



Πανεπιστήμιο  
Ιωαννίνων



Πανεπιστήμιο  
ΕΚΠΑ



Πανεπιστήμιο  
ΑΠΘ



Πανεπιστήμιο  
Πατρών



Πανεπιστήμιο  
Κρήτης



Πανεπιστήμιο  
Κύπρου

---

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΝΕΩΝ ΨΥΧΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ  
ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΕ ΟΛΙΚΟ ΑΙΜΑ ΜΕ ΤΗΝ  
ΜΕΘΟΔΟ LC-MS/MS**

---

**ΔΙ-ΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**

**(Δ.Π.Μ.Σ.)**

**«ΑΝΟΡΓΑΝΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»**

Ελευθερίου Ιωάννα

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2024

**Εισαγωγή στο ΔΙ-ΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ  
ΣΠΟΥΔΩΝ (Δ.Π.Μ.Σ.) «ΑΝΟΡΓΑΝΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»**

**του κ.** \_\_\_\_\_

Επιβλέπων μέλος ΔΕΠ: κ.Βασιλική Μπούμπα

Θέμα: «Ανίχνευση Νέων Ψυχοδραστικών Ενώσεων σε ολικό αίμα με την μέθοδο LC-MS/MS»

Ορισμός Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής από την Επιτροπή Προγράμματος  
Σπουδών (ΕΠΣ)::....<sup>A</sup>/...-...-....

1. Σωτήριος Χατζηκακού
2. Νικόλαος Κουρκουμέλης
3. Βασιλική Μπούμπα

Έγκριση Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας στις

\_\_\_\_\_

Ο Διευθυντής του Δ.Π.Μ.Σ.

Καθηγητής \_\_\_\_\_

Ο/Η Γραμματέας

\_\_\_\_\_

*Στην οικογένεια μου*

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	7
ABSTRACT .....	8
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	9
Κατάλογος Πινάκων .....	10
Κατάλογος Εικόνων .....	10
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	12
Κεφάλαιο 1 .....	12
1.1 Εισαγωγή .....	12
1.2 Νέες Ψυχοδραστικές Ενώσεις – New Psychoactive Substances (NPS) .....	14
1.3 Νομοθεσία.....	16
1.4 Συνθετικά Οπιοειδή.....	17
1.4.1 Δομή.....	18
1.4.2 Κατηγορίες οπιοειδών.....	19
1.4.3 Μηχανισμός δράσης .....	20
1.4.5 Παρενέργειες χρήσης.....	22
1.5 Συνθετικές Καθιόνες.....	23
1.5.1 Δομή.....	23
1.5.2 Κατηγορίες συνθετικών καθιόνων .....	24
1.5.3 Μηχανισμός δράσης .....	25
1.5.4 Παρενέργειες χρήσης.....	26
1.6 Συνθετικά κανναβινοειδή.....	27
1.6.1 Δομή.....	27
1.6.2 Κατηγορίες .....	28
1.6.3 Μηχανισμός δράσης .....	30
1.6.4 Παρενέργειες .....	30
1.7 Φαιαιθυλαμίνες.....	30
1.7.1 Δομή.....	31
1.7.2 Κατηγορίες .....	31
1.7.3 Μηχανισμός Δράσης.....	32
1.7.4 Παρενέργειες .....	32
1.8 Αμφεταμίνες.....	32
1.8.1 Δομή.....	33
1.8.2 Μηχανισμός Δράσης.....	33
1.8.3 Παρενέργειες .....	34
1.9 Συνθετικές Βενζοδιαζεπίνες.....	36

1.9.1	Δομή.....	36
1.9.2	Κατηγορίες .....	37
1.9.3	Μηχανισμός δράσης .....	38
1.9.4	Παρενέργειες χρήσης.....	38
1.10	Τρυπταμίνες .....	39
1.10.1	Δομή.....	40
1.10.2	Κατηγορίες .....	40
1.10.3	Μηχανισμός δράσης.....	41
1.10.4	Παρενέργειες .....	41
1.11	Πιπεραζίνες.....	41
1.11.2	Κατηγορίες .....	42
1.11.3	Μηχανισμός δράσης.....	42
1.11.4	Παρενέργειες .....	42
1.12	Αλκαλοειδή.....	43
1.12.2	Δομή.....	43
1.12.3	Κατηγορίες .....	43
1.12.4	Μηχανισμός δράσης.....	45
1.12.5	Παρενέργειες χρήσης.....	45
1.13	Βενζυλόνη (BMDP).....	46
Κεφάλαιο 2 .....		47
2.1	Μέθοδοι προσδιορισμού νέων ψυχοδραστικών ουσιών στο αίμα .....	47
2.2	Αέρια Χρωματογραφία-Φασματομετρία Μάζας (GC-MS) .....	47
2.3	ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ .....	48
2.3.1	ΤΜΗΜΑΤΑ ΥΓΡΟΥ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΟΥ .....	49
2.3.2	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC).....	50
2.3.3	Υγρή χρωματογραφία υπεραπόδοσης (UHPLC).....	51
2.4	Υγρή Χρωματογραφία-Φασματομετρία Μάζας (LC-MS).....	51
2.4.1	ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΜΑΖΩΝ .....	52
2.4.2	ΤΜΗΜΑΤΑ ΦΑΣΜΑΤΟΓΡΑΦΟΥ ΜΑΖΩΝ.....	52
2.4.3	Ιονισμός/Πηγή ιόντων και διεπαφές .....	52
2.4.4	Ιονισμός ηλεκτροψεκασμού (Electrospray ionization) .....	53
2.5	Αναλυτές μάζας (Mass analysers) .....	54
2.5.1	Αρχή λειτουργίας .....	54
2.5.2	Είδη αναλυτών μάζας.....	55
2.5.3	Αναλυτής τύπου τετράπολο.....	55

2.5.4 Ανιχνευτής.....	56
2.5.5 Ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστές (Electron Multiplier).....	56
2.6 Βιολογικά υποστρώματα.....	57
2.6.1 Το ολικό αίμα ως βιολογικό υπόστρωμα .....	57
Κεφάλαιο 3 .....	58
3.1 Οργανολογία και Υλικά.....	58
3.1.1 Χημικά Αντιδραστήρια.....	58
3.1.2 Οργανολογία .....	58
3.1.2.1 Συσκευές .....	58
3.2 Πρωτόκολλο προκατεργασίας δειγμάτων LLE (Εκχύλιση Υγρού-Υγρού).....	59
3.3 Παρασκευή λευκών (blank) δειγμάτων .....	59
3.4 Συνθήκες Υγρής Χρωματογραφίας .....	59
3.5 Συνθήκες MS/MS.....	60
3.6 Σκοπός διπλωματικής εργασίας .....	62
3.7 Επικύρωση Μεθόδου.....	62
3.8 Εκλεκτικότητα.....	63
3.9 Επιμόλυνση εκ μεταφοράς (Carryover effect) .....	63
3.10 Επίδραση υποστρώματος (Matrix effect).....	63
3.11 Ακρίβεια μεθόδου.....	63
3.12 Πιστότητα μεθόδου.....	64
3.13 Γραμμικότητα.....	64
3.14 Σταθερότητα.....	65
3.15 LOD (Όριο ανίχνευσης).....	66
3.16 LOQ (Όριο ποσοτικοποίησης) .....	66
Κεφάλαιο 4 .....	67
4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	67
4.1 Γραμμικότητα.....	67
4.2 Ακρίβεια μεθόδου.....	71
4.3 Επιμόλυνση εκ μεταφοράς.....	71
4.4 Φαινόμενο υποστρώματος .....	71
4.5 LOD (Όριο ανίχνευσης) και LLOQ (Κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης) .....	72
4.6 Εκλεκτικότητα.....	72
4.7 Σταθερότητα.....	72
Κεφάλαιο 5 .....	73
5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	73

Συμπεράσματα .....	74
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	75

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι νέες ψυχοδραστικές ουσίες ορίζονται 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 ενδέχεται να αποτελούν απειλή για τη δημόσια υγεία. Είναι γνωστές στην αγορά με όρους όπως «designer drugs», «legal highs», «herbal highs», «bath salts». Για τον εντοπισμό και την ταυτοποίηση τους γίνεται χρήση της τεχνικής LC-MS/MS, στην οποία ένα φασματομέτρο μάζας σε συνδυασμό με έναν υγρό χρωματογράφο μπορούν να ανιχνεύσουν τις χαρακτηριστικές μάζες ιόντων μιας ένωσης ή μιας κατηγορίας ενώσεων. Η βενζυλόνη αποτελεί μια νέα ψυχοδραστική ουσία που χρησιμοποιείται για ψυχοδιεγερτικούς σκοπούς, γνωρίζοντας ραγδαίο ποσοστό χρήσης την τελευταία επταετία. Ανήκει στην οικογένεια των συνθετικών καθινονών που προκαλούν σύγχυση, παραισθήσεις, βραχυπρόθεσμη ψύχωση, μανία ενώ δεν είναι λίγες οι περιπτώσεις όπου έχουν καταγραφεί κλινικά συμπτώματα επιθετικότητας, αυταπάτες, ταχυκαρδία, και ζάλη. Στην παρούσα διπλωματική εργασία έγινε ανάπτυξη και επικύρωση μιας μεθόδου προσδιορισμού βενζυλόνης σε δείγματα ολικού αίματος για να διαπιστωθεί η εγκυρότητα της ανάλογα με τον εξεταζόμενο παράγοντα. Το ολικό αίμα αποτελεί βιολογικό υγρό το οποίο μπορεί να δώσει ποικίλες πληροφορίες και σε αυτό μπορούν να ανιχνευθούν ουσίες που έχουν καταναλωθεί, ωστόσο η λήψη δείγματος γίνεται παρεμβατικά καθώς δεν υπάρχει άλλος τρόπος για την δειγματοληψία αίματος. Η ανάλυση του αίματος έγινε με την χρήση υγρής χρωματογραφίας υπερ υψηλής απόδοσης (UPLC), συζευγμένης με φασματομετρία μάζας σε σειρά (MS/MS). Για την περάτωση της μελέτης πραγματοποιήθηκε κατάλληλη προκεταργασία δειγμάτων αίματος με την χρήση κατάλληλου πρωτοκόλου εκχύλισης υγρού-υγρού πριν την εισαγωγή των δειγμάτων στο σύστημα ανάλυσης, τα βήματα του οποίου περιγράφονται στο πειραματικό μέρος. Για την ανάπτυξη και την επικύρωση της μεθόδου ακολουθήθηκαν πιστά οι οδηγίες που περιλαμβάνονται στο Forensic Toxicology (ASB Approved March 2019, ANSI Approved November 2019). Έγινε εξέταση των παραμέτρων της γραμμικότητας με τη βοήθεια του συντελεστή συσχέτισης όπου βρέθηκε  $R^2=0.9959$ , η ακρίβεια/πιστότητα της μεθόδου, το όριο ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ) τα οποία ανέρχονται στα 0,3mg/L και 1mg/L αντίστοιχα. Επίσης εξετάστηκε η επίδραση του υποστρώματος και η σταθερότητα της ουσίας σε δείγματα ολικού αίματος όπου παρατηρήθηκε μεγάλη σταθερότητα καθώς διακυμάνθηκε μεταξύ 95% και 98% για θερμοκρασία 5°C που αντιστοιχεί στην θερμοκρασία συστήματος θαλάμου ανάλυσης δειγμάτων.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Βενζυλόνη, Υγρή χρωματογραφία υπερυψηλής απόδοσης, φασματομετρία μάζας σε σειρά



## ABSTRACT

New psychoactive substances are defined as substances of abuse, either in pure form or in a preparation, that are not controlled by the 1961 Single Convention on Narcotic Drugs or the 1971 Convention on Psychotropic Substances, but which may pose a threat to public health. In the illegal market they're known as "designer drugs", "legal highs", "herbal highs", "bath salts". For their detection and identification, a method that is widely used is LC-MS/MS, in which a mass spectrometer combined with a liquid chromatograph can detect the characteristic ion masses of a compound or a class of compounds. Benzylone is a new psychoactive substance used for psychostimulant purposes, experiencing a rapid rate of use over the last seven years. It belongs to the family of synthetic cathinones that cause confusion, hallucinations, short-term psychosis, mania, while there are not a few cases where clinical symptoms of aggression, delusions, tachycardia, and dizziness have been recorded. In this thesis, a method for the determination of benzylone in whole blood samples was developed and validated to establish its validity depending on the factor examined. Whole blood is a biological fluid that can provide a variety of information and substances that have been consumed can be detected in it, however the sample is taken invasively as there is no other way to sample blood. Blood analysis was performed using ultra high-performance liquid chromatography (UPLC) coupled to mass spectrometry (MS/MS). To complete the study, appropriate preprocessing of blood samples was performed using an appropriate liquid-liquid extraction protocol before introducing the samples into the analysis system, the steps of which are described in the experimental part. For the development and validation of the method, the guidelines included in Forensic Toxicology (ASB Approved March 2019, ANSI Approved November 2019) were closely followed. The linearity parameters were examined with the help of the correlation coefficient where  $R^2=0.9959$  was found, the precision/fidelity of the method, the limit of detection (LOD) and quantification (LOQ) which are 0.3mg/L and 1mg/L respectively. The effect of the substrate and the stability of the substance in whole blood samples were also examined where a high stability was observed as it varied between 95% and 98% for a temperature of 5°C which corresponds to the temperature of the sample analysis chamber system.

**KEY WORDS:** NPS, Benzylone, Ultra-high Performance liquid chromatography (UHPLC), Tandem Mass Spectrometry

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ιατροδικαστικής & Τοξικολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Με την ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου κ.Βασιλική Μπούμπα για την υποστήριξη καθ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας μέχρι να φέρω εις πέρας ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα μέλη της τριμελούς επιτροπής κ.Σωτήρη Χατζηκακού, κ.Νικόλαο Κουρκουμέλη που με τίμησαν με τη συμμετοχή τους, με υποστήριξαν και έδειξαν ενδιαφέρον στην προσπάθειά μου αυτή, όπως και το μεταπτυχιακό πρόγραμμα που μου άνοιξε νέους ακαδημαϊκούς και επαγγελματικούς ορίζοντες.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό του εργαστηρίου που βοήθησε στην ανάπτυξη ευχάριστου κλίματος εργασίας, παρόλα αυτά, ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στον κ.Βασίλη Παπαχαρίση και την κ.Φωτεινή Αλβανοπούλου για τις συμβουλές, την υποστήριξη και την συνολική τους βοήθεια κατά την διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο καθώς και την υποψήφια διδάκτορα του εργαστηρίου κ.Δήμητρα Φλώρου για τις συμβουλές, την καθοδήγηση και την επίλυση όποιων αποριών. Δεν μπορώ να παραλήψω να ευχαριστήρω την κ.Ελευθερία Κατσαρού με την οποία είχα μια άριστη συνεργασία στο εργαστήριο και με την οποία αναπτύχθηκε μια δυνατή φιλία.

Τέλος οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ τους γονείς μου για την στήριξη που μου παρείχαν, την ευκαιρία που μου έδωσαν να διευρύνω τις ακαδημαϊκές μου γνώσεις και να κατακτήσω ακόμα ένα όνειρο.

## Κατάλογος Πινάκων

- Πίνακας 1: Συμπτώματα στερητικού συνδρόμου συναρτήσει χρόνου (Σελ.20)
- Πίνακας 2: Παρενέργειες χρήσης αμφεταμινών (Σελ.32)
- Πίνακας 3: Παρενέργειες χρήσης βενζοδιαζεπινών (Σελ.37)
- Πίνακας 4: Πρόγραμμα έκλυσης της κινητής φάσης σε σταθερή ανά τον χρόνο ροή (Σελ.58)
- Πίνακας 5: Παράμετροι MS για τον προσδιορισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό της βενζυλόνης (Σελ.59)
- Πίνακας 6: Δεδομένα γραμμικότητας δειγμάτων βενζυλόνης ανά συγκέντρωση (Σελ.66)
- Πίνακας 7: Αποτελέσματα ελέγχου ακρίβειας δειγμάτων σε χρονικό διάστημα μίας, τριών και πέντε ημερών για συγκεντρώσεις 5ng/ml, 50ng/ml, 150ng/ml (Σελ.69)
- Πίνακας 8: Αποτελεσματικότητα εκχύλισης της Βενζυλόνης (Σελ.70)

## Κατάλογος Εικόνων

- Εικόνα 1: Δομή φαιντανύλης (Σελ.16)
- Εικόνα 2: Χημικές δομές και δραστικότητα του φεντανύλ και άλλων συνθετικών οπιοειδών (Σελ.16)
- Εικόνα 3: Δομές οπιοειδών αναλγητικών (Σελ.18)
- Εικόνα 4: Μηχανισμός δράσης οπιοειδών (Σελ.19)
- Εικόνα 5: Βασική χημική δομή καθινόνης (Σελ.22)
- Εικόνα 6: Παραδείγματα συνθετικών καθινονών από κάθε ομάδα (Σελ.23)
- Εικόνα 7: Μηχανισμός δράσης συνθετικών καθινονών (Σελ.23)
- Εικόνα 8: Προτεινόμενη δομή κανναβινοειδών (Σελ.26)
- Εικόνα 9: Χημικές δομές μερικών φαινυλαιθυλαμινών (Σελ.29)
- Εικόνα 10: Δομές αμφεταμίνης και παραγώγων αμφεταμίνης (Σελ.31)
- Εικόνα 11: Μηχανισμός δράσης αμφεταμίνης (Σελ.32)
- Εικόνα 12 : Γενική δομή βενζοδιαζεπίνης (Σελ.34)
- Εικόνα 13: Δομές 1,4 βενζοδιαζεπινών (Σελ.35)
- Εικόνα 14: Δομές ιμιδαζο- και τριαζολοβενζοδιαζεπινών (Σελ.35)
- Εικόνα 15: Υποδοχέας γάμμα αμινοβουτυρικού οξέος (GABA-A) με τις θέσεις στόχους (Σελ.36)

- Εικόνα 16: Βασική δομή τρυπταμίνης (Σελ.38)
- Εικόνα 17: Χημικές δομές πιπεραζίνης και παραγώγων της (Σελ.40)
- Εικόνα 18: Ταξινόμηση των αλκαλοειδών με βάση τις δομές (Σελ.43)
- Εικόνα 19: Στερεοχημική δομή βενζυλόνης όπου αστερίσκος υποδηλώνει χειρικό κέντρο (Σελ.44)
- Εικόνα 20: Διάγραμμα τμημάτων χρωματογράφου HPLC (Σελ.47)
- Εικόνα 21: Διάταξη HPLC (Σελ.48)
- Εικόνα 22: Αναπαράσταση πηγής ιόντων ηλεκτροψεκασμού (Σελ.51)
- Εικόνα 23: Μηχανισμός electrospray ionization (Σελ.52)
- Εικόνα 24: Διαχωριστική ικανότητα φασματομετρίας μαζών (Σελ.53)
- Εικόνα 25: Ένα τριπλό τετραπολικό φασματόμετρο μάζας (Σελ.54)
- Εικόνα 26: Σχηματική απεικόνιση φασματόμετρο μάζας τριπλού τετράπολου (Σελ.54)
- Εικόνα 27: Διάγραμμα ταυτοποίησης ιόντων βενζυλόνης (Σελ.59)
- Εικόνα 28: Χρόνος έκλυσης βενζυλόνης (Σελ.62)

## ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### Κεφάλαιο 1

#### 1.1 Εισαγωγή

Η Τοξικολογία είναι η επιστήμη που μελετά τις επιπτώσεις χημικών ενώσεων, ουσιών ή καταστάσεων στους ανθρώπους, τα ζώα και το περιβάλλον. [1] Μπορεί να χαρακτηριστεί και ως η επιστήμη της των δηλητηρίων αφού ασχολείται με ένα ευρύ φάσμα θεματικών πεδίων που επικεντρώνεται στην προέλευση, τη φύση, τις ιδιότητες και τους μηχανισμούς δράσης τοξικών ουσιών, την κλινική εικόνα δηλητηριάσεων, την θεραπευτική αντιμετώπιση, την μεθοδολογία ανίχνευσης και ταυτοποίησης των τοξικών ουσιών, την αξιολόγηση ασφαλείας και αποτίμηση των κινδύνων που απορρέουν από τη χρήση τους. [2] Καθώς κατανοούμε πώς διάφοροι παράγοντες μπορούν να προκαλέσουν βλάβη στους ανθρώπους και άλλους οργανισμούς, ίσως ένας πιο κατάλληλος ορισμός της τοξικολογίας είναι «η μελέτη των δυσμενών επιπτώσεων των χημικών ή φυσικών παραγόντων στους ζωντανούς οργανισμούς». Σύμφωνα με τον Παρακέλσο (Ελβετός χημικός, 1493-1541) ο οποίος θεωρείται πατέρας της τοξικολογίας «Τίποτε δεν είναι δηλητήριο, τα πάντα είναι δηλητήριο. Η δόση κάνει το δηλητήριο». [3]

Ιστορικά η επιστήμη της τοξικολογίας άρχισε να υφίσταται ως έννοια από τα αρχαία χρόνια. Παρόλο που αρχικά ήταν μια εμπειρική επιστήμη και δεν εξελίχθηκε μέχρι την εμφάνιση της χημείας και των αναλυτικών επιστημών. [4] Κάνοντας μια αναδρομή στο παρελθόν ένα από τα παλαιότερα γνωστά έντυπα δεδομένα που έχουμε, ο πάπυρος Ebers, χρονολογείται περίπου το 1500 π.Χ. και περιέχει πληροφορίες που σχετίζονται με πολλά αναγνωρισμένα δηλητήρια, όπως το κώνειο (HCN), το ακόνιτο, το όπιο και μέταλλα όπως ο μόλυβδος (Pb), ο χαλκός (Cu) και το αντιμόνιο (Sb). [5] Ο Ιπποκράτης (πατέρας της Ιατρικής) περίπου το 400 π.Χ. πρόσθεσε έναν αριθμό δηλητηρίων και αρχών κλινικής τοξικολογίας σχετικά με τη βιοδιαθεσιμότητα στη θεραπεία και την υπερδοσολογία. Ο Θεόφραστος (370–286 π.Χ.), μαθητής του Αριστοτέλη, συμπεριέλαβε πολλές αναφορές σε δηλητηριώδη φυτά στο βιβλίο του *De Historia Plantarum*, ενώ ο Διοσκουρίδης, ένας Έλληνας γιατρός στην αυλή του Ρωμαίου αυτοκράτορα Νέρωνα, έκανε την πρώτη προσπάθεια να ταξινομήσει τα δηλητήρια σε φυτικά, ζωικά και ορυκτά δηλητήρια στο βιβλίο του *De Materia Medica*, το οποίο περιέχει αναφορά σε περίπου 600 φυτά και γνώριζε το χλωριούχο μόλυβδο (Chlorblei), το οξείδιο του ψευδαργύρου, το ανθρακικό νάτριο, το θειούχο αρσενικό, το λουλακί και περιέγραψε τη διαδικασία με την οποία λαμβάνεται ο υδράργυρος από την κιννάβαρη και την παρασκευή οξικού μολύβδου, ασβεστόνευρου και θειικού χαλκού. [4]

Πέραν από τις έντυπες αναφορές και αποδεικνύουν την ύπαρξη της τοξικολογίας από αρχαιότατων χρόνων ένας θρύλος αναφέρει ότι ο Ρωμαίος βασιλιάς Μιθριδάτης ΣΤ' του Πόντου, φοβόταν τόσο πολύ το ενδεχόμενο δηλητηρίασης του που κατάπινε σκόπιμα ανά τακτά χρονικά διαστήματα ένα μείγμα 36 συστατικών ως προστασία από ενδεχόμενη δολοφονία, μάλιστα μετά από την επικείμενη σύλληψή του από τους εχθρούς του, οι προσπάθειές του να αυτοκτονήσει με δηλητήριο απέτυχαν λόγω της επιτυχημένης παρασκευής του αντιδότη. [5]

Ετυμολογικά η λέξη τοξικολογία προέρχεται από τις λέξεις τοξικό + λόγος. Η λέξη τοξικό απευθύνεται στα δηλητήρια, τα οποία από αρχαιοτάτων χρόνων είχαν πρωταγωνιστικό ρόλο σε δολοφονίες και αυτοκτονίες διαφόρων διάσημων προσωπικοτήτων αλλά και κοινών ανθρώπων (ίσως δεν ακούγεται καλά αυτό). Αρχίζοντας την ιστορική αναδρομή από την αρχαία Αθήνα, συχνή ήταν η απονομή θανατικής ποινής με υποχρεωτική κατάποση κωνείου (γνωστού και ως υδροκυανίου). Μάλιστα ένα παράδειγμα τέτοιας απονομής ποινής ήταν και ο θάνατος του γνωστού φιλόσοφου Σωκράτη. Επίσης ο Αθηναίος πολιτικός Θεμιστοκλής (525-459π.Χ) αυτοκτόνησε με την κατάποση αίματος ταύρου καθώς στην αρχαιότητα πίστευαν ότι ήταν πολύ τοξικό πιθανότατα λόγω ύπαρξης τοξινών όπως η αλλαντίαση, ο άνθρακας ή άλλες που κατοικούν στα βοοειδή [6].

Μερικούς αιώνες μετά κατά τη διάρκεια της κυριαρχίας της Ρωμαϊκής αυτοκρατορίας, υπάρχουν πολλά παραδείγματα παρόμοιων περιπτώσεων όπως αυτό της δηλητηρίασης του αυτοκράτορα Κλαυδίου με μανιτάρια (πιθανόν βολετούς) από την σύζυγο του Αγριππίνα με σκοπό να ανέβει ο υιός της Νέρωνας στην εξουσία. Η ειρωνεία έγκυται στο γεγονός ότι ο αυτοκράτορας πλέον Νέρωνας είχε ο ίδιος δηλητηριαστεί από τον μόλυβδο που υπήρχε στις σωλήνες του παλατιού και από τις οποίες έπινε νερό, με αποτέλεσμα την σταδιακή εμφάνιση ψυχικής διαταραχής που τον οδήγησε στο να κάψει την Ρώμη. [6] Παράλληλα στα χρόνια της Βυζαντινής Αυτοκρατορίας συχνό φαινόμενο ήταν η δηλητηρίαση του αυτοκράτορα από επίδοξους διεκδικητές του θρόνου. Ένα πιο «πρόσφατο» παράδειγμα είναι η δηλητηρίαση του στρατηγού Ναπολέοντα με καλομέλι (χλωριούχο υδράργυρο) ενώ οι δηλητηριάσεις δεν έλειπαν και από την Καθολική εκκλησία. Ως επί το πλείστον τα δηλητήρια που χρησιμοποιούσαν στο παρελθόν είχαν την βάση τους στο αρσενικό (As) και αλάτά του, υδράργυρος (Hg), μελαντόνα (φυτό).

Παράλληλα με την χρήση τοξικών ουσιών με σκοπό την πρόκληση θανάτου ή άλλων βλαβών, ο άνθρωπος χρησιμοποίησε διάφορες ουσίες γνωστές και ως ψυχοδραστικές ενώσεις προς ίδιον όφελος. Συγκεκριμένα υπάρχουν αναφορές χρήσης όπιου από τους Σουμέριους το 5000 π.Χ. Στην αρχαία Κίνα γινόταν χρήση κάνναβης (πηγή της μαριχουάνας) γύρω στο 3000 π.Χ. ενώ οι αρχαίοι άνθρωποι στην γεωγραφική περιοχή της σημερινής Ελβετίας κατανάλωναν σπόρους παπαρούνας η οποία αποτελεί την πηγή του όπιου το 2500 π.Χ. Επιπρόσθετα τα φύλλα κόκας (η πηγή της κοκαΐνης) είναι γνωστό ότι μασώνται εδώ και χιλιάδες χρόνια. Ακόμα ένα παράδειγμα χρήσης ψυχοδραστικών ουσιών αποτελούν οι αρχαίοι Έλληνες που έπιναν χυμό παπαρούνας από το 300 π.Χ. ενώ την ίδια περίπου περίοδο, φυλές της Νότιας Αμερικής χρησιμοποιούσαν ένα παραισθησιογόνο που ονομαζόταν cohoba, φτιαγμένο από κόκκους μιμόζας. Οι Κινέζοι και άλλοι Ασιάτες χρησιμοποιούσαν τακτικά όπιο μέχρι το 1000 μ.Χ. και οι ιθαγενείς της Αμερικής χρησιμοποιούσαν καπνό πριν ανακαλυφθούν από τον Κολόμβο το 1492. Η χρήση διαφόρων ναρκωτικών ήταν επίσης κοινή στις πολλές κοινωνίες που έχουν μελετήσει οι ανθρωπολόγοι. [7] [8]

Με την πάροδο των ετών, την εξέλιξη και την περαιτέρω ανάπτυξη της κοινωνίας αλλά και της ανθρωπότητας γενικότερα άρχισε να εξαπλώνεται σε διάφορα κοινωνικά στρώματα η άλλη όψη του νομίσματος της ανάπτυξης της επιστήμης καθώς οι εξαρτησιογόνες και ψυχοδραστικές ενώσεις ήρθαν για να μείνουν. Η χρήση τους όπως είναι γνωστή σήμερα άρχισε από τα τέλη της δεκαετίας του 1880 και τις αρχές του 1900 με το όπιο, την κοκαΐνη φτάνοντας σήμερα να υπάρχουν εκατοντάδες είδη προς ανίχνευση. [9]

## 1.2 Νέες Ψυχοδραστικές Ενώσεις – New Psychoactive Substances (NPS)

Οι νέες ψυχοδραστικές ουσίες ορίζονται 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 ενδέχεται να αποτελούν απειλή για τη δημόσια υγεία. Ο όρος «νέες» δεν αναφέρεται απαραίτητα σε ουσίες που ανακαλύφθηκαν πρόσφατα αλλά σε ουσίες που έγιναν πρόσφατα διαθέσιμες στην αγορά. [10] Οι περισσότερες NPS συντέθηκαν για πρώτη φορά πριν από δεκαετίες.

Τα NPS είναι γνωστά στην αγορά με όρους όπως «designer drugs», «legal highs», «herbal highs», «bath salts». Ο όρος «designer drugs» χρησιμοποιήθηκε αρχικά για τον προσδιορισμό συνθετικών ουσιών, αλλά πρόσφατα χρησιμοποιήθηκε για να συμπεριλάβει άλλες ψυχοδραστικές ουσίες που μιμούνται τις επιπτώσεις των παράνομων ναρκωτικών και παρασκευάζονται με την μερική τροποποίηση της χημικής δομής των ήδη γνωστών ουσιών, με σκοπό την παράκαμψη των ελέγχων ναρκωτικών. Οι προαναφερθείς όροι-ονόματα χρησιμοποιούνται για να αναφέρονται στα NPS που προσφέρονται ως «νόμιμη» εναλλακτική λύση στα ελεγχόμενα ναρκωτικά. Αυτές οι ουσίες συχνά αναγράφονται ως «δεν προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση». Οι NPS μπορούν να είναι φυσικά υλικά ή συνθετικές ουσίες, συχνά όμως σκόπιμα κατασκευάζονται συνθετικά για να παρακάμψουν τα υπάρχοντα διεθνή και εγχώρια μέτρα ελέγχου των ναρκωτικών. Στο παράνομο εμπόριο γίνεται προσπάθεια μερικά NPS να παρουσιαστούν ως ασφαλείς, αποδεκτές και νόμιμες εναλλακτικές λύσεις έναντι των παράνομων ναρκωτικών. Ωστόσο δεν υπάρχει βιβλιογραφία που να επιβεβαιώνει την ασφάλεια ή την νομιμότητα των ενώσεων αυτών και φυσικά δεν έχει καθοριστεί συνιστώμενη. Σε γενικά πλαίσια περιλαμβάνουν διάφορες ομάδες ουσιών, όπως οι συνθετικά κανναβινοειδή, συνθετικές καθιόνες, φαιραιθυλαμίνες, πιπεραζίνες, τρυπταμίνες και φυτικές ουσίες κ.ά. τα οποία θα μελετηθούν παρακάτω. [10]

Η χρήση ψυχοδραστικών ουσιών γίνεται εδώ και χιλιάδες χρόνια τόσο για ιατρικούς και ψυχικούς σκοπούς όσο και για χαλάρωση, ευχαρίστηση, για ενίσχυση της απόδοσης. Παρόλο που αρχικά οι ουσίες αυτές προέρχονταν από τη χρήση φυτών, όπως η παπαρούνα οπίου, η εφέδρα, η κόκα, το περγόλι και η κάνναβη με την ανάπτυξη της χημείας κυρίως κατά τον 19<sup>ο</sup> και 20<sup>ο</sup> αιώνα οι επιστήμονες μπόρεσαν να απομονώσουν τις δραστικές ουσίες και να προσδιορίσουν τις χημικές τους δομές, να

τις μελετήσουν και να τις τροποποιήσουν με αποτέλεσμα να είναι διαθέσιμες πολύ περισσότερες από τις αρχικές νέες ουσίες.

Για παράδειγμα το φυσικό ακατέργαστο όπιο από την παπαρούνα κατεργάστηκε δίνοντας μορφίνη, η δομή της οποίας αργότερα τροποποιήθηκε για να σχηματιστεί η διακετυλομορφίνη που είναι αρκετά πιο ισχυρό οπιοειδές γνωστό εμπορική ονομασία ηρωίνη. Μάλιστα υπήρξε η λανθασμένη θεώρηση ότι αποτελούσε «μη εθιστικό» υποκατάστατο της μορφίνης.

Σε κάθε περίπτωση ο σκοπός της κατεργασίας και δημιουργίας παραπλήσιων ενώσεων με τις αρχικές ήταν ανάπτυξη νέων και καλύτερων φαρμάκων. Ωστόσο ένας πολύ μικρός αριθμός κατάφερε αν κυκλοφορήσει στην αγορά με επιτυχία ενώ μερικά χρησιμοποιήθηκαν για ερευνητικούς σκοπούς ως φαρμακολογικά και κλινικά εργαλεία για την ανάπτυξη νέων τύπων ουσιών.

Λόγω της σχεδόν ανύπαρκτης νομοθεσίας την τότε εποχή σε συνδυασμό με την απουσία επαρκών γνώσεων για τις ψυχοδραστικές αυτές ουσίες πολλές άρχισαν να χρησιμοποιούνται πέραν του αρχικού σκοπού για τον οποίο προορίζονταν. Καθώς αυξήθηκαν οι ανησυχίες κατά τη διάρκεια του εικοστού αιώνα σχετικά με την υγεία και την κοινωνική για τις βλάβες που προκαλούνται από αυτά τα φάρμακα, τα μέτρα ελέγχου εισήχθησαν ολοένα και πιο αυστηρά σε μια προσπάθεια να μειωθεί η διαθεσιμότητά τους και να περιοριστούν οι ανεπιθύμητες ενέργειες που προκαλούσαν.

Με βάση αυτά τα δεδομένα έκαναν την εμφάνιση τους οι παράνομες αγορές και έγιναν προσπάθειες να παρακαμφθούν οι έλεγχοι των ουσιών από τις αρχές. Παραδείγματα αποτελούν η μορφίνη όπου ο έλεγχος για την διακίνηση της άρχισε να ισχύει από το 1920, έτσι οι φαρμακευτικές εταιρείες παράγγαγαν τεράστιες ποσότητες μη ελεγχόμενων εστέρων μορφίνης όπως βενζυλομορφίνη και ακετυλοπροπιονυλομορφίνη για να πουληθούν στην παράνομη αγορά οπιοειδών. Επίσης τη δεκαετία του 1960, μετά την ανακάλυψη και σύνθεση του THC (Τετραϋδροκανναβινόλη), κύριο ψυχοδραστικό συστατικό της κάνναβης, επιχειρήθηκε η παραγωγή «συνθετικής μαριχουάνας», ενώ από τα τέλη της δεκαετίας του 1970 και μετά άρχισε να πωλείται φαιντανίλ ως ηρωίνη ή «συνθετική ηρωίνη» σε ανυποψίαστους χρήστες.

Η ανθρώπινη περιέργεια έπαιξε μεγάλο ρόλο για την διάδοση τους καθώς μέχρι τη δεκαετία του 1960, οι περισσότερες ουσίες που εμφανίζονταν στην αγορά παράνομων ναρκωτικών ήταν φάρμακα, όμως έπειτα μεγάλος αριθμός ουσιών έκαναν την εμφάνιση τους καθώς η απουσία αρκετών πληροφοριών σε σχέση με τα αποτελέσματά χρήσης τους διέφυγε από τα ερευνητικά εργαστήρια, όμως τις βίωσαν ομάδες ανθρώπων που ήθελαν να πειραματιστούν μαζί τους. Ουσίες που εκπροσωπούν αυτή την κατηγορία είναι το LSD (Διαιθυλαμίδιο του λυσεργικού οξέος) και το MDMA ή «έκσταση» όπως είναι πιο γνωστό τα οποία διαδόθηκαν ευρέως, καθώς παράγονται σε παράνομα εργαστήρια και τελικά έγιναν απέκτησαν τεράστια ζήτηση στην αγορά ναρκωτικών. [11]



Συγκεντρωτικά οι κατηγορίες των ψυχοδραστικών ενώσεων είναι οι εξής:

- Οπιοειδή
- Συνθετικές Καθιόνες
- Φαινυλαιθυλαμίνες
- Πιπεραζίνες
- Τρυπταμίνες
- Αλκαλοειδή
- Βενζοδιαζεπίνες
- Αμφετανίνες
- Συνθετικά Κανναβινοειδή
- Κεταμίνες

### 1.3 Νομοθεσία

Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει επακριβώς νομοθεσία που να άπτεται στις νέες ψυχοδραστικές ουσίες ωστόσο η οδηγία της ΕΕ προβλέπει διαδικασία για την ένταξη νέων ψυχοδραστικών ουσιών στον ορισμό των «ναρκωτικών». Δίνεται στην Ευρωπαϊκή Επιτροπή η εξουσία να εκδίδει κατ' εξουσιοδότηση πράξεις για την προσθήκη νέων ψυχοδραστικών ουσιών στον κατάλογο του παραρτήματος. Αυτό θα αντικαταστήσει την τρέχουσα πρακτική καταχώρισης νέων ψυχοδραστικών ουσιών μέσω της εκτελεστικής απόφασης (ΕΕ) 2017/2170 του Συμβουλίου δυνάμει της απόφασης 2005/387/ΔΕΥ του Συμβουλίου.

Κατά την εξέταση της ενδεχόμενης προσθήκης μιας νέας ουσίας στον κατάλογο, η Επιτροπή πρέπει να λαμβάνει υπόψη τα εξής:

- εάν η έκταση ή τα πρότυπα χρήσης της, η διαθεσιμότητά της και η πιθανότητα διάδοσης της χρήσης της εντός της ΕΕ είναι σημαντικά, και
- εάν η βλάβη που προκαλείται στην υγεία από την κατανάλωσή της μπορεί να συνιστά απειλή για τη ζωή λόγω:
  - της οξείας ή χρόνιας τοξικότητάς της και
  - του κινδύνου κατάχρησης ή της πιθανότητας να προκληθεί εξάρτηση.

Επιπλέον, η Επιτροπή πρέπει να αξιολογεί εάν οι επιβλαβείς κοινωνικές συνέπειες που προκαλεί η νέα ψυχοδραστική ουσία για τα άτομα και την κοινωνία είναι σοβαρές και εάν οι εγκληματικές δραστηριότητες, συμπεριλαμβανομένου του οργανωμένου εγκλήματος, που σχετίζονται με τη νέα ψυχοδραστική ουσία είναι συστηματικές, περιλαμβάνουν σημαντικά παράνομα κέρδη ή συνεπάγονται σημαντικό οικονομικό κόστος. [12]

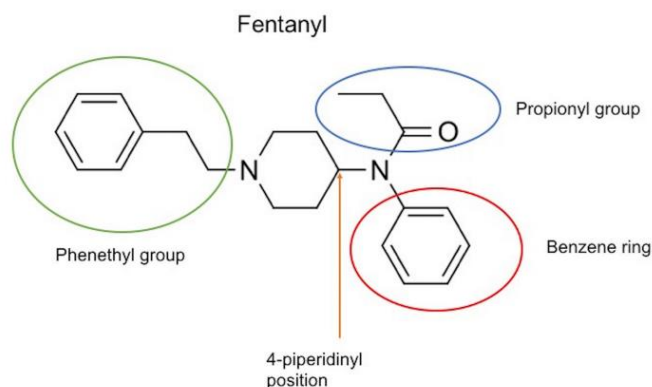
Η διαδικασία για την υπαγωγή νέων ψυχοδραστικών ουσιών στον ορισμό των «ναρκωτικών» πραγματοποιείται βάσει αξιολόγησης κινδύνου που διεξάγεται σύμφωνα με το άρθρο 5γ του Κανονισμού (ΕΕ) αρ. 1920/2006 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου<sup>22</sup> και σύμφωνα με τα κριτήρια που καθορίζει η παράγραφος 2 της Απόφασης - Πλαίσιο 2004/757/ΔΕΥ του Συμβουλίου (βλ. Κεφάλαιο

2 της Έκθεσης). Έτσι, τροποποιείται κάθε φορά το Παράρτημα της εν λόγω Απόφασης – Πλαίσιο, προκειμένου να προστεθούν νέες ΝΨΟ στο Παράρτημα και να οριστεί ότι οι ουσίες αυτές υπάρχουν στον ορισμό των «ναρκωτικών». [13]

#### 1.4 Συνθετικά Οπιοειδή

Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει ημισυνθετικά και συνθετικά φάρμακα, τα οποία παράγουν τα αποτελέσματά τους συνδυαζόμενα με υποδοχείς οπιοειδών και ανταγωνίζονται ανταγωνιστικά από τη ναλοξόνη. [14] Ο γενικός όρος «οπιοειδές» περιλαμβάνει ενώσεις που εξάγονται από τον παπαρουνόσπορο καθώς και ημισυνθετικές και συνθετικές ενώσεις με παρόμοιες ιδιότητες που μπορούν να αλληλοεπιδράσουν με τους υποδοχείς οπιοειδών στον εγκέφαλο. Τα οπιοειδή έχουν αναλγητική και ηρεμιστική δράση και χρησιμοποιούνται συνήθως για τη διαχείριση του πόνου. [15] Ετυμολογικά, η ονομασία τους προέρχεται από το φυτό όπιο από το οποίο εξήχθησαν ενώσεις όπως η μορφίνη και η κωδεΐνη, ή τα ημισυνθετικά παράγωγά του, όπως η ηρωΐνη. Είναι γνωστά ως τα πιο ισχυρά αναλγητικά της επιστήμης και είναι συχνά τα μόνα φάρμακα ικανά να ελέγξουν διάφορες εξαιρετικά επώδυνες καταστάσεις, συμπεριλαμβανομένου του πόνου που βιώνουν οι καρκινοπαθείς. [16] Τα οπιούχα είναι φυσικές ουσίες που προέρχονται από το *Papaver somniferum* (παπαρούνα οπίου), οι οποίες περιέχουν περισσότερους από 20 διαφορετικούς υποπαράλλαγες. Η μορφίνη και η κωδεΐνη, είναι δύο από τα πιο κοινά παυσίπονα που συνταγογραφούνται. Τα συνθετικά οπιοειδή δημιουργούνται προς σύνδεση με τους ίδιους υποδοχείς στον εγκέφαλο με τα οπιούχα και να προκαλούν παρόμοια αποτελέσματα όπως ευφορία, άγχος, αισθήματα χαλάρωσης και υπνηλία. [17]

Ο όρος οπιοειδές αποδίδεται σε οποιαδήποτε ουσία, που είναι ενδογενής είτε συνθετική και παράγει αποτελέσματα παρόμοια με τη μορφίνη. Επιπλέον, ο όρος νέα ή νέα συνθετικά οπιοειδή (NSO) έχει χρησιμοποιηθεί για να αναφέρεται σε ανάλογα φεντανύλης και μη-φεντανυλικές ενώσεις με άλλες χημικές δομές, που περιλαμβάνονται όλα στην ομάδα των οπιοειδών NPS. [18] Η φαιντανύλη (φαιντανύλ) είναι ένα ισχυρό συνθετικό οπιοειδές παραπλήσιο της μορφίνης, αλλά είναι 50 έως 100 φορές πιο ισχυρό και μαζί με την πεθιδίνη, μεθαδόνη, τραμαδόλη αποτελούν τους κύριους εκπροσώπους των συνθετικών οπιοειδών. Όπως η μορφίνη, είναι ένα φάρμακο που χρησιμοποιείται συνήθως για τη θεραπεία ασθενών με έντονο πόνο, ειδικά μετά από χειρουργική επέμβαση. [19] Στην αγορά υπάρχουν ποικίλα παράγωγα του φαιντανύλ (parent compound) τα οποία αποτελούν την νέα γενιά συνθετικών οπιοειδών και συγκαταλέγονται στα NPS.

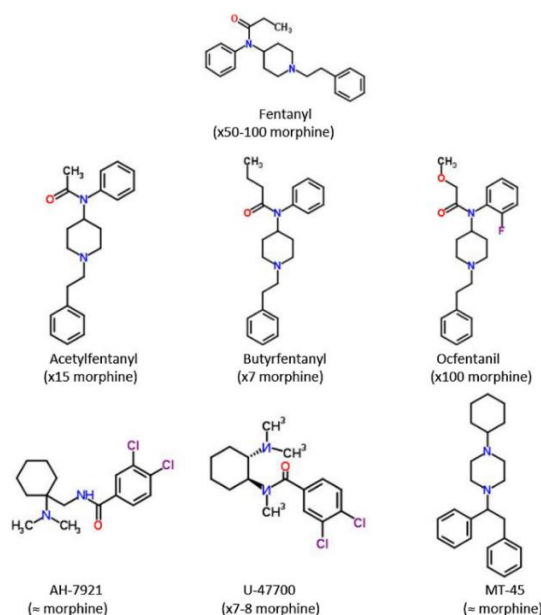


Εικόνα 1: Δομή φαιντανύλης (Postmortem toxicology of new synthetic opioids)

Τα παράγωγα της φαιντανύλης έχουν αναπτυχθεί με την προσθήκη διαφόρων υποκαταστατών στο μητρικό μόριο με σκοπό την τροποποίηση της δραστηριότητάς του. Τα προσφάτως σχηματισθέντα μόρια δημιουργούνται με τροποποίηση ή αντικατάσταση της αλυσίδας φενανυλοπροπιονυλίου ή αντικατάσταση του τμήματος αιθυλφαινυλίου. Περαιτέρω, οι υπάρχουσες παραλλαγές έχουν υποκατασταθεί με χλωρό, φθορο ή μεθοξυ υποκαταστάτες στον N-φαινυλικό δακτύλιο. Ορισμένα ανάλογα φεντανύλης χρησιμοποιούνται ιατρικά, αλλά τα περισσότερα στερούνται ιατρικής ένδειξης. [18]

#### 1.4.1 Δομή

Η χημική δομή των συνθετικών οπιοειδών χωρίζεται σε αυτές που βασίζονται σε δακτύλιο 4,5-εποξυμορφινάνης (π.χ. μορφίνη), οι φαινυλπiperιδίνες (π.χ. φεντανύλη) και οι διφαινυλεπτυλαμίνες (π.χ. μεθαδόνη). Τα συνθετικά οπιοειδή έχουν τροποποιημένη δομή καθώς αποτελούν παράγωγα καθεμιάς από των βασικών ενώσεων. [17]



Εικόνα 2: Χημικές δομές και δραστηριότητα του φεντανύλ και άλλων συνθετικών οπιοειδών (New synthetic opioids: Part of a new addiction landscape)

Ένα χημικό παράγωγο της φαιντανύλης αποτελεί η σουφεντανίλη (Sufentanil) που παράγεται με την προσθήκη μιας ομάδας μεθοξυμεθυλίου στον δακτύλιο πιπεριδίνης και αντικατάσταση του δακτυλίου φαινυλίου από θειοφαίνιο. Μέσω αυτών των δομικών αλλαγών η ουσία είναι 5-10 φορές πιο δραστική από την μητρική ένωση. Με την με την εισαγωγή μιας ομάδας μεθοξυμεθυλίου σε συνδυασμό με αντικατάσταση του δακτυλίου φαινυλίου του φαιναιθυλίου με έναν δακτύλιο τετραζολυλίου, σχηματίζεται η αλφεντανίλη (Alfentanil), η οποία παρόλο που δεν παρουσιάζει μεγαλύτερη δραστικότητα από την μητρική ένωση (φαιντανύλη), είναι κατά πολύ δραστικότερη της μορφίνης περίπου 30 φορές. Με αντικατάσταση του φαινυλικού δακτυλίου της ομάδας φαιναιθυλίου στην πρώτη θέση του δακτυλίου πιπεριδίνης με μία καρβομεθοξυ- ομάδα έχουμε σχηματισμό του ρεμιφεντανίλ (Remifentanil) που διαθέτει μια εξαιρετικά σύντομη διάρκεια δράσης λόγω του μεταβολισμού του απευθείας στο πλάσμα από μη ειδικές εστεράσες (ενεργή ομάδα ενζύμων που βρίσκονται στο αίμα και στους ιστούς σε όλο το σώμα).

Η καρφεντανίλη φέρει ένα πρόσθετο τμήμα καρβοξυλικού μεθυλεστέρα στη θέση 4 του δακτυλίου πιπεριδίνης και αποτελεί ένα από τα πιο ισχυρά οπιοειδή. Το Ocfentanil διαθέτει μια μεθοξυ- ομάδα αντί για μια ομάδα μεθυλίου και ένα άτομο φθορίου στην ορθο- θέση της ομάδας ανιλίνης αποκτώντας 2,5 φορές μεγαλύτερη δραστικότητα από τη φαιντανύλη και περίπου 200 φορές πιο ισχυρή από τη μορφίνη. Τέλος η ακετυλοφαιντανύλη (Acetylfentanyl) αποτελεί ανάλογο του ακετυλοαμιδίου της φεντανύλης με υποκατάσταση της μονάδα N-προπιονυλίου με ένα τμήμα ακετυλίου. Παρόλο που παρουσιάζει ορισμένες ομοιότητες με την ηρωίνη, όπως το χρώμα, τη συνοχή και τη φαρμακολογική δραστηριότητα και είναι περίπου 15 φορές πιο ισχυρό από τη μορφίνη, έχει 3 φορές χαμηλότερη δραστικότητα από τη φαιντανύλη. Οι δομές μερικών από τα πιο πάνω φαίνονται στην Εικόνα 1. [20]

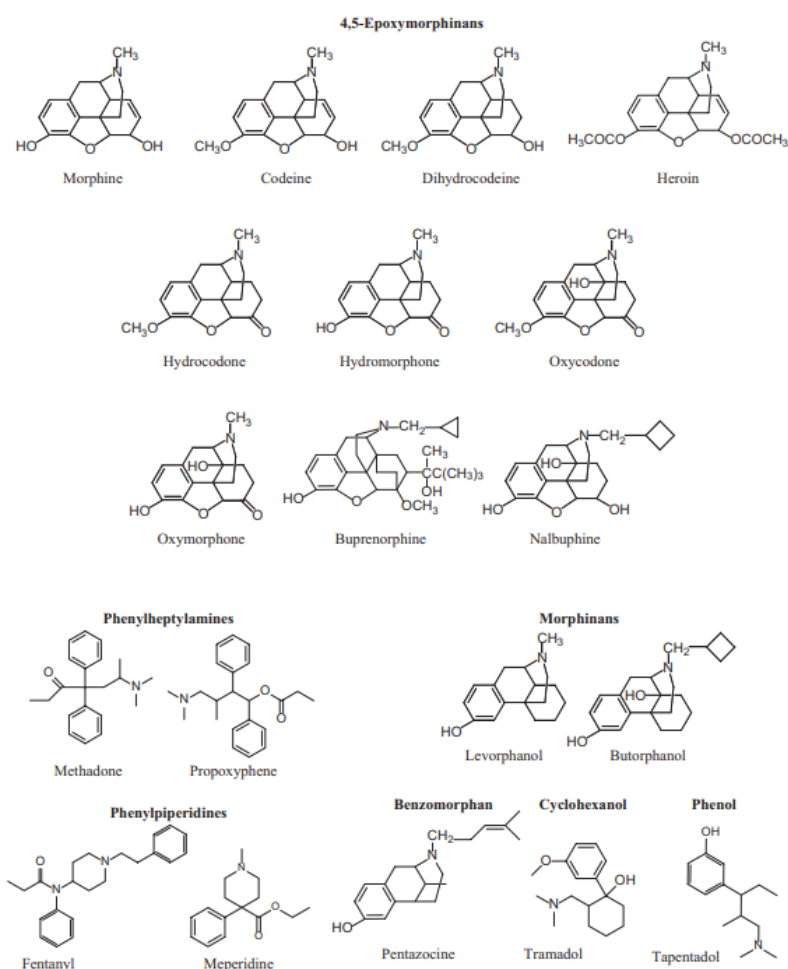
Μερικά νέα συνθετικά οπιοειδή χωρίς κάποια χημική συγγένεια με το φαιντανύλ είναι το MT-45 είναι δομικά διακριτό από άλλα οπιοειδή και παρουσιάζει εκλεκτικό αγωνιστή υποδοχέα  $\mu$ -οπιοειδών, με σημαντικά χαμηλότερες συγγένειες υποδοχέα δέλτα και κάπα-οπιοειδών και με παρόμοια ισχύ με τη μορφίνη. Το AH-7921 διαθέτει αναλγητική δράση παρόμοια με τη μορφίνη ως αγωνιστή υποδοχέα  $\mu$ -οπιοειδών που έχει βρεθεί ότι είναι αρκετές φορές πιο ισχυρός από την κωδεΐνη και τουλάχιστον τόσο ισχυρός όσο η μορφίνη. Τέλος το U-47700 είναι ένα δομικό ισομερές του AH-7921, ενώ αποκαλείται και ως «ψεύτικη μορφίνη» ή «U4» ή μερικές φορές αναφέρεται ως «ροζ». Παρουσιάζει 7,5 φορές πιο ισχυρή δράση από τη μορφίνη. [20]

#### 1.4.2 Κατηγορίες οπιοειδών

Τα οπιοειδή μπορούν να διαχωριστούν ανάλογα με τις χημικές τους ομάδες:

- Φαινανθρένες (π.χ.: μορφίνη, κωδεΐνη, υδρομορφόνη, λεβορφανόλη, οξυκωδόνη, υδροκωδόνη, οξυμορφόνη, βουπρενορφίνη, ναλβουφίνη και βουτορφανόλη)
- Βενζομορφάνες (π.χ.: αλαζοκίνη, 8-CAC, Fluorophen)
- Φαινυλπιπεριδίνες (π.χ.: φεντανύλ, αλφεντανίλ, σουφεντανίλη, μεπεριδίνη)
- Διφαινυλεπτάνια (π.χ.: προποξυφαΐνη, μεθαδόνη)

Ταυτόχρονα όμως μπορούν επίσης να ταξινομηθούν ανάλογα με την επίδρασή τους στους υποδοχείς οπιοειδών του ανθρώπινου οργανισμού. Επομένως μπορούν να θεωρηθούν ως αγωνιστές, μερικοί αγωνιστές και ανταγωνιστές. Οι αγωνιστές αλληλεπιδρούν με έναν υποδοχέα για να παράγουν μια μέγιστη απόκριση από αυτόν τον υποδοχέα (ένα παράδειγμα είναι η αναλγησία μετά τη χορήγηση μορφίνης). Αντίθετα, οι ανταγωνιστές συνδέονται με τους υποδοχείς αλλά δεν παράγουν λειτουργική απόκριση, ενώ ταυτόχρονα εμποδίζουν έναν αγωνιστή να συνδεθεί με αυτόν τον υποδοχέα (ναλοξόνη). Οι μερικοί αγωνιστές συνδέονται με τους υποδοχείς αλλά προκαλούν μόνο μερική λειτουργική απόκριση ανεξάρτητα από την ποσότητα του φαρμάκου που χορηγείται (βουπρενορφίνη). [21]



Εικόνα 3: Δομές οπιοειδών αναλγητικών (Πηγή: Principles of Forensic Toxicology)

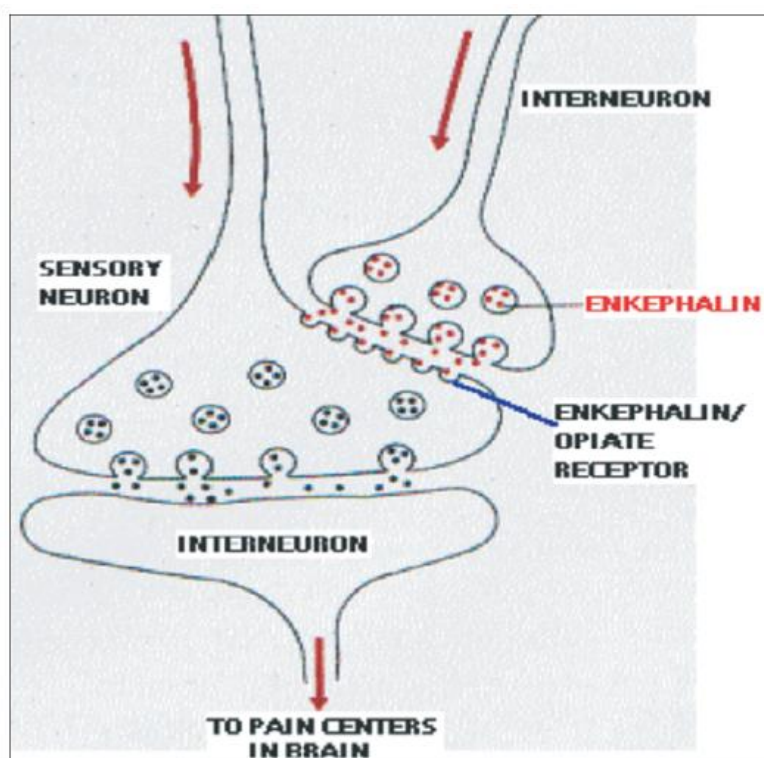
### 1.4.3 Μηχανισμός δράσης

Τα οπιοειδή επιδρούν φαρμακολογικά στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) λόγω της εκλεκτικής δέσμευσης των υποδοχέων σε διάφορες θέσεις. Κατά την περίοδο δράσης τους παρατηρείται διέγερση των ανθρώπινων συναισθημάτων καθώς παράγουν αναλγητικό αποτέλεσμα εμποδίζοντας τη μετάδοση επώδυνων ερεθισμάτων. Οι ειδικοί υποδοχείς στις νευρικές απολήξεις των νευρώνων εμποδίζονται από τα οπιοειδή με άμεσο αποτέλεσμα την παρεμπόδιση απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστών, διακόπτοντας έτσι τον πόνο, προκαλώντας έτσι αίσθημα ευφορίας. [22] Αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς οπιοειδών mu, δέλτα ή κάπα, οι οποίοι συνδέονται

με τις πρωτεΐνες G1. Κλείνουν κανάλια ασβεστίου που λειτουργούν με τάση τύπου N και ανοίγουν κανάλια καλίου που εξαρτώνται από το ασβέστιο (από το εσωτερικό). Αυτό οδηγεί σε υπερπόλωση και μείωση της νευρωνικής διεγερσιμότητας, ενώ μειώνεται η ενδοκυτταρική cAMP η οποία ρυθμίζει την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών που προκαλούν πόνο. [23]

Η ενεργοποίηση των κλασικών υποδοχέων οπιοειδών οδηγεί σε αναλγησία μέσω της καταστολής των συναισθηματικών και αντανακλαστικών συστατικών του πόνου. Καθώς υπάρχουν διάφορα είδη υποδοχέων, η ενεργοποίηση των τριών κλασικών υποδοχέων οπιοειδών οδηγεί σε διαφορετικά φυσιολογικά αποτελέσματα. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα MOP μπορεί να προκαλέσει αναπνευστική καταστολή, καταστολή, ευφορία, ναυτία και έμετο, κατακράτηση ούρων, σπασμό των χοληφόρων, δυσκοιλιότητα και αναλγησία εικονικού φαρμάκου, ενώ η ενεργοποίηση του υποδοχέα DOP σχετίζεται με αναπνευστική καταστολή, σπασμούς και αλλαγές στη διάθεση π.χ. αίσθημα άγχους και κατάθλιψης. [24]

Κατά την πρόσληψη οπιοειδών γίνεται δέσμευση στην ίδια θέση υποδοχέα με τα ενδογενή οπιοειδή (όπως εγκεφαλίνες, ενδορφίνες) και έτσι η απελευθέρωση διεγερτικών νευροδιαβιβαστών όπως η ακετυλοχολίνη και το γλουταμικό μειώνεται, μειώνοντας έτσι τη διεγερτική είσοδο των κυττάρων λήψης. Τα οπιοειδή δρουν δεσμεύοντας μη κατελιημένους υποδοχείς εγκεφαλίνης, ενισχύοντας έτσι τα αναλγητικά αποτελέσματα του συστήματος, όπως φαίνεται πιο κάτω στην εικόνα 3. [25]



Εικόνα 4: Μηχανισμός δράσης οπιοειδών (Πηγή: Mechanism of Action of Opioids and Clinical Effects)

#### 1.4.5 Παρενέργειες χρήσης

Οι οπιοειδείς ενώσεις είναι εξαιρετικά εξαρτησιογόνες οδηγώντας τους χρήστες σε μια σειρά από παρενέργειες τόσο κατά τη διάρκεια όσο και σε περίπτωση προσπάθειας απεξάρτησης. Ένα πρόβλημα το οποίο μπορεί να προκύψει που σχετίζεται με την χρήση οπιοειδών είναι ο κίνδυνος αναπνευστικής ανεπάρκειας, που είναι η κύρια αιτία θανάτου σε περιπτώσεις μέθης. Λόγω της ανοχής που δημιουργείται με την συνεχή έκθεση στις ουσίες αυτές σταδιακά απαιτείται μεγαλύτερη δόση για να επιτευχθεί το ίδιο αποτέλεσμα. [26] Άλλες επιδράσεις των συνθετικών οπιοειδών μπορεί να είναι το αίσθημα χαλάρωσης, ευφορίας, ανακούφισης από τον πόνο, καταστολής, σύγχυσης, υπνηλίας, ζάλης, ναυτίας, εμετός, κατακράτηση ούρων, στένωση της κόρης οφθαλμού και αναπνευστική καταστολή. Σε περιπτώσεις χρόνιας υπερδοσολογίας παρουσιάζονται συμπτώματα όπως λήθαργος, αλλαγές στο μέγεθος της κόρης, κρύο και μαλακό δέρμα, κυάνωση, κώμα και αναπνευστική ανεπάρκεια που οδηγεί σε θάνατο, υπεραλγησία (επαγόμενη από οπιοειδή μη φυσιολογική ευαισθησία στον πόνο, που ονομάζεται επίσης παράδοξη υπεραλγησία), γαστρεντερικές διαταραχές, ανοσολογική δυσλειτουργία, ορμονικές διαταραχές, μυϊκή ακαμψία και μυόκλωνος. [27] Η παρουσία τριάδας συμπτωμάτων όπως το κώμα, οι κόρες των ματιών και η αναπνευστική καταστολή υποδηλώνουν έντονη δηλητηρίαση από οπιοειδή. Σε περίπτωση προσπάθειας αποχής και απεξάρτησης από τα οπιοειδή παρουσιάζονται συμπτώματα τα οποία παρουσιάζονται πιο κάτω στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1: Συμπτώματα στερητικού συνδρόμου συναρτήσει χρόνου

8-12 ώρες	Δακρύρροια
	Χασμουρητό-Λήθαργος
	Ρινόρροια
	Εφίδρωση
12-14 ώρες	Ευερεθιστότητα
	Piloerection («σάρκα χήνας»)
	Ανήσυχος ύπνος
	Αδυναμία
	Αίσθημα τρόμου
	Ανορεξία
	Μυδρίαση
	Μυϊκοί σπασμοί
48–72 ώρες (peak του συνδρόμου)	Αυξημένη ευερεθιστότητα
	Αυξημένος καρδιακός ρυθμός
	Αυπνία
	Υπέρταση
	Έντονη ανορεξία
	Αίσθημα παγωμάρας-ζέστης
	Φτάρνισμα
	Εφίδρωση και φουσκώματα
	Ναυτία και έμετος
	Piloerection
	Υπερθερμία
	Υπέρπνοια

	Κουλιακές κράμπες
	Μυϊκοί πόνοι
7-10 μέρες	Τα συμπτώματα επιμένουν

[26]

### 1.5 Συνθετικές Καθινόνες

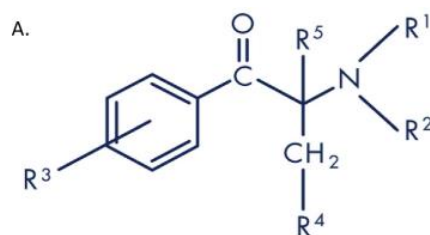
Η καθινόνη, αποτελεί ένα φυσικό διεγερτικό που παράγεται από το φυτό «khat», έχει χρησιμοποιηθεί για μακρά ιστορία στην Ανατολική Αφρική και την Αραβική Χερσόνησο, μοιάζει με αμφεταμίνη όσον αφορά τη χημική δομή και τις φυσικές επιδράσεις, και ελέγχεται από τον κατάλογο του UNODC στην Ενιαία Σύμβαση του 1971 για τις Ψυχοτρόπες Ουσίες. Συντέθηκαν για πρώτη φορά τη δεκαετία του 1920 ως πιθανά φαρμακευτικά προϊόντα. Η πρώτη συνθετική καθινόνη - μεθκαθινόνη - παρήχθη το 1928, ακολουθούμενη από τη μεφεδρόνη ένα χρόνο αργότερα. [28] [29] Μερικές δεκαετίες πιο μετά και συγκεκριμένα το 1967 συντέθηκε η πυροβαλερόνη που προορίζονταν για φάρμακο κατά της παχυσαρκίας και της χρόνιας κόπωσης που αργότερα αποσύρθηκαν από την αγορά. Το 1996 την εμφάνιση της έκανε η μεθυλόνη ως πιθανό αντιπαρκινσονικό και αντικαταθλιπτικό φάρμακο. Ωστόσο μετά το 2000 άρχισαν να κάνουν την εμφάνιση τους στο dark web, στο Ευρωπαϊκή και Ασιατική αγορά συνθετικές καθινόνες και ως αποτέλεσμα αυξήθηκε κατακόρυφα η χρήση τους. [30]

Μερικές άλλες από τις καλύτερα αναγνωρισμένες συνθετικές καθινόνες εκτός από την μεφεδρόνη είναι η μεθυλενοδιοξυπυροβαλερόνη (MDPV) και η α-πυρρολιδινοβαλεροφαινόνη (α-PVP, "flakka"). Πέραν από τις προαναφερθείσες ουσίες υπάρχει ένα ευρύ φάσμα περίπου 100-150 συνθετικών καθινονών που εντοπίστηκαν στην παράνομη αγορά. Στην αγορά για τις καθινόνες χρησιμοποιείται ο όρος «bath salts». [31] Οι συνθετικές καθινόνες χρησιμοποιούνται ευρέως λόγω των διεγερτικών και παραισθησιογόνων επιδράσεων τους, αντικαθιστώντας την 3,4 μεθυλενοδιοξυμεθαμφεταμίνη (MDMA), την κοκαΐνη και τις αμφεταμίνες, που είναι πολύ πιο ακριβές στην αγορά και παρουσιάζουν πολύ μεγαλύτερη δραστηριότητα από τα φάρμακα που προορίζονται να μιμηθούν, αυξάνοντας τον κίνδυνο υπερβολικής δόσης και θανάτου.

#### 1.5.1 Δομή

Η χημική δομή των συνθετικών καθινονών είναι παρόμοια με την αμφεταμίνη, τη μεθαμφεταμίνη και την έκσταση. Λόγω αυτού είναι κοινώς ονομαζόμενες ως β-κετοαμφεταμίνες. Όλες οι συνθετικές καθινόνες βασίζονται στη βασική δομή της φυσικής καθινόνης (εικόνα 5) και αποτελούν παράγωγα φαινυλαλκυλαμινών, που μοιάζουν δομικά με μόριο αμφεταμίνης με καρβονυλικό δεσμό στη θέση β της αμινοαλκυλικής αλυσίδας υποκατεστημένο στον αρωματικό δακτύλιο. [28]





Εικόνα 5: Βασική χημική δομή καθινόνης (Πηγή: Synthetic cathinones – From natural plant stimulant to new drug of abuse)

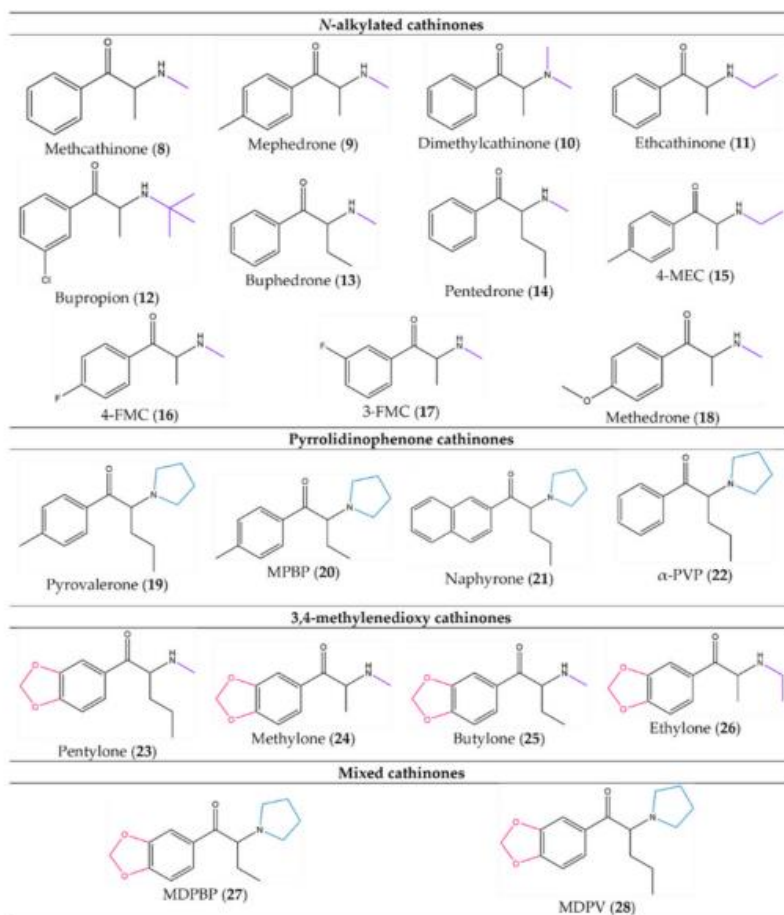
Οι συνθετικές καθινόνες μπορούν να ταξινομηθούν ως φαινυλαιθυλαμίνες που προκαλούν ψυχοδιεγερτικά αποτελέσματα ενώ τα παράγωγα καθινόνης μπορούν να χαρακτηριστούν ως β-κετο φαινυλαιθυλαμίνες. Η αρχική δομή της καθινόνης αποτελείται από έναν δακτύλιο φαινυλίου και μια συνδεδεμένη αμινοαλκυλική αλυσίδα με μια καρβονυλ- ομάδα στη θέση βήτα. Τα παράγωγα καθινόνης συντίθενται με υποκατάσταση σε «θέσεις» της καθινόνης όπως στον αρωματικό δακτύλιο, την πλευρική αλυσίδα αλκυλίου και το άτομο αζώτου στην αμινομάδα, όπου προστίθενται αλκυλικές αλυσίδες, αλογόνα κλπ. [32]

Μερικά παραδείγματα ουσιών που ανήκουν στην κατηγορία των νέων συνθετικών καθινονών αποτελούν η 2-Me-α-PVP (ο-πυροβαλερόνη), της οποίας η χρήση αναπτύχθηκε πρόσφατα παρόλο που έχει συντεθεί από το 2006. Διαφέρει από την πυροβαλερόνη στη θέση της μεθυλικής ομάδας στον φαινυλικό δακτύλιο (4-μεθυλ έναντι 2-μεθυλ). Επίσης η α-PCYP η οποία πριν βγει στην αγορά, δοκιμάστηκε το 2015 για τις φαρμακολογικές της επιδράσεις σε συναπτοσώματα εγκεφάλου αρουραίου. [32]

### 1.5.2 Κατηγορίες συνθετικών καθινονών

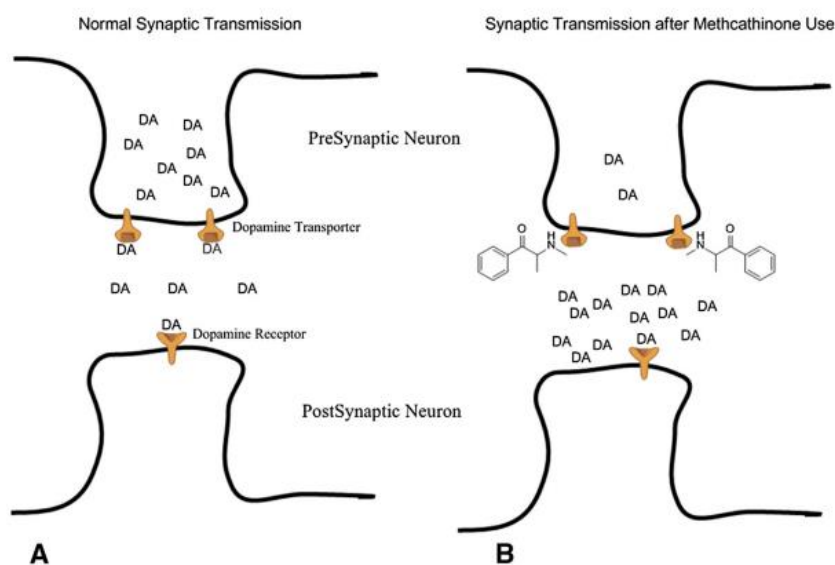
Οι συνθετικές καθινόνες μπορούν να διαχωριστούν σε τέσσερις ομάδες με βάση το πρότυπο υποκατάστασης:

- N-αλκυλιωμένες καθινόνες: Περιλαμβάνουν μεθκαθινόνη, μεφεδρόνη, διμεθυλοκαθινόνη και αιθαθινόνη, είναι N-υποκατεστημένες ενώσεις με μη υποκατεστημένο ή υποκατεστημένο φαινυλικό δακτύλιο. Εδώ ανήκουν οι περισσότερες από τις πρώτες συνθετικές καθινόνες αποτελούν μέρος αυτής της ομάδας.
- Παράγωγα πυρρολιδινοφαινόνης: Περιέχουν στη δομή τους έναν υποκατεστημένο ή μη υποκατεστημένο δακτύλιο φαινυλίου και έναν δακτύλιο πυρρολιδινυλίου στην πλευρική αλυσίδα. (π.χ.: πυροβαλερόνη, MPBP, ναφυρόνη, α-PVP)
- 3,4-μεθυλενοδιοξυ καθινόνες: Σ' αυτή την κατηγορία ανήκουν η πεντυλόνη, η μεθυλόνη, η βουτυλόνη και η αιθυλόνη. Χαρακτηρίζονται από έναν 1,3-βενζοδιοξολ-5-υλ δακτύλιο και μια ευθεία πλευρική αλυσίδα. Επιπλέον, παρουσιάζουν παρόμοια δομή και φαρμακολογικές ιδιότητες με το MDMA.
- Μικτές καθινόνες ή 3,4 μεθυλενοδιοξυπυρρολιδινοφαινόνης: Παρουσιάζουν στη δομή τους έναν συνδυασμό των τμημάτων των δύο τελευταίων ομάδων: έναν μεθυλενοδιοξυλικό δακτύλιο και έναν πλευρικό δακτύλιο πυρρολιδινυλίου. (π.χ.: MDPBP, MDPV) [33]



Εικόνα 6: Παραδείγματα συνθετικών καθινονών από κάθε ομάδα (Πηγή: Synthetic Cathinones: Recent Developments, Enantioselectivity Studies and Enantioseparation Methods)

### 1.5.3 Μηχανισμός δράσης



Εικόνα 7: Μηχανισμός δράσης συνθετικών καθινονών (Πηγή: SYNTHETIC CATHINONES («BATH SALTS»))

Οι συνθετικές καθιόνες φαίνεται να εμφανίζουν τις ψυχοδιεγερτικές τους ιδιότητες λόγω αλληλεπιδράσεων με μεμβρανικούς μεταφορείς μονοαμινών, όπως μεταφορείς νοραδρεναλίνης (NAT), μεταφορείς σεροτονίνης (SERT) και μεταφορείς ντοπαμίνης (DAT). [33] Στην εικόνα 7 φαίνεται ο τρόπος δράσης των συνθετικών καθιόνων στους νευρώνες σε σύγκριση με την κανονική τους λειτουργία. Πιο συγκεκριμένα σε κανονικές συνθήκες, η ντοπαμίνη (DA) απελευθερώνεται από τον προσυναπτικό νευρώνα στη συναπτική σχισμή, όπου η DA μπορεί να συνδεθεί με μετασυναπτικούς υποδοχείς DA στον πολυσυναπτικό νευρώνα για να διαδώσει την ουδετεροδιαβίβαση. Ταυτόχρονα μπορεί επίσης να συνδεθεί στον μεταφορέα DA που βρίσκεται στον προσυναπτικό νευρώνα και να μεταφερθεί πίσω στον προσυναπτικό νευρώνα για επανασυσκευασία και απελευθέρωση. Εν αντιθέσει στο β τμήμα της εικόνας φαίνεται ότι υπό συνθήκες χρήσης μεθ-καθιόνης, υπάρχει αυξημένη συγκέντρωση DA στη συναπτική σχισμή που οδηγεί σε αυξημένη ενεργοποίηση των μετασυναπτικών υποδοχέων ντοπαμίνης. [34] Ο/Οι μηχανισμός/οι δράσης μερικών συνθετικών καθιόνων έχει/έχουν διερευνηθεί λεπτομερώς, ωστόσο ακόμα ένα ευρύ φάσμα μηχανισμών είναι ακόμη υπό διερεύνηση. [31]

#### 1.5.4 Παρενέργειες χρήσης

Όπως είναι φυσιολογικό τόσο η βραχεία όσο και η χρόνια χρήση καθιόνων προκαλούν ποικίλες επιδράσεις στην συμπεριφορά, τον ψυχισμό και την παθολογία του χρήστη. Οι βραχυπρόθεσμες ανεπιθύμητες ενέργειες που αναφέρθηκαν μετά τη χρήση μεφεδρόνης (διεγερτικό) μπορεί να περιλαμβάνουν απώλεια όρεξης, θολή όραση, αίσθημα άγχους και κατάθλιψη ενώ μετά τη χρήση προκαλείται σύγχυση, παραισθήσεις, βραχυπρόθεσμη ψύχωση και μανία. Ταυτόχρονα έχουν καταγραφεί κλινικά συμπτώματα παράνοια και επιθετικότητα, αυταπάτες, παράνοια, ταχυκαρδία, κοιλιακό άλγος, υπερθερμία, ζάλη, τρόμο, ραβδομύλυση (διάσπαση των σκελετικών μυών). Σε περιπτώσεις δηλητηρίασης από συνθετικές καθιόνες έχουν καταγραφεί σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες, όπως οξεία ηπατική ανεπάρκεια, οξεία νεφρική βλάβη, υψηλή αρτηριακή πίεση και αίσθημα τρόμου. Ορισμένοι χρήστες συνθετικών καθιόνων έχουν επίσης αναφέρει την ανάπτυξη συμπτωμάτων ανοχής, εξάρτησης ή στέρησης με παρατεταμένη χρήση [35]

Αν λάβει δε κανείς υπόψη ότι οι χρήστες κατά την ώρα της πρόσληψης καταναλώνουν συχνά ένα «κοκτέιλ» ναρκωτικών τότε μπορεί μερικές φορές να μην γνωρίζουν ποια φάρμακα έχουν πάρει, κάνοντας έτσι τον συσχετισμό επιδράσεων απευθείας με τις συνθετικές καθιόνες αρκετά πιο δύσκολο. Σε περίπτωση συχνής πρόσληψης υψηλών δόσεων συνθετικών καθιόνων μπορεί να προκληθεί ανοχή, εξάρτηση και σύνδρομο στέρησης μετά από απότομη διακοπή, επομένως παρουσιάζονται στερητικά συμπτώματα όπως διαταραχές ύπνου, κόπωση, κατάθλιψη, άγχος και λαχτάρα [30], μυοκαρδίτιδα και καρδιακή ανακοπή, νευρολογικά συμπτώματα, όπως αϋπνία, πονοκεφάλους, τρίξιμο των δοντιών, επιληπτικές κρίσεις, διαταραχές της όρασης και άλλα, όπως ρινορραγίες, έλκη των βλεννογόνων της μύτης και του λαιμού. Άλλες πιθανές επιδράσεις περιλαμβάνουν διάχυτη ενδαγγειακή πήξη (DIC) και ανεπάρκεια πολλαπλών οργάνων που οδηγεί σε θάνατο. Στην περίπτωση της μεφεδρόνης και του MDPV, έχουν αναφερθεί θρομβοεμβολικές επιπλοκές και τοπικές λοιμώξεις (συμπεριλαμβανομένης της νεκρωτικής απονευρωσίτιδας). [28]

## 1.6 Συνθετικά κανναβινοειδή

Η κάνναβη (*cannabis sativa*) και τα εκχυλίσματα κάνναβης χρησιμοποιούνται εδώ και αιώνες στην επιστήμη της ιατρικής. Κατά τη διάρκεια ερευνών τη δεκαετία του 70', βρέθηκε ότι η Δ-(9)-τετραϋδροκανναβινόλη (THC) είναι το κύριο δραστικό συστατικό της κάνναβης, υπεύθυνο για τις περισσότερες από τις θεραπευτικές αλλά και ψυχοτρόπες δράσεις της. [36] Η κάνναβη (μαριχουάνα), το χασίς, το *sinsemilla*, το κερί και τα βρώσιμα ψυχοδραστικά προϊόντα του φυτού *Cannabis sativa* λαμβάνονται μέσω κατάποσης ή καπνίσματος με σκοπό την πρόκληση αισθήματος ευφορίας ωστόσο προκαλεί εξάρτηση και χαρακτηρίζεται από αναστρέψιμη ψυχολογική έκπτωση.

Η κάνναβη είναι επίσης το ναρκωτικό με τη συχνότερη κατάχρηση στον κόσμο, το ναρκωτικό με τον υψηλότερο επιπολασμό σε περιπτώσεις οδήγησης υπό την επήρεια ναρκωτικών και ενδείξεις θετικών αποτελεσμάτων σε νάρκοτεστ στο χώρο εργασίας από οποιοδήποτε άλλο ναρκωτικό κατάχρησης. [22]

Το έναυσμα για την έναρξη σύνθεσης συνθετικών κανναβινοειδών (SCB) έδωσε η ανακάλυψη της δομής της D-9τετραϋδροκανναβινόλης (THC) το 1960 και έπειτα. Μάλιστα οι ενώσεις αυτές χρησιμοποιήθηκαν για τη διερεύνηση πιθανών θεραπευτικών επιδράσεων και για τη μελέτη της φαρμακολογίας των υποδοχέων κανναβινοειδών. Ωστόσο, στις αρχές της δεκαετίας του 2000, οι παραλλαγές των SCB (synthetic cannabinoids) άρχισαν να παράγονται εμπορικά. Στην αγορά αυτά τα φάρμακα κυκλοφορούν με εμπορικές ονομασίες, όπως «Spice», «K2», «Herbal Incense», «Cloud 9», «Mojo», ενώ στις συσκευασίες τους αναγράφεται η ένδειξη «δεν προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση». Όσον αφορά την λειτουργικότητα τα συνθετικά κανναβινοειδή συνδέονται με τους ίδιους υποδοχείς με τα κανναβινοειδή που βρίσκονται στα φυτά κάνναβης, συμπεριλαμβανομένων των THC, CBD και πολλών άλλων. [37] [38]

Ιστορικά, τα πρώτα συνθετικά κανναβινοειδή που εμφανίστηκαν στην αγορά ήταν οι κυκλοεξυλοφαινόλες (π.χ. CP-47,497-C8) και οι ναφθοϋλινδόλες (π.χ. JWH-018), ακολουθούμενες από την ευρύτερη ομάδα αμινοαλκυλινδολίων, συμπεριλαμβανομένων αλογονωμένων παραγώγων (π.χ. AM-2201, 5FUR-144 (XLR-11), UR-144 και AM-2201). Αργότερα εισήχθησαν παράγωγα ινδόλης με ομάδες που μοιάζουν με αμινοξέα συνδεδεμένα μέσω συνδέτη ακαρβοξαμιδίου (π.χ. MDMB-CHMICA και 5F-MDMBPICA) και τα ανάλογα ινδαζόλης τους (π.χ. 5F-AKB48, AB-CHMINACA, AB-PINACA). Οι πρόσφατες εξελίξεις περιλαμβάνουν την εισαγωγή παραγώγων του *cumyl*, συχνά συνδεδεμένα με Ινδό λες ή ινδαζόλες με συνδεδετικό καρβοξαμίδιο (π.χ. CUMYL-5F-PINACA/5F-CUMYL-PINACA), 7-αζαϊνδόλες (π.χ. 5F-AB-P7AICA), καρβαζόλια (π.χ. EG-018 και MDMB-CHMCZCA), γ-καρβολινόνες (π.χ. CUMYL-PeGACLONE, 5F-Cumyl-PeGaClone) και ενώσεις με τροποποιημένες πλευρικές αλυσίδες (π.χ. CUMYL-CBMINACA ή Cumyl-NB-MeGaClone) [37]

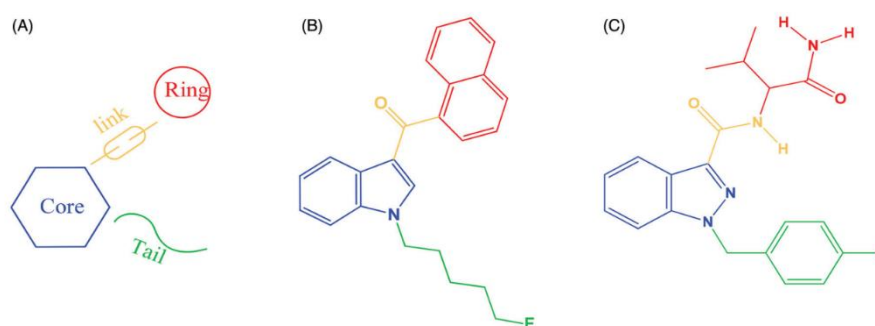
### 1.6.1 Δομή

Η κατηγορία των συνθετικών κανναβινοειδών απαρτίζεται κυρίως από λιπόφιλες και μη πολικές ενώσεις, ενώ δομικά αποτελούνται ως επί το πλείστον από περίπου 22 έως 26 άτομα άνθρακα, γεγονός που τα καθιστά πτητικά κατά το κάπνισμα,

ωστόσο από χημικής απόψεως, πολλά από αυτά δεν έχουν χημική δομική συγγένεια με τα «κλασικά» κανναβινοειδή όπως την Δ-9-τετραϋδροκανναβινόλη. Το Ευρωπαϊκό Κέντρο Παρακολούθησης Ναρκωτικών και Τοξικομανίας εξήγαγε το συμπέρασμα ότι η γενική δομή τους αποτελείται από τέσσερα βασικά δομικά στοιχεία

- Τον πυρήνα της ένωσης και τους υποκαταστάτες
- Τον σύνδεσμος
- Τον δακτύλιος και τους υποκαταστάτες
- Την ουρά (που υποδηλώνει μεταβαλλόμενες θέσεις)

Βάσει της μεθόδου εκχώρησης κωδικού ονόματος σε κάθε συστατικό γίνεται η αναγνώριση της χημικής δομής του κανναβινοειδούς χωρίς την ύπαρξη μακροσκελούς χημικού ονόματος. [39] Πιο κάτω στην εικόνα 8 φαίνεται η προαναφερθείσα δομή.



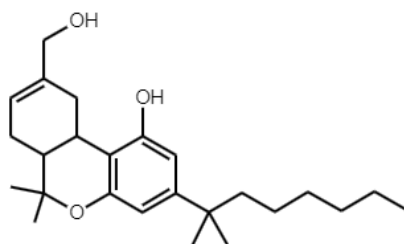
Εικόνα 8: Προτεινόμενη δομή κανναβινοειδών (Πηγή: The synthetic cannabinoids phenomenon: from structure to toxicological properties)

### 1.6.2 Κατηγορίες

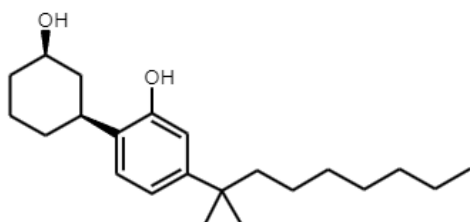
Τα συνθετικά κανναβινοειδή διακρίνονται στις ακόλουθες κατηγορίες:

- Κλασικά κανναβινοειδή: THC, άλλα συστατικά της κάνναβης. και τα δομικά συνθετικά ανάλογα τους (π.χ.: HU-210, AM-411, AM-906 και O-1184)
- Μη κλασικά κανναβινοειδή: Περιλαμβάνουν τις κυκλοεξυλοφαινόλες ή 3-αρυλοκυκλοεξανόλες (π.χ.: CP-47,497-C8, CP-55.940, CP-55.244)
- Υβριδικά κανναβινοειδή: Περιλαμβάνουν συνδυασμούς δομικών χαρακτηριστικών κλασικών και μη κλασικών κανναβινοειδών (π.χ.: AM-4030)
- Αμινοαλκυλινδόλες: Διαχωρίζονται περαιτέρω σε
  - i) Ναφθοϋλινδόλες (π.χ. JWH-015, JWH-018, JWH-073, JWH081, JWH-122, JWH-200, JWH-210, JWH-398)
  - ii) Φαινυλακετυλινδόλες (π.χ. JWH-250, JWH-251)
  - iii) Βενζοϋλινδόλες (π.χ. AM-2233, AM-694, RCS-4, pravadoline).
  - iv) Ναφθυλμεθυλινδόλες (π.χ. JWH-184)
  - v) Κυκλοπροποϋλινδόλες (π.χ. UR-144, XLR-11)
  - vi) Αδαμαντοϊνδόλες (π.χ. AB-001, AM-1248)
  - vii) Ινδολο καρβοξαμίδια (π.χ. APICA, STS-135)
- Εικοσανοειδή: Περιλαμβάνουν ενδοκανναβινοειδή όπως η ανανδαμίδη και τα συνθετικά τους ανάλογα (π.χ.: μεθανανδαμίδη)

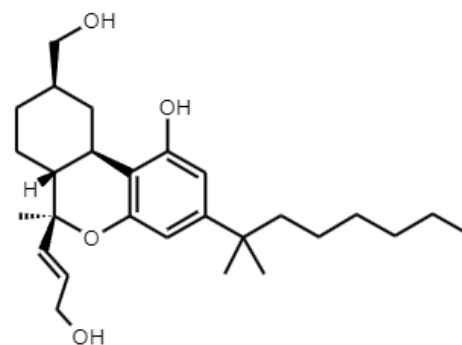
- Άλλες ενώσεις: Περιλαμβάνουν διαρυλοπυραζόλες (εκλεκτικός ανταγωνιστής CB1 Rimonabant), ναφθυλοπυρρόλες (JWH-307), ναφθυλομεθυλινδένια ή παράγωγα ναφθαλινο-1-υλο-(4-πεντυλοξυναφθαλεν-1-υλο)μεθανόνης (CRA-13). [40]



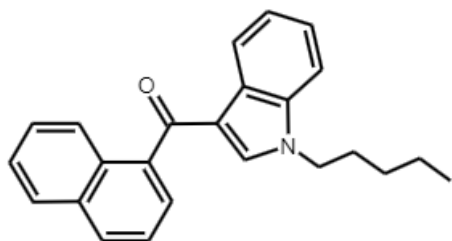
HU-210



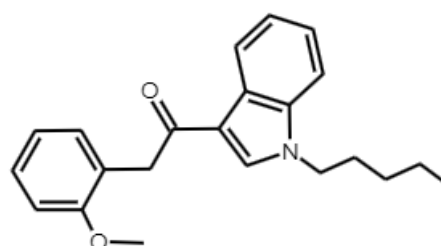
CP-47,497-C8



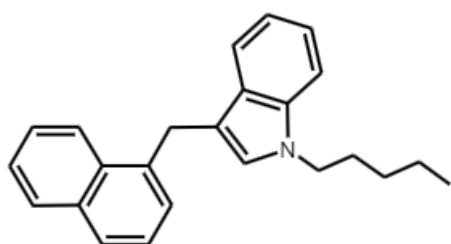
AM-4030



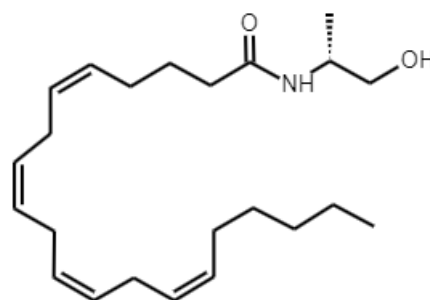
JWH-018



JWH-250



JWH-175



Μεθανανδαμίδη

### 1.6.3 Μηχανισμός δράσης

Τα συνθετικά κανναβινοειδή μιμούνται τα φυσικά κανναβινοειδή όσον αφορά τον τρόπο δράσης. Τα κύρια σημεία δράσης των κανναβινοειδών βρίσκονται στον εγκέφαλο και το νωτιαίο μυελό. Προσδένονται σε δύο τύπους υποδοχέων συζευγμένων με πρωτεΐνη G, CB1 και CB2. Οι υποδοχείς CB1 εκφράζονται κυρίως στον εγκέφαλο και βρίσκονται στα βασικά γάγγλια, την παρεγκεφαλίδα, τον υπόκαμπο, τους φλοιούς σύνδεσης, το νωτιαίο μυελό και τα περιφερικά νεύρα. Μέσω των ανταγωνιστικών επιδράσεων στον υποδοχέα CB1, επάγουν τις διανοητικές και συμπεριφορικές επιδράσεις τους. Δρώντας στον υποδοχέα CB1, αλλάζει η αντίληψη, η διάθεση του χρήστη ενώ διαταράσσεται η λειτουργία της μνήμης και της μάθησης οδηγώντας σε εξασθενημένη κρίση. Από την άλλη οι υποδοχείς CB2 βρίσκονται κυρίως στους περιφερικούς ιστούς στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, στα αιμοποιητικά συστήματα και στον σπλήνα. Αυτοί οι υποδοχείς μπορεί να παίζουν ρόλο στην ανοσοκατασταλτική δραστηριότητα της κάνναβης.

Και οι δύο υποδοχείς κανναβινοειδών, CB1 και CB2, συνδέονται με την G-πρωτεΐνη και ενεργοποιούνται μέσω της αναστολής της αδενυλικής-κυκλάσης (AC). Η ενεργοποίηση αυτών των υποδοχέων προκαλεί αναστολή της απελευθέρωσης του νευροδιαβιβαστές ακετυλοχολίνη και γλουταμικό ενώ επηρεάζονται έμμεσα οι υποδοχείς του υαμινοβουτυρικού οξέος, του N-μεθυλ-D-ασπαρτικού, των οπιοειδών και της σεροτονίνης. Οι υποδοχείς κανναβινοειδών εντοπίζονται κυρίως προσυναπτικοί παρά μετασυναπτικοί, πράγμα που σημαίνει ότι τα κανναβινοειδή ρυθμίζουν τις απελευθερώσεις νευροδιαβιβαστών. [41]

### 1.6.4 Παρενέργειες

Οι επιδράσεις χρήσης τους περιλαμβάνουν αίσθημα ευφορίας και χαλάρωσης, αλλοιωμένη αντίληψη χρόνου, έλλειψη συγκέντρωσης, μειωμένη ικανότητα μάθησης και προσωρινή απώλεια μνήμης, αλλαγές στη διάθεση, όπως αντιδράσεις πανικού και παράνοια. Οι υποκειμενικές επιδράσεις της κάνναβης, όπως η «αρέσκεια» των ναρκωτικών και η «αίσθηση των επιδράσεων των ναρκωτικών», εμφανίζονται μετά την πρώτη ρουφηξιά του τσιγάρου. Το κάπνισμα κάνναβης προκαλεί γρήγορες αλλαγές στα φυσιολογικά επιπεφυκότων, ξηροστομία και λαιμού, και αυξημένη όρεξη, ταχυκαρδία. Λιγότερο γνωστές επιδράσεις είναι η έντονη υπόταση και η ζάλη που παρατηρήθηκε κατά τη διάρκεια έρευνας στο περίπου 30% των συμμετεχόντων. [22]

### 1.7 Φαιναιθυλαμίνες

Οι φαιναιθυλαμίνες αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια μονοαμινικών αλκαλοειδών που περιλαμβάνουν τις υποκατηγορίες [42] :

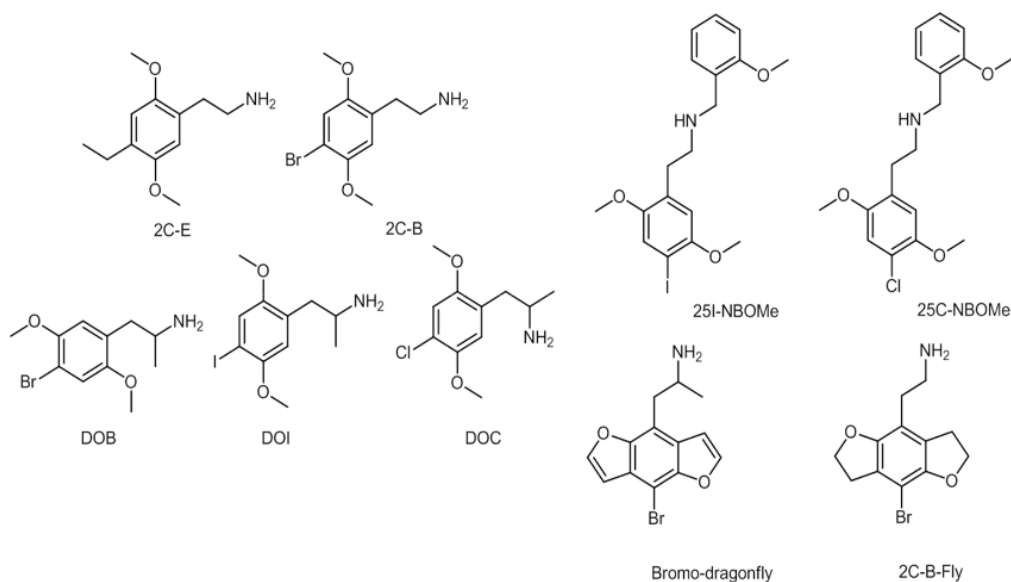
- Αμφεταμίνες
- Μεταμφεταμίνες
- MDMA (έκσταση)

Ο όρος «φαιναιθυλαμίνη» αποτελεί μια συζευγμένη μορφή για την 2-φαινυλαιθυλαμίνη/2-PEA επίσης γνωστή ως β-φαινυλαιθυλαμίνη. [43] Ταξινομούνται

ως διεγερτικά (αμφεταμίνη και μεθαμφεταμίνη), εντακτογόνα (MDMA και MDA) ή ψυχεδελικά [2,5-διμεθοξυ-4-ιωδοαμφεταμίνη και 2,5-διμεθοξυ-4 βρωμοαμφεταμίνη (DOB)] ανάλογα με τις φαρμακολογικές τους ιδιότητες. Παρόλα αυτά στη βιβλιογραφία υπάρχουν περιορισμένα δεδομένα σχετικά με τη φαρμακολογία και την τοξικολογία των φαινυλαιθυλαμινών τόσο στον άνθρωπο όσο και στα ζώα. [44] Στην αγορά διακινούνται φαινυλαιθυλαμίνες με τα ονόματα «Europra» για το 2C-E, «4-FMP», «παραφθοροαμφεταμίνη», «RDJ» για το 4-FA και «4-MMA», «Methyl-MA» για το PMMA, συνήθως υπό μορφή χαπιών, αλλά και σε μορφή σκόνης. [10]

Η σύνθεση νέων φαινυλαιθυλαμινών άρχισε τη δεκαετία του 1980 συνεχίζοντας τη δεκαετία του 1990 με ενώσεις όπως DOC, DOI (D series), 2C-T-7, 2C-T-2 (2C series). Ενώ εν συνεχεία παραλλαγές στο μόριο της μεσκαλίνης (φυσική φαινυλαιθυλαμίνη) οδήγησαν στη σύνθεση ισχυρών παραισθησιογόνων ουσιών π.χ. STP/DOM, MDE, 4-MTA. [10]

### 1.7.1 Δομή



Εικόνα 9: Χημικές δομές μερικών φαινυλαιθυλαμινών (Πηγή: An Update on the Implications of New Psychoactive Substances in Public Health)

### 1.7.2 Κατηγορίες

- Σειρά «2C»: Περιλαμβάνουν ενώσεις με υποκαταστάσεις αρωματικού δακτυλίου π.χ. 2C-E, 2C-B
- Σειρά «D»: Περιλαμβάνουν αμφεταμίνες με αρωματικές υποκαταστάσεις π.χ. DOI, DOC
- Βενζοδιφουράνια (π.χ. Bromo-Dragonfly)
- Άλλες ουσίες (π.χ. PMMA)

[45] [46]



### 1.7.3 Μηχανισμός Δράσης

Οι φαινυλαιθυλαμίνες δρουν ως αγωνιστές στους υποδοχείς 5-HT<sub>2A</sub> του εγκεφάλου, οι οποίοι προκαλούν τις κύριες παραισθησιογόνες τους επιδράσεις. Επιπλέον, η ενεργοποίηση των περιφερειακών υποδοχέων 5-HT προκαλεί συμπαθοδιεγερτικές επιδράσεις στο καρδιαγγειακό και αναπνευστικό σύστημα. Με βάση πειράματα που έγιναν σε αρουραίους οι ενώσεις 2C (φαινυλαιθυλαμίνες υποκατεστημένες με δακτύλιο που προέρχονται από την τροποποίηση της δομής της μεσκαλίνης με δύο μεθοξυομάδες στον δακτύλιο βενζολίου) εμφανίζουν πολύ χαμηλή δυναμικότητα και ελάχιστη διέγερση για την απελευθέρωση μονοαμινών στον εγκέφαλο. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα παραισθησιογόνα δρουν δεσμεύοντας ως αγωνιστές ή ανταγωνιστές στους υποδοχείς 5-HT<sub>2A/2C</sub>. [44]

### 1.7.4 Παρενέργειες

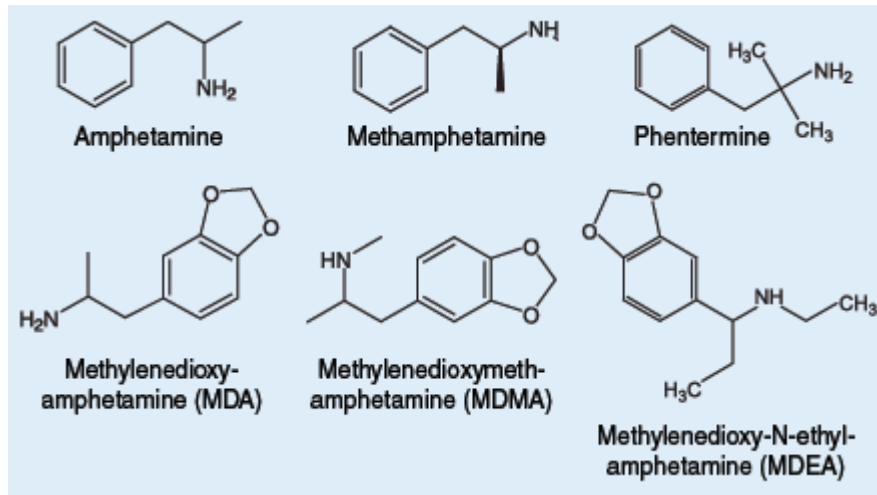
Οι σοβαρές παρενέργειες χρήσης που καταγράφηκαν περιλαμβάνουν αιφνίδιο θάνατο, υπερπυρεξία, ραβδομυόλυση, πολυοργανική ανεπάρκεια ή μεμονωμένη ηπατική ανεπάρκεια, σύνδρομο σεροτονίνης, υπονατρίαμια με εγκεφαλικό οίδημα και οξεία διαταραχή πανικού, ενώ ελαφρά κλινικά συμπτώματα σχετίζονται με διαταραχή στο κεντρικό και αυτόνομο νευρικό σύστημα όπως ταχυκαρδία, υπέρταση, μυδρίαση, νυσταγμός, ξηροστομία, εφίδρωση, σύγχυση, αυξημένη διάθεση και αταξία. Επιπλέον, πολλά άλλα κλινικά συμπτώματα έχουν αναφερθεί για τακτικούς χρήστες έκστασης (PMMA) όπως ενδαγγειακή πήξη, εγκεφαλικό επεισόδιο, ευερεθιστότητα, τρόμος, παραλήρημα, παράνοια, κατάθλιψη, αϋπνία, απώλεια συντονισμού και τάσεις αυτοκτονίας [47]

## 1.8 Αμφεταμίνες

Οι αμφεταμίνες είναι μια κατηγορία διεγερτικών του κεντρικού νευρικού συστήματος. Η αμφεταμίνη (αλφαμεθυλφαινοαιθυλαμίνη ή α-μεθυλφαινοαιθυλαμίνη) και η μεθυλφαινιδάτη χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία της διαταραχής υπερκινητικότητας λόγω έλλειψης προσοχής (ADHD) [48], ενώ αρχικά χρησιμοποιήθηκαν ως βοηθήματα για απώλεια βάρους. Σήμερα πέραν των νόμιμων χρήσεων της, χρησιμοποιείται ως υποκατάστατο της κοκαΐνης καθώς επιφέρει τα ίδια αποτελέσματα με αρκετά πιο χαμηλό κόστος. [49] Η «ανακάλυψη» της αμφεταμίνης έγινε τη δεκαετία του 1880, όταν ο Ρουμάνος χημικός Lazar Edeleano συνέθεσε πρώτος τη βάση, ωστόσο καθώς τα ερευνητικά του ενδιαφέροντα αποτελούσαν οι συνθετικές βαφές, δεν έκανε καμία αναφορά σε οποιαδήποτε φαρμακολογική δραστηριότητα της ουσίας. [50] Στην αγορά υπάρχουν υπό την μορφή χαπιών ή σκόνης. Οι κοινές συνταγογραφούμενες αμφεταμίνες περιλαμβάνουν την αμφεταμίνη και τη δεξτροαμφεταμίνη (Adderall®), δεξτροαμφεταμίνη (Dexedrine®), λιδεξααμφεταμίνη (Vyvanse™) και μεθαμφεταμίνη (Desoxyn®), ενώ παρανόμως διακινούνται ως Bennies, Black Beauties, Crank, Ice, Speed και Uppers. [51]

### 1.8.1 Δομή

Τα σημαντικά δομικά χαρακτηριστικά της αμφεταμίνης περιλαμβάνουν (1) ο μη υποκατεστημένος δακτύλιος φαινυλίου, (2) η πλευρική αλυσίδα δύο άνθρακα μεταξύ του δακτυλίου φαινυλίου και του αζώτου, (3) η α-μεθυλική ομάδα και (4) η πρωτογενής αμινομάδα. [52]



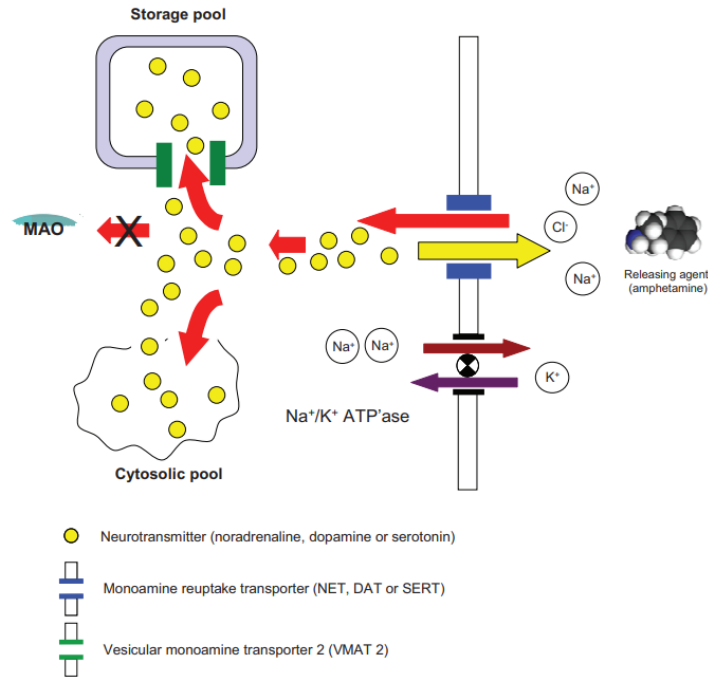
Εικόνα 10: Δομές αμφεταμίνης και παραγώγων αμφεταμίνης (Πηγή: The extraction of amphetamine and related drugs using Molecularly Imprinted Polymer SPE)

### 1.8.2 Μηχανισμός Δράσης

Ένα μόριο νευροδιαβιβαστή μονοαμίνης ή αμφεταμίνης συνδέεται με δύο ιόντα  $\text{Na}^+$  και ένα  $\text{Cl}^-$  και το μοριακό σύμπλοκο που προκύπτει μεταφέρεται ενεργά στο προσυναπτικό τερματικό άκρο από τον σχετικό μεταφορέα επαναπρόσληψης μονοαμίνης. Υπάρχουν δύο δεξαμενές νευροδιαβιβαστών μονοαμίνης σε κάθε τύπο νευρικού τερματικού: η κυτταροπλασματική δεξαμενή που περιέχει νεοσυντιθέμενες μονοαμίνες και η φυσαλιδώδης δεξαμενή που αποθηκεύει τις μονοαμίνες και από την οποία απελευθερώνονται όταν οι νευρώνες πυροδοτούν δυναμικά δράσης.

Η μετατόπιση των μονοαμινών από την κυτταροπλασματική δεξαμενή στη δεξαμενή αποθήκευσης πραγματοποιείται από ένα παρόμοιο ενεργό σύστημα μεταφορέα, τον φυσαλιδώδη μεταφορέα μονοαμίνης 2 (VMAT2). Δεδομένου ότι η αμφεταμίνη ανταγωνίζεται τις ενδογενείς μονοαμίνες για τη μεταφορά στα νευρικά τερματικά μέσω NET, DAT ή SERT, όσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση της αμφεταμίνης που υπάρχει στη σύναψη, τόσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των μορίων αμφεταμίνης που μεταφέρονται σε σχέση με κάθε μόριο μονοαμίνης. Μόλις εισέλθει στο προσυναπτικό τερματικό, η αμφεταμίνη εκτοπίζει τις μονοαμίνες από την κυτταροπλασματική δεξαμενή. Επιπλέον, επειδή η αμφεταμίνη έχει επίσης συγγένεια με το VMAT2, εμποδίζει τη μετατόπιση των μονοαμινών στο ενδονευρωνικό κυστίδια αποθήκευσης. Το αποτέλεσμα αυτών των ενεργειών είναι ότι η κατεύθυνση του μεταφορέα επαναπρόσληψης αντιστρέφεται, έτσι ώστε αντί να αντλεί νευροδιαβιβαστή από τη σύναψη στο νευρικό τερματικό, αντλεί νευροδιαβιβαστή από τους νευρώνες στη σύναψη. [53]

Επομένως καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι επηρεάζει τους νευροδιαβιβαστές μέσω ενός αριθμού μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένου του μηχανισμού πρόκλησης απελευθέρωσης και πρόληψης της επαναπρόσληψης ντοπαμίνης, νορεπινεφρίνης και, σε μικρότερο βαθμό, σεροτονίνης και αναστολής το μεταβολισμού της ντοπαμίνης και της νορεπινεφρίνης. Έτσι ως αποτέλεσμα με τον συνδυασμό αυτών των διεργασιών παράγονται τα διεγερτικά αποτελέσματα, όπως αυξημένη ενέργεια, καρδιακό ρυθμό και αρτηριακή πίεση. [54]



Εικόνα 11: Μηχανισμός δράσης αμφεταμίνης (Πηγή: Amphetamine, past and present – a pharmacological and clinical perspective)

### 1.8.3 Παρενέργειες

Σε περίπτωση υπερδοσολογίας αμφεταμινών στον οργανισμό επιφέρονται συμπτώματα τα οποία ποικίλουν ανάλογα με την ποσότητα της δόσης και το μέρος στο οποίο εκδηλώνονται. Πιο κάτω δίνεται πίνακας συμπτωματολογίας.

Πίνακας 2: Συμπτωματολογία υπερδοσολογίας αμφεταμινών

ΣΥΣΤΗΜΑ	ΜΙΚΡΗ/ΜΕΤΡΙΑ ΥΠΕΡΔΟΣΟΛΟΓΙΑ	ΥΨΗΛΗ ΥΠΕΡΔΟΣΟΛΟΓΙΑ
ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΟ	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Μη φυσιολογικός καρδιακός παλμός</li> <li>- Υψηλή ή χαμηλή αρτηριακή πίεση</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Καρδιογενές σοκ (η καρδιά δεν αντλεί αρκετό αίμα)</li> <li>- Εγκεφαλική αιμορραγία (αιμορραγία στον εγκέφαλο)</li> <li>- Κυκλοφορική κατάρρευση (μερική ή πλήρης ανεπάρκεια του</li> </ul>

		κυκλοφορικού συστήματος)
ΚΝΣ	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Σύγχυση</li> <li>- Ασυνήθιστα γρήγορα αντανακλαστικά</li> <li>- Σοβαρή αναταραχή</li> <li>- Τρόμος (ακούσια μυϊκή σύσπαση)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Οξεία ψύχωση με αμφεταμίνη (π.χ. αυταπάτες και παράνοια)</li> <li>- Καταναγκαστική και επαναλαμβανόμενη κίνηση</li> <li>- Σύνδρομο σεροτονίνης (υπερβολική σεροτονινεργική νευρική δραστηριότητα)</li> <li>- Συμπαθομιμητικό τοξίδρομο (υπερβολική αδρενεργική δραστηριότητα των νευρών)</li> </ul>
ΜΥΟΣΚΕΛΕΤΙΚΟ	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Μυϊκοί πόνοι</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ραβδομυόλυση (ταχεία διάσπαση των μυών)</li> </ul>
ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟ	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ταχεία αναπνοή</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Πνευμονικό οίδημα (συσσώρευση υγρού στους πνεύμονες)</li> <li>- Πνευμονική υπέρταση (υψηλή αρτηριακή πίεση στις αρτηρίες του πνεύμονα)</li> <li>- Αναπνευστική αλκάλωση (μειωμένο CO<sub>2</sub> του αίματος)</li> </ul>
ΟΥΡΟΠΟΙΗΤΙΚΟ	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Επώδυνη ούρηση</li> <li>- Κατακράτηση ούρων</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Αδυναμία παραγωγής ούρων</li> <li>- Νεφρική ανεπάρκεια</li> </ul>
ΑΛΛΑ	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Αυξημένη θερμοκρασία σώματος</li> <li>- Μυδρίαση (διασταλμένες κόρες)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Αυξημένο ή χαμηλό κάλιο στο αίμα</li> <li>- Υπερπυρεξία (εξαιρετικά αυξημένη κεντρική θερμοκρασία σώματος)</li> </ul>

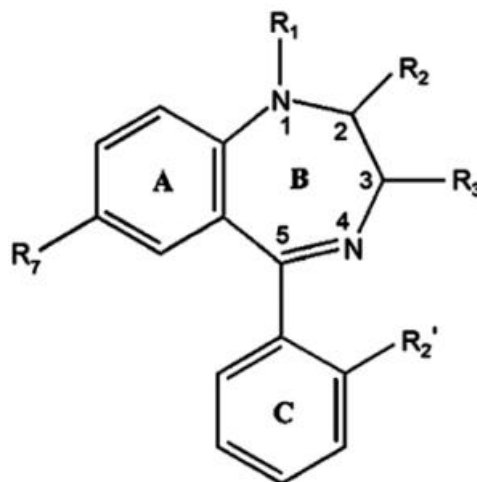
		- Μεταβολική οξέωση (υπερβολικά όξινα σωματικά υγρά)
--	--	--

## 1.9 Συνθετικές Βενζοδιαζεπίνες

Οι βενζοδιαζεπίνες αποτελούν μια κατηγορία ενώσεων που χρησιμοποιούνται ως υπνωτικά, αγχολυτικά, αντισπασμωδικά και μυοχαλαρωτικά. Είναι αγωνιστές του GABA (γαμινοβουτυρικό οξύ) και επιδρούν στους υποδοχείς GABA - α, των οποίων η ενεργοποίηση επιβραδύνει την πιο υψηλή δραστηριότητα των νευρώνων. Η ύπαρξη τους έγινε αρκετά γνωστή τις δεκαετίες του 1960 και του 1970 μέσω της αντίληψης ότι οι βενζοδιαζεπίνες ήταν ιδανικό φάρμακο για χαλάρωση ύπνου, οπότε και διαδόθηκαν ραγδαία στην κοινωνία. [55] Εν αντιθέσει η παραγωγή των βενζοδιαζεπινών άρχισε από τα μέσα της δεκαετίας του 1950, όταν η φαρμακευτική εταιρεία Roche ξεκίνησε ένα πρόγραμμα με στόχο την ανάπτυξη νέων ηρεμιστικών. Μάλιστα λόγω της σχετικά χαμηλής τοξικότητάς τους, αντικατέστησαν γρήγορα τα βαρβιτουρικά που χρησιμοποιούνταν τακτικά για τη θεραπεία του άγχους και της αϋπνίας εκείνη την εποχή διατηρώντας την λειτουργία τους αυτή μέχρι σήμερα. [11] Οι ιατρικές ιδιότητες των βενζοδιαζεπινών έφεραν στο φως τις συνθετικές βενζοδιαζεπίνες οι οποίες προορίζονται κατά κύριο λόγο για μη ιατρικές χρήσεις καθώς προσφέρουν υπνωτικά και αγχολυτικά αποτελέσματα, τη διαχείριση των οξείων επιδράσεων των διεγερτικών ή την αυτοθεραπεία των συμπτωμάτων στέρησης. [17]

### 1.9.1 Δομή

Όπως φαίνεται πιο κάτω στο σχήμα 1, η βασική δομή των συνθετικών βενζοδιαζεπινών βασίζεται στην σύντηξη ενός δακτυλίου βενζολίου και ενός δακτυλίου διαζεπίνης. Ενώ με «R» συμβολίζονται οι θέσεις στις οποίες υπάρχουν πλευρικές ομάδες που είναι αυτές που προσδίδουν τις μοναδικές τους ιδιότητες. [56]



Εικόνα 12 : Γενική δομή βενζοδιαζεπίνης (Πηγή: Principles of forensic toxicology)

### 1.9.2 Κατηγορίες

Οι βενζοδιαζεπίνες κατηγοριοποιούνται με δύο τρόπους. Αφενός με διαχωρίζονται με βάση χημικά σε:

- 1,4-Βενζοδιαζεπίνες
- 1,5-βενζοδιαζεπίνες
- Ιμιδαζο-βενζοδιαζεπίνες
- Θειοδιαζεπίνες
- Θειοτριαζολοδιαζεπίνες
- Τριαζολοβενζοδιαζεπίνες
- Οξαζολοβενζοδιαζεπίνες

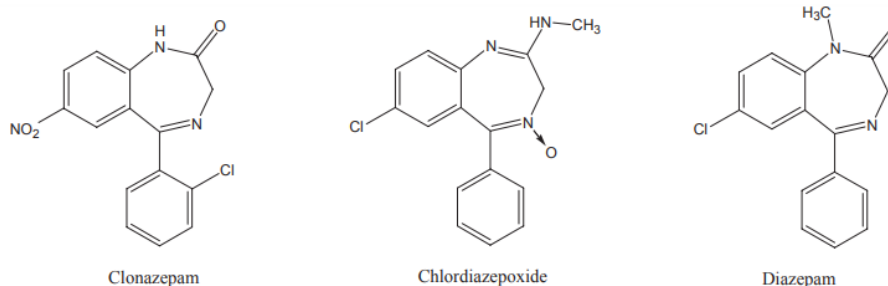
Ενώ αφετέρου μπορούν να διαχωριστούν με βάση την παραγωγή ενεργών μεταβολιτών και χρόνο ημιζωής ως εξής:

- Βραχείας δράσης: Περίπου 1–12 ώρες π.χ. μιδαζολάμη και τριαζολάμη
- Ενδιάμεσης δράσης: Περίπου 12–40 ώρες π.χ. οξαζεπάμη
- Μακράς δράσης: Περίπου >40 ώρες π.χ. κλοναζεπάμη, διαζεπάμη

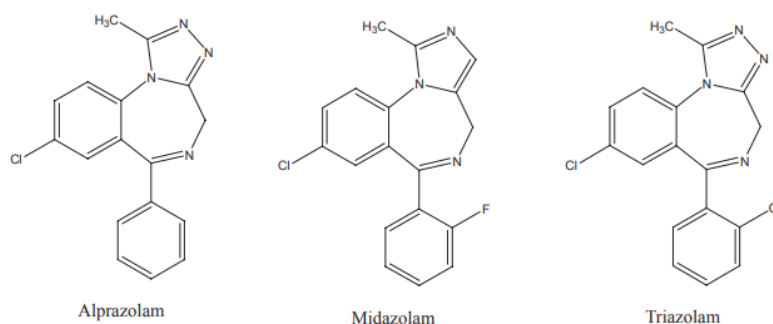
ή

- Μικρού χρόνου ημιζωής: Περίπου 1–24 ώρες π.χ. μιδαζολάμη και τριαζολάμη
- Μέσου χρόνου ημιζωής: Περίπου 24–48 ώρες π.χ. οξαζεπάμη
- Μεγάλου χρόνου ημιζωής: Περίπου >48 ώρες π.χ. κλοναζεπάμη, διαζεπάμη

[57]



Εικόνα 13: Δομές 1,4 βενζοδιαζεπινών (Πηγή: Principles of forensic toxicology)

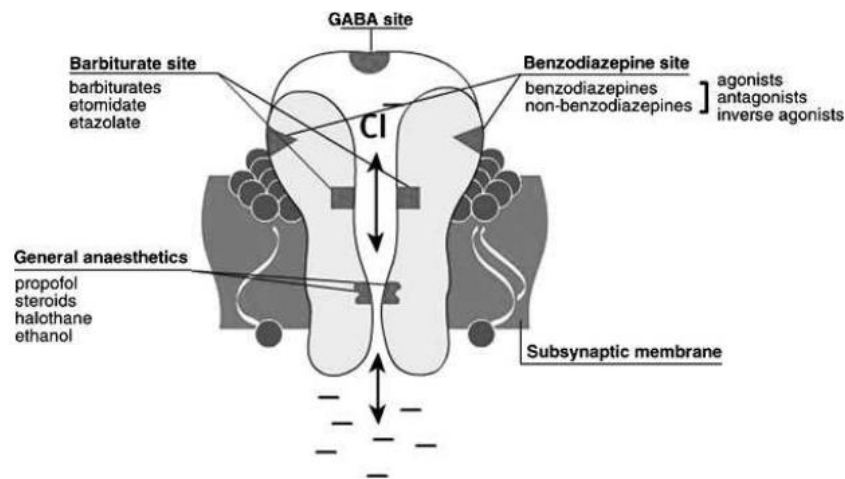


Εικόνα 14: Δομές ιμιδαζο- και τριαζολοβενζοδιαζεπινών (Πηγή: Principles of forensic toxicology)

### 1.9.3 Μηχανισμός δράσης

Οι νέες βενζοδιαζεπίνες επιδρούν μέσω αλληλεπιδράσεων στους γ-αμινοβουτυρικούς υποδοχείς οξέος-A (GABA-A) οι οποίοι παρουσιάζουν ομοιότητες με τις ιατρικά συνταγογραφούμενες βενζοδιαζεπίνες. Οι υποδοχείς GABA-A αποτελούν δίαυλους ιόντων που απαρτίζονται από διαφορετικές υπομονάδες σύνθεσης, που ανταποκρίνονται στον ανασταλτικό νευροδιαβιβαστή GABA. Οι συνθετικές βενζοδιαζεπίνες μπορεί να ενισχύσουν τα αποτελέσματα του GABA υποδοχέα ως θετικοί αλλοστερικοί ρυθμιστές δεσμεύοντας σε μια θέση υποδοχέα που είναι διαφορετική από τη θέση δέσμευσης του GABA, με αποτέλεσμα να επέρχεται χαλάρωση, ηρεμία, υπνηλία (που προκαλεί ύπνο), αγχολυτικές (αντι-αγχωτικές), αντισπασμωδικές και μυοχαλαρωτικές ιδιότητες.

Ένας άλλος μηχανισμός δράσης περιλαμβάνει ενεργοποίηση της μιτοχονδριακής πρωτεΐνης μετατοπιστή (TSPO) 18kDa, η οποία διεγείρει τη σύνθεση νευροδραστικών στεροειδών, συμπεριλαμβανομένης της αλλοπρεγνανολόνης. Η 4-χλωροδιαζεπάμη (Ro 5-4864) συνδέεται με αυτή την πρωτεΐνη αντί του υποδοχέα GABA-A, που οδηγεί σε αγγογένεση και αυξημένο κίνδυνο επιληπτικών κρίσεων. Ορισμένες συνθετικές βενζοδιαζεπίνες έχει επίσης βρεθεί ότι ενεργοποιούν τον υποδοχέα γλουταμινικού AMPA, οδηγώντας στο γρήγορο άνοιγμα και κλείσιμο ενός διαύλου ιόντων που είναι διαπερατό από κατιόντα νατρίου (Na), ασβεστίου (Ca) και καλίου (K). Ωστόσο εάν ανασταλεί, αυτό έχει ως αποτέλεσμα και την αναστολή της γρήγορης διεγερτικής συναπτικής μετάδοσης του κεντρικού νευρικού συστήματος. [17]



Εικόνα 15: Υποδοχέας γάμμα αμινοβουτυρικού οξέος (GABA-A) με τις θέσεις στόχους (Πηγή: <http://ccforum.com/content/12/S3/S4/figure/F1>)

### 1.9.4 Παρενέργειες χρήσης

Η πρόσληψη βενζοδιαζεπινών προκαλεί τόσο επιθυμητά αποτελέσματα (όταν πρόκειται για καθαρά ιατρική χρήση), όσο και μη επιθυμητά (όταν πρόκειται για μη ιατρική χρήση) τα οποία παρουσιάζονται πιο κάτω στον πίνακα 2.

Πίνακας 3: Παρενέργειες χρήσης βενζοδιαζεπινών

Επιθυμητά αποτελέσματα	Μη επιθυμητά οξεία αποτελέσματα	Χρόνιες παρενέργειες χρήσης
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ανακούφιση από ένταση, ψυχικό στρες και άγχος</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Μειωμένη νοητική δραστηριότητα και εγρήγορση, υπνηλία, λήθαργος και μπορεί να παρουσιαστεί βλάβη στη διαύγεια της σκέψης και της κρίσης</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ανάπτυξη ανεκτικότητας, ψυχολογικής και σωματικής εξάρτησης</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Αισθήματα ηρεμίας, χαλάρωσης και ευεξίας σε ανήσυχα άτομα</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Πιθανή διαταραχή του μυϊκού συντονισμού, ζάλη, χαμηλό αίμα πίεση ή λιποθυμία</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Πονοκέφαλος, ευερεθιστότητα, σύγχυση, εξασθένηση της μνήμης, κατάθλιψη, αϋπνία και τρόμος</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Βελτιωμένη αντιμετώπιση καταστάσεων πίεσης ή ψυχολογικών προβλημάτων</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Μειωμένες συναισθηματικές αντιδράσεις σε εξωτερικά ερεθίσματα, π.χ. πόνος</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Η απότομη διακοπή μπορεί να οδηγήσει σε στερητικό σύνδρομο που μπορεί να περιλαμβάνει αϋπνία, άγχος, αντιληπτική υπερευαισθησία, τρόμο, ευερεθιστότητα, ναυτία και έμετος, ακόμη και ψυχική σύγχυση και επικίνδυνους για τη ζωή σπασμούς</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ανακούφιση από ανεπιθύμητες ενέργειες που σχετίζονται με την υπερδιέγερση ή την απόσυρση άλλων φαρμάκων (δηλαδή ως μέρος ενός προτύπου πολλαπλής χρήσης ναρκωτικών)</li> </ul>		

[58]

### 1.10 Τρυπταμίνες

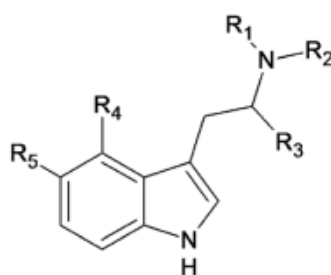
Οι τρυπταμίνες βρίσκονται φυσικά σε φρέσκους, φυτά και μανιτάρια. Ωστόσο, πολλά συνθετικά παράγωγα τρυπταμίνης έχουν συντεθεί και χρησιμοποιούνται ψυχαγωγικά ως νέες ψυχοδραστικές ουσίες. [59] Η τρυπταμίνη, ένα μονοαμινικό αλκαλοειδές που περιέχει μια ένα δακτύλιο ινδόλης που προέρχεται από την αποκαρβοξυλίωση του αμινοξέος της τρυπτοφάνης. Τα ανάλογα τρυπταμίνης που παράγονται από τη συνθετική τροποποίηση της διαδραματίζουν ζωτικό ρόλο στην ανθρώπινη ζωή λόγω της εισαγωγής βιολογικά ενεργών λειτουργιών στον πυρήνα της



που μπορεί να προκαλέσουν αλλοιώσεις της φυσικής και πνευματικής κατάστασης του ανθρώπινου εγκεφάλου. Μια ποικιλία νευροδραστικών ενώσεων που κυμαίνονται από τοξικές ουσίες έως φάρμακα κατά της ημικρανίας, όπως η σουματριπτάνη, η ριζατριπτάνη και η ζολμιτριπτάνη παράγονται με υποκαταστάσεις στον δακτύλιο ινδόλης στο C-2 και με άζωτο της πλευρικής αλυσίδας του. [60]

### 1.10.1 Δομή

Γενικά, τα κλασικά παραισθησιογόνα μπορούν να χωριστούν σε δύο κύριες δομικές κατηγορίες: φαινυλαλκυλαμίνες και ινδολαμίνες. Η χημική ραχοκοκαλιά των παραισθησιογόνων φαινυλαλκυλαμινών είναι μια ομάδα φαινηθλαμίνης, η οποία είναι μια επικρατούσα δομή σε μια σειρά ενδογενών ενώσεων, συμπεριλαμβανομένων των νευροδιαβιβαστών ντοπαμίνη και νορεπινεφρίνη. Η φυσική ένωση μεσκαλίνη, ένα αλκαλοειδές που απομονώθηκε από τον κάκτο Peyote (*Lophophora williamsii*) ή οι συνθετικές ενώσεις 2,5-διμεθοξυ-4-μεθυλαμφεταμίνη (DOM) και 2,5-διμεθοξυ-4-ιωδοαμφεταμίνη (DOI) είναι παραδείγματα αυτού. κατηγορία παραισθησιογόνων. Αντίθετα, οι ινδολαμίνες περιέχουν έναν πυρήνα ινδολίου ως βασική δομή, που έχει υψηλή δομική ομοιότητα με την 5-υδροξυτρυπταμίνη (5-HT ή σεροτονίνη), έναν νευροδιαβιβαστή μονοαμίνης που ρυθμίζει την ανθρώπινη διάθεση και συμπεριφορά. Η 5-HT είναι η απλούστερη από όλες τις γνωστές τρυπταμίνες, που διαφέρει μόνο στην απουσία μιας ομάδας υδροξυλίου στον αρωματικό δακτύλιο. [61]



Εικόνα 16: Βασική δομή τρυπταμίνης (Πηγή: The hallucinogenic world of tryptamines: an updated review)

### 1.10.2 Κατηγορίες

Για τις τρυπταμίνες έχουν προταθεί δύο ταξινομήσεις. Με βάση τον Nichols διαχωρίζονται σε δύο κύριες ομάδες:

- Απλές τρυπταμίνες, συμπεριλαμβανομένης της διμεθυλτρυπταμίνης (DMT),
- Εργολίνες (ομάδα χημικών ενώσεων που αρχικά συντέθηκαν από μύκητα ερυσιβόδους, μεταξύ των οποίων είναι το διαιθυλαμίδιο του λυσεργικού οξέος (LSD)).

Με βάση τον Fantegrossi διαχωρίζονται σε τρεις υποομάδες:

- (1) απλές τρυπταμίνες, χωρίς τροποποίηση του δακτυλίου της ινδόλης
- (2) τρυπταμίνες που έχουν μια τροποποίηση στη θέση 4 στον δακτύλιο ινδόλης
- (3) τρυπταμίνες που έχουν μια τροποποίηση στη θέση 5

[62]

### 1.10.3 Μηχανισμός δράσης

Οι ψυχεδελικές υποκατεστημένες τρυπταμίνες λειτουργούν μηχανιστικά μέσω της ενεργοποίησης των συζευγμένων με Gq υποδοχέων 5-HT<sub>2A</sub> (5-HT<sub>2AR</sub>) και των υποδοχέων 5-HT<sub>1A</sub> συζευγμένων με Gi (5-HT<sub>1AR</sub>). Το 5-HT<sub>2AR</sub> εντοπίζεται κυρίως στον φλοιό, το κλειστό ραβδωτό σώμα και το κοιλιακό ραβδωτό σώμα, ενώ το 5-HT<sub>1AR</sub> εκφράζεται σε νευρώνες απελευθέρωσης 5-HT στον πυρήνα της ραχιαίας ράχης, παίζοντας ρόλο στον έλεγχο της ανατροφοδότησης της απελευθέρωσης 5-HT. Πολλές γνωστές υποκατεστημένες τρυπταμίνες είναι επίσης αγωνιστές του υποδοχέα 5-HT<sub>2C</sub> (5-HT<sub>2CR</sub>) και είτε υποστρώματα μεταφορέα 5-HT (SERT) είτε αναστολείς – πρόσθετα χαρακτηριστικά που πιθανώς επηρεάζουν τις ψυχοδραστικές τους ιδιότητες και τις πιθανές τοξικότητες. [63]

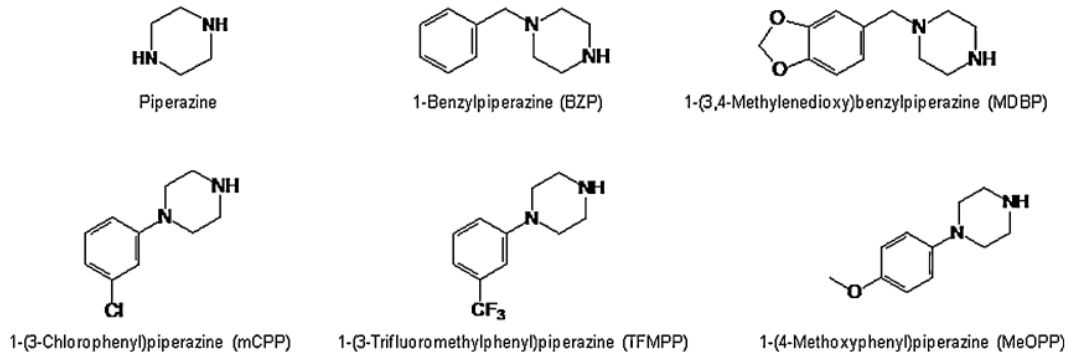
Συνδέονται με το 5-HT<sub>1A</sub> και υποδοχείς 5-HT<sub>2A</sub> με παρόμοια συγγένεια. Ορισμένες τρυπταμίνες είναι ελαφρώς πιο επιλεκτικές για τον έναν ή τον άλλο υποτύπο υποδοχέα. Ωστόσο, διάφορα ψυχεδελικά τρυπταμίνης έχουν αποδειχθεί ότι είναι ανενεργά στον υποδοχέα 5-HT<sub>1A</sub> (όσον αφορά λειτουργικές δοκιμασίες σε σχετικές συγκεντρώσεις) ή δρουν ως κυρίως μερικοί αγωνιστές με σημαντικά χαμηλότερη ισχύ σε σύγκριση με τους υποδοχείς 5-HT<sub>2A</sub>, στους οποίους τα ψυχεδελικά τρυπταμίνης δρουν ως μέτριοι έως πλήρεις αγωνιστές. [64]

### 1.10.4 Παρενέργειες

Τα παράγωγα τρυπταμίνης επιδρούν στον εγκέφαλο προξενώντας ψυχολογικές διαταραχές στους χρήστες, συμπεριλαμβανομένης της οξείας ψύχωσης. Παράλληλα ανεπιθύμητες ενέργειες των φαρμάκων περιλαμβάνουν αίσθημα ανησυχίας, αποπροσανατολισμό, θόλωση συνείδησης, σύγχυση, παραισθήσεις, προσωρινή αμνησία, καταληψία, μυδρίαση, ταχύπνοια, υπέρταση και ταχυκαρδία. Σε σοβαρές περιπτώσεις, η χρήση φαρμάκων τρυπταμίνης έχει οδηγήσει σε οξεία νεφρική ανεπάρκεια και ραβδομυόλυση. Τέλος, έχουν καταγραφεί αρκετοί θάνατοι μετά τη χρήση φαρμάκων τρυπταμίνης. [65]

### 1.11 Πιπεραζίνες

Οι πιπεραζίνες είναι τα πρώτα πλήρως συνθετικά φάρμακα κατάχρησης προερχόμενα από ενώσεις με βάση τη φαινυλαιθυλαμίνη. [66] Από χημικής απόψεως, οι πιπεραζινικές ενώσεις προέρχονται από την πιπεραζίνη. Δομικά διαθέτουν κυκλική δομή αποτελούμενη από δύο άζωτα σε αντίθετες θέσεις και τέσσερις άνθρακες καταναμημένους μεταξύ των δύο ατόμων αζώτου. Η πιο κοινή τους ένωση είναι η 1-βένζυλοπιπεραζίνη (BZP) και παρόλο που αρχικά προορίστηκε ως αντικαταθλιπτικό φάρμακο, αποσύρθηκε από την αγορά όταν βρέθηκε ότι έχει παρόμοιες ιδιότητες με την αμφεταμίνη. [10] Σήμερα παραμένουν στην αγορά καθαρά για νόμιμα ιατρικούς σκοπούς και κτηνιατρική φαρμακοθεραπεία. Φάρμακα που προέρχονται από πιπεραζίνες εμφανίστηκαν στην παράνομη αγορά, ως χάπια έκστασης με τα ονόματα «Rapture», «Frenzy», «Bliss», «Charge», «Herbal ecstasy», «A2», «Legal X», «Pep X», «Pep Love» ή «Nemesis». Γενικά, διατίθενται υπό μορφή κάψουλας, ταμπλέτας ή χαπιού αλλά και σε σκόνη ή υγρή μορφή. [67]



Εικόνα 17: Χημικές δομές πιπεραζίνης και παραγώγων της (Πηγή: Drug and alcohol dependence)

### 1.11.2 Κατηγορίες

- Βενζυλπιπεραζίνες: π.χ. N-βενζυλπιπεραζίνη (BZP), μεθυλενοδιοξυ ανάλογο της 1-(3,4-μεθυλενοδιοξυβενζυλ)πιπεραζίνη (MDBP)
- Φαινυλπιπεραζίνες: π.χ. 1-ροφαινυλ(3-)χ πιπεραζίνη (mCPP), 1-(3-τριφθορομεθυλφαινυλ)πιπεραζίνη (TFMPP), 1-(4 μεθοξυφαινυλ)πιπεραζίνη (MeOPP)
- Θειενυλομεθυλοπιπεραζίνες: Αποτελεί μια Τρίτη ομάδα φαρμάκων που μοιάζει με τις πιπεραζίνες

[67]

### 1.11.3 Μηχανισμός δράσης

Οι πιπεραζίνες ανήκουν σε μία ευρύτερη κατηγορία αυτή των συνθετικών διεγερτικών και δια αυτό διαθέτουν παρόμοια μηχανιστική δράση με τις καθινόνες, τις αμινοϊνδάνες, τις φαιναιθυλαμίνες και τις τρυπταμίνες. Με την αύξηση των νευροδιαβιβαστών μονοαμίνης DA και 5HT και σε μικρότερο βαθμό τη συγκέντρωση της νοραδρεναλίνης (NE) στη συναπτική σχισμή, επέρχεται επίδραση στις διεγερτικές επιδράσεις. Στη συνέχεια υπάρχει διέγερση της μη εξωκυτταρωτικής απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστών αναστέλλοντας τον φυσαλιδώδη μεταφορέα μονοαμίνης-2 (VMAT2) και αναστροφή της εισροής μεταφορέα, με αποτέλεσμα τη διέγερση της απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστών από την κυτταροπλασματική δεξαμενή ή των συναπτικών κυστιδίων. [68]

### 1.11.4 Παρενέργειες

- Πονοκέφαλο
- Πόνοι στο στομάχι
- Απώλεια όρεξης
- Τρέμουλο
- Συναισθηματικές εναλλαγές
- Σύγχυση
- Ευερεθιστότητα
- Αϋπνία
- Κούραση
- Ζάλη
- Ακανόνιστοι καρδιακοί ρυθμοί
- Εμετός

- Φόβο απώλειας ελέγχου
- Κρίσεις πανικού
- Ανησυχία
- Υπερευαισθησία στο φως και στο θόρυβο
- Κατασχέσεις Grand mal (από BZP)
- Μακροχρόνιο hangover μετά από κατάχρηση

[69]

Πέραν των πιο πάνω λόγω του ότι είναι διεγερτικά φάρμακα, η πρόσληψη τους είναι ιδιαίτερα επικίνδυνη, ειδικά εάν λαμβάνονται από χρήστες με υψηλή αρτηριακή πίεση ή καρδιακή πάθηση. Ακόμα και σε απόλυτα υγιή νεαρά άτομα μπορεί να προκληθεί κρίση ή καρδιακή προσβολή μετά τη λήψη τους. [70]

## 1.12 Αλκαλοειδή

Ο όρος αλκαλοειδές επινοήθηκε το 1819 από τον Γερμανό φαρμακοποιό W. Meisner, ο οποίος χρησιμοποίησε την αραβική λέξη al-qali, που σχετίζεται με το φυτό από το οποίο αφαιρέθηκε για πρώτη φορά η σόδα [71] που προέρχεται από τη λέξη "alkaline", θέλοντας να περιγράψει τις υδατοδιαλυτές βάσεις. [72] Στην δομή τους συνήθως περιλαμβάνουν βασικά άτομα αζώτου, θείου και σπάνια βρωμίου, φώσφορου ή χλωρίου, ενώ μπορεί να περιέχουν κάποιες ουδέτερες ή ασθενώς όξινες ενώσεις. Παρόλο το μεγάλο φάσμα ενώσεων που υπάγονται στην κατηγορία αυτή λίγες συνθετικές ενώσεις θεωρούνται ως αλκαλοειδή. Ενώσεις που αποτελούν συνθετικά παράγωγα των αλκαλοειδών είναι η μορφίνη και το λυσεργικό οξύ, που παράγουν ηρωίνη και LSD, αντίστοιχα. [71]

### 1.12.2 Δομή

Οι χημικές δομές των αλκαλοειδών ποικίλουν. Σε γενικά πλαίσια, περιέχουν τουλάχιστον ένα άτομο αζώτου διαθέτοντας δομή τύπου αμίνης. Ειδικότερα, η δομή επιδέχεται κάποιες διαφοροποιήσεις ανάλογα με την υποκατηγορία αλκαλοειδούς στην οποία εμπίπτει η εκάστοτε ουσία. Εάν ταξινομούνται με βάση την προέλευση και την παρουσία του ατόμου αζώτου τότε διαχωρίζονται σε [73] :

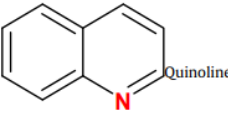
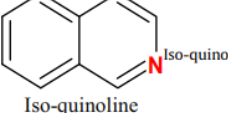
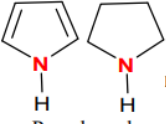
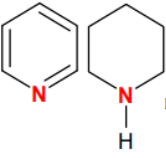
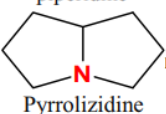
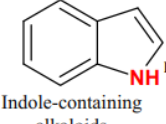
- True alkaloids: Περιέχουν άτομο αζώτου στο σύστημα του δακτυλίου και προέρχονται από αμινοξέα. Ενώ μοιράζονται ένα άζωτο ετεροκυκλικού δακτυλίου που προέρχεται από μια βιογενετική αμίνη, σχηματιζόμενη με αποκαρβοξυλίωση από ένα αμινοξύ. [72] π.χ. κοκαΐνη, μορφίνη, κινίνη
- Πρωτοαλκαλοειδή: Τα αλκαλοειδή που περιέχουν άτομο αζώτου στη δομή τους αλλά όχι στο σύστημα δακτυλίου και προέρχονται από αμινοξέα π.χ. νοχιμβίνη, μεσκαλίνη, ορδενίνη
- Ψευδοαλκαλοειδή: Αλκαλοειδή που δεν προέρχονται από αμινοξέα αλλά από τερπένια ή στεροειδή, περιέχοντας άτομο αζώτου στις δομές των δακτυλίων τους. [71] π.χ. καψαϊκίνη, καφεΐνη, εφεδρίνη [74]

### 1.12.3 Κατηγορίες

Τα αλκαλοειδή ταξινομούνται κυρίως σε δύο μεγάλες κατηγορίες δηλαδή με βάση την προέλευση και την παρουσία του ατόμου αζώτου και με βάση τη δομή του δακτυλίου.

[73], ωστόσο η πιο ολοκληρωμένη ταξινόμηση των αλκαλοειδών βασίζεται στην παρουσία του δακτυλίου στη δομή τους. Συγκεκριμένα ταξινομούνται σε [71]:

- Αλκαλοειδή τροπανίου: Προέρχονται από ορνιθίνη και ακετοξικό π.χ. κοκαΐνη, ατροπίνη, σκοπολαμίνη
- Αλκαλοειδή πυρρολιζιδίνης: Η πλειονότητα τους εμφανίζονται ως N-οξειδία. Διαθέτουν των τοξικές επιδράσεις, ιδιαίτερα ηπατικές βλάβες π.χ.: σενεσιονίνη
- Αλκαλοειδή πιπεριδίνης: Είναι μονοκυκλικές ενώσεις με πυρήνα C5N. Επιφέρουν χρόνια νευροτοξικότητα π.χ. Lobeline
- Αλκαλοειδή κινολίνης: Μια ποικιλία απλών ετεροαρωματικών κινολινών απομονώνεται από διάφορες θαλάσσιες πηγές αν και η κύρια πηγή απομόνωσης αποτελεί το φυτό Cinchona π.χ. κινχονίνη, κινχονιδίνη, κινίνη κινιδίνη
- Αλκαλοειδή ισοκινολίνης: Διαθέτουν τεράστιες φαρμακευτικές ιδιότητες όπως αντικές, αντιμυκητιακές, αντικαρκινικές, αντιοξειδωτικές, αντισπασμωδικές ενώ είναι και αναστολείς ενζύμου π.χ. Μορφίνη, κωδεΐνη
- Αλκαλοειδή ινδόλης: π.χ. Vincristine, Reserpine
- Αλκαλοειδή στεροειδών: Κύριο χαρακτηριστικό τους είναι το σύστημα δακτυλίου 1,2-κυκλοπεντανίου φαινανθρενίου π.χ. βουφοτοξίνη, κυκλωνομαντιόνη
- Αλκαλοειδή ιμιδαζόλης: Δομικό χαρακτηριστικό τους αποτελεί όπως υποδηλώνει και το όνομα, η ύπαρξη ιμιδαζολικού δακτυλίου ενώ κύριος εκπρόσωπος της κατηγορίας αυτής είναι η πιλοκαρπίνη
- Αλκαλοειδή πουρίνης: Αποτελούνται από δακτύλιο πουρίνης και σάκχαρο πεντόζης μαζί με μια άλλη βάση πυριμιδίνης π.χ. Καφεΐνη, θεοφυλλίνη, θεοβρωμίνη
- Αλκαλοειδή πυρρολιδίνης: Αποτελεί τον βασικό πυρήνα των αλκαλοειδών πυρρολιδίνης. Η υγρίνη (βιοσυντίθεται από ορνιθίνη), η φικίνη (όπου ο δακτύλιος πυρρολιδίνης εμπλέκεται σε έναν πυρήνα φλαβόνης) και η μπρεβικολίνη (όπου είναι συνδεδεμένη με μια μονάδα β-καρβολίνης) είναι μερικά παραδείγματα αυτού του τύπου αλκαλοειδών

S.no.	Types of Alkaloids	Structure	Examples
1	Quinoline	 Quinoline	Quinine, Quinidine, cinchonine, cupreine, camphothecine [2,12]
2.	Iso-quinoline	 Iso-quinoline	Morphine, nicotine, codeine, narceine, Cephaeline, emetine [2]
3.	Pyrrole andPyrrolidine	 Pyrrole andPyrrolidine	Hygrine, coca species [12]
4.	Pyridine andPiperidine	 Pyridine andPiperidine	Arecoline, canine, lobeline, anabesine, trigonelline [1,2]
5.	Pyrrolizidine	 Pyrrolizidine	Senecio-nine, Echimidine,Seneciophylline [11]
6.	Indole-containing alkaloids	 Indole-containing alkaloids	Vincristine, Reserpine,Serotonin [4,5]

Εικόνα 18: Ταξινόμηση των αλκαλοειδών με βάση τις δομές (Πηγή: Pharmacological activities and toxicities of alkaloids on human health)

#### 1.12.4 Μηχανισμός δράσης

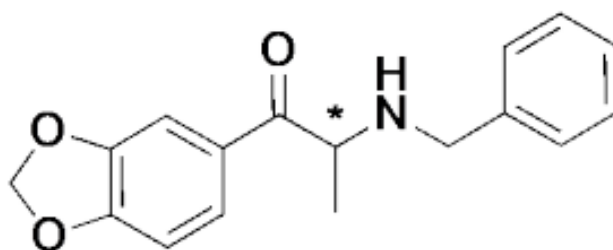
Τα αλκαλοειδή δρουν άμεσα στο κεντρικό νευρικό σύστημα του ανθρώπινου σώματος, επηρεάζοντας επίσης τα νουκλεϊκά οξέα, το DNA, το RNA, τη διαπερατότητα της μεμβράνης και τις πρωτεΐνες. Λόγω αυτών των ιδιοτήτων, πολλά αλκαλοειδή χρησιμοποιούνται ως φαρμακολογικά δραστικές ενώσεις στην ιατρική επιστήμη.

#### 1.12.5 Παρενέργειες χρήσης

Τα αλκαλοειδή έχουν την δυνατότητα αύξησης των καρδιακών παλμών και να προκαλούν καρδιαγγειακές παθήσεις, αυξάνοντας την αρτηριακή πίεση, μπλοκάροντας την αναπνευστική οδό, ενώ μειώνουν τη θερμοκρασία του δέρματος. Παρόλο που τα αλκαλοειδή περιλαμβάνονται στην καθημερινότητα μας σε διάφορους τομείς όπως η ιατρική, η διατροφή ορισμένα από αυτά έχουν ενοχοποιηθεί για καρκινογένεση, ναυτία, κοιλιακό άλγος, παραισθήσεις κ.ά. [75]

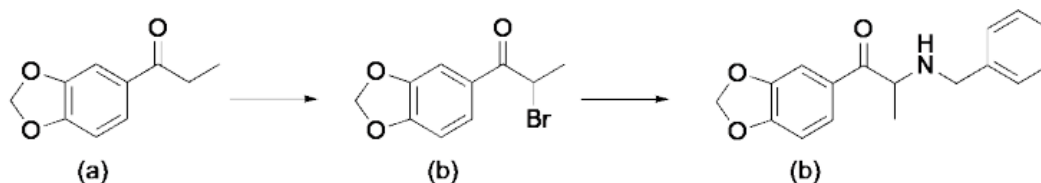
### 1.13 Βενζυλόνη (BMDP)

Η Βενζυλόνη ( $C_{17}H_{17}NO_3$ ), ονομασία κατά IUPAC: 3,4-Μεθυλενοδιοξυ-N-βενζυλοκαθινόνη ανήκει στην οικογένεια των συνθετικών καθινονών. Έκανε την εμφάνιση της στην παράνομη αγορά μετά τον περιορισμό διακίνησης της εφυλόνης (N-αιθυλοπεντυλόνη) μεταξύ 2017 και 2019. Σε αυτό το γεγονός συνέτεινε η ανίχνευση της στις τοξικολογικές εξετάσεις κατά την διενέργεια νεκροτομών. Εντοπίστηκε για πρώτη φορά σε υποθέσεις κατασχεμένων ναρκωτικών στις Ηνωμένες Πολιτείες το 2019, γεγονός που την καθιστά ως νέο συνθετικό παράγωγο στην παράνομη αγορά. [76] Λόγω της πρόσφατης έναρξης διακίνησης του, δεν υπάρχουν αρκετές πληροφορίες σχετικά με τις ονομασίες με τις οποίες κυκλοφορεί στην αγορά. Μελέτες *in vitro* απέδειξαν ότι η βενζυλόνη είναι σε θέση να αναστέλλει την πρόσληψη ντοπαμίνης και νορεπινεφρίνης.



Εικόνα 19: Στερεοχημική δομή βενζυλόνης όπου αστερίσκος υποδηλώνει χειρικό κέντρο

Λόγω των λιγοστών πληροφοριών σχετικά με την βενζυλόνη, οι επιστήμονες δεν είναι σίγουροι για το συνθετικό μονοπάτι της ουσίας και των παραγώγων της ωστόσο εικάζεται ότι παράγεται με βρωμίωση του προδρόμου μορίου 3,4-μεθυλενοδιοξυπροπιοφαινόνης (α) που δίνει το άλφα-βρωμιωμένο ενδιάμεσο (β). Στη συνέχεια ακολουθείται από αμίνωση με φαινυλομεθαναμίνη για να δώσει βενζυλόνη (γ) όπως φαίνεται στο διάγραμμα που ακολουθεί. [77]



Εικόνα 13: Συνθετική πορεία βενζυλόνης από το πρόδρομο μόριο 3,4-μεθυλενοδιοξυπροπιοφαινόνη

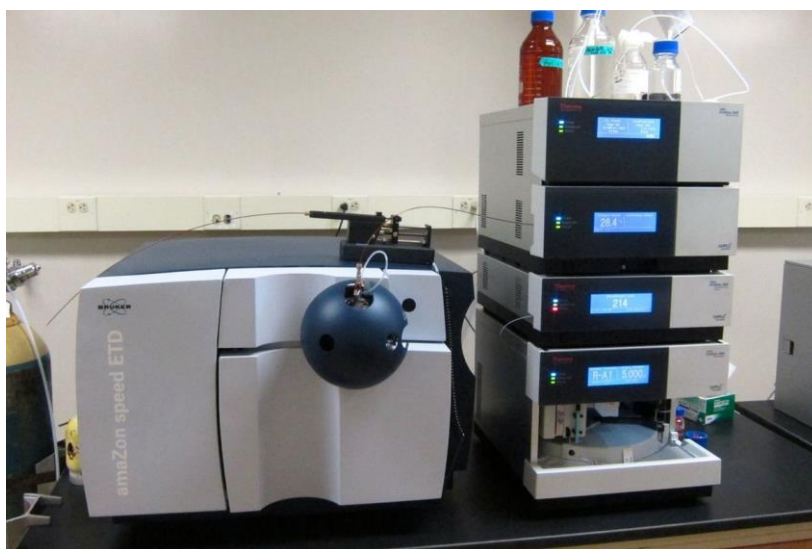
## Κεφάλαιο 2

### 2.1 Μέθοδοι προσδιορισμού νέων ψυχοδραστικών ουσιών στο αίμα

Όπως φαίνεται πιο κάτω η ανίχνευση νέων ψυχοδραστικών ουσιών στο αίμα επιτυγχάνεται με μεθόδους που περιλαμβάνουν υγρή ή αέρια χρωματογραφία. Σε γενικό επίπεδο η χρωματογραφία είναι χημική αναλυτική τεχνική διαχωρισμού ουσιών από τα αρχικά μείγματα τους. Ο διαχωρισμός των ουσιών βασίζεται σε ορισμένες ιδιότητες των ουσιών όπως η πτητικότητα, η πολικότητα, τα ηλεκτρικά φορτία (για ιοντικές ενώσεις) και το μέγεθος μορίων. [78] Επίσης στις χρωματογραφικές τεχνικές, ο διαχωρισμός είναι αποτέλεσμα του συνδυασμού δράσεων της κινητής και της στατικής φάσης.

### 2.2 Αέρια Χρωματογραφία-Φασματομετρία Μάζας (GC-MS)

Η τεχνική GC-MS περιλαμβάνει κατανομή των ενώσεων μεταξύ της στερεάς/υγρής στατικής φάσης σε μια στήλη και της αέριας κινητής φάσης. [79] Η αέρια χρωματογραφία διαχωρίζει τα συστατικά ενός μείγματος και η φασματοσκοπία μάζας χαρακτηρίζει κάθε ένα από τα συστατικά ξεχωριστά. Μετά την απομόνωση των συστατικών μπορούν να αξιολογηθούν μεμονωμένα. Σε όλες τις χρωματογραφίες, ο διαχωρισμός συμβαίνει όταν το μίγμα του δείγματος εισάγεται σε μια κινητή φάση, στην παρούσα περίπτωση η κινητή φάση είναι ένα αδρανές αέριο όπως το ήλιο, ενώ η στατική φάση είναι συνήθως μια χημική ουσία που μπορεί να προσελκύσει επιλεκτικά συστατικά σε ένα μείγμα δείγματος. Όπως αναφέρθηκε και πριν κάθε ένωση στο μείγμα αλληλεπιδρά με διαφορετικό ρυθμό με βάση διάφορους παράγοντες, έτσι οι ουσίες που αλληλεπιδρούν πιο γρήγορα θα εκλυθούν από τη στήλη πρώτες και αντίστοιχα αυτές που αλληλεπιδρούν πιο αργά θα εξέλθουν τελευταίες. [80]



Εικόνα 12: Συσκευή GC-MS

Μόλις τα συστατικά εξέλθουν της στήλης GC, ιονίζονται και κατακερματίζονται από το φασματόμετρο μάζας με χρήση ηλεκτρονίων ή πηγών χημικού ιονισμού. Τα ιονισμένα μόρια και θραύσματα στη συνέχεια επιταχύνονται μέσω του αναλυτή μάζας του οργάνου, ο οποίος πολύ συχνά είναι τετραπολική ή παγίδα ιόντων. Στη συνέχεια τα ιόντα διαχωρίζονται με βάση τις διαφορετικές αναλογίες μάζας



προς φορτίο ( $m/z$ ). Η λήψη δεδομένων GC-MS μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε σε λειτουργία πλήρους σάρωσης, για να καλύψει είτε ένα ευρύ φάσμα αναλογιών  $m/z$  είτε επιλεγμένη λειτουργία παρακολούθησης ιόντων (SIM), για συλλογή δεδομένων των μαζών που μας ενδιαφέρουν. [81]

Στην δική μας περίπτωση όπου σκοπός είναι ο διαχωρισμός και η ανίχνευση νέων ψυχοδραστικών ουσιών τότε απαιτείται η τήρηση ενός προκαθορισμένου πρωτοκόλλου κατά το οποίο πρώτα γίνεται η κατεργασία του αρχικού δείγματος αίματος του ασθενούς. Οι τεχνικές προετοιμασίας δειγμάτων μπορεί να περιλαμβάνουν εκχύλιση υγρού-υγρού (LLE), εκχύλιση στερεάς φάσης ή μικροεκχύλιση στερεάς φάσης, με σκοπό την απομόνωση των ενώσεων-στόχων από τη μήτρα του αίματος, στην απομάκρυνση των παρεμβαλλόμενων ουσιών και στη συμπίκνωση των αναλυτών για επακόλουθη ανάλυση. [82] Μετά το πέρας της κατεργασίας και της ανάλυσης των δειγμάτων ακολουθεί η ανάλυση δεδομένων για τον εντοπισμό και την ποσοτικοποίηση των NPS στο δείγμα ολικού αίματος. Σε αυτό το στάδιο περιλαμβάνεται η σύγκριση των λαμβανόμενων φασμάτων μάζας και των χρόνων συγκράτησης των αναλυτών με πρότυπα αναφοράς ή φασματικές βιβλιοθήκες, ενώ ο ποσοτικός προσδιορισμός μπορεί να πραγματοποιηθεί μετρώντας τις περιοχές κορυφής των προσδιορισμένων αναλυτών και συγκρίνοντάς τις με καμπύλες βαθμονόμησης που παρασκευάζονται με τη χρήση τυπικών διαλυμάτων. [83]

### 2.3 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

Ο όρος χρωματογραφία χρησιμοποιείται για να περιγράψει ένα ευρύ φάσμα τεχνικών διαχωρισμού, ωστόσο όλες οι τεχνικές μοιράζονται την ίδια αρχή. Αυτή η αρχή μπορεί να περιγραφεί ως η διαφορά στις ιδιότητες αλληλεπίδρασης της αναλύομενης ουσίας σε δύο φάσεις. Μία από αυτές τις φάσεις είναι σχετικά στατική και ονομάζεται στατική φάση ενώ η άλλη είναι σχετικά κινητή και ονομάζεται κινητή φάση. [84] Σύμφωνα με την IUPAC, χρωματογραφία είναι η τεχνική, η οποία χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό ενός δείγματος, στην οποία τα συστατικά κατανέμονται ανάμεσα σε δύο μη αναμιγνύομενες φάσεις, τη στατική και την κινητή. Εφευρέθηκε από το Ρώσο βοτανολόγο Mikhail Tswet στις αρχές του 20ου αιώνα. [85]

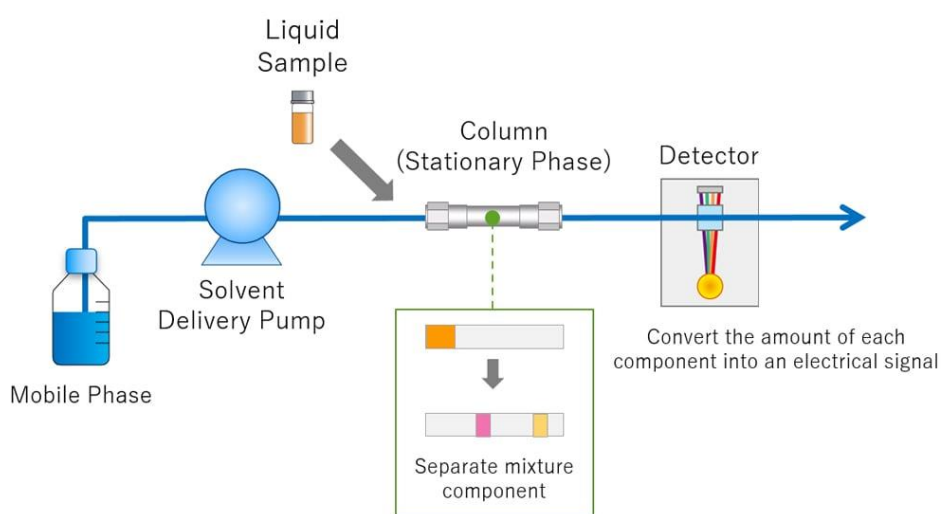
Εφόσον κάθε συστατικό μετακινείται με διαφορετική ταχύτητα, λόγω διαφορετικής κατανομής των συστατικών μεταξύ σταθερής και κινητής φάσης, μπορεί ένα μείγμα να διαχωριστεί στα συστατικά του. Η κινητή φάση συναντάται με τη μορφή υγρού ή αέριου συστατικού, ενώ η στατική είναι ένα πορώδες ή κοκκώδες στερεό ή ακόμη και λεπτό υμένιο υγρού προσροφημένο σε στερεό υπόστρωμα. Όταν η κινητή φάση διαπερνά την χρωματογραφική στήλη έχουμε την λεγόμενη έκλυση.

Μετά το πέρας του διαχωρισμού, ακολουθεί η ανίχνευση των συστατικών μέσω της κορυφής με τη μορφή της καμπύλης Gauss (χρωματογράφημα). Στο χρωματογράφημα αναγράφεται ο απαιτούμενος χρόνος μέχρι το συστατικό να εξέλθει της στήλης και να προχωρήσει στον ανιχνευτή. Ο χρόνος αυτός ονομάζεται χρόνος συγκράτησης και συμβολίζεται ως  $t_R$ . Αντίστοιχα ο όγκος κινητής φάσης που απαιτείται για την έκλυση του συστατικού ονομάζεται όγκος συγκράτησης και συμβολίζεται ως  $V_R$ . [86]

### 2.3.1 ΤΜΗΜΑΤΑ ΥΓΡΟΥ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΟΥ

Ένα σύστημα Υγρής Χρωματογραφίας περιλαμβάνει:

- α) Φιάλες αποθήκευσης διαλυτών κινητής φάσης
- β) Αντλία
- γ) Μονάδα εισαγωγής του δείγματος
- δ) Χρωματογραφική στήλη
- ε) Ανιχνευτής
- στ) Σύστημα συλλογής και καταγραφής των αποτελεσμάτων
- ζ) Απαερωτής κενού



Εικόνα 20: Διάγραμμα τμημάτων χρωματογράφου HPLC (Πηγή: [https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/basic/what\\_is\\_hplc.html](https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/basic/what_is_hplc.html))

Επιγραμματικά πιο κάτω δίνεται ο ρόλος των μερών του χρωματογράφου [87] [88]:

**Φιάλες αποθήκευσης διαλυτών κινητής φάσης:** Οι διαλύτες που θα αποτελέσουν την κινητή φάση βρίσκονται αποθηκευμένοι σε ειδικές φιάλες. Η κινητή φάση είναι απαραίτητη για τη μεταφορά των δειγμάτων μέσα από το σύστημα της υγρής χρωματογραφίας

**Απαερωτής κενού:** Ο απαερωτής εξασφαλίζει την απαέρωση της κινητής φάσης, ώστε να είναι εφικτός ο έλεγχος της πίεσης στη χρωματογραφική στήλη

**Αντλία (pump):** Η αντλία εξασφαλίζει τη συνεχή άντληση και προώθηση της κινητής φάσης διαμέσου του συνόλου του συστήματος, από τους περιέκτες των διαλυτών μέχρι το δοχείο συλλογής των αποβλήτων του συστήματος, υπό ρυθμιζόμενη υψηλή πίεση και ροή. Αποτελείται από υλικό το οποίο είναι αδρανές προς τους διαλύτες ή οποιαδήποτε μικτή σύνθεση υδατικού ρυθμιστικού και οργανικών διαλυτών. Παρέχει υψηλό όγκο κινητής φάσης έως 10mL/min, ενώ υπάρχουν τρεις κύριοι τύποι αντλιών

που χρησιμοποιούνται, δηλαδή η παλινδρομική αντλία, οι αντλίες σύριγγας και οι αντλίες σταθερής πίεσης

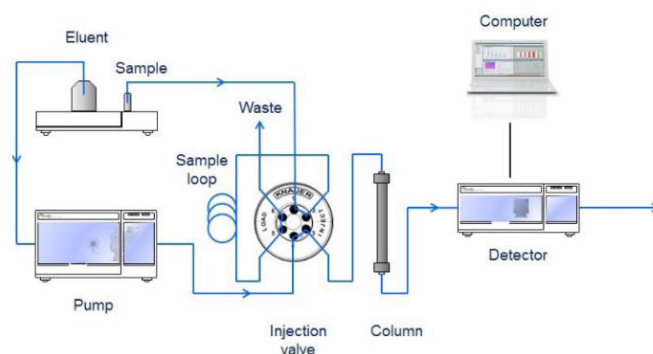
Σύστημα εισαγωγής δείγματος (injection system/ injector valve): περιλαμβάνει βρόγχο σταθερού όγκου ή αυτόματο σύστημα εισαγωγής, μεταβλητού (προεπιλεγμένου) όγκου έγχυσης. Βρίσκεται πριν τη χρωματογραφική στήλη και επιτρέπει την εισαγωγή του δείγματος στη ροή της κινητής φάσης

Χρωματογραφική στήλη (column): Εντός της στήλης επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός του μίγματος στα συστατικά του. Εφόσον ο διαχωρισμός καθορίζεται και από τη θερμοκρασία, η στήλη εμπεριέχεται σε θερμοστατούμενο κλίβανο (column oven)

Ανιχνευτής (detector): Η ανίχνευση των ουσιών που εξέρχονται της στήλης γίνεται συνεχώς, κυρίως με φασματομετρία UV/Vis, όπου το παραγόμενο από τον ανιχνευτή φως προσπίπτει σε κυψελίδα συνεχούς ροής από χαλαζία και μετριέται η απορρόφηση του φωτός

### 2.3.2 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

Η αρχή διαχωρισμού βασίζεται στην κατανομή της αναλυόμενης ουσίας (δείγμα) μεταξύ μιας κινητής φάσης (διαλύτης έκλουσης) και μιας στατικής φάσης (υλικό πλήρωσης της στήλης) όπου ανάλογα με τη χημική δομή της αναλυόμενης ουσίας, τα μόρια επιβραδύνονται κατά τη διέλευση της στατικής φάσης. Οι ειδικές διαμοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων ενός δείγματος και του υλικού συσκευασίας καθορίζουν το χρόνο τους εντός της στήλης. [89] Βάσει των προηγούμενων διαφορετικά συστατικά ενός δείγματος εκλούνται σε διαφορετικούς χρόνους. Στη συνέχεια μια μονάδα ανίχνευσης (π.χ. ανιχνευτής υπεριώδους ακτινοβολίας) αναγνωρίζει τις αναλυόμενες ουσίες μετά την έξοδο από τη στήλη, έτσι τα σήματα μετατρέπονται και καταγράφονται από ένα σύστημα διαχείρισης δεδομένων (λογισμικό υπολογιστή) και στη συνέχεια εμφανίζονται στο χρωματογράφημα. Γενικά, ένα σύστημα HPLC περιέχει έναν διαλύτη, δεξαμενή, μια αντλία, μια βαλβίδα έγχυσης, μια στήλη, μια μονάδα ανιχνευτή και μια μονάδα επεξεργασίας δεδομένων όπως παρουσιάζονται στο πιο κάτω σχήμα. [90]



Εικόνα 21: Διάταξη HPLC (Πηγή: <https://www.knauer.net>)

Οι ανιχνευτές που κυρίως χρησιμοποιούνται στην HPLC είναι: Ανιχνευτές ορατού-υπεριώδους (UV/Vis Detector) ανιχνευτές συστοιχίας φωτοδιόδων (Diode Array Detector, DAD), αγωγιμομετρικοί ανιχνευτές (Conductivity Detector), ανιχνευτές δείκτη διάθλασης (Refractive Index Detector) φασματογράφοι μάζας MS

(Mass Spectroscopy Detector, MS Detector), ανιχνευτής Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Ανιχνευτής NMR) (Nuclear Magnetic Resonance Detector, NMR Detector), ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές (Electrochemical Detector), φθορισμομετρικοί ανιχνευτές (Fluorescence Detector). [88]

### 2.3.3 Υγρή χρωματογραφία υπεραπόδοσης (UHPLC)

Η τεχνική της UHPLC είναι παρόμοια με αυτή της HPLC, ωστόσο λόγω της αυξανόμενης ανάγκης για γρήγορες και εξαιρετικά γρήγορες τεχνικές διαχωρισμού που είναι πιο αποτελεσματικές και έχουν ανώτερη ανάλυση, κρίθηκε η επιτακτική η ανάπτυξη της. Παρέχει στους αναλυτές νέους τρόπους απόκτησης γρήγορων αναλυτικών τεχνικών διαχωρισμού. Εφαρμόζοντας ενίσχυση της χρωματογραφικής ανάλυσης με τον μεγαλύτερο αριθμό επιλύσιμων κορυφών ταυτόχρονα ενισχύεται ο διαχωρισμός της υγρής χρωματογραφίας (LC). [91] Επίσης γίνεται χρήση μικρής ποσότητας υλικών συσκευασίας στήλης και μείωση του μεγέθους των σωματιδίων, επομένως η ανάλυση γίνεται ταχύτερη και πιο ευαίσθητη. Συγκριτικά με την HPLC μειώνει τη χρήση όγκου κινητής φάσης κατά τουλάχιστον 80% γεγονός που προσδίδει σημαντικό πλεονέκτημα για τους αναλυτές παρέχοντας γρήγορα και ακριβή αναλυτικά ευρήματα διαχωρισμού. [92] [93]

Αποτελείται από το σύστημα παροχής διαλυτών που λειτουργεί στα 8000–15000 psi και περιλαμβάνει δύο κύριες ταξινομήσεις συστημάτων παροχής διαλυτών (αντλία σταθερής πίεσης και η αντλία σταθερού όγκου), την στήλη UHPLC η οποία είναι μικρή σε μήκος, τον έλεγχο στήλης ο οποίος ρυθμίζει την θερμοκρασία εντός της στήλης, ένεση δείγματος και τον ανιχνευτή. Οι πιο συνηθισμένοι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται στην ανάλυση UHPLC είναι τύποι που βασίζονται σε UV/vis. Η ανίχνευση των αναλυτών βασίζεται συμβατικά στην απορρόφηση. Ο ανιχνευτής UHPLC πρέπει να έχει μεγάλο μήκος διαδρομής, κυψέλη ανίχνευσης χαμηλού όγκου. Μάλιστα ανάλογα με τον τύπο του ανιχνευτή, η ευαισθησία του UHPLC μπορεί να αυξηθεί κατά 2-3 φορές περισσότερο από αυτή του HPLC. [94]

### 2.4 Υγρή Χρωματογραφία-Φασματομετρία Μάζας (LC-MS)

Η Υγρή Χρωματογραφία-Φασματομετρία Μάζας (LC-MS) είναι μια συνδυαστική τεχνική Υγρής Χρωματογραφίας και Φασματομετρίας Μάζας που χρησιμοποιείται με σκοπό τον διαχωρισμό (HPLC) και ανίχνευση (MS) ουσιών και των ιόντων τους. Ένα φασματόμετρο μάζας σε συνδυασμό με έναν υγρό χρωματογράφο μπορεί να ανιχνεύσει τις χαρακτηριστικές μάζες ιόντων μιας ένωσης ή μιας κατηγορίας ενώσεων. Το σύστημα μπορεί επιλεκτικά να ανιχνεύσει ενώσεις ενδιαφέροντος καθιστώντας έτσι εύκολη την εύρεση και τον εντοπισμό όταν υπάρχουν. [95]

Για ένα σύστημα LC-MS, η οργανολογία περιλαμβάνει:

- (1) Μονάδα LC,
- (2) Διεπαφή μεταξύ του LC και του MS,
- (3) Πηγή ιόντων που ιονίζει δείγματα (π.χ. μονάδα API),

(4) Μονάδα αναλυτή μάζας που χωρίζει το ιόντα με βάση τη μάζα τους σε φορτίο ( $m/z$ ),

(5) Μονάδα ανιχνευτή που ανιχνεύει τα διαχωρισμένα ιόντα

Για να γίνει πιο κατανοητή η λειτουργία της τεχνικής είναι σκόπιμο να αναλυθεί η οργανολογία της φασματοσκοπίας μαζών.

#### 2.4.1 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΜΑΖΩΝ

Η αναλυτική τεχνική ταυτοποίησης και προσδιορισμού της αρχικής ένωσης από τις πληροφορίες που παρέχει το φάσμα μαζών της, ονομάζεται Φασματομετρία Μαζών (Mass Spectrometry/MS). Η φασματομετρία μάζας επιτρέπει τον προσδιορισμό, τον χαρακτηρισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό των χημικών ενώσεων ως αναλυτών-στόχων με βάση τις αντίστοιχες μοριακές τους μάζες και τα πρότυπα κατακερματισμού. [96] Η λογική του MS είναι να σχηματίζει ιόντα από ένα δείγμα, να διαχωρίζει τα ιόντα με βάση τον λόγο  $m/z$  τους και στην συνέχεια να προχωρήσει στην μέτρηση της ποσότητας των ιόντων. [97] Τα άτομα ή μόρια μπορούν να ταυτοποιηθούν, με τη βοήθεια του χαρακτηριστικού φάσματός τους, με συσχέτισμό των γνωστών μαζών με ήδη υπάρχουσες μάζες ή μέσω του χαρακτηριστικού τρόπου θραυσματοποίησης.

Τα φασματομέτρα μάζας λειτουργούν ιονίζοντας μόρια ενώ στη συνέχεια ταξινομούν και αναγνωρίζουν τα ιόντα σύμφωνα με τις αναλογίες μάζας προς φορτίο ( $m/z$ ). Δύο βασικοί παράγοντες αυτής της διαδικασίας είναι η πηγή ιόντων, που παράγει τα ιόντα, και ο αναλυτής μάζας, που ταξινομεί τα ιόντα. Συνήθως γίνεται χρήση αρκετών τύπων πηγών ιόντων, ανάλογα της κατηγορίας ενώσεων, ωστόσο στην παρούσα έρευνα έγινε χρήση του τύπου electrospray ionization (ιονισμός ηλεκτροψεκασμού). [98]

#### 2.4.2 ΤΜΗΜΑΤΑ ΦΑΣΜΑΤΟΓΡΑΦΟΥ ΜΑΖΩΝ

Τα όργανα MS αποτελούνται μια πηγή ιόντων, η οποία μπορεί να μετατρέψει μόρια δείγματος αέριας φάσης σε ιόντα, ένα αναλυτής μάζας, ο οποίος ταξινομεί τα ιόντα με βάση τις μάζες τους εφαρμόζοντας ηλεκτρομαγνητικά πεδία και έναν ανιχνευτή, ο οποίος μετρά την τιμή μιας ποσότητας δείκτη και έτσι παρέχει δεδομένα για τον υπολογισμό της αφθονίας κάθε ιόντος που υπάρχει. Η τεχνική βρίσκει εφαρμογή τόσο ποιοτική όσο και ποσοτική χρήση καθώς περιλαμβάνει την αναγνώριση άγνωστων ενώσεων, τον προσδιορισμό της ισοτοπικής σύστασης στοιχείων σε ένα μόριο και τον προσδιορισμό της δομής μιας ένωσης παρατηρώντας τον κατακερματισμό της. [97]

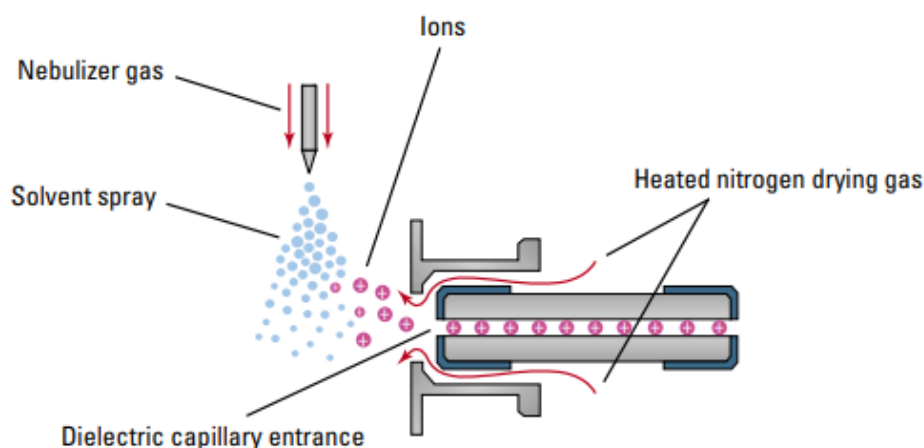
#### 2.4.3 Ιονισμός/Πηγή ιόντων και διεπαφές

Η υγρή χρωματογραφία διαχωρίζει το υγρό μείγμα συστατικών, ωστόσο το υγρό που περιέχει μείγμα συστατικών μεταφέρεται στην πηγή ιόντων του φασματομέτρου μάζας. Καθώς η πηγή ιόντων λειτουργεί κάτω από υψηλό κενό, λόγω της διαφοράς στην πίεση είναι πρακτικά δύσκολο να εξατμιστούν οι μαζεμένες οι σταγόνες υγρού χωρίς να χάνεται μείγμα συστατικών. Έτσι κρίθηκε αναγκαία η εισαγωγή των τεχνικών ιονισμού ατμοσφαιρικής πίεσης (API), οι οποίες επέκτειναν σημαντικά τον αριθμό των ενώσεων που μπορούν να αναλυθούν επιτυχώς με LC/MS. Οι συνήθειες τεχνικές ιονισμού ατμοσφαιρικής πίεσης είναι [99]:

- Direct liquid Introduction (DLI)
- Atmospheric-Pressure Ionization (API)
- Electrospray Ionization (ESI)
- Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI)
- Thermo spray and Plasma spray Ionization (TSPI)
- Atmospheric pressure photo Ionization (APPI)
- Particle Beam Ionization
- Continuous Flow Fast Atom Bombardment (FAB)

#### 2.4.4 Ιονισμός ηλεκτροψεκασμού (Electrospray ionization)

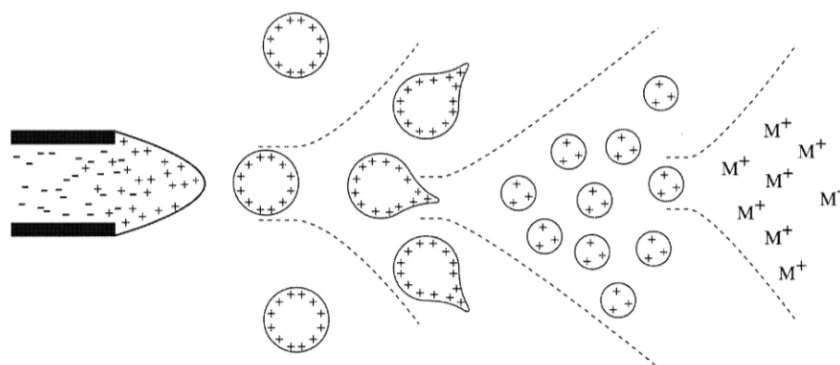
Ο ιονισμός ηλεκτροψεκασμού (ESI) αναπτύχθηκε από τον Αμερικανό χημικό John Bennett Fenn και αποτελεί την πιο χρήσιμη πηγή ιόντων, η οποία χρησιμοποιεί ηλεκτρική ενέργεια για να βοηθήσει τη μεταφορά ιόντων από το διάλυμα στην αέρια φάση πριν υποβληθούν σε φασματομετρική ανάλυση μάζας. [100] Το υγρό δείγμα περασμένο μέσα από έναν τριχοειδές σωλήνα, ο οποίος διατηρείται σε υψηλό θετικό ή αρνητικό ηλεκτρικό δυναμικό. Λόγω της ύπαρξης ηλεκτρικού δυναμικού τα φορτισμένα σταγονίδια σχηματίζονται στο τριχοειδές άκρο τα οποία στη συνέχεια υποβάλλονται σε διαδικασία εξάτμισης (νεφελοποίησης). [99] Τα σταγονίδια εξατμίζονται γρήγορα με την εφαρμογή θερμότητας και ξηρού αζώτου και το υπολειπόμενο ηλεκτρικό φορτίο στα σταγονίδια μεταφέρεται στις αναλυόμενες ουσίες. Οι ιονισμένες αναλυόμενες ουσίες στη συνέχεια μεταφέροντα στο υψηλό κενό του φασματομέτρου μάζας μέσω μιας σειράς μικρών ανοιγμάτων και τάσεων εστίασης. Η πηγή ιόντων και τα επακόλουθα οπτικά ιόντα μπορούν να λειτουργήσουν για την ανίχνευση θετικών ή αρνητικών ιόντων και μπορεί να πραγματοποιηθεί εναλλαγή μεταξύ αυτών των δύο τρόπων λειτουργίας σε μια αναλυτική εκτέλεση. [101]



Εικόνα 22: Αναπαράσταση πηγής ιόντων ηλεκτροψεκασμού (Πηγή: Basics of LC-MS)

Οι ουδέτερες ενώσεις μπορούν επίσης να μετατραπούν σε διάλυμα ιοντικής μορφής ή σε αέρια φάση με πρωτονίωση ή κατιονισμό (π.χ. κατιονισμό μετάλλου) και ως εκ τούτου μπορούν να μελετηθούν με ESI-MS. Συνοπτικά η μεταφορά ιοντικών ειδών από το διάλυμα στην αέρια φάση μέσω ESI περιλαμβάνει τρία στάδια:

- 1) διασπορά ενός λεπτού ψεκασμού σταγονιδίων φόρτισης
- 2) εξάτμιση διαλύτη και
- 3) εξώθηση ιόντων από τα πολύ φορτισμένα σταγονίδια



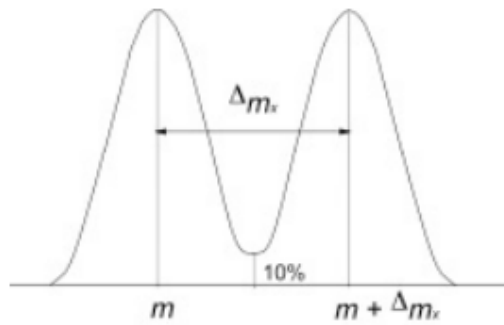
Εικόνα 23: Μηχανισμός electrospray ionization (Πηγή: Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications)

## 2.5 Αναλυτές μάζας (Mass analysers)

### 2.5.1 Αρχή λειτουργίας

Μετά τον ιονισμό τα ιόντα μεταφέρονται στον αναλυτή μάζας όπου ο διαχωρισμός των ιόντων γίνεται σύμφωνα με την αναλογία μάζας προς φορτίο ( $m/z$ ). Τα φασματόμετρα μάζας λειτουργούν με τη δυναμική των φορτισμένων σωματιδίων σε ηλεκτρικά και μαγνητικά πεδία στο κενό που περιγράφεται από τον νόμο της δύναμης Lorentz και τον δεύτερο νόμο της κίνησης του Νεύτωνα. [102]

Ο διαχωρισμός είναι απαραίτητος, έτσι ώστε το μετρούμενο ιοντικό ρεύμα στον ανιχνευτή ιόντων, που ακολουθεί των αναλυτή μαζών, να αντιστοιχεί σε ιόντα με συγκεκριμένο λόγο  $m/z$ . Από τον τύπο του αναλυτή μαζών εξαρτάται η Διαχωριστική Ικανότητα (Resolution,  $R$ ) του οργάνου, που είναι το σπουδαιότερο χαρακτηριστικό της ποιότητας ενός φασματόμετρου μαζών. Η διαχωριστική ικανότητα ορίζεται από τον τύπο  $R = M/\Delta M$  όπου  $M$ : μάζα της πρώτης κορυφής και  $\Delta M$ : διαφορά μαζών δύο διαδοχικών κορυφών. Ικανοποιητικός διαχωρισμός θεωρείται ότι επιτυγχάνεται όταν δύο περίπου κορυφές ίδιου ύψους επικαλύπτονται σε ύψος που δεν υπερβαίνει το 10 % του ύψους των κορυφών, όπως φαίνεται πιο κάτω.



Εικόνα 24: Διαχωριστική ικανότητα φασματομετρίας μαζών

### 2.5.2 Είδη αναλυτών μάζας

- Quadrupole (Τετράπολο)
- Time-of-flight (Αναλυτής χρόνου πτήσης)
- Ion trap (Παγίδα ιόντων)
- FTICR (Fourier transfer ion cyclotron resonance) [99]

### 2.5.3 Αναλυτής τύπου τετράπολο

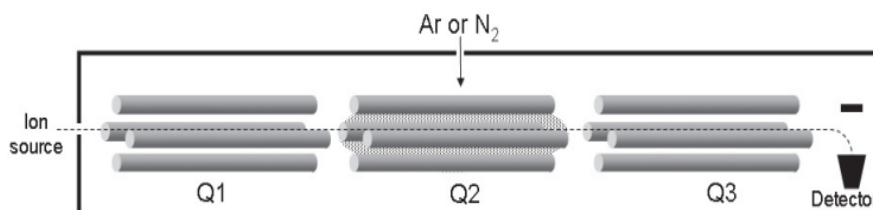
Οι τετραπολικοί αναλυτές αποτελούν τον πιο ευρέως χρησιμοποιημένο τύπο αναλυτή μάζας. Διαθέτουν πλεονεκτήματα όπως χαμηλή σχετικά τιμή, συμπαγή κατασκευή, μεγαλύτερες ανοχές, ταχύτερη σάρωση (< 100 ms), δυνατότητα συνδυασμών με όργανα και συμβατότητα με χρωματογραφικές τεχνικές. [103] Αποτελείται από ένα ζεύγος θετικών και αρνητικών ράβδων διατεταγμένων με εναλλακτικό τρόπο. Ένα ιόν που διέρχεται από τον τετραπολικό αναλυτή θα έλκεται διαδοχικά και στη συνέχεια θα απωθείται από κάθε ράβδο μέχρι να φτάσει στο πεδίο "σέλας"

Ένας τετραπολικός αναλυτής μάζας αποτελείται από τέσσερις παράλληλες ράβδους διατεταγμένες σε ένα τετράγωνο. Τα ιόντα της αναλυόμενης ουσίας που έχουν προηγουμένως μετατραπεί στην αέρια φάση κατευθύνονται προς το κέντρο του τετραγώνου. Οι τάσεις που εφαρμόζονται στις ράβδους δημιουργούν ηλεκτρομαγνητικά πεδία. Αυτά τα πεδία καθορίζουν ποια αναλογία μάζας προς φορτίο ιόντων μπορεί να περάσει μέσα από το φίλτρο σε μια δεδομένη στιγμή. Οι τετραπολικοί αναλυτές μάζας μπορούν να λειτουργήσουν μέσα δύο λειτουργίες:

- Λειτουργία σάρωσης (scan)
- Επιλεγμένη λειτουργία παρακολούθησης ιόντων (SIM).

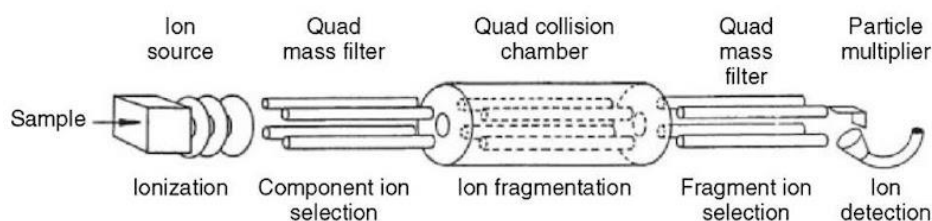
Στη λειτουργία σάρωσης, ο αναλυτής μάζας παρακολουθεί μια σειρά από αναλογίες μάζας προς φόρτιση. Στη λειτουργία SIM, ο αναλυτής μάζας παρακολουθεί μόνο μερικές αναλογίες μάζας προς φόρτιση αλλά παρέχει πληροφορίες για λιγότερα ιόντα (πιο ευαίσθητη από τη λειτουργία σάρωσης). [103]





Εικόνα 25: Ένα τριπλό τετραπολικό φασματόμετρο μάζας. Τα Q1 και Q3 λειτουργούν ως φίλτρα μάζας και μπορούν να στερεωθούν, να σαρωθούν ή να κλιμακωθούν ανεξάρτητα. Στο Q2 πραγματοποιούνται συγκρούσεις που περιέχει ένα αδρανές αέριο χαμηλής πίεσης επιφέροντας τον κατακερματισμό (Πηγή: Principles and Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry)

Εντός του τετράπολου κατά την διάρκεια λειτουργίας του συνδυάζονται τρία τετράπολα για την εξαγωγή του αποτελέσματος. Αρχικά επιλέγεται στο πρώτο τετράπολο (Q1) ένα μόνο ιόν (μητρικό ιόν) που στη συνέχεια οδηγείται στο δεύτερο τετράπολο (Q2), όπου συγκρούεται με περίσσεια ενός αδρανούς αερίου (αργό ή άζωτο). Το τετράπολο Q2 αποτελεί την κυψελίδα συγκρούσεων (collision cell) και λειτουργεί ως χώρος θραυσματοποίησης του μητρικού ιόντος, έτσι ως αποτέλεσμα έχουμε θραυσματοποίηση του αρχικού μητρικού ιόντος και παραγωγή θυγατρικών ιόντων. Στο τρίτο τετράπολο (Q3), πραγματοποιείται ο διαχωρισμός και η μέτρηση των θυγατρικών ιόντων.



Εικόνα 26: Σχηματική απεικόνιση φασματόμετρο μάζας τριπλού τετράπολου (Πηγή: Quadrupole mass analyzers: theoretical and practical considerations (Proteomics))

#### 2.5.4 Ανιχνευτής

Ο ανιχνευτής είναι ένα σημαντικό εργαλείο του φασματόμετρου μάζας παράγοντας το ρεύμα που είναι ανάλογο με τον αριθμό των ιόντων που τον χτυπούν. Μόλις σχηματιστούν τα ιόντα περνούν από τον αναλυτή, για να ανιχνευθούν και να μετατραπούν σε σήμα. Επιγραμματικά πιο κάτω δίνονται οι τύποι ανιχνευτών που χρησιμοποιούνται.

- Φαρανταϊκό Κύπελλο (Faraday Cup)
- Ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής (Electron Multiplier)
- Φωτογραφικό πιάτο (Photographic Plate)

#### 2.5.5 Ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής (Electron Multiplier)

Ο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος ανιχνευτής ιόντων στη φασματομετρία μάζας είναι ο πολλαπλασιαστής ηλεκτρονίων (EM). Η θεμελιώδης αρχή του πολλαπλασιαστή είναι, όπως υποδηλώνει το όνομα, ο πολλαπλασιασμός του αριθμού των ηλεκτρονίων που αναδύονται από ένα ηλεκτρόδιο σε σύγκριση με τον αριθμό που

προσπίπτει σε αυτό. [104] Σε αυτόν τον ανιχνευτή, τα ιόντα από τον αναλυτή επιταχύνονται σε υψηλή ταχύτητα προκειμένου να ενισχυθεί η αποτελεσματικότητα ανίχνευσης. Εκεί εφαρμόζεται διαφορά δυναμικού ( $\Delta V$ ) στα δύο άκρα με τρόπο, ώστε να εμφανίζεται γραμμική μεταβολή του δυναμικού κατά μήκος του σωλήνα. [105]

## 2.6 Βιολογικά υποστρώματα

Τα βιολογικά υποστρώματα αποτελούν σημαντικό παράγοντα κατά την διάρκεια της βιοανάλυσης καθώς επιτρέπουν την διενέργεια μελετών σε τοξικολογικές μελέτες, σε φαρμακοκινητικές μελέτες, σε κλινικές δοκιμές, μελέτες βιοδιαθεσιμότητας και βιοϊσοδυναμίας και στη βιοϊατρική σε μελέτες μεταβολισμού, κλινικές αναλύσεις, μελέτες θεραπευτικού αποτελέσματος με παρακολούθηση συγκέντρωσης φαρμάκου στο αίμα, ώστε να βρεθεί η θεραπευτική δόση, στη διαγνωστική.

Στα βιολογικά υποστρώματα ανήκουν το αίμα, τα ούρα, οι τρίχες, οι όνυχες, το εγκεφαλονωτιαίο υγρό, του οποίου η ανάλυση δίνει πληροφορίες για την ποσότητα μίας ουσίας στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) κατά τη στιγμή του θανάτου, τα στοματικά υγρά, ο ιδρώτας, το μηκόνιο, το περικαρδικό υγρό, το οφθαλμικό υγρό, οι ιστοί από όργανα, αδένες, οστά, γαστρικό περιεχόμενο κλπ. Κάθε βιολογικό υπόστρωμα αποκαλύπτει διαφορετικές πληροφορίες ανάλογα από το που προέρχεται. Στην συγκεκριμένη εργασία το βιολογικό υπόστρωμα που επιλέχθηκε να εξεταστεί για την ανάπτυξη και επικύρωση της μεθόδου είναι το ολικό αίμα, το οποίο προσφέρει την καλύτερη συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης μίας ουσίας και της ληφθείσας δόσης. Ο όρος ολικό αίμα αναφέρεται στο αίμα, το οποίο συνδυάζεται με έναν αντιπηκτικό παράγοντα κατά τη διαδικασία συλλογής και θεωρείται ένα ειδικά τυποποιημένο προϊόν για περαιτέρω επεξεργασία για αναλυτικούς σκοπούς. [106]

### 2.6.1 Το ολικό αίμα ως βιολογικό υπόστρωμα

Το αίμα ως βιολογικό υπόστρωμα μπορεί να συλλεχθεί μόνο με παρεμβατικές μεθόδους καθώς δεν εξέρχεται αυτούσιο εκτός του ανθρώπινου οργανισμού όπως τα ούρα για παράδειγμα. Αποτελείται από το πλάσμα που περιέχει 91% νερό, 7% πρωτεΐνες (ινωδογόνο, αλβουμίνη, σφαιρίνη), 2% θρεπτικά συστατικά, αμινοξέα, σάκχαρα, λιπίδια, ηλεκτρολύτες και τα ερυθρά αιμοσφαίρια, λευκά αιμοσφαίρια και τα αιμοπετάλια. Στην βιοανάλυση η χρήση αίματος μπορεί να παρουσιάσει μειονεκτήματα όπως ότι :

- Οι συγκεντρώσεις των φαρμάκων είναι σε μερικές περιπτώσεις χαμηλές και ανιχνεύσιμες για σύντομο χρονικό διάστημα
- Δεν υπάρχει πάντα συσχέτιση των κλινικών αποτελεσμάτων με τη συγκέντρωση στο αίμα
- Σε περιπτώσεις φαρμάκων με μεγάλο ποσοστό κατανομής, και πιο συγκεκριμένα σε αυτά που έχουν βασικά δραστικά συστατικά, είναι προτιμότερη η ανάλυση άλλων βιολογικών δειγμάτων, όπως τα ούρα

## Κεφάλαιο 3

### 3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### Πειραματικό – Ερευνητικό Μέρος

Για την περάτωση των πειραμάτων ακολουθήθηκε η πιο κάτω πειραματική διαδικασία, συνοδευόμενη από τα όργανα και υλικά που χρησιμοποιήθηκαν.

#### 3.1 Οργανολογία και Υλικά

##### 3.1.1 Χημικά Αντιδραστήρια

Για την εύρυθμη λειτουργία του LC-MS χρησιμοποιήθηκαν αντιδραστήρια για χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (UHPLC).

Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν:

- Benzylone 10mg, LOT no.6986 (LGC standards LTD, UK)
- Υψηλής καθαρότητας νερό, Aquatron Water Still A4000D, Bibby Sterilin Limited (Staffordshire, UK).
- Acetonitrile, CARLO ERBA Reagents GmbH (Cornaredo, Italy)
- Methanol, CARLO ERBA Reagents GmbH (Cornaredo, Italy)
- Water UHPLC-MS grade, CARLO ERBA Reagents GmbH (Cornaredo, Italy)
- Formic acid (99%) προμηθεύτηκαν από την εταιρεία CARLO ERBA Reagents GmbH (Cornaredo, Italy)

##### 3.1.2 Οργανολογία

Για την διεξαγωγή του πειράματος και την ανάλυση των δειγμάτων, χρησιμοποιήθηκε σύστημα Υγρής Χρωματογραφίας Υπέρ Υψηλής Απόδοσης, Dionex UHPLC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, United States), συζευγμένο με διαδοχική Φασματομετρία Μαζών Q-Trap 5500™ mass spectrometer (Sciex, Darmstadt, Germany) το οποίο αποτελείται από τα εξής μέρη:

- Απαερωτή
- Δυαδική αντλία
- Αυτόματο δειγματολήπτη
- Κλίβανο στήλης
- Λογισμικό καταγραφής (Analyst 17.1)

##### 3.1.2.1 Συσκευές

- Αναλυτική στήλη Thermo Scientific Accucore C18 (50 x 30 mm), Particle size 2,6μm
- Ατομικός αναδευτήρας περιδίνησης (vortex), Heidolph REAX top
- Γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες
- Ηλεκτρονικός αναλυτικός ζυγός ακριβείας  $\pm 0,0001$ g, OHAUS Exlorert™
- Μηχανική πιπέτα μεταβλητού όγκου (Eppendorf Research, 2-20μL, Gilson, 50-200μL)
- Nichiryo Autoclavable Nichipet EX II, 100-1000μL
- Ογκομετρικοί κύλινδροι

- Ρύγχη πιπετών (DF200ST, DIAMOND TIPACK, 20-200 $\mu$ L, SARSTEDT AG&CO. KG, 1000 $\mu$ L)
- Σύστημα εξάτμισης συνδεδεμένο με άζωτο, Cole-Palmer-Linde Gas Greece
- Βελόνες εξάτμισης 127mm, Cole Palmer
- Φιαλίδια HPLC, Sun-Sri<sup>TM</sup>, 0,25ml
- Φιαλίδια Eppendorf χωρητικότητας 2ml

### 3.2 Πρωτόκολλο προκατεργασίας δειγμάτων LLE (Εκχύλιση Υγρού-Υγρού)

Πραγματοποιείται προσθήκη ολικού αίματος και καρβονικού ρυθμιστικού διαλύματος pH = 9 ποσότητας 200 $\mu$ l έκαστο σε φιαλίδιο Eppendorf χωρητικότητας 2ml. Ακολουθεί ανάδευση δια χειρός και με χρήση αναδευτήρα για χρονικό διάστημα 10 λεπτών. Παρασκευάζεται διάλυμα που περιέχει MTBE σε ποσότητα 4957 $\mu$ l και HCl συγκέντρωσης 0,1M και περιεκτικότητας 37% σε ποσότητα 43ml. Ποσότητα 1 $\mu$ l του διαλύματος MTBE-HCl προστίθεται στο Eppendorf και ακολουθεί εκ νέου έντονη ανάδευση μέσω αναδευτήρα. Ακολούθως έπεται φυγοκέντριση στις 10000 στροφές για 10 λεπτά και λήψη της υπερκείμενης φάσης. Στη συνέχεια έχουμε εξάτμιση του υπερκείμενου μέχρι ξηρού, με χρήση ρεύματος αζώτου και μετά την περάτωση της ξήρανσης, ακολουθεί επαναδιάλυση σε 50 $\mu$ l διαλύματος A:B (88:12). Η διαδικασία ολοκληρώνεται με ανάδευση και λήψη του διαλύματος και τοποθέτηση του σε φιαλίδιο HPLC, με σκοπό την τοποθέτηση του στον αυτόματο δειγματολήπτη.

### 3.3 Παρασκευή λευκών (blank) δειγμάτων

Για την παρασκευή των λευκών δειγμάτων έγινε λήψη ολικού αίματος από άτομα τα οποία δεν κάνουν χρήση βενζυλόνης ενώ στην συνέχεια ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία όπως περιγράφεται πιο πάνω.

### 3.4 Συνθήκες Υγρής Χρωματογραφίας

Όπως αναφέρθηκε και πριν η ανάλυση διεξήχθη σε σύστημα Dionex UHPLC (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) που αποτελείται από έναν απαερωτή, μια δυαδική αντλία, έναν αυτόματο δειγματολήπτη και έναν κλίβανο στήλης. Το σύστημα έχει συζευχθεί με φασματόμετρο μάζας Q-Trap 5500<sup>TM</sup> (Sciex, Darmstadt, Γερμανία), που είναι σε λειτουργία παρακολούθησης πολλαπλών αντιδράσεων (MRM) και εξοπλισμένο με μια πηγή Turbo V ιονισμού ηλεκτροψεκασμού (ESI) που λειτουργεί σε positive mode.

Ο διαχωρισμός των ιόντων πραγματοποιήθηκε σε στήλη τύπου Accupore C18 (50 mm x 3 mm, με το μέγεθος σωματιδίων να είναι 2,6  $\mu$ m) η οποία περιλαμβάνει φυσίγγιο διαστάσεων 2,1 mm x 0,2  $\mu$ m (Thermo Scientific, Waltham, MA, ΗΠΑ). Χρησιμοποιείται ρυθμός ροής 0,5ml/λεπτό. Οι στήλες τίθενται σε λειτουργία στη θερμοκρασία των 30°C. Αποτελούνται από κινητές φάσεις :10 mM υδατικού οξικού αμμωνίου CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>(aq) (ρυθμισμένο σε pH 3,5) με 0,1% μυρμηκικό οξύ (διαλύτης έκλουσης A) και ακετονιτρίλιο (AcCN) βαθμού UHPLC-MS με 0,1% μυρμηκικό οξύ (διαλύτης έκλουσης B), το οποίο είναι απαερωμένο από την εταιρεία Elmasonic S ultrasonic, Γερμανία.

Εντός του αυτόματου δειγματολήπτη η θερμοκρασία ήταν 5°C. Ακόμα έγινε ξέπλυμα της βελόνας του εγχυτήρα με 200  $\mu$ L μεθανόλης πριν και μετά από κάθε ένεση

ενώ ο όγκος του δείγματος που εγχύθηκε ήταν 1  $\mu\text{L}$ . Η έκλυση το οργανικού διαλύτη B γίνεται θερμοπρογραμματιζόμενα με πρόγραμμα βαθμίδωσης στον υπολογιστή όπως φαίνεται πιο κάτω στον πίνακα:

Πίνακας 4: Πρόγραμμα έκλυσης της κινητής φάσης σε σταθερή ανά τον χρόνο ροή

No.	Χρόνος	Pοή (ml/min)	%B	Curve
1	0	RUN		
2	0.1	0.5	12	5
3	2.5	0.5	40	5
4	4.5	0.5	100	5
5	6	0.5	100	5
6	6.1	0.5	12	5
7	7.5	0.5	12	5
8	7.5	STOP RUN		

Τα δείγματα λαμβάνονται από τα φιαλίδια μέσω βελόνας ρεοδίνης του αυτόματου δειγματολήπτη (5°C) και ο όγκος έγχυσης ισοδυναμεί με 1 $\mu\text{l}$ . Στην στατική φάση, η αντίστροφης φάσης στήλη Thermo Fischer Scientific πληρώνεται με οκταδέκυλο πυρήτιο (ODS)-Si-C18. Το μέγεθος των πόρων ανέρχεται στα 80 $\text{\AA}$ , ενώ το μέγεθος των διερχόμενων μορίων στα 2,6 $\mu\text{m}$ . Η διάμετρος της αναλυτικής στήλης, ανέρχεται στα 3mm και το μήκος της στα 50mm. Ως όργανο καταγραφής χρησιμοποιείται ο φασματογράφος μαζών, καθώς είναι ενωμένος με την UHPLC μέσω ιώδους σωλήνωσης από ανοξείδωτο ατσάλι. Τέλος υπάρχει μια δεύτερη σωλήνωση υπάρχει για τα απόβλητα.

### 3.5 Συνθήκες MS/MS

Το φασματόμετρο μάζας που χρησιμοποιήθηκε Q-Trap 5500<sup>TM</sup> mass spectrometer (Sciex, Darmstadt, Germany) περιλαμβάνει πηγή ιονισμού ηλεκτροψεκασμού (ESI) που λειτουργεί σε positive mode. Οι εφαρμοζόμενες συνθήκες εισόδου ESI ήταν οι εξής:

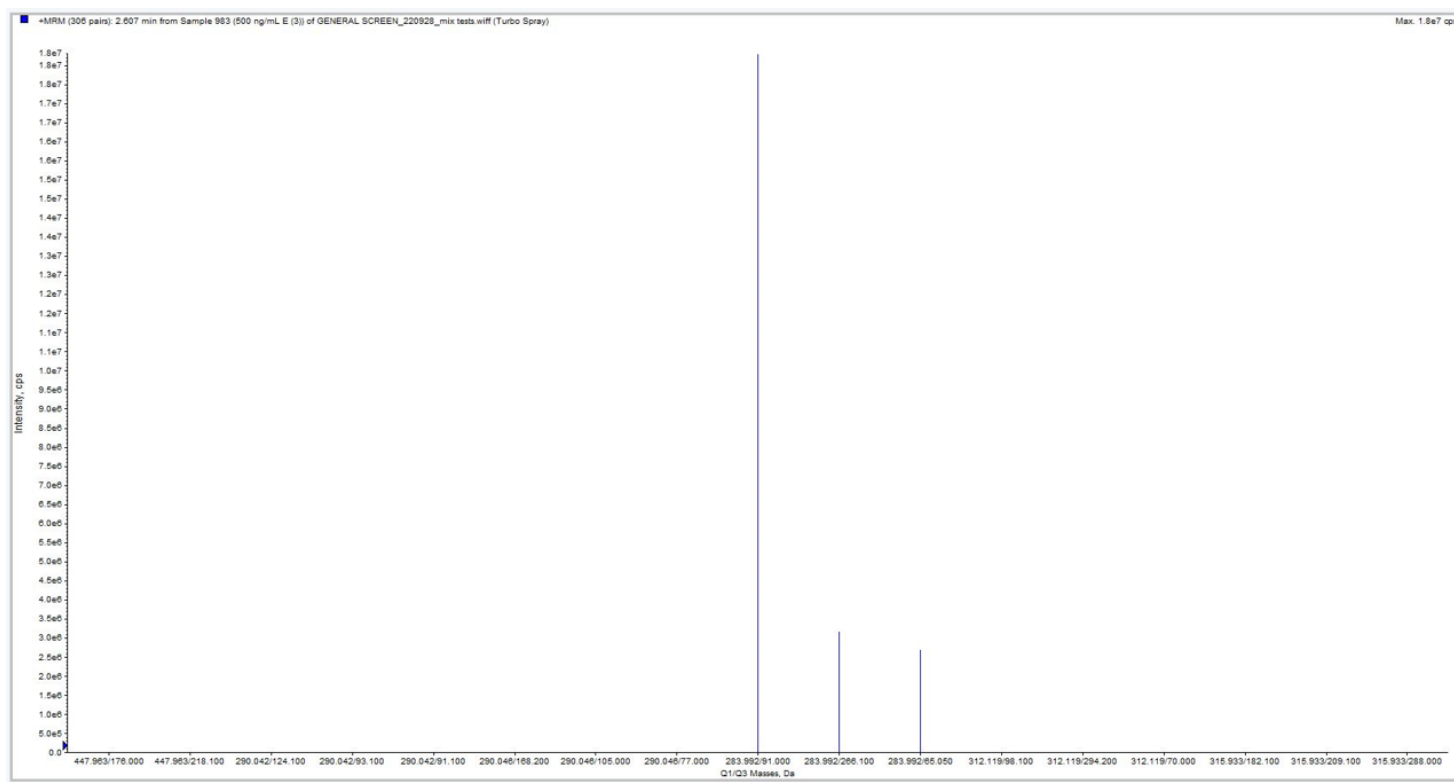
- Αέριο 1, άζωτο (55 psi)
- Αέριο 2, άζωτο (55 psi)
- Τάση ψεκασμού ιόντων 5500 V, θετική λειτουργία
- Θερμοκρασία πηγής ιόντων: 550°C.

Το άζωτο χρησιμοποιήθηκε ως αέριο παραπετάσματος στα 55 psi. Η βελτιστοποίηση των χρόνων παραμονής και όλων των άλλων ρυθμίσεων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τον προγραμματισμένο αλγόριθμο MRM που είναι ενσωματωμένος στην έκδοση λογισμικού Sciex Analyst® έκδοση 1.7.1 (Sciex, Darmstadt, Γερμανία), στον τρόπο αυτόματης ποσοτικής βελτιστοποίησης. Το λογισμικό SciexOS 1.6 1 (Sciex, Darmstadt, Γερμανία) εφαρμόστηκε για την επεξεργασία δεδομένων.

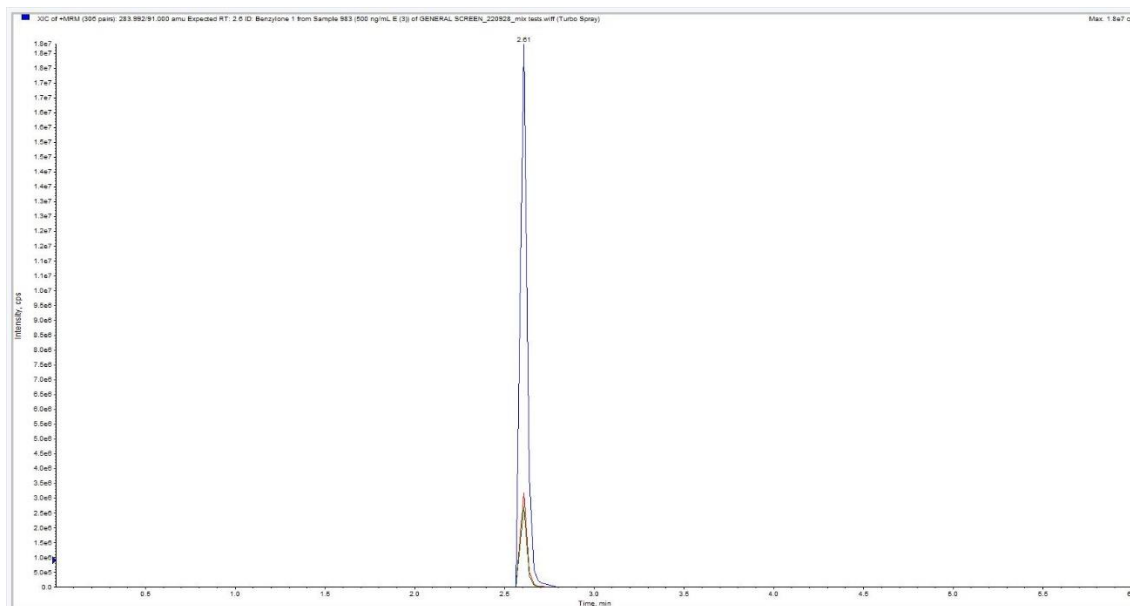
Πίνακας 5: Παράμετροι MS για τον προσδιορισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό της βενζυλόνης

Μάζα Q1	Μάζα Q3	Χρόνος κατακράτησης (min)	Ταυτότητα ένωσης	DP(V)	EP(V)	CE(V)	CXP(V)
283,992	91	2,6	Benzylone 1	31	10	45	10
283,992	266,1	2,6	Benzylone 2	31	10	19	18
283,992	65,05	2,6	Benzylone 3	31	10	77	8

Όπου DP είναι μια τάση που εφαρμόζεται στο στόμιο του φασματογράφου που βοηθά στην αποτροπή της συσσώρευσης των ιόντων μεταξύ τους, EP το δυναμικό που ασκείται κατά την είσοδο του δείγματος, CE αναφέρεται στον ρυθμό επιτάχυνσης των ιόντων καθώς εισέρχονται στο δεύτερο τετράπολο και CXP εστιάζει και επιταχύνει τα ιόντα από το Q2 και προς το Q3 ενώ βοηθά όλα τα ιόντα κατακερματισμού από το Q2 και στο Q3.



Εικόνα 27: Διάγραμμα ταυτοποίησης ιόντων βενζυλόνης



Εικόνα 28: Χρόνος έκλουσης βενζυλόνης

### 3.6 Σκοπός διπλωματικής εργασίας

Σκοπός της εργασίας ήταν η ανασκόπηση και περιγραφή των νέων ψυχοδραστικών ενώσεων και η ανάπτυξη μιας μεθόδου προσδιορισμού της βενζυλόνης σε δείγματα ολικού αίματος με την τεχνική LC-MS/MS με στοιχεία επικύρωσης όπως η αξιολόγηση των παραμέτρων του ορίου ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης, της σταθερότητας, της εκλεκτικότητας της μεθόδου, της ακρίβειας μεθόδου, του φαινομένου του υποστρώματος, του φαινομένου της μεταφοράς, της γραμμικότητας κ.ά. Τα δείγματα προήλθαν από αίμα που λήφθηκε από νεκροτομές που έγιναν στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, ζώντες ασθενείς του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Η μέθοδος αναπτύχθηκε με κύριο σκοπό να έχει την ικανότητα να προσδιορίζει την ουσία της βενζυλόνης στα δείγματα, με εύκολη και γρήγορη προκατεργασία δείγματος, χωρίς την χρήση μεγάλων ποσοτήτων διαλυτών, έχοντας ωστόσο όμως τα επιθυμητά αποτελέσματα, εντός των ορίων εγκυρότητας που προέρχονται από το Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology, δηλαδή η μέθοδος να είναι αρωγός στον ακριβή προσδιορισμό της ουσίας.

### 3.7 Επικύρωση Μεθόδου

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων είναι απαραίτητη η ανάπτυξη, η επικύρωση και η εφαρμογή μιας κατάλληλης αναλυτικής μεθόδου. Η επικύρωση είναι η διαδικασία διεξαγωγής ενός συνόλου πειραμάτων για τη δημιουργία αντικειμενικών αποδείξεων ότι μια μέθοδος είναι κατάλληλη για το σκοπό και για τον εντοπισμό των περιορισμών της μεθόδου υπό κανονικές συνθήκες λειτουργίας. Στην παρούσα εργασία έγινε χρήση των Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology (ASB Approved March 2019, ANSI Approved November 2019).

Ανάλογα με την ανάπτυξη και χρήση της μεθόδου, υπάρχουν τρεις υποκατηγορίες επικύρωσης: 1. Η Πλήρης Επικύρωση (Full Validation), η οποία αναφέρεται στην ανάπτυξη μιας καινούργιας βιοαναλυτικής μεθόδου, 2. Η Μερική Επικύρωση (Partial

Validation), η οποία εφαρμόζεται όταν υπάρχει τροποποίηση μιας ήδη επικυρωμένης βιοαναλυτικής μεθόδου, και απλά γίνεται μεταφορά μεταξύ εργαστηρίων, μεταξύ οργάνων, αλλάζει κάτι στην προκατεργασία του δείγματος, στο λογισμικό ή στο όργανο, και 3. Η Διασταυρούμενη Επικύρωση (Cross Validation), η οποία ουσιαστικά είναι η σύγκριση μεταξύ δύο ή περισσότερων βιοαναλυτικών μεθόδων ως προς τις παραμέτρους που εξετάζονται για επικύρωση.

### 3.8 Εκλεκτικότητα

Ορίζεται ως η ικανότητα μιας αναλυτικής μεθόδου να ανιχνεύει και να διαφοροποιεί την αναλυόμενη ένωση από άλλες ουσίες, που ενδεχομένως υπάρχουν στο δείγμα, συμπεριλαμβανομένων των συναφών της ουσιών. Για την διεξαγωγή των πειραμάτων εκλεκτικότητας χρησιμοποιήθηκαν 10 κλινικά δείγματα μεταθανάτιου αίματος και 5 δείγματα αίματος σε αποσύνθεση. Τα δείγματα αναλύθηκαν χωρίς την προσθήκη εσωτερικού προτύπου για να αποδειχθεί η απουσία κοινών παρεμβολών από το υπόστρωμα.

### 3.9 Επιμόλυνση εκ μεταφοράς (Carryover effect)

Ορίζεται ως η εμφάνιση σήματος της αναλυόμενης ουσίας στα δείγματα που ακολουθούν την ανάλυση θετικού δείγματος. Το γεγονός αυτό (μεταφορά ουσίας σε επόμενο δείγμα) μπορεί να οδηγήσει σε ανακριβή αποτελέσματα κατά την ποιοτική ή ποσοτική ανάλυση κατά τη χρήση μεθόδων οργάνων. Απαιτείται αξιολόγηση της μεταφοράς κατά την επικύρωση της μεθόδου που προορίζεται για επιβεβαίωση ή και ποσοτικοποίηση. Για να αξιολογηθεί η μεταφορά της ουσίας ως μέρος της επικύρωσης της μεθόδου, τα δείγματα τυφλού υποστρώματος πρέπει να αναλυθούν αμέσως μετά από δείγμα υψηλής συγκέντρωσης ή υλικό αναφοράς.

Για να διαπιστώσουμε ποια είναι η συγκέντρωση στην οποία η μέθοδος είναι απαλλαγμένη από το φαινόμενο της επιμόλυνσης εκ μεταφοράς επιβάλλεται να εντοπίζουμε την υψηλότερη ενισχυμένη συγκέντρωση (500ng/ml) η οποία βρίσκεται πάνω από το LOD της μεθόδου στο τυφλό μητρικό δείγμα, προχωρώντας σε ανάλυση blank (λευκών) δειγμάτων των οποίων η απόκριση πρέπει να είναι χαμηλότερη από το κατώτερο όριο ποσοτικής αποτίμησης LOQ (Lower Limit Of Quantification). Προς επιβεβαίωση των πιο πάνω απαιτείται να γίνουν αναλύσεις εις τριπλούν. Η αναλυτική διαδικασία θα πρέπει να τροποποιηθεί για να αφαιρεθεί οποιαδήποτε μεταφορά.

### 3.10 Επίδραση υποστρώματος (Matrix effect)

Περιγράφει τις αλλαγές που παρατηρούνται στην ανίχνευση ή τον ποσοτικό προσδιορισμό μιας αναλυόμενης ουσίας όταν υπάρχουν άλλες ουσίες στο δείγμα, στην κύρια απόκριση σήματος της αναλυόμενης ουσίας στόχου. Το φαινόμενο μπορεί να οφείλεται σε προβλήματα που μπορεί να δημιουργήσει η μη αναμενόμενη παρουσία αγνώστων ενώσεων, στην ανάλυση, ενώ τα προβλήματα μπορεί να εντοπιστούν στη χρωματογραφία και, κυρίως, στην πηγή ιοντισμού. Είναι σημαντικό να διερευνάται συχνά η ύπαρξη ή όχι ουσιών-παρεμβολών στο μητρικό δείγμα από τουλάχιστον δέκα διαφορετικές πηγές χωρίς την προσθήκη εσωτερικού προτύπου.

### 3.11 Ακρίβεια μεθόδου

Για τον προσδιορισμό της ακρίβειας της μεθόδου αξιολογήθηκε η ακρίβεια κατά την πραγματοποίηση της εκτέλεσης και η ακρίβεια μεταξύ των εκτελέσεων. Αυτό



επιτυγχάνεται μέσω της αξιολόγησης των αναλύσεων τρεις φορές ανα concentration pool (χαμηλή, μεσαία και υψηλή) με πέντε επαναλήψεις. Οι διαφορετικές εκτελέσεις που χρησιμοποιούνται για την διερεύνηση της ακρίβειας εκτελούνται χρησιμοποιώντας διαφορετική καμπύλη βαθμονόμησης για κάθε εκτέλεση. Ο συντελεστής διακύμανσης (% CV) δεν πρέπει να υπερβαίνει το 20% σε κάθε συγκέντρωση. Στο τέλος για την αξιολόγηση της ακρίβειας αποδοχής χρησιμοποιείται η μεγαλύτερη υπολογιζόμενη κατά την εκτέλεση και μεταξύ της εκτέλεσης % CV για κάθε συγκέντρωση.

### 3.12 Πιστότητα μεθόδου

Ως πιστότητα ορίζεται ο επαναλαμβανόμενος προσδιορισμός του ίδιου δείγματος. Για να είναι αποδεκτή η τιμή, πρέπει να εμπίπτει στα όρια αποδοχής, όπου η σχετική τυπική απόκλιση αποκλίνει  $\leq 15\%$  από την πραγματική τιμή. Κατά τον έλεγχο της πιστότητας πραγματοποιούνται μελέτες ακριβείας για όλες τις ποσοτικές μεθόδους, καθώς και στο σημείο λήψης απόφασης για ανοσοπροσδιορισμούς. Η ακρίβεια εκφράζεται μέσω του συντελεστή διακύμανσης (% CV). Ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση (std dev) της απόκρισης υπολογίζονται για κάθε συγκέντρωση για να προσδιοριστεί το % CV με βάση τον τύπο:

$$\%CV = (\text{τυπική απόκλιση}/\text{mean response}) \times 100$$

Σε περιπτώσεις ποσοτικών διαδικασιών, πρέπει να αξιολογηθούν δύο διαφορετικοί τύποι μελετών ακριβείας κατά την επικύρωση της μεθόδου:

1. Ακρίβεια εντός της εκτέλεσης
2. Ακρίβεια μεταξύ της εκτέλεσης

Η ακρίβεια αξιολογείται πραγματοποιώντας αναλύσεις εις τριπλούν ανά συγκέντρωση (χαμηλή, μεσαία και υψηλή) σε πέντε διαφορετικές δοκιμές. Το ποσοστό % CV δεν πρέπει να υπερβαίνει το 20% σε κάθε συγκέντρωση, ενώ το μεγαλύτερο υπολογιζόμενο % CV εντός και μεταξύ της εκτέλεσης για κάθε συγκέντρωση θα χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση της ακρίβειας αποδοχής.

Ο υπολογισμός ακρίβειας εντός της εκτέλεσης υπολογίζεται ξεχωριστά για κάθε συγκέντρωση. Η ακρίβεια κατά τη διάρκεια λειτουργίας του τρεξίματος μπορεί να υπολογίζεται χρησιμοποιώντας τα δεδομένα από τις τριπλές αναλύσεις κάθε εκτέλεσης σε κάθε συγκέντρωση ως:

$$CV\% \text{ εντός τρεξίματος} = \frac{\text{Τυπική απόκλιση ενός τρεξίματος δειγμάτων}}{\text{Μέσος όρος τυπικής απόκλισης ενός τρεξίματος δειγμάτων}} \times 100$$

Για τον υπολογισμό της ακρίβειας μεταξύ των εκτελέσεων υπολογίζουμε για κάθε συγκέντρωση των πέντε run.

### 3.13 Γραμμικότητα

Ορίζεται ως το μαθηματικό μοντέλο που δείχνει τη σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης της αναλυόμενης ουσίας και της αντίστοιχης απόκρισης του οργάνου. Ο καθορισμός του μοντέλου βαθμονόμησης γίνεται με προσδιορισμό του εύρους εργασίας (καθώς εντός αυτού του εύρους υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της απόκρισης

σήματος) και της συγκέντρωσης της αναλυόμενης ουσίας στο δείγμα. Γίνεται χρήση μιας μοναδικής πηγής κενού πίνακα (ανά τύπο υποστρώματος) κατά την πειραματική δημιουργία του κατάλληλου μοντέλου βαθμονόμησης για μια μέθοδο ενώ για την αξιολόγηση του μοντέλου βαθμονόμησης χρησιμοποιούνται τουλάχιστον 9 διαφορετικές μη μηδενικές συγκεντρώσεις. Οι συγκεντρώσεις πρέπει να κατανέμονται κατάλληλα σε όλο το εύρος για να μπορεί να δημιουργηθεί το καταλληλότερο μοντέλο βαθμονόμησης. Χρησιμοποιούνται τουλάχιστον πέντε αντίγραφα ανά συγκέντρωση και χρησιμοποιείται το απλούστερο μοντέλο βαθμονόμησης που ταιριάζει καλύτερα στη σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης. Ένα μοντέλο βαθμονόμησης δεν πρέπει να αξιολογείται απλώς μέσω του συντελεστή συσχέτισής του ( $r$ ).

Το μοντέλο βαθμονόμησης πρέπει να είναι γραμμικό και να περιλαμβάνει το εύρος 0,05-500ng/ml. Για σκοπούς αξιολόγησης πιθανοτήτων υπέρβασης του εύρους, τα δείγματα βαθμονόμησης παρασκευάστηκαν σε τυφλό αίμα σε συγκεντρώσεις:

- 0,05ng/ml
- 0,5ng/ml
- 2,5ng/ml
- 12,5ng/ml
- 20ng/ml
- 25ng/ml
- 50ng/ml
- 100ng/ml
- 250ng/ml
- 500ng/ml

Κάθε βαθμονομητής αναλύθηκε μία φορά ανά εκτέλεση σε πέντε ξεχωριστές δοκιμές ενώ, ένα εξαγόμενο τυφλό υπόστρωμα αναλύθηκε μετά από κάθε βαθμονομητή για να αξιολογηθεί η μεταφορά σε κάθε συγκέντρωση. Η καμπύλη είναι αποτέλεσμα συνδυασμού όλων των μετρήσεων. Η αξιολόγηση της γραμμικότητας χρησιμοποιήθηκε μόνο για τον προσδιορισμό της καταλληλότητας επιλεγμένων περιοχών βαθμονόμησης, ωστόσο η τελική μέθοδος επικυρώθηκε έναντι βαθμονόμησης ενός μόνο σημείου για κατά προσέγγιση ημιποσοτικοποίηση στην τελική μέθοδο. Πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις παλινδρόμησης για την ουσία της βενζυλόνης όπου οι τιμές  $r^2 > 0,95$  ήταν αποδεκτές.

### 3.14 Σταθερότητα

Η διερεύνηση με σκοπό την αξιολόγηση της σταθερότητας των δειγμάτων είναι αναγκαία για να διασφαλίζεται ότι κάθε βήμα που πραγματοποιείται κατά την προετοιμασία, την επεξεργασία και την ανάλυση του δείγματος, καθώς και οι χρησιμοποιούμενες συνθήκες αποθήκευσης δεν επηρεάζουν τη συγκέντρωση της αναλυόμενης ουσίας. Στα πειράματα ελέγχου της σταθερότητας των επεξεργασμένων δειγμάτων χρησιμοποιούνται σετ δειγμάτων τυφλού πλέγματος τόσο σε χαμηλές όσο και σε υψηλές συγκεντρώσεις. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί μια μοναδική πηγή τυφλού πίνακα (ανά τύπο υποστρώματος) για την αξιολόγηση της σταθερότητας του επεξεργασμένου δείγματος. Τα επεξεργασμένα δείγματα για μια δεδομένη δεξαμενή συγκέντρωσης συνδυάζονται, αναμειγνύονται καλά και στη συνέχεια χωρίζονται σε διαφορετικά φιαλίδια (αυτόματης δειγματοληψίας) για ενόργανη ανάλυση.

Τα πρώτα φιαλίδια κάθε συγκέντρωσης αναλύονται αμέσως επί τρεις φορές για να καθοριστούν οι αποκρίσεις οργάνου σε χρόνο μηδέν, ωστόσο τα φιαλίδια που απομένουν πρέπει να διατηρούνται με τρόπο που να αποθηκεύονται συνήθως κατά τη συνήθη ανάλυση (π.χ. σε ψυγείο ή θερμοκρασία δωματίου σε αυτόματο δειγματολήπτη). Τα υπόλοιπα φιαλίδια αναλύονται εις τριπλούν σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα που αντιπροσωπεύουν το τυπικό χρονικό εύρος αναμένεται να περιμένουν τα επεξεργασμένα δείγματα πριν εγχυθούν στο όργανο. Η αναλύομενη ουσία θεωρείται σταθερή έως ότου το μέσο σήμα (π.χ. εμβαδόν κορυφής ή λόγος εμβαδού κορυφής της αναλυόμενης ουσίας προς εσωτερικό πρότυπο) σε σύγκριση με τον μέσο όρο του χρόνου μηδέν, το σήμα ξεφεύγει από την αποδεκτή μεροληψία της μεθόδου.

### 3.15 LOD (Όριο ανίχνευσης)

Ορίζεται ως η χαμηλότερη συγκέντρωση μιας αναλυόμενης ουσίας σε ένα δείγμα που μπορεί να διαφοροποιηθεί αξιόπιστα από την τυφλή μήτρα και να προσδιοριστεί με την αναλυτική μέθοδο. Η επιλογή της προσέγγισης εξευρέσεως του LOD γίνεται ούτως ώστε να παρέχεται η πιο λογική εκτίμηση του LOD δεδομένου του αναλυτικού οργάνου (ή της έλλειψής του) που χρησιμοποιείται στη μέθοδο. Οφείλουμε να εξετάσουμε το LOD σε πολλαπλά runs χρησιμοποιώντας ενισχυμένο δείγμα υποστρώματος από τουλάχιστον τρεις διαφορετικές πηγές τυφλού δείγματος.

Για τον προσδιορισμό του LOD αναλύθηκαν τουλάχιστον τρία δείγματα τυφλού εις διπλούν (δύο χωριστά δείγματα) σε τουλάχιστον τρεις δοκιμές. Υπολογίζεται το μέσο σήμα από όλα τα δείγματα τυφλού πίνακα και η τυπική απόκλιση του σήματος. Ομοίως, δείγματα ενισχυμένης συγκέντρωσης υποστρώματος φθίνουσας συγκέντρωσης αναλύονται εις διπλούν κατά τη διάρκεια τουλάχιστον τριών δοκιμών. Η χαμηλότερη συγκέντρωση ενός ενισχυμένου δείγματος υποστρώματος που αποδίδει σταθερά σήμα μεγαλύτερο από το μέσο σήμα από τα δείγματα τυφλού μήτρας συν 3,3 φορές την τυπική απόκλιση του σήματος από τα δείγματα τυφλού μήτρας, προσδιορίζεται ως το LOD.

### 3.16 LOQ (Όριο ποσοτικοποίησης)

Ορίζεται ως η ελάχιστη ποσότητα εισαγόμενου συστατικού, πάνω από το θόρυβο της βασικής γραμμής η οποία παρέχει επαναλήψιμα εμβαδά κορυφής και μπορεί να προσδιοριστεί ποσοτικά με ακρίβεια. Το κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης (LLOQ) προσδιορίστηκε με χρήση μιας συγκέντρωσης σημείου απόφασης που καθορίζεται ως ο χαμηλότερος βαθμονομητής που παρήγαγε αναλογία σήματος προς θόρυβο μεγαλύτερη από 10:1 και αξιολογήθηκε σε ομαδοποιημένους πίνακες αίματος στη μελέτη γραμμικότητας. Το όριο ανίχνευσης δεν διερευνήθηκε συστηματικά καθώς το LLOQ παρείχε επαρκή όρια ανίχνευσης για όλες τις αναλυόμενες ουσίες. Για κάθε τύπο υποστρώματος, επι προκειμένων βενζυλόνη, τουλάχιστον τρεις διαφορετικές πηγές τυφλού δείγματος πρέπει να ενισχυθούν με βενζυλόνη στη συγκέντρωση του σημείου απόφασης και να αναλυθούν σε τουλάχιστον τρεις αναλύσεις για να αποδειχθεί ότι πληρούνται όλα τα κριτήρια ανίχνευσης, αναγνώρισης, μεροληψίας και ακρίβειας.

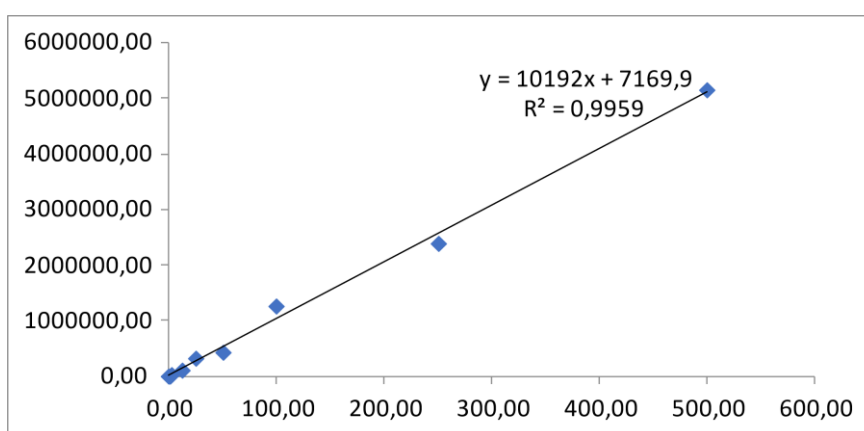
## Κεφάλαιο 4

### 4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 4.1 Γραμμικότητα

Για την εξεύρεση της γραμμικότητας εξετάσθηκαν τρία είδη δειγμάτων το καθένα από πέντε φορές το καθένα. Μέσω της καμπύλης βαθμονόμησης καταδεικνύεται η σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης της αναλυόμενης ένωσης (βενζυλόνης) και της απόκρισης της αναλυτικής διεργασίας στην αναλυόμενη ουσία. Από τα αποτελέσματα που λήφθηκαν, προσδιορίστηκε η εξίσωση ευθείας της καμπύλης και υπολογίστηκε ο συντελεστής προσδιορισμού με εφαρμογή της μεθόδου ελαχίστων τετραγώνων σε υπολογιστικό πρόγραμμα.

Η εξίσωση ευθείας για τα πιο κάτω δεδομένα βρέθηκε  $y = 10192x + 7169,69$  ενώ ο συντελεστής συσχέτισμού (R) υπολογίστηκε ως  $R^2 = 0.9959$



Όνομα δείγματος	0.05ng/ml	0.5ng/ml	2.5ng/ml	12.5ng/ml	25ng/ml	50ng/ml	100ng/ml	250ngml	500ng/ml
Βενζυλόνη Α (1)	N/A	2154	12030	37950	236500	300700	1225000	1642000	3984000
Βενζυλόνη Α (2)	2764	2137	13420	36520	300300	288300	1178000	1862000	4028000
Βενζυλόνη Α (3)	N/A	2582	11820	42560	359800	313500	1155000	1714000	4173000
Βενζυλόνη Α (4)	2498	1546	12960	41650	307700	302300	1093000	1710000	4320000
Βενζυλόνη Α (5)	1897	N/A	13190	37580	332400	282900	1112000	1739000	4656000
Βενζυλόνη Β (1)	4176	4967	21640	116300	292400	620700	1677000	2750000	6060000
Βενζυλόνη Β (2)	N/A	5151	26210	113300	227100	586900	1155000	2598000	5939000
Βενζυλόνη Β (3)	N/A	4320	23490	126200	250400	618200	1736000	2674000	5837000
Βενζυλόνη Β (4)	4717	5339	24270	113900	275300	608200	1225000	2529000	6165000
Βενζυλόνη Β (5)	N/A	N/A	25600	114700	277100	589800	1178000	2537000	5681000
Βενζυλόνη Γ (1)	N/A	5775	13070	139900	298300	409800	1112000	2977000	4591000
Βενζυλόνη Γ (2)	2764	6629	14560	134100	332900	405000	1093000	2854000	5461000
Βενζυλόνη Γ (3)	N/A	5932	15430	132800	317400	392000	1155000	2632000	5453000
Βενζυλόνη Γ (4)	2498	4706	13940	139900	343000	403800	1577000	2732000	5369000
Βενζυλόνη Γ (5)	1897	8249	16330	129500	340600	401700	1225000	2753000	5548000
Μέσος όρος	2901.38	4575.92	17197.33	97124	302746.67	434920	1259733.33	2380200	5151000

Πίνακας 6: Δεδομένα γραμμικότητας δειγμάτων βενζυλόνης ανά συγκέντρωση 0,05ng/ml, 0,5ng/ml, 2,5ng/ml, 12.5ng/ml, 25ng/ml, 50ng/ml, 100ng/ml, 250ng/ml και 500ng/ml





#### 4.2 Ακρίβεια μεθόδου

Για να διαπιστωθεί η ακρίβεια της μεθόδου, ετοιμάστηκαν τρεις ομάδες δειγμάτων υποστρώματος στις ακόλουθες συγκεντρώσεις: χαμηλή (5 ng/mL), μέση (50 ng/mL); και υψηλή (150 ng/mL). Κάθε συγκέντρωση αναλύθηκε εις τριπλούν εντός πέντε χωριστών ημερών όπως φαίνεται πιο κάτω στους πίνακες που ακολουθούν.

Intraday Χαμηλή	Interday Χαμηλή
9-14	6

Intraday Μέση	Interday Μέση
10-16	13

Intraday Υψηλή	Interday Υψηλή
9-14	9

Πίνακας 7: Αποτελέσματα ελέγχου ακρίβειας δειγμάτων σε χρονικό διάστημα μίας, τριών και πέντε ημερών για συγκεντρώσεις 5ng/ml, 50ng/ml, 150ng/ml

Για την εξακρίβωση των πιο πάνω αποτελεσμάτων διεξήχθησαν σύνολο δεκαπέντε εκχυλίσεις (3 φορές την μέρα, επί πέντε φορές) ανά συγκέντρωση. Το εύρος των μετρήσεων δίνεται πιο πάνω, ενώ η ακρίβεια μετρήσεων εκφράζεται μέσω του συντελεστή διακύμανσης (%CV) που υπολογίστηκε για κάθε συγκέντρωση μέσω του τύπου:

$$CV\% = (\text{τυπική απόκλιση}/\text{mean response}) \times 100$$

#### 4.3 Επιμόλυνση εκ μεταφοράς

Διερευνήθηκε το ενδεχόμενο ύπαρξης του φαινομένου αλλοίωσης της συγκέντρωσης του μετρούμενου δείγματος λόγω υπολειμάτων που παρέμειναν στο αναλυτικό όργανο. Για την διαπίστωση ύπαρξης του φαινομένου γίνεται ανάλυση blank (λευκών) δειγμάτων των οποίων η απόκριση θα πρέπει να είναι χαμηλότερη από το κατώτερο όριο ποσοτικής αποτίμησης LOQ (Lower Limit Of Quantification). Μετά από σειρά δοκιμών σε blank δείγματα, δεν παρατηρήθηκε το φαινόμενο μεταφοράς.

#### 4.4 Φαινόμενο υποστρώματος

Η διερεύνηση ύπαρξης του φαινομένου μεταφοράς υποστρώματος και της αποτελεσματικότητας της εκχύλισης εξετάζονται μέσω της μεθόδου προσθήκης μετά τις εκχυλίσεις σε δύο συγκεντρώσεις. Αρχικά προετοιμάζονται τρία σετ δειγμάτων εκ των οποίων το πρώτο σετ περιέχει καθαρά πρότυπα με αναλυτές σε χαμηλές και υψηλές τιμές συγκεντρώσεων αραιωμένες σε 10% διαλύτη έκλουσης B και 90% έκλουσμα A.

Προς εκτίμηση των αποτελεσμάτων το δεύτερο σετ αποτελείται από τυφλό αίμα που εκχυλίστηκε χρησιμοποιώντας την πιο πάνω μέθοδο, με την ανασύσταση του να γίνεται με 10% διαλύτη έκλουσης B και 90% έκλουσμα A, το οποίο περιέχει αναλυτές τόσο σε χαμηλές όσο και σε υψηλές συγκεντρώσεις.



Τέλος, για την εκτίμηση της απόδοσης εκχυλίσεως, τα τυφλά δείγματα αίματος εμπλουτίστηκαν με αναλυτές σε χαμηλές και υψηλές συγκεντρώσεις ενώ εκχυλίστηκαν χρησιμοποιώντας την πιο πάνω μέθοδο. Η τελική επίδραση του φαινομένου του υποστρώματος εκτιμάται με σύγκριση του σετ δειγμάτων 2 με το σετ δειγμάτων 1 ενώ η αποτελεσματικότητα εκχυλίσεως εκτιμάται με σύγκριση του σετ δειγμάτων 3 με το σετ δειγμάτων 2. Όλα τα αποτελέσματα αναγράφονται ως ποσοστά. Για το φαινόμενο υποστρώματος και τα δεδομένα για την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης, τιμές άνω του 0% υποδηλώνουν ενίσχυση ιόντων, ενώ τιμές κάτω του 0% υποδηλώνουν καταστολή ιόντων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους πίνακες που ακολουθούν. Όπου ME=Matrix Effect και EE= Extraction

<b>ME Low = (SET 2/ SET -1) * 100</b>
-5
<b>ME High= (SET 2/ SET -1) * 100</b>
-6

Πίνακας 5: Matrix effect Βενζυλόνης

<b>EE LOW= (SET 3/SET 2-1)*100</b>
1
<b>EE HIGH= (SET 3/SET 2-1)*100</b>
4

Πίνακας 8: Αποτελεσματικότητα εκχύλισης της Βενζυλόνης

Κατά τη διάρκεια των μετρήσεων δεν διαπιστώθηκε υπέρβαση του ορίου  $\pm 20\%$  μέσης καταστολής/ενίσχυσης ιονισμού των ιόντων στόχων της βενζυλόνης.

#### 4.5 LOD (Όριο ανίχνευσης) και LLOQ (Κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης)

Το όριο ανίχνευσης και το όριο ποσοτικοποίησης υπολογίζονται με βάση την καμπύλη αναφοράς. Γίνεται επιλογή μιας συγκέντρωσης που αποτελεί το σημείο απόφασης που είναι ο χαμηλότερος βαθμονομητής που παράγει αναλογία σήματος προς θόρυβο. Από τα διαθέσιμα δεδομένα προκύπτει ότι το όριο ανίχνευσης της βενζυλόνης ισούται με 0,05ng/ml και το όριο ποσοτικοποίησης ισούται με 0,5ng/ml.

#### 4.6 Εκλεκτικότητα

Μετά το πέρας των αναλύσεων βρέθηκε ότι η μέθοδος είναι επιλεκτική ως προς την ουσία της βενζυλόνης χωρίς να εντοπίζονται ενδογενείς για το καθένα από τα κλινικά δείγματα αίματος που αναλύθηκαν. Επιπλέον, δεν ανιχνεύθηκαν ψευδώς θετικές παρεμβολές από ενώσεις συν-έκλυσης, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που εκτελούνται ως μέρος της μεθόδου.

#### 4.7 Σταθερότητα

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων όπου εξετάζεται η σταθερότητα γίνεται παρασκευή δειγμάτων ποσότητας υποστρώματος (βενζυλόνης) σε συγκεντρώσεις 5ng/ml και 200ng/ml επί τρεις φορές το καθένα, στους 5°C (θερμοκρασία εισδοχής LC/MS). Ακολούθως κάθε συγκέντρωση διαχωρίζεται σε 6 φιαλίδια αυτόματης δειγματοληψίας. Έπειτα στο πρώτο φιαλίδιο κάθε συγκέντρωσης πραγματοποιείται έγχυση προς καθορισμό της χρονικής στιγμής  $t_0$ , ενώ τα υπόλοιπα φιαλίδια αναλύονται από τρεις φορές σε διάστημα 24 ωρών. Τελικά υπολογίζεται ο μέσος όρος των σημάτων αναλυτών από τις αναλύσεις που έγιναν εις τριπλούν και συγκρίνονται με τα σήματα χρόνου  $t_0$ . Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα, τόσο σε χαμηλές συγκεντρώσεις

(5ng/ml), όσο και σε ψηλές (200ng/ml) το σήμα των δειγμάτων δεν αλλιώνεται σε σύγκριση με το σήμα κατά την χρονική στιγμή μηδέν ( $t_0$ ). Πιο συγκεκριμένα όπως φαίνεται και στον παρακάτω πίνακα για χαμηλή και υψηλή συγκέντρωση αντίστοιχα η το δείγμα της βενζυλόνης έδωσε σήμα ταυτόσημο κατά 95% και 96% σε σχέση με το σήμα χρόνου  $t_0$  ενώ στις μετρήσεις που έγιναν σε διάστημα χρόνου μιας βδομάδας 97% και 98%

BENZYLONH	Χαμηλή (5ng/ml)	Υψηλή (200ng/ml)
Μέρα 1 <sup>η</sup>	95%	96%
Μέρα 7 <sup>η</sup>	97%	98%

Επομένως με βάση τα πιο πάνω αποτελέσματα κρίνεται ότι η σταθερότητα της βενζυλόνης είναι αρκετά υψηλή λαμβάνοντας υπόψη και το όριο επιτρεπτών αποκλίσεων της τάξεως του  $\pm 15\%$  της μεθόδου που ακολουθούμε.

## Κεφάλαιο 5

### 5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η βενζυλόνη αποτελεί μια νέα ψυχοδραστική ουσία που έκανε την εμφάνιση στο εμπόριο μεταξύ 2017-2019 και ανήκει στην οικογένεια των συνθετικών καθινονών. Η ανάπτυξη μιας μεθόδου προσδιορισμού της βενζυλόνης επιτρέπει τον προσδιορισμό επιπέδων της ουσίας και κρίνεται αναγκαία καθώς έχει αρχίσει να διεισδύει ταχύτατα στην αγορά παράνομων ουσιών, επομένως βοηθά στον έγκαιρο εντοπισμό της και τον έλεγχο χρήσης της.

Η ανάπτυξη μιας αξιόπιστης και ακριβούς μεθόδου προσδιορισμού της βενζυλόνης είναι απαραίτητη για την εγκυρότητα των εξαχθέντων αποτελεσμάτων άρα και για την αξιολόγηση εντοπισμού της βενζυλόνης στα δείγματα που λήφθηκαν από ολικό αίμα. Όπως σε κάθε φαρμακευτικό σκεύασμα έτσι και στην περίπτωση της βενζυλόνης ο εντοπισμός της στα βιολογικά υγρά του ανθρώπινου οργανισμού μπορεί να επηρεαστεί από διάφορους παράγοντες που παίζουν καθοριστικό ρόλο όπως η συγκέντρωση ουσίας, η απέκκριση της μέσω των ούρων, δηλαδή η απεκκριτική λειτουργία των νεφρών κ.ά.

Εν έτει 2024 υπάρχει ανάγκη για την ανάπτυξη νέων αναλυτικών μεθόδων που να αποσκοπούν στον εμπλουτισμό των ήδη υπάρχοντων μεθόδων για τον ευρύ προσδιορισμό νέων ψυχοδραστικών ουσιών σε βιολογικά υποστρώματα, αφού η ανάπτυξη και η δημιουργία και η διακίνηση των επιβλαβών ουσιών που δεν έχουν θεσμοθετηθεί ως παράνομες από την αστυνομία είναι επίσης ραγδαία. Με την περάτωση της παρούσας μελέτης και την εξέταση διαφόρων παραμέτρων, έχει διαπιστωθεί ότι η προτεινόμενη μέθοδος είναι ακριβής και κατάλληλη για αναλύσεις βενζυλόνης που διενεργήθηκαν σε δείγματα ολικού αίματος.

## Συμπεράσματα

Η βενζυλόνη είναι μια νέα ψυχοδραστική ουσία που χρησιμοποιείται ως διεγερτικό ναρκωτικό για ψυχαγωγικούς σκοπούς. Σε αυτή την διπλωματική εργασία έγινε επικύρωση μεθόδου LC-MS/MS για τον προσδιορισμό της βενζυλόνης σε δείγματα ολικού αίματος με την βοήθεια του Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology (ASB Approved March 2019, ANSI Approved November 2019).

Μέσα από την διεξαγωγή πειραμάτων και από τα διαθέσιμα δεδομένα προκύπτει ότι το όριο ανίχνευσης (LOD) της βενζυλόνης ισούται με 0,05ng/ml και το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) ισούται με 0,5ng/ml. Μέσω της καμπύλης γραμμικότητας της μεθόδου βρέθηκε ότι  $R^2=0.9959$ , ενώ δεν παρατηρήθηκε φαινόμενο μεταφοράς ουσιών άρα δεν υφίσταται υπερφόρτωση η στήλη. Παράλληλα κατά την εξέταση του φαινομένου του υποστρώματος σε δείγματα βενζυλόνης δεν διαπιστώθηκε υπέρβαση του ορίου  $\pm 20\%$  μέσης καταστολής/ενίσχυσης ιονισμού των ιόντων στόχων της βενζυλόνης. Ταυτόχρονα βρέθηκε ότι η μέθοδος είναι επιλεκτική ως προς την ουσία της βενζυλόνης χωρίς να εντοπίζονται ενδογενείς ουσίες για το καθένα από τα κλινικά δείγματα αίματος που αναλύθηκαν ενώ δεν ανιχνεύθηκαν ψευδώς θετικές παρεμβολές από ενώσεις συν-έκλυσης, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που εκτελούνται ως μέρος της μεθόδου. Τέλος η σταθερότητα δειγμάτων βενζυλόνης είναι αρκετά υψηλή και κυμένεται από 95% μέχρι 98% μένοντας εντός του ορίου αποκλίσεων  $\pm 15\%$ .

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] N. I. o. E. H. Sciences, «<https://www.niehs.nih.gov>,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.niehs.nih.gov/health/topics/science/toxicology/index.cfm>.
- [2] V. Boumba. [Ηλεκτρονικό]. Available: [http://bic.chem.uoi.gr/Notes/Molecular%20Biochemistry/Boumba/Toxicology\\_BIOINORG-2021\\_2.pdf](http://bic.chem.uoi.gr/Notes/Molecular%20Biochemistry/Boumba/Toxicology_BIOINORG-2021_2.pdf). [Πρόσβαση 5th April 2023].
- [3] E. C. Agency, «<https://ec.europa.eu>,» [Ηλεκτρονικό]. Available: [https://ec.europa.eu/health/ph\\_projects/2003/action3/docs/2003\\_3\\_09\\_a21\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/health/ph_projects/2003/action3/docs/2003_3_09_a21_en.pdf). [Πρόσβαση April 2023].
- [4] H. Marquardt, S. G. Schäfer, R. McClellan και F. Welsch, «History of Toxicology,» σε *Toxicology*, Academic Press, 1999.
- [5] A. pharmacy, «<https://accesspharmacy.mhmedical.com>,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://accesspharmacy.mhmedical.com/content.aspx?bookid=449&sectionid=39910766#6479024>. [Πρόσβαση April 2023].
- [6] P. Wexler, *History of Toxicology and Environmental Health*, Elsevier, 2015.
- [7] J. Thakker και R. Durrant, *Substance Use & Abuse: Cultural and Historical Perspectives*, SAGE Publications, Inc., 2003.
- [8] B. Page και M. Singer, *Comprehending Drug Use*, Rutgers University Press, 2010.
- [9] T. L. Anderson, *Drug and alcohol use in social context*, Wadsworth Publishing, 2018.
- [10] U. (. N. O. o. D. a. Crime, «The challenge of new psychoactive substances,» 2013.
- [11] Hans H. Maurer και Simon D. Brandt , *New Psychoactive Substances*, Springer, 2018.
- [12] [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://eur-lex.europa.eu/EL/legal-content/summary/criminal-acts-and-the-applicable-penalties-drug-trafficking.html>.
- [13] «Ετήσια έκθεση ΣΟΔΝ-ΕΜΠ για τα ναρκωτικά στην Ελλάδα,» Ελληνική Αστυνομία, 2023.
- [14] Enno Freye και Joseph Victor Levy, «Mechanism of Action of Opioids and clinical effects Part II,» σε *Opioids in Medicine*, Springer Science, 2008.
- [15] W. H. O. (WHO), «[who.int](https://www.who.int),» [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/opioid-overdose>. [Πρόσβαση 26th April 2023].
- [16] D. I. D. Milovan, σε *OPIOIDS - STRUCTURE AND SYNTHESIS*, Belgrade, University of Belgrade, Faculty of Chemistry, 2017.
- [17] Abu Shafi, Alex J. Berry, Harry Sumnall, David M. Wood και Derek K. Tracy, «New psychoactive substances: a review and updates,» *Therapeutic Advances in Psychopharmacology*, 2020.

- [18] C. Pérez-Mañá, E. Papaseit, F. Fonseca, . A. Farré , M. Torrens και M. Farré, «Drug Interactions With New Synthetic Opioids,» *Frontiers in Pharmacology*, 2018.
- [19] «drugabuse.gov,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://nida.nih.gov/sites/default/files/drugfacts-fentanyl.pdf>. [Πρόσβαση 28 April 2023].
- [20] Abu Shafi, Alex J. Berry, Harry Sumnall, David M. Wood και Derek K. Tracy, «Synthetic opioids: a review and clinical update,» *Therapeutic Advances in phycopharmacology*, τόμ. 12, 2022.
- [21] H. Pathan και J. Williams, «Basic opioid pharmacology: an update,» *British Journal of pain*, 2012.
- [22] Barry S. Levine και Sarah Kerrigan, *Principles of Forensic Toxicology*, Springer, 2020.
- [23] Daniel Thomas Ginat, Juan E. Small και Pamela Whitney Schaefer, *Neuroimaging Pharmacopoeia*, Springer, 2015.
- [24] H. Laycock και C. Bantel, «Opioid mechanisms and opioid drugs,» *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, τόμ. 12, αρ. 1, pp. 31-35, 2011.
- [25] Enno Freye και Joseph Victor Levy, «Mechanism of Action of Opioids and clinical effects,» *Opioids in Medicine*, 2008.
- [26] Barry S. Levine και Sarah Kerrigan, *Principles of Forensic Toxicology*, 5th Edition, Springer, 2020.
- [27] The misuse of synthetic opioids: harms and clinical management of fentanyl, fentanyl analogues and other novel synthetic opioids, Novel Psychoactive Treatment UK Network (NEPTUNE), 2018.
- [28] Ewelina Pieprzyca, Rafał Skowronek, Ľuboš Nižnanský και Piotr Czekaj, «Synthetic cathinones – From natural plant stimulant to new drug of abuse,» *European Journal of Pharmacology*, 2020.
- [29] S.-Y. Fan, C.-Z. Zang, P.-H. Shih, Y.-C. Ko, Y.-H. Hsu, M.-C. Lin, S.-H. Tseng και D.-Y. Wang, «A LC-MS/MS method for determination of 73 synthetic cathinones and related metabolites in urine,» *Forensic Science International Journal*, 2020.
- [30] Ana Sofia Almeida, Bárbara Silva, Paula Guedes de Pinho, Fernando Remião και Carla Fernandes, «Synthetic Cathinones: Recent Developments, Enantioselectivity Studies and Enantioseparation Methods,» *Molecules*, 2022.
- [31] Richard A. Glennon και Małgorzata Dukat, «Synthetic Cathinones: A Brief Overview of Overviews with Applications to the Forensic Sciences,» *Ann Forensic Res Analysis*, 2017.
- [32] Patryk Kuroпка, Marcin Zawadzki και Paweł Szpot, «A review of synthetic cathinones emerging in recent years (2019-2022),» *Forensic Toxicology*, 2022.

- [33] Ana Sofia Almeida, Bárbara Silva, Paula Guedes de Pinho, Fernando Remião και Carla Fernandes, «Synthetic Cathinones: Recent Developments, Enantioselectivity Studies and Enantioseparation Methods,» *Molecules*, 2022.
- [34] Matthew L. Banks, Travis J. Worst, Daniel E. Rusyniak και Jon E. Sprague, «SYNTHETIC CATHINONES (“BATH SALTS”),» *The Journal of Emergency Medicine*, τόμ. 46, αρ. 5, 2014.
- [35] U. N. O. O. D. A. C. Laboratory and Scientific Section, Recommended methods for the Identification and Analysis of Synthetic Cathinones in Seized Materials, New York: United Nations, 2015.
- [36] Simon Hudson και John Ramsey, «The emergence and analysis of synthetic cannabinoids,» *Drug Testing and Analysis*, 2011.
- [37] G. J. Kumar, «Emergence of Synthetic Cannabinoids: Pharmacological insights and adverse effects,» *Research Journal of Chemistry and Environment*, 2023.
- [38] ©. E. M. C. f. D. a. D. Addiction, «Synthetic cannabinoids in Europe - A review,» 2021.
- [39] Vera L. Alves, João L. Gonçalves, Joselin Aguiar, Helena M. Teixeira και José S. Câmara, «The synthetic cannabinoids phenomenon: from structure to toxicological properties,» *Critical Reviews in Toxicology*, 2020.
- [40] U. N. O. o. D. a. Crime, Synthetic cannabinoids in herbal products, United Nations Office on Drugs and Crime.
- [41] D. N. Kamkaen, «Medical Cannabis: Pharmacology and Mechanism of Action,» College of Pharmacy, Rangsit University, Bangkok, 2019.
- [42] SIMON L. HILL και SIMON H. L. THOMAS, «Clinical toxicology of newer recreational drugs,» *Informa healthcare USA*, 2011.
- [43] Leslie King, «New phenethylamines in Europe,» *Drug Testing and Analysis*, 2013.
- [44] Elli Tyrkkö, Mikael Andersson και Robert Kronstrand, «The Toxicology of New Psychoactive Substances: Synthetic,» *The drug monit*, 2016.
- [45] U. N. O. O. D. a. Crime, «<https://www.unodc.org>,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.unodc.org/LSS/SubstanceGroup/Details/275dd468-75a3-4609-9e96-cc5a2f0da467>.
- [46] Ana Y. Simão, Mónica Antunes, Emanuel Cabral, Patrik Oliveira, Luana May Rosendo, Ana Teresa Loureiro Brinca, Estefânia Alves, Hernani Marques, Tiago Rosado, Luis António Passarinha, Maristela Andraus, Mário Barroso και Eugenia Gallardo, «An Update on the Implications of New Psychoactive Substances in Public Health,» *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2022.
- [47] MILENA JADRIJEVIĆ-MLADAR TAKAČ, JOAO DANIEL CASIMIRO MAGINA και TIN TAKAČ, «Evaluation of phenylethylamine type entactogens and their metabolites relevant to ecotoxicology – a QSAR study,» *Acta Pharmacology*, 2019.

- [48] Ronil V. Chandra, Daniel Thomas Ginat και Juan E. Small, «Amphetamines,» σε *Neuroimaging pharmacopoeia*, Springer, 2015.
- [49] S. SM, «Amphetamines,» σε *Prescriber's Guide: Stahl's Essential Psychopharmacology*, Cambridge, Cambridge University Press, 2017.
- [50] N. Rassmussen, «Amphetamine-Type Stimulants: The Early History of Their Medical uses,» *Internation review of neurobiology*, 2015.
- [51] D. o. J. D. e. administration, «dea.gov,» [Ηλεκτρονικό]. Available: [https://www.dea.gov/sites/default/files/2020-06/Amphetamines-2020\\_0.pdf](https://www.dea.gov/sites/default/files/2020-06/Amphetamines-2020_0.pdf). [Πρόσβαση 11th May 2023].
- [52] J. H. Biel και B. A. Bopp , «Amphetamines: Structure-Activity relationships,» σε *Handbook of Psychopharmacology*, Springer , 2012.
- [53] David J Heal, Sharon L Smith, Jane Gosden και David J Nutt, «Amphetamine, past and present – a pharmacological and clinical perspective,» *Journal of Psychopharmacology*, 2013.
- [54] Conor Crean, Iphigenia Naidis και Susan Ifeagwu, Terminology and information on drugs, United Nations Publications, 2016.
- [55] Amber N. Edinoff, Catherine A. Nix, Janice Hollier, Caroline E. Sagrera, Blake M. Delacroix, Tunde Abubakar, Elyse M. Cornett, Adam M. Kaye και Alan D. Kaye, «Benzodiazepines: Uses, Dangers, and Clinical Considerations,» *Neurology international journal*, 2021.
- [56] Pareek Aastha, Kumar Navneet, Agarwal Anshu, Sharma Pratima και Kishore Dharma, «1, 5 Benzodiazepines: Overview of Properties and Synthetic Aspects,» *Research Journal of Chemical Sciences*, 2013.
- [57] Hans H. Maurer και Simon D. Brandt, «Designer Benzodiazepines: Another Class of NPS,» σε *New Psychoactive Substances: Pharmacology, Clinical, Forensic and*, Springer, 2018.
- [58] Heesun Chung, Les Iversen, Wendy Lim Jong Lee, Franco Tagliaro, Eleuterio Umpiérrez και Scott Oulton, Terminology and Information on Drugs 3rd edition, New York: United Nations Publications, 2016.
- [59] Anna Rickli, Olivier D. Moning, Marius C. Hoener και Matthias E. Liechti, «Receptor interaction profiles of novel psychoactive tryptamines compared with classic hallucinogens».
- [60] Shazia Kousara, Sadia Noreen Anjuma, Farrukh Jaleela, Jallat Khana και Sidra Naseema, «Biomedical Significance of Tryptamine: A Review,» *Journal of Pharmacovigilance*, 2017.
- [61] Ana Margarida Araújo, Félix Carvalho, Maria de Lourdes Bastos, Paula Guedes de Pinho και Márcia Carvalho, «The hallucinogenic world of tryptamines: an updated review,» *Archives of Toxicology*, 2015.

- [62] Roberta Tittarelli, Giulio Mannocchi, Flaminia Pantano και Francesco Saverio Romolo, «Recreational Use, Analysis and Toxicity of Tryptamines,» *Current Neuropharmacology*, 2015.
- [63] A. Abbas, «Pharmacologic activity of substituted tryptamines at 5-HT 2A R, 5-HT 2C R, 5-HT 1A R, and SERT,» *The Journal of Pharmacology and experimental therapeutics*, 2023.
- [64] Dino Luethi και Matthias E. Liechti, «Designer drugs: mechanism of action and adverse effects,» *Archives of Toxicology*, 2020.
- [65] Dino Luethi και Matthias E. Liechti, «Designer drugs: mechanism of action and adverse effects,» *Archives of Toxicology*, 2020.
- [66] Luana May Rosendo, Tiago Rosado, Hernani Marques και Ana Teresa Loureiro Brinca, «An Update on the Implications of New Psychoactive Substances in Public,» *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2022.
- [67] M.D. Arbo, M.L. Bastos και H.F. Carmo, «Piperazine compounds as drugs of abuse,» *Drug and Alcohol Dependence*, 2011.
- [68] Abu Shafi, Alex J. Berry, Harry Sumnall, David M. Wood και Derek K. Tracy, «New psychoactive substances: a review and updates,» *Therapeutic Advances in Psychopharmacology*, 2020.
- [69] «<https://www.narconon.org>,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.narconon.org/drug-abuse/piperazine-effects.html>. [Πρόσβαση 25th May 2023].
- [70] «<https://www.knowthescore.info>,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.knowthescore.info/drug/piperazines/>. [Πρόσβαση 25th May 2023].
- [71] Prasanta Dey, Amit Kundu, Anoop Kumar, Meenakshi Gupta, Byung Mu Lee, Tejendra Bhakta, Suvakanta Dash και Hyung Sik Kim, «Analysis of alkaloids (indole alkaloids, isoquinoline alkaloids, tropane alkaloids),» σε *Recent Advances in Natural Products Analysis*, Elsevier, 2020.
- [72] A. Zahari, «GENERAL CHEMICAL ASPECTS OF ALKALOIDS,» UM Students Repository, 2010.
- [73] Ayushi Rajput, Renu Sharma και Ruchi Bharti, «Pharmacological activities and toxicities of alkaloids on human health,» *Materials Today: Proceedings*, 2021.
- [74] Ryohei Eguchi, Naoaki Ono, Aki Hirai Morita, Tetsuo Katsuragi, Satoshi Nakamura, Ming Huang, Altaf-UI-Amin και Shigehiko Kanaya, «Classification of alkaloids according to the starting substances of their biosynthetic pathways using graph convolutional neural networks,» *BMC Bioinformatics*, 2019.
- [75] Ayushi Rajput, Renu Sharma και Ruchi Bharti, «Pharmacological activities and toxicities of alkaloids on human health,» *Materials Today: Proceedings*, 2022.



- [76] «Eutylone (bk-EBDB) and Benzylone (BMDP): Increasing Prevalence of New Synthetic Stimulants in the United States,» *NPS Discovery*, 2020.
- [77] «Critical Review Report:3,4-Methylenedioxy-N-benzylcathinone (Benzylone, BMDP),» World Health Organization (WHO), Geneva, 2021.
- [78] «Εισαγωγή στη Χρωματογραφία (Κεφάλαιο 17Α),» Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών , Αθήνα.
- [79] Shimadzu, «<https://www.shimadzu.eu.com>,» March 2020. [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.shimadzu.eu.com/sites/shimadzu.seg/files/SEG/GCMSBASIC.pdf>. [Πρόσβαση 16 June 2023].
- [80] U. ο. Colorado, «<https://cires1.colorado.edu>,» [Ηλεκτρονικό]. Available: [https://cires1.colorado.edu/jimenez/CHEM-5181/Labs/Gas\\_Chromatography.pdf](https://cires1.colorado.edu/jimenez/CHEM-5181/Labs/Gas_Chromatography.pdf).
- [81] «<https://www.thermofisher.com>,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.thermofisher.com/gr/en/home/industrial/mass-spectrometry/mass-spectrometry-learning-center/gas-chromatography-mass-spectrometry-gc-ms-information.html>. [Πρόσβαση 2023].
- [82] Richard Bade, Ahmed Abdelaziz, Lynn Nguyen, Aaron J. Pandopoulos, Jason M. White και Cobus Gerber, «Determination of 21 synthetic cathinones, phenethylamines, amphetamines and opioids in influent wastewater using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry,» *Talanta*, 2019.
- [83] Lorna A Nisbet, Fiona M Wylie, Barry K Logan και Karen S Scott, «Gas Chromatography-Mass Spectrometry Method for the Quantitative Identification of 23 New Psychoactive Substances in Blood and Urine,» *Journal of Analytical Toxicology*, 2019.
- [84] Dr Hayder Obayes Hashim, «Chromatography and HPLC principles,» 2018.
- [85] D. Skoog, Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης 6η έκδοση, Εκδόσεις Κωσταράκη , 2007.
- [86] Γ. Θεωδορίδης, Σ. Γηρούση , Γ. Ζαχαριάδης, Α. Σ. Ζώτου και Β. Σαμανίδου, Βιοαναλυτική χημεία, Εκδόσεις Κάλλιπος , 2015.
- [87] Nikalje Anna Pratima και Ramesh Gadikar, «Liquid Chromatography-Mass Spectrometry and Its Applications: A Brief Review,» *Archives of Organic and Inorganic Chemical Sciences*, 2018.
- [88] Π. Καρκαλούσος, Ζ. Γεωργίου, Χ. Κρούπης, Α. Παπαϊωάννου, Π. Πλαγιάς, Σ. Βασίλειος, Γ. Ε. Τσότσου και Χ. Φροντζούλα, «ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ (ΑΠΟΔΟΣΗΣ) (HPLC) ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ, ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΚΑΙ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ,» σε *Εργαστηριακές ασκήσεις κλινικής χημείας*, Κάλλιπος, Ανοικτές Ακαδημαϊκές Εκδόσεις, 2015.
- [89] Meyer V. R, *Practical High Performance Liquid Chromatography*, Wiley, 2010.
- [90] J. W. Dolan, «Peak Tailing and Resolution,» *LCG Europe*, 2002.

- [91] S. G. N. A. S. R. Kumar A, «Review UPLC: a preeminent technique in pharmaceutical analysis.,» *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 2012.
- [92] Chesnut SM και Salisbury JJ, «The role of UHPLC in pharmaceutical development,» *Journal of Separation Science*, 2007.
- [93] R. C. Chawla G, «Principle, instrumentation, and applications of UPLC: A novel technique of liquid chromatography,» *Open Chemistry Journal*, 2016.
- [94] Feruza Ahmed, Tadele Eticha, Ariaya Hymete και Ayenew Ashenef, «High Performance Liquid Chromatography,» *Principles and Applications of Ultra-High-Performance Liquid Chromatography*, 2022.
- [95] Basics of LC/MS, Hewlett Packard, 1998.
- [96] M. Vogeser και K. G. Parhofer, «Liquid Chromatography Tandem-mass Spectrometry Technique and Applications in Endocrinology,» *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2007.
- [97] Ju-Seop Kang , «Principles and Applications of LC-MS/MS for the Quantitative Bioanalysis of Analytes in Various Biological Samples,» σε *Tandem Mass Spectrometry – Applications and Principles*, Intechopen, 2012.
- [98] Basics of LC/MS, USA: Agilent Technologies, 2001.
- [99] Nikalje Anna Pratima και Ramesh Gadikar, «Liquid Chromatography-Mass Spectrometry and Its Applications: A Brief Review,» *Archives of Organic and Inorganic Chemical Sciences*, 2018.
- [100] Chung Shun Ho, Ka Chun Lam, Michael HM Chan, R C K Cheung, Lap KAY Law, Lydia C W Lit, K.F. Ng, Margaret Suen και H.L. Tai, «Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications,» *The Clinical Biochemist Reviews*, 2003.
- [101] J. Pitt, «Principles and Applications of of LC-MS in Clinical Biochemistry,» *Clinical Biochemistry Vol 30* , 2009.
- [102] PRINCY AGARWAL και ANJU GOYAL, «A REVIEW ON ANALYZERS FOR MASS SPECTROMETRY,» *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2017.
- [103] F. Lemièrè, Mass analyzers for LC-MS, Primer, 2002.
- [104] «<https://www.britannica.com>,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.britannica.com/science/mass-spectrometry/Electron-multipliers>. [Πρόσβαση 3rd July 2023].
- [105] E. De Hoffmann και V. Stroobant, Mass Spectrometry Principles and Applications (3rd edition), Wiley, 2007.
- [106] H. Parliament, «<https://www.hellenicparliament.gr>,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.hellenicparliament.gr/UserFiles/2f026f42-950c-4efc-b950-340c4fb76a24/n-nard-eis.pdf>.

- [107] Εφημερίς της Κυβερνήσεως, Τεύχος 1ο, Αρ. Φύλλου 103, ΝΟΜΟΣ ΥΠ' ΑΡΙΘ. 3459 Κώδικας νόμων για ναρκωτικά, 2006.
- [108] Chinaza Godswill Awuchi, Maduabuchi Patrick Aja, Nancy Bonareri Mitaki, Sonia Morya, Ikechukwu O. Amagwula, Chinelo Kate Echeta και Victory S. Igwe, *Journal of Chemistry*, 2023.
- [110] Brooke Mills, Andres Yepes και Kenneth Nugent, «Synthetic Cannabinoids,» *The American Journal of the Medical Sciences*, τόμ. 350, 2015.
- [111] S. Chayasirisobhon, «Mechanisms of Action and Pharmacokinetics of Cannabis,» *The Permanente Journal*, 2020.
- [112] «go.drugbank.com,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00182>. [Πρόσβαση 11th May 2023].
- [113] U. N. O. o. D. a. Crime, Recommended methods for the Identification and Analysis of Barbiturates and Benzodiazepines under International Control, New York: UNODC, 2012.
- [114] Fabresse N., «LC–HRMS and GC–MS identification of new synthetic cannabinoids and new psychoactive substances in seized materials,» *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2019.
- [115] Żwir-Ferenc A. και M. Biziuk, «Solid phase extraction technique - Trends, opportunities and applications,» *Polish Journal of Environmental Studies*, 2006.
- [116] «<https://www.affinisep.com>,» 2023. [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.affinisep.com/technologies/solid-phase-extraction/>.