ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΑΛΚΟΟΛΩΝ ΣΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΓΡΑ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ RAMAN. ΕΝΑ ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΟ ΑΛΚΟΤΕΣΤ.

Παναγιώτα Παπασπυριδάκου[1], Πηνελόπη Μουτζούρη[1], Χρίστος Κοντογιάννης[1,2] και Μαλβίνα Όρκουλα[1,*]
[1]Εργαστήριο Ενόργανης Ανάλυσης, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών
[2]ΙΤΕ/ΙΕΧΜΗ, Πάτρα
e-mail: malbie@upatras.gr

Περίληψη

Η ανίχνευση αλκοολών σε βιολογικά υγρά (σάλιο, ούρα, ορός αίματος) αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα σε περιπτώσεις χρήσης αλκοολούχων ποτών και ενδιαφέρει κλάδους όπως η τοξικολογία και η εγκληματολογική χημεία. Μέχρι σήμερα τέτοιου είδους μετρήσεις γίνονται με αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας η οποία εξασφαλίζει αξιοπιστία, είναι, όμως, χρονοβόρα, έχει μεγάλο κόστος και χρειάζεται εξειδικευμένο προσωπικό. Από την άλλη μεριά, εύκολες στη χρήση τεχνικές όπως αυτές που χρησιμοποιούνται στα αλκοτέστ δεν είναι αρκετά αξιόπιστες και συχνά αμφισβητούνται.

Στην παρούσα εργασία, η φασματοσκοπία Raman χρησιμοποιείται ως αναλυτικό εργαλείο για την ανίχνευση αλκοολών (αιθανόλης, μεθανόλης) σε ανθρώπινα βιολογικά υγρά (σάλιο, ούρα και ορός αίματος). Η φασματοσκοπία Raman είναι μια τεχνική που εφαρμόζεται στη μελέτη βιολογικών υγρών και έχει τη δυνατότητα και για in-situ εφαρμογή. Τελικός στόχος είναι η κατασκευή ενός μικρού και ευέλικτου συστήματος για τέτοιου είδους αναλύσεις, εύκολου στη χρήση από μη εξειδικευμένα άτομα.

Για το σκοπό αυτό, παρασκευάστηκαν και μελετήθηκαν μίγματα αλκοολών με σάλιο, ούρα και ορό αίματος που λήφθηκαν από υγιείς εθελοντές. Οι συγκεντρώσεις κυμαίνονταν από ελάχιστες τιμές έως τα όρια που επιφέρουν θάνατο. Η ανίχνευση των αλκοολών έγινε με ακρίβεια ενώ η ελάχιστη συγκέντρωσή τους που κατέστη δυνατό να μετρηθεί ήταν αρκετά χαμηλότερη από τα επίπεδα της μέθης (0.05%) και μάλιστα στα όρια της ευθυμίας και ελαφράς ζάλης (0.03%). Τέλος, βιολογικά υγρά λήφθησαν από εθελοντές μετά την κατανάλωση αλκοόλ. Η συγκέντρωση αιθανόλης που ανιχνεύθηκε στον ορό του αίματος ήταν σε πολύ καλή συμφωνία με αυτήν που προέβλεψε συσκευή αλκοτέστ.

Λέξεις-Κλειδιά: *Βιολογικά υγρά, αιθανόλη, μεθανόλη, αλκοτέστ, Raman spectroscopy.*

Abstract

Alcohol detection in biological fluids (saliva, urine, blood serum) is very important in cases of alcohol consumption and concerns mostly the scientific fields of toxicology and forensic chemistry. So far, alcohol determination was conducted by mass spectroscopy- gas chromatography (GC-MS), an accurate and precise technique which is also time consuming, expensive and requires expert personnel. On the other hand, low cost and simpler techniques, such as alcohol testing with breathalyzers, are not reliable, and often disputed.

In this project, Raman spectroscopy is used as an analytical tool for the detection of alcohol (ethanol and methanol) in human biological fluids. Raman spectroscopy is a technique that has been used for the study of biological fluids and has many in-situ applications. Final goal of this project is the construction of a small and handy equipment, simple enough to be conducted by non expert personnel.

Biological fluids (urine, blood serum and saliva) acquired by healthy volunteers and mixtures with alcohols (ethanol and methanol) were prepared. The concentrations of alcohol ranged from zero to the lethal alcohol dosage. Quantitative analysis was performed with accuracy and the minimum concentration detected was lower than the threshold for intoxication (0,05%) and found close to the limits for conviviality and dizziness (0,03%). Finally, in order to check the applicability of the proposed method in real conditions, biological fluids after alcohol consumption were collected from volunteers. The ethanol concentration detected in blood serum, was in accordance to the measured alcohol concentration of a breathalyzer.

Key words: *Biological fluids, ethanol, methanol, alcohol testing, Raman spectroscopy*

1.Εισαγωγή

Η αιθανόλη είναι μία χημική ουσία με μόνη αποδεκτή χρήση στη γενική ιατρική ως αντισηπτικό. Παρόλα αυτά, αποτελεί (όπως και η μεθανόλη σε περιπτώσεις νόθευσης) συστατικό των αλκοολούχων ποτών. Δρα ως κατασταλτικό του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ), και η περιεκτικότητα της στο αίμα έχει συσχετιστεί με κλιμακούμενες παρενέργειες στη συμπεριφορά και στη νηφαλιότητα του καταναλωτή βραχυπρόθεσμα, ενώ μακροπρόθεσμα συνδέεται με τη συνολική υγεία του (Pohorecky and Brick 1988). Σε περιεκτικότητα μικρότερη από 0,63μl/ml στο αίμα, η αιθανόλη δρα ως διεγερτικό του ΚΝΣ, προξενώντας ευφορία και ευθυμία στο άτομο. Περιεκτικότητα αιθανόλης μεταξύ 0,63-1.27μl/ml προκαλεί μείωση των αντανακλαστικών και της ικανότητας αντίληψης του ατόμου, η οποία επιδεινώνεται με αύξηση της προσληφθείσας ποσότητας αιθανόλης. Η μέθη προκαλείται από περιεκτικότητα αιθανόλης μεγαλύτερη των 3,8μl/ml στο αίμα , ενώ περιεκτικότητα άνω των 5,07μl/ml προκαλεί καταστολή του αναπνευστικού συστήματος και τελικά θάνατο (Pohorecky and Brick 1988).

Η κατανάλωση μεθανόλης είναι πιο επικίνδυνη για την υγεία καθώς ακόμα και σε χαμηλή περιεκτικότητα στο αίμα, μπορεί να προκαλέσει πιο έντονα προβλήματα σε σύγκριση με την αντίστοιχη σε αιθανόλη. Σε περιεκτικότητα 0,63μl/ml έχει σημειωθεί αιμοδιάλυση (Gonda, Gault et al. 1978) ενώ με την κατανάλωση μεθανόλης έχει συσχετιστεί και η νόσος Parkinson (Oliveras Ley and Galindo Gali 1983).

Οι μέθοδοι ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης του αλκοόλ στον άνθρωπο που χρησιμοποιούνται σήμερα είναι κυρίως τεχνικές αέριας χρωματογραφίας (GC) (Helander, Beck et al. 1996), αέριας χρωματογραφίας συζευγμένη με φασματοσκοπία μάζας (GC-MS) (Dahl, Stephanson et al. 2002), ενζυματικές μέθοδοι (Schwartz, O'Donnell et al. 1989, Dahl, Stephanson et al. 2002), τεχνικές ηλεκτροχημικής οξείδωσης (Gibb, Yee et al. 1984), η φασματοσκοπία υπερύθρου (IR) (Ridder, Hendee et al. 2005), και η απορρόφηση υπεριώδους (UV) (Gibb, Yee et al. 1984). Οι τεχνικές αυτές μετρούν άμεσα την περιεκτικότητα σε αιθανόλη ή την περιεκτικότητα στους μεταβολίτες της αιθυλο-γλυκουρονίδιο (EtG) και ακεταλδεΰδη (Gibb, Yee et

al. 1984, Helander, Beck et al. 1996, Dahl, Stephanson et al. 2002). Η τεχνικές της αέριας χρωματογραφίας (GC και GC-MS) είναι οι πιο ακριβείς και ευρέως χρησιμοποιούμενες για το σκοπό αυτό, αλλά είναι ιδιαίτερα χρονοβόρες, κοστοβόρες, και απαιτούν ειδικά εκπαιδευμένο προσωπικό. Οι υπόλοιπες τεχνικές στερούνται ακρίβειας, ταχύτητας και επαναληψιμότητας.

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της περιεκτικότητας σε αιθανόλη και μεθανόλη βιολογικών υγρών (ορός αίματος, ούρα, σάλιο) με χρήση της φασματοσκοπίας Raman, με απώτερο σκοπό την ανάπτυξη μίας νέας μεθοδολογίας που με ικανοποιητική ακρίβεια θα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένα εναλλακτικό αλκοτέστ για εργαστηριακές μετρήσεις ή ακόμα και on site.

2. Μεθοδολογία

2.1 Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων

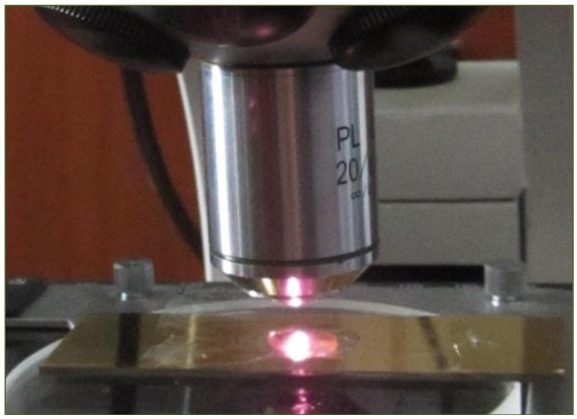
Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν ανθρώπινα βιολογικά υγρά στα οποία ανιχνεύεται το αλκοόλ. Δείγματα ούρων, σάλιου και ορού αίματος, απομονώθηκαν από υγιείς εθελοντές, που απείχαν από κατανάλωση οποιουδήποτε αλκοολούχου ποτού για τουλάχιστον 3 ημέρες. Η πρακτική λήψης των δειγμάτων αυτών ήταν σύμφωνη με τους κανόνες βιοηθικής και εγκεκριμένη από την επιτροπή Βιοηθικής του Πανεπιστημίου Πατρών. Η αιμοληψία έγινε στο Κέντρο Αιμοδοσίας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Πατρών και ο ορός απομονώθηκε με φυγοκέντρηση στις 3500RPM για 20min. Όλα τα βιολογικά υγρά αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία -20˚C αμέσως μετά τη λήψη τους.

Παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα με προσθήκες αιθανόλης και μεθανόλης σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν από 0,3μl/ml έως 5μl/ml, για την κατασκευή καμπυλών βαθμονόμησης. Στα δείγματα του σάλιου προστέθηκε πολυαιθυλενογλυκόλη σε περιεκτικότητα 1%. Όλες οι προσθήκες αλκοολών πραγματοποιήθηκαν λίγο πριν τη λήψη των φασμάτων Raman.

2.2 Συλλογή φασμάτων Raman

Η συλλογή των φασμάτων έγινε με φασματόμετρο Raman συζευγμένο με οπτικό μικροσκόπιο (InVia Raman Microscope, Renishaw, UK) και πηγή laser στα 785nm.

Τα δείγματα για τη μελέτη τοποθετούνταν σε γυάλινα πλακίδια υψηλής ανακλαστικότητας με επικάλυψη χρυσού (EMF Corporation, Ithaca, NY). Τα πλακίδια έφεραν κοιλότητα στο κέντρο τους για την απόθεση ποσότητας δείγματος (περίπου 30μl) η οποία στη συνέχεια καλυπτόταν με διαφανή μεμβράνη για να αποφευχθεί η εξάτμιση της αλκοόλης. Το υλικό κατασκευής της μεμβράνης που χρησιμοποιήθηκε δε εμφάνιζε ισχυρές κορυφές που να επικαλύπτονται με κορυφές του δείγματος. Το ίχνος του laser εστιαζόταν στο κέντρο της κοιλότητας και στην κυρίως μάζα του δείγματος. Κάθε φάσμα ήταν το άθροισμα 30 σαρώσεων, ενώ η έκθεση του δείγματος στην ακτινοβολία laser σε κάθε σάρωση, δεν ξεπερνούσε τα 10sec. Από κάθε δείγμα συλλέχθηκαν συνολικά 5 φάσματα.



Εικόνα 1 Λήψη φάσματος από δείγμα βιολογικού υγρού με φασματόμετρο micro-Raman. Διακρίνεται το ίχνος του laser στο κέντρο της κοιλότητας του δειγματοφορέα, καθώς και η μεμβράνη που επικαλύπτει το δείγμα.

2.3 Επεξεργασία φασμάτων

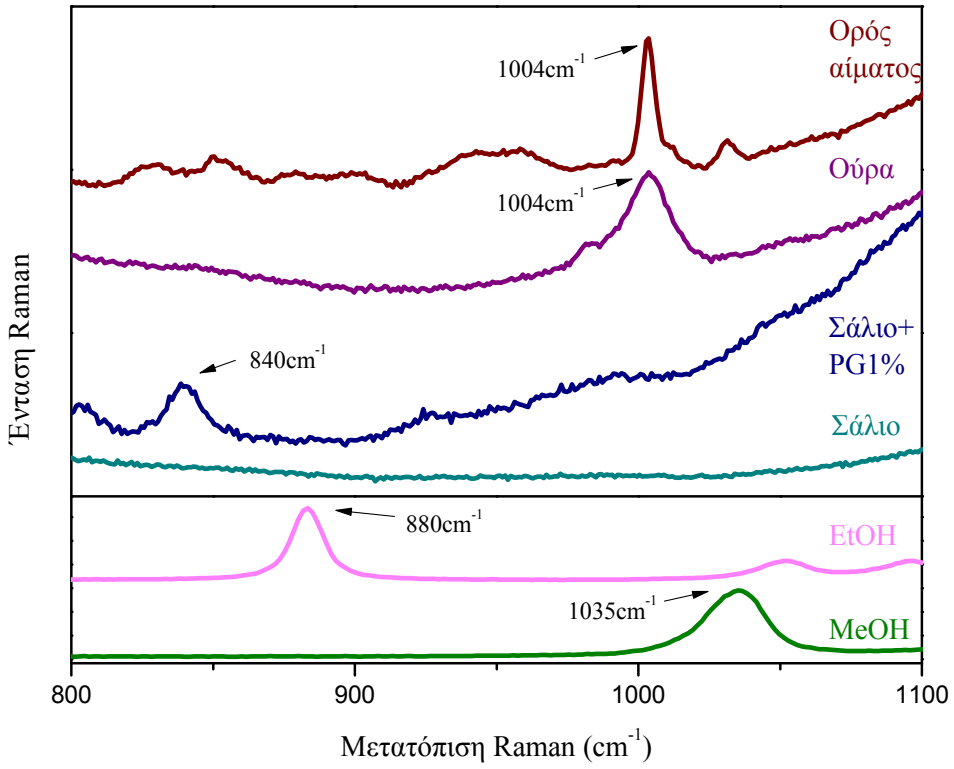
Στο γράφημα 1 εικονίζονται τα φάσματα Raman των προτύπων ουσιών (ορού αίματος, ούρων, σάλιου, αιθανόλης και μεθανόλης) και σημειώνονται οι χαρακτηριστικές κορυφές που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση. Τα ύψη των κορυφών αυτών, μετρήθηκαν στα φάσματα των μιγμάτων, μετά από αφαίρεση του υποβάθρου. Υπολογίστηκαν οι λόγοι των κορυφών και κατασκευάστηκαν οι καμπύλες βαθμονόμησης. Η επεξεργασία των φασμάτων έγινε με χρήση κατάλληλου λογισμικού (Microcal OriginPro8).

2.4 Ανάλυση βιολογικών υγρών εθελοντών

Για την επιβεβαίωση της αποτελεσματικότητας της μεθόδου που αναπτύχθηκε, υγιείς εθελοντές που προηγουμένως απείχαν από την κατανάλωση αλκοολούχου ποτού για 48hr, κατανάλωσαν συγκεκριμένη ποσότητα αλκοόλ (320ml αλκοολούχου ποτού 7,5%v/v) και στη συνέχεια συλλέχθηκαν δείγματα σάλιου, ούρων και ορού αίματος. Στο δείγμα του σάλιου πριν τη συλλογή του φάσματος Raman προστέθηκε PG σε περιεκτικότητα 1%. Τα φάσματα από τα δείγματα των εθελοντών συλλέχθηκαν στις ίδιες συνθήκες με αυτά των προτύπων δειγμάτων.

3.Αποτελέσματα

3.1 Φάσματα Raman από βιολογικά υγρά και αλκοόλες

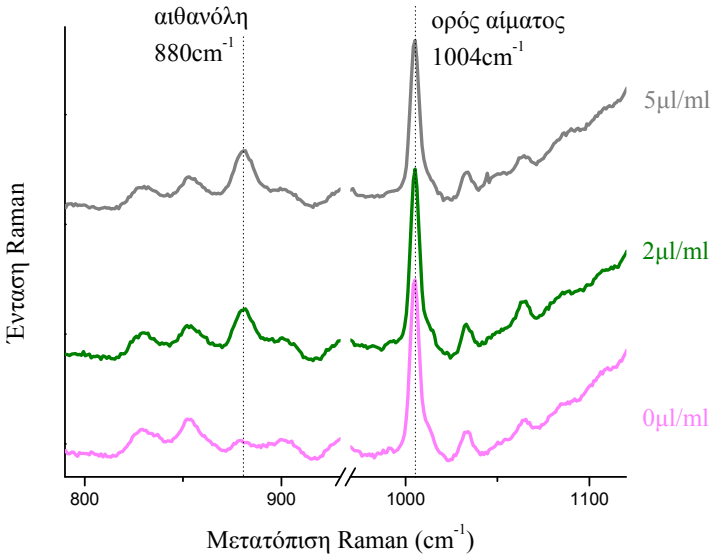


Γράφημα 1 Φάσματα Raman βιολογικών υγρών ορού αίματος, ούρων, σάλιου και σάλιου μετά την προσθήκη 1% PG, και των αλκοολών αιθανόλης και μεθανόλης.

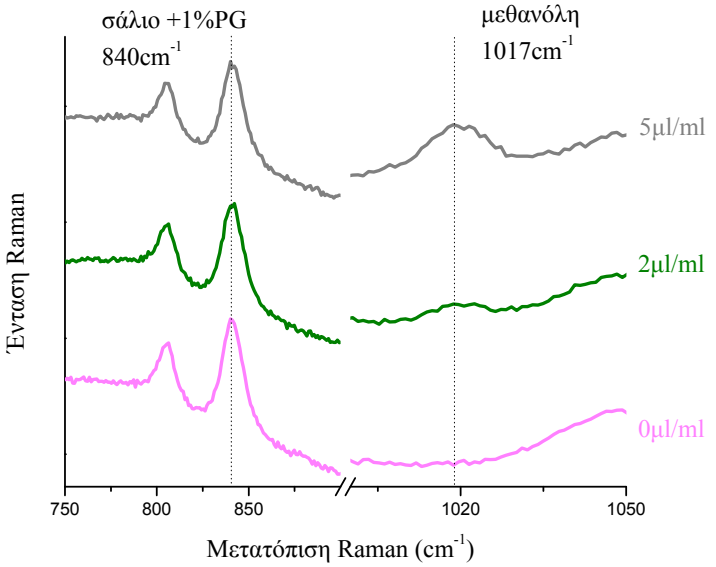
Το φάσμα του σάλιου δεν εμφάνιζε κάποια έντονη κορυφή. Για να καταστεί εφικτός ο υπολογισμός του λόγου του ύψους της κορυφής της αλκοόλης προς το ύψος της κορυφής του σάλιου, προστέθηκε σε όλα τα δείγματα σάλιου διάλυμα 1% προπυλενογλυκόλης (PG).

Για τα δείγματα με τα ούρα επιλέχθηκε για την ανάλυση η κορυφή στους 1004cm^{-1}, για τα δείγματα του σάλιου η κορυφή στους 840cm^{-1}, και για τον ορό του αίματος η κορυφή στους 1004cm^{-1}. Οι χαρακτηριστικές κορυφές της αιθανόλης και της μεθανόλης στα δείγματα βιολογικών υγρών εντοπίζονται στους 878 και 1017cm^{-1} αντίστοιχα (η καθαρή μεθανόλη εμφανίζει μία ισχυρή κορυφή στους 1035cm^{-1}, όμως στα διαλύματα με τα βιολογικά υγρά η κορυφή της μετατοπίζεται στους 1017cm^{-1}).

Ακολουθούν ενδεικτικά γραφήματα με τα φάσματα Raman πριν και μετά την προσθήκη αιθανόλης ή μεθανόλης στα βιολογικά υγρά.



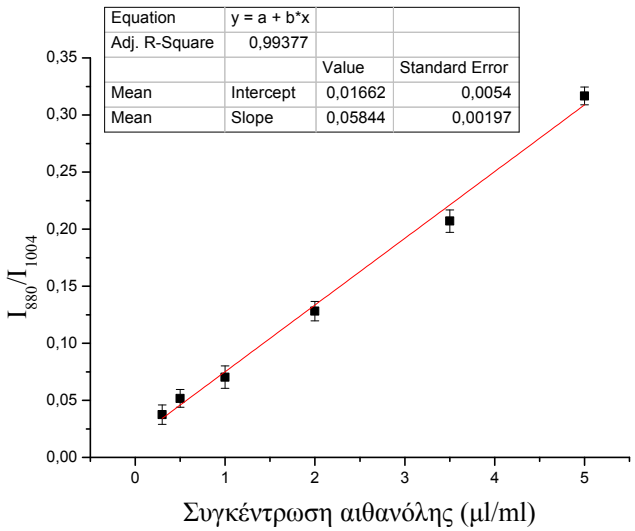
Γράφημα 2. Φάσματα Raman ορού αίματος πριν και μετά την προσθήκη αιθανόλης σε περιεκτικότητα 2μl/ml και 5μl/ml.



Γράφημα 3. Φάσματα Raman σάλιου πριν και μετά την προσθήκη μεθανόλης σε περιεκτικότητα 2μl/ml και 5μl/ml.

3.2 Καμπύλες βαθμονόμησης και όρια ανίχνευσης αιθανόλης και μεθανόλης στα βιολογικά υγρά

Από τα φάσματα Raman που συλλέχθηκαν για κάθε δείγμα, υπολογίστηκε ο λόγος του ύψους της κορυφής της αλκοόλης προς το ύψος της χαρακτηριστικής κορυφής του βιολογικού υγρού και κατασκευάστηκαν καμπύλες βαθμονόμησης για κάθε υγρό. Ενδεικτικά παρατίθεται η καμπύλη βαθμονόμησης για τα ούρα με προσθήκη αιθανόλης.



Γράφημα 4 Καμπύλες βαθμονόμησης για τα πρότυπα διαλύματα ούρων με προσθήκη αιθανόλης.

Στο δείγμα του ορού του αίματος με την αιθανόλη, η συγκέντρωση παύει να συνδέεται γραμμικά με το λόγο των υψών, σε συγκεντρώσεις άνω των 3μl/ml. Αυτό υποδεικνύει πιθανή αλληλεπίδραση μεταξύ της αιθανόλης και των συστατικών του ορού του αίματος. Η αλληλεπίδραση αυτή έχει σημειωθεί σε προηγούμενες μελέτες (Avdulov, Chochina et al. 1996, Daragan, Voloshin et al. 2000, Lin, Wei et al. 2004). Επομένως για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης της αιθανόλης στον ορό αίματος χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις έως 2μl/ml.

Όλες οι εξισώσεις που προέκυψαν από τις καμπύλες βαθμονόμησης παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα. Από τις εξισώσεις αυτές υπολογίστηκαν και τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της κάθε αλκοόλης για κάθε δείγμα (James N. Miller and Miller 2005).

Πίνακας 1 Εξισώσεις καμπυλών βαθμονόμησης των προτύπων διαλυμάτων βιολογικών υγρών μετά την προσθήκη αιθανόλης ή μεθανόλης, και όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ) για κάθε μίγμα.

		σάλιο1%PG	ούρα	ορός αίματος
EtOH	εξίσωση	y=0.119(±0.003)x+0.023(±0.009)	y=0.059(±0.002)x+0.016(±0.005)	y=0.108(±0.011)x+0.003(±0.007)
	LOD (μl/ml)	0.28	0.53	0.09
	LOQ (μl/ml)	0.85	1.60	0.26
MeOH	εξίσωση	y=0.085(±0.009)x-0.009(±0.032)	y =0.052(±0.005)x-0.017(±0.012)	y =0.023(±0.002)x+0.016(±0.005)
	LOD (μl/ml)	0.86	0.66	0.21
	LOQ (μl/ml)	2.58	1.97	0.64

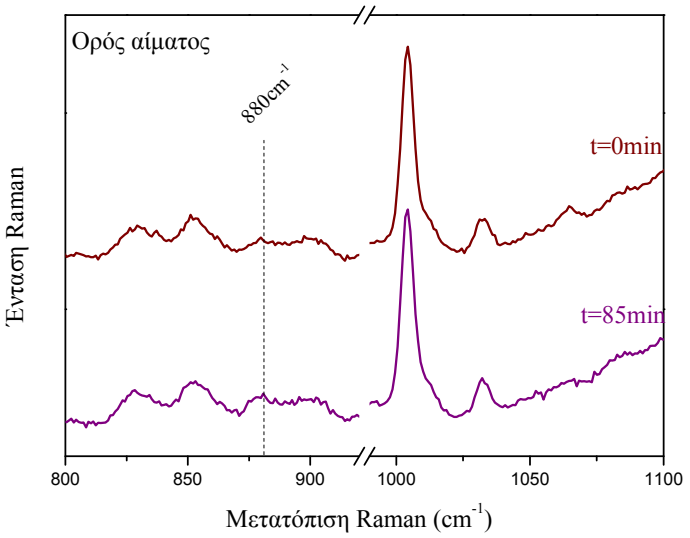
Τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της αιθανόλης για τον ορό του αίματος είναι αρκετά χαμηλότερα από τις περιεκτικότητες αιθανόλης που έχουν σημειωθεί πως προκαλούν ευθυμία (0,63μl/ml) ή μέθη (3,8μL/ml) (Pohorecky and Brick 1988). Στα δείγματα του σάλιου και των ούρων τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης είναι αυξημένα σε σύγκριση με αυτά του ορού του αίματος, με το όριο ανίχνευσης για την αιθανόλη στο σάλιο να υπολογίζεται στο 0,28μl/ml και στα ούρα να έχει σχεδόν τη διπλάσια τιμή (0,53μl/ml).

Όσον αφορά στη μεθανόλη, το χαμηλότερο όριο ανίχνευσης εντοπίζεται στο δείγμα του ορού του αίματος, με το όριο αυτό να είναι 4 και 3 φορές μεγαλύτερο για τα δείγματα του σάλιου και των ούρων αντίστοιχα. Όλα τα όρια ανίχνευσης που υπολογίστηκαν για τη μεθανόλη είναι σημαντικά μεγαλύτερα από αυτά της αιθανόλης στα αντίστοιχα δείγματα.

3.3 Υπολογισμός περιεκτικότητας αιθανόλης σε βιολογικά υγρά εθελοντών μετά την κατανάλωση αλκοολούχου ποτού

Μετά την κατασκευή των καμπυλών βαθμονόμησης και τον υπολογισμό των ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της αιθανόλης σε κάθε βιολογικό υγρό, ακολούθησε πείραμα με εθελοντές που κατανάλωσαν ποσότητα αλκοόλ (320ml οινοπνευματώδους ποτού περιεκτικότητας 7,5%v/v). Δείγματα των βιολογικών υγρών συλλέχθηκαν πριν (t=0min) και 85min μετά την κατανάλωση αλκοόλ. Αμέσως πριν την αιμοληψία από τον εθελοντή που είχε καταναλώσει αλκοόλ, μετρήθηκαν τα επίπεδα της αιθανόλης στο αίμα του με συσκευή μέτρησης αλκοόλ στην αναπνοή (JV digital alcohol tester). Η περιεκτικότητα της αιθανόλης βρέθηκε 0,2μl/ml.

Ενδεικτικά παρατίθενται τα φάσματα που συλλέχθηκαν από το δείγμα του ορού αίματος πριν και μετά την κατανάλωση αλκοολούχου ποτού από εθελοντή:



Γράφημα 5 Φάσματα Raman ορού αίματος εθελοντή πριν (t=0min) και μετά (t=85min) την κατανάλωση αλκοόλ.

Στα φάσματα που συλλέχθηκαν από τα δείγματα των εθελοντών που κατανάλωσαν αλκοολούχο ποτό, υπολογίστηκαν οι λόγοι των υψών της κορυφής της αιθανόλης προς την κορυφή του κάθε βιολογικού υγρού, εφαρμόστηκαν οι αντίστοιχες εξισώσεις και υπολογίστηκε η συγκέντρωση αιθανόλης σε κάθε περίπτωση. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα 2.

Πίνακας 2. Υπολογισμός συγκέντρωσης αιθανόλης στα βιολογικά υγρά εθελοντών μετά την κατανάλωση αλκοόλ.

Βιολογικό υγρό	Περιεκτικότητα αιθανόλης (μl/ml)
Ορός αίματος	0.24
Σάλιο	0.88
Ούρα	0.27

Η περιεκτικότητα της αιθανόλης στον ορό του αίματος, βρέθηκε 0,24μl/ml, και είναι σε καλή συμφωνία με την τιμή που μετρήθηκε με τη συσκευή μέτρησης αλκοόλ στην αναπνοή του εθελοντή (0,2μl/ml), αλλά τα αποτελέσματα από τα δείγματα του σάλιου και των ούρων αποκλίνουν. Αυτό οφείλεται αφενός στο γεγονός ότι τα υγρά προέρχονται από διαφορετικούς δότες, αφετέρου στο ότι η τιμή που δίνει η συσκευή αναπνοής αντιστοιχεί στη συγκέντρωση της αιθανόλης στο αίμα. Επομένως, για το σάλιο και τα ούρα πρακτικά δεν υπάρχει μέτρο σύγκρισης. Είναι όμως σημαντικό το γεγονός ότι η αιθανόλη ανιχνεύθηκε με την τεχνική Raman και στα δύο βιολογικά υγρά μετά από μικρή κατανάλωση αλκοόλ, ενώ παράλληλα οι τιμές βρίσκονται πάνω από τα όρια ποσοτικοποίησης.

4.Συμπεράσματα

Η αναλυτική μεθοδολογία που αναπτύχθηκε στην παρούσα εργασία στηρίζεται στην τεχνική της φασματοσκοπίας Raman για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση της αιθανόλης και της μεθανόλης σε δείγματα βιολογικών υγρών (ορός του αίματος, σάλιο και ούρα). Παρασκευάστηκαν δυαδικά μίγματα βιολογικού υγρού-αιθανόλης και βιολογικού υγρού-μεθανόλης, και από την επεξεργασία των φασμάτων Raman που συλλέχθηκαν, κατασκευάστηκαν οι αντίστοιχες καμπύλες βαθμονόμησης.

Για κάθε βιολογικό υγρό υπολογίστηκαν τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης. Για τον ορό αίματος το όριο ποσοτικοποίησης είναι κάτω από την καταγεγραμμένη τιμή αιθανόλης στο αίμα που προκαλεί ευφορία, ενώ για τα άλλα δύο δείγματα βιολογικών υγρών, τα όρια ανίχνευσης βρίσκονται κάτω από την καταγεγραμμένη τιμή αιθανόλης στο αίμα που προκαλεί ευφορία και τα όρια ποσοτικοποίησης είναι κάτω από την καταγεγραμμένη τιμή της αιθανόλης στο αίμα που προκαλεί μέθη.

Όσον αφορά στη μεθανόλη, τα όρια ανίχνευσης και στα τρία βιολογικά υγρά βρέθηκαν υψηλότερα από αυτά της αιθανόλης. Ειδικότερα, το όριο ανίχνευσης για τον ορό του αίματος βρέθηκε χαμηλότερο από την τιμή της μεθανόλης στο αίμα που προκαλεί αιμοδιάλυση. Στα άλλα δύο δείγματα το όριο ανίχνευσης είναι υψηλότερο. Τα όρια αυτά μπορούν να βελτιωθούν με χρήση laser μεγαλύτερης έντασης.

Η προτεινόμενη μεθοδολογία επιβεβαιώθηκε με τη μελέτη βιολογικών υγρών εθελοντών μετά την κατανάλωση αλκοολούχου ποτού. Συγκεκριμένα η αιθανόλη ανιχνεύθηκε με επιτυχία και στα τρία βιολογικά υγρά (ορός αίματος, σάλιο και ούρα) και η περιεκτικότητα της στον ορό του αίματος βρέθηκε σε καλή συμφωνία με την τιμή που καταγράφηκε από συσκευή μέτρησης αιθανόλης στην αναπνοή. Στα δείγματα του σάλιου και των ούρων οι τιμές που υπολογίστηκαν βρέθηκαν υψηλότερες από αυτές στον ορό του αίματος, κάτι που αποδίδεται στο μεταβολισμό της αιθανόλης και στη διαφορετική φύση των δειγμάτων. Οι τιμές αυτές ωστόσο, βρέθηκαν πάνω από τα όρια ποσοτικοποίησης, γεγονός που υποδεικνύει την ακρίβεια των αποτελεσμάτων.

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε στην παρούσα εργασία έχει καλή επαναληψιμότητα και είναι ικανή να προσδιορίσει ποιοτικά και ποσοτικά την περιεκτικότητα σε αιθανόλη και μεθανόλη βιολογικών υγρών όπως ούρα, σάλιο και ορός αίματος. Σημαντικό πλεονέκτημά της είναι η ευκολία συλλογής των φασμάτων, χαρακτηριστικό που δείχνει ότι μπορεί να εφαρμοστεί από μη εξειδικευμένο προσωπικό. Το σύστημα Raman που χρησιμοποιήθηκε στην εργασία αυτή είναι

σταθερό, αλλά με τη σύγχρονη τεχνολογία και τα ήδη υπάρχοντα στην κυκλοφορία φορητά όργανα Raman είναι εφικτή η μελλοντική εφαρμογή αυτής της μεθοδολογίας εκτός εργαστηρίου (on site).

Εν κατακλείδι, η προτεινόμενη μεθοδολογία είναι μία εναλλακτική πρόταση για την ανίχνευση αλκοολών σε βιολογικά υγρά ώστε να προσπεραστούν τα προβλήματα των τεχνικών που χρησιμοποιούνται αυτή τη στιγμή (όπως το υψηλό κόστος σε χρόνο και χρήμα και η ανάγκη εξειδικευμένου προσωπικού για την διεξαγωγή τους).

5.Βιβλιογραφία

Avdulov, N. A., S. V. Chochina, V. A. Daragan, F. Schroeder, K. H. Mayo and W. G. Wood (1996). "Direct binding of ethanol to bovine serum albumin: a fluorescent and 13C NMR multiplet relaxation study." Biochemistry **35**(1): 340-347.

Dahl, H., N. Stephanson, O. Beck and A. Helander (2002). "Comparison of Urinary Excretion Characteristics of Ethanol and Ethyl Glucuronide." Journal of Analytical Toxicology **26**(4): 201-204.

Daragan, V. A., A. M. Voloshin, S. V. Chochina, T. N. Khazanovich, W. G. Wood, N. A. Avdulov and K. H. Mayo (2000). "Specific Binding of Ethanol to Cholesterol in Organic Solvents." Biophysical Journal **79**(1): 406-415.

Gibb, K. A., A. S. Yee, C. C. Johnston, S. D. Martin and R. M. Nowak (1984). "Accuracy and usefulness of a breath alcohol analyzer." Annals of Emergency Medicine **13**(7): 516-520.

Gonda, A., H. Gault, D. Churchill and D. Hollomby (1978). "Hemodialysis for methanol intoxication." The American Journal of Medicine **64**(5): 749-758.

Helander, A., O. Beck and A. W. Jones (1996). "Laboratory testing for recent alcohol consumption: comparison of ethanol, methanol, and 5-hydroxytryptophol." Clinical Chemistry **42**(4): 618-624.

James N. Miller and J. C. Miller (2005). Calibration methods: regression and correlation. Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry, Pearson Education Limited. **1:** 107-147.

Lin, S.-Y., Y.-S. Wei, M.-J. Li and S.-L. Wang (2004). "Effect of ethanol or/and captopril on the secondary structure of human serum albumin before and after protein binding." European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics **57**(3): 457-464.

Oliveras Ley, C. and F. Galindo Gali (1983). "Parkinsonian Syndrome after Methanol Intoxication." European Neurology **22**(6): 405-409.

Pohorecky, L. A. and J. Brick (1988). "Pharmacology of ethanol." Pharmacology & Therapeutics **36**(2): 335-427.

Ridder, T. D., S. P. Hendee and C. D. Brown (2005). "Noninvasive alcohol testing using diffuse reflectance near-infrared spectroscopy." Applied spectroscopy **59**(2): 181-189.

Schwartz, R. H., R. M. O'Donnell, M. M. Thorne, P. R. Getson and J. M. Hicks (1989). "Evaluation of colorimetric dipstick test to detect alcohol in saliva: A pilot study." Annals of Emergency Medicine **18**(9): 1001-1003.