



Πανεπιστήμιο
Κύπρου

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΙ ΚΑΙ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΤΙΚΟΙ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΙ ΟΥΣΙΩΝ
ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΣΗΜΑΣΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ ΝΙΚΟΛΑΟΥ

2021



Πανεπιστήμιο
Κύπρου

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΙ ΚΑΙ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΤΙΚΟΙ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΙ ΟΥΣΙΩΝ
ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΣΗΜΑΣΙΑΣ

ΑΘΗΝΑ ΝΙΚΟΛΑΟΥ

Διατριβή η οποία υποβλήθηκε προς απόκτηση διδακτορικού τίτλου σπουδών στο
Πανεπιστήμιο Κύπρου

ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ 2021

ΑΘΗΝΑ ΝΙΚΟΛΑΟΥ



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ ΝΙΚΟΛΑΟΥ

Εξεταστική Επιτροπή:

- 1. Καθηγητής Ιωάννης Πασχαλίδης (Πρόεδρος)**
- 2. Επικ. Καθηγητής Αγαπίου Αγάπιος (Εσωτερικό Μέλος)**
- 3. Αναπλ. Καθηγήτρια Κωνσταντίνα Καπνίση-Χριστοδούλου (Ερευνητική Σύμβουλος)**
- 4. Καθηγήτρια Βικτώρια Σαμανίδου (Εξωτερικό Μέλος)**
- 5. Καθηγήτρια Δέσπω Φάττα-Κάσινου (Εξωτερικό Μέλος)**

Ιανουάριος 2021

ΣΕΛΙΔΑ ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑΣ

Υποψήφιος Διδάκτορας: Αθηνά Νικολάου

Τίτλος Διατριβής: ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΙ ΚΑΙ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΤΙΚΟΙ
ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΙ ΟΥΣΙΩΝ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΣΗΜΑΣΙΑΣ

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή εκπονήθηκε στο πλαίσιο των σπουδών για απόκτηση Διδακτορικού διπλώματος στο Τμήμα Χημείας και εγκρίθηκε στις 22.01.2021 από τα μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής.

Εξεταστική Επιτροπή:

Ερευνητική Σύμβουλος:

Κωνσταντίνα Καπνίση-Χριστοδούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

.....
Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κύπρου

Πρόεδρος Εξεταστικής Επιτροπής:

Ιωάννης Πασχαλίδης, Καθηγητής

.....
Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κύπρου

Μέλος Εξεταστικής Επιτροπής:

Αγαπίου Αγάπιος, Επίκουρος Καθηγητής

.....
Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κύπρου

Μέλος Εξεταστικής Επιτροπής:

Δέσπω Φάττα-Κάσινου, Καθηγήτρια

.....
Τμήμα Πολιτικών Μηχανικών και Μηχανικών Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Κύπρου

Μέλος Εξεταστικής Επιτροπής:

Βικτώρια Σαμανίδου, Καθηγήτρια

.....
Τμήμα Χημείας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Υπεύθυνη δήλωση

Η παρούσα διατριβή υποβάλλεται προς συμπλήρωση των απαιτήσεων για απονομή Διδακτορικού Τίτλου του Πανεπιστημίου Κύπρου. Είναι προϊόν πρωτότυπης εργασίας αποκλειστικά δικής μου, εκτός των περιπτώσεων που ρητώς αναφέρονται μέσω βιβλιογραφικών αναφορών, σημειώσεων ή και άλλων δηλώσεων.

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή εκπονήθηκε στο Ερευνητικό Εργαστήριο Ενόργανης Ανάλυσης του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κύπρου και πειράματα πραγματοποιήθηκαν επίσης στο σύστημα UPLC-MS/MS που βρίσκεται στο M.C. Analysis Center στην Αλάμπρα, υπό την επίβλεψη της Δρ. Κωνσταντίνας Καπνίση-Χριστοδούλου (Σεπτέμβριος 2015 - Δεκέμβριος 2020).

Η σύνθεση των κυκλοφρουκτανών έγινε από την ερευνητική ομάδα του Καθηγητή Daniel W. Armstrong και από την εταιρία A.Z.Y.P. LLC, τους οποίους ευχαριστούμε θερμά για την ευγενική χορηγία.

Αθηνά Νικολάου

.....

*«Προσπάθησε να μην γίνεις ένας άνθρωπος της επιτυχίας, αλλά ένας άνθρωπος της αξίας»
(Albert Einstein)*

Στην οικογένεια και τους φίλους μου

Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της διδακτορικής μου διατριβής, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που στάθηκαν στο πλάι μου και με βοήθησαν, ο καθένας με το δικό του μοναδικό τρόπο, όλο αυτό το διάστημα για την πραγματοποίηση ενός πολύ σημαντικού προσωπικού μου στόχου, όπως αυτός των διδακτορικών σπουδών. Η αγάπη, η παρουσία, και η υποστήριξη των ανθρώπων αυτών, αποτέλεσαν την κινητήρια δύναμη για την υλοποίηση του εν λόγω στόχου.

Οι πρώτες ευχαριστίες ανήκουν στην ερευνητική μου σύμβουλο Δρ. Κωνσταντίνα Καπνίση-Χριστοδούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κύπρου, για την ευκαιρία που μου έδωσε προσφέροντάς μου τη δυνατότητα να πραγματοποιήσω τις διδακτορικές μου σπουδές στο Εργαστήριο Ενόργανης Ανάλυσης. Παράλληλα, θα ήθελα να την ευχαριστήσω για την πολύ σημαντική καθοδήγησή της στην πραγματοποίηση της παρούσας έρευνας, για τη συνεχή της ενθάρρυνση και την αμέριστη συμπαράστασή της, τόσο σε ακαδημαϊκό, όσο και σε προσωπικό επίπεδο.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα μέλη της εσωτερικής εξεταστικής μου επιτροπής, τον Καθηγητή Δρ. Ιωάννη Πασχαλίδη, και τον Επίκουρο Καθηγητή Δρ. Αγάπιο Αγαπίου του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κύπρου, για την πολύτιμή τους συμμετοχή στις επιτροπές αξιολόγησης της ερευνητικής μου διατριβής, καθώς επίσης και τις πολύτιμες συμβουλές και υποδείξεις τους. Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια Δρ. Βικτώρια Σαμανίδου του Τμήματος Χημείας του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης και την Καθηγήτρια Δρ. Δέσπω Φάττα-Κάσινου του Τμήματος Πολιτικών Μηχανικών και Μηχανικών Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Κύπρου για την αποδοχή τους να συμμετάσχουν ως εξωτερικά μέλη της εξεταστικής επιτροπής και για τις χρήσιμες υποδείξεις τους σχετικά με την επιμέλεια του τελικού κειμένου της διατριβής.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου και ένα τεράστιο ευχαριστώ στο Δρ. Κλείτο Σωκράτους (Ινστιτούτο Νευρολογίας και Γενετικής Κύπρου) που μου έμαθε πρώτος να χειρίζομαι το σύστημα UPLC-MS/MS. Εκεί διεξήχθησαν τα προπαρασκευαστικά πειράματα του δεύτερου μέρους της εν λόγω διδακτορικής εργασίας. Επιπλέον, ένα μεγάλο ευχαριστώ στους συνεργάτες μας Μιχάλη Κωνσταντίνου και Αρτέμη Λούπη για τη δυνατότητα χρήσης του συστήματος UPLC-MS/MS το οποίο βρίσκεται στο εργαστήριο Ενόργανης Ανάλυσης (MC Analysis Center Ltd) στην Αλάμπρα και τις συμβουλές που παρείχαν στη διεξαγωγή των πειραμάτων.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στους συμφοιτητές μου στο Εργαστήριο Ενόργανης Ανάλυσης, τη Μαρία Μαυρουδή, το Γιάννη Σταύρου, την Ηλιάνα Αγαθοκλέους, την Αταλάντη Χρίστου, την Κατερίνα Ιωάννου, τη Γεωργία Ιωάννου και το Μάριο Χριστοδούλου. Τους ευχαριστώ για την άψογη συνεργασία, τις πολύτιμες συμβουλές τους, για τη στήριξή τους και για όλες τις ωραίες στιγμές που μοιραστήκαμε.

Θα ήταν παράλειψή μου να μην ευχαριστήσω τους φίλους μου, Ελένη, Άντρη, Δημήτρη Λία, Αντωνία, και Ραφαέλα για την ανοχή και την πολύπλευρη συμπαράσταση που επέδειξαν στα άγχη και τις ανησυχίες μου, όλο αυτό το διάστημα.

Τις πιο πολλές ευχαριστίες τις οφείλω στην οικογένειά μου. Αρχικά, τους ευχαριστώ για την ψυχική και οικονομική υποστήριξη. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στη μητέρα μου, Σοφία, για τις ηθικές αξίες που μου δίδαξε στη ζωή μου και τις ατελείωτες ώρες που στάθηκε στο πλάι μου δίνοντας μου πολύτιμες συμβουλές και ακούγοντας τους προβληματισμούς μου και τις φοβίες μου. Για τους ίδιους λόγους ευχαριστώ και την Ξένια. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον πατέρα μου, Γιώργο, που με στηρίζει σε ό,τι και να κάνω, που μου δίνει δύναμη όταν τη χρειάζομαι και που πιστεύει σε εμένα περισσότερο από εμένα την ίδια. Τον ευχαριστώ που με έμαθε να αντιμετωπίζω τη ζωή με αισιοδοξία και να βρίσκω λόγους να χαμογελώ ακόμα και στα πιο δύσκολα. Δεν θα παραλείψω να πω ευχαριστώ στην αδελφή μου, Περσεφόνη, που ξέρω ότι θα βρίσκεται πάντα δίπλα μου σε ό,τι κι αν την χρειαστώ.

Περίληψη

Ο πρωταρχικός στόχος της παρούσας διδακτορικής έρευνας είναι η χρήση χειρόμορφων ιοντικών υγρών (Chiral Ionic Liquids, CILs) σε συνδυασμό με μια νέα τάξη χειρόμορφων επιλογέων (Chiral Selectors, CSs), τις κυκλοφρουκτάνες (Cyclofructans, CFs), ως πρόσθετα στην ηλεκτροκινητική χρωματογραφία τριχοειδούς (Electrokinetic Capillary Chromatography, EKC) για το διαχωρισμό τεσσάρων φαρμακευτικών ουσιών. Στο στάδιο αυτό, επιχειρήθηκε ο εναντιομερής διαχωρισμός της θυροξίνης (Thyroxine, T4), της νεφοπάμης (Nefopam, NEF), της σετιριζίνης (Cetirizine, CTZ) και της φεξοφenaδίνης (Fexofenadine, FXD). Συμπληρωματικά, εξετάστηκαν και οι κυκλοδεξτρίνες, (Cyclodextrins, CDs), οι οποίες αποτελούν τους πιο διαδεδομένους CSs στην EKC.

Αρχικά, μελετήθηκαν διάφορες φυσικές CFs και CDs, καθώς επίσης και τα παράγωγά τους που φέρουν διάφορους υποκαστάτες προσφέροντας έτσι επιπλέον θέσεις για αλληλεπιδράσεις, ενισχύοντας την εναντιοεκλεκτικότητα. Ανάμεσα στις CFs που μελετήθηκαν, ξεχωριστή θέση επέδειξε η θειική κυκλοφρουκτάνη 6 (Sulfated Cyclofructan 6, SCF₆), η οποία διακρίθηκε για την αποτελεσματικότητα της στη χειρόμορφη ανάλυση των ουσιών NEF και FXD.

Στη συνέχεια, εξετάστηκαν τα L- και D- εναντιομερή ενός CIL ως προς την αποτελεσματικότητα τους στην εναντιοεκλεκτική αναγνώριση. Τα δύο αυτά CILs, τα οποία έχουν ως βάση τους εστέρες των αμινοξέων, συντέθηκαν στο εργαστήριο Ενόργανης Ανάλυσης και προστέθηκαν στο ρυθμιστικό διάλυμα (Background Electrolyte, BGE) για τη μελέτη της επίδρασης στους στο διαχωρισμό αυτών των ουσιών. Η χρήση των εν λόγω CILs, ως των μοναδικών πρόσθετων στο BGE, δε σημείωσε καμία επίδραση στη χειρόμορφη αναγνώριση των εξεταζόμενων αναλυτών. Για σκοπούς μελέτης της συνεργιστικής δράσης τους με τις CFs, επιλέχθηκε το L- εναντιομερές, του γαλακτικού *tert*-βουτυλεστέρα της L-αλανίνης (L-Alanine *tert*-butyl ester Lactate, L-AlaC₄Lac).

Για την αξιολόγηση των μεθόδων που αναπτύχθηκαν, μελετήθηκαν διάφοροι παράμετροι που ενδέχεται να επηρεάζουν την εκλεκτικότητα, όπως για παράδειγμα το είδος και η συγκέντρωση του CS και του CIL, η διαμόρφωση του CIL (L- και D-), η θερμοκρασία της στήλης, το pH και το είδος BGE, καθώς και το συνεργιστικό φαινόμενο μεταξύ του CS και του CIL.

Η χειρόμορφη ανάλυση των ενώσεων NEF και FXD πραγματοποιήθηκε σε μικρό χρονικό διάστημα (<5 min), με χρήση 2 mM της SCF₆, σε pH 8.0 και 7.1, αντίστοιχα. Ο διαχωρισμός αξιολογήθηκε υπολογίζοντας τη διαχωριστική ικανότητα (Resolution, R_s), καθώς επίσης και

τη σχετική τυπική απόκλιση (Relative Standard Deviation, RSD) των χρόνων μετανάστευσης της ηλεκτροσωματικής ροής και των κορυφών των αναλυτών. Για το NEF, η R_s ανήλθε στο 1.9 και για την FXD στο 1.7, ενώ η επαναληψιμότητα αποδείχθηκε εξαιρετική, αφού όλες οι τιμές %RSD ήταν μικρότερες από 1.2%.

Διάφορες CFs αλλά και CDs εξετάστηκαν για τον εναντιομερή διαχωρισμό των ενώσεων T4 και CTZ, χωρίς όμως να σημειωθεί πλήρης διαχωρισμός. Αντίθετα, παρατηρήθηκε σχάση της κορυφής της πρώτης ($R_s = 0.3$), με την προσθήκη ενός οργανικού τροποποιητή στο BGE, το οποίο περιείχε το ισοπρόπυλο-καρβαμικό παράγωγο της CF₆ (isopropyl carbamate CF₆, IP-CF₆), ως το CS. Για την CTZ παρατηρήθηκε ένας μικρός ώμος στην κορυφή με χρήση του καρβοξυ-μέθυλο παραγώγου της CF₆, ενώ η προσθήκη οργανικού τροποποιητή ή του L-AlaC₄Lac δε σημείωσε καμία επίδραση στην εναντιοεκλεκτικότητα.

Τέλος, εξετάστηκε η συνεργιστική δράση των υπό εξέταση CILs με τις CFs. Σημειώθηκε συνέργεια της δράσης του L-AlaC₄Lac με την SCF₆ ως προς τα εναντιομερή της NEF. Συγκεκριμένα, επιτεύχθηκε χειρόμορφος διαχωρισμός με χρήση χαμηλότερης συγκέντρωσης του CS. Αξίζει να σημειωθεί, ότι αυτή είναι η πρώτη φορά που μελετήθηκε η ικανότητα των CILs ως των μόνων πρόσθετων στο BGE, καθώς επίσης και σε συνδυασμό με τις CFs, ως προς τη χειρόμορφη ανάλυση των ενώσεων T4, NEF, CTZ και FXD.

Στο επόμενο στάδιο της παρούσας διδακτορικής έρευνας επιχειρήθηκε, για πρώτη φορά, ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός της κύριας ψυχοδραστικής ένωσης της κάνναβης, της Δ⁹-τετραϋδροκανναβινόλης (Δ⁹-tetrahydrocannabinol, THC) και των μεταβολιτών της, σε ένα μη συνηθισμένο βιολογικό δείγμα, στις κυψελίδες αυτιού (κερί). Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε με χρήση της τεχνικής υγρής χρωματογραφίας υπερέψης απόδοσης σε σύζευξη με διαδοχική φασματομετρία μαζών (Ultra-Pressure Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry, UPLC-MS/MS). Εκτός από την κύρια ψυχοτρόπο ένωση του φυτού κάνναβης *Sativa*, γνωστή σε όλους ως THC, εξετάζεται επίσης η ανίχνευση των οξειδωμένων μεταβολιτών της, 11-υδρόξυ-Δ⁹-τετραϋδροκανναβινόλης (11-Δ⁹-hydroxy-Δ⁹-tetrahydrocannabinol, THC-OH) και 11-καρβοξυ-τετραϋδροκανναβινόλης (11-carboxy-Δ⁹-tetrahydrocannabinol, THC-COOH). Παράλληλα, μελετώνται δύο εξίσου σημαντικά κανναβινοειδή που απομονώθηκαν επίσης από το φυτό της κάνναβης, η κανναβινόλη (cannabinol, CBN) και η κανναβιδιόλη (cannabidiol, CBD), με την τελευταία να είναι γνωστή για τις ευεργετικές ιδιότητες που αποδίδονται στο φυτό.

Πρωτίστως, περιγράφονται τα στάδια ανάπτυξης και αξιολόγησης της αναλυτικής μεθόδου στο σύστημα UPLC-MS/MS, με τον προσδιορισμό και τη βελτιστοποίηση, τόσο των

χρωματογραφικών όσο και των φασματομετρικών παραμέτρων. Επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός όλων των κανναβινοειδών ενώσεων που εξετάστηκαν σε αυτή την εργασία συμπεριλαμβανομένων των ενώσεων CBD και THC, οι οποίες παρουσιάζουν, εκτός από την ίδια μοριακή μάζα και πανομοιότυπα μοτίβα θραυσματοποίησης. Η μέθοδος αξιολογείται μέσω της γραμμικότητας και των ορίων ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD) και ποσοτικοποίησης (Limit of Quantitation, LOQ). Τα κριτήρια αυτά αξιολογήθηκαν με την κατασκευή καμπυλών βαθμονόμησης στην απουσία μήτρας, σε επτά επίπεδα συγκεντρώσεων, με ταυτόχρονο υπολογισμό των ορίων γραμμικότητας 0.1-15.0 ng/mL και του συντελεστή συσχέτισης ($r^2 > 0.99$). Τα όρια LOD και LOQ κυμάνθηκαν από 0.07-0.18 ng/mL και 0.22-0.53 ng/mL, αντίστοιχα.

Το σημαντικότερο και συνάμα το πιο κρίσιμο στάδιο της διδακτορικής αυτής έρευνας αποτέλεσε ο προσδιορισμός και η αξιολόγηση της πειραματικής μεθόδου επεξεργασίας αυτών των ασυνήθιστων βιολογικών δειγμάτων. Η αποδοτικότητα της εκχύλισης των πέντε κανναβινοειδών από την εξεταζόμενη μήτρα υπολογίζεται μέσω των πειραμάτων ανάκτησης, της επίδρασης του υλικού της μήτρας και του φαινομένου «Carryover». Τα πειράματα ανάκτησης πραγματοποιήθηκαν σε δύο επίπεδα συγκεντρώσεων (χαμηλό και υψηλό) και σημειώθηκαν αξιοσημείωτα ποσοστά για όλα τα εξεταζόμενα κανναβινοειδή, καθώς οι τιμές κυμάνθηκαν από 79-91%. Επιπλέον, δε σημειώθηκε η επίδραση του υλικού της μήτρας, ούτε του φαινομένου «Carryover».

Τελικός στόχος αποτέλεσε η διερεύνηση της εφαρμοσιμότητας των αναπτυχθέντων μεθοδολογιών, τόσο της ανάλυσης στο σύστημα UPLC-MS/MS όσο και της επεξεργασίας των δειγμάτων. Η αναπτυχθείσα μέθοδος εφαρμόστηκε σε πραγματικά δείγματα κεριού που λήφθηκαν από χρήστες κάνναβης, με σκοπό την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των κανναβινοειδών. Στο στάδιο αυτό επιτυγχάνεται, για πρώτη φορά, η ανίχνευση της κύριας ψυχοτρόπου ένωσης της κάνναβης, της THC, καθώς επίσης και της CBN στις κυψελίδες αυτιού. Επίσης, για πρώτη φορά, πραγματοποιείται ποσοτικοποίηση στα τρία εκ των τεσσάρων δειγμάτων από χρήστες κάνναβης που εξετάστηκαν.

Η ανίχνευση της THC υποδηλώνει πρόσφατη χρήση κάνναβης και βρίσκεται σε συμφωνία με τη δήλωση συχνής χρήσης από τους εθελοντές παρούσας μελέτης, ενώ αντίθετα η ανίχνευση της CBN επιβεβαιώνει τη χρήση κάνναβης. Η μέθοδος που αναπτύχθηκε στο σύστημα UPLC-MS/MS αποτελεί μια καινοτόμα μέθοδο που βρίσκει εφαρμογή στη διεκπεραίωση της μελέτης αυτής, αλλά και μελλοντικά θα βρίσκει εφαρμογή σε τοξικολογικές αναλύσεις. Εν κατακλείδι, διαπιστώθηκε πως το κεριό του αυτιού μπορεί να αποτελεί ένα εναλλακτικό δείγμα για ανίχνευση κανναβινοειδών ενώσεων.

Abstract

The present doctoral thesis is divided into two main parts. Firstly, the chiral analysis of clinically important compounds by employing chiral selectors (CSs) in Capillary Electrophoresis (CE) is examined. The combined use of chiral ionic liquids (CILs) and conventional CSs in CE, to establish a synergistic system, has proven to be an effective approach for the separation of enantiomeric pairs. In this study, a new CE method was developed, employing a binary system of a CS, either a cyclodextrin (CD) or a cyclofructan (CF), and a chiral amino acid ester-based ionic liquid (AAIL), for the chiral separation of four basic and zwitterionic drug compounds. In particular, the enantioseparations of thyroxine (T4), nefopam (NEF), cetirizine (CTZ) and fexofenadine (FXD) were examined, by supporting the background electrolyte (BGE) with a CS and the CIL, L-alanine *tert*-butyl ester lactate (L-AlaC₄Lac). Emphasis was laid on establishing a binary system of a native CF, or derivatives, along with the CIL for the resolution of the enantiomeric pairs.

Parameters, such as the type of the CS, the concentration of both the CS and CIL, and the BGE's pH and type, were methodically examined, to optimize the chiral separation of each analyte. It was observed that, in some cases, the addition of the CIL into the BGE improved both resolution (R_s) and efficiency significantly. Examination of the CILs (both L- and D-enantiomers), which were synthesized in the Instrumental Analysis Laboratory, as the sole CSs in the BGE did not provide any enantio-resolution for the analytes under study.

After the optimization of separation conditions, baseline separations of NEF ($R_s = 1.9$) and FXD ($R_s = 1.7$) were achieved in less than 5 min. Both NEF and FXD were enantiomerically resolved by using the sulphated CF₆ (SCF₆), as the CS at a concentration of 2 mM. The enantioseparations were evaluated by calculating both the R_s and the Relative Standard Deviation (RSD) values of the electroosmotic flow (EOF) and the analytes' peaks. Precision was exceptional with RSD values of less than 1.2% for all peaks.

On the contrary, for the drugs CTZ and T4, only a peak splitting was observed. In the case of T4, the peak splitting was observed upon the addition of acetonitrile to the BGE, which contained the isopropyl carbamate derivative of CF₆ (IP-CF₆), as the CS. A shoulder on the CTZ peak was observed, by utilizing the carboxy-methyl CF₆ (CM-CF₆), as the chiral additive in the BGE. In this case, the addition of the CIL or any organic modifier to the BGE did not provide any effect on resolution.

Finally, the synergistic effect of AAILs and CFs was evaluated. Synergy was observed between L-AlaC₄Lac and SCF₆ towards NEF's enantiomeric pair, which enabled baseline separation of analyte enantiomers, at a much lower concentration of the CS.

The main objective of this doctoral study, as described in the second part of the thesis, is the analysis of *cerumen*, commonly known as earwax, for the detection of cannabis. Cerumen, a non-conventional biological secretion, that is yet very little exploited as a forensic specimen, is proposed as an alternative matrix for forensic analysis, especially for the detection of phytocannabinoids.

A fully validated analytical Ultra Performance Liquid Chromatography - tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method was developed for the detection and quantification of the most prevalent psychoactive illicit drug globe wide, commonly referred to as THC (Δ^9 -tetrahydrocannabinol), along with two metabolites and two major cannabinoids found in *Cannabis Sativa*. Chromatographic separation of Cannabidiol (CBD) and THC was crucial, since both presented the same molecular mass and fragmentation pattern in the MS/MS system. All five cannabinoids under study were chromatographically resolved within 5 min. The analytical method was validated, and standard external calibration curves were established, within 0.1-15.0 ng/mL, with correlation coefficients $r^2 > 0.99$. Limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) for all cannabinoids were calculated in the range of 0.07-0.18 ng/mL and 0.22-0.53 ng/mL, respectively.

The backbone and the most laborious challenge of this doctoral research was the establishment of the extraction procedure of cannabinoids. After examining various extraction solvents, the optimum, regarding the extraction efficiency, for all analytes was selected. A straightforward extraction of cannabinoids with acidified acetonitrile followed by a fully validated experimental procedure was achieved. All evaluation parameters, including precision, accuracy, matrix effect, extraction recoveries and carryover effect, were determined and were found to be within acceptable limits. The extraction method and analysis, which was performed in two (low and high) concentration levels, enabled minimum total analysis time and good recoveries (79-91%) for all phytocannabinoids under study. Additionally, no matrix effect nor carryover was observed.

To prove applicability of the proposed assay, volunteers were selected, and their cerumen samples were examined, for cannabis. All samples were analysed by using the developed UPLC-MS/MS method, and they were all tested positive to cannabis. Surprisingly, both THC and Cannabinol (CBN) were detected, and quantification was performed in three out

of the four samples. To the best of our knowledge, detection of the psychoactive THC was achieved for the first time in this biological specimen, indicating recent cannabis abuse, in accordance with self-reports from the volunteers. Furthermore, detection of its oxidized form, CBN, could be an indication of past abuse. Detection of both THC and CBN in cerumen is a suggestion that this biological secretion could be used as an alternative for forensic analysis, and detection of cannabinoids in this matrix is possible.

ΑΘΗΝΑ ΝΙΚΟΜΑΧΟΥ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Υπεύθυνη δήλωση	ii
Ευχαριστίες	iv
Περίληψη	vi
Abstract	ix
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	xii
Κατάλογος Σχημάτων	xv
Κατάλογος Πινάκων	xx
Κατάλογος Συντημήσεων	xxii
1. Εισαγωγή	1
1.1 Χειρομορφία	1
1.1.1 Χειρόμορφα Φάρμακα	2
1.1.2. Χειρόμορφοι Διαχωρισμοί	4
1.2. Χειρόμορφοι Επιλογείς στην Ηλεκτροφόρηση Τριχοειδούς	5
1.2.1. Κυκλοδεξτρίνες	7
1.2.2. Κυκλοφρουκτάνες	8
1.2.3. Χειρόμορφα Ιοντικά Υγρά	10
1.4. Κάνναβη	12
1.4.1. Φαρμακολογία και Φαρμακοκινητική	13
1.4.2. Επιδράσεις της Κάνναβης	13
2. Κανναβινοειδείς Ενώσεις στα Βιολογικά Δείγματα	14
2.1. Προσδιορισμός Κανναβινοειδών Ενώσεων με Χρήση της LC-MS/MS	17
2.1.1 Προσδιορισμός σε Συνηθισμένα Βιολογικά Δείγματα	18
2.1.2 Προσδιορισμός σε μη-Συνηθισμένα Βιολογικά Δείγματα	22
2.2. Μέθοδοι Εξαγωγής Κανναβινοειδών Ενώσεων από τα Βιολογικά Δείγματα	26
3. Χρωματογραφικές και Ηλεκτροφορητικές Τεχνικές	29
3.1. Ηλεκτροφόρηση Τριχοειδούς	29
3.1.1. Γενικές Αρχές	29
3.1.2. Οργανολογία	31
3.1.3. Εφαρμογές της CE	33
3.1.4. Ηλεκτροκινητική Χρωματογραφία Τριχοειδούς	33
3.2. Υγρή Χρωματογραφία Υπερυψηλής Απόδοσης	34
3.2.1. Γενικές Αρχές	35
3.2.2. Οργανολογία	37

3.3. Ανιχνευτές.....	39
3.3.1. Ανιχνευτής Συστοιχίας Φωτοδιόδων.....	39
3.3.2. Διαδοχική Φασματομετρία Μάζας.....	39
3.3.2.1. Τετραπολικός Αναλυτής Μαζών	40
3.3.2.2. Ιονισμός Ηλεκτροψεκασμού.....	42
4. Ανάπτυξη και Επικύρωση Μεθόδου.....	44
4.1. Ακρίβεια.....	45
4.2. Γραμμικότητα.....	46
4.3. Όρια Ανίχνευσης και Ποσοτικοποίησης.....	46
4.4. Απόδοση Εκχύλισης.....	47
4.5. Επίδραση του Μητρικού Υλικού	47
4.6. Φαινόμενο «Carryover»	49
5. Πειραματικό Μέρος.....	50
5.1. Χειρόμορφος Διαχωρισμός Ενώσεων Κλινικής Σημασίας με Χρήση της CE	50
5.1.1. Οργανολογία.....	50
5.1.2. Αναλύτες.....	52
5.1.3. Διαλύτες και Αντιδραστήρια	52
5.1.4. Σύνθεση των CILs	53
5.2. Ανίχνευση και Ποσοτικοποίηση Κανναβινοειδών Ενώσεων στις Κυψελίδες (κερί) Αυτιού με Χρήση της Τεχνικής UPLC-MS/MS	54
5.2.1 Οργανολογία.....	54
5.2.2. Αναλύτες.....	56
5.2.3. Διαλύτες.....	56
5.3. Δειγματοληψία και Επεξεργασία Κυψελίδων Αυτιού	56
5.3.1. Ανάπτυξη Μεθόδου Επεξεργασίας Κυψελίδων Αυτιού.....	58
6. Αποτελέσματα.....	60
6.1. Ανάπτυξη Μεθόδων Χειρόμορφου Διαχωρισμού	60
6.1.1. Επίδραση Ρυθμιστικού Διαλύματος	61
6.1.2. Επίδραση του Είδους και της Συγκέντρωσης του CS	62
6.1.3. Μελέτη Επίδρασης του pH.....	70
6.1.4. Μελέτη Επίδρασης Οργανικού Πρόσθετου	73
6.1.5. Μελέτη Συνεργιστικού Φαινομένου Μεταξύ SCF ₆ και L-AlaC ₄ Lac.....	75
6.1.6. Συμπεράσματα.....	80
6.2. Προσδιορισμός Κανναβινοειδών σε Κυψελίδες Αυτιού με Χρήση της UPLC-MS/MS	82

6.2.1. Μελέτη Χρωματογραφικών Συνθηκών	83
6.2.2. Μελέτη Παραμέτρων Φασματομετρίας Μάζας	87
6.3. Μέθοδος Επεξεργασίας Κυψελίδων Αυτιού	90
6.3.1. Μελέτη του Διαλύτη Εκχύλισης Κανναβινοειδών Ενώσεων.....	91
6.3.2. Μελέτη Τεχνικής Ανάδευσης.....	93
6.3.3. Μελέτη Εξάτμισης του Διαλύτη Εκχύλισης.....	93
6.4. Αξιολόγηση Μεθόδου	95
6.4.1. Ακρίβεια	95
6.4.2. Γραμμικότητα.....	96
6.4.3. Όρια LOD και LOQ	97
6.4.4. Απόδοση της Εκχύλισης.....	98
6.4.5. Επίδραση Μητρικού Υλικού	102
6.4.6. Φαινόμενο «Carryover»	103
6.5. Εφαρμογή σε Πραγματικά Δείγματα Κυψελίδων Αυτιού από Χρήστες Κάνναβης	106
6.6. Συμπεράσματα	114
7. Γενικά Συμπεράσματα	116
8. Μελλοντική Εργασία	119
9. Βιβλιογραφία	120
10. Παράρτημα	126

Κατάλογος Σχημάτων

Σχήμα 1.1. Τρόποι αναγραφής των εναντιομερών.	1
Σχήμα 1.2. Το μοντέλο τριών σημείων αλληλεπίδρασης. (α) Εναντιομερές 1, το οποίο αλληλεπιδρά με τον CS σε τρία σημεία. (β) Εναντιομερές 2, μετά από πιθανές περιστροφές, μόνο δύο ομάδες μπορούν να αλληλοεπιδράσουν με δύο σημεία του CS.	5
Σχήμα 1.3. Δομική απεικόνιση CDs.	7
Σχήμα 1.4. Η D-φρουκτοφουρανόζη, δομική μονάδα των CFs.....	8
Σχήμα 1.5. Αναπαράσταση της δομής των CFs, R = H. CF-6, CF-7 (n = 1), και CF-8 (n = 2).	9
Σχήμα 2.1. Δομές των συνηθέστερων κανναβινοειδών i) THC, ii) THC-OH, iii) THC-COOH, iv) CBN και v) CBD.....	15
Σχήμα 3.1. Κατανομή φορτίου στα εσωτερικά τοιχώματα του τριχοειδούς και δημιουργία της EOF.....	31
Σχήμα 3.2. Ηλεκτροσωμωτική ροή (EOF), ηλεκτροφορητική ευκινησία (μ_p) [141].	31
Σχήμα 3.3. Σχηματικό διάγραμμα ενός συστήματος CE [142].....	32
Σχήμα 3.4. Καμπύλες van Deemter για διαφορετικά μεγέθη σωματιδίων (1.7, 3.5 και 5 μm) [149].	36
Σχήμα 3.5. Σχηματική αναπαράσταση συστήματος HPLC. 1. Αντλία, 2. Σύστημα εισαγωγής του δείγματος, 3. Χρωματογραφική Στήλη, 4. Ανιχνευτής [151].	37
Σχήμα 3.6. Σχηματική απεικόνιση των τμημάτων ενός διαδοχικού συστήματος φασματομετρίας μαζών.....	40
Σχήμα 3.7. Σχηματική απεικόνιση του τετραπολικού αναλυτή μαζών [155].....	41
Σχήμα 3.8. Σχηματική απεικόνιση του ιοντισμού ESI [157].....	43
Σχήμα 5.1. Σύστημα Agilent CE και τα βασικά μέρη από τα οποία αποτελείται [164]	50
Σχήμα 5.2. Δομές των χειρόμορφων ιοντικών υγρών L-AlaC ₄ Lac και D-AlaC ₄ Lac.....	53
Σχήμα 5.3. Αντιπροσωπευτική σύνθεση του L-AlaC ₄ Lac.....	53
Σχήμα 5.4. Σύνθεση του L-AlaC ₄ Lac στο εργαστήριο Ενόργανης Χημικής Ανάλυσης....	54
Σχήμα 5.5. Waters Xevo TQXS UPLC-MS/MS, το οποίο βρίσκεται στο ιδιωτικό εργαστήριο M.C. Analysis στην Αλάμπρα.....	55

Σχήμα 5.6. Τα μέσα συλλογής των δειγμάτων α) Jobson probe, β) μπατονέτες (ωτοκαθαριστές).....	57
Σχήμα 5.7. Σχηματικά οι διάφορες διαδικασίες επεξεργασίας δειγμάτων, μέχρι την τελική διαμόρφωση της πειραματικής διαδικασίας.	59
Σχήμα 6.1. Δομές των φαρμακευτικών ενώσεων που έχουν μελετηθεί: 1) Θυροξίνη (T4), 2) Νεφοπάμη, (NEF), 3) Σετριζίνη (CTZ) και 4) Φεξοφεναδίνη (FXD).....	60
Σχήμα 6.2. Δομή της β-CD και των παραγώγων της.....	63
Σχήμα 6.3. Δομή των CFs που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την εργασία.....	64
Σχήμα 6.4. Επίδραση της συγκέντρωσης της SCF ₆ στο διαχωρισμό του NEF. Πειραματικές συνθήκες: 100 mM Tris/10 mM Borate ως το BGE, με προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων SCF ₆ . C _{NEF} = 0.4 mg/mL, pH 8.0, λ = 200 nm. Δυναμικό 20 kV, θερμοκρασία T = 20 °C, έγχυση 50 mbars σε 3 sec.	65
Σχήμα 6.5. Επίδραση της συγκέντρωσης της SCF ₆ στο διαχωρισμό της FXD. Πειραματικές συνθήκες: 100 mM Tris/10 mM Borate ως το BGE, C _{FXD} = 1.0 mg/mL, pH 7.1, λ = 195 nm. Δυναμικό 20 kV, θερμοκρασία T = 25 °C και έγχυση 30 mbars σε 3 sec.....	66
Σχήμα 6.6. Επίδραση της συγκέντρωσης της CM-CF ₆ στο διαχωρισμό της CTZ. Πειραματικές συνθήκες: 100 mM Tris/10 mM Borate ως το BGE, C _{CTZ} = 0.5 mg/mL, pH 8.2, λ = 195 nm. Δυναμικό 20 kV, T = 25 °C και έγχυση στα 30 mbars σε 3 sec.....	67
Σχήμα 6.7. Μελέτη της n-CF ₇ στο διαχωρισμό της CTZ. Πειραματικές συνθήκες: 100 mM Tris/10 mM Borate ως το BGE, C _{CTZ} = 0.5 mg/mL, pH 8.2, λ = 195 nm. Δυναμικό 20 kV, T = 25 °C και έγχυση στα 30 mbars σε 3 sec.	68
Σχήμα 6.8. Επίδραση του BGE στο διαχωρισμό της CTZ. Πειραματικές συνθήκες: BGE 25 mM Borate; 100 mM Tris/10 mM Borate, C _{CTZ} = 0.5 mg/mL σε H ₂ O, pH 8.2, λ = 195 nm. Δυναμικό 15 kV, T = 25 °C και έγχυση στα 30 mbars σε 3 sec.	69
Σχήμα 6.9. Επίδραση του pH στο διαχωρισμό του NEF σε σταθερή συγκέντρωση, 1 mM της SCF ₆ . Πειραματικές συνθήκες: ίδιες με το Σχήμα 6.4.	71
Σχήμα 6.10. Επίδραση του pH στο διαχωρισμό του NEF σε σταθερή συγκέντρωση, 2 mM της SCF ₆ . Πειραματικές συνθήκες: ίδιες με το Σχήμα 6.4.	72
Σχήμα 6.11. Μελέτη επίδρασης του δυναμικού στο χειρόμορφο διαχωρισμό του NEF. Πειραματικές συνθήκες: 100 mM Tris/10 mM Borate ως το BGE, προσθήκη 4 mM SCF ₇ .	

$C_{NEF} = 0.4 \text{ mg/mL}$, pH 8.0, $\lambda = 200 \text{ nm}$, θερμοκρασία $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$, έγχυση 50 mbars σε 3 sec. Δυναμικό 18 kV (A) και 10 kV για (B).....	73
Σχήμα 6.12. Επίδραση της συγκέντρωσης του οργανικού πρόσθετου στο διαχωρισμό της T4. Προσθήκη 40 mM ACN σε 10 mM IP-CF ₆ . Πειραματικές συνθήκες: 100 mM Tris/10 mM Borate ως το BGE, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, $C_{T4} = 0.4 \text{ mg/mL}$, pH 8.6, $\lambda = 214 \text{ nm}$, δυναμικό 30kV και μήκος έγχυσης 50 mbars σε 3 sec.....	74
Σχήμα 6.13. Συνεργιστική δράση της SCF ₆ και του L-AlaC ₄ Lac. Σταθερή συγκέντρωση 2 mM SCF ₆ και μεταβλητές συγκεντρώσεις L-AlaC ₄ Lac. Ίδιες πειραματικές συνθήκες με Σχήμα 6.4 με εφαρμοζόμενο δυναμικό στα 15 kV.....	75
Σχήμα 6.14. Γραφική απεικόνιση της συνεργιστικής δράσης της SCF ₆ και του L-AlaC ₄ Lac στις βέλτιστες συνθήκες διαχωρισμού. Σταθερή συγκέντρωση 2 mM SCF ₆ και μεταβλητές συγκεντρώσεις L-AlaC ₄ Lac.....	76
Σχήμα 6.15. Συνεργιστική δράση της SCF ₆ και του L-AlaC ₄ Lac. Σταθερή συγκέντρωση 1 mM SCF ₆ και μεταβλητές συγκεντρώσεις L-AlaC ₄ Lac. Ίδιες πειραματικές συνθήκες με Σχήμα 6.4.....	77
Σχήμα 6.16. Συνεργιστική δράση της SCF ₆ και του L-AlaC ₄ Lac. Σταθερή συγκέντρωση 1 mM SCF ₆ και 40 mM L-AlaC ₄ Lac. Ίδιες πειραματικές συνθήκες με Σχήμα 6.4, με τη μόνη διαφορά (A) $V = 20 \text{ kV}$ και (B) $V = 15 \text{ kV}$	77
Σχήμα 6.17. Επίδραση προσθήκης L-ALaC ₄ Lac στο διαχωρισμό του NEF. Στο BGE προστέθηκαν 4 mM SCF ₇ και 40 mM L-AlaC ₄ Lac. Συνθήκες ίδιες με Σχήμα 6.3, δυναμικό 10 kV.....	78
Σχήμα 6.18. Επίδραση προσθήκης L-ALaC ₄ Lac στο διαχωρισμό του NEF. Στο BGE προστέθηκαν διάφορες συγκεντρώσεις L-AlaC ₄ Lac. Συνθήκες ίδιες με Σχήμα 6.4, εφαρμοζόμενο δυναμικό 15 kV.....	79
Σχήμα 6.19. Επίδραση προσθήκης D-ALaC ₄ Lac στο διαχωρισμό της CTZ. Στο BGE προστέθηκαν διάφορες συγκεντρώσεις D-AlaC ₄ Lac. Συνθήκες ίδιες με Σχήμα 6.6, δυναμικό 20 kV.....	79
Σχήμα 6.20. TIC των υπό μελέτη ενώσεων στα προπαρασκευαστικά πειράματα. Συνθήκες: κινητή φάση (A) H ₂ O, 0.1% FA και (B) ACN, 0.1% FA, όγκος έγχυσης 10 μL και ροή 0.8 mL/min, $T = 50 \text{ }^\circ\text{C}$. Συγκέντρωση αναλυτών 2 $\mu\text{g/mL}$, σειρά έκλυσης THC-OH, THC-COOH, CBD, CBN και THC.	84

Σχήμα 6.21. TIC των υπό μελέτη ενώσεων στις βέλτιστες συνθήκες διαχωρισμού. Συνθήκες: κινητή φάση (A) H ₂ O, 0.1% FA και (B) ACN, 0.1% FA, όγκος έγχυσης 10 μL και ροή 0.35 mL/min, T = 35 °C. Συγκέντρωση αναλυτών 15 ng/mL, σειρά έκλουσης THC-OH, THC-COOH, CBD, CBN και THC.	85
Σχήμα 6.22. Μελέτη όγκου έγχυσης των αναλυτών, συναρτήσει του εμβαδού της THC. 87	
Σχήμα 6.23. Φάσματα σάρωσης θυγατρικού ιόντος A) για την ένωση THC και THC-d ₃ και B) για τις ενώσεις CBD και CBN.	89
Σχήμα 6.24. Προτεινόμενοι μηχανισμοί διάσπασης των THC-OH, THC και THC-COOH [178].	90
Σχήμα 6.25. Ραβδόγραμμα της έντασης του σήματος που λήφθηκε για κάθε ουσία στα TIC, συναρτήσει της μεθόδου εκχύλισης στα προπαρασκευαστικά πειράματα.	95
Σχήμα 6.26. Μελέτη της απόδοσης της εκχύλισης συναρτήσει του διαλύτη εκχύλισης στο υψηλό επίπεδο συγκέντρωσης, στα 9.0 ng/mL.	98
Σχήμα 6.27. Σήμα τυφλού δείγματος στο TIC για την ένωση CBN.	104
Σχήμα 6.28. Ανίχνευση της CBN στο δείγμα 1, δεξί αυτί (A) και αριστερό αυτί (B). Ιόν ποσοτικοποίησης (πάνω) και ταυτοποίησης (κάτω).	108
Σχήμα 6.29. Ανίχνευση της CBN στο δείγμα 2, δεξί αυτί (A) και αριστερό αυτί (B). Ιόν ποσοτικοποίησης (πάνω) και ταυτοποίησης (κάτω).	108
Σχήμα 6.30. Ανίχνευση της CBN στο δείγμα 3, δεξί αυτί (A) και αριστερό αυτί (B). Ιόν ποσοτικοποίησης (πάνω) και ταυτοποίησης (κάτω).	109
Σχήμα 6.31. Ανίχνευση της CBN στο δείγμα 4 δεξί αυτί (A) και αριστερό αυτί (B). Ιόν ποσοτικοποίησης (πάνω) και ταυτοποίησης (κάτω).	109
Σχήμα 6.32. Ανίχνευση της THC στο δείγμα 1, δεξί αυτί (A) και αριστερό αυτί (B). Ιόν ποσοτικοποίησης (πάνω) και ταυτοποίησης (κάτω).	110
Σχήμα 6.33. Ανίχνευση της THC στο δείγμα 2, δεξί αυτί (A) και αριστερό αυτί (B). Ιόν ποσοτικοποίησης (πάνω) και ταυτοποίησης (κάτω).	110
Σχήμα 6.34. Ανίχνευση της THC στο δείγμα 3, δεξί αυτί (A) και αριστερό αυτί (B). Ιόν ποσοτικοποίησης (πάνω) και ταυτοποίησης (κάτω).	111
Σχήμα 6.35. Ανίχνευση της THC στα δείγμα 4 δεξί αυτί (A) και αριστερό αυτί (B). Ιόν ποσοτικοποίησης (πάνω) και ταυτοποίησης (κάτω).	111

Σχήμα 6.36. TIC από την ανάλυση τυφλού δείγματος 5, για την ένωση CBN. Δείγμα από το δεξί (A) και αριστερό αυτί (B). Ιόν ποσοτικοποίησης (πάνω) και ιόν ταυτοποίησης (κάτω).	113
Σχήμα Π1. Γραφική αναπαράσταση των μεγεθών f και g που χρησιμοποιούνται κατά τον υπολογισμό του παράγοντα Kaiser.	126
Σχήμα Π2. Καμπύλες Βαθμονόμησης που λήφθηκαν χωρίς I.S., στην απουσία μήτρας, για όλα τα κανναβινοειδή που μελετήθηκαν σε αυτή την εργασία, i) THC, ii) THC-OH, iii) THC-COOH, iv) CBN και v) CBD.	126

Κατάλογος Πινάκων

	Σελ.
Πίνακας 6.1.	Είδος, συγκέντρωση, pH και εύρος σταθερότητας pH των BGEs που μελετήθηκαν. 61
Πίνακας 6.2.	Οι CDs και CFs που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη. 63
Πίνακας 6.3.	Επίδραση της συγκέντρωσης του L-ALaC4Lac στη διαχωριστική ικανότητα και στην αποδοτικότητα. 76
Πίνακας 6.4.	Βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες της βαθμιδωτής έκλουσης. 86
Πίνακας 6.5.	Παράμετροι MS/MS των υπό μελέτη ουσιών, καθώς επίσης και οι MRM μεταβάσεις. 88
Πίνακας 6.6.	RSD (%) τιμές των χρόνων συγκράτησης και των εμβαδών των εξεταζόμενων ουσιών. 96
Πίνακας 6.7.	Εξισώσεις Καμπυλών Βαθμονόμησης, συντελεστές γραμμικότητας (r , r^2) με τη χρήση I.S. για κάθε εξεταζόμενη ένωση. 96
Πίνακας 6.8.	Εξισώσεις Καμπυλών Βαθμονόμησης, συντελεστές γραμμικότητας και όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης (ng/mL) χωρίς τη χρήση I.S. για κάθε εξεταζόμενη ένωση. 97
Πίνακας 6.9.	Όρια Ανίχνευσης και Ποσοτικοποίησης με χρήση I.S. και χωρίς. 97
Πίνακας 6.10.	Απόδοση της εκχύλισης των εξεταζόμενων ουσιών (% PE) στην υψηλή (HQC, 9.0 ng/mL) και χαμηλή (LQC, 0.2 ng/mL) συγκέντρωση, σε διάφορους διαλύτες εκχύλισης. 99
Πίνακας 6.11.	Συνολικά αποτελέσματα της απόδοσης της εκχύλισης (% PE) στην υψηλή (9.0 ng/mL) και χαμηλή (0.2 ng/mL) συγκέντρωση ανάκτησης. 101
Πίνακας 6.12.	Απόδοση της εκχύλισης σε διάφορους διαλύτες εκχύλισης και σε δύο επίπεδα συγκεντρώσεων (LQC, 0.2 ng/mL και HQC, 9.0 ng/mL) με τη χρήση I.S. 102

Πίνακας 6.13.	Οι τιμές % ΜΕ που υπολογίστηκαν με σκοπό τον προσδιορισμό της επίδρασης της μήτρας.	103
Πίνακας 6.14.	Προσδιορισμός του φαινομένου «Carryover» με λήψη τυφλού δείγματος μετά την υψηλότερη συγκέντρωση των πειραμάτων ανάκτησης.	104
Πίνακας 6.15.	Απώλεια (%) των ενώσεων σε διάλυμα κινητής φάσης σε διαφορετικές θερμοκρασίες με την πάροδο 24 h.	106
Πίνακας 6.16.	Αποτελέσματα ποσοτικοποίησης για τις ουσίες CBN και THC για τα άτομα που συμμετείχαν στη μελέτη αυτή (μικτά αποτελέσματα από την ανάλυση διξιού (R) και αριστερού (L) αντιού).	112

Κατάλογος Συντμήσεων

AAILs	Amino Acid Ester-based Ionic Liquids, ιοντικά υγρά από εστέρες των αμινοξέων
AcA	Acetic Acid, οξικό οξύ
ACN	Acetonitrile, ακετονιτρίλιο
Ala	Alanine, αλανίνη
AlaC₄	Alanine tert butyl ester, τριτ-βουτυλεστέρας της αλανίνης
BGE	Background Electrolyte, ηλεκτρολύτης υποβάθρου
Borate	Sodium tetraborate decahydrate, δεκαϋδρικό τετραβορικό νάτριο
β-CD	beta-Cyclodextrin, β-κυκλοδεξτρίνη
CBD	Cannabidiol, Κανναβιδιόλη
CBN	Cannabinol, Κανναβινόλη
CDs	Cyclodextrins, κυκλοδεξτρίνες
CE	Capillary Electrophoresis, ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς
CFs	Cyclofructans, κυκλοφρουκτάνες
CILs	Chiral Ionic Liquids, χειρόμορφα ιοντικά υγρά
CM-CD	Carboxymethyl CD, καρβοξυμεθυλική κυκλοδεξτρίνη
CSPs	Chiral Stationary Phases, χειρόμορφες στατικές φάσεις
CSs	Chiral Selectors, χειρόμορφοι επιλογείς
CTZ	Cetirizine, σετιριζίνη
CV	Cone Voltage
CZE	Capillary Zone Electrophoresis, ηλεκτροφόρηση ζώνης τριχοειδούς
DAD	diode-array detector, ανιχνευτής συστοιχίας φωτοδιόδων
DC	Direct Current, συνεχές ρεύμα
DNA	deoxyribonucleic acid, δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ

EKC	Electrokinetic Capillary Chromatography, ηλεκτροκινητική χρωματογραφία τριχοειδούς
EOF	Electroosmotic Flow, ηλεκτροωσμωτική ροή
ESI	Electrospray ionization, ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό
EtOH	Ethanol, αιθανόλη
EWDTs	European Workplace Drug Testing Society
FA	Formic Acid, μεθανικό οξύ (φορμικό οξύ)
FDA	Food and Drug Administration, Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων
FXD	Fexofenadine, φεξοφεναδίνη
GC	Gas Chromatography, Αεριοχρωματογραφία
HPLC	High Performance Liquid Chromatography, υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης
HP-CD	Hydroxypropyl- CD, υδροξυπροπυλο κυκλοδεξτρίνη
ILs	Ionic Liquids, ιοντικά υγρά
IS	Internal Standard, εσωτερικό πρότυπο
L-AlaC₄Cl	L-alanine tert-butyl ester hydrochloride, χλωρίδιο του τερτ-βουτυλικού εστέρα της L-αλανίνης
L-AlaC₄Lac	L-Alanine tert butyl ester Lactate, λακτικός τερτ βουτυλεστέρας της L-αλανίνης
LC	Liquid Chromatography, Υγρή Χρωματογραφία
LLE	Liquid-liquid extraction, εκχύλιση υγρού-υγρού
LOD	Limit of Detection, όριο ανίχνευσης
LOQ	Limit of Quantitation, όριο ποσοτικοποίησης
L-Pro	L-proline, L-προλίνη
μ_p	Electroforetic mobility, ηλεκτροφορητική κινητικότητα
M-CD	Methyl-CD, μεθυλιωμένη-κυκλοδεξτρίνη

MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization, ιοντισμός εκρόφησης υποβοηθούμενος από υλικό της μήτρας και λέιζερ
ME	Matrix effect, επίδραση μητρικού υλικού
MEKC	Micellar ElectroKinetic Chromatography, μικυλλιακή ηλεκτροκινητική χρωματογραφία
MeOH	Methanol, μεθανόλη
MRM	Multiple Reaction Monitoring, παρακολούθηση πολλαπλών ιόντων
MS	Mass spectrometry, φασματομετρία μαζών
MS/MS	Tandem Mass Spectrometry, διαδοχική φασματομετρία μαζών
n-CF	Native CFs, φυσικές κυκλοφρουκτάνες
N	Efficiency, αποδοτικότητα
NaOH	Sodium hydroxide, υδροξείδιο του νατρίου
NEF	Neforam, νεφοπάμη
NMR	Nuclear Magnetic Resonance, πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός
PE	Process Efficiency, απόδοση εκχύλισης
PLE	Pressurized liquid extraction, εκχύλιση υγρού υπό πίεση
rac-AlaC₄Lac	rac-Alanine <i>tert</i> butyl ester lactate, γαλακτικός <i>τριτ</i> -βουτυλεστέρας της rac-αλανίνης
RF	Radiofrequency, ραδιοσυχνότητα
Rs	Resolution, διαχωριστική ικανότητα
RSD	Relative Standard Deviation, σχετική τυπική απόκλιση
SD	Standard Deviation, τυπική απόκλιση
S-CD	Sulfated CD,θειϊκή κυκλοδεξτρίνη
S-CF	Sulfated CF,θειϊκή κυκλοφρουκτάνη
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate, δωδέκυλο θειϊκό νάτριο
SoHT	Society of Hair Testing

SPE	Solid phase extraction, εκχύλιση στερεάς φάσης
TEA	Triethylamine, τριαιθυλαμίνη
THC	Δ^9 -Tetrahydrocannabinol, Δ^9 -τετραϋδροκανναβινόλη
THC-<i>d</i>₃	Δ^9 -Tetrahydrocannabinol- <i>d</i> ₃ , δευτεριωμένη Δ^9 -τετραϋδροκανναβινόλη
THCA-A	Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid A, Δ^9 -τετραϋδροκανναβινολικό οξύ A
THC-COOH	11-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol, 11-νορ- Δ^9 -τετραϋδροκανναβινόλη
THC-COO-glu	glucuronidated 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-carboxylic acid
THC-OH	11- Δ^9 -hydroxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol, 11-υδροξύ- Δ^9 -τετραϋδροκανναβινόλη
TIC	Total Ion Current, χρωματογράφημα συνολικών ιόντων/ρεύματος
TM-β-CD	Trimethyl-beta-Cyclodextrin, τριμεθυλιωμένη- β -κυκλοδεξτρίνη
t_R	retention time, χρόνος συγκράτησης
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)aminomethane, τρισ(υδροξυμεθυλο)αμινομεθάνιο
T4	Thyroxine, θυροξίνη
UHPLC	Ultra-High Performance/Pressure Liquid Chromatography, Υγρή Χρωματογραφία Υπερύψηλης Απόδοσης/ Πίεσης
UPLC	Ultra-Performance/Pressure Liquid Chromatography, υγρή χρωματογραφία υπερύψηλης απόδοσης
UV-Vis	Ultraviolet-visible, υπεριώδες-ορατό

1. Εισαγωγή

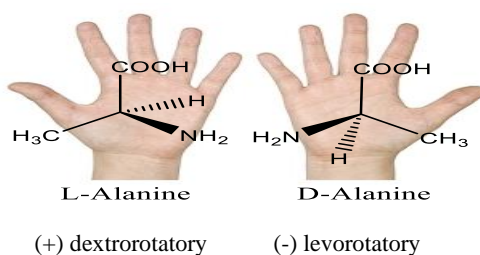
1.1 Χειρομορφία

Η χειρομορφία αποτελεί σήμερα αναπόσπαστο κομμάτι της φαρμακευτικής ανάπτυξης και συνάμα της ακαδημαϊκής έρευνας. Ανακαλύφθηκε το 1848 από τον Γάλλο χημικό Louis Pasteur, καθώς μελετούσε τους κρυστάλλους του τρυγικού εναμμώνιου νατρίου. Ο Pasteur παρατήρησε ότι τέτοιες χειρόμορφες ενώσεις υπάρχουν ως ζεύγη και έχουν σχέση ειδώλου-αντικειμένου, δηλαδή σχετίζονται μεταξύ τους όπως το δεξί με το αριστερό χέρι [1]. Η χειρομορφία αποτελεί ένα είδος στερεοϊσομέρειας και τέτοια στερεοϊσομερή καλούνται εναντιομερή. Πολλά βιομόρια, όπως το DNA, τα αμινοξέα και τα σάκχαρα, είναι χειρόμορφα.

Τα εναντιομερή μιας ένωσης παρουσιάζουν τις ίδιες χημικές και φυσικές ιδιότητες. Ως αποτέλεσμα αυτής της ομοιότητας, είναι πολύ δύσκολο να γίνει διάκριση μεταξύ εναντιομερών όταν συγκρίνονται βασικές φυσικοχημικές ιδιότητες, όπως το σημείο βρασμού, το σημείο τήξης και η πυκνότητα.

Ωστόσο, η μοναδική τους διαφορά έγκειται στη διάταξή τους στο χώρο και συνεπώς, τα εναντιομερή μιας ένωσης μπορούν να διακριθούν μεταξύ τους με βάση την οπτική τους δραστηριότητα. Όταν ένα επίπεδο πολωμένου φωτός περνά διαμέσου του ενός εναντιομερούς, τότε το μόριο στρέφει το φως σε μία ορισμένη κατεύθυνση. Όταν το ίδιο επίπεδο πολωμένου φωτός περνά μέσα από το άλλο εναντιομερές, τότε αυτό στρέφει το φως κατά το ίδιο ποσό, αλλά προς την αντίθετη κατεύθυνση. Τέτοια μόρια ονομάζονται οπτικά ισομερή. Αυτά που στρέφουν το πολωμένο φως δεξιόστροφα αναγράφονται ως (+) και αυτά που το στρέφουν αριστερόστροφα ως (-).

Επίσης, κάποιες φορές γίνεται αναφορά στα D- (dextro) και L- (levo) εναντιομερή (**Σχήμα 1.1**). Ο συγκεκριμένος τρόπος αναγραφής των εναντιομερών, χρησιμοποιείται συνήθως από βιοχημικούς για την περιγραφή, κυρίως, της στερεοχημικής διαμόρφωσης των σακχάρων και των αμινοξέων.



Σχήμα 1.1. Τρόποι αναγραφής των εναντιομερών.

1.1.1 Χειρόμορφα Φάρμακα

Οι περισσότερες φαρμακευτικές ουσίες αποτελούνται από ένα ή περισσότερα χειρόμορφα κέντρα, τα οποία είναι υπεύθυνα για την οπτική ενεργότητα του φαρμάκου. Τα εναντιομερή τους αλληλεπιδρούν διαφορετικά με χειρόμορφους στόχους, όπως υποδοχείς, ένζυμα και ιοντικά κανάλια, με αποτέλεσμα να διαφέρουν ως προς τις φαρμακοκινητικές και τοξικολογικές τους ιδιότητες. Στη φύση, τα περισσότερα μόρια βρίσκονται μόνο στη μία εναντιομερή τους μορφή. Συγκεκριμένα, τα αμινοξέα βρίσκονται στην L-μορφή, ενώ τα σάκχαρα στην D-μορφή. Έτσι, οι ζωντανοί οργανισμοί εμφανίζουν διαφορετική απόκριση σε καθένα από τα εναντιομερή των χειρόμορφων ενώσεων.

Περίπου το 40% των συνθετικών φαρμακευτικών σκευασμάτων που υπάρχουν σήμερα στη παγκόσμια αγορά είναι χειρόμορφα. Παρ' όλο που τα εναντιομερή μιας χειρόμορφης ένωσης έχουν πανομοιότυπη χημική δομή, τα περισσότερα παρουσιάζουν διαφορές στις βιολογικές, φαρμακολογικές και τοξικολογικές τους ιδιότητες [2, 3]. Ωστόσο, πέρασε περίπου ένας αιώνας από την ανακάλυψη της χειρομορφίας μέχρι την κατανόηση του ρόλου που αυτή διαδραματίζει στη φαρμακευτική βιομηχανία και κατά συνέπεια στους ζωντανούς οργανισμούς.

Μέχρι το 1950 τα περισσότερα φαρμακευτικά σκευάσματα ήταν φυτικής προέλευσης ή παρασκευάζονταν με μερική σύνθεση από φυσικά προϊόντα. Στη φύση απαντάται το ένα εναντιομερές και έτσι τα παραγόμενα φάρμακα της εποχής αποτελούνταν από το μοναδικό εναντιομερές (eutomer) της δραστικής ουσίας. Με την κυριαρχία των συνθετικών φαρμάκων στην παγκόσμια αγορά, τα ρακεμικά μίγματα των ουσιών προερχόμενα από την πλήρη οργανική σύνθεση χορηγούνταν για θεραπευτικούς σκοπούς χωρίς τον έλεγχο των φαρμακοδυναμικών δυνατοτήτων και το διαχωρισμό των επιμέρους εναντιομερών.

Το παράδειγμα ορόσημο στον τομέα της φαρμακευτικής ανάλυσης και των χειρόμορφων φαρμακευτικών ουσιών αποτέλεσε η θαλιδομίδη. Μια συνθετική φαρμακευτική ουσία, της οποίας το ρακεμικό μίγμα χορηγείτο ως κατασταλτικό της ναυτίας στις εγκυμονούσες τη δεκαετία του '60. Το φάρμακο αυτό όμως αποδείχθηκε ότι προκαλούσε τερατογενέσεις, εξαιτίας της παρουσίας του (-) εναντιομερούς της [4, 5]. Το πιο πάνω τραγικό γεγονός αποτέλεσε σταθμό, ώστε να τεθούν σε εφαρμογή αυστηρότεροι κανονισμοί που επιβάλλουν τη μελέτη των διαφορετικών φαρμακολογικών και τοξικών ιδιοτήτων των εναντιομερών μιας ένωσης.

Συνοπτικά, υπάρχουν τέσσερις διαφορετικοί πιθανοί τρόποι επίδρασης των εναντιομερών μιας φαρμακευτικής ουσίας [6, 7]:

- i. Μόνο το ένα εναντιομερές παρουσιάζει την απαιτούμενη φαρμακολογική δράση, ενώ το άλλο μπορεί να είναι μη-δραστικό ή, χειρότερα, να προκαλεί τοξικότητα. Το περισσότερο δραστικό εναντιομερές ονομάζεται 'eutomer', ενώ το άλλο που είναι λιγότερο δραστικό ονομάζεται 'distomer'.
- ii. Και τα δύο εναντιομερή μπορεί να έχουν σχεδόν ταυτόσημη ποιοτική και ποσοτική φαρμακολογική δράση. Παράδειγμα: Η φεξοφenaδίνη (fexofenadine, FXD) χορηγείται ως ρακεμικό μίγμα και αρκετές μελέτες δηλώνουν παρόμοια δράση των δύο εναντιομερών. Εντούτοις, μια σύγχρονη μελέτη των Akamine et al. (2018) [8], παρουσιάζει την πιθανότητα για καλύτερα θεραπευτικά αποτελέσματα με τη χρήση μόνο του (R)- εναντιομερούς και πιθανότατα ελαχιστοποίηση των αλληλεπιδράσεων με άλλα φάρμακα. Παρ' όλα αυτά, τονίζουν την αναγκαιότητα για διενέργεια περισσότερων μελετών αναφορικά με τις φαρμακοδυναμικές ικανότητες των εναντιομερών της ένωσης.
- iii. Τα δύο εναντιομερή δύναται να έχουν παρόμοιες φαρμακολογικές ιδιότητες, ωστόσο, διαφέρουν στη δραστικότητα που εμφανίζουν. Παράδειγμα: Μελέτες για τα εναντιομερή της νεφοπάμης (neforam, NEF) έχουν δείξει ότι το (+)NEF είναι ουσιαστικά πολύ πιο ισχυρό από το (-)NEF. Παρομοίως και η σεταιριζίνη (cetirizine, CTZ), ένα ισχυρό αντιισταμινικό δεύτερης γενιάς που χορηγείται για τη θεραπεία της αλλεργικής ρινίτιδας. Σε κλινικές δοκιμασίες, η λεβοσεταιριζίνη (levocetirizine, L-CTZ) έχει επιδείξει δύο φορές υψηλότερη δράση σε σύγκριση με τη CTZ και περίπου 30 φορές υψηλότερη δράση από τη δεξτρο-σεταιριζίνη (dextrocetirizine, D-CTZ).
- iv. Τα εναντιομερή μπορεί να παρουσιάζουν εντελώς διαφορετικές φαρμακολογικές ιδιότητες. Παράδειγμα: η θυροξίνη (thyroxine, T4). Η L-T4 χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του υποθυροειδισμού, ενώ η D-T4 δεν παρουσιάζει δράση στο βασικό μεταβολισμό, αλλά η δράση της έχει να κάνει με τη μείωση της χοληστερόλης, των φωσφολιπιδίων και της απολιποπρωτεΐνης Β και άλλων λιπιδίων [9].

Ως εκ τούτου, ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration, FDA) των ΗΠΑ και ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων (European Medicines Agency, EMA), από το 1992 απαιτούν όπως κάθε εναντιομερές μελετάται ξεχωριστά για τις φαρμακολογικές και μεταβολικές του δραστηριότητες [10]. Επιπλέον, απαιτείται οπτική καθαρότητα για χειρόμορφα μόρια, των οποίων τα εναντιομερή τους παρουσιάζουν διαφορετική ποιοτική και ποσοτική φαρμακολογική ή τοξικολογική δράση [11].

Συνεπώς, η ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων χειρόμορφου διαχωρισμού αποτελεί μείζον θέμα που απασχολεί τη φαρμακευτική βιομηχανία. Λόγω της δραματικής αύξησης των χειρόμορφων φαρμακευτικών ουσιών που σημειώνεται, η αναζήτηση νέων, καλύτερων και αποδοτικότερων μεθόδων χειρόμορφου διαχωρισμού ολοένα και αυξάνεται.

1.1.2. Χειρόμορφοι Διαχωρισμοί

Οι κυριότερες μέθοδοι διαχωρισμού που χρησιμοποιούνται τις τελευταίες δεκαετίες είναι οι χρωματογραφικές και οι ηλεκτροφορητικές. Η αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography, GC), η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) και η ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς (Capillary Electrophoresis, CE), έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για τον διαχωρισμό χειρόμορφων ενώσεων κλινικής σημασίας [12-16].

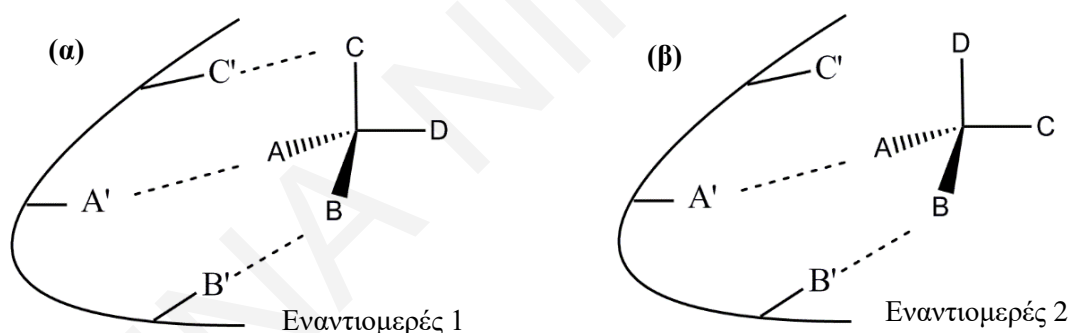
Η εναντιοεκλεκτικότητα καθορίζεται από τις διάφορες αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα μεταξύ του χειρόμορφου επιλογέα (Chiral Selector, CS) και των εναντιομερών μιας ουσίας. Όταν χρησιμοποιείται ένας CS, ο πρωταρχικός μηχανισμός αλληλεπίδρασης περιλαμβάνει τη συμπλοκοποίηση. Η αλληλεπίδραση του CS με το ένα εναντιομερές της ουσίας προκαλεί την εκλεκτική συγκράτησή της σε χρωματογραφικά ή ηλεκτροφορητικά συστήματα. Έτσι, επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός πολλών οπτικά ενεργών ισομερών [17, 18].

Το 1933, προτάθηκε από τους Easson και Stedman ο «κανόνας των τριών σημείων» (three point rule). Σύμφωνα με τον κανόνα αυτό, τουλάχιστον τρεις αλληλεπιδράσεις πρέπει να αναπτύσσονται μεταξύ του CS και του εναντιομερούς μορίου στόχου [19]. Επομένως, τουλάχιστον τρία σημεία του επιλογέα πρέπει να αλληλεπιδρούν με τρία σημεία των εναντιομερών μορίων, τα οποία πρέπει να είναι συμπληρωματικά μεταξύ τους, όπως είναι το κλειδί με την κλειδαριά. Αντίθετα, το άλλο εναντιομερές μιας χειρόμορφης ένωσης θα πρέπει να μην πληροί το μοντέλο των τριών σημείων, ώστε ο διαχωρισμός να είναι επιτυχής.

Στο **Σχήμα 1.2** φαίνεται η διαφορά αλληλεπίδρασης δύο εναντιομερών μιας ένωσης με ένα CS. Στο **Σχήμα 1.2 (α)** παρουσιάζεται το ένα εναντιομερές, το οποίο «συμπλοκοποιείται προσωρινά» με το CS σε τρία σημεία. Αντίθετα, το άλλο εναντιομερές (**Σχήμα 1.2 (β)**) έχει μόνο δύο σημεία αλληλεπίδρασης με τον επιλογέα. Όπως και να διαταχθεί ή να περιστραφεί, μόνο με αυτά τα δύο σημεία μπορεί να αλληλεπιδρά. Αρχικά, θεωρείτο ότι οι αλληλεπιδράσεις θα πρέπει να είναι ελκτικές. Μια πιο καινούρια θεωρία όμως, αναφέρει ότι οι απωστικές δυνάμεις (π.χ. στερεοχημικές παρεμποδίσεις) δρουν ως ένα άλλο είδος αλληλεπίδρασης. Μέχρι και δύο από τις τρεις αλληλεπιδράσεις μπορούν να είναι απωστικές,

εάν η τρίτη αλληλεπίδραση είναι τόσο ισχυρή ώστε να σχηματιστεί ένα από τα δύο πιθανά σύμπλοκα εναντιομερούς αναλύτη και CS [20, 21].

Οι μοριακές αλληλεπιδράσεις που μπορεί να αναπτυχθούν μεταξύ των εναντιομερών και του CS είναι πολλές και η ισχύς τους διαφέρει ανάλογα με τον τύπο της αλληλεπίδρασης. Ο ισχυρότερος τύπος αλληλεπίδρασης είναι ηλεκτροστατικής φύσης. Ακολουθούν οι δεσμοί υδρογόνου, οι οποίοι αναπτύσσονται, συνήθως, μεταξύ ενός υδρογόνου μιας υδροξυλομάδας ή αμινομάδας και ενός ατόμου οξυγόνου ή αζώτου ή φθορίου. Οι στερεοχημικές παρεμποδίσεις αποτελούν ένα άλλο είδος αλληλεπίδρασης, στο οποίο οι δυνάμεις που αναπτύσσονται είναι απωστικές. Λιγότερο ισχυρές είναι οι π-π αλληλεπιδράσεις των αρωματικών δακτυλίων. Για παράδειγμα, αρωματικά συστήματα, τα οποία περιέχουν υποκαταστάτες-δότες ηλεκτρονίων, έχουν την τάση να προσφέρουν τα π-ηλεκτρόνια τους σε άλλα συστήματα που είναι φτωχά σε ηλεκτρόνια. Έτσι, σε μια χειρόμορφη αναγνώριση τα π-ηλεκτρόνια μιας ομάδας δότη ηλεκτρονίων (του ενός εναντιομερούς) αλληλεπιδρούν με τα π-ηλεκτρόνια μιας ομάδας δέκτη ηλεκτρονίων (του CS), καθώς και το αντίστροφο. Ακολουθούν σε σειρά ισχύος οι δυνάμεις ιόντος-διπόλου, έπειτα οι διπόλου-διπόλου, ενώ τελευταίες στην κατάταξη ισχύος συναντώνται οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις [21].



Σχήμα 1.2. Το μοντέλο τριών σημείων αλληλεπίδρασης. (α) Εναντιομερές 1, το οποίο αλληλεπιδρά με τον CS σε τρία σημεία. (β) Εναντιομερές 2, μετά από πιθανές περιστροφές, μόνο δύο ομάδες μπορούν να αλληλοεπιδράσουν με δύο σημεία του CS.

1.2. Χειρόμορφοι Επιλογείς στην Ηλεκτροφόρηση Τριχοειδούς

Ο διαχωρισμός χειρόμορφων ενώσεων παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον τις τελευταίες δεκαετίες στη φαρμακοβιομηχανία. Είναι πλέον γνωστό πως τα εναντιομερή μιας ένωσης διαφέρουν στις φαρμακολογικές, τοξικολογικές και βιολογικές τους δράσεις. Για το λόγο αυτό ο FDA, καθώς επίσης και ο EMA, απαιτούν εναντιομερική καθαρότητα των φαρμάκων που διοχετεύονται στην παγκόσμια αγορά. Με την πάροδο του χρόνου και την εξέλιξη της

τεχνολογίας, νέες χρωματογραφικές μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί και εφαρμοστεί με κύριο στόχο τον εναντιομερή διαχωρισμό ενώσεων.

Για περισσότερες από δύο δεκαετίες, υπάρχει έντονο ενδιαφέρον για το χειρόμορφο διαχωρισμό ενώσεων με τη μέθοδο της CE, λόγω της ευελιξίας, της υψηλής αποδοτικότητας διαχωρισμού, της ταχύτητας αλλά και της χαμηλής κατανάλωσης αντιδραστηρίων, δειγμάτων και διαλυτών. Η τεχνική αυτή μπορεί να εφαρμοστεί σε χειρόμορφους αλλά και σε μη χειρόμορφους διαχωρισμούς φαρμακευτικών και βιοϊατρικών δειγμάτων, καθώς επίσης και σε τρόφιμα. Η CE έχει διάφορους λειτουργικούς τρόπους, ανάλογα με τη σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος (Background Electrolyte, BGE) και το είδος του τριχοειδούς. Τα πιο διαδεδομένα είδη ηλεκτροφόρησης είναι η ηλεκτροφόρηση ζώνης τριχοειδούς (Capillary Zone Electrophoresis, CZE), η μυκυλλιακή ηλεκτροκινητική χρωματογραφία (Micellar Electrokinetic Chromatography, MEKC) και η ηλεκτροκινητική χρωματογραφία (Electrokinetic Chromatography EKC) [22].

Σε όλες τις περιπτώσεις της χειρόμορφης CE, ένας ή περισσότεροι CSs τοποθετούνται ως πρόσθετα στην κινητή φάση (το ρυθμιστικό διάλυμα) με στόχο το διαχωρισμό. Η διάκριση των εναντιομερών στην CE επιτυγχάνεται εξαιτίας της ηλεκτροφορητικής τους ευκινήσιας, καθώς και των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των CSs και των αναλυτών. Η εναντιοεκλεκτική αναγνώριση των εναντιομερών από τους CSs βασίζεται στο σχηματισμό προσωρινών διαστερεοϊσομερών συμπλόκων, τα οποία έχουν διαφορετικές κινητικότητες. Επομένως, η διαχωριστική ικανότητα (Resolution, R_s) βασίζεται στις διαφορετικές σταθερές πρόσδεσης των εναντιομερών με τους CSs ή/και στις διαφορετικές κινητικότητες των διαστερεοϊσομερών [18].

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών, διάφοροι CSs έχουν χρησιμοποιηθεί στην CE για χειρόμορφους διαχωρισμούς λόγω των ικανοτήτων τους στη χειρόμορφη αναγνώριση. Μερικοί από αυτούς είναι οι κυκλοδεξτρίνες (Cyclodextrins, CDs), οι κυκλοφρουκτάνες (Cyclofructans, CFs), τασιενεργές ενώσεις, αιθέρους στέμματος, οπτικώς ενεργά μικύλλια, μακροκυκλικά αντιβιοτικά και πρωτεΐνες.

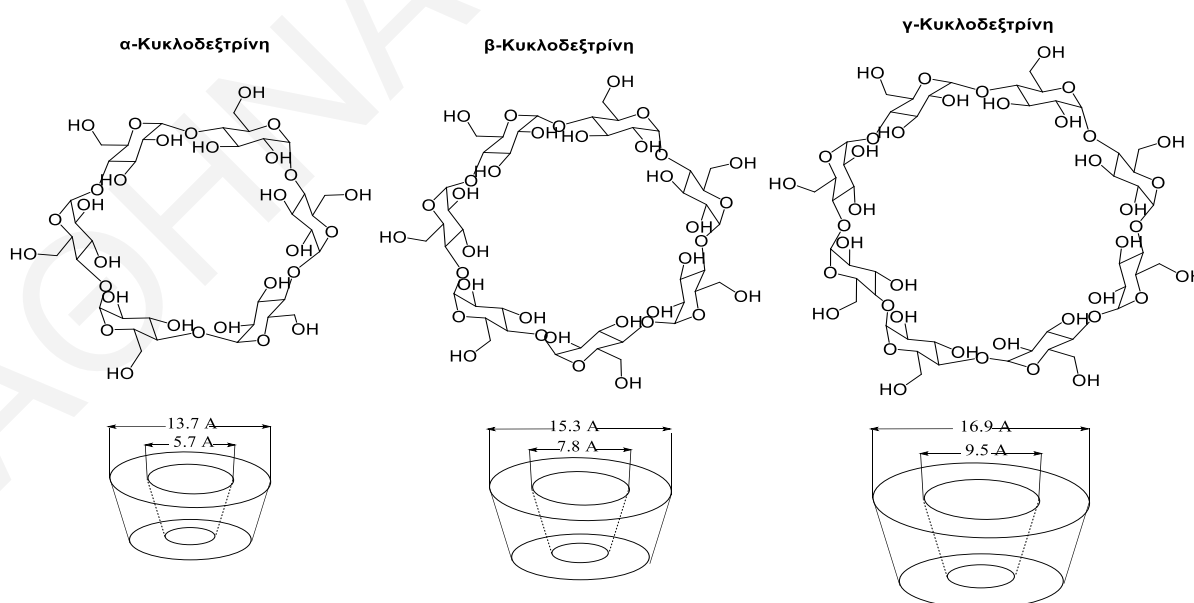
Οι απαιτήσεις που πρέπει να πληρούν οι CSs στην CE είναι χαμηλή απορρόφηση στο UV, υψηλή διαλυτότητα στο νερό και ελάχιστη δυνατή αλληλεπίδραση με τα αρνητικά φορτισμένα τοιχώματα του τριχοειδούς. Μέχρι στιγμής, όπως είναι ήδη γνωστό, στην CE κυριαρχούν οι CDs ως CSs. Από το 2009 και έπειτα, οι CFs προτείνονται επίσης ως μια νέα τάξη επιλογών με ιδιότητες συγκρίσιμες με αυτές των CDs [23].

1.2.1. Κυκλοδεξτρίνες

Οι CDs είναι οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενοι CSs, τόσο σε χρωματογραφικές όσο και σε ηλεκτροφορητικές τεχνικές διαχωρισμού. Υπάρχει μεγάλος αριθμός εμπορικά διαθέσιμων στηλών HPLC που έχουν ως χειρόμορφες στατικές φάσεις (Chiral Stationary Phases, CSPs) διάφορα παράγωγα CDs.

Οι CDs είναι κυκλικοί ολιγοσακχαρίτες που αποτελούνται από 6 μέχρι 8 μονάδες α -D-γλυκοκυρανόζης συνδεδεμένες μεταξύ τους με α -(1,4) γλυκοζιτικούς δεσμούς. Το σχήμα τους προσομοιάζει το σχήμα κόλουρου κώνου. Η εξωτερική επιφάνεια είναι υδρόφιλη, λόγω των δευτεροταγών και πρωτοταγών υδροξυλομάδων που βρίσκονται στο μεγαλύτερο και μικρότερο στόμιο του κώνου, αντίστοιχα. Αντίθετα, η εσωτερική κοιλότητα είναι υδρόφοβη. Το μέγεθος της κοιλότητας μιας CD μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με τον αριθμό των μονάδων γλυκοκυρανόζης (**Σχήμα 1.3**).

Οι CDs μπορούν να αλληλεπιδράσουν με μόρια κατάλληλου μεγέθους για το σχηματισμό συμπλόκων έγκλεισης. Επίσης, οι δευτεροταγείς υδροξυλομάδες μπορούν να παραγωγοποιηθούν, με στόχο το σχηματισμό παραγώγων CDs με επιπλέον σημεία αλληλεπίδρασης ή και διαφορετική πολικότητα. Θεικές CDs (Sulfated CDs, S-CDs), καρβοξυμεθυλικές CDs (Carboxymethyl CDs, CM-CDs), αλκυλικές και αρωματικές CDs έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς σαν CSs στην HPLC και στην CE για το χειρόμορφο διαχωρισμό ουσιών [13, 24].



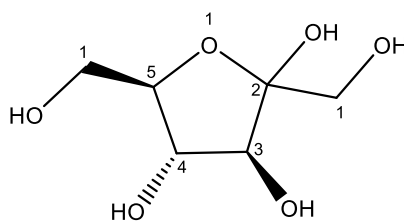
Σχήμα 1.3. Δομική απεικόνιση CDs.

1.2.2. Κυκλοφρουκτάνες

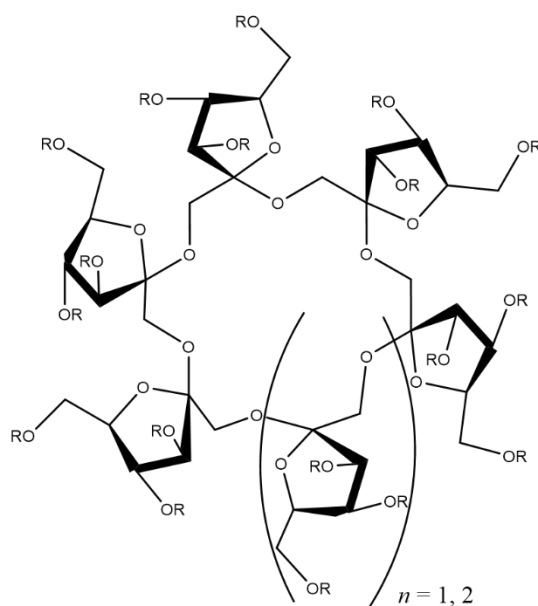
Οι CFs αποτελούν μία ομάδα μακροκυκλικών ολιγοσακχαριτών (γνωστές και ως κυκλοϊνούλο-ολιγοσακχαρίτες) και απαρτίζονται από συνδεδεμένες μονάδες D-φρουκτοφουρανόζης. Αποτελούν προϊόντα του ενζυματικού καταβολισμού (digestion) της ινουλίνης, μια βιολογική διαδικασία που καταλύεται από ένα εξωκυττάριο ένζυμο, την φρουκτανοτρανσφεράση [25, 26].

Η πρώτη χρήση τους ως CSs έγινε το 1998 από τους Sawada et al., διαχωρίζοντας τα εναντιομερή διάφορων αμινοξέων με τη χρήση της φασματομετρίας μάζας (Mass Spectrometry, MS) [27]. Παρόλ' αυτά, δεν ακολούθησαν άλλες μελέτες εφαρμογής στους χειρόμορφους διαχωρισμούς για τα επόμενα χρόνια. Μόλις πρόσφατα έχουν κατασκευαστεί CSPs στήλες HPLC που περιέχουν διάφορα παράγωγα CFs [28-35], ενώ στην CE έχουν δημοσιευτεί ελάχιστες μελέτες [36-39].

Οι CFs αποτελούν ισομερή των CDs. Ωστόσο, σε αντίθεση με τις CDs, οι οποίες έχουν ένα κωνικό σχήμα, οι CFs σχηματίζουν μια δομή δίσκου με μια κεντρική εσοχή [40]. Αποτελούνται από μονάδες D-φρουκτοφουρανόζης (**Σχήμα 1.4**), οι οποίες είναι συνδεδεμένες μεταξύ τους μέσω β-2,1 γλυκοζιτικών δεσμών. Η διάταξη αυτή έχει σαν αποτέλεσμα στο μόριο των CFs να σχηματίζεται ένας σκελετός αιθέρα στέμματος και εξαιτίας αυτού, παρουσιάζουν αρκετές ομοιότητες. Συγκεκριμένα, η κύρια δομή των CFs αποτελείται από ένα σκελετό αιθέρα-στέμματος και μονάδες D-φρουκτοφουρανόζης, οι οποίες είναι συνδεδεμένες πάνω στον αιθερικό δακτύλιο, σχηματίζοντας μια σπειροειδή (spiral) διευθέτηση. Ο αιθερικός δακτύλιος μπορεί να έχει συνδεδεμένες 6, 7, ή 8 μονάδες φρουκτοφουρανόζης, σχηματίζοντας, έτσι, τις φυσικές CF-6, CF-7 και CF-8, αντίστοιχα, οι οποίες παρουσιάζονται στο **Σχήμα 1.5**.



Σχήμα 1.4. Η D-φρουκτοφουρανόζη, δομική μονάδα των CFs.



Σχήμα 1.5. Αναπαράσταση της δομής των CFs, R = H. CF-6, CF-7 (n = 1), και CF-8 (n = 2).

Οι υδροξυλομάδες των μονάδων της φρουκτοφουρανόζης είναι διευθετημένες πάνω από το επίπεδο του δακτυλίου, ενώ οι αλκυλομάδες του δακτυλίου κάτω από το επίπεδο. Έτσι, η πάνω πλευρά θεωρείται σχετικά υδρόφιλη, ενώ η κάτω υδρόφοβη. Επιπλέον, οι υδροξυλομάδες στις θέσεις 3 και 4 συγκλίνουν προς τον αιθερικό δακτύλιο, ενώ οι αλκυλομάδες κάτω από το επίπεδο, κρατούν «διπλωμένο» και σχετικά απομονωμένο τον αιθερικό δακτύλιο [23, 41].

Οι CFs έχουν προταθεί ως CSPs στην GC και στην HPLC για την επίτευξη χειρόμορφων διαχωρισμών. Η ικανότητα τους για εναντιοεκλεκτική αναγνώριση οφείλεται στις χειρόμορφες μονάδες φρουκτοφουρανόζης, από τις οποίες αποτελούνται [28, 30, 31, 34, 35, 42]. Οι φυσικές CFs δεν παρουσιάζουν αξιόλογη εναντιοεκλεκτικότητα, και για το λόγο αυτό έχουν συντεθεί διάφορα παράγωγα των CFs. Υπάρχουν εμπορικά διαθέσιμες στήλες HPLC, οι οποίες έχουν παράγωγα των CFs ως CSPs. Μερικές από αυτές είναι η ισοπροπυλο καρβαμική CF-6 (LARIHC CF6-P), η R-ναφθυλ-αιθυλο καρβαμική CF-6 (LARIHC CF6-RN) και η διμεθυλοφαινυλο καρβαμική CF-7 (LARIHC CF7-DMP). Η LARIHC CF6-RN έχει χρησιμοποιηθεί για τον εναντιομερή διαχωρισμό ενός μεγάλου αριθμού ρακεμικών ουσιών που περιέχουν αμινομάδες. Οι άλλες δύο στήλες, έδειξαν ότι, μπορούν να διαχωρίσουν επίσης και άλλες ενώσεις με διαφορετικές χαρακτηριστικές ομάδες (π.χ. οξέα και σύμπλοκα μετάλλων) [29, 33]. Η παρουσία των αρωματικών ομάδων σε αυτές τις δύο στήλες παίζει σημαντικό ρόλο στην χειρόμορφη ανάλυση, αφού έχει βρεθεί ότι ο

διαχωρισμός μη-πρωτοταγών αμινών με τη χρήση αρωματικών CSPs είναι πολύ καλύτερος απ' ό τι ο διαχωρισμός με χρήση αλειφατικών CSPs.

Στην CE, υπάρχουν ελάχιστες μελέτες στις οποίες γίνεται χρήση των CFs ως CSs για την επίτευξη χειρόμορφων διαχωρισμών. Η ερευνητική ομάδα του D.W. Armstrong εφάρμοσε για πρώτη φορά, το 2009, τις CFs ως CSs στην CE [36]. Συγκεκριμένα, η θειική CF-6 (sulfated CF-6, SCF₆) και θειική CF-7 (sulfated CF-7, SCF₇) προστέθηκαν στο BGE και ένας μεγάλος αριθμός οπιτικά ενεργών αναλυτών διαχωρίστηκε με επιτυχία. Οι ουσίες που εξετάστηκαν ήταν βάσεις και περιείχαν στα μόρια τους αμίνες (πρωτοταγείς, δευτεροταγείς και τριτοταγείς) ως χαρακτηριστικές ομάδες. Οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του θετικά φορτισμένου αναλύτη και της αρνητικά φορτισμένης SCF-6 ή -7, καθώς επίσης και οι δεσμοί υδρογόνου, αποτελούν τον κύριο μηχανισμό του χειρόμορφου διαχωρισμού στην συγκεκριμένη περίπτωση. Σε μια παρόμοια μελέτη από τους Zhang et al., τρεις βασικές φαρμακευτικές ενώσεις (tamsulosin, bupivacaine και tropramide) διαχωρίστηκαν πλήρως με τη χρήση της SCF₆ [37]. Η ισοπροπυλο-καρβαμική CF-6 (isopropylcarbamate CF-6, IP-CF₆) αποτελεί ένα άλλο παράγωγο που χρησιμοποιήθηκε σαν CS στην CE. Υπάρχουν ελάχιστες μελέτες με χρήση της IP-CF₆ στην CE που έχουν δημοσιευτεί μέχρι σήμερα [38, 39]. Σε μια μελέτη από τους Perera et al., χρησιμοποιήθηκε η IP-CF₆ για το χειρόμορφο διαχωρισμό ορισμένων τετραϋδροβενζυλιμιδαζολικών αναλυτών [38]. Σε μια άλλη εργασία [39], μελετήθηκε η ικανότητα της IP-CF₆ να διαχωρίσει διναφθολικά παράγωγα, χωρίς όμως μεγάλη επιτυχία, αφού μόνο το BNP διαχωρίστηκε πλήρως μετά από προσθήκη ιόντων βαρίου μέσα στο BGE.

1.2.3. Χειρόμορφα Ιοντικά Υγρά

Τα ιοντικά υγρά (Ionic Liquids, ILs) είναι οργανικά άλατα, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρόσθετα στην CE. Το κύριο χαρακτηριστικό τους γνώρισμα αποτελεί το χαμηλό σημείο τήξης, που είναι συνήθως ίσο ή μικρότερο των 100 °C [43, 44]. Οι ιδιότητες των ILs (σημείο τήξης, ιξώδες, διαλυτότητα, κτλ.) διαφέρουν ανάλογα με το κατιόν και το ανιόν από τα οποία απαρτίζονται [45]. Τα πιο κοινά ILs είναι αυτά που έχουν ως κατιόν ένα αλκυλιμιδαζολικό κατιόν και ως ανιόν ένα ανόργανο ανιόν, όπως Cl⁻, BF₄⁻, NO₃⁻ ή ένα οργανικό, όπως CH₃COO⁻. Τα ILs παρουσιάζουν ξεχωριστές ιδιότητες, όπως για παράδειγμα μεγάλη θερμική σταθερότητα, μηδαμινή τάση ατμών και δυνατότητα ρύθμισης του ιξώδους και της διαλυτότητάς τους στο νερό ή σε οργανικούς διαλύτες. Λόγω αυτών των μοναδικών χαρακτηριστικών, τα ILs βρίσκουν πολλές εφαρμογές στους διαχωρισμούς με χρήση των GC, HPLC και CE [46-49].

Τα πρώτα ILs χρησιμοποιήθηκαν σαν στατικές φάσεις στην GC και αργότερα στην HPLC, είτε ως στατικές φάσεις είτε ως πρόσθετα στην κινητή φάση [46, 47]. Η προσθήκη τους στην κινητή φάση έδειξε θετική επίδραση στην αποδοτικότητα (Efficiency, N) και στη R_s , βελτιώνοντας τους διαχωρισμούς [50, 51]. Η χρήση των ILs επεκτάθηκε και στην CE, είτε ως στατικές φάσεις είτε ως πρόσθετα ρυθμιστικού διαλύματος για εναντιομερείς διαχωρισμούς [52-54]. Παρ' όλα αυτά, μόνο μερικά ILs έχουν χρησιμοποιηθεί σαν πρόσθετα στο ρυθμιστικό διάλυμα [55-57].

Πρόσφατα, μια νέα γενιά ILs που προέρχονται από αμινοξέα και εστέρες αμινοξέων, έχει συντεθεί από τους Tao et al. [58, 59]. Η σύνθεση των συγκεκριμένων ILs τα καθιστά πιο "πράσινα" σε σύγκριση με τα κοινώς χρησιμοποιούμενα ILs, διότι ως πρόδρομα μόρια χρησιμοποιούνται "βιο-ανανεώσιμα υλικά", αντί συνθετικά χημικά μόρια [59]. Μέχρι τώρα, έχουν συντεθεί αρκετά ILs, των οποίων τα κατιόντα έχουν ως βάση αμινοξέα και τους εστέρες τους, όπως για παράδειγμα η αλανίνη (Ala) και ο τερτ-βουτυλεστέρας της αλανίνης (AlaC₄) [59, 60]. Οι Bwambok et al. χρησιμοποίησαν μια απλή αντίδραση μετάθεσης, με σκοπό να συνθέσουν ILs τα οποία έχουν σαν κατιόν το AlaC₄⁺ και διάφορα ανόργανα ή οργανικά ανιόντα (NO₃⁻, BF₄⁻, γαλακτικό (Lac⁻) και bis(trifluoromethane)sulfonamide (NTf₂⁻)). Πειράματα με χρήση Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, NMR) απέδειξαν ότι αυτά τα ILs παρουσιάζουν εναντιοεκλεκτικές ιδιότητες [60].

Στο πρώτο μέρος της διδακτορικής αυτής διατριβής, συντίθενται χειρόμορφα ILs (Chiral Ionic Liquids, CILs), τα οποία προέρχονται από εστέρες αμινοξέων (Amino Acid Ester Based ILs, AAILs) και χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα στο BGE για να μελετηθεί η δυνατότητά τους να λειτουργήσουν ως οι μοναδικοί CSs, καθώς και η συνεργειακή τους δράση με άλλους CSs (CFs και CDs), με στόχο πιο αποδοτικούς χειρόμορφους διαχωρισμούς.

Η πρωτοτυπία του πρώτου μέρους αυτής έρευνας αποτέλεσε η αξιοποίηση των CFs, καθώς επίσης και των AAILs για τη χειρόμορφη ανάλυση ουσιών κλινικής σημασίας. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν η T4, η NEF, η CTZ και η FXD. Υπάρχει περιορισμένος αριθμός βιβλιογραφικών αναφορών σχετικά με το διαχωρισμό των εν λόγω ενώσεων στην CE. Σε καμία από αυτές δεν αναφέρεται η χρήση των CFs ή των L- και D-AlaC₄Lac ως CSs. Η υφιστάμενη βιβλιογραφία αναφορικά με το διαχωρισμό των κλινικών αυτών ενώσεων και σχετικές λεπτομέρειες περιγράφονται στο Κεφάλαιο 6.1.2.

1.4. Κάνναβη

Η *Cannabis Sativa*, αποτελεί σήμερα το πιο αμφιλεγόμενο φυτό παγκόσμια, εξαιτίας της γνωστής σε όλους ουσίας του, με ψυχοδραστικές ιδιότητες, της Δ⁹-τετραϋδροκανναβινόλης (Δ⁹-tetrahydrocannabinol, THC). Η τελευταία αποτελεί σήμερα ένα από τα πιο διαδεδομένα παράνομα ναρκωτικά [61]. Παράλληλα, το φυτό αυτό είναι γνωστό ανά το παγκόσμιο για τις θεραπευτικές του ιδιότητες και χρησιμοποιείται για ιατρικούς σκοπούς για πάνω από 5000 έτη [62]. Το 19^ο αιώνα μετανάστες μετέφεραν το φυτό στη Β. Αμερική και η χρήση του καθορίστηκε ως παράνομη τη δεκαετία του '30. Από το 1960 η χρήση της κάνναβης αυξήθηκε ραγδαία, μέχρι σήμερα, όπου θεωρείται ως το πιο διαδεδομένο παράνομο φυτό. Τα βότανα (herbal), τα φύλλα γνωστά σε όλους ως μαριχουάνα, καθώς και η ρητίνη του φυτού (αναφέρεται ως χασίς) λαμβάνονται από το φυτό της *Cannabis Sativa*.

Το φυτό της κάνναβης και τα προϊόντα του αποτελούνται από μια πληθώρα χημικών ενώσεων [63]. Ορισμένες από τις πολλές ουσίες του φυτού αποτελούν μοναδικά συστατικά της κάνναβης, όπως για παράδειγμα, τα κανναβινοειδή και τα τερπένια που αποτελούν την πλειοψηφία. Ο όρος «κανναβινοειδή» αντιπροσωπεύει μια ομάδα C₂₁ τερπενοφαινολικών ενώσεων που βρίσκονται μέχρι τώρα μοναδικά στο φυτό *Cannabis Sativa*.

Το ενδιαφέρον προς τη χημεία και τη φαρμακολογία του φυτού που ανήκει στην κατηγορία των *Cannabaceae*, αυξάνεται ραγδαία, έπειτα από την ανακάλυψη των επονομαζόμενων φυσικών κανναβινοειδών ή φυτοκανναβινοειδών. Τουλάχιστον 90 κανναβινοειδείς ενώσεις έχουν απομονωθεί από το φυτό και έχουν χαρακτηριστεί από το 1940. Σημαντική ανακάλυψη και ορόσημο στην ιστορία της κάνναβης, υπήρξε η απομόνωση και ο πλήρης χαρακτηρισμός της κύριας ψυχοδραστικής ένωσης του φυτού, της THC, το 1964 από τον Raphael Mechoulam [64]. Η χρήση της κάνναβης είτε ως πηγή ινών (fibers) ή ως σπόροι ή για θεραπευτικούς σκοπούς, εξαρτάται κατά κύριο λόγο από το λόγο της συγκέντρωσης της THC και της κανναβιδιόλης (Cannabidiol, CBD). Η τελευταία, παρουσιάζει πληθώρα φαρμακευτικών ιδιοτήτων χωρίς καμία ψυχοτρόπο δράση. Συγκεκριμένα, αναλγητικές, αντιοξειδωτικές και αντιεπιληπτικές δράσεις απονέμονται σε αυτή την ένωση, η οποία φαίνεται επίσης να μειώνει και τις ψυχοτρόπες παρενέργειες της THC [65]. Η κανναβινόλη (cannabinol, CBN), ένα άλλο κανναβινοειδές, πιστεύεται ότι προέρχεται από οξείδωση της THC, ως αποτέλεσμα της αποθήκευσής της για παρατεταμένο χρονικό διάστημα και έχει ισχυρές κατασταλτικές ιδιότητες. Πέρα από τα κανναβινοειδή, διάφορες άλλες κατηγορίες μορίων υπάρχουν σε αυτό το σύνθετο φυτό, όπως τα τερπένια, τα φλαβονοειδή, τα

στιλβενιοειδή, αμινοξέα, λιπαρά οξέα, αλκαλοειδή, υδρογονάνθρακες, υδατάνθρακες και φαινόλες [63].

1.4.1. Φαρμακολογία και Φαρμακοκινητική

Η κάνναβη μπορεί να χρησιμοποιηθεί με τη μορφή βοτάνου/φύλλων, αποξηραμένης ρητίνης, ελαίου και σκόνης. Συνήθως, τα φύλλα και η ρητίνη καπνίζονται σε συνδυασμό, όπως ένα κανονικό τσιγάρο (joints) ή υπό μορφή ατμού σε ειδικές συσκευές για κάπνισμα (pipes ή bongs). Η κάνναβη μπορεί επίσης να καταναλωθεί δια στόματος σε διάφορα βρώσιμα προϊόντα (π.χ. σε μπισκότα, κέικ ή τσάι), αφού θερμανθεί επαρκώς για να διασπάσει την ψυχοδραστική ένωση THC [66].

Το κάπνισμα κάνναβης παρέχει την ταχύτερη απορρόφηση στη συστηματική κυκλοφορία του αίματος μέσω των πνευμόνων. Όταν καπνίζεται η κάνναβη, η βιοδιαθεσιμότητα της THC μπορεί να ανέλθει στο 50% και η συγκέντρωση της THC στο πλάσμα κορυφώνεται ανάμεσα στα πρώτα 10 λεπτά. Όταν η κάνναβη λαμβάνεται δια στόματος (κατάποση), τότε η βιοδιαθεσιμότητα ανέρχεται μόνο στο ~6%. Αυτό οφείλεται στην αποικοδόμηση της THC από τα γαστρικά υγρά στα πρώτα στάδια του μεταβολισμού της. Οι μέγιστες συγκεντρώσεις στο πλάσμα επιτυγχάνονται μετά από 1 έως 2 ώρες [67]. Ο άμεσος χρόνος ημιζωής της κατανομής της THC είναι μικρός (λιγότερο από 1 ώρα). Ωστόσο, η αργή απελευθέρωσή της από το λιπώδη ιστό στο αίμα οδηγεί σε μεγαλύτερους χρόνους ημιζωής από 1 μέχρι 4 ημέρες. Στη συνέχεια, η THC υποβάλλεται σε ηπατική ενζυματική διάσπαση οδηγώντας στην παραγωγή διαφόρων μεταβολιτών, με περισσότερες από 20 ενώσεις γνωστές μέχρι σήμερα [68].

Οι δύο κύριοι μεταβολίτες είναι η 11-υδροξύ- Δ^9 -τετραϋδροκανναβινόλη (11- Δ^9 -hydroxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol, THC-OH), η οποία σχηματίζεται με υδροξυλίωση της THC, ακολουθούμενη από περαιτέρω οξειδωση της σε 11-καρβοξύ-τετραϋδροκανναβινόλη (11-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol, THC-COOH). Η THC-OH αποτελεί τον ενεργό μεταβολίτη, με μερική ψυχοδραστική δραστηριότητα, ενώ το THC-COOH είναι ανενεργό και παράγεται μέσα σε λίγα λεπτά από την πρόσληψη της THC. Η τελευταία αποβάλλεται διαμέσου των κοπράνων και των ούρων. Η απέκκριση στα κόπρανα γίνεται μέσω του υδροξυλιωμένου μεταβολίτη (THC-OH), ενώ στα ούρα αποβάλλεται ως το συζυγές γλυκουρονιδικό οξύ του THC-COOH [67, 69].

1.4.2. Επιδράσεις της Κάνναβης

Πέρα των 90 κανναβινοειδών ενώσεων έχουν απομονωθεί από το φυτό της κάνναβης, με την THC και CBD να αποτελούν τις πιο διαδεδομένες ουσίες. Εξ αυτών, η THC, η κύρια

ψυχοτρόπος ένωση, έχει την ιδιότητα να μιμείται τη δράση της ανανδαμίδης, ενός νευροδιαβιβαστή που παράγεται στο ανθρώπινο σώμα.

Οι ψυχοδραστικές επιδράσεις της κάνναβης προκύπτουν από την αλληλεπίδραση της THC με δύο υποδοχείς συζευγμένους με G-πρωτεΐνη, τους υποδοχείς κανναβινοειδών τύπου 1 (CB1R) και 2 (CB2R) [70, 71]. Ο CB1R εκφράζεται κυρίως στον ανθρώπινο εγκέφαλο και η αλληλεπίδραση της THC με τον εν λόγω υποδοχέα είναι υπεύθυνη για την ψυχοτρόπο δράση, το «high» που βιώνουν οι χρήστες κάνναβης [72, 73].

Διάφορα φαρμακευτικά σκευάσματα κάνναβης χρησιμοποιούνται στην κλινική κοινότητα, σε πειραματικό στάδιο, για τη θεραπεία της επιληψίας, της σκλήρυνσης κατά πλάκας, σε νευροπαθητικά άλγη, στην αρθρίτιδα, στη ναυτία και στις εμετικές τάσεις εξαιτίας της χημειοθεραπείας και ως ενισχυτικό της όρεξης σε ασθενείς/φορείς HIV/AIDS, στην κατάθλιψη, σε αγχώδεις διαταραχές και διαταραχές ύπνου, σε ψυχώσεις, στο γλαύκωμα, στο σύνδρομο Tourette και στις νόσους Πάρκινσον, Χάντινγκτον και Αλτσχάιμερ [74-76].

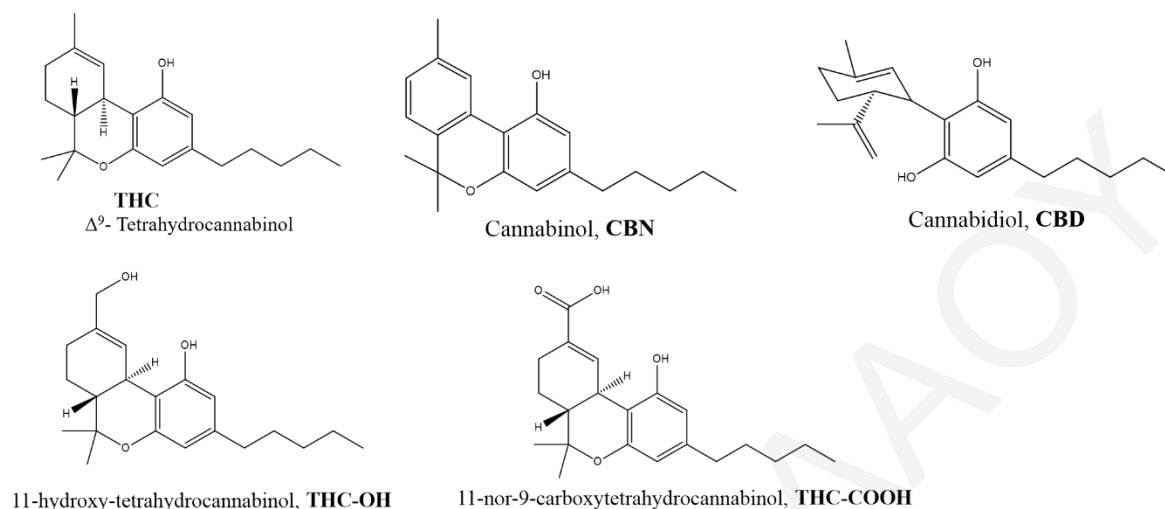
Ως συνέπεια της διαθεσιμότητας των φαρμακευτικών παρασκευασμάτων κάνναβης, υπάρχει αυξανόμενη ζήτηση ανάπτυξης ποιοτικών και ποσοτικών αναλυτικών μεθόδων για τον προσδιορισμό των βιοδραστικών συστατικών της κάνναβης, τόσο σε βιολογικά υγρά όσο και σε φαρμακευτικά σκευάσματα, για τον καθορισμό των συγκεντρώσεων των κανναβινοειδών ενώσεων.

2. Κανναβινοειδείς Ενώσεις στα Βιολογικά Δείγματα

Η νόμιμη χρήση της μαριχουάνας εδραιώνεται σταδιακά σε πολλές πολιτείες ανά το παγκόσμιο. Παρ' όλο που αρχικά το φυτό χρησιμοποιείτο ως ιατρικό βάλσαμο και βότανο εδώ και 5000 χρόνια, η επέκταση της χρήσης του για «ψυχαγωγικούς σκοπούς» εξαιτίας της ψυχοδραστικής ουσίας του, το έχει καθιερώσει ως ένα από τα πιο αμφιλεγόμενα παράνομα ναρκωτικά [62]. Η παράνομη χρήση της κάνναβης, οδήγησε στη θέσπιση διεθνών νομοθεσιών με σκοπό τον έλεγχο της κατάχρησης, ειδικότερα σε περιπτώσεις, όπως η οδήγηση κάτω από την επήρεια ναρκωτικών, εγκλήματα συνδεδεμένα με χρήση ναρκωτικών, η χρήση ναρκωτικών ουσιών στο χώρο εργασίας, σε δικαστικές διαμάχες αναφορικά με την επιμέλεια παιδιών, σε ελέγχους “doping” και σε τοξικολογικές και δικανικές υποθέσεις [77].

Ανάμεσα στις ουσίες που μελετώνται, τα κανναβινοειδή, λαμβάνουν ολοένα και μεγαλύτερη σημασία, και όχι άδικα, αφού η κάνναβη είναι μακράν το πιο ευρέως καλλιεργημένο, διακινούμενο και χρησιμοποιούμενο παράνομο ναρκωτικό. Τα πιο διαδεδομένα κανναβινοειδή, τα οποία προέρχονται από το φυτό της κάνναβης, είναι η CBN, CBD, καθώς

επίσης και η κύρια ψυχοδραστική ουσία του φυτού, η THC, με τους μεταβολίτες της, THC-OH και THC-COOH. Οι δομές των ενώσεων αυτών παρουσιάζονται στο **Σχήμα 2.1**.



Σχήμα 2.1. Δομές των συνηθέστερων κανναβινοειδών i) THC, ii) THC-OH, iii) THC-COOH, iv) CBN και v) CBD.

Στις μέρες μας, η ανίχνευση ορισμένων ναρκωτικών ουσιών μπορεί να γίνει επιτόπου, με τη χρήση συσκευών συλλογής σάλιου [78]. Ο όγκος των δειγμάτων που συλλέγεται σε αυτές τις αναλύσεις είναι πολύ μικρότερος από αυτών που συλλέγονται κατά την ανάλυση αίματος ή ούρων. Επομένως, οι συγκεντρώσεις των ανιχνευόμενων ουσιών βρίσκονται σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα, γεγονός που οδηγεί σε περιορισμούς στην ανάπτυξη μιας αναλυτικής μεθόδου [79]. Σε αυτές τις περιπτώσεις, όπου η ανίχνευση των ουσιών πραγματοποιείται με τεχνικές ανοσοδοκιμασίας (immunoassay screening), ακολουθεί πάντοτε μια δεύτερη χρωματογραφική ανάλυση, για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης και επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων [80-91]. Οι αναλύσεις αυτές περιλαμβάνουν, κυρίως, την GC-MS ή την υγρή χρωματογραφία σε σύζευξη με διαδοχική φασματομετρία μαζών (Liquid Chromatography tandem MS, LC-MS/MS). Στο σάλιο, η THC αποτελεί τον κυρίαρχο βιοδείκτη, ενώ οι συγκεντρώσεις του THC-COOH περιορίζονται σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα. Ένα άλλο σημαντικό εμπόδιο που προκύπτει είναι η δυσκολία στην συλλογή του δείγματος από τη συσκευή δειγματοληψίας, ειδικότερα όταν πρόκειται για την ανάλυση τέτοιων λιπόφιλων ουσιών, όπως είναι τα κανναβινοειδή.

Το αίμα και τα ούρα εξετάζονται ως προς την παρουσία της THC ή/και των μεταβολιτών της. Τα ούρα αποτελούν το συνηθέστερο δείγμα που εξετάζεται, εξαιτίας των υψηλότερων συγκεντρώσεων των ουσιών κατάχρησης, αλλά και του μεγαλύτερου, χρονικά, παραθύρου

ανίχνευσης. Τα κανναβινοειδή και ειδικότερα οι μεταβολίτες, ανιχνεύονται στα ούρα μέχρι περίπου 3-4 ημέρες (περιστασιακή χρήση) και έως και μερικές εβδομάδες σε χρόνιους χρήστες (καθημερινή κατάχρηση) [87, 92].

Αντίστοιχα κατά την ανάλυση δειγμάτων αίματος, η παρουσία της THC, καθώς επίσης και της φάσης I και II μεταβολιτών της, THC-OH και THC-COOH, αντίστοιχα, καταδεικνύει πρόσφατη χρήση, αντανακλώντας δοσολογίες των ναρκωτικών για μερικές ώρες. Έτσι το αίμα θεωρείται ως εναλλακτικό της ανάλυσης σάλιου [83, 92-94].

Τα ούρα και το αίμα αποτελούν τα συνηθέστερα δείγματα που εξετάζονται για τον προσδιορισμό της κατάχρησης ουσιών. Η ανίχνευση πραγματοποιείται άμεσα σε κλινικά εργαστήρια με χρήση επικυρωμένων χρωματογραφικών μεθόδων. Παρ' όλα αυτά, η ανάλυση αυτών των δειγμάτων παρουσιάζει μερικούς περιορισμούς στη διαδικασία συλλογής, αλλά και στην ανιχνευσιμότητα των ουσιών, εξαιτίας του σύντομου χρόνου ημιζωής των ουσιών σε αυτά τα βιολογικά δείγματα.

Στα τέλη της δεκαετίας του 2000, άλλα βιολογικά υγρά εκτός των ούρων, όπως το σάλιο, ο ιδρώτας ακόμη και τις τρίχες κεφαλής, προτάθηκαν ως εναλλακτικά για τη χαρτογράφηση των ουσιών κατάχρησης. Η ανάλυση μαλλιών θεωρείται ως μια εναλλακτική αλλά και πλέον εδραιωμένη, από τα τέλη της δεκαετίας του '80, μέθοδος για την ανίχνευση ναρκωτικών [81, 82, 84, 89, 95-100]. Η συλλογή δειγμάτων δεν είναι επεμβατική και είναι εύκολο να πραγματοποιηθεί υπό συνθήκες που αποτρέπουν τη νοθεία των αποτελεσμάτων από τον ίδιο τον χρήστη. Το σημαντικότερο πλεονέκτημα της ανάλυσης τριχών κεφαλής συγκριτικά με την ανάλυση ούρων ή αίματος, είναι το μεγαλύτερο παράθυρο ανίχνευσης (εβδομάδες έως μήνες, ανάλογα με το μήκος της τρίχας, έναντι των 2-4 ημερών στο αίμα ή στα ούρα). Για σκοπούς εγκυρότητας των αποτελεσμάτων, οι δύο δοκιμές αλληλοσυμπληρώνονται. Με αυτόν τον τρόπο, η ανάλυση ούρων και αίματος παρέχουν βραχυπρόθεσμες πληροφορίες για την κατάχρηση ναρκωτικών, ενώ μέσω της ανάλυσης τριχών κεφαλής, μπορούν να ληφθούν σημαντικές πληροφορίες αναφορικά με το ιστορικό της κατάχρησης [101].

Παρ' όλα τα πλεονεκτήματα που παρέχει η τοξικολογική ανάλυση τριχών κεφαλής, η ανάγκη για τον προσδιορισμό των βασικών μηχανισμών ενσωμάτωσης ναρκωτικών ουσιών στις τρίχες παραμένει. Οι διαφορές στις συγκεντρώσεις κατά μήκος της τρίχας μπορεί να οδηγήσουν σε λανθασμένα συμπεράσματα αναφορικά με το ιστορικό χρήσης και κατ' επέκταση σε λανθασμένη διάκριση μεταξύ παθητικού και ενεργητικού χρήστη. Ο Moosmann και οι συνεργάτες του αναφέρουν στην εργασία τους την ανίχνευση του Δ^9 -τετραϋδροκανναβινολικού οξέος A (Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid A, THCA-A), του

βιογενετικού πρόδρομου (biogenetic precursor) μορίου της THC, σε τρίχες κεφαλής ατόμων που επεξεργάζονταν κάνναβη, χωρίς όμως να κάνουν χρήση. Αυτή η ομάδα τονίζει την αναγκαιότητα για την έγκυρη αξιολόγηση της ενσωμάτωσης των ουσιών στα βιολογικά δείγματα με σκοπό την αποφυγή λανθασμένων αποτελεσμάτων κατά την τοξικολογική ανάλυση τριχών κεφαλής [102].

2.1. Προσδιορισμός Κανναβινοειδών Ενώσεων με Χρήση της LC-MS/MS

Οι εξαρτησιογόνες ναρκωτικές ουσίες αποτελούν μια σημαντική ανησυχία, η οποία επηρεάζει κάθε πτυχή της σημερινής κοινωνίας. Συνεπώς, αυξάνεται ολοένα η ανάγκη για ανάπτυξη νέων μεθόδων για τον αποτελεσματικό προσδιορισμό ουσιών κατάχρησης, αλλά και των μεταβολιτών τους στα βιολογικά δείγματα. Οι τυπικές μέθοδοι για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των ουσιών αυτών είναι οι ανοσοδοκιμασίες, ακολουθούμενες πάντοτε από μια χρωματογραφική μέθοδο (GC-MS, LC-MS), λόγω της αυξημένης αναλυτικής ευαισθησίας που παρέχουν στους χρήστες τους [67, 80, 82, 86, 87, 95, 103-111]. Η προετοιμασία των δειγμάτων αποτελεί εξίσου σημαντική παράμετρο της ανάλυσης, εξαιτίας της δυσκολίας εκχύλισης των ουσιών αυτών από τη μήτρα, καθώς και της μεγάλης ευαισθησίας που παρουσιάζουν λόγω της ταχύτατης οξειδωσης τους στην παρουσία φωτός ή ατμοσφαιρικού αέρα [112].

Τα ούρα και το αίμα είναι τα συνήθη μέσα ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης των ουσιών αυτών και υπάρχουν αρκετές βιβλιογραφικές αναφορές που μελετούν τον προσδιορισμό των κανναβινοειδών με διάφορες τεχνικές, κυρίως χρωματογραφικές, όπως η HPLC και η GC, αλλά και πιο σπάνια ηλεκτροφορητικές, όπως η CE [113, 114]. Τα τελευταία χρόνια, το ενδιαφέρον στρέφεται προς νέα δείγματα που δίνουν περισσότερες πληροφορίες σχετικά με το ιστορικό της κατάχρησης.

Η πιο πολυσυζητημένη ένωση, η THC, αποτελεί τον βασικότερο αναλύτη-στόχο στις βιβλιογραφικές μελέτες. Υπάρχει, μέχρι στιγμής, σημαντικός αριθμός μελετών αναφορικά με τον προσδιορισμό της THC ή/και των μεταβολιτών της στο αίμα και στα ούρα με χρήση της GC-MS έπειτα από εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction, SPE) ή υγρής φάσης (Liquid-Liquid Extraction, LLE) και παραγωγοποίηση των εξεταζόμενων ενώσεων [97, 105, 115, 116]. Τα σημαντικότερα μειονεκτήματα της τεχνικής GC-MS είναι η χρονοβόρα διαδικασία επεξεργασίας των δειγμάτων και η ανάγκη για εφαρμογή διαφόρων τεχνικών για παραγωγοποίηση των μη-πτητικών και θερμοευαίσθητων αυτών ενώσεων. Γενικότερα, αυτές οι μέθοδοι παρουσιάζουν μειωμένη αναλυτική ευαισθησία ή εκλεκτικότητα και δυσχεραίνουν τον προσδιορισμό των κανναβινοειδών. Την τελευταία

δεκαετία, τεχνικές όπως οι LC-MS ή LC-MS/MS με χρήση, κυρίως, ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (electrospray ionization, ESI) κρίνονται καταλληλότερες για τον προσδιορισμό ουσιών κατάχρησης, όπως η THC και οι κύριοι μεταβολίτες της [108, 117, 118].

Σε μια πληθώρα ερευνητικών εργασιών, περιγράφονται διάφορες μέθοδοι που βασίζονται στις τεχνικές LC και Υγρής Χρωματογραφίας Υπερύψηλης Απόδοσης (Ultra-High Performance/Pressure LC, UHPLC) για τον προσδιορισμό των φυσικών κανναβινοειδών σε διαφορετικές μήτρες. Υπογραμμίζουν επίσης τη σημασία των τεχνικών αυτών, καθώς και τις αξιοσημείωτες εξελίξεις στην ευαισθησία και στην ευελιξία που παρέχουν στους χρήστες. Ενώ στη δεκαετία του 2000 κυριαρχούσε η χρήση συμβατικών μεθόδων HPLC, τα τελευταία χρόνια αυξάνεται δραματικά ο αριθμός των δημοσιεύσεων, στις οποίες χρησιμοποιούνται μέθοδοι UHPLC για τον προσδιορισμό των φυσικών κανναβινοειδών στο φυτό *Cannabis Sativa*, σε εμπορικά διαθέσιμα προϊόντα κάνναβης, καθώς και σε ανθρώπινα βιολογικά εκκρίματα.

Για τον προσδιορισμό των φυσικών κανναβινοειδών σε ένα LC σύστημα υπάρχουν διάφορες εμπορικά διαθέσιμες στήλες, με τις C18 να αποτελούν τις κυρίαρχες και ενίοτε τις C8 ή τις φαίνυλο- στήλες. Το ακετονιτρίλιο (ACN), η μεθανόλη (MeOH) και το νερό με μικρό ποσοστό, συνήθως 0.1%, μυρμηκικού οξέος (HCOOH) ή οξικού οξέος (CH₃COOH), ή διάφορα ρυθμιστικά διαλύματα μυρμηκικού ή οξικού άλατος, αποτελούν συνήθως την κινητή φάση, με ρυθμό ροής κυμαινόμενο από 0.2 έως 1.5 mL/min, ανάλογα με τη χρήση συστήματος HPLC ή UHPLC.

Η κατεργασία των δειγμάτων μπορεί να ποικίλει ανάλογα με τη μήτρα που εξετάζεται κάθε φορά. Στόχος είναι η εκλεκτική και αποτελεσματική απομάκρυνση των κανναβινοειδών ενώσεων από την εξεταζόμενη μήτρα και τέλος η ανίχνευση τους. Διάφορες τεχνικές έχουν αναπτυχθεί για την ταχύτερη και αποτελεσματικότερη απομόνωση των ουσιών αυτών όπως η LLE, η SPE, καθώς και διάφορες αυτοματοποιημένες τεχνικές επεξεργασίας δειγμάτων, για τη μείωση της πολυπλοκότητας και του χρόνου ανάλυσης των ιδιαίτερων αυτών δειγμάτων [119]. Οι αυτοματοποιημένες τεχνικές παρέχουν στο χρήστη τη δυνατότητα ταυτόχρονης επεξεργασίας μεγάλου αριθμού δειγμάτων, γεγονός μεγάλης σημασίας σε διάφορα τοξικολογικά εργαστήρια.

2.1.1 Προσδιορισμός σε Συνηθισμένα Βιολογικά Δείγματα

Το αίμα αποτελεί ένα από τα συνηθέστερα δείγματα τοξικολογικής ανάλυσης, με αναλύσεις αίματος (whole blood), πλάσματος ή ορού αίματος. Οι μέθοδοι επεξεργασίας των δειγμάτων

αίματος περιορίζονται στη χρήση κυρίως της SPE, της LLE και πρόσφατα ολοένα αυξάνεται ο αριθμός των αυτοματοποιημένων εκδοχών της SPE. Χρησιμοποιούνται διάφοροι οργανικοί διαλύτες εκχύλισης, όπως η MeOH, το ACN, το εξάνιο, ο αιθυλεστέρας κ.ά., ή και μίγματα των διαλυτών αυτών.

Βασικός βιοδείκτης στο αίμα αποτελεί η THC, καθώς επίσης και οι μεταβολίτες της THC-OH και THC-COOH. Μέχρι στιγμής υπάρχουν διάφορες μέθοδοι για τον προσδιορισμό κανναβινοειδών ενώσεων στο αίμα και ορισμένες μελέτες εξετάζουν τη συσχέτιση της χορηγημένης ποσότητας και της τελικά ανιχνεύσιμης στο αίμα, καθώς επίσης και του χρονικού πλαισίου ανίχνευσης.

Σε μια προσπάθεια προσδιορισμού βιοδεικτών κανναβινοειδών ενώσεων στο αίμα και στο πλάσμα, οι Schwore et al. μελέτησαν κυρίως την THC [120]. Πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε περιστασιακούς χρήστες κάνναβης, έδειξαν ότι η THC ανιχνευόταν στο αίμα για 6 ώρες μετά το κάπνισμα. Οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι τα αποτελέσματα της ανιχνεύσιμης κάνναβης σχετίζονταν ευκολότερα με το χρόνο πρόσληψης, παρά με τις καθορισμένες συγκεντρώσεις της THC, οι οποίες χορηγήθηκαν στους εθελοντές. Τα ευρήματα τους επιβεβαιώθηκαν με μαθηματικά μοντέλα που ανέπτυξαν, με σκοπό τη συσχέτιση του χρόνου από την τελευταία χρήση, και της ανιχνεύσιμης THC στο πλάσμα και στο αίμα σε ένα διάστημα εμπιστοσύνης 95%.

Οι König et al., καθιέρωσαν μια αυτοματοποιημένη SPE μέθοδο σε σύνδεση με το LC-MS/MS σύστημα, με στόχο τον ποσοτικό προσδιορισμό της THC και δύο μεταβολιτών της στο περιφερικό αίμα [118]. Η καταβύθιση πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με ACN, ενώ πραγματοποιήθηκε προ-συγκέντρωση του δείγματος πριν την ανάλυση με χρήση μιας C18 στήλης. Οι ερευνητές τονίζουν πως η αυτοματοποίηση μέσω της online SPE οδηγεί σαφέστατα σε ευκολότερες και ταχύτερες διαδικασίες προετοιμασίας δειγμάτων για την εξαγωγή των κανναβινοειδών.

Το THCA-A, το βιοσυνθετικό πρόδρομο μόριο της THC στα φυτά κάνναβης, δεν έχει ψυχοτρόπες επιδράσεις. Μπορεί να βρίσκεται στον καπνό της κάνναβης, αλλά όχι σε φαρμακευτικά σκευάσματα, τα οποία εμπεριέχουν μόνο THC, ενώ παράλληλα μπορεί να ανιχνευθεί στο αίμα και στα ούρα. Στόχος των Raikos et al. ήταν η ανάπτυξη μιας αξιόπιστης μεθόδου για τον προσδιορισμό THCA-A στο ανθρώπινο αίμα ή πλάσμα χρησιμοποιώντας την τεχνική LC-MS/MS [109]. Συλλέχθηκαν 58 δείγματα αίματος και πλάσματος από οδηγούς με ενδείξεις ότι οδήγησαν υπό την επήρεια κάνναβης. Οι ερευνητές αξιοποίησαν μια υπάρχουσα μέθοδο LC-MS/MS [118] έπειτα από τροποποίησή της. Η ανίχνευση τόσο

της THC, όσο και του THCA-A σε όλα τα δείγματα, υποδηλώνει κατάχρηση και όχι τη χορήγηση φαρμακευτικής THC.

Σε μια άλλη μελέτη, η THC και οι μεταβολίτες της μαζί με άλλα δευτερεύοντα κανναβινοειδή, εξετάστηκαν ως πιθανοί βιοδείκτες για την ένδειξη πρόσφατης χρήσης κάνναβης (στο αίμα) με παράθυρο ανίχνευσης που βρέθηκε να κυμαίνεται από 6-8 ώρες [110]. Τα υπό μελέτη κανναβινοειδή εκχυλίστηκαν με καλή αποδοτικότητα με χρήση των WAX-S tips (DPX). Η αξιοποίηση της εν λόγω τεχνικής εκχύλισης οδήγησε, σύμφωνα με τους ερευνητές της εργασίας αυτής, σε σημαντική μείωση του χρόνου ανάλυσης, μείωση της κατανάλωσης διαλύτη, ενώ παράλληλα σημειώθηκαν χαμηλά όρια ποσοτικοποίησης (Limits of Quantitation, LOQs) και χαμηλή επίδραση του υλικού της μήτρας.

Τα ούρα, μέχρι στιγμής, φαίνεται να αποτελούν το προτεινόμενο μέσο ανάλυσης ναρκωτικών ουσιών, η συλλογή του οποίου είναι εύκολη και σχετικά άμεση. Οι ναρκωτικές ουσίες και οι μεταβολίτες τους μπορούν να ανιχνεύονται για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στα ούρα σε αντίθεση με τα το αίμα ή το σάλιο [121, 122]. Πριν την ανάλυσή τους συνήθως υποβάλλονται σε μία διαδικασία υδρόλυσης με στόχο τη μετατροπή των συζυγών ενώσεων τους (γλυκουρονίδια), στους αντίστοιχους ελεύθερους μεταβολίτες τους. Για την αποφυγή των λανθασμένων θετικών ή αρνητικών ενδείξεων, είναι απαραίτητο να προσδιοριστούν αρχικά τα πιθανώς θετικά δείγματα με διάφορες μεθόδους ανοσοδοκιμασίας. Η βασική αρχή αυτών των τεστ, είναι η χρήση αντισωμάτων με την ιδιότητα να συνδέονται με τα μόρια στόχος. Η εκλεκτικότητα αυτής της τεχνικής είναι περιορισμένη, ανάλογα με την εξειδίκευση των αντισωμάτων. Ψευδώς θετικά αποτελέσματα μπορεί να προκύψουν, εάν παρεμβάλλονται στη δοκιμή χημικά και δομικά παρόμοιες ουσίες του εξεταζόμενου ναρκωτικού. Μια συγκέντρωση δείγματος κάτω από το αποδεκτό όριο ή μια αραίωση ή νοθεία του δείγματος για να συγκαλυφθεί η παρουσία ενός ναρκωτικού μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Δυστυχώς, σε τέτοιες δοκιμές θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι παρεμβολές των χημικά παρόμοιων ουσιών. Επομένως, τα αρχικά θετικά αποτελέσματα ανοσοδοκιμασίας πρέπει πάντοτε να επιβεβαιώνονται με μια δεύτερη, πιο εξειδικευμένη μέθοδο ανάλυσης, όπως η MS.

Σε μια εργασία από τους Montesano et al. αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε μια μέθοδος LC-MS/MS για τον προσδιορισμό των THC-COOH, THC, THC-OH, CBD και CBN στα ούρα [123]. Συνδυασμός υδρόλυσης, ενζυματικής και βασικής, αποδείχθηκε βέλτιστος για ανίχνευση των επιλεγμένων ενώσεων στα ούρα. Τα πλεονεκτήματα αυτής της μελέτης είναι ο μειωμένος χρόνος και συγκέντρωση των ενζύμων και, κατ' επέκταση, το μειωμένο κόστος της ανάλυσης. Λήφθηκαν ικανοποιητικές τιμές ανάκτησης από 65 μέχρι 85% για όλους τους

αναλύτες, χαμηλή επίδραση υλικού της μήτρας (<18%) και η χρωματογραφική ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε διάστημα μόλις 3 λεπτών.

Το στοματικό υγρό, ή σάλιο, χρησιμοποιείται, ειδικότερα στις μέρες μας, για κλινικές και τοξικολογικές αναλύσεις. Μπορεί να συλλέγεται επί τόπου, μη επεμβατικά και ταυτόχρονα μπορούν να συλλέγονται πολλά δείγματα, μειώνοντας παράλληλα τη δυνατότητα νοθείας, αφού η συλλογή γίνεται στην παρουσία των κρατικών αρχών. Επιπλέον, παρουσιάζει χαμηλότερο βιολογικό κίνδυνο κατά τη συλλογή του και παρέχει τη δυνατότητα διάκρισης πρόσφατης κατάχρησης ουσιών. Τα κανναβινοειδή, αποτελούν τους πιο διαδεδομένους αναλύτες της τοξικολογικής έρευνας και επομένως, η εφαρμογή της εξέτασης σάλιου απαιτεί επαρκή επιστημονικά δεδομένα για την υποστήριξη της εγκυρότητας της ανίχνευσης των ευαίσθητων αυτών ενώσεων. Το σάλιο είναι μια πολύπλοκη μήτρα και η διαθέσιμη ποσότητα δείγματος είναι περιορισμένη, ειδικότερα μετά το κάπνισμα της μαριχουάνας, γεγονός που μπορεί να αποτελεί εμπόδιο στην ανάλυση.

Η THC θεωρείται ως βιολογικός δείκτης της χρήσης κάνναβης στο σάλιο δηλώνοντας μάλιστα πρόσφατη λήψη της ουσίας. Ωστόσο, απαιτούνται επιπλέον βιοδείκτες για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων, προς αποφυγή λανθασμένων ενδείξεων όπως για παράδειγμα στην περίπτωση της παθητικής εισπνοής καπνού. Η ταυτοποίηση του THC-COOH, μπορεί να αποτελέσει επιπλέον στοιχείο υποδηλώνοντας και πάλι πρόσφατη κατάχρηση, καθώς επίσης και ο προσδιορισμός των ουσιών CBD ή/και CBN.

Σε μια μελέτη των Concheeiro et al., αναπτύχθηκε μια αναλυτική μέθοδος LC-MS για ταυτόχρονη ποσοτικοποίηση των THC, THC-COOH, CBD και CBN στο σάλιο. Τα ποσοστά ανάκτησης των ενώσεων κυμάνθηκαν από 52.4–109.2%, της αποδοτικότητας της μεθόδου από 12.2–88.9% και της επίδρασης της μήτρας από –86% μέχρι –6.9% [124].

Επί του παρόντος, υπάρχει σημαντικός αριθμός βιβλιογραφικών αναφορών στις οποίες διάφορα βιολογικά δείγματα εξετάζονται συνδυαστικά με στόχο τη μέγιστη πληροφόρηση αναφορικά με την ανίχνευση των ουσιών αυτών. Η βιβλιογραφία αυτή βασίζεται κυρίως σε οργανωμένες μελέτες, στις οποίες πραγματοποιείται χορήγηση ελεγχόμενης δοσολογίας κάνναβης σε έμπειρους χρήστες. Αντίθετα, η έρευνα αναφορικά με τη διακύμανση των συγκεντρώσεων της THC, μετά τη χρήση, είναι περιορισμένη. Με σκοπό την έρευνα των εναπομενόντων επιπέδων κάνναβης στο αίμα, στα ούρα και στο σάλιο, ο Odell και οι συνεργάτες του, έλαβαν δείγματα 1 φορά την ημέρα για 7 ημέρες από 21 εθελοντές, δεδομένου της αποχής τους από κάθε χρήση της κάνναβης [125]. Τα δείγματα αίματος και σάλιου εξετάστηκαν για THC, ενώ τα δείγματα ούρων για τον μεταβολίτη THC-COOH. Σε

ορισμένα άτομα, η THC ήταν ανιχνεύσιμη στο αίμα για τουλάχιστον 7 ημέρες και τα δείγματα σάλιου ήταν θετικά ως προς την THC έως και 78 ώρες μετά την πρώτη συλλογή δείγματος. Σύμφωνα με αυτά τα αποτελέσματα, οι ερευνητές υποστηρίζουν ότι η κινητική της THC στο ανθρώπινο σώμα δεν είναι τόσο απλή, όσο πιστεύαν προηγουμένως. Προτείνουν ακόμη την καθιέρωση ενός αξιόπιστου αλγορίθμου για τη μαθηματική μοντελοποίηση του μεταβολισμού THC σε χρήστες για να διασαφηνιστεί η μεταβολική αποβολή της THC.

2.1.2 Προσδιορισμός σε μη-Συνηθισμένα Βιολογικά Δείγματα

Τα τελευταία χρόνια, αξιοσημείωτες εξελίξεις στις ευαίσθητες αναλυτικές μεθόδους επιτρέπουν τον προσδιορισμό ναρκωτικών ουσιών σε μη-συνηθισμένα βιολογικά δείγματα, όπως είναι οι τρίχες κεφαλής. Τα πλεονεκτήματα αυτών των δειγμάτων έναντι των παραδοσιακών, είναι ότι η συλλογή τους γίνεται μη επεμβατικά και μπορεί να επιβλέπεται, ώστε να μην υπάρχει δυνατότητα αλλοίωσης των αποτελεσμάτων από τον χρήστη. Επίσης, η συλλογή υλικού μπορεί να γίνει από άτομο που δεν πρέπει κατ' ανάγκη να ανήκει στην ιατρική κοινότητα, όπως στην περίπτωση της αιμοληψίας. Το παράθυρο ανίχνευσης στη μελέτη τέτοιου τύπου δείγματος αυξάνεται σημαντικά σε εβδομάδες, μέχρι και μήνες, δίνοντας, επίσης, σημαντικές πληροφορίες σχετικά με το ιστορικό της χρήσης.

Η ένωση THC-COOH αποτελεί τον βιοδείκτη ανίχνευσης της κάνναβης στις τρίχες κεφαλής. Διάφοροι οργανισμοί, όπως οι SoHT (Society of Hair Testing) και SAMHSA (Substance Abuse and Mental Health Services Administration) έχουν συσταθεί, με στόχο την προώθηση κατευθυντήριων γραμμών αναφορικά με τη συλλογή, επεξεργασία και ανάλυση τριχών κεφαλής. Στις οδηγίες αυτές αναφέρονται επίσης και οι συγκεντρώσεις-όρια (cut offs), κάτω από τα οποία η ανίχνευση των ουσιών δεν είναι αποδεκτή.

Οι Montesano et al. χρησιμοποίησαν μια αυτοματοποιημένη εκχύλιση υγρού υπό πίεση (Pressurized liquid extraction, PLE) στην εργασία τους. Το εκχύλισμα στη συνέχεια καθαρίστηκε με SPE και ακολούθησε ανάλυση του σε σύστημα HPLC-MS/MS. Οι μέθοδοι PLE-SPE παρείχαν μια αποτελεσματική εκχύλιση και καθαρισμό των δειγμάτων (τρίχες κεφαλής), με την ελάχιστη κατανάλωση οργανικών διαλυτών, επιτρέποντας παράλληλα σημαντική μείωση της επίδρασης της μήτρας. Η τελευταία κυμάνθηκε από -7 μέχρι -12 για όλα τα κανναβινοειδή [89]. Η απόδοση της PLE αξιολογήθηκε με σύγκριση μεταξύ τεσσάρων θετικών δειγμάτων και διαλυμάτων αναφοράς. Όλα υποβλήθηκαν σε εκχύλιση PLE και σε πέψη με NaOH, ενώ υψηλότερες ανακτήσεις (86%-100%) ελήφθησαν χρησιμοποιώντας PLE για όλες τις προσδιοριζόμενες ουσίες, εκτός από την CBN. Σύμφωνα

με τα αποτελέσματα τους, η χρήση PLE υπήρξε ιδανική καθώς η ανάκτηση του THC-COOH ήταν υψηλότερη.

Μία άλλη ερευνητική ομάδα του Πανεπιστημίου του Sheffield κατόρθωσε για πρώτη φορά να ανιχνεύσει την THC και τους μεταβολίτες της THC-COOH, THC-OH και THC-COO-glu, καθώς επίσης και την CBN και CBD σε μία μόνο τρίχα μαλλιών, με τη βοήθεια της τεχνικής Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization MS (MALDI-MS) [126]. Πραγματοποιήθηκε επίσης παραγωγοποίηση των ενώσεων για βελτίωση της απόδοσης του ιοντισμού, επιτρέποντας την ανίχνευση των ουσιών.

Παρ' όλο που η ανάλυση τριχών κεφαλής έχει καθιερωθεί σε τοξικολογικές αναλύσεις ρουτίνας, ορισμένες ερευνητικές ομάδες αμφισβητούν την ανάλυση αυτή, υποστηρίζοντας ότι η εύρεση κανναβινοειδών στις τρίχες κεφαλής δεν καταδεικνύει πάντα τη χρήση κάνναβης. Ο ισχυρισμός τους βασίζεται στην πιθανότητα της εξωτερικής επιμόλυνσης δειγμάτων π.χ. από επαφή με μολυσμένα χέρια ή μέσω του καπνού που μπορεί να επιμολύνει το δείγμα, καθώς αυτό είναι φυσικά εκτεθειμένο. Πολλοί ερευνητές επισημαίνουν τη σημασία της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων κατά την εξέταση για πιθανή χρήση ναρκωτικών στο χώρο εργασίας και σε περιπτώσεις επιμέλειας των παιδιών σε δικαστικές διαμάχες κ.ά. [102]. Η ανάλυση τριχών κεφαλής εφαρμόζεται εκτενώς σε τέτοιες περιπτώσεις, αν και σημαντικές πληροφορίες σχετικά με την ενσωμάτωση των κύριων αναλυτικών στόχων, THC και THC-COOH, στις ανθρώπινες τρίχες δεν έχουν εξακριβωθεί επιστημονικά [102].

Το ενδιαφέρον σε μια μελέτη από τους Moosman et al. είναι ότι, ούτε η THC ούτε το THCA-A, φαίνεται να ενσωματώνονται στις ανθρώπινες τρίχες κεφαλής σε σημαντικές ποσότητες μετά τη συστηματική πρόσληψη τους. Σε αυτή την εργασία, το THC-COOH ανιχνεύθηκε και σε τμήματα τριχών, τα οποία είχαν ήδη αναπτυχθεί πριν από την επιβλεπόμενη χορήγηση της THC. Σε μία προσπάθεια να αποκλείσουν το ενδεχόμενο της ενσωμάτωσης THCA-A στα μαλλιά μέσω του αίματος, σμήγματος ή ιδρώτα, χορηγήθηκαν 50 mg THCA-A καθημερινά σε έναν εθελοντή για περίοδο 30 ημερών. Παρά τη σχετικά υψηλή δόση, κανένα ίχνος του THCA-A δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα από τα τμηματικά δείγματα τριχών που εξετάστηκαν κατά τη διάρκεια της μελέτης.

Σε μία δεύτερη μελέτη που διεξήχθη από την ίδια ομάδα, δύο εθελοντές λάμβαναν (δια του στόματος) ντροναβινόλη (dronabinol, THC) για περίοδο 30 ημερών, με σκοπό την αξιολόγηση της πιθανής ενσωμάτωσης της THC, μέσω της κυκλοφορίας του αίματος, στις

τρίχες κεφαλής. Παραδόξως, δεν ανιχνεύθηκε η THC σε κανένα από τα εξεταζόμενα δείγματα (τρίχες κεφαλής, γενειάδας ή σώματος) σε καμία στιγμή της δειγματοληψίας.

Οι πιο πάνω μελέτες έδειξαν ότι και τα τρία κανναβινοειδή μπορούν να είναι ανιχνεύσιμα στα μαλλιά των ατόμων που δεν καταναλώνουν ουσίες, λόγω της παθητικής μεταφοράς τους μέσω της επαφής τους με άτομα χρήστες κάνναβης, μέσω των χεριών τους, του ιδρώτα ή του καπνού της κάνναβης.

Σε ορισμένες περιπτώσεις, άτομα που φοβούνται τις συνέπειες ενός θετικού τεστ, προσπαθούν να επηρεάσουν την ανιχνευσιμότητα (π.χ. με το απλό βάψιμο ή ξύρισμα των μαλλιών) [127]. Ως εκ τούτου, οι επεξεργασμένες (βαμμένες) τρίχες κεφαλής δε γίνονται αποδεκτές ως δείγμα [128, 129]. Διάφορες άλλες μελέτες, ειδικότερα σε περιπτώσεις δικαστικής διαμάχης για την κηδεμονία των παιδιών, εξετάζουν εναλλακτικά βιολογικά δείγματα όπως το μηκόνιο, το γάλα θηλασμού ακόμη και τον ομφάλιο λώρο των νεογνών [130, 131]. Ανάλυση τέτοιων δειγμάτων αποτελεί σημαντική απόδειξη της χρήσης από εγκυμονούσες γυναίκες και καθορίζει τον κίνδυνο που διατρέχουν τόσο τα έμβρυα, όσο και τα νεογνά σε τέτοιες περιπτώσεις.

Κυψελίδες Αυτιού ως Εναλλακτικό Δείγμα για Τοξικολογικές Αναλύσεις

Μέχρι πρόσφατα, το κερί του αυτιού (cerumen) θεωρείτο ένα παρεξηγημένο βιολογικό υγρό το οποίο αποβάλλει το σώμα. Για το λόγο αυτό δεν αξιοποιήθηκε στην ιατρική και τοξικολογική έρευνα. Το κερί, ένα μίγμα σμήγματος και ιδρώτα, εκκρίνεται από ειδικούς ιδρωτοποιούς και σμηγματογόνους αδένες, που βρίσκονται στο κανάλι του αυτιού [132, 133]. Σύμφωνα με τον Prokop-Prigge και την ομάδα του, το κερί μπορεί να παρέχει σημαντικές πληροφορίες για ένα άτομο, συμπεριλαμβανομένης της εθνικότητας, της φυλής, του φύλου, των ασθενειών, της τροφής που καταναλώνεται ακόμη και της πιθανής έκθεσης σε περιβαλλοντικούς ρύπους [134]. Αρκετές ερευνητικές ομάδες έχουν χαρακτηρίσει το κερί του αυτιού ως μια παραμελημένη έκκριση του ανθρώπινου σώματος, ενώ, ταυτόχρονα, υποστηρίζουν την επιστημονική έρευνα για την ανάλυση του ως ένα βήμα προόδου στην κλινική διάγνωση.

Το κερί παράγεται στο εξωτερικό κανάλι του αυτιού, και σε αντίθεση με τις τρίχες κεφαλής ή τον ιδρώτα, βρίσκεται φυσικά προστατευμένο από εξωτερικές επιμολύνσεις. Οι τελευταίες μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης στα εν λόγω δείγματα, εξαιτίας της μη αποτελεσματικής απομάκρυνσής τους κατά την προετοιμασία του δείγματος. Οι ερευνητές υποστηρίζουν πως επικρατούν οι ίδιοι μηχανισμοί ενσωμάτωσης ναρκωτικών στο κερί όπως και στις τρίχες κεφαλής [135]. Επομένως, η ανίχνευση σε αυτά

τα δείγματα θα παρουσιάζει μεγαλύτερη αξιοπιστία, αφού μπορεί να αποφευχθούν ακόμη και οι λανθασμένες θετικές ενδείξεις που ενδέχεται να υπάρξουν, λόγω επιμόλυνσης των τριχών κεφαλής εξαιτίας της συναναστροφής με άλλα άτομα, π.χ. από το κάπνισμα, ή μέσω της επαφής και μεταφοράς με τον ιδρώτα, ή ακόμη και μέσω της επεξεργασίας του φυτού.

Η δειγματοληψία είναι μη επεμβατική και μπορεί εύκολα να πραγματοποιηθεί από μη ιατρικό προσωπικό με την ίδια ακριβώς διαδικασία που ο καθένας εφαρμόζει σπίτι του. Εξίσου σημαντική είναι η μεγαλύτερη χρονική διάρκεια αποθήκευσης οποιασδήποτε ουσίας σε αυτήν τη μήτρα, η οποία πιστεύεται ότι υπερβαίνει το διάστημα αποθήκευσης που είθισται στα ούρα και στο αίμα. Το μεγαλύτερο παράθυρο ανίχνευσης στο κερύ μπορεί να παρέχει συμπληρωματικές πληροφορίες σχετικά με τους μηχανισμούς ενσωμάτωσης παράνομων ουσιών στα βιολογικά εκκρίματα.

Πρόσφατα, προτάθηκε από δύο ερευνητικές ομάδες, το ενδεχόμενο χρήσης του κεριού του αυτιού ως εναλλακτικό δείγμα για την ανίχνευση ψυχοδραστικών φαρμάκων και ναρκωτικών ενώσεων [135, 136]. Η πρώτη μελέτη (2017) από τους Shokry et al. εξετάζει, για πρώτη φορά, την πιθανότητα ανάλυσης των κυψελίδων, ως εναλλακτικό δείγμα για ανίχνευση 12 αντιεπιληπτικών και ψυχοτρόπων φαρμάκων με τη μέθοδο LC-MS/MS. Για την επιβεβαίωση της εφαρμοσιμότητας της προτεινόμενης μελέτης τους, συλλέχθηκαν δείγματα από ασθενείς, στους οποίους χορηγούνταν φάρμακα ή κοκτέιλ των φαρμάκων [135]. Η τεχνική εξαγωγής των ενώσεων από τα δείγματα αξιολογήθηκε εκτενώς και τα LOQs ήταν ικανοποιητικά χαμηλά, ώστε να επιτευχθεί η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση σχεδόν σε όλα τα δείγματα. Αξίζει να σημειωθεί πως η επεξεργασία του δείγματος περιελάμβανε την άμεση εκχύλιση με μεθανόλη, χωρίς καμία άλλη προεργασία των δειγμάτων, ενώ παράλληλα δεν αναφέρεται σε κανένα σημείο το μέσο δειγματοληψίας και ο τρόπος προσδιορισμού της αρχικής μάζας του δείγματος που συλλέχθηκε. Αντίθετα, αναφέρεται ότι συλλέχθηκαν 20 mg μάζας για έκαστο δείγμα, και ότι η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε σχεδόν σε όλα τα δείγματα.

Μόλις ένα μήνα αργότερα δημοσιεύτηκε η μελέτη των Meier et al., στην οποία εξετάστηκαν δείγματα ούρων, αίματος, τριχών κεφαλής και κυψελίδων κεριού από νεκρούς, μέσω των τεχνικών GC-MS και LC-MS/MS. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των αποτελεσμάτων των δύο μεθόδων [136]. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά τους, σε όλες τις περιπτώσεις της πρόσφατης χρήσης (στην ανίχνευση οπιωδών, αμφεταμινών και παραγώνων, κοκαΐνης, μεθαδόνης και διαζεπίνης ή/και των μεταβολιτών τους) στο αίμα, το αντίστοιχο δείγμα κυψελίδων ήταν θετικό. Επιπρόσθετα, σε τρία δείγματα υπόπτων, όπου οι ουσίες ήταν ανιχνεύσιμες μόνο στα ούρα, το αντίστοιχο δείγμα κεριού βρέθηκε επίσης

θετικό. Ακόμη και σε περιπτώσεις όπου οι ουσίες ανιχνεύτηκαν μόνο σε δείγματα από τρίχες κεφαλής, το κερύ βρέθηκε επίσης θετικό ως προς ορισμένες ουσίες σε ποσοστό 52,5%. Παρ' όλα αυτά, τα κανναβινοειδή ανιχνεύθηκαν μόνο σε ποσοστό 31,6% των χρηστών κάνναβης. Το παράδοξο για τους ερευνητές ήταν ότι δεν κατέστη δυνατή η ανίχνευση της THC, αλλά της οξειδωμένης μορφής της, της CBN. Εξαιτίας αυτού, οι ερευνητές επισημαίνουν την αναγκαιότητα για περισσότερες μελέτες σε δείγματα κυψελίδων, με σκοπό την αντιμετώπιση των προβλημάτων που υφίστανται στην ανίχνευση των κανναβινοειδών και με απώτερο στόχο τη χρήση του ως πιθανό εναλλακτικό της ανάλυσης ούρων, αφού το παράθυρο ανίχνευσης διευρύνεται σημαντικά [136]. Η ποσοτικοποίηση στα δείγματα κυψελίδων δεν πραγματοποιήθηκε για καμία ναρκωτική ένωση, καθώς δεν κατέστη δυνατό να προσδιοριστεί η καθαρή μάζα του δείγματος κεριού που συλλέχθηκε. Βασικό πρόβλημα αποτέλεσε το γεγονός ότι δεν μπόρεσαν να διαχωρίσουν το κερύ από τις μπατονέτες, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για τη δειγματοληψία.

2.2. Μέθοδοι Εξαγωγής Κανναβινοειδών Ενώσεων από τα Βιολογικά Δείγματα

Η κανονική διαδικασία ανάλυσης δειγμάτων σε ένα διαπιστευμένο εργαστήριο πρέπει να περιλαμβάνει τη συλλογή δείγματος, την επεξεργασία, την ανάλυση και τέλος την επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Τα κλινικά εργαστήρια τοξικολογικών αναλύσεων οφείλουν να ακολουθούν τις διαδικασίες και τα πρωτόκολλα από διάφορους νεοσύστατους οργανισμούς όπως ο SoHT, ο SAMHSA, ο European Workplace Drug Testing Society (EWDTTS) και άλλοι, για την επιλογή των κατάλληλων δειγμάτων, τον τρόπο δειγματοληψίας, μεταφοράς και αποθήκευσης, με στόχο τη ελαχιστοποίηση τυχόν σφαλμάτων κατά την επεξεργασία και ανάλυση.

Κατά τη μεταφορά των δειγμάτων, πιθανές απώλειες των υπό εξέταση ενώσεων πρέπει να ληφθούν υπόψη, καθώς επηρεάζουν την ποιότητα των αποτελεσμάτων. Για τον προσδιορισμό των κανναβινοειδών ενώσεων και των μεταβολιτών τους στο πλάσμα, στα ούρα και στο σάλιο, τα δείγματα θα πρέπει να αποθηκεύονται στο ψυγείο ή στην κατάψυξη για μείωση της αποικοδόμησης των ουσιών. Αντίθετα, για τις τρίχες κεφαλής συστήνεται η φύλαξη των δειγμάτων σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτεινό μέρος. Το κερύ δεν έχει ακόμη καθιερωθεί ως εναλλακτικό δείγμα ανάλυσης και έτσι η βιβλιογραφία αναφορικά με τη φύλαξη, επεξεργασία και ανάλυση του είναι ελάχιστη. Για το λόγο αυτό, δεν υπάρχει κάποιο καθιερωμένο πρωτόκολλο που πρέπει να ακολουθείται προς αποφυγή παραγόντων που επηρεάζουν την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Επομένως, κάθε παράμετρος από τη συλλογή και τη φύλαξη μέχρι την επεξεργασία και ανάλυση πρέπει να μελετηθεί εκτενώς.

Η κατεργασία των δειγμάτων αποτελεί αδιαμφισβήτητα το σημαντικότερο στάδιο της αναλυτικής πορείας για τη μετατροπή των βιολογικών δειγμάτων σε κατάλληλη μορφή, η οποία να επιτρέπει την ανάλυσή τους στα αναλυτικά μηχανήματα. Το στάδιο της εκχύλισης αποτελεί το κυριότερο στάδιο της διαδικασίας αυτής, και παρουσιάζει δύο σημαντικά πλεονεκτήματα: (i) την απομάκρυνση των προσμίξεων για τη μείωση των παρεμποδίσεων και κατ' επέκταση την επίδραση στο αναλυτικό σήμα και (ii) την προ-συγκέντρωση των αναλυτών, με στόχο την αύξηση της ευαισθησίας της μεθόδου με τελικό αποτέλεσμα την μείωση των ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης. Στην UHPLC-MS/MS το στάδιο της επεξεργασίας είναι ιδιαίτερα σημαντικό για τη μείωση της επίδρασης της μήτρας (Matrix Effect, ME), ένα φαινόμενο, το οποίο προκαλεί αλλαγές στη διαδικασία ιονισμού των εξεταζόμενων ενώσεων, εξαιτίας των ενδογενών συστατικών του δείγματος [137, 138].

Στο αίμα, στο πλάσμα, ή στον ορό αίματος, στα ούρα και στο σάλιο δεσπόζουν οι τεχνικές SPE και LLE, με κυρίαρχη την SPE για την κατεργασία των δειγμάτων. Τα τελευταία χρόνια, σημαντικά βήματα στην τεχνολογία οδήγησαν στην αυτοματοποίηση των τεχνικών επεξεργασίας των δειγμάτων, ώστε να μειωθεί σημαντικά ο χρόνος ανάλυσης, ενώ δίνεται η δυνατότητα για ταυτόχρονη επεξεργασία μεγάλου αριθμού δειγμάτων.

Σύμφωνα με τις επίσημες οδηγίες του SoHT, καθιερώνονται οι ενδείξεις βέλτιστης πρακτικής αναφορικά με την ανάλυση ναρκωτικών στις τρίχες κεφαλής [103]. Οι οδηγίες περιλαμβάνουν προτεινόμενες διαδικασίες συλλογής και αποθήκευσης, προεργασίας και επεξεργασίας των δειγμάτων μέχρι και την ανάλυσή τους, καθώς επίσης και τη χρήση των cut-offs ορίων. Στη δημοσίευσή τους αναφέρεται η καθολική διαδικασία ανάλυσης τριχών κεφαλής σε διαπιστευμένα εργαστήρια. Αρχικό στάδιο της διαδικασίας αποτελεί η έκπλυση του δείγματος με οργανικούς και υδατικούς διαλύτες, για την απομάκρυνση των προσμίξεων, αλλά και των κοσμητικών προϊόντων που χρησιμοποιούνται στα μαλλιά. Ακολουθεί η ομογενοποίηση του δείγματος και στη συνέχεια η επώαση (incubation) και η εκχύλιση. Αναφορικά με τις τελευταίες, κάθε εργαστήριο καλείται να αντιμετωπίσει τα πιθανά προβλήματα, ανάλογα με τις ουσίες που μελετώνται, με στόχο τη βέλτιστη αποδοτικότητα της εκχύλισης [119].

Μέθοδοι Εξαγωγής Κανναβινοειδών Ενώσεων από τις Κυψελίδες Αυτιών

Εξαιτίας της ελάχιστης βιβλιογραφίας σχετικά με τη σύσταση αλλά και την επεξεργασία αυτού του ιδιαίτερου βιολογικού δείγματος, οι πληροφορίες αναφορικά με τις μεθόδους επεξεργασίας είναι πολύ περιορισμένες. Συγκεκριμένα, υπάρχουν δύο μόνο μελέτες μέχρι σήμερα, στις οποίες γίνεται αναφορά της μεθόδου επεξεργασίας αυτού του ασυνήθιστου δείγματος.

Στην πρώτη μελέτη από τους Shokry et al., οι ερευνητές προχώρησαν σε μία απλή, απευθείας εκχύλιση των ουσιών από την εξεταζόμενη μήτρα, χρησιμοποιώντας μεθανόλη ως διαλύτη [135]. Πρόκειται ουσιαστικά για ένα στάδιο «διαλυτοποίησης» των κυψελίδων, χωρίς καμία άλλη προεργασία δείγματος ή κάποιο στάδιο καθαρισμού. Σε αυτή την εργασία, όπως αναφέρθηκε και πρωτύτερα, μελετήθηκαν διάφορα αγχολυτικά φάρμακα. Τα επίπεδα ανάκτησης για τις εν λόγω ουσίες κυμάνθηκαν από 85.2 – 99.5%, γεγονός που υποδηλώνει μια καλή αποδοτικότητα εκχύλισης της αναπτυχθείσας μεθόδου επεξεργασίας των δειγμάτων κεριού.

Στη δεύτερη επιστημονική εργασία από τους Meier et al., ακολουθήθηκε παρόμοια προετοιμασία, χρησιμοποιώντας δείγματα κεριού από νεκρούς [136]. Σε αυτή τη περίπτωση, ο οξικός αιθυλεστέρας χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης εκχύλισης, και τα δείγματα αφέθηκαν για 1 ώρα σε λουτρό υπερήχων (sonication). Ακολούθησε εξάτμιση του διαλύτη με αέριο άζωτο και στη συνέχεια επαναδιαλυτοποίηση στην κινητή φάση για ανάλυση. Σε αυτή την εργασία δεν πραγματοποιήθηκαν πειράματα αξιολόγησης της μεθόδου επεξεργασίας των δειγμάτων και έτσι δεν υπάρχει πληροφόρηση για την αποδοτικότητα της εκχύλισης.

3. Χρωματογραφικές και Ηλεκτροφορητικές Τεχνικές

Η χρωματογραφική ανάλυση αποτελεί τη ναυαρχίδα των αναλυτικών τεχνικών για το διαχωρισμό ουσιών. Ένα συστατικό διαχωρίζεται εξαιτίας της διαφορετικής κατανομής του ανάμεσα σε μια κινητή και μια στατική φάση. Η συνεχής ροή της κινητής φάσης προκαλεί την κίνηση των επιμέρους συστατικών του μίγματος, με αποτέλεσμα αυτά να διαχωρίζονται λόγω της διαφορετικής ταχύτητας μετακίνησης. Αντίθετα, στην ηλεκτροφόρηση ο διαχωρισμός βασίζεται στη διαφορετική ταχύτητα όδευσης φορτισμένων σωματιδίων σε ρυθμιστικό διάλυμα στο οποίο έχει εφαρμοστεί ηλεκτρικό πεδίο.

3.1. Ηλεκτροφόρηση Τριχοειδούς

Η ηλεκτροφόρηση (electrophoresis) είναι μια τεχνική που αναπτύχθηκε από το Σουηδό χημικό Arne Tiselius τη δεκαετία του '30 για τη μελέτη των πρωτεϊνών του ορού. Αποτελεί μια καινοτόμα τεχνική διαχωρισμού που βασίζεται στη διαφορετική ταχύτητα όδευσης των φορτισμένων σωματιδίων σε BGE, κατά μήκος του οποίου εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο.

Ένα σημαντικό πλεονέκτημα, είναι η εφαρμογή της για τον αναλυτικό διαχωρισμό μιας μεγάλης ποικιλίας ουσιών, όπως τα αμινοξέα, φάρμακα, βιταμίνες, υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα, ανόργανα ανιόντα και κατιόντα. Για πολλά χρόνια η ηλεκτροφόρηση υπήρξε η καταλληλότερη μέθοδος διαχωρισμού μεγάλων φορτισμένων μορίων, όπως ένζυμα, ορμόνες, αντισώματα, DNA και RNA, για τα οποία εκδηλώνεται μεγάλο ενδιαφέρον, τόσο για τη βιομηχανική, όσο για τη βιολογική έρευνα [22].

Η CE είναι η πλέον μοντέρνα αναλυτική τεχνική και αποτελεί την «ενόργανη έκδοση» της ηλεκτροφόρησης. Ανακαλύφθηκε μόλις τις τελευταίες τέσσερις δεκαετίες και αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο για τους επιστήμονες.

3.1.1. Γενικές Αρχές

Η CE παρέχει γρήγορο και αποτελεσματικό διαχωρισμό φορτισμένων ενώσεων με την εφαρμογή δυναμικού. Κατά το τέλος της δεκαετίας του '80, η δραματική ανάπτυξη στον τομέα της έρευνας ανάγκασε την εξέλιξη της ηλεκτροφόρησης τριχοειδούς σωλήνα, ώστε να καλυφθούν οι νέες απαιτήσεις στον αναλυτικό διαχωρισμό ενώσεων. Η ανάπτυξη της τεχνικής αυτής πιθανόν να οφείλεται στην εύκολη λειτουργία της, αλλά και στη δυνατότητα της να παρέχει υψηλές αποδόσεις. Η πρώτη εμφάνιση της τεχνικής αυτής, με τη διάταξη που είναι γνωστή ως σήμερα, έγινε το 1981 από τους ερευνητές Jorgerson και Lukacs [139]. Ωστόσο, ο όρος ηλεκτροφόρηση καθιερώθηκε το 1987 από τον F. Kohlraush. Η CE αποτελεί ένα συνδυασμό της ηλεκτροφόρησης και της χρωματογραφίας. Ανήκει στην οικογένεια

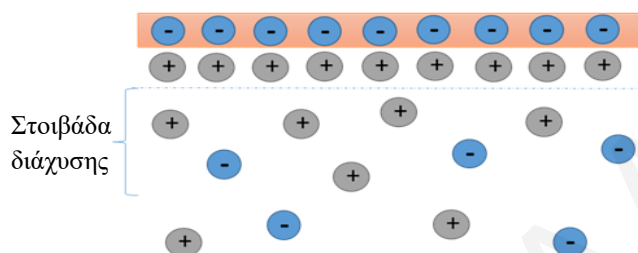
τεχνικών, στην οποία γίνεται χρήση στήλης τριχοειδούς από τηγμένη πυριτία για το διαχωρισμό μικρών και μεγάλων μορίων με μεγάλες αποδόσεις. Οι εφαρμογές της αφορούν κυρίως τους τομείς ελέγχου ποιότητας και καθαρότητας, ποσοτικούς προσδιορισμούς, διαχωρισμούς εναντιομερών μορφών των φαρμάκων και προσδιορισμού της στοιχειομετρίας των δραστικών ουσιών.

Ο διαχωρισμός ουσιών στην CE εξαρτάται από τη διαφορετική ηλεκτροφορητική κινητικότητα μετανάστευσης (μ_p) των αναλυτών κατά μήκος του ηλεκτροδίου με αντίθετο φορτίο σε εφαρμοζόμενο ηλεκτρικό πεδίο, καθώς επίσης και την ηλεκτροωσμωτική ροή (electroosmotic flow, EOF). Δύο αναλύτες με διαφορετικό φορτίο ή στους οποίους ασκούνται διαφορετικές δυνάμεις τριβής, διαχωρίζονται κατά την όδευση τους διαμέσου του ρυθμιστικού. Ουδέτεροι αναλύτες δε διαχωρίζονται αφού δεν επηρεάζονται από το ηλεκτρικό πεδίο.

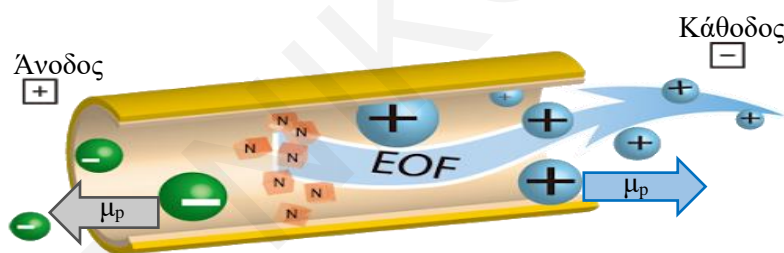
Η ταχύτητα όδευσης των ιόντων εξαρτάται και από την EOF του ρυθμιστικού διαλύματος. Η EOF παρατηρείται όταν εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο σε διάλυμα μέσα σε τριχοειδή στήλη, τα τοιχώματα της οποίας είναι αρνητικά φορτισμένα. Όταν ρυθμιστικό διάλυμα διέρχεται διαμέσου του τριχοειδούς, τότε το φορτίο συσσωρεύεται στην εσωτερική του επιφάνεια. Σε τριχοειδή πληρωμένο με silica, οι ομάδες σιλανόλης (Si-OH) ιονίζονται σε ομάδες Si-O⁻, σε τιμές pH μεγαλύτερες από τρία (pH>3). Ο ιονισμός ενισχύεται όταν τρέξουμε πυκνό διάλυμα βάσης όπως NaOH ή KOH διαμέσου του τριχοειδούς πριν την εισαγωγή του ρυθμιστικού διαλύματος. Τα θετικά ιόντα του ρυθμιστικού έλκονται από τις αρνητικά φορτισμένες ομάδες σιλανόλης σχηματίζοντας μια διπλοστοιβάδα στο τοίχωμα του τριχοειδούς, τη στοιβάδα διάχυσης, δημιουργώντας έτσι μια διαφορά δυναμικού κοντά στα τοιχώματα, γνωστή ως το δυναμικό ζήτα (ζ). Τα κατιόντα της πρώτης στοιβάδας είναι ισχυρά «δεμένα» στις ομάδες σιλανόλης (fixed layer), ενώ της δεύτερης ασθενέστερα (mobile layer). Με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου, τα κατιόντα της δεύτερης στοιβάδας παρασύρονται προς την αρνητικά φορτισμένη κάθοδο. Επειδή τα κατιόντα αυτά είναι επιδιαλυτώμενα, μαζί τους παρασύρουν και το ρυθμιστικό διάλυμα, προκαλώντας έτσι την EOF του ρυθμιστικού. Η EOF εξαρτάται από τη δύναμη του ηλεκτρικού πεδίου και την πυκνότητα του φορτίου στα εσωτερικά τοιχώματα του τριχοειδούς (**Σχήμα 3.1**) και αυξάνεται με το pH μέχρι όλες οι διαθέσιμες ομάδες σιλανόλης να φορτιστούν αρνητικά [140].

Στα τυπικά συστήματα CE, η EOF κατευθύνεται προς την αρνητικά φορτισμένη κάθοδο, ώστε το ρυθμιστικό διάλυμα να ρέει διαμέσου του τριχοειδούς, από το φορτίο της πηγής προς το δοχείο προορισμού. Σύμφωνα με την ηλεκτροφορητική κινητικότητα (μ_p), οι

αναλύτες μεταναστεύουν προς το ηλεκτρόδιο με το αντίθετο φορτίο, όμως η EOF του διαλύματος είναι μεγαλύτερη από αυτή των αναλυτών, έτσι όλα τα συστατικά κινούνται προς την κάθοδο. Ως αποτέλεσμα της μ_p και της EOF, τα μικρότερα θετικά φορτία εξέρχονται πρώτα, ακολούθως τα μεγαλύτερα θετικά, στη συνέχεια όλα τα ουδέτερα μαζί και τέλος τα μεγαλύτερα αρνητικά και έπειτα τα μικρότερα σε μέγεθος αρνητικά (Σχήμα 3.2).



Σχήμα 3.1. Κατανομή φορτίου στα εσωτερικά τοιχώματα του τριχοειδούς και δημιουργία της EOF.



Σχήμα 3.2. Ηλεκτροοσμωτική ροή (EOF), ηλεκτροφορητική ευκινησία (μ_p) [141].

3.1.2. Οργανολογία

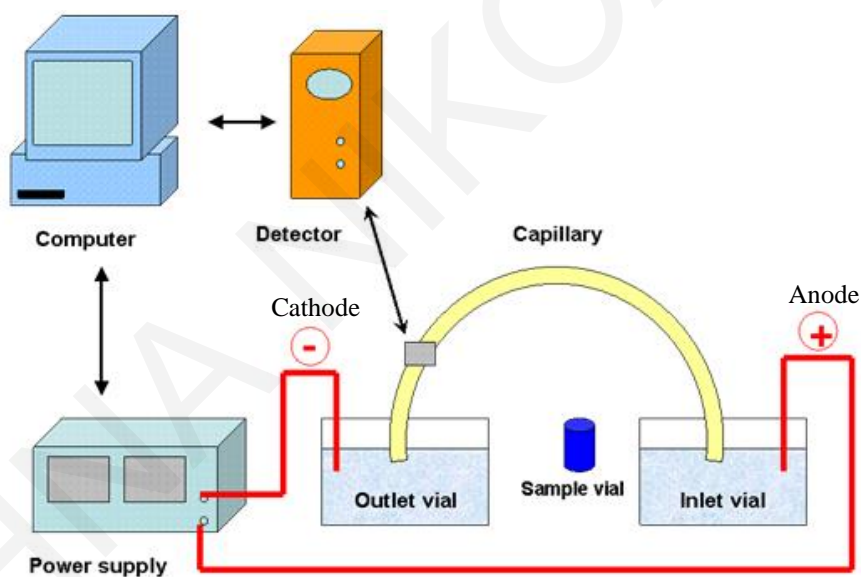
Η οργανολογία ενός συστήματος CE είναι σχετικά απλή (Σχήμα 3.3). Ένας τριχοειδής σωλήνας από τηγμένη πυρίτια (SiO_2), με εσωτερική διάμετρο που κυμαίνεται από 10 μm έως 100 μm και μήκος συνήθως 40 έως 100 cm, εκτείνεται ανάμεσα στα δύο δοχεία του ρυθμιστικού διαλύματος, στα οποία βυθίζονται ηλεκτρόδια λευκόχρυσου (Pt).

Τα ηλεκτρόδια αυτά χρησιμεύουν για την ηλεκτρική επαφή μεταξύ του υψηλής τάσης τροφοδοτικού και του τριχοειδούς σωλήνα. Το συνηθέστερο υλικό που χρησιμοποιείται στους τριχοειδείς σωλήνες είναι η τηγμένη πυρίτια, γιατί είναι χημικά και ηλεκτρικά αδρανής, εύκαμπτη και φθηνή. Ένα σύστημα CE αποτελείται από ένα υψηλής τάσης τροφοδοτικό, μια λάμπα UV, ένα ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων, δύο ηλεκτρόδια, τα

δοχεία της κινητής φάσης, το δοχείο του δείγματος και από ένα σύστημα καταγραφής και αποθήκευσης αποτελεσμάτων. Όπως φαίνεται και **Σχήμα 3.3**, η εισαγωγή του δείγματος γίνεται στο ένα άκρο του τριχοειδούς σωλήνα και η ανίχνευση στο άλλο.

Παρ' όλο που η οργανολογία είναι απλή, υπάρχουν σημαντικές πειραματικές δυσκολίες στην εισαγωγή του δείγματος και στην ανίχνευση, εξαιτίας των πολύ μικρών όγκων που χρησιμοποιούνται. Ο όγκος ενός κοινού τριχοειδούς σωλήνα κυμαίνεται μεταξύ 4 έως 5 μL , οι εισαγόμενοι όγκοι των υπό μελέτη δειγμάτων πρέπει να είναι της τάξης των μερικών nL ή μικρότεροι [22].

Για την εισαγωγή του δείγματος, το ένα άκρο του τριχοειδούς σωλήνα και το ηλεκτρόδιο του απομακρύνονται από το δοχείο με το ρυθμιστικό διάλυμα και εισάγεται σε δοχείο στο οποίο περιέχεται το δείγμα. Ακολουθεί η εφαρμογή τάσης (ηλεκτροκίνητη έγχυση) ή πίεσης (έγχυση υπό πίεση) για κάποιο χρονικό διάστημα και στη συνέχεια επιστρέφει στο πρώτο δοχείο, όπου και παραμένει καθ' όλη τη διάρκεια του διαχωρισμού.



Σχήμα 3.3. Σχηματικό διάγραμμα ενός συστήματος CE [142].

Όλα τα ιόντα, θετικά και αρνητικά, ωθούνται διαμέσου του τριχοειδούς προς την ίδια κατεύθυνση (κάθοδος) λόγω της EOF. Οι αναλύτες διαχωρίζονται κατά τη μετανάστευσή τους λόγω της διαφορετικής ηλεκτροφορητικής ευκινησίας και λόγω του μεγέθους τους. Ακολούθως, ανιχνεύονται στην έξοδο του τριχοειδούς, όπου βρίσκεται ο ανιχνευτής. Η ανίχνευση στην CE χωρίζεται σε δύο κατηγορίες: (1) ανίχνευση μέσα στον τριχοειδή και (2) εξωτερική ανίχνευση. Στην πρώτη κατηγορία η ανίχνευση πραγματοποιείται με τη βοήθεια

φασματοφωτομετρικών ανιχνευτών με κυριότερο εκπρόσωπο το UV. Στη δεύτερη κατηγορία ανίχνευσης ανήκουν τα φασματόμετρα μάζας (Mass Spectrometer, MS) [22]

Ο ανιχνευτής στέλνει τα δεδομένα στον ηλεκτρονικό υπολογιστή για καταγραφή και αποθήκευση ως ηλεκτροφερόγραμμα, το οποίο αποτελεί απόκριση του ανιχνευτή συναρτήσει του χρόνου. Οι διαχωρισμένοι αναλύτες εμφανίζονται με τη μορφή κορυφών με διαφορετικό χρόνο έκλυσης στο ηλεκτροφερόγραμμα.

3.1.3. Εφαρμογές της CE

Το κύριο πλεονέκτημα της ποικιλίας των διαφορετικών εφαρμογών της CE είναι ο διαχωρισμός και η ανάλυση μιας ευρείας κλίμακας διαφορετικών ουσιών, από ανόργανα μόρια μέχρι βιολογικά πολυμερή. Η CE αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο για το χειρόμορφο διαχωρισμό εναντιομερών ενώσεων. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με την προσθήκη ενός CS στο ρυθμιστικό διάλυμα, ο οποίος είναι ικανός να διακρίνει τα εναντιομερή της υπό μελέτη ένωσης. Ένας μεγάλος αριθμός CSs είναι σήμερα διαθέσιμος, μεταξύ των οποίων είναι και οι CDs, χειρόμορφοι αιθέρες στέμματος, χειρόμορφες επιφανειοδραστικές ουσίες, οπτικά ενεργά μικύλλια, γραμμικοί πολυσακχαρίτες αλλά και πρωτεΐνες.

3.1.4. Ηλεκτροκινητική Χρωματογραφία Τριχοειδούς

Στην ΕΚC, ένα μόριο προστίθεται στο ρυθμιστικό διάλυμα που πληρώνει την τριχοειδή στήλη, το οποίο δρα ως ψευδοστατική φάση και αλληλεπιδρά με τον αναλύτη. Συνεπώς, οποιαδήποτε τεχνική χρησιμοποιεί μόρια που δρουν ως ψευδοστατική φάση καλείται ΕΚC. Για παράδειγμα, όταν στο ΒGE προστίθενται CDs, η μέθοδος αυτή καλείται CD-ΕΚC. Αντίστοιχα, αν χρησιμοποιούνται τασιενεργά μόρια (μικύλλια), τότε καλείται ΜΕΚC [143].

Η ΜΕΚC, ένα υβρίδιο της ηλεκτροφόρησης και της χρωματογραφίας, ανακαλύφθηκε το 1984 από τον Terabe και τους συνεργάτες του και αποτελεί μια από τις πιο ευρέως χρησιμοποιημένες μεθόδους της CE. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημά της είναι ότι επιτρέπει το διαχωρισμό τόσο φορτισμένων, όσο και ηλεκτρικώς ουδέτερων σωματιδίων [144, 145]. Βασίζεται στην εισαγωγή μιας επιφανειοδραστικής ουσίας στο ΒGE, σε οριακά επίπεδα συγκέντρωσης, στα οποία σχηματίζονται μικύλλια.

Με παρόμοιο τρόπο στην ΕΚC γίνεται χρήση CSs, κυρίως των CDs. Οι ουδέτερα φορτισμένες μπορούν να αλληλοεπιδρούν μόνο με τους υπό εξέταση αναλύτες, ενώ οι φορτισμένες CDs παρουσιάζουν ηλεκτροφορητική ευκινησία ίση ή αντίθετη με την EOF. Συγκεκριμένα, οι αρνητικά φορτισμένες CDs παρουσιάζουν ηλεκτροφορητική ευκινησία αντίθετη προς την ισχυρή EOF, με αποτέλεσμα να μεταναστεύουν βραδύτερα προς την

αρνητικά φορτισμένη κάθοδο. Οι αναλύτες ανάλογα με τις ομάδες που διαθέτουν αλληλεπιδρούν με τους CSs, με αποτέλεσμα τη χειρόμορφη ανάλυση τους.

Εφαρμογές της τεχνικής αυτής παρατίθενται στο **Κεφάλαιο 1.2** της παρούσας διατριβής, στο οποίο περιγράφονται ουσιαστικά οι CSs, οι οποίοι δρουν ως ψευδοστατική φάση. Σε αυτή τη μελέτη έγινε εφαρμογή της EKC, προσθέτοντας CDs, CFs ή και CILs στο ρυθμιστικό διάλυμα, προσφέροντας έτσι τη δυνατότητα διαχωρισμού φορτισμένων, αλλά και ουδέτερων μορίων. Οι κλινικές ουσίες που μελετήθηκαν στο πρώτο μέρος αυτής της εργασίας υπήρξαν είτε ουδέτερες είτε θετικά φορτισμένες στο εύρος pH που μελετήθηκε.

3.2. Υγρή Χρωματογραφία Υπερυψηλής Απόδοσης

Η χρωματογραφία αποτελεί μια εκ των σημαντικότερων αναλυτικών τεχνικών διαχωρισμού τα τελευταία χρόνια με απήχηση στο ευρύτερο επιστημονικό πεδίο. Στην υγρή χρωματογραφία ο διαχωρισμός βασίζεται στη διαφορετική αλληλεπίδραση των συστατικών ενός μίγματος μεταξύ μιας υγρής κινητής φάσης και μιας στερεής στατικής φάσης. Η HPLC είναι ο όρος που περιγράφει την υγρή χρωματογραφία, στην οποία η κινητή φάση μεταφέρεται μηχανικά, μέσω αντλίας, διαμέσου μιας στήλης, η οποία είναι πληρωμένη με τη στατική φάση. Έτσι, πολύ εύστοχα χαρακτηρίζεται ως η «ναυαρχίδα» των χρωματογραφικών τεχνικών [22]. Αποτελεί την πλέον κατάλληλη τεχνική για τον ακριβή και επαναλήψιμο προσδιορισμό ενός μεγάλου φάσματος μοριακών ενώσεων με βιολογικό ενδιαφέρον. Αποτελεί παραλλαγή της κλασικής χρωματογραφίας στήλης και η ταχύτατη εδραίωση της στο χώρο της ενόργανης ανάλυσης βασίστηκε κατά κύριο λόγο στην εξέλιξη των υλικών πλήρωσης της στήλης. Τα κύρια πεδία εφαρμογών της HPLC είναι η ανάλυση φαρμάκων, τροφίμων, καθώς και περιβαλλοντικών και βιολογικών δειγμάτων.

Όπως αναφέρθηκε στην αρχή της ενότητας, ο διαχωρισμός των συστατικών στο χρωματογραφικό σύστημα είναι αποτέλεσμα της διαφορετικής αλληλεπίδρασης των εξεταζόμενων ενώσεων ανάμεσα στην κινητή και στη στατική φάση και των επαναλαμβανόμενων ισορροπιών των συστατικών μεταξύ των δύο φάσεων κατά τη μετακίνησή τους [22]. Η διαφορετική φυσικοχημική συγγένεια των μορίων με τις δύο φάσεις οφείλεται στις διαφορές των συστατικών του μίγματος και κυρίως, σε ορισμένα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους, όπως διαφορές στο μέγεθος του μορίου, το φορτίο, την πτητικότητα και τη διαλυτότητα.

Σε πρώτο στάδιο, το προς ανάλυση δείγμα σε διάλυμα, εισάγεται στη χρωματογραφική στήλη, στην οποία βρίσκεται η στατική φάση. Τα συστατικά του δείγματος συμπαρσύρονται από την κινητή φάση, η οποία προωθείται στη στήλη με τη βοήθεια μιας

αντλίας υψηλής πίεσης. Στη συνέχεια, κάτω από σωστά επιλεγμένες πειραματικές συνθήκες μετακινούνται διαμέσου της κινητής φάσης με διαφορετικές ταχύτητες και εξαιτίας αυτού τελικά διαχωρίζονται.

Τα συστατικά, τα οποία εκλούνται από το άκρο της χρωματογραφικής στήλης, εισέρχονται στον κατάλληλο ανιχνευτή και τα σήματα καταγράφονται ως συνάρτηση του χρόνου, δίνοντας ένα διάγραμμα με μια σειρά κορυφών, το λεγόμενο χρωματογράφημα. Οι θέσεις των κορυφών ως προς τον άξονα του χρόνου εξυπηρετούν την ανίχνευση των συστατικών του δείγματος, και το εμβαδόν κάθε κορυφής αποτελεί το ποσοτικό τους μέτρο.

Ένα τεχνολογικό άλμα που επιτεύχθηκε τα τελευταία χρόνια εξαιτίας της χημείας των σωματιδίων, της βελτιστοποίησης του συστήματος HPLC, του σχεδιασμού του ανιχνευτή, αλλά και του ελέγχου και της επεξεργασίας των δεδομένων, οδήγησαν στην ανακάλυψη της UHPLC. Ο πρώτος όρος που χρησιμοποιήθηκε ήταν UPLC από την εταιρεία Waters, η οποία εισήγαγε πρώτη στην αγορά το σύστημα αυτό. Στη συνέχεια και άλλες εταιρείες ακολούθησαν με παραλλαγή της ονομασίας σε UHPLC. Η UPLC, ως μια νέα κατηγορία στην επιστήμη του διαχωρισμού της αναλυτικής χημείας, διατηρεί την πρακτικότητα και τις αρχές της HPLC, ενώ βελτιώνει τα χαρακτηριστικά της ταχύτητας, ευαισθησίας και διακριτικής ικανότητας. Το πρώτο σύστημα UHPLC κυκλοφόρησε το έτος 2004 και από τότε διάφορα συστήματα UHPLC διατίθενται στο εμπόριο και μπορούν να λειτουργήσουν σε πιέσεις έως και 15000-19000 psi. Η UPLC αντιπροσωπεύει μια εκσυγχρονισμένη και παράλληλα βελτιωμένη εκδοχή της HPLC με σημαντικές καινοτομίες στην οργανολογία και στην τεχνολογία των σωματιδίων, με στόχο τη βελτίωση του διαχωρισμού. Με τη χρήση στηλών νέας γενιάς, πακεταρισμένες με σωματίδια μεγέθους 1.7 μm και όργανα ειδικά σχεδιασμένα με εξειδικευμένες ικανότητες για να παρέχουν την κινητή φάση με πιέσεις έως και 15000 psi, επιτεύχθηκε σημαντική πρόοδος στην ανάλυση, στην ταχύτητα και στην ευαισθησία. Τα πλεονεκτήματα αυτά αντισταθμίζουν το υψηλό κόστος αγοράς και συντήρησης των μηχανημάτων, τα οποία θεωρούνται ως τα μοναδικά μειονεκτήματα αυτών των συστημάτων.

3.2.1. Γενικές Αρχές

Οι βασικές αρχές αυτής της εξέλιξης διαφαίνονται στην εξίσωση van Deemter, μια εμπειρική φόρμουλα που περιγράφει τη σχέση μεταξύ της γραμμικής ταχύτητας (u) και του ύψους της πλάκας (HETP (H) ή αποδοτικότητας της στήλης). Δεδομένου ότι το μέγεθος των σωματιδίων (dp) είναι μία από τις μεταβλητές, η εξίσωση van Deemter μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διερεύνηση της χρωματογραφικής απόδοσης.

$$H = 2\lambda dp + \frac{2\gamma D_m}{u} + f(k)\left(\frac{dp^2}{D_m}\right) u = a + \frac{b}{u} + cu \quad (\text{Εξ. 1})$$

όπου

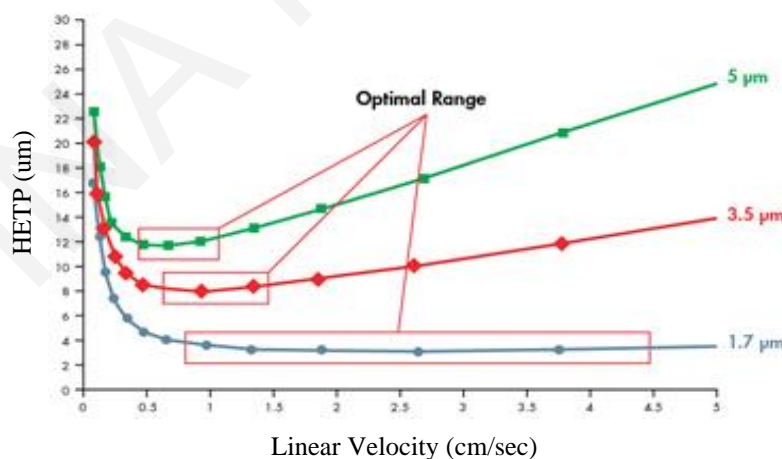
λ, γ : σταθερές που εξαρτώνται από την ποιότητα της πλήρωσης της στήλης,

D_m : συντελεστής διάχυσης στην κινητή φάση και

$f(k)$: μια συνάρτηση του παράγοντα κατακράτησης (k).

Σύμφωνα με την εν λόγω εξίσωση, όταν το μέγεθος των σωματιδίων μειωθεί κάτω από 2.5 μm παρατηρείται σημαντική μείωση της HETP, γεγονός που οδηγεί σε υψηλότερη αποδοτικότητα και σε ένα πιο επίπεδο προφίλ της καμπύλης Van Deemter (**Σχήμα 3.4**). Επομένως, η αύξηση του ρυθμού ροής της κινητής φάσης δεν έχει αρνητική επίδραση στην αποδοτικότητα, κάτι που παρατηρείται με τη χρήση σωματιδίων διαμέτρου 5 ή 10 μm [146-148].

Μια παράμετρος που εξετάζεται επίσης σε ένα αναλυτικό πείραμα είναι η χρωματογραφική ταχύτητα ροής και πώς αυτή επηρεάζει τα δεδομένα της ανάλυσης. Πρωτίστως, ο χρόνος ανάλυσης μειώνεται με αύξηση της ταχύτητας ροής. Επιπρόσθετα, το πλάτος της κορυφής μειώνεται, οδηγώντας σε ανάλογη αύξηση του ύψους της. Στενότερες, και συνεπώς υψηλότερες κορυφές, είναι εύκολο να ανιχνευθούν και να διαφοροποιηθούν από το θόρυβο του υποβάθρου, οδηγώντας έτσι σε υψηλότερη ευαισθησία.



Σχήμα 3.4. Καμπύλες van Deemter για διαφορετικά μεγέθη σωματιδίων (1.7, 3.5 και 5 μm) [149].

Επιπλέον, με απλά χρωματογραφικά παραδείγματα και βασική αριθμητική, μπορεί εύκολα κανείς να κατανοήσει τις θεωρητικές αρχές που οδηγούν σε βελτίωση της ανάλυσης με εφαρμογή της τεχνολογίας UPLC. Όπως αναφέρεται στη θεμελιώδη εξίσωση της ανάλυσης,

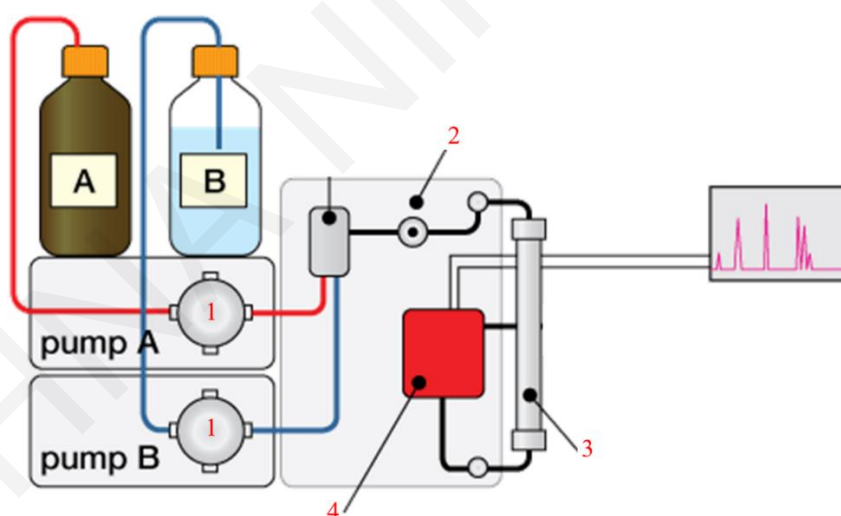
η εν λόγω παράμετρος είναι ευθέως ανάλογη με την τετραγωνική ρίζα της αποδοτικότητας.

$$R_S = \frac{\sqrt{N}}{4} \frac{(\alpha - 1)}{\alpha} \frac{k}{(k + 1)} \quad (\text{Εξ. 2})$$

Με δεδομένο ότι η αποδοτικότητα είναι αντιστρόφως ανάλογη με το μέγεθος των σωματιδίων, η μείωση του μεγέθους των σωματιδίων του υλικού πλήρωσης οδηγεί σε αύξηση της αποδοτικότητας. Για παράδειγμα, όταν το μέγεθος μειώνεται κατά 3 φορές, από 5 μm (HPLC) σε 1.7 μm (UPLC), η θεωρία προβλέπει ότι η N πρέπει να αυξηθεί κατά 3 φορές, οδηγώντας σε 1.7 αύξηση της διαχωριστικής ικανότητας (τετραγωνική ρίζα του 3) [150].

3.2.2. Οργανολογία

Η οργανολογία ενός σύγχρονου συστήματος HPLC παρουσιάζεται στο **Σχήμα 3.5**. Τα βασικά τμήματα του μηχανήματος είναι η αντλία, το σύστημα εισαγωγής του δείγματος, η χρωματογραφική στήλη, ο ανιχνευτής και το σύστημα συλλογής και καταγραφής αποτελεσμάτων.



Σχήμα 3.5. Σχηματική αναπαράσταση συστήματος HPLC. 1. Αντλία, 2. Σύστημα εισαγωγής του δείγματος, 3. Χρωματογραφική Στήλη, 4. Ανιχνευτής [151].

Η αντλία αποτελεί το βασικό τμήμα του χρωματογραφικού συστήματος και επιτρέπει τη διέλευση του διαλύτη διαμέσου της στήλης και λειτουργεί ώστε να παρέχει με σταθερή ροή την κινητή φάση με σκοπό τη διασφάλιση της αναπαραγωγιμότητας και της ακρίβειας της μεθόδου. Υπάρχει δυνατότητα για δύο εναλλακτικές τεχνικές ανάλυσης, η ισοκρατική

έκλυση (isocratic elution), στην οποία η κινητή φάση έχει σταθερή σύσταση σε όλη τη διάρκεια ανάλυσης και η βαθμιδωτή έκλυση (gradient elution), στην οποία η κινητή φάση μεταβάλλεται βαθμιαία, ή σε τακτά χρονικά διαστήματα σύμφωνα με τη σχετική εντολή που καταχωρείται στο σύστημα. Η βαθμιδωτή έκλυση εφαρμόζεται συνήθως σε πολύπλοκα δείγματα που εμπεριέχουν πολλά συστατικά, με στόχο την επίτευξη καλύτερου και ταχύτερου διαχωρισμού.

Η στήλη αποτελεί τον πυρήνα κάθε χρωματογραφικού συστήματος. Πολλές στήλες βρίσκονται εμπορικά διαθέσιμες σε διαφορετικά μήκη, μεγέθη και με ποικίλα υλικά πλήρωσης. Ένας ορθός συνδυασμός του μήκους και του υλικού πλήρωσης σε συσχέτιση με την κατάλληλη κινητή φάση μπορεί να συνδράμει στον πιο αποτελεσματικό διαχωρισμό των ενώσεων ενός μείγματος [152, 153].

Στο πλαίσιο ενός επιτυχούς διαχωρισμού, αξίζει να αναφερθεί μία βασική εξίσωση, η οποία εκφράζει κατά κύριο λόγο την αποδοτικότητα μιας χρωματογραφικής στήλης. Πρόκειται για ένα πρωτεύον χαρακτηριστικό της, τη διαχωριστική ικανότητα, η οποία αποτελεί ουσιαστικά ποσοτικό μέτρο της ικανότητας μιας στήλης να διαχωρίσει δύο αναλύτες. Για ένα μίγμα δύο ενώσεων A και B, η διαχωριστική ικανότητα μπορεί να οριστεί από την ακόλουθη εξίσωση:

$$R_s = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{w_A + w_B} \quad (\text{Εξ. 3})$$

όπου $(t_R)_A$ και $(t_R)_B$ οι χρόνοι συγκράτησης των κορυφών A και B, αντίστοιχα και w_A και w_B , το εύρος της βάσης των κορυφών [22]. Τιμές R_s μεγαλύτερες από 1.5 αντιστοιχούν ουσιαστικά σε πλήρη διαχωρισμό των δύο συστατικών, ενώ σε μικρότερες τιμές παρατηρείται αλληλεπικάλυψη των κορυφών, ή συνέκλυση των δύο εναντιομερών ($R_s = 0$) [154].

Στις περιπτώσεις που ο διαχωρισμός είναι πλήρης, υπολογίζεται και ένας άλλος πολύ σημαντικός παράγοντας, η αποδοτικότητα (αριθμός θεωρητικών πλακών) των κορυφών, N , η οποία ορίζεται ως:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w} \right)^2 \quad (\text{Εξ. 4})$$

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι όσο πιο μεγάλη είναι η αποδοτικότητα, τόσο πιο μικρή είναι η διεύρυνση των κορυφών και επομένως πιο οξείες και καλοσχηματισμένες είναι οι κορυφές.

3.3. Ανιχνευτές

3.3.1. Ανιχνευτής Συστοιχίας Φωτοδιόδων

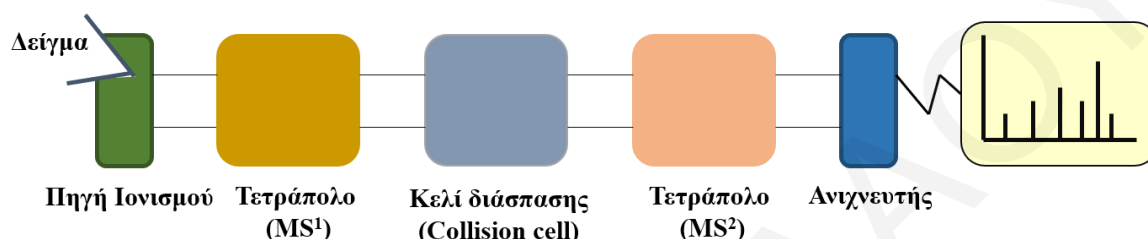
Ένας προηγμένος ανιχνευτής τύπου UV, ο ανιχνευτής συστοιχίας φωτοδιόδων (Diode-Array Detector, DAD) είναι ο πιο διαδεδομένος στην CE και στην HPLC, καθώς έχει τη δυνατότητα να παρακολουθεί ταυτόχρονα όλο το εύρος της περιοχής UV. Χρησιμοποιεί μια σειρά φωτοδιόδων που ανιχνεύουν το φως που διασπείρεται από ένα σταθερό μονοχρωμάτορα σε όλο το εύρος των μηκών κύματος, παρέχοντας έτσι διαχωριστική ικανότητα περίπου 1 nm. Χρήσιμος για πολύπλοκα μείγματα που περιέχουν ενώσεις με ευρέως διαφορετικές περιοχές απορρόφησης και για μίγματα που οι κορυφές αλληλεπικαλύπτονται χρωματογραφικά, αλλά μπορούν να διαχωριστούν ανάλογα με τη ξεχωριστή απορρόφησή τους στο UV. Ο ανιχνευτής το παρέχει πλήρες φάσμα UV κάθε κορυφής του χρωματογραφήματος, που καταγράφεται σε δευτερόλεπτα και βοηθά στην ταυτοποίηση των αγνώστων ενώσεων, καθώς εξέρχονται από τη χρωματογραφική στήλη.

Η βασική διαφορά σε σχέση με τον κλασικό ανιχνευτή UV-Vis είναι η παρουσία του ολογραφικού φράγματος στη θέση του μονοχρωμάτορα. Η ακτινοβολία από μία λυχνία διέρχεται διαμέσου της κυψελίδας, στην οποία βρίσκεται το δείγμα, με αποτέλεσμα μέρος αυτής να απορροφάται από τα συστατικά του δείγματος. Στη συνέχεια, η δέσμη προσπίπτει σε ένα σταθερό μονοχρωμάτορα-φράγμα περίθλασης, όπου και διασπείρεται στα επιμέρους μήκη κύματος (λ), τα οποία κατευθύνονται προς το μεταλλάκτη-παράταξη συστοιχίας φωτοδιόδων. Το σήμα εξόδου κάθε διόδου, αντιστοιχεί στην ακτινοβολία διαφορετικού μήκους κύματος (λ) και το φάσμα λαμβάνεται με ανάγνωση των σημάτων εξόδου όλων των διόδων της συστοιχίας σε σειρά [22].

3.3.2. Διαδοχική Φασματομετρία Μάζας

Η τεχνική της φασματομετρίας μαζών σε σειρά αποτελεί την πιο διαδεδομένη τεχνική ανάμεσα στις υπόλοιπες τεχνικές φασματομετρίας μάζας και χαρακτηρίζεται για την εξαιρετική ευαισθησία που παρέχει στους χρήστες της. Η πληθώρα εφαρμογών της και η συμβατότητά της με συστήματα, την έχει καθιερώσει ως ανιχνευτή σε συστήματα υγρής χρωματογραφίας σε μεγάλη σειρά αναλυτικών διεργασιών. Πρόκειται ουσιαστικά για μια αναλυτική τεχνική ανίχνευσης μορίων σε μορφή ιόντων με κριτήριο το λόγο της μάζας ως προς το φορτίο τους (m/z) [22].

Η πιο κοινή διαμόρφωση στη διαδοχική φασματομετρία μαζών είναι το τριπλό τετράπολο (triple quadrupole, TQ), το οποίο χρησιμοποιεί δύο τετράπολα (MS^1 , MS^2) ως αναλυτές μαζών. Αυτή η οργανολογία επιτρέπει αναλύσεις υψηλών απαιτήσεων και εφαρμόζεται κυρίως για την ανάπτυξη νέων αναλυτικών μεθόδων. Το όργανο ανάλυσης αποτελείται από την α) την πηγή ιοντισμού, β) δύο τετραπολικούς αναλυτές μαζών (MS^1 , MS^2), γ) την κυψελίδα σύγκρουσης (collision cell), η οποία παρεμβάλλεται μεταξύ των δύο τετραπόλων και δ) τον ανιχνευτή (Σχήμα 3.6).



Σχήμα 3.6. Σχηματική απεικόνιση των τμημάτων ενός διαδοχικού συστήματος φασματομετρίας μαζών.

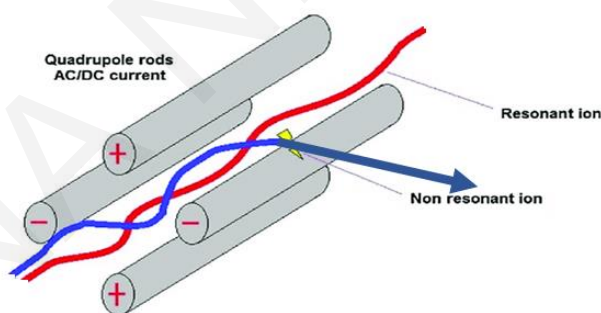
Τα μητρικά ιόντα δημιουργούνται με ηλεκτροψεκασμό (ESI) και επιλέγονται στον πρώτο τετραπολικό αναλυτή (MS^1). Ακολούθως, οδηγούνται στο ενδιάμεσο τετράπολο, την κυψελίδα σύγκρουσης, η οποία χρησιμοποιείται ως χώρος θραύσης των ιονισμένων μορίων και πληρώνεται με αέριο σύγκρουσης (collision gas) που είναι, συνήθως, αδρανές αέριο όπως το αργό, παράγοντας έτσι τα θυγατρικά ιόντα. Αυτά με τη σειρά τους, επιλέγονται στο δεύτερο τετραπολικό αναλυτή (MS^2) και καταλήγουν στον ανιχνευτή. Τα παραγόμενα σήματα καταγράφονται, εντέλει, σε κάποιον υπολογιστή και εμφανίζονται γραφικά ως φάσματα μάζας, παρουσιάζοντας τη σχετική αφθονία των σημάτων σύμφωνα με το λόγο τους m/z . Αξίζει να σημειωθεί, πως η ταυτότητα εκάστου μορίου καθορίζεται από το συνδυασμό των μαζών (m/z), τόσο των μητρικών, όσο και των θυγατρικών του ιόντων.

3.3.2.1. Τετραπολικός Αναλυτής Μαζών

Οι τετραπολικοί αναλυτές αποτελούν τους πιο διαδεδομένους αναλυτές μαζών σήμερα και χρησιμοποιούνται ευρέως σε κάθε τομέα της αναλυτικής χημείας. Ένα τετράπολο αποτελείται από τέσσερις παράλληλες μεταλλικές ράβδους, οι οποίες είναι συμμετρικά τοποθετημένες προς τη δέσμη των ιόντων και συνδέονται διαγωνίως ηλεκτρικά αναμεταξύ τους (Σχήμα 3.7). Κάθε ζεύγος ράβδων συνδέεται με τον πόλο πηγής τάσεως, που περιέχει μια συνεχή (Direct Current, DC) και μια εναλλασσόμενη υψίσυχη συνιστώσα, στην περιοχή των ραδιοσυχνοτήτων (radiofrequency, RF). Με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου τα

ίοντα επιταχύνονται εντός του τετραπολικού αναλυτή. Για μία συγκεκριμένη τιμή των δυναμικών αυτών, ίοντα ενός συγκεκριμένου λόγου m/z ακολουθούν μία σταθερή τροχιά διαμέσου των ράβδων και φτάνουν τελικά στον ανιχνευτή. Για συγκεκριμένες τιμές των δυναμικών RF και DC προωθούνται επιλεγμένα ίοντα, με συγκεκριμένο λόγο m/z και απορρίπτονται τα υπόλοιπα, τα οποία αποκτούν μεγαλύτερο ρυθμό επιτάχυνσης, με αποτέλεσμα να προσκρούουν στα ηλεκτρόδια και να αποφορτίζονται. Το δυναμικό DC, συνδυαζόμενο με το RF δυναμικό, δρουν ως φίλτρο για την απόρριψη των ιόντων με μεγάλο m/z . Ο τετραπολικός αναλυτής μαζών δικαίως χαρακτηρίζεται ως ένα φίλτρο μαζών, αφού επιτρέπει μόνο σε ίοντα καθορισμένου m/z να περάσουν ανάμεσα στις μεταλλικές ράβδους, κινούμενα σε ευθεία τροχιά, και τελικά να φτάσουν στον ανιχνευτή.

Οι τετραπολικοί αναλυτές μαζών εμφανίζουν σημαντικά πλεονεκτήματα, καθώς αποτελούν λιγότερο απαιτητικά όργανα, τόσο σε κόστος αγοράς, όσο και στη λειτουργία τους, είναι μικροί σε μέγεθος και μηχανικά ανθεκτικότεροι σε σχέση με άλλους τύπους φασματομέτρων μαζών. Επιπλέον, παρέχουν υψηλότερες ταχύτητες σάρωσης, ώστε ολόκληρο το φάσμα μαζών να λαμβάνεται σε χρόνους μικρότερους των 100 ms, ενώ μέσω των δυνατοτήτων MS/MS, προσφέρουν υψηλότερη ευαισθησία για την ποσοτική ανάλυση γνωστών ή άγνωστων ενώσεων στόχων ακόμη και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις [22].



Σχήμα 3.7. Σχηματική απεικόνιση του τετραπολικού αναλυτή μαζών [155].

Οι πιθανοί τρόποι λήψης δεδομένων σε ένα παράλληλο σύστημα τετραπόλων (MS/MS) είναι:

i) Σάρωση πρόδρομου ιόντος (Precursor ion scan ή Parent ion scan)

Ο πρώτος αναλυτής ρυθμίζεται, ώστε να εκτελεί σάρωση σε ένα επιλεγμένο εύρος μαζών των μητρικών ιόντων. Τα παραγόμενα «μητρικά» ίοντα οδηγούνται στο δεύτερο αναλυτή, ο οποίος είναι ρυθμισμένος σε λειτουργία επιλογής συγκεκριμένου ιόντος. Από το δεύτερο τετράπολο εξέρχεται ένα επιλεγμένο μοναδικό ιόν με συγκεκριμένο λόγο m/z .

ii) Σάρωση θυγατρικού ιόντος (Product ion ή Daughter ion scan)

Στο πρώτο τετράπολο επιτρέπεται η διέλευση μόνο ενός ιόντος με συγκεκριμένο λόγο m/z , το οποίο στη συνέχεια οδηγείται και θραυσματοποιείται εντός του θαλάμου διάσπασης. Τα παραγόμενα θυγατρικά ιόντα οδηγούνται με τη σειρά τους στο δεύτερο αναλυτή, ο οποίος είναι ρυθμισμένος σε λειτουργία σάρωσης.

iii) Παρακολούθηση προεπιλεγμένων ιόντων (Multiple Reaction Monitoring, MRM)

Στην τεχνική MRM, χρησιμοποιούνται δύο στάδια φιλτραρίσματος μαζών με τη βοήθεια ενός TQ. Στο πρώτο τετράπολο επιλέγεται ένα πρόδρομο ιόν για κάθε ένωση, με συγκεκριμένη τιμή λόγου m/z , το οποίο θραυσματοποιείται στο θάλαμο διάσπασης. Στη συνέχεια, στο δεύτερο τετραπολικό αναλυτή λαμβάνονται πληροφορίες μόνο για ένα μικρό αριθμό επιλεγμένων θυγατρικών ιόντων. Είναι προφανές ότι με τον συγκεκριμένο τρόπο λήψης φασμάτων αυξάνεται εντυπωσιακά η εκλεκτικότητα της τεχνικής, δεδομένου ότι το προεπιλεγμένο μητρικό ιόν επιβεβαιώνεται από την παρουσία κάποιου συγκεκριμένου θυγατρικού του. Παράλληλα, επιτυγχάνεται υψηλή ευαισθησία, αφού η επιλογή ενός μοναδικού ιόντος, αυξάνει σημαντικά το παραγόμενο σήμα. Η σάρωση σε λειτουργία MRM αποτελεί πολύτιμο εργαλείο, ιδιαίτερα για διαδικασίες ποσοτικοποίησης.

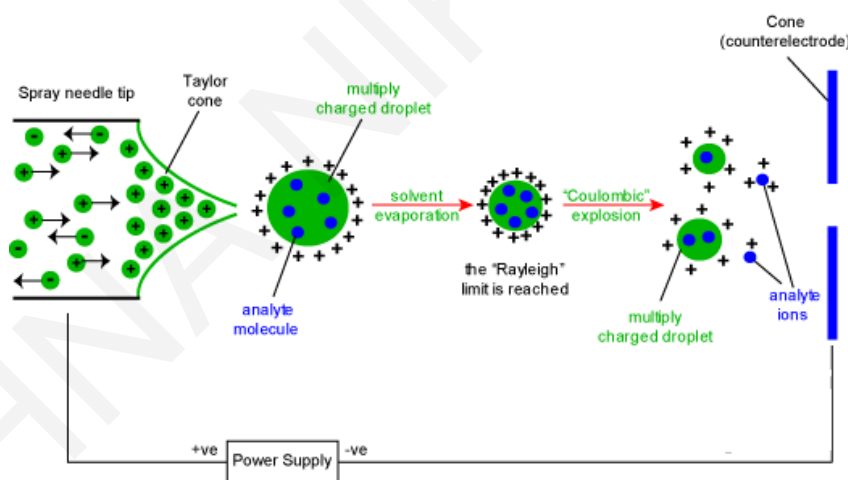
3.3.2.2. Ιονισμός Ηλεκτροψεκασμού

Ο ESI βασίζεται στην παραγωγή και μεταφορά ιόντων που βρίσκονται αρχικά σε ένα διάλυμα, στην αέρια φάση. Αποτελεί μια ήπια τεχνική ιοντισμού με την οποία παράγονται απλά ή πολλαπλά φορτισμένα ιόντα. Μέσω αυτής, μπορούν να αναλυθούν πολικά μόρια μικρού μοριακού βάρους, μη πτητικές και θερμικά ασταθείς ενώσεις, καθώς επίσης και ενώσεις με βιολογική σημασία, όπως οι πρωτεΐνες.

Ο μηχανισμός ESI πραγματοποιείται σε τρία βήματα: i) εκνέφωση ενός διαλύματος δείγματος σε ηλεκτρικά φορτισμένα σταγονίδια ii) εξάτμιση του διαλύτη και συρρίκνωση των σταγονιδίων ii) εκπομπή των ιόντων στην αέρια φάση.

Σε μια πηγή ESI, μια συνεχής ροή του διαλύματος που εμπεριέχει το δείγμα, διέρχεται διαμέσου ενός μεταλλικού τριχοειδή σωλήνα. Στο άκρο του εφαρμόζεται υψηλή τάση (2.5-6 kV), η οποία μπορεί να φέρει θετική ή αρνητική τιμή ανάλογα με τις ενώσεις που επιλέγονται προς ιοντισμό. Καθώς το διάλυμα διέρχεται μέσω του ηλεκτρικού πεδίου, που έχει δημιουργηθεί στο άκρο του τριχοειδούς, στην επιφάνεια του λαμβάνει χώρα διαχωρισμός φορτίου. Τα ομόσημα με το ηλεκτρικό πεδίο ιόντα τείνουν να κινηθούν μακριά από αυτό, ενώ αντίθετα, τα ετερόσημα με το ηλεκτρικό πεδίο ιόντα έλκονται από αυτό απομακρυνόμενα από το μέτωπο του διαλύματος.

Η ανάπτυξη απωστικών ηλεκτροστατικών δυνάμεων, γνωστών και ως «κουλομβικών απώσεων», μεταξύ των συσσωρευμένων στο μέτωπο του διαλύματος ομόσημων ιόντων, ανταγωνίζεται τις συνεκτικές δυνάμεις της επιφανειακής τάσης του υγρού, με αποτέλεσμα η επιφάνεια του να αρχίζει να εκτείνεται, επιτρέποντας στα ομόσημα ιόντα να κινηθούν προς την έξοδο. Με αυτό τον τρόπο το υγρό εξέρχεται από τον τριχοειδή σωλήνα με μια μορφή κωνικής διάταξης που ονομάζεται «κόνος Taylor». Όταν στο τμήμα του διαλύματος που συνιστά τον κώνο Taylor, επιτευχθεί το όριο Rayleigh, στο οποίο η κουλομβική άπωση του επιφανειακού φορτίου γίνεται ίση με την επιφανειακή τάση του διαλύματος, αποδεδυμένονται μικρά φορτισμένα σταγονίδια με τη μορφή εκνεφώματος, τα οποία κάτω από συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης, κινούνται προς την είσοδο του φασματομέτρου. Με τη βοήθεια ροής N₂ ως αέριο ξήρανσης ή αυξημένων θερμοκρασιών στην πηγή ESI, τα φορτισμένα σταγονίδια συνεχώς μειώνονται σε μέγεθος (εξάτμιση του διαλύτη) οδηγώντας σε αύξηση της πυκνότητας του επιφανειακού τους φορτίου. Όταν οι ηλεκτροστατικές απωστικές δυνάμεις μεταξύ των ομοσήμων ιόντων του επιφανειακού φορτίου υπερβούν τις συνεκτικές δυνάμεις της επιφανειακής τάσης (όριο Rayleigh), τα σταγονίδια διαιρούνται σε μικρότερα με μια διάσπαση γνωστή ως «κουλομβική έκρηξη» (Σχήμα 3.8) [156].



Σχήμα 3.8. Σχηματική απεικόνιση του ιοντισμού ESI [157].

Υγρή Χρωματογραφία Υπερύψηλης Απόδοσης σε σύζευξη με διαδοχική φασματομετρία μαζών

Η διαδοχική σύζευξη αποτελεί τη μέθοδο επιλογής για ποσοτικές αναλύσεις αφού παρέχει υψηλή ευαισθησία ακόμη και σε περιπτώσεις πολύπλοκων δειγμάτων όπως το αίμα, πλάσμα, ιστούς, υδατικά απόβλητα και πολλά άλλα, και τη δυνατότητα μείωσης των πολύπλοκων και πολλαπλών σταδίων καθαρισμού και προετοιμασίας των δειγμάτων κατά τις διάφορες αναλύσεις ρουτίνας. Το πρώτο εμπορικά διαθέσιμο σύστημα LC-MS/MS με

πηγή ιοντισμού ESI κυκλοφόρησε πριν περίπου 32 χρόνια. Στις μέρες μας, τα όργανα LC-MS/MS στελεχώνουν τα αναλυτικά εργαστήρια και αποτελούν σημαντικά εργαλεία στις αναλύσεις ρουτίνας.

4. Ανάπτυξη και Επικύρωση Μεθόδου

Είναι διεθνώς αποδεκτό ότι η διαδικασία επικύρωσης μιας μεθόδου αποτελεί αναπόσπαστο μέρος για την εδραίωσή της σε ένα αναλυτικό εργαστήριο, σύμφωνα με τα πρότυπα συμμόρφωσης και τις απαιτήσεις της νομοθεσίας των διάφορων κανονιστικών Επιτροπών [158]. Παράλληλα με την ταχεία ανάπτυξη των αναλυτικών μεθόδων, αποδίδεται μεγάλη σημασία στην ποιότητα και εγκυρότητα αποτελεσμάτων, τα οποία εξασφαλίζονται μέσω της διαδικασίας της επικύρωσης. Η αξιολόγηση της μεθόδου αποτελεί ουσιαστικά το εργαλείο για τον προσδιορισμό του σκοπού, για τον οποίο προορίζεται η μέθοδος και τελικά για να τεκμηριωθεί πειραματικά η καταλληλότητά της. Προτού ξεκινήσει η διαδικασία της επικύρωσης, πρέπει να καθοριστεί εάν η αναπτυχθείσα μεθοδολογία εξυπηρετεί τον αναλυτικό σκοπό για τον οποίο προορίζεται. Για παράδειγμα, πρέπει να ληφθούν υπόψη το είδος της μεθόδου, ο τύπος και το εύρος συγκεντρώσεων των αναλυτών που θα εξεταστούν, και ο τύπος του υλικού ή της μήτρας για την οποία εφαρμόζεται η μέθοδος. Εν κατακλείδι, η βάση για μια σωστή αξιολόγηση στηρίζεται κυρίως στο σαφή προσδιορισμό των αναλυτικών απαιτήσεων [159, 160].

Στο πλαίσιο της επικύρωσης των μεθόδων που αναπτύχθηκαν σε αυτή την ερευνητική εργασία, εφαρμόστηκαν διάφορα μέτρα αξιολόγησης, τα οποία στη συνέχεια παρουσιάζονται με λεπτομέρεια. Αναφορικά με το πρώτο μέρος της διδακτορικής αυτής έρευνας, η ανάπτυξη της μεθόδου περιορίστηκε στον προσδιορισμό του κατάλληλου CS ή CIL ή και συνδυασμών, καθώς επίσης και στη βέλτιστη συγκέντρωση αυτών, ώστε να επιτευχθεί πλήρης διαχωρισμός των χειρόμορφων ενώσεων. Εν συνεχεία, ακολούθησε η επικύρωση με τον προσδιορισμό της ακρίβειας, μέσω του υπολογισμού της σχετικής τυπικής απόκλισης (Relative Standard Deviation, RSD), η οποία εκφράζει την εγγύτητα της συμφωνίας μεταξύ επαναλαμβανόμενων πειραμάτων στις ίδιες αναλυτικές συνθήκες, με την μέση τιμή των μετρήσεων (επαναληψιμότητα).

Η αύξηση της ευαισθησίας αποτέλεσε τη σημαντικότερη πρόκληση του δεύτερου μέρους της παρούσας διδακτορικής μελέτης, αφού η THC και τα παράγωγα της βρίσκονται σε ελάχιστες ποσότητες στα βιολογικά δείγματα. Η μεγαλύτερη δυσκολία έγκειται στο γεγονός ότι ο χρόνος ημιζωής των ουσιών αυτών είναι μικρός, αφού μεταβολίζονται πολύ γρήγορα και καθιστούν, τις πλείστες φορές, αδύνατη την ανίχνευση τους κάτω από τα αποδεκτά όρια

ανίχνευσης. Η αναγκαιότητα για την ανάπτυξη μιας κατάλληλης, και συνάμα αξιόπιστης μεθόδου, επιτεύχθηκε με την αξιολόγηση της αναπτυχθείσας μεθοδολογίας. Στο πλαίσιο αυτό, εκτιμήθηκαν τα όρια γραμμικότητας, η ακρίβεια, η πιστότητα και τα LODs και LOQs, καθώς επίσης και άλλοι, εξίσου σημαντικές παράμετροι επικύρωσης και αξιολόγησης μεθόδων επεξεργασίας βιολογικών δειγμάτων, όπως η επίδραση του υλικού της μήτρας, το φαινόμενο «Carryover» και η ανάκτηση (Recovery).

Η αξιολόγηση της μεθόδου, που αναπτύχθηκε και χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά για τη μελέτη αυτή, πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του ICH (International Council for Harmonisation) για την αξιολόγηση και επικύρωση αναλυτικών μεθόδων [158].

4.1. Ακρίβεια

Η ακρίβεια ορίζεται ως η εγγύτητα της συμφωνίας (βαθμός διασποράς) μεταξύ μιας σειράς επαναλαμβανόμενων μετρήσεων που λαμβάνονται σε καθορισμένες συνθήκες μιας μεθόδου (εκφράζεται συνήθως ως ποσοστό). Σύμφωνα με τον ICH προσδιορίζεται με την ανάλυση δειγμάτων ελέγχου (Quality Control Samples, QC), τα οποία εμβολιάζονται με γνωστής συγκέντρωσης μίγμα των εξεταζόμενων ουσιών. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται σύγκριση με τα αναλυτικά δεδομένα που λαμβάνονται από την μέτρηση πρότυπων διαλυμάτων στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις, συγκεντρώσεις που αποκρίνονται στις τιμές που εμπίπτουν στις καμπύλες βαθμονόμησης [103].

Η ακρίβεια διακρίνεται σε τρεις κατηγορίες: την επαναληψιμότητα (repeatability or intraday precision), την ενδιάμεση ακρίβεια (intermediate or interday precision) και την αναπαραγωγιμότητα (reproducibility). Η *επαναληψιμότητα* περιγράφει τη συμφωνία μεταξύ των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται κάτω από τις ίδιες συνθήκες λειτουργίας σε σύντομο χρονικό διάστημα. Η εν λόγω παράμετρος υπολογίζεται συνήθως μετά από διαδοχικές πειραματικές μετρήσεις που λαμβάνονται την ίδια μέρα από τον ίδιο ερευνητή και πραγματοποιούνται στο ίδιο όργανο.

Σε αντίθεση με την επαναληψιμότητα, για τον προσδιορισμό της *ενδιάμεσης ακρίβειας*, οι μετρήσεις πραγματοποιούνται στον ίδιο εργαστηριακό χώρο αλλά σε διαφορετικές ημέρες. Η ενδιάμεση ακρίβεια αποτελεί ουσιαστικά μέτρο της σταθερότητας μιας μεθόδου κατά τη διάρκεια μεγάλων χρονικών διαστημάτων μετά την ανάπτυξη της.

Η αναπαραγωγιμότητα αναφέρεται στην πραγματοποίηση μετρήσεων με αξιοποίηση της ίδιας μεθόδου, η οποία όμως διεξάγεται σε διαφορετικούς εργαστηριακούς χώρους, σε διαφορετικό όργανο και από διαφορετικούς επιστημονικούς αναλυτές.

Κριτήριο αξιολόγησης της ακρίβειας είναι η απόλυτη τυπική απόκλιση (absolute standard deviation, s) και η εκατοστιαία σχετική τυπική απόκλιση (RSD), οι οποίες εκφράζονται ποσοτικά σύμφωνα με τις ακόλουθες εξισώσεις:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N-1}} \quad (\text{Εξ. 5})$$

$$RSD (\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (\text{Εξ. 6})$$

όπου N , ο αριθμός των επαναλαμβανόμενων μετρήσεων, \bar{x} η μέση τιμή των N μετρήσεων και x_i η κάθε επιμέρους μέτρηση [161].

4.2. Γραμμικότητα

Η γραμμικότητα μιας αναλυτικής διαδικασίας αναφέρεται στην ευθέως ανάλογη εξάρτηση της μετρούμενης ιδιότητας (μέσα σε ένα δεδομένο εύρος) ως προς τη συγκέντρωση (ποσότητα) του αναλύτη στο δείγμα. Η γραμμικότητα συχνά αξιολογείται με πρότυπα διαλύματα σε 5-6 επίπεδα συγκέντρωσης, που καλύπτουν το εύρος των συγκεντρώσεων, κατασκευάζοντας γράφημα του λαμβανομένου σήματος του οργάνου ως συνάρτηση της συγκέντρωσης της υπό ανάλυση ένωσης. Εκφράζεται κυρίως με το συντελεστή γραμμικής συσχέτισης (correlation coefficient, r) ή το συντελεστή προσδιορισμού (coefficient of determination, r^2), οι οποίοι πρέπει να προσεγγίζουν τη μονάδα. Ο συντελεστής συσχέτισης ή/και προσδιορισμού, η τετμημένη, η κλίση της γραμμής παλινδρόμησης θα πρέπει να υποβάλλονται στα αποτελέσματα.

4.3. Όρια Ανίχνευσης και Ποσοτικοποίησης

Ως LOQ ορίζεται η χαμηλότερη συγκέντρωση η οποία μπορεί να μετρηθεί με ακρίβεια και πιστότητα, ενώ ως LOD, η ποσότητα που μπορεί να ανιχνευθεί χωρίς, όμως, να μπορεί να ποσοτικοποιηθεί. Ως ευαισθησία χαρακτηρίζεται η ικανότητα της μεθόδου να διακρίνει μικρές μεταβολές της συγκέντρωσης ή της απόλυτης ποσότητας και εκφράζεται με την κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης.

Τα LOD και LOQ μπορούν να υπολογιστούν από την καμπύλη βαθμονόμησης σύμφωνα με τις παρακάτω εξισώσεις:

$$\text{LOD} = \frac{3.3 \text{ SD}}{m} \quad (\text{Εξ. 7})$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \text{ SD}}{m} \quad (\text{Εξ. 8})$$

όπου m , η κλίση και SD , η τυπική απόκλιση της καμπύλης βαθμονόμησης.

4.4. Απόδοση Εκχύλισης

Η ανάκτηση εκφράζει την εγγύτητα της συμφωνίας μεταξύ μιας πραγματικής τιμής και της μετρούμενης πειραματικής. Σε μεθόδους οι οποίες περιλαμβάνουν κάποιο στάδιο εκχύλισης, η ανάκτηση ή αλλιώς απόδοση της εκχύλισης (process efficiency, PE), αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της επικύρωσης της μεθόδου. Η αξιολόγηση της εν λόγω παραμέτρου επιτυγχάνεται με τη μέθοδο εμβολιασμού (spiking), στην οποία γίνεται προσθήκη γνωστής συγκέντρωσης του αναλύτη στην εξεταζόμενη μήτρα, πριν την έναρξη της επεξεργασίας. Ο βαθμός, στον οποίο η ποσότητα του αναλύτη που εμβολιάστηκε στο δείγμα λαμβάνεται πίσω μετά την επεξεργασία και ανάλυση του δείγματος, ορίζεται ως ανάκτηση και εκφράζεται συνήθως σαν ποσοστό (%). Η ανάκτηση δεν απαιτείται πάντοτε να ισοδυναμεί με 100%, αλλά τα επίπεδα των αναλυτών και του εσωτερικού προτύπου (Internal Standard, I.S.) πρέπει να παρουσιάζουν συνοχή και σταθερότητα [158]. Η διαδικασία αυτή απαιτεί τη λήψη μετρήσεων εντός της εξεταζόμενης μήτρας και σε διαφορετικά επίπεδα συγκεντρώσεων. Συγκεκριμένα, θα πρέπει να μελετάται τουλάχιστον μία συγκέντρωση κοντά στο όριο ποσοτικοποίησης και μία υψηλή συγκέντρωση, στο όριο της καμπύλης βαθμονόμησης [159, 160].

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, η απόδοση της εκχύλισης (PE) των κανναβινοειδών υπολογίστηκε από το λόγο του εμβαδού τυφλού δείγματος, το οποίο εμβολιάστηκε πριν την εκχύλιση (C), ως προς το εμβαδόν πρότυπου διαλύματος των αναλυτών στην ίδια συγκέντρωση (A), με βάση την ακόλουθη εξίσωση.

$$\% PE = \frac{C}{A} \times 100 \quad (\text{Εξ. 9})$$

4.5. Επίδραση του Μητρικού Υλικού

Θα περίμενε κανείς ότι η σύγχρονη οργανολογία της UPLC-MS/MS θα επέφερε απολύτως «καθαρά» και επαναλήψιμα αποτελέσματα χωρίς παρεμποδίσεις από το υπόστρωμα. Τα πλεονεκτήματα αυτής της τεχνικής περιλαμβάνουν την ευαισθησία και την απόδοση. Στην πράξη όμως, φαινόμενα αδικαιολόγητης μείωσης της απόδοσης σήματος παρατηρούνται συχνά στις αναλύσεις βιολογικών δειγμάτων, ακόμα και με τη χρήση υπερσύγχρονων οργάνων. Το πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα, αποτελεί το «φαινόμενο υποστρώματος» ή αλλιώς επίδραση του μητρικού υλικού (ME).

Η σύζευξη MS/MS αποτελεί ένα ισχυρό, θεμελιακό αναλυτικό εργαλείο που η χρήση του, σε συνδυασμό με ένα χρωματογραφικό LC ή GC σύστημα προσφέρει τη δυνατότητα υψηλής ευαισθησίας και εκλεκτικότητας στην ποσοτική ανάλυση ενώσεων στα βιολογικά δείγματα [137]. Ωστόσο, ένα μοναδικό, αλλά αξιοσημείωτο τρωτό σημείο της τεχνικής αυτής, αποτελεί η επίδραση του μητρικού υλικού. Η επίδραση αυτή, η «αχίλλειος πτέρνα» της UPLC-MS/MS, όπως πολύ εύστοχα σχολιάζει η ομάδα του Taylor σε επιστημονικό τους άρθρο, είναι ένας όρος που χρησιμοποιείται για να καθορίσει τη διαφορά του αναλυτικού (φασματομετρικού) σήματος που σημειώνεται κατά τη μέτρηση μιας ουσίας σε πρότυπο διάλυμα και σε ένα βιολογικό δείγμα [138]. Οι επιδράσεις αυτές προέρχονται κυρίως από ενδογενή συστατικά της μήτρας και μπορούν να επηρεάσουν, τόσο τη χρωματογραφική συμπεριφορά των αναλυτών, όσο και το βαθμό ιοντισμού των ιόντων, με αποτέλεσμα την καταστολή (ion suppression) ή την ενίσχυση (ion enhancement) στη μέτρηση του αναλυτικού σήματος, η οποία οφείλεται στη συνέκλυση των συστατικών της μήτρας.

Οι επιδράσεις αυτές μπορεί να μην παρουσιάζονται άμεσα στα χρωματογραφήματα ανάλυσης, εντούτοις προκαλούν καταλυτικές επιπτώσεις στην ακρίβεια, στην πιστότητα και στην ευαισθησία. Το ανεπιθύμητο αυτό φαινόμενο είναι εξαιρετικά μεταβλητό μεταξύ των ποικίλων, ετερογενών δειγμάτων που εξετάζονται, γεγονός που δυσχεραίνει περισσότερο τον έλεγχο, την πρόβλεψη, αλλά και τον περιορισμό των επιδράσεων του. Λαμβάνοντας υπόψη τη μεγάλη επιρροή της συγκεκριμένης παραμέτρου στα ποιοτικά χαρακτηριστικά μιας μεθόδου (ακρίβεια, αξιοπιστία), πολλοί ερευνητές περιλαμβάνουν την αξιολόγησή της, ως ένα ουσιαστικό μέρος της επικύρωσής της. Να σημειωθεί ότι, σε ορισμένες μόνο ερευνητικές εργασίες έχουν γίνει προσπάθειες προκειμένου να μειώσουν ή να εξαλείψουν την επίδραση της μήτρας που σημειώθηκε στα στάδια της επεξεργασίας, με τις προσπάθειες κυρίως να επικεντρώνονται στη βελτιστοποίηση της προετοιμασίας του δείγματος [137]. Ωστόσο, η προσέγγιση αυτή, είναι χρονοβόρα, κοστίζει περισσότερο και, επιπλέον, αυξάνεται ο κίνδυνος της απώλειας των αναλυτών κατά τη διάρκεια πολλών διαδοχικών σταδίων καθαρισμού.

Υπάρχουν διάφορες προσεγγίσεις προσδιορισμού του φαινομένου αυτού στη βιβλιογραφία. Οι σημαντικότερες είναι ο εμβολιασμός (με χρήση πρότυπου διαλύματος των εξεταζόμενων ουσιών) του τυφλού δείγματος μετά την εκχύλιση. Ο καθορισμός του ME σε αυτή την εργασία πραγματοποιήθηκε βάση την ακόλουθη εξίσωση, με εμβολιασμό του δείγματος μετά την εκχύλιση. Στην συνέχεια, υπολογίστηκε η επίδραση της μήτρας (ME) από το λόγο του εμβαδού τυφλού δείγματος, το οποίο εμβολιάστηκε μετά την εκχύλιση (B), ως προς το εμβαδό καθαρού (πρότυπου) μίγματος των αναλυτών της ίδιας συγκέντρωσης (A) [162].

$$ME = \frac{B}{A} \times 100 \quad (\text{Εξ. 10})$$

Όπου:

ME < 100 %, υποβάθμιση της έντασης του αναλυτικού σήματος των ιόντων (ion suppression)

ME = 100 %, καμία επίδραση της μήτρας

ME > 100 %, ενίσχυση της έντασης του αναλυτικού σήματος των ιόντων (ion enhancement)

4.6. Φαινόμενο «Carryover»

Το φαινόμενο «Carryover» αποτελεί σημαντική ανησυχία κατά την ανάλυση βιολογικών δειγμάτων με τις τεχνικές HPLC, LC-MS και LC-MS/MS, καθώς μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την ακρίβεια (accuracy) και την πιστότητα (precision) μιας μεθόδου, ειδικότερα στις πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις αναλυτών που συνήθως εξετάζονται [163]. Η συνεχόμενη αύξηση της ευαισθησίας στα συστήματα LC-MS/MS νέας γενιάς, με όρια ανίχνευσης που φτάνουν μέχρι την κλίμακα των μερικών pg/mL, ενισχύει ολοένα και περισσότερο το ρίσκο για την παρουσίαση του φαινομένου κατά την βιοανάλυση.

Το φαινόμενο «Carryover», αλλά και η παρουσία προσμίξεων σε ένα χρωματογραφικό σύστημα είναι συνήθως αποτέλεσμα της απορρόφησης ή συσσώρευσης σωματιδίων του δείγματος στη χρωματογραφική στήλη ή στον αυτόματο δειγματολήπτη από προηγούμενες αναλύσεις δειγμάτων. Τα σωματίδια αυτά παρεμβάλλονται στις αμέσως επόμενες αναλύσεις δείγματος, ή ακόμη χειρότερα, σε ορισμένες περιπτώσεις, μπορούν να επηρεάσουν τυχαία τα χρωματογραφήματα που λαμβάνονται από τις αναλύσεις δειγμάτων που πραγματοποιούνται σε μεταγενέστερο στάδιο.

Συνεπώς, το φαινόμενο «Carryover» πρέπει να προσδιορίζεται και να ελαχιστοποιείται από τα αρχικά στάδια της ανάπτυξης μιας αναλυτικής μεθόδου. Κατά την επικύρωση και αξιολόγηση της μεθόδου, το «Carryover» προσδιορίζεται από την έγχυση τυφλού (blank) δείγματος αμέσως μετά την υψηλότερη συγκέντρωση της καμπύλης βαθμονόμησης ή μετά την ανάλυση δείγματος υψηλής συγκέντρωσης. Σύμφωνα με τον ICH, το μετρούμενο αναλυτικό σήμα στο τυφλό δείγμα δεν πρέπει να είναι μεγαλύτερο από το 20% του εμβαδού της κορυφής του αναλύτη στο LOQ [158].

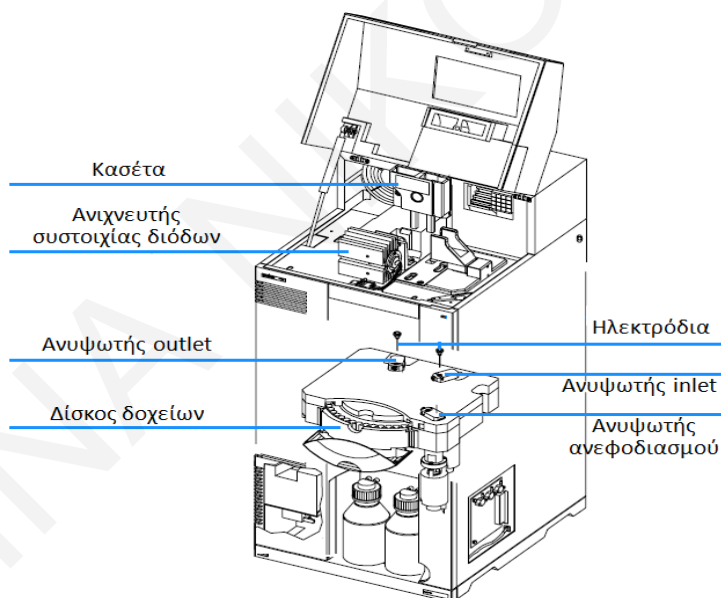
5. Πειραματικό Μέρος

5.1. Χειρόμορφος Διαχωρισμός Ενώσεων Κλινικής Σημασίας με Χρήση της CE

Στο πρώτο μέρος της παρούσας διδακτορικής εργασίας μελετήθηκε ο χειρόμορφος διαχωρισμός τεσσάρων ουσιών μεγάλου κλινικού και φαρμακευτικού ενδιαφέροντος: της T4, του NEF, της CTZ και της FXD. Πιο κάτω περιγράφεται το πειραματικό μέρος (οργανολογία, αντιδραστήρια, αναλύτες, BGEs), για κάθε μελέτη ξεχωριστά.

5.1.1. Οργανολογία

Όλα τα πειράματα διεξήχθησαν σε σύστημα Agilent CE G1600A, εφοδιασμένο με ανιχνευτή συστοιχίας διόδων DAD UV-vis. Επιπλέον, στο σύστημα υπάρχει ένας αυτόματος δειγματολήπτης, ο οποίος είναι συνδεδεμένος με ηλεκτρονικό υπολογιστή. Ο χειρισμός του συστήματος και η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε μέσω του λογισμικού Agilent ChemStation. Το σύστημα απεικονίζεται στο **Σχήμα 5.1**.



Σχήμα 5.1. Σύστημα Agilent CE και τα βασικά μέρη από τα οποία αποτελείται [164].

Για όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκε τριχοειδής στήλη από τηγμένη πυριτία, η οποία καλύπτεται εξωτερικά από μια επίστρωση πολυϊμιδίου, ενός θερμικά σταθερού πολυμερούς με καλή χημική αντίσταση και εξαιρετικές μηχανικές ιδιότητες. Η επίστρωση αυτή προσδίδει στη στήλη ελαστικότητα, προστατεύοντάς την από σπάσιμο και βοηθά στη διατήρηση της θερμοκρασίας κατά μήκος της στήλης. Η τηγμένη πυριτία είναι μη κρυσταλλική μορφή του διοξειδίου του πυριτίου (SiO_2) και παρουσιάζει τη χαρακτηριστική

άμορφη δομή του γυαλιού. Η τηγμένη πυριτία έχει σχεδόν μηδενική θερμική διαστολή και καλή θερμική αντίσταση, παρουσιάζει πολύ καλή χημική αδράνεια, μπορεί να επικαλυφθεί, έχει χαμηλή διηλεκτρική σταθερά, είναι καλά διαπερατή στο UV-Vis και είναι φθηνή.

Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε είχε εσωτερική διάμετρο (internal diameter, i.d.) 50 μm , ολικό μήκος (total length, L) 38.5 cm και αποτελεσματικό μήκος (effective length, l) 30 cm. Αποτελεσματικό μήκος ορίζεται το μήκος της στήλης από την είσοδο της μέχρι τον ανιχνευτή.

Σημαντική παράμετρος για την ύπαρξη σταθερών συνθηκών, ώστε να επιτευχθεί η καλύτερη δυνατή επαναληψιμότητα, αποτελεί το πλύσιμο της στήλης. Στην παρούσα έρευνα, κάθε νέα στήλη πλενόταν αρχικά με απεσταγμένο νερό (H_2O) για 10 λεπτά, στη συνέχεια με υδροξείδιο του νατρίου (NaOH) 1 M για μια ώρα, ξανά με H_2O για ακόμα 10 λεπτά και τέλος με το BGE για 30 λεπτά. Ο ρόλος του NaOH είναι η αποπρωτονίωση των ομάδων σιλανόλης στην εσωτερική επιφάνεια της στήλης, ενώ του BGE η επίτευξη συνθηκών ισορροπίας μέσα στη στήλη. Στην αρχή κάθε μέρας η στήλη πλενόταν με H_2O (5 min), 1 M NaOH (10 min), H_2O (5 min) και BGE για (15 min), ενώ, μεταξύ διαδοχικών πειραμάτων, με H_2O (1 min), 1 M NaOH (2 min), H_2O (1 min) και τελικά με BGE για 5 min.

Το σύστημα Agilent CE G1600A είναι εφοδιασμένο με ανιχνευτή DAD για ανίχνευση στο UV-Vis. Για να είναι δυνατή η ανίχνευση με UV-Vis δημιουργείται παράθυρο ανίχνευσης περίπου 0.5 cm σε απόσταση 30 cm της στήλης με κάψιμο της εξωτερικής επίστρωσης πολυϊμιδίου, ώστε η δέσμη φωτός από τον ανιχνευτή να διαπεράσει τη γυάλινη στήλη, η οποία αντικαθιστά την κυψελίδα, και να πραγματοποιηθεί η ανίχνευση των αναλυτών. Στη συνέχεια, η στήλη τοποθετείται μέσα στην κασέτα με τέτοιο τρόπο ώστε το παράθυρο να συμπίπτει με το παράθυρο του ανιχνευτή. Η ανίχνευση έγινε στα 214 nm για την T4, στα 200 nm NEF και στα 195 nm για την CTZ και την FXD.

Στο σύστημα CE περιέχεται επίσης τροφοδοτικό υψηλής τάσης, με το οποίο εφαρμόζεται τάση εύρους 0 έως 30 kV και ρεύμα εύρους 0 έως 100 μA . Οι αντίστροφες τιμές δυναμικού μπορούν να προκύψουν με αντιστροφή ανόδου-καθόδου ή με επικάλυψη των τοιχωμάτων της στήλης. Η διατήρηση της τάσης σε σταθερά επίπεδα είναι σημαντική ώστε να υπάρχει επαναληψιμότητα στους χρόνους μετανάστευσης των αναλυτών. Οι μελέτες πραγματοποιήθηκαν εφαρμόζοντας δυναμικό 20 kV, εκτός από τις περιπτώσεις που αναφέρεται διαφορετικά (από 15-30 kV).

Εκτός από τη σταθερή τάση, σημαντική παράμετρος για την επίτευξη καλής επαναληψιμότητας είναι ο αποτελεσματικός έλεγχος της θερμοκρασίας της στήλης, αφού ο χρόνος μετανάστευσης των αναλυτών εξαρτάται ισχυρά από τη θερμοκρασία. Το σύστημα CE είναι εφοδιασμένο με θερμοστάτη αέρα, ο οποίος ρυθμίζει τη θερμοκρασία στους ± 0.1 °C, διατηρώντας τη θερμοκρασία σταθερή και εξαλείφοντας τη θερμοκρασία Joule. Επιπρόσθετα, ο έλεγχος της θερμοκρασίας μπορεί να εφαρμοστεί ως παράμετρος βελτιστοποίησης του διαχωρισμού, αφού αυξομειώσεις της θερμοκρασίας οδηγούν σε αυξομειώσεις του ιξώδους του BGE, το οποίο με τη σειρά του προκαλεί μεταβολές στους χρόνους μετανάστευσης και στη R_s των αναλυτών. Η θερμοκρασία της στήλης διατηρήθηκε στους 20° C, εκτός από τις περιπτώσεις που αναφέρεται διαφορετικά.

Η έγχυση του δείγματος για όλους τους αναλύτες που μελετήθηκαν στην παρούσα έρευνα πραγματοποιήθηκε υδροδυναμικά με εφαρμογή πίεσης 50 mbar για 3 sec εκτός στην περίπτωση της FXD και της CTZ (30 mbar για 3 sec). Η υδροδυναμική έγχυση επιλέχθηκε έναντι της ηλεκτροκινητικής έγχυσης λόγω της καλύτερης επαναληψιμότητας που προσφέρει.

5.1.2. Αναλύτες

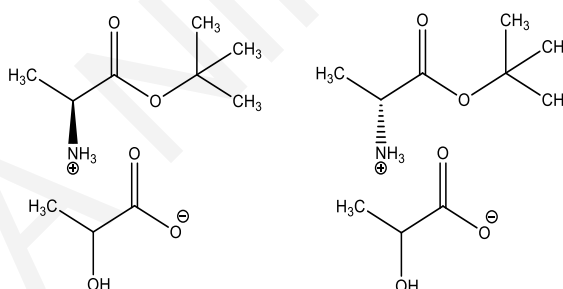
Όλες οι χημικές ενώσεις λήφθηκαν από την εταιρία Sigma Aldrich. Τα πρότυπα διαλύματα των αναλυτών προετοιμάστηκαν σε 9 mM NaOH (L-T4, D-T4), σε MeOH (NEF και FXD) και σε H₂O (CTZ), σε συγκέντρωση 1 mg/mL. Στη συνέχεια αραιώθηκαν σε συγκεντρώσεις 0.2 mg/mL, 0.4 mg/mL, 0.5 mg/mL και 1.0 mg/mL για την L,D- T4, NEF, CTZ και FXD αντίστοιχα.

5.1.3. Διαλύτες και Αντιδραστήρια

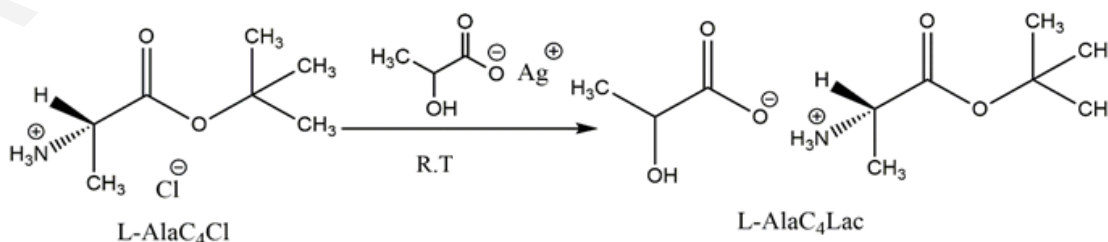
Ως ρυθμιστικά διαλύματα χρησιμοποιήθηκαν το τρις-υδροξυμέθυλ-αμινομεθάνιο (Tris-(hydroxymethyl)aminomethane Tris) σε συγκεντρώσεις 15, 25, 100 mM, το δεκαένυδρο τετραβορικό νάτριο (sodium tetraborate decahydrate, Borate) σε συγκεντρώσεις 15, 25, 100 mM, το οξικό αμμωνίο (Ammonium Acetate) σε συγκέντρωση 5 mM και μίγμα από 100 mM Tris και 10 mM Borate. Η ρύθμιση του pH πραγματοποιήθηκε με προσθήκη διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) ή υδροχλωρικού (HCl) ή οξικού (CH₃COOH) οξέος (Merck, Darmstadt, Germany), αντίστοιχα. Στα πειράματα όπου CDs, CFs, CILs ή και συνδυασμός αυτών χρησιμοποιήθηκαν σαν πρόσθετα, το pH ρυθμίστηκε μετά την προσθήκη τους στο BGE.

5.1.4. Σύνθεση των CILs

Τα CILs που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την εργασία είναι τα L- και D- εναντιομερή του γαλακτικού εστέρα της τερτ-βουτυλ αλανίνης (Alanine tert-butyl ester Lactate, L-AlaC₄Lac, D-AlaC₄Lac), τα οποία απεικονίζονται στο **Σχήμα 5.2**. Η σύνθεσή τους αναφέρεται σε προηγούμενες δημοσιεύσεις [58, 60]. Αρχικά, δημιουργήθηκαν δύο μίγματα. Το ένα μίγμα δημιουργήθηκε προσθέτοντας κατάλληλη ποσότητα υδροχλωρικού εστέρα της τερτ-βουτυλ αλανίνης (L-Alanine tert-butyl ester hydrochloride, L-AlaC₄Cl) σε ορισμένη ποσότητα MeOH, και το δεύτερο με κατάλληλη ποσότητα γαλακτικού αργύρου (silver lactate, AgLac) επίσης σε MeOH. Ακολούθως, τα δύο αυτά μίγματα αναμείχθηκαν και αναδεύτηκαν για περίπου δύο ώρες. Το ίζημα που σχηματίστηκε απομακρύνθηκε με διήθηση και το διήθημα τοποθετήθηκε σε περιστροφικό εξατμιστήρα (rotary evaporator) προς εξάτμιση του διαλύτη. Το D-AlaC₄Lac συντέθηκε με την ίδια διαδικασία χρησιμοποιώντας το D- εναντιομερές του εστέρα της αλανίνης. Στο **Σχήμα 5.3**, φαίνεται η αντιπροσωπευτική πορεία σύνθεσης των CILs και συγκεκριμένα του L-AlaC₄Lac και στο **Σχήμα 5.4** παρουσιάζεται το L-AlaC₄Lac, όπως παρασκευάστηκε στο Εργαστήριο Ενόργανης Χημικής Ανάλυσης.



Σχήμα 5.2. Δομές των χειρόμορφων ιοντικών υγρών L-AlaC₄Lac και D-AlaC₄Lac.



Σχήμα 5.3. Αντιπροσωπευτική σύνθεση του L-AlaC₄Lac.



Σχήμα 5.4. Σύνθεση του L-AlaC₄Lac στο εργαστήριο Ενόργανης Χημικής Ανάλυσης.

5.2. Ανίχνευση και Ποσοτικοποίηση Κανναβινοειδών Ενώσεων στις Κυψελίδες (κερί) Αυτιού με Χρήση της Τεχνικής UPLC-MS/MS

Στο επόμενο στάδιο της διδακτορικής διατριβής, επιχειρήθηκε για πρώτη φορά, ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός της THC, της κύριας ψυχοδραστικής ένωσης της κάνναβης και των μεταβολιτών της, σε ένα μη συνηθισμένο βιολογικό δείγμα, στις κυψελίδες αυτιού (κερί, cerumen), με τη χρήση της τεχνικής UPLC-MS/MS. Στα προπαρασκευαστικά πειράματα, τόσο της επεξεργασίας όσο και της ανάλυσης αυτού του ασυνήθιστου βιολογικού δείγματος, διαπιστώθηκε πως πράγματι αποτελεί ένα εναλλακτικό δείγμα για ανίχνευση κανναβινοειδών ενώσεων. Τόσο η μέθοδος που αναπτύχθηκε στο UPLC-MS/MS, όσο και η μέθοδος επεξεργασίας των δειγμάτων, αποτελούν καινοτόμες μεθόδους που βρίσκουν εφαρμογή στη διεκπεραίωση της μελέτης αυτής, αλλά και σε μελλοντικές τοξικολογικές αναλύσεις.

5.2.1 Οργανολογία

Η διεξαγωγή όλων των πειραμάτων του δεύτερου μέρους της διδακτορικής μελέτης πραγματοποιήθηκε σε σύστημα Waters Xevo TQXS UPLC-MS/MS εξοπλισμένο με σύστημα ACQUITY I-Class LC, το οποίο βρίσκεται στο τμήμα Ενόργανης Χημικής Ανάλυσης του ιδιωτικού εργαστηρίου M.C. Analysis στην Αλάμπρα (Σχήμα 5.5) Για τα πειράματα αναπτύχθηκε μια καινούργια μέθοδος στο συζευγμένο σύστημα, η οποία εφαρμόστηκε για πρώτη φορά.

Για την ανίχνευση των εξεταζόμενων ουσιών χρησιμοποιήθηκε τριπλό τετραπολικό φασματόμετρο μάζας εξοπλισμένο με πηγή ESI. Ο χειρισμός του συστήματος, καθώς επίσης η συλλογή και η επεξεργασία όλων των πειραματικών δεδομένων, έγινε μέσω του λογισμικού MassLynx V 4.2.



Σχήμα 5.5. Waters Xevo TQXS UPLC-MS/MS, το οποίο βρίσκεται στο ιδιωτικό εργαστήριο M.C. Analysis στην Αλάμπρα.

Οι παράμετροι που εφαρμόστηκαν στην πηγή ιοντισμού ήταν: 3.0 kV το δυναμικό τριχοειδούς, 10.0 V το δυναμικό του cone, 150 °C θερμοκρασία της πηγής, ενώ η θερμοκρασία αποδιαλύτωσης ήταν 500 °C; 150 L/h η ροή του αερίου του cone, 600 L/h η ροή του αερίου αποδιαλύτωσης (και τα δύο αέρια ήταν άζωτο). Στην κυψελίδα σύγκρουσης χρησιμοποιήθηκε αέριο Ar.

Για το χρωματογραφικό προσδιορισμό των ενώσεων, χρησιμοποιήθηκε στήλη τύπου ACQUITY UPLC™ BEH C18 της εταιρίας Waters με διαστάσεις 50 x 2.1 mm, και εσωτερική διάμετρο σωματιδίων (i.d.), 1.7 μm και κινητή φάση αποτελούμενη από δύο συστήματα διαλυτών, (A) υδατικό διάλυμα 0.1% μυρμηκικού οξέος (FA) (H₂O, 0.1% FA) και (B) ακετονιτριλίου με διάλυμα μυρμηκικού οξέος (ACN, 0.1% FA). Το εφαρμοζόμενο, βαθμιδωτό πρόγραμμα έκλουσης των διαλυτών ήταν: αρχικά 0 min 55% B; 0.0-0.5 min 64% B; 0.5-4.0 min 67.5% B; από 4.1 μέχρι και το 6.0 min ανήλθε στα 95% B και τέλος από 6.1 μέχρι 8.0 min επανήλθε στο αρχικό 55% B. Η βέλτιστη ταχύτητα ροής ορίστηκε στα 0.35 mL/min, ενώ ο όγκος έγχυσης δείγματος ήταν 10 μL. Η θερμοκρασία της στήλης και του αυτόματου δειγματολήπτη διατηρήθηκε στους 35 °C και 10 °C, αντίστοιχα. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, επιλέχθηκε η στήλη BEH C18, καθώς θεωρείται μία από τις πρώτες επιλογές για τους περισσότερους διαχωρισμούς, αφού επιτρέπει την εφαρμογή μιας

ευρύτερης περιοχής του pH κατά την ανάλυση [88, 94, 123, 165]. Δικαίως αποκαλείται ως στήλη καθολικής χρήσης, καθώς συναντάται σε πληθώρα δημοσιεύσεων, στις οποίες εξετάζεται ο διαχωρισμός ποικίλων ενώσεων ανάμεσα τους και των κανναβινοειδών σε διάφορα βιολογικά δείγματα.

5.2.2. Αναλύτες

Όλες οι πρότυπες ενώσεις κανναβινοειδών αγοράστηκαν από τις εταιρίες Cerilliant (Round Rock, Texas) και LGC (Wesel, Germany) σε διαλύματα μεθανόλης, συγκέντρωσης 1 mg/mL. Στη μελέτη αυτή εξετάστηκαν τα συνηθέστερα κανναβινοειδή: η THC, ii) η THC-OH iii) η THC-COOH), iv) η CBN, και v) η CBD.

5.2.3. Διαλύτες

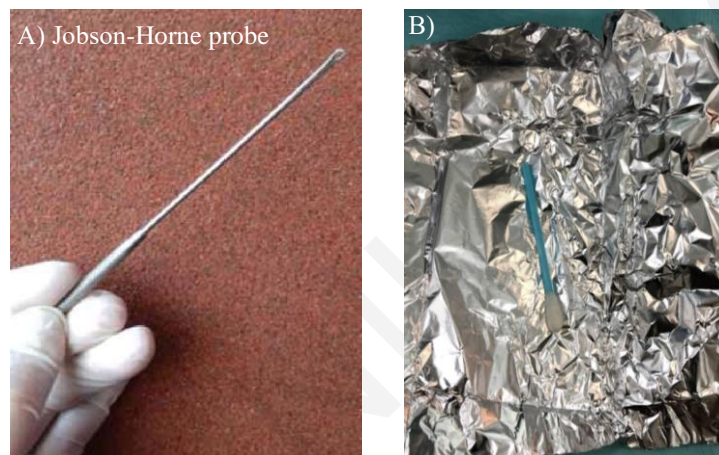
Το ACN, η MeOH, το μυρμηκικό οξύ (Formic Acid, FA) και το οξικό οξύ (Acetic Acid, AcA) που χρησιμοποιήθηκαν κατά την ανάλυση ήταν καθαρότητας LC-MS/MS και λήφθηκαν από την εταιρεία Merck (Darmstadt, Germany) και Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). Ομοίως, για την παρασκευή της κινητής φάσης χρησιμοποιήθηκε υψηλής καθαρότητας νερό (MS Grade).

5.3. Δειγματοληψία και Επεξεργασία Κυψελίδων Αυτιού

Για τη μελέτη της μεθόδου επεξεργασίας των κυψελίδων, συλλέχθηκαν αρχικά δείγματα από υγιή άτομα, εθελοντές. Για την επιλογή των εθελοντών δεν υπήρχε κάποιο ιδιαίτερο κριτήριο παρά μόνο ότι τα άτομα δεν έπρεπε να κάνουν χρήση οποιασδήποτε ναρκωτικής ουσίας ή χρήση άλλων φαρμάκων. Επιλέχθηκαν συνολικά 10 άτομα, 6 άνδρες και 4 γυναίκες, άνω των 18 ετών. Οι εθελοντές κλήθηκαν, κατά την περίοδο της δειγματοληψίας, να μην χρησιμοποιούν μπατονέτες για τον καθαρισμό των αυτιών τους, εκτός από την ημέρα της δειγματοληψίας. Από τους εθελοντές δε ζητήθηκαν επιπρόσθετες πληροφορίες, παρά μόνο η συγκατάθεση τους για τη συμμετοχή στη συγκεκριμένη μελέτη. Επιπρόσθετα, είχαν το δικαίωμα να σταματήσουν την παροχή δειγμάτων όποτε το επιθυμούσαν. Αξίζει να σημειωθεί ότι λήφθηκε σχετική έγκριση από την Εθνική Επιτροπή Βιοηθικής Κύπρου (ΕΕΒΚ/ΕΠ/2020/49).

Τα δείγματα συλλέχθηκαν σε καθορισμένη χρονική περίοδο, συγκεκριμένα, μία φορά την εβδομάδα και σε καθορισμένη σταθερή ώρα της ημέρας. Η συνοχή και σταθερότητα στη δειγματοληψία βοηθά στην ελαχιστοποίηση των διαφορών μεταξύ των δειγμάτων, διαφορές που αφορούν κυρίως την ποσότητα έκκρισης του κεριού στα άτομα. Μελετήθηκαν επίσης

διαφορετικά μέσα συλλογής κυψελίδων, όπως οι γνωστές σε όλους μπατονέτες (ωτοκαθαριστές, cotton swabs) και τα Jobson Horne Probes (ιατρικά μεταλλικά σκευάσματα), τα οποία παρουσιάζονται στο **Σχήμα 5.6**. Αρχικά, η περιοχή καθαρίστηκε με μικρή ποσότητα αλκοόλης στην εξωτερική επιφάνεια και στη συνέχεια δείγματα συλλέχθηκαν και από τα δύο αυτιά. Οι εθελοντές κλήθηκαν να μην έχουν καθαρίσει τα αυτιά τους για μία βδομάδα πριν τη συλλογή δείγματος. Τα δείγματα φυλάχθηκαν σε σκοτεινό μέρος σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C) για ξήρανση μέχρι την ανάλυση τους, η οποία πραγματοποιήθηκε σε διάστημα 48h το μέγιστο. Η διαδικασία φύλαξης των δειγμάτων που ακολουθήθηκε ήταν σύμφωνη με τα πρωτόκολλα που ορίζονται από τον SoHT [103].



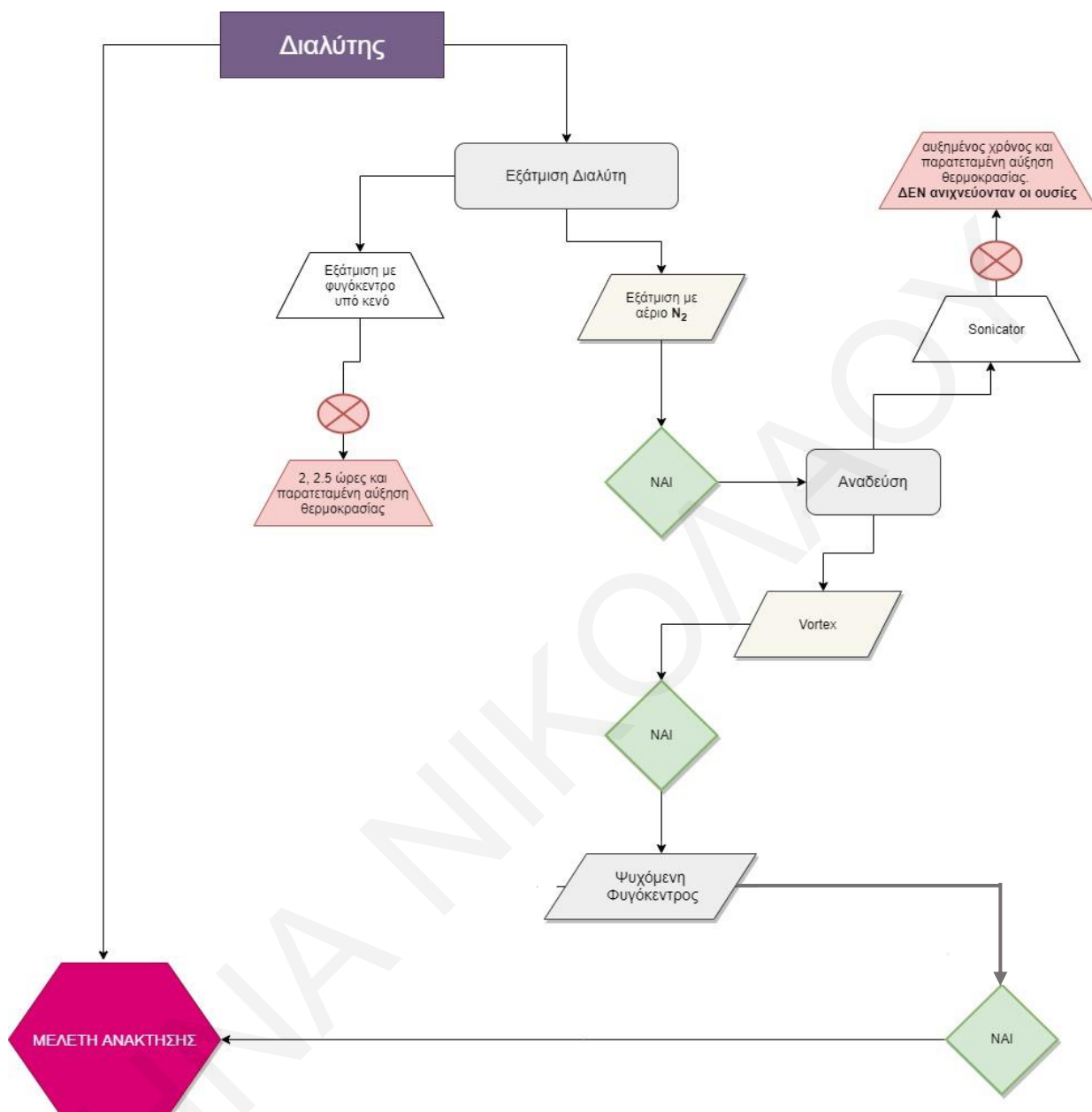
Σχήμα 5.6. Τα μέσα συλλογής των δειγμάτων α) Jobson probe, β) μπατονέτες (ωτοκαθαριστές).

Δείγματα κεριού συλλέχθηκαν σε κατοπινό στάδιο και από άτομα χρήστες κάνναβης. Τα δείγματα συλλέχθηκαν ανώνυμα και ζητήθηκαν ορισμένες πληροφορίες αναφορικά με το είδος, τη συχνότητα και την ποσότητα χρήσης. Μοναδικό κριτήριο επιλογής των εν λόγω εθελοντών αποτέλεσε η χρήση κάνναβης και μόνο και όχι η χρήση οποιωνδήποτε άλλων ναρκωτικών ουσιών. Η διαδικασία δειγματοληψίας ήταν η ίδια με αυτήν που ακολουθήθηκε για τη δειγματοληψία από υγιή άτομα.

5.3.1. Ανάπτυξη Μεθόδου Επεξεργασίας Κυψελίδων Αυτιού

Το σημαντικότερο και συνάμα το πιο κρίσιμο στάδιο της αναλυτικής πορείας για τον προσδιορισμό των κανναβινοειδών ενώσεων σε αυτό το βιολογικό δείγμα, αποτελεί σαφέστατα η προετοιμασία του δείγματος. Στόχος είναι η αποτελεσματική και εκλεκτική απομόνωση των ουσιών αυτών από την εξεταζόμενη μήτρα, ώστε να διασφαλιστεί μετέπειτα η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση τους. Αξίζει να σημειωθεί, ότι η εργασία αυτή αποτέλεσε ιδιαίτερη πρόκληση εξαιτίας της ελάχιστης βιβλιογραφίας που υπάρχει αναφορικά με την ανάλυση και επεξεργασία αυτού του δείγματος. Στην προσπάθεια αυτή, μελετήθηκαν διάφοροι διαλύτες εκχύλισης, όπως το ACN, το οξιμισμένο με οξικό οξύ (acetic acid, AcA) ακετονιτρίλιο (ACN, 1% AcA), η MeOH, η ακετόνη, ο οξικός αιθυλεστέρας και το εξάνιο/ACN (Hexane/ACN). Με την επιλογή του βέλτιστου διαλύτη εκχύλισης, στη συγκεκριμένη περίπτωση του οξιμισμένου ACN (1% AcA), προσδιορίστηκαν τα ακόλουθα στάδια της κατεργασίας του δείγματος, όπως το είδος και ο χρόνος ανάδευσης, το είδος της φυγόκεντρου και ο τρόπος εξάτμισης του διαλύτη. Όλα τα πιο πάνω στάδια, περιγράφονται αναλυτικότερα στο σημείο βελτιστοποίησης της μεθόδου επεξεργασίας (**Κεφάλαιο 6.3**).

Η αρχική πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής: στο δείγμα αρχικά προστέθηκαν καθορισμένα μL μίγματος των εξεταζόμενων ενώσεων γνωστής αρχικής συγκέντρωσης σε δύο επίπεδα, υψηλό (High Quality Control, HQC) και χαμηλό (Low Quality Control, LQC) και στη συνέχεια το δείγμα αφέθηκε για 15 λεπτά στο διαλύτη εκχύλισης (ACN, 1% AcA, 1 mL). Ακολούθησε έντονη ανάδευση, με συσκευή vortex, ή σε λουτρό υπερήχων και στη συνέχεια το δείγμα τοποθετήθηκε στη φυγόκεντρο για 10 λεπτά στους 4 °C στις 10000 rpm, ή υπό κενό για όσο χρονικό διάστημα απαιτήθηκε για την εξάτμιση του εκάστου διαλύτη. Ακολούθησε εξάτμιση του διαλύτη με αέριο N_2 , στις περιπτώσεις όπου δε χρησιμοποιήθηκε φυγόκεντρος που λειτουργούσε υπό κενό, και εν συνεχεία, επαναδιαλυτοποίηση του δείγματος στην κινητή φάση πριν την ανάλυση. Οι διάφορες διαδικασίες επεξεργασίας δειγμάτων, μέχρι την τελική διαμόρφωση της πειραματικής διαδικασίας, συνοψίζονται στο σχηματικό διάγραμμα (**Σχήμα 5.7**).



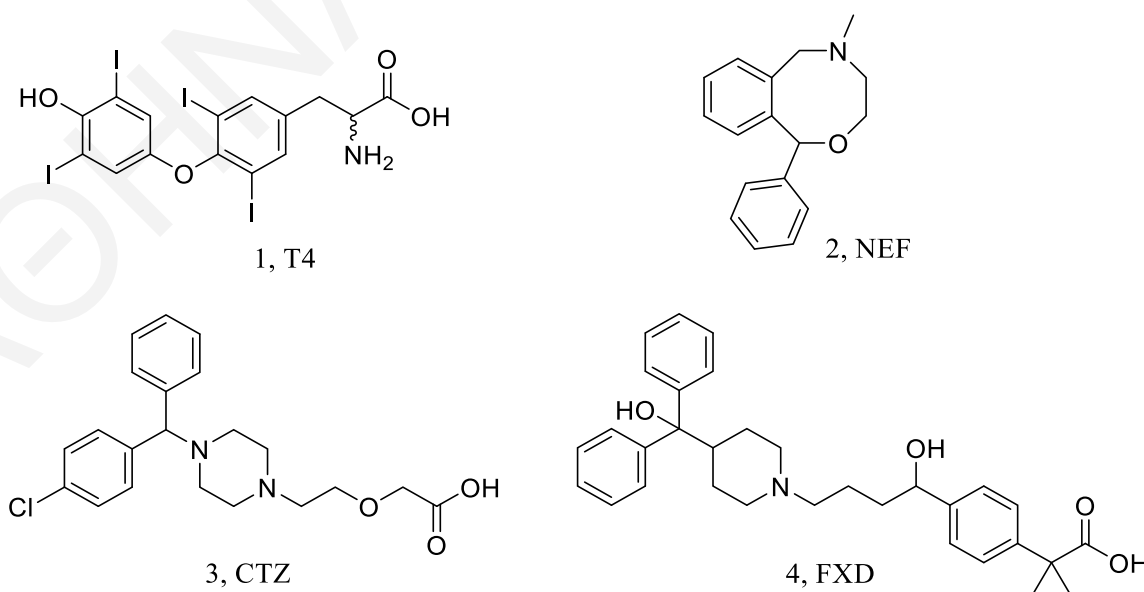
Σχήμα 5.7. Σχηματικά οι διάφορες διαδικασίες επεξεργασίας δειγμάτων, μέχρι την τελική διαμόρφωση της πειραματικής διαδικασίας.

6. Αποτελέσματα

6.1. Ανάπτυξη Μεθόδων Χειρόμορφου Διαχωρισμού

Πρωταρχικό στόχο της παρούσας έρευνας αποτέλεσε η ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων που να επιτρέπουν τον εναντιομερή διαχωρισμό των ουσιών T4, NEF, CTZ και FXD. Οι δομές των ενώσεων αυτών παρουσιάζονται στο **Σχήμα 6.1**. Οι βέλτιστες συνθήκες κάθε μεθόδου προσδιορίστηκαν με την αξιολόγηση διαφόρων παραμέτρων, όπως η σύσταση και το είδος του BGE, η συγκέντρωση και το είδος των CFs και των AAILs (συγκεκριμένα τα δύο εναντιομερή L- και D- του AlaC₄Lac), το pH, και το συνεργιστικό φαινόμενο μεταξύ των CFs και του L-AlaC₄Lac. Με τη χρήση της EKC και των διαφόρων CSs επιτεύχθηκε ο πλήρης διαχωρισμός των εναντιομερών του NEF και της FXD, μικρή σχάση της κορυφής σημειώθηκε για τα εναντιομερή της T4, ενώ για την CTZ δεν κατέστη δυνατός ο διαχωρισμός. Αξίζει να σημειωθεί ότι εκτός των CFs, μελετήθηκαν και αρκετές CDs με στόχο τη χειρόμορφη ανάλυση των εξεταζόμενων μορίων.

Τα εναντιομερή της CTZ και της FXD αποτέλεσαν ιδιαίτερη πρόκληση για το διαχωρισμό τους, αφού είναι επαμφοτερίζουσες ενώσεις. Ο διαχωρισμός των εναντιομερών της CTZ δεν επιτεύχθηκε με χρήση οποιασδήποτε CF, ενώ τα εναντιομερή της FXD, παρ' όλο που είναι ουδέτερα είδη σε μεγάλο εύρος pH, διαχωρίστηκαν με την προσθήκη της αρνητικής SCF₆ στην EKC. Τα αποτελέσματα των διαφόρων παραμέτρων που μελετήθηκαν στο πρώτο μέρος της διδακτορικής αυτής εργασίας παρουσιάζονται με λεπτομέρεια στα ακόλουθα κεφάλαια.



Σχήμα 6.1. Δομές των φαρμακευτικών ενώσεων που έχουν μελετηθεί: 1) Θυροξίνη (T4), 2) Νεφοπάμη, (NEF), 3) Σετιριζίνη (CTZ) και 4) Φεξοφenaδίνη (FXD).

6.1.1. Επίδραση Ρυθμιστικού Διαλύματος

Η επιλογή του ρυθμιστικού διαλύματος αποτελεί εξαιρετικά σημαντική παράμετρο για έναν επιτυχή εναντιομερή διαχωρισμό, καθώς η σύστασή του επηρεάζει τη μετανάστευση των αναλυτών. Η επιλογή του κατάλληλου BGE στην CE περιλαμβάνει μελέτη πολλών παραγόντων, όπως τη διαλυτότητα και η σταθερότητα των αναλυτών στον ηλεκτρολύτη, το βαθμό ιονισμού των αναλυτών, την επίδραση των ανιόντων και των κατιόντων του ηλεκτρολύτη στη μετανάστευση των ουσιών, την επίδραση του pH, οργανικών τροποποιητών και άλλων πρόσθετων και την απώλεια της θερμότητας που δημιουργείται στον ηλεκτρολύτη κατά τη διέλευση του ρεύματος [166]. Στους πλείστους διαχωρισμούς με χρήση της τεχνικής CE χρησιμοποιούνται συγκεντρώσεις BGE από 1 mM έως 1000 mM.

Σε πρώτο στάδιο, εξετάστηκαν διάφορα ρυθμιστικά διαλύματα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και σε διάφορες τιμές pH για το διαχωρισμό των τεσσάρων φαρμακευτικών ουσιών. Δοκιμάστηκαν το οξικό αμμώνιο (ammonium acetate) σε συγκέντρωση 5 mM, το τρισ(υδροξυμεθυλο)αμινομεθάνιο (tris-(hydroxymethyl)aminomethane, Tris) σε συγκέντρωση 15-100 mM, το δεκαϋδρικό τετραβορικό νάτριο (sodium tetraborate decahydrate, Borate) σε εύρος 15-100 mM και μίγμα 100 mM Tris/10 mM Borate σε εύρος pH 7.0-9.5 (Πίνακας 6.1). Για όλες τις ενώσεις, το 100 mM Tris/10 mM Borate επιλέχθηκε ως το βέλτιστο BGE, λόγω της σταθερότητας της γραμμής βάσης (baseline), αλλά και της καλύτερης διαχωριστικής ικανότητας, στις ενώσεις, όπου ο διαχωρισμός ήταν επιτυχής.

Πίνακας 6.1. Είδος, συγκέντρωση, pH και εύρος σταθερότητας pH των BGEs που μελετήθηκαν.

Είδος BGE	Συγκέντρωση (mM)	pH	Εύρος σταθερότητας pH
οξικό αμμώνιο (C ₂ H ₇ NO ₂)	5	3.5-5.0	3.8-5.8
Tris (HOCH ₂) ₃ CNH ₂	15-100	7.0 – 9.5	7.0-9.2
Borate (B ₄ Na ₂ O ₇ · 10H ₂ O)	15-100	7.0 – 9.5	7.0-9.5
Tris/Borate	100/10	7.0 – 9.5	–

6.1.2. Επίδραση του Είδους και της Συγκέντρωσης του CS

Όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενο κεφάλαιο, ορισμένες απαιτήσεις που πρέπει να πληρούν οι CSs στην CE είναι χαμηλή απορρόφηση στο UV, υψηλή διαλυτότητα στο νερό, ελάχιστη δυνατή αλληλεπίδραση με τα αρνητικά φορτισμένα τοιχώματα του τριχοειδούς, καθώς και η δυνατότητά τους για αλληλεπίδραση με τα μόρια στόχος.

Οι φυσικές α -, β - και γ - CDs χαρακτηρίζονται από το αυξανόμενο μέγεθος της υδρόφοβης, κοιλότητάς τους. Αυτή η κοιλότητα είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό συμπλόκων εγκλεισμού με τα εναντιομερή και συγκεκριμένα το ένα εναντιομερές αλληλεπιδρά ισχυρότερα από το άλλο. Η α -CD αποτελεί το λιγότερο διαδεδομένο CS, λόγω της κακής εναντιοεκλεκτικότητας της, ίσως λόγω της μικρότερης κοιλότητάς της, η οποία θα περιορίζει τις σχετικές αλληλεπιδράσεις με τα μόρια στόχος [167]. Σε αυτή τη διδακτορική εργασία μελετήθηκαν ορισμένες CDs, σε περιπτώσεις όπου ο διαχωρισμός με χρήση των CFs δεν ήταν επιτυχής. Ανάμεσα στις CDs που μελετήθηκαν η S- β -CD παρουσίασε τα καλύτερα αποτελέσματα στην εναντιοεκλεκτική αναγνώριση, ειδικότερα προς τα εναντιομερή της CTZ, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από προηγούμενες βιβλιογραφικές αναφορές.

Όσον αφορά τις CFs, προτάθηκαν το 2009 ως νέα τάξη CS με συγκρίσιμες ιδιότητες με αυτές των CDs [23]. Παράγωγα των CFs που περιέχουν ογκώδεις και υδρόφοβες αλκυλ-αλυσίδες διαλύονται δύσκολα στον BGE, ενώ η χρήση αρωματικών δακτυλίων προκαλεί θόρυβο στη βασική γραμμή λόγω απορρόφησης στο UV. Συνεπώς, λίγα παράγωγα CFs έχουν χρησιμοποιηθεί μέχρι σήμερα ως CSs στην CE. Τα πιο σημαντικά παράγωγα, που έδειξαν να παρουσιάζουν μεγάλη εναντιοεκλεκτική ικανότητα ως προς βασικούς αναλύτες, οι οποίοι περιέχουν αμινομάδες, είναι η SCF₆ και η SCF₇. Εκτός από αυτά τα παράγωγα, έχει επίσης μελετηθεί και η IP-CF₆ ως CS στην CE, χωρίς όμως να παρουσιάζει ιδιαίτερη εναντιοεκλεκτική ικανότητα [36-39].

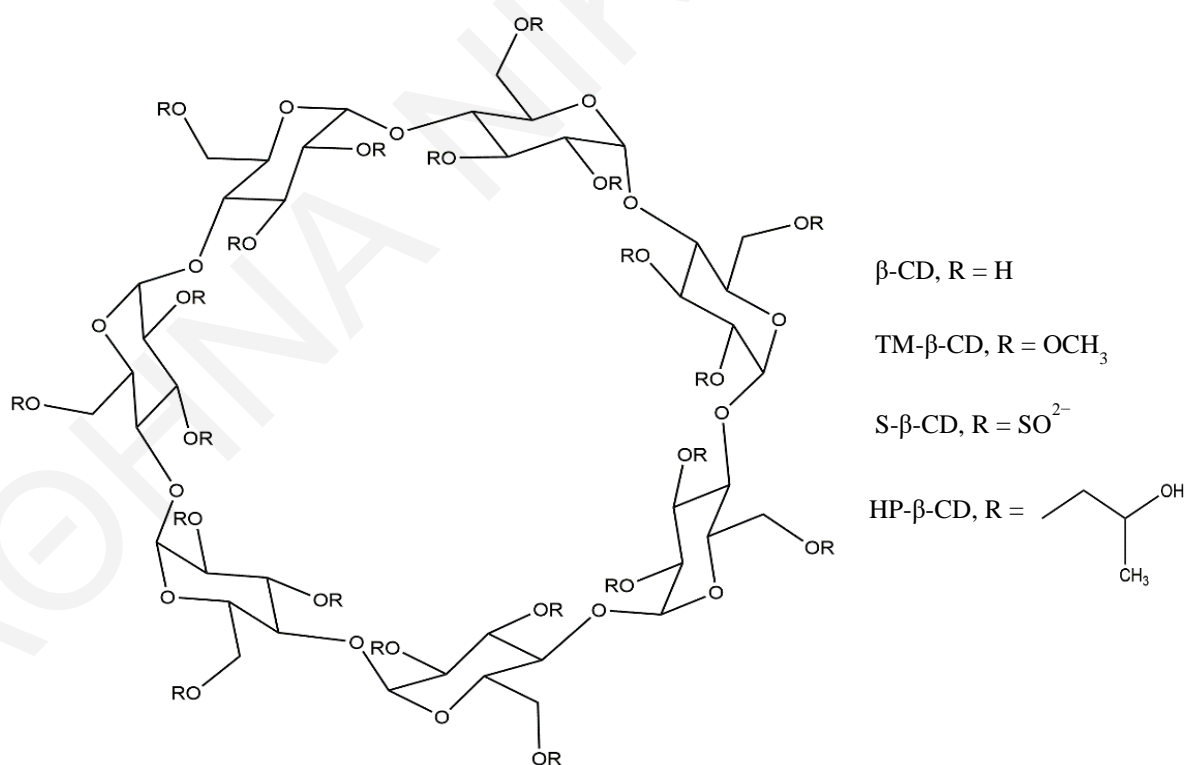
Σε αυτή την εργασία, τα παράγωγα τόσο των CDs όσο και των CFs αποδείχτηκαν καλύτεροι CSs για το διαχωρισμό των υπό εξέταση αναλυτών. Οι υποκαταστάτες που προστίθενται παρέχουν στα μόρια νέες ιδιότητες ενισχύοντας την εναντιοεκλεκτικότητα, καθώς αυξάνονται οι θέσεις για πιθανές αλληλεπιδράσεις με τα υπό μελέτη μόρια.

Σημαντικό μέρος αυτή της εργασίας αποτέλεσε η εύρεση του κατάλληλου CS, καθώς και της βέλτιστης συγκέντρωσής του, η οποία ήταν αρκετή για τον πλήρη διαχωρισμό. Μελετήθηκε σημαντικός αριθμός CSs και το εύρος των συγκεντρώσεων κυμάνθηκε από 0.5

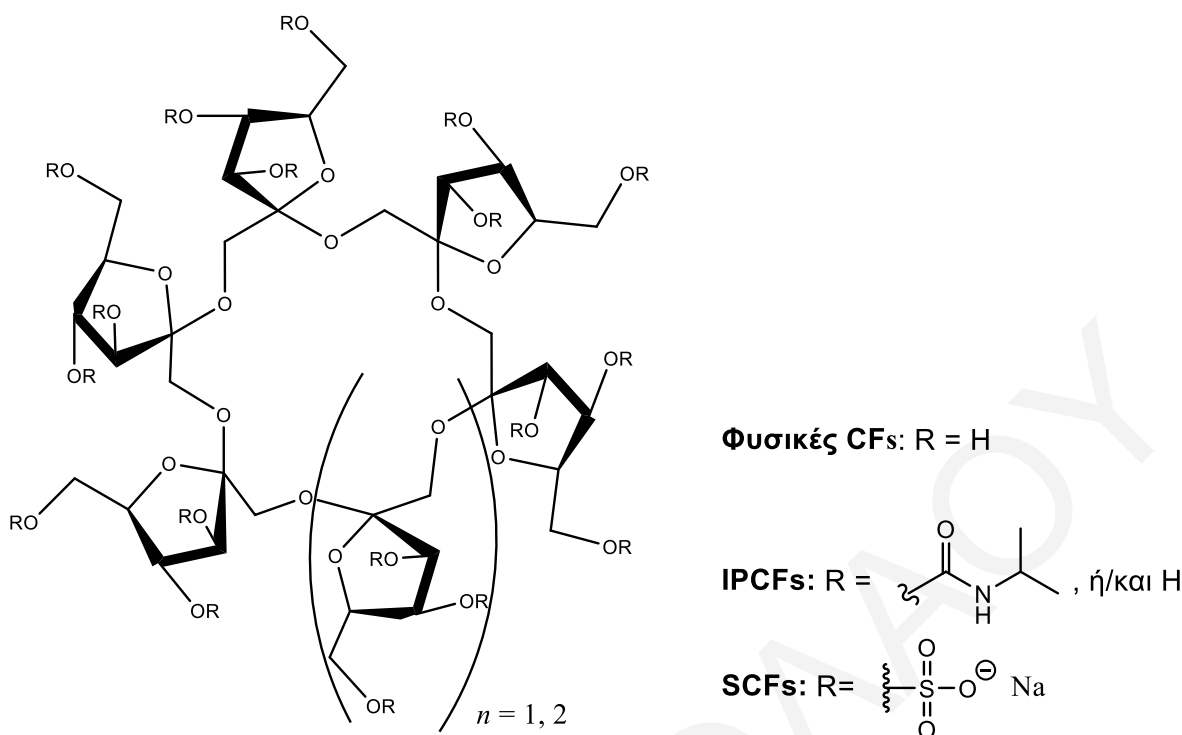
-10 mM ή 0.1–2.0 % κ.ο. Στον **Πίνακα 6.2.** παρουσιάζονται οι φυσικές CDs και CFs, καθώς και τα παράγωγά τους, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την εργασία. Στο **Σχήμα 6.2** παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά οι δομές της φυσικής β-CD και των παραγώγων της και στο **Σχήμα 6.3** παρουσιάζονται οι δομές των CFs που χρησιμοποιήθηκαν.

Πίνακας 6.2. Οι CDs και CFs που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη.

Cyclodextrins (CDs)			Cyclofructans (CFs)	
α -CD	β -CD	γ -CD	SCF ₆	SCF ₇
S- α -CD	S- β -CD	-	IP-CF ₆	IP-CF ₇
-	TM- β -CD	-	n-CF ₆	n-CF ₇
HP- α -CD	HP- β -CD	HP- γ -CD	CM-CF ₆	-



Σχήμα 6.2. Δομή της β-CD και των παραγώγων της.



Σχήμα 6.3. Δομή των CFs που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την εργασία.

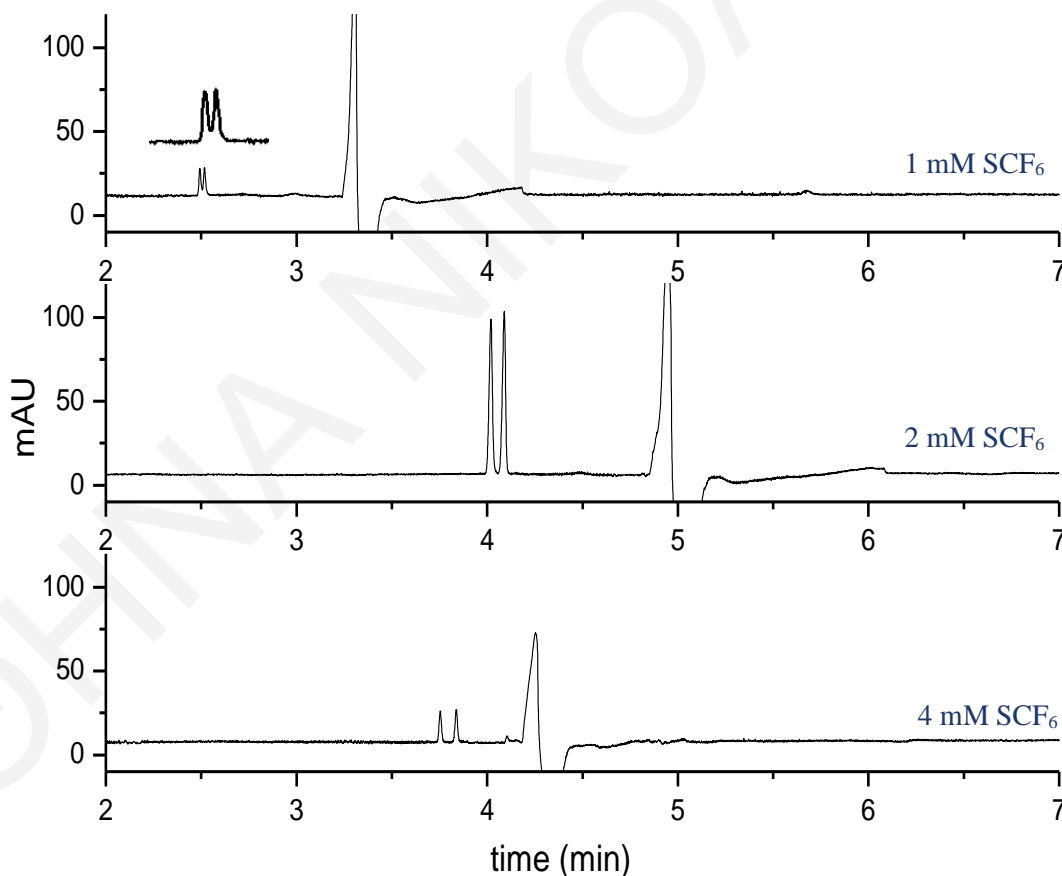
Χειρόμορφος Διαχωρισμός NEF

Το NEF είναι ένα μη οπιοειδές, αναλγητικό φάρμακο και χορηγείται κυρίως για τη θεραπεία μέτριου, οξείου ή χρόνιου πόνου [168]. Για τη χειρόμορφη ανάλυση του NEF, έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι στην CE, κυρίως με τη χρήση των παραγώγων των CDs ως CS, αφού η φυσική β-CD δεν παρουσίασε καμία εναντιοεκλεκτικότητα [169]. Έχει επιχειρηθεί επίσης ο διαχωρισμός με τη χρήση αντιβιοτικών, με χρόνους ανάλυσης που ξεπερνούν τα 30 λεπτά. Συγκεκριμένα, με τη χρήση της erythromycin lactobionate ο διαχωρισμός δεν ήταν πλήρης, ενώ με τη χρήση της chondroitin sulfate ο διαχωρισμός επιτεύχθηκε στα 32 λεπτά [170, 171].

Σε αυτή την εργασία τα εναντιομερή του NEF διαχωρίστηκαν πλήρως με χρήση του σουλφωنيομένου παραγώγου της κυκλοφρουκτάνης 6 (Sulfated Cyclofructan 6, SCF₆) ως το CS. Η βέλτιστη συγκέντρωση για το διαχωρισμό των εναντιομερών του NEF ήταν τα 2 mM SCF₆ (**Σχήμα 6.4**). Όπως έχει παρατηρηθεί, η αύξηση της συγκέντρωσης του CS μέχρι τα 4 mM ($R_s = 3.8$) οδήγησε σε αύξηση της διαχωριστικής ικανότητας, ενώ μεγαλύτερη αύξηση της συγκέντρωσης (μέχρι τα 10 mM) οδήγησε σε μείωση του διαχωρισμού, όπου παρατηρήθηκε συνέκλουση των εναντιομερών. Τα αποτελέσματα της μελέτης της

επίδρασης της συγκέντρωσης της SCF_6 στο διαχωρισμό των εναντιομερών του NEF παρουσιάζονται στο **Σχήμα 6.4**.

Βασικό στοιχείο της εν λόγω εναντιοεκλεκτικότητας, αποτελούν οι ισχυρές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις που πιθανότατα αναπτύχθηκαν ανάμεσα στην αρνητικά φορτισμένη CF και τη θετικά φορτισμένη εξεταζόμενη ένωση. Επιπλέον, οι δεσμοί υδρογόνου και οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις ενδέχεται να συμπληρώνουν τον τριαδικό κανόνα χειρόμορφης αναγνώρισης. Εναλλακτικά, για επιβεβαίωση των πιο πάνω υποθέσεων επιβάλλεται η διεξαγωγή επιπρόσθετων πειραμάτων με χρήση άλλων τεχνικών (πχ με φασματοσκοπία NMR και με φασματοσκοπία υπέρυθρου) για τη μελέτη της εναντιοεκλεκτικότητας, το οποίο δεν αποτελούσε ζητούμενο σε αυτή τη διδακτορική διατριβή.



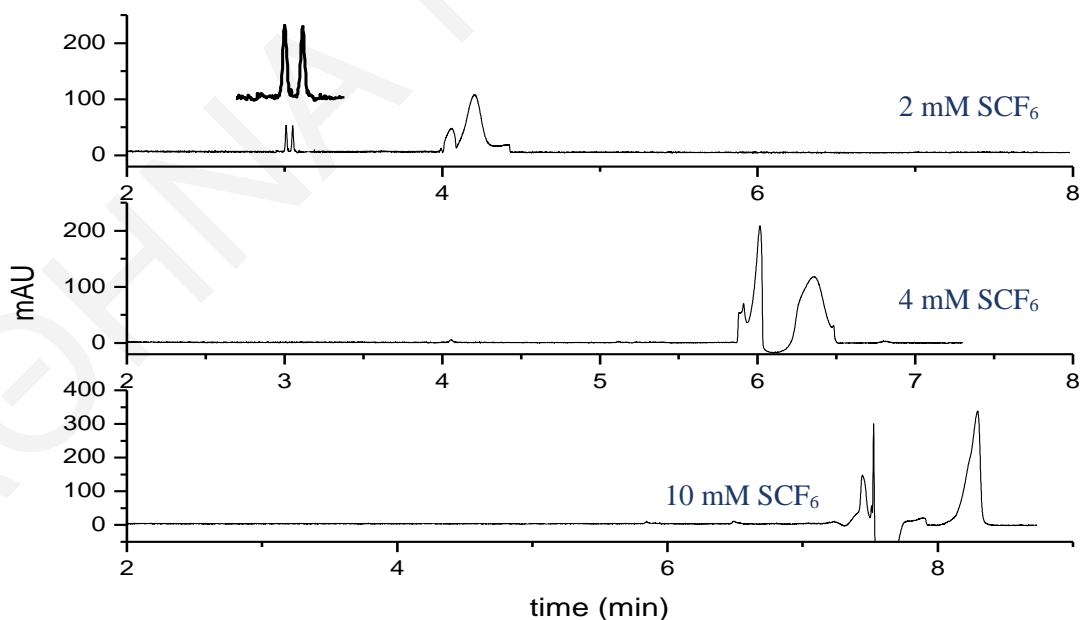
Σχήμα 6.4. Επίδραση της συγκέντρωσης της SCF_6 στο διαχωρισμό του NEF. Πειραματικές συνθήκες: 100 mM Tris/10 mM Borate ως το BGE, με προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων SCF_6 . $C_{NEF} = 0.4$ mg/mL, pH 8.0, $\lambda = 200$ nm. Δυναμικό 20 kV, θερμοκρασία $T = 20$ °C, έγχυση 50 mbars σε 3 sec.

Χειρόμορφος Διαχωρισμός FXD

Ο χειρόμορφος διαχωρισμός της FXD αποτέλεσε ιδιαίτερη πρόκληση σε αυτή την μελέτη. Μέχρι στιγμής, δεν υπάρχει δημοσίευση, στην οποία να πραγματοποιείται χειρόμορφος διαχωρισμός του εν λόγω μορίου στην CE. Αντιθέτως, υπάρχει μία μόνο βιβλιογραφική αναφορά στην CE και αφορά τον ποιοτικό προσδιορισμό της σε ταμπλέτες, με προσθήκη καρβοξυλικών ή σουλφονιωμένων παραγώγων της β-CD στο BGE, οι οποίοι δρουν ως «μεταφορείς» του αναλύτη με σκοπό την ανίχνευση του [8].

Ο διαχωρισμός της FXD επιτεύχθηκε μόνο με χρήση της SCF₆ σε συγκέντρωση 2 mM ($R_s = 1.7$). Με αύξηση όμως της συγκέντρωσης, η R_s μηδενίστηκε και παρατηρήθηκε πιθανή συνέκλιση της ουσίας με την EOF, αφού άλλωστε σε μεγάλο εύρος pH η ένωση είναι ουδέτερη (zwitterion). Τα σχετικά ηλεκτροφερογράμματα αυτής της μελέτης παρουσιάζονται στο **Σχήμα 6.5**.

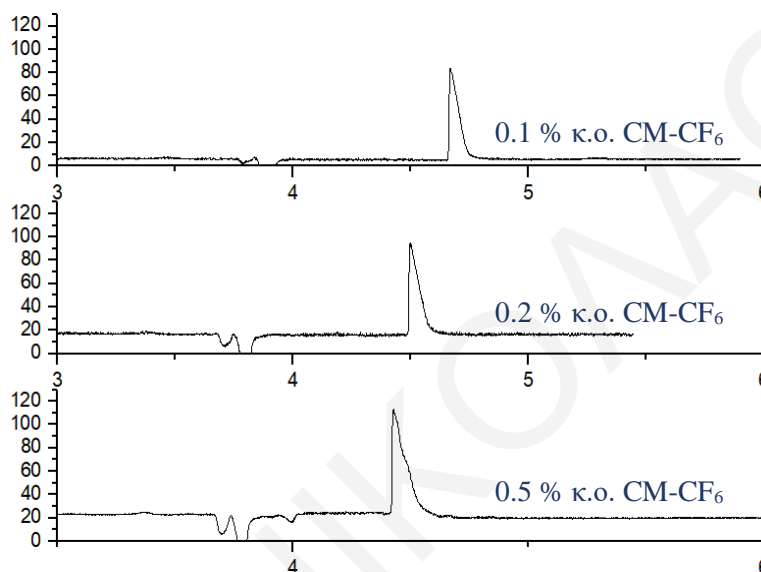
Μελετήθηκε, για σκοπούς σύγκρισης, και η SCF₇ σε διάφορες συγκεντρώσεις. Παρ' όλη τη διαφορά στο μέγεθος της κοιλότητας της εν λόγω CF, δε σημειώθηκε εναντιοεκλεκτικότητα ως προς τα εναντιομερή της ένωσης. Προσθήκη οργανικών τροποποιητών και των CILs δεν οδήγησαν σε καμία βελτίωση.



Σχήμα 6.5. Επίδραση της συγκέντρωσης της SCF₆ στο διαχωρισμό της FXD. Πειραματικές συνθήκες: 100 mM Tris/10 mM Borate ως το BGE, $C_{FXD} = 1.0$ mg/mL, pH 7.1, $\lambda = 195$ nm. Δυναμικό 20 kV, θερμοκρασία $T = 25$ °C και έγχυση 30 mbars σε 3 sec.

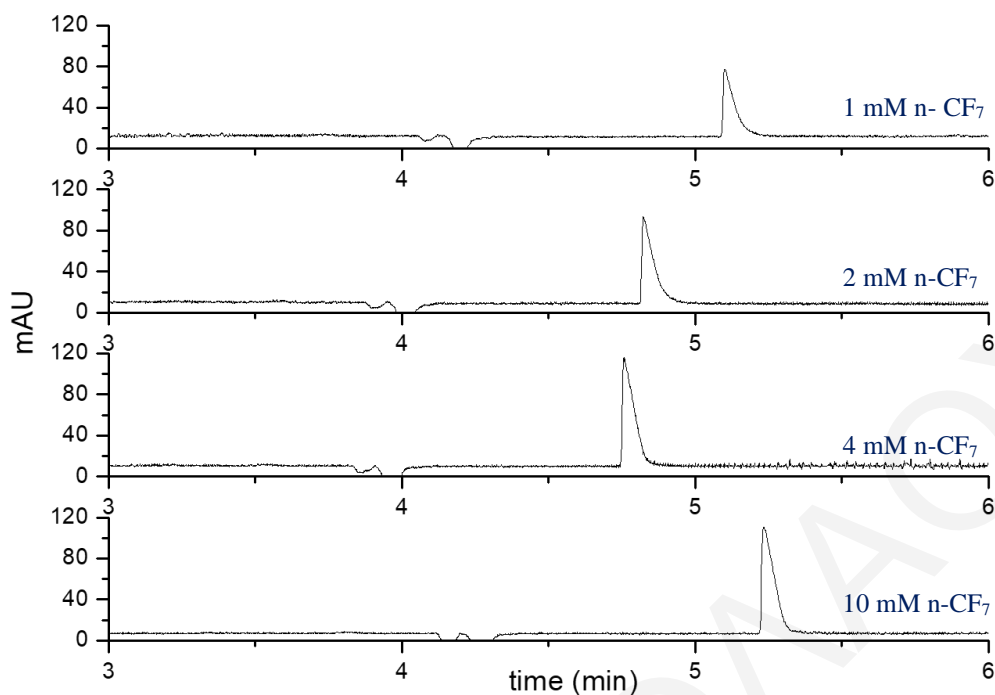
Χειρόμορφος Διαχωρισμός CTZ

Η CTZ παρουσίασε μια μικρή σχάση κορυφής/ώμος, με χρήση του καρβοξυ-μέθυλο παραγώγου της CF₆ (Carboxy-methyl CF₆, CM-CF₆) σε συγκέντρωση 0.5% κ.ο. Στο **Σχήμα 6.6** παρουσιάζεται το εν λόγω ηλεκτροφερόγραμμα, το οποίο λήφθηκε σε συγκέντρωση 0.5% κ.ο. Αύξηση της συγκέντρωσης σε 1.0 και 1.5% κ.ο. δεν οδήγησε σε διαχωρισμό και η μικρή σχάση που σημειώθηκε σε συγκέντρωση 0.5% εξαφανίστηκε.



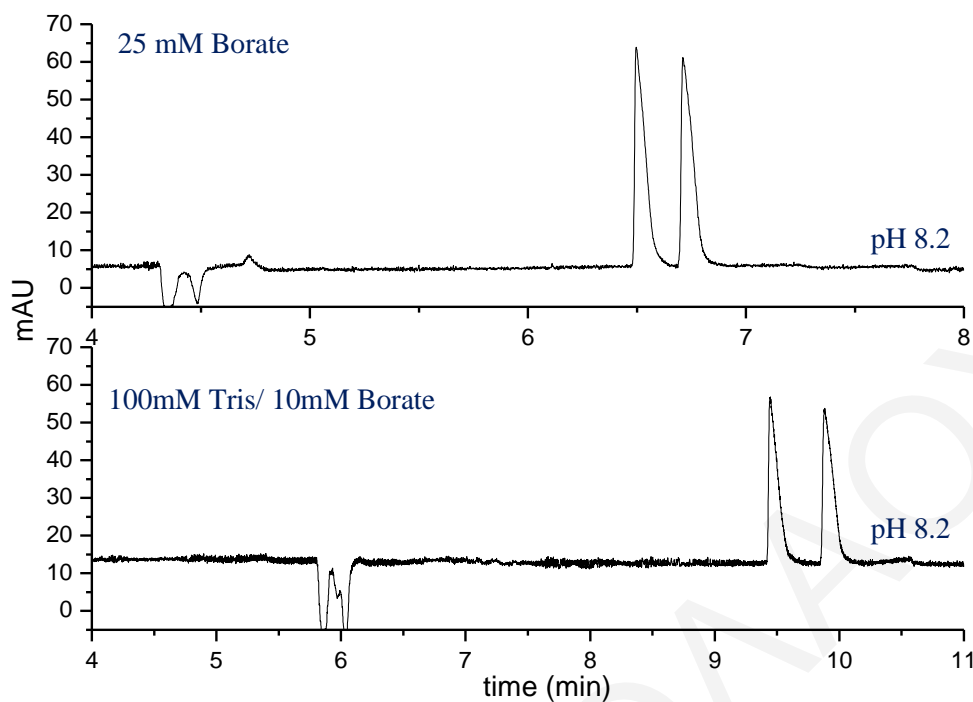
Σχήμα 6.6. Επίδραση της συγκέντρωσης της CM-CF₆ στο διαχωρισμό της CTZ. Πειραματικές συνθήκες: 100 mM Tris/10 mM Borate ως το BGE, C_{CTZ} = 0.5 mg/mL, pH 8.2, λ = 195 nm. Δυναμικό 20 kV, T = 25 °C και έγχυση στα 30 mbars σε 3 sec.

Ο χειρόμορφος διαχωρισμός αυτής της ένωσης αποτέλεσε ιδιαίτερη πρόκληση, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, καθώς ο αναλύτης βρίσκεται σε μορφή zwitterion σε μεγάλο εύρος pH. Σε τιμές pH μεγαλύτερες από 8.0 – 9.0, ο αναλύτης φαίνεται να φέρει αρνητικό φορτίο και εκλύεται μετά την EOF. Σε αυτή την περίπτωση, η προσθήκη ενός θετικά φορτισμένου CS θα αποτελούσε ιδανική συνθήκη για την εξέταση της πιθανότητας διαχωρισμού των εναντιομερών, εξαιτίας των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων που θα αναπτύσσονταν. Δυστυχώς, δεν υπήρχε διαθέσιμη θετικά φορτισμένη CF και έτσι δοκιμάστηκαν οι φυσικές CFs, χωρίς όμως να παρατηρηθεί επίδραση στην εναντιοεκλεκτικότητα. Στο **Σχήμα 6.7** παρουσιάζονται ενδεικτικά ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν από την μελέτη της n-CF₇ ως προς τη χειρόμορφη ανάλυση της CTZ, κατά την οποία δεν σημειώθηκε εναντιοεκλεκτικότητα και ο αναλύτης εκλύεται ως αρνητικά φορτισμένο ιόν μετά την EOF.



Σχήμα 6.7. Μελέτη της n-CF₇ στο διαχωρισμό της CTZ. Πειραματικές συνθήκες: 100 mM Tris/10 mM Borate ως το BGE, C_{CTZ} = 0.5 mg/mL, pH 8.2, λ = 195 nm. Δυναμικό 20 kV, T = 25 °C και έγχυση στα 30 mbars σε 3 sec.

Μια προηγούμενη μελέτη από τους Hancu et al. αναφέρει το διαχωρισμό της με χρήση της Sulfobutyl ether-β-CD σε συγκέντρωση 5 mM και pH 7 [172]. Το BGE σε αυτή την μελέτη ήταν 5 mM Borate, ο διαχωρισμός επιτεύχθηκε σε διάστημα 7 λεπτών, αλλά σημειώθηκε μικρή αστάθεια στη βασική γραμμή και χαμηλή αποδοτικότητα των κορυφών. Για σκοπούς σύγκρισης με την πιο πάνω εργασία, πραγματοποιήθηκε ανάλυση σε δύο BGEs, συγκεκριμένα σε 25 mM Borate και σε 100 mM Tris/ 10 mM Borate, με προσθήκη της S-β-CD σε συγκέντρωση 1% κ.ο. Ο διαχωρισμός σε αυτή την περίπτωση πραγματοποιήθηκε σε pH 8.2 και με τη χρήση του 100 mM Tris/ 10 mM Borate ως BGE. Στο **Σχήμα 6.8** παρουσιάζονται οι βέλτιστες συνθήκες, όπως έχουν προσδιοριστεί στα πειράματα στο εργαστήριο Ενόργανης Ανάλυσης.



Σχήμα 6.8. Επίδραση του BGE στο διαχωρισμό της CTZ. Πειραματικές συνθήκες: BGE 25 mM Borate; 100 mM Tris/10 mM Borate, $C_{CTZ} = 0.5 \text{ mg/mL}$ σε H_2O , pH 8.2, $\lambda = 195 \text{ nm}$. Δυναμικό 15 kV, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ και έγχυση στα 30 mbars σε 3 sec.

Αξίζει να σημειωθεί ότι υπάρχει άλλη μια δημοσίευση από τους Chou et al. με χρήση της S-β-CD ως το CS. Ο διαχωρισμός σε αυτή την περίπτωση επιτεύχθηκε σε διάστημα επτά λεπτών και με χρήση 5 mM Borate ως το BGE [173]. Η διαχωριστική ικανότητα ανήλθε στο 3.2.

Συμπερασματικά σημειώθηκε ότι, η S-β-CD παρουσίασε εξαιρετική εναντιοεκλεκτικότητα ως προς το διαχωρισμό των εναντιομερών της CTZ, ενώ οι SCF_6 και SCF_7 , που εξετάστηκαν επίσης σε αυτή τη μελέτη, δεν παρουσίασαν καμία εναντιοεκλεκτικότητα.

Χειρόμορφος Διαχωρισμός T4

Η T4 χορηγείται για τη θεραπεία του υποθυρεοειδισμού και περιλαμβάνει τις L-T4 και D-T4. Μόνο η L-T4 όμως αποτελεί τη δραστική ένωση. Ορισμένες δημοσιεύσεις αναφέρουν το διαχωρισμό των εναντιομερών της με χρήση χειρόμορφων στατικών στηλών στην HPLC [174]. Εντούτοις, υπάρχουν μόνο δύο αναφορές με χρήση της CE και καμία από αυτές δεν αξιοποιεί τις CFs και τα CILs. Η πρώτη, το 2003, με τη χρήση των κυκλοσοφοραζών, ενός

πολυσακχαρίτη, ως CS, σε συγκέντρωση 60 mM επιτυγχάνεται πλήρης διαχωρισμός με χρόνους ανάλυσης μεγαλύτερους από 35 λεπτά [175]. Το 2009, οι Kang et al., αξιοποίησαν μία προηγούμενη μελέτη στην HPLC, με βάση ένα μηχανισμό ανταλλαγής υποκαταστάτη. Η έρευνα αυτή επικεντρώθηκε στην ανάπτυξη μιας απλής μεθόδου στην CE για τον εναντιομερή διαχωρισμό της T4, με χρήση ενός συμπλόκου χαλκού-προλίνης. Ο διαχωρισμός ($R_S = 1.6$) επιτεύχθηκε σε διάστημα 15 λεπτών [176].

Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκαν όλες οι CDs και CFs, οι οποίες παρουσιάζονται στο **Πίνακα 6.2**, καθώς επίσης και συνδυασμοί αυτών. Μελετήθηκαν επίσης τα L- και D-εναντιομερή του ALaC₄Lac είτε ως τα μοναδικά πρόσθετα στο BGE είτε σε συνδυασμό με τις CFs ή τις CDs. Σε καμία από αυτές τις περιπτώσεις δε σημειώθηκε εναντιοεκλεκτικότητα ως προς τα εναντιομερή της T4.

Στην προσπάθεια για περαιτέρω διερεύνηση του διαχωρισμού, μελετήθηκε η προσθήκη διαφόρων οργανικών πρόσθετων σε συνδυασμό με τις CFs ή τα AAILs. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης παρουσιάζονται σε επόμενο κεφάλαιο (**Κεφάλαιο 6.1.4**).

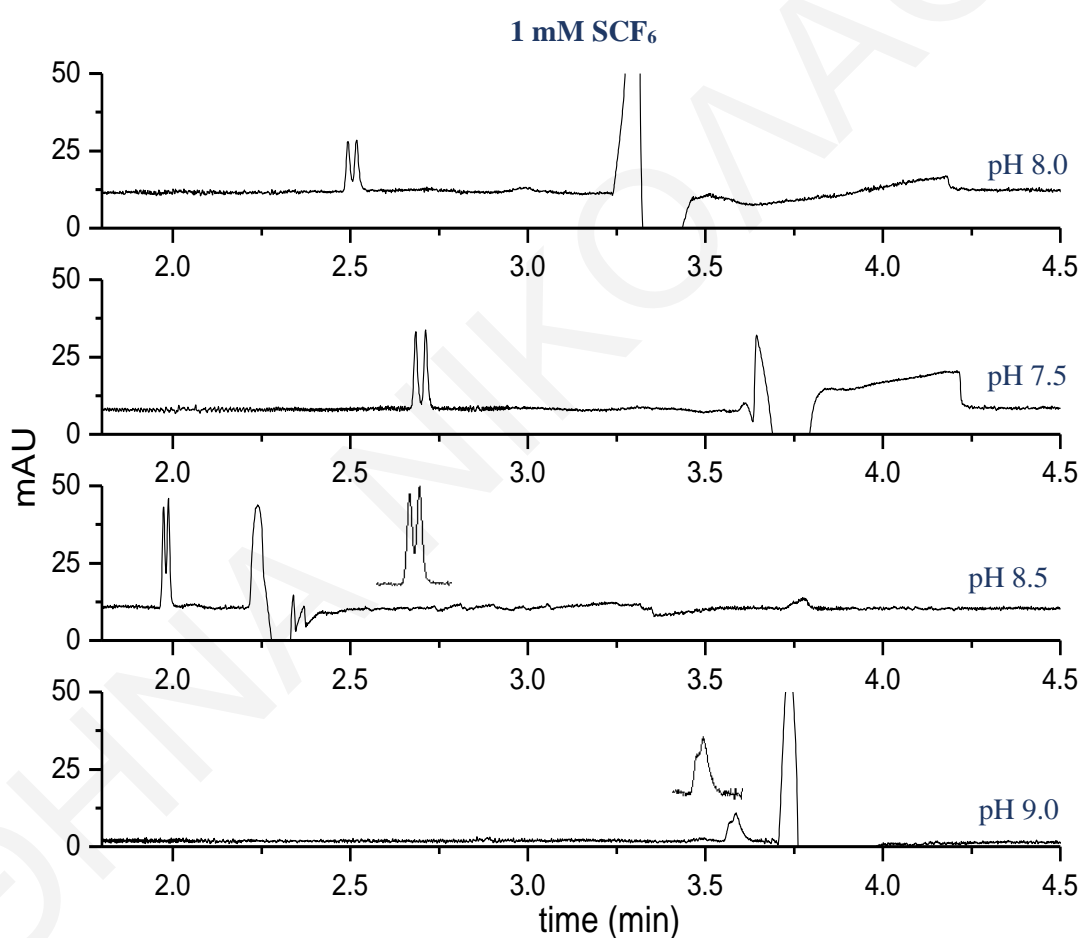
6.1.3. Μελέτη Επίδρασης του pH

Το pH του ρυθμιστικού διαλύματος αποτελεί επίσης μια σημαντική παράμετρο, αφού καθορίζει το βαθμό ιονισμού των αναλυτών και συνεπώς επηρεάζει τις αλληλεπιδράσεις τους με τους CSs. Το pH του BGE μπορεί να επηρεάσει χρόνους μετανάστευσης στην CE, την EOF, και το βαθμό ιονισμού των αναλυτών. Συνεπώς, αναλύτες που περιέχουν ομάδες, οι οποίες μπορούν να ιονιστούν, επηρεάζονται από το pH του BGE. Για παράδειγμα βασικοί αναλύτες όπως οι αμίνες, όταν βρίσκονται σε διάλυμα με τιμή του pH μικρότερη από τη σταθερά διάστασής τους (pK_a), φέρουν θετικό φορτίο, και επομένως εκλούνται πρώτοι σε ένα ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό. Σε περίπτωση που το pH έχει μεγαλύτερη τιμή από την τιμή pK_a , οι αναλύτες αυτοί είναι ουδέτεροι και έτσι συνεκλούνται με το διαλύτη (δηλαδή την EOF). Όταν οι υπό μελέτη αναλύτες έχουν για παράδειγμα στο μόριο τους καρβοξυλικά οξέα ως χαρακτηριστικές ομάδες, τότε φέρουν αρνητικό φορτίο όταν $pH > pK_a$ και εκλούνται τελευταίοι, μετά την EOF. Συνεπώς, το pH πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψη στη διαδικασία βελτιστοποίησης ενός διαχωρισμού.

Ανάλογα με την pK_a του κάθε αναλύτη, ορίστηκε αρχικά το εύρος pH, στο οποίο ενδέχεται να υπάρξει διαχωρισμός στην CE με τη χρήση πάντοτε ενός χειρόμορφου μορίου για ενίσχυση της εναντιοεκλεκτικότητας. Έπειτα από διάφορες μελέτες, με χρήση του κατάλληλου οξέος ή βάσης, αντίστοιχα, και σε ορισμένες περιπτώσεις, αλλαγή του είδους

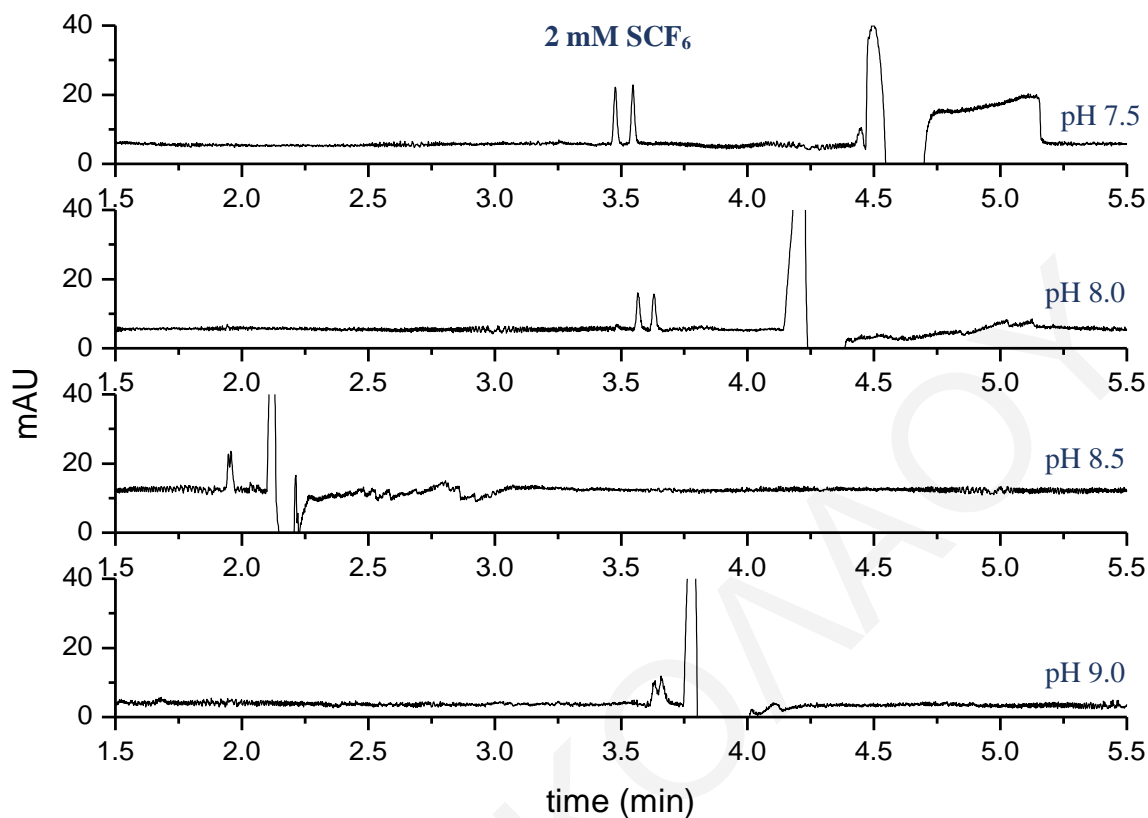
του BGE προσδιορίστηκε το βέλτιστο pH. Για την T4, βέλτιστο αποδείχτηκε το pH 8.6, για το NEF το pH 8.0, και τα pH 8.2 και 7.1 για την CTZ και την FXD αντίστοιχα.

Στις βέλτιστες συνθήκες διαχωρισμού, το NEF είναι κατιονικό με αποτέλεσμα να υπερισχύουν οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με την αρνητικά φορτισμένη SCF₆. Σε μεγαλύτερο pH, ο διαχωρισμός εξαφανίζεται σταδιακά, λόγω της μείωσης του ποσοστού των ιονισμένων μορίων του αναλύτη. Η αισθητή μείωση της R_s προκύπτει αυξανόμενου του pH, λόγω του ότι πλησιάζει οριακά την pK_a τιμή για τον υπό μελέτη αναλύτη. Στο **Σχήμα 6.9** και **Σχήμα 6.10** παρουσιάζεται η μελέτη αυτή σε συγκεντρώσεις 1 mM και 2 mM της SCF₆, αντίστοιχα.



Σχήμα 6.9. Επίδραση του pH στο διαχωρισμό του NEF σε σταθερή συγκέντρωση, 1 mM της SCF₆. Πειραματικές συνθήκες: ίδιες με το Σχήμα 6.4.

Πραγματοποιήθηκαν επίσης συνδυασμοί μελετών, όπως για παράδειγμα η μελέτη επίδρασης του pH σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του CS και σε διαφορετικές τιμές pH. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν οι συγκεντρώσεις 1, 2, 4 και 10 mM της SCF₆ σε τέσσερα επίπεδα pH 7.5, 8.0, 8.5 και 9.0.



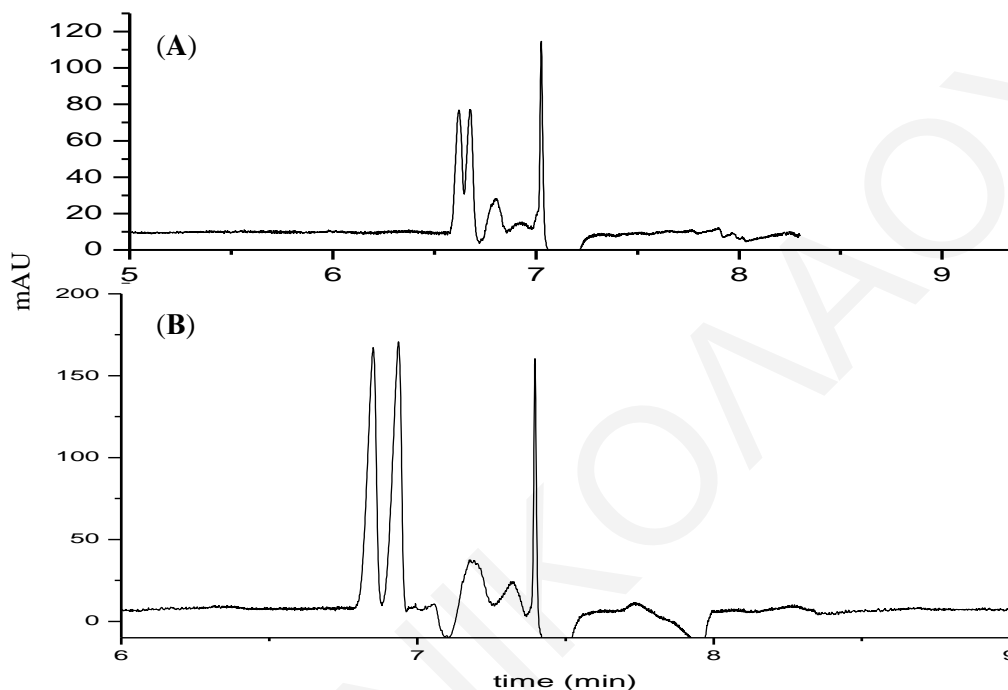
Σχήμα 6.10. Επίδραση του pH στο διαχωρισμό του NEF σε σταθερή συγκέντρωση, 2 mM της SCF_6 . Πειραματικές συνθήκες: ίδιες με το Σχήμα 6.4.

Σε αυτό το σημείο, αξίζει να σημειωθεί πως στις περιπτώσεις που ο διαχωρισμός δεν ήταν πλήρης, μελετήθηκε η επίδραση του εφαρμοζόμενου δυναμικού στη διαχωριστική ικανότητα. Η μείωση του εφαρμοζόμενου δυναμικού οδηγεί σε μεγαλύτερους χρόνους μετανάστευσης και συνεπώς δίνεται μεγαλύτερο χρονικό διάστημα για την ανάπτυξη αλληλεπιδράσεων μεταξύ του CS και των μορίων στόχος. Σε αυτή την περίπτωση, η μεταβολή που παρατηρήθηκε ήταν μικρή και δεν ήταν επαρκής για την επίτευξη πλήρους διαχωρισμού.

Πραγματοποιήθηκε επίσης σύγκριση μεταξύ της SCF_6 και SCF_7 για τη χειρόμορφη ανάλυση του NEF. Με χρήση της SCF_7 , σε χαμηλές συγκεντρώσεις του CS, δε σημειώθηκε καμία εναντιοεκλεκτικότητα ως προς τα εναντιομερή του NEF, πιθανώς λόγω του μεγαλύτερου μεγέθους της κοιλότητας της εν λόγω CF. Συνεπώς, οι αποστάσεις στο χώρο δεν επιτρέπουν την αλληλεπίδραση σε τρία σημεία με το μόριο στόχος.

Σε συγκέντρωση 4 mM SCF_7 όμως, σημειώθηκε μερικός διαχωρισμός ($R_s = 0.6$). Τα εναντιομερή του αναλύτη δε διαχωρίζονται πλήρως, ακόμα και με προσθήκη 10 mM SCF_7 .

Κατά την προσθήκη 4 mM SCF₇, το μεγαλύτερο δυναμικό που εφαρμόστηκε ήταν τα 18 kV, λόγω του υψηλού παραγόμενου ρεύματος (~98 μ A). Σε αυτήν την περίπτωση, η μελέτη επίδρασης του δυναμικού παρουσιάζεται στο **Σχήμα 6.11**, στο οποίο παρατηρείται αισθητή βελτίωση της R_s ($R_s = 1.3$), με μείωση του δυναμικού στα 10 kV.

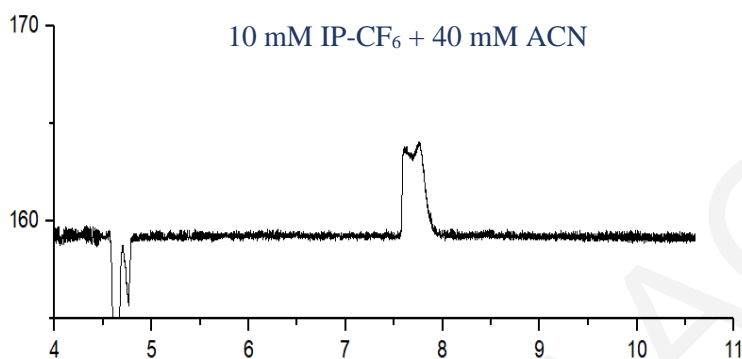


Σχήμα 6.11. Μελέτη επίδρασης του δυναμικού στο χειρόμορφο διαχωρισμό του NEF. Πειραματικές συνθήκες: 100 mM Tris/10 mM Borate ως το BGE, προσθήκη 4 mM SCF₇. $C_{NEF} = 0.4$ mg/mL, pH 8.0, $\lambda = 200$ nm, θερμοκρασία $T = 20$ °C, έγχυση 50 mbars σε 3 sec. Δυναμικό 18 kV (A) και 10 kV για (B).

6.1.4. Μελέτη Επίδρασης Οργανικού Πρόσθετου

Με σκοπό τη βελτιστοποίηση του διαχωρισμού των εν λόγω ενώσεων, μελετήθηκαν διάφορα οργανικά πρόσθετα, όπως η MeOH, η αιθανόλη (ethanol, EtOH), το ACN και η τριεθυλαμίνη (TEA). Οι ουσίες αυτές χρησιμοποιήθηκαν σε συνδυασμό με τους CSs ή/και με τα CILs. Σύμφωνα με μελέτες που αναφέρουν τη χρήση χειρόμορφων στατικών φάσεων αποτελούμενες από παράγωγα της CF-6 στην HPLC, έχει βρεθεί ότι οργανικά πρόσθετα στην κινητή φάση μπορεί να ωθήσουν τις αλληλεπιδράσεις των μορίων στόχων με τις στήλες ενισχύοντας τη δυνατότητα της συμπλοκοποίησής τους. Η συμπλοκοποίηση μπορεί να βελτιώσει ή να χειροτερέψει τον διαχωρισμό [23, 177]. Στην παρούσα εργασία, δεν παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη βελτίωση της R_s με τη χρήση οργανικών πρόσθετων.

Στην περίπτωση της T4, δεν κατέστη δυνατός ο διαχωρισμός των εναντιομερών της. Αξίζει να σημειωθεί ότι, με προσθήκη 40 mM ACN στο ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε 10 mM της IP-CF₆ σημειώθηκε μικρός ώμος (Σχήμα 6.12) στην κορυφή ($f/g = 0.2$). Περαιτέρω προσθήκη ACN δεν οδήγησε σε πλήρη διαχωρισμό.



Σχήμα 6.12. Επίδραση της συγκέντρωσης του οργανικού πρόσθετου στο διαχωρισμό της T4. Προσθήκη 40 mM ACN σε 10 mM IP-CF₆. Πειραματικές συνθήκες: 100 mM Tris/10 mM Borate ως το BGE, T = 25 °C, C_{T4} = 0.4 mg/mL, pH 8.6, λ = 214 nm, δυναμικό 30kV και μήκος έγχυσης 50 mbars σε 3 sec.

Σε αυτό το σημείο αξίζει, να αναφερθεί ο παράγοντας Kaiser για τον υπολογισμό της R_S για τα εναντιομερή της T4. Στις περιπτώσεις, όπου η διαχωριστική ικανότητα είναι πολύ μικρή, πολλές φορές, χρησιμοποιείται ο παράγοντας *Kaiser* και περιγράφεται από τη σχέση:

$$\text{Παράγοντας Kaiser} = \frac{f}{g} \quad (\text{Εξ. 11})$$

Όπου f η απόσταση από το μέσο της διατομής μεταξύ των μέγιστων σημείων των κορυφών μέχρι την κοιλάδα μεταξύ των κορυφών, και g η απόσταση από το ίδιο σημείο μέχρι τη βασική γραμμή (Σχήμα Π1, Παράρτημα).

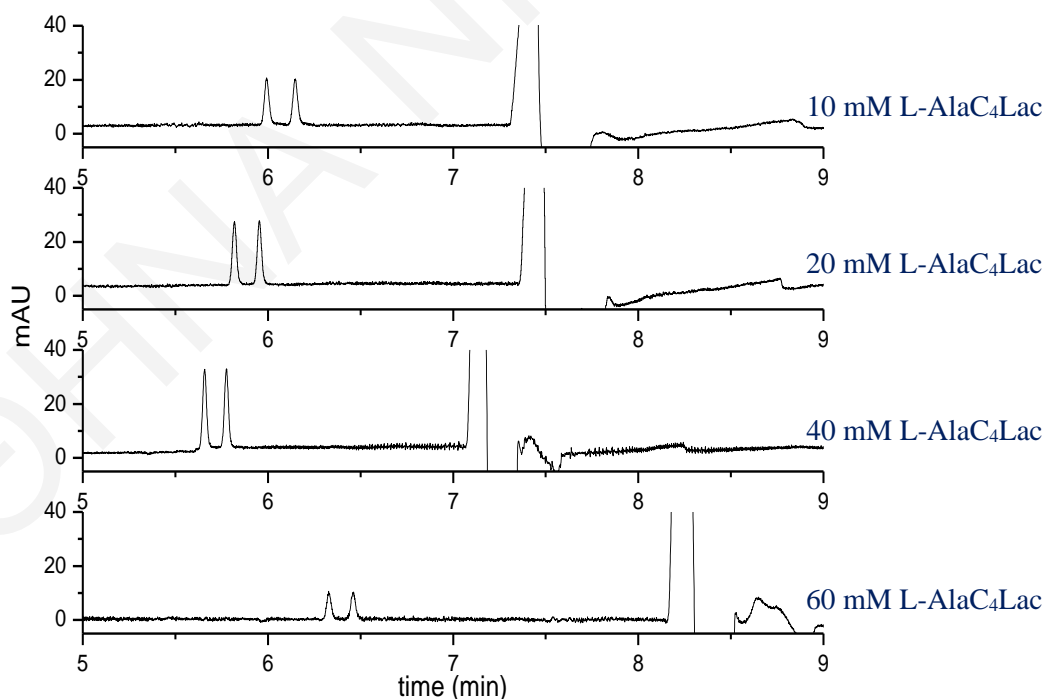
Σε αυτό το σημείο, μελετήθηκε άλλη μια παράμετρος, η θερμοκρασία με στόχο τη διερεύνηση της επίδρασης της στο διαχωρισμό. Η αύξηση της θερμοκρασίας οδηγεί σε μικρότερους χρόνους ανάλυσης λόγω της μείωσης του ιξώδους του διαλύματος. Στις βέλτιστες συνθήκες η μεταβολή της θερμοκρασίας από τους 20 μέχρι και τους 30 °C, δεν σημείωσε καμία μεταβολή στη διαχωριστική ικανότητα, μόνο ελάχιστη μείωση του χρόνου ανάλυσης.

Πραγματοποιήθηκε επίσης μελέτη με χρήση της IP-CF₇, ώστε να αξιολογηθεί η επίδραση του μεγέθους της κοιλότητας της εν λόγω CF. Δε σημειώθηκαν αξιοσημείωτες μεταβολές αναφορικά με την εναντιοεκλεκτικότητα της IP-CF₇ ως προς τα εναντιομερή της ένωσης, ακόμη και όταν έγινε προσθήκη οργανικών τροποποιητών και των L- και D- L-AlaC₄Lac.

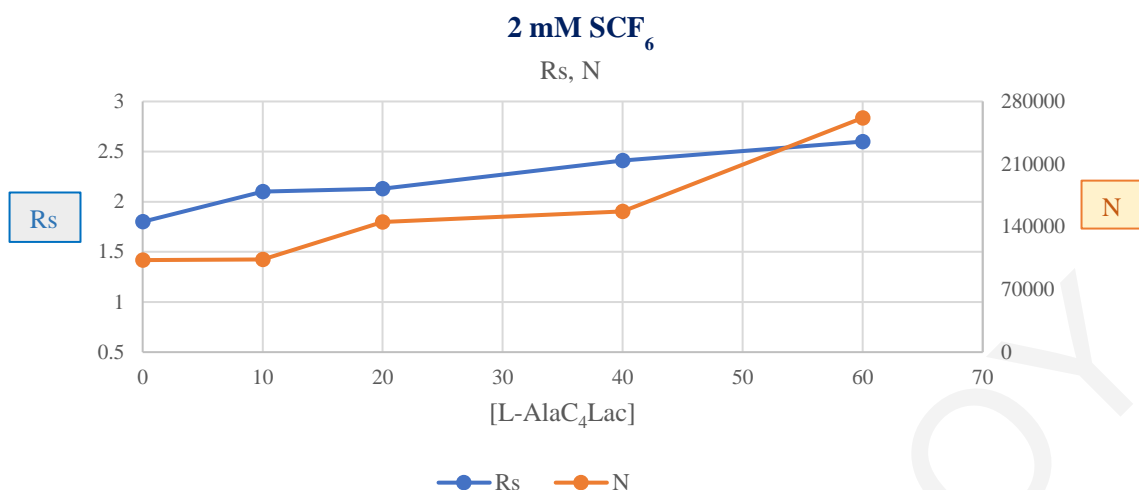
6.1.5. Μελέτη Συνεργιστικού Φαινομένου Μεταξύ SCF₆ και L-AlaC₄Lac

Στο πλαίσιο αυτής της μελέτης, αξιολογήθηκε επίσης το συνεργιστικό φαινόμενο μεταξύ της SCF₆ και του L-AlaC₄Lac, διατηρώντας σταθερές τις βέλτιστες συνθήκες και μεταβάλλοντας μόνο τη συγκέντρωση του CIL. Τα L- και D- παρουσίασαν παραπλήσιες τιμές R_s, έτσι επιλέχθηκε το L- εναντιομερές, αφού η σύνθεση του D- στοιχίζει περισσότερο και το ρακεμικό δεν είναι εμπορικά διαθέσιμο.

Όσον αφορά τον αναλύτη NEF, η προσθήκη του CIL σε BGE που περιείχε 2 mM SCF₆ οδήγησε σε μικρή αύξηση της R_s (Σχήμα 6.13). Όλες οι πειραματικές συνθήκες ήταν οι ίδιες, εκτός από το εφαρμοζόμενο δυναμικό, το οποίο ορίστηκε στην τιμή των 15 kV, εξαιτίας της αύξησης του παραγόμενου ρεύματος. Στο διάγραμμα του Σχήματος 6.14 παρουσιάζονται γραφικά οι τιμές της R_s, όσο και της N.



Σχήμα 6.13. Συνεργιστική δράση της SCF₆ και του L-AlaC₄Lac. Σταθερή συγκέντρωση 2 mM SCF₆ και μεταβλητές συγκεντρώσεις L-AlaC₄Lac. Ίδιες πειραματικές συνθήκες με Σχήμα 6.4 με εφαρμοζόμενο δυναμικό στα 15 kV.

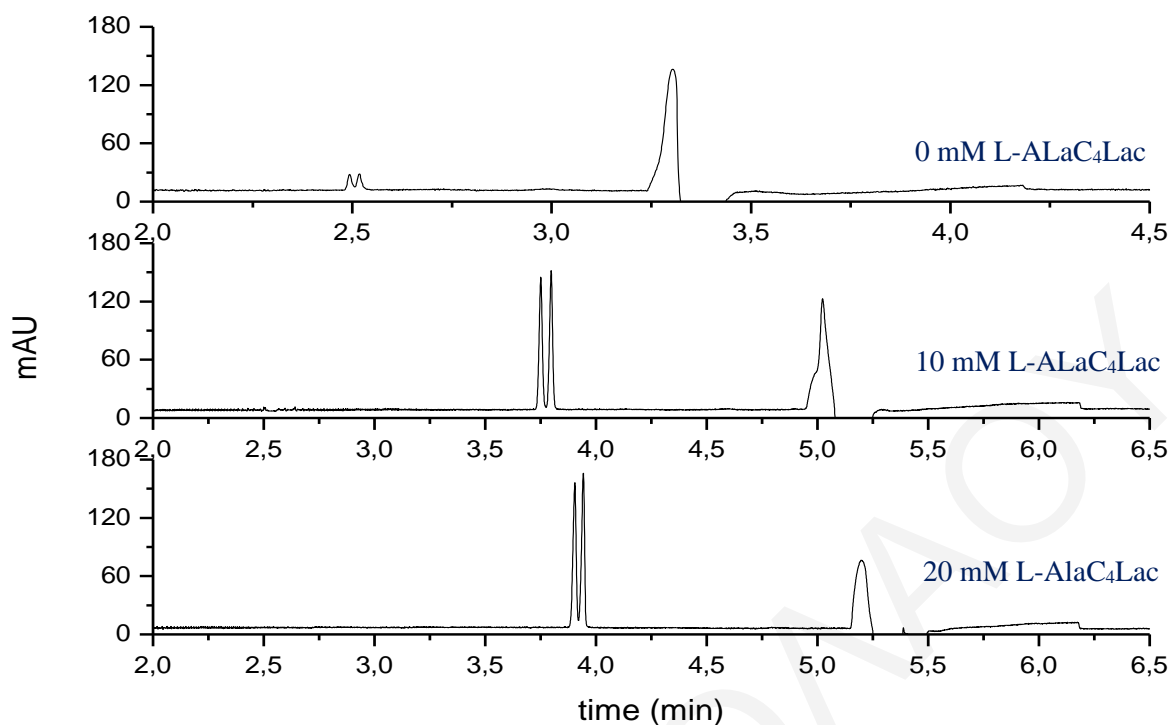


Σχήμα 6.14. Γραφική απεικόνιση της συνεργιστικής δράσης της SCF₆ και του L-AlaC₄Lac στις βέλτιστες συνθήκες διαχωρισμού. Σταθερή συγκέντρωση 2 mM SCF₆ και μεταβλητές συγκεντρώσεις L-AlaC₄Lac.

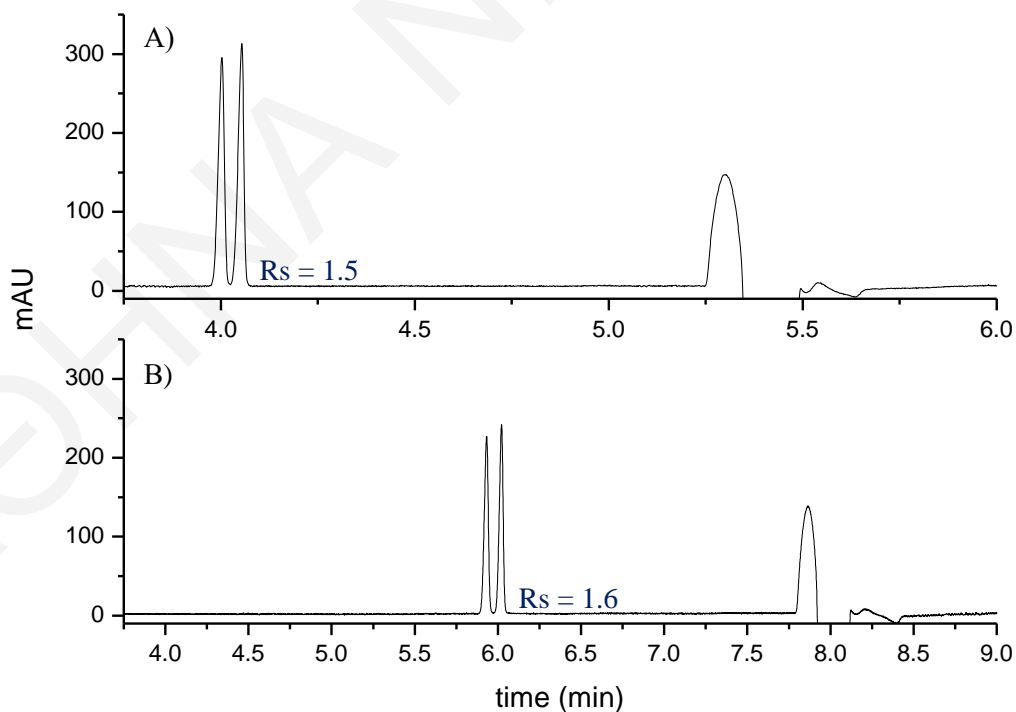
Όταν η συγκέντρωση της SCF₆ ήταν 1 mM, επιτεύχθηκε μερικός διαχωρισμός των εναντιομερών του NEF ($R_s = 1.1$). Η προσθήκη του L-AlaC₄Lac οδήγησε σε αισθητή αύξηση της R_s , αλλά και της αποδοτικότητας, μέχρι συγκέντρωσης 40 mM του CIL, όπου παρατηρήθηκε πλήρης διαχωρισμός ($R_s = 1.5$). Στον **Πίνακα 6.3** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της R_s και της N αυτής μελέτης. Στο **Σχήμα 6.15** και **Σχήμα 6.16** παρουσιάζονται τα σχετικά ηλεκτροφερογραφήματα. Συμπερασματικά, ο συνδυασμός του L-AlaC₄Lac με τη SCF₆, απέδειξε ικανότητα συνέργειας στην εναντιοεκλεκτική αναγνώριση για τα ισομερή του NEF.

Πίνακας 6.3. Επίδραση της συγκέντρωσης του L-AlaC₄Lac στη διαχωριστική ικανότητα και στην αποδοτικότητα.

[L-AlaC ₄ Lac]	R _s	N
0 mM	1.1	10.5 x 10 ⁴
10 mM	1.2	25.6 x 10 ⁴
20 mM	1.1	21.4 x 10 ⁴
40 mM	1.5	21.9 x 10 ⁴

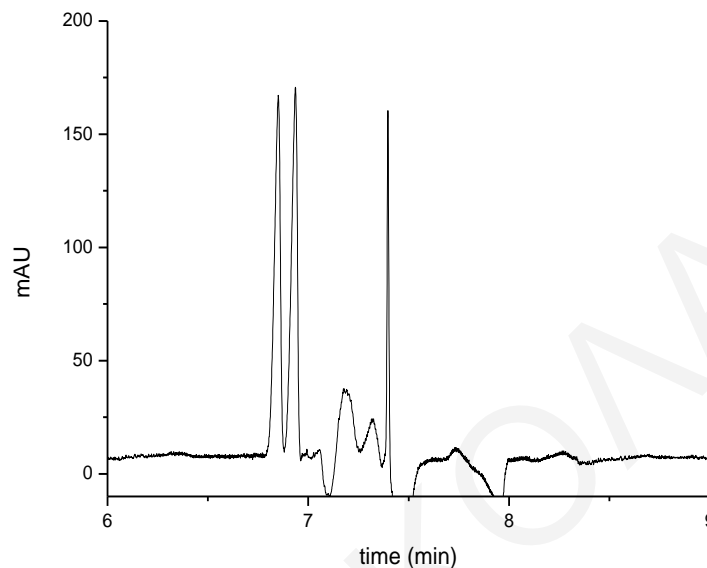


Σχήμα 6.15. Συνεργιστική δράση της SCF₆ και του L-AlaC₄Lac. Σταθερή συγκέντρωση 1 mM SCF₆ και μεταβλητές συγκεντρώσεις L-AlaC₄Lac. Ίδιες πειραματικές συνθήκες με Σχήμα 6.4.



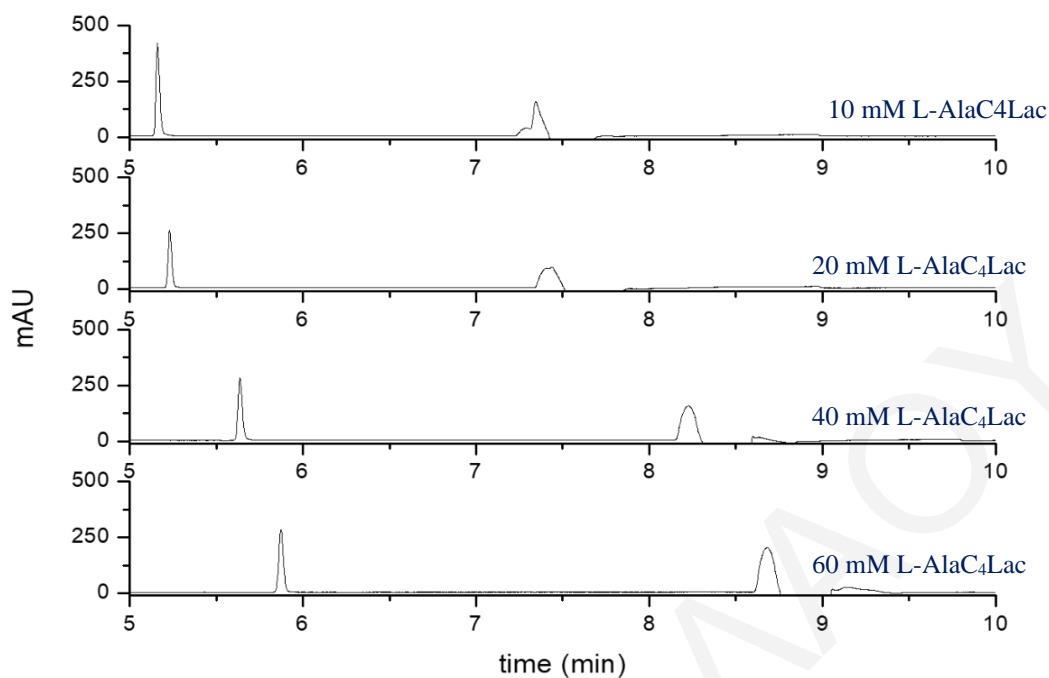
Σχήμα 6.16. Συνεργιστική δράση της SCF₆ και του L-AlaC₄Lac. Σταθερή συγκέντρωση 1 mM SCF₆ και 40 mM L-AlaC₄Lac. Ίδιες πειραματικές συνθήκες με Σχήμα 6.4, με τη μόνη διαφορά (A) V = 20 kV και (B) V = 15 kV.

Μια ακόμη μελέτη πραγματοποιήθηκε για να εξεταστεί το ενδεχόμενο συνεργιστικής δράσης μεταξύ της SCF₇ και του L-ALaC₄Lac. Όταν 4 mM SCF₇ χρησιμοποιήθηκαν για τον εναντιομερή διαχωρισμό του NEF, επιτεύχθηκε μερικός διαχωρισμός. Όταν το L-ALaC₄Lac προστέθηκε στο BGE σε συγκέντρωση 40 mM, η R_s αυξήθηκε στο 1.4. Το ηλεκτροφερογράφημα παρουσιάζεται στο **Σχήμα 6.17**.

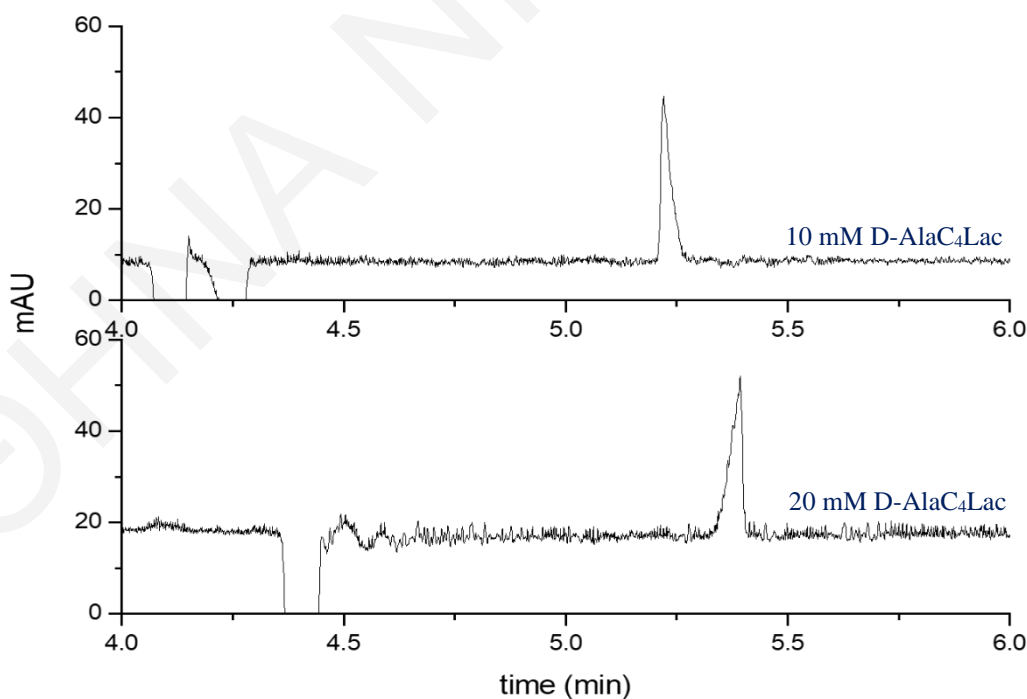


Σχήμα 6.17. Επίδραση προσθήκης L-ALaC₄Lac στο διαχωρισμό του NEF. Στο BGE προστέθηκαν 4 mM SCF₇ και 40 mM L-AlaC₄Lac. Συνθήκες ίδιες με Σχήμα 6.3, δυναμικό 10 kV.

Σε αυτό το σημείο αξίζει να τονιστεί, ότι με τη χρήση του L-AlaC₄Lac ως το μοναδικό πρόσθετο στο BGE, δε σημειώθηκε εναντιοεκλεκτικότητα για κανένα από τα εναντιομερή των ενώσεων. Στο **Σχήμα 6.18** παρουσιάζεται το παράδειγμα για την περίπτωση του NEF, με προσθήκη διαφόρων συγκεντρώσεων (10-60 mM) του AAIL στο BGE. Παρομοίως, στο **Σχήμα 6.19**, παρουσιάζονται τα ηλεκτροφερογραφήματα που λήφθηκαν από την προσθήκη του D-AlaC₄Lac, στην προσπάθεια μελέτης του για το διαχωρισμό των εναντιομερών της CTZ.



Σχήμα 6.18. Επίδραση προσθήκης L-ALaC₄Lac στο διαχωρισμό του NEF. Στο BGE προστέθηκαν διάφορες συγκεντρώσεις L-AlaC₄Lac. Συνθήκες ίδιες με Σχήμα 6.4, εφαρμοζόμενο δυναμικό 15 kV.



Σχήμα 6.19. Επίδραση προσθήκης D-ALaC₄Lac στο διαχωρισμό της CTZ. Στο BGE προστέθηκαν διάφορες συγκεντρώσεις D-AlaC₄Lac. Συνθήκες ίδιες με Σχήμα 6.6, δυναμικό 20 kV.

6.1.6. Συμπεράσματα

Από την πιο πάνω εργασία εξήχθησαν σημαντικά συμπεράσματα αναφορικά με το χειρόμορφο διαχωρισμό τεσσάρων ουδέτερων, βασικών και αρνητικά φορτισμένων ενώσεων. Χρησιμοποιήθηκαν κυρίως οι CFs, αλλά και CDs, ως CS, ενώ παράλληλα μελετήθηκε και το πιθανό συνεργιστικό φαινόμενο μεταξύ ενός CS και των AAILs. Οι διαμορφώσεις (L- και D-) του AlaC₄Lac αξιολογήθηκαν, είτε ως τα μοναδικά πρόσθετα στο BGE, είτε σε συνδυασμό με τις CFs.

Πλήρης διαχωρισμός επιτεύχθηκε για τις δύο εκ των εξεταζόμενων ενώσεων με χρήση της SCF₆ ως CS. Η τελευταία κατάφερε να διαχωρίσει σε μικρό χρόνο ανάλυσης (< 4 λεπτών), με πολύ υψηλή αποδοτικότητα και επαναληψιμότητα (%RSD < 1.2%) τα εναντιομερή της NEF και της FXD. Το pH αποτέλεσε ένα καθοριστικό παράγοντα για το διαχωρισμό των εναντιομερών του NEF, εξαιτίας των ισχυρών ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων που αναπτύχθηκαν μεταξύ των αναλυτών και της αρνητικά φορτισμένης SCF₆.

Το είδος του BGE, το pH, η συγκέντρωση και το είδος του CS, καθώς και η συγκέντρωση του CIL μελετήθηκαν εκτενώς με στόχο τον επιτυχή διαχωρισμό των φαρμάκων. Ακόμη και στις περιπτώσεις, όπου ο διαχωρισμός δεν ήταν πλήρης, σχάσιμο της κορυφής της T4 σημειώθηκε με την προσθήκη οργανικού τροποποιητή, ο οποίος φαίνεται να ενισχύει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ CS και μορίου. Συγκεκριμένα, για τα εναντιομερή της T4, σημειώθηκε μικρό σχάσιμο της κορυφής μόνο με την προσθήκη 40 mM ACN στο BGE (pH 8.6) που περιείχε 10 mM IP-CF₆. Στην περίπτωση της CTZ παρατηρήθηκε ένας μικρός ώμος της κορυφής μόνο με τη προσθήκη 0.5 % κ.ο. της CM-CF₆.

Τα νέα AAILs με βάση τους εστέρες των αμινοξέων, τα οποία μπορούν εύκολα να συντεθούν από εμπορικά διαθέσιμα αντιδραστήρια, έδειξαν ότι μπορούν να λειτουργήσουν ως πρόσθετα στο BGE. Η χρήση του L-AlaC₄Lac ως το μοναδικό πρόσθετο στο BGE δεν παρουσίασε εναντιοεκλεκτικότητα για τα εναντιομερή των ενώσεων που μελετήθηκαν. Σε συνδυασμό με CSs όμως, έχουν την δυνατότητα να δρουν συνεργιστικά βελτιώνοντας τους χειρόμορφους διαχωρισμούς. Σε αυτή την εργασία, σημειώθηκε πιθανή συνέργεια με την SCF₆, βελτιώνοντας την εναντιοεκλεκτικότητα ως προς τα εναντιομερή του NEF. Επιπρόσθετα, το NEF διαχωρίστηκε πλήρως με χρήση του L-ALaC₄Lac (40 mM) σε χαμηλότερη συγκέντρωση (1 mM) του CS. Συνεπώς, στη συγκεκριμένη περίπτωση, οι αλληλεπιδράσεις που μπορούν να αναπτυχθούν για την επίτευξη του διαχωρισμού, πιθανώς να περιλαμβάνουν στερεοχημικές παρεμποδίσεις (λόγω της τερτ-βουτυλο-ομάδας) και δεσμούς υδρογόνου. Επιπλέον, η μειωμένη ηλεκτροοσμωτική ευκινησία, η οποία με τη

σειρά της, επέτρεπε την αύξηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του L-AlaC₄Lac, της SCF₆ και του αναλύτη, μπορεί να οδήγησε στην ενίσχυση της εναντιοεκλεκτικότητας. Ως εκ τούτου, συμπεραίνεται ότι στην προκειμένη περίπτωση η συνεργιστική επίδραση ήταν σημαντική. Σαφέστατα όμως επιβάλλονται περισσότερες μελέτες για να διαπιστωθούν οι ακριβείς μηχανισμοί εναντιοεκλεκτικής αναγνώρισης και η μελέτη του δυαδικού συστήματος του CIL και της CF.

ΑΘΗΝΑ ΝΙΚΟΛΑΟΥ

6.2. Προσδιορισμός Κανναβινοειδών σε Κυψελίδες Αυτιού με Χρήση της UPLC-MS/MS

Πρωταρχικός σκοπός και πρωτοτυπία του δεύτερου μέρους της παρούσας διδακτορικής έρευνας αποτέλεσε ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός κανναβινοειδών ενώσεων σε ένα μη-συνηθισμένο βιολογικό δείγμα. Ο προσδιορισμός της κύριας ψυχοτρόπου ουσίας της κάνναβης (THC) και των μεταβολιτών της (THC-OH και THC-COOH), καθώς επίσης και δύο κύριων κανναβινοειδών, της CBN και της CBD πραγματοποιήθηκε σε κυψελίδες (κερί) αυτιού από άτομα χρήστες κάνναβης, με την τεχνική UPLC-MS/MS. Για την επίτευξη αυτού του στόχου, επιλέχθηκε αρχικά η χρωματογραφική στήλη, με στόχο το διαχωρισμό των εξεταζόμενων ενώσεων, ενώ παράλληλα καθορίστηκε το βέλτιστο χρωματογραφικό σύστημα διαλυτών. Ακολούθως, βελτιστοποιήθηκαν τα χαρακτηριστικά του, όπως ο ρυθμός έκλουσης, το ποσοστό εκάστου διαλύτη, καθώς επίσης και η βαθμιδωτή έκλουση. Στη συνέχεια, προσδιορίστηκαν τα χαρακτηριστικά του φασματομέτρου μαζών με στόχο την ανίχνευση, αλλά και ποσοτικοποίηση των ενώσεων.

Η εφαρμογή της UPLC-MS/MS επέτρεψε τη χρωματογραφική ανάλυση και διαχωρισμό των ενώσεων σε διάστημα μόλις 4.7 λεπτών. Παράλληλα, η ταυτόχρονη εξέταση δύο μεταβάσεων (Multiple Reaction Monitoring, MRM), ανά ένωση, στο σύστημα MS/MS παρέχει με τη σειρά της μια αξιόπιστη ταυτοποίηση των κανναβινοειδών ενώσεων συμπληρωματική των χρόνων συγκράτησης (retention time, t_R) στο χρωματογραφικό σύστημα.

Η ανάπτυξη της μεθόδου επεξεργασίας αυτών των βιολογικών δειγμάτων αποτέλεσε ιδιαίτερη πρόκληση, καθώς οι βιβλιογραφικές αναφορές είναι περιορισμένες στο ελάχιστο. Η συνολική πορεία ανάπτυξης και αξιολόγησης της μεθόδου επεξεργασίας των δειγμάτων που αναπτύχθηκε ειδικά για τη διατριβή αυτή, παρουσιάζονται εκτενώς στα επόμενα κεφάλαια.

Σε αυτό το σημείο αξίζει να τονιστεί ότι, μέχρι στιγμής, δεν υπάρχει καμία βιβλιογραφική αναφορά σχετικά με την ανίχνευση κανναβινοειδών ενώσεων στο κερί σε ενεργούς χρήστες κάνναβης.

6.2.1. Μελέτη Χρωματογραφικών Συνθηκών

Σε αρκετές μελέτες, όπου η ανάλυση πραγματοποιείται με τη χρήση της τεχνικής MS/MS, ο χρωματογραφικός διαχωρισμός των ενώσεων δεν κρίνεται απαραίτητος, καθώς δύο ενώσεις σπάνια ενδέχεται να παρουσιάζουν ταυτόχρονα τον ίδιο χρόνο συγκράτησης και τις ίδιες MRM μεταπτώσεις. Ωστόσο, δύο από τα εξεταζόμενα κανναβινοειδή, η THC και η CBD, έχουν ακριβώς την ίδια μοριακή μάζα και παρουσιάζουν πανομοιότυπο μοτίβο μεταπτώσεων. Σε αυτή την περίπτωση, ο χρωματογραφικός διαχωρισμός των δύο αυτών ενώσεων αποτέλεσε επιτακτική ανάγκη.

Στα προπαρασκευαστικά πειράματα, διερευνήθηκε η χρωματογραφική συμπεριφορά των αναλυτών αυτών, μεταβάλλοντας την εκατοστιαία σύσταση της κινητής φάσης. Επιλέχθηκε η στήλη BEH C18 και συνεπώς πολικοί διαλύτες για τη χρωματογραφική ανάλυση αντίστροφης φάσης. Βαθμιδωτή μείωση της υδατικής φάσης από 45% σε 32.5% (v/v) και αύξηση του ποσοστού του ακετονιτριλίου από 55% σε 67.5% (v/v) οδήγησε σε έναν εξαιρετικό διαχωρισμό μεταξύ των αναλυτών σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα. Επιπλέον, επιτεύχθηκε ο χρωματογραφικός διαχωρισμός των ουσιών CBD και THC, οι οποίες δεν μπορούν να διαχωριστούν στο συζευγμένο σύστημα MS/MS. Η βαθμιδωτή αύξηση του ποσοστού του οργανικού διαλύτη οδήγησε στην ταχύτερη έκλυση των πιο υδρόφοβων ενώσεων.

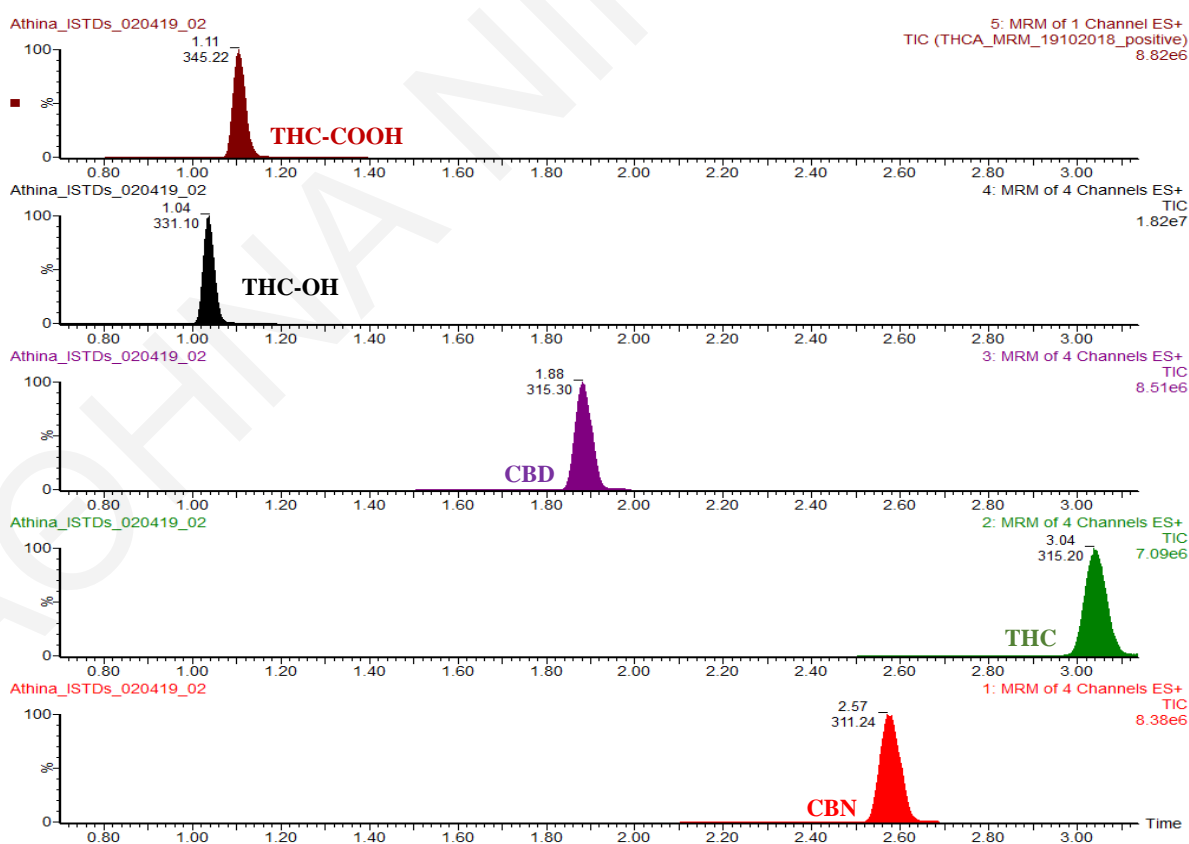
Μια σύντομη μελέτη στο πλαίσιο των προπαρασκευαστικών πειραμάτων εστίασε στη μελέτη της χρωματογραφικής ροής και της θερμοκρασίας της στήλης. Μείωση της ροής του συστήματος από 0.8 σε 0.35 mL/min, οδήγησε σε σημαντική μείωση τόσο της παραγόμενης πίεσης, όσο και της ποσότητας διαλυτών που καταναλώθηκε συνολικά, αυξάνοντας ωστόσο κατά ελάχιστο τον χρόνο έκλυσης των ουσιών, κατά περίπου 1.7 λεπτά.

Στο **Σχήμα 6.20** παρουσιάζεται το χρωματογράφημα συνολικών ιόντων (Total Ion Current (Chromatogram), TIC) που λήφθηκε στα προπαρασκευαστικά στάδια του χρωματογραφικού διαχωρισμού των κανναβινοειδών ενώσεων με το ίδιο σύστημα δυαδικού συστήματος αναλυτών, παρόμοιο ρυθμό βαθμιδωτής έκλυσης, αλλά με διαφορετική ροή (0.8 mL/min), θερμοκρασία στήλης $T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ και σε υψηλότερη συγκέντρωση των αναλυτών (0.2 $\mu\text{g/mL}$). Εν συνεχεία, έπειτα από τα πειράματα με σκοπό τη βελτίωση της ροής αλλά και της βαθμιδωτής έκλυσης, προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες τιμές. Ο βέλτιστος ρυθμός ροής, του διαλύτη ήταν 0.35 mL/min, ενώ η θερμοκρασία της στήλης διατηρήθηκε στους 35 $^{\circ}\text{C}$. Η χαμηλότερη ροή εξασφαλίζει τη διατήρηση, σε χαμηλά επίπεδα, της πίεσης

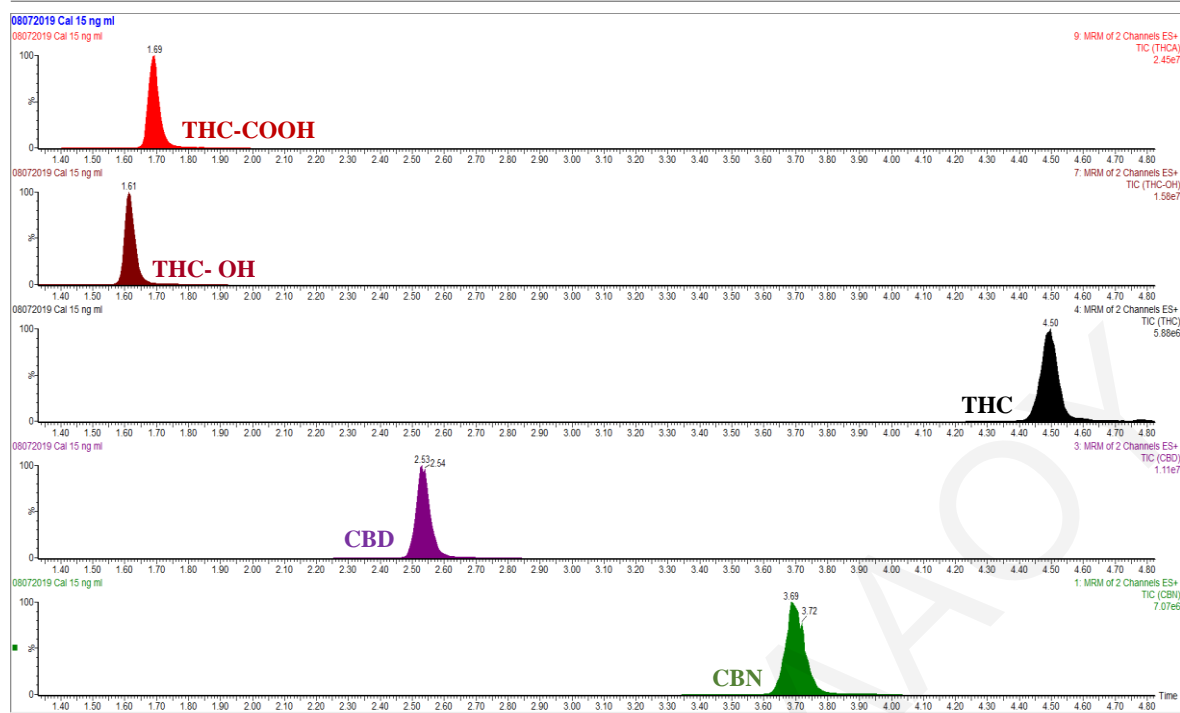
του συστήματος UPLC-MS/MS. Ο συνολικός χρόνος ανάλυσης ανήλθε στα οκτώ λεπτά, ενώ ο χρόνος διαχωρισμού ήταν μόλις 4.5 min.

Η σειρά έκλουσης των ενώσεων ήταν THC-OH, THC-COOH, CBD, CBN και τέλος η THC, η οποία κατακρατείται περισσότερο στη χρωματογραφική στήλη. Οι δύο μεταβολίτες της THC, THC-OH και THC-COOH, εκλύονται πρώτοι ως πιο πολικές ενώσεις, λόγω του επιπλέον υδροξυλίου και της καρβοξυλικής ομάδας, αντίστοιχα. Ακολουθεί η διόλη CBD, η CBN που εξαιτίας των επιπρόσθετων διπλών δεσμών φαίνεται να παρουσιάζει μικρότερη υδροφοβικότητα από την THC, η οποία εκλύεται τελευταία. Το TIC που λήφθηκε στις βέλτιστες συνθήκες διαχωρισμού παρουσιάζεται στο **Σχήμα 6.21**.

Κριτήρια χρωματογραφικής αξιολόγησης αποτέλεσαν η διαχωριστική ικανότητα, ο χρόνος έκλουσης, η μορφή των κορυφών (συμμετρία και εύρος), καθώς και το εμβαδόν τους, το οποίο σχετίζεται με την ευαισθησία της μεθόδου. Στο πλαίσιο της βελτιστοποίησης της μεθόδου, σημαντικό μέλημα αποτέλεσε ο συντομότερος δυνατός χρόνος ανάλυσης. Το τελευταίο επιτεύχθηκε με εφαρμογή βαθμιδωτής έκλουσης και με χρήση συστήματος δύο διαλυτών, όπως περιγράφεται στο πειραματικό μέρος.



Σχήμα 6.20. TIC των υπό μελέτη ενώσεων στα προπαρασκευαστικά πειράματα. Συνθήκες: κινητή φάση (A) H₂O, 0.1% FA και (B) ACN, 0.1% FA, όγκος έγχυσης 10 μL και ροή 0.8 mL/min, T = 50 °C. Συγκέντρωση αναλυτών 2 μg/mL, σειρά έκλουσης THC-OH, THC-COOH, CBD, CBN και THC.



Σχήμα 6.21. TIC των υπό μελέτη ενώσεων στις βέλτιστες συνθήκες διαχωρισμού. Συνθήκες: κινητή φάση (A) H₂O, 0.1% FA και (B) ACN, 0.1% FA, όγκος έγχυσης 10 μ L και ροή 0.35 mL/min, T = 35 $^{\circ}$ C. Συγκέντρωση αναλυτών 15 ng/mL, σειρά έκλουσης THC-OH, THC-COOH, CBD, CBN και THC.

Η στήλη αποτελεί τον πυρήνα κάθε χρωματογραφικού συστήματος. Πολλές στήλες είναι εμπορικά διαθέσιμες σε ποικίλα μήκη, μεγέθη και με διάφορα υλικά πλήρωσης. Η χρήση του σωστού συνδυασμού του μήκους και του υλικού πλήρωσης σε σχέση με την κατάλληλη κινητή φάση, μπορεί να βοηθήσει στον αποτελεσματικό διαχωρισμό των ενώσεων ενός μείγματος. Σε γενικές γραμμές, οι στήλες LC είναι αρκετά ανθεκτικές, με μεγάλο χρόνο ζωής, εκτός εάν χρησιμοποιούνται με κάποιο τρόπο που είναι εγγενώς καταστρεπτικός, όπως για παράδειγμα, με πολύ όξινα ή βασικά εκλύσματα ή με συνεχείς ενέσεις "βρώμικων" βιολογικών ή ακατέργαστων δειγμάτων.

Για τον προσδιορισμό των λιπόφιλων αυτών ενώσεων που εξετάστηκαν στο δεύτερο μέρος της διατριβής αυτής, επιλέχθηκε η εμπορικά διαθέσιμη στήλη BEH C18, η οποία αποτελεί μία εκ των πιο διαδεδομένων, και δικαίως χαρακτηρίζεται ως στήλη καθολικής, χρήσης αφού μεγάλος αριθμός υδρόφοβων, κυρίως ενώσεων μπορεί να διαχωριστεί με τη χρήση της [88, 94, 123, 165]. Επιλέχθηκε λοιπόν χρωματογραφική ανάλυση αντίστροφης φάσης με άπολη στατική φάση και πολικούς διαλύτες έκλουσης για τον προσδιορισμό των κανναβινοειδών ενώσεων, οι οποίες χαρακτηρίζονται ως υδρόφοβες.

Η βαθμιδωτή έκλυση εφαρμόζεται συνήθως σε πολύπλοκα δείγματα που περιέχουν πολλά συστατικά, με σκοπό την επίτευξη καλύτερου και ταχύτερου διαχωρισμού, σε ένα χρωματογραφικό σύστημα. Σε αυτή την εργασία, μελετήθηκε η σύσταση της κινητής φάσης αποτελούμενη αρχικά από (A) υδατικό διάλυμα 0.1% μυρμηκικού οξέος (FA) (H₂O, 0.1% FA) και (B) ακετονιτριλίου με διάλυμα 0.1% μυρμηκικού οξέος, (ACN, 0.1% FA). Το εφαρμοζόμενο, βαθμιδωτό πρόγραμμα έκλυσης των διαλυτών βελτιστοποιήθηκε αυξάνοντας σταδιακά τον οργανικό χαρακτήρα της κινητής φάσης μέχρι τη βέλτιστη: αρχικά 0 min 55 % B; 0.0-0.5 min 64 % B; 0.5-4.0 min 67.5 % B; 4.1-6.0 min 95 % B; 6.1-8.0 min 55 % B. Στον **Πίνακα 6.4** παρουσιάζεται η σύσταση της κινητής φάσης στις βέλτιστες συνθήκες της βαθμιδωτής έκλυσης.

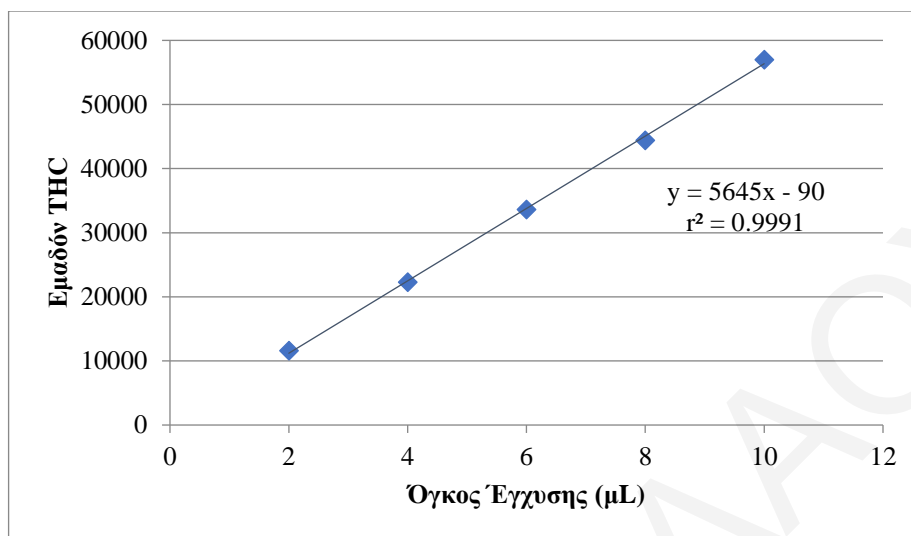
Εκτός από τη σύσταση των διαλυτών στη βαθμιδωτή έκλυση, μελετήθηκε επίσης η επίδραση της θερμοκρασίας της στήλης στο διαχωρισμό. Συγκεκριμένα, ο θερμοστάτης της στήλης ορίστηκε μεταξύ 35 - 50 °C. Ως βέλτιστη θερμοκρασία επιλέχθηκαν αυτή των οι 35 °C στην οποία επιτεύχθηκε διαχωρισμός των ενώσεων στο LC σύστημα σε μικρό χρονικό διάστημα, παρά τη μικρή αύξηση στο χρόνο ανάλυσης. Παράλληλα, αποφεύγεται η αυξημένη θερμοκρασία εντός της στήλης εξαιτίας της ευαισθησίας των εξεταζόμενων ουσιών στη θερμότητα.

Πίνακας 6.4. Βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες της βαθμιδωτής έκλυσης.

AA	Time (min)	Flow (mL/min)	% A	% B
1.	Initial	0.35	45.0	55.0
2.	0.5	0.35	36.0	64.0
3.	4.0	0.35	32.5	67.5
4.	4.1	0.35	5.0	95.0
5.	6.0	0.35	5.0	95.0
6.	6.1	0.35	55.0	45.0
7.	8.0	0.35	55.0	55.0

Στο πλαίσιο του χρωματογραφικού προσδιορισμού των ενώσεων πραγματοποιήθηκε μια μικρή μελέτη του όγκου έγχυσης των αναλυτών (2, 4, 6, 8 και 10 μ L) συναρτήσει του εμβαδού αυτών. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται με γραφική αναπαράσταση, στην οποία σημειώθηκε εξαιρετική γραμμικότητα με συντελεστή προσδιορισμού (coefficient of determination, r^2) r^2 μεγαλύτερο από 0.99. Στο **Σχήμα 6.22**, παρουσιάζεται η γραφική

παράσταση για την THC. Ο τελικός όγκος έγχυσης ορίστηκε στα 10 μL , παρ' όλο που και σε μικρότερους όγκους παρουσιάζεται πολύ καλή γραμμικότητα.



Σχήμα 6.22. Μελέτη όγκου έγχυσης των αναλυτών, συναρτήσεως του εμβαδού της THC.

6.2.2. Μελέτη Παραμέτρων Φασματομετρίας Μάζας

Πρώτο βήμα στην ανάπτυξη της κατάλληλης μεθόδου με την τεχνική UPLC-MS/MS αποτελεί η ρύθμιση των παραμέτρων λειτουργίας του φασματογράφου μαζών. Για την υλοποίηση του πιο πάνω βήματος απαιτείται η εκτέλεση τριών σταδίων: 1) η εύρεση των μητρικών ιόντων με λήψη φασμάτων πλήρους σάρωσης, 2) ο προσδιορισμός των θυγατρικών ιόντων από τη θραυσματοποίηση των επιλεγμένων μητρικών σε λειτουργία σάρωσης θυγατρικού ιόντος, και 3) η εισαγωγή των τιμών m/z τόσο των μητρικών, όσο και των θυγατρικών ιόντων στο λογισμικό προς τη δημιουργία μεθόδου παρακολούθησης προεπιλεγμένων ιόντων (MRM).

Στο πρώτο στάδιο και για κάθε μια από τις ουσίες που μελετήθηκαν, λήφθηκαν φάσματα πλήρους σάρωσης σε μια καθορισμένη περιοχή μαζών (100-500 m/z), κάτω από συνθήκες ESI (+). Ως μητρικά ιόντα επιλέχθηκαν τα πρωτονιωμένα μοριακά ιόντα $[M+H]^+$ των ενώσεων, τα οποία λήφθηκαν από τα φάσματα πλήρους σάρωσης και συμφωνούν με παλαιότερες βιβλιογραφικές αναφορές.

Ακολούθησε σάρωση θυγατρικού ιόντος και έτσι λήφθηκαν πληροφορίες για τη θραυσματοποίηση των επιλεγμένων μητρικών ιόντων. Για όλες τις εξεταζόμενες ουσίες, δύο θυγατρικά ιόντα που παράγονται από το κάθε μητρικό, επιλέχθηκαν ως μετάπτωση ιόντων MRM. Με στόχο την ποσοτικοποίηση, επιλέχθηκε η πιο ευαίσθητη μετάπτωση MRM

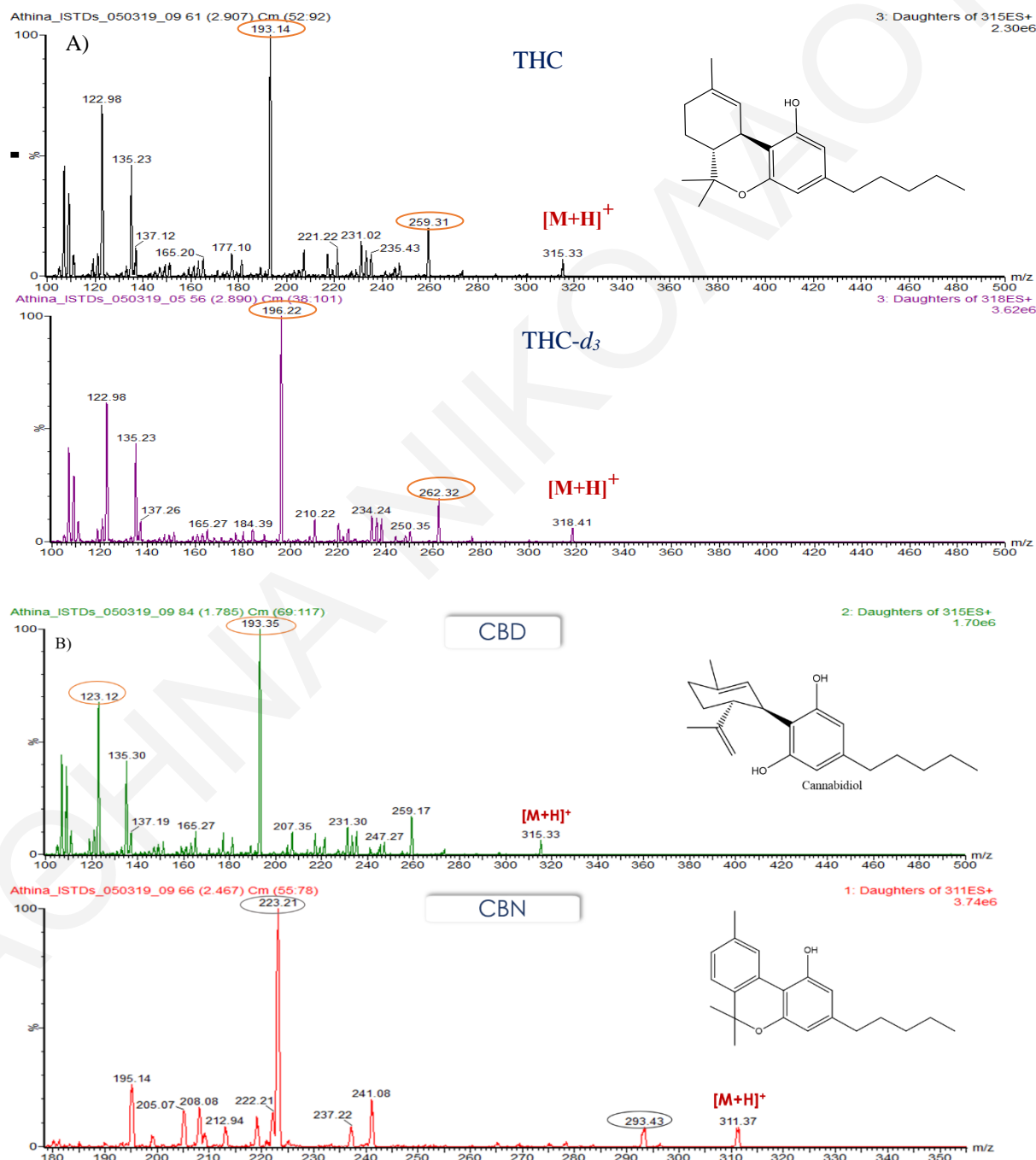
(μεγαλύτερη σε αφθονία), ενώ για σκοπούς ταυτοποίησης επιλέχθηκε μια δεύτερη. Αυτό, σε συνδυασμό με το χρόνο έκλυσης (t_R) της κάθε ουσίας, αποτελούν δεδομένα που προσδίδουν αξιοπιστία στη μέθοδο. Οι MRM μεταβάσεις κάθε αναλύτη βελτιστοποιήθηκαν. Στον **Πίνακα 6.5** παρουσιάζονται οι τιμές m/z των μητρικών και θυγατρικών ιόντων κάθε αναλύτη, καθώς επίσης και οι βέλτιστες τιμές των MS παραμέτρων: το δυναμικό του πρώτου τετραπόλου (Cone Voltage, CV) το οποίο καθορίζει το μητρικό ιόν και την ενέργεια σύγκρουσης (Collision Energy, CE), η οποία ελέγχει το βαθμό θραυσματοποίησης των μητρικών ιόντων στο θάλαμο σύγκρουσης. Στη στήλη που παρουσιάζονται οι ενέργειες σύγκρουσης, πρώτα παρατίθεται η CE (eV) για το ιόν ποσοτικοποίησης και έπειτα για το ιόν ταυτοποίησης των μορίων.

Πίνακας 6.5. Παράμετροι MS/MS των υπό μελέτη ουσιών, καθώς επίσης και οι MRM μεταβάσεις.

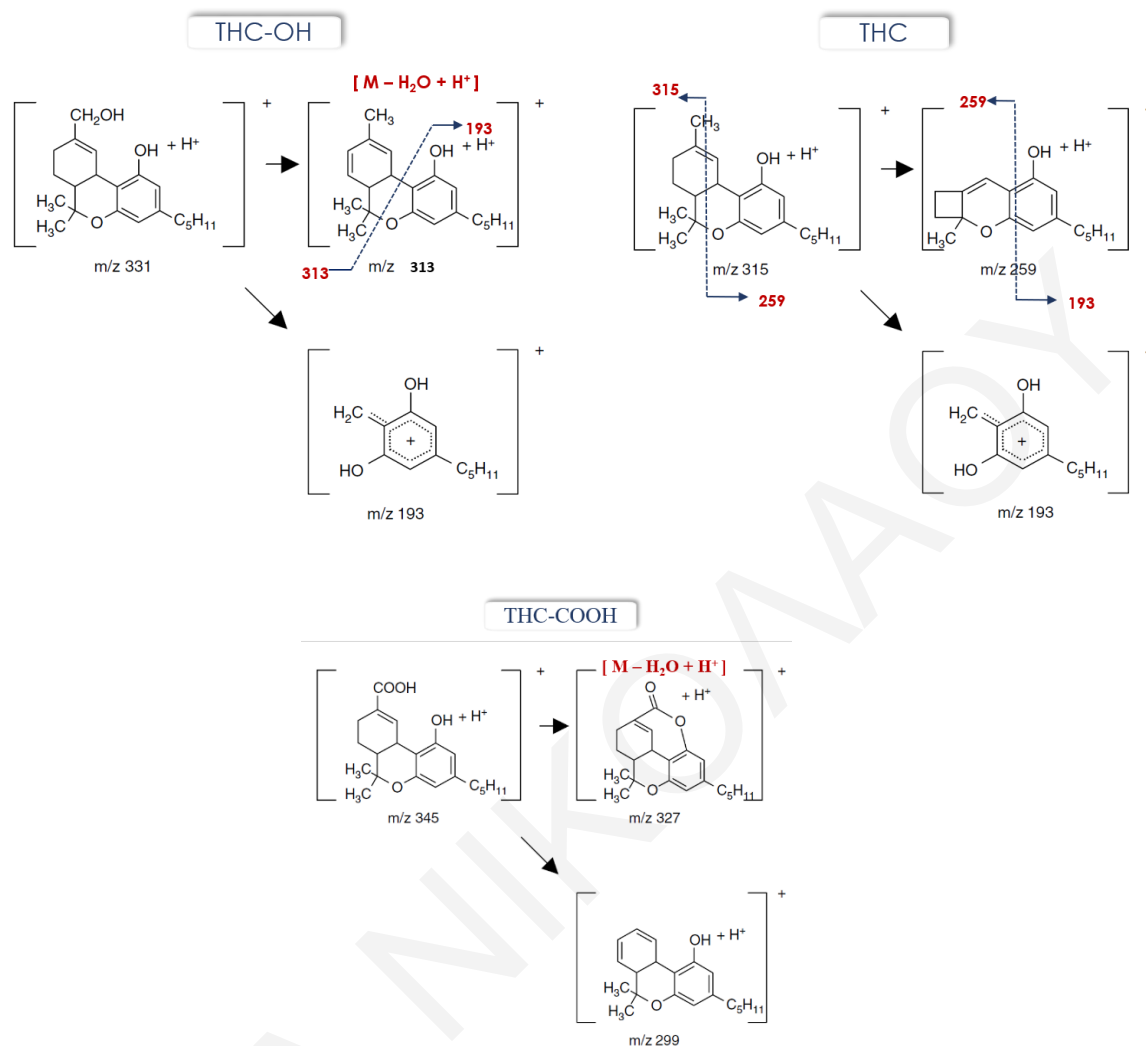
Αναλύτης	Μοριακή Μάζα	Μητρικό ιόν $[M+H]^+$	Μετάπτωση Ποσοτικοποίησης	Μετάπτωση Ταυτοποίησης	Cone V. (V)	Collision E.(eV)
THC	314.46	315.3	315.3 > 193.2	315.3 > 259.2	10	20, 20
THC-OH	330.47	331.1	331.1 > 193.2	331.1 > 313.3	10	25, 15
THC-COOH	344.19	345.1	345.1 > 327.3	345.1 > 299.3	10	15, 20
CBN	310.43	311.2	311.2 > 223.2	311.2 > 293.3	10	20, 15
CBD	314.46	315.2	315.2 > 193.3	315.2 > 123.2	10	21, 30

Στο **Σχήμα 6.23** παρουσιάζονται ενδεικτικά τα TIC που λήφθηκαν από τη λειτουργία σάρωσης θυγατρικών και μητρικών ιόντων των ενώσεων THC, THC- d_3 , CBD και CBN. Για την THC, το ιόν σε μεγαλύτερη αφθονία m/z 193 επιλέχθηκε για σκοπούς ποσοτικοποίησης, ενώ το δεύτερο ιόν m/z 259 επιλέχθηκε για σκοπούς ταυτοποίησης του μορίου. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι δεσπόζουσες θέσεις θραυσματοποίησης των πλείστων ουσιών βρίσκονται στο σύστημα βενζοπυρανίου (δύο δακτυλίων). Υποθέτουμε ότι το πρώτο βήμα κατά τη διαδικασία θρυμματισμού της αλκοόλης (THC-OH) είναι η αποσύνδεση ενός μορίου νερού $[M-H_2O+H]^+$ και στη συνέχεια των δύο δακτυλίων αριστερά του μορίου

(Σχήμα 6.24), που οδηγεί σε δύο κύρια θυγατρικά θραύσματα με m/z 313 και 193. Για την THC, ο προτεινόμενος μηχανισμός φαίνεται επίσης στο Σχήμα 6.24, όπου λαμβάνονται τα θυγατρικά ιόντα με λόγους m/z 259 και 193. Στο ίδιο σχήμα παρουσιάζεται και η πορεία θραυσματοποίησης για το οξύ (THC-COOH). Αρχικά, η απώλεια ενός μορίου νερού και στη συνέχεια αποκαρβοξυλίωση και οξείδωση δίνει τα θραύσματα 327 και 299, αντίστοιχα. Οι πιο πάνω προτεινόμενοι μηχανισμοί συμφωνούν με βιβλιογραφικές αναφορές [94, 118, 178].



Σχήμα 6.23. Φάσματα σάρωσης θυγατρικού ιόντος A) για την ένωση THC και THC- d_3 και B) για τις ενώσεις CBD και CBN.



Σχήμα 6.24. Προτεινόμενοι μηχανισμοί διάσπασης των THC-OH, THC και THC-COOH [178].

6.3. Μέθοδος Επεξεργασίας Κυψελίδων Αυτιού

Η πειραματική διαδικασία προετοιμασίας, αλλά και συλλογής των δειγμάτων αποτέλεσε μία εξίσου ιδιαίτερη πρόκληση. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε σύγκριση της τεχνικής συλλογής των δειγμάτων. Μελετήθηκαν οι γνωστές σε όλους μπατονέτες, αλλά και τα μεταλλικά εργαλεία, που συστήνονται από την ιατρική κοινότητα, τα λεγόμενα Jobson Horne probe. Μεταξύ των δύο, μεγαλύτερη ευκολία στη χρήση, καθώς επίσης και μεγαλύτερη ποσότητα δείγματος, συλλέχθηκε με τη χρήση μπατονετών, οι οποίες και επιλέχθηκαν για τις μετέπειτα μελέτες. Ακολούθησε μια εκτενέστερη μελέτη, με στόχο τον προσδιορισμό της βέλτιστης πειραματικής διαδικασίας εξαγωγής των κανναβινοειδών ενώσεων από την εξεταζόμενη μήτρα. Εκτός από την επιτυχία της καλύτερης δυνατής ανάκτησης των ουσιών, σκοπό αποτέλεσε επίσης η σύνθεση μιας απλουστευμένης μεθόδου κατεργασίας των

πολύπλοκων αυτών δειγμάτων, ώστε αυτή να βρίσκει εφαρμογή σε ένα ευρύτερο επιστημονικό πλαίσιο σε τοξικολογικές αναλύσεις ρουτίνας. Επιπρόσθετα, εξετάστηκε η εφαρμογή της μεθόδου σε πραγματικά δείγματα με στόχο, τόσο την ανίχνευση, όσο και την ποσοτικοποίηση των βασικότερων κανναβινοειδών: THC, THC-OH, THC-COOH, CBD και CBN.

6.3.1. Μελέτη του Διαλύτη Εκχύλισης Κανναβινοειδών Ενώσεων

Σημαντική παράμετρο και καθοριστικό βήμα στην επεξεργασία κάθε βιολογικού δείγματος αποτελεί η επιλογή του καταλληλότερου διαλύτη εκχύλισης. Στόχος είναι η εκλεκτική απομάκρυνση των ενώσεων από την εξεταζόμενη μήτρα με σκοπό την ανίχνευση και μετέπειτα την ποσοτικοποίησή τους. Τα ποσοστά ανάκτησης εξετάζονται πάντοτε ως προς την απόδοση της εκχύλισης και αφορούν ενώσεις που ανήκουν στην ίδια κατηγορία ή σε διαφορετικές κατηγορίες. Συνεπώς, η εύρεση ενός διαλύτη που να παρέχει όλες τις εξεταζόμενες ουσίες με τα μεγαλύτερα δυνατά ποσοστά αποτελεί εξαιρετικά δύσκολη διαδικασία.

Η γενική πορεία που ακολουθείται συνήθως για τον προσδιορισμό των απαγορευμένων ουσιών στα βιολογικά δείγματα περιλαμβάνει εκχύλιση των ενώσεων από τη μήτρα των δειγμάτων με διάφορες μεθόδους, κυρίως με εκχύλιση LLE ή SPE. Σε ορισμένα δείγματα, όπως για παράδειγμα οι τρίχες κεφαλής, απαιτείται επίσης η προετοιμασία του δείγματος με έκπλυση προς απομάκρυνση των καλλυντικών προϊόντων, ιδρώτα και άλλων επιφανειακών ουσιών, ακολουθεί η ομογενοποίηση και τέλος η επώαση (incubation) και εκχύλιση [103]. Πολλές φορές είναι απαραίτητη η παραγωγοποίηση των αναλυτών, ειδικότερα όταν για την ανάλυση χρησιμοποιείται η τεχνική GC-MS [96, 179-181], ενώ σπανιότερα στην LC για ενίσχυση της αποδοτικότητας του ιοντισμού των ενώσεων [83, 182].

Ένας εξίσου σημαντικός παράγοντας είναι και η φύση του βιολογικού υγρού, το οποίο εξετάζεται. Για παράδειγμα, στην ανάλυση σάλιου, η ποσότητα που λαμβάνεται είναι σημαντικά μικρότερη από ό,τι στην ανάλυση ούρων ή αίματος και συνεπώς οι ποσότητες των απαγορευμένων ουσιών ή φαρμάκων που τελικά ανιχνεύονται βρίσκονται σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα. Αυτό υποδηλώνει κάποιους ενδεχόμενους περιορισμούς που προκύπτουν και μπορούν να επηρεάσουν την πορεία ανάπτυξης μιας αναλυτικής μεθόδου, καθώς οι ενώσεις θα πρέπει να ανιχνεύονται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις και σε μικρότερους όγκους δειγμάτων [106, 124]. Το κερύ αποτελεί ένα βιολογικό δείγμα, το οποίο δεν έχει εξερευνηθεί στην τοξικολογική ανάλυση και υπάρχουν λίγες πληροφορίες

αναφορικά με την επεξεργασία του και τις ποσότητες των ναρκωτικών ουσιών που ενδέχεται να ανιχνεύονται σε αυτό.

Όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω, στόχο αυτής της διδακτορικής εργασίας αποτέλεσε σύνθεση μιας απλουστευμένης, αλλά συνάμα αποδοτικής και ταχείας μεθόδου επεξεργασίας δειγμάτων. Στην προσπάθεια αυτή μελετήθηκαν διάφοροι οργανικοί διαλύτες και σε κάθε περίπτωση, πραγματοποιήθηκε ανάλυση του δείγματος, ώστε να οριστεί ο κατάλληλος διαλύτης, ο οποίος θα παρουσίαζε τη μεγαλύτερη εκλεκτικότητα. Για το σκοπό αυτό, εθελοντές έδιναν δείγματα κεριού και από τα δύο αυτιά, μία φορά την εβδομάδα, σε καθορισμένο και σταθερό χρονικό διάστημα. Τα άτομα αυτά παρέμειναν σταθερά και δεν έκαναν χρήση οποιασδήποτε ουσίας. Αρχικά, επιλέχθηκαν διάφοροι οργανικοί διαλύτες εκχύλισης με στόχο την απομόνωση των κανναβινοειδών από το κεριό. Οι διαλύτες εκχύλισης που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτά τα προπαρασκευαστικά πειράματα ήταν το ACN, η MeOH, ο οξικός αιθυλεστέρας και η ακετόνη. Μετά την επεξεργασία και ανάλυση των δειγμάτων, μελετήθηκαν τα TIC που λήφθηκαν από τις μελέτες διαφόρων διαλυτών εκχύλισης και έτσι, σε αρχικό στάδιο, επιλέχθηκε το ACN ως ο διαλύτης εκχύλισης. Από τα προπαρασκευαστικά πειράματα διαπιστώθηκε η καταλληλότητα του ACN, σε αντίθεση με τους υπόλοιπους διαλύτες, αφού δίνει τις υψηλότερες εντάσεις στο μετρούμενο αναλυτικό σήμα για όλους τους αναλύτες που εξετάστηκαν.

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε μια ουσιαστική μελέτη της αποδοτικότητας του ACN στην εκχύλιση των υπό εξέταση ενώσεων. Η πορεία που ακολουθήθηκε περιγράφεται στο **Κεφάλαιο 6.4** και είναι σύμφωνη με τις οδηγίες για αξιολόγηση μεθόδων ανάλυσης βιολογικών δειγμάτων, όπως αυτές δημοσιεύτηκαν από τον ICH οργανισμό. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών έδωσαν πολύ χαμηλά ποσοστά ανάκτησης. Έτσι, διεξήχθη μια νέα μελέτη που αφορούσε τους διαλύτες εκχύλισης συναρτήσει της απόδοσης της εκχύλισης, με σκοπό την εύρεση του βέλτιστου διαλύτη. Το οξιτισμένο με 1% οξικό οξύ (acetic acid, AcA) ACN παρουσίασε τη μεγαλύτερη εκλεκτικότητα στην εκχύλιση των ουσιών αυτών, έπειτα από τον προσδιορισμό και την αξιολόγηση της ανάκτησης και επιλέχθηκε ως ο βέλτιστος διαλύτης εκχύλισης. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων της μελέτης απόδοσης της εκχύλισης παρουσιάζονται με λεπτομέρεια στο **Κεφάλαιο 6.4**.

6.3.2. Μελέτη Τεχνικής Ανάδευσης

Σε αυτή την εργασία μελετήθηκε επίσης και ο τρόπος ανάδευσης των δειγμάτων για την αποτελεσματική εξαγωγή των κανναβινοειδών ενώσεων από την εξεταζόμενη μήτρα. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν δύο τρόποι ανάδευσης, η ανάδευση με τη βοήθεια της συσκευής Vortex και η ανάδευση σε λουτρό υπερήχων (ultra-sonication bath). Ο παρατεταμένος χρόνος (1.5 ώρες) και η αύξηση της θερμοκρασίας στο λουτρό (η θερμοκρασία του θερμοστάτη ανήλθε άνω των 40 °C) με χρήση της δεύτερης τεχνικής οδήγησε σε σοβαρούς προβληματισμούς ως προς την ανθεκτικότητα των ευαίσθητων ουσιών αυτών. Οι προβληματισμοί επιβεβαιώθηκαν από τις μετρήσεις, αφού δεν κατέστη δυνατή η ανίχνευση καμίας εκ των εξεταζόμενων ενώσεων στο σύστημα UPLC-MS/MS. Έτσι, η ανάδευση με τη συσκευή Vortex επιλέχθηκε για την εξαγωγή των ουσιών από τους ωτοκαθαριστές (μπατονέτες). Στην ανάδευση με Vortex μελετήθηκε επίσης και ο χρόνος, από 1-5 λεπτά, χωρίς καμία ουσιαστική μεταβολή στην ανάκτηση των ουσιών. Έτσι, η ανάδευση καθορίστηκε στο 1.5 λεπτό, για τη διατήρηση της συνολικής διάρκειας επεξεργασίας στο ελάχιστο, ώστε η μέθοδος να βρίσκει εφαρμογή στην ανάλυση μεγάλου όγκου δειγμάτων σε κλινικά εργαστήρια.

6.3.3. Μελέτη Εξάτμισης του Διαλύτη Εκχύλισης

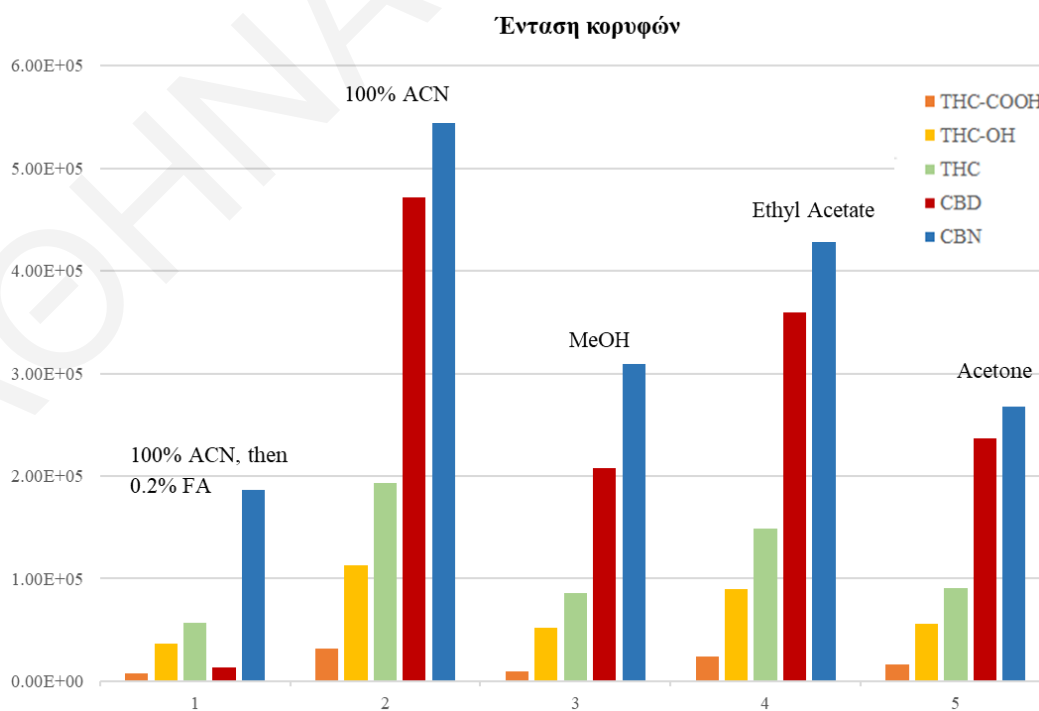
Αξίζει να σημειωθεί ότι, στην προσπάθεια καθιέρωσης και βελτιστοποίησης της πειραματικής διαδικασίας, μελετήθηκε και ο τρόπος εξάτμισης του διαλύτη εκχύλισης. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν δύο είδη φυγόκεντρο. Η μια φυγόκεντρος, η οποία λειτουργεί υπό κενό δίνει τη δυνατότητα ταυτόχρονης εξάτμισης του διαλύτη. Αντίθετα, η δεύτερη λειτουργεί υπό ρυθμιζόμενη θερμοκρασία με τη δυνατότητα ψύξης των δειγμάτων, σε κλειστό κύκλωμα, συνεπώς και στην απουσία φωτός. Σε αυτή την περίπτωση, ακολουθούσε εξάτμιση του διαλύτη εκχύλισης με αέριο άζωτο (N₂), σε θερμοκρασία δωματίου και στην απουσία φωτός. Συγκεκριμένα, η εξάτμιση πραγματοποιήθηκε είτε με αέριο άζωτο, είτε με χρήση φυγόκεντρο, που λειτουργούσε υπό κενό, αντίστοιχα και στη συνέχεια ακολούθησε επαναδιαλυτοποίηση στην κινητή φάση με την προσθήκη του κατάλληλου διαλύτη, ώστε τελικά να πραγματοποιηθεί η ανάλυση. Ακολούθησε σύγκριση των αποτελεσμάτων των δύο μεθόδων και η διαδικασία επεξεργασίας περιγράφεται στο πειραματικό μέρος.

Στα προπαρασκευαστικά πειράματα, στις περιπτώσεις που χρησιμοποιήθηκε φυγόκεντρος υπό κενό, η αυξημένη θερμοκρασία, η χρήση Eppendorf tube για μεγάλο χρονικό διάστημα και ο παρατεταμένος χρόνος που απαιτείται για την εξάτμιση του διαλύτη (80-150 λεπτά)

υπήρξαν απαγορευτικοί παράγοντες, εξαιτίας της ευαισθησίας των ενώσεων, τόσο στη θερμοκρασία, όσο και στην παρουσία φωτός. Επομένως, το πρώτο είδος φυγόκεντρου απορρίφθηκε.

Η φυγόκεντρος στην οποία υπάρχει δυνατότητα καθορισμού της θερμοκρασίας (σε σκοτεινό μέρος) και η ακολουθούμενη εξάτμιση του διαλύτη με αέριο άζωτο, όχι μόνο μείωσαν δραματικά τη συνολική διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας σε 40 λεπτά, έναντι των 2-2.5 ωρών που δαπανήθηκαν στην πρώτη περίπτωση, αλλά οδήγησαν και σε αυξημένη εκλεκτικότητα αναφορικά με την εκχύλιση.

Ως αρχική πειραματική διαδικασία επιλέχθηκε η δεύτερη μέθοδος, στην οποία χρησιμοποιήθηκε ψυχόμενη φυγόκεντρος και εξάτμιση του διαλύτη με αέριο άζωτο (N_2), με μοναδική εξαίρεση την περίπτωση 1. Στην περίπτωση 1, μετά την επεξεργασία του δείγματος, έγινε προσθήκη αντίστοιχης ποσότητας μυρμηκικού οξέος (FA), πριν την ανάλυση του δείγματος, ώστε να συμπληρωθεί η σύσταση της κινητής φάσης (50:50 ACN/ H_2O , 0.1 % FA). Αντίθετα, για τα δείγματα 2 μέχρι και 5, η εξάτμιση πραγματοποιήθηκε με αέριο N_2 , ακολουθούμενη από επαναδιαλυτοποίηση στην κινητή φάση H_2O/ACN , 0.1% FA. Οι διαλύτες εκχύλισης που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτά τα προπαρασκευαστικά πειράματα ήταν το ACN (1 και 2), η MeOH (3), ο οξικός αιθυλεστέρας (ethyl acetate) (4) και η ακετόνη (5). Στο ραβδόγραμμα (Σχήμα 6.25) παρουσιάζεται η ένταση που μετρήθηκε στα χρωματογραφήματα συνολικών ιόντων (TIC) για κάθε ουσία και για κάθε πειραματική διαδικασία (1-5).



Σχήμα 6.25. Ραβδόγραμμα της έντασης του σήματος που λήφθηκε για κάθε ουσία στα TIC, συναρτήσει της μεθόδου εκχύλισης στα προπαρασκευαστικά πειράματα.

6.4. Αξιολόγηση Μεθόδου

Είναι διεθνώς αποδεκτό ότι η διαδικασία επικύρωσης μιας μεθόδου αποτελεί αναπόσπαστο μέρος για την εδραίωσή της σε ένα αναλυτικό εργαστήριο. Η αναγκαιότητα για την ανάπτυξη μιας κατάλληλης, και συνάμα αξιόπιστης μεθόδου, επιτεύχθηκε με την αξιολόγηση της αναπτυχθείσας μεθοδολογίας. Στο πλαίσιο της επικύρωσης των μεθόδων που αναπτύχθηκαν, εφαρμόστηκαν διάφορα μέτρα αξιολόγησης. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με επίσημες οδηγίες για την αξιολόγηση και επικύρωση αναλυτικών μεθόδων [158].

Πλήρης αξιολόγηση της αναπτυχθείσας μεθοδολογίας περιλαμβάνει εκτίμηση της γραμμικότητας, της ακρίβειας, των LOD και LOQ. Η επικύρωση των μεθόδων συμπληρώνεται με αξιολόγηση της ανάκτησης, του προσδιορισμού της επίδρασης του μητρικού υλικού (Matrix Effect, ME), του φαινομένου «Carryover», αλλά και της σταθερότητας των δειγμάτων.

6.4.1. Ακρίβεια

Στη μελέτη αυτή καθορίστηκε αρχικά η ακρίβεια της μεθόδου με την ανάλυση δειγμάτων ελέγχου (Quality Control, QC), τα οποία εμβολιάστηκαν με μίγμα γνωστής συγκέντρωσης των ενώσεων. Το μίγμα αυτό παρασκευάστηκε ξεχωριστά από το πρότυπο μίγμα, το οποίο χρησιμοποιήθηκε αποκλειστικά για την κατασκευή των καμπυλών βαθμονόμησης.

Μετά τη βελτιστοποίηση των χρωματογραφικών και φασματομετρικών παραμέτρων, ακολούθησε ο προσδιορισμός της ακρίβειας της μεθόδου με μέτρο την επαναληψιμότητα. Η ακρίβεια της μεθόδου εκτιμήθηκε μέσω διαδοχικά επαναλαμβανόμενων μετρήσεων των πρότυπων διαλυμάτων σε συγκέντρωση 15.0 ng/mL που πραγματοποιήθηκαν την ίδια μέρα (intra-day precision). Κριτήριο εκτίμησης της ακρίβειας ήταν η σχετική τυπική απόκλιση (Relative Standard Deviation, RSD). Συγκεκριμένα, η εντός της ημέρας ακρίβεια λήφθηκε για τους χρόνους συγκράτησης (retention time, t_R) και το εμβαδόν των κορυφών, έπειτα από δύο σειρές 12 διαδοχικών αναλύσεων. Οι τιμές κυμάνθηκαν από 0.00-0.28 % και 1.60-2.08 %, αντίστοιχα. Λεπτομέρειες αναφορικά με τις %RSD τιμές και για το μέσο χρόνο χρωματογραφικής ανάλυσης για κάθε αναλύτη παρουσιάζονται στον **Πίνακα 6.6**.

Πίνακας 6.6. RSD (%) τιμές των χρόνων συγκράτησης και των εμβαδών των εξεταζόμενων ουσιών.

Αναλύτης	Χρόνος συγκράτησης (t_R)	intra-day precision, n = 12	
		%RSD t_R	%RSD Area
CBN	3.78 ± 0.01	0.19	2.0
CBD	2.58 ± 0.01	0.28	2.0
THC	4.59 ± 0.04	0.14	1.8
THC-OH	1.66 ± 0.00	0.00	1.6
THC-COOH	1.74 ± 0.01	0.00	2.1

6.4.2. Γραμμικότητα

Οι καμπύλες βαθμονόμησης για τις πέντε ενώσεις κατασκευάστηκαν με εξωτερική βαθμονόμηση (external calibration), στην απουσία δηλαδή μήτρας, με δύο επαναλαμβανόμενες μετρήσεις του εμβαδού των κορυφών, σε επτά διαφορετικά επίπεδα συγκεντρώσεων (Παράρτημα). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα διαλύματα των αναλυτών σε εύρος συγκεντρώσεων από 0.1 μέχρι και 15.0 ng/mL. Όπως παρατηρήθηκε, λήφθηκαν πολύ καλές γραμμικότητες για όλους τους αναλύτες που μελετήθηκαν, αφού σε όλες τις περιπτώσεις ο συντελεστής προσδιορισμού (r^2) ήταν μεγαλύτερος από 0.99. Στο σημείο αξίζει αυτό να σημειωθεί ότι οι καμπύλες βαθμονόμησης διεξήχθησαν με τη χρήση του δευτεριωμένου ανάλογου της THC (THC- d_3), ως το εσωτερικό πρότυπο (internal standard, I.S.). Ωστόσο τόσο οι υπολογισμοί όσο και τα γραφήματα των καμπυλών πραγματοποιήθηκαν με χρήση (Πίνακας 6.7) και χωρίς τη χρήση του I.S. (Πίνακας 6.8).

Πίνακας 6.7. Εξισώσεις Καμπυλών Βαθμονόμησης, συντελεστές γραμμικότητας (r , r^2) με τη χρήση I.S. για κάθε εξεταζόμενη ένωση.

Καμπύλες Βαθμονόμησης με χρήση I.S.			
Ένωση	Εξίσωση καμπύλης	r	r^2
CBN	0.245 x - 0.003	0.998	0.996
CBD	0.218 x - 0.004	0.998	0.995
THC	0.179 x - 0.003	0.998	0.996
THC-OH	0.368 x - 0.007	0.998	0.996
THC-COOH	0.441 x - 0.008	0.997	0.995

Πίνακας 6.8. Εξισώσεις Καμπυλών Βαθμονόμησης, συντελεστές γραμμικότητας (r , r^2) χωρίς τη χρήση I.S. για κάθε εξεταζόμενη ένωση.

Καμπύλες Βαθμονόμησης χωρίς τη χρήση I.S.

Ένωση	Εξίσωση Καμπύλης	r	r^2
CBN	$y = 24263 x + 1021$	0.999	0.999
CBD	$y = 21921 x - 336$	0.999	0.998
THC	$y = 17888 x - 46$	0.999	0.998
THC-OH	$y = 36653 x + 561$	0.999	0.998
THC-COOH	$y = 44136x - 158$	0.999	0.997

Για σκοπούς συντομίας θα παρουσιαστούν οι καμπύλες βαθμονόμησης για κάθε κανναβινοειδή ένωση στην απουσία μήτρας, χωρίς τη χρήση I.S. στο Παράρτημα (**Σχήμα 1**). Όπως παρατηρείται (**Πίνακας 6.8**), λήφθηκαν πολύ καλές γραμμικότητες και στις δύο περιπτώσεις. Ειδικότερα στην περίπτωση που δεν χρησιμοποιήθηκε I.S. σημειώθηκε ελαφρώς καλύτερη γραμμικότητα, αφού σε όλες τις περιπτώσεις ο συντελεστής συσχέτισης (r) ήταν μεγαλύτερος από 0.999.

6.4.3. Όρια LOD και LOQ

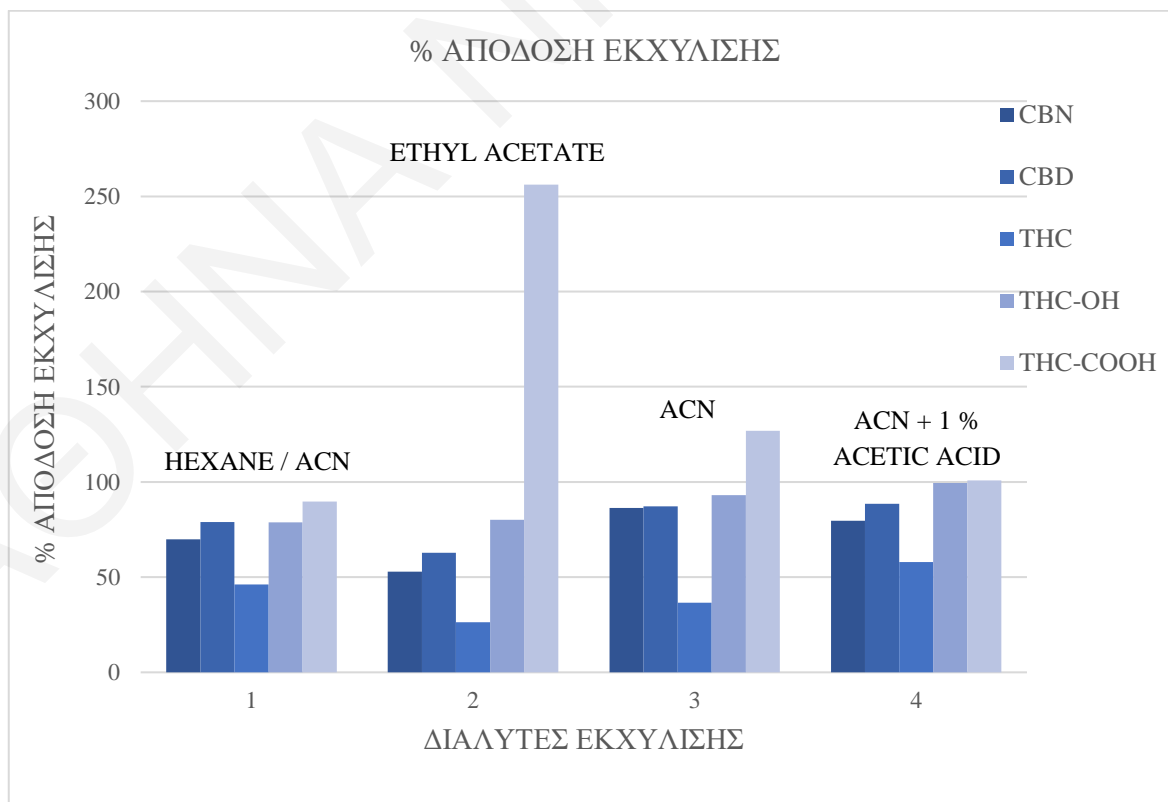
Τα όρια LOD και LOQ υπολογίστηκαν σύμφωνα με τις εξισώσεις 6 και 7, από τις καμπύλες βαθμονόμησης (στην απουσία μήτρας). Οι τιμές των LODs και LOQs που υπολογίστηκαν κυμαίνονταν από 0.07 – 0.18 ng/mL και 0.22 – 0.53 ng/mL, αντίστοιχα (**Πίνακας 6.9**). Αυτά τα αποτελέσματα, όπως αποδείχθηκε, έδωσαν τη δυνατότητα προσδιορισμού των κανναβινοειδών ενώσεων στα υπό μελέτη δείγματα.

Πίνακας 6.9. Όρια Ανίχνευσης και Ποσοτικοποίησης με χρήση I.S. και χωρίς.

Αναλύτες	Με χρήση I.S. (ng/mL)		Χωρίς I.S. (ng/mL)	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ
CBN	0.04	0.14	0.07	0.22
CBD	0.01	0.04	0.08	0.23
THC	0.04	0.11	0.13	0.39
THC-OH	0.07	0.22	0.18	0.53
THC-COOH	0.06	0.17	0.15	0.47

6.4.4. Απόδοση της Εκχύλισης

Σε μεθόδους, οι οποίες περιλαμβάνουν κάποιο στάδιο εκχύλισης, η ανάκτηση, ή αλλιώς απόδοση της μεθόδου εκχύλισης (Process Efficiency, PE), αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της επικύρωσης της μεθόδου. Η αξιολόγηση της εν λόγω παραμέτρου σε αυτή την εργασία, αξιολογήθηκε πειραματικά με τη μέθοδο εμβολιασμού (spiking). Η ανάκτηση των κανναβινοειδών, υπολογίστηκε με σύγκριση της απόκρισης του αναλύτη σε δείγμα εμβολιασμένο με γνωστής συγκέντρωσης μίγματος των ουσιών, ως προς την απόκριση σε πρότυπο μίγμα της ίδιας συγκέντρωσης με βάση την **Εξίσωση 9**. Μελέτη της ανάκτησης των κανναβινοειδών πραγματοποιήθηκε αρχικά σε διάφορους διαλύτες εκχύλισης που εξετάστηκαν σε αυτή την διδακτορική εργασία, ώστε τελικά να επιλεγεί ο καταλληλότερος. Η μελέτη της απόδοσης της εκχύλισης στο υψηλό επίπεδο συγκέντρωσης, σε διάφορους διαλύτες, παρουσιάζεται στο **Σχήμα 6.26**. Όπως παρατηρείται, με χρήση του οξινομένου ακετονιτριλίου λήφθηκαν συνολικά καλύτερα ποσοστά ανάκτησης (**Πίνακας 6.10**) σε σχέση με τους υπόλοιπους διαλύτες, για όλες τις ενώσεις. Δύο εκ των διαλυτών, το Hexane/ACN και το οξινομένο (1% AcA) ACN, που έδωσαν αρχικά τα καλύτερα αποτελέσματα ανάκτησης, επιλέγηκαν και μελετήθηκε η απόδοση εκχύλισης και στη χαμηλή συγκέντρωση (**Πίνακας 6.10**).



Σχήμα 6.26. Μελέτη της απόδοσης της εκχύλισης συναρτήσει του διαλύτη εκχύλισης στο υψηλό επίπεδο συγκέντρωσης, στα 9.0 ng/mL.

Πίνακας 6.10. Απόδοση της εκχύλισης των εξεταζόμενων ουσιών (% PE) στην υψηλή (HQC, 9.0 ng/mL) και χαμηλή (LQC, 0.2 ng/mL) συγκέντρωση, σε διάφορους διαλύτες εκχύλισης.

Διαλύτης Εκχύλισης	CBN	CBD	THC	THC-OH	THC-COOH
HEXANE/ACN (HQC)	69.9	78.9	45.1	78.8	89.6
ETHYL ACETATE (HQC)	52.8	62.8	26.2	80.1	256.1
ACN (HQC)	86.4	87.1	37.9	93.1	126.9
ACN + 1% ACETIC ACID (HQC)	79.6	88.5	58.0	99.4	100.7
HEXANE/ACN (LQC)	62.4	68.1	35.5	67.1	14.7
ACN + 1% ACETIC ACID (LQC)	83.7	88.0	58.6	99.0	105

Ως αποτέλεσμα εδραιώθηκε η βέλτιστη πειραματική διεργασία, με την επιλογή του οξινομένου ακετονιτριλίου ως διαλύτη εκχύλισης, η οποία περιγράφεται ως ακολούθως. Συγκεκριμένα, το δείγμα αφέθηκε για 15 λεπτά σε ACN 1% AcA (1 mL) που περιείχε ορισμένα μL μίγματος των ουσιών (σε δύο επίπεδα συγκέντρωσης). Η συγκέντρωση αυτή καθορίστηκε με βάση τα επίπεδα ανάκτησης και ανάλογα με τη μάζα του κεριού που αναλύθηκε σε κάθε περίπτωση, υπολογίστηκε ο όγκος του μίγματος ο οποίος προστέθηκε πριν την εκχύλιση. Ακολούθησε έντονη ανάδευση του δείγματος (vortex) για 1.5 λεπτό και στη συνέχεια το δείγμα μεταφέρθηκε σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στις 10000 rpm, στους 4 °C για 10 λεπτά. Στη συνέχεια, το διάλυμα μεταφέρθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα και ο διαλύτης εκχύλισης εξατμίστηκε με αέριο N_2 . Εν συνεχεία, προστέθηκαν 1 mL κινητής φάσης, ακολούθησε διήθηση με φίλτρο Captiva Econo Filter, PTFE 13 mm 0.2 μm και τέλος ανάλυση του δείγματος στο σύστημα UPLC-MS/MS.

Η απόδοση της εκχύλισης μετρήθηκε με τη χρήση του βέλτιστου διαλύτη, σε δύο επίπεδα συγκεντρώσεων, ένα χαμηλό κοντά στο LOQ και ένα υψηλό κοντά στα όρια της καμπύλης. Το χαμηλό επίπεδο (Low Quality Control, LQC) ορίστηκε στα 0.2 ng/mL και το υψηλό στα 9.0 ng/mL (High Quality Control, HQC). Πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις σε κάθε επίπεδο και η απόδοση της μεθόδου εκχύλισης υπολογίστηκε με βάση την **Εξίσωση 9**. Τα

αποτελέσματα όλων των μετρήσεων της απόδοσης της εκχύλισης ($n = 6$), στις βέλτιστες πειραματικές συνθήκες, παρατίθενται στον **Πίνακα 6.11**.

Πίνακας 6.11. Συνολικά αποτελέσματα της απόδοσης της εκχύλισης (% PE) στην υψηλή (9.0 ng/mL) και χαμηλή (0.2 ng/mL) συγκέντρωση ανάκτησης.

Αναλύτης	Απόδοση Εκχύλισης (PE) (mean \pm SD, %)
CBN	78.8 \pm 6.8
CBD	82.2 \pm 4.0
THC	84.1 \pm 10.2
THC-OH	91.2 \pm 5.1
THC-COOH	83.1 \pm 6.4

Χρήση Εσωτερικού Προτύπου

Τα εσωτερικά πρότυπα χρησιμοποιούνται συνήθως στη βιοανάλυση με τις τεχνικές LC-MS/MS. Ο κύριος σκοπός της χρήσης των I.S.s, είναι για βελτίωση της ακρίβειας και της πιστότητας του ποσοτικού προσδιορισμού ενώσεων.

Ωστόσο, η ανάγκη για χρήση εσωτερικών προτύπων σε συστήματα LC-MS/MS εξαρτάται επίσης από τον βαθμό χρωματογραφικού διαχωρισμού και το βαθμό καθαρότητας του δείγματος. Αυτό, τονίζει την ανάγκη για μια ολοκληρωμένη ανάπτυξη μεθόδου, συμπεριλαμβανομένης της επιλογής ενός I.S. Συγκεκριμένα, μπορούν να χρησιμοποιηθούν i) δομικά ή χημικά παρόμοιες ενώσεις ii) ένα σταθερό επισημασμένο ισότοπο του αναλύτη ή iii) να μην χρησιμοποιηθεί κανένα I.S.

Ειδικότερα στην περίπτωση εφαρμογής της LC-MS/MS σε βιοαναλυτικές μεθόδους, τα I.S.s δεν επιβάλλεται να χρησιμοποιηθούν υποχρεωτικά, καθώς σε ορισμένες περιπτώσεις, τα αποτελέσματα της αξιολόγησης της μεθόδου ενδέχεται να χειροτερεύσουν αντί να βελτιωθούν. Ένα χαρακτηριστικό φαινόμενο που σημειώθηκε αναφορικά με τη χρήση δευτεριωμένων προτύπων σε προηγούμενη δημοσίευση του Wieling (2002), ήταν τα διαφορετικά ποσοστά ανάκτησης της αλοπεριδόλης, σε σχέση με το δευτεριωμένο ανάλογο της, με την ανάκτηση της δευτεριωμένης ένωσης να παρουσιάζει 35% χαμηλότερη ανάκτηση από την αλοπεριδόλη [183]. Με βάση τα δεδομένα αυτής της εργασίας, ο ερευνητής υποστηρίζει ότι σε περιπτώσεις που τα εσωτερικά πρότυπα προκαλούν αρνητικές επιδράσεις στα αποτελέσματα της ανάλυσης, τότε η ποσοτικοποίηση χωρίς τη χρήση I.S. είναι προτιμότερη.

Στην παρούσα διδακτορική εργασία επιλέχθηκε η χρήση του δευτεριωμένου THC-*d*₃ ως το εσωτερικό πρότυπο. Όλα τα κανναβινοειδή που μελετήθηκαν έχουν παραπλήσιες χημικές δομές και μοριακές μάζες. Η THC παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ομοιότητα με τις υπόλοιπες ουσίες που μελετήθηκαν και έτσι το δευτεριωμένο ανάλογο της, το οποίο είναι εμπορικά διαθέσιμο, επιλέχθηκε ως το I.S. της μελέτης.

Στα προπαρασκευαστικά πειράματα ανάκτησης, έγινε αμέσως αντιληπτή η αισθητή μείωση της με τη χρήση του εν λόγω I.S. Τα ποσοστά ανάκτησης σε όλους τους διαλύτες ήταν πολύ χαμηλά, ενώ αντίθετα απουσία του προτύπου οδήγησε σε πολύ αποδοτικότερες ανακτήσεις. Τα ποσοστά της απόδοσης της μεθόδου εκχύλισης, για κάθε εξεταζόμενη ένωση και με τη χρήση I.S., παρουσιάζονται στον **Πίνακα 6.12**. Δύο εκ των αποδοτικότερων διαλυτών επιλέχθηκαν και μελετήθηκαν σε δύο επίπεδα (χαμηλό και υψηλό), σε μεταγενέστερο στάδιο (**Πίνακας 6.10**), για τον προσδιορισμό του βέλτιστου.

Σημαντική βελτίωση σημειώθηκε στα αποτελέσματα ανάκτησης, στην απουσία του I.S. Μια πιθανή εξήγηση για αυτό το φαινόμενο ίσως είναι η διακριτή, διαφορετική συμπεριφορά του I.S. στην πορεία εκχύλισης, σε σχέση με τις υπόλοιπες ενώσεις και για το λόγο αυτό κρίθηκε ακατάλληλο για τη διεξαγωγή της εν λόγω μελέτης.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραμάτων ανάκτησης στην απουσία του I.S., σε δύο επίπεδα συγκεντρώσεων και με τρεις επαναλήψεις σε κάθε συγκέντρωση, για σκοπούς ελέγχου της αποδοτικότητας της μεθόδου. Ο βέλτιστος διαλύτης εκχύλισης, όπως αναφέρθηκε και προγενέστερα, είναι το οξιμισμένο ακετονιτρίλιο, αφού έδωσε τα καλύτερα ποσοστά ανάκτησης για το σύνολο των κανναβινοειδών που εξετάστηκαν. Τα αποτελέσματα από τα πειράματα αυτά ($n = 6$) παρουσιάζονται στον **Πίνακα 6.11** και περιγράφηκαν στην αρχή του **Κεφαλαίου 6.4.4**.

Πίνακας 6.12. Απόδοση της εκχύλισης σε διάφορους διαλύτες εκχύλισης και σε δύο επίπεδα συγκεντρώσεων (LQC, 0.2 ng/mL και HQC, 9.0 ng/mL) με τη χρήση I.S.

Μέθοδος Εκχύλισης	CBN	CBD	THC	THC-OH	THC-COOH
HEXANE/ACN (HQC)	22.7	20.8	22.7	108.8	55.2
ETHYL ACETATE (HQC)	41.4	42.8	35.6	279.2	354.8
ACN (HQC)	62.3	57.8	36.5	331.3	144.2
ACN + 1% ACETIC ACID (HQC)	70.5	60.4	58.0	336.4	192.6
HEXANE/ACN (LQC)	10.6	10.7	11.7	50.3	4.8
ACN + 1% ACETIC ACID (LQC)	8.9	8.7	11.9	50.1	27.0

6.4.5. Επίδραση Μητρικού Υλικού

Σύμφωνα με τον ευρωπαϊκό οργανισμό EMA, για τον προσδιορισμό του φαινομένου επίδρασης της μήτρας (ME) στα βιολογικά δείγματα, όταν χρησιμοποιούνται αναλυτές μαζών, πρέπει να εξετάζονται τουλάχιστον 6 τυφλά δείγματα από μεμονωμένους δότες. Για κάθε αναλύτη, η επίδραση της μήτρας (Matrix Effect, ME) υπολογίζεται από το λόγο του εμβαδού του καθαρού (πρότυπου) αναλύτη γνωστής συγκέντρωσης ως προς το εμβαδό τυφλού δείγματος, το οποίο εμβολιάζεται μετά την εκχύλιση [158]. Εξαιτίας της μη χρήσης I.S. σε αυτή την εργασία, η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε λαμβάνοντας χρωματογραφήματα από δείγματα τυφλού, τα οποία εμβολιάστηκαν με μίγμα πρότυπων ουσιών σε τρία διαφορετικά επίπεδα συγκέντρωσης (0.1, 3.0 και 15.0 ng/mL) και από την ανάλυση πρότυπων διαλυμάτων των ενώσεων, στην αντίστοιχη συγκέντρωση. Ο λόγος του ME λήφθηκε με βάση την **Εξίσωση 10** και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον **Πίνακα 6.13**. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη συγκεκριμένη μελέτη έδειξαν ότι δε σημειώνεται επίδραση του υλικού της μήτρας για καμία από τις εξεταζόμενες ουσίες, επισημαίνοντας τη δυνατότητα χρήσης των εξωτερικών καμπυλών βαθμονόμησης ως έγκυρη και απλή προσέγγιση για ποσοτικοποίηση.

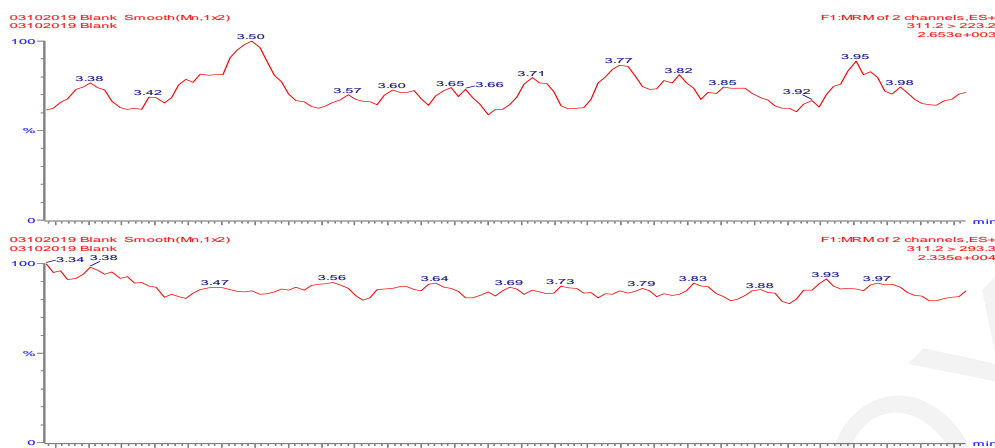
Πίνακας 6.13. Οι τιμές % ΜΕ που υπολογίστηκαν με σκοπό τον προσδιορισμό της επίδρασης της μήτρας.

Αναλύτης	Matrix Effect % (mean \pm SD)
CBN	101 \pm 2
CBD	103 \pm 3
THC	104 \pm 5
THC-OH	100 \pm 1
THC-COOH	102 \pm 2

6.4.6. Φαινόμενο «Carryover»

Για τη μελέτη του «Carryover» πραγματοποιήθηκαν τρεις διαδοχικές εγχύσεις τυφλού δείγματος (blank) μετά το υψηλότερο σημείο της καμπύλης βαθμονόμησης. Σύμφωνα με τις ICH οδηγίες για αξιολόγηση βιοαναλυτικών μεθόδων, το εμβαδόν κορυφής του τυφλού σήματος δεν πρέπει να ξεπερνά το 20% του εμβαδού της κορυφής του δείγματος στο όριο LOQ [158]. Συγκεκριμένα, από τις καμπύλες βαθμονόμησης σημειώθηκε το εμβαδόν της κάθε κορυφής στην εν λόγω συγκέντρωση (LOQ για κάθε αναλύτη), και ακολούθως υπολογίστηκε το 20% αυτού.

Στη συνέχεια, για τον πειραματικό προσδιορισμό του φαινομένου, πραγματοποιήθηκε ανάλυση τυφλών δειγμάτων, αμέσως μετά τη μεγαλύτερη συγκέντρωση των καμπυλών βαθμονόμησης. Δε σημειώθηκε κορυφή για καμία από τις εξεταζόμενες ουσίες, στις αναλύσεις τυφλού δείγματος. Από τα πιο πάνω συμπεραίνεται ότι δεν παρουσιάζεται το φαινόμενο «Carryover» στην ανάλυση των δειγμάτων κεριού αυτής της εργασίας. Στο **Σχήμα 6.27** παρουσιάζεται το χρωματογράφημα TIC τυφλού δείγματος ως προς την ανάλυση της CBN.



Σχήμα 6.27. Σήμα τυφλού δείγματος στο TIC για την ένωση CBN.

Για τον προσδιορισμό του φαινομένου «Carryover», πραγματοποιήθηκε και δεύτερος προτεινόμενος τρόπος εξέτασης της παραμέτρου αυτής, με την ανάλυση τυφλού δείγματος αμέσως μετά τη λήψη δεδομένων ανάκτησης στην υψηλότερη συγκέντρωση. Συγκεκριμένα, μετρήθηκε το αναλυτικό σήμα τυφλού δείγματος μετά την ανάκτηση στο υψηλό επίπεδο συγκέντρωσης. Σημειώθηκε μια μικρή κορυφή ελάχιστης έντασης και εμβαδού για κάποιες από τις εξεταζόμενες ουσίες. Για κάθε ουσία όμως το εμβαδόν της κορυφής ήταν πολύ μικρότερο από το 20% του εμβαδού της κορυφής της αντίστοιχης ένωσης στο LOQ. Το εμβαδόν κάθε ουσίας στο τυφλό δείγμα και στο 20% του LOQ παρατίθενται στον **Πίνακα 6.14**. Το αναλυτικό σήμα ήταν και πάλι μικρότερο του 20% του LOQ γεγονός που επιβεβαιώνει για ακόμη μία φορά τη μη ύπαρξη φαινομένων «Carryover» αναλυτών κατά την επεξεργασία του δείγματος.

Πίνακας 6.14. Προσδιορισμός του φαινομένου «Carryover» με λήψη τυφλού δείγματος μετά την υψηλότερη συγκέντρωση των πειραμάτων ανάκτησης.

Φαινόμενο «Carryover»

Ένωση	Εμβαδόν στο LOQ	20% εμβαδού στο LOQ	Εμβαδόν στο τυφλό δείγμα	% Carryover
CBN	6434	1287	12	0.93
CBD	4827	966	20	2.07
THC	7020	1404	0	0.0
THC-OH	20171	4034	3	0.08
THC-COOH	20412	4083	95	2.33

Σταθερότητα των Δειγμάτων

Μία άλλη παράμετρος, η οποία αξιολογήθηκε στο πλαίσιο αυτής της εργασίας, είναι η σταθερότητα των δειγμάτων μετά την επεξεργασία τους. Μελετήθηκε η σταθερότητα τους στο χρόνο και στη θερμοκρασία, όταν οι ουσίες βρίσκονταν επαναδιαλυτοποιημένες στην κινητή φάση. Τα δείγματα συλλέχθηκαν και αφέθηκαν για 24 ώρες σε σκοτεινό μέρος για να ξηραθούν σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο για την ανάλυσή τους, η οποία πραγματοποιήθηκε την επόμενη μέρα ή αποθηκεύτηκαν στους $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ μέχρι την ανάλυσή τους, σε διάστημα όχι μεγαλύτερο της μίας εβδομάδας.

Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η σταθερότητα στο χρόνο σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες, στους 25, στους 10 και $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Τα δείγματα κεριού, που λήφθηκαν από υγιή άτομα, επεξεργάστηκαν σύμφωνα με την πειραματική διαδικασία που περιγράφηκε στο **Κεφάλαιο 6.4.4**, ακολούθως πραγματοποιήθηκε επαναδιαλυτοποίηση στην κινητή φάση και ανάλυση τους στο σύστημα UPLC-MS/MS. Εν συνεχεία, τα ίδια επεξεργασμένα δείγματα (διαλυτοποιημένα στην κινητή φάση) αποθηκεύτηκαν σε σκοτεινό μέρος στις τρεις αυτές θερμοκρασίες. Σε όλα τα δείγματα παρουσιάστηκαν απώλειες των εξεταζόμενων κανναβινοειδών της τάξης του 18%, η οποία σημειώθηκε σε διάστημα μόλις 24 ωρών. Η απώλεια ήταν αναμενόμενη, δεδομένης της λιπόφιλης φύσης των εν λόγω αναλυτών. Έτσι, η αποθήκευσή τους σε μη-οργανικούς διαλύτες οδηγεί σαφώς σε απώλειες. Αυτό καταδεικνύει ότι, μετά την επεξεργασία των δειγμάτων η ανάλυση πρέπει να γίνεται άμεσα.

Αντίθετα, από προηγούμενες μελέτες σε σκευάσματα κάνναβης, αλλά και σε πρότυπα διαλύματα κανναβινοειδών, σε οργανικούς όμως διαλύτες, έχει βρεθεί ότι απώλειες παρουσιάζονται όταν τα διαλύματα εκτίθενται στο φως (όχι απαραίτητα ηλιακό) ή στον αέρα. Στην απουσία φωτός, τα σκευάσματα ή πρότυπα διαλύματα κάνναβης μπορούν να παραμένουν σταθερά μέχρι και 1 ή 2 χρόνια, όταν αυτά αποθηκεύονται σε γυάλινα αδρανοποιημένα δοχεία [112, 184, 185]. Τονίζεται όμως στο σημείο αυτό, ότι η αποθήκευση των κανναβινοειδών ενώσεων γινόταν σε πρότυπα διαλύματα οργανικών διαλυτών, όπως η MeOH και το ACN. Επομένως, δεν μπορεί να υπάρξει σύγκριση με την αποθήκευση σε υδατικά διαλύματα (κινητές φάσεις συστημάτων UPLC-MS/MS), στα οποία πραγματοποιήθηκε η μελέτη της παρούσας εργασίας.

Για τον προσδιορισμό της απώλειας των ουσιών αυτών χρησιμοποιήθηκε η ακόλουθη εξίσωση:

$$\% \text{ Απώλεια} = \frac{A_t - A_0}{A_t} \times 100\%$$

Όπου A_0 το αρχικό εμβαδόν κορυφής, και A_t είναι το εμβαδόν κορυφής που λήφθηκε σε διαφορετικό χρόνο (24 ώρες). Η απώλεια εκφράστηκε ως η μέση απώλεια % του αναλύτη στο δείγμα, στις βέλτιστες συνθήκες και τα αποτελέσματα αναρτώνται στον **Πίνακα 6.15**.

Πίνακας 6.15. Απώλεια (%) των ενώσεων σε διάλυμα κινητής φάσης σε διαφορετικές θερμοκρασίες με την πάροδο 24 h.

<i>Αναλύτες</i>	-20 °C	10 °C	25 °C
	% Απώλεια		
<i>THC-OH</i>	14.3	16.3	12.7
<i>THC-COOH</i>	12.0	15.7	16.5
<i>CBD</i>	17.6	34.1	18.2
<i>CBN</i>	17.7	16.2	5.9
<i>THC</i>	20.6	26.1	22.1

6.5. Εφαρμογή σε Πραγματικά Δείγματα Κυψελίδων Αυτιού από Χρήστες Κάνναβης

Σημαντικότερο μέρος της διδακτορικής αυτής εργασίας αποτέλεσε η ανάπτυξη επικυρωμένων αναλυτικών μεθόδων για την ανίχνευση, αλλά και για τον αποτελεσματικό ποσοτικό προσδιορισμό των κανναβινοειδών ενώσεων σε δείγματα κυψελίδων αυτιού. Δείγματα κεριού λήφθηκαν ταυτοχρόνως και από τα δύο αυτιά, από άτομα που κάνουν συχνή χρήση κάνναβης. Σε ορισμένες περιπτώσεις, σύμφωνα με δική τους μαρτυρία, η χρήση εξασκείτο επί καθημερινής βάσης. Τα δείγματα συλλέχθηκαν, αριθμήθηκαν και εν συνεχεία, επεξεργάστηκαν και αναλύθηκαν εντός 24 ωρών από τη συλλογή τους. Οι πληροφορίες για τα δείγματα, τα αποκαλούμενα “street samples” είναι ελλιπείς. Συλλέχθηκαν ανώνυμα από εθελοντές, χωρίς τις απαραίτητες πληροφορίες για τη συχνότητα, το είδος και την ποσότητα της χρήσης. Συγκεκριμένα, για τα δείγματα #3 και #4 υπάρχει η πληροφορηση ότι η χρήση γινόταν επί καθημερινής βάσης, ενώ αντίθετα, για τα δείγματα #1 και #2 δεν υπάρχει καμία πληροφορία. Σε όλα τα δείγματα, όπως παρουσιάζεται και στα χρωματογραφήματα TIC (**Σχήματα 6.28-6.35**), ανιχνεύτηκαν οι ενώσεις THC και CBN. Στο σημείο αυτό αξίζει να τονισθεί, ότι η ανίχνευση της THC πραγματοποιείται για

πρώτη φορά σε αυτό το βιολογικό δείγμα, ενώ παράλληλα ανίχνευση τόσο της THC, όσο και της CBN επιτεύχθηκε για πρώτη φορά σε ανθρώπινα δείγματα κεριού. Επιπρόσθετα, η ποσοτικοποίηση των εν λόγω κανναβινοειδών σε αυτό το μη-συνηθισμένο βιολογικό δείγμα διενεργήθηκε για πρώτη φορά και επιτεύχθηκε στις τρεις εκ των τεσσάρων περιπτώσεων που εξετάστηκαν σε αυτή την εργασία. Στα δείγματα #2 και #4, η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε μόνο για την ένωση THC, ενώ η ποσότητα που ανιχνεύθηκε για την CBN ήταν κάτω από το όριο ποσοτικοποίησης. Στο δείγμα #1, η ποσότητα που ανιχνεύθηκε για την THC ήταν επίσης κάτω από το LOQ, ενώ η ανίχνευση της CBN δε μπορεί να εξακριβωθεί, καθώς δε σημειώθηκε αναλυτικό σήμα για τη δεύτερη μετάβαση ποσοτικοποίησης (**Σχήμα 6.28**). Ο χρόνος ανίχνευσης χρησιμοποιήθηκε ως επιπλέον στοιχείο για την ταυτοποίηση της εν λόγω ένωσης.

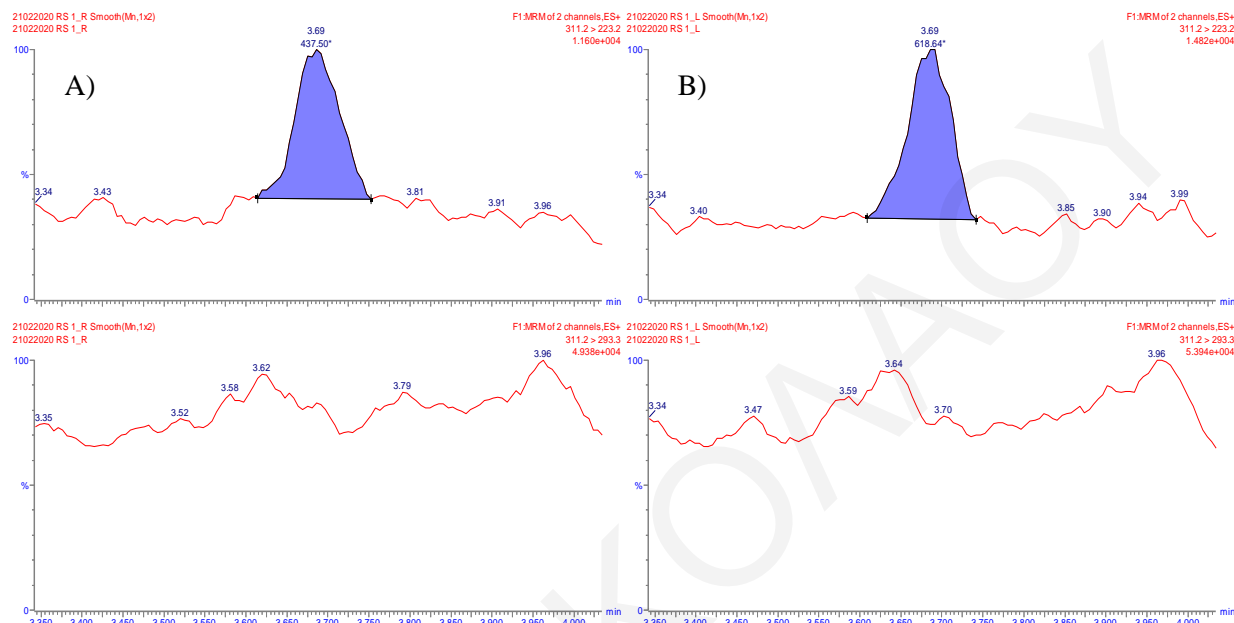
Σύμφωνα με τη μοναδική υπάρχουσα δημοσίευση των Meier et. al., δεν κατέστη δυνατή η ανίχνευση της THC, αλλά μόνο της οξειδωμένης της μορφής, της CBN. Οι ερευνητές αυτής της μελέτης προτείνουν ότι το κεριό θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτικό βιολογικό δείγμα για την ανίχνευση ναρκωτικών ενώσεων και εκτιμούν ότι το παράθυρο ανίχνευσης είναι μεγαλύτερο από την ανάλυση ούρων, αλλά μικρότερο από την ανάλυση μαλλιών. Σημειώνουν επίσης, ότι η ανίχνευση της CBN έναντι της THC, μπορεί να αποτελεί ένδειξη παρελθοντικής χρήσης. Δε μπόρεσαν όμως να προσδιορίσουν πότε έγινε η τελευταία χρήση, καθώς η εξέταση πραγματοποιήθηκε σε δείγματα που λήφθηκαν από νεκρούς. Πιθανολογούν μάλιστα, ότι η ανίχνευση της οξειδωμένης μορφής ενδέχεται να υποδηλώνει την οξείδωση της THC πριν ή κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης των ουσιών αυτών στο κεριό. Μια τέτοια δήλωση θα πρέπει να τύχει επιστημονικής τεκμηρίωσης, καθώς η μεταβολική δράση, αλλά κυρίως οι μηχανισμοί ενσωμάτωσης των ουσιών αυτών στα βιολογικά δείγματα δεν έχουν ακόμη εξακριβωθεί.

Αντίθετα, τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής έρευνας αποδεικνύουν την ανίχνευση της THC, αδιαμφισβήτητο στοιχείο, μέχρι στιγμής, για την εξακρίβωση της πρόσφατης χρήσης μαριχουάνας, όπως αυτό φαίνεται από την ανάλυση συμβατικών δειγμάτων, όπως είναι τα ούρα, το αίμα και το σάλιο σε προηγούμενες μελέτες.

Όπως αναφέρθηκε και στο στάδιο ανάπτυξης της μεθόδου ανάλυσης στο σύστημα UPLC-MS/MS, επιλέχθηκαν δύο MRM μεταβάσεις για κάθε εξεταζόμενη ουσία. Το ιόν ποσοτικοποίησης (μεγαλύτερο σε αφθονία) και μια δεύτερη μετάβαση για σκοπούς ταυτοποίησης του μορίου (**Πίνακας 6.5, Κεφάλαιο 6.2.2**). Οι μεταβάσεις MRM που επιλέχθηκαν για την ένωση CBN είναι η $311.2 > 223.2$ για την ποσοτικοποίηση και η 311.2

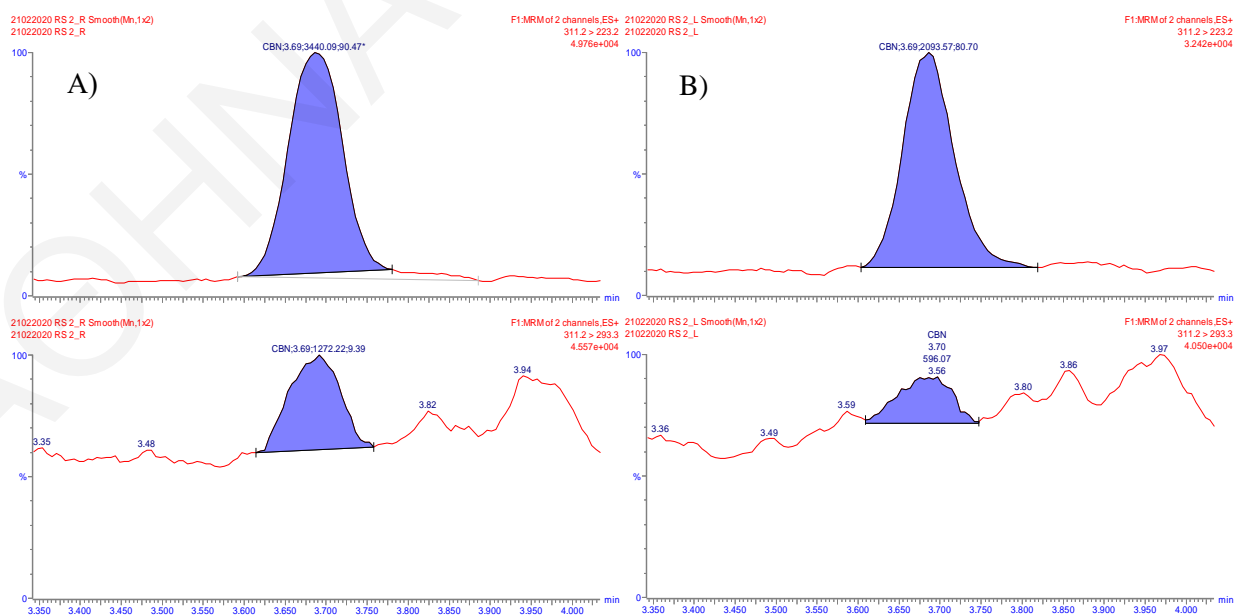
> 293.3 για την ταυτοποίηση. Για την THC είναι η $315.3 > 193.2$ (ποσοτικοποίηση) και η $315.3 > 259.2$ (ταυτοποίηση). Στα σχήματα που ακολουθούν, παρουσιάζονται τα ιόντα αυτά για τα δύο κανναβινοειδή που εντοπίστηκαν στα δείγματα, πρώτα για την CBN (Σχήματα 6.28 – 6.31) και ακολουθούν τα TIC για την ανίχνευση της THC (Σχήματα 6.32 – 6.35).

Δείγμα 1



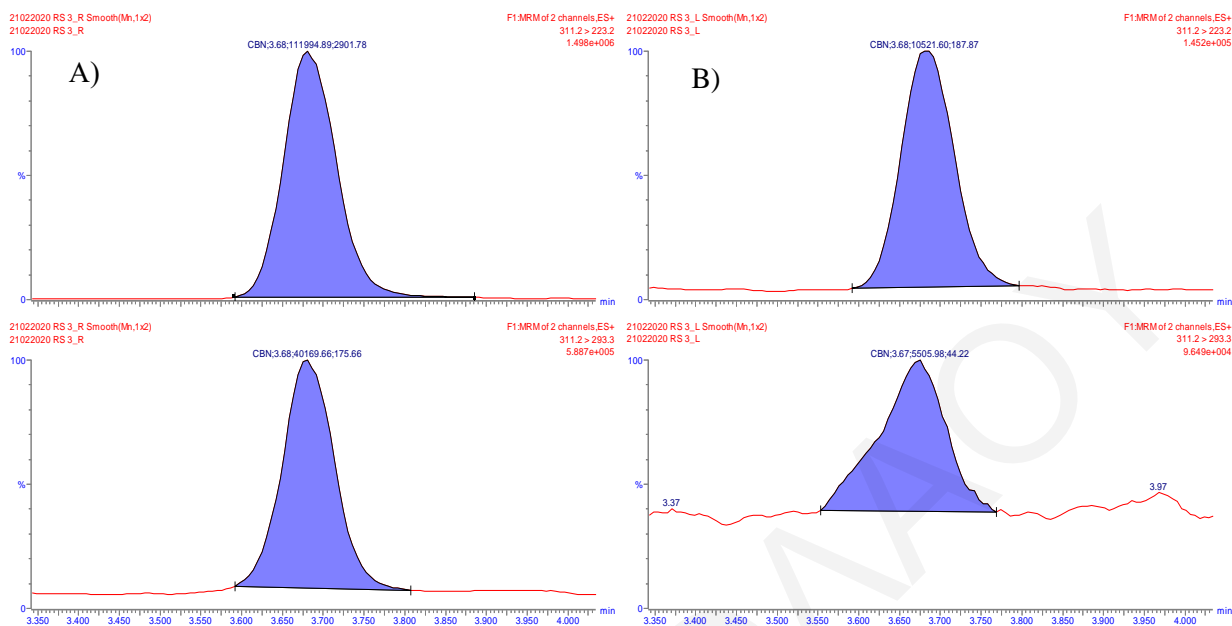
Σχήμα 6.28. Ανίχνευση της CBN στο δείγμα 1, δεξί αυτί (A) και αριστερό αυτί (B). Ιόν ποσοτικοποίησης (πάνω) και ταυτοποίησης (κάτω).

Δείγμα 2



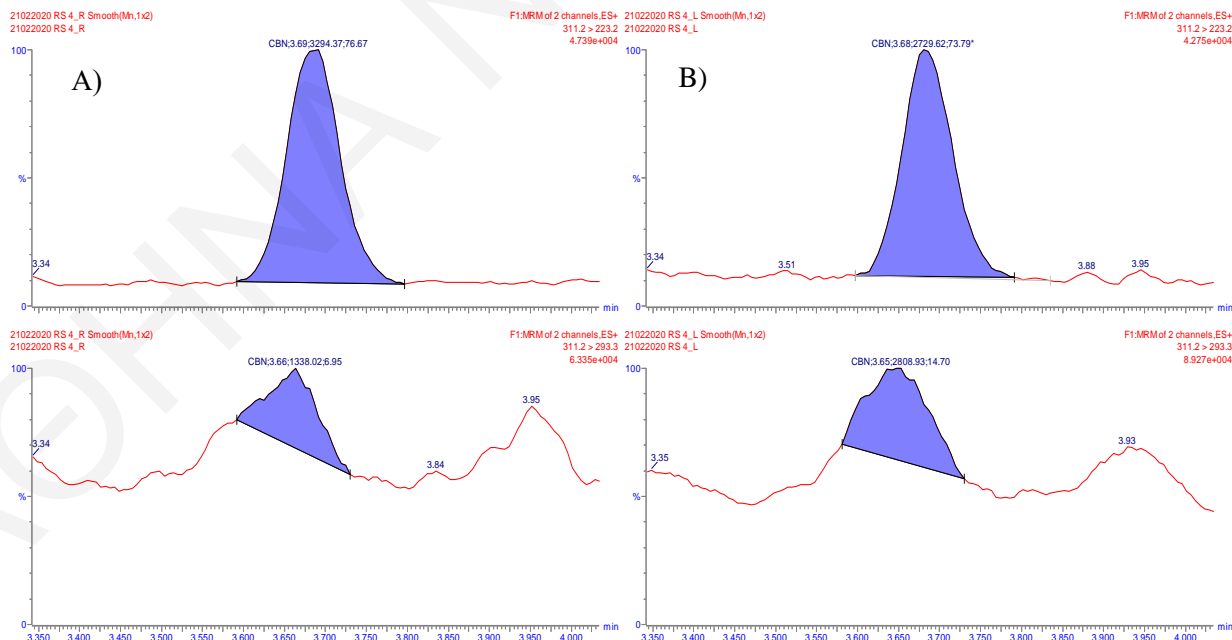
Σχήμα 6.29. Ανίχνευση της CBN στο δείγμα 2, δεξί αυτί (A) και αριστερό αυτί (B). Ιόν ποσοτικοποίησης (πάνω) και ταυτοποίησης (κάτω).

Δείγμα 3



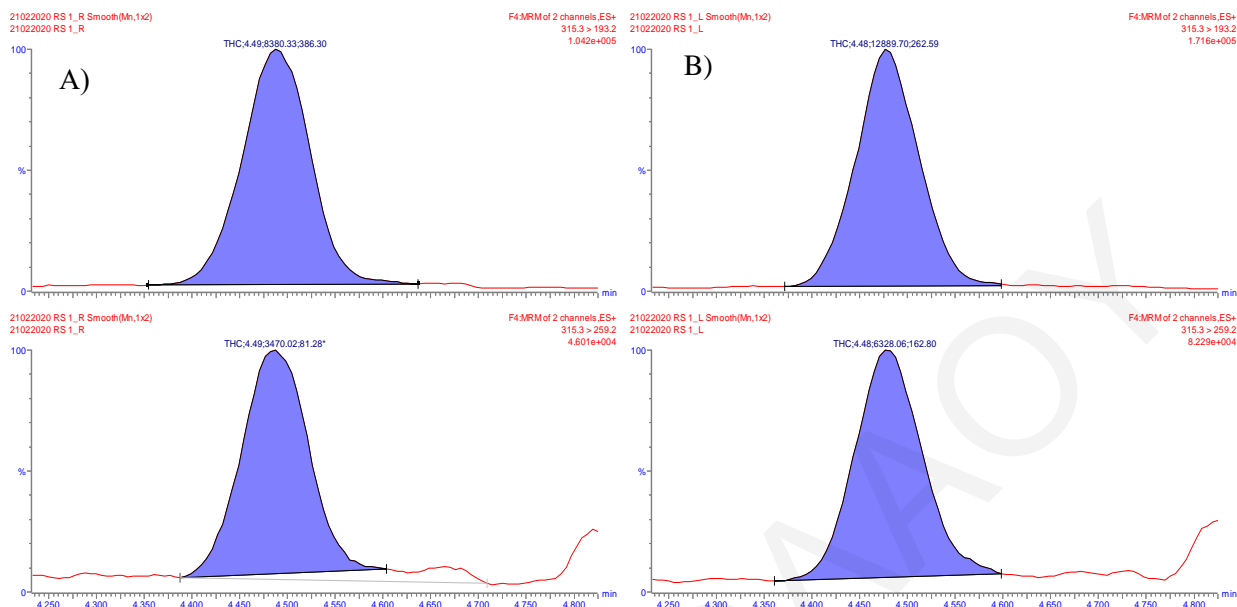
Σχήμα 6.30. Ανίχνευση της CBN στο δείγμα 3, δεξί αυτί (A) και αριστερό αυτί (B). Ιόν ποσοτικοποίησης (πάνω) και ταυτοποίησης (κάτω).

Δείγμα 4



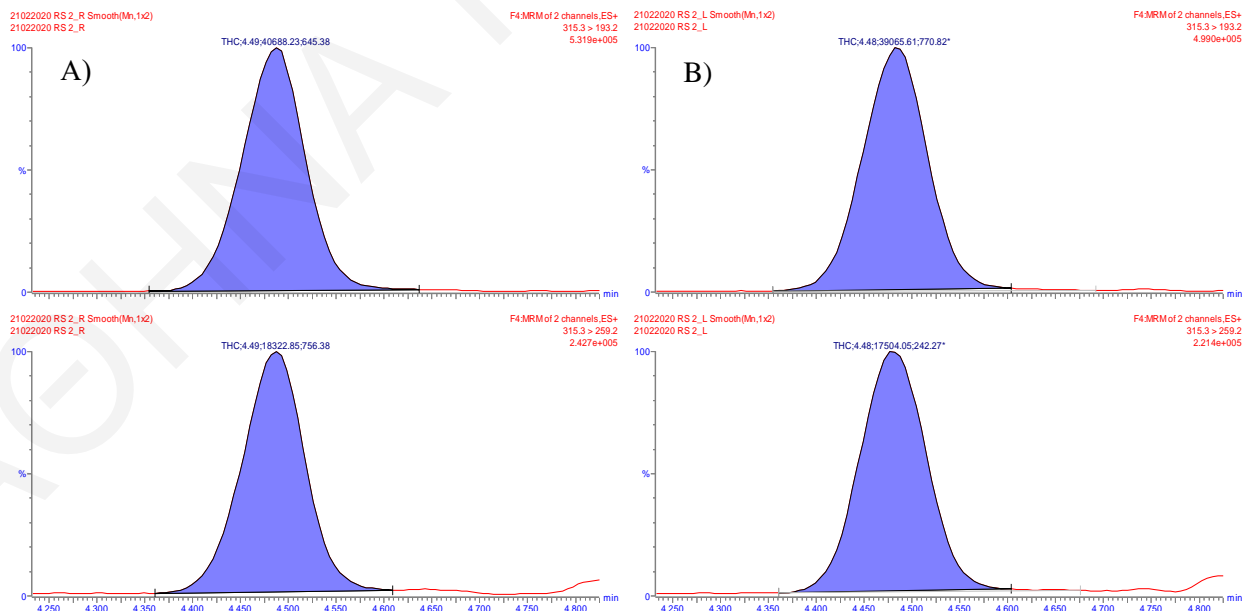
Σχήμα 6.31. Ανίχνευση της CBN στο δείγμα 4 δεξί αυτί (A) και αριστερό αυτί (B). Ιόν ποσοτικοποίησης (πάνω) και ταυτοποίησης (κάτω).

Δείγμα 1

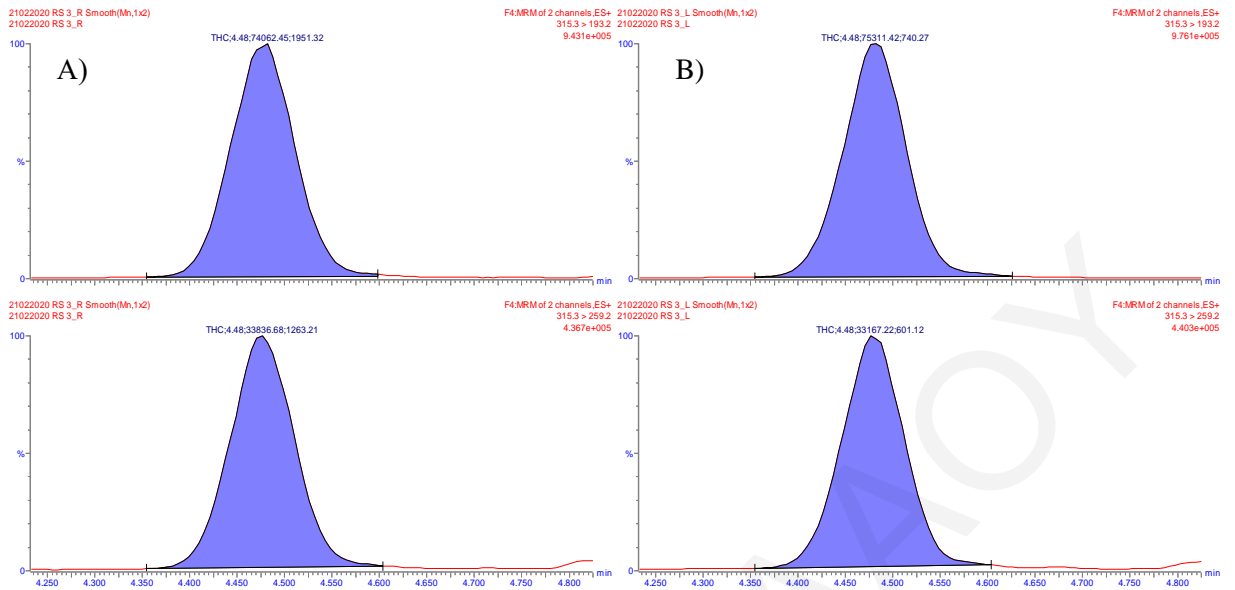


Σχήμα 6.32. Ανίχνευση της THC στο δείγμα 1, δεξί αυτί (A) και αριστερό αυτί (B). Ιόν ποσοτικοποίησης (πάνω) και ταυτοποίησης (κάτω).

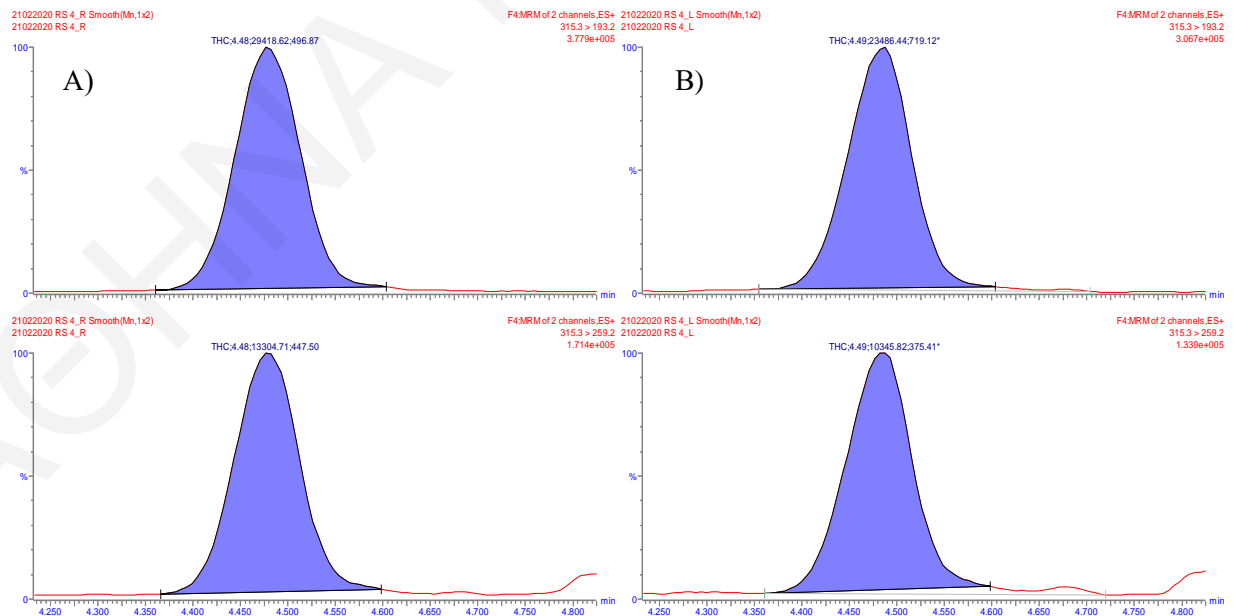
Δείγμα 2



Σχήμα 6.33. Ανίχνευση της THC στο δείγμα 2, δεξί αυτί (A) και αριστερό αυτί (B). Ιόν ποσοτικοποίησης (πάνω) και ταυτοποίησης (κάτω).

Δείγμα 3

Σχήμα 6.34. Ανίχνευση της THC στο δείγμα 3, δεξί αυτί (A) και αριστερό αυτί (B). Ιόν ποσοτικοποίησης (πάνω) και ταυτοποίησης (κάτω).

Δείγμα 4

Σχήμα 6.35. Ανίχνευση της THC στα δείγμα 4 δεξί αυτί (A) και αριστερό αυτί (B). Ιόν ποσοτικοποίησης (πάνω) και ταυτοποίησης (κάτω).

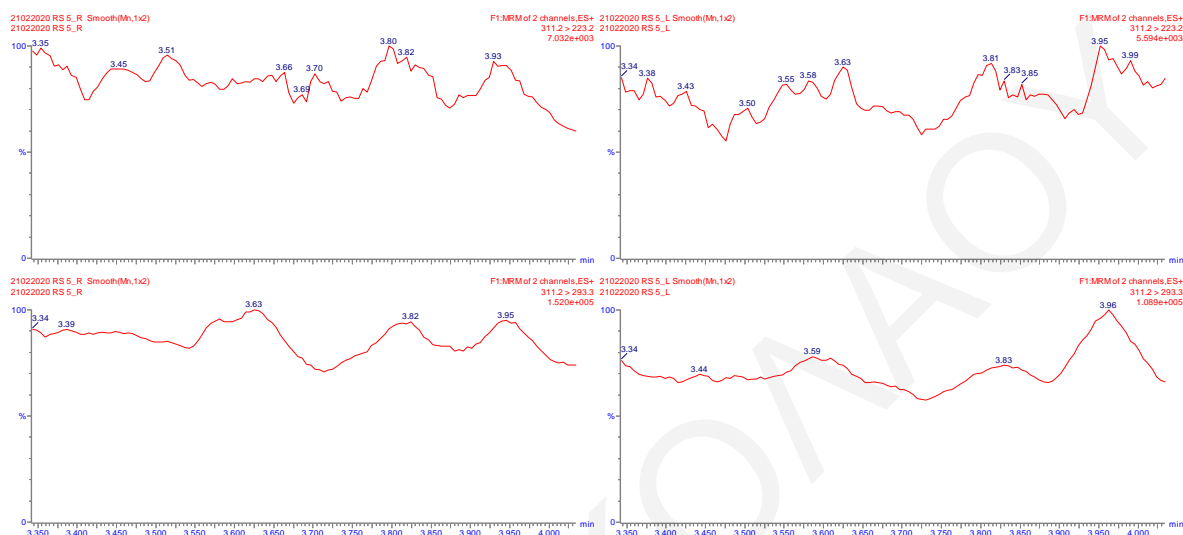
Λαμβάνοντας υπόψη τα ευρήματα της πιο πάνω μελέτης, αλλά και άλλων εργασιών που μελετούν την ανίχνευση των κανναβινοειδών ενώσεων σε διάφορα τετμημένα βιολογικά δείγματα, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα, ότι αποδεδειγμένα η ανίχνευση της THC είναι δυνατή, σε περιπτώσεις πρόσφατης κατανάλωσης σκευασμάτων κάνναβης ή καπνίσματος μαριχουάνας. Δεδομένης της δήλωσης περί καθημερινής χρήσης από τα άτομα στα δείγματα #3 και #4, αυτό αποδεικνύεται και πειραματικά από την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση αυτής της ένωσης σε μεγάλες σχετικά συγκεντρώσεις.

Η ποσοτικοποίηση των ανιχνεύσιμων ουσιών πραγματοποιήθηκε σε εύρος 17.28-59.96 (pg/mg) για την THC και στα 5.98 (pg/mg) για την CBN (στο δείγμα #3), δεδομένα που συλλέχθηκαν και από τα δύο αυτιά, δεξί (R) και αριστερό (L). Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε με χρήση των καμπυλών βαθμονόμησης (χωρίς τη χρήση I.S.), οι οποίες πραγματοποιήθηκαν στο πλαίσιο της εργασίας αυτής. Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν ως μέσος όρος από την ανάλυση του R, L αυτιού, παρουσιάζονται στον **Πίνακα 6.16**. Η μετατροπή σε pg/mg, δηλαδή ανά μονάδες μάζας δείγματος, πραγματοποιήθηκε με συμπερίληψη της μάζας κάθε δείγματος χρήστη κάνναβης στους υπολογισμούς. Δε σημειώθηκε σημαντική διαφορά ανάμεσα σε δεξί και αριστερό αυτί, γεγονός που συνάδει με τη βιβλιογραφία [136]. Βέβαια θα πρέπει να ληφθεί μεγαλύτερος αριθμός δειγμάτων, ώστε να υπάρξει μια πιο ξεκάθαρη εικόνα αναφορικά με τη συσχέτιση της ποσότητας που ανιχνεύεται ανάμεσα στο δεξί και το αριστερό αυτί. Θεωρητικά δεν αναμένεται κάποια διαφορά, δεδομένου ότι η ποσότητα που συλλέχθηκε ανάμεσα στα δύο αυτιά δεν είναι σημαντικά διαφορετική και δεδομένου, φυσικά, ότι η σύσταση του κεριού και στα δύο αυτιά είναι πανομοιότυπη [186].

Πίνακας 6.16. Αποτελέσματα ποσοτικοποίησης για τις ουσίες CBN και THC για τα άτομα που συμμετείχαν στη μελέτη αυτή (μικτά αποτελέσματα από την ανάλυση διξιού (R) και αριστερού (L) αυτιού). *Κάτω από το όριο ποσοτικοποίησης

Δείγμα	R, L Δείγματα	CBN (pg/mg)	CBN (ng/mL)	THC (pg/mg)	THC (ng/mL)
1	R, L	-	-	8.01*	0.15*
2	R, L	1.28*	0.09*	40.26	2.23
3	R, L	5.98	0.45	59.96	4.23
4	R, L	0.96*	0.08*	17.28	1.48

Για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων εξετάστηκαν και τυφλά δείγματα (control samples), από άτομα, τα οποία δεν έχουν κάνει χρήση ναρκωτικών ουσιών. Όπως ήταν αναμενόμενο, καμία από τις εξεταζόμενες ουσίες δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα από τα δείγματα τυφλού. Ενδεικτικά TIC από το δείγμα τυφλού (# 5), (δεξί και αριστερό αυτί) παρουσιάζεται για την CBN στο Σχήμα 6.36.



Σχήμα 6.36. TIC από την ανάλυση τυφλού δείγματος 5, για την ένωση CBN. Δείγμα από το δεξί (A) και αριστερό αυτί (B). Ιόν ποσοτικοποίησης (πάνω) και ιόν ταυτοποίησης (κάτω).

Σύγκριση μεταξύ δειγμάτων

Όπως προαναφέρθηκε, για τα δείγματα #3 και #4 υπάρχει πληροφόρηση από τα άτομα χρήστες ότι έκαναν καθημερινή χρήση, με τελευταία φορά την ημέρα ακριβώς πριν την δειγματοληψία και συνεπώς την μέρα πριν την ανάλυση των δειγμάτων. Αντίθετα, για τα δείγματα #1 και #2 δεν υπάρχουν πληροφορίες από τους χρήστες. Εξετάζοντας λοιπόν τα αποτελέσματα των TIC για τις ανιχνεύσιμες ενώσεις CBN και THC, διακρίνονται ορισμένες διαφορές αναφορικά με την κατάχρηση των ουσιών. Σε όλες τις περιπτώσεις ανιχνεύθηκε τόσο η CBN, όσο και η THC, με εξαίρεση το δείγμα #1, όπου η ανιχνεύσιμη ποσότητα της CBN ένωσης ήταν κάτω από το όριο LOD. Ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε σε όλα τα δείγματα με εξαίρεση το δείγμα #1, αφού η ανιχνεύσιμη ποσότητα της THC ήταν κάτω από το LOQ. Τα δείγματα #2-4 παρουσιάζουν συγκρίσιμες συγκεντρώσεις των εξεταζόμενων ενώσεων, ειδικότερα της THC (1.48 - 4.23 ng/mL), γεγονός που υποδηλώνει ότι πιθανώς το δείγμα #2 να προέρχεται από άτομο που κάνει καθημερινή/συχνή χρήση κάνναβης. Η υπόθεση αυτή στηρίζεται στο γεγονός ότι τα δείγματα #3-4, έχουν δηλώσει ότι εξασκούν συχνή, καθημερινή χρήση. Επιπλέον, η ανίχνευση της THC αποτελεί ένδειξη πρόσφατης

χρήσης, ενώ η ανίχνευση της CBN πιθανώς να υποδηλώνει παρελθοντική χρήση, αλλά σίγουρα αποτελεί ένδειξη χρήσης κάνναβης. Περισσότερες όμως μελέτες θα πρέπει να διεξαχθούν για τον προσδιορισμό της χρονικής διάρκειας ανίχνευσης των ουσιών αυτών. Τα δείγματα θα πρέπει να προέρχονται από εθελοντές που βρίσκονται σε προγράμματα απεξάρτησης, για να κρατείται ιστορικό.

Η μη ανίχνευση της CBD ήταν αναμενόμενη, λόγω των δειγμάτων που έχουν συλλεχθεί. Οι χρήστες κάνναβης καπνίζουν σε μορφή τσιγάρου τη μαριχουάνα, της οποίας η σύσταση υποδηλώνει υψηλά ποσοστά της ψυχοτρόπου ένωσης και πολύ χαμηλότερα ποσοστά της CBD. Τα σκευάσματα αυτά είναι με τέτοιο τρόπο κατασκευασμένα, ώστε να προκαλούν παραισθήσεις (high) και έτσι είναι υψηλά σε περιεκτικότητα της THC. Αντίθετα, στις περιπτώσεις, όπου γίνεται χορήγηση φαρμακευτικής κάνναβης, αναμένονται υψηλά ποσοστά CBD και καθόλου THC.

Η μη- ανίχνευση των μεταβολιτών της THC, THC-OH και THC-COOH, ήταν επίσης αναμενόμενη. Ο χρόνος ημι-ζωής της THC-OH, που είναι ο μεταβολίτης I φάσης της THC, είναι πολύ σύντομος και έτσι είναι πολύ σπάνια η ανίχνευση τους στα βιολογικά υγρά. Στην περίπτωση ανάλυσης τριχών κεφαλής, εξετάζεται το THC-COOH, ο φάσης II μεταβολίτης της THC, και η ανίχνευση υποδηλώνει παρελθοντική χρήση, εντός του διαστήματος 1-2 μηνών.

Σε αυτή την εργασία, δεν ανιχνεύθηκε το THC-COOH, αλλά η CBN, η οποία θεωρείται ως η οξειδωμένη μορφή της THC. Σύμφωνα με τη δημοσίευση των Meier et al., όπως αναφέρθηκε και προγενέστερα, η ανίχνευση της οξειδωμένης μορφής, ενδέχεται να υποδηλώνει την οξείδωση της THC πριν ή κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης της THC στο κερί [136].

6.6. Συμπεράσματα

Από το δεύτερο μέρος της διδακτορικής αυτής εργασίας εξήχθησαν σημαντικά συμπεράσματα αναφορικά με ένα φλέγον ζήτημα, την ανίχνευση κάνναβης σε μη συμβατικά βιολογικά εκκρίματα.

Για το σκοπό αυτό αναπτύχθηκε και αξιολογήθηκε μια αναλυτική μέθοδος ανίχνευσης και προσδιορισμού πέντε φυτοκανναβινοειδών ενώσεων, στο σύστημα UPLC-MS/MS, σε διάστημα μόλις τεσσάρων λεπτών και με συνολικό χρόνο ανάλυσης επτά λεπτών. Οι ουσίες CBD και THC, οι οποίες δε διαχωρίζονται στο MS/MS σύστημα, διαχωρίστηκαν

χρωματογραφικά. Τα κριτήρια αξιολόγησης της μεθόδου έδειξαν πολύ καλή γραμμικότητα και χαμηλά LODs και LOQs, ζητούμενο σε τέτοια αναλυτικά προβλήματα που αφορούν την ανίχνευση τέτοιων ενώσεων, οι οποίες βρίσκονται σε ελάχιστες ποσότητες στα βιολογικά δείγματα και ειδικότερα, στα μη-συμβατικά.

Η μέθοδος επεξεργασίας των δειγμάτων μελετήθηκε εκτενώς αξιολογώντας διάφορα κριτήρια, με στόχο τον προσδιορισμό του βέλτιστου διαλύτη εκχύλισης. Για την διεξαγωγή των πειραμάτων αξιολόγησης της μεθόδου επεξεργασίας συλλέχθηκαν δείγματα από υγιή άτομα, πάντοτε σε καθορισμένο, σταθερό χρονικό διάστημα. Η απόδοση της εκχύλισης των εξεταζόμενων κανναβινοειδών κυμάνθηκε σε υψηλά επίπεδα για όλες τις ουσίες (79-91%), ενώ δεν σημειώθηκε επίδραση του μητρικού υλικού ή το φαινόμενο «Carryover». Η συνολική πειραματική διαδικασία είναι εύκολη και γρήγορη και μπορούν ταυτόχρονα να εξετάζονται πολλαπλά δείγματα. Αξιολογήθηκε επίσης και η απώλεια των κανναβινοειδών ενώσεων που σημειώθηκε μετά την επεξεργασία τους, καθώς αυτά αποθηκεύτηκαν σε σκοτεινό μέρος σε διάφορες θερμοκρασίες (25, 10, και -20 °C).

Τέλος, οι αναπτυχθείσες μεθοδολογίες, τόσο της επεξεργασίας, όσο και της ανάλυσης στο σύστημα UPLC-MS/MS, εφαρμόστηκαν σε δείγματα που λήφθηκαν από χρήστες κάνναβης. Σε όλα τα δείγματα επιτεύχθηκε η ανίχνευση τόσο της CBN, όσο και της ψυχοδραστικής THC, με την τελευταία να ανιχνεύεται για πρώτη φορά σε αυτό το βιολογικό δείγμα. Η ταυτόχρονη ανίχνευση των δύο αυτών ουσιών υποδηλώνει πρόσφατη χρήση κάνναβης, για την περίπτωση της THC, ενώ για την οξειδωμένη μορφή της, CBN, επιβεβαιώνει τη χρήση κάνναβης και πιθανώς να υποδηλώνει παρελθοντική χρήση. Επιπρόσθετα, για πρώτη φορά πραγματοποιείται ποσοτικοποίηση των κανναβινοειδών ενώσεων στις κυψελίδες αυτιού. Δείγματα συλλέχθηκαν σε όλες τις περιπτώσεις και από το δεξί και από το αριστερό αυτί, σημειώνοντας πως δεν υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο.

7. Γενικά Συμπεράσματα

Στο πρώτο μέρος της διδακτορικής αυτής έρευνας εξετάστηκε η χειρόμορφη ανάλυση ενώσεων κλινικής σημασίας με χρήση της CE. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν η T4, το NEF, η CTZ και η FXD. Από αυτή τη μελέτη εξήχθησαν σημαντικά συμπεράσματα σχετικά με τη χρήση των CFs ως CSs, των AAIL και άλλων πρόσθετων στη CE. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι, το είδος και η συγκέντρωση του CS και το pH είναι πολύ σημαντικοί παράγοντες για την επίτευξη του χειρόμορφου διαχωρισμού των ενώσεων. Από τα πιο πάνω συμπεραίνεται, ότι οι αλληλεπιδράσεις τριών σημείων (three-point rule) που απαιτούνται για μια επιτυχημένη χειρόμορφη αναγνώριση, πιθανόν να περιλαμβάνουν στερεοχημικές παρεμποδίσεις, ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και δεσμούς υδρογόνου.

Τα AAILs έδειξαν ότι μπορούν να αυξήσουν την εναντιοεκλεκτικότητα και την αποδοτικότητα που παρουσιάζουν διάφοροι CSs, βελτιώνοντας, σε ορισμένες περιπτώσεις το διαχωρισμό. Για παράδειγμα, σημειώθηκε πλήρης διαχωρισμός και διπλασιασμός της αποδοτικότητας (N) για τα εναντιομερή του NEF (με την προσθήκη του AAIL), σε χαμηλότερη συγκέντρωση CS. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει την πιθανή ανάπτυξη συνέργειας μεταξύ των CFs και των AAILs. Ωστόσο, για την εξακρίβωση των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται, καθώς και τη διευκρίνιση του μηχανισμού διαχωρισμού απαιτούνται περαιτέρω μελέτες.

Η εύκολη και γρήγορη σύνθεσή τους, το γεγονός ότι βασίζονται σε φυσικά πρόδρομα μόρια (αμινοξέα και γαλακτικό οξύ), το σχετικά χαμηλό κόστος τους σε σύγκριση με άλλους CSs, αλλά και το μεγάλο εύρος επιλογής διάφορων κατιόντων, τα καθιστούν ιδανικά για χρήση στην CE σε συνδυασμό με άλλους CSs, με στόχο την επίτευξη ή/και βελτίωση των διαχωρισμών διάφορων χειρόμορφων ενώσεων.

Οι CFs, ως οι μοναδικοί CSs, παρουσίασαν διαφορετική εναντιοεκλεκτική ικανότητα. Για παράδειγμα, η SCF₆ αποτέλεσε τον πιο αποτελεσματικό CS αυτής της εργασίας, καθώς οι δύο εκ των ενώσεων που εξετάστηκαν διαχωρίστηκαν πλήρως με την προσθήκη της στο BGE. Αξίζει εδώ να σημειωθεί ότι, στις βέλτιστες συνθήκες διαχωρισμού, ο χρόνος ανάλυσης ήταν μικρότερος ($t < 5$ min) και στις δύο περιπτώσεις, ενώ απαιτήθηκε ελάχιστη συγκέντρωση CF (2 mM). Το γεγονός ότι, σε κάποιες περιπτώσεις οι SCF₇ και IP-CF₇ παρουσίασαν χαμηλότερη ή καθόλου εναντιοεκλεκτικότητα σε σχέση με τις αντίστοιχες SCF₆ και IP-CF₆, υποδηλώνει ότι ανάλογα με τον υπό μελέτη αναλύτη, ο δακτύλιος των CFs επηρεάζει διαφορετικά τη χειρόμορφη αναγνώριση.

Όλες οι πιο πάνω προσπάθειες που έγιναν, μέχρι τώρα, απέδειξαν ότι ο χειρόμορφος διαχωρισμός της T4 δεν ήταν δυνατό να επιτευχθεί χρησιμοποιώντας διάφορες CFs, είτε ως οι μοναδικοί CSs στον BGE, είτε σε συνδυασμό με το L-AlaC₄Lac ή και με άλλα οργανικά πρόσθετα. Επιπρόσθετα, ο χειρόμορφος διαχωρισμός της T4 δεν ήταν δυνατόν να πραγματοποιηθεί ούτε με τη χρήση διάφορων παραγώγων των CDs. Με παρόμοιο τρόπο δεν κατέστη δυνατή η χειρόμορφη ανάλυση της CTZ με χρήση των CFs, του L-AlaC₄Lac ή και με άλλα οργανικά πρόσθετα. Έτσι, η συγκεκριμένη μελέτη για τον εναντιομερή διαχωρισμό της T4 και της CTZ παραμένουν μια πρόκληση για το Εργαστήριο της Ενόργανης Ανάλυσης.

Η κάνναβη, το πιο αμφιλεγόμενο και συνάμα πιο το ευρέως χρησιμοποιούμενο παράνομο φυτό, αποτελεί αναμφισβήτητα στις μέρες θέμα προς συζήτηση, καθώς η χρήση της επεκτείνεται σε ψυχαγωγικούς, πέρα από τους ιατρικούς, σκοπούς. Η χρήση ναρκωτικών ουσιών συνδέεται άρρηκτα πολλές φορές με εγκλήματα και έτσι απαιτείται η ανάπτυξη έγκυρων αναλυτικών μεθόδων για την ανίχνευση των ουσιών αυτών με στόχο τον έλεγχο από τις θεσμοθετημένες αρχές.

Το δεύτερο μέρος της διδακτορικής αυτής έρευνας αποτέλεσε μια ιδιαίτερη πρόκληση. Στόχος της μελέτης αυτής, ήταν η ανίχνευση κανναβινοειδών ενώσεων σε ένα μη συνηθισμένο βιολογικό δείγμα, τις κυψελίδες (κερί) αυτιού. Αρχικά, επιτεύχθηκε η ανάπτυξη μιας χρωματογραφικής μεθόδου για το διαχωρισμό των πέντε κανναβινοειδών που εξετάστηκαν στην εργασία αυτή. Οι ενώσεις CBD και THC διαχωρίστηκαν χρωματογραφικά, καθώς ο διαχωρισμός τους στο σύστημα MS/MS ήταν αδύνατος. Στη συνέχεια αξιολογήθηκε η αναπτυχθείσα μεθοδολογία με βάση τη γραμμικότητα, τα LODs και LOQs και την επαναληψιμότητα.

Ωστόσο, το μεγαλύτερο αναλυτικό εμπόδιο της μελέτης αυτής, αποτέλεσε ο καθορισμός της βέλτιστης μεθόδου επεξεργασίας των δειγμάτων. Ο στόχος ήταν η εξαγωγή των κανναβινοειδών ενώσεων από την εξεταζόμενη μήτρα με τη μεγαλύτερη δυνατή αποδοτικότητα. Πρωτίστως, διεξήχθησαν η μελέτη του διαλύτη εκχύλισης, ο καθορισμός των πειραματικών σταδίων επεξεργασίας και καθαρισμού των δειγμάτων, και η μελέτη του εσωτερικού προτύπου, της THC-*d*₃. Έπειτα από τη μελέτη διαφόρων παραμέτρων, προσδιορίστηκε και ακολούθως αξιολογήθηκε η πειραματική διαδικασία. Η ανάκτηση, η επίδραση του υλικού της μήτρας και το φαινόμενο «Carryover» αποτέλεσαν τα σημαντικότερα μέτρα αξιολόγησης και εξακριβώθηκε η δυνατότητα εφαρμογής της μεθόδου επεξεργασίας των δειγμάτων αυτών σε πραγματικά δείγματα, από άτομα χρήστες.

Η ανίχνευση τόσο της ψυχοτρόπου ένωσης, όσο και της οξειδωμένης μορφής της CBN, καταδεικνύουν την επιτυχή εφαρμογή των πιο πάνω τεχνικών, καθώς τα ευρήματα συνάδουν με τη δήλωση των εθελοντών περί συχνής χρήσης, στις δύο περιπτώσεις μάλιστα, επί καθημερινής βάσης. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται και από τις υψηλές συγκεντρώσεις που ανιχνεύτηκαν στα δείγματα. Οι τεχνικές που αναπτύχθηκαν, για πρώτη φορά, σε αυτή τη διατριβή ενδέχεται, μελλοντικά, να βρίσκουν εφαρμογές σε κλινικά εργαστήρια τοξικολογικής ανάλυσης.

8. Μελλοντική Εργασία

Αναφορικά με το πρώτο μέρος της μελέτης αυτής, νέοι CS και νέα AAIL μπορούν να εξεταστούν προς το διαχωρισμό της CTZ και της T4.

Η μελέτη κανναβινοειδών ενώσεων αποτελεί αντικείμενο έρευνας τις τελευταίες δεκαετίες, γεγονός που δηλώνει τη σημαντικότητα τους και την ανάγκη για ανάπτυξη νέων και καινοτόμων μεθόδων για την έγκυρη ανίχνευση τους. Οι ερευνητές, μέχρι στιγμής, επισημαίνουν την ανάγκη για την επίλυση των προβλημάτων που υπάρχουν μέχρι σήμερα στην ανίχνευση των κανναβινοειδών ενώσεων ειδικότερα εξαιτίας του μικρού χρόνου ημιζωής των ενώσεων αυτών. Ένα πλαίσιο, στο οποίο υπάρχουν προοπτικές μελέτης, είναι ο προσδιορισμός των επιπέδων των κανναβινοειδών ενώσεων σε άτομα που υπόκεινται σε θεραπεία με φαρμακευτικά σκευάσματα κάνναβης. Για παράδειγμα, ενδιαφέρουσα θα ήταν η διεξαγωγή μιας πειραματικής μελέτης στην οποία ενδέχεται να υπάρξει συσχέτιση ανάμεσα στη χορηγούμενη ποσότητα και σε αυτή που τελικά ανιχνεύεται στο κερύ.

Επιπρόσθετα, πρέπει να διεξαχθούν μελέτες αναφορικά με τη βιοδιαθεσιμότητα των ουσιών αυτών στις κυψελίδες αυτιού. Με παρόμοιο τρόπο θα μπορούσε να διεξαχθεί μια μελέτη για τη συσχέτιση χορηγούμενων ποσοτήτων κάνναβης (για παράδειγμα υπό τη μορφή τσιγάρου), με σκοπό τον προσδιορισμό του παραθύρου ανίχνευσης σε αυτό το βιολογικό δείγμα. Τέλος, τέτοιες μελέτες ενδέχεται να παρέχουν, πληροφορίες αναφορικά με τη μεταβολική δραστηριότητα των κανναβινοειδών και των μηχανισμών ενσωμάτωσης στα βιολογικά δείγματα.

9. Βιβλιογραφία

- [1] Roos, G., Roos, C., *Organic chemistry concepts: An EFL approach*, Academic Press 2014.
- [2] Caner, H., Groner, E., Levy, L., Agranat, I., *Drug discovery today* 2004, 3, 105-110.
- [3] Nguyen, L. A., He, H., Pham-Huy, C., *International journal of biomedical science: IJBS* 2006, 2, 85.
- [4] Eriksson, T., Björkman, S., Roth, B., Fyge, Å., Höglund, P., *Chirality* 1995, 7, 44-52.
- [5] Eriksson, T., Björkman, S., Höglund, P., *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 2001, 57, 365-376.
- [6] Van Eeckhaut, A., Michotte, Y., *Chiral Separations by Capillary Electrophoresis*, CRC Press 2009, pp. 1-23.
- [7] Nguyen, L. A., He, H., Pham-Huy, C., *International Journal of Biomedical Science : IJBS* 2006, 2, 85-100.
- [8] Akamine, Y., Miura, M., *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 2018, 14, 429-434.
- [9] Young, W. F., Gorman, C. A., Jiang, N.-S., Machacek, D., Hay, I. D., *Clin. Pharmacol. Ther.* 1984, 36, 781-787.
- [10] Chankvetadze, B., *Journal of separation science* 2001, 24, 691-705.
- [11] *Chirality*, Alan R. Liss, Inc. 1992, pp. 338-340.
- [12] Schurig, V., *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2002, 21, 647-661.
- [13] Ward, T. J., Ward, K. D., *Anal. Chem.* 2010, 82, 4712-4722.
- [14] Wang, Y., Zhou, Y., Ma, C., Yang, B., Feng, R., Zhang, Y., Fu, J., Chen, W., Sun, Y., Ma, J., *Acta Pharmaceutica Sinica B* 2012, 2, 527-533.
- [15] Fanali, S., *Journal of Chromatography A* 1996, 735, 77-121.
- [16] Maier, N. M., Franco, P., Lindner, W., *Journal of Chromatography A* 2001, 906, 3-33.
- [17] Beesley, T. E., Scott, R. P. W., *Chiral Chromatography*, Wiley 1998, pp. 29-52.
- [18] Chankvetadze, B., *Capillary electrophoresis in chiral analysis*, John Wiley & Sons 1997.
- [19] Easson, L. H., Stedman, E., *Biochem. J.* 1933, 27, 1257-1266.
- [20] Davankov, V. A., *Chirality* 1997, 9, 99-102.
- [21] Berthod, A., *Anal. Chem.* 2006, 78, 2093-2099.
- [22] Skoog, D., West, D., Holler, F., Crouch, S., *Chapter*, 9, 251-258.
- [23] Jiang, C., Tong, M. Y., Breitbach, Z. S., Armstrong, D. W., *Electrophoresis* 2009, 30, 3897-3909.
- [24] Zhang, X., Zhang, C., Sun, G., Xu, X., Tan, Y., Wu, H., Cao, R., Liu, J., Wu, J., *Instrumentation Science and Technology* 2012, 40, 194-215.
- [25] Kawamura, M., Uchiyama, T., Kuramoto, T., Tamura, Y., Mizutani, K., *Carbohydr. Res.* 1989, 192, 83-90.
- [26] Kawamura, M., Uchiyama, T., *Carbohydr. Res.* 1994, 260, 297-304.
- [27] Sawada, M., Takai, Y., Shizuma, M., Takeda, T., Adachi, H., Uchiyama, T., *Chem. Commun.* 1998, 1453-1454.
- [28] Sun, P., Wang, C., Breitbach, Z. S., Zhang, Y., Armstrong, D. W., *Anal. Chem.* 2009, 81, 10215-10226.
- [29] Sun, P., Wang, C., Padivitage, N. L. T., Nanayakkara, Y. S., Perera, S., Qiu, H., Zhang, Y., Armstrong, D. W., *Analyst* 2011, 136, 787-800.
- [30] Wang, C., Sun, P., Armstrong, D., in: Berthod, A. (Ed.), *Chiral Recognition in Separation Methods*, Springer Berlin Heidelberg 2010, pp. 77-96.
- [31] Aranyi, A., Bagi, A., Ilisz, I., Pataj, Z., Fülöp, F., Armstrong, D. W., Péter, A., *J. Sep. Sci.* 2012, 35, 617-624.
- [32] Gondová, T., Petrovaj, J., Kutschy, P., Armstrong, D. W., *J. Chromatogr. A* 2013, 1272, 100-105.

- [33] Shu, Y., Breitbach, Z. S., Dissanayake, M. K., Perera, S., Aslan, J. M., Alatrash, N., MacDonnell, F. M., Armstrong, D. W., *Chirality* 2015, 27, 64-70.
- [34] Vozka, J., Kalíková, K., Janečková, L., Armstrong, D. W., Tesařová, E., *Analytical Letters* 2012, 45, 2344-2358.
- [35] Woods, R. M., Patel, D. C., Lim, Y., Breitbach, Z. S., Gao, H., Keene, C., Li, G., Kürti, L., Armstrong, D. W., *J. Chromatogr. A* 2014, 1357, 172-181.
- [36] Jiang, C., Tong, M.-Y., Breitbach, Z. S., Armstrong, D. W., *Electrophoresis* 2009, 30, 3897-3909.
- [37] Zhang, Y. J., Huang, M. X., Zhang, Y. P., Armstrong, D. W., Breitbach, Z. S., Ryoo, J. J., *Chirality* 2013, 25, 735-742.
- [38] Perera, S., Na, Y.-C., Doundoulakis, T., Ngo, V. J., Feng, Q., Breitbach, Z. S., Lovely, C. J., Armstrong, D. W., *Chirality* 2013, 25, 133-140.
- [39] Maier, V., Kalíková, K., Příbylka, A., Vozka, J., Smuts, J., Švidrnoch, M., Ševčík, J., Armstrong, D. W., Tesařová, E., *J. Chromatogr. A* 2014, 1338, 197-200.
- [40] Immel, S., Schmitt, G. E., Lichtenthaler, F. W., *Carbohydr. Res.* 1998, 313, 91-105.
- [41] Sun, P., Armstrong, D. W., *Journal of Chromatography A* 2010, 1217, 4904-4918.
- [42] Kalíková, K., Janečková, L., Armstrong, D. W., Tesařová, E., *J. Chromatogr. A* 2011, 1218, 1393-1398.
- [43] Chum, H. L., Koch, V., Miller, L., Osteryoung, R., *Journal of the American Chemical Society* 1975, 97, 3264-3265.
- [44] Huddleston, J. G., Visser, A. E., Reichert, W. M., Willauer, H. D., Broker, G. A., Rogers, R. D., *Green chemistry* 2001, 3, 156-164.
- [45] Berthod, A., Ruiz-Angel, M., Carda-Broch, S., *Journal of Chromatography A* 2008, 1184, 6-18.
- [46] Anderson, J. L., Armstrong, D. W., *Analytical chemistry* 2003, 75, 4851-4858.
- [47] Armstrong, D. W., He, L., Liu, Y.-S., *Analytical chemistry* 1999, 71, 3873-3876.
- [48] Mavroudi, M. C., Kapnissi-Christodoulou, C. P., *Electrophoresis* 2014, 35, 2573-2578.
- [49] Nicolaou, A. G., Mavroudi, M. C., Stavrou, I. J., Weatherly, C. A., Kapnissi-Christodoulou, C. P., *Electrophoresis* 2019, 40, 539-546.
- [50] He, L., Zhang, W., Zhao, L., Liu, X., Jiang, S., *Journal of Chromatography A* 2003, 1007, 39-45.
- [51] Ruiz-Angel, M., Carda-Broch, S., Berthod, A., *Journal of Chromatography A* 2006, 1119, 202-208.
- [52] Wu, X., Wei, W., Su, Q., Xu, L., Chen, G., *Electrophoresis* 2008, 29, 2356-2362.
- [53] Vaher, M., Koel, M., Kazarjan, J., Kaljurand, M., *Electrophoresis* 2011, 32, 1068-1073.
- [54] Mwongela, S. M., Numan, A., Gill, N. L., Agbaria, R. A., Warner, I. M., *Analytical chemistry* 2003, 75, 6089-6096.
- [55] Li, L., Du, H., Yu, H., Xu, L., You, T., *Electrophoresis* 2013, 34, 277-283.
- [56] Cui, Y., Ma, X., Zhao, M., Jiang, Z., Xu, S., Guo, X., *Chirality* 2013, 25, 409-414.
- [57] Zhang, J., Du, Y., Zhang, Q., Chen, J., Xu, G., Yu, T., Hua, X., *Journal of Chromatography A* 2013, 1316, 119-126.
- [58] Tao, G.-h., He, L., Sun, N., Kou, Y., *Chemical communications* 2005, 3562-3564.
- [59] Tao, G.-h., He, L., Liu, W.-s., Xu, L., Xiong, W., Wang, T., Kou, Y., *Green chemistry* 2006, 8, 639-646.
- [60] Bwambok, D. K., Marwani, H. M., Fernand, V. E., Fakayode, S. O., Lowry, M., Negulescu, I., Strongin, R. M., Warner, I. M., *Chirality* 2008, 20, 151-158.
- [61] Atakan, Z., *Therapeutic advances in psychopharmacology* 2012, 2, 241-254.
- [62] Bridgeman, M. B., Abazia, D. T., *Pharmacy and Therapeutics* 2017, 42, 180.
- [63] Aizpurua-Olaizola, O., Soydaner, U., Öztürk, E., Schibano, D., Simsir, Y., Navarro, P., Etxebarria, N., Usobiaga, A., *Journal of natural products* 2016, 79, 324-331.
- [64] Martin, B., Mechoulam, R., Razdan, R., *Life sciences* 1999, 65, 573-595.
- [65] Mechtler, K., Bailer, J., De Hueber, K., *Industrial Crops and Products* 2004, 19, 19-24.

- [66] Barrus, D. G., Capogrossi, K. L., Cates, S. C., Gourdet, C. K., Peiper, N. C., Novak, S. P., Lefever, T. W., Wiley, J. L., *Methods report (RTI Press)* 2016, 2016.
- [67] Musshoff, F., Madea, B., *Therapeutic drug monitoring* 2006, 28, 155-163.
- [68] Drummer, O., London, Hodder Arnold, p22 2001.
- [69] Huestis, M. A., Henningfield, J. E., Cone, E. J., *Journal of Analytical Toxicology* 1992, 16, 276-282.
- [70] Di Marzo, V., Bifulco, M., De Petrocellis, L., *Nature reviews Drug discovery* 2004, 3, 771-784.
- [71] Wu, J., Nature Publishing Group 2019.
- [72] Karschner, E. L., Schwilke, E. W., Lowe, R. H., Darwin, W. D., Pope, H. G., Herning, R., Cadet, J. L., Huestis, M. A., *Addiction* 2009, 104, 2041-2048.
- [73] Volkow, N. D., Baler, R. D., Compton, W. M., Weiss, S. R., *New England Journal of Medicine* 2014, 370, 2219-2227.
- [74] Koppel, B. S., Brust, J. C., Fife, T., Bronstein, J., Youssof, S., Gronseth, G., Gloss, D., *Neurology* 2014, 82, 1556-1563.
- [75] Borgelt, L. M., Franson, K. L., Nussbaum, A. M., Wang, G. S., *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy* 2013, 33, 195-209.
- [76] Whiting, P. F., Wolff, R. F., Deshpande, S., Di Nisio, M., Duffy, S., Hernandez, A. V., Keurentjes, J. C., Lang, S., Misso, K., Ryder, S., *Jama* 2015, 313, 2456-2473.
- [77] Williams, J., Bretteville-Jensen, A. L., *Journal of health economics* 2014, 36, 20-32.
- [78] Scheidweiler, K. B., Himes, S. K., Chen, X., Liu, H.-F., Huestis, M. A., *Analytical and bioanalytical chemistry* 2013, 405, 6019-6027.
- [79] Mali, N., Karpe, M., Kadam, V., *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 2011, 1, 58-65.
- [80] Anizan, S., Milman, G., Desrosiers, N., Barnes, A. J., Gorelick, D. A., Huestis, M. A., *Analytical and bioanalytical chemistry* 2013, 405, 8451-8461.
- [81] Kintz, P., Mangin, P., *Forensic Science International* 1995, 70, 3-11.
- [82] Staub, C., *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 1999, 733, 119-126.
- [83] Lacroix, C., Sausseureau, E., *Journal of Chromatography B* 2012, 905, 85-95.
- [84] Mercolini, L., Mandrioli, R., Protti, M., Conti, M., Serpelloni, G., Raggi, M. A., *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 2013, 76, 119-125.
- [85] Mercolini, L., Musenga, A., Comin, I., Baccini, C., Conti, M., Raggi, M. A., *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 2008, 47, 156-163.
- [86] Aizpurua-Olaizola, O., Zarandona, I., Ortiz, L., Navarro, P., Etxebarria, N., Usobiaga, A., *Drug testing and analysis* 2017, 9, 626-633.
- [87] Andersson, M., Scheidweiler, K. B., Sempio, C., Barnes, A. J., Huestis, M. A., *Analytical and bioanalytical chemistry* 2016, 408, 6461-6471.
- [88] Cho, H. S., Cho, B., Sim, J., Baek, S. K., In, S., Kim, E., *Forensic Science International* 2019, 295, 219-225.
- [89] Montesano, C., Simeoni, M. C., Vannutelli, G., Gregori, A., Ripani, L., Sergi, M., Compagnone, D., Curini, R., *Journal of Chromatography A* 2015, 1406, 192-200.
- [90] Pichini, S., Marchei, E., Martello, S., Gottardi, M., Pellegrini, M., Svaizer, F., Lotti, A., Chiarotti, M., Pacifici, R., *Forensic Science International* 2015, 249, 47-51.
- [91] Shin, Y., Kim, J. Y., Cheong, J. C., Kim, J.-H., Kim, J.-H., Lee, H. S., *Journal of Chromatography B* 2020, 122157.
- [92] Aizpurua-Olaizola, O., Omar, J., Navarro, P., Olivares, M., Etxebarria, N., Usobiaga, A., *Analytical and bioanalytical chemistry* 2014, 406, 7549-7560.
- [93] Tiscione, N. B., Miller, R., Shan, X., Sprague, J., Yeatman, D. T., *Journal of Analytical Toxicology* 2016, 40, 639-648.
- [94] Sørensen, L. K., Hasselstrøm, J. B., *Journal of Analytical Toxicology* 2017, 41, 382-391.

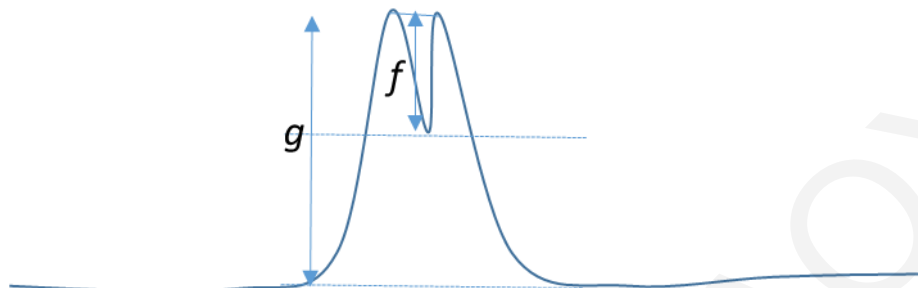
- [95] Kintz, P., Villain, M., Cirimele, V., *Therapeutic drug monitoring* 2006, 28, 442-446.
- [96] Musshoff, F., Junker, H. P., Lachenmeier, D. W., Kroener, L., Madea, B., *Journal of Analytical Toxicology* 2002, 26, 554-560.
- [97] Orfanidis, A., Mastrogianni, O., Koukou, A., Psarros, G., Gika, H., Theodoridis, G., Raikos, N., *Journal of Chromatography B* 2017, 1047, 141-150.
- [98] Shah, I., Al-Dabbagh, B., Salem, A. E., Hamid, S. A., Muhammad, N., Naughton, D. P., *BMC chemistry* 2019, 13, 106.
- [99] Thieme, D., Sachs, H., Uhl, M., *Drug testing and analysis* 2014, 6, 112-118.
- [100] Uhl, M., Sachs, H., *Forensic Science International* 2004, 145, 143-147.
- [101] Kintz, P., Mura, P., Jamey, C., Raul, J.-S., *Forensic toxicology* 2017, 35, 173-178.
- [102] Moosmann, B., Roth, N., Auwärter, V., *Scientific reports* 2015, 5, 14906.
- [103] Cooper, G. A., Kronstrand, R., Kintz, P., *Forensic Science International* 2012, 218, 20-24.
- [104] Kintz, P., *Workplace drug testing. Pharmaceutical Press, London* 2011, 187-215.
- [105] Kintz, P., Cirimele, V., *Biomedical Chromatography* 1997, 11, 371-373.
- [106] Desrosiers, N. A., Scheidweiler, K. B., Huestis, M. A., *Drug testing and analysis* 2015, 7, 684-694.
- [107] Molnar, A., Fu, S., Lewis, J., Allsop, D. J., Copeland, J., *Forensic Science International* 2014, 238, 113-119.
- [108] Jamey, C., Szwarc, E., Tracqui, A., Ludes, B., *Journal of Analytical Toxicology* 2008, 32, 349-354.
- [109] Raikos, N., Schmid, H., Nussbaumer, S., Ambach, L., Lanz, S., Längin, A., König, S., Roth, N., Auwärter, V., Weinmann, W., *Forensic Science International* 2014, 243, 130-136.
- [110] Scheidweiler, K. B., Newmeyer, M. N., Barnes, A. J., Huestis, M. A., *Journal of Chromatography A* 2016, 1453, 34-42.
- [111] Scheidweiler, K. B., Desrosiers, N. A., Huestis, M. A., *Clinica chimica acta* 2012, 413, 1839-1847.
- [112] Fairbairn, J., Liebmann, J., Rowan, M., *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 1976, 28, 1-7.
- [113] Mazina, J., Spiljova, A., Vaher, M., Kaljurand, M., Kulp, M., *Analytical Methods* 2015, 7, 7741-7747.
- [114] Backofen, U., Matysik, F.-M., Lunte, C. E., *Journal of Chromatography A* 2002, 942, 259-269.
- [115] Angeli, I., Casati, S., Ravelli, A., Minoli, M., Orioli, M., *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 2018, 155, 1-6.
- [116] Nadulski, T., Sporkert, F., Schnelle, M., Stadelmann, A. M., Roser, P., Schefter, T., Pragst, F., *Journal of Analytical Toxicology* 2005, 29, 782-789.
- [117] Park, M., Kim, J., Park, Y., In, S., Kim, E., Park, Y., *Journal of Chromatography B* 2014, 947, 179-185.
- [118] König, S., Aebi, B., Lanz, S., Gasser, M., Weinmann, W., *Analytical and bioanalytical chemistry* 2011, 400, 9-16.
- [119] Vogliardi, S., Tucci, M., Stocchero, G., Ferrara, S. D., Favretto, D., *Analytica Chimica Acta* 2015, 857, 1-27.
- [120] Schwope, D. M., Karschner, E. L., Gorelick, D. A., Huestis, M. A., *Clinical chemistry* 2011, 57, 1406-1414.
- [121] Verstraete, A. G., *Therapeutic drug monitoring* 2004, 26, 200-205.
- [122] Vandevenne, M., Vandenbussche, H., Verstraete, A., *Acta Clinica Belgica* 2000, 55, 323-333.
- [123] Montesano, C., Sergi, M., Odoardi, S., Simeoni, M. C., Compagnone, D., Curini, R., *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 2014, 91, 169-175.
- [124] Concheiro, M., Lee, D., Lendoiro, E., Huestis, M. A., *Journal of Chromatography A* 2013, 1297, 123-130.

- [125] Odell, M. S., Frei, M. Y., Gerostamoulos, D., Chu, M., Lubman, D. I., *Forensic Science International* 2015, 249, 173-180.
- [126] Beasley, E., Francese, S., Bassindale, T., *Analytical chemistry* 2016, 88, 10328-10334.
- [127] Schütz, H., Erdmann, F., Verhoff, M. A., Weiler, G., *Legal medicine* 2003, 5, S6-S19.
- [128] Jurado, C., Kintz, P., Menendez, M., Repetto, M., *International journal of legal medicine* 1997, 110, 159-163.
- [129] Kintz, P., *Forensic Sci Int* 2015, 249, A1-A2.
- [130] Jensen, T. L., Wu, F., McMillin, G. A., *Clinical Mass Spectrometry* 2019, 14, 115-123.
- [131] Ramnarine, R. S., Poklis, J. L., Wolf, C. E., *Journal of Analytical Toxicology* 2019, 43, 746-752.
- [132] Shokry, E., Antoniosi Filho, N. R., *Biochemia medica: Biochemia medica* 2017, 27, 1-15.
- [133] Shokry, E., de Oliveira, A. E., Avelino, M. A. G., de Deus, M. M., Antoniosi Filho, N. R., *Journal of proteomics* 2017, 159, 92-101.
- [134] Prokop-Prigge, K. A., Thaler, E., Wysocki, C. J., Preti, G., *Journal of Chromatography B* 2014, 953, 48-52.
- [135] Shokry, E., Marques, J. G., Ragazzo, P. C., Pereira, N. Z., Antoniosi Filho, N. R., *Forensic toxicology* 2017, 35, 348-358.
- [136] Meier, S. I., Koelzer, S. C., Schubert-Zsilavec, M., Toennes, S. W., *Drug testing and analysis* 2017, 9, 1572-1585.
- [137] Matuszewski, B., Constanzer, M., Chavez-Eng, C., *Analytical chemistry* 2003, 75, 3019-3030.
- [138] Taylor, P. J., *Clinical Biochemistry* 2005, 38, 328-334.
- [139] Jorgenson, J. W., Lukacs, K., *Clinical chemistry* 1981, 27, 1551-1553.
- [140] Landers, J. P., *Handbook of capillary electrophoresis*, CRC press 1996.
- [141] WynSep, WynSep Adaptive Separation, Discover the capillary electrophoresis theory, <http://wynsep.com/capillary-electrophoresis-theory/?lang=en> 2019.
- [142] Slideshare, Health and Medicine, The principle and performance of capillary electrophoresis, <https://www.slideshare.net/improved/the-principle-and-performance-of-capillary-electrophoresis> 2018.
- [143] Terabe, S., *The Chemical Record* 2008, 8, 291-301.
- [144] Terabe, S., *Annu. Rev. Anal. Chem.* 2009, 2, 99-120.
- [145] Terabe, S., *Procedia Chemistry* 2010, 2, 2-8.
- [146] Nováková, L., Matysová, L., Solich, P., *Talanta* 2006, 68, 908-918.
- [147] Wren, S. A., Tchelitcheff, P., *Journal of Chromatography A* 2006, 1119, 140-146.
- [148] de Villiers, A., Lestremau, F., Szucs, R., Gélébart, S., David, F., Sandra, P., *Journal of Chromatography A* 2006, 1127, 60-69.
- [149] Waters, The Promise of Small Particles, https://www.waters.com/waters/en_US/The-Promise-of-Small-Particles/nav.htm?cid=134804750&locale=en_US 2021.
- [150] Arsenault, J. C., McCabe, D. R., Grumbach, E. S., *Beginners guide to UPLC: ultra-performance liquid chromatography*, Waters Corporation 2009.
- [151] Jeff, C., *Xactly, Chromatography*, <https://xactly.com/Chromatography.html>, 2012.
- [152] Kazakevich, Y. V., Lobrutto, R., *HPLC for pharmaceutical scientists*, John Wiley & Sons 2007.
- [153] Kupiec, T., *International journal of pharmaceutical compounding* 2004, 8, 223-227.
- [154] Ho, W. F., Stuart, B., Prichard, E. R., *High performance liquid chromatography*, Royal Society of Chemistry 2003.
- [155] Santoiemma, G., *Applied Soil Ecology* 2018, 123, 546-550.
- [156] Wilm, M., *Molecular & cellular proteomics* 2011, 10.

- [157] Paul, G., *University of Bristol, High Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry (HPLC/MS)*, <http://www.bris.ac.uk/chemistry/facilities/nerc-lsmsf/techniques/hplcms/>.
- [158] Agency, E., *Committee for Medicinal Products for Human Use (EMA/CHMP/EWP/192217/2009)* 2011.
- [159] Kaza, M., Karaźniewicz-Łada, M., Kosicka, K., Siemiątkowska, A., Rudzki, P. J., *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 2019, 165, 381-385.
- [160] Taverniers, I., Van Bockstaele, E., De Loose, M., *Pharmaceutical Sciences Encyclopedia: Drug Discovery, Development, and Manufacturing* 2010, 1-48.
- [161] ICH, T., *Food and Drug Administration, Centre for Drug Evaluation and Research, Centre for Biologics Evaluation and Research* 1996, 1269.
- [162] Hajšlová, J., Zrostlikova, J., *Journal of Chromatography A* 2003, 1000, 181-197.
- [163] Hughes, N. C., Wong, E. Y., Fan, J., Bajaj, N., *The AAPS journal* 2007, 9, E353-E360.
- [164] Agilent, *Agilent Capillary Electrophoresis System, User's Manual*, <https://www.americaninstrument.com/pdf/2018Z-ELECTRO.pdf> 2000.
- [165] Fabritius, M., Staub, C., Mangin, P., Giroud, C., *Forensic Science International* 2012, 223, 114-118.
- [166] Heiger, D. N., *High performance capillary electrophoresis: an introduction : a primer*, Agilent Technologies 2000.
- [167] Yu, R. B., Quirino, J. P., *Molecules* 2019, 24, 1135.
- [168] Mather, G. G., Labroo, R., Le Guern, M. E., Lepage, F., Gillardin, J. M., Levy, R. H., *Chirality: The Pharmacological, Biological, and Chemical Consequences of Molecular Asymmetry* 2000, 12, 153-159.
- [169] Yanes, E., Gratz, S., Sutton, R., Stalcup, A., *Fresenius' journal of analytical chemistry* 2001, 369, 412-417.
- [170] Zhang, Q., Du, Y., Chen, J., Xu, G., Yu, T., Hua, X., Zhang, J., *Analytical and bioanalytical chemistry* 2014, 406, 1557-1566.
- [171] Yang, F., Du, Y., Chen, B., Fan, Q., Xu, G., *Chromatographia* 2010, 72, 489-493.
- [172] Hancu, G., Budău, M., Papp, L. A., Rusu, A., Mircia, E., *Indonesian Journal of Pharmacy* 2014, 25, 223.
- [173] Chou, Y. W., Huang, W. S., Ko, C. C., Chen, S. H., *Journal of separation science* 2008, 31, 845-852.
- [174] Wang, R., Jia, Z.-P., Chen, L.-R., Ge, X., Ma, J., Zhang, Q., Xie, H., Ao, Y., Wang, J., *Chromatographia* 2004, 59, 749-752.
- [175] Lee, S., Jung, S., *Carbohydrate research* 2003, 338, 1143-1146.
- [176] Kang, J., Kutscher, D., Montes-Bayón, M., Blanco-González, E., Sanz-Medel, A., *Electrophoresis* 2009, 30, 1774-1782.
- [177] Steed, J. W., Atwood, J. L., *Supramolecular chemistry*, John Wiley & Sons 2013.
- [178] Maralikova, B., Weinmann, W., *Journal of mass spectrometry* 2004, 39, 526-531.
- [179] Fodor, B., Molnár-Perl, I., *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2017, 95, 149-158.
- [180] Cardenia, V., Toschi, T. G., Scappini, S., Rubino, R. C., Rodriguez-Estrada, M. T., *Journal of food and drug analysis* 2018, 26, 1283-1292.
- [181] Foltz, R. L., McGinnis, K. M., Chinn, D. M., *Biomedical mass spectrometry* 1983, 10, 316-323.
- [182] Luo, Y. R., Yun, C., Lynch, K. L., *Journal of Analytical Toxicology* 2019, 43, 331-339.
- [183] Wieling, J., *Chromatographia* 2002, 55, S107-S113.
- [184] Lindholst, C., *Australian Journal of Forensic Sciences* 2010, 42, 181-190.
- [185] Christophersen, A. S., *Journal of Analytical Toxicology* 1986, 10, 129-131.
- [186] Okuda, I., Bingham, B., Stoney, P., Hawke, M., *The Journal of otolaryngology* 1991, 20, 212-215.

10. Παράρτημα

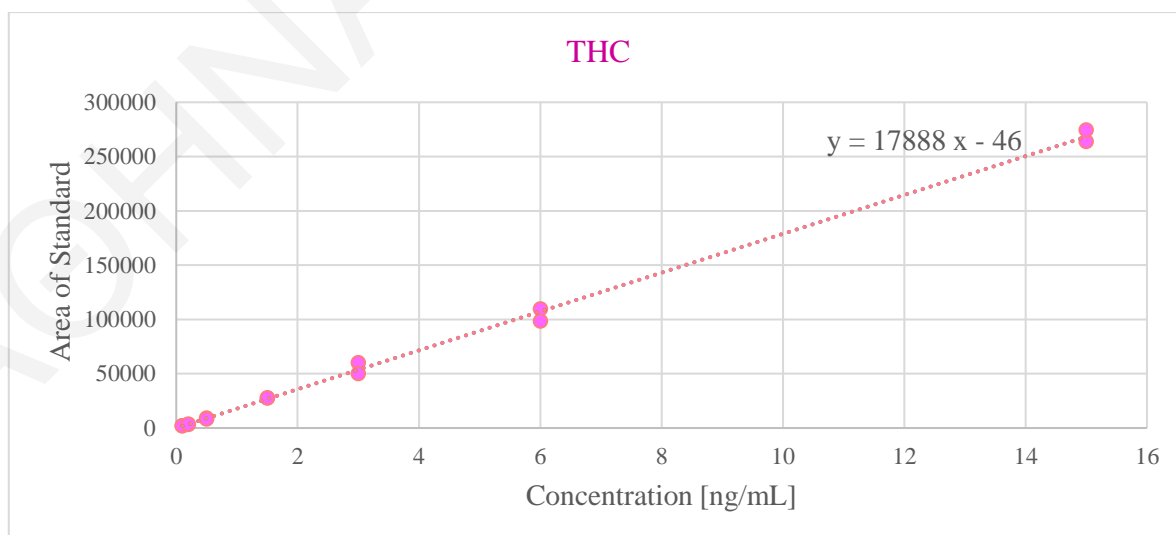
Συμπληρωματικά παρουσιάζονται σχήματα για την επεξήγηση του παράγοντα *Kaiser* και τις καμπύλες βαθμονόμησης που λήφθηκαν στην παρούσα διδακτορική έρευνα.



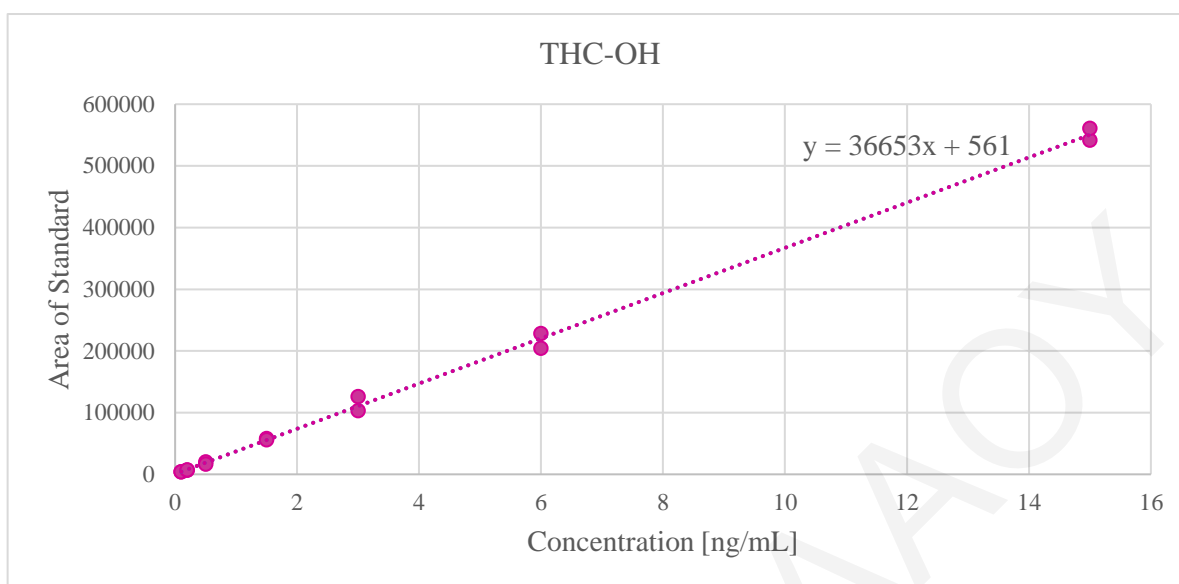
Σχήμα Π1. Γραφική αναπαράσταση των μεγεθών f και g που χρησιμοποιούνται κατά τον υπολογισμό του παράγοντα Kaiser.

Σχήμα Π2. Καμπύλες Βαθμονόμησης που λήφθηκαν χωρίς I.S., στην απουσία μήτρας, για όλα τα κανναβινοειδή που μελετήθηκαν σε αυτή την εργασία, i) THC, ii) THC-OH, iii) THC-COOH, iv) CBN και v) CBD.

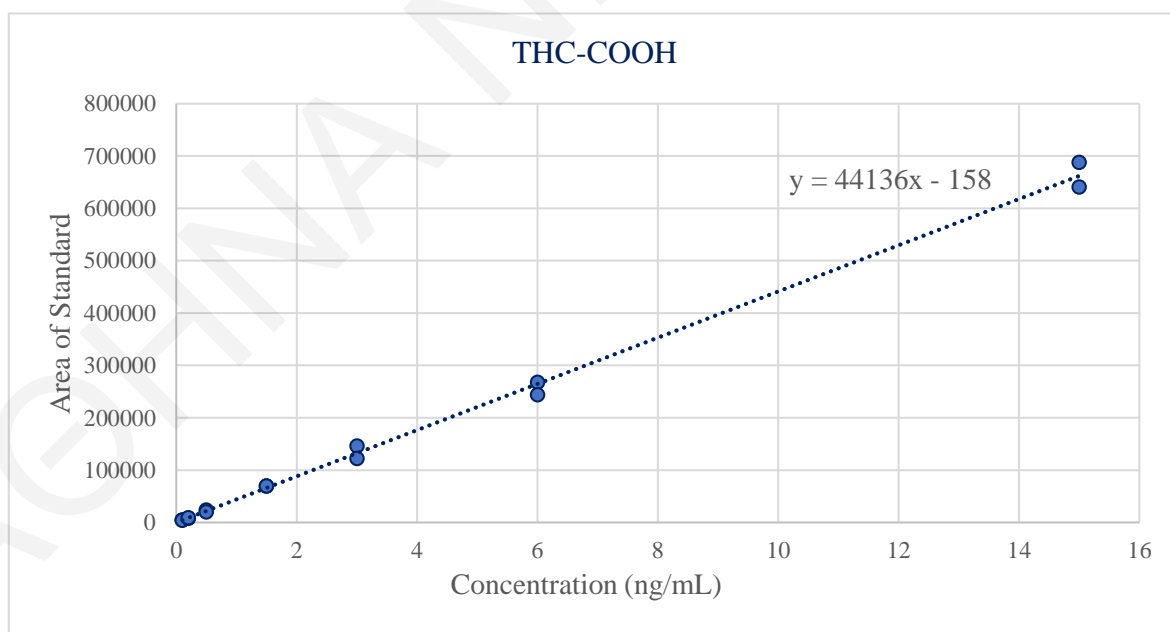
i) Καμπύλη βαθμονόμησης για την THC



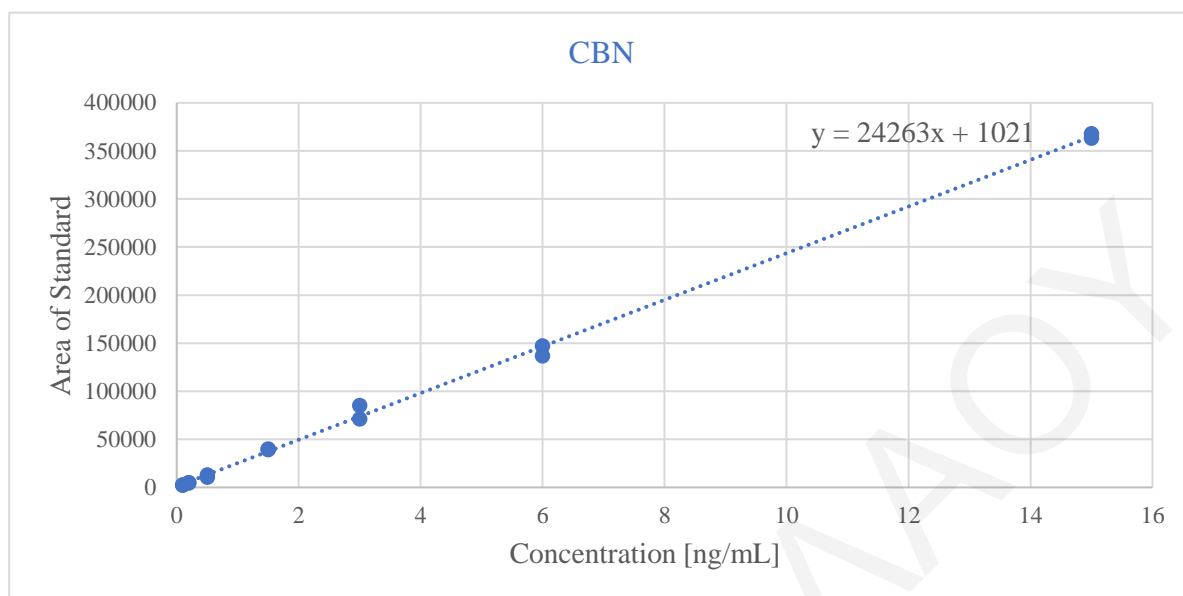
ii) Καμπύλη βαθμονόμησης για την THC-OH



iii) Καμπύλη βαθμονόμησης για την THC-COOH



iv) Καμπύλη βαθμονόμησης για την CBN



v) Καμπύλη βαθμονόμησης για την CBD

