



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΑΤΡΟΔΙΚΑΣΤΙΚΗΣ & ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ

**Προσδιορισμός Επιλεγμένων Εξαρτησιογόνων και
Νέων Ψυχοδραστικών Ουσιών (New Psychoactive Substances, NPS)
σε Βιολογικά Υλικά με την χρήση Υγρής Χρωματογραφίας Συζευγμένης
με Διαδοχική Φασματομετρία Μαζών (LC-MS/MS) και
Διερεύνηση της Μοριακής τους Δομής με Φασματοσκοπικές Μεθόδους-
Εφαρμογή σε Νεκροτομικό Υλικό και Κλινικά Περιστατικά**

ΔΗΜΗΤΡΑ ΦΛΩΡΟΥ
Βιολόγος, M.Sc.

Δ Ι Δ Α Κ Τ Ο Ρ Ι Κ Η Δ Ι Α Τ Ρ Ι Β Η

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2024



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΑΤΡΟΔΙΚΑΣΤΙΚΗΣ & ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ

**Προσδιορισμός Επιλεγμένων Εξαρτησιογόνων και
Νέων Ψυχοδραστικών Ουσιών (New Psychoactive Substances, NPS)
σε Βιολογικά Υλικά με την χρήση Υγρής Χρωματογραφίας Συζευγμένης
με Διαδοχική Φασματομετρία Μαζών (LC-MS/MS) και
Διερεύνηση της Μοριακής τους Δομής με Φασματοσκοπικές Μεθόδους-
Εφαρμογή σε Νεκροτομικό Υλικό και Κλινικά Περιστατικά**

ΔΗΜΗΤΡΑ ΦΛΩΡΟΥ
Βιολόγος, M.Sc.

Δ Ι Δ Α Κ Τ Ο Ρ Ι Κ Η Δ Ι Α Τ Ρ Ι Β Η

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2024

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».

Ημερομηνία αίτησης της κας Φλώρου Δήμητρας: 31-10-2019

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: Γ.Σ. αριθμ. 914^ο/3-3-2020

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπουσα:

Μπούμπα Βασιλική, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατροδικαστικής-Τοξικολογίας με έμφαση στη Δικαστική Τοξικολογία

Μέλη:

Μπαϊρακτάρη Ελένη, Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας
Σακκάς Βασίλειος, Αναπληρωτής Καθηγητής Αναλυτικής Χημείας του Τμήματος Χημείας

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 26-3-2020

«Προσδιορισμός επιλεγμένων εξαρτησιογόνων ουσιών και νέων ψυχοδραστικών ουσιών (New Psychoactive Substances, NPS) σε βιολογικά υλικά με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας συζευγμένης με διαδοχική φασματομετρία μαζών (LC-MS/MS) και διερεύνηση μοριακής δομής με φασματοσκοπικές μεθόδους»

Τροποποίηση τίτλου θέματος: Γ.Σ. αριθμ. 1033^ο/15-11-2022

«Προσδιορισμός επιλεγμένων εξαρτησιογόνων ουσιών και νέων ψυχοδραστικών ουσιών (New psychoactive substances, NPS) σε βιολογικά υλικά με την χρήση υγρής χρωματογραφίας συζευγμένης με διαδοχική φασματομετρία μαζών (LC-MS/MS) και διερεύνηση μοριακής δομής με φασματοσκοπικές μεθόδους-Εφαρμογή σε νεκροτομικό υλικό και κλινικά περιστατικά»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 1095^ο/23-4-2024

1. Μπούμπα Βασιλική, Καθηγήτρια Ιατροδικαστικής-Τοξικολογίας με έμφαση στη Δικαστική Τοξικολογία του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
2. Μπαϊρακτάρη Ελένη, Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
3. Σακκάς Βασίλειος, Αναπληρωτής Καθηγητής Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
4. Κουρκουμέλης Νικόλαος, Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Φυσικής-Βιοφυσικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
5. Ορφανίδης Αμβρόσιος, Επίκουρος Καθηγητής Ιατροδικαστικής-Τοξικολογίας με έμφαση στην Τοξικολογία του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
6. Φραγκούλη Κλειώ-Ευαγγελία, Επίκουρη Καθηγήτρια Ιατροδικαστικής-Τοξικολογίας με έμφαση στην Ιατροδικαστική του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
7. Μπαρμπούτη Αλεξάνδρα, Επίκουρη Καθηγήτρια Ανατομίας-Ιστολογίας-Εμβρυολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 31-5-2024

Ιωάννινα 3-6-2024

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Σπυρίδων Κοντσιώτης
Καθηγητής Νευρολογίας



Με αγάπη στους γονείς μου,
Χρήστο και Ιουλία,
που στάθηκαν δίπλα μου...

Στην μνήμη του πολυαγαπημένου μου θείου Γιάννη,
δεν σε ξεχνώ ποτέ!!

Με εκτίμηση και σεβασμό στην
Επιβλέπουσα Καθηγήτριά μου,
κ. Βασιλική Μπούμπα

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή πραγματεύεται την ανάπτυξη σύγχρονων και πρωτότυπων μεθοδολογιών για τον αποτελεσματικό και ακριβή προσδιορισμό κλασικών και μη εξαρτησιογόνων ουσιών. Πιο συγκεκριμένα, αναπτύχθηκαν μέθοδοι ανάλυσης με χρήση της υγρής χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών και μέθοδοι φασματοσκοπίας, με απώτερο στόχο την κάλυψη αναγκών στην τοξικολογική διερεύνηση κλινικών και νεκροτομικών περιστατικών. Εκπονήθηκε στο εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κατά τη χρονική περίοδο 03/2020-05/2024, υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας Μπούμπα Α. Βασιλική. Το έργο πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με το Κέντρο Μαγνητικού Συντονισμού του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και υπό την επίβλεψη του Δρ. Τσιαφούλη Κωνσταντίνου. Το αντικείμενο της διατριβής αποτελεί ένα εγχείρημα που στοχεύει στην ενίσχυση του έργου του δικαστικού τοξικολόγου σε κρίσιμα περιστατικά τοξικολογικής ανάλυσης όπου καλείται να δώσει απάντηση για την ύπαρξη ή όχι εξαρτησιογόνων ουσιών σε βιολογικά υλικά.

Με την ολοκλήρωση της διατριβής, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους ανθρώπους που συνετέλεσαν στην υλοποίησή της. Καταρχήν, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην επιβλέπουσα Καθηγήτρια μου, Μπούμπα Βασιλική, για την εμπιστοσύνη που μου επέδειξε από το ξεκίνημα της διατριβής μου με την ανάθεση της συγκεκριμένης μελέτης και την ευκαιρία που μου χάρισε να διευρύνω τα ερευνητικά μου ενδιαφέροντα. Την ευχαριστώ για το χρόνο που μου αφιέρωσε τα τελευταία χρόνια προσφέροντάς μου την πολύτιμη διδασκαλία και τη βαθιά της γνώση στο επιστημονικό αντικείμενο, εφόδια ανεκτίμητα χωρίς τα οποία δε θα είχε γίνει πραγματικότητα η εκπόνηση αυτής της μελέτης. Εκφράζω, επίσης, τις ευχαριστίες μου για την βοήθεια της να προσαρμοστώ στο εργαστήριο μετά την επιστροφή μου από την Αγγλία όπου και διέμενα για πολλά χρόνια, για τις παρατηρήσεις της, τη συμπαράσταση και ενθάρρυνση που έλαβα από μέρους της όταν όλες οι δυσκολίες μου φάνταζαν ανυπέρβλητα εμπόδια. Είναι και θα είναι η μέντορας μου.

Ευχαριστώ θερμά τον Δρ. Τσιαφούλη Κωνσταντίνου για την καλή του διάθεση και την μεγάλη βοήθεια που μου προσέφερε στην εκμάθηση του NMR καθώς και στην πραγματοποίηση των σχετικών πειραμάτων. Επίσης, θερμές ευχαριστίες εκφράζω στα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, την Καθηγήτρια κ. Μπαϊρακτάρη Ελένη και τον Καθηγητή κ. Σακκά Βασίλειο, για το ενδιαφέρον, την ενθάρρυνσή και βοήθειά τους για την επίλυση εργαστηριακών προβλημάτων που χρειάστηκε να αντιμετωπίσω. Εκφράζω ιδιαίτερες

ευχαριστίες στην Επίκουρη Καθηγήτρια Ανατομίας-Ιστολογίας-Εμβρυολογίας κ. Μπαρμπούτη Αλεξάνδρα και στον Αναπληρωτή Καθηγητή Ιατρικής Φυσικής-Βιοφυσικής κ. Κουρκουμέλη Νικόλαο για την τιμή να αποτελέσουν μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής.

Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον Καθηγητή του Πανεπιστημίου Monash, Victoria, Australia, Dr. Gerostamoulos Dimitri, Προϊστάμενο των Εργαστηρίων Τοξικολογίας του Ινστιτούτου Ιατροδικαστικής Ιατρικής της Βικτώρια (Victorian Institute of Forensic Medicine VIFM), και στον κ. Matthew Di Rago, Επιστημονικό Συνεργάτη του VIFM, για την εξαιρετική συνεργασία στο πειραματικό σκέλος της διατριβής, και την αδιάκοπη και τεράστια προθυμία να τους να βοηθήσουν με κάθε τρόπο.

Ευχαριστώ από τα βάθη της καρδιάς μου τους συνεργάτες μου στο Εργαστήριο, που με τα χρόνια έγιναν πολύτιμοι φίλοι μου, Θάλεια, Γλυκερία, Βασίλη, Σαββίνα, Χαρά, Φαίη για την άριστη συνεργασία μας κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής μου. Μαζί βιώσαμε και μοιραστήκαμε όλες τις έντονες, ευχάριστες και δυσάρεστες, στιγμές κατά την παράλληλη διεξαγωγή των εργασιών μας. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω και στα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας για την πολύπλευρη βοήθειά τους κατά την εκπόνηση της διατριβής, την Επίκουρη Καθηγήτρια Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας κ. Φραγκούλη Κλειώ-Ευαγγελία και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατροδικαστικής με έμφαση στην Δικαστική Παθολογική Ανατομική κ. Μητσέλου Αντιγόνη. Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Επίκουρο Καθηγητή Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας κ. Ορφανίδη Αμβρόσιο για την άριστη συνεργασία μας, τις συμβουλές, τον χρόνο που διέθεσε καθημερινά, και την μεγάλη βοήθεια που μου προσέφερε στην ολοκλήρωση της συγγραφής της διατριβής μου.

Τέλος, το πιο μεγάλο ευχαριστώ ανήκει στην οικογένειά μου, στους γονείς μου, Χρήστο και Ιουλία, στον αδερφό μου Θωδωρή, και την μικρή μου ανιψιά Ιουλία, για την ηθική συμπαράσταση, αγάπη, στήριξη, συμβουλές αλλά και την υπομονή που έδειξαν έως ότου ολοκληρώσω το στόχο μου. Ευχαριστώ θερμά τον σύντροφο μου, Παναγιώτη, που είναι πάντα δίπλα μου στα εύκολα και στα δύσκολα, για τη μοναδική του ικανότητα να επιλύει τα προβλήματα μου, αλλά και για την ακλόνητη πίστη του σε εμένα. Επίσης, ευχαριστώ τους στενούς μου φίλους Ηλιάνα, Κάλλη, Δημήτρη και Τζωρτζίνα για την πολύπλευρη στήριξή τους.

Φλώρου Δήμητρα
Ιωάννινα, 2024

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΧΗΜΑΤΑ.....	xviii
ΠΙΝΑΚΕΣ.....	xx
ΑΡΤΙΚΟΛΕΞΑ-ABBREVIATIONS.....	xxii
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 ΔΙΚΑΣΤΙΚΗ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ.....	1
1.1.1 Τοξικολογική εξέταση.....	1
1.2 ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΣΤΗΝ ΔΙΚΑΣΤΙΚΗ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ.....	4
1.2.1 Κλινικά βιολογικά υλικά.....	4
1.2.2 Νεκροτομικό υλικό.....	6
1.3 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΕΞΑΡΤΗΣΙΟΓΟΝΩΝ, ΝΕΩΝ ΨΥΧΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ (NPS) ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ ΤΟΞΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΩΝ.....	9
1.3.1 Εξαρτησιογόνες ουσίες.....	9
1.3.2 Νέες Ψυχοτρόπες Ουσίες- Novel Psychoactive Substances (NPS).....	12
1.3.3 Άλλες κατηγορίες ουσιών.....	19
1.3.4 Εξαρτησιογόνες ουσίες και πανδημία κορονοϊού (COVID-19).....	20
1.4 ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΕΣ ΣΤΗΝ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ.....	21
1.4.3 Προκατεργασία βιολογικών υλικών για LC-MS/MS.....	41
1.4.4 Αναλυτικές τεχνικές προσδιορισμού ανίχνευσης ουσιών.....	46
1.5 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	66
2 ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	67
2.1 ΥΛΙΚΑ - ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ.....	67
2.1.1 Πρότυπες ενώσεις.....	67
2.1.2 Εργαστηριακές Συσκευές.....	81
2.1.3 Διαλύτες, αντιδραστήρια και υλικά.....	82
2.2 ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	84
2.3 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ FPSE ΦΙΛΤΡΟΥ.....	87
2.3.1 Προεργασία του υποστρώματος πριν την επικάλυψη.....	87
2.3.2 Σύνθεση του διαλύματος κολλοειδούς-γέλης για την επικάλυψη του υποστρώματος.....	87
2.4 ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΟΥΣΙΩΝ ΑΠΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΛΙΚΑ.....	88
2.4.1 Μεθοδολογία υγρής-υγρής εκχύλισης ολικού αίματος.....	88
2.4.2 Μεθοδολογία εκχύλισης FPSE βρωφίνης από σίελα.....	89
2.5 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ.....	89
2.5.1 Βελτιστοποίηση παραμέτρων Υγρής Χρωματογραφίας.....	91
2.6 ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ.....	93
2.7 ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ.....	102

2.8	ΤΕΧΝΙΚΗ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ (Nuclear Magnetic Resonance, NMR)	106
2.8.1	Αποσαφήνιση της δομής της βενζυλόνης	106
2.8.2	Ανίχνευση βενζυλόνης στα ούρα με τον ανιχνευτή αντίστροφου τριπλού συντονισμού (ΤΧΙ).....	107
2.8.3	Ανίχνευση βενζυλόνης σε ούρα με τον κρυοανιχνευτή (NEO-TCPI).....	108
2.9	ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ LLE-UHPLC-MS/MS ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΑ ΚΑΙ ΔΙΚΑΣΤΙΚΑ ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΑ	110
3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	111
3.1	ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΟΥΣΙΩΝ ΑΠΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΛΙΚΑ	111
3.1.1	Υγρή-υγρή εκχύλιση – μέθοδος ολικού αίματος.....	111
3.1.2	Εκχύλιση μέσω προσρόφησης σε δίκτυο επικαλυμμένων ιών (Fabric Phase Sorptive Extraction, FPSE) σιέλων	112
3.2	ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΗ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ .	115
3.2.1	Πρόγραμμα βαθμωτής έκλυσης ουσιών – μέθοδος ολικού αίματος	115
3.2.2	Πρόγραμμα βαθμωτής έκλυσης βρωφίνης - μέθοδος σιέλων	115
3.2.3	Όγκος εισαγωγής δειγματος.....	116
3.3	ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ	117
3.4	ΑΝΑΛΥΣΗ ΟΥΣΙΩΝ ΜΕ LC-MS/MS – ΜΕΘΟΔΟΣ ΟΛΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ	119
3.5	ΑΝΑΛΥΣΗ ΒΡΩΡΦΙΝΗΣ - ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΙΕΛΩΝ	124
3.6.1	Επικύρωση μεθοδολογίας LLE-LC-MS/MS σε ολικό αίμα	125
3.6.2	Επικύρωση μεθοδολογίας FPSE-LC-MS/MS σε σίελα.....	143
3.7	ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΣΥΝΘΕΤΙΚΩΝ ΝΑΡΚΩΤΙΚΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ (NMR)	145
3.7.1	Αποσαφήνιση της δομής της βενζυλόνης	145
3.7.2	Επίδραση συγκέντρωσης και φαινόμενο χημικής ανταλλαγής.....	148
3.7.3	Δομή της βενζυλόνης σε διάλυμα DMSO-d ₆	152
3.7.4	Ανάπτυξη και εφαρμογή της μεθόδου NMR σε δείγματα ούρων	153
3.8	ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΑ ΚΑΙ ΔΙΚΑΣΤΙΚΑ ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΑ	157
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	163
5	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	178
	ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	186
	SUMMARY	188
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	190

ΣΧΗΜΑΤΑ

Σχήμα 1: Το «κατώφλι» ανίχνευσης ουσιών συγκριτικά για αίμα, σίελα, ούρα και τρίχες.....	6
Σχήμα 2: Μοριακή δομή παραγώγων καθινόνης.....	15
Σχήμα 3: Μοριακή δομή φαινεθλαμινών.....	16
Σχήμα 4: Μοριακή δομή παραγώγων τρυπταμίνης.....	17
Σχήμα 5: Σχηματική απεικόνιση της εκχύλισης FPSE.....	45
Σχήμα 6: Αναλυτική σχηματική απεικόνιση διάταξης HPLC (Wikipedia, 2024).....	47
Σχήμα 7: Εφαρμογή τεχνικών API για ενώσεις με βάση την πολικότητα και το μοριακό βάρος.....	51
Σχήμα 8: Σχηματική απεικόνιση πηγής ESI σε λειτουργία θετικού ιοντισμού [http://www.lamondlab.com/MSResource/images/lcms/ESI.jpg].....	53
Σχήμα 9: Σχηματική απεικόνιση τετραπολικού αναλυτή (Skoog, 2007).....	55
Σχήμα 10: Σχηματικό διάγραμμα τριπλού τετραπόλου αναλυτή μαζών (Sciex, 2019).....	57
Σχήμα 11: Προσανατολισμός των διανυσμάτων των πυρηνικών μαγνητικών διπολικών ροπών μ, α) απουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου H ₀ , β) παρουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου H ₀	61
Σχήμα 12: Διάταξη φασματόμετρου NMR.....	64
Σχήμα 13: Λεπτομερέστερη απεικόνιση του μαγνήτη και του αισθητήρα ενός φασματόμετρου NMR.....	65
Σχήμα 14: Σωληνάκια Vacutainer® παρουσία αντιπηκτικών και συντηρητικών παραγόντων.....	84
Σχήμα 15: Σωληνάκια Vacutainer SST II Advance χωρίς παρουσία αντιπηκτικών παραγόντων.....	85
Σχήμα 16: (α) Επίδραση του διαλύτη εκχύλισης στην απόδοση των ουσιών. (β) Επίδραση του διαλύτη επανασύστασης στην απόδοση των ουσιών. Η μονάδα μέτρησης του εμβαδού ήταν cps: cycle per second/ κύκλοι ανά δευτερόλεπτο.	112
Σχήμα 17: (α) Επίδραση του υλικού επικάλυψης στην απόδοση της βρωφίνης. (β) Επίδραση του pH στην απόδοση της βρωφίνης. (γ) Επίδραση του χρόνου εκχύλισης στην απόδοση της βρωφίνης. (δ) Επίδραση του διαλύτη έκλουσης στην απόδοση της βρωφίνης. (ε) Επίδραση του χρόνου έκλουσης στην απόδοση της βρωφίνης.	114
Σχήμα 18: Επίδραση του όγκου ενέσιμου δείγματος στην απόδοση των ουσιών.	116

Σχήμα 19: Βέλτιστη απόκριση ουσιών ανάλογα με την θερμοκρασία ιοντισμού.....	118
Σχήμα 20: Χρωματογράφημα των 92 ουσιών στόχων εμβολιασμένων σε ολικό αίμα σε συγκέντρωση 250 ng/mL.....	121
Σχήμα 21: (α) Χρωματογράφημα ολικού ιόντος (Πλήρης σάρωση) βενζυλόνης.(β) Φάσματα ιόντων βενζυλόνης.	122
Σχήμα 22: (α) Χρωματογράφημα ολικού ιόντος (Πλήρης σάρωση) κοκαΐνης.(β) Φάσματα ιόντων κοκαΐνης.....	122
Σχήμα 23: (α) Χρωματογράφημα ολικού ιόντος (Πλήρης σάρωση) διαζεπάμης.(β) Φάσματα ιόντων διαζεπάμης.	122
Σχήμα 24: (α) Χρωματογράφημα ολικού ιόντος (Πλήρης σάρωση) MDMA.(β) Φάσματα ιόντων MDMA.....	123
Σχήμα 25: (α) Χρωματογράφημα ολικού ιόντος (Πλήρης σάρωση) παροξετίνης.(β) Φάσματα ιόντων παροξετίνης.	123
Σχήμα 26: (α) Χρωματογράφημα ολικού ιόντος (Πλήρης σάρωση) πραζεπάμης.(β) Φάσματα ιόντων πραζεπάμης.	123
Σχήμα 27: (α) Χρωματογράφημα ολικού ιόντος (Πλήρης σάρωση) βρωρφίνης.(β) Φάσματα ιόντων βρωρφίνης.	124
Σχήμα 28: Δομή BMDP (Marvin JS).....	145
Σχήμα 29: Φάσμα ^1H NMR 4,95 mM (1,43 mg/mL) βενζυλόνης σε DMSO- d_6 (64 μεταβάσεις, πειραματικός χρόνος 5m 32s). Τα ένθετα (I) έως (III) αποτελούν μεγέθυνση των περιοχών του φάσματος.....	146
Σχήμα 30: Φάσμα HMBC της βενζυλόνης σε DMSO- d_6 με τα πρωτόνια και τους άνθρακες να υποδεικνύονται. Στο τετράγωνο που περιλαμβάνεται στο σχήμα παρουσιάζονται οι άνθρακες των δακτυλίων A και B.	147
Σχήμα 31: Φάσμα HSQC-TOCSY της βενζυλόνης σε DMSO- d_6 . Ένθετο (I) είναι μια μεγέθυνση της αρωματικής περιοχής. Οι γραμμές (α) και (β) υποδεικνύουν την συσχέτιση TOCSY των συστημάτων spin για τον δακτύλιο-A και την μεθυλομάδα, αντίστοιχα.....	148
Σχήμα 32: Πείραμα DOSY σε βενζυλόνη (1,43 mg/mL)/ DMSO- d_6	150
Σχήμα 33: Φάσμα HSQC της βενζυλόνης σε συγκέντρωση 0,24 mg/ mL σε DMSO- d_6 . Το H_2O καταστέλλεται με τη χρήση καταστολής διαλύτη WET. Στο ένθετο (I) εμφανίζεται η περιοχή του φάσματος που αντιστοιχεί στους αρωματικούς δακτυλίους A και B.....	151
Σχήμα 34: Φάσματα ^1H - ^{13}C HSQC της βενζυλόνης σε DMSO- d_6 . (A) για 1,43 mg/mL (5,0 mM) και (B) για 0,24 mg/mL (0,85 mM).	151

- Σχήμα 35:** Περιορισμοί NOE της βενζυλόνης (επίπεδο συγκέντρωσης 1,43 mg/mL (5,0 mM) σε DMSO-d₆. Τα μαύρα βέλη υποδεικνύουν τα πειράματα NOESY και τα κόκκινα τα πειράματα ROESY. 153
- Σχήμα 36:** Προτεινόμενη χημική δομή της βενζυλόνης σε DMSO-d₆. 153
- Σχήμα 37:** (Α) Φάσμα NMR δείγματος ούρων, (Β) και (Γ) φάσματα NMR κατά τη διαδοχική προσθήκη 50 μL διαλύματος βενζυλόνης σε DMSO-d₆ με αποτέλεσμα 0,13 mg/mL (0,46 mM) και 0,25 mg/mL (0,88 mM), αντίστοιχα. Τα πρωτόνια της βενζυλόνης "φασματοσκοπική υπογραφή NMR" υπογραφή NMR" υποδεικνύονται στο (Γ). 154
- Σχήμα 38:** Φάσμα ¹H-¹³C HSQC δείγματος ούρων DMSO-d₆ εμβολιασμένου με βενζυλόνη 0,25 mg/mL (0,88 mM). 155
- Σχήμα 39:** ¹H-¹³C HMBC φάσμα δείγματος ούρων σε DMSO-d₆ εμβολιασμένου με 0,25 mg/mL (0,88 mM) βενζυλόνης. 155
- Σχήμα 40:** Συχνότητα εμφάνισης ουσιών σε ποσοστό % ανά κατηγορία ενώσεων. 162

ΠΙΝΑΚΕΣ

Πίνακας 1: Μέθοδοι και συνθήκες ανάλυσης αίματος	25
Πίνακας 2: Μέθοδοι και συνθήκες ανάλυσης σιέλων.....	39
Πίνακας 3: Μελετώμενες ουσίες, χημική δομή, χημικός τύπος και μοριακό βάρος, pKa και t _{1/2}	72
Πίνακας 4: Οι τέσσερις διαφορετικές μέθοδοι εκχύλισης ολικού αίματος που εφαρμόστηκαν κατά την βελτιστοποίηση της προκατεργασίας δειγμάτων	88
Πίνακας 5: Οι 10 διαφορετικές μέθοδοι εκχύλισης σιέλων που δοκιμάστηκαν κατά την βελτιστοποίηση της προκατεργασίας δειγμάτων.....	89
Πίνακας 6: Τελικό πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης ουσιών από ολικό αίμα, 7,5 λεπτών ...	92
Πίνακας 7: Τελικό πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης βρωφίνης από σιέλα, 6,5 λεπτών.....	92
Πίνακας 8: Πρόδρομα (Q1) και παραγόμενα ιόντα (Q3), ο χρόνος κατακράτησης (RT), τα δυναμικά DP, EP και CXP, και οι ενέργειες σύγκρουσης (Collision Energy) για τις 92 μελετώμενες ουσίες, αναφορικά με την μεθοδολογία LLE για το ολικό αίμα	94
Πίνακας 9: Πρόδρομα (Q1) και παραγόμενα ιόντα (Q3), dwell time (ms), και τα δυναμικά DP, EP και CXP, και οι ενέργειες σύγκρουσης (Collision Energy) για την βρωφίνη, αναφορικά με την μεθοδολογία FPSE για τα σιέλα	101
Πίνακας 10: Χρόνοι κατακράτησης των 92 ουσιών στόχων & των 3 εσωτερικών προτύπων	119
Πίνακας 11: LOD/LOQ για τις 92 ουσίες-στόχοι στο ολικό αίμα.....	125
Πίνακας 12: Πιστότητα της προτεινόμενης μεθοδολογίας LLE-LC-MS/MS προσδιορισμού των 92 ουσιών-στόχων σε ολικό αίμα.....	128
Πίνακας 13: Ακρίβεια ως ανάκτηση της προτεινόμενης μεθοδολογίας LLE-LC-MS/MS προσδιορισμού των 92 ουσιών-στόχων σε ολικό αίμα.	131
Πίνακας 14: Δεδομένα παλινδρόμησης και γραμμικότητα, για τις 92 ουσίες-στόχους στο ολικό αίμα.....	134
Πίνακας 15: Επίδραση του υποστρώματος σε χαμηλό (5 ng/mL) και υψηλό επίπεδο (200 ng/mL) συγκέντρωσης για τις 92 ουσίες-στόχους στο ολικό αίμα.....	137
Πίνακας 16: Σταθερότητα των 92 ουσιών-στόχων σε δύο επίπεδα συγκέντρωσης (5-200 ng/mL) και σε δύο χρονικά διαστήματα (24 ώρες/ μίας εβδομάδας).	140

Πίνακας 17: Πιστότητα της προτεινόμενης μεθοδολογίας FPSE -LC-MS/MS προσδιορισμού της βρωφίνης στα σίελα εντός της ημέρας και μεταξύ ημερών.	143
Πίνακας 18: Σταθερότητα της βρωφίνης σε δύο θερμοκρασίες (5°C και -20°C) και σε δύο χρονικά διαστήματα (1 και 2 εβδομάδες).....	144
Πίνακας 19: Χημική απόδοση της βενζυλόνης στα 4,95 mM (1,43 mg/mL) σε DMSO-d ₆ .	147
Πίνακας 20: ¹ H NMR μετατοπίσεις της βενζυλόνης σε DMSO-d ₆ για δύο επίπεδα συγκεντρώσεων: 1.43 mg/mL (5 mM) and 0.24 mg/mL (0.83 mM).....	149
Πίνακας 21: Χημικές μετατοπίσεις ¹³ C και τιμές ΔδC για τη βενζυλόνη σε δύο επίπεδα συγκέντρωσης: 0,24 mg/mL (0,85 mM) και 1,43 mg/mL (5,0 mM) σε DMSO-d ₆	152
Πίνακας 22: Χημικές μετατοπίσεις (δH και δC) της βενζυλόνης 0,25 mg/mL (0,88 mM) σε δείγμα ούρων DMSO-d ₆	156
Πίνακας 23: Αποτελέσματα νεκροτομικών περιστατικών μετά από ολοκληρωμένη διερεύνηση.....	158
Πίνακας 24: Αποτελέσματα δικαστικών κλινικών περιστατικών.	160
Πίνακας 25: Αποτελέσματα κλινικών περιστατικών.....	161
Πίνακας 26: Εύρη θεραπευτικών, τοξικών και θανατηφόρων συγκεντρώσεων (ng/mL) των ουσιών-στόχων	174

ΑΡΤΙΚΟΛΕΞΑ – ABBREVIATIONS

- 6-MAM: 6-monoacetylmorphine, 6-Μονοακέτυλο-μορφίνη
- Al₂O₃: Aluminium oxide, Οξείδιο του αργιλίου
- API: Atmospheric Pressure Ionisation, Ατμοσφαιρική πίεση
- APCI: Atmospheric Pressure Chemical Ionisation, Χημικός ιονισμός σε ατμοσφαιρική πίεση
- APPI: Atmospheric Pressure Photo Ionisation, Φωτοϊονισμός σε ατμοσφαιρική πίεση
- B: Magnetic Sector Analyzer, Αναλυτής μαγνητικού τομέα απλής εστίασης
- BE: Benzoyl Ecgonine, Βενζούλοεκγονίνη
- CAD: Collision activated dissociation, Διάσπαση επαγόμενη από σύγκρουση
- CID: Collision induced dissociation, Διάσπαση επαγόμενη από σύγκρουση
- COVID-19: Κορονοϊός 2019
- CUR: Curtain gas, Αέριο «κουρτίνας»
- CE: Collision energy, Ενέργεια σύγκρουσης
- CV: Coefficient of variation, Συντελεστής μεταβλητότητας
- CXP: Collision cell exit potential, Δυναμικό εξόδου της κυψέλης σύγκρουσης
- DAD: Diode Array Detector, Ανιχνευτής συστοιχίας διόδων
- DLLME: Dispersive liquid-liquid microextraction, Μικροεκχύλιση υγρού-υγρού με διασπορά
- DMT: N,N-dimethyltryptamin, N,N-διμεθυλοτρυπταμίνη
- DP: Declustering potential
- EE: Ευρωπαϊκή Ένωση
- EC: Electrochemical Detector, Ηλεκτροχημικός ανιχνευτής
- EMCCDA: European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (Ευρωπαϊκό Κέντρο Παρακολούθησης Ναρκωτικών και Τοξικομανίας)
- EME: Ecgonine Methyl Ester, Μεθυλεστέρας της εκγονίνης
- EP: Entrance potential, Δυναμικό εισόδου
- ESI: Electrospray Ionization, Ιονισμός με ψεκασμό σε ηλεκτρικό πεδίο
- FAB: Continuous-Flow Fast Atom Bombardment, Βομβαρδισμός με ταχεία άτομα
- FPSE: Fabric Phase Sorptive Extraction, Εκχύλιση μέσω προσρόφησης σε δίκτυο επικαλυμμένων ινών
- FS: Full Scan, Τεχνική πλήρους σάρωσης
- FT- ICR-MS: Αναλυτής ιοντικού κυκλοτρονικού συντονισμού με μετασχηματισμό Fourier
- Gas-phase sources: Πηγές αέριας φάσης

GS1: Gas source 1, GAS 1

GS2: Gas source 2, GAS 2

GC: Gas Chromatography, Αέρια χρωματογραφία

GC-MS: Gas Chromatography- Mass spectrometry, Αέρια Χρωματογραφία συζευγμένη με Φασματομετρία Μάζας

H.Π.Α.: Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής

HPLC: High Performance Liquid Chromatography, Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

IS: Ion Spray Voltage

IS: Internal Standard, Εσωτερικό Πρότυπο

IT: Ion trap, Αναλυτής παγίδας ιόντων

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry

ΚΕ.Θ.Ε.Α.: Κέντρο Θεραπείας Εξαρτημένων Ατόμων

LC: Liquid Chromatography, Υγρή Χρωματογραφία

LC- MS/MS: Liquid Chromatography tandem Mass spectrometry, Υγρή Χρωματογραφία συζευγμένη με Φασματομετρία Μάζας

LLE: Liquid-Liquid Extraction, Εκχύλιση Υγρού-Υγρού

LOD: Limit of Detection, Όριο ανίχνευσης

LOQ: Limit of Quantitation, Όριο ποσοτικοποίησης

LPME: Liquid Phase Microextraction, Μικροεκχύλιση υγρής φάσης

LSD: Lysergic acid diethylamide, Διαιθυλαμίδιο του λυσεργικού οξέος

m/z: Λόγος μάζας προς φορτίο

MALDI: Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization, Ιοντισμός εκρόφησης υποβοηθούμενος από υλικό υποστρώματος και laser

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

MDMA: 3,4 Methylenedioxymethamphetamine, 3,4 Μεθυλανοδιοξυμεθαμφεταμίνη

MEPS: Microextraction by packed sorbent, Μικροεκχύλιση με πακτωμένο προσροφητικό υλικό

MRM: Multiple Reaction Monitoring

MRI: Magnetic Resonance Imaging, Απεικόνιση μαγνητικού συντονισμού

MME: Μέσα μαζικής ενημέρωσης

MS: Mass Spectrometry Detector, Ανιχνευτής φασματομετρίας μαζών

MS/MS: Tandem Mass Spectrometry, Φασματομετρία μαζών σε σειρά

MTMS: Trimethoxymethylsilane, Μεθυλτριμεθοξυσιλάνιο

MTBE: Methyl tert-butyl ether, Μεθυλ τριτο -βουτυλαιθέρας

NSDUH: National Survey on Drug Use and Health, Εθνική Έρευνα για τη Χρήση Ναρκωτικών και την Υγεία

NMR: Nuclear Magnetic Resonance, Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού

NP-HPLC: Normal HPLC, Κανονικής φάσης

NPS: Novel Psychoactive Substance, Νέες ψυχοδραστικές ουσίες

NSO: Novel Psychoactive Opioid, Νέα ψυχοδραστικά Οπιοειδή

O.K.A.NA.: Οργανισμός Κατά των Ναρκωτικών

OHE: Οργανισμός Ηνωμένων Εθνών

Orbitrap: Orbital Trap analyzer, Αναλυτής τροχιακής παγίδας ιόντων

PCB: Polychlorinated biphenyls, Πολυχλωριωμένα διφαινύλια

PEG: Polyethylene glycol, Πολυαιθυλενογλυκόλη

PFAS: Per- and polyfluoroalkyl substances, Πολυφθοροαλκυλικές ουσίες

Plasma Desorption: Εκρόφιση με πλάσμα

Plate Height: Ύψος θεωρητικής πλάκας

PMR: Postmortem redistribution, μεταθανάτια ανακατανομή

Q: Quatrupole Mass Analyser, Τετραπολικός αναλυτής μαζών

RF: Fluorescence Detector, Φθορισμομετρικός ανιχνευτής

Rs: Resolution, Διαχωριστική ικανότητα στήλης

RID: Refractive Index Detector, Διαφορικός ανιχνευτής δείκτη διάθλασης

RP: Reversed Phase, HPLC αντίστροφης φάσης

RSD: Relative Standard Deviation, Σχετική Τυπική Απόκλιση

S/N: Signal to Noise, Σήματ προς θόρυβο

SALLE: Salting-out assisted liquid-liquid extraction, Εκχύλιση υγρού-υγρού με εξαλάτωση

SBSE: Stir Bar Sorptive Extraction, Εκχύλιση με προσροφητική ράβδο ανάδευσης

Secondary Ion MS: Βομβαρδισμός με ιόντα

SiO₂: Silicon dioxide, Οξείδιο του πυριτίου

SIM: Single Ion Monitoring, τεχνική της επιλεκτικής παρακολούθησης ιόντων

SLE: Solid/Liquid Extraction, Εκχύλιση στερεού/υγρού

SPE: Solid-Phase Extraction, Εκχύλιση στερεής φάσης

SPME: Solid Phase MicroExtraction, Μικροεκχύλιση στερεής φάσης

SRM: Single Reaction Monitoring

SWGTOX: Scientific Working Group for Forensic Toxicology

tR: Retention Time (RT), Χρόνος Κατακράτησης

TIAFT: The International Association of Forensic Toxicologists

TFA: Trifluoroethanoic acid, Τριφθοραιθανικό οξύ

TIC: Total Ion Chromatogram, Συνολικό ρεύμα ιόντων

TOF: Time of Flight, Αναλυτής χρόνου πτήσης

W: Peak Width, Εύρος κορυφής

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

XIC: Extracted Ion Chromatography

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

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

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΔΙΚΑΣΤΙΚΗ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ

Τοξικολογία είναι η επιστήμη που ασχολείται με τη μελέτη των δηλητηρίων, ή πιο συγκεκριμένα με τη μελέτη του τρόπου με τον οποίο οι χημικές ουσίες επηρεάζουν την φυσιολογική λειτουργία ενός βιολογικού συστήματος. Η Τοξικολογία έχει τις ρίζες της στην εποχή του Γαληνού (131-200 μ.Χ.) και του Παράκελσου (1493-1541 μ.Χ.), που θεωρείται ο «πατέρας» της Τοξικολογίας και είχε διατυπώσει την περίφημη φράση "Τίποτα δεν είναι δηλητήριο, τα πάντα είναι δηλητήριο. Η δόση κάνει το δηλητήριο" (dosis facit venenum) (Hartmann, 1896, Deichmann et al., 1986). Σήμερα, γνωρίζουμε πως ο ισχυρισμός αυτός ισχύει και κάθε ουσία θα μπορούσε να γίνει τοξική, αν ληφθεί σε ικανή ποσότητα ώστε να προκαλέσει βλάβη ή ακόμη και θάνατο. Στη σύγχρονη κοινωνία, εξαιτίας της συνεχώς αυξανόμενης χρήσης χημικών ουσιών, η επιστήμη της Τοξικολογίας έχει ιδιαίτερη σημασία. Έχουν αναπτυχθεί πολλοί επιμέρους κλάδοι της Τοξικολογίας με εξειδικευμένα αντικείμενα αυτής όπως: η Αναλυτική, η Αναπαραγωγική, η Αναπτυξιακή, η Δικαστική, η Κλινική, η Οικοτοξικολογία και η Ρυθμιστική Τοξικολογία.

Πιο συγκεκριμένα, το αντικείμενο της Δικαστικής Τοξικολογίας αφορά την διερεύνηση της δράσης μίας ουσίας στον ανθρώπινο οργανισμό ως αιτία εμφάνισης μιας νόσου ή βίαιου θανάτου ή με άλλα λόγια, τη διερεύνηση της πιθανότητας ύπαρξης αιτιώδους σχέσης μεταξύ της λήψης της ουσίας και του οποιουδήποτε ανεπιθύμητου αποτελέσματος. Περιλαμβάνει την χρήση της αναλυτικής και κλινικής χημείας, και της φαρμακολογίας. Το πεδίο εφαρμογής της Δικαστικής Τοξικολογίας έχει διευρυνθεί ιδιαίτερα τα τελευταία 50 χρόνια (Chung, 2017). Η εφαρμογή της Δικαστικής Τοξικολογίας απαιτεί αφενός την γνώση της τοξικής δράσης των δηλητηρίων και αφετέρου την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό τους σε διάφορα βιολογικά υλικά. Η Δικαστική Τοξικολογία εφαρμόζει τη χρήση κατάλληλων αναλυτικών τεχνικών για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό εξαρτησιογόνων ουσιών και φαρμάκων σε βιολογικά υλικά και ιστούς (Adatsi, 2005). Η Δικαστική Τοξικολογία εξυπηρετεί το έργο της Δικαιοσύνης και η εξέταση των περιστατικών γίνεται κατόπιν αντίστοιχων εντολών από τις Ανακριτικές και Δικαστικές Αρχές. Τα βιολογικά υλικά που εξετάζονται αφορούν είτε νεκροτομικό υλικό στα πλαίσια της ιατροδικαστικής διερεύνησης των αιτιών θανάτου είτε κλινικά δείγματα για την εξακρίβωση της χρήσης ή κατάχρησης ουσιών, στα πλαίσια της δικαστικής διερεύνησης εγκληματικών πράξεων.

1.1.1 Τοξικολογική εξέταση

Η τοξικολογική διερεύνηση ενός περιστατικού έχει ως σκοπό την απομόνωση της τοξικής ουσίας, την ταυτοποίησή της, τον ποσοτικό της προσδιορισμό και την επιβεβαίωση απουσίας άλλων τοξικών παραγόντων. Η τοξικολογική εξέταση αποτελεί εξειδικευμένη εξέταση που πρέπει να γίνεται από κατάλληλα εκπαιδευμένο και καταρτισμένο επιστημονικό προσωπικό. Οι μέθοδοι ανάλυσης που χρησιμοποιούνται κατά τη διενέργεια της τοξικολογικής εξέτασης πρέπει να είναι επικυρωμένες σύμφωνα με διεθνείς κατευθυντήριες γραμμές.

Η τυπική διαδικασία της διενέργειας των αναλύσεων από το Τοξικολογικό Εργαστήριο, περιλαμβάνει, συνήθως, δυο στάδια αναλύσεων, το «προσανατολιστικό» και το «επιβεβαιωτικό». Στο πρώτο στάδιο, πραγματοποιείται ο προσανατολιστικός έλεγχος για την παρουσία κάποιας ουσίας στο εξεταζόμενο δείγμα (screening test). Η ανοσοδοκιμασία (EMIT, ELISA) αποτελεί την πιο συνήθη μέθοδο ελέγχου για την παροχή ποιοτικών και ημιποσοτικών αποτελεσμάτων, όπου πραγματοποιείται η επιλογή των δυνητικά θετικών δειγμάτων στις εξεταζόμενες κατηγορίες ουσιών. Χρησιμοποιείται, κυρίως, για την ανίχνευση κλασσικών «ναρκωτικών» ουσιών π.χ. αμφεταμινών, κοκαΐνης, κανναβινοειδών, οπιούχων και βενζοδιαζεπινών (Mao et al., 2006, Juhascik et al., 2006, Knittel et al., 2009, Garside et al., 2009, Datta, 2019, Tamama, 2021). Ωστόσο, στις συγκεκριμένες μεθόδους εντοπίζονται προβλήματα παρεμποδίσεων και διασταυρούμενης δραστηριότητας, δίνοντας σε αρκετές περιπτώσεις «ψευδώς» θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα. Επιβάλλεται, συνεπώς, να χρησιμοποιούνται επιβεβαιωτικές μέθοδοι για την επαλήθευση της παρουσίας κάποιας ουσίας. Επίσης, μπορεί να πραγματοποιηθεί προσανατολιστικός έλεγχος με χρήση αναλυτικών τεχνικών που περιλαμβάνουν αέρια ή υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας και χρήση κατάλληλων βιβλιοθηκών φασμάτων μαζών για την ανίχνευση των πιθανών υπάρχουσών ουσιών στο εξεταζόμενο δείγμα.

Γενικά οι παραδοσιακές τεχνικές ανάλυσης που έχουν χρησιμοποιηθεί, για την ανίχνευση διαφόρων εξαρτησιογόνων ουσιών, περιλαμβάνουν τη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, την υγρή χρωματογραφία (LC) και την αέρια χρωματογραφία (GC) συζευγμένη, είτε με διάφορους ανιχνευτές, είτε με φασματογράφο μάζας (MS) (Skoog et al., 2007, Stauffer et al., 2008). Η μέθοδος της αέριας χρωματογραφίας (GC) συζευγμένης με φασματομετρία μάζας (MS) χρησιμοποιείται εδώ και πολλά χρόνια για την ανίχνευση ουσιών (Drummer et al., 1994). Ωστόσο, οι θερμικά ευπαθείς και μη πτητικοί αναλύτες απαιτούν μερικές φορές παραγωγοποίηση (π.χ. όξινα φάρμακα) (Drummer et al., 1999). Παρόλο που η αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC-MS) αποτελεί το χρυσό πρότυπο για τις αναλυτικές μεθόδους, η φασματομετρία μαζών σε σειρά (LC-MS/MS) έχει αποδειχθεί κατάλληλη για την ανάλυση θερμοευαίσθητων και πολικών ουσιών (Di Rago et al., 2014). Η LC σε συνδυασμό με MS έχει επεκτείνει το εύρος των ενώσεων που μπορούν να αναλυθούν με την απαιτούμενη ειδικότητα και ευαισθησία που απαιτεί η τοξικολογική εξέταση χωρίς την ανάγκη παραγωγοποίησης. Αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο στην τοξικολογία, προσφέροντας ταχεία και αξιόπιστη ανίχνευση, κλασσικών, και μη, εξαρτησιογόνων ουσιών και φαρμάκων σε διάφορα βιολογικά υποστρώματα.

Σε δεύτερο στάδιο, ακολουθεί ο επιβεβαιωτικός έλεγχος στα δείγματα που χαρακτηρίστηκαν ως θετικά στο πρώτο στάδιο. Ο επιβεβαιωτικός έλεγχος πρέπει να γίνεται με χρήση διαφορετικής μεθόδου από αυτή που εφαρμόστηκε κατά τον προσανατολιστικό έλεγχο και τη χρήση προτύπων ουσιών. Στο στάδιο αυτό πραγματοποιείται, όποτε απαιτείται, ο ποσοτικός προσδιορισμός των ανιχνευθεισών ουσιών στα εξετασθέντα δείγματα. Οι αναλυτικές τεχνικές που θα εφαρμοσθούν θα πρέπει να εξασφαλίζουν υψηλή εκλεκτικότητα, ευαισθησία, ακρίβεια, ταχύτητα και επαναληψιμότητα των αναλύσεων προκειμένου να ληφθούν αξιόπιστα αποτελέσματα. Τις προϋποθέσεις αυτές παρέχει η ανίχνευση των ουσιών με φασματομετρία μάζα (συζευγμένη με αέριο ή υγρό χρωματογράφο). Αξίζει να αναφερθεί ότι το φάσμα μάζας

μια ουσίας χαρακτηρίζεται ως το «δακτυλικό αποτύπωμα» της, αναδεικνύοντας τη σημασία του προσδιορισμού ουσιών με φασματομετρία μαζών.

Θεμελιώδη αρχή της Δικαστικής Τοξικολογίας αποτελεί το ότι η λήψη κάποιου φαρμάκου ή δηλητηρίου δεν αποκλείεται ακόμη και σε περιπτώσεις που το αποτέλεσμα της τοξικολογικής ανάλυσης είναι αρνητικό. Ένα αρνητικό αποτέλεσμα υποδηλώνει ότι οι συγκεκριμένες ουσίες και μόνο που εξετάστηκαν από το εργαστήριο, είτε απουσίαζαν στο δείγμα που ελέγχθηκε, είτε υπήρχαν σε συγκεντρώσεις κάτω από το όριο ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD) της συγκεκριμένης μεθόδου που εφαρμόστηκε. Η διαθέσιμη μεθοδολογία εξαρτάται από τις οικονομικές δυνατότητες του εργαστηρίου, την τοποθεσία, και τις απαιτήσεις των γιατρών (Σπηλιοπούλου, 2006).

Στην χώρα μας, η τοξικολογική εξέταση πραγματοποιείται στα Εργαστήρια Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας, στις Ιατροδικαστικές Υπηρεσίες και στα Εγκληματολογικά Εργαστήρια της Αστυνομίας.

1.2 ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΣΤΗΝ ΔΙΚΑΣΤΙΚΗ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ

Κάθε αναλυτική διαδικασία περιλαμβάνει την δειγματοληψία βιολογικών δειγμάτων, την συντήρηση, την προκατεργασία, την ανάλυση και τέλος την επεξεργασία των αποτελεσμάτων (Θεοδωρίδης, 2015^α). Τα ανθρώπινα βιολογικά δείγματα λαμβάνονται από ζώντα (κλινικά δείγματα) ή αποβιώσαντα άτομα (νεκροτομικά δείγματα) και χωρίζονται σε αέρια, υγρά και στερεά (Moldoveanu, David, 2015).

1.2.1 Κλινικά βιολογικά υλικά

Το αίμα, τα ούρα και τα σίελα, αποτελούν τα συμβατικά και ευρέως χρησιμοποιούμενα βιολογικά υποστρώματα, λόγω της ανίχνευσης υψηλής συγκέντρωσης των ενώσεων και των μεταβολιτών τους, αλλά και της εύκολης λήψης τους. Μη συμβατικά υποστρώματα που μπορούν, επίσης, να χρησιμοποιηθούν είναι τα δάκρυα, ο ιδρώτας, τα κόπρανα, το ανθρώπινο γάλα, οι όνυχες και οι τρίχες. Τα τελευταία χρόνια, οι τρίχες έχουν γίνει ένα βασικό βιολογικό υλικό, στους τομείς της Δικαστικής και Κλινικής Τοξικολογίας, εναλλακτικό των συνήθων δειγμάτων αίματος και ούρων, για τον έλεγχο της χρόνιας χρήσης ουσιών (Boumba et al., 2006).

α) Αίμα

Το αίμα αποτελεί το πλέον προτιμώμενο βιολογικό υπόστρωμα για τοξικολογική ανάλυση, εφόσον είναι διαθέσιμο, καθώς προσφέρει την ιδανικότερη συσχέτιση ανάμεσα στη συγκέντρωση μίας ουσίας και της ληφθείσας δόσης. Είναι ένα εξειδικευμένο σωματικό υγρό με ελαφρώς αλκαλικό pH (7.35-7.45), που περιέχει τα ερυθρά κ' τα λευκά αιμοσφαίρια, τα αιμοπετάλια (έμμορφα συστατικά) και το πλάσμα. Αποτελεί το 8% του ανθρώπινου βάρους, με μέσο όγκο αίματος 5 λίτρα εκ των οποίων τα 2,7-3 λίτρα είναι πλάσμα. Στις λειτουργίες του περιλαμβάνονται η μεταφορά οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών στους πνεύμονες και στους ιστούς, ο σχηματισμός θρόμβων σε περιπτώσεις τραυματισμών, η ρύθμιση της θερμοκρασίας του σώματος κ.λπ. (Flanagan et al., 2007).

Στα τοξικολογικά εργαστήρια αναλύονται το ολικό αίμα, το πλάσμα ή/και ο ορός. Η ανάλυση του αίματος είναι ένα πολύ σημαντικό «εργαλείο» που επιτρέπει να διαπιστωθεί αν η συγκέντρωση που ανιχνεύεται είναι τοξική ή θεραπευτική. Το χρονικό «κατώφλι» ανίχνευσης ουσιών κυμαίνεται από μερικά λεπτά ως 1-2 μέρες μετά την λήψη. Η τοξικολογική εξέταση του αίματος ενδείκνυται σε περιστατικά όπου απαιτείται η διερεύνηση της συμμόρφωσης του ασθενούς με την χορηγηθείσα φαρμακευτική αγωγή και κατά τη διερεύνηση περιστατικών δηλητηρίασης (Μπούμπα, 2006). Αξίζει να αναφερθεί, πως η παρακολούθηση των θεραπευτικών επιπέδων στο πλάσμα για τα περισσότερα τυπικά και άτυπα αντιψυχωσικά συνιστάται ανεπιφύλακτα (Boumba et al., 2018).

β) Ούρα

Τα ούρα είναι το αμέσως επόμενο, πιο συχνά χρησιμοποιούμενο, βιολογικό υλικό στην Δικαστική Τοξικολογία. Η σύσταση των ούρων ποικίλει πολύ περισσότερο από τη σύσταση του αίματος, επηρεάζεται από την πρόσληψη νερού και τη σύσταση της τροφής (Flanagan et al., 2007). Τα ούρα αποτελούνται κυρίως από νερό (95%), ουρία, ουρικό και οξαλικό οξύ, κρεατινίνη, αμμωνία, άλατα και οργανικές ή ανόργανες ενώσεις που αποβάλλονται από τα νεφρά και άλλα όργανα του ουροποιητικού συστήματος. Το pH τους είναι όξινο (~6), ενώ το χρώμα και η οσμή τους ποικίλλουν και αλλάζουν τη σύσταση των ούρων κάθε φορά.

Η δειγματοληψία των ούρων είναι ανώδυνη και μη παρεμβατική, γεγονός που το καθιστά κατάλληλο για αναλύσεις μεγάλης κλίμακας. Βασικό μειονέκτημα της χρήσης των ούρων είναι η εύκολη νοθεία τους, καθώς και η δυνατότητα βακτηριακής μόλυνσης, εάν δε συντηρηθούν σε κατάλληλες συνθήκες. Τα ούρα είναι ιδανικό υπόστρωμα για την ανίχνευση εξαρτησιογόνων ουσιών και των μεταβολιτών τους, δεδομένου ότι συχνά είναι παρούσες σε πολύ υψηλότερες συγκεντρώσεις από ό,τι στο αίμα και ο όγκος τους δεν είναι, συνήθως, περιοριστικός. Το χρονικό «κατώφλι» ανίχνευσης είναι, συνήθως, ευρύτερο ως 3-4 μέρες, σε σχέση με το αίμα (Negusz, Cooper, 2013). Ο προσδιορισμός των μεταβολιτών πραγματοποιείται ευκολότερα στα ούρα σε περιπτώσεις φαρμάκων, όπως τα αντικαταθλιπτικά και τα αντιψυχωσικά, που μεταβολίζονται τόσο πολύ που η μητρική τους ένωση δεν ανιχνεύεται (Skopp, 2004).

γ) Σίελα

Τα τελευταία χρόνια τα σίελα έχουν χρησιμοποιηθεί ως διαγνωστικό υλικό για διάφορες παθήσεις, μολυσματικές ασθένειες, αυτοάνοσα νοσήματα, ενδοκρινικές διαταραχές, καρκίνους και κληρονομικές διαταραχές (Samaranayake, 2007). Ενώ έχει αποδειχθεί η καταλληλότητα τους στην ανίχνευση εξαρτησιογόνων ουσιών (De Campos et al., 2022).

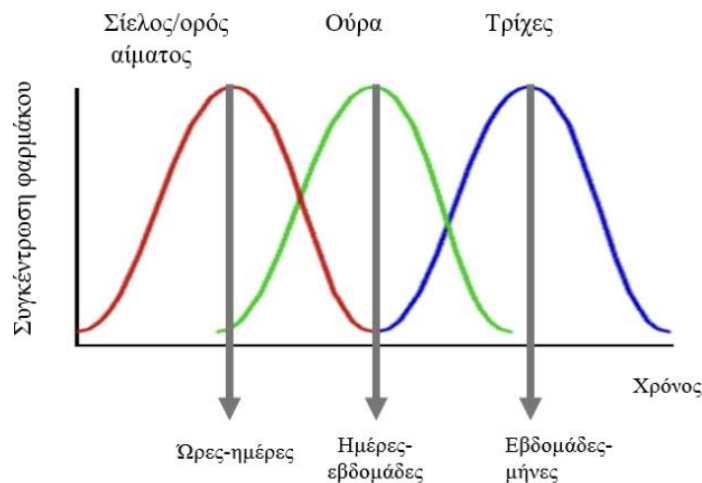
Τα σίελα αποτελούν το έκκριμα των σιελογόνων αδένων (παρωτίδα, υπογνάθιοι και υπογλώσσιοι). Περιέχουν 99,5% νερό και 0,5% ανόργανα (ιόντα καλίου, νατρίου, χλωρίου και διττανθρακικά ιόντα) και οργανικά συστατικά (ένζυμα, πρωτεΐνες, αντισώματα, ορμόνες, αυξητικούς παράγοντες κ.λπ.) (Humphrey, Williamson, 2001, Cuevas-Córdoba, Santiago-García, 2014). Το pH τους είναι ελαφρώς πιο όξινο από του αίματος (5,8- 6,8) με αποτέλεσμα τον ιοντισμό των ασθενών βάσεων και την εμφάνιση υψηλότερων συγκεντρώσεων των φαρμάκων από ότι στο πλάσμα.

Η μεταφορά μορίων ενός φαρμάκου από το αίμα στα σίελα, εξαρτάται από φυσικοχημικούς παράγοντες, όπως το pH, το pKa, τη λιποδιαλυτότητα της φαρμακευτικής ένωσης και το κλάσμα των πρωτεϊνών του πλάσματος (Langel et al., 2014, Bellagambi et al., 2020). Η υδατοδιαλυτότητα είναι ένας βασικός παράγοντας, με τις υδρόφιλες ουσίες να διαχέονται ευκολότερα.

Τα πλεονεκτήματα των σιέλων, έναντι των άλλων συμβατικών βιολογικών υλικών, τα έχουν καθιερώσει ως κατάλληλο εναλλακτικό υπόστρωμα για την αξιολόγηση της πρόσφατης

έκθεσης σε ψυχοδραστικά φάρμακα (De Campos, 2022). Τα σίελα προσφέρουν μια μη επεμβατική, απλή, και σχετικά οικονομική μέθοδο ανίχνευσης πρόσφατης χρήσης (12-24 ώρες) εξαρτησιογόνων ουσιών. Το «κατώφλι» ανίχνευσης στους χρόνιους χρήστες είναι συνήθως μεγαλύτερο. Η δειγματοληψία μπορεί να πραγματοποιηθεί από μη εξειδικευμένο προσωπικό. Η συλλογή των σιέλων μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω της μεθόδου αποστράγγισης, απόχρεμψης, αναρρόφησης, και επιχρίσματος (Navazesh, 1993). Τα σίελα και το πλάσμα περιέχουν αρκετές κοινές πρωτεΐνες, γεγονός που επιτρέπει την χρήση τους ως εναλλακτικό διαγνωστικό υπόστρωμα έναντι του αίματος. Βέβαια, το pH του πλάσματος είναι σταθερό, ενώ το pH των σιέλων ποικίλλει (Drummer, 2005).

Συνοψίζοντας το υποκεφάλαιο των βιολογικών υποστρωμάτων, παρουσιάζεται σχηματικά (Σχήμα 1) το χρονικό «κατώφλι» ανίχνευσης ουσιών συγκριτικά για αίμα, σίελα, ούρα και τρίχες. Είναι προφανές ότι η διαπίστωση της «επήρειας» σε ουσίες προκύπτει μετά από τοξικολογική εξέταση αίματος ή σιέλων, ενώ η χρόνια έκθεση /το ιστορικό χρήσης σε ουσίες μπορεί να τεκμηριωθεί με την ανάλυση τριχών.



Σχήμα 1: Το «κατώφλι» ανίχνευσης ουσιών συγκριτικά για αίμα, σίελα, ούρα και τρίχες

1.2.2 Νεκροτομικό υλικό

Κατά τη διενέργεια της νεκροτομής υπάρχει, συνήθως, η δυνατότητα λήψης πολλών και διαφορετικών βιολογικών υλικών. Η επιλογή και η ποσότητα των δειγμάτων εξαρτάται από το περιστατικό και μπορεί να διαφέρει κατά περίπτωση. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν τα περιστατικά προχωρημένης σήψης ή ταρίχευσης, όπου η διαθεσιμότητα των βιολογικών υλικών είναι περιορισμένη (Μπούμπα, 2006). Εκτός των συμβατικών υλικών (αίμα, ούρα, κ.λπ.) υπάρχουν και μη συμβατικά νεκροτομικά υλικά που μπορούν να χρησιμοποιηθούν όπως το εγκεφαλονωτιαίο υγρό, το υαλοειδές υγρό, η χολή, ο εγκέφαλος, η καρδιά, το ήπαρ, τα νεφρά, οι πνεύμονες, ο μυϊκός ιστός, τα οστά, οι όνυχες και οι τρίχες (Skopp, 2004). Η δειγματοληψία τους επιβάλλεται να πραγματοποιείται το ταχύτερο δυνατό

μετά τον θάνατο και το κάθε δείγμα πρέπει να τοποθετείται σε διαφορετικό περιέκτη και να αποθηκεύεται μέχρι την ανάλυση (Skorpp, 2004).

Οι σύγχρονες αναλυτικές μέθοδοι που εφαρμόζονται κατά την διενέργεια της τοξικολογικής εξέτασης νεκροτομικού υλικού επιτρέπουν την ευαίσθητη και ειδική ανίχνευση ουσιών. Ωστόσο, απαιτείται η αξιολόγηση αρκετών άλλων, προαναλυτικών κυρίως, παραγόντων που μπορεί να επηρεάσουν τα αποτελέσματα της τοξικολογικής εξέτασης. Προαναλυτικοί παράγοντες που παίζουν καθοριστικό ρόλο στην τοξικολογική εξέταση αποτελούν η δειγματοληψία, το είδος και η ποιότητα του βιολογικού υλικού, η σταθερότητα, ο μεταβολισμός της κάθε προσδιοριζόμενης ουσίας, η συντήρηση του δείγματος, καθώς και η έλλειψη κατάλληλων προτύπων ουσιών, εργαστηριακών υποδομών και ενόργανων διατάξεων. Την τοξικολογική εξέταση σε νεκροτομικό υλικό επηρεάζουν επιπλέον παράγοντες, συγκεκριμένα το χρονικό διάστημα μεταξύ της λήψης μίας ουσίας και της στιγμής του θανάτου, και μεταθανάτια φαινόμενα όπως η αυτόλυση, ή σήψη και η μεταθανάτια ανακατανομή.

Η τοξικολογική εξέταση σε νεκροτομικό υλικό δυσχεραίνεται λόγω των αλλαγών που υφίσταται η κάθε ουσία κατά την εξέλιξη μεταθανάτιων φαινομένων καθώς και της παρουσίας παρεμποδίζουσων ενδογενών ουσιών (Yarema, Becker, 2005). Συγκεκριμένα, κατά την αποσύνθεση ενός πτώματος λαμβάνουν χώρα διαδοχικά οι διαδικασίες της αυτόλυσης και της σήψης, μέσω ενζύμων που υπάρχουν στο αίμα και της δράσης μικροοργανισμών, αντίστοιχα. Καθώς εξελίσσονται οι εξεργασίες αυτές, επέρχονται, σε κυτταρικό επίπεδο, αλλαγές στο pH, στη διαπερατότητα των μεμβρανών και στη συγγένεια δέσμευσης του φαρμάκου στον ιστό (Negrusz, Cooper, 2013). Οι αλλαγές αυτές οδηγούν στην απελευθέρωση και στην διάχυση φαρμάκων και ουσιών από τις θέσεις δέσμευσής τους, στους διάφορους ιστούς και όργανα. Το φαινόμενο της μεταθανάτιας διάχυσης φαρμάκων από θέσεις μεγαλύτερης συγκέντρωσης (ιστοί) σε θέσεις χαμηλότερης συγκέντρωσης φαρμάκου (αίμα), έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης του φαρμάκου στο αίμα και περιγράφεται ως μεταθανάτια ανακατανομή (postmortem redistribution, PMR). Υπάρχουν, ωστόσο, περιπτώσεις που έχει παρατηρηθεί το αντίστροφο φαινόμενο, γεγονός που αποδεικνύει πως η μεταθανάτια ανακατανομή μπορεί να οδηγήσει σε απρόβλεπτες μεταβολές της συγκέντρωσης των ουσιών. Ο ακριβής μοριακός μηχανισμός δεν είναι πλήρως κατανοητός. Ένας προτεινόμενος μηχανισμός περιλαμβάνει την διάχυση ουσιών από περιοχές με περίσσεια φαρμάκου, όπως το γαστρικό περιεχόμενο, λόγω είτε τραυματισμού του στομάχου, είτε εισρόφησης λόγω εμετού τη στιγμή του θανάτου. Ένας άλλος μηχανισμός αφορά την ατελή κατανομή του φαρμάκου κατά το θάνατο, με αποτέλεσμα διαφορετικές συγκεντρώσεις ουσιών σε διαφορετικά σημεία δειγματοληψίας που δεν υποδηλώνουν απαραίτητα ένδειξη PMR (Negrusz, Cooper 2013). Έχει παρατηρηθεί ότι τα βασικά, μη πολικά φάρμακα με μεγάλο όγκο κατανομής $V_d > 3 \text{ L/Kg}$ είναι πιθανότερο να παρουσιάσουν φαινόμενα μεταθανάτιας ανακατανομής. Τα φάρμακα αυτά διαχέονται ευκολότερα στα βιολογικά υγρά κατά τη διαδικασία της κυτταρικής λύσης, η οποία αυξάνει τη συγκέντρωσή τους στο αίμα. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν τα τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά και οι αμφεταμίνες (Yarema, Becker, 2005). Η μεταθανάτια ανακατανομή έχει γενικά μια τόσο απρόβλεπτη επίδραση στις συγκεντρώσεις των

αναγνωρισμένων φαρμάκων που έχει αναφερθεί ως «τοξικολογικός εφιάλτης» (Pounder, Jones, 1990).

Ενδιαφέρον προκαλεί, πως σε δείγματα αίματος, του ίδιου περιστατικού, που ελήφθησαν από διαφορετικές θέσεις, προσδιορίστηκαν συγκεντρώσεις φαρμάκων και ουσιών, όπου οι τιμές τους διέφεραν μέχρι και δέκα φορές μεταξύ τους (Drummer, Gerostamoulos, 2002). Έχει παρατηρηθεί ότι τα επίπεδα των φαρμάκων που προσδιορίζονται σε αίμα που έχει ληφθεί από την καρδιακή κοιλότητα ή από κεντρικά αγγεία είναι υψηλότερα σε σχέση με αυτά που προσδιορίζονται σε αίμα από περιφερικές θέσεις. Είναι πιθανό σε κεντρικό σημείο να υπάρχει επιμόλυνση από φάρμακα που διαχέονται από το γαστρεντερικό σωλήνα (π.χ. στόμαχος). Συνεπώς, το αίμα, όπου είναι δυνατόν, πρέπει να συλλέγεται από περιφερικό σημείο όπως οι σφαγίτιδες ή οι μηριαίες φλέβες. Παρ' όλα αυτά, το αίμα που συλλέγεται από περιφερικό σημείο δεν σημαίνει ότι δεν έχει υποστεί διάχυση φαρμάκων όμως, είναι σημαντικά μικρότερη (Drummer, 2018). Σε περιπτώσεις όπου δεν είναι διαθέσιμο το αίμα από μηριαίες φλέβες, μελέτες έχουν προτείνει βιολογικά υποστρώματα με την ακόλουθη σειρά: αίμα από άλλο σημείο του σώματος, μυς, υαλοειδές υγρό, εγκέφαλος, καρδιά, σπλήνας, νεφρός, ήπαρ και χολή (Ketola, Kriikku, 2019). Σε περιστατικά σοβαρών τραυματισμών, το αίμα πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο για ποιοτικό προσδιορισμό ουσιών, επειδή η περίπτωση επιμόλυνσης από άλλα σωματικά υγρά ή ιστούς είναι υψηλή (Μπούμπα, 2006).

Τα μεταθανάτια δείγματα ούρων συλλέγονται από την ουροδόχο κύστη κατά τη νεκροτομή. Ωστόσο, η διαθεσιμότητα των μεταθανάτιων ούρων στο 50% των περιστατικών είναι περιορισμένη λόγω της απώλειας τους, που προκαλείται συχνά εξαιτίας της χαλάρωσης των σφιγκτήρων της ουροδόχου κύστης και της ουρήθρας, κατά το θάνατο (Κουτσελίνης, 2002). Αξίζει να αναφερθεί ότι η δειγματοληψία αίματος και ούρων, γίνεται προ της νεκροτομής σε χώρες όπου εφαρμόζεται η «απεικονιστική νεκροψία» (vitropsy) (O'Donnell, Woodford, 2008).

1.3 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΕΞΑΡΤΗΣΙΟΓΟΝΩΝ, ΝΕΩΝ ΨΥΧΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ (NPS) ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ ΤΟΞΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

Οι ουσίες που αφορούν την δικαστική τοξικολογία ανήκουν στις εξαρτησιογόνες, σε συνταγογραφούμενα φάρμακα (π.χ. αντικαταθλιπτικά), σε καυστικά/διαβρωτικά δηλητήρια, στο οινόπνευμα (αιθυλική αλκοόλη), στα βαρέα μέταλλα (π.χ. λίθιο, αρσενικό), στις πτητικές (π.χ. αλκοόλες, αλειφατικοί/αρωματικοί υδρογονάνθρακες), στα γεωργικά προϊόντα (π.χ. εντομοκτόνα, παρασιτοκτόνα), στα τοξικά αέρια (π.χ. μονοξείδιο του άνθρακα), και σε άλλες ουσίες (π.χ. «νέα συνθετικά» ναρκωτικά).

1.3.1 Εξαρτησιογόνες ουσίες

Ως εξαρτησιογόνος ουσία ορίζεται κάθε φυσική ή τεχνητή/χημική ουσία που επιδρά στο Κ.Ν.Σ., και μπορεί να μεταβάλλει την συναισθηματική κατάσταση, την αντίληψη και την σκέψη του χρήστη. Στη βιβλιογραφία συναντώνται και άλλοι όροι για την περιγραφή των ουσιών αυτών, όπως «ψυχοτρόπες», «εθιστικές», κ.λπ.. Οι ουσίες αυτές μπορούν να έχουν διεγερτική ή κατασταλτική δράση, μέσω ενεργοποίησης των νευρώνων, επειδή η χημική τους δομή μιμείται εκείνη ενός φυσικού νευροδιαβιβαστή.

Τα τελευταία 50 χρόνια η χρήση, η παραγωγή, η διανομή και η πώληση εξαρτησιογόνων ουσιών υπόκεινται σε διεθνής συμβάσεις. Οι συμβάσεις των Ηνωμένων Εθνών (η Ενιαία Σύμβαση για τις Ναρκωτικές Ουσίες το 1961, η Σύμβαση για τις Ψυχοτρόπες Ουσίες το 1971, και η Σύμβαση κατά της Παράνομης Διακίνησης Ναρκωτικών και Ψυχοτρόπων Ουσιών το 1988) προβλέπουν ότι η χρήση όλων των ψυχοδραστικών ουσιών (υπό έλεγχο) πρέπει να περιορίζεται σε ιατρικούς και επιστημονικούς σκοπούς (WHO, 2023).

Κατηγορίες εξαρτησιογόνων ουσιών

Η κατηγοριοποίηση τους πραγματοποιείται βάσει της ιατρικής χρήσης, της εθιστικής τους ικανότητας, των επιδράσεών τους και της φαρμακολογικής τους δράσης στον οργανισμό. Ωστόσο, ο ακριβής διαχωρισμός των ουσιών είναι συχνά περίπλοκος, καθώς ορισμένες επιδράσεις συχνά αλληλοεπικαλύπτονται. Η χρήση τους διαχωρίζεται σε νόμιμη (τσιγάρο, αλκοόλ, καπνός, καφεΐνη κ.λπ.) και σε παράνομη (χασίς, ηρωίνη, κοκαΐνη, κ.λπ.). Ο όρος «ναρκωτικά» χρησιμοποιείται σχεδόν αποκλειστικά για τις παράνομες εξαρτησιογόνες ουσίες, και ταξινομούνται με βάση της φαρμακολογικές τους δράσης κυρίως σε:

- Ψευδαισθησιογόνα/Παραισθησιογόνα
- Οπιούχα - Αλκαλοειδή του οπίου - Οπιοειδή
- Κατασταλτικά του Κ.Ν.Σ.
- Διεγερτικά του Κ.Ν.Σ.
- Εισπνεόμενες/πτητικές ουσίες

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν ουσίες που ανήκουν στις πρώτες τέσσερις κατηγορίες. Αναλυτικά:

- **Ψευδαισθησιογόνα/Παραισθησιογόνα**

Τα παραισθησιογόνα προέρχονται από φυτά και μύκητες, καθώς και συνθετικά ή ημισυνθετικά παραγόμενες ενώσεις. Έχουν την δυνατότητα να διαταράσσουν τον ψυχικό κόσμο του ατόμου και να προκαλούν οπτικές και ακουστικές παραισθήσεις. Παρόλο που δεν θεωρούνται ναρκωτικά εξάρτησης, η χορήγηση τους ενέχει ψυχολογικούς κινδύνους (Andersen et al., 2020).

Τα κλασικά παραισθησιογόνα χρησιμοποιούνται από τον άνθρωπο εδώ και 5.000 χρόνια, αλλά το επιστημονικό ενδιαφέρον χρονολογείται από τα τέλη του 1800, όταν απομονώθηκε η μεσκαλίνη. Μετά την τυχαία ανακάλυψη των ψυχοδραστικών επιδράσεων του LSD το 1943, η έρευνα για τα κλασικά παραισθησιογόνα εκτοξεύτηκε (Hofmann, 1959).

Αν και η χρήση παραισθησιογόνων παραμένει αμφιλεγόμενη, επιστήμονες διερεύνησαν τη χρήση των κλασικών παραισθησιογόνων για την αντιμετώπιση της εξάρτησης από το αλκοόλ και τα ναρκωτικά, καθώς και για το άγχος, την κατάθλιψη, και την ιδεοψυχαναγκαστική διαταραχή. Η θεραπευτική αξία των παραισθησιογόνων αποδίδεται στην ξεχωριστή ικανότητά τους να μεταβάλλουν τη συνείδηση και να προκαλούν νέες ιδέες, δημιουργώντας έτσι θεμελιώδεις αλλαγές στο νοητικό σχήμα. Ωστόσο, η κατάχρησή τους οδήγησε στην ποινικοποίησή τους, από τον νόμο περί ελεγχόμενων ουσιών το 1970, και η κλινική έρευνα πάνω σε αυτά ανεστάλη για ένα διάστημα (Carhart-Harris, Goodwin, 2017).

Αποτελούνται από τις ινδολοαλκυλαμίνες και τις φαινυλοαλκυλαμίνες, καθεμία από τις οποίες έχει υποκατηγορίες με βάση δομικές διαφορές (Glennon, 1994). Άλλες κατηγορίες παραισθησιογόνων, περιλαμβάνουν τα διαχωριστικά αναισθητικά (π.χ. κεταμίνη), τα αντιχολινεργικά (π.χ. ατροπίνη) και τους αγωνιστές των υποδοχέων καππα-οπιοειδών (Baker, 2018). Ο ακριβής μηχανισμός δράσης και η φαρμακοκινητική αυτών των ουσιών δεν είναι απολύτως γνωστά. Παρ' όλα αυτά, οι ψυχεδελικές ουσίες ορίζονται βάσει της ικανότητας τους να δρουν ως αγωνιστές των υποδοχέων σεροτονίνης και συγκεκριμένα να προσδέονται στον υποδοχέα 5-HT_{2A} (Vollenweider, Kometer, 2010, Carhart-Harris, Nutt, 2017).

- **Οπιούχα - Αλκαλοειδή του οπίου - Οπιοειδή**

Τα οπιούχα συνήθως παράγονται από δύο βασικές πηγές, είτε από το φυτό *Papaversomniferum*, μέσω της παραλαβής της ρητίνης από το περικάρπιο της παπαρούνας, είτε από τεχνητά χημικά συστατικά γνωστά ως οπιοειδή. Οι αρχαίοι Έλληνες έκαναν χρήση του οπίου και επωφελούνταν από τις ψυχαγωγικές και θεραπευτικές του ιδιότητες (για να καταπραΰνει τους πονοκεφάλους, τις πέτρες στα νεφρά, τον βήχα, την δύσπνοια, το άσθμα και την καρδιακή ανεπάρκεια (Brownstein, 1993, Prioreshi et al., 1998).

Τα οπιούχα ταξινομούνται σε ενδογενή οπιοειδή (π.χ. ενδορφίνες, εγκεφαλίνες), σε φυσικά αλκαλοειδή του οπίου (π.χ. μορφίνη, κωδεΐνη), σε ημισυνθετικά (π.χ. υδροκωδόνη, ηρωίνη) και σε συνθετικά που παρασκευάζονται σε εργαστήρια (π.χ. μεθαδόνη, τραμαδόλη, φεντανύλη). Ο τρόπος δράσης των οπιοειδών περιλαμβάνει κυρίως την αλληλεπίδραση με

συγκεκριμένους υποδοχείς οπιοειδών στο σώμα. Υπάρχουν τρεις κύριοι τύποι υποδοχέων οπιοειδών, μι (μ), δέλτα (δ) και κάππα (κ), που εκφράζονται κυρίως στο κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα. Πρόσφατες μελέτες επικεντρώθηκαν στη συμμετοχή των υποδοχέων κάππα (που εκφράζονται και στην επιφάνεια διαφόρων τύπων ανοσοκυττάρων, π.χ. T-κυττάρων, B-κυττάρων και μονοκυττάρων) και στο ρόλο που διαδραματίζουν σε μια σειρά παθήσεων του ανοσοποιητικού συστήματος (π.χ. φλεγμονώδης νόσος του εντέρου, αρθρίτιδα, υπαραχνοειδής αιμορραγία, αγγειακή δυσλειτουργία) (Szczeraniak et al., 2022).

- **Κατασταλτικά του Κ.Ν.Σ.**

Ετυμολογικά η λέξη «κατασταλτικά» αναφέρεται στην καταπραϋντική/ηρεμιστική δράση που προκαλούν στο Κ.Ν.Σ.. Χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: τα μείζονα ηρεμιστικά που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση σοβαρών ψυχιατρικών περιπτώσεων και στα ήπια ηρεμιστικά που χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση του άγχους. Περιλαμβάνει το αλκοόλ, τα γενικά αναισθητικά, τις βενζοδιαζεπίνες, τα βαρβιτουρικά, τα αγχολυτικά φάρμακα, και άλλες ουσίες που έχουν παρόμοια δράση στον εγκέφαλο, καθώς και πτητικές ουσίες.

Τα βαρβιτουρικά περιορίστηκαν τη δεκαετία του '60, με την είσοδο των βενζοδιαζεπινών λόγω των διαταραχών της συμπεριφοράς και τη σωματική εξάρτηση που εμφάνιζαν (López-Muñoz et al., 2005). Οι πρώτες βενζοδιαζεπίνες, το χλωροδιαζεποξείδιο και η διαζεπάμη, ανακαλύφθηκαν 1955 και το 1963, αντίστοιχα, και έγιναν τα πιο ευρέως συνταγογραφούμενα φάρμακα παγκοσμίως μέχρι το 1977 (Mahadik et al., 2012). Οι βενζοδιαζεπίνες είναι κατασταλτικά που ενισχύουν την δράση του νευροδιαβιβαστή γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA) στον υποδοχέα GABA_A. Αν και λιγότερο τοξικές από τα βαρβιτουρικά, μπορούν να προκαλέσουν βαθιά απώλεια αισθήσεων σε υπερβολική δόση. Ωστόσο, όταν συνδυάζονται με άλλα κατασταλτικά του Κ.Ν.Σ., όπως το αλκοόλ και τα οπιοειδή, ο κίνδυνος αυξάνεται (Schmitz, 2016, Kim et al., 2017, Penninkilampi, Eslick, 2018).

- **Διεγερτικά του Κ.Ν.Σ.**

Ο όρος «διεγερτικά» καλύπτει μια ευρεία κατηγορία ουσιών που αυξάνουν τη δραστηριότητα του Κ.Ν.Σ., επιταχύνοντας τόσο τις νοητικές όσο και τις σωματικές διεργασίες. Χρησιμοποιούνται για την βελτίωση της απόδοσης, την θεραπεία κάποιων διαταραχών καθώς και για ψυχαγωγικούς σκοπούς. Είναι ευρέως καταχρηστικά και άκρως εθιστικά (Sessa et al., 2022). Υπάρχουν νόμιμα χορηγούμενα διεγερτικά φάρμακα αλλά και παράνομες διεγερτικές ουσίες. Τα διεγερτικά του Κ.Ν.Σ. που συνήθως χρησιμοποιούνται περιλαμβάνουν τις αμφεταμίνες, την έκσταση (MDMA), την κοκαΐνη, το κρακ, την καφεΐνη, την εφεδρίνη, κ.λπ.. Η ικανότητά τους να αυξάνουν τα επίπεδα ορισμένων νευροδιαβιβαστών, καθορίζει την επίδρασή τους στον οργανισμό και τις παρενέργειες τους (Hardman, 1996).

1.3.2 Νέες Ψυχοτρόπες Ουσίες- Novel Psychoactive Substances (NPS)

Για περισσότερο από μια δεκαετία, οι νέες ψυχοδραστικές ουσίες (Novel Psychoactive Substances, NPS) είναι διαθέσιμες ως εναλλακτικές λύσεις στα κοινά ναρκωτικά κατάχρησης (EMCDDA, 2022). Ως “νέες” ψυχοτρόπες ουσίες ορίζονται οι συνθετικές ουσίες που μιμούνται τις επιδράσεις των κλασικών ναρκωτικών έχοντας σκόπιμα διαφορετική χημική δομή ώστε να μην εμπίπτουν στους περιορισμούς του νόμου περί χρήσης ναρκωτικών (Misuse of Drugs Act, 1971) ή που δεν ελέγχονται από την επικαιροποιημένη Ενιαία Σύμβαση του 1971 για τα Ναρκωτικά, αποτελώντας κίνδυνο για τη δημόσια υγεία (UNODC, 2021). Στο πλαίσιο αυτό, ο όρος «νέο» δεν αναφέρεται αναγκαστικά σε νέες ουσίες, αλλά σε ουσίες που πρόσφατα έγιναν διαθέσιμες για κατάχρηση. Τα NPS, συχνά, χρησιμοποιούνται ως υποκατάστατα του ελεγχόμενου πρωτότυπου “ναρκωτικού”, λόγω της δυνατότητας να προμηθεύονται ανώνυμα, ευκολότερα και σε χαμηλότερη τιμή μέσω διαδικτύου. Το πρώτο NPS που αναγνωρίστηκε το 2005, ήταν ένα συνθετικό κανναβινοειδές με το όνομα «Herbal mixture-Spice», που πωλούνταν ως αποσμητικό χώρου και παρουσίαζε παρόμοιες επιδράσεις με την κάνναβη. Από την πρώτη τους εμφάνιση, αναφέρεται ότι κατά μέσο όρο κάθε εβδομάδα μια νέα ουσία εισέρχεται στην αγορά (UNODC, 2021).

Τα NPS δεν υποβάλλονται σε κριτήρια ασφαλείας, παρά το γεγονός ότι ορισμένα από αυτά χαρακτηρίζονται “νόμιμα” (Ifeagwu et al., 2017). Ως αποτέλεσμα, οι νέοι συμμετέχουν σε επικίνδυνες, μη ασφαλείς συμπεριφορές (Dignam, Bigham, 2017), επειδή βρίσκονται υπό την επικίνδυνη παρανόηση ότι “η νομιμότητα μπορεί να ισοδυναμεί με ασφάλεια”. Στην πραγματικότητα, τα περισσότερα από αυτά τα προϊόντα είναι φαρμακολογικά πιο ισχυρά και επικίνδυνα από τα κλασικά ναρκωτικά κατάχρησης (Meader et al., 2018). Οι ψυχοδραστικές αυτές ουσίες κυκλοφορούν στην παράνομη αγορά με διάφορες ονομασίες όπως “legal highs”, “herbal highs”, “research chemicals”, “bath salts”, “designer drugs” που υποδηλώνουν τον προορισμό τους για μια φαινομενικά νόμιμη χρήση. Πολλά από τα πρόσφατα αναγνωρισμένα NPS, είναι παράγωγα γνωστών εξαρτησιογόνων ουσιών, των οποίων η μοριακή δομή έχει τροποποιηθεί ελαφρώς.

Τα τελευταία 2-3 χρόνια, μια κατηγορία συνθετικών ουσιών υψηλής δραστηριότητας, τα βενζιμιδαζόλια με χαρακτηριστικά παραδείγματα την ετονιταζίνη και την ισοτονιταζίνη, εμφανίστηκαν επίσης στις αγορές παράνομων ναρκωτικών (Ujvary et al., 2021).

Η εμφάνιση τους έχει παρουσιάσει μεγάλες προκλήσεις για τον έλεγχο των ναρκωτικών και απειλές για τη δημόσια υγεία. Ορισμένα NPS έχουν υποβληθεί σε διεθνή έλεγχο βάσει των Συμβάσεων του Οργανισμού Ηνωμένων Εθνών (ΟΗΕ) και έχουν ληφθεί διαφορετικές προσεγγίσεις για τον νομικό έλεγχο σε εθνικό επίπεδο κάθε χώρας (Peacock et al., 2019, Corkery et al., 2019). Αξίζει να σημειωθεί, πως περισσότερες από 140 χώρες/περιοχές έχουν αναφέρει τουλάχιστον ένα NPS μέχρι το 2023 (UNODC, 2023).

Μία από τις σημαντικότερες ανησυχίες είναι ότι οι μακροπρόθεσμες επιπτώσεις αυτών των προϊόντων είναι επί του παρόντος άγνωστες. Το 2018, σημειώθηκε αύξηση της τάξης του 16%

των θανάτων που οφείλονται σε υπερβολική δόση NPS, αποτελώντας το υψηλότερο ποσοστό από την πρώτη εμφάνιση των NPS (Bicknell et al., 2017). Τα τρέχοντα στοιχεία υποδηλώνουν ότι η διαθεσιμότητα των NPS στην αγορά παράνομων ναρκωτικών και οι σχετικές οξείες και θανατηφόρες δηλητηριάσεις υποεκτιμώνται λόγω των αναλυτικών προκλήσεων που τίθενται. Υπάρχουν εγγενείς δυσκολίες στην ταυτοποίηση μη ταξινομημένων ενώσεων, λόγω των μεγάλων παραλλαγών στη χημική δομή, της έλλειψης εμπορικά διαθέσιμων προτύπων και της συνεχούς αλλαγής των NPS που χρησιμοποιούνται στη σκηνή των ναρκωτικών (Zawilska, Wojcieszak, 2019). Το διαδίκτυο διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στη διαφήμιση και τη διανομή αυτών των προϊόντων, καθώς έχει μια σειρά από πλεονεκτήματα σε σχέση με τις πωλήσεις σε καταστήματα, όπως οι γρήγορες και εύκολες πωλήσεις, οι αγοραστές και οι πωλητές είναι συνήθως ανώνυμοι και, κυρίως, η υπέρβαση της εθνικής και διεθνούς νομοθεσίας (Corazza et al., 2020).

Ακόμη και αν υπάρχουν όλο και περισσότερες αναφορές για τη θνησιμότητα και τη νοσηρότητα που προκαλούν, η οικονομική κρίση, η δυσκολία στην ανίχνευση τους, η απλή προσβασιμότητά τους και η νόμιμη διάθεσή τους είναι μεταβλητές που ευνοούν την παγκόσμια ανάπτυξή τους. Καθίσταται συνεπώς επιτακτική η ανάγκη για ανάπτυξη νέων ευαίσθητων και αξιόπιστων μεθόδων ανίχνευσης των ουσιών αυτών σε διαφορετικά υποστρώματα (Boumba et al., 2017).

Κατηγορίες των Νέων Ψυχοτρόπων Ουσιών

Μέχρι σήμερα έχουν αναφερθεί περισσότερα από 1200 NPS που ανήκουν σε καθορισμένες ομάδες (UNODC, 2023). Διακρίνονται στις εξής κατηγορίες:

- Συνθετικά κανναβινοειδή
- Συνθετικές καθινόνες
- Συνθετικά οπιοειδή
- Φαινεθυλαμίνες
- Πιπεραζίνες
- Τρυπταμίνες
- Συνθετικές βενζοδιαζεπίνες
- Φυτικές ουσίες
- Διάφορες ουσίες (χημικές δομές που δε ανήκουν στις υπόλοιπες ομάδες)

Αναλυτικά:

i. Συνθετικά Κανναβινοειδή

Ο όρος «κάνναβη» αναφέρεται στα διάφορα ψυχοδραστικά σκευάσματα (φύλλα μαριχουάνας, χασίς και χασισέλαιο) του φυτού της κάνναβης. Η εμφάνιση και η διάδοση της τοποθετείται το 18^ο αιώνα, και χρησιμοποιήθηκε για την ανακούφιση από τα συμπτώματα ποικίλων ψυχιατρικών διαταραχών σχετιζόμενων με άγχος όπως η μανία (Pertwee, 2006). Στις αρχές του 20^{ου} αιώνα επισημαίνονται οι επικίνδυνες δράσεις της και διατυπώνεται η άποψη ότι

προκαλεί εξάρτηση. Η απαγόρευση της κάνναβης άρχισε στις Η.Π.Α., το 1937, και ίσχυσε πολύ γρήγορα σχεδόν σε όλο τον κόσμο. Παρ' όλα αυτά, τα παράγωγα της, η μαριχουάνα και το χασίς, παραμένουν οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες ουσίες των δυτικών κοινωνιών (Ashton, 2001).

Τη δεκαετία του '70, ξεκίνησε η παραγωγή των συνθετικών αναλόγων που δεν αποτελούνται μόνο από ενώσεις δομικά παρόμοιες με τα φυτοκανναβινοειδή, αλλά επίσης από συνθετικά ανάλογα με διαφορετικό χημικό τύπο που περιλαμβάνουν τα κλασσικά και μη κλασσικά κανναβινοειδή και τις αμινοαλκυλινδόλες (Howlett et al., 2002). Τόσο τα φυτοκανναβινοειδή όσο και τα συνθετικά κανναβινοειδή δρουν ως αγωνιστές του CB1 υποδοχέα των κανναβινοειδών (CB1R), που εκφράζεται στον εγκέφαλο, και του CB2 (CB2R), που εκφράζεται σε περιφερικούς ιστούς (π.χ. λεμφαδένες) και κύτταρα (T-λεμφοκύτταρα, μακροφάγα) του ανοσοποιητικού συστήματος (Alves et al., 2020, Alzubi et al., 2024).

Ο χημικός John W. Huffman συνέθεσε τα πρώτα συνθετικά κανναβινοειδή, τη σειρά "JWH", με στόχο την διερεύνηση των πιθανών φαρμακευτικών δυνατοτήτων πολυάριθμων συνθετικών κανναβινοειδών. Διακρίνονται στις κατηγορίες των ναπτοϋλινδολών (π.χ. JWH-018), των φαινυλακετυλινδολών (π.χ. JWH-250), των βενζοϊνδολών (π.χ. AM-694, RSC-4) των ναφθοϋλοπυρρολών (π.χ. JWH-147) και άλλων κανναβινοειδών (π.χ. ADB-FUBINACA, CP-47) (Florou, Boumba, 2021).

ii. Διεγερτικά

Οι φαιναθυλαμίνες, οι πιπεραζίνες, οι τρυπταμίνες και οι συνθετικές καθιόνες ανήκουν στις διεγερτικές και παραισθησιογόνες ουσίες και μπορούν να δημιουργήσουν μια αίσθηση ευφορίας και ευεξίας (Schifano et al., 2015). Είναι μια από τις μεγαλύτερες ομάδες των NPS, που πωλούνται συνήθως ως σκόνες ή χάπια. Τα διεγερτικά αυξάνουν τα συναπτικά επίπεδα σεροτονίνης, ντοπαμίνης ή/και νοραδρεναλίνης (Simmler et al., 2013, Simmler et al., 2014).

Τα περισσότερα σεροτονινεργικά φάρμακα, παρόμοια με την έκσταση, παράγουν περισσότερη ενσυναίσθηση και συναισθηματική ειλκρίνεια (Nichols, 1986). Τα περισσότερα ντοπαμινεργικά φάρμακα, παρόμοια με την κοκαΐνη, προκαλούν ευφορικές και μανιακές εμπειρίες (Greene et al., 2008). Περιστατικά περιγράφουν επιληπτικές κρίσεις, παραλήρημα καθώς νεφρική και αναπνευστική ανεπάρκεια μετά την χρήση τους (Prosser, Nelson, 2012, Seely et al., 2013). Μακροπρόθεσμα, σχετίζονται με παρορμητική συμπεριφορά, κατάχρηση και εξάρτηση (Winstock et al., 2011).

A. Πιπεραζίνες

Οι πιπεραζίνες πήραν το όνομα τους λόγω της χημικής ομοιότητάς της με την πιπεριδίνη, ένα συστατικό της πιπερίνης που βρίσκεται στο φυτό "Piper nigrum". Η "πιπεραζίνη" αποτελείται από ένα πρόσθετο άτομο αζώτου (πρόθεμα -αζ) σε αντίθεση με την πιπεριδίνη.

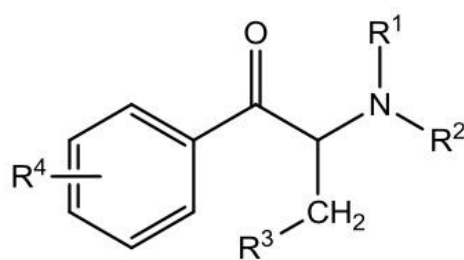
Η πιο κοινή πιπεραζίνη είναι η 1-βενζυλοπιπεραζίνη (BZP), ενώ άλλα παράγωγα της μπορεί να είναι η 1-(3-χλωροφαινυλο) πιπεραζίνη (mCPP) και η 1-(3-τριφθορομεθυλοφαινυλο) πιπεραζίνη (TFMPP). Στις αρχές του 20^{ου} αιώνα, η Bayer διαφήμιζε την πιπεραζίνη ως αντιπαρασιτικό φάρμακο. Το 1980, στην Ουγγαρία, η BZP χρησιμοποιήθηκε ως πιθανό αντικαταθλιπτικό φάρμακο, ωστόσο αργότερα ανακαλύφθηκε πως μπορεί να γίνει κατάχρηση λόγω συγκρίσιμων, με την αμφεταμίνη, χαρακτηριστικών (EMCDDA, 2009).

Η συνδυαστική χρήση του TFMPP με το BZP, παράγει χαμηλότερης δραστηριότητας επιδράσεις του MDMA (Baumann et al., 2004) (Baumann et al., 2005), ενώ το mCPP παράγει παρόμοια διεγερτικά και παραισθησιογόνα αποτελέσματα (Tancer, Johanson, 2001). Στην Ευρώπη έχουν αναφερθεί θανατηφόρες περιπτώσεις που αφορούσαν τη χρήση πιπεραζινών, με δύο περιπτώσεις που αφορούσαν το BZP σε συνδυασμό με το TFMPP (EMCDDA, 2009).

B. Συνθετικές καθινόνες

Οι συνθετικές καθινόνες είναι παράγωγα της φυσικής ένωσης καθινόνης, του κύριου ψυχοδραστικού συστατικού του φυτού «Catha edulis». Τη δεκαετία του 1970 το (S)-(-) στερεοϊσομερές της καθινόνης, απομονώθηκε από τα φύλλα του khat (Kalix, 1990). Πολλά χρόνια πριν από την ανακάλυψη της καθινόνης στο khat, η ένωση είχε συντεθεί από φαρμακευτικούς χημικούς (Van der Schoot et al., 1962) διερευνώντας την για θεραπευτικές δυνατότητες.

Η καθινόνη είναι το β-κετο ανάλογο της αμφεταμίνης και όλες οι συνθετικές καθινόνες εμφανίζουν ένα β-κετο τμήμα στη δομή τους (Σχήμα 2). Αρκετές συνθετικές καθινόνες είναι ευρέως συνταγογραφούμενα φάρμακα (π.χ. βουπροπιόνη), ενώ άλλες ναρκωτικά κατάχρησης (π.χ. 4-μεθυλομεθκαθινόνη, μεφεδρόνη) (Baumann et al., 2018).



Σχήμα 2: Μοριακή δομή παραγώγων καθινόνης

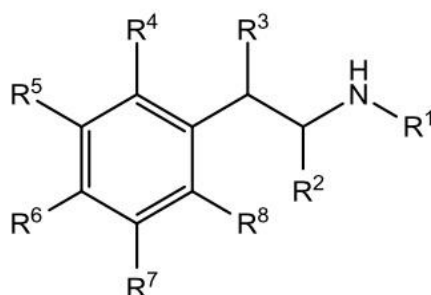
Οι συνθετικές καθινόνες αποτελούν μια από τις σημαντικότερες ομάδες μεταξύ των NPS, καθώς είναι η δεύτερη πολυπληθέστερη ομάδα (156 ενώσεις), μετά τα συνθετικά κανναβινοειδή (209 ενώσεις) το 2019 στην ΕΕ (Kuroпка et al., 2023).

Οι πρώτες συνθετικές καθινόνες εντοπίστηκαν, στα τέλη του 2010, σε προϊόντα διαθέσιμα στην αγορά υπό την ονομασία «άλατα μάνιου» (Prosser, Nelson, 2012), και μέχρι το 2011, υπήρχαν αυξανόμενες αναφορές δηλητηριάσεων στις Η.Π.Α. (Warrick et al., 2013). Οι χαμηλές δόσεις «αλάτων μάνιου» παράγουν τυπικές διεγερτικές επιδράσεις, όπως αυξημένη ενέργεια, διάθεση και ευφορία. Ωστόσο οι υψηλές δόσεις ή η επαναλαμβανόμενη χρήση

μπορεί να προκαλέσουν σοβαρά προβλήματα, όπως παραισθήσεις, ψύχωση, ταχυκαρδία, υπέρταση και υπερθερμία, που συχνά συνοδεύονται από επιθετικές ή βίαιες συμπεριφορές (Karch, 2015). Παρόμοια με τις αμφεταμίνες, οι συνθετικές καθιόνες είναι ψυχοκινητικά διεγερτικά που ασκούν τις επιδράσεις τους μειώνοντας τη φυσιολογική λειτουργία των μεταφορέων της πλασματικής μεμβράνης για την ντοπαμίνη, τη νορεπινεφρίνη και την 5-HT (SERT) (Baumann, 2020). Συνδέονται συνήθως με αυξημένη νευροτοξικότητα σε σύγκριση με τα παραδοσιακά διεγερτικά (Fleckenstein et al., 2000, Xie, Miller, 2009). Η τοξικολογική ανάλυση τέτοιων προϊόντων το 2010 και το 2011 εντόπισε τρεις συνθετικές ενώσεις: 4-Methyl-N-methylcathinone (4-MMC, μεφεδρόνη), 3,4μεθυλενοδιοξυ-N-methylcathinone (MDMC, μεθυλόνη) και 3,4 μεθυλενοδιοξυπυροβαλερόνη (MDPV) (Spiller et al., 2011). Το 2013 η μεφεδρόνη, η μεθυλόνη και το MDPV τέθηκαν σε μόνιμο έλεγχο, καθιστώντας τα ως παράνομα ναρκωτικά στις Η.Π.Α..

Γ. Φαινεθλαμίνες

Μία από τις σημαντικότερες ομάδες των NPS είναι οι συνθετικές φαινεθλαμίνες που έχουν κοινό τμήμα φαινεθλαμίνης. Περιλαμβάνουν ουσίες όπως η "σειρά 2C", υποκατεστημένες με δακτύλιο αμφεταμινών, η "σειρά D", οι βενζοδιουράνες και άλλες (π.χ. p-μεθοξυμεθαμφεταμίνη (PMMA)). Οι φαινεθλαμίνες της σειράς "D" είναι μεγαλύτερης διάρκειας και πιο ισχυρές συγκριτικά με άλλες φαινεθλαμίνες. Οι ενώσεις των "σειρών D" και "2C", έχουν ισχυρές παραισθησιογόνες επιδράσεις και εξαρτώνται από τη δόση, με επιδράσεις που κυμαίνονται από διεγερτικές έως παραισθησιογόνες (Huang, Bai, 2010). (Σχήμα 3).



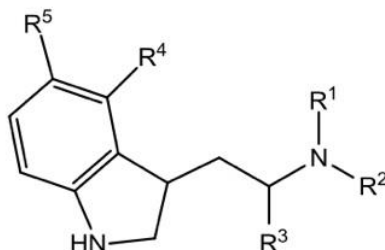
Σχήμα 3: Μοριακή δομή φαινεθλαμινών

Η PMMA, συντέθηκε για πρώτη φορά το 1938, και πωλούνταν ως υποκατάστατο της "έκστασης" (Glennon et al., 1988). Τις δεκαετίες του '80 και '90, ο βιοχημικός Alexander Shulgin συνέθεσε νέες ψυχοδραστικές ενώσεις, συμπεριλαμβανομένων φαινεθλαμινών και υποκατάστατων της αμφεταμίνης.

Παρόλο που έχουν δημοσιευθεί αρκετές αναφορές για κλινικά συμπτώματα και δηλητηριάσεις που οφείλονται σε αυτές τις ουσίες, οι περισσότερες από αυτές τις δημοσιεύσεις δεν περιέχουν αναλυτικά δεδομένα (Maas et al., 2015). Επιπλέον, εξακολουθεί να υπάρχει έλλειψη πληροφοριών σχετικά με τις φαρμακολογικές και τοξικολογικές επιδράσεις αυτών των νέων ψυχοδραστικών ουσιών.

Δ. Τρυπταμίνες

Οι τρυπταμίνες είναι μια ομάδα αλκαλοειδών μονοαμινών, που προέρχονται από το αμινοξύ τρυπτοφάνη και είναι παρόμοιες με τη σεροτονίνη (5-υδροξυτρυπταμίνη, 5-HT). Γνωστές τρυπταμίνες, όπως η ψιλοκυβίνη, που περιέχεται στα μανιτάρια, και η N,N-διμεθυλοτρυπταμίνη (DMT), που υπάρχει στο ψυχοδραστικό ποτό ayahuasca (Araújo et al., 2015).



Σχήμα 4: Μοριακή δομή παραγώγων τρυπταμίνης

Με την ανακάλυψη των παραισθησιογόνων ιδιοτήτων του LSD, οι τρυπταμίνες άρχισαν να χρησιμοποιούνται ψυχαγωγικά μεταξύ των νέων. Έτσι, εμφανίστηκαν συνθετικά τρυπταμίνες, όπως η α-μεθυλοτρυπταμίνη (AMT), η 5-μεθοξυ-N,N-διμεθυλοτρυπταμίνη (5-MeO-DMT) και η 5-μεθοξυ-N,N-δισοπροπυλοτρυπταμίνη (5-MeO-DIPT), τα οποία αναγνωρίστηκαν ως τα επόμενη γενιάς ναρκωτικά σχεδιασμού που θα αντικαταστήσουν το LSD.

Οι συνθετικές τρυπταμίνες, έχουν συνδεθεί με διέγερση, ταχυαρρυθμίες, υπερπυρεξία και θάνατο, ενώ οι τρυπταμίνες τύπου εργολίνης προκαλούν επιληπτικές κρίσεις (Greene, 2013). Τα τελευταία χρόνια έχουν περιγραφεί αναφορές δηλητηρίασης και θανάτων που σχετίζονται με τη χρήση νέων τρυπταμινών, γεγονός που προκάλεσε διεθνή ανησυχία για τις τρυπταμίνες. Οι ενώσεις “psilocin”, “psilocybin”, DET, DMT και “etryptamine” είναι οι μόνες τρυπταμίνες που ελέγχονται σε διεθνή επίπεδο. Ωστόσο, η έλλειψη βιβλιογραφίας σχετικά με τις φαρμακολογικές και τοξικολογικές ιδιότητες των νέων παραισθησιογόνων τρυπταμινών δυσχεραίνει την αξιολόγηση της πραγματικής δυνητικής βλάβης τους για τη γενική δημόσια υγεία (Araújo et al., 2015).

iii. Συνθετικά Οπιοειδή

Τα νέα συνθετικά οπιοειδή (ΝΣΟ) αποτελούν μια από τις ταχύτερα αναπτυσσόμενες ομάδες NPS, οι οποίες εμφανίστηκαν κατά το δεύτερο μισό της δεκαετίας του 2000 (Zawilska et al., 2023). Αποτελούν μείζονα κίνδυνο για τη δημόσια υγεία και απαιτεί επαγρύπνηση από πολλούς τομείς, προκειμένου να ανακοπεί η ροή τους (Karila et al., 2019). Τα ΝΣΟ, όπως και τα φυσικά φάρμακα από την οπιούχο παπαρούνα (π.χ. μορφίνη, ηρωίνη και κωδεΐνη), δρουν στους ίδιους στόχους στον εγκέφαλο για να παράγουν αναλγητικά αποτελέσματα (Karila et al., 2019). Ο σχεδιασμός ορισμένων ΝΣΟ εξελίχθηκε από τη θεραπευτική χρήση στη σύνθεση νέων παραγώγων φεντανύλης για την παράνομη αγορά. Διάφορα ανάλογα της φεντανύλης (π.χ. ακετυλο-, φουρανυλο-φεντανύλη και καρφεντανύλη) έχουν επιδείξει ιδιαίτερα

επικίνδυνες φαρμακολογικές επιδράσεις (Jones et al., 2018, Brunetti et al., 2021). Η φεντανύλη είναι 60 φορές ισχυρότερη και πολύ πιο επικίνδυνη από την ηρωίνη και 80 από την μορφίνη. Η φεντανύλη, τα ανάλογα της φεντανύλης και άλλα νέα συνθετικά οπιοειδή είναι όλα αγωνιστές διαφορετικής ισχύος στον υποδοχέα μ-οπιοειδών (Armenian et al., 2018). Έχουν την δυνατότητα να επηρεάσουν διάφορα συστήματα (π.χ. καρδιαγγειακό, γαστρεντερικό, ουροποιητικό, νευροενδοκρινικό) και όργανα (π.χ. μήτρα) του οργανισμού. Η σωματική εξάρτηση και ο εθισμός αποτελούν κλινικές ανησυχίες (Benyamin et al., 2008).

Επί του παρόντος, η μόνη διαθέσιμη θεραπεία για την αναστροφή των αρνητικών επιδράσεων των οπιοειδών είναι η ναλοξόνη. Ωστόσο, η αποτελεσματικότητά της, ιδίως μετά από υπερβολική δόση οπιοειδών, ποικίλλει ανάλογα με τη φαρμακοκινητική και τη φαρμακοδυναμική του ληφθέντος οπιοειδούς. Ανθεκτικότητα στην ναλοξόνη παρουσιάζουν τα οπιοειδή μακράς δράσης και εκείνα με υψηλή συγγένεια στον υποδοχέα μ-οπιοειδών (Van Lemme et al., 2023). Το 2023, η Ελλάδα, μέσω του Υπουργείου Υγείας και του Οργανισμού Κατά των Ναρκωτικών (Ο.ΚΑ.ΝΑ.), προέβη σε ενέργειες για τη διεύρυνση της πρόσβασης σε θεραπείες που μπορούν να αντιστρέψουν τις δυσμενείς επιπτώσεις από υπερδοσολογία οπιοειδών (WHO, 2023).

Η κρίση των οπιοειδών

Από το 1999 έως το 2021, σχεδόν 645.000 άνθρωποι πέθαναν από υπερβολική δόση οπιοειδών, συνταγογραφούμενων ή παράνομων. Η αύξηση των θανάτων από υπερβολική δόση οπιοειδών περιγράφεται σε τρία διακριτά «κύματα».

Το **1^ο κύμα** ξεκίνησε στη δεκαετία του '90 με την αύξηση της συνταγογράφησης οπιοειδών. Με τους θανάτους από υπερβολική δόση συνταγογραφούμενων οπιοειδών να αυξάνονται από το 1999.

Το **2^ο κύμα** ξεκίνησε το 2010, με ραγδαία αύξηση θανάτων από υπερβολική δόση ηρωίνης. Το 2012, ο αριθμός των συνταγογραφούμενων οπιοειδών, όπως η οξυκωδόνη και η υδροκωδόνη, έφτασε στα 255 εκατομμύρια και οι θάνατοι ξεπέρασαν τους 11.000 ετησίως. Γεγονός που οδήγησε σε εκτεταμένη κατάχρηση.

Το **3^ο κύμα** ξεκίνησε το 2013, με σημαντική αύξηση των θανάτων από υπερβολική δόση συνθετικών οπιοειδών, και κυρίως της παράνομα παρασκευασμένης φεντανύλης (Volkow, Blanco, 2020, Pardo et al., 2021). Οι ουσιοεξαρτημένοι στράφηκαν στη φεντανύλη λόγω του σκληρού ελέγχου των φαρμακευτικών εταιρειών επί των συνταγογραφούμενων παυσίπονων χαπιών. Για να επωφεληθούν αυτής της κατάστασης, οι παράνομοι μικροπαραγωγοί κατέκλυσαν τις αγορές με νοθευμένα χάπια (δισκία φεντανύλης), που «μιμούνται» τα συνταγογραφούμενα φάρμακα. Στα τέλη του 2017, οι θάνατοι από υπερβολική δόση συνταγογραφούμενων οπιοειδών και ηρωίνης άρχισαν να μειώνονται, ενώ οι θάνατοι από φεντανύλη συνέχισαν να αυξάνονται (Gardne et al., 2022).

Αξίζει να σημειωθεί πως ο αριθμός των ανθρώπων που πέθαναν από υπερβολική δόση ναρκωτικών το 2021 ήταν εξαπλάσιος από τον αριθμό του 1999, με τα ποσοστά θανάτων που σχετίζονται με οπιοειδή να έχουν αυξηθεί κατά 15% (Ahmed et al., 2023).

1.3.3 Άλλες κατηγορίες ουσιών

Μελετήθηκαν, επίσης ουσίες που ανήκουν σε διάφορες υποκατηγορίες ουσιών και μπορούν δυνητικά να συμβάλλουν στην αιτία θανάτου.

Μια κατηγορία ψυχοτρόπων φαρμάκων, γνωστή ως αντιψυχωσικά ή νευροληπτικά, χρησιμοποιούνται γενικά για τη θεραπεία της ψύχωσης (η οποία περιλαμβάνει παραισθήσεις, ψευδαισθήσεις, παράνοια ή διαταραγμένη σκέψη), ιδίως σε περιπτώσεις σχιζοφρένειας. Τα αντιψυχωσικά ταξινομούνται με βάση τη δραστηριότητα, την ημερομηνία ανακάλυψης και τη χημική τους δομή σε τυπικά ή πρώτης γενιάς (Kule, Kagawa, 2023) και σε άτυπα ή δεύτερης και τρίτης γενιάς (με λιγότερες δηλαδή παρενέργειες). Τα άτυπα αντιψυχωσικά, συμπεριλαμβανομένων της δεύτερης, τρίτης και μερικών πρώτης γενιάς, είναι γενικά λιγότερο αποτελεσματικά από τα τυπικά, εκτός από την κλοζαπίνη (πρώτης γενιάς), η οποία έχει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα από τα υπόλοιπα αντιψυχωσικά.

Τα αντικαταθλιπτικά φάρμακα χρησιμοποιούνται κυρίως για τη θεραπεία της μείζονος καταθλιπτικής διαταραχής, καθώς και άλλων ψυχικών διαταραχών, συμπεριλαμβανομένων ορισμένων αγχωδών διαταραχών. Ταξινομούνται με βάση τη χημική δομή και τον μηχανισμό δράσης σε τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά (Gillman, 2007), σε ειδικούς αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης (Santarelli et al., 2003), σε αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης και νοραδρεναλίνης (Lambert, Bourin, 2002), σε αναστολείς μονοαμινοξειδάσης (Fiedorowicz, Swartz, 2004) και σε άλλα. Τα φάρμακα αυτά παρότι ήταν αποτελεσματικά παρουσίαζαν σοβαρές και επικίνδυνες παρενέργειες.

Τα αντιεπιληπτικά φάρμακα (π.χ. τοπιραμάτη, καρβαμαζεπίνη) είναι ιδιαίτερα επιρρεπή σε αλληλεπιδράσεις φαρμάκων (Johannessen, Landmark, 2003). Στόχος τους είναι η καταστολή της επιληπτικής δραστηριότητας, είτε στην επιληπτογόνο εστία (εστιακοί σπασμοί), είτε στην αναστολή διάδοσης της στον υπόλοιπο εγκέφαλο (γενικευμένοι σπασμοί). Επίσης, τα μυοχαλαρωτικά φάρμακα χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία μυϊκών προβλημάτων και συγκεκριμένα των σπασμών (κυκλοβενζαπρίνη) και της σπαστικότητας (Singh et al., 2022). Οι αναστολείς των διαύλων νατρίου (π.χ. προκαϊναμίδη) είναι φάρμακα που εμποδίζουν την αγωγή των ιόντων νατρίου (Na^+) μέσω των διαύλων νατρίου, και χρησιμοποιούνται ως τοπικά αναισθητικά, αντισπασμωδικά (Wood, Boorman, 2005), αντιαρρυθμικά (Zamponi et al., 1993), εντομοκτόνα και έχουν, επίσης, προταθεί για χρήση στη θεραπεία της κυστικής ίνωσης (Hirsh et al., 2008). Οι αναστολείς διαύλων ασβεστίου (π.χ. βεραπαμίλη και διλτιαζέμη) παρεμποδίζουν την είσοδο ιόντων ασβεστίου από τους διαύλους των κυτταρικών μεμβρανών. Η δράση αυτή ασκείται κυρίως στον καρδιακό μυ, που προκαλούν ελάττωση της συσπαστικότητας (Chaffman, Brogden, 1985, Brogden, Benfield, 1996). Οι βήτα αναστολείς (π.χ. προπρανολόλη), είναι κατηγορία φαρμάκων που χρησιμοποιούνται, κυρίως, για τη διαχείριση μη φυσιολογικών καρδιακών ρυθμών, για τη θεραπεία της υψηλής αρτηριακής πίεσης (James et al., 2014).

Οι H₂-ανταγωνιστές (π.χ. σιμετιδίνη) χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία του έλκους και της γαστροοισοφαγικής παλινδρόμησης. Οι εκλεκτικοί ανταγωνιστές των μουσκαρινικών υποδοχέων (π.χ. ατροπίνη) έχουν συγκρίσιμη επουλωτική δράση με τους H₂-ανταγωνιστές (Das, 1989).

1.3.4 Εξαρτησιογόνες ουσίες και πανδημία κορονοϊού (COVID-19)

Η πανδημία COVID-19 δημιούργησε μια κατάσταση έκτακτης ανάγκης για τη δημόσια υγεία, αναδεικνύοντας τις ελλείψεις στα παγκόσμια συστήματα υγειονομικής περίθαλψης. Επιδείνωσε το πρόβλημα χρήσης εξαρτησιογόνων ουσιών επηρεάζοντας τις αγορές μέσω ελλείψεων φαρμάκων, αυξήσεων των τιμών τους και μείωσης της ποιότητας/καθαρότητας τους (Ziavrou et al., 2022).

Στην αρχή της πανδημίας, το 2020, η χρήση κάνναβης και παράνομων ναρκωτικών παρέμεινε σταθερή στην Ελλάδα. Ενώ αργότερα κατά το 2021, παρατηρήθηκε μείωση της χρήσης κάνναβης, των μεθαμφεταμινών και της έκστασης, αλλά αύξηση της κοκαΐνης και των αμφεταμινών. Αξίζει να σημειωθεί πως η διαθεσιμότητα των συνθετικών ναρκωτικών μειώθηκε δραστικά λόγω των περιορισμών των αεροπορικών ταξιδιών, ενώ η κοκαΐνη, η ηρωίνη και τα οπιοειδή, τα οποία φαίνονται να διακινούνται κυρίως από τη θάλασσα, εξακολουθούσαν να εντοπίζονται στα ευρωπαϊκά λιμάνια κατά τη διάρκεια της πανδημίας (Zaami et al., 2020).

Η κοινωνική απομόνωση, η περιορισμένη πρόσβαση σε θεραπείες, και το άγχος από τη συνεχιζόμενη COVID-19 πανδημία έχουν αναγνωριστεί ως βασικοί παράγοντες με οξείες επιπτώσεις στην υγεία των χρηστών (Taylor et al., 2021). Επίσης, η οικονομική δυσφορία και ο πανικός λόγω παραπληροφόρησης για την πανδημία κατέστησαν προβληματική την πρόσβαση και την προμήθεια βασικών φαρμάκων υψηλής ποιότητας και ώθησε τους καταναλωτές και τους πωλητές προς τα πλαστά/νοθευμένα φάρμακα, κλιμακώνοντας καταστάσεις έκτακτης ανάγκης για τη δημόσια υγεία (Ziavrou et al., 2022).

1.4 ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΕΣ ΣΤΗΝ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ

Η ανίχνευση και ταυτοποίηση εξαρτησιογόνων ουσιών και φαρμάκων αποτελεί σημαντική αναλυτική πρόκληση στη Κλινική και Δικαστική Τοξικολογία. Έτσι, έχουν αναπτυχθεί διαφορετικές μέθοδοι που στοχεύουν στην ανάλυση συγκεκριμένων ενώσεων-στόχων ή κατηγοριών ενώσεων (στοχευμένη ανάλυση). Οι σύγχρονες ανάγκες στα τοξικολογικά εργαστήρια επιβάλλουν την ανάπτυξη και εφαρμογή μεθόδων που επιτρέπουν να εξετάζονται ταυτόχρονα μεγάλος αριθμός ουσιών με αυξημένη ευαισθησία. Ωστόσο, πρέπει να αναφερθεί ότι υπάρχει, επίσης, αυξανόμενη ανάγκη για την ανάπτυξη και εφαρμογή μη στοχευμένων αναλυτικών προσεγγίσεων.

Στον Πίνακα 1, παρουσιάζονται οι αναλυτικές μέθοδοι που έχουν δημοσιευτεί για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό εξαρτησιογόνων ουσιών, NPS, φαρμάκων και άλλων ουσιών σε αίμα με χρήση LC-MS/MS.

Έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι αναλύσεων που στοχεύουν σε κοινά συνταγογραφούμενα φάρμακα, όπως τα αντιψυχωσικά (Saar et al., 2010, Fisher et al., 2013, Patteet et al., 2014, Montenarh et al., 2016) και τα αντικαταθλιπτικά (Montenarh et al., 2014), καθώς και στο συνδυασμό τους (Steuer et al., 2015). Αρκετές εργασίες περιγράφουν τον προσδιορισμό βενζοδιαζεπινών (Marin et al., 2008, Sauve et al., 2012, Montenarh et al., 2014, Lee et al., 2015) σε συνδυασμό με υπνωτικά φάρμακα (Laloup et al., 2005, Ishida et al., 2009, Verplaetse et al., 2012, Montenarh et al., 2014, Banaszkiwicz et al., 2020). Επίσης, υπάρχουν εργασίες που αναφέρουν την ταυτόχρονη ανίχνευση βενζοδιαζεπινών, αντικαταθλιπτικών, αντιψυχωσικών και των μεταβολιτών τους (Sempio et al., 2014, Barone et al., 2023). Μια άλλη εργασία αναφέρει την ταυτόχρονη ανίχνευση αντιψυχωσικών, βενζοδιαζεπινών και υπνωτικών (Remane et al., 2011), ενώ μία άλλη βενζοδιαζεπινών, ηρεμιστικών, αντικαταθλιπτικών, αντιψυχωσικών και μεθαδόνης (Lerch, 2021).

Παρόλο που η πλειονότητα αυτών των μεθόδων στοχεύει σε ορισμένες ενώσεις από τις προαναφερθείσες κατηγορίες ουσιών/φαρμάκων, υπάρχουν κάποιες μέθοδοι που περιλαμβάνουν τον συμπροσδιορισμό ουσιών από διάφορες κατηγορίες φαρμάκων. Η εργασία 23, αναφέρει την ανίχνευση οκτώ ψυχοδραστικών ουσιών (αντισπασμωδικά, αντιψυχωσικά, αντικαταθλιπτικά, διεγερτικά του κεντρικού νευρικού συστήματος (Κ.Ν.Σ.), αντιπαρκινσονικοί παράγοντες και αγχολυτικά) σε πλάσμα (Park et al., 2018). Ενώ, η εργασία 2, περιγράφει τον προσδιορισμό 57 φαρμακευτικών (αντικαταθλιπτικών, υπνωτικών) και παράνομων ουσιών (αμφεταμινών, LSD, NPS, βενζοδιαζεπινών) στο πλάσμα (Dos Santos et al., 2023). Η μελέτη 13, ασχολήθηκε με τον συμπροσδιορισμό αμφεταμινών, κοκαΐνης και μεταβολιτών της (Bjork et al., 2013), άλλες (65, 35) με οπιούχα, αμφεταμίνες και μεταβολίτες κοκαΐνης (Bouzas et al., 2009, Dulaurent et al., 2016), ενώ άλλες (30, 24) με την κοκαΐνη, τους μεταβολίτες της και το κρακ (Chen et al., 2017, Takitane et al., 2018). Έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι (69, 56) που ανιχνεύουν οπιούχα (Coles et al., 2007, Eichhorst et al., 2012), και οπιοειδή στον ορό, στο πλάσμα και στο ολικό αίμα (Musshoff et al., 2006, Gergov et al., 2009, Verplaetse, Tytgat, 2010, Eckart et al., 2015, Verplaetse, Henion, 2016, Papsun et al., 2016, Mohr et al., 2016, Smith et al., 2019, Fogarty et al., 2022). Υπάρχουν, επίσης, αρκετές

αναφορές ανίχνευσης φεντανύλης, αναλόγων και μεταβολιτών της στο αίμα (Strayer et al., 2018, Fogarty et al., 2018, Busardo et al., 2019, Palmquist, Swortwood, 2020). Αξίζει να αναφερθεί πως εννέα εργασίες (67, 57, 17, 39, 26, 18, 16, 8, 5) έχουν αναπτύξει μεθόδους ανίχνευσης διάφορων ουσιών (εξαρτησιογόνες, NPS, φάρμακα και άλλες ουσίες) στο μεταθανάτιο αίμα (Gergov et al., 2009), (Sauve et al., 2012), (Deeb et al., 2014), (Frost et al., 2015), (Fagiola et al., 2018), (Seither et al., 2020), (Lau et al., 2020), (Rodrigues et al., 2021), (Ferrari, Caldas et al., 2022).

Υπάρχουν μελέτες (72, 48, 60, 11, 61) που αναφέρουν τον συμπροσδιορισμό αρκετά μεγάλου αριθμού εξαρτησιογόνων ουσιών και φαρμάκων σε αίμα. Ήδη από το 2005, η εργασία 72, περιέγραψε την ανίχνευση 301 ουσιών κατάχρησης (οπιούχα, κοκαΐνη, αμφεταμίνες, κανναβινοειδή), αντικαταθλιπτικών, αντιψυχωτικών, υπνωτικών, βενζοδιαζεπινών και ορισμένων καρδιακών φαρμάκων σε ορό αίματος (Mueller et al., 2005). Η μελέτη 48, έχει προτείνει την ταυτόχρονη ανίχνευση 132 μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων, βαρβιτουρικών, αντισπασμωδικών, αντιδιαβητικών, μυοχαλαρωτικό, διουρητικών και τρωκτικοκτόνων σε ολικό αίμα (Di Rago et al., 2014). Μια άλλη μελέτη, η 60, αναφέρει τον ταυτόχρονο προσδιορισμό 136 αντικαταθλιπτικών, νευροληπτικών, βενζοδιαζεπινών, β-αναστολέων, αντιδιαβητικών και αναλυτών που σχετίζονται με τη διάγνωση του εγκεφαλικού θανάτου, σε ολικό αίμα (Remane et al., 2010). Ενώ μια άλλη, η 11, τον προσδιορισμό 327 ουσιών που ανήκουν σε διάφορες κατηγορίες όπως αμφεταμίνες, αναισθητικά, αντικαταθλιπτικά, αντιψυχωσικά, αντισπασμωδικά, βενζοδιαζεπίνες, β-αποκλειστές, οπιοειδή και μη οπιοειδή αναλγητικά, διεγερτικά, THC και μεγάλου αριθμού συνθετικών κανναβινοειδών και NPS σε ολικό αίμα (Di Rago et al., 2021). Τέλος, η μελέτη 61, αναφέρει την ταυτόχρονη ανίχνευση 700 εξαρτησιογόνων ουσιών και βενζοδιαζεπινών στον ορό αίματος (Dresen et al., 2010).

Αρκετές δημοσιευμένες μελέτες (14, 16, 18, 27, 28, 62) έχουν προτείνει μεθόδους για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό νέων συνθετικών ναρκωτικών στο αίμα. Υπάρχουν μελέτες που περιγράφουν μέθοδο ανίχνευσης για μια κατηγορία NPS, π.χ. για 30 συνθετικές καθιόνες (Lau et al., 2020), για ένα συνθετικό κανναβινοειδές και το μεταβολίτη του (Seither et al., 2020), για 72 συνθετικά κανναβινοειδή (Ambroziak, Adamowicz, 2017), για 12 συνθετικές βενζοδιαζεπίνες (Mastrovito et al., 2021), για 9 βαρβιτουρικά (Zhang et al., 2017), και για 5 πιπεραζίνες (Antia et al., 2010). Ενώ, υπάρχουν εργασίες που ασχολούνται με την ανάπτυξη μεθόδων για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό NPS, στο αίμα, που ανήκουν σε διαφορετικές κατηγορίες, π.χ. ενός οπιοειδούς και ενός διεγερτικού (Ellefsen et al., 2017), 31 συνθετικών αμφεταμινών, τρυπταμινών και πιπεραζινών στον ορό αίματος (Wohlfarth et al., 2010), 78 συνθετικές καθιόνες, συνθετικά κανναβινοειδή, φαινεθυλαμίνες, πιπεραζίνες, της κεταμίνης και των αναλόγων της, βενζοφουρανών, και των τρυπταμινών (Odoardi et al., 2015), 56 NPS, συμπεριλαμβανομένων παραγώγων αμφεταμίνης, ενώσεων 2C, αμινοινδανών, καθιόνων, πιπεραζινών, τρυπταμινών, διασπαστικών και άλλων (Ambach et al., 2015), 143 καθιόνες, φαινεθυλαμίνες, τρυπταμίνες, πιπεραζίνες, πιπεριδίνες, συνθετικά κανναβινοειδή, αρυλαλκυλαμίνες, αρυλκυκλοεξυλαμίνες, αμινοινδάνες και άλλα φάρμακα (Adamowicz, Tokarczyk, 2016), 16 συνθετικά κανναβινοειδή και οι μεταβολίτες τους, καθιόνες και

φαινεθλαμίνες (Montesano et al., 2017), 182 συνθετικά κανναβινοειδή, συνθετικά οπιοειδή, συνθετικές καθινόνες και διεγερτικά (Giorgetti et al., 2022).

Αρκετές εργασίες (34, 10, 29, 19, 5, 15, 13, 7) αναφέρουν την ταυτόχρονη ανίχνευση NPS και άλλων φαρμάκων/ουσιών στο αίμα π.χ. 64 NPS (συνθετικά κανναβινοειδή, συνθετικές καθινόνες, φαινεθλαμίνες, ινδάνια, πιπεραζίνες, τρυπταμίνες, φαινκυκλιδίνες, μεθοξαεταμίνη, κεταμίνη και ο μεταβολίτης της) και 5 αμφεταμίνες (Vaiano et al., 2016), 120 NPS, 43 βενζοδιαζεπίνες, ένα υπνωτικό και αμφεταμίνες (Vaiano et al., 2021), 69 NPS και πέντε διεγερτικά τύπου αμφεταμίνης (Lehmann et al., 2017), NPS (36 συνθετικά κανναβινοειδή, 12 ανάλογα της φαιντανύλης, 16 συνθετικές καθινόνες, 7 τρυπταμίνες και 6 φαινεθλαμίνες), 10 διαθέσιμοι μεταβολίτες, 24 κλασικά παράνομα ναρκωτικά και 8 μεταβολίτες (Di Trana et al., 2020), συνθετικές καθινόνες, φαινεθλαμίνες, συνθετικά κανναβινοειδή, αμφεταμίνες και άλλες ψυχοδραστικές ουσίες (κοκαΐνη, κωδεΐνη, βενζοϋλεκγονίνη, βενζοδιαζεπίνες, μεφεδρόνη, μεθαδόνη, LSD, κεταμίνη, μορφίνη κ.α.) (Ferrari, Caldas et al., 2022), 20 κλασικές βενζοδιαζεπίνες, 4 συνθετικές βενζοδιαζεπίνες και 3 υπνωτικά (Banaszkiewicz et al., 2020). Μια άλλη εργασία έχει αναφέρει την ταυτόχρονη ανίχνευση 84 φαρμακευτικών φαρμάκων (αντιψυχωσικών, αντικαταθλιπτικών κ.λπ.), με ορισμένες από τις σημαντικότερες ομάδες ναρκωτικών κατάχρησης: οπιούχα, κοκαΐνη, κανναβινοειδή, αμφεταμίνες, βενζοδιαζεπίνες και νέες ψυχοδραστικές ουσίες στο αίμα (Orfanidis et al., 2021). Επίσης, μια ενδιαφέρουσα μελέτη έχει αναφέρει τον ταυτόχρονο προσδιορισμό 522 ψυχοτρόπων ουσιών και NPS (Czarny et al., 2022).

Με δεδομένο ότι οι αναπτυχθείσες μέθοδοι στοχεύουν στην εφαρμογή τους στην καθ'ημέρα πράξη οι περισσότερες από τις αναφερόμενες στον Πίνακα 1, μελέτες αναφέρουν τα αποτελέσματα που προκύπτουν κατά την εφαρμογή του σε πραγματικά περιστατικά. Μόνο 11 από τις 72 εργασίες δεν αναφέρουν εφαρμογή της μεθόδου τους σε πραγματικά περιστατικά (Mueller et al., 2005, Antia et al., 2010, Verplaetse, Tytgat, 2010, Remane et al., 2010, Eichhorst et al., 2012, Montenarh et al., 2014, Lee et al., 2015, Montesano et al., 2017, Palmquist, Swortwood, 2020, Lerch, 2021, Smith et al., 2023).

Υπάρχουν δημοσιευμένες μελέτες (8, 2, 24, 23, 25) που αναφέρουν μεθόδους για τον προσδιορισμό ουσιών από διάφορες χώρες ανά τον κόσμο, παρέχοντας στοιχεία για την επιδημιολογία ανίχνευσης ουσιών που ανιχνεύονται στα πραγματικά περιστατικά. Συγκεκριμένα, στη Βραζιλία, σε μια μελέτη η σιταλοπράμη ανιχνεύθηκε σε 17 από τα 52 πραγματικά δείγματα που αναλύθηκαν (Rodrigues et al., 2021), σε άλλη, η ακεταμινοφαΐνη, η διαζεπάμη και η λιδοκαΐνη ανιχνεύθηκε σε ένα περιστατικό (Dos Santos et al., 2023), ενώ σε μία άλλη μέθοδο, προσδιορίστηκε η κοκαΐνη, η βενζοϋλεκγονίνη, το κοκαϊθυλένιο και το προϊόν πυρόλυσης του μεθυλεστέρα της ανυδροεκγονίνης (AEME) σε 22 δείγματα (Takitane et al., 2018). Στην Κορέα, μια δημοσιευμένη μέθοδος εφαρμόστηκε με επιτυχία σε 323 πραγματικά δείγματα πλάσματος και ανιχνεύθηκαν αντιψυχωτικά, αντικαταθλιπτικά, αντιεπιληπτικά και διεγερτικά του Κ.Ν.Σ. (Park et al., 2018). Δείγματα αίματος από 42 νεκροτομικά περιστατικά από τη Φλόριντα, το Ιλινόις, το Μίσιγκαν και το Τενεσί υποβλήθηκαν για τοξικολογική ανάλυση, όπου ανιχνεύθηκε η κοκαΐνη ή/και η βενζοϋλεκγονίνη (BE), η μορφίνη, η φεντανύλη και η κυκλοπροπυλοφεντανύλη καθώς και ο

συνδυασμός τους. Οι βενζοδιαζεπίνες ήταν επίσης ένα κοινό εύρημα, καθώς ήταν παρούσες σε 12 περιστατικά (Fogarty et al., 2018).

Παρατηρείται πως ενώ αρκετές μελέτες στοχεύουν σε κοινά συνταγογραφούμενα φάρμακα ή σε εξαρτησιογόνες, ή σε ψυχοτρόπες ουσίες ή NPS, η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός ουσιών που ανήκουν σε διαφορετικές κατηγορίες, και μπορεί να συμβάλουν στην αιτία θανάτου, χρειάζεται περαιτέρω έρευνα.

Πίνακας 1: Μέθοδοι και συνθήκες ανάλυσης αίματος

A/A	Δείγμα	Ουσίες	Προκατεργασία	Στήλες	Χρόνος ανάλυσης (λεπτά)	Αναφορά
1	Πλάσμα, ορός	127 εξαρτησιογόνες ουσίες	SPE: 100 μ L πλάσμα, ορός, 450 μ L MeOH:ACN (50:50)	Kinetex Biphenyl (100 x 2.1 mm, 2.6 μ m) (Phenomenex)	10	Smith et al., 2023
2	Πλάσμα	57 φάρμακα και παράνομες εξαρτησιογόνες ουσίες	PpT: 50 μ L πλάσμα, 240 μ L MeOH:ACN (3:1)	Acquity UPLC® C18 (2.1 mm \times 50 mm, 1.7 μ m) (Waters Corporation, Ireland)	7	Dos Santos et al., 2023
3	Ολικό αίμα, ορός	68 ψυχοτρόπες ουσίες	PpT: 100 μ L αίμα, ορός, 300 μ L ACN	Acquity UPLC® HSS C18 column (2.1 \times 150mm, 1.8 μ m) (Waters)	15	Barone et al., 2023
4	Ολικό αίμα	182 NPS	PpT: 500 μ L αίμα, 1.5 mL ACN	Acquity UPLC® HSS C18 (1.8 μ m, 2.1 \times 150 mm (Waters, Italy, Milan)	17	Giorgetti et al., 2022
5	Μετα-θανάτιο αίμα	32 NPS, 24 εξαρτησιογόνες ουσίες και 23 συνταγογραφούμενα φάρμακα	QuEChERS: 500 μ L of αίμα, 2 mL H ₂ O/ACN (1:1), 500 mg άνυδρου MgSO ₄ /NaOAc (4:1)	Acquity UHPLC® BEH C18 (2.1 \times 100 mm, 1.7 μ m) (Waters; Milford, MA, USA)	14.1	Ferrari, Caldas et al., 2022
6	Ολικό αίμα	12 ουσίες και 2 μεταβολίτες της ίδιας δομικής κατηγορίας με το οπιοειδές U-47700	SPE: 500 μ L αίμα, 2 mL οξικού αιθυλεστέρα/ACN/ NH ₄ OH (78:20:2)	Cortecs UPLC® C18 (2.1 \times 100 mm, 1.6 μ m) (Waters)	6	Fogarty et al., 2022
7	Ολικό αίμα	522 ψυχοδραστικές ουσίες και οι	LLE: 500 μ L αίμα, 200 μ L ACN	Kinetex C18 (3.0 \times 100 mm; 2.6 μ m)	30	Czarny et al., 2022

		μεταβολίτες τους		(Phenomene x)		
8	Μετα- θανάτιο αίμα	28 ψυχοτρόπες ουσίες	QuEChERS: 100 μL of αίμα, 300 μL ACN, θειικό μαγνήσιο και οξικό νάτριο (4:1)	Raptor™ Biphenyl (100 mm × 2.1 mm ID, 2.7 μm) (Restek, Bellefonte, PA, USA)	8.5	Rodrigue s et al., 2021
9	Ολικό αίμα	16 νέες και κλασσικές βενζοδιαζεπίνες και 1 φάρμακο	PPt: 200 μL αίμα, 600 μL ACN	Raptor™ Biphenyl (50 × 2.1 mm, 2.7 μm) (Restek, Bellefonte, PA, USA)	8	Garcia et al., 2021
10	Ολικό αίμα	120 NPS και 43 εξαρτησιογόνες	PPt: 200 μL αίμα, 700 μL ACN	Zorbax Eclipse Plus C18 (2.1 × 100 mm, 1.8 μm) (Agilent Technologies)	35	Vaiano et al., 2021
11	Ολικό αίμα	327 εξαρτησιογόνες ουσίες και NPS	LLE: 100 μL αίμα, 1 mL BuCl:IPA (9:1)	Kinetex C18 (4.6 × 50 mm, 2.6 μm) (Phenomene x, Melbourne, Australia)	6.5	Di Rago et al., 2021
12	Πλάσμα , ορός	60 εξαρτησιογόνες ουσίες και φάρμακα	SPE: 250 μL ορού ή πλάσματος, 1 mL ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (70:30) H ₂ O- MeOH	Nucleoshell RP 18 (150 × 2 mm, 2.7 μm) (Macherey-N agel)	15	Lerch, 2021
13	Ολικό αίμα	84 εξαρτησιογόνες ουσίες και φάρμακα	Mini-QuEChERS: 200 μL αίμα, 20 mg MgSO ₄ , 5 mg K ₂ CO ₃ , 5 mg NaCl και 600 μL ACN	Acquity UHPLC® BEH C18 (150 × 2.1 m m, 1.7 μm) με προστήλη Acquity BEH C18 VanGuard	17	Orfanidis et al., 2021

				(5 × 2.1 mm, 1.7 μm (Waters)		
14	Ολικό αίμα	12 συνθετικές βενζοδιαζεπίνες	LLE: 0.95 mL αίμα, 3 mL MTBE: 1- χλωροβουτάνιο (60:40)	Acquity UHPLC® BEH C18 (Waters Corp., Milford MA)	5	Mastrovit o et al., 2021
15	Ολικό αίμα	20 κλασσικές βενζοδιαζεπίνες, 4 συνθετικές βενζοδιαζεπίνες και 3 υπνωτικά	LLE: 0.5 mL αίμα, 1 mL οξικού αιθυλεστέρα	InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 (3.0 × 100 mm, 2.7 μm) με προστήλη InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 Fast Guard (3.0 mm × 5 mm) (Agilent Technologies)	13	Banaszki ewicz et al., 2020
16	Μετα- θανάτιο αίμα	30 συνθετικές καθιόνες	SPE: 0.25 mL αίμα, 2 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (100 mM, pH 6), 3 mL (93% διγλωρομεθάνιο, 5% ισοπροπανόλη και 2% NH ₄ OH), 100 μL HCl:MeOH	Infinity Poroshell 120EC-C18 (2.1 × 100 m m, 2.7 μm) (Agilent Technologies , Santa Clara, CA, USA)	16	Lau et al., 2020
17	Πλάσμα	1 ανάλογο φεντανύλης, και 2 μεταβολίτες της	SPE: 100 μL πλάσμα, 1 mL NH ₄ OH 5% σε διγλωρομεθάνιο: ισοπροπανόλη (80:20)	Infinity Poroshell 120 EC-C18 (2.1 × 100 mm, 2.7 μm) με προστήλη (2.1 × 5 mm, 2.7 μm) (Agilent Technologies)	7.2	Palmquist , Swortwo od, 2020
18	Ολικό αίμα,	1 συνθετικό κανναβινοειδές	PPT: 1 mL αίμα, 1 mL ACN	InfinityLab PFP	13.5	Seither et al., 2020

	μετα-θανάτιο αίμα	και ο μεταβολίτης του	SPE: 1 mL αίμα, 1 mL ACN: NH ₄ OH (98:2)	Poroshell 120 (3.0 × 50 mm, 4 μm) (Agilent Technologies)		
19	Ολικό αίμα	77 NPS, 24 εξαρτησιογόνες ουσίες και 18 μεταβολίτες τους	PPT: 100 μL αίμα, 500 μL ακετόνη: ACN (8:2)	Oasis HLB (4.6 × 20 mm, 5 μm) (Waters, Milford, MA, USA)	10	Di Trana et al., 2020
20	Πλάσμα	1 οπιοειδές και 2 μεταβολίτες του	SPE: 100 μL πλάσμα, 1 mL (80:20) διγλωρομεθάνιο: ισοπροπανόλη με 5% NH ₄ OH	Zorbax Eclipse Plus C18 (2.1 × 50 mm, 1.8 μm) με μια αντίστοιχη προστήλη (Agilent Technologies)	8	Smith et al., 2019
21	Ολικό αίμα	Φεντανύλη και 22 ανάλογα και μεταβολίτες	LLE: 100 μL αίμα, 500 μL ακετόνη: ACN (8:2)	Acquity UPLC® BEH C18 (50 x 2.1 mm, 1.7 μm) (Waters)	8	Busardo et al., 2019
22	Ολικό αίμα	7 νέα συνθετικά οπιοειδή	SPE: 500 μL αίμα, οι όξινοι και ουδέτεροι αναλυτές εκλούστηκαν με οξικό αιθυλεστέρα. Οι βασικοί αναλύτες με διγλωρομεθάνιο/ισοπροπανόλη (80:20) με 5% NH ₄ OH	Poroshell 120 EC-C18 (100 × 2.1 mm, 2.7 μm) με προστήλη (5 × 2.1 mm, 2.7 μm) (Agilent Technologies)	11	Lowry et al., 2018
23	Πλάσμα	18 ψυχοτρόπα φάρμακα και 6 μεταβολίτες	PPT: 200 μL αίμα, 700 μL ACN	Kinetex XB-C18 (50 × 3.0 mm, 2.6 μm) (Phenomenex, Torrance, CA, USA)	11	Park et al., 2018

24	Ολικό αίμα	Κοκαΐνη και 2 μεταβολίτες της και 1 ΑΕΜΕ	LLE: 100 μ L αίμα, 1000 μ L MTBE/2-προπανόλη (70:30)	Kinetex Biphenyl (100 \times 2.1 mm, 1.7 μ m) (Phenomenex, Torrance, CA, USA)	5.1	Takitane et al., 2018
25	Ολικό αίμα	18 νέα ανάλογα και μεταβολίτες της φεντανύλης	SPE: 500 μ L αίμα, 2 mL οξικού αιθυλεστέρα/ACN/ NH ₄ OH (78:20:2)	Infinity Poroshell EC C18 (3.0 \times 150 mm, 2.7 μ m) (Agilent Santa Clara, CA)	10	Fogarty et al., 2018
26	Μετα-θανάτιο αίμα	50 NPS	SPE: 1 mL αίμα, 6 mL γλωριούχο n-βουτύλιο:οξικός αιθυλεστέρας (70:30)	Poroshell 120 EC-C18 (3 mm \times 50 mm, 2.7 μ m) (Agilent Technologies)	9	Fagiola et al., 2018
27	Ολικό αίμα	72 συνθετικά κανναβινοειδή	PPt: 200 μ L αίμα, 600 μ L ACN	Kinetex C18 2.6 μ 100 Å (100 \times 4.6 mm) (Phenomenex, Torrance, CA, USA)	16	Ambroziak, Adamowicz, 2017
28	Ολικό αίμα	9 βαρβιτουρικά	LLE: 100 μ L αίμα, 400 μ L εξάνιο-οξικός αιθυλεστέρας (1:9)	Acquity UPLC BEH C18 (2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μ m)	9	Zhang et al., 2017
29	Ορός	74 NPS	SPE: 300 μ L ορός, 100 μ L ρυθμιστικού διαλύμα: τετραϋδροφουράνιο, MeOH, H ₂ O και NH ₄ OH 25% (4:3:3:0,2), και 100 μ L NH ₄ OH 5%	Kinetex Biphenyl, 100 \times 2.1 mm, 2.6 μ m) (Phenomenex)	9.3	Lehmann et al., 2017
30	Ολικό αίμα	Κοκαΐνη και 9 μεταβολίτες της	SPE: 174 μ L αίμα, 500 μ L MeOH/H ₂ O	Atlantis T3 C18 100Å (2.1 \times 150 mm, 3 μ m)	28	Chen et al., 2017

			(95:5), 7,5% NH ₄ OH	(Waters, Milford, MA)		
31	Ολικό αίμα	2 NPS	LLE: 1 mL αίμα, 200 μL υδροξείδιο του νατρίου 0,1 M, και 5 mL χλωριούχο N-βουτύλιο	Allure PFP Propyl (50 × 2.1 mm, 5 μm) (Restek) με προστήλη (10 × 2.1 mm, 5 μm)	17	Ellefsen et al., 2017
32	Ολικό αίμα	16 NPS	SPE: 100 μL αίμα, 100 μL 10 mM HCOOH σε MeOH	Kinetex C18- XB (10 cm x 2.1 mm ID) (Phenomenex, Torrance, CA, USA)	14.5	Montesano et al., 2017
33	Ολικό αίμα	3 νέα συνθετικά οπιοειδή	SPE: 500 μL αίμα, 2 mL οξικού αιθυλεστέρα/ ACN/ NH ₄ OH (78:20:2)	Zorbax Eclipse Plus C18 column (4.6 × 100 mm, 3.5 μm) (Agilent Technologies)	10	Mohr et al., 2016
34	Ολικό αίμα	64 NPS και 5 αμφεταμίνες	PPt: 200 μL αίμα, 600 μL ACN	Zorbax Eclipse Plus C18 (2.1 × 50 mm , 1.8 μm)	15	Vaiano et al., 2016
35	Ολικό αίμα	35 εξαρτησιογόνες ουσίες και φάρμακα	PPt: 100 μL αίμα, 200 μL ACN, QuEChERS: 5 mM μυρμηκικό αμμώνιο/0,1 % μυρμηκικό οξύ	Pinnacle DB PFP Propyl, (50 × 2.1 mm, 1.9 μm) (Restek, Lisses, France)	6	Dulaurent et al., 2016
36	Ολικό αίμα	1 συνθετικό οπιοειδές	LLE: 500 μL αίμα, 4,0 mL χλωριούχου N-βουτυλίου/ ACN (4:1)	Acquity UPLC® BEH C18 (2.1 × 50 mm, 1.7 μm) (Waters, Milford, MA)	2.45	Papsun et al., 2016
37	Ολικό αίμα, πλάσμα	24 εξαρτησιογόνες και φάρμακα	LLE: 20 μL αίμα ή πλάσμα, 200 μL ACN με 0.1 % φορμικό οξύ	Hypersil Gold C18 (50 x 2.1 mm,	20	Arora et al., 2016

				1.9 μm) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)		
38	Ολικό αίμα, αποξηρα μένες κηλίδες αίματος	5 οπιοειδή	On-line DBS: 1 mL 0.1% NH ₄ OH SPE: 5 mM ammonium formate, 0.1% formic acid, MeOH	Raptor Biphenyl, 2.7 μm, 2.1 x 50 mm με προστίλη (2.1 x 5 mm, 2.7 μm) (Restek (Bellefonte, PA, USA)	3.4	Verplaets e, Henion, 2016
39	Μετα- θανάτιο αίμα	6 οπιούχα	SPE: 1 mL αίμα, 2 mL 10 mM ανθρακικού αμμωνίου, 0,5 mL MeOH: 0,5 M οξικό οξύ (9:1)	Supelguard ™ Discovery® 18 (2 cm × 4.0 mm, 5 μm) (Supelco/Sig ma-Aldrich, Bellefonte, PA, USA)	2.85	Frost et al., 2015
40	Ορός, πλάσμα	35 οπιοειδή	SPE: 200 μL αίμα, πλάσμα, 3 × 1 mL διγλωρομεθάνιο/2 -προπανόλη/ NH ₄ OH (40:10:2)	ZORBAX Eclipse Plus Phenyl- hexyl Rapid Resolution HD 2.1 × 100 mm 1.8- μ, (Agilent Technologies , Santa Clara, CA, United States)	36	Eckart et al., 2015
41	Ολικό αίμα	143 NPS	PPt: 200 μL αίμα, 600 μL ACN	Zorbax SB- C18 (2.1 x 50 mm, 1.8 μm) (Perlan Technologies , Warsaw, Poland)	14	Adamowi cz, Tokarczy k, 2015

42	Ολικό αίμα	56 NPS	SPE: 500 μ L αίμα, 2 mL διγλωρομεθάνιο/2 - προπανόλη/αμμωνία (40:10:1)	Synergi Polar-RP (100 \times 2.0 mm, 2.5 μ m) (Phenomenex, Aschaffenburg, Germany)	20	Ambach et al., 2015
43	Ολικό αίμα	78 NPS	DLLME: 500 μ L αίμα, 350 μ L χλωροφόρμιο/MeOH (1:2,5)	Kinetex C18 (100 \times 2.1 mm, 2.6 μ m) (Phenomenex, Bologna, Italy)	14	Odoardi et al., 2015
44	Ολικό αίμα, αποξηραμένες κηλίδες αίματος	8 βενζοδιαζεπίνες, επτά μεταβολίτες και ένα υπνωτικό	DBS: 30 μ L ολικού αίματος FTA DMPK C ξήρανση, 300 μ L MeOH / ACN (1:1)	Kinetex™ RP C18 (50 \times 3.0 mm, 2.6 μ m)	8	Lee et al., 2015
45	Ολικό αίμα	40 αντικαταθλιπτικά και αντιψυχωτικά	PpT: 200 μ L αίμα, 600 μ L ACN	Synergy Polar RP (100 \times 2.0 mm, 2.5 μ m) (Phenomenex, Aschaffenburg, Germany)	18	Steuer et al., 2015
46	Ολικό αίμα, πλάσμα και ορός	33 αντιψυχωτικά	LLE: 500 μ L ολικού αίματος, πλάσμα και ορού, 1 mL, αιθέρας/οξικός αιθυλεστέρας (1:1)	SunFire C18 (2.1 \times 150 mm, 3.5 μ m) (Waters, Milford, MA)	30	Montenarh et al., 2015
47	Ολικό αίμα, πλάσμα και ορός	33 αντικαταθλιπτικά	LLE: 500 μ L ολικού αίματος, πλάσμα και ορού, 1 mL, αιθέρας/οξικός αιθυλεστέρας (1:1)	SunFire C18 (2.1 \times 150 mm, 3.5 μ m) (Waters, Milford, MA)	30	Montenarh et al., 2014
48	Ολικό αίμα	132 φάρμακα	PpT: 100 μ L αίμα, 200 μ L ACN	Kinetex XB-C18 (4.6 mm - 150 mm, 5 mm) (Phenomenex)	20	Di Rago et al., 2014

				x Melbourne, Australia)		
49	Ολικό αίμα	88 ψυχοδραστικές ουσίες	LLE: 200 μ L αίμα, 400 μ L MeOH	Hypersil Gold aQ C18 (100 \times 2.1mm, 3 mm) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)	20	Sempio et al., 2014
50	Ολικό αίμα, πλάσμα και ορός	16 βενζοδιαζεπίνες και 3 υπνωτικά	LLE: 500 μ L αίμα, πλάσμα, ορός, 1 mL, αιθέρας/ οξικός αιθυλεστέρας (1:1)	SunFire C18 (2.1 \times 150 m m, 3.5 μ m) (Waters, Milford, MA)	30	Montenar h et al., 2014
51	Μετα- θανάτιο αίμα, πλάσμα και ορός	22 αντιεπιληπτικά φάρμακα	LLE: 100 μ L αίμα, 300 μ L MeOH	Gemini C18 (150 \times 2,1 mm, 5 μ m) με προστήλη C18 (4 \times 2,0 mm) (Phenomene x)	17	Deeb et al., 2014
52	Ορός	6 αντιψυχωσικά και 8 μεταβολίτες	LLE: 200 μ L ορός, 1 mL MTBE	Agilent SB C18 (2.1 \times 50 mm, 1.7 μ m) (Agilent Technologies)	6	Patteet et al., 2014
53	Πλάσμα , ορός, ολικό αίμα	10 άτυπα αντιψυχωσικά	LLE: 200 μ L αίμα, πλάσμα, ορός, 100 μ L οξικός βουτυλεστέρας: βουτανόλη (9 + 1)	Waters Spherisorb S5SCX 5 μ m sulfopropyl- modified silica 10 (100 mm \times 2.1 mm) (Hichrom, Reading, UK)	6	Fisher et al., 2013
54	Ολικό αίμα	31 παράνομες και φαρμακευτικές ουσίες	Αυτοματοποιημέν η SPE: 200 μ L αίμα, δύο aliquots των 250 μ L AcN	Acquity UPLC CSH C18 (100 \times 2.1	6.5	Bjork et al., 2013

			8 % του 25 % NH ₃ σε H ₂ O	mm, 1.7 μm) (Waters Corporation, Milford, USA)		
55	Ολικό αίμα	27 βενζοδιαζεπίνες και 3 υπνωτικά	SPE: 500 μL αίμα, 3× 1 mL ακετόνης- χλωροφορμίου (1:1) και 3× 1 mL οξικού αιθυλεστέρα με αμμωνιοποίηση 2%.	Acquity C18 (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm), με προστήλη 0.2 μm (Waters, Zellik, Belgium).	13	Verplaets e et al., 2012
56	Ολικό αίμα, πλάσμα και ορός	11 οπιούχα	LLE: 200 μL αίμα, πλάσμα, ορός, 50 μL 90:10 (%) AcN (0.1% φορμικό οξύ):H ₂ O (0.1% φορμικό οξύ)	Agilent Zorbax™ Eclipse XDB-C18 (4.6×50 mm, 1.8 μm) (Agilent, Mississauga, ON, Canada) με προστήλη 0.2 μm (Waters)	5.2	Eichhorst et al., 2012
57	Ολικό αίμα, μετα- θανάτιο αίμα	11 βενζοδιαζεπίνες	LLE με υποστήριξη ChemElut® στήλες: 500 μL αίμα, 2,5 mL μεθυλο- τριτοβουτυλαιθέρ α	Acquity UPLC BEH C18 (2.1 × 100 mm, 1.7 μm) με προστήλη Acquity UPLC BEH C18 VanGuard (2.1 × 5 mm, 1.7 μm) (Waters, Wexford, Ireland)	8	Sauve et al., 2012
58	Πλάσμα	31 νευροληπτικά, 28 βενζοδιαζεπίνες και φάρμακα Z	LLE: 500 μL πλάσμα, 600 μL οξικού βουτυλεστέρα/ οξικού	TF Hypersil GOLD Phenyl (100 × 2.1 mm, 1.9 μm)	18	Remane et al., 2011

αιθυλεστέρα (50:50)						
59	Ολικό αίμα	30 αντιψυχωτικά	LLE: 100 µL αίμα, 1 mL 1-χλωροβουτάνιο	Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6 × 150 mm, 5 µm) (Biolab, Scoresby, VIC, Australia)	20	Saar et al., 2010
60	Πλάσμα	136 εξαρτησιογόνες ουσίες και φάρμακα	LLE: 500 µL πλάσμα, 600 µL οξικού βουτυλίου/ οξικού αιθυλεστέρα (50:50)	TF Hypersil GOLD Phenyl (100 × 2.1 mm, 1.9 µm)	18	Remane et al., 2010
61	Ορός	700 εξαρτησιογόνες ουσίες και βενζοδιαζεπίνες	LLE: 1 mL ορού, 0,5 mL βορικό άλας (pH 9), 1,5 mL 1-χλωροβουτάνιο	Restek Allure PFP Propyl (50 × 2.1 mm, 5 µm) με προστήλη (10 × 2.1 mm) (Restek, Bad Homburg, Germany)	17	Dresen et al., 2010
62	Πλάσμα	5 πιπεραζίνες	PPt: 90 µL πλάσμα, 20 µL ZnSO ₄ , 100 µL MeOH	Zorbax C18 HPLC (4,6 × 150 mm, 5 µm) προστήλη (4,6 × 10, 5 µm) (Agilent Technologies)	12	Antia et al., 2010
63	Ορός	31 NPS	SPE: 1 mL ορού, 1,5 mL διχλωρομεθάνιο/ι σοπροπανόλη/ 25% αμμωνία (80:20:2)	Synergi Polar RP (150 × 2 mm, 4 µm) με προστήλη (Polar RP 4 mm × 2.0 mm)	15	Wohlfart h et al., 2010

						(Phenomene x)
64	Ολικό αίμα	1 οπιοειδές και ο κύριος μεταβολίτης του	SPE: 1 mL αίμα, 2 mL MeOH, 2 mL H ₂ O, 1 mL 0.1 M ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 6	Acquity C18 (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm) (Waters Zellik, Belgium)	6	Verplaets e, Tytgat, 2010
65	Ορός	19 εξαρτησιογόνες και φάρμακα	PpT: 100μL ορός, 200 μL MeOH: θειικό ψευδάργυρο, (0.1 M) (4:1), Online εκχύλιση	Allure PFP (30×2.1 mm, 3 μm) (Restek, Germany)	23	Bouzas et al., 2009
66	Πλάσμα	43 βενζοδιαζεπίνες και μεταβολίτες, ζολπιδέμη, ζοπικλόνη	SPE: 1 mL πλάσμα, 300 μL οξικό οξύ (pH 5), 1 mL H ₂ O, χρήση στήλης μικροσωματιδίων Focus TM	Acquity UPLC [®] BEH C18 (100 × 2.1 mm, 1.7 μm) με προστήλη (5 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) (Waters, MA, USA)	17	Ishida et al., 2009
67	Μετα- θανάτιο αίμα	25 οπιοειδή	LLE: 1 mL αίμα, 600 μL οξικό βουτυλεστέρας, pH 7,0	Gemini C18 (100 × 2.0 mm, 3 μm) με προστήλη (4.0 mm × 2.0 mm) (Phenomene x, Torrance, CA, USA)	24	Gergov et al., 2009
68	Πλάσμα , ορός	13 βενζοδιαζεπίνες	SPE: 1 mL πλάσμα, ορός, 2 mL 0,1 M οξικό νάτριο, pH 5,0	XTerra [®] MS C18 (2.1 × 150 mm, 3.5- μm) (Waters, MA, USA)	9.5	Marin et al., 2008
69	Ολικό αίμα, πλάσμα και ορός	6 οπιούχα	SPE: 1mL αίμα, πλάσμα, ορό, 70:25:5 οξικό αιθυλεστέρα/ ισοπροπανόλη/ NH ₄ OH	Nova-Pak CN HP (3,9 x 100 mm,4 μm) (Waters, MA, USA)	10	Coles et al., 2007
70	Πλάσμα	11 οπιοειδή και 5 μεταβολίτες τους	SPE: 1 mL πλάσμα, 0,4 mL MeOH για τις	Synergi MAX-RP C12 (150 × 2	35	Musshoff et al., 2006

			λιγότερο βασικές ενώσεις, 0,4 mL MeOH /οξικό οξύ (9:1) για τις ισχυρότερες	mm, 4 μm) (Phenomene x)		
71	Ολικό αίμα	26 βενζοδιαζεπίνες, μεταβολίτες και 2 υπνωτικά	LLE: 250 μL αίμα, 500 μL 1 - χλωροβουτανίου, χλωριούχο αμμώνιο (pH9,2)	XTerra MS C18 (150- x 2.1-mm, 3.5 μm) (Waters)	35	Laloup et al., 2005
72	Ορός	301 εξαρτησιογόνες και φάρμακα	LLE (βασικές ουσίες): 1 mL ορός, 500 μL οξικός βουτυλεστέρας LLE (όξινες/ ουδέτερες ουσίες): 1 mL ορός, 5 mL διγλωρομεθάνιο/2 προπανόλη (95:5) SPE (όξινες/ ουδέτερες): 1 mL ορός, 1,5 mL ακετόνη/διγλωρο μεθάνιο (1:1) SPE (βασικές): 1,5 mL διγλωρομεθάνιο/ι σοπροπανόλη/ 25% υδατικό αμμώνιο (80:20:2)	Synergi Polar RP (150 x 2mm, 4mm) με προστήλη (4 x 2mm) (Phenomene x, Germany)	10	Mueller et al., 2005

Στον Πίνακα 2, παρουσιάζονται δημοσιευμένες μέθοδοι προσδιορισμού ενώσεων σε σίελα με χρήση LC-MS/MS. Είναι προφανές, ότι οι μελέτες στα σίελα είναι αριθμητικά λιγότερες (Πίνακας 2) σε σχέση με τις μελέτες στο αίμα (Πίνακας 1).

Υπάρχουν μελέτες που περιγράφουν την ταυτόχρονη ανίχνευση βενζοδιαζεπινών (Moore et al., 2007) ή σε συνδυασμό τους με υπνωτικά (Jang et al., 2013). Ενώ άλλες εργασίες έχουν αναφέρει τον ταυτόχρονο προσδιορισμό πολλών κατηγοριών εξαρτησιογόνων ουσιών συμπεριλαμβανομένων των αμφεταμινών, της κοκαΐνης, της κάνναβης, των οπιοειδών, των αντικαταθλιπτικών και των βενζοδιαζεπινών (Concheiro et al., 2008, Zancanaro et al., 2012, Valen et al., 2016, Bassotti et al., 2020, Desharnais et al., 2020).

Παρατηρείται πως από το 2017 και έπειτα τα σίελα άρχισαν να χρησιμοποιούνται ως βιολογικό υλικό για την ανίχνευση NPS. Υπάρχουν μελέτες (1, 2) που περιγράφουν μέθοδο ανίχνευσης για μια κατηγορία NPS, π.χ. συνθετικά παραισθησιογόνα (Lesne et al., 2023), ή συνθετικό οπιοειδές (Florou et al., 2022). Αλλά και μελέτες (4, 8) που ασχολούνται με την ανίχνευση διαφόρων κατηγοριών NPS π.χ. συνθετικά κανναβινοειδή και παράγωγα καθινόνης (Cooman et al., 2020), συνθετικές καθινόνες, πιπεραζίνες, φαινεθυλαμίνες, συνθετικά κανναβινοειδή και οι μεταβολίτες τους (Rocchi et al., 2017). Αρκετές εργασίες (3, 10) αναφέρουν την ταυτόχρονη ανίχνευση NPS και άλλων φαρμάκων/ουσιών στα σίελα. Συγκεκριμένα, η εργασία 3, ανέφερε τον προσδιορισμό 104 εξαρτησιογόνων και NPS, συμπεριλαμβανομένων συνθετικών κανναβινοειδών, συνθετικών καθινόνων, αναλόγων φαιντανύλης, φαινεθυλαμινών και εξαρτησιογόνων ουσιών (THC, MDMA, LSD και οι μεταβολίτες τους) (Da Cunha et al., 2020). Ενώ η μελέτη 10, περιέγραψε τον ταυτόχρονο προσδιορισμό 20 εξαρτησιογόνων ουσιών (κοκαΐνης, αμφεταμίνες) και συνθετικών οπιοειδών και παραισθησιογόνων (Montesano et al., 2015).

Από τις 14 εργασίες, οι μισές έχουν εφαρμόσει την μέθοδο σε πραγματικά δείγματα (Zancanaro et al., 2012, Jang et al., 2013, Montesano et al., 2015, Valen et al., 2016, Grabenauer et al., 2018, Da Cunha et al., 2020, Bassotti et al., 2020). Στη Βραζιλία, σε μια ενδιαφέρουσα εφαρμογή σε 2235 πραγματικά περιστατικά, περίπου το 10% αυτών ήταν θετικά (\geq LOD) σε τουλάχιστον μία αναλυόμενη ουσία.

Πίνακας 2: Μέθοδοι και συνθήκες ανάλυσης σιέλων

A/A	Δείγμα	Ουσίες	Προκατεργασία	Στήλες	Χρόνος ανάλυσης (λεπτά)	Αναφορά
1	Σιέλα	28 συνθετικά παραισθησι ογόνα	MEPS: 100 μ L σιέλα (pH 7), 50 μ L MeOH	PLRP-S 300 Å (150.0 \times 1.0 mm, 5 μ m) (Varian, Palo Alto, CA, USA)	20	Lesne et al., 2023
2	Σιέλα	1 NPS	FPSE: 1 mL σιέλα, 100 μ L ACN, φίλτρο υαλοϊνών (FG) επικαλυμμένο με PEG300, 150 μ L MeOH	Accupore C18 (50 mm \times 3 mm, 2.6 μ m) με προστήλη (2.1 mm \times 0.2 μ m) (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)	6.5	Florou et al., 2022
3	Σιέλα	104 NPS και εξαρτησιογ όνες ουσίες	LLE: 500 μ L σιέλα, 500- μ L κορεσμένου υδατικού διαλύματος τετραβορικού νατρίου και 2-mL MTBE	Raptor™ (100 \times 2.1 mm, 2.7 μ m) (Restek, Bellefonte, PA, USA)	13.5	Da Cunha et al., 2020
4	Σιέλα	24 NPS	SPE: 100 μ L, 1 mL MeOH, 1 mL 1- βουτανόλη: χλωριούχο μεθυλένιο: οξικό οξύ (24,5:75:0,5) και 1 mL NH ₄ OH: NH ₄ OH (98:2).	Zorbax Eclipse Plus C18 (3.0 mm \times 50 mm, 1.8 μ m) (Agilent Technologies)	13	Cooman et al., 2020
5	Σιέλα	17 εξαρτησιογ όνες ουσίες	"dilute-and-shot": 200 μ L αραιωμένα σιέλα	Hypersil PFP Gold (50 \times 2.1 mm, 1.9 μ m) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts)	12	Bassotti et al., 2020
6	Σιέλα	92 εξαρτησιογ όνες ουσίες	PPT: 1 mL σιέλα, 4.5 mL ακετόνη: ACN (30:70)	Zorbax Eclipse Plus C18 (2.1 \times 100 mm, 3.5 μ m) (Agilent)	13	Desharnai s et al., 2020

7	Σίελα	7 οπιοειδή	SPE: 750 μ L σίελα, 2 ml διχλωρομεθάνιο: MeOH: NH ₄ OH (78:20:2)	Poroshell 120 SB-C18 (2.1 \times 100 mm, 2.7 μ m) (Agilent Technologies)	7.1	Grabena er et al., 2018
8	Σίελα	31 NPS	PPT: 90 mL σίελα, 30 μ L MeOH MEPS C18: 100 μ L MeOH 10mM HCOOH	Kinetex C18 με προστήλη (2.1 \times 100 mm, 1.7 μ m) (Phenomenex, Torrance, CA, USA)	12.4	Rocchi et al., 2017
9	Σίελα	21 εξαρτησιογ όνες ουσίες	SLE: 180 μ L σίελα, 700 μ L οξικό αιθυλεστέρα/επτά νιο (4:1)	Acquity UPLC® BEH C18 (2.1 x 50 mm, 1.7 μ m) με προστήλη (Acquity UPLC BEH C18 2.1 x 5 mm, 1.7 μ m) (Waters, Wexford, Ireland)	7.1	Valen et al., 2016
10	Σίελα	20 εξαρτησιογ όνες ουσίες	MEPS C18: 120 μ L σίελα, 100 μ L 5 mM μυρμηκικού οξέος σε MeOH	PFP Kinetex (2,1 \times 100 mm, 2,6 μ m) (Phenomenex) με προστήλη GuardUltra Cartridge (PFP)	12.5	Montesan o et al., 2015
11	Σίελα	25 βενζοδιαζε πίνες και η ζολπιδέμη	LLE: 1 mL, 8 ml οξικού αιθυλεστέρα	Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6 mm \times 150 mm, 5 μ m) (Agilent Technologies)	15	Jang et al., 2013
12	Σίελα	32 συνταγογρ αφούμενες και ψυχοδραστι κές ουσίες	LLE: 500 μ L σίελα, 1.3 mL οξικός αιθυλεστέρας:εξά νιο (4:3)	Luna® C18 (150 mm \times 2.0 mm, 5 μ m) (Phenomenex, Torrance, USA)	22	Zancanar o et al., 2012
13	Σίελα	22 παράνομες και φαρμακευτι κές ουσίες και οι	SPE: 500 μ L σίελα, 2 mL διχλωρομεθάνιο:2 -προπανόλη (75:25)	Atlantis C18 (50 \times 2.1 mm, 3 μ m) (Waters, Milford, MA, USA)	12	Concheir o et al., 2008

μεταβολίτες ς τους						
14	Σίελα	14 βενζοδιαζε πίνες	SPE: 1 mL σίελα, (2 mL) οξικό άλας και 2% NH ₄ OH	Zorbax Eclipse XDB C18 (4.6 x 50 mm x 1.8 µm) (Agilent Technologies)	10	Moore et al., 2007

1.4.3 Προκατεργασία βιολογικών υλικών για LC-MS/MS

Η προκατεργασία δειγμάτων είναι ένα σημαντικό και αναπόφευκτο βήμα στη ροή της τοξικολογικής ανάλυσης, καθώς όλα σχεδόν τα βιολογικά υλικά δεν μπορούν να αναλυθούν απευθείας από τα αντίστοιχα αναλυτικά όργανα. Η συλλογή και η προετοιμασία τους απαιτεί περισσότερο από το 80% του χρόνου της αναλυτικής διαδικασίας και επηρεάζει την αποτελεσματικότητα και την απόδοσή της (Zilfidou et al., 2018).

Η προαναλυτική επεξεργασία βιολογικών δειγμάτων περιλαμβάνει τον καθαρισμό και την απομόνωση του αναλύτη μέσω αραίωσης, διήθησης, καταβύθισης πρωτεϊνών, εκχύλισης ή και συνδυασμό αυτών (Bylda et al., 2014). Ουσιαστικά, η προετοιμασία του δείγματος στοχεύει στη διάλυση και την ομογενοποίηση των αναλυτών, στη διάσπαση των πρωτεϊνικών δεσμών, στην προσθήκη εσωτερικού προτύπου και στην αφαίρεση των παρεμποδίσεων του υποστρώματος (Flanagan et al., 2008).

Η επιλογή της ιδανικής τεχνικής προεπεξεργασίας δειγμάτων επηρεάζεται από παράγοντες όπως τα χημικά χαρακτηριστικά της αναλύμενης ουσίας (π.χ. πολικότητα, φορτίο, θερμική σταθερότητα, μοριακό βάρος), την συγκέντρωσή της, τις αναλυτικές προκλήσεις, καθώς και τον διαθέσιμο εργαστηριακό εξοπλισμό.

Αναφορικά με τις εκχυλίσεις για τον προσδιορισμό εξαρτησιογόνων ουσιών εφαρμόζονται μια πληθώρα τεχνικών και αναλύονται με αέρια ή με υγρή χρωματογραφία συζευγμένες με φασματομετρία μάζας, όπως: η εκχύλιση στερεής φάσης (Solid Phase Extraction, SPE) (Papoutsis et al. 2012), η μικροεκχύλιση στερεής φάσης (Solid Phase MicroExtraction, SPME) (Chaves et al. 2009), η εκχύλιση υγρού-υγρού με εξαλάτωση (Salting-out Assisted Liquid-Liquid Extraction, SALLE) (Tang & Weng, 2013), η εκχύλιση στερεού/υγρού (Solid/Liquid Extraction, SLE) (Rositano et al., 2016), η υγρή-υγρή εκχύλιση (Liquid-Liquid Extraction, LLE) (Amundsen et al., 2013), η εκχύλιση μέσω προσρόφησης σε δίκτυο επικαλυμμένων ινών (Fabric Phase Sorptive Extraction, FPSE) (Florou et al., 2022), η εκχύλιση με προσροφητική ράβδο ανάδευσης (SBSE-Stir Bar Sorptive Extraction) (Bazhdanzadeh et al., 2011), η εκχύλιση με περιστρεφόμενη στήλη μονόλιθου (Manousi et al., 2020), η μικροεκχύλιση με πακτωμένο προσροφητικό υλικό (MicroExtraction by Packed Sorbent, MEPS) (Mandrioli et al., 2011), η εκχύλιση QuEChERS (Alves et al., 2017), και η μικροεκχύλιση υγρού-υγρού με διασπορά (Dispersive Liquid-Liquid Microextraction, DLLME) (Xiong et al., 2009).

Οι τεχνικές εκχύλισης ταξινομήθηκαν σε συμβατικές τεχνικές (εκχύλιση Soxhlet, αφέψημα, εκχύλιση, υδροαπόσταξη και απόσταξη με ατμό) και σε μη συμβατικές τεχνικές εκχύλισης (εκχύλιση με τη βοήθεια υπερήχων, εκχύλιση με τη βοήθεια μικροκυμάτων, εκχύλιση με παλμικό ηλεκτρικό πεδίο, εκχύλιση με υπερκρίσιμα υγρά και εκχύλιση με τη βοήθεια ενζύμων).

Παρακάτω αναφέρονται οι μέθοδοι προκατεργασίας που χρησιμοποιήθηκαν ανά εργασία στους Πίνακες 1 και 2. Παρατηρείται πως η πλειονότητα των μελετών (25) που παρουσιάζονται στον Πίνακα 1, χρησιμοποιούν ως μέθοδο προκατεργασία αίματος την εκχύλιση LLE. Ενώ, αρκετές μελέτες χρησιμοποιούν την εκχύλιση SPE (23), ή την PPT (15), και πιο λίγες μελέτες, άλλες μεθόδους (3 QUECHERS και 1 DLLME) ή και συνδυασμό αυτών (PPT & QUECHERS, PPT & SPE, LLE & SPE). Υπάρχουν δύο ενδιαφέρουσες μελέτες που περιγράφουν την εκχύλιση με ξηρή κηλίδα αίματος (Dried Blood Spot, DBS), που χρησιμοποιεί χαμηλό όγκο αίματος (λιγότερο από 50 μL) και μικρό χρόνο ανάλυσης. Έπειτα, όπως φαίνεται στον Πίνακα 2, χρησιμοποιούνται διαφορετικές μέθοδοι προκατεργασίας σιέλων, με την εκχύλιση SPE, LLE και MEPS, να επικρατούν στις περισσότερες μελέτες. Αναφορικά με τις στήλες διαχωρισμού, παρατηρείται ότι οι C18, χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο σε τέτοιου είδους αναλύσεις.

1.4.3.1 Υγρή-υγρή εκχύλιση (Liquid-Liquid Extraction, LLE)

Η εκχύλιση υγρού-υγρού (LLE) αποτελεί εδώ και δεκαετίες μια βασική μέθοδο για την προετοιμασία βιολογικών δειγμάτων (Ashri, Abdel-Rehim, 2011). Στη παρούσα διατριβή η LLE χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση των 92 μελετώμενων ουσιών σε ολικό αίμα.

Η τεχνική της εκχύλισης υγρού-υγρού περιλαμβάνει τον διαχωρισμό της διαλυμένης ουσίας σε δύο υγρά είτε μερικώς είτε αμιγώς μη αναμείξιμα. Η ουσία κατανέμεται μεταξύ δύο φάσεων με ορισμένη αναλογία. Στο στάδιο αυτό λαμβάνουν χώρα κάποιες αλληλεπιδράσεις (υδροφοβικές, διασποράς, διπολικές, δεσμών υδρογόνου) μεταξύ αναλυτών και μορίων διαλύτη. Έτσι, ενώ η έντονη ανάμιξη ευνοεί τη μεταφορά του εκχυλίσματος από τον ένα διαλύτη στον άλλο, μπορεί να επηρεάσει την ευκολία του διαχωρισμού φάσεων με το σχηματισμό γαλακτωμάτων και τον αφρισμό (Berk, 2018). Για την αντιμετώπιση των προβλημάτων αυτών προτείνεται η εφαρμογή φυγοκέντρωσης, η προσθήκη ουδέτερων αλάτων ή μικρής ποσότητας μεθανόλης. Μερικές φορές, τα γαλακτώματα χρειάζονται επιπλέον χρόνο και προσπάθεια για να απομακρυνθούν, μειώνοντας την εργαστηριακή αποτελεσματικότητα. Μετά την εκχύλιση, για να ληφθεί ένα εντελώς καθαρό εκχύλισμα, το νερό πρέπει να αφαιρεθεί από την οργανική φάση. Η εκχυλισμένη ένωση απομακρύνεται από την οργανική στοιβάδα, μέσω ξήρασης με εξάτμιση, από ρεύμα πεπιεσμένου αέρα ή αζώτου, και στη συνέχεια επαναδιαλύεται σε κατάλληλο, για τον αναλυτικό εξοπλισμό, διαλύτη (Berk, 2018).

Η μέθοδος προσφέρει αποτελεσματικό καθαρισμό και απομόνωση του επιθυμητού διαλύτη, ειδικά για δείγματα που περιλαμβάνουν μακρομόρια και άλατα (Ashri, Abdel-Rehim, 2011). Ωστόσο, υπάρχει πιθανότητα να συνεκχυλίσουν μαζί με τους αναλυτές και άλλες ενώσεις με παρόμοιες ιδιότητες (π.χ. οργανικοί διαλυτές και μη υπερβολικά πολικές ενώσεις

μετακινούνται στο οργανικό στρώμα) (Θεοδωρίδης, 2015^α). Η εκχύλιση των ενώσεων εξαρτάται καθαρά από τα χαρακτηριστικά του διαλύτη, όπως η αναμιξιμότητα, η πυκνότητα και η διαλυτότητα (Subramanian et al., 2023). Η προσεκτική επιλογή των διαλυτών εκχύλισης είναι απαραίτητη για την ελαχιστοποίηση των παρεμβολών του υποστρώματος. Η πυκνότητα των διαλυτών διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον διαχωρισμό των φάσεων. Διαλύτες με μικρότερη πυκνότητα από εκείνη του νερού (1.00 g/mL) διαχωρίζονται ως άνω φάση, ενώ με μεγαλύτερη ως κάτω φάση (Negrusz, Cooper, 2013). Ένας άλλος σημαντικός παράγοντας για την επιτυχή εφαρμογή της LLE είναι το pH του δείγματος, καθώς καθορίζει το είδος των ουσιών (όξινες, ουδέτερες ή βασικές). Το pH του υδατικού υποστρώματος πρέπει να ρυθμιστεί κατά δύο μονάδες υψηλότερα από το pKa ενός βασικού αναλύτη ή κατά δύο μονάδες χαμηλότερα από το pKa ενός όξινου αναλύτη (Kyle, 2017).

Η LLE είναι μια βασική μέθοδος εκχύλισης στα αναλυτικά εργαστήρια, στην βιομηχανία τροφίμων, τη φαρμακευτική βιομηχανία και την υδρομεταλλουργία, λόγω της ευκολίας και απλότητας στη χρήση. Οι εφαρμογές της στα τρόφιμα περιορίζονται σε μεμονωμένες περιπτώσεις, όπως η παραγωγή αιθέριου ελαίου εσπεριδοειδών "χωρίς τερπένιο" με εκχύλιση των οξυγονωμένων ενώσεων του αιθέριου ελαίου με υδατική αιθανόλη (Berk, 2018).

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

Το 2014, οι Kabir και Furton (Kabir, Furton, 2014) ανέπτυξαν μια νέα, πολλά υποσχόμενη και αποτελεσματική πράσινη τεχνική εκχύλισης, μέσω προσρόφησης σε δίκτυο επικαλυμμένων ινών (Fabric Phase Sorptive Extraction, FPSE), για την προετοιμασία δειγμάτων. Το FPSE συνδυάζει την εκχύλιση της SPME/SPE σε μια ενιαία τεχνολογική πλατφόρμα.

Αυτή η νέα μέθοδος χρησιμοποιεί ένα φυσικό ή τεχνητό διαπερατό και εύκαμπτο υπόστρωμα (δίκτυο ινών) ως μέσο εκχύλισης, πάνω στο οποίο ένα υβριδικό οργανικό-ανόργανο διάλυμα κολλοειδούς γέλης (sol-gel) επικαλύπτεται χημικά με ένα απίστευτα λεπτό στρώμα (Kabir et al., 2013, Zilfidou et al., 2018). Η τεχνολογία sol-gel συνθέτει ανόργανα πολυμερή και υβριδικά προϊόντα με διάφορες ιδιότητες, όπως σταθερότητα, ομοιογένεια, καθαρότητα, και επιλεκτικότητα, επιτρέποντας ισχυρή συγκράτηση της επικάλυψης και μειωμένο χρόνο εκχύλισης (Kabir et al., 2013, Kazantzi, Anthemidis, 2017). Η δυνατότητα χρήσης διαφορετικών sol-gel επικαλύψεων οδηγεί στην προσρόφηση ουσιών με διαφορετικά χαρακτηριστικά, γεγονός που αποτελεί βασικό πλεονέκτημα αυτής της εκχύλισης (Ruan et al., 2020). Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής η FPSE εφαρμόστηκε σε σίελα για τον προσδιορισμό του συνθετικού οπιοειδούς βρωφίνης.

i. Προετοιμασία sol-gel και φίλτρου

Η επιλογή του υποστρώματος για την τεχνολογία sol-gel εξαρτάται από την πολικότητα της ουσίας. Ο πολυεστέρας προτιμάται για μη πολικές ουσίες, ενώ η κυτταρίνη για πολικές ή μέτρια πολικές ουσίες. Απαιτείται ένα υπόστρωμα με λειτουργικές ομάδες υδροξυλίου και διαπερατότητα για την αποτελεσματική εκχύλιση των αναλυτών από ένα υδατικό δείγμα,

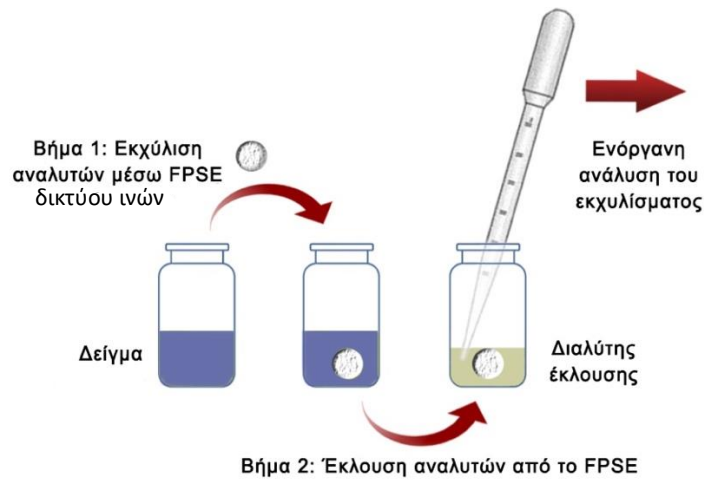
ακολουθούμενη από προεπεξεργασία για την απομάκρυνση των υπολειπόμενων χημικών ουσιών. Η διαδικασία προετοιμασίας sol-gel διαλύματος, περιλαμβάνει την επικάλυψη ενός υποστρώματος/φίλτρου, το οποίο περιέχει ανόργανες ή οργανικές τροποποιημένες πρόδρομες ουσίες, ένα ενεργό ανόργανο ή οργανικό πολυμερές, έναν όξινο καταλύτη και νερό για υδρόλυση. Τα πιο γνωστά πολυμερή είναι το πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο (PDMS) και η πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG). Η PEG επιλέγεται για την εκχύλιση πιο πολικών ενώσεων όπως φαρμακευτικά προϊόντα (Racamonde et al., 2015, Santana-Viera et al., 2017, Kalaboka et al., 2020), ζιζανιοκτόνα τριαζίνης (Roldán-Pijuán et al., 2015) ή εντομοκτόνα (Manousi et al., 2020). Αναφορικά με τους καταλύτες συνήθως χρησιμοποιούνται το τριφθοραιθανικό οξύ (TFA), το υδροχλώριο, το οξικό οξύ, το υδροφθορικό οξύ και το οξαλικό οξύ. Η επιλογή της πρόδρομης ουσίας και του πολυμερούς, σε συνδυασμό με τη χημεία της επιφάνειας του υποστρώματος, επηρεάζει σημαντικά την εκλεκτικότητα και την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης. Όσον αφορά το μέγεθος του «ύφασμάτινου μέσου», αυτό είναι συνήθως 2,5 cm × 2 cm (Celeiro et al., 2020), και οι δύο πλευρές εκτίθενται στους αναλυτές στόχους. Σε ορισμένες περιπτώσεις το μέγεθος του υφάσματος είναι μικρότερο για μικρότερους όγκους δειγμάτων (1 cm × 1.5 cm) (Gülle et al., 2019, Ulusoy et al., 2020). Ωστόσο, μελέτες έχουν δείξει πως οι μεγαλύτεροι όγκοι διαλύτη μπορεί να προκαλέσουν αραίωση του αναλύτη και η απόδοση της εκχύλισης να μειωθεί, καθώς αυξανόταν ο όγκος του δείγματος, γεγονός που αποδόθηκε στον ανεπαρκή χρόνο επαφής του ροφητικού, συνεπώς ο όγκος πρέπει να διατηρείται χαμηλός (Gouma et al., 2020, Kabir, Samanidou, 2021).

ii. Αντιδράσεις sol-gel

Η διαδικασία FPSE περιλαμβάνει την καταλυτική υδρόλυση των πρόδρομων μορίων sol-gel, την πολυσυμπύκνωση των πρόδρομων μορίων, την τυχαία ενσωμάτωση ενεργού οργανικού πολυμερούς και την ακινητοποίηση του αναπτυσσόμενου δικτύου sol-gel στην επιφάνεια του υποστρώματος. Η κυτταρίνη, ένα υδρόφιλο γραμμικό πολυμερές, είναι ένα υποσχόμενο υπόστρωμα για επικάλυψη κολλοειδούς γέλης λόγω της διαπερατότητάς της και των λειτουργικών ομάδων υδροξυλίου, οι οποίες συμβάλλουν στο σχηματισμό ενός χημικά συνδεδεμένου στρώματος απορροφητικού υλικού (Kabir et al., 2017).

iii. Διαδικασία εκχύλισης μέσω προσρόφησης σε δίκτυο επικαλυμμένων ινών

Η διαδικασία εκχύλισης περιλαμβάνει την εμβάπτιση του δικτύου ινών («ύφασμα») σε ένα γυάλινο φιαλίδιο που περιέχει το διάλυμα δείγματος με τους αναλύτες, αναδεύεται χρησιμοποιώντας εξωτερικές συσκευές όπως μαγνητική ανάδευση ή λουτρά υπερήχων για ταχύτερη διάχυση. Μετά την αποκατάσταση της ισορροπίας προσρόφησης, το «ύφασμα» απομακρύνεται και εκλούεται με τις ενώσεις-στόχους, παρέχοντας υψηλό συντελεστή προσυγκέντρωσης (Kabir et al., 2017, Kazantzi, Anthemidis, 2017).



Σχήμα 5: Σχηματική απεικόνιση της εκχύλισης FPSE

Δεδομένου ότι ξεπερνά τα περισσότερα από τα μειονεκτήματα που σχετίζονται με άλλες τεχνικές μικροεκχύλισης (Fontanals et al., 2023), η εκχύλιση FPSE έχει εφαρμοστεί αποτελεσματικά για τον προσδιορισμό διαφόρων οργανικών και ανόργανων αναλυτών σε διάφορους τύπους περιβαλλοντικών και βιολογικών δειγμάτων σε αναλυτικά, περιβαλλοντικά και τοξικολογικά εργαστήρια (Kazantzi, Anthemidis, 2017). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η επιτυχημένη εφαρμογή της FPSE στην εκχύλιση πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων από δείγματα νερού (Saini et al., 2017), καθώς και στην ανάλυση εξαρτησιογόνων ουσιών (Fontanals et al., 2023) και NPS (Florou et al., 2022).

1.4.4 Αναλυτικές τεχνικές προσδιορισμού ανίχνευσης ουσιών

Στην Δικαστική Τοξικολογία για τον προσδιορισμό εξαρτησιογόνων ουσιών και φαρμάκων, μέγιστης σημασίας, εκτός από την επεξεργασία του δείγματος, είναι:

- α) ο προσδιορισμός των συστατικών του εκχυλίσματος με σύγχρονες τεχνικές διαχωρισμού αέριας και υγρής χρωματογραφίας, και
- β) η ανίχνευση τους με διαφορετικούς ανιχνευτές.

1.4.4.1 Υγρή Χρωματογραφία (Liquid Chromatography, LC)

Η υγρή χρωματογραφία αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική διαχωρισμού ουσιών και ποσοτικού προσδιορισμού, σε ένα εύλογο χρονικό διάστημα (Skoog et al., 2007).

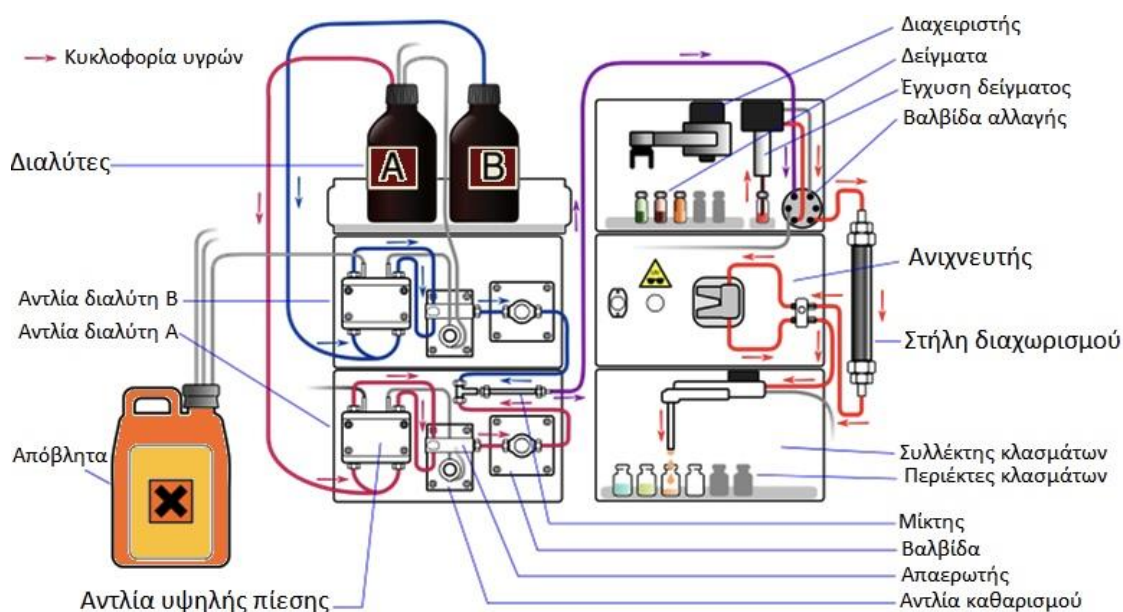
Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), που παρουσιάστηκε για πρώτη φορά το 1969, αποτελεί αξιολογότερη τεχνική υγρής χρωματογραφίας κατά την οποία, η κινητή υγρή φάση, υπόκειται σε ελεγχόμενη πίεση, διασχίζει μια στήλη που περιέχει τη στατική φάση, η οποία μπορεί να είναι είτε στερεή, είτε υγρή, ενωμένη χημικά σε στερεό υπόστρωμα (Michaelis et al., 1973). Η HPLC έχει γνωρίσει σημαντική ανάπτυξη τα τελευταία χρόνια, συμπεριλαμβανομένων των αλλαγών στο υλικό πλήρωσης της στήλης, τον διαχωρισμό υψηλής ταχύτητας, τη βελτιστοποίηση του λογισμικού, τη αυξημένη ευαισθησία και την ευελιξία της σε διάφορα βιολογικά υποστρώματα (Negrusz, Cooper, 2013). Υπάρχουν διάφοροι τύποι HPLC ανάλογα με τον μηχανισμό διαχωρισμού και το είδος της στατικής φάσης, όπως η χρωματογραφία προσρόφησης, η κατανομής στήλης, η μοριακού αποκλεισμού, η ιοντοανταλλαγής, ζεύγους ιόντων και συγγένειας (Skoog et al., 2007).

Βάσει της πολικότητας της κινητής και της στατικής φάσης διακρίνονται δύο τύποι χρωματογραφίας προσρόφησης, η 1) Χρωματογραφία Κανονικής Φάσης και η 2) Χρωματογραφία Αντίστροφης Φάσης (Ahmed et al., 2023), αναλυτικά:

- 1) Η HPLC κανονικής φάσης (NP-HPLC) χρησιμοποιεί οξείδιο του πυριτίου (SiO_2) ή αργιλίου (Al_2O_3) ως πληρωτικό υλικό, που είναι πολικό λόγω των ομάδων υδροξυλίου που περιέχει. Ως κινητή φάση χρησιμοποιούνται μη πολικοί διαλύτες (π.χ. εξάνιο). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ισχυρότερη αλληλεπίδραση των πολικών ενώσεων με τη πολική στατική φάση, σε αντίθεση με τις λιγότερο πολικές ενώσεις οι οποίες διασχίζουν ταχύτερα τη στήλη και εκλούνται νωρίτερα (Sarker, Nahar et al., 2015).
- 2) Στην HPLC αντίστροφης φάσης (Reversed Phase, RP), που χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα διατριβή, η στατική φάση αποτελείται από οξείδιο του πυριτίου συζευγμένο με διάφορες ομάδες (π.χ. αλκύλια C18, φαινύλιο, αμινομάδες, κυανομάδες κ.λπ.) που προσδίδουν ένα μη πολικό χαρακτήρα (υδρόφοβη). Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται μέσω υδρόφοβης προσρόφησης στην υδρόφοβη στατική φάση. Τα μη πολικά μόρια προσροφώνται ισχυρότερα στις αλυσίδες υδρογονανθράκων (μεγαλύτερη χρονικά αλληλεπίδραση με τη στατική φάση), ενώ τα πολικά μόρια κινούνται ταχύτερα και η έκλουση πραγματοποιείται νωρίτερα (Dorsey, Dill, 1989, Zuvella et al., 2019).

Οργανολογία του συστήματος HPLC

Αναφορικά με την κλασσική διάταξη μιας υγρής χρωματογραφίας, ένα σύστημα HPLC αποτελείται από φιάλες αποθήκευσης διαλυτών των δύο φάσεων, έναν απαερωτή, μια αντλία υψηλής πίεσης, ένα σύστημα εισαγωγής δειγμάτων (χειροκίνητος ή αυτόματος), το θερμοστατούμενο θάλαμο που περιέχει την χρωματογραφική στήλη και την προστήλη, έναν ανιχνευτή, τον καταγραφέα και την δεξαμενή αποβλήτων (Bélanger et al., 1997, Ahmed et al., 2023) (Σχήμα 6).



Σχήμα 6: Αναλυτική σχηματική απεικόνιση διάταξης HPLC (Wikipedia, 2024)

Αναλυτικά:

A. Η υγρή χρωματογραφία περιλαμβάνει την **κινητή φάση** (ρυθμιστικό, υδατικό διάλυμα-νερό) και την **στατική φάση** (οργανικοί διαλύτες) που διατηρούνται σε δοχεία. Η συγγένεια των συστατικών με την κινητή και την στατική φάση διαφέρει (βαθμός προσρόφησης, διαλυτότητας, ιοντισμού, κ.λπ.) μεταξύ των ουσιών και εξασφαλίζει τον διαχωρισμό. Ο έλεγχος του pH της κινητής φάσης είναι άκρως σημαντικός για την ανάλυση των ιοντιζόμενων συστατικών, καθώς μικρές αλλαγές μπορεί να επηρεάσουν τη συγκράτηση και την εκλεκτικότητά τους. Το pH της κινητής φάσης θα πρέπει να καθορίζεται μεταξύ ± 1 μονάδων της τιμής pK_a του οξέος που χρησιμοποιείται για τη δημιουργία του ρυθμιστικού διαλύματος (Douglas et al., 2007). Οι ουσίες μεταφέρονται με την κινητή φάση, με διαφορετικές ταχύτητες, προκειμένου να διαχωριστούν μέσω της στατικής φάσης. Το μήκος και το πληρωτικό υλικό της στήλης, η θερμοκρασία, η ροή και κυρίως η σύσταση της κινητής φάσης επηρεάζει τον βαθμό διαχωρισμού (Ardrey, 2003).

B. Η ποιότητα και η καθαρότητα των διαλυτών είναι ζωτικής σημασίας για την απόδοση, καθώς οι αδιάλυτες προσμίξεις μπορούν να προκαλέσουν θόρυβο, επιπλέον κορυφές και αλλαγές στο χρόνο κατακράτησης (Retention Time, tR). Επίσης, οι φυσαλίδες από αέρα που

δυναμικά εμφανίζονται στα κανάλια της κινητής φάσης μπορούν να μειώσουν την απόδοση του χρωματογραφικού διαχωρισμού, απαιτώντας σύγχρονα συστήματα HPLC με **απαερωτές** (Ardrey, 2003).

Γ. Η HPLC χρησιμοποιεί μία ή δύο **αντλίες** υψηλής πίεσης που δημιουργεί παλμούς ροής που προωθούν τη κινητή φάση διαμέσου της στήλης. Οι σύγχρονες αντλίες ελέγχουν, τη ροή (από 0,01 έως 10 mL/min) και τη μέγιστη πίεση (μέχρι και 34500 kPa – 10000 psi) (Negrusz, Cooper, 2013). Μερικές αναλυόμενες ουσίες διαχωρίζονται πιο εύκολα με την εφαρμογή μίας ισοκρατικής κινητής φάσης (isocratic elution), η οποία διατηρεί σταθερή σύνθεση. Διαφορετικά, διαχωρισμός μπορεί να προκύψει με μια σταδιακή αλλαγή της σύνθεσης της κινητής φάσης που χαρακτηρίζεται ως βαθμιδωτή (gradient elution) (Ardrey, 2003).

Δ. Το **σύστημα εισαγωγής δείγματος** αποτελείται από μια περιστροφική βαλβίδα υψηλής πίεσης με κύλινδρο ραδονίου (Rotor seal) με 6 κανάλια, που συνδέονται με χαλύβδινο βρόχο. Ο βρόγχος (Loop) έχει δύο θέσεις, στην μία θέση “φορτώνεται” το δείγμα στον εισαγωγέα (Load) περιστρέφεται κατά τριάντα μοίρες στην άλλη θέση (Inject), για να παρασύρει ποσοτικά τον όγκο του δείγματος και να το προωθήσει για ανάλυση (Χατζηγιάννου, Κουμπάρης, 2005). Ο όγκος του δείγματος που εισέρχεται στο σύστημα είναι συνήθως 2-5 μ L. Ο χρόνος κύκλου έγχυσης είναι περίπου 25 s χωρίς πλύση και 60 s με διπλή πλύση που χρησιμοποιείται για την περαιτέρω μείωση των παρασυρόμενων ουσιών (Ahmed et al., 2023).

Ε. Ένας **θερμοστατούμενος θάλαμος** συνδέεται με το σύστημα εισαγωγής δείγματος που περιέχει την **προστήλη** και την **αναλυτική στήλη**. Οι στήλες πρέπει να είναι πληρωμένες, ώστε να ελαχιστοποιούνται οι στάσιμες περιοχές. Η κινητή φάση διέρχεται πρώτα από μια προ-στήλη, που δρα ως χημικό φίλτρο, για την απομάκρυνση ενώσεων που μπορούν να κορέσουν την αναλυτική στήλη και να μειώσουν τη διάρκεια ζωής της. Η προστήλη και η στήλη έχουν το ίδιο υλικό πλήρωσης. Ευθύγραμμοι ανοξείδωτοι χαλύβδινοι σωλήνες προτιμώνται ως ιδανικές στήλες για την HPLC. Το πληρωτικό υλικό της στήλης αποτελείται από σωματίδια μεγέθους 3 ως 10 μ m, με σφαιρικό ή ακανόνιστο σχήμα (Bird, 1989).

Ζ. Στην HPLC χρησιμοποιείται πληθώρα **ανιχνευτών**. Ιδανικά, θα πρέπει να ανταποκρίνεται σε όλα τα συστατικά του μείγματος, να επιτρέπει χαμηλά όρια ανίχνευσης, να παρέχει γραμμική απόκριση σε όλο το εύρος συγκεντρώσεων, να είναι σταθερός στις μεταβολές της θερμοκρασίας και του ρυθμού ροής και να αποτρέπει τη διεύρυνση των κορυφών. Οι κυριότεροι τύποι ανιχνευτών για μία διάταξη HPLC είναι ο ανιχνευτής συστοιχίας διόδων (Diode Array Detector, DAD), ο διαφορικός ανιχνευτής δείκτη διάθλασης (Refractive Index Detector, RID), ο φθορισμομετρικός ανιχνευτής (Fluorescence Detector, RF), ο ηλεκτροχημικός ανιχνευτής (Electrochemical Detector, EC) και ο ανιχνευτής φασματομετρίας μαζών (Mass Spectrometry Detector, MS) (Χατζηγιάννου, Κουμπάρης, 2005, Moldoveanu, 2023), που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διδακτορική διατριβή.

Φασματογραφία μάζας (Mass Spectrometry, MS)

Το πρώτο φασματόμετρο μάζας κατασκευάστηκε το 1912, από τον σερ Joseph John Thomson, που διαχώρισε ιόντα επιβάλλοντας τα να κινηθούν μέσα σε μαγνητικό πεδίο. Ο πρώτος φασματογράφος μάζας, που ήταν διαθέσιμος στο εμπόριο το 1948, ανίχνευε ιόντα μέχρι 300 Da με χαμηλή ευαισθησία.

Η φασματομετρία μάζας είναι μια αναλυτική τεχνική που μετατρέπει τα μόρια σε ταχέως κινούμενα ιόντα και τα διαχωρίζει με βάση τον λόγο μάζας προς φορτίο τους (m/z) (Στράτης et al., 2004). Οι αναλυτές μάζας διαχωρίζουν τα ιόντα χρησιμοποιώντας είτε ηλεκτρικά ή μαγνητικά πεδία, είτε μέσω μετρήσεων του χρόνου που χρειάζεται το κάθε ιόν για να διασχίσει μια συγκεκριμένη απόσταση (Kearle, Verkcerk, 2009). Παρέχει πληροφορίες σχετικά με την ποιοτική και ποσοτική σύσταση των δειγμάτων, τη δομή των μορίων, τη σύσταση στερεών επιφανειών και τα ισότοπα ατόμων (Skoog et al, 2007). Πρόκειται για μια εκλεκτική και ευαίσθητη τεχνική που συνδυάζει την αέρια ή την υγρή χρωματογραφία και παρέχει τις συζευγμένες τεχνικές GC-MS και LC-MS αντίστοιχα (Θεοδωρίδης, 2015^β). Αποτελεί την πλέον αξιόπιστη τεχνική ταυτοποίησης ουσιών (εξαρτησιογόνων, φαρμάκων) σε πολύπλοκα βιολογικά δείγματα.

Τα βασικά τμήματα ενός τυπικού φασματόμετρου μάζας είναι το σύστημα εισαγωγής δείγματος, την πηγή ιόντων, τον αναλυτή μάζας, τον ανιχνευτή, το σύστημα κενού που διατηρεί το φασματόμετρο υπό κενό μέσω εσωτερικών και εξωτερικών αντλιών κενού και τον καταγραφέα δεδομένων (Skoog et al., 2007).

1.4.4.2 Υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με διαδοχική φασματομετρία μαζών

Η χρωματογραφία υγρών (LC) συζευγμένη με τη φασματομετρία μάζας (MS), που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή, αποτελεί μια ιδανική μέθοδο ανάλυσης πολύπλοκων μειγμάτων. Η διαφοροποίηση των ενώσεων στην υγρή χρωματογραφία γίνεται με βάση τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες (τη συγγένεια τους για τη στατική φάση ή κινητή φάση) και στη φασματομετρία μάζας από τη σχέση της μάζας προς το φορτίο. Η σύζευξη αυτή απαιτεί τη χρήση διάταξης διεπαφής (interface), αφού συνδέονται δύο ασύμβατες τεχνικές, για την αποτελεσματική μεταφορά διαχωρισμένων συστατικών από τη στήλη της LC στην πηγή ιόντων MS (Dass, 2006).

Αποτελεί πρόκληση λόγω θεμελιωδών διαφορών, όπως η θερμοκρασία λειτουργίας (το LC λειτουργεί σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ενώ το MS απαιτεί αυξημένη θερμοκρασία). Ωστόσο, τα πλεονεκτήματα του συνδυασμού των δύο τεχνικών προσφέρουν υψηλή αξιοπιστία, ακρίβεια, ταχύτητα και ευαισθησία για τη διερεύνηση μικρών και μεγάλων μορίων, με την τεχνολογία τριπλού τετραπόλου να επιτυγχάνει επιλεκτικότητα και ανάλυση πολλών συστατικών.

Πηγή ιόντων

Ο ιοντισμός είναι το αρχικό στάδιο της φασματομετρικής ανάλυσης μάζας, που μετατρέπει τις ουδέτερες ενώσεις σε ιοντικό είδος αερίου φάσης με αρνητικά ή θετικά φορτία. Με τη χρήση ηλεκτρικών και μαγνητικών δυνάμεων επιτυγχάνεται ο χειρισμός της κατεύθυνσης και της ταχύτητας των ιόντων (Θεοδωρίδης, 2015^β).

Το φάσμα μάζας ενός αναλύτη λαμβάνεται με τη μετατροπή των μορίων του σε ιόντα. Οι τεχνικές ιοντισμού που χρησιμοποιούνται για τη λήψη ιόντων διακρίνονται σε «σκληρές» και «μαλακές». Οι «σκληρές» τεχνικές περιλαμβάνουν μεταφορά υψηλής ενέργειας, η οποία οδηγεί σε διάσπαση των μητρικών ιόντων σε θυγατρικά ιόντα (θραύση), για τον εντοπισμό χαρακτηριστικών ομάδων στο αρχικό μόριο. Οι «μαλακές» τεχνικές επιτυγχάνουν ιοντισμό υπό ηπιότερες συνθήκες, με αποτέλεσμα περιορισμένο κατακερματισμό και μία μόνο κύρια κορυφή, και χρησιμοποιεί τα φάσματα για τον ακριβή υπολογισμό της σχετικής μοριακής μάζας των μορίων του αναλύτη.

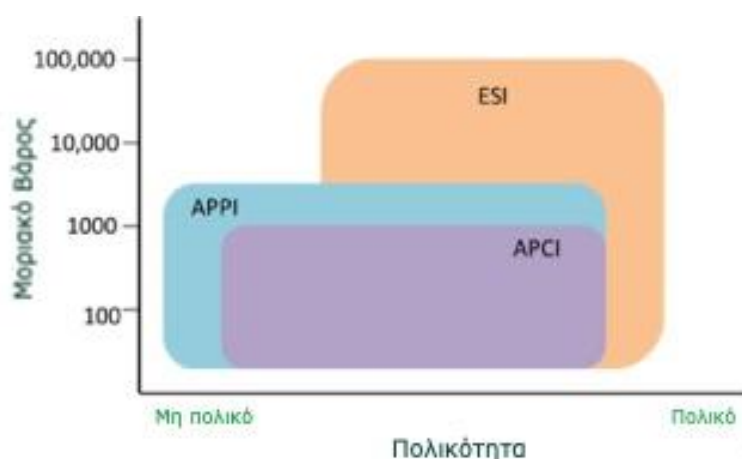
Οι πηγές ιόντων διακρίνονται σε πηγές αέριας φάσης (gas-phase sources), όπου το αναλυόμενο δείγμα μετατρέπεται σε αέριο και μετά ιοντίζεται, και σε πηγές εκρόφησης, όπου το δείγμα, σε υγρή ή στερεά μορφή, απορροφά ενέργεια από κάποια πηγή και τα μόρια του εκροφούνται και μετατρέπονται σε φορτισμένα σωματίδια αέριας φάσης (εκρόφηση/ desorption sources) (Skoog, 2007).

A. Πηγές εκρόφησης

Μία άλλη κατηγορία πηγών είναι ο ιοντισμός εκρόφησης υποβοηθούμενος από υλικό υποστρώματος και laser (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization, MALDI), ο βομβαρδισμός με ταχέα άτομα (Continuous-Flow Fast Atom Bombardment, FAB), και ο βομβαρδισμός με ιόντα (Secondary Ion MS) και η εκρόφηση με πλάσμα (Plasma Desorption). (Θεοδωρίδης, 2015^β).

B. Πηγές αέριας φάσης

Ο ιοντισμός αέριας φάσης, που εφαρμόζεται κυρίως σε ενώσεις σταθερές στη θέρμανση με σημείο ζέσεως κάτω από $\sim 500^{\circ}\text{C}$, αποτελεί κοινή πρακτική στη φασματομετρία μάζας. Διαχωρίζονται σε δύο κατηγορίες: μέθοδοι κενού και ατμοσφαιρικής πίεσης (Atmospheric Pressure Ionisation, API). Οι τεχνικές ιοντισμού ατμοσφαιρικής πίεσης αντιπροσωπεύουν το μεγαλύτερο τμήμα των εφαρμογών και της αγοράς οργάνων. Διάφορες πηγές ιοντισμού ατμοσφαιρικής πίεσης είναι διαθέσιμες όπως ο ιοντισμός με ψεκασμό σε ηλεκτρικό πεδίο (Electrospray, ESI), ο χημικός ιοντισμός σε ατμοσφαιρική πίεση (Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI), ο φωτιοντισμός σε ατμοσφαιρική πίεση (Atmospheric Pressure Ionization, APPI).



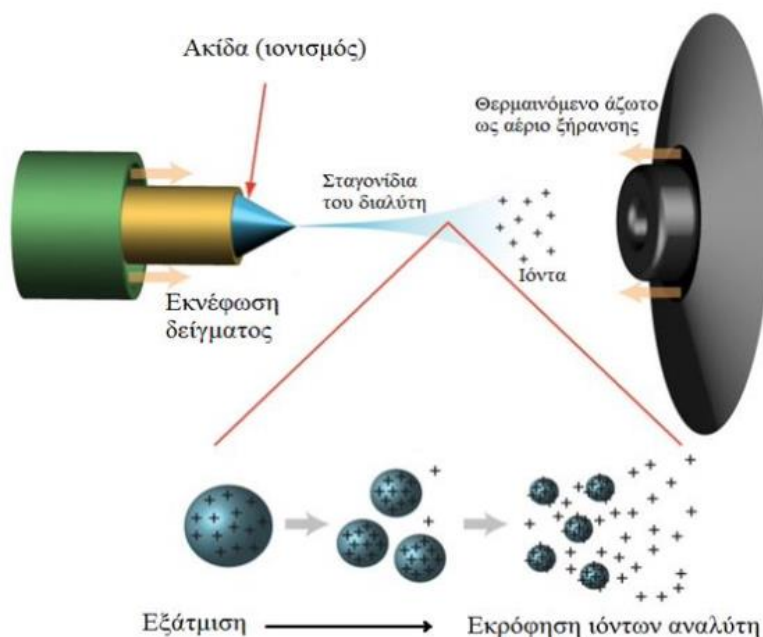
Σχήμα 7: Εφαρμογή τεχνικών API για ενώσεις με βάση την πολικότητα και το μοριακό βάρος

Η πηγή ιοντισμού εξαρτάται από τις φυσικό-χημικές ιδιότητες της αναλυόμενης ουσίας καθώς και από τις συνθήκες HPLC. Το ESI χρησιμοποιείται για την ανάλυση μεσαίων και υψηλών πολικότητας ενώσεων με μοριακό βάρος έως 10000, ενώ τα APCI και APPI χρησιμοποιούνται για μικρότερα μόρια όπως τα λιπίδια και οι ορμόνες (Wang, 2015) (Σχήμα 7). Οι ESI και APCI είναι οι δύο πιο κοινές τεχνικές μαλακού ιοντισμού. Το ESI κυριαρχεί στην τοξικολογική ανάλυση λόγω του αποτελεσματικού ιοντισμού των φαρμάκων (Θεοδωρίδης, 2015^β).

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε αποκλειστικά η τεχνική «Ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (Electron Spray Ionization, ESI)». Αποτελεί μια τεχνική «μαλακού» ιοντισμού (μικρότερη θραυσματοποίηση) που χρησιμοποιείται από το 1984 για τη μέτρηση βιομορίων, με μοριακά βάρη μεγαλύτερα από 10^5 Da, πολικά μόρια και μη πτητικές ενώσεις

υπό ατμοσφαιρική πίεση και θερμοκρασία. Παράγει πολλαπλά πολυσθενή ιόντα, μειώνοντας τον λόγο μάζας προς φορτίο (m/z) και επιτρέποντας τη χρήση τετραπολικών ανιχνευτών (Στράτης et al., 2004, Skoog, 2007).

Ο μηχανισμός του ESI, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 8, δημιουργεί ένα ισχυρό ηλεκτρικό πεδίο μεταξύ ενός τριχοειδούς και ενός ηλεκτροδίου, δημιουργώντας ένα νέφος από επιφανειακά φορτισμένα σταγονίδια. Αναλυτικά, το υγρό έκλουσης της στήλης ρέει σε έναν τριχοειδή ανοξειδωτο σωλήνα όπου εφαρμόζεται υψηλό δυναμικό. Στο τέλος του τριχοειδούς παράγονται σταγονίδια, που περιέχουν θετικά (πρωτόνια) και αρνητικά φορτία (αρνητικά ιόντα) ανάλογα με την πολικότητα του δυναμικού (Bruins et al., 1987). Το δυναμικό στο τριχοειδές του ESI, ρυθμίζεται με τέτοιο τρόπο ώστε να αντισταθμίζει τις εναλλαγές της κινητής φάσης. Τα φορτία κατανέμονται στην επιφάνεια των σταγονιδίων σε ίσες αποστάσεις μεταξύ τους όπου δρα η επιφανειακή τάση, που διατηρεί το σφαιρικό σχήμα των σταγονιδίων, και η απωστική δύναμη Coulomb, που διασπά το σφαιρικό σχήμα των σταγονιδίων. Ο νεφελοποιητής (N_2) που ψεκάζει σε ορθή γωνία ως προς το τριχοειδές οδηγεί στην εμφάνιση ενός επιφανειακού νέφους που μειώνει το θόρυβο των σταγονιδίων, αυξάνει την ευαισθησία και διατηρεί το τριχοειδές καθαρό για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (Cole, 2010). Ο χώρος μεταξύ του τριχοειδούς και του ηλεκτροδίου διασχίζεται από τα σταγονίδια, όπου ο διαλύτης εξατμίζεται, η ακτίνα του σταγονιδίου μειώνεται και τα φορτία εντός του σταγονιδίου κινούνται μαζί, οδηγώντας σε αύξηση της πυκνότητας φορτίου στην επιφάνεια των σταγονιδίων. Η πυκνότητα φορτίου αυξάνεται μέχρι το όριο σταθερότητας Rayleigh (το σημείο στο οποίο το σταγονίδιο περιέχει τον μέγιστο αριθμό πανομοιότυπων φορτίων), όπου τα σταγονίδια διασπώνται σε μικρότερα λόγω ηλεκτροστατικής απόθησης, τα οποία έχουν και υψηλότερο λόγο φορτίου προς μάζα. Κατά τη διάρκεια της σχάσης, το σταγονίδιο χάνει ένα μικρό ποσοστό της μάζας του, μαζί με ένα σχετικά μεγάλο ποσοστό του φορτίου του (10-18%). Το τελικό αποτέλεσμα αποδίδει ιόντα στην αέρια φάση που έλκονται και κατευθύνονται μέσω της οπής του τριχοειδούς στην περιοχή του οπτικού συστήματος ιόντων και έπειτα εισέρχονται στον αναλύτη μαζών (Li et al., 2005).



Σχήμα 8: Σχηματική απεικόνιση πηγής ESI σε λειτουργία θετικού ιοντισμού
 [http://www.lamondlab.com/MSResource/images/lcms/ESI.jpg]

Μειονέκτημα του συνδυασμού ESI με τη φασματομετρία μάζας, αποτελεί η ευαισθησία στην παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων άλατος και σε παρεμποδίσεις του υποστρώματος. Στα πλεονεκτήματα συγκαταλέγονται η συμβατότητα του με την χρωματογραφία υγρών αντίστροφης φάσης, καθώς ο αναλύτης βρίσκεται υπό τη μορφή διαλύματος (Ardrey, 2003).

Αναλυτής μάζας

Ο αναλυτής μάζας είναι μια κρίσιμη διάταξη ενός φασματομέτρου μάζας. Ιδανικά, ο αναλυτής θα πρέπει να παρουσιάζει συμβατότητα με όλες τις τεχνικές ιοντισμού, τις διαδικασίες εισαγωγής δειγμάτων, και επιπλέον να μπορεί να διαχωρίσει ένα μεγάλο πλήθος εισερχομένων ιόντων. Η ποιότητα ενός αναλυτή βασίζεται στην ικανότητα διαχωρισμού, την ακρίβεια και το εύρος μαζών, την ταχύτητα σάρωσης και την απόδοση εκπομπής (Kearle, Verkerk, 2009). Υπάρχουν διάφοροι τύποι, ανάλογα με την περιοχή και την ταχύτητα σάρωσης, την ευαισθησία, τη διακριτική ικανότητα και το κόστος.

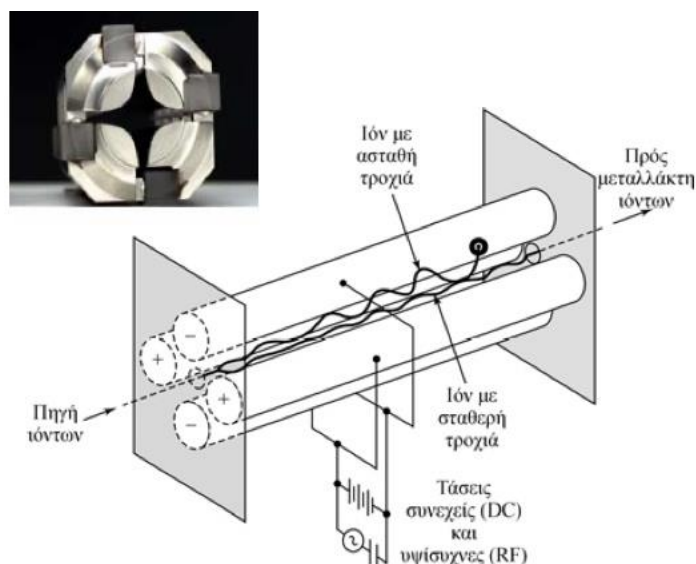
Οι κυριότεροι τύποι αναλυτών περιλαμβάνουν:

- i. Αναλυτής Μαγνητικού τομέα απλής εστίασης (Magnetic Sector Analyzer, B)
- ii. Αναλυτής Μαγνητικού τομέα διπλής εστίασης
- iii. Τετραπολικός αναλυτής μαζών (Quadrupole Mass Analyser, Q)
- iv. Αναλυτής παγίδα ιόντων (Ion trap, IT)
- v. Αναλυτής χρόνου πτήσης (Time of Flight, TOF)
- vi. Αναλυτής ιοντικού κυκλοτρονικού συντονισμού με μετασχηματισμό Fourier (FT- ICR- MS)
- vii. Αναλυτής τροχιακής παγίδας ιόντων (Orbital Trap analyzer, Orbitrap)

Οι αναλυτές μαζών χωρίζονται σε συνεχείς και παλμικούς. Με την ανίχνευση συγκεκριμένων ιόντων, παρατηρείται μειωμένος λόγος σήματος προς θόρυβο (Signal to Noise, S/N). Στους συνεχείς αναλυτές ανήκουν οι τετραπολικόι αναλυτές και οι αναλυτές μαγνητικής εκτροπής. Αντιθέτως οι παλμικοί αναλυτές μαζών, συλλέγουν ένα ολόκληρο φάσμα μαζών από ένα και μοναδικό παλμό ιόντων με αποτέλεσμα να παρέχουν μεγαλύτερο S/N. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν οι αναλυτές χρόνου πτήσης, οι αναλυτές κυκλοτρονιακού συντονισμού ιόντος με μετασχηματισμό κατά Fourier και οι τετραπολικές παγίδες ιόντων (McLucky et al., 2001).

Τετραπολικός αναλυτής μαζών (Quadrupole Mass Analyser, Q)

Ο τετραπολικός αναλυτής αναπτύχθηκε, το 1953, από τον Wolfgang Paul, που απέδειξε πως ήταν ο ιδανικός για τη σύζευξη με την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (LC-MS) το 1974. Ο τετραπολικός αναλυτής μαζών αποτελεί τον πιο συχνά χρησιμοποιούμενο αναλυτή μαζών. Αποτελείται από τέσσερις κυλινδρικές, μεταλλικές ράβδους (πόλοι) που είναι παράλληλες μεταξύ τους, και λειτουργούν σαν ηλεκτρόδια, όπως φαίνεται στο Σχήμα 9. Είναι τοποθετημένες έτσι ώστε σε διαγώνια διάταξη να σχηματίζουν δύο ζεύγη, και να συνδέονται το ένα με τον θετικό πόλο και το άλλο με τον αρνητικό πόλο μιας πηγής μεταβλητής τάσης. Εφαρμόζονται εναλλασσόμενες τάσεις στις ράβδους, οι οποίες μεταβάλλονται κατά 180°. Η πηγή εναλλασσόμενου ρεύματος (με τάση πόλων από 5-10 Volt) λειτουργεί σε υψηλές συχνότητες (ραδιοσυχνότητα), και έτσι τα ιόντα εισέρχονται στο τετράπολο. Η εναλλασσόμενη και η συνεχής τάση αυξάνονται ταυτόχρονα ξεκινώντας από το μηδέν και καταλήγοντας σε μια μέγιστη τιμή. Ο λόγος m/z επηρεάζει την τροχιά των ιόντων που διέρχονται στο χώρο μεταξύ των ηλεκτροδίων. Κάποια διέρχονται και εξέρχονται από το τετράπολο προς τον ανιχνευτή, ενώ μερικά φτάνουν στα τοιχώματα και μετατρέπονται σε ουδέτερα μόρια και απομακρύνονται (McLucky et al., 2001, Skoog, 2007). Τα ιόντα κινούνται διαγράφοντας ελικοειδείς πορείες μέσα στο τετράπολο. Η διαχωριστική ικανότητα τέτοιων οργάνων φτάνει τις 3.000, ενώ η δυνατότητα ανάλυσης ιόντων με m/z έως τις 3.000 (Στρατής et al., 2004).



Σχήμα 9: Σχηματική απεικόνιση τετραπολικού αναλυτή (Skoog, 2007)

Ο τετραπολικός αναλυτής μάζας αποτελεί ένα δημοφιλή αναλυτής φασματομετρίας μάζας λόγω των μικρών διαστάσεων και των υψηλών μηχανικών αντοχών του. Προσφέρει υψηλές ταχύτητες σάρωσης, επιτρέποντας τη γρήγορη ανάλυση ολόκληρου του φάσματος σε χρονικό διάστημα μικρότερο από 100 ms και τη δυναμική σύζευξη με χρωματογραφικές τεχνικές.

Τριπλό τετράπολο (Triple Quadrupole, QQQ)

Στην παρούσα διατριβή, χρησιμοποιήθηκε το τριπλό τετράπολο QQQ (Triple Quadrupole), που αποτελεί συνδυασμό τριών τετραπόλων που συνδέονται σε σειρά, Q1, Q2 και Q3. Προσφέρει τη παρακολούθηση επιλεγμένης αντίδρασης, με την δυνατότητα επιλογής να περάσει μόνο ένα ή όλα τα ιόντα, και τη λήψη φασμάτων προεπιλεγμένων ιοντικών θραυσμάτων (Skoog, 2007). Τα ιόντα εστιάζονται στο Q0, από τον οδηγό ιόντων Qjet χωρίς να φιλτραριστούν, πριν περάσουν στο πρώτο τετράπολο Q1, όπου πραγματοποιείται η επιλογή ενός μητρικού ιόντος (πρόδρομα ιόντα), (Sciex, 2019). Έτσι, επιτυγχάνεται η αύξηση της ευαισθησίας και η βελτίωση της αναλογίας S/N. Έπειτα, το επιλεγμένο μητρικό ιόν οδηγείται στο δεύτερο τετράπολο Q2, που λειτουργεί σαν κυψέλη σύγκρουσης, όπου μέσω υψηλού δυναμικού επιταχύνεται και αποκτά υψηλή κινητική ενέργεια. Συγκρούεται με περίσσεια αδρανούς αερίου και προκαλείται θραυσματοποίηση του σε θραύσματα, θυγατρικά ιόντα, τα οποία αναλύονται στο Q3. Το αδρανές αέριο καλείται αέριο σύγκρουσης (collision gas). Το Q1 και το Q3 δρουν ως τετράπολα επιλεκτικής μάζας. Η πιο εύχρηστη μέθοδος κατακερματισμού είναι γνωστή ως επαγόμενη διάσπαση που προκαλείται από σύγκρουση (collision induced dissociation, CID), παρέχοντας πληροφορίες σχετικά με τα δομικά χαρακτηριστικά των ενώσεων, επιτρέποντας την ταυτοποίηση και τη δομική διασαφήνισή τους. Σύμφωνα με αυτή, το πρόδρομο ιόν εισέρχεται στο χώρο σύγκρουσης (collision cell) που περιέχει ένα αδρανές αέριο, όπως Ar, He, N₂, CO₂. Ακολουθούν επαναλαμβανόμενες συγκρούσεις με το αέριο αυτό και έτσι προκύπτει ο σχηματισμός των θυγατρικών ιόντων. Έπειτα τα ιόντα εισέρχονται στον ανιχνευτή. Υπάρχουν περιπτώσεις όπου παρατηρείται μερικώς κατακερματισμός της αναλυόμενης ουσίας, κατά τη μετάβαση από την ατμοσφαιρική

πίεση στο κενό, γνωστή ως In-Source-CID. Αυτό συμβαίνει σε πολύ εύθραυστες αναλυόμενες ουσίες λόγω της επιτάχυνσής τους στο φασματόμετρο μάζας (Parcher et al., 2018).

Ο συνδυασμός τετραπόλου με παγίδες ιόντων ή αναλυτή χρόνου πτήσης στη θέση του τελικού αναλυτή (αντί δηλαδή του Q3) επιτρέπει τη λήψη φασμάτων υψηλής διαχωριστικής ικανότητας. Τα όργανα που χρησιμοποιούνται στη φασματομετρία μαζών σε σειρά στο χρόνο (tandem mass spectrometry in time) είναι οι παγίδες ιόντων και οι αναλυτές FT-MS (αναλυτής μαζών κυκλοτρονικού συντονισμού ιόντων ή Orbitrap με μετασχηματισμό Fourier) (Rossi et al., 1997).

Σύμφωνα σχηματικό διάγραμμα τριπλού τετραπόλου αναλυτή μαζών (σχήμα 10) στην περιοχή «1» υπάρχουν (Schneider et al., 2001):

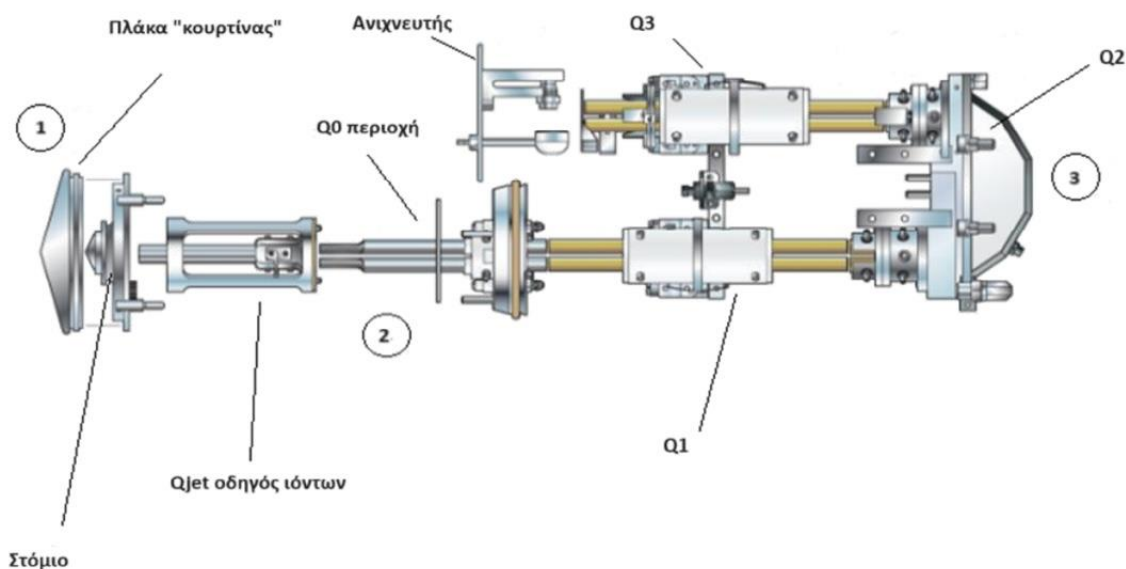
- Το «Ionspray Voltage (IS)», όπου πραγματοποιείται ο έλεγχος της τάσης που εφαρμόζεται στο ηλεκτρόδιο που ιονίζει το δείγμα στην πηγή ιόντων. Καθορίζει τη σταθερότητα και την ευαισθησία του ψεκασμού.
- Το «GAS 1 (nebulizing gas, GS1)», όπου πραγματοποιείται ο έλεγχος του αερίου του νεφελοποιητή, που βοηθά στη δημιουργία μικρών σταγονιδίων του δείγματος και επηρεάζει τη σταθερότητα και την ευαισθησία του ψεκασμού.
- Το «GAS 2 (drying gas, GS2)», όπου πραγματοποιείται ο έλεγχος του βοηθητικού ή turbo αερίου και συμμετέχει στην εξάτμιση του διαλύτη για την παραγωγή ιόντων δείγματος αέριας φάσης.
- Το «Temperature of ion source (TEM)», όπου πραγματοποιείται ο έλεγχος της θερμοκρασίας του αερίου turbo (GS2) στον αισθητήρα της πηγής ιόντων.
- Το «Curtain gas (CUR)», όπου πραγματοποιείται ο έλεγχος της ροής αερίου διεπιφάνειας «Curtain GasTM», επιτυγχάνοντας εξάτμιση του διαλύτη και εμποδίζει τα σταγονίδια να μολύνουν τα παραγόμενα ιόντα. Το «Curtain GasTM» βρίσκεται μεταξύ του «Curtain plate» και του «Orifice». Το άζωτο, το αργό και το κρυπτόνιο χρησιμοποιούνται συνήθως ως «αέρια κουρτίνας».
- Το «Declustering Potential (DP)», όπου πραγματοποιείται ο έλεγχος της τάσης στο «Orifice» και έτσι αποτρέπεται η συσσωμάτωση των ιόντων του διαλύτη που ενδέχεται να έχουν παραμείνει στα ιόντα του δείγματος, αφού εισέλθουν στον θάλαμο κενού. Η παράμετρος αυτή βελτιστοποιείται για κάθε προσδιοριζόμενη ουσία.

Στην περιοχή «2» υπάρχουν (Mörlein et al., 2020):

- Το «Entrance Potential (EP)», όπου πραγματοποιείται ο έλεγχος της διαφοράς δυναμικού μεταξύ της τάσης στο Q0 και της γείωσης. Το δυναμικό εισόδου καθοδηγεί και εστιάζει τα ιόντα μέσω της περιοχής υψηλής πίεσης Q0.

Στην περιοχή «3» υπάρχουν (Mörlein et al., 2020):

- Το «Collision Energy (CE)», όπου πραγματοποιείται ο έλεγχος της διαφοράς δυναμικού μεταξύ Q0 και Q2. Η ενέργεια σύγκρουσης αποτελεί την ποσότητα ενέργειας που λαμβάνουν τα πρόδρομα ιόντα καθώς επιταχύνονται στο Q2, όπου συγκρούονται με μόρια αερίου. Βοηθά στην αύξηση της έντασης των θραυσμάτων.
- Το «Collision Cell Exit Potential (CXP)», ή δυναμικό εξόδου της κυψέλης σύγκρουσης, βοηθά όλα τα ιόντα κατακερματισμού να εστιασούν και να επιταχύνουν όλα τα ιόντα να βγουν από το Q2 και να εισέλθουν στο Q3.



Σχήμα 10: Σχηματικό διάγραμμα τριπλού τετραπόλου αναλυτή μαζών (Sciex, 2019)

Στη φασματομετρία μαζών χρησιμοποιούνται τρεις βασικές τεχνικές σάρωσης/λειτουργίας:

i) Τεχνική πλήρους σάρωσης (Full Scan, FS)

Η τεχνική πλήρους σάρωσης δίνει τη δυνατότητα να προσδιοριστεί μια άγνωστη ουσία προσδιορίζοντας το μοριακό της βάρος ή συγκρίνοντας το φάσμα της με πρότυπα φάσματα. Συγκεκριμένα, λαμβάνεται το ολικό φάσμα για ορισμένο χρόνο όπου το εύρος μάζας ενδιαφέροντος σαρώνεται για να ταυτοποιηθούν όλα τα ιόντα που υπάρχουν στο δείγμα. Τα ιόντα ενδιαφέροντος που απομονώνονται, επιλέγονται συνήθως με βάση την αφθονία ή τη σημασία τους. Σημειώνεται πως αυξάνοντας το χρόνο σάρωσης και μειώνοντας το εύρος σάρωσης αυξάνεται η ευαισθησία της μέτρησης, καθώς αυξάνεται ο συνολικός αριθμός των ιόντων τα οποία φθάνουν στον ανιχνευτή (Θεοδωρίδης, 2015^β).

ii) Τεχνική επιλεκτικής παρακολούθησης ιόντων (Single Ion Monitoring, SIM)

Είναι μια στοχευμένη μέθοδος ανάλυσης που εφαρμόζεται για ποσοτικοποίηση ή ανίχνευση συγκεκριμένων ενώσεων ή ιόντων σε ένα σύνθετο μείγμα. Αυτό επιτυγχάνεται με την επιλογή ορισμένων χαρακτηριστικών ιόντων της αναλύμενης ουσίας και ο αναλυτής μεταβαίνει τάχιστα από τη μια μάζα στην άλλη. Ωστόσο, υπάρχει κίνδυνος να ληφθούν ψευδώς θετικά

αποτελέσματα διότι οποιαδήποτε ένωση που δίνει το συγκεκριμένο ιόν μπορεί να συμπεροδιοριστεί, συνεπώς προκύπτει μειωμένη εκλεκτικότητα (Θεοδωρίδης, 2015^β).

iii) Παρακολούθηση επιλεγμένων/πολλαπλών αντιδράσεων (Select/multiple reaction monitoring, SRM/MRM)

Η δυνατότητα ταυτόχρονης παρακολούθησης ενός μητρικού και ενός θυγατρικού ιόντος, καθώς και η επιλεκτική θραυσματοποίηση τους, χρησιμοποιώντας τους λόγους m/z κάθε προσδιοριζόμενης ένωσης για την ταυτοποίηση τους (Single Reaction Monitoring, SRM) παρέχει υψηλή εκλεκτικότητα και ευαισθησία, λόγω μείωσης του σήματος. Η τεχνική SRM (Selected Reaction Monitoring), χρησιμοποιείται για ποιοτική και ποσοτική ανάλυση. Όταν επιλέγονται δύο ή περισσότερα χαρακτηριστικά θραύσματα, η τεχνική ονομάζεται «παρακολούθηση πολλαπλών αντιδράσεων θραυσματοποίησης ιόντων» (Multiple Reaction Monitoring, MRM), που χρησιμοποιείται στην παρούσα διατριβή (Ardrey, 2003, Cohen, Borchers, 2012). Ο συνδυασμός μητρικού/θυγατρικών ιόντων αποτελεί ένα είδος αποτυπώματος για την κάθε ουσία, ο οποίος σε συνδυασμό με το χρόνο συγκράτησης (tR), μπορεί να οδηγήσει στην ταυτοποίηση της. Η διαδικασία επιλογής SRM/ MRM πραγματοποιείται με πειράματα απευθείας έγχυσης (infusion-compound optimisation) προτύπων διαλυμάτων της κάθε ένωσης χωριστά στο φασματομέτρο μάζας. Ο χρόνος (dwell time) που δαπανά ο αναλυτής μάζας σε κάθε ιόν κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου και ο χρόνος (cycle time) που χρειάζεται το όργανο για να «περάσει» όλες τις MRM μεταβάσεις μίας λίστας προτού ξεκινήσει εκ νέου είναι σημαντικοί παράμετροι για την λειτουργία MRM (Sciex, 2018).

Στη διαδοχική φασματομετρία μάζας υπάρχουν διάφορες τεχνικές σάρωσης (Ardrey, 2003), οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες είναι: η σάρωση θυγατρικού ιόντος (Product Ion Scan), που παρέχει πληροφορίες για την δομή της εξεταζόμενης ουσίας, η σταθερή απώλεια ουδέτερου θραύσματος (Constant Neutral Loss Scan, CNL), και η σάρωση προδρόμου ιόντος (Precursor Ion Scan) (Θεοδωρίδης, 2015^β).

1.4.4.3 Φασματοσκοπικές μέθοδοι ταυτοποίησης ουσιών

Οι φασματοσκοπικές μέθοδοι αποτελούν βασικό εργαλείο για τον προσδιορισμό και την ταυτοποίηση των μοριακών δομών καθώς και τον έλεγχο της καθαρότητας των εξεταζόμενων ουσιών. Οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες φασματοσκοπικές μέθοδοι είναι η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance spectrometry, NMR), η φασματοσκοπία υπερύθρου και η φασματοσκοπία UV/Vis (Hesse et al., 2002).

Συγκεκριμένα, η NMR αποτελεί το πιο ισχυρό εργαλείο για τη διερεύνηση της δομής μικρών μορίων, όπως τα NPS. Αποτελεί συμπληρωματική των άλλων φασματομετρικών τεχνικών, όπως της φασματομετρία μάζας και της φασματομετρίας υπέρυθρου για την ταυτοποίηση περίπλοκων μορίων (π.χ. οργανικά, οργανομεταλλικά και βιοχημικά μόρια). Ωστόσο, παρέχει περισσότερες δομικές πληροφορίες από τις περισσότερες φασματοσκοπικές τεχνικές (Cordier et al., 2022). Συμβάλλει στη στερεοχημική ταυτοποίηση των οργανικών ενώσεων, δεδομένου

ότι οι πυρήνες που εξετάζονται, κυρίως, είναι το υδρογόνο (λόγω της αφθονίας του) και ο άνθρακας (Bothwell, Griffin, 2011). Παρουσιάζει υψηλή διείσδυση στους ιστούς χωρίς να καταστρέφει το δείγμα, καθιστώντας την αξιόπιστη και αναπαραγώγιμη. Η χαμηλή ευαισθησία και το υψηλό κόστος σε σύγκριση με τη φασματοσκοπία μάζας, αποτελούν μειονεκτήματα της μεθόδου.

Η μέθοδος NMR, που ανακαλύφθηκε το 1946 από τους Bloch και Purcell, ήταν ζωτικής σημασίας στη χημική ανάλυση *in vitro* δειγμάτων προσφέροντας μία μη επεμβατική ανάλυση δειγμάτων. Το 1953, παρουσιάστηκε το πρώτο εμπορικό όργανο NMR για τη μελέτη χημικών δομών. Η τεχνολογία NMR χρησιμοποιήθηκε, ωστόσο, για πρώτη φορά το 1973 σε βιολογικό υλικό, συγκεκριμένα σε ερυθρά αιμοσφαίρια και αφορούσε τη μετατροπή της γλυκόζης σε γαλακτικό οξύ. Πλέον, χρησιμοποιείται ευρέως στην κλινική έρευνα, τη βιοχημεία, τη φυσική και την ιατρική. Μια από τις πιο σημαντικές εφαρμογές της είναι η απεικόνιση μαγνητικού συντονισμού (Magnetic Resonance Imaging, MRI), που αποτελεί πολύτιμη τεχνική για διάφορες ιατρικές ειδικότητες (Hayes, 2009, Wei et al., 2022).

Η φασματοσκοπία NMR είναι μία από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους για μελέτες μεταβολικής και φαρμακομεταβολομικής τα τελευταία 15 χρόνια (Amin, 2017, Xu, 2017, Jiang, 2018, De Castro, Ciulli, 2019). Έχει περιγραφεί για τον προσδιορισμό μεταβολιτών σε πλάσμα, ούρα, δείγμα κοπράνων και άλλα βιολογικά υλικά (Beckonert et al., 2007). Η μεταβολομική, αφορά την ποσοτική ανάλυση των χαμηλού μοριακού βάρους οργανικών και ανόργανων μεταβολιτών που είναι τελικά ή ενδιάμεσα προϊόντα του μεταβολισμού σε έναν οργανισμό.

Η NMR χρησιμοποιείται για ποιοτικές αναλύσεις στην ανάπτυξη φαρμάκων, την ταυτοποίηση μορίων, τον προσδιορισμό δομής, συμπεριλαμβανομένης της μελέτης ισομερών και την αξιολόγηση της τοξικότητας φαρμάκων. Αποτελεί μη καταστροφική, ευέλικτη και ισχυρή τεχνική (Singh et al 2016). Ωστόσο, η χρήση της φασματοσκοπίας NMR για τον ποσοτικό προσδιορισμό των φαρμάκων ή/και των μεταβολιτών τους σε βιολογικά υλικά αντιμετωπίζει ορισμένους περιορισμούς. Συγκεκριμένα, εμφανίζονται σοβαρές επικαλύψεις σημάτων που καθιστούν δυσνόητη την ακριβή ερμηνεία των φασμάτων, ιδίως σε χαμηλές συγκεντρώσεις αναλυτών (Carneiro et al., 2013). Από την άλλη πλευρά, οι νέες τεχνικές NMR, όπως η χρήση χημειοανίχνευσης με βάση το ^{19}F NMR, με ανιχνευτές σημασμένους με ^{19}F , βοηθούν στην ελαχιστοποίηση των παρεμβολών του σήματος.

Πρόσφατες μελέτες αποδεικνύουν την δυνατότητα χρήσης της τεχνολογίας NMR για την ανίχνευση εξαρτησιογόνων ουσιών (Mehr et al., 2023, Prosser, Alonzi, 2023). Ειδικότερα, έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση, την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό διεγερτικών ουσιών τύπου αμφεταμίνης και αναλόγων σε ούρα (Jiang et al., 2023), και δειγμάτων μεθαμφεταμίνης (Armellin, et al., 2006). Η NMR έχει εφαρμοστεί στον προσδιορισμό της δομής και τον ποσοτικό προσδιορισμό ουσιών σε κατασχεθέντα δείγματα (Giraudieu, 2017, Santos et al 2018) και άγνωστες σκόνες που ενεπλάκησαν σε μια θανατηφόρα υπόθεση (Ameline, 2019).

Η χρήση φασματοσκοπικών μεθόδων για την διεύρυνση της δομής εξαρτησιογόνων και νέων ψυχοδραστικών ουσιών, έχει προκαλέσει αυξανόμενο ενδιαφέρον και αποτελούν μία νέα καινοτόμα πρακτική. Όπως αναφέρθηκε, η ταυτοποίηση και ο ποσοτικός προσδιορισμός των NPS σε βιολογικά υλικά αποτελεί έναν ενδιαφέροντα στόχο στον τομέα της δικαστικής τοξικολογίας. Οι παρόμοιες δομές των ομάδων NPS, η ταχέως μεταβαλλόμενη δομή τους και η έλλειψη πιστοποιημένων προτύπων αναφοράς για τις περισσότερες από αυτές, καθιστούν αναγκαία την ανάπτυξη και καθιέρωση νέων αναλυτικών προσεγγίσεων για την ανίχνευσή τους.

Βασικές αρχές του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού

Η μέθοδος NMR βασίζεται στην ανίχνευση πυρήνων. Πολλά είδη πυρήνων συμπεριφέρονται σαν να περιστρέφονται γύρω από έναν άξονα (αυτοστροφορμή, spin), και δεδομένου ότι είναι θετικά φορτισμένοι λειτουργούν ως μικροσκοπικοί μαγνήτες με τυχαίο προσανατολισμό. Ορισμένα άτομα έχουν έναν πυρήνα χωρίς συνολικό spin, επειδή αλληλοεξουδετερώνονται. Από την άλλη πλευρά, ο πυρήνας ατόμων όπως το ^{13}C , το ^1H , το ^{31}P , το ^{15}N και το ^{19}F διαθέτουν πλήρες spin (Μαυρομούστακος, Ματσούκας, 2006).

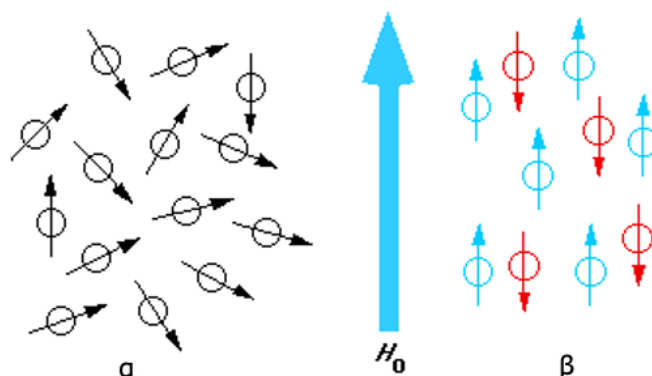
Οι προσανατολισμένοι πυρήνες των ατόμων από την κατάσταση χαμηλότερης ενέργειας μεταβαίνουν στην κατάσταση υψηλότερης ενέργειας με αναστροφή του spin. Όταν λαμβάνει χώρα η αναστροφή, συντονίζονται με την εφαρμοζόμενη ακτινοβολία, και έτσι προκύπτει το φαινόμενο του «πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού» (Passe et al., 1995). Η συχνότητα απορρόφησης της προσπίπτουσας ακτινοβολίας που παρατηρείται από την αλληλεπίδραση της με τους πυρήνες του αναλυτή, είναι χαρακτηριστική για κάθε πυρήνα.

Ιδιότητες και αλληλεπίδραση πυρήνων με μαγνητικό πεδίο

Οι κανόνες της κβαντομηχανικής ορίζουν το πυρηνικό spin με τον κβαντικό αριθμό του πυρηνικού spin (I). Η ένταση των μαγνητικών πεδίων που δημιουργούνται εξαρτάται από την μαγνητική ροπή, μ , που αποτυπώνει το μέγεθος του δημιουργούμενου δίπολου και αποτελεί χαρακτηριστική ιδιότητα του πυρήνα. Ο γυρομαγνητικός λόγος, γ , εξαρτάται από τη φύση του πυρήνα και αποτελεί θεμελιώδη πυρηνική σταθερά. Η στροφορμή, L , είναι ένα διανυσματικό μέγεθος που αντιστοιχεί στην περιστροφική κίνηση.

Όταν ένα δείγμα πυρήνων βρίσκεται εκτός μαγνητικού πεδίου, τα spin των πυρήνων έχουν όλους τους πιθανούς προσανατολισμούς και οι πυρήνες περιστρέφονται γύρω από τον άξονα τους. Οι ζυγοί ατομικοί και μαζικοί πυρήνες δεν έχουν στροφορμή και μαγνητικές ιδιότητες ($I = 0$), συνεπώς η απουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου τα ανύσματα των πυρηνικών μαγνητικών ροπών προσανατολίζονται τυχαία στο χώρο (Σχήμα 11α). Ενώ οι πυρήνες με περιττό μαζικό αριθμό και περιττό ή άρτιο ατομικό αριθμό έχουν ημιακέραιους αριθμούς spin, όπως ο πυρήνας ^1H με κβαντικό αριθμό πυρηνικού spin $I=1/2$. Για του πυρήνες αυτούς είναι πιθανοί μόνο δύο προσανατολισμοί με διαφορετική ενέργεια, ο παράλληλος ($I = 1/2$) (χαμηλότερη ενεργειακή κατάσταση) και αντιπαράλληλος ($I = -1/2$) (υψηλότερη ενεργειακή

κατάσταση) προς το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο H_0 (Σχήμα 11β). Οι πυρήνες ^{13}C , το ^1H , το ^{31}P και το ^{19}F αποτελούν τους σημαντικότερους με κβαντικό αριθμό spin $\frac{1}{2}$ (Passe et al., 1995).



Σχήμα 11: Προσανατολισμός των διανυσμάτων των πυρηνικών μαγνητικών διπολικών ροπών μ , α) απουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου H_0 , β) παρουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου H_0

Η ενεργειακή διαφορά μεταξύ της παράλληλης αντιπαράλληλης διάταξης των πυρήνων αυξάνεται με την ισχύ του εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου H_0 , με αποτέλεσμα να απαιτείται ακτινοβολία υψηλότερης ενέργειας για την αναστροφή του spin. Οι δύο καταστάσεις δεν είναι ενεργειακά ισοδύναμες και υπάρχει μια μετρήσιμη **διαφορά ενέργειας (ΔE)** μεταξύ τους, που είναι ανάλογη με την ισχύ του μαγνητικού πεδίου. Ο άξονας περιστροφής του πυρήνα δεν μπορεί να προσανατολίζεται ακριβώς παράλληλα ή αντιπαράλληλα με διεύθυνση το μαγνητικό πεδίο H_0 αλλά πρέπει να κάνει γυροσκοπική πορεία γύρω από το πεδίο κατά μία γωνία με γωνιακή ταχύτητα.

Κάθε τύπος πρωτονίου σε ένα μόριο δημιουργεί μία απλή κορυφή. Όταν ένα πρωτόνιο βρίσκεται κοντά σε ένα άλλο πρωτόνιο, βιώνει σύζευξη spin, προκαλώντας δύο απορροφήσεις για το κάθε πρωτόνιο. Η πολλαπλότητα των δύο απορροφήσεων είναι αποτέλεσμα της σύζευξης των spin των γειτονικών πρωτονίων και χαρακτηρίζεται από τη **σταθερά σύζευξης J (J-coupling)**. Ως σταθερά σύζευξης J , ορίζεται η απόσταση μεταξύ των υποκορυφών που συνιστούν μία πολλαπλή κορυφή και εξαρτάται από τη στερεοχημεία του μορίου. Τα σύγχρονα φασματόμετρα είναι υψηλής διαχωριστικής ικανότητας και μπορούν να διαχωρίσουν κορυφές με διαφορά 0,01 ppm και λιγότερο (Bothwell, Griffin, 2011).

Στην περίπτωση εφαρμογής ενός δεύτερου μαγνητικού πεδίου (H_1) ο άξονας περιστροφής του πυρήνα μεταπίπτει γύρω από τη διεύθυνση του μαγνητικού πεδίου H_0 (μετάπτωση Larmor). Η **συχνότητα Larmor**, αναφέρεται στη συχνότητα στην οποία οι πυρήνες διεγείρονται ώστε να συντονίζονται με ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία όταν εφαρμόζονται σε σταθερό μαγνητικό πεδίο. Το φαινόμενο της πυρηνικής θωράκισης είναι μια σημαντική διαταραχή της συχνότητας Larmor, καθώς τα ηλεκτρόνια που περιφέρονται γύρω από τον πυρήνα δημιουργούν ένα μικρό μαγνητικό πεδίο που αντιτίθεται στο εξωτερικό μαγνητικό πεδίο H_0 , μειώνοντας τη συχνότητα που απαιτείται για τον συντονισμό. Υψηλότερη πυκνότητα ηλεκτρονίων οδηγεί σε μεγαλύτερη θωράκιση, προκαλώντας χαμηλότερη χημική μετατόπιση (Pintaske et al., 2006). Η **χημική μετατόπιση, δ** , επηρεάζεται από το χημικό περιβάλλον των πρωτονίων και ορίζεται ως η

διαφορά μεταξύ της συχνότητας συντονισμού του παρατηρούμενου πρωτονίου με μία ένωση αναφορά. Το TMS χρησιμοποιείται ως πρότυπο αναφοράς, λόγω του πολύ ισχυρού επαγωγικού +I φαινομένου. Τα πρωτόνια του TMS έχουν θωρακιστεί ισχυρά από τα ηλεκτρόνια σθένους και επομένως συντονίζονται σε ισχυρότατο μαγνητικό πεδίο. Το TMS είναι αδιάλυτο στο νερό συνεπώς δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε υδατικά διαλύματα.

Σε ένα σύστημα δύο πυρήνων (A και B), η αλλαγή στην ένταση μίας NMR απορρόφησης του πυρήνα A επέρχεται όταν διαταράσσονται οι πληθυσμοί των ενεργειακών καταστάσεων spin του πυρήνα B. Η διαταραχή αυτή συμβαίνει με το φαινόμενο του κορεσμού (saturation) της αντίστοιχης απορρόφησης, δηλαδή την ακτινοβολήσή της, ώστε να μην υπάρχει περίσσεια πυρήνων στη βασική κατάσταση και έτσι, να υπάρχουν οι ίδιοι πληθυσμοί στη βασική και διεγερμένη κατάσταση. Το **πυρηνικό Φαινόμενο Overhauser (Nuclear Overhauser Effect, NOE)** που δημιουργείται στην περίπτωση αυτή αφορά την προσπάθεια των δύο πυρήνων να επανέλθουν σε μία κατάσταση θερμικής ισορροπίας (Μαυρομούστακος, Ματσούκας, 2006).

Φάσμα NMR

Το φάσμα NMR περιλαμβάνει πολλές κορυφές απορρόφησης (σήματα), που απεικονίζουν διαφορές στο χημικό περιβάλλον των πρωτονίων και την χημική δομή των διαφόρων μορίων. Συγκεκριμένα περιλαμβάνουν: τον αριθμό, τις θέσεις, τις εντάσεις των σημάτων (χημική μετατόπιση), και την σχάση τους σε επιμέρους κορυφές. Για την πλειονότητα των οργανικών ενώσεων, τα παραγόμενα σήματα κυμαίνεται μεταξύ 0 και 12ppm. Τα φάσματα αφορούν έναν ή δύο άξονες συχνοτήτων και χωρίζονται σε μονοδιάστατα και δισδιάστατα πειράματα.

A) Ένα μονοδιάστατο φάσμα NMR (^1D NMR) βασίζεται στον ίδιο άξονα συχνοτήτων, όπου οι κορυφές του κάθε μορίου τοποθετούνται μέσα στις συχνότητες συντονισμού τους. Στα μονοδιάστατα πειράματα χρησιμοποιούνται βασικοί παράμετροι όπως το εύρος συχνοτήτων φάσματος (spectrum width), η καθυστέρηση παλμών (pulse delay), το εύρος παλμών (pulse width), και ο αριθμός σαρώσεων (number of scans).

B) Τα πειράματα δύο διαστάσεων (^2D NMR) βασίζονται σε δύο άξονες συχνοτήτων και επιτρέπουν το διαχωρισμό επικαλυπτόμενων φασματικών κορυφών. Η χρήση τους περιορίζεται στο χαρακτηρισμό ενώσεων, που δεν μπορούν να ταυτοποιηθούν με τη λήψη μονοδιάστατων φασμάτων. Η ταξινόμηση των ^2D NMR φασμάτων γίνεται σε ομοπυρηνικά (πειράματα στα οποία οι συχνότητες και των δύο διαστάσεων αναφέρονται σε πυρήνες ίδιου ατόμου) και ετεροπυρηνικά (πειράματα στα οποία οι συχνότητες των δύο διαστάσεων αναφέρονται σε πυρήνες διαφορετικού ατόμου) (Hayes, 2009).

Μετά την λήψη των φασμάτων είναι απαραίτητη η επεξεργασία δεδομένων, όπως διόρθωση της βασικής γραμμής, ευθυγράμμιση, τμηματοποίηση, κανονικοποίηση και κλιμάκωση, ενώ ορισμένες φορές απαιτείται αφαίρεση του σήματος του νερού ή άλλου διαλύτη.

Ομοπυρηνικά πειράματα

Στα ομοπυρηνικά πειράματα ανήκουν τα πειράματα φασματοσκοπίας συσχέτισης (Correlation Spectrometry, COSY), NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy), ROESY (Rotating Frame Overhauser Effect Spectroscopy), TOCSY (Total Correlation Spectroscopy), DOSY (Diffusion-Ordered Spectroscopy), INADEQUATE (Incredible Natural Abundance Double Quantum Transfer Experiment), J-Resolved. Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν τα εξής:

1) Το πείραμα COSY, χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό περιστροφών που συνδέονται μεταξύ τους. Αποτελείται από έναν παλμό ραδιοσυχνότητας ($p1$) ακολουθούμενο από τον ειδικό χρόνο εξέλιξης ($t1$), ακολουθούμενο από έναν δεύτερο παλμό ($p2$) ακολουθούμενο από μια περίοδο μέτρησης ($t2$). Το δισδιάστατο φάσμα που προκύπτει δείχνει τις συχνότητες για ένα μόνο ισότοπο, συννηθέστερα υδρογόνο (^1H) κατά μήκος και των δύο αξόνων. Η παλμική ακολουθία που εφαρμόζεται για τη διεξαγωγή του πειράματος COSY αποτελείται από δύο παλμούς 90° (Hayes, 2009).

2) Το πείραμα NOESY, αφορά τη συσχέτιση πυρήνων ^1H - ^1H . Οι διπολικές συζεύξεις, εξαρτώνται από την απόσταση μεταξύ των spin καθώς και τον προσανατολισμό του μορίου σε σχέση με το μαγνητικό πεδίο. Βασίζεται στο πυρηνικό φαινόμενο Overhauser (NOE), στο οποίο ένας πληθυσμός από δύο καταστάσεις που δε βρίσκονται σε ισορροπία, επανέρχεται στην τιμή ισορροπίας του, με αποτέλεσμα οι πληθυσμοί των ενεργειακών επιπέδων των spin να μεταβάλλονται. Το πρόσημο του NOE είναι θετικό για μικρά και αρνητικό για μεγάλα μόρια. Η παλμική ακολουθία που χρησιμοποιείται για τη διεξαγωγή του πειράματος NOESY αποτελείται από τρεις παλμούς των 90° (Hayes, 2009).

3) Το πείραμα TOCSY αποτελεί μία από τις κυριότερες τεχνικές, που παρατηρείται η συσχέτιση μεταξύ ενός spin και όλων των υπολοίπων spin από το ίδιο σύστημα. Μία μη επικαλυπτόμενη απορρόφηση μπορεί να είναι αρκετή για να προσδιοριστούν τα spin που αποτελούν μέρη του ίδιου συστήματος spin, ακόμα και αν αυτά συμπίπτουν με διαφορετικά συστήματα spin. Η παλμική ακολουθία που χρησιμοποιείται για τη διεξαγωγή του πειράματος TOCSY είναι 90° (Cavanagh, Rance, 1990).

4) Το πείραμα DOSY διαχωρίζει τα σήματα διαφορετικών συστατικών σε ένα μείγμα με βάση τη μέτρηση των συντελεστών διάχυσης χωρίς διαχωρισμό των συστατικών σε ένα δείγμα. Αποτελεί από ένα ψευδό-δισδιάστατο χάρτη στον οποίο ο οριζόντιος άξονας περιγράφει την χημική μετατόπιση ενώ ο κατακόρυφος αντιστοιχεί σε αυτόν του συντελεστή διάχυσης. Το πείραμα DOSY έχει προταθεί για τη μελέτη του φαινομένου της χημικής ανταλλαγής (Cabrita, Berger et al., 2002).

Ετεροπυρηνικά πειράματα

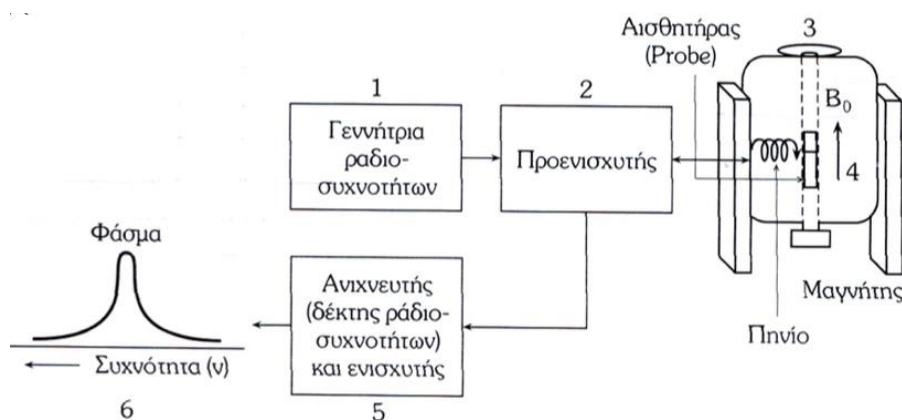
Στα ετεροπυρηνικά πειράματα ανήκουν τα πειράματα HETCOR (Heteronuclear Correlation Spectroscopy), HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence), HSQC (Hetero-nuclear

Single Quantum Coherence), και HMBC (Heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy), και ^1H - ^{13}C HSQC-TOCSY. Στην παρούσα διατριβή λήφθηκαν φάσματα:

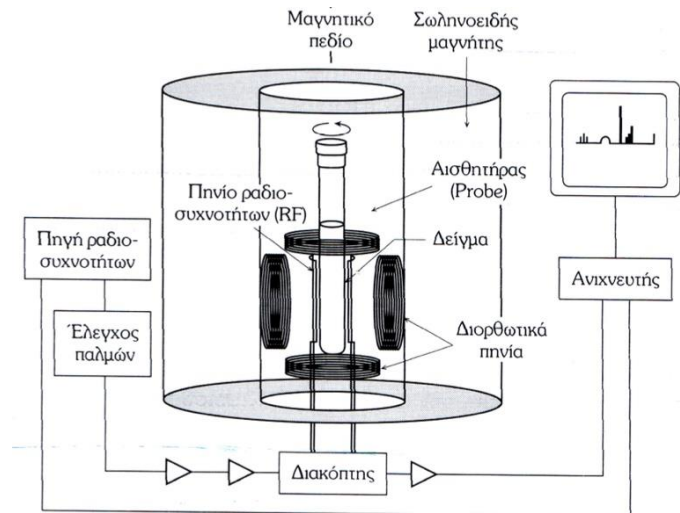
- 1) Το πείραμα ετεροπυρηνικής φασματοσκοπίας μονοκβαντικής συσχέτισης (Heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy, HSQC) που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των συσχετισμών απλού δεσμού πρωτονίου-άνθρακα, όπου τα πρωτόνια βρίσκονται κατά μήκος του ενός άξονα και οι άνθρακες κατά μήκος του άλλου (Farkas et al., 2022).
- 2) Το πείραμα ετεροπυρηνικής φασματοσκοπίας συσχέτισης πολλών δεσμών (Heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy, HMBC), παρέχει συσχετίσεις μεταξύ ανθράκων που διαχωρίζονται κυρίως από δύο ή τρεις δεσμούς (Farkas et al., 2022).
- 3) Το πείραμα ^1H - ^{13}C HSQC-TOCSY, συνδυάζει πειράματα ^1H - ^{13}C HSQC με πειράματα ^1H -TOCSY για να δώσει συσχετισμούς δεσμού μεταξύ ενός ^{13}C συνδεδεμένου με ^1H σε όλα τα άλλα συζευγμένα ^1H . Τα συζευγμένα ^1H μπορούν να φανούν κατά μήκος μιας γραμμής στην ίδια χημική μετατόπιση ^{13}C από το άτομο άνθρακα που είναι συνδεδεμένο στο πρωτεύον ^1H (Bingol et al., 2018).

Οργανολογία φασματοσκοπίας NMR

Ένας φασματογράφος NMR αποτελείται από 1) έναν ισχυρό μαγνήτη ικανός να δημιουργήσει ένα σταθερό μαγνητικό πεδίο υψηλής έντασης, 2) έναν αισθητήρα (probe) που βοηθά στην τοποθέτηση του πηνίου κοντά στο δείγμα, 3) μία γεννήτρια ραδιοσυχνοτήτων με ταλαντωτή που παράγει κατάλληλη RF ακτινοβολία, η οποία μέσω ενός 4) ενισχυτή μετατρέπεται σε έντονο και αναπαραγωγίμο παλμό ραδιοσυχνότητας μικρής διάρκειας το οποίο περιβάλλεται από ένα πηνίο, 5) έναν μετατροπέα ADC ο οποίος μετατρέπει τα σήματα NMR σε ψηφιακή μορφή για αποθήκευση στον καταγραφέα/ υπολογιστή, 6) έναν προγραμματιστή παλμών (pulse programmer) ώστε να παράγονται με ακρίβεια οι χρόνοι, οι παλμοί και οι καθυστερήσεις (Σχήμα 9, 10).



Σχήμα 12: Διάταξη φασματομέτρου NMR



Σχήμα 13: Λεπτομερέστερη απεικόνιση του μαγνήτη και του αισθητήρα ενός φασματόμετρου NMR

Επειδή το παραγόμενο μαγνητικό πεδίο στην περιοχή του δείγματος πρέπει να είναι πολύ ομοιογενές και σταθερό κατά τη διάρκεια της μέτρησης, λαμβάνονται διάφορα μέτρα για την επίτευξη του σκοπού αυτού, όπως:

A) Η τεχνική «κλειδώματος» μαγνητικού πεδίου (lock) στη συχνότητα συντονισμού ενός πυρήνα αναφοράς, χρησιμοποιείται για την αντιστάθμιση των διακυμάνσεων του μαγνητικού πεδίου μετά τη μέτρηση. Ο πυρήνας αναφοράς ακτινοβολείται συγχρόνως με το δείγμα και παρακολουθείται η συχνότητα συντονισμού του στην επιβαλλόμενη ένταση του μαγνητικού πεδίου του φασματόμετρου. Οι μεταβολές της έντασης του σήματος απορρόφησης αναφοράς, αντισταθμίζεται με τη βοήθεια διορθωτικών πηνίων που βρίσκονται μέσα στο μαγνητικό πεδίο (Hanson, 2013).

B) Μέσα στον κύριο πυρήνα υπάρχουν διορθωτικά πηνία τα οποία παράγουν ασθενή μαγνητικά πεδία που αντισταθμίζουν τις ανομοιογένειες του βασικού μαγνητικού πεδίου που προκαλούνται από το δείγμα. Η διαδικασία ομογενοποίησης πεδίου (shimming) εξαρτάται από το εφαρμοζόμενο πεδίο, τη συχνότητα συντονισμού του πυρήνα, τη διάμετρο του σωληνίσκου του δείγματος, τα οποία ρυθμίζονται μέσω υπολογιστή και βελτιστοποιούνται με κατάλληλους αλγορίθμους (Hanson, 2013).

Γ) Η ανομοιογένεια του πεδίου απαλείφεται με περιστροφή του δείγματος γύρω από τον άξονα του μικρού γυάλινου σωληνίσκου, διαμέτρου 5 mm και χωρητικότητας 0,4-0,7 mL, όπου τοποθετείται το δείγμα.

1.5 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοποί της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν:

1. Προσδιορισμός επιλεγμένων εξαρτησιογόνων και νέων ψυχοδραστικών ουσιών (New Psychoactive Substances, NPS) σε βιολογικά υλικά με την χρήση υγρής χρωματογραφίας συζευγμένης με διαδοχική φασματομετρία μαζών (LC-MS/MS).

Ειδικότερα:

- i. Ανάπτυξη και επικύρωση νέας αναλυτικής μεθόδου για τον προσδιορισμό επιλεγμένων εξαρτησιογόνων, νέων ψυχοδραστικών και άλλων ουσιών σε ολικό αίμα με εφαρμογή υγρής-υγρής εκχύλισης.
 - ii. Ανάπτυξη και επικύρωση νέας μεθόδου εκχύλισης νέων ψυχοδραστικών ουσιών από σίελα ανθρώπου με εφαρμογή FPSE και χρήση πιλοτικής ουσίας νέο συνθετικό οπιοειδές, βρωρφίνη.
2. Διερεύνηση της μοριακής δομής επιλεγμένων εξαρτησιογόνων και νέων ψυχοδραστικών ουσιών (New Psychoactive Substances, NPS) σε βιολογικά υλικά με φασματοσκοπικές μεθόδους.

Ειδικότερα:

- i. Εφαρμογή τεχνικών NMR για τον προσδιορισμό της μοριακής δομής NPS με πιλοτική ουσία της νέα συνθετική καθινόνη, βενζυλόνη.
 - ii. Εφαρμογή τεχνικών NMR για τον προσδιορισμό της δομής και την ανίχνευση νέων ψυχοδραστικών ουσιών σε ούρα με πιλοτική ουσία της νέα συνθετική καθινόνη, βενζυλόνη.
3. Εφαρμογή σε κλινικά περιστατικά και σε νεκροτομικό υλικό, κατά την τοξικολογική διερεύνηση περιστατικών ιατροδικαστικού ενδιαφέροντος.

2 ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΥΛΙΚΑ - ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

2.1.1 Πρότυπες ενώσεις

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκαν ουσίες που ανήκουν σε 10 κατηγορίες. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν 19 κοινές ουσίες κατάχρησης (αλκαλοειδή της κόκας και μεταβολίτες, αμφεταμίνες, οπιούχα, κεταμίνη και ο μεταβολίτης της), 55 συνταγογραφούμενα και μη φάρμακα (αντιεπιληπτικά αντικαταθλιπτικά, αντιψυχωσικά, βενζοδιαζεπίνες, υπνωτικοί παράγοντες), επτά νέες ψυχοδραστικές ουσίες και 11 άλλες ουσίες. Για τις αναλύσεις υγρής χρωματογραφίας συζευγμένη με φασματομετρία μάζας, η κλοζαπίνη-d₄, η μορφίνη-d₃, και η MDMA-d₅ χρησιμοποιήθηκαν ως εσωτερικά πρότυπα >=98% (HPLC). Ενώ για τις αναλύσεις NMR ως πρότυπο χρησιμοποιήθηκε το 3-τριμέθυλο-πυριτο-προπανοϊκό οξύ (TSP-d₄).

Η Ν-δεσμέθυλ-σιταλοπράμη HCl ως άλας ήταν ευγενική προσφορά της H. Lundbeck A/S (LOT Number: 97743-99-2). Οι υπόλοιπες προσδιοριζόμενες χημικές ουσίες αγοράστηκαν ως πρότυπα (αναλυτικής καθαρότητας) από την LGC Standards Ltd (Luckenwalde, Germany και UK), την Cerilliant Corporation (Paloma Drive, Round Rock, Texas), την Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA), Toronto Research Chemicals (Toronto, Canada) και την Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, Germany). Αναλυτικά:

LGC Standards Ltd (Luckenwalde, Germany)

- i. Μιανσερίνη ως άλας Mianserin HCl, 1,0 mL/αμπούλα, 1.000 mg/mL σε Μεθανόλη, LOT Number: 8213
- ii. Μαπροτιλίνη ως άλας Maprotiline HCl, 1,0 mL/αμπούλα, 1.000 mg/mL σε Μεθανόλη, LOT Number: 8450
- iii. Ιμιπραμίνη ως άλας Imipramine HCl, 1,0 mL/αμπούλα, 1.000 mg/mL σε Μεθανόλη, LOT Number: 8165
- iv. Τριμιπραμίνη ως Trimipramine, 1,0 mL/αμπούλα, 1.000 mg/mL σε Μεθανόλη, LOT Number: 8630
- v. Μιρταζαπίνη ως Mirtazapine, 10 mg, LOT: Number 85650-52-8
- vi. Φλουβοξαμίνη ως Fluvoxamine, 10 mg, LOT: Number 54739-18-3
- vii. Φλουοξετίνη ως Fluoxetine HCl, 250 mg, LOT Number: 56296-78-7
- viii. Αμοξαπίνη ως Amoxepine, 250 mg, LOT: Number 14028-44-5
- ix. Ο-Δεσμέθυλ-βενλαφαξίνη ως O-Desmethylvenlafaxine, 100 mg, LOT: Number: 93413-62-8
- x. Σουλπιρίδη ως Sulpiride, 250 mg, LOT Number: 15676-16-1
- xi. Ολανζαπίνη ως Olanzapine, 10 mg, LOT Number: 1001543
- xii. Χλωροπρομαζίνη ως άλας Chlorpromazine HCl, 1,0 mL/αμπούλα, 1.0 mg/mL σε Μεθανόλη, LOT Number: 8262
- xiii. 6-Μονοακετυλομορφίνη ως 6-MAM, 10 mg, LOT Number: 54155
- xiv. Κωδεΐνη ως Codeine, 1.0 mg/ml σε Μεθανόλη, LOT Number: 76-57-3

- xv. Μορφίνη ως Morphine, 1.0 mg/ml σε Μεθανόλη, LOT Number: 57-27-2
- xvi. Βουπρενορφίνη ως Buprenorphine, 250 mg, LOT: Number 52485-79-7
- xvii. Νορβουπρενορφίνη ως Norbuprenorphine, 1,0mL/αμπούλα, 1.0 σε Μεθανόλη, LOT Number: 78715-23-8
- xviii. (±)-3,4-μεθυλενοδιοξυαμφεταμίνη ως MDA, 1,0 mL/αμπούλα, 1.0 σε Μεθανόλη, LOT Number: 4764-17-4
- xix. 3,4-μεθυλαινοδιοξυμεθαμφεταμίνη ως MDMA, 50 mg, LOT Number: 64057-70-1
- xx. Μεθυλεστέρας της εκγονίνης ως Ecgonine Methyl Ester (EME), 10 mg, LOT Number: 7143-09-1
- xxi. Βεραπαμίλη ως άλας Verapamil HCl, 1,0 mL/αμπούλα, 1.000 mg/mL σε Μεθανόλη, LOT Number: 9374
- xxii. Διλτιαζέμη ως άλας Diltiazem HCl, 1,0 mL/αμπούλα, 1.000 mg/mL σε Ακετονιτρίλιο, LOT Number: 9011
- xxiii. Μεφεδρόνη ως άλας Mephedrone HCl, 10 mg, LOT Number: 1189726-22-4
- xxiv. Κεταμίνη ως άλας Ketamine HCl, 100 mg, LOT Number: 1867-66-9
- xxv. Νορκεταμίνη ως άλας Norketamine HCl, 10 mg, LOT Number: 79499-59-5
- xxvi. Λιδοκαΐνη ως Lidocaine, 250 mg, LOT Number: 137-58-6
- xxvii. Παρακεταμόλη ως Paracetamol, 250 mg, LOT number: 103-90-2
- xxviii. Προπρανολόλη ως άλας Propranolol HCl, 100 mg, LOT number: 318-98-9
- xxix. Σιμετιδίνη ως Cimetidine, 500 mg, LOT Number: 51481-61-9
- xxx. Προκαΐναμίδη ως άλας Procainamide HCl, 250 mg, LOT Number: 614-39-1
- xxxi. Κυκλοβενζαπρίνη ως άλας Cyclobenzaprine HCl, 25 mg, LOT Number: 6202-23-9
- xxxii. Ατροπίνη ως Atropine, 250 mg, LOT number: 51-55-8
- xxxiii. Ναλοξόνη ως Naloxone, 1 mg, LOT number: 465-65-6
- xxxiv. Τεμαζεπάμη ως Temazepam, 250 mg, LOT Number: 846-50-4
- xxxv. 3,4-Μεθυλενοδιοξυμεθαμφεταμίνη-d5 ως 3,4-MDMA-d5, 1,0 mL/αμπούλα, LOT number: 1209325

LGC Standards Ltd (UK)

- i. Ευτυλόνη (β-κετο-1,3-βενζοδιοξολυλ- N - αιθυλβουταναμίνη) ως άλας Eutylone HCl, 10 mg, LOT Number: 16812
- ii. Βενζυλόνη (3,4-μεθυλενοδιοξυ-N-βενζυλοκαθινόνη) ως άλας Benzylone HCl, 10 mg, LOT Number: 6986

Cerilliant Corporation (Paloma Drive, Round Rock, Texas)

- i. Κλομπραμίνη ως άλας Clomipramine HCl σε μεθανόλη, 1,0 mg/mL, LOT Number: 17321-77-6
- ii. Δεσιπραμίνη ως άλας Desipramine HCl, 1,0 mL/αμπούλα, 1,0 mg/mL σε Μεθανόλη, LOT Number: FN012711-01
- iii. Προτριπτυλίνη ως άλας Protriptyline HCl, 1,0 mL/αμπούλα, 1,0 mg/mL σε Μεθανόλη, LOT Number: FN060412-05

- iv. Νορτριπτυλίνη ως άλας Nortriptyline HCl, 1,0 mL/αμπούλα, 1,0 mg/mL σε Μεθανόλη, LOT Number: FN110711-03
- v. N- Δεσμεθυλτριμιπραμίνη ως N-Desmethyltrimipramine maleate, 1,0 mL/αμπούλα, 1,0 mg/mL σε Μεθανόλη, LOT Number: FN090710-01
- vi. Αμιτριπτυλίνη ως άλας Amitriptyline HCl, 1,0 mL/αμπούλα, 1,0 mg/mL σε Μεθανόλη, LOT Number: FN102912-01
- vii. Αριπιπραζόλη ως Aripiprazole, αμπούλα, 1,0 mg/mL σε Ακετονιτρίλιο, LOT Number: 129722-12-9
- viii. Διαζεπάμη ως Diazepam, 1,0 mL/αμπούλα, 1,0 mg/mL σε Μεθανόλη, LOT Number: FE082310-03
- ix. Κλομπαζάμη ως Clobazam, 1,0 mL/αμπούλα, 1,0 mg/mL σε Μεθανόλη, LOT Number: 22316-47-8
- x. Βρωμαζεπάμη ως Bromazepam, 1,0 mL/αμπούλα, 1,0 mg/mL σε Μεθανόλη, LOT Number: FE081610-02
- xi. Τριαζολάμη ως Triazolam, 1,0 mL/αμπούλα, 1,0 mg/mL σε Μεθανόλη, LOT Number: FE090412-02
- xii. Αλπραζολάμη ως Alprazolam, 1,0 mL/αμπούλα, 1,0 mg/mL σε Μεθανόλη, LOT Number: FE110211-01
- xiii. N-δεσμέθυλ-φλουνιτραζεπάμη ως N-desmethylflunitrazepam, 1,0 mL/αμπούλα, 1,0 mg/mL σε Μεθανόλη, LOT Number: FN021811-03
- xiv. Λοραζεπάμη ως Lorazepam, 1,0 mL/αμπούλα, 1,0 mg/mL σε Μεθανόλη, LOT Number: FE032511-01
- xv. Α-υδροξυαλπραζολάμη ως a-Hydroxyalprazolam, 1,0 mL/αμπούλα, 1,0 mg/mL σε Μεθανόλη, LOT Number: FE032311-06
- xvi. Χλωροδιαζεποξειδή ως Chlordiazepoxide, 1,0 mL/αμπούλα, 1,0 mg/mL σε Μεθανόλη, LOT Number: FE062310-01
- xvii. Νιτραζεπάμη ως Nitrazepam, 1,0 mL/αμπούλα, 1,0 mg/mL σε Ακετονιτρίλιο, LOT Number: FE040312-01
- xviii. Πραζεπάμη ως Prazepam, 1,0 mL/αμπούλα, 1,0 mg/mL σε Μεθανόλη, LOT Number: FE041212-03
- xix. Φλουνιτραζεπάμη ως Flunitrazepam, 1,0 mL/αμπούλα, 1,0 mg/mL σε Μεθανόλη, LOT Number: FE080311-01
- xx. Νορδαζεπάμη ως Nordiazepam, 1,0 mL/αμπούλα, 1,0 mg/mL σε Μεθανόλη, LOT Number: FE110410-01
- xxi. Μιδαζολάμη ως Midazolam, 1,0 mL/αμπούλα, 1,0 mg/mL σε Μεθανόλη, LOT Number: FE101512-01
- xxii. Οξαζεπάμη ως Oxazepam, 1,0 mL/αμπούλα, 1,0 mg/mL σε Μεθανόλη, LOT Number: FE013012-02
- xxiii. Ζολπιδέμη ως Zolpidem tartrate, 1,0 mL/αμπούλα, 1,0 mg/mL σε Μεθανόλη, LOT Number: FE02261402
- xxiv. Ζοπικλόνη ως Zopiclone, 1,0 mL/αμπούλα, 1,0 mg/mL σε Ακετονιτρίλιο, LOT Number: FE110311-01
- xxv. Καρβαμαζεπίνη ως Carbamazepine, 1,0 mL/αμπούλα, 1,0 mg/mL σε Μεθανόλη, LOT Number: FN102010-01

- xxvi. Τοπιραμάτη ως Topiramate, 1,0 mL/αμπούλα, 1,0 mg/mL σε Μεθανόλη, LOT Number: FN042012-01
- xxvii. Σιλδεναφίλη ως Sildenafil, 1,0 mL/αμπούλα, 1,0 mg/mL σε Μεθανόλη, LOT Number: FN111912-01
- xxviii. Μελατονίνη ως Melatonin, 1,0 mL/αμπούλα, 1,0 mg/mL σε Μεθανόλη, LOT Number: FN082911-01
- xxix. Μορφίνη-d₃ ως morphine-d₃, 1,0 mL/αμπούλα, LOT number: 67293-88-3

Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA)

- i. Μεθαδόνη ως άλας Methadone HCl, 1 mg, LOT Number: 1095-90-5
- ii. Αμφεταμίνη ως άλας Amphetamine HCl, 5 mg, LOT Number: 2706-50-5
- iii. Μεθαμφεταμίνη ως άλας Methamphetamine HCl, 5 mg, LOT Number: 51-57-0
- iv. Κοκαΐνη ως Cocaine, 5 mg, LOT Number: 50-36-2
- v. Βενζοϋλεκγονίνη ως Benzoylcegonine (BE) 5 mg, LOT Number: 519-09-5
- vi. Φλουβρωμαζεπάμη ως Flubromazepam, 1 mg, LOT Number: 0570041-28
- vii. ADB-BUTINACA, 1 mg, LOT Number: 2682867-55-4
- viii. Φεντανύλη ως άλας Fentanyl HCl, 1 mg, LOT number: 1443-54-5
- ix. Βρωφίνη ως άλας Brorphine HCl, 1 mg, LOT Number: 2707204-49-5

Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, Germany)

- i. Αγομελατίνη ως Agomelatine, 5 mg, LOT Number: 138112-76-2
- ii. Βουπροπίονη ως άλας Bupropion HCl, 50 mg, LOT Number: 31677-93-7
- iii. Ντουλοξετίνη ως άλας (S)-Duloxetine, 10 mg, LOT Number: 136434-34-9
- iv. Σερτραλίνη ως άλας Sertraline HCl, 10 mg, LOT Number: 79559-97-0
- v. Σιταλοπράμη ως άλας Citalopram hydrobromide \geq 98% (HPLC), 10 mg, LOT Number: 59729-32-7
- vi. Βενλαφαξίνη ως άλας Venlafaxine HCl, 10 mg, LOT Number: 99300-78-4
- vii. Παροξετίνη ως άλας Paroxetine maleate, 10 mg, LOT Number: 64006-44-6
- viii. N-δεσμέθυλ κλοζαπίνη ως N-desmethyl clozapine, 10 mg, LOT Number: 6104-71-8
- ix. Κλοζαπίνη ως Clozapine, 25 mg, LOT Number: 5786-21-0
- x. Αμισουλπρίδη ως Amisulpride, 10 mg, LOT Number: 71675-85-9
- xi. Αλοπεριδόλη ως Haloperidol, 5g, LOT Number: 52-86-8
- xii. Κουετιαπίνη ως άλας Quetiapine hemifumarate salt \geq 98% (HPLC), 10mg, LOT Number: 111974-72-2
- xiii. Ρισπεριδόνη ως Risperidone, 10 mg, LOT Number: 106266-06-2
- xiv. Παλιπεριδόνη ως Paliperidone, 10 mg, LOT Number: 144598-75-4
- xv. 3-τριμέθυλο-πυριτο-προπανοϊκό οξύ (TSP-d₄), LOT Number: 24493-21-8

Toronto Research Chemicals (Toronto, Canada)

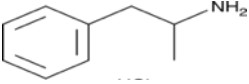
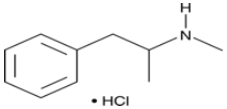
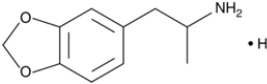
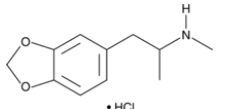
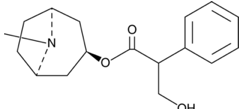
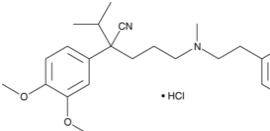
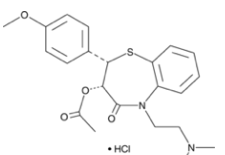
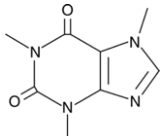
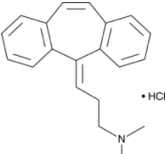
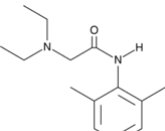
- i. 2-FDCK ως άλας 2-fluoro Deschloroketamine HCl, 1,0 mg, LOT number: 9-GAC-83-1

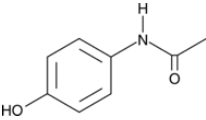
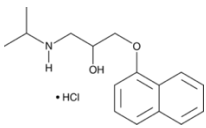
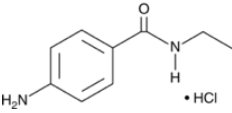
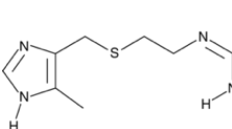
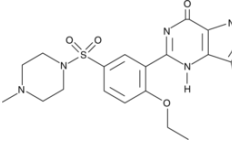
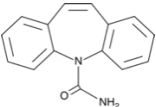
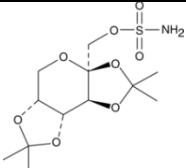
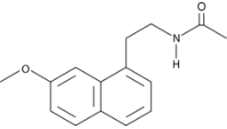
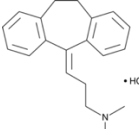
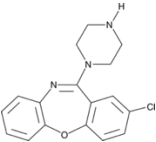
- ii. Μιρταγυνίνη ως Mitragynine, 1,0 mg, LOT number: 50-GHZ-64-1
- iii. Κλοζαπίνη-d₄ ως Clozapine-d₄, 1,0 mg, LOT number: W-510

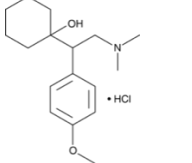
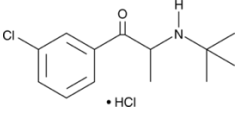
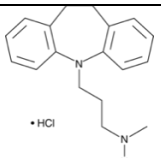
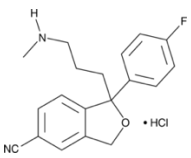
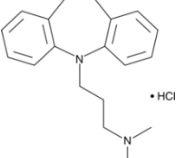
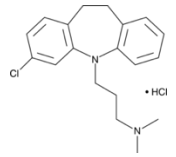
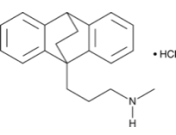
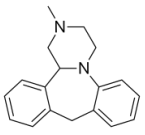
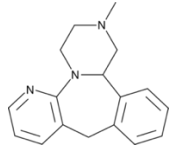
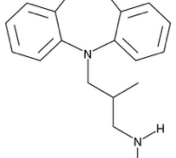
Για κάθε στερεής μορφής αναλύτη παρασκευάστηκε πρότυπο διάλυμα παρακαταθήκης συγκέντρωσης 1 mg/mL σε διαλύτη μεθανόλη ή ακετονιτρίλιο, για προσδιορισμό με υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με διαδοχική φασματομετρία μάζας (LC-MS/MS), όπου αποθηκεύτηκε στους -20°C. Κατά τον ίδιο τρόπο παρασκευάστηκαν με κατάλληλες αραιώσεις τα αντίστοιχα διαλύματα εργασίας (working solutions) σε συγκεντρώσεις 0.01 mg/mL και 0.1 mg/mL, με σκοπό τον έλεγχο απόκρισης του κάθε ανιχνευτή.

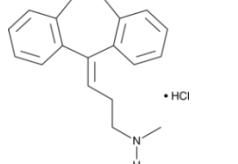
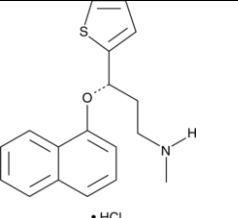
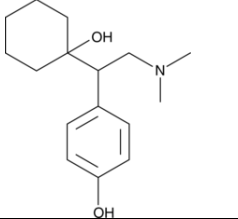
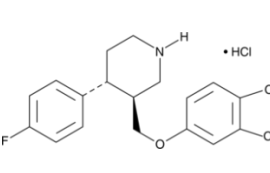
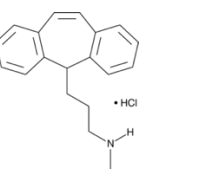
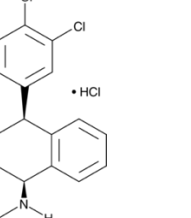
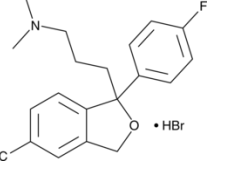
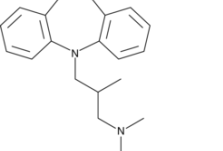
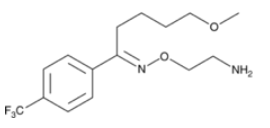
Στον πίνακα 3, παρουσιάζεται η χημική δομή, ο χημικός τύπος, το μοριακό βάρος, το pK_a και το t_{1/2} των 92 μελετώμενων ουσιών.

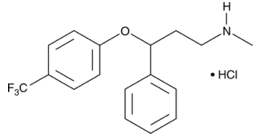
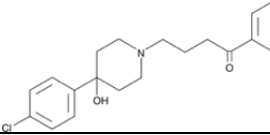
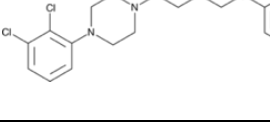
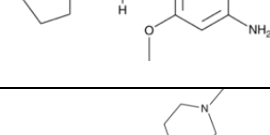
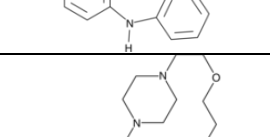
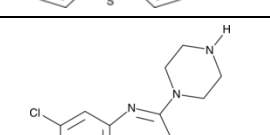
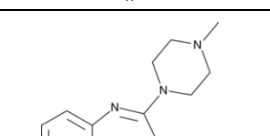
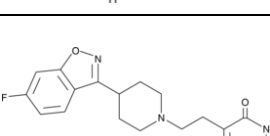
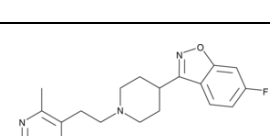
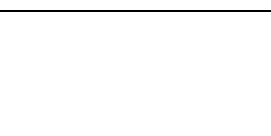
Πίνακας 3: Μελετώμενες ουσίες, χημική δομή, χημικός τύπος και μοριακό βάρος, pKa και t_{1/2}

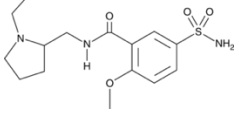
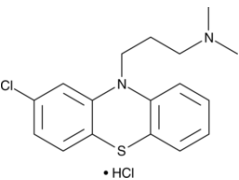
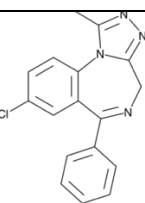
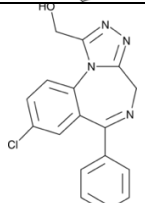
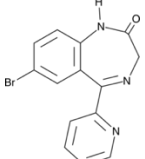
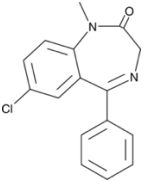
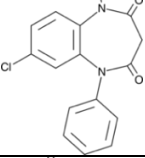
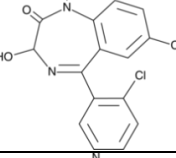
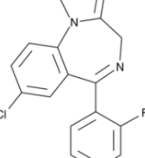
Ουσίες	Χημική δομή	Χημικός τύπος	Μοριακό βάρος (g/mol)	pKa	t _{1/2}
Αμφεταμίνες					
Αμφεταμίνη		C ₉ H ₁₃ N	135.21	9.9	7-34 h*
Μεθαμφεταμίνη		C ₉ H ₁₃ N • HCl	149.2	9.87	6-16 h
MDA		C ₁₀ H ₁₃ NO ₂ • HCl	179.2	9.67	-
MDMA		C ₁₁ H ₁₅ NO ₂ • HCl	229.7	9.9	-
Άλλες ουσίες					
Ατροπίνη		C ₁₇ H ₂₃ NO ₃	289.4	9.8	2-4 h
Βεραπαμίλη		C ₂₇ H ₃₈ N ₂ O ₄ • HCl	491.1	8.9	3-7 h
Διλτιαζέμη		C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₄ • HCl	451.0	7.7	2.8-9.2 h
Καφεΐνη		C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	194.2	0.8	2.3- 12 h
Κυκλοβενζαπρίνη		C ₂₀ H ₂₁ N • HCl	311.9	8.5	20-40 h
Λιδοκαΐνη		C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O	234.3	7.9	0.7-1.8 h

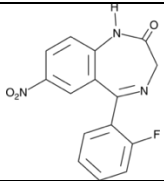
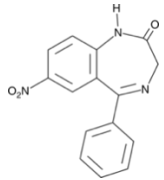
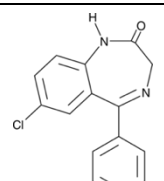
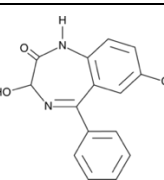
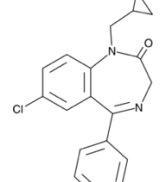
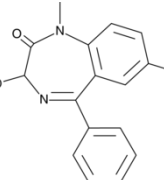
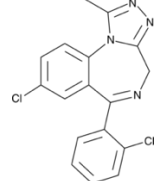
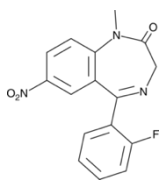
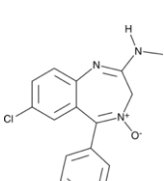
Παρακεταμόλη		$C_8H_9NO_2$	151.2	9.5	1-3 h
Προπρανολόλη		$C_{16}H_{21}NO_2 \cdot HCl$	295.8	9.5	2-4 h
Προκαϊναμίδη		$C_{13}H_{21}N_3O \cdot HCl$	271.8	9.2	2-5 h
Σιμετιδίνη		$C_{10}H_{16}N_6S$	252.3	7.1	1-4 h
Σιλδεναφίλη		$C_{22}H_{30}N_6O_4S$	474.6	8.7	1.4-4.5 h
Αντιεπιληπτικά					
Καρβαμαζεπίνη		$C_{15}H_{12}N_2O$	236.3	7.0	18-65 h (μονή δόση) 5-26 h (χρόνια θεραπεία)
Τοπιραμάτη		$C_{12}H_{21}NO_8S$	339.4	8.6	19-23 h
Αντικαταθλιπτικά					
Αγομελατίνη		$C_{15}H_{17}NO_2$	243.3	16.1	<2 h
Αμιτριπτυλίνη		$C_{20}H_{23}N \cdot HCl$	313.9	9.4	8-51 h
Αμοξαπίνη		$C_{17}H_{16}ClN_3O$	313.8	7.6	8-12 h

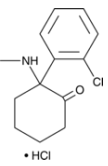
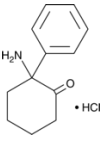
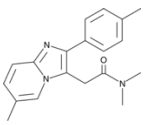
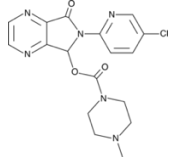
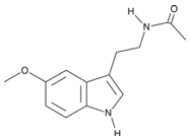
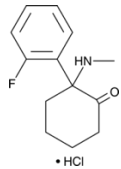
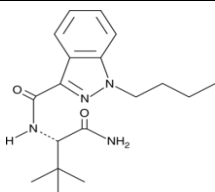
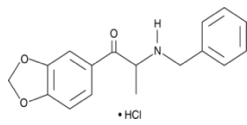
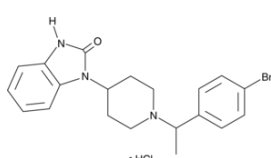
Βενλαφαξίνη		$C_{17}H_{27}NO_2 \cdot HCl$	313.9	9.4	3-7 h
Βουπροπιόνη		$C_{13}H_{18}ClNO \cdot HCl$	276.2	8.0	4-31 h
Δεσιπραμίνη		$C_{18}H_{22}N_2 \cdot HCl$	302.8	9.5	12-54 h
Δεσμέθυλ- σιταλοπράμη		$C_{19}H_{19}FN_2O \cdot HCl$	346.8	8.7	-
Ιμπραμίνη		$C_{19}H_{24}N_2 \cdot HCl$	316.9	9.5	6-20 h
Κλομιπραμίνη		$C_{19}H_{23}ClN_2 \cdot HCl$	351.3	9.5	12-36 h
Μαπροτιλίνη		$C_{20}H_{23}N \cdot HCl$	313.9	10.5	36-105 h
Μιανσερίνη		$C_{18}H_{20}N_2$	264.3	7.1	6-39 h
Μιρταζαπίνη		$C_{17}H_{19}N_3$	265.4	7.1	20-40 h
N-δεσμέθυλ- τριμπραμίνη		$C_{19}H_{24}N_2$	280.4	-	-

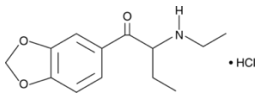
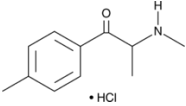
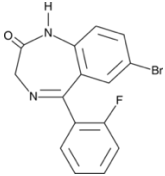
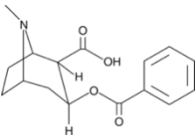
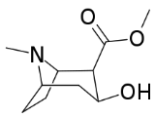
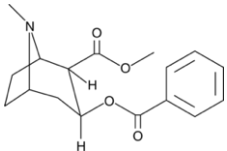
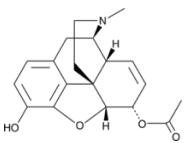
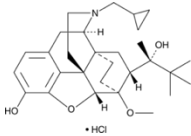
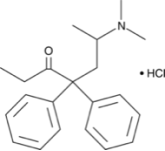
Νοτριπτυλίνη		$C_{19}H_{21}N \cdot HCl$	299.8	9.7	15-90 h
Ντουλοξετίνη		$C_{18}H_{19}NOS \cdot HCl$	333.9	9.6	8-17 h
Ο-δεσμέθυλ-βενλαφαζίνη		$C_{16}H_{25}NO_2$	263.4	9.78-14.4	-
Παροξετίνη		$C_{19}H_{20}FNO_3 \cdot HCl$	365.8	9.9	7-37 h
Προτριπτυλίνη		$C_{19}H_{21}N \cdot HCl$	299.8	8.2	54-92 h
Σερτραλίνη		$C_{17}H_{17}Cl_2N \cdot HCl$	342.7	8.5	22-36 h
Σιταλοπράμη		$C_{20}H_{21}FN_2O \cdot HBr$	405.3	9.5	25-40 h
Τριμπραμίνη		$C_{20}H_{26}N_2$	410.5	7.7	16-39 h
Φλουβοξαμίνη		$C_{15}H_{21}F_3N_2O_2$	434.4	8.7	8-28 h

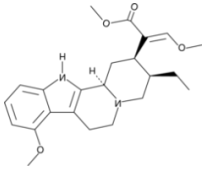
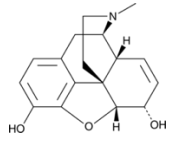
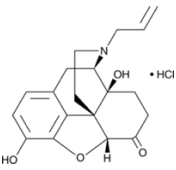
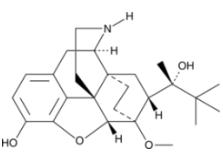
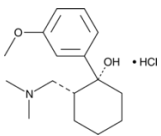
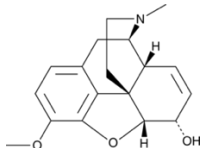
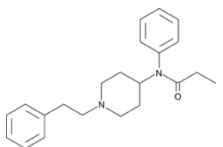
Φλουοξετίνη		$C_{17}H_{18}F_3NO \cdot HCl$	345.8	9.5	1-3 d**
Αντιψυχωσικά					
Αλοπεριδόλη		$C_{21}H_{23}ClFNO_2$	375.9	8.3	14-41 h
Αριπιπραζόλη		$C_{23}H_{27}Cl_2N_3O_2$	448.4	7.6	60-90 h
Αμισουλπρίδη		$C_{17}H_{27}N_3O_4S$	369.5	9.4	11-27 h
Κλοζαπίνη		$C_{18}H_{19}ClN_4$	326.8	3.7, 7.6	6-17 h
Κουατεπίνη		$C_{21}H_{25}N_3O_2S$	441.5	3.3, 6.8	2.7-9.3 h
Νορκλοζαπίνη		$C_{17}H_{17}ClN_4$	312.8	8.83- 15.9	-
Ολανζαπίνη		$C_{17}H_{20}N_4S$	312.4	5.0- 7.4	21-54 h
Παλιπεριδόνη		$C_{23}H_{27}FN_4O_3$	426.5	8.2, 2.6	20-30 h (από το στόμα) 25-49 d (ενδομυϊκά)
Ρισπεριδόνη		$C_{23}H_{27}FN_4O_2$	410.5	3.1- 8.2	3 -20 h

Σουλπιρίδη		$C_{15}H_{23}N_3O_4S$	341.4	9.0-10.2	4-11 h
Χλωροπρομαζίνη		$C_{17}H_{19}ClN_2S \cdot HCl$	355.3	9.3	7-119 h (μέση τιμή 18-30 h)
Βενζοδιαζεπίνες					
Αλπραζολάμη		$C_{17}H_{13}ClN_4$	308.8	2.4	6-27 h
Α-υδροξυ-αλπραζολάμη		$C_{17}H_{13}ClN_4O$	324.8	4.9-13.6	-
Βρωμαζεπάμη		$C_{14}H_{10}BrN_3O$	316.2	2.9-11	12-27 h
Διαζεπάμη		$C_{16}H_{13}ClN_2O$	284.7	3.4	21-37 h
Κλοβαζάμη		$C_{16}H_{13}ClN_2O_2$	300.7	6.6	10-50 h
Λοραζεπάμη		$C_{15}H_{10}Cl_2N_2O_2$	321.2	1.3, 11	9-16 h
Μιδαζολάμη		$C_{18}H_{13}ClFN_3$	325.8	6.2	1-4 h

N-δεσμέθυλ φλουνιτραζεπάμη		$C_{15}H_{10}FN_3O_3$	299.3	-	-
Νιτραζεπάμη		$C_{15}H_{11}N_3O_3$	281.3	3.2, 10.8	17-48 h
Νορδαζεπάμη		$C_{15}H_{11}ClN_2O$	270.7	3.5, 12	31-97 h
Οξαζεπάμη		$C_{15}H_{11}ClN_2O_2$	286.7	11.6 οξύ, 1.7 βάση	4-11 h
Πραζεπάμη		$C_{19}H_{17}ClN_2O$	324.8	2.7	1-3 h
Τεμαζεπάμη		$C_{16}H_{13}ClN_2O_2$	300.7	1.3	3-13 h
Τριαζολάμη		$C_{17}H_{12}Cl_2N_4$	343.2	1.2, 1.5, 2.2, 6.5	1.8-3.9 h
Φλουνιτραζεπάμη		$C_{16}H_{12}FN_3O_3$	313.3	1.8	9-25 h
Χλωροδιαζεποξείδη		$C_{16}H_{14}ClN_3O$	299.8	4.8	6-27 h

Κεταμίνη & μεταβολίτης					
Κεταμίνη		$C_{13}H_{16}ClNO \cdot HCl$	274.2	7.5	3-4 h
Νορκεταμίνη		$C_{12}H_{15}NO \cdot HCl$	225.7	7.2	-
Υπνωτικοί παράγοντες					
Ζολπιδέμη		$C_{19}H_{21}N_3O$	307.4	6.2	1.4-4.5 h
Ζοπικλόνη		$C_{17}H_{17}ClN_6O_3$	388.8	6.7	3.5-6.5 h
Μελατονίνη		$C_{13}H_{16}N_2O_2$	232.3	15.8, οξύ, 1.6 βάση	40-50 min***
NPS					
2-FDCK		$C_{13}H_{16}FNO \cdot HCl$	257.7	6.51 ± 0.20	-
ADB-BUTINACA		$C_{18}H_{26}N_4O_2$	330.4	-	-
Βενζυλόνη		$C_{17}H_{17}NO_3 \cdot HCl$	319.8	8.11 ± 0.11	-
Βρωρφίνη		$C_{20}H_{22}BrN_3O \cdot HCl$	436.8	6.61	-

Ευτυλόνη		$C_{13}H_{17}NO_3 \cdot HCl$	271.7	7.94 ± 0.19	-
Μεφεδρόνη		$C_{11}H_{15}NO \cdot HCl$	213.7	-	-
Φλουμπρομαζεπάμη		$C_{15}H_{10}BrFN_2O$	333.2	11.5 ± 0.70	-
Ουσίες κατάχρησης					
Αλκαλοειδή της κόκας και μεταβολίτες					
Βενζοϋλεκγονίνη (BE)		$C_{16}H_{19}NO_4$	289.3	$3.15, 9.5$	12 h
Μεθυλεστέρας της εκγονίνης (EME)		$C_{10}H_{17}NO_3$	199.2	9.04	4.2 h
Κοκαΐνη		$C_{17}H_{21}NO_4$	303.4	8.6	0.7-1.5 h
Οπιούχα					
6-Μονοακέτυλο μορφίνη (6-MAM)		$C_{19}H_{21}NO_4$	327.4	9.08	-
Βουπρενορφίνη		$C_{29}H_{41}NO_4$	504.1	$8.5, 10.0$	2-4 h (παρεντερικά) 18-49 h (υπογλώσσια)
Μεθαδόνη		$C_{21}H_{27}NO \cdot HCl$	345.9	8.6	15-55 h

Μιτραγυνίνη		$C_{23}H_{30}N_2O_4$	398.5	8.11 ± 0.11	4-9 h (από το στόμα σε αουραίους)
Μορφίνη		$C_{17}H_{19}NO_3$	285.3	9.6 οξύ, 7.9 βάση	1.3-6.7 h
Ναλοξόνη		$C_{19}H_{21}NO_4$	363.8	7.9	30-80 min
Νορβουπρενορφίνη		$C_{25}H_{35}NO_4$	413.6	9.8 οξύ, 10.4 βάση	-
Τραμαδόλη		$C_{16}H_{25}NO_2 \cdot HCl$	299.8	9.4	4.3-7.7 h
Κωδεΐνη		$C_{18}H_{21}NO_3$	299.4	8.2	1.2-3.9 h
Φεντανύλη		$C_{22}H_{28}N_2O$	336.5	8.4	3-12 h

*h: hours= ώρες, **d: days= ημέρες, ***min: minutes=λεπτά

2.1.2 Εργαστηριακές Συσκευές

Για την πραγματοποίηση της ερευνητικής διατριβής χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα όργανα και συσκευές:

- i. Σύστημα φασματομετρίας μαζών (Triple Quad™ 5500+) του οίκου Sciex Darmstadt, Γερμανία)
- ii. Σύστημα υγρής χρωματογραφίας υπερ-υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού συστοιχίας διόδων του οίκου Dionex Softron GmbH, Part of Thermo Fisher Scientific Inc. (Dornierstraße, Γερμανία).

iii. NMR φασματογράφος Bruker AV500 (500.13 MHz) (Bruker Biospin, Rheinstetten, Γερμανία)

-AVII – TXI

-NEO- TCPI

Λοιπός εργαστηριακός εξοπλισμός:

iv. Φυγόκεντρος (IKA G-L, Γερμανία)

v. Αναλυτικός ζυγός (Explorer™ OHAUS, USA)

vi. Παρασκευαστικός ζυγός (Adventurer™ OHAUS, USA)

vii. Ατομικός αναδευτήρας περιδίνησης (Vortex) (Velp Scientifica, Ιταλία)

viii. Συσκευή λουτρού υπερήχων (Elmasonic S ultrasonic, Γερμανία)

ix. Θερμοστατούμενος κλίβανος

x. Ψυγείο και καταψύκτης

xi. Συσκευή παρασκευής υπερκάθαρου νερού (Aquatron Water Still A4000D purification system from Bibby Sterilin Limited (Staffordshire, Ηνωμένο Βασίλειο)

xii. Ρυθμιζόμενη αυτόματη πιπέτα (2-20 µL)

xiii. Ρυθμιζόμενη αυτόματη πιπέτα (10-100 µL)

xiv. Ρυθμιζόμενη αυτόματη πιπέτα (100-1000 µL)

xv. Ρύγχη πιπετών (2-100 µL)

xvi. Ρύγχη πιπετών (100-1000 µL)

xvii. Πλαστικές πιπέτες μίας χρήσεως

xviii. Γυάλινα σιφόνια μετρήσεων (5 και 10 mL)

xix. Γυάλινοι εσφυρισμένοι κωνικοί δοκιμαστικοί σωλήνες

xx. Ογκομετρικές φιάλες (25, 50 και 100 mL)

xxi. Ογκομετρικοί κύλινδροι (10, 25, 50 και 100 mL)

xxii. Φιαλίδια Eppendorf χωρητικότητας 1,5 mL, 2 mL (Eppendorf AG, Hamburg, Γερμανία)

xxiii. Πλαστικά φιαλίδια Falcon χωρητικότητας 50ml αντίστοιχα (Greiner bio-one)

xxiv. Σωλήνας NMR 5 mm (Wilmad® & Norell® Standard Series™)(Merck (Darmstadt, Γερμανία)

2.1.3 Διαλύτες, αντιδραστήρια και υλικά

Όλοι οι διαλύτες και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για LC-MS/MS και NMR αναλύσεις ήταν τουλάχιστον υψηλής καθαρότητας (LC-MS βαθμού). Ο τρίτο-βουτυλο-

μεθυλαιθέρας (MTBE) 99.5%, το οξείδιο του δευτερίου (D_2O) αγοράστηκε από Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, Γερμανία), ενώ το οργανικό πολυμερές πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG 300) αγοράστηκε από Sigma-Aldrich (Αθήνα, Ελλάδα). Το υδροχλωρικό οξύ (37%), ο διαιθυλαιθέρας, το υδροξείδιο του νατρίου (NaOH), το μονοένυδρο δισόξινο φωσφορικό νάτριο (NaH_2PO_4), το πρόδρομο μόριο sol-gel τριμεθοξυμεθυλοσιλάνιο (MTMS), ο καταλύτης τριφθοραιθανικό οξύ (TFA) και η ακετόνη αγοράστηκαν από τη Merck (Darmstadt, Γερμανία). Η σκόνη διττανθρακικού νατρίου ($NaHCO_3$) αποκτήθηκε από την Mallinckrodt Pharmaceuticals (St. Louis, ΗΠΑ). Τα φίλτρα Whatman, μικρο-υαλοϊνών 100 mm και κυτταρίνης 125 mm, αγοράστηκαν από την General Electric (Boston, MA, USA). Οι διαλύτες ακετονιτρίλιο, μεθανόλη, νερό, και φορμικό οξύ αγοράστηκαν από την CARLO ERBA Reagents GmbH (Cornaredo, Ιταλία), ενώ το οξικό αμμώνιο (99%) από Fluka™ Analytical Standards (Steinheim, Γερμανία). Δις αποσταγμένο νερό λαμβανόταν από συσκευή συστήματος καθαρισμού Aquatron Water Still A4000D του οίκου Bibby Sterilin Limited (Staffordshire, Ηνωμένο Βασίλειο). Το διχλωρομεθάνιο αγοράστηκε από τη Fisher Scientific (μέρος της Thermo Fisher Scientific) (Waltham, MA, ΗΠΑ). Τέλος, το δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο 99.9% ($DMSO-d_6$) αποκτήθηκε από τη Deutero GmbH (Kastellaun, Γερμανία).

2.2 ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

A. Βιολογικά υλικά από υγιείς δότες

Τα βιολογικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη και επικύρωση αναλυτικών μεθοδολογιών προσδιορισμού των προαναφερθεισών ουσιών, με υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας, ήταν το ολικό αίμα¹ και τα σίελα². Δείγματα ούρων³ χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία πρωτότυπης μεθόδου ανίχνευσης ουσιών με διαφορετική τεχνική ανάλυσης (NMR).

1. Δείγματα ολικού αίματος συλλέχθηκαν από τη Μονάδα Αιμοληψίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, καθώς και από το προσωπικό του εργαστηρίου. Σε κάθε περίπτωση, τα συγκεκριμένα δείγματα ήταν από υγιείς δότες, με απουσία οποιασδήποτε φαρμακευτικής αγωγής. Τα δείγματα ολικού αίματος αποθηκεύτηκαν σε σωληνάρια των 2 mL, BD Vacutainer® (Becton Dickinson) παρουσία αντιπηκτικού παράγοντα και συντηρητικού (φθοριούχο νάτριο 5 mg και καλιούχο οξαλικό άλας 4 mg), και ακολούθησε αποθήκευση αυτών στους 4°C μέχρι τη στιγμή της ανάλυσής τους (Σχήμα 14).



Σχήμα 14: Σωληνάρια Vacutainer® παρουσία αντιπηκτικών και συντηρητικών παραγόντων

2. Για την ανάπτυξη και επικύρωση μιας διαφορετικής αναλυτικής μεθοδολογίας συλλέχθηκαν δείγματα σιέλων, αποκλειστικά από το προσωπικό του εργαστηρίου. Η συλλογή των σιέλων πραγματοποιείται με μια απλή τεχνική απόχρεμψης, η οποία επιτρέπει στο υγρό να συσσωρεύεται στο κάτω μέρος του στόματος ενώ το άτομο πτύει σε έναν προζυγισμένο δοκιμαστικό σωλήνα κάθε 60 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια, τα συλλεγμένα σίελα αναδεύονται για 30 δευτερόλεπτα και τοποθετούνται σε λουτρό υπερήχων για 60 δευτερόλεπτα. Τέλος, τα δείγματα αποθηκεύονται σε πλαστικά σωληνάρια, και παραμένουν στους 4°C μέχρι τη στιγμή της ανάλυσής τους.

3. Για την ανάπτυξη νέας μεθοδολογίας ανίχνευσης ουσιών σε ούρα συλλέχθηκε βιολογικό υλικό σε πλαστικά φιαλίδια Falcon, από το προσωπικό του εργαστηρίου, και φυγοκεντρήθηκε (5 min, 10,000 rpm). Κλάσματα των 5 mL ούρων αποθηκεύτηκαν, στους 4°C μέχρι την ανάλυση.

B. Βιολογικά υλικά από κλινικά δείγματα

Η αναλυτική μέθοδος που αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε στο ολικό αίμα, εφαρμόστηκε σε κλινικά δείγματα που ελήφθησαν από το τμήμα επειγόντων περιστατικών, την Ψυχιατρική, την Παιδιατρική, την Παθολογική και την Νευρολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Το ολικό αίμα αποθηκεύεται σε σωληνάρια των 5 mL, BD Vacutainer® SST II Advance (Becton Dickinson), που περιέχουν επιταχυντή πήξεως ψεκασμένο στα τοιχώματα και ένα χημικώς αδρανές gel διαχωρισμού, ωστόσο δεν περιέχουν αντιπηκτικό. Ακολουθεί αποθήκευση στους 4°C μέχρι τη στιγμή της ανάλυσης (Σχήμα 15).



Σχήμα 15: Σωληνάρια Vacutainer SST II Advance χωρίς παρουσία αντιπηκτικών παραγόντων

Γ. Βιολογικά δείγματα από νεκροτομικό υλικό

Η παρούσα διατριβή επεκτάθηκε στην μελέτη μεταθανάτιων βιολογικών υλικών. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε νεκροτομικό ολικό αίμα το οποίο συλλέχθηκε από περιστατικά που υπεβλήθησαν σε νεκροψία-νεκροτομή στο Εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας, του Τμήματος Ιατρικής, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κατά τη χρονική περίοδο 2020-2024. Η διενέργεια της νεκροψίας-νεκροτομής πραγματοποιείται 12-18 ώρες μετά τη στιγμή του θανάτου, για την ιατροδικαστική διερεύνηση των αιτών θανάτου σε αιφνίδιους ή βίαιους θανάτους. Το ολικό αίμα αποθηκεύεται σε σωληνάρια των 2 mL, BD

Vacutainer®(Becton Dickinson) παρουσία αντιπηκτικού και συντηρητικού παράγοντα, και αποθηκεύεται στους 4°C μέχρι τη στιγμή της ανάλυσής.

2.3 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ FPSE ΦΙΛΤΡΟΥ

2.3.1 Προεργασία του υποστρώματος πριν την επικάλυψη

Ένα κυκλικό φίλτρο κυτταρίνης (Whatman Cellulose) διαμέτρου 125 mm και ένα φίλτρο φίλτρο υαλοϊνών (Whatman Microfiber Glass) των 110 mm τοποθετήθηκαν σε ένα ποτήρι ζέσεως με απιονισμένο νερό και έπειτα σε λουτρό υπερήχων για 15 λεπτά. Στη συνέχεια, η διαδικασία επαναλήφθηκε με NaOH (1,0 M, 1 ώρα) και HCl (0,1 M, 1 ώρα). Πλύση με απιονισμένο νερό πραγματοποιούνταν στο τέλος κάθε βήματος. Έπειτα, το φίλτρο αφέθηκε να στεγνώσει στους 25 °C για 24 ώρες, σε ατμοσφαιρικό αέρα.

2.3.2 Σύνθεση του διαλύματος κολλοειδούς-γέλης για την επικάλυψη του υποστρώματος

Παρασκευάστηκε διάλυμα PEG300 των 5gr, ως πρόδρομος κολλοειδούς γέλης, χρησιμοποιώντας 5 mL MTMS ως πρόδρομη ένωση, 2 mL καταλύτη TFA (95%) με 5% νερό και ένα μείγμα 10 mL ακετόνης και διχλωρομεθανίου (50:50 v/v). Το διάλυμα αναμίχθηκε σε συσκευή Vortex για 5 λεπτά και φυγοκεντρήθηκε για άλλα 5 λεπτά. Η επικάλυψη ξεκίνησε όταν το καθορισμένο μέσο βυθίστηκε στο διάλυμα κολλοειδούς γέλης για 4 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την επικάλυψη, το επικαλυμμένο υπόστρωμα αφέθηκε να στεγνώσει για 24 ώρες στον ξηραντήρα για την εξάτμιση του διαλύτη και την ολοκλήρωση της αντίδρασης. Στη συνέχεια, ξεπλύθηκε με ένα μείγμα ακετόνης και διχλωρομεθανίου (50:50 v/v) υπό χρήση υπερήχων για 30 λεπτά, και ακολούθησε ξήρανση στον αέρα για 30 λεπτά, όπου τέλος αποκόπηκε σε κυκλικά κομμάτια διαμέτρου 1cm και αποθηκεύτηκε μέχρι τη χρήση.

2.4 ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΟΥΣΙΩΝ ΑΠΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

2.4.1 Μεθοδολογία υγρής-υγρής εκχύλισης ολικού αίματος

Επιμολύνθηκαν 180 μL ολικού αίματος, που δεν περιείχε κάποια από τις 92 μελετώμενες ουσίες, με 20 μL μείγματος των 92 ενώσεων συγκέντρωσης 2500 ng/mL (τελικός όγκος 200 μL). Η τελική συγκέντρωση που επετεύχθη ήταν 250 ng/mL. Πραγματοποιήθηκαν πέντε επαναλαμβανόμενες δοκιμές για την βελτιστοποίηση των παρακάτω παραμέτρων:

1) Διαλύτης έκλουσης με προσθήκη:

- α) 1,0 mL τριτ-βουτυλο-μεθυλαιθέρας (MTBE)
- β) 1,0 mL τριτ-βουτυλο-μεθυλαιθέρας (MTBE) οξινισμένο με 0.1 M υδροχλωρικό οξύ (HCl) 37% (w/v)

2) Διαλύτης ανασύστασης με χρήση:

- α) μεθανόλη 100%
- β) κινητή (A): οργανική (B) φάση σε ποσοστό 50:50%
- γ) κινητή (A): οργανική (B) φάση σε ποσοστό 88:12%

Πίνακας 4: Οι τέσσερις διαφορετικές μέθοδοι εκχύλισης ολικού αίματος που εφαρμόστηκαν κατά την βελτιστοποίηση της προκατεργασίας δειγμάτων

Μέθοδος	Διαλύτης Έκλουσης/ Όγκος (μL)	Διαλύτης Επαναδιάλυσης (v/v)
1	MTBE/ 1000 μL	MeOH 100%
2	MTBE/ 1000 μL	A: B 50:50%
3	MTBE/ 1000 μL	A: B 88:12%
4	MTBE+HCl/ 991,4 μL +8,6 μL	A: B 88:12%

Συνοψίζοντας τα παραπάνω αποτελέσματα, διαμορφώθηκε η τελική μεθοδολογία εκχύλισης ολικού αίματος:

Μεταφορά 200 μL δείγματος ολικού αίματος σε σωληνάριο Eppendorff των 2 mL με επακόλουθη προσθήκη 200 μL ανθρακικού ρυθμιστικού διαλύματος (1 M, pH 9,5) και 20 μL μείγματος 3 εσωτερικών προτύπων. Ακολουθεί πολύ καλή ανάδευση (vortex) για 10 λεπτά. Η εκχύλιση των προσδιοριζόμενων ουσιών έγινε με προσθήκη 1,0 mL τριτο-βουτυλο-μεθυλαιθέρας (MTBE) με 0.1 M υδροχλωρικού οξέος (HCl) (37%). Το δείγμα αναδεύεται έντονα και ακολουθεί φυγοκέντρηση (10 min, 10,000 rpm). Στη συνέχεια, η οργανική στοιβάδα μεταφέρεται σε σωληνάριο Eppendorf όγκου 2 mL όπου εξατμίζεται μέχρι ξηρού με χρήση N_2 , σε θερμοκρασία 40°C. Το εκχύλισμα επαναδιαλύεται σε 50 μL A:B (88:12%), και αναδεύεται για 30s. Τέλος, το εκχύλισμα μεταφέρεται σε φιαλίδιο ανάλυσης, το οποίο τοποθετείται στον αυτόματο δειγματολήπτη για ανάλυση.

2.4.2 Μεθοδολογία εκχύλισης FPSE βρωφίνης από σιέλα

Επιμολύνθηκαν 980 μL δείγμα σιέλων με 20 μL βρωφίνης συγκέντρωσης 10.000 ng/mL (τελικό όγκος 1 mL). Η τελική συγκέντρωση που επετεύχθη ήταν 200 ng/mL. Πραγματοποιήθηκαν 10 πειραματικές δοκιμές με χρήση διαφορετικών παραμέτρων κατά την διάρκεια της εκχύλισης προκειμένου να επιλεγθούν οι καταλληλότερες συνθήκες.

Πραγματοποιήθηκαν δοκιμές στο:

- i. **Ρύθμιση pH σιέλων:** 4.5 ή 7 ή 9
- ii. **Χρόνος εκχύλιση:** 10 ή 20 ή 30 λεπτά
- iii. **Διαλύτη έκλουσης:** Μεθανόλη ή ακετονιτρίλιο ή μεθανόλη: ακετονιτρίλιο (50:50%)
- iv. **Χρόνος έκλουσης:** 5 ή 10 ή 15 λεπτά
- v. Τύπο των συντιθέμενων φίλτρων **Whatman (κυτταρίνης και υαλοϊνών)**, αλλάζοντας κάθε φορά μία παράμετρο και διατηρώντας όλες τις άλλες σταθερές.

Πίνακας 5: Οι 10 διαφορετικές μέθοδοι εκχύλισης σιέλων που δοκιμάστηκαν κατά την βελτιστοποίηση της προκατεργασίας δειγμάτων

Μέθοδοι	Τύποι Φίλτρων	Χρόνος Εκχύλισης (min)	pH	Βέλτιστος Χρόνος Έκλουσης (min)	Διαλύτης Έκλουσης
1	WC	30	7	10	MeOH
2	FG	30	7	10	MeOH
3	FG	30	4.5	10	MeOH
4	FG	30	9	10	MeOH
5	FG	10	7	10	MeOH
6	FG	20	7	10	MeOH
7	FG	30	7	10	MeOH:AcN 50:50 (v/v)
8	FG	30	7	10	AcN
9	FG	30	7	15	MeOH
10	FG	30	7	5	MeOH

Συνοψίζοντας τα παραπάνω αποτελέσματα διαμορφώθηκε η τελική μεθοδολογία εκχύλισης σιέλων:

Σε ένα 1 mL σιέλων προστίθενται 100 μL ακετονιτρίλιο, ακολουθεί ανάδευση για 30 δευτερόλεπτα, λουτρό υπερήχων για 60 δευτερόλεπτα και, τέλος, φυγοκέντρωση στις 15.000 rpm για 15 λεπτά. Το υπερκείμενο τοποθετείται σε φιαλίδιο με φίλτρο υαλοϊνών (FG) επικαλυμμένο με PEG300, όπου παραμένει για 30 λεπτά, ώστε να αλληλεπιδράσει με ανάδευση στις 300 rpm, pH=7. Τέλος, προστέθηκαν 150 μL μεθανόλη για να επιτευχθεί εκρόφηση υπό ήπια ανάδευση στις 300 rpm για 10 λεπτά.

2.5 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

Για τον προσδιορισμό των επιλεγμένων ουσιών χρησιμοποιήθηκε υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με διαδοχική φασματομετρία μάζας (LC-MS/MS). Η ενόργανη διάταξη που χρησιμοποιήθηκε ήταν του οίκου Dionex UltiMate 3000 UHPLC (Thermo Scientific, Waltham, MA, ΗΠΑ) που αποτελείται από :

- i. μια δυαδική αντλία με δυνατότητα βαθμιδωτής έκλουσης
- ii. έναν αυτόματο δειγματολήπτη με σταθερή θερμοκρασία στους 5 °C
- iii. έναν θερμοστατούμενο θάλαμο τοποθέτησης της χρωματογραφικής στήλης

Οι προσδιοριζόμενες ενώσεις διαχωρίστηκαν με χρωματογραφική στήλη αντίστροφης φάσης, η οποία φέρει ως υλικό πλήρωσης ομάδες σιλανόλης χημικά συνδεδεμένες με αλυσίδες 18 ατόμων άνθρακα (C18). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε η στήλη Accucore™ C18 (μήκος 50 mm × εσωτερική διάμετρο 3 mm, και διάμετρος σωματιδίων 2,6 μm) εξοπλισμένη με προστήλη (2,1 mm × 0,2 μm) του οίκου Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, ΗΠΑ). Η θερμοκρασία τόσο της προστήλης όσο και της αναλυτικής στήλης παρέμενε σταθερή στους 30°C.

Η κινητή φάση αποτελούνταν από υδατικό διάλυμα οξικού αμμωνίου συγκέντρωσης 10 mM, pH 3,7, με 0,1% φορμικό οξύ (διαλύτης έκλουσης A) και η οργανική φάση περιείχε ακετονιτρίλιο με 0,1% φορμικό οξύ (διαλύτης έκλουσης B). Λόγω της μεγάλης ποικιλίας που παρουσιάζουν οι αναλύτες ως προς την πολικότητά τους, καθώς και για τον καλύτερο διαχωρισμό των συστατικών του δείγματος επιλέχθηκε η χρησιμοποίηση βαθμωτής έκλουσης (gradient elution). Η ροή παρέμεινε σταθερή στα 0.5 mL/min.

Επιπλέον, εξετάστηκε και η σταθερότητα των ρυθμιστικών διαλυμάτων που αποτελούσαν την υδατική κινητή φάση, τα οποία παρέμεναν σταθερά χωρίς την παρουσία αλγών και αιωρημάτων για τουλάχιστον ένα μήνα, σε θερμοκρασία δωματίου (25°C). Για την αποφυγή επιμόλυνσης κατά τη μεταφορά των δειγμάτων το σύστημα επιτρέπει τη δυνατότητα έκπλυσης της βελόνας έγχυσης εξωτερικά με μεθανόλη 20%, πριν και έπειτα από κάθε χρήση της.

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το αντίστοιχο λογισμικό πρόγραμμα Chromeleon 7.2 Chromatography Data System, Reversion 1.1 του οίκου Thermo Fisher Scientific Inc..

2.5.1 Βελτιστοποίηση παραμέτρων Υγρής Χρωματογραφίας

Για ανάπτυξη μεθόδων στην υγρή χρωματογραφία πραγματοποιήθηκαν πειράματα για την βελτιστοποίηση παραμέτρων όπως το πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης και ο όγκος του ενέσιμου δείγματος, προκειμένου να επιτευχθεί ο καλύτερος χρωματογραφικός διαχωρισμός στο ολικό αίμα και στα σίελα.

2.5.1.1 Βαθμωτή έκλουση στο ολικό αίμα

Εφαρμόστηκαν τέσσερις δοκιμές στο πρόγραμμα της βαθμωτής έκλουσης για την βελτιστοποίηση του χρωματογραφικού διαχωρισμού των 92 ουσιών-στόχων στο ολικό αίμα. Παρατίθενται αναλυτικά τα δοκιμαστικά προγράμματα που περιέχουν τις συστάσεις της οργανικής φάσης (%B) κάθε χρονική στιγμή.

A. Πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης 12 λεπτών:

Η δοκιμή με τον μεγαλύτερο χρόνο ανάλυσης (12,0 λεπτά), ξεκινούσε με 5% διαλύτη B μέχρι το 1,50 λεπτό. Έπειτα, στο 2^ο βήμα ο διαλύτης B αυξήθηκε στο 45% από το 6,50 έως το 7,00 λεπτό. Στο 3^ο βήμα, ο διαλύτης B αυξήθηκε στο 80% από το 9,00 έως το 9,50 λεπτό. Ενώ στο 4^ο βήμα, ο διαλύτης B έφτασε στο 100% από το 9,50 έως το 10,5 λεπτό. Τέλος, στο 5^ο βήμα, ο διαλύτης B επέστρεψε στην αρχική αναλογία (4%) από 11,0 ως 12,0 min.

B. Πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης 11 λεπτών:

Σε αυτή τη δοκιμή ο χρόνος ανάλυσης μειώθηκε στα 11 λεπτά. Εδώ το 1^ο βήμα άρχιζε από 35% διαλύτη B μέχρι το 1,00 λεπτό. Έπειτα από το 6,50 μέχρι το 7,00 λεπτό ο διαλύτης B έφτανε στο 80%. Στο 3^ο βήμα ο διαλύτης B έφτανε στα 100% από το 7,00 έως το 8,00 λεπτό. Στο 4^ο βήμα σταδιακά πραγματοποιούνταν μείωση του διαλύτη B στο 80% από το 9,00 μέχρι το 10,0 λεπτό. Τέλος, στο 5^ο βήμα, πραγματοποιούνταν επανασύσταση της αρχικής αναλογίας (35% B) από το 10,0 ως το 11,0 λεπτό.

Γ. Πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης 9,5 λεπτών:

Σε αυτή τη δοκιμή ο χρόνος ανάλυσης μειώθηκε στα 9.5 λεπτά. Στο 1^ο βήμα η σύσταση του διαλύτη B ήταν στο 12% από το 0,0 μέχρι το 1,00 λεπτό. Στο 2^ο βήμα, ο διαλύτης B έφτασε στο 60% από το 3,95 έως το 7,50 λεπτό. Έπειτα, στο 3^ο βήμα, ο διαλύτης B έφτανε στα 100% από το 7,50 έως το 8,50 λεπτό. Τέλος, στο 4^ο βήμα, πραγματοποιούνταν επανασύσταση της αρχικής αναλογίας (12% B) από το 9,00 ως το 9,50 λεπτό.

Δ. Πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης 7,5 λεπτών:

Σε αυτή τη δοκιμή ο χρόνος ανάλυσης μειώθηκε στα 7.5 λεπτά. Στο 1^ο βήμα ο διαλύτης B έφτασε στο 12% από το 0,0 μέχρι το 0,100 λεπτό. Στο 2^ο βήμα, ο διαλύτης B έφτασε στο 40% από το 2,50 λεπτό. Έπειτα, ο διαλύτης B έφτασε στο 100% B από το 4,50 έως το 6,00 λεπτό.

Το επόμενο βήμα περιλάμβανε την επανασύσταση της αρχικής αναλογίας (12% B) από 6,10 ως 7,50 min.

Πίνακας 6: Τελικό πρόγραμμα βαθμωτής έκλυσης ουσιών από ολικό αίμα, 7,5 λεπτών

Εκλυσιτικό πρόγραμμα Δ		
	Χρόνος (min)	% Αναλογία B
1^ο Βήμα	0,100	12,0
2^ο Βήμα	2,500	40,0
3^ο Βήμα	4,500	100,0
4^ο Βήμα	6,000	100,0
5^ο Βήμα	6,100	12,0
6^ο Βήμα	7,500	12,0

2.5.1.2 Βαθμωτή έκλυση στα σίελα

Το πρόγραμμα βαθμωτής έκλυσης στα σίελα βασίστηκε στο προαναφερθέν τελικό πρόγραμμα Δ και τροποποιήθηκε, προκειμένου να επιτευχθεί μικρότερος χρόνος ανάλυσης της βρωφίνης.

Πίνακας 7: Τελικό πρόγραμμα βαθμωτής έκλυσης βρωφίνης από σίελα, 6,5 λεπτών

Εκλυσιτικό πρόγραμμα		
	Χρόνος (min)	% Αναλογία B
1^ο Βήμα	0,100	12,0
2^ο Βήμα	1,000	50,0
3^ο Βήμα	2,000	100,0
4^ο Βήμα	5,000	100,0
5^ο Βήμα	5,500	12,0
6^ο Βήμα	6,500	12,0

2.5.1.3 Όγκος εισαγωγής δείγματος

Πραγματοποιήθηκαν πειραματικές δοκιμές αναφορικά με τον όγκο εισαγωγής δείγματος. Συγκεκριμένα, δοκιμάστηκαν οι εξής όγκοι: 1 μL, 2 μL και 5 μL.

2.6 ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ

Το σύστημα υγρής χρωματογραφίας ήταν συζευγμένο με αναλυτή φασματομετρίας μάζας τριπλού τετραπόλου Q-Trap 5500⁺™ του οίκου Sciex (Darmstadt, Γερμανία).

Οι παράμετροι που καθορίζουν την τελική ευαισθησία της μεθόδου αφορούν τον χρωματογραφικό διαχωρισμό, τον ανιχνευτή, την πηγή, και τα δυναμικά του τετραπόλου.

Ο ανιχνευτής ρυθμίστηκε σε λειτουργία «παρακολούθηση πολλαπλών αντιδράσεων θραυσματοποίησης ιόντων» (multiple reaction monitoring, MRM). Για κάθε προσδιοριζόμενη ουσία καθορίστηκαν τρία ιόντα (transitions), ο χρόνος συγκράτησης και ένα εύρος αυτού $\pm 0,2$ min. Όσον αφορά τις συνθήκες λειτουργίας του ανιχνευτή MS, ο ιονισμός ήταν θετικός (+) και πραγματοποιήθηκε με τεχνική ιονισμού ατμοσφαιρικής πίεσης και συγκεκριμένα του ηλεκτροψεκασμού Jetstream® (ESI).

Η θερμοκρασία της πηγής ιονισμού ελέγχθηκε σε συνδυασμό με τις τιμές αερίου πηγής ιονισμού 1 & 2 (Gas 1 & Gas 2) για την εύρεση της καλύτερης απόκρισης για την κάθε ουσία. Οι δοκιμές περιλάμβαναν θερμοκρασία 450, 500, 550, 600, 650 και 700 °C και αντίστοιχα 45, 50, 55, 60, 65 και 70 psi Gas 1 & Gas 2.

Όλα τα ιόντα (transitions), τα δυναμικά θραυσματοποίησης (fragmentor voltage), οι ενέργειες σύγκρουσης (Collision Energy - CE) και όλες οι άλλες ρυθμίσεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τον προγραμματισμένο αλγόριθμο MRM που ενσωματώθηκε στην έκδοση λογισμικού Sciex Analyst ® 1.7.1 (Sciex, Darmstadt, Γερμανία).

Το λογισμικό SciexOS 1.6 (Sciex, Darmstadt, Γερμανία) χρησιμοποιήθηκε για την επεξεργασία δεδομένων. Το ιόν με τη μεγαλύτερη αφθονία χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό, ενώ το δεύτερο και τρίτο σε αφθονία για ποιοτική ταυτοποίηση. Στον Πίνακα παρουσιάζονται τα πρόδρομα και παραγόμενα ιόντα, ο χρόνος κατακράτησης και οι τιμές των διαφορετικών δυναμικών.

Πίνακας 8: Πρόδρομα (Q1) και παραγόμενα ιόντα (Q3), ο χρόνος κατακράτησης (RT), τα δυναμικά DP, EP και CXP, και οι ενέργειες σύγκρουσης (Collision Energy) για τις 92 μελετούμενες ουσίες, αναφορικά με την μεθοδολογία LLE για το ολικό αίμα

A/A	Ουσίες	Ιόντα	Q1 (amu)	Q3 (amu)	RT (min)	DP	EP	CE	CXP
1	2-FDCK	2-FDCK 1		190.9	1.4	61	10	19	16
		2-FDCK 2	222.059	163.2	1.4	61	10	23	14
		2-FDCK 3		203.9	1.4	61	10	21	16
2	6-MAM	6-MAM 1		165	1.01	95	10	45	16
		6-MAM 2	328.040	211	1.01	95	10	37	16
		6-MAM 3		193.1	1.01	95	10	39	12
3	ADB-BUTINACA	ADB-BUTINACA 1		201.1	4.31	81	10	35	12
		ADB-BUTINACA 2	331.060	286.2	4.31	81	10	21	18
		ADB-BUTINACA 3		314.1	4.31	81	10	15	24
4	Α-υδροξυ- αλπραζολάμη	Α-υδροξυ- αλπραζολάμη 1		297	3.4	136	10	35	18
		Α-υδροξυ- αλπραζολάμη 2	324.949	279	3.4	136	10	33	18
		Α-υδροξυ- αλπραζολάμη 3		216.1	3.4	136	10	53	12
5	Αγομελατίνη	Αγομελατίνη 1		185.1	3.73	86	10	23	22
		Αγομελατίνη 2	244.067	170	3.73	86	10	37	18
		Αγομελατίνη 3		153	3.73	86	10	41	18
6	Αλοπεριδόλη	Αλοπεριδόλη 1		165	3.36	106	10	31	18
		Αλοπεριδόλη 2	375.985	123	3.36	106	10	47	16
		Αλοπεριδόλη 3		95	3.36	106	10	75	14
7	Αλπραζολάμη	Αλπραζολάμη 1		281	3.67	161	10	37	16
		Αλπραζολάμη 2	308.955	205	3.67	161	10	57	12
		Αλπραζολάμη 3		274	3.67	161	10	35	20
8	Αμισουλπρίδη	Αμισουλπρίδη 1		242	1.51	116	10	37	22
		Αμισουλπρίδη 2	370.015	196	1.51	116	10	53	18
		Αμισουλπρίδη 3		112.1	1.51	116	10	33	12
9	Αμιτριπυλίνη	Αμιτριπυλίνη 1		91.1	3.7	56	10	29	10
		Αμιτριπυλίνη 2	278.070	105.1	3.7	56	10	29	12
		Αμιτριπυλίνη 3		117.07	3.7	56	10	29	14
10	Αμοξαπίνη	Αμοξαπίνη 1		271	3.31	131	10	37	28
		Αμοξαπίνη 2	314.012	193	3.31	131	10	59	30
		Αμοξαπίνη 3		297.2	3.31	131	10	31	18
11	Αμφεταμίνη	Αμφεταμίνη 1		91	1.08	25	10	25	12
		Αμφεταμίνη 2	136.013	119.1	1.08	25	10	13	20
		Αμφεταμίνη 3		65	1.08	25	10	51	10
12	Αριπιπραζόλη	Αριπιπραζόλη 1		285	3.64	176	10	37	18
		Αριπιπραζόλη 2	447.963	176	3.64	176	10	41	18

		Αριπιπραζόλη 3		218.1	3.64	176	10	35	16
		Ατροπίνη 1		124.1	1.74	111	10	33	14
13	Ατροπίνη	Ατροπίνη 2	290.042	93.1	1.74	111	10	37	10
		Ατροπίνη 3		91.1	1.74	111	10	47	10
		Βενζυλόνη 1		91	2.6	31	10	45	10
14	Βενζυλόνη	Βενζυλόνη 2	283.992	266.1	2.6	31	10	19	18
		Βενζυλόνη 3		65.05	2.6	31	10	77	8
		Βενλαφαξίνη 1		58	2.61	41	10	47	8
15	Βενλαφαξίνη	Βενλαφαξίνη 2	278.117	260.1	2.61	41	10	17	24
		Βενλαφαξίνη 3		121.1	2.61	41	10	35	16
		Βεραπαμίλη 1		165.2	3.64	121	10	37	16
16	Βεραπαμίλη	Βεραπαμίλη 2	455.105	303.1	3.64	121	10	35	22
		Βεραπαμίλη 3		150.1	3.64	121	10	45	10
		Βουπρενορφίνη 1		396.2	3.22	161	10	53	22
17	Βουπρενορφίνη	Βουπρενορφίνη 2	468.232	414.2	3.22	161	10	47	24
		Βουπρενορφίνη 3		55.1	3.22	161	10	77	8
		Βουπροπιόνη 1		184.1	2.59	20	10	19	20
18	Βουπροπιόνη	Βουπροπιόνη 2	240.034	131.1	2.59	20	10	37	16
		Βουπροπιόνη 3		166	2.59	20	10	27	20
		Βρωμαζεπάμη 1		182.1	3.02	131	10	41	12
19	Βρωμαζεπάμη	Βρωμαζεπάμη 2	315.933	209.1	3.02	131	10	37	12
		Βρωμαζεπάμη 3		288	3.02	131	10	27	18
		Βρωρφίνη 1		218.2	3.14	106	10	29	20
20	Βρωρφίνη	Βρωρφίνη 2	399.936	182.9	3.14	106	10	33	16
		Βρωρφίνη 3		104.057	3.14	106	10	59	12
		BE 1		168.2	1.6	75	10	25	8
21	BE	BE 2	290.046	105	1.6	75	10	37	12
		BE 3		77	1.6	75	10	63	32
		Δεσιπραμίνη 1		72	3.51	71	10	21	10
22	Δεσιπραμίνη	Δεσιπραμίνη 2	267.090	44	3.51	71	10	51	20
		Δεσιπραμίνη 3		208.087	3.51	71	10	31	22
		Δεσμεθυλ- σιταλοπράμη 1		109.1	3.14	126	10	29	14
23	Δεσμεθυλ- σιταλοπράμη	Δεσμεθυλ- σιταλοπράμη 2	311.032	262.1	3.14	126	10	23	14
		Δεσμεθυλ- σιταλοπράμη 3		293.1	3.14	126	10	23	22
		Δεσμεθυλ- τριμιπραμίνη 1		86.1	3.69	91	10	21	10
24	Δεσμεθυλ- τριμιπραμίνη	Δεσμεθυλ- τριμιπραμίνη 2	281.065	44.1	3.69	91	10	51	10
		Δεσμεθυλ- τριμιπραμίνη 3		208.1	3.69	91	10	31	18
		Διαζεπάμη 1		193	4.16	136	10	43	18
25	Διαζεπάμη	Διαζεπάμη 2	284.988	154.1	4.16	136	10	37	14
		Διαζεπάμη 3		257	4.16	136	10	31	18

26	Διλτιαζέμη	Διλτιαζέμη 1		178	3.27	46	5	33	4
		Διλτιαζέμη 2	414.990	150.2	3.27	36	7	61	4
		Διλτιαζέμη 3		109	3.27	46	5	79	4
27	Ευτυλόνη	Ευτυλόνη 1		188	1.7	11	10	27	12
		Ευτυλόνη 2	236.035	218	1.7	11	10	19	16
		Ευτυλόνη 3		174	1.7	11	10	45	12
28	ΕΜΕ	ΕΜΕ 1		182.1	0.46	80	10	23	16
		ΕΜΕ 2	200.023	82	0.46	80	10	35	14
		ΕΜΕ 3		91.1	0.46	80	10	43	12
29	Ζολπιδέμη	Ζολπιδέμη 1		235.1	2.45	80	10	45	14
		Ζολπιδέμη 2	308.033	236.1	2.45	80	10	37	18
		Ζολπιδέμη 3		263.1	2.45	80	10	37	24
30	Ζοπικλόνη	Ζοπικλόνη 1		245	2.06	10	10	23	24
		Ζοπικλόνη 2	389.016	217	2.06	10	10	43	14
		Ζοπικλόνη 3		345.1	2.06	10	10	13	18
31	Ιμιπραμίνη	Ιμιπραμίνη 1		86.1	3.68	131	10	21	10
		Ιμιπραμίνη 2	281.019	58.2	3.68	131	10	51	8
		Ιμιπραμίνη 3		208.3	3.68	136	10	29	12
32	Καρβαμαζεπίνη	Καρβαμαζεπίνη 1		194	3.32	106	10	27	24
		Καρβαμαζεπίνη 2	237.019	193	3.32	106	10	45	22
		Καρβαμαζεπίνη 3		192.1	3.32	106	10	33	10
33	Καφεΐνη	Καφεΐνη 1		138.1	0.94	1	10	25	12
		Καφεΐνη 2	195.019	110.1	0.94	1	10	29	12
		Καφεΐνη 3		42.1	0.94	1	10	57	18
34	Κεταμίνη	Κεταμίνη 1		125	1.68	20	10	35	14
		Κεταμίνη 2	238.024	220	1.68	20	10	21	20
		Κεταμίνη 3		179	1.68	20	10	25	10
35	Κλοβαζάμη	Κλοβαζάμη 1		259	3.96	111	10	27	16
		Κλοβαζάμη 2	301.000	224	3.96	111	10	43	16
		Κλοβαζάμη 3		223.5	3.96	111	10	55	26
36	Κλοζαπίνη	Κλοζαπίνη 1		270	2.91	111	10	33	16
		Κλοζαπίνη 2	326.986	192	2.91	111	10	57	18
		Κλοζαπίνη 3		226.9	2.91	111	10	43	22
37	Κλομιπραμίνη	Κλομιπραμίνη 1		86.1	3.9	140	10	25	10
		Κλομιπραμίνη 2	315.054	58.1	3.9	140	10	55	14
		Κλομιπραμίνη 3		227	3.9	140	10	55	26
38	Κωδεΐνη	Κωδεΐνη 1		215.1	0.77	100	10	35	14
		Κωδεΐνη 2	300.047	165	0.77	100	10	51	18
		Κωδεΐνη 3		183.1	0.77	100	10	39	16
39	Κοκαΐνη	Κοκαΐνη 1		182.2	2.4	31	10	27	12
		Κοκαΐνη 2	304.044	82.1	2.4	31	10	41	12
		Κοκαΐνη 3		77	2.4	31	10	69	10
40	Κουετιαπίνη	Κουετιαπίνη 1	384.008	253	3.02	116	10	31	22

		Κουετιαπίνη 2		221	3.02	116	10	49	20
		Κουετιαπίνη 3		279	3.02	116	10	35	24
		Κυκλοβενζαπρίνη 1		215	3.57	11	10	57	22
41	Κυκλοβενζαπρίνη	Κυκλοβενζαπρίνη 2	276.041	216.1	3.57	11	10	33	16
		Κυκλοβενζαπρίνη 3		231.1	3.57	11	10	25	16
		Λιδοκαΐνη 1		86.1	1.7	51	10	23	8
42	Λιδοκαΐνη	Λιδοκαΐνη 2	235.107	58.1	1.7	51	10	47	12
		Λιδοκαΐνη 3		30	1.7	51	10	63	14
		Λοραζεπάμη 1		274.9	3.62	96	10	31	20
43	Λοραζεπάμη	Λοραζεπάμη 2	320.895	303	3.62	96	10	21	18
		Λοραζεπάμη 3		229.1	3.62	96	10	41	14
		Μαπροτιλίνη 1		191	3.68	101	10	27	14
44	Μαπροτιλίνη	Μαπροτιλίνη 2	277.784	178.055	3.68	101	10	45	18
		Μαπροτιλίνη 3		117.073	3.68	101	10	37	14
		Μεθαδόνη 1		265.1	3.73	20	10	21	16
45	Μεθαδόνη	Μεθαδόνη 2	310.087	105	3.73	20	10	33	12
		Μεθαδόνη 3		77.1	3.73	20	10	67	12
		Μεθαμφεταμίνη 1		91.1	1.15	36	10	27	12
46	Μεθαμφεταμίνη	Μεθαμφεταμίνη 2	150.066	119.2	1.15	36	10	15	10
		Μεθαμφεταμίνη 3		65.1	1.15	36	10	49	10
		Μελατονίνη 1		174	2.43	81	10	21	48
47	Μελατονίνη	Μελατονίνη 2	233.043	159	2.43	81	10	37	18
		Μελατονίνη 3		130.1	2.43	81	10	59	14
		Μεφεδρόνη 1		160.1	1.51	50	10	17	16
48	Μεφεδρόνη	Μεφεδρόνη 2	178.052	145.1	1.51	50	10	27	14
		Μεφεδρόνη 3		144	1.51	50	10	41	18
		Μιανσερίνη 1		208	3.17	151	10	29	14
49	Μιανσερίνη	Μιανσερίνη 2	265.089	58	3.17	151	10	51	8
		Μιανσερίνη 3		91.1	3.17	151	10	51	22
		Μιδαζολάμη 1		290.9	2.91	141	10	37	18
50	Μιδαζολάμη	Μιδαζολάμη 2	325.956	223	2.91	141	10	51	14
		Μιδαζολάμη 3		248.9	2.91	141	10	55	18
		Μιρταζαπίνη 1		195.1	2.19	131	10	35	22
51	Μιρταζαπίνη	Μιρταζαπίνη 2	266.044	72	2.19	131	10	25	10
		Μιρταζαπίνη 3		194	2.19	131	10	55	22
		Μιτραγυνίνη 1		174	3.35	116	10	39	20
52	Μιτραγυνίνη	Μιτραγυνίνη 2	399.121	226.2	3.35	116	10	33	14
		Μιτραγυνίνη 3		238.1	3.35	116	10	35	14
		Μορφίνη 1		201	0.57	61	10	35	12
53	Μορφίνη	Μορφίνη 2	286.077	165	0.57	61	10	53	22
		Μορφίνη 3		152	0.57	61	10	73	12
		MDA 1		163.1	1.17	25	10	15	18
54	MDA	MDA 2	180.027	105	1.17	25	10	31	12

55	MDMA	MDA 3		133.1	1.17	25	10	25	14
		MDMA 1		163.2	1.35	30	10	19	20
		MDMA 2	194.048	105.1	1.35	30	10	35	12
		MDMA 3		133.1	1.35	30	10	27	14
		N-Δεσμεθυλ-φλουνιτραζεπάμη 1		254	3.48	141	10	35	18
56	N-Δεσμεθυλ-φλουνιτραζεπάμη	N-Δεσμεθυλ-φλουνιτραζεπάμη 2	299.996	198.1	3.48	141	10	51	12
		N-Δεσμεθυλ-φλουνιτραζεπάμη 3		225	3.48	141	10	47	14
		Ναλοξόνη 1		310	0.81	1	10	27	18
57	Ναλοξόνη	Ναλοξόνη 2	328.011	253.1	0.81	1	10	35	14
		Ναλοξόνη 3		212	0.81	1	10	49	20
		Νιτραζεπάμη 1		236.1	3.53	116	10	35	18
58	Νιτραζεπάμη	Νιτραζεπάμη 2	281.933	180	3.53	116	10	49	10
		Νιτραζεπάμη 3		207.3	3.53	116	10	47	30
		Νορβουπρενορφίνη 1		187.2	2.57	181	10	49	12
59	Νορβουπρενορφίνη	Νορβουπρενορφίνη 2	414.173	211.2	2.57	181	10	49	12
		Νορβουπρενορφίνη 3		223.2	2.57	181	10	51	14
		Νορδαζεπάμη 1		140	3.86	151	10	39	20
60	Νορδαζεπάμη	Νορδαζεπάμη 2	270.963	165	3.86	151	10	39	22
		Νορδαζεπάμη 3		208	3.86	151	10	37	12
		Νορκεταμίνη 1		207	1.64	15	10	17	30
61	Νορκεταμίνη	Νορκεταμίνη 2	224.02	125	1.64	15	10	33	14
		Νορκεταμίνη 3		179	1.64	15	10	23	12
		Νορκλοζαπίνη 1		270	2.92	116	10	33	24
62	Νορκλοζαπίνη	Νορκλοζαπίνη 2	312.95	192	2.92	116	10	53	22
		Νορκλοζαπίνη 3		226.9	2.92	116	10	39	24
		Νορτριπτυλίνη 1		233.086	3.6	101	10	19	14
63	Νορτριπτυλίνη	Νορτριπτυλίνη 2	264.074	105.081	3.6	101	10	27	14
		Νορτριπτυλίνη 3		91.058	3.6	101	10	27	10
		Ντουλοξετίνη 1		154.1	3.62	80	10	9	14
64	Ντουλοξετίνη	Ντουλοξετίνη 2	298.007	44	3.62	80	10	37	12
		Ντουλοξετίνη 3		188.1	3.62	80	10	9	16
		Ο-Δεσμέθυλ-Βενλαφαξίνη 1		58.1	1.79	36	10	41	18
65	Ο-Δεσμέθυλ-Βενλαφαξίνη	Ο-Δεσμέθυλ-Βενλαφαξίνη 2	264.114	246.1	1.79	36	10	17	28
		Ο-Δεσμέθυλ-Βενλαφαξίνη 3		107.2	1.79	36	10	51	12
		Ολανζαπίνη 1		256	1.44	126	10	31	22
66	Ολανζαπίνη	Ολανζαπίνη 2	312970	84.1	1.44	126	10	29	10
		Ολανζαπίνη 3		197.9	1.44	126	10	53	22
		Οξαζεπάμη 1	286.892	241	3.5	60	10	31	14

		Οξαζεπάμη 2		269.1	3.5	60	10	21	16
		Οξαζεπάμη 3		104	3.5	60	10	51	14
		Παλιπεριδόνη 1		207.1	2.48	141	10	37	18
68	Παλιπεριδόνη	Παλιπεριδόνη 2	427.045	110.1	2.48	141	10	57	12
		Παλιπεριδόνη 3		69.1	2.48	141	10	87	16
		Παρακεταμόλη 1		110.1	0.71	86	10	23	12
69	Παρακεταμόλη	Παρακεταμόλη 2	152.021	65	0.71	86	10	39	8
		Παρακεταμόλη 3		93	0.71	86	10	31	10
		Παροξετίνη 1		192.1	3.45	81	10	29	24
70	Παροξετίνη	Παροξετίνη 2	330.062	70	3.45	81	10	53	22
		Παροξετίνη 3		44	3.45	81	10	53	20
		Πραζεπάμη 1		271	4.56	136	10	31	16
71	Πραζεπάμη	Πραζεπάμη 2	325.005	140.1	4.56	136	10	47	14
		Πραζεπάμη 3		208	4.56	136	10	49	14
		Προκαϊναμίδη 1		163	0.63	1	10	23	16
72	Προκαϊναμίδη	Προκαϊναμίδη 2	236.068	120.1	0.63	1	10	41	14
		Προκαϊναμίδη 3		92	0.63	1	10	53	10
		Προπρανολόλη 1		116.1	2.9	1	10	25	12
73	Προπρανολόλη	Προπρανολόλη 2	260.052	183	2.9	1	10	25	16
		Προπρανολόλη 3		56	2.9	1	10	45	8
		Προτριπτυλίνη 1		191.1	3.5	116	10	37	12
74	Προτριπτυλίνη	Προτριπτυλίνη 2	264.068	155.1	3.5	116	10	29	10
		Προτριπτυλίνη 3		189.1	3.5	116	10	67	22
		Ρισπεριδόνη 1		191.1	3.07	66	10	37	22
75	Ρισπεριδόνη	Ρισπεριδόνη 2	411.051	110	3.07	66	10	63	12
		Ρισπεριδόνη 3		82.1	3.07	66	10	75	38
		Σερτραλίνη 1		275	3.82	66	10	17	16
76	Σερτραλίνη	Σερτραλίνη 2	305.959	159	3.82	66	10	35	16
		Σερτραλίνη 3		129	3.82	66	10	29	14
		Σιλδεναφίλη 1		58.1	3.1	161	10	69	8
77	Σιλδεναφίλη	Σιλδεναφίλη 2	475.090	100.1	3.1	161	10	37	12
		Σιλδεναφίλη 3		283.1	3.1	161	10	51	20
		Σιμετιδίνη 1		159	0.62	20	10	21	16
78	Σιμετιδίνη	Σιμετιδίνη 2	253.030	95	0.62	20	10	39	10
		Σιμετιδίνη 3		117.1	0.62	20	10	23	8
		Σιταλοπράμη 1		109	3.21	25	10	35	12
79	Σιταλοπράμη	Σιταλοπράμη 2	325.030	262	3.21	25	10	27	16
		Σιταλοπράμη 3		234	3.21	25	10	39	24
		Σουλπιρίδη 1		112.2	0.68	126	10	33	12
80	Σουλπιρίδη	Σουλπιρίδη 2	341.978	213.9	0.68	126	10	41	24
		Σουλπιρίδη 3		84	0.68	126	10	53	14
		Τεμαζεπάμη 1		255.1	3.86	121	10	31	14
81	Τεμαζεπάμη	Τεμαζεπάμη 2	300.960	283	3.86	121	10	19	26

82	Τοπιραμάτη	Τεμαζεπάμη 3		177	3.86	121	10	51	18
		Τοπιραμάτη 1		264	3.01	106	10	13	18
		Τοπιραμάτη 2	339.964	184	3.01	106	10	19	18
		Τοπιραμάτη 3		282	3.01	106	10	9	18
83	Τραμαδόλη	Τραμαδόλη 1		58	2.08	1	10	47	8
		Τραμαδόλη 2	264.076	246.2	2.08	1	10	17	16
		Τραμαδόλη 3		42.1	2.08	1	10	79	20
84	Τριαζολάμη	Τριαζολάμη 1		308	3.68	161	10	37	18
		Τριαζολάμη 2	342.916	315	3.68	161	10	39	20
		Τριαζολάμη 3		238.9	3.68	161	10	55	30
85	Τριμιπραμίνη	Τριμιπραμίνη 1		100.1	3.73	56	10	23	12
		Τριμιπραμίνη 2	295.099	58	3.73	56	10	51	8
		Τριμιπραμίνη 3		208.1	3.73	56	10	33	14
86	Φεντανύλη	Φεντανύλη 1		188.1	3.02	11	10	31	10
		Φεντανύλη 2	337.041	105.1	3.02	11	10	45	12
		Φεντανύλη 3		79.048	3.02	11	10	77	10
87	Φλουβοξαμίνη	Φλουβοξαμίνη 1		71	3.58	80	10	19	8
		Φλουβοξαμίνη 2	318.979	258.1	3.58	80	10	17	14
		Φλουβοξαμίνη 3		41	3.58	80	10	55	10
88	Φλουβρωμαζεπάμη	Φλουβρωμαζεπάμη 1		226	3.9	146	10	39	14
		Φλουβρωμαζεπάμη 2	332.876	184	3.9	146	10	43	16
		Φλουβρωμαζεπάμη 3		206	3.9	146	10	49	24
89	Φλονιτραζεπάμη	Φλονιτραζεπάμη 1		268	3.83	146	10	35	16
		Φλονιτραζεπάμη 2	313.890	239	3.83	146	10	47	20
		Φλονιτραζεπάμη 3		240	3.83	146	10	39	14
90	Φλουοξετίνη	Φλουοξετίνη 1		44	3.79	80	10	45	10
		Φλουοξετίνη 2	309.974	148.1	3.79	80	10	13	16
		Φλουοξετίνη 3		101.1	3.79	80	10	21	18
91	Χλωροδιαζεποξείδη	Χλωροδιαζεποξείδη 1		283	2.91	25	10	21	18
		Χλωροδιαζεποξείδη 2	299.952	227	2.91	25	10	35	14
		Χλωροδιαζεποξείδη 3		282.5	2.91	25	10	33	22
92	Χλωροπρομαζίνη	Χλωροπρομαζίνη 1		86.2	3.82	96	10	25	8
		Χλωροπρομαζίνη 2	318.899	57.9	3.82	96	10	53	12
		Χλωροπρομαζίνη 3		214	3.82	96	10	55	14
Εσωτερικά Πρότυπα									
1	ZZ μορφίνη-d3	ZZ μορφίνη-d3 1		155.1	0.54	100	10	51	18
		ZZ μορφίνη-d3 2	289.017	165	0.54	100	10	49	20
		ZZ μορφίνη-d3 3		181	0.54	100	10	47	20
2	Κλοζαπίνη-d4	Κλοζαπίνη-d4 1		272	2.87	1	10	33	26
		Κλοζαπίνη-d4 2	331.002	192.1	2.87	1	10	59	12
		Κλοζαπίνη-d4 3		273	2.87	1	10	33	18

3	MDMA-d5	MDMA-d5 1	199.053	165.1	1.33	1	10	19	14
		MDMA-d5 2		107.1	1.33	1	10	35	12
		MDMA-d5 3		135.1	1.33	1	10	27	14

Πίνακας 9: Πρόδρομα (Q1) και παραγόμενα ιόντα (Q3), dwell time (ms), και τα δυναμικά DP, EP και CXP, και οι ενέργειες συγκρούσης (Collision Energy) για την βρωρφίνη, αναφορικά με την μεθοδολογία FPSE για τα σίελα

Ουσία	Ιόντα	Q1 (Da)	Q3 (Da)	Dwell Time (ms)	DP	EP	CE	CXP
Βρωρφίνη	Βρωρφίνη 1	399.9	218.2	1.4	61	10	19	16
	Βρωρφίνη 2	399.9	182.9	1.4	61	10	23	14
	Βρωρφίνη 3	399.9	104.6	1.4	61	10	21	16

2.7 ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ

Η επικύρωση των μεθόδων έγινε με βάση τις κατευθυντήριες γραμμές από την Αμερικανική Ακαδημία Εγκληματικών Επιστημών (AAFS- Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology, 2019). Όλα τα πειράματα επικύρωσης διεξήχθησαν με χρήση δειγμάτων εμβολιασμένων με κατάλληλη συγκέντρωση των αντίστοιχων ουσιών για κάθε τύπο βιολογικού υποστρώματος. Η επικύρωση περιλαμβάνει την αξιολόγηση των ακόλουθων παραμέτρων: ακρίβεια, επαναληψιμότητα, γραμμικότητα, επίδραση υποστρώματος, επιλεκτικότητα, ευαισθησία, σταθερότητα και ανάκτηση, όπως περιγράφεται παρακάτω.

i. Όριο ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ)

Το όριο ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD) αποτελεί το χαμηλότερο επίπεδο συγκέντρωσης μιας ουσίας που μπορεί να ανιχνευθεί αξιόπιστα. Μαθηματικά ισούνται με την ελάχιστη συγκέντρωση της ουσίας που έχει συγκέντρωση τριπλάσια από την τυπική απόκλιση διαδοχικών μετρήσεων του τυφλού ($LOD=3 \times \text{Σήμα-προς-Θόρυβο (S/N)}$). Ενώ το όριο ποσοτικοποίησης (Limit of Quantitation, LOQ) αποτελεί την ελάχιστη συγκέντρωση προσδιοριζόμενης ουσίας, που μπορεί να διακριθεί από τη μηδενική συγκέντρωση. Μαθηματικά ισούνται με την ελάχιστη συγκέντρωση της ουσίας που έχει συγκέντρωση δεκαπλάσια από την τυπική απόκλιση διαδοχικών μετρήσεων του τυφλού ($LOQ=10 \times \text{(S/N)}$).

$$\text{Σήμα/Θόρυβο (S/N)} = \frac{\text{ύψος αναλύτη}}{\text{πλάτος θορύβου}}$$

Συγκεκριμένα:

A) Επιμολύνθηκαν 180 μL ολικού αίματος ($\times 3$) με 20 μL μείγματος των 92 ουσιών σε εννέα συγκεντρώσεις (0.01, 0.0162, 0.0313, 0.05, 0.0625, 0.1, 0.125, 0,25, 0.5, 1.0, 2, 2.5, 5, και 10 ng/mL), με τελικό όγκο 200 μL . Πραγματοποιήθηκαν τρεις δοκιμές.

B) Επιμολύνθηκαν 980 μL δείγμα σιέλων ($\times 3$) με 20 μL βρωφίνης σε έξι συγκεντρώσεις (0.01, 0.05, 0.25, 1, 5, 10 ng/mL), με τελικό όγκο 1 mL . Η τελική συγκέντρωση που επετεύχθη ήταν 200 ng/mL . Πραγματοποιήθηκαν τρεις πειραματικές δοκιμές.

ii. Εκλεκτικότητα (Selectivity)

Η μελέτη της εκλεκτικότητας διασφαλίζει την έλλειψη παρεμπόδισης στον προσδιορισμό των ουσιών σε ένα δείγμα από άλλα συστατικά του δείγματος (γνωστές προσμείξεις, μεταβολίτες, συστατικά του ολικού αίματος και των σιέλων του δείγματος, κλπ). Μια μέθοδος είναι εκλεκτική όταν δίνει ορθά αναλυτικά αποτελέσματα για τις επιμέρους ουσίες του δείγματος χωρίς να υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ τους, καθώς και με τα συστατικά του κάθε υποστρώματος.

Συγκεκριμένα:

A) Επιμολύνθηκαν 180 μL ολικού αίματος ($\times 10$) με 20 μL μείγματος 27 ουσιών συγκέντρωσης 50 ng/mL, με τελικό όγκο 200 μL . Πραγματοποιήθηκαν τρεις δοκιμές.

B) Επιμολύνθηκαν 980 μL δείγμα σιέλων ($\times 10$) με 20 μL μείγματος 87 ουσιών, συγκέντρωσης 50 ng/mL, με τελικό όγκο 1 mL. Πραγματοποιήθηκαν τρεις πειραματικές δοκιμές.

iii. Πιστότητα (Precision)

Ο βαθμός συμφωνίας και εγγύτητας μεταξύ των αποτελεσμάτων εκφράζει την πιστότητα. Δύο διαφορετικοί τύποι μελετών πιστότητας αξιολογούνται κατά την επικύρωση της μεθόδου: εντός της ημέρας επαναληψιμότητα (within a day/intra-day precision) και μεταξύ ημερών αναπαραγωγιμότητα (between days/inter-day precision). Η μελέτη της πιστότητας μπορεί να πραγματοποιηθεί ταυτόχρονα με την μελέτη ακρίβειας. Ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση (Standard Deviation – SD) της απόκρισης υπολογίζονται για κάθε συγκέντρωση για να προσδιοριστεί ο συντελεστής διακύμανσης (%CV), το οποίο δεν πρέπει να υπερβαίνει το 20% σε κάθε συγκέντρωση.

- Εντός της ημέρας επαναληψιμότητα $CV(\%) = \frac{SD \text{ ενός συνόλου δειγμάτων}}{\text{Μέση τιμή απόκρισης κάθε ουσίας}}$
- Μεταξύ ημερών αναπαραγωγιμότητα $CV(\%) = \frac{SD \text{ όλων των σετ δειγμάτων στην καθε C}}{\text{Μέση τιμή απόκρισης για κάθε C}}$

Αξιολογήθηκε σε τρία επίπεδα συγκέντρωσης για το ολικό αίμα, χαμηλό (5 ng/mL), μεσαίο (50 ng/mL) και υψηλό (150 ng/mL), και σε δύο επίπεδα για τα σιέλα, χαμηλό (0.25 ng/mL) και υψηλό (50 ng/mL). Για την εντός της ημέρας και μεταξύ των ημερών πιστότητα έλαβαν χώρα τρεις εκχυλίσεις και 5 επαναλήψεις σε μία ημέρα και σε διάστημα πέντε ημερών, αντίστοιχα.

iv. Ακρίβεια (Accuracy)

Η ακρίβεια αξιολογείται με την έννοια της ανάκτησης (recovery), η οποία υπολογίζεται με την εφαρμογή της μεθόδου σε εμβολιασμένο δείγμα. Χρησιμοποιήθηκαν δύο επίπεδα συγκεντρώσεων. Για το ολικό αίμα: χαμηλό (5 ng/mL) και υψηλό (200 ng/mL) και για τα σιέλα: χαμηλό (1 ng/mL) και υψηλό (50 ng/mL), επαναληπτικά πέντε φορές. Εκφράστηκε ως το εκατοστιαίο ποσοστό του λόγου της αρχικής συγκέντρωσης προς τη τελική και υπολογίζεται για κάθε συγκέντρωση χρησιμοποιώντας τον ακόλουθο τύπο:

$$\% \text{ Απόλυτη ανάκτηση} = \frac{\text{Αρχική συγκέντρωση}}{\text{Τελική συγκέντρωση}} * 100\%$$

*Η τελική συγκέντρωση συμπεριλαμβάνει τον συντελεστή προσυγκέντρωσης

v. Γραμμικότητα (Linearity)

Η γραμμικότητα αναφέρεται στην γραμμική εξάρτηση της μετρούμενης ιδιότητας από την συγκέντρωση της κάθε ουσίας. Για τον έλεγχο της κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς σε εννιά επίπεδα συγκέντρωσης για το ολικό αίμα (0.05, 0.5, 2.5, 12.5, 25, 50, 100, 250, 500 ng/mL), και σε επτά επίπεδα για τα σίελα (0.05, 0.25, 1, 5, 10, 25, 50 ng/mL) και αναλύθηκαν τρεις φορές. Η αξιολόγηση έγινε με στατιστικές μεθόδους, υπολογίζοντας την εξίσωση της ευθείας παλινδρόμησης ελαχίστων τετραγώνων ($y=ax+b$) και τον συντελεστή προσδιορισμού (Coefficient of Determination, R^2).

vi. Επιμόλυνση εκ μεταφοράς (Carry Over)

Η μεταφορά της αναλυόμενης ουσίας σε επόμενο δείγμα μπορεί να οδηγήσει σε ανακριβές ποιοτικό ή ποσοτικό αποτέλεσμα. Δείγματα ολικού αίματος και σιέλων, από υγιείς δότες, αναλύθηκαν αμέσως μετά από δείγμα επιμολυσμένο με το μείγμα των 92 ουσιών σε υψηλή συγκέντρωση (400 ng/mL). Απαλλαγμένο από μόλυνση εκ μεταφοράς θεωρείται το δείγμα που δεν παρατηρείται μεταφορά αναλυόμενης ουσίας (πάνω από το LOD της μεθόδου).

vii. Επίδραση υποστρώματος και Καταστολή/ Ενίσχυση Ιονισμού

Παρασκευάστηκαν δύο διαφορετικές ομάδες δειγμάτων: η ομάδα 1, αποτελείται από πρότυπες ουσίες σε δύο επίπεδα συγκέντρωσης: χαμηλό (5 ng/mL για το ολικό αίμα και 0.25 ng/mL για τα σίελα) και υψηλό (200 ng/mL για το ολικό αίμα και 50 ng/mL για τα σίελα). Η ομάδα 2, αποτελείται από τουλάχιστον δέκα διαφορετικούς υγιείς δότες (ανά τύπο υποστρώματος, ολικό αίμα και σίελα). Μετά την ολοκλήρωση της εκχύλισης, τα υποστρώματα θα εμβολιαστούν με καθαρό πρότυπο χαμηλής και υψηλής συγκέντρωσης ώστε να καθιερωθούν δυο ποσοστά καταστολής/ενίσχυσης. Η μέση καταστολή/ενίσχυση του ιόντος της κάθε ουσίας δεν πρέπει να υπερβαίνει το $\pm 25\%$. Υπολογίζεται για κάθε συγκέντρωση και κάθε ουσία χρησιμοποιώντας τον ακόλουθο τύπο:

$$\text{Καταστολή/ Ενίσχυση Ιονισμού (\%)} = \left(\frac{\text{Μέση τιμή Εμβαδού ομάδας 2}}{\text{Μέση τιμή Εμβαδού ομάδας 1}} - 1 \right) * 100$$

viii. Σταθερότητα (Stability)

Η μελέτη της σταθερότητας των 92 μελετώμενων ουσιών σε ολικό αίμα εμβολιασμένο με τις 92 ουσίες σε δύο επίπεδα συγκέντρωσης, χαμηλό (5 ng/mL) και υψηλό (150 ng/mL). Αρχικά, μελετήθηκε η βραχυπρόθεσμη σταθερότητα, σε θερμοκρασία συντήρησης (5°C) για διάστημα 24 ωρών (short-term stability) και έπειτα, η μακροπρόθεσμη σταθερότητα για διάστημα μίας εβδομάδας (long-term stability).

Ενώ, η μελέτη σταθερότητας της βρωφίνης στα σίελα πραγματοποιήθηκε σε ένα επίπεδο συγκέντρωσης (50 ng/mL). Αρχικά, μελετήθηκε η σταθερότητα για διάστημα δύο εβδομάδων και έπειτα τεσσάρων εβδομάδων, σε θερμοκρασίες 5°C και -20°C.

Η αναλυόμενη ουσία θεωρείται σταθερή έως ότου το μέσο σήμα (π.χ. εμβαδόν κορυφής ή οι αναλογίες εμβαδού κορυφής προς το εσωτερικό πρότυπο) σε σύγκριση με το σήμα του μέσου όρου του χρόνου μηδέν πέσει εκτός της αποδεκτής ακρίβειας της μεθόδου. Αποδεκτό εύρος απόκλισης ορίστηκε το $\pm 20\%$ της κάθε συγκέντρωσης (χαμηλό, υψηλό) του προσφάτως εμβολιασμένου δείγματος. Αποτελεί αξιοσημείωτη παράμετρο, καθώς συχνά τα δείγματα προετοιμάζονται αλλά δεν αναλύονται αμέσως.

2.8 ΤΕΧΝΙΚΗ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ (Nuclear Magnetic Resonance, NMR)

Στο Κέντρο NMR του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων υλοποιήθηκαν πειράματα με την τεχνική του Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε φασματογράφος Bruker AVII 500 MHz που λειτουργεί στα 500,13 MHz σε ένταση μαγνητικού πεδίου 11,74 Tesla και 298°K. Ο φασματογράφος ήταν εξοπλισμένος με ανιχνευτή αντίστροφου τριπλού συντονισμού (TXI) με θωρακισμένη διαβάθμιση Z, και με κρυοανιχνευτή (NEO-TCPI) (Bruker Biospin, Rheinstetten, Γερμανία). Η επεξεργασία των φασμάτων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό πρόγραμμα TopSpin 4.2. Ενώ, το λογισμικό MarvinSketch (Chemanox LTD) χρησιμοποιήθηκε για τη διαλεύκανση των χημικών δομών.

Για κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκαν αυτόματα το κλείδωμα (Lock), η προσαρμογή (shimming), ο συντονισμός (tuning) και η αντιστοίχιση (matching). Όλα τα φάσματα $^1\text{D}^1\text{H}$ NMR συλλέχθηκαν με γωνία αναστροφής 30°, φασματικό πλάτος 20 ppm, με καθυστέρηση χαλάρωσης (relaxation delay) 5 s και με χρόνο λήψης 3,27 s. Συλλέχθηκαν 64 K σημεία δεδομένων. Η προσαρμογή της φάσης και η διόρθωση της γραμμής βάσης πραγματοποιήθηκαν χειροκίνητα χρησιμοποιώντας την έκδοση 4.07 του TopSpin.

2.8.1 Αποσαφήνιση της δομής της βενζυλόνης

Για την αποσαφήνιση της δομής της βενζυλόνης έγινε συνδυασμός αναλυτικών πειραμάτων. Αρχικά, ελήφθησαν φάσματα ^1H NMR και ^{13}C NMR σε τελική συγκέντρωση βενζυλόνης 1.43 mg/mL (5 mM).

Πιο συγκεκριμένα, για τα ^1H NMR, προσδιορίστηκαν:

- 1) ο αριθμός των σημάτων για κάθε σύνολο χημικά ισοδύναμων πρωτονίων
- 2) οι τιμές ολοκλήρωσης (η περιοχή κάτω από κάθε κορυφή αντιστοιχεί στον αριθμό των ισοδύναμων πρωτονίων)
- 3) οι χημικές μετατοπίσεις που παρουσιάζουν οι διαφορετικοί τύποι πρωτονίων (π.χ. αρωματικά, αλδεϋδες)

Για τα ^{13}C NMR, προσδιορίστηκαν:

- 1) ο αριθμός των σημάτων για κάθε σύνολο χημικά ισοδύναμων ανθράκων
- 2) οι χημικές μετατοπίσεις που παρουσιάζουν οι διαφορετικοί τύποι ανθράκων (π.χ. αλκύλιο, καρβονύλιο)

Έπειτα πραγματοποιήθηκαν πειράματα ^1H - ^1H COrrrelation SpectroscopY (COSY), ^1H - ^1H TOtal Correlation SpectroscopY (TOCSY), ^1H - ^1H Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY (NOESY), ^1H - ^1H Rotating- Frame Overhauser Effect SpectroscopY (ROESY), ^1H - ^{13}C ετεροπυρηνικής ενιαίας κβαντικής συνεκτικότητας (HSQC), ^1H - ^{13}C HSQC με καταστολή του διαλύτη WET με παλμό σχήματος, και ^1H - ^{13}C ετεροπυρηνικής συσχέτισης πολλαπλών δεσμών (HMBC) πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση λογισμικού Bruker.

Καταγράφηκαν οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων σε σχέση με την εσωτερική αναφορά (TSP, 0,0 ppm). Χρησιμοποιήθηκε ένα τυπικό σύνολο παραμέτρων Bruker "proton" (ακολουθία παλμών zg30) για την απόκτηση και επεξεργασία μονοδιάστατου φάσματος ^1H NMR. Για την ταυτοποίηση δευτερευόντων αναλυτών πραγματοποιήθηκαν επιλεκτικά πειράματα ^1D TOCSY, με ενίσχυση διαβάθμισης, με τη χρήση ενός τυποποιημένου προγράμματος παλμών της Bruker (seldigr). Για την καταστολή του σήματος του διαλύτη στα 4,92 ppm, 4,60 ppm και στα 5,65 ppm, μελετήθηκαν τρία προγράμματα καταστολής, η ^1D έκδοση του «noesygrph» με χρήση του προγράμματος παλμών «lc1grrpf2», η ^1D σμίλευση διέγερσης με χρήση 180° επιλεκτικών προς το νερό παλμών και το ^1D πείραμα με χρήση της ακολουθίας παλμών «WATERGATE».

2.8.2 Ανίχνευση βενζυλόνης στα ούρα με τον ανιχνευτή αντίστροφου τριπλού συντονισμού (TXI)

Στα πλαίσια ανάπτυξης μεθοδολογίας ανίχνευσης νέων συνθετικών ουσιών στα ούρα, πραγματοποιήθηκαν διαφορετικές πειραματικές δοκιμές με χρήση διαφορετικών παραμέτρων προκειμένου να επιλεγθούν οι καταλληλότερες συνθήκες.

Ανίχνευση και σταθερότητα βενζυλόνης

Πραγματοποιήθηκαν πειράματα με τον ανιχνευτή αντίστροφου τριπλού συντονισμού (TXI). Ζυγίστηκε 1 mg σκόνης βενζυλόνης και διαλύθηκε σε 1 mL μεθανόλης, όπου έπειτα προστέθηκαν 700 μL DMSO- d_6 . Η τελική συγκέντρωση της βενζυλόνης μετά την ανάμιξη ήταν 1,43 mg/mL (5 mM). Πειράματα ^1H NMR, HSQC, HSQC-TOCSY, DOSY έλαβαν χώρα σε 600 μL του προαναφερθέν μείγματος. Τα υπόλοιπα 100 μL αποθηκεύτηκαν στους -20°C .

Για την μελέτη της σταθερότητας της βενζυλόνης και των πιθανών χημικών μετατοπίσεων που προκύπτουν, σε διάλυμα μικρότερης συγκέντρωσης, μετά από μια εβδομάδα, εφαρμόστηκε η παρακάτω διαδικασία: στα εναπομείναντα 100 μL του αρχικού μείγματος, προστέθηκαν 500 μL DMSO- d_6 και επαναλήφθηκαν τα πειράματα ^1H NMR, HSQC, και HMBC. Η τελική συγκέντρωση της βενζυλόνης μετά την ανάμιξη ήταν 0,24 mg/mL (0,83 mM).

Τα πειράματα Diffusion Ordered Spectroscopy (DOSY) πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση παλμών διπολικής κλίσης. Βελτιστοποιήθηκαν οι τιμές μεγάλου δέλτα (Δ) και μικρού δέλτα (δ) και οι βέλτιστες τιμές που επιλέχθηκαν ήταν 0,20 s και 2,4 ms, αντίστοιχα. Συλλέχθηκαν 16 μεταβατικές καταστάσεις με χρήση γραμμικού πλάτους κλίσης που κυμαίνονταν από 2 έως 95 % της μέγιστης τιμής κλίσης (1 έως 74 G/cm).

Ανίχνευση βενζυλόνης σε ούρα

Για την ανίχνευση της βενζυλόνης σε ούρα, έγιναν πειράματα εμβολιασμού του διαλύματος απευθείας στο σωληνάριο NMR (in tube)^a καθώς και στον πάγκο (on bench)^b, ως εξής:

α) Αρχικά, σε 450 μL ούρων από υγιείς δότες προστέθηκαν 50 μL DMSO-d_6 . Πραγματοποιήθηκαν πειράματα «lc1pnrgrf2» και ^1H NMR. Το πρόγραμμα «lc1pnrgrf2» που χρησιμοποιήθηκε ήταν μια ακολουθία ^1D NOESY που παρείχε βελτιωμένη καταστολή διαλύτη. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 50 μL βενζυλόνης συγκέντρωσης 1,43 mg/mL (550 μL τελικό όγκο). Η συγκέντρωση της βενζυλόνης στο στάδιο αυτό ήταν 0,13 mg/mL και ελήφθησαν φάσματα ^1H NMR και ^1D NOESY. Έπειτα, προστέθηκαν ακόμη 50 μL βενζυλόνης συγκέντρωσης 1,43 mg/mL (600 μL τελικό όγκο). Η συγκέντρωση της βενζυλόνης στο στάδιο αυτό ήταν 0,25 mg/mL και λήφθηκαν τα φάσματα ^1H NMR, ^1D NOESY και ^1H - ^{13}C HSQC.

β) Στη συνέχεια, σε 440 μL ούρων από υγιείς δότες, προστέθηκαν 10 μL TSP- d_4 - D_2O (10,3 mg TSP- d_4 σε 1 mL D_2O) και 100 μL DMSO-D_6 και λήφθηκαν φάσματα ^1H NMR και ^1D NOESY. Το διάλυμα αναδεύτηκε σε αναδευτήρα για 1 λεπτό και στη συνέχεια μεταφέρθηκε σε σωλήνα NMR διαμέτρου 5 mm. Ακολούθησε η προσθήκη 5 μL βενζυλόνης συγκέντρωσης 1,43 mg/mL (555 μL τελικό όγκο). Η τελική συγκέντρωση της βενζυλόνης μετά την ανάμιξη ήταν 0,013 mg/mL. Ελήφθησαν τα ίδια φάσματα με προηγουμένως. Έπειτα, προστέθηκαν ακόμη 5 μL βενζυλόνης συγκέντρωσης 1,43 mg/mL (560 μL τελικό όγκο). Η συγκέντρωση της βενζυλόνης στο στάδιο αυτό ήταν 0,026 mg/mL. Ελήφθησαν τα ίδια φάσματα.

Για τα πειράματα NOESY χρησιμοποιήθηκε χρόνος ανάμιξης 0,15, 0,3 και 0,5 s. Το πείραμα HSQC-TOCSY πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος hsqcdietgprsisp.2 με βελτίωση της ευαισθησίας. Αποκτήθηκαν 64 προσανυξήσεις των 50 σαρώσεων στη διάσταση F1 με χρήση φασματικού πλάτους από 12 και 165 ppm στις διαστάσεις F2 και F1, αντίστοιχα. Ο χρόνος ανάμιξης TOCSY ορίστηκε στα 100 ms και η καθυστέρηση d 24 ορίστηκε στα 170 ms (= 1/4 J).

2.8.3 Ανίχνευση βενζυλόνης σε ούρα με τον κρυσταλλογονικό (NEO-TCPI)

Η πειραματική μεθοδολογία πραγματοποιήθηκε με χρήση δύο διαφορετικών αρχικών συγκεντρώσεων για την βενζυλόνη σε χαμηλή (10.000 ng/mL) και υψηλή (1 mg/mL σε μεθανόλη) συγκέντρωση, προκειμένου να προσδιοριστεί το όριο ανίχνευσης της με κρυσταλλογονικό (NEO-TCPI) (Bruker Biospin, Rheinstetten, Γερμανία).

Αρχικά, αποκτήθηκε θερμική ισορροπία με την παραμονή των δειγμάτων ούρων σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, έγινε ανάμιξη 795 μL ούρων με 200 μL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (NaHPO_4) υψηλής συγκέντρωσης (2M, pH 9.5) και με 5 μL διαλύματος βενζυλόνης (1 mg/mL) (συνολικός όγκος 1 mL). Ακολούθησε ήπια ανάδευση και στη συνέχεια φυγοκέντρηση στις 10.000 rpm για 5 λεπτά. Έπειτα, 440 μL του διαυγούς υπερκειμένου μεταφέρθηκε σε σωληνάριο Eppendorf, όπου προστέθηκαν 10 μL διαλύματος TSP- d_4 - D_2O και 100 μL DMSO-d_6 . Η τελική συγκέντρωση του TSP στο σωληνάριο NMR ήταν 1.09 mM. Το τελικό διάλυμα (550 μL τελικός όγκος) αναδεύτηκε με χρήση αναδευτήρα για 1 λεπτό και στη συνέχεια μεταφέρθηκε σε γυάλινο σωλήνα NMR διαμέτρου 5mm. Έπειτα προστέθηκαν επιπλέον 5 μL βενζυλόνης απευθείας στον γυάλινο σωλήνα NMR, και ελήφθησαν φάσματα όπως προηγουμένως. Τέλος, προστέθηκαν επιπλέον 5 μL βενζυλόνης και

λήφθηκαν τα ίδια φάσματα όπως πριν. Το LOD της προτεινόμενης μεθόδου υπολογίστηκε με τη μέθοδο αναλογία σήματος προς θόρυβο (Signal-to-Noise Ratio, SNR).

2.9 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ LLE-UHPLC-MS/MS ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΑ ΚΑΙ ΔΙΚΑΣΤΙΚΑ ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΑ

Η μέθοδος LLE-UHPLC-MS/MS που αναπτύχθηκε στην παρούσα διατριβή εφαρμόστηκε τόσο σε κλινικά όσο και σε δικαστικά δείγματα αίματος που υποβλήθηκαν για τοξικολογικές αναλύσεις ρουτίνας στη Μονάδα Τοξικολογίας.

Τα υποβληθέντα δείγματα περιλάμβαναν μεταθανάτιο αίμα που ελήφθη κατά τη νεκροψία/νεκροτομή και κλινικά δείγματα (ολικό αίμα) που αφορούσαν ασθενείς του νοσοκομείου ή δικαστικές κλινικές περιπτώσεις. Όλα τα δείγματα αίματος αναλύθηκαν αρχικά με τη μέθοδο EMIT και GC-MS και επιβεβαιώθηκαν ως θετικά. Τα δείγματα φυλάσσονταν στους -20°C μέχρι την ημέρα της ανάλυσης.

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΟΥΣΙΩΝ ΑΠΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

Ο όρος «βελτιστοποίηση» χρησιμοποιείται κατά την ανάπτυξη μιας νέας αναλυτικής μεθόδου. Συγκεκριμένα, αφορά την εύρεση των κατάλληλων πειραματικών συνθηκών/παραμέτρων που δίνουν τα βέλτιστα αποτελέσματα και θα επιτρέψουν στην αναλυτική μέθοδο να έχει τη μέγιστη απόκριση. Ο επιτυχημένος ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός εξαρτάται από τις συνθήκες του χρωματογραφικού συστήματος. Η βελτιστοποίηση πραγματοποιήθηκε τροποποιώντας έναν παράγοντα τη φορά.

3.1.1 Υγρή-υγρή εκχύλιση – μέθοδος ολικού αίματος

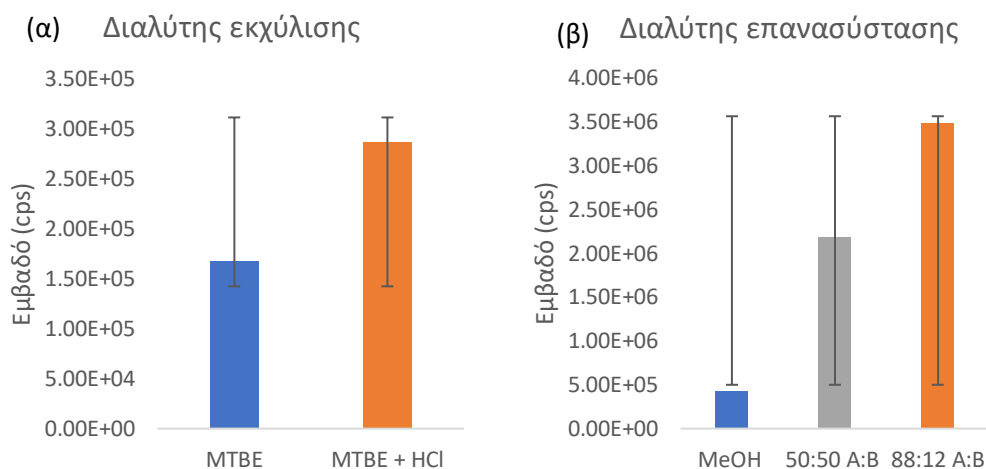
Κατά τη διαδικασία της βελτιστοποίησης της μεθόδου εκχύλισης ολικού αίματος, διαφορετικές παράμετροι υπολογίστηκαν και συγκρίθηκαν κατά την ανάλυση των δειγμάτων. Αναλυτικά πραγματοποιήθηκαν επαναλαμβανόμενες δοκιμές (επί 5) στον:

3) Διαλύτης εκχύλισης:

Από την σύγκριση των δύο δοκιμών παρατηρήθηκε ότι η εκχύλιση των προσδιοριζόμενων ουσιών με προσθήκη 1,0 mL τριτ-βουτυλο-μεθυλαιθέρας (MTBE) με προσθήκη 0.1 M υδροχλωρικού οξέος (HCl) παρουσίασε πιο συμμετρικές κορυφές και ικανοποιητικότερη ανάκτηση, ενώ χωρίς την προσθήκη HCl οι κορυφές παρουσίασαν μια ελαφρώς πεπλατυσμένη μορφή και ένα ασύμμετρο σχήμα (Σχήμα 16 α).

4) Διαλύτης ανασύστασης:

Ο μέσος όρος του εμβαδού της κάθε προσδιοριζόμενης ουσίας απέδειξε ότι ο διαλύτης 88:12% (A:B) απέδωσε καλύτερα χρωματογραφικά αποτελέσματα συγκριτικά με τις υπόλοιπες δοκιμές, καθώς και τον μεγαλύτερο αριθμό ενώσεων με ικανοποιητικότερη ανάκτηση (Σχήμα 16 β).



Σχήμα 16: (α) Επίδραση του διαλύτη εκχύλισης στην απόδοση των ουσιών. (β) Επίδραση του διαλύτη επανασύστασης στην απόδοση των ουσιών. Η μονάδα μέτρησης του εμβαδού ήταν cps: cycle per second/ κύκλοι ανά δευτερόλεπτο.

3.1.2 Εκχύλιση μέσω προσρόφησης σε δίκτυο επικαλυμμένων ιών (Fabric Phase Sorptive Extraction, FPSE) σιέλων

Κατά τη διαδικασία της βελτιστοποίησης της μεθόδου εκχύλισης βρωφίνης στα σιέλα, διαφορετικές παράμετροι υπολογίστηκαν και συγκρίθηκαν κατά την ανάλυση των δειγμάτων. Προκειμένου να επιλεγεί το πιο αποδοτικό πρωτόκολλο ελέγχθηκε ο αριθμός ενώσεων με μέγιστα και ελάχιστα εμβαδά κορυφών.

Πραγματοποιήθηκαν δοκιμές στο «υφασμάτινο υπόστρωμα», στο pH, στο χρόνο εκχύλισης, στο διαλύτη έκλουσης, και στο χρόνο έκλουσης. Συγκεκριμένα:

α) Οι μεγαλύτερες αποδόσεις εκρόφησης λήφθηκαν όταν χρησιμοποιήθηκε **φίλτρο υαλοϊνών (FG)**, επικαλυμμένο με PEG300. Ως εκ τούτου, αυτός ο συνδυασμός επιλέχθηκε για περαιτέρω βελτιστοποίηση (Σχήμα 17 α). Το PEG 300 χρησιμοποιείται ευρέως και επιλέχθηκε λόγω της υδατοδιαλυτότητας και των υδρόφιλων ιδιοτήτων του.

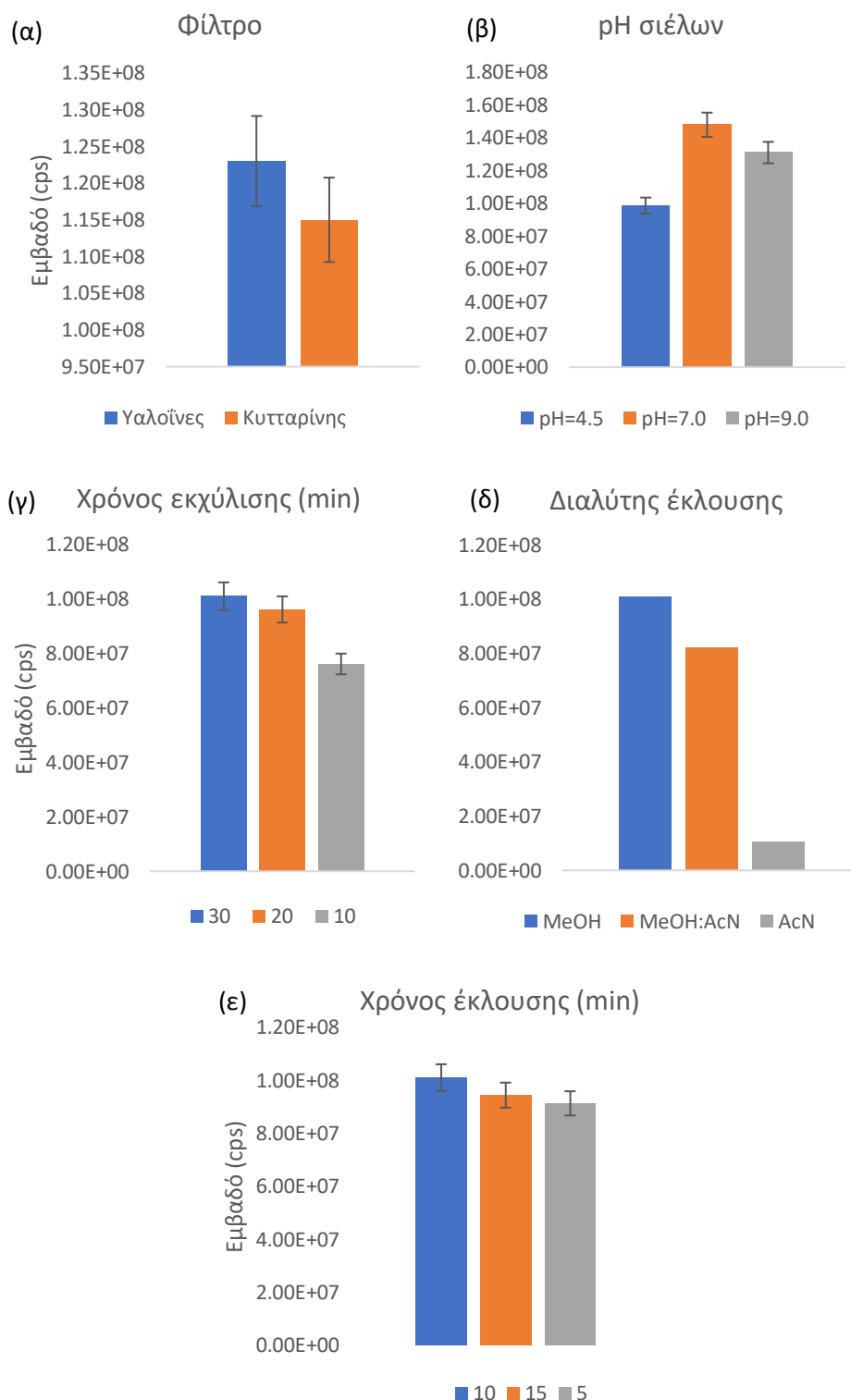
β) Η βρωφίνη αποτελεί ασθενές οξύ (SWGTOX, 2013), επομένως αναμένεται ότι η ιοντισμένη μορφή $pK_a + 2$ (8.61) θα παρέχει το ιδανικό αποτέλεσμα. Ωστόσο, παρατηρήθηκε ότι τα αποτελέσματα με $pH=7$ και $pH=9$ ήταν συγκρίσιμα μεταξύ τους. Το ουδέτερο pH (**$pH=7$**) παρουσίασε την μεγαλύτερη επίδραση για αυτό και επιλέχθηκε (Σχήμα 17 β).

γ) Ο βέλτιστος **χρόνος εκχύλισης των 30 λεπτών** βρέθηκε να είναι ο πιο αποτελεσματικός (Σχήμα 17 γ).

δ) Ως **διαλύτης έκλουσης** επιλέχθηκε **μεθανόλη**, διότι ήταν πιο αποτελεσματική από το ακετονιτρίλιο και το μείγμα τους (Σχήμα 17 δ).

ε) Ο χρόνος έκλυσης **10 λεπτών** παρουσίασε με μικρή διαφορά καλύτερη απόδοση για αυτό και επιλέχθηκε (Σχήμα 17 ε).

Γενικά, οι διαφορές που προέκυψαν στις παραμέτρους κατά την εφαρμογή των διαφορετικών συνθηκών δεν ήταν στατιστικά σημαντικές ($p > 0,05$) και επιλέχθηκε να εφαρμοστεί η παράμετρος με την καλύτερη απόδοση.



Σχήμα 17: (α) Επίδραση του φίλτρου στην απόδοση της βρωρφίνης. (β) Επίδραση του pH στην απόδοση της βρωρφίνης. (γ) Επίδραση του χρόνου εκχύλισης στην απόδοση της βρωρφίνης. (δ) Επίδραση του διαλύτη έκλουσης στην απόδοση της βρωρφίνης. (ε) Επίδραση του χρόνου έκλουσης στην απόδοση της βρωρφίνης.

3.2 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΗ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ

3.2.1 Πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης ουσιών – μέθοδος ολικού αίματος

Η σύγκριση και η επιλογή των εκλουστικών προγραμμάτων της κινητής φάσης έγινε βάση των λαμβανόμενων χρωματογραφημάτων των προσδιοριζόμενων ουσιών, συγκεκριμένα, του εμβადού, της συμμετρίας και της διαχωριστικότητας των κορυφών. Δοκιμάστηκαν τέσσερα διαφορετικά προγράμματα έκλουσης όπου τροποποιήθηκαν παράμετροι όπως ο χρόνος ανάλυσης και το ποσοστό του διαλύτη Β. Οι δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν ταξινομήθηκαν κατά φθίνοντα συνολικό χρόνο ανάλυσης. Αναλυτικά:

Το εκλουστικό πρόγραμμα Α, συνολικής διάρκειας ανάλυσης 12 λεπτών με 5%B, αποτέλεσε την δοκιμή με τον μεγαλύτερο χρόνο ανάλυσης. Παρατηρήθηκε ικανοποιητικό διαχωρισμό των ουσιών, πλην ενός μεγάλου χρονικού διαστήματος όπου δεν παρουσιάστηκε καμία εκλούσιμη ουσία προς το τέλος της ανάλυσης. Συνεπώς, το πρόγραμμα χρήζει περαιτέρω βελτίωσης.

Το εκλουστικό πρόγραμμα Β, συνολικής διάρκειας ανάλυσης 11 λεπτών με 35%B, στο οποίο αφαιρέθηκε χρόνος ανάλυσης (1 λεπτό), ώστε να παρατηρηθεί εάν μειώνεται ο κενός χρόνος χωρίς κάποια εκλούσιμη ουσία. Ωστόσο παρατηρήθηκε ότι δεν ήταν αρκετός διότι το κενό χωρίς καμία εκλούσιμη ουσία παρέμεινε. Επίσης η αλλαγή του ποσοστού οργανικού διαλύτη σε 35% οδήγησε σε συνέκλουση πολλών ουσιών. Έτσι, λοιπόν και αυτό το πρόγραμμα απορρίφθηκε.

Το εκλουστικό πρόγραμμα Γ, συνολικής διάρκειας ανάλυσης 9,5 λεπτών με 12%B, όπου παρατηρήθηκε ιδιαίτερα ικανοποιητικός διαχωρισμός των ουσιών, πλην την παραμονή του μεγάλου χρονικού διαστήματος χωρίς καμία εκλούσιμη ουσία. Έτσι, λοιπόν, αποφασίστηκε ότι χρήζει περαιτέρω βελτίωσης προκειμένου να «συμπιεστούν» τα τμήματα του χρωματογραφήματος όπου δεν εκλουόταν καμία απολύτως ένωση.

Το εκλουστικό πρόγραμμα Δ, συνολικής διάρκειας ανάλυσης 7,5 λεπτών με 12%B, κρίθηκε ιδιαίτερα ικανοποιητικό, καθότι αφενός ο χρόνος ανάλυσης θεωρείται αρκετά μικρός, αφετέρου οι ενώσεις διαχωρίστηκαν ικανοποιητικά με μικρές εξαιρέσεις συνέκλουσης. Το συγκεκριμένο πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης επιλέχθηκε έχοντας συγκεντρώσει όλα τα δεδομένα από τις προαναφερθείσες πειραματικές δοκιμές έκλουσης. Η συνολική διάρκεια του προγράμματος ήταν 7.5 min με ρυθμό ροής 0.500 mL/min και η αρχική τιμή πίεσης κατά την ανάλυση ήταν περίπου 1770 psi.

3.2.2 Πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης βρωφίνης - μέθοδος σιέλων

Το πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε για τα σιέλα βασίστηκε στο τελικό πρόγραμμα έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε για το ολικό αίμα και προσαρμόστηκε ως εξής:

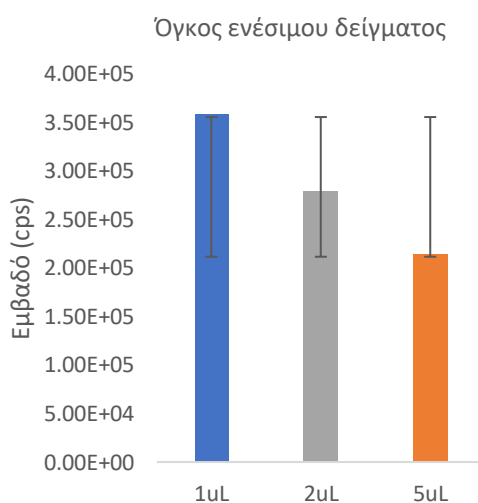
α) Μείωση κατά ένα λεπτό του συνολικού χρόνου του προγράμματος διότι στα συγκεκριμένα πειράματα μας αφορούσε μόνο η έκλυσης της βρωφίνης.

β) Το βήμα (ii) από 40% διαλύτη έκλυσης B τροποποιήθηκε σε 50% B.

Το συγκεκριμένο βελτιστοποιημένο πρόγραμμα έκλυσης κρίθηκε ιδιαίτερα ικανοποιητικό με μικρό χρόνο ανάλυσης στα 6.5 min, με ρυθμό ροής 0.500 mL/min και με αρχική τιμή πίεσης κατά την ανάλυση περίπου στα 1870 psi.

3.2.3 Όγκος εισαγωγής δείγματος

Για την εξαγωγή αποτελεσμάτων αναφορικά με τον όγκο εισαγωγής δείγματος συγκρίθηκε το εμβαδό, η συμμετρία και η διαχωριστικότητα όλων των χρωματογραφικών κορυφών για κάθε όγκο. Η εισαγωγή του δείγματος γίνεται ακαριαία ώστε να αποφευχθεί η διασπορά του δείγματος με ειδική σύριγγα Hamilton[®]. Η διαχωριστικότητα των προσδιοριζόμενων ουσιών στο αίμα και το σχήμα των χρωματογραφικών κορυφών ήταν παρόμοια με αυτά που λαμβανόταν με την ανάλυση προτύπων διαλυμάτων των αναλυτών. Από τα εξαγόμενα αποτελέσματα των παραπάνω πειραμάτων παρατηρήθηκε ότι η διαχωριστικότητα ελαττώνεται όταν η ποσότητα του δείγματος αυξάνεται, συνεπώς ως βέλτιστη τιμή ορίστηκε αυτή των 1 μ L (Σχήμα 18).



Σχήμα 18: Επίδραση του όγκου ενέσιμου δείγματος στην απόδοση των ουσιών.

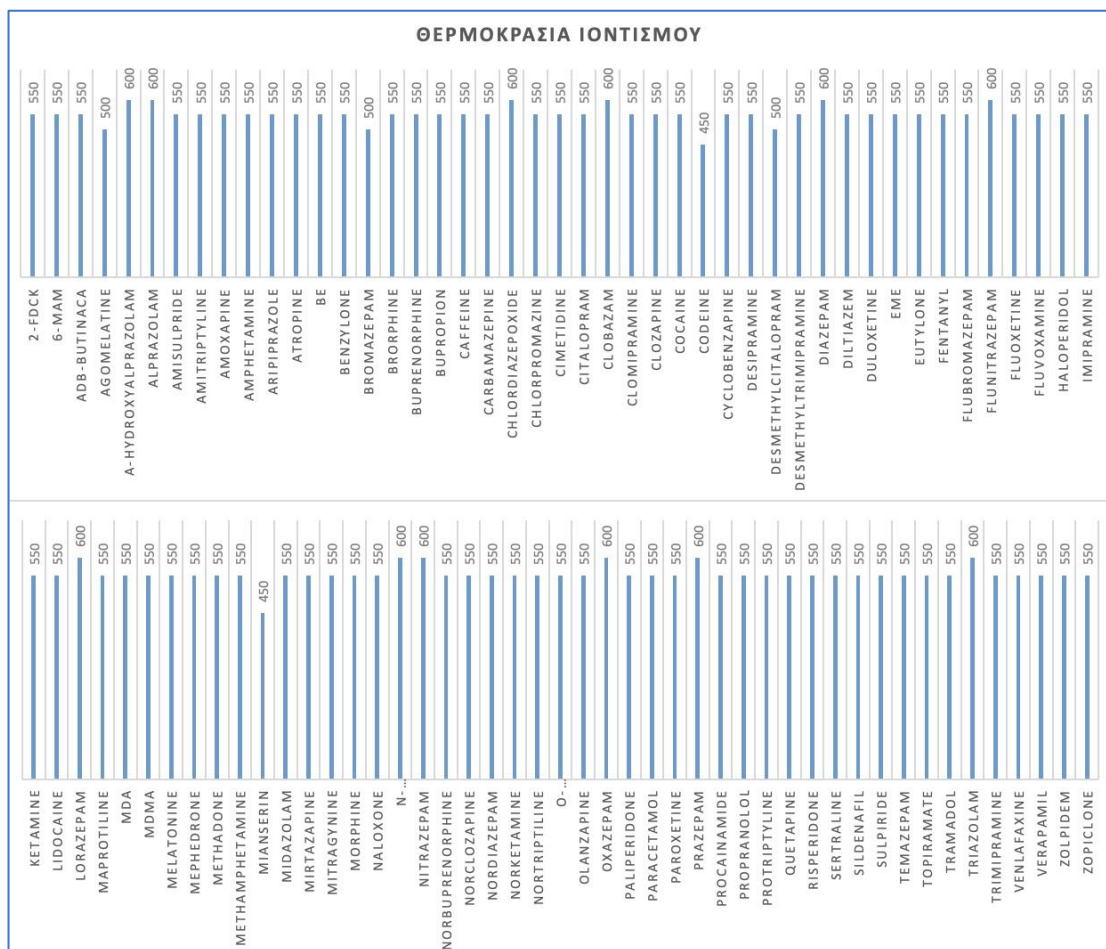
3.3 ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ

Η βελτιστοποίηση διαφόρων παραμέτρων στο φασματομέτρο μαζών είναι απαραίτητη για την επίτευξη όσο το δυνατό μεγαλύτερης έντασης κορυφών και άρα την αύξηση της ευαισθησίας της μεθόδου.

Σχετικά με τη θερμοκρασία πηγής ιοντισμού εξετάστηκαν διάφορες τιμές για το σύνολο των εξεταζόμενων ουσιών. Η επιλογή της θερμοκρασίας πηγής ιοντισμού έγινε με σύγκριση αντίστοιχων χρωματογραφημάτων και συγκεκριμένα, του εμβαδού, της συμμετρίας και της διαχωριστικότητας των κορυφών. Από τα εξαγόμενα αποτελέσματα των παραπάνω πειραμάτων ως βέλτιστη τιμή θερμοκρασίας επιλέχθηκε αυτή των 550°C (Σχήμα 19).

Συνοπτικά, ως αέριο εκνέφωσης χρησιμοποιήθηκε άζωτο με:

- Θερμοκρασία: 550°C
- Δυναμικό-τάση τριχοειδούς: 5500.0 V
- Gas 1: 55 psi
- Gas 2: 55 psi
- Curtain gas: 20 psi



Σχήμα 19: Βέλτιστη απόκριση ουσιών ανάλογα με την θερμοκρασία ιοντισμού.

3.4 ΑΝΑΛΥΣΗ ΟΥΣΙΩΝ ΜΕ LC-MS/MS – ΜΕΘΟΔΟΣ ΟΛΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ

Οι βελτιστοποιημένες συνθήκες εφαρμόστηκαν και παρείχαν συμμετρικές κορυφές και για τις όλες τις ουσίες που αναλύθηκαν στο ολικό αίμα. Οι χρόνοι συγκράτησης των 92 ουσιών και των 3 εσωτερικών προτύπων, απεικονίζονται με βάση τον αύξοντα χρόνο κατακράτησης στον Πίνακα 10.

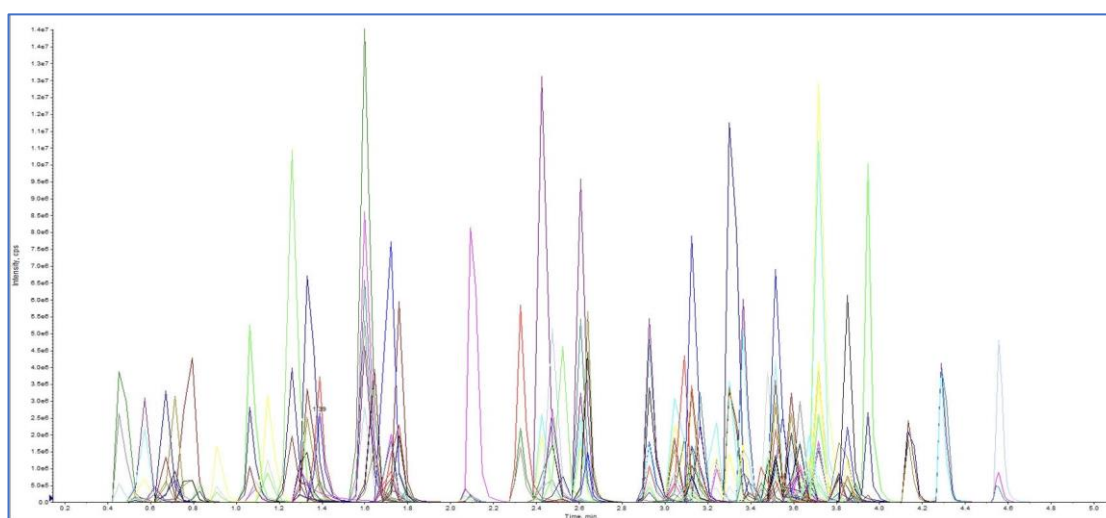
Πίνακας 10: Χρόνοι κατακράτησης των 92 ουσιών στόχων & των 3 εσωτερικών προτύπων

A/A	Ουσίες	Χρόνος συγκράτησης (λεπτά)
1	EME	0,46
2	Μορφίνη	0,57
3	Σιμετιδίνη	0,62
4	Προκαϊναμίδη	0,63
5	Σουλπιρίδη	0,68
6	Παρακεταμόλη	0,71
7	Ναλοξόνη	0,81
8	Κωδεΐνη	0,84
9	Καφεΐνη	0,94
10	Αμφεταμίνη	1,08
11	6-MAM	1,12
12	MDA	1,17
13	Μεθαμφεταμίνη	1,27
14	MDMA	1,35
15	2-FDCK	1,40
16	Ολανζαπίνη	1,44
17	BE	1,60
18	Αμισουλπρίδη	1,61
19	Μεφεδρόνη	1,61
20	Νορκεταμίνη	1,64
21	Ευτυλόνη	1,70
22	Λιδοκαΐνη	1,70
23	Ατροπίνη	1,74
24	Κεταμίνη	1,75
25	Ο-Δεσμethyl-βενλαφαξίνη	1,79
26	Ζοπικλόνη	2,06
27	Τραμαδόλη	2,08
28	Μιρταζαπίνη	2,31
29	Κοκαΐνη	2,40
30	Μελατονίνη	2,43
31	Ζολπιδέμη	2,45
32	Παλιπεριδόνη	2,48
33	Νορβουπρενορφίνη	2,57
34	Βουπροπιόνη	2,59

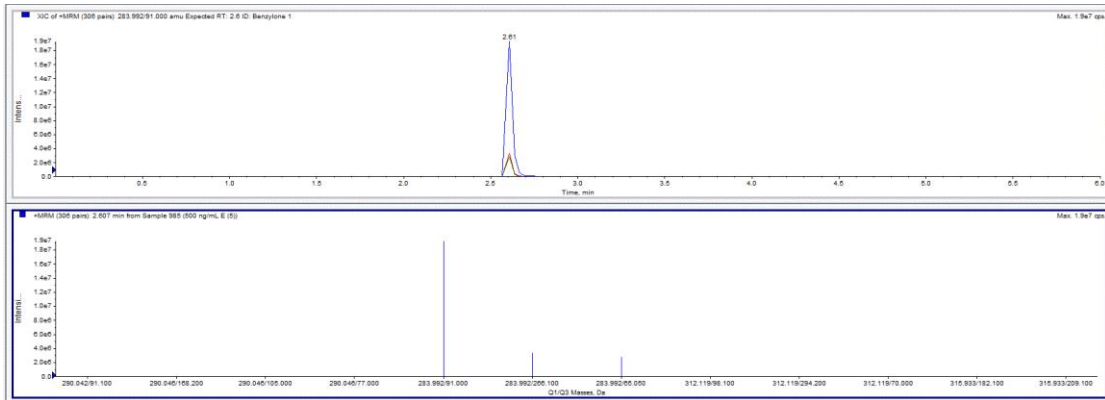
35	Βενζυλόνη	2,60
36	Βενλαφαξίνη	2,61
37	Προπρανολόλη	2,90
38	Χλωροδιαζεποξείδη	2,91
39	Νορκλοζαπίνη	2,92
40	Τοπιραμάτη	3,01
41	Βρωμαζεπάμη	3,02
42	Φεντανύλη	3,02
43	Κλοζαπίνη	3,06
44	Ρισπεριδόνη	3,07
45	Σιλδεναφίλη	3,10
46	Μιδαζολάμη	3,13
47	Βρωρφίνη	3,14
48	Δεσμεθυλ-σιταλοπράμη	3,14
49	Κουετιαπίνη	3,14
50	Μιανσερίνη	3,17
51	Σιταλοπράμη	3,21
52	Βουπρενορφίνη	3,22
53	Διλτιαζέμη	3,27
54	Αμοξαπίνη	3,31
55	Καρβαμαζεπίνη	3,32
56	Μιτραγυνίνη	3,35
57	Αλοπεριδόλη	3,36
58	α-υδροξυ-αλπραζολάμη	3,40
59	Παροξετίνη	3,45
60	N-Δεσμεθυλ-φλουνιτραζεπάμη	3,48
61	Οξαζεπάμη	3,50
62	Προτριπυλίνη	3,50
63	Δεσιπραμίνη	3,51
64	Νιτραζεπάμη	3,53
65	Κυκλοβενζαπρίνη	3,57
66	Φλουβοξαμίνη	3,58
67	Νορτριπυλίνη	3,60
68	Ντουλοξετίνη	3,62
69	Λοραζεπάμη	3,62
70	Αριπιπραζόλη	3,64
71	Βεραπαμίλη	3,64
72	Αλπραζολάμη	3,67
73	Ιμιπραμίνη	3,68
74	Μαπροτιλίνη	3,68
75	Τριαζολάμη	3,68
76	Δεσμεθυλ-τριμιπραμίνη	3,69
77	Αμιτριπυλίνη	3,70

78	Αγομελατίνη	3,73
79	Μεθαδόνη	3,73
80	Τριμιπραμίνη	3,73
81	Φλουοξετίνη	3,79
82	Χλωροπρομαζίνη	3,82
83	Σερτραλίνη	3,82
84	Φλονιτραζεπάμη	3,83
85	Νορδαζεπάμη	3,86
86	Τεμαζεπάμη	3,86
87	Κλομιπραμίνη	3,90
88	Φλουβρωμαζεπάμη	3,90
89	Κλοβαζάμη	3,96
90	Διαζεπάμη	4,16
91	ADB-BUTINACA	4,31
92	Πραζεπάμη	4,56
ΕΣΩΤΕΡΙΚΑ ΠΡΟΤΥΠΑ		
1	Μορφίνη-d3	0,54
2	MDMA-d5	1,33
3	Κλοζαπίνη-d4	3,02

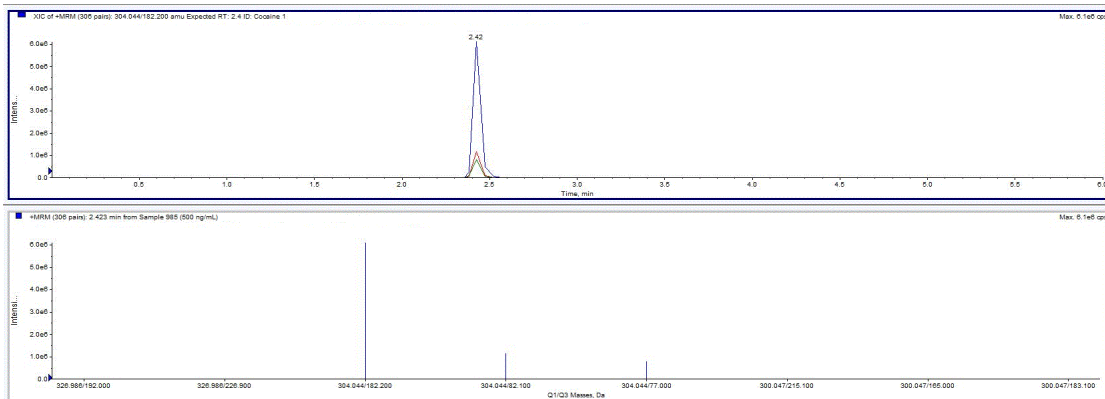
Το χρωματογράφημα (Total Ion Chromatograph, TIC), που ελήφθη μετά τον εμβολιασμό του ολικού αίματος με τις 92 ενώσεις σε συγκέντρωση 250 ng/mL, απεικονίζει την ένταση όλων των ιόντων σε σχέση με τον χρόνο (Σχήμα 20). Ενδεικτικά παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα της βενζυλόνης, της κοκαΐνης, της διαζεπάμης, του MDMA, της παροξετίνης, και της πραζεπάμης (Σχήματα 21-26, αντίστοιχα) μετά από τη λήψη τιμών έντασης σε μία διακριτή μάζα (Extracted Ion Chromatograph, XIC) μαζί με το φάσμα μάζας (διάγραμμα έντασης ιόντων ως συνάρτηση του λόγου m/z) για κάθε ουσία.



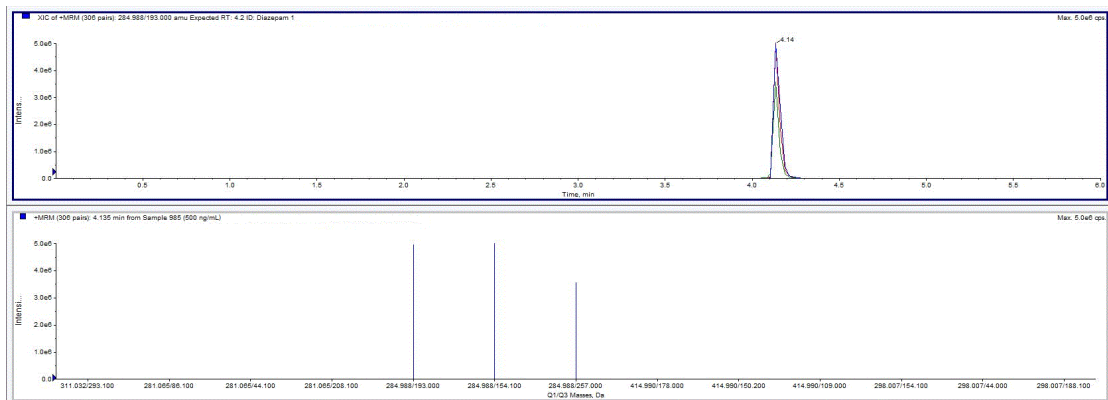
Σχήμα 20: Χρωματογράφημα των 92 ουσιών στόχων εμβολιασμένων σε ολικό αίμα σε συγκέντρωση 250 ng/mL.



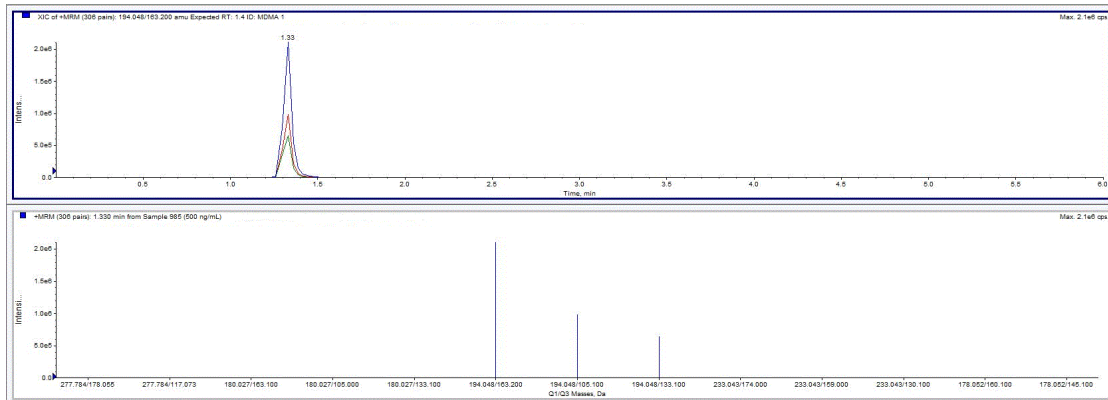
Σχήμα 21: (α) Χρωματογράφημα ολικού ιόντος (Πλήρης σάρωση) βενζυλόνης. (β) Φάσματα ιόντων βενζυλόνης.



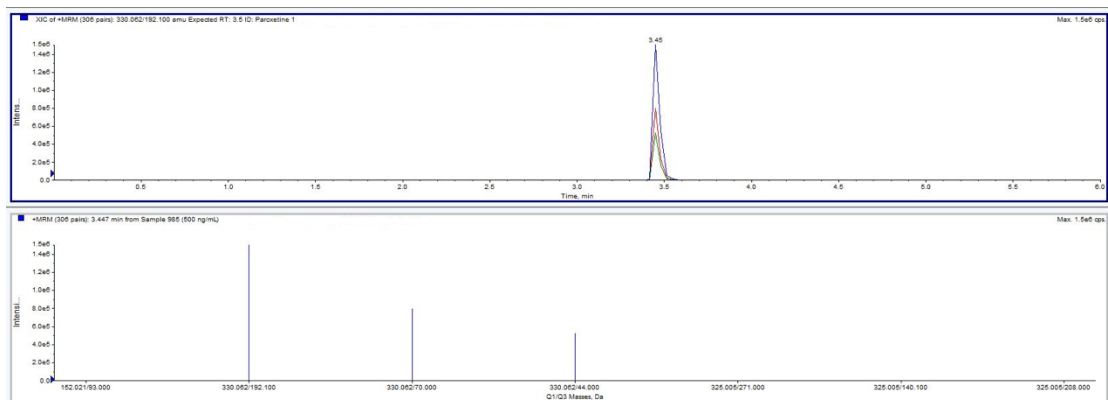
Σχήμα 22: (α) Χρωματογράφημα ολικού ιόντος (Πλήρης σάρωση) κοκαΐνης. (β) Φάσματα ιόντων κοκαΐνης.



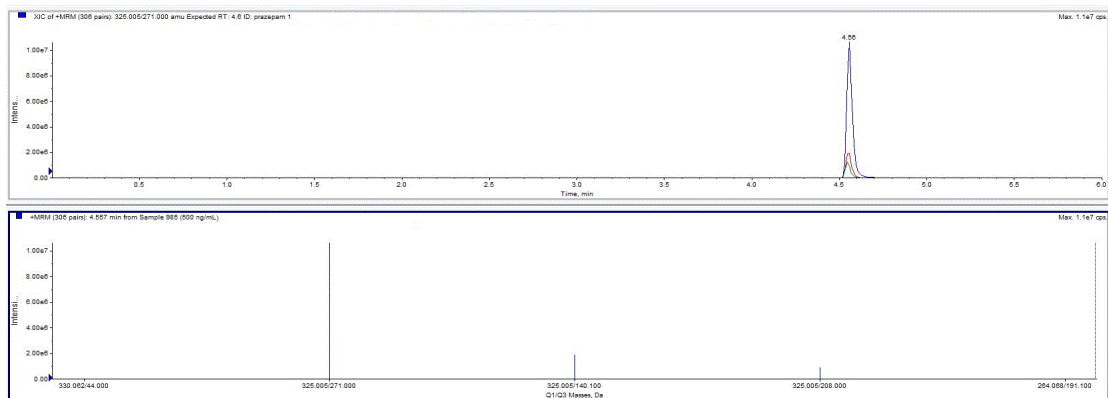
Σχήμα 23: (α) Χρωματογράφημα ολικού ιόντος (Πλήρης σάρωση) διαζεπάμης. (β) Φάσματα ιόντων διαζεπάμης.



Σχήμα 24: (α) Χρωματογράφημα ολικού ιόντος (Πλήρης σάρωση) MDMA. (β) Φάσματα ιόντων MDMA.



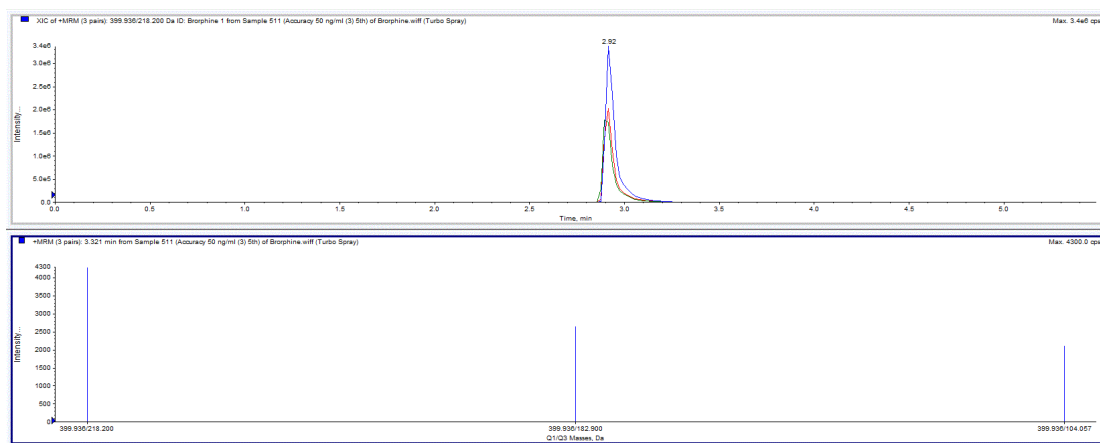
Σχήμα 25: (α) Χρωματογράφημα ολικού ιόντος (Πλήρης σάρωση) παροζετίνης. (β) Φάσματα ιόντων παροζετίνης.



Σχήμα 26: (α) Χρωματογράφημα ολικού ιόντος (Πλήρης σάρωση) πραζεπάμης. (β) Φάσματα ιόντων πραζεπάμης.

3.5 ΑΝΑΛΥΣΗ ΒΡΩΡΦΙΝΗΣ - ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΙΕΛΩΝ

Οι βελτιστοποιημένες συνθήκες εφαρμόστηκαν και παρείχαν μια συμμετρική κορυφή για την βρωρφίνη που αναλύθηκε στα σίελα. Ελήφθη μια μοναδική κορυφή με χρόνο κατακράτησης 2,88 λεπτά, καθώς και ακριβής τιμή m/z 399,9. Το λαμβανόμενο φάσμα ιόντων της βρωρφίνης φαίνεται στο Σχήμα 27 β.



Σχήμα 27: (α) Χρωματογράφημα ολικού ιόντος (Πλήρης σάρωση) βρωρφίνης.(β) Φάσματα ιόντων βρωρφίνης.

3.6 ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΩΝ

3.6.1 Επικύρωση μεθοδολογίας LLE-LC-MS/MS σε ολικό αίμα

i. Όριο ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ)

Τα LODs και LOQs εκτιμήθηκαν με βάση τον λόγο σήματος προς θόρυβο να είναι ίσος με 3 (S/N=3) και 10 (S/N=10), αντίστοιχα. Οι τιμές των ορίων ανίχνευσης κυμαίνονταν από 0,01 έως 5 ng/mL και των ορίων ποσοτικοποίησης από 0,05 έως 40 ng/mL (Πίνακας 11).

Πίνακας 11: LOD/LOQ για τις 92 ουσίες-στόχοι στο ολικό αίμα.

A/A	Ουσίες	Όριο ανίχνευσης (ng/mL)	Όριο ποσοτικοποίησης (ng/mL)
1	2-FDCK	0,1	0,5
2	6-MAM	0,1	0,5
3	ADB-BUTINACA	0,01	0,05
4	α-υδροξυ-αλπραζολάμη	5	25
5	Αγομελατίνη	0,05	0,25
6	Αλοπεριδόλη	0,05	0,25
7	Αλπραζολάμη	0,1	0,5
8	Αμισουλπρίδη	0,1	0,5
9	Αμιτριπτυλίνη	0,05	0,25
10	Αμοξαπίνη	0,01	0,05
11	Αμφεταμίνη	0,5	2,5
12	Αριπιπραζόλη	2,5	12,5
13	Ατροπίνη	0,01	0,05
14	Βενζυλόνη	0,05	0,25
15	Βενλαφαξίνη	0,05	0,25
16	Βεραπαμίλη	8	40
17	Βουπρενορφίνη	0,1	0,5
18	Βουπροπιόνη	0,05	0,25
19	Βρωμαζεπάμη	1	5
20	Βρωρφίνη	0,05	0,25
21	BE	2,5	12,5
22	Δεσιπραμίνη	0,01	0,05
23	Δεσμεθυλ-σιταλοπράμη	0,1	0,5
24	Δεσμεθυλ-τριμιπραμίνη	0,01	0,05
25	Διαζεπάμη	0,05	0,25
26	Διλτιαζέμη	0,5	2,5
27	Εντυλόνη	0,01	0,05
28	EME	0,1	0,5
29	Ζολπιδέμη	0,05	0,25

30	Ζοπικλόνη	0,1	0,5
31	Ιμιπραμίνη	1	5
32	Καρβαμαζεπίνη	0,125	0,62
33	Καφεΐνη	0,125	0,62
34	Κεταμίνη	0,05	0,25
35	Κλοβαζάμη	0,05	0,25
36	Κλοζαπίνη	0,05	0,25
37	Κλομιπραμίνη	2,5	12,5
38	Κωδεΐνη	0,1	0,5
39	Κοκαΐνη	0,01	0,05
40	Κουετιαπίνη	0,05	0,25
41	Κυκλοβενζαπρίνη	0,1	0,5
42	Λιδοκαΐνη	0,05	0,25
43	Λοραζεπάμη	1	5
44	Μαπροτιλίνη	0,5	2,5
45	Μεθαδόνη	0,05	0,25
46	Μεθαμφεταμίνη	0,05	0,25
47	Μελατονίνη	0,05	0,25
48	Μεφεδρόνη	0,1	0,5
49	Μιανσερίνη	1	5
50	Μιδαζολάμη	0,1	0,5
51	Μιρταζαπίνη	0,05	0,25
52	Μιτραγυνίνη	0,1	0,5
53	Μορφίνη	0,5	2,5
54	MDA	2,5	12,5
55	MDMA	0,01	0,05
56	N-Δεσμεθυλ-φλουνιτραζεπάμη	0,5	2,5
57	Ναλοξόνη	0,05	0,25
58	Νιτραζεπάμη	2,5	12,5
59	Νορβουπρενορφίνη	2,5	12,5
60	Νορδαζεπάμη	0,5	2,5
61	Νορκεταμίνη	0,1	0,5
62	Νορκλοζαπίνη	0,01	0,05
63	Νορτριπυλίνη	1	5
64	Ντουλοξετίνη	2,5	12,5
65	O-Δεσμέθυλ-βενλαφαξίνη	2,5	12,5
66	Ολανζαπίνη	0,5	2,5
67	Οξαζεπάμη	2,5	12,5
68	Παλιπεριδόνη	0,01	0,05
69	Παρακεταμόλη	0,01	0,05
70	Παροξετίνη	0,5	2,5
71	Πραζεπάμη	0,01	0,05
72	Προκαΐναμίδη	0,05	0,25

73	Προπρανολόλη	0,01	0,05
74	Προτριπτυλίνη	0,5	2,5
75	Ρισπεριδόνη	2,5	12,5
76	Σερτραλίνη	0,5	2,5
77	Σιλδεναφίλη	2,5	12,5
78	Σιμετιδίνη	0,1	0,5
79	Σιταλοπράμη	0,01	0,05
80	Σουλπιρίδη	0,05	0,25
81	Τεμαζεπάμη	0,5	2,5
82	Τοπιραμάτη	2,5	12,5
83	Τραμαδόλη	0,05	0,25
84	Τριαζολάμη	2,5	12,5
85	Τριμιπραμίνη	5	25
86	Φεντανύλη	0,01	0,05
87	Φλουβοξαμίνη	2,5	12,5
88	Φλουβρωμαζεπάμη	0,5	2,5
89	Φλουνιτραζεπάμη	0,05	0,25
90	Φλουοξετίνη	1	5
91	Χλωροδιαζεποξειδή	5	25
92	Χλωροπρομαζίνη	0,5	2,5

ii. Εκλεκτικότητα (Selectivity)

Η προτεινόμενη μέθοδος χαρακτηρίζεται από εκλεκτικότητα, παρέχοντας ορθά αναλυτικά αποτελέσματα. Παρατηρήθηκε συνέκλουση μεταξύ κάποιων αναλυτών που ήταν αναμενόμενη λόγω του μεγάλου αριθμού ουσιών που εξετάζονται ταυτόχρονα. Επίσης, σημειώνεται οι συνεκλούμενες ουσίες έχουν διαφορετικά πρόδρομα (Q1) και παραγόμενα ιόντα (Q3). Συνεπώς, τα αποτελέσματα έδειξαν απουσία επιδράσεων από τα συστατικά του υποστρώματος και από άλλους μεταβολίτες.

iii. Πιστότητα (Precision)

Η αξιολόγηση της πιστότητας έγινε για κάθε προσδιοριζόμενη ουσία σε εμβολιασμένα δείγματα ολικού αίματος (τρία επίπεδα εμβολιασμού). Από τα εξαγόμενα αποτελέσματα, οι τιμές RSD% για τις 92 εξεταζόμενες ουσίες, για την εντός ημέρας επαναληψιμότητα κυμαίνονταν από 3% έως 15%, και η μεταξύ των ημερών επαναληψιμότητα από 7% έως 18% (Πίνακας 12).

Πίνακας 12: Πιστότητα της προτεινόμενης μεθοδολογίας LLE-LC-MS/MS προσδιορισμού των 92 ουσιών-στόχων σε ολικό αίμα.

Α/Α	Ουσίες (ng/mL)	Εντός ημέρας			Μεταξύ ημερών		
		Χαμηλό (5)	Μεσαίο (50)	Υψηλό (150)	Χαμηλό (5)	Μεσαίο (50)	Υψηλό (150)
1	2-FDCK	8	9	9	13	11	11
2	6-MAM	9	8	8	11	11	11
3	ADB-BUTINACA	8	10	5	11	13	11
4	A-υδροξυ- αλπραζολάμη	9	9	10	13	12	11
5	Αγομελατίνη	11	13	9	12	14	17
6	Αλοπεριδόλη	12	12	9	14	13	10
7	Αλπραζολάμη	9	11	8	14	13	10
8	Αμισουλπρίδη	12	11	7	14	12	8
9	Αμιτριπτυλίνη	8	11	8	11	14	11
10	Αμοξαπίνη	12	8	4	15	12	8
11	Αμφεταμίνη	9	9	3	11	11	7
12	Αριπιπραζόλη	8	8	6	12	12	8
13	Ατροπίνη	12	10	7	14	11	11
14	Βενζυλόνη	9	10	9	14	13	9
15	Βενλαφαξίνη	12	11	6	14	13	11
16	Βεραπαμίλη	6	8	10	11	15	10
17	Βουπρενορφίνη	9	9	5	13	12	7
18	Βουπροπιόνη	6	10	7	8	12	8
19	Βρωμαζεπάμη	9	9	6	12	12	10
20	Βρωρφίνη	13	7	5	15	11	7
21	BE	7	9	6	11	16	10
22	Δεσιπραμίνη	12	10	7	14	13	11
23	Δεσμεθυλ- σιταλοπράμη	10	9	8	12	12	14
24	Δεσμεθυλ- τριμπραμίνη	12	12	7	14	15	11
25	Διαζεπάμη	6	9	6	9	12	11
26	Διλτιαζέμη	9	11	4	11	13	8
27	Εντυλόνη	12	10	8	15	13	12
28	EME	13	9	6	15	13	12
29	Ζολπιδέμη	11	8	9	15	12	13
30	Ζοπικλόνη	11	11	4	14	14	7
31	Ιμιπραμίνη	13	11	7	15	13	10
32	Καρβαμαζεπίνη	7	11	8	12	12	9
33	Καφεΐνη	10	10	4	13	13	9
34	Κεταμίνη	13	10	7	15	12	12
35	Κλοβαζάμη	11	11	4	13	12	9

36	Κλοζαπίνη	10	9	5	12	13	9
37	Κλομιπραμίνη	9	10	5	13	13	9
38	Κωδεΐνη	13	9	7	16	11	10
39	Κοκαΐνη	12	11	6	15	16	9
40	Κουετιαπίνη	7	12	4	11	14	10
41	Κυκλοβενζαπρίνη	9	11	6	11	15	11
42	Λιδοκαΐνη	12	11	6	15	13	9
43	Λοραζεπάμη	11	8	8	14	11	11
44	Μαπροτιλίνη	13	12	9	10	15	10
45	Μεθαδόνη	10	9	7	13	12	12
46	Μεθαμφεταμίνη	8	9	8	10	13	12
47	Μελατονίνη	10	11	5	13	13	10
48	Μεφεδρόνη	7	10	8	11	11	11
49	Μιανσερίνη	15	8	7	14	13	10
50	Μιδαζολάμη	11	11	5	14	13	10
51	Μιρταζαπίνη	13	11	8	15	14	12
52	Μιτραγυνίνη	14	9	7	17	11	11
53	Μορφίνη	6	8	4	14	12	7
54	MDA	14	9	4	17	10	7
55	MDMA	11	9	5	13	13	11
56	N-Δεσμεθυλ- φλουνιτραζεπάμη	11	11	9	14	13	12
57	Ναλοξόνη	7	9	8	10	13	12
58	Νιτραζεπάμη	9	10	5	10	12	12
59	Νορβουπρενορφίνη	13	10	9	16	13	11
60	Νορδαζεπάμη	12	11	8	16	13	12
61	Νορκεταμίνη	9	12	8	13	15	12
62	Νορκλοζαπίνη	8	8	6	11	10	11
63	Νορτριπτυλίνη	11	12	9	16	15	12
64	Ντουλοξετίνη	12	11	5	14	13	11
65	O-Δεσμέθυλ- βενλαφαξίνη	9	8	8	13	11	11
66	Ολανζαπίνη	10	12	16	12	14	18
67	Οξαζεπάμη	12	11	5	13	15	11
68	Παλιπεριδόνη	9	4	4	13	9	10
69	Παρακεταμόλη	12	10	10	15	12	12
70	Παροξετίνη	13	9	9	16	13	12
71	Πραζεπάμη	7	11	5	11	12	8
72	Προκαΐναμίδη	10	10	6	15	13	10
73	Προπρανολόλη	11	8	5	12	14	12
74	Προτριπτυλίνη	10	11	5	14	14	11
75	Ρισπεριδόνη	13	9	8	14	15	17
76	Σερτραλίνη	10	10	7	13	13	12

77	Σιλδεναφίλη	8	11	4	11	14	10
78	Σιμετιδίνη	11	10	8	15	13	9
79	Σιταλοπράμη	10	9	6	13	12	11
80	Σουλπιρίδη	10	12	7	13	13	12
81	Τεμαζεπάμη	9	11	6	12	14	9
82	Τοπιραμάτη	12	7	9	14	11	11
83	Τραμαδόλη	9	11	4	12	13	9
84	Τριαζολάμη	11	10	4	14	14	7
85	Τριμιπραμίνη	10	9	4	14	11	7
86	Φεντανύλη	10	12	5	14	14	10
87	Φλουβοξαμίνη	10	10	5	14	12	9
88	Φλουβρωμαζεπάμη	11	11	6	13	13	10
89	Φλουνιτραζεπάμη	12	12	4	13	12	8
90	Φλουοξετίνη	13	12	6	15	15	11
91	Χλωροδιαζεποξείδη	8	9	5	13	11	9
92	Χλωροπρομαζίνη	11	11	6	15	13	10

iv. Ακρίβεια (Accuracy)

Η αξιολόγηση της ακρίβειας – ανάκτησης έγινε για κάθε προσδιοριζόμενη ουσία σε εμβολιασμένα δείγματα ολικού αίματος (δύο επίπεδα εμβολιασμού). Στο σύνολο των αναλυτών οι ανακτήσεις ήταν αρκετά υψηλές και κυμάνθηκαν από 65 έως 89% για το χαμηλό επίπεδο και από 66 έως 89% για το υψηλό επίπεδο (Πίνακας 13).

Πίνακας 13: Ακρίβεια ως ανάκτηση της προτεινόμενης μεθοδολογίας LLE-LC-MS/MS προσδιορισμού των 92 ουσιών-στόχων σε ολικό αίμα.

Α/Α	Ουσίες	ΑΝΑΚΤΗΣΗ (%)	
		Χαμηλό Επίπεδο (5 ng/mL)	Υψηλό Επίπεδο (200 ng/mL)
1	2-FDCK	67	69
2	6-MAM	73	67
3	ADB-BUTINACA	68	70
4	α-υδροξυ-αλπραζολάμη	71	75
5	Αγομελατίνη	66	65
6	Αλοπεριδόλη	70	74
7	Αλπραζολάμη	73	71
8	Αμισουλπρίδη	66	67
9	Αμιτριπυλίνη	73	70
10	Αμοξαπίνη	72	76
11	Αμφεταμίνη	73	69
12	Αριπιπραζόλη	76	71
13	Ατροπίνη	70	76
14	Βενζυλόνη	68	71
15	Βενλαφαξίνη	73	70
16	Βεραπαμίλη	66	67
17	Βουπρενορφίνη	71	67
18	Βουπροπύνη	68	66
19	Βρωμαζεπάμη	76	74
20	Βρωρφίνη	75	70
21	BE	76	81
22	Δεσιπραμίνη	72	71
23	Δεσμεθυλ-σιταλοπράμη	66	65
24	Δεσμεθυλ-τριμιπραμίνη	68	66
25	Διαζεπάμη	74	69
26	Διλτιαζέμη	73	78
27	Ευτυλόνη	83	79
28	EME	77	74
29	Ζολπιδέμη	80	77
30	Ζοπικλόνη	75	76
31	Ιμπραμίνη	72	68
32	Καρβαμαζεπίνη	73	69
33	Καφεΐνη	89	89
34	Κεταμίνη	81	75
35	Κλοβαζάμη	73	66
36	Κλοζαπίνη	79	71
37	Κλομιπραμίνη	69	70
38	Κωδεΐνη	76	74

39	Κοκαΐνη	78	73
40	Κουετιαπίνη	74	76
41	Κυκλοβενζαπρίνη	71	76
42	Λιδοκαΐνη	70	76
43	Λοραζεπάμη	73	75
44	Μαπροτιλίνη	73	71
45	Μεθαδόνη	78	74
46	Μεθαμφεταμίνη	70	73
47	Μελατονίνη	67	73
48	Μεφεδρόνη	69	66
49	Μιανσερίνη	72	74
50	Μιδαζολάμη	71	68
51	Μιρταζαπίνη	87	81
52	Μιτραγυνίνη	76	73
53	Μορφίνη	79	75
54	MDA	72	79
55	MDMA	87	82
56	N-Δεσμεθυλ-φλουνιτραζεπάμη	65	62
57	Ναλοξόνη	73	74
58	Νιτραζεπάμη	66	67
59	Νορβουπρενορφίνη	67	71
60	Νορδαζεπάμη	74	75
61	Νορκεταμίνη	80	77
62	Νορκλοζαπίνη	65	68
63	Νορτριπτυλίνη	72	71
64	Ντουλοξετίνη	73	69
65	O-Δεσμέθυλ-βενλαφαξίνη	66	68
66	Ολανζαπίνη	70	66
67	Οξαζεπάμη	75	72
68	Παλιπεριδόνη	67	66
69	Παρακεταμόλη	86	80
70	Παροξετίνη	76	72
71	Πραζεπάμη	83	80
72	Προκαΐναμίδη	70	72
73	Προπρανολόλη	75	70
74	Προτριπτυλίνη	67	69
75	Ρισπεριδόνη	71	72
76	Σερτραλίνη	66	69
77	Σιλδεναφίλη	74	72
78	Σιμετιδίνη	65	69
79	Σιταλοπράμη	77	67
80	Σουλπιρίδη	65	68
81	Τεμαζεπάμη	69	66

82	Τοπιραμάτη	79	77
83	Τραμαδόλη	71	77
84	Τριαζολάμη	84	79
85	Τριμπραμίνη	67	66
86	Φεντανύλη	73	77
87	Φλουβοξαμίνη	79	75
88	Φλουβρωμαζεπάμη	68	66
89	Φλουνιτραζεπάμη	76	72
90	Φλουοξετίνη	82	78
91	Χλωροδιαζεποξείδη	69	66
92	Χλωροπρομαζίνη	77	73

v. Γραμμικότητα (Linearity)

Σχετικά με τη γραμμικότητα της μεθόδου, το εύρος των λαμβανόμενων τιμών για τους συντελεστές προσδιορισμού (R^2) ήταν 0,9811 έως 0,9995 σε εννιά επίπεδα συγκέντρωσης για το ολικό αίμα (0,05- 500 ng/mL). Στον Πίνακα 14, παρουσιάζεται η εξίσωση της ευθείας παλινδρόμησης ελαχίστων τετραγώνων ($y=ax+b$) και ο συντελεστής προσδιορισμού (Coefficient of Determination, R^2).

Πίνακας 14: Δεδομένα παλινδρόμησης και γραμμικότητα, για τις 92 ουσίες-στόχους στο ολικό αίμα.

A/A	Ουσίες	Δεδομένα παλινδρόμησης	R ²
1	2-FDCK	$y=26962x - 82341$	0,9908
2	6-MAM	$y = 1447,7x - 124,12$	0,9966
3	ADB-BUTINACA	$y=40939x + 64760$	0,9933
4	A-υδροξυ-αλπραζολάμη	$y = 7182,6x - 4310,5$	0,9905
5	Αγομελατίνη	$y = 92512x + 2E+06$	0,9811
6	Αλοπεριδόλη	$y = 59026x - 283413$	0,9965
7	Αλπραζολάμη	$y = 7907,3x + 52315$	0,9911
8	Αμισουλπρίδη	$y = 6474,3x + 6379,8$	0,9992
9	Αμιτριπυλίνη	$y = 19621x - 115371$	0,9981
10	Αμοξαπίνη	$y = 20273x + 87220$	0,9968
11	Αμφεταμίνη	$y = 46193x + 30270$	0,9917
12	Αριπιπραζόλη	$y = 3458,3x + 7911$	0,9911
13	Ατροπίνη	$y = 25078x + 151388$	0,991
14	Βενζυλόνη	$y = 11065x + 10183$	0,9943
15	Βενλαφαξίνη	$y = 41435x - 104859$	0,9926
16	Βεραπαμίλη	$y = 307,94x - 2216,5$	0,9937
17	Βουπρενορφίνη	$y = 1179,5x + 4884,5$	0,9932
18	Βουπροπιόνη	$y = 41637x - 121405$	0,9976
19	Βρωμαζεπάμη	$y = 18160x - 25421$	0,9933
20	Βρωρφίνη	$y = 20703x - 127654$	0,9984
21	BE	$y = 71,225x - 814,08$	0,9936
22	Δεσιπραμίνη	$y = 86340x - 410669$	0,9974
23	Δεσμεθυλ-σιταλοπράμη	$y = 23097x - 22537$	0,9993
24	Δεσμεθυλ-τριμιπραμίνη	$y = 51500x - 100162$	0,9988
25	Διαζεπάμη	$y = 20868x - 18402$	0,9924
26	Διλτιαζέμη	$y = 102,16x + 644,85$	0,9909
27	Ευτυλόνη	$y = 24046x - 71311$	0,9944
28	EME	$y = 38650x + 20180$	0,9993
29	Ζολπιδέμη	$y = 66884x - 1E+06$	0,9904
30	Ζοπικλόνη	$y = 787,5x + 2171,7$	0,9904
31	Ιμιπραμίνη	$y = 16350x + 76433$	0,9946
32	Καρβαμαζεπίνη	$y = 185592x - 570621$	0,9965
33	Καφεΐνη	$y = 18603x + 234142$	0,9905
34	Κεταμίνη	$y = 48464x - 45169$	0,9945
35	Κλοβαζάμη	$y = 88099x - 22441$	0,9941
36	Κλοζαπίνη	$y = 52089x - 338481$	0,9977
37	Κλομιπραμίνη	$y = 4217,3x + 9950$	0,9923
38	Κωδεΐνη	$y = 6767,4x + 17631$	0,9946
39	Κοκαΐνη	$y = 201297x - 3E+06$	0,9929
40	Κουετιαπίνη	$y = 83422x - 770462$	0,9979
41	Κυκλοβενζαπρίνη	$y = 33431x - 265603$	0,9983

42	Λιδοκαΐνη	$y = 101281x - 209431$	0,9979
43	Λοραζεπάμη	$y = 26970x + 379830$	0,99
44	Μαπροτιλίνη	$y = 5562,6x - 15455$	0,998
45	Μεθαδόνη	$y = 121739x - 1E+06$	0,9977
46	Μεθαμφεταμίνη	$y = 96423x - 491697$	0,9961
47	Μελατονίνη	$y = 30876x + 209329$	0,9947
48	Μεφεδρόνη	$y = 84265x - 11589$	0,9907
49	Μιανσερίνη	$y = 11,614x + 932,52$	0,9901
50	Μιδαζολάμη	$y = 25332x - 92574$	0,9913
51	Μιρταζαπίνη	$y = 66189x - 407135$	0,9985
52	Μιτραγυνίνη	$y = 72975x - 1E+06$	0,99
53	Μορφίνη	$y = 2229,5x - 170,01$	0,9946
54	MDA	$y = 36046x - 272778$	0,9967
55	MDMA	$y = 80900x - 174619$	0,9988
56	N-Δεσμεθυλ-φλουνιτραζεπάμη	$y = 36863x + 344848$	0,9917
57	Ναλοξόνη	$y = 59390x + 158408$	0,9931
58	Νιτραζεπάμη	$y = 1625,4x + 8963,5$	0,9904
59	Νορβουπρενορφίνη	$y = 941,85x + 7785,3$	0,9907
60	Νορδαζεπάμη	$y = 9629,5x + 77929$	0,9958
61	Νορκεταμίνη	$y = 40836x - 220050$	0,9975
62	Νορκλοζαπίνη	$y = 50816x - 262951$	0,9986
63	Νορτριπτυλίνη	$y = 20188x + 40036$	0,994
64	Ντουλοξετίνη	$y = 1007,7x - 1169,6$	0,9993
65	O-Δεσμέθυλ-βενλαφαζίνη	$y = 4310x - 99523$	0,9932
66	Ολανζαπίνη	$y = 289,23x + 1633,4$	0,9983
67	Οξαζεπάμη	$y = 63102x + 261210$	0,9901
68	Παλιπεριδόνη	$y = 9398,5x + 65349$	0,99
69	Παρακεταμόλη	$y = 37521x + 184837$	0,9903
70	Παροξετίνη	$y = 10782x + 55100$	0,9939
71	Πραζεπάμη	$y = 41192x + 95983$	0,9913
72	Προκαΐναμίδη	$y = 3930,2x - 31821$	0,9948
73	Προπρανολόλη	$y = 5524,1x + 548,54$	0,9947
74	Προτριπτυλίνη	$y = 36084x - 58585$	0,9958
75	Ρισπεριδόνη	$y = 656,29x - 6633,4$	0,9927
76	Σερτραλίνη	$y = 11631x - 94486$	0,993
77	Σιλδεναφίλη	$y = 9136,9x - 99380$	0,9993
78	Σιμετιδίνη	$y = 5722,6x + 25873$	0,9904
79	Σιταλοπράμη	$y = 36322x - 191059$	0,9984
80	Σουλπιρίδη	$y = 39287x - 329898$	0,9942
81	Τεμαζεπάμη	$y = 90217x - 482662$	0,996
82	Τοπιραμάτη	$y = 65463x + 519004$	0,9911
83	Τραμαδόλη	$y = 2312,3x - 33715$	0,9905
84	Τριαζολάμη	$y = 25930x - 343363$	0,9984

85	Τριμιπραμίνη	$y = 70,149x - 392,86$	0,9953
86	Φεντανύλη	$y = 55901x - 489413$	0,9959
87	Φλουβοξαμίνη	$y = 15057x - 43963$	0,9995
88	Φλουβρωμαζεπάμη	$y = 341,5x + 0,3838$	0,9994
89	Φλουνιτραζεπάμη	$y = 38643x + 209865$	0,9916
90	Φλουοξετίνη	$y = 10124x - 30414$	0,9991
91	Χλωροδιαζεποξείδη	$y = 31418x - 29109$	0,994
92	Χλωροπρομαζίνη	$y = 152,75x + 661,37$	0,9991

vi. Επιμόλυνση εκ μεταφοράς (Carry Over)

Η αξιολόγηση της μεταφοράς πραγματοποιήθηκε με ανάλυση δειγμάτων «τυφλού» δείγματος αμέσως μετά την ανάλυση δειγμάτων ελέγχου υψηλής συγκέντρωσης (400 ng/mL). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μέθοδος ήταν απαλλαγμένη από μόλυνση εκ μεταφοράς. Το εμβαδόν των 92 αναλυτών στα τυφλά δείγματα (blank) ήταν μικρότερο από το 10% του εμβαδού της χαμηλότερης συγκέντρωσης της καμπύλης βαθμονόμησης για κάθε αναλύτη.

vii. Επίδραση υποστρώματος και Καταστολή/ Ενίσχυση Ιοντισμού (Matrix Effect)

Σύμφωνα με τις τιμές της επίδρασης υποστρώματος, παρατηρήθηκε ότι για 10 ουσίες (καφεΐνη, μορφίνη, MDA, MDMA, νορβουπρενορφίνη, οξαζεπάμη, φλουβρωμαζεπάμη, φλουνιτραζεπάμη, φλουοξετίνη, χλωροπρομαζίνη) από τις 92 παρατηρείται ενίσχυση ιοντισμού ενώ για τις υπόλοιπες καταστολή σήματος. Η επίδραση του υποστρώματος δεν υπερέβη το $\pm 25\%$ για καμία από τις ουσίες (Πίνακας 15).

Πίνακας 15: Επίδραση του υποστρώματος σε χαμηλό (5 ng/mL) και υψηλό επίπεδο (200 ng/mL) συγκέντρωσης για τις 92 ουσίες-στόχους στο ολικό αίμα.

A/A	Ουσίες	Επίδραση υποστρώματος χαμηλό επίπεδο % (5 ng/mL)	Επίδραση υποστρώματος υψηλό επίπεδο % (200 ng/mL)
1	2-FDCK	-13	-13
2	6-MAM	-8	-6
3	ADB-BUTINACA	-12	-11
4	A-υδροξυ-αλπραζολάμη	-8	-9
5	Αγομελατίνη	-16	-11
6	Αλοπεριδόλη	-12	-6
7	Αλπραζολάμη	-4	-14
8	Αμισουλπρίδη	-9	-11
9	Αμιτριπυλίνη	-12	-6
10	Αμοξαπίνη	-17	-15
11	Αμφεταμίνη	-8	-9
12	Αριπιπραζόλη	-18	-10
13	Ατροπίνη	-16	-17
14	Βενζυλόνη	-5	-6
15	Βενλαφαξίνη	-5	-6
16	Βεραπαμίλη	-16	-17
17	Βουπρενορφίνη	-7	-8
18	Βουπροπίνη	-6	-7
19	Βρωμαζεπάμη	-11	-13
20	Βρωρφίνη	-17	-11
21	BE	-16	-15
22	Δεσιπραμίνη	-13	-14
23	Δεσμεθυλ-σιταλοπράμη	-11	0
24	Δεσμεθυλ-τριμιπραμίνη	-17	-18
25	Διαζεπάμη	-3	-5
26	Διλτιαζέμη	-2	-11
27	Ευτυλόνη	-14	-12
28	EME	-16	-14
29	Ζολπιδέμη	-2	-8
30	Ζοπικλόνη	-8	-9
31	Ιμιπραμίνη	-4	-9
32	Καρβαμαζεπίνη	-15	-19
33	Καφεΐνη	18	15
34	Κεταμίνη	-15	-21
35	Κλοβαζάμη	-11	-9
36	Κλοζαπίνη	-18	-18
37	Κλομιπραμίνη	-15	-16
38	Κωδεΐνη	-14	-10

39	Κοκαΐνη	-16	-10
40	Κουετιαπίνη	-8	-5
41	Κυκλοβενζαπρίνη	-7	-8
42	Λιδοκαΐνη	-6	-5
43	Λοραζεπάμη	-1	-2
44	Μαπροτιλίνη	-13	-14
45	Μεθαδόνη	10	7
46	Μεθαμφεταμίνη	-12	-10
47	Μελατονίνη	-1	-9
48	Μεφεδρόνη	-7	-8
49	Μιανσερίνη	-22	-24
50	Μιδαζολάμη	-7	-11
51	Μιρταζαπίνη	-4	-7
52	Μιτραγυνίνη	-8	-9
53	Μορφίνη	4	0
54	MDA	2	8
55	MDMA	6	7
56	N-Δεσμεθυλ-φλουνιτραζεπάμη	-11	-10
57	Ναλοξόνη	-7	-8
58	Νιτραζεπάμη	-6	-12
59	Νορβουπρενορφίνη	6	12
60	Νορδαζεπάμη	-18	-17
61	Νορκεταμίνη	-13	-8
62	Νορκλοζαπίνη	-1	-3
63	Νορτριπτυλίνη	-10	-12
64	Ντουλοξετίνη	-12	-9
65	O-Δεσμέθυλ-Βενλαφαξίνη	-7	-14
66	Ολανζαπίνη	-18	-16
67	Οξαζεπάμη	17	10
68	Παλιπεριδόνη	-11	-6
69	Παρακεταμόλη	-19	-24
70	Παροξετίνη	-3	0
71	Πραζεπάμη	-5	-4
72	Προκαϊναμίδη	-10	-7
73	Προπρανολόλη	-14	-15
74	Προτριπτυλίνη	-18	-16
75	Ρισπεριδόνη	-15	-17
76	Σερτραλίνη	-10	-17
77	Σιλδεναφίλη	-12	-15
78	Σιμετιδίνη	-12	-16
79	Σιταλοπράμη	-16	-18
80	Σουλπιρίδη	-6	-3
81	Τεμαζεπάμη	-10	-12

82	Τοπιραμάτη	-9	-8
83	Τραμαδόλη	-4	-8
84	Τριαζολάμη	-13	-20
85	Τριμπραμίνη	-14	-19
86	Φεντανύλη	-2	-9
87	Φλουβοξαμίνη	-9	-13
88	Φλουβρωμαζεπάμη	1	9
89	Φλονιτραζεπάμη	10	10
90	Φλουοξετίνη	4	8
91	Χλωροδιαζεποξειδή	-8	-10
92	Χλωροπρομαζίνη	15	7

viii. Σταθερότητα (Stability)

Η μελέτη σταθερότητας έδειξε ότι οι προσδιοριζόμενες ουσίες παρέμεναν σταθερές για 24 ώρες στους 5°C, στη χαμηλή (5 ng/mL) και στην υψηλή (200 ng/mL) συγκέντρωση. Συγκεκριμένα, για τα πειράματα μακροπρόθεσμης σταθερότητας, παρατηρήθηκε ότι οι αναλύτες ήταν σταθεροί σε θερμοκρασία κατάψυξης (-20°C) για χρονικό διάστημα μίας εβδομάδας. Η σταθερότητα ήταν μεγαλύτερη από 85% και στα δύο χρονικά διαστήματα που μελετήθηκαν καθώς και στα δύο επίπεδα συγκεντρώσεων (Πίνακας 16).

Πίνακας 16: Σταθερότητα των 92 ουσιών-στόχων σε δύο επίπεδα συγκέντρωσης (5-200 ng/mL) και σε δύο χρονικά διαστήματα (24 ώρες/ μίας εβδομάδας).

A/A	Ουσίες (ng/mL)	Σταθερότητα % μιας ημέρας		Σταθερότητα % μιας εβδομάδας	
		(5)	(200)	(5)	(200)
1	2-FDCK	98	99	90	91
2	6-MAM	99	99	92	92
3	ADB-BUTINACA	98	99	90	91
4	A-υδροξυ-αλπραζολάμη	99	98	89	90
5	Αγομελατίνη	99	99	92	93
6	Αλοπεριδόλη	98	99	91	92
7	Αλπραζολάμη	99	99	91	91
8	Αμισουλπρίδη	98	99	90	91
9	Αμιτριπτυλίνη	97	98	87	89
10	Αμοξαπίνη	98	99	90	91
11	Αμφεταμίνη	99	99	91	92
12	Αριπιπραζόλη	98	98	91	93
13	Ατροπίνη	99	99	91	92
14	Βενζυλόνη	98	99	90	91
15	Βενλαφαξίνη	96	97	89	90
16	Βεραπαμίλη	97	98	92	93
17	Βουπρενορφίνη	99	99	91	91
18	Βουπροπύνη	98	98	89	89
19	Βρωμαζεπάμη	98	99	91	92
20	Βρωρφίνη	97	99	93	94
21	BE	98	99	90	91
22	Δεσιπραμίνη	98	99	89	90
23	Δεσμεθυλ-σιταλοπράμη	99	99	91	91
24	Δεσμεθυλ-τριμιπραμίνη	97	98	92	93
25	Διαζεπάμη	96	97	90	91
26	Διλτιαζέμη	99	99	87	88
27	Ευτυλόνη	97	98	92	92
28	EME	98	99	90	91
29	Ζολπιδέμη	99	99	89	90
30	Ζοπικλόνη	98	98	88	89
31	Ιμιπραμίνη	98	99	88	91
32	Καρβαμαζεπίνη	97	97	86	87
33	Καφεΐνη	99	99	94	95
34	Κεταμίνη	98	99	92	93
35	Κλοβαζάμη	99	99	90	91
36	Κλοζαπίνη	99	99	94	95
37	Κλομιπραμίνη	97	98	91	91
38	Κωδεΐνη	98	99	92	91

39	Κοκαΐνη	98	99	93	91
40	Κουετιαπίνη	98	99	93	94
41	Κυκλοβενζαπρίνη	97	98	86	87
42	Λιδοκαΐνη	98	99	90	91
43	Λοραζεπάμη	99	99	91	92
44	Μαπροτιλίνη	97	98	86	87
45	Μεθαδόνη	98	99	91	92
46	Μεθαμφεταμίνη	98	99	90	91
47	Μελατονίνη	98	99	92	94
48	Μεφεδρόνη	98	99	93	91
49	Μιανσερίνη	95	96	86	86
50	Μιδαζολάμη	97	98	90	91
51	Μιρταζαπίνη	95	96	89	90
52	Μιτραγυνίνη	98	98	88	89
53	Μορφίνη	99	99	89	90
54	MDA	97	99	90	91
55	MDMA	98	99	92	92
56	N-Δεσμεθυλ-φλουνιτραζεπάμη	98	98	90	91
57	Ναλοξόνη	99	99	88	89
58	Νιτραζεπάμη	98	99	91	92
59	Νορβουπρενορφίνη	98	99	90	91
60	Νορδαζεπάμη	98	99	92	93
61	Νορκεταμίνη	98	99	91	92
62	Νορκλοζαπίνη	98	99	90	91
63	Νορτριπτυλίνη	97	99	88	90
64	Ντουλοξετίνη	98	99	89	90
65	O-Δεσμέθυλ-Βενλαφαξίνη	98	99	88	89
66	Ολανζαπίνη	96	97	85	86
67	Οξαζεπάμη	95	96	86	86
68	Παλιπεριδόνη	98	98	90	91
69	Παρακεταμόλη	99	99	93	94
70	Παροξετίνη	98	99	92	93
71	Πραζεπάμη	99	99	93	95
72	Προκαΐναμίδη	98	98	90	91
73	Προπρανολόλη	98	99	91	91
74	Προτριπτυλίνη	98	99	89	89
75	Ρισπεριδόνη	96	96	86	86
76	Σερτραλίνη	98	99	87	88
77	Σιλδεναφίλη	98	99	86	87
78	Σιμετιδίνη	99	99	90	91
79	Σιταλοπράμη	98	99	89	91
80	Σουλπιρίδη	98	98	88	89
81	Τεμαζεπάμη	98	99	90	91

82	Τοπιραμάτη	98	99	91	92
83	Τραμαδόλη	98	99	90	91
84	Τριαζολάμη	98	99	89	90
85	Τριμιπραμίνη	98	99	87	88
86	Φεντανύλη	99	99	90	91
87	Φλουβοξαμίνη	97	98	89	90
88	Φλουβρωμαζεπάμη	99	99	90	91
89	Φλουνιτραζεπάμη	98	99	91	92
90	Φλουοξετίνη	99	99	89	89
91	Χλωροδιαζεποξείδη	98	99	90	91
92	Χλωροπρομαζίνη	98	98	89	90

3.6.2 Επικύρωση μεθοδολογίας FPSE-LC-MS/MS σε σίελα

i. Όριο ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ)

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, τα LODs και LOQs εκτιμήθηκαν με βάση τον λόγο σήματος προς θόρυβο να είναι ίσος με 3 (S/N=3) και 10 (S/N=10), αντίστοιχα. Η τιμή του ορίου ανίχνευσης ήταν 0,015 ng/mL και της ποσοτικοποίησης 0,05 ng/mL.

ii. Εκλεκτικότητα (Selectivity)

Η προτεινόμενη μέθοδος χαρακτηρίζεται από εκλεκτικότητα, παρέχοντας ορθά αναλυτικά αποτελέσματα και αποκλείοντας οποιαδήποτε παρεμβολή από το υπόστρωμα.

iii. Πιστότητα (Precision)

Για την εντός της ημέρας (within a day/intra-day precision) και μεταξύ των ημερών πιστότητα (between days/inter-day precision) έλαβαν χώρα τρεις εκχυλίσεις και 5 επαναλήψεις σε μία ημέρα και σε διάστημα πέντε ημερών, αντίστοιχα. Από τα εξαγόμενα αποτελέσματα, οι τιμές RSD% για την βρωφίνη, για την εντός ημέρας επαναληψιμότητα είναι 6.4-7.6% και η μεταξύ των ημερών επαναληψιμότητα ήταν 9.9% - 8.1% για το χαμηλό -και- υψηλό επίπεδο αντίστοιχα (Πίνακας 17).

Πίνακας 17: Πιστότητα της προτεινόμενης μεθοδολογίας FPSE -LC-MS/MS προσδιορισμού της βρωφίνης στα σίελα εντός της ημέρας και μεταξύ ημερών.

Αναλύτης	Πιστότητα εντός ημέρας		Πιστότητα μεταξύ ημερών	
	Χαμηλό επίπεδο (1 ng/mL)	Υψηλό επίπεδο (50 ng/mL)	Χαμηλό επίπεδο (1 ng/mL)	Υψηλό επίπεδο (50 ng/mL)
Βρωφίνη	6.4	7.6	9.9	8.1

iv. Ακρίβεια (Accuracy)

Η αξιολόγηση της ακρίβειας -ανάκτησης- έγινε για κάθε προσδιοριζόμενη ουσία σε εμβολιασμένα δείγματα ελέγχου ποιότητας σιέλων (δύο επίπεδα εμβολιασμού). Η ανάκτηση ήταν αρκετά υψηλή και κυμαίνεται στα 65% για το χαμηλό επίπεδο (1 ng/mL) και 75% για το υψηλό (50 ng/mL).

v. Γραμμικότητα (Linearity)

Σχετικά με τη γραμμικότητα ο συντελεστής προσδιορισμού (Coefficient of Determination, R^2) ήταν 0,9993 σε επτά επίπεδα συγκέντρωσης για τα σίελα (0.05- 50 ng/mL) και η εξίσωση της ευθείας παλινδρόμησης ελαχίστων τετραγώνων ($y=ax+b$) ήταν $y= 18025x + 31786$.

vi. Επιμόλυνση εκ μεταφοράς (Carry Over)

Η αξιολόγηση της μεταφοράς πραγματοποιήθηκε με ανάλυση δειγμάτων «τυφλού» δείγματος αμέσως μετά την ανάλυση δειγμάτων ελέγχου υψηλής συγκέντρωσης (400 ng/mL). Δεν παρατηρήθηκε μόλυνση εκ μεταφοράς σε κανένα αναλυόμενο δείγμα.

vii. Επίδραση υποστρώματος και Καταστολή/ Ενίσχυση Ιοντισμού

Σχετικά με την επίδραση του υποστρώματος παρατηρείται καταστολή σήματος. Για το χαμηλό επίπεδο (1 ng/mL): -20% , για το και υψηλό (5 ng/mL) επίπεδο:-23%.

viii. Σταθερότητα (Stability)

Η μελέτη σταθερότητας πραγματοποιήθηκε για διάστημα δύο και τεσσάρων εβδομάδων, σε θερμοκρασίες 5°C και -20°C, και σε συγκέντρωση 50 ng/mL. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η σταθερότητα της βρωφίνης κυμάνθηκε σε υψηλά ποσοστά (95-98%) (Πίνακας 18).

Πίνακας 18: Σταθερότητα της βρωφίνης σε δύο θερμοκρασίες (5°C και -20°C) και σε δύο χρονικά διαστήματα (1 και 2 εβδομάδες).

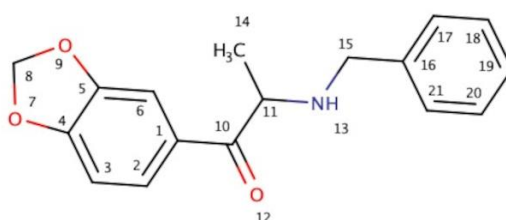
Αναλύτης	Σταθερότητα δύο εβδομάδων (%)		Σταθερότητα τεσσάρων εβδομάδων (%)	
	5°C	-20°C	5°C	-20°C
Βρωφίνη	97	98	95	97

3.7 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΣΥΝΘΕΤΙΚΩΝ ΝΑΡΚΩΤΙΚΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ (NMR)

Η ανάπτυξη της αναλυτικής μεθοδολογίας αφορούσε τον προσδιορισμό της δομής της συνθετικής καθινόνης, βενζυλόνης, καθώς και την ανίχνευσή της σε βιολογικό υλικό.

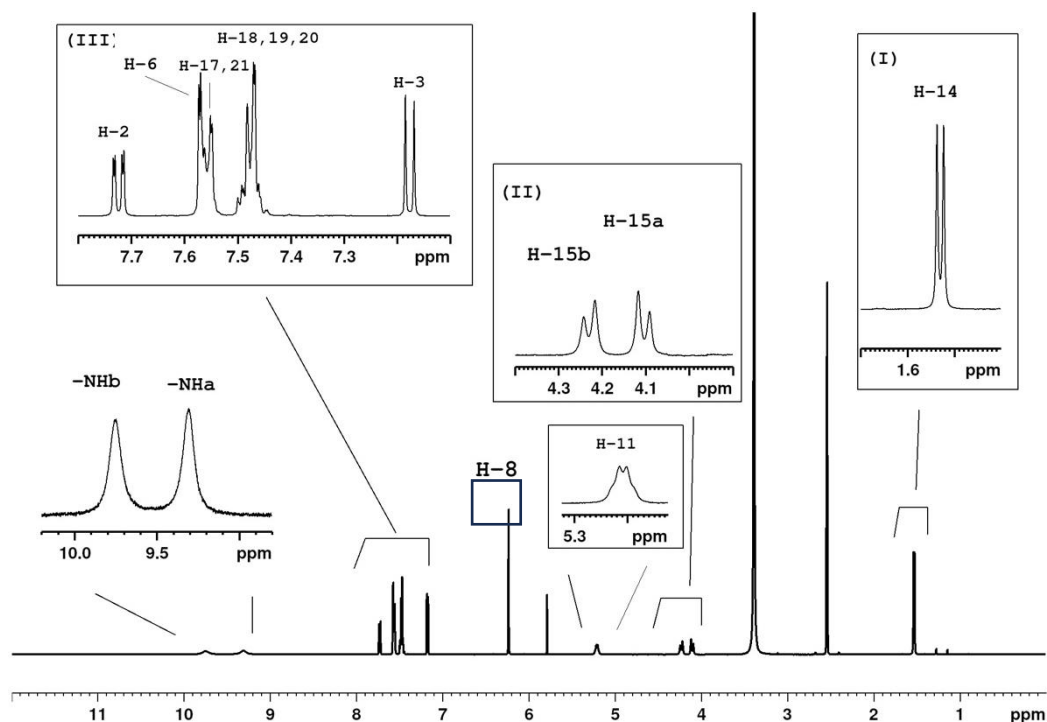
3.7.1 Αποσαφήνιση της δομής της βενζυλόνης

Η διαδικασία της αποσαφήνισης της χημικής δομής της βενζυλόνης απαιτεί συνδυασμό αναλυτικών πειραμάτων. Το φάσμα ^1H NMR της βενζυλόνης (1,43 mg/mL) σε DMSO- d_6 στα 4,95 mM παρουσιάζεται στο Σχήμα 28. Η χημική μετατόπιση του C15 υποδηλώνει ότι συνδέεται άμεσα με ένα ετεροάτομο, στην περίπτωση αυτή, ένα άτομο αζώτου.



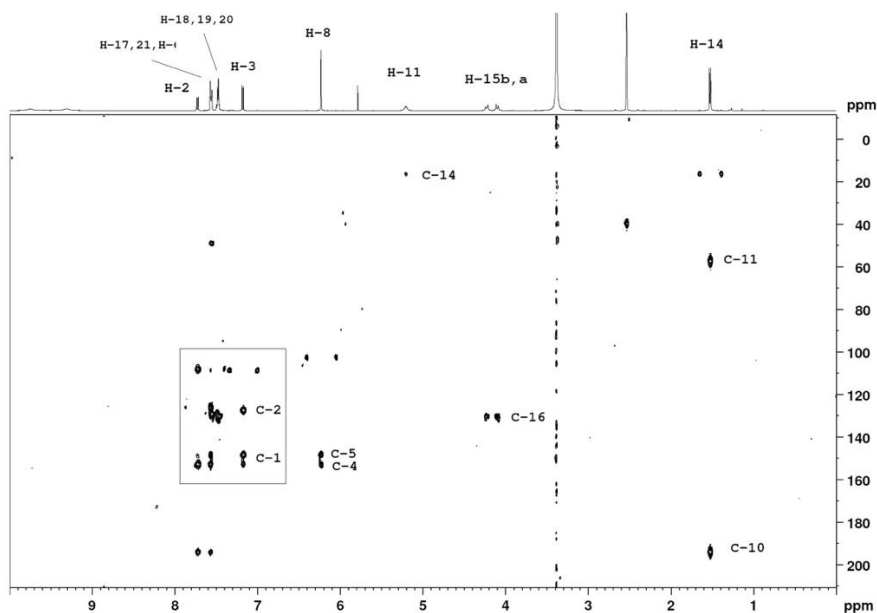
Σχήμα 28: Δομή BMDP (Marvin JS).

Στα ένθετα I, II και III (μεγέθυνση της επιλεγμένης περιοχής του φάσματος) του Σχήματος 29, απεικονίζονται: το πρωτόνιο H14 στα 1,53 ppm, το πρωτόνιο H11 στα 5,21 ppm και το πρωτόνιο H8 στα 6,24 ppm. Το πρωτόνιο H15 έχει δύο διακριτά σήματα -το καθένα από αυτά είναι «διπλό», τα H15α και H15β, με σταθερά σύζευξης J περίπου 13 Hz, στα 4,10 ppm και 4,22 ppm, αντίστοιχα. Επίσης, υπάρχουν δύο NH πρωτόνια, NHα και NHβ στα 9,31 ppm και 9,74 ppm, αντίστοιχα, με τιμή που αντιστοιχεί σε ένα πρωτόνιο το καθένα.



Σχήμα 29: Φάσμα ^1H NMR 4,95 mM (1,43 mg/mL) βενζυλόνης σε $\text{DMSO-}d_6$ (64 μεταβάσεις, πειραματικός χρόνος 5m 32s). Τα ένθετα (I) έως (III) αποτελούν μεγέθυνση των περιοχών του φάσματος.

Στο Σχήμα 30, απεικονίζεται το φάσμα $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ HMBC της βενζυλόνης. Συγκεκριμένα, υποδεικνύονται οι διασταυρούμενες κορυφές των χημικών μετατοπίσεων ^1H στην διάσταση ^{13}C . Οι διασταυρούμενες κορυφές H14 προς το καρβοξύλιο C10 και C11, οι διασταυρούμενες κορυφές H8 προς το C4 και C5 του δακτυλίου A και οι διασταυρούμενες κορυφές H15 προς το C16 υποδεικνύουν το χαρακτηριστικό μοτίβο της καθινόνης. Ο C-10 για το H-11 δεν εμφανίζονται λόγω του επιπέδου μεγέθυνσης που χρησιμοποιείται στο Σχήμα. Στον Πίνακα 19, παρουσιάζονται οι άνθρακες των δακτυλίων A και B.



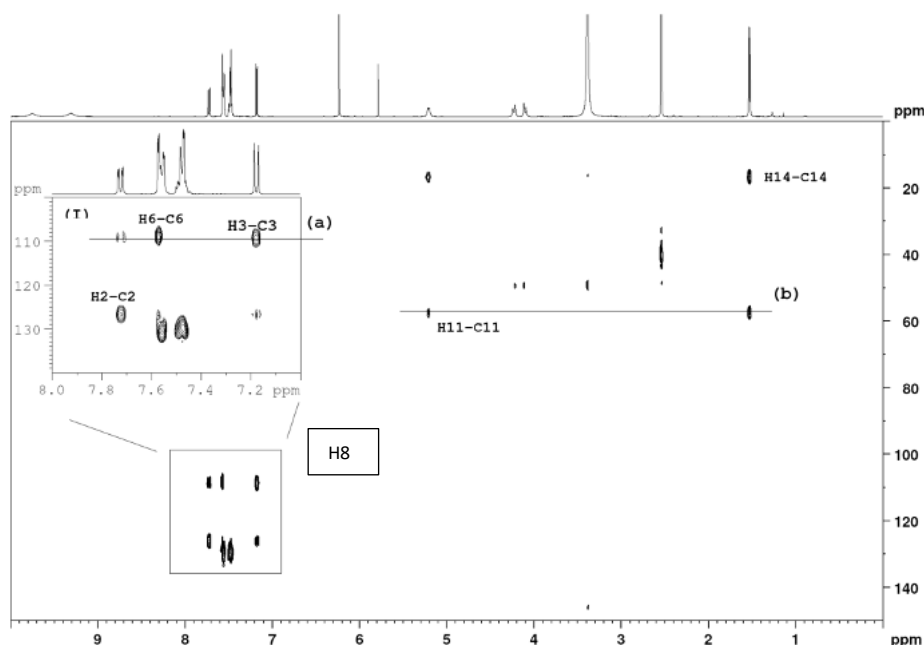
Σχήμα 30: Φάσμα HMBC της βενζυλόνης σε DMSO- d_6 με τα πρωτόνια και τους άνθρακες να υποδεικνύονται. Στο τετράγωνο που περιλαμβάνεται στο σχήμα παρουσιάζονται οι άνθρακες των δακτυλίων A και B.

Πίνακας 19: Χημική απόδοση της βενζυλόνης στα 4,95 mM (1,43 mg/mL) σε DMSO- d_6 .

Θέση	δ_H / ppm	Αριθμός πρωτονίων	Multiplicity, J in Hz	δ_C / ppm
1				128.4
2	7.72	1H	dd, (8.3, 1.63)	126.8
3	7.17	1H	d, 8.2	109.2
4				153.3
5				149.3
6	7.572	1H	d, 1.68	108.3
8	6.235	2H	m	103.2
10				194.6
11	5.21	1H	m	57.8
14	1.53	3H	d, 6.97	17.1
H-15 $_{\alpha}$	4.10	1H	d, 12.98	49.59
H-15 $_{\beta}$	4.22	1H	d, 12.98	49.62
16				130.4
H-18,19,20	7.48	3H	m	C-18 & C-20 at 129.4 C-19 at 131.7
H-17,21	7.56	2H	m	C-17 & C-21 at 132.7
NH $_{\alpha}$	9.31	1H	br ¹	
NH $_{\beta}$	9.74	1H	br ¹	

¹Broad peak

Έπειτα, αποκτήθηκε το φάσμα HSQC-TOCSY που απεικονίζεται στο Σχήμα 31. Στο ένθετο (I) (γραμμή (α)), το H2-C2 έχει μια διασταυρούμενη κορυφή με το H3-C3, όπως αναμένεται για τον δακτύλιο A. Επιπλέον, το H11-C11 έχει μια διασταυρούμενη κορυφή με το σύστημα H14-C14 (γραμμή (β)), υποδεικνύοντας τη χαρακτηριστική ομάδα των πρωτονίων. Η διασταυρούμενη κορυφή από H11-C11 έως H14-C14 είναι χαρακτηριστική για τη δομή της βενζυλόνης. Έτσι, μαζί με την ύπαρξη του πρωτονίου H8 στα 6,2 ppm (για το επίπεδο συγκέντρωσης 1,43 mg/mL (5,0 mM) βενζυλόνης σε DMSO-d₆), αποτελούν ισχυρή ένδειξη της ύπαρξης ενός τμήματος NPS που μοιάζει με "καθινόνη". Το μοτίβο αυτό προτείνεται ως "φασματοσκοπική υπογραφή NMR" για την πιθανή ύπαρξη τμήματος NPS που μοιάζει με "καθινόνη" σε άγνωστο δείγμα.



Σχήμα 31: Φάσμα HSQC-TOCSY της βενζυλόνης σε DMSO-d₆. Ένθετο (I) είναι μια μεγέθυνση της αρωματικής περιοχής. Οι γραμμές (α) και (β) υποδεικνύουν την συσχέτιση TOCSY των συστημάτων spin για τον δακτύλιο-A και την μεθυλομάδα, αντίστοιχα.

3.7.2 Επίδραση συγκέντρωσης και φαινόμενο χημικής ανταλλαγής

Τα φαινόμενα χημικής ανταλλαγής και αλληλεπίδρασης με τον διαλύτη που συμβάλλουν στο μοτίβο των πρωτονίων των συγκεκριμένων κορυφών στο φάσμα ¹H NMR της βενζυλόνης σε DMSO-d₆ μελετήθηκαν σε δύο επίπεδα συγκέντρωσης: 1,43 mg/mL (5,0 mM) και 0,24 mg/mL (0,85 mM). Στον Πίνακα 20, παρουσιάζονται οι ¹H NMR χημικές μετατοπίσεις.

Πίνακας 20: ^1H NMR μετατοπίσεις της βενζυλόνης σε $\text{DMSO}-d_6$ για δύο επίπεδα συγκεντρώσεων: 1.43 mg/mL (5 mM) and 0.24 mg/mL (0.83 mM).

Θέση	Πρωτόνια	C=0.24 mg/mL	C=1.43 mg/mL	$\Delta\delta^{\#}$ /Hz
		δ/ppm (multiplicity, J)	δ/ppm (multiplicity, J)	
2	H-2	7.72 (dd, 8.3 Hz, 1.63 Hz)	7.72 (dd, 8.3 Hz, 1.63 Hz)	+0.4
3	H-3	7.17 (d, 8.08 Hz)	7.17 (d, 8.2 Hz)	<u>0</u>
6	H-6	7.570 (d, 1.58 Hz)	7.572 (d, 1.68 Hz)	<u>+1.0</u>
8	H-8	6.234 (b)	6.235 (m)	<u>+0.5</u>
11	H-11	5.20 (b)	5.21 (m)	<u>+5</u>
13	NH $_{\alpha}$	9.26	9.31	+20
13	NH $_{\beta}$	9.57	9.74	+89
14	H-14	1.51 (d, 4.57Hz)	1.53 (d, 6.97 Hz)	+10
15	H-15 $_{\alpha}$	4.09 (d, 12.98 Hz)	4.10 (d, 12.98 Hz)	+1.5
15	H-15 $_{\beta}$	4.21 (b)	4.23 (d, 12.98 Hz)	+7.5
18-20	H-18,19,20	7.48 (m, 6.5 Hz)	7.48 (m)	<u>0</u>
17,21	H-17,21	7.53 (d, 6.7 Hz)	7.56 (m)	+14

$^{\#}$ Εκφράζεται ως $\Delta\delta$ σε 1,43 σε σύγκριση με 0,24 mg/mL

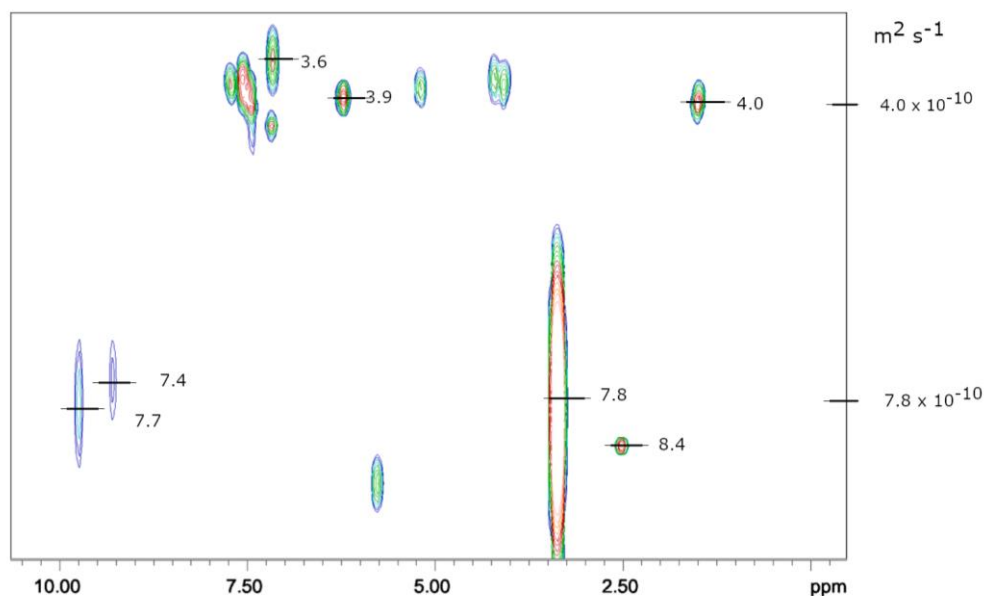
Όπως φαίνεται στον Πίνακα 20, τα πρωτόνια H17 και H21 του δακτυλίου B αποπροστατεύονται ($\Delta\delta$ +14 Hz) κατά την αύξηση της συγκέντρωσης της βενζυλόνης, πιθανώς λόγω αλληλεπίδρασης στην αυξημένη συγκέντρωση. Το ίδιο φαινόμενο αποπροστασίας διαπιστώθηκε επίσης για τα πρωτόνια H14 ($\Delta\delta$ των +10 Hz).

Η κορυφή των πρωτονίων H11, είναι διευρυμένη στο χαμηλό επίπεδο συγκέντρωσης και δεν παρατηρείται το μοτίβο πολλαπλότητας όπως στο υψηλό επίπεδο. Το πρωτόνιο H15 $_{\beta}$ στα 4,21 ppm έχει επίσης διευρυμένη και αποπροστατευμένη κορυφή ($\Delta\delta$ +7 Hz), ενώ το πρωτόνιο H-15 $_{\alpha}$ ήταν λιγότερο αποπροστατευμένο ($\Delta\delta$ +1,5 Hz) και παρατηρείται το μοτίβο της διπλής κορυφής.

Τα αμιδικά πρωτόνια είναι αποπροστατευμένα, το -NH $_{\alpha}$ με τιμή $\Delta\delta$ +20 Hz, ενώ το πρωτόνιο -NH $_{\beta}$ είχε $\Delta\delta$ +89 Hz που δείχνει ισχυρή επίδραση. Έτσι, το H15 $_{\beta}$ συσχετίζεται με το πρωτόνιο -NH $_{\beta}$. Επιπλέον, η συμμετοχή του αμιδικού πρωτονίου -NH $_{\alpha}$ σε έναν ενδομοριακό δεσμό υδρογόνου με το τμήμα -C=O -αν και θα ήταν αναμενόμενο να συντονίζεται σε χαμηλότερο πεδίο σε σύγκριση με το πρωτόνιο -NH $_{\beta}$ - θα μπορούσε να εξηγήσει τη μικρή επίδραση της συγκέντρωσης στη χημική του μετατόπιση. Η εξάρτηση της συγκέντρωσης των πρωτονίων θα μπορούσε να είναι ενδεικτική της συμμετοχής τους σε φαινόμενα χημικής ανταλλαγής που μειώνουν το χρόνο χαλάρωσης T $_2$.

Προκειμένου να μελετηθεί η πιθανή συμμετοχή του -NH $_{\beta}$ σε φαινόμενα χημικής ανταλλαγής με αλληλεπίδραση με τον διαλύτη πραγματοποιήθηκε το πείραμα DOSY. Όπως απεικονίζεται στο Σχήμα 32, παρατηρούνται δύο διαφορετικές τιμές για τα δύο αμιδικά πρωτόνια. Το -NH $_{\beta}$, είναι πιο "υδατοειδές" από το άλλο, δείχνοντας δύο διαφορετικά περιβάλλοντα διαλυτοποίησης για τα δύο πρωτόνια. Η παραπάνω παρατήρηση θα μπορούσε να εξηγηθεί από

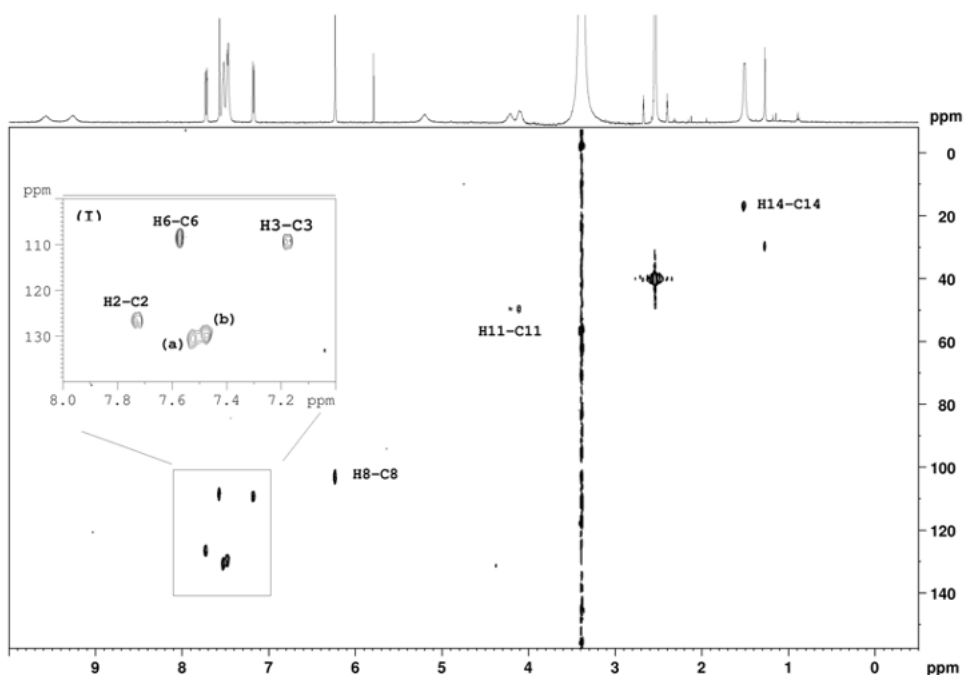
την αλληλεπίδραση χημικής ανταλλαγής του πρωτονίου -NHβ και από τον πιθανό σχηματισμό ενός ενδομοριακού δεσμού H του πρωτονίου -NHα με το τμήμα -C=O της βενζυλόνης.



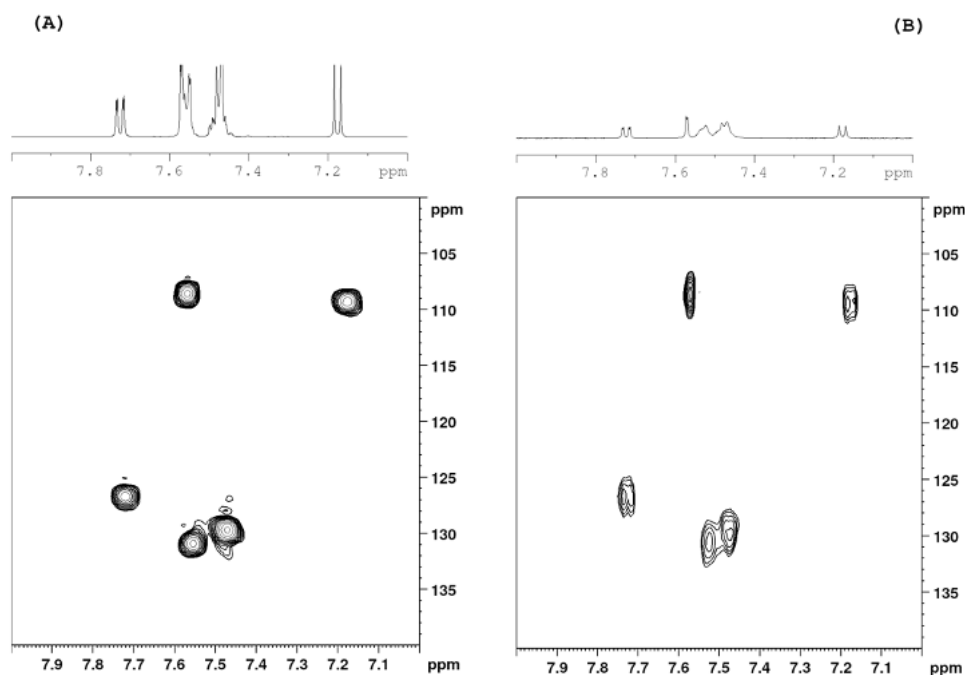
Σχήμα 32: Πείραμα DOSY σε βενζυλόνη (1,43 mg/mL)/ DMSO- d_6 .

Έπειτα αποκτήθηκαν φάσματα 2D ^1H - ^{13}C HSQC και HMBC για την επίδραση της συγκέντρωσης στον άνθρακα, για δύο επίπεδα συγκέντρωσης της βενζυλόνης σε DMSO- d_6 : 0,24 mg/mL (0,85 mM) και 1,43 mg/mL (5,0 mM).

Στο Σχήμα 33, απεικονίζεται το φάσμα ^1H - ^{13}C HSQC για 0,24 mg/mL (0,85 mM) βενζυλόνης και στο Σχήμα 34 τα φάσματα ^1H - ^{13}C HSQC για τις αρωματικές περιοχές στα δύο επίπεδα συγκέντρωσης. Στον Πίνακα 21, παρουσιάζονται οι παρατηρούμενες ^{13}C χημικές μετατοπίσεις. Παρατηρούνται μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις του ^{13}C για τα δύο επίπεδα συγκέντρωσης της βενζυλόνης.



Σχήμα 33: Φάσμα HSQC της βενζυλόνης σε συγκέντρωση 0,24 mg/ mL σε DMSO- d_6 . Το H_2O καταστέλλεται με τη χρήση καταστολής διαλύτη WET. Στο ένθετο (I) εμφανίζεται η περιοχή του φάσματος που αντιστοιχεί στους αρωματικούς δακτυλίους A και B.



Σχήμα 34: Φάσματα 1H - ^{13}C HSQC της βενζυλόνης σε DMSO- d_6 . (A) για 1,43 mg/mL (5,0 mM) και (B) για 0,24 mg/mL (0,85 mM).

Πίνακας 21: Χημικές μετατοπίσεις ^{13}C και τιμές $\Delta\delta\text{C}$ για τη βενζυλόνη σε δύο επίπεδα συγκέντρωσης: 0,24 mg/mL (0,85 mM) και 1,43 mg/mL (5,0 mM) σε DMSO- d_6 .

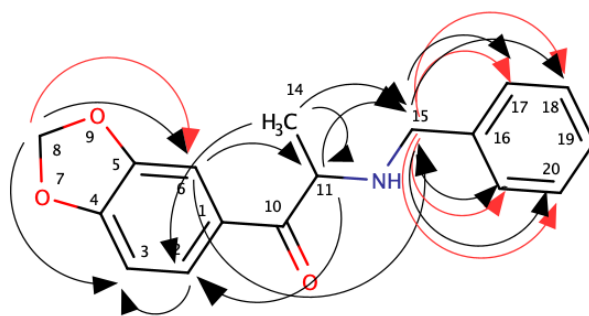
Position	0.24 mg/mL δ_{C} / ppm	1.43 mg/mL δ_{C} / ppm	$\Delta\delta_{\text{C}}^{\#}$ / Hz
1	§	128.4	
2	126.60	126.85	31.44
3	109.51	109.24	-33.96
4	153.5	153.5	
5	149.7	148.7	-125.77
6	108.94	108.51	-54.08
8	103.4	103.16	-30.18
10	§	194.6	
11	§	57.81	
14	17.40	17.13	-33.96
15 α	49.88	49.59	-36.47
15 β	49.75	49.62	-16.35
18, 20	130.0	129.65	-44.02
19	§	131.7	
16	§	130.4	
17, 21	130.7	130.79	11.32

[#]Εκφράζεται ως $\Delta\delta$ σε 1,43 σε σύγκριση με 0,24 mg/mL

§ Δεν παρατηρήθηκε λόγω του χαμηλού επιπέδου συγκέντρωσης

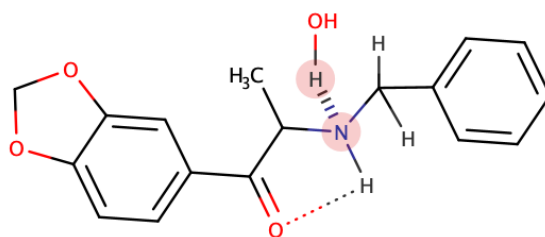
3.7.3 Δομή της βενζυλόνης σε διάλυμα DMSO- d_6

Για τη μελέτη της δομής της βενζυλόνης σε DMSO- d_6 , πραγματοποιήθηκε το πείραμα NOESY και το πείραμα ROESY. Από το φάσμα NOESY παρατηρούνται ισχυρές διασταυρούμενες κορυφές NOE των πρωτονίων H14 προς τα πρωτόνια H11, H15, H2; των πρωτονίων H11 προς τα πρωτόνια H15 και H2; των πρωτονίων H6 προς τα πρωτόνια H15, H11 και των πρωτονίων H2 προς τα πρωτόνια H3, H11 και H14. Για το πείραμα NOESY με χρήση μεγαλύτερου χρόνου ανάμιξης (0,5 s), παρατηρήθηκαν οι διασταυρώσεις του H8 με τα πρωτόνια H6 και H2 και οι διασταυρώσεις των πρωτονίων H15 με τα H17, H21 και H18 και H20. Στο σχήμα 35, απεικονίζονται οι προαναφερθείσες διασταυρώσεις NOE. Με την απόκτηση του πειράματος ROESY, επετεύχθη η καλύτερη ανάλυση για τις διασταυρούμενες κορυφές H15 και H8.



Σχήμα 35: Περιορισμοί NOE της βενζυλόνης (επίπεδο συγκέντρωσης 1,43 mg/mL (5,0 mM) σε DMSO- d_6). Τα μαύρα βέλη υποδεικνύουν τα πειράματα NOESY και τα κόκκινα τα πειράματα ROESY.

Ο ενδομοριακός δεσμός και η διέγερση του δεύτερου αμιδικού πρωτονίου, θα μπορούσαν να εξηγήσουν (i) τα δύο διακριτά σήματα των πρωτονίων H15 και (ii) την ύπαρξη δύο διακριτών συντονισμών NH. Για τα δύο διακριτά πρωτόνια H15 με τιμή $^3J_{H-H}$ 12,98 Hz, αναμένεται γωνία $\approx 160^\circ$ για καθένα από αυτά. Η κορυφή 5,79 ppm (singlet), η ένταση της οποίας μειώνεται όταν λαμβάνεται φάσμα 1H NMR με προκορεσμό (σταθερή ακτινοβολία) της υπολειπόμενης κορυφής νερού στα 3,3 ppm, θα μπορούσε να είναι η ομάδα -OH από το H-OH που συνδέεται με το άζωτο. Το σχήμα 36, παρουσιάζει την προτεινόμενη χημική δομή της βενζυλόνης σε DMSO- d_6 .



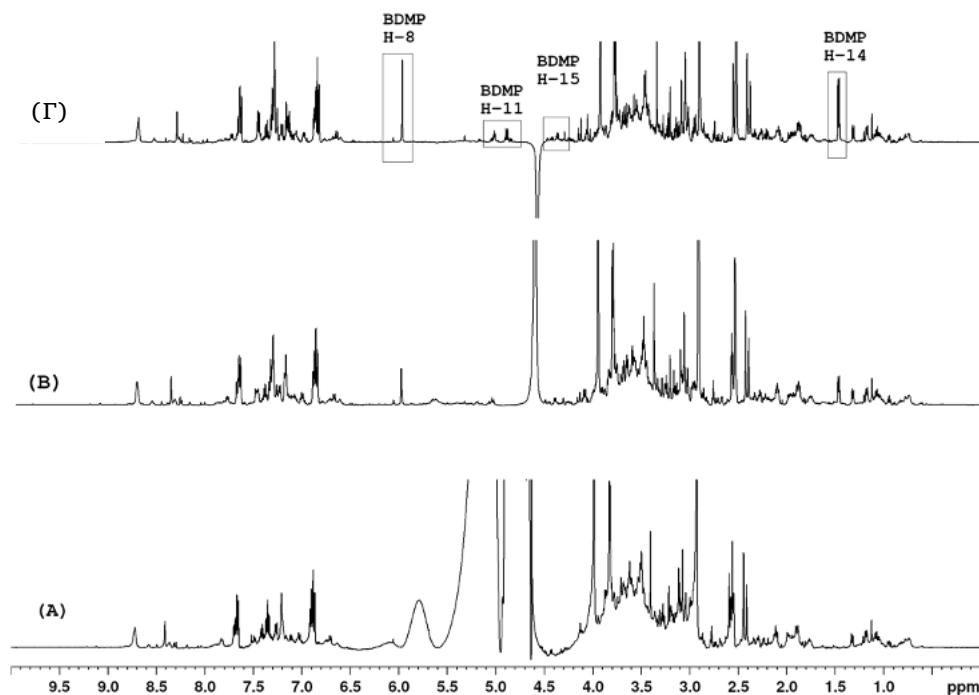
Σχήμα 36: Προτεινόμενη χημική δομή της βενζυλόνης σε DMSO- d_6 .

3.7.4 Ανάπτυξη και εφαρμογή της μεθόδου NMR σε δείγματα ούρων

Για την απόκτηση φασμάτων 1D 1H NMR χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα παλμών lc1gppnf2, το οποίο συνδυάζει τόσο την αύξηση της ευαισθησίας μέσω της καταστολής των διπλών συχνοτήτων όσο και τα αναλυτικά πλεονεκτήματα για τον ποσοτικό προσδιορισμό. Πιο συγκεκριμένα, μέσω του προγράμματος lc1gppnf2 καταστάλθηκε και εξαλείφθηκε περαιτέρω η δεύτερη ευρεία κορυφή του διαλύτη που εμφανίζεται στα $\approx 5,6$ ppm αυξάνοντας έτσι την ευαισθησία της μεθόδου για το χαρακτηριστικό πρωτόνιο H-8 της βενζυλόνης. Προκειμένου να μειωθεί η διαλυτότητα της βενζυλόνης στο δείγμα ούρων και να ελαχιστοποιηθεί το σήμα του νερού προστέθηκε DMSO- d_6 στα ούρα.

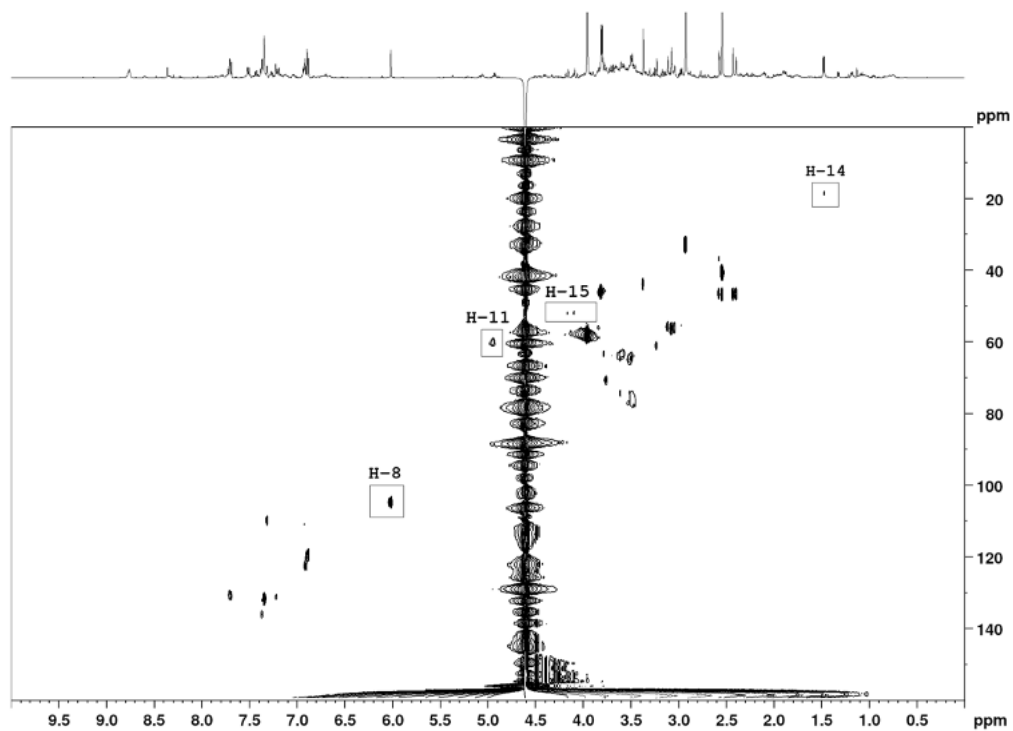
Όπως απεικονίζεται στο Σχήμα 37, κατά τη διαδοχική προσθήκη του διαλύματος βενζυλόνης σε DMSO- d_6 , αποκαλύπτονται το σήμα H8 στα 6,02 ppm και το σήμα H11 στα 5,2 ppm, επιτρέποντας την πιθανή ταυτοποίηση της βενζυλόνης. Επιπλέον, με την προσθήκη DMSO- d_6 , υποδεικνύεται σαφώς η παρατήρηση του "φασματοσκοπικής υπογραφής NMR" της

βενζυλόνης: τα πρωτόνια H8, H11, H15 και H14 (Σχήμα 37C) έχουν σήματα που δεν επικαλύπτονται.

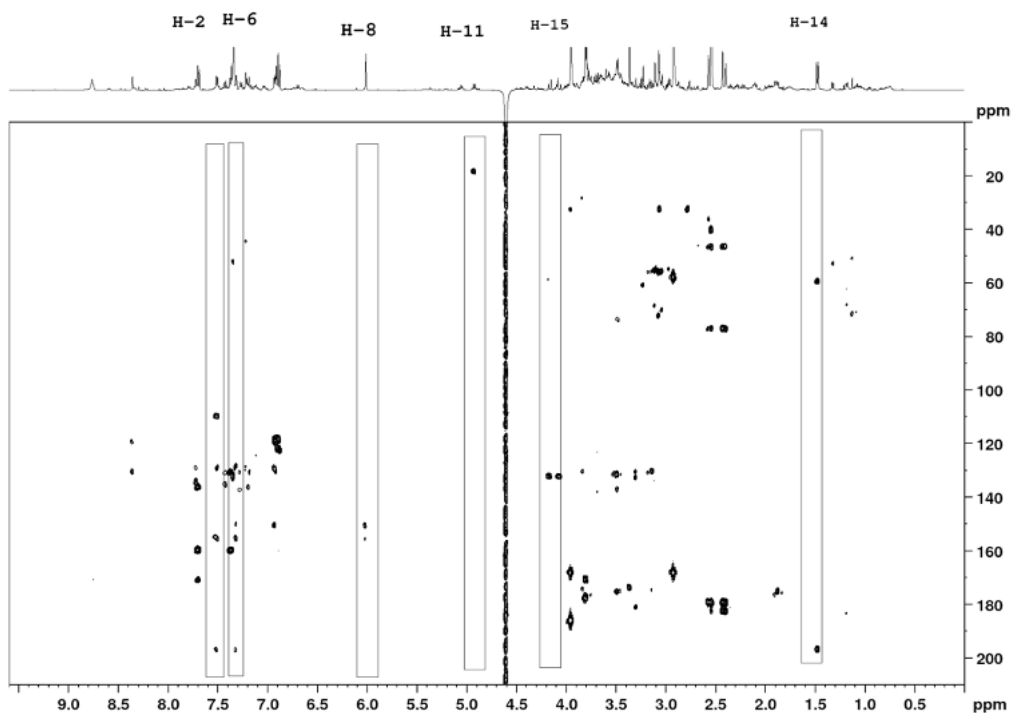


Σχήμα 37: (A) Φάσμα NMR δείγματος ούρων, (B) και (Γ) φάσματα NMR κατά τη διαδοχική προσθήκη 50 μL διαλύματος βενζυλόνης σε $\text{DMSO}-d_6$ με αποτέλεσμα 0,13 mg/mL (0,46 mM) και 0,25 mg/mL (0,88 mM), αντίστοιχα. Τα πρωτόνια της βενζυλόνης "φασματοσκοπική υπογραφή NMR" υποδεικνύονται στο (Γ).

Για τις χημικές μετατοπίσεις ^1H και ^{13}C της βενζυλόνης σε δείγματα ούρων αποκτήθηκαν φάσματα $^1\text{D } ^1\text{H}$ και $2\text{D } ^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HSQC και HMBC (Σχήματα 38, 39). Στο πείραμα HSQC, η καταστολή του σήματος του H_2O επέτρεψε την προβολή των H11-C11 και H15-C15, όπως υποδεικνύεται με τετράγωνα στην Σχήμα 38. Η χαρακτηριστική περιοχή της βενζυλόνης υποδεικνύεται επίσης στο Σχήμα 39.



Σχήμα 38: Φάσμα ^1H - ^{13}C HSQC δείγματος ούρων DMSO-d_6 εμβολιασμένου με $0,25 \text{ mg/mL}$ ($0,88 \text{ mM}$) βενζολόνης.



Σχήμα 39: ^1H - ^{13}C HMBC φάσμα δείγματος ούρων σε DMSO-d_6 εμβολιασμένου με $0,25 \text{ mg/mL}$ ($0,88 \text{ mM}$) βενζολόνης.

Ο Πίνακας 22, παρέχει τις χημικές μετατοπίσεις δH και δC και η συγκέντρωσης της βενζυλόνης ήταν 0,25 mg/mL (0,88 mM). Παρατηρείται ότι το H8 συντονίζεται στα 6,08 ppm, ενώ όταν βρίσκεται στο διάλυμα DMSO-d₆ στα 6,2 ppm. Αντίστοιχα, το H11 στα 4,94 ppm ενώ σε DMSO-d₆ στα 5,20 ppm, το H14 στα 1,45 ppm ενώ σε DMSO-d₆ στα 1,51 ppm. Είναι ενδιαφέρον ότι το πρωτόνιο H15_α συντονίζεται στα 4,09 ppm τόσο στο δείγμα ούρων όσο και στο διάλυμα DMSO-d₆ και το H15_β είναι προστατευμένο στο δείγμα ούρων (4,16 στο δείγμα ούρων και 4,21 στο διάλυμα DMSO-d₆). Το ίδιο φαινόμενο προστασίας εμφανίζεται για τα πρωτόνια H2 και H6 του δακτυλίου A και το H17 του δακτυλίου B (οι τιμές χημικής μετατόπισης είναι 7,52, 7,33, 7,35 και 7,72, 7,57, 7,53 ppm στο δείγμα ούρων και στο DMSO-d₆, αντίστοιχα). Συνεπώς, όλα τα πρωτόνια είναι θωρακισμένα στο δείγμα ούρων σε σύγκριση με τον διαλύτη DMSO-d₆, με εξαίρεση το πρωτόνιο H15_α. Η σύζευξη του H15_α με το πρωτόνιο -NH_α που συμμετέχει στον ενδομοριακό δεσμό H με το τμήμα -C=O δεν επηρεάζεται από το υπόστρωμα.

Πίνακας 22: Χημικές μετατοπίσεις (δH και δC) της βενζυλόνης 0,25 mg/mL (0,88 mM) σε δείγμα ούρων DMSO-d₆.

Θέση	δ _C /ppm	δ _H /ppm
1	119.3	
2	129.2	7.52
3	110.8	6.94
4	151.7	
5	151.7	
6	128.5	7.33
8	104.9	6.02
10	198.2	
11	60.0	4.94
14	18.5	1.45 (d, 7.1)
15 _α	51.6	4.09 (d, 12.9)
15 _β	51.8	4.16 (d, 12.9)
16	132.6	
17	132.0	7.35

Για την εφαρμογή της μεθόδου σε δείγματα ούρων, η τιμή του pH τους ρυθμίστηκε σε ~9,5. Σε αυτή την τιμή pH η ομάδα -NH δεν πρωτονιώνεται (τιμή pK_a ~8,5) και αναμένεται μικρότερη επίδραση στις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων H14 και H15. Με βάση το πρωτόνιο H8, η τιμή LOD για τη βενζυλόνη υπολογίστηκε σε 0,07 µg/mL (0,2 µM) και η τιμή LOQ υπολογίστηκε σε 0,23 µg/mL (0,7 µM).

3.8 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΑ ΚΑΙ ΔΙΚΑΣΤΙΚΑ ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΑ

Η αναπτυχθείσα αναλυτική μεθοδολογία (LLE-UHPLC-MS/MS) εφαρμόστηκε τόσο σε δείγματα ολικού αίματος ασθενών, όσο και σε νεκροτομικό υλικό για τον προσδιορισμό εξαρτησιογόνων ουσιών και φαρμάκων.

Συγκεκριμένα, εφαρμόστηκε για τον τοξικολογικό έλεγχο νεκροτομικού αίματος, που ελήφθη κατά τη διενέργεια νεκροψίας-νεκροτομής, σε 100 περιστατικά που παραπέμφθηκαν από τις αρμόδιες Αρχές στο Εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας για ιατροδικαστική διερεύνηση των αιτών θανάτου σε αιφνίδιους ή βίαιους θανάτους.

Με τον όρο «αιφνίδιος θάνατος» νοείται η ταχεία και απροσδόκητη λήξη της ζωής, γεγονός που οφείλεται σε μια εσωτερική αιτία άγνωστη, παθολογική, οργανικής ή λειτουργικής φύσης. Αιφνίδιοι θάνατοι θεωρούνται οι θάνατοι από καρδιαγγειακές παθήσεις, από παθήσεις του αναπνευστικού συστήματος, του Κ.Ν.Σ., του πεπτικού συστήματος, από άλλες αιτίες (ενδοκρινικές παθήσεις, παθήσεις του αίματος και του ουροποιητικού κ.λπ.) καθώς και θάνατοι από ανακοπή, αναφυλαξία και αιμορραγία. Κατά κανόνα χαρακτηρίζονται ως φυσικοί θάνατοι δηλαδή θάνατοι που επέρχονται λόγω «φυσιολογικής» φθοράς του οργανισμού ή παθολογικής αιτίας μετά από πλήρη ιατροδικαστική διερεύνηση. Ενώ, «βίαιος θάνατος» επέρχεται λόγω της επίδρασης στον οργανισμό ενός εξωτερικού παράγοντα που προκάλεσε αποστέρηση ενός στοιχείου απαραίτητου για τη ζωή ή αντίθετα υπέρμετρη δράση ή προκάλεσε κάκωση (μηχανική, φυσική, χημική) ή δηλητηρίαση ή μεταβολή των συνθηκών του περιβάλλοντος, ασυμβίβαστη άμεσα ή έμμεσα (λόγω πρόκλησης βλάβης της υγείας) με τη ζωή (Κουτσελίνης, 2002). Κατά κανόνα χαρακτηρίζονται μη φυσικοί θάνατοι δηλαδή θάνατοι που επέρχονται λόγω εξωτερικής αιτίας μετά από πλήρη ιατροδικαστική διερεύνηση. Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως υπάρχει και η περίπτωση θανάτων που χαρακτηρίζονται ως «αδιευκρίνιστης αιτιολογίας». Η πλήρης ιατροδικαστική διερεύνηση του θανάτου, συμπεριλαμβάνει συνήθως εκτός της νεκροψίας/νεκροτομής, την τοξικολογική και την ιστοπαθολογική εξέταση, κατά περίπτωση.

Στον Πίνακα 23, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που επιλεγμένων χαρακτηριστικών περιστατικών που υπεβλήθησαν σε ιατροδικαστικό έλεγχο για τον προσδιορισμό των αιτών θανάτου μαζί με επιδημιολογικά και άλλα στοιχεία. Συγκεκριμένα, αφορούν περιστατικά βίαιων θανάτων (περιστατικά 1, 2, 3, 5, 6, 8, 9, 12, 13, 15 & 19), αιφνιδίων θανάτων (περιστατικά 4, 7, 10, 14, 16, 17, 18, 20, 21, 22 & 23), και ένα περιστατικό αδιευκρίνιστου θανάτου (περιστατικό 11), που ήταν θετικά σε κάποια ουσία. Για τα περιστατικά αυτής της κατηγορίας τα αποτελέσματα των τοξικολογικών εξετάσεων συνέβαλαν στον αποσαφήνιση των συνθηκών θανάτου, της αιτίας θανάτου ή/και της πιθανότητας οι προσδιορισθείσες ουσίες να επηρέασαν τη συμπεριφορά ή τις αντιδράσεις του ατόμου που οδήγησαν στον θάνατο. Αξίζει να σημειωθεί ότι στο περιστατικό αδιευκρίνιστου θανάτου παρατηρήθηκαν προχωρημένες σηπτικές εξεργασίες κατά την νεκροψία/νεκροτομή.

Πίνακας 23: Αποτελέσματα νεκροτομικών περιστατικών μετά από ολοκληρωμένη διερεύνηση.

Αρ. περιστατικού	Ηλικία	Γένος	Αποτελέσματα	Συγκέντρωση (ng/mL)	Είδος Θανάτου
1	72	Α	Παρακεταμόλη	62.6	Μη Φυσικά αίτια: Οδικό τροχαίο ατύχημα
			Σιλδεναφίλη	0.19	
2	35	Α	Αμφεταμίνη	<LOQ	Μη Φυσικά αίτια: Αυτοκτονία
			Αλπραζολάμη	11	
			Βρωμαζεπάμη	11	
			Διαζεπάμη	16	
			Νορδαζεπάμη	2.8	
			Φεντανύλη	1.9	
3	43	Α	Κοκαΐνη	<LOQ	Μη Φυσικά αίτια: Κατάχρηση ουσιών- πνευμονικό οίδημα
			ΕΜΕ	<LOQ	
			Διαζεπάμη	2.37	
			Μεθαδόνη	39.7	
			Μεθαμφεταμίνη	1.11	
			Μιρταζαπίνη	<LOQ	
			Παρακεταμόλη	14.0	
4	20	Θ	Ατροπίνη	6	Φυσικά αίτια: Ενδονοσοκομειακός θάνατος
			Λιδοκαΐνη	600	
			Μιδαζολάμη	87	
			Παρακεταμόλη	4394	
5	52	Α	Αμιτριπτυλίνη	59	Μη Φυσικά αίτια: Οδικό τροχαίο ατύχημα
			Νορτριπτυλίνη	14	
			Μαπροτιλίνη	39	
			Σερτραλίνη	291	
6	57	Α	Αλπραζολάμη	11.6	Μη Φυσικά αίτια: Αυτοκτονία
			Μιρταζαπίνη	111	
			Παλιπεριδόνη	60	
			Παρακεταμόλη	24.5	
7	38	Α	Ντουλοξετίνη	153	Φυσικά αίτια: Αιφνίδιος θάνατος
			Λιδοκαΐνη	47	
			Μιδαζολάμη	176	
8	68	Α	Σιταλοπράμη	597	Μη Φυσικά αίτια: Ασφυκτικός θάνατος
			Δεσμέθυλ- σιταλοπράμη	87	
9	66	Α	Διαζεπάμη	41	Μη Φυσικά αίτια: Πτώση εξ' ύψους
			Νορδαζεπάμη	<LOQ	
			Μιρταζαπίνη	113	
			Κουετιαπίνη	40	
			Ζολπιδέμη	3.7	
10	72	Θ	Ατροπίνη	61	Φυσικά αίτια: Ενδονοσοκομειακός θάνατος
			Βρωμαζεπάμη	14	
			Λιδοκαΐνη	167	

			Παρακεταμόλη	402	
			Τραμαδόλη	46	
			Βενλαφαζίνη	220	
			Δεσμέθυλ-βενλαφαζίνη	1757	
11	63	A	Αμιτριπτυλίνη	177	Αδιευκρίνιστος θάνατος
			Νοτριπτυλίνη	130	
			Κυκλοβενζαπρίνη	0.75	
			Φλουοξετίνη	407	
12	47	A	Κουετιαπίνη	205	Μη Φυσικά αίτια: Οδικό τροχαίο ατύχημα
13	30	Θ	Κοκαΐνη	851	Μη Φυσικά αίτια: Κατάχρηση ουσιών
			BE	2121	
			EME	3396	
14	51	A	Διαζεπάμη	8.2	Φυσικά αίτια: Αιφνίδιος θάνατος
			Νορδαζεπάμη	4.76	
			Οξαζεπάμη	<LOQ	
			Τεμαζεπάμη	<LOQ	
			Λιδοκαΐνη	225	
			Παρακεταμόλη	526	
15	36	A	Κοκαΐνη	0.52	Μη Φυσικά αίτια: Οδικό τροχαίο ατύχημα
			BE	72.6	
			EME	5.34	
16	83	A	Κωδεΐνη	<LOQ	Φυσικά αίτια: Αιφνίδιος θάνατος
			Λιδοκαΐνη	100	
			Παρακεταμόλη	1916	
			Βενλαφαζίνη	10.8	
			Δεσμέθυλ-βενλαφαζίνη	829	
17	62	A	Λιδοκαΐνη	41.4	Φυσικά αίτια: Αιφνίδιος θάνατος
18	66	A	Διαζεπάμη	35	Φυσικά αίτια: Αιφνίδιος θάνατος
19	26	A	Παρακεταμόλη	717	Μη Φυσικά αίτια: Εργατικό ατύχημα
			Λιδοκαΐνη	47.8	
			Ατροπίνη	4.9	
20	51	A	Διαζεπάμη	114	Φυσικά αίτια: Αιφνίδιος θάνατος
21	60	Θ	Διαζεπάμη	43	Φυσικά αίτια: Αιφνίδιος θάνατος
			Νορδαζεπάμη	38	
22	53	A	Παρακεταμόλη	230	Φυσικά αίτια: Αιφνίδιος θάνατος
			Λιδοκαΐνη	45	
23	79	A	Διαζεπάμη	47	Φυσικά αίτια: Αιφνίδιος θάνατος
			Νορδαζεπάμη	41	
			Αμιτριπτυλίνη	285	

			Νορτριπτυλίνη	895	
			Μαπροτιλίνη	45	
			Μιρταζαπίνη	116	
			Βενλαφαξίνη	25	
			Δεσμέθυλ- βενλαφαξίνη	971	

Επίσης, η αναπτυχθείσα μέθοδος εφαρμόστηκε για τον τοξικολογικό έλεγχο δειγμάτων αίματος που ελήφθησαν από άτομα (50 περιστατικά) που ελέγχθηκαν για χρήση παράνομων ουσιών από τις Ανακριτικές και Δικαστικές Αρχές. Στο Πίνακα 24, παρουσιάζονται εννέα επιλεγμένα περιστατικά, που είτε παρουσίασαν διαταραγμένη συμπεριφορά μετά από αναφερόμενη λήψη τοξικών ουσιών ή συμπτώματα τοξικότητας, είτε υπέστησαν κάποιο ατύχημα. Αξίζει να αναφερθεί η σημασία της τοξικολογικής εξέτασης σε περιπτώσεις ατυχημάτων ανηλίκων που προσέρχονται σε νοσηλευτικά ιδρύματα, όπου μπορεί να αναδειχθεί παραμέληση ανηλίκων ή έκθεση τους σε κίνδυνο, όπως αποδείχθηκε για το περιστατικό 32.

Πίνακας 24: Αποτελέσματα δικαστικών κλινικών περιστατικών.

Αρ. περιστατικού	Ηλικία	Γένος	Αποτελέσματα	Συγκέντρωση (ng/mL)	Πληροφορίες
24	-	-	Σιταλοπράμη	135	Έλεγχος κατάχρησης ουσιών
			Δεσμέθυλ-σιταλοπράμη	63	
			Σερτραλίνη	68	
25	36	Α	Διαζεπάμη	191.4	Έλεγχος κατάχρησης ουσιών
			Νορδαζεπάμη	57.5	
			Οξαζεπάμη	8.4	
			Τεμαζεπάμη	9.6	
			Σιταλοπράμη	33.5	
26	36	Α	Παρακεταμόλη	174	Έλεγχος κατάχρησης ουσιών
			Κοκαΐνη	336	
			ΒΕ	2609	
			ΕΜΕ	9455	
27	-	-	Λιδοκαΐνη	51	Έλεγχος κατάχρησης ουσιών
			Μιδαζολάμη	368	
			Φεντανύλη	1.35	
28	63	Α	Παρακεταμόλη	56.2	Έλεγχος κατάχρησης ουσιών
			Κοκαΐνη	0.4	
			ΒΕ	111	
			ΕΜΕ	21	
29	37	Α	Αλπραζολάμη	12.8	Έλεγχος κατάχρησης ουσιών
			Παρακεταμόλη	3480	

			α-OH-αλπραζολάμη	<LOQ	
			Λοραζεπάμη	<LOQ	
30	-	A	Παρακεταμόλη	250	Έλεγχος κατάχρησης ουσιών
31	-	-	Αλπραζολάμη	13	Οδικό τροχαίο ατύχημα
			Βενλαφαζίνη	16	
			Δεσμέθυλ-βενλαφαζίνη	0.24	
32	3	A	Αλπραζολάμη	48.2	Διερεύνηση παραμέλησης ανηλίκου
			α-OH-αλπραζολάμη	0.79	

Τέλος, η αναπτυχθείσα μέθοδος εφαρμόστηκε για τον τοξικολογικό έλεγχο δειγμάτων αίματος συνολικά 50 κλινικών περιστατικών, που αφορούσαν άτομα που προσήλθαν στο τμήμα επειγόντων περιστατικών ή σε άλλες κλινικές των νοσηλευτικών ιδρυμάτων της πόλης μας είτε με συμπτώματα δηλητηρίασης είτε με διαταραχές συμπεριφοράς. Στον Πίνακα 25, παρουσιάζονται ενδεικτικά τρία κλινικά περιστατικά που είτε ανέφεραν απόπειρα αυτοκτονίας, είτε εισήλθαν στο νοσοκομείο για θεραπευτικούς σκοπούς (παρακολούθηση θεραπευτικών επιπέδων φαρμάκων).

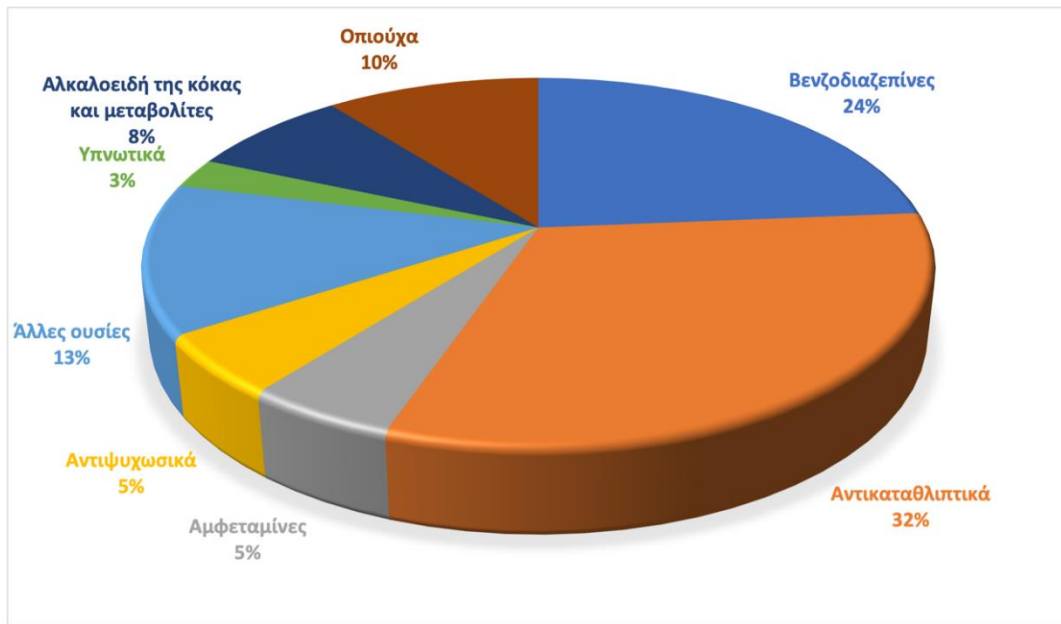
Πίνακας 25: Αποτελέσματα κλινικών περιστατικών.

Αρ. περιστατικού	Ηλικία	Γένος	Αποτελέσματα	Συγκέντρωση (ng/mL)	Πληροφορίες
33	15	Θ	Παροξετίνη	<LOQ	Απόπειρα αυτοκτονίας
34	14	Θ	Φλουοξετίνη	475	Ψυχιατρική παρακολούθηση εφήβων
35	14	Θ	Παλιπεριδόνη	121	Απόπειρα αυτοκτονίας
			Φλουοξετίνη	43	

Στα περιστατικά που αναφέρονται στους Πίνακες 23-25, προσδιορίστηκαν 38 ουσίες (αλπραζολάμη, αμιτριπτυλίνη, αμφεταμίνη, ατροπίνη, α-OH-αλπραζολάμη, ΒΕ, βενλαφαζίνη, βρωμαζεπάμη, διαζεπάμη, δεσμέθυλ-βενλαφαζίνη, δεσμέθυλ-σιταλοπράμη, ΕΜΕ, ζολπιδέμη, κουετιαπίνη, κοκαΐνη, κυκλοβενζαπρίνη, κωδεΐνη, λιδοκαΐνη, λοραζεπάμη, μαπροτιλίνη, μεθαδόνη, μεθαμφεταμίνη, μιδαζολάμη, μιρταζαπίνη, νορδαζεπάμη, νορτριπτυλίνη, ντουλοξετίνη, οξαζεπάμη, παρακεταμόλη, παροξετίνη, παλιπεριδόνη, σεραλίνη, σιταλοπράμη, σιλδεναφίλη, τραμαδόλη, τεμαζεπάμη, φεντανύλη, φλουοξετίνη). Οι ουσίες αυτές ανήκουν σε διάφορες κατηγορίες, όπως οπιούχα/οπιοειδή, κοκαΐνη και μεταβολίτες, αμφεταμίνες, βενζοδιαζεπίνες, αντικαταθλιπτικά, αντιψυχωσικά, υπνωτικά, αναλγητικά αναισθητικά και άλλα. Στα περισσότερα δείγματα η ανίχνευση κάποιου μητρικού φαρμάκου συνοδεύεται και με την ανίχνευση του αντίστοιχου μεταβολίτη. Αξίζει να αναφερθεί ότι σε

συνολικά 28 περιστατικά ανιχνεύθηκαν πάνω από μία ουσίες, ενώ σε επτά περιστατικά (12, 17, 18, 20, 30, 33, 34) ανιχνεύθηκε μόνο μία (Πίνακες 23, 24, 25).

Στο Σχήμα 40, παρουσιάζεται η συχνότητα ανίχνευση των ουσιών ανά κατηγορία. Διαπιστώθηκε ότι τα αντικαταθλιπτικά αποτελούν την συχνότερη ανιχνευόμενη κατηγορία ουσιών ακολουθούμενη από τις βενζοδιαζεπίνες. Τρίτα σε σειρά με ποσοστό 10% ακολουθούν τα οπιούχα και με 8% τα αλκαλοειδή της κόκας και οι μεταβολίτες της.



Σχήμα 40: Συχνότητα εμφάνισης ουσιών σε ποσοστό % ανά κατηγορία ενόσεων.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στη σημερινή εποχή υπάρχει διαθεσιμότητα χιλιάδων ουσιών, για εκούσια ή ακούσια χρήση ή κατάχρηση, από διάφορες οδούς λήψης, που δυνητικά έχουν τοξικές ή θανατηφόρες επιδράσεις. Οι ουσίες αυτές μπορεί να είναι συνταγογραφούμενα ή μη φάρμακα, και άλλες ουσίες, εξαρτησιογόνες ή μη, ελεγχόμενες ή όχι, που διακινούνται ή νόμιμα ή παράνομα, στις διάφορες χώρες ανά τον κόσμο. Επισημαίνεται ακόμη ότι το είδος και το πλήθος των τοξικών ουσιών δεν παραμένει σταθερό, αλλά αυξάνεται με τον χρόνο, με χαρακτηριστικότερο παράδειγμα των τελευταίων ετών το φαινόμενο των NPS (UNODC, 2023). Έτσι κάθε τοξικολογικό εργαστήριο θα πρέπει να είναι σε θέση να αναζητήσει πληθώρα χημικών ουσιών όπως φάρμακα, «ναρκωτικά», και άλλες τοξικές ουσίες ποικίλης προέλευσης.

Η απόλυτη τεκμηρίωση της επίδρασης μιας τοξικής ουσίας στον οργανισμό γίνεται με τη διενέργεια της τοξικολογικής εξέτασης, όπου εφαρμόζονται μέθοδοι και πρακτικές αναλυτικής τοξικολογίας. Καθοριστικοί παράγοντες της επιτυχούς τοξικολογικής εξέτασης αποτελούν το είδος, η ποιότητα και η ποσότητα του υπό ανάλυση βιολογικού υλικού. Από την άλλη, η ορθή αξιολόγηση του αποτελέσματος προϋποθέτει την συνεκτίμηση πολλών άλλων παραγόντων που σχετίζονται με το περιστατικό, όπως το ιατρικό ιστορικό, το ιστορικό χρήσης ή κατάχρησης φαρμάκων και ουσιών, η ηλικία, το φύλο, και άλλα.

Η εργαστηριακή αναλυτική πρακτική, στην Δικαστική Τοξικολογία, καθιστά αναγκαία και σημαντική την ανάπτυξη νέων και ευαίσθητων αναλυτικών μεθόδων προσδιορισμού εξαρτησιογόνων ουσιών και φαρμάκων, σε βιολογικά υλικά. Αυτά προέρχονται, είτε από κλινικά δείγματα, δηλαδή ασθενείς, για διαγνωστικούς και θεραπευτικούς λόγους, είτε από νεκροτομικό υλικό, κατά την ιατροδικαστική διερεύνηση των αιτιών θανάτου. Είναι σημαντικό να τονιστεί πως κάθε εργαστήριο ανά την επικράτεια και διεθνώς έχει διαφορετικές δυνατότητες, ανάγκες, προτεραιότητες, αλλά και περιορισμούς όσον αφορά τον εξοπλισμό, αλλά και τους οικονομικούς και ανθρώπινους πόρους για την ανάπτυξη νέων μεθόδων και την παροχή νέων υπηρεσιών.

Οι τεχνολογικές εξελίξεις στις τεχνικές LC-MS/MS και η εφαρμογή τους στην τοξικολογική ανάλυση επέτρεψαν την ανάπτυξη μεθόδων για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό μεγάλου αριθμού ουσιών. Η τεχνική διαχωρισμού LC-MS/MS χαρακτηρίζεται από εξαιρετική ευαισθησία, εκλεκτικότητα και αξιοπιστία, καθιστώντας την σήμερα την πλέον ευαίσθητη και αξιόπιστη τεχνική ταυτοποίησης ξеноβιοτικών ουσιών σε διάφορα βιολογικά υλικά. Η χρήση UHPLC, συζευγμένη με MS, παρέχει σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι μιας συμβατικής διάταξης HPLC. Συγκεκριμένα, η ταχύτητα του χρωματογραφικού διαχωρισμού δύναται να μειωθεί τρείς έως δέκα φορές σε σχέση με τη κλασική HPLC, ενώ παράλληλα, χαρακτηρίζεται από υψηλή διαχωριστική ικανότητα, ευαισθησία και ακρίβεια (Guillarme et al. 2013), (Dong et al. 2014), (Fekete et al. 2014), (Behnoush et al., 2015). Στα μειονεκτήματα των ενόργανων διατάξεων LC-MS/MS περιλαμβάνονται το υψηλό κόστος αγοράς, λειτουργίας και συντήρησης, καθώς και η εξειδίκευση του επιστημονικού προσωπικού που απαιτείται για τον χειρισμό του.

Οι εξαρτησιογόνες ουσίες κατανέμονται σε κατηγορίες με βάση την ιατρική τους χρήση, την πιθανότητα κατάχρησης και την εθιστική τους ικανότητα. Η Ενιαία Σύμβαση για τα Ναρκωτικά που θεσπίστηκε αρχικά το 1961, επικαιροποιήθηκε το 1971 ως Σύμβαση για τις ψυχοτρόπες ουσίες (Convention on Psychotropic Substances) και ισχύει μέχρι σήμερα. Αποτελεί μια συνθήκη των Ηνωμένων Εθνών με σκοπό τον έλεγχο των ψυχοδραστικών ουσιών, με ή χωρίς εξαρτησιογόνο δράση. Η Σύμβαση περιλαμβάνει τέσσερις Πίνακες ελεγχόμενων ουσιών, από τον Πίνακα I (πιο περιοριστικός) έως τον Πίνακα IV (λιγότερο περιοριστικός). Στον Πίνακα I, ανήκουν ουσίες με υψηλή πιθανότητα κατάχρησης, που μπορούν να αποτελέσουν σοβαρό κίνδυνο για τη δημόσια υγεία (π.χ. αμφεταμίνες, παραισθησιογόνα, τρυπταμίνες). Στον Πίνακα II, ανήκουν ουσίες με υψηλή πιθανότητα κατάχρησης, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρή ψυχολογική ή σωματική εξάρτηση (π.χ. αμφεταμίνες, κανναβινοειδή). Ο Πίνακας III, περιλαμβάνει ουσίες που έχουν λιγότερες πιθανότητες κατάχρησης, συγκριτικά με τις ουσίες που ανήκουν στους Πίνακες I και II, αλλά η κατάχρηση τους μπορεί να οδηγήσει σε χαμηλή ή μέτρια σωματική ή/και ψυχολογική εξάρτηση και έχουν αποδεκτή ιατρική χρήση (π.χ. βαρβιτουρικά, οπιούχα, υπνωτικά). Στον Πίνακα IV, ανήκουν ουσίες που έχουν χαμηλή πιθανότητα κατάχρησης η οποία μπορεί να οδηγήσει σε περιορισμένη σωματική ή ψυχολογική εξάρτηση σε σχέση με τις ουσίες του Πίνακα III, και έχουν αποδεκτή χρήση (π.χ. αναλγητικά, ηρεμιστικά, βενζοδιαζεπίνες) (DEA, 2017).

Η νομοθεσία για τα ναρκωτικά, εφόσον έχει ουσιαστικό χαρακτήρα κυρωτικών διατάξεων, αποτελεί ένα τυπικό δείγμα ειδικού ποινικού νόμου. Σύμφωνα με τις ισχύουσες νομοθετικές διατάξεις της Ελληνικής Νομοθεσίας για τα Ναρκωτικά (κατά το άρθρο 1, παρ. 2 του ν. 3459/2006 (Α'103)) δομούνται οι Πίνακες Α, Β, Γ, Δ, που περιέχουν ταξινομημένες τις ναρκωτικές ουσίες. Στον Πίνακα Α, ανήκουν ουσίες που παράγονται, διακινούνται και διατίθενται αποκλειστικά από το κράτος. Στον Πίνακα Β, ανήκουν ουσίες που παράγονται, διακινούνται και διατίθενται από το Κρατικό Μονοπώλιο Ναρκωτικών, ύστερα από γνωμοδότηση της Επιτροπής Ναρκωτικών, με ευθύνη του Εθνικού Οργανισμού Φαρμάκων (Ε.Ο.Φ.). Στον Πίνακα Γ, ανήκουν ουσίες που παράγονται, διακινούνται και διατίθενται από νομικά και φυσικά πρόσωπα μέσω του Κρατικού Μονοπωλίου Ναρκωτικών, ύστερα από γνωμοδότηση της Επιτροπής Ναρκωτικών με ευθύνη του Ε.Ο.Φ.. Τέλος, στον Πίνακα Δ, ανήκουν ουσίες που παράγονται, διακινούνται και διατίθενται από νομικά ή φυσικά πρόσωπα, ύστερα από γνωμοδότηση της Επιτροπής Ναρκωτικών με ευθύνη του Ε.Ο.Φ..

Το φαινόμενο NPS και η σημασία τους στην τοξικολογική εξέταση

Οι νέες ψυχοδραστικές ουσίες (NPS) αποτελούν μια κατηγορία συνθετικών ουσιών οι οποίες μιμούνται τις επιδράσεις των κλασικών εξαρτησιογόνων ουσιών έχοντας σκόπιμα διαφορετική χημική δομή, ώστε να μην εμπίπτουν στους περιορισμούς του νόμου περί χρήσης «ναρκωτικών» (Misuse of Drugs Act, 1971). Από το 2005 που αναφέρθηκε αρχικά η κατάχρηση τους έως και σήμερα έχουν εμφανιστεί πάνω από 1200 νέες ψυχοδραστικές ουσίες (UNODC, 2023).

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκαν επτά NPS, και συγκεκριμένα το συνθετικό κανναβινοειδές ADB-BUTINACA, οι συνθετικές καθιόνες βενζυλόνη, ευτυλόνη, μεφεδρόνη, το συνθετικό οπιοειδές βρωρφίνη, η συνθετική βενζοδιαζεπίνη φλουβρωμαζεπάμη και το ανάλογο κεταμίνης 2-FDCK. Οι συγκεκριμένες ουσίες, παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον από ερευνητική άποψη. Κάποιες από αυτές αποτελούν NPS που πρόσφατα έκαναν την εμφάνισή τους ως ουσίες κατάχρησης στην διεθνή αγορά των «ναρκωτικών» (π.χ. η βενζυλόνη και η ευτυλόνη συντέθηκαν στα μέσα του 2019, ενώ η βρωρφίνη το 2018).

Ορισμένα απ' αυτά τα NPS υπόκεινται σε έλεγχο βάσει των σχετικών Συμβάσεων του ΟΗΕ σε ορισμένες χώρες, αλλά όχι ακόμη στην χώρα μας. Συγκεκριμένα, η φλουβρωμαζεπάμη που συντέθηκε για πρώτη φορά το 1960, δεν έλαβε περαιτέρω προσοχής μέχρι τα τέλη του 2012, όταν εμφανίστηκε στην αγορά ως νέο συνθετικό ναρκωτικό (Baumeister et al., 2015). Από το 2017, περιλαμβάνεται στον Πίνακα I ως ελεγχόμενη ουσία, στις Η.Π.Α και στο Ηνωμένο Βασίλειο. Η ευτυλόνη αναφέρθηκε για πρώτη φορά από το EMCDDA το 2014. Στις Η.Π.Α. θεωρείται ελεγχόμενη ουσία του Πίνακα I, ως ισομερές της πεντυλόνης. Η βρωρφίνη δεν ελέγχεται από την Ενιαία Σύμβαση για τα Ναρκωτικά, ωστόσο θεωρείται παράνομη η πώληση, η παραγωγή, η κατοχή ή η κατανάλωσή της σε αρκετές χώρες. Η 2-FDCK αναφέρθηκε για πρώτη φορά από το EMCDDA το 2016. Επί του παρόντος είναι παράνομη στην Ιταλία, την Ιαπωνία, τη Λετονία, τη Σιγκαπούρη, τη Σουηδία, την Ελβετία, τον Καναδά, το Βέλγιο και το Ηνωμένο Βασίλειο. Τον Οκτώβριο του 2023, ο Π.Ο.Υ. συνέστησε να προστεθεί το 2-FDCK στον Πίνακα II της Σύμβασης για τις ψυχοτρόπες ουσίες του 1971 (WHO, 2024).

Άλλες, όπως η μεφεδρόνη, χρησιμοποιούνται και ελέγχονται σχεδόν από την αρχή της εμφάνισης του φαινομένου NPS τόσο διεθνώς, όσο και στη χώρα μας (η μεφεδρόνη έχει υπαχθεί στον Πίνακα A από το 2011). Τέλος, το συνθετικό κανναβινοειδές ADB-BUTINACA, χαρακτηρίστηκε ως ελεγχόμενη ουσία και κατατάχθηκε στον Πίνακα A των Ναρκωτικών το Φεβρουάριο του 2024 (ΦΕΚ 852B/2024). Το γεγονός ότι οι υπόλοιπες ουσίες δεν έχουν ακόμη χαρακτηριστεί και τεθεί υπό έλεγχο στην χώρα μας, τις καθιστά ιδανικές για περαιτέρω έρευνα και διερεύνηση.

Επισημαίνεται ότι η δομή τους μεταβάλλεται διαρκώς, και εμφανίζονται στην παράνομη αγορά νέα μόρια NPS με λιγότερο ή περισσότερο τροποποιημένη δομή σε σχέση με άλλα, κυρίως με την εισαγωγή νέων υποκατάστατων στην βασική δομή τους. Έτσι προκύπτουν ουσίες με διαφορετικές φαρμακολογικές και τοξικολογικές επιδράσεις. Επιπλέον, καθίσταται δύσκολο να ανιχνευτούν και να ταυτοποιηθούν σε βιολογικά υλικά, κυρίως λόγω της έλλειψης προτύπων ουσιών και κατάλληλων μεθόδων για την ανίχνευση τους. Αλλά ακόμη και να καταστεί δυνατός ο προσδιορισμός τους, είναι δύσκολη η αξιολόγηση των ποσοτικών αποτελεσμάτων επειδή σπάνια είναι γνωστά τα όρια ασφαλείας τους από αντίστοιχες μελέτες. Καθίσταται προφανής, η επιτακτική ανάγκη για ανάπτυξη νέων ευαίσθητων, αξιόπιστων και αναπαραγωγίμων μεθόδων για τον προσδιορισμό τους σε διάφορα βιολογικά υποστρώματα.

Προσδιορισμός εξαρτησιογόνων ουσιών, NPS και άλλων φαρμάκων σε ολικό αίμα

Η μεθοδολογία UHPLC-MS/MS με χρήση LLE, εφαρμόστηκε στην παρούσα διατριβή, για τον προσδιορισμό επιλεγμένων εξαρτησιογόνων ουσιών, NPS και φαρμάκων στο αίμα.

Από τις ουσίες που μελετήθηκαν αρκετές ανιχνεύονται με μεγάλη συχνότητα σε κλινικά και δικαστικά περιστατικά στην περιοχή της Ηπείρου. Ο διαχωρισμός των ουσιών-στόχων πραγματοποιήθηκε με βάση της χημική δομής και τον μηχανισμό δράσης τους σε 10 κατηγορίες (Πίνακας 3). Οι συγκεκριμένες κατηγορίες ουσιών, παρουσιάζουν πολύ μεγάλο ενδιαφέρον από αναλυτική σκοπιά, τόσο στην κλινική πράξη, όσο και κατά την τοξικολογική διερεύνηση περιστατικών ιατροδικαστικού ενδιαφέροντος, που εμπίπτουν στο αντικείμενο της Δικαστικής Τοξικολογίας. Συγκεκριμένα, περιλαμβάνονται κοινές ουσίες κατάχρησης (αλκαλοειδή της κόκας και μεταβολίτες, αμφεταμίνες, οπιούχα, κεταμίνη και ο μεταβολίτης της και άλλες ενταγμένες στους Πίνακες Α και Β), συνταγογραφούμενα και μη φάρμακα (αντιεπιληπτικά αντικαταθλιπτικά, αντιψυχωσικά, βενζοδιαζεπίνες, υπνωτικοί παράγοντες και άλλες ενταγμένες στους Πίνακες Γ και Δ) που εμπλέκονται συνήθως σε υποθέσεις δηλητηριάσεων στην επικράτειά μας, καθώς και φάρμακα που εμπλέκονται σε υποθέσεις ιατρικής αμέλειας, και ορισμένα NPS και τοξικές ουσίες που πιθανώς σχετίζονται με ανεπιθύμητα αποτελέσματα.

Οι περισσότερες δημοσιευμένες μέθοδοι καλύπτουν ένα μικρό φάσμα ενώσεων, καθότι εστιάζουν σε ορισμένες κατηγορίες ενώσεων (NPS, ή ουσίες κατάχρησης, ή βαρβιτουρικά, ή βενζοδιαζεπίνες, ή κανναβινοειδή, ή αντικαταθλιπτικά, ή αντιψυχωσικά, ή αντιεπιληπτικά) (Giorgetti et al., 2022, Fogarty et al., 2022, Mastrovito et al., 2021, Lau et al., 2020, Palmquist, Swortwood, 2020, Seither et al., 2020, Smith et al., 2019, Busardo et al., 2019, Lowry et al., 2018, Park et al., 2018, Fogarty et al., 2018 Fagiola et al., 2018, Ambroziak, Adamowicz, 2017, Zhang et al., 2017, Lehmann et al., 2017, Chen et al., 2017, Ellefsen et al., 2017, Montesano et al., 2017, Mohr et al., 2016, Papsun et al., 2016, Verplaetse, Henion, 2016, Frost et al., 2015, Eckart et al., 2015, Adamowicz, Tokarczyk, 2015, Ambach et al., 2015, Odoardi et al., 2015, Montenarh et al., 2015, Montenarh et al., 2014, Deeb et al., 2014, Patteet et al., 2014, Fisher et al., 2013, Eichhorst et al., 2012, Sauve et al., 2012, Saar et al., 2010, Antia et al., 2010, Wohlfarth et al., 2010, Verplaetse, Tytgat, 2010, Gergov et al., 2009, Marin et al., 2008, Coles et al., 2007, Musshoff et al., 2006).

Επίσης, υστερούν στον αριθμό αναλυτών που προσδιορίζουν (αναφέρονται από 1 ως 88 αναλύτες) (Dos Santos et al., 2023, Barone et al., 2023, Ferrari, Caldas et al., 2022, Fogarty et al., 2022, Rodrigues et al., 2021, Garcia et al., 2021, Lerch, 2021, Orfanidis et al., 2021, Banaszkiwicz et al., 2020, Mastrovito et al., 2021, Lau et al., 2020, Palmquist, Swortwood, 2020, Seither et al., 2020, Di Trana et al., 2020, Smith et al., 2019, Busardo et al., 2019, Lowry et al., 2018, Park et al., 2018, Takitane et al., 2018, Fogarty et al., 2018, Fagiola et al., 2018, Ambroziak, Adamowicz, 2017, Zhang et al., 2017, Lehmann et al., 2017, Chen et al., 2017, Ellefsen et al., 2017, Montesano et al., 2017, Mohr et al., 2016, Vaiano et al., 2016, Dulaurent et al., 2016, Papsun et al., 2016, Arora et al., 2016, Verplaetse, Henion, 2016, Frost et al., 2015, Eckart et al., 2015, Ambach et al., 2015, Odoardi et al., 2015, Lee et al., 2015, Steuer et al., 2015, Montenarh et al., 2015, Montenarh et al., 2014, Sempio et al., 2014, Deeb et al., 2014, Patteet et al., 2014, Fisher et al., 2013, Bjork et al., 2013, Verplaetse et al., 2012, Eichhorst et al., 2012, Sauve et al., 2012, Remane et al., 2011, Saar et al., 2010, Antia et al., 2010, Wohlfarth et al., 2010, Verplaetse, Tytgat, 2010, Bouzas et al., 2009, Ishida et al., 2009, Gergov et al., 2009, Marin et al., 2008, Coles et al., 2007, Musshoff et al., 2006, Laloup et al., 2005).

Προφανώς οι επιλεγμένοι αναλύτες της κάθε μεθόδου στόχευαν στην κάλυψη των αναγκών του αντίστοιχου εργαστηρίου.

Οι δημοσιευθείσες μελέτες (Πίνακας 1) για την ανίχνευση NPS σε αίμα με χρήση τεχνικών LC-MS/MS αναφέρουν την ταυτόχρονη ανίχνευση 32 (Ferrari, Caldas et al., 2022), 56 (Ambach et al., 2015), 64 (Vaiano et al., 2016), 74 (Lehmann et al., 2017), 78 (Odoardi et al., 2015), 120 (Vaiano et al., 2021), 143 (Adamowicz, Tokarczyk, 2016) και 182 NPS (Giorgetti et al., 2022), αντίστοιχα. Αρκετές δημοσιευμένες μελέτες περιγράφουν μέθοδο ανίχνευσης για μια κατηγορία NPS (Lau et al., 2020, Seither et al., 2020, Ambroziak, Adamowicz, 2017, Mastrovito et al., 2021, Zhang et al., 2017, Antia et al., 2010). Κάποιες άλλες ασχολούνται με την ανάπτυξη μεθόδων για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό NPS που ανήκουν σε διαφορετικές κατηγορίες (Ellefsen et al., 2017, Wohlfarth et al., 2010, Odoardi et al., 2015, Ambach et al., 2015, Adamowicz, Tokarczyk, 2016, Montesano et al., 2017, Giorgetti et al., 2022). Αξίζει να αναφερθεί ότι είναι περιορισμένες οι αναφορές για μεθόδους που ανιχνεύουν ταυτόχρονα NPS μαζί με άλλες κατηγορίες ουσιών (Vaiano et al., 2016, Vaiano et al., 2021, Lehmann et al., 2017, Di Trana et al., 2020, Ferrari, Caldas et al., 2022, Banaszkiwicz et al., 2020, Orfanidis et al., 2021, Czarny et al., 2022).

Όπως παρατηρείται στον Πίνακα 1, ενώ αρκετές μελέτες πλησιάζουν σε αριθμό ενώσεων την αναπτυχθείσα μέθοδο (92 ενώσεις-στόχοι), υστερούν σε χρόνο ανάλυσης που κυμαίνεται από 8 έως 35 λεπτά (Smith et al., 2023, Barone et al., 2023, Giorgetti et al., 2022, Ferrari, Caldas et al., 2022, Czarny et al., 2022, Rodrigues et al., 2021, Garcia et al., 2021, Vaiano et al., 2021, Lerch, 2021, Orfanidis et al., 2021, Banaszkiwicz et al., 2020, Lau et al., 2020, Seither et al., 2020, Di Trana et al., 2020, Smith et al., 2019, Busardo et al., 2019, Lowry et al., 2018, Park et al., 2018, Fogarty et al., 2018, Fagiola et al., 2018, Ambroziak, Adamowicz, 2017, Zhang et al., 2017, Lehmann et al., 2017, Chen et al., 2017, Ellefsen et al., 2017, Montesano et al., 2017, Mohr et al., 2016, Vaiano et al., 2016, Arora et al., 2016, Eckart et al., 2015, Adamowicz, Tokarczyk, 2015, Ambach et al., 2015, Odoardi et al., 2015, Lee et al., 2015, Steuer et al., 2015, Montenarh et al., 2015, Montenarh et al., 2014, Di Rago et al., 2014, Sempio et al., 2014, Montenarh et al., 2014, Deeb et al., 2014, Verplaetse et al., 2012, Sauve et al., 2012, Remane et al., 2011, Saar et al., 2010, Remane et al., 2010, Dresen et al., 2010, Antia et al., 2010, Wohlfarth et al., 2010, Bouzas et al., 2009, Ishida et al., 2009, Gergov et al., 2009, Marin et al., 2008, Coles et al., 2007, Musshoff et al., 2006, Laloup et al., 2005, Mueller et al., 2005).

Υπάρχουν, 14 μελέτες που παρουσιάζουν μικρότερο ή και συγκρίσιμο χρόνο ανάλυσης σε σχέση με την παρούσα μελέτη, που κυμαίνεται από 2.45 έως 7.2 λεπτά (Dos Santos et al., 2023, Fogarty et al., 2022, Di Rago et al., 2021, Mastrovito et al., 2021, Palmquist, Swortwood, 2020, Takitane et al., 2018, Dulaurent et al., 2016, Papsun et al., 2016, Verplaetse, Henion, 2016, Frost et al., 2015, Patteet et al., 2014, Bjork et al., 2013, Eichhorst et al., 2012, Verplaetse, Tytgat, 2010). Παρατηρείται, βέβαια, ότι οι 13 από αυτές ασχολούνται με την ανίχνευση λιγότερων ουσιών σε σχέση με την παρούσα μελέτη που κυμαίνεται από 2 ως 57 ουσίες (Dos Santos et al., 2023, Fogarty et al., 2022, Di Rago et al., 2021, Takitane et al., 2018, Dulaurent et al., 2016, Bjork et al., 2013, Verplaetse, Tytgat, 2010).

Όπως διαπιστώνεται από τους Πίνακες 1 και 2, οι στήλες διαχωρισμού που προτιμώνται κατά κύριο λόγο στην τοξικολογική ανάλυση είναι οι C18. Έτσι, και στην αναπτυχθείσα μεθοδολογία χρησιμοποιήθηκε στήλη C18, και παρατηρήθηκε πως το πολύ μικρό πορώδες της συνέβαλε στο σχηματισμό πολύ στενών κορυφών κατά την έκλυση των ενώσεων. Το γεγονός αυτό είχε ως αποτέλεσμα τον καλύτερο και γρηγορότερο χρωματογραφικό διαχωρισμό και το μεγάλο ύψος κορυφής για κάθε αναλύτη, ελαχιστοποιώντας τις δευτερεύουσες αλληλεπιδράσεις και την «ουρά» της κορυφής.

Η εκχύλιση LLE κυριαρχεί εδώ και χρόνια στις αναλυτικές εφαρμογές για την απομόνωση διαφόρων εξαρτησιογόνων ουσιών, NPS και φαρμάκων από βιολογικά υλικά προσφέροντας καλή απόδοση εκχύλισης, καθαρά εκχυλίσματα και σύντομο χρόνο επεξεργασίας του δείγματος (Mueller et al., 2005, Laloup et al., 2005, Gergov et al., 2009, Dresen et al., 2010, Remane et al., 2010, Saar et al., 2010, Remane et al., 2011, Sauve et al., 2012, Eichhorst et al., 2012, Fisher et al., 2013, Sempio et al., 2014, Montenarh et al., 2014, Deeb et al., 2014, Patteet et al., 2014, Montenarh et al., 2014, Montenarh et al., 2015, Papsun et al., 2016, Arora et al., 2016, Ellefsen et al., 2017, Zhang et al., 2017, Takitane et al., 2018, Busardo et al., 2019, Banaszkiwicz et al., 2020, Mastrovito et al., 2021, Di Rago et al., 2021, Czarny et al., 2022). Ωστόσο, η μέθοδος υγρής-υγρής εκχύλισης που βελτιστοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή παρουσιάζει ορισμένα μοναδικά χαρακτηριστικά σε σύγκριση με άλλες προηγούμενες μελέτες που έχουν αναφέρει σχετικές μεθόδους. Αρχικά, εφαρμόστηκε ένα βήμα εκχύλισης με χρήση MTBE οξιμισμένου με HCl κατάλληλο για την εκχύλιση βασικών και ουδέτερων ουσιών. Παρατηρήθηκε πως οι προσδιοριζόμενες ουσίες παρουσίασαν πιο συμμετρικές κορυφές με την χρήση του οξιμισμένου MTBE, σε σχέση με τη μη χρήση, όπου οι κορυφές είχαν ελαφρώς πεπλατυσμένο σχήμα. Σημειώνεται ακόμη πως οι ανακτήσεις ήταν πιο υψηλές μετά την χρήση του οξιμισμένου MTBE. Τέλος, ο διαλύτης ανασύστασης 88:12% (A:B) έδωσε καλύτερα χρωματογραφικά αποτελέσματα σε σύγκριση με τις άλλες δοκιμές, καθώς και πιο ικανοποιητική ανάκτηση για τους περισσότερους αναλύτες.

Η πλήρης επικύρωση της αναλυτικής μεθοδολογίας αποτελεί προϋπόθεση για την εφαρμογή μεθόδων στην Δικαστική Τοξικολογία, και είναι απαραίτητη για την εξασφάλιση αξιόπιστων αποτελεσμάτων. Υπάρχουν ορισμένες δημοσιευμένες μέθοδοι που δεν έχουν αξιολογήσει την τυχόν επίδραση του υποστρώματος ή δεν έχουν χρησιμοποιήσει ισοτοπικά επισημασμένα εσωτερικά πρότυπα (IS) για τη βελτίωση της ακρίβειας και της αξιοπιστίας (Zhang et al., 2017, Fogarty et al., 2018). Επίσης, το μεταθανάτιο αίμα δεν προτιμάται συνήθως σε επικυρώσεις LC-MS/MS, δεδομένου ότι η εκλεκτικότητα και η επίδραση του υποστρώματος μπορεί να επηρεαστούν σημαντικά (Gergov et al., 2009, Deeb et al., 2014, Frost et al., 2015, Fagiola et al., 2018, Seither et al., 2020, Lau et al., 2020, Rodrigues et al., 2021, Ferrari, Caldas et al., 2022). Για την επικύρωση της αναλυτικής διαδικασίας ακολουθήθηκαν οι κατευθυντήριες γραμμές από την Αμερικανική Ακαδημία Δικαστικής Τοξικολογίας (AAFS- Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology, 2019). Για τον σκοπό αυτό προσδιορίστηκαν τα όρια αντίχενυσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ), η γραμμικότητα, η ακρίβεια, η πιστότητα (επαναληψιμότητα και αναπαραγωγιμότητα), η σταθερότητα, η επίδραση υποστρώματος και η εκλεκτικότητα.

Συγκεκριμένα, η ακρίβεια (εκφραζόμενη ως ποσοστό ανάκτησης %) ήταν σε ικανοποιητικά επίπεδα για την πλειοψηφία των αναλυτών, ακόμη και στα χαμηλά επίπεδα εμβολιασμού. Ωστόσο, είναι σημαντικό να τονιστεί ότι η ανάκτηση δεν αποτελεί πρώτιστης σπουδαιότητας κριτήριο επικύρωσης αν πληρούνται η γραμμικότητα, η πιστότητα και η ανιχνευσιμότητα (Dadgar et al., 1995, Hartmann et al., 1998, Shah et al., 2000, Peters et al. 2007). Υπάρχουν ορισμένες οδηγίες επικύρωσης που αναφέρουν ότι η ανάκτηση πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 50% (Peters et al., 2004). Τα ποσοστά ανακτήσεων των προσδιοριζόμενων ουσιών ήταν συγκρίσιμα και βελτιωμένα κατά περίπτωση με εκείνα άλλων δημοσιευμένων εργασιών (Borges et al., 2009, Wohlfarth et al. 2011, Rees et al., 2012, Mashayekhi, Khalilian, 2016, Di Rago et al., 2021). Ειδικότερα, η μέση ανάκτηση των αναλυτών ήταν πάνω από 70% για τους 67 από τους 92 αναλύτες. Πιο χαμηλές ανακτήσεις (60-70%), τόσο σε χαμηλές όσο και σε υψηλές συγκεντρώσεις, επιτεύχθηκαν για 25 αναλυτές (βλ. Πίνακα 13). Επιπλέον, οι ουσίες που παρουσίασαν πιο χαμηλή ανάκτηση έχουν σχετικά υψηλές θεραπευτικές συγκεντρώσεις, ως εκ τούτου, μια χαμηλότερη τιμή ανάκτησης εξακολουθεί να αποδίδει αποδεκτές συγκεντρώσεις αναλυτών και επιτρέπει την ανίχνευση ακόμη και σε υπο-θεραπευτικές συγκεντρώσεις. Όπως συμβαίνει με όλες τις μεθόδους ταυτόχρονης ανίχνευσης πολλαπλών αναλυτών, πρέπει να επιτευχθεί ένας συμβιβασμός στην απόδοση του κάθε αναλυτή (Di Rago et al., 2021). Παρόλο που ορισμένες ουσίες απέδωσαν χαμηλότερες ανακτήσεις η μέθοδος θεωρείται επαρκής και ικανή για τον προσδιορισμό των 92 ουσιών στόχων.

Το όριο ανίχνευσης (LOD) και το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) κυμάνθηκαν σε ιδιαίτερα χαμηλές τιμές και ήταν συγκρίσιμα και βελτιωμένα κατά περίπτωση με εκείνα άλλων δημοσιευμένων εργασιών (Dos Santos et al., 2023, Czarny et al., 2022, Vaiano et al., 2021, Sempio et al., 2014, Barone et al., 2014).

Οι καμπύλες βαθμονόμησης παρουσίασαν δυναμικό γραμμικό εύρος για το σύνολο των αναλυτών. Η επίδραση του υποστρώματος βρέθηκε να κυμαίνεται στο εύρος $100 \pm 20\%$ και για χαμηλές και για υψηλές συγκεντρώσεις, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι ενδογενείς ουσίες δεν επηρεάζουν το σήμα των αναλυτών της μελέτης. Η προτεινόμενη μέθοδος χαρακτηρίζεται από εκλεκτικότητα, παρέχοντας ορθά αναλυτικά αποτελέσματα, μιας και δεν παρατηρήθηκαν παρεμβολές από ενδογενείς ή άλλες ουσίες. Το φαινόμενο της επιμόλυνσης εκ μεταφοράς θεωρήθηκε αμελητέο, καθώς το εμβαδό της κορυφής των αναλυτών σε δείγματα από υγιής δότες ήταν $<1\%$ του υψηλότερου εμβαδού της κορυφής δειγμάτων εμβολιασμένων με αναλύτες σε υψηλή συγκέντρωση. Η ακρίβεια εντός και μεταξύ των ημερών βρέθηκε εντός των αποδεκτών ορίων για την χαμηλή και την υψηλή συγκέντρωση. Η σταθερότητα του δειγματολήπτη, καθώς και η βραχυπρόθεσμη σταθερότητα αποθήκευσης των αναλυτών στο αίμα ήταν ικανοποιητική και εντός των αποδεκτών ορίων.

Η προτεινόμενη μεθοδολογία αποδείχτηκε ταχεία, ευαίσθητη, ειδική και αποτελεσματική για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση πολλών ουσιών σε ολικό αίμα.

Προσδιορισμός της βρωφίνης σε σίελα

Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε μια καινοτόμος τεχνική εκχύλισης για την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση της βρωφίνης, στα σίελα. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε η εκχύλιση μετά από προσρόφηση σε δίκτυο επικαλυμμένων

ινών (FPSE) σε συνδυασμό με υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (UHPLC-MS/MS).

Η βρωρφίνη αποτελεί μια από τις πιο πρόσφατες εισόδους νέων συνθετικών οπιοειδών (ΝΣΟ) στην αγορά των NPS, η οποία συνέβαλε σε περισσότερους από 100 θανάτους μέσα σε λίγους μήνες (Krotulski et al., 2021). Η βρωρφίνη (1-[1-[1-[1-(4-βρωμοφαινυλ) αιθυλ]-πιπεριδίνη-4-υλ]-1,3-διυδρο-2H-βενζο[d] ιμιδαζολ-2-όνη) αποτελεί ένα υποκατεστημένο ανάλογο της πιπεριδίνης-βενζιμιδαζολόνης και διατηρεί δομικές ομοιότητες με τη φεντανύλη (Πίνακας 3) (Grafinger et al., 2021). Συνδέεται στον υποδοχέα μ-οπιοειδών ως αγωνιστής και είναι πιο ισχυρή από τη μορφίνη, αλλά λιγότερο ισχυρή από τη φεντανύλη (Kennedy et al., 2018). Συντέθηκε για πρώτη φορά το 1967 από τον Janssen (Janssen, 1967), ωστόσο οι φυσικοχημικές ιδιότητες της δεν έχουν ακόμη καθοριστεί πλήρως. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η βρωρφίνη δρα ως ασθενές οξύ με τιμή pKa τα 6.61 (Florou et al., 2022).

Στο Βέλγιο τον Φεβρουάριο του 2020 διενεργήθηκε ο πρώτος ποσοτικός προσδιορισμός βρωρφίνης σε ορό αίματος ατόμου υπό την επήρεια αλκοόλ με υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας υψηλής ευκρίνειας (LC-HRMS) (Verougstraete et al., 2020). Επιπλέον, το 2020 αναφέρθηκαν 20 δηλητηριάσεις από βρωρφίνη και πραγματοποιήθηκε η ανίχνευση (in vivo και in vitro) τους σε βιολογικά υλικά (ούρα, αίμα) που ελήφθησαν από αυτά τα περιστατικά με χρήση μεθόδων LC-MS/MS (Krotulski et al., 2021, Vohra et al., 2021).

Δεν είναι γνωστή, ακόμη, καμία περίπτωση δηλητηρίασης ή αστυνομικής υπόθεσης με την βρωρφίνη στη χώρα μας, παρά το γεγονός ότι έχει εντοπιστεί σε ορισμένες ευρωπαϊκές χώρες αποδεικνύοντας την δυναμική της να εξαπλωθεί ευρέως και σύντομα σε άλλες χώρες (Vandeputte et al., 2021, Vohra et al., 2021, Razinger et al., 2021, Verougstraete et al., 2021). Αποτελεί αναγκαιότητα η ανάπτυξη αναλυτικής μεθοδολογίας για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση αυτού του νέου συνθετικού οπιοειδούς προκειμένου να εφαρμοστεί σε περιστατικά με υποψία χρήσης βρωρφίνης.

Στη βιβλιογραφία υπάρχουν δημοσιευμένες μελέτες για τον προσδιορισμό και την ταυτοποίηση της βρωρφίνης σε μορφή σκόνης, που διακινείται παράνομα, χρησιμοποιώντας τεχνικές που περιλαμβάνουν GC-MS, υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με DAD ή φασματογράφο μάζας χαμηλής και υψηλής ευκρίνειας (LC-DAD, LC-MS/MS, LC-HRMS), φασματοσκοπικές μεθόδους (FT-IR και ^1H - και ^{13}C -NM) (Krotulski et al., 2021, Vandeputte et al., 2021, Verougstraete et al., 2021). Επίσης, έχουν αναφερθεί αναλυτικές μεθοδολογίες που περιλαμβάνουν LC-MS/MS για τον ποσοτικό προσδιορισμό της βρωρφίνης σε συμβατικά βιολογικά υλικά (αίμα/ορός και ούρα) (Verougstraete et al., 2021). Η εφαρμογή φασματογράφου μαζών με αναλυτή χρόνου πτήσης (LC-QToF-MS) έχει χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των μεταβολιτών της βρωρφίνης στο αίμα και στα ούρα (Grafinger et al., 2021).

Τα πλεονεκτήματα των σιέλων, έναντι των άλλων συμβατικών βιολογικών υλικών, τα έχουν καθιερώσει ως το πλέον κατάλληλο εναλλακτικό υπόστρωμα για την αξιολόγηση της πρόσφατης έκθεσης σε ψυχοδραστικά φάρμακα (de Campos et al., 2022). Το γεγονός ότι είναι

ελαφρώς πιο όξινα από το αίμα (pH 5,8-6,8) έχει ως αποτέλεσμα τον ιονισμό των ασθενών βασικών ουσιών και την εμφάνιση υψηλότερων συγκεντρώσεων των ουσιών από ό,τι στο πλάσμα (de Campos et al., 2022). Επιπλέον, αποτελούν ένα από τα κύρια βιολογικά υλικά που αναλύονται για την αξιολόγηση διαφόρων κατηγοριών NPS, αξιοποιώντας την πρόοδο στις διαδικασίες εκχύλισης και ανάλυσης (Rocchi et al., 2018, Sorribes-Soriano et al., 2019, Bianchi et al., 2019).

Η FPSE είναι μια σχετικά νέα τεχνική προετοιμασίας δειγμάτων με ευρεία εφαρμογή στη βιοανάλυση (Mohamed et al., 2022). Οι κύριοι παράγοντες της εκλεκτικότητας της εκχύλισης είναι η πολικότητα του πολυμερούς και η υδρόφιλη ή υδροφοβική ιδιότητα του μέσου (Jimenez-Holgado et al., 2020). Ανάλογα με τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του sol-gel, αυτή η προσέγγιση μικροεκχύλισης μπορεί να εκχυλίσει αναλυτές με ευρύ φάσμα πολικότητας (Aznar et al., 2016). Η μεμβράνη FPSE επιτρέπει την άμεση εκχύλιση αναλυτών από το βιολογικό υλικό, ελαχιστοποιώντας τα στάδια προκατεργασίας του δείγματος. Επίσης, οι αναλύτες εκροφώνται γρήγορα σε οργανικούς διαλύτες, από το μέσο FPSE. Τα χαρακτηριστικά αυτά κατέδειξαν την ηγετική του θέση ως πράσινη τεχνολογία προετοιμασίας δειγμάτων του 21^{ου} αιώνα. Μια προηγούμενη εφαρμογή της FPSE στην ανάλυση σιέλων περιλαμβάνει την εκχύλιση μη στεροειδών, αντιφλεγμονωδών φαρμάκων με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας (Tartaglia et al., 2020).

Η πιθανότητα εμπλοκής της βρωφίνης σε περιπτώσεις δηλητηρίασης και η πιθανότητα ευρείας χρήσης της, τονίζουν τη σημασία της ανίχνευσης αυτού του ισχυρού NPS σε κλινικές περιπτώσεις και σε εναλλακτικά δείγματα.

Η αναπτυχθείσα μέθοδος παρουσίασε αποδεκτά αναλυτικά αποτελέσματα, σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές. Το εύρος της γραμμικότητας στα σίελα σχετίζεται με τις συγκεντρώσεις της αναλυόμενης ουσίας στο πλάσμα, μια εκτίμηση που επιβεβαιώνεται από προηγούμενα αναφερόμενα αποτελέσματα (Verougstraete et al., 2021). Οι ληφθείσες ανακτήσεις (>95%) είναι ικανοποιητικές και συγκρίσιμες με αποτελέσματα από άλλες μελέτες για τη βρωφίνη (Grafinger et al., 2021, Vandeputte et al., 2021, Verougstraete et al., 2021) ή για τα NPS γενικά (Boumba et al., 2017). Το φαινόμενο επίδρασης του υποστρώματος ήταν αποδεκτό και καταγράφεται ως καταστολή ιόντων τόσο σε χαμηλές όσο και υψηλές συγκεντρώσεις. Αξίζει να αναφερθεί ότι τα LOD και LOQ της βρωφίνης στα σίελα της μελέτης είναι χαμηλότερα από αυτά που αναφέρθηκαν προηγουμένως στον ορό και στα ούρα (Grafinger et al., 2021). Η βραχυπρόθεσμη και μακροπρόθεσμη σταθερότητα της βρωφίνης στα σίελα ήταν αποδεκτή και εντός των αποδεκτών ορίων.

Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσα διδακτορικής διατριβής, αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε για πρώτη φορά μία αναλυτική μέθοδος προσδιορισμού της βρωφίνης σε σίελα με την εκχύλιση FPSE, προσφέροντας ένα νέο εργαλείο που θα μπορούσε να προωθήσει την τοξικολογική έρευνα. Η προτεινόμενη μεθοδολογία αποδείχθηκε αξιόπιστη, απλή, σχετικά γρήγορη, οικονομική και ευαίσθητη για τον προσδιορισμό της βρωφίνης στα σίελα και έδωσε το έναυσμα για εφαρμογή της για την ανάλυση άλλων NPS καθώς και εξαρτησιογόνων ουσιών (Florou et al., 2022).

Τεχνική πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) για τον προσδιορισμό της βενζυλόνης

Λόγω της δυναμικής και εξελισσόμενης φύσης των συνθετικών ουσιών, είναι απαραίτητη η περαιτέρω διερεύνηση τους με χρήση διαφορετικών τεχνικών προκειμένου να βρεθούν αξιόπιστοι τρόποι ανίχνευση τους. Στο πλαίσιο αυτό, πραγματοποιήθηκε διερεύνηση της δομής της συνθετικής καθινόνης, βενζυλόνης, καθώς και προσπάθειας ανίχνευσης της σε ούρα με χρήση της τεχνικής πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR). Η επιλογή της βενζυλόνης βασίστηκε στο γεγονός ότι αποτελεί μια νέα ψυχοτρόπος ουσία που παρουσιάζει αυξανόμενη χρήση τόσο στην Ευρώπη, όσο και στον υπόλοιπο κόσμο. Η βενζυλόνη (3,4-μεθυλενοδιοξυ-N-βενζυλοκαθινόνη) έχει διεγερτικές επιδράσεις στο Κ.Ν.Σ. (Mueller, Rentsch, 2012). Δεν υπάρχουν συγκεκριμένες πληροφορίες σχετικά με τις οδούς σύνθεσης της. Είναι τεχνικά εφικτή η μετατροπή της βενζυλόνης σε 3,4-μεθυλενοδιοξαμφεταμίνη (MDA) (Fornal et al., 2013). Η ανίχνευση της αναφέρθηκε για πρώτη φορά στο Ευρωπαϊκό Κέντρο Παρακολούθησης Ναρκωτικών και Τοξικομανίας (EMCCDA) τον Δεκέμβριο του 2010. Μεταξύ του 2011 και του 2018 αναφέρθηκαν συνολικά 33 κατασχέσεις, 89 το 2019 και 51 το 2020.

Μέχρι στιγμής, η τεχνική NMR έχει εφαρμοστεί για τον προσδιορισμό της δομής και ποσοτικό προσδιορισμό άγνωστων NPS σε δείγματα με μορφή σκόνης που κατασχέθηκαν από τις Αρχές (Gaspar et al., 2018, Ameline et al., 2019, Ameline et al., 2019). Η εφαρμογή της φασματοσκοπίας benchtop - NMR για τον χαρακτηρισμό NPS έχει αναφερθεί πρόσφατα (Castaing-Cordier et al., 2022).

Η προκατεργασία του δείγματος απαιτεί ελάχιστη προετοιμασία, η οποία συνίσταται στην προσθήκη συγκεκριμένης αναλογίας ενός απρωτικού διαλύτη (DMSO- d_6) που δίνει τη δυνατότητα εμφάνισης πρωτονίων που ανταλλάσσονται και δίνουν διευρυμένες κορυφές σε υδατικά διαλύματα. Η χρήση του ρυθμιστικού διαλύματος συνέβαλε στην αποτελεσματική ελαχιστοποίηση των μεταβολών pH και την καλύτερη σταθεροποίηση στην περιοχή 9.5 ± 0.5 . Το δευτεριωμένο άλας TSP χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερική ουσία αναφοράς (δ ^1H 0.0) για τη βαθμονόμηση των χημικών μετατοπίσεων. Το D_2O προστέθηκε ακριβώς πριν την εκτέλεση των πειραμάτων ^1H NMR για να ελαχιστοποιηθεί η ανταλλαγή των εύκολα αποσπώμενων πρωτονίων με το δευτέριο. Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στα δείγματα ούρων, όπου πραγματοποιήθηκε διαδοχικός εμβολιασμός της βενζυλόνης, παρατηρήθηκε διαφορά στην ένταση των κορυφών μετά από τον πρώτο και τον δεύτερο εμβολιασμό. Τα πρωτόνια H8, H11, H14 και H15 προτάθηκαν ως πιθανή «φασματοσκοπική υπογραφή NMR» για την πιθανή ύπαρξη μιας «καθινονικής ομάδας τύπου βενζυλόνης». Οι υπόλοιπες κορυφές που παρατηρούνται στα φάσματα πιθανών να αντιστοιχούν σε αμινοξέα, χημικές ανόργανες ή οργανικές ουσίες, παραπροϊόντα του μεταβολισμού, ουρία, ουρικό οξύ, κρεατινίνη, αμμωνία, οξαλικό οξύ, διάφορα άλατα (φωσφορικά, θειικά, χλωριούχα κ.α.).

Συνολικά, η φασματοσκοπία NMR, θα μπορούσε να αποτελέσει ένα ουσιαστικό εργαλείο στη συνεχιζόμενη προσπάθεια κατανόησης και αντιμετώπισης των προκλήσεων που θέτουν τα NPS. Η ικανότητά της να παρέχει λεπτομερείς δομικές και χημικές πληροφορίες την καθιστά πολύτιμη τεχνική για τον εντοπισμό και τον χαρακτηρισμό αυτών των ταχέως εξελισσόμενων ενώσεων.

Εφαρμογή σε πραγματικά περιστατικά

Η αναπτυχθείσα αναλυτική μεθοδολογία (LLE-UHPLC-MS/MS) εφαρμόστηκε για τον προσδιορισμό και την μέτρηση επιπέδων της συγκεντρώσεως εξαρτησιογόνων ουσιών, NPS και φαρμάκων σε κλινικά και νεκροτομικά περιστατικά.

Στον Πίνακα 26, αναφέρονται τα εύρη θεραπευτικών, τοξικών και θανατηφόρων συγκεντρώσεων που υπάρχουν στη διεθνή βιβλιογραφία (TIAFT reference blood level list of therapeutic and toxic substances – Sept. 2004). Η σύγκριση με τις ευρεθείσες τιμές (Πίνακες 23, 24, 25) αποδεικνύει ότι οι ενώσεις είναι εντός των θεραπευτικών ορίων. Ωστόσο, υπάρχουν εννέα περιστατικά όπου οι τιμές είναι πάνω από τα θεραπευτικά όρια, όπως η σερτραλίνη στο περιστατικό 5, η ντουλοξετίνη στο περιστατικό 7, η σιταλοπράμη στο περιστατικό 8, η ατροπίνη στο περιστατικό 10, η κοκαΐνη στο περιστατικό 13 και στο 26, η μιρταζαπίνη και η νορτριπυλίνη στο περιστατικό 23, η μιδαζολάμη στο περιστατικό 27, και η παλιπεριδόνη στο περιστατικό 35.

Συγκεκριμένα, τα περιστατικά 13, 26, και 27 που αφορούν χρόνιους χρήστες ουσιών και φαρμάκων, η ανάπτυξη ανοχής λόγω της χρονιότητας λήψης αποτελεί μία πιθανότητα. Το περιστατικό 10, αφορά ενδονοσοκομειακό θάνατο συνέπεια πρόσφατων ισχαιμικών βλαβών του μυοκαρδίου. Το υψηλό επίπεδο συγκεντρώσεως της ατροπίνης είναι πιθανότατα αποτέλεσμα της προσπάθειας ανάνηψης. Είναι γνωστό πως η ατροπίνη είναι ένα ενδοφλέβιο φάρμακο που χορηγείται μόνο στο νοσοκομείο, το οποίο μπορεί να αυξήσει την καρδιακή συχνότητα προκαλώντας φλεβοκομβική ταχυκαρδία (Das, 1989). Το περιστατικό 35, αφορά απόπειρα φαρμακευτικής δηλητηρίασης συνεπώς μπορεί να δικαιολογηθεί η ευρεθείσα υψηλή συγκεντρώση του αντιψυχωσικού παλιπεριδόνης. Στα περιστατικά 5, 7, 8 και 23, που αφορούν νεκροτομικό υλικό, ανιχνεύονται υψηλές συγκεντρώσεις αντικαταθλιπτικών ουσιών (Πίνακας 23). Στα μεταθανάτια δείγματα, κατά την αποσύνθεση του πτώματος λαμβάνουν χώρα χημικές διεργασίες (φαινόμενο μεταθανάτιας ανακατανομής), γεγονός που δυσχεραίνει την ανάλυση τους (Yarema, Becker, 2005). Το φαινόμενο PMR αυξάνει τις συγκεντρώσεις των φαρμάκων στο αίμα κατά τη στιγμή του θανάτου. Τα φάρμακα απελευθερώνονται και διαχέονται από ιστούς ή όργανα (π.χ. ήπαρ) με υψηλές συγκεντρώσεις μετά το θάνατο σε κοντινά αιμοφόρα αγγεία. Ο ακριβής μοριακός μηχανισμός δεν είναι πλήρως κατανοητός, αλλά οι αλλαγές στο pH και στη δομή των πρωτεϊνών μεταβάλλουν την πρωτεϊνική σύνθεση των φαρμάκων (Negrusz, Cooper, 2013). Στο περιστατικό 23, παρατηρείται επίσης υψηλή συγκεντρώση μιρταζαπίνης. Έχει αναφερθεί ότι οι συγκεντρώσεις της μιρταζαπίνης αυξάνονται σημαντικά μετά από τη διακομιδή στο νεκροτομείο μέχρι την εκτέλεση της νεκροψίας-νεκροτομής (Gerostamoulos et al. 2012). Ένας άλλος σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την μεταθανάτια ανακατανομή, και συνεπώς την τοξικολογική εξέταση σε νεκροτομικό υλικό, είναι η θέση που πραγματοποιείται η δειγματοληψία. Συγκεκριμένα για τη μιρταζαπίνη, έχει αναφερθεί σημαντική διαφορά των συγκεντρώσεών της μεταξύ δειγμάτων αίματος που ελήφθησαν από τις καρδιακές κοιλότητες και από τα περιφερικά (μηνιαία) αγγεία (Anderson et al. 1999).

Συμπερασματικά, η εφαρμογή της μεθόδου σε νεκροτομικά περιστατικά απέδειξε την σημασία της τοξικολογικής εξέτασης για την ανίχνευση ουσιών στην διαπίστωση της αιτίας θανάτου. Ενώ για τα κλινικά περιστατικά συνέβαλλε τόσο στην ορθή θεραπευτική αντιμετώπιση από τους ιατρούς, όσο και στην αναγνώριση παραβατικών κοινωνικών θεμάτων, όπως η κατάχρηση ουσιών ή η παραμέληση ανηλίκων. Το γεγονός ότι προσδιορίστηκαν 38 ουσίες και φάρμακα που ανήκουν σε διαφορετικές κατηγορίες φαρμάκων/εξαρτησιογόνων δείχνει την δυναμική της συγκεκριμένης μεθόδου. Αξίζει να αναφερθεί πως η μέθοδος εφαρμόστηκε με επιτυχία για ποιοτική ανάλυση δειγμάτων ούρων.

Η ανάπτυξη νέων αναλυτικών μεθοδολογιών με σύγχρονες τεχνικές για τον προσδιορισμό εξαρτησιογόνων και ψυχοτρόπων ουσιών αποτελεί εργαλείο απαραίτητο για τα εργαστήρια Δικαστικής Τοξικολογίας προκειμένου να αντιμετωπίσουν τις προκλήσεις που σχετίζονται με την χρήση ή κατάχρηση ουσιών στις σύγχρονες κοινωνίες.

Πίνακας 26: Εύρη θεραπευτικών, τοξικών και θανατηφόρων συγκεντρώσεων (ng/mL) των ουσιών-στόχων

Ουσίες (ng/mL)	Εύρος θεραπευτικών συγκεντρώσεων	Εύρος τοξικών συγκεντρώσεων	Εύρος θανατηφόρων συγκεντρώσεων
Αμφεταμίνες			
Αμφεταμίνη	20-150	200	500-1000 (για ουσιοεξαρτημένους 1000-10000)
MDA	400	1000	2000
Άλλες ουσίες			
Ατροπίνη	2-25	30-100	200
Βεραπαμίλη	20-350	900	2500-4000
Διλτιαζέμη	50-400	800	2000-6000
Καφεΐνη	8000-20000	30000-50000	>80000
Κυκλοβενζαπρίνη	3-36	400	-
Λιδοκαΐνη	1000-5000	6000-10000	10000-25000
Παρακεταμόλη	2500-25000	75000-150000	160000
Προπρανολόλη	50-150	1000-2000	4000-10000
Προκαΐναμίδη	4000-10000	10000-15000	>20000
Σιμετιδίνη	500-1500	1300	110000*
Σιλδεναφίλη	50-500	-	-
Αντιεπιληπτικά			
Καρβαμαζεπίνη	4000-12000	12000	>25000
Τοπιραμάτη	3000-10000	-	-
Αντικαταθλιπτικά			
Αγομελατίνη	7 – 300	600	
Αμιτριπυλίνη	50-300	-	-
Αμοξαπίνη	10-200	-	-

Βενλαφαξίνη και μεταβολίτες	250-750	1000-1500	6600*
Βουπροπρόνη	25-100	170	450
Ιμιπραμίνη	45-150	400-500	2000
Κλομιπραμίνη	20-250	-	-
Μαπροτιλίνη	75-250	300-800	1000-5000
Μιανσερίνη	15-70	500-5000	-
Μιρταζαπίνη	20-100	-	-
Νοτριπτυλίνη	50-250	>250	1000-3000
Ντουλοξετίνη	30-120	-	-
Παροξετίνη	10-250	350-400	-
Προτριπτυλίνη	70-170	500	1000
Σερτραλίνη	50-250	290*	1600*
Σιταλοπράμη	20-200	-	500
Τριμιπραμίνη	10-300	500	8700*
Φλουβοξαμίνη	50-250	650	-
Φλουοξετίνη	150-500	2000	1300-6800
Αντιψυχωσικά			
Αλοπεριδόλη	5 – 15	10-100	500
Αριπιπραζόλη	150 – 500	-	-
Αμισουλπρίδη	100 – 320	10000*	640
Κλοζαπίνη	100 – 600	800-1300	3000
Κουετιαπίνη	25-365	1800*	7000
Νορκλοζαπίνη	100-600	700	-
Ολανζαπίνη	10 – 50	200	1000*
Παλιπεριδόνη	20 – 60	-	-
Ρισπεριδόνη	4 – 90	-	1800*
Σουλπιρίδη	40-600	-	3800*
Χλωροπρομαζίνη	30-500 παιδιά: 40-100	500-2000	2000
Βενζοδιαζεπίνες			
Αλπραζολάμη	5-50	100-400	-
Βρωμαζεπάμη	80-170	300-400	1000
Διαζεπάμη	αγχολυτικό: 125-250 αντιεπιληπτικό: 250-500	1500	5000
Κλοβαζάμη	100-400	-	-
Λοραζεπάμη	20-250	300-600	-
Μιδαζολάμη	80-250	1000-1500	-
Νιτραζεπάμη	30-120	200-500	-
Νορδαζεπάμη	200-800	1500-2000	-
Οξαζεπάμη	150-2000	2000	3000-5000

Πραζεπάμη	10-40	-	-
Τεμαζεπάμη	20-150	1000	8200*
Τριαζολάμη	2-20	40	-
Φλουνιτραζεπάμη	5-15	50	-
Χλωροδιαζεποξειδη	400-4000	3000-10000	20000
Κεταμίνη			
Κεταμίνη	500-6500	7000	-
Υπνωτικοί παράγοντες			
Ζολπιδέμη	80-150	500	2000-4000
Ζοπικλόνη	10-50	150	600*
Ουσίες κατάχρησης			
Αλκαλοειδή της κόκας			
Κοκαΐνη	50-300	250-5000	1-20000
Οπιούχα			
Μεθαδόνη	αναλγητικό: 100-300 ουσιοεξαρτημένοι: 200-750	ασθενής: 200 χρήστες: >750	200-1000
Μορφίνη	10-120	150-500	50-4000
Ναλοξόνη	10-30	-	-
Τραμαδόλη	100-800	1000	2000
Κωδεΐνη	10-250	300-1000	1600
Φεντανύλη	1-2	2-20	-

*παρουσίαση περιστατικού

Επιδημιολογικά δεδομένα χρήσης εξαρτησιογόνων ουσιών

Το φαινόμενο της ουσιοεξάρτησης είναι πολυδιάστατο και εξαρτάται από ψυχολογικούς, κοινωνικούς και ατομικούς παράγοντες. Τα τελευταία χρόνια, παρατηρείται ανησυχητική αύξηση της κατάχρησης συνθετικών οπιοειδών, κυρίως της φεντανύλης και των συναφών αναλόγων με βάση την πιπεριδίνη. Η υπερβολική δόση οπιοειδών είναι η υπ' αριθμόν ένα αιτία θανάτου για άτομα ηλικίας 25 έως 64 ετών (Dezfulian et al., 2021) και ένας σημαντικός παράγοντας που συμβάλλει στη μείωση του προσδόκιμου ζωής, στις Η.Π.Α. (Dowell et al., 2022).

Η παγκόσμια έκθεση για τις εξαρτησιογόνες ουσίες, το 2023, έδειξε την αύξηση των χρηστών κατά 23% σε σχέση με το 2011. Η κάνναβη είναι η ουσία που καταναλώνεται περισσότερο, με 219 εκατομμύρια ενήλικες, και ακολουθούν τα οπιοειδή, οι αμφεταμίνες και η κοκαΐνη (UNODC, 2023a). Στην Ελλάδα, έρευνα του 2019 έδειξε ότι το 22,9% μαθητών λυκείου έχει κάνει χρήση κάποιας παράνομης ουσίας, κυρίως κάνναβης, με το 12,1% να αναφέρει επαναλαμβανόμενη χρήση. Στην ετήσια έκθεση, του Συντονιστικού Οργάνου Δίωξης-Εθνική Μονάδα Πληροφοριών (ΣΟΔΝ-ΕΜΠ), το 2022, για τα ναρκωτικά αναφέρθηκαν 131 θάνατοι από χρήση ουσιών με τα οπιοειδή, και κυρίως την ηρωίνη, να βρίσκονται στην κορυφή.

Συνέπειες χρήσης εξαρτησιογόνων ουσιών και μέτρα πρόληψης

Οι πληροφορίες σχετικά με τις βραχυπρόθεσμες και μακροπρόθεσμες επιπτώσεις των εξαρτησιογόνων ουσιών και των NPS, είναι περιορισμένες, με αποτέλεσμα οι κίνδυνοι για την υγεία και την ασφάλεια των πολιτών να είναι υψηλοί. Η χρήση τους παρουσιάζει πολλές και συνεχόμενες προκλήσεις για τις υπηρεσίες ταυτοποίησης ελέγχου των ναρκωτικών και για τη δημόσια υγεία. Ο Οργανισμός των Ηνωμένων Εθνών για τα Ναρκωτικά και το Έγκλημα (UNODC), χαρακτήρισε την χρήση των NPS ως επιδημία, και δημιούργησε ένα πρόγραμμα έγκαιρης καταγραφής και προειδοποίησης για την συλλογή πληροφοριών σχετικά με τον επιπολασμό τους, σε διαφορετικές χώρες, μεταξύ αυτών και η Ελλάδα (UNODC, 2023). Αποτελούν προφανώς, ένα παγκόσμιο πολυδιάστατο πρόβλημα, λόγω της μεγάλης ποικιλίας διαθέσιμων νέων ουσιών, της αδιευκρίνιστης νομικά κατάστασής τους, της ικανότητάς τους να διαφεύγουν τους τοξικολογικούς ελέγχους, της ταχείας αναπροσαρμογής της δομής τους όταν προκύπτουν νομικοί περιορισμοί, και της έλλειψης επίγνωσης των χρηστών για τις δυσμενείς επιπτώσεις τους (Florou, Boumba, 2021).

Το 1987 ο ΟΗΕ με σκοπό την ευαισθητοποίηση σχετικά με τη χρήση και τη διακίνηση ναρκωτικών καθιέρωσε την 26^η Ιουνίου ως την «Παγκόσμια Ημέρα κατά των Ναρκωτικών και της Παράνομης Διακίνησης» (Bareerah, 2018). Στην Ελλάδα λειτουργούν συνολικά 114 δομές θεραπείας και 52 συμβουλευτικά κέντρα που υλοποιούν σχέδια με σκοπό την συμβουλευτική θεραπεία και την εφαρμογή προγραμμάτων αποκατάστασης για την αντιμετώπιση της ουσιοεξάρτησης. Χαρακτηριστικά, το 2020, 11.707 άτομα έλαβαν κάποιου είδους θεραπεία. Την ίδια χρονιά, 386.745 σύριγγες δόθηκαν σε χρήστες ουσιών, ποσοστό μειωμένο κατά 17% σε σχέση με το 2019 που είχαν δοθεί 464.745 σύριγγες, γεγονός που αποδεικνύει τα άμεσα οφέλη των δομών αυτών (Mohammadnezhad, 2020).

Η στρατηγική της Ε.Ε. για τα ναρκωτικά το 2021-2025 αντιμετωπίζει τις υφιστάμενες και υπό εξέλιξη προκλήσεις και προβλέπει τις εξελίξεις στο περίπλοκο φαινόμενο των ναρκωτικών. Στοχεύει στην ενίσχυση της κοινωνικής και ατομικής ευημερίας, και την προώθηση της δημόσιας υγείας μέσω μιας βασισμένης σε στοιχεία, συνολικής και πολυτομεακής προσέγγισης. Επίσης, στοχεύει στην καταπολέμηση της παραγωγής συνθετικών ναρκωτικών, στη μείωση των ασθενειών που σχετίζονται με τα ναρκωτικά, στην πρόληψη των υπερβολικών δόσεων και στην προώθηση της διεθνούς συνεργασίας με τον περιορισμό της διαθεσιμότητας ναρκωτικών στις φυλακές και τη χρηματοδότηση έρευνας που σχετίζεται με τα ναρκωτικά.

Η αναγνώριση και η ταυτοποίηση των ψυχοδραστικών ουσιών όχι θα βελτιώσει τη γνώση, την ευαισθητοποίηση και την περίθαλψη των χρηστών και των νέων.

5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η τοξικολογική εξέταση βιολογικών υλικών αποτελεί αδιαμφισβήτητη απόδειξη της προηγούμενης χρήσης ουσιών ή γενικά της έκθεσης σε ουσίες. Λόγω της δυναμικής, εξελισσόμενης φύσης και της μεγάλης διαθεσιμότητας των ουσιών για κατάχρηση, καθίσταται αναγκαία και σημαντική η ανάπτυξη νέων και ευαίσθητων αναλυτικών μεθόδων προσδιορισμού εξαρτησιογόνων ουσιών και φαρμάκων, σε βιολογικά υλικά που προέρχονται, είτε από κλινικά δείγματα είτε από νεκροτομικό υλικό.

A. Πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός επιλεγμένων εξαρτησιογόνων και νέων ψυχοδραστικών ουσιών (New Psychoactive Substances, NPS) σε βιολογικά υλικά με την χρήση υγρής χρωματογραφίας συζευγμένης με διαδοχική φασματομετρία μαζών (LC-MS/MS).

Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε η:

- i. Ανάπτυξη και επικύρωση ταχείας, ευαίσθητης, ακριβούς και εκλεκτικής, νέας αναλυτικής μεθόδου για τον προσδιορισμό επιλεγμένων εξαρτησιογόνων, νέων ψυχοδραστικών και άλλων ουσιών σε ολικό αίμα με εφαρμογή υγρής-υγρής εκχύλισης.
- ii. Ανάπτυξη και επικύρωση νέας εκλεκτικής και ακριβούς μεθόδου εκχύλισης (FPSE) της νέας ψυχοδραστικής ουσίας, βρωρφίνη, από σίελα.

B. Εφαρμόστηκαν τεχνικές NMR για την διερεύνηση της μοριακής δομής της νέας συνθετικής καθινόνης, βενζυλόνης καθώς και την ανίχνευση της σε ούρα.

Γ. Εφαρμογή της αναπτυχθείσας μεθοδολογία για το ολικό αίμα στην ανάλυση κλινικών δειγμάτων για διαγνωστικούς και θεραπευτικούς λόγους και σε νεκροτομικό υλικό κατά την ιατροδικαστική διερεύνηση των αιτιών θανάτου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στη σύγχρονη εποχή, η διαθεσιμότητα χιλιάδων ουσιών, για εκούσια ή ακούσια χρήση ή κατάχρηση, μέσω διαφόρων οδών λήψης, με δυνητικά τοξικές ή θανατηφόρες επιδράσεις είναι υψηλή. Η απόλυτη τεκμηρίωση της επίδρασης μιας τοξικής ουσίας στον οργανισμό γίνεται με τη διενέργεια της τοξικολογικής εξέτασης. Η δυναμική φύση των διαθέσιμων ουσιών για κατάχρηση καθιστά αναγκαία και σημαντική την ανάπτυξη νέων και ευαίσθητων αναλυτικών μεθόδων προσδιορισμού εξαρτησιογόνων ουσιών και φαρμάκων, σε βιολογικά υλικά που προέρχονται, σε κλινικά δείγματα ή νεκροτομικό βιολογικό υλικό.

Στην παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός επιλεγμένων εξαρτησιογόνων και νέων ψυχοδραστικών ουσιών (New Psychoactive Substances, NPS) σε βιολογικά υλικά με την χρήση υγρής χρωματογραφίας συζευγμένης με διαδοχική φασματομετρία μαζών (LC-MS/MS). Συγκεκριμένα, αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε μια ταχεία, ευαίσθητη, ακριβής και εκλεκτική, νέα αναλυτική μέθοδος για τον προσδιορισμό επιλεγμένων εξαρτησιογόνων, νέων ψυχοδραστικών (NPS) και άλλων ουσιών σε ολικό αίμα με εφαρμογή υγρής-υγρής εκχύλισης. Ο διαχωρισμός των ουσιών-στόχων πραγματοποιήθηκε με βάση την χημική δομή και τον μηχανισμό δράσης τους σε 10 κατηγορίες. Ειδικότερα, περιλαμβάνονται κοινές ουσίες κατάχρησης, συνταγογραφούμενα και μη φάρμακα που εμπλέκονται συνήθως σε υποθέσεις δηλητηριάσεων και ιατρικής αμέλειας στην επικράτειά μας, και ορισμένα NPS και τοξικές ουσίες που πιθανώς σχετίζονται με ανεπιθύμητα αποτελέσματα. Η μέθοδος υγρής-υγρής εκχύλισης, που βελτιστοποιήθηκε, περιλαμβάνει ένα βήμα εκχύλισης με χρήση οξιτισμένου MTBE με HCl, κατάλληλο για την εκχύλιση βασικών και ουδέτερων ουσιών, ενώ χρησιμοποιεί διαλύτη ανασύστασης 88:12% A:B, αποδίδοντας ικανοποιητικές ανακτήσεις για τους περισσότερους αναλύτες.

Επίσης, αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε, μια σύγχρονη τεχνική εκχύλισης μέσω προσρόφησης σε δίκτυο επικαλυμμένων ινών (Fabric Phase Sorptive Extraction, FPSE) για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση της βρωφίνης σε σίελα. Δοκιμάστηκαν διαφορετικές μεθοδολογίες εκχύλισης, αλλάζοντας το pH των σιέλων, τον χρόνο εκχύλισης, τον διαλύτη έκλουσης, τον χρόνο έκλουσης, σε δύο τύπους συντιθέμενων φίλτρων Whatman (κυτταρίνης και υαλοϊνών), προκειμένου να επιλεγθεί το αποδοτικότερο. Επισημαίνεται ότι η εφαρμογή αυτής της τεχνικής για τον προσδιορισμό της βρωφίνης στα σίελα αποτελεί καινοτομία, διότι βιβλιογραφικά δεν έχει υπάρξει άλλη αναφορά.

Εφαρμόστηκαν τεχνικές πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) για την διερεύνηση της μοριακής δομής της νέας συνθετικής καθιόνης, βενζυλόνης καθώς και την ανίχνευση της σε ούρα με ελάχιστη προκατεργασία του δείγματος. Τα πρωτόνια H8, H11, H14 και H15 προτάθηκαν ως «φασματοσκοπική υπογραφή NMR», για την πιθανή ύπαρξη μιας «καθιονικής ομάδας τύπου βενζυλόνης». Συνολικά, η φασματοσκοπία NMR, θα μπορούσε να γίνει ένα ουσιαστικό εργαλείο στη συνεχιζόμενη προσπάθεια κατανόησης και αντιμετώπισης των προκλήσεων που θέτουν τα NPS. Η ικανότητά της να παρέχει λεπτομερείς δομικές και χημικές πληροφορίες την καθιστά πολύτιμη τεχνική για τον εντοπισμό και τον χαρακτηρισμό αυτών των ταχέως εξελισσόμενων ενώσεων.

Η αναπτυχθείσα μέθοδος υγρής-υγρής χρωματογραφίας εφαρμόστηκε με επιτυχία σε τοξικολογικές αναλύσεις ρουτίνας για την ανάλυση βιολογικών δειγμάτων είτε σε κλινικά δείγματα, για διαγνωστικούς και θεραπευτικούς λόγους, είτε σε νεκροτομικό υλικό κατά την ιατροδικαστική διερεύνηση των αιτιών θανάτου. Στα περιστατικά που αναλύθηκαν ανιχνεύθηκαν επιτυχώς αντικαταθλιπτικά, βενζοδιαζεπίνες, οπιούχα, αλκαλοειδή της κόκας καθώς και άλλες ουσίες. Το γεγονός ότι οι ευρεθείσες ουσίες ανήκουν σε διαφορετικές κατηγορίες φαρμάκων/εξαρτησιογόνων αποδεικνύει την δυναμική της συγκεκριμένης μεθόδου. Η εφαρμογή των μεθόδων στην τοξικολογική ανάλυση νεκροτομικού υλικού επιβεβαίωσε την αναγκαιότητα αξιόπιστων και ευαίσθητων αναλυτικών μεθοδολογιών προσδιορισμού ουσιών, προκειμένου να διαπιστωθεί η πιθανή συμμετοχή τους στην αιτία θανάτου.

SUMMARY

“Identification of selected addictive drugs and New Psychoactive Substances (NPS) in biological samples using Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry (LC-MS/MS), and investigation of their molecular structure by spectroscopic methods; application to postmortem samples and clinical cases”

Dimitra Florou, Biologist M.Sc.

Forensic toxicology, a crucial discipline in criminal investigations, has undergone significant advancements in recent years. The scope of forensic toxicology services has currently become technically and intellectually demanding. The dynamic and evolving nature of substances available for abuse makes it necessary to develop new and sensitive analytical methods for identifying addictive substances and drugs of abuse in biological fluids derived from either clinical or postmortem samples.

Herein, a fully validated method based on liquid-liquid extraction (LLE) in human whole blood through liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS/MS) is described. The proposed method simultaneously detects substances belonging to 10 different classes, including drugs of abuse, prescription and over-the-counter drugs commonly involved in poisoning and medical malpractice cases in our territory, as well as certain new psychoactive substances (NPS) and toxic substances potentially associated with adverse effects. The optimised LLE employs one extraction step using acidified MTBE with HCl, suitable for the extraction of basic and neutral substances, and 88:12% A:B as a reconstitution solvent, yielding satisfactory recoveries for most analytes. Moreover, the development and validation of an innovative, simple, rapid, sensitive, specific, effective, and reliable method based on the application of fabric phase sorptive extraction (FPSE) and LC-MS/MS to determine and quantify bupropion in oral fluid (OF) is presented for the first time. Various extraction methodologies were tested including changing the pH of the OF, the extraction time, the elution solvent, and the elution time, using two types of Whatman filters (cellulose and glass fibre) to select the most efficient one. It should be noted that the application of this technique for the determination of bupropion in saliva is a novel approach, as there has been no other report in the literature.

Several Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopic techniques were used to elucidate benzylone's properties and structure. Moreover, a novel NMR spectroscopic-based method for the identification and determination of benzylone in spiked urine samples is presented. Additionally, an NMR spectroscopic pattern/signature for the possible existence of benzylone in a solution is proposed for the first time. Overall, NMR spectroscopy, with its inherent advantages, could become an essential tool in the ongoing effort to understand and address the challenges posed by NPS. Its ability to provide detailed structural and chemical information makes it a valuable technique for identifying and characterizing these rapidly evolving compounds.

The developed LLE method has been successfully applied in routine toxicological analyses for the analysis of biological samples either in clinical samples, for diagnostic and therapeutic purposes, or in postmortem samples during forensic investigation of causes of death. Antidepressants, benzodiazepines, benzodiazepines, opiates, coca alkaloids and other substances were successfully detected. The fact that the identified substances belong to different drug/addictive substance categories demonstrates the potential of this method. The application of the method to postmortem samples has confirmed the necessity of reliable and sensitive analytical methodologies for identifying substances to establish their possible involvement in the cause of death.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Adamowicz, P., Tokarczyk, B. (2016). Simple and rapid screening procedure for 143 new psychoactive substances by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug Test Anal* 8(7): 652-667.

Adatsi, F. K. (2005). *Forensic Toxicology. Encyclopedia of Toxicology (Second Edition)*

Ahmed, F., Eticha, T., Hymete, A., Ashenef, A. (2023). *Principles and Applications of Ultra-High-Performance Liquid Chromatography*. Intech Open

Alves, V., Conceição, C., Gonçalves, J., Teixeira, H. M., Câmara, J. S. (2017). Improved Analytical Approach Based on QuEChERS/UHPLC-PDA for Quantification of Fluoxetine, Clomipramine and their Active Metabolites in Human Urine Samples. *J Anal Toxicol* 41(1): 45-53.

Alves, V. L., Gonçalves, J. L., Aguiar, J., Teixeira H. M., Câmara, J. S. (2020). The synthetic cannabinoids phenomenon: from structure to toxicological properties. A review. *Crit Rev Toxicol* 50(5): 359-382.

Alzubi, A., Almahasneh, F., Khasawneh, R., Abu-El-Rub, E., Baker, W. B., Al-Zoubi, R. M. (2024). The synthetic cannabinoids menace: a review of health risks and toxicity. *Eur J Med Res* 29(1): 49.

Ambach, L., Redondo, A. H., König, S., Angerer, V., Schürch, S., Weinmann, W. (2015). Detection and quantification of 56 new psychoactive substances in whole blood and urine by LC-MS/MS. *Bioanalysis* 7(9): 1119-1136.

Ambroziak, K., Adamowicz, P. (2018). Simple screening procedure for 72 synthetic cannabinoids in whole blood by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Forensic Toxicol* 36(2): 280-290.

Ameline, A., Garnier, D., Gheddar, L., Richeval, C., Gaulier, J. M., Raul, J. S., Kintz P. (2019). Identification and analytical characterization of seven NPS, by combination of. *Forensic Sci Int* 298: 140-148.

Ameline, A., Garnier, D., Gheddar, L., Richeval, C., Gaulier, J. M., Raul, J. S., Kintz P. (2019). Identification and analytical characterization of seven NPS, by combination of. *Forensic Sci Int* 298: 140-148.

Amin, A. M., Sheau Chin, L., Teh, C.-H., Mostafa, H., Mohamed Noor, D.A., Abdul Kader, M.A.Sk., Kah Hay, Y., Ibrahim B. (2017). ¹H NMR based pharmacometabolomics analysis of urine identifies metabolic phenotype of clopidogrel high on treatment platelets reactivity in coronary artery disease patients. *J Pharm Biomed Anal* 146: 135-146.

Amundsen, I., Oiestad, Å., Ekeberg, D., Kristoffersen L. (2013). Quantitative determination of fifteen basic pharmaceuticals in ante- and post-mortem whole blood by high pH mobile phase reversed phase ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 927: 112-123.

Andersen, A. B. A., Pyykkönen, A., Jensen, H. J. A., McKee, V., Vaara J., Nielsen, U. G. (2020). Remarkable reversal of ^{13}C -NMR assignment in d^1 , d^2 compared to d^8 , d^9 acetylacetonate complexes: analysis and explanation based on solid-state MAS NMR and computations. *Phys Chem Chem Phys* 22(15): 8048-8059.

Anderson, B., Southern, B. D., Powers, R. E. (1999). Anatomic asymmetries of the posterior superior temporal lobes: a postmortem study. *Neuropsychiatry Neuropsychol Behav Neurol* 12(4): 247-254.

Antia, U., Tingle, M. D., Russell B. R. (2010). Validation of an LC-MS method for the detection and quantification of BZP and TFMPP and their hydroxylated metabolites in human plasma and its application to the pharmacokinetic study of TFMPP in humans. *J Forensic Sci* 55(5): 1311-1318.

Araújo, A. M., Carvalho, F., Bastos, M. e. L., Guedes de Pinho, P., Carvalho, M. (2015). The hallucinogenic world of tryptamines: an updated review. *Arch Toxicol* 89(8): 1151-1173.

Ardrey, R.E. (2003). *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction*. John Wiley & Sons, Ltd

Armellin, S., Brenna, E., Frigoli, S., Fronza, G., Fuganti, C., Mussida, D. (2006). Determination of the synthetic origin of methamphetamine samples by ^2H NMR spectroscopy. *Anal Chem* 78(9): 3113-3117.

Armenian, P., Vo, K. T., Barr-Walker, J., Lynch K. L. (2018). Fentanyl, fentanyl analogs and novel synthetic opioids: A comprehensive review. *Neuropharmacology* 134(Pt A): 121-132.

Arora, B., Velpandian, T., Saxena, R., Lalwani, S., Dogra, T. D., Ghose, S. (2016). Development and validation of an ESI-LC-MS/MS method for simultaneous identification and quantification of 24 analytes of forensic relevance in vitreous humour, whole blood and plasma. *Drug Test Anal* 8(1): 86-97.

Ashri, N. Y., Abdel-Rehim M. (2011). Sample treatment based on extraction techniques in biological matrices. *Bioanalysis* 3(17): 2003-2018.

Ashton, C. H. (2001). Pharmacology and effects of cannabis: a brief review. *Br J Psychiatry* 178: 101-106.

Aznar, M., Alfaro, P., Nerin, C., Kabir, A., Furton, K. G. (2016). Fabric phase sorptive extraction: An innovative sample preparation approach applied to the analysis of specific migration from food packaging. *Anal Chim Acta* 936: 97-107.

Baker, L. E. (2018). Hallucinogens in Drug Discrimination. *Curr Top Behav Neurosci* 36: 201-219.

Banaszkiewicz, L., Woźniak, M. K., Kata, M., Domagalska, E., Wiergowski, M., Szpiech, B., Kot-Wasik A. (2020). Rapid and simple multi-analyte LC-MS/MS method for the determination of benzodiazepines and Z-hypnotic drugs in blood samples: Development, validation and application based on three years of toxicological analyses. *J Pharm Biomed Anal* 191: 113569.

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

Barone, R., Giorgetti, A., Cardella, R., Rossi, F., Garagnani, M., Pascali, J. P., Mohamed, S., Fais, P., Pelletti, G. (2023). Development and validation of a fast UPLC-MS/MS screening method for the detection of 68 psychoactive drugs and metabolites in whole blood and application to post-mortem cases. *J Pharm Biomed Anal* 228: 115315.

Bassotti, E., Merone, G. M., D'Urso, A., Savini, F., Locatelli, M., Tartaglia, A., Dossetto, P., D'Ovidio, C., de Grazia, U. (2020). A new LC-MS/MS confirmation method for the determination of 17 drugs of abuse in oral fluid and its application to real samples. *Forensic Sci Int* 312: 110330.

Baumann, M. H., Clark, R. D., Budzynski, A. G., Partilla, J. S., Blough, B. E., Rothman, R. B. (2004). Effects of "Legal X" piperazine analogs on dopamine and serotonin release in rat brain. *Ann N Y Acad Sci* 1025: 189-197.

Baumann, M. H., Clark, R. D., Budzynski, A. G., Partilla, J. S., Blough, B. E., Rothman, R. B. (2005). N-substituted piperazines abused by humans mimic the molecular mechanism of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, or 'Ecstasy'). *Neuropsychopharmacology* 30(3): 550-560.

Baumann, M. H., Walters, H. M., Niello, M., Sitte, H. H. (2018). Neuropharmacology of Synthetic Cathinones. *Handb Exp Pharmacol* 252: 113-142.

Baumeister, D., Tojo, L.M., Tracy, D.K. (2015). Legal highs: staying on top of the flood of novel psychoactive substances. *Therap Advances in Psychopharmacol.* 5 (2): 97–132.

Bazhdanzadeh, S., Talebpour, Z., Adib, N., Aboul-Enein, H. Y. (2011). A simple and reliable stir bar sorptive extraction-liquid chromatography procedure for the determination of chlorpromazine and trifluoperazine in human serum using experimental design methodology. *J Sep Sci* 34(1): 90-97.

Beckonert, O., Keun, H. C., Ebbels T. M., Bundy, J., Holmes, E., Lindon, J. C., Nicholson, J. K. (2007). Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nat Protoc* 2(11): 2692-2703.

Behnoush, B., A. Sheikazadi, E. Bazmi, A. Fattahi, E. Sheikazadi and S. H. Saberi Anary (2015). "Comparison of UHPLC and HPLC in benzodiazepines analysis of postmortem samples: a case-control study." *Medicine (Baltimore)* 94(14): e640.

Bellagambi, F.G., Lomonaco, T., Salvo, P., Vivaldi, F., Hangouët, M., Ghimenti, S., Biagini, D., di Francesco, F., Fuoco, R., Errachid, A. (2020). Saliva sampling: Methods and devices. An overview. In *TrAC - Trends in Analytical Chemistry Elsevier B.V.* (124).

Bélanger, M.R., Pare, J.R.J., Sigouin, M. (1997). High performance liquid chromatography (HPLC): Principles and applications. Chapter 2. Techniques and Instrumentation in *Analytical Chemistry*, 18, 37-59

Bence Farkas, L., Timári, I., Kövér, K. E., Sørensen O. W. (2022). Four-in-one: HSQC, HSQC-TOCSY (or H2BC), TOCSY, and enhanced HMBC spectra integrated into a single NO Relaxation Delay (NORD) NMR experiment. *J Magn Reson* 343: 107297.

Benyamin, R., Trescot, A. M., Datta, S., Buenaventura, R., Adlaka, R., Sehgal, N., Glaser, S. E., Vallejo R. (2008). Opioid complications and side effects. *Pain Physician* 11(2 Suppl): S105-120.

Berk, Z. (2018). Extraction. *Food Process Engineering and Technology*, 3rd Edition, United States: Academic Press. 289–310.

Bianchi, F., Agazzi, S., Riboni, N., Erdal, N., Hakkarainen, M., Ilag, L. L., Anzillotti, L., Andreoli, R., Marezza, F., Moroni, F., Cecchi, R., Careri M. (2019). Novel sample-substrates for the determination of new psychoactive substances in oral fluid by desorption electrospray ionization-high resolution mass spectrometry. *Talanta* 202: 136-144.

Bicknell, V., Gerostamoulos, D., Leo Ranson, D. (2017). Novel psychoactive substances: The challenges for health care, analytical science and the law. *Journal of Law and Medicine* 24(4), pp. 763-766.

Bingol, K. (2018). Recent Advances in Targeted and Untargeted Metabolomics by NMR and MS/NMR Methods. *High Throughput* 7(2).

Bird, I. M. (1989). High performance liquid chromatography: principles and clinical applications. *BMJ* 299(6702): 783-787.

Bjørk, M. K., Simonsen, K. W., Andersen, D. W., Dalsgaard, P. W., Sigurðardóttir, S. R., Linnet, K., Rasmussen, B. S. (2013). Quantification of 31 illicit and medicinal drugs and metabolites in whole blood by fully automated solid-phase extraction and ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 405(8): 2607-2617.

Borges, K. B., Freire, E. F., Martins, I., de Siqueira M. E. (2009). Simultaneous determination of multibenzodiazepines by HPLC/UV: investigation of liquid-liquid and solid-phase extractions in human plasma. *Talanta* 78(1): 233-241.

Bothwell, J. H. F., Griffin, J. L. (2011, May). An introduction to biological nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biological Reviews*, Vol. 86, pp. 493–510.

Boumba, V. A., Di Rago, M., Peka, M., Drummer, O. H., Gerostamoulos D. (2017). The analysis of 132 novel psychoactive substances in human hair using a single step extraction by tandem LC/MS. *Forensic Sci Int* 279: 192-202.

Boumba, V. A., Ziavrou, K. S., Vougiouklakis, T. (2006). Hair as a biological indicator of drug use, drug abuse or chronic exposure to environmental toxicants. *Int J Toxicol* 25(3): 143-163.

Boumba, V.A., Petrikis, P., Patteet, L., Baou, M., Rallis, G., Metsios, A., Karampas, A., Maudens, K., Mavreas, V. (2018). A Pilot Study Of Plasma Antipsychotic Drugs Concentrations Of First Episode Patients With Psychosis From EPIRUS – Greece. *Current Psychopharmacol*, 7, 2, 00

- Bourin, M., Lambert O. (2002). Pharmacotherapy of anxious disorders. *Hum Psychopharmacol* 17(8): 383-400.
- Bouzas, N. F., Dresen, S., Munz B., Weinmann, W. (2009). Determination of basic drugs of abuse in human serum by online extraction and LC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem* 395(8): 2499-2507.
- Brogden, R. N., Benfield P. (1996). Verapamil: a review of its pharmacological properties and therapeutic use in coronary artery disease. *Drugs* 51(5): 792-819.
- Brownstein, M. J. (1993). A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(12): 5391-5393.
- Bruins, A.P., Covey, T.R., Henion, J.D. (1987). Ion spray interface for combined liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometry. *Analyt Chem*, 59, 2642-2646
- Brunetti, P., Pirani, F., Carlier, J., Giorgetti, R., Busardò, F. P., Lo Faro A. F. (2021). A 2017-2019 Update on Acute Intoxications and Fatalities from Illicit Fentanyl and Analogs. *J Anal Toxicol* 45(6): 537-554.
- Busardò, F. P., Carlier, J., Giorgetti, R., Tagliabracci, A., Pacifici, R., Gottardi, M., Pichini, S. (2019). Ultra-High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Assay for Quantifying Fentanyl and 22 Analogs and Metabolites in Whole Blood, Urine, and Hair. *Front Chem* 7: 184.
- Bylda, C., Thiele, R., Kobold, U., Volmer, D. A. (2014). Recent advances in sample preparation techniques to overcome difficulties encountered during quantitative analysis of small molecules from biofluids using LC-MS/MS. *Analyst* 139(10): 2265-2276.
- Cabrita, E.J., Berger, S. (2002). HR-DOSY as a new tool for the study of chemical exchange phenomena. *Magnetic Reson in Chem* 40 (13): S122-S127
- Carneiro, C.S., Marsico, E.T., Ribeiro, R.O., Conte-Junior, C.A., Mano, S.B., Augusto, C.J.C., Oliveira de Jesus, E.F. (2016). Low-Field Nuclear Magnetic Resonance (LF NMR 1H) to assess the mobility of water during storage of salted fish (*Sardinella brasiliensis*). *Journal of Food Engin.* 169, 321-325
- Carhart-Harris, R. L., Goodwin, G. M. (2017). The Therapeutic Potential of Psychedelic Drugs: Past, Present, and Future. *Neuropsychopharmacology* 42(11): 2105-2113.
- Carhart-Harris, R. L., Nutt, D. J. (2017). Serotonin and brain function: a tale of two receptors. *J Psychopharmacol* 31(9): 1091-1120.
- Castaing-Cordier, T., Benavides Restrepo, A., Dubois, D., Ladroue, V., Besacier, F., Buleté, A., Charvoz, C., Goupille, A., Jacquemin, D., Giraudeau, P., Farjon, J. (2022). Characterization of new psychoactive substances by integrating benchtop NMR to multi-technique databases. *Drug Test Anal* 14(9): 1629-1638.

Cavanagh, J., Rance, M. (1990), Sensitivity improvement in isotropic mixing (TOCSY) experiments. *Journal of Magnetic Resonance*. 88 (1), 72-85

Celeiro, M., Vazquez, L., Nurerk, P., Kabir, A., Furton, K. G., Dagnac, T., Llompart M. (2020). Fabric phase sorptive extraction for the determination of 17 multiclass fungicides in environmental water by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J Sep Sci* 43(9-10): 1817-1829.

Chaffman, M., Brogden, R. N. (1985). Diltiazem. A review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy. *Drugs* 29(5): 387-454.

Chaves, A. R., Chiericato Júnior, G., Queiroz, M. E. (2009). Solid-phase microextraction using poly(pyrrole) film and liquid chromatography with UV detection for analysis of antidepressants in plasma samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 877(7): 587-593.

Chen, X., Zheng, X., Ding, K., Zhou, Z., Zhan, C. G., Zheng F. (2017). A quantitative LC-MS/MS method for simultaneous determination of cocaine and its metabolites in whole blood. *J Pharm Biomed Anal* 134: 243-251.

Chung, H., Choe, S. (2017). Overview of Forensic Toxicology, Yesterday, Today and in the Future. *Curr Pharm Des* 23(36): 5429-5436.

Cohen Freue, G. V., Borchers C. H. (2012). Multiple reaction monitoring (MRM): principles and application to coronary artery disease. *Circ Cardiovasc Genet* 5(3): 378.

Cole, R. (2010). *Electrospray and MALDI Mass Spectrometry. Fundamentals, Instrumentation, Practicalities, and Biological Applications*. John Wiley & Sons, Inc. 2nd Edition

Coles, R., Kushnir, M. M., Nelson, G. J., McMillin, G. A., Urry, F. M. (2007). Simultaneous determination of codeine, morphine, hydrocodone, hydromorphone, oxycodone, and 6-acetylmorphine in urine, serum, plasma, whole blood, and meconium by LC-MS-MS. *J Anal Toxicol* 31(1): 1-14.

Concheiro, M., de Castro, A., Quintela, O., Cruz, A., López-Rivadulla, M. (2008). Determination of illicit and medicinal drugs and their metabolites in oral fluid and preserved oral fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 391(6): 2329-2338.

Cooman, T., Santos, H., Cox, J., Allochio Filho, J.F., Bastos Borges, K., Romano, W., Arroyo-Mora, L.E. (2020). Development, validation and evaluation of a quantitative method for the analysis of twenty-four new psychoactive substances in oral fluid by LC-MS/MS, *Forensic Chem*, 19:100231

Corazza, O., Coloccini, S., Marrinan, S., Vigar, M., Watkins, C., Zene, C., Negri, A., Aresti, A., Darke, S., Rinaldi, R., Metastasio, A., Bersani, G. (2020). Novel Psychoactive Substances in Custodial Settings: A Mixed Method Investigation on the Experiences of People in Prison and Professionals Working With Them. *Front Psychiatry* 11: 460.

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

Corkery, J. M., Schifano, F., Martinotti, G. (2020). How deaths can help clinicians and policy-makers understand the risks of novel psychoactive substances. *Br J Clin Pharmacol* 86(3): 482-498.

Czarny, J., Musial, J., Powierska-Czarny, J., Galant, N., Raczkowski, M., Buszewski, B., Gadzala-Kopciuch, R. (2022). Validation of a simple and quick method for determination of psychoactive substances, drugs and their metabolites from human blood by LC-MS/MS. *Microchemical Journal*, 182, 107922

da Cunha, K. F., Oliveira, K. D., Huestis, M. A., Costa, J. L. (2020). Screening of 104 New Psychoactive Substances (NPS) and Other Drugs of Abuse in Oral Fluid by LC-MS-MS. *J Anal Toxicol* 44(7): 697-707.

Dadgar, D., Burnett, P. E. Choc, M. G. Gallicano, K., Hooper J. W. (1995). Application issues in bioanalytical method validation, sample analysis and data reporting. *J Pharm Biomed Anal* 13(2): 89-97.

Dass, C. (2007). Hyphenated Separation Techniques. *Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry*. John Wiley & Sons, Inc. pp. 151–194.

Das, G. (1989). Therapeutic review. Cardiac effects of atropine in man: an update. *International journal of clinical Pharmacology and Therapeutics*. (10):473-7

Datta, P. (2019). Immunoassay Design for Screening of Drugs of Abuse. *Critical Issues in Alcohol and Drugs of Abuse Testing*, 121–128.

De Campos, E.G., da Costa, B.R.B., dos Santos, F.S., Monedeiro, F., Alves, M.N.R., Santos Junior, W.J.R., De Martinis, B.S. (2021). Alternative matrices in forensic toxicology: a critical review. *Forensic Toxicol*. 40(1):1-18

De Castro, G. V., Ciulli, A. (2019). Spy vs. spy: selecting the best reporter for. *Chem Commun (Camb)* 55(10): 1482-1485.

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

Deeb, S., McKeown, D. A., Torrance, H. J., Wylie, F. M., Logan, B. K., Scott K. S. (2014). Simultaneous analysis of 22 antiepileptic drugs in postmortem blood, serum and plasma using LC-MS-MS with a focus on their role in forensic cases. *J Anal Toxicol* 38(8): 485-494.

Deichmann, W. B., D. Henschler, B. Holmstedt and G. Keil (1986). "What is there that is not poison? A study of the Third Defense by Paracelsus." *Arch Toxicol* 58(4): 207-213.

Desharnais, B., Lajoie M. J., Laquerre J., Mireault, P., Skinner, C. D. (2020). A threshold LC-MS/MS method for 92 analytes in oral fluid collected with the Quantisal® device. *Forensic Sci Int* 317: 110506.

Dezfulian, C., Orkin, A. M., Maron, B. A., Elmer, J., Girotra, S., Gladwin, M. T., Merchant, R. M., Panchal, A. R., Perman, S. M., Starks M. A., S. van Diepen, E. J. Lavonas, (2021). Opioid-Associated Out-of-Hospital Cardiac Arrest: Distinctive Clinical Features and Implications for Health Care and Public Responses: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation* 143(16): e836-e870.

Di Rago, M., Pantatan, S., Hargreaves, M., Wong, K., Mantinieks, D., Kotsos, A., Glowacki, L., Drummer, O. H., Gerostamoulos, D. (2021). High Throughput Detection of 327 Drugs in Blood by LC-MS-MS with Automated Data Processing. *J Anal Toxicol* 45(2): 154-183.

Di Rago, M., Saar, E., Rodda, L. N., Turfus, S., Kotsos, A., Gerostamoulos, D., Drummer O. H. (2014). Fast targeted analysis of 132 acidic and neutral drugs and poisons in whole blood using LC-MS/MS. *Forensic Sci Int* 243: 35-43.

Dignam, G., Bigham, C. (2017). Novel psychoactive substances: a practical approach to dealing with toxicity from legal highs. *BJA Education*, 2017;17/5:172–77

Douglas, A., Skoog, F., Holler, J., Stanley, R. Crouch. (2007). *Principles of Instrumental Analysis, Sixth Edition*

Dong, M.W., Zhang, K. (2014), Ultra-high-pressure liquid chromatography (UHPLC) in method development, *TrAC Trends Analytical Chemistry*, 63: 21-30.

Dorsey, J.K., Dill K.A. (1989). The molecular mechanism of retention in reversed-phase liquid chromatography. *CHEMICAL REVIEWS*, 89, 331-346

Dos Santos, B. P., Eller, S., Borges, G.R., de Gouveia, G.C., Sebben, V.C., Arbo, M.D., de Oliveira T. F. (2023). "A multi-analyte LC-MS/MS method for the determination of 57 pharmaceuticals and illicit drugs in plasma, and its application to poisoning cases." *J Pharm Biomed Anal* 222: 115082.

Dowell, D., Ragan, K. R., Jones, C. M., Baldwin, G. T., Chou R. (2022). CDC Clinical Practice Guideline for Prescribing Opioids for Pain - United States, 2022. *MMWR Recomm Rep* 71(3): 1-95.

Dresen, S., Ferreirós, N., Gnann, H., Zimmermann, R., Weinmann, W. (2010). Detection and identification of 700 drugs by multi-target screening with a 3200 Q TRAP LC-MS/MS system and library searching. *Anal Bioanal Chem* 396(7): 2425-2434.

Drummer, O. H. (1999). Chromatographic screening techniques in systematic toxicological analysis. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 733(1-2): 27-45.

Drummer, O. H., Horomidis, S., Kourtis, S., Syrjanen, M. L., Tippett, P. (1994). Capillary gas chromatographic drug screen for use in forensic toxicology. *J Anal Toxicol* 18(3): 134-138.

Drummer, O.H. (2005). Review: Pharmacokinetics of illicit drugs in oral fluid. *Forensic Science International*, 150(2–3), 133–142.

Drummer, O.H. (2017). Good Practices in Forensic Toxicology. *Curr Pharm Des.*, 23(36):5437-5411

Drummer, O.H., Gerostamoulos, J. (2002). Postmortem Drug Analysis: Analytical and Toxicological Aspects. *Therapeutic Drug Monitoring* 24:199–209 © Lippincott Williams & Wilkins, Inc., Philadelphia

Dulaurent, S., El Balkhi, S., Poncelet, L., Gaulier, J. M., Marquet, P, Saint-Marcoux F. (2016). QuEChERS sample preparation prior to LC-MS/MS determination of opiates, amphetamines, and cocaine metabolites in whole blood. *Anal Bioanal Chem* 408(5): 1467-1474.

Eckart, K., Röhrich, J., Breitmeier, D., Ferner, M., Laufenberg-Feldmann, R., Urban R. (2015). Development of a new multi-analyte assay for the simultaneous detection of opioids in serum and other body fluids using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 1001: 1-8.

Eichhorst, J. C., Etter, M. L., Hall, P. L., Lehotay D. C. (2012). Opiate screening and quantitation in urine/blood matrices using LC-MS/MS techniques." *Methods Mol Biol* 902: 53-64.

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

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

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

Ellefsen, K. N., Taylor, E. A., Simmons, P., Willoughby, V., Hall B. J. (2017). Multiple Drug-Toxicity Involving Novel Psychoactive Substances, 3-Fluorophenmetrazine and U-47700. *J Anal Toxicol* 41(9): 765-770.

Fagiola, M., Hahn, T., Avella J. (2018). Screening of Novel Psychoactive Substances in Postmortem Matrices by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS-MS). *J Anal Toxicol* 42(8): 562-569.

Fekete, S., Schappler, J., Veuthey, J.L., Guillarme, D. (2014). Current and future trends in UHPLC, *TrAC Trends in Anal Chemistry*, 63: 2-13.

Ferrari Júnior, E., Caldas E. D. (2022). Determination of new psychoactive substances and other drugs in postmortem blood and urine by UHPLC-MS/MS: method validation and analysis of forensic samples. *Forensic Toxicol* 40(1): 88-101.

Fiedorowicz, J. G., Swartz, K. L. (2004). The role of monoamine oxidase inhibitors in current psychiatric practice. *J Psychiatr Pract* 10(4): 239-248.

Fisher, D. S., Partridge, S. J., Handley, S. A., Couchman, L., Morgan, P. E., Flanagan R. J. (2013). LC-MS/MS of some atypical antipsychotics in human plasma, serum, oral fluid and haemolysed whole blood. *Forensic Sci Int* 229(1-3): 145-150.

Flanagan, J.R., Taylor, A., Watson, I.A., Whelpton, R. (2007). *Fundamentals of Analytical Toxicology*. John Wiley & Sons, Ltd. (2.2.2.1): 23-27.

Fleckenstein, A. E., Gibb, J. W., Hanson, G. R. (2000). Differential effects of stimulants on monoaminergic transporters: pharmacological consequences and implications for neurotoxicity. *Eur J Pharmacol* 406(1): 1-13.

Florou, D., Boumba V. A. (2021). Hair analysis for New Psychoactive Substances (NPS): Still far from becoming the tool to study NPS spread in the community? *Toxicol Rep* 8: 1699-1720.

Florou, D., Vlachou, T., Sakkas, V., Boumba V. (2022). Application of Fabric Phase Sorptive Extraction (FPSE) Engaged to Tandem LC-MS/MS for Quantification of Bupropion in Oral Fluid. *J Xenobiot* 12(4): 356-364.

Fogarty, M. F., Mohr, A. L. A., Papsun, D. M., Logan B. K. (2022). Analysis of the Illicit Opioid U-48800 and Related Compounds by LC-MS-MS and Case Series of Fatalities Involving U-48800. *J Anal Toxicol* 46(1): 17-24.

Fogarty, M. F., Papsun, D. M., Logan, B. K. (2018). Analysis of Fentanyl and 18 Novel Fentanyl Analogs and Metabolites by LC-MS-MS, and report of Fatalities Associated with Methoxyacetylfentanyl and Cyclopropylfentanyl. *J Anal Toxicol* 42(9): 592-604.

Fontanals, N., Borrull, F., Marce, R.M. (2023). *Advances in Sample Preparation*, 5, 100050

Fornal, E., Stachniuk A., Wojtyła, A. (2013). LC-Q/TOF mass spectrometry data driven identification and spectroscopic characterisation of a new 3,4-methylenedioxy-N-benzyl cathinone (BMDP). *J Pharm Biomed Anal* 72: 139-144.

Frost, J., Løkken, T. N., Brede, W. R., Hegstad, S., Nordrum, I. S., Slørdal L. (2015). A validated method for simultaneous determination of codeine, codeine-6-glucuronide, norcodeine, morphine, morphine-3-glucuronide and morphine-6-glucuronide in post-mortem blood, vitreous fluid, muscle, fat and brain tissue by LC-MS. *J Anal Toxicol* 39(3): 203-212.

Garcia, L., Tiscione, N. B., Yeatman, D. T., Richards-Waugh, L. (2021). Novel and Nonroutine Benzodiazepines and Suvorexant by LC-MS-MS. *J Anal Toxicol* 45(5): 462-474.

Gardner, E. A., McGrath, S. A., Dowling, D., Bai D. (2022). The Opioid Crisis: Prevalence and Markets of Opioids. *Forensic Sci Rev* 34(1): 43-70.

Garside, D., Hargrove, R. L., Winecker R. E. (2009). Concentration of oxycodone in postmortem fluids and tissue. *J Anal Toxicol* 33(3): 121-128.

Gaspar, H., Bronze, S., Oliveira, C., Victor, B.L., Machuqueiro, M., Pacheco, R., Caldeira M.J., Santos S. (2018). Proactive response to tackle the threat of emerging drugs: Synthesis and toxicity evaluation of new cathinones. *Forensic Sci Int* 290: 146-156.

Gergov, M., Nokua, P., Vuori, E., Ojanperä, I. (2009). Simultaneous screening and quantification of 25 opioid drugs in post-mortem blood and urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Forensic Sci Int* 186(1-3): 36-43.

Gerostamoulos, D., Beyer, J., Staikos, V., Tayler, P., Woodford, N., Drummer, O. H. (2012). The effect of the postmortem interval on the redistribution of drugs: a comparison of mortuary admission and autopsy blood specimens. *Forensic Sci Med Pathol* 8(4): 373-379.

Gillman, P. K. (2007). Tricyclic antidepressant pharmacology and therapeutic drug interactions updated. *Br J Pharmacol* 151(6): 737-748.

Giorgetti, A., Barone, R., Pelletti, G., Garagnani, M., Pascali, J., Haschimi, B., Auwärter V. (2022). Development and validation of a rapid LC-MS/MS method for the detection of 182 novel psychoactive substances in whole blood. *Drug Test Anal* 14(2): 202-223.

Giraudeau, P. (2017). Challenges and perspectives in quantitative NMR. *Magn Reson Chem* 55(1): 61-69.

Glennon, R. A. (1994). Classical hallucinogens: an introductory overview. *NIDA Res Monogr* 146: 4-32.

Glennon, R. A., Ismaiel, A. E., Martin, B., Poff D., M. Sutton. (1988). A preliminary behavioral investigation of PMMA, the 4-methoxy analog of methamphetamine. *Pharmacol Biochem Behav* 31(1): 9-13.

Gouma, V., Pournara A. D., Manos M. J., Giokas D. L. (2022). Fabric phase sorptive extraction and passive sampling of ultraviolet filters from natural waters using a zirconium metal organic framework-cotton composite. *J Chromatogr A* 1670: 462945.

Grabnauer, M., Moore, K. N., Bynum, N. D., White, R. M., Mitchell, J. M., Hayes E. D., Flegel, R. (2018). Development of a Quantitative LC-MS-MS Assay for Codeine, Morphine, 6-Acetylmorphine, Hydrocodone, Hydromorphone, Oxycodone and Oxymorphone in Neat Oral Fluid. *J Anal Toxicol* 42(6): 392-399.

Grafinger, K. E., Wilde, M., Otte, L., Auwärter, V. (2021). Pharmacological and metabolic characterization of the novel synthetic opioid brophine and its detection in routine casework. *Forensic Sci Int* 327: 110989.

Greene, S. L., Kerr F., Braitberg, G. (2008). Review article: amphetamines and related drugs of abuse. *Emerg Med Australas* 20(5): 391-402.

Guillarme, D., Dong, M.W. (2013). Newer developments in HPLC impacting pharmaceutical analysis: a brief review, *American Pharm Review*, 16: 38-43.

Gülle, S., Ulusoy, H.I., Kabir, A., Tartaglia, A., Furton, K.G., Locatelli, M., Samanidou, V. (2019). Application of a fabric phase sorptive extraction-high performance liquid chromatography-photodiode array detection method for the trace determination of methyl paraben, propyl paraben and butyl paraben in cosmetic and environmental samples. *Analytical Methods*. 11(48).

Hanson, J.E. (2013). NMR Spectroscopy in Nondeuterated Solvents (No-D NMR): Applications in the Undergraduate Organic Laboratory. NMR Spectroscopy in the Undergraduate Curriculum, ACS Symposium Series, Chapter 5pp 1128, 69-81

Hardman, J.G., Limbird, L.E., Goodman Gilman. (1996). Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics, 9th ed. New York

Hartmann, C., Smeyers-Verbeke, J., Massart, D. L., McDowall, R. D. (1998). Validation of bioanalytical chromatographic methods. J Pharm Biomed Anal 17(2): 193-218.

Hartmann F. (1896). The life of Philippus Theophrastus Bombast of Hohenheim, known by the name of Paracelsus: and the substance of his teachings concerning cosmology, anthropology, pneumatology, magic and sorcery, medicine, alchemy and astrology, philosophy and theosophy. 2. London: Kegan Paul, Trench, Trübner, & Co. Ltd; revised and enlarged

Hassan, Z., Bosch, O. G., Singh, D., Narayanan, S., Kasinather, B. V., Seifritz, E., Kornhuber, J., Quednow, B. B., Müller C. P. (2017). Novel Psychoactive Substances-Recent Progress on Neuropharmacological Mechanisms of Action for Selected Drugs. Front Psychiatry 8: 152.

Hayes, R. G. (2009). High resolution NMR theory and chemical applications, 2nd edition (Becker, Edwin D.). J of Chemical Educ, 58(7), A226.

Hesse, M., Meier, H., Zeeh, B. (2002). Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie Georg Thieme Verlag, 6th Edition (reviewed), ISBN 3-13-576106-1

Hirsh A.J., Zhang, J., Zamurs, A., Fleege, J., Thelin, W.R., Caldwell, R.A., Sabater, J.R., Abraham, W.M., Donowitz, M., Cha, B., Jphnson, K.B., George, J.A., Johnson, M.R., Boucher, R.C. (April 2008). Pharmacological properties of N-(3,5-diamino-6-chloropyrazine-2-carbonyl)-N'-4-[4-(2,3-dihydroxypropoxy)phenyl]butyl-guanidine methanesulfonate (552-02), a novel epithelial sodium channel blocker with potential clinical efficacy for cystic fibrosis lung disease. J. Pharmacol. Exp. Ther. 325 (1): 77-88

HOFMANN, A. (1959). Psychotomimetic drugs; chemical and pharmacological aspects. Acta Physiol Pharmacol Neerl 8: 240-258.

Howlett, A. C., Barth, F., Bonner, T. I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W. A., Felder, C. C., Herkenham, M., Mackie, K., Martin, B. R., Mechoulam, R., Pertwee, R. G. (2002). International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. Pharmacol Rev 54(2): 161-202.

Huang, H. H., Bai Y. M. (2011). Persistent psychosis after ingestion of a single tablet of '2C-B'. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 35(1): 293-294.

Humphrey, S.P., Williamson, R.T. (2001). A review of saliva : Normal composition, flow, and function. 85(2).

Ifeagwu, S. C., Raithelhuber, M., Crean, C., Gerostamoulos, D., Chung H., Tettey J. N. (2017). Toxicology in international drug control-Prioritizing the most harmful, persistent and prevalent substances. Forensic Sci Int 274: 2-6.

Ishida, T., Kudo, K., Hayashida M., Ikeda N. (2009). Rapid and quantitative screening method for 43 benzodiazepines and their metabolites, zolpidem and zopiclone in human plasma by liquid chromatography/mass spectrometry with a small particle column. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 877(25): 2652-2657.

James, P. A., Oparil, S., Carter, B. L., Cushman, W. C., Dennison-Himmelfarb, C., Handler, J., Lackland, D. T., LeFevre, M. L., MacKenzie, T. D., Ogedegbe, O., Smith, L. S. C., Svetkey, P., Taler, S. J., Townsend, R. R., Wright, J. T., Narva, A. S., Ortiz, E. (2014). Evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults: report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). *JAMA* 311(5): 507-520.

Jang, M., Chang, H., Yang, W., Choi, H., Kim, E., Yu, B.H., Oh, Y., Chung H.(2013). Development of an LC-MS/MS method for the simultaneous determination of 25 benzodiazepines and zolpidem in oral fluid and its application to authentic samples from regular drug users. *J Pharm Biomed Anal* 74: 213-222.

Janssen, P.A.J. (1967). Derivatives of Benzimidazolyl Piperidine. U.S. Patent 3,318,900

Jiang, B., Zhang, Y., Guo, T., Zhao, H., Jin Y. (2018). Structural Characterization of Lignin and Lignin-Carbohydrate Complex (LCC) from Ginkgo Shells. *Polymers (Basel)*10(7).

Jiang, L., Zheng, R., Zeng, N., Wu, C., Su, H. (2023). Self-assembly of amphiphilic dextran micelles and superparamagnetic iron oxide nanoparticle-loading as magnetic resonance imaging contrast agents. *Regen Biomater* 10: rbac096.

Jiménez-Holgado, C., Chrimatopoulos, C., Stathopoulos, V., Sakkas, V. (2020). Investigating the Utility of Fabric Phase Sorptive Extraction and HPLC-UV-Vis/DAD to Determine Antidepressant Drugs in Environmental Aqueous Samples. *Separations*, 7, 39.

Johannessen, S. I., Battino, D., Berry, D. J., Bialer, M., Krämer, G., Tomson, T., Patsalos, P. N. (2003). Therapeutic drug monitoring of the newer antiepileptic drugs. *Ther Drug Monit* 25(3): 347-363.

Jones, C. M., Einstein, E. B., Compton, W. M. (2018). Changes in Synthetic Opioid Involvement in Drug Overdose Deaths in the United States, 2010-2016. *JAMA* 319(17): 1819-1821.

Juhascik, M., Habel, S., Barron, W., Behonick, G. (2006). Validation of an ELISA method for screening methadone in postmortem blood. *J Anal Toxicol* 30(8): 617-620.

Kabir, A., Furton, K.G. (2014). Fabric Phase Sorptive Extractor (FPSE).

Kabir, A., Furton, K. G., Malik, A. (2013). Innovations in sol-gel microextraction phases for solvent-free sample preparation in analytical chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 45, 197–218.

Kabir, A., Mesa, R., Jurmain, J., Furton, K. G. (2017). Fabric phase sorptive extraction explained. *Separations*, 4(2).

Kabir, A., Samanidou, V. (2021). Fabric phase sorptive extraction: A paradigm shift approach in analytical and bioanalytical sample preparation. *Molecules*, 26(4).

Kalaboka, M., Chrimatopoulos, C., Jimenez-Holgado, C., Boti, V., Sakkas, V., Albanis, T. (2020). Exploring the Efficiency of UHPLC-Orbitrap MS for the Determination of 20 Pharmaceuticals and Acesulfame K in Hospital and Urban Wastewaters with the Aid of FPSE. *Separations*, 7(3),46

Kalix, P. (1990). Pharmacological properties of the stimulant khat. *Pharmacol Ther* 48(3): 397-416.

Karch, S.B. (2015). Cathinone neurotoxicity (“The 3Ms”). *Current Neuropharmacology* 13(1):21–25.

Karila, L., Marillier, M., Chaumette, B., Billieux, J., Franchitto, N., Benyamina, A. (2019). New synthetic opioids: Part of a new addiction landscape. *Neurosci Biobehav Rev*106: 133-140.

Kazantzi, V., Anthemidis, A. (2017). Fabric sol–gel phase sorptive extraction technique: A review. *Separations*, 4(2).

Kebarle, P., Verkerk, U. H. (2009). Electrospray: from ions in solution to ions in the gas phase, what we know now. *Mass Spectrom Rev* 28(6): 898-917.

Kennedy, N. M., Schmid, C. L., Ross, N. C., Lovell, K. M., Yue, Z., Chen, Y. T., Cameron, M. D., Bohn, L. M., Bannister, T. D. (2018). Optimization of a Series of Mu Opioid Receptor (MOR) Agonists with High G Protein Signaling Bias. *J Med Chem* 61(19): 8895-8907.

Ketola, R., Kriikku, P. (2019). Drug concentrations in post-mortem specimens. *Drug Test Anal.* 11(9):1338-1357

Kim, H.B., Myung, S.K., Park, Y.C., Park, B. (2017). Use of benzodiazepine and risk of cancer: A meta-analysis of observational studies. *International Journal of Cancer*, 140 (3): 513–525).

Knittel, J. L., Clay, D. J., Bailey, K. M., Gebhardt, M. A., Kraner, J. C. (2009). Comparison of oxycodone in vitreous humor and blood using EMIT screening and gas chromatographic-mass spectrometric quantitation. *J Anal Toxicol* 33(8): 433-438.

Krotulski, A. J., Papsun, D. M., Noble, C., Kacinko, S. L., Logan, B. K. (2021). Brorphine- Investigation and quantitation of a new potent synthetic opioid in forensic toxicology casework using liquid chromatography-mass spectrometry. *J Forensic Sci* 66(2): 664-676.

Kule, M., Kagawa, M. M. (2023). Adherence to Typical Antipsychotics among Patients with Schizophrenia in Uganda: A Cross-Sectional Study. *Schizophr Res Treatment*2023: 7035893.

Kuropka, P., Zawadzki, M., Szpot, P. (2023). A narrative review of the neuropharmacology of synthetic cathinones-Popular alternatives to classical drugs of abuse. *Hum Psychopharmacol* 38(3): e2866.

Kyle, P.B. (2017). Toxicology: GCMS. Chapter 7. Mass Spectrometry for the Clinical Laboratory, Elsevier Inc. 131-163.

Laloup, M., Ramirez Fernandez, M. e. M., De Boeck, G., Wood, M., Maes, V., Samyn, N.(2005). Validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of 26 benzodiazepines and metabolites, zolpidem and zopiclone, in blood, urine, and hair. *J Anal Toxicol* 29(7): 616-626.

Lamond Laboratory. (2023). Available online: <http://www.lamondlab.com/MSResource/images/lcms/ESI.jpg>

Langel, K., Gjerde, Z., Favretto, D., Lillsunde, P., Øiestad, E.L., Ferrara, S.D.G., Verstraete, A.G. (2013). Comparison of drug concentrations between whole blood and oral fluid. *Drug Test. Analysis*, vol 6, pp 461–471.

Lau, T., Concheiro, M., Cooper, G. (2020). Determination of 30 Synthetic Cathinones in Postmortem Blood Using LC-MS-MS. *J Anal Toxicol* 44(7): 679-687.

Lee, H., Park, Y., Jo, J., In, S., Kim, E., Pyo, J., Choe, S. (2015). Analysis of benzodiazepines and their metabolites using DBS cards and LC-MS/MS. *Forensic Sci Int* 255: 137-145.

Lehmann, S., Kieliba, T., Beike, J., Thevis, M., Mercer-Chalmers-Bender, K. (2017). Determination of 74 new psychoactive substances in serum using automated in-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 1064: 124-138.

Lesne, E., Muñoz-Bartual, M., Esteve-Turrillas, F. A. (2023). Determination of synthetic hallucinogens in oral fluids by microextraction by packed sorbent and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 415(17): 3607-3617.

Lerch, O. (2021). Determining Psychoactive Drugs in Blood Plasma and Serum Using Automated SPE–LC–MS/MS. *LCGC INTERNATIONAL*, 17, 05

Li, X. J., Yi, E.C., Kemp, C.J., Zhang, H., Aebersold, R. (2005). A software suite for the generation and comparison of peptide arrays from sets of data collected by liquid chromatography-mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 4(9): 1328-1340.

López-Muñoz, F., Ucha-Udabe, R., Alamo, C. (2005). The history of barbiturates a century after their clinical introduction. *Neuropsychiatr Dis Treat* 1(4): 329-343.

Lowry, J., Truver, M.T., Swortwood, M.J. (2018). Quantification of seven novel synthetic opioids in blood using LC–MS/MS. *Forensic Toxicology*, 37(1).

Maas, A., Wippich, C., Madea, B., Hess, C. (2015). Driving under the influence of synthetic phenethylamines: a case series. *Int J Legal Med* 129(5): 997-1003.

Mahadik, P., Senthilkumar G.P., Powar Amol S., Devprakash D., Mani T. Tamizh, Gavali Sulbha A. (2012). Chemical and Biological Properties of Benzodiazepines-An overview. *Research J of Pharm and Technol* 5(2), 181-189

Mandrioli, R., Mercolini, L., Lateana, D., Boncompagni, G., Raggi, M. A. (2011). Analysis of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in human plasma, urine and saliva by MEPS-LC-UV. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 879(2): 167-173.

Manousi, N., Alampanos, V., Ferracane, A., Efstratiadis, G., Kabir, A., Furton, K. G., Tranchida, P.Q., Zachariadis, G. A., Mondello, L., Rosenberg, E., Samanidou, V. F. (2022). Magnet integrated fabric phase sorptive extraction as a stand-alone extraction device for the monitoring of benzoyl urea insecticides in water samples by HPLC-DAD. *J Chromatogr A* 1672: 463026.

Manousi, N., Tzanavaras, P. D., Zacharis, C. K. (2020). Bioanalytical HPLC Applications of In-Tube Solid Phase Microextraction: A Two-Decade Overview. *Molecules* 25(9).

Mao, C. L., Zientek, K. D., Colahan, P. T., Kuo, M. Y., Liu, C. H., Lee, K. M., Chou, C. C. (2006). Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for fentanyl and applications of fentanyl antibody-coated nanoparticles for sample preparation. *J Pharm Biomed Anal* 41(4): 1332-1341.

Marin, S. J., Coles, R., Merrell, M., McMillin, G. A. (2008). Quantitation of benzodiazepines in urine, serum, plasma, and meconium by LC-MS-MS. *J Anal Toxicol* 32(7): 491-498.

Mashayekhi, H. A., Khalilian, F. (2016). Development of Solid-Phase Extraction Coupled with Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Method for the Simultaneous Determination of Three Benzodiazepines in Human Urine and Plasma. *J Chromatogr Sci* 54(6): 1068-1073.

Mastrovito, R. A., Papsun, D. M., Logan, B. K. (2021). The Development and Validation of a Novel Designer Benzodiazepines Panel by LC-MS-MS. *J Anal Toxicol* 45(5): 423-428.

Mata, D. C., Davis, J. F., Figueroa, A. K., Stanford, M. J. (2016). Ultra-Performance Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry for the Quantitation of Seventeen Sedative Hypnotics in Six Common Toxicological Matrices. *J Anal Toxicol* 40(1): 58-63.

McLuckey, S. A., Wells, J. M. (2001). Mass analysis at the advent of the 21st century. *Chem Rev* 101(2): 571-606.

Meader, N., Mdege, N., McCambridge, J. (2018). The public health evidence-base on novel psychoactive substance use: scoping review with narrative synthesis of selected bodies of evidence. *J Public Health (Oxf)* 40(3): e303-e319.

Mehr, S. H. M., Tang, A.W., Laing, R. R. (2023). Automated qualitative and quantitative analysis of complex forensic drug samples using. *Magn Reson Chem* 61(2): 95-105.

Michaelis, A.F., Cornish, D.W., Vivilecchia R. (1973). High Pressure Liquid Chromatography. *J of Pharm Sci.* 62, 9, 1399-1416

Mohamed, H. M. (2021). Solventless Microextraction Techniques for Pharmaceutical Analysis: The Greener Solution. *Front Chem* 9: 785830.

Mohammadnezhad, M., Thomas, A., Kabir, R. (2020). Determinants and Prevention Strategies of Substance Abuse in Pacific Countries: A Systematic Review. *Oman Med J* 35(5): e187.

Mohr, A. L., Friscia, M., Papsun, D., Kacinko, S. L., Buzby, D., Logan, B. K. (2016). Analysis of Novel Synthetic Opioids U-47700, U-50488 and Furanyl Fentanyl by LC-MS/MS in Postmortem Casework. *J Anal Toxicol* 40(9): 709-717.

Moldoveanu, S. C. (2024). Comparison of several HPLC methods for the analysis of vitamin C. *Biomed Chromatogr* 38(1): e5753.

Moldoveanu, S., David V., (2015). The role of sample preparation. *Modern sample prep for chromatogr*, 33-49

Montenarh, D., Hopf, M., Maurer, H. H., Schmidt, P., Ewald, A. H. (2014). Detection and quantification of benzodiazepines and Z-drugs in human whole blood, plasma, and serum samples as part of a comprehensive multi-analyte LC-MS/MS approach. *Anal Bioanal Chem* 406(3): 803-818.

Montenarh, D., Hopf, M., Maurer, H. H., Schmidt, P., Ewald, A. H. (2016). "Development and validation of a multi-analyte LC-MS/MS approach for quantification of neuroleptics in whole blood, plasma, and serum." *Drug Test Anal* 8(10): 1080-1089.

Montenarh, D., Wernet, M. P., Hopf, M., Maurer, H. H., Schmidt, P. H., Ewald, A. H. (2014). Quantification of 33 antidepressants by LC-MS/MS--comparative validation in whole blood, plasma, and serum. *Anal Bioanal Chem* 406(24): 5939-5953.

Montesano, C., Simeoni, M. C., Curini, R., Sergi, M., Lo Sterzo, C., Compagnone, D. (2015). Determination of illicit drugs and metabolites in oral fluid by microextraction on packed sorbent coupled with LC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem* 407(13): 3647-3658.

Montesano, C., Vannutelli, G., Piccirilli, V., Sergi, M., Compagnone, D., Curini, R. (2017). Application of a rapid μ -SPE clean-up for multiclass quantitative analysis of sixteen new psychoactive substances in whole blood by LC-MS/MS. *Talanta* 167: 260-267.

Moore, C., Coulter, C., Crompton, K., Zumwalt, M. (2007). Determination of benzodiazepines in oral fluid using LC-MS-MS. *J Anal Toxicol* 31(9): 596-600.

Mörlein, S., Schuster, C., Paal, M., Vogeser, M. (2020). Collision energy-breakdown curves - An additional tool to characterize MS/MS methods. *Clin Mass Spectrom* 18: 48-53.

Mueller, C. A., Weinmann, W., Dresen, S., Schreiber, A., Gergov, M. (2005). Development of a multi-target screening analysis for 301 drugs using a QTrap liquid chromatography/tandem mass spectrometry system and automated library searching. *Rapid Commun Mass Spectrom* 19(10): 1332-1338.

Musshoff, F., Trafkowski, J., Kuepper, U., Madea, B. (2006). An automated and fully validated LC-MS/MS procedure for the simultaneous determination of 11 opioids used in palliative care, with 5 of their metabolites. *J Mass Spectrom* 41(5): 633-640.

Navazesh, M. (1993). Methods for Collecting Saliva. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 694(1 Saliva as a D), 72–77.

Negrusz A, Cooper G, Clarke's Forensic Toxicology, Second Edition, 2013, Pharmaceutical Press, London.

Nichols, D. E. (1986). Differences between the mechanism of action of MDMA, MBDB, and the classic hallucinogens. Identification of a new therapeutic class: entactogens. *J Psychoactive Drugs* 18(4): 305-313.

Niessen, W. M. (2011). Fragmentation of toxicologically relevant drugs in positive-ion liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* 30(4): 626-663.

O'Donnell, C., Woodford, N. (2008). "Post-mortem radiology--a new sub-speciality?". *Clin Radiol.* 63 (11): 1189–94.

Odoardi, S., Fisichella, M., Romolo, F. S., Strano-Rossi, S. (2015). High-throughput screening for new psychoactive substances (NPS) in whole blood by DLLME extraction and UHPLC-MS/MS analysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 1000: 57-68.

Orfanidis, A., Gika, H. G., Theodoridis, G., Mastrogianni, O., Raikos, N. (2021). A UHPLC-MS-MS Method for the Determination of 84 Drugs of Abuse and Pharmaceuticals in Blood. *J Anal Toxicol* 45(1): 28-43.

Palmquist, K. B., Swortwood, M. J. (2020). Quantification of Furanylfentanyl and its Metabolites in Human and Rat Plasma Using LC-MS-MS. *J Anal Toxicol* 44(6): 589-595.

Papoutsis, I., Khraiwesh, A., Nikolaou, P., Pistos, C., Spiliopoulou, C., Athanaselis, S. (2012). A fully validated method for the simultaneous determination of 11 antidepressant drugs in whole blood by gas chromatography-mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 70: 557-562.

Papsun, D., Krywaczyk, A., Vose, J. C., Bundock, E. A., Logan, B. K. (2016). Analysis of MT-45, a Novel Synthetic Opioid, in Human Whole Blood by LC-MS-MS and its Identification in a Drug-Related Death. *J Anal Toxicol* 40(4): 313-317.

Pardo, B., Taylor, J., Caulkins, J., Reuter, P., Kilmer, B. (2021). The dawn of a new synthetic opioid era: the need for innovative interventions. *Addiction* 116(6): 1304-1312.

Parcher, J.F., Wang, M., Chittiboyina, A.G., Khan, I.A. (2017). In-source collision-induced dissociation (IS-CID): Applications, issues and structure elucidation with single-stage mass analyzers. *Drug Testing and Analysis* 10, 1, 28-36

Park, D., Choi, H., Jang, M., Chang, H., Woo, S., Yang, W. (2018). Simultaneous determination of 18 psychoactive agents and 6 metabolites in plasma using LC-MS/MS and application to actual plasma samples from prescription candidates. *Forensic Sci Int* 288: 283-290.

Passe, T. J., Charles, H.C., Rajagopalan, P., Krishnan, K. R. (1995). Nuclear magnetic resonance spectroscopy: a review of neuropsychiatric applications. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 19(4): 541-563.

Patteet, L., Maudens, K. E., Sabbe, B., Morrens, M., De Doncker, M, Neels, H. (2014). High throughput identification and quantification of 16 antipsychotics and 8 major metabolites in serum using ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta* 429: 51-58.

Peacock, A., Bruno, R., Gisev, N., Degenhardt, L., Hall, W., Sedefov, R., White, J., Thomas, K.V., Farrell, M., Griffiths, P. (2019). New psychoactive substances: challenges for drug surveillance, control, and public health responses. *Lancet* 394(10209): 1668-1684.

Penninkilampi, R., Eslick, G.D. (2018). A Systematic Review and Meta-Analysis of the Risk of Dementia Associated with Benzodiazepine Use, After Controlling for Protopathic Bias. *CNS Drugs* 32(6): 485-497.

Pertwee, R. G. (2006). Cannabinoid pharmacology: the first 66 years. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1(Suppl 1): S163-171.

Peters, F.T., Hartung, M., Herbold, M., Schmitt, G., Daldrup, T., Musshoff, F. (2004). Anlage zu den Richtlinien der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen, Anhang C: Anforderungen an die Durchführung von Analysen, 1. Validierung, *Toxichem. Krimtech.* 71, 146–154.

Pintaske, J., Müller-Bierl, B., Schick, F. (2006). Geometry and extension of signal voids in MR images induced by aggregations of magnetically labelled cells. *Phys Med Biol* 51(18): 4707-4718.

Pounder, D. J., Jones, G.R. (1990). Post-mortem drug redistribution--a toxicological nightmare. *Forensic Sci Int* 45(3): 253-263.

Prioreschi, P., Heaney, R.P., Brehm, E. (1998). A quantitative assessment of ancient therapeutics: poppy and pain in the Hippocratic Corpus. *Med Hypotheses* 51(4): 325-331.

Prosser, J. M., Nelson, L. S. (2012). The toxicology of bath salts: a review of synthetic cathinones. *J Med Toxicol* 8(1): 33-42.

Prosser, R. S., Alonzi, N. A. (2023). Discerning conformational dynamics and binding kinetics of GPCRs by ¹⁹F NMR. *Curr Opin Pharmacol* 72: 102377.

Racamonde, I., Rodil, R., Quintana, J.B., Sieira, B.J., Kabir, A., Furton, K.G., Cela, R. (2015). Fabric phase sorptive extraction: a new sorptive microextraction technique for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs from environmental water samples. *Anal Chim Acta* 865: 22-30.

Razinger, G., Grenc, D., Pezdir, T., Kranvogel, R., Brvar, M. (2021). Severe rhabdomyolysis and acute kidney failure due to synthetic opioid bromphine exposure in combination with chronic sertraline therapy. *Eur J Clin Pharmacol* 77(11): 1759-1761.

Rees, K. A., McLaughlin, P. A., Osselton, M. D. (2012). Validation of a gas chromatography-ion trap-tandem mass spectrometry assay for the simultaneous quantification of cocaine, benzoylecgonine, cocaethylene, morphine, codeine, and 6-acetylmorphine in aqueous solution, blood, and skeletal muscle tissue. *J Anal Toxicol* 36(1): 1-11.

Remane, D., Meyer, M. R., Peters, F. T., Wissenbach, D. K., Maurer, H. H. (2010). Fast and simple procedure for liquid-liquid extraction of 136 analytes from different drug classes for development of a liquid chromatographic-tandem mass spectrometric quantification method in human blood plasma. *Anal Bioanal Chem* 397(6): 2303-2314.

Remane, D., Meyer, M. R., Wissenbach, D. K., Maurer, H. H. (2011). Ultra high performance liquid chromatographic-tandem mass spectrometric multi-analyte procedure for target screening and quantification in human blood plasma: validation and application for 31 neuroleptics, 28 benzodiazepines, and Z-drugs. *Anal Bioanal Chem* 401(4): 1341-1352.

Rocchi, R., Simeoni, M. C., Montesano, C., Vannutelli, G., Curini, R., Sergi, M., Compagnone, D. (2018). Analysis of new psychoactive substances in oral fluids by means of microextraction by packed sorbent followed by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug Test Anal* 10(5): 865-873.

Rodrigues, T. B., Morais, D. R., Gianvecchio, V. A. P., Aquino, E. M., Cunha, R. L., Huestis, M. A., Costa, J. L. (2021). Development and Validation of a Method for Quantification of 28 Psychotropic Drugs in Postmortem Blood Samples by Modified Micro-QuEChERS and LC-MS-MS. *J Anal Toxicol* 45(7): 644-656.

Roldán-Pijuán, M., Lucena, R., Cárdenas, S., Valcárcel, M., Kabir, A., Furton, K. G. (2015). Stir fabric phase sorptive extraction for the determination of triazine herbicides in environmental waters by liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1376: 35-45.

Rositano, J., Harpas, P., Kostakis, C., Scott, T. (2016). Supported liquid extraction (SLE) for the analysis of methylamphetamine, methylenedioxymethylamphetamine and delta-9-tetrahydrocannabinol in oral fluid and blood of drivers. *Forensic Sci Int* 265: 125-130.

Rossi, D. T., Hoffman, K. L., Janiczek-Dolphin, N., Bockbrader, H., Parker, T. D. (1997). Tandem-in-time mass spectrometry as a quantitative bioanalytical tool. *Anal Chem* 69(22): 4519-4523.

Ruan, X., Xing, L., Peng, J., Li, S., Yong, Y., Sun, Q. (2020). A simplified fabric phase sorptive extraction method for the determination of amphetamine drugs in water samples using liquid chromatography-mass spectrometry. *RSC Adv* 10(18): 10854-10866.

Saar, E., Gerostamoulos, D., Drummer, O. H., Beyer, J. (2010). Identification and quantification of 30 antipsychotics in blood using LC-MS/MS. *J Mass Spectrom* 45(8): 915-925.

Saini, S.S., Kabir, A., Rao, A.L.J., Malik, A.K., Furton, K.G. (2017). A Novel Protocol to Monitor Trace Levels of Selected Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Environmental Water Using Fabric Phase Sorptive Extraction Followed by High Performance Liquid Chromatography-Fluorescence Detection. *Separations*. 4 (2), 22

Samaranayake, L. (2007). Saliva as a diagnostic fluid. *International Dental Journal*, 57(5), 295-299.

Santos, J.S., Escher, G.B., da Silva Pereira, J.M., Marinho, M.T., do Prado-Silva, L., Sant'Ana, A.S., Dutra, L.M., Baeison, A., Granato, D. (2018). ¹H NMR combined with

chemometrics tools for rapid characterization of edible oils and their biological properties. *Industr Crops and Prod*, 116, 191-200

Santana-Viera, S., Guedes-Alonso, R., Sosa-Ferrera, Z., Santana-Rodríguez, J.J., Kabir, A., Furton, K.G. (2017). Optimization and application of fabric phase sorptive extraction coupled to ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for the determination of cytostatic drug residues in environmental waters. *J Chromatogr A* 1529: 39-49.

Santarelli, L., Saxe, M., Gross, C., Surget, A., Battaglia, F., Dulawa, S., Weisstaub, N., Lee, J., Duman, R., Arancio, O., Belzung, C., Hen, R. (2003). Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 301(5634): 805-809.

Sarker, S.D., Nahar, L. (2015). Chapter 19 - Applications of High Performance Liquid Chromatography in the Analysis of Herbal Products. *Evidence-Based Validation of Herbal Medicine*, 405-425

Sauve, E. N., Langødegård, M., Ekeberg, D., Øiestad, A. M. (2012). Determination of benzodiazepines in ante-mortem and post-mortem whole blood by solid-supported liquid-liquid extraction and UPLC-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 883-884: 177-188.

Schifano, F., Orsolini, L., Duccio Papanti, G., Corkery, J.M. (2015). Novel psychoactive substances of interest for psychiatry. *World Psychiat* 14(1): 15-26.

Schmitz, A. (2016). Benzodiazepine use, misuse, and abuse: A review. *Ment Health Clin* 6(3): 120-126.

Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX). Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology. *J. Anal. Toxicol.* 2013, 37, 452–474.

Sciex (2019). SCIEX Triple Quad™ 5500+ System System User Guide. Available online: <https://sciex.jp/content/dam/SCIEX/pdf/customer-docs/user-guide/5500plus-system-user-guide-en.pdf>

Sciex (2018). The Scheduled MRMTM Algorithm Pro. Available online: <https://sciex.com/content/dam/SCIEX/pdf/tech-notes/all/Scheduled-MRM-Pro-Overview-RUO-MKT-02-8539-A.pdf>

Schneider, B. B., Douglas, D.J., Chen, D. D. (2001). Ion fragmentation in an electrospray ionization mass spectrometer interface with different gases. *Rapid Commun Mass Spectrom* 15(4): 249-257.

Seely, K. A., Patton, A.L., Moran, C.L., Womack, M.L., Prather, P.L., Fantegrossi, W.E., Radominska-Pandya, A., Endres, G.W., Channell, K.B., Smith, N.H., McCain, K.R., James, L.P., Moran, J.H. (2013). Forensic investigation of K2, Spice, and "bath salt" commercial preparations: a three-year study of new designer drug products containing synthetic cannabinoid, stimulant, and hallucinogenic compounds. *Forensic Sci Int* 233(1-3): 416-422.

Seither, J. Z., Reidy, L.J., Boland, D. M. (2020). Identification and Quantification of 5-Fluoro ADB and the 5-Fluoro ADB Ester Hydrolysis Metabolite in Postmortem Blood Samples by LC-MS/MS. *J Anal Toxicol* 44(2): 133-139.

Sempio, C., Morini, L., Vignali, C., Groppi, A. (2014). Simple and sensitive screening and quantitative determination of 88 psychoactive drugs and their metabolites in blood through LC-MS/MS: application on postmortem samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 970: 1-7.

Sessa, B., Aday, J. S., O'Brien, S., Curran, H. V., Measham, F., Higbed, L., Nutt, D.J. (2022). Debunking the myth of 'Blue Mondays': No evidence of affect drop after taking clinical MDMA. *J Psychopharmacol* 36(3): 360-367.

Shah, V. P., Midha, K. K., Findlay, J. W., Hill, H. M., Hulse, J. D., McGilveray, I. J., McKay, G., Miller, K. J., Patnaik, R. N., Powell, M. L., Tonelli, A., Viswanathan, C.T., Yacobi, A. (2000). Bioanalytical method validation--a revisit with a decade of progress. *Pharm Res* 17(12): 1551-1557.

Simmler, L. D., T. A. Buser, M. Donzelli, Y. Schramm, L. H. Dieu, J. Huwyler, S. Chaboz, M. C. Hoener, Liechti, M. E. (2013). Pharmacological characterization of designer cathinones in vitro. *Br J Pharmacol* 168(2): 458-470.

Simmler, L. D., Rickli, A., Schramm, Y., Hoener, M. C., Liechti, M. E. (2014). Pharmacological profiles of aminoindanes, piperazines, and pipradrol derivatives. *Biochem Pharmacol* 88(2): 237-244.

Singh, K., Senatorov, I. S., Cheshmehkani, A., Karmokar, P. F., Moniri, N. H. (2022). The Skeletal Muscle Relaxer Cyclobenzaprine Is a Potent Non-Competitive Antagonist of Histamine H1 Receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 380(3): 202-209.

Singh, S., Roy, R. (2016). The application of absolute quantitative ¹H NMR spectroscopy in drug discovery and development. *Expert Opin Drug Discov* 11(7): 695-706.

Skoog, D.A., Holler, J.F., Croouch, S.R. (2007). —Αεριοχρωματογραφία, in *Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης*, 6th ed., Εκδόσεις Κωσταράκη, pp. 903–934.

Skoog, D.A., Holler, J.F., Croouch, S.R. (2007). —Υγροχρωματογραφία, in *Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης*, 6th ed., Εκδόσεις Κωσταράκη, pp. 935–979.

Skoog, D.A., Holler, J.F., Croouch, S.R. (2007). —Φασματοσκοπία μοριακών μαζών, in *Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης*, 6th ed., Εκδόσεις Κωσταράκη, pp. 624-666

Skoog, D.A., Holler, J.F., Croouch, S.R. (2007). —Φασματομετρία Ατομικών Μαζών, in *Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης*, 6th ed., Εκδόσεις Κωσταράκη, pp. 322–347.

Skopp, G. (2004). Preanalytic aspects in postmortem toxicology. *Forensic Sci Int* 142(2-3): 75-100.

Smith, C. R., Truver, M. T., Swortwood, M. J. (2019). Quantification of U-47700 and its metabolites in plasma by LC-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 1112: 41-47.

Smith, K., Johnson-Davis, K. L., Shahrokh K. (2023). A New Broad-Spectrum Drug Screen for 127 Analytes by LC-MS/MS. *J Appl Lab Med* 8(2): 240-250.

Sorribes-Soriano, A., Valencia, A., Esteve-Turrillas, F. A., Armenta, S., Herrero-Martínez, J. M. (2019). Development of pipette tip-based poly(methacrylic acid-co-ethylene glycol dimethacrylate) monolith for the extraction of drugs of abuse from oral fluid samples. *Talanta* 205: 120158.

Spiller, H.A., Ryan, M.L., Weston, R.G., Jansen, J. (2011). Clinical experience with and analytical confirmation of “bath salts” and “legal highs” (synthetic cathinones) in the United States. *Clin Toxicol (Phila)* 49(6):499–505).

Stauffer, E., Dolan, J.A., Newman, R. (2008). Gas Chromatography and Gas Chromatography—Mass Spectrometry. *Fire Debris Analysis*, 235–293.

Steuer, A. E., Poetzsch, M., Koenig, M., Tingelhoff, E., Staeheli, S. N., Roemmelt, A. T., Kraemer, T. (2015). Comparison of conventional liquid chromatography-tandem mass spectrometry versus microflow liquid chromatography-tandem mass spectrometry within the framework of full method validation for simultaneous quantification of 40 antidepressants and neuroleptics in whole blood. *J Chromatogr A* 1381: 87-100.

Strayer, K. E., Antonides, H. M., Juhascik, M. P., Daniulaityte, R., Sizemore, I. E. (2018). LC-MS/MS-Based Method for the Multiplex Detection of 24 Fentanyl Analogues and Metabolites in Whole Blood at Sub ng mL. *ACS Omega* 3(1): 514-523.

Szczepaniak, A., Machelak, W., Fichna, J., Zielińska, M. (2022). The role of kappa opioid receptors in immune system - An overview. *Eur J Pharmacol* 933: 175214.

Takitane, J., Leyton, V., Andreuccetti, G., Gjerde, H., Vindenes, V., Berg, T. (2018). Determination of cocaine, metabolites and a crack cocaine biomarker in whole blood by liquid-liquid extraction and UHPLC-MS/MS. *Forensic Sci Int* 289: 165-174.

Tamama, K. (2021). Advances in drugs of abuse testing. *Clin Chim Acta* 514: 40-47.

Tancer, M. E., Johanson, C.E. (2001). The subjective effects of MDMA and mCPP in moderate MDMA users. *Drug Alcohol Depend* 65(1): 97-101.

Tang, Y. Q., Weng, N. (2013). Salting-out assisted liquid-liquid extraction for bioanalysis. *Bioanalysis* 5(12): 1583-1598.

Tartaglia, A., Kabir, A., D'Ambrosio, F., Ramundo, P., Ulusoy, S., Ulusoy, H. I., Merone, G. M., Savini, F., D'Ovidio, C., Grazia, U., Furton, K. G., Locatelli, M. (2020). Fast off-line FPSE-HPLC-PDA determination of six NSAIDs in saliva samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 1144: 122082.

Taylor, S., Paluszek, M. M., Rachor, G. S., McKay, D., Asmundson, G.J.G. (2021). Substance use and abuse, COVID-19-related distress, and disregard for social distancing: A network analysis. *Addict Behav* 114: 106754.

"The Misuse of Drugs Act 1971 (Amendment) Order 2017". [Legislation.gov.uk](https://www.legislation.gov.uk).

Trana, A. D., Mannocchi, G., Pirani, F., Maida, N., Gottardi, M., Pichini, S., Busardò, F. P. (2020). A Comprehensive HPLC-MS-MS Screening Method for 77 New Psychoactive Substances, 24 Classic Drugs and 18 Related Metabolites in Blood, Urine and Oral Fluid. *J Anal Toxicol* 44(8): 769-783.

Ujváry, I., Christie, R., Evans-Brown, M., Gallegos, A., Jorge, R., de Moraes, J., Sedefov, R. (2021). DARK Classics in Chemical Neuroscience: Etonitazene and Related Benzimidazoles. *ACS Chem Neurosci* 12(7): 1072-1092.

Ulusoy, H., Köseoğlu, K., Kabir, A., Ulusoy, S., Locatelli, M. (2020). Fabric phase sorptive extraction followed by HPLC-PDA detection for the monitoring of pirimicarb and fenitrothion pesticide residues. *Mikrochim Acta* 187(6): 337.

United Nations Office on Drugs and Crime. (2021). Share of NPS Stimulants and Synthetic Cannabinoids Remains Stable While Opioids Continue to Increase. <https://www.unodc.org/LSS/Announcement/Details/d45a4db1-4f64-447e-818c-35ce7a2e2278>.

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

Vaiano, F., Busardò, F.P., Palumbo, D., Kyriakou, C., Fioravanti, A., Catalani, V., Mari, F., Bertol, E. (2016). A novel screening method for 64 new psychoactive substances and 5 amphetamines in blood by LC-MS/MS and application to real cases. *J Pharm Biomed Anal* 129: 441-449.

Vaiano, F., Bertol, E., Mineo, M., Pietrosemoli, L., Rubicondo, J., Supuran, C.T., Carta, F. (2021). Development of a New LC-MS/MS Screening Method for Detection of 120 NPS and 43 Drugs in Blood. *Separations*, 8(11), 221

Valen, A., Leere Øiestad, Å., Strand, D. H., Skari, R., Berg, T. (2017). Determination of 21 drugs in oral fluid using fully automated supported liquid extraction and UHPLC-MS/MS. *Drug Test Anal* 9(5): 808-823.

Van der Schoot, J., Ariens, E. J., van Rossum, J., Hurkmans, J. A. (1962). Phenylisopropylamine derivatives, structure and action. *Arzneimittelforschung* 12: 902-907.

Van Lemmen, M., Florian, J., Li, Z., Van Velzen, M., Van Dorp, E., Niesters, M., Sarton, E., Olofsen E., Van ser Schrier, R., Strauss, D.G., Dahan, A. (2023). Opioid Overdose: Limitations in Naloxone Reversal of Respiratory Depression and Prevention of Cardiac Arrest: Erratum. *Anesthesiology* 139(6): 920.

Vandeputte, M. M., Krotulski, A. J., Papsun, D. M., Logan, B. K., Stove, C. P. (2021). The Rise and Fall of Isotonitazene and Brorphine: Two Recent Stars in the Synthetic Opioid Firmament. *J Anal Toxicol.* 46,2 115-121

Verougstraete, N., Vandeputte, M. M., Lyphout, C., Cannart, A., Hulpia, F., Van Calenbergh, S., Verstraete, A. G., Stove, C. (2021). First Report on Brorphine: The Next Opioid on the Deadly New Psychoactive Substance Horizon? *J Anal Toxicol* 44(9): 937-946.

Verplaetse, R., Cuypers, E., Tytgat, J. (2012). The evaluation of the applicability of a high pH mobile phase in ultrahigh performance liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of benzodiazepines and benzodiazepine-like hypnotics in urine and blood. *J Chromatogr A* 1249: 147-154.

Verplaetse, R., Henion, J. (2016). Quantitative determination of opioids in whole blood using fully automated dried blood spot desorption coupled to on-line SPE-LC-MS/MS. *Drug Test Anal* 8(1): 30-38.

Verplaetse, R., Tytgat, J. (2010). Development and validation of a sensitive ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the analysis of fentanyl and its major metabolite norfentanyl in urine and whole blood in forensic context. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 878(22): 1987-1996.

Vohra, V., King, A. M., Jacobs, E., Aaron, C. (2021). Death associated with brorphine, an emerging novel synthetic opioid. *Clin Toxicol (Phila)* 59(9): 851-852.

Volkow, N. D., Blanco, C. (2021). The changing opioid crisis: development, challenges and opportunities. *Mol Psychiatry* 26(1): 218-233.

Vollenweider, F. X., Kometer, M. (2010). The neurobiology of psychedelic drugs: implications for the treatment of mood disorders. *Nat Rev Neurosci* 11(9): 642-651.

Wang, C. (2015). The Ionization Technology of LC-MS, Advantages of APPI on Detection of PPCPs and Hormones, *Austin Chromatogr* 2(2), 1-3

Warrick, B. J., Hill, M., Hekman, K., Christensen, R., Goetz, R., Casavant, M.J., Wahl, M., Mowry, J.B., Spiller, H., Anderson, D., Aleguas, A., Gummin, D., Thomas, R., Nezelek, C., Smolinske, S. (2013). A 9-state analysis of designer stimulant, "bath salt," hospital visits reported to poison control centers. *Ann Emerg Med* 62(3): 244-251.

Wei, Y., Yang, C., Jiang, H., Li, Q., Che, F., Wan, S., Yao, S., Gao, F., Zhang, T., Wang, J., Song, B. (2022). Multi-nuclear magnetic resonance spectroscopy: state of the art and future directions. *Insights Imaging* 13(1): 135.

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

WHO. World Health Organization (2024). World Health Organization recommends five NPS for scheduling. Retrieved January 22, 2024.

Winstock, A., Mitcheson, L., Ramsey, J., Davies, S., Puchnarewicz, M., Marsden, J. (2011). Mephedrone: use, subjective effects and health risks. *Addiction* 106(11): 1991-1996.

Wikipedia (free encyclopedia). (2023). Liquid Chromatography. Available online: https://en.wikipedia.org/wiki/Liquid_chromatography%E2%80%93mass_spectrometry

Wohlfarth, A., Toepfner, N. Hermanns-Clausen, M., Auwärter, V. (2011). Sensitive quantification of clozapine and its main metabolites norclozapine and clozapine-N-oxide in serum and urine using LC-MS/MS after simple liquid-liquid extraction work-up. *Anal Bioanal Chem* 400(3): 737-746.

Wohlfarth, A., Weinmann, W., Dresen, S. (2010). LC-MS/MS screening method for designer amphetamines, tryptamines, and piperazines in serum. *Anal Bioanal Chem* 396(7): 2403-2414.

Wood, J. N., Boorman, J. (2005). Voltage-gated sodium channel blockers; target validation and therapeutic potential. *Curr Top Med Chem* 5(6): 529-537.

Xie, Z., Miller G. M. (2009). Trace amine-associated receptor 1 as a monoaminergic modulator in brain. *Biochem Pharmacol* 78(9): 1095-1104.

Xiong, C., Ruan, J., Cai, Y., Tang, Y. (2009). Extraction and determination of some psychotropic drugs in urine samples using dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal* 49(2): 572-578.

Xu, Z., Liu, C., Zhao, S., Chen, S., Zhao, Y. (2019). Molecular Sensors for NMR-Based Detection. *Chem Rev* 119(1): 195-230.

Yarema, M. C., Becker, C. E. (2005). Key concepts in postmortem drug redistribution. *Clin Toxicol (Phila)* 43(4): 235-241.

Zaami, S., Marinelli, E., Vari, M.R., (2020). New Trends of Substance Abuse During COVID-19 Pandemic: An International Perspective. *Front Psychiatry* 11: 700.

Zamponi, G. W., Sui, X., Coddling, P. W., French, R. J. (1993). Dual actions of procainamide on batrachotoxin-activated sodium channels: open channel block and prevention of inactivation. *Biophys J* 65(6): 2324-2334.

Zancanaro, I., Limberger, R.P., Bohel, P.O., dos Santos, M.K., De Boni, R.B., Pechansky, F., Caldas, E.D. (2012). Prescription and illicit psychoactive drugs in oral fluid--LC-MS/MS method development and analysis of samples from Brazilian drivers. *Forensic Sci Int* 223(1-3): 208-216.

Zawilska, J. B., Adamowicz, P., Kurpeta, M., Wojcieszak, J. (2023). Non-fentanyl new synthetic opioids - An update. *Forensic Sci Int* 349: 111775.

Zawilska, J. B., Wojcieszak, J. (2019). An expanding world of new psychoactive substances--designer benzodiazepines. *Neurotoxicology* 73: 8-16.

Zhang, G., Terry, A. V., Bartlett, M. G. (2008). Bioanalytical methods for the determination of antipsychotic drugs. *Biomed Chromatogr* 22(7): 671-687.

Zhang, X., Lin, Z., Li, J., Huang, Z., Rao, Y., Liang, H., Yan, J., Zheng F. (2017). Rapid determination of nine barbiturates in human whole blood by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug Test Anal* 9(4): 588-595.

Ziavrou, K. S., Noguera, S., Boumba, V. A. (2022). Trends in counterfeit drugs and pharmaceuticals before and during COVID-19 pandemic. *Forensic Sci Int* 338: 111382.

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

Zuvela, P., Skoczylas, M., Liu, J.J., Baczek, T., Kaliszan, R., Wah Wong, M., Buszewski, B., Heberger, K. (2019). Column Characterization and Selection Systems in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *CHEMICAL REVIEWS*. 119, 6, 3674-3729

Θεοδωρίδης, Γ., Γηρούση, Σ., Ζαχαριάδης Γ., Ζώτου, Α., & Σαμανίδου, Β. (2015α). Τεχνικές Προκατεργασίας Βιολογικών Δειγμάτων στη Βιοαναλυτική Χημεία. *Κάλλιπος, Ανοικτές Ακαδημαϊκές Εκδόσεις*, σσ. 77-93.

Θεοδωρίδης, Γ., Γηρούση, Σ., Ζαχαριάδης Γ., Ζώτου, Α., & Σαμανίδου, Β. (2015β). Φασματομετρία μάζας, Βιοαναλυτική Χημεία. *Κάλλιπος, Ανοικτές Ακαδημαϊκές Εκδόσεις*, σσ 203-215.

Σπηλιοπούλου Χ., (2006): “Πανεπιστημιακές Σημειώσεις”, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών.

Κουτσελίνης ΑΣ, Ιατροδικαστική Ε Έκδοση, 2002, Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου, Αθήνα.

Μπούμπα ΒΑ, Σημειώσεις στη Δικαστική Τοξικολογία, 2006, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.

Στράτης, Γ. Ζαχαριάδης, Β. Σαμανίδου, Γ. Θεοδωρίδης. Ειδικές Μέθοδοι Διαχωρισμού και Χημικής Ανάλυσης. Εκδόσεις ΖΗΤΗ. Θεσσαλονίκη 2004.

Χατζηϊωάννου ΘΠ, Κουμπάρης ΜΑ, Ενόργανη Ανάλυση, 2005, Πανεπιστημίου Αθηνών, Αθήνα.

