



Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας  
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών



Εργαστήριο Χημείας, Βιοχημείας, Κοσμητολογίας

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

## Μέθοδοι προσδιορισμού παραισθησιογόνων και εξαρτησιογόνων ουσιών σε κλινικά δείγματα και σε δείγματα τροφίμων

GRADUATE THESIS

## Methods for the determination of hallucinogenic and addictive substances in clinical samples and food samples



ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ/NAME OF STUDENT

**Τσαπρούνη Δέσποινα - Ιωάννα**

Tsaprouni Despoina - Ioanna

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR

**Τράπαλη Μαρία**

Trapali Maria

ΑΙΓΑΛΕΩ/AIGALEO 2021



Faculty of Health and Caring Professions  
Department of Biomedical Sciences



Laboratory of Chemistry, Biochemistry, Cosmetology

GRADUATE THESIS

**Methods for the determination of hallucinogenic and addictive substances in clinical samples and food samples**

NAME OF STUDENT

**Tsaprouni Despoina – Ioanna**

**op17029**

**despoinatsaprouni@hotmail.com**

FIRST SUPERVISOR

**Trapali Maria**

SECOND SUPERVISOR

**Foutzoula Christina**

THIRD SUPERVISOR

**Karkalousos Petros**

AIGALEO 2021



Δήλωση συγγραφέα προπτυχιακής διπλωματικής εργασίας

Η κάτωθι υπογεγραμμένη **Τσαπρούνη Δέσποινα Ιωάννα** του **Ιωάννη**, με αριθμό μητρώου **ορ17029** φοιτήτρια του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής/διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Όνομα φοιτήτριας

**Τσαπρούνη Δέσποινα – Ιωάννα**

Υπογραφή φοιτητή

## Ευχαριστίες

Ολοκληρώνοντας τη διπλωματική μου εργασία, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε όσους συνέβαλλαν στην εκπόνηση της.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπων καθηγήτρια μου Τράπαλη Μαρία, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε να αναπτύξω το συγκεκριμένο θέμα καθώς και την πολύ καλή καθοδήγηση της που με βοήθησε να ολοκληρώσω την εργασία μου.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την αδερφή μου, τους φίλους μου και τον σύντροφό μου για τη στήριξη, τη συμπαράσταση και την κατανόησή που μου έδειχναν, καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Αφιερώνεται στον σύντροφο μου Γιώργο,  
που με βοήθησε να πιστέψω στον εαυτό μου  
και να γίνω το άτομο που είμαι σήμερα.

## Περίληψη

Οι παραισθησιογόνες και εξαρτησιογόνες ουσίες αποτελούν ουσίες που χρησιμοποιούνται από την αρχαιότητα μέχρι και σήμερα. Οι ουσίες αυτές ελκύουν το άτομο σε πολλαπλές χρήσεις και συγχρόνως μπορεί να του προκαλέσουν παραισθήσεις και σε μεγάλες δοσολογίες ενδέχεται να επέλθει ακόμη και ο θάνατος. Οι ουσίες αυτές χωρίζονται σε 7 βασικές κατηγορίες. Συνήθως αναφέρονται με τον όρο ναρκωτικές ουσίες καθώς περιλαμβάνονται ουσίες όπως η ηρωΐνη, η κοκαΐνη, το LSD κ.α.. Ωστόσο υπάρχουν εξαρτησιογόνα που καταναλώνονται μέσα από τα τρόφιμα. Κάποια από αυτά είναι η μυριστικήνη, η καφεΐνη, ακόμη και η ινδική κάνναβη έχει εισαχθεί σε πολλά φαγώσιμα σκευάσματα. Ο εργαστηριακός προσδιορισμός τους είναι μείζονος σημασίας, καθώς και δίνει τη δυνατότητα μελέτης της ουσίας αυτής. Επιπλέον μπορεί να ανιχνευτεί σε κλινικά δείγματα και σε δείγματα τροφίμων καλύπτοντας νομικές περιπτώσεις, όπως για παράδειγμα την διαλεύκανση μιας εγκληματικής ενέργειας ή ακόμη και την επεξήγηση ενός θανάτου. Η πιο συνήθης μέθοδος προσδιορισμού των παραισθησιογόνων και εξαρτησιογόνων ουσιών είναι η HPLC. Επιπλέον, χρησιμοποιούνται και άλλες τεχνικές όπως η τριχοειδής χρωματογραφία και η ηλεκτροφόρηση. Τέλος, έχουν γίνει προσπάθειες διερεύνησης των ουσιών αυτών και σε εναλλακτικά δείγματα, όπως δείγματα μαλλιών, σιέλου και ιδρώτα. Η προσπάθεια διερεύνησης νέων μεθόδων ανάλυσης των εξαρτησιογόνων και παραισθησιογόνων ουσιών, έχει δώσει πολύ θετικά αποτελέσματα στον επιστημονικό χώρο, προσπαθώντας την ανάπτυξη ταχύτερων, οικονομικότερων και πιο αξιόπιστων μεθόδων ανάλυσης. Η συνεχής επιστημονική εξέλιξη ενδέχεται να κατορθώσει να φθάσει στο σημείο οι αναλύσεις αυτές να αποτελούν αναλύσεις ρουτίνας για το εργαστήριο. Αν και με το πέρασμα των χρόνων οι μέθοδοι προσδιορισμού των εξαρτησιογόνων και παραισθησιογόνων ουσιών έχουν βελτιωθεί αρκετά, η HPLC παραμένει μια γρήγορη και αξιόπιστη επιλογή. Η χρήση εναλλακτικών δειγμάτων, επιτρέπει να ανοιχτούν νέοι ορίζοντες που αφορούν την διερεύνηση των ουσιών αυτών και να δώσουν λύση σε πολλές αιτίες ατυχημάτων ή ακόμη και θανάτων.

Λέξεις κλειδιά: παραισθησιογόνα, εξαρτησιογόνα, διερεύνηση, HPLC, τριχοειδής χρωματογραφία, ηλεκτροφόρηση

## Abstract

Hallucinogenic and addictive substances are substances that have been used since antiquity until today. These substances attract the person to multiple uses and at the same time can cause hallucinations and in large doses may even lead to death. These substances are divided into 7 main categories. They are usually referred to as drugs as they include substances such as heroin, cocaine, LSD, etc. However, there are addictive's that are consumed through food. Some of these are myristicin, caffeine and even cannabis has been introduced into many edible formulations. Their laboratory determination is of major importance, as well as enables the study of this substance. In addition, it can be detected in clinical specimens and food samples covering legal cases, such as the elucidation of a criminal act or even the explanation of a death. The most common method of determining hallucinogenic and addictive substances is HPLC. In addition, other techniques such as capillary chromatography and electrophoresis are used. Finally, efforts have been made to investigate these substances in alternative samples, such as hair, saliva and sweat samples. The effort to explore new methods of analysis of addictive and hallucinogenic substances, has given very positive results in the scientific field, trying to develop faster, more economical and more reliable methods of analysis. Continuous scientific development may go so far as to make these analyzes routine for the laboratory. Although over time the methods for determining addictive and hallucinogenic substances have improved considerably, HPLC remains a fast and reliable option. The use of alternative samples allows to open new horizons for the investigation of these substances and to provide a solution to many causes of accidents or even death.

Key words: hallucinogens, addictive substances, investigation, HPLC, capillary chromatography, electrophoresis



Περιεχόμενα	
<b>Δήλωση συγγραφέα προπτυχιακής διπλωματικής εργασίας</b> .....	<b>iv</b>
<b>Ευχαριστίες</b> .....	<b>v</b>
<b>Περίληψη</b> .....	<b>vii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>viii</b>
<b>Συνομογραφίες</b> .....	<b>xi</b>
<b>Κεφάλαιο 1. Παραισθησιογόνα - Εξαρτησιογόνα</b> .....	<b>3</b>
1.1 Γενικά για τις παραισθησιογόνες και εξαρτησιογόνες ουσίες .....	3
1.2 Ιστορική αναδρομή .....	5
<b>Κεφάλαιο 2. Οπιοειδή</b> .....	<b>6</b>
2.1 Ηρωίνη.....	6
2.2 Μορφίνη .....	7
2.3 Μέθοδοι προσδιορισμού ηρωίνης και μορφίνης .....	9
<b>Κεφάλαιο 3. Διεγερτικά του ΚΝΣ</b> .....	<b>15</b>
3.1 Κοκαΐνη.....	15
3.2 Αμφεταμίνες .....	17
3.3 Μέθοδοι προσδιορισμού κοκαΐνης και αμφεταμινών .....	19
<b>Κεφάλαιο 4. Παραισθησιογόνα ή ψυχεδελικά</b> .....	<b>26</b>
4.1 LSD .....	26
4.2 MDMA .....	28
4.3 Μέθοδοι προσδιορισμού LSD και MDMA .....	30
<b>Κεφάλαιο 5. Κατασταλτικά του ΚΝΣ</b> .....	<b>37</b>
5.1 Βαρβιτουρικά.....	37
5.2 Αλκοόλ .....	38
5.3 Μέθοδοι προσδιορισμού βαρβιτουρικών και αλκοόλ.....	40
<b>Κεφάλαιο 6. Ινδική κάνναβη</b> .....	<b>48</b>

6.1 Μαριχουάνα/ Χασίς.....	48
6.2 Μέθοδοι προσδιορισμού μαριχουάνας/ χασίς.....	50
<b>Κεφάλαιο 7. Εισπνεόμενα.....</b>	<b>54</b>
7.1 Αιθάνιο, πεντάνιο, ισοπροπένιο.....	54
7.2 Μέθοδοι προσδιορισμού αιθάνιου, πεντάνιου, ισοπροπένιου .....	56
<b>Κεφάλαιο 8. Αντικαταθληπτικά.....</b>	<b>60</b>
8.1 Βενζοδιαζεπίνες .....	60
8.2 Μέθοδοι προσδιορισμού των βενζοδιαζεπινών.....	62
<b>Κεφάλαιο 9. Εξαρτησιογόνα σε τρόφιμα.....</b>	<b>67</b>
9.1 Μυριστικήνη .....	67
9.2 Καφεΐνη .....	69
9.3 Μέθοδοι προσδιορισμού μυριστικήςνης και καφεΐνης.....	70
<b>Αναφορές.....</b>	<b>80</b>

## Συντομογραφίες

	Αγγλική ορολογία		Ελληνική ορολογία
ΚΝΣ	Central Nervous System		Κεντρικό Νευρικό Σύστημα
HPLC	High-performance chromatography	liquid	Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης
NPHPLC	Normal-phase HPLC		HPLC κανονική φάσης
RPHPLC	Reverse Phase HPLC		HPLC αντίστροφης φάσης
MDMA	Methylenedioxyamphetamine		μεθυλαινοδιοξυμεθαμφεταμίνη
INN	Diacetylmorphine		διακετυλομορφίνη
COC	Cocaine		Κοκαΐνη
LSD	Lysergic acid diethylamide		Διαιθυλαμίδιο του λυσεργικού οξέος
FDA	Food and Drug Administration		Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων
GC	Gas chromatography		αέρια χρωματογραφία
MS	Mass spectrometry		φασματογράφος μάζας
CE	Cross-entropy		τριχοειδή ηλεκτροφόρηση
RP-HPLC	Reverse phase high performance liquid chromatography		υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης
ICV	Intracerebroventricular		ενδοεγκεφαλο-τριχοειδή
IT	intrathecal		ενδορραχιαία
CBG	Cannabigerol		κανναβιγκερόλη
CBD	Cannabidiol		κανναβιδιόλη
THCA	tetrahydrocannabinolic acid		Δ9 -τετραϋδροκανναβινολικό οξύ
6MA	6-methyladenine		6-ακετυλομορφίνη
LOD	limit of detection		Όριο ανίχνευσης
CV	Curriculum Vitae		Ορθότητα
IA	immunoassay		ανοσοδοκιμασία
RIA	Radioimmunoassay		ραδιοανοσοδοκιμασία
CE	Capillary electrophoresis		τριχοειδής ηλεκτροφόρηση
CZE	Capillary zone electrophoresis		ηλεκτροφόρηση τριχοειδών ζωνών

MECC	Micellar electrokinetic capillary chromatography	μικροκυτταρική ηλεκτροκινητική τριχοειδή χρωματογραφία
CIEF	Capillary isoelectric focusing	τριχοειδή ισοηλεκτρική εστίαση
CGE	Capillary gel electrophoresis	τριχοειδές τζελ ηλεκτροφόρηση
CITP	Capillary isotachopheresis	τριχοειδής ισοταφοφόρηση
CEC	Competing Enantioselective Conversion	τριχοειδή ηλεκτροχρωματογραφία
6-MAM	6-monoacetylmorphine	6-μονοαιθυλομορφίνης
MLC	Micellar liquid chromatography	μικροκυτταρική υγρή χρωματογραφία
CF	cystic fibrosis	κυστική ίνωση
NO	Nitric oxide	Νιτρικό οξύ
UPLC	Ultra-Performance liquid chromatography	Υγρή χρωματογραφία υπερ-υψηλής απόδοσης
LC-DED	Liquid chromatography -direct energy deposition	ανίχνευση διπλού ηλεκτροδίου υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης
CFVE	carbon fibre veil electrode	ηλεκτρόδιο από ίνες άνθρακα
TLC	Thin layer chromatography	χρωματογραφία λεπτής στιβάδας
LSIMS	Liquid secondary ion mass spectrometry	φασματομετρία μάζας δευτερεύοντος ιόντος υγρού
ECD	Electron-capture dissociation	Ανιχνευτής δέσμευσης ηλεκτρονίων
EI	Electron ionization	ιονισμό ηλεκτρονικής πρόσκρουσης
PCI	Positive-Ion Chemical	θετικός χημικός ιονισμός
NCI	Negative-Ion Chemical	Αρνητικός χημικός ιονισμός
CZE	Capillary zone electrophoresis	Ηλεκτροφόρηση τριχοειδών ζωνών
CIEF	Capillary isoelectric focusing	τριχοειδής ισοηλεκτρική εστίαση
CGE	<u>Capillary gel electrophoresis</u>	ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς πηκτής
CITP	Capillary isotachopheresis	τριχοειδής ισοταφοφόρηση
MECC	micellar electrokinetic	μικροκυτταρική ηλεκτροκινητική

	capillary chromatography	τριχοειδής χρωματογραφία
CEC	Capillary electrochromatography	τριχοειδής ηλεκτροχρωματογραφία
CE	Capillary electrophoresis	Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση
SLE	Solid-liquid extraction	εκχύλιση στερεού υγρού
SD	Hydro Distillation	απόσταξη ατμού
PLE	Pressurized liquid extraction	εξαγωγή υγρού υπό πίεση
SPE	Solid-phase extraction	διαδικασία εκχύλισης στερεάς φάσης
MASE ή USE	Utilization Saturation and Errors	εξαγωγή με διαλύτες με μικροκύματα ή υπερήχους
APCI	atmospheric pressure chemical ionization	χημικός ιονισμός σε ατμοσφαιρική πίεση
ESI	Electrospray Ionization	Ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό
SPME	Solid phase microextraction	μικροεξαγωγή στερεάς φάσης
FID	flame ionization detector	ανίχνευση ιονισμού φλόγας
HEX	hexosaminidase	εξωζαμιδάση
AABA	$\alpha$ -amino-n-butyric acid	$\alpha$ -αμινο- $\nu$ - βουτυρικό οξύ
MCV	Mean corpuscular volume	μέσος όγκος ερυθρών

## Πρόλογος

Στη παρούσα διπλωματική εργασία αναλύονται οι παραισθησιογόνες και εξαρτησιογόνες ουσίες και ο εργαστηριακός προσδιορισμός τους. Η χρήση τους έχει ξεκινήσει από τους αρχαίους πολιτισμούς και συνεχίζεται ακόμη και σήμερα. Οι ουσίες αυτές χωρίζονται στις εξής κατηγορίες: τα οπιοειδή, τα διεγερτικά του ΚΝΣ, τα παραισθησιογόνα ή ψυχεδελικά, τα κατασταλτικά του ΚΝΣ, τα αντικαταθλιπτικά, η ινδική κάνναβη και τα εισπνεόμενα. Η κάθε μια κατηγορία από αυτές περιλαμβάνει πληθώρα ουσιών. Γίνεται ανάλυση των σημαντικότερων ουσιών που είναι ευρέως διαδεδομένες (Nichols D. , 2004).

Τα οπιοειδή αποτελούν μια κατηγορία εξαρτησιογόνων και παραισθησιογόνων ουσιών. Η κατηγορία αυτή χωρίζεται σε πέντε υποκατηγορίες. Οι υποκατηγορίες είναι οι εξής: φυσικά οπιούχα (μορφίνη, κωδεΐνη, θηβαΐνη), ημισυνθετικά οπιοειδή (ηρωίνη, υδροκωδόνη, υδρομορφόνη κ.α.), πλήρως συνθετικά οπιοειδή (πεθιδίνη, μεθαδόνη κ.α.), ενδογενή οπιοειδή πεπτίδια (ενδορφίνες, εγκεφαλίνες) και κάποια φάρμακα (tramadol, tapentadol). Από τα παραπάνω ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στην ηρωίνη και στην μορφίνη και αναλύονται οι μέθοδοι προσδιορισμού τους. Τα διεγερτικά του ΚΝΣ περιλαμβάνουν ουσίες όπως η κοκαΐνη και οι αμφεταμίνες. Ο προσδιορισμός τους γίνεται με βάση βιολογικά δείγματα, όπως τα ούρα, το αίμα, τα μαλλιά, τη σίελο κ.α.. Στις παραισθησιογόνες ουσίες ή ψυχεδελικά περιλαμβάνονται: η έκσταση (MDMA), το LSD, η μεσκαλίνη κ.α.. Γίνεται αναφορά στην έκσταση και στο LSD. Στα κατασταλτικά του ΚΝΣ αναλύονται τα βαρβιτουρικά και το αλκοόλ. Το αλκοόλ είναι το πιο σύνηθες εξαρτησιογόνο που εντοπίζεται σε όλες τις κοινωνικές τάξεις και σε μεγάλο φάσμα ηλικιών. Τα βαρβιτουρικά έχουν παρόμοια χρήση με τις βενζοδιαζεπίνες και η ιδιότητα τους είναι να καταστέλλουν το νευρικό σύστημα. Οι βενζοδιαζεπίνες είναι μια κατηγορία φαρμάκων που χρησιμοποιούνται σαν ηρεμιστικά καθώς έχουν υπνωτικές, ηρεμιστικές και αγχολυτικές δράσεις. Η μακροχρόνια χρήση τους προκαλεί εξάρτηση και έχει δυσμενείς επιπτώσεις για την υγεία των χρηστών. Η Ινδική κάνναβη περιλαμβάνει τη μαριχουάνα και το χασίς. Τα τελευταία χρόνια γίνεται μια προσπάθεια νομιμοποίησης της, σε πολλές χώρες που ήταν παράνομη, όπως στην Ελλάδα, ώστε να χρησιμοποιείται για φαρμακευτικούς σκοπούς. Η κάνναβη μπορεί να ανιχνευτεί είτε σε κλινικά δείγματα, είτε σε δείγματα τροφίμων, καθώς και μπορεί να καταναλωθεί σε διάφορα βρώσιμα είδη όπως το κέικ, οι σοκολάτες και το τσάι. Τέλος τα εισπνεόμενα αποτελούν μια

κατηγορία εξαρτησιογόνων ουσιών που περιλαμβάνει ουσίες όπως η βενζίνη, οι βαφές μαλλιών, τα σπρέι, το χλωροφόρμιο, ο διαιθυλαιθέρας, το χλωριούχο αιθύλιο, το υποξείδιο του αζώτου, το αιθάνιο και το αιθυλένιο. Η κυριότερη μέθοδος προσδιορισμού που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των παραπάνω ουσιών είναι η HPLC.

Όσον αφορά τα τρόφιμα εκτός από την ινδική κάνναβη παραισθησιογόνα ουσία είναι και η μυριστική που αποτελεί το βασικό συστατικό του μοσχοκάρυδου (L. Dawidowicz & P. Dybowski, 2012). Ένα άλλο σύννηθες εξαρτησιογόνο είναι η καφεΐνη που εντοπίζεται σε διάφορα ροφήματα όπως ο καφές, το τσάι, αλλά και σε γλυκά όπως το tiramisu. Τα ποτά που περιέχουν καφεΐνη, καταναλώνονται ευρύτερα στον κόσμο για αυτό και είναι μείζονος σημασίας η ανάπτυξη των μεθόδων προσδιορισμού τους, που θα συμβάλουν συγχρόνως και στη μελέτη της δομής και των επιπτώσεών της (Sereshti & Samadi, 2014).

## Κεφάλαιο 1. Παραισθησιογόνα - Εξαρτησιογόνα

### 1.1 Γενικά για τις παραισθησιογόνες και εξαρτησιογόνες ουσίες

Οι παραισθησιογόνες ουσίες μπορούν να χωριστούν σε δυο κατηγορίες. Τις τρυπταμίνες και τις φαιναιθυλαμίνες. Αποτελούν ουσίες που διαθέτουν την ικανότητα να μεταβάλλουν έντονα την αντίληψη, τη διάθεση και μια σειρά γνωστικών διαδικασιών. Οι ουσίες αυτές θεωρούνται ασφαλείς και δεν φαίνεται να παρουσιάζουν εθισμό ή εξάρτηση. Παρόλο που δεν φαίνεται να προκαλούν σωματική εξάρτηση έχει αποδειχθεί ότι είναι πιθανό να προκαλέσουν ψυχική εξάρτηση. Ο όρος παραισθησιογόνα, αρχικά χρησιμοποιήθηκε για να περιγράψει τις ουσίες εκείνες που προκαλούσαν στον άνθρωπο παραισθήσεις και τον έφερναν αντιμέτωπο με μη υπαρκτές καταστάσεις. Ωστόσο είναι γεγονός ότι η λήψη τους σε μικρές δόσεις δεν φαίνεται να επιφέρει αυτά τα αποτελέσματα. Μπορούμε να τα συναντήσουμε και με άλλες ονομασίες όπως ψυχοκινητικά και ψυχεδελικά. Η επικρατέστερη όμως ονομασία στη βιβλιογραφία είναι παραισθησιογόνα. Μια άλλη ονομασία που έχει δει αυξανόμενη χρήση είναι το «*entheogen*». Ο όρος αυτός προέρχεται από την αρχαία ελληνική λέξη «*entheos*» που σημαίνει «*θεός μέσα*». Η χρήση αυτού του όρου φαίνεται να παρουσιάζει τη δυνατότητα εύρεσης μιας θεϊκής οντότητας μέσα στους χρήστες της, έπειτα από την κατανάλωση τους. Η έντονη χρήση των παραισθησιογόνων ουσιών μπορεί να μεταβάλει απότομα και δραματικά τη συνείδηση και σε υψηλές δόσεις μπορεί να προκαλέσει παραλήρημα, απώλεια επαφής με την πραγματικότητα, ψευδαισθήσεις και σε ακραίες περιπτώσεις ακόμη και θάνατο. Σαν ουσίες δεν φαίνεται να απασχολούν ιδιαίτερα την επιστημονική κοινότητα. Έπειτα από μελέτη τους βρέθηκε πως δεν είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν σαν θεραπευτικά φάρμακα. Εκτός από την επιστημονική κοινότητα, χαμηλό ενδιαφέρον φαίνεται να παρουσιάζει και η κοινωνία. Μεγάλο ποσοστό των ανθρώπων σήμερα δεν γνωρίζει σχεδόν τίποτα για τα παραισθησιογόνα εκτός από το γεγονός ότι περιλαμβάνουν είδη ναρκωτικών και η χρήση τους νομικά είναι μη επιτρεπτή (Nichols D. , 2004).



Τα παραισθησιογόνα μπορούν να προκαλέσουν:

- *Προβλήματα στην αντίληψη:* Ο χρήστης παρουσιάζει αυξημένη αίσθηση της ακοής, δεν μπορεί να διακρίνει σχήματα ή και χρώματα και με δυσκολία εστιάζει σε αντικείμενα ή ανθρώπους.
- *Σωματικά συμπτώματα:* Ο χρήστης μπορεί να αισθανθεί ζάλη, ναυτία, υπνηλία, αδυναμία, αίσθημα φόβου, μεταβολή της όρασης σε συνδυασμό με την ύπαρξη παραισθήσεων.
- *Ψυχικές διαταραχές:* Ο χρήστης χάνει την αίσθηση του χρόνου, συγχρόνως υπάρχουν έντονες μεταβολές στη διάθεση του, καθώς και τη μια στιγμή μπορεί να δείχνει χαρούμενος και την αμέσως επόμενη δυστυχισμένος. Ξεκινάει να βλέπει πράγματα και να βιώνει καταστάσεις που δεν είναι αληθινές και δυσκολεύεται να αντιληφθεί τι συμβαίνει γύρω του με αποτέλεσμα να δυσκολεύετε να εκφραστεί (Nichols D. , 2004).

Οι εξαρτησιογόνες και παραισθησιογόνες ουσίες χωρίζονται σε 7 μεγάλες κατηγορίες. Οι κατηγορίες αυτές είναι οι εξής:

- *Οπιοειδή:* Ως οπιοειδές χαρακτηρίζεται μια χημική ένωση που επιδρά με την δέσμευση της στους υποδοχείς των οπιοειδών, οι οποίοι βρίσκονται στο ΚΝΣ και τον γαστρεντερικό σωλήνα. Αυτά είναι η μορφίνη, η ηρωίνη, η κωδεΐνη, η φεθαδόνη, η φεντανύλη και η μεπεριδίνη.
- *Διεγερτικά του ΚΝΣ:* Σε αυτά περιλαμβάνεται η κοκαΐνη, η βενζοϋλεκγονίνη, ο μεθυλεστέρας εκγονίνης, οι αμφεταμίνες και τα παράγωγά τους (MCMA, MDA, κ.λπ).
- *Ψυχεδελικά ή Παραισθησιογόνα:* Περιλαμβάνει το LSD, τη μεσκαλίνη, τη φαινσυκλιδίνη (PCP), το MDMA, τη ψιλοκυβίνη, τη κεταμίνη κ.α.. Κύριο χαρακτηριστικό η πρόκληση παραισθήσεων.
- *Κατασταλτικά του ΚΝΣ:* Αποτελούν το οινόπνευμα (αλκοόλ) και τα βαρβιτουρικά. Διαθέτουν την ικανότητα να «καταστέλλουν» ή να αμβλύνουν τις λειτουργίες του εγκεφάλου και άλλων τμημάτων του ΚΝΣ, είτε ηρεμώντας το άτομο είτε κάνοντας το ακόμα και να αποκοιμηθεί.

- *Ινδική κάνναβη:* Χρησιμοποιείται ως θεραπευτικό μέσο ή για ψυχαγωγικού σκοπούς. Είναι το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο ναρκωτικό στις ανεπτυγμένες χώρες. Στη κατηγορία αυτή εντάσσεται η μαριχουάνα και το χασίς.
- *Εισπνεόμενα:* Εισπνέονται και απορροφούνται δια μέσου των πνευμόνων. Κάποια από αυτά είναι το χλωροφόρμιο, ο διαιθυλαιθέρας, το χλωριούχο αιθύλιο, το υποξείδιο του αζώτου, το αιθάνιο και το αιθυλένιο.
- *Αντικαταθληπτικά:* Αποτελούν φάρμακα που βοηθούν στην ανακούφιση συμπτωμάτων κατάθλιψης, διαταραχών άγχους, δυσθυμίας, καθώς και σε πολλές άλλες διαταραχές, όπως για παράδειγμα η ιδεοψυχαναγκαστική διαταραχή. Στη κατηγορία αυτή εντάσσονται οι βενζοδιαζεπίνες.

## 1.2 Ιστορική αναδρομή

Τα φυσικά παραισθησιογόνα δεν αποτελούν μια νέα ανακάλυψη δεδομένου ότι χρησιμοποιούνται από τα αρχαία χρόνια και φαίνεται να έχουν συμβάλει σημαντικά στην ανάπτυξη της θρησκευτικής σκέψης και της φιλοσοφίας. Αποτελούν παράγωγα της φύσης που εάν καταναλωθούν δύναται να προκαλέσουν παραισθήσεις, όπως για παράδειγμα η κατανάλωση κάποιων ειδώνμανιταριών. Αν υποθέσουμε ότι οι άνθρωποι κατά την αρχαιότητα είχαν την ίδια νοημοσύνη με τους ανθρώπους του σήμερα, τότε θα αντιληφθούμε ότι είναι πρακτικά απίθανο οι άνθρωποι αυτοί να μαζεύονταν σε ομάδες, γύρω από μια φωτιά και να προσπαθούσαν να εξηγήσουν τον κόσμο γύρω τους. Εκτός βέβαια και αν είχαν προβεί σε κατανάλωση παραισθησιογόνων. Τότε θα ερχόντουσαν αντιμέτωποι με καινούργιες καταστάσεις που θα απαιτούσαν εξηγήσεις. Ένα παράδειγμα χρήσης παραισθησιογόνων ουσιών αποτελεί το «*soma*» στην αρχαία Ινδία. Στο Μεξικό έχουν καταγραφεί πάνω από 40 είδη φυτών που έχουν χρησιμοποιηθεί σε θρησκευτικές τελετές και ακόμη και σήμερα παραμένουν άγνωστα. Ένα άλλο παράδειγμα που απευθύνεται στη χώρα μας είναι η χρήση ενός ειδικού φίλτρου στην αρχαία Ελευσίνα που χορηγούταν, κατά τη διάρκεια μιας τελετής, σε όσους είχαν καταδικαστεί για ανθρωποκτονία. Η τελετή αυτή λάμβανε χώρα κάθε Σεπτέμβρη και παρόλο που δεν γνωρίζουμε πολλά για αυτή, υπάρχουν εύλογα επιχειρήματα που αποδεικνύουν ότι το ειδικό αυτό φίλτρο ήταν ένα είδος παραισθησιογόνου. Η ύπαρξη του τελετουργικού αυτού, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, λάμβανε χώρα κατά τον 2<sup>ο</sup> αιώνα μ.Χ. (Nichols D. , 2004).

Η σύγχρονη συνειδητοποίηση όσον αφορά τα παραισθησιογόνα, έγινε στις 6 Απριλίου 1943, όταν ο Albert Hofmann, χημικός φυσικών προϊόντων με την Sandoz Pharmaceuticals από τη Βασιλεία της Ελβετίας, αντιμετώπισε ασυνήθιστες ψυχικές επιδράσεις μετά από εργασία με το LSD. Η υποψία του χημικού ότι οι επιπτώσεις που είχε παρατηρήσει οφείλονταν σε τυχαία έκθεση σε μια μικρή αλλά άγνωστη ποσότητα LSD επιβεβαιώθηκε τρεις ημέρες αργότερα όταν έγινε σκόπιμη λήψη ενός διαλύματος με LSD από του στόματος, με σχετικά μεγάλη δόση αυτής της ουσίας. Μέχρι τότε δεν είχε βρεθεί κανένα φάρμακο που να έχει τόσο υψηλή ισχύ (Nichols D. , 2004).

## Κεφάλαιο 2. Οπιοειδή

### 2.1 Ηρωίνη

Η ηρωίνη ή διακετυλομορφίνη (INN) αποτελεί ένα παράνομο και εξαιρετικά εθιστικό ναρκωτικό. Είναι ένα ημισυνθετικό οπιούχο και ο χημικός της τύπος είναι  $C_{21}H_{23}NO_5$  και έχει διαλυτότητα στο νερό 0,058. Είναι το πιο συχνό ναρκωτικό κατάχρησης και δρα ταχύτερα στον οργανισμό από τα υπόλοιπα μέλη των οπιοειδών. Οι χρήστες της περιγράφουν ένα έντονο αίσθημα ευχαρίστησης που το ονομάζουν «*rush*» ή «*high*». Εκτός από ψυχική εξάρτηση μπορεί να προκαλέσει και σωματική εξάρτηση έπειτα από επαναλαμβανόμενη χορήγηση υψηλών δόσεων. Όταν ένας χρήστης επί χρόνια χορηγείται ηρωίνη, δημιουργεί τη φυσική εξάρτηση. Κατά την φυσική εξάρτηση ο χρήστης χρειάζεται συνεχή πρόληψη της ουσίας προκειμένου να μην εμφανίσει το χαρακτηριστικό σύνδρομο στέρησης των οπιοειδών ή αλλιώς το σύνδρομο αποχής. Τα συμπτώματα του συνδρόμου μπορούν να εμφανιστούν μέσα σε λίγες ώρες μετά τη τελευταία χορήγηση (Hosztafi, 2011).

Τα συμπτώματα της απόσυρσης από την ηρωίνη περιλαμβάνουν:

- Ανησυχία.
- Αϋπνία.
- Διαρροϊκές κενώσεις.
- Μυϊκοί και οστικοί πόνοι.
- Λαχτάρα για χρήση ναρκωτικών.
- Ξαφνικά κρυολογήματα.
- Ανήσυχες κινήσεις των άκρων.

Τα συμπτώματα στέρησης κορυφώνονται σε 48 με 72 ώρες από την τελευταία δόση και υποχωρούν μετά από περίπου μια εβδομάδα. Εκείνες ακριβώς τις ώρες η αδυναμία, η κατάθλιψη είναι έντονα. Συχνά συνυπάρχει ναυτία με εμετό. Ορισμένοι χρόνιοι τοξικομανείς αργούν υπερβολικά να βγουν από τη φάση της στέρησης και τα συμπτώματα της συνεχίζονται σε αυτούς για πολλούς μήνες ακόμη και χρόνια μετά την τελευταία χορήγηση. Ο εθισμός στην ηρωίνη προκαλεί στον χρήστη καταναγκαστική συνεχή λήψη ναρκωτικών ουσιών και υψηλή τάση υποτροπής μετά από περιόδους αποχής (Hosztafi, 2011).

Η οδός χορήγησης της ηρωίνης ποικίλλει και ενδέχεται να έχει συμβάλει και στον μεγάλο βαθμό εθισμού που προκαλεί η ουσία. Κυριαρχεί η ενδοφλέβια χορήγηση. Πρόσφατα βρέθηκαν και άλλοι τρόποι χορήγησης της, όπως το κάπνισμα, η λήψη από τη μύτη ή από το στόμα, μέσω αναθυμιάσεων και με τη μορφή υπόθετου. Εφόσον η ενέσιμη ηρωίνη συναντάται πιο συχνά είναι αυξανόμενη και η διάδοση ασθενειών στους χρήστες, όπως ο ιός HIV, η ηπατίτιδα Β, C και άλλων μακροχρόνιων μολυσματικών ασθενειών που μεταδίδονται διαμέσου του αίματος. Εκτός από την αυξημένη πιθανότητα μετάδοσης ασθενειών, η μακροχρόνια χρήση ηρωίνης έχει και σοβαρές ιατρικές συνέπειες όπως βακτηριακές λοιμώξεις των αιμοφόρων αγγείων, ηπατικές και νεφρικές παθήσεις, πνευμονικές επιπλοκές και ουλές στις φλέβες (Hosztafi, 2011). Η υπερδοσολογία της μπορεί να οδηγήσει και στον θάνατο. Το ποσοστό θνησιμότητας μεταξύ χρηστών ηρωίνης κυμαίνεται μεταξύ 1 και 3% (Demaret, Ansseau, & Lemaître, 2013).

Στους τοξικομανείς παρατηρείται συχνά μεταβολή της συμπεριφοράς τους. Για παράδειγμα αυξάνεται η εγκληματική τους συμπεριφορά χωρίς όμως να σχετίζεται άμεσα με τον εθισμό τους στην ηρωίνη. Ο εθισμός παίρνει την μορφή μιας χρόνιας υποτροπιάζουσας ασθένειας που απαιτεί μακροχρόνια θεραπεία υποκατάστασης συντήρησης (Demaret, Ansseau, & Lemaître, 2013).

## 2.2 Μορφίνη

Η μορφίνη ανήκει στην κατηγορία των οπιοειδών και χρησιμοποιείται ως αναλγητικό για την ανακούφιση του μέτριου έως έντονου πόνου, δρώντας άμεσα στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ). Έχει υψηλή διαλυτότητα στο νερό ενώ στα λιπίδια εμφανίζει χαμηλή διαλυτότητα λόγω των δύο υδρόφιλων ομάδων- OH που υπάρχουν στους άνθρακες 3 και

6 (Christrup, 1997). Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (ΠΟΥ) συνιστά τη χρήση της για την ανακούφιση του πόνου που οφείλεται σε καρκίνο. Η μορφίνη διασπάται δια μέσου του μεταβολισμού σε μορφίνη-3-γλυκουρονίδη (M3G) (45-55%) και μορφίνη-6-γλυκουρονίδη (M6G) (10-15%). Για να επιτευχθεί ο μεταβολισμός του απαιτείται η σύζευξη με διφωσφογλυκουρονικό οξύ ουριδίνης. Το σύζευγμα που δημιουργείται αποτελεί τον κύριο μεταβολίτη σε πολλά θηλαστικά (Bosch Ojeda, Espinosa Bosch, Ruiz Sánchez, & Sánchez Rojas, 2007). Ο μεταβολισμός της δεν πραγματοποιείται μόνο στο ήπαρ αλλά και στον εγκέφαλο και τα νεφρά. Κατά κανόνα, οι γλυκουρονίδες θεωρούνται ως πολύ πολικοί διαλύτες που δεν δύναται να διασχίσουν το φράγμα αίματος-εγκεφάλου. Ο μεταβολισμός της στον εγκέφαλο συγκριτικά με το ήπαρ παρουσιάζει μικρότερη μεταβολική ισχύ. Παρόλο που στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό ανιχνεύονται συγκεντρώσεις M3G και M6G, έπειτα από συστηματική χρήση, λόγω χαμηλής μεταβολικής ισχύς φαίνεται να αντικατοπτρίζουν τον ηπατικό της μεταβολισμό. Μόνο το M6G μπορεί να εντοπιστεί στο πλάσμα και έχει αναλγητική δράση. Ο κύριος μεταβολίτης M3G έχει πολύ χαμηλή συγγένεια για τους υποδοχείς οπιοειδών και δεν εμφανίζει αναλγητικό αποτέλεσμα ούτε με ενδοεγκεφαλο-τριχοειδή (ICV) ούτε με ενδορραχιαία (IT) χορήγηση. Επιπλέον, οι χρήστες της αναπτύσσουν ταχύτατα ανοχή, φυσική και ψυχική εξάρτηση στην ουσία (Christrup, 1997).

Η μορφίνη ( $C_{17}H_{19}NO_3$ ) είναι ένα φυσικό αλκαλοειδές που απομονώνεται από το φυτό της παπαρούνας (*Papaver somniferum*). Για πρώτη φορά απομονώθηκε το 1806 από τον Γερμανό φαρμακοποιό Friedrich Serturmer και έλαβε το όνομα της από τον θεό Morpheus (θεός του ονείρου) της Ρωμαϊκής μυθολογίας. Η μορφίνη αποτελεί το πρώτο αλκαλοειδές που απομονώθηκε. Η ανακάλυψη αυτή ήταν μια σπουδαία πρόοδο για την οργανική και την ιατρική χημεία. Το μόριο της αποτελείται από πέντε συστήματα συμπυκνωμένου δακτυλίου. Αν και δομικά το μόριο της είναι άκαμπτο, οι λειτουργικές του ομάδες και η τριτοταγής αμίνη που σχηματίζεται από το άτομο αζώτου, της προσδίδουν χημική αντιδραστικότητα. Οι περισσότερες φαρμακολογικές της δράσεις οφείλονται στη στερεοχημική της δομή (Christrup, 1997).

Στο πλάσμα η μορφίνη συνδέεται με πρωτεΐνες σε ένα ποσοστό περίπου στο 45%. Μετά τη χορήγηση της από το στόμα, απορροφάται σχεδόν πλήρως από τον γαστρεντερικό σωλήνα. Περίπου το 1972 αποδείχθηκε, δια μέσου πειραμάτων σε ποντίκια, η αναλγητική δράση του M6G. Μετά από υποδόρια ένεση σε ποντίκια το M6G

ήταν 4 φορές πιο ισχυρό από την μορφίνη, ενώ μετά από ενδοεγκεφαλική χορήγηση ήταν περίπου 45 φορές πιο ισχυρό από το μητρικό φάρμακο. Το 1982 υπήρχε η υπόθεση ότι τα M3G και M6G μπορεί να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στις κλινικές επιδράσεις και παρενέργειες που παρατηρήθηκαν μετά από μακροχρόνια θεραπεία με μορφίνη. Αυτή η άποψη υποστηρίχθηκε όταν παρατηρήθηκε συσσώρευση M6G σε ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια, που λάμβαναν θεραπευτικά μορφίνη, και αποδείχθηκε ότι ο πιο πιθανός παράγοντας που προκαλεί παρατεταμένα αποτελέσματα οπιοειδών μετά τη χορήγηση της είναι ο M6G (Christrup, 1997).

### 2.3 Μέθοδοι προσδιορισμού ηρωίνης και μορφίνης

Ο προσδιορισμός της ηρωίνης και της μορφίνης πραγματοποιείται συχνά στο πλάσμα διότι ο τύπος αυτός δείγματος μας προσφέρει μια αντιπροσωπευτική εικόνα της δόσης που χορηγήθηκε και των επιπέδων της ουσίας που ανιχνεύτηκαν. Τα τελευταία χρόνια γίνεται αναφορά σε αναλυτικές μεθόδους ποσοτικοποίησης φαρμάκων κατάχρησης στο πλάσμα με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας ή υψηλής απόδοση υγρή χρωματογραφία (Fernández, Morales, Vázquez, Bermejo, & Tabernero, 2006).

Η ηρωίνη υδρολύεται με μεγάλη ταχύτητα σε 6-ακετυλομορφίνη (6AM), η οποία με τη σειρά της υδρολύεται σε μορφίνη. Επομένως, η κατανάλωση ηρωίνης μπορεί να επιβεβαιωθεί εάν προσδιοριστούν στο δείγμα οι δυο αυτοί μεταβολίτες. Πραγματοποιήθηκε μελέτη που χρησιμοποιούσε το HPLC-DAD με σκοπό να αναπτυχθεί μια νέα μέθοδος για τον προσδιορισμό της 6AM, της μορφίνης, της κωδεΐνης, της BEG, του κοκαϊθυλενίου, της μεθαδόνης και του μεταβολίτη της EDDP στο πλάσμα εξάγοντας το φάρμακο από το βιολογικό υγρό. Παρασκευάστηκε ένα ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με pH 6,0 με ανάμιξη 445mL 0,1M διυδροφωσφορικού καλίου με 55mL 0,1M όξινου φωσφορικού νατρίου. Παρασκευάστηκαν μεμονωμένα διαλύματα που περιείχα συγκέντρωση 1mg/mL κάθε φαρμάκου σε μεθανόλη ή ακετονιτρίλιο για 6AM. Τα διαλύματα εργασία παρασκευάστηκαν με διαδοχικές αραιώσεις των αποθεμάτων διαλύματος για να ληφθούν τελικές συγκεντρώσεις στην περιοχή 1-100 µg/mL στην κινητή φάση. Όλα τα διαλύματα αποθηκεύτηκαν σε ψύξη στους 4°C (Fernández, Morales, Vázquez, Bermejo, & Tabernero, 2006).

Οι αναλύτες ταυτοποιήθηκαν από τους χρόνους κατακράτησής τους (δηλαδή 6,87 λεπτά για μορφίνη, 9,38 λεπτά για κωδεΐνη, 10,82 λεπτά για BEG, 12,58 λεπτά για

6AM, 15,12 λεπτά για κοκαΐνη, 16,19 λεπτά για κοκαϊθυλένιο, 17,83 λεπτά για EDDP και 18,86 λεπτά για μεθαδόνη) και τα φασματικά δεδομένα UV. Ο ανιχνευτής διαθέτει την ικανότητα να σαρώνει το μήκος κύματος 200-400nm επέτρεψε να ληφθούν τρισδιάστατα χρωματογραφήματα που δείχνουν τη μεταβολή της απορρόφησης του μήκους κύματος σε σχέση με τον χρόνο. Πρακτικά η ικανότητα αυτή προσέφερε αυξημένη ευαισθησία καθώς επέτρεπε τη χρήση των μηκών κύματος όπου οι χρωματογραφικές αποκρίσεις των αναλυτών ήταν μέγιστες. Αυτό οδήγησε επίσης σε αυξημένη ειδικότητα καθώς επέτρεπε τον εντοπισμό πιθανών ακαθαρσιών και/ή την ύπαρξη φαρμάκων που αφαιρέθηκαν από το πλάσμα, με χρόνους κατακράτησης παρόμοιους με αυτούς των στοχευόμενων φαρμάκων, αλλά με φάσματα σημαντικά διαφορετικά από αυτά. Κάθε κορυφή στο φάσμα αντιστοιχεί σε μια μοναδική ένωση, όταν τα φάσματα σε όλα τα σημεία της συμπίπτουν με το φάσμα για την εν λόγω ένωση. Η εφαρμογή της παραπάνω διαδικασίας εκχύλισης σε 10 δείγματα πλάσματος που δεν εμπεριείχαν φάρμακα, απέδειξε υψηλή καθαρότητα σε όλα. Στην πραγματικότητα, δεν εμφανίζονταν κορυφές στις χρωματογραφικές περιοχές όπου υπήρχαν οι αναλύτες. Βάση των κριτηρίων των Bresolle et al. για την επικύρωση χρωματογραφικών μεθόδων, η προτεινόμενη μέθοδος παρέχει γραμμική απόκριση. Ο υπολογισμός της απόδοσης εκχύλισης πραγματοποιήθηκε συγκρίνοντας την περιοχή κάτω από την κορυφή για κάθε φάρμακο όπως ελήφθη από 10 δείγματα πλάσματος σε δύο συγκεντρώσεις (2 και 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) με εκείνη που ελήφθη με άμεση ένεση μιας κινητής φάσης που περιέχει πανομοιότυπες συγκεντρώσεις αναλύτη. Όπως απεικονίζεται στο Σχήμα 1, η φτωχότερη ανάκαμψη ήταν αυτή για το BEG (60%), ενώ η υψηλότερη για τη methadone (94,95%) (Fernández, Morales, Vázquez, Bermejo, & Tabernero, 2006).

**Σχήμα 1:** Ανάκτηση, όριο ανίχνευσης (LOD), ορθότητα (CV) και ακρίβεια της μεθόδου (Fernández, Morales, Vázquez, Bermejo, & Tabernero, 2006).

Drug	Recovery (%)	LOD ( $\mu\text{g/mL}$ )	CV (%)	Accuracy (%)
Morphine	83.21 $\pm$ 4.02	0.024	4.02	-5.40
Codeine	94.08 $\pm$ 4.74	0.032	3.18	+6.76
6AM	67.74 $\pm$ 3.35	0.030	6.45	+0.67
Cocaine	69.25 $\pm$ 3.29	0.010	2.55	+8.10
BEG	60.02 $\pm$ 3.16	0.010	3.75	-3.07
Cocaethylene	89.34 $\pm$ 4.47	0.010	2.93	-1.01
Methadone	94.95 $\pm$ 5.26	0.049	4.56	-5.85
EDDP	70.98 $\pm$ 2.97	0.055	2.77	+3.29

CV: coefficients of variation.

Πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση του ορίου ανίχνευσης από τον Armbruster και τους συνεργάτες του. Το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) ορίστηκε ως η χαμηλότερη συγκέντρωση που καθορίστηκε με καλή ακρίβεια και ορθότητα. Αυτό το αποτέλεσμα ήταν αποδεκτό από την επιστημονική κοινότητα καθώς και είχαν ληφθεί τοξικές και θανατηφόρες συγκεντρώσεις αυτών των ουσιών που ήταν υψηλότερες από την τιμή που υπολογίστηκε για το όριο ποσοτικού προσδιορισμού. Η ακρίβεια και η ορθότητα της προτεινόμενης μεθόδου εκτιμήθηκαν από τα αποτελέσματα που ελήφθησαν σε 10 επαναλαμβανόμενες αναλύσεις σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις αναλύτη στο πλάσμα (2 και 10  $\mu\text{g/mL}$ ), την ίδια ημέρα. Οι μέσοι συντελεστές διακύμανσης για τις 8 αυτές ουσίες ήταν αποδεκτοί. Η ορθότητα, εκφραζόμενη ως η εκατοστιαία διαφορά μεταξύ της μετρούμενης συγκέντρωσης και της εικονικής τιμής της, ήταν επαρκής καθώς τα αποτελέσματα κυμαίνονταν μεταξύ -1,01% και + 8,10% (Σχημα 1). Τέλος έγινε εφαρμογή της μεθόδου σε 21 δείγματα πλάσματος από θανατηφόρες υπερδοσολογίες μεθαδόνης, ηρωΐνης και/ή κοκαΐνης. Η παρουσία ή η απουσία φαρμάκων σε κάθε περίπτωση επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα που αποκτήθηκαν από προηγούμενη εφαρμογή. Όλα τα αρνητικά αποτελέσματα που λήφθηκαν αντιστοιχούσαν σε τιμές



μικρότερες από το LOD. Οι ασθενείς ήταν 5 γυναίκες και 16 άνδρες στους οποίους εντοπίστηκαν οπιοειδή και κοκαΐνη, σε συνδυασμό με άλλες ουσίες όπως για παράδειγμα το αλκοόλ, η καφεΐνη, η κάνναβη, οι βενζοδιαζεπίνες, η πικρακετάμη, η παρακεταμόλη και η προποξυφαΐνη. Σύμφωνα με τις αναλογίες που ελήφθησαν από τις μέσες συγκεντρώσεις στο πλάσμα αποδείχθηκε ότι το BEG ξεπερνά την κοκαΐνη και το κοκαϊθυλένιο και η μεθαδόνη υπερβαίνει το EDDP (Fernández, Morales, Vázquez, Bermejo, & Tabernero, 2006).

Σπάνια συναντώνται μη χρωματογραφικές μέθοδοι για την ανίχνευση οπιούχων σε ολικό αίμα, πλάσμα ή ορό αντίστοιχα. Έχουν γίνει αναφορές για τη χρήση ανοσοδοκιμασίας (IA) ως πρώτο βήμα. Ωστόσο, αν ληφθεί θετικό αποτέλεσμα θα πρέπει πάντοτε να επιβεβαιώνεται με μια δεύτερη μέθοδο που διαθέτει ευαισθησία ισάξια με τη δοκιμή διαλογής και που παρέχει το υψηλότερο επίπεδο εμπιστοσύνης στο αποτέλεσμα. Έχει γίνει αναφορά ανάλυσης μορφίνης και κωδεΐνης σε μαλλιά τοξικομανών με διάφορες τεχνικές GC-MS. Οι Pelli et al. ανέφεραν μια εξαιρετικά ευαίσθητη διαδικασία ταυτοποίησης στα μαλλιά με παράλληλη φασματοσκοπία. Τα δείγματα από τρίχες που λήφθηκαν, τακτοποιήθηκαν με 0,1M HCl, ακολουθούμενο από εκ νέου εκχύλιση με οργανικό διαλύτη. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με άμεση εισαγωγή του υπολείμματος που διαλύθηκε σε μεθανόλη στην πηγή ιόντων. Έχει γίνει χρήση της GC-MS για τον προσδιορισμό της κωδεΐνης και της μορφίνης στα μαλλιά, και από άλλους ερευνητές. Κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί διάκριση μεταξύ ηρωΐνης και της κωδεΐνης με ανάλυση GC-MS, αλλά πρέπει να υπάρχει ιδιαίτερη προσοχή κατά τη χρήση λιγότερων συγκεκριμένων τεχνικών όπως η ραδιοανοσοδοκιμασία (RIA). Ο προσδιορισμός τους στις τρίχες ξεκίνησε να εφαρμόζεται το 1991 (Bosch Ojeda, Espinosa Bosch, Ruiz Sánchez, & Sánchez Rojas, 2007).

Πραγματοποιήθηκαν πειράματα προσδιορισμού ηρωΐνης και μορφίνης σε τρίχες πιθήκων, στους οποίους είχε προηγηθεί η χορήγηση των ουσιών. Αποδείχτηκε ότι το συνολικό επίπεδο μορφίνης στα μαλλιά από πιθήκους που χορηγήθηκαν με ηρωΐνη ήταν έξι φορές υψηλότερο από εκείνο που χορηγήθηκε με μορφίνη. Οι Mangin και Kintz έδειξαν μεταβλητότητα των συγκεντρώσεων οπιούχων στα ανθρώπινα μαλλιά ανάλογα με την ανατομική τους προέλευση (κεφαλή, ηβικές περιοχές κ.α.). Οι Moeller et al. ανέπτυξαν μια νέα μέθοδο εκχύλισης χρησιμοποιώντας SPE μετά από επώαση

κονιοποιημένων δειγμάτων μαλλιών με β-γλυκουρονιδάση/αρυλ-σουλφατάση σε ρυθμιστικό φωσφορικών. Έπειτα οι Welch et al. απέδειξαν ότι οι εκχυλίσσεις με 0,1 M HCl είναι αποτελεσματικές στην απομάκρυνση της μορφίνης από τα μαλλιά. Τα ευρήματα των ερευνών των Nakahara et al. δείχνουν ότι η μεθανόλη-TFA ήταν ο καλύτερος διαλύτης για την εκχύλιση 6-MAM και μορφίνης με ελάχιστη υδρόλυση και μέγιστη απόδοση 6-MAM. Έγινε αναφορά από τον Cirimele για εκχύλιση υπερκρίσιμων υγρών κωδεΐνης, μορφίνης και 6-MAM σε τρίχες τοξικομανών. Οι Gygi et al. διαπίστωσαν ότι μετά από ελεγχόμενη χορήγηση, η ενσωμάτωση της μορφίνης, της κωδεΐνης και των μεταβολιτών της στα μαλλιά των αρουραίων λαμβάνει χώρα με διαφορετικό τρόπο ανάλογο της δόσης που χορηγήθηκε. Οι Jurado et al. και οι Kintz και Mangin ανέφεραν ταυτόχρονη ποσοτικοποίηση των οπιούχων, της κοκαΐνης και των κανναβινοειδών στα μαλλιά με GC-MS. Οι αναλύσεις μαλλιών των δηλητηριάσεων από πολυφάρμακα συμπεριλαμβανομένων των οπιούχων έχουν συζητηθεί ως αναφορές περιπτώσεων. Οι Hold et al. ανέπτυξαν μια ευαίσθητη μέθοδο για τη συνδυασμένη εκχύλιση κοκαΐνης, οπιούχων και των μεταβολιτών τους από ανθρώπινα μαλλιά κεφαλής χρησιμοποιώντας μια τεχνική πέψης με βάση το ένζυμο. Οι Tagliaro et al. ανέφεραν τα ευρήματα τους από την ανάλυση των μαλλιών σχετικά με τους θανάτους που σημειώθηκαν από υπερβολική δόση ηρωίνης (Bosch Ojeda, Espinosa Bosch, Ruiz Sánchez, & Sánchez Rojas, 2007).

Έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι για τον προσδιορισμό της μορφίνης και της ηρωίνης σε βιολογικά δείγματα. Για παράδειγμα οι Drost et al. ανέφεραν μια μέθοδο GC-MS SIM με Cl, αμμωνία-μεθάνιο (1: 5), για τον προσδιορισμό της ελεύθερης και υδρολυμένης μορφίνης στον ορό και το εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Τα δείγματα εκχυλίστηκαν με SPE και παρασκευάστηκαν ως παράγωγα σιλυλίου. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της φαρμακοκινητικής της μορφίνης έπειτα από επισκληρίδιο χορήγηση σε ασθενείς που υποβλήθηκαν σε χειρουργική επέμβαση της κοιλιακής περιοχής. Ο Spiehler ανέφερε επίσης μια μέθοδο για τον προσδιορισμό της ελεύθερης και υδρολυμένης μορφίνης στο αίμα. Τα δείγματα εκχυλίστηκαν με οργανικό διαλύτη και παραγωγοποιήθηκαν με τριφθοροοξεικό ανυδρίτη. Οι Jones et al. ανέπτυξαν μια εξαιρετικά ευαίσθητη μέθοδο για τον προσδιορισμό της μορφίνης στα ούρα και τα όργανα του σώματος, χρησιμοποιώντας δυο μεθόδους εκχύλισης υγρού-υγρού. Η παραγωγοποίηση των εκχυλισμάτων έγινε με πενταφθοροπροπιονικό ανυδρίτη. Έπειτα από σύγκριση της χρήσης των συσκευασμένων στηλών με τριχοειδής στήλες

συντηγμένου πυριτίου και διαπιστώθηκε ότι η ευαισθησία του προσδιορισμού αυξήθηκε περίπου 10 φορές μέσω της χρήσης τριχοειδών στηλών (Bosch Ojeda, Espinosa Bosch, Ruiz Sánchez, & Sánchez Rojas, 2007).

**Πίνακας 1:** Μέθοδοι αέριας χρωματογραφίας (Bosch Ojeda, Espinosa Bosch, Ruiz Sánchez, & Sánchez Rojas, 2007).

Αναλύτες	Τύπος ανίχνευσης	Παρατηρήσεις	Εφαρμογές
Ηρωίνη, κωδεΐνη, 6-ακετυλομορφίνη	SIM-EI	Με το TFA ως παράγωγο. Εκχύλιση σε χλωροφόρμιο – ισοπροπανόλη– η επτάνιο	Ούρα
Κωδεΐνη, 6-ακετυλομορφίνη, κοκαΐνη και οι μεταβολίτες της	MS, MS – MS	Χρησιμοποιώντας SPEC MP3. Δευτεριωμένα ανάλογα ως εσωτερικό πρότυπο. Παραγωγγοποίηση με BSTFA-MS	Αίμα
6-MAM	MS	Εκχύλιση με ενζυματική θεραπεία. Παραγωγγοποίηση με PFPA (70 ° C, 30 λεπτά)	Μαλλιά
Ηρωίνη, 6-ακετυλομορφίνη	MS	Χρησιμοποιώντας το Amchro C18 εκ δευτεριωμένη μορφίνη και κωδεΐνη. Παραγωγγοποίηση με PFPA-πενταφθορο-1-προπανόλη (PFP). Στήλη OV-1	Ορός, Αίμα
Ηρωίνη, 6-MAM	MS	Εκχύλιση υγρού-υγρού σε pH 9,5, προπιονυλίωση σε θερμοκρασία δωματίου χρησιμοποιώντας παγίδα ιόντων πλήρους σάρωσης	Αίμα, Ούρα, Υαλοειδής χιτώνας

Η ανάλυση της μορφίνης σε ανθρώπινους ιστούς, όπως τα νεφρά και το ήπαρ είναι ιδιαίτερα σημαντική όταν δεν είναι διαθέσιμα βιολογικά υγρά λόγω ύφεσης του σώματος σε ύποπτες περιπτώσεις δηλητηρίασης από μορφίνη ή ηρωίνη. Όταν έχει περάσει ο χρόνος μετά την κατάποση, η σύζευξη γλυκουρονίδης και θειικού άλατος της μορφίνης μπορεί να είναι σημαντική. Ως εκ τούτου, είναι δύσκολο να εκτιμηθεί η ποσότητα του φαρμάκου που λαμβάνεται με βάση μόνο τις συγκεντρώσεις της μη συζευγμένης μορφίνης στα ανθρώπινα υγρά. Σε τέτοιες περιπτώσεις, ολικές συγκεντρώσεις μορφίνης που λαμβάνονται με όξινη υδρόλυση έχουν χρησιμοποιηθεί για εγκληματολογικές τοξικολογικές εξετάσεις. Επομένως, καθίσταται σημαντική η ανάπτυξη μιας απλής και αξιόπιστης μεθοδολογίας για τον προσδιορισμό της ελεύθερης και ολικής

μορφίνης σε ανθρώπινους ιστούς (Bosch Ojeda, Espinosa Bosch, Ruiz Sánchez, & Sánchez Rojas, 2007).

Η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (CE) είναι ίσως η πιο ταχέως αναπτυσσόμενη αναλυτική τεχνολογία που έχει εμφανιστεί τις τελευταίες δύο δεκαετίες. Οι διαχωρισμοί CE μπορούν να πραγματοποιηθούν χρησιμοποιώντας ηλεκτροφόρηση τριχοειδών ζωνών (CZE), μικροκυτταρική ηλεκτροκινητική τριχοειδή χρωματογραφία (MECC), τριχοειδή ηλεκτροχρωματογραφία (CEC), τριχοειδή ισοηλεκτρική εστίαση (CIEF), τριχοειδές τζελ ηλεκτροφόρηση (CGE) και τριχοειδής ισοταφοφόρηση (CITP). Προς το παρόν το κύριο πεδίο εφαρμογής της CE είναι ο προσδιορισμός φαρμακευτικών ουσιών. Η μέθοδος CE διαθέτει αυτόματη έγχυση τόσο σε ηλεκτροκινητικές όσο και σε υδροδυναμικές λειτουργίες, θερμοστατικό διαχωρισμό υπό σταθερή τάση ή σταθερές τρέχουσες συνθήκες, και ανίχνευση σε τριχοειδή, απορρόφησης UV, μέσω φίλτρου ή μονοχρωματικού μήκους κύματος ανιχνευτές ή με πιο εξελιγμένα φασματοφωτόμετρα ταχείας σάρωσης ή συστοιχίας διόδων. Το μεγαλύτερο μέρος της συνολικής επιλεκτικότητας που απαιτείται από τη μέθοδο, βασίζεται σε εκείνη που προσφέρεται από τον ηλεκτροφορητικό/ηλεκτροκινητικό διαχωρισμό (Bosch Ojeda, Espinosa Bosch, Ruiz Sánchez, & Sánchez Rojas, 2007).

## Κεφάλαιο 3. Διεγερτικά του ΚΝΣ

### 3.1 Κοκαΐνη

Η κοκαΐνη (COC) αποτελεί ένα αλκαλοειδές του φυτού *Erythroxylum coca* που εντοπίζεται στη Νότια Αμερική και χρησιμοποιούνταν από τους αρχαίους πολιτισμούς σε θρησκευτικές τελετές. Όταν η Νότια Αμερική κατακτήθηκε από την Ισπανία, τα φύλλα του φυτού χρησιμοποιήθηκαν στους ντόπιους εργαζόμενους στα μεταλλεία αργύρου για να τους αυξήσουν την αντοχή και την αποτελεσματικότητα. Μετά το 1855, όπου έγινε απομόνωση του COC από έναν Γερμανό χημικό (Friedrich Gaedcke), χρησιμοποιήθηκε ως το πρώτο αναισθητικό. Η COC ήταν πολύ δημοφιλής στα κρασιά όταν υπήρχε σε συνδυασμό με αιθανόλη (κοκκαϊθυλένιο, COE). Το 1885 η COC εμφανίστηκε στην Coca-Cola, η οποία περιείχε σε ένα ποτήρι 9mg COC. Το 1903 απαγορεύτηκε η πώληση Coca-Cola με COC. Το 1914 περιορίστηκε η διανομή, πώληση και χρήση της παρόλο που ήταν ακόμη νόμιμες (Janicka, Kot-Wasik, & Namieśnik, 2010).

Η κοκαΐνη (3- (βενζοϋλοξυ) -8-μεθυλ-8-αζαδικυκλο μεθυλεστέρας οκτανίου-2-καρβοξυλικού οξέος) και τα οπιοειδή είναι διαδεδομένα σε πολλά κοινωνικά, πολιτιστικά, και προσωπικά περιβάλλοντα, είτε ως ναρκωτικά κατάχρησης είτε για ψυχαγωγικούς σκοπούς. Συναντάται ως μια λευκή ή υπόλευκη σκόνη που δά ως διεγερτικό. Η αυξημένη χρήση της δημιουργεί ένα σοβαρό κοινωνικό πρόβλημα που πυροδοτείται από τις συνέπειες της κατανάλωσης της (Mecolini, et al., 2008).

Η χρήση της COC έχει τη δυνατότητα να προκαλέσει στον χρήστη υπερκινητικότητα, ευεξία, ανησυχία, ευφορία, αυξημένη αρτηριακή πίεση και καρδιακό ρυθμό. Καταστέλλει το αίσθημα της κούρασης, της πείνας και της δίψας. Οι παρενέργειες αυξάνονται με την συχνή χρήση της ουσίας. Μπορεί να περιλαμβάνουν παράνοια, συσπάσεις και ανικανότητα. Η υπερβολική δοσολογία του είναι δυνατό να προκαλέσει παραισθήσεις, αύξηση της αρτηριακής πίεσης και ταχυκαρδία. Η τοξικότητα του φαρμάκου ενδέχεται να οδηγήσει σε επιληπτικές κρίσεις και να καταλήξει σε θάνατο από εγκεφαλικό επεισόδιο, εγκεφαλική αιμορραγία, αναπνευστική ανεπάρκεια ή καρδιακή ανεπάρκεια. Ανάλογα με την καθαρότητα της, τη δοσολογία λήψης και τον τρόπο που χορηγείται εξαρτάται η διάρκεια των αποτελεσμάτων της. Μπορεί να κυμανθεί από 20 λεπτά έως αρκετές ώρες. Χρόνιοι χρήστες μπορεί να οδηγηθούν σε κατάθλιψη που τους δημιουργεί αυτοκτονικές τάσεις. Επιπλέον η χρόνια χρήση αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης αυτοάνοσων νοσημάτων όπως ο ερυθματώδης λύκος, η σπειραματονεφρίτιδα και η αγγειίτιδα. Ο συνδυασμός της COC με το αλκοόλ αυξάνει τις πιθανότητες αιφνίδιου θανάτου (Mecolini, et al., 2008).

Ο πιο συχνός τρόπος λήψης της COC είναι με την εμφύσηση, μπορεί όμως να ληφθεί και από το στόμα και ενδοφλεβίως. Η ποσότητα που εμφυσάει ο χρήστης, λεγόμενη ως «μια γραμμή» ποικίλει ανάλογα με την ποσότητα των άλλων ουσιών, αλλά συνήθως κυμαίνεται από 35 έως 100mg. Η εμφύσηση της έχει παρατηρηθεί ότι προκαλεί σοβαρή βλάβη στους βλεννογόνους της μύτης, ενώ η χορήγηση της ενδοφλεβίως προμηνύει τον κίνδυνο μετάδοσης ασθενειών. Σύμφωνα με μελέτες έχει αποδειχθεί ότι σε διαστήματα αποχής από τη λήψη COC, οι χρήστες διαμέσου συμβάντων και εικόνων που έχουν συσχετίσει με τα ναρκωτικά, αναπτύσσουν πολύ έντονη λαχτάρα (Mecolini, et al., 2008).

### 3.2 Αμφεταμίνες

Η αμφεταμίνη (AMPH) και τα παράγωγα της έχουν μεγάλη ποικιλία όσον αφορά τη δομή και τα αποτελέσματα τους, που θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ως ένα σημαντικό εργαλείο για τη δημιουργία ψυχοδραστικών φαρμάκων. Η αμφεταμίνη ( $C_9H_{13}N$ ) κυκλοφορεί με διάφορα εμπορικά ονόματα και χρησιμοποιείται ως διεγερτικό φάρμακο. Στα κατώτερα κοινωνικά στρώματα χρησιμοποιείται ως υποκατάστατο της κοκαΐνης για ψυχαγωγικούς σκοπούς. Ο Alexander Shulgin (1978), δηλώνει ότι το «το όνομα αμφεταμίνη χρησιμοποιείται για να περιγράψει μια μοναδική χημική ένωση και δεν υφίσταται η χρήση του στον πληθυσμό». Οι χημικοί JH Biel και BA Borpp το 1978 δήλωσαν τα δομικά χαρακτηριστικά της AMPH. Έτσι αναφέρθηκε ότι η AMPH διαθέτει:

- έναν μη υποκατεστημένο δακτύλιο φαινυλίου,
- μια πλευρική αλυσίδα δυο ατόμων άνθρακα μεταξύ του δακτυλίου φαινυλίου και του αζώτου,
- μια ομάδα α-μεθυλίου και
- μια πρωτοταγή αμινομάδα.

Οι πιο μελετημένες ενώσεις είναι η AMPH και η μεθαμφεταμίνη (METH). Η METH δεν ακολουθεί το τέταρτο χαρακτηριστικό σύμφωνα με τους JH Biel και BA Borpp καθώς και διαθέτει δευτεροταγή αμίνη και όχι πρωτοταγή. Και οι δυο αυτές ενώσεις έχουν την ικανότητα να προκαλούν απελευθέρωση κατεχολαμίνης έχοντας μικρή συγγένεια για τους νευρωνικούς υποδοχείς (Sulzer, Sonders, Poulsen, & Galli, 2005).

Όπως έχει παρατηρηθεί με τη κοκαΐνη, τη νικοτίνη, τη μαριχουάνα, τα οπιούχα και το αλκοόλ, έτσι και οι αμφεταμίνες έχουν χρησιμοποιηθεί ως φυτικά προϊόντα για χιλιάδες χρόνια. Τα κυριότερα είδη από τα οποία μπορούν να ληφθούν οι αμφεταμίνες είναι τα μέλη του γένους *Ephedra* και των δέντρων *Catha edulis*, γνωστό στα αραβικά και ως *gat* και στο μεγαλύτερο μέρος της Ανατολικής Αφρικής ως *myrrha*. Η *ephedra sinica*, συχνά γνωστή ως *ephedra* και στη Κίνα ως *Ma huang*, έχει βρεθεί σε νεολιθικούς τάφους της Μέσης Ανατολής και σε ναούς στην Ινδία. Το βότανο αυτό φαίνεται να λαμβάνει μέρος στη γνωστή θρησκευτική τελετή στην Ινδία, το *soma*, ως η τροφή των θεών. Ένα κινεζικό βιβλίο φυτικών φαρμάκων του 1ου αιώνα μ.Χ., *Shen Nong Ben*, αναφέρει τη χρήση του για τη θεραπεία του άσθματος και των λοιμώξεων του ανώτερου αναπνευστικού. Το κύριο δραστικό συστατικών των αμφεταμινών είναι η εφεδρίνη που ανακαλύφθηκε το 1887 από τον Nagajoshi Nagai. Μια πρόσφατη μελέτη δείχνει ότι το η

νέας γενιάς Ephedra στερείται αλκαλοειδών που σχετίζονται με τη φαιναιθυλαμίνη. Η over-the-counter εφεδρίνη ήταν ένα δημοφιλές κατασταλτικό της όρεξης και χρησιμοποιείται ευρέως από τους αθλητές για να ενισχύσει την απόδοση. Τον Απρίλιο του 2004 απαγορεύτηκε στη χρήση ως συμπλήρωμα διατροφής στην αμερικανική αγορά από τον FDA. Σήμερα η εφεδρίνη και η ψευδοεφεδρίνη είναι οι δυο πιο συνηθισμένες δραστικές ουσίες που χρησιμοποιούνται από ερασιτέχνες σε εργαστήρια για τη παραγωγή METH και διακίνηση της στην παράνομη αγορά (Sulzer, Sonders, Poulsen, & Galli, 2005).

Τα χλωρά φύλλα του θάμνου ή του δέντρου *Catha edulis*, που προέρχονται από την Κένυα, τη Σομαλία και καλλιεργούνται ευρέως στην Υεμένη, περιέχουν τις αμφεταμίνες cathinone και norpseudoephedrine (cathine). Η κλινική τους χρήση αναφέρθηκε τον 11<sup>ο</sup> αιώνα από τον Abu Al-Rihan Bin Ahmed Al-Baironi. Το βότανο έχει καταγραφεί ότι χρησιμοποιείται από το 55% του πληθυσμού της Βόρειας Σομαλίας και το 85% των ενήλικων ανδρών στη Βόρεια Υεμένη. Επιπλέον αντιπροσωπεύει το 30% της γεωργικής παραγωγής της Υεμένης. Η χρήση του συνδέεται με τα συναισθήματα της ικανοποίησης, την καταστολή της κόπωσης και την απώλεια της όρεξης. Μπορεί να προκαλέσει παράνοια και άλλες διαταραχές στη συμπεριφορά, ωστόσο δεν προκαλεί έντονα συμπτώματα στέρησης. πρόσθετα είδη φυτών περιέχουν φυσικές αμφεταμίνες, συμπεριλαμβανομένων των AMPH και METH όπου συναντώνται σε είδη ακακίας και AMPH συναντάται σε αιγυπτιακό γιασεμί. Δεν γνωρίζουμε άλλα φυτά που χρησιμοποιούνται συνήθως για τη χορήγηση αυτών των φαρμάκων. Υπάρχουν, ωστόσο, κάποια φυτικά προϊόντα με συστατικά παρόμοια με των αμφεταμινών. Το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο ψυχοδιεγερτικό στον κόσμο λέγεται ότι είναι η ακεκολίνη, η κύρια δραστική ένωση στο φοίνικα *Areca catechu*, που καταναλώνεται από το 10-20% του παγκόσμιου πληθυσμού. Εκτός από την ακεκολίνη, που δεν είναι φαιναιθυλαμίνη, ορισμένες ενώσεις μοιάζουν που με φαινυθυλαμίνη εντοπίζονται στο καρύδι (Sulzer, Sonders, Poulsen, & Galli, 2005).

Οι συνθετικές αμφεταμίνες εφευρέθηκαν το 1887 από τον Lazar Edeleanu. Η αμφεταμίνη πήρε το όνομα της από την α-μεθυλ-φανυλαιθυλ-αμίνη. Το AMPH εντάχθηκε σε μια προσπάθεια ανάπτυξης συνθετικών συμπαθομιμητικών, από όπου έγινε η πρώτη αναφορά των διεγερτικών της αποτελεσμάτων. Επιπλέον αναγνωρίστηκε ότι είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικό όταν χορηγηθεί από το στόμα. Το AMPH εισήχθη

εμπορικά το 1932 από τη φαρμακευτική εταιρεία Smith, Kline και French ως Benzedrine, η οποία χορηγούταν σε εισπνεόμενη μορφή. Μέχρι το 1946, η φαρμακευτική βιομηχανία προώθησε περισσότερες από 30 χρήσεις για το AMPH, συμπεριλαμβανομένης της θεραπείας της σχιζοφρένειας, του εθισμού στα οπιούχα, της βρεφικής εγκεφαλικής παράλυσης, της ναυτίας, της ασθένειας ακτινοβολίας και του επίμονου λόξυγκα (Sulzer, Sonders, Poulsen, & Galli, 2005).

### 3.3 Μέθοδοι προσδιορισμού κοκαΐνης και αμφεταμινών

Σήμερα υπάρχουν διάφορες αναλυτικές τεχνικές για τον έλεγχο των ουσιών κατάχρησης σε βιολογικά δείγματα. Η COC μπορεί να προσδιοριστεί μεμονωμένα ή ταυτόχρονα με άλλα φάρμακα σε ένα ευρύ φάσμα πινάκων. Στην ιατροδικαστική απαιτούνται μεθοδολογίες ευρείας εφαρμογής και υψηλής ειδικότητας για τον έλεγχο αυτών των ουσιών. Τα πιο κοινά δείγματα που χρησιμοποιούνται για τη διερεύνηση του COC είναι τα ούρα, το αίμα, τα μαλλιά, ο ιδρώτας, η σίελος, τα δόντια, τα νύχια, το αμνιακό υγρό και τα εσωτερικά όργανα. Τα δικαστήρια βασίζονται στα αποτελέσματα από τις τοξικολογικές αναλύσεις και αποφασίζουν εάν ένα άτομο ήταν υπό την επήρεια ναρκωτικών ουσιών κατά τη διάρκεια του συγκεκριμένου γεγονότος (π.χ. βιασμός, ληστεία ή ατυχήματα στο χώρο εργασίας). Για τον λόγο αυτό η αναγνώριση της ουσίας και των μεταβολιτών του σε υγρά ή ιστούς του σώματος, πρέπει να είναι αντικειμενική και αξιόπιστη (Janicka, Kot-Wasik, & Namieśnik, 2010).

Η προετοιμασία του δείγματος αποτελεί ένα κρίσιμο σημείο, καθώς και είναι απαραίτητο για τη λήψη αξιόπιστων και μεγάλης ακρίβειας δεδομένων. Ο κύριος στόχος της προετοιμασίας του δείγματος είναι ο διαχωρισμός της ένωσης-στόχο. Το βιολογικό υλικό χαρακτηρίζεται από: περίπλοκη σύνθεση μήτρας, πολύ χαμηλή συγκέντρωση αναλυτών (π.χ.  $\mu\text{g}/\text{mg}$  μαλλιών και  $\text{ng}/\text{mL}$  αίματος και ούρων), υψηλή πιθανότητα παρεμβολών και εξαιρετικά περιορισμένη πρόσβαση σε υλικά αναφοράς. Τέτοια προβλήματα μπορούν να ξεπεραστούν εάν ακολουθηθούν οι κατάλληλες διαδικασίες προετοιμασίας του δείγματος. Τα αποτελέσματα της μήτρας μπορούν να παρατηρηθούν με φασματομετρία μάζας (MS) και με δυο τύπου αναζωογόνησης. Τον ιονισμό με ηλεκτροψεκάσμο (ESI), που είναι ο πιο διαδεδομένος, και ο χημικός ιονισμός ατμοσφαιρικής πίεσης (APCI). Το ESI επηρεάζεται σαφώς από στοιχεία με ευρύ φάσμα πολικότητας, καθιστώντας αυτόν τον τύπο πολύ ευαίσθητο. Το APCI αποδεικνύεται



λιγότερο επιρρεπείς από το ESI, ειδικά στο παρουσία υδρόφοβων παρεμβολών. Η καταστολή συχνά παρατηρείται στην αρχή σε χρωματογραφήματα από ούρα, από του στόματος υγρά ή πλάσμα, πιθανώς λόγω των διαφορετικών διεργασιών ιονισμού. Το APCI βασίζεται σε αντιδράσεις αέριας φάσης ενώ το ESI σε αντιδράσεις υγρής φάσης. Παρατηρούνται επίσης μεγάλες διαφορές στα αποτελέσματα της μήτρας ανάλογα με τη προετοιμασία του δείγματος. Γενικά, η καταβύθιση πρωτεΐνης ακετονιτριλίου σε συνδυασμό με την υγρή χρωματογραφία με ESI και διαδοχικά MS δίνει το καλύτερο αποτέλεσμα, με σημαντικές περιοχές καταστολής στην αρχή και στο τέλος του χρωματογραφικού διαχωρισμού (Janicka, Kot-Wasik, & Namieśnik, 2010).

Οι κύριες παρεμβολές που παρατηρούνται στα ούρα είναι τα υδρόφιλα υπολειμματικά συστατικά (πιθανότατα ανόργανα άλατα). Τα στοματικά υγρά έχουν περισσότερες παρεμβολές από τα ούρα. Τα συστατικά της μήτρας είναι υδρόφιλης και υδρόφοβης φύσης, συμπεριλαμβανομένων πρωτεϊνών, αμινοξέων, και ειδικά βλεννίνη. Όσον αφορά το πλάσμα, έχει επίσης ένα ευρύ φάσμα πολικότητας, αλλά οι συγκεντρώσεις του είναι υψηλότερες από αυτές του στοματικού υγρού. Οι φυσικοχημικές ιδιότητες του COC και των μεταβολιτών του απαιτούν διαφορετικές προσεγγίσεις κατά το στάδιο της απομόνωσης. Επομένως, η προσεκτική βελτιστοποίηση των διαδικασιών προετοιμασίας των δειγμάτων είναι απαραίτητη και σημαντική για την επίτευξη χαμηλών ορίων ανίχνευσης (LODs) και αξιόπιστων ποιοτικά και ποσοτικά δεδομένων (Janicka, Kot-Wasik, & Namieśnik, 2010).

Για να ξεκινήσει η διαδικασία της ανάλυσης προηγείται η δειγματοληψία, η αποθήκευση και η μεταφορά του υλικού. Λάθη κατά τη λήψη μπορεί να αυξήσουν το χρόνο και το κόστος της ανάλυσης, ακόμη και να προκαλέσουν διφορούμενη ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση. Μια από τις κυριότερες αρχές της αναλυτικής χημείας είναι η συλλογή αντιπροσωπευτικών δειγμάτων, κάτι που είναι ιδιαίτερα δύσκολο να επιτευχθεί όταν πρέπει να αναλυθεί ανθρώπινο υλικό. Το πιο πολύτιμο υλικό για διερεύνηση είναι τα ούρα λόγω ότι διαθέτει ευρύ φάσμα ανίχνευσης. Μερικά ναρκωτικά, όπως το COC μεταβολίζονται πολύ γρήγορα για αυτό και πρέπει να γίνει άμεσα η ανάλυση στα ούρα. Όταν πραγματοποιείται εξέταση στα ούρα για παρουσία COC πρακτικά μετράται ο μεταβολίτης BZE. Ο BZE έχει βιολογικό χρόνος ημιζωής 5-8 ώρες, που είναι πολύ μεγαλύτερος από αυτόν του COC (0,5-1,5 ώρες). Το BZE απομακρύνεται από τα ούρα σε 3-5 ημέρες. Το χρονικό διάστημα μετά τη χρήση

ναρκωτικών για το οποίο λαμβάνεται θετικό αποτέλεσμα μπορεί εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης της συχνότητας χρήσης και της ποσότητας ναρκωτικών, τον ρυθμό απέκκριση, τον χρόνο ημιζωής, την ηλικία του φάρμακου, το βάρος, τη δραστηριότητα και τη διατροφή του χρήστη. Υπάρχουν πολλά βιολογικά δείγματα που μπορεί να είναι λαμβάνονται με μη επεμβατικό τρόπο, όπως: σάλιο, μαλλιά και νύχια. Αυτό το είδος συλλογής δειγμάτων δεν απαιτεί ιδιαίτερες εγκαταστάσεις και η στενή επίβλεψη των λειτουργιών του υπόκειται στην εξάλειψη της νοθείας (Janicka, Kot-Wasik, & Namieśnik, 2010).

Έρευνα σε 16 ευρωπαϊκές χώρες έδειξε ότι η πιο κατάλληλη μήτρα για προσδιορισμός των ναρκωτικών είναι σάλιο, λόγω της διαθεσιμότητάς του, της καλής συσχέτισης αποτελεσμάτων και της χαμηλής του διεισδυτικότητας. Το σάλιο έχει παρόμοιο «παράθυρο ανίχνευσης» με το αίμα, το πλεονέκτημα είναι η αυστηρή επιβεβαίωση της παρουσίας ναρκωτικών την ώρα της εξέτασης. Δυστυχώς, αποτελεί μια ακριβή μέθοδο και για αυτό περιορίζεται η ευρεία χρήση της, παρατείνοντας το χρόνο διαλογής. Συνήθως συλλέγονται σωματικά υγρά (π.χ. αίμα και ούρα) για εργαστηριακή εξέταση. Στο πλάσμα, οι συγκεντρώσεις τοξικών ουσιών είναι ανάλογες με τη κλινική κατάσταση του χρήστη. Οι δοκιμές που αφορούν το πλάσμα είναι σχετικά ακριβές, διότι έχει σύνθετη σύνθεση μήτρας που μπορεί να διακόψει ή ακόμη και να κάνει αδύνατη τη τοξικολογική ανάλυση. Η συλλογή των ούρων αν και μειώνει σημαντικά το χρόνο διαλογής και επιμηκύνει το «παράθυρο ανίχνευσης» για ναρκωτικά κατάχρησης, καθιστά δύσκολο να προσδιοριστεί εάν το άτομο που εξετάστηκε ήταν κάτω από την επιρροή του φαρμάκου τη στιγμή ενός συμβάντος (Janicka, Kot-Wasik, & Namieśnik, 2010).

Πίνακας 2: Εκτιμήσεις για την ανίχνευση της κοκαΐνης και/ ή των μεταβολιτών της στο σάλιο, το αίμα, τα ούρα και τα μαλλιά (Janicka, Kot-Wasik, & Namieśnik, 2010).

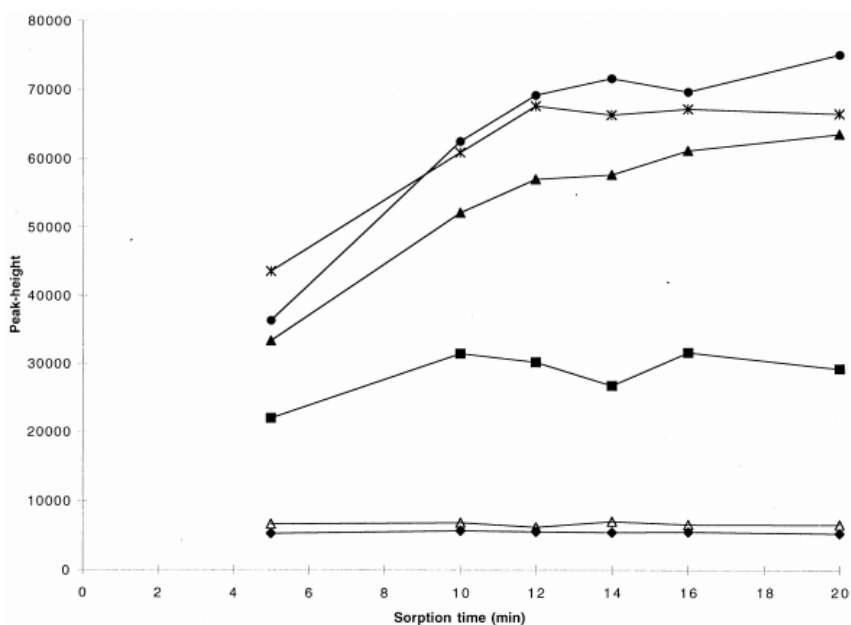
<b>Μήτρα</b>	<b>Ώρα για ανίχνευση</b>	<b>Σχόλια</b>
Ούρα	Έως 3 ημέρες	Είναι η πιο κοινή, οικονομική μέθοδος δοκιμής για τη παρουσία COC. Η συλλογή του δείγματος μπορεί να γίνει από το σπίτι.
Σίελος	Έως 10 ώρες	Είναι βραχυπρόθεσμη διαδικασία, μπορεί να ανιχνεύσει φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν πρόσφατα.
Αίμα	Έως 10 ώρες	Ακριβό τεστ για την ανίχνευση COC.
Μαλλιά	Μήνες	Είναι αποτελεσματικός τρόπος δοκιμής της περιεκτικότητας σε COC για μεγάλο χρονικό διάστημα. Κάθε φορά που μια ουσία εισέρχεται στο σώμα εναποθέτει υπολείμματα στα μαλλιά που ανιχνεύονται στα μαλλιά.

Όσον αφορά τις αμφεταμίνες και τις μεθαμφεταμίνες, λόγω της ευρείας χρήσης τους σαν ουσίες κατάχρησης, εξετάζονται από την ιατροδικαστική τοξικολογία. Οι ανοσολογικές μέθοδοι όπως το EMIT (ενζυμική πολλαπλασιαστική τεχνική ανοσοδοκιμασίας) χρησιμοποιούνται ευρέως για τη διαλογή ενώ η χρωματογραφία τριχοειδούς αερίου (GC), η φασματομετρία μάζας GC (GC-MS), η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) και η ηλεκτροφόρηση των τριχοειδών (CE) χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των αμφεταμινών στα ούρα. Οι μέθοδοι GC και GC-MS συχνά προτιμώνται για ποσοτικό προσδιορισμό και επιβεβαίωση. Τα περισσότερα εργαστήρια προτιμούν την εκχύλιση υγρού-υγρού για την παρασκευή δείγματος, καθώς αυτές οι ενώσεις εξάγονται αποτελεσματικά σε οργανικό διαλύτη από δείγμα ούρων με αλκαλικό pH. Οι περισσότερες μέθοδοι GC και GC-MS για τις αμφεταμίνες περιλαμβάνουν ένα στάδιο παραγωγοποίησης μετά την εκχύλιση με αντιδραστήρια όπως τριχλωροοξικό ανυδρίτη, τριφθοροοξικό ανυδρίτη, πενταφθοροπροπιονικό ανυδρίτη και επταφθοροβουτυρικό ανυδρίτη για μείωση της πτητικότητας και βελτίωση της χρωματογραφίας των ενώσεων. Οι διαδικασίες που ακολουθούνται για τη προετοιμασία του δείγματος πριν από την GC περιλαμβάνουν διάφορα στάδια όπως προσθήκη οργανικού διαλύτη για εκχύλιση, ανάμιξη, φυγοκέντρηση, συλλογή οργανικής φάσης, εξάτμιση διαλύτη εκχύλισης, προσθήκη αντιδραστηρίου παραγωγοποίησης, θέρμανση, εξάτμιση περίσσειας αντιδραστηρίου και διάλυση του υπολείμματος σε διαλύτη για ένεση στο GC. Αυτές οι διαδικασίες είναι δύσκολο να αυτοματοποιηθούν και όταν αναλύεται ένας μεγάλος αριθμός δειγμάτων, η υψηλή ποσότητα οργανικού διαλύτη που χρησιμοποιείται στη διαδικασία εκχύλισης είναι ζήτημα υγείας και ασφάλειας (Ugland, Krogh, & Rasmussen, 1999).

Η μικροεξαγωγή στερεάς φάσης (SPME) περιλαμβάνει τη δειγματοληψία, την εξαγωγή, τη συγκέντρωση και την εισαγωγή δείγματος σε ένα μόνο βήμα και προσφέρει μια απλή, χωρίς διαλύτες εναλλακτική λύση στις παραδοσιακές μεθόδους για την προετοιμασία του δείγματος. Επιπλέον είναι εύκολο να γίνει με αυτόματο τρόπο. Το SPME αρχικά αναπτύχθηκε για την πραγματοποίηση περιβαλλοντικής ανάλυσης και εφαρμόστηκε επιτυχώς στην ανάλυση πτητικών φαρμάκων σε βιολογικά δείγματα. Η στερεά του φάση είναι ένας μη πτητικός πολυμερικός απορροφητής επικαλυμμένος σε μια ίνα πυριτίου τοποθετημένη σε μια συσκευή τύπου σύριγγας για να τη προστατεύει.

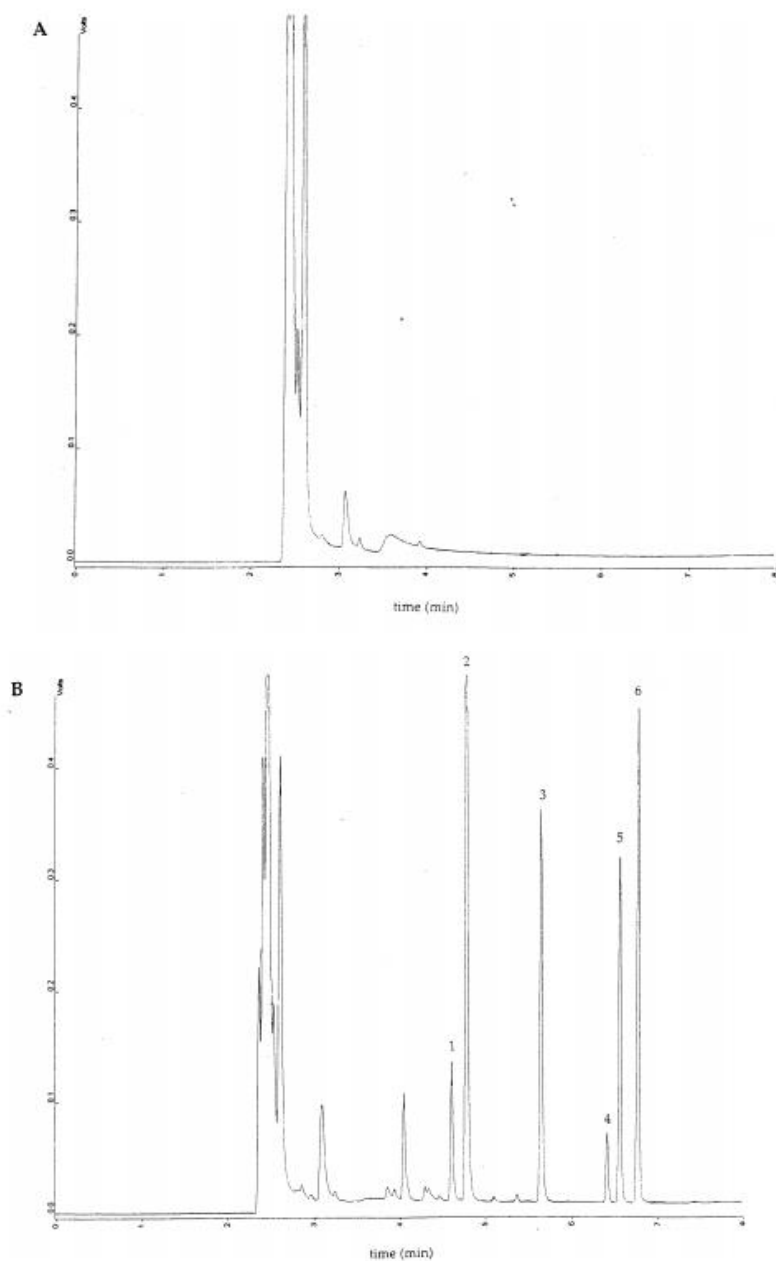
Βασίζεται στον διαχωρισμό οργανικών ενώσεων μεταξύ υδατικού δείγματος και οργανικής φάσης πολυμερούς. Διάφορες πολυμερικές φάσεις ποικίλης πολικότητας διατίθενται στο εμπόριο για το SPME (πολυδιμεθυλοσιλοξάνη (PDMS) και πολυακρυλικό). Η ποσότητα των εκχυλισθέντων αναλυτών εξαρτάται από τον συντελεστή κατανομής μεταξύ της επικάλυψης ινών και της μήτρας δείγματος. Τα κύρια προβλήματα που σχετίζονται με το SPME-GC των αμφεταμινών και τα παράγωγά τους αφορούν την πολική φύση των αμινομάδων. Η παραγωγοποίηση των πολικών ομάδων σε λιγότερο πολικές, θα αυξήσει τον συντελεστή κατανομής επίστρωσης/νερού και θα βελτιώσει την αποτελεσματικότητα του SPME (Ugland, Krogh, & Rasmussen, 1999).

Η αντίδραση αμινών με αλκυλοχλωρομυρμηκικά άλατα σε βιολογικά δείγματα έχει αναφερθεί ότι είναι ταχεία και έχει ως αποτέλεσμα υδατοσταθερά καρβαμικά άλατα επιτρέποντας την άμεση παραγωγοποίηση των αμφεταμινών στο δείγμα. Πρόσφατα αναφέρθηκε μια μέθοδο για τον προσδιορισμό της αμφεταμίνης και της μεθαμφεταμίνης στα ούρα με βάση την υδατοποίηση του αλκυλοχλωρομυρμηκικού παραγώγου και το SPME. Ο στόχος της μελέτης ήταν να καταδείξει τη δυνατότητα και την ανθεκτικότητα του SPME και του υδατικού αλκυλοχλωρομορφικού παραγώγου για τον προσδιορισμό των σχεδιαστών φαρμάκων MDA, MDMA και MDEA επιπλέον της αμφεταμίνης και της μεθαμφεταμίνης στα ούρα (Ugland, Krogh, & Rasmussen, 1999).



**Σχήμα 2:** Καμπύλες προσρόφησης SPME για αμφεταμίνη (◆), μεθαμφεταμίνη (Δ) και μεθοξυφαινοαμίνη (I.S.) (■), MDA (▲), MDMA (\*) και MDEA (O) στα ούρα μετά την παραγωγοποίηση προπυλοχλωρομυρμηκικού εστέρα (Ugland, Krogh, & Rasmussen, 1999).

Για τη διερεύνηση των αμφεταμινών χρειάζεται δείγμα ούρων (1200μL) τοποθετημένο σε φιαλίδιο αυτόματης δειγματοληψίας 2 mL. Στο δείγμα προστίθεται μεθοξυφαινομίνη (I.S.) ( $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) και 300  $\mu\text{L}$  διαλύματος αποτελούμενο από 2,5 M  $\text{K}_2\text{CO}_3$ / ρυθμιστικό διάλυμα  $\text{KHCO}_3$  (pH 10,8) και 0,5 g NaCl ( $C_{\text{TEΛ}} = 5,5 \text{ M}$ ). Το μείγμα αναδεύεται και προστίθενται 8  $\mu\text{L}$  χλωρομυρμηκικού προπυλεστέρα και αναδεύεται για 10 sec. Το φιαλίδιο φορτώνεται στο GC για αυτοματοποιημένο SPME (Ugland, Krogh, & Rasmussen, 1999).



**Σχήμα 3:** (A) χρωματογράφημα ούρων. (B) χρωματογράφημα ούρων με αμφεταμίνη, μεθαμφεταμίνη, MDA, MDMA και MDEA και μεθοξυφαινοαμίνη μετά από παραγωγοποίηση με προπυλοχλωρομυρμηκικό εστέρα. Κορυφές: 1. Αμφεταμίνη, 2. Μεθαμφεταμίνη, 3. Μεθοξυφαινοαμίνη, 4. MDA, 5. MDMA και 6. MDEA (Ugland, Krogh, & Rasmussen, 1999).

Πίνακας 3: Απόλυτη ποσότητα αμφεταμίνης, μεθαμφεταμίνης, μεθοξυφαινομίνη (I.S.), MDA, MDMA και MDEA από δείγμα ούρων με  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  κάθε ένωσης, εκφραζόμενη ως ng στην ίνα PDMS SPME (Ugland, Krogh, & Rasmussen, 1999).

Αμφεταμίνη	17
Μεθαμφεταμίνη	81
Μεθοξυφαινομίνη	64
MDA	11
MDMA	117
MDEA	69

Σχετικά με τη διαδικασία: Σε ένα δείγμα ούρων (200  $\mu\text{L}$ ) με αμφεταμίνη, μεθαμφεταμίνη, MDMA, MDA, MDEA και μεθοξυφαινοαμίνη (20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) προστέθηκαν 200  $\mu\text{L}$  εξανίου-χλωροφορμίου (3:1) μετά από αλκαλοποίηση με 50  $\mu\text{L}$  0,25 M  $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{KHCO}_3$  ρυθμιστικού (σε pH 12). Για παραγωγοποίηση στο μείγμα προστέθηκαν 4  $\mu\text{L}$  χλωρομυρμηκικού προπυλεστέρα. Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε 1 λεπτό. Η υδατική φάση στον πυθμένα απομακρύνθηκε και η οργανική φάση φυγοκεντρήθηκε δύο φορές στις 3000 rpm για 5 λεπτά και η απομένουσα υδατική φάση απομακρύνθηκε. Η οργανική φάση συμπυκνώθηκε στα 50  $\mu\text{L}$  υπό ρεύμα αζώτου, και 1  $\mu\text{L}$  εγχύθηκε είτε σε GC/ NPD είτε σε GC/ MS. Η ποσότητα αμφεταμίνης, μεθαμφεταμίνης, MDMA, MDA, MDEA και μεθοξυφαινοαμίνης που εκχυλίστηκε προσδιορίστηκε με σύγκριση των κορυφών που ελήφθησαν με εκχύλιση υγρού-υγρού και ύψους κορυφών που λήφθηκε από το SPME. Για διαχωρισμό των παραγωγοποιημένων αμφεταμινών, η θερμοκρασία διατηρήθηκε στους 180 °C για 1 λεπτό και στη συνέχεια αυξήθηκε από 20°C min<sup>-1</sup> στους 300 °C, και διατηρήθηκε σταθερή για 1 λεπτό (Ugland, Krogh, & Rasmussen, 1999).

Η μη πολική ίνα επίστρωσης PDMS βρέθηκε να είναι η πιο αποτελεσματική καθώς και η πιο ισχυρή στην εκχύλιση των παραγωγοποιημένων φαρμάκων σε σύγκριση με τις άλλες εμπορικά διαθέσιμες επικαλύψεις ινών SPME. Η προσθήκη χλωριούχου νατρίου στα ούρα είχε προηγουμένως βρεθεί ότι ενισχύει περαιτέρω την κατανομή των αναλυτών στην επικάλυψη PDMS. Επιλέγεται χρόνος προσρόφησης 16 λεπτά καθώς η κατανομή έχει φτάσει σε ισορροπία και το όριο ανίχνευσης είναι επαρκές για χρήση στην εγκληματολογική τοξικολογία. Το δείγμα αναδεύεται αυτόματα κατά τη διάρκεια της προσρόφησης. Υπό αυτές τις συνθήκες θα μπορούσαν να αναλυθούν αυτόματα 85 δείγματα εντός 24 ωρών. Επίσης, παρατηρήθηκε μείωση της αναπαραγωγιμότητας και του εμπλουτισμού όταν οι ίνες χρησιμοποιήθηκαν για περισσότερες από 150 εκχυλίσεις από δείγματα ούρων. Οι ίνες SPME αντικαθίστανται κάθε 100 δείγματα. Η διάρκεια ζωής τους ενισχύεται με βύθιση της ίνας σε καθαρό νερό όταν δεν χρησιμοποιείται και με

τοποθέτηση δειγμάτων νερού μεταξύ των δειγμάτων ούρων προς ανάλυση (Ugland, Krogh, & Rasmussen, 1999).

## Κεφάλαιο 4. Παραισθησιογόνα ή ψυχεδελικά

### 4.1 LSD

Το 1938 οι Stoll και Hofmann συνέθεσαν το διαιθυλαμίδιο του λυσεργικού οξέος (LSD), από το λυσεργικό οξύ, που αποτελούσε προϊόν υδρόλυσης των αλκαλοειδών *C. purpurea*. Το *C. purpurea* είναι ένα μυκητιακό παράσιτο γνωστό στη γεωργία από τους αρχαίους χρόνους. Η κατανάλωση του στη περίοδο του Μεσαίωνα προκάλεσε μαζικές δηλητηριάσεις και μπορούσε να αποβεί μοιραία για ανθρώπους και ζώα. Σήμερα, το LSD γνωστό και ως «οξύ», αποτελεί από τις πιο διάσημες ναρκωτικές ουσίες, που διεγείρουν τον εγκέφαλο, ιδιαίτερα στις ΗΠΑ αλλά και στην Ευρώπη (Foltz, Eades, & Reuschel, 1999). Τη δεκαετία του 1945-1960 υπήρξαν δοκιμές του φαρμάκου από ψυχιάτρους για θεραπευτική χρήση. Τα αποτελέσματα δεν ήταν ενθαρρυντικά καθώς και σημειώθηκαν αρκετές αρνητικές αντιδράσεις. Το 1947, κυκλοφόρησε από την φαρμακευτική εταιρεία Sandoz με την ονομασία «Delysid» και χρησιμοποιούταν σαν ψυχιατρικό φάρμακο (Wennig, Schneider, & Kuffer, 1998).

Το LSD είναι άοσμο και άγευστο και ο χημικός του τύπος είναι  $C_{20}H_{25}N_3O$ . Πριν τη χορήγηση του, συχνά προστίθεται σε απορροφητικό χαρτί και χωρίζεται σε μικρά τετράγωνα, καθένα από τα οποία αποτελεί μια δόση. Η κατανάλωση του συνήθως πραγματοποιείται με κατάποση. Η ενεργή δόση είναι μόλις 20-80μg, αλλά μερικές φορές έχει παρατηρηθεί δόση έως και 500μg. Εφόσον προηγηθεί η κατανάλωση του ξεκινούν οι παραισθησιογόνες παρενέργειες σε 30 με 90 λεπτά και διαρκούν για 5 έως 14 ώρες. Δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως η δράση του, ωστόσο φαίνεται να δρα σαν τη σεροτονίνη. Ο χρόνος που απαιτείται για να αποβληθεί από το πλάσμα είναι 5,1 ώρες. Ο μεταβολισμός του φαρμάκου πραγματοποιείται στο ήπαρ, ενώ ένα ποσοστό περίπου στο 1% αποβάλλεται αμετάβλητο στα ούρα (Wennig, Schneider, & Kuffer, 1998).

Σύμφωνα με μια έρευνα που διεξήχθη σχετικά με την κατανάλωση του LSD παρατηρήθηκε ότι η χρήση του είχε μειωθεί κατά τη δεκαετία του 1980. Από τις αρχές του 1990 ξεκίνησε να αυξάνεται ταχύτατα. Το LSD αποτελεί ένα φάρμακο που δεν θεωρείται εθιστικό. Ωστόσο η καθημερινή χορήγηση του μπορεί να προκαλέσει ανοχή

στον οργανισμό και να οδηγήσει σε δυσμενείς απρόβλεπτες επιδράσεις του φαρμάκου (Wennig, Schneider, & Kuffer, 1998).

Σχετικά με την τοξικότητα του LSD φαίνεται να μην έχει βρεθεί ένδειξη βλάβης οργάνων ή νευροψυχολογικών ελλειμάτων ακόμη και σε πολύ υψηλές δόσεις. Οι ψυχικές επιδράσεις του είναι κατά βάση οι πιο έντονες. Εμφανίζονται λόγω της διακοπής της φυσιολογικής αλληλεπίδρασης μεταξύ των εγκεφαλικών κυττάρων και της σεροτονίνης.

Αυτές μπορεί να είναι:

- Παραισθήσεις.
- Οπτικές ψευδαισθήσεις.
- Κρίσεις πανικού.
- Φόβος για απώλεια ελέγχου και πιθανότητα θανάτου.
- Τρομακτικές σκέψεις και συναισθήματα
- Τεχνητή ευφορία και βεβαιότητα.
- Μειωμένη αντίληψη βάθους και χρόνου.
- Διαστρεβλωμένη αίσθηση χρόνου, ταυτότητας, αντίληψης αντικειμένων, κινήσεων, χρωμάτων, ήχων, αφής και της εικόνας του σώματος του χρήστη.

Οι οπτικές αλλαγές κατά τη χρήση είναι πολύ συχνές. Οι ασθενείς μπορούν να προσαρμοστούν στην ένταση συγκεκριμένων χρωμάτων. Οι χρήστες LSD αυξάνουν την κοινωνική τους συμπεριφορά λόγω αύξησης των επιπέδων ωκυτοκίνης στο πλάσμα. Σε υψηλές δόσεις προκαλείται σοβαρό άγχος, παράνοια και κρίσεις πανικού. Μερικοί άνθρωποι δεν αναρρώνουν ποτέ από αυτές τις ψυχώσεις. Το LSD προκαλεί τα εξής αισθήματα:

- Συναίσθημα ευτυχίας.
- Εμπιστοσύνη και εγγύτητα.
- Μειωμένη αντίληψη της λύπης και του φόβου.

Οι φυσικές επιδράσεις εμφανίζονται μέσω της διέγερσης του συμπαθητικού νευρικού συστήματος. Τα συμπτώματα που αποκτά ο χρήστης είναι: διασταλμένες κόρες, τρόμος, ξηροστομία, αϋπνία, απώλεια όρεξης, εφίδρωση ή ρίγη, υψηλότερη ή χαμηλότερη θερμοκρασία σώματος. Ωστόσο η επίδραση που θα έχει η ουσία στον χρήστη εξαρτάται από τη γενική ψυχική του κατάσταση, την ψυχολογία του τη δεδομένη χρονική στιγμή



που γίνεται η χρήση και το περιβάλλον όπου πραγματοποιείται (Wennig, Schneider, & Kuffer, 1998).

## 4.2 MDMA

Η έκσταση (MDMA) είναι το πιο δημοφιλές παραισθησιογόνο στο σήμερα. Αλλιώς μπορεί να αναφερθεί και ως «*ψυχαγωγικό φάρμακο*». Η χρήση του μπορεί να προκαλέσει αλλαγή της αντίληψης του χρόνου καθώς και αλλαγή στην οπτική αντίληψη. Αν και περιγράφεται σαν παραισθησιογόνο, η περιγραφή αυτή δεν είναι απολύτως σωστή. Η έκσταση και άλλα παρόμοια φάρμακα είναι παράγωγα αμφεταμίνης που έχουν μερικές κοινές φαρμακολογικές ιδιότητες με τη μεσκαλίνη. Έχει λάβει μεγάλη διασημότητα κυρίως σε πάρτι, διότι καταφέρνει να ενισχύσει την ενέργεια, τη σεξουαλική διέγερση και την αντοχή, που παίζουν σημαντικό ρόλο. Μέσω των πάρτι, η έκσταση ξεκίνησε να γίνεται μόδα σε νέους καθώς και θεωρούνταν ένα ασφαλές ναρκωτικό. Η παράνομη διακίνηση της έχει αυξηθεί αρκετά. Το ναρκωτικό αυτό μεταγενέστερα αποδείχθηκε ότι έχει σοβαρές επιπτώσεις για τον οργανισμό. Σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές, έχουν σημειωθεί περισσότεροι από 87 θανάτους που σχετίζονται με τη χρήση της έκστασης. Παρατηρήθηκε ότι μπορούσε να προκαλέσει στους χρήστες της ηπατική νέκρωση, καρδιακές αρρυθμίες, μόνιμα σωματικά και ψυχιατρικά προβλήματα κ.α.. Επιπλέον έχουν καταγραφεί και περιπτώσεις χρηστών που έχουν οδηγηθεί σε αυτοκτονία. Τα στοιχεία που διατίθενται ως σήμερα σχετικά με την έκσταση δεν είναι επαρκή ώστε να προσδιοριστεί ακριβώς ο βαθμός της βλάβης που μπορεί να προκαλέσει (Kalant, 2001).

Η έκσταση χημικά προσδιορίζεται ως N-μεθυλ-3,4-μεθυλενοδιοξυ-αμφεταμίνη ή 3,4-μεθυλενοδιοξυ-μεθαμφεταμίνη. Μια άλλη ουσία πολύ κοντά στο MDMA είναι το N-αιθυλ-3,4-μεθυλενο-διοξαμφεταμίνη (MDEA), το οποίο αναφέρεται συχνά ως έκσταση. Η διαφορά τους εντοπίζεται στο άτομο αζώτου της δομής αμφεταμίνης, όπου στη μια περίπτωση υπάρχει ενωμένη μια ομάδα μεθυλίου 1-άνθρακα και στην άλλη μια ομάδα αιθυλίου 2-άνθρακα. Η έκσταση διαφέρει από την αμφεταμίνη και την μεθαμφεταμίνη, μοιάζει όμως δομικά με τη μεσκαλίνη. Έτσι οι φαρμακολογικές επιδράσεις της είναι ένα μείγμα αμφεταμινών και μεσκαλίνης. Τα φάρμακα αυτά ξεκίνησαν να σχεδιάζονται παράνομα από εργαστήρια για μη ιατρική χρήση. Η δημιουργία της έκστασης δεν αποτελεί μια τυχαία ανακάλυψη, αλλά έναν σκόπιμο σχεδιασμό. Το MDMA και το MDEA

εμφανίζουν πολλές ομοιότητες με τους φυσικούς νευροδιαβιβαστές επινεφρίνη, σεροτονίνη και ντοπαμίνη (Kalant, 2001).

Για να μπορέσουν να προσδιοριστούν οι επιπτώσεις της χρήσης του MDMA θα πρέπει να είναι γνωστά η δοσολογία, η συχνότητα και η διάρκεια της χρήσης. Συνήθως οι χρήστες κάνουν προσεκτική χρήση με χαμηλή δοσολογία, ώστε να λαμβάνουν τα θετικά αποτελέσματα της. Τα αποτελέσματα χρήσης της μπορούν να χωριστούν σε δυο ομάδες. Στα οξεία (μικρό διάστημα χρήσης) και στα χρόνια (χρόνια χρήσης) (Kalant, 2001).

Στα οξεία αποτελέσματα περιλαμβάνονται οι επιθυμητές αντιδράσεις και οι ανεπιθύμητες. Στις επιθυμητές αντιδράσεις περιλαμβάνονται η αύξηση της ενέργειας, αντοχή, εγρήγορση, σεξουαλική διέγερση και αναβολή του αισθήματος της κούρασης και της υπνηλίας. Ψυχολογικά το άτομο αισθάνεται ευφορία, ευεξία και ενισχύονται οι αισθήσεις του (π.χ. η ακοή του). Ο χρήστης γίνεται κοινωνικός με μεγάλη εξωστρέφεια, αυξημένη αίσθηση εγγύτητα με τους άλλους και ανοχή στα συναισθήματα και τις απόψεις τους. Πολλά παραισθησιογόνα, όπως η έκσταση και τα LSD, δοκιμάστηκαν ως θεραπεία σε ψυχιατρικούς ασθενείς. Έπειτα από 10ετή παρακολούθηση των ασθενών τα αποτελέσματα δεν ήταν αισιόδοξα. Αποδείχθηκε ότι η επιρροή που δεχόντουσαν από την χρήση τους είχε περιστασιακά θετικά αποτελέσματα. (Kalant, 2001).

Όσον αφορά τα ανεπιθύμητα αποτελέσματα της χρήσης της, φαίνεται να έχει σοβαρές επιπτώσεις σε πολλές φυσικές λειτουργίες, ακόμη και όταν λαμβάνεται σε μικρές δοσολογίες αποκλειστικά και μόνο για ψυχαγωγικούς σκοπούς. Οι χρήστες φαίνεται να εκδηλώνουν μυϊκή ένταση, σφίξιμο των γναθών και συνεχής ανήσυχη κίνηση των ποδιών. Οδηγούνται σε αυξημένη θερμοκρασία σώματος και υπάρχει πόνος στους μύες της πλάτης και των άκρων κατά τις πρώτες 2-3 ημέρες της χρήσης του (Kalant, 2001).

Το MDMA έχει την ικανότητα να αυξάνει τα επίπεδα της σεροτονίνης προκαλώντας μεταβολές στις αισθήσεις και στη διάθεση του ατόμου. Εάν γίνει υψηλή κατανάλωση, απελευθερώνεται μαζικά σεροτονίνη και μπορεί να προκαλέσει οξεία ψυχωτικά συμπτώματα και χημική βλάβη στα κύτταρα που την απελευθέρωσαν. Ο εντοπισμός της βλάβης πραγματοποιήθηκε σε πειραματόζωα. Χημικές και μικροσκοπικές μελέτες απέδειξαν ότι η ποσότητα σεροτονίνης και των μεταβολιτών της στον εγκέφαλο είχε μειωθεί σημαντικά. Σε ανθρώπους έχει παρατηρηθεί μείωση κατά 50-80% συγκριτικά με άτομα που δεν είχαν λάβει MDMA. Επίσης παρατηρήθηκε ότι η μείωση

της διμερούς συμμετρίας των κυματομορφών στους χρήστες MDMA ήταν παρόμοια με αλλαγές που είχαν παρατηρηθεί κατά τη γήρανση και στην άνοια. Συγκριτικά με άλλες ναρκωτικές ουσίες, σε χρήστες έκστασης και κάνναβης παρατηρήθηκε αλλαγή του ακουστικού ερεθίσματος. Με τη μείωση της σεροτονίνης παρατηρήθηκαν μείωση επίσης στην προλακτίνη και στη κορτιζόλη, οι οποίες παρέμεναν ακόμη και έναν χρόνο μετά την τελευταία χρήση. Παρόλο που έχουν βρεθεί τα αποτελέσματα αυτά σε χρήστες MDMA, δεν μπορεί να αποδειχθεί ότι οφείλονται σε αυτό (Kalant, 2001).

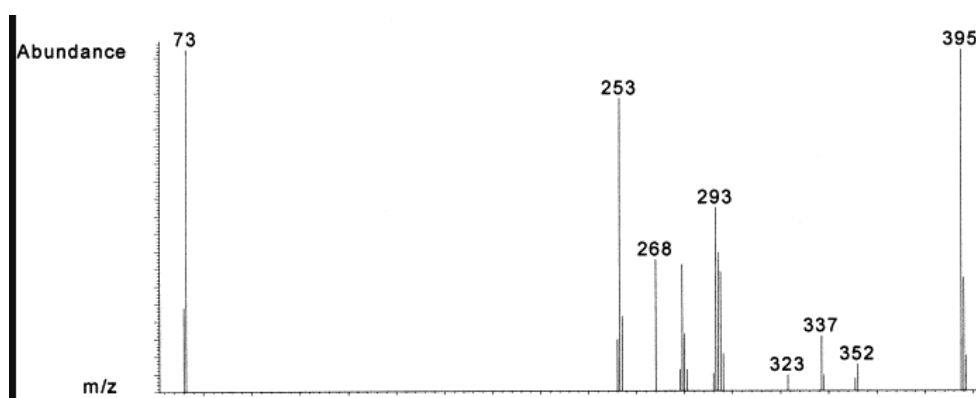
#### 4.3 Μέθοδοι προσδιορισμού LSD και MDMA

Το 1992 οι Nelson και Foltz ανέπτυξαν την ανάλυση του LSD. Η ανίχνευση του γίνεται συχνά με τη χρήση ανοσοπροσδιορισμών. Για να γίνει επιβεβαίωση και ποσοτικός προσδιορισμός της ουσίας χρησιμοποιείται αέρια χρωματογραφία (GC), τριχοειδή ηλεκτροφόρηση (CE) ή υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης (RP-HPLC) και σύζευξη μιας από αυτές τις τεχνικές με φασματογράφο μάζας (MS). Τα συστήματα HPLC και GC στη πραγματικότητα είναι συμπληρωματικά. Το RP-HPLC με ανίχνευση φθορισμού συνιστάται για ποσοτικό προσδιορισμό ενώ το τριχοειδές GC με τη χρησιμοποίηση συντηγμένης φάσης πυριτίας αποτελεί τη συνιστώμενη τεχνική για ταυτοποίηση αλκαλοειδών του μύκητα *Claviceps purpurea* (Wennig, Schneider, & Kuffer, 1998).

Στο εμπόριο διατίθενται ποιοτικές δοκιμασίες από διάφορους προμηθευτές όπως η Roche και η DPC. Οι δοκιμασίες αυτές περιλαμβάνουν ραδιοϊσοτοπικές (RIA) και τεχνολογίες nonRIA. Οι nonRIA τεχνολογίες έχουν εύκολο χειρισμό, χωρίς να απαιτείται ειδική προεργασία του δείγματος, και χαμηλό κόστος. Σε αντίθεση με τις RIA δοκιμασίες που έχουν υψηλό κόστος και το ραδιενεργό υλικό είναι δύσκολο στη προμήθεια και τη χρήση του. Χρησιμοποιούνται γενικά για τον προσδιορισμό της παρουσίας LSD σε σωματικά υγρά, με χαμηλό κόστος και αυξημένη ταχύτητα. Δεν διαθέτουν όμως την εξειδίκευση και την ποσοτική ακρίβεια μιας καλά σχεδιασμένης ανάλυσης που βασίζεται στο συνδυασμό χρωματογραφικού διαχωρισμού και φασματομετρικής ανίχνευσης μάζας. Ένα ακόμη αρνητικό χαρακτηριστικό είναι ότι για τον ανοσοπροσδιορισμό απαιτούνται μεγαλύτερες συγκεντρώσεις LSD στο δείγμα συγκριτικά με τις φασματομετρικές μεθόδους μάζας. Παρόλο που οι ανοσοδοκιμασίες έχουν δείξει θετικά

αποτελέσματα πρέπει πάντα να επιβεβαιώνονται και από μια δεύτερη πιο συγκεκριμένη μέθοδο (Wennig, Schneider, & Kuffer, 1998).

Η μέθοδος GC-MS χρησιμοποιήθηκε για ανίχνευση χαμηλών επιπέδων LSD όσο 10 pg/mL. Έχει λάβει περιορισμένη χρήση διότι είναι μη αναστρέψιμη η προσρόφηση του LSD σε στήλες GC, ενώ συγχρόνως έχει χαμηλή πτητικότητα και θερμική αστάθεια. Η επιλεκτική εκχύλιση και η παραγωγοποίηση του αζώτου ινδόλης του LSD είναι απαραίτητη προκειμένου να χρησιμοποιηθεί αυτή η μέθοδος. Η αντίδραση Retro-Diels και η διάσπαση του τμήματος δεσδροπιπεριδίνης δίνουν τα θραύσματα  $m/z$  268, 253 και 279. Η διάσπαση του τριμεθυλοσιλυλο (TMS) από το LSD δίνει την κορυφή στο  $m/z$  73. Ο κατακερματισμός του LSD πραγματοποιείται με τη χρήση ιονισμού ηλεκτροψεκασμού (ESI). Το φάσμα μάζας κρούσης ηλεκτρονίων (EI) του TMS-LSD αντιπροσωπεύεται στο Σχήμα 1 (Wennig, Schneider, & Kuffer, 1998).



**Σχήμα 5:** Φάσμα μάζας EI του TMS-LSD (Wennig, Schneider, & Kuffer, 1998).

Το 1992 αναπτύχθηκε μια ανάλυση GC-MS-MS στο Northwest Bioanalytical στην Αμερική και διαθέτει την ικανότητα να αναλύει περισσότερα από χίλια δείγματα ούρων. Η μέθοδος συνίσταται στην προσθήκη μεθανολικού διαλύματος που περιέχει 1,2 ng του εσωτερικού προτύπου (LAMPA) σε 4 mL ούρων. Τα ούρα γίνονται ελαφρός όξινα (PH=6) με τη προσθήκη ρυθμιστικού φωσφορικού 0,1 M και εκχυλίζονται με στήλη Bond Elut Certify I. Αρχικά ρυθμίζεται η στήλη SPE με διαδοχική πλύση με μεθανόλη και 0,1M φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος. Αφού προστεθεί το δείγμα των ούρων, η στήλη πλένεται διαδοχικά με 1 M οξικού οξέος και μεθανόλη, και οι αναλύτες εκλούνται με οξικό αιθυλεστέρα που περιέχει 4% υδροξείδιο αμμωνίου. Είναι σημαντικό για την

αποτελεσματικότητα της μεθόδου να παρασκευάζεται οξικό οξύ καθημερινά. Οι αναλύσεις GC-MS-MS πραγματοποιούνται σε ένα όργανο Finnigan TSQ7000 εξοπλισμένο με μια καλά απενεργοποιημένη τριχοειδή στήλη GC με επικάλυψη φαινυλομεθυλοσιλικόνης 5%. Για να επιτευχθεί ο ιονισμός χρησιμοποιείται αμμωνία ως αέριο αντιδραστήριο με θετικό ιόν με χημικό ιονισμό. Υπό τις συνθήκες αυτές γίνεται ο διαχωρισμός των τριμεθυλοσιλυλ παραγώγων των LSD, iso-LSD και LAMPA χρωματογραφικά. Σχηματίζουν άφθονα πρωτονιωμένα ιόντα μορίων (MH) που μπορούν να διαχωριστούν με σύγκρουση σε εξέχοντα ιόντα προϊόντος που επιλέγονται στον δεύτερο αναλυτή μάζας. Τα αντίστοιχα φάσματα ιόντων προϊόντος για iso-LSD και LAMPA είναι παρόμοια με τη διαφορά τους να εντοπίζεται μόνο στις σχετικές εντάσεις των κύριων ιόντων προϊόντος (Foltz, Eades, & Reuschel, 1999).

Στα τέλη της δεκαετίας του 1980, το ESI-MS έχει αναπτυχθεί ως μια σημαντική τεχνική για την ανίχνευση μορίων που υπάρχουν σε χαμηλές συγκεντρώσεις όπως για παράδειγμα το LSD. Ο περιορισμός της μεθόδου αυτής είναι οι χαμηλοί ρυθμοί ροής υγρού και η ανάγκη αποφυγής υψηλού υδατικού περιεχομένου της κινητής φάσης. Όμως το γεγονός ότι αποτελεί μια δοκιμασία που απαιτεί υψηλά εκπαιδευμένο προσωπικό και συγχρόνως έχει υψηλό κόστος για την εφαρμογή της, την έχει αποκλείσει από ανάλυση ρουτίνας και πλέον δεν χρησιμοποιείται σε πολλά εργαστήρια (Wennig, Schneider, & Kuffer, 1998).

Η κύρια μέθοδος που χρησιμοποιείται πλέον στα εργαστήρια για την ανάλυση ιχνών LSD σε βιοδείγματα είναι η HPLC μαζί με την ανίχνευση φθορισμού. Αυτές οι μέθοδοι έχουν αναθεωρηθεί από τους Nelson και Foltz. Οι Francis και Craston χρησιμοποίησαν καθαρισμό συγγένειας (ACU) για διαχωρισμό HPLC με ανίχνευση φθορισμού. Η κινητή φάση αποτελούνταν από 65% μαθανόλη και 35% υδατικό οξικό αμμώνιο. Η οπτική διέγερση και εκπομπή παρατηρήθηκαν στα 320 και 400 nm αντίστοιχα. Το όριο ανίχνευσης (LOD) ήταν στα 0,5 ng/mL LSD στα ούρα. Το μεγάλο πλεονέκτημα που έχει αυτή η μέθοδος είναι ότι μπορεί να αναλύσει μεγάλους όγκους δειγμάτων (έως 4 mL ούρων κατά τη χρήση αντισώματος 5 μg) σε σύντομο χρονικό διάστημα χωρίς να απαιτείται παραγωγοποίηση. Το κύριο μειονέκτημά της είναι ότι ο ποσοτικός προσδιορισμός δεν είναι δυνατός σε υψηλές συγκεντρώσεις φαρμάκου λόγω κορεσμού των αντισωμάτων εργαστήρια (Wennig, Schneider, & Kuffer, 1998).

Μια άλλη χρήση του φθορισμού HPLC είναι για τη ποσοτική εκτίμηση της συγκέντρωσης LSD στα ούρα πριν από την τελική επιβεβαίωση με υγρή χρωματογραφία (LC)-MS. Για τον διαχωρισμό χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου σε ΡΗ 8 σε συγκέντρωση 0,1 Μ κατά τη κινητή φάση. Το μήκος κύματος διέγερσης ήταν 330 nm και το μήκος κύματος εκπομπής στα 420 nm. Το LOD εκτιμάται ότι είναι 0,5 ng/mL και το γραμμικό εύρος ποσοτικού προσδιορισμού ήταν έως 10 ng/mL (Wennig, Schneider, & Kuffer, 1998).

Όσον αφορά το MDMA η εντόπιση του στα μαλλιά αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1993. Μπορεί επίσης να ανιχνευτεί στο σάλιο και στον ιδρώτα. Η βιβλιογραφία είναι πολύ πτωχή όσον αφορά αυτά τα βιολογικά δείγματα. Η διερεύνηση για κατάχρηση ναρκωτικής ουσίας μπορεί να προσδιοριστεί με διάφορες εργαστηριακές εξετάσεις. Η τυπική προσέγγιση βασίζεται στη διαλογή φαρμάκων με ανοσοπροσδιορισμό, ακολουθούμενη από επιβεβαίωση με τη χρήση αεριοχρωματογραφίας - φασματομετρίας μάζας (GC – MS). Το πιο κοινό βιολογικό δείγμα που χρησιμοποιείται είναι τα ούρα. Είναι δύσκολο να εντοπίσουμε τοξικές ουσίες από δείγματα σάλιου, μαλλιών και ιδρώτα καθώς και η ποσότητα του DNA που μπορούμε να απομονώσουμε από αυτά τα δείγματα είναι μικρή. Στον παρακάτω πίνακα (Βλ. Σχήμα 6) παρουσιάζονται τα κύρια πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα του ελέγχου των ούρων (Wennig, Schneider, & Kuffer, 1998).

**Σχήμα 6.** Σύγκριση ούρων, ιδρώτα, σάλιου και μαλλιών για ανάλυση αμφεταμινών υποκατεστημένων με δακτύλιο (Wennig, Schneider, & Kuffer, 1998).

Parameter	Urine	Sweat	Saliva	Hair
Sample collection	Privacy concerns	Non invasive	Non invasive	Non invasive
Detected compound	Parent drug and metabolites	Parent drug>> metabolites	Parent drug>> metabolites	Parent drug>> metabolites
Window of detection	2–3 Days	1 Week	Some hours	Some months
Drug concentration	High	Low	Low	Low
Associated problems	Adulteration	Limited sample	Limited sample	Environmental contamination
Units	ng/ml	ng/patch	ng/ml	ng/mg

Όσον αφορά το σάλιο, αποτελεί ένα βιολογικό δείγμα που έχει ξεκινήσει να χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο ως ένα εναλλακτικό δείγμα. Τα τελευταία χρόνια έχει προταθεί να χρησιμοποιείται για τη διερεύνηση της χρήσης αλκοόλ σε οδηγούς. Ο Samyn και οι συνάδελφοί του, έκαναν πρόσφατα κάποιες αναφορές σχετικά με των προσδιορισμό ναρκωτικών ουσιών σε δείγματα σιέλου. Σε μια μελέτη σχετικά με το MDMA και το MDEA, παρατηρήθηκαν μόνο ίχνη μη μεταβολισμένων φαρμάκων. Τα επίπεδα τους παρέμειναν ανιχνεύσιμα για αρκετές ώρες μετά την κατάποση των ουσιών. Πραγματοποιήθηκε άλλη μια μελέτη που αφορούσε την ανίχνευση αυτών των ουσιών σε τραυματίες οδηγούς στον δρόμο. Βρέθηκε ότι ίχνη MDA, MDMA και MDEA μπορούσαν να ανιχνευθούν στο σάλιο (Sondermann & Kovar, 1999).

Από το 1911, υπήρχε η γνώση ότι τα φάρμακα απεκκρίνονται μέσω του ιδρώτα. Αλλά μέχρι πρόσφατα δεν είχε αναπτυχθεί κάποια λύση για τον προσδιορισμό των ουσιών. Τα τελευταία χρόνια έχουν σημειωθεί σημαντικές πρόοδοι με την ανάπτυξη μιας τεχνολογίας «patch ιδρώτα», η οποία προτάθηκε από την PharmChem Labs. (Menlo Park, ΗΠΑ). Ωστόσο, έχει δοθεί ελάχιστη προσοχή στον ιδρώτα ως δείγμα για την ανίχνευση αμφεταμινών υποκατεστημένων με δακτύλιο. Πρόσφατα, οι Kidwell και οι συνεργάτες

του δεν ανέφεραν την ανίχνευση έκστασης ή σχετικών ενώσεων στον ιδρώτα (Sondermann & Kovar, 1999).

Σχεδόν όλη η διαθέσιμη βιβλιογραφία που αφορά τον προσδιορισμό αυτών των ουσιών σε μαλλιά, αφορά έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί από Ιάπωνες. Και πάλι μέχρι πρόσφατα, η ανίχνευση αμφεταμινών με υποκατάσταση δακτυλίου δεν έχει τεκμηριωθεί καλά. Σύμφωνα με μια διαδικασία εξέτασης που πραγματοποιήθηκε το 1995, σημειώθηκαν τέσσερις σημαντικές μέθοδοι (19), (20), (21), (22), που βασίζονται όλες στη GC-MS (βλ. Σχήμα 7). Και στις τέσσερις μεθόδους εφαρμόστηκε απολύμανση πριν την διερεύνηση. Το εύρος των συγκεντρώσεων μαλλιών που αναφέρεται στη βιβλιογραφία συνοψίζεται Σχήμα 7. Μεταβολίτες ούρων MDMA δεν αναφέρθηκαν ποτέ στα ανθρώπινα μαλλιά (Sondermann & Kovar, 1999).

**Σχήμα 7** . Διαδικασίες GC-MS για την ανίχνευση αμφεταμινών στα μαλλιά (Sondermann & Kovar, 1999).

Ref.	Drug	Hydrolysis	Work-up	Derivatization	Column	Ions (m/z)	Limit of detection (pg/mg)
[19]	MDA	Methanol sonication	-	PAA	HP-5MS	44, 135, 162, 235	10
	MDMA					58, 114, 135, 249	10
	MDEA					72, 128, 135, 263	10
[20]	MDA	Methanol-5 M	SPE Bond Elut	PFPA	TC-1	135, 162, 325	100
	MDMA	HCl (20:1)	Certify			204, 162, 135, 339	100
	MDEA					218, 162, 135, 353	100
[21]	MDA	1 M NaOH	SPE Bond Elut	PFPA	HP-1	135, 162	40
	MDMA		Certify			204, 162	40
	MDEA					218, 190	100
	MBDB					218, 176	40
[22]	MDA	1 M NaOH	L/L ethyl	HFBA	HP-5MS	135, 240, 275	50
	MDMA		acetate			210, 254, 389	20
	MDEA					240, 268, 403	20
	MBDB					176, 268, 403	20



**Σχήμα 8.** Εύρος συγκεντρώσεων (ng/mg) που παρατηρείται στα μαλλιά (Sondermann & Kovar, 1999).

Αναφ.	MDA	MDMA	MDEA	MBDB
[19]	0,04-1,23 (n=6)	0,05-2,91 (n=9)	0,80-3,07 (n=5)	NR <sup>a</sup>
[20]	0,13-0,79 (n=5)	0,15-12,51 (n=7)	NR	NR
[21]	0,05-0,89 (n=16)	0,1-8,3 (n=16)	0,12-15,0 (n=13)	0,21-1,3 (n=2)
[22]	0,4-8,0 (n=13)	0,3-42,7 (n=14)	0,6-69,3 (n=6)	1,41-3,09 (n=2)

Η διάδοση της αμφεταμίνης και σχετικών φαρμάκων παρουσιάζει απότομη άνοδο στη παράνομη αγορά. Το Ευρωπαϊκό Κέντρο Παρακολούθησης Ναρκωτικών και Τοξικομανίας (ΕΚΠΝΤ) χαρακτηρίζει αυτές τις ουσίες ως τις πιο διαδεδομένες στην Ευρώπη μετά την Κάνναβη. Οι ανοσοδοκιμασίες όπως οι ραδιοανοσοδοκιμασίες (RIA), η ενζυμική ανοσοδοκιμασία (EIA), η ανοσοδοκιμασία πόλωσης φθορισμού (FPIA) χρησιμοποιούνται ως τεχνικές διαλογής. Τα αποτελέσματά τους θα πρέπει πάντοτε να επιβεβαιώνονται με συγκεκριμένες τεχνικές όπως η αέρια χρωματογραφία – φασματομετρία μάζας (GC – MS). Επίσης αναπτύσσονται ανοσοχημικές τεχνικές για την ανίχνευση της αμφεταμίνης και αμφεταμίνης, σε πολύ υψηλές τιμές, σε δείγματα ούρων. Οι τεχνικές αυτές παρουσιάζουν κάποιους περιορισμούς:

- Ο αριθμός των ανιχνεύσιμων ουσιών περιορίζεται σε MDA, MDMA και σε ορισμένες περιπτώσεις MDEA και έχει μειωμένη ευαισθησία.
- Επιτρέπει θετική ανίχνευση μόνο για πρόσφατη λήψη υψηλών δόσεων, με αποτέλεσμα τον κίνδυνο ψευδώς αρνητικών αναλύσεων.
- Με χαμηλότερες τιμές από αυτές που προτείνονται, ο αριθμός των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων είναι υψηλός, λόγω κοινών φαρμάκων όπως η εφεδρίνη, η ρανιτιδίνη και οι παρεμβαλλόμενες ουσίες.
- Οι ανοσοχημικές δοκιμασίες είναι οικονομικά αποδοτικές μόνο όταν αναλύονται πολλά δείγματα (Pellegrini, et al., 2001).

Η ανάλυση των δειγμάτων είναι μια πολύ χρονοβόρα διαδικασία. Συνήθως προηγείται διαχωρισμός της δραστικής ουσία από τη μήτρα, ώστε να είναι δυνατή η αναγνώριση. Η φασματοσκοπία εγγύς υπέρυθρων (NIR) αποτελεί μια καινούργια δυνατότητα για ταχεία ανάλυση των δειγμάτων. Η NIR αποτελεί μια τεχνολογία που

συναντάται κυρίως στις βιομηχανίες τροφίμων και γεωργικών προϊόντων, στη βιοϊατρική, στην κλινική και φαρμακευτική έρευνα. Αυτό οφείλεται στο ότι έχει την ικανότητα να δίνει γρήγορες, ακριβείς και μη καταστροφικές μετρήσεις. Στην ιατροδικαστική μέχρι τώρα έχει εξεταστεί μόνο η ταυτοποίηση παραγώγων αμφεταμίνης και 3,4-μεθυλενδιοξαμφεταμίνης σε σύνθετους (Kintz & Samyn, 1999).

## Κεφάλαιο 5. Κατασταλτικά του ΚΝΣ

### 5.1 Βαρβιτουρικά

Το σύνθετο βαρβιτουρικό οξύ (2,4,6-τριυδροξυπυριμιδίνη) χρησιμοποιείται ευρέως για τη κατασκευή πλαστικών, υφασμάτων, δεικτών, φαρμακευτικών παρασκευασμάτων (ηρεμιστικών) και πολυμερών. Η ένωση αυτή ανακαλύφθηκε το 1863 από Γερμανό ερευνητή von Baeyer όταν ένωσε την ουρία με το μηλονικό οξύ. Το ίδιο το βαρβιτουρικό οξύ δεν έχει την ικανότητα να επηρεάζει το κεντρικό νευρικό σύστημα, ωστόσο αποτελεί πρόδρομο των φαρμακευτικών βαρβιτουρικών που σε υπερβολικές ποσότητες μπορεί να αποβεί θανατηφόρο. Πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε ποντίκια εργαστηρίου έδειξαν ότι το βαρβιτουρικό οξύ μπορεί να προκαλέσει αύξηση του βάρους του ήπατος και των νεφρών που οδηγεί σε υπερηγλυκαιμία και δυσανεξία στη γλυκόζη. Το στερεό υπόλειμμα του βαρβιτουρικού οξέος προκαλεί ερεθισμό στο δέρμα, τα μάτια και την αναπνευστική οδό όταν το άτομο έρθει σε επαφή. Τα παράγωγα από τα οποία προέρχεται το βαρβιτουρικό οξύ έχει αποδειχθεί ότι έχουν αντιμικροβιακή δράση και αποτελούν ανασταλτικούς παράγοντες όγκων (Bartzatt, 2001).

Το βαρβιτουρικό οξύ από μόνο του δεν είναι υπνωτικό, αλλά τα παράγωγα του παρουσιάζουν υψηλή ηρεμιστική και υπνωτική δράση, ενώ χρησιμοποιούνται συχνά και ως αγχολυτικά, αντισπασμωδικά και αναισθητικά (Reza Zarei & Gholamian, 2011). Τα ηρεμιστικά βαρβιτουρικά καταστέλλουν τον νευρικό, τον σκελετικό και τον καρδιακό μυ και έχουν ως αποτέλεσμα την εμφάνιση κατάθλιψης. Η δηλητηρίαση που μπορεί να προκαλέσουν επηρεάζει άμεσα το καρδιαγγειακό σύστημα και μπορεί να οδηγήσει τον ασθενή σε κώμα. Η συνεχής τους χρήση μπορεί να προκαλέσει ανοχή, χωρίς όμως αυτό να αναιρεί τις θανατηφόρες επιπτώσεις που μπορεί να έχει η λήψη υπερβολικής ποσότητας. Επιπλέον, έπειτα από συνεχής χρήση η απότομη διακοπή τους μπορεί να προκαλέσει στον ασθενή σοβαρό σύνδρομο στέρησης. Οι βαρβιτουρικές ενώσεις

διαχέονται σε όλους τους ιστούς και τα όργανα του οργανισμού, συμπεριλαμβανομένου του εγκεφάλου και του πλακούντα (Bartzatt, 2001).

Το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) αποτελεί τον κύριο ανασταλτικό νευροδιαβιβαστή στο ΚΝΣ των θηλαστικών. Τα βαρβιτουρικά δεσμεύονται με τον υποδοχέα GABA<sub>A</sub> στην υπομονάδα Β, ενισχύοντας την επίδραση του GABA στον υποδοχέα αυτόν. Επιπλέον έχουν την ικανότητα να αναστέλλει τους διεγέρτες υποδοχέων AMPA προκαλώντας μεταβολές στο ΚΝΣ. Η αποβολή των βαρβιτουρικών από τον οργανισμό γίνεται κυρίως στο ήπαρ. Η διάσπαση του δακτυλίου του βαρβιτουρικού οξέος εμφανίζεται μόνο ελαφρά, ωστόσο σε ποσότητες κατανάλωσης μεγαλύτερες από αυτές που χορηγούνται για τα ηρεμιστικά, προκαλεί τοξικές επιδράσεις. Στις τοξικές δραστηριότητες συμπεριλαμβάνεται η διαταραχή της ένδο- και εξωκυτταρικής οσμωτικής ισορροπίας. Τα βαρβιτουρικά που χρησιμοποιούνται ως ηρεμιστικά μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τρεις κατηγορίες: μακράς διάρκειας, βραχείας δράσης και εξαιρετικά βραχείας δράσης. Η φαινοβαρβιτάλη, ένα μακράς διάρκειας μέλος, χορηγείται έως 120 mg/ημέρα. Το Amobarbital, μέλος βραχείας δράσης, χορηγείται έως και 150 mg/ημέρα. Το θειοπεντρικό νάτριο, εξαιρετικά βραχείας δράσης, χορηγείται ενδοφλεβίως έως 0,2 g/θεραπεία. Τα επίπεδα λήψης που μπορεί να αποβούν θανατηφόρα, ποικίλλουν ευρέως και εξαρτώνται από τον τύπο, τη δόση, την οδό χορήγησης και τη κατάσταση του ασθενή (Bartzatt, 2001).

## 5.2 Αλκοόλ

Το αλκοόλ σε συνδυασμό με διάφορους παράγοντες, όπως το κοινωνικό πλαίσιο, το φαρμακολογικό ιστορικό, η γενετική προδιάθεση, το περιβάλλον και άλλα μπορεί να εξελιχθεί σε μια καταναγκαστική χρήση, εφόσον προκαλεί εθισμό στον χρήστη αναγκάζοντας τον σε συνεχή κατανάλωση. Παρόλο που είναι γνωστό ότι το αλκοόλ μπορεί να προκαλέσει εθισμό, δεν έχει αποσαφηνιστεί ακόμη πως ακριβώς συμβαίνει. Πιο συγκεκριμένα, καθίσταται απαραίτητο να απαντηθούν δύο σημαντικά ερωτήματα: α) Από ποιους παράγοντες (γενετικούς, περιβαλλοντικούς) εξαρτάται η έναρξη λήψης και ο εθισμός στο αλκοόλ; και β) ποιες αλλαγές εντοπίζονται στον εγκέφαλο που διέπουν τη μετάβαση από την ελεγχόμενη στην καταναγκαστική λήψη (Spanagel, Molander, Bilbao, & Vengeliene, 2009).

Οι γενετικά προσδιορισμένοι μη ειδικοί παράγοντες ευαισθησίας που αυξάνουν τον κίνδυνο ο χρήστης να αναπτύξει εθισμό περιλαμβάνουν ψυχιατρικές διαταραχές. Κάποιες από αυτές είναι το άγχος και η κατάθλιψη. Τα άτομα που αναπτύσσουν εξάρτηση παρουσιάζουν κάποια χαρακτηριστικά γνωρίσματα στη προσωπικότητα τους. Αποτελούν άτομα παθητικά εξαρτημένα, με παρορμητικότητα ή αντικοινωνικότητα. Οι ψυχιατρικές διαταραχές σε συνδυασμό με τα χαρακτηριστικά της προσωπικότητας αντικατοπτρίζουν τις διαφορές στα συστήματα νευροδιαβιβαστή του εγκεφάλου που με τη σειρά τους επηρεάζουν τη φαρμακοδυναμική του αλκοόλ και εν μέρει μπορούν να καθορίσουν την εξάρτηση του χρήστη έπειτα από υπερβολική και μακροχρόνια κατανάλωση (Spanagel, Molander, Bilbao, & Vengeliene, 2009).

Υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί που καθορίζουν τη φαρμακοκινητική του αλκοόλ. Τα γονίδια που συμβάλλουν στον μεταβολισμό του αλκοόλ επηρεάζουν την αντίδραση του οργανισμού σε αυτό και τον κίνδυνο ο χρήστης να αναπτύξει εθισμό. Η αφυδρογονάση αλκοόλης και η αφυδρογονάση αλδεϋδης μπορούν να προστατεύσουν το άτομο από την υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ. Κατά τον μεταβολισμό του αλκοόλ το πρώτο προϊόν που παράγεται είναι η ακεταλδεϋδη. Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αντίδραση και μπορεί να προκαλέσει κάποια αποτελέσματα που μιμούνται εκείνα του αλκοόλ. Η παραγωγή της γίνεται από το ένζυμο καταλάση στον εγκέφαλο μετά τη λήψη αλκοόλ. Έπειτα από μελέτες αποδείχθηκε ότι η ακεταλδεϋδη συμβάλει σε πολλές συμπεριφορές που προκαλεί το αλκοόλ μετά τη λήψη. Ο μηχανισμός δράσης της δεν είναι ακόμη σαφής το μόνο που γνωρίζουμε είναι ότι επηρεάζει τη δραστηριότητα διαφορετικών συστημάτων νευροδιαβιβαστών. Ο εθισμός στο αλκοόλ είναι αρκετά περίπλοκος με αποτέλεσμα να μην είναι εφικτό να μελετηθεί στα πειραματόζωα. Ωστόσο η έναρξη και διατήρηση της λήψης του και η αναζήτηση του όταν υπάρχει αποχή από αυτό είναι εφικτό να διαμορφωθεί επιτυχώς (Spanagel, Molander, Bilbao, & Vengeliene, 2009).

Το αλκοόλ φαρμακολογικά είναι πολύπλοκο και δρα με τη διακοπή διακριτών πρωτεϊνών υποδοχέων ή τελεστών άμεσων ή έμμεσων αλληλεπιδράσεων. Σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις έχει τη δυνατότητα να αλλάξει τη σύνθεση των λιπιδίων που περιβάλλουν την μεμβράνη. Σε πολλές χώρες το επιτρεπτό νόμιμο εύρος συγκεντρώσεων για οδήγηση είναι 5-20mM (Spanagel, Molander, Bilbao, & Vengeliene, 2009).

Γενικά η αλκοόλη θεωρείται ένας μη ειδικός φαρμακολογικός παράγοντας. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι έχει κάποιους πρωτεύοντες στόχους, όπως το NMDA, GABA<sub>A</sub>, 5-HT<sub>3</sub> και nAChRs, καθώς και L-τύπου Ca<sup>2+</sup> κανάλια και GIRK. Ακόμη και χαμηλές συγκεντρώσεις (όσο 1mM) μπορούν να προκαλέσουν μεταβολές στη λειτουργία αυτών των υποδοχέων και των καναλιών ιόντων. Οι οξείες επιδράσεις του αλκοόλ προκαλούνται από την αλληλεπίδραση των συστημάτων των καναλιών των νευροδιαβιβαστών. Έπειτα από αυτή τη πρώτη μεταβολή που προκαλεί επιδρά σε μια ποικιλία νευροπεπτιδίων, καταλήγοντας στις τυπικές συμπεριφορές της χρήση αλκοόλ που κυμαίνονται από καταστολή έως ακόμη και ύπνωση (Spanagel, Molander, Bilbao, & Vengeliene, 2009).

### 5.3 Μέθοδοι προσδιορισμού βαρβιτουρικών και αλκοόλ

Για τον προσδιορισμό των βαρβιτουρικών μπορεί να χρησιμοποιηθεί μέθοδος ανάλυσης που χρησιμοποιεί φασματοφωτόμετρο. Για την εφαρμογή της μεθόδου λαμβάνεται υδατικό δείγμα 1-3mL για ανάλυση, ή εναλλακτικά διαλύεται ένα στερεό δείγμα σε ισοδύναμο όγκο και μετά προστίθεται 0,50 mL υδατικού κορεσμένου NaNO<sub>2</sub>. Στη συνέχεια προστίθενται 0,1mL 2M οξικού οξέος και το ανακατεύουμε. Προστίθεται αρκετό απεσταγμένο νερό ωστόσο να φθάσει σε τελικό όγκο 4mL και ανακατεύεται. Η απορρόφηση διαβάζεται σε μήκος κύματος 530nm με φασματόμετρο UV - Vis. Ο σχηματισμός γνωστών προτύπων ακολουθεί τα ίδια στάδια χρησιμοποιώντας ένα αποθεματικό υδατικό μείγμα βαρβιτουρικού οξέος στα 3.000 mg/mL για να ληφθούν τα επιθυμητά επίπεδα συγκέντρωσης. Χρησιμοποιείται νερό, NaNO<sub>2</sub> και οξικό οξύ μόνο ως μείγμα για το «τυφλό» (Bartzatt, 2001).

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό μιας ποσότητα 10-30g, το υδατικό δείγμα ή το διαλυτοποιημένο στερεό δείγμα δεν πρέπει να είναι μεγαλύτερο από 10 L, το οποίο στη συνέχεια τοποθετείται σε κατάλληλο μικρό-σωλήνας αντίδρασης. Προστίθενται 10mL κορεσμένου NaNO<sub>2</sub> και 2mL οξικού οξέος 2M. Πραγματοποιείται ανάμιξη και παρατηρείται ένα κόκκινο - βιολετί τελικό σημείο. Τα πρότυπα των επιθυμητών τιμών συγκέντρωσης γίνονται ακολουθώντας τα ίδια βήματα και στη συνέχεια χρησιμοποιούνται για σύγκριση και παρεμβολή συγκεντρώσεων δοκιμαστικών δειγμάτων. Ένα αποθεματικό μείγμα βαρβιτουρικού οξέος στα 3.000 mg/ mL παρέχει ποσότητες στα 3 g/ l και είναι βολικό για το σκοπό αυτό. Οι γνωστοί έλεγχοι στα 12, 15,

18, 21, 24 και 27 g βαρβιτουρικού οξέος, είναι κατάλληλοι και συγχρόνως αντιπροσωπευτικοί για χρήση με αυτό το πρωτόκολλο (Bartzatt, 2001).

Για να λάβουμε σε σύντομο χρονικό διάστημα ένδειξη θετική/αρνητική για βαρβιτουρικό οξύ, πρέπει να τοποθετήσουμε 90L κορεσμένου  $\text{NaNO}_2$  με 90L υδατικού δείγματος και να ανακατεύσουμε. Έπειτα προσθέτουμε 20L οξικού οξέος 2M και λαμβάνουμε ένα ερυθρό-ιώδες χρώμα που είναι ενδεικτικό για το βαρβιτουρικό οξύ. Θα πρέπει επίσης, να γίνεται ταυτόχρονα η εκτέλεση ενός θετικού και ενός αρνητικού μάρτυρα. Ένα αποθεματικό διάλυμα βαρβιτουρικού οξέος στα 3.000 mg/mL παρέχει ένα βολικό μέσο για τη δημιουργία επιθυμητών συγκεντρώσεων. Η δοκιμασία αυτή ονομάζεται spot-spot test. Ακολουθώντας αυτό το πρωτόκολλο για το spot test, 100 g βαρβιτουρικού οξέος και 100 g καθεμιάς από τις οργανικές ή ανόργανες ενώσεις που αναφέρονται στο Σχήμα 9 αποδείχθηκε ότι δεν παρεμβαίνουν στη διάκριση και την ερμηνεία του οριστικού χρωματομετρικού τελικού σημείου κατά την παραγωγή βουρουρικού οξέος (Bartzatt, 2001).

**Σχήμα 9:** Ενώσεις που αξιολογούνται ότι δεν έχουν παρεμβολή στην χρωματομετρική αντίδραση για προσδιορισμό βαρβιτουρικού οξέος (Bartzatt, 2001).

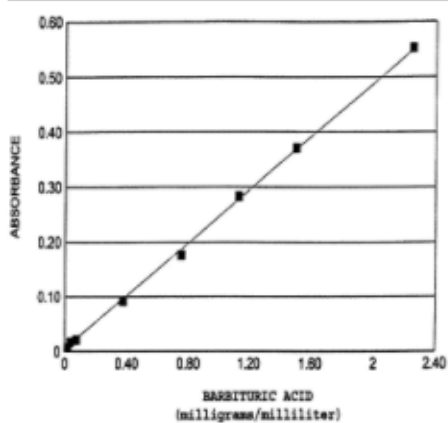
ΟΡΓΑΝΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ	Ανόργανα άλατα
Ασπιρίνη	$\text{NaN}_3$
Κινίνη	$\text{NaCl}$
Νικοτινικό οξύ	$\text{CaCO}_3$
Νικοτιναμίδη	$\text{LiBr}$
Ινοσιτόλη	$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$
Καφεΐνη	$\text{K}_2\text{HPO}_4$
Χοληστερίνη	
L- προλίνη	
p- Νιτροβενζοϊκό οξύ	
Μαλεϊκό οξύ	
Μυριστικό οξύ	
υ- Τρυγικό οξύ	
Βενζολοσουλφοναμίδιο	

Εδώ παρουσιάζεται ένα ευρύ φάσμα οργανικών λειτουργικών ομάδων και ανόργανων αλάτων.

Μπορούν να παρασκευαστούν υδατικά μίγματα βαρβιτουρικού οξέος σε εύρος 1-2 mg/mL και να προσδιοριστούν με πρότυπη καμπύλη. Για να αποδειχθεί η εφαρμογή

σε κλάσματα σκόνης, μια ποσότητα 4,0 mg βαρβιτουρικού οξέος αλέστηκε σε γουδί. Στη συνέχεια διασκορπίστηκε τυχαία σε μια επιφάνεια 24 × 24 in.2. Χρησιμοποιείται ένα βαμβακοφόρο σπειρό που εναλλάσσεται συστηματικά στη περιοχή μπρος-πίσω. Το βαμβακοφόρο σπειρό πλένεται σε πλαστικό σωλήνα με ελάχιστο νερό και αφότου στεγνώσει υποβάλλεται στο spot test. Για εναλλακτικά στερεά δείγματα, ίσες ποσότητες ανόργανων αλάτων αναμιγνύονται με βαρβιτουρικό οξύ, και μετά υποβάλλονται σε δοκιμή κηλίδας. Το παράγωγο ερυθρού-ιώδους του βαρβιτουρικού οξέος, το βουλουρικό οξύ, σχηματίζεται κατά την αντίδραση υδατικού νιτρώδους και βαρβιτουρικού οξέος σε ένα όξινο διάλυμα. Το τελικό σημείο είναι ισχυρό και χρωματιστό και αναγνωρίζεται εύκολα. Η αντίδραση αυτή δεν προκαλεί σημαντικές αλλαγές της θερμοκρασίας. Ο σχηματισμός του προϊόντος βουρικού οξέος πραγματοποιείται γρήγορα σε θερμοκρασία δωματίου και σε λιγότερο από ένα λεπτό γίνεται σταθερός έως και 24 ώρες στους 25 °C. Ο γρήγορος σχηματισμός της χρωματομετρικής απόκρισης αποτελεί ένα πλεονέκτημα έναντι άλλων αναλυτικών μεθοδολογιών. Για την πραγματοποίηση αυτών των αντιδράσεων χρησιμοποιούνται γυάλινα ή πλαστικά δοχεία. Τα αντιδραστήρια είναι σταθερά στους 25 °C για 10 εβδομάδες και διατηρούν την αντιδραστικότητά τους με βαρβιτουρικό οξύ (Bartzatt, 2001).

Οι χρωματομετρικοί προσδιορισμοί είναι ευέλικτοι και εύκολα μπορούν να ερμηνευτούν. Όταν το βαρβιτουρικό οξύ τοποθετείται με οξικό οξύ και νιτρώδες νάτριο, τα προκύπτοντα προϊόντα περιλαμβάνουν νιτροποίηση στην πέντε θέση του βαρβιτουρικού οξέος και σχηματίζεται το ταυτομερές βουρικό οξύ. Το σχηματισμένο βουρικό οξύ είναι ένα πορφυρό άλας σταθερό στους 25 °C για 24 ώρες. Διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων βαρβιτουρικού οξέος χρησιμοποιούνται για τυπικές καμπύλες, η οποία αποδεικνύεται στο Σχ. 1 (Bartzatt, 2001).



Σχήμα 10: Η τυπική καμπύλη για τον προσδιορισμό του βαρβιτουρικού οξέος αναπτύσσεται για εύρος 0,01875-2,25 mg/mL αναλύτη. Οι απορροφήσεις είναι του έγχρωμου προϊόντος αντίδρασης βουρικό οξύ, τα οποία διαβάζονται σε μήκος κύματος 530 nm σε κύτταρα 1 cm. Τα αποτελέσματα είναι πολύ γραμμικά, με συντελεστή συσχέτισης

1.000 και κλίση 16.33 ανά mg/mL) όταν αναλύονται με γραμμική παλινδρόμηση (Bartzatt, 2001).

Ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης της λείας γραμμής αποκαλύπτει τον συντελεστή συσχέτισης 1, δείχνοντας ένα υψηλό επίπεδο γραμμικότητας. Το γράφημα δείχνει τη σχέση της απορρόφησης στα 530 nm, η οποία απεικονίζεται σε σχέση με τη συγκέντρωση του βαρβιτουρικού οξέος που εκφράζεται ως χλιοστόγραμμα ανά χλιοστόλιτρο στα υδατικά διαλύματα. Ο υπολογισμός της γραμμομοριακής απορροφητικότητας του παραγώγου μωβ βουρικού οξέος παρήγαγε μια σταθερή τιμή (χρησιμοποιώντας το Beer's Law) 31,37 ανά mol/ l ανά cm, με τυπική απόκλιση πληθυσμού 0,71 ανά mol/ l ανά cm. Η χρήση μιας προετοιμασμένης τυπικής καμπύλης επιτρέπει την ταχεία και ακριβή ποσοτικοποίηση του βαρβιτουρικού οξέος με πολλά δείγματα. Για τη δοκιμή ταχείας κηλίδας, το όριο ανίχνευσης είναι μικρότερο από 18,75 g βαρβιτουρικού οξέος ανά χλιοστόλιτρο διαλύματος. Αυτή η μέθοδος ανάλυσης είναι ευαίσθητη και παράγει ένα κόκκινο-βιολετί τελικό σημείο. Συνιστάται θετικός μάρτυρας μίας γνωστής ποσότητας βαρβιτουρικού οξέος και ένας αρνητικός μάρτυρας. Οι μικροί γυάλινοι σωλήνες αντίδρασης είναι ευεργετικοί και βοηθούν στον προσδιορισμό του τελικού σημείου. Για να αποδειχθεί η δυνατότητα εφαρμογής αυτών των πρωτοκόλλων για μίγματα που έχουν άλλες οργανικές ενώσεις, η δοκιμή επιτόπου δοκιμής εφαρμόστηκε σε μίγματα που περιείχαν 100 g βαρβιτουρικού οξέος συν 100 g μιας από τις ακόλουθες ενώσεις: ασπιρίνη, θειική κινίνη, νικοτινικό οξύ, νικοτιναμίδιο, ινοσιτόλη, L-προλίνη, καφεΐνη και χοληστερόλη (Bartzatt, 2001).

Οι οργανικές λειτουργικές ομάδες που αντιπροσωπεύονται στις επιλεγμένες ενώσεις περιλαμβάνουν καρβοξυλικά οξέα, αιθερικές ομάδες, αλκοολικές υδροξυλομάδες, τριτοταγείς αμίνες, δευτεροταγείς αμίνες, αμιδικές ομάδες, κυκλικές αμιδικές δομές, αλκυλικές αλυσίδες και δομές που φέρουν αρωματικούς δακτυλίους. Διάφορα ανόργανα άλατα δοκιμάστηκαν με παρόμοιο τρόπο, άλατα όπως NaCl, LiBr, NaN<sub>3</sub>, ανθρακικά και φωσφορικά άλατα. Το τελικό σημείο του κόκκινου-ιώδους που παρατηρήθηκε κατά το σχηματισμό βουρικού οξέος παρέμεινε ισχυρό και εύκολα αναγνωρίσιμο παρά την ισότιμη παρουσία του αμινοξέος, της βιταμίνης, του φαρμάκου, του ανόργανου άλατος ή του μεταβολίτη. Εφαρμογή της ίδιας διαδικασίας δοκιμής παρουσία σουλφανιλαμίδης και L-τρυπτοφάνη (ένα βασικό αμινοξύ) παρήγαγε ένα



κίτρινο λιπαρό προϊόν που ακυρώνει το τελικό σημείο του κόκκινου-ιώδους και παρεμβαίνει στην ερμηνεία της δοκιμής σποτ βαρβιτουρικού οξέος. Η διαδικασία του σωλήνα μικροαντίδρασης επιτρέπει τη χρήση δοχείων τριχοειδών, τα οποία λειτούργησαν καλά και παρείχαν ένα βολικό μέσο για την πραγματοποίηση παρεμβολικών συγκρίσεων με γνωστούς ελέγχους. Επίσης κατάλληλοι είναι σωλήνες μικροφυγοκέντρωσης. Το κόκκινο-ιώδες τελικό σημείο του σχηματισμού βουρικού οξέος είναι αναγνωρίσιμο με τη χρήση δειγμάτων σε συγκεντρώσεις 12, 15, 18, 21, 24, 27g, που επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό με συγκριτική παρεμβολή. Μπορούν να ανιχνευθούν οπτικά μόλις 10 g. Ένα αποθεματικό μείγμα βαρβιτουρικού οξέος στα 3.000 mg/ mL θα διανείμει 3 g/ mL για τους ελέγχους ανάλυσης (Bartzatt, 2001).

Ο ποτενσιομετρικός προσδιορισμός του βαρβιτουρικού οξέος απαιτεί ακριβό εξοπλισμό, πολύπλοκη ερμηνεία δεδομένων και λειτουργεί με μια τοξική οργανική ένωση υδραργύρου. Παρόμοια ευαισθησία ανίχνευσης επιτεύχθηκε με μια άλλη φασματοφωτομετρική μεθοδολογία, ωστόσο χρησιμοποιεί την ελεγχόμενη ουσία ένυδρη χλωράλη που έχει μεγαλύτερες περιόδους επώασης και δεν διαθέτει την ικανότητα δοκιμασίας μικροαντίδρασης ή δοκιμής σημείου. Ο εξοπλισμός που χρησιμοποιεί τριχοειδή ηλεκτροφόρηση με ηλεκτροχημική ανίχνευση είναι πολύ ακριβός και έχει εφαρμοστεί ως μέσο για ταυτοποίηση βαρβιτουρικού οξέος και 2-θειοβαρβιτουρικού οξέος (Bartzatt, 2001).

Όσον αφορά το αλκοόλ η πιο προφανής δοκιμή για βαριά κατανάλωση αλκοόλ είναι η μέτρηση του στο αίμα, στα ούρα ή στην εκπνοή. Ωστόσο, αυτό το απλό τεστ δεν μπορεί να κάνει διάκριση μεταξύ οξείας και χρόνιας κατανάλωσης αλκοόλ, εκτός εάν σχετίζεται με αυξημένη ανοχή στο αλκοόλ. Σύμφωνα με το Αμερικανικό Εθνικό Συμβούλιο για τον Αλκοολισμό (NCA), το αλκοόλ στο αίμα που υπερβαίνει το 1,5 ‰ χωρίς σοβαρές ενδείξεις δηλητηρίασης, πάνω από 3 ‰ ανά πάσα στιγμή ή πάνω από 1 ‰ σε εξέταση ρουτίνας είναι κριτήρια πρώτου επιπέδου του αλκοολισμού. Η μεθανόλη είναι ένας σημαντικός παράγοντας που εμφανίζεται στα περισσότερα αλκοολούχα. Ο μεταβολισμός της μέσω της αφυδρογονάσης της ηπατικής αλκοόλης αναστέλλεται από την αιθανόλη. Έτσι, η υπερβολική και παρατεταμένη κατανάλωση αλκοόλ οδηγεί σε υψηλά επίπεδα μεθανόλης. Αυξημένα επίπεδα μεθανόλης στο αίμα απαντώνται συχνά σε μεθυσμένους οδηγούς και αλκοολικούς. Με βάση αυτά τα ευρήματα, τα επίπεδα μεθανόλης στο αίμα που υπερβαίνουν τα > 10 mg/ l είναι ενδεικτικά του αλκοολισμού

(Σχήμα 11). Για τον προσδιορισμό της μεθανόλης, η ευαισθησία της συμβατικής χρωματογραφίας αερίου χώρου (GC) για την ανάλυση της αλκοόλης αίματος πρέπει να βελτιωθεί με ειδική παρασκευή δείγματος ή με χρήση τεχνικής κρουσκόπησης με τριχοειδείς στήλες (Musshoff & Daldrup, 1998).

Σχήμα 11: Εργαστηριακές παράμετροι για τη διάγνωση της υψηλής κατανάλωσης αλκοόλ και αλκοολισμού σύμφωνα με τον Gilg (Musshoff & Daldrup, 1998).

	Normal range	Reaction after short-term loading	Diagnostic sensitivity (%)	Diagnostic specificity (%)	Practicability	Normalization after withdrawal
<i>Enzymes</i>						
GGT	<28 U/l	-	50-90	~70	++++	2-5 w
ASAT	<18 U/l	-	30-50	~90	++++	1-3 w
ALAT	<22 U/l	-	20-45	~70	++++	1-4 w
GLDH	<4 U/l	-	5-60	?	+++	?
β-HEX	<6.2 U/l	+	high	?	+	2-4 d
<i>Hematological parameters</i>						
MCV	<92/100 fl	-	40/70-96	~60-90	++++	1-3 m
CDT	<20/26 U/l	-	50-90	90-100	(++)	~2 w
HDL chol.	<50 mg/dl	-	50-90	high	+++	1-4 w
Apolipop. A1/2		-	>45	high	++	~2 w
<i>Metabolites</i>						
Acetaldehyde		(+)	-	-	+	
Acetate	0.75 mM	-?	-	-	(++)	?
2-Propanol	<2 mg/l	(+)	-	?	(++)	hs
Acetone	<7 mg/l	-	-	-	(++)	hs
Methanol	<10 mg/l	(++)	~80	high	(++)	hs-1 d
<i>Urine/(blood)</i>						
5-HTOL/5-HIAA	<20	+	60	high	+	hs
Dolichol	4.7 ng/ml	+	low	?	+	ds-ws
TIQ and THBC (SAL)					+	

Sensitivity: % of positive results for alcoholics.

Specificity: % of negative results for nonalcoholics.

+: Special laboratory.

++: Special method outside a clinical laboratory.

+++ : Special test in a routine laboratory.

++++: Simple routine method in a clinical laboratory.

Η μέτρηση του επιπέδου του ορού του ενζύμου γ-γλουταμυλοτρανσφεράση (GGT) - ένα ένζυμο που συνδέεται με μεμβράνη που βρίσκεται στις ημιτονοειδείς μεμβράνες του ηπατικού κυττάρου - είναι σήμερα ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος εργαστηριακός δείκτης της έντονης κατανάλωσης αλκοόλ και του αλκοολισμού. Τα επίπεδα του GGT στο πλάσμα συσχετίζονται με τη συνολική ποσότητα αλκοόλ που καταναλώνεται και δεν επηρεάζεται από την οξεία κατανάλωση αλκοόλ. Ωστόσο, συσχετίζεται ελαφρώς με την περίοδο υπερβολικής κατανάλωσης. Σε χρόνιους αλκοολικούς ασθενείς ή σε άτομα που υπέρ καταναλώνουν αλκοόλ, ο GGT στον ορό έχει αναφερθεί ότι είναι αυξημένος στο 34-85% των περιπτώσεων. Κατά την αποχή, το GGT επιστρέφει στα φυσιολογικά επίπεδα σε 1-2 μήνες (Σχήμα 11). Οι μηχανισμοί αύξησης GGT δεν είναι πλήρως κατανοητοί. Οι υποθετικές δυνατότητες είναι η επαγωγή της ηπατικής GGT στο ενδοπλασματικό δίκτυο, οι φυσικοχημικές μεταβολές των μεμβρανών του πλάσματος των ηπατικών κυττάρων και η μειωμένη πρόσληψη της GGT από τα ηπατοκύτταρα από το αίμα. Τα αυξημένα επίπεδα GGT δεν είναι ειδικά για τον βαρύ εθισμό στο αλκοόλ. Όλα τα είδη των ηπατικών παθήσεων, του διαβήτη, της παχυσαρκίας, της παγκρεατίτιδας, της υπερλιπιδαιμίας, της καρδιακής ανεπάρκειας, της ηλικίας, του καπνίσματος και του σοβαρού τραύματος θα πρέπει επίσης να λαμβάνονται υπόψη όταν λαμβάνεται η διαγνωστική σημασία της αυξημένης GGT. Στα κλινικά εργαστήρια, η GGT μετριέται συχνότερα χρησιμοποιώντας μια κινητική μέθοδο. Για τον προσδιορισμό σε εντελώς αιμολυμένα ή κατεψυγμένα δείγματα αίματος, περιγράφεται μια μέθοδος από τους Gjerde και Mørland (Musshoff & Daldrup, 1998).

Η ολική ασπαρτική αμινοτρανσφεράση (ASAT) ορού και ομογενοποιημένου ήπατος αποτελείται από δύο ισοένζυμα. Το διαλυτό κυτοσολικό ισοένζυμο αντιπροσωπεύει περίπου το 20% της συνολικής ηπατικής δραστηριότητας και το μιτοχονδριακό ισοένζυμο το υπόλοιπο 80%. Έχουν βρεθεί αυξημένες δραστηριότητες των επιπέδων των μιτοχονδριακών ASAT στον ορό σε αλκοολικούς ασθενείς με και χωρίς αλκοολική ηπατική νόσο (Σχήμα 11). Η αποτελεσματικότητα της δοκιμής μπορεί να αυξηθεί περαιτέρω με τον προσδιορισμό του λόγου του μιτοχονδριακού ASAT προς το συνολικό ASAT. Η δραστηριότητα του ASAT μπορεί να αναλυθεί με μια απλή ανοσοχημική διαδικασία. Το βασικό αντίσωμα έναντι της διαλυτής ασπαρτικής αμινοτρανσφεράσης διατίθεται στο εμπόριο. Η αμινοτρανσφεράση της αλανίνης (ALAT) βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα του ήπατος και απελευθερώνεται στο αίμα έπειτα από βλάβη των

ηπατοκυττάρων. Μια αναλογία ASAT προς ALAT που υπερβαίνει τα δύο βρίσκεται στους αλκοολικούς και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διαφοροποίηση από τη μη αλκοολική ηπατική βλάβη. Η μείωση της ALAT σχετίζεται με την ανεπάρκεια της 5-φωσφορικής πυριδοξάλης που σχετίζεται με την υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ (Musshoff & Daldrup, 1998).

Η β-εξωζαμιδάση (HEX) είναι μια όξινη λυσοσωμική γλυκοσιδάση. Το αυξημένο HEX ούρων είναι ένας ευαίσθητος δείκτης νεφρικών παθήσεων. Αυξημένα επίπεδα HEX στον ορό βρίσκονται σε ηπατικές παθήσεις, υπέρταση, σακχαρώδη διαβήτη, έμφραγμα του μυοκαρδίου και άλλες ασθένειες. Στον ορό, βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα HEX σε 69% έως 94% και στα ούρα σε περίπου 81% σε περιπτώσεις αλκοολισμού (Σχήμα 11). Ειδικά το ισοένζυμο HEX B αποδείχθηκε ότι είναι ενδεικτικό της κατάχρησης αλκοόλ. Η αιτία για το αυξημένο περιεχόμενο δεν είναι γνωστή, αλλά μπορεί να προκύψει από μεταβολές στο ρυθμό κάθαρσης/ εξάλειψης ή παραγωγής/ απελευθέρωσης στην κυκλοφορία. Το συνολικό HEX μετριέται με φασματοφωτομετρική μέθοδο χρησιμοποιώντας ρ-νιτροφαινυλ- N-ακετυλο-β-γλυκοζαμίνη ως υπόστρωμα. Τα ισοένζυμα μπορούν να προσδιοριστούν με ανοσοχημική μέθοδο (Musshoff & Daldrup, 1998).

Το α-αμινο-ν-βουτυρικό οξύ (AABA) αυξάνεται μετά από χρόνια κατανάλωση αλκοόλ που προκαλείται από αυξημένη ηπατική παραγωγή. Ωστόσο, ο υποσιτισμός πρωτεΐνης καταστέλλει επίσης το επίπεδο AANB στο πλάσμα και προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί η επίδραση της ανεπάρκειας πρωτεΐνης, το AANB συσχετίστηκε με τη λευκίνη και ο λόγος AANB/ λευκίνης εισήχθη ως εμπειρικός βιοχημικός δείκτης αλκοολισμού. Σε ορισμένες μελέτες, ο λόγος AANB προς λευκίνη πλάσματος φαίνεται να έχει περιορισμένη αξία ως δείκτης βιοχημικού αλκοολισμού που προκαλείται από την σχετικά χαμηλή ευαισθησία και ειδικότητα. Ο προσδιορισμός της αναλογίας απαιτεί έναν αναλυτή αμινοξέων, ο οποίος καθιστά τη δοκιμή ακριβή και δεν είναι ευρέως διαθέσιμη (Musshoff & Daldrup, 1998).

Αυξημένος μέσος όγκος ερυθρών (MCV) βρίσκεται στο 31–96% των αλκοολικών ασθενών (Σχήμα 11). Ωστόσο, καταστάσεις που δεν σχετίζονται με το αλκοόλ όπως η βιταμίνη B<sub>12</sub> και η ανεπάρκεια φολικού οξέος, ηπατική νόσος, δικτυοκυττάρωση, αντιεπιληπτικά, ηλικία, κάπνισμα και άλλα μπορεί επίσης να αυξήσουν τις τιμές MCV. Η μέτρηση είναι οικονομική και μπορεί να εκτελεστεί εύκολα. Οι μεθοδολογικές διαφορές

πρέπει να ληφθούν υπόψη στη συζήτηση των κρίσιμων τιμών (Musshoff & Daldrup, 1998).

## Κεφάλαιο 6. Ινδική κάνναβη

### 6.1 Μαριχουάνα/ Χασίς

Η κάνναβη θεωρείται ως το πιο αμφιλεγόμενο φυτό στην κοινωνία μας. Εκτός από την σημαντική ιατρική της χρήση, η οποία παρουσιάζει αύξηση τα τελευταία χρόνια, αποτελεί και το πιο συχνά καταναλωμένο ναρκωτικό στις Ευρωπαϊκές χώρες. Εκτιμάται ότι περίπου τέσσερα εκατομμύρια Ευρωπαίοι πολίτες (1% ατόμων 15-64 ετών) χρησιμοποιούν την κάνναβη καθημερινά. Περίπου το 7% της Ευρώπης έχουν κάνει κατανάλωση τουλάχιστον μια φορά κατά τη διάρκεια ενός έτους. Τα προϊόντα κάνναβης έχουν ως βασικό συστατικό το φυτό *Cannabis sativa* L. που ανήκει στην οικογένεια των *Cannabaceae*. Καθώς και η χρήση κάνναβης είναι πολύ συχνή η χημεία της έχει μελετηθεί εκτενώς. Έχουν αναγνωριστεί περισσότερες από 500 ενώσεις. Από αυτές γνωστές είναι περίπου οι 70 (De Backer, et al., 2009).

Από τα κύρια συστατικά του *C. sativa* L., η Δ9-τετραϋδροκανναβινόλη (THC) είναι υπεύθυνη για τις ψυχοδραστικές ιδιότητες. Στους ιστούς των φυτών τα κανναβινοειδή συντίθενται σε όξινη (καρβοξυλιωμένη) μορφή. Η ομάδα του καρβοξυλίου είναι ασταθής και για αυτόν τον λόγο χάνεται εύκολα το CO<sub>2</sub> όταν υπάρχει επίδραση θερμότητας ή φωτός. Αυτό φέρει ως αποτέλεσμα την ύπαρξη ουδέτερων κανναβινοειδών (THC, CBD, CBG). Αυτά σχηματίζονται όταν θερμανθεί ή ξηραθεί το υλικό που έχει συλλεχθεί από το φυτό της κάνναβης, ή κατά την αποθήκευσή του ή ακόμα και όταν καπνίζεται. Οι πιο συνηθισμένοι τύποι είναι το Δ9-τετραϋδροκανναβινολικό οξύ A (THCA-A), το κανναβιδιολικό οξύ (CBDA) και το κανναβινολικό οξύ (CBGA). Το THC οξύ υπάρχει σε δυο μορφές: THCA-A και TCHA-B, με το TCHA-A να είναι η κυριότερη μορφή. Σε δείγματα κάνναβης όμως, ανιχνεύεται μόνο το TCHA-B. Το CBGA αποτελεί τον πρόδρομο των CBDA και του κανναβικρομινικού οξέος (CBCA) (De Backer, et al., 2009).

Η χρήση της κάνναβης αποτελεί μια νόμιμη πράξη για δυο κατηγορίες ατόμων σύμφωνα με την η ομοσπονδιακή κυβέρνηση του Καναδά. Η κατηγορία 1 περιλαμβάνει άτομα που παρουσιάζουν συμπτώματα που σχετίζονται με τον ιό του HIV/AIDS,

αρθρίτιδα, καρκίνο, τραυματισμός ή νόσος του νωτιαίου μυελού, επιληψία ή σκλήρυνση κατά πλάκας. Η κατηγορία 2 περιλαμβάνει συμπτώματα και καταστάσεις που αξιολογούνται από τον κλινικό ιατρό του ασθενή. Οι ασθενείς που εντάσσονται στις δυο αυτές κατηγορίες μπορούν να προμηθευτούν νόμιμα αποξηραμένη κάνναβη, να αγοράσουν σπόρους για την καλλιέργεια κάνναβης ή ακόμη και να ορίσουν ένα άλλο άτομο να την καλλιεργήσει για εκείνους (Walsh, et al., 2013).

Το θηλυκό φυτό *Cannabis sativa* είναι εκείνο από το οποίο σε μεγάλο βαθμό προέρχονται τα παρασκευάσματα κάνναβης. Η περιεκτικότητα του σε THC είναι υψηλότερη στις ανθισμένες περιοχές του φυτού, ενώ μειώνεται στα φύλλα, στους μίσχους και στους σπόρους του φυτού. Η μαριχουάνα έχει περιεκτικότητα σε THC 0,5-5,0% και παρασκευάζεται από τις ξηρές ανθισμένες περιοχές και τα φύλλα του φυτού. Το χασίς έχει περιεκτικότητα σε THC 2-20% και αποτελείται από αποξηραμένη ρητίνη κάνναβης και συμπιεσμένα άνθη. Το έλαιο χασίς μπορεί να έχει περιεκτικότητα σε THC μεταξύ 15% και 50%. Ποικιλίες κάνναβης όπως η *Sinsemilla* και η *Netherwood* φθάνουν σε περιεκτικότητα THC έως και 20% (Solowij & Hall, 1998).

Η χρήση της κάνναβης παρέχει στον χρήστη ευφορία και χαλάρωση, μεταβολές στην αντίληψη, παραμόρφωση της αίσθησης του χρόνου και αύξηση των συνηθισμένων εμπειριών, όπως η ακρόαση μουσικής, η λήψη φαγητού και η παρακολούθηση ταινιών. Προκαλεί στο άτομο μέθη επηρεάζοντας τη βραχυπρόθεσμη μνήμη, τις κινητικές του δεξιότητες, την ομιλία του, τον χρόνο που απαιτείται για να αντιδράσει σε ερεθίσματα, ενώ συγχρόνως του προκαλεί ασταμάτητο μη δικαιολογημένο γέλιο. Οι δυσάρεστες παρενέργειες του είναι η πρόκληση άγχους και οι αντιδράσεις πανικού. Τα αρνητικά αποτελέσματα συνήθως αναφέρονται από μη έμπειρους χρήστες και αποτελούν αιτία διακοπής της χρήσης της. Οι πιο έμπειροι χρήστες σπάνια αναφέρουν αυτά τα αποτελέσματα, ωστόσο περιστασιακά υπάρχει αναφορά τους έπειτα από υπέρδοσολογία THC (Solowij & Hall, 1998).

Ο πιο κοινός τρόπος λήψης κάνναβης για ψυχαγωγικούς λόγους είναι το κάπνισμα. Το κάπνισμα της ή η κατάποση THC αυξάνει τον καρδιακό ρυθμό κατά 20-50% μέσα σε λίγα λεπτά. Η αύξηση αυτή μπορεί να παραμείνει έως και 3 ώρες μετά τη χρήση. Η αρτηριακή πίεση αυξάνεται όταν το άτομο κάθεται, ενώ όταν βρίσκεται σε όρθια θέση μειώνεται. Οι νέοι υγιείς χρήστες αναπτύσσουν ανοχή στη κάνναβη, με αποτέλεσμα να μην παρουσιάζουν αυτή την εικόνα. Η τοξικότητα που παρουσιάζουν τα κανναβινοειδή

είναι πολύ χαμηλή, ενώ συγχρόνως δεν υπάρχουν δημοσιευμένες αναφορές παγκοσμίως, θανάτων δηλητηρίασης από δόσης κάνναβης. Έπειτα από εργαστηριακή διερεύνηση και πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε ποντίκια, διαπιστώθηκε ότι η δόση THC που απαιτείται ώστε να προκαλέσει θνησιμότητα 50% στα ποντίκια είναι εξαιρετικά υψηλή συγκριτικά με τη δόση που περιέχουν φάρμακα που χρησιμοποιούνται ευρέως (Solowij & Hall, 1998).

Ο καπνός της κάνναβης προκαλεί μεταλλάξεις στον οργανισμό που είναι δυνατό να οδηγήσουν στην καρκινογένεση. Τα κανναβινοειδή μειώνουν την κυτταρική διαμεσολάβηση και τη χυμική ανοσία σε τρωκτικά. Έτσι μειώνεται η αντίσταση του οργανισμού στις λοιμώξεις. Τα μη κανναβινοειδή στα καπνά κάνναβης διαθέτουν την ικανότητα να επηρεάζουν τα κυψελικά μακροφάγα κύτταρα. Ωστόσο τα αποτελέσματα αυτά δεν μπορούν να αντιστοιχηθούν με τη χρήση κάνναβης σε ανθρώπους, διότι οι δόσεις THC που χρησιμοποιήθηκαν στις μελέτες στα ζώα είναι πολύ υψηλές και η ανοχή μπορεί να αναπτυχθεί στις επιπτώσεις στην ανοσία των ανθρώπων (Solowij & Hall, 1998).

## 6.2 Μέθοδοι προσδιορισμού μαριχουάνας/χασίς

Για τον προσδιορισμό των κανναβινοειδών έχουν αναπτυχθεί και συζητηθεί πολλές αναλυτικές διαδικασίες. Οι ανοσοχημικές μέθοδοι, κυρίως η ELISA, χρησιμοποιούνται ως εργαλείο για ανίχνευση χρήσης κάνναβης. Ωστόσο για διερεύνηση της χρήσης ναρκωτικών ουσιών στον χώρο της εργασίας, κατά την οδήγηση ή για εγκληματολογικές υποθέσεις, είναι απαραίτητο να γίνεται επιβεβαίωση των θετικών αποτελεσμάτων με δοκιμές ανοσοπροσδιορισμού. Στις περισσότερες περιπτώσεις χρησιμοποιούνται μεθοδολογίες αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας (GC-MS). Αποτελεί ευρέως μια απαιτητική και χρονοβόρα τεχνική καθώς απαιτεί εκτεταμένη προεργασία και παραγωγοποίηση του δείγματος. Σε αντίθεση με το GC, στην ανάλυση με τη μέθοδο υγρής χρωματογραφίας (LC), δεν πραγματοποιείται αποσύνθεση των κανναβινοειδών, με αποτέλεσμα να μπορεί να πραγματοποιηθεί απευθείας η ανάλυση τους. Η διαθεσιμότητα συστημάτων υγρής χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας (LC-MS) επέτρεψε την ανάπτυξη ισχυρών και ευαίσθητων μεθόδων για την ανάλυση φαρμάκων κατάχρησης που δεν απαιτούν βήματα παραγωγοποίησης (Teixeira, και συν., 2007).

Ο Hughes και οι συνεργάτες του ήταν οι πρώτοι που δημιούργησαν μια μέθοδο LC/MS/MS για την ανάλυση του THC στο αίμα, που περιλάμβανε διάφορες τεχνικές ιονισμού, στήλης, διαδικασίες εκχύλισης στερεάς φάσης, ωστόσο, επιτεύχθηκε χαμηλός ρυθμός ανάκτησης. Καθίσταται απαραίτητο να συνεχίσουν να γίνονται πειράματα όσον αφορά τις τεχνικές εξαγωγής που ικανοποιούν τις αναλυτικές απαιτήσεις αυτού του πεδίου για την ανάλυση βιολογικών δειγμάτων. Μια μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρέως για την απομόνωση και τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης αναλυτών από αίμα, ούρα και άλλα βιολογικά υγρά είναι η μέθοδος εκχύλισης υγρού-υγρού (LLE). Το μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι οι διαδικασίες εκτέλεσης της είναι επίπονες, εντατικές και κοστοβόρες. Πραγματοποιήθηκε μια έρευνα που είχε ως στόχο να αναπτυχθεί μια μέθοδος χρησιμοποιώντας ESI/LC/MS ικανή να ανιχνεύσει THC και τους κύριους μεταβολίτες της 11-OH THC και THC-COOH σε στοματικό υγρό, ούρα και ολικό αίμα σε μία μόνο ανάλυση LC-MS με αποτελεσματική διαδικασία δειγματοληψίας στερεάς φάσης (SPE) (Teixeira, και συν., 2007).

Πραγματοποιήθηκαν μελέτες επικύρωσης ξεχωριστά για κάθε δείγμα, σιέλου, ούρων και αίματος, αξιολογώντας την THC και τους μεταβολίτες της, σε δείγματα σιέλου, 11-OH THC και THC-COOK σε δείγματα ούρων και αίματος. Για να αξιολογηθεί η καθαρότητα και η επιλεκτικότητα της ουσίας, αναλύθηκαν 10 διαφορετικά τυφλά δείγματα, που δεν είχαν προσθήκη αναλυτή ή εσωτερικού προτύπου, για να ελεγχθούν οι κορυφές που ενδέχεται να επηρεάσουν την ανίχνευση του αναλυτή ή του εσωτερικού προτύπου (IS). Επίσης, πραγματοποιήθηκε ανάλυση αρνητικών δειγμάτων (τυφλά δείγματα + IS), προκειμένου να γίνει επαλήθευση της παρουσίας ή απουσίας φυσικού αναλυτή στο διάλυμα IS. Για να γίνει εκτίμηση πιθανών παρεμβολών, επισημάνθηκαν 10 διαφορετικά δείγματα χωριστά για να περιέχουν 1000 ng/mL κανναβινόλη και κανναβιδιόλη και 25 ng/mL καφεΐνης, 3,4-μεθυλενοδιοξυμεθαμφεταμίνη, 3,4-μεθυλενοδιοξυαμφεταμίνη, βενζοϋλεγκονίνη, μεθαδόνη, μορφίνη, διαζεπάμη και αλλοβαρβιτάλη (Teixeira, και συν., 2007).

Στη σιέλο, η βαθμονόμηση πραγματοποιήθηκε με επισήμανση των δειγμάτων με THC σε συγκεντρώσεις μεταξύ 5 και 2000ng/mL. Χρησιμοποιήθηκαν 7 βαθμονομητές για τη δημιουργία 2 τυπικών καμπυλών, για χαμηλές και υψηλές συγκεντρώσεις (5, 10, 25, 50, 150, 300 και 450 ng/mL. 450, 600, 750, 900, 1000, 1500 και 2000 ng/mL) , κάθε συγκέντρωση εγχύθηκε εις τριπλούν. Για δείγματα αίματος και ούρων, η βαθμονόμηση



πραγματοποιήθηκε με εμβάπτιση των αντίστοιχων δειγμάτων με THC, 11-OH THC και THC-COOH σε συγκεντρώσεις μεταξύ 2 και 2000 ng/mL, καθεμία συγκέντρωση εγχύθηκε επίσης εις τριπλούν. Χρησιμοποιήθηκαν 8 βαθμονομητές για τη δημιουργία 2 τυπικών καμπυλών (2, 5, 10, 25, 50, 100, 150, 300 ng/mL και 300, 450, 600, 750, 900, 1000, 1500, 2000 ng /mL), το όριο ανίχνευσης τους (LOD) εκτιμήθηκε από δείγματα που εξήχθησαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις των υπό μελέτη ενώσεων, όπου η απόκριση του πρωτονιωμένου μοριακού ιόντος σε λειτουργία SIR ήταν ισοδύναμη με 3 φορές τον θόρυβο περιβάλλοντος. Το όριο ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ) ήταν η χαμηλότερη ποσότητα αναλύτη σε ένα δείγμα που θα μπορούσε να προσδιοριστεί ποσοτικά με μια κατάλληλη ακρίβεια (συντελεστές διακύμανσης,  $CV < 20\%$ ) και ακρίβεια (80-120%) (Teixeira, και συν., 2007).

Η ανάκτηση του SPE προσδιορίστηκε με επανειλημμένη ανάλυση 5 δειγμάτων σε 3 διαφορετικά επίπεδα συγκέντρωσης THC, 11-OH THC και THC-COOH (25, 100 και 1000ng/mL). Η ανάκτηση της εκχύλισης προσδιορίστηκε συγκρίνοντας τις αντιπροσωπευτικές περιοχές κορυφής των εκχυλισμένων δειγμάτων, χωρίς φάρμακα, που είχαν προκληθεί πριν από την εκχύλιση με την περιοχή της κορυφής των δειγμάτων που ενισχύθηκαν μετά την εκχύλιση στα ίδια επίπεδα συγκέντρωσης. Οι συντελεστές της διακύμανσης των τιμών κατά τη διάρκεια της ημέρας προσδιορίστηκαν με επαναλαμβανόμενες αναλύσεις ( $n=5$ ) από σίελο, ούρα & δείγματα αίματος, είτε στην ίδια πορεία είτε σε ξεχωριστές ημέρες. Επιλέχθηκαν 3 συγκεντρώσεις για επικύρωση (25,100 και 1000ng/mL). Το αποτέλεσμα της μήτρας διερευνήθηκε με εκχύλιση τυφλών δειγμάτων (από σίελο, ούρα και αίμα) και ανασύσταση με ακετονιτρίλιο που περιείχε γνωστές ποσότητες των αναλυτών, αναλύοντας τα ανασυσταμένα εκχυλίσματα και στη συνέχεια συγκρίνοντας τις περιοχές κορυφής των αναλυτών με εκείνες των αναλυτών σε ακετονιτρίλιο (Teixeira, και συν., 2007).

Γενικά, η διαδικασία LC-MS χρησιμοποιείται για τη ποσοτική ανάλυση των THC και THC-COOH σε δείγματα σιέλου, ούρων και αίματος. Η διαδικασία αυτή έχει υψηλή ειδικότητα, επιλεκτικότητα και ευαισθησία και μπορεί να θεωρηθεί ως εναλλακτική μέθοδος, συγκριτικά με το GC-MS, για την επιβεβαίωση των θετικών αποτελεσμάτων της δοκιμασίας ανοσοπροσδιορισμού. Το LOD και το LOQ για THC και THC-COOH ήταν παρόμοια με αυτά που ελήφθησαν από το GC-MS, με τη διαφορά ότι η LC-MS δεν απαιτούσε παράγωγο και έτσι ήταν λιγότερο απαιτητική και χρονοβόρα διαδικασία. Ο

ταυτόχρονος προσδιορισμός των THC και THC-COOH έχει μεγάλες δυνατότητες στην εγκληματολογική τοξικολογία, την κλινική ανάλυση και τις φαρμακοκινητικές μελέτες των κανναβινοειδών (Teixeira, και συν., 2007).

Η αρχική ανάλυση του φυτού της κάνναβης είναι απαραίτητη για διάφορους σκοπούς, όπως ο προσδιορισμός του φαινοτύπου του και ο ποιοτικός έλεγχος της κάνναβης που χρησιμοποιείται για φαρμακευτικούς σκοπούς ως θεραπευτική αγωγή. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί επανειλημμένα ότι οι επιδράσεις της THC ή άλλων μεμονωμένων κανναβινοειδών δεν είναι ίσες με εκείνες όλων των παρασκευασμάτων κάνναβης. Για παράδειγμα ένα μέρος της βιοδραστικότητας της που παρατηρείται σε κάποια παρασκευάσματα ενδέχεται να οφείλεται σε όξινα κανναβινοειδή. Για αυτόν τον λόγο είναι απαραίτητη η εύρεση μιας μεθόδου που θα επιτρέπει την πραγματοποίηση του ποσοτικού και ποιοτικού προσδιορισμού των ουδέτερων και όξινων κανναβινοειδών σε φυτικό υλικό (De Backer, et al., 2009).

Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος είναι η αέρια χρωματογραφία (GC) για την ανάλυση προϊόντων κάνναβης, αλλά η αδυναμία της είναι ότι δεν επιτρέπει τον προσδιορισμό των όξινων κανναβινοειδών που οφείλονται στην αποκαρβοξυλίωση στις ουδέτερες μορφές τους κατά την ανάλυση. Για να μπορέσουν να ποσοτικοποιηθούν τα ουδέτερα κανναβινοειδή απαιτείται η χρονοβόρα διαδικασία της παραγωγοποίησης. Η Υψηλή Απόδοση Υγρή Χρωματογραφία (HPLC), σε αντίθεση, επιτρέπει τον προσδιορισμό των ουδέτερων μορφών, καθώς δεν είναι απαραίτητος ο διαχωρισμός τους με θέρμανση. Επομένως είναι η πιο απλή λύση για τον προσδιορισμό της αρχικής σύνθεσης των κανναβινοειδών σε φυτικό υλικό. Πραγματοποιήθηκε εξέταση διαφορετικών αναλυτικών μεθόδων HPLC για τα κανναβινοειδή από τους Raharjo και Verpoorte. Ωστόσο, στις περισσότερες μελέτες δεν έγινε επικυρωποίηση σύμφωνα με τις νέες οδηγίες που χρησιμοποιούν τη προσέγγιση συνολικού σφάλματος, ή δεν βρισκόντουσαν σε θέση να διαχωρίσουν αποτελεσματικά όλα τα κανναβινοειδή. Λόγω της σύνθεσης που έχει το φυτό, καθίσταται δύσκολο να αναλυθούν τα κύρια κανναβινοειδή, καθώς και εμφανίζεται επικάλυψη κορυφών μεταξύ CBD/CBG και CBN/CBGA. Κατά συνέπεια έπρεπε να γίνει συνδυασμός της HPLC με μια δευτερεύουσα μέθοδο ανάλυσης, προκειμένου να αναγνωρίσει και να ποσοτικοποιήσει όλα τα κύρια κανναβινοειδή. Η χρήση φασματομετρίας μάζας σε συνδυασμό με HPLC μπορεί να είναι μια λύση για την επίλυση όλων των κορυφών σε μία μόνο αναλυτική πορεία. Ωστόσο, λόγω του

αυξημένου κόστους αυτής της μεθόδου, δεν διατίθεται συνήθως στα περισσότερα εργαστήρια (De Backer, et al., 2009).

Οι χρωματογραφικές δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν για διερεύνηση, χρησιμοποιούσαν ένα σύστημα HPLC Hewlett-Packard (HP), αποτελούμενο από μια αντλία τεταρτοταγούς διαλύτη G1311A, έναν απαερωτήρα διαλύτη G1322A, ένα αυτόματο δείγμα G1313A και διαμέρισμα στηλών G1316A. Για την ανίχνευση χρησιμοποιήθηκε ένας ανιχνευτής φωτοδίοδος (DAD). Τα φάσματα λήφθηκαν από την περιοχή 200-400nm. Οι χρωματογραφικοί διαχωρισμοί επιτεύχθηκαν χρησιμοποιώντας μια αναλυτική στήλη Waters XTerra® MS C18, προστατευμένη από μια στήλη προστασίας Waters XTerra® MS C18. Ο έλεγχος του εξοπλισμού, η απόκτηση δεδομένων και η ολοκλήρωση πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό Empower Pro 2.0. Η κινητή φάση αποτελούταν από ένα μείγμα που περιείχε μεθανόλη, νερό και 50mM μυρμηκικού αμμωνίου. Το μυρμηκικό αμμώνιο είναι ένα ρυθμιστικό διάλυμα σε pH 5.19. Αρχικά ρυθμίστηκε στο 68% μεθανόλη, η οποία εν συνεχεία αυξήθηκε γραμμικά σε 90,5% μεθανόλη σε διάστημα 25 λεπτών, στη συνέχεια αυξήθηκε σε 95% εντός ενός λεπτού. Αφού διατηρείται αυτή η κατάσταση για 3 λεπτά, η στήλη ρυθμίστηκε στην αρχική κατάσταση σε 1 λεπτό και επανεξισορροπήθηκε υπό αυτήν την κατάσταση για 6 λεπτά. Ο συνολικός χρόνος εκτέλεσης ήταν 36 λεπτά. Ο ρυθμός ροής ρυθμίστηκε στα 0,3 mL/min και ο όγκος έγχυσης ήταν 30 μL. Η πραγμάτωση όλων των πειραμάτων έγινε στους 30 °C. Η μέθοδος είναι επικυρωμένη σύμφωνα με το ISO17025 και τις οδηγίες της Γαλλικής Εταιρείας Φαρμακευτικών Επιστημών και Τεχνικών (SFSTP). Η παρούσα μέθοδος επικυρώθηκε πλήρως χρησιμοποιώντας προσέγγιση συνολικού σφάλματος. Το λογισμικό e.noval V2.0 χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό όλων των αποτελεσμάτων επικύρωσης και τη δημιουργία προφίλ ακριβείας (De Backer, et al., 2009).

## Κεφάλαιο 7. Εισπνεόμενα

### 7.1 Αιθάνιο, πεντάνιο, ισοπροπένιο

Το εκπνεόμενο αιθάνιο, το πεντάνιο και το ισοπρένιο έχουν προταθεί ως βιοδείκτες του οξειδωτικού στρες. Υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον για την ανίχνευση και παρακολούθηση της φλεγμονής των αεραγωγών, που μπορεί να οφείλεται σε άσθμα, χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ) και κυστική ίνωση (CF). Η φλεγμονή των αεραγωγών συνοδεύεται από αυξημένη παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS)

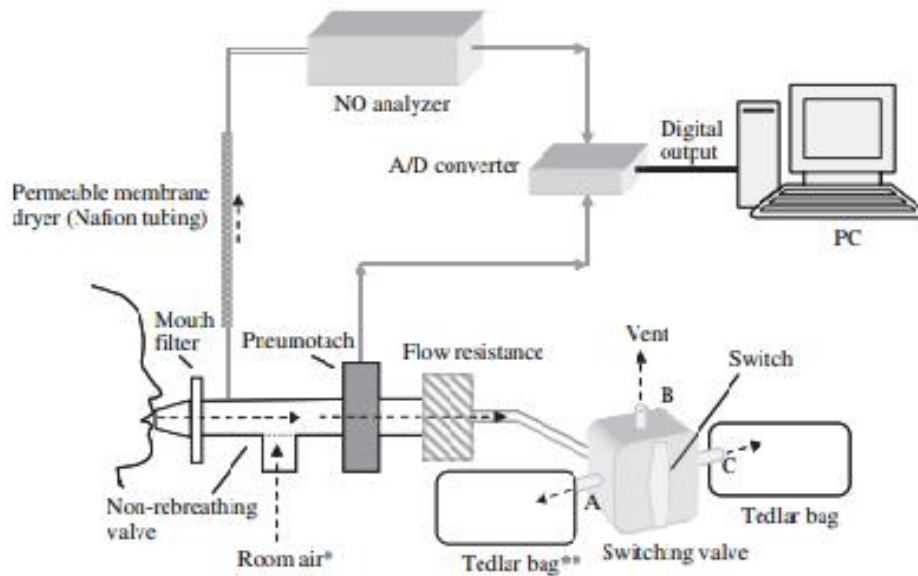
σε ενεργοποιημένα φλεγμονώδη κύτταρα όπως τα ηωσινόφιλα, τα ουδετερόφιλα και τα κυψελιδικά μακροφάγα. Το αιθάνιο ( $C_2H_6$ ) που είναι μια οργανική χημική ένωση, σχηματίζεται από την υπεροξείδωση των λιπαρών οξέων  $\alpha$ -3 όπως το λινολενικό οξύ, ενώ το πεντάνιο παράγεται από την υπεροξείδωση λιπαρών οξέων  $\alpha$ -6 όπως λινολεϊκό και αραχιδονικό οξύ. Εντοπίζεται στην ατμόσφαιρα της γης και στο επίπεδο της θάλασσας. Παρόλο που συμπεριλαμβάνεται στα «αέρια του θερμοκηπίου» του δίνεται μικρή περιβαλλοντική σημασία, εξαιτίας της μικρής του ποσότητας και ελάχιστης συμβολής του στο φαινόμενο αυτό, συγκριτικά με το μεθάνιο. Επιπλέον, αναφέρεται ο δεύτερος απλούστερος άκυκλος κορεσμένος υδρογονάνθρακας. Αυξημένα επίπεδα αιθανίου, στον ανθρώπινο οργανισμό, έχουν βρεθεί σε ασθενείς που πάσχουν από άσθμα, ΧΑΠ και CF και δεν έχουν προβεί σε λήψη θεραπείας με στεροειδή (Larstad, Toren, Bake, & Olin, 2007).

Το πεντάνιο ( $C_5H_{12}$ ) ανιχνεύτηκε επίσης σε αυξημένες συγκεντρώσεις σε ασθενείς με άσθμα. Τα πεντάνια είναι οργανικές ενώσεις που αποτελούνται από άνθρακα και υδρογόνο. Είναι συστατικά κάποιων καυσίμων και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εξειδικευμένοι διαλύτες σε εργαστήρια. Το πεντάνιο διαθέτει παρόμοιες ιδιότητες με αυτές των βουτανίων και των εξανίων. Το ισοπροπένιο ή 2-μεθυλ-1,3-βουταδιένιο ( $C_5H_8$ ) είναι ο κύριος εκπνεόμενος υδρογονάνθρακας ενδογενής προέλευσης. Παράγεται και εκπέμπεται από πολλά είδη δένδρων, όπως οι βελανιδιές, οι ευκάλυπτοι και διάφορα λαχανικά, με απώτερο σκοπό να καταπολεμήσουν τις αβιοτικές καταπονήσεις. Συναντάται ως ένα άχρωμο πτητικό υγρό, όταν βρίσκεται στη καθαρή μορφή του. Σχηματίζεται κυρίως κατά μήκος του ισοπρενοειδούς μονοπατιού της βιοσύνθεσης της χοληστερόλης, αλλά η ακριβής του προέλευση δεν έχει διευκρινιστεί επαρκώς. Η ετήσια παραγωγή του από τη βλάστηση φθάνει περίπου τους 600 εκατομμύρια τόνους, σχεδόν ισοδύναμη με τη παραγωγή μεθανίου στην ατμόσφαιρα. Μειωμένα επίπεδα ισοπροπενίου έχουν παρατηρηθεί σε ασθενείς με οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας και σε ασθενείς με CF σε οξεία αναπνευστική παρόξυνση. Αντίθετα, έχουν περιγραφεί αυξημένα επίπεδα εκπνεόμενου ισοπρενίου σε μια μικρής κλίμακας μελέτη πειραματικής έκθεσης στο όζον. Από μελέτες που αφορούν την εκπνοή νιτρικού οξειδίου ( $NO$ ), που είναι ένας καθιερωμένος δείκτης φλεγμονής των αεραγωγών, η ανάσα πριν την εκπνοή και ο ρυθμός ροής της εκπνοής έχουν σημαντικές

επιπτώσεις στην εκπνεόμενη συγκέντρωση. Το πεντάνιο μπορεί να βρεθεί στον αέρα του περιβάλλοντος (Larstad, Toren, Bake, & Olin, 2007).

## 7.2 Μέθοδοι προσδιορισμού αιθάνιου, πεντάνιου, ισοπροπένιου

Για τον προσδιορισμό του αιθάνιου, πεντάνιου και ισοπροπένιου χρειάζεται συλλογή μιας αναπνοής. Για να επιτευχθεί αυτό κατασκευάστηκε ένας νέος εξοπλισμός συλλογής μιας αναπνοής για τη συλλογή δειγμάτων σε σάκου, επιτρέποντας μετρήσεις ρυθμού ροής, διάρκειας και πίεσης (Εικ.2). Το μηχανογραφημένο σύστημα βιοανάδρασης που χρησιμοποιήθηκε για μετρήσεις FENO χρησιμοποιήθηκε επίσης για τον ρυθμό ροής, τη διάρκεια και τη συλλογή αναπνοής ελεγχόμενης πίεσης, προκειμένου να προσδιοριστεί το αιθάνιο, το πεντάνιο και το ισοπρένιο. Η αντίσταση πόνος πνεύμονα/ αναπνοή στο σύστημα συζεύχθηκε μέσω αδρανούς σωλήνα στην είσοδο δείγματος μίας βαλβίδας ορείχαλκου μεταγωγής πέντε κατευθύνσεων, επιτρέποντας τη ροή αέρα από μία μόνο είσοδο να αλλάξει σε οποιαδήποτε από τις τέσσερις εξόδους. Μία από τις ακραίες συνδέσεις εξόδου χρησιμοποιήθηκε για την αγκύρωση της βαλβίδας στον πίνακα που υποστηρίζει το σύστημα και οι άλλες τρεις εξόδους (Α, Β και Γ, Σχ. 4) χρησιμοποιήθηκαν ως διόδους ροής αέρα κατά τις διάφορες διαδικασίες δειγματοληψίας. Οι σακούλες Tedlar (3 L) με διπλά εξαρτήματα από ανοξείδωτο χάλυβα προσαρτήθηκαν σε μία ή δύο από τις άλλες ακραίες συνδέσεις της βαλβίδας, μέσω του εξαρτήματος της τσάντας που είχε αρχικά ένα διάφραγμα με μια θύρα σύριγγας (η οποία αφαιρέθηκε λίγο πριν από την προσάρτηση και στη συνέχεια δειγματοληψία για αύξηση της εσωτερικής διαμέτρου). Στο εσωτερικό, η διάμετρος του άλλου εξαρτήματος, που χρησιμοποιήθηκε για την έκπλυση, την πλήρωση και τη σφράγιση του σάκου, ήταν πολύ μικρή για δειγματοληψία, προκαλώντας την αντίσταση να είναι υψηλή κατά τη συλλογή δειγμάτων. Πριν από κάθε δειγματοληψία, οι σάκοι γεμίζονται με άζωτο και κατόπιν εκκενώνονται πλήρως χρησιμοποιώντας αντλία κενού. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται πέντε φορές. Ρυθμίστηκε με αέρα δωματίου αμέσως πριν και μετά τη δειγματοληψία αναπνοής, γεμίζοντας μια σακούλα Tedlar, χρησιμοποιώντας ηλεκτρική αντλία. Οι αναλυτές μεταφέρθηκαν σε απορροφητικούς σωλήνες εντός μίας ώρας από την ολοκλήρωση της συλλογής αναπνοής, κατά τη διάρκεια του οποίου οι σακούλες αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (Larstad, Toren, Bake, & Olin, 2007).



Εικ.1: Σχηματική αναπαράσταση του εξοπλισμού συλλογής εκπνεόμενου αέρα. Το θέμα εκπνεύστηκε μέσω του φίλτρου στόματος και ο αέρας ρέει μέσω της βαλβίδας χωρίς αναπνοή, της πνευματικής πίεσης και της αντίστασης ροής, σε σάκους Tedlar που συνδέονται με τη βαλβίδα εναλλαγής. Ένα μικρό μέρος του εκπνεόμενου αέρα αναλύθηκε επίσης από τον αναλυτή NO. \* Κατά τη διάρκεια της βασικής μέτρησης χρησιμοποιήθηκε ιατρικός αναπνευστικός αέρας χωρίς NO αντί για αέρα δωματίου. Στη μελέτη εισπνοής καθαρού αέρα, το άτομο εισέπνευσε συνθετικό καθαρισμένο αέρα από ξεχωριστή συσκευή και στη συνέχεια εξέπνευσε μέσω της παραπάνω συσκευής. \*\* Δύο σάκοι συνδεδεμένοι με τις θύρες A και Γ χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη συγκράτησης της αναπνοής, αλλά μόνο ένας σάκος που συνδέθηκε με τη θύρα Γ χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη εισπνοής καθαρού αέρα και στη μελέτη του ρυθμού ροής εκπνοής (Larstad, Toren, Bake, & Olin, 2007).

Για τον προσδιορισμό των ουσιών αρχικά χρειάστηκε να μεταφερθεί το δείγμα σε απορροφητικούς σωλήνες. Για τη συλλογή δειγμάτων εκπνεόμενου αέρα χρησιμοποιήθηκαν πολυστρωματικοί σωλήνες ροφητικού που περιέχουν Tenax TA, Carborack X και Carboxen 1000. Πραγματοποιήθηκε θέρμανση του σάκου Tedlar που περιείχε τον αέρα του δείγματος στους 40 °C για να αποφευχθεί πιθανή συμπύκνωση στα τοιχώματα του σάκου έπειτα από τη δειγματοληψία. Στη συνέχεια συνδέθηκε με έναν σωλήνα και μια αντλία χειροκίνητης δειγματοληψίας 100 mL, μέσω ενός διαπερατού στεγνωτήρα μεμβράνης. Το στεγνωτήριο περιέχει μια σωληνοειδή μεμβράνη Nafion, η οποία απομακρύνει επιλεκτικά μόρια νερού από το δείγμα. Το

Nafion είναι ένα συμπολυμερές τετραφθοροαιθυλενίου και υπερφθορο3,6-διοξα-4-μεθυλ-οκτενίου-σουλφονικού οξέος. Τα μόρια νερού στο δείγμα ενυδατώνουν το σουλφονικό οξύ και μεταφέρονται μέσω της μεμβράνης κατά μήκος της βαθμίδας υγρασίας σε μια ροή ξηρού αέρα αντίθετου ρεύματος  $2 \text{ L min}^{-1}$  έξω από τη μεμβράνη. Ένας όγκος 100 mL αζώτου, ακολουθούμενος από έναν όγκο δείγματος 100 mL χρησιμοποιήθηκε για να ξεπλυθεί ο σωλήνας. Στη συνέχεια ένας όγκος δείγματος 500 mL ( $5 * 100 \text{ mL}$ ) μεταφέρθηκε στον σωλήνα από τη χειροκίνητη αντλία με ρυθμό ροής περίπου  $200 \text{ mL min}^{-1}$ . Τα τελικά καλύμματα τεφλόν χρησιμοποιήθηκαν για να καλυφθούν οι σωλήνες κατά τη διάρκεια της αυτοματοποιημένης θερμικής εκρόφησης (Larstad, Toren, Bake, & Olin, 2007).

Μετά τη μεταφορά επιλέχθηκαν τυχαία τα μισά δείγματα και αναλύθηκαν, ενώ τα υπόλοιπα μισά διατηρήθηκαν στους σωλήνες, σφραγίστηκαν με ορείχαλκο Swagelok και κρίκους Teflon, σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι την ανάλυση τους την επόμενη ημέρα. Έγινε αυτόματη ρύθμιση των σωλήνων στους  $330 \text{ }^\circ\text{C}$  για 5 λεπτά με ρυθμό ροής ηλίου  $50 \text{ mL min}^{-1}$  μετά από κάθε ανάλυση. Η επαναληψιμότητα της μεταφοράς δειγμάτων από τους σάκους στους σωλήνες διερευνήθηκε συλλέγοντας τον εκπνεόμενο αέρα από έναν υγιή έλεγχο σε έναν σάκο Tedlar και στη συνέχεια μεταφέροντας τους συλλεγόμενους αναλύτες σε σωλήνες ( $n=4$ ) και αναλύοντάς τους χρησιμοποιώντας τις μεθόδους που περιεγράφηκε. Οι πιθανές απώλειες των αναλυτών μέσω του διαπερατού στεγνωτήρα μεμβράνης κατά τη μεταφορά δείγματος μελετήθηκαν συγκρίνοντας τα πρότυπα μεταφοράς αερίου με και χωρίς το στεγνωτήριο. Επιπλέον, διερευνήθηκε η μεταφορά δειγμάτων εκπνεόμενου αέρα με και χωρίς το στεγνωτήριο. Η χρήση προτύπων που παρασκευάζονται σε άζωτο (σχετική υγρασία,  $\text{RH}=0\%$ ) συγκρίθηκε με τη χρήση προτύπων παρασκευασμένων σε άζωτο κορεσμένο με νερό ( $\text{RH}=100\%$ ). Για το σκοπό αυτό, μια ροή αζώτου κατευθύνθηκε μέσω μιας γυάλινης φιάλης, από την οποία λήφθηκαν δείγματα ( $4*500 \text{ mL}$ ) με μια αεροστεγή σύριγγα και μεταφέρθηκε σε ένα σάκο Tedlar. Για να αυξηθεί το RH σε 100%, προστέθηκαν περίπου 20 mL καθαρισμένου νερού στη φιάλη, η οποία θερμάνθηκε. Το RH στη γυάλινη φιάλη μετρήθηκε από έναν αισθητήρα υγρασίας Testo 625 (Larstad, Toren, Bake, & Olin, 2007).

Το αιθάνιο, το πεντάνιο και το ισοπρένιο προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας μια αναλυτική μέθοδο που περιελάμβανε θερμική εκρόφηση των συστατικών του δείγματος αέρα από πολυστρωματικοί σωλήνες σε αυτόματο θερμική αποβολή, κρυο-

εστίαση σε ψυχρή παγίδα, θερμική εκρόφηση από την ψυχρή παγίδα, διαχωρισμός αερίου-στερεού με GC και με ανίχνευση ιονισμού φλόγας (FID). Το σύστημα στήλης περιελάμβανε μια προ-στήλη και μια αναλυτική στήλη. Ένα μηχανογραφημένο πρόγραμμα επεξεργασίας δεδομένων χρησιμοποιήθηκε για την απόκτηση των χρωματογραφικών δεδομένων. Οι συγκεντρώσεις προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας καμπύλη βαθμονόμησης δύο σημείων με βάση 3 τυφλές μετρήσεις και 3 μετρήσεις σε υψηλότερο επίπεδο. Παρασκευάστηκε αέριο βαθμονόμησης αραιώνοντας γνωστούς όγκους πιστοποιημένου αερίου βαθμονόμησης (αιθάνιο, πεντάνιο) και ισοπροπένιου σε άζωτο σε σάκους σε τελικές συγκεντρώσεις 2.4, 2.5 και 79 p.p.b. για τους αντίστοιχους αναλυτές. Τα τυπικά δείγματα στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε απορροφητικούς σωλήνες, με τον ίδιο εξοπλισμό και διαδικασίες που χρησιμοποιήθηκαν για τα δείγματα εκπνεόμενου αέρα. Έπειτα, τα τυπικά δείγματα αναλύθηκαν. Ο αναλυτής NO βαθμονομείται καθημερινά χρησιμοποιώντας αέρα χωρίς NO και πιστοποιημένο αέριο βαθμονόμησης NO (Larstad, Toren, Bake, & Olin, 2007).

Ζητήθηκε από άτομα να εισπνεύσουν καθαρό αέρα μέσω επιστόμου που είναι προσαρτημένο σε αμφίδρομη βαλβίδα Teflon. Η βαλβίδα συνδέθηκε με ένα σάκο αδρανούς αερίου 30L γεμάτο με συνθετικό καθαρό αέρα. Συλλέχθηκαν 4 τύποι δειγμάτων για ανάλυση: εκπνοή βασικής γραμμής χωρίς εισπνοή καθαρού αέρα, μια εκπνοή μετά από μια ανάσα καθαρού αέρα και εκπνοές μετά από 1 και 4 λεπτά καθαρού αέρα. Κατά τις δύο τελευταίες διαδικασίες χρησιμοποιήθηκε ένα κλιπ μύτης. Σε όλες τις περιπτώσεις, το άτομο εξέπνευσε στα 50 mL s<sup>-1</sup> για 20 s. Ο αναλυτής NO κατέγραψε NO καθ' όλη τη διάρκεια της εκπνοής. Για να εξετάσουν τα αποτελέσματα των ατόμων που κρατούν την αναπνοή τους πριν από την εκπνοή, πρώτα εισπνεύσουν τον αέρα του περιβάλλοντος και στη συνέχεια εκπνέουν αμέσως στο επιστόμιο χρησιμοποιώντας μια αργή απλή εκπνοή με ρυθμό ροής 50 mL s<sup>-1</sup>. Στη συνέχεια κράτησαν τις αναπνοές τους για 10 και 20s πριν εκπνεύσουν με ρυθμό ροής 50 mL s<sup>-1</sup> για περίοδο 10s (Larstad, Toren, Bake, & Olin, 2007).

Ένα μέρος του διαστημικού αέρα και ένα τμήμα του κυψελιδικού αέρα δειγματολήφθηκαν σε δύο ξεχωριστούς σάκους με δειγματοληψία διαστημικού αέρα από τη θύρα A της βαλβίδας μεταγωγής κατά τη διάρκεια των πρώτων 3s, και στη συνέχεια με εναλλαγή της βαλβίδας στη θύρα B για να απορρίψετε το μεσαίο τμήμα. Έπειτα, αλλάχθηκε η βαλβίδα στη θύρα C στα 7s, προκειμένου να δοκιμαστεί ο κυψελιδικός



αέρας κατά τη διάρκεια των τελευταίων 3s της εκπνοής. Το τμήμα του αέρα περιείχε έτσι 150 mL, ενώ το κυψελιδικό τμήμα του αέρα περιείχε 150 mL δείγμα. Μετά την εκπνοή περιείχε 350 mL. Αυτό επαναλήφθηκε 6-8 φορές, για να λάβει αρκετό αέρα για τις αναλύσεις. Για τις πρώτες 3-4 φορές, ο αναλυτής NO καταχώρισε NO κατά το πρώτο 30% της εκπνοής, δηλαδή για τα πρώτα 3s, και για τις 3 τελευταίες φορές, ο αναλυτής NO παρακολούθησε το τελευταίο 30% της εκπνοής. Η επαναληψιμότητα της μεταφοράς δειγμάτων αναπνοής από τους σάκους στους σωλήνες ήταν <4% (CV). Δεν ανιχνεύθηκαν απώλειες αναλύτη μέσω του διαπερατού στεγνωτήρα μεμβράνης. Ήταν απαραίτητο να χρησιμοποιηθεί το διαπερατό στεγνωτήριο μεμβράνης κατά τη μεταφορά των δειγμάτων εκπνεόμενου αέρα για να αποφευχθεί η υπερβολική υγρασία που εισέρχεται στον απορροφητικό σωλήνα, κάτι που θα επηρέαζε αρνητικά τη χρωματογραφία. Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην απόκριση κατά τη σύγκριση της χρήσης προτύπων που παρασκευάστηκαν σε υγρό άζωτο (RH=100%) και των προτύπων που παρασκευάστηκαν σε ξηρό άζωτο (RH=0%) (Larstad, Toren, Bake, & Olin, 2007).

## Κεφάλαιο 8. Αντικαταθληπτικά

### 8.1 Βενζοδιαζεπίνες

Οι βενζοδιαζεπίνες εμφανίστηκαν στα τέλη του 1950 συγκλονίζοντας την ιατρική κοινότητα καθώς μπορούσαν να λάβουν πολλές χρήσεις. Χρησιμοποιούνταν ως ηρεμιστικά αγχολυτικά, υπνωτικά, σπασμολυτικά και μυοχαλαρωτικά, συνδυάζοντας χαμηλή τοξικότητα χωρίς να προκαλούν εξάρτηση στον χρήστη. Οι ιδιότητες του το καθιστούσαν ιδανικό φάρμακο για πολλές παθήσεις. Τα φάρμακα αυτά ξεκίνησαν να συνταγογραφούνται για μεγάλα χρονικά διαστήματα, συχνά για πολλά χρόνια, αντικαθιστώντας τα βαρβιτουρικά τα οποία κατέστησαν επικίνδυνα σε υπερβολικές δόσεις, προκαλώντας εθισμό και πληθώρα παρενεργειών στον χρήστη. Η πρώτη βενζοδιαζεπίνη, το χλωροδιαζεποδεΐδιο (Librium), συντάθηκε το 1955 από τον Leo Sternbach ενώ εργαζόταν σε έρευνα σχετικά με τα ηρεμιστικά. Η ένωση αυτή αποδείχθηκε ότι ήταν ένα πολύ ισχυρό ηρεμιστικό, αντισπασμωδικό με μυοχαλαρωτικές επιδράσεις όταν υποβαλλόταν για δοκιμή σε ζώα. Λόγο των αποτελεσμάτων αυτών το φάρμακο κυκλοφόρησε ταχύτατα το 1960 με την επωνυμία Librium. Μετά τη χλωροδιαζεποδεΐδιο, η διαζεπάμη κυκλοφόρησε στο εμπόριο από την Hoffmann - La

Roche με την επωνυμία Valium το 1963. Στα τέλη του 1970 οι βενζοδιαζεπίνες έγιναν τα πιο συχνά συνταγογραφούμενα φάρμακα στον κόσμο. Έπειτα από χρόνια χρήση τους, ασθενείς ξεκίνησαν να παραπονιούνται για αίσθημα εξάρτησης στην ουσία και αδυναμία απόσυρσης της από την καθημερινότητά τους (Mehdi, 2012).

Όσον αφορά τις βενζοδιαζεπίνες, παρουσιάζονται αντισταθμιστικές αλλαγές στον νευροδιαβιβαστή GABA και στους υποδοχείς της βενζοδιαζεπίνης, με αποτέλεσμα τη μείωση της δράσης του GABA και των βενζοδιαζεπινών. Αυτό οδηγεί στην αυξανόμενη λήψη του φαρμάκου προκειμένου να επιφέρει τα ίδια αποτελέσματα. Η εξάρτηση που προκαλεί το φάρμακο έχει χωρίζεται σε δυο κατηγορίες. Τη φυσική εξάρτηση που περιλαμβάνει τις φυσικές συνέπειες της απόσυρσης της ουσίας από τον οργανισμό και είναι διαφορετική για κάθε φάρμακο και τη ψυχολογική εξάρτηση, που είναι το υποκείμενο αίσθημα απώλειας ελέγχου λήψης μιας ουσίας. Το GABA και το γ-αμινοβουτυρικό οξύ, είναι οι πιο σημαντικοί ανασταλτικοί νευροδιαβιβαστές στον εγκέφαλο των θηλαστικών και αντιπροσωπεύουν περίπου το 30% όλων των συνάψεων σε ολόκληρο τον εγκέφαλο. Όταν αντιδρούν οι βενζοδιαζεπίνες στην τοποθεσία των υποδοχέων τους, η οποία βρίσκεται στην GABA δέκτης, η ένωση τους λειτουργεί ως ενισχυτής των ενεργειών του. Το GABA έχει την ικανότητα να καθιστά τον νευρώνα πιο ανθεκτικό στη διέγερση. Διάφοροι υπό τύποι υποδοχέων βενζοδιαζεπίνης έχουν ελαφρώς διαφορετικές δράσεις. Το Alpha 1 για παράδειγμα είναι υπεύθυνο για τα ηρεμιστικά αποτελέσματα. Το Alpha 2 ασκεί αγχολυτικά εφέ. Τα Alpha 1, Alpha 2 και Alpha 5 ευθύνονται για τα αντισπασμωδικά αποτελέσματα. Λόγο ότι οι βενζοδιαζεπίνες προκαλούν ανασταλτική δράση στο GABA, μειώνεται η έκκριση νευροδιαβιβαστών όπως η ντοπαμίνη, η σεροτονίνη, η νορεπινεφρίνη και η ακετυλοχολίνη (Mehdi, 2012).

#### Οι βασικές ιδιότητες των βενζοδιαζεπινών είναι:

- *Αγχολυτική και ανασταλτική συμπεριφορά.* Η επίδραση παρουσιάζεται στα ζώα ως αύξηση των συμπεριφορών αποκρίσεις που καταστέλλονται πειραματικά ή που απουσιάζουν λόγω της έμφυτης αποστροφής.
- *Αντιεπιληπτικά.* Οι βενζοδιαζεπίνες διαθέτουν τις πιο ισχυρές χημικά προκαλούμενες επιληπτικές δραστηριότητες. Σε υψηλότερες δόσεις οι περισσότερες, αλλά όχι όλες, αποτρέπουν επίσης τις επιληπτικές κρίσεις προκαλείται από ηλεκτροπληξία.
- *Ηρεμιστικό/υπνωτικό.* Αυτές οι επιδράσεις των βενζοδιαζεπινών παρατηρούνται πιο εύκολα ως μείωση του αυθόρμητου κινητήρα δραστηριότητα σε τρωκτικά

τοποθετημένα σε θάλαμο παρατήρησης. Οι βενζοδιαζεπίνες θα μειώσουν τον χρόνο καθυστέρησης του ύπνου (χρόνος για να κοιμηθεί αφού σβήσουν τα φώτα) που μπορεί να αποδειχθεί με ηλεκτροεγκεφαλογράφημα.

- *Χαλαρωτικό μυών.* Συχνές δοκιμές σε τρωκτικά δείχνουν ότι οι βενζοδιαζεπίνες επηρεάζουν την απόδοση των κινήσεων τους, για παράδειγμα, η ικανότητα του τρωκτικού να ισορροπεί σε ένα περιστρεφόμενο τύμπανο. Η γάτα δείχνει έντονη αταξία μετά από χορήγηση σχετικά χαμηλών δόσεων (Mehdi, 2012).

## 8.2 Μέθοδοι προσδιορισμού των βενζοδιαζεπινών

Για τον προσδιορισμό των βενζοδιαζεπινών χρησιμοποιούνται μέθοδοι υγρής χρωματογραφίας. Είναι οι μέθοδοι εκείνες που περιλαμβάνουν τις τεχνικές στις οποίες το υγρό χρησιμοποιείται ως κινητή φάση. Διακρίνεται η υγρή χρωματογραφία (LC), που είναι από τις παλαιότερες χρωματογραφικές μεθόδους, καθώς και οι σύγχρονες τεχνικές, όπως η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης γνωστή και ως υψηλή απόδοση υγρή χρωματογραφία (HPLC), υγρό υψηλής απόδοσης χρωματογραφία (UPLC), χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) και χρωματογραφία λεπτής στιβάδας υψηλής απόδοσης (HPTLC). Η HPLC έχει βρει εφαρμογές τόσο στην ποιοτική όσο και στην ποσοτική ανάλυση διαφόρων ενώσεων και μιγμάτων. Η ποιοτική ανάλυση βασίζεται στον διαχωρισμό και την ταυτοποίηση που επιβεβαιώνουν την ταυτότητα των αναλυθέντων ενώσεων, σύνθετων μιγμάτων ή του καθαρού φαρμάκου. Οι τεχνικές αυτές έχουν βρει ευρεία χρήση, όχι μόνο στη φαρμακευτική βιομηχανία, αλλά και στην τοξικολογική ανάλυση, τον έλεγχο του ντόπινγκ στην ιατροδικαστική, τη γεωργία και τη βιομηχανία τροφίμων (Szatkowska, Koba, Kośliński, Wandas, & Bączek, 2014).

Η HPLC έχει εφαρμοστεί ευρέως στην ανάλυση παραγώγων βενζοδιαζεπίνης κυρίως σε βιολογικά υγρά όπως ούρα, μαλλιά, πλάσμα, ορός, πλήρες αίμα, νύχια, γαστρικά υγρά, θραύσματα ιστών και υγρά έκκρισης από του στόματος καθώς και σε φαρμακευτικά παρασκευάσματα, δηλαδή κάψουλες δισκίων και ενέσιμα διαλύματα. Έπειτα από κατάλληλη προετοιμασία του δείγματος, η HPLC μπορεί να ταυτοποιήσει και να προσδιορίσει βενζοδιαζεπίνες σε φαρμακευτικά σύμπλοκα καθώς και σε άλλες ιατρικές ουσίες. Μια ακόμη χρήση της είναι για να ανιχνεύει προσμείξεις σε φαρμακευτικά προϊόντα που περιέχουν τα παράγωγα βενζοδιαζεπίνης, μελέτες σχετικά με τη σταθερότητα των βενζοδιαζεπινών σε ορισμένες συνθέσεις και διαχωρισμό των εναντιομερών. Όσον αφορά τα βιολογικά υγρά, η HPLC επιτρέπει επιπλέον την

ταυτοποίηση μεταβολιτών όπως τα γλυκουρονίδια. Πρακτικά η HPLC αντίστροφης φάσης (RPHPLC) χρησιμοποιείται συχνότερα από την HPLC κανονικής φάσης (NP-HPLC). Οι τυπικές στήλες RP περιλαμβάνουν στήλες C18 και C8. Επιπλέον, έχουν αναφερθεί αναφορές για στήλες μικρών οπών με εσωτερική διάμετρο 1 mm, καθώς και στήλες τροποποιημένες με υδρόφοβες ομάδες. Επιπλέον, έχουν αναφερθεί στήλες με πολυμερισμένη στατική φάση όπως πολυβινυλική αλκοόλη καθώς και φαινυλ ομάδες, κυανομάδες ή β-κυκλοδεξτρίνη. Ένα ακόμη παράδειγμα αποτελούν οι μονολιθικές στήλες επικαλυμμένες με διοξείδιο του πυριτίου, με σκοπό τη διασφάλιση χαμηλής πίεσης στη στήλη και έτσι να επιτευχθεί η αύξηση της αποτελεσματικότητας του διαχωρισμού (Szatkowska, Koba, Kośliński, Wandas, & Bączek, 2014).

Ο διαχωρισμός των δοκιμαστικών ενώσεων πραγματοποιήθηκε με διαφορετικά εκλούσματα ως κινητή φάση σε ισοκρατικές συνθήκες. Η ανίχνευση UV σε μήκος κύματος 215 nm, 220 nm, 226 nm, 228 nm, 230 nm, 235 nm, 240 nm, 242 nm, 250 nm, 254 nm, 255 nm αναφέρθηκε ως η πιο κατάλληλη. Επιπλέον, ο ανιχνευτής συστοιχιών διόδων (DAD) αναφέρθηκε ότι ήταν εφαρμόσιμος στην ανάλυση βενζοδιαζεπινών καθώς και στον ηλεκτροχημικό ανιχνευτή. Έχει αναφερθεί εκτενώς η χρήση HPLC σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (HPLC-MS). Επίσης, προτείνεται η διαδοχική φασματομετρία μάζας (HPLC-MS-MS) και η HPLC-DAD-MS (Szatkowska, Koba, Kośliński, Wandas, & Bączek, 2014).

#### Μέθοδοι ιονισμού που χρησιμοποιούνται στην ανάλυση βενζοδιαζεπίνης:

- ιονισμός ηλεκτροψεκασμού σε θετική λειτουργία (ESI +) και ιονισμός ηλεκτροψεκασμού σε αρνητική λειτουργία (ESI -),
- ιονισμός ατμοσφαιρικής πίεσης σε συνδυασμό με ιονισμό ηλεκτροψεκασμού (API-ESI),
- ιονισμός χημικής και ατμοσφαιρικής πίεσης (APCI),
- ιονισμός θερμοψεκασμού (TSP),
- ιονισμός ψεκασμού ήχου (SSI).

Στην ανάλυση MS χρησιμοποιήθηκε συχνά αναλυτής μάζας τριπλού τετραπόλου. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν παγίδα ιόντων και αναλυτής μάζας απλής τετράπολης (Szatkowska, Koba, Kośliński, Wandas, & Bączek, 2014).

Η ανάλυση των θερμοευαίσθητων βενζοδιαζεπινών μπορεί να προκαλέσει προβλήματα. Για αυτόν τον λόγο προτάθηκε η διαδοχική φασματομετρία μάζας με

ιονισμό θερμοψεκασμού. Η τεχνική αυτή προτείνεται για την ανάλυση των περισσότερων βενζοδιαζεπινών, εκτός από την κεταζολάμη, όπου παρατηρήθηκε πλήρης αποσύνθεση στη διαζεπάμη όταν διεξήχθη ανάλυση σε αυτή τη συγκεκριμένη κατάσταση. Η μέθοδος HPLC-MS-MS έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για να ανιχνεύσει τη διαζεπάμη σε φυτικά φάρμακα και συμπληρώματα διατροφής. Η προσθήκη διαζεπάμης αυξάνει την επίδραση αυτής της ένωσης. Ωστόσο, η μέθοδος LC-MS έχει περιορισμούς. Για παράδειγμα τα αποτελέσματα της μήτρας ιονισμού. Μεταξύ άλλων τεχνικών για την ταυτοποίηση παραγώγων βενζοδιαζεπίνης σε φαρμακευτικά παρασκευάσματα, έχει χρησιμοποιηθεί η μικροκυτταρική υγρή χρωματογραφία (MLC). Το MLC χρησιμοποιήθηκε για να προσδιορίσει τα αντισπασμωδικά φάρμακα όπως το χλωροδιαζεποξείδιο και η διαζεπάμη σε κάψουλες, χάπια, δισκία, εγχύσεις, σταγόνες και υπόθετα (Szatkowska, Koba, Kośliński, Wandas, & Bączek, 2014).

Έχει πραγματοποιηθεί προσδιορισμός της φλουνιτραζεπάμης και της νιτραζεπάμης με ανίχνευση διπλού ηλεκτροδίου υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (LC-DED) σε αναγωγική-αναγωγική λειτουργία, με χρήση ηλεκτροδίου από ίνες άνθρακα (CFVE) συνδυαστικά με ένα υαλώδες ηλεκτρόδιο άνθρακα. Σημειώνεται συνεχώς βελτίωση στις ηλεκτροχημικές μεθόδους ανάλυσης των ναρκωτικών ουσιών. Από τον De Carvalho χρησιμοποιήθηκε υγρή χρωματογραφία ζεύγους ιόντων με παλμική αμπερομετρική ανίχνευση προκειμένου να αξιολογηθούν διάφορα διουρητικά φάρμακα. Η υγρή χρωματογραφία Ultra-Performance (UPLC), μπορεί επίσης να εφαρμοστεί για τον προσδιορισμό των βενζοδιαζεπινών. Η μέθοδος αυτή μπορεί να αξιοποιηθεί για τον προσδιορισμό των ηρεμιστικών και αντικαταθλιπτικών φαρμάκων σε φαρμακευτικά προϊόντα. Επιπλέον μπορεί να προσδιοριστεί η θεραπευτική και η τοξική συγκέντρωση των βενζοδιαζεπινών σε δείγματα αίματος. Σε φαρμακευτικά δισκία, διαλύματα έγχυσης ή εναιωρήματα, προκειμένου να προσδιοριστούν αρκετές βενζοδιαζεπίνες (διαζεπάμη, νιτραζεπάμη, φλουνιτραζεπάμη, χλωροδιαζεποξείδιο, κλοναζεπάμη, τετραζεπάμη, οξαζεπάμη και τεμαζεπάμη), χρησιμοποιείται η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Έχει σημειωθεί χρήση της και για τον προσδιορισμό τους σε βιολογικό υλικό, κυρίως ορό, στο πλάσμα, στα ούρα και πιο σπάνια σε υγρά του στομάχου. Επιπλέον μπορεί να ανιχνεύσει μεταβολίτες σε ήδη αναλυμένο υλικό. Ο διαλύτης που χρησιμοποιείται συνήθως για την εκχύλιση βενζοδιαζεπίνης ήταν το βενζόλιο. Τυπικά, η TLC χρησιμοποιεί γυάλινες πλάκες επικαλυμμένες με σίλικα καθώς και πλάκες RP-18 επικαλυμμένες με μη

πολικό προσροφητικό, με την προσθήκη του παράγοντα φθορισμού F254. Οι Schwartz και Carbone χρησιμοποίησαν δισδιάστατη χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό της medazepam και των μεταβολιτών της στο αίμα (Szatkowska, Koba, Kośliński, Wandas, & Bączek, 2014).

Η ποσοτική ανάλυση επιλεγμένων παραγώγων βενζοδιαζεπίνης πραγματοποιήθηκε με σάρωση πυκνομετρίας με κατάλληλα μήκη κύματος (διαζεπάμη και οξαζεπάμη στα 380 nm και χλωροδιαζεποξείδιο στα 390 nm). Σε περίπτωση όπου υπάρχει έλλειψη προτύπων, η ταυτοποίηση γίνεται με TLC σε συνδυασμό με τεχνικές MS. Η τεχνική TLC ενισχύεται επίσης με ήπια μέθοδο ιονισμού, γνωστή ως φασματομετρία μάζας δευτερεύοντος ιόντος υγρού (LSIMS) για τον προσδιορισμό της ριμαζαφόνης και των τριών μεταβολιτών της. Η μέθοδος TLC επέτρεψε την ανίχνευση βενζοδιαζεπινών ακόμη και σε συγκέντρωση νανογραμμαρίων. Το HPTLC έχει επίσης χρησιμοποιηθεί, για τον προσδιορισμό των βενζοδιαζεπινών σε απλό αλλά και πολύπλοκο φαρμακευτικό δείγμα, για την ανίχνευση μολυσματικών ουσιών σε διαφορετικές δόσεις. Η HPTLC αναφέρθηκε επίσης ότι ανιχνεύει μολυσματικούς παράγοντες σε φαρμακευτικό δείγμα με HPTLC-UV/FTIR και ταυτοποιεί την υδροχλωρική φλουραζεπάμη και τους μολυσματικούς παράγοντες στις κάψουλες και τη μάζα σκόνης. Η ανίχνευση FT-IR αύξησε την ευαισθησία και το ρυθμό της ανάλυσης. Προκειμένου να αναπτυχθεί μια ταχεία και ευαίσθητη μέθοδος για βενζοδιαζεπίνες στον ορό, χρησιμοποιήθηκε προηγουμένως εκχύλιση δείγματος χρησιμοποιώντας επικαλυμμένες με σιλικάζελ πλάκες. Χρησιμοποιήθηκε επίσης στην εγκληματολογική ανάλυση για τον προσδιορισμό παραγώγων βενζοδιαζεπίνης σε προϊόντα διατροφής όπως αναψυκτικά, χυμοί φρούτων, μπισκότα. Η διαζεπάμη ανιχνεύθηκε με πυκνομετρία στα 230 nm ή σε συνδυασμό με MS. Για τον διαχωρισμό των βενζοδιαζεπινών σε τεχνική HPTLC έχουν χρησιμοποιηθεί συνήθως πλακίδια επικαλυμμένα με silica gel. Η ανάλυση δεκαοκτώ βενζοδιαζεπινών, που παρασκευάστηκε πρώτα κατάλληλα, πραγματοποιήθηκε επίσης σε πλάκες με διυδροξυ ομάδες (OH), κυανό (CN) και αμινο (NH<sub>2</sub>). Κινητή φάση αποτελούμενη από ένα μείγμα τετραχλωριούχου άνθρακα: οξικού αιθυλεστέρα και νερού: μεθανόλης - χρησιμοποιείται σε διαφορετικές αναλογίες. Ο διαχωρισμός σε αντίστροφη φάση σε πλάκες με δραστικές ομάδες NH<sub>2</sub> αποδείχθηκε ακατάλληλος για τις περισσότερες ενώσεις που μελετήθηκαν, με εξαίρεση το χλωροδιαζεποξείδιο και τη μεδαζεπάμη. Έχει αποδειχθεί ότι αυτές οι πλάκες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για το

διαχωρισμό των βενζοδιαζεπινών, όχι μόνο σε κανονική φάση, αλλά και σε αντίστροφη φάση, ανάλογα με τις ιδιότητες της κινητής φάσης. Σε ένα λίγες περιπτώσεις η πλάκα TLC αποθηκεύτηκε σε μεθανόλη πριν από την ανάλυση και μετά ξηράνθηκε στους περίπου 110 °C (Szatkowska, Koba, Kośliński, Wandas, & Bączek, 2014).

Χρησιμοποιήθηκε επίσης αέριο χρωματογραφία (GC) στην ανάλυση παραγώγων βενζοδιαζεπίνης που εκχυλίστηκαν από ούρα ή αίμα χρησιμοποιώντας για παράδειγμα η-βουτυλοχλωρίδιο ή ένα μείγμα χλωροφορμισοπροπυλάνθρακα (9: 1). Απαιτείται διαδικασία παραγωγοποίησης ώστε να μετατραπούν οι ενώσεις σε αριθμό πτητικών παραγώγων που θα μπορούσαν να αναλυθούν σε αέρια φάση. Σε ορισμένες περιπτώσεις όμως, η παραγοντοποίηση δεν ήταν απαραίτητη. Ήταν δυνατό να χρησιμοποιηθεί μέθοδος άμεσης χρωματογραφίας αερίου για να αποφευχθεί η διαδικασία της παραγωγοποίησης. Η ανίχνευση επιλεγμένων ενώσεων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας έναν ανιχνευτή δέσμησης ηλεκτρονίων (ECD). Χρησιμοποιήθηκαν αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (GC-MS) ή GC-MS-MS με ιονισμό ηλεκτρονικής πρόσκρουσης (EI) θετικό χημικό ιονισμό (PCI) και αρνητικό χημικό ιονισμό (NCI) (Szatkowska, Koba, Kośliński, Wandas, & Bączek, 2014).

Μέχρι στιγμής, υπάρχουν πολλές αναφορές σε άρθρα για τη χρησιμότητα της άμεσης UV- φασματοφωτομετρίας στην ανάλυση των βενζοδιαζεπινών. Η χρήση της βοήθησε τον προσδιορισμό της νιτραζεπάμης και της κλοναζεπάμης σε βιολογικά υγρά και διαπίστωσε ότι η χρήση του πέμπτου φάσματος παραγώγων για τη νιτραζεπάμη και του έκτου παραγώγου φάσματος για την κλοναζεπάμη επιτρέπει τον προσδιορισμό αυτών των ενώσεων απευθείας στα ούρα. Επιπλέον, η χρήση ενός τετάρτου παραγώγου του φάσματος παρέχει τον προσδιορισμό τους στο πλάσμα. Η μέθοδος του φάσματος τέταρτου παραγώγου χρησιμοποιήθηκε επίσης για τον προσδιορισμό της διαζεπάμης και της οξαζεπάμης λαμβάνοντας υπόψη την κινητική της αποδόμησης της πραζεπάμης σε υδατικά διαλύματα. Μια ακόμη τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της ποσότητας των βενζοδιαζεπινών ήταν η φασματοφωτομετρία διαφοράς στο UV-VIS. Χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του χλωροδιαζεποξειδίου, της δεμοξεπάμης και της νιτροζεπάμης σε δισκία. Η φασματοφθοριομετρία προτάθηκε επίσης ως μέθοδος ποσοτικής ανάλυσης βενζοδιαζεπινών. Χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της νιτραζεπάμης και της οξαζεπάμης σε φαρμακευτικά προϊόντα, τη φλουραζεπάμη και τους κύριους μεταβολίτες της στο αίμα και τα ούρα, και διαζεπάμη, κλοναζεπάμη,

βρωμοζεπάμο, λοραζεπάμη σε φάρμακα καθώς και βιολογικά υγρά. Έχει επίσης προταθεί φθοριομετρική μέθοδος για τον ποσοτικό προσδιορισμό παραγώγων βενζοδιαζεπίνης που περιέχουν υδροξυλομάδα στη θέση 3 (οξαζεπάμη, λοραζεπάμη, κινολαζεπάμη, τεμαζεπάμη) σε ούρα και ορό. Η φθοριομετρική ανίχνευση χρησιμοποιώντας τεχνική έγχυσης ροής - χρησιμοποιήθηκε επίσης στην ανάλυση οξαζεπάμης, διαζεπάμης και νιτραζεπάμης σε φαρμακευτικά προϊόντα, μετά από προηγούμενη υδρόλυση αυτών των ενώσεων (Szatkowska, Koba, Kośliński, Wandas, & Bączek, 2014).

Η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (CE) περιλαμβάνει πολλές διαφορετικές τεχνικές ηλεκτρομετανάστευσης. Ηλεκτροφόρηση τριχοειδών ζωνών (CZE), τριχοειδή ισοηλεκτρική εστίαση (CIEF), ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς πηκτής (CGE), τριχοειδής ισοταφοφόρηση (CITP), μικροκυτταρική ηλεκτροκινητική τριχοειδής χρωματογραφία (MECC) και τριχοειδής ηλεκτροχρωματογραφία (CEC) αποτελούν τα πιο δημοφιλή παραδείγματα μεθόδων που χρησιμοποιούνται στην ανάλυση βιολογικών δειγμάτων. Η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιεί ένα μαγνητικό πεδίο για να δώσει τη ροή σε ηλεκτρικά φορτισμένα σωματίδια. Η διαδικασία αυτή συνήθως πραγματοποιείται σε υγρό μέσο. Τα φορτισμένα σωματίδια κινούνται μέσα σε υγρό με διαφορετικές ταχύτητες και κατευθύνσεις, γεγονός που τους επιτρέπει να διαχωριστούν. Πραγματοποιήθηκε χρήση της μεθόδου MECC από τον Hancu και τους συνεργάτες του για τον προσδιορισμό 8 βενζοδιαζεπινών, για τη μελέτη της σταθερότητας τους σε όξινο περιβάλλον. Η μέθοδος αυτή κρίθηκε αξιόπιστη και ταχύτατη, με χρόνο διαχωρισμού μικρότερο από 20 λεπτά (Szatkowska, Koba, Kośliński, Wandas, & Bączek, 2014).

## Κεφάλαιο 9. Εξαρτησιογόνα σε τρόφιμα

### 9.1 Μυριστικήνη

Η μυριστικήνη (5-αλλυλ-1-μεθοξυ-2,3-μεθυλενοδιοξυβενζόλιο) αποτελεί το κύριο συστατικό του αιθέριου ελαίου μοσχοκάρυδου (*Miristica fragrans* Houtt). Η συγκέντρωση του αιθέριου ελαίου στο λάδι συχνά φτάνει το 15%. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία η μυριστικήνη δρα ως ανταγωνιστής υποδοχέας της σεροτονίνης και έχει παραισθησιογόνες επιπτώσεις. Η κατανάλωση μεγάλης ποσότητας μυριστικήςνης μπορεί να προκαλέσει δηλητηριάσεις κατά της οποίες ο ασθενείς παρουσιάζει παραλήρημα, σπασμούς, ναυτία, αφυδάτωση, αύξηση παλμικού ρυθμού και γενικός πόνος στο σώμα.



Τα συμπτώματα της δηλητηρίασης εμφανίζονται έπειτα από 3-6 ώρες από την κατανάλωση της μυριστικίνης και παραμένουν έως 72 ώρες. Η δηλητηρίαση από μοσχοκάρυδο αποτελεί ένα σύνθητες συμβάν καθώς και έχουν σημειωθεί πολλές τα τελευταία χρόνια με κάποιες από αυτές να καταλήγουν θανατηφόρες λόγω δηλητηρίασης από μυριστικίνη (L. Dawidowicz & P. Dybowski, 2012).

Η χρήση της έχει λάβει αυξανόμενο ρυθμό καθώς και αποτελεί ένα φθινό παραισθησιογόνο. Το *Miristica fragrans* Houtt στην Ινδία συναντάται και με τις ονομασίες *Jaiphal* και *Javitri*. Είναι ένα αειθαλές αρωματικό δέντρο ου συνήθως φτάνει τα 5-13 μέτρα ύψος. Από αυτό παράγεται το μπαχαρικό μοσχοκάρυδο και το άνθος μοσχοκάρυδου (*mace*) που χρησιμοποιείται επίσης στη μαγειρική. Το μοσχοκάρυδο παράγεται από τον πυρήνα του σπόρου στο εσωτερικό του ενώ το *mace* είναι το σαρκώδες κόκκινο, καθαρό σαν κάλυμμα δέρματος (*aril*) στον πυρήνα. Από την στιγμή που γίνει λήψη των σπορίων του μοσχοκάρυδου απαιτούνται 3 με 6 εβδομάδες προκειμένου να αποξηραθεί και να μπορεί να χρησιμοποιηθεί. Στην παραδοσιακή ιατρική, το μοσχοκάρυδο είναι εφικτό να χρησιμοποιηθεί ως διεγερτικό, για εντερική καταρροή και κολικούς, πόνους στο στομάχι, ναυτία, ελονοσία, ισχιαλγία, ρευματισμοί, στα πρώιμα στάδια της λέπρας, για διέγερση της όρεξη και είναι διάσημο για την ικανότητα του να προάγει την εμμηνορροϊκή απόρριψη και να προκαλεί άμβλωση. Το *mace* χρησιμοποιείται ευρέως ως αρωματικός παράγοντας και σε βαφές μαλλιών. Άλλη μια χρήση του που έχει αναφερθεί είναι σαν λαϊκό φάρμακο. Επιπλέον διαθέτει αντιφλεγμονώδης και αντικαρκινική δράση έναντι του θηλώματος (Jaiswal, Kumar, Singh, & Singh, 2009).

Η μυριστικίνη είναι περίπου το 4% του μοσχοκάρυδου. Το λάδι του *mace* περιέχει τα ίδια συστατικά αρώματος, αλλά το συνολικό κλάσμα των τερπενοειδών αυξάνεται σε σχεδόν 90%. Τόσο το μοσχοκάρυδο όσο και το *mace* περιέχουν 2% διαρυλοπροπανοειδή που είναι μη πτητικό διμερή φαινυλοπροπανοειδών συστατικών του αιθέριου ελαίου. Στην περιοχή Αργουβεδα της Ινδίας το μοσχοκάρυδο χρησιμοποιείται στην ιατρική διότι θεωρείται ότι έχει αντιδιαρροϊκή δραστηριότητα. Η κατανάλωση του σε μεγάλες ποσότητες ωστόσο μπορεί να προκαλέσει εκφυλισμό του ήπατος. Η μυριστικίνη που απομονώνεται από τους σπόρους του φυτού *M. perfans* εμφανίζει καλή αντιβακτηριακή δράση έναντι θετικών και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων (Jaiswal, Kumar, Singh, & Singh, 2009).

## 9.2 Καφεΐνη

Ιστορικά η καφεΐνη ξεκίνησε να καταναλώνεται από την φυλή Calla της Αιθιοπίας πριν από 1000 χρόνια. Η καφεΐνη απομονώθηκε από κόκκους καφέ το 1819 από τον Γερμανό χημικό Friedlieb Ferdinand Runge. Η χημική ονομασία της είναι 1,3,7-τριμεθυλοξανθίνη. Έχει βρει πολλές εφαρμογές όπως τα αναλγητικά, τα βοηθήματα διατροφής και τις θεραπείες γρίπης. Κλινικά χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της νευρασθένειας και την αποκατάσταση του κώματος. Μεγάλο μέρος του πληθυσμού κάνει καθημερινή χρήση της είτε για παροχή ενέργειας είτε λόγω απόλαυσης της γεύσης της. Η χρήση αυτή μπορεί να γίνει με την κατανάλωση ροφήματος καφέ ή ενεργειακών ποτών που περιέχουν καφεΐνη (Sereshti & Samadi, 2014).

Η καφεΐνη προκαλεί προσωρινή αποτροπή της υπνηλίας ενώ ενισχύει την εγρήγορση του ατόμου. Η ετήσια κατανάλωση της παγκοσμίως αγγίζει τους 120000 τόνους. Στη Βόρεια Αμερική η ημερήσια κατανάλωση της πραγματοποιείται από το 90% των ενηλίκων. Αποτελεί μια ψυχοδραστική ουσία που σε σύγκριση με άλλες ψυχοδραστικές ουσίες η χρήση της είναι απολύτως νόμιμη και μη ρυθμιζόμενη σε σχεδόν όλες τις χώρες. Έχει διουρητικές ιδιότητες όταν χορηγείται σε επαρκείς δόσεις σε άτομα που δεν παρουσιάζουν ανοχή. Ανοχή σε αυτήν φαίνεται να παρουσιάζουν συστηματικοί χρήστες, στους οποίους δεν εμφανίζεται και το φαινόμενο αυτό. Παρόλο που υπάρχει η αντίληψη πως η συνεχής κατανάλωση καφεΐνης προκαλεί αφυδάτωση, δεν φαίνεται να έχει αποδειχτεί κάτι τέτοιο επιστημονικά. Η καθαρή καφεΐνη είναι άοσμη με πικρή γεύση και απαντάται σε σπόρους, φύλλα, καρπούς πολλών φυτών (κακάο, τσάι, κόλα, γκουαράνα). Για τα φυτά αποτελεί φυσικό φυτοφάρμακο, καθώς και απομακρύνει ή σκοτώνει μερικά είδη εντόμων που τρέφονται από τα φυτά αυτά (Sereshti & Samadi, 2014).

Η συγκέντρωση της στον οργανισμό είναι μείζονος σημασίας διότι αποτελεί βασικό σημάδι ορισμένων διαταραχών όπως οι καρδιακές παθήσεις, το άσθμα, η νεφρική δυσλειτουργία και η καρκινογένεση. Η καφεΐνη για να καταστεί θανατηφόρα, η δόση της θα πρέπει να υπερβαίνει τα 10g. Επίσης έχουν σημειωθεί περιπτώσεις κώματος έπειτα από υπερδοσολογία (>200 mg /ημέρα). Τα ποτά που περιέχουν καφεΐνη ρυθμίζονται από την Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA). Η μέγιστη τιμή της επιβάλλεται να μην προσπερνά τα 200 mg/L. Είναι σημαντικό να γίνεται παρακολούθηση της καφεΐνης στα ποτά και τα τρόφιμα, καθιερώνοντας μια πιο ακριβή,

απλή, γρήγορη και χαμηλού κόστους αναλυτική μέθοδο, προκειμένου να μελετώνται οι φυσιολογικές επιδράσεις της στον μεταβολισμό του ανθρώπινου σώματος, συμπεριλαμβανομένης της διέγερσης του κεντρικού νευρικού συστήματος και της αύξησης της αρτηριακής πίεσης σύντομα όρος και έλεγχος της ποιότητας των τροφίμων (Sereshti & Samadi, 2014).

### 9.3 Μέθοδοι προσδιορισμού μυριστικής και καφεΐνης

Για να μπορέσει να προσδιοριστεί η μυριστική σε μπαχαρικά όπως το μοσχοκάρυδο, θα πρέπει να πραγματοποιηθεί, για τις περισσότερες μεθόδους, απομόνωση της μέσω απόσταξης ατμού (SD) ή εκχύλισης στερεού υγρού (SLE). Συγκριτικά με τις μεθόδους εξαγωγής το SD απαιτεί μεγάλη ποσότητα δείγματος, ενώ συγχρόνως είναι λιγότερο αποτελεσματικό και αναπαραγωγικό. Σύμφωνα με τα παραπάνω στοιχεία η μέθοδος αυτή ολοένα και αντικαθίσταται από την τεχνική εκχύλισης που προσδίδει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα. Ωστόσο, το κύριο αρνητικό χαρακτηριστικό των υγρών-στερεών εκχυλισμάτων, που προορίζονται για ανάλυση αέριας χρωματογραφίας, είναι η παρουσία μη πτητικών συστατικών. Τα συστατικά αυτά εναποτίθενται στο σύστημα GC αλλάζοντας τις χρωματογραφικές του ιδιότητες. Λόγω του κινδύνου αυτού, συνιστάται η απομάκρυνση μη πτητικών ενώσεων από τα εκχυλίσματα (π.χ. με διαδικασία εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE)). Συνίσταται κυρίως όταν χρησιμοποιούνται σύγχρονες τεχνικές εξαγωγής, όπως για παράδειγμα εξαγωγή υγρού υπό πίεση (PLE), εξαγωγή με διαλύτες με μικροκύματα ή υπερήχους (MASE ή USE) (L. Dawidowicz & P. Dybowski, 2012).

Η διαδικασία προετοιμασίας των δειγμάτων για τον υπολογισμό της μυριστικής σε μπαχαρικά, αποτελείται από δύο στάδια:

- Εξαγωγή δείγματος και
- Διαδικασία εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE)

Για να πραγματοποιηθεί η εξαγωγή των δειγμάτων μπαχαρικών που εξετάστηκαν χρησιμοποιήθηκε PLE και USE. Αρχικά λήφθηκαν 500γρ. του υπό εξέταση μπαχαρικού (αλεσμένο μοσχοκάρυδο) και αναμίχθηκαν με ουδέτερο γυαλί με σκοπό τη μείωση του όγκου της μεθανόλης που εφαρμόζεται ως εκχυλιστικό. Σε ένα κελί εκχύλισης τοποθετήθηκε ανοξείδωτος χάλυβας 22mL και υποβλήθηκε στη διαδικασία εκχύλισης χρησιμοποιώντας ASE 200 από την Dionex. Για τη διαδικασία PLE χρησιμοποιήθηκαν οι εξής θερμοκρασίες: 40, 60, 80, 100 και 120 °C. Σε όλες τις περιπτώσεις, ο στατικός χρόνος

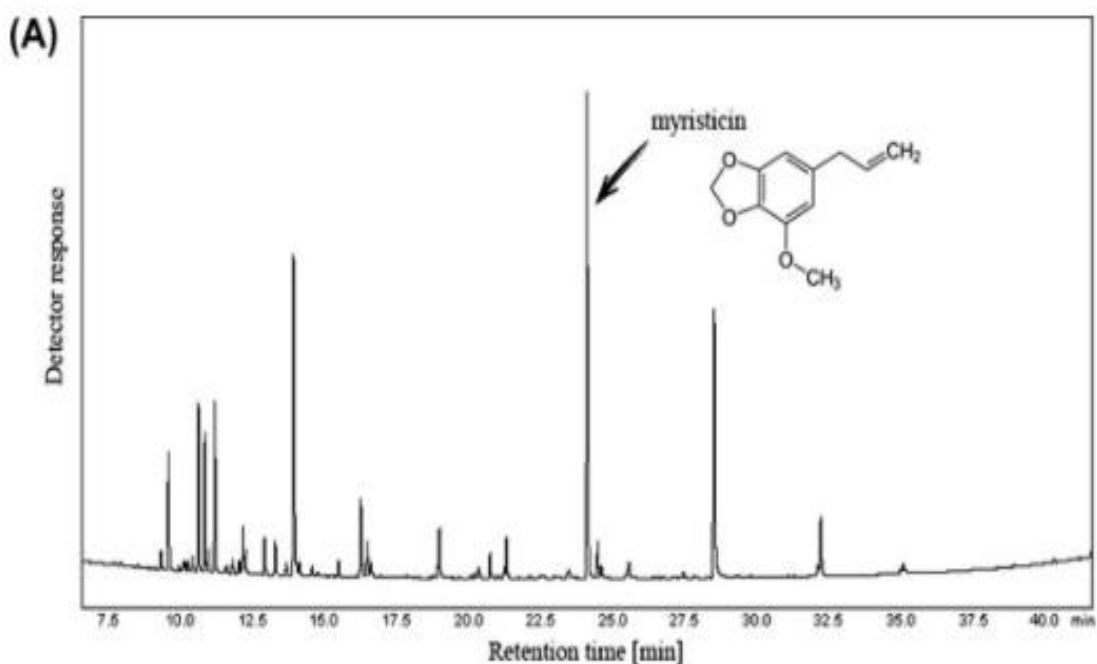
εκχύλισης και η στατική πίεση εκχύλισης ήταν οι ίδιοι και ισοδυναμούσαν με 15 λεπτά και 60 bar. Η διαδικασία PLE αποτελείται από τον όγκο έκπλυσης διαλύτη (100% του όγκου των κυψελών εκχύλισης), από την εκκαθάριση (10 δευτερόλεπτα χρησιμοποιώντας πεπιεσμένο άζωτο 10 bar) και από τη συλλογή σε 60 γυάλινα φιαλίδια mL με καουτσούκ επικαλυμμένα με τεφλόν. Το σύστημα υποβλήθηκε σε πλύση με τον διαλύτη εκχύλισης μεταξύ των διαδικασιών. Τα ληφθέντα εκχυλίσματα (όγκοι περίπου 28 mL) μεταφέρθηκαν σε ογκομετρικές φιάλες (50 mL) και στη συνέχεια γεμίστηκαν με μεθανόλη. Το ληφθέν υπερκείμενο (500  $\mu$ L) αραιώθηκε με νερό mili-Q έως 2500  $\mu$ L και υποβλήθηκε σε διαδικασία SPE (L. Dawidowicz & P. Dybowski, 2012).

Για να εκτελεστεί το SPE χρησιμοποιήθηκε ένα φυσίγγιο SPE γεμάτο με 0,5γρ. SeptraC18-E. Έπειτα το φυσίγγιο αυτό πλύθηκε με 5 mL n-εξανίου, ξηράνθηκε υπό κενό (περίπου για 5 λεπτά), φορτώθηκε με το εκχύλισμα (2 mL) του εξεταζόμενου δείγματος και εκπλύθηκε ξανά με 1 mL μίγματος μεθανόλης/νερού (20%). Μετά την αναρρόφηση από την SPE, τα υπόλοιπα συστατικά εκλούστηκαν σε βαθμονομημένη φιάλη με 5 mL n-εξάνιο και αναλύθηκαν με GC. Η διεργασία SPE πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τον θάλαμο κενού SPE με ταχύτητα έκλουσης 1 σταγόνας  $s^{-1}$  (L. Dawidowicz & P. Dybowski, 2012).

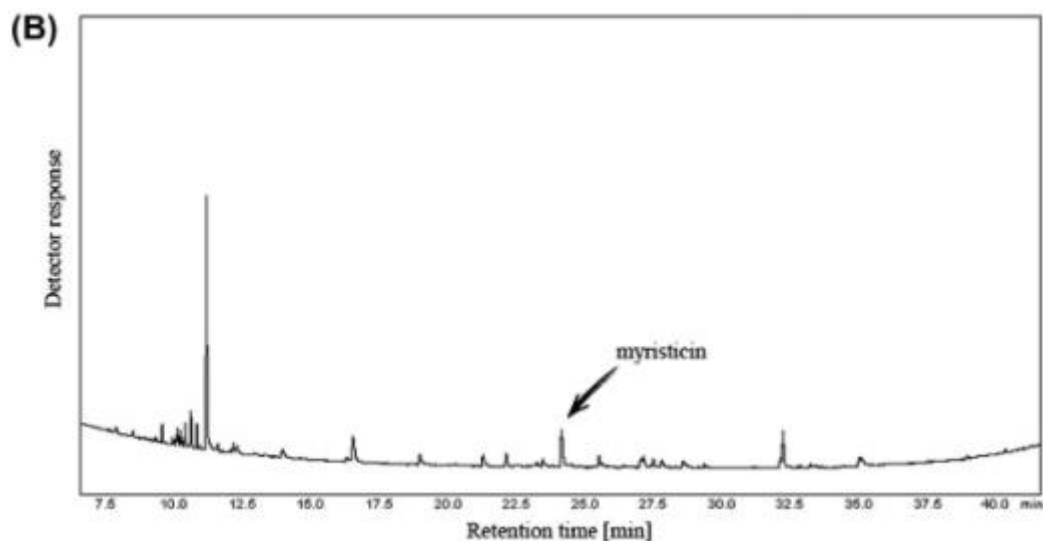
Η πιστοποίηση των συστατικών αιθέριου ελαίου στα παρασκευασμένα δείγματα πραγματοποιήθηκε με τη χρήση GC/MS QP2010. Χρησιμοποιήθηκε μια τριχοειδής στήλη συντηγμένου πυριτίου ZB5-MS (30m  $\times$  0,25 mm id, πάχος μεμβράνης 0,25  $\mu$ m). Το ήλιο (βαθμός 5.0) χρησιμοποιήθηκε ως αέριο φορέας. 1 $\mu$ L του δείγματος εγχύθηκε από αυτόματο δείγμα τύπου AOC - 20i. Η θερμοκρασία του εγχυτήρα ήταν 310  $^{\circ}$ C. Εφαρμόστηκε το ακόλουθο πρόγραμμα θερμοκρασίας: 1 λεπτό στους 50  $^{\circ}$ C και στη συνέχεια μια γραμμική αύξηση θερμοκρασίας έως 250  $^{\circ}$ C με ρυθμό 6  $^{\circ}$ C  $min^{-1}$ . Το φασματόμετρο μάζας λειτουργούσε σε λειτουργία EI στα 70 eV. Η θερμοκρασία της πηγής ιόντων ήταν 220  $^{\circ}$ C. Τα φάσματα μάζας μετρήθηκαν στην περιοχή 35-360 amu. Πραγματοποιήθηκε ποιοτική ανάλυση συγκρίνοντας τους δείκτες συγκράτησης και τα φάσματα MS για τις λαμβανόμενες κορυφές με τα ανάλογα δεδομένα από τις βάσεις δεδομένων NIST N05 και Adams. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας αέριο χρωματογράφο με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας - GC-FID μοντέλο GC-2010. 1 $\mu$ L του δείγματος εγχύθηκε από αυτόματο δείγμα τύπου AOC - 20i σε μια τριχοειδή στήλη συντηγμένου πυριτίου ZB5-

MS. Το πρόγραμμα θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια του διαχωρισμού GC-FID ήταν το ίδιο με αυτό του GC/MS. Η αναγνώριση κορυφών πραγματοποιήθηκε συγκρίνοντας τους δείκτες κατακράτησης GC με εκείνους από το GC/MS (L. Dawidowicz & P. Dybowski, 2012).

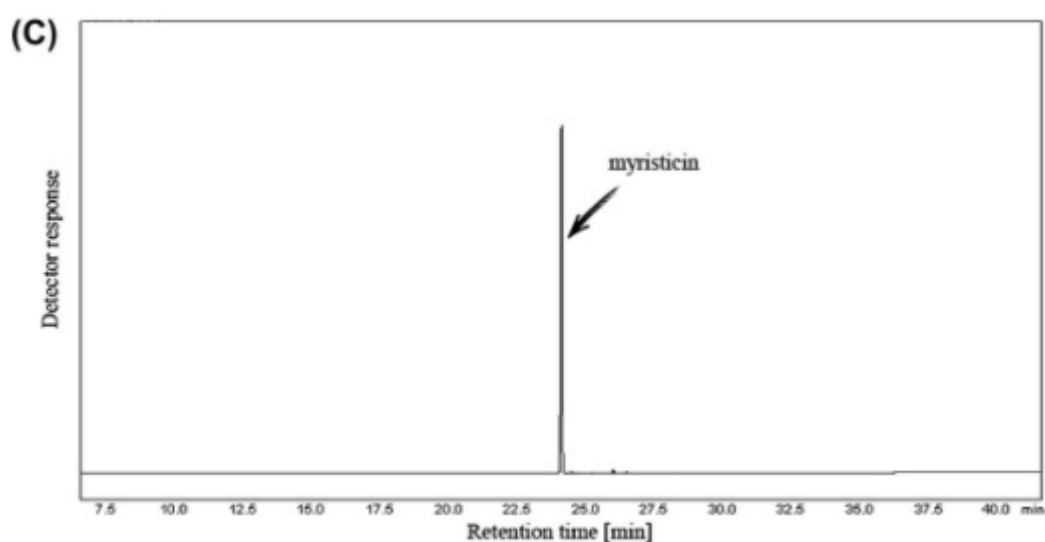
Το Σχήμα 12 παρουσιάζει τυπικά χρωματογραφήματα εκχυλισμάτων SPE που λαμβάνονται σύμφωνα με την παρουσιαζόμενη διαδικασία για δύο τυχαία επιλεγμένα μπαχαρικά που διαφέρουν ως προς τη συγκέντρωση μυριστικής (Σχήμα 12 Α και Β) και το χρωματογράφημα αναλυτικού προτύπου μυριστικής (Σχήμα 12Γ). Η χρωματογραφική κορυφή που εμφανίζεται στα 24.235 λεπτά και επισημαίνεται με ένα βέλος αντιστοιχεί στη μυριστική. Όπως φαίνεται από το σχήμα, οι εφαρμοζόμενες χρωματογραφικές συνθήκες επιτρέπουν επαρκή ανάλυση της μυριστικής από τις κορυφές του δείγματος. Η ταυτότητα και η καθαρότητα της κορυφής της μυριστικής επιβεβαιώθηκαν από τα φάσματα MS και την τιμή του δείκτη κατακράτησης, που είναι το 1520, ακριβώς το ίδιο όπως στη βιβλιογραφία (L. Dawidowicz & P. Dybowski, 2012).



**Σχήμα 12 Α:** Χρωματογράμματα GC από αλεσμένο μοσχοκάρυδο Prymat (χρωματογράφημα Α) (L. Dawidowicz & P. Dybowski, 2012).



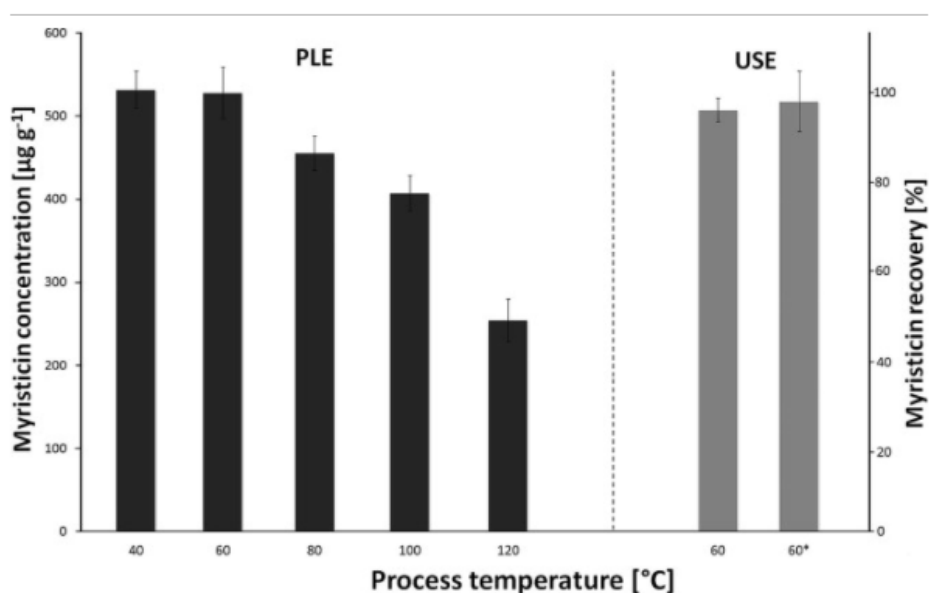
**Σχήμα 12 Β:** Τριπε μπαχαρικό Prymat (χρωματογράφημα Β) (L. Dawidowicz & P. Dybowski, 2012).



**Σχήμα 12 Γ:** Πρότυπο μυριστικίνης (χρωματογράφημα C) (L. Dawidowicz & P. Dybowski, 2012).

Παρόλο που η μυριστικίνη μπορεί εύκολα να απομονωθεί από μοσχοκάρυδο χρησιμοποιώντας απλή διαδικασία SLE, προτιμώνται πιο αποτελεσματικές τεχνικές εκχύλισης όπως PLE ή USE στα σύγχρονα εργαστήρια. Ο γρήγορος χρόνος εκχύλισης, οι ευνοϊκές περιβαλλοντικές επιπτώσεις λόγω της χαμηλής χρήσης οργανικών διαλυτών και η δυνατότητα εξάλειψης των μειονεκτημάτων της κλασικής εκχύλισης είναι οι επιπρόσθετοι λόγοι του τρέχοντος ενδιαφέροντος για τις σύγχρονες μεθόδους εκχύλισης. Στο σχήμα 4 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις της μυριστικίνης που υπολογίζονται στο αλεσμένο μοσχοκάρυδο χρησιμοποιώντας PLE (μαύρες στήλες στην

αριστερή πλευρά του σχήματος) και κατά USE (γκρίζες στήλες στη δεξιά πλευρά του σχήματος) (L. Dawidowicz & P. Dybowski, 2012).



**Σχήμα 13:** Οι ποσότητες της μυριστικίνης υπολογίστηκαν στο μοσχοκάρυδο *Prunella* χρησιμοποιώντας PLE σε διαφορετική θερμοκρασία (μαύρες ράβδους στο αριστερό μέρος του σχήματος) και χρησιμοποιώντας απλή ή πολλαπλή χρήση στους 60 °C (γκρίζες γραμμές στο δεξί μέρος του σχήματος). Η μεγαλύτερη ποσότητα μυριστικίνης, υπολογιζόμενη από PLE στους 40 °C, θεωρήθηκε ως 100% ανάκαμψη. Η μπάρα USE με την ένδειξη 60 \* αντιστοιχεί σε πολλαπλή USE (n = 3) (L. Dawidowicz & P. Dybowski, 2012).

Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο σχήμα 3, η διαδικασία USE παρέχει πολύ υψηλή ανάκτηση μυριστικίνης, αλλά και εκτελεί την ανάλυση με επαναλαμβανόμενο τρόπο που επιβαρύνεται με ένα μικρό σφάλμα. Η ανάκτηση της μυριστικίνης στη διαδικασία USE είναι σχεδόν 100% όταν η συγκέντρωση της, που εκτιμάται με αυτήν τη μέθοδο σχετίζεται με εκείνη που εκτιμάται με χρήση PLE στους 40 °C. Δεν υπάρχει ουσιαστική διαφορά ( $p < 0,005$ ) στην ανάκτηση μυριστικίνης σε μια ή σε πολλαπλές χρήσεις. Για πολύ πυκνούς πίνακες, το USE, σε σχέση με το PLE, αποτελεί λιγότερο αποτελεσματική μέθοδος εξαγωγής. Τα αποτελέσματα λήψης δείχνουν ότι η διαδικασία μιας χρήσης USE επαρκεί για την εξαγωγή σχεδόν ολόκληρου του αναλύτη από το χρησιμοποιημένο υλικό. Επιπλέον, το USE, σε αντίθεση με τη διαδικασία PLE, δεν απαιτεί την εφαρμογή ακριβού και εξειδικευμένου εξοπλισμού. Προκειμένου να εκτιμηθεί το όριο ανίχνευσης (LOD) και το όριο ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ), το πρότυπο μυριστικίνης σε εξάνιο εγχύθηκε σε GC σε

καθορισμένο λόγο σήματος προς θόρυβο. Το LOD θεωρήθηκε ως 3: 1 και το LOQ ως 10: 1. Το όριο ποσοτικού προσδιορισμού ισούται με  $4,51 \text{ ngg}^{-1}$ . Η τιμή αυτή είναι περίπου 10 φορές μεγαλύτερη από την τιμή της αναχαίτισης, κάτι που αποδεικνύει υψηλή ακρίβεια της μεθόδου (L. Dawidowicz & P. Dybowski, 2012).

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: καφεΐνη, αιθανόλη, ακετόνη, μεθανόλη, καθαρό ήλιο, χλωροφόρμιο, χλωριούχο νάτριο, τετραχλωράνθρακας, χλωροβενζόλιο, με καθαρότητα μεγαλύτερη από 99%. Παρασκευάστηκε ένα τυποποιημένο διάλυμα καφεΐνης με συγκέντρωση  $2 \text{ mL}^{-1}$  σε διπλό αποσταγμένο νερό, αποθηκεύτηκε σε ψύξη και προστατεύθηκε από τον φως. Πρότυπα εργασίας,  $0,05\text{-}500 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ , παρασκευάστηκαν πρόσφατα χρησιμοποιώντας διπλό απεσταγμένο νερό με κατάλληλες αραιώσεις του βασικού διαλύματος αποθεμάτων και χρησιμοποιήθηκαν για αξιολόγηση και βελτιστοποίηση μεθόδων. Πριν από την ανάλυση των δειγμάτων καθημερινά χρειάζεται η κατασκευή μιας καμπύλης βαθμονόμησης. Από συσκευές χρησιμοποιήθηκε: φυγόκεντρος, υδατόλουτρο υπερήχων με έλεγχο θερμοκρασίας και ψηφιακό χρονόμετρο. Χρησιμοποιήθηκε επίσης μια σύριγγα Hamilton  $50 \text{ } \mu\text{L}$  για την έγχυση οργανικών διαλυτών (L. Dawidowicz & P. Dybowski, 2012).

Πραγματοποιήθηκε διεξαγωγή αναλύσεων GC με τη χρήση αέριου χρωματογράφου εξοπλισμένου με σύστημα ανίχνευσης NPD και στήλη πυριτίου συντηγμένου με τριχοειδή HP-5. Η θερμοκρασία αρχικά ρυθμίστηκε στους  $100 \text{ } ^\circ\text{C}$  και διατηρήθηκε για  $1'$ , κατόπιν προγραμματίστηκε στους  $30 \text{ } ^\circ\text{C min}^{-1}$  έως  $250 \text{ } ^\circ\text{C}$  και διατηρήθηκε για  $5'$ . Η θερμοκρασία της θύρας έγχυσης ρυθμίστηκε στους  $220 \text{ } ^\circ\text{C}$ . Η θερμοκρασία του ανιχνευτή (NPD) διατηρήθηκε στους  $250 \text{ } ^\circ\text{C}$  με ρυθμούς ροής υδρογόνου και αέρα  $3$  και  $60 \text{ mL min}^{-1}$ , αντίστοιχα. Η θύρα έγχυσης λειτούργησε σε αναλογία διαχωρισμού 1:15. Άλλες συνθήκες λειτουργίας ήταν: ο ρυθμός ροής,  $1 \text{ mL min}^{-1}$  και η πίεση εισόδου,  $6,6 \text{ psi}$  (L. Dawidowicz & P. Dybowski, 2012).

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για την εφαρμογή της μεθόδου ήταν 5 τύποι τσαγιού (πράσινο, μαύρο, λευκό, oolong και earl grey black tea bag), 2 είδη καφέ (Nescafe και καφές Ρίο και Βραζιλία) και 8 ποτά (Coca Cola κανονική και 0%, Pepsi και max Pepsi, Sprite, 7up, Red Bull και Hype).  $0,1 \text{ g}$  τσαγιού τοποθετήθηκε σε ποτήρι ζέσεως  $100 \text{ mL}$  και προστέθηκαν σε αυτό  $20 \text{ mL}$  βραστό απεσταγμένο νερό. Το διάλυμα διατηρήθηκε ζεστό για  $10$  λεπτά. Έπειτα φυγοκεντρήθηκε για  $5$  λεπτά σε  $4000 \text{ rpm}$  για τον διαχωρισμό των στερεών σωματιδίων από το διάλυμα. Σε περίπτωση που το τσάι



βρίσκεται σε σακουλάκι τότε τοποθετούνται 250mL βραστόυ απεσταγμένου νερού για 2 λεπτά και διηθείται σε διηθητικό χαρτί για να απομακρυνθούν τα στερεά σωματίδια. Ο Nescafe με τη μορφή λεπτής σκόνης τοποθετείται σε 100mL βραδτού απεσταγμένου νερού 1g. Στη περίπτωση του καφέ του Ρίου ή της Βραζιλίας σε 1g κονιοποιημένου καφέ προστίθεται 100mL απεσταγμένου νερού και αναδεύεται και θερμαίνεται σε σημείο βρασμού. Στη συνέχεια γίνεται διήθηση σε διηθητικό χαρτί για να ληφθεί ένα διαφανές διάλυμα. Πριν πραγματοποιηθεί εφαρμογή της διαδικασίας τα δείγματα ποτών απαερώθηκαν σε υδατόλουτρο υπερήχων για 10 λεπτά και στη συνέχεια διηθήθηκαν (L. Dawidowicz & P. Dybowski, 2012).

Πραγματοποιήθηκε τοποθέτηση 1mL διαλύματος του δείγματος σε κωνικό δοκιμαστικό σωλήνα και σε αυτό προστέθηκε 0,1g NaCl. Έπειτα εγχύθηκαν 200μL αιθανόλης (διαλύτης διασποράς) που περιείχε 20μL χλωροφορμίου (διαλύτης εκχύλισης) με τη χρήση σύριγγας. Έτσι, σχηματίστηκε ένα θολό διάλυμα (με μικροσκοπικά σταγονίδια χλωροφορμίου διασκορπισμένα στην υδατική φάση). Πραγματοποιήθηκε εκχύλιση καφεΐνης από την υδατική φάση σε χλωροφόρμιο. Σε αυτό το βήμα, πραγματοποιείται εκχύλιση καφεΐνης από υδατική φάση σε χλωροφόρμιο. Μετά από φυγοκέντρηση του θολού διαλύματος στις 4000 rpm για 2', το εκχυλιστικό (χλωροφόρμιο) που περιέχει προσυμπυκνωμένη καφεΐνη καθιζάνει στον πυθμένα του δοκιμαστικού σωλήνα. Τέλος, 0,7mL της ιζηματοποιημένης οργανικής φάσης εγχύθηκε σε GC-NPD. Η απόδοση και η ανθεκτικότητα της διαδικασίας εξετάστηκαν με χαμηλότερους όγκους δείγματος. Σε αυτήν την περίπτωση, η διαδικασία εξετάστηκε με 0,5mL διαλύματος δείγματος και 100μL αιθανόλης που περιείχε 10μL χλωροφορμίου με συγκέντρωση άλατος 10%. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν τη δυνατότητα εκτέλεσης της διαδικασίας για δείγματα περιορισμένου όγκου. Αν και η διαδικασία μπορεί να εκτελεστεί απευθείας στα μη αραιωμένα δείγματα, αλλά η προ-αραίωση του δείγματος μπορεί να μειώσει την κατανάλωση δείγματος και επίσης απλοποιεί τη μέθοδο DLLME μειώνοντας το φαινόμενο της μήτρας (L. Dawidowicz & P. Dybowski, 2012).

Προκειμένου να επιτευχθεί καλύτερη απόδοση και συνθήκες για τη διαδικασία εξαγωγής, οι αποτελεσματικές παράμετροι της προτεινόμενης μεθόδου διερευνήθηκαν και βελτιστοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο one-at-a-time. Για τον λόγο αυτό, ένα υδατικό πρότυπο διάλυμα καφεΐνης καφεΐνης ( $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) παρασκευάστηκε από τυποποιημένο διάλυμα και χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο δείγμα διαλύματος. Η

αποτελεσματικότητα εκχύλισης της μεθόδου αξιολογήθηκε ως η μέση χρωματογραφική κορυφή περιοχή της καφεΐνης έπειτα από 3 διαδοχικές ενέσεις. Σύμφωνα με μια έρευνα που αφορούσε το pH για την αποτελεσματικότητα εκχύλισης της καφεΐνης, αποδείχθηκε ότι στις περισσότερες έρευνες χρησιμοποιείται το φυσικό pH των δειγμάτων. Σε κάποιες μελέτες όμως, τα αποτελέσματα παράχθηκαν σε pH 7 και σε μερικές άλλες με pH 12,5. Η δυνατότητα εφαρμογής της προτεινόμενης μεθόδου για τον προσδιορισμό της καφεΐνης σε 15 δείγματα αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας τη διαδικασία υπό τις βέλτιστες συνθήκες και τα αποτελέσματα παρουσιάστηκαν στο Σχήμα 14 (L. Dawidowicz & P. Dybowski, 2012).

Σχήμα 14: Προσδιορισμός της καφεΐνης σε διάφορα πραγματικά δείγματα με τη μέθοδο DLLME-GC – NPD (L. Dawidowicz & P. Dybowski, 2012).

Sample	Caffeine ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	RSD%, n = 3	Caffeine added ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Caffeine found ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Relative recovery (%)	RSD%, n = 3
Green tea	120.5	3.2	50.0	169.8	98.5	3.7
Oolong tea	145.2	4.7	50.0	193.3	96.2	4.5
White tea	165.8	4.0	50.0	214.1	96.7	3.9
Black tea	149.5	3.0	50.0	198.9	98.8	3.6
Tea bag	171.7	4.5	50.0	220.4	97.4	4.8
Coffee	267.5	2.8	50.0	318.1	101.2	3.0
Nescafe coffee	246.8	3.2	50.0	295.6	97.6	3.8
Red bull	297.9	2.9	50.0	348.2	100.5	3.4
Hype	314.7	3.3	50.0	364.4	99.4	2.8
Coca cola	94.1	4.5	25.0	118.9	99.2	4.4
Coca-zero	83.1	2.6	25.0	107.7	98.8	3.1
Pepsi	55.5	3.1	25.0	80.6	100.3	3.7
Pepsi max	51.3	2.9	25.0	76.2	99.6	2.7
7up	nd <sup>a</sup>	nd	25.0	24.5	98.0	4.2
Sprite	nd	nd	25.0	24.4	97.6	4.5

a

Not detected.

Η σχετική ανάκτηση (RR) υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας την ακόλουθη εξίσωση:

$$RR = \frac{C_{found} - C_{real}}{C_{added}} * 100$$

Όπου  $C_{found}$ ,  $C_{real}$ ,  $C_{added}$  είναι οι συγκεντρώσεις του αναλύτη που προστέθηκαν μετά την προσθήκη γνωστών ποσοτήτων προτύπου στο πραγματικό δείγμα, η συγκέντρωση του αναλύτη σε πραγματικό δείγμα και η συγκέντρωση γνωστών ποσοτήτων του προτύπου που αυξήθηκε στο πραγματικό δείγμα, αντίστοιχα. Οι σχετικές τιμές ανάκτησης 96,2-101,2% ελήφθησαν με 3 επαναλαμβανόμενες μετρήσεις. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι διαφορετικοί πίνακες δείγματος δεν είχαν σημαντική επίδραση στην αποτελεσματικότητα εκχύλισης της καφεΐνης. Όσο αφορά τις αναλυτικές προδιαγραφές της προτεινόμενης μεθόδου (DLLME-GC-NPD) συγκρίθηκαν με εκείνες άλλων προηγουμένως δημοσιευμένων μεθόδων για τον προσδιορισμό της καφεΐνης (Σχήμα 15) (L. Dawidowicz & P. Dybowski, 2012).

Σχήμα 15: Σύγκριση μεταξύ DLLME – GC – NPD και άλλων μεθόδων για τον προσδιορισμό της καφεΐνης (L. Dawidowicz & P. Dybowski, 2012).

No.	Analysis method	Extraction method	EF <sup>a</sup>	LOD <sup>b</sup>	LOQ <sup>c</sup>	LDR <sup>d</sup>	Solventes	Extraction Time	Ref.
1	GC-NPD	DLLME	16	0.02	0.05	0.05–500	CHCl <sub>3</sub> : 20 μL	Few seconds	This work
2	GC-MS (SIM)	DDSME <sup>e</sup>	14–16	0.004		0.05–5	CHCl <sub>3</sub> : 0.5 μL	5 min	Shrivastava and Wu (2007)
3	GC-MS	UAE		0.001		0.005–30	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> : 1 mL	5 min	Zou and Li (2006)
4	HPLC	UAE	–	0.05	0.16	0.16–250	H <sub>2</sub> O: 50 mL	30 min	Al-Othman et al. (2012)
5	HPLC	UAE	–	0.1	0.33	–	H <sub>2</sub> O: 50 mL	30 min	Tzanavaras and Themelis (2007)
6	HPLC	UAE	–	0.004	0.014	–	CH <sub>3</sub> OH: 25 mL	20 min	Rostagno et al. (2011)
7	FT-IR with chemometrics	–	–	5	–	–	–	–	Paradkar and Irudayaraj (2002)
8	FT-Raman	SPE	–	18	–	–	–	~2 min	Armenta et al. (2005)
9	ESI-IMS <sup>f</sup>	MIP-SPE	–	0.2	–	0.5–20	CH <sub>3</sub> OH: 2 mL	~134 min	Jafari et al. (2011)
10	Voltammetry	–	–	0.02	–	0.06–19	–	–	Guo et al. (2011)

- a  
Enrichment factor.
- b  
Limit of detection ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).
- c  
Limit of quantification ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).
- d  
Linear dynamic range ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).
- e  
Drop-to-drop solvent microextraction.
- f  
Electrospray ionization–ion mobility spectrometry.

## Αναφορές

- Bartzatt, R. (2001, September 10). Determination of barbituric acid, utilizing a rapid and simple colorimetric assay. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, σσ. 909-915.
- Bosch Ojeda, C., Espinosa Bosch, M., Ruiz Sánchez, A., & Sánchez Rojas, F. (2007, February 19). Morphine and its metabolites: Analytical methodologies for its determination. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, σσ. 799-815.
- Christrup, L. L. (1997, January). Morphine metabolites. *ACTA ANAESTHESIOLOGICA SCANDINAVICA*, σσ. 116-122.
- De Backer, B., Debrus, B., Lebrun, P., Theunis, L., Dubois, N., Decock, L., . . . Charlier, C. (2009, November 06). Innovative development and validation of an HPLC/DAD method for the qualitative and quantitative determination of major cannabinoids in cannabis plant material. *Journal of Chromatography B*, σσ. 4115-4124.
- Demaret, I., Anseau, M., & Lemaître, A. (2013, june). Heroin. *Revue medicale de Liege*, σσ. 287-293.
- Fernández, P., Morales, L., Vázquez, C., Bermejo, A., & Taberner, M. (2006, August 10). HPLC–DAD determination of opioids, cocaine and their metabolites in plasma. *Forensic Science International*, σσ. 31-35.
- Foltz, R., Eades, D., & Reuschel, S. (1999, October 15). Recent advances in chromatographic and mass spectrometric methods for determination of LSD and its metabolites in physiological specimens. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, σσ. 145-159.
- Hosztafi, S. (2011). Heroin addiction. *Acta Pharm Hung*, σσ. 173-183.
- Jaiswal, P., Kumar, P., Singh, V., & Singh, D. (2009, August 03). Biological Effects of *Myristica fragrans*. *ARBS Annual Review of Biomedical Sciences*, σσ. 21-29.
- Janicka, M., Kot-Wasik, A., & Namieśnik, J. (2010). Analytical procedures for determination of cocaine and its metabolites in biological samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, σσ. 209-224.
- Kalant, H. (2001, 10 02). The pharmacology and toxicology of «ecstasy» (MDMA) and related drugs. *CMAJ*, σσ. 917–928.

- Kintz, P., & Samyn, N. (1999, 10 15). Determination of «Ecstasy» components in alternative biological specimens. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, σσ. 137-143.
- L. Dawidowicz, A., & P. Dybowski, M. (2012, April 16). Determination of myristicin in commonly spices applying SPE/GC. *Food and Chemical Toxicology*, σσ. 2362-2367.  
Ανάκτηση από Determination of myristicin in commonly spices applying SPE/GC.
- Larstad, M., Toren, K., Bake, B., & Olin, A.-C. (2007, January). Determination of ethane, pentane and isoprene in exhaled air – effects of breath-holding, flow rate and purified air. *Acta Physiologica*, σσ. 87-98.
- Mehdi, T. (2012, March). Benzodiazepines Revisited. *British Journal of Medical Practitioners*.
- Mercolini, L., Mandrioli, R., Conti, M., Saladini, B., Augusta Raggi, M., & Baccini, C. (2008, September 29). Quantitative analysis of cocaine in human hair by HPLC with fluorescence detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, σσ. 456-461.
- Mercolini, L., Mandrioli, R., Saladini, B., Conti, M., Baccini, C., & Raggi, M. (2008, February 15). Quantitative analysis of cocaine in human hair by HPLC with fluorescence detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, σσ. 456-461.
- Musshoff, F., & Daldrup, T. (1998, August 21). Determination of biological markers for alcohol abuse. *Journal of Chromatography B*, σσ. 245–264.
- Nichols, D. (2004, February). Hallucinogens. *Pharmacology & Therapeutics*, σσ. 131-181.
- Pellegrini, M., Rosati, F., Pacifi, R., Zuccaro, P., Romolo, F., & Lopez, A. (2001, June 20). Rapid screening method for determination of Ecstasy and amphetamines in urine samples using gas chromatography–chemical ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, σσ. 243-251.
- Reza Zarei, A., & Gholamian, F. (2011, February 26). Development of a dispersive liquid–liquid microextraction method for spectrophotometric determination of barbituric acid in pharmaceutical formulation and biological samples. *Analytical Biochemistry*, σσ. 224-228.
- Sereshti, H., & Samadi, S. (2014, March 01). food chemistry. *A rapid and simple determination of caffeine in teas, coffees and eight beverages*, σσ. 8-13.

- Solowij, N., & Hall, P. (1998, November 14). Adverse effects of cannabis. *The Lancet*, σσ. 1611-1616.
- Sondermann, N., & Kovar, K.-A. (1999, 12 20). Screening experiments of ecstasy street samples using near infrared spectroscopy. *Forensic Science International*, σσ. 147-156.
- Spanagel, R., Molander, A., Bilbao, A., & Vengeliene, V. (2009, January 29). Neuropharmacology of alcohol addiction. *British journal of pharmacology*, σσ. 299-315.
- Sulzer, D., Sonders, M., Poulsen, N., & Galli, A. (2005, April). Mechanisms of neurotransmitter release by amphetamines: A review. *Progress in Neurobiology*, σσ. 406-433.
- Szatkowska, P., Koba, M., Kośliński, P., Wandas, J., & Bączek, T. (2014, May 15). Analytical methods for determination of benzodiazepines. A short review. *Open Chemistry*, σσ. 994-1007.
- Teixeira, H., Verstraete, A., Proença, P., Corte-Real, F., Monsanto, P., & Nuno Vieira, D. (2007, August 6). Validated method for the simultaneous determination of Δ9-THC and Δ9-THC-COOH in oral fluid, urine and whole blood using solid-phase extraction and liquid chromatography–mass spectrometry with electrospray ionization. *Forensic Science International*, σσ. 148-155.
- Ugland, H., Krogh, M., & Rasmussen, K. (1999, March). Automated determination of 'Ecstasy' and amphetamines in urine by SPME and capillary gas chromatography after propylchloroformate derivatisation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, σσ. 463-475.
- Walsh, Z., Callaway, R., Belle-Isle, L., Capler, R., Kay, R., Lucas, P., & Holtzman, S. (2013, November). Cannabis for therapeutic purposes: Patient characteristics, access, and reasons for use. *International Journal of Drug Policy*, σσ. 511-516.
- Wennig, R., Schneider, S., & Kuffer, P. (1998, August 21). Determination of lysergide (LSD) and phencyclidine in biosamples. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, σσ. 189-200.

## **Πηγές Εικόνων**

Εικόνα εξώφυλλου: <https://www.drugtargetreview.com/news/48519/ai-predict-outcomes-complex-chemical-reactions/?fbclid=IwAR3eSOZE-RyIlx7gl8XxjcsVKxk97wzbOssIHch0z0glZptayk8YP-7HBSY>