεργικού οξέος (LSD), μαριχουάνα, **MDA**.

Πίνακας II

Στην κατηγορία αυτή ανήκουν ουσίες (συνταγογραφούμενες) οι οποίες έχουν μεγάλη πιθανότητα κατάχρησης, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρή ψυχολογική ή σωματική εξάρτηση. Τα φάρμακα αυτά δεν έχουν αποδεκτή ιατρική χρήση (ή με αυστηρούς περιορισμούς) στις Ηνωμένες Πολιτείες και παραδείγματα τέτοιων ουσιών είναι **μορφίνη**, φαινυκλιδίνη, **κοκαΐνη**, **μεθαδόνη**, υδροκωδόνη, φεντανύλη, **μεθαμφεταμίνη**, **αμφεταμίνη**.

Πίνακας III

Οι ουσίες στην κατηγορία αυτή έχουν λιγότερες πιθανότητες κατάχρησης από τις ουσίες των Πινάκων II και I αλλά η κατάχρησή τους μπορεί να οδηγήσει σε χαμηλή ή μέτρια σωματική ή/και ψυχολογική εξάρτηση. Έχουν αποδεκτή ιατρική χρήση στις Ηνωμένες Πολιτείες και παραδείγματα αυτής της κατηγορίας αποτελούν αναβολικά στεροειδή, κεταμίνη, **κωδεΐνη** με ασπιρίνη και ορισμένα βαρβιτουρικά.

Πίνακας IV

Οι ουσίες που ανήκουν στον Πίνακα IV έχουν χαμηλή πιθανότητα κατάχρησης η οποία μπορεί να οδηγήσει σε περιορισμένη σωματική ή ψυχολογική εξάρτηση σε σχέση με τις ουσίες του Πίνακα III. Τα φάρμακα αυτά έχουν αποδεκτή ιατρική χρήση στις Ηνωμένες Πολιτείες και στην κατηγορία αυτή ανήκουν ουσίες όπως αλπραζολάμη, κλοναζεπάμη και διαζεπάμη.

Πίνακας V

Στην κατηγορία αυτή, οι ουσίες έχουν χαμηλότερη πιθανότητα κατάχρησης σε σχέση με εκείνες του Πίνακα IV και η κατάχρησή τους μπορεί να οδηγήσει σε περιορισμένη εξάρτηση. Η ιατρική χρήση των φαρμάκων είναι αποδεκτή στις Ηνωμένες Πολιτείες και κοινά παραδείγματα της κατηγορίας αυτής αποτελούν τα φάρμακα για την αντιμετώπιση του βήχα τα οποία περιέχουν κωδεΐνη (DEA, 2017).

3.7. Κατηγοριοποίηση των εξαρτησιογόνων ουσιών με βάση τη φαρμακολογική δράση τους

Οι εξαρτησιογόνες ουσίες μπορούν να ταξινομηθούν και με βάση τον τρόπο αλληλεπίδρασής τους με τον εγκέφαλο και το σώμα (DEA, 2017). Έτσι, οι εξαρτησιογόνες ουσίες κατηγοριοποιούνται και ως εξής:

1. Ναρκωτικά αναλγητικά ή οπιοειδή. Οι ουσίες αυτές είναι ικανές να αμβλύνουν τις αισθήσεις και να ανακουφίσουν τον πόνο, χωρίς να προκαλέσουν απώλεια συνείδησης. Όμως, μπορούν να προκαλέσουν φυσική ή σωματική εξάρτηση. Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται φυσικά αλκαλοειδή του οπίου (π.χ. **μορφίνη, κωδεΐνη**), ημισυνθετικά οπιούχα (π.χ. **ηρωίνη**, οξυκωδόνη, υδροκωδόνη) και συνθετικά ναρκωτικά αναλγητικά (π.χ. **μεθαδόνη**, φεντανύλη). Τα φυσικά αλκαλοειδή του οπίου παρασκευάζονται από το όπιο, τον αποξηραμένο οπό των άωρων κωδίων του φυτού *Papaversomniferum*, αυτοφυούς στη Μικρά Ασία. Τα ημισυνθετικά οπιοειδή συντίθενται από τα φυσικά προϊόντα του οπίου ενώ τα συνθετικά οπιοειδή παρασκευάζονται εξ ολοκλήρου σε εργαστήριο (Κουτσελίνης, 1997· DEA, 2017).
2. Διεγερτικά του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ). Στην κατηγορία αυτή ανήκει μία ποικιλία ουσιών οι οποίες έχουν διαφορετική χημική δομή και φαρμακολογική δράση αλλά μπορούν να προκαλέσουν διέγερση των συστημάτων του σώματος (Κουτσελίνης, 1997). Αυτή η κατηγορία φαρμάκων περιλαμβάνει διάφορα συνταγογραφούμενα φάρμακα, συμπληρώματα διατροφής και παράνομα φάρμακα όπως **αμφεταμίνη, μεθαμφεταμίνη και κοκαΐνη** (DEA, 2017).
3. Κατασταλτικά του ΚΝΣ. Οι ουσίες στην κατηγορία αυτή διευκολύνουν τον ύπνο και βοηθούν στην ανακούφιση από το άγχος και τους μυϊκούς σπασμούς. Στα κατασταλτικά ανήκουν πολλές φαρμακευτικές ουσίες, κυρίως συνθετικής προέλευσης με τις κυριότερες να περιλαμβάνουν τα βαρβιτουρικά, άλλα υπνωτικά και αγχολυτικά όπως οι βενζοδιαζεπίνες αλλά και κάποια παράνομα όπως το γ-υδροξυβουτυρικό οξύ (GHB) (Κουτσελίνης, 1997· DEA, 2017).
4. Παραισθησιογόνα-Ψευδαισθησιογόνα. Οι ουσίες αυτές, είναι δραστικά συστατικά ορισμένων φυτών και μυκήτων ή είναι συνθετικές και ημισυνθετικές ουσίες που παρασκευάζονται στο εργαστήριο. Τα παραισθησιογόνα μπορούν να αλλάξουν την αντίληψη, τη διάθεση και το θυμικό του ανθρώπου. Μεταξύ των κυριότερων ουσιών συγκαταλέγονται τα παραισθησιογόνα μανιτάρια, LSD, **MDA** (Κουτσελίνης, 1997· DEA, 2017).

Στην κατηγορία αυτή επίσης ανήκουν τα κανναβινοειδή (μαριχουάνα). Η μαριχουάνα είναι μία ψυχοτρόπος ουσία που παράγεται από το φυτό *Cannabis sativa*. Το δραστικό

συστατικό είναι Δ9–τετραϋδροκανναβινόλη (Δ9–THC). Η μαριχουάνα μπορεί να προκαλέσει επίσης κατασταλτικά και διεγερτικά αποτελέσματα στο ΚΝΣ (DEA, 2017).

5. Οργανικοί διαλύτες και ατμοί. Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει μία ποικιλία χημικών ουσιών που μπορούν να προκαλέσουν ευφορία και εξάρτηση με την εισπνοή του αερίου ή των ατμών που αναδύονται από τον διαλύτη (Κουτσελίνης, 1997). Μια ποικιλία οικιακών και άλλων προϊόντων με βάση οργανικούς διαλύτες και αέρια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να προκαλέσουν ψυχοδραστικό αποτέλεσμα. Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται προϊόντα όπως το διορθωτικό υγρό, το ψυκτικό μέσο κλιματισμού, οι μαρκαδόροι και τα χρώματα, το αποσμητικό χώρου, το βουτάνιο, η βενζίνη κ.α.(DEA, 2017).
6. Αναβολικά στεροειδή. Οι ενώσεις αυτές είναι συνθετικές και αποτελούν παραλλαγή της φυσικής ανδρικής ορμόνης τεστοστερόνης. Η κατάχρησή τους έχει ως στόχο την αύξηση της ανάπτυξης των μυών, την ενίσχυση της φυσικής και της αθλητικής απόδοσης. Παραδείγματα αποτελούν η τεστοστερόνη, η νανδρολόνη, η μεθανδιενόνη, η στανοζολόλη (DEA, 2017).

3.8. Μελετώμενες ουσίες στην παρούσα εργασία

Οι ουσίες στόχοι της παρούσας διατριβής μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε οπιούχα, οπιοειδή, αμφεταμίνες-μεθαμφεταμίνες και αλκαλοειδή της κόκας.

3.8.1.Οπιούχα: μορφίνη, 6-μονοακέτυλο μορφίνη, κωδεΐνη

❖ Μορφίνη

Η μορφίνη αποτελεί το κατ' εξοχή ναρκωτικό αναλγητικό. Είναι λευκή κρυσταλλική σκόνη, άοσμη, με πικρή γεύση και, όπως έχει αναφερθεί, είναι αλκαλοειδές που περιέχεται στο όπιο και ανήκει στα παράγωγα του φαινανθρενίου (Κουτσελίνης, 1997). Η κύρια δράση της μορφίνης απευθύνεται στο ΚΝΣ όπου μπορεί να δράσει παραλυσικά ή διεγερτικά (Κουτσελίνης, 1997). Είναι ιδιαίτερα σημαντική στη θεραπευτική, καθώς μπορεί να ανακουφίσει το μέτριο έως έντονο πόνο σχεδόν κάθε πάθησης, ακόμα και σε ασθενείς με καρκίνο. Έχει επίσης χορηγηθεί σε ασθενείς για τη θεραπεία του εμφράγματος του

μυοκαρδίου (Dewey, 2007) και σε άτομα που πάσχουν από μυοσκελετικούς πόνους, κοιλιακό άλγος, πόνο στο στήθος, αρθρίτιδα και πονοκεφάλους (Murphy et al., 2021).

Οδοί χορήγησης

Οι κύριοι τρόποι χορήγησης της μορφίνης είναι μέσω του στόματος, ενδοφλέβια, επισκληρίδια και ενδορραχιαία. Μπορεί να χορηγηθεί και ενδομυϊκά ενώ είναι επίσης διαθέσιμη και ως υπόθετο. Επιπλέον, η μορφίνη μπορεί να προσληφθεί και μέσω της εισπνοής και να απορροφηθεί από το ρινικό βλεννογόνο (Murphy et al., 2021).

Μηχανισμός δράσης

Η μορφίνη έχει συγγένεια με τους δ, κ και μ υποδοχείς οπιοειδών αλλά δρα κυρίως δεσμεύοντας τον μ υποδοχέα εντός του ΚΝΣ και του περιφερικού νευρικού συστήματος (Murphy et al., 2021).

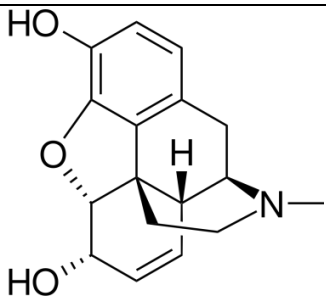
Οι μ υποδοχείς ευθύνονται για την αναλγησία, την αναπνευστική καταστολή, την ευφορία, τη νάρκωση, τη μειωμένη γαστρεντερική κινητικότητα και τη σωματική εξάρτηση. Οι κ υποδοχείς είναι υπεύθυνοι για την αναλγησία, τη νάρκωση, τη δύσπνοια, την εξάρτηση, τη δυσφορία και την αναπνευστική καταστολή. Οι δ υποδοχείς ίσως ευθύνονται για τις ψυχομιμητικές και τις δυσφορικές δράσεις (Korecky, 2019).

Ανεπιθύμητες ενέργειες

Η μορφίνη μπορεί να προκαλέσει χρόνια ή οξεία δηλητηρίαση. Η ευαισθησία του κάθε ατόμου καθώς και η λαμβανόμενη δόση καθορίζουν τα συμπτώματα και την εξέλιξή τους. Στα συμπτώματα της οξείας δηλητηρίασης μεταξύ άλλων περιλαμβάνονται η εφίδρωση, η ναυτία, ο εμετός, η διάρροια, οι σπασμοί ακόμα και το κώμα και ο θάνατος. Η χρόνια δηλητηρίαση εκδηλώνεται με ψυχικές (διέγερση, ευφορία, μειωμένη αντίληψη και μνήμη, πλήρης αδυναμία) και λειτουργικές διαταραχές (μείωση εκκρίσεων και όρεξης, δυσλειτουργία βασικών οργάνων, δερματοπάθειες, προβλήματα στα νύχια και στα δόντια, αυξημένα αντανεκλαστικά, δυσκολία στην ομιλία, αϋπνίες). Η τοξική δόση της μορφίνης για τους ενήλικες οι οποίοι δεν έχουν εθιστεί σε αυτή υπολογίζεται σε 50-60 mg ενώ η θανατηφόρος δόση σε 100-200 mg. Στα παιδιά μπορεί να προκληθεί θανατηφόρος δηλητηρίαση ακόμα και με δόση μικρότερη των 10 mg (Κουτσελίνης, 1997).

Η χημική δομή, ο χημικός τύπος και οι ιδιότητες της μορφίνης συνοψίζονται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1. Χημική δομή, χημικός τύπος και κυριότερες ιδιότητες της μορφίνης.

Χημική δομή	
Χημικός τύπος	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃
Μοριακό βάρος (g/mol)	285.34
LogKow	0.89
pKa	8.18
Διαλυτότητα	Νερό: σχεδόν αδιάλυτη Μεθανόλη: διαλυτή

❖ **6-Μono ακετυλο μορφίνη (6-MAM)**

Η 6-MAM αποτελεί μεταβολίτη της ηρωίνης. Η ηρωίνη είναι ένα εθιστικό και ευρέως χρησιμοποιούμενο οπιούχο που συντίθεται από τη μορφίνη. Είναι ημισυνθετικό ναρκωτικό και είχε χρησιμοποιηθεί για την ανακούφιση του μέτριου έως του έντονου πόνου. Πλέον, δεν έχει καμία φαρμακευτική χρήση (Hiotis, 2005· Qian et al., 2020).

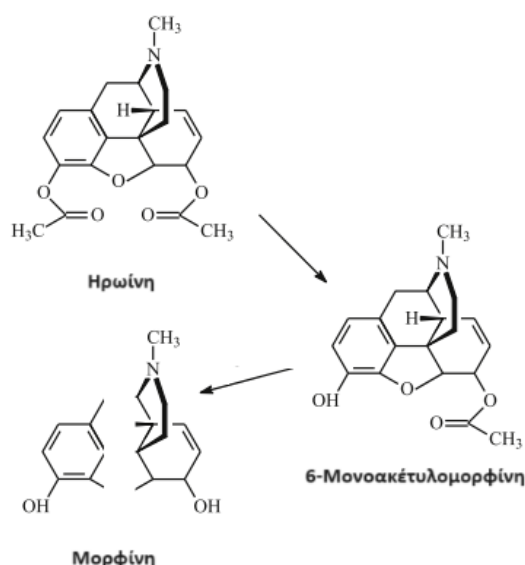
Οδοί χορήγησης

Η λήψη της ηρωίνης μπορεί να είναι παρεντερική, υπογλώσσια, από του στόματος, από το ορθό ή με ρινική εμφύσηση (Hiotis, 2005)

Μηχανισμός δράσης

Η ηρωίνη, λόγω της υψηλής λιποφιλικότητας της, εισέρχεται γρήγορα στο ΚΝΣ αλλά διασπάται σύντομα. Η δράση της ηρωίνης, παρόμοια με τα άλλα οπιοειδή, οφείλεται στη φαρμακολογική δράση στους υποδοχείς μ , κ και δ στο σώμα. Με την ενδοφλέβια χορήγηση η ηρωίνη αρχικά μεταβολίζεται σε 6-MAM και στη συνέχεια σε μορφίνη (εικόνα 3). Διάφορες εστεράσεις συμβάλουν στην υδρόλυση της ηρωίνης σε 6-MAM όπως η βουτυρυλοχολινεστεράση (BChE), η καρβοξυλεστεράση 1 (CES1) και η καρβοξυλεστεράση 2 (CES2). Η περαιτέρω υδρόλυση της 6-MAM σε μορφίνη επιτυγχάνεται από τα ερυθροκύτταρα, την ακετυλοχολινεστεράση (AChE), τη CES1 και τη CES2. Οι μεταβολίτες αυτοί είναι υπεύθυνοι για την ανακούφιση του πόνου.

Επιπλέον, έχουν υψηλή συγγένεια με τους μ υποδοχείς ενώ η ηρωίνη έχει βραχύβια παρουσία σε πλάσμα και εγκέφαλο, πολύ χαμηλότερη συγγένεια με τους υποδοχείς και έτσι εγγενή αποτελεσματικότητα. Είναι σαφές ότι, η επίδραση του φαρμάκου είναι αποτέλεσμα των μεταβολιτών της. Η 6-MAM είναι ο κύριος μεταβολίτης της ηρωίνης που είναι υπεύθυνος για τις ψυχοδραστικές και νευρικές επιδράσεις της και για την πρόωμη αύξηση της ντοπαμίνης. Η 6-MAM, μετά από την ενδοφλέβια χορήγηση της ηρωίνης, βρίσκεται σε μέγιστη συγκέντρωση στο σώμα σε 0.3-2.7 λεπτά (Hiotis, 2005· Gottås et al., 2014· Perekopskiy & Kiyatkin, 2019· Qian et al., 2020).



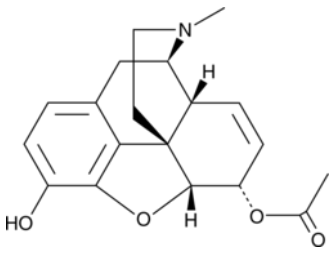
Εικόνα 3. Υδρόλυση ηρωίνης από εστεράσες στους ανθρώπους (Qian et al., 2020).

Ανεπιθύμητες ενέργειες

Οι κυριότερες ανεπιθύμητες ενέργειες της ηρωίνης οφείλονται στους μεταβολίτες της. Μπορεί να γίνει τοξική σε οποιαδήποτε ποσότητα ειδικά όταν είναι περιορισμένης καθαρότητας. Αρχικά, προκαλεί ευφορία κι ανακούφιση από τον πόνο. Προκαλεί καταστολή στο ΚΝΣ και μπορεί ακόμα να οδηγήσει σε κώμα. Επιπλέον, η κατανάλωσή της μπορεί να προκαλέσει πνευμονικό οίδημα, ναυτία, μύωση, υποξία, βραδυκαρδία, υποθερμία, υπόταση και αναπνευστική ανακοπή. Η ανοχή είναι συχνή στους χρόνιους χρήστες οι οποίοι αναζητούν μεγαλύτερες δόσεις για να βιώσουν τα συμπτώματα της ηρωίνης (Hiotis, 2005).

Η χημική δομή, ο χημικός τύπος και οι βασικές ιδιότητες της 6-Μονοακέτυλο μορφίνης συνοψίζονται στον πίνακα 2.

Πίνακας 2. Δομή, τύπος και βασικές ιδιότητες της 6- Μονοακέτυλο μορφίνης.

Χημική δομή	
Χημικός τύπος	C ₁₉ H ₂₁ NO ₄
Μοριακό βάρος (g/mol)	327.4
LogKow	1.9
pKa	9.08
Διαλυτότητα	Μεθανόλη: ελάχιστα διαλυτή Νερό: σχεδόν αδιάλυτη

❖ Κωδεΐνη

Αποτελεί αλκαλοειδές που λαμβάνεται από το όπιο ή από τη μορφίνη με μεθυλίωση και ανήκει στα παράγωγα του φαινανθρενίου. Ονομάζεται και μεθυλομορφίνη και έχει αναλγητικές, καταπραυντικές, ηρεμιστικές και αντιπερισταλτικές (αναστέλλουν τις κινήσεις του εντέρου) ιδιότητες ενώ συνιστάται επίσης στη φυματίωση και στην αϋπνία. Η κωδεΐνη χρησιμοποιείται ευρέως στην ανακούφιση του χρόνιου και του οξέος πόνου συμπεριλαμβανομένου ασθενών που υποφέρουν από καρκίνο και από τραύμα στο κεφάλι. Θεωρείται λιγότερη εθιστική ουσία σε σχέση με τη μορφίνη. Συχνά, παρατηρείται η λήψη της κωδεΐνης σε συνδυασμό με άλλα φάρμακα όπως αναλγητικά, αντισταμινικά, αποχρεμπτικά, ηρεμιστικά ακόμα και με καφεΐνη (Κουτσελίνης, 1997· Bhandari et al., 2011· Tay & Roberts, 2018).

Οδοί χορήγησης

Η χορήγηση της κωδεΐνης είναι συχνότερη από το στόμα, ως δισκίο, κάψουλα, σιρόπι ή υγρό διάλυμα. Χορηγείται επίσης και ενδομυϊκά (Kane, 2007).

Μηχανισμός δράσης

Ο μηχανισμός δράσης των οπιοειδών, συμπεριλαμβανομένης της κωδεΐνης, ορίζονται από τη δράση τους σε τρεις συγκεκριμένους τύπους υποδοχέων οπιοειδών στο σώμα: δ, μ και κ υποδοχείς, οι οποίοι αναφέρθηκαν στο υποκεφάλαιο της μορφίνης (Kane, 2007).

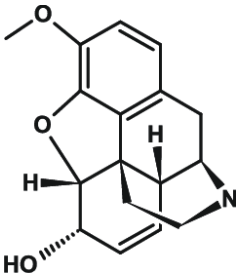
Ανεπιθύμητες ενέργειες

Η κωδεΐνη μπορεί να προκαλέσει οξεία δηλητηρίαση και εκδήλωση διάφορων συμπτωμάτων όπως υπνηλία, δυσφορία, ζάλη και αλλεργική αντίδραση. Παρατηρούνται προβλήματα στο καρδιαγγειακό σύστημα (υπόταση), στο ουροποιητικό σύστημα (κατακράτηση ούρων), στους αεραγωγούς των πνευμόνων (αναπνευστική καταστολή) και στο γαστρεντερικό (πόνος στο στομάχι). Η επαναλαμβανόμενη χρήση της κωδεΐνης μπορεί να οδηγήσει τα άτομα σε χρόνια τοξικότητα η οποία να προκαλέσει ανοχή, σωματική εξάρτηση ή/και εθισμό. Η υπερβολική δόση οδηγεί σε επιβράδυνση των λειτουργιών του ΚΝΣ και έτσι το άτομο μπορεί να βρεθεί σε κώμα ακόμη και στον θάνατο (Kane, 2007).

Η παρατήρηση θανάτων δεν είναι συχνή ενώ η θανατηφόρος δόση κυμαίνεται από 500 mg και 1 g (Κουτσελίνης, 1997).

Η χημική δομή, ο χημικός τύπος και οι ιδιότητες της κωδεΐνης συνοψίζονται στον πίνακα 3.

Πίνακας 3. Δομή, χημικός τύπος και κυριότερες ιδιότητες της κωδεΐνης

Χημική δομή	
Χημικός τύπος	C ₁₈ H ₂₁ NO ₃
Μοριακό βάρος (g/mol)	299.4
LogKow	1.19
Pka	8.2
Διαλυτότητα	Νερό και αλκοόλες: διαλυτή

3.8.2.Οπιοειδή: μεθαδόνη

❖ Μεθαδόνη

Είναι ένα συνθετικό οπιοειδές, παράγωγο του διφαινυλοεπτανίου, το οποίο διατίθεται στο εμπόριο. Λειτουργεί ως ένας τυπικός αγωνιστής των μ υποδοχέων των οπιοειδών με φαρμακολογικές ιδιότητες παρόμοιες της μορφίνης (Κουτσελίνης, 1997).

Η μεθαδόνη είναι εγκεκριμένη από τον FDA (Food and Drug Administration) για την ανακούφιση του μέτριου έως σοβαρού πόνου σε περιπτώσεις όπου η χρήση μη οπιοειδών φαρμάκων ή ακόμα και άλλων οπιοειδών δεν έχει ανταποκριθεί. Ως αναλγητικό χρησιμοποιείται επίσης σε καρκινοπαθείς ή άλλους ασθενείς που βρίσκονται σε τελικό στάδιο και σε διάφορες παθήσεις με χρόνιο πόνο. Επιπροσθέτως, χρησιμοποιείται για την αποτοξίνωση από τα οπιοειδή και για την αποφυγή του κινδύνου υποτροπιάσης (Durrani & Bansal, 2021).

Οδοί χορήγησης

Οι τρόποι χορήγησης της μεθαδόνης είναι μέσω του στόματος (δισκίο ή συμπυκνωμένο σιρόπι), ενδοφλέβια, ενδομυϊκά, υποδόρια, επισκληρίδια και ενδορραχιαία (Durrani & Bansal, 2021).

Μηχανισμός δράσης

Η μεθαδόνη είναι ένας πλήρης αγωνιστής των μ-υποδοχέων των οπιοειδών και επάγει άλλους υποδοχείς οπιοειδών. Η ενεργοποίηση των μ-υποδοχέων από τη μεθαδόνη θα επάγει διάφορα αποτελέσματα, όπως την αναστολή της μετάδοσης του αισθήματος του πόνου από το νωτιαίο μυελό και θα συμβάλλει σε λιγότερη ανοχή στα οπιοειδή (Durrani & Bansal, 2021).

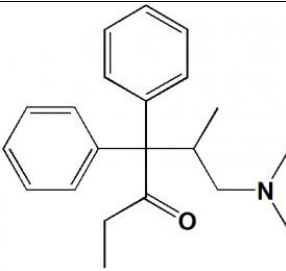
Επίσης, η μεθαδόνη είναι ένας μη ανταγωνιστικός ανταγωνιστής του υποδοχέα N-methyl-d-aspartate (NMDA). Αυτή η ιδιότητα της μεθαδόνης πιθανώς ενισχύει τα οφέλη για την ανακούφιση του νευροπαθητικού πόνου (Durrani & Bansal, 2021).

Ανεπιθύμητες ενέργειες

Οι ανεπιθύμητες ενέργειες της μεθαδόνης σχετίζονται με την υπερβολική δραστηριότητα των υποδοχέων των οπιοειδών. Σε αυτές περιλαμβάνονται ο κνησμός, η εφίδρωση, η ναυτία, η ξηρότητα του στόματος, η δυσκοιλιότητα, η υπνηλία, η υπόταση, οι σπασμοί, η καρδιακή δυσλειτουργία και η αναπνευστική καταστολή. Τα άτομα μπορούν να οδηγηθούν σε ανοχή και σωματική εξάρτηση. Η υπερβολική δόση μπορεί να οδηγήσει σε κώμα ακόμα και θάνατο (Toombs & Kral, 2005· Durrani & Bansal, 2021).

Η χημική δομή, ο χημικός τύπος και οι βασικές ιδιότητες της μεθαδόνης συνοψίζονται στον πίνακα 4.

Πίνακας 4. Δομή, χημικός τύπος και βασικές ιδιότητες της μεθαδόνης.

Χημική δομή	
Χημικός τύπος	C ₂₁ H ₂₇ NO
Μοριακό βάρος (g/mol)	309.4
LogKow	3.93
pKa	9.2
Διαλυτότητα υδροχλωρικής μεθαδόνης	Νερό και αλκοόλες: διαλυτή

3.8.3. Αμφεταμίνες-μεθαμφεταμίνες: αμφεταμίνη, μεθαμφεταμίνη, 3,4-μεθυλενοδιοξαμφεταμίνη

❖ Αμφεταμίνη

Η αμφεταμίνη είναι μια συμπαθομιμητική ένωση που προέρχεται από τη φαιαιθυλαμίνη (Aronson, 2016). Οι αμφεταμίνες, αποτελούν διεγερτικά του ΚΝΣ και είχαν χρησιμοποιηθεί ευρέως στη θεραπευτική. Έχουν χρησιμοποιηθεί για την αντιμετώπιση της ναρκοληψίας, της υπερκινητικότητας των παιδιών και της παχυσαρκίας μετά από ιατρική ένδειξη (Κουτσελίνης, 1997).

Οδοί χορήγησης

Η αμφεταμίνη προσλαμβάνεται μέσω της εισπνοής και απορροφάται από το ρινικό βλεννογόνο ή εγχέεται ενδοφλεβίως (Waller & Sampson, 2018).

Μηχανισμός δράσης

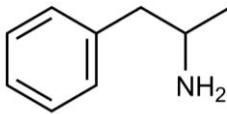
Η δράση της έγκειται στην απελευθέρωση κατεχολαμινών (ντοπαμίνης, επινεφρίνης, νορεπινεφρίνης) στους κεντρικούς συναπτικούς χώρους και στην επαναπρόσληψή τους από τις νευρικές απολήξεις. Τα επίπεδα των συγκεντρώσεων των ενδογενών νευροδιαβιβαστών στις συνάψεις είναι υψηλά για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, οι ανταποκρινόμενοι στη διέγερση νευρώνες να επηρεάζονται θετικά (Κουτσελίνης, 1997).

Ανεπιθύμητες ενέργειες

Τα συμπτώματα που προκαλούνται από την πρόσληψη της αμφεταμίνης είναι ανάλογα με τη ληφθείσα δόση. Αρχικά, η αμφεταμίνη θα προκαλέσει ευφορία, διέγερση, μειωμένη κόπωση και ανορεξία. Στα συμπτώματα της οξείας τοξικότητας περιλαμβάνονται οι παραισθήσεις, η σύγχυση, η παράνοια, η επιθετική συμπεριφορά, ο πανικός, ο τρόμος, η υπερθερμία, η υπέρταση και οι καρδιακές αρρυθμίες. Από τα συνηθέστερα προβλήματα που παρατηρούνται στους χρήστες αμφεταμινών είναι η ανοχή σε κεντρικές δράσεις τους (ανορεξιογόνο και ευφορική δράση) με αποτέλεσμα την αύξηση της δόσης. Η συνεχής χρήση αμφεταμίνης μπορεί να οδηγήσει σε τοξική ψύχωση, σε μείωση των σπασμών και εν τέλει στον θάνατο. Τέλος, η δόση που προκαλεί οξεία τοξικότητα και θάνατο ποικίλλει (Κουτσελίνης, 1997· Waller & Sampson, 2018).

Η χημική δομή, ο χημικός τύπος και οι βασικές ιδιότητες της αμφεταμίνης συνοψίζονται στον πίνακα 5.

Πίνακας 5. Δομή, χημικός τύπος και βασικές ιδιότητες της αμφεταμίνης.

Χημική δομή	
Χημικός τύπος	C ₉ H ₁₃ N
Μοριακό βάρος (g/mol)	135.21
LogKow	1.76
pKa	9.9
Διαλυτότητα υδροχλωρικής αμφεταμίνης	Νερό και μεθανόλη: διαλυτή

❖ Μεθαμφεταμίνη

Η μεθαμφεταμίνη είναι ένα ισχυρό, εξαιρετικά εθιστικό διεγερτικό που επηρεάζει το ΚΝΣ. Είναι χημικά παρόμοια με την αμφεταμίνη. Η πιο συχνή μορφή της είναι η κρυσταλλική μεθαμφεταμίνη. Η μεθαμφεταμίνη απαντάται μετά από επεξεργασία και σε λευκή ή υπόλευκη σκόνη με λίγο πικρή γεύση (NIDA, 2019· Edinoff et al., 2022).

Οδοί χορήγησης

Ανάλογα τη διαθέσιμη μορφή ποικίλουν και οι τρόποι χορήγησης. Η μεθαμφεταμίνη μπορεί να καπνιστεί, να εγχυθεί, να ληφθεί δια του στόματος ή να προσληφθεί μέσω της εισπνοής και να απορροφηθεί από το ρινικό βλεννογόνο (NIDA, 2019· Edinoff et al., 2022).

Μηχανισμός δράσης

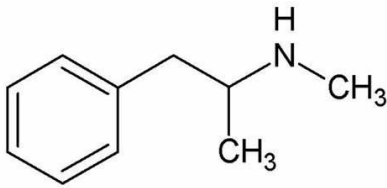
Ο μηχανισμός δράσης της μεθαμφεταμίνης είναι όμοιος με της αμφεταμίνης. Βασίζεται στην απελευθέρωση μεγάλων ποσοτήτων ντοπαμίνης. Η ντοπαμίνη εμπλέκεται στα συστήματα του εγκεφάλου που σχετίζονται με πράξεις με ένα σκοπό, το κίνητρο, την κινητική λειτουργία, με τελικό αποτέλεσμα την απελευθέρωσή της στο κύκλωμα ανταμοιβής (χαρακτηριστικό των εθιστικών φαρμάκων). Η απελευθέρωση της ντοπαμίνης στο κύκλωμα ανταμοιβής οδηγεί τον εγκέφαλο σε μία κατάσταση να θέλει να επαναλάβει την λήψη της ουσίας για να βιώσει ξανά την ευφορία, την πνευματική οξύτητα και τη θετική διάθεση (Edinoff et al., 2022).

Ανεπιθύμητες ενέργειες

Η λήψη της μεθαμφεταμίνης μπορεί να προκαλέσει μία ποικιλία συμπτωμάτων όπως πόνο στο στήθος, τρέμουλο, δύσπνοια ακόμα και έμφραγμα του μυοκαρδίου. Η εν λόγω ουσία επηρεάζει το ΚΝΣ και τα άτομα βιώνουν έντονη διέγερση, άγχος, ψευδαισθήσεις, παραισθήσεις και επιληπτικές κρίσεις. Η συνεχής χρήση της μπορεί να οδηγήσει σε ψύχωση και ψυχιατρικές διαταραχές. Η μεθαμφεταμίνη είναι υπεύθυνη για προβλήματα στα δόντια και στο δέρμα, ακραία απώλεια βάρους, γρήγορη αναπνοή και προβλήματα στον ύπνο. Η πρόκληση εγκεφαλικής αγγειίτιδας, η οποία προκαλεί φλοιώδη τύφλωση και ισχαιμικά εγκεφαλικά επεισόδια έχει επίσης αναφερθεί. Σε περιπτώσεις υπερδοσολογίας, προκαλείται θάνατος από εγκεφαλικό επεισόδιο, καρδιακή ανακοπή ή ανεπάρκεια πολλών οργάνων που τα προκαλεί η αυξημένη θερμοκρασία του σώματος (NIDA, 2019· Edinoff et al., 2022).

Η χημική δομή, ο τύπος και οι βασικές ιδιότητες της μεθαμφεταμίνης συνοψίζονται στον πίνακα 6.

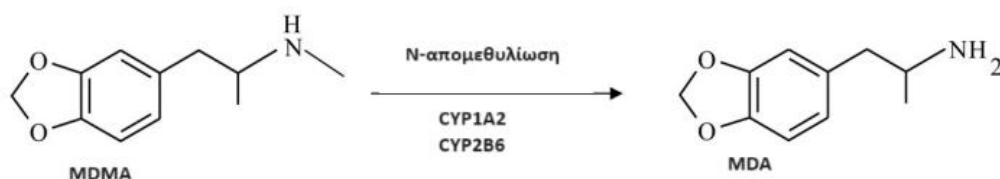
Πίνακας 6. Δομή, χημικός τύπος και βασικές ιδιότητες της μεθαμφεταμίνης.

Χημική δομή	
Χημικός τύπος	C ₁₀ H ₁₅ N
Μοριακό βάρος (g/mol)	149.23
LogKow	2.07
pKa	9.87
Διαλυτότητα υδροχλωρικής μεθαμφεταμίνης	Νερό και μεθανόλη: διαλυτή

❖ 3,4-Μεθυλενοδιοξαμεταμίνη (MDA)

Η MDA είναι παράγωγο αμφεταμίνης και μέλος ομάδας ουσιών που είναι γνωστά ως "Ecstasy", είναι δηλαδή παραισθησιογόνο. Σε αυτήν περιλαμβάνεται και η μεθυλενοδιοξυμεθαμφεταμίνη (MDMA) (Cunha-Oliveira et al., 2013· Hutchings & Widdop, 2013).

Η MDMA μεταβολίζεται σε MDA ακολουθώντας μία δευτερεύουσα μεταβολική οδό. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται με απομεθυλίωση από το ένζυμο Κυτόχρωμα P450 (CYP1A2 & CYP2B6) και απεικονίζεται στην εικόνα 4 (Mueller et al., 2011).



Εικόνα 4. Δευτερεύουσα μεταβολική οδό της MDMA σε MDA (Mueller et al., 2011).

Η MDA Έχει μη ιατρικές χρήσεις από το 1960 ενώ παλιά είχε χρησιμοποιηθεί ως αντιβηχικό και ανορεξιογόνο (Climko et al., 1987).

Οδοί χορήγησης

Η MDA μπορεί να ληφθεί από το στόμα και ενδοφλεβίως (Hutchings & Widdop, 2013).

Μηχανισμός δράσης

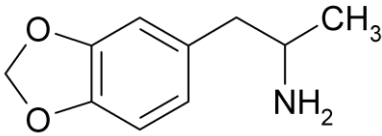
Η MDA είναι πιο νευροτοξική από την MDMA. Η δράση της έγκειται στην απελευθέρωση μονοαμινών και στην καταστροφή των νευρώνων που παράγουν σερετονίνη, οι οποίοι ρυθμίζουν την επιθετικότητα, τη διάθεση, τη σεξουαλική δραστηριότητα, τον ύπνο και την ευαισθησία στον πόνο (Cunha-Oliveira et al., 2013).

Ανεπιθύμητες ενέργειες

Η MDA αρχικά προκαλεί ευφορία, αλλοιωμένη αίσθηση της πραγματικότητας και του χρόνου και αισθήματα ικανοποίησης. Η λήψη της προκαλεί ψευδαισθήσεις με απώλεια αισθητηριακής ή αντιληπτικής ικανότητας, αυξημένη νευρική δραστηριότητα και γνωστικές αλλοιώσεις. Σε μεγάλες δόσεις μπορεί να προκαλέσει ημικρανία, επιληπτικές κρίσεις, διέγερση, τρόμο, ταχυκαρδία, υπέρταση, υπερθερμία, μυϊκή ακαμψία, υπεραερισμό και να οδηγήσει τους χρήστες ακόμα και σε κώμα (Baggott et al., 2010· Hutchings & Widdop, 2013).

Η χημική δομή, ο χημικός τύπος και οι βασικές ιδιότητες της 3,4-Μεθυλενοδιοξαμ페ταμίνη συνοψίζονται στον πίνακα 7.

Πίνακας 7. Δομή, χημικός τύπος και βασικές ιδιότητες της 3,4-Μεθυλενοδιοξαμ페ταμίνη.

Χημική δομή	
Χημικός τύπος	C ₁₀ H ₁₃ NO ₂
Μοριακό βάρος	179.22
LogKow	1.64
pKa	9.67
Διαλυτότητα υδροχλωρικής 3,4-Μεθυλενοδιοξαμ페ταμίνης	Νερό και μεθανόλη: διαλυτή

3.8.4.Αλκαλοειδή της κόκας: κοκαΐνη και μεταβολίτες

❖ Κοκαΐνη

Η κοκαΐνη είναι ένα αλκαλοειδές και λαμβάνεται από τα φύλλα του φυτού *Erythroxylum coca* και άλλα είδη *Erythroxylum* στη Νότια Αμερική. Είναι μία εθιστική ουσία που προκαλεί διέγερση και χρησιμοποιείται σε 2 κύριες μορφές: κοκαΐνη σε σκόνη και κρακ (Ryan, 2019).

Η μορφή βάσης (κρακ κοκαΐνη) και η μορφή άλατος (υδροχλωρική κοκαΐνη), θα παραχθούν από την εκχύλιση της κοκαΐνης από τα φύλλα του φυτού. Οι δύο αυτές μορφές έχουν την ίδια φαρμακολογική δράση αλλά διαφέρουν ως προς τις φυσικές ιδιότητες (Ryan, 2019).

Οδοί χορήγησης

Το κρακ κοκαΐνης μπορεί να καπνιστεί ενώ η μορφή άλατος εγχέεται (ενδοφλέβια) ή προσλαμβάνεται μέσω της εισπνοής και απορροφάται από το ρινικό βλεννογόνο (Ryan, 2019).

Μηχανισμός δράσης

Η κοκαΐνη δρα στον εγκέφαλο αλλάζοντας τη σηματοδότηση των ενδογενών νευροδιαβιβαστών. Η κοκαΐνη έχει άμεση επίδραση στα σήματα της ντοπαμίνης. Δεσμεύει τον μεταφορέα ντοπαμίνης (Dopamine transporter, DAT) και εμποδίζει την επαναπρόσληψη της από τους ντοπαμινεργικούς νευρώνες. Έτσι, η εξωκυτταρική ντοπαμίνη αυξάνεται αρκετές τάξεις μεγέθους. Επιπλέον, η κοκαΐνη εμποδίζει την πρόσληψη των νευροδιαβιβαστών μονοαμίνης διότι έχει παρόμοια συγγένεια με τους μεταφορείς της και προκαλεί αύξηση των συγκεντρώσεων σεροτονίνης και νορεπινεφρίνης. Από τις παραπάνω επιδράσεις η αύξηση της εξωκυτταρικής ντοπαμίνης είναι κυρίως υπεύθυνη για τη συμπεριφορά που σχετίζεται με τον εθισμό (Trifilieff & Martinez, 2013).

Η κοκαΐνη επίσης μπλοκάρει τα κανάλια ιόντων νατρίου. Αυτή η δράση είναι υπεύθυνη για το τοπικό αναισθητικό αποτέλεσμα και τις καρδιακές αρρυθμίες (Cubo, 2014).

Ανεπιθύμητες ενέργειες

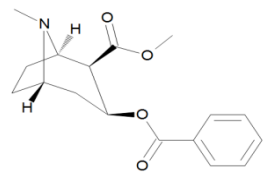
Η κοκαΐνη προκαλεί αγγειοσυστολή των αιμοφόρων αγγείων με αποτέλεσμα να εγκυμονεί κινδύνους για την υγεία, ιδιαίτερα όσο αφορά την καρδιά και τον εγκέφαλο (Shimomura, Jackson & Paul, 2019). Η χρήση της έχει συσχετιστεί με αύξηση του καρδιακού ρυθμού, του σφυγμού, της αρτηριακής πίεσης και του ρυθμού αναπνοής (Smart, 1991). Η κατάχρησή της μπορεί να οδηγήσει σε διάφορα προβλήματα όπως στεφανιαία νόσο, αρρυθμίες, έμφραγμα

του μυοκαρδίου, αορτική ανατομή, ανευρύσματα και κρίσεις άσθματος (Shimomura et al., 2019).

Η χρήση της κοκαΐνης επιφέρει επιπτώσεις και σε ψυχολογικό επίπεδο, με αυτές να αφορούν κυρίως το αίσθημα διέγερσης και ευφορίας, την υπερκινητικότητα και την αυξημένη ενέργεια και ομιλητικότητα. Στα νευρολογικά προβλήματα που προκαλεί η χρήση της περιλαμβάνονται η διέγερση του ΚΝΣ, οι επιληπτικές κρίσεις, η ενδοεγκεφαλική αιμορραγία, η ψύχωση, το εγκεφαλικό ακόμα και ο αιφνίδιος θάνατος (Smart, 1991).

Η χημική δομή, ο τύπος και οι βασικές ιδιότητες της κοκαΐνης συνοψίζονται στον πίνακα 8.

Πίνακας 8. Δομή, χημικός τύπος και βασικές ιδιότητες της κοκαΐνης.

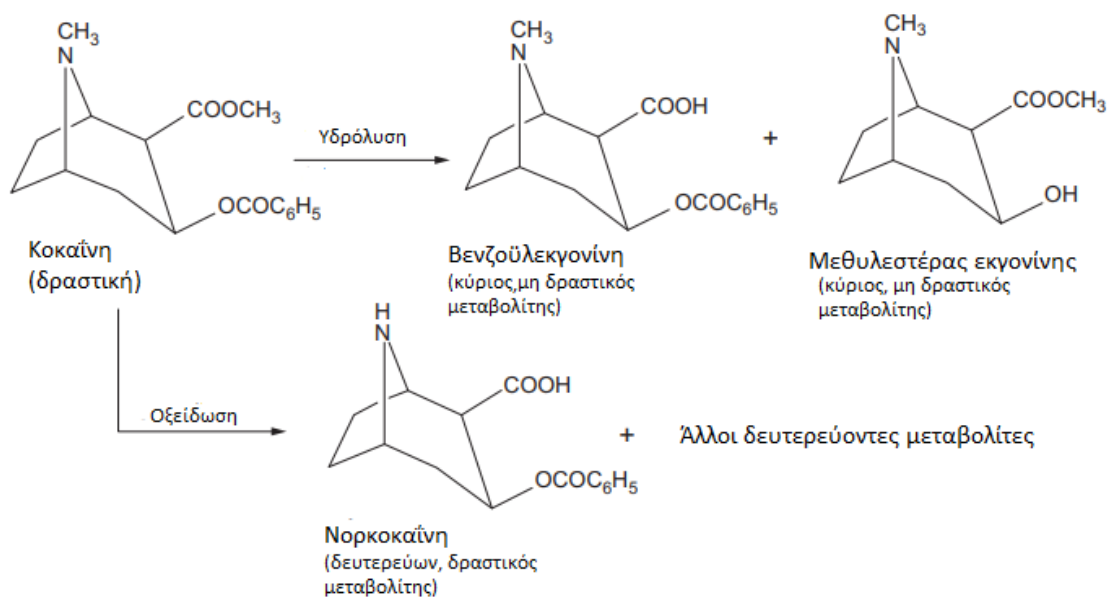
Χημική δομή	
Χημικός τύπος	$C_{17}H_{21}NO_4$
Μοριακό βάρος (g/mol)	303.35
LogKow	2.3
pKa	8.7
Διαλυτότητα	Νερό: ελάχιστα διαλυτή Μεθανόλη: διαλυτή

❖ Μεταβολίτες κοκαΐνης- Βενζοϋλεκγονίνη και Μεθυλεστέρας της εκγονίνης

Η κοκαΐνη μεταβολίζεται και απενεργοποιείται μέσω της υδρόλυσης με τη βοήθεια των χολινεστερασών του ήπατος και του ορού σε 2 κύριους μεταβολίτες, τη βενζοϋλεκγονίνη (BE) και τον μεθυλεστέρα της εκγονίνης (EME) (εικόνα 5). Οι δύο αυτοί μεταβολίτες είναι υδατοδιαλυτοί και αποβάλλονται από τα ούρα. Η ανίχνευση των δύο αυτών μεταβολιτών έπειτα από την πραγματοποίηση τοξικολογικής εξέτασης υποδηλώνει την πρόσφατη χρήση κοκαΐνης (Ryan, 2019).

Οι υπόλοιποι μεταβολίτες είναι ανενεργοί ή έχουν πολύ μικρή δραστηριότητα (Shimomura et al., 2019). Εξάιρεση αποτελεί η νορκοκαΐνη, η οποία είναι φαρμακολογικά ενεργή και σχηματίζεται μέσω οξειδωτικού μεταβολισμού (Shimomura et al., 2019). Η μητρική ένωση

υδρολύεται 35-54% σε βενζοϋλεγκονίνη, 32-49% σε μεθυλεστέρα εκγονίνης και περίπου 5% σε νορκοκαΐνη (Binelli et al., 2013).



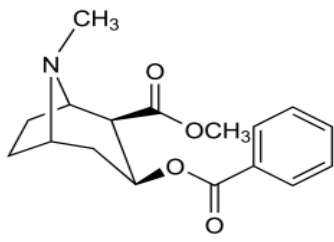
Εικόνα 5. Μεταβολισμός κοκαΐνης (Shimomura et al., 2019).

Οι χημικές δομές, οι τύποι και οι βασικές ιδιότητες των Βενζοϋλεγκονίνη και Μεθυλεστέρα της εκγονίνης συνοψίζονται στους πίνακες 9 και 10 αντίστοιχα.

Πίνακας 9. Δομή, χημικός τύπος και βασικές ιδιότητες της Βενζοϋλεγκονίνης.

Χημική δομή (Βενζοϋλεγκονίνη)	
Χημικός τύπος	$C_{16}H_{19}NO_4$
Μοριακό βάρος	289.33
LogKow	1.71
pKa	9.5 & 3.15
Διαλυτότητα	Νερό: αδιάλυτη, Μεθανόλη: διαλυτή

Πίνακας 10. Δομή, χημικός τύπος και βασικές ιδιότητες του Μεθυλεστέρα της εκγονίνης.

Χημική δομή (Μεθυλεστέρα της εκγονίνης)	
Χημικός τύπος	C ₁₀ H ₁₇ NO ₃
Μοριακό βάρος	199.25
LogKow	0.14
pKa	9.04
Διαλυτότητα	Νερό: διαλυτή Μεθανόλη: σχεδόν αδιάλυτη

3.9.Νέες ψυχοδραστικές ουσίες (NPSs)

Οι νέες ψυχοδραστικές ουσίες αποτελούν μία πολύπλοκη κατηγορία ουσιών οι οποίες μιμούνται τις επιδράσεις άλλων παράνομων εξαρτησιογόνων ουσιών. Το UNODC έχει ορίσει τα NPSs ως «ουσίες κατάχρησης, είτε σε καθαρή μορφή είτε σε παρασκεύασμα, που δεν ελέγχονται από την Ενιαία Σύμβαση του 1961 για τα Ναρκωτικά ή τη Σύμβαση του 1971 για τις Ψυχοτρόπες Ουσίες, αλλά που μπορούν να αποτελέσουν απειλή για τη δημόσια υγεία» (UNODC, 2016· Shafi et al., 2020).

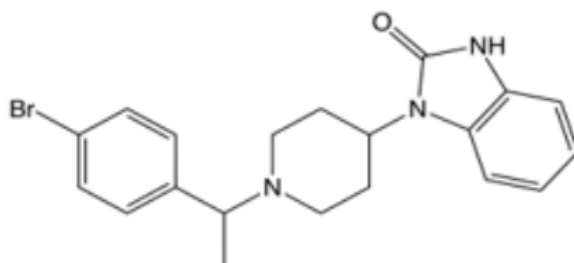
Η τεράστια ποικιλία ουσιών, η ταχεία προσαρμογή σε νομικούς περιορισμούς, η περιορισμένη ανιχνευσιμότητά τους από τους συνήθεις τοξικολογικούς ελέγχους καθώς και οι άγνωστες δυσμενείς επιπτώσεις, καθιστούν τα NPSs ένα παγκόσμιο πρόβλημα υγείας. Τα περισσότερα από τα NPSs είναι πιο επικίνδυνα και φαρμακολογικά ισχυρά σε σχέση με τις κλασσικές εξαρτησιογόνες ουσίες (Florou & Boumba, 2021).

Οι ουσίες αυτές είναι υπεύθυνες για σωματικά και ψυχικά προβλήματα. Οι βλάβες αυτές οφείλονται σε αλληλεπιδράσεις με υποδοχείς του ΚΝΣ, όπως υποδοχείς οπιοειδών, υποδοχείς κανναβινοειδών, υποδοχείς γάμμα-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA), υποδοχείς Ν-μεθυλο-D-ασπαρτικού (NMDA), υποδοχείς σερετονίνης και επηρεάζουν τη δράση αρκετών νευροδιαβιβαστών. Η πρόκληση εξάρτησης, εθισμού ακόμα και θανάτου είναι πιθανό αποτέλεσμα της κατάχρησης των συγκεκριμένων ουσιών (Lin et al., 2023).

Πάνω από 1200 ουσίες έχουν εμφανιστεί παγκοσμίως σε 141 χώρες (UNODC, 2023b), οι οποίες ανάλογα με το μηχανισμό δράσης, μπορούν να χωριστούν σε: συνθετικά διεγερτικά, συνθετικά κανναβινοειδή, συνθετικά παραισθησιογόνα, **συνθετικά οπιοειδή** και συνθετικές βενζοδιαζεπίνες (Shafi, et al., 2020).

Τα νέα συνθετικά οπιοειδή (Novel Synthetic Opioids, NSOs) αποτελούν μία νέα και επικίνδυνη κατηγορία των Νέων Ψυχοδραστικών Ουσιών και η χρήση τους αποτελεί σοβαρό ζήτημα δημόσιας υγείας. Στις Ηνωμένες Πολιτείες η χρήση τους είναι η κύρια αιτία υπερδοσολογίας που οφείλεται στα οπιοειδή και στην Ευρώπη έχει παρατηρηθεί αύξηση των περιπτώσεων δηλητηρίασης ακόμη και των θανατηφόρων περιστατικών. Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται ανάλογα φεντανύλης και μη φεντανύλης. Τα NSOs διαθέτουν ισχυρούς αγωνιστές οπιοειδών και τα επιθυμητά αποτελέσματα μπορούν να προκληθούν με τη χορήγηση πολύ μικρότερης δόσης σε σχέση με τα συμβατικά οπιοειδή (Salle et al., 2019).

Η βρωρφίνη (Brorphine) (1-[1-[1-(4-bromophenyl) ethyl]-piperidin-4-yl]-1,3-dihydro-2H-benzo [d]imidazol-2-one) αποτελεί μία νεοεισαχθείσα ουσία στην κατηγορία των NSOs και η τοξικότητα της μπορεί να γίνει εύκολα αντιληπτή καθώς το 2020 ήταν υπεύθυνη για την πρόκληση πάνω από 100 θανάτων. Στην εικόνα 6 απεικονίζεται η χημική δομή της (Florou et al., 2022).



Εικόνα 6. Χημική δομή της βρωρφίνης.

Η βρωρφίνη είναι παρόμοια με τη φεντανύλη και δρα ως αγωνιστής του μ-υποδοχέα των οπιοειδών με τον οποίο συνδέεται. Η ενεργοποίηση του συγκεκριμένου υποδοχέα θα προκαλέσει αναλγησία, ευφορία και αναπνευστική καταστολή (DEA, 2021).

Ο μεγάλος αριθμός των ουσιών, η έλλειψη φαρμακολογίας και μελετών για τον ανθρώπινο μεταβολισμό καθώς και οι μικρές χορηγούμενες ποσότητες καθιστούν δύσκολη την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των NPSs σε βιολογικά υποστρώματα. Έτσι, είναι

επιτακτική ανάγκη η ανάπτυξη νέων ευαίσθητων, αξιόπιστων και αναπαραγώγιμων μεθόδων για τον προσδιορισμό αυτών των ουσιών σε διάφορα υποστρώματα (Boumba et al., 2017· Salle et al, 2019).

Στο πλαίσιο αυτό αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε πρόσφατα (Florou et al., 2022) μία νέα, γρήγορη ευαίσθητη και αξιόπιστη μεθοδολογία για την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση της βρωφίνης στο στοματικό υγρό. Η μεθοδολογία βασίστηκε στην εφαρμογή της Fabric Phase Sorptive Extraction (FPSE) σε συνδυασμό με την Υγρή Χρωματογραφία συζευγμένη με σύστημα διαδοχικής Φασματομετρίας μάζας (LC-MS/MS). Η γραμμικότητα της μεθόδου ήταν πολύ καλή ($R^2 = 0.999$), η επαναληψιμότητα εντός της ημέρας κυμάνθηκε στο 9.9% και μεταξύ των διαφορετικών ημερών στο 6.4%. Η ακρίβεια εκφράστηκε μέσω της ανάκτησης και κυμάνθηκε από 65-75% ενώ το LOD και LOQ του αναλύτη προσδιορίστηκαν στα 0.015 και 0.05 ng/mL αντίστοιχα. Η σταθερότητα της βρωφίνης έπειτα από 2 και 4 εβδομάδες ήταν υψηλότερη από 95%, ενώ δεν παρατηρήθηκαν επιδράσεις από τα συστατικά του υποστρώματος και από άλλα κοινά φάρμακα καθώς και φαινόμενα μεταφοράς ποσότητας αναλύτη από έγχυση σε έγχυση. Αυτή αποτέλεσε την πρώτη μελέτη που χρησιμοποιεί την FPSE σε συνδυασμό με την τεχνική LC-MS/MS για τον προσδιορισμό της συγκεκριμένης ουσίας στο στοματικό υγρό, παρουσιάζοντας έτσι μια απλή, οικονομική, ευαίσθητη και αποτελεσματική διαδικασία που μπορεί να εφαρμοστεί και στην ανάλυση και άλλων NPSs (Florou et al., 2022).

4. Στάδια αναλυτικής διαδικασίας

Διάφοροι αναλύτες οι οποίοι βρίσκονται σε πολύπλοκα υποστρώματα μπορούν να διαχωριστούν και να προσδιοριστούν με τις σύγχρονες αναλυτικές μεθόδους (Kazantzi & Anthemidis, 2017).

Κάθε αναλυτική διαδικασία ακολουθεί τα εξής έξι βήματα:

1. Δειγματοληψία.
2. Συντήρηση δείγματος
3. Προκατεργασία δείγματος.
4. Ανάλυση δείγματος.
5. Επεξεργασία αποτελέσματος (Θεοδωρίδης και άλλοι, 2015a).

Τα υποστρώματα των δειγμάτων ταξινομούνται σε οργανικά (στα οποία περιλαμβάνονται και τα βιολογικά υγρά) και ανόργανα. Υποδιαιρούνται σε στερεά, ημι-στερεά (στα οποία περιλαμβάνονται οι κρέμες, οι αλοιφές, οι γέλες, τα εναιωρήματα και τα κολλοειδή), υγρά και αέρια (Αρχοντάκη, 2008).

Τα βιολογικά δείγματα είναι συνήθως πολύ περίπλοκα και χωρίζονται σε αέρια, υγρά και στερεά δείγματα. Ανθρώπινοι ιστοί, μεταβολίτες και προϊόντα βιοαποικοδόμησης σχετικοί με την ανθρώπινη υγεία ή διάφορες μορφές ζωής μπορούν να θεωρηθούν βιολογικά δείγματα. Μεγάλα μόρια (πρωτεΐνες), μικρά οργανικά μόρια και ένα ανόργανο περιεχόμενο συνήθως συνθέτουν τα βιολογικά δείγματα (Moldoveanu & David, 2015).

Με τη δειγματοληψία, η οποία είναι το πρώτο βήμα μιας αναλυτικής διαδικασίας, παραλαμβάνεται ένα μικρό τμήμα από τη συνολική ποσότητα του υλικού διατηρώντας ίδια τη χημική σύσταση (Θεοδωρίδης και άλλοι, 2015a).

Η φύση του δείγματος, ο σκοπός της ανάλυσης και η διαθεσιμότητα του δείγματος είναι βασικοί παράγοντες, από τους οποίους εξαρτάται η δειγματοληψία των βιολογικών δειγμάτων (Moldoveanu & David, 2015).

Η συντήρηση του δείγματος είναι ουσιώδης για την επίτευξη σωστών αναλυτικών αποτελεσμάτων. Πραγματοποιείται σε ειδικές συνθήκες π.χ. φωτός και θερμοκρασίας (Θεοδωρίδης και άλλοι, 2015a), ώστε να αποφευχθεί η μόλυνση, η αλλοίωση ή η απώλεια αναλυτών. Συγκεκριμένα, η συλλογή και η συντήρηση των βιολογικών δειγμάτων πρέπει να

γίνεται υπό συγκεκριμένες συνθήκες και η ανάλυσή τους να πραγματοποιείται εντός ενός ορισμένου διαστήματος σταθερότητας. Φυσικές και χημικές διεργασίες κατά τη διάρκεια των χειρισμών και της αποθήκευσης (θερμική αποσύνθεση, μικροβιακή δράση, οξείδωση ή αναγωγή, φωτοαποδόμηση κ.λπ.) μπορούν να επιφέρουν αλλοίωση στο δείγμα (Moldoveanu & David, 2015).

Η προκατεργασία προετοιμάζει το δείγμα για μέτρηση-ανάλυση (Θεοδωρίδης και άλλοι, 2015a). Είναι ένα βασικό αλλά ταυτόχρονα κουραστικό και χρονοβόρο στάδιο μιας αναλυτικής μεθοδολογίας (Kazantzi & Anthemidis, 2017). Στοχεύει στην παραλαβή ενός ομογενούς και αναπαραγωγίμου διαλύματος το οποίο θα βρίσκεται σε κατάλληλη μορφή για να εγχυθεί στο αναλυτικό όργανο (Αρχοντάκη, 2008).

Ο εύκολος διαχωρισμός, η ταυτοποίηση, ο ποσοτικός προσδιορισμός των ενώσεων και η απόδοση του αναλυτικού συστήματος διασφαλίζεται από ένα καθαρό δείγμα απαλλαγμένο από παρεμβολές του υποστρώματος (Kabir & Furton, 2019). Η επίδραση που προκαλείται από το υπόστρωμα, μπορεί να οφείλεται σε ενδογενείς ή εξωγενείς παράγοντες (Bylda et al., 2014). Στους ενδογενείς περιλαμβάνονται οι μεταβολίτες του αναλύτη, πρωτεΐνες, άλατα, οξέα, βάσεις και διάφορες άλλες ενώσεις που μπορεί να είναι παρόμοιες με τον αναλύτη-στόχο (Jalili et al., 2020). Στους εξωγενείς περιλαμβάνονται όλες οι υπόλοιπες ουσίες οι οποίες εισάγονται στο δείγμα κατά την επεξεργασία και την ανάλυσή του (Bylda et al., 2014). Οι ενώσεις του υποστρώματος, μπορούν να οδηγήσουν σε ένα λανθασμένο σήμα στο σύστημα MS διότι υπάρχει η πιθανότητα συνέκλωσης και συσσωμάτωσης με τον αναλύτη κατά το χρωματογραφικό διαχωρισμό (Bylda et al., 2014).

Επιπροσθέτως, τα περισσότερα βιολογικά δείγματα είναι ασυμβίβαστα με τα αναλυτικά όργανα και έτσι με την προκατεργασία θα αποφευχθούν σημαντικά προβλήματα, όπως το μπλοκάρισμα της στήλης. Επιπλέον, επιτυγχάνεται η προσυγκέντρωση των αναλυτών, ώστε να είναι εφικτός ο προσδιορισμός και η ανίχνευσή τους ακόμη και σε χαμηλά επίπεδα συγκεντρώσεων αυξάνοντας έτσι την ευαισθησία μιας μεθόδου (Jalili et al., 2020).

Η προετοιμασία ενός δείγματος εξαρτάται από τη φύση, τη χημική σταθερότητα, τη διαλυτότητα, τον αριθμό και τη συγκέντρωση των αναλυτών-στόχων, την αναλυτική μέθοδο και το βιολογικό υπόστρωμα (Moldoveanu & David, 2015).

Μετά την προκατεργασία ακολουθεί η ανάλυση με την οποία προσδιορίζονται ποσοτικά οι αναλύτες-στόχοι και η επεξεργασία του αποτελέσματος, όπου το σήμα του οργάνου μετατρέπεται σε χημική πληροφορία (π.χ. συγκέντρωση) (Θεοδωρίδης και άλλοι, 2015a).

4.1. Βιολογικό δείγμα-Στοματικό υγρό

Στον τομέα της τοξικολογίας τα πιο κοινά εφαρμοζόμενα βιολογικά υποστρώματα είναι το αίμα και τα ούρα. Όμως, έχει αυξηθεί σημαντικά και η χρήση εναλλακτικών υποστρωμάτων όπως του στοματικού υγρού, του ιδρώτα, των μαλλιών, των νυχιών, του μηκωνίου κτλ. λόγω της ανάπτυξης ευαίσθητων τεχνικών προκατεργασίας και ανάλυσης (Wille et al., 2014).

Συγκεκριμένα, το στοματικό υγρό αποτελεί το πιο κατάλληλο υπόστρωμα για να αξιολογηθεί η πρόσφατη έκθεση σε εξαρτησιογόνες ουσίες και έτσι πρόσφατες μελέτες αναλύουν διάφορες κατηγορίες ουσιών, χρησιμοποιώντας μικρούς όγκους του (De Campos et al., 2021).

4.1.1 Το στοματικό υγρό ως διαγνωστικό υλικό

Η χρήση του στοματικού υγρού ως υπόστρωμα για τη διάγνωση διαφόρων ανθρωπίνων παθήσεων (διάγνωση ιών, βακτηρίων και συστημικών ασθενειών) έχει κερδίσει μεγάλο ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια. Η ανάλυση των σιέλων χρησιμοποιείται για τη διάγνωση μολυσματικών ασθενειών (π.χ. Human immunodeficiency virus, HIV), αυτοάνοσων νοσημάτων (π.χ. Σύνδρομο Sjögren), ενδοκρινικών διαταραχών (π.χ. παρακολούθηση επιπέδων στεροειδούς ορμόνης), καρκίνων (π.χ. καρκίνος του στόματος και του μαστού) και κληρονομικών διαταραχών (π.χ. κυστική ίνωση) (Samaranayake, 2007).

Η χρήση του ως διαγνωστικό υλικό οφείλεται στην ανταλλαγή του με ουσίες που συνθέτουν το πλασματικό υγρό. Ένα λεπτό στρώμα επιθηλιακών κυττάρων, το οποίο διαχωρίζει τους σιελογόνους αγωγούς από τη συστηματική κυκλοφορία, επιτρέπει για τις ουσίες που εισέρχονται στα σιέλα μέσω της ενεργούς μεταφοράς, τη διάχυση μέσω μεμβράνης ή τη παθητική διάχυση μέσω μίας βαθμίδας συγκέντρωσης (Lima et al., 2010).

Από το σύνολο των πρωτεϊνών που βρίσκονται στο στοματικό υγρό, το 27% βρίσκονται επίσης και στο πλάσμα. Η αντιστοιχία αυτή, επιτρέπει στο βιολογικό αυτό υπόστρωμα να χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτικό διαγνωστικό υλικό έναντι του αίματος. Το 73% των πρωτεϊνών του στοματικού υγρού, που απουσιάζουν από το πλάσμα δίνουν τη δυνατότητα εντοπισμού και ανάπτυξης βιοδεικτών για διάφορες ασθένειες, όπως ο καρκίνος και τα εγκεφαλικά επεισόδια. Επιπροσθέτως, το 40% των πρωτεϊνών του πλάσματος, θα μπορούσαν να βρεθούν στο στοματικό υγρό (Loo et al., 2010· Cuevas-Córdoba & Santiago-García, 2014).

Τέλος, η ανάλυσή του είναι πολύ χρήσιμη για την παρακολούθηση των επιπέδων των φαρμάκων και την κατάχρηση των εξαρτησιογόνων ουσιών στο χώρο εργασίας και στους ελέγχους κατά την οδήγηση (Wille et al., 2014).

4.1.2 Πλεονεκτήματα χρήσης του στοματικού υγρού έναντι άλλων υποστρωμάτων

Η χρήση του στοματικού υγρού ως διαγνωστικό υλικό, παρέχει μία μη επεμβατική, απλή, ανώδυνη και οικονομική μέθοδο συλλογής δειγμάτων για τον έλεγχο μεγάλων πληθυσμών, σε αντίθεση με τη συλλογή αίματος η οποία είναι επεμβατική και πιο δύσκολη διαδικασία. Επιπλέον, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση πρόσφατης χρήσης εξαρτησιογόνων ουσιών, συνήθως για 12-24 ώρες μετά την κατανάλωσή τους. Η περίοδος ανίχνευσης μπορεί να διαφέρει σε χρόνιους χρήστες όπου το αποτέλεσμα παραμένει θετικό για μεγαλύτερα διαστήματα. Επιπλέον, το προσωπικό που συλλέγει το δείγμα δεν απαιτείται να είναι εξειδικευμένο και παρατηρεί απευθείας το άτομο κατά τη διάρκεια την οποία το παράγει και έτσι εξασφαλίζεται η ακεραιότητα του δείγματος. Εν αντιθέσει με τη συλλογή ούρων όπου απαιτείται ιδιωτικότητα και έτσι υπάρχει μεγάλη πιθανότητα νοθείας (Concheiro et al., 2007· Samaranayake, 2007· Wille et al., 2014· Martini et al., 2020· Tamama, 2021).

Τέλος, το μητρικό φάρμακο στο στοματικό υγρό, είναι συνήθως παρόν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις σε σύγκριση με τα ούρα. Έτσι, η ταυτοποίηση του φαρμάκου είναι πιο σίγουρη. Η υψηλή συσχέτιση (για πολλά φάρμακα) μεταξύ των συγκεντρώσεων των σιέλων και του ελεύθερου κλάσματος του φαρμάκου στο πλάσμα είναι χρήσιμη σε περιπτώσεις όπου η ανίχνευση την ίδια ημέρα είναι σημαντική (Martini et al., 2020).

4.1.3. Σύσταση

Το στοματικό υγρό είναι ένα διαυγές υγρό το οποίο εκκρίνεται στη στοματική κοιλότητα από τους σιελογόνους αδένες (εξωκρινείς αδένες). Οι σιελογόνοι αδένες διακρίνονται σε μείζονες και ελάσσονες, όροι που αναφέρονται στο ανατομικό μέγεθος των αδένων και όχι στη σημαντικότητά τους. Στους μείζονες σιελογόνους αδένες (εικόνα 7) περιλαμβάνονται τρία ζεύγη αδένων (παρωτίδα, υπογλώσσιος και υπογνάθιος). Η παρωτίδα βρίσκεται απέναντι από τους πρώτους γομφίους της άνω γνάθου και ο υπογνάθιος και υπογλώσσιος αδένας στο κάτω τμήμα του στόματος. Οι ελάσσονες αδένες κατανέμονται σε όλο το στοματικό βλεννογόνο δηλαδή στο κάτω χείλος, στη γλώσσα, στον ουρανίσκο, στα μάγουλα και στον φάρυγγα. (Humphrey & Williamson, 2001· De Almeida et al., 2008).

Οι μείζονες αδένες παράγουν περισσότερα σίελα, αλλά η ποιότητα του περιεχομένου ποικίλλει. Το 20% των σιελογόνων εκκρίσεων παράγεται από την παρωτίδα, το 65% από τον υπογνάθιο, το 7-8% από τον υπογλώσσιο και λιγότερο από 10% από τους ελάσσονες αδένες (Humphrey & Williamson, 2001).



Εικόνα 7. Απεικόνιση μείζονων σιελογόνων αδένων (De Almeida et al, 2008).

Το στοματικό υγρό είναι ένα ελαφρώς όξινο υγρό ($\text{pH}=6.2-7.6$) το οποίο παρά την ανομοιογένεια της προέλευσής του, το 99% της περιεκτικότητάς του είναι νερό. Το υπόλοιπο 1% αποτελείται από ανόργανα και οργανικά συστατικά πρωτεϊνικής ή μη φύσης. Μια ποικιλία ηλεκτρολυτών, όπως νάτριο, κάλιο, ασβέστιο, μαγνήσιο, διττανθρακικά και φωσφορικά άλατα βρίσκονται στο στοματικό υγρό. Ανοσοσφαιρίνες, γλυκοπρωτεΐνες, ένζυμα, βλεννίνες και αζωτούχα προϊόντα, όπως η ουρία και η αμμωνία συνθέτουν επίσης τη σύσταση του. Στα μη πρωτεϊνικά συστατικά περιλαμβάνονται το ουρικό οξύ, η χολερυθρίνη, η κρεατινίνη, η γλυκόζη, διάφορα λιπίδια, το γαλακτικό οξύ και άλλα (Humphrey & Williamson, 2001· Cuevas-Córdoba & Santiago-García, 2014).

4.1.4. Ποσότητα και ταχύτητα ροής του στοματικού υγρού

Υπό κανονικές συνθήκες η μέση ημερήσια παραγωγή σιέλων σε υγιείς ενήλικες κυμαίνεται μεταξύ 1 και 1.5 L (Humphrey & Williamson, 2001).

Η ποσότητα και η ταχύτητα ροής στον άνθρωπο επηρεάζεται από μια πληθώρα γενικών παραγόντων, οι σημαντικότεροι από τους οποίους είναι ο βαθμός ενυδάτωσης του σώματος, η θέση του σώματος, η έκθεση στο φως, οι κιρκάδιοι και οι ετήσιοι ρυθμοί, το μέγεθος των αδένων, διάφορα διεγερτικά ερεθίσματα και η λήψη φαρμακευτικών ουσιών (Dawes, 2004).

4.1.5. Λειτουργία

Τα σιέλα συμβάλλουν σε πολυάριθμες λειτουργίες του οργανισμού, συνδράμοντας έτσι στη διατήρηση της υγείας του. Σε αυτές περιλαμβάνονται:

- Συμμετοχή στη διαδικασία της πέψης, στη φυσιολογία του οισοφάγου και στην προστασία των γαστρικών κυττάρων.
- Συνεισφορά στη μάσηση, στην ομιλία, στην κατάποση και στη γευσιγνωσία.
- Συμμετοχή στη λίπανση και στην προστασία των βλεννογόνων σε πιθανή εισβολή μικροοργανισμών.
- Παροχή αντιβακτηριακής, αντιμυκητιακής και αντικής προστασίας.
- Διατήρηση της οδοντικής ακεραιότητας και ομοιόστασης του στόματος (Lima et al., 2010· Loo et al., 2010· Spielmann & Wong, 2011· Cuevas-Córdoba & Santiago-García, 2014).

Ο πίνακας 11 συνοψίζει κάποια από τα συστατικά του στοματικού υγρού και την κύρια λειτουργία τους (Sridharan, 2019).

Πίνακας 11. Συστατικά στοματικού υγρού και ο ρόλος τους (Sridharan,2019)

Συστατικό στοματικού υγρού	Λειτουργία
Αμυλάση	Πέψη
Διττανθρακικά	Ρυθμιστική ικανότητα σιέλων
Κάλιο	Επαναμετάλλωση δοντιών
Αντισώματα σιέλων	Αντιμικροβιακή προστασία
Λακτοφερίνη	Αντιμικροβιακή προστασία
Λυσοζύμη	Υδρόλυση κυτταρικής μεμβράνης
Βλεννίνες	Πέψη, λίπανση και σχηματισμός ιστών
Πρωτεάση	Πέψη
Νερό	Ακεραιότητα βλεννογόνου

4.1.6. Μηχανισμοί μεταφοράς αναλυτών από το αίμα στο στοματικό υγρό

Οι συγκεντρώσεις των φαρμάκων στο στοματικό υγρό δεν είναι απλώς μια απλή αντανάκλαση της συνολικής συγκέντρωσης του φαρμάκου στο αίμα. Η μεταφορά μορίων φαρμάκου από το αίμα στο στοματικό υγρό και επομένως και η συγκέντρωση του φαρμάκου σε αυτό, εξαρτώνται από διάφορους φυσικοχημικούς παράγοντες, όπως το pH του υποστρώματος, το pKa, η λιποδιαλυτότητα της φαρμακευτικής ένωσης και το κλάσμα των μορίων φαρμάκου που συνδέονται με πρωτεΐνες στο πλάσμα (Langel et al., 2013).

Ο κύριος καθοριστικός παράγοντας για την ελεύθερη διάχυση φαρμάκων από το αίμα στο στοματικό υγρό είναι η διαλυτότητα στο νερό. Οι υδρόφιλες ουσίες γενικά διαχέονται ευκολότερα. Το pH του πλάσματος είναι αρκετά σταθερό στο 7.4, αλλά το pH του στοματικού υγρού μπορεί να κυμαίνεται σημαντικά μεταξύ ατόμων, γεγονός που επηρεάζει τη συγκέντρωση φαρμάκων σε αυτό. Άλλοι παράγοντες επίσης είναι το μοριακό βάρος του φαρμάκου, ο ρυθμός ροής και η κινητική αποβολής. Το μοριακό βάρος φαίνεται να παίζει μικρό ρόλο παρά τον γενικό κανόνα ότι τα μικρότερα μόρια διαχέονται ευκολότερα από τα μεγαλύτερα (Haeckel, 1993· Wille et al., 2009· Langel et al., 2013).

Η συγκέντρωση βασικών φαρμάκων στα σίελα (π.χ. αμφεταμίνες) είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη συγκέντρωσή τους στο πλάσμα, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η ανιχνευσιμότητά τους, σε αντίθεση με λιπόφιλα μόρια όπως η Τετραϋδροκανναβινόλη (Drummer,2005).

Εν συντομία, οι κύριοι μηχανισμοί με τους οποίους οι αναλύτες μεταφέρονται από το αίμα στα σίελα είναι οι ακόλουθοι:

- Η υπερδιήθηση. Στην υπερδιήθηση, οι αναλυτές, οι οποίοι είναι μικρού μοριακού βάρους (>1900 Da, όπως νερό και ιόντα) διασχίζουν τους σιελογόνους αδένες μέσω των κενών συνδέσεων μεταξύ των κυττάρων των εκκριτικών μονάδων (διακυτταρικός δεσμός).
- Μεταφορά διαμέσου των πόρων. Η μεταφορά των ενώσεων από το πλάσμα στη στοματική κοιλότητα μπορεί να γίνει μέσω της ουλικής αύλακας (η περιοχή μεταξύ του δοντιού και του περιβάλλοντα ουλικού ιστού) ή απευθείας από τον στοματικό βλεννογόνο.
- Παθητική διάχυση. Είναι διαδικασία που ένα μόριο θα διανεμηθεί από μία περιοχή υψηλής συγκέντρωσης σε χαμηλή. Με παθητική διάχυση μεταφέρονται στα σίελα, οι λιπόφιλοι αναλύτες διαμέσου των λιπιδικών μεμβρανών (π.χ. στεροειδής ορμόνη) (Bellagambi et al., 2020).

4.1.7. Μέθοδοι συλλογής στοματικού υγρού

- I. Μέθοδος αποστράγγισης (εικόνα 8). Το υποκείμενο κάθεται ήσυχα με το κεφάλι σκυμμένο προς τα κάτω και το στόμα ανοιχτό και τα σίελα αφήνονται να στάξουν από το κάτω χείλος σε βαθμονομημένο δοκιμαστικό σωλήνα. Το υποκείμενο πτύει στον δοκιμαστικό σωλήνα στο τέλος της περιόδου συλλογής (Navazesh, 1993· Priya & Prathibha, 2017).
- II. Μέθοδος απόχρεμψης (εικόνα 9). Τα σίελα αφήνονται να συσσωρευτούν στο κάτω μέρος του στόματος και το υποκείμενο πτύει σε προζυγισμένο ή βαθμονομημένο δοκιμαστικό σωλήνα κάθε 60 δευτερόλεπτα (Navazesh, 1993· Priya & Prathibha, 2017).
- III. Μέθοδος αναρρόφησης. Το σίελα αναρροφούνται συνεχώς από το κάτω μέρος του στόματος χρησιμοποιώντας μικροπιπέτες, σύριγγες, εκτοξευτήρα σιέλων ή αναρροφητή (εικόνα 10) (Navazesh, 1993· Priya & Prathibha, 2017).
- IV. Μέθοδος επιχρίσματος - απορροφητική (εικόνα 11). Πραγματοποιείται με την εισαγωγή και την τοποθέτηση μιας συνθετικής γάζας ή μιας προζυγισμένης μπατονέτας ή σπόγγου από βαμβάκι στις οπές των βασικών αδένων. Το υποκείμενο μασάει αυτό το αντικείμενο το οποίο εμποτίζεται με τα σίελα και στη συνέχεια αφαιρείται για να ζυγιστεί εκ νέου στο τέλος της περιόδου συλλογής (Navazesh, 1993· Lee & Wong, 2009· Priya & Prathibha, 2017).



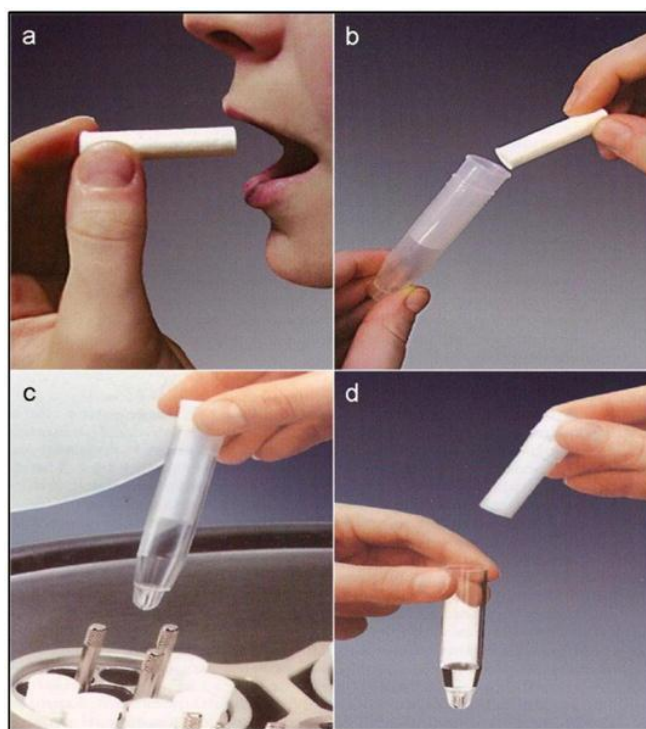
Εικόνα 8. Μέθοδος αποστράγγισης
(Priya & Prathibha, 2017).



Εικόνα 9. Μέθοδος απόχρεμψης
(Priya & Prathibha, 2017).



Εικόνα 10. Σωλήνας αναρρόφησης σιέλων
(Priya & Prathibha, 2017)



Εικόνα 11. Συλλογή και επεξεργασία σιέλων με την
απορροφητική μέθοδο (επιχρίσματος) (Lee & Wong, 2009).

4.2. Προετοιμασία δείγματος

Ο καθαρισμός του δείγματος και η απομόνωση του αναλύτη μπορούν να επιτευχθούν με διάφορες τεχνικές μεθόδους ή συνδυασμούς διαφόρων τεχνικών μεθόδων. Η προετοιμασία των βιολογικών δειγμάτων μπορεί να πραγματοποιηθεί με:

- Αραίωση
- Διήθηση / μικροδιάλυση / υπερδιήθηση
- Καταβύθιση πρωτεϊνών
- Εκχύλιση
- Συνδυασμός μεθόδων (τεχνικές εκχύλισης με μία ή περισσότερες μεθόδους) (Bylda et al., 2014· Soltani & Jouyban, 2014).

Η αραίωση είναι η απλή μέθοδος προετοιμασίας δείγματος η οποία προηγείται από κάποια άλλη τεχνική προετοιμασίας. Η διήθηση συνδυάζεται επίσης με άλλες μεθόδους και είναι ευρέως χρησιμοποιούμενη. Η διήθηση χωρίζεται σε υπερδιήθηση, μικροδιήθηση και νανοδιήθηση, ανάλογα με το πορώδες των φίλτρων και χρησιμοποιείται για καθαρισμό βιολογικών δειγμάτων. Η μικροδιάλυση έχει εφαρμοστεί σε μελέτες φαρμακοκινητικής και είναι μία μέθοδος άμεσης δειγματοληψίας (Soltani & Jouyban, 2014).

Οι πιο κοινές χρησιμοποιούμενες τεχνικές για την ανάλυση φαρμάκων στα βιολογικά δείγματα αποτελούν η καταβύθιση των πρωτεϊνών, η εκχύλιση υγρού-υγρού και η εκχύλιση στερεάς φάσης, οι οποίες αποτελούν καθιερωμένες και καλά βελτιστοποιημένες τεχνικές (Ashri & Abdel-Rehim, 2011· Queiroz & Donizeti de Souza, 2018).

4.2.1. Καταβύθιση πρωτεϊνών

Οι πρωτεΐνες πρέπει να απομακρύνονται πριν την ανάλυση γιατί μπορούν να δημιουργήσουν πολλά προβλήματα στο αναλυτικό σύστημα. Καθιζάνουν παρουσία οργανικού διαλύτη στην κινητή φάση και προσροφώνται ή καταβυθίζονται στην εξωτερική επιφάνεια της πορώδους στατικής φάσης με αποτέλεσμα να προκαλείται φράξιμο της πρόσβασης στους πόρους και ελάττωση των θέσεων προσρόφησης (Θεοδωρίδης και άλλοι, 2015a).

Επιπλέον, σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας, η παρουσία πρωτεϊνών μπορεί να οδηγήσει σε μη αναστρέψιμη αύξηση της πίεσης του συστήματος και μείωση της εκλεκτικότητας. Σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας μπορεί να προκληθεί καταστολή ιόντων λόγω μη ικανοποιητικής καταβύθισης (Ashri & Abdel-Rehim, 2011).

Η τεχνική της καταβύθισης των πρωτεϊνών στηρίζεται στην αλληλεπίδραση ενός αντιδραστηρίου και των τμημάτων της πρωτεΐνης (οι διαλυτές πρωτεΐνες αποτελούνται από έναν υδρόφοβο πυρήνα ο οποίος περιβάλλεται από μια υδρόφιλη επιφάνεια). Τα κοινά αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στην καταβύθιση είναι κυρίως οργανικοί διαλύτες και οργανικές ενώσεις όπως μεθανόλη, ακετονιτρίλιο, ακετόνη, ουρία και γουανιδίνη, μεταλλικά ιόντα όπως θειικός ψευδάργυρος, άλατα όπως ο χλωριούχος αργίλιος, διαλύματα οξέων όπως το τριχλωροξικό οξύ ή συνδυασμός αυτών. Στη συνέχεια, ακολουθεί περιδίνηση και φυγοκέντρωση. Μετά την καταβύθιση, μειώνεται η διαλυτότητα της πρωτεΐνης ενώ μικρά μόρια όπως φάρμακα και μεταβολίτες, όταν δεν αλληλεπιδρούν ισχυρά με την πρωτεΐνη, γίνονται ελεύθερα και διαλυτά (Ashri & Abdel-Rehim, 2011· Moldoveanu & David, 2015).

Γίνεται φανερό ότι πραγματοποιείται μετουσίωση των πρωτεϊνών όπου τροποποιείται η τεταρτοταγής δομή και επηρεάζονται οι δεσμοί υδρογόνου, οι γέφυρες θείου και άλλες αλληλεπιδράσεις της τριτοταγούς και τεταρτοταγούς δομής της πρωτεΐνης (Moldoveanu & David, 2015).

Ορισμένες φορές, η καταβύθιση είναι το πρώτο στάδιο μιας ανάλυσης και ακολουθεί κάποια άλλη τεχνική εκχύλισης για να επιτευχθεί υψηλότερη ευαισθησία. Γενικά η τεχνική αυτή είναι μία καθολική διαδικασία η οποία χαρακτηρίζεται από απλότητα, ταχύτητα χωρίς τις περισσότερες φορές να απαιτείται τροποποίηση στο pH. Στα μειονεκτήματα της μεθόδου περιλαμβάνονται η μη πλήρης απομάκρυνση των πρωτεϊνών, η μειωμένη ευαισθησία, ο κίνδυνος συγκαταβύθισης του αναλύτη και η αραίωση του δείγματος (Ashri & Abdel-Rehim, 2011).

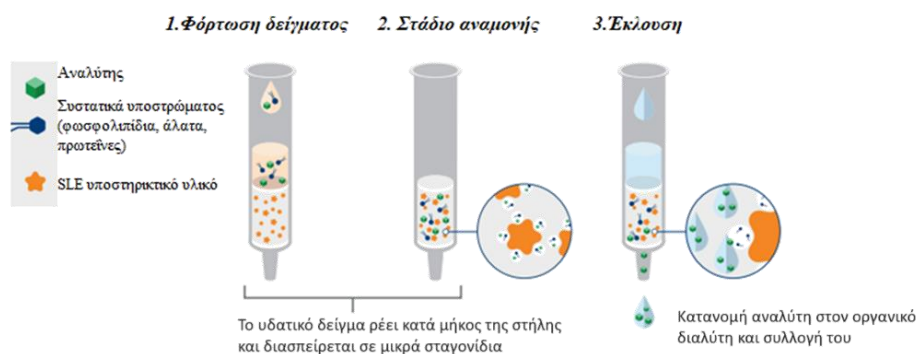
4.2.2. Εκχύλιση υγρού-υγρού (Liquid-Liquid Extraction, LLE)

Η προετοιμασία υδατικών και βιολογικών δειγμάτων πραγματοποιείται εδώ και πολλές δεκαετίες με την εκχύλιση υγρού-υγρού (Ashri & Abdel-Rehim, 2011). Η εκχύλιση υγρού-υγρού είναι μια διαδικασία διαχωρισμού κατά την οποία η διαλυμένη ουσία κατανέμεται σε δύο διαλύτες οι οποίοι είναι μεταξύ τους μη αναμείξιμοι ή μερικώς αναμείξιμοι. Συνήθως ο ένας διαλύτης είναι το νερό ή ένα υδατικό μίγμα [(π.χ. πλάσμα, ούρα και ορός (Ashri & Abdel-Rehim, 2011))] και ο άλλος ένας μη πολικός οργανικός διαλύτης. Αρχικά, οι δύο διαλύτες αναμειγνύονται και στη συνέχεια πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των φάσεων. Η οργανική στιβάδα που περιέχει την εκχυλισμένη ένωση απομακρύνεται, εξατμίζεται μέχρι

ξηρού, και επαναδιαλύεται σε διαλύτη συμβατό με το αναλυτικό σύστημα (Θεοδωρίδης και άλλοι, 2015a· Berk, 2018).

Αν και η συγκεκριμένη τεχνική παρέχει πολύ καλό καθαρισμό για δείγματα που περιέχουν άλατα και μακρομόρια (Ashri & Abdel-Rehim, 2011), έχει πολλά μειονεκτήματα. Είναι χρονοβόρα τεχνική στην οποία χρησιμοποιείται μεγάλη ποσότητα οργανικών διαλυτών, οι οποίοι είναι τοξικοί, αυξάνοντας παράλληλα και το κόστος της επεξεργασίας. Επιπλέον, η έντονη ανάμιξη μπορεί να σχηματίσει γαλακτώματα δυσχεραίνοντας έτσι το διαχωρισμό των φάσεων. Τέλος, οι διαλύτες επειδή δεν είναι εκλεκτικοί μπορούν να συνεκχυλίσουν με τους αναλύτες και παρεμποδίζουσες ενώσεις με παρόμοιες ιδιότητες (Θεοδωρίδης και άλλοι, 2015a).

Η LLE στην κλασσική της μορφή πραγματοποιείται κυρίως με τη βοήθεια ενός διαχωριστικού χωνιού και δύσκολα αυτοματοποιείται. Η εκχύλιση σε αδρανές στερεό υπόστρωμα (Supported Liquid Extraction, SLE) (εικόνα 12) με χρήση μη αναμίξιμου διαλύτη ακινητοποιημένου σε γη διατόμων ή συνθετικά υλικά σε μικροστήλη από πολυπροπυλένιο, έχει τροποποιήσει την LLE και έχει την ίδια αρχή μεθόδου (Θεοδωρίδης και άλλοι, 2015a).



Εικόνα 12. Βασικά στάδια SLE εκχύλισης (Biotage, 2020).

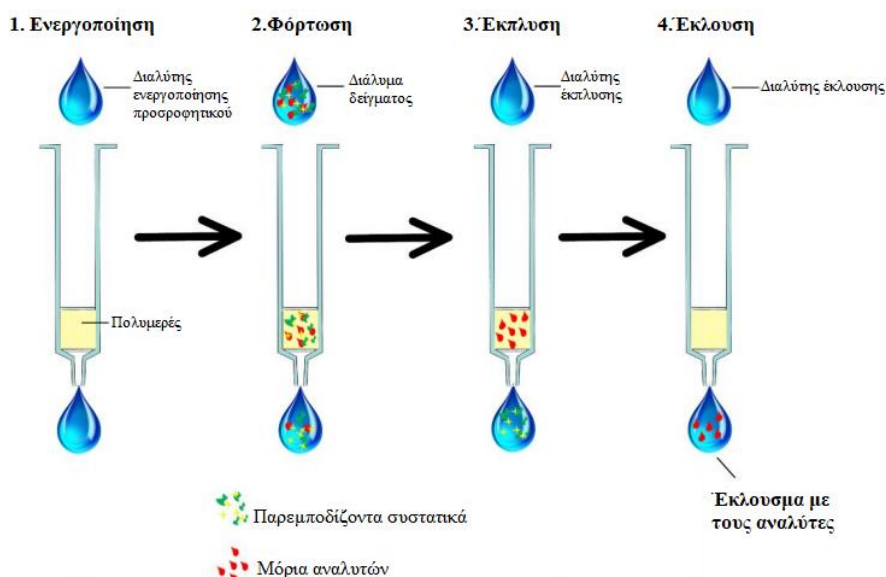
4.2.3. Εκχύλιση στερεής φάσης (Solid Phase Extraction, SPE)

Η SPE στηρίζεται στην κατανομή των αναλυτών-στόχων ανάμεσα στη στερεή φάση (προσροφητικό υλικό) και στην υγρή, όπου βρίσκονται όλες οι παρεμποδίσεις. Οι αναλύτες εμφανίζουν μεγαλύτερη συγγένεια με τις ομάδες της στερεής φάσης και έτσι διαχωρίζονται. Οι ενώσεις παραλαμβάνονται από το στερεό υπόστρωμα με τη βοήθεια κατάλληλων

διαλυτών. Οι διάφοροι μηχανισμοί συγκράτησης και έκλυσης των ενώσεων εξαρτώνται από τις διαμοριακές δυνάμεις μεταξύ των προσδιοριζόμενων ενώσεων, τις ενεργές ομάδες του προσροφητικού υλικού και την υγρή φάση του δείγματος (Θεοδωρίδης και άλλοι, 2015a).

Η SPE στηρίζεται στο μηχανισμό της εξαντλητικής εκχύλισης, όπου το δείγμα διέρχεται μέσω ενός συμπαγούς στρώματος ροφητικών σωματιδίων τα οποία κατανέμονται σε φυσίγγιο ή σε δίσκο (Kabir & Furton, 2019). Τα προσροφητικά SPE είναι κυρίως χημικώς τροποποιημένα με βάση το διοξείδιο του πυριτίου με ορισμένες πολυμερικές φάσεις (Kabir & Furton, 2019). Τα εμπορικά προϊόντα SPE διατίθενται σε μορφή φυσιγγίων, σωλήνες και 96-well-plates (Kyle, 2017).

Η εκχύλιση στερεής φάσης χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό ενός βιολογικού δείγματος και για τον προσδιορισμό φαρμακευτικών ουσιών. Το προσροφητικό, πριν την εισαγωγή του βιολογικού υποστρώματος, προετοιμάζεται με νερό ή μεθανόλη (Kyle, 2017). Σε ένα μεγάλο σωλήνα εισάγεται μια στήλη προσροφητικού υλικού όπου στη συνέχεια θα υποδεχθεί το βιολογικό δείγμα (π.χ. αίμα). Το δείγμα ρέει μέσω του σωλήνα υπό κενό, πραγματοποιείται προσρόφηση του φαρμάκου στο υλικό και η υπόλοιπη ποσότητα δείγματος αφήνεται να περάσει μέσω της στήλης. Τέλος, ένας συμβατός διαλύτης με το αναλυτικό σύστημα θα πραγματοποιήσει έκλυση του φαρμάκου από το προσροφητικό (εικόνα 13) (Houck & Siegel, 2015).



Εικόνα 13. Βασικά στάδια εκχύλισης στερεής φάσης (SPE) (Sandoval, 2017)

Η SPE αναγνωρίζεται ως μία εναλλακτική λύση αντί της LLE. Η τεχνική αυτή είναι ευρέως αποδεκτή και μπορεί να εκχύλίζει πολικές ενώσεις χρησιμοποιώντας μικρό όγκο οργανικού διαλύτη. Επιπλέον, απαιτείται λιγότερος χρόνος προεργασίας δείγματος και χαμηλότερο κόστος ανάλυσης σε σχέση με την LLE. Χαρακτηρίζεται από απλότητα και μπορεί να αυτοματοποιηθεί (Kazantzi & Anthemidis, 2017).

Η SPE, ωστόσο, παραμένει μια χρονοβόρα και πολύπλευρη τεχνική προετοιμασίας δειγμάτων. Τα αναλυόμενα δείγματα πρέπει να είναι καθαρά χωρίς να περιέχουν σωματίδια. Η εκχύλιση πλήρους αίματος, γαστρικού περιεχομένου ή ιστού δεν είναι συμβατή με πολλά μέσα εκχύλισης SPE (Kyle, 2017). Επιπλέον, η εξάτμιση διαλύτη και η ανασύσταση δείγματος είναι συχνά αναπόφευκτη, οδηγώντας σε πιθανή απώλεια αναλύτη. Τέλος, η εκχύλιση πολλών πολικών αναλυτών και μεταβολιτών από βιολογικά δείγματα καθίσταται δύσκολη λόγω περιορισμένου αριθμού πολικών προσροφητικών συμβατών με SPE (Kabir & Furton, 2019).

4.2.4.Μικροεκχύλιση στερεής φάσης (Solid Phase MicroExtraction, SPME)

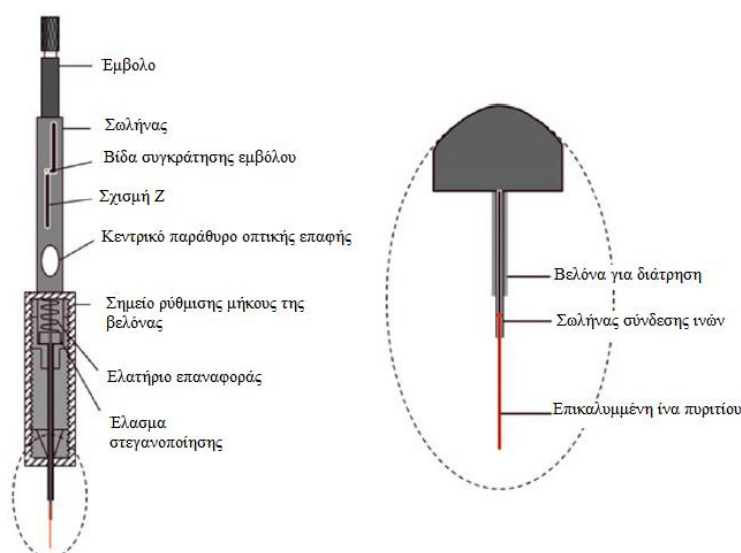
Προκειμένου να ξεπεραστούν τα προβλήματα της SPE, ο Pawliszyn και οι συνεργάτες του το 1987 εισήγαγαν τη μικροεκχύλιση στερεής φάσης (Pawliszyn & Liu, 1987). Πρόκειται για μία νέα τεχνική δειγματοληψίας και παρασκευής δείγματος χωρίς χρήση διαλυτών/μικρή χρήση διαλυτών (Kabir et al., 2017).

Ο μηχανισμός της SPME δεν βασίζεται στην εξαντλητική εκχύλιση αλλά στην ισορροπία κατανομής των αναλυτών μεταξύ της φάσης εκχύλισης επί της ίνας SPME (συντηγμένη ίνα πυριτίου / σταθερή εύκαμπτη ίνα / μεταλλική ίνα) και του υποστρώματος του δείγματος (Kataoka, 2017· Kabir & Furton, 2019). Πραγματοποιείται με τη βοήθεια ίνας τετηγμένου διοξειδίου του πυριτίου (SiO_2) επικαλυμμένη με μια στατική φάση από πολυμερές υλικό (στην εικόνα 14 παρουσιάζεται η πρώτη εμπορικά διαθέσιμη συσκευή SPME) και ακολουθεί τα εξής στάδια:

1. Κατανομή των ουσιών στόχων μεταξύ του δείγματος και του πολυμερούς υλικού της στατικής φάσης έως ότου επιτευχθεί ισορροπία.
2. Μεταφορά της ίνας με τις συμπυκνωμένες ουσίες σε αναλυτικό σύστημα για την πραγματοποίηση εκρόφησης, διαχωρισμού και ποσοτικοποίησης, χωρίς να είναι απαραίτητο ένα ενδιάμεσο στάδιο καθαρισμού (Θεοδωρίδης και άλλοι, 2015a).

Υπάρχουν δύο τρόποι με τους οποίους χρησιμοποιείται η SPME:

- Ο άμεσος, με την εμφύσηση της ίνας στο δείγμα που περιέχει τους αναλύτες και
- ο έμμεσος, με την εισαγωγή της ίνας στον υπερκείμενο χώρο του δείγματος το οποίο περιέχει πτητικούς αναλύτες που κατανέμονται μεταξύ αέριας και υγρής φάσης (Ashri & Abdel-Rehim, 2011).



Εικόνα 14. Συσκευή SPME (Xu & Ouyang, 2019)

Η δειγματοληψία, η συμπίκνωση, ο διαχωρισμός και η εισαγωγή δείγματος στο αναλυτικό σύστημα μπορούν να πραγματοποιηθούν σε ένα μόνο βήμα ενώ είναι δυνατός ο προσδιορισμός τόσο των πτητικών όσο και των μη πτητικών αναλυτών από σύνθετα υποστρώματα δείγματος (Jalili et al., 2019). Η απλότητα, η ταχύτητα, η συμβατότητα με πολλά αναλυτικά όργανα, η δυνατότητα αυτοματοποίησης καθώς και η εμπορική διαθεσιμότητα των υλικών επικάλυψης την καθιστούν μία διαδεδομένη τεχνική εκχύλισης (Jalili et al., 2020).

Όμως, η SPME παραμένει μία τεχνική με αρκετά μειονεκτήματα. Το υψηλό κόστος, οι περιορισμένες εφαρμογές της στην υγρή χρωματογραφία, η αστάθεια των ινών σε οργανικούς διαλύτες και βιολογικά δείγματα (καταστροφή της επικάλυψης) καθώς και η μόλυνση του δείγματος από προηγούμενο δείγμα με αποτέλεσμα την εμφάνιση κορυφών που στην πραγματικότητα δεν υπάρχουν (συμπαράσυρση-Carry over) είναι μερικά από τα προβλήματα που αντιμετωπίζει η SPME (Ashri & Abdel-Rehim, 2011). Η μικρή μάζα του ροφητή και η

χωρητικότητα του δείγματος καθώς και η μηχανική παραμόρφωση μπορούν να οδηγήσουν σε μειωμένη ακρίβεια και ευαισθησία (Kumar et al., 2014· Kazantzi & Anthemidis, 2017).

Επιπροσθέτως, ο χρόνος εκχύλισης μπορεί να παραταθεί από το υψηλό ιξώδες του πολυμερούς το οποίο καθυστερεί τη μεταφορά μάζας των προσδιοριζόμενων ουσιών εντός των ροφητών. Τέλος, με την SPME, αν δεν τροποποιηθεί το pH του υποστρώματος, προσδιορίζονται μόνο ουδέτεροι αναλύτες (Kabir & Furton, 2019).

4.2.5. Εκχύλιση μέσω προσρόφησης σε δίκτυο επικαλυμμένων ινών (Fabric Phase Sorptive Extraction, FPSE)

Η τεχνική Fabric Phase Sorptive Extraction (FPSE) προτάθηκε από τους Kabir και Furton το 2014 ως τεχνικής προετοιμασίας δείγματος. Έκτοτε έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον των επιστημόνων ως μία αποτελεσματική, ευαίσθητη και πράσινη μέθοδο προκατεργασίας δειγμάτων για τον προσδιορισμό διαφόρων αναλυτών σε διάφορα περιβαλλοντικά και βιολογικά δείγματα (Kazantzi & Anthemidis, 2017).

Αυτή η νέα τεχνική χρησιμοποιεί ως μέσο εκχύλισης ένα φυσικό ή συνθετικό υπόστρωμα (δίκτυο ινών), στο οποίο επικαλύπτεται χημικά ένα υβριδικό οργανικό-ανόργανο διάλυμα κολλοειδούς-γέλης (sol-gel), με μία εξαιρετικά λεπτή στρώση (Kabir et al., 2013).

Η τεχνολογία sol-gel χρησιμοποιείται για τη σύνθεση ανόργανων πολυμερών και οργανικών – ανόργανων υβριδικών προϊόντων με διαφορετικό μέγεθος, μορφή, σχήμα, θερμική και χημική σταθερότητα, ομοιογένεια, καθαρότητα, πορώδες και επιλεκτικότητα. Η τεχνολογία sol-gel επιτρέπει την ισχυρή συγκράτηση της επικάλυψης στο υπόστρωμα λόγω της χημικής σύνδεσης. Ο μειωμένος χρόνος ισορροπίας εκχύλισης καθώς και η γρήγορη μεταφορά μάζας χάρη στην εγγενή πορώδη δομή αποτελούν επίσης χαρακτηριστικά της τεχνολογίας sol-gel (Kabir et al., 2013· Kazantzi & Anthemidis, 2017).

Δημιουργία διαλύματος κολλοειδούς-γέλης και προετοιμασία φίλτρου

Πριν τη διαδικασία της εκχύλισης απαιτείται η μεμβράνη FPSE να επικαλυφθεί με το διάλυμα κολλοειδούς-γέλης. Η συγκεκριμένη ενέργεια περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

1. Επιλογή και προκατεργασία του υποστρώματος. Η πολικότητα των ουσιών καθορίζει την επιλογή του υποστρώματος. Για μη πολικές ουσίες προτιμάται ο πολυεστέρας και για πολικές ή μέτρια πολικές ουσίες προτιμάται η κυτταρίνη. Το υπόστρωμα για να

χρησιμοποιηθεί στη sol-gel τεχνολογία θα πρέπει να διαθέτει υδροξυλικές λειτουργικές ομάδες και να είναι διαπερατό έτσι ώστε το υδατικό δείγμα που περιέχει τους αναλύτες να μπορέσει να διεισδύσει στη μεμβράνη και μέσω των πόρων οι αναλύτες να εκχυλιστούν σχεδόν εξαντλητικά σε σύντομο χρονικό διάστημα. Στη συνέχεια, το υπόστρωμα προκατεργάζεται έτσι ώστε να απομακρυνθούν υπολειμματικά χημικά από την επιφάνειά του.

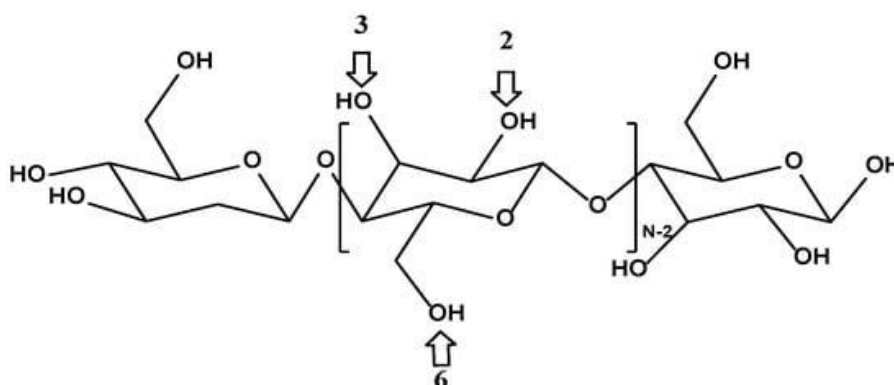
2. Προετοιμασία του κολλοειδούς διαλύματος για τη δημιουργία του διαλύματος κολλοειδούς-γέλης, το οποίο θα επικαλύψει χημικά το υπόστρωμα/φίλτρο. Το διάλυμα περιέχει έναν ή περισσότερους προδρόμους ανόργανα/οργανικά τροποποιημένους, ένα ενεργό ανόργανο/οργανικό πολυμερές, ένα συμβατό σύστημα διαλυτών, έναν όξινο καταλύτη και νερό για υδρόλυση. Μεταξύ των διαθέσιμων οργανικά τροποποιημένων πρόδρομων ουσιών, χρησιμοποιούνται το μεθυλτριμεθοξυσιλάνιο (MTMS), το φαινυλοτριμεθοξυσιλάνιο (PTMS) και 3-αμινοπροπυλοτριμεθοξυσιλάνιο (3-APTMS). Στα πιο δημοφιλή πολυμερή περιλαμβάνονται το πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο (PDMS), η πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) καθώς και το πολυ(διμεθυλοδιφαινυλοσιλοξάνιο) (PDMDPS). Όσο αφορά τους καταλύτες, χρησιμοποιούνται το τριφθοραιθανικό οξύ (TFA), το υδροχλώριο, το οξικό οξύ, το υδροφθορικό οξύ και το οξαλικό οξύ. Η πολικότητα και η μοριακή κατάσταση των αναλυτών θα καθορίσει την επιλογή του πρόδρομου και του πολυμερούς. Το βήμα αυτό είναι το πιο σημαντικό στη δημιουργία της FPSE μεμβράνης καθώς η επιλογή του προδρόμου, του πολυμερούς σε συνδυασμό με τη χημεία της επιφάνειας του υποστρώματος καθορίζουν την επιλεκτικότητα και την απόδοση της εκχύλισης.
3. Επικάλυψη του φίλτρου με το sol-gel διάλυμα με τη βοήθεια της τεχνολογίας εμβάπτισης. Η διαδικασία της επικάλυψης αρχίζει με την εμβάπτιση του προκατεργασμένου φίλτρου στο διάλυμα κολλοειδούς-γέλης.
4. Ξήρανση (ωρίμανση) και καθαρισμός της επικαλυμμένης μεμβράνης με ένα σύστημα οργανικών διαλυτών. Η απομάκρυνση των μη συνδεδεμένων συστατικών του διαλύματος κολλοειδούς-γέλης καθώς και των υποπροϊόντων αντίδρασης θα πραγματοποιηθεί σε αυτό το στάδιο καθαρισμού.
5. Κατάτμηση της μεμβράνης σε κομμάτια στο επιθυμητό μέγεθος. Όταν ο όγκος του δείγματος που θα χρησιμοποιηθεί (π.χ. σίελα) είναι μικρός, τότε συνιστάται μικρό μέγεθος μεμβράνης. Ένας μεγαλύτερος όγκος δείγματος (5-20 mL) απαιτεί μεγαλύτερο μέγεθος μεμβράνης. Όμως, παρά το γεγονός ότι η μεγαλύτερη μεμβράνη θα οδηγήσει την εκχύλιση γρηγορότερα σε ισορροπία, ο όγκος του διαλύτη έκλουσης που απαιτείται είναι

μεγαλύτερος. Ένας μεγαλύτερος όγκος οργανικού διαλύτη στο στάδιο της έκλουσης μπορεί να οδηγήσει σε αραίωση των αναλυτών. Έτσι, ο όγκος του διαλύτη θα πρέπει να διατηρείται στο μικρότερο δυνατό επίπεδο στο πλαίσιο και της πράσινης χημείας (Kabir & Samanidou, 2021).

Αντιδράσεις κολλοειδούς-γέλης

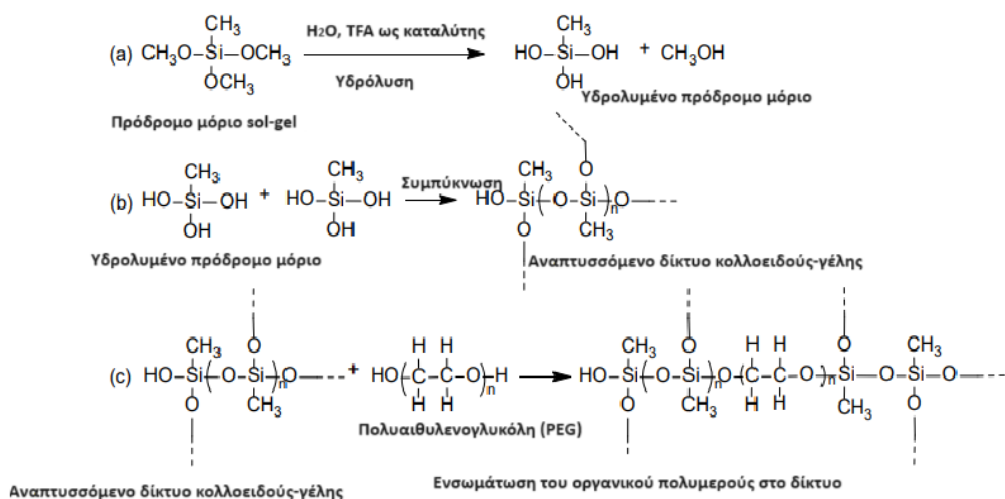
Μία σειρά αντιδράσεων πραγματοποιούνται κατά τη δημιουργία των διαλυμάτων κολλοειδούς-γέλης στο εκάστοτε υπόστρωμα για τη διαδικασία FPSE. Αρχικά, λαμβάνει χώρα η καταλυτική υδρόλυση του πρόδρομου μορίου sol-gel (π.χ. MTMS), παρουσία καταλύτη, (π.χ. TFA). Τα υδρολυμένα πρόδρομα μόρια πολυσυμπυκνώνονται οδηγώντας έτσι σε ένα αναπτυσσόμενο δίκτυο sol-gel. Στη συνέχεια, το ενεργό οργανικό πολυμερές (π.χ. PEG) ενσωματώνεται τυχαία στο αναπτυσσόμενο δίκτυο sol-gel. Τέλος, το αναπτυσσόμενο δίκτυο sol-gel ακινητοποιείται στην επιφάνεια του υποστρώματος μέσω πολυσυμπύκνωσης. (Kabir et al., 2017).

Η κυτταρίνη (εικόνα 15) είναι ένα υδρόφιλο γραμμικό πολυμερές της β-D-γλυκοπυρανόζης και ένας εξαιρετικός υποψήφιος ως πιθανό υπόστρωμα για επικάλυψη κολλοειδούς-γέλης λόγω της διαπερατότητάς του και των λειτουργικών ομάδων που διαθέτει. Τρεις λειτουργικές ομάδες υδροξυλίου (στις θέσεις 2,3 και 6) περιέχονται σε κάθε διμερές κυτταρίνης. Αυτές οι υδροξυλικές ομάδες συμμετέχουν στην πολυσυμπύκνωση κατά τη διαδικασία επικάλυψης κολλοειδούς γέλης και η πολυσυμπύκνωση θα οδηγήσει στη δημιουργία ενός λεπτού, χημικώς συνδεδεμένου στρώματος ροφητή τυλιγμένου στις μικροΐνες κυτταρίνης (Kabir et al., 2017).

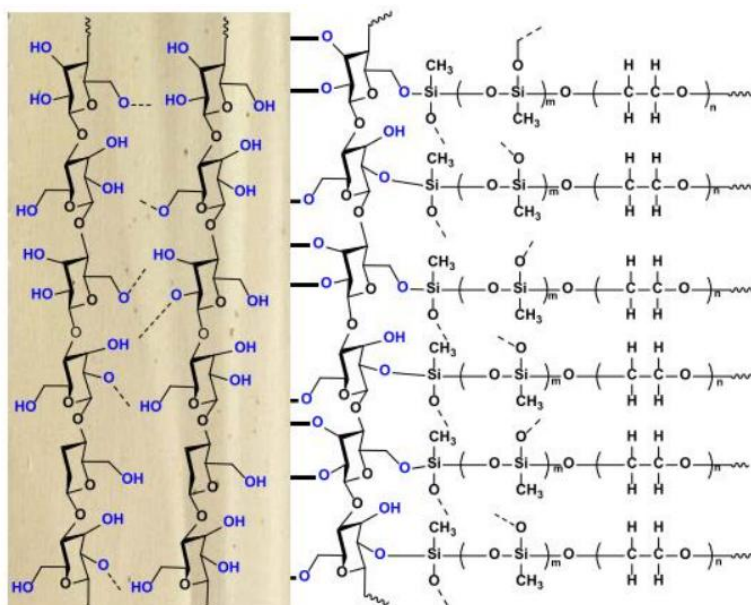


Εικόνα15. Χημική δομή κυτταρίνης (Kabir et al., 2017).

Αξιίζει να σημειωθεί, ότι η συγκεκριμένη συσκευή FPSE (ίνες κυτταρίνης/ πολυαιθυλενογλυκόλη) που χρησιμοποίησαν στην εργασία τους ο Kabir και άλλοι το 2017 επιλέχτηκε ως η κατάλληλη και στην παρούσα εργασία. Οι εικόνες 16 και 17 περιγράφουν σχηματικά την παραπάνω σύνθεση (Kabiret al., 2017).



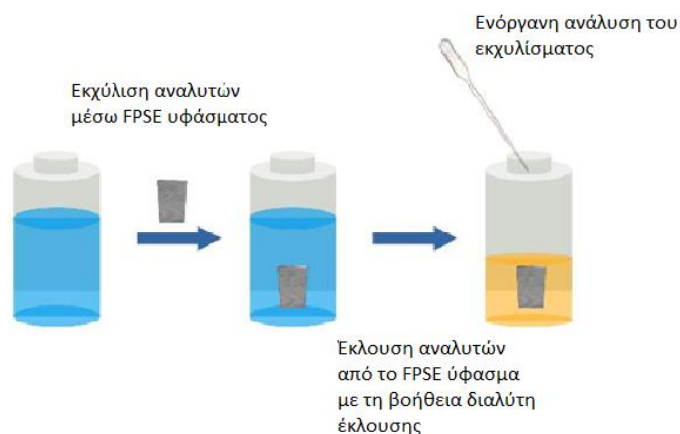
Εικόνα 16. Χημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν μέρος στην σύνθεση της PEG sol-gel επικάλυψης της επιφάνειας του δικτύου ινών (a) υδρόλυση του μεθυλτριμεθοξυσιλανίου (MTMS) υπό την επίδραση καταλύτη οξέος, (b) συμπύκνωση των υδρολυμένων μορίων MTMS προς δημιουργία sol-gel δικτύου, (c) τυχαία ενσωμάτωση μορίων πολυμερούς (PEG) στο αναπτυσσόμενο sol-gel δίκτυο (Kabir et al., 2017).



Εικόνα 17. Σχηματική αναπαράσταση μικροϊνών κυτταρίνης επικαλυμμένες με sol-gel PEG (Kabir et al., 2017).

Διαδικασία της εκχύλισης

Η διαδικασία της εκχύλισης ξεκινάει με την απευθείας εμβάπτιση της μεμβράνης στο διάλυμα του δείγματος που περιέχει τους αναλύτες, οι οποίοι θα προσροφηθούν πάνω στην τροποποιημένη επιφάνεια του μέσου FPSE. Η χρήση κάποιας εξωτερικής διάταξης όπως μαγνητική ανάδευση ή λουτρό υπερήχων, θα αυξήσει τη διάχυση των αναλυτών και θα οδηγήσει σε ταχύτερη εκχύλιση. Η δημιουργία διαμοριακών δυνάμεων όπως δυνάμεις London, δεσμοί υδρογόνου, αλληλεπιδράσεις διπόλου διπόλου είναι αποτέλεσμα των αλληλεπιδράσεων που λαμβάνουν χώρα. Στη συνέχεια, όταν επέλθει η αποκατάσταση της ισορροπίας προσρόφησης, η μεμβράνη απομακρύνεται και εμβαπτίζεται σε δοχείο με μικρό όγκο διαλύτη έκλουσης. Το έκλουσμα περιέχει τις ενώσεις στόχους παρέχοντας υψηλό παράγοντα προσυγκέντρωσης, ο οποίος εξαρτάται από τον όγκο του δείγματος και από τον όγκο του διαλύτη έκλουσης. Τέλος, το έκλουσμα αναλύεται με έγχυσή του στο αναλυτικό όργανο (Kabir et al., 2017· Kazantzi & Anthemidis, 2017). Η εικόνα 18 απεικονίζει σχηματικά τη διαδικασία FPSE.



Εικόνα 18. Σχηματική αναπαράσταση της εκχύλισης FPSE

Συνδυασμός SPE και SPME

Η FPSE έχει συνδυάσει καινοτόμα τις δύο βασικές τεχνικές προκατεργασίας (SPE και SPME) σε μία ενιαία τεχνική προεργασίας δειγμάτων. Η εξαντλητική εκχύλιση της SPE και ο χαρακτηριστικός μηχανισμός εκχύλισης που βασίζεται στην ισορροπία της SPME ενώνονται. Όταν το μέσο FPSE έρχεται σε επαφή με το υδατικό διάλυμα που περιέχει τους αναλύτες, λόγω της πορώδους επικάλυψης και της διαπερατότητας του υποστρώματος, το υδατικό

διάλυμα διαχέεται εύκολα και γρήγορα στο μέσο FPSE και αλληλεπιδρά με το sol-gel, προσομοιάζοντας έτσι την εκχύλιση στερεής φάσης. Την ίδια στιγμή, οι αναλύτες μεταφέρονται στο μέσο FPSE με βάση την κατανομή της αναλυόμενης ουσίας μεταξύ του sol-gel και του δείγματος μέχρι να επιτευχθεί ισορροπία. Με αυτόν τον τρόπο, η FPSE μιμείται την εκχύλιση SPME (Zilfidou et al., 2018· Tartaglia et al., 2019· Kabir & Samanidou, 2021).

Επιπλέον, οι τεχνικές SPE και SPME χρησιμοποιούν περιορισμένο αριθμό υποστρωμάτων. Σε αντίθεση, στην FPSE, προσφέρεται ένα ευρύ φάσμα προσροφητικών τα οποία μπορούν να εφαρμοστούν σε διάφορα είδη δειγμάτων. Έτσι, χρησιμοποιούνται τόσο υδρόφιλα όσο υδρόφοβα καθώς και συνδυασμός τους. Η επιλογή του υποστρώματος είναι καίριας σημασίας καθώς επηρεάζει την επιλεκτικότητα και την πολικότητα του μέσου (Zilfidou et al., 2018· Kabir & Samanidou, 2021).

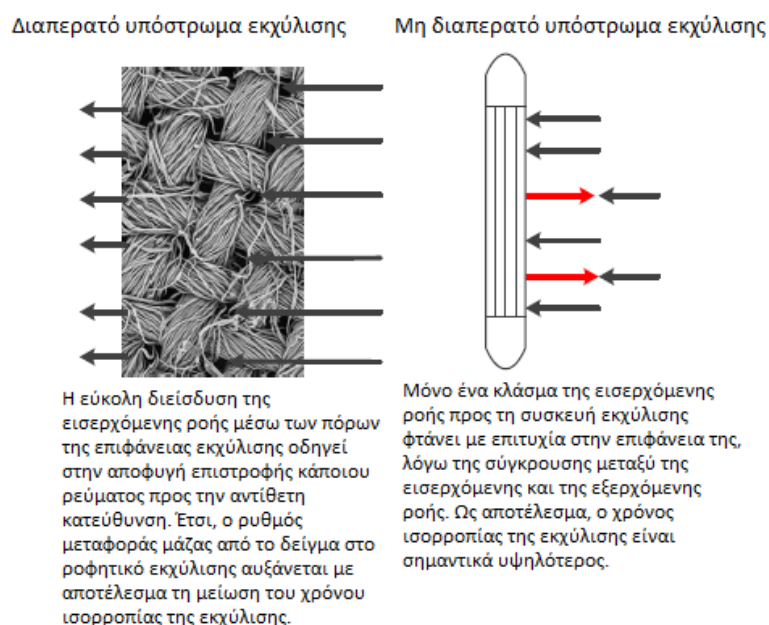
Στις τεχνικές μικροεκχύλισης, η επιλεκτικότητα της μεθόδου, εξαρτάται από τα οργανικά πολυμερή και στις τεχνικές εξαντλητικής εκχύλισης από τους οργανικούς υποκαταστάτες. Ωστόσο, στην τεχνική FPSE η επιλεκτικότητα και η πολικότητα του μέσου επηρεάζεται και από το οργανικό πολυμερές και από τους οργανικούς υποκαταστάτες, τους οποίους φέρει το ανόργανο πρόδρομο (Zilfidou et al., 2018).

Πλεονεκτήματα διαδικασίας

Βασικό πλεονέκτημα της εκχύλισης μέσω προσρόφησης σε δίκτυο επικαλυμμένων ινών (FPSE), έναντι των υπόλοιπων τεχνικών είναι η μεγάλη ποικιλία sol-gel επικαλύψεων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν. Η διαφορετικότητα των επικαλύψεων θα οδηγήσει στην προσρόφηση ουσιών με διαφορετικά χαρακτηριστικά (Ruan et al., 2020).

Η διαδικασία της FPSE χαρακτηρίζεται από απλότητα, επαναληψιμότητα, χαμηλό κόστος και ελάχιστη κατανάλωση διαλυτών. Η ισχυρή χημική σύνδεση μεταξύ του sol-gel και του δικτύου ινών επιτρέπει την έκθεση των μέσων FPSE σε οποιονδήποτε οργανικό διαλύτη για εκχύλιση ή έκλυση των αναλυτών ακόμα και σε πολύ όξινα ή βασικά περιβάλλοντα ενώ ο ισχυρός ομοιοπολικός δεσμός προσδίδει χημική και θερμική σταθερότητα. Η πορώδης επικάλυψη, το διαπερατό υπόστρωμα και η υψηλή ενεργός επιφάνεια της συσκευής FPSE οδηγούν πολύ γρήγορα την εκχύλιση σε ισορροπία (εικόνα 19). Τα βήματα προκατεργασίας δείγματος ελαχιστοποιούνται, περιορίζοντας έτσι τα πειραματικά σφάλματα, την πιθανή απώλεια αναλυτών καθώς και το κόστος της διαδικασίας, η οποία μπορεί να ολοκληρωθεί

ακόμα και με την απευθείας εισαγωγή του μέσου στο δοχείο με το δείγμα. Η απόδοση της διαδικασίας μπορεί να αυξηθεί με τη βοήθεια της μαγνητικής ανάδευσης και της εμβάπτισης σε λουτρό υπερήχων. Τέλος, το μέσο FPSE, έπειτα από καθαρισμό με κατάλληλο διαλύτη και ξήρανση σε ύαλο ωρολογίου μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί σε περαιτέρω διαδικασίες εκχύλισης (Kabir et al., 2017· Kazantzi & Anthemidis, 2017· Zilfidou et al., 2018· Jiménez-Holgado et al., 2020).



Εικόνα 19. Σύγκριση της ροής υγρού μέσω διαπερατού και αδιαπεράτου υποστρώματος (Kabir et al., 2017).

4.3. Τεχνικές ανάλυσης δείγματος

Τα τελευταία χρόνια, η ανάλυση βιολογικών δειγμάτων έχει γίνει πολύ απαιτητική. Σημαντικά προβλήματα που προκύπτουν, αφορούν την αξιοπιστία της χρησιμοποιούμενης μεθόδου, την ευαισθησία, την ταχύτητα και την απόδοση της ανάλυσης (Niu et al., 2018).

Για την ανάλυση βιολογικών δειγμάτων έχουν χρησιμοποιηθεί ανοσοδοκιμασίες, τεχνικές χρωματογραφίας και φασματομετρίας μάζας.

4.3.1. Ανοσοδοκιμασίες

Οι ανοσοχημικές τεχνικές χρησιμοποιούνται για τις αναλύσεις ρουτίνας στην κατάχρηση φαρμάκων. Βασίζονται στην ανοσοχημική αντίδραση εξαιρετικής εξειδίκευσης, ενός

αντιγόνου (Ag) και ενός αντισώματος (Ab) η οποία οδηγεί στη δημιουργία ενός συμπλόκου αντιγόνου-αντισώματος. Κοινές τεχνικές αποτελούν οι EMIT (enzyme multiplied immunoassay technique), CEDIA (cloned enzyme donor immunoassay), chemiluminescent immunoassays (CLIA), KIMS (kinetic interaction of microparticle in solution) και άλλες. Οι κύριες κατηγορίες ουσιών που μελετώνται είναι οι αμφεταμίνες, οι μεταβολίτες κοκαΐνης, ο μεταβολίτης THC (Τετραϋδροκανναβινόλη), τα οπιούχα, η φαινκυκλιδίνη και οι βενζοδιαζεπίνες (Datta, 2019· Tamama, 2021).

Οι ανοσοδοκιμασίες αποτελούν μία κοινή μέθοδο ελέγχου, λόγω της απλότητας, του χαμηλού κόστους και της ταχύτητας της ανάλυσης. Τα συστήματα που χρησιμοποιούνται είναι αυτοματοποιημένα, γρήγορα και παρέχουν ποιοτικά και ημιποσοτικά αποτελέσματα. Τα δείγματα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν, είναι το αίμα, τα ούρα και άλλα σωματικά υγρά όπως τα σίελα και το μηκόνιο. Όμως, αντιμετωπίζουν προβλήματα παρεμποδίσεων και διασταυρούμενης δραστηριότητας, δίνοντας ψευδή θετικά όσο και ψευδή αρνητικά αποτελέσματα. Έτσι, για να επιβεβαιωθεί η παρουσία μία ουσίας σε ένα συγκεκριμένο δείγμα πρέπει να ακολουθήσει ανάλυση με τεχνική υγρής χρωματογραφίας ή αέριας χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μάζας (Datta, 2019· Tamama, 2021).

4.3.2. Αέρια Χρωματογραφία (Gas Chromatography, GC)

Η αέρια χρωματογραφία είναι τεχνική διαχωρισμού, η οποία διαχωρίζει τα συστατικά πολύπλοκων δειγμάτων με βάση τις διαφορές τους στην πτητικότητα και στην πολικότητα. Τα συστατικά κατανέμονται μεταξύ μιας κινητής αέριας φάσης και μιας στερεάς ή υγρής στατικής φάσης (Skoog et al., 2007a· Stauffer et al., 2008).

Ανάλογα με τη φύση της στατικής φάσης, ταξινομείται η χρωματογραφία ως αερίου-στερεού (gas solid chromatography, GSC) και αερίου-υγρού (gas liquid chromatography, GLC). Η πρώτη έχει περιορισμένες εφαρμογές ενώ η χρωματογραφία αερίου-υγρού χρησιμοποιείται σε όλους τους κλάδους των θετικών επιστημών. Στη χρωματογραφία αερίου-στερεού οι αναλύτες κατακρατούνται στη στατική φάση μέσω φυσικής προσρόφησης. Στην τεχνική της αέριας-υγρής χρωματογραφίας τα συστατικά διαχωρίζονται με βάση την κατανομή τους μεταξύ ενός υγρού (στατική φάση), καθηλωμένου σε στερεό φορέα ή στα τοιχώματα ανοικτών τριχοειδών σωλήνων και του φέροντος αερίου (κινητή φάση) (Skoog, et al., 2007a).

Το αέριο της κινητής φάσης καλείται φέρον αέριο το οποίο είναι αδρανές και δεν αλληλεπιδρά με τους αναλύτες, έτσι η κατανομή τους δεν εξαρτάται από αυτό. Ο τύπος του

χρησιμοποιούμενου ανιχνευτή καθώς και η καταλληλότητα των αερίων (αποτελεσματικότητα και διαθεσιμότητα) καθορίζουν την επιλογή του φέροντος αερίου. Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα αέρια είναι το ήλιο (He), το υδρογόνο (H₂), το άζωτο (N₂) και το αργό (Ar) τα οποία διατίθενται πεπιεσμένα σε οβίδες. Η ταχύτητα ροής ρυθμίζεται με ρυθμιστές και μετρητές πίεσης (Skoog et al., 2007a· Stauffer et al., 2008).

Σημαντικό μέρος στην αέρια χρωματογραφία αποτελεί η στήλη. Υπάρχουν δύο γενικοί τύποι στηλών, οι πληρωμένες και οι στήλες ανοιχτού σωλήνα ή τριχοειδείς. Οι τριχοειδείς στήλες κατασκευάζονται από τηγμένη πυριτία ή ανοξείδωτο χάλυβα, το μήκος τους μπορεί να φτάσει τα 100 μέτρα και έχουν υψηλή διακριτική ικανότητα (Skoog et al., 2007a).

Ο ρόλος του ανιχνευτή είναι επίσης αξιοσημείωτος για την πραγματοποίηση της ανάλυσης. Ο ανιχνευτής παράγει ένα μετρήσιμο ηλεκτρονικό σήμα ως απόκριση στην έκλυση των συστατικών από τη στήλη. Στο εμπόριο κυκλοφορούν διάφοροι τύποι ανιχνευτών ανάλογα με τις ιδιότητες των ουσιών που χρήζουν προς ανίχνευση και παρέχουν ικανοποιητική ευαισθησία. Έχουν χρησιμοποιηθεί ανιχνευτές ιοντισμού φλόγας (FID), ανιχνευτές θερμικής αγωγιμότητας (TCD), ανιχνευτές σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD), ηλεκτρολυτικής αγωγιμότητας (Hall) και ανιχνευτές φασματομετρίας μαζών (MS) (Skoog et al., 2007a· Stauffer et al., 2008).

Για την πραγματοποίηση του χρωματογραφικού διαχωρισμού, το δείγμα εισάγεται μέσω μιας θύρας έγχυσης στον εγχυτήρα. Η έκλυση πραγματοποιείται με τη ροή του φέροντος αερίου, το οποίο αποτελεί την κινητή φάση. Το φέρον αέριο διέρχεται από την είσοδο και σαρώνει το δείγμα στη στατική φάση (στήλη). Ένας φούρνος ελεγχόμενης θερμοκρασίας, μέσα στον οποίο βρίσκεται η στήλη, διατηρεί την επιθυμητή θερμοκρασία. Τα συστατικά του δείγματος διαχωρίζονται καθώς αυτά ταξιδεύουν μέσα στη στατική φάση και εξέρχονται από τη στήλη σε διαφορετικούς χρόνους. Με την έξοδό τους από τη στήλη, τα συστατικά θα εισέλθουν στον ανιχνευτή όπου θα παραχθεί ηλεκτρονικό σήμα. Η ένταση του σήματος είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των αναλυτών (Skoog et al., 2007a· Stauffer et al., 2008).

Η χρήση ανιχνευτών φασματομετρίας μάζας και η ανάπτυξη συζευγμένων διατάξεων GC-MS έχει επιτρέψει με μεγάλη επιτυχία τον προσδιορισμό πολυάριθμων συστατικών σε φυσικά, βιολογικά και περιβαλλοντικά συστήματα (Skoog et al., 2007a).

4.3.3. Υγρή Χρωματογραφία (Liquid Chromatography, LC)

Η υγρή χρωματογραφία είναι μία διαδεδομένη τεχνική διαχωρισμού με πολλές εφαρμογές. Η ευαισθησία της, η εύκολη προσαρμογή σε ποσοτικούς διαχωρισμούς, ο διαχωρισμός θερμικά ευαίσθητων ουσιών καθώς και ο προσδιορισμός ενός μεγάλου φάσματος χημικών ενώσεων, οργανικών και ανόργανων την καθιστούν τεχνική ευρείας αποδοχής (Skoog et al., 2007b).

Η συγκεκριμένη τεχνική περιλαμβάνει μία κινητή φάση, η οποία αποτελείται από έναν διαλύτη ή σύστημα διαλυτών και από μία στατική φάση η οποία μπορεί να είναι στερεή ή υγρή ακινητοποιημένη σε κάποιο αδρανές υπόστρωμα. Η κινητή φάση ρέει μεταφέροντας τις ουσίες προς διαχωρισμό μέσω της στατικής φάσης. Ο διαφορετικός βαθμός αλληλεπίδρασης των συστατικών με τις δύο φάσεις καθορίζει και τον διαχωρισμό τους (Γεωργίου και άλλοι, 2015).

Στις αρχές του εικοστού αιώνα, η υγρή χρωματογραφία πραγματοποιούνταν μέσα σε γυάλινες στήλες μήκους από 50 cm έως 500 cm και διαμέτρου από 1cm έως 5 cm. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα οι ταχύτητες ροής της κινητής φάσης να είναι μικρές και όλη η διαδικασία διαχωρισμού να διαρκεί μερικές ώρες. Οι επιστήμονες για να αυξήσουν την απόδοση της στήλης και την ταχύτητα του διαχωρισμού (αύξηση του εμβαδού της επιφάνειας της στατικής φάσης το οποίο αλληλοεπιδρά με τους αναλύτες) μείωσαν το μέγεθος των σωματιδίων του υλικού πλήρωσης. Οι μικρές διαστάσεις των σωματιδίων των πληρωτικών υλικών (3 μm-10 μm) δημιουργούσαν προβλήματα στη ροή της κινητής φάσης. Έτσι, για την αντιμετώπιση αυτών των δυσκολιών, δημιουργήθηκαν πιο εξελιγμένα όργανα, όπου η κινητή φάση πλέον δεν ρέει υπό την επίδραση της βαρύτητας, αλλά με τη βοήθεια αντλίας επιτυγχάνοντας ταχύτερη ροή του υγρού έκλουσης (Skoog et al., 2007b).

Ο συνδυασμός των μικρότερων σωματιδίων πληρωτικού υλικού και της υψηλής πίεσης αύξησε την απόδοση της στήλης και οδήγησε στη δημιουργία της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC, High Performance Liquid Chromatography). Ο όρος αυτός χρησιμοποιείται για τη διάκριση των νεότερων τεχνικών από τις παλαιότερες στις οποίες χρησιμοποιούνταν η βαρυτική ροή και αποτελεί την πιο διαδεδομένη τεχνική της χημικής ανάλυσης παγκοσμίως (Skoog et al., 2007b).

Ανάλογα τον μηχανισμό διαχωρισμού και το είδος της στατικής φάσης υπάρχουν διάφοροι τύποι HPLC:

1. Χρωματογραφία προσρόφησης η οποία χωρίζεται σε κανονικής και αντίστροφης φάσης.

2. Χρωματογραφία κατανομής.
3. Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού.
4. Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής.
5. Χρωματογραφία ζεύγους ιόντων.
6. Χρωματογραφία συγγένειας (Skoog et al., 2007b).

HPLC Κανονικής φάσης

Στην HPLC κανονικής φάσης το οξείδιο του πυριτίου (SiO_2) ή το οξείδιο του αργιλίου (Al_2O_3) χρησιμοποιείται ως πληρωτικό υλικό. Τα υλικά αυτά είναι πολικά λόγω των υδροξυλομάδων που περιέχουν. Ενώ, μη πολικοί διαλύτες όπως εξάνιο ή χλωροφόρμιο χρησιμοποιούνται ως κινητή φάση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι πολικές ενώσεις στο διαχωριζόμενο μίγμα να αλληλεπιδρούν ισχυρότερα με την πολική στατική φάση και να κατακρατούνται λόγω προσρόφησης πιο ισχυρά από αυτήν, σε αντίθεση με τις λιγότερο πολικές ενώσεις οι οποίες διασχίζουν τη στήλη ταχύτερα και εκλούνται νωρίτερα. Ο διαχωρισμός χημικών ενώσεων που δεν διαλύονται στο νερό ή που υδrolύνονται (δε συνιστάται η παραμονή τους σε υδατικό περιβάλλον) καθώς και ο διαχωρισμός ισομερών ουσιών πετυχαίνεται με την HPLC κανονικής φάσης (Γεωργίου κα άλλοι, 2015).

HPLC Αντίστροφης φάσης

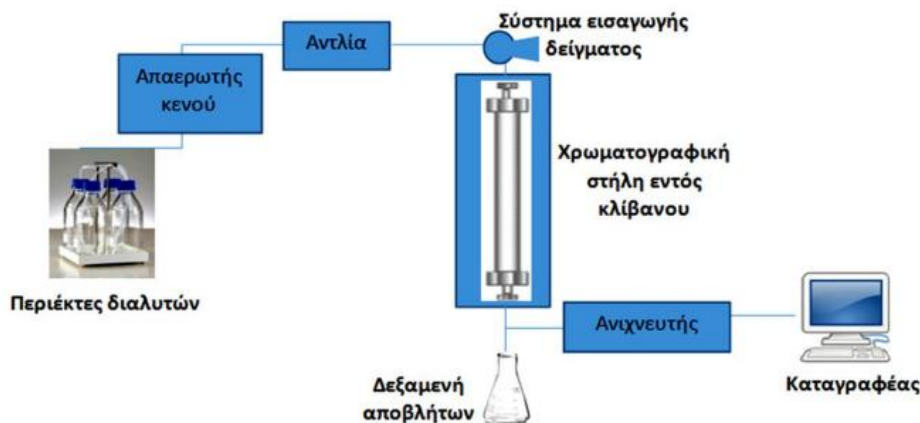
Στην HPLC αντίστροφης φάσης, η στατική φάση αποτελείται από οξείδιο του πυριτίου συζευγμένο με διάφορες ομάδες, όπως αλκύλια, φαινύλιο, διόλες, αμινομάδες, κυανομάδες κ.α., οι οποίες προσδίδουν έναν μη πολικό χαρακτήρα. Ενώ, μίγματα οργανικών διαλυτών (μεθανόλη, ακετονιτρίλιο, κ.ά.) με υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα συνθέτουν την κινητή φάση. Ο διαχωρισμός είναι αποτέλεσμα προσρόφησης υδρόφοβων μορίων σε υδρόφοβη στατική φάση, υπό την ροή κινητής φάσης αυξημένης πολικότητας. Η προσρόφηση των μη πολικών μορίων του δείγματος είναι ισχυρότερη στις αλυσίδες υδρογονάνθρακα (αλληλεπιδρούν περισσότερο χρόνο με τη στατική φάση) και για την αποδέσμευσή τους, απαιτείται υψηλότερη συγκέντρωση οργανικού διαλύτη στην κινητή φάση. Σε αντίθεση με τα μη πολικά, η κίνηση των πολικών μορίων θα είναι ταχύτερη διαμέσου της στήλης και η έκλυσή τους θα πραγματοποιηθεί νωρίτερα. Η χρωματογραφία HPLC αντίστροφης φάσης χρησιμοποιείται συχνότερα στις εφαρμογές HPLC και γενικότερα στις μεθόδους διαχωρισμού ουσιών (Γεωργίου και άλλοι, 2015).

Ο διαχωρισμός και η ανάλυση ουσιών από πολύπλοκα μίγματα είναι εφικτός με την επιλογή κατάλληλου συστήματος στατικής και κινητής φάσης ή πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης. Η επιλογή της στατικής φάσης (στήλη) εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά/προδιαγραφές της στήλης (π.χ. διάμετρος πόρων) σε συνδυασμό με τη μοριακή δομή της προσδιοριζόμενης ουσίας (π.χ. πολικότητα, μέγεθος). Σε μία χρωματογραφική ανάλυση εφαρμόζονται κυρίως δύο διαφορετικές τεχνικές έκλουσης: η ισοκρατική έκλουση (isocratic elution) και η βαθμιδωτή έκλουση (gradient elution). Στην ισοκρατική έκλουση, η σύσταση της κινητής φάσης παραμένει σταθερή κατά τη διάρκεια της ανάλυσης, ενώ στη βαθμιδωτή έκλουση η σύστασή της, μεταβάλλεται κατά την ανάλυση είτε γραμμικά, είτε σε διακριτά βήματα (Γεωργίου και άλλοι, 2015).

Μια τυπική διάταξη υγρής χρωματογραφίας περιλαμβάνει τα επιμέρους τμήματα (εικόνα 20):

- Φιάλες στις οποίες περιέχονται οι διαλύτες της κινητής φάσης.
- Απαερωτής κενού, ο οποίος απαερώνει την κινητή φάση και έτσι ελέγχεται η πίεση στη χρωματογραφική στήλη.
- Αντλία, με την οποία πετυχαίνεται η διαρκής άντληση και η προώθηση της κινητής φάσης σε όλο το σύστημα.
- Σύστημα εισαγωγής δείγματος, το οποίο βρίσκεται πριν τη χρωματογραφική στήλη και εισάγει το δείγμα στη ροή της κινητής φάσης.
- Χρωματογραφική στήλη και προστατευτική προστήλη, που βρίσκονται σε θερμοστατούμενο κλίβανο ή φούρνο. Με τη βοήθεια της στήλης επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος.
- Ανιχνευτής, με τον οποίο εξασφαλίζεται η ανίχνευση των ουσιών που εξέρχονται από τη στήλη. Κάποιοι από τους ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται στην HPLC είναι: ανιχνευτές ορατού-υπεριώδους (UV/Vis Detector), αγωγιμομετρικοί ανιχνευτές (Conductivity Detector), ανιχνευτές δείκτη διάθλασης (Refractive Index Detector), ανιχνευτές πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Ανιχνευτής NMR), ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές (Electrochemical Detector), φθορισμομετρικοί ανιχνευτές (Fluorescence Detector), ανιχνευτές σκέδασης φωτός μετά από εξάτμιση (Evaporative light scattering detector, ELSD) και **ανιχνευτές φασματομετρίας μαζών (Mass Spectroscopy Detector, MS Detector)**.
- Καταγραφέας, ο οποίος είναι υπεύθυνος για την καταγραφή του σήματος σε όλη τη διάρκεια της ανάλυσης. Στη συνέχεια, ακολουθεί η αποστολή του στον ηλεκτρονικό υπολογιστή για την παραγωγή του χρωματογραφήματος.

- Δεξαμενή αποβλήτων, στην οποία γίνεται η συλλογή της κινητής φάσης με τα συστατικά του δείγματος (Γεωργίου και άλλοι, 2015).



Εικόνα 20. Σχηματική απεικόνιση ενός συστήματος υγρής χρωματογραφίας (Γεωργίου και άλλοι, 2015).

4.3.4. Φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry, MS)

Φασματομετρία μάζας ονομάζεται η αναλυτική τεχνική κατά την οποία τα μόρια (συστατικά) ενός δείγματος μετατρέπονται σε ταχύτατα κινούμενα ιόντα και στη συνέχεια πραγματοποιείται διαχωρισμός τους σε σχέση με το λόγο της μάζας προς το φορτίο τους (m/z). Η φασματομετρία μαζών εφαρμόζεται ευρέως σε πολλούς τομείς της τεχνολογίας και της έρευνας και έχει τις περισσότερες εφαρμογές σε σχέση με τις άλλες αναλυτικές τεχνικές. Η συγκεκριμένη τεχνική παρέχει πληροφορίες για:

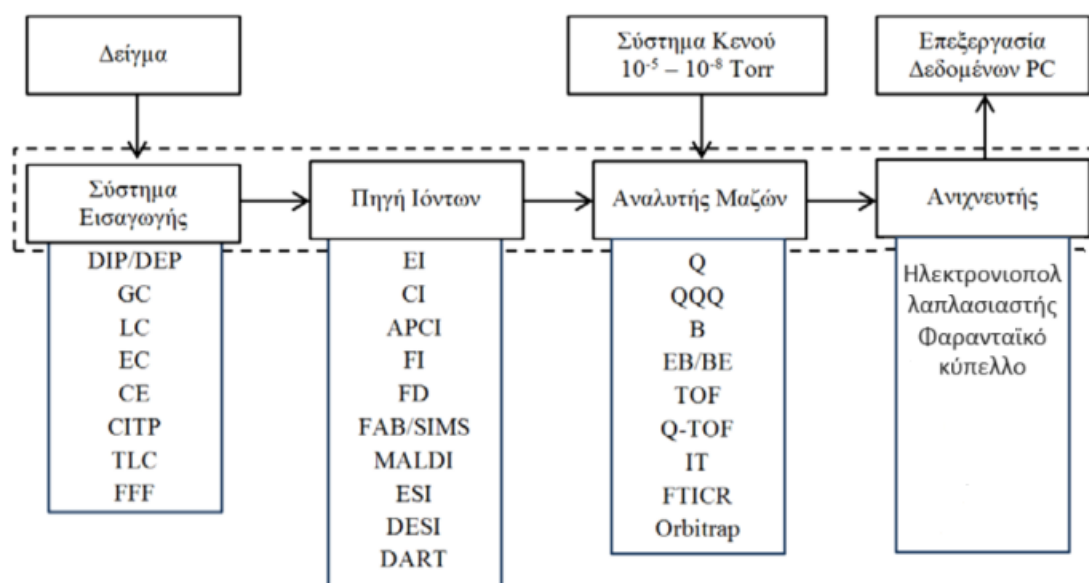
- την ποιοτική και ποσοτική σύσταση σύνθετων μειγμάτων και δειγμάτων,
- τη δομή ανόργανων, οργανικών και βιολογικών μορίων,
- τη δομή και τη σύσταση στερεών επιφανειών και
- την παρουσία και το ποσοστό ισοτόπων ατόμων σε δείγματα (Skoog et al., 2007c· Δεληγιαννάκης και άλλοι, 2010)

Η φασματομετρία μάζας είναι πολύ σημαντική τεχνική γιατί παρουσιάζει τις παρακάτω ιδιότητες:

1. Είναι εκλεκτική καθώς πραγματοποιεί ακριβή μέτρηση των σχετικών μοριακών μαζών και έτσι επιτυγχάνεται η ταυτοποίηση ενώσεων ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις.
2. Είναι ευαίσθητη και φτάνει έως τα 10^{-18} mol.
3. Δρα σαν ολικός ανιχνευτής (universal detector) καθώς επιτρέπει την ανάλυση σώματος ανεξάρτητα από τη φύση του.
4. Εφαρμόζεται στις ομικές τεχνολογίες επιτυγχάνοντας αποδοτική εύρεση των χημικών μορίων που δημιουργούν το κύτταρο (π.χ. νουκλεοτίδια).
5. Συνδυάζεται με την αέρια ή την υγρή χρωματογραφία και παρέχει τις συζευγμένες τεχνικές GC-MS και LC-MS αντίστοιχα, βοηθώντας έτσι στην έρευνα και στις αναλύσεις ρουτίνας (Δεληγιαννάκης και άλλοι, 2010· Θεοδορίδης και άλλοι, 2015b).

Ένα τυπικό φασματόμετρο παρουσιάζει τα επιμέρους τμήματα (εικόνα 21).

- Το σύστημα εισαγωγής του δείγματος. Το δείγμα εισάγεται σε αέρια ή υγρή μορφή υπό συνθήκες σταθερής ροής με ελάχιστη απώλεια κενού. Υπάρχουν συστήματα μεμονωμένης εισαγωγής, συστήματα άμεσης εισαγωγής με δειγματολήπτη και συστήματα **εισαγωγής χρωματογραφίας** και ηλεκτροφόρησης.
- Την πηγή ιόντων με την οποία επιτυγχάνεται η μετατροπή των εισερχόμενων συστατικών σε ιόντα.
- Τον αναλυτή μαζών ο οποίος πραγματοποιεί διαχωρισμό των ιόντων ανάλογα με το λόγο μάζας / φορτίου (m/z) που φέρουν.
- Τον ανιχνευτή ο οποίος συλλαμβάνει τα διαχωριζόμενα ιόντα και τα μετατρέπει σε ηλεκτρικό σήμα. Το παραγόμενο ηλεκτρικό σήμα είναι ανάλογο του αριθμού των ιόντων και του φορτίου τους. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται επεξεργασία του σήματος σε ηλεκτρονικό υπολογιστή με τη βοήθεια ειδικού λογισμικού.
- Το σύστημα κενού το οποίο διατηρεί το φασματόμετρο υπό κενό και δημιουργεί επαρκή ποσότητα ατμών για τη λήψη του φάσματος. Η δημιουργία του κενού βασίζεται σε εσωτερικές και εξωτερικές αντλίες κενού (Skoog et al., 2007c· Δεληγιαννάκης και άλλοι, 2010)



Εικόνα 21. Τυπική διάταξη ενός φασματογράφου μάζας με τις συντομογραφίες των κυριότερων τεχνικών/επιλογών κάθε σταδίου (Δεληγιαννάκης και άλλοι, 2010).

Υγρή χρωματογραφία- φασματομετρία μαζών (LC-MS)

Η απομόνωση ενός αναλύτη από ένα πολύπλοκο μίγμα που περιέχει διαφορετικά μόρια ίδιας μοριακής μάζας, συνήθως δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί μόνο με τη φασματομετρία μάζας. Αυτό συμβαίνει καθώς η διαφοροποίηση των ενώσεων γίνεται με τον λόγο μάζας προς φορτίο και ο μεγάλος αριθμός των παραγόμενων ιόντων δυσχεραίνει την ερμηνεία του πολύπλοκου φάσματος. Η ύπαρξη μιας επιπρόσθετης τεχνικής διαχωρισμού είναι απαραίτητη πριν την εισαγωγή του δείγματος στο φασματόμετρο μάζας. Έτσι, το φασματόμετρο μάζας συζεύγνυνται με συστήματα διαχωρισμού και η προκύπτουσα τεχνική ονομάζεται συζευγμένη τεχνική (Skoog et al., 2007c· Sargent, 2013).

Ο συνδυασμός της υγρής χρωματογραφίας και της φασματομετρίας μάζας επιτρέπει την απομόνωση και τη μέτρηση του επιθυμητού αναλύτη από πολύπλοκα δείγματα. Ειδικά, ενδείκνυται για τον προσδιορισμό μη πτητικών θερμοευαίσθητων ενώσεων. Η διαφοροποίηση των ενώσεων στην υγρή χρωματογραφία γίνεται με βάση τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες και στη φασματομετρία μάζας από τη σχέση της μάζας προς το φορτίο. Είναι ένα ισχυρό αναλυτικό εργαλείο και αποτελεί εκλεκτική τεχνική. Η τεχνική αυτή επιτρέπει την αναγνώριση των ειδών που αντιστοιχούν σε κάθε χρωματογραφική κορυφή μέσω του φάσματος μάζας (Sargent, 2013).

Η σύζευξη της χρωματογραφίας με τη φασματομετρία μάζας χρησιμοποιείται για την ανάλυση περιβαλλοντικών δειγμάτων, τροφίμων, βιολογικών ιστών και υγρών. Η σύζευξη όμως των δύο τεχνικών δεν είναι τόσο απλή καθώς υπάρχουν θεμελιώδεις διαφορές και έτσι απαιτείται σημείο διασύνδεσης (interface), όπου θα μεταφέρει αποτελεσματικά τα διαχωρισμένα συστατικά από τη στήλη της LC στην πηγή ιόντων MS. Ένα πρόβλημα είναι ο ρυθμός ροής του διαλύτη καθώς κυμαίνεται από 0.5 έως 1.5 mL/min σε συμβατικές αναλυτικές στήλες ευρείας οπής. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή μεγάλης ροής αερίου σε σημείο που μπορεί να προκληθεί διαταραχή των συνθηκών κενού κάτω από τις οποίες δουλεύει το φασματόμετρο μάζας. Επιπλέον αναντιστοιχία αποτελεί η ασυμβατότητα των κοινών διαλυτών HPLC και των μη πτητικών ρυθμιστικών με τη φασματομετρία μάζας και η θερμοκρασία λειτουργίας των δύο διατάξεων (ο υγρός χρωματογράφος λειτουργεί σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ενώ το φασματόμετρο μάζας απαιτεί αυξημένη θερμοκρασία) (Dass, 2007).

Το ιδανικό σημείο διασύνδεσης πρέπει να είναι μηχανικά απλό και χημικά αδρανές. Η απόδοση της χρωματογραφίας και της φασματομετρίας μάζας δεν πρέπει να επηρεάζονται από τη διασύνδεση. Εξίσου σημαντικό αποτελεί η μεταφορά δείγματος να είναι υψηλή και η χημική ταυτότητα της αναλυόμενης ουσίας να παραμένει ανεπηρέαστη από το σημείο επαφής. Τέλος, κατά τη μεταφορά της ουσίας, το μεγαλύτερο μέρος της κινητής φάσης να αφαιρείται χωρίς να επηρεάζεται ο ιονισμός και το κενό του συστήματος της φασματομετρίας μάζας (Dass, 2007).

Έτσι, αναπτύχθηκαν διάφορες διατάξεις για τη διασύνδεση του υγρού χρωματογράφου με το φασματόμετρο μάζας, που επιτρέπουν την παρουσία ιόντων στην αέρια φάση (πριν τον αναλυτή μάζας). Μερικές από αυτές είναι: Direct Liquid Introduction, Moving Belt/Wire, Thermospray, Particle Beam, Atmospheric Pressure Ionization, **Electrospray**, Atmospheric Pressure Chemical Ionization, Continuous-Flow Fast Atom Bombardment. Η πιο σημαντική από αυτές τις διατάξεις και πιο συχνά χρησιμοποιούμενη είναι αυτή του **ηλεκτροψεκασμού** (Dass, 2007).

Πηγή ιόντων

Ο σχηματισμός των ιόντων είναι το αρχικό στάδιο σε μία μέτρηση με φασματομετρία μάζας και η τεχνική ιονισμού που θα εφαρμοστεί είναι καθοριστικής σημασίας για τη μέτρηση και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Οι πηγές ιόντων χωρίζονται σε σκληρές και μαλακές. Στις σκληρές τεχνικές κυριαρχεί η μετάδοση αρκετής ενέργειας στα μόρια του αναλύτη και έτσι ανεβαίνουν σε υψηλότερη διεγερμένη κατάσταση. Η αποδιέγερση που ακολουθεί οδηγεί σε επιπλέον σπάσιμο δεσμών και παραγωγή θυγατρικών ιόντων (θραύσματα) με λόγους m/z μικρότερους από το μητρικό ιόν. Αντίθετα, στις μαλακές τεχνικές ο ιοντισμός επιτυγχάνεται με ηπιότερες συνθήκες, με αποτέλεσμα ο κατακερματισμός να είναι περιορισμένος (Skoog, et al., 2007c).

Τα φάσματα που προκύπτουν είτε από τις σκληρές είτε από τις μαλακές τεχνικές είναι πολύ χρήσιμα και μπορούν να αντληθούν πολλές πληροφορίες. Η ύπαρξη πολλών κορυφών στις σκληρές τεχνικές, λόγω θραύσης του μητρικού ιόντος, δίνουν πληροφορίες για τις χαρακτηριστικές ομάδες που υπήρχαν στην αρχική ένωση και έτσι μία πιο σαφή εικόνα για τη δομή της. Στις μαλακές τεχνικές, το λαμβανόμενο φάσμα αποτελείται από την κορυφή του μοριακού ιόντος και λίγες επιπλέον κορυφές και έτσι μπορεί να υπολογιστεί με μεγάλη ακρίβεια το μοριακό βάρος των μορίων του αναλύτη (Skoog et al., 2007c).

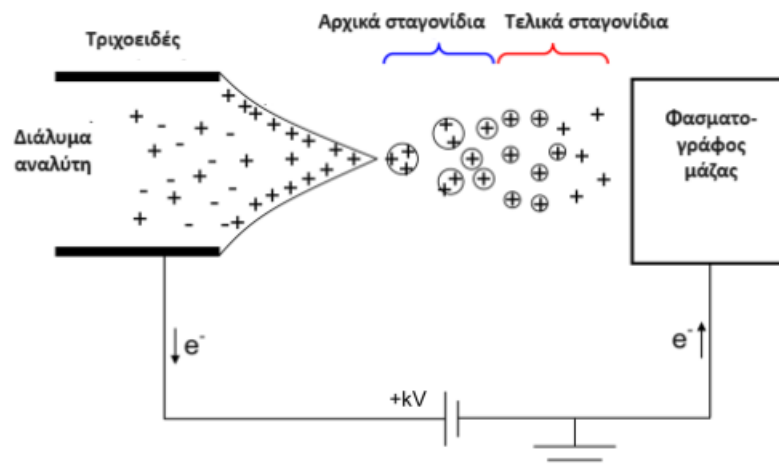
Οι τεχνικές ιονισμού χωρίζονται επίσης σε πηγές αέριας φάσης και σε πηγές εκρόφησης. Στις πηγές αέριας φάσης αρχικά πραγματοποιείται ο εξαερισμός και στη συνέχεια ο ιοντισμός του δείγματος. Στις πηγές εκρόφησης πραγματοποιείται απευθείας μετατροπή του δείγματος το οποίο βρίσκεται σε υγρή ή στερεή κατάσταση σε αεριώδη ιόντα (Skoog et al., 2007c).

Έτσι, υπάρχουν πηγές ιονισμού τόσο για πτητικές ενώσεις (Ιονισμός με πρόσκρουση ηλεκτρονίων, EI και Χημικός ιονισμός, CI), όσο και για μη πτητικές ενώσεις (ιονισμός σε ατμοσφαιρική πίεση). Οι τεχνικές ιονισμού ατμοσφαιρικής πίεσης περιλαμβάνουν τον **Ηλεκτροψεκασμό** (Electrospray, ESI), το Χημικό Ιονισμό σε ατμοσφαιρική Πίεση (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation, APCI) και το Φωτοϊονισμό σε Ατμοσφαιρική Πίεση (Atmospheric Pressure Photo Ionisation, APPI). Σε άλλες πηγές ιονισμού, όπως στον Ιονισμό εκρόφησης με λέιζερ υποβοηθούμενος από υλικό μήτρας (MALDI) και στον βομβαρδισμό με ταχέα άτομα (FAB), η απορρόφηση της ενέργειας προερχόμενη από διάφορες πηγές (π.χ. laser) θα προκαλέσει τον ιονισμό των μορίων της αναλυόμενης ουσίας (Θεοδωρίδης και άλλοι, 2015b).

Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό

Ο συγκεκριμένος ιοντισμός πραγματοποιείται υπό ατμοσφαιρική πίεση και θερμοκρασία. Μέσω ενός ανοξειδωτού τριχοειδή σωλήνα το διάλυμα του αναλύτη αντλείται και ρέει με ταχύτητα μερικών $\mu\text{L}/\text{min}$. Ο σωλήνας βρίσκεται σε δυναμικό της τάξης των μερικών kV ως προς ένα ηλεκτρόδιο που τον περιβάλλει. Μεταξύ του τριχοειδούς και του ηλεκτροδίου δημιουργείται ένα ισχυρό ηλεκτρικό πεδίο. Η διαβίβαση αερίου ξήρανσης μέσω εξωτερικού σωλήνα δημιουργεί εκνέφωμα στην άκρη του τριχοειδούς. Ο ψεκασμός του αναλύτη στο χώρο του ηλεκτρικού πεδίου οδηγεί στην εμφάνιση ενός νέφους επιφανειακά, φορτισμένων σταγονιδίων. Οι φορτισμένες σταγόνες διέρχονται μέσω του τριχοειδούς όπου ο διαλύτης εξατμίζεται και τα μόρια του αναλύτη φορτίζονται. Η εξατμηση του διαλύτη ενισχύει το φορτίο των σταγονιδίων και μειώνει το μέγεθος τους. Η πυκνότητα φορτίου αυξάνεται μέχρι ενός ορίου, το οποίο καλείται όριο Rayleigh, κατά το οποίο δεν μπορεί η επιφανειακή τάση να υποστηρίξει το φορτίο (η ηλεκτροστατική άπωση είναι μεγαλύτερη της επιφανειακής τάσης) και πραγματοποιείται κουλομβική έκρηξη όπου τα σταγονίδια διασπώνται σε μικρότερα. Η συγκεκριμένη διαδικασία επαναλαμβάνεται πολλές φορές μέχρι την απομάκρυνση των μορίων του διαλύτη δημιουργώντας ένα πολλαπλώς φορτισμένο ιόν του αναλύτη, το οποίο εισέρχεται στον αναλυτή μάζας (Skoog et al., 2007c· Gross, 2017). Ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό απεικονίζεται στην εικόνα 22.

Ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό αποτελεί μία από τις σημαντικότερες τεχνικές στη φασματομετρία μάζας, αποτελώντας μία μαλακή τεχνική ιονισμού (λιγότερη θραυσματοποίηση) που εφαρμόζεται για τον χαρακτηρισμό ανόργανων/οργανικών ουσιών και συνθετικών πολυμερών. Επίσης, ο προσδιορισμός βιολογικών μορίων έως 100000 Da, τόσο μέτριων πολικών όσο και πολικών αλλά και θερμικά ασταθών μορίων επιτυγχάνεται με τη συγκεκριμένη τεχνική. Τα παραγόμενα ιόντα είναι πολυσθενή και αυτό έχει ως συνέπεια οι τιμές m/z να είναι μικρές και η ανίχνευσή τους από τα τετραπολικά όργανα να είναι σχετικά απλή. Τέλος, με την τεχνική αυτή η εισαγωγή του δείγματος μπορεί να γίνει απευθείας από την έξοδο χρωματογραφικών στηλών και έτσι να συνδυαστεί με αέρια και υγρή χρωματογραφία (Skoog et al., 2007c· Gross, 2017).



Εικόνα 22. Σχηματική απεικόνιση μιας πηγής ESI σε λειτουργία θετικού ιονισμού (Konermann et al., 2013).

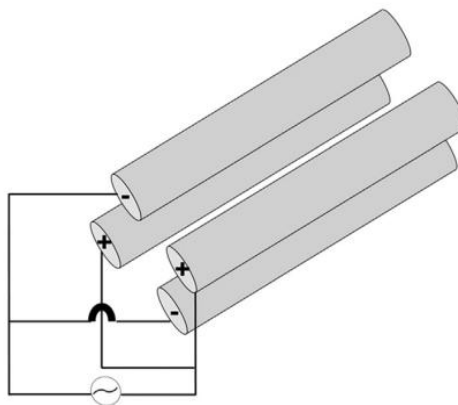
Αναλυτής μάζας

Ο αναλυτής μάζας αποτελεί τη σημαντικότερη διάταξη ενός φασματομέτρου μάζας. Ένας ιδανικός αναλυτής θα πρέπει να μπορεί να πραγματοποιεί διαχωρισμούς στα ιόντα που διαφέρουν ελάχιστα στο λόγο m/z . Επιπλέον, η δυνατότητα διέλευσης αρκετών ιόντων είναι σημαντική για τη δημιουργία άμεσου μετρήσιμου ρεύματος ιόντων και μεγαλύτερης ευαισθησίας. Τέλος, ο ιδανικός αναλυτής θα πρέπει να είναι συμβατός με όλες τις τεχνικές ιονισμού και με όλες τις διαφορετικές διαδικασίες εισαγωγής του αναλυόμενου δείγματος. Όμως, οι παραπάνω ιδιότητες δεν είναι απόλυτα συμβατές καθώς ιδανικός αναλυτής δεν υπάρχει. Άρα για την επιλογή του αναλυτή πρέπει να γίνονται σχεδιαστικοί συμβιβασμοί. Υπάρχουν διάφοροι τύποι, ανάλογα με την περιοχή και την ταχύτητα σάρωσης, την ευαισθησία, τη διακριτική ικανότητα και το κόστος. Οι κυριότεροι είναι οι αναλυτές μαγνητικού τομέα, ο τετραπολικός αναλυτής μαζών, ο αναλυτής παγίδας ιόντων, ο αναλυτής χρόνου πτήσης, οι αναλυτές ιοντικού κυκλοτρονικού συντονισμού με μετασχηματισμό Fourier και ο αναλυτής τροχιακής παγίδας ιόντων (Στράτης και άλοι, 2004· Skoog et al., 2007c).

Τετραπολικός αναλυτής

Ο τετραπολικός αναλυτής (εικόνα 23) αποτελείται από τέσσερις, παράλληλες μεταξύ τους, κυλινδρικές, μεταλλικές ράβδους που δρουν σαν ηλεκτρόδια. Είναι τοποθετημένες με τέτοιο

τρόπο ώστε ανά δύο, σε διαγώνια διάταξη να σχηματίζουν ζευγάρι. Το ένα ζεύγος συνδέεται με τον θετικό πόλο μια πηγής μεταβλητής τάσης DC (συνεχές ρεύμα) και το δεύτερο ζεύγος με τον αρνητικό πόλο. Επιπλέον σε κάθε ζευγάρι ράβδων εφαρμόζονται μεταβλητές τάσεις AC (εναλλασσόμενο ρεύμα) που βρίσκονται σε διαφορά φάσης κατά 180° . Η πηγή του εναλλασσόμενου ρεύματος λειτουργεί με υψηλή συχνότητα της τάξης των ραδιοκυμάτων. Για τη λήψη του φάσματος μάζας, τα ιόντα επιταχύνονται ανάμεσα στις ράβδους με δυναμικό από 5 έως 10 Volt. Η εναλλασσόμενη και η συνεχής τάση που έχουν εφαρμοσθεί στα ζεύγη των ράβδων αυξάνονται ταυτόχρονα, διατηρώντας το λόγο τους σταθερό. Η τροχιά των ιόντων που διέρχονται από τον χώρο μεταξύ των ηλεκτροδίων επηρεάζεται διαφορετικά από το σύνολο των εφαρμοζόμενων διαφορών δυναμικού ανάλογα με το λόγο m/z . Σε κάποια χρονική στιγμή, τα ιόντα φθάνουν στα τοιχώματα του τετραπόλου, μεταβάλλονται σε ουδέτερα μόρια και απομακρύνονται. Τα ιόντα, των οποίων οι τιμές m/z βρίσκονται σε μία στενή περιοχή τιμών m/z μπορούν να φτάσουν στον μεταλλάκτη. Λόγω του γεγονότος αυτού, το τετράπολο, κάποιες φορές αναφέρεται και ως «φίλτρο μαζών», αφού μόνο τα ιόντα των οποίων ο λόγος m/z αντιστοιχεί σε μία στενή περιοχή τιμών διαπερνούν και εξέρχονται από το τετράπολο προς τον ανιχνευτή διαγράφοντας ελικοειδείς τροχιές (Skoog et al., 2007d).



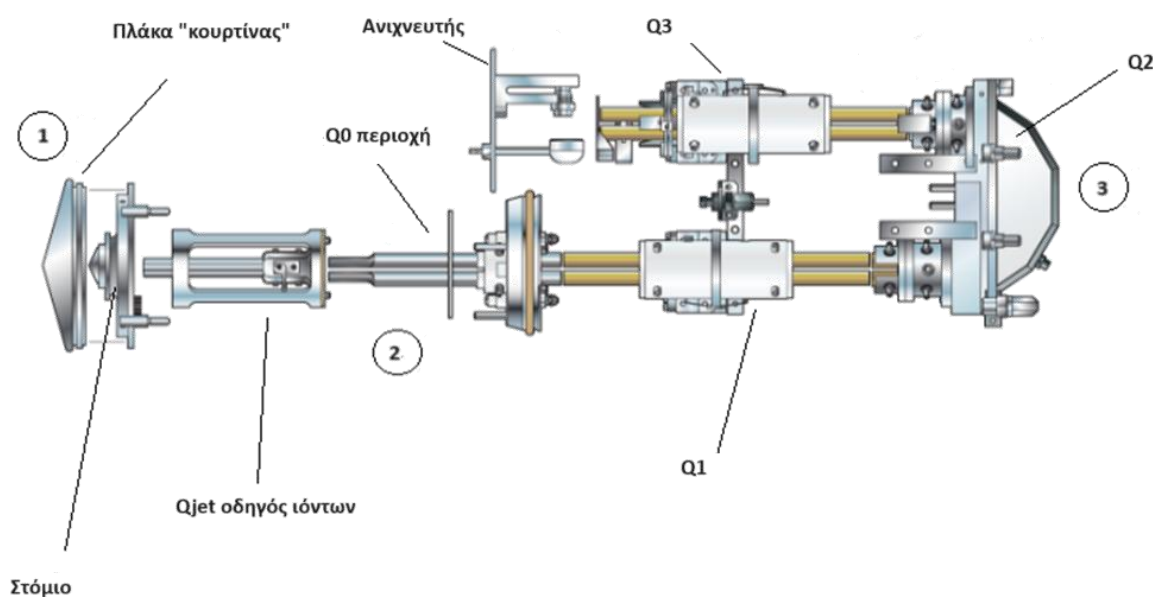
Εικόνα 23. Σχηματική αναπαράσταση τετραπολικού αναλυτή (Thomas, 2019).

Τριπλό τετράπολο

Το τριπλό τετράπολο (εικόνα 24) αποτελεί δημοφιλή αναλυτή μάζας για ποσοτικούς προσδιορισμούς LC-MS και αποτελεί συνδυασμό τριών τετραπόλων. Η συγκεκριμένη διάταξη προσφέρει τα καλύτερα χαρακτηριστικά απόδοσης και εκμεταλλεύεται τα θετικά στοιχεία του τετραπόλου (Sargent, 2013). Προσφέρει γρήγορη σάρωση και δυνατότητα

εφαρμογής φασματομετρίας μάζας σε σειρά / Tandem MS (Κακλαμάνος, 2009). Η φασματομετρία μαζών σε σειρά στο χώρο προσφέρει παρακολούθηση επιλεγμένης αντίδρασης και τη λήψη φάσματος προεπιλεγμένων ιοντικών θραυσμάτων (Skoog et al., 2007d).

Η συγκεκριμένη διάταξη είναι λιγότερο απαιτητική σε κόστος αγοράς και στη λειτουργία σε σχέση με άλλες διατάξεις. Η ποσοτική ανάλυση γνωστών ενώσεων στόχων επιτυγχάνεται με ταχύτητα, υψηλή ευαισθησία, ειδικότητα και γραμμικότητα (Θεοδωρίδης και άλλοι, 2015b).



Εικόνα 24. Απεικόνιση τριπλού τετραπόλου με τις διαδρομές που ακολουθούν τα ιόντα (Sciex, 2019).

Αρχικά, ο οδηγός ιόντων Qjet εστιάζει τα ιόντα πριν εισέλθουν στην περιοχή Q0 χωρίς να τα φιλτράρει (Sciex, 2019). Έτσι, πετυχαίνεται αύξηση της ευαισθησίας και βελτίωση της αναλογίας σήματος προς θόρυβο. Στην περιοχή Q0 τα ιόντα εστιάζονται εκ νέου πριν περάσουν στο τετράπολο Q1 (Sciex, 2019). Στο πρώτο τετράπολο (Q1) πραγματοποιείται η επιλογή ενός μητρικού ιόντος. Στη συνέχεια, το μητρικό ιόν οδηγείται στο δεύτερο τετράπολο (Q2), όπου επιταχύνεται μέσω υψηλού δυναμικού, αποκτά υψηλή κινητική ενέργεια και συγκρούεται με περίσσεια αδρανούς αερίου (αργό ή ήλιο) και προκαλείται θραυσματοποίησή του σε θυγατρικά. Το αδρανές αέριο καλείται αέριο σύγκρουσης (collision gas). Το τετράπολο αυτό καλείται και ως κυψελίδα συγκρούσεων. Στο τρίτο τετράπολο (Q3) πραγματοποιείται σάρωση, διαχωρισμός και μέτρηση των θραυσμάτων (θυγατρικών ιόντων)

ή παρακολούθηση ενός μόνο θραύσματος. Στη συνέχεια τα ιόντα αυτά θα εισέλθουν στον ανιχνευτή (Κακλαμάνος, 2009· Sciex, 2019).

Στον πίνακα 12 απεικονίζονται οι κύριοι παράμετροι του τριπλού τετραπόλου, η περιοχή λειτουργίας με βάση την εικόνα 23 και ο βασικός τους ρόλος.

Πίνακας 12. Κύριοι παράμετροι, περιοχή λειτουργίας και βασικός ρόλος.

Περιοχή	Παράμετρος	Λειτουργία
1	Ion Spray Voltage (IS)	Έλεγχος της τάσης που εφαρμόζεται στο ηλεκτρόδιο που ιονίζει το δείγμα στην πηγή ιόντων. Καθορίζει τη σταθερότητα και την ευαισθησία του ψεκασμού.
1	GAS 1 (GS1)	Έλεγχος του αερίου του νεφελοποιητή, ο οποίος βοηθά στη δημιουργία μικρών σταγονιδίων του δείγματος και επηρεάζει τη σταθερότητα και την ευαισθησία του ψεκασμού.
1	GAS 2 (GS2)	Έλεγχος του βοηθητικού ή turbo αερίου. Συμμετέχει στην εξάτμιση του διαλύτη για την παραγωγή ιόντων δείγματος αέριας φάσης.
1	Temperature (TEM)	Έλεγχος της θερμοκρασίας του αερίου turbo (GS2) στον αισθητήρα της πηγής ιόντων.
1	Curtain gas (CUR)	Έλεγχος της ροής αερίου της διεπιφάνειας Curtain Gas™. Έτσι επιτυγχάνεται η εξάτμιση του διαλύτη και εμποδίζονται τα σταγονίδια του να μολύνουν τα παραγόμενα ιόντα. Η διασύνδεση Curtain Gas™ βρίσκεται μεταξύ του curtain plate και του orifice.
1	Declustering Potential (DP)	Έλεγχος της τάσης στο orifice και έτσι αποτρέπεται η συσσώματωση των ιόντων. Χρησιμοποιείται για την ελαχιστοποίηση των συσσωματωμάτων του διαλύτη που ενδέχεται να έχουν παραμείνει στα ιόντα του δείγματος, αφού εισέλθουν στον θάλαμο κενού. Βελτιστοποιείται για κάθε ένωση.
2	Entrance Potential (EP)	Έλεγχος της διαφοράς δυναμικού μεταξύ της τάσης στο Q0 και της γείωσης. Το δυναμικό εισόδου καθοδηγεί και εστιάζει τα ιόντα μέσω της περιοχής υψηλής πίεσης Q0.
3	Collision Energy (CE)	Έλεγχος της διαφοράς δυναμικού μεταξύ Q0 και Q2. Αυτή είναι η ποσότητα ενέργειας που λαμβάνουν τα πρόδρομα ιόντα καθώς επιταχύνονται στο Q2, όπου συγκρούονται με μόρια αερίου. Βοηθά

		στην αύξηση της έντασης των θραυσμάτων.
3	Collision Cell Exit Potential (CXP)	Εστίαση και επιτάχυνση όλων των ιόντων από το Q2 στο Q3.

Η παρακολούθηση των ιόντων πραγματοποιείται με διάφορους τύπους σάρωσης/λειτουργίας:

- Πλήρης σάρωση (Full scan) η οποία παρέχει ένα φάσμα πλήρους σάρωσης για κάθε ουσία. Ο προσδιορισμός της ταυτότητας μίας άγνωστης ουσίας επιτυγχάνεται με την πλήρη σάρωση. Υστερεί σε ευαισθησία και σε δυνατότητα ποσοτικοποίησης αλλά παρέχει περισσότερες πληροφορίες από άλλους τύπους σάρωσης (Κακλαμάνος, 2009).
- Παρακολούθηση επιλεγμένου ιόντος (Single Ion Monitoring, SIM) όπου παρακολουθείται ένα συγκεκριμένο ιόν ή ομάδα ιόντων. Όταν το φάσμα μίας ουσίας είναι γνωστό μπορεί να επιτευχθεί ανίχνευσή της σε πολύπλοκα μίγματα ακόμα και σε μικρές συγκεντρώσεις, πετυχαίνοντας χαμηλότερα όρια ανίχνευσης και μεγαλύτερη ταχύτητα σάρωσης. Όμως, μπορεί να παρατηρηθεί μείωση της εκλεκτικότητας καθώς μία ουσία μπορεί να δίνει το ίδιο ιόν με την ουσία που μας ενδιαφέρει, οδηγώντας σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα (Κακλαμάνος, 2009).
- Λειτουργία SRM (Select Reaction Monitoring) ή MRM (Multiple Reaction Monitoring) κατά την οποία παρακολουθείται μια συγκεκριμένη αντίδραση ή ομάδα αντιδράσεων όπως η αντίδραση θραυσματοποίησης (επιλέγεται στη λειτουργία MS/MS). Η παρακολούθηση ενός συγκεκριμένου αριθμού μητρικών/θυγατρικών ιόντων μπορεί να προσφέρει γρήγορη σάρωση και υψηλή εκλεκτικότητα. Η επίδραση των παρεμποδίζουσων ουσιών εξαλείφεται καθώς είναι απαραίτητος ο σχηματισμός του μητρικού ιόντος με τον ίδιο λόγο m/z με τον αναλύτη και η θραυσματοποίηση στα ίδια θυγατρικά ιόντα. Τέλος, η λειτουργία παρουσιάζει αυξημένη ευαισθησία καθώς το υπόβαθρο του θορύβου είναι χαμηλό (Κακλαμάνος, 2009).

Σημαντικοί παράμετροι στη λειτουργία MRM αποτελούν: *dwell time* όπου είναι ο χρόνος που δαπανά ο αναλυτής μάζας σε κάθε ιόν (MRM μετάβαση) κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου και *cycle time* όπου είναι ο χρόνος που χρειάζεται το όργανο για να «περάσει» όλες τις MRM μεταβάσεις μία λίστας προτού ξεκινήσει εκ νέου από την αρχή (Sciex, 2018).

Στο τριπλό τετράπλο πραγματοποιείται σάρωση θυγατρικών ιόντων (Product Ion Scanning) όπου το φάσμα μάζας δείχνει τα θυγατρικά ιόντα που προέκυψαν από τη διάσπαση του μητρικού. Η σάρωση αυτή δίνει και πληροφορίες για τη δομή της ουσίας και είναι ιδιαίτερη χρήσιμη για την εξέταση πολύπλοκων δειγμάτων όπως βιολογικών δειγμάτων (Κακλαμάνος, 2009)

Ανιχνευτής

Ο ανιχνευτής κατέχει σπουδαίο ρόλο στην MS ανάλυση. Στη φασματομετρία μάζας ως ανιχνευτές χρησιμοποιούνται κυρίως οι ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστές (electronmultipliers). Επίσης, έχουν χρησιμοποιηθεί και τα φαρανταϊκά κύπελλα. Το κύριο μέρος του ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστή είναι ένας γυάλινος ή μεταλλικός σωλήνας με μεταλλική επίστρωση. Η πρόσπτωση των ιόντων του αναλυτή στη συγκεκριμένη επιφάνεια οδηγεί σε εκπομπή ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας, τα οποία έλκονται από την επόμενη επιφάνεια και θα προσπέσουν σε αυτήν εκπέμποντας νέα ηλεκτρόνια υψηλής ενέργειας. Τα παραγόμενα ηλεκτρόνια έλκονται στην επόμενη επιφάνεια έως την τελευταία με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένας μεγάλος αριθμός ηλεκτρονίων για κάθε ένα ηλεκτρόνιο που προσπίπτει. Έτσι, δημιουργείται αλυσιδωτή αντίδραση και το σήμα ενισχύεται έως 10^7 , το οποίο θα απεικονιστεί στην οθόνη του υπολογιστή ως φάσμα μάζας (Skoog et al., 2007d).

Η τεχνική της φασματομετρία μάζας σε συνδυασμό με την υγρή χρωματογραφία προσδιορίζει ποσοτικά και ποιοτικά διάφορα συστατικά από πολύπλοκα φυσικά και βιομηχανικά υλικά. Η ταυτοποίηση και ο προσδιορισμός φαρμάκων και μεταβολιτών τους, φερομονών εντόμων, αλκαλοειδών στα φυτά, ατμοσφαιρικών ρυπαντών, πολυμερών, πετροχημικών και άλλων χημικών πετυχαίνεται με τη φασματομετρία μάζας. Έτσι, διάφοροι τομείς όπως της χημείας, της βιολογίας, της περιβαλλοντικής επιστήμης, της αρχαιολογίας, της φαρμακευτικής, της βιομηχανίας πετρελαίου, της εγκληματολογίας και της ιατροδικαστικής έχουν γνωρίσει μεγάλη ανάπτυξη από την εξέλιξη της τεχνικής αυτής (Skoog et al., 2007c).

ΣΚΟΠΟΣ

Το φαινόμενο της χρήσης εξαρτησιογόνων ουσιών αποτελεί φαινόμενο κοινωνικής παθογένειας και έχει λάβει τεράστιες διαστάσεις τα τελευταία χρόνια. Η χρήση τους έχει χαρακτηριστεί ως μάστιγα των κοινωνιών παγκοσμίως καθώς προκαλούν υπονόμηση της σωματικής, πνευματικής και ψυχικής υγείας του ατόμου, διάλυση του κοινωνικού ιστού και ανάπτυξη της παραοικονομίας και του οργανωμένου εγκλήματος. Η ανάπτυξη ευαίσθητων αναλυτικών τεχνικών σε συνδυασμό με την συνεργασία όλων των αρμόδιων φορέων θα οδηγήσει στην αποτελεσματική αντιμετώπισή του.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση μιας νέας αναλυτικής μεθοδολογίας βασισμένης στην FPSE για τον προσδιορισμό εξαρτησιογόνων ουσιών και μεταβολιτών τους στο στοματικό υγρό, σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας συζευγμένης με διαδοχική φασματομετρία μάζας τριπλού τετραπόλου (LC-MS/MS).

5. Πειραματικό μέρος

5.1. Σκεύη, χημικά αντιδραστήρια, οργανολογία

Η παρούσα μέθοδος αποτελεί μία εύκολη, πράσινη, οικονομική και γρήγορη τεχνική εκχύλισης εξαρτησιογόνων ουσιών από το στοματικό υγρό. Η απλότητά της έγκειται και στα χρησιμοποιούμενα αναλώσιμα κατά τη διάρκεια εξαγωγής της. Έτσι χρησιμοποιήθηκαν:

- Ογκομετρικοί κύλινδροι των 100 και των 1000 mL
- Γυάλινα φιαλίδια των 10 mL
- Πλαστικός περιέκτης αποθήκευσης σιέλων
- Σιφώνια των 2, 5 και 10 mL
- Ποτήρια ζέσεως των 25, 1000 και 2000 mL
- Φυγοκεντρικός σωλήνας Falcon των 50 mL
- Πλαστικά eppendorfs των 2 mL
- Αυτοματοποιημένες Πιπέτες Pasteur των 1000, 200, 100 και 10 μ L
- Μαγνητάκι ανάδευσης των 0,5 cm και των 2 cm
- Πλαστικά φιαλίδια (vials) με microinsert των 100 μ L με βιδωτό πόμα για HPLC

Οι χρησιμοποιούμενοι διαλύτες και αντιδραστήρια στις αναλύσεις LC-MS ήταν τουλάχιστον HPLC ποιότητας. Διαλύτες: όπως ακετονιτρίλιο, μεθανόλη, νερό (ποιότητας Ultra High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometer, UHPLC-MS) και μυρμηκικό οξύ (99%) αγοράστηκαν από την εταιρεία CARLO ERBA Reagents GmbH (Cornaredo, Italy). Το οξικό αμμώνιο (99%) αγοράστηκε από την Fluka™ Analytical Standards (Steinheim, Germany). Το διχλωρομεθάνιο αγοράστηκε από τη Fisher Scientific (μέρος της Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)). Η ακετόνη, το υδροξείδιο του νατρίου και το υδροχλωρικό οξύ αγοράστηκαν από την Merck (Darmstadt, Germany).

Η επιλογή του υποστρώματος ήταν το πρωταρχικό βήμα για τη σύνθεση του μέσου FPSE. Χρησιμοποιήθηκαν Whatman φίλτρα μικρο-υαλοϊνών 110 mm και Whatman φίλτρα κυτταρίνης 125 mm. Τα δύο φίλτρα αγοράστηκαν από την εταιρία General Electric (Boston, MA, USA). Για την επικάλυψη του υποστρώματος χρησιμοποιήθηκε οργανικό πολυμερές πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG 300) το οποίο αγοράστηκε από τη Sigma-Aldrich (Athens, Greece). Το πρόδρομο μόριο sol-gel μεθυλοτριμεθοξυσιλάνιο (MTMS) και ο καταλύτης τριφθοραιθανικό οξύ (TFA) προμηθεύτηκαν από τη Merck (Darmstadt, Germany).

Οι αναλύτες υδροχλωρική αμφεταμίνη, βενζοϋλεκγονίνη, υδροχλωρική μεθαδόνη υδροχλωρική μεθαμφεταμίνη, κοκαΐνη και κωδεΐνη αγοράστηκαν από την Cayman Chemical

Company (Ann Arbor, MI, USA) και οι αναλύτες υδροχλωρική 3,4-μεθυλενοδιοξαμεταμίνη, 6-μονοακέτυλο μορφίνη, μεθυλεστέρας της εκγονίνης και μορφίνη από την εταιρεία LGC GmbH (Luckenwalde, Germany). Όλοι ήταν καθαρότητας πάνω από 98%.

Στις συσκευές και στα όργανα για τον προσδιορισμό των συγκεκριμένων αναλυτών χρησιμοποιήθηκαν: αναλυτικός ζυγός (Explorer OHAUS, USA) για τη ζύγιση του πολυμερούς και των αναλυτών, συσκευή ομογενοποίησης Vortex (Biochem, Ioannina, Greece) και φυγόκεντρος (Centurion K241RPrO, Centurion Scientific Limited, West Sussex, UK) για τη σύνθεση του υλικού εκχύλισης. Η φυγόκεντρος που χρησιμοποιήθηκε για την καταβύθιση των πρωτεϊνών των σιέλων και ο θερμαινόμενος μαγνητικός αναδευτήρας αγοράστηκαν από τη Fisher Scientific (μέρος της Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)). Το λουτρό υπερήχων που χρησιμοποιήθηκε για την απαέρωση των διαλυτών και κατά την προκατεργασία των σιέλων αγοράστηκε από ElmasonicS, Germany. Τέλος, η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας UHPLC (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) συζευγμένης με φασματόμετρο μάζας Triple Quad5500™/ QTrap 5500 (Sciex, Darmstadt, Germany) (εικόνα 25).



Εικόνα 25. Η διάταξη LC-MS/MS που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή. Στα αριστερά απεικονίζεται το μηχάνημα UHPLC και στα δεξιά το φασματόμετρο μάζας Triple Quad.

5.2. Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων

Σε καθαρά γυάλινα φιαλίδια ζυγίστηκε 1mg της εκάστοτε ουσίας και προστέθηκε μεθανόλη 1 mL ώστε να παρασκευαστεί διάλυμα παρακαταθήκης συγκεντρώσεως 1 mg/mL. Το διάλυμα παρακαταθήκης αποθηκεύτηκε στους -20°C στο σκοτάδι μέχρι την ανάλυση. Πρότυπα διαλύματα εργασίας παρασκευάζονταν καθημερινά σε μεθανόλη.

5.3. Δειγματοληψία και αποθήκευση δείγματος

Το στοματικό υγρό συλλέχτηκε από διάφορα άτομα τα οποία δεν έκαναν χρήση των συγκεκριμένων εξαρτησιογόνων ουσιών με την απλή τεχνική της απόχρεμψης. Στην τεχνική αυτή, το στοματικό υγρό αφήνεται να συσσωρευτεί στο κάτω μέρος του στόματος ενώ το υποκείμενο πτύει στον προζυγισμένο δοκιμαστικό σωλήνα κάθε 60 δευτερόλεπτα. Το δείγμα στη συνέχεια ομογενοποιήθηκε σε συσκευή vortex για 1 λεπτό ακολουθούμενο από τοποθέτησή του σε λουτρό υπερήχων για άλλο ένα λεπτό. Τέλος, τα ομογενοποιημένα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε πλαστικούς περιέκτες αποθήκευσης και τοποθετήθηκαν στο ψυγείο όπου βρισκόταν υπό ψύξη (5°C) μέχρι την ανάλυσή τους.

5.4. Σύνθεση του FPSE μέσου επικαλυμμένο με το διάλυμα κολλοειδούς -γέλης

Προεργασία του υποστρώματος πριν την επικάλυψη

Τυχών πρόσθετα και ρυπογόνοι παράγοντες πρέπει να απομακρυνθούν από το υπόστρωμα (εικόνα 26) και έτσι ακολουθήθηκε ένας εκτεταμένος καθαρισμός. Παράλληλα με τον καθαρισμό έλαβε χώρα και η ενεργοποίηση του υποστρώματος για να επιτευχθεί μέγιστη πρόσδεση του sol-gel με το δίκτυο ινών. Έτσι, ένα κυκλικό φίλτρο Whatman κυτταρίνης διαμέτρου 125 mm και ένα φίλτρο Whatman υαλοϊνών των 110 mm τοποθετήθηκαν σε ποτήρι ζέσεως με υπερκάθαρο νερό υπό την επίδραση υπερήχων για 15 min για να διαβραχούν πλήρως. Στη συνέχεια, η διαδικασία επαναλήφθηκε με NaOH (1.0 M, 1 ώρα υπέρηχοι) και HCl (0.1 M, 1 ώρα υπέρηχοι). Στο τέλος κάθε σταδίου τα υποστρώματα ξεπλένονταν με ποσότητα υπερκάθαρου νερού για να αφαιρεθούν τα χημικά υπολείμματα και αφήθηκαν να στεγνώσουν σε ατμοσφαιρικές συνθήκες και σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες.

Σύνθεση του διαλύματος κολλοειδούς- γέλης για την επικάλυψη του υποστρώματος

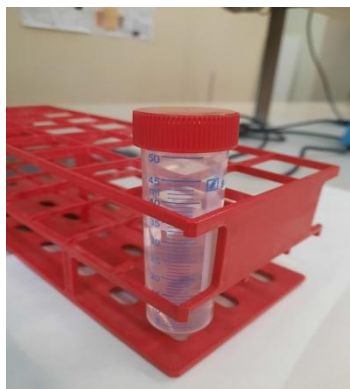
Η σύνθεση του sol-gel διαλύματος είναι πολύ σημαντική καθώς θα καθορίσει την επιλεκτικότητα και το πορώδες του προσροφητικού κολλοειδούς γέλης. Το διάλυμα sol-gel αποτελείται από ένα ενεργό οργανικό πολυμερές, μίγμα οργανικών διαλυτών, μία πρόδρομη ένωση και έναν καταλύτη.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν 5 mL μεθυλοτριμεθοξυσιλανίου (MTMS) ως πρόδρομη ένωση και 2 mL 95% υδατικού διαλύματος τριφθοραιθανικού οξέος (TFA) ως καταλύτης. Η πρόδρομη ένωση και ο καταλύτης ομογενοποιήθηκαν υπό vortex για 1 min. Στη συνέχεια, 5 g πολυμερούς πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG) διαλύθηκαν σε 10 mL μίγματος διαλυτών, αποτελούμενο από διχλωρομεθάνιο : ακετόνη (50:50 v/v) και ομογενοποιήθηκαν για ένα λεπτό σε συσκευή Vortex. Τα δύο διαλύματα αναμίχθηκαν και ομογενοποιήθηκαν σε συσκευή Vortex για 5 λεπτά. Τέλος, ακολούθησε φυγοκέντριση του προκύπτοντος μίγματος για 5 λεπτά στα 5000 rpm, για να απομακρυνθούν αιωρούμενα στερεά και το υπερκείμενο συλλέχτηκε για την επικάλυψη του υποστρώματος (εικόνα 27).

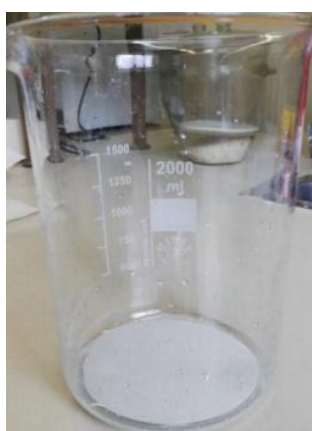
Η διαδικασία της επικάλυψης ξεκίνησε από την εισαγωγή του καθαρισμένου μέσου στο ποτήρι ζέσεως που περιείχε το διάλυμα κολλοειδούς-γέλης, όπου παρέμεινε βυθισμένο για 4 ώρες (εικόνα 28). Έτσι, σχηματίστηκε ένα τρισδιάστατο δίκτυο σε όλη την επιφάνεια του πορώδους υποστρώματος. Στη συνέχεια, το επικαλυμμένο υπόστρωμα τοποθετήθηκε σε ξηραντήρα όλο το βράδυ για την ολοκλήρωση της αντίδρασης της συμπύκνωσης, την εξάτμιση του διαλύτη και την ωρίμανση της επικάλυψης κολλοειδούς-γέλης ώστε το επικαλυμμένο μέσο FPSE να είναι καθαρό και απαλλαγμένο από δομικές παραμορφώσεις (εικόνα 29). Έπειτα, το sol-gel επικαλυμμένο δίκτυο τοποθετήθηκε σε ποτήρι ζέσεως με μίγμα οργανικών διαλυτών ακετόνης : διχλωρομεθανίου 50:50 % v/v και τέθηκε υπό την επίδραση υπερήχων για 30 λεπτά. Έτσι, επιτεύχθηκε απομάκρυνση υπολειμματικών συστατικών sol-gel που δεν προσδέθηκαν χημικά με την επιφάνεια του υποστρώματος. Το επικαλυμμένο μέσο αφέθηκε να στεγνώσει σε ατμοσφαιρικές συνθήκες και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 30 λεπτά και τέλος τεμαχίστηκε σε κυκλικά κομμάτια διαμέτρου 1 cm (εικόνα 30). Τα κυκλικά κομμάτια αποθηκεύτηκαν σε σφραγισμένο καθαρό δοχείο μέχρι τη χρήση τους, για να αποφευχθεί τυχόν επιμόλυνση από την ατμόσφαιρα.



Εικόνα 26. Ακατέργαστο φίλτρο κυτταρίνης.



Εικόνα 27. Διάλυμα sol-gel.



Εικόνα 28. Βύθιση του υποστρώματος στο διάλυμα sol/gel.



Εικόνα 29. Τοποθέτηση του μέσου FPSE στον ξηραντήρα, μετά τη διαδικασία επικάλυψης.



Εικόνα 30. Τελικό υπόστρωμα κυτταρίνης διαμέτρου 1 cm.

5.5. Προκαταρκτικά πειράματα

Με σκοπό να καθοριστούν οι βέλτιστοι παράμετροι της εκχύλισης FPSE (τύπος υποστρώματος, pH δείγματος, χρόνος εκχύλισης, διαλύτης έκλουσης, μέσο έκλουσης, χρόνος έκλουσης) και κατά επέκταση η μέγιστη απόδοσή της, διενεργήθηκαν προκαταρκτικά πειράματα. Για τη βελτιστοποίηση ελέγχθηκε μία παράμετρος τη φορά ενώ οι υπόλοιπες διατηρήθηκαν σταθερές.

Με την ανάλυση εμβολιασμένου διαλύματος στοματικού υγρού (εις τριπλούν) με το μίγμα των αναλυτών (200 ng/mL) εξετάστηκαν: δύο τύποι φίλτρων Whatman (φίλτρο από υαλοΐνες και φίλτρο κυτταρίνης), διαφορετικές τιμές pH σε τέσσερα διαφορετικά επίπεδα (5,7,9,12), διαφορετικοί χρόνοι εκχύλισης (10, 20 και 30 λεπτά), τρεις διαλύτες έκλουσης (μεθανόλη, ακετονιτρίλιο και το μίγμα τους 50:50 v/v), διαφορετικά μέσα έκλουσης (vortex και υπέρηχοι) και τέλος, διάφοροι χρόνοι έκλουσης (5, 10 και 15 λεπτά).

5.6. Διαδικασία εκχύλισης FPSE

Πριν τη διαδικασία της εκχύλισης, προηγήθηκε ένα στάδιο καταβύθισης των πρωτεϊνών. Η παρουσία των πρωτεϊνών επηρεάζει τα αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου και τη διάρκεια ζωής της ενόργανης διάταξης. Έτσι, τοποθετήθηκε 1 mL στοματικού υγρού σε erppendorf, το οποίο αναδεύτηκε για 30 δευτερόλεπτα σε συσκευή vortex και στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων για ένα λεπτό για να διασπαστούν οι βλεννώδεις ουσίες. Η καταβύθιση των πρωτεϊνών διεξήχθη με την προσθήκη 100 μ L ακετονιτρίλιου, και ακολούθησε εκ νέου ανάδευση σε συσκευή vortex για 30 δευτερόλεπτα και τοποθέτησή του σε λουτρό υπερήχων για ένα λεπτό. Τέλος, το μίγμα φυγοκεντρήθηκε στις 15.000 rpm για 15 λεπτά. Οι πρωτεΐνες απομακρύνθηκαν από το δείγμα ως λευκό ίζημα (εικόνα 31).

Μετά τον καθορισμό των τελικών συνθηκών από τα προκαταρκτικά πειράματα, για την έναρξη της διαδικασίας της εκχύλισης το επικαλυμμένο μέσο εμβαπτίστηκε σε 2 mL μίγματος διαλυτών μεθανόλης και ακετονιτρίλιου (50:50 % v/v) για 5 λεπτά (εικόνα 32). Έτσι, το μέσο καθαρίστηκε και απομακρύνθηκαν πιθανοί επιμολυντές από το περιβάλλον. Μετά το πέρας των πέντε λεπτών το μέσο εκπλύθηκε με απιονισμένο νερό (εικόνα 33). Στη συνέχεια, έλαβε μέρος η διαδικασία της εκχύλισης όπου το μέσο FPSE μαζί με το υπερκείμενο (pH=7) που συλλέχτηκε από τη φυγοκέντρηση τοποθετήθηκαν σε γυάλινο φιαλίδιο και αναδεύτηκαν για 30 λεπτά στις 300 rpm σε μαγνητικό αναδευτήρα (εικόνα 34). Στο στάδιο αυτό οι αναλύτες προσροφώνται στο μέσο εκχύλισης. Έπειτα, το φίλτρο

απομακρύνθηκε και τοποθετήθηκε σε ένα δεύτερο γυάλινο φιαλίδιο που περιείχε 150 μL μεθανόλης (εικόνα 35) για να πραγματοποιηθεί η διαδικασία της έκλουσης. Αυτή πραγματοποιήθηκε υπό ήπια ανάδευση (300 rpm) σε συσκευή vortex για 10 λεπτά (εικόνα 36). Τέλος, το έκλουσμα τοποθετήθηκε σε vial για να εγχυθεί στο LC-MS/MS.



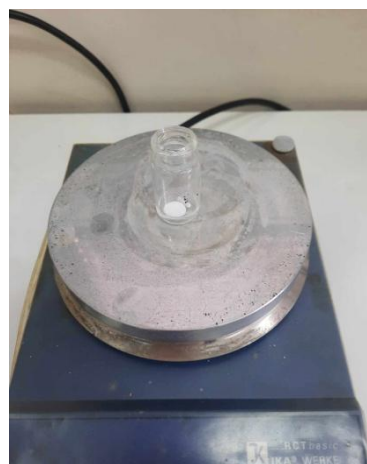
Εικόνα 31. Καταβύθιση πρωτεϊνών ως λευκό ίζημα.



Εικόνα 32. Καθαρισμός φίλτρου με MeOH/CAN.



Εικόνα 33. Έκπλυση του φίλτρου με απιονισμένο νερό.



Εικόνα 34. Διαδικασία εκχύλισης υπό τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα.



Εικόνα 35. Τοποθέτηση του φίλτρου στον διαλύτη έκλουσης.



Εικόνα 36. Διαδικασία έκλουσης των αναλυτών υπό τη βοήθεια συσκευής vortex.

5.8. Συνθήκες χρωματογραφικής ανάλυσης

Η ανίχνευση και η ποσοτικοποίηση των υπό-μελέτη αναλυτών πραγματοποιήθηκε σε σύστημα Dionex UHPLC (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Ο εξοπλισμός αποτελούνταν από έναν απαερωτή, μια δυαδική αντλία, έναν αυτόματο δειγματολήπτη και έναν φούρνο στήλης. Το σύστημα συζεύχθηκε με ένα φασματόμετρο μάζας Triple Quad5500™/ QTrap 5500 (Sciex, Darmstadt, Germany) σε λειτουργία MRM (Multiple Reaction Monitoring) εξοπλισμένο με μια πηγή ιονισμού (Turbo V) χρησιμοποιώντας θετικό ηλεκτροψεκασμό (ESI^+). Πρότυπο μίγμα των ουσιών βοήθησε στη βελτιστοποίηση των χρωματογραφικών συνθηκών.

Ο διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε σε μία αναλυτική στήλη ανάστροφης φάσης Accupore C18 50 mm x 3 mm, με μέγεθος σωματιδίων 2.6 μm , εξοπλισμένη με προστήλη με διαστάσεις 2.1 mm x 0.2 μm (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), όπου λειτουργούσαν στους 30°C. Η θερμοκρασία του αυτομάτου δειγματολήπτη ήταν 5°C. Η βελόνα του εγχυτήρα καθαριζόταν με 200 μL μεθανόλης πριν και μετά από κάθε ένεση και ο όγκος έγχυσης ήταν σταθερός και ίσος με 5 μL .

Οι κινητές φάσεις αποτελούνταν από 10 mM υδατικού οξικού αμμωνίου σε pH 3.5 με 0.1% μυρμηκικό οξύ (διαλύτης έκλουσης A) και ακετονιτρίλιο UHPLC-MS με 0.1% μυρμηκικό οξύ (διαλύτης έκλουσης B), σε βαθμιδωτή έκλουση και σταθερή ροή 0.5 mL/min. Η απαέρωση των διαλυτών έκλουσης έγινε σε λουτρό υπερήχων για 10 min από ElmasonicS,

Germany. Η βαθμιδωτή έκλυση ξεκίνησε με αναλογίες 98/2 % v/v (A/B) και αυξήθηκε στα 0.25 πρώτα λεπτά σε ποσοστό B 14 %. Το ποσοστό αυτό αυξήθηκε στο 45 % στα 2.5 min και στα 3.5 min αυξήθηκε στο 100%, όπου παρέμεινε για ένα λεπτό. Το σύστημα επέστρεψε στις αρχικές αναλογίες 98/2 % v/v (A/B) στα 5 min όπου και παρέμεινε για 1.5 λεπτό (πίνακας 13).

Πίνακας 13. Βαθμιδωτό πρόγραμμα έκλυσης που χρησιμοποιήθηκε για τον διαχωρισμό των ουσιών.

Χρόνος (min)	Διαλύτης A(%)	Διαλύτης B(%)	Ροή (mL/min)
0	Έναρξη		0.5
0	98	2	0.5
0.25	86	14	0.5
2.5	55	45	0.5
3.5	0	100	0.5
4.5	0	100	0.5
5.0	98	2	0.5
6.5	98	2	0.5
6.5	Τερματισμός		0.5

Η επιλογή της κινητής φάσης έγινε με στόχο τις βέλτιστες συνθήκες ιονισμού και την ταυτόχρονη εξασφάλιση συμμετρικών κορυφών. Η βέλτιστη απόκριση σήματος, η ευαισθησία και γενικότερα μία επιτυχημένη ανάλυση LC-MS/MS καθορίζεται από τη διαδικασία του ιονισμού, ο οποίος εξαρτάται κυρίως από το pH της κινητής φάσης και το pKa των αναλυτών. Στο σύστημα LC-MS/MS οι αναλύτες προτιμώνται να βρίσκονται ήδη στην ιονισμένη τους μορφή στην κινητή φάση, για να αυξηθεί η παραγωγή των ιόντων (Kafeenah et al., 2019).

Οι αναλύτες στην παρούσα εργασία συμπεριφέρονται ως ασθενείς βάσεις. Στην ανάλυση ESI⁺-LC-MS/MS το pH της κινητής φάσης πρέπει να είναι ιδανικά τουλάχιστον 2 μονάδες μικρότερο από το pKa των αναλυτών για να αυξηθεί η ευαισθησία. Έτσι, για την εξασφάλιση της όξινης κινητής φάσης επιλέχτηκε το μυρμηκικό οξύ.

Επιπλέον, το μυρμηκικό οξύ μπορεί να περιορίσει την καταστολή του σήματος σε πολύπλοκα υποστρώματα (Choi et al., 2001). Μία από τις λειτουργίες της διασύνδεσης του LC-MS είναι και η εξάτμιση των μορίων της κινητής φάσης. Έτσι, η κινητή φάση πρέπει να είναι επαρκώς πτητική (Dolan, 2015). Για τον σκοπό αυτό, επιλέχτηκε το οξικό αμμώνιο ως ρυθμιστικό

διάλυμα σε συγκέντρωση 10 mM και όχι μεγαλύτερη, για την αποφυγή της καθίζησης κατά την ανάμειξη με τον οργανικό διαλύτη.

5.8. Συνθήκες συζευγμένης Φασματομετρίας Μάζας (MS/MS)

Το φασματόμετρο μάζας ήταν εξοπλισμένο με πηγή ιονισμού ηλεκτροψεκασμού (ESI). Επιλέχτηκε ο θετικός ηλεκτροψεκασμός καθώς σύμφωνα με τους πίνακες 1-10 του κεφαλαίου 3 όπου απεικονίζονται οι δομές των ουσιών, όλες περιέχουν ομάδες αζώτου και μία είναι και εστέρα. Στον θετικό ηλεκτροψεκασμό τα ιόντα σχηματίζονται μέσω πρωτονίωσης, όπου το αρχικό μόριο (M) λαμβάνει ένα πρωτόνιο (H) και συμβολίζεται $[M+H]^+$.

Αρχικά, εφαρμόστηκαν διαφορετικές τιμές για GS1, GS2, Ion source temperature ώστε να επιλεχθούν οι βέλτιστες τιμές για την καλύτερη απόκριση των ουσιών. Δοκιμάστηκαν οι θερμοκρασίες 450, 550 και 600 °C και αντίστοιχα 45,55 και 60 psi gas source (GS1 + GS2).

Οι τελικές εφαρμοζόμενες συνθήκες ESI ήταν οι εξής: GS1 άζωτο (55 psi), GS2 άζωτο (55 psi), Ion Spray Voltage 5500 V, Ion source temperature (TEM), 550 °C, curtain gas άζωτο (55 psi). Η διάρκεια του προγράμματος ήταν 6.002 min, η παράμετρος cycle time ήταν 0.602 sec και cycles 600.

Οι διάφοροι παράμετροι του πίνακα 14, βελτιστοποιήθηκαν για κάθε ουσία, χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο MRM που είναι ενσωματωμένος στην έκδοση λογισμικού SciexAnalyst® έκδοση 1.7.1 (Sciex, Darmstadt, Germany), για αυτόματη ποσοτική βελτιστοποίηση. Τα δεδομένα επεξεργάστηκαν με το λογισμικό SciexOS 1.6 1 (Sciex, Darmstadt, Germany).

Πίνακας 14 . Παράμετροι MS για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των ουσιών.

	Q1 Mass (Da)	Q3 Mass (Da)	Dwell time (msec)	ID	DP (volts)	CE (volts)	CXP (volts)	EP (volts)
1	300.047	215.100	15.0	Κωδεΐνη 1	56.000	35.000	14.000	10.000
2	300.047	165.000	15.0	Κωδεΐνη 2	56.000	51.000	18.000	10.000
3	300.047	183.100	15.0	Κωδεΐνη 3	56.000	39.000	16.000	10.000
4	286.077	201.000	15.0	Μορφίνη 1	162.670	35.000	12.000	10.000
5	286.077	165.000	15.0	Μορφίνη 2	162.670	53.000	22.000	10.000
6	286.077	152.000	15.0	Μορφίνη 3	162.670	73.000	12.000	10.000
7	328.040	165.000	15.0	6-Μονοακέτυλο μορφίνη 1	141.360	45.000	16.000	10.000
8	328.040	211.000	15.0	6-Μονοακέτυλο μορφίνη 2	141.360	37.000	16.000	10.000
9	328.040	193.100	15.0	6-Μονοακέτυλο μορφίνη 3	141.360	39.000	12.000	10.000
10	136.013	91.000	15.0	Αμφεταμίνη 1	60.570	25.000	12.000	10.000
11	136.013	119.100	15.0	Αμφεταμίνη 2	60.570	13.000	20.000	10.000
12	136.013	65.000	15.0	Αμφεταμίνη 3	60.570	51.000	10.000	10.000
13	290.046	168.200	15.0	Βενζοϋλεκγονίνη 1	110.000	25.000	8.000	10.000
14	290.046	105.000	15.0	Βενζοϋλεκγονίνη 2	110.000	37.000	12.000	10.000
15	290.046	77.000	15.0	Βενζοϋλεκγονίνη 3	110.000	63.000	32.000	10.000
16	304.044	182.200	15.0	Κοκαΐνη 1	112.720	27.000	12.000	10.000

17	304.044	82.000	15.0	Κοκαΐνη 2	112.720	41.000	12.000	10.000
18	304.044	91.000	15.0	Κοκαΐνη 3	112.720	69.000	10.000	10.000
19	200.023	182.100	15.0	Μεθυλεστέρας της εκγονίνης 1	110.000	23.000	16.000	10.000
20	200.023	82.000	15.0	Μεθυλεστέρας της εκγονίνης 2	110.000	35.000	14.000	10.000
21	200.023	91.100	15.0	Μεθυλεστέρας της εκγονίνης 3	110.000	43.000	12.000	10.000
22	180.027	163.100	15.0	3,4- Μεθυλενοδιοξυαμφετ αμίνη 1	57.060	15.000	18.000	10.000
23	180.027	105.000	15.0	3,4- Μεθυλενοδιοξυαμφετ αμίνη 2	57.060	31.000	12.000	10.000
24	180.027	133.100	15.0	3,4- Μεθυλενοδιοξυαμφετ αμίνη 3	57.060	25.000	14.000	10.000
25	310.087	265.100	15.0	Μεθαδόνη 1	93.120	21.000	16.000	10.000
26	310.087	105.000	15.0	Μεθαδόνη 2	93.120	33.000	12.000	10.000
27	310.087	77.100	15.0	Μεθαδόνη 3	93.120	67.000	12.000	10.000
28	150.066	91.100	15.0	Μεθαμφεταμίνη 1	56.290	27.000	12.000	10.000
29	150.066	119.200	15.0	Μεθαμφεταμίνη 2	56.290	15.000	10.000	10.000
30	150.066	65.100	15.0	Μεθαμφεταμίνη 3	56.290	49.000	10.000	10.000

Το Q1 χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση των αναλυτών και το Q3 για τον ποιοτικό προσδιορισμό τους. Τα τρία επιλεγμένα ιόντα ήταν μοναδικά για κάθε αναλύτη.

5.9. Επικύρωση μεθόδου

Η επικύρωση μιας μεθόδου είναι η διαδικασία με την οποία αξιολογούνται τα χαρακτηριστικά ποιότητας της μεθόδου, μέσω της εκτέλεσης πειραμάτων και εξετάζεται η ανταπόκρισή της ως προς τις προδιαγραφές. Έτσι, μπορεί να αποδειχτεί ότι είναι κατάλληλη να αποδώσει επιτυχώς, στο επίπεδο της προβλεπόμενης χρήσης της.

Για την επικύρωση της αναλυτικής διαδικασίας ακολουθήθηκαν οι κατευθυντήριες γραμμές από την American Academy of Forensic Science Standards Board (AAFS ASB) (AAFS Standards Board, 2019). Για τον σκοπό αυτό προσδιορίστηκαν τα όρια ανίχνευσης (Limits of Detection-LOD) και ποσοτικοποίησης (Limits of Quantification-LOQ), η καμπύλη βαθμονόμησης, η γραμμικότητα, η ακρίβεια, η πιστότητα (επαναληψιμότητα και αναπαραγωγιμότητα), η σταθερότητα, η επίδραση του υποστρώματος και η εκλεκτικότητα.

Η χαμηλότερη συγκέντρωση η οποία μπορεί να μετρηθεί με ακρίβεια και πιστότητα ονομάζεται **όριο ποσοτικοποίησης (LOQ)** και ορίστηκε ως το εμβαδόν της χρωματογραφικής κορυφής του αναλύτη που εμφανίζει σήμα 10 φορές μεγαλύτερο από τον μέσο όρο του θορύβου των δύο διπλανών κορυφών (εκατέρωθεν της κορυφής του αναλύτη). Αντίστοιχα, το **όριο ανίχνευσης (LOD)** αποτελεί τη χαμηλότερη συγκέντρωση του αναλύτη και ορίστηκε ως 3.3 φορές μικρότερο του LOQ.

Τόσο το LOD όσο και το LOQ προσδιορίστηκαν αναλύοντας εις διπλούν, τρία δείγματα στοματικού υγρού εμβολιασμένα με συγκεντρώσεις των αναλυτών στο εύρος 0.001-10 ng/mL σε τρεις διαφορετικές δοκιμές. Κριτήριο για την ταυτοποίηση αποτελεί, ο χρόνος έκλουσης ο οποίος να αντιστοιχεί στο $\pm 2\%$, του χρόνου κατακράτησης του πρότυπου δείγματος και το σχήμα της κορυφής να είναι συμμετρικό. Επιπλέον, η αναλογία του ποσοτικού ιόντος προς το ποιοτικό ιόν να αντιστοιχεί στο $\pm 25\%$ της πρότυπης ουσίας.

Οι **καμπύλες βαθμονόμησης** συσχετίζουν την απόκριση σήματος (εμβαδόν κορυφής) με τη συγκέντρωση του αναλύτη. Για την ελαχιστοποίηση των επιδράσεων του υποστρώματος στην αναλυτική απόκριση και έτσι την καλύτερη ποσοτικοποίηση, κατασκευάστηκαν matrix match (προσομοίωση υποστρώματος) καμπύλες βαθμονόμησης. Συνεπώς, για την κατασκευή των καμπυλών αυτών (matrix-match calibration curves) εκχυλίστηκαν με την διαδικασία της FPSE 5 τυφλά δείγματα στοματικού υγρού για κάθε συγκέντρωση και πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός, σε επίπεδο συγκεντρώσεων που κυμαινόταν μεταξύ LOQ έως 450 ng/mL για κάθε ουσία.

Η **γραμμικότητα** αναφέρεται στη γραμμική συσχέτιση του σήματος της ενόργανης διάταξης (εμβαδόν) από το στοματικό υγρό μετά την εκχύλιση με FPSE, συναρτήσει της συγκέντρωσης των αναλυτών. Η γραμμικότητα εξετάστηκε σε εμβολιασμένο στοματικό υγρό σε εύρος συγκεντρώσεων από LOQ έως 60 ng/mL (συγκέντρωση εμβολιασμού). Κάθε επίπεδο συγκέντρωσης μετρήθηκε εις τριπλούν.

Η υψηλότερη συγκέντρωση εμβολιασμού στην οποία δεν παρατηρείται μεταφορά αναλύτη (πάνω από το LOD της μεθόδου) στο τυφλό δείγμα του στοματικού υγρού, προσδιορίζεται ότι είναι η συγκέντρωση στην οποία η μέθοδος είναι απαλλαγμένη από μεταφορά. Για την αξιολόγηση ενδεχόμενης μεταφοράς (**Carry over-συμπαράσυρση**) πέντε τυφλά δείγματα στοματικού υγρού αναλύθηκαν αμέσως μετά την εκτέλεση τριπλών δειγμάτων υψηλής συγκέντρωσης (450 ng/mL). Η συγκέντρωση αυτή επιλέχτηκε καθώς είναι το υψηλότερο σημείο των καμπυλών βαθμονόμησης.

Η αξιολόγηση της **εκλεκτικότητας** (selectivity/interference studies) μίας μεθόδου είναι πολύ σημαντική καθώς διάφορες ουσίες όπως συστατικά του υποστρώματος, άλλα φάρμακα-μεταβολίτες και προσμίξεις παρεμποδίζουν την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση των αναλυτών. Για την αξιολόγηση διάφορων επιδράσεων από το υπόστρωμα συλλέχθηκαν από δέκα διαφορετικούς υγιείς δότες δείγματα στοματικού υγρού τα οποία δεν περιείχαν τους αναλύτες. Για την αξιολόγηση των επιδράσεων από άλλα φάρμακα τρία δείγματα στοματικού υγρού εμβολιάστηκαν με μίγμα που περιείχε αντικαταθλιπτικά και βενζοδιαζεπίνες σε συγκέντρωση 5000ng/mL.

Η **επίδραση του υποστρώματος** (matrix effect), αναφέρεται σε μια διαφορά στην απόκριση του σήματος του αναλύτη σε πρότυπο διάλυμα έναντι της απόκρισης για τον ίδιο όταν αναλύεται σε ένα βιολογικό υπόστρωμα. Είναι δηλαδή το αποτέλεσμα του σήματος που προκαλείται από όλα τα άλλα συστατικά του δείγματος που συνελκύονται με τον αναλύτη.

Για την αξιολόγηση της ποσοτικής επίδρασης χρησιμοποιήθηκε η προσέγγιση post extraction addition. Παρασκευάστηκαν δύο διαφορετικά σύνολα δειγμάτων. Το σύνολο 1 (Set 1) αποτελείται από καθαρό πρότυπο των αναλυτών σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις, μία χαμηλή (LOQ) και μία υψηλή (10xLOQ) και αναλύθηκε 6 φορές η κάθε συγκέντρωση (κατευθείαν έγχυση χωρίς εκχύλιση). Το σύνολο 2 (Set 2) αποτελείται από δέκα διαφορετικά δείγματα στοματικού υγρού τα οποία εκχυλίστηκαν εις διπλούν, με τη διαδικασία της FPSE και μετά την εκχύλιση πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός με τη χαμηλή και την υψηλή συγκέντρωση. Οι θετικές τιμές δηλώνουν ενίσχυση σήματος και οι αρνητικές καταστολή. Το

μέσο εμβαδόν κάθε συνόλου (X) χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση του φαινομένου καταστολής/ενίσχυσης για κάθε συγκέντρωση, το ποσοστό του οποίου δίνεται από την εξής σχέση:

$$\text{Καταστολή ή ενίσχυση ιονισμού} = \left(\frac{X \text{ Εμβαδόν συνόλου 2}}{X \text{ Εμβαδόν συνόλου 1}} - 1 \right) \times 100$$

Η **ακρίβεια** της μεθόδου, εκφράστηκε ως **ανάκτηση** μετά την εκχύλιση και ορίζεται ως η εγγύτητα μεταξύ της μέτρησης και της τιμής του εμβολιασμού. Το ποσοστό της απόλυτης ανάκτησης μετρήθηκε σε εμβολιασμένα δείγματα στοματικού υγρού γνωστής συγκέντρωσης (χαμηλή-μέση-υψηλή). Η ανάκτηση προσδιορίστηκε αναλύοντας κάθε συγκέντρωση 3 φορές σε πέντε διαφορετικές ημέρες.

Για τον υπολογισμό του ποσοστού αυτού χρησιμοποιήθηκε η εξής σχέση:

$$\% \text{Απόλυτη ανάκτηση} = \frac{\text{Συγκέντρωση εμβολισμού}}{\text{Μετρούμενη συγκέντρωση} *} \times 100\%$$

*Η τελική μετρούμενη συγκέντρωση είναι ανηγμένη ως προς τον συντελεστή προσυγκέντρωσης.

Η **πιστότητα** περιλαμβάνει τη συμφωνία των μετρήσεων εντός της ημέρας (επαναληψιμότητα, Intraday precision) και μεταξύ διαφορετικών ημερών (αναπαραγωγιμότητα, Interday precision). Ο προσδιορισμός αφορούσε το ίδιο δείγμα κάτω από τις ίδιες συνθήκες, δηλαδή ίδια μέθοδος ελέγχου, ίδιος χειριστής, ίδια συσκευή, ίδιο εργαστήριο και σύντομο χρονικό διάστημα.

Ως μέτρο της πιστότητας χρησιμοποιείται ο συντελεστής μεταβλητότητας (% CV). Η τυπική απόκλιση (std dev) και ο μέσος όρος (απόκριση) των επιλεγμένων τιμών χρησιμοποιήθηκε για να προσδιοριστεί ο CV.

$$\%CV = \frac{\text{Τυπική απόκλιση}}{\text{Μέση απόκριση}} \times 100$$

Για την αξιολόγηση της πιστότητας χρησιμοποιήθηκαν μετρήσεις σε εμβολιασμένα δείγματα στοματικού υγρού γνωστής συγκέντρωσης (χαμηλή-μέση-υψηλή). Κάθε συγκέντρωση αναλύθηκε εις τριπλούν μέσα στην ίδια μέρα και σε πέντε διαφορετικές. Από τις μετρήσεις αυτές υπολογίζεται η τυπική απόκλιση και ο συντελεστής διακύμανσης.

Η **σταθερότητα** ενός αναλύτη αναφέρεται στην ικανότητά του να αντιστέκεται σε οποιοδήποτε χημική μεταβολή ενός υποστρώματος κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες για

ένα δεδομένο χρονικό διάστημα. Τα πειράματα σταθερότητας διεξήχθησαν για να αξιολογηθεί ο χρόνος της αποθήκευσης -σε θερμοκρασία δωματίου- των επεξεργασμένων δειγμάτων σε περίπτωση που δεν αναλυθούν άμεσα. Έτσι, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα σιέλων εμβολιασμένα σε χαμηλή και υψηλή συγκέντρωση για να καθοριστεί η απόκριση στο χρόνο μηδέν. Έντεκα δείγματα για κάθε συγκέντρωση υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με την παρούσα μέθοδο εκχύλισης. Τα εκλούσματα κάθε συγκέντρωσης συνδυάστηκαν και χωρίστηκαν σε έντεκα διαφορετικά φιαλίδια για έγχυση στο LC-MS/MS. Το πρώτο φιαλίδιο κάθε συγκέντρωσης εγχύθηκε αμέσως εις τριπλούν για να καθοριστούν οι αποκρίσεις του χρόνου μηδέν. Από τα υπόλοιπα φιαλίδια, τα μισά φυλάχθηκαν στον αυτόματο δειγματολήπτη σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για να αναλυθούν έπειτα από μία ημέρα και τα άλλα μισά φυλάχθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για να αναλυθούν έπειτα από μία βδομάδα. Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων υπολογίστηκε ο μέσος όρος των σημάτων για κάθε συγκέντρωση για τα δύο χρονικά διαστήματα και συγκρίθηκε με τα σήματα στον χρόνο μηδέν.

6.Αποτελέσματα και συζήτηση

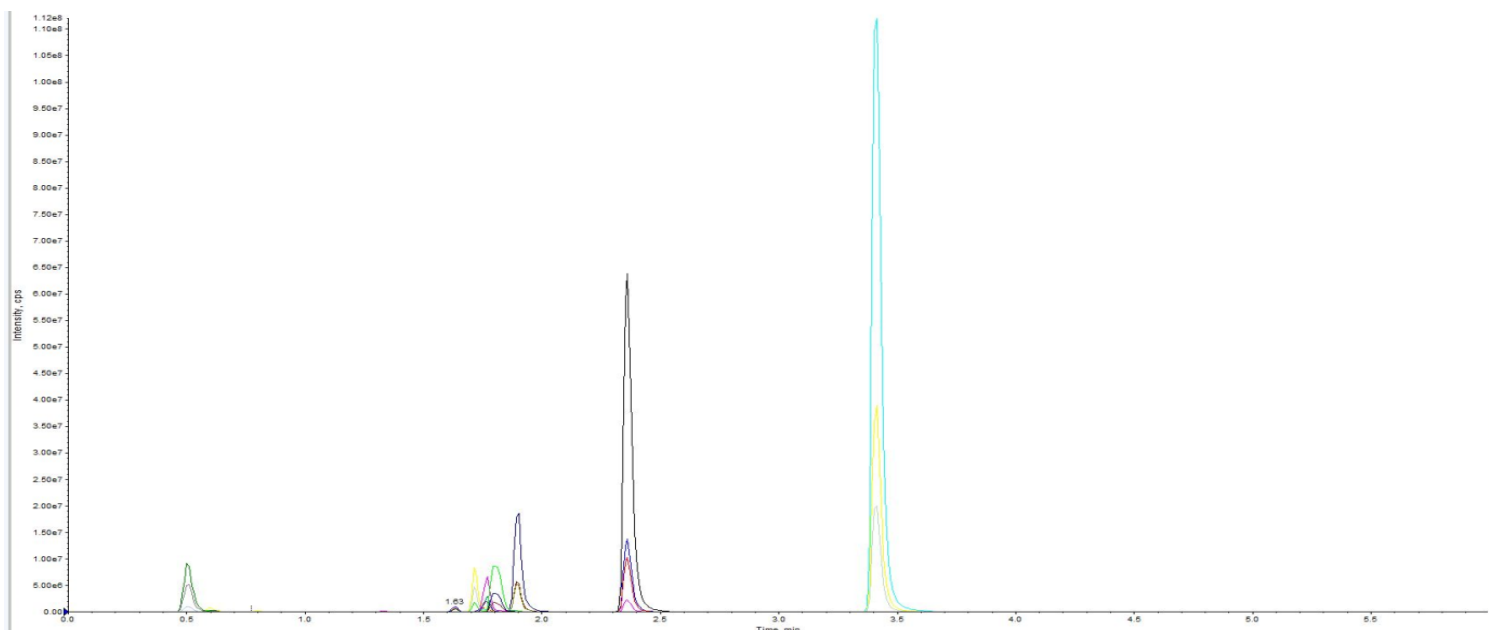
6.1. Χρωματογραφήματα και φάσματα μάζας

Οι εφαρμοζόμενες χρωματογραφικές συνθήκες παρείχαν συμμετρικές κορυφές για κάθε ουσία με τους χρόνους κατακράτησης (retention time) να απεικονίζονται στον πίνακα 15.

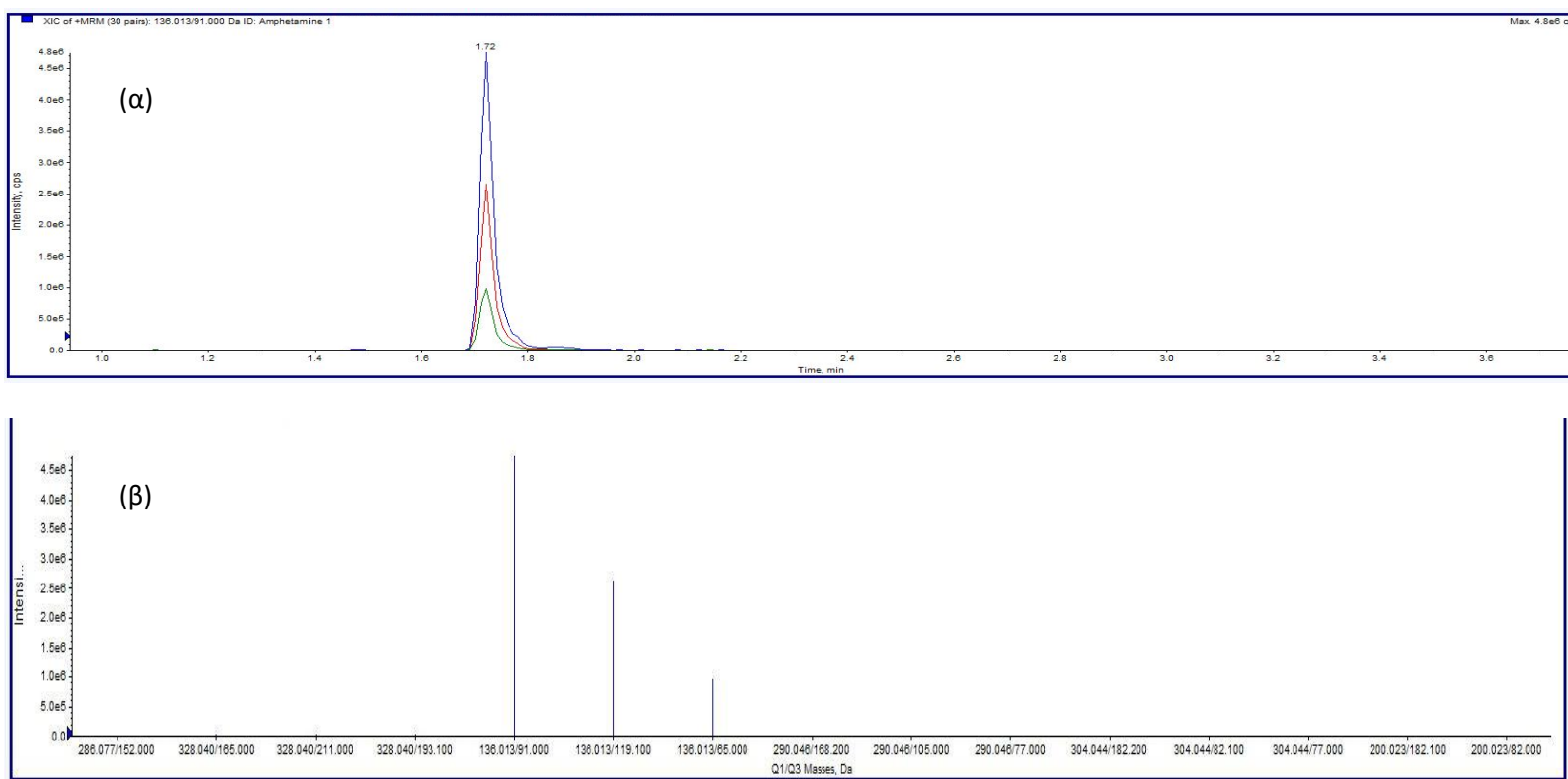
Πίνακας 15. Χρόνοι κατακράτησης των ουσιών στόχων.

Ουσίες	Χρόνος κατακράτησης (λεπτά)
Αμφεταμίνη	1.72
Βενζοϋλεγκονίνη	1.89
Μεθυλεστέρας της εκγονίνης	0.50
Κοκαΐνη	2.36
Κωδεΐνη	1.63
Μεθαδόνη	3.40
Μεθαμφεταμίνη	1.80
3-4 Μεθυλενοδιοξυαμφεταμίνη	1.77
6-Μονοακέτυλο μορφίνη	1.75
Μορφίνη	1.33

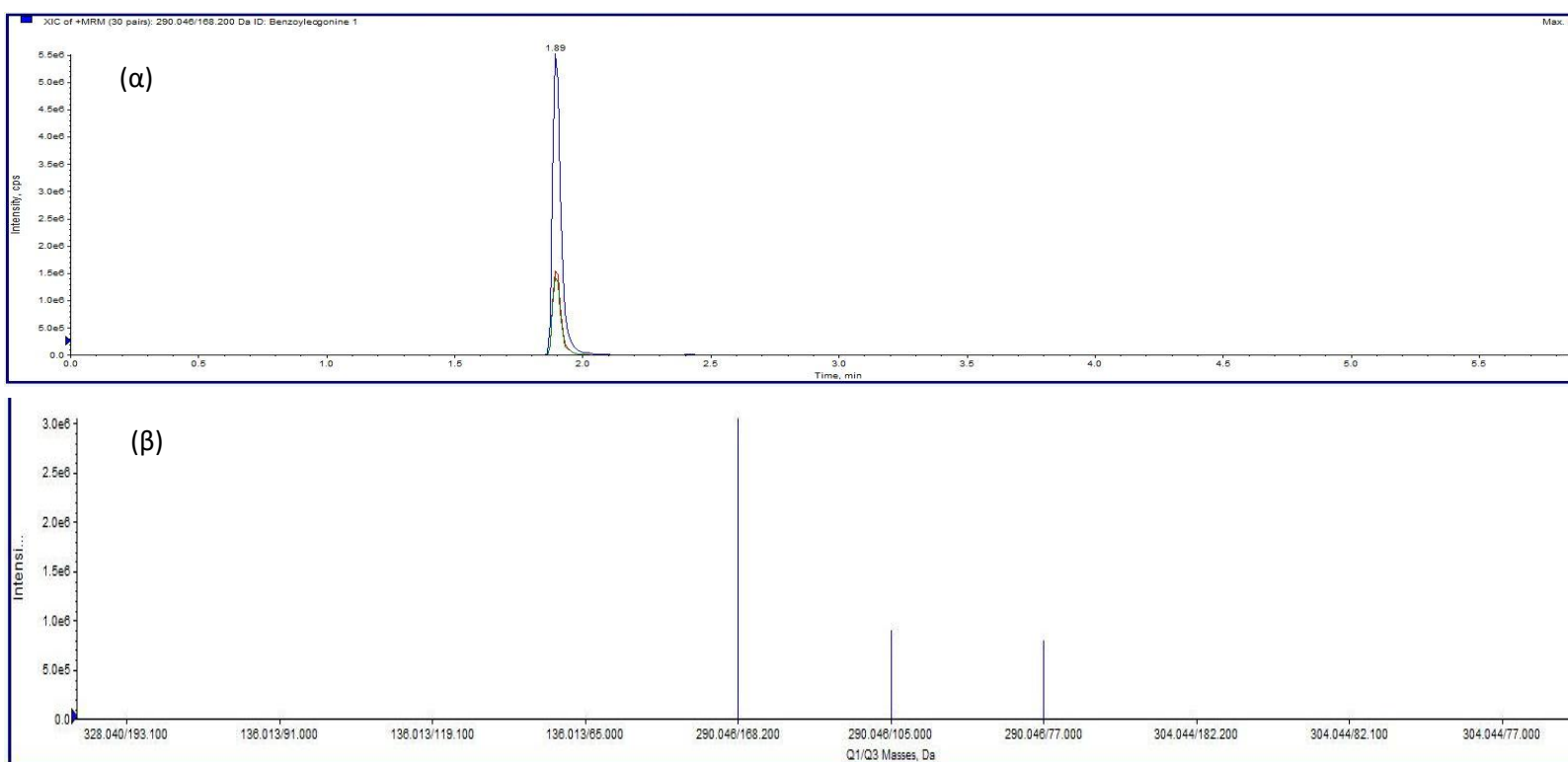
Το χρωματογράφημα (Total Ion Chromatograph, TIC), που προέκυψε έπειτα από τον εμβολιασμό του στοματικού υγρού με τις ενώσεις στόχους σε συγκέντρωση 50 ng/mL, απεικονίζει την ένταση όλων των ιόντων σε σχέση με τον χρόνο και δίνεται στην εικόνα 37. Αντίστοιχα, τα χρωματογραφήματα που δημιουργήθηκαν για κάθε ουσία μετά από τη λήψη τιμών έντασης σε μία διακριτή μάζα (Extracted Ion Chromatograph, XIC) μαζί με το φάσμα μάζας (διάγραμμα έντασης ιόντων ως συνάρτηση του λόγου m/z) για κάθε ουσία απεικονίζονται στις εικόνες 38-47 .



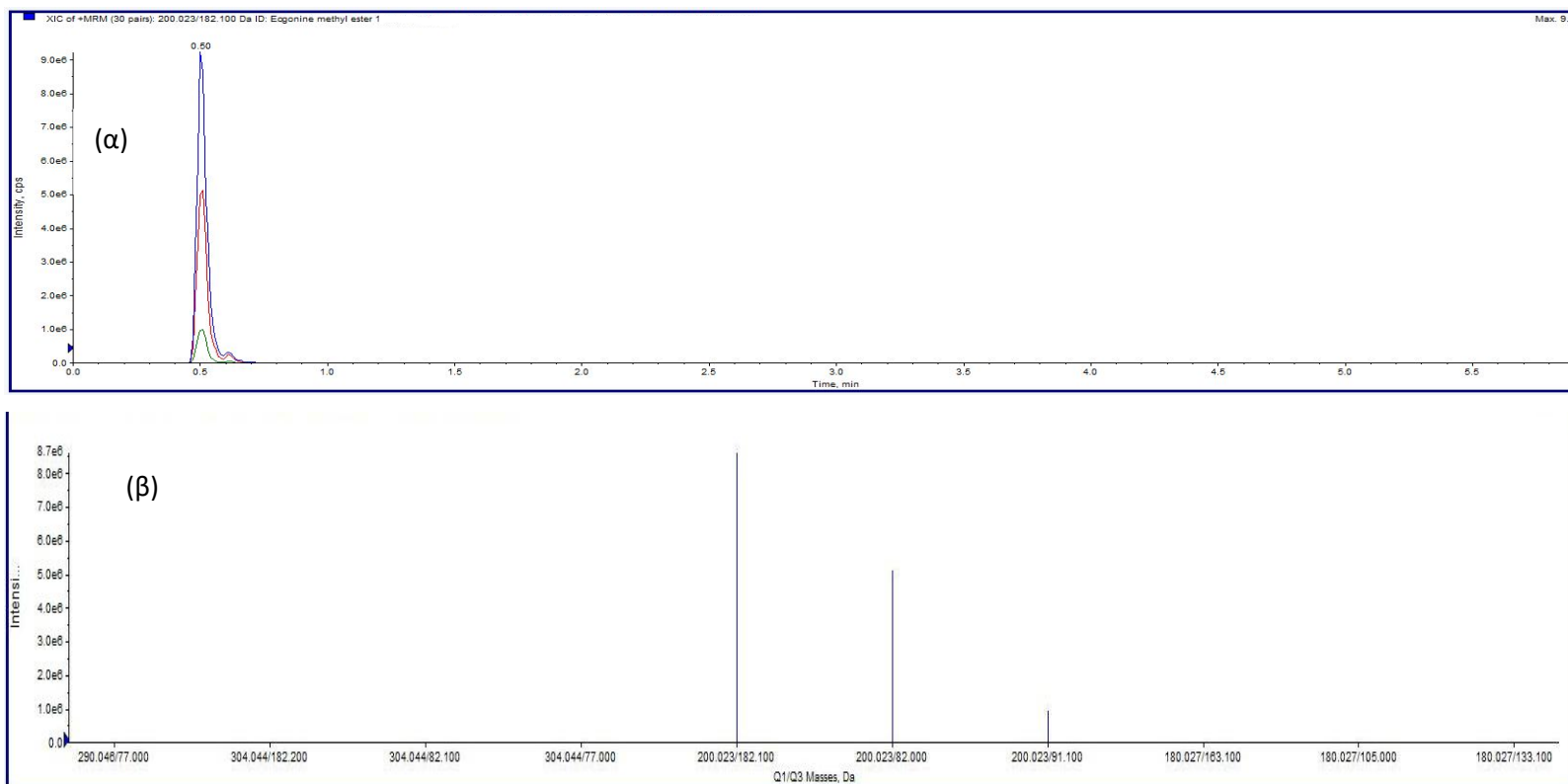
Εικόνα 37. TIC Χρωματογράφημα των ουσιών στόχων εμβολιασμένων στο στοματικό υγρό σε συγκέντρωση 50 ng/mL.



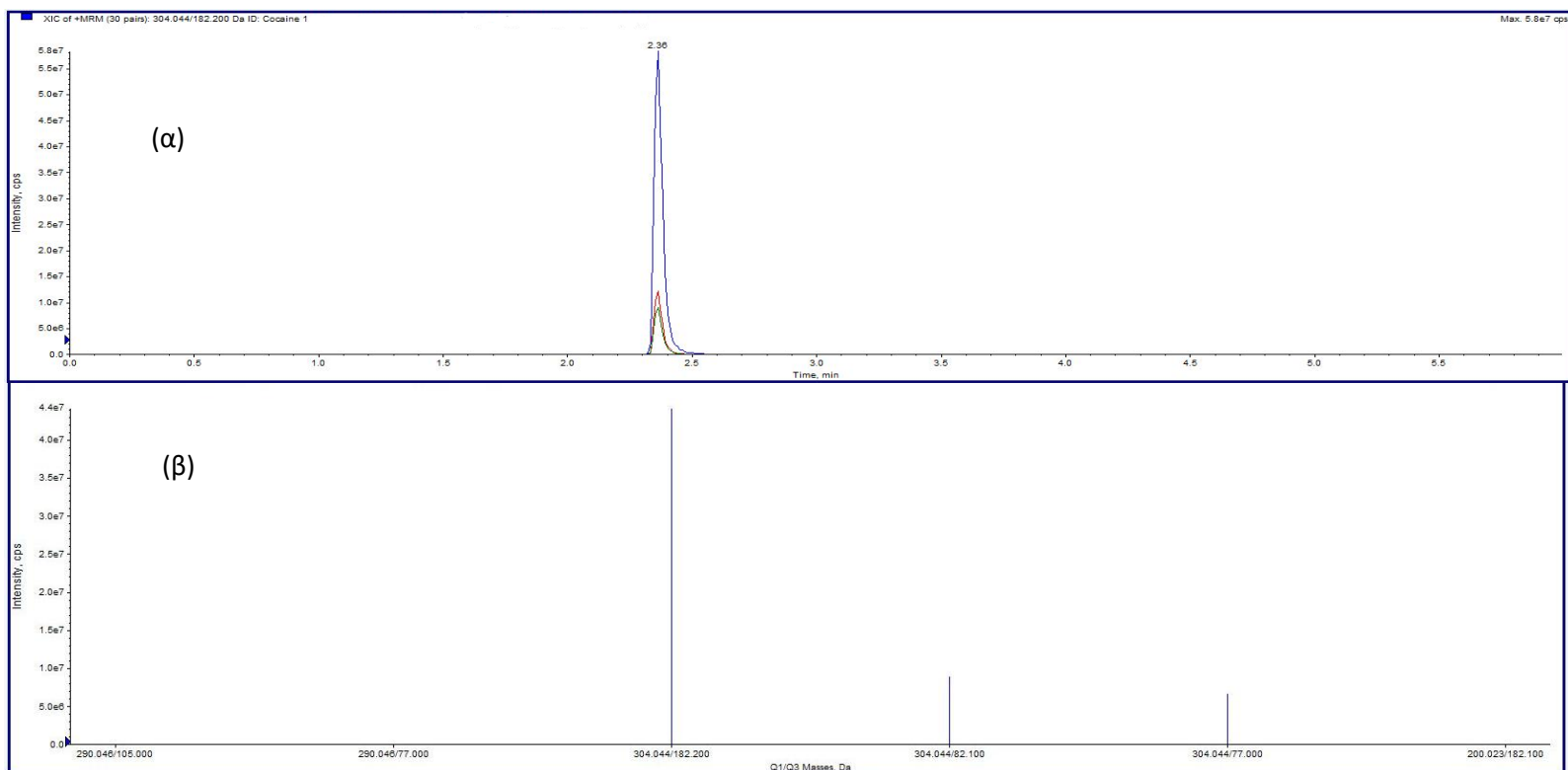
Εικόνα 38. (α) ΧIC Χρωματογράφημα Αμφεταμίνης. (β) Φάσμα μάζας Αμφεταμίνης.



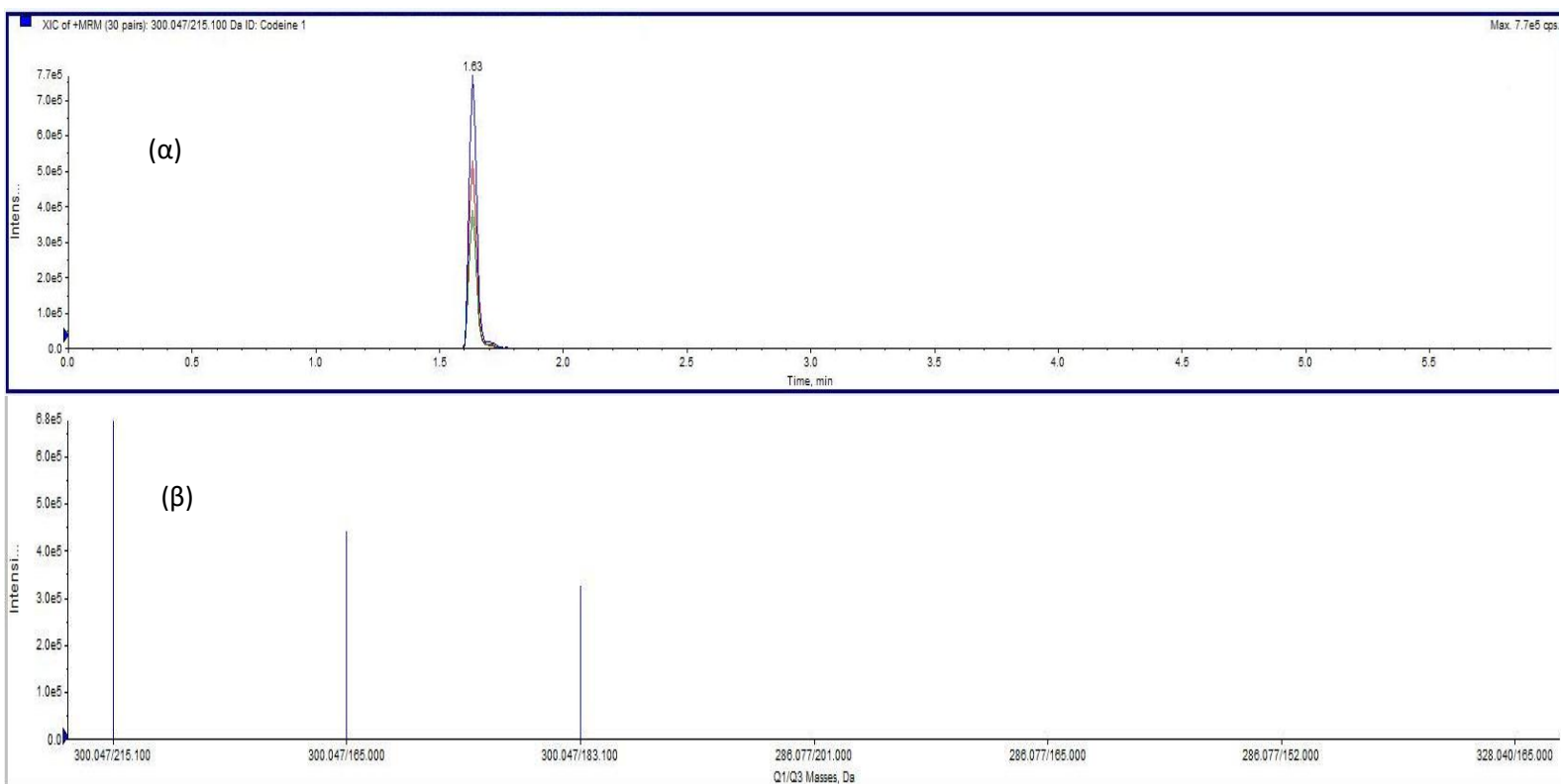
Εικόνα 39. (α) ΧIC Χρωματογράφημα Βενζοϋλεκγονίνης. (β) Φάσμα μάζας Βενζοϋλεκγονίνης.



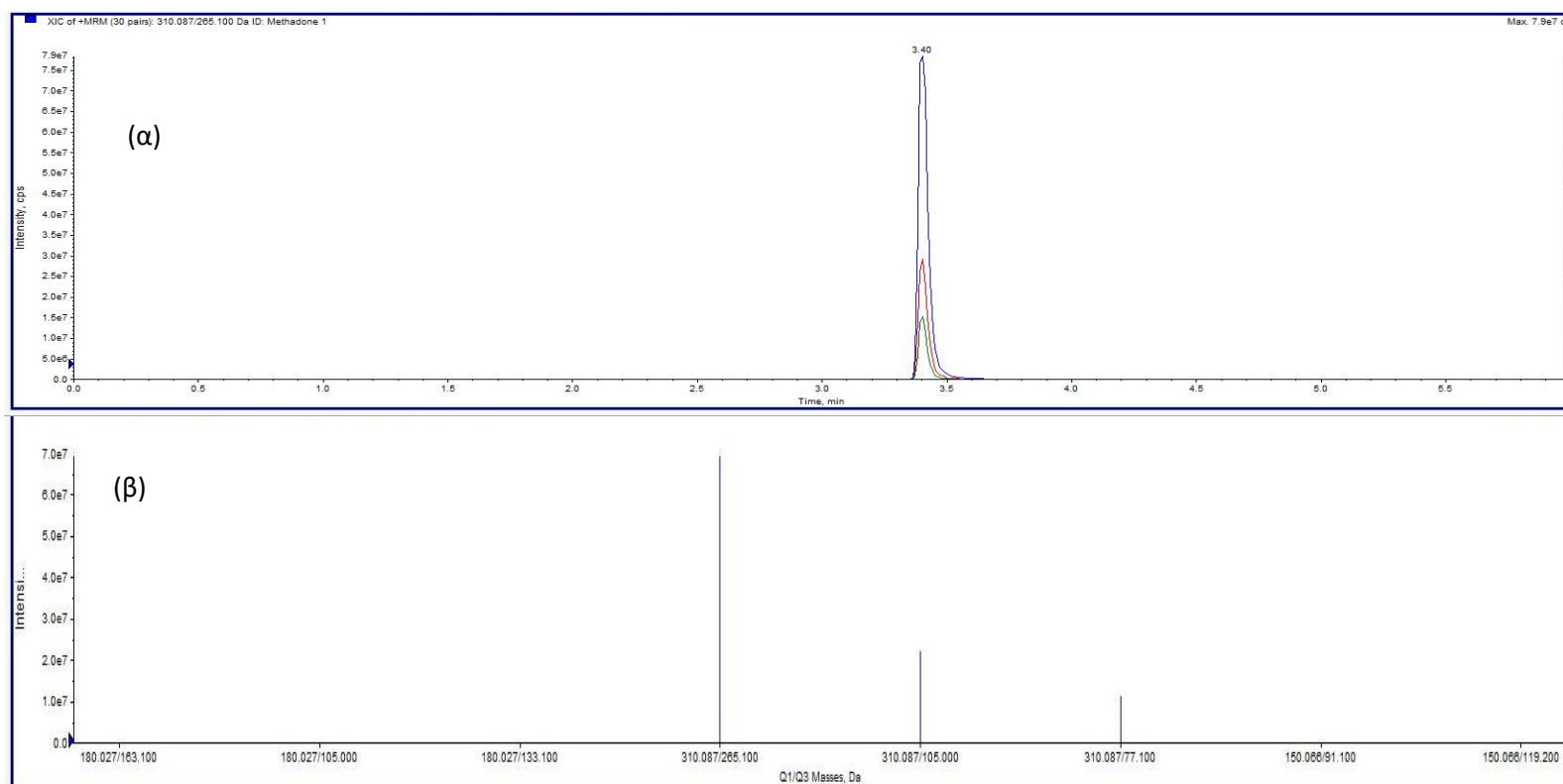
Εικόνα 40. (α) ΧΙC Χρωματογράφημα Μεθυλεστέρα της εκγονίνης. (β) Φάσμα μάζας Μεθυλεστέρα της εκγονίνης.



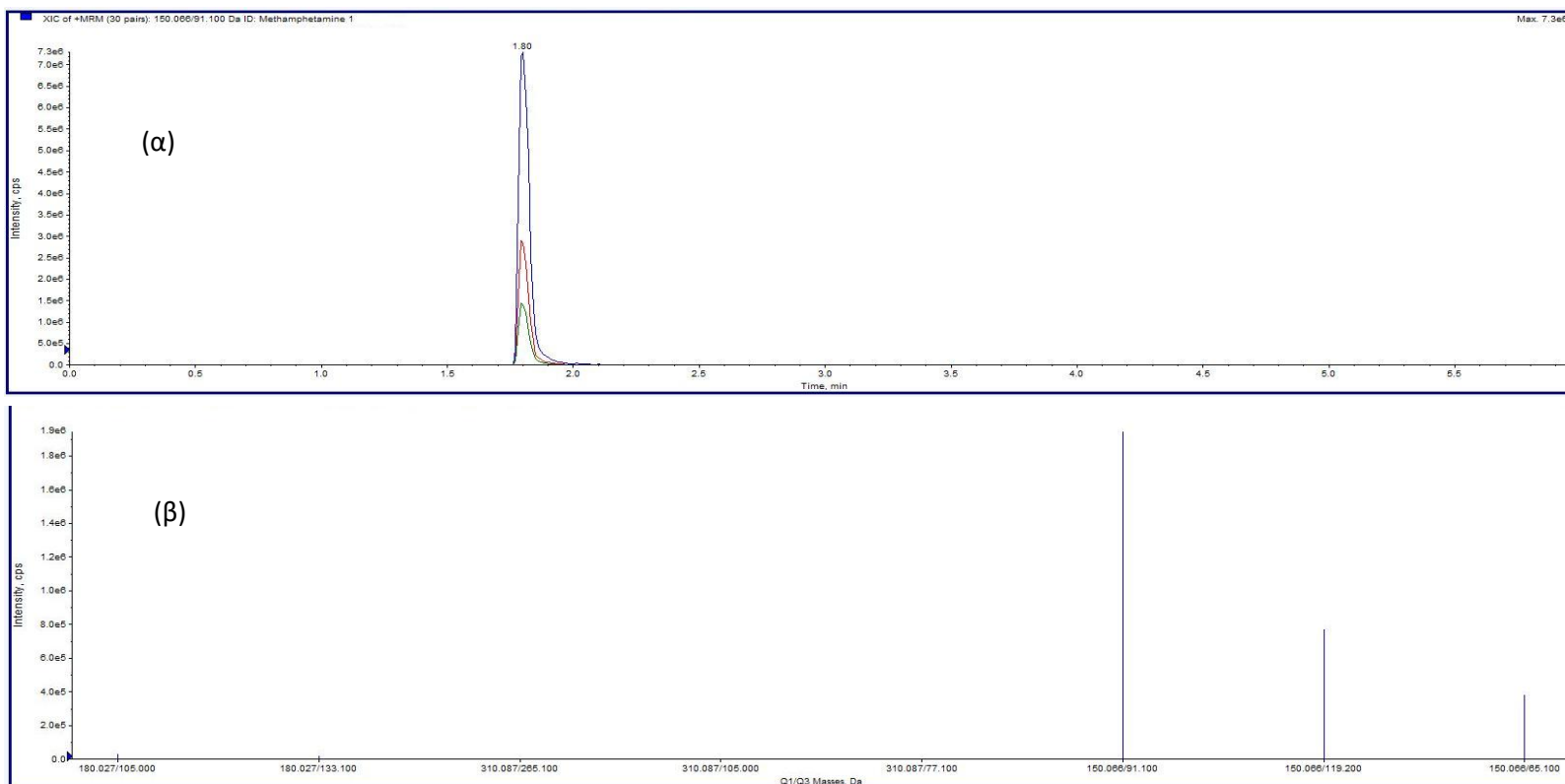
Εικόνα 41. (α) ΧΙC Χρωματογράφημα Κοκαΐνης. (β) Φάσμα μάζας Κοκαΐνης.



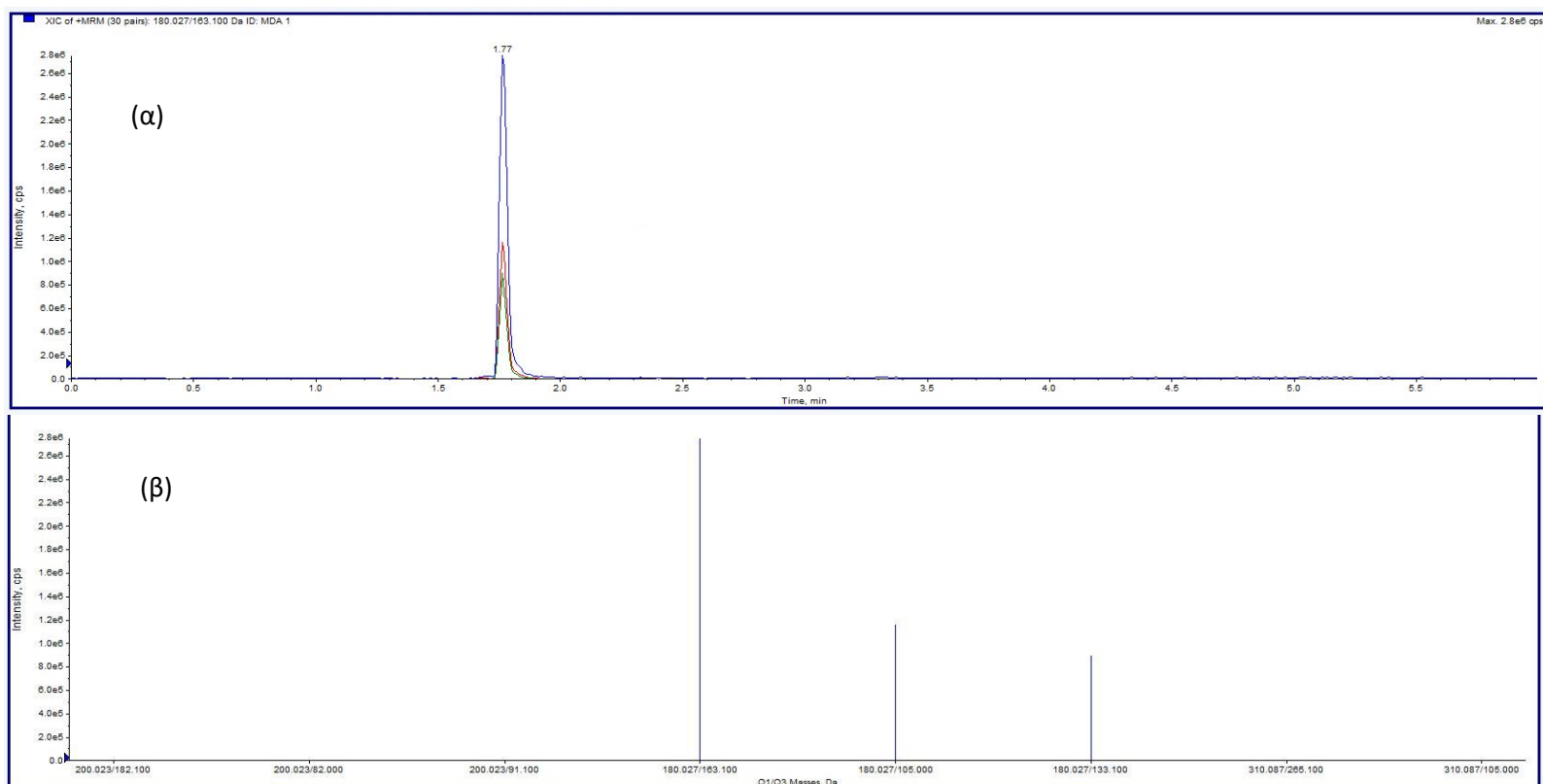
Εικόνα 42. (α) ΧIC Χρωματογράφημα Κωδεΐνης. (β) Φάσμα μάζας Κωδεΐνης.



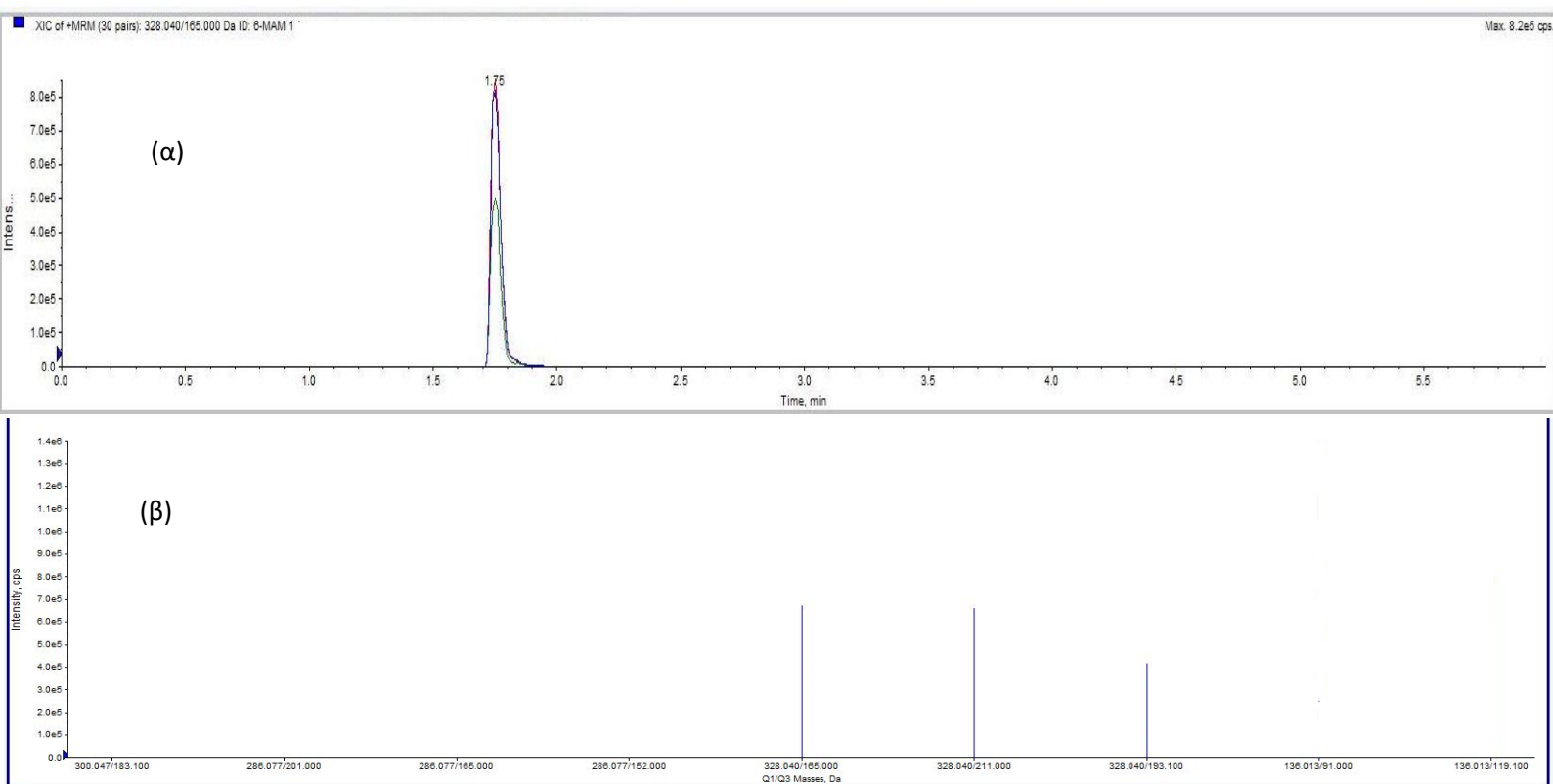
Εικόνα 43. (α) ΧIC Χρωματογράφημα Μεθαδόνης. (β) Φάσμα μάζας Μεθαδόνης.



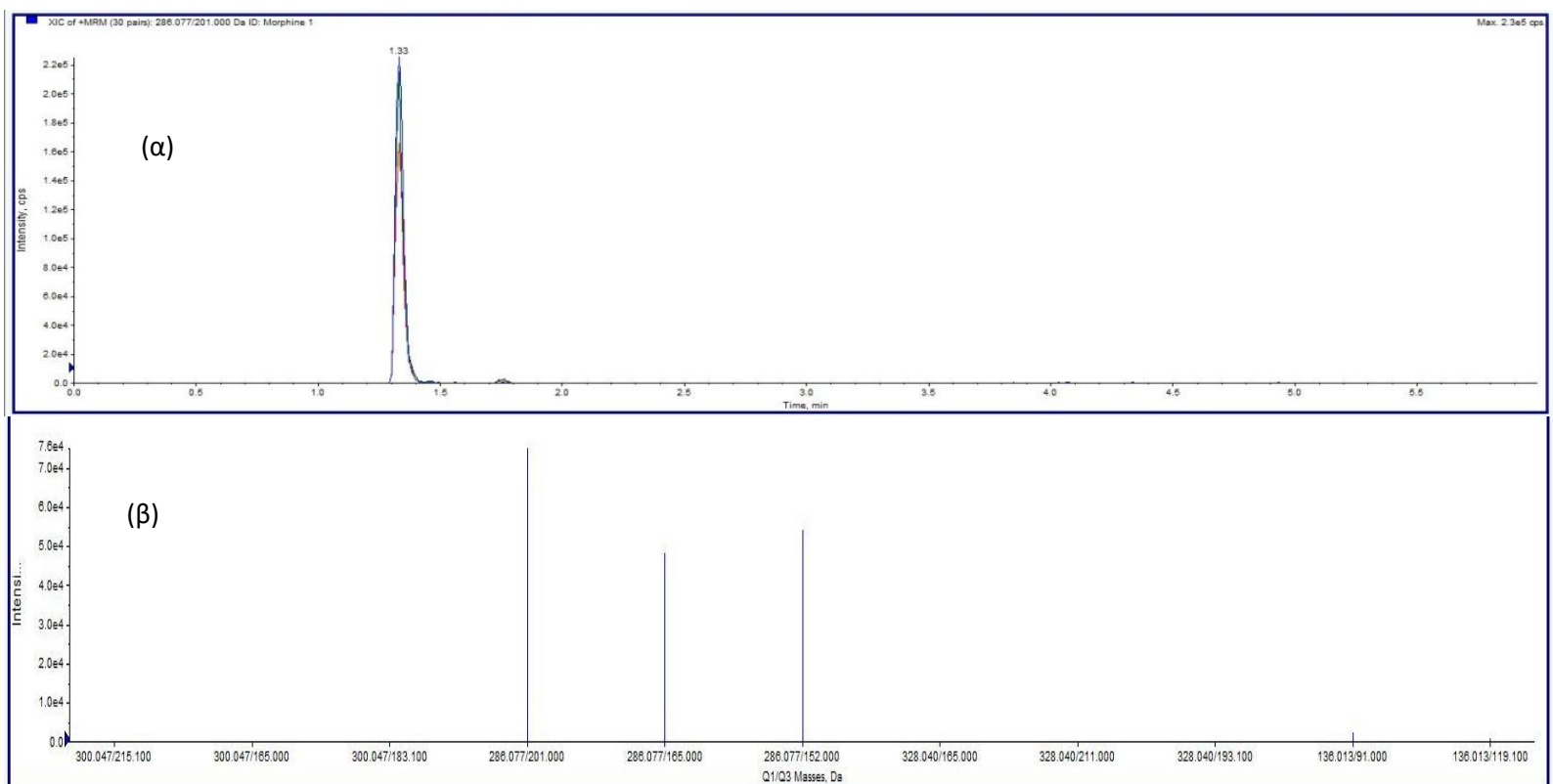
Εικόνα 44. (α) XIC Χρωματογράφημα Μεθαμφεταμίνης. (β) Φάσμα μάζας Μεθαμφεταμίνης.



Εικόνα 45. (α) XIC Χρωματογράφημα 3,4- Μεθυλενοδιοξαμφεταμίνης. (β) Φάσμα μάζας 3,4- Μεθυλενοδιοξαμφεταμίνης.



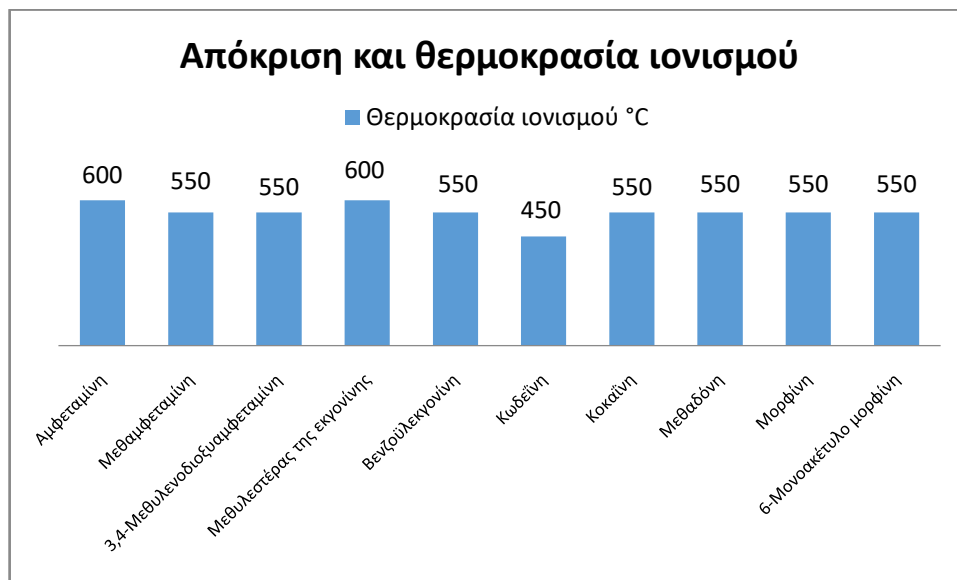
Εικόνα 46. (α) ΧIC Χρωματογράφημα 6-Μονοακέτυλο μορφίνης. (β) Φάσμα μάζας 6-Μονοακέτυλο μορφίνης.



Εικόνα 47. (α) ΧIC Χρωματογράφημα Μορφίνης. (β) Φάσμα μάζας Μορφίνης.

6.2. Καθορισμός της θερμοκρασίας της πηγής ιοντισμού

Η πλειονότητα των αναλυτών εμφάνισε μεγαλύτερη απόκριση και μικρότερο λόγο σήματος προς θόρυβο (S/N) όταν η θερμοκρασία ιοντισμού ήταν 550°C και 55 psi gas source (GS1 + GS2) αντίστοιχα (διάγραμμα 1).



Διάγραμμα 1. Βέλτιστη απόκριση αναλυτών ανάλογα με τη θερμοκρασία ιοντισμού.

6.3. Επιλογή υποστρώματος

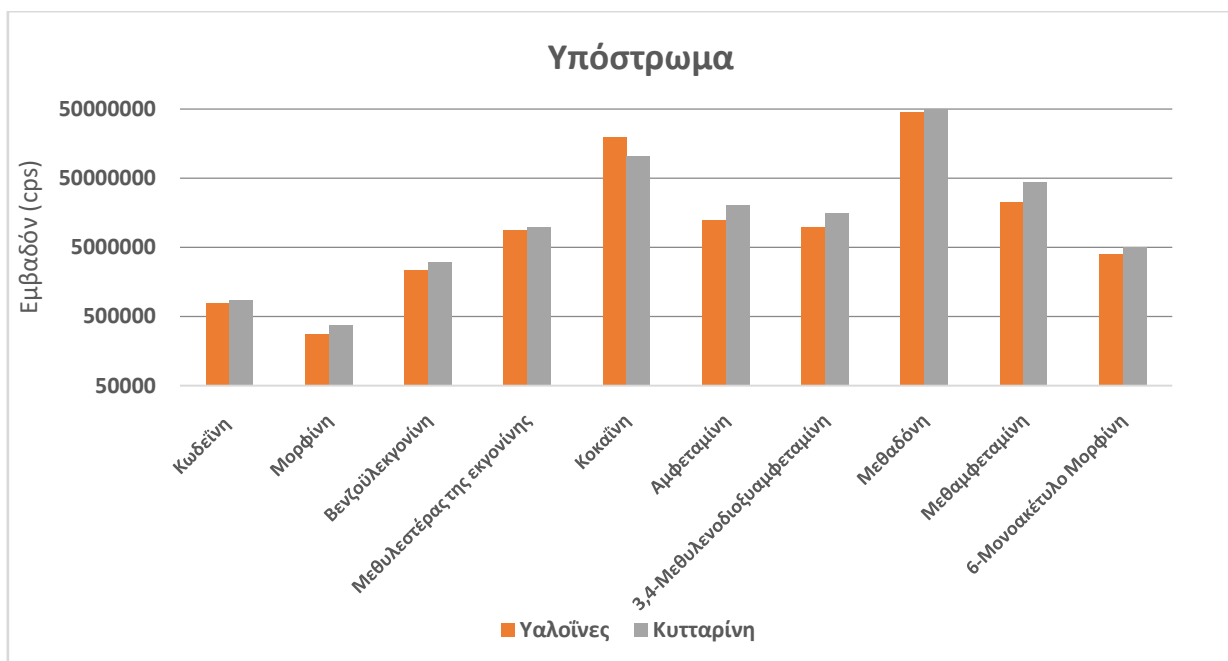
Η απόδοση και η εκλεκτικότητα της εκχύλισης μέσω προσρόφησης σε δίκτυο επικαλυμμένων ινών (FPSE) εξαρτάται από την επιλογή του υποστρώματος. Η επιλογή αυτή εξαρτάται από την υδροφιλικότητα ή υδροφοβικότητα των μελετώμενων αναλυτών και τη στρατηγική που θα χρησιμοποιηθεί για την έκλουσή τους από το μέσο FPSE. Εάν η εκρόφηση πραγματοποιείται με τη μεσολάβηση διαλύτη, τότε προτιμώνται υποστρώματα όπως η κυτταρίνη και ο πολυεστέρας ενώ, αν πραγματοποιείται θερμική εκρόφηση οι υαλοΐνες είναι η καλύτερη επιλογή (Lakade et al., 2015).

Λόγω της αυξημένης πολικότητας των περισσότερων ουσιών ($\log K_{ow}=0.14-3.93$) αναμένεται ένα πολικό πολυμερές (PEG) επικαλυμμένο σε ένα υδρόφιλο υπόστρωμα (κυτταρίνη) να έχουν καλύτερη ικανότητα έκλουσης.

Τα ευρήματα της μελέτης επιβεβαίωσαν αυτόν τον ισχυρισμό και έτσι ως μέσο εκχύλισης FPSE επιλέχθηκαν κυκλικά διαμέτρου 1 cm υποστρώματα κυτταρίνης επικαλυμμένα με διάλυμα sol-gel πολυμερούς PEG 300. Το μέσο κυτταρίνη-PEG300 εμφάνισε καλύτερα

αποτελέσματα για τους περισσότερους αναλύτες συγκριτικά με το μέσο Υαλοΐνες-PEG300 και επιλέχθηκε ως το βέλτιστο (διάγραμμα 2).

Το μέγεθος του φίλτρου επιλέχθηκε στο 1 cm καθώς όγκος του δείγματος του στοματικού υγρού στην παρούσα μελέτη είναι μικρός (1 mL). Ο όγκος αυτός επιλέχθηκε λόγω της φύσης του δείγματος και σε συνδυασμό με το γεγονός ότι ο μεγάλος όγκος εκχύλισης μειώνει την απόδοση της εκχύλισης (Gouma et al., 2022).



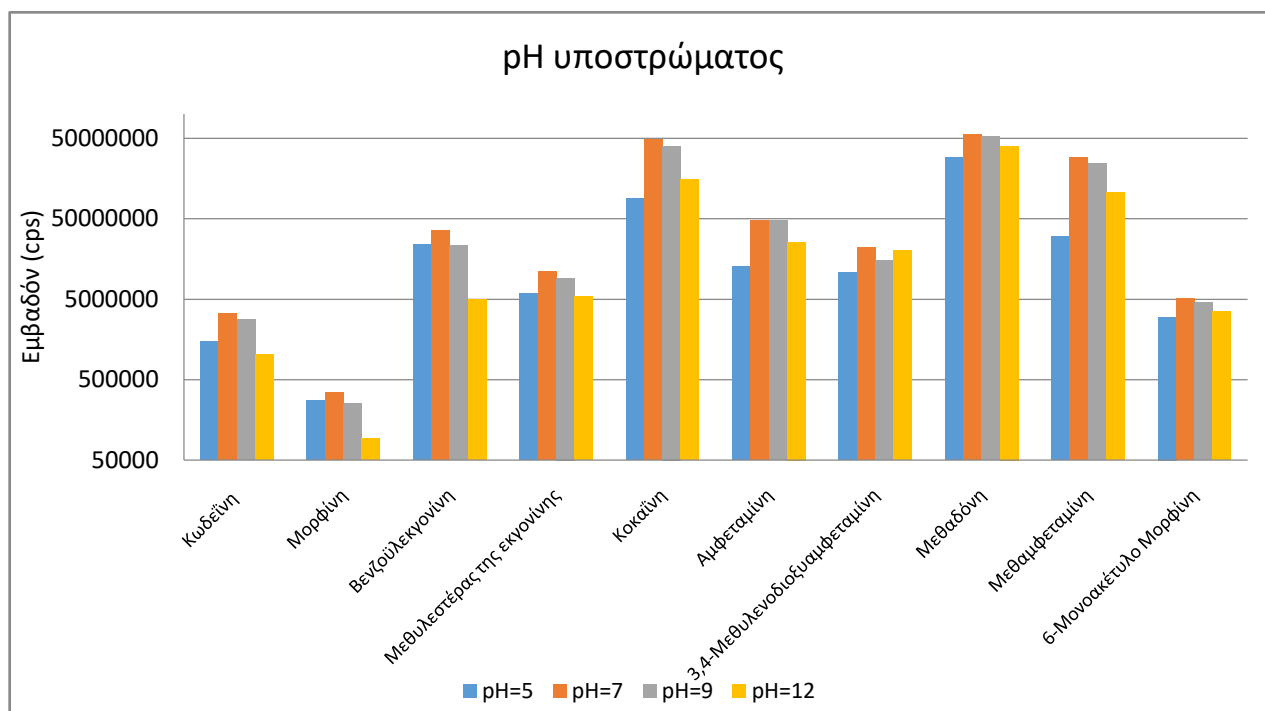
Διάγραμμα 2. Επίδραση του υποστρώματος στην απόδοση της εκχύλισης των δέκα αναλυτών.

6.4. Βελτιστοποίηση των πειραματικών συνθηκών

6.4.1 Βελτιστοποίηση του pH του δείγματος

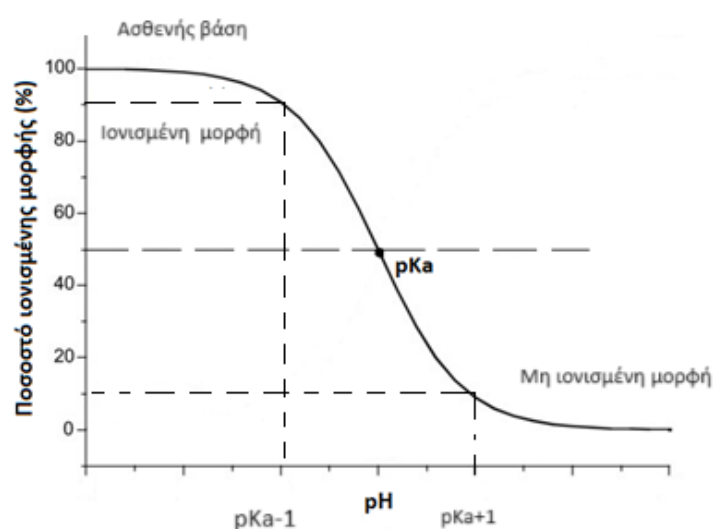
Στο θετικό ιονισμό με ηλεκτροψεκασμό (ESI^+) όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα είναι απαραίτητο οι αναλύτες να βρίσκονται στην ιοντική τους μορφή.

Στη τιμή $pH=7$ παρατηρήθηκαν τα καλύτερα αποτελέσματα για την πλειονότητα των ουσιών (διάγραμμα 3). Αυτό συμβαίνει γιατί οι εξεταζόμενες ουσίες συμπεριφέρονται ως ασθενείς βάσεις ($pK_a=8.18-9.9$) με εξαίρεση τη Βενζοϊλεκγονίνη που συμπεριφέρεται ως επαμφοτερίζουσα (τιμές $pK_a=3.15$ και 9.5). Συνεπώς, επιλέχθηκε η τιμή $pH=7$ ως η βέλτιστη.



Διάγραμμα 3. Επίδραση του pH του υποστρώματος στην απόδοση της εκχύλισης των δέκα αναλυτών.

Όπως παρουσιάζεται σε ένα τυπικό διάγραμμα ιονισμού ασθενών βάσεων, τιμές pH δύο μονάδων μικρότερες από τις τιμές pKa των ουσιών ($pKa-2$), οδηγούν αυτές στην ιονισμένη μορφή τους. Ενώ, για τιμές pH δύο μονάδες μεγαλύτερες από τις τιμές pKa των ουσιών ($pKa+2$), βρίσκονται στη μοριακή μορφή τους.



Εικόνα 48. Διάγραμμα ποσοστού ιονισμένης μορφής μιας ασθενής βάσης.

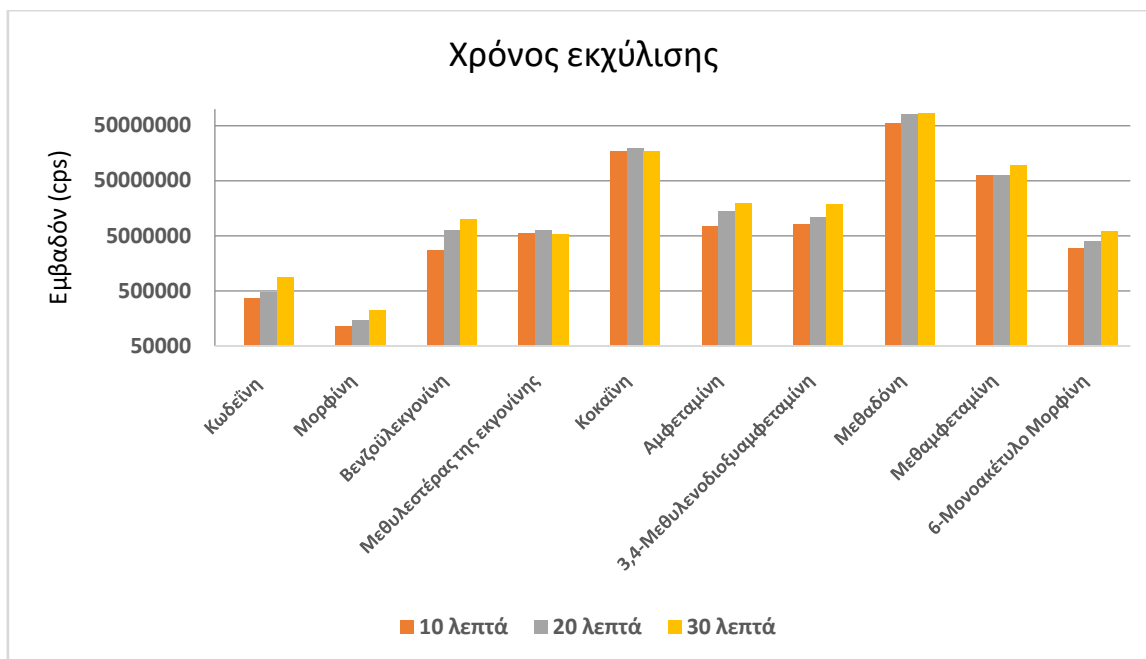
6.4.2. Βελτιστοποίηση του χρόνου προσρόφησης

Ο βέλτιστος χρόνος εκχύλισης εξαρτάται από διάφορους παράγοντες συμπεριλαμβανομένης της μοριακής μάζας, της πολικότητας των αναλυτών και της πολυπλοκότητας του υποστρώματος που επηρεάζει τη διάχυση των αναλυτών από το δείγμα στο μέσο παγίδευσης κατά τη διαδικασία της εκχύλισης (Mesa et al., 2018).

Ο χρόνος προσρόφησης σχετίζεται με την κατανομή των αναλυτών μεταξύ του υδατικού δείγματος και του μέσου FPSE. Το πορώδες δίκτυο της επίστρωσης sol-gel, η υψηλή ενεργός επιφάνεια του μέσου FPSE και το διαπερατό υπόστρωμα της κυτταρίνης μειώνουν συνεργιστικά τον χρόνο που χρειάζεται για να επέλθει η ισορροπία εκχύλισης. Επιπλέον, το χαμηλό ιξώδες του στοματικού υγρού επιτρέπει τη γρήγορη διάχυση των αναλυτών.

Ο βέλτιστος χρόνος εκχύλισης συνδέεται με την αύξηση της απόδοσης και την ευαισθησία της μεθόδου καθώς και με το μικρότερο χρονικό διάστημα, μετά το οποίο η ποσότητα του αναλύτη που παγιδεύεται δεν παρουσιάζει κάποια αύξηση.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στον χρόνο προσρόφησης των 10 λεπτών δεν επιτυγχάνεται επαρκής παγίδευση των αναλυτών. Δύο αναλύτες (μεθυλεστέρας της εκγονίνης και κοκαΐνη) εμφάνισαν καλύτερα αποτελέσματα στα 20 λεπτά. Οι υπόλοιποι αναλύτες εμφάνισαν καλύτερη συμπεριφορά στα 30 λεπτά (διάγραμμα 4). Επιπλέον, λόγω της πολυπλοκότητας του υποστρώματος ο μεγαλύτερος χρόνος προσρόφησης/εκχύλισης (30 λεπτά) οδήγησε στη δημιουργία καλύτερης συμμετρίας των χρωματογραφικών κορυφών καθώς και πιο επαναλήψιμων αποτελεσμάτων. Συνεπώς επιλέχτηκε βέλτιστος χρόνος προσρόφησης/εκχύλισης τα 30 λεπτά.

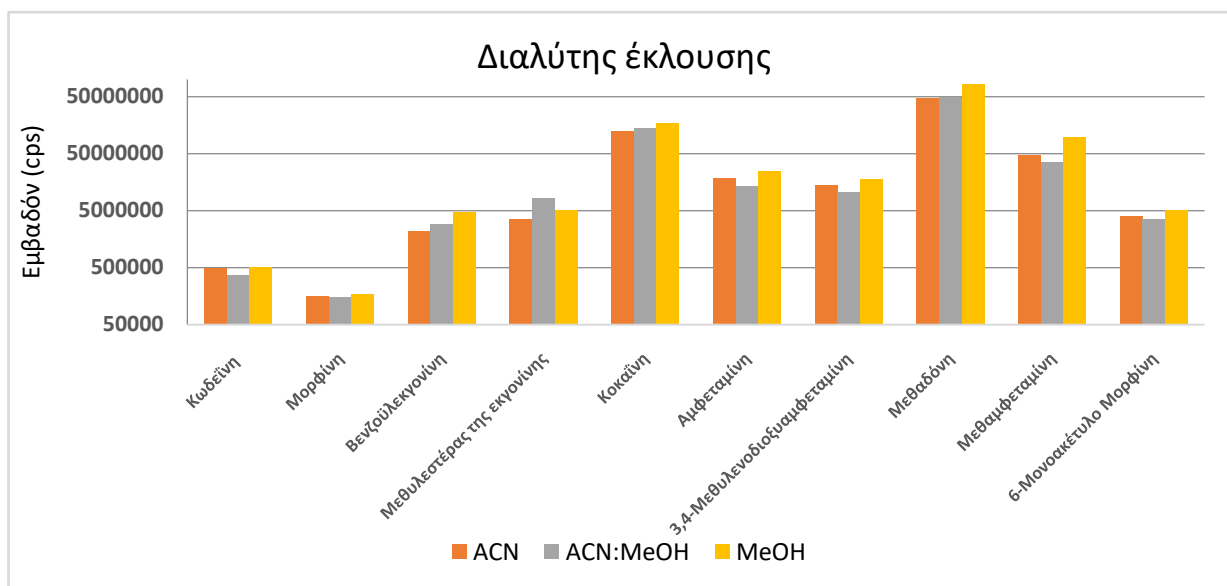


Διάγραμμα 4. Επίδραση του χρόνου της εκχύλισης στην απόδοση της εκχύλισης των δέκα αναλυτών.

6.4.3. Βελτιστοποίηση του διαλύτη έκλουσης

Λόγω της αυξημένης πολικότητας των περισσότερων ουσιών ($\log K_{ow}=0.14-3.93$) η αποτελεσματικότητα της έκλουσης μελετήθηκε με χρήση διαλυτών όπως η μεθανόλη (πολικότητα 0.762), το ακετονιτρίλιο (πολικότητα 0.46) και μίγμα μεθανόλης:ακετονιτρίλιου 1:1. Επιπλέον, επιλέχθηκαν οι συγκεκριμένοι διαλύτες λόγω του χαμηλού τους ιξώδους γεγονός που τους επιτρέπει να διεισδύσουν εύκολα στη λεπτή στρώση του προσροφητικού και να εκροφήσουν γρήγορα και ποσοτικά τους παγιδευμένους αναλύτες.

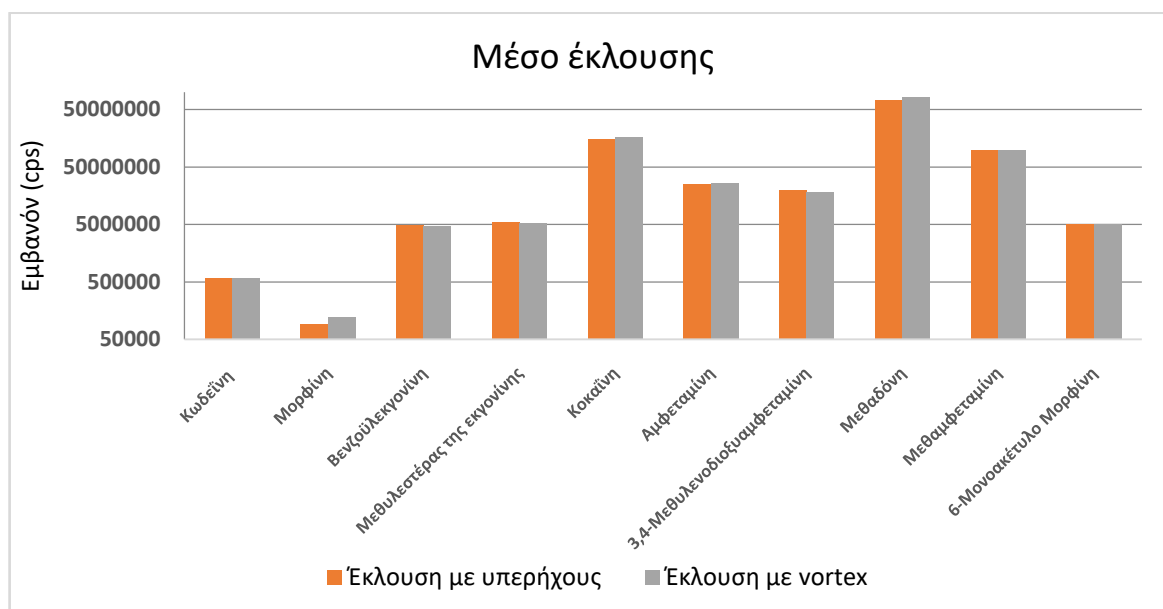
Όπως αναμενόταν η πλειονότητα των ουσιών εμφάνισε καλύτερα αποτελέσματα όταν, ως διαλύτης έκλουσης, χρησιμοποιήθηκε η μεθανόλη η οποία είναι πιο πολική από το ακετονιτρίλιο (διάγραμμα 5). Επίσης, αξίζει να σημειωθεί ότι όταν, ως διαλύτης έκλουσης, χρησιμοποιήθηκε το ακετονιτρίλιο οι χρωματογραφικές κορυφές για τις αμφεταμίνη, μεθαμφεταμίνη, βενζοϋλεκγονίνη, κωδεΐνη και 3-4, μεθυλενοδιοξυαμφεταμίνη εμφάνισαν μη φυσιολογικό σχήμα καθώς ήταν ευρείες και όχι καλά καθορισμένες. Έτσι, ως διαλύτης έκλουσης επιλέχθηκε η μεθανόλη.



Διάγραμμα 5. Επίδραση του διαλύτη έκλουσης στην απόδοση της εκχύλισης των δέκα αναλυτών.

6.4.4.Βελτιστοποίηση του μέσου έκλουσης

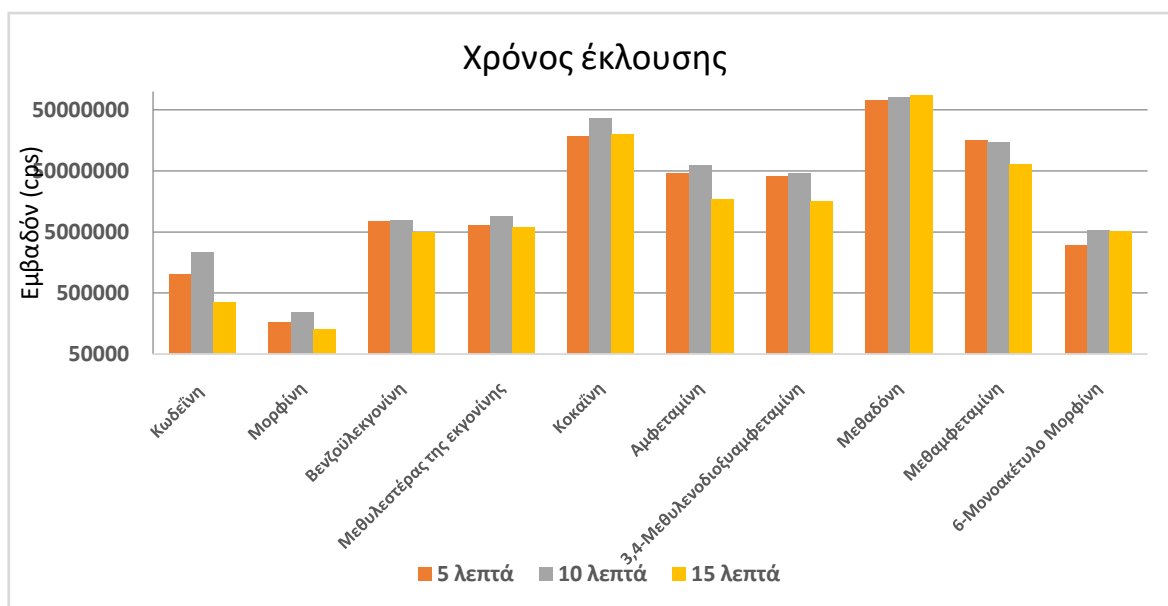
Η εκρόφηση με τα δύο διαφορετικά μηχανικά μέσα (υπέρηχοι και περιδίνηση-vortex) δεν παρουσίασε σημαντικές διαφοροποιήσεις (διάγραμμα 6). Όμως, για να αποφευχθούν τυχόν μεταβολές στη δομή, τη φυσική και χημική κατάσταση των ουσιών λόγω της υψηλής θερμικής ενέργειας που απελευθερώνει το λουτρό υπερήχων, επιλέχτηκε ως βέλτιστο μέσο έκλουσης η ανάδευση με συσκευή περιδίνησης-vortex.



Διάγραμμα 6. Επίδραση του μέσου έκλουσης στην απόδοση της εκχύλισης των δέκα αναλυτών.

6.4.5 Βελτιστοποίηση του χρόνου έκλουσης

Τα αποτελέσματα για την πλειονότητα των αναλυτών έδειξαν ότι η μέγιστη ικανότητα εκρόφησης από το μέσο FPSE επιτεύχθηκε στα δέκα λεπτά (διάγραμμα 7). Εξαίρεση αποτελεί η μεθαδόνη και η μεθαμφεταμίνη, οι οποίες εμφάνισαν καλύτερα αποτελέσματα στα 15 και 5 λεπτά αντίστοιχα. Γενικά, ο μικρός χρόνος εκρόφησης (5 λεπτά) οδηγεί σε ανεπαρκή έκλυση των αναλυτών από το φίλτρο FPSE ενώ ο μεγαλύτερος (15 λεπτά) μπορεί να οδηγήσει σε επαναπαγίδευση ένα μέρος των αναλυτών στο μέσο FPSE οδηγώντας στη μείωση της αποτελεσματικότητας της διαδικασίας της εκρόφησης.



Διάγραμμα 7. Επίδραση του χρόνου έκλουσης στην απόδοση της εκχύλισης των δέκα αναλυτών.

Αξίζει να σημειωθεί ότι ο όγκος έκλουσης που επιλέχθηκε για τη συγκεκριμένη μελέτη είναι τα 150 μL , καθώς παρέχει μία καλή απόδοση της εκχύλισης και ταυτόχρονα έναν ευνοϊκό παράγοντα προσυγκέντρωσης. Η επιλογή του μικρού όγκου, συμβαδίζει επίσης με τις αρχές της πράσινης Χημείας που υπαγορεύει μικρή κατανάλωση διαλυτών.

Ανακεφαλαιώνοντας τα παραπάνω, οι βέλτιστες παράμετροι για την εκχύλιση των αναλυτών από τα σίελα μέσω της FPSE είναι οι εξής:

- Κυκλικό υπόστρωμα κυτταρίνης (WC) διαμέτρου 1cm επικαλυμμένο με sol-gel πολυμερούς PEG 300.
- pH δείγματος 7.
- Χρόνος εκχύλισης δείγματος (όγκου 1 mL) 30 λεπτά υπό ανάδευση.
- Διαλύτης έκλουσης μεθανόλη, σε όγκο 0.15 mL για 10 λεπτά σε συσκευή περιδίνησης-vortex ως μέσο έκλουσης.

6.5. Αναλυτικά χαρακτηριστικά

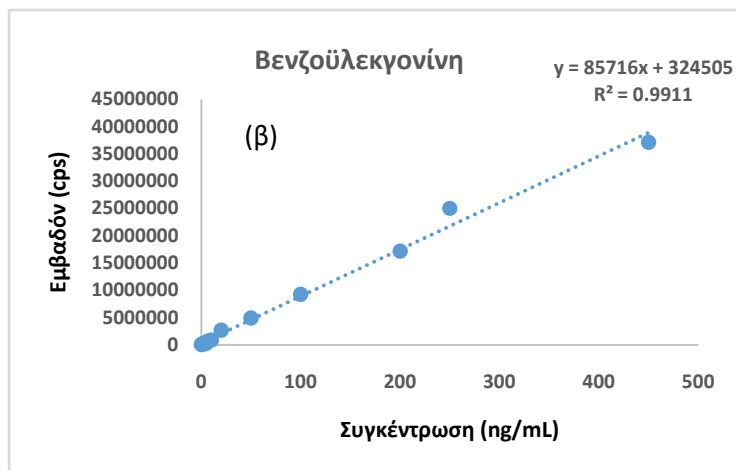
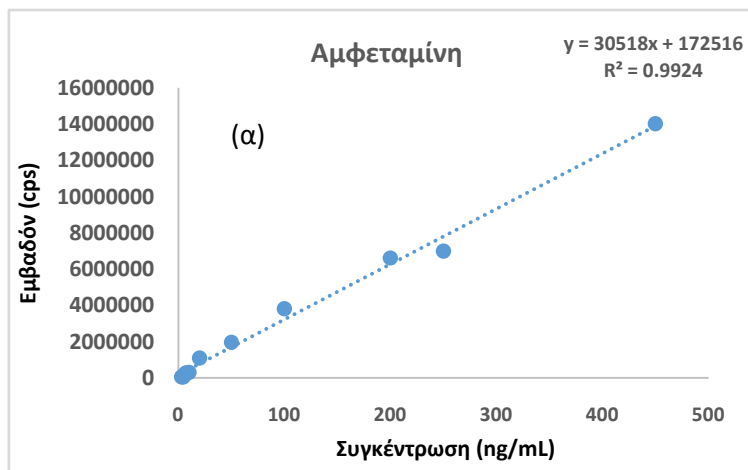
6.5.1 Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης

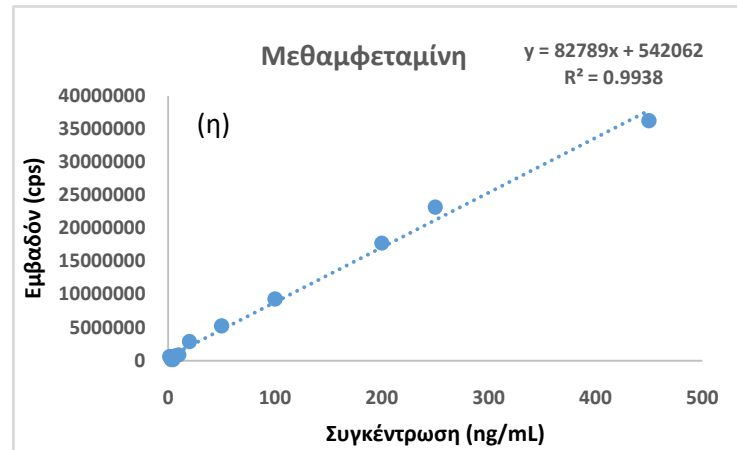
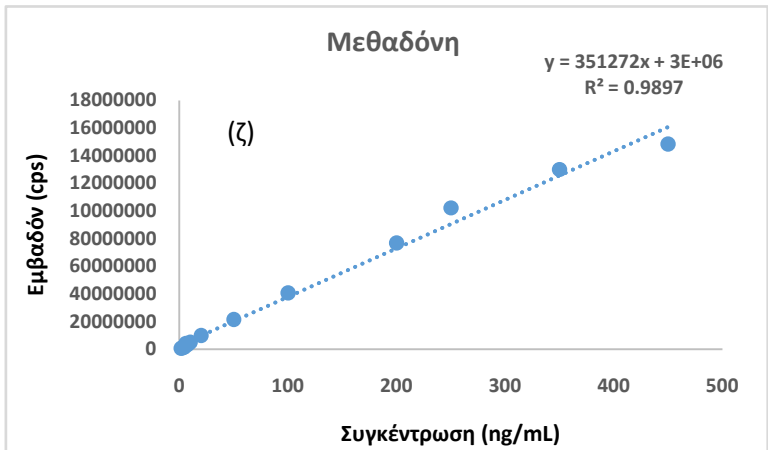
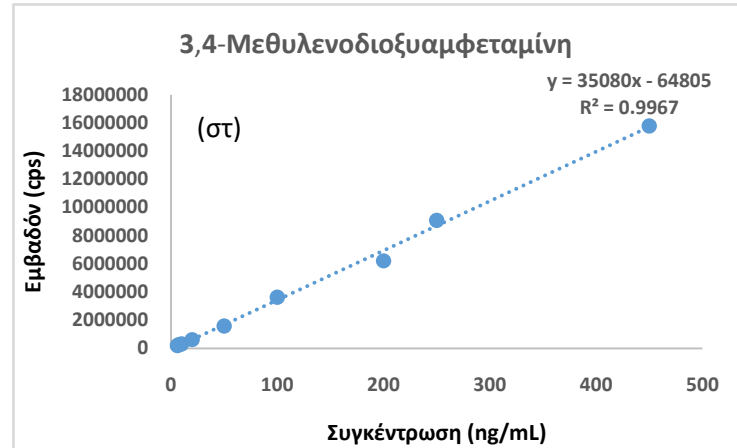
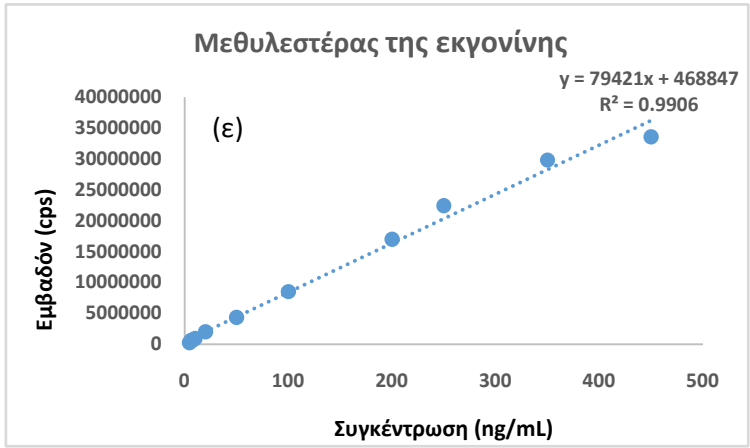
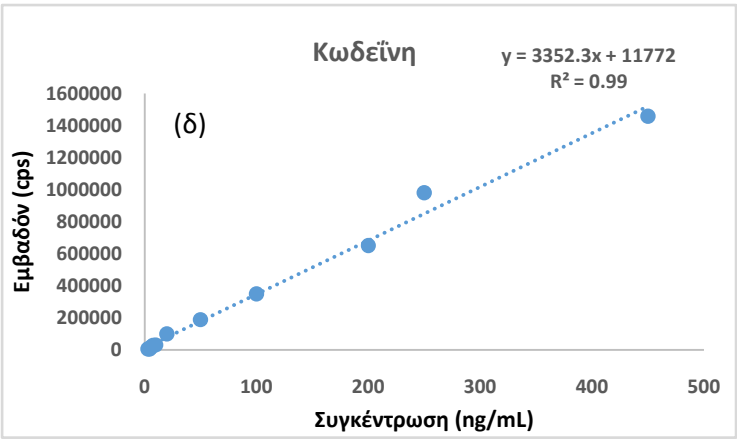
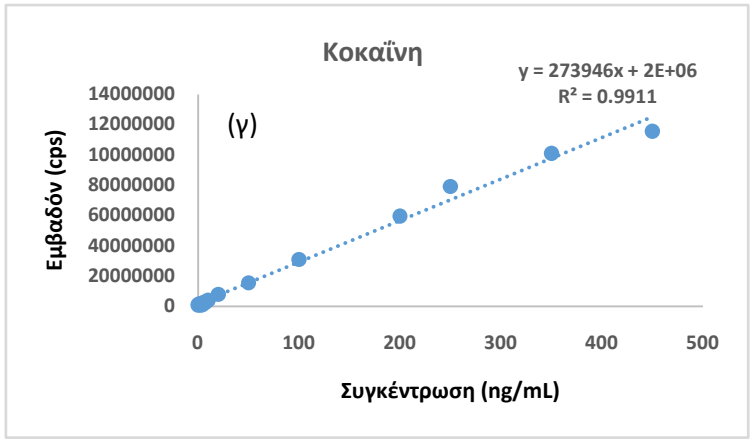
Για τον υπολογισμό των LOQ και LOD μετρήθηκε η αναλογία σήματος προς θόρυβο (S/N) η οποία υπολογίστηκε αυτόματα από το λογισμικό του LC-MS/MS.

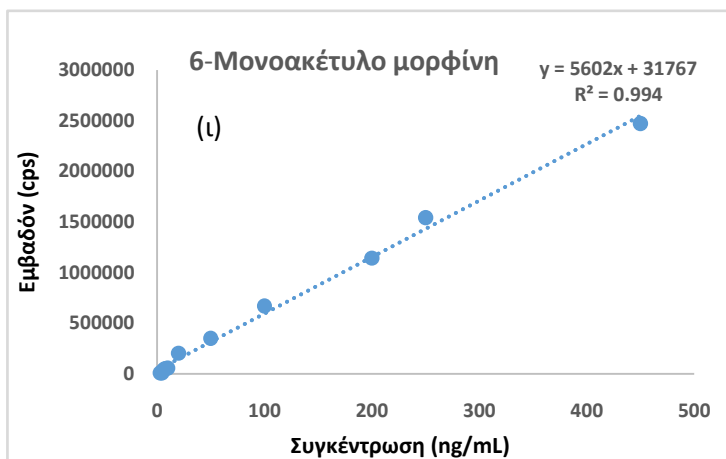
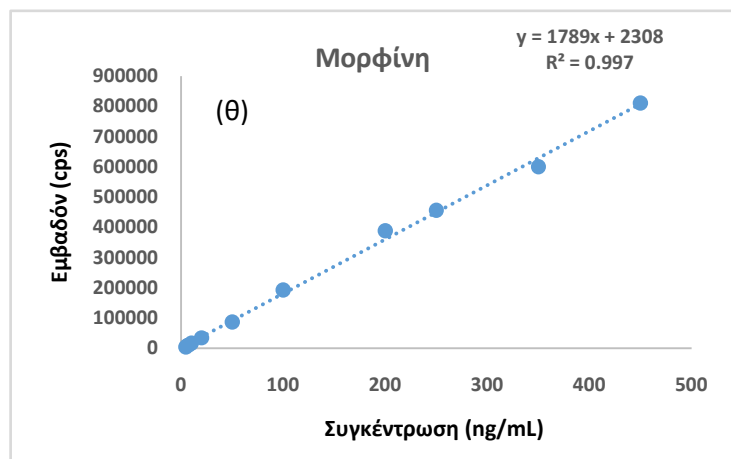
Συνεπώς, για τις ενώσεις αμφεταμίνη, βενζοϋλεκγονίνη, κοκαΐνη, κωδεΐνη, μεθαδόνη, μεθαμφεταμίνη, μεθυλεστέρας της εκγονίνης, μορφίνη, 3-4 μεθυλενοδιοξυαμφεταμίνη και 6-μονοακέτυλο μορφίνη προσδιορίστηκαν τα LOQ: 1 ng/mL, 0.03 ng/mL, 0.03 ng/mL, 3 ng/mL, 0.03 ng/mL, 1 ng/mL, 4 ng/mL, 4 ng/mL, 6 ng/mL και 3 ng/mL αντίστοιχα (Πίνακας 16). Τα LOD, για τις ενώσεις αμφεταμίνη, βενζοϋλεκγονίνη, κοκαΐνη, κωδεΐνη, μεθαδόνη, μεθαμφεταμίνη, μεθυλεστέρας της εκγονίνης, μορφίνη, 3-4 μεθυλενοδιοξυαμφεταμίνη και 6-μονοακέτυλο μορφίνη προσδιορίστηκαν στα 0.4 ng/mL, 0.01 ng/mL, 0.01 ng/mL, 0.9 ng/mL, 0.01 ng/mL, 0.4 ng/mL, 1 ng/mL, 1 ng/mL, 2 ng/mL και 0.9 ng/mL αντίστοιχα (Πίνακας 16).

6.5.2 Καμπύλη βαθμονόμησης σε προσομοιωμένη μήτρα (matrix matched)

Οι καμπύλες βαθμονόμησης που λήφθηκαν μέσω της μεθόδου των ελαχίστων τετραγώνων εμφάνισαν συντελεστές προσδιορισμού R^2 που κυμάνθηκαν από 0.9897-0.997 [διαγράμματα 8(α)-8(ι)].



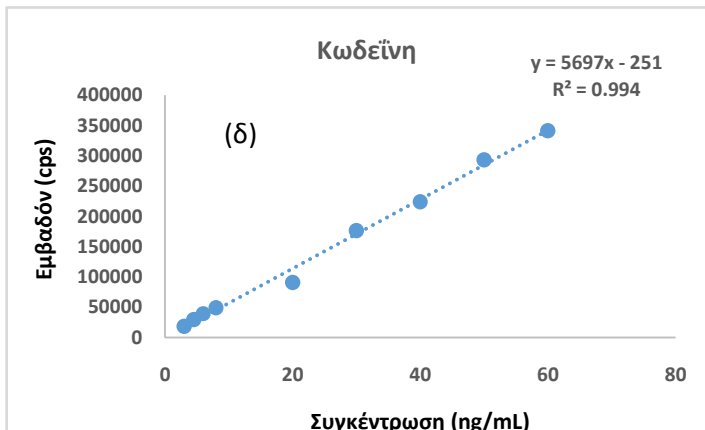
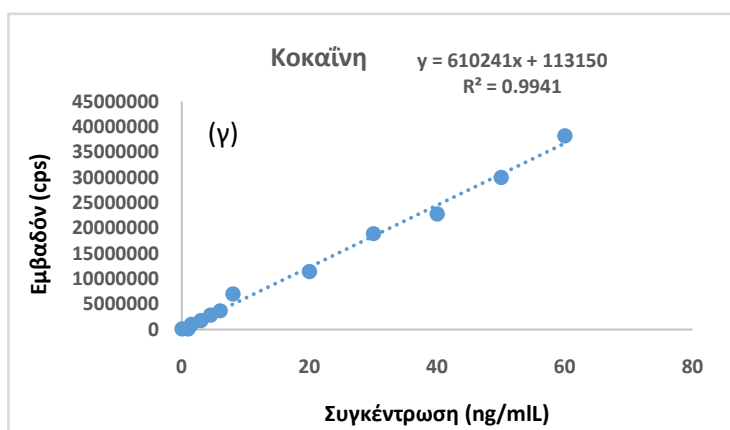
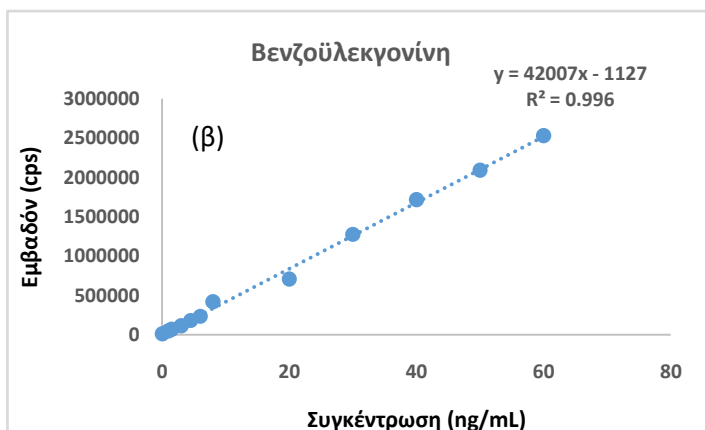
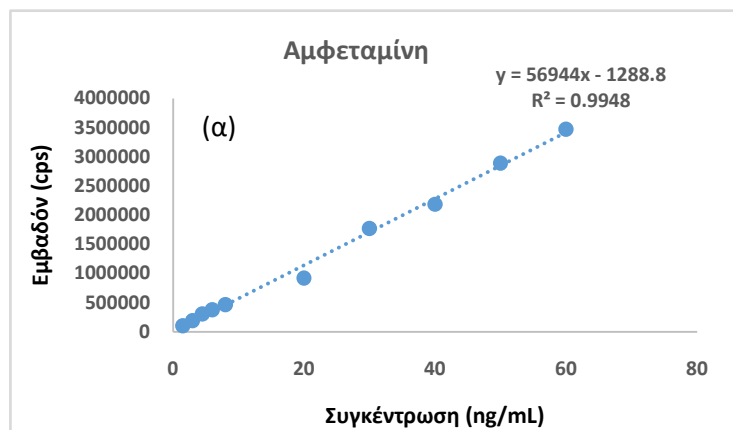


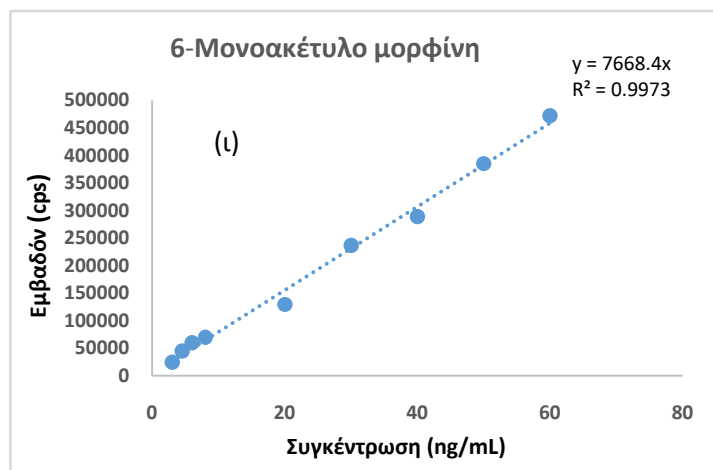
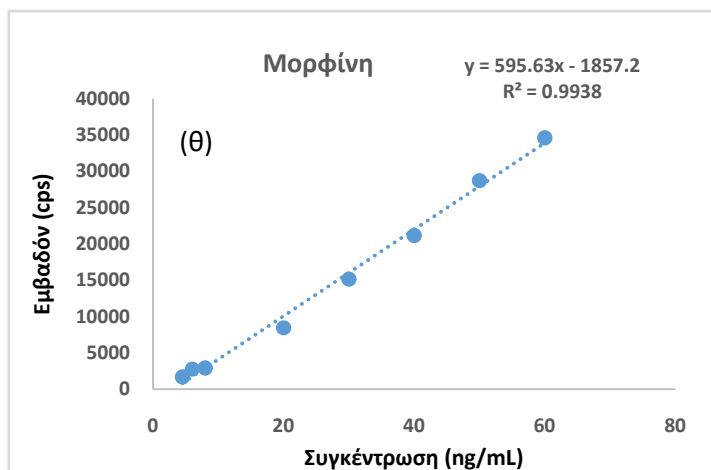
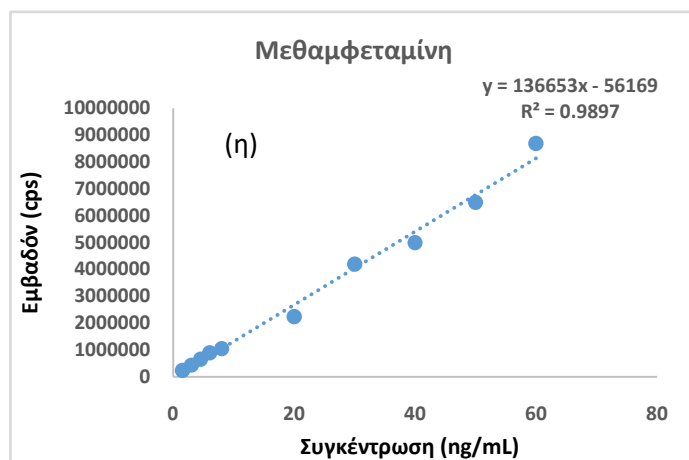
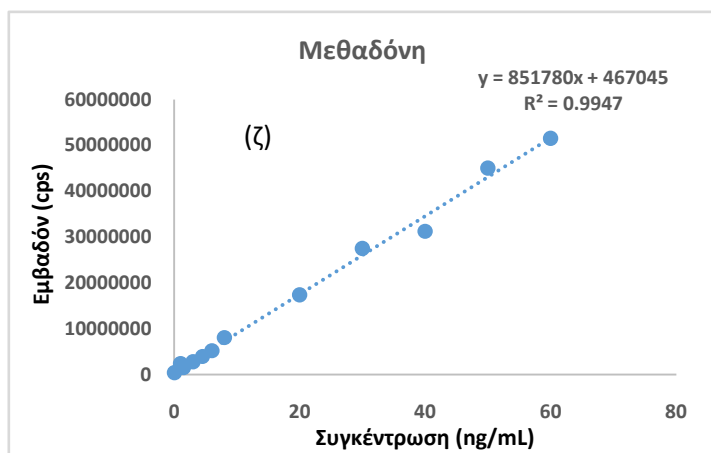
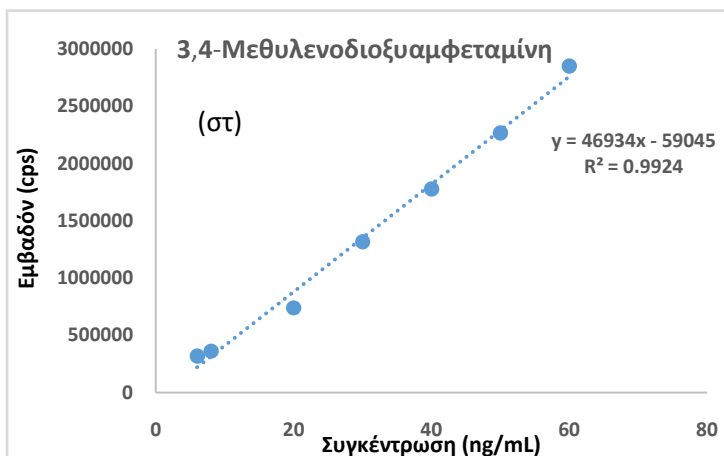
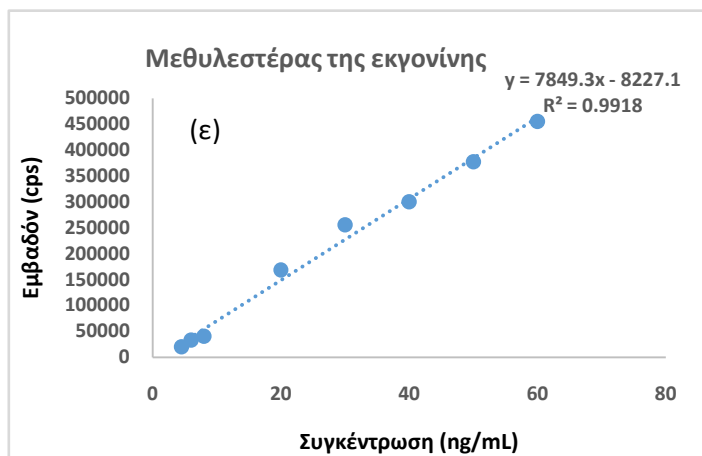


Διαγράμματα 8(α)-8(ι). Καμπύλες προσομοίωσης μήτρας βαθμονόμησης των αναλυτών: (α) αμφεταμίνη (β) βενζοϋλεκγονίνη (γ) κοκαΐνη (δ) κωδεΐνη (ε) μεθυλεστέρας της εκγονίνης (στ) 3,4-μεθυλενοδιοξυαμφεταμίνη (ζ) μεθαδόνη (η) μεθαμφεταμίνη (θ) μορφίνη (ι) 6-μονοακέτυλο μορφίνη.

6.5.3. Γραμμικότητα

Ο έλεγχος της γραμμικότητας της μεθόδου πραγματοποιήθηκε με εμβολιασμένα δείγματα στοματικού υγρού για το κάθε επίπεδο συγκέντρωσης των αναλυτών λαμβάνοντας το μέσο όρο τριών επαναλήψεων μετά από κατεργασία με FPSE. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, όπως αυτά αποτυπώνονται στα διαγράμματα 9(α)-9(ι) οι αποκρίσεις παρουσιάζουν γραμμική συσχέτιση στην περιοχή των μελετώμενων συγκεντρώσεων και εμφανίζουν συντελεστές προσδιορισμού που κυμαίνονται μεταξύ 0.9897 και 0.9973.





Διαγράμματα 9(α)-9(ι). Καμπύλες γραμμικότητας της μεθόδου για τους εξεταζόμενους αναλύτες: (α) αμφεταμίνη (β) βενζοϋλεκγονίνη (γ) κοκαΐνη (δ) κωδεΐνη (ε) μεθυλεστέρας της εκγονίνης (στ) 3,4-μεθυλενοδιοξαμφεταμίνη (ζ) μεθαδόνη (η) μεθαμφεταμίνη (θ) μορφίνη (ι) 6-μονοακέτυλο μορφίνη.

6.5.4. Συμπαράσυρση (carry-over)

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μέθοδος είναι απαλλαγμένη από συμπαράσυρση κατά τη διάρκεια των δοκιμών LC-MS/MS, καθώς το εμβαδόν των αναλυτών στα τυφλά δείγματα ήταν μικρότερο από το 10% του εμβαδού της χαμηλότερης συγκέντρωσης της καμπύλης βαθμονόμησης για κάθε αναλύτη. Έτσι, το ποσοτικό και ποιοτικό αποτέλεσμα που προέκυψε είναι ακριβές.

6.5.5 Εκλεκτικότητα (selectivity/ interference studies)

Τα αποτελέσματα έδειξαν απουσία επιδράσεων από τα συστατικά του υποστρώματος και από άλλα κοινά φάρμακα/μεταβολίτες.

6.5.6. Επίδραση υποστρώματος (matrix effect)

Η επίδραση του υποστρώματος δεν υπερέβη το $\pm 25\%$ ($<24\%$ για όλες τις ουσίες) και ο συντελεστής μεταβλητότητας (coefficient of variation, CV) για κάθε συγκέντρωση του συνόλου 2 δεν υπερέβη το 20% ($<19\%$ για όλες τις ουσίες) και έτσι δεν υπάρχει επίδραση σε άλλες σημαντικές παραμέτρους επικύρωσης.

Η επίδραση υποστρώματος για τις: αμφεταμίνη, βενζοϋλεκγονίνη, κοκαΐνη, μεθαμφεταμίνη, κωδεΐνη, μορφίνη, μεθυλεστέρα της εκγονίνης, 3,4-μεθυλενοδιοξαμφεταμίνη και μορφίνη στις χαμηλές συγκεντρώσεις και για τις: αμφεταμίνη, βενζοϋλεκγονίνη, μεθαμφεταμίνη, μεθυλεστέρα της εκγονίνης και 3,4 μεθυλενοδιοξαμφεταμίνη στις υψηλές συγκεντρώσεις καταγράφηκε ως καταστολή. Για τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις και ουσίες η επίδραση του υποστρώματος ήταν ενισχυτική (πίνακας 16).

6.5.7. Ανάκτηση

Οι απόλυτες ανακτήσεις που υπολογίστηκαν για τη χαμηλή, τη μέση και την υψηλή συγκέντρωση για όλους τους αναλύτες κυμάνθηκαν από 10-93% (πίνακας 16).

Για τις: μορφίνη, βενζοϋλεκγονίνη, μεθυλεστέρας της εκγονίνης ανάλογες τιμές αναφέρθηκαν στη σχετική βιβλιογραφία (Arantes et al., 2021· Montesano et al., 2015· Odoardi et al., 2014· Zancanaro et al., 2012· Concheiro et al., 2008).

Οι παρατηρούμενες χαμηλές τιμές των απόλυτων τιμών της ανάκτησης δεν αποτελούν ουσιαστικό πρόβλημα για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό τους καθώς τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης είναι χαμηλότερα από τις παραμετρικές τιμές που προτείνει η SAMHSA για την επιβεβαίωση κατάχρησης εξαρτησιογόνων ουσιών (Department of Health and Human Services, 2004).

6.5.8. Πιστότητα

Οι τιμές CV % για όλους τους αναλύτες ήταν μικρότερες του 17% τόσο εντός της ημέρας όσο και μεταξύ διαφορετικών ημερών για όλα τα επίπεδα συγκεντρώσεων. Αναλυτικά οι τιμές απεικονίζονται στον πίνακα 16.

6.5.9. Σταθερότητα

Η σταθερότητα όλων των αναλυτών στη χαμηλή και στην υψηλή συγκέντρωση ήταν μεγαλύτερη από 84 % και στα δύο χρονικά διαστήματα που μελετήθηκαν. Τα αποτελέσματα της σταθερότητας απεικονίζονται στον πίνακα 17.

Πίνακας 16. Αναλυτικές παράμετροι επικύρωσης της μεθοδολογίας FPSE-LC-MS/MS σε δείγματα στοματικού υγρού για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των δέκα αναλυτών.

Αναλύτης	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	Ανάκτηση%			Επίδραση υποστρώματος%		Επαναληψιμότητα %			Αναπαραγωγιμότητα %		
			LOQ	5xLOQ	10xLOQ	LOQ	10xLOQ	LOQ	5xLOQ	10xLOQ	LOQ	5xLOQ	10xLOQ
Αμφεταμίνη	0.4	1	64	64	64	-23	-22	9	8	7	12	11	10
Βενζοϋλεκγονίνη	0.01	0.03	30	31	33	-9	-9	6	8	10	13	10	4
Μεθυλεστέρας της εκγονίνης	1	4	10	11	11	-24	-20	4	5	3	8	6	3
Κοκαΐνη	0.01	0.03	71	65	70	-0.5	7	8	7	6	4	5	4
Κωδεΐνη	0.9	3	73	68	73	-2	13	6	6	5	17	10	4
Μεθαδόνη	0.01	0.03	93	92	87	7	8	3	5	6	7	8	11

Μεθαμφεταμί νη	0.4	1	60	59	61	-24	-24	2	3	3	6	7	6
Μορφίνη	1	4	14	15	16	-10	2	3	5	8	10	11	11
3,4- Μεθυλενοδιο ξυαμφεταμίν η	2	6	57	53	56	-11	-9	12	9	4	7	5	2
6- Μονοακέρυλο μορφίνη	0.9	3	63	62	64	-24	24	2	2	2	6	6	7

Πίνακας 17. Σταθερότητα των αναλυτών έπειτα από την ανάλυσή τους σε χρονικό διάστημα μίας ημέρας και επτά ημερών σε σχέση με τον χρόνο μηδέν

Αναλύτης	Σταθερότητα μίας ημέρας (%)		Σταθερότητα μίας εβδομάδας (%)	
	LOQ	10xLOQ	LOQ	10xLOQ
Αμφεταμίνη	99	99	91	93
Βενζοϋλεκγονίνη	96	97	88	88
Μεθυλεστέρας της εκγονίνης	90	93	90	92
Κοκαΐνη	88	88	84	87
Κωδεΐνη	91	89	88	87

<i>Μεθαδόνη</i>	86	91	86	90
<i>Μεθαμφεταμίνη</i>	99	98	91	92
<i>Μορφίνη</i>	88	90	85	87
<i>3,4-Μεθυλενοδιοξυαμφεταμίνη</i>	98	98	98	98
<i>6-Μονοακέτυλο μορφίνη</i>	87	91	85	89

7.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η παρούσα εργασία αποτελεί την πρώτη προσπάθεια εκχύλισης και προσυγκέντρωσης των συγκεκριμένων αναλυτών με την υπάρχουσα μεθοδολογία από κάποιο βιολογικό υπόστρωμα και συγκεκριμένα από το στοματικό υγρό. Η εφαρμογή της FPSE για την προετοιμασία του δείγματος είχε ως αποτέλεσμα μία γρήγορη, εύκολη και οικονομική προετοιμασία δείγματος με υψηλή ευαισθησία και εκλεκτικότητα που εξασφαλίστηκε από τη σύγχρονη αναλυτική τεχνική LC-MS/MS με την οποία συνδυάστηκε. Μεταβλητές που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης εξετάστηκαν και βελτιστοποιήθηκαν. Ο προσδιορισμός και η ποσοτικοποίηση των εξεταζόμενων ψυχοτρόπων ουσιών, έγινε με βάση διεθνείς κατευθυντήριες οδηγίες επικύρωσης. Ελέγχθηκαν τα όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ), η γραμμική περιοχή, η ακρίβεια, η πιστότητα (επαναληψιμότητα και αναπαραγωγιμότητα), η επίδραση του υποστρώματος, η εκλεκτικότητα και η σταθερότητα. Η προτεινόμενη μέθοδος παρουσιάζει γραμμικότητα που κυμάνθηκε στο εύρος από 0.9897 έως 0.9973, ενώ η επαναληψιμότητα (intraday precision) και η αναπαραγωγιμότητα (interday precision) εκφρασμένες ως εκατοστιαία σχετική τυπική απόκλιση CV %, κυμάνθηκαν σε εύρος από 2 έως 12 % και 3 έως 17 %, αντίστοιχα. Η ακρίβεια εκφράστηκε μέσω της ανάκτησης και κυμάνθηκε από 10 - 93%. Η μέθοδος ήταν εκλεκτική και δεν παρατηρήθηκε επίδραση από το υπόστρωμα και από άλλα φάρμακα καθώς και φαινόμενα συμπαράσυρσης. Μελλοντικός στόχος αποτελεί η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των συγκεκριμένων αναλυτών με την FPSE και σε άλλα βιολογικά υποστρώματα πέρα του στοματικού υγρού, καθώς και η εφαρμογή της παρούσας μεθοδολογίας για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό Νέων Ψυχοδραστικών Ουσιών στα σίελα.

ΞΕΝΟΓΛΩΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

AAFS Standards Board (2019). Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology, ANSI/ASB Standard 036, First Edition 2019, American Academy of Forensic Science. www.asbstandardsboard.org.

Arantes, A.C.F., da Cunha, K.F., Cardoso, M.S., Oliveira, K.D. & Costa, J.L. (2021). Development and validation of quantitative analytical method for 50 drugs of antidepressants, benzodiazepines and opioids in oral fluid samples by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Forensic Toxicology*, 39(1), 179–197. <https://doi.org/10.1007/s11419-020-00561-8>

Aronson, J.K. (2016). Amphetamines. In *Meyler's Side Effects of Drugs: The International Encyclopedia of Adverse Drug Reactions and Interactions* 16th Edition (308-323). Netherlands: Elsevier <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53717-1.00285-7>

Ashri, N.Y. & Abdel-Rehim, M. (2011). Sample treatment based on extraction techniques in biological matrices. *Bioanalysis*, 3(17), 2003-18. doi: 10.4155/bio.11.201.

Baggott, M.J., Siegrist, J.D., Galloway, G.P., Robertson, L.C., Coyle, J.R. & Mendelson, J.E. (2010). Investigating the mechanisms of hallucinogen-induced visions using 3,4-methylenedioxymphetamine (MDA): A randomized controlled trial in humans. *PLoS ONE*, 5(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014074>

Bhandari, M., Bhandari, A. & Bhandari, A. (2011). Recent updates on codeine. *Pharmaceutical Methods*, 2(1), 3–8. doi:10.4103/2229-4708.81082

Barerah, S. (2018). Forms of Drug Abuse and Their Effects. *Alcoholism & Drug Abuse Weekly* 1(1):13-19

Bellagambi, F.G., Lomonaco, T., Salvo, P., Vivaldi, F., Hangouët, M., Ghimenti, S., Biagini, D., di Francesco, F., Fuoco, R., & Errachid, A. (2020). Saliva sampling: Methods and devices. An overview. In *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* (Vol. 124). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115781>

Berk, Z. (2018). Extraction. *Food Process Engineering and Technology*, 3rd Edition, 289–310. United States: Academic Press. doi:10.1016/b978-0-12-812018-7.00011-7

Binelli, A., Marisa, I., Fedorova, M., Hoffmann, R., & Riva, C. (2013). First evidence of protein profile alteration due to the main cocaine metabolite (benzoylecgonine) in a freshwater biological model. *Aquatic Toxicology*, 140-141, 268–278. doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.06.013>

Biotage (2020). Bioanalytical Sample Preparation. Available online:
<https://www.biotage.com/biofluids-sample-prep>

Boumba, V.A., Di Rago, M., Peka, M., Drummer, O.H., & Gerostamoulos, D. (2017). The analysis of 132 novel psychoactive substances in human hair using a single step extraction by tandem LC/MS. *Forensic Science International*, 279, 192–202. doi:10.1016/j.forsciint.2017.08.0

Bylda, C., Thiele, R., Kobold, U. & Volmer, D.A. (2014). Recent advances in sample preparation techniques to overcome difficulties encountered during quantitative analysis of small molecules from biofluids using LC-MS/MS. *The Analyst*, 139(10), 2265. doi:10.1039/c4an00094c

Casolin, A. (2016). Comparison of urine and oral fluid for workplace drug testing. *Journal of Analytical Toxicology*, 40(7), 479–485. <https://doi.org/10.1093/jat/bkw055>

Choi, B.K., Hercules, D.M., & Gusev, A.I. (2001). LC-MS/MS signal suppression effects in the analysis of pesticides in complex environmental matrices. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 369(3-4), 370–377. doi:10.1007/s0021

Chong, S.L., Wang, D., Hayes, J.D., Wilhite, B.W. & Malik, A. (1997). Sol–Gel Coating Technology for the Preparation of Solid-Phase Microextraction Fibers of Enhanced Thermal Stability. *Analytical Chemistry*, 69(19), 3889–3898. doi:10.1021/ac9703360

Concheiro, M., de Castro, A., Quintela, Ó., Cruz, A. & López-Rivadulla, M. (2008). Determination of illicit and medicinal drugs and their metabolites in oral fluid and preserved oral fluid by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391(6), 2329–2338. doi:10.1007/s00216-008-2135-4

Climko, R.P., Roehrich, H., Sweeney, D.R. & Al-Razi, J. (1987). ECSTACY: A Review of MDMA and MDA. *The International Journal of Psychiatry in Medicine*, 16(4), 359–372. doi:10.2190/dcrp-u22m-aumd-d84h

Concheiro, M., de Castro, A., Quintela, Ó., Cruz, A. & López-Rivadulla, M. (2007). Confirmation by LC-MS of drugs in oral fluid obtained from roadside testing. *Forensic Science International*, 170(2–3), 156–162. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2007.03.034>

Concheiro, M., de Castro, A., Quintela, Ó., Cruz, A. & López-Rivadulla, M. (2008). Determination of illicit and medicinal drugs and their metabolites in oral fluid and preserved oral fluid by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391(6), 2329–2338. doi:10.1007/s00216-008-2135-4

Costa, S. & Teixeira, J. P. (2014). Toxicology. *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition*, 4, 718–720. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00440-1>

Crouch, D.J., Day, J., Baudys, J. & Fatah, A.A. (2005). *Evaluation of Saliva/Oral Fluid as an Alternate Drug Testing Specimen-Final Report*. Available online : <https://nvlpubs.nist.gov/nistpubs/Legacy/IR/nistir7139.pdf>

Cruz, H.M., da Silva, E.F., Villela-Nogueira, C.A., Nabuco, L.C., Rodrigues do Ó, K.M., Lewis-Ximenez, L.L. & Villar, L.M. (2011). Evaluation of saliva specimens as an alternative sampling method to detect hepatitis B surface antigen. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 25(2), 134–141. doi:10.1002/jcla.20447

Cubo, E. (2014). Cocaine. *Encyclopedia of the Neurological Sciences*, 1, 811–813. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385157-4.00256-6>

Cuevas-Córdoba, B. & Santiago-García, J. (2014). Saliva: A Fluid of Study for OMICS. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 18(2), 87–97. doi:10.1089/omi.2013.0064

Cunha-Oliveira, T., Rego, A.C., Carvalho, F. & Oliveira, C.R. (2013). Medical Toxicology of Drugs of Abuse. *Principles of Addiction*, 159–175. doi:10.1016/b978-0-12-398336-7.00017-6

Dass, C. (2007). "Hyphenated Separation Techniques". *Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry*. John Wiley & Sons, Inc. pp. 151–194. doi:10.1002/9780470118498.ch5.

Datta, P. (2019). Immunoassay Design for Screening of Drugs of Abuse. *Critical Issues in Alcohol and Drugs of Abuse Testing*, 121–128. doi:10.1016/b978-0-12-815607-0.00009-5

Dawes, C. (2004). Factors influencing salivary flow rate and composition. In: EDGAR M, DAWES C, O'MULLANE D, ed. *Saliva and oral Health*, 3rd ed. London, UK: British Dental Association, 32-39

De Almeida, P.D.V., Grégio, A.M.T., Machado, M.Â.N., De Lima, A.A.S. & Azevedo, L.R. (2008). Saliva composition and functions: A comprehensive review. *Journal of Contemporary Dental Practice*, 9(3), 072–080. <https://doi.org/10.5005/jcdp-9-3-72>

De Campos, E.G., da Costa, B.R.B., dos Santos, F.S., Monedeiro, F., Alves, M.N.R., Santos Junior, W.J.R. & De Martinis, B.S. (2021). Alternative matrices in forensic toxicology: a critical review. *Forensic Toxicology*. doi:10.1007/s11419-021-00596-5

Department of Health and Human ServicesS (2004). Proposed revisions to mandatory guidelines for federal workplace drug testing programs. *Fed Regist* 69:19673–19732. Available online : <https://www.federalregister.gov/documents/2004/04/13/04-7984/proposed-revisions-to-mandatory-guidelines-for-federal-workplace-drug-testing-programs>

Dewey, W. (2007). Morphine. *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, 1–6. doi:10.1016/b978-008055232-3.62208-1

Dolan, J. (2015). HPLC Columns A Guide to HPLC and LC-MS Buffer Selection. Available : www.ace-hplc.com

Drummer, O.H. (2005). Review: Pharmacokinetics of illicit drugs in oral fluid. *Forensic Science International*, 150(2–3), 133–142. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.11.022>

DEA. Drug Enforcement Administration (2017, September 18). Drugs of abuse: A DEA resource guide 2017 Edition, U.S. Department of Justice. Available online: https://www.dea.gov/sites/default/files/drug_of_abuse.pdf

DEA. Drug Enforcement Administration (2020, April 14). Drugs of abuse: A DEA resource guide 2020 Edition, U.S. Department of Justice. Available online: https://www.dea.gov/sites/default/files/2020-04/Drugs%20of%20Abuse%202020-Web%20Version-508%20compliant-4-24-20_0.pdf

DEA. Drug Enforcement Administration (2021, July). Bupropion. Diversion Control Division Drug & Chemical Evaluation Section. Available online : https://www.dea.gov/diversion.usdoj.gov/drug_chem_info/bupropion.pdf

Durrani, M. & Bansal, K. (2022, January 09). Methadone. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.

Edinoff, A.N., Kaufman, S.E., Green, K.M., Provenzano, D.A., Lawson, J., Cornett, E.M., Murnane, K.S., Kaye, A.M. & Kaye, A.D (2022). Methamphetamine Use: A Narrative Review of Adverse Effects and Related Toxicities. *Health Psychol Res.* 2022 Sep 15;10(3):38161. doi: 10.52965/001c.38161.

EMCDA. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (2020). European Drug Report 2020: Trends and Developments, Publications Office of the European Union, Luxembourg. Available online: https://www.emcdda.europa.eu/edr2020_en

EMCDA. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (2022). European Drug Report 2022: Trends and Developments. , Publications Office of the European Union, Luxembourg. Available online: https://www.emcdda.europa.eu/publications/edr/trends-developments/2022_en

EMCDA. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (2023). European Drug Report 2023: Trends and Developments, Publications Office of the European Union, Luxembourg. Available online: https://www.emcdda.europa.eu/publications/european-drug-report/2023_en

Florou, D. & Boumba, V.A (2021). Hair analysis for New Psychoactive Substances (NPS): Still far from becoming the tool to study NPS spread in the community?. *Toxicology Reports*, Volume 8, 2021, Pages 1699-1720. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2021.09.003>

- Florou, D., Vlachou, T., Sakkas, V. & Boumba, V. (2022). Application of Fabric Phase Sorptive Extraction (FPSE) Engaged to Tandem LC-MS/MS for Quantification of Brorphine in Oral Fluid. *J. Xenobiot.* 2022, 12, 356–364. <https://doi.org/10.3390/jox12040025>
- Gottås, A., Boix, F., Øiestad, E. L., Vindenes, V. & Mørland, J. (2014). Role of 6-monoacetylmorphine in the acute release of striatal dopamine induced by intravenous heroin. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 17(09), 1357–1365. doi:10.1017/s1461145714000169
- Gouma, V., Pournara, A.D., Manos, M.J. & Giokas, D.L. (2022). Fabric phase sorptive extraction and passive sampling of ultraviolet filters from natural waters using a zirconium metal organic framework-cotton composite, *J. Chromatogr. A* 1670 (2022) 462945, doi:10.1016/j.chroma.2022.462945
- Gross, J. H. (2017). Electrospray Ionization. *Mass Spectrometry*, 721–778. doi:10.1007/978-3-319-54398-7_12
- Haeckel, R. (1993). Factors Influencing the Saliva/Plasma Ratio of Drugs. *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol 694, pp 128–142. doi:10.1111/j.1749-6632.1993.tb18347.x
- Hill, S.L. & Thomas, S.H.L. (2020). Drug misuse. *Medicine (United Kingdom)*, 48(3), 176–181. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2019.12.007>
- Hiotis, M. (2005). Heroin. *Encyclopedia of Toxicology*, 510-511. doi:10.1016/b0-12-369400-0/00600-1
- Hodgson, E. (2004). *A textbook of Modern Toxicology*, 3rd edition. ΣτοE. Hodgson (Επιμ.), *Introduction to Toxicology* (σσ. 2-12). Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons.
- Houck, M.M. & Siegel, J.A. (2015). *Separation Methods. Fundamentals of Forensic Science*, 121–151. Elsevier Ltd. doi:10.1016/b978-0-12-800037-3.00006-6
- Humphrey, S.P. & Williamson, R.T. (2001). A review of saliva : Normal composition , flow , and function. 85(2).
- Hutchings, A.D., & Widdop, B. (2013). Drugs of Abuse. *The Immunoassay Handbook*, 963–987. doi:10.1016/b978-0-08-097037-0.00077-4
- Jalili, V., Barkhordari, A. & Heidari M. (2019). The role of aerogel-based sorbents in microextraction techniques. *Microchem Journal*, 147, 948–954. Doi:<https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.04.028>
- Jalili, V., Barkhordari, A. & Ghiasvand A (2020). A comprehensive look at solid-phase microextraction technique: a review of reviews. *Microchem Journal*, 152, 104319. doi:10.1016/j.microc.2019.104319

- Jiménez-Holgado, C., Chrimatopoulos, C., Stathopoulos, V. & Sakkas, V. (2020). Investigating the Utility of Fabric Phase Sorptive Extraction and HPLC-UV-Vis/DAD to Determine Antidepressants Drugs in Environmental Aqueous Samples. *Separations*, 7, 39
<https://doi.org/10.3390/separations7030039>
- Kabir, A., Furton, K. G. & Malik, A. (2013). Innovations in sol-gel microextraction phases for solvent-free sample preparation in analytical chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 45, 197–218. doi:10.1016/j.trac.2012.11.014
- Kabir, A. & Furton, K.G. (2014). Fabric Phase Sorptive Extractor (FPSE).
- Kabir, A., Mesa, R., Jurmain, J., & Furton, K. G. (2017). Fabric phase sorptive extraction explained. *Separations*, 4(2). <https://doi.org/10.3390/separations4020021>
- Kabir, A., & Furton, K. G. (2019). Fabric phase sorptive extraction: A new generation, green sample preparation approach. In *Solid-Phase Extraction*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816906-3.00013-3>
- Kabir, A., & Samanidou, V. (2021). Fabric phase sorptive extraction: A paradigm shift approach in analytical and bioanalytical sample preparation. *Molecules*, 26(4). <https://doi.org/10.3390/molecules26040865>
- Kafeenah, H.I.S., Osman, R. & Bakar, N.K.A. (2019). Effect of Mobile Phase pH on the Electrospray Ionization Efficiency and Qualitative Analysis of Pharmaceuticals in ESI + LC-MS/MS. *Journal of Chromatographic Science*. doi:10.1093/chromsci/bmz061
- Kane, B.M. (2007). Codeine. Στο David J. Triggle D.J. (Επιμ.), *DRUGS The Straight Facts*. Νέα Υόρκη: Chelsea House Publishers
- Kataoka, H. (2017). Sample preparation for liquid chromatography. *Liquid Chromatography*, 1–37. doi:10.1016/b978-0-12-805392-8.00001-3
- Kazantzi, V. & Anthemidis, A. (2017). Fabric sol–gel phase sorptive extraction technique: A review. *Separations*, 4(2). <https://doi.org/10.3390/separations4020020>
- Konermann, L., Ahadi, E., Rodriguez, A.D. & Vahidi, S. (2013). Unraveling the mechanism of electrospray ionization. *Analytical Chemistry*, 85(1), 2–9. <https://doi.org/10.1021/ac302789c>
- Kopecky, E.A. (2019). Opioid Pharmacology: Developmental Effects on Opioid Metabolism. *Clinical Journal of Pain*, 35(6), 481–486. <https://doi.org/10.1097/AJP.0000000000000710>

- Kumar, R., Gaurav, Heena, Malik, A.K., Kabir, A. & Furton, K.G. (2014). Efficient analysis of selected estrogens using fabric phase sorptive extraction and high performance liquid chromatography-fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1359, 16–25. doi:10.1016/j.chroma.2014.07.013
- Kyle, P.B. (2017). Toxicology: GCMS. In *Mass Spectrometry for the Clinical Laboratory*, 131-163. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800871-3.00007-9>
- Lakade, S.S., Borull, F., Furton, K.G., Kabir, A., Fontanals, N. & Marcé, R.M. (2015). Comparative study of different fabric phase sorptive extraction sorbents to determine emerging contaminants from environmental water using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta*, 144, 1342–1351. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.08.009>
- Langel, K., Gunnar, T., Ariniemi, K., Rajamäki, O. & Lillsunde, P. (2011). A validated method for the detection and quantitation of 50 drugs of abuse and medicinal drugs in oral fluid by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 879(13–14), 859–870. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.02.027>
- Langel, K., Gjerde, H., Favretto, D., Lillsunde, P., Øiestad, E.L., Ferrara, S.D. & G. Verstraete, A.G. (2013). Comparison of drug concentrations between whole blood and oral fluid. *Drug Test. Analysis*, vol 6, pp 461–471. Doi: 10.1002/dta.1532
- Lee, Y.H. & Wong, D.T.W. (2009). Saliva: An emerging biofluid for early detection of diseases. *American Journal of Dentistry* 22(4):241-8.
- Lima, D.P., Diniz, D.G., Moimaz, S.A.S., Sumida, D.H. & Okamoto, A.C. (2010). Saliva: reflection of the body. *International Journal of Infectious Diseases*, 14(3), 184-188. doi:10.1016/j.ijid.2009.04.022
- Lin, O.A., Chuang, P.J. & Tseng, Y.J. (2023). Comparison of controlled drugs and new psychoactive substances (NPS) regulations in East and Southeast Asia. *Regul Toxicol Pharmacol*, Feb;138:105338. doi: 10.1016/j.yrtph.2023.105338.
- Loo, J. A., Yan, W., Ramachandran, P. & Wong, D. T. (2010). Comparative Human Salivary and Plasma Proteomes. *Journal of Dental Research*, 89(10), 1016–1023. doi:10.1177/0022034510380414
- McLellan, A.T. (2017). Substance Misuse and Substance use Disorders: Why do they Matter in Healthcare? *Trans Am Clin Climatol Assoc.*, 128:112-130. PMID: 28790493.
- Martini, M.B.A., Batista, T.B.D., Henn, I.W., da Rosa, De Souza, P.T., Vieira, A.R. & Azevedo-Alanis, L.R. (2020). Whether drug detection in urine and oral fluid is similar? A systematic review. In *Critical Reviews in Toxicology* (Vol. 50, Issue 4, pp. 348–358). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/10408444.2020.1751062>

- Mesa, R., Kabir, A., Samanidou, V. & Furton, K.G. (2018). Simultaneous determination of selected estrogenic endocrine disrupting chemicals and bisphenol A residues in whole milk using fabric phase sorptive extraction coupled to HPLC-UV detection and LC-MS / MS. August, 1–11. <https://doi.org/10.1002/jssc.201800901>
- Montesano, C., Simeoni, M.C., Curini, R., Sergi, M., Sterzo, C. lo, & Compagnone, D. (2015). Determination of illicit drugs and metabolites in oral fluid by microextraction on packed sorbent coupled with lc-ms/ms. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(13), 3647–3658. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8583-8>
- Mohammadnezhad, M., Thomas, A. & Kabir, R.(2020). Determinants and Prevention Strategies of Substance Abuse in Pacific Countries: A Systematic Review. *Oman Medical Journal*, 35(5). <https://doi.org/10.5001/omj.2020.128>
- Moldoveanu, S. & David, V. (2015). The Role of Sample Preparation. *Modern Sample Preparation for Chromatography*, 33–49. doi:10.1016/b978-0-444-54319-6.00002-5
- Mueller, M., Goodwin, A.K., Ator, N.A., McCann, U.D. & Ricaurte, G.A. (2011). Metabolism and Disposition of 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (“Ecstasy”) in Baboons after Oral Administration: Comparison with Humans Reveals Marked Differences. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 338(1), 310–317. doi:10.1124/jpet.111.180612
- Murphy, P.B., Bechmann, S. & Barrett, M.J. (2021, May 30). Morphine. In *StatPearls*. StatPearlsPublishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK526115/>
- NIDA. National Institute on Drug Abuse (2019, May 16). Methamphetamine DrugFacts, National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services. Available online <https://nida.nih.gov/publications/drugfacts/methamphetamine>
- Navazesh, M. (1993). Methods for Collecting Saliva. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 694(1 Saliva as a D), 72–77. doi:10.1111/j.1749-6632.1993.tb18343.x
- Niu, Z., Zhang, W., Yu, C., Zhang, J. & Wen, Y. (2018). Recent advances in biological sample preparation methods coupled with chromatography, spectrometry and electrochemistry analysis techniques. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 102, 123–146. doi:10.1016/j.trac.2018.02.005
- Odoardi, S., Anzillotti, L. & Strano-Rossi, S. (2014). Simplifying sample pretreatment: Application of dried blood spot (DBS) method to blood samples, including postmortem, for UHPLC-MS/MS analysis of drugs of abuse. *Forensic Science International*, 243, 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2014.04.015>
- Ortiz N.R. & Preuss C.V. (2023). Controlled Substance Act. In: *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL). PMID: 34662058.

- Pawliszyn, J. & Liu, S. (1987). Sample introduction for capillary gas chromatography with laser desorption and optical fibers. *Analytical Chemistry*, 59(10), 1475–1478. doi:10.1021/ac00137a024
- Perekopskiy, D. & Kiyatkin, E.A. (2019). 6-Monoacetylmorphine (6-MAM), Not Morphine, Is Responsible for the Rapid Neural Effects Induced by Intravenous Heroin. *ACS Chemical Neuroscience*, 10(8), 3409–3414. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.9b00305>
- Pourallahvirdi, M., Rahmani, F., Ranjbar, F., Bakhtavar, H.E. & Ettehadi, A. (2016). Major Causes of Drug Abuse From the Viewpoint of Addicted Persons Referred to Addiction Treatment Centers of Tabriz City, Iran. *Archives of Neuroscience*, 3(3). <https://doi.org/10.5812/archneurosci.37653>
- Priya, Y. & Prathibha K.M. (2017). Methods of collection of saliva-A Review. *International Journal of Oral Health Dentistry*, 3(3), 149–153. <https://doi.org/10.18231/2395-499X.2017.0032>
- Qian, Y., Gilliland, T.K. & Markowitz, J.S. (2020). The influence of carboxylesterase 1 polymorphism and cannabidiol on the hepatic metabolism of heroin. *Chemico-Biological Interactions*, 316, 108914. doi:10.1016/j.cbi.2019.108914
- Queiroz, M.E.C. & Donizeti de Souza, I. (2018). Sample preparation techniques for biological samples. *Scientia Chromatographica*, 10(3), 174–194. <https://doi.org/10.5935/sc.2018.011>
- Room, R. (2001). Drugs: International Aspects, in *International Encyclopedia of the Social & Behavioral Sciences*. Elsevier, pp 3881-3885. Doi: <https://doi.org/10.1016/B0-08-043076-7/01872-6>
- Ruan, X., Xing, L., Peng, J., Li, S., Song, Y. & Sun, Q. (2020). A simplified fabric phase sorptive extraction method for the determination of amphetamine drugs in water samples using liquid chromatography-mass spectrometry. *RSC Advances*, 10(18), 10854–10866. <https://doi.org/10.1039/c9ra10138a>
- Ryan, S.A. (2019). Cocaine Use in Adolescents and Young Adults. *Pediatric Clinics of North America*, 66(6), 1135–1147. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2019.08.014>
- Sahu, K.K. & Sahu, S. (2012). Substance Abuse Causes and Consequences. *Bangabasi Academic Journal*, 9(May), 52–59. <https://www.researchgate.net/publication/246544796>
- Salle, S., Bodeau, S., Dhersin, A., Ferdonnet, M., Goncalves, R., Lenski, M., Fabresse, N. (2019). Novel synthetic opioids: A review of the literature. *Toxicologie Analytique et Clinique*. doi:10.1016/j.toxac.2019.10.001
- Sargent, M. (2013). Guide to achieving reliable quantitative LC-MS measurements, 1st edition, RSC Analytical Methods Committee.
- Samaranayake, L. (2007). Saliva as a diagnostic fluid. *International Dental Journal*, 57(5), 295–299. <https://doi.org/10.1111/j.1875-595X.2007.tb00135.x>

- Sandoval, M.A.R (2017). Extraction of Phorbol Esters (PEs) from Pinion cake using computationally-designed polymers as adsorbents for Solid Phase Extraction. University of Leicester.
- Sciex (2018). The Scheduled MRM™ Algorithm Pro. Available online : <https://sciex.com/content/dam/SCIEX/pdf/tech-notes/all/Scheduled-MRM-Pro-Overview-RUO-MKT-02-8539-A.pdf>
- Sciex (2019). SCIEX Triple Quad™ 5500+ System System User Guide. Available online : <https://sciex.jp/content/dam/SCIEX/pdf/customer-docs/user-guide/5500plus-system-user-guide-en.pdf>
- Shafi, A., Berry, A.J., Sumnall, H., Wood, D. M. & Tracy, D.K. (2020). New psychoactive substances: a review and updates. *Therapeutic Advances in Psychopharmacology*, 10, 204512532096719. doi:10.1177/2045125320967197
- Shimomura, E.T., Jackson, G.F. & Paul, B.D. (2019). Cocaine, Crack Cocaine, and Ethanol. *Critical Issues in Alcohol and Drugs of Abuse Testing*, 215–224. doi:10.1016/b978-0-12-815607-0.00017-4
- Skoog, D.A., Holler, J.F. & Croouch, S.R. (2007a). “Αεριοχρωματογραφία,” in *Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης*, 6th ed., Εκδόσεις Κωσταράκη, pp. 903–934.
- Skoog, D.A., Holler, J.F. & Croouch, S.R. (2007b). “Υγροχρωματογραφία,” in *Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης*, 6th ed., Εκδόσεις Κωσταράκη, pp. 935–979.
- Skoog, D.A., Holler, J.F. & Croouch, S.R. (2007c). “Φασματοσκοπία μοριακών μαζών,” in *Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης*, 6th ed., Εκδόσεις Κωσταράκη, pp. 624–666
- Skoog, D.A., Holler, J.F. & Croouch, S.R. (2007d). “Φασματομετρία Ατομικών Μαζών,” in *Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης*, 6th ed., Εκδόσεις Κωσταράκη, pp. 322–347.
- Smart, R.G. (1991). Crack cocaine use: A review of prevalence and adverse effects. *American Journal of Drug and Alcohol Abuse*, 17(1), 13–26. <https://doi.org/10.3109/00952999108992806>
- Soltani, S. & Jouyban, A. (2014). Biological sample preparation: Attempts on productivity increasing in bioanalysis. *Bioanalysis*, 6(12), 1691–1710. <https://doi.org/10.4155/bio.14.118>
- Spielmann, N. & Wong, D. (2011). Saliva: diagnostics and therapeutic perspectives. *Oral Diseases*, 17(4), 345–354. doi:10.1111/j.1601-0825.2010.01773.x
- Spooner, C. & Hetherington, K. (2004). Social determinants of drug use. National Drug and Alcohol Research Centre, University of New South Wales, Australia
- Sridharan, G. (2019). Saliva and Salivary Diagnostics || Functions of Saliva. , 10.5772/intechopen.77735(Chapter 2), –. doi:10.5772/intechopen.84709

- Stauffer, E., Dolan, J.A. & Newman, R. (2008). Gas Chromatography and Gas Chromatography—Mass Spectrometry. *Fire Debris Analysis*, 235–293. doi:10.1016/b978-012663971-1.50012-9
- Tamama, K. (2021). Advances in drugs of abuse testing. In *Clinica Chimica Acta* (Vol. 514, pp. 40–47). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.12.010>
- Tartaglia, A., Locatelli, M., Kabir, A., Furton, K. G., Macerola, D., Sperandio, E., Piccolantonio, S., Ulusoy, H. I., Maroni, F., Bruni, P., Croce, F. & Samanidou, V. F. (2019). Comparison between exhaustive and equilibrium extraction using different SPE sorbents and sol-gel carbowax 20M coated FPSE media. *Molecules*, 24(3). <https://doi.org/10.3390/molecules24030382>
- Tay, E.M.Y. & Roberts, D. M. (2018). A spotlight on the role, use, and availability of codeine and the implications faced. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 11(11), 1057–1059. <https://doi.org/10.1080/17512433.2018.1537122>
- Taylor, S., Paluszek, M.M., Rachor, G.S., McKay, D. & Asmundson, G.J.G. (2021). Substance use and abuse, COVID-19-related distress, and disregard for social distancing: A network analysis. *Addictive Behaviors*, 114(September 2020), 106754. <https://doi.org/10.1016/j.addbeh.2020.106754>
- Thomas, S.N. (2019). Mass spectrometry. *Contemporary Practice in Clinical Chemistry*, 171–185. doi:10.1016/b978-0-12-815499-1.00010-7
- Toombs, J.D. & Kral, L.A. (2005). Methadone treatment for pain states. *American Family Physician*, 71(7), 1353-1358.
- Trifilieff, P. & Martinez, D. (2013). Cocaine: Mechanism and Effects in the Human Brain. In *The Effects of Drug Abuse on the Human Nervous System*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418679-8.00005-8>
- UNODC. United Nations Office on Drugs and Crime (2016, September). Global Smart Update Volume 16. Available online :<https://www.unodc.org/documents/scientific/Global-SMART-Update-2016-vol-16.pdf>
- UNODC. United Nations Office on Drugs and Crime. (2018, June). World drug report 2018. Booklet 1-Executive Summary. In United Nations publication, Vienna Austria. Available online:https://www.unodc.org/wdr2018/prelaunch/WDR18_Booklet_1_EXSUM.pdf
- UNODC. United Nations Office on Drugs and Crime. (2020, June). In United Nations publication, Vienna, Austria. Available online: <https://wdr.unodc.org/wdr2020/index2020.html>
- UNODC. United Nations Office on Drugs and Crime. (2023a, June). The world drug report. Booklet 1- Executive Summary. In United Nations publication, Vienna, Austria.https://www.unodc.org/res/WDR-2023/WDR23_Exsum_fin_SP.pdf

UNODC. United Nations Office on Drugs and Crime. (2023b, August). Current NPS Threats, Volume VI. Available online : https://www.unodc.org/res/scientists/ewa/Current_NPS_Threats_VI.pdf

Waller, D.G. & Sampson, A.P. (2018). Substance abuse and dependence. In *Medical Pharmacology and Therapeutics* (pp. 675–688). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-7020-7167-6.00054-3>

Whitesell, M., Bachand, A., Peel, J. & Brown, M. (2013). Familial, Social, and Individual Factors Contributing to Risk for Adolescent Substance Use. *Journal of Addiction*, 2013, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2013/579310>

WHO. World Health Organization (2023). Drugs (Psychoactive). Available online :https://www.who.int/health-topics/drugs-psychoactive#tab=tab_1

Wille, S.M.R., Raes, E., Lillsunde, P., Gunnar, T., Laloup, M., Samyn, N., Christophersen, A.S., Moeller, M.R., Hammer, K.P. & Verstraete, A.G. (2009). Relationship Between Oral Fluid and Blood Concentrations of Drugs of Abuse in Drivers Suspected of Driving Under the Influence of Drugs. *Ther Drug Monit*, vol 31, Number 4, pp 511-519.

Wille, S.M.R., Baumgartner, M.R., Di Fazio, V., Samyn, N. & Kraemer, T. (2014). Trends in drug testing in oral fluid and hair as alternative matrices. *Bioanalysis*, 6(17), 2193–2209. <https://doi.org/10.4155/bio.14.194>

Xu, J. & Ouyang, G. (2019). Extraction | Solid-phase microextraction. In *Encyclopedia of Analytical Science* (3rd ed.). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.14552-4>

Zaami, S., Marinelli, E. & Vari, M.R. (2020). New Trends of Substance Abuse During COVID-19 Pandemic: An International Perspective. *Frontiers in Psychiatry*, 11(July), 1–4. <https://doi.org/10.3389/fpsyt.2020.00700>

Zancanaro, I., Limberger, R.P., Bohel, P.O., dos Santos, M.K., de Boni, R.B., Pechansky, F. & Caldas, E.D. (2012). Prescription and illicit psychoactive drugs in oral fluid-LC-MS/MS method development and analysis of samples from Brazilian drivers. *Forensic Science International*, 223(1–3), 208–216. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2012.08.048>

Zilfidou, E., Kabir, A., Furton, K.G. & Samanidou, V. (2018). Fabric phase sorptive extraction: Current state of the art and future perspectives. *Separations*, 5(3). <https://doi.org/10.3390/separations5030040>

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Αρχοντάκης, Ε. (2008). Προκατεργασία Δείγματος Για Αναλύσεις Με Hplc. ΕΚΠΑ, Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Χημείας, Αθήνα.

Δεληγιαννάκης Ι., Χελά Δ. & Κωνσταντίνου Ι. (2010). "Ενόργανη Περιβαλλοντική Ανάλυση", Εκδόσεις Τζιόλα, Θεσσαλονίκη

ΕΚΤΕΠΝ. Εθνικό Κέντρο Τεκμηρίωσης και Πληροφόρησης για τα Ναρκωτικά (2022). Η Κατάσταση του προβλήματος των ναρκωτικών και των οιοπνευματωδών ποτών στην Ελλάδα. Ετήσια Έκθεση 2022, Ερευνητικό Πανεπιστημιακό Ινστιτούτο Ψυχικής Υγείας, Νευροεπιστημών και Ιατρικής Ακριβείας «Κώστας Στεφανής». Διαθέσιμο: <https://www.ektepn.gr/sites/default/files/2022-06/%CE%9A%CF%8D%CF%81%CE%B9%CE%B1%CE%95%CF%85%CF%81%CE%AE%CE%BC%CE%B1%CF%84%CE%B1%CE%95%CE%9A%CE%A4%CE%95%CE%A0%CE%9D2022.pdf>

Θεοδωρίδης, Γ., Γηρούση, Σ., Ζαχαριάδης, Γ., Ζώτου, Α. & Σαμανίδου, Β. (2015a). Τεχνικές Προκατεργασίας Βιολογικών Δειγμάτων Στο Βιοαναλυτική χημεία [Προπτυχιακό εγχειρίδιο]. Κάλλιπος, Ανοικτές Ακαδημαϊκές Εκδόσεις, σσ. 77-93.

Θεοδωρίδης, Γ., Γηρούση, Σ., Ζαχαριάδης, Γ., Ζώτου, Α., & Σαμανίδου, Β. (2015b). Φασματομετρία μάζας Στο Βιοαναλυτική χημεία [Προπτυχιακό εγχειρίδιο]. Κάλλιπος, Ανοικτές Ακαδημαϊκές Εκδόσεις, σσ.203-215

Κακλαμάνος Π.Γ. (2009). Διδακτορική Διατριβή. Ανάπτυξη μεθόδων προσδιορισμού ορμονών με αυξητική δράση σε βιολογικά δείγματα με Υγρή Χρωματογραφία – Φασματομετρία Μαζών, Τμήμα Χημείας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Γεωργίου Ζ., Καρκαλούσος Π., Κρούπης, Χ., Παπαϊωάννου, Α., Πλαγιάς, Π., Σπυρόπουλος, Β., Τσότσου, Γ.Ε. & Φούντζουλα, Χ. (2015). Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (Απόδοσης) (HPLC) στην Κλινική Χημεία Βασικές Αρχές και Παραδείγματα Στο Εργαστηριακές Ασκήσεις Κλινικής Χημείας, [Εργαστηριακός Οδηγός]. Κάλλιπος, Ανοικτές Ακαδημαϊκές Εκδόσεις, σσ. 222-260.

Κουτσελίνης, Α. (1997). Τοξικολογία Τόμος Α και Β. Αθήνα: Γρ. Παρισιάνος.

Σπυρόπουλος, Τ. (2016). Βασικές αρχέςΤοξικολογίας. Διαθέσιμο: https://docplayer.gr/5046076-Vasikes-arhes-toxikologias.html#show_full_text

Στράτης, Ι., Ζαχαριάδης, Γ., Σαμανίδου, Β., & Θεοδωρίδης, Γ. (2004). Ειδικές Μέθοδοι Διαχωρισμού και Χημικής Ανάλυσης, Θεσσαλονίκη: Ζήτη

ΣΟΔΝ-ΕΜΠ. Συντονιστικό Όργανο Δίωξης Ναρκωτικών – Εθνική Μονάδα Πληροφοριών (2019). Ετήσια Έκθεση του Συντονιστικού Οργάνου Δίωξης Ναρκωτικών – Εθνικής Μονάδας Πληροφοριών (ΣΟΔΝ – ΕΜΠ) για τα Ναρκωτικά στην Ελλάδα το έτος 2019. Διαθέσιμο: https://www.astynomia.gr/file/2022/01/2019-ekthesi_sodn.pdf

Συντονιστικό Όργανο Δίωξης Ναρκωτικών – Εθνική Μονάδα Πληροφοριών (ΣΟΔΝ-ΕΜΠ) (2022). Ετήσια Έκθεση του Συντονιστικού Οργάνου Δίωξης Ναρκωτικών – Εθνικής Μονάδας Πληροφοριών (ΣΟΔΝ – ΕΜΠ) για τα Ναρκωτικά στην Ελλάδα το έτος 2022. Διαθέσιμο : <https://www.astynomia.gr/file/2023/06/21062023sodnetisia2022.pdf>