



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**AMİNLERDEN OLUŞTURULAN İYON ÇİFTLERİNİN
EKSTRAKSİYONU VE AMİN SINIFI ANTİDEPRESANLAR
VE UYARICILARIN EKSTRAKTİF
SPEKTROFOTOMETRİK MİKTAR TAYİNİ**

Gülseren SARIOĞLU

**Kimya Anabilim Dalı
Analitik Kimya Programı**

**Danışman
Prof.Dr. Reşat APAK**

Ocak, 2009

İSTANBUL

Bu çalışma 13/02/2009 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı Analitik Kimya programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi



Prof. Dr. Reşat APAK (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi



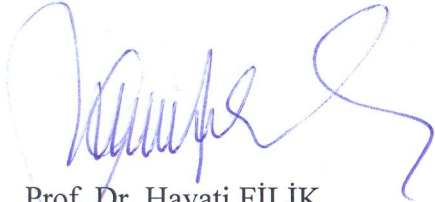
Prof. Dr. Hüseyin AFŞAR
Yıldız Teknik Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi



Prof. Dr. Esmâ TÜTEM
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi



Prof. Dr. İzzet TOR
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi



Prof. Dr. Hayati FİLİK
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin T-1051/09072007 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimim boyunca birikimlerini benimle paylaşan ve olumlu düşünceleriyle beni teşviklendiren, bilgi ve yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım Prof. Dr. Reşat Apak'a, tanıdığı imkan ve desteğinden dolayı Doç. Dr. Erol Erçağ'a, çalışmalarım süresince her zaman desteğini hissettiğim ve göstermiş olduğu hoşgörü ve yardımlarından dolayı Ar. Gör. Ayşem Arda'ya, aynı süre boyunca desteklerini esirgemeyen Doç. Dr. Kevser Sözgen Başkan'a, daima yanımda olan grup arkadaşım Şule Eren'e ve diğer tüm arkadaşlarıma, ismini saymadığım sevgili hocalarıma ve hayatım boyunca maddi manevi desteklerini benden esirgemeyen değerli aileme en içten dileklerle teşekkür ederim.

Tezimle aynı ismi taşıyan T-1051/09072007 sayılı projeme maddi destek sağlayan İ.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Yürütücü Sekreterliği'ne, yüksek lisans eğitimim boyunca çalışmalarımı sürdürdüğüm Analitik Kimya Anabilim Dalı kürsüsüne ve bu kürsüde bulunan herkese teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamda kullandığım MDMA örneği için Adalet Bakanlığı Adli Tıp Kurumu Kimya İhtisas Dairesi Başkanı Yüksek Kimya Mühendisi Faruk Biçer'e, fluoksetin örneği için Deva İlaç A.Ş.'ye, sibutramin örneği için İstanbul Gıda İhtisas Gümrük Laboratuvarı'na, desteklerinden dolayı Ankara Kriminal Polis Laboratuvarı Kimyasal İncelemeler Şube Müdürlüğü'nden Emniyet Amiri Taner Bora'ya ve tüm bu bağlantıları etkin biçimde sağlayan sevgili hocam Doç. Dr. Erol Erçağ'a teşekkür ederim.

OCAK, 2009

Gülseren SARIOĞLU

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	İ
İÇİNDEKİLER.....	İİ
ŞEKİL LİSTESİ.....	V
TABLO LİSTESİ.....	Vİİ
SEMBOL LİSTESİ.....	İX
ÖZET.....	X
SUMMARY.....	Xİ
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR	3
2.1. UYUŞTURUCU MADDELER	3
2.1.1. Amfetaminler	5
2.1.2. Ecstasy (MDMA).....	6
2.1.3. 3,4-Metilendioksiamfetamin (MDA).....	9
2.1.4. Antidepresanlar.....	9
2.1.4.1. Fluoksetin.....	10
2.1.5. Sibutramin.....	10
2.2. UYUŞTURUCU MADDELER İÇİN KULLANILAN ANALİZ YÖNTEMLERİ..	11
2.2.1. Renk Testleri	11
2.2.2. Mikrokristal Testler	12
2.2.3. UV ve Görünür Bölge Spektrofotometrisi.....	12
2.2.3.1. Salisilaldehit Reaksiyonu	12
2.2.3.2. Diazolandırma Reaksiyonu	12
2.2.3.3. 9-Kloroakridin Reaksiyonu	13
2.2.3.4. Ditiyokarbamat Reaksiyonu	13
2.2.3.5. Akonitik Anhidrit Reaksiyonu.....	13
2.2.3.6. Kloranil Reaksiyonu	13
2.2.3.7. Tetrasiyonoetilen Reaksiyonu.....	13
2.2.3.8. Pikrik Asit Reaksiyonu.....	14
2.2.3.9. Sinnamik Anhidrit Reaksiyonu.....	14
2.2.3.10. 2,4-Dinitrofloro Benzen Reaksiyonu	14
2.2.3.11. 1,2-Naphtokinon-4-sulfonat (NQS) ile Reaksiyon.....	14

2.2.4. IR ve Raman Spektrometrisi	14
2.2.5. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)	15
2.2.6. Gaz Kromatografisi (GC)	15
2.2.7. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	16
2.2.8. Radyoizotopik Metotlar	18
2.3. LİTERATÜRDEKİ AMFETAMİNLER, FLUOKSETİN VE SİBUTRAMİN MADDELERİ İLE İLGİLİ ANALİZLER	18
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	25
3.1. KULLANILAN CİHAZLAR.....	25
3.2. KİMYASAL MADDELER.....	25
3.2.1. Çözeltilerin Hazırlanması	26
3.3. UYGULANAN YÖNTEMLER.....	27
3.3.1. Ekstraktif-Spektrofotometrik Yöntem	27
3.3.2. Kromatografik Yöntem.....	29
3.3.2.1. HPLC Analizi	29
4. BULGULAR.....	30
4.1. MDMA, MDA, FLUOKSETİN VE SİBUTRAMİN STANDARTLARI KULLANILARAK EKSTRAKTİF-SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEMİN OPTİMİZASYONU.....	30
4.1.1. Ekstraksiyon İçin Uygun Organik Çözücü Seçimi	30
4.1.2. Kullanılan Tampon Çözeltilerin Seçimi	30
4.1.3. Optimum Çalışma pH'ının Belirlenmesi	31
4.1.3.1. Erio-T Reaktifi İle MDMA, MDA, Fluoksetin ve Sibutramin Tayini İçin Optimum pH Tespiti	31
4.1.3.2. BCP Reaktifi İle MDMA, MDA, Fluoksetin ve Sibutramin Tayini İçin Optimum pH Tespiti	35
4.1.3.3. Metil Oranj Reaktifi İle MDMA, MDA, Fluoksetin ve Sibutramin Tayini İçin Optimum pH Tespiti.....	39
4.1.4. Reaktif Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	43
4.2. EKSTRAKTİF-SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEMİN MDMA, MDA, FLUOKSETİN VE SİBUTRAMİN STANDARTLARINA UYGULANMASI	47
4.3. HPLC YÖNTEMİNİN MDMA, MDA, FLUOKSETİN VE SİBUTRAMİN STANDARTLARINA UYGULANMASI	63
4.4. GELİŞTİRİLEN YÖNTEM İLE MDMA, FLUOKSETİN, SİBUTRAMİN TAYİNİNDE İNTERFERANS ANALİZİ	66
4.5. MDMA-MDA SENTETİK KARIŞIMLARINA GELİŞTİRİLEN YÖNTEMİN UYGULANMASI.....	69

4.6. ECSTASY, PROZAC VE LİDA TİCARİ İLAÇLARINDA GELİŞTİRİLEN YÖNTEM İLE STANDART KATKI ÇALIŞMASI.....	71
4.7. ECSTASY, PROZAC VE LİDA TİCARİ İLAÇLARINDA HPLC YÖNTEMİ İLE STANDART KATKI ÇALIŞMASI	76
4.8. EKSTRAKTİF-SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEM İLE HPLC YÖNTEMİNİN KIYASLANMASI.....	78
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	81
KAYNAKLAR.....	86
ÖZGEÇMİŞ	92

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1: Uyuşturucu maddelerin sınıflandırılması.....	4
Şekil 2.2: Amfetamin ve metamfetamin'in kimyasal yapısı.....	5
Şekil 2.3: Bazı amfetamin türevlerinin kimyasal yapısı.....	6
Şekil 2.4: Farklı şekil ve markalarda ecstasy tabletler.	8
Şekil 2.5: Fluoksetin'in kimyasal yapısı.....	10
Şekil 2.6: Sibutramin'in kimyasal yapısı.....	10
Şekil 3.1: Anyonik boyaların ve katyonik amin yapılı uyarıcıların kimyasal yapıları... 28	
Şekil 4.1: Erio-T reaktifi ile MDMA tayini için pH değişiminin incelenmesi.	32
Şekil 4.2: Erio-T reaktifi ile MDA tayini için pH değişiminin incelenmesi.....	33
Şekil 4.3: Erio-T reaktifi ile fluoksetin tayini için pH değişiminin incelenmesi.	34
Şekil 4.4: Erio-T reaktifi ile sibutramin tayini için pH değişiminin incelenmesi.	35
Şekil 4.5: BCP reaktifi ile MDMA tayini için pH değişiminin incelenmesi.	36
Şekil 4.6: BCP reaktifi ile MDA tayini için pH değişiminin incelenmesi.	37
Şekil 4.7: BCP reaktifi ile fluoksetin tayini için pH değişiminin incelenmesi.	38
Şekil 4.8: BCP reaktifi ile sibutramin tayini için pH değişiminin incelenmesi.	39
Şekil 4.9: Metil oranj reaktifi ile MDMA tayini için pH değişiminin incelenmesi.	40
Şekil 4.10: Metil oranj reaktifi ile MDA tayini için pH değişiminin incelenmesi.....	41
Şekil 4.11: Metil oranj reaktifi ile fluoksetin tayini için pH değişiminin incelenmesi. .	42
Şekil 4.12: Metil oranj reaktifi ile sibutramin tayini için pH değişiminin incelenmesi.	43
Şekil 4.13: MDMA'nın ve referans çözeltilerinin distile suya karşı absorbanslarının artan erio-T konsantrasyonuna göre değişimi.	44
Şekil 4.14: MDMA'nın ve referans çözeltilerinin distile suya karşı absorbanslarının artan BCP konsantrasyonuna göre değişimi.	45
Şekil 4.15: MDMA'nın ve referans çözeltilerinin distile suya karşı absorbanslarının artan metil oranj konsantrasyonuna göre değişimi.....	46
Şekil 4.16: MDMA örneklerinde erio-T reaktifi ile elde edilen spektrumlar.....	48
Şekil 4.17: MDA örneklerinde erio-T reaktifi ile elde edilen spektrumlar.	49

Şekil 4.18: Fluoksetin örneklerinde erio-T reaktifi ile elde edilen spektrumlar.	50
Şekil 4.19: Sibutramin örneklerinde erio-T reaktifi ile elde edilen spektrumlar.	51
Şekil 4.20: MDMA örneklerinde BCP reaktifi ile elde edilen spektrumlar.	52
Şekil 4.21: MDA örneklerinde BCP reaktifi ile elde edilen spektrumlar.....	53
Şekil 4.22: Fluoksetin örneklerinde BCP reaktifi ile elde edilen spektrumlar.	54
Şekil 4.23: Sibutramin örneklerinde BCP reaktifi ile elde edilen spektrumlar.....	55
Şekil 4.24: MDMA örneklerinde metil oranj reaktifi ile elde edilen spektrumlar.....	56
Şekil 4.25: MDA örneklerinde metil oranj reaktifi ile elde edilen spektrumlar.	57
Şekil 4.26: Fluoksetin örneklerinde metil oranj reaktifi ile elde edilen spektrumlar.	58
Şekil 4.27: Sibutramin örneklerinde metil oranj reaktifi ile elde edilen spektrumlar. ...	59
Şekil 4.28: MDMA standart maddesinin kromatogramı.	63
Şekil 4.29: MDA standart maddesinin kromatogramı.....	63
Şekil 4.30: Fluoksetin standart maddesinin kromatogramı.	64
Şekil 4.31: Sibutramin standart maddesinin kromatogramı.....	64
Şekil 4.32: MDMA, MDA, fluoksetin ve sibutraminden oluşan sentetik karışımın kromatogramı.	65
Şekil 4.33: MDMA kromatogramı.	68
Şekil 4.34: MDMA + kafein kromatogramı.	68
Şekil 4.35: MDMA ile MDMA+kafein kromatogramlarının karşılaştırılması ile elde edilen kromatogram.	68
Şekil 4.36: Erio-T reaktifi ile ecstasy örneğinde standart katkı çalışması.....	72
Şekil 4.37: Erio-T reaktifi ile prozac örneğinde standart katkı çalışması.....	72
Şekil 4.38: Erio-T reaktifi ile lida örneğinde standart katkı çalışması.	73
Şekil 4.39: BCP reaktifi ile ecstasy örneğinde standart katkı çalışması.....	73
Şekil 4.40: BCP reaktifi ile prozac örneğinde standart katkı çalışması.	74
Şekil 4.41: BCP reaktifi ile lida örneğinde standart katkı çalışması.	74
Şekil 4.42: Metil oranj reaktifi ile ecstasy örneğinde standart katkı çalışması.....	75
Şekil 4.43: Metil oranj reaktifi ile prozac örneğinde standart katkı çalışması.....	75
Şekil 4.44: Metil oranj reaktifi ile lida örneğinde standart katkı çalışması.	76
Şekil 4.45: HPLC yöntemiyle ecstasy tablet için standart katkı çalışması.....	77
Şekil 4.46: HPLC yöntemiyle prozac kapsül için standart katkı çalışması.	77
Şekil 4.47: HPLC yöntemiyle lida kapsül için standart katkı çalışması.....	78

TABLO LİSTESİ

Tablo 4.1: Erio-T reaktifi ile MDMA tayininde pH-absorbans değişimi.	31
Tablo 4.2: Erio-T reaktifi ile MDA tayininde pH-absorbans değişimi.	32
Tablo 4.3: Erio-T reaktifi ile fluoksetin tayininde pH-absorbans değişimi.	33
Tablo 4.4: Erio-T reaktifi ile sibutramin tayininde pH-absorbans değişimi.	34
Tablo 4.5: BCP reaktifi ile MDMA tayininde pH-absorbans değişimi.	35
Tablo 4.6: BCP reaktifi ile MDA tayininde pH-absorbans değişimi.	36
Tablo 4.7: BCP reaktifi ile fluoksetin tayininde pH-absorbans değişimi.	37
Tablo 4.8: BCP reaktifi ile sibutramin tayininde pH-absorbans değişimi.	38
Tablo 4.9: Metil oranj reaktifi ile MDMA tayininde pH-absorbans değişimi.	39
Tablo 4.10: Metil oranj reaktifi ile MDA tayininde pH-absorbans değişimi.	40
Tablo 4.11: Metil oranj reaktifi ile fluoksetin tayininde pH-absorbans değişimi.	41
Tablo 4.12: Metil oranj reaktifi ile sibutramin tayininde pH-absorbans değişimi.	42
Tablo 4.13: Erio-T konsantrasyonuna göre örnek ve referans çözeltilerin absorbans değişimi.	44
Tablo 4.14: BCP konsantrasyonuna göre örnek ve referans çözeltilerin absorbans değişimi.	45
Tablo 4.15: Metil oranj konsantrasyonuna göre örnek ve referans çözeltilerin absorbans değişimi.	46
Tablo 4.16: Erio-T reaktifi ile MDMA tayininde elde edilen absorbanslar.	48
Tablo 4.17: Erio-T reaktifi ile MDA tayininde elde edilen absorbanslar.	49
Tablo 4.18: Erio-T reaktifi ile fluoksetin tayininde elde edilen absorbanslar.	50
Tablo 4.19: Erio-T reaktifi ile sibutramin tayininde elde edilen absorbanslar.	51
Tablo 4.20: BCP reaktifi ile MDMA tayininde elde edilen absorbanslar.	52
Tablo 4.21: BCP reaktifi ile MDA tayininde elde edilen absorbanslar.	53
Tablo 4.22: BCP reaktifi ile fluoksetin tayininde elde edilen absorbanslar.	54
Tablo 4.23: BCP reaktifi ile sibutramin tayininde elde edilen absorbanslar.	55
Tablo 4.24: Metil oranj reaktifi ile MDMA tayininde elde edilen absorbanslar.	56

Tablo 4.25: Metil oranj reaktifi ile MDA tayininde elde edilen absorbanlar.	57
Tablo 4.26: Metil oranj reaktifi ile fluoksetin tayininde elde edilen absorbanlar.	58
Tablo 4.27: Metil oranj reaktifi ile sibutramin tayininde elde edilen absorbanlar.	59
Tablo 4.28: Erio-T reaktifi ile uyarıcı aminlerin tayininde elde edilen sonuçlar.	60
Tablo 4.29: BCP reaktifi ile uyarıcı aminlerin tayininde elde edilen sonuçlar.	61
Tablo 4.30: Metil oranj reaktifi ile uyarıcı aminlerin tayininde elde edilen sonuçlar. ...	62
Tablo 4.31: MDMA, MDA, fluoksetin ve sibutramin için HPLC verileri.	65
Tablo 4.32: MDMA için interferans analizi.	66
Tablo 4.33: Fluoksetin için interferans analizi.	67
Tablo 4.34: Sibutramin için interferans analizi.	67
Tablo 4.35: MDMA-MDA sentetik karışımlarında erio-T reaktifi kullanılarak elde edilen absorban toplamsallığı.	69
Tablo 4.36: MDMA-MDA sentetik karışımlarında BCP reaktifi kullanılarak elde edilen absorban toplamsallığı.	70
Tablo 4.37: MDMA-MDA sentetik karışımlarında metil oranj reaktifi kullanılarak elde edilen absorban toplamsallığı.	70
Tablo 4.38: % 28'lik ecstasy tablette mevcut MDMA bileşiminin tespiti.	79
Tablo 4.39: % 36'lık ecstasy tablette mevcut MDMA bileşiminin tespiti.	79
Tablo 4.40: Prozac kapsülde mevcut fluoksetin bileşiminin tespiti.	80
Tablo 4.41: Lida kapsülde mevcut sibutramin bileşiminin tespiti.	80

SEMBOL LİSTESİ

MDMA	: 3,4- methylenedioxyamfetamine, ecstasy
MDA	: 3,4- methylenedioxyamfetamine
MDEA	: 3,4-methylenedioxy-N-ethylamfetamine
DOB	: 2,5-dimethoxy-4-bromoamfetamine
MBDB	: N-methyl-1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-butanamine
AMP	: amfetamin
HME	: 4-hydroxy-3-methoxyethylamfetamine
HMMA	: 3-hydroxy-4-methoxymetamfetamine
HMA	: 3-hydroxy-4-methoxyamfetamine
FLU	: fluoxetine
FLV	: fluvoxamine
BCP	: bromocresol purple
HPLC	: yüksek performanslı sıvı kromatografisi
RP-HPLC	: ters faz- yüksek performanslı sıvı kromatografisi
LC	: likit kromatografisi
LC-ESI-MS	: likit kromatografisi-elektrosprey iyonizasyon-kütle spektrometrisi
GC	: gaz kromatografisi
MS	: kütle spektrometrisi
TLC	: ince tabaka kromatografisi
NMR	: nükleer manyetik rezonans
FL	: floresans
RSD	: bağıl standart sapma
LOD	: dedeksiyon limiti
LOQ	: tayin limiti

ÖZET

AMİNLERDEN OLUŞTURULAN İYON ÇİFTLERİNİN EKSTRAKSİYONU VE AMİN SINIFI ANTİDEPRESANLAR VE UYARICILARIN EKSTRAKTİF SPEKTROFOTOMETRİK MİKTAR TAYİNİ

Amfetaminler, merkezi sinir sistemi üzerinde çok güçlü uyarıcı etkisi olan sentetik ilaçlardır. Amfetaminlerin temel yapısını feniletilamin çekirdeği oluşturur. Yasadışı uyuşturucular olarak üretilmiş 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA), ecstasy olarak bilinir, 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA) ve metamfetamin gibi bazı amfetamin türevleri birbirinden farklı uyarıcı etkilere sahiptir. Bazı antidepresanlar ve etken madde olarak sibutramin içeren Lida gibi zayıflama ilaçları da amfetaminler gibi aktif amin bileşenleri içerirler. Literatürde bu amin bileşiklerinin analizi için flouresans, IR-Raman gibi çeşitli spektroskopik metotlar ile HPLC, LC, GC ve bunların MS dedektörleri ile birleştirilmiş sistemleri gibi karmaşık kromatografik metotlar var olmasına rağmen basit, kolay uygulanabilir, hassas ve düşük maliyetli bir spektrofotometrik yöntem bulunmamaktadır. Bu kapsamda bu tez çalışmasının amacı; bahsi geçen katyonik amin bileşiklerinin erio-T, BCP (bromocresol purple) ve metil oranj gibi anyonik boyalar ile asidik ortamda meydana getirdiği iyon-asosiyatif komplekslerin oluşumunun sağlanması ve bu renkli komplekslerin uygun organik çözücülere çekilerek amin yapılı uyarıcı maddelerin kantitatif tayinlerinin gerçekleştirilmesidir. Çalışılan her reaktif için analit ekstraksiyonunun en uygun yapıldığı koşullar sağlanmıştır. İyon-asosiyatif komplekslerinin en uygun ekstraksiyon pH'ı (deneysel çalışmalar sonucunda analit ve reaktiflere bağlı olarak bulunan pH 3,0-3,6) genellikle reaktiflerin pKa değerlerinden büyük, aminlerin (amonyum) pKa değerlerinden küçük veya bu değerlere yakındır. Ekstraksiyon işleminde kullanılan organik çözücü saf kloroform ya da kloroform-bütanol karışımıdır. Analiz edilen aminler için (reaktif boyalarla oluşturdukları komplekslere ait) molar absorptivite, analitler için dedeksiyon limiti gibi analitik bulgular şöyle özetlenebilir: MDMA: $\epsilon=8,63 \times 10^3 - 1,50 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, LOD: 0,09-0,33 $\mu\text{g mL}^{-1}$, MDA: $\epsilon=3,12 \times 10^3 - 1,21 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, LOD: 0,14-1,42 $\mu\text{g mL}^{-1}$, Fluoksetin: $\epsilon=1,95 \times 10^4 - 2,54 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, LOD: 0,09-0,24 $\mu\text{g mL}^{-1}$, Sibutramin: $\epsilon=1,77 \times 10^4 - 2,31 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, LOD: 0,07-0,28 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Geliştirilen metot MDMA, fluoksetin, sibutramin için ecstasy, prozac ve lida gerçek örnekleri kullanılarak istatistiksel olarak standart bir HPLC metoduna (Hypersil C-18 kolon ve mobil faz olarak % 70 asetonitril, % 30 o-fosforik asit kullanılarak pH'sı 6'ya ayarlanmış % 1'lik trietilamin çözeltisi kullanılmıştır) karşı valide edilmiştir.

SUMMARY

EXTRACTION OF ION PAIRS PRODUCED FROM AMINES AND EXTRACTIVE SPECTROPHOTOMETRIC QUANTITATION OF AMINE CLASS ANTIDEPRESSANTS AND STIMULANTS

Amphetamines are synthetic drugs having a strong stimulant effect on the central nervous system. The basic structural unit of amphetamines comprises the phenyl ethylamine nucleus. Some amphetamine derivatives, also manufactured as illicit drugs, are 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA), also known as ecstasy, 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA), and methamphetamine having different stimulant effects. Some antidepressants and slimming agents such as Lida (containing sibutramine as active ingredient) also contain the amine active constituents like amphetamines. Although various spectroscopic techniques such as fluorescence, IR-Raman, and more sophisticated chromatographic methods such as HPLC, LC, and GC coupled to MS detectors exist in literature for the assay of these amine compounds, simple, flexible, sensitive and low-cost spectrophotometric methods have not been devised. Thus, the purpose of this work is to develop ion-associative complexes of these cationic amines with anionic basic dyes such as bromocresol purple (BCP), methyl orange (MeO), and eriochrome black-T (erio-T) in acidic medium, and to extract these colored complexes into suitable organic solvents for the quantitative estimation of these amines. The conditions for optimal extraction of analyte were determined for each given reagent. The optimal pH of ion-associative complexes extraction (experimentally found between pH 3,0 and 3,6, depending on the analyte and reagent) was usually greater than the pK_a of reagent dye and smaller than the pK_a of amine (ammonium) or close to these values. The extracting solvent was either pure chloroform or a dilute solution of BuOH in $CHCl_3$. The analytical findings (molar absorptivities (ϵ), limit of detection (LOD), for the active amine constituent, respectively) with a given reagent dye are as follows: MDMA: $\epsilon=8,63 \times 10^3 - 1,50 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, LOD: 0,09-0,33 $\mu\text{g mL}^{-1}$, MDA: $\epsilon=3,12 \times 10^3 - 1,21 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, LOD: 0,14-1,42 $\mu\text{g mL}^{-1}$, Fluoxetine: $\epsilon=1,95 \times 10^4 - 2,54 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, LOD: 0,09-0,24 $\mu\text{g mL}^{-1}$, Sibutramine: $\epsilon=1,77 \times 10^4 - 2,31 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, LOD: 0,07-0,28 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The proposed method for MDMA, fluoxetine, sibutramine was statistically validated using ecstasy, prozac, lida against standard HPLC equipped with a Hypersil C-18 column with (70 % acetonitrile-30 % triethylamine aqueous solution in pH 6 o-phosphoric acid) mobile phase.

1. GİRİŞ

Amfetamin ve türevleri ile antidepresanlar canlı üzerinde gösterdikleri etkiler nedeniyle drug (uyuşturucu madde) olarak tabir edilmektedirler. İnsanlık tarihinin başlangıcından itibaren uyuşturucu maddelerin keyif verici, ağrı giderici, hastalıkları iyileştirici olarak kullanıldığı bilinmektedir. Fakat zaman içerisinde bu tür maddelerin tedavi edici etkilerinden çok keyif verici özelliklerinin ortaya çıkması, bu maddelerin kötüye kullanımı sonucunu doğurmuştur. Amfetamin ve türevleri, vücut işlevlerini yoğun olarak etkileyen psikoaktif maddelerdir. Bu maddelerin asıl tehlikesi vücudun bilinçaltındaki koruma mekanizmalarını etkisiz hale getirmesindeki özelliğinde yatmaktadır. Böylelikle amfetamin ve türevleri sadece yorgunluk hissini değil, açlık ve susuzluk hislerini de bastırır ve koruma mekanizmalarında arızalar oluşturur. Amfetaminler, türevleri ve antidepresanların yanı sıra son zamanların güncel konularından biri olan zayıflama ilacı Lida'nın etken maddesi sibutramin de uyuşturucu madde sınıfı içerisinde incelenmektedir.

Literatürde bu tip maddeler için çok çeşitli analiz yöntemleri verilmektedir. Analitik kimyada, uyuşturucu maddelerin tanınmasında en basitinden en karmaşığına birçok teknik uygulanmaktadır. Amaçtan bağımsız olarak her durumda çok yönlü teknikler kullanmak zorunlu değildir. Uyuşturucu analizinde renk testleri geçerli bir tekniktir. Fakat renk testleri uyuşturucunun her zaman tam olarak ne olduğunu belirtmez, bazen de onları fonksiyonel gruplarına göre tanımlar. Bu nedenle saf uyuşturucular için çok iyi uygulanabilen bir tekniktir. UV spektrofotometrisi, Floresans Spektrometrisi, IR ve Raman Spektrometrisi, İnce Tabaka Kromatografisi, Gaz Kromatografisi (GC), Kütle Spektrometrisi ve Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) gibi birçok analiz yöntemi de uyuşturucu analizlerinde kullanılmaktadır [1-3].

Bu tez çalışması dahilinde literatürde özellikle amfetaminler, türevleri ve sibutramin için spektrofotometrik yöntemlerin eksikliğini giderebilmek amacıyla, polis kriminal laboratuvarlarında ayrıntılı tetkiklerin uygulanmasından önce kullanılabilir nitelikte, polis kriminal laboratuvarların eleme analiz ihtiyaçlarına ve önceliklerine uygun, süratli, basit ve ucuz bir ekstraktif-spektrofotometrik yöntem geliştirilmiştir.

Geliştirilen ekstraktif-spektrofotometrik yöntemin esası, asidik ortamda kuvaterner amine dönüştürülecek primer, sekonder, tersiyer amin gruplarının anyonik boyalarla iyon asosiyatı oluşturması ve bu iyon asosiyatının uygun bir organik çözücü veya çözücü karışımı ile ekstrakte edilmesine dayanmaktadır. Meydana gelen iyon asosiyat kompleksinin oluşumu, $R_2NH_2^+$, R_3NH^+ gibi fonksiyonel amin grupları ile erio-T, BCP, metil oranj gibi aril sülfonat grubu içeren anyonik boyalar arasında gerçekleşmektedir. Beklenildiği üzere büyük bir katyon (protonlanmış amin) ile büyük bir anyonun (anyonik boya) oluşturduğu iyon asosiyatı oldukça zayıf bir hidrasyon kabuğuna sahiptir ve kolaylıkla organik çözücülere ekstrakte edilerek bu aminlerin ekstraktif-spektrofotometrik tayinleri gerçekleştirilebilir. Geliştirilen yöntemde amfetaminler, antidepresanlar ve sibutramin ile çeşitli reaktifler arasında, asidik ortamda renkli iyon asosiyatı oluşturulmuş ve oluşum koşulları çeşitli değişkenlere (pH, reaktif türü ve derişimi, organik çözücü veya çözücü karışımı türü vb.) göre optimize edilmiştir. Organik fazda elde edilen renkli, kararlı kompleksler spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir. Bu analizleri takiben yöntemin ilaç tabletlerinde var olan çeşitli dolgu maddeleri ve diğer bileşenlerden etkilenip etkilenmediği araştırılmış ve bu amaçla ayrıntılı bir girişim (interferans) analizi yapılmıştır. Geliştirilmiş ekstraktif-spektrofotometrik tayin yöntemi referans yöntem olarak kullanılan HPLC yöntemi ile kıyaslanmıştır.

Anabilim Dalımızda, iyon asosiyat komplekslerinin ekstraktif-spektrofotometrik yöntemle tayinleri ile ilgili çalışmalar mevcut olup [4] elde edilen bilgi birikimi yardımıyla, bu tez çalışmasında amfetamin ve türevleri, amin sınıfı antidepresanlardan olan fluoksetin ve sibutramin gibi aktif amin bileşenleri içeren uyuşturucu maddeler için seçimli, kolay uygulanabilen, düşük maliyetli spektrofotometrik bir tayin yöntemi geliştirilmiştir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. UYUŞTURUCU MADDELER

Uyuşturucu maddeler ile ilgili aşağıdaki tanımlar yapılmaktadır:

❖ Belirli dozda alındığında kiŐinin sinir sistemine etki ederek, akli, fiziki ve psikolojik dengesini bozan, fert ve toplum içerisinde iktisadi ve sosyal çöküntü meydana getiren, alışkanlık ve bağımlılık yapan, kanunların kullanılmasını, bulundurulmasını ve satıŐını yasakladığı narkotik ve psikotrop sözcükleriyle de tanımlanan maddelere uyuşturucu maddeler denir.

❖ Bazı ilaçların (drug) amaç dışı kullanımında ortaya çıkan etkileri insanoğlunun hoŐuna gitmiŐ ve bunlara da tıpkı ilk çağlardan beri kullanılan bitkiler gibi alışmiŐ ve müptela olmuŐlardır. İlaçların tedavi dışı kullanımına amaç dışı kullanım veya ‘suistimal’ denir.

❖ Uyuşturucu bağımlılığı ruhsal ve fiziksel olarak madde alımını sürdürme gereksinimidir. Bir maddeye bağımlılık fiziksel, ruhsal veya her ikisi ile de olabilir. Ruhsal bağımlılık; alışkanlık olarak da isimlendirilir, maddeye karşı devamlı veya aralıklı Őiddetli istekle belirlidir. Fiziksel bağımlılık; yoksunluk belirtilerinin ortaya çıkıŐını önlemek için maddeyi alma gereksinimidir ve toleransla belirlidir.

Uyuşturucu maddeleri turlerine göre aşağıdaki sınıflandırmaya tabi tutabiliriz [5];

A) AFYON VE TÜREVLERİ

- 1) Afyon
- 2) Morfin
- 3) Kodein
- 4) Metadon
- 5) Eroin

B) KENEVİR VE TÜREVLERİ

- 1) Reçine esrar
- 2) Toz esrar
- 3) Pres esrar
- 4) Gonca esrar
- 5) Likit (sıvı) esrar

C) UYARICILAR

- 1) Amfetaminler
- 2) Kokain
- 3) Kafein

D) SENTETİKLER

- 1) Ecstasy
- 2) Captagon
- 3) Metamfetamin
- 4) Lysergic Acid Diethylamid (LSD)
- 5) Gamma Hydroxybutyrate (GHB)
- 6) Ketamine Hydrochloride (Ketamin)
- 7) Phencylidine (PCP)

E) SAKİNLEŞTİRİCİLER

- 1) Barbituratlar
- 2) Trankizanlar
- 3) Sedatifler

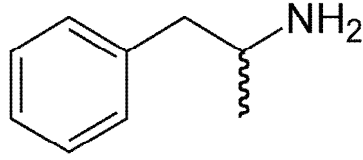
F) UÇUCU MADDELER

- 1) Yapıştırıcılar (tutkal, zank vb.)
- 2) Boya incelticileri, çözücüler
- 3) Kuru temizlemede kullanılan uçucu sıvılar
- 4) Benzin, gazyağı, tiner, aseton
- 5) Likit Petrol Gazı (LPG)
- 6) Yzeyssel anestezi için kullanılan sprej Őeklindeki maddeler
- 7) Oda, sa, vücut, kozmetik vb. sprejler

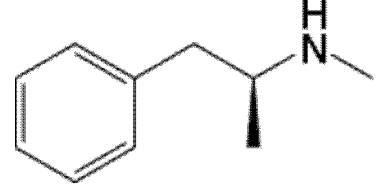
Şekil 2.1: Uyuşturucu maddelerin sınıflandırılması.

2.1.1. Amfetaminler

Amfetamin, tümüne birden amfetaminler adı verilen ve merkezi sinir sistemi üzerinde çok güçlü uyarıcı etkisi olan, sentez yoluyla üretilmiş bir dizi ilacın ilk örneğidir. Amfetaminlerin temel yapısını feniletülamın çekirdeği oluşturur [6]. Kimyasal yapısı itibariyle, insanda bulunan uyarıcılardan adrenalin ve dopamine benzer. Amfetamin ve türevleri, vücut işlevlerini yoğun olarak etkileyen psikoaktif maddelerdir. Bu maddelerin asıl tehlikesi vücudun bilinçaltındaki koruma mekanizmalarını etkisiz hale getirme özelliğinde yatmaktadır. Böylelikle amfetamin ve türevleri sadece yorgunluk hissini değil, açlık ve susuzluk hislerini de bastırır ve koruma mekanizmalarında arızalar oluşturur.



Amfetamin



Metamfetamin

Şekil 2.2: Amfetamin ve metamfetamin'in kimyasal yapısı.

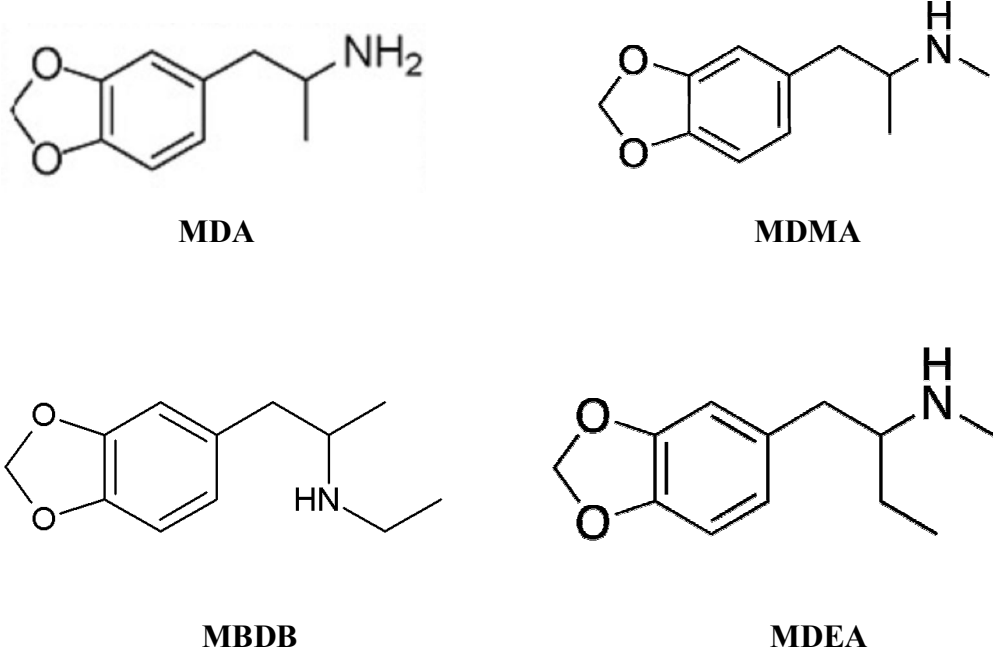
Kimyasal yapısına göre, uyarıcı etkileri birbirinden farklı amfetaminler vardır. Bunların en çok tanınanları şöyle sıralanabilir:

- D-amfetamin (dexedrin)
- Metamfetamin (desoxyn)
- Metilfenidat (ritalin)
- Fenmezadin (preludin)

Amfetamin türevleri ise şöyledir:

- Efedrin (nasal dekonjestan)
- Propranolamin (nasal dekonjestan, iştah kesici)
- MDMA (3,4- metilendioksimetamfetamin, Ecstasy, Adem, XTC)
- MDA (3,4-metilendioksiamfetamin)
- MDEA (3,4-metilendioksi-N-etilamfetamin, MDE, Havva, Eve)

- DOB (2,5-Dimetoksi-4-bromamfetamin)
- MBDB (N-metil-1-(1,3-benzodioksol-5-yl)-2-butanamin)



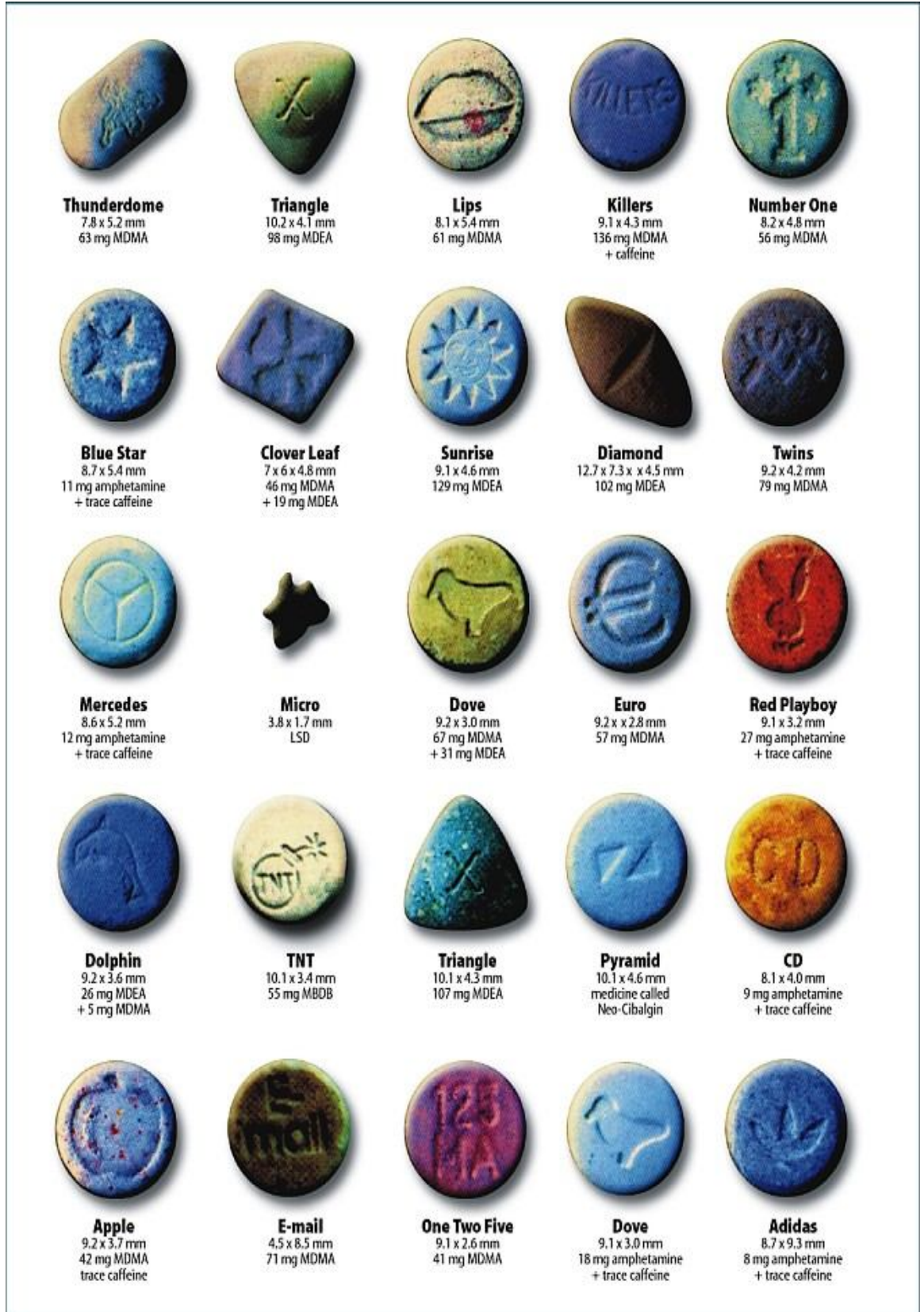
Şekil 2.3: Bazı amfetamin türevlerinin kimyasal yapısı.

2.1.2. Ecstasy (MDMA)

Ecstasy, kimyasal adıyla MDMA (3,4-metilendioksümetamfetamin) uyarıcı bir etkiye sahip sert (hard) uyuşturucular grubuna giren beyaz, kristal toz halinde bir maddedir [6]. Ecstasy ağızdan alınan bir haptır. Haplar değişik şekil ve markalarda mevcuttur. Bazı durumlarda MDMA toz halinde satılmakla beraber sıvı halde de olabilir. Yasal kullanımı yoktur, dolayısıyla denetim altında değildir. Genel bir kullanıcının bir doz içerisinde hangi maddeleri bulunduğunu bilmesi bu sebeple imkansızdır. Çok az ecstasy örneği saftır. Çoğu talk pudrası, laktoz, parasetamol, kafein, teofilin gibi dolgu maddeleri ile karıştırılmıştır. Daha da tehlikelisi metamfetamin, ketamin, efedrin, psödoefedrin gibi anestezi ilaçları ve sakinleştiriciler de ecstasy tabletlerine karıştırılıp etkilerinin artması sağlanmaktadır [7-8].

EX, X, XTC, E, beyaz kumrular, soda, uçuş, kanat, pıt gibi sokak adlarına sahip olan ecstasy hapları üzerindeki logolara göre de çeşitli marka isimleriyle adlandırılmakta ve bu marka isimlerin kalitesi doğrultusunda içeriğindeki etken madde miktarı değişmekte

ve hapın uyarıcı aktivitesi artmaktadır [9]. Şekil 2.4'de farklı marka ve şekillerde ecstasy tabletler görülmektedir. Ecstasy daima tablet ya da kapsül olarak yutulur. Çok nadir olarak burun yolu ile inhale edilir, dumanı içilir veya enjekte edilir. Ecstasy'nin etkisi tabletin alımından sonra 20-40 dakikada bulantı ile birlikte olabilen neşe artışıyla belirir. Tablet alımından 60-90 dakika sonra kullanıcıda pik etkiler ortaya çıkar. Sansasyonlar artar, müzik sesleri daha güzel gelir. 3-4 saat sonra ecstasy etkileri hafifler. Ecstasy hapının kullanıldığı özel çevrelerin beraberinde getirdiği ortam bu maddelerin tehlikesini katlayarak artırmaktadır, nitekim bu uyuşturucunun kullanımı ile birlikte vücuda yapılan sürekli yüklemeler (aşırı enerji artışından dolayı vücudun yüksek aktivite göstermesi) asıl tehlikeyi oluşturmaktadır. Gelişen şartlara göre vücut mevcut sıcaklığını kendi sisteminde düzenlemektedir. Vücut sıcaklığı, uzun süreli ve yoğun aktiflik etkisiyle normalden daha da yükselmektedir (42 derece olduğu görülmüştür). Vücut, su içmekle dahi tekrar düzelemeyecek kadar büyük ölçüde su kaybına uğramaktadır. Bunun sonucunda kalp ve yüksek tansiyon sorunları, yüksek ateş ve şok etkileri görülmektedir. Bunun yanı sıra kalp ritminde bozuklukların ve merkezi krampların görüldüğü olaylar gerçekleşmiştir.



Şekil 2.4: Farklı şekil ve markalarda ecstasy tabletler.

2.1.3. 3,4-Metilendioksiamfetamin (MDA)

İlaç bilimi açısından bakıldığında MDA maddesi hem amfetamine hem de LSD'ye yakındır. MDA maddesinin etkisi alınan doza bağlı olup düşük dozlar genelde canlanma etkileri yaparken, yüksek dozdaki alımı halüsinasyonlara ve bozuk algılamalara yol açmaktadır. Kullananlarda madde alındıktan sonra artan bir iletişim kurma ihtiyacından bahsedilir.

MDA, MDMA'dan daha uzun süren (8-12 saat) ve daha güçlü etkileri olan bir maddedir. MDA'da yanlış doz kullanımında ölümcül olaylar görülür, 300 mg'da uzun süreli bitkinlik halleri görülmekte olup, 500 mg'da ise ölüm gerçekleşmektedir. 1960'lı yıllarda A.B.D.'de MDA tüketimine doğrudan bağlanan ölüm olayları kayda geçmiştir.

2.1.4. Antidepresanlar

Antidepresanlar, doğrudan veya dolaylı olarak beyinde noradrenalin, dopamin ve/veya serotoninin etkilerini kolaylaştıran [10], klinik depresyonla ilişkili kimyasal dengesizliği düzeltmek için kullanılan psikiyatrik ilaç, besin maddeleri veya ot gibi diğer maddeler için kullanılan bir terimdir. Antidepresanlar bu işlevlerini beyin hücreleri arasındaki kimyasal ileticilerin hücreler arası mesafeyi geçişini kolaylaştırarak yaparlar.

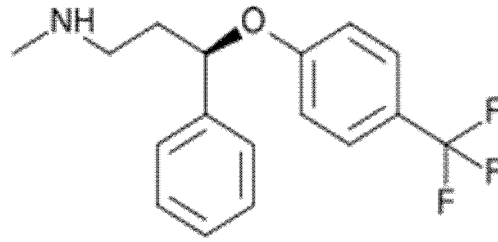
Antidepresan ilaçları 4 grup halinde sınıflandırmak mümkündür;

- ❖ Trisiklik antidepresanlar,
- ❖ Heterosiklik antidepresanlar,
- ❖ Selektif serotonin re-uptake (geri alım) inhibitörleri (SSRI),
- ❖ Monoamin oksidaz inhibitörleri (MAO).

Bu tez çalışmasında selektif serotonin reuptake inhibitörleri grubuna giren fluoksetin antidepresanı incelenmiştir. Bu ilaçlar oldukça sık kullanılan bir alt grubu oluştururlar.

2.1.4.1. Fluoksetin

Fluoksetin, SSRI sınıfının öncü molekülü, santral nöronlarda serotonin geri alımını selektif olarak bloke eden ilaçların prototipidir ve yarılanma ömrü birkaç gün olan aktif bir metaboliti vardır. Depresyon, obsesif kompulsif bozukluk, bulimia nervosa, premenstrüel disforik bozukluk ve bir takım diğer psikiyatrik bozuklukların tedavisi ve semptomlarının giderilmesinde kullanılır. Türkiyede Prozac, Depreks, Depset, Florak, Fulsac, Loksetin, Seronil, Zedprex gibi depresyon tedavisinde kullanılan antidepresan ilaçların etken maddesidir.

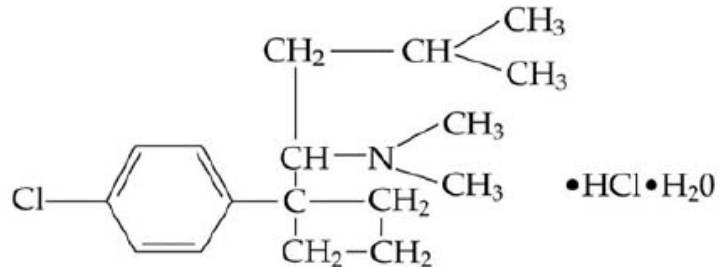


Fluoksetin

Şekil 2.5: Fluoksetin'in kimyasal yapısı.

2.1.5. Sibutramin

Sibutramin, kilo vermede, verilen kilonun korunmasında ve obezite tedavisinde kullanılan, ticari adı ABD'de *Meridia*, Avrupa'da ve diğer ülkelerde ise *Reductil* ve ülkemizde *Lida* olarak bilinen ilaçların etken maddesi olan, merkezi sinir sistemine etki edip, noradrenalin, serotonin ve daha düşük düzeyde dopamin geri alımını engelleyerek bir antidepresan özellik de gösteren [11], uyarıcı sınıfı maddeler içerisinde incelenen bir β -feniletilamin'dir [12]. İlaçlarda, sibutramin hidroklorür monohidrat şeklinde kullanılmaktadır.



Sibutramin hidroklorür monohidrat

Şekil 2.6: Sibutramin'in kimyasal yapısı.

Sibutramin tedavisi ile kalp atış hızı ve/veya kan basıncı artışları arasında bağlantı vardır. Yeterince kontrol altında olmayan hipertansiyonlu hastalarda, koroner arter hastalığı, konjestif kalp yetmezliği ve inme geçirmiş olan hastalarda, hamilelerde ve epilepsi hastalarında kullanılmamalıdır. Bu maddeyi içeren ilaçların doktor kontrolü dışı kullanımının karaciğer, böbrek, kalp yetmezliğine ve anoreksiyaya (aşırı zayıflık) neden olabileceği belirtilmiştir. Aksi takdirde ölümcül sonuçlar doğurabilen ve örnekleri de yaşanmış olan bu uyarıcının ülkemizde kullanılan Lida kapsüllerde normalinin üç katı miktarda bulunduğu tespit edilmiştir. Lida kapsüllerde bulunan sibutramin miktarı 27,4 mg'dır [13]. Bu miktar ölümcül bir dozdur ve buna ek olarak tüketicilerin yoğun talepleri üzerine sahte lidaların imalatı gündeme gelmiştir. Sahte lidalarda ise durum daha da kötüdür ki bunlar gelişigüzel hazırlanmış kapsüllerdir. Nihayetinde Sağlık Bakanlığı tarafından ilaç yasaklanmış ve gümrüklerden geçişi engellenmiştir. Bu denli önem arz eden bir ilaç için kolay uygulanabilir, hızlı ve güvenilir bir spektrofotometrik metot geliştirmek önemli bir ihtiyaç haline gelmiştir.

2.2. UYUŞTURUCU MADDELER İÇİN KULLANILAN ANALİZ YÖNTEMLERİ

2.2.1. Renk Testleri

Uyuşturucu analizinde en geçerli tekniktir. Ticari uyuşturucuları ortaya çıkartan kitler bu renk testlerine dayanır. Renk testleri uyuşturucunun her zaman tam olarak ne olduğunu belirtmez bazen de onları fonksiyonel gruplarına göre tanımlar. Moleküldeki kimyasallar hakkında geniş bilgiler verir. Liberman deneyinde (reaktif olarak sülfat ve nitrat asidi kullanılır) amfetamin turuncu renk oluşturur. Marquish deneyinde (sülfat asidi ve formaldehit reaktif olarak kullanılır) amfetamin, penformin (antidiyabetik) gibi turuncu renk alır. Marquish deneyinde renk oluşmuyorsa, amfetaminden belirlenemeyecek kadar az miktarda var demektir. Renk oluşumu birçok nedene bağlıdır. Bunlar; reaksiyon zamanı, sıcaklık, stabilite (denge), reaktif konsantrasyonu, boyalar ya da diğer renk vericilerdir. Renk testleri sonucunda renge karar verme görecelidir. Velapoldi ve Wicks tarafından bir renk testi yapılmış ve ISCC-NBS'de (renk merkezi çizelgesi) açıklığa, koyuluğa bakılarak renk çizelgeleri oluşturulmuş ve bu çizelgelere göre renklere numaralar verilerek çalışmalarını sürdürülmüştür. Renk testleri saf uyuşturucuda çok iyi uygulanabilmektedir [14].

2.2.2. Mikrokristal Testler

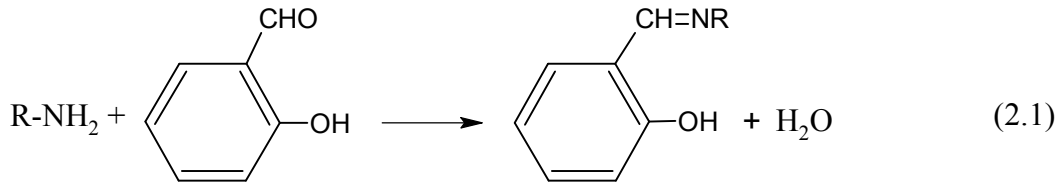
Sonuçları teyit etmede en iyi yöntemdir. Mikroskopla yapılır. Numuneye ait görüntü çözümlenmeleri karşılaştırılır ve oluşum halindeki kristaller incelenir. Belirginleşme konusuna gelince testler değişiklik gösterir. Sistematik bir tanımlama yoktur, ayrıca testleri öğrenmek zaman alır ve yorucudur. Yanlış sonuçlar çıkabilir. Bir karışımda az miktar amfetamini tayin etmek için basit ve yararlı bir yöntem vardırki bu da karışımı alkali çözeltisine koymaktır. Bazik amfetamin uçucudur ve seyreltilmiş hidroklorik asit içinde tutulabilir. Amfetamin hidroklorür kristallenir. Kristaller mikroskopta kutuplu yapı olarak gözlemlenirler. Amfetamin hidroklorür için uygulanan yöntem spektrofotometri veya kromatografidir ve bu test tanımlamayı sağlar. Renk ve mikrokristal testler yapılırken sülfat, fosfat ve klorür için geleneksel yaş kimya iyon testleri yapmak uygundur [14].

2.2.3. UV ve Görünür Bölge Spektrofotometrisi

Temel kimyasal türevlendirme reaksiyonlarıyla analizler mümkündür. Bu yöntemler aşağıda belirtilmiştir.

2.2.3.1. Salisilaldehit Reaksiyonu

Bir primer amin ile salisilaldehitin reaksiyonu sonucu parlak sarı Schiff bazları meydana gelir.



Milun [15] tarafından kullanılan bu reaksiyon primer aminlerin 410 nm'de analiz edilmesi içindir.

2.2.3.2. Diazolandırma Reaksiyonu

Baindelin ve Kemp [16] primer aromatik aminlerin analizi için bir metot geliştirmişlerdir. Metot, primer aminlerin diazolandırılması ve N-(1-naftil) etilendiaminle birleşerek renkli azo boyaları vermesi temeline dayanır. Renk oluşumu 1-2 dakika içerisinde tamamlanır. Bazı durumlarda kenetleme reaksiyonunun oluşabilmesi için reaksiyon ortamına sodyum bikarbonat, sodyum asetat ya da sodyum

hidroksit katılır. Çözeltideki alkaliliğin mümkün olduğu kadar iyi ayarlanması gerekir. Çünkü fazla alkalilik diazo bileşiklerinin bozulmasına yol açar.

2.2.3.3. 9-Kloroakridin Reaksiyonu

Primer aromatik aminler 9-Kloroakridin ile kuvvetli renkli çözeltiler verirler. Reaksiyon ürünü turuncu renkli bir bileşiktir ve reaktif körünün analizin yapıldığı dalga boyu aralığında absorbanası yoktur. Bu yöntem primer, sekonder, tersiyer aromatik aminlerin, primer, sekonder, tersiyer alifatik aminlerin, heterosiklik ve karbonil bileşikleri varlığında analizi için uygundur [17].

2.2.3.4. Ditiyokarbamat Reaksiyonu

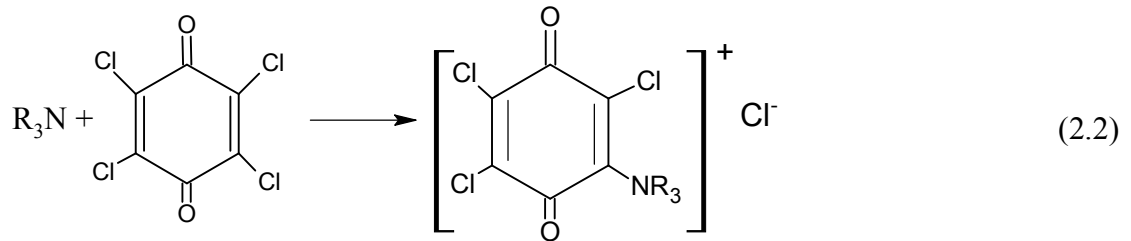
Sekonder aminler ve karbon disülfür reaksiyona girerek ditiyokarbamik asit oluşturmaktadır. Ditiyokarbamik asit ile bakır (II) klorür, 440 nm'de absorbanası ölçülebilen sarı renkli tuz oluşturmak üzere reaksiyon verir. Primer aminler düşük renk şiddeti vermekte ve tersiyer aminler karbon sülfür ile reaksiyon vermemektedir [17].

2.2.3.5. Akonitik Anhidrit Reaksiyonu

Tersiyer aminler ya da kuvaterner aminler akonitik anhidrit ile reaksiyona girerek 500 nm'de absorbanası ölçülebilen renkli çözeltiler verirler. Primer ve sekonder aminler bu reaksiyonu göstermezler [17].

2.2.3.6. Kloranil Reaksiyonu

Tersiyer aminlerin kloranil ile reaksiyonuna dayanan özel kolorimetrik bir metottur.

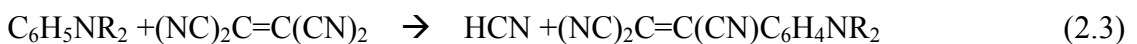


Oluşan yeşil renkli çözelti 610 nm'de analiz edilebilir. Metot akonitik anhidrit metodu ile birleştirilerek kullanıldığında tersiyer aminler nicelik bakımından amin tuzlarından ya da kuvaterner aminlerden farklılandırılabilir [17].

2.2.3.7. Tetrasiyonoetilen Reaksiyonu

Shenk [18] tersiyer aromatik aminlerin analizi için tetrasiyonoetilen ile kompleks oluşumuna dayanan bir metot geliştirmiştir.

Reaksiyon denklemi:



2.2.3.8. *Pikrik Asit Reaksiyonu*

Kuvaterner amonyum bileşikleri pikrik asitle reaksiyona girerek, kloroforma ekstrakte edilebilen ve spektrofotometrik olarak 365 nm'de absorbansı ölçülebilen pikratları oluştururlar. Bazı sekonder aminler de pikrik asitle reaksiyon verirler ve kuvaterner bileşiklerin analizine engel olabilirler [17].

2.2.3.9. *Sinnamik Anhidrit Reaksiyonu*

Alifatik aminler sinnamik asitle reaksiyona girerek kloroformla ekstrakte edilebilen ve UV spektrofotometresi ile ölçülebilen aminleri oluştururlar. Alkollerin, kloroformla ekstrakte edilebilen sinnamik esterlerin oluşumunu engellemesi beklenebilir. Bu olay alkali çözeltideki hidroliz süresinin uzatılması ile giderilebilir [17].

2.2.3.10. *2,4-Dinitrofloro Benzen Reaksiyonu*

Primer ve sekonder aminler tamponlanmış çözeltide 2,4-dinitroflorobenzen ile reaksiyona girerek substitue 2,4-dinitrofenilamin oluşturur ve bu renkli ürünün absorbansı ölçülür [17].

2.2.3.11. *1,2-Naphtokinon-4-sulfonat (NQS) ile Reaksiyon*

Primer ve sekonder aminlerin analizi için kinetik-spektrofotometrik bir metot geliştirilmiştir. Yöntem, bu aminlerin non-iyonik yüzey aktif madde varlığında NQS ile verdikleri renk reaksiyonuna dayanır. Her bir analiz için optimum şartlar araştırılmıştır. Uygun pH:10,5 (0,1 M karbonat – bikarbonat tamponu), yüzey aktif madde derişimi:triton X-100 % 0,1'lik ve NQS derişimi $6,4 \times 10^{-3}$ M, sıcaklık 45 °C'dir. Ölçümler 490 nm'de yapılmıştır. Bu yöntem ilaç örneklerinde efedrin ve amfetamin analizi için uygulanmıştır [19].

2.2.4. **IR ve Raman Spektrometrisi**

Amfetaminler, moleküler titreşim enerji seviyeleri arasındaki geçişlerde IR ışınımını absorbe ederler. Raman ve IR spektrometre teknikleri birçok açıdan yararlıdır. IR tekniğiyle asimetrik titreşimler ve polar gruplar iyi çalışılabilirken Raman tekniğiyle simetrik titreşimler ve polar olmayan gruplar en iyi şekilde incelenebilmektedir. Her iki teknik yardımıyla molekülleri ayırt etmek için mükemmel “parmak izi” spektrumu elde edilebilmektedir [14].

2.2.5. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)

İnce tabaka kromatografisi çok az maliyetli ve çok çeşit içeren bir tekniktir. TLC’de sabit ve mobil faz seçenekleri çok fazladır. TLC paralel, çoklu örneklerin kalitatif, kantitatif tayinlerinde veya hazırlık tekniği olarak kullanılabilir. Amfetaminleri test etmek için ince tabaka kromatografisi sistemlerinden bazıları uygulanır. Tek ince tabaka kromatografisi sistemi çok az yardımcı olur. Daha fazla bilgi edinebilmek için çoklu ince tabaka kromatografisi sistemleri kullanmak gerekir. 29 ince tabaka kromatografisi sistemi değerlendirilmiş fakat başlıca 4 tanesi uyuşturucular için seçilmiştir. Bu 4 ince tabaka kromatografisi sisteminin çözücü ve çözücü karışımları aşağıdaki gibidir;

- ❖ Metanol- amonyak (100:1,5)
- ❖ Sikloheksan-toluen-dietilamin (75:15:10)
- ❖ Kloroform- metanol (9:1)
- ❖ Aseton

Silika jel 0,1 M KOH’e daldırılır ve kurutulur. Uyuşturucuları görüntülemek için TLC kloroform-metanol sistemi kullanmak en iyisidir [14].

2.2.6. Gaz Kromatografisi (GC)

GC 1962’den bu yana amfetaminlerin nitelik ve niceliklerini belirlemede kullanılan etkin bir metottur. Seçici, güvenilir ve hassas bir sistemdir. Alev iyonizasyon dedektörü (FID) yaygın bir dedektör olarak kullanılmaktadır. Azot içeren bileşiklerin seçimli tanımlanması azot-fosfor seçimli dedektör (NPD) ile yapılır ve elektron tutucu dedektör (ECD) uygun bir türevin oluşumundan sonra kullanılabilir. GC biyolojik (idrar, kan ve salya) ve biyolojik olmayan (saç ve tabletler) matrislerde metilendioksi analoglarının tayininde yaygın olarak kullanılmaktadır [14].

Sabit Faz: Birçok sabit faz amfetaminlerin gaz-likit kromatografisinde kullanılır. Moffat ve arkadaşları [20] 8 değişik sabit fazı karşılaştırmıştır (SE-30, Apiezon L/KOH, OV-17, Carbowax 20 M/KOH, Carbowax 20 M, CDMS, DEGS/KOH, DEGS) ve sonuç olarak polaritesi az olan SE-30 gaz likit kromatografisi için tercih edilen likit faza göre seçilmiştir.

Türevlerin Oluşması: Türev oluşturma tanımlamada yardımcı olarak kullanılan ayrı bir tekniktir. Uyuşturucunun kromatografik etkileşimini (stasyoner ve mobil fazlar arasındaki dağılımını) ve analizlerin duyarlılığını arttırmak için türev oluşturulur. Türevler, kolona belirteçle birlikte örnek çözeltisi enjekte edilerek tüpte veya kolonda oluşturulur.

Kapiler Kolonlar: Yüksek ayrıştırıcı özelliğine ve esnekliğine sahip kapiler kolonlar ve erimiş silika kolonlar kullanılır. Bu kolonlar modern gaz kromatografisi için dizayn edilmiştir ve kesikli, kesiksiz enjeksiyon olmak üzere birden çok enjeksiyon türüyle numune incelenebilir. Son yıllarda amfetamin analizlerine kapiler gaz kromatografisi katkıda bulunmuştur.

2.2.7. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Özellikle adli durumlar için uyuşturucu analizlerinin en önemli tekniğidir. Uçucu olmayan uyuşturucularda bu tekniği kullanmak daha doğru bilgilere ulaştırmaktadır. UV, florimetrik ve elektrokimyasal dedektör gibi çeşitli dedektörler kullanılabilir. Amfetamin analizinde genellikle UV dedektör kullanılmaktadır [14].

Amfetamin analizinde çeşitli HPLC sistemleri kullanılmıştır.

❖ Kolon Çözücü Sistemleri

Önemli bir katkı Jane [21] tarafından yapılmıştır. Araştırmacı, 6 µm silika ile doldurulmuş 250x4,6 mm ID kolon ve mobil faz olarak metanol, 2 N amonyak, 1 N amonyum nitrat (27:2:1) kullanmıştır. Uyuşturucuların büyük bir kısmı ile çalışılmış ve 27 amfetamin tipi uyarıcının göreceli alıkonma süreleri belirlenmiştir. Uyarıcıların çoğu bu sistem kullanılarak ayrılmıştır. Metanol-su oranının değişimi, amonyak ya da amonyum nitratın konsantrasyonlarının değişimi bileşiklerin alıkonmasını etkilemiştir. Tanımlama UV absorpsiyonuyla 254 nm' de yapılmıştır. Kantitatif analiz ise pik yükseklik ölçümleriyle yapılmıştır.

Ters faz kromatografisi µ-Bondapak C-18 ile Twitchett ve Moffat [22] tarafından yapılmıştır. Amfetamin ve metamfetamin içeren 30 bileşik üzerinde çalışılmış, temel uyuşturucular için kolonun alıkonma verimi düşük bulunmuştur. Daha sonra Twitchett

ve arkadaşları aynı 30 örnekle mikro partikül boyutlu katyon değiştirici kolon kullanmışlardır. Tüm uyuşturucular için kabul edilebilir alıkonma süreleri elde edilmiştir. Ancak kolon ömrünün kısa olduğu gözlemlenmiştir.

Lurie ve arkadaşları [23], adli kimyanın ilgilendiği uyuşturucuların analizinde ters-faz iyon-çifti kromatografisini kullanmıştır. μ -Bondapak C-18 kolon ve pH 3-5'te karışıt iyon olarak sülfonik asit, mobil faz olarak metanol-su-asetik asit (20:79:1) karışımı kullanılmış, UV dedektör ile ölçüm 254 nm'de yapılmıştır.

Flanagan ve arkadaşları [24], susuz iyonik çözeltilerle silika kolonda temel uyuşturucuların kromatografik analizini yapmıştır. Analizde bir Spherisorb 5 silika kolon kullanılmış ve çözelti olarak perklorik asit içeren metanol-hekzan (85:15) karışımı kullanılmıştır. Susuz iyonik sistemler yüksek verim, stabilite ve uzun kolon ömrü göstermiştir.

❖ *Multi-dedeksiyon ve multi-kolon sistemleri*

Çift dalga boylu UV dedektörlü HPLC kullanılarak uyuşturucu tanımlaması Baker ve arkadaşları [25] tarafından yapılmıştır. 254 ve 280 nm dalga boylarında ölçümler alınmıştır. Üç kolonlu bir sistemde çalışılmıştır. Kolon ve mobil faz koşulları şunlardır: 1- μ -Bondapak C-18 kolon, mobil faz: Metanol-su (2:3) karışımı, pH:7 (fosfat tamponu), 2- μ -Porasil kolon, mobil faz: metanol- 2 N amonyak- 1 N amonyum nitrat (27:2:1) karışımı, 3- μ -Porasil kolonu, mobil faz: diklorometan ve amonyak. 100 uyuşturucu test edilmiş ve bunların % 5'i sadece göreceli alıkonma süreleri kullanılarak, % 95'i ise hem alıkonma süreleri hem de absorbans oranları kullanılarak ayrılmıştır.

Isokratik multi-kolon HPLC Wheals [26] tarafından temel uyuşturucuların kalitatif analizi için uygulanmıştır. Biri silika, diğeri merkaptopropil ile modifiye edilmiş silika ve bir diğeri de n-propil sülfonik asit ile modifiye edilmiş silika olmak üzere üç farklı kolon kullanılmıştır. Mobil faz metanol- 2 N amonyak- 1 N amonyum nitrat (27:2:1) karışımıdır. Amfetaminleri içeren 161 uyuşturucu madde analiz edilmiştir. Alıkonma sırası uyuşturucu maddelerin bazik özelliğinin artışı ile paralel bulunmuştur.

2.2.8. Radyoizotopik Metotlar

Amino bileşiklerinin analizi için radyoizotopik ayıraçlarla amino gruplarının türevlendirilmesi bu bileşiklerin analizi için oldukça kullanışlı bir yaklaşım sağlamıştır. Tersiyer aminler türevlendirme için daha az uyumludur fakat bu teknikle analiz edilmişlerdir. Sülfonik asit klorürleri, karboksilik asitler, asetik anhidrit ve dinitroflorobenzen oldukça fazla kullanılan ayıraçlardır [17].

2.3. LİTERATÜRDEKİ AMFETAMİNLER, FLUOKSETİN VE SİBUTRAMİN MADDELERİ İLE İLGİLİ ANALİZLER

Literatürde amfetaminler ve antidepresan maddeler için çeşitli spektroskopik yöntemlerin yanı sıra HPLC, LC, GC gibi daha karmaşık kromatografik yöntemlere oldukça sık rastlanmaktadır. Buna karşılık uyarıcı maddeler sınıfı içerisinde incelenen sibutramin için kromatografik yöntemlere ulaşılabilirken spektrofotometrik yöntemlere rastlanamamaktadır. Literatürdeki uyarıcı ve uyuşturucu maddelerle ilgili bazı çalışmalar aşağıda görülmektedir.

Karine ve arkadaşları tarafından MDMA, MDEA, MDA için kan, serum, balgam ve idrar örneklerine uygulanmış bir HPLC metodu tanımlanmıştır. Yöntem likit-likit ekstraksiyonu sonrasında uygun iç standart kullanılarak RP-18 kolonda floresans dedektörü ile gerçekleştirilmiştir. Mobil faz olarak amonyum asetat-metanol-asetonitril karışımı kullanılmıştır. Eksitasyon ve emisyon dalga boyları sırasıyla 288 ve 324 nm'dir. Kan, serum ve balgam örneklerinde konsantrasyon aralığı $2-1000 \mu\text{g L}^{-1}$, ekstraksiyon yüzde geri kazanımı $> \% 70$, analitik yüzde geri kazanım $\% 95,5-104,4$, belirtme sınırı (LOD) değeri $0,8 \mu\text{g L}^{-1}$, tayin sınırı (LOQ) değeri $2 \mu\text{g L}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. İdrar örneklerindeki LOD değeri $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$, LOQ değeri $0,1 \text{mg L}^{-1}$ 'dir. Uygulanan yöntem sonucunda elde edilen bu değerler LC-MS/MS yöntemi ile doğrulanmıştır [27].

Natale Alfredo ve arkadaşları tarafından amfetamin ve metaboliti olan 4-hidroksinorefedrin için elektrokimyasal dedektör kullanılarak bir HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Yöntemde bu türler için 2,5-dihidroksibenzaldehit türevlendirme aracı olarak kullanılmıştır. Analiz izokratik modda RP-18 kolon kullanılarak

gerçekleştirilmiştir. Analizde 30:70 oranında metanol- (% 5 trietilamin içeren) sodyumdihidrojen fosfat mobil faz olarak kullanılmıştır. Konsantrasyon aralığı 10-40 nmol mL⁻¹, LOD değeri 50 ng mL⁻¹, LOQ değeri 0,3-0,6 µg L⁻¹, korelasyon katsayısı ise 0,99'dan büyük olarak saptanmıştır [28].

Son yıllarda Talwar ve arkadaşları tarafından metilendioksi amfetaminlerin sodyumnaftokinon 4-sülfonat ile türevlendirilmesine dayalı bir HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Bu çalışmada UV dedeksiyonu kullanılmış ve türler 20 dakikada tanımlanmıştır. İdrar örneklerinde yapılan bu çalışmada MDA, MDMA ve MDEA için konsantrasyon aralığı 250-3500 ng mL⁻¹, dedeksiyon limitleri sırasıyla 75, 75 ve 65 ng mL⁻¹ olarak belirlenmiştir. Yöntem interferanslardan arınmıştır [29].

Sadeghipour ve arkadaşları metilendioksi amfetaminlerin analizini, LC ile birleştirilmiş floresans dedektörü kullanarak 30 dakikada gerçekleştirmişlerdir. Metilendioksi amfetaminler, MDA, MDMA ve MDEA'nın doğal floresansları yöntemde avantaj sağlamıştır. Uygulama sonucunda 2-3 ng mL⁻¹ dedeksiyon limiti ve yüksek hassasiyet sağlanmıştır. Yöntem serum ve plazma örneklerine uygulanabilmiştir. Metamfetamin ve amfetamin türleri metilendioksi yapısına sahip olmadığından (floresans özelliği sağlayan kısım) yukarıda belirtilen iki tür için yüksek seçicilik sağlanmıştır [30-31].

Fang ve arkadaşları tarafından metilendioksi amfetaminler için 9-florenillmetil kloroformat (FMOC) türevlendirmesine dayanan bir metot geliştirilmiştir. UV ve floresans dedeksiyonu kullanılarak gerçekleştirilen yöntemde türevlendirme yapılarak ve yapılmadan alınan ölçümler kıyaslanmıştır. Türevlendirme sonucu analitler için uygun seçicilik ve duyarlılık sağlandığı görülmüştür. Tayin aralığı 0,5-20 µg mL⁻¹, dedeksiyon limitleri MDA, MDMA ve MDEA için sırasıyla 0,01, 0,025, 0,025 µg mL⁻¹ dir. Metot plazma ve idrar örneklerine de uygulanmıştır [32].

Segura ve arkadaşları MDMA'nın başlıca metaboliti olan 3-hidroksi metabolitinin analizi için HPLC-EC yöntemini kullanmışlardır. Tayin aralığı 50-1000 ng mL⁻¹ olarak belirlenmiştir [33] .

Brunnenberg ve Kovar MDE ve metabolitleri olan HME, MDA için plazma örneklerinde kiral HPLC yöntemini kullanmıştır. MDA florometrik olarak analiz edilmiştir. Dedeksiyon limiti $1,2 \text{ ng mL}^{-1}$ 'dir [34].

Mancinelli de idrar, serum ve tükürük gibi biyolojik sıvılarda amfetamin ve türevlerinin analizleri için benzer bir yol kullanmış ve LOD değerini 2 ng mL^{-1} olarak bulmuştur [35].

4-bromo-2,5-dimetoksifeniletamin (2C-B) ve 4-metiltiyoamfetamin (4-MTA)'nın, AMP ve MDMA ile benzer amaçlarla kullanıldığı son zamanlarda kaydedilmiştir. Soares ve arkadaşları insan idrarında AMP ve metabolitleri p-hidroksiamfetamin (p-HAMP), MDMA, MDA, 2C-B ve 4-MTA'nın analizini katı faz ekstraksiyonu ardından HPLC yöntemini kullanarak gerçekleştirmiştir. Asit hidrolizinden sonra idrar OASIS MCX kolonu (katı faz ekstraksiyonunda kullanılan kolon) boyunca saflaştırılmış, metanol fazına alındıktan sonra % 5'lik amonyak ile elue edilmiştir. Eluat HPLC-UV sistemine enjekte edilmiştir. Sistemde C-18 kolon kullanılmıştır. Mobil faz $0,05 \text{ M } \% 0,1$ trietilamin içeren asetat tamponu ($\text{pH}=3,9$)'nun 1:1 oranda metanol ile karıştırılması sonucunda elde edilmiştir. Tayin 220 nm 'de yapılmıştır. Kesinlik için varyasyon katsayısı (bağıl standart sapma) tüm bileşikler için % 3,3 ile % 5,9 arasında saptanmıştır. Doğruluk % 85'in üzerindedir. Tayin limitleri 20 mL 'lik örnek için; 14, 5,3, 100, 34, 47, 33 ng 'dir [36].

Pellegrini ve arkadaşları ecstasy ve amfetaminler için idrar örneklerinde pozitif kimyasal iyonizasyon (PCI) dedektörü kullanılarak gerçekleştirilen bir GC-MS yöntemi sunmuştur. Örnek hazırlıkları likit-likit ekstraksiyonu ile sınırlandırılmıştır. Analiz 30 dakikada gerçekleştirilmiştir. Ölçümler ecstasy'nin 50-100 mg 'ının mideye alınmasından 48-72 saat sonra pozitif dedeksiyon vermiştir [37] .

Marquet ve arkadaşları kan örneklerinde amfetamin, metamfetamin, MDA, MDMA ve MDEA için hassas bir GC-MS metodu gerçekleştirmiştir. Electron-Impact dedeksiyonu kullanılan yöntem heptafloro bütirik asit türevlendirmesi ile uygulanmıştır. LOD değerleri sırasıyla MDA, MDMA ve MDEA için 8, 1 ve $0,5 \text{ ng mL}^{-1}$ 'dir [38].

Ortuno ve arkadaşları plazma örneklerinde MDMA ve MDEA için solid-likit ekstraksiyonu kullanılarak azot-fosfor dedeksiyonu ile gerçekleştirilen bir GC metodu uygulamıştır. Metot idrarda MDA, HMMA ve HMA metabolitlerinin analizi için modifiye edilmiştir. MDA için LOD değeri $1,6 \text{ ng mL}^{-1}$ olarak saptanmıştır [39].

Navarro ve arkadaşları tükürük örneklerinde MDMA ve metabolitlerinin analizi için GC-MS yöntemini kullanmıştır. Sonuçların plazmadaki konsantrasyonlar ile benzer olduğu görülerek tükürük örneklerinin amfetamin analizi açısından güvenilir bir matris olduğu görülmüştür [40].

Fucci ve arkadaşları, MDEA ve MDMA için tükürük örneklerinde solid faz ekstraksiyonunu kullanarak GC yöntemiyle analiz etmiştir [41].

Stead ve arkadaşları, TLC sistemlerinin standardizasyonunu yapmış, 8 tane TLC sistemini kullanarak 794 tane uyuşturucunun Rf değerleri listelemişlerdir [42].

O'Brien ve arkadaşları, 2 çözücü sistemiyle farklılandırılmış amfetamin ve onun başlıca halusiojenik türevlerini tayin etmek için TLC'yi kullanmışlardır [43].

Baileys ve arkadaşları, UV, IR, NMR ve erime noktalarını kullanarak amfetaminlerin N-metillenmiş analoglarının tanımlanmasını yapmışlardır. N-metillenmiş amfetaminleri ayırmak için 6 ince tabaka kromatografi sistemi kullanılmıştır. Geliştirilen tabakalar 254 nm UV ışınımı altında ninhidrin püskürtülerek incelenmiştir [44].

Vinson ve arkadaşları, sokak uyuşturucularının genel tanımlanması için ince tabaka kromatografisi çözücü sistemini (etilasetat-metanol-amonyak (100:18:1,5)) önermiştir. Doğrulayıcı sistem olarak da TLC çözücü sistemini (metanol-amonyağı (100:1,5)) önermiştir [45].

Loh ve arkadaşları, 3x3 cm poliamid tabakalar kullanarak çeşitli TLC sistemlerindeki amfetamin ve metamfetamin türevlerinin kromatogramını 5 dakikadan az bir sürede çıkartmışlardır [46].

Manuela ve arkadaşları insan plazmasında düşük konsantrasyonda bulunan fluoksetin (FLU) için izokratik elüsyona dayalı bir HPLC analizi geliştirmiştir. Yöntemde likitlik ekstraksiyonu sonrasında iç standart olarak diazepam kullanılmış, RP kolonda UV dedektörü ile 226 nm'de analiz gerçekleştirilmiştir. Kromatografik ayırma 30 dakikada gerçekleşmiş, yüzde geri kazanım % 101, RSD % 4,78 ve LOQ değeri 5 ng mL^{-1} olarak bulunmuştur [47].

Jean-Claude ve arkadaşları biyolojik sıvılarda FLU ve onun metaboliti olan N-FLU'nun analizi için bir HPLC yöntemi kullanmıştır. Analiz 227 nm'de UV dedektörle gerçekleştirilmiş, % 90 yüzde geri kazanım, 5 ng mL^{-1} LOD değeri elde edilmiştir [48].

B. Venkateswara ve arkadaşları olanzapin ve FLU için bir RP-HPLC yöntemi geliştirmiştir. Analiz C-18 kolonda, 225 nm'de, $1,2 \text{ mL min}^{-1}$ akış hızıyla gerçekleştirilmiştir. Mobil faz olarak 40:30:30 (v/v/v) oranında $9,5 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$ (pH trietilamin ile $6,8 \pm 0,1$ 'e ayarlanmış), asetonitril ve metanol ve iç standart olarak paroksetin kullanılmıştır. Korelasyon katsayısı olanzapin ve FLU için $\geq 0,995$, LOQ olanzapine için $0,005 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, FLU için $0,001 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ olarak bulunmuştur [49].

Wilson ve arkadaşları tarafından, 10 trisiklik ve nontrisiklik antidepresanın (imipramin, amitriptilin, slomipramin, FLU, sertralin, paroksetin, sitalopram, mirtazapin, moklobemid ve duloksetin) analizi bir RP-HPLC yöntemi kullanılarak 230 nm'de izokratik elüsyon ile gerçekleştirilmiştir. Moklobemid (% 59) dışında diğer antidepresanlar için % 72 ve % 86 aralığında yüzde geri kazanımlar elde edilmiştir. LOQ değerleri moklobemid için ng mL^{-1} , sitalopram, duloksetin ve amitriptilin için 5 ng mL^{-1} , mirtazapin, paroksetin, imipramin, fluoksetin, sertralin ve slomipramin için 10 ng mL^{-1} dir [50].

Saleh ve arkadaşları plazma ve idrarda FLU ve fluvoxamine (FLV) analizi için bir NMR metodu kullanmışlardır. LOD değeri $0,5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ($1,3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$), LOQ değeri $2 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ($4,6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$)'dir. İdrar örneklerinde yüzde geri kazanım % 96-103 aralığında, plazma örneklerinde ise % 93-104 arasında, bağıl standart sapma ise $< \% 7,5$ 'dür [51].

Islam ve arkadaşları tarafından FLU için spektrofotometrik bir metot geliştirilmiştir. FLU benzoil perosit ve potasyum iyodür ile reaksiyona sokulup 30 °C'de 1 dakika ısıtılmış ve meydana gelen mavi renkli bileşik 570 nm'de maksimum absorbands vermiştir. LOQ değeri 0,01 mg mL⁻¹, relatif standart sapma % 0,68'dir [52].

Lories ve arkadaşları yaygın olarak kullanılan iki antidepresan olan FLU ve sertralin için bir spektrofotometrik metot geliştirmişlerdir. Metot uyarıcıların, π akseptörleri olan kloranil, 2,3 dikloro-5, 6-disiyanokinon (DDQ) ve σ akseptörü olan iyot ile oluşturduğu yük transfer kompleksi reaksiyonlarına dayanmaktadır. FLU için kloranil, DDQ ve iyot ile meydana gelen renkli ürünler sırasıyla 550, 450 ve 263 nm'de, sertralin için ise 450, 455 ve 290 nm'de maksimum absorbands vermiştir. FLU için yüzde geri kazanım değerleri % 99,83, 99,76 ve 100,00, relatif standart sapma değerleri % 1,24, 0,95 ve 1,13, sertralin için ise % 100,39, 99,78 ve 99,69, relatif standart sapma değerleri % 1,02, 0,81 ve 0,57'dir [53].

R. Fontanille ve arkadaşları plazmada FLU ve metaboliti N-FLU için bir GC metodu geliştirmişlerdir. Bir organik çözücü ile ekstrakte edilmiş 1 mL plazma örneği OV-1 fused-silica kolon ve azot-fosfor dedektörü ile birleşmiş GC sistemine enjekte edilmiştir. Dedeksiyon limitleri sırasıyla FLU ve N-FLU için 0,3 ve 2 ng mL⁻¹ dir [54].

Li Ding ve arkadaşları sibutramin ve onun iki aktif N-desmetil metabolitinin plazmada analizi için bir LC-ESI-MS metodu kullanmışlardır. İç standart olarak fenoprolamin hidroklorür kullanılmıştır. Sodyumbikarbonat ile alkali hale getirilmiş örnekler sikloheksan ile ekstrakte edildikten sonra RP-HPLC sistemi ile ayrılmıştır. Mobil faz olarak 25:75 (v/v) 10 mM amonyum asetat (asetik asit ile pH 3,5'a ayarlanmış) ve metanol kullanılmıştır. Kütle spektrometrisinde sibutramin için kütle/yük oranı m/z : 280, N-mono-desmetilsibutramin (metabolit 1) için kütle/yük oranı m/z : 266, N-di-desmetilsibutramin (metabolit 2) için kütle/yük oranı m/z : 252, iç standart için kütle/yük oranı m/z : 344'dür. Ekstraksiyon yüzde geri kazanımı sırasıyla sibutramin, metabolit 1 ve metabolit 2 için % 90,2, 90,9 ve 91,0'dir [55].

A.I. Segail ve arkadaşları tarafından sibutramin analizi için bir RP-HPLC yöntemi tanımlanmıştır. Yöntem C-18 kolon ile 225 nm'de 1,1 mL min⁻¹ akış hızıyla

uygulanmıştır. Mobil faz olarak 80: 20: 0.3 (v/v/v) metanol, su, trietilamin (% 85'lik fosforik asit ile pH 4,5'a ayarlanmış) kullanılmıştır. Yüzde geri kazanım değeri % 100,4±1,8'dir. Relatif standart sapma % 0,4'ün altındadır [56].

T. Radhakrishna ve arkadaşları iç standart olarak 4-kloro anilin ve lovastatin kullanarak sibutramin için iki izokratik LC metodu geliştirmişlerdir. Relatif standart sapma % 1.3'ün altında, korelasyon katsayısı 0,999'un üzerindedir. Ölçümler 225 nm'de C-18 kolon kullanılarak yapılmıştır. Birinci metotta mobil faz olarak pH'ı ortofosforik asit ile 6'ya ayarlanmış 0,05 M diamonyum hidrojen fosfat (% 35) çözeltisi ve asetonitril (% 65) kullanılmış, 1,0 mL min⁻¹ akış hızıyla izokratik elüsyon gerçekleştirilmiştir. İkinci metotta ise mobil faz olarak % 1'lik trietilamin çözeltisi (% 30) (pH'ı ortofosforik asit ile 6'ya ayarlanmış) ve asetonitril (% 70) kullanılmış, 1,5 mL min⁻¹ akış hızıyla izokratik elüsyon gerçekleştirilmiştir [11].

Chandorkar ve arkadaşları tarafından sibutramin için geliştirilen izokratik RP-HPLC metodunda mobil faz olarak sodyumdihidrojen fosfat ve asetonitril kullanılmış, C-8 RP kolonda, 230 nm'de, 1,0 mL min⁻¹ akış hızıyla analiz gerçekleştirilmiştir. LOD değeri 2 µg mL⁻¹, LOQ değeri 5 µg mL⁻¹, yüzde geri kazanım % 99,3-100, relatif standart sapma % 2,0'nin altındadır [57].

J. Wang ve arkadaşları içinde sibutramin de bulunan altılı bir sentetik karışımın (fenfloramin, fenolftalein, N-di-desmetil sibutramin, N-mono-desmetil sibutramin, sibutramin ve orlistat) ayırımında bir LC-ESI-MS metodu kullanmışlardır. Yöntem kilo verdirici bitkisel ürünlere uygulanmıştır. Kromatografik ayırım C-8 RP kolonda, gradient olarak, asetonitril ve 20 mM amonyum format mobil fazları ve iç standart olarak sildenafil kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Fenfloramin, fenolftalein, N-di-desmetil sibutramin, N-mono-desmetil sibutramin, sibutramin, orlistat ve sildenafil için sırasıyla m/z değerleri 232, 319, 252, 266, 280, 496 ve 475'dir. LOD 0,0018-0,73 µgg⁻¹, yüzde geri kazanım ise % 92,7-109,5 aralığındadır [58].

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. KULLANILAN CİHAZLAR

Bu çalışmada kullanılan cihazlar; kimyasal madde tartımları için Shimadzu-AX 200 analitik terazi, pH ölçümleri için Metrohm Herisau E512 pH metre, bidistile su üretimi için Millipore Simpak 1 Synergy 185 bidistile su sistemi, absorbans ölçümleri ve spektrum çizimleri için Cary 1E UV-Vis spektrofotometre, HPLC ayırmaları için Perkin Elmer Series 200 UV-Vis dedektör, Perkin Elmer Series 200 pompa, Perkin Elmer Series 200 vakum degazer, Perkin Elmer 600 Series Link Chromatography ara yüzey (interface) ve Macherey Nagel marka 250 x 4,6 mm, HxSil 5 µm C-18 HPLC kolonudur.

3.2. KİMYASAL MADDELER

(±)-N-metil-3,4-metilendioksiamfetamin hidroklorür (MDMA, Ecstasy etken maddesi) ve 3,4-metilendioksiamfetamin (MDA); Lipomed marka sertifikalı referans materyallerdir. Validasyon çalışmalarında kullanılan ecstasy tabletler İstanbul Emniyet Müdürlüğü Kriminal Polis Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir.

1-(4-klorofenil)-N,N-dimetil-a-(2-metilpropil)-siklobütanmetanamin (Sibutramin, Lida etken maddesi) % 100,18 saflıkta olup İstanbul Gıda İhtisas Gümrük Laboratuvarı'ndan, validasyon çalışmalarında kullanılan lida kapsüller Kunming Dali Industry&Trade Co. Ltd'den temin edilmiştir.

Saf N-metil-3-fenil-3-[4- (triflorometil)fenoksi]propan-1-amin (Fluoksetin, Prozac etken maddesi) % 99 saflıkta olup interferan analizlerinde kullanılan saf patent blue V, talk, sarı demir oksit (Fe₂O₃ .H₂O), ve validasyon çalışmalarında kullanılan Prozac (20 mg fluoksetin/kapsül) Deva İlaç A.Ş.'den temin edilmiştir.

İnterferans analizlerinde kullanılan glukoz, fruktoz ve titanyum dioksit Merck marka, kafein ve parasetamol ise Fluka markadır. Denemeler esnasında kullanılan metanol ve asetonitril Sigma-Aldrich marka, kloroform Riedel-de Haen markadır ve tüm çözücüler HPLC saflıktadır. Bromocresol purple (BCP) (Riedel-de Haen), eriochrom black T (erio-T), metil oranj, n-bütanol, asetik asit, sodyum hidroksit, sodyum asetat, potasyum dihidrojen fosfat, HPLC analizlerinde kullanılan % 85'lik o-fosforik asit ve trietilamin Merck markadır.

3.2.1. Çözeltilerin Hazırlanması

Tüm MDMA, MDA, fluoksetin, sibutramin saf maddelerinin stok çözeltileri metanolde çözülerek hazırlanmıştır. Ecstasy, prozac ve lida gibi haplar ise MDMA, fluoksetin ve sibutramin etken maddeleri yanında bir takım dolgu maddelerini de içermelerinden dolayı metanolde çözülüp, çözülen kısımlar mavi bant süzgeç kağıdı ile süzülerek çözünmeyen kısımlar ayrılmış ve çözülen kısım metanol ile hacme tamamlanarak çözeltileri hazırlanmıştır. Tüm stok çözeltiler ışıktan korunmuş ve dolapta saklanmıştır.

❖ Spektrofotometrik yöntemde kullanılan diğer çözeltiler:

Tampon çözeltiler: Farklı pH koşullarında çalışmak üzere kullanılan tampon çözeltilerden pH 1, 2 tamponları 0,1 M KCl-HCl, pH 3-5 tamponları 0,2 M NaAc-HAc kullanılarak distile su ile hazırlanmıştır.

Reaktif çözeltileri: 500 µg mL⁻¹'lik erio-T ve BCP çözeltileri ile 1000 µg mL⁻¹'lik metil oranj çözeltisi distile suda çözülerek hazırlanmıştır.

İnterferan madde analizlerinde kullanılan çözeltiler: İnterferan madde analizi için kullanılan kafein, parasetamol, sarı demir oksit (Fe₂O₃ .H₂O), titanyum dioksit, patent blue V, glukoz, fruktoz ve talk gibi maddeler metanolde çözülerek hazırlanmıştır. Bu maddelerden sarı demir oksit, titanyum dioksit ve talk metanolde çözünmediğinden süspansiyon halinde kullanılmıştır.

❖ HPLC yönteminde kullanılan çözeltiler:

Tüm MDMA, MDA, ecstasy, fluoksetin, prozac, sibutramin ve lida stok çözeltileri metanolde çözülerek hazırlanmıştır. MDMA, MDA, fluoksetin ve sibutramin maddeleri saf maddeler olduğundan metanolde kolaylıkla çözünmektedirler. Fakat ecstasy, prozac ve lida gibi hapların MDMA, fluoksetin ve sibutramin etken maddelerinin yanı sıra bir takım dolgu maddelerini de içermelerinden dolayı metanolde çözülüp, çözülen kısımlar mavi bant süzgeç kağıdı ile süzülerek çözünmeyen kısımlar ayrılmış ve çözülen kısım metanol ile hacme tamamlanarak çözeltileri hazırlanmıştır.

Mobil faz (mobil faz B) çözeltisi: o-fosforik asit ile pH'ı 6'ya ayarlanmış % 1 trietilamin içeren çözelti (bidistile su kullanılarak hazırlanmıştır).

3.3. UYGULANAN YÖNTEMLER

3.3.1. Ekstraktif-Spektrofotometrik Yöntem

Kullanılan ekstraktif spektrofotometrik yöntemin amacı, amin yapılı (primer, sekonder, tersiyer aminler) uyarıcı maddelerin anyonik boyalar ile asidik ortamda meydana getirdikleri iyon asosiyatı oluşumu ve bu iyon asosiyatının uygun organik faza çekilmesi suretiyle tayinlerinin yapılmasıdır. İyon asosiyatı katyonik amin ile sulfonil grubuna sahip olan anyonik yapıdaki boyalar arasında oluşmaktadır. Denemelerde kullanılan sulfonil grubu içeren bu anyonik boyalar ve katyonik yapıdaki amin grupları içeren uyarıcı maddeler Şekil 3.1'de görülmektedir. Şilifli bir deney tüpü içerisine sırasıyla 0,5 mL indikatör çözeltisi, 2 mL tampon çözelti, 1 mL örnek çözeltisi ve 3 mL organik çözücü (erio-T için 20:1 kloroform-bütanol karışımı, BCP için 10:1 kloroform-bütanol karışımı ve metil oranj için kloroform) ilave edilerek ekstraksiyon yapılmıştır. Alt kısmındaki organik faz mavi bant süzgeç kağıdından süzildükten sonra ele geçen çözeltinin, referans çözeltinin ekstraktına karşı uygun dalga boyunda spektrofotometrik ölçümü yapılmıştır. Referans çözelti, amin analiti dışında kalan tüm karışım bileşenlerini içeren çözelti olarak tanımlanmaktadır. Organik fazda oluşan renk minimum 30 dakika kararlıdır.

3.3.2. Kromatografik Yöntem

3.3.2.1. HPLC Analizi

Ayrırmalar, Hamilton marka 250 x 4,6 mm, partikül büyüklüğü 5 µm olan HxSil C-18 HPLC kolonunda gerçekleştirilmiştir.

HPLC yöntemi ile (akış hızı 1,8 mL min⁻¹ olarak modifiye edilmiştir) [11]; MDMA, MDA, fluoksetin ve sibutramin tek bir kromatogramda birbirlerinden ayrılarak analiz edilmiştir.

Kromatografik şartlar:

Asetonitril (A) ve o-fosforik asit kullanılarak pH'ı 6'ya ayarlanmış % 1'lik trietilamin çözeltisi (B) ikili çözücü sisteminden oluşan hareketli fazın izokratik elüsyonu uygulanmıştır. Çözeltiler bidistile su kullanılarak hazırlanmıştır.

30 dakika % 70 (A) - % 30 (B)

Akış hızı 1,8 mL min⁻¹, dedeksiyon (belirleme) dalga boyu 225 nm, elüsyon süresi 30 dakika'dır.

4. BULGULAR

4.1. MDMA, MDA, FLUOKSETİN VE SİBUTRAMİN STANDARTLARI KULLANILARAK EKSTRAKTİF-SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEMİN OPTİMİZASYONU

4.1.1. Ekstraksiyon İçin Uygun Organik Çözücü Seçimi

Kullanılan ekstraktif-spektrofotometrik yöntemde iyon asosiyatı komplekslerinin uygun ekstraksiyonunu sağlamak açısından kloroform, karbon tetraklorür, isobutilmetilketon ve oktanol gibi organik çözücüler ile çalışmalar yapılmıştır. Kloroform dışındaki diğer tüm organik çözücüler varlığında (karbon tetraklorür, isobutilmetilketon ve oktanol) referans çözeltilerin organik fazı (referans çözeltinin ekstraktı) renklenmiş, dolayısıyla spektrofotometrik ölçümler sonunda elde edilen analite ait net absorbansın azalışına sebep olmuştur. Bu çalışmalar sonucunda ekstraksiyon için kloroform uygun çözücü olarak saptanmıştır. Erio-T ve BCP için kloroform ile polarlığı arttıracak bütanol'ün (polar çözücü) belirli oranlardaki karışımı kullanılmıştır. Erio-T reaktifi için 20:1, BCP reaktifi için 10:1 oranında kloroform-bütanol karışımı, metil oranj reaktifi ile yapılan çalışmalarda ise organik çözücü olarak sadece kloroform kullanılmıştır.

4.1.2. Kullanılan Tampon Çözeltilerin Seçimi

Kullanılan ekstraktif-spektrofotometrik yöntemdeki iyon asosiyatları oluşumunun asidik ortamda gözlenmesi esas alındığından yapılan pH çalışmaları pH 1-5 aralığında gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle uygun ekstraksiyonu sağlamak için kullanılan en uygun tampon çözeltilerin pH 3 ve 5 aralığındakiler için 0,2 M'lık NaAc-HAc tamponu olduğu görülmüştür. pH 1 ve 2 ise 0,1 M'lık HCl-KCl çözeltileri kullanılarak hazırlanmıştır. pH 3-5 aralığındaki tamponların hazırlanması için HCl-KHftalat, NaOH-KHftalat ve 0,5 M Sitrik asit-0,2 M Na₂HPO₄ karışımları da denenmiştir. Fakat NaAc-HAc tamponları ile karşılaştırıldığında diğer tamponların ekstraksiyon verimini düşürdüğü görülmektedir. Aynı şartlarda NaAc-HAc tamponu ile diğer tamponlar kullanılarak

yapılan denemeler kıyaslandığında NaAc-HAc tamponları ile daha yüksek absorbanlar elde edilmiştir. Ayrıca 0,2 M konsantrasyonun altındaki NaAc-HAc tamponu yeterince tamponlama gücüne sahip olmadığından ve 0,2 M'in üzerindeki konsantrasyonlarda da referans çözeltisinin organik ekstraktında renklenme görüldüğünden uygun konsantrasyon olarak 0,2 M seçilmiştir.

4.1.3. Optimum Çalışma pH'ının Belirlenmesi

Erio-T, BCP ve metil oranj reaktifleri kullanılarak MDMA, MDA, fluoksetin ve sibutramin analitleri için pH çalışmaları yapılmış, pH-absorbans grafikleri çizilmiştir.

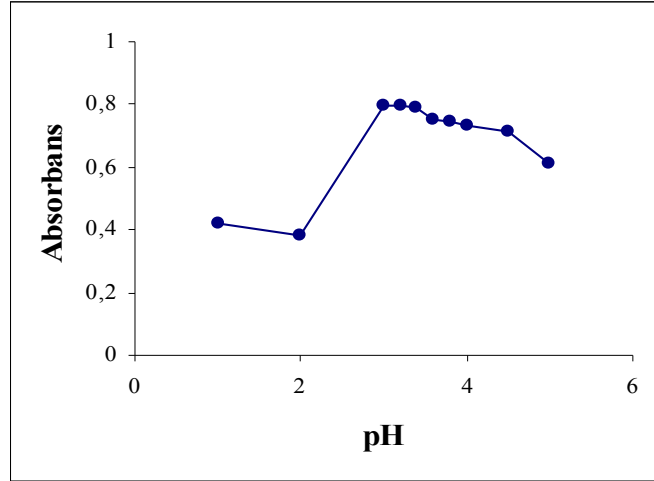
4.1.3.1. Erio-T Reaktifi İle MDMA, MDA, Fluoksetin ve Sibutramin Tayini İçin Optimum pH Tespiti

❖ MDMA Tayini İçin Optimum Çalışma pH'ının Tespiti

Ekstraksiyon için en uygun çalışma pH'ını bulmak açısından pH:1-5 aralığında $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ MDMA ile $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ erio-T reaktifi kullanılarak deneme yapılmıştır. pH çalışmasının sonuçları Tablo 4.1'de, pH-absorbans grafiği ise Şekil 4.1'de görülmektedir.

Tablo 4.1: Erio-T reaktifi ile MDMA tayininde pH-absorbans değişimi.

pH	A ₅₁₃
1,0	0,421
2,0	0,383
3,0	0,799
3,2	0,795
3,4	0,789
3,6	0,751
3,8	0,745
4,0	0,733
4,5	0,715
5,0	0,612



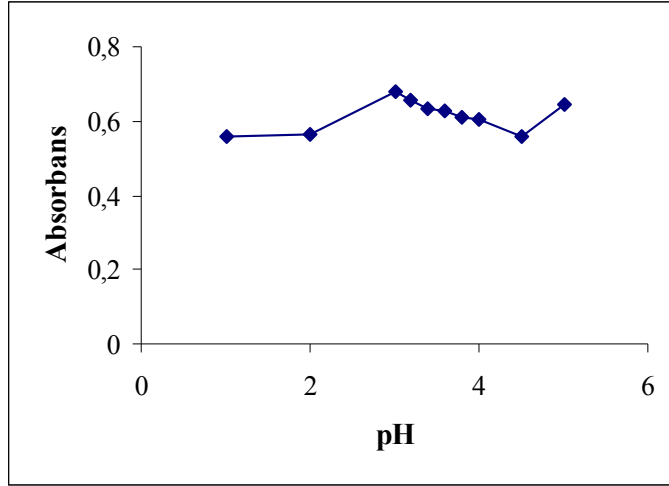
Şekil 4.1: Erio-T reaktifi ile MDMA tayini için pH değişiminin incelenmesi.

❖ MDA Tayini İçin Optimum Çalışma pH'ının Tespiti

Ekstraksiyon için en uygun çalışma pH'ını bulmak açısından pH:1-5 aralığında $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ MDA ile $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ erio-T reaktifi kullanılarak deneme yapılmıştır. pH çalışmasının sonuçları Tablo 4.2'de, pH-absorbans grafiği ise Şekil 4.2'de görülmektedir.

Tablo 4.2: Erio-T reaktifi ile MDA tayininde pH-absorbans değişimi.

pH	A_{513}
1,0	0,556
2,0	0,565
3,0	0,680
3,2	0,656
3,4	0,631
3,6	0,627
3,8	0,612
4,0	0,605
4,5	0,558
5,0	0,644



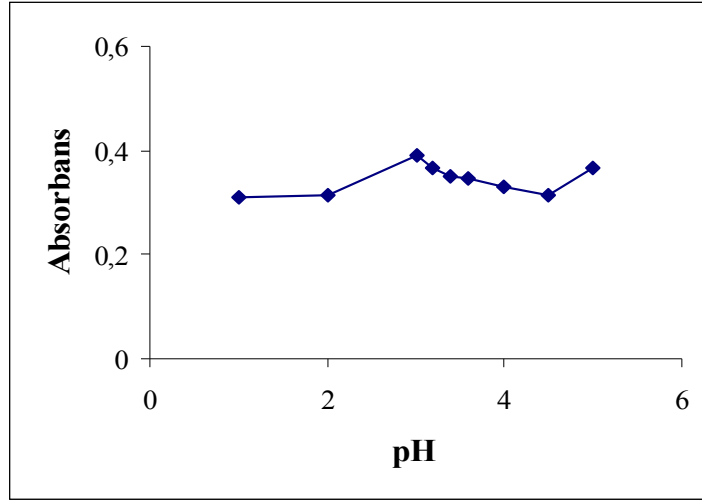
Şekil 4.2: Erio-T reaktifi ile MDA tayini için pH değişiminin incelenmesi.

❖ Fluoksetin Tayini İçin Optimum Çalışma pH'ının Tespiti

Ekstraksiyon için en uygun çalışma pH'ını bulmak açısından pH:1-5 aralığında $6 \mu\text{g mL}^{-1}$ Fluoksetin ile $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ erio-T reaktifi kullanılarak deneme yapılmıştır. pH çalışmasının sonuçları Tablo 4.3'de, pH-absorbans grafiği ise Şekil 4.3'de görülmektedir.

Tablo 4.3: Erio-T reaktifi ile fluoksetin tayininde pH-absorbans değişimi..

pH	A_{525}
1,0	0,310
2,0	0,313
3,0	0,391
3,2	0,365
3,4	0,350
3,6	0,346
4,0	0,331
4,5	0,315
5,0	0,366



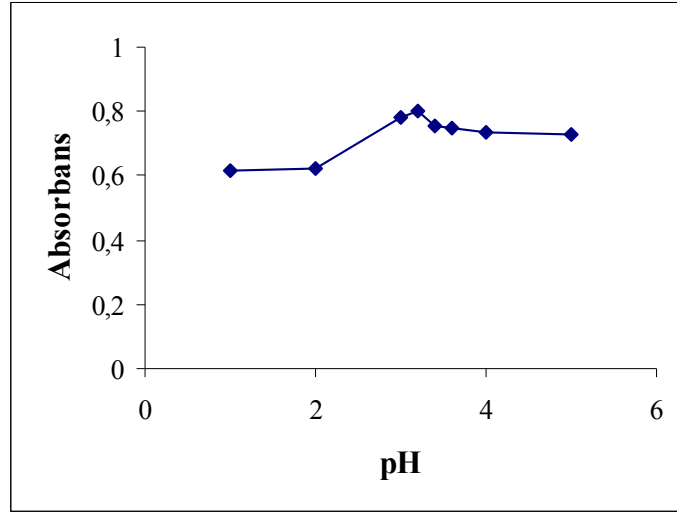
Şekil 4.3: Erio-T reaktifi ile fluoksetin tayini için pH değişiminin incelenmesi.

❖ Sibutramin Tayini İçin Optimum Çalışma pH'ının Tespiti

Ekstraksiyon için en uygun çalışma pH'ını bulmak açısından pH:1-5 aralığında $12 \mu\text{g mL}^{-1}$ sibutramin ile $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ erio-T reaktifi kullanılarak deneme yapılmıştır. pH çalışmasının sonuçları Tablo 4.4'de, pH-absorbans grafiği ise Şekil 4.4'de görülmektedir.

Tablo 4.4: Erio-T reaktifi ile sibutramin tayininde pH-absorbans değişimi.

pH	A_{525}
1,0	0,616
2,0	0,624
3,0	0,783
3,2	0,803
3,4	0,755
3,6	0,747
4,0	0,736
5,0	0,731



Şekil 4.4: Erio-T reaktifi ile sibutramin tayini için pH değişiminin incelenmesi.

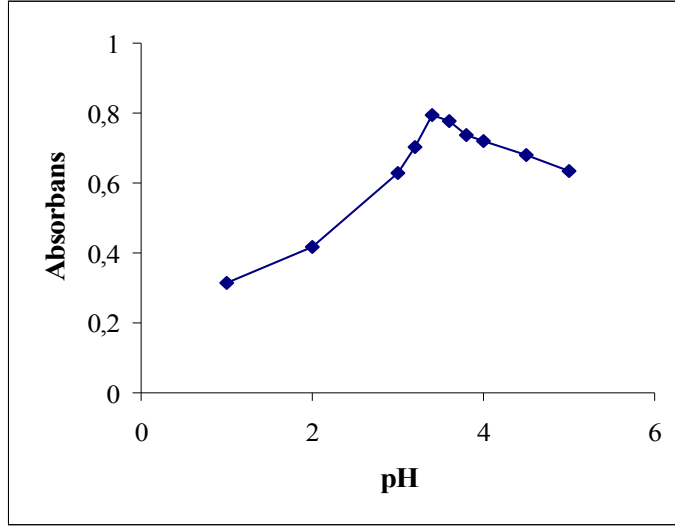
4.1.3.2. BCP Reaktifi İle MDMA, MDA, Fluoksetin ve Sibutramin Tayini İçin Optimum pH Tespiti

❖ MDMA Tayini İçin Optimum Çalışma pH'ının Tespiti

Ekstraksiyon için en uygun çalışma pH'ını bulmak açısından pH:1-5 aralığında $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ MDMA ile $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ BCP reaktifi kullanılarak deneme yapılmıştır. pH çalışmasının sonuçları Tablo 4.5'de, pH-absorbans grafiği ise Şekil 4.5'de görülmektedir.

Tablo 4.5: BCP reaktifi ile MDMA tayininde pH-absorbans değişimi.

pH	A_{412}
1,0	0,314
2,0	0,419
3,0	0,631
3,2	0,705
3,4	0,795
3,6	0,777
3,8	0,739
4,0	0,718
4,5	0,678
5,0	0,632



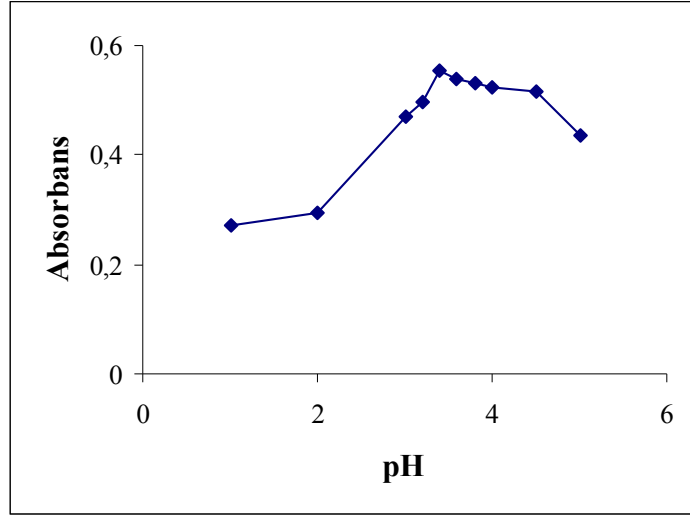
Şekil 4.5: BCP reaktifi ile MDMA tayini için pH değişiminin incelenmesi.

❖ MDA Tayini İçin Optimum Çalışma pH'ının Tespiti

Ekstraksiyon için en uygun çalışma pH'ını bulmak açısından pH:1-5 aralığında $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ MDA ile $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ BCP reaktifi kullanılarak deneme yapılmıştır. pH çalışmasının sonuçları Tablo 4.6'da, pH-absorbans grafiği ise Şekil 4.6'da görülmektedir.

Tablo 4.6: BCP reaktifi ile MDA tayininde pH-absorbans değişimi.

pH	A_{412}
1,0	0,270
2,0	0,294
3,0	0,469
3,2	0,496
3,4	0,553
3,6	0,539
3,8	0,531
4,0	0,524
4,5	0,515
5,0	0,437



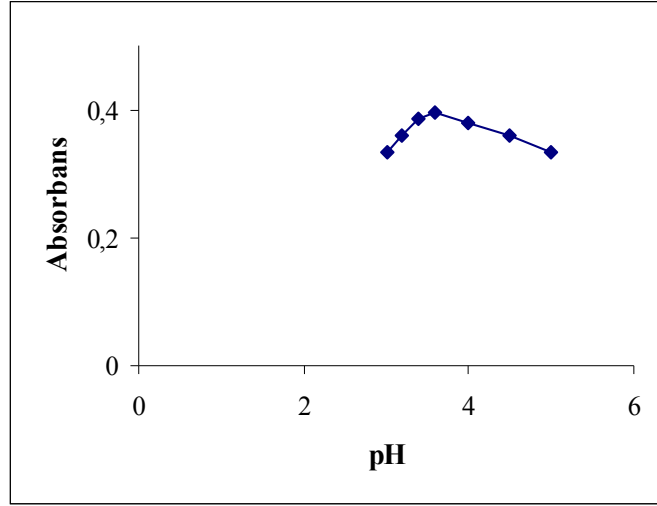
Şekil 4.6: BCP reaktifi ile MDA tayini için pH değişiminin incelenmesi.

❖ Fluoksetin Tayini İçin Optimum Çalışma pH'ının Tespiti

Ekstraksiyon için en uygun çalışma pH'ını bulmak açısından pH:1-5 aralığında $6 \mu\text{g mL}^{-1}$ fluoksetin ile $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ BCP reaktifi kullanılarak deneme yapılmıştır. pH çalışmasının sonuçları Tablo 4.7'de, pH-absorbans grafiği ise Şekil 4.7'de görülmektedir.

Tablo 4.7: BCP reaktifi ile fluoksetin tayininde pH-absorbans değişimi.

pH	A ₄₁₅
1,0	-
2,0	-
3,0	0,334
3,2	0,360
3,4	0,387
3,6	0,395
4,0	0,380
4,5	0,358
5,0	0,333



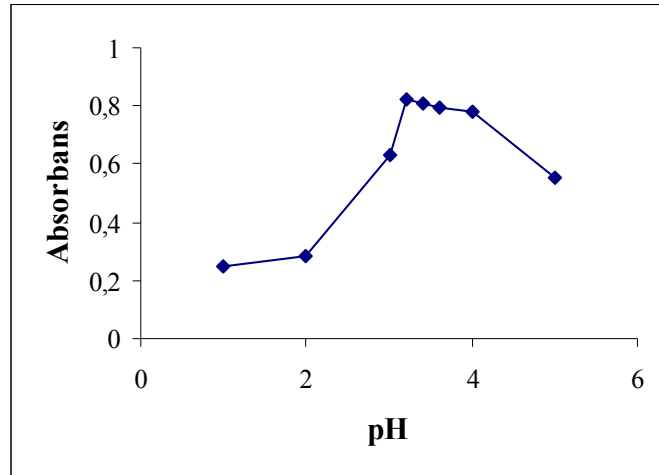
Şekil 4.7: BCP reaktifi ile fluoksetin tayini için pH değişiminin incelenmesi.

❖ Sibutramin Tayini İçin Optimum Çalışma pH'ının Tespiti

Ekstraksiyon için en uygun çalışma pH'ını bulmak açısından pH:1-5 aralığında $12 \mu\text{g mL}^{-1}$ sibutramin ile $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ BCP reaktifi kullanılarak deneme yapılmıştır. pH çalışmasının sonuçları Tablo 4.8'de, pH-absorbans grafiği ise Şekil 4.8'de görülmektedir.

Tablo 4.8: BCP reaktifi ile sibutramin tayininde pH-absorbans değişimi.

pH	A_{415}
1,0	0,250
2,0	0,284
3,0	0,628
3,2	0,826
3,4	0,812
3,6	0,794
4,0	0,782
5,0	0,556



Şekil 4.8: BCP reaktifi ile sibutramin tayini için pH değişiminin incelenmesi.

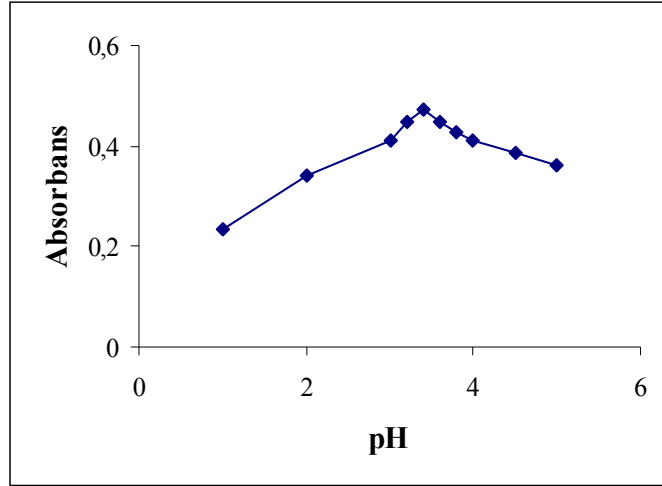
4.1.3.3. Metil Oranj Reaktifi İle MDMA, MDA, Fluoksetin ve Sibutramin Tayini İçin Optimum pH Tespiti

❖ MDMA Tayini İçin Optimum Çalışma pH'ının Tespiti

Ekstraksiyon için en uygun çalışma pH'ını bulmak açısından pH:1-5 aralığında $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ MDMA ile $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ metil oranj reaktifi kullanılarak deneme yapılmıştır. pH çalışmasının sonuçları Tablo 4.9'da, pH-absorbans grafiği ise Şekil 4.9'da görülmektedir.

Tablo 4.9: Metil oranj reaktifi ile MDMA tayininde pH-absorbans değişimi.

pH	A_{423}
1,0	0,233
2,0	0,342
3,0	0,412
3,2	0,448
3,4	0,473
3,6	0,448
3,8	0,427
4,0	0,412
4,5	0,386
5,0	0,360



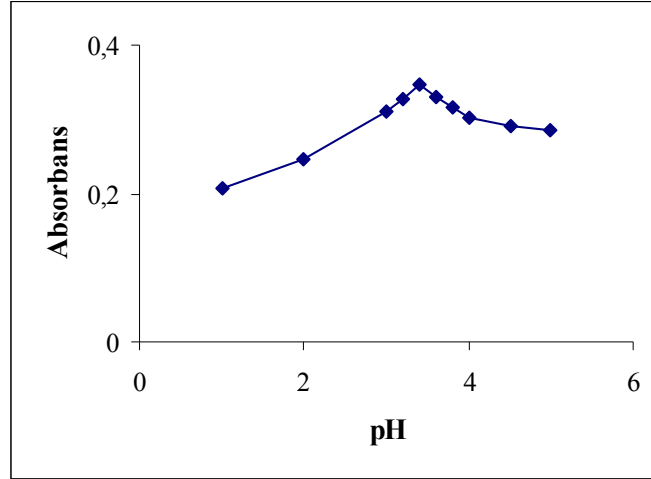
Şekil 4.9: Metil oranj reaktifi ile MDMA tayini için pH değişiminin incelenmesi.

❖ MDA Tayini İçin Optimum Çalışma pH'ının Tespiti

Ekstraksiyon için en uygun çalışma pH'ını bulmak açısından pH:1-5 aralığında $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ MDA ile $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ metil oranj reaktifi kullanılarak deneme yapılmıştır. pH çalışmasının sonuçları Tablo 4.10'da, pH-absorbans grafiği ise Şekil 4.10'da görülmektedir.

Tablo 4.10: Metil oranj reaktifi ile MDA tayininde pH-absorbans değişimi.

pH	A_{423}
1,0	0,206
2,0	0,246
3,0	0,311
3,2	0,327
3,4	0,348
3,6	0,331
3,8	0,315
4,0	0,301
4,5	0,292
5,0	0,286



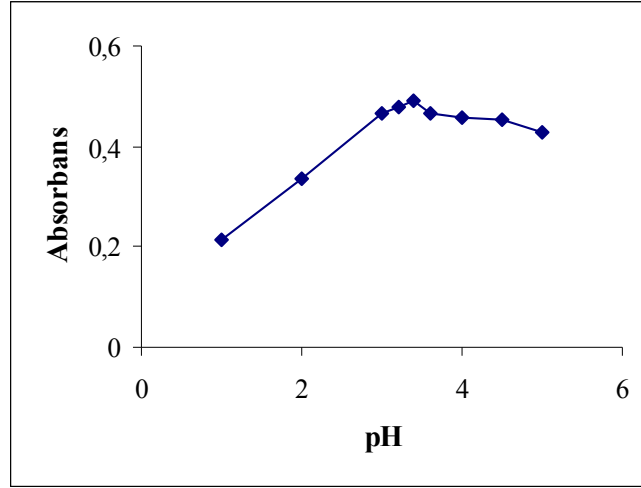
Şekil 4.10: Metil oranj reaktifi ile MDA tayini için pH değişiminin incelenmesi.

❖ Fluoksetin Tayini İçin Optimum Çalışma pH'ının Tespiti

Ekstraksiyon için en uygun çalışma pH'ını bulmak açısından pH:1-5 aralığında $6 \mu\text{g mL}^{-1}$ fluoksetin ile $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ metil oranj reaktifi kullanılarak deneme yapılmıştır. pH çalışmasının sonuçları Tablo 4.11'de, pH-absorbans grafiği ise Şekil 4.11'de görülmektedir.

Tablo 4.11: Metil oranj reaktifi ile fluoksetin tayininde pH-absorbans değişimi.

pH	A_{425}
1,0	0,213
2,0	0,337
3,0	0,467
3,2	0,477
3,4	0,491
3,6	0,464
4,0	0,456
4,5	0,452
5,0	0,430



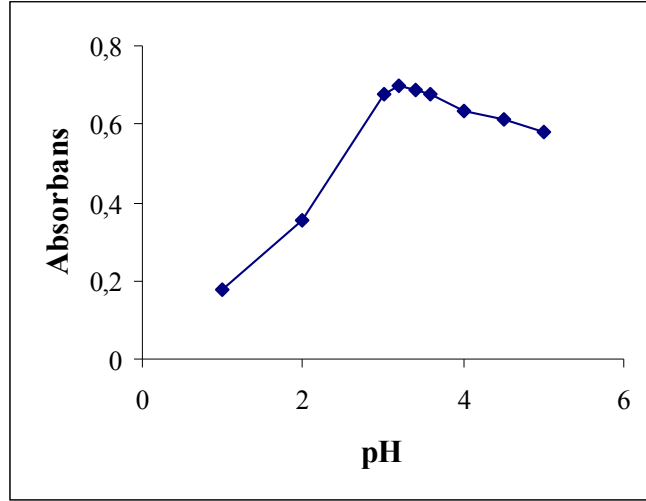
Şekil 4.11: Metil oranj reaktifi ile fluoksetin tayini için pH değişiminin incelenmesi.

❖ Sibutramin Tayini İçin Optimum Çalışma pH'ının Tespiti

Ekstraksiyon için en uygun çalışma pH'ını bulmak açısından pH:1-5 aralığında $8 \mu\text{g mL}^{-1}$ sibutramin ile $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ metil oranj reaktifi kullanılarak deneme yapılmıştır. pH çalışmasının sonuçları Tablo 4.12'de, pH-absorbans grafiği ise Şekil 4.12'de görülmektedir.

Tablo 4.12: Metil oranj reaktifi ile sibutramin tayininde pH-absorbans değişimi.

pH	A_{425}
1,0	0,176
2,0	0,352
3,0	0,674
3,2	0,698
3,4	0,686
3,6	0,679
4,0	0,635
4,5	0,613
5,0	0,581



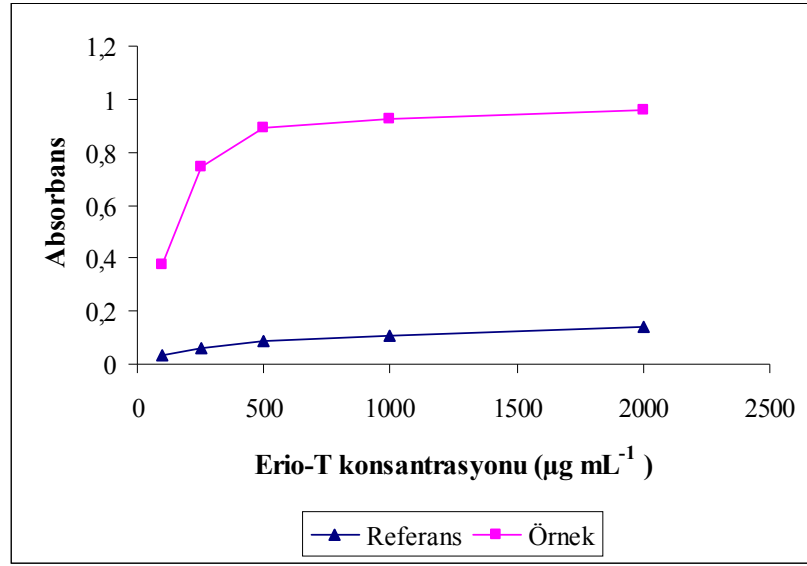
Şekil 4.12: Metil oranj reaktifi ile sibutramin tayini için pH değişiminin incelenmesi.

4.1.4. Reaktif Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Sabit bir MDMA konsantrasyonuna ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) karşılık artan konsantrasyonlarda erio-T, BCP ve metil oranj reaktifleri kullanılarak hem MDMA örneklerine hem de referans çözeltilere ekstraktif-spektrofotometrik yöntem uygulanmış ve distile suya karşı her üç reaktif için uygun dalga boyunda absorbans ölçümü yapılmıştır. Referans ve örnek çözeltilerin absorbans farklarının sabit kaldığı veya çok az değiştiği boya konsantrasyonları belirlenmiştir. Yapılan ölçümler ve grafiklerden de anlaşılacağı üzere Erio-T ve BCP reaktifleri için belirlenen konsantrasyon $500 \mu\text{g mL}^{-1}$, metil oranj reaktifi için belirlenen konsantrasyon ise $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'dir. Erio-T reaktifi için yapılan ölçümler Tablo 4.13'de, BCP reaktifi için yapılan ölçümler Tablo 4.14'de, metil oranj reaktifi için yapılan ölçümler Tablo 4.15'de, reaktif konsantrasyonuna karşın absorbans değişimini veren grafikler ise Erio-T reaktifi için Şekil 4.13'de, BCP reaktifi için Şekil 4.14'de, metil oranj reaktifi için Şekil 4.15'de verilmiştir.

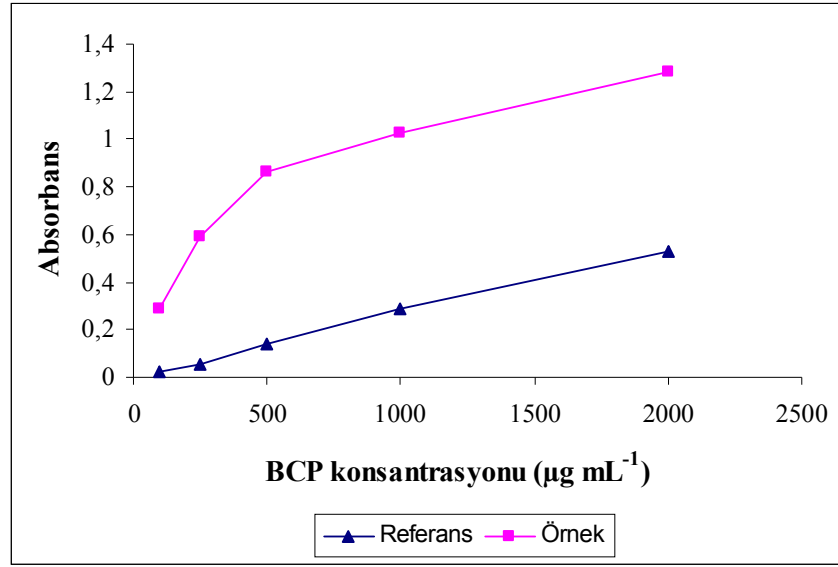
Tablo 4.13: Erio-T konsantrasyonuna göre örnek ve referans çözeltilerin absorbands değışimi.

Erio-T Konsantrasyonu, ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Referans Çözeltilerin Absorbansları	Örnek Çözeltilerin Absorbansları	ΔA
100	0,031	0,376	0,345
250	0,058	0,742	0,684
500	0,086	0,892	0,805
1000	0,108	0,925	0,817
2000	0,143	0,956	0,812

**Şekil 4.13:** MDMA'nın ve referans çözeltilerinin distile suya karşı absorbandslarının artan erio-T konsantrasyonuna göre değışimi.

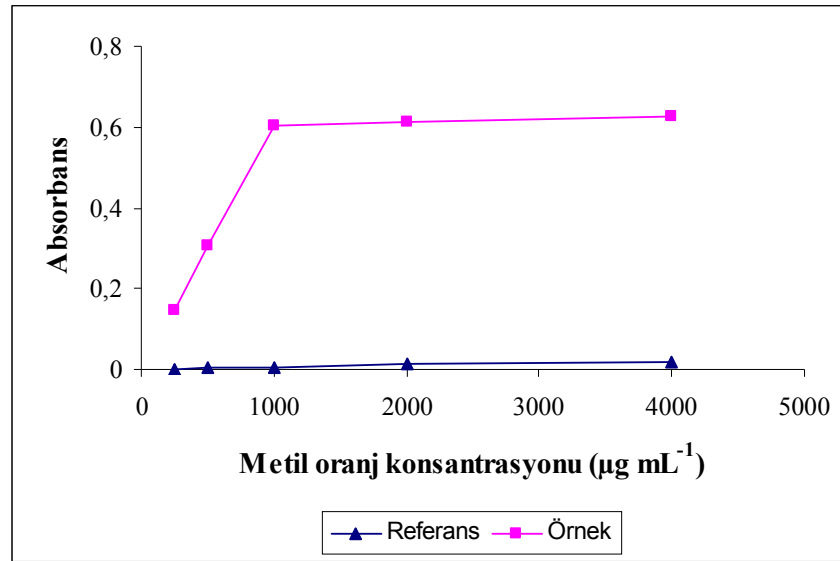
Tablo 4.14: BCP konsantrasyonuna göre örnek ve referans çözeltilerin absorbands değışimi.

BCP Konsantrasyonu, ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Referans Çözeltilerin Absorbansları	Örnek Çözeltilerin Absorbansları	ΔA
100	0,025	0,290	0,265
250	0,056	0,589	0,533
500	0,139	0,867	0,727
1000	0,284	1,030	0,746
2000	0,531	1,280	0,749

**Şekil 4.14:** MDMA'nın ve referans çözeltilerinin distile suya karşı absorbandslarının artan BCP konsantrasyonuna göre değışimi.

Tablo 4.15: Metil oranj konsantrasyonuna göre örnek ve referans çözeltilerin absorbands değışimi.

Metil oranj Konsantrasyonu, ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Referans Çözeltilerin Absorbansları	Örnek Çözeltilerin Absorbansları	ΔA
250	0,0014	0,1473	0,1459
500	0,0031	0,3084	0,3053
1000	0,0042	0,6046	0,6004
2000	0,0125	0,6144	0,6019
4000	0,0197	0,6284	0,6087



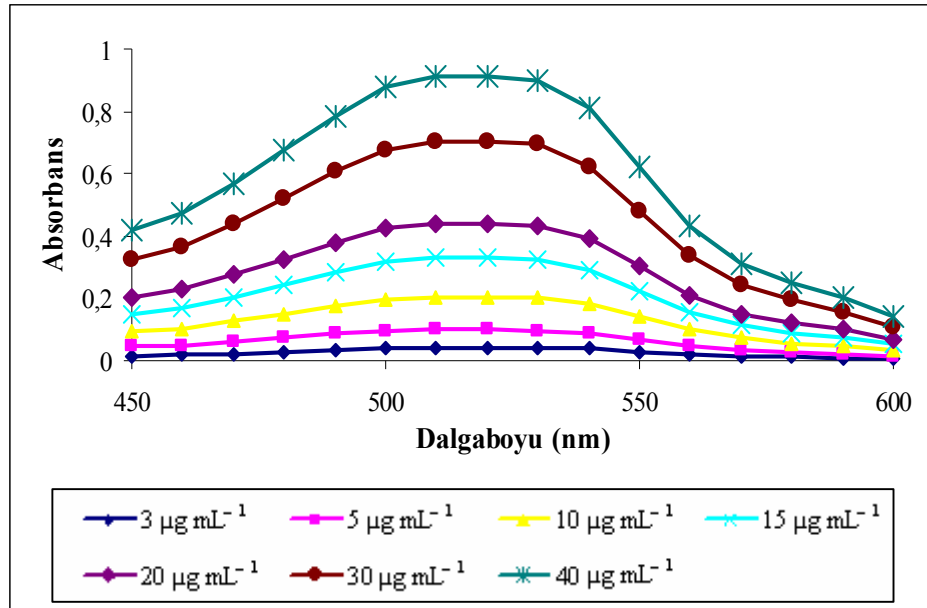
Şekil 4.15: MDMA'nın ve referans çözeltilerinin distile suya karşı absorbandslarının artan metil oranj konsantrasyonuna göre değışimi.

4.2. EKSTRAKTİF-SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEMİN MDMA, MDA, FLUOKSETİN VE SİBUTRAMİN STANDARTLARINA UYGULANMASI

Erio-t reaktifi kullanılarak MDMA için 0,86-11,43 $\mu\text{g mL}^{-1}$, MDA için 1,43-14,29 $\mu\text{g mL}^{-1}$, fluoksetin için 1,43-14,29 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sibutramin için 1,43-14,29 $\mu\text{g mL}^{-1}$, BCP reaktifi kullanılarak MDMA için 0,86-17,14 $\mu\text{g mL}^{-1}$, MDA için 1,43-21,43 $\mu\text{g mL}^{-1}$, fluoksetin için 1,43-14,29 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sibutramin için 1,43-14,29 $\mu\text{g mL}^{-1}$, metil oranj reaktifi kullanılarak MDMA için 1,43-22,86 $\mu\text{g mL}^{-1}$, MDA için 7,14-57,14 $\mu\text{g mL}^{-1}$, fluoksetin için 1,43-14,29 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sibutramin için 1,43-14,29 $\mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyon aralığında çalışılarak kalibrasyon doğruları oluşturulmuştur. Erio-T reaktifi kullanılarak MDMA standart maddesi için elde edilen sonuçlar Tablo 4.16'da, spektrumlar Şekil 4.16'da, MDA standart maddesi için elde edilen sonuçlar Tablo 4.17'de, spektrumlar Şekil 4.17'de, fluoksetin standart maddesi için elde edilen sonuçlar Tablo 4.18'de, spektrumlar Şekil 4.18'de, sibutramin standart maddesi için elde edilen sonuçlar Tablo 4.19'da, spektrumlar Şekil 4.19'da, BCP reaktifi kullanılarak MDMA standart maddesi için elde edilen sonuçlar Tablo 4.20'de, spektrumlar Şekil 4.20'de, MDA standart maddesi için elde edilen sonuçlar Tablo 4.21'de, spektrumlar Şekil 4.21'de, fluoksetin standart maddesi için elde edilen sonuçlar Tablo 4.22'de, spektrumlar Şekil 4.22'de, sibutramin standart maddesi için elde edilen sonuçlar Tablo 4.23'de, spektrumlar Şekil 4.23'de, metil oranj reaktifi kullanılarak MDMA standart maddesi için elde edilen sonuçlar Tablo 4.24'de, spektrumlar Şekil 4.24'de, MDA standart maddesi için elde edilen sonuçlar Tablo 4.25'de, spektrumlar Şekil 4.25'de, fluoksetin standart maddesi için elde edilen sonuçlar Tablo 4.26'da, spektrumlar Şekil 4.26'da, sibutramin standart maddesi için elde edilen sonuçlar Tablo 4.27'de, spektrumlar Şekil 4.27'de verilmiştir.

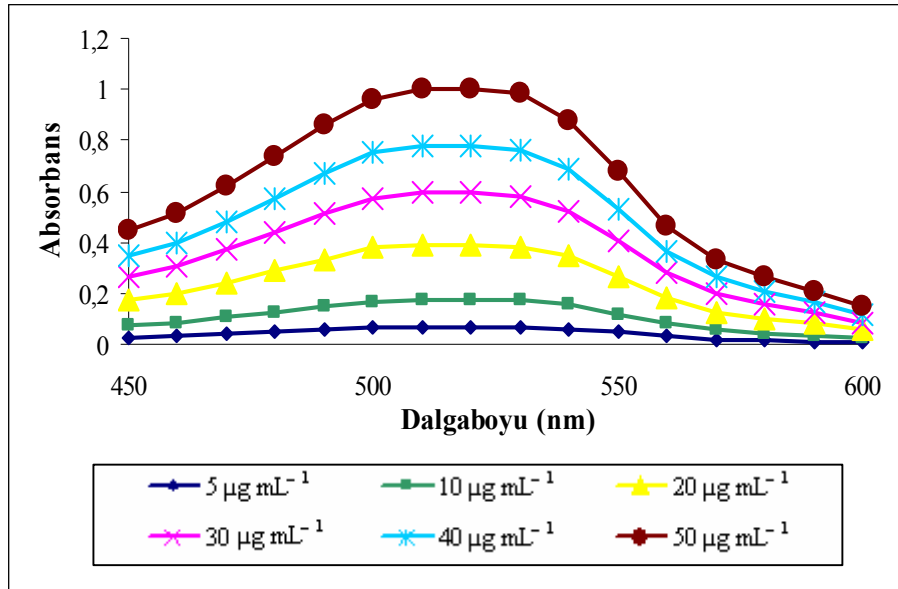
Tablo 4.16: Erio-T reaktifi ile MDMA tayininde elde edilen absorbanlar.

Başlangıç Konsantrasyonu, ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Son Konsantrasyon, ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	A_{513} (1)	A_{513} (2)	A_{513} (3)	A_{ortalama}
3	0,857	0,044	0,043	0,046	0,044
5	1,428	0,101	0,103	0,092	0,099
10	2,857	0,200	0,204	0,211	0,205
15	4,285	0,329	0,331	0,327	0,329
20	5,714	0,437	0,440	0,450	0,442
30	8,571	0,701	0,684	0,685	0,690
40	11,428	0,907	0,921	0,914	0,914

**Şekil 4.16:** MDMA örneklerinde erio-T reaktifi ile elde edilen spektrumlar.

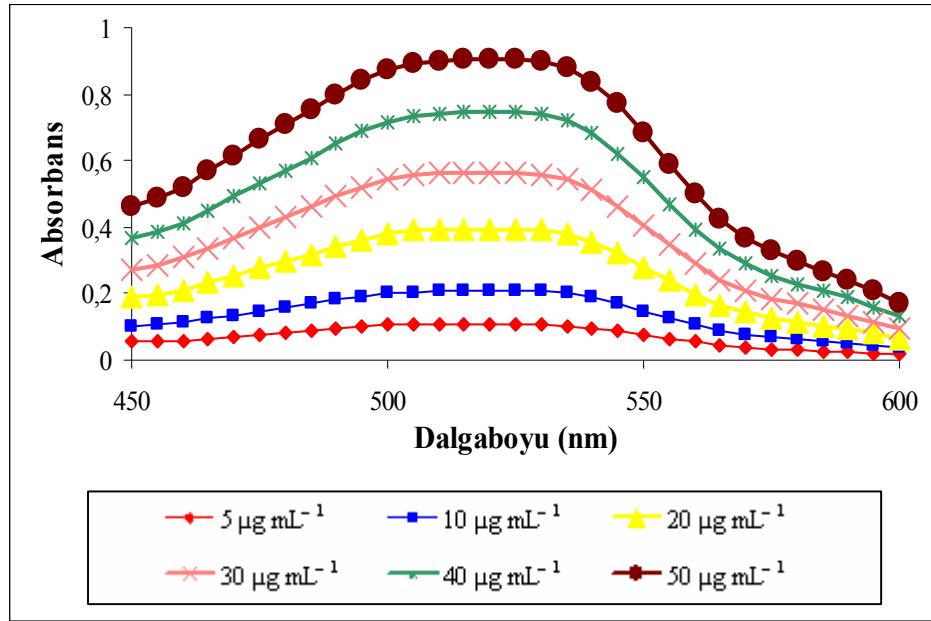
Tablo 4.17: Erio-T reaktifi ile MDA tayininde elde edilen absorbanlar.

Başlangıç Konsantrasyonu, ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Son Konsantrasyon, ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	A_{513} (1)	A_{513} (2)	A_{513} (3)	A_{ortalama}
5	1,428	0,075	0,065	0,069	0,070
10	2,857	0,161	0,170	0,174	0,168
20	5,714	0,356	0,408	0,391	0,385
30	8,571	0,582	0,561	0,595	0,579
40	11,428	0,777	0,778	0,775	0,777
50	14,285	1,020	1,000	0,995	1,005

**Şekil 4.17:** MDA örneklerinde erio-T reaktifi ile elde edilen spektrumlar.

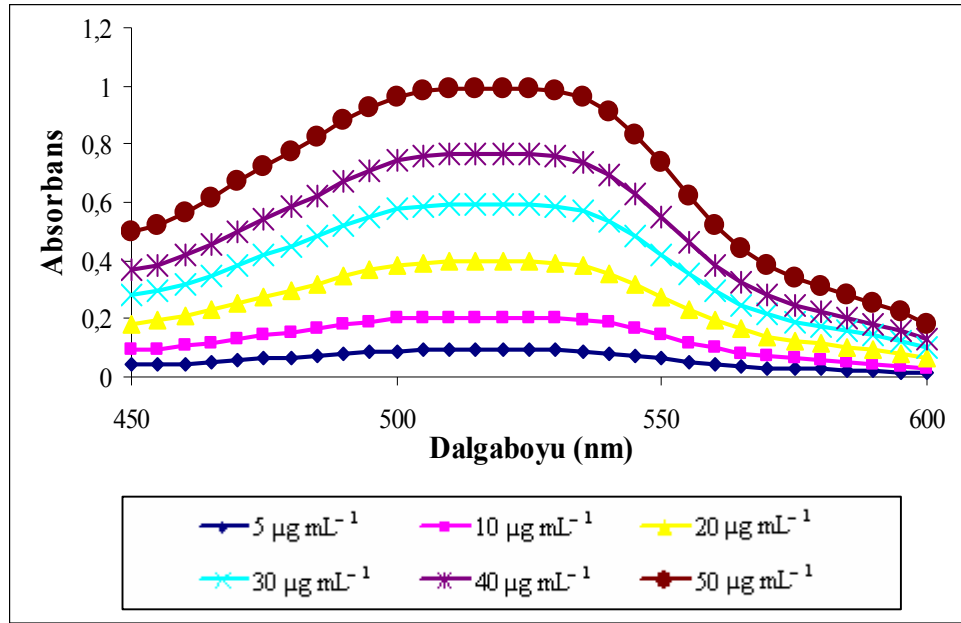
Tablo 4.18: Erio-T reaktifi ile fluoksetin tayininde elde edilen absorbanlar.

Başlangıç Konsantrasyonu, ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Son Konsantrasyon, ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	A_{525} (1)	A_{525} (2)	A_{525} (3)	A_{ortalama}
5	1,428	0,107	0,092	0,109	0,110
10	2,857	0,208	0,209	0,197	0,210
20	5,714	0,394	0,390	0,383	0,390
30	8,571	0,559	0,580	0,566	0,568
40	11,428	0,746	0,716	0,736	0,733
50	14,285	0,903	0,888	0,905	0,903

**Şekil 4.18:** Fluoksetin örneklerinde erio-T reaktifi ile elde edilen spektrumlar.

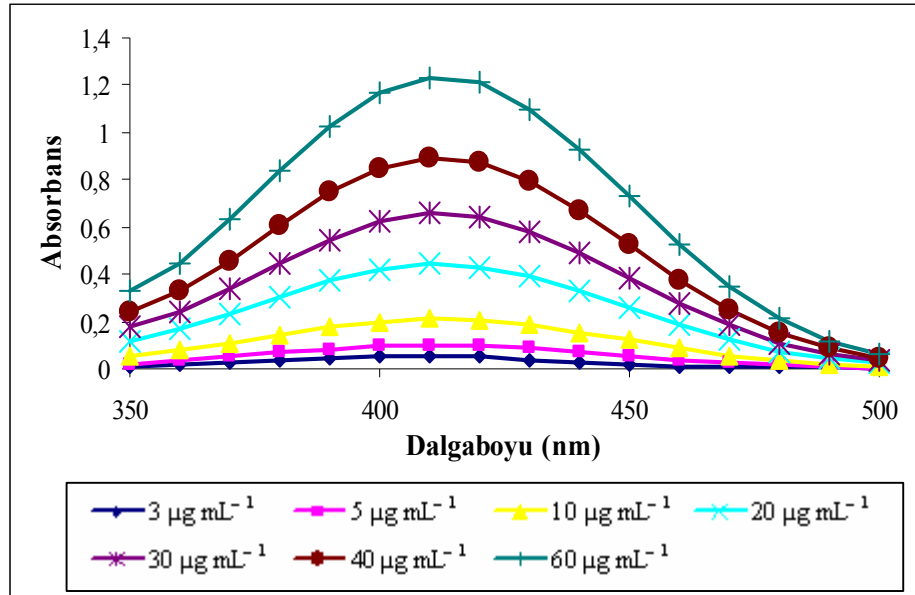
Tablo 4.19: Erio-T reaktifi ile sibutramin tayininde elde edilen absorbanlar.

Başlangıç Konsantrasyonu, ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Son Konsantrasyon, ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	A_{525} (1)	A_{525} (2)	A_{525} (3)	A_{ortalama}
5	1,428	0,094	0,092	0,073	0,086
10	2,857	0,212	0,206	0,149	0,189
20	5,714	0,397	0,399	0,378	0,391
30	8,571	0,591	0,593	0,592	0,592
40	11,428	0,760	0,774	0,767	0,767
50	14,285	0,988	0,992	0,966	0,992

**Şekil 4.19:** Sibutramin örneklerinde erio-T reaktifi ile elde edilen spektrumlar.

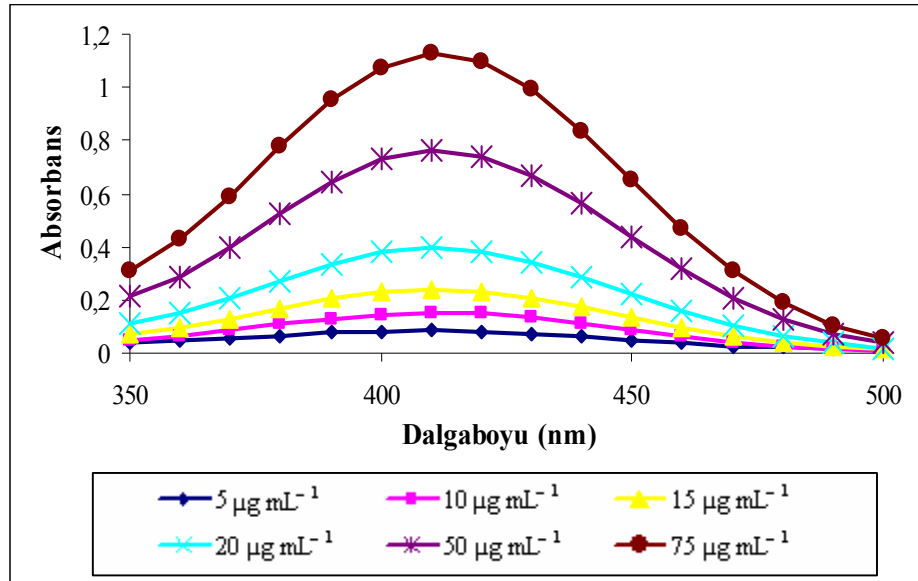
Tablo 4.20: BCP reaktifi ile MDMA tayininde elde edilen absorbanlar.

Başlangıç Konsantrasyonu, ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Son Konsantrasyon, ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	A_{412} (1)	A_{412} (2)	A_{412} (3)	A_{ortalama}
3	0,857	0,050	0,058	0,048	0,052
5	1,428	0,114	0,099	0,106	0,106
10	2,857	0,211	0,203	0,207	0,207
20	5,714	0,443	0,447	0,436	0,442
30	8,571	0,651	0,663	0,657	0,657
40	11,428	0,913	0,907	0,905	0,908
60	17,142	1,346	1,358	1,367	1,357

**Şekil 4.20:** MDMA örneklerinde BCP reaktifi ile elde edilen spektrumlar.

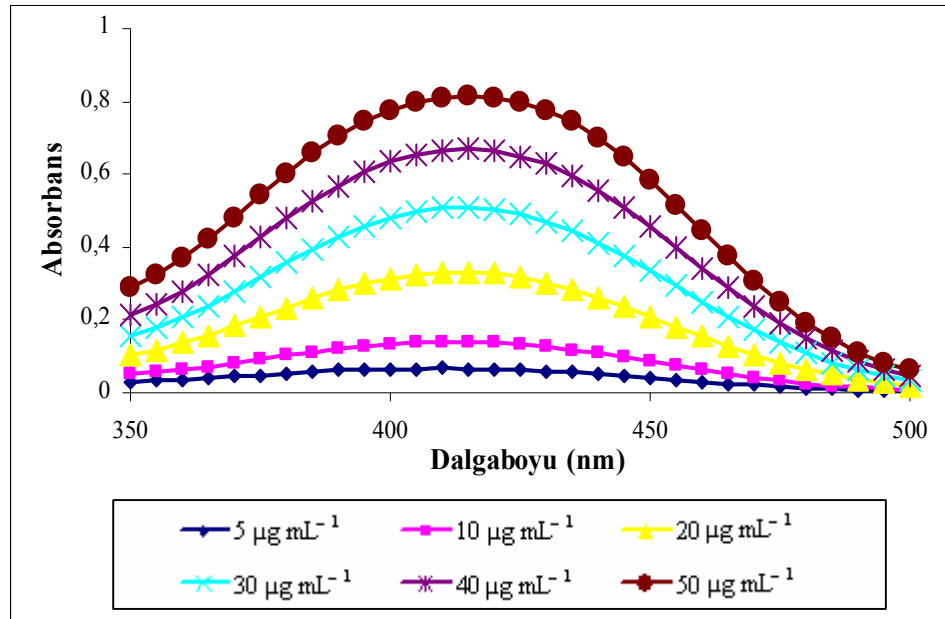
Tablo 4.21: BCP reaktifi ile MDA tayininde elde edilen absorbanlar.

Başlangıç Konsantrasyonu, ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Son Konsantrasyon, ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	A_{412} (1)	A_{412} (2)	A_{412} (3)	A_{ortalama}
5	1,428	0,086	0,071	0,098	0,085
10	2,857	0,153	0,168	0,165	0,162
15	4,285	0,252	0,228	0,243	0,241
25	7,142	0,382	0,411	0,392	0,395
50	14,285	0,768	0,756	0,768	0,764
75	21,428	1,139	1,108	1,140	1,129

**Şekil 4.21:** MDA örneklerinde BCP reaktifi ile elde edilen spektrumlar.

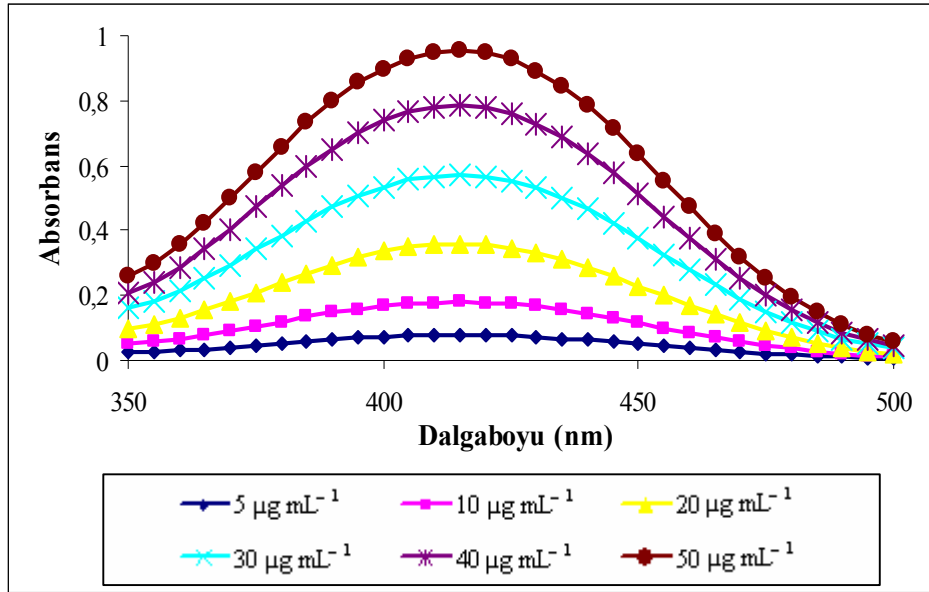
Tablo 4.22: BCP reaktifi ile fluoksetin tayininde elde edilen absorbanlar.

Başlangıç Konsantrasyonu, ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Son Konsantrasyon, ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	A_{415} (1)	A_{415} (2)	A_{415} (3)	A_{ortalama}
5	1,428	0,067	0,068	0,070	0,069
10	2,857	0,144	0,141	0,146	0,144
20	5,714	0,322	0,321	0,326	0,323
30	8,571	0,502	0,504	0,498	0,501
40	11,428	0,642	0,669	0,678	0,663
50	14,285	0,824	0,819	0,822	0,822

**Şekil 4.22:** Fluoksetin örneklerinde BCP reaktifi ile elde edilen spektrumlar.

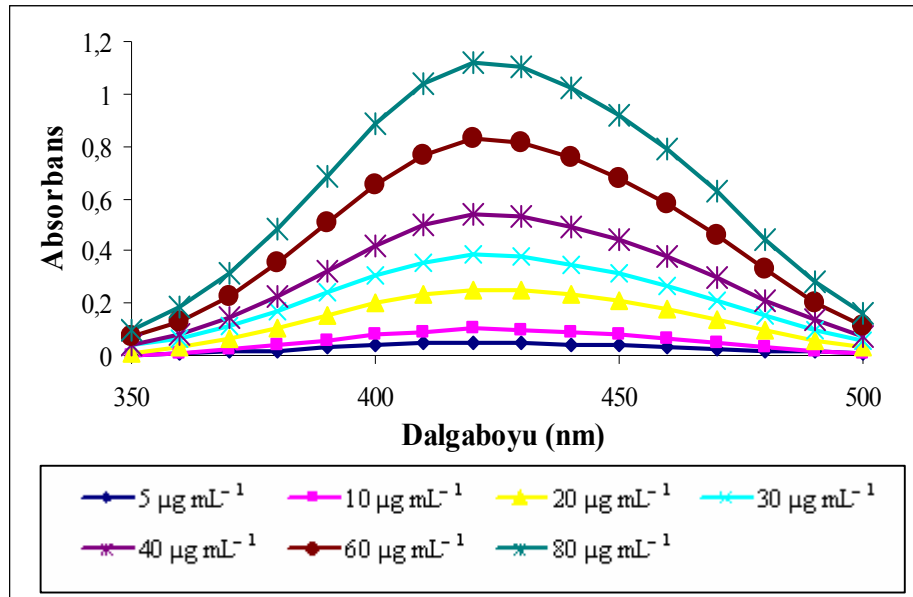
Tablo 4.23: BCP reaktifi ile sibutramin tayininde elde edilen absorpsanlar.

Başlangıç Konsantrasyonu, ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Son Konsantrasyon, ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	A_{415} (1)	A_{415} (2)	A_{415} (3)	A_{ortalama}
5	1,428	0,077	0,074	0,082	0,078
10	2,857	0,172	0,176	0,164	0,170
20	5,714	0,354	0,370	0,361	0,361
30	8,571	0,526	0,554	0,540	0,540
40	11,428	0,708	0,732	0,727	0,722
50	14,285	0,909	0,928	0,872	0,900

**Şekil 4.23:** Sibutramin örneklerinde BCP reaktifi ile elde edilen spektrumlar.

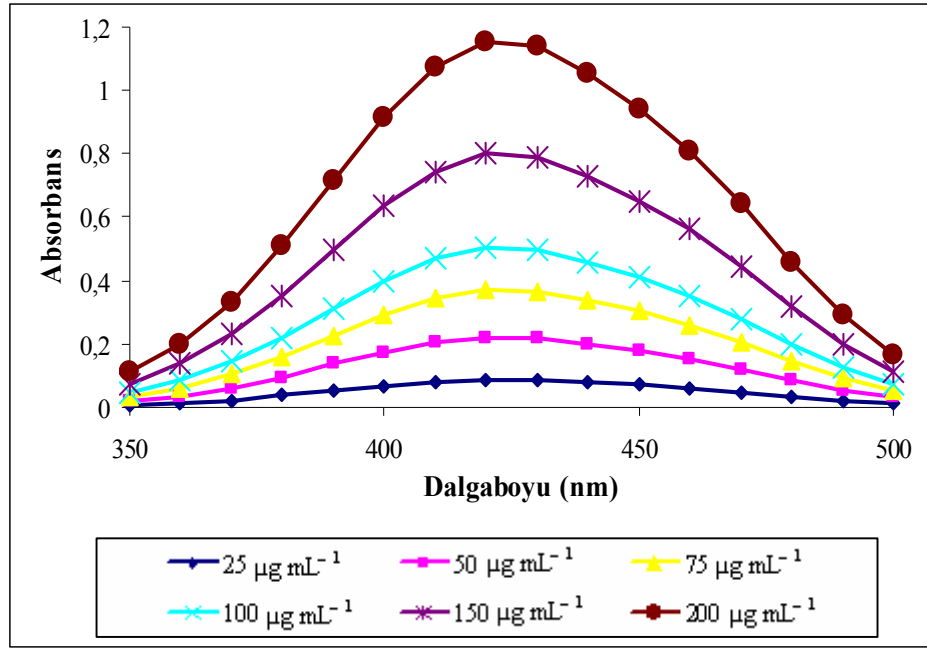
Tablo 4.24: Metil oranj reaktifi ile MDMA tayininde elde edilen absorbanlar.

Başlangıç Konsantrasyonu, ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Son Konsantrasyon, ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	A_{423} (1)	A_{423} (2)	A_{423} (3)	A_{ortalama}
5	1,428	0,044	0,056	0,047	0,049
10	2,857	0,094	0,104	0,105	0,101
20	5,714	0,251	0,259	0,255	0,255
30	8,571	0,377	0,397	0,384	0,386
40	11,428	0,533	0,558	0,532	0,541
60	17,142	0,830	0,856	0,810	0,832
80	22,857	1,109	1,138	1,134	1,127

**Şekil 4.24:** MDMA örneklerinde metil oranj reaktifi ile elde edilen spektrumlar.

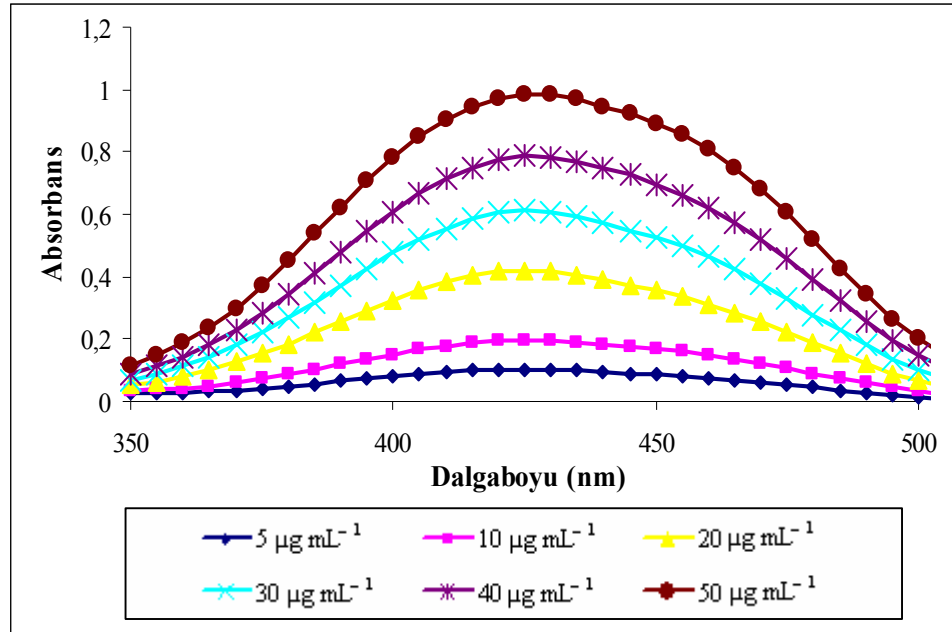
Tablo 4.25: Metil oranj reaktifi ile MDA tayininde elde edilen absorbanlar.

Başlangıç Konsantrasyonu, ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Son Konsantrasyon, ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	A_{423} (1)	A_{423} (2)	A_{423} (3)	A_{ortalama}
25	7,142	0,083	0,087	0,085	0,085
50	14,285	0,243	0,222	0,233	0,232
75	21,428	0,374	0,371	0,373	0,372
100	28,571	0,512	0,492	0,520	0,508
150	42,857	0,802	0,812	0,804	0,806
200	57,142	1,121	1,080	1,130	1,110

**Şekil 4.25:** MDA örneklerinde metil oranj reaktifi ile elde edilen spektrumlar.

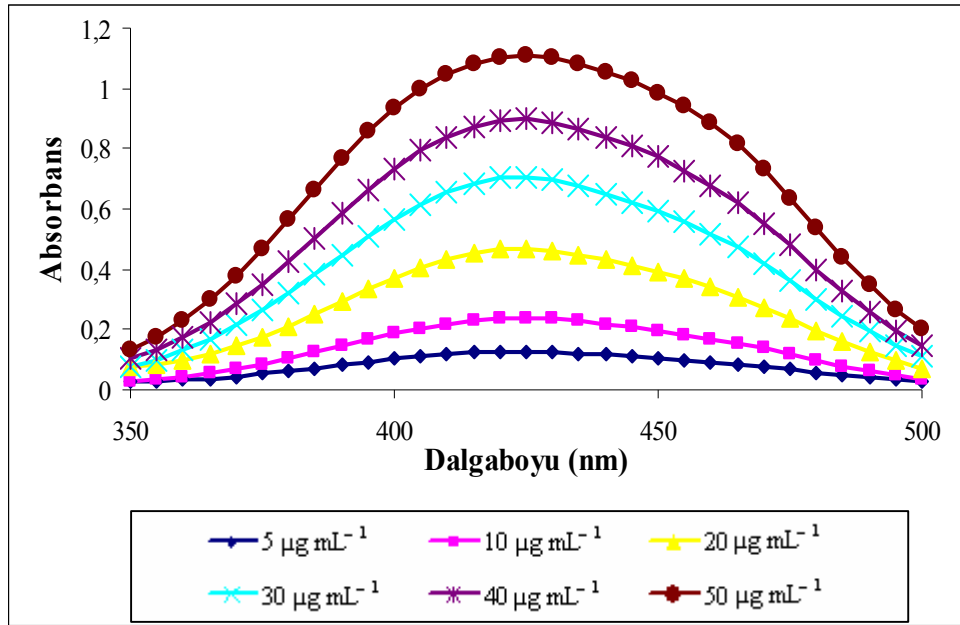
Tablo 4.26: Metil oranj reaktifi ile fluoksetin tayininde elde edilen absorbanlar.

Başlangıç Konsantrasyonu, ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Son Konsantrasyon, ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	A_{425} (1)	A_{425} (2)	A_{425} (3)	A_{ortalama}
5	1,428	0,100	0,105	0,103	0,103
10	2,857	0,192	0,201	0,236	0,210
20	5,714	0,406	0,424	0,431	0,420
30	8,571	0,588	0,612	0,647	0,615
40	11,428	0,787	0,799	0,793	0,793
50	14,285	0,952	0,988	1,050	0,997

**Şekil 4.26:** Fluoksetin örneklerinde metil oranj reaktifi ile elde edilen spektrumlar.

Tablo 4.27: Metil oranj reaktifi ile sibutramin tayininde elde edilen absorbanlar.

Başlangıç Konsantrasyonu, ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Son Konsantrasyon, ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	A_{425} (1)	A_{425} (2)	A_{425} (3)	A_{ortalama}
5	1,428	0,127	0,130	0,195	0,151
10	2,857	0,238	0,248	0,298	0,261
20	5,714	0,469	0,461	0,484	0,471
30	8,571	0,706	0,691	0,712	0,703
40	11,428	0,905	0,904	0,903	0,904
50	14,285	1,115	1,096	1,111	1,111

**Şekil 4.27:** Sibutramin örneklerinde metil oranj reaktifi ile elde edilen spektrumlar.

Her üç reaktif ile dört ayrı madde için yapılan çalışmaların sonuçları Tablo 4.28-4.30'da görülmektedir. Verilen doğru denklemlerinde c: derişim, r: korelasyon katsayısını; % RSD: yüzde relatif standart sapma değerini; LOD (Limit of Detection): dedeksiyon limitini (belirtme sınırını), LOQ (Limit of Quantification): tayin limitini ifade etmektedir.

Tablo 4.28: Erio-T reaktifi ile uyarıcı aminlerin tayininde elde edilen sonuçlar.

Drug	Doğru Denklemi	(r)	ϵ (L mol ⁻¹ cm ⁻¹)	Doğrusal Aralık ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	% RSD (n=5)	LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$) (n=5)	LOQ($\mu\text{g mL}^{-1}$) (n=5)
MDMA	$A_{513} = 8,25 \times 10^{-2}c - 2,5 \times 10^{-2}$	0,9997	14953	0,86–11,43	1,301	0,14	0,47
MDA	$A_{513} = 7,21 \times 10^{-2}c + 3,51 \times 10^{-2}$	0,9995	12077	1,43–14,29	2,140	0,22	0,73
Fluoksetin	$A_{525} = 6,14 \times 10^{-2}c + 3,25 \times 10^{-2}$	0,9996	23593	1,43–14,29	1,690	0,24	0,80
Sibutramin	$A_{525} = 6,96 \times 10^{-2}c - 1,08 \times 10^{-2}$	0,9996	19167	1,43–14,29	1,394	0,07	0,23

c: konsantrasyon ($\mu\text{g mL}^{-1}$)

*Doğrusal aralık son konsantrasyon cinsinden (organik ekstraktın konsantrasyonu) verilmiştir. LOD ve LOQ değerleri tabloda görülen doğru denklemleri kullanılarak hesaplanmıştır.

Tablo 4.29: BCP reaktifi ile uyarıcı aminlerin tayininde elde edilen sonuçlar.

Drug	Doğru Denklemi	(r)	ϵ (L mol ⁻¹ cm ⁻¹)	Doğrusal Aralık ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	% RSD (n =5)	LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$) (n =5)	LOQ($\mu\text{g mL}^{-1}$) (n =5)
MDMA	$A_{412} = 8,01 \times 10^{-2}c - 1,64 \times 10^{-2}$	0,9997	14953	0,86 –17,14	1,808	0,09	0,3
MDA	$A_{412} = 5,22 \times 10^{-2}c + 1,57 \times 10^{-2}$	0,9999	9912	1,43–21,43	2,590	0,14	0,47
Fluoksetin	$A_{415} = 5,92 \times 10^{-2}c - 1,69 \times 10^{-2}$	0,9997	19540	1,43–14,29	2,549	0,13	0,43
Sibutramin	$A_{415} = 6,4 \times 10^{-2}c - 1,05 \times 10^{-2}$	0,9999	17696	1,43–14,29	1,113	0,074	0,25

c: konsantrasyon ($\mu\text{g mL}^{-1}$)

*Doğrusal aralık son konsantrasyon cinsinden (organik ekstraktın konsantrasyonu) verilmiştir. LOD ve LOQ değerleri tabloda görülen doğru denklemleri kullanılarak hesaplanmıştır.

Tablo 4.30: Metil oranj reaktifi ile uyarıcı aminlerin tayininde elde edilen sonuçlar.

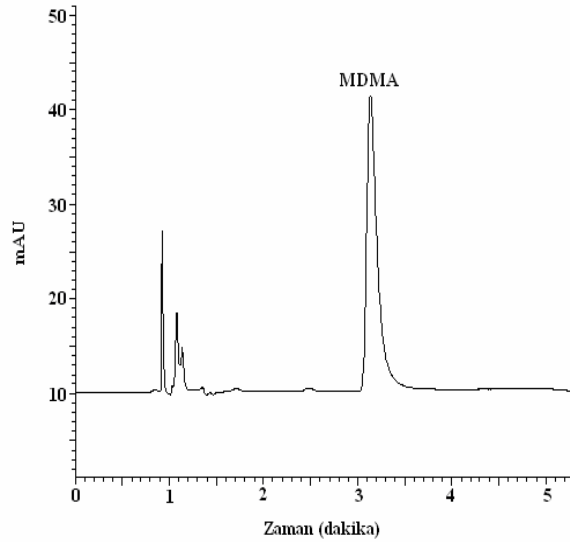
Drug	Doğru Denklemi	(r)	ϵ (L mol ⁻¹ cm ⁻¹)	Doğrusal Aralık ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	% RSD (n=5)	LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$) (n=5)	LOQ($\mu\text{g mL}^{-1}$) (n=5)
MDMA	$A_{423} = 5,07 \times 10^{-2}c - 3,69 \times 10^{-2}$	0,9996	8627	1,43–22,86	1,752	0,33	1,10
MDA	$A_{423} = 2,04 \times 10^{-2}c - 6,46 \times 10^{-2}$	0,9997	3115	7,14–57,14	1,530	1,42	4,73
Fluoksetin	$A_{425} = 6,9 \times 10^{-2}c + 1,40 \times 10^{-2}$	0,9996	25408	1,43–14,29	2,667	0,09	0,30
Sibutramin	$A_{425} = 7,49 \times 10^{-2}c + 4,71 \times 10^{-2}$	0,9998	23088	1,43–14,29	1,361	0,28	0,93

c: konsantrasyon ($\mu\text{g mL}^{-1}$)

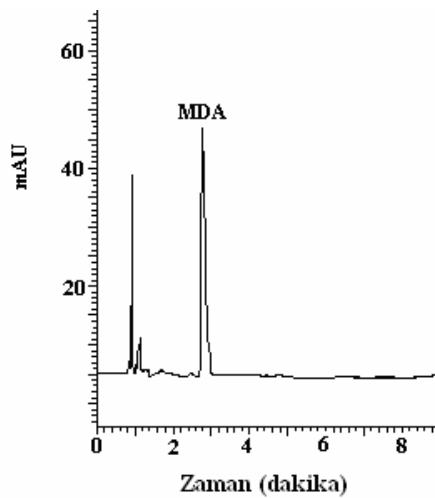
*Doğrusal aralık son konsantrasyon cinsinden (organik ekstraktın konsantrasyonu) verilmiştir. LOD ve LOQ değerleri tabloda görülen doğru denklemleri kullanılarak hesaplanmıştır.

4.3. HPLC YÖNTEMİNİN MDMA, MDA, FLUOKSETİN VE SİBUTRAMİN STANDARTLARINA UYGULANMASI

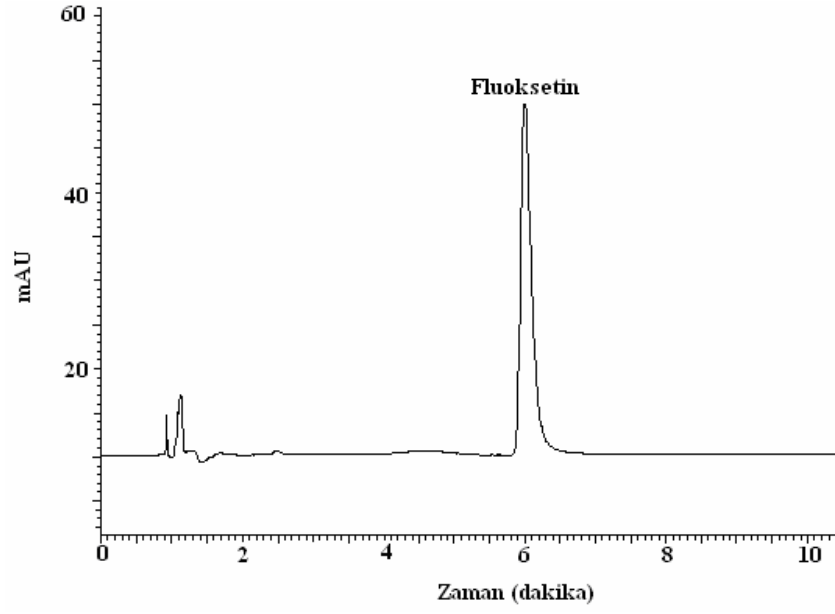
MDMA için $2,5-30 \mu\text{g mL}^{-1}$, MDA için $5-50 \mu\text{g mL}^{-1}$, fluoksetin için $3-20 \mu\text{g mL}^{-1}$, sibutramin için $5-40 \mu\text{g mL}^{-1}$ derişim aralığındaki standart maddelere literatürdeki HPLC yöntemi uygulanmış ve belirlenen pik alanları ile derişimler arasında oluşturulan grafiklerden elde edilen doğru denklemleri, korelasyon katsayısı, yüzde relatif standart sapma gibi veriler Tablo 4.31’de verilmiştir. MDMA Şekil 4.28’de, MDA Şekil 4.29’da, fluoksetin Şekil 4.30’da, sibutramin Şekil 4.31’de ve bu maddeleri içeren sentetik karışımların Şekil 4.32’de kromatogramları verilmiştir.



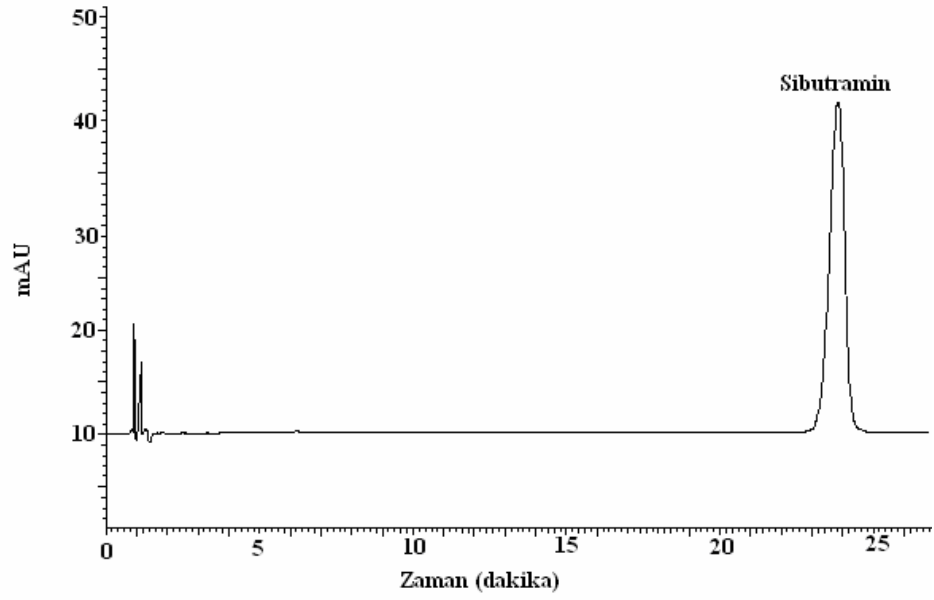
Şekil 4.28: MDMA standart maddesinin kromatogramı.



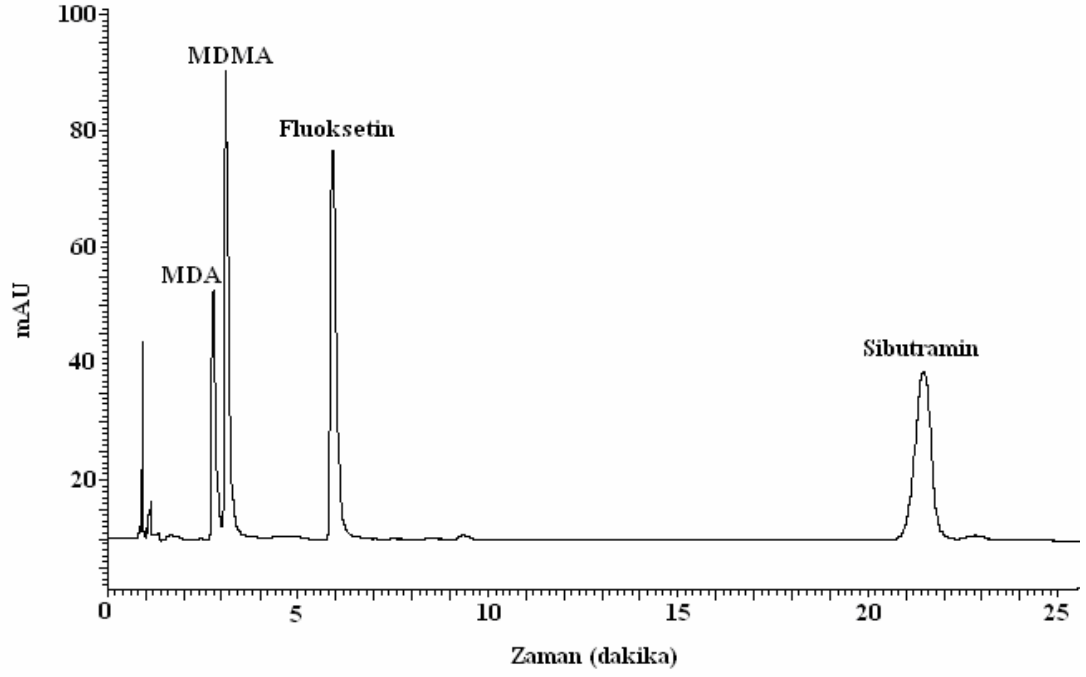
Şekil 4.29: MDA standart maddesinin kromatogramı.



Şekil 4.30: Fluoksetin standart maddesinin kromatogramı.



Şekil 4.31: Sibutramin standart maddesinin kromatogramı.



Şekil 4.32: MDMA, MDA, fluoksetin ve sibutraminden oluşan sentetik karışımın kromatogramı.

Tablo 4.31: MDMA, MDA, fluoksetin ve sibutramin için HPLC verileri.

Drug	Doğru Denklemi	(r)	Doğrusal Aralık ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	% RSD (n=5)
MDMA	$y = 16801 c + 12897$	0,9995	2,5-30	1,615
MDA	$y = 16738 c - 18684$	0,9993	5-50	2,800
Fluoksetin	$y = 43828 c + 24267$	0,9998	3-20	0,379
Sibutramin	$y = 19158 c + 5954,2$	1	5-40	0,668

y: Pik Alanı, c: konsantrasyon ($\mu\text{g mL}^{-1}$)

4.4. GELİŞTİRİLEN YÖNTEM İLE MDMA, FLUOKSETİN, SİBUTRAMİN TAYİNİNDE İNTERFERANS ANALİZİ

Ecstasy tabletlerin içeriğinde MDMA, MDA, MDEA gibi etken maddelerin yanı sıra kafein, parasetamol, teofilin, ketamin gibi katkı maddeleri ile talk, glukoz, fruktoz gibi dolgu maddeleri de bulunmaktadır. Fluoksetin ve sibutramin kapsüller ise yapılarında titanyum dioksit, sarı demir oksit ($\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$), patent blue V, glukoz, fruktoz, talk gibi dolgu maddeleri ile yutma kolaylığı sağlayıcı maddeler içerirler. Bu nedenle bu gibi dolgu ve katkı maddelerinin interferan etkisi saf MDMA, fluoksetin ve sibutramin konsantrasyonunun ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) 100 katı olacak şekilde hazırlanan karışım çözeltilerine geliştirilen yöntemin uygulanması sonucunda incelenmiş ve uygun geri kazanım değerleri elde edilmiştir.

Geliştirilen ekstraktif-spektrofotometrik yöntem ile ecstasy tablet için kafein, parasetamol, titanyum dioksit, talk, glukoz ve fruktoz gibi maddeler interferans analizinde kullanılmış ve sonuçlar Tablo 4.32’de verilmiştir. Prozac kapsül ve lida kapsül için sarı demir oksit ($\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$), patent blue V, titanyum dioksit, talk, glukoz ve fruktoz gibi maddeler interferans analizinde kullanılmış ve sonuçlar sırasıyla Tablo 4.33 ve 4.34’de verilmiştir.

Tablo 4.32: MDMA için interferans analizi.

İnterferan	İnterferan Kons. ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	İnterferan/Analit Kütle Oranı	% Geri Kazanım		
			Erio-T	Metil Oranj	BCP
Kafein	2000	100	98,5	96,8	95,4
Parasetamol	2000	100	97,3	92,6	93,5
Glukoz	2000	100	92,6	92,6	97,7
Fruktoz	2000	100	99,5	95,4	99,1
Talk	2000	100	95,1	91,9	91,6

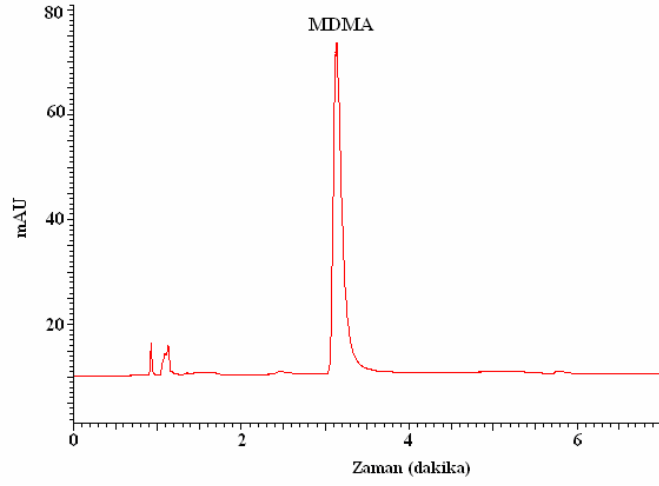
Tablo 4.33: Fluoksetin için interferans analizi.

İnterferan	İnterferan Kons. ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	İnterferan/Analit Kütle Oran	% Geri Kazanım		
			Erio-T	Metil Oranj	BCP
Sarı demir oksit	2000	100	93,8	97,4	97,2
Patent blue V	2000	100	90,4	92,3	90,3
Titanyum dioksit	2000	100	92,1	90,4	93,5
Glukoz	2000	100	96,6	91,3	94,4
Fruktoz	2000	100	97,5	93,3	95,1
Talk	2000	100	91,5	95,0	92,3

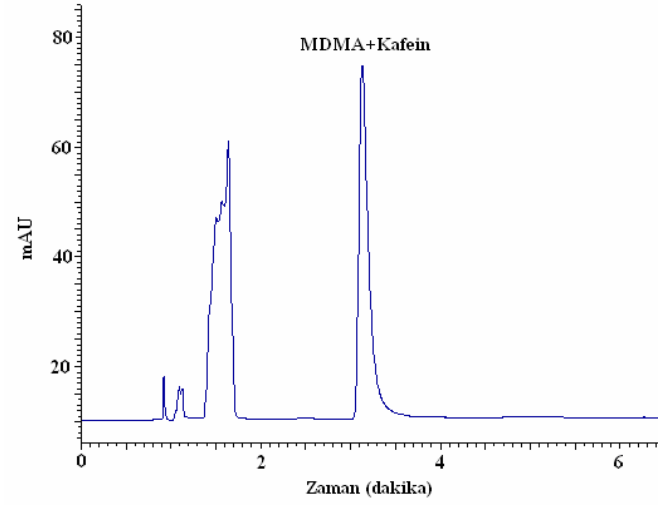
Tablo 4.34: Sibutramin için interferans analizi.

İnterferan	İnterferan Kons. ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	İnterferan/Analit Kütle Oran	% Geri Kazanım		
			Erio-T	Metil Oranj	BCP
Sarı demir oksit	2000	100	94,6	91,3	93,5
Patent blue V	2000	100	97,4	95,0	95,3
Titanyum dioksit	2000	100	100,0	92,9	91,4
Glukoz	2000	100	93,8	91,8	96,4
Fruktoz	2000	100	97,2	99,3	98,7
Talk	2000	100	91,5	98,9	93,0

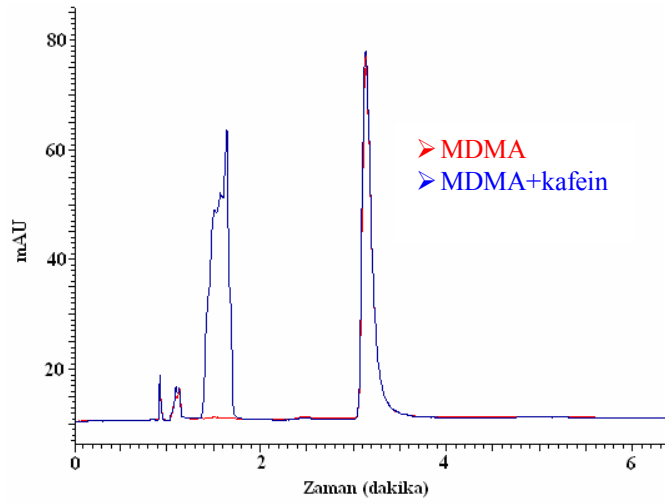
Denemelerde kullanılan % 36'lık ecstasy tablet içeriğinde MDMA etken maddesinin yanında kafein de içermektedir. Ekstraktif-spektrofotometrik yöntem ile kafeinin interferan etkisi araştırılmış ve herhangi bir girişiminin olmadığı tespit edilmiştir. Kafeinin interferan etkisi HPLC yöntemi ile araştırılmıştır. HPLC yöntemi ile kafein için yapılan interferans analizi sonuçları ise Şekil 4.33-4.35'de görülmektedir. Kromatogramlardan da görüldüğü üzere ecstasy tablette MDMA yanında var olan kafeinin MDMA pikine herhangi bir etkisi yoktur. Dolayısıyla kafeinin kullanılan HPLC yönteminde MDMA tayinine interferans etkisi yoktur.



Şekil 4.33: MDMA kromatogramı.



Şekil 4.34: MDMA + kafein kromatogramı.



Şekil 4.35: MDMA ile MDMA+kafein kromatogramlarının karşılaştırılması ile elde edilen kromatogram.

4.5. MDMA-MDA SENTETİK KARIŞIMLARINA GELİŞTİRİLEN YÖNTEMİN UYGULANMASI

7,5-100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyon aralığında hazırlanan MDMA, MDA ve 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 oranlardaki MDMA+MDA sentetik karışım çözeltilerine erio-T, BCP ve metil oranj reaktifleri kullanılarak ekstraktif-spektrofotometrik yöntem uygulanmıştır. Elde edilen renkli çözeltilerin uygun dalga boyunda absorbans ölçümleri yapılmış ve bu absorbans değerleri tekli ve karışım çözeltileri (MDMA, MDA ve MDMA+MDA) için karşılaştırılmıştır.

MDMA-MDA sentetik karışımlarına erio-T reaktifi kullanılarak ekstraktif-spektrofotometrik yöntemin uygulanması sonucu elde edilen sonuçlar Tablo 4.35’de, BCP reaktifi kullanılarak ekstraktif-spektrofotometrik yöntemin uygulanması sonucu elde edilen sonuçlar Tablo 4.36’da, metil oranj reaktifi kullanılarak ekstraktif-spektrofotometrik yöntemin uygulanması sonucu elde edilen sonuçlar Tablo 4.37’de verilmiştir.

Tablo 4.35: MDMA-MDA sentetik karışımlarında erio-T reaktifi kullanılarak elde edilen absorbans toplamsallığı.

Karışım Başlangıç Konsantrasyonu	Karışım Oranı	Absorbans
15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ MDMA+7,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ MDA	2:1 MDMA+MDA	0,636
15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ MDMA	-	0,418
7,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ MDA	-	0,228
15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ MDMA+15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ MDA	1:1 MDMA+MDA	0,761
15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ MDMA	-	0,418
15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ MDA	-	0,344
15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ MDMA+30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ MDA	1:2 MDMA+MDA	1,151
15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ MDMA	-	0,418
30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ MDA	-	0,724
15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ MDMA+45 $\mu\text{g mL}^{-1}$ MDA	1:3 MDMA+MDA	1,393
15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ MDMA	-	0,418
45 $\mu\text{g mL}^{-1}$ MDA	-	0,975

Tablo 4.36: MDMA-MDA sentetik karışımlarında BCP reaktifi kullanılarak elde edilen absorban toplamsallığı.

Karışım Başlangıç Konsantrasyonu	Karışım Oranı	Absorbans
15 µg mL⁻¹ MDMA+7,5 µg mL⁻¹ MDA	2:1 MDMA+MDA	0,503
15 µg mL ⁻¹ MDMA	-	0,396
7,5 µg mL ⁻¹ MDA	-	0,113
15 µg mL⁻¹ MDMA+15 µg mL⁻¹ MDA	1:1 MDMA+MDA	0,653
15 µg mL ⁻¹ MDMA	-	0,396
15 µg mL ⁻¹ MDA	-	0,257
15 µg mL⁻¹ MDMA+30 µg mL⁻¹ MDA	1:2 MDMA+MDA	0,899
15 µg mL ⁻¹ MDMA	-	0,396
30 µg mL ⁻¹ MDA	-	0,554
15 µg mL⁻¹ MDMA+45 µg mL⁻¹ MDA	1:3 MDMA+MDA	1,108
15 µg mL ⁻¹ MDMA	-	0,396
45 µg mL ⁻¹ MDA	-	0,742

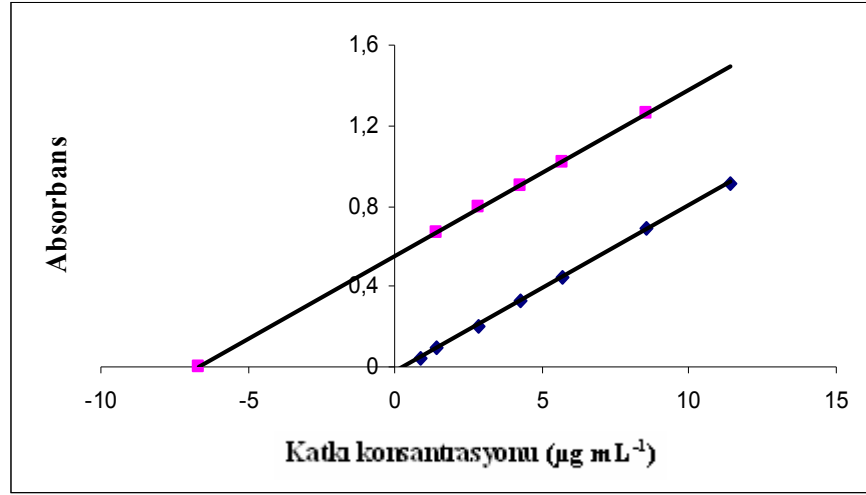
Tablo 4.37: MDMA-MDA sentetik karışımlarında metil oranj reaktifi kullanılarak elde edilen absorban toplamsallığı.

Karışım Başlangıç Konsantrasyonu	Karışım Oranı	Absorbans
25 µg mL⁻¹ MDMA+25 µg mL⁻¹ MDA	1:1 MDMA+MDA	0,354
25 µg mL ⁻¹ MDMA	-	0,290
25 µg mL ⁻¹ MDA	-	0,056
25 µg mL⁻¹ MDMA+50 µg mL⁻¹ MDA	1:2 MDMA+MDA	0,426
25 µg mL ⁻¹ MDMA	-	0,290
50 µg mL ⁻¹ MDA	-	0,117
25 µg mL⁻¹ MDMA+75 µg mL⁻¹ MDA	1:3 MDMA+MDA	0,503
25 µg mL ⁻¹ MDMA	-	0,290
75 µg mL ⁻¹ MDA	-	0,193
25 µg mL⁻¹ MDMA+100 µg mL⁻¹ MDA	1:4 MDMA+MDA	0,564
25 µg mL ⁻¹ MDMA	-	0,290
100 µg mL ⁻¹ MDA	-	0,271

4.6. ECSTASY, PROZAC VE LİDA TİCARİ İLAÇLARINDA GELİŞTİRİLEN YÖNTEM İLE STANDART KATKI ÇALIŞMASI

Başlangıç konsantrasyonu olarak $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ MDMA içeren ecstasy (İstanbul Emniyet Müdürlüğü tarafından tebliğ edilen miktar % 28 oranında MDMA içerdiği yönündedir), $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ fluoksetin içeren prozac (1 kapsül 20 mg fluoksetin içermektedir (% 8,7'lik)) ve $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ sibutramin içeren lida (1 kapsül 24,7 mg sibutramin içermektedir (% 8,9'luk)) çözeltilerine sırasıyla başlangıç konsantrasyonları $5\text{-}30 \mu\text{g mL}^{-1}$ MDMA, $5\text{-}40 \mu\text{g mL}^{-1}$ fluoksetin ve $5\text{-}40 \mu\text{g mL}^{-1}$ sibutramin çözeltileri ilave edilerek ecstasy+MDMA, prozac+fluoksetin, lida+sibutramin karışım çözeltileri hazırlanmış, hazırlanan bu çözeltilere erio-t, BCP ve metil oranj reaktifleri kullanılarak ekstraktif-spektrofotometrik yöntem uygulanmış ve standart katkı grafikleri çizilerek ecstasy, prozac ve lida'da mevcut aktif bileşenlerin (MDMA, fluoksetin ve sibutramin) miktarları tespit edilmiştir.

Ekstraktif-spektrofotometrik yöntemin erio-T reaktifi kullanılarak gerçekleştirilmesi sonucunda elde edilen absorbans değerleri ile konsantrasyonlar arasında çizilen kalibrasyon grafiği, doğru denklemleri, korelasyon katsayısı MDMA için Şekil 4.36'da, fluoksetin için Şekil 4.37'de, sibutramin için Şekil 4.38'de, BCP reaktifi kullanılarak elde edilen veriler MDMA için Şekil 4.39'da, fluoksetin için Şekil 4.40'da, sibutramin için Şekil 4.41'de ve metil oranj reaktifi kullanılarak elde edilen veriler MDMA için Şekil 4.42'de, fluoksetin için Şekil 4.43'de, sibutramin için Şekil 4.44'de görülmektedir.



Şekil 4.36: Erio-T reaktifi ile ecstasy örneğinde standart katkı çalışması.

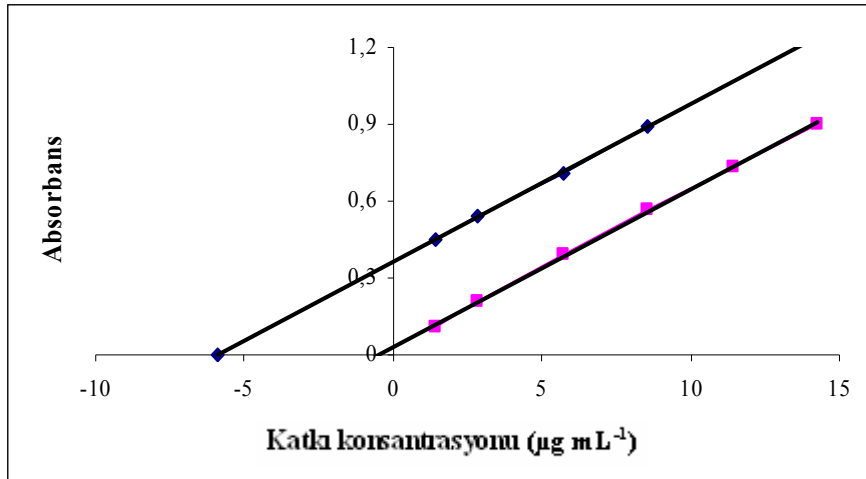
MDMA çalışma doğrusu; $A_{513}=8,25 \times 10^{-2}c - 2,5 \times 10^{-2}$; $r=0,9997$

(c: $\mu\text{g mL}^{-1}$ cinsinden son konsantrasyon)

Standart katkı doğru denklemi; $A_{513}=8,24 \times 10^{-2}c + 5,513 \times 10^{-1}$; $r=1$

(c: $\mu\text{g mL}^{-1}$ cinsinden katkı konsantrasyonu)

bulunan değer: $6,69 \mu\text{g mL}^{-1}$, **beklenen değer:** $5,71 \mu\text{g mL}^{-1}$ MDMA



Şekil 4.37: Erio-T reaktifi ile prozac örneğinde standart katkı çalışması.

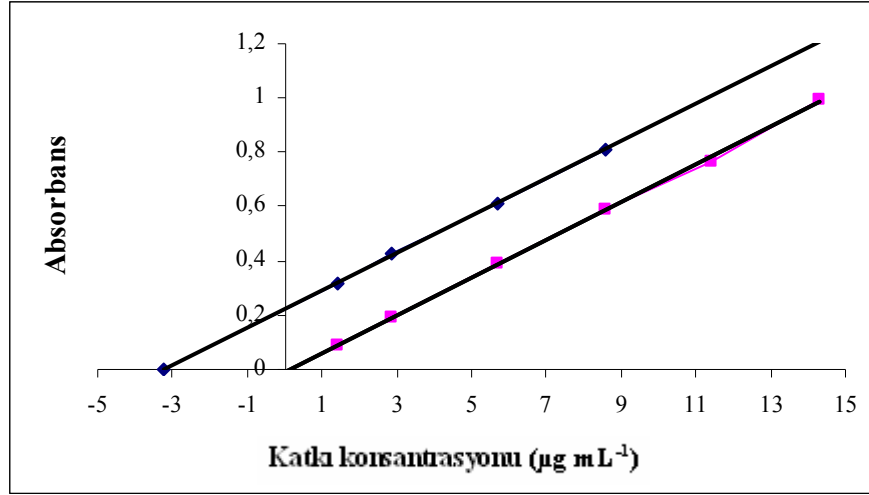
Fluoksetin çalışma doğrusu; $A_{525}=6,14 \times 10^{-2}c + 3,25 \times 10^{-2}$; $r=0,9996$

(c: $\mu\text{g mL}^{-1}$ cinsinden son konsantrasyon)

Standart katkı doğru denklemi; $A_{525}=6,14 \times 10^{-2}c + 3,624 \times 10^{-1}$; $r=1$

(c: $\mu\text{g mL}^{-1}$ cinsinden katkı konsantrasyonu)

bulunan değer: $5,9 \mu\text{g mL}^{-1}$, **beklenen değer:** $5,71 \mu\text{g mL}^{-1}$ fluoksetin



Şekil 4.38: Erio-T reaktifi ile lida örneğinde standart katkı çalışması.

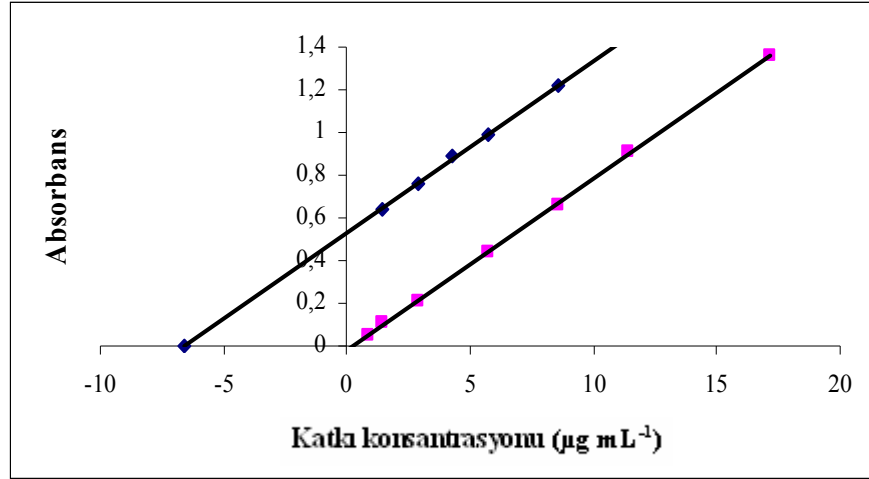
Sibutramin çalışma doğrusu; $A_{525}=6,96 \times 10^{-2} C - 1,08 \times 10^{-2}$; $r=0,9996$

(c: µg mL⁻¹ cinsinden son konsantrasyon)

Standart katkı doğru denklemi; $A_{525}=6,9 \times 10^{-2} C + 2,217 \times 10^{-1}$; $r=0,9995$

(c: µg mL⁻¹ cinsinden katkı konsantrasyonu)

bulunan değer: 3,21 µg mL⁻¹, **beklenen değer:** 2,86 µg mL⁻¹ sibutramin



Şekil 4.39: BCP reaktifi ile ecstasy örneğinde standart katkı çalışması.

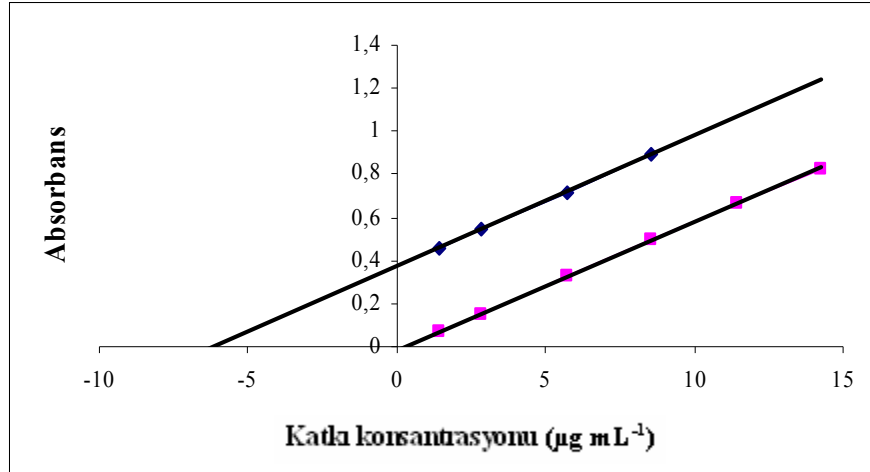
MDMA çalışma doğrusu; $A_{412}=8,01 \times 10^{-2} C - 1,64 \times 10^{-2}$; $r=0,9997$

(c: µg mL⁻¹ cinsinden son konsantrasyon)

Standart katkı doğru denklemi; $A_{412}=8,01 \times 10^{-2} C - 1,64 \times 10^{-2}$; $r=0,9997$

(c: µg mL⁻¹ cinsinden katkı konsantrasyonu)

bulunan değer: 6,62 µg mL⁻¹, **beklenen değer:** 5,71 µg mL⁻¹ MDMA



Şekil 4.40: BCP reaktifi ile prozac örneğinde standart katkı çalışması.

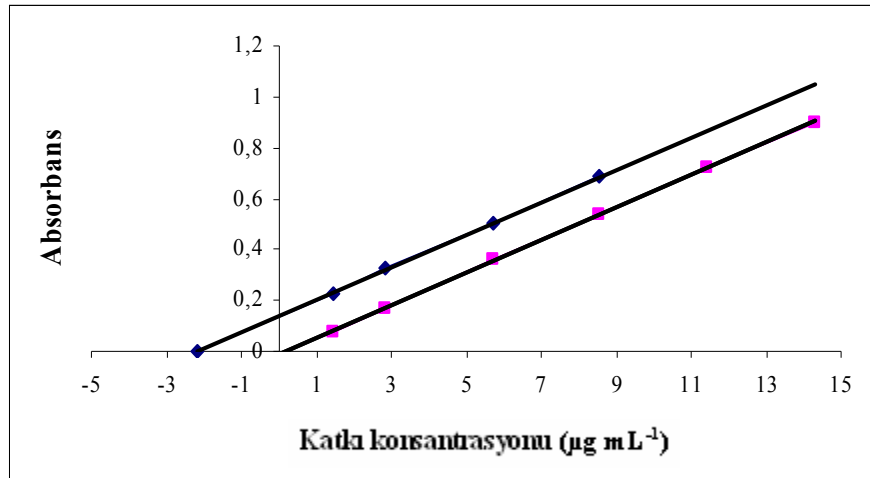
Fluoksetin çalışma doğrusu; $A_{415}=5,92 \times 10^{-2}c - 1,69 \times 10^{-2}$; $r=0,9997$

(c: $\mu\text{g mL}^{-1}$ cinsinden son konsantrasyon)

Standart katkı doğru denklemi; $A_{415}=5,91 \times 10^{-2}c + 3,769 \times 10^{-1}$; $r=0,9999$

(c: $\mu\text{g mL}^{-1}$ cinsinden katkı konsantrasyonu)

bulunan değer: $6,52 \mu\text{g mL}^{-1}$, **beklenen değer:** $5,71 \mu\text{g mL}^{-1}$ fluoksetin



Şekil 4.41: BCP reaktifi ile lida örneğinde standart katkı çalışması.

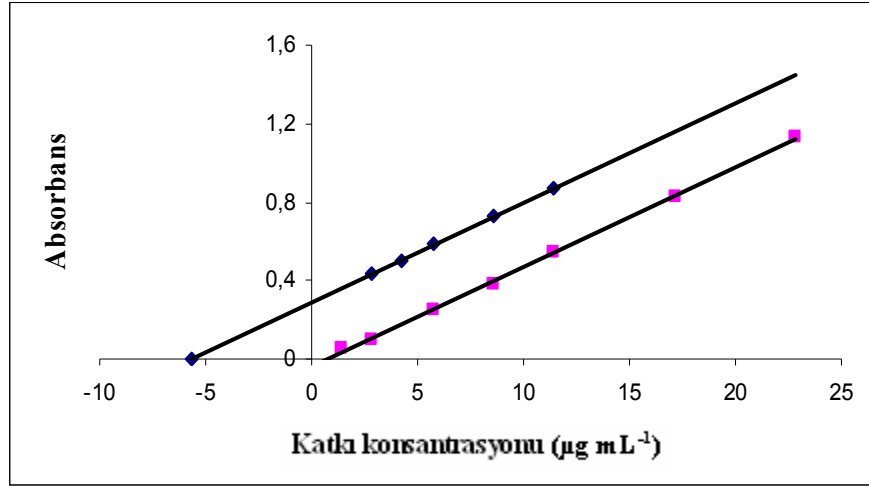
Sibutramin çalışma doğrusu; $A_{415}=6,39 \times 10^{-2}c - 1,03 \times 10^{-2}$; $r=0,9999$

(c: $\mu\text{g mL}^{-1}$ cinsinden son konsantrasyon)

Standart katkı doğru denklemi; $A_{415}=6,38 \times 10^{-2}c + 1,386 \times 10^{-1}$; $r=0,9996$

(c: $\mu\text{g mL}^{-1}$ cinsinden katkı konsantrasyonu)

bulunan değer: $2,15 \mu\text{g mL}^{-1}$, **beklenen değer:** $2,86 \mu\text{g mL}^{-1}$ sibutramin



Şekil 4.42: Metil oranj reaktifi ile ecstasy örneğinde standart katkı çalışması.

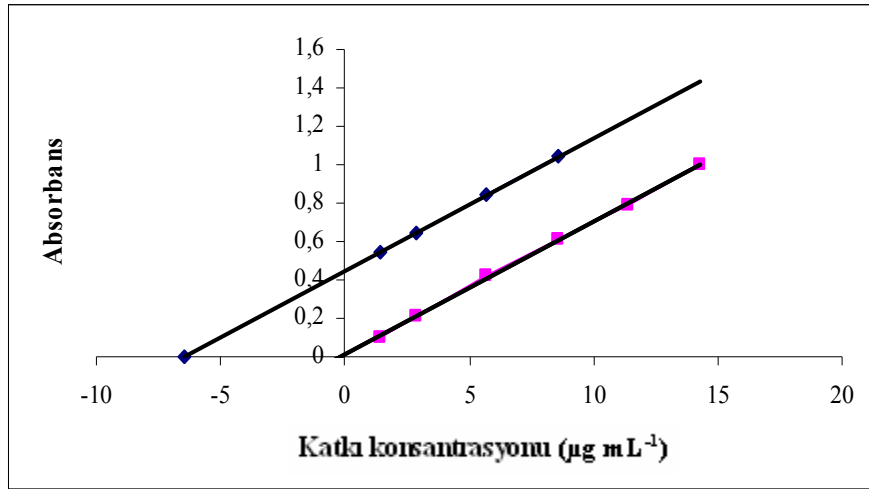
MDMA çalışma doğrusu; $A_{423}=5,07 \times 10^{-2} C - 3,69 \times 10^{-2}$; $r=0,9996$

(c: $\mu\text{g mL}^{-1}$ cinsinden son konsantrasyon)

Standart katkı doğru denklemi; $A_{423}=5,09 \times 10^{-2} C + 2,893 \times 10^{-1}$; $r=0,9997$

(c: $\mu\text{g mL}^{-1}$ cinsinden katkı konsantrasyonu)

bulunan değer: $5,68 \mu\text{g mL}^{-1}$, **beklenen değer:** $5,71 \mu\text{g mL}^{-1}$ MDMA



Şekil 4.43: Metil oranj reaktifi ile prozac örneğinde standart katkı çalışması.

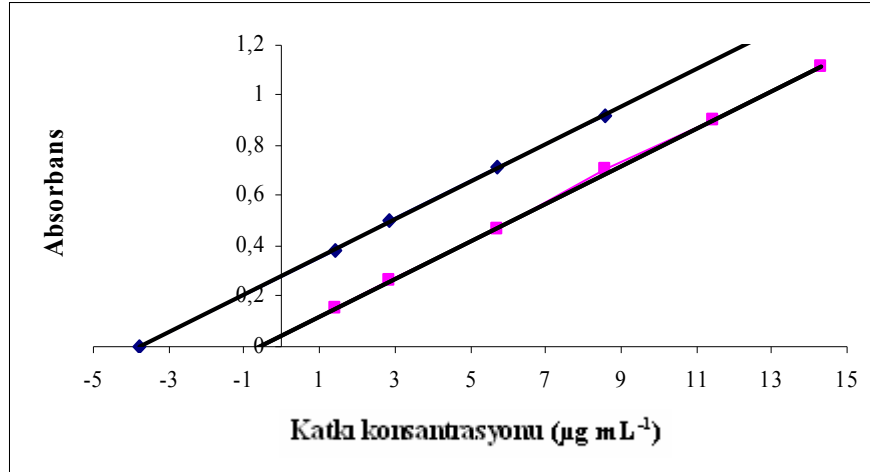
Fluoksetin çalışma doğrusu; $A_{425}=6,9 \times 10^{-2} C + 1,40 \times 10^{-2}$; $r=0,9996$

(c: $\mu\text{g mL}^{-1}$ cinsinden son konsantrasyon)

Standart katkı doğru denklemi; $A_{425}=6,94 \times 10^{-2} C + 4,415 \times 10^{-1}$; $r=1$

(c: $\mu\text{g mL}^{-1}$ cinsinden katkı konsantrasyonu)

bulunan değer: $6,49 \mu\text{g mL}^{-1}$, **beklenen değer:** $5,71 \mu\text{g mL}^{-1}$ fluoksetin



Şekil 4.44: Metil oranj reaktifi ile lida örneğinde standart katkı çalışması.

Sibutramin çalışma doğrusu; $A_{425}=7,49 \times 10^{-2} C + 4,71 \times 10^{-2}$; $r=0,9998$

(c: $\mu\text{g mL}^{-1}$ cinsinden son konsantrasyon)

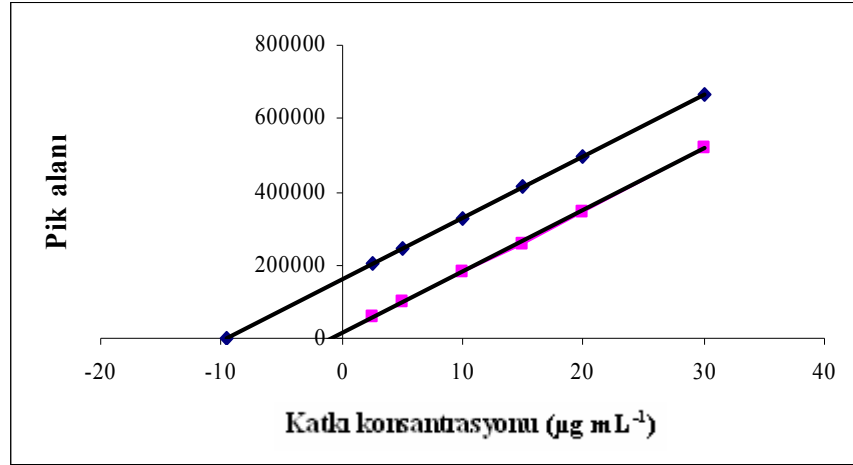
Standart katkı doğru denklemi; $A_{425}=7,47 \times 10^{-2} C + 2,841 \times 10^{-1}$; $r=0,9998$

(c: $\mu\text{g mL}^{-1}$ cinsinden katkı konsantrasyonu)

bulunan değer: $3,80 \mu\text{g mL}^{-1}$, **beklenen değer:** $2,86 \mu\text{g mL}^{-1}$ sibutramin

4.7. ECSTASY, PROZAC VE LİDA TİCARİ İLAÇLARINDA HPLC YÖNTEMİ İLE STANDART KATKI ÇALIŞMASI

Aynı ecstasy tablet, prozac kapsül ve lida kapsül kullanılarak (bkz. 4.6) $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ MDMA içeren ecstasy, $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ fluoksetin içeren prozac ve $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ sibutramin içeren lida çözeltileri üzerine $2,5-30 \mu\text{g mL}^{-1}$ aralığında standart MDMA, $3-20 \mu\text{g mL}^{-1}$ aralığında standart fluoksetin ve $5-40 \mu\text{g mL}^{-1}$ aralığında standart sibutramin çözeltileri ilave edilerek ecstasy+MDMA, prozac+fluoksetin ve lida+sibutramin karışım çözeltileri hazırlanmış, hazırlanan bu çözeltilere HPLC yöntemi uygulanmıştır. Standart katkı grafikleri çizilerek MDMA, fluoksetin ve sibutramin miktarları HPLC yöntemi ile tespit edilmiştir. HPLC yöntemi ile standart katkı çalışmaları sonucunda ele geçen pik alanları ile konsantrasyonlar arasında çizilen kalibrasyon grafikleri ecstasy tablet için Şekil 4.45'de, prozac kapsül için Şekil 4.46'da ve lida kapsül için Şekil 4.47'de görülmektedir.



Şekil 4.45: HPLC yöntemiyle ecstasy tablet için standart katkı çalışması.

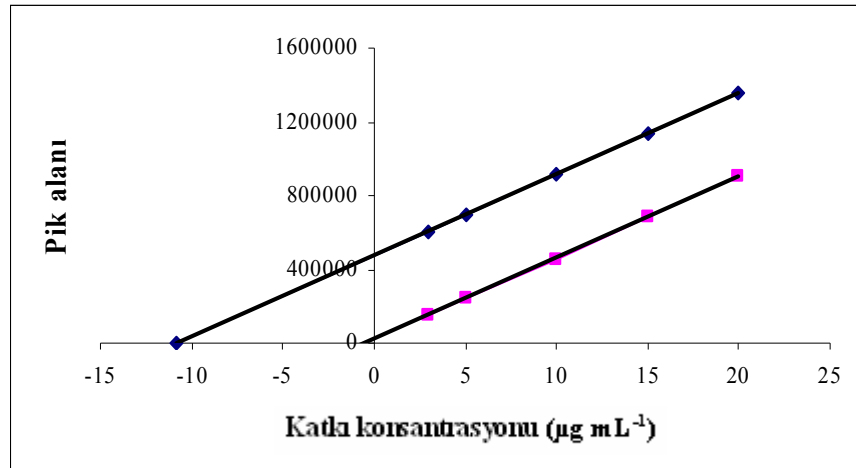
Doğru denklemi; Pik alanı= 16801c + 12897 ; r=0,9995

(c: µg mL⁻¹ cinsinden MDMA konsantrasyonu)

Standart katkı doğru denklemi; Pik alanı= 16822c + 161337 ; r=1

(c: µg mL⁻¹ cinsinden katkı konsantrasyonu)

bulunan miktar: 9,59 µg mL⁻¹, beklenen miktar: 10,00 µg mL⁻¹ MDMA



Şekil 4.46: HPLC yöntemiyle prozac kapsül için standart katkı çalışması.

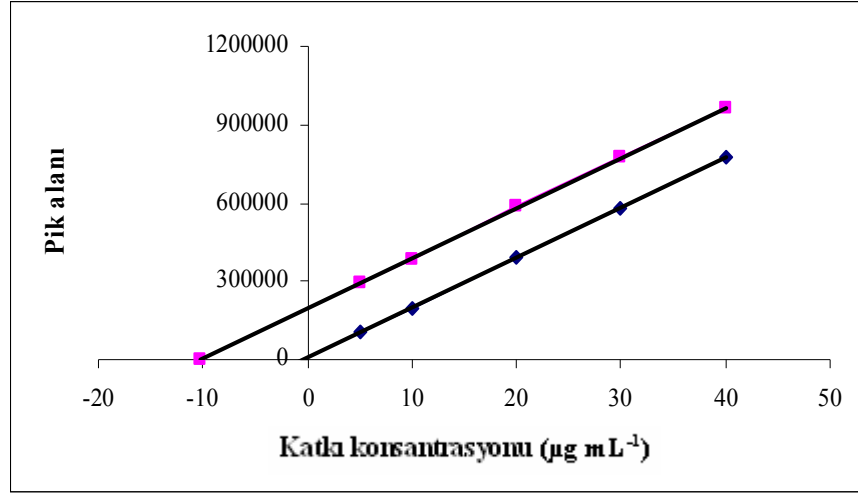
Doğru denklemi; Pik alanı= 43828c + 24267 ; r=0,9998

(c: µg mL⁻¹ cinsinden fluoksetin konsantrasyonu)

Standart katkı doğru denklemi; Pik alanı= 43816c + 476389 ; r=0,9999

(c: µg mL⁻¹ cinsinden katkı konsantrasyonu)

bulunan miktar: 10,87 µg mL⁻¹, beklenen miktar: 10,00 µg mL⁻¹ fluoksetin



Şekil 4.47: HPLC yöntemiyle lida kapsül için standart katkı çalışması.

Doğru denklemi; Pik alanı= 19158c + 5954,2 ; r=1

(c: µg mL⁻¹ cinsinden sibutramin konsantrasyonu)

Standart katkı doğru denklemi; Pik alanı= 19159c + 196539 ; r=0,9999

(c: µg mL⁻¹ cinsinden katkı konsantrasyonu)

bulunan miktar: 10,26 µg mL⁻¹, beklenen miktar: 10,00 µg mL⁻¹ sibutramin

4.8. EKSTRAKTİF-SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEM İLE HPLC YÖNTEMİNİN KIYASLANMASI

İki farklı ecstasy tablet (teorik olarak % 28 ve % 36 MDMA içeren), prozac kapsül (teorik olarak % 8,7 fluoksetin içeren) ve lida kapsül'den (teorik olarak % 8,9 sibutramin içeren) alınan 5'er farklı tartım sonucunda hazırlanmış gerçek örnek çözeltilerinin her iki yöntem ile analizleri yapılmış ve bu analizlerin sonuçları karşılaştırılmıştır. % 28'lik ecstasy tablet için elde edilen sonuçlar Tablo 4.38'de, % 36'lık ecstasy tablet için elde edilen sonuçlar Tablo 4.39'da, prozac kapsül için elde edilen sonuçlar Tablo 4.40'da ve lida kapsül için elde edilen sonuçlar Tablo 4.41'de görülmektedir. Ecstasy tabletlerden % 28'lik olanı etken madde olarak yalnızca MDMA, % 36'lık olanı ise MDMA yanında bu tip tabletlerde uyarıcı etkiyi arttırmak amacıyla kullanılan stimulant maddelerden biri olan kafein de içermektedir. Bu kısım ile ilgili ayrıntılı analiz sonuçları interferans analizi kısmında (bkz. 4.4) verilmiştir.

Tablo 4.38: % 28'lik ecstasy tablette mevcut MDMA bileşiminin tespiti.

Örnek	Spektrofotometrik Yöntem ile Elde Edilen A_{513}	Spektrofotometrik Yöntem ile Bulunan % MDMA Miktarı	HPLC Yöntemi ile Elde Edilen Pik Alanı	HPLC Yöntemi ile Bulunan % MDMA Miktarı
1	0,350	25,25	86196	24,42
2	0,346	24,98	88680	25,06
3	0,354	25,52	88201	25,13
4	0,347	25,05	87010	24,45
5	0,341	24,65	86134	24,22

Tablo 4.39: % 36'lık ecstasy tablette mevcut MDMA bileşiminin tespiti.

Örnek	Spektrofotometrik Yöntem ile Elde Edilen A_{513}	Spektrofotometrik Yöntem ile Bulunan % MDMA Miktarı	HPLC Yöntemi ile Elde Edilen Pik Alanı	HPLC Yöntemi ile Bulunan % MDMA Miktarı
1	0,362	33,51	91774	33,53
2	0,354	32,81	90793	33,12
3	0,359	33,25	89054	32,38
4	0,349	32,38	88881	32,30
5	0,357	33,07	90806	33,12

Tablo 4.40: Prozac kapsülde mevcut fluoksetin bileşiminin tespiti.

Örnek	Spektrofotometrik Yöntem ile Elde Edilen A ₅₂₅	Spektrofotometrik Yöntem ile Bulunan % Fluoksetin Miktarı	HPLC Yöntemi ile Elde Edilen Pik Alanı	HPLC Yöntemi ile Bulunan % Fluoksetin Miktarı
1	0,525	8,71	376864	8,74
2	0,519	8,61	373423	8,61
3	0,529	8,78	374816	8,68
4	0,534	8,87	375203	8,71
5	0,541	9,00	375827	8,78

Tablo 4.41: Lida kapsülde mevcut sibutramin bileşiminin tespiti.

Örnek	Spektrofotometrik Yöntem ile Elde Edilen A ₅₂₅	Spektrofotometrik Yöntem ile Bulunan % Sibutramin Miktarı	HPLC Yöntemi ile Elde Edilen Pik Alanı	HPLC Yöntemi ile Bulunan % Sibutramin Miktarı
1	0,560	9,05	161170	8,90
2	0,553	9,00	162350	9,17
3	0,566	9,20	160645	8,97
4	0,574	9,30	159728	8,91
5	0,568	9,23	161784	9,03

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Geliştirilen ekstraktif-spektrofotometrik yöntemin esası, asidik ortamda proton alarak kuvaterner amine dönüştürülecek primer, sekonder, tersiyer amin gruplarının anyonik boyalarla iyon asosiyatı oluşturması ve bu iyon asosiyatının uygun bir organik çözücü veya çözücü karışımı ile ekstrakte edilmesine dayanmaktadır. Meydana gelen iyon asosiyat kompleksinin oluşumu, $R_2NH_2^+$, R_3NH^+ gibi amin gruplarının protonlanmış halleri ile erio-T, BCP, metil oranj gibi aril sülfonat grubu içeren anyonik boyalar arasında gerçekleşmektedir. Beklenildiği üzere büyük bir katyon (protonlanmış amin) ile büyük bir anyonun (anyonik boya) oluşturduğu iyon asosiyatı oldukça zayıf hidrasyon kabuğuna sahiptir ve kolaylıkla organik çözücülere ekstrakte edilerek bu aminlerin ekstraktif-spektrofotometrik tayinleri gerçekleştirilebilir. Katyon ve anyon ne kadar iri moleküllü olursa bunların primer hidrasyon kabukları olmayacağından veya çok zayıf olacağından oluşan iyon asosiyatının adeta yüksüz bir molekül gibi organik faza geçişi kolaylaşmaktadır. Bu çalışmada MDMA, fluoksetin ve sibutramin ile çeşitli anyonik boyalar arasında, asidik ortamda oluşan renkli iyon asosiyat komplekslerinin oluşum koşulları optimize edilmiş, uygun dalga boylarında absorbans ölçümleri yapılmış ve çalışma grafikleri hazırlanmıştır. Bu analizleri takiben geliştirilen yöntemin ilaç tabletlerinde var olan çeşitli dolgu maddelerinden etkilenip etkilenmediği araştırılmış ve bu amaçla ayrıntılı bir girişim (interferans) analizi yapılmıştır. Geliştirilen ekstraktif-spektrofotometrik tayin yöntemi literatürde var olan bir standart referans HPLC yöntemi ile kıyaslanmıştır.

Kullanılan ekstraktif-spektrofotometrik yöntemdeki iyon asosiyatları oluşumunun asidik ortamda gözlenmesi esas alındığından yapılan pH çalışmaları pH 1-5 aralığında gerçekleştirilmiştir. Uygun pH seçimi amin fonksiyonel grubunun protonlanarak katyonik, boyar maddenin de proton vererek anyonik olması esasına dayalıdır. Bu amaçla yapılan çalışmalarda, ekstraksiyonu sağlamak için kullanılan en uygun tampon çözeltilerin, 3 ve 5 aralığındaki pH değerleri için NaAc-HAc tamponu olduğu

görülmüştür. pH 1 ve 2 ise HCl-KCl çözeltileri kullanılarak hazırlanmıştır. pH 3-5 aralığında, HCl-KHftalat, NaOH-KHftalat ve sitrik asit- Na_2HPO_4 tampon karışımları da denenmiştir. Fakat NaAc-HAc tamponları ile karşılaştırıldığında diğer tamponların ekstraksiyon verimini düşürdüğü görülmüştür. Aynı şartlarda NaAc-HAc tamponu ile diğer tamponlar kullanılarak yapılan denemeler kıyaslandığında NaAc-HAc tamponları ile daha yüksek absorbanlar elde edilmiştir. Ayrıca 0,2 M konsantrasyonun altındaki NaAc-HAc tamponu yeterince tamponlama gücüne sahip olmadığından ve 0,2 M'ın üzerindeki konsantrasyonlarda da referans çözeltisinin organik ekstrakt fazında renklenme görüldüğünden dolayı uygun konsantrasyon olarak 0,2 M seçilmiştir. Erio-T reaktifi kullanılarak yapılan çalışmalarda MDMA, MDA, fluoksetin için optimum çalışma pH'ı 3,0, sibutramin için ise 3,2 olarak bulunmuştur. BCP reaktifi varlığında yapılan çalışmalarda ise MDMA ve MDA için uygun pH değerleri 3,4 olup fluoksetin için 3,6 ve sibutramin için 3,2 olarak belirlenmiştir. Metil oranj reaktifi ile MDMA, MDA ve fluoksetin analizinde ise optimum çalışma pH'ı 3,4, aynı reaktif ile sibutramin tayininde 3,2 olarak belirlenmiştir. Burada iyon çifti ekstraksiyonu söz konusu olduğu için seçilen pH değerleri ideal olarak, analit amin'in amonyum formunun pK_a değerinden küçük, buna karşılık boyanın pK_a değerinden büyük olmalıdır. Böyle bir ideal pH bulunamadığı takdirde optimal ekstraksiyon pH'ı bu değerlere yakın olmalıdır ki amin mümkün olduğunca amonyum formunda, boya ise mümkün olduğunca sülfonat formunda bulunsun.

Kullanılan ekstraktif-spektrofotometrik yöntemde iyon assosiyat komplekslerinin ekstraksiyonunu sağlamak açısından kloroform, karbon tetraklorür, isobutilmetilketon ve oktanol gibi organik çözücüler ile çalışmalar yapılmıştır. Kloroform dışındaki diğer tüm organik çözücüler varlığında (karbon tetraklorür, isobutilmetilketon ve oktanol) referans çözeltilerin ekstraktı (blank organik fazı) renklenmiştir. Bu çalışmalar sonucunda ekstraksiyon için kloroform uygun çözücü olarak saptanmıştır. Fakat kloroformun apolarlığı yüksek olduğundan iyon assosiyat kompleksinin organik faza geçişi güçleşmekte ara yüzeyde köpük oluşmakta ve fazların tam ayrılmama durumu ortaya çıkmaktadır. Bu zorluğu yenmek açısından kloroform ile polarlığı arttıracak bütanol'ün (polar çözücü) belirli oranlardaki karışımı kullanılmıştır. Erio-T için 20:1, BCP için 10:1 oranında kloroform-bütanol karışımı, metil oranj reaktifi ile yapılan çalışmalarda ise organik çözücü olarak sadece kloroform kullanılmıştır. Organik faz

polar kılındıkça, sulu fazdan küçük moleküllü iyonlarda ekstrakte olmaya başlamaktadır. Organik fazın polarlığını belli bir oranda arttırmak ideal olmakla birlikte bu miktarın çok iyi optimize edilmesi şarttır. Aksi takdirde reaktif körü de renklenerek analite ait olan net absorbansın azalışına sebep olmaktadır.

Geliştirilen spektrofotometrik yöntemde, iyon assosiyatı oluşturmak üzere kullanılan boyaların konsantrasyonları optimize edilmiştir. Bu parametre incelenirken dikkat çeken en önemli husus, reaktif (boya) konsantrasyonlarının belirlenen maksimum değerlerden (erio-T ve BCP için $500 \mu\text{g mL}^{-1}$, metil oranj için $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$) yüksek tutulması durumunda, analite ait net absorbansın analit konsantrasyonu ile orantılı olarak artmadığı yönündedir ve yapılan çalışmalarda Beer yasasından sapmalar gözlemlenmiştir. Beer yasasını sınırlayıcı bir etken olarak; yüksek derişimlerde absorpsiyon yapan moleküller arasındaki uzaklık çok azalır ve moleküller komşularının yük dağılımını etkiler. Özellikle bazı boyaların orta-düşük konsantrasyonlarda bile çözeltide aglomerik yığışımalar yaptıkları bilinmektedir. Etkileşim düzeyi derişime bağlı olduğu için, bu olay boya aglomerleri ile analit (amonyum) katyonları arasında farklı tipte iyon yığışımları oluşumuna yol açarak analit derişimi ile absorbans arasındaki doğrusal ilişkiden sapmalara neden olmaktadır. Moleküler etkileşimler $0,01 \text{ M}$ 'dan seyreltik çözeltilerde önemli olmamakla birlikte bu çalışmada gözlemlendiği gibi büyük organik iyon veya moleküller için durum istisna olabilmektedir. Bu duruma literatürde verilen en güzel örneklerden biri de metilen mavisi katyonunun sulu çözeltide, 436 nm 'deki molar absorptivitesinin boya derişimi 10^{-5} M 'dan 10^{-2} M 'a arttırıldığında % 88 artmasıdır. Bazı boyalar için 10^{-6} M 'dan daha düşük derişimlerde bile Beer yasasına tam uyum gözlenmemektedir.

Gerçek kompleks karışımlarda Beer kuralının geçerliliği için standart katkı yönteminin uygulanışı iyi bir imkandır. Eğer saf çözeltide elde edilen standart maddeye özgü kalibrasyon doğrusunun eğimi, gerçek örneğe farklı konsantrasyonlarda standart maddelerin katılması ile elde edilen doğrunun eğiminden önemli ölçüde farklı değilse gerçek örnek ve standart madde arasında bir kimyasal etkileşimin olmadığı düşünülebilir. Bu durumda genellikle Beer yasasından kimyasal sapmalar beklenmez. Yapılan çalışmalarda standart katkı doğrularının tayini yapılmak istenen maddelerin (MDMA, fluoksetin, sibutramin) kalibrasyon doğrularına paralel olduğu bulunmuştur.

Ayrıca sentetik ve gerçek karışımlar için de Beer yasasına uygun olarak karışım bileşenlerinden gelen absorbanların toplamsallığı denel olarak gösterilmiştir.

Tez çalışmasına konu olan maddelerden biri olan ve zayıflama ilaçlarında kullanılan sibutramin Sağlık Bakanlığı tarafından yasaklanmış ve gümrüklerden geçişi engellenmiş bir uyuşturucu maddedir. Bu madde de pek çok uyuşturucu madde gibi yasa dışı kullanılmaktadır. Literatürde bu maddenin tayini için genellikle HPLC ve LC ile birleştirilmiş ESI-MS yöntemleri kullanılmasına rağmen bu denli önem arz eden bir ilaç için kolay uygulanabilir, hızlı ve güvenilir bir spektrofotometrik metot bulunmamaktadır. Geliştirilen yöntem bu ihtiyacı karşılama anlamında seçenek sunması açısından oldukça önemlidir.

Spektrofotometrik teknikler, basit, düşük maliyetli ve kolay uygulanabilmelerinden dolayı amin tipi uyarıcıların kantitatif tayinini hızlı bir şekilde gerçekleştirmek için iyi bir seçimdir. Genellikle spektrofotometrik yöntem yardımı ile tayini en çok yapılan amin tipi uyarıcı fluoksetindir. Fakat uygulanmış yöntemler bazı problemler içermektedir. Mandrioli [59] hızlı bir spektroflorimetrik metod geliştirmiştir. Fakat bu metotta UV bölgesinde benzer eksitasyon ve emisyon dalga boylarına sahip diğer organik bileşiklerin girişiminden de söz edilebilir. Prabhakar'ın spektrofotometrik metodu ise renk stabilitesinin sağlanamaması (5 dakika) ve analitik açıdan kabul edilmeyen (yazarlar tarafından olasılıkla hatalı olarak bildirilen $10^{-3} \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) molar absorpsiyon katsayısından dolayı başarılı bir çalışma değildir [60]. Literatürde fluoksetinin benzoilperoksit ve KI ile oksidasyon ürünü olarak spektrofotometrik yöntem ile ölçülebilen mavi renkli bir ürün belirtilmiş fakat bu ürünün yapısı tanımlanamamıştır [52]. Bir başka yöntemde kromazurol S kullanılarak ekstraktif spektrofotometrik fluoksetin tayininde ilaç tabletlerinde fazla miktarda bulunan dolgu maddelerinin interferan etkisi araştırılmamıştır [61]. Babewy'in geliştirdiği spektrofotometrik metotta kloranil ile fluoksetinin molar absorpsiyon katsayısı oldukça düşüktür ($\epsilon=4,85 \times 10^2 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Metot başlangıçta buharlaştırma ve sonra tekrar asetonda çözme gibi uzun zaman alan ve yorucu aşamalar gerektirmekte ve I_3^- ile fluoksetinin maksimum absorbanı UV aralığındadır [53].

Geliştirilen analiz yöntemi ise yasadışı kullanılan amin tipi uyuşturucu maddelerin süratle kalitatif ve kantitatif tayini için kullanışlı bir yöntemdir. Karşıt yüklü reaktif

kullanarak bu maddelerin iyon assosiyat komplekslerini oluşturup ekstrakte ederek tayin etmek bir avantajdır. Bu avantaj özellikle erio-T reaktifi kullanıldığında daha fazladır. Çünkü bu reaktif kullanıldığında görünür alanda daha uzun dalga boyunda absorpsiyon maksimumu elde etmek mümkün olmuş ve yüksek etkin molar absorptivite elde edilmiştir. Gerek bu reaktif ve diğer reaktifler, gerekse ekstraksiyon çözücöleri kolay bulunan ucuz maddelerdir. Geliştirilen spektrofotometrik yöntemler, söz konusu aminleri daha duyarlı olarak, fakat daha yüksek maliyet ve zahmetle tayin eden HPLC/MS ve LC/MS/MS yöntemlerine göre olağanüstü bir basitlik ve ucuzluk sağlamakta ve genelde eleyici yöntemler olarak adli tıp ve kriminoloji laboratuvarlarının iç yükünü potansiyel bakımdan azaltmaktadır.

Geliştirilen yöntemlerin özellikle genç kuşakları tehdit eden ve yaygın kullanımının istatistiksel olarak 13-14 yaşa kadar indiği saptanan uyarıcı ve uyuruşturucu maddelerin belirlenmesi ve analizlenmesi açısından önemli yararlar sağlayarak kamu sağlığı ve güvenliğine katkıda bulunacağı umulmaktadır.

KAYNAKLAR

1. CONCEIRO M., CASTRO A. D., QUINIELA O., LOPEZ- RIVADULLA M., CRUZ A., 2005, Determination of MDMA, MDA, MDEA and MBDB in Oral Fluid Using High Performance Liquid Chromatography With Native Fluorescence Detection, *Forensic Science International*, 50, 221-226.
2. COSTA J. L. D., CHASIN A. A. D. M., 2004, Determination of MDMA, MDEA and MDA in Urine High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection, *Journal of Chromatography B*, 811 (1), 41-45.
3. MITREVSKI B., ZDRAVKOVSKI Z., 2005, Rapid and Simple Method for Direct Determination of Several Amphetamines in Seized Tablets by GC-FID, *Forensic Science International*, 152, (2-3), 199-203.
4. APAK R., BAYKUT F., AYDIN A., 1989, The Uranyl-Chloro-Substituted Benzoic Acid-Rhodamine B-Benzene Extraction System, *Talanta*, 36, 993-998.
5. *Uyuşturucu Maddelerin Sınıflandırılması* [online], Kütahya Emniyet Müdürlüğü İnternet Sitesi, www.kutahya.pol.tr, [Ziyaret Tarihi: 17 Şubat 2009].
6. BUTLER D., GUILBAULT G. G., 2004, Analytical Techniques for Ecstasy, *Analytical Letters*, 37 (10), 2003-2030.
7. COLE J.C., ALTERED S. H. R., 2003, The Clinical Effects of Ecstasy, *Pharmacol. Therap.*, 98, 35-58.
8. BAGGOTT M., HEIFERTS B., JONES R.T., MENDELSON J., SFERIOS E., ZHENDER J., 2000, Chemical Analysis of Ecstasy Pills, *J. Amer. Med. Assoc.*, 248, 2190-2198.
9. ZİNGG C., 2005, *The analysis of ecstasy tablets in a forensic drug intelligence perspective*, ADAG COPY AG, Zürich, Switzerland, ISBN 2-940098-34-4.
10. SÜZER Ö., 2005, Antidepresan ve Antimanik İlaçlar, *Türkiye Klinikleri J. Int. Med. Sci.*, 1(44), 18-25.
11. RADHAKRISHNA T., NARAYANA CH. L., RAO D. S., VYAS K., REDDY G. O., 2000, LC Method for The Determination of Assay and Purity of Sibutramine Hydrochloride and Its Enantiomers by Chiral Chromatography, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 22, 627-639.

12. EKER M. Ç., ONAT Ö., PIRILDAR Ş., ÖZAŞKINLI S., 2003, Sibutramin ile İndüklenen Bir Mikst Epizot Olgusu, *Klinik Psikofarmakoloji Bülteni*, 13, 129-132.
13. JUNG J. J., HERMANNNS-CLAUSEN M. M., WEINMANN W. W., 2006, Anorectic Sibutramine Detected in a Chinese Herbal Drug for Weight Loss, *Forensic Science International*, 161 (2-3), 221-222.
14. K.E.RASMUSSEN, P.KHUTSEN, 1985, Techniques for the Detection and Identification of Amphetamines and Amphetamines-Like Substances, *Office on Drugs and Crime-Bulletin on Narcotics*, 1 (007), 95-112.
15. MILUN, A. J., 1957, Colorimetric Determination of Primary Amine in Fatty Amine Acetates and Fatty Amines, *Analyt. Chem.*, 29, 1502-1504.
16. BANDELIN F. J., KEMP C. R., 1946, Colorimetric Determination of Local Anesthetic Compounds, *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, 18 (8), 470-471.
17. AHUJA S., 1998, *Impurities Evaluation of Pharmaceuticals*, Informa Health Care, ISBN 0824798848, 9780824798840, 293.
18. SCHENK G. H., WARNER P., BAZZELLE W., 1966, Spectrophotometric Determination of Tertiary Aromatic Amines in the Presence of Primary and Secondary Amines by Complexation with Tetracyanoethylene, *Anal. Chem.*, 38 (7), 907-910.
19. CABEZZA A. S., FALCO P. C., JEGUA C. M., 1994, Spectrophotometric Determination of Primary and Secondary Amines by Reaction with 1-2 naphthoquinone-4-sulphonate, *Analytical Letters*, 24, 1095-1108.
20. MOFFAT A.C., STEAD A.H., SMALLDON K.W., 1974, Optimum Use of Paper, Thin-Layer and Gas-Liquid Chromatography For the Identification of Basic Drugs. III. Gas-Liquid Chromatography, *Journal of Chromatography*, 90, 19-33.
21. JANE I., 1975, The Separation of a Wide Range of Drugs of Abuse by High-Pressure Liquid Chromatography, *Journal of Chromatography*, 111, 227-233.
22. TWITCHETT P.J., MOFFAT A.C., 1975, High Pressure Liquid Chromatography Of Drugs. An Evaluation of an Octadecylsilane Stationary Phase, *Journal of Chromatography*, 111, 149-157.
23. LURIE I.S., 1981, Improved Isocratic Mobile Phase For the Reversed Phase Ion-Pair Chromatographic Analysis of Drugs of Forensic Interest, *Journal of Liquid Chromatography*, 4, 399-408.
24. FLANAGAN R.J., 1982, High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of Basic Drugs on Silica Columns Using Non-Aqueous Ionic Eluents, *Journal of Chromatography*, 247, 15-37.

25. BAKER J.K., SKELTON R.E., MA C.Y., 1979, Identification of Drugs by High-Pressure Liquid Chromatography with Dual Wavelengthultraviolet Detection, *Journal of Chromatography*, 168, 417-427.
26. WHEALS B.B., 1980, Isocratic Multi-Column High-Performance Liquid Chromatography as a Technique Analysis and Its Application to The Characterisation of Basic Drugs Using Aqueous Methanol Solvent, *Journal of Chromatography*, 187, 65-85.
27. CLAUWAERT K. M., BOCXLAER J. F. V., LETTER E. A. De, CALENBERGH S. V., LAMBERT W. E. and LEENHEER A. P. De, 2000, DETERMINATION OF the Designer Drugs 3,4-Methylenedioxymethamphetamine, 3,4-Methylenedioxyethylamphetamine, and 3,4-Methylenedioxyamphetamine with HPLC and Fluorescence Detection in Whole Blood, Serum, Vitreous Humor, and Urine, *Clinical Chemistry*, 46, 1968-1977.
28. SANTAGATI N. A., FERRARA G., MARRAZZO A. and RONSISVALLE G., 2002, Simultaneous Determination of Amphetamine and One of Its Metabolites by HPLC with Electrochemical Detection, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30, 247-255.
29. TALWAR D., WATSON I.D., STEWART M.J., 1999, Routine Analysis of Amphetamine Class Drugs as Their Naphthoquinone Derivatives in Human Urine by Highperformance Liquid Chromatography, *J. Chromatogr. B*, 735, 229-241.
30. SADEGHIPOUR F., VEUTHEY J. L., 1997, Sensitive and Selective Determination of Methylenedioxyated Amphetamines by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorimetric Detection, *J. Chromatogr. A*, 787, 137-143.
31. SADEGHIPOUR F., GIROUD C., RIVIER L., VEUTHEY J. L., 1997, Rapid Determination of Amphetamines by High-Performance Liquid Chromatography with UV Detection, *J. Chromatogr. A*, 761, 71-78.
32. FANG C., CHUNG Y.L., JU-TSUNG L., LIN C.H., 2002, Rapid Analysis of 3,4-Methylenedioxymethamphetamine: a Comparison of Non-Aqueous Capillary Electrophoresis/Fluorescence Detection with GC/MS, *Forensic Sci. Int.*, 125, 142-148.
33. SEGURA M., ORTUNO J., MCLURE J.A., PUJADAS M., PIZARRO N., FARRE M., LLEBARIA A., JOGLAR J., SEGURA J., DE LA TORRE R., 2002, High Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection Applied to The Analysis of 3,4 Dihydroxymethamphetamine in Human Plasma and Urine, *J. Chromatogr. B*, 769, 313-321.
34. BRUNNENBERG M., KOVAR K. A., 2001, Stereospecific Analysis of Ecstasy Like N-ethyl 3,4-Methylenedioxyamphetamine and Its Metabolites in Humans, *J. Chromatogr. B*, 751, 9-18.

35. MANCINELLI R., GENTILI S., GUIDUCCI M.S., MACCHIA T., 1999, Simple and Reliable High – Performance Liquid Chromatography Fluorimetric Procedure for The Determination of Amphetamine Derived Designer Drugs, *J.Chromatogr .B*, 735, 243-253.
36. SOARES M. E., CARVALHO M., CARMO H., CARVALHO F., REQUIMTE M. L. B., 2004, Simultaneous Determination of Amphetamine Derivatives in Human Urine After SPE Extraction and HPLC-UV Analysis, *Biomed. Chromatogr.*, 18 (2), 125-131.
37. PELLEGRINI M., ROSATI F., PACIFICI R., ZUCCARO R., ROSMOLO F.S., LOPEZ A., 2002, Rapid Screening Method for Determination of Ecstasy and Amphetamines in Urine Samples Using Gas Chromatography-Chemical Ionisation Mass Spectrometry, *J. Chromatogr. B*, 769, 243-251.
38. MARQUET P., LACASSIE E., BATTU C., FAUBERT H., LACHATRE G., 1997, Simultaneous Determination of Amphetamine and Its Analogs in Human Whole Blood by Gas Chromatography-Mass Spectrometry, *J. Chromatogr. B*, 700, 77-82.
39. ORTUNO J., PIZZARO N., FARRE M., MAS M., SEGURA J., CAMI J., BRENNEISEN R., DE LA TORRE R., 1999, Quantification of 3,4 Methylendioxyamphetamine and Its Metabolites in Plasma and Urine by Gas Chromatography with Nitrogen-Phosphorous Detection, *J. Chromatogr. B*, 723, 221-232.
40. NAVARRO M., PICHINI S., FARRE M., ORTUNO J., ROSET P.N., SEGURA J., DE LA TORRE R., 2001, Usefulness of Saliva for Measurement of 3,4 Methylendioxyamphetamine and Its Metabolites: Correlation with Plasma Drug Concentrations and Effect on Salivary pH, *Clin. Chem.*, 47, 1788-1795.
41. FUCCI N., DE GIOVANNI N., CHIAROTTI M., 2003, Simultaneous Detection of Some Drugs of Abuse in Saliva Samples by SPME Technique, *Forensic Sci. Int.* 134, 40-45.
42. STEAD A.H., 1982, Standardised Thin-Layer Chromatographic Systems for The Identification of Drugs and Poisons, *The Analyst*, 107, 1106-1168.
43. O'BRIEN B.A., BONICAMP J.M., JONES D.W., 1982, Differentiation of Amphetamine and Its Major Hallucinogenic Derivatives Using Thin-Layer Chromatography, *Journal of Analytical Toxicology*, 6, 143-147.
44. BAILEY K., 1975, Identification of the N-methylated Analogs of the Hallucinogenic Amphetamines and Some Isomers, *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 58, 62-65.
45. VINSON J.A., HOOYMAN J.E., WARD C.E, 1975, Identification of Street Drugs by Thin-Layer Chromatography and a Single Visualization Reagent, *Journal of Forensic Sciences*, 20, 552-556.

46. LOH H.H., 1972, Mini Thin-Layer Chromatography III.A Rapid and Sensitive Method for The Estimation of Amphetamine and Methamphetamine, *Journal of Chromatography*, 68, 289-293.
47. MAYA M. T., DOMINGOS C. R., GUERREIRO M. T., MORAIS J. A., 2000, Determination of the Antidepressant Fluoxetine in Human Plasma by LC with UV Detection, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 23, 989-996.
48. ALVAREZ J. C., BOTHUA D., COLLIGNON I., ADVENIER C., VAROQUAUX O. S., 1998, Determination of Fluoxetine and Its Metabolite Norfluoxetine in Serum and Brain Areas Using High Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection, *Journal of Chromatography B*, 707, 175-180.
49. REDDY B. V., REDDY K. V. N. S., SREERAMULU J., KANUMULA G. V., 2007, Simultaneous Determination of Olanzapine And Fluoxetine By HPLC, *Chromatographia*, 66, 111-114.
50. MALFARA W. R., BERTUCCI C., QUEIROZ M. E. C., CARVALHO S. AP. D., BIANCHI M. De L. P., CESARINO E. J., CRIPPA J. A., QUEIROZ R. H. C., 2007, Reliable HPLC Method for Therapeutic Drug Monitoring of Frequently Prescribed Tricyclic and Nontricyclic Antidepressants, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 44, 955-962.
51. TREFI S., GILARD V., BALAYSSAC S., MARTINO M. M., MARTINO R., 2008, Quality Assessment of Fluoxetine and Fluvoxamine Pharmaceutical Formulations Purchased in Different Countries or Via The Internet by ^{19}F and 2D DOSY ^1H NMR, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 46, 707-722.
52. KHAN I. U., AMAN T., IQBAL M. A., and KAZI A. A., 2000, Spectrophotometric Quantitation of Fluoxetine Hydrochloride Using Benzoyl Peroxide and Potassium Iodide, *Mikrochim. Acta*, 134, 27-31.
53. BEBAWY L. I., KOUSY N. EI, SUDDIK J. K., SHOKRY M., 1999, Spectrophotometric Determination of Fluoxetine and Sertraline Using Chloranil, 2,3 Dichloro-5,6 Dicyano Benzoquinone and Iodine, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 21, 133-142.
54. FONTANILLE R., JOURDIL N., VILLIER C., BESSARD G., 1997, Direct Analysis of Fluoxetine and Norfluoxetine in Plasma by Gas Chromatography with Nitrogen-Phosphorus Detection, *Journal of Chromatography B*, 692, 337-343.
55. DING L., HAO X., HUANG X., ZHANG S., 2003, Simultaneous Determination of Sibutramine and Its *N*-Desmethyl Metabolites in Human Plasma by Liquid Chromatography–Electrospray Ionization–Mass Spectrometry: Method and Clinical Applications, *Analytica Chimica Acta*, 492, 241-248.

- 56.** SEGALL A.I., COLLADO E. A., RICCI R. A., PIZZORNO M. T., 2003, Reversed-Phase HPLC Determination of Sibutramine Hydrochloride in The Presence of Its Oxidatively-Induced Degradation Products, *Journal of liquid chromatography & related technologies*, 26, 977-986.
- 57.** CHANDORKAR J., KOTWAL V., DHANDE N., PACHPOR M., and PANDE V., 2008, Development and Validation of High Performance Liquid Chromatography Method for Analysis of Sibutramine Hydrochloride and Its Impurity, *Pak. J. Pharm. Sci.*, 21 (2), 121-124.
- 58.** WANG J., CHEN B. and YAO S., 2008, Analysis of Six Synthetic Adulterants in Herbal Weight-Reducing Dietary Supplements by LC Electrospray Ionization-MS, *Food Additives and Contaminants*, 25 (7), 822-830.
- 59.** MANDRIOLI R., PUCCI V., VISINI D., VARANI G., RAGGI M.A., 2002, Rapid Methods for Determination of Fluoxetine in Pharmaceutical Formulations, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 29, 1127-1134.
- 60.** PRABHAKAR A. H., PATEL V.B., GIRIDHAR R., 1999, Spectrophotometric Determination of Fluoxetine Hydrochloride in Bulk and in Pharmaceutical Formulations, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 20, 427-432.
- 61.** STARCZEWSKA B., MIELECH K., 2000, Application of Chrome Azurol S For The Extractive Spectrophotometric Determination of Fluoxetine and Fluvoxamine, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 23, 243-247.

ÖZGEÇMİŞ

03.05.1981 yılında İstanbul'da doğdum. 1987 yılında başladığım ilköğrenimimi Hattat Rakım İlköğretim ve Muallim Naci İlköğretim okullarında tamamladıktan sonra öğrenim gördüğüm Eyüp Otakçılar Lisesi'nden 1998 yılında mezun oldum. 2000 yılında Öğrenci Seçme ve Yerleştirme Merkezi tarafından düzenlenen üniversite giriş sınavı sonucunda İ.Ü. Mühendislik Fakültesi Kimya Bölümü'ne girmeye hak kazandım ve 1 yıllık isteğe bağlı ingilizce hazırlık öğrenimi sonrasında 4 yıllık üniversite öğrenimimi tamamlayıp 2005 yılında Kimya Bölümü'nden mezun oldum. 2004 yılı yaz döneminde stajımı Santa Farma İlaç Sanayi A.Ş.'de tamamladım. 19.10.2005 tarihinde İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Programı'nda yüksek lisans öğrenimime başladım.