

**T.C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HAŞHAŞ TOHUMLARININ GIDA OLARAK TÜKETİLMESİNDEN  
SONRA İDRARDA MORFİN SAPTANMASI**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Kimyager  
Emine ÖZBUNAR**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Serap Annette AKGÜR**

**İZMİR  
2017**

**T.C.**  
**EGE ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HAŞHAŞ TOHUMLARININ GIDA OLARAK TÜKETİLMESİNDEN**  
**SONRA İDRARDA MORFİN SAPTANMASI**

**Bağımlılık Toksikolojisi Anabilim Dalı**  
**Yüksek Lisans Tezi**

**Kimyager**  
**Emine ÖZBUNAR**


**DANIŞMAN**  
**Prof. Dr. Serap Annette AKGÜR**

**İZMİR**  
**2017**


DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

Başkan

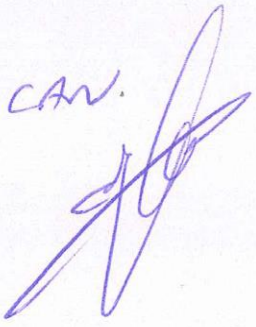
(Danışman)

Prof. Dr. Saygı A. Aksoy  


Üye

Prof. Dr. F. N. Ertas 

Üye

Doç. Dr. İ. Özgür Can. 

Yüksek Lisans Tezinin kabul edildiği tarih: .....4.4.2017.....

## ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasının planlanması, yürütülmesi ve sonuçlandırılması aşamalarında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyerek destek olan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Serap Annette Akgür'e,

Yüksek lisansımın ilk gününde bu yana yolumu aydınlatan ve her türlü yardımları ile bana sürekli destek olan Sayın Araş. Gör. Melike Aydoğdu ve Araş. Gör. Rukiye Döğer'e,

Uzun ve zahmetli deneysel çalışmalarım süresince bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen, her sorunumu çözen, yol göstericiliği ve tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı Sayın Halil İbrahim Bostancı'ya,

Bağımlılık Toksikolojisi Laboratuvarı'nda çalışmaktan keyif aldığım, enerjileri hiç bitmeyen, destek ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Özlem Akın, Nevin Emircan Köprübaşı, Meryem Koruyucu, Berika Şentürk'e,

Aynı zamanda yüksek lisansım boyunca manevi destekleriyle her zaman yanımda bulunan tüm yakın arkadaşlarıma,

Çalışmada gönüllü olmayı kabul eden yardımsever gönüllülerime (gizlilik koşulundan dolayı isimlerinizi yazamıyorum),

Sevgi ve inançlarıyla her zaman yanımda olan, içimin gülen yüzleri, annem-babama (Hafize-Hüseyin Özbunar); ve diğer yarılarım, canım abim-ablama (Mehmet Ali- Fatma Özbunar)... Sizin her türlü desteğiniz olmadan olmazdı biliyorum...

Sonsuz Teşekkürler...

**İzmir/ Şubat 2017**

**Emine  
ÖZBUNAR**



*Aileme...*

## ÖZET

### HAŞHAŞ TOHUMLARININ GIDA OLARAK TÜKETİLMESİNDEN SONRA İDRARDA MORFİN SAPTANMASI

Bu çalışmanın amacı; haşhaş tohumu ezmesinin gıda olarak alınımından sonra ülkemiz kanunları kapsamında yasadışı maddelerden biri olarak kabul edilen morfinin idrarda bulunma oranının değerlendirilmesidir.

Çalışmada seçilen on gönüllü (8 Kadın, 2 Erkek) belirlenen üç ayrı tarihte; önce beyaz, sonra sarı ve en son siyah haşhaş tohumlarından yapılan ezmeleri en az 100g olacak şekilde kahvaltıda tüketmişlerdir. Her bir gönüllüden kahvaltı öncesi ve sonrasında (0., 2., 4., 6., 8., 12., 24. ve 48. saatlerde) alınan toplam 227 idrar örneklerinde yasadışı madde analizi yapıldı.

İdrar örneklerinin taraması enzimatik immunoassay yöntemi (CEDIA- Olympus AU400) ile semi-kantitatif olarak yapıldı. Haşhaş tüketimi sonucunda toplanan idrar örneklerinde kreatinin normalizasyonu yapıldıktan sonra; morfin ve türevleri için eşik değer (cut off) üzerinde elde edilen veriler sırasıyla, beyaz haşhaş tohumu ezmesi alımında %63.4 (n=45/71), sarı haşhaş tohumu ezmesi alımında %73.4 (n=58/79), siyah haşhaş tohumu ezmesi alımında %68.8 (n=53/77) bulunmuştur. Pozitif olarak saptanan idrar örneklerinin doğrulama çalışması Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (Agilent Technologies 5977 A MSD) ile yapıldı. Bu aşamada içinde; morfin için 25-2000 µg/L arasında doğrusal bir yanıt elde edildi. Kalibrasyon eğrisinin korelasyon katsayısı ( $R^2$ ) 0.9804'tür. Morfinin belirtme alt limiti (LOD) 3 µg/L, tayin alt limiti (LOQ) 10 µg/L dir. 50 µg/L, 100 µg/L, 250 µg/L ve 500 µg/L (n=3) derişimlerde yapılan ortalama geri kazanım değerleri %97.73-110.75 arasında elde edildi.

Haşhaşın gıda olarak alınması sonucunda toplanan idrar örneklerinin GC/MS ile analizinde morfin için LOQ değerinin üzerinde elde edilen veriler sırasıyla; beyaz haşhaş tohumu ezmesi alımında %73.2 (n=52/71); sarı haşhaş tohumu ezmesi alımında %74.7 (n=59/79); siyah haşhaş tohumu ezmesi alımında %79.2 (n=61/77) olarak elde edilmiştir.

Çalışmamızda, haşhaş tohumlarını gıda olarak tüketen kişilerin idrar örneklerinde morfin saptanmıştır. Bağımlılık potansiyeli ve keyif verici özelliği nedeniyle suistimali önemli bir problem olan morfin kullanımının, haşhaş

tohumlarını gıda olarak tüketiminden sonra ayırt edilebilmesi için haşhaş tohumlarının doğal bileşini olan “**tebain**” analizi yapılmıştır. Bir belirteç olarak seçilen tebain analizi için katı faz ekstraksiyon yöntemi uygulandı ve GC/MS ile Wiley kütüphane taraması yapılarak gönüllülerin 0. saatleri hariç diğer saatlerde alınan idrar örneklerinde tebain saptandı.

Sonuç olarak, haşhaş tohumu ezmesini gıda olarak tüketen kişilerin idrar immunoassay ve GCMS analizleri sonuçlarının önemli kısmının eşik değerin üzerinde morfin bulunmuştur. Adli toksikolojik analizlerde haşhaş tohumlarının gıda olarak alımını gösteren tebain gibi bir belirtecin analiz edilmesinin önemi gösterilmiştir. Ülkemizde haşhaş tohumu ile yapılan gıdaların tüketiminin yaygınlığı nedeniyle bu çalışmada ele edilen adli toksikolojik verilerin ilgili düzenlemelerde değerlendirilmesi önemlidir.

**Anahtar kelimeler:** Haşhaş tohumu; morfin; tebain; immunoassay; GC/MS

## ABSTRACT

### THE DETERMINATION OF MORPHINE IN URINE AFTER POPPY SEEDS CONSUMING AS A FOOD

The aim of this study is the evaluation rate of presence of morphine, which is generally accepted as an illegal substance under the laws in our country, in urine samples after poppy seed paste consumption as a food.

In this research, ten selected volunteers has consumed first white, later yellow and lastly black opium poppy seed pastes at breakfast on three different dates, at rate of 100 grams. The illegal substance analysis was made from total 227 urine samples obtained from each volunteer before and after breakfast (0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 and 48 hours).

Screening of urine samples was made by enzymatic immunoassay (CEDIA-Olympus AU400) semi-quantitatively. After creatinine normalization in the urine samples; the results for morphine and its derivatives were found above the cut off (300 ng/ml) value; for white opium poppy seed paste % 63.4 (n=45/71), for yellow opium poppy seed paste % 73.4 (n=58/79), for black opium poppy seed paste % 68.8 (n=53/77), respectively. The confirmation of positive urine samples was made by Gas Chromatography-Mass Spectrometry (Agilent Technologies 5977A MSD). A linear response between 25-2000 µg/L was obtained for morphine. The coefficient of correlation of calibration curve ( $R^2$ ) was 0.9804. The limit of detection of morphine (LOD) 3 µg/L, limit of quantification (LOQ) 10 µg/L. Made in 50 µg/L, 100 µg/L, 250 µg/L ve 500 µg/L (n=3) concentrations, and average recovery value was found between %97.73-110.75.

In GC/MS analysis of collected urine samples, morphine's above value of LQQ were respectively as obtained; white opium poppy seed paste %73.2 (n=52/71), yellow opium poppy seed paste %74.7 (n=59/79), black opium poppy seed paste %79.2 (n=61/77).

In this study, after consuming opium poppy seed paste morphine was detected in urine samples. In order to evaluate consumption of opium poppy seeds for distinguish opioid abuse, thebaine -the natural composition of poppy seeds- has been analysed. For thebaine analysis, chosen as an indicator for seeds, a solid phase extraction method has been applied and by doing Wiley library scanning thebaine



has been detected after consumption of opium seed paste in all urine samples of volunteers.

As a conclusion; morphine and derivatives were detected in urine samples after consumption of poppy seed paste as food with an immunoassay results, mostly above cut-off value. The importance of analysing an indicator for poppy seeds such as thebaine has been shown. Because of the common use of poppy seeds food in our country, these obtained forensic toxicological results, should be taken into consideration in the relevant legislations.

**Keywords:** Poppy seed, morphine, thebaine, immunoassay, GC/MS.



## İÇİNDEKİLER

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
ÖNSÖZ.....	IV
ÖZET.....	VI
ABSTRACT.....	VIII
İÇİNDEKİLER .....	X
TABLolar DİZİNİ .....	XIV
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	XV
RESİMLER DİZİNİ .....	XVII
GRAFİKLER DİZİNİ .....	XVIII
Kısaltmalar Listesi .....	XIX
1 GİRİŞ .....	1
2 GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Haşhaş .....	3
2.1.1 Haşhaş Bitkisinin Tarihçesi.....	3
2.1.2 Haşhaş Ekimi.....	5
2.1.2.1 Dünya .....	5
2.1.2.2 Türkiye.....	6
2.1.3 Haşhaş Bitkisinin Genel Özellikleri.....	7
2.1.4 Haşhaş Bitkisinin Bölümleri .....	11
2.1.4.1 Haşhaş Kapsülü .....	11
2.1.4.1.1 Morfin.....	13
2.1.4.1.2 Kodein.....	14
2.1.4.1.3 Tebain .....	15
2.1.4.1.4 Papaverin .....	16
2.1.4.1.5 Noskapin.....	17
2.1.4.2 Haşhaş Yaprağı.....	17

2.1.4.3	Haşhaş Tohumu .....	18
2.1.5	Haşhaş Tohumu Ezmesi Yapımı.....	19
2.2	Morfinin Farmakokinetiği .....	19
2.2.1	Morfinin Absorpsiyon.....	21
2.2.2	Morfinin Dağılımı .....	21
2.2.3	Morfinin Metabolizması ve Eliminasyonu.....	21
2.2.4	Morfinin Etkisi ve Toksikolojisi .....	24
2.3	Yasadışı Maddelerin Tayininde Kullanılan Biyolojik Örnekler .....	24
2.4	Toksikolojik Analiz Yöntemleri.....	26
2.4.1	Tarama .....	27
2.4.1.1	İmmunoassay.....	27
2.4.2	Doğrulama .....	30
2.4.2.1	Ekstraksiyon.....	30
2.4.2.1.1	Sıvı-sıvı ekstraksiyon (LLE).....	30
2.4.2.1.2	Katı-faz ekstraksiyon (SPE) .....	31
2.4.2.2	Kromatografik Yöntemler .....	33
2.4.2.2.1	Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometrisi (GC/MS) .....	33
2.5	Validasyon (Geçerlilik) .....	37
3	GEREÇ ve YÖNTEM.....	38
3.1	Kullanılan Gereçler.....	38
3.1.1	Kimyasal Malzemeler .....	38
3.1.2	Cihazlar .....	39
3.1.3	Kartuşlar ve Kitler .....	39
3.1.4	Cam Malzemeler .....	39
3.1.5	Çözeltiler .....	39
3.2	Cihaz Çalışma Prensipleri.....	40
3.2.1	İmmunoassay Çalışması .....	40

3.2.2	GC/MS Çalışması.....	42
3.3	Gönüllülerle Çalışma .....	43
3.3.1	Gönüllülerin Seçimi .....	43
3.3.1.1	Kabul Kriterleri .....	43
3.3.1.2	Dışlama Kriterleri.....	43
3.3.2	Gönüllülerin Haşhaş Tohumu Ezmelerini Tüketmesi.....	44
3.3.3	Gönüllülerin İdrar Vermeleri .....	44
3.4	Deneysel Kısım .....	45
3.4.1	Morfin Analizi İçin Yöntem Validasyonu.....	45
3.4.2	Haşhaş Tohumu Ezmesi Ekstraksiyon Yöntemi .....	45
3.4.3	İdrarda Morfin Analizi Ekstraksiyon Yöntemi .....	47
3.4.4	İdrarda Tebain Analizi Ekstraksiyon Yöntemi.....	48
4	BULGULAR.....	49
4.1	İmmunoassay Verileri.....	49
4.2	GC/MS Verileri .....	53
4.2.1	Validasyon Bulguları .....	53
4.2.1.1	Doğrusallık (Linearite).....	53
4.2.1.2	Belirtme Alt Limiti (Limit of Detection, LOD) .....	55
4.2.1.3	Tayin Alt Limiti (Limit of Quantitation, LOQ).....	55
4.2.1.4	Duyarlılık.....	56
4.2.1.5	Geri Kazanım .....	56
4.2.1.6	Seçimlilik.....	57
4.2.2	Haşhaş Tohumu Ezmesi Verileri .....	60
4.2.3	GC/MS ile Gönüllü İdrarlarındaki Morfin Analiz Verileri.....	62
4.2.4	GC/MS ile Gönüllü İdrarlarındaki Tebain Analiz Verileri.....	65
5	TARTIŞMA .....	66
6	SONUÇ ve ÖNERİLER.....	71

<b>7 KAYNAKLAR .....</b>	<b>72</b>
<b>EKLER.....</b>	<b>80</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>85</b>



## TABLULAR DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b> Dünya ana üretici ülkeler bazında yasal haşhaş ekim alanları (Hektar) .....	5
<b>Tablo 2.</b> Afyonda bulunan alkaloidlerin bazıları, kapalı formülleri, keşfeden bilim adamı ve keşfedilme senesi.....	12
<b>Tablo 3.</b> İmmunoassay cihazındaki bakılan parametrelerin cut off, amax ve cihaz kontrol değerleri .....	41
<b>Tablo 4.</b> GC/MS çalışma koşulları .....	42
<b>Tablo 5.</b> GC/MS ile analiz edilen analitler için baz alınan m/z oranları ve alıkönma zamanları .....	43
<b>Tablo 6.</b> Beyaz haşhaş tohumu ezmesi tüketen gönüllülerin idrarlarının immunoassayde bakılan parametrelerinin sonuçları .....	50
<b>Tablo 7.</b> Sarı haşhaş tohumu ezmesi tüketen gönüllülerin idrarlarının immunoassayde bakılan parametrelerinin sonuçları .....	51
<b>Tablo 8.</b> Siyah haşhaş tohumu ezmesi tüketen gönüllülerin idrarlarının immunoassayde bakılan parametrelerinin sonuçları .....	52
<b>Tablo 9.</b> Kalibrasyon eğrisi için gerekli değerler .....	54
<b>Tablo 10.</b> İdrarda morfin'e ait LOQ, LOD değerleri.....	56
<b>Tablo 11.</b> İdrar havuzuna ekim yapılmış morfine ait farklı derişimlerde yapılan geri kazanım verileri.....	57
<b>Tablo 12.</b> Beyaz haşhaş tohumu ezmesi tüketen gönüllülerin idrarındaki GC/MS ile saptanan morfin verileri .....	64
<b>Tablo 13.</b> Sarı haşhaş tohumu ezmesi tüketen kişileri idrarındaki GC/MS ile saptanan morfin verileri .....	64
<b>Tablo 14.</b> Siyah haşhaş tohumu ezmesi tüketen kişileri idrarındaki GC/MS ile saptanan morfin verileri .....	65
<b>Tablo 15.</b> İmmunoasseyin performans özellikleri .....	68

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Morfinin yapısı .....	13
Şekil 2. Kodeinin yapısı.....	14
Şekil 3. Tebainin yapısı .....	15
Şekil 4. Papaverinin yapısı.....	16
Şekil 5. Noskapinin yapısı .....	17
Şekil 6. Haşhaş tohumu ezmesi yapımı .....	19
Şekil 7. Maddelerin organizmaya giriş yolları, dağılımı ve atılımları (40) .....	20
Şekil 8. Morfinin metabolizması .....	22
Şekil 9. Haşhaş tohumu metabolizması .....	23
Şekil 10. Toksikolojik analiz basamakları .....	27
Şekil 11. Enzim fragmanlarının genetik üretimi.....	28
Şekil 12. EA ve ED-Analit konjugatın aktif enzim oluşturması.....	28
Şekil 13. Anti- Analit Antikor Ed- Analit konjugata bağlanması ve aktif enzim oluşmasını bloke etmesi .....	29
Şekil 14. SPE kolonunun yapısı.....	32
Şekil 15. Çeşitli ticari SPE kolon ve diskleri ile vakum manifoldu. ....	32
Şekil 16. Gaz kromatograf cihazının şematik gösterimi verilmiştir. ....	34
Şekil 17. Kütle spektrometrisinin bileşenleri.....	35
Şekil 18. Haşhaş tohumu ezmesi için kullanılan katı-faz ekstraksiyon yönteminin şematik gösterimi. ....	46
Şekil 19. İdrarda morfin analizi yöntem basamakları.....	48
Şekil 20. İdrarda tebain analizi için çalışmada kullanılan katı-faz ekstraksiyon yönteminin şematik gösterimi. ....	49
Şekil 21. İdrar havuzuna (kör) ait kromatogram.....	58
Şekil 22. İdrar havuzuna (kör) 100µg/L olacak şekilde morfin d <sub>3</sub> iç standardı eklenmesine ait kromatogram ve spektrum.....	58
Şekil 23. İdrar havuzuna 100 µg/L olacak şekilde morfin standardı ve morfin-d <sub>3</sub> iç standardı eklenmesine ait kromatogram ve spektrum.. ....	59
Şekil 24. Siyah haşhaş tohumu ezmesine ait kromatogram.....	60
Şekil 25. Haşhaş tohumu ezmesi içindeki tebainin kromatogramı ve spektrumu .....	61
Şekil 26. Haşhaş tohumu ezmesinin scan moda saptanan tebain pikinin elde edilmiş verimi .....	62

**Şekil 27.** Haşhaş tohumu ezmesi tüketen kişi idrarında morfin kromatogramı..... 63  
**Şekil 28.** Haşhaş tohumu ezmesi tüketmiş kişinin idrarında GC/MS ile saptanan  
tebain, kodein ve neopin piklerinin kromatogramı ..... 66





## RESİMLER DİZİNİ

<b>Resim 1.</b> Türkiye’de haşhaş ekimine izin verilen iller .....	7
<b>Resim 2.</b> Haşhaş bitkisinin değişik ülkelere ait çeşitleri .....	9
<b>Resim 3.</b> Değişik türlerdeki haşhaş kapsülleri.....	10
<b>Resim 4.</b> Yaşken çizilen kapsülden akan lateks ve toplanma şekli .....	11
<b>Resim 5.</b> Haşhaş kapsülü ve tohumu .....	18
<b>Resim 6.</b> Farklı renkli haşhaş tohumları .....	18
<b>Resim 7.</b> Çalışmada kullanılan immunoassay cihazı.....	41
<b>Resim 8.</b> Çalışmada kullanılan Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi.....	42
<b>Resim 9.</b> Haşhaş tohumu ezmesi yenildiği çalışmadan görüntüler. ....	44
<b>Resim 10.</b> Çalışmada kullanılan gönüllülerin idrarları.....	45
<b>Resim 11.</b> Haşhaş tohumu ezmesi ile metanol karışımı .....	46

## GRAFİKLER DİZİNİ

**Grafik 1.** Dünya yasal haşhaş ekim alanları..... 6

**Grafik 2.** Morfine ait kalibrasyon grafiği..... 55



## Kısaltmalar Listesi

Drog	:Biyolojik menşeyli ilaç ham maddelerine verilen ad.
6-MAM	:6-monoasetilmorfin
6-AC	:6-asetil kodein
ATM4G	:Asetilenmiş-tebainin-4-metabolit-glukronidi
Subsp.	:Alt tür (Subspecies)
Var.	:Varyete (Varietas)
TMO	:Toprak Mahsulleri Ofisi
SAMHSA	:Madde Bağımlılığı ve Akıl Sağlığı Hizmetleri İdaresi
TEK	:Uyuşturucu Maddeler Tek Sözleşmesi
UMİ	:Uyuşturucu Maddeler İnhisarı
GC	:Gaz Kromatografisi
GC-MS	:Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
HPLC	:Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
LC-MS/MS	:Sıvı Kromatografisi-Ardışık Kütle Spektrometresi
TOF	:Uçuş zamanlı kütle analizörü
RIA	:Radyo immunoassay
CEDIA	:Klonlanmış enzim verici immunoassay
EMIT	:Enzimler çarpılı immunoassay
SPE	:Katı faz ekstraksiyonu (Solid Phase Extraction)
LLE	:Sıvı sıvı ekstraksiyon (Liquid-liquid extraction)
ED	:Enzim Donör
EA	:Enzim Alıcı
SIM	:Seçili İyon İzleme
SCAN	:Toplam İyon İzleme
NIST	:Uluslar arası Enstitü standartları ve teknoloji (National Institute of Standards and Technology)
Rt	:Alıkonma Zamanı (Retention Time)
BSTFA	: N,O bis(trimetilsilil) trifluoroasetamid
TMCS	:Trimetilklorosilan
MeOH	:Metanol
KOH	:Potasyum Hidroksit
LOD .	:Belirtme alt limiti (Limit Of Detection)
LOQ	:Tayin alt limiti (Limit Of Quantitation)
RSD	:Bağıl Standart Sapma (Relative Standard Deviation)
SD.	:Standart Sapma (Standard Deviation)
G.K.	:Geri kazanım
G.N.	:Gönüllü Numarası
R <sup>2</sup>	:Korelasyon katsayısı

Ppb	:Milyarda bir parça (Parts Per Billion )
Ppm	:Milyonda bir parça (Parts Per Million)
Std	:Standart
İçstd	:İç standart
S/N	:Sinyal/Gürültü
Std <sub>c</sub>	:Standartın derişimi
G1	:1 Numaralı gönüllü
G2	:2 Numaralı gönüllü
G3	:3 Numaralı gönüllü
G4	:4 Numaralı gönüllü
G5	:5 Numaralı gönüllü
G6	:6 Numaralı gönüllü
G7	:7 Numaralı gönüllü
G8	:8 Numaralı gönüllü
G9	:9 Numaralı gönüllü
G10	:10 Numaralı gönüllü

## 1 GİRİŞ

Anadolu, tarih boyunca çeşitli uygarlıklara ev sahipliği yapmış bir konumda bulunmaktadır. Bu uygarlıklarda tarımsal faaliyetler, bölgenin iklim çeşitliliği nedeniyle çok çeşitli alanlarda yoğun bir şekilde yapılmıştır ve yapılmaktadır. Bu uygarlıkların en önemlileri, Asurlar, Hititler, Selçuklular ve Osmanlılar olmuştur. Günümüzde tarımın Türkiye ekonomisindeki oranı azalmış olmakla birlikte, yurtiçi gıda gereksiniminin karşılanması, sanayi sektörüne girdi temini, ihracat ve yarattığı istihdam olanakları açısından hala büyük öneme sahiptir (1).

Haşhaş (Papaver Somniferum Linnaeus), kültür bitkilerimizden rekabet gücü çok yüksek olan milli bir servet kaynağımızdır (2). Türkiye dünya yasal haşhaş ekim alanları içerisinde %46'lık pay ile ilk sırada yer almaktadır (3).

Haşhaş bitkisi iki önemli ürüne sahiptir. Birisi kapsülleri ve bunlardaki alkaloidleri diğeri ise tohumlarıdır. Türkiye hem morfin ve türevleri ihracatı yönünden, hem de tohum ihracatı ile dünya pazarlarının devamlı üyesidir.

Haşhaş tohumu bitkinin gıda amaçlı kullanılan kısımlarından biridir. Yılda yaklaşık 25.000 ton gıda amaçlı haşhaş tohumu üretilmektedir. Tohum renkleri beyaz, sarı, açık kahve, pembe, gri- mavi ve çiğ kahve olabilir. Türkiye'de en fazla yetiştirilen haşhaş tohumları sırasıyla beyaz, sarı ve gri-mavi (siyah) çeşitlerdir. Tohumları kavruarak çerez olarak yendiği gibi çörek, pide gibi hamur işlerinde ve tatlı yapımında kullanılır.

Yeşil kapsülün içinde süt boruları bulunmakta ve bu kanallar özel bir salgı (lateks) içermektedir. Çizilmesiyle bitkinin akan lateksinin havada kurutulmuş şekli droğu oluşturur. Bu droğa **Opium**, Türkçe "**Afyon**" adı verilmektedir (4). Günümüzde haşhaş bitkisinde tespit edilen 44 farklı alkaloid bulunmaktadır (5). Bunlardan en önemlileri morfin, kodein, tebain, narkotin ve papaverindir. Ham afyonda en fazla morfin bulunmaktadır. Morfin afyon bileşiminde %5-25 arasında bir değer almaktadır (6).

Narkotik maddeler grubunda yer alan morfin, daha çok uyuşturucu etkisi nedeniyle kullanılmaktadır. Keyif verici özellik taşımasından dolayı alışkanlık

yaparak devamlı kullanma ihtiyacı gösterir ve zamanla artan dozda alma gereğini hissettirir. Alınan miktar az ise morfinin uyarıcı bir etkisi vardır. Kişi yorgunluk, açlık, uykusuzluk hissetmez; enerjik ve canlı hisseder. Daha sonra ise sersemlik, uyku hali, gözbebeklerinin küçülmesi, fiziki faaliyetlerin azalması, bulantı, kan basıncının azalması, yüz renginin solması, kusma, kaşıntı ve solunum durgunluğu gibi etkileri vardır (7).

Bağımlılık yapıcı madde tayinlerinde farklı örnek tipleri kullanılabilir. Örnek seçiminde maddenin atılımı yol, biriktiği doku ve yarılanma ömrü gibi kriterler göz önünde bulundurulmalıdır. Tayinlerde idrar, kan (serum), mide içeriği, göz sıvısı, ter, tükürük/oral sıvı, saç en sık kullanılan örneklerdir. İdrar; vücuda alınan yabancı maddelerin metabolize olduktan sonra metaboliti en yüksek oranda saptandığı matristir. Numunenin kolay temin edilebilmesi ve analiz tekniklerinin bu yönde daha çok geliştirilmiş olması nedeniyle analizlerin idrar üzerinden yapılmasına sıklıkla rastlanmaktadır.

5237 sayılı Türk Ceza Kanunu 188. maddesinde uyuşturucu maddeler arasında morfin de yer almaktadır. Morfin kullanımı, suçtur ve cezayı yarı oranında arttırmaktadır (8). Afyon alkaloidleri elde edilen haşhaş bitkisinin, gıda olarak tohumlarının tüketilmesi ile biyolojik örneklere yapılan toksikolojik testler üzerinde etkisini gözden geçirmek için bu yüksek lisans çalışması planlanmıştır.

Çalışmada seçilen on gönüllü belirlenen üç ayrı tarihte; önce beyaz, sonra sarı ve en son siyah haşhaş tohumlarından yapılan ezmeleri en az 100g olacak şekilde kahvaltıda tüketmişlerdir. Her bir gönüllüden kahvaltı öncesi ve sonrasında (0., 2., 4., 6., 8., 12., 24. ve 48. saatlerde) alınan toplam 227 idrar örneklerinde yasadışı madde analizi yapılmıştır. Gönüllülerden alınan idrar örnekleri önce enzimatik immunoassay yöntemi (Olympus AU400) ile opiyat, numunede saflık, kreatinin, 6-monoasetilmorfin (6-MAM,eroin metaboliti) parametrelerine bakılmıştır. Pozitif idrar örneklerinin doğrulama çalışması sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi kullanılarak morfin, haşhaş tohumlarının gıda olarak alımını gösteren belirteç olan tebain için katı-faz ekstraksiyon yöntemi kullanılarak GC/MS cihazında analizleri yapılmıştır. Haşhaş tohumu ezmesinin gıda olarak alınımından sonra ülkemiz kanunları kapsamında yasadışı maddelerden biri olarak kabul edilen morfinin idrarda bulunma oranının değerlendirilmiştir.

## 2 GENEL BİLGİLER

### 2.1 Haşhaş

#### 2.1.1 Haşhaş Bitkisinin Tarihçesi

Haşhaş kültürünün ne zaman ve nerede başladığı yıllardır tartışma konusu olmuştur. Dünya'nın çeşitli bölgelerinde milattan önceki çağlardan bu zaman kadar haşhaş yetiştirilmektedir. Mezopotamya'da Sümer ve Asur uygarlıklarında MÖ 3 bin yıllarında haşhaş bitkisinin varlığı hakkında deliller görülmektedir. Sümerler döneminde ilk kez organize bir şekilde çiftçi toplulukları tarafından başlıca yetiştirilen bitkilerden birisinin haşhaş olduğu belirtilmektedir. Sümerler haşhaş "Neşe bitkisi" olarak adlandırmışlardır ve onun tohumlarını yiyecek olarak kullanmışlardır (9).

Asurlara ait bazı kabartmalarda haşhaş resimlerine rastlanıldığı belirtilmektedir. Bu devre ait bir Asuri kabartmasında kral elinde "lotus ve haşhaş demetleri" tutmaktadır. Böylece bu kabartma, bu bitkinin daha o zamanlar tanındığını gösterir (10,11).

Anadolu'da kurulan Hitit uygarlığının, MÖ 2 bin yıllarında, başşehri Hattuşaş (Boğazköy)'de bulunan tabletlerde bitkisel ilaç tanımlarına (drog) rastlanmıştır. Bu tabletlerde haşhaş "Gış haşşikka" ismiyle geçer. Hittitçe'de bu kelime sızincaya, donuncaya kadar içmek, uyumak ve yatıştırmak fiiliyle bağlantılıdır. Hititler hastalıklara iyi gelmesi nedeniyle haşhaş kutsallaştırmış ve hasımlarına satışını cezalandırmak kaydıyla yasaklamışlardır (12). Ayrıca Hittitler bir şehre "haşşikkaşnauanta" ismini vermişler ve haşhaşlı ekmek yapmışlardır (13).

MÖ 12 yy da Hitit imparatorluğunun yıkılması ile Gaziantep civarında kurulan Kargamış beyliğinin (MÖ 1050-850 dönemi) ana tanrıça olan Kububa (bereket tanrısı)'nın elinde haşhaş kapsülü motifi bulunan taş kabartma Ankara Anadolu Medeniyetleri Müzesinde sergilenmektedir. MÖ 150-100 yıllarında Synnada (Şuhut-Afyon) şehrinin bağımsızlığını belirten para motifleri kullanılmıştır (12).

Dioscorides MS 20-79 yıllarında yaşamış, Kozan ilçesinin kuzeyinde bulunan Anazarba şehrinde doğmuş bir Grek hekimidir. Padanius takma adıyla tanınır. Osmanlı dönemi kitaplarında "Skoridos" olarak bilinir. Grekçe olarak yazdığı ilaçlar

bilgisi adlı kitabı Arapça'ya "Kitab-al Haşayiş" olarak çevrilmiştir. Bu eserde haşhaş resmi vardır (14).

MS 150-170 yıllarında Apameia (Dinar-Afyon)'da bulunan lahidin (Roma dönemine ait mermer mezar) süs motiflerinde haşhaş kapsülü kabartmaları vardır (15).

Anadolu'ya ve yakın doğuya keşif gezileri yapan Pierre Belon, Josep-Pitton de Tournefort gibi seyyahlar, seyahatnamelerinde Türklerde haşhaş ekimi, afyon elde edilişi, kullanışı ve ticareti hakkında ayrıntılı bilgiler vermektedirler. Fransız hekim Pierre Belon (1517-1564) Anadolu'yu gezmiş ve yazdığı kitapta afyon elde edilişi, cinsleri hakkında geniş bilgiler verilmiştir. O zamanlar ülkemizin Paflangonya (Bolu civarı), Kapodakya (Kayseri-Niğde civarı), Klikya (Antalya civarı) bölgelerinde geniş olarak haşhaş ekilmektedir (13).

Anadolu'dan afyonun her dönemde Doğu ve Batı ülkelerine satışı olmuştur. 1550 li yıllarda İstanbul Süleymaniye'de afyon tiryakileri için satış yapan bir çarşının da var olduğu bilinmektedir. Tiryakiler Çarşısı da denilen bu çarşıda "esnâf-ı ehl-i keyf" ve "afyoncuyân" adlarıyla anılan, haşhaş kapsülünden elde edilen afyonları çeşitli işlemlerden geçirdikten sonra macun haline getiren bir esnaf sınıfı mevcuttu (15).

Anadolu'da yetiştirilen afyon cinslerinin ilk analizleri Faik Paşa (Giorgio Dellasudda 1831-1913) tarafından yapılmıştır. Afyon çeşitlerini gösteren koleksiyon yine Faik Paşa tarafından hazırlanmış ve 1867 Paris uluslar arası sergide tanıtılmıştır (13).

İlk Afyon fabrikası 1613 yılında Hindistan'ın Surat şehrinde Fransız-Hint işbirliği ile kurulmuştur. Haşhaş bitkisi tarihsel olarak çok önceki zamanlarda günümüze Anadolu'da yetiştirilmekte olmasına rağmen fabrikasyon halinde işleme yoluna gidilmemiştir. Haşhaş bitkisi kapsülü uzun yıllar çizilmiş ve elde edilen afyon sakızının ihracatı yapılmıştır. Oysa İngiltere'de 1837 yılında, Almanya'da 1886 yılında (Knoli AG firması 7 Ağustos 1886 yılında Metilmorfin=Kodein ve Etilmorfin için patent almıştır), Fransa'da 1847 yılında, Amerika'da 1898 yılında afyon alkaloidleri üretimi çalışmaları başlamıştır (15).



Haşhaşla ilgili 1931 yılında afyon antlaşması Cenevre’de imzalanmıştır. Bunun gereği 2253 sayılı kanun ile Uyuşturucu Maddeler İnhisarı (UMİ) kurulmuştur. 1933 yılına kadar serbest olan afyon üretimi-alımı-satış işleri 1933-1938 arası UMİ tarafından yapılmıştır (16).

Çizilmemiş haşhaş kapsüllerinden afyon alkaloidleri üretilmesi için Toprak Mahsulleri Ofisine (TMO) bağlı olarak Afyon ili Bolvadin ilçesinde Afyon Alkaloidleri Fabrikası kurulmuştur. Bu fabrika 1981-1982 döneminde üretime başlamıştır. Bu fabrika yıllık 20.000 ton çizilmemiş haşhaş kapsülü işleme kapasitesiyle alanında dünyanın en büyük fabrikasıdır.

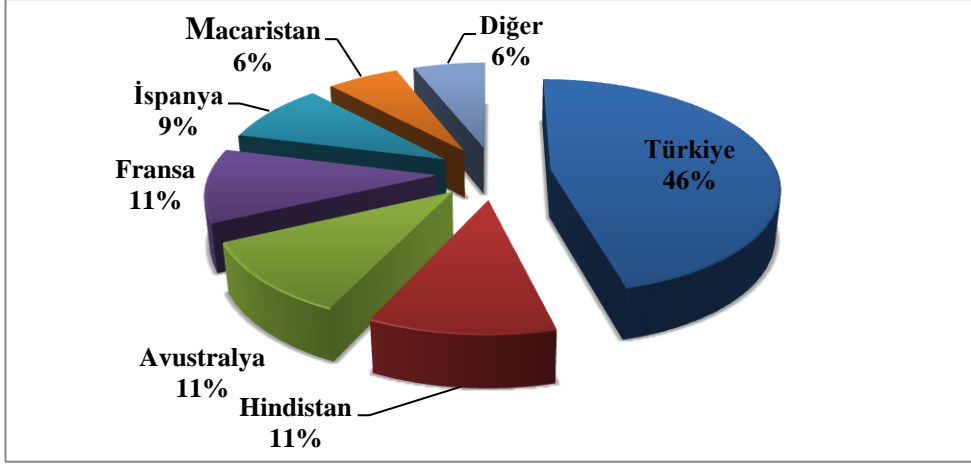
## 2.1.2 Haşhaş Ekimi

### 2.1.2.1 Dünya

Dünyada uyuşturucu maddelerin ekimi, üretimi, ithali ve ihracını ülkemizin de imza koyduğu Birleşmiş Milletler Uyuşturucu Maddelere Dair 1961 TEK Sözleşmesi (Single Convention on Narcotic Drugs) ve tadiline ilişkin 1972 Protokolü’ne göre düzenlenmektedir. Günümüzde haşhaşın yasal ekimine ülkeler çapında bakıldığında ana üretici olarak Türkiye, Hindistan, Avustralya, Fransa, İspanya, Macaristan’da yer almaktadır (**Tablo1**). Birleşmiş Milletler geleneksel haşhaş üreticisi olarak, Türkiye ve Hindistan kabul etmiştir (3).

**Tablo 1.** Dünya Ana Üretici Ülkeler Bazında Yasal Haşhaş Ekim Alanları (Hektar)  
(17)

Yıllar	Türkiye	Hindistan	Avustralya	Fransa	İspanya	Macaristan	Toplam
2010	51.897	12.237	9.127	9.400	6.439	7.308	96.408
2011	54.911	16.518	10.973	8.592	9.488	6.025	106.507
2012	13.511	12.092	8.352	8.680	8.762	3.929	55.326
2013	32.277	5.619	11.484	10.209	8.700	2.600	70.889
2014	26.621	5.329	7.210	9.060	8.521	5.560	62.301
2015	61.591	5.423	7.410	8.450	...	5.120	87.994



**Grafik 1.** Dünya yasal haşhaş ekim alanları

Tablo ve grafikten görüldüğü gibi son beş yıllık verilerin ortalamasına göre ülkemiz dünya yasal haşhaş ekim alanları içerisinde %46'lık bir paya sahiptir

#### 2.1.2.2 Türkiye

Ülkemizde haşhaş ekimi; 3298 Sayılı Uyuşturucu Maddelerle İlgili Kanun ve Yönetmelik çerçevesinde, lisansa tabi, kontrollü ve çizilmemiş haşhaş kapsülü üretimi şeklinde yapılmaktadır. Birleşmiş Milletler Teşkilatınca ülkemize verilen 70.000 hektar limit dâhilinde Bakanlar Kurulunca haşhaş ekimine müsaade edilen yerlerde (TMO) Genel Müdürlüğünce yapılan planlama çerçevesinde haşhaş ekimi ve çizilmemiş kapsül üretimi yaptırılmaktadır. Yıllara göre değişmekle birlikte 2015 yılı sonbaharından itibaren Türkiye'de **Resim1**'de görünen illerinde izin belgesi olarak haşhaş ekimi serbesttir. Söz konusu 70.000 hektar ekim limiti, ekiliş ve üretim potansiyelleri dikkate alınarak yerleşim birimlerine dağıtılmaktadır (3).



**Resim 1.** Türkiye’de haşhaş ekimine izin verilen iller

Ülkemizde yaygın şekilde gıda amaçlı tüketilen haşhaş tohumları serbest piyasada yasal olarak satılmaktadır. Üretilen haşhaş tohumlarından bir kısmı çiftçi ihtiyaçları için ayrılmakta gerisinin ise çiftçinin elinde kalmaması, değer fiyatının altında satılmaması amacıyla 1988 yılından itibaren TMO haşhaş tohumu alımıyla görevlendirilmiştir. Haşhaşın ithalatı, iç tüketimi karşılayacak şekilde yeterli düzeyde haşhaş tohumu üretimi bulunduğu için yapılmamaktadır.

### 2.1.3 Haşhaş Bitkisinin Genel Özellikleri

Tarımı yapılan ve çeşitli şekillerde faydalanma imkanı olan haşhaş bitkisinin bilimsel sınıflandırılması diğer bitkiler arasındaki yeri şu şekildedir:

Takım :Rhoedales

Familya :Papaveraceae

Cins :Papaver

Tür :Papaver somniferum L. (18)

Afyon İngilzcede Opium, Latince Succus papaveris olarak geçmektedir. Haşhaş bitkisi gelincik bitkisinin akrabası olduğundan gelincikgillerin Latince ismi Papaverdir. Somniferum ise uyku getiren, uyutucu, uyku verici, rüya gördürücü anlamındadır. Opium, grekçe opos=usare, afyon ise farsça afium=uyku

kelimelerinden gelmektedir (19). Yazılışındaki L harfi kısaltması keşfeden bilim adamının ismi “Linnaeus” ilk harfidir.

Papaveraceae familyası 28 cins ve tanımlanmış yaklaşık 250 tür bitkiyi kapsamaktadır. Bu familyaya bağlantılı bitkiler dünyada Kuzey Yarımkürenin ılıman ve savan bölgelerinde yayılış göstermektedir. Bu familyadan 5 cinsi Türkiye de bulunmaktadır (20). Bu cinslerden biri olan Papaver L. cinsinin dünya üzerinde 110 kadar türü olduğu bildirilmektedir (21,22). Türkiye’de ise Papaver L. cinsinin tanımlanmış 36 türü olduğu bildirilmektedir. Bu türlerin yarısı tek yıllık, yarısı iki veya çok yıllık otsu bitkilerdir. İki ve çok yıllık olan türlerin kök sistemi tek yıllık türlerin kök sistemine göre daha güçlüdür. Papaver L. cinsinin çiçekleri geniş yüzeyle olup gösterişlidir ve renkleri beyaz, eflatun, pembe veya kırmızı olabilmektedir (23).

Papaver somniferum bitkisinin Türkçe isimi haşhaştır. Geleneksel olarak binlerce yıldan beri yetiştirilen bu bitki, ülkemize uluslararası platformlarda geleneksel üretici olma özelliğini kazandırmıştır (24).

Bu bitkinin iki alt türü vardır:

1) Papaver Somniferum Subspecies (subsp.) Subspontaneum: Bu alt türe “açık haşhaş” adı verilmektedir. Kapsülleri olgunlaşınca üstten delikler açılır ve tohumlar buradan toprağa dökülür.

2) Papaver Somniferum Subsp. Anatolicum: Bu alt türe “kör haşhaş” adı verilir. Kapsüller olgunlaşınca bile kapalı kalır.

Anadolu’da. Papaver Somniferum Varyete (P. Somniferum var.) olarak ise 4’e ayrılır;

- a) P. Somniferum var. album (beyaz çiçekli)
- b) P. Somniferum var. nigrum (mor çiçekli)
- c) P. Somniferum var. setigerum (koyu-mor çiçekli)
- d) P. somniferum var. glabrum (kırmızı-mor çiçekli) (19).



**Resim 2.** Haşhaş bitkisinin değişik ülkelere ait çeşitleri

Türkiye’de tarımsal amaçlı ağırlıklı olarak *P. Somniferum* subsp *anatolicum* alt türünün beyaz ve mor çiçekli varyeteleri kullanılmaktadır (6). Ayrıca yüksek morfin içeriğinden dolayı yalnızca ikisi *P. somniferum* var. *album* ve *P. somniferum* var. *glabrum* tercih edilmektedir (19).

Haşhaş bitkisinin boyu iklim ve yetiştirme şartlarına bağlı olarak 30-170 cm arasında değişebilmektedir. Normal şartlarda yetiştirilen ana kapsülün yerden yüksekliği ortalama 1 m civarındadır (18,25).



**Resim 3.** Değişik türlerdeki haşhaş kapsülleri

## 2.1.4 Haşhaş Bitkisinin Bölümleri

### 2.1.4.1 Haşhaş Kapsülü

Haşhaş bitkisinin meyveleri olarak bilinirler. Haşhaş kapsülünün mezokarpında, boyuna süt boruları ve boruların içinde özel bir salgı (lateks) bulunmaktadır. Ülkemizde haşhaş kapsülünün yeşil iken çizilmesi yasaktır ve birtakım yaptırımları vardır. Tarlada gelişiminin tamamlayan kapsül kendi özel rengini alır ve tohumlar bölmelerden ayrılır. Tohumlar kapsüllerin içerisinden kırılarak alındıktan sonra küspesi Afyon Alkaloidleri Fabrikasında işlem görmek üzere toplanır.

Tam olgunlaşmadığı dönemde yani yeşil renkli iken kapsülün çizilmesiyle akıtılan lateksin havada kurutulmuş şekli droğu oluşturur. Bu droğa **Opium**, Türkçe “**Afyon**” adı verilmektedir. Ham afyon sarıdan kahverengine ve siyaha kadar değişen renkte; taze iken elastiki ve kuruyunca sertleşen bir kütlesi vardır (19). Genel olarak 700-800 g ağırlığında, somun şeklinde, haşhaş veya labada yaprağına sarılı topaklar halindedir. Özel bulandırıcı bir kokusu ve acı bir tadı vardır (26).



**Resim 4.** Yaşken çizilen kapsülden akan lateks ve toplanma şekli

Kapsüldeki afyon miktarı %0.2-0.8 arasında değişmekle beraber yapılan ıslah çalışmaları neticesinde bu oran %1'e ulaşmış durumadır. Alkaloidler bitkilerden elde edilen, genellikle kuvvetli fizyolojik ve farmakodinamik etkileşim gösteren, halka içinde bir veya birden fazla azot taşıyan, bazik karakterli maddelerdir. Afyonun

uyuşturucu etkisi içindeki alkaloidlerden ileri gelmektedir. Bunlara genel olarak afyon alkaloidleri denir. **Tablo 2**'de görüldüğü gibi afyonda önemli sayılan yaklaşık 23 tane alkaloid bulunmaktadır (27).

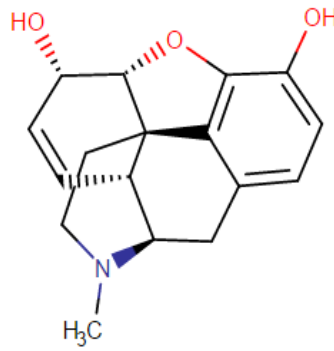
**Tablo 2.** Afyonda bulunan alkaloidlerin bazıları, kapalı formülleri, keşfeden kişinin ismi ve keşfin yapıldığı yıllar (27)

Adı	Formülü	Keşfeden kişinin ismi	Keşif yılı
Morfin	$C_{17}H_{19}O_3N$	Sertürner	1816
Narkotin	$C_{22}H_{23}O_7N$	Robiquet	1817
Kodein	$C_{18}H_{21}O_3N$	Robiquet	1832
Narsein	$C_{23}H_{27}O_8N$	Peletiner	1832
Tebain	$C_{19}H_{21}O_3N$	Merck	1835
Pseudomorfin	$C_{17}H_{18}O_3N$	Smiles	1835
Papaverin	$C_{20}H_{21}O_4N$	Hesse	1848
Kriptopin	$C_{21}H_{25}O_5N$	Hesse	1864
Roadin	$C_{21}H_{21}O_6N$	Hesse	1867
Lantopin	$C_{23}H_{25}O_4N$	Hesse	1870
Mekonidin	$C_{21}H_{23}O_4N$	Hesse	1870
Kodamin	$C_{20}H_{25}O_4N$	Hesse	1870
Lavdanin	$C_{20}H_{25}O_4N$	Hesse	1870
Lavdonasin	$C_{21}H_{27}O_4N$	Hesse	1871
Hidrokatarnin	$C_{12}H_{15}O_3N$	Hesse	1871
Oksinarkotin	$C_{22}H_{23}O_8N$	Becket ve Wright	1876
Protepin	$C_{20}H_{19}O_5N$	Hesse	1878
Ksantalın	$C_{20}H_{19}O_5N$	Smith	1893
Papaveramin	$C_{21}H_{25}O_6N$	Hesse	1903
Aporein	$C_{18}H_{16}O_2N$	Pavesi	1905
Neopin	$C_{18}H_{21}O_4N$	Smith	1911
Porfidroksin	$C_{19}H_{23}O_4N$	Rakshit	1919
Narkotolin	$C_{21}H_{21}O_7N$	Wrede	1937



Sertturner'in 1805 yılında afyon haşhaşından morfini izole etmesinden bu güne kadar 44 alkaloid izole edilmiştir (5). Ancak tıpta ve eczacılıkta daha çok kullanılan ve haşhaşta en fazla bulunan morfin, kodein, tebain, noskapin, papaverin alkaloidlerinin izolasyonu ve türevlendirilmesi konuları üzerinde araştırmalar yoğunlaştırılmıştır.

#### 2.1.4.1.1 Morfin



Şekil 1. Morfinin yapısı

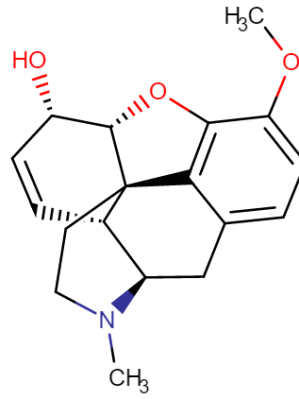
- \* IUPAC: 7,8 didehidro-4,5epoksi-17 metilmorfinan-3,6 diol
- \* Morfinin kapalı formülü C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>3</sub> dur.
- \* Molekül kütlesi: 285.34 dur.
- \* %71.56 C, %6.71 H, %4.91 N, % 16.82 O içermektedir.
- \* Yarı kararlı fazdadır.
- \* Bazik karakterdedir.
- \* Erime noktası 197°C dir.
- \* Yüksek erime yapısında olanlar 190-200°C aralığında süblimleşir.

Morfin kelimesi eski çağlardaki rüyalar tanrısı Morpheus'dan gelmiştir. Ham afyon içerisinde miktarı en fazla olan alkaloid morfindir. Derişim oranı %5-25'e kadar değişmektedir. Morfin molekülü, biri fenolik iki hidroksil grubu taşıyıp 5 halkadan oluşmaktadır. Bu halkalardan ikisi heterosiklidir; diğer üçü, bir fenantren halkası meydana getirmek üzere birleşmiştir (28,29). Saf morfin, beyaz billuri bir

tozdur, suda çözünmez ve asitlerle suda çözünen tozlar meydana getirir. Afyondan kimyasal yollarla ayrılarak elde edilen morfin, kapsül blok tablet veya sıvı şeklinde bulunabilir. Havada bozulmaktadır. Tadı acıdır.

Morfin asetik anhidritin asetilasyon prosesiyle diasetilmorfin olan Eroine asetillenmektedir (30).

#### 2.1.4.1.2 Kodein



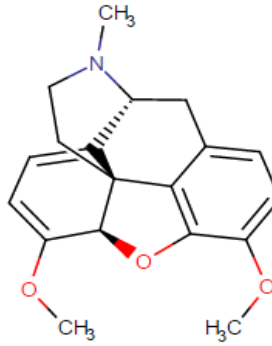
Şekil 2. Kodeinin yapısı

- \* IUPAC 7,8-didehidro-4,5-epoksi-6-dihidroksi-3-metoksi-N-metilmorfinan
- \* Morfinin kapalı formülü  $C_{18}H_{21}NO_3$  dur.
- \* Molekül kütlesi 299.4 tür.
- \* %72.2 C, %7.07 H, % 4.68 N, %16.03 O içermektedir.
- \* Bazik karakterdedir.
- \* Erime noktası 154-156°C dir ve ışıktan etkilenmektedir.
- \* Suda, eterde, kloroformda ve etanolde çözünmektedir .

Morfinin monometil eteri olup drogda %0.5-3 kadar bulunmaktadır. Ham afyonun bileşiminde doğal olarak düşük oranda bulunur. Yapı yönünden morfinin 3-metil eteri olarak değerlendirilebilir. Morfinin fenolik hidroksil grubundan metilenmiş (3-metilmorfin) şeklindedir (28,29).

Fosfat ya da sülfat tuzları şeklinde doğrudan kullanılabilen bir ilaçtır. Analjezik etkisi morfine göre daha azdır (15). Bu nedenle hafif ve orta şiddetli ağrılara karşı kullanılmaktadır. Düşük dozlarda analjezik etki göstermezken antitusif etki göstererek öksürüğü baskılar. Kodein, aspirin gibi ilaçlara katıldığında onların analjezik etkisini oldukça artırır. Kodeinin toksik etkisi ve bağımlılık yapma özelliği de morfine göre daha azdır (6,31).

#### 2.1.4.1.3 Tebain



Şekil 3. Tebainin yapısı

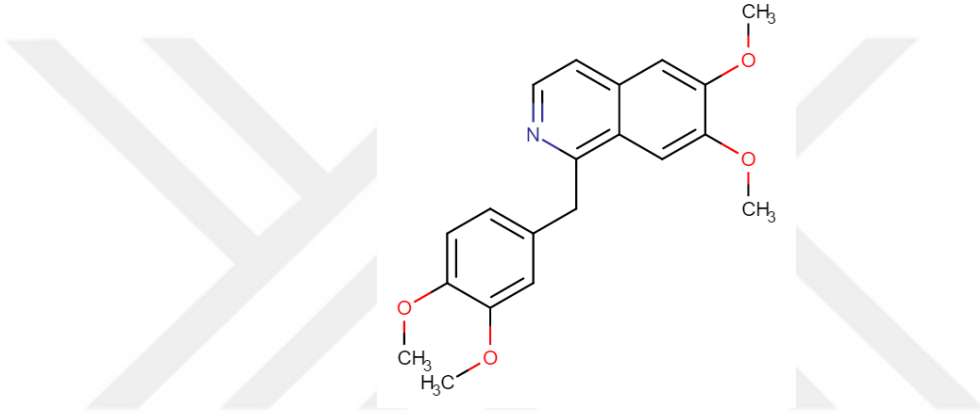
- \* IUPAC 3,6-dimetoksi-4,5-epoksi-6,8-dien-N-metilmorfin
- \* Morfinin kapalı formülü  $C_{19}H_{21}NO_3$  dur.
- \* Molekül kütlesi: 311.4 tür.
- \* %73.29 C, % 6.8 H, % 4.5 N, % 15.41 O içermektedir.
- \* Bazik karakterdedir.
- \* Erime noktası  $193^{\circ}C$  dir

Tebain eskiden afyon ihraç eden Mısır şehri Teb'den gelmektedir (32). Ham afyonun yapısında doğal olarak bulunmaktadır. Morfinin iki hidroksil grubunun metillenmiş şeklidir. Drogda %0.2-1 oranında bulunmaktadır (28,29).

Tebainin toksik etkisinden dolayı doğrudan tıbbi kullanımı yoktur (33,34). Ancak tebainden elde edilen yarısentetik opioidler narkotik analjezik, antitusif ve

sedatif özellikleri sayesinde çok fazla kullanım alanı bulmuş ve tebainin ticari değerini artırmıştır. Tebain türevi yarısentetik ilaçların en önemli özelliklerinden biri de uyuşturucu bağımlılığı tedavisinde kullanılmasıdır. Ticari olarak en çok üretilen tebain türevi oksikodondur (35). Tebain türevlerinin kullanım alanlarının artmasıyla tebaine olan ihtiyaç da artmıştır. Bu nedenle haşhaşa tebaine göre daha fazla bulunan kodein kullanılarak da tebain sentezi yapılmaktadır (36).

#### 2.1.4.1.4 Papaverin

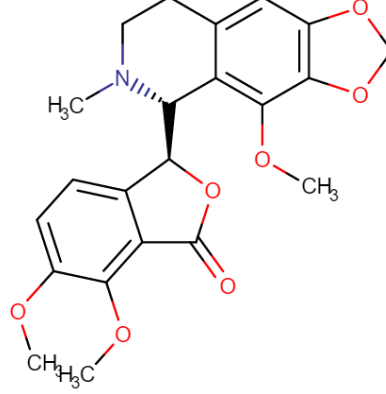


Şekil 4. Papaverinin yapısı

- \* IUPAC 6,7-dimetoksi-1-(3,4-dimetoksibenzil)-izokinolin
- \* Morfinin kapalı formülü  $C_{20}H_{21}NO_4$  dur.
- \* Molekül kütlesi: 339.4 tür.
- \* %70.78 C, %6.24 H, %4.13 N, %18.86 O içermektedir.
- \* Asidik karakterdedir.
- \* Erime noktası 146-148°C dir
- \* Etanol,piridin, eterde çözünürken suda çözünmemektedir .

Afyonda %0.5-1.3 oranında bulunan minör bir alkaloiddir. Papaverinin benzilizokinolin halkası vardır. 4 metoksil grubu taşımaktadır (37). Antispazmodik etkisinden dolayı tıpta kullanılmaktadır (28,29).

#### 2.1.4.1.5 Noskabin



Şekil 5. Noskabinin yapısı

\*(-)- $\alpha$ -(1,2,3,4-tetrahidro-8-metoksi-2-metil-6,7-metilendioksiizokinol-1-yl)-5,6-dimetoksiftalid

\* Morfinin kapalı formülü  $C_{22}H_{23}NO_7$  dur.

\* Molekül kütlesi: 413.4 tür.

\* %63.92 C, %5.61 H, %3.39 N, %27.09 O içermektedir.

\* Erime noktası 146-148°C dir

\* Eter ve etanolde çok az çözünürken kloroform ve alkolde çözünmektedir.

Önceleri morfin gibi narkotik sanıldığı için adına narkotin denilmiştir. Drogda morfenden sonra en fazla noskabin bulunmaktadır (%2-10). Seyreltik HCl ile tüketilerek NaOH ile çöktürülebilir. Narkotin, ftalil izokinolin halkası içerir ve ikisi birleşmiş olmak üzere 5 metoksil grubu taşır. Azot metillidir. Beyaz kristaller görünümündedir (28,29).

#### 2.1.4.2 Haşhaş Yaprağı

Haşhaş bitkisinin oval şekilli, sapsız, gri yeşil renkli yapraklarıdır. Yaprakların kenarı çift dişli olup dalgalıdır. Hemen hemen tüsüz olan bu yapraklar toplandıktan sonra gölgede kurutularak drog elde edilir. Yapraklar % 0.02 ile 0.4 toplam alkaloid ihtiva etmektedir. Bu yapraklardan haricen ağrı kesici olarak yararlanılmaktadır (26).

### 2.1.4.3 Haşaş Tohumu

Beyazdan siyaha kadar değişik renklerde ve 1 mm çapında küçük küremsi tohumlardır (38). Haşaş elde edildikten sonra tarlada kendi haline bırakılır, kapsüller sararır, sallandığı zaman tohum sesi geliyorsa artık tohumlar olgunlaşmıştır.



**Resim 5.** Haşaş kapsülü ve tohumu

Haşaş tohumları değişik renklerde; gri-mavi, sarı, beyaz, çiğ kahve ve pembe olabilmektedir.



**Resim 6.** Farklı renk haşaş tohumları

Türkiye’de en fazla yetiştirilen haşhaş tohumları sarı, gri-mavi ve beyaz sıralamasındadır.

Haşhaş tohumları renklerine göre çok amaçlı kullanılmaktadır. Sarı, kahverengi ve beyaz tohumlardan elde edilen yağ, yemeklerde kullanıldığı gibi çabuk kuruma özelliğinden dolayı boya sanayinde ve ayrıca sabun üretiminde de kullanılmaktadır. Gri-mavi renkli tohum ise özellikle Avrupa ve Amerika’ya 1988’den bu yana ihraç edilmektedir (37).

### 2.1.5 Haşhaş Tohumu Ezmesi Yapımı

Haşhaş tohumu ezmesi, haşhaş tanelerinin makine yardımıyla ya da eski usul haşhaş taşının üzerinde sürterek elde edilir. Ülkemizde geleneksel olarak tüketilen bir gıda ürünüdür.

Vitamin ve mineral madde içeriğinin yanında önemli oranda yağ içeriğine sahip olan haşhaş tohumu, lineloik asit, oleik asit ve omega yağ asitlerince zengin doymamış yağ aside bileşimi ile insan beslenmesinde önemli bir kaynak olarak değerlendirilmektedir (15,39). Haşhaş ezmesi yapım şeması **Şekil 6**’da verilmiştir.



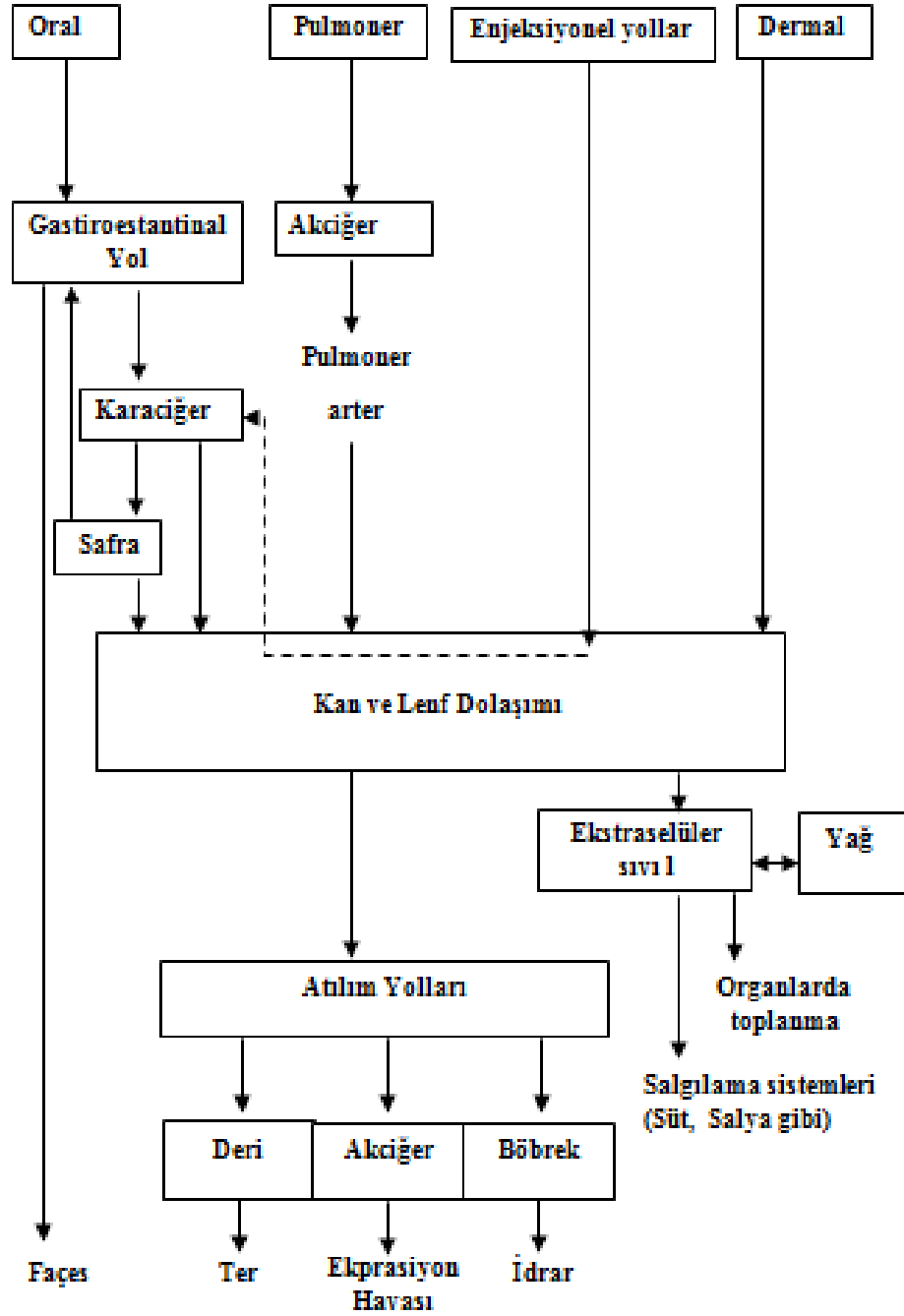
**Şekil 6.** Haşhaş tohumu ezmesi yapımı

Haşhaş tohumu ve ezmesi; çoğunlukla ekmek, simit, börek, kek gibi hamur işlerinde pasta ve lokum süslemelerinde, tatlıların iç harcında kullanılmaktadır. Ayrıca haşhaş ezmesi tıpkı çikolata gibi sabah kahvaltılarda da tüketilmektedir.

## 2.2 Morfinin Farmakokinetiği

Bir kimyasal maddenin etkisini göstermesi için, giriş yollarından absorbe olması ve etki yerine belirli konsantrasyonda ulaşması gerekir. Ancak maddenin etki

yerindeki konsantrasyonunu etkileyen faktörler, o maddenin organizmada uğradığı değişime modeline bağlıdır. Bu değişimler; giriş yolları ve absorpsiyon, dağılım, biyotransformasyon ve atılım olarak sınıflandırılabilir (40).



Şekil 7. Maddelerin organizmaya giriş yolları, dağılımı ve atımları (40)



### 2.2.1 Morfinin Absorpsiyon

Morfin genellikle 10-15 mg dozunda cilt altından enjeksiyon suretiyle uygulanır. Doku içinden çabuk ve tam olarak absorbe edilir. Bu yollardan uygulanmasından sonra analjezik etkisi ortalama 20 dakikada başlar, 45-90 dakikada maksimuma erişir ve 4-6 saat kadar devam eder. İntravenöz yollardan uygulandığında etkisi 1-2 dakikada başlar, 10-20 dakikada maksimuma ulaşır ve kısa sürer. Verilen morfin dozunun %90'ı 24 saat içinde elimine edilir. Burun mukozasına solüsyon olarak uygulandığında nispeten kolay bir şekilde absorbe edilir. Rektum (dışkıdan atılmadan önce tutulduğu yer) mukozasından da absorbe edilir. Ağız yoluyla alındığında mide barsak kanalından tam olarak absorbe edilir. Fakat bu yoldan alınan morfinin önemli bir kısmı karaciğerden ilk geçişte eliminasyona uğradığı için kan düzeyi ve etki gücü düşük olur (7).

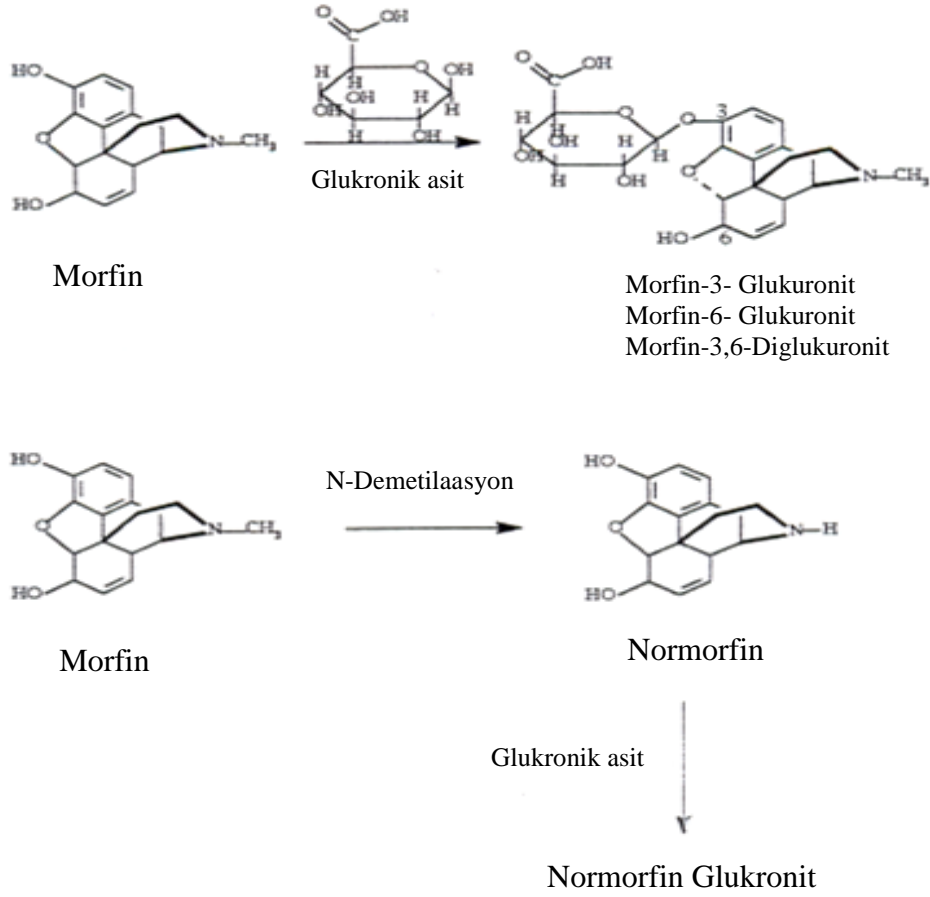
### 2.2.2 Morfinin Dağılımı

Plazma proteinlerine %35 oranında bağlanır. Parenkimatöz dokulara (karaciğer, akciğer, dalak, böbrek) hızla dağılır; bu nedenle kandaki konsantrasyonu çabuk düşer. Etkin kan konsantrasyonu 65 ng/ml, dağılım hacmi 230±60 L dir. Temel etki yeri santral sinir sistemi olmasına karşın, 3. ve 6. karbon atomlarında taşıdığı hidrofil gruplar (-OH) nedeniyle, kan-beyin engelini aşarak santral sinir sistemine ulaşabilen madde miktarı azdır. Plazma yarılanma ömrü yaklaşık 2 saattir (41).

### 2.2.3 Morfinin Metabolizması ve Eliminasyonu

Morfinin büyük kısmı, karaciğerde fenolik hidroksil grubu üzerinden glukuronik asitle birleşmek suretiyle inaktive edilmekte ve idrardaki morfinin çoğu bu konjugat şeklinde olmaktadır. Bütün vücuda yayılarak böbrekler, karaciğer, akciğer, dalak, beyin ve kaslarda birikir, süt ve terde eser miktarda rastlanır. Morfinin bu en önemli metabolik tepkimesi **Şekil 8**'de gösterilmektedir. Bu yolla morfin-3, morfin-6, morfin 3,6-glukuronitlere dönüşmektedir. Diğer bir tepkime N-demetilasyondur. Enjeksiyon yoluyla uygulama sonrası morfinin %90'ı 24 saatte idrarla atılmaktadır. %10 serbest morfin, %65-70 konjuge morfin, %1 normorfin, %3 normorfin glukuronit halinde vücuttan atılır. Ağızdan alındığında morfinin %60'ı 24 saatte idrarla atılmaktadır. Yaklaşık %3'u 48 saatte serbest morfin olarak atılır.

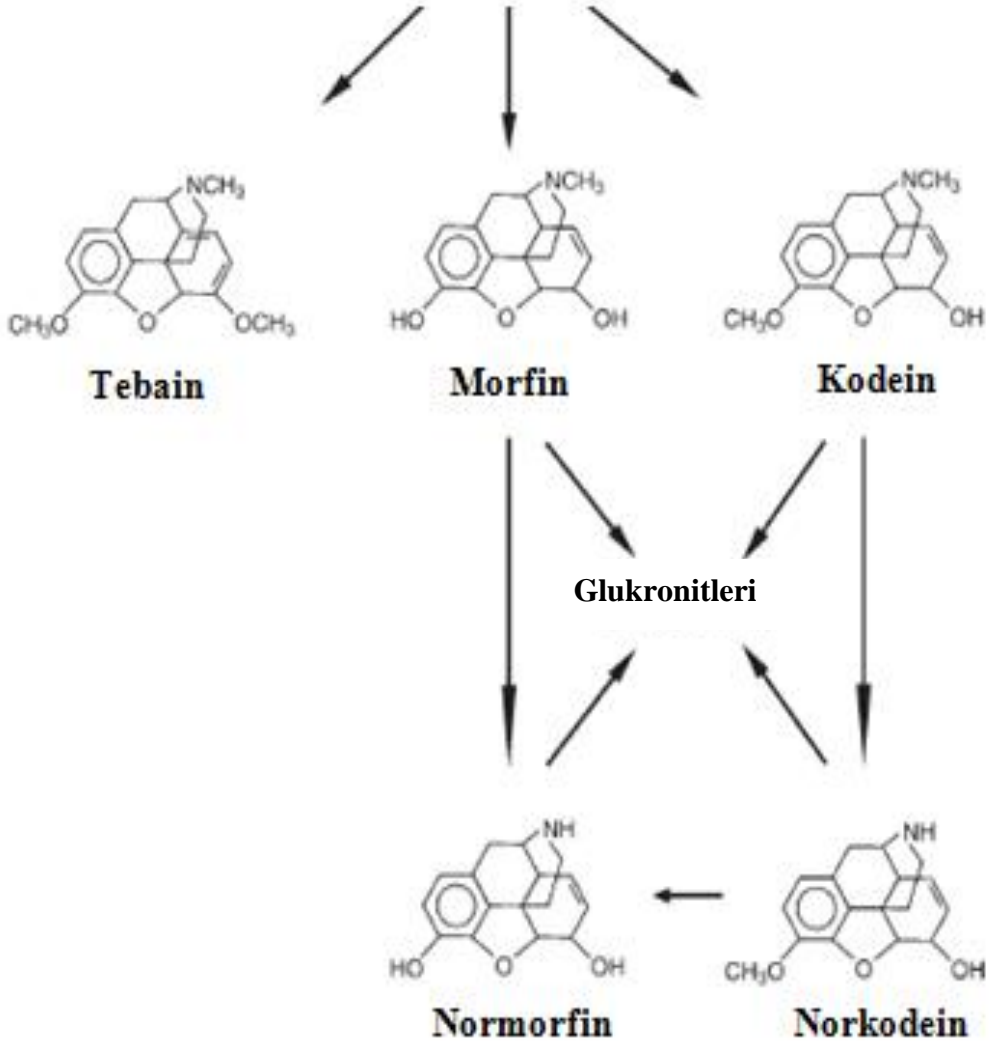
Morfinin idrarla atılımı idrarın pH sına da bağılıdır. İdrar asidik oldukça morfinin serbest halde atılımı, bazik oldukça morfinin glukuronitler halinde atılımı artmaktadır. Dozun yaklaşık %10'u safra ile atılır. Morfin, aynı zamanda kodein ve eroinin metabolitidir (42,43). Safra ile atılan miktar %7-10 oranında olup, enterohepatik dolaşıma (safra tuzları ve diğere maddelerin yinelenen döngüyle karaciğere den atılması, bunların daha sonra bağırsak mukozasından geçerek tekrar karaciğere hücreleri tarafından alınması ve tekrar bağırsağı atılması) girer (7).



Şekil 8. Morfinin metabolizması



### Haşhaş Tohumu



Şekil 9. Haşhaş tohumu metabolizması

#### 2.2.4 Morfinin Etkisi ve Toksikolojisi

Madde etkilerini, hücre membranında yerleşmiş özel reseptörlere bağlanarak oluşturur. Bu reseptörlerin tanımlanması ve alt tiplerinin saptanması son yıllarda yapılan araştırmalar ile gerçekleştirilmiştir. Opioidlerin bu güne kadar kendilerine özgü 4 tip reseptör kanıtlanmıştır. Bunlar: mü ( $\mu$ ), kappa ( $\kappa$ ), sigma ( $\sigma$ ) ve delta ( $\delta$ ) reseptörleridir. Morfin  $\mu$ ,  $\kappa$ , ve  $\delta$  reseptörlerine agonist etki göstermektedir. Mü reseptörüne afinitesi, diğer reseptörlere oranla daha fazladır. Sigma reseptörlere etkisi ise henüz tam olarak bilinmemektedir (41).

Morfinin farmakolojik etkileri; analjezi, öfori-disfori, sedasyon (uyku hali), solunum depresyonu, öksürük kesici etki, bulantı ve kusma, miyozis (göz bebeklerini küçülmesi) vb sayılabilir (7).

Tolerans ve bağımlılık: Morfinin terapötik dozlarının kısa aralıklarla tekrarlanarak verilmesi, oluşan etkilerin bazılarında azalmaya neden olur (tolerans). Morfinin bu şekilde kullanılması sonucunda, sürekli morfin alınmasını gerektiren, alınmadığında karakteristik belirtilere yol açar ve fiziksel bağımlılık adı verilen durum gelişir. Morfinin direkt toksik etkileri, farmakolojik etkilerinin uzantısıdır. Hiperaktivite, solunum depresyonu (solunumun yavaşlaması durumu), bulantı, kusma, kafa içi basıncının artması vb. bu etkilerin bazılarıdır. Doğuma yakın kullanılırsa, morfin plesantayı aşarak, kan beyin engeli gelişmemiş fetüsün beyinde yüksek konsantrasyona ulaşabilir ve doğumdan sonra bebekte solunum depresyonu gelişebilir (41).

#### 2.3 Yasadışı Maddelerin Tayininde Kullanılan Biyolojik Örnekler

Bağımlılık yapıcı madde ölçümlerinde farklı örnek tipleri kullanılabilir. Örnek seçiminde maddenin atılımı yol, biriktiği doku ve yarılanma ömrü gibi kriterler göz önünde bulundurulmalıdır. Ölçümlerinde kullanılan örnekler; kan (serum), idrar, mide içeriği, göz sıvısı, ter, tükürük/ oral sıvı, saç...vb. şekilde sıralanabilir (44). Bu çalışmada idrar materyali kullanılmıştır.

İdrar; ilaç kullanan kişinin kanının böbreklerden filtre edilmesi ve ilaçların idrarda yoğunlaşması nedeni ile idrar kullanışlı bir örnek olarak kabul edilmektedir (45). Üstünlüğü; ilaç ve kimyasal maddelerin idrardaki konsantrasyonun kana göre

daha yüksek olması ve proteinlere bağılı olmadan atılmasıdır. Madde kullanımının tespit edilmesinde kullanılması, hasta için konfor, analizler için ise hız sağlamaktadır (46). İdrar izolasyon prosedürü öncesi ilaç konjugatlarını (glukuronidlerini) daha kolay ölçülebilir bileşiklere dönüştürmek için hidroliz gerektirebilir.

İdrar, analiz için etkin bir örnek olmasına karşın örnek alımı sırasında örneğin güvenilirliği ile ilgili önemli sorunlar mevcuttur. En sık karşılaşılan, örnek veren kişinin, madde saptanmasını engellemek amacıyla, idrar örneğini madde kullanmayan bir kişinin idrarı ile değiştirilmesi ya da idrar örneğine madde karıştırılması gibi örneği değiştirici çeşitli yollar kullanılmaktadır. Bu sorunların önüne geçmenin en etkin yolu idrar toplanırken direk izlemektir. Diğer yollar ise örneğin toplandığı zaman diliminde idrarın sıcaklığı kontrol edilmesi, özgül ağırlığı pH' sı ve kreatinin düzeyi ölçülmelidir. Test için uygun bir idrar örneği 32.5°C-37.2°C sıcaklık, 1005-1030 yoğunluk, pH 4.0-10.0 ve kreatinin konsantrasyonu 20-400 mg/dL (1.8-35.4 mmol/L) olmalıdır (47). Bu aralıkların dışındaki değerler, test için kabul edilmemektedir, çünkü böyle bir idrar örneği SAMHSA (Madde Bağımlılığı ve Akıl Sağlığı Hizmetleri İdaresi) kriterlerine uymamaktadır (48).

Kreatinin, kas metabolizmasının idrarla atılan bir yan ürünüdür. Ölçümü böbrek fonksiyonlarını değerlendirmek için rutinde klinik olarak kullanılır. Ayrıca kreatinin tayini, bir idrar örneğinin kötüye kullanım bulgularının geçerliliğini değerlendirmek için önemli parametrelerdendir. Pozitif bir madde testinden kaçınmak için kullanılan en yaygın uygulamalardan biri, sistemini boşaltmak için nispeten kısa sürede fazla sıvının kasıtlı olarak tüketilmesidir. Buna genellikle su yüklemesi veya seyreltme adı verilir ve maddenin cut off konsantrasyonunun altında olmasına neden olabilir. Bu nedenle, bir kişi son zamanlarda madde kullanmış olsa da, kasıtlı seyreltme madde konsantrasyonunu düşürebilir, bu da yanlış negatif madde testi ile sonuçlanabilir.

İdrar konsantrasyonunu bu faktör olarak ortadan kaldırmak için, kreatinin normalleşmesi adı verilen bir hesaplama yapılır. Kreatinin değeri ne kadar yüksek olursa, idrar örneğinin yoğunlaştığı o kadar yoğun olur. Kreatinin değeri ne kadar düşük olursa, idrar örneğinin ne kadar seyreltik olur. Hesaplama, idrar konsantrasyonunun dalgalanmasını düzeltir ve numunedeki madde seviyesinin daha

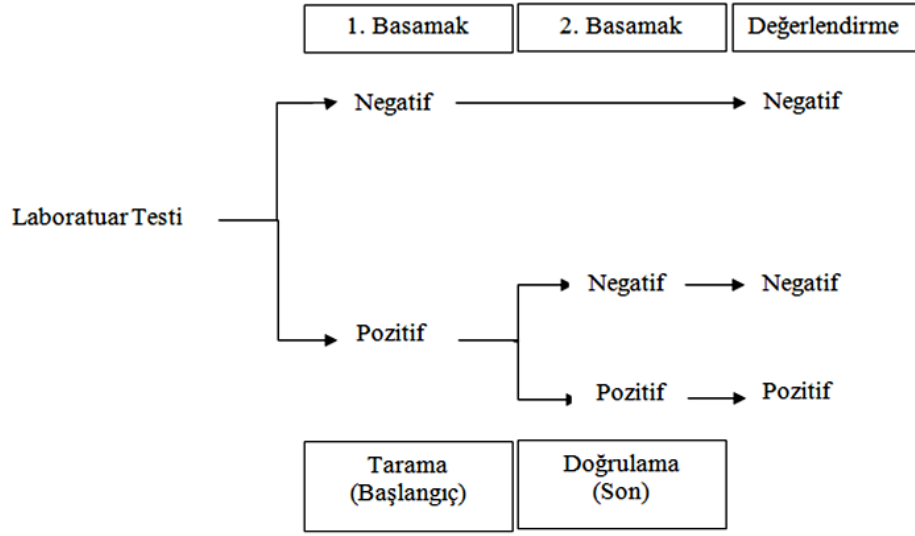
net bir resmini sunar ve zamanla uy sturucu testlerinde uy sturucu seviyelerinin yorumlanmasını basitleştirir (49).

#### **2.4 Toksikolojik Analiz Yöntemleri**

Madde kullanımı ile mücadele amacıyla kullanımı tespit etmek için madde analizleri uygulanır. Çeşitli ihtiyaçlara yönelik (resmi veya özel; küçük veya büyük; bölgesel veya genel; tıbbi, adli veya idari amaçlı; trafikte veya ehliyet/ticari çalışma yetkisi alırken sürücülere, okullarda ergenlere, müsabakada sporculara, işyerinde kamu çalışanlarına gibi) madde analiz programları oluşturulur (50-55).

Madde analizleri tıbbi ihtiyaçları karşılamak için, tanı bulgusu olarak kullanılacaksa yüksek özgüllükte (ayırıcı tanıda), yüksek duyarlılıkta (erken tanıda), tedavi bulgusu olarak kullanılacaksa yüksek kesinlikte (seri ölçümle izlemde) olması istenen kalite gereklilikleridir. Fakat suç kanıtı için adli ihtiyaçları ve davranış kanıtı için sosyal/ idari ihtiyaçları karşılamakta kullanılacak ise yüksek özgüllük, duyarlılık ve kesinlikte (hüküm vermede) olması istenen kalite gereklilikleridir. Ceza verme (adli), işten atma (mali) veya toplumda dışlanma (sosyal) gibi sonuçları olabilecek kararlarda test yönteminin analiti daha kesin, tereddütsüz ve savunulabilir şekilde saptaması gereklidir. Bu durumlarda tarama testleri tek başına istenen kalite performansını karşılayamazlar; bu nedenle etkin ve kapsamlı bir madde tarama prosedürü yürütmek, klinik ve adli olgular için hem olguya ait biyolojik matrikslerde bulunup bulunmadığı var ise miktarını belirlemede var olabilecek maddeleri tayin etmek için basamaklı analiz stratejisi uygulanır (56).

Basamaklı analiz stratejisinde; ilk basamakta immunokimyasal yöntemeye dayanan, kalitatif veya semi-kantitatif olarak, madde ve/veya metabolitlerinin varlığının arandığı tarama analizleri uygulanır. İkinci basamakta ise enstrümental yöntemlere dayanan, kantitatif olarak, madde varlığının doğrulandığı ve miktarının ölçüldüğü doğrulama analizleri uygulanır. Tarama analizleri daha hızlı ve ucuz olduğu için başlangıç olarak tercih edilir. Birinci basamak analizlerinde pozitif çıkan örnekler, yalancı pozitiflik açısından doğrulama analizleri ile doğrulanırlar (Şekil10) (57).



**Şekil 10.** Toksikolojik analiz basamakları

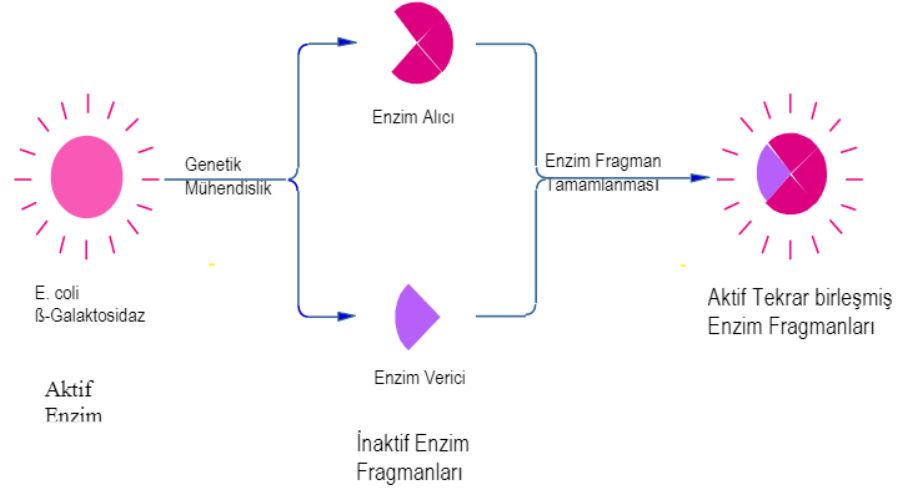
## 2.4.1 Tarama

Tarama analiz yöntemleri immunokimyasal tekniğe dayanırlar. Hasta başı cihazlarla veya laboratuvardaki otoanalizörlerle işaretli, immunoassay yöntemleri ile kalitatif veya semi-kantitatif olarak uygulanırlar. Tek bir maddeye spesifik olmayıp başka moleküllere çapraz reaksiyon (interferans) verebilirler (56).

### 2.4.1.1 İmmunoassay

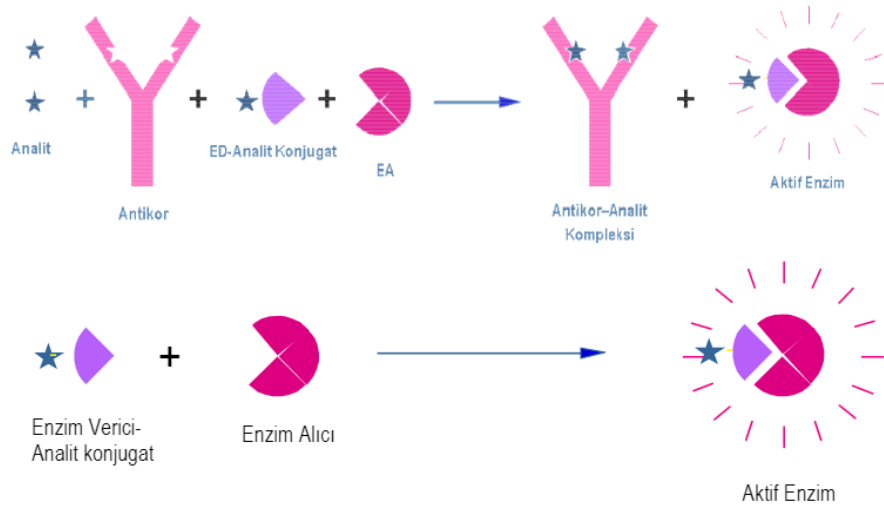
İmmünolojik yöntemlerde temel bileşenler, spesifik bir antijene bağlanan bir antikor, analit olan yani ölçümü yapılacak bir antijeni yada bağlanmış olan antijen-antikor kompleksini ölçen bir tarama metodu olarak tanımlanmıştır. Adli laboratuvarlarda bu yöntemle biyolojik sıvılarda herhangi bir özütleme prosedürü uygulanmaksızın amfetaminler, kokain ve metabolitleri, opiyatlar, esrar, benzodiazepinler ve barbitüratlar nitel ve seminicel tayini yapılır. Biyolojik sıvılar çoğunlukla postmortem ve antemortem kan ve idrar örnekleridir. Yöntem biyolojik sıvılarda söz konusu maddelerin taranması amacıyla uygulanır. Analiz sonucu ile analite mevcut maddenin yalnız grubu belirlenmiş olur. Bu nedenle maddenin cinsi

ve miktarı GC/MS, HPLC, LC/MS/MS gibi tekniklerle belirlenerek immunoassay sonucu teyit edilmiş olur (58).



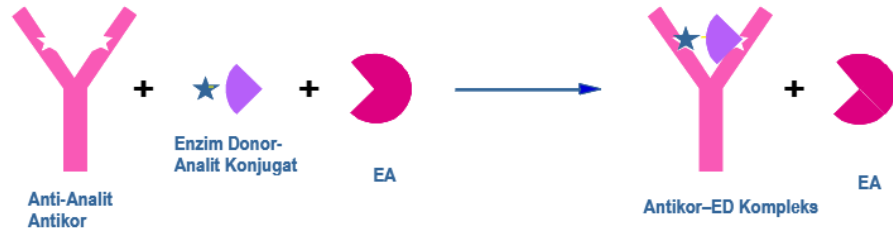
**Şekil 11.** Enzim fragmanlarının genetik üretimi

Numunedeki analit antikora bağlanmak için yarışır, ED (Enzim Donör) Analitin konjugatın enzim formasyonunu sağlar (58).



**Şekil 12.** EA ve ED-Analite konjugatın aktif enzim oluşturması





**Şekil 13.** Anti- Analit Antikor Ed- Analit konjugata bağlanması ve aktif enzim oluşmasını bloke etmesi

Bu çalışmamızda bakılan parametrelerde kullanılan EMIT ve CEDIA, rekombinat DNA teknolojisi kullanılarak Escherichia Coli bakterisinden elde edilen  $\beta$ -Galaktosidaz enziminden iki ayrı fragman oluşturur. Bu iki fragman enzimatik olarak aktif değildir. Solüsyondaki fragmanlar tetramerik  $\beta$  -Galaktosidaz molekülünün tamamen aktif hale gelmesi ve tamamlanması için kendiliğinden birleşir. Fragmanlardan biri enzim Donör (ED) ve diğeri enzim akseptör (alıcı) (EA) dır. ED- analit konjugatı ve test örneğindeki analit ile sınırlı miktarlardaki spesifik antikora bağlanmak için yarışır. ED- analit konjugatın anti-analit antikora bağlanması iki enzim fragmanının birleşmesini inhibe eder. Böylece aktif enzim oluşumu engellenir. Test örneğindeki analit miktarı ne kadar fazla olursa ED- analit konjugatına bağlanacak anti-analit antikor o kadar az olur. Böylece ED- analit ve EA fragmanlarının birleşmesi ile çok aktif bir enzim oluşur. Yarışmalı protein bağlanması, miktarı direkt olarak örnekteki analit derişimine bağlı olan aktif bir enzim ve ürün oluşmasına neden olur. Aktif enzim oluşumu ile spektrofotometrik olarak ölçülebilen bir renk değişimi meydana gelir. Oluşan aktif enzim miktarı ve meydana gelen absorbans değişimleri, örnekteki analit miktarı ile orantılıdır. Eğer numunede madde yoksa antikor inaktif fragmanlardan birine bağlanır ve aktif enzim oluşumu önlemiş olur (58).

Opiyat immunoassay testlerini yorumlarken özellikle dikkatli olunmalıdır. Opiyat terimi kısmen afyon haşhaşından türetilen yarı sentetik alkaloidler (buprenorfin, dihidrokodon, eroin, hidrokodon, hidromorfon, levorfanol, oksikodon ve oksimorfon) ve afyon haşhaşından doğal olarak oluşan alkaloidleri (morfin, kodein) ifade eder. İmmunoassay testleri, yarı sentetik opioidler ile değişken çapraz

reaktiviteye (kullanılmakta olan analiz yönteminin test edilen madde ile kimyasal olarak benzeri arasında ayırım yapılamaması) sahiptir ve kullanımlarını tespit edebilir yada etmeyebilir. Bu da test sonucunun değerlendirilmesinde çok önemli bir konudur. Madde testlerini yorumlamak için bu madde sınıfının metabolizmasını anlamak esastır (59).

## **2.4.2 Doğrulama**

Doğrulama analiz yöntemleri enstrümantal tekniğe dayanır.

Kimyasal analizi yapılacak biyolojik numuneler, genellikle aranan maddeden başka bileşenlerinde var olduğu karmaşık bir matris içerirler. Bu nedenle cihazlar yardımıyla yapılan analizler öncesinde örnek hazırlama, uygulanması gereken çok önemli bir basamaktır.

Doğrulama, kromatografi ile bütünleşik kütle spektrometre cihazlarında (GC/MS, LC-MS/MS) kantitatif olarak uygulanırlar. Doğrulama testlerinde kullanılan enstrümantal yöntemlerin özgülüğü, yüksek olduğundan her bir ana molekül ve metabolitleri tek başına tanırlar/ayırt ederler (56).

### **2.4.2.1 Ekstraksiyon**

Çeşitli cihazlar (yüksek basınçlı sıvı kromatografi (HPLC), gaz kromatografi (GC), gaz kromatografi-kütle spektrofotometresi (GC-MS), radioimmün assay (RIA), spektrometrik teknikler...vb.) yardımıyla yapılan toksikolojik analiz yapılacak biyolojik sıvılarda, analiz öncesinde ön ayırma ve temizleme işlemine gereksinim olduğundan yapılması gereken önemli bir basamaktır. Örnek hazırlama kısmında sıvı-sıvı ekstraksiyon, katı-sıvı ekstraksiyon, katı faza mikroekstraksiyon... vb yöntemler kullanılabilir (60).

Bizim çalışmamızda sıvı-sıvı ekstraksiyon ve katı-faz ekstraksiyon kullanıldı.

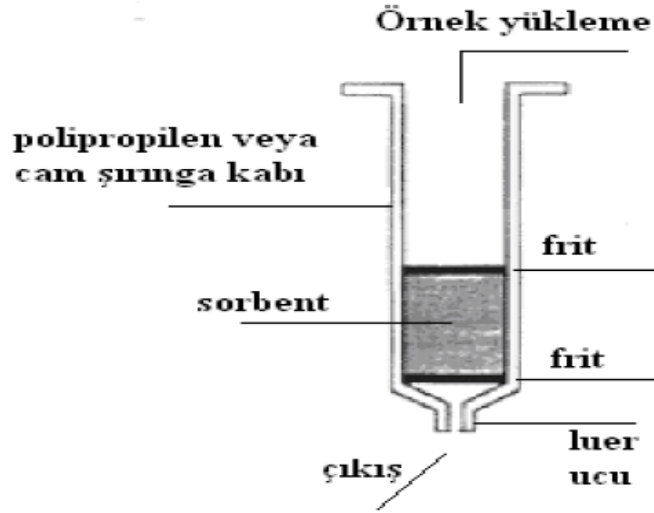
#### **2.4.2.1.1 Sıvı-sıvı ekstraksiyon (LLE)**

Maddeyi biyolojik örnekten izole etmekte kullanılan geleneksel yöntemdir. Birbirine karışmayan iki sıvı arasında meydana gelen faz farkından yararlanır. Biyolojik örnek sulu faz olarak kabul edilirken, çözücü ise organik faz olarak

adlandırılır. Bu yöntemin büyük avantajı, seçiciliğidir (ekstraksiyon şeması doğru uygulandığında). Analitin yüksüz (non-iyonize) olduğu pH'da izolasyon gerçekleştirilir. Asidik maddeler için sulu faz asitleştirilmelidir, bazik maddeler için sulu faz bazikleştirilmelidir. Sıvı-sıvı ekstraksiyonda organik faz olarak genellikle etil asetat, kloroform, toluen, diklorometan, butil asetat, dietil eter kullanılmaktadır.

#### **2.4.2.1.2 Katı-faz ekstraksiyon (SPE)**

Örnek hazırlama işleminin basitleştirilmesi, zaman kaybının önlenmesi ve analiz maliyetinin azaltılması amacıyla, 1970'li yılların ortalarında klasik metotlara alternatif olarak yeni bir teknik olan katı faz ekstraksiyon metodu (SPE) kullanılmaya başlanmıştır. SPE yapılacak biyolojik örneğe göre ekstraksiyon öncesi bazı işlemler vardır. Kan, doku örnekleri için deproteinizasyon, süzme ve santrifüj yapılması gerekir. İdrar için ise sadece bir seyreltme basamağı ve/veya santrifüj yeterlidir (45). Bu yaklaşım, çeşitli tutucu maddelerin (adsorban) küçük, tek kullanımlık ekstraksiyon kolonlarına doldurularak pratik bir şekilde örnek hazırlama düzeneği tasarlanması esasına dayanmaktadır (61). Genel olarak SPE yöntemi, sıvı örneklerin istenmeyen bileşenlerden ayrılması (temizleme), örnek matris yapısının değiştirilmesi ve analitlerin zenginleştirilmesi amaçlarıyla hazırlanmış olan küçük tek kullanımlık kolon veya disklerden geçirilmesi esasına dayanmaktadır. Katı faz ekstraksiyonu sıvı örnekler ya da çözeltilerdeki analitin uygun bir katı faz üzerinde toplanmasını ve sonra analitin katı fazdan küçük hacimli bir çözelti (hareketli faz) ile elue edilmesini esas alır. SPE kesikli olarak uygulanabildiği gibi akışa enjeksiyon teknikleri ile de uygulanabilmektedir. Sıvı örneğin kolondan geçirilmesi, yerçekimi vasıtasıyla (manuel) gerçekleştirilebildiği gibi, zaman kaybının önüne geçmek amacıyla vakum manifoldları yardımıyla da yapılabilir (61-64). **Şekil 14**'te klasik bir SPE kolonunun yapısı, **Şekil 15**'de çeşitli ticari SPE kolon ve diskleri ile vakum manifoldu görülmektedir.



Şekil 14. SPE kolonunun yapısı



Şekil 15. Çeşitli ticari SPE kolon ve diskleri ile vakum manifoldu.

SPE metodunda kolondan geçirilme sırasında örnek molekülleri ile tutucu madde arasında kimyasal bir etkileşim meydana gelir. Bu etkileşimden faydalanarak maddelerin ayrılma işlemi başlıca iki yolla gerçekleştirilir (45,62,65).

Birinci yol; ilk aşama analiz edilecek bileşik tutucu maddeye bağlanarak kolon içinde tutulurken, çözelti ve istenmeyen bileşenler bu madde ile herhangi bir etkileşime girmezler. Daha sonra istenmeyen bileşenler uygun yıkama çözeltisi ile uzaklaştırılır ve analiz edilecek bileşen tutucu maddeden uygun bir çözelti yardımıyla çözdürülerek alınır. İkinci yöntemde ise, istenmeyen bileşenlerin tutucu madde ile etkileşimi söz konusudur. Özellikle atık yağlar gibi matristen ayrılması zor olan maddelerin analizinde kullanılan bu yöntemde, matristeki istenmeyen bileşenler

tutucu madde tarafından sıkı şekilde bağlanırlar. Asıl aranan madde ise tutucu madde ile etkileşime girmez ve uygun çözeltili yardımıyla çözdürülerek toplanır. Bu yöntemde, kolon içerisindeki tutucu maddenin oluşturduğu katı faz filtre işlevi görmektedir (61).

Kısaca her iki ayırma yönteminde de SPE kolondaki tutucu maddenin önce şartlandırılması gerekmektedir. Şartlandırma işlemi, kolondan uygun çözeltili geçirilerek tutucu maddenin aktif hale getirilmesi ve matristeki maddeler ile tekrarlanabilir etkileşim için gerekli ortamın sağlanabilmesi amacıyla yapılmaktadır. Polar olmayan tutucu maddeler, kolon hacminin 2-3 katı miktarda suyla karışabilen metanol, tetrahidrofuran, isopropanol gibi polar çözücüler ile; polar tutucu maddeler ise polar olmayan çözücülerle şartlandırılmaktadır (62,63).

#### **2.4.2.2 Kromatografik Yöntemler**

##### **2.4.2.2.1 Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometrisi (GC/MS)**

Gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi iki güçlü analitik tekniğin kombinasyonudur. Bu kombinasyon birçok avantaja sahiptir. Birincisi, bu teknikle nitel analiz amacıyla karmaşık yapıları bir karışım bileşenlerine ayrılır, her bir bileşimin kütle spektrumu elde edilir; ikincisi bu bileşimlerin miktarıyla ilgili bilgi elde edilir. Gaz kromatografisi bir ayırma tekniği, kütle spektrometrisi ise bir teşhis tekniğidir (66).

Gaz kromatografisi James ve Martin tarafından 1952 yılında geliştirilmiştir. Bu teknik uçucu olan veya uçucu hale getirilebilen maddelerin belirli bir sıcaklıkta taşıyıcı gazın akışı yardımıyla sabit bir faz ile etkileşerek ayrılmaları esasına dayanır. Gaz kromatografisi cihazı aşağıdaki bileşenlerden oluşur (67,68):

-Enjektör

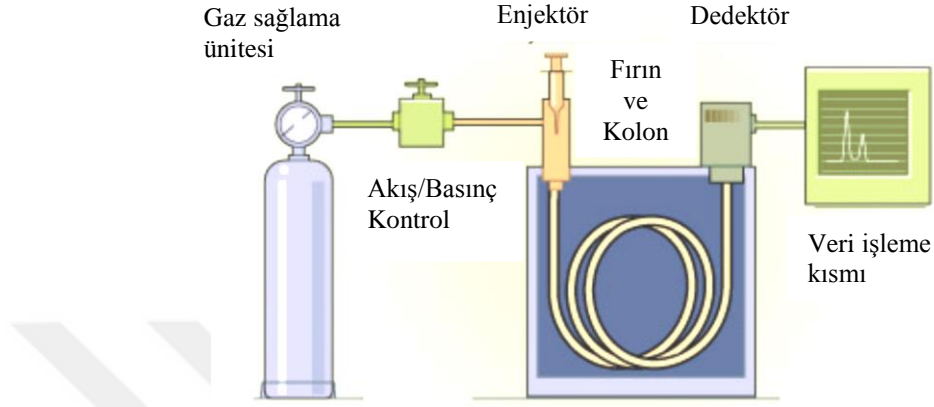
-Akış/Basınç kontrol

-Gaz sağlama ünitesi

-Fırın ve Kolon

-Dedektör

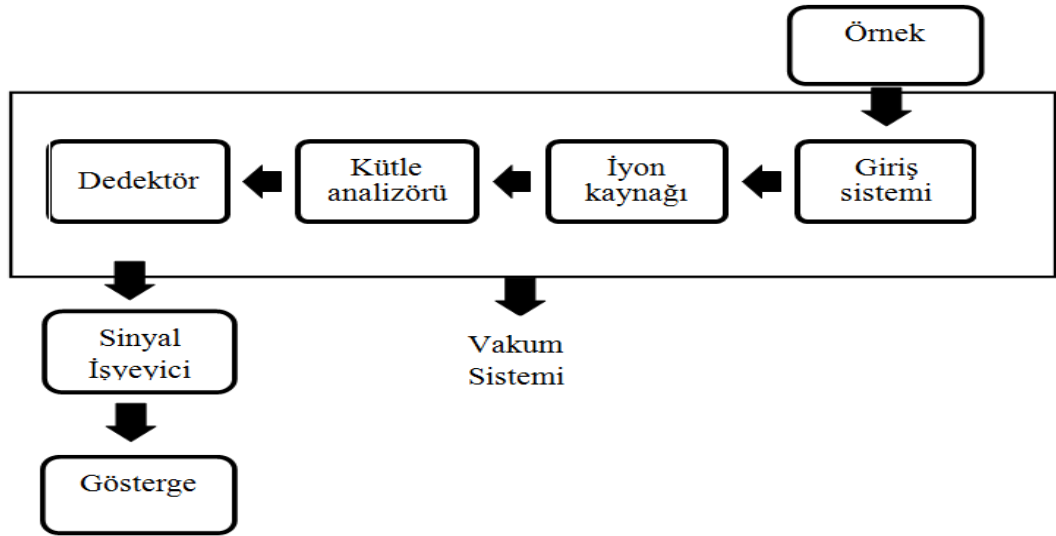
-Veri işleme kısmı



**Şekil 16.** Gaz kromatograf cihazının şematik gösterimi verilmiştir.

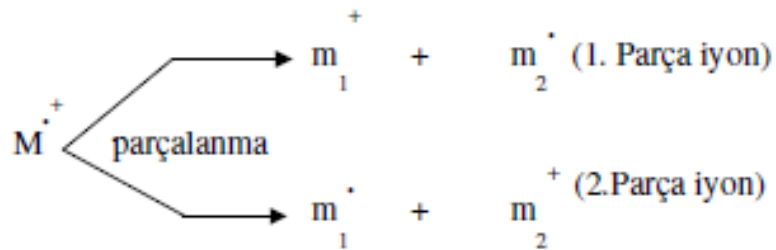
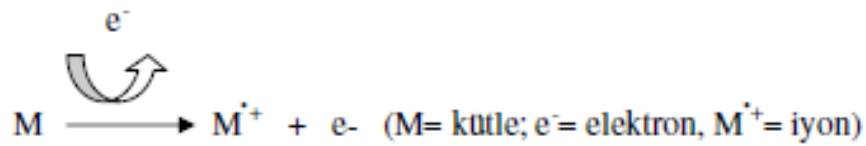
Gaz kromatografisine konan örnek içindeki maddeler, helyum gibi özel bir gazla sabit faz içinden sürüklenirler. Bu arada örnek içindeki gazlar (gaz olsun olmasın fark etmez, sıcak bir hücrede gaz haline getirilirler) sabit fazla aralarındaki ilgiye göre az veya çok tutulurlar. En sonunda sürükleyici gaz tarafından detektöre, oradan da atmosfere atılırlar. Gazların sabit fazla hareketli faz arasında dağılımlarında, çözünürlük, bağlanma, adsorplanma, moleküler süzülebilme gibi olaylar etkin olabilirler (69).

Kütle spektrometrisinin temel prensibi inorganik ya da organik bileşiklerin uygun bir yöntemle iyonlarını oluşturmak, bu iyonları kütle/yük oranlarına göre ayırmak ve bunların kütle/yük oranlarını ve bolluklarını ayrı ayrı nitel ve nicel olarak tespit etmektir (70). Bir kütle spektrometresinin bileşenleri **Şekil 17**'de gösterilmiştir



Şekil 17. Kütle spektrometrisinin bileşenleri

Kütle spektrometresinde gaz fazındaki örnek, 70 eV'luk enerji ile elektron bombardımanına tabi tutulur. Bir organik molekülle bu yüksek enerjili elektronlardan birinin çarpışmasıyla molekülden bir elektron kopar ve bir organik iyon meydana gelir. Bu iyonlar kararsızdır ve daha küçük parçalara yani radikallere ve diğer iyonlara parçalanırlar. Bir organik molekülün elektron bombardımanı (EI) sonucu aşağıdaki eşitliklerde gösterilen işlemlerle oluşan iyonlar ve bu kararsız iyonların parçalanması ile oluşan parça iyonlar ortaya çıkar (60).



Bu prosesler sonucunda oluşan iyonların dağılımı ve bollukları o madde için kütle spektrumunu verir. Tipik bir kütle spektrometresinde artı yüklü parçacıklar saptanır. Kütle spektrumu bu parçacıkların kütle/yük ( $m/z$ ) oranlarına karşılık bolluklarının (artı yüklü değişik parçacıkların bağıl bollukları) çizimi ile elde edilir. Bir iyonun  $m/z$  değeri kütlelerine eşittir. Bu nedenle, kütle spektrumu pratik olarak parçacıkların kütlelerine karşılık bağıl bolluklarının çizimi şeklinde ifade edilebilir. Bir molekülün ya da iyonun parçacıklara nasıl parçalandığı bileşiğin karbon iskeletine ve bulunan işlevsel gruplara bağlıdır. Bu yüzden ki parçacıkların yapı ve kütleleri ana molekülün yapısı hakkında ipucu verir. Sinyal işleme ve gösterge kısımları hariç sistemin tamamı radikaller, hava molekülleri ve diğer parçacıklar arasındaki çarpışma ve tepkimeleri en aza indirmek için yüksek ( $10^{-5}$ - $10^{-8}$  torr) vakum altındadır. Burada buhar halindeki örnek önce iyonlaşma bölgesine gider, yüksek vakum altındaki bu bölgede örnek yüksek enerjili akım içinden geçirilerek içindeki moleküllerden bazılarının iyonlaşması sağlanır. Moleküler iyon oluştuktan sonra çok kısa bir zamanda ( $10^{-10}$ - $10^{-6}$  saniye) parçalanmaya ve düzenlenmeye uğrar. Uzun ömürlü parçacıklar iyon toplayıcısına ulaşır. Parçacıkların izlediği yol, analizörün tipine (TOF, sektör veya kuadropol) göre, hızlandırma voltajına ve parçacığın  $m/z$  değerine göre değişmektedir. İyon demetleri elektriksel ilettiler şeklinde sinyallere dönüşür ve pikler şeklinde gösterilir (71).

Kütle analizör tiplerinden en çok kullanılanı kuadropol kütle analizörüdür. Yüksek tarama hızı, maliyeti, boyut olarak daha küçük oluşu bu analizörün bazı avantajlarından. Dört paralel silindirik çubuktan oluşmaktadır. Karşılıklı çubuklar elektriksel olarak birbirine bağlıdır. Bir çifti doğru akım kaynağının pozitif tarafına, diğer çifti ise negatif ucuna bağlıdır. Ayrıca her çubuğa radyo frekanslı alternatif akım uygulanır. İyonlar çubuklar arasında 5-10 V luk potansiyelle hızlandırılırken çubuklara uygulanan doğru akım ve alternatif akım aynı oranda artırılır.  $m/z$  değerine sahip olanların yanı sıra tüm iyonlar çubuklara çarpar, sadece kararlı olan  $m/z$  değeri taşıyan iyonlar dedektöre ulaşır (67).

Kütle spektrometrisinde iki tip iyon tarama modu vardır. Bunlar toplam iyon taraması (SCAN) ve seçilmiş iyon taraması (SIM) modlarıdır. SCAN modunda geniş bir  $m/z$  taraması yapılır. SIM mod ise sadece seçilmiş  $m/z$  değerlerine sahip iyonların tarandığı moddur. Tarama,  $m/z$  değerleri hedef bileşiği en iyi temsil edecek şekilde



yapılır (70). SIM modunda kütle analizörü, ilgilenilen m/z değerlerini dönüşümlü olarak ölçer. Bir m/z değerinden diğerine atlar. Bu nedenle analiz için gereksiz olan m/z değerlerinde harcanan tarama süresi sıfıra inerken ilgilenilen iyonlar için sinyal integrasyon süresi 10-100 kat artar. Dolayısıyla hassasiyetin arttığı gözlenir. SCAN ya da SIM modu arasında yapılacak seçim gerekli olan gözlenebilme sınırına ve elde edilmek istenen bilgiye göre değişir (60).

Kromatogramdaki herhangi bir pikin veya bütün piklerin kütle spektrumları sistem bilgisayarında yüklü kütüphanelerdeki spektrumlarla karşılaştırılır. NIST (National Institute of Standards and Technology) ve WILEY kütüphaneleri gibi büyük spektral kütüphaneler ticari olarak mevcuttur. Moleküler iyonun parçalanma reaksiyonları ve sonuçta oluşan parçalanma iyonları örnek hakkında önemli bilgiler verir. İçeriği bilinmeyen örnekte moleküler türün nitel analizi şüphe edilen bileşiğe ait referans maddenin aynı şartlardaki GC alıkonma karakteristikleri ve kütle spektrumlarının örneğinkilerle karşılaştırılmasıyla yapılır (72,73).

Nicel analiz GC/MS'in önemli bir uygulama alanıdır. GC/MS'in nicel analizdeki gücü, yüksek seçiciliğe ve düşük tayin limitlerine ulaşılabilmesi ile açıklanabilir. Kalibrasyon eğrileri genellikle geniş bir derişim aralığında doğrusaldır (73).

SIM in nicel analizde uygulama şekli, uygulama alanına ve analizi yapılan örneğin karmaşıklığına bağlıdır. Bazı farmasötik uygulamalarda SIM sadece analitin tek bir karakteristik iyonun m/z değerine göre yapılırken, kalıntı analizlerinde birkaç m/z kullanılmalıdır. Bu tür uygulamalarda analitin varlığının teyidi için ölçüt vardır ve çeşitli iyonların pik alanları referans maddenin kütle spektrumundan belirlenmiş oranlarla uyusmalıdır (74).

## **2.5 Validasyon (Geçerlilik)**

Geçerlilik, bir veya bir seri analitin, belirli bir matris içindeki konsantrasyonunun tayini için kullanılan belirli bir yöntemin, amaçlanan uygulama bakımından güvenilirliğini göstermek için yapılması gereken bütün işlemleri kapsamaktadır (75). Validasyon; laboratuvarında ilk defa uygulanacağında, yeni bir yöntem geliştirildiğinde, mevcut yöntemde değişiklik yapıldığında, geçerli kılınmış bir yöntem farklı bir laboratuvarında uygulanacağında, farklı bir cihazla veya farklı bir

analist tarafından kullanıldığında, kalite kontrol sırasında mevcut yöntemin zamanla değiştiği anlaşıldığında, iki yöntemin eşitliğinin karşılaştırılması gerektiğinde yapılır (76).

Validasyon parametreleri:

- Doğrusallık (Linearite)
- Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik
- Seçimlilik ve Duyarlılık
- Doğruluk
- Geri Kazanım
- LOD
- LOQ
- Stabilité
- Matris etkisidir.

### 3 GEREÇ ve YÖNTEM

Tez çalışmamın analizleri Ege Üniversitesi Madde Bağımlılığı, Toksikoloji ve İlaç Bilimleri Enstitüsü Bağımlılık Toksikolojisi Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. İdrar örnekleri çalışmada yer almayı kabul eden sağlıklı gönüllülerden Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınan izin çerçevesinde gönüllü onam formu imzalatılarak alınmıştır (EK 1/ Karar No 15-3.1/3).

#### 3.1 Kullanılan Gereçler

##### 3.1.1 Kimyasal Malzemeler

- |                                   |               |
|-----------------------------------|---------------|
| • Morfin standartı                | Cerilliant    |
| • Morfin-d <sub>3</sub> standartı | Cerilliant    |
| • Potasyum hidroksit              | Sigma Aldrich |
| • Etil asetat                     | Merck         |
| • Asetik Asit                     | Sigma Aldrich |
| • Sodyum asetat                   | Sigma Aldrich |
| • Disodyum hidrojen fosfat        | Sigma Aldrich |
| • Sodyum dihidrojen fosfat        | Sigma Aldrich |

- Metanol Merck
- İsoopropanol Merck
- Amonyum hidroksit Sigma Aldrich
- BSTFA %1TMCS Sigma Aldrich
- Helyum gazı Yüksek saflıkta
- Azot gazı Habaş

### 3.1.2 Cihazlar

- Cedia İmmunoassay Olmpus AU400
- Gaz kromatografisi Agilent Technologies 7890B
- Kütle spektrometresi Agilent Technologies 5977A MSD
- Katı-sıvı ekstraksiyon manifoldu Biotage
- Hassas Terazı Sartorius
- Otomatik Mikropipet (10-100 µL, 100-1000 µL) Axygen Scientific
- Santrifüj Nüve NF 1200 R
- Vortex Labnet VX 100
- Azotlu uçurucu Thermo Scientific reacti-Therm III
- Su banyosu Nüve BM 302
- pH Metre Thermo Scientific orion star A211

### 3.1.3 Kartuşlar ve Kitler

- Toxi Tube-A Agilent Technologies
- SPE Kartuşu UCT Clean Screen ZSDAU20
- Opiyat Thermo Scientific
- Sample Check Thermo Scientific
- Kreatin Thermo Scientific
- 6-MAM(eroın metaboliti) Thermo Scientific

### 3.1.4 Cam Malzemeler

- Balonjoje
- Deney tüpü
- İnsert
- Vial
- Vial Kapağı

### 3.1.5 Çözeltiler

**0.1 M asetik asit çözeltisi:** 1.43 mL asetik asit alınıp distile su ile 250 mL tamamlanır.

**0.1 M sodyum asetat çözeltisi:** 20.5g sodyum asetat tartılıp 250 mL ye kadar distile su ile tamamlanır.

**pH 4.5 0.1 M asetat tampon çözeltisi:** 0.1M asetik asit çözeltisinden 7 mL ile 0.1 M sodyum asetat çözeltisinden 3 mL alınıp 200mL ye distile su ile tamamlanır.

**0.2 M Sodyum dihidrojen fosfat çözeltisi:** Sodyumdihidrojenfosfat tan 7.81 g tartıp 250 mL ye saf su ile seyreltilir.

**0.2 M Disodyum hidrojen fosfat çözeltisi:** Disodyum hidrojen fosfat tan 7.1 g tartıp 250 mL ye saf su ile seyreltilir.

**pH 6 0.1 M fosfat tamponu:** 0.2M sodyum dihidrojen fosfat çözeltisinden 39 mL ile 0.1 M di sodyum hidrojen fosfat çözeltisinden 61 mL alınıp 200mL ye distile su ile tamamlanır.

**0.1 M KOH:** 28.055 g potasyum hidroksit tartılıp üzerine azar azar distile saf su eklenip 500 mL ye kadar tamamlanır.

**Kullanılan elüent:** etilasetat:isopropanol:amonyumhidroksit karışımının 84:12:4 (v/v) oranında olacak şekilde analiz öncesi taze hazırlanmalıdır.

**İdrar havuzu:** Hiçbir madde kullanılmadığı bilinen ve yakın zamanda haşhaş tüketmemiş sağlıklı kişilerin idrarlarından belli oranda alınıp hazırlanmıştır.

**Toxi Tüp A:** metilen klorür, heptan ve çinko klorürden oluşan sıvı sıvı ekstraksiyon kartuşudur.

## **3.2 Cihaz Çalışma Prensipleri**

### **3.2.1 İmmunoassay Çalışması**

Çalışmada Olympus AU400 marka immunoassay cihazı ile çalışıldı.



**Resim 7.** Çalışmada kullanılan immunoassay cihazı

Çalışma prensibi: Çalışma öncesi kalibratör ve kontroller oda sıcaklığına gelinceye kadar (~30 dk) bekletilir. Uygun sıcaklığa gelince cihazda tanımlanarak çalışılıp sonuçlarla değerlendirilir, çıkan sonuçlar referans aralıklarına uygun ise idrar numuneleri için çalışma başlatılabilir. Okuma işlemi 8 dakika içinde yapılır.

**Tablo 3.** İmmunoassay cihazındaki bakılan parametrelerin cut off, amax ve cihaz kontrol değerleri

<b>Parametreler</b>	<b>Cut off (ng/mL)</b>	<b>Amax Değerleri</b>	<b>Kontrol değerleri</b>
<b>Opiyat</b>	0-300	>2000	Clinical Low 225/ High 375 (169/281- 281/469)
<b>İdrarda Bütünlük</b>	85-105		İdrarda Bütünlük 75 (60 - 90)
<b>Kreatinin</b>	20-300	>300	Krea 7.5 (5.5-8.5)
<b>6-MAM</b>	0-10	>20	Select LOW 7.5/ HIGH 15 (5.64/9.36 - 9.38/15.62)

### 3.2.2 GC/MS Çalışması

Çalışmada Agilent Technologies 5977A MSD GC/MS cihazı kullanıldı



**Resim 8.** Çalışmada kullanılan Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi.

### GC/MS Çalışma Koşulları

**Tablo 4.** GC/MS çalışma koşulları.

<b>Kapiler Kolon</b>	Silika dolgulı; 30 m uzunluğunda, 0.25 $\mu$ m film kalınlığı ve 0.25 mm iç çapında olan (HP-5MS)
<b>Fırın Sıcaklık Programı</b>	Başlangıç sıcaklığı 150°C de 1 dakika bekleyerek, sonra 30°C/min artışla 280°C'ye çıkarılır ve 5 dakika bekleyerek son sıcaklığa ulaşılır.
<b>Taşıyıcı Gaz ve Akış</b>	Helyum, 1.5 ml/min
<b>Enjeksiyon Bloğu Sıcaklığı</b>	250°C
<b>Dedektör Sıcaklığı</b>	230°C
<b>Enjeksiyon Hacmi</b>	1 $\mu$ L, splitless
<b>Analiz Süresi</b>	Morfin için 10.33 dk Tebain için 15 dk

**Tablo 5.** GC/MS ile analiz edilen analitler için baz alınan m/z oranları ve alıkonma zamanları

<b>Analiz edilen maddeler</b>	<b>m/z oranları</b>	<b>Alıkonma Zamanı (Rt)</b>
Morfin	196, 236, 414, <u>429</u>	7.12
Morfin-d <sub>3</sub>	199, 296, <u>432</u>	7.11
Tebain	296, <u>311</u> , 312	11.75-11.83

### **3.3 Gönüllülerle Çalışma**

#### **3.3.1 Gönüllülerin Seçimi**

##### **3.3.1.1 Kabul Kriterleri**

- ✓ 18-65 yaş arasında,
- ✓ Örnek alındığı gün bir sağlık sorunu bulunmayan, kronik ve metabolik hastalığı olmayan (Diyabet vb.)
- ✓ Sürekli ilaç kullanımı olmayan,
- ✓ Alkol vb. psikoaktif madde kullanımı olmayan,
- ✓ İdrarda opiyat kullanımı tarama testinde negatif sonuç vermiş olan,
- ✓ Gebelik testi sonucu negatif olan,
- ✓ Oral haşhaş tohumuna duyarlılık göstermeyen,
- ✓ Vücut kitle indeks oranı normal olan (18.5-24.5) kişiler seçilmiştir.

##### **3.3.1.2 Dışlama Kriterleri**

Diyabet, böbrek hastalığı, ishal, kusma, şeker, enfeksiyonel hastalıkları, alkol gibi alışkanlıkları var ise, soğuk algınlığı, öksürük kesici ilaç kullanımı olduğunda, metabolizmayı değiştirecek gıdalar (örneğin; lahanası, brokoli, greyfurt gibi) tüketildiğinde, örnek verememe durumunda sorumlu kişi tarafından araştırma dışı bırakılabilirsiniz.

### 3.3.2 Gönüllülerin Haşhaş Tohumu Ezmelerini Tüketmesi

Çalışmada seçilen on gönüllü belirlenen üç ayrı tarihte; önce beyaz, sonra sarı ve en son siyah haşhaş tohumlarından yapılan ezmeleri en az 100g olacak şekilde, çay ve ekmek eşliğinde kahvaltıda tüketildi. Ayrıca gönüllülerden doz alımından ilk iki saat içinde 1 Lt su içmeleri istendi. Tüketimden sonra gönüllülerimizden rutin hayatlarına devam etmeleri istendi, dışlama kriterleri dışında herhangi bir kısıtlılık getirilmedi.



**Resim 9.** Haşhaş tohumu ezmesi yenildiği çalışmadan görüntüler.

### 3.3.3 Gönüllülerin İdrar Vermeleri

Gönüllülerimizden doz alımından önce (0.saat) ve sonrasında (2., 4., 6., 8., 12. ve 48. saatlerde) idrar örneklerini kendilerine verilen idrar kaplarına almaları ve kapların üzerine gönüllü no, saat ve haşhaş türü yazılan etiketleri yapıştırmaları istendi.





**Resim 10.** Çalışmada kullanılan gönüllülerin idrarları

10 gönüllümüzün isimlerine G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7, G8, G9 ve G10 kodları verildi. Kimin hangi kodu aldığı çalışmayı yapan analist ve gönüllü arasında gizli kaldı.

### **3.4 Deneysel Kısım**

#### **3.4.1 Morfin Analizi İçin Yöntem Validasyonu**

İdrarda morfin analizi validasyonu Ege Üniversitesi Madde Bağımlılığı, Toksikoloji ve İlaç Bilimleri Enstitüsü Bağımlılık Toksikolojisi Laboratuvarı Morfin Analiz Yöntemi temel alınarak yapıldı. Yöntemdeki optimum veriler kullanılarak, doğrusallık (linearite), LOD, LOQ, duyarlılık, geri kazanım, seçimlilik, parametreleriyle kısmi validasyon yapıldı.

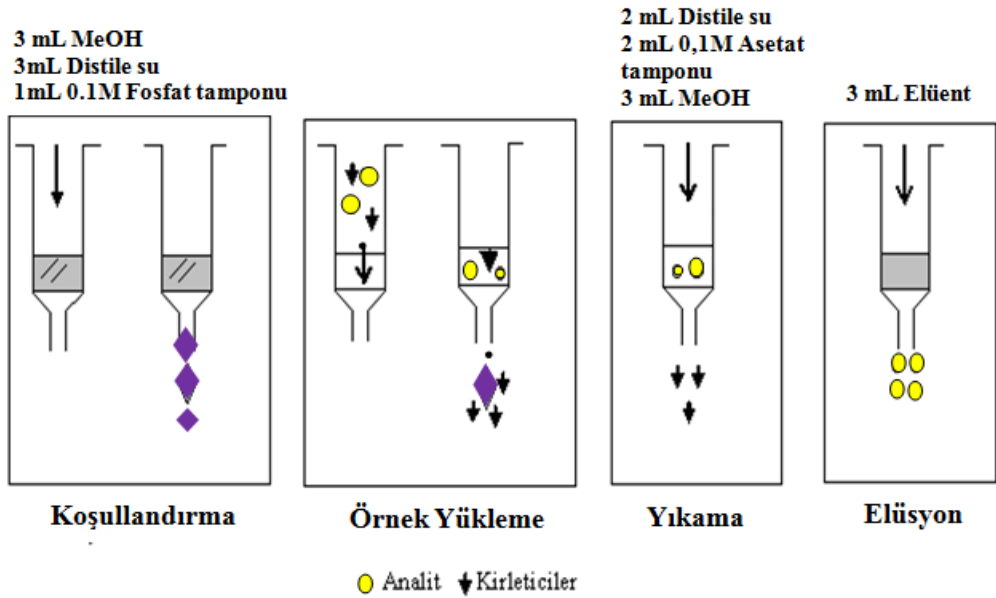
#### **3.4.2 Haşhaş Tohumu Ezmesi Ekstraksiyon Yöntemi**

Ağız kapaklı cam tüp içersine 1.5 gr haşhaş tohumu ezmesi tartıldı, üzerine 10 mL MeOH eklenip ağız kapatıldı ve en az 5 dk iyice çalkalandı.



**Resim 11.** Haşhaş tohumu ezmesi ekstraksiyonu

4100 rpm de 5 dk. santrifüj edildikten sonra üst fazdan 2 ml alınıp cam tüpe konuldu. Azot atmosferi altında kuruluğa kadar uçuruldu. Örnek üzerine 5 mL su konulup ve vortekslendikten sonra UCT ZSDAU20 kartuş kullanılarak **Şekil 18**'de görsel olarak gösterilen katı faz ekstraksiyon işlemi yapıldı.



**Şekil 18.** Haşhaş tohumu ezmesi için kullanılan katı-faz ekstraksiyon yönteminin şematik gösterimi.

Elüsyon işlemi ile sonunda elde edilen elüent 40°C'de azot atmosferi altında kuruluğa kadar uçurulup üzerine 100 µl MeOH eklenip vortekslendikten sonra vialle alınarak GC/MS ile analiz edildi.

Bu işlem beyaz, sarı, siyah haşhaş tohumu ezmelerinin tümüne uygulandı.

### **3.4.3 İdrarda Morfin Analizi Ekstraksiyon Yöntemi**

2.0 mL idrar örneğine 100 ppb olacak şekilde morfin-d<sub>3</sub> standardı ekimi yapıldı. 1ml 1 M KOH ilave edilerek, 60°C'de 30 dk su banyosunda bekletilerek bazik hidroliz yapıldı. Hidroliz aşamasından sonra sıvı-sıvı ekstraksiyon yapmak için idrar örnekleri Toxi Tube A'ya aktarılıp 5 dk boyunca elde çalkalandı. 4100 rpm de 5 dk. santrifüj edildikten sonra üst fazdan 1 ml alınıp cam tüpe konuldu. 40°C'de azot atmosferi altında kuruluğa kadar uçuruldu. Örneği GC/MS'de analize hazırlamak için türevlendirici ajan olan 100 µL BSTFA % 1 TMCS konularak 80°C de 30 dk inkübe edildi. Türevlendirme aşamasından sonra 50 µL etilasetat eklenerek vortekslendikten sonra vialle alındı. 1 µL örnek GC/MS ile analiz edildi. Deneyin şematik gösterimi **Şekil 19'**da gösterilmektedir

2 mL idrar örneğine 100 µg/mL olacak şekilde morfin-d<sub>3</sub> standart ekimi yapıldı.



1mL 1 M KOH ilave edilerek 60°C 30 dk su banyosunda bekletildi.



Toxi Tüp A aktarıp 4100 rpm 5 dk santrifüj edildi



Toxi tüpün üst organik fazından 1 mL alınıp temiz cam tüpe aktarıldı ve azot atmosferi altında kuruyana kadar uçuruldu.



100 µL BSTFA %1 TMCS konulup 80°C 30 dk inkübe edildi.



50 µL etilasetat eklenerek vortekslendikten sonra viallere alındı.

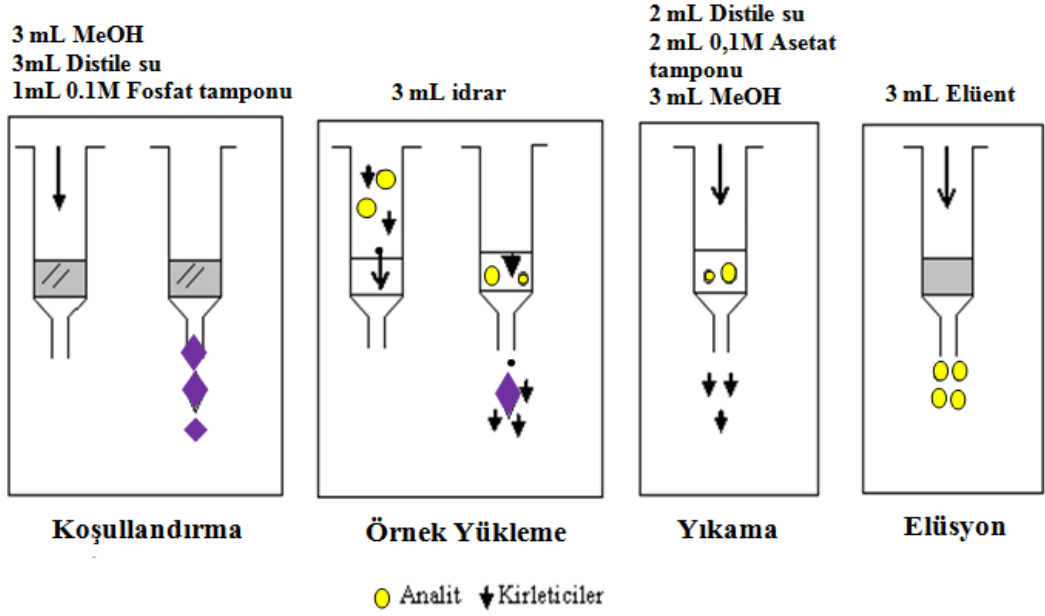


GC/MS

**Şekil 19.** İdrarda morfin analizi yöntem basamakları

#### 3.4.4 İdrarda Tebain Analizi Ekstraksiyon Yöntemi

3 mL idrar örneği cam tüpe alındı, santrifüj yapıldıktan sonra UCT ZSDAU20 kartuş kullanılarak **Şekil 20**'de görsel olarak gösterilen katı faz ekstraksiyon işlemi yapıldı.



**Şekil 20.** İdrarda tebain analizi için çalışmada kullanılan katı-faz ekstraksiyon yönteminin şematik gösterimi.

Elüsyon işlemi ile sonunda elde edilen elüent 40°C de azot atmosferi altında kuruluğa kadar uçuruldu üzerine 100 µl MeOH eklenip vortekslendikten sonra viale konularak GC/MS ile analiz edildi.

## 4 BULGULAR

### 4.1 İmmunoassay Verileri

İmmunoassay cihazı ile haşhaş tohumu tüketen gönüllülerin idrarlarında opiyat, idrar bütünlük, kreatinin ve 6-MAM parametrelerine bakıldı. İmmunoassayle bakılan parametrelerine ait veriler; beyaz haşhaş tohumu ezmesi tüketen gönüllü idrarları için **Tablo 6**'da, sarı haşhaş tohumu ezmesi tüketen gönüllü idrarları için **Tablo 7**'de, siyah haşhaş tohumu ezmesi tüketen gönüllü idrarları için **Tablo 8**'de bulunmaktadır.

**Tablo 6.** Beyaz haşhaş tohumu ezmesi tüketen gönüllülerin idrarlarının immunoassayde bakılan parametrelerinin sonuçları

G.N.	Bakılan Parametreler	Saatler							
		0	2	4	6	8	12	24	48
1	Opiat ng/mL	0	389	654	326	310	46	37	18
	İdrar Bütünlük %	88	90	90	89	89	85	85	8
	Kreatinin mg/dL	54	41.9	55	34.7	53.4	34.9	62.1	70.2
	Eroin ng/mL	0	0	0	0	0	0	0	0
2	Opiat ng/mL	0	1996	1837	1417	756	351	61	12
	İdrar Bütünlük %	95	98	98	96	94	86	86	86
	Kreatinin mg/dL	132.4	155	155	70.3	100.3	106.7	74	108.6
	Eroin ng/mL	0	0	0	0	0	0	0	0
3	Opiat ng/mL	78	Max	Max	474	662	636	466	26
	İdrar Bütünlük %	93	99	100	99	95	85	86	86
	Kreatinin mg/dL	202.8	155	155	28.2	64.1	92.5	221.7	251
	Eroin ng/mL	0	0	0	0	0	0	0	0
4	Opiat ng/mL	1	187	Max	686	625	908	189	65
	İdrar Bütünlük %	93	89	90	89	89	87	86	86
	Kreatinin mg/dL	204.8	21.6	155	25	36.1	92.7	107.8	129.1
	Eroin ng/mL	0	0	0	0	0	0	0	0
5	Opiat ng/mL	62	1342	Max	Max	-	-	-	-
	İdrar Bütünlük %	94	98	100	98	-	-	-	-
	Kreatinin mg/dL	210.7	40.2	155	155	-	-	-	-
	Eroin ng/mL	0	0	0	0	-	-	-	-
6	Opiat ng/mL	0	580	675	-	-	-	-	-
	İdrar Bütünlük %	89	97	99	-	-	-	-	-
	Kreatinin mg/dL	282.4	54.4	43.7	-	-	-	-	-
	Eroin ng/mL	0	0	0	-	-	-	-	-
7	Opiat ng/mL	5	1251	Max	1776	Max	773	137	11
	İdrar Bütünlük %	95	95	98	96	92	85	85	86
	Kreatinin mg/dL	178.4	66.4	155	59.3	158.5	134.1	114.7	97
	Eroin ng/mL	0	0	0	0	1	0	0	0
8	Opiat ng/mL	0	Max	Max	512	1041	638	0	0
	İdrar Bütünlük %	92	96	95	97	98	95	93	93
	Kreatinin mg/dL	194.6	43.5	155	43.2	60.6	112.3	155.8	228.7
	Eroin ng/mL	0	0	0	0	0	0	0	0
9	Opiat ng/mL	0	Max	Max	1520	187	1350	750	186
	İdrar Bütünlük %	95	100	99	101	98	101	95	103
	Kreatinin mg/dL	184.3	14.8	155	65.2	141.2	55.2	84.8	175.1
	Eroin ng/mL	0	0	0	0	0	0	0	0
10	Opiat ng/mL	0	Max	Max	Max	1297	548	0	10
	İdrar Bütünlük %	103	102	102	102	103	103	104	101
	Kreatinin mg/dL	16.3	36.5	155	155	51.5	37.4	0.2	30.0
	Eroin ng/mL	0	0	0	1	0	0	0	1

Opiyat için >2000 üzerindeki değerler=Max  
İdrar örneği mevcut değil= -

**Tablo 7.** Sarı haşhaş tohumu ezmesi tüketen gönüllülerin idrarlarının immunoassayde bakılan parametrelerinin sonuçları

G.N.	Bakılan Parametreler	Saatlar							
		0	2	4	6	8	12	24	48
1	Opiat ng/mL	0	604	1709	1585	980	525	106	11
	İdrar Bütünlük %	90	90	92	89	90	88	88	88
	Kreatinin mg/ dL	47.3	30.3	28.2	34.1	36.4	36.8	36.2	51.8
	Eroin ng/mL	0	0	0	0	0	0	0	0
2	Opiat ng/mL	0	1943	Max	1788	Max	740	323	70
	İdrar Bütünlük %	94	97	98	97	93	96	94	94
	Kreatinin mg/ dL	110.6	21	155	40.4	102.4	60.9	88.2	92
	Eroin ng/mL	0	0	1	0	1	0	0	0
3	Opiat ng/mL	27	Max	Max	1733	Max	Max	1091	13
	İdrar Bütünlük %	91	98	96	96	93	91	92	96
	Kreatinin mg/ dL	167.1	155	44.7	20.1	115.9	124.3	133.2	39.8
	Eroin ng/mL	0	0	0	0	0	0	0	0
4	Opiat ng/mL	26	Max	Max	Max	Max	Max	612	84
	İdrar Bütünlük %	93	97	97	95	96	91	93	96
	Kreatinin mg/ dL	100.5	155	21.2	38.8	35.7	107.4	79.8	63.8
	Eroin ng/mL	0	0	0	0	0	0	0	0
5	Opiat ng/mL	0	Max	Max	Max	Max	Max	1271	-
	İdrar Bütünlük %	91	96	98	97	94	91	90	-
	Kreatinin mg/ dL	180.9	27.3	155	24.7	120.2	127.9	192.5	-
	Eroin ng/mL	0	1	1	2	6	1	0	-
6	Opiat ng/mL	1	690	Max	Max	Max	Max	758	66
	İdrar Bütünlük %	92	96	95	93	91	94	93	94
	Kreatinin mg/ dL	118.9	32.5	110	92,4	135	106.6	123.1	113.9
	Eroin ng/mL	0	0	2	3	4	3	1	0
7	Opiat ng/mL	0	Max	Max	Max	Max	Max	1297	128
	İdrar Bütünlük %	92	96	98	96	95	93	93	89
	Kreatinin mg/ dL	194.6	43.5	155	43.2	60.6	112.3	155.8	228.7
	Eroin ng/mL	0	0	0	2	1	2	1	0
8	Opiat ng/mL	14	Max	Max	Max	1979	Max	1627	31
	İdrar Bütünlük %	95	98	98	97	96	98	94	96
	Kreatinin mg/ dL	59.8	155	155	26.5	38.3	155	143.1	26.9
	Eroin ng/mL	0	0	0	1	2	0	1	0
9	Opiat ng/mL	0	Max	Max	Max	Max	Max	994	112
	İdrar Bütünlük %	96	95	97	98	95	93	93	92
	Kreatinin mg/ dL	43.8	155	155	155	44.6	104.9	97	114.2
	Eroin ng/mL	0	1	1	1	1	0	0	0
10	Opiat ng/mL	21	Max	Max	Max	Max	1190	44	0
	İdrar Bütünlük %	97	99	98	98	96	96	98	99
	Kreatinin mg/ dL	155	155	155	155	155	60.7	21.1	155
	Eroin ng/mL	0	0	1	0	0	1	0	0

Opiyat için >2000 üzerindeki değerler=Max

İdrar örneği mevcut değil= -

**Tablo 8.** Siyah haşaş tohumu ezmesi tüketen gönüllülerin idrarlarının immunoassayde bakılan parametrelerinin sonuçları

G.N.	Bakılan Parametreler	Saatler							
		0	2	4	6	8	12	24	48
1	Opiat ng/mL	16	1213	1710	1118	355	112	97	85
	İdrar Bütünlük %	90	91	94	95	95	93	93	91
	Kreatinin ng/mL	36.2	34.6	32.1	38.4	58.4	38.2	39.5	320.2
	Eroin ng/mL	0	0	0	0	0	0	0	0
2	Opiat ng/mL	4	464	Max	Max	1935	1810	207	302
	İdrar Bütünlük %	95	99	102	100	100	98	99	100
	Kreatinin ng/mL	132.4	28.3	40.6	68.3	68.6	132.3	120.5	118.7
	Eroin ng/mL	0	0	0	0	0	0	0	0
3	Opiat ng/mL	0	Max	Max	Max	Max	458	286	55
	İdrar Bütünlük %	93	99	103	99	98	100	100	95
	Kreatinin ng/mL	184.3	155	155	65.2	141.2	55.2	84.8	175.1
	Eroin ng/mL	0	0	0	0	0	0	0	0
4	Opiat ng/mL	0	753	1899	Max	Max	1678	163	250
	İdrar Bütünlük %	95	97	103	102	98	99	100	96
	Kreatinin ng/mL	86.9	30	24.6	38.1	84.1	66.4	85.9	182.3
	Eroin ng/mL	0	0	0	0	0	0	0	0
5	Opiat ng/mL	0	Max	1866	Max	776	1781	395	-
	İdrar Bütünlük %	95	99	102	100	102	97	97	-
	Kreatinin ng/mL	207	51.3	21.7	81.3	46.3	151.8	161.3	-
	Eroin ng/mL	0	0	0	0	0	0	0	-
6	Opiat ng/mL	9	871	Max	-	1822	-	788	237
	İdrar Bütünlük %	96	100	103	-	101	-	96	96
	Kreatinin ng/mL	123.6	29.5	155	-	47	-	148.4	171.6
	Eroin ng/mL	0	0	0	-	0	-	0	0
7	Opiat ng/mL	0	Max	Max	1734	Max	1450	307	163
	İdrar Bütünlük %	95	97	102	103	100	96	98	97
	Kreatinin ng/mL	238.2	84.7	155	35	106.2	182.1	122.8	94.5
	Eroin ng/mL	0	0	0	0	0	0	0	0
8	Opiat ng/mL	0	Max	Max	Max	Max	603,4	542	12
	İdrar Bütünlük %	95	100	99	101	98	101	95	103
	Kreatinin ng/mL	164.6	155	43.7	155	66.3	155	121.5	23.2
	Eroin ng/mL	0	0	0	0	0	0	0	0
9	Opiat ng/mL	0	Max	Max	1931	756	1912	442	14
	İdrar Bütünlük %	98	101	99	100	102	95	103	102
	Kreatinin ng/mL	64.1	155	35.3	37.7	29.4	129.5	155	30.7
	Eroin ng/mL	0	0	0	0	0	0	0	0
10	Opiat ng/mL	54.38	Max	Max	Max	1636	576	195	5
	İdrar Bütünlük %	100	101	103	101	100	102	101	103
	Kreatinin ng/mL	155	155	155	155	51.7	35.3	69.7	22.9
	Eroin ng/mL	0	0	0	0	0	0	0	0

Opiyat için >2000 üzerindeki değerler=Max  
İdrar örneği mevcut değil= -



## 4.2 GC/MS Verileri

### 4.2.1 Validasyon Bulguları

#### 4.2.1.1 Doğrusallık (Linearite)

Bir analitik yöntemin doğrusallığı test sonuçlarından doğrudan elde edilerek ya da çok iyi tanımlanmış matematiksel derişimleri belli, belirli bir sırada verilen örnekler içinde analitin değişik konsantrasyondaki örneklerinden elde edilir (77). Doğrusallık %80-%120 oranındaki konsantrasyon uzunluğuna sahip beş ya da beşten fazla standarttan en az 3 tekrar çalışılmasıyla elde edilir. Veriler grafiğe geçirilerek, lineer regrasyon (alan) analizi yapılır ve korelasyon katsayısı ( $R^2$ ) hesaplanır. Korelasyon katsayısı 1'e yakın olmalıdır.

Morfin için 25, 50, 100, 250, 500, 1000 ve 2000  $\mu\text{g/L}$  derişimde olacak şekilde 7 farklı derişimde ( $n=3$ ) standart çözeltilerin üzerine 100  $\mu\text{g/L}$  morfin- $d_3$  iç standardı eklenerek metanol içerisinde çözeltiler hazırlandı, çözeltiler azot atmosferi altında uçuruldu, 100  $\mu\text{g/L}$  BSTFA %1 TMCS ile türevlendirme işlemi yapıldı, 80°C'de 30 dk inkübe edildikten sonra 50  $\mu\text{L}$  etil asetat eklenerek viale alınıp GC/MS cihazı ile analiz edildi.

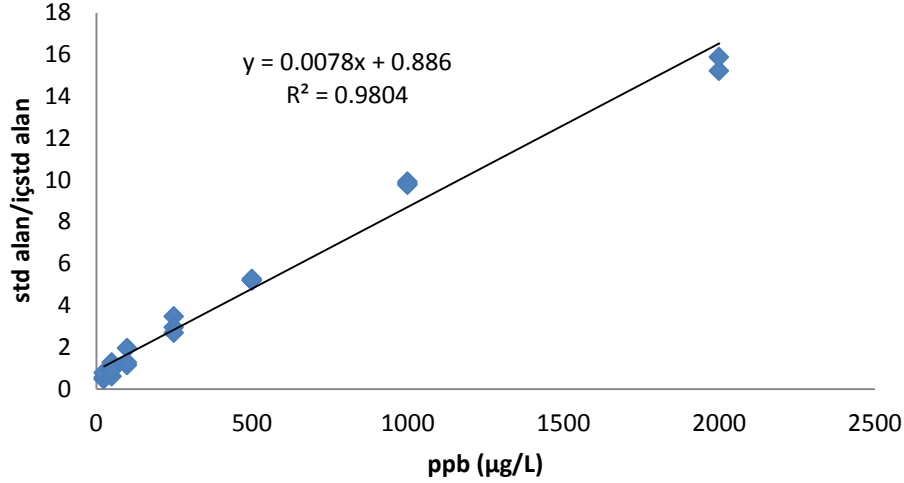
Morfin standardı ve morfin  $d_3$  iç standardı için elde edilen kromatogramlardan yola çıkılarak elde edilen alıkönma süresi ( $R_t$ ) ve pik alanı verisi yardımıyla çizilen kalibrasyon eğrisi kullanılarak, analizi yapılan örneklerdeki morfin miktarı hesaplandı.

Derişimlere karşılık gelen standart (std) alan ve iç standart (içstd) alan değerleri ile standart alan/iç standart alan oranı **Tablo 9**'da gösterilmektedir.

**Tablo 9.** Kalibrasyon eğrisi için gerekli değerler

Derişim $\mu\text{g/L}$	Std alan	İçstd alan	Std alan/İçstd alan
25	412	880	0.468182
25	539	995	0.541709
25	748	972	0.769547
50	515	856	0.601636
50	1275	1009	1.263627
50	934	1054	0.886148
100	1121	991	1.131181
100	1695	869	1.950518
100	1056	833	1.267707
250	2588	745	3.473826
250	4046	1372	2.94898
250	2299	854	2.692037
500	5570	1074	5.18622
500	5742	1105	5.19638
500	5795	1103	5.253853
1000	17949	1828	9.818928
1000	17014	1717	9.909144
1000	13483	1382	9.756151
2000	32961	2167	15.21043
2000	28021	1765	15.87592

Derişimlere denk gelen standart respons/iç standart respons değerleri ile kalibrasyon eğrisi çizildi.



**Grafik 2.** Morfine ait kalibrasyon grafiği

#### 4.2.1.2 Belirtme Alt Limiti (Limit of Detection, LOD)

Örnekte ölçülebilen fakat kesin olarak miktarı belirlenemeyen en düşük miktardır. Kromatografik yöntemlerde azalan konsantrasyonda örnek hazırlanarak elde edilen kromatogramdan pik yüksekliği ve gürültü ölçülerek S/N oranı hesaplanabilir (78). Yöntemin belirtme alt limiti, köre ait sinyallerin yüksekliklerinin 3 katının, ekim yapılmış en küçük derişim olan 50 µg/L örneğin sinyalinin yüksekliği ile karşılaştırıldı ve  $LOD = \frac{Std_c \cdot 3 \cdot B_h}{Std_h}$  formülü kullanılarak hesaplandı.

#### 4.2.1.3 Tayin Alt Limiti (Limit of Quantitation, LOQ)

Analitik bir yöntemle analitin, uygun doğruluk ve kesinlikle tayin edilebilecek en düşük derişimidir. LOD değerinde olduğu gibi LOQ da derişim cinsinden ifade edilir ve S/N oranından faydalanılır (79). Analitin bilinen miktarlarla azaltılmasıyla hazırlanan örnekler ölçülür ve kabul edilebilir kesinlik ve doğruluğa sahip en düşük miktar tespit edilir. Yöntemin belirtme alt sınırı, köre ait sinyallerin yüksekliklerinin 10 katının, ekim yapılmış en küçük derişim olan 50 µg/L örneğin sinyalinin yüksekliği ile karşılaştırıldı ve  $LOQ = \frac{Std_c \cdot 10 \cdot B_h}{Std_h}$  formülü kullanılarak hesaplandı.

(Kör Sinyal Gürültü Yüksekliği ( $B_h$ ), en düşük derişimdeki standardın sinyal yüksekliği ( $Std_h$ ), Standardın derişimi ( $Std_c$ )).

**Tablo 10.** İdrarda morfin'e ait LOQ, LOD değerleri.

<b>S/N</b>	49
<b>Standardın derişimi (Std.)</b>	50 µg/L
<b>LOD</b>	3 µg/L
<b>LOQ</b>	10 µg/L

#### **4.2.1.4 Duyarlılık**

Duyarlılık; test işleminin konsantrasyonundaki küçük değişimleri kaydetme kapasitesidir. Kalibrasyon eğrisinin eğimidir (77). Ön çalışmalardan elde edilen verilerden faydalanarak, çalışılacak derişimler belirlendi. 100 µg/L derişimde 3'er kez enjeksiyon yapıldı. Morfin için kalibrasyon grafiğindeki denkleme bakıldığında  $y = 0.0078x + 0.886$ , buradaki kalibrasyon eğrisinin eğimi  $m = 0.0078$  'dir.

#### **4.2.1.5 Geri Kazanım**

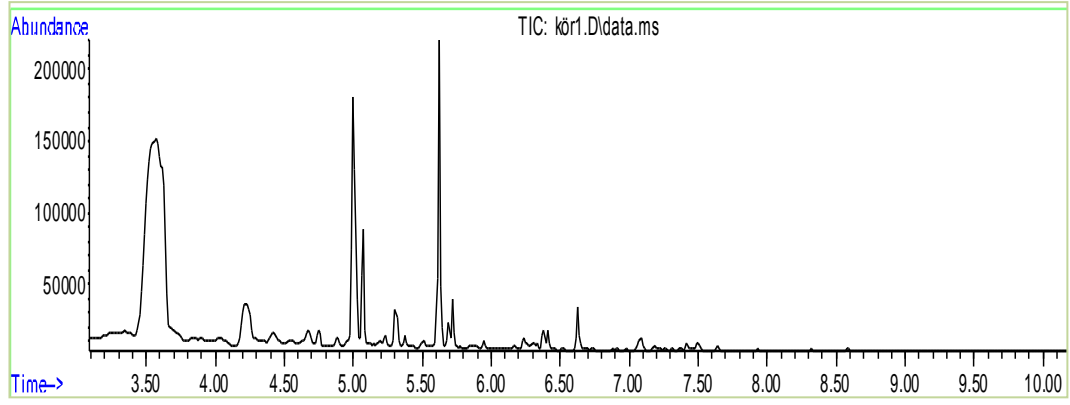
Bir matris içindeki bir analitin geri kazanımı, saf standardın gerçek konstrasyonu ile matrise eklenmiş ve ekstrakte edilmiş olan analit miktarının ölçüm sonucunun karşılaştırılmasıdır. Geri kazanım, ekstraksiyon verimliliğidir. Denemeler sonucu elde edilen veriler iç standart sonuçları kullanılarak hesaplanmıştır.

**Tablo 11.** İdrar havuzuna ekim yapılmış morfine ait farklı derişimlerde yapılan geri kazanım verileri

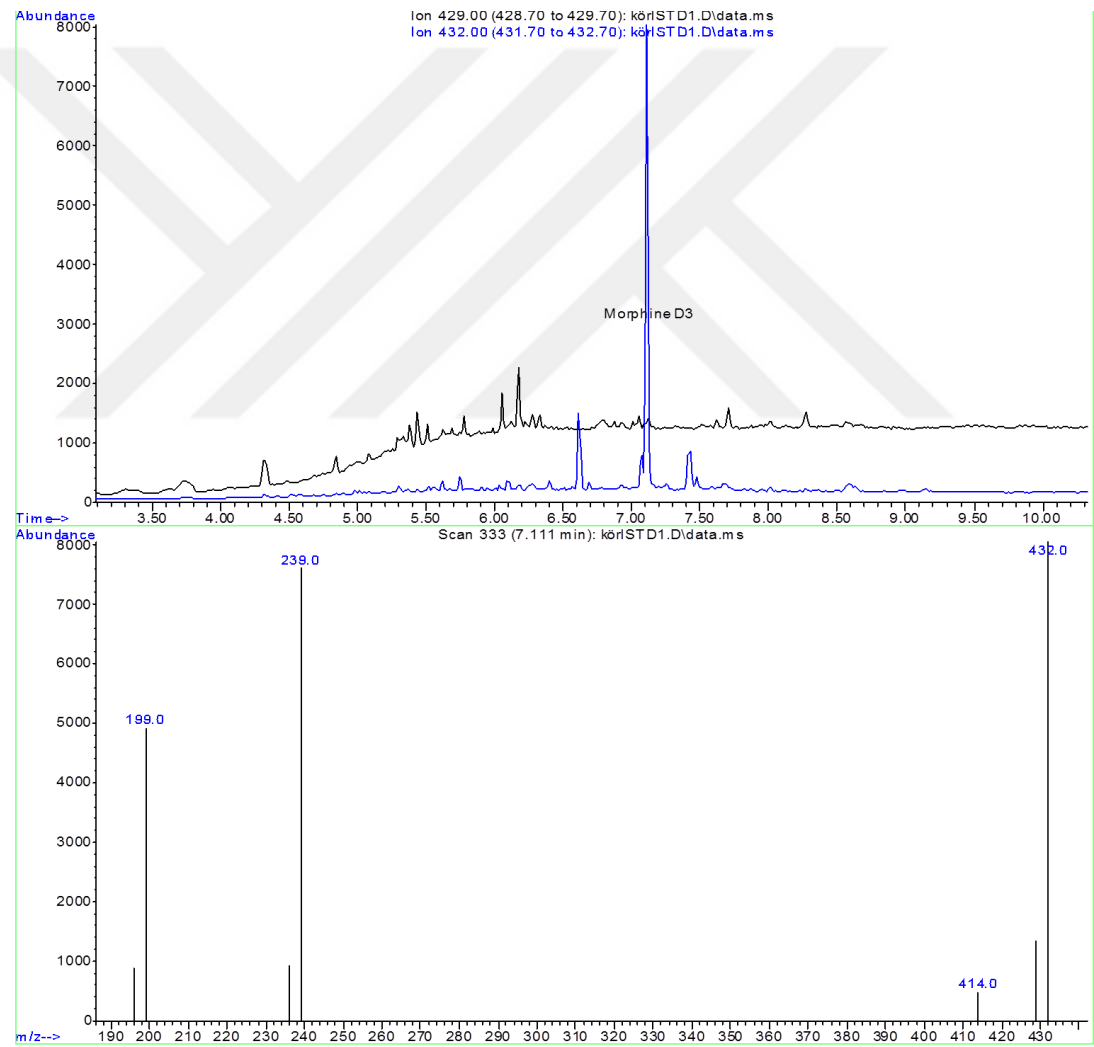
Derişim	50 µg/L		100 µg/L		250 µg/L		500 µg/L	
	Bulunan Değer (µg/L)	% G.K.	Bulunan Değer (µg/L)	% G.K.	Bulunan Değer (µg/L)	% G.K.	Bulunan Değer (µg/L)	% G.K.
1. Paralel Ekstraksiyon	54.86	109.72	101.45	101.45	250.78	100.31	484.08	96.82
2. Paralel Ekstraksiyon	54.94	109.88	102.98	102.82	256.88	102.75	490.20	98.04
3. Paralel Ekstraksiyon	56.33	112.66	104.82	104.82	263.97	105.59	491.66	98.33
<b>Ortalama</b>	55.38	110.75	103.08	103.03	257.21	102.88	488.65	97.73
<b>Std. Sapma (SD)</b>	0.83	1.65	1.69	1.69	6.60	2.64	4.02	0.80
<b>% RSD</b>	1.49	1.49	1.64	1.64	2.57	2.57	0.82	0.82

#### 4.2.1.6 Seçimlilik

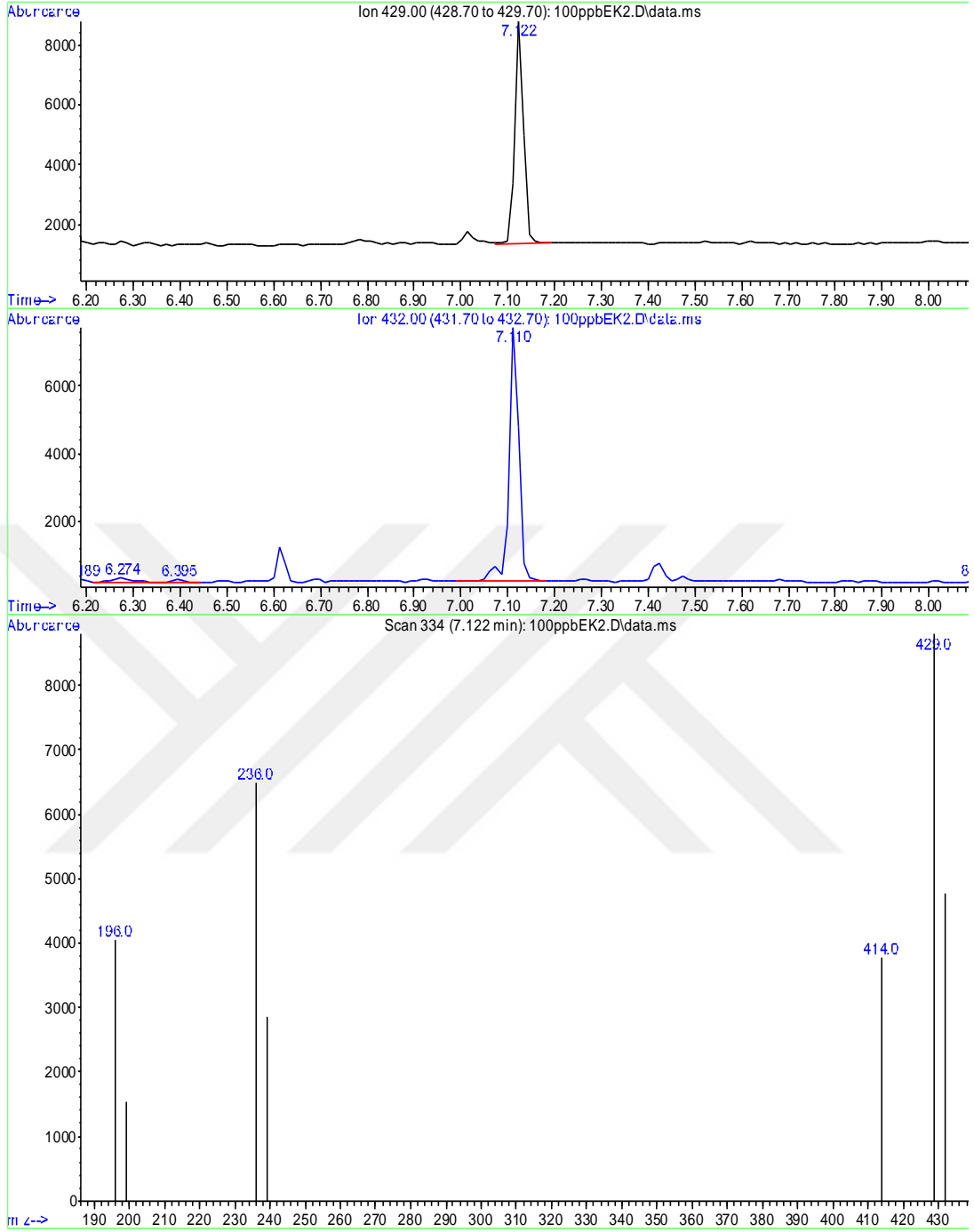
Yöntemin seçimliliği; analiti örnekte varlığı tespit edilmiş analit ile girişim yapabilen diğer bileşenlerden farklı olarak ölçme yeteneğidir (75). Örnek matrisinde bulunması gereken bileşenlerin yanında analiz edilecek maddelerin doğru ve özgün belirlenebilmesi, analitik yöntemlerin seçimliliğini belirler. İlgili standart yöntem, gaz kromatografik bir analiz yöntemidir. Şekil 21'den Şekil 23'e görüldüğü üzere seçimli ve seçici bir analiz yapılabilmektedir.



Şekil 21. İdrar havuzuna (kör) ait kromatogram.



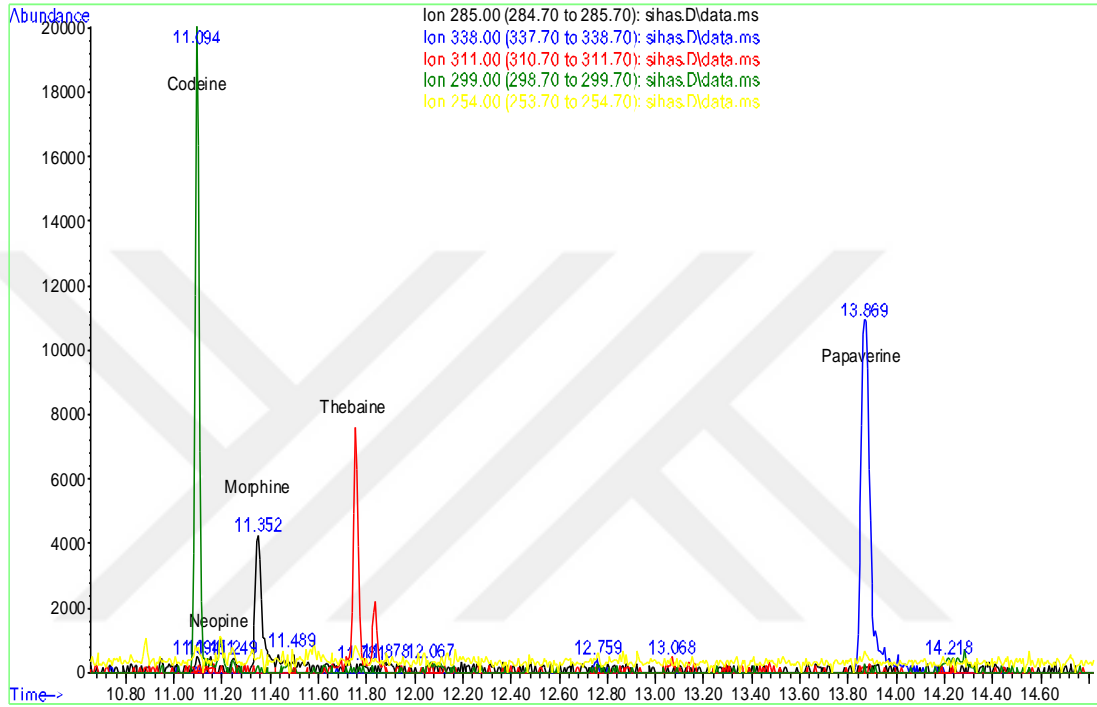
Şekil 22. İdrar havuzuna (kör) 100µg/L olacak şekilde morfin d<sub>3</sub> iç standardı eklenmesine ait kromatogram ve spektrum



**Şekil 23.** İdrar havuzuna 100 µg/L olacak şekilde morfin standardı ve morfin-d<sub>3</sub> iç standardı eklenmesine ait kromatogram ve spektrum..

#### 4.2.2 Haşhaş Tohumu Ezmesi Verileri

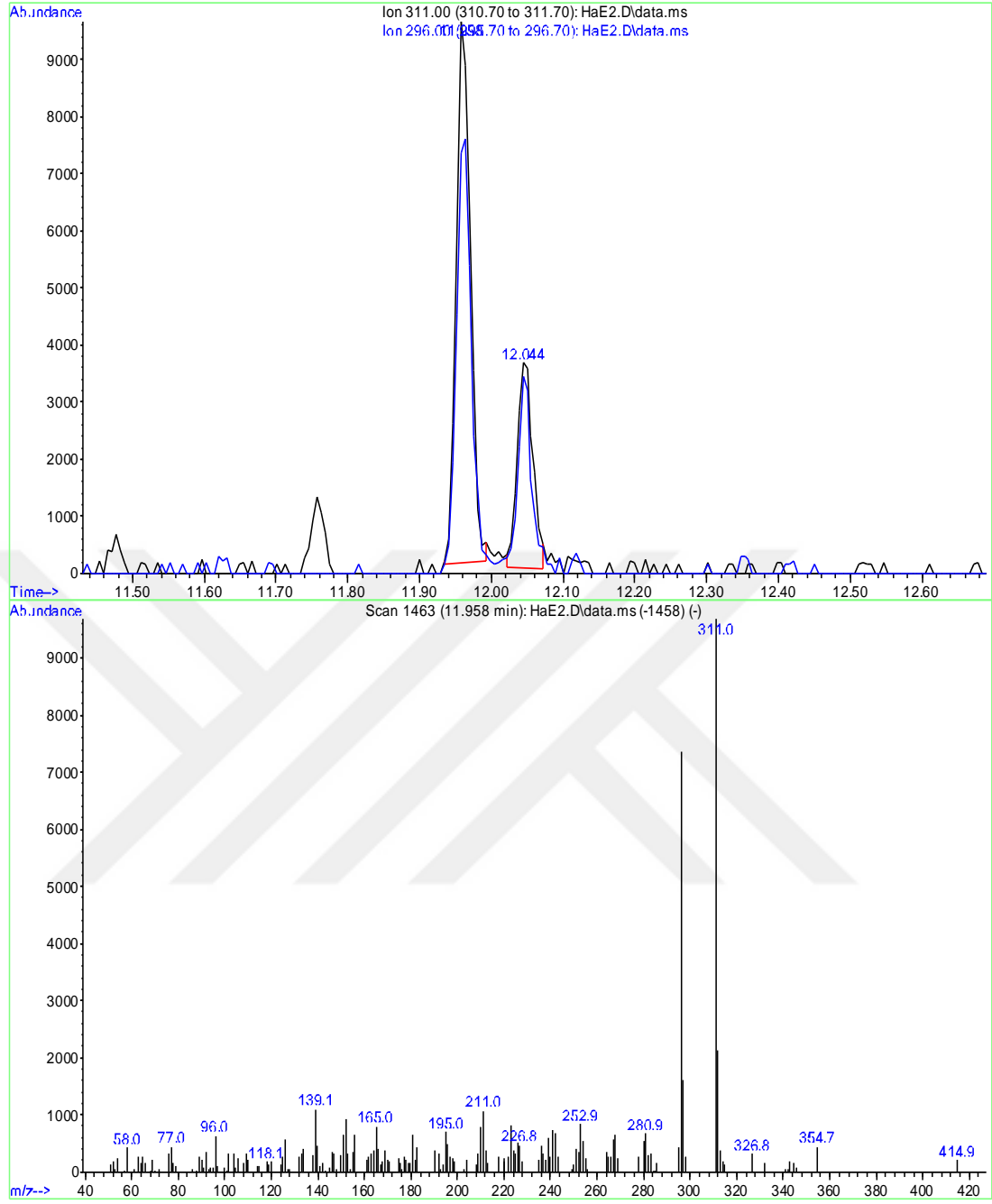
Beyaz, sarı, siyah haşhaş tohumu ezmelerinin içerisinde morfin, kodein, tebain, papaverin alkaloidleri bulundu. **Şekil 24**'te siyah haşhaş tohumu ezmesinin içerisindeki alkaloid verilerini göstermektedir.



**Şekil 24.** Siyah haşhaş tohumu ezmesine ait kromatogram

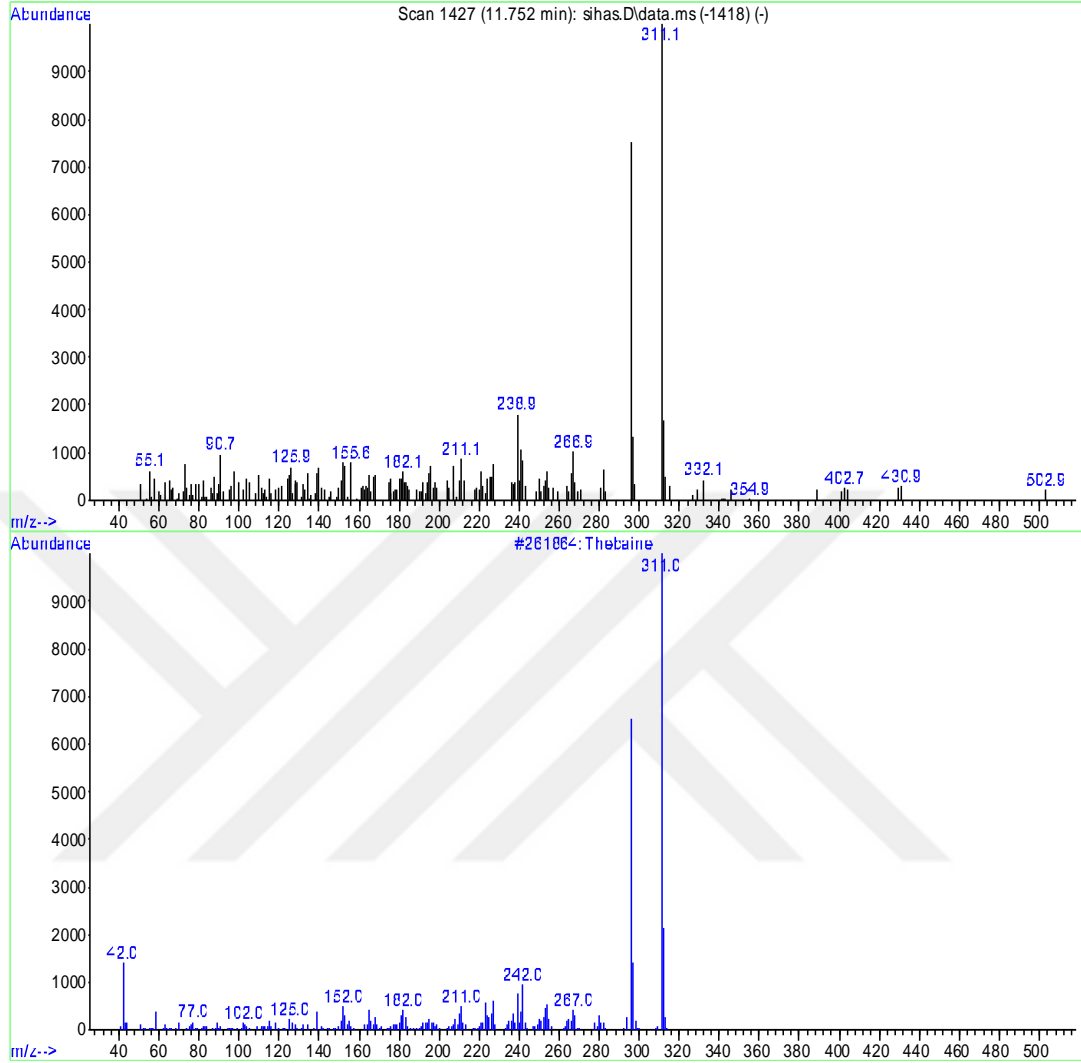
Haşhaş tohumu ezmesi scan moda çalışılarak Wiley kütüphanesinde tarama yapıldı. Haşhaş tohumu verimi için bazı denemeler yapıldı. Bu denemeler sonucunda elde edilmiş yüzdesinin bakımından en yüksekini elde ettiğimiz tebain pikinin kromatogram ve spektrumu **Şekil 25** ve **Şekil 26**'da verilmiştir.





Şekil 25. Haşhaş tohumu ezmesi içindeki tebainin kromatogramı ve spektrumu

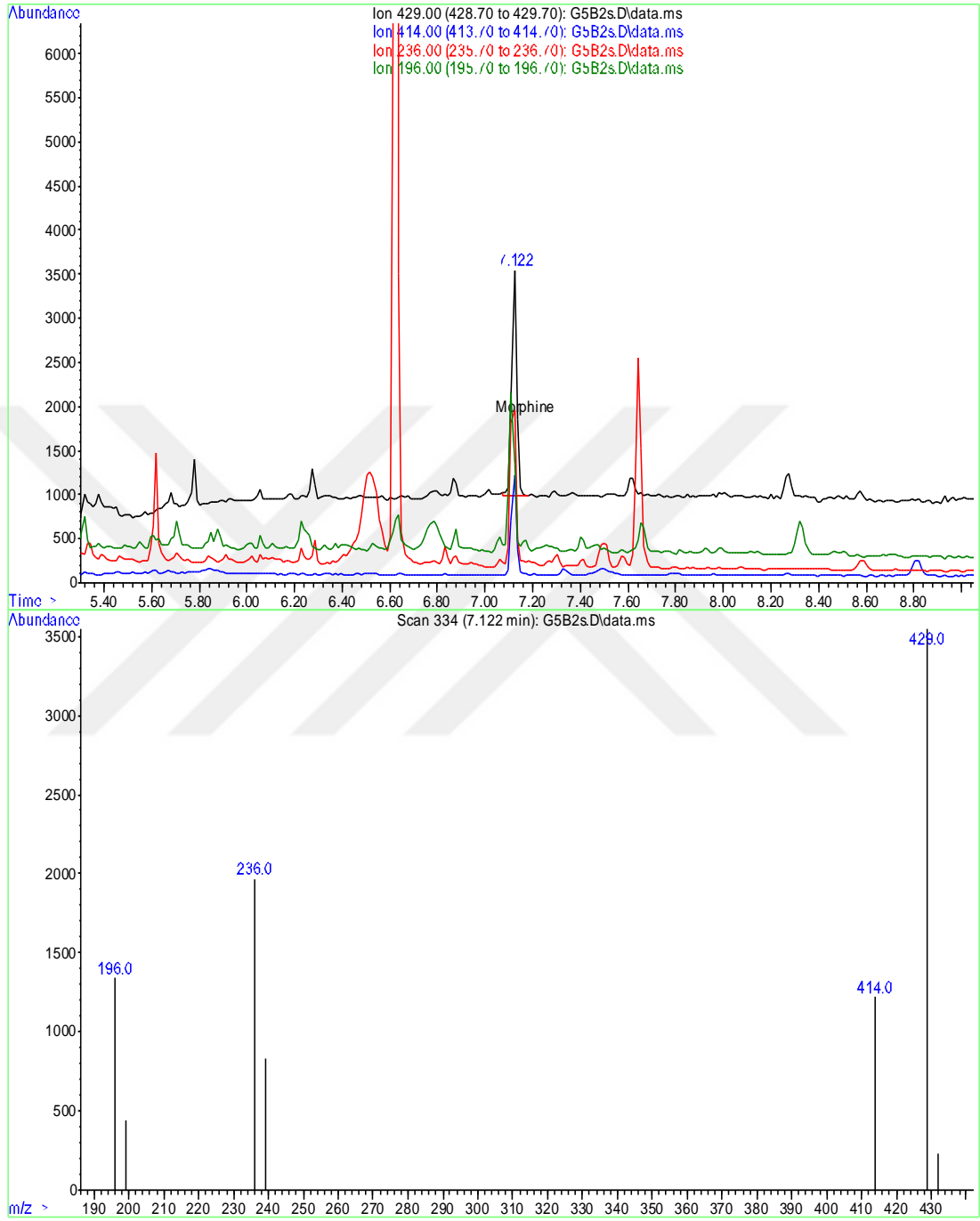
Library Searched : C:\Database\wiley7n.1  
Quality : 96  
ID : Thebaine



**Şekil 26.** Haşhaş tohumu ezmesinin scan moda saptanan tebain pikinin elde edilmiş verimi

#### 4.2.3 GC/MS ile Gönüllü İdrarlarındaki Morfin Analiz Verileri

Farklı renk haşhaş tohumu ezmesi tüketen gönüllülerin idrarlarında morfin için sıvı sıvı ekstraksiyon yöntemi sonrasında GC/MS kullanılarak elde edilen morfinin kromatogramı ve spektrumu **Şekil 27**'de gösterilmektedir. GC/MS de saptanan morfin verileri; beyaz haşhaş tohumu için **Tablo 12**'de, sarı haşhaş tohumu için **Tablo 13**'de, siyah haşhaş tohumu için **Tablo14**'te gösterilmektedir.



Şekil 27. Haşhaş tohumu ezmesi tüketen kişi idrarında morfin kromatogramı

**Tablo 12.** Beyaz haşhaş tohumu ezmesi tüketen gönüllülerin idrarındaki GC/MS ile saptanan morfin verileri ( $\mu\text{g/L}$ )

G.N.	Saatler							
	0	2	4	6	8	12	24	48
G1	<LOD	60.28	31.13	11.97	10.91	5.87	5.92	3.91
G2	<LOD	37.64	10.73	20.91	14.65	9.91	6.68	<LOD
G3	<LOD	42.18	17.04	23.66	11.34	14.95	15.09	10.12
G4	<LOD	28.1	10.27	19.4	11.78	15.29	8.15	4.45
G5	<LOD	42.45	13.36	10.57	-	-	-	-
G6	4.56	42.36	17.77	-	-	-	-	-
G7	<LOD	57.27	19.39	38.08	53.08	17.87	11.4	3.08
G8	<LOD	61.5	28.27	24.79	29.42	25.72	23.69	19.84
G9	4.24	56.04	31.26	21.26	26.07	21.94	16.21	12.29
G10	<LOD	68.34	32.96	20.58	28.19	20.34	16.73	13.03

İdrar örneği mevcut değil= -

**Tablo 13.** Sarı haşhaş tohumu ezmesi tüketen kişileri idrarındaki GC/MS ile saptanan morfin verileri ( $\mu\text{g/L}$ )

G.N.	Saatler							
	0	2	54	6	8	12	24	48
G1	<LOD	39.02	61.5	45.7	31.55	17.46	10.08	3.72
G2	6.78	68.56	32.75	41.45	45.7	22.44	16.15	6.37
G3	3.16	20.28	64.17	17.5	45.36	31.51	16.09	<LOD
G4	<LOD	34.89	58.27	64.95	35.72	47.69	10.97	3.86
G5	<LOD	118.18	57.7	28.95	166.65	60.66	31.25	-
G6	<LOD	86.37	109.88	83.53	96.51	62.26	24.69	6.46
G7	9.53	152,77	32.97	62.73	57.73	78.58	41.59	13.18
G8	<LOD	49.86	15.54	50.03	36.65	11.24	54.17	7.08
G9	<LOD	26.08	16.11	16.57	24.84	28.76	19.57	6.74
G10	<LOD	21.17	26.89	11.08	6.02	59.08	3.53	4.9

İdrar örneği mevcut değil= -

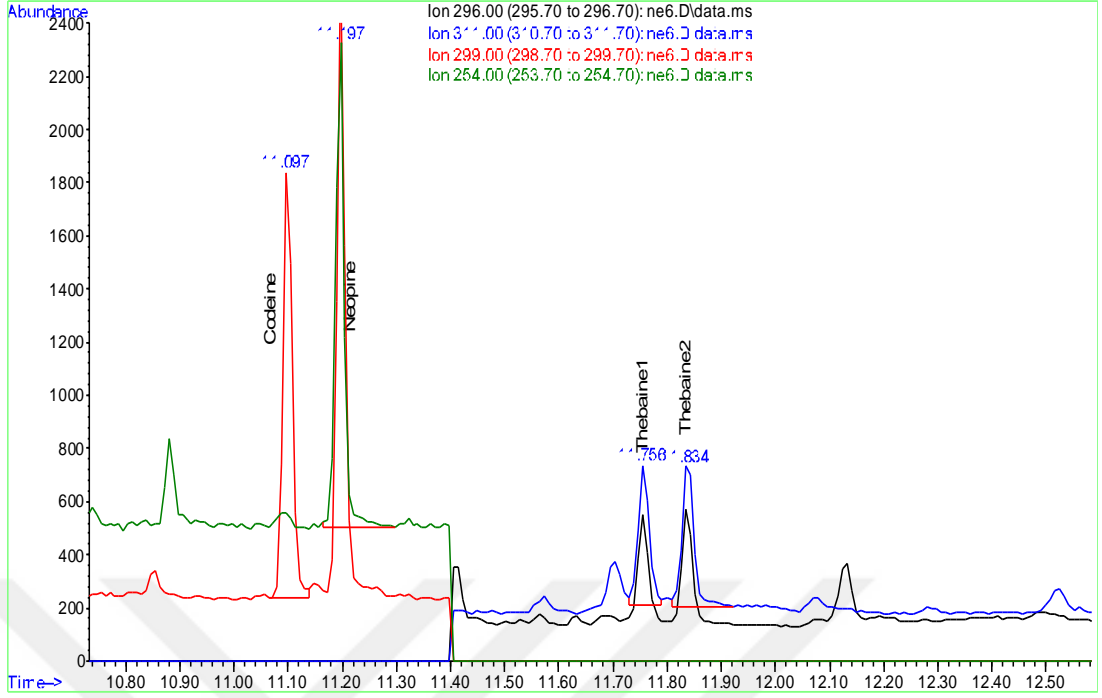
**Tablo 14.** Siyah haşhaş tohumu ezmesi tüketen kişileri idrarındaki GC/MS ile saptanan morfin verileri ( $\mu\text{g/L}$ )

G.N.	Saatler							
	0	2	4	6	8	12	24	48
G1	<LOD	44.56	41.7	23.41	27.64	24.32	31.84	<LOD
G2	3.89	31.2	52.83	79.71	40.49	34.91	15.7	<LOD
G3	3.9	18.51	23.78	27.03	28.89	12.19	15.82	3.93
G4	5.13	31.82	27.92	39.32	32.98	21.64	16.99	49.20
G5	<LOD	83	48.23	62.99	17.97	33.62	12.54	-
G6	6.1	42.23	29.51	-	35.46	-	19.9	17.1
G7	7.25	99.09	30.92	53.42	33.11	35.22	33.23	20.51
G8	<LOD	15.41	60.36	20.62	42.19	15.26	22.21	22.37
G9	<LOD	13.24	21.45	11.15	15.12	22.19	15.58	5.9
G10	3.15	15.05	13.74	14.81	31.14	24.13	<LOD	3.95

İdrar örneği mevcut değil= -

#### 4.2.4 GC/MS ile Gönüllü İdrarlarındaki Tebain Analizi Verileri

Tebain standardı olmadığı için gönüllü idrarları SİM modda Wiley kütüphane taraması sonucunda tebain pikine rastlanmıştır. 11.75-11.83 alıkonma zamanlarına sahip, ikili pik şeklinde tespit edildi.



**Şekil 28.** Haşhaş tohumu ezmesi tüketmiş kişinin idrarında GC/MS ile saptanan tebain, kodein ve neopin piklerinin kromatogramı

## 5 TARTIŞMA

Ülkemizin milli servet kaynağı olan haşhaş, kapsüllerinden alkaloidleri elde edilerek türevleri hazırlanmakta ve ilaç endüstrisinin kullanımına sunulmaktadır. Haşhaş bitkisinin tohumları yasal olarak satılmakta ve yaygın şekilde gıda amaçlı tüketilmektedir. Buradan yola çıkarak haşhaş tohumu ile yapılan gıda ürünlerinin tüketimi sonrasında yasadışı madde saptanmasına yönelik yapılan adli toksikolojik test analizlerinde morfinin eşik değerin üzerinde olup olmayacağı eğer var ise hangi düzeyde etkileşim etkisi, araştırılmak istenmiştir.

Haşhaş tohumu ezmeleri Afyon ilinin Sandıklı ilçesinde bulunan çarşı içerisinde satılan bir dükkandan alındı. Haşhaş tohumunun ezme olarak seçilmesinin nedeni özellikle Afyon gibi üretimini olduğu yerlerde sıklıkla kahvaltılarda tüketildiği gibi börek içlerine de katılıp yenilmesidir.

Yapılan literatür taramasında, değişik oranlarda çalışmalar yapıldığı görülmüş (80,86) ve ülkemizde de çok tüketildiği için ortalama bir değer olarak 100g haşhaş tohumu ezmesi tüketimine karar verildi.

Casella ve ark (84) yaptıkları haşhaş tohumu ekstraksiyon modeli yöntemi kullanılarak yapılan analizde alkaloidler tarafımızdan saptanamadı. Fakat yöntemde modifikasyon ile alkaloidlerin varlığı tespit edildi. Bu prosedür üç renk haşhaş tohumu ezmelerine uygulandığında, kodein, morfin, tebain ve papaverinin varlığı tüm ezmelerde saptandı. Haşhaş tohumunun alkaloid konsantrasyonundaki değişiklikler iklim, toprak, kompozisyon, tohum kalitesi, hasat yılı ve ekili haşhaşın çeşitliliği nedeniyle ortaya çıkabilmektedir. Pişmiş, elenmiş ve muamele edilmiş (gıda için yıkama, ıslatma, öğütme ve fırınlama) tohum numunelerine yapılan işlemlerin madde konsantrasyonunu azaltmasının yanı sıra alkaloid konsantrasyonlarındaki ( $\leq$ %80-90) belirgin azalmalar yapılan çalışmalarla belgelenmiştir (43,85-87). Çalışmamızda aynı işlemde geçmiş, hazır olarak alınan beyaz, sarı, siyah, haşhaş tohumu ezmelerin içinde tespit edilen alkaloid konsantrasyonları aralarında çok az fark vardır ve yüzde büyüklük sıralaması siyah, sarı ve beyaz şeklindedir.

10 gönüllümüzün ( 8 Kadın, 2 Erkek) ikisi araştırmacı bilgisi dâhilinde özel sebeplerden dolayı belli saatlerdeki idrarlarını veremedi ve toplamda 227 idrar örneği toplandı.

İdrar örneklerinde kreatin normalizasyonu yapılmadan önceki sonuçlarımız; beyaz haşhaş tohumu ezmesinde alımında %45.1 (n=32/77), sarı haşhaş tohumu ezmesinde alımında %54.4 (n=43/79), siyah haşhaş tohumu ezmesinde alımında %53.3 (n=41/77); kreatin normalizasyonu yapıldıktan sonraki sonuçlarımız; sırasıyla, beyaz haşhaş tohumu ezmesinde alımında %62 (n=44/71), sarı haşhaş tohumu ezmesinde alımında %73.4 (n=58/79), siyah haşhaş tohumu ezmesinde alımında %68.8 (n=53/77) bulunmuştur. Bu da gösteriyor ki kreatinin normalizasyonu yapıldıktan sonra eşik değerinin üzerinde kalan sayısında artış olduğunu göstermiştir.

Haşhaş tohumu ezmelerinin tüketiminden sonra morfin içeren idrar örneklerinin GC/MS doğrulaması ile immunoassayin performans özellikleri aşağıdaki Tablo 15’de gösterilmektedir

**Tablo 15.** İmmunoassayin performans özellikleri

	Beyaz	Sarı	Siyah
Yanlış Negatif	8	2	9
Yanlış Pozitif	0	1	1
Doğru Negatif	17	19	15
Doğru Pozitif	43	57	52

Çalışmamızda GC/MS’le analiz edilen idrardaki morfin konsantrasyonu (10.08-166.65 µg/L) arasında değişti. Sonuçlarımız daha önceki çalışmalarda yayınlanan morfin konsantrasyonu (4.1-302.1 µg/L) aralığındadır (86). Ayrıca idrar örnekleride morfinin 48 saate kadar saptanması, önceden yayınlanmış haşhaş tohumu atılımı çalışmalarında sunulan sonuçlara karşılık gelir (80,83,88).

İmmunoassayde opiyat sonuçlarımızın çok yüksek bulmamızın nedeni cihazın 6-MAM hariç mevcut bütün morfin ve türevlerinin, seçiciliğini benzer ve hepsini birleştirerek veriyor olmasıdır. Tanımlayıcı enzimler geniş bir opiyat (morfin ve türevleri) yelpazesıyla reaksiyona girer. Bu yüzden immunoassayden sonra örneğin doğrulanması yapıldığında morfin değerini daha düşük verebilir. Ayrıca bunu gözlemlemek için 2 mL idrar havuzuna 50 µg/L olacak şekilde morfin standardı ektiğimizde immunoassayde opiyat sonucunun 50 µg/L gördük.

Bu veriler ışığında haşhaş tohumu ezmesi tüketimiyle morfin idrarda çoğunlukla pozitif sonuç vermektedir. İdrar örneğindeki morfinin varlığının yorumlanması bazı durumlarda bir sorun teşkil eder çünkü idrar örneğinde bulunan morfin farklı kaynaklardan da gelebilir. Bu kaynaklar; illegal olarak tüketilen çiğ afyon, reçeteli farmasötik afyon, yasadışı eroïn, farmasötik morfin, farmasötik kodein, ve haşhaş tohumu sayılabilir (89). İdrar numunesinde ek olarak bulunan diğer alkaloidlerin varlığı morfinin varlığının yorumlamada önemli bir yardımcıdır.



Haşhaş tohumu tüketimi sonrasında alınan idrarların GC/MS ile analizi sonucu, morfin, tebain, kodein ve neopin elde edildi.

Morfin, kodein, tebain, neopin, papaverin (haşhaş tohumunda) alkaloidlerinin her birinin kimliğini seçici iyon izleme (SİM) kullanılarak belirlenmiştir.

Buradan yola çıkarak yaptığımız araştırmalarda tebainin haşhaş tohumu alımından yararlı bir belirteç olarak önerilmiştir (84,86,90). Çalışmamızda sıvı sıvı ekstraksiyon yöntemi ile GC/MS morfin analizini sonuçları içerisinde yapılan Wiley kütüphane taramasında tebain saptanmadı. Bunun nedeni tebainin türevlendirme aşamasında yüksek sıcaklıktan dolayı bozulmaya uğramasıydı (84). Babike M. (89) yaptığı çalışmasında 3 mL idrar örneği toxi tüpe alındıktan sonra azot altında uçuruldu ve üzerine 100 µL MeOH ile GC/MS le analiz edilmesi sonucunda tebaini saptadıklarını bildirmişlerdir. Bu analizi uyguladığımızda biz tebaini saptayamadık. Casella ve ark (84) yaptıkları SPE prosedürü uygulandığında ise Wiley kütüphane taramasıyla tebaini tespit ettik. Örnek hazırlama kısmında bazı denemelerde bulduk. Makalede geçen örnek hazırlama kısmı 5 mL idrar, 1 M NaOH şeklindeydi. Buna ek olarak; 3mL idrar, 3 mL MeOH, 5 mL su; 3 mL idrar, 1mL 1 M KOH ve yalnız 3 mL idrar ile denemeler yapıldı. Yaptığımız denemeler sonucunda %100 en yakın olan %96 lık tebain piki eldesini örnek hazırlama kısmına 3 mL idrar denemesiyle bulundu. Bu prosedür haşhaş tohumu tüketimi sonucunda alınan idrar örneklerimizin tümüne uygulandı. Tebainin stereoizomeri olduğu için çift pik şeklinde ard arda gelmektedir (91). Tüm idrar örneklerimizde 0.saatleri hariç hepsinde az da olsa tebain tespit edildi. Meadway ve ark. (86) çalışmalarında tebain haşhaş tohumlu kapalı ekmek rulolarının tüketimini takiben sadece dört idrardan ikisinde bulunmuştur. Haşhaş ezmesinde bulunan daha büyük miktarda tohum tüketimini takiben, tebain 24 saat boyunca en az bir numunede tüm deneklerde saptamışlardır. Yine bu yöntem ile tebain pikinin yanında kodein ve neopin (kodein metaboliti ya da afyon kullanımını gösterir) pikini de görüyoruz.

İdrarda morfinin yanında kodein bulmamız daha önceki çalışmalarla desteklemiştir (80-86) .

Beyaz, sarı, siyah haşhaş tohumu ezmesinin içerisinde var olan papaverin Trofkowski (88) ve Mass (92) tarafından yayınlanan sonuçlara benzer şekilde, haşhaş tohumlarının tüketilmesinden sonra idrar örneklerimizde iki yöntemle de saptanmadı. Ek olarak morfin, kodein, noskapin ve papaverinin analjezik, antitüsif veya vazodilatatör ajanlar olarak kullanılması göz önüne alındığında, pozitif bulgular belirli tıbbi tedavilere bağlı olabileceği için belirteç olarak kullanılmadık.

Farklı kötüye kullanım uyuşturucu sınıfları arasında afyon ürünü kullanım belirteçlerinin araştırılması en çok ilgi görür. Çünkü hangi yasal veya yasadışı ürünlerin kullanılmasıyla ilgili yasal sorunlar sıkça ortaya çıkmaktadır. Afyon ürünlerini spesifik belirteçleri arasında eroin için 6-AC(6-asetil kodein) ve 6-MAM (6-monoasetil morfin) ve afyon için retikulin verilir (89). 6-MAM üriner opiyatların kaynakları arasında bir ayırma yöntemi olarak önerilmiştir. Haşhaş tohumu ezmesi tüketiminden sonra alınan idrar örneklerimizin tümünün içerisinde eroin metaboliti olan 6-MAM immunoassay cihazı ile saptanmadı Bu metabolit analiz edilen tohum numunelerinde herhangi birinden veya tohum alımından sonra idrar örneklerinde rastlanmaması bazı yazarları desteklemiştir (86). Bu nedenle 6-AC ve 6-MAM varlığı haşhaş tohumu tüketiminin yerine eroini kötüye kullanımını teyit eder. Yarılanma ömürleri çok kısa olduklarından saptanabilir olma ihtimalinin düşüktür (92). Eroin ile haşhaş tohumu arasındaki farkı bulmak için son zamanların gözde markeri olarak, eroinin elde ediliş aşamasında asit anhidritlenmesi ile tebainin yapısının bozulduğunda idrarda saptanan ATM4G (asetillenmiş-tebain-4-metabolit-glukronid) dir (91,93).

Bu sonuçlar ışığında 100 g haşhaş ezmesinin fazla olabileceği eleştirileri için çalışmamıza ek olarak İzmir Bornova'da fırından alınan haşhaşlı çörekten 2 dilim yenilmesi sonucunda kişilerin idrarlarında immunoassay için opiyat cut off değerinin üzerinde pozitif verildi. Doğrulaması için sıvı sıvı ekstraksiyon yöntemi sonrasında GC/MS ile morfin analizi sonucu saptanabilen değer üzerinde bulunmuştur. Yine bu idrarlara katı-faz ekstraksiyon yöntemi uygulanarak GC/MS verildiğinde tebaine rastlandı.

## 6 SONUÇ ve ÖNERİLER

İdrar örneklerinin taraması enzimatik immunoassay yöntemi (CEDIA- Olympus AU400) ile semi-kantitatif olarak yapıldı. Haşhaş tüketimi sonucunda toplanan idrar örneklerinde kreatinin normalizasyonu yapıldıktan sonra; morfin ve türevleri için eşik değer (cut off) üzerinde elde edilen veriler sırasıyla, beyaz haşhaş tohumu ezmesi alımında %63.38 (n=4571), sarı haşhaş tohumu ezmesi alımında %73.4 (n=58/79), siyah haşhaş tohumu ezmesi alımında %68.83 (n=53/77) bulunmuştur. Pozitif olarak saptanan idrar örneklerinin doğrulama çalışması Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (Agilent Technologies 5977 A MSD) ile yapıldı. Bu aşama içinde; morfin için 25-2000 µg/L arasında doğrusal bir yanıt elde edildi. Kalibrasyon eğrisinin korelasyon katsayısı ( $R^2$ ) 0.9804 'dür. Morfinin belirtme alt limiti (LOD) 3 µg/L, tayin alt limiti (LOQ) 10 µg/L dir. 50 µg/L, 100 µg/L, 250 µg/L ve 500 µg/L (n=3) derişimlerde yapılan ortalama geri kazanım değerleri %97.73-110.75 arasında bulundu.

Haşhaşın gıda olarak alınması sonucunda toplanan idrar örneklerinin GC/MS ile analizinde morfin için LOQ değerinin üzerinde elde edilen veriler sırasıyla; beyaz haşhaş tohumu ezmesi alımında %73.2 (n=52/71); sarı haşhaş tohumu ezmesi alımında %85.5 (n=69/79); siyah haşhaş tohumu ezmesi alımında %79.2 (n=61/77) olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda, haşhaş tohumlarını gıda olarak tüketen kişilerin idrar örneklerinde morfin saptanmıştır. Bağımlılık potansiyeli ve keyif verici özelliği nedeniyle suistimali önemli bir problem olan morfin kullanımının, haşhaş tohumlarını gıda olarak tüketiminden sonra ayırt edilebilmesi için haşhaş tohumlarının doğal bileşimini olan “**tebain**” analizi yapılmıştır. Bir belirteç olarak seçilen tebain analizi için katı faz ekstraksiyon yöntemi uygulandı ve GC/MS ile Wiley kütüphane taraması yapılarak gönüllülerin 0. saatleri hariç diğer saatlerde alınan idrar örneklerinde tebain saptandı.

Sonuç olarak, haşhaş tohumu ezmesini gıda olarak tüketen kişilerin idrar immunoassay ve GCMS analizleri sonuçlarının önemli kısmının eşik değer üzerinde morfin bulunmuştur. Adli toksikolojik analizlerde haşhaş tohumlarının gıda olarak alımını gösteren tebain gibi bir belirtecin analiz edilmesinin önemi gösterilmiştir. Ülkemizde haşhaş tohumu ile yapılan gıdaların tüketiminin yaygınlığı

nedeniyle bu çalışmada ele edilen adli toksikolojik verilerin ilgili düzenlemelerde değerlendirilmesi önemlidir.

Haşhaş tohumu ezmesinin tüketilmesi sonucunda idrar örneklerinde morfin ve kodein bulunması adli tıp testlerinde analitik veri yorumlamasını sorgulamaya neden olmuştur. Bu nedenle pozitif sonuç vermesi gibi bir sonuçla karşılaşmadan önce kişinin son zamanlarda yediği yiyeceklerin ayrıntılı sorulması, gıda anemnezi iyi yapılmalıdır. İdrarda tebainin var olup olmadığı tespit etmeliyiz. Ayrıca idrardaki diğer alkaloidler ve metabolitlerini saptanmalıyız ki morfinin geliş kaynağını diğer belirteçler üzerinden yorumlansın.

Haşhaş tohumları için pozitif madde testlerine kesinlikle yol açmayacak bir gıda kullanımı eşiği kullanılabilir.

Ülkemizde bu tip analizlerin yapıldığı adli kurumlar dışındaki kurumlara da (Gençlik ve Spor Bak. vb.) bu konuda bilgilendirilebilir

Gebe veya emziren annelere, haşhaş tohumu tüketimiyle alınan morfinin bebekte birtakım etkilere yol açabileceği için bilgilendirme yapılabilir.

## 7 KAYNAKLAR

1. Yavuz F. Türkiye’de tarım. Tarım ve Köy işleri Bakanlığı. 2005;1-18.
2. İncekara F. Endüstri bitkileri ve ıslahı-Yağ bitkileri. İzmir: Ege Üniversitesi Yayınları; 1964.
3. Toprak Mahsulleri Ofisi. Haşhaş ile genel bilgiler. <http://www.tmo.gov.tr/Main.aspx?ID=147>. 25/02/2017.
4. Baytop T. Farmakognozi ders kitabı. İstanbul: İstanbul Üniversitesi yayınları; 2003.
5. Hosztafi S. Chemical structures of alkaloids. Chemistry-Biochemistry of Poppy. 1998;93-158.
6. Tanker M, Tanker N. Farmakognozi. Ankara:Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları; 2003.

7. Kayaalp O. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. 4.Baskı Ankara: Feryal Matbaacılık; 1998.
8. Resmi Gazete. <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2004/10/20041012.htm>  
Erişim tarihi: 03.03.2017
9. Rahımı A. Düşük morfinli haşhaş ( Papaver Somniferum L.) hatlarının bazı bitkisel ve tarımsal özellikleri üzerine araştırmalar. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü; 2013.
10. İncekara F. Endüstri bitkileri ve ıslahı, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınlar;1979.
11. Brownstein MJ. A brief history of opiates, opioid peptides and opioid receptors. Proc. Natl. Acad. Sci.1993; p. 5391-5393.
12. Seyirli M, Başyılmaz R. Her yönüyle Akamas'ın Şehri Şuhut. Özen matbaası;1982.
13. Baytop T. Türkiye'nin papaver türleri üzerinde araştırmalar. İstanbul Üniversitesi Ecz. Fak. Yayını;1982.
14. Baytop T. Türkiye'de bitkilerle tedavi. İstanbul Üniversitesi Ecz. Fak. Yayını;1984.
15. Küçük YN. Türkiye'nin çeşitli yörelerinde yetiştirilen haşhaş bitkilerinden alkaloidlerin ekstraksiyonu ve ekstranların susuz ortamlarda özelliklerinin incelenmesi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Ens; 1996.
16. Anonim 1 <http://www.kanunum.com/files/2253-1>. Erişim tarihi: 23/03/2017.
17. INCB Narcotic Drugs Report 2015 .
18. Erdurmuş A, Öneş Y. TMO haşhaş kitabı. Ankara: Alkosan Yayınlar; 1990.
19. Baytop T. Farmakognozi ders kitabı. İstanbul Üniversitesi Ecz. Fak.Yayımları;1974.
20. Seçmen Ö, Gemici Y, Görk G, Bekar L. ve Leblebici E. Tohumlu Bitkiler Sistematigi. İzmir: Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Ders Kitapları Serisi No: 11;1995. p.396.
21. Kapoor LD. Opium poopy: botany, chemistry and pharmacology. Food Products Press; 1997.
22. Hosokawa K, Shibata T, Nakamura I, Hishida A. Discrimination among species of papaver based on the plastid rp116 gene and the rp116-rp114 spacer sequence. Forensic Science International 2003;139:195-199.
23. Davis PH. Flora of Turkey. Edinburg: Edinburg University Pres;1982.p. 395 .

24. Tanker M, Tanker N. Farmakognozi ders kitabı. Ankara:Reman Basımevi;1976.
25. Özcan MM, Atalay Ç. Determination of seed and oil properties of some poppy (*papaver somniferum L.*) varieties. *Grasas Y Aceites* 2006;57 (2):169-174.
26. Tanker M, Tanker N. Farmakognozi ders kitabı. Ankara:Özışık Matbaası;1973.
27. Önmez H. Papaver somniferum bitkisinden elde edilen alkaloidlerin ekstraksiyonunda kullanılan çözücü ve metodların karşılaştırılması. Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü;2007.
28. Tanker M, Tanker N. Farmakognozi. Ankara:Ankara Üniversitesi Eczacılık Yayınları;1990
29. Moffat AC, Jackson JV, Moss MS, Widdop B. Clarke's Isolation and Identification of Drugs. London: The Pharmaceutical Press; 1986.
30. Odell L R, Skopec J, Mcclukey A. A 'cold synthesis' of heroin and implications in heroin signature analsis utility of trifluoroacetic/acetic anhydride in the acetylation of morphine. *Forensic. Sci.Int* 2006;64(2-3):221-9.
31. Üstün C. Santral sinir sistemine etkili tıbbi bitkilerin tarihsel süreç içinde ve günümüz tedavisindeki yeri. Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü;1998.
32. Schiff LP. Opium and its alkaloids. *American Journal of Pharmaceutical Education* 2002;66:186-194
33. Bentley KW. The chemistry of the morphine alkaloids. London: Oxford University Press; 1954.
34. Li W, Tao YM, Tang Y, Xu XJ, Chen J, Fu W, et. al. Highly selective and potent  $\mu$  opioid ligands by unexpected substituent on morphine skeleton. *Bioorg. Med. Chem. Let.* 2010;20:418-421.
35. Canser ML, Dung J, Keskeny EM, Luo J. Preparation of oxycodone. United States Patent Application 20060111383; 2006.
36. Lin Z. Francis CA, Kaldahl CA, Antczak KG, Kumar V. Process for manufacturing thebaine. United States Patent 6790959; 2004.

37. Çopur E. Haşaş kapsüllerinde bazı metallerin atomik absorpsiyon spektrofotometre yöntemi ile saptanması ve orijin belirlemede önemi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü;2006.
38. Tanker M, Tanker N. Farmakognozi. Ankara: Ankara Üniversitesi Basımevi;1991.
39. Nas S, Gökalp YH, Ünsal M. Bitkisel yağ teknolojisi. Denizli: Pamukkale Üniversitesi Mimarlık Fakültesi Matbaası;2001.
40. Vural N. Toksikoloji. Ankara:Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi yayınları;2005.
41. Dökmenci İ. Farmakoloji. Saray medikal yayıncılık;1996.
42. Uzbay IT, ‘‘Nöropsikofarmakoloji’’ Rasyonel ilaç kullanımı. İstanbul Medikal Yayıncılık;2007.
43. Lachenmeier DW, Sproll C, Musahoff F. Poppy seed foods and opiate drug testing— where are we today? Therapeutic Drug Monitoring 2010;32:1–18.
44. Burtis CA. Ashwood ER. Tietz textbook of clinical chemistry. 3rd ed: Saunders Company; 1999.
45. Maurer HH. Systematic toxicological analysis procedures for acidic drugs and/or metabolites relevant to clinical and forensic toxicology and/or doping control. Journal of Chromatography B 1999;733:3-25.
46. Maurer HH. Analytical toxicology. EXS 2010; 100:317-37.
47. Dasgupta A, Wahed A, Wells A. Rapid spot tests for detecting the presence of adulterants in urine specimens submitted for drug testing. Am J Clin Pathol 2002;117(2):325-29.
48. U.S.Dept. of Health and Human Services. Mandatory guidelines for federal workplace drug testing programs: Final Guidelines Notice. Fed Reg 1988;53:11969-89.
49. Sci test laboratories. <http://scitestlabs.com/Drug-Testing-Services/creatinine-normalization.html> Erişim tarihi:22/01/2007.
50. Toxicology and Drug Testing in the Clinical Laboratory. Clinical and Laboratory Standards Institute;2007.
51. Drug Testing: A White Paper of the American Society of Addiction Medicine American Society of Addiction Medicine;2013.
52. Lum G, Mushlin B. Urine drug testing: Approaches to screening and confirmation testing. Lab Med 2004;35(6):368-73.

53. Warner EA, Walker RM, Friedmann PD. Should informed consent be required for laboratory testing for drugs of abuse in medical settings? The American journal of medicine. 2003;115(1):54-8.
54. Hammett-Stabler CA, Pesce AJ, Cannon DJ. Urine drug screening in the medical setting. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry. 2002;315(1-2):125-35.
55. Wish ED, Gropper BA. Drug testing by the criminal justice system: methods, research, and applications. Crime and Justice. 1990(13):321-91.
56. Küme T, Karakükçü Ç, Kara UN, Pınar A. Tıbbi laboratuvarlarda madde analizleri. Türk Klinik Biyokimya Derg 2016;14(1):58-71.
57. Işıklı S, Irak M. Türkiye’de madde kullanımı ve bağımlılığı profili araştırması: 2002 yılı madde kullanımı geniş alan araştırması. Türk Psikologlar Derneği, 2002.
58. Zazoğlu S. İmmünojenik analiz (CEDIA) pozitif sonuçlarının LC/MS/MS yöntemi ile teyidi ve yöntemin validasyonu. İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü; 2011.
59. Smith PF, Siegel J editör. Handbook of Forensic Drug Analysis. Academic Press;2004 .
60. Türkmen Z. Acil tıp servislerinde sıkça karşılaşılan ilaç ve toksik maddelerin yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi (ypitk) ve gaz kromatografisi kütle spektrometresi (GC/MS) yöntemleri ile analizi. İstanbul Üni Adli Tıp Ens;2011.
61. Yavuz O, Aksoy A. Örnek hazırlamada katı faz ekstraksiyonu metodu. Fırat Üniversitesi. Sağlık Bil. Dergisi 2006;20(3): 259-269.
62. Shulamit L. Solid phase extraction (SPE). [http://www.forumsci.co.il/HPLC/SPE\\_handouts.pdf](http://www.forumsci.co.il/HPLC/SPE_handouts.pdf) Erişim tarihi: 29.1.2017.
63. Zıf M. Solid phase extraction for sample preparation. Phillipsburg: JT Baker;2005.
64. Hennion MC. Solid-phase extraction: method development, sorbents and coupling with liquid chromatography. Journal of Chromatography A. 1999;856:3-54.
65. Macherey-Nagel. Sample preparation, solid phase extraction. In: Macherey-Nagel Catalogue 2004;184-241.



66. Watson J, Sparkman OD. Introduction to mass spectrometry. England:John Wiley and Sons;2007.
67. Skoog DA, Holler JF, Crouch SR. Principles of instrumental analysis. 6th ed. Belmont, CA : Thomson, Brooks/Cole; 2007; p.1039.
68. Kitson FG, Larsen BS, McEwen CN. Gas Chromatography and Mass Spectrometry. 4th Ed. California: Academic Pres 1996;3:20.
69. Gündüz T. Kantitatif analiz ders kitabı. 4.Baskı Bölüm 25 Kromatografi Ankara: Bilge Yayıncılık;1993.
70. Gross J. Mass spectrometry a textbook. Germany;2004;518.
71. Uyar T. Organik kimya. Ankara:Güneş Kitabevi. 1992; 970-974 .
72. Niessen W. Current practice of Gas Chromatography – Mass Spectrometry. New York: Marcel Dekker Inc;2001. p.110-113.
73. Kırmızıbayrak Ö. Suda bazı östrojenik steroidlerin gaz kromatografisi- kütle spektrometrisi ile tayini. Ankara:Hacettepe Üniversitesi;2010.
74. Niedbala RS, Kardos K, Waga J, Fritch D, Yeager L, Doddamane S, et. al. Laboratory analysis of remotely collected oral fluid specimens for opiates by immunoassay. Journal Analytical Toxicology 2001;25:310-315.
75. Green JM. Peer Reviewed: A practical guide to analytical method validation. Analytical Chemistry. American Chemical Society; 1996;68(9): 305A – 309A.
76. Akdağ İ. Metot validasyon eğitim notları. 2003.
77. Söğüt Ertaş Ö, Kayali A. Analitik yöntem geçerliliğine genel bir bakış. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi 2005;34(1): 41–57.
78. Metotların geçerli kılınması (validasyon) prosedürü; 2014. Available from: doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
79. Swartz ME, Krull IS. Analytical method development and validation. New York:Marcel Dekker Inc; 1997.
80. Thevis M, Opfermann G, Schänzer W. Urine concentrations of morphine and codeine afterconsumption of poppy seeds. Journal of Analytical Toxicology 2003;27:53–56.
81. Hayes LW, Krasselt WG, Mueggler PA. Concentrations of morphine and codeine in serum and urine after ingestion of poppy seeds. Clinical Chemistry 1987;33:806–808.

82. Moeller M, Hammer K, Engel O. Poppy seed consumption and toxicological analysis of blood and urine samples. *Forensic Science International* 2004;143:183–186.
83. ElSohly H, Stanford D, Jones A, ElSohly M, Snyder H, Pedersen C. Gas Chromatographic/mass spectrometric analysis of morphine and codeine in human urine of poppy seed eaters. *J forensic Sci* 1988;33:347-355.
84. Cassella G, Wu AH, Shaw BR, Hill DW. The analysis of thebaine in urine for the detection of poppy seed consumption. *J Anal Toxicol*. 1997;21:376-83.
85. Lo DST, Chua TH. Poppy seeds: implications of consumption. *Med Sci Law*. 1992;32(4):296-302.
86. Meadway C, George S, Braithwaite R. Opiate concentrations following the ingestion of poppy seed products—evidence for ‘the poppy seed defence’. *Forensic Sci. Int.* 1998;96(1): 29-38.
87. Sproll C, Perz RC, Lachenmeier DW. Optimized LC/MS/MS analysis of morphine and codeine in poppy seed and evaluation of their fate during food processing as a basis for risk analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2010;54:5292–5298.
88. Trafkowski J, Madea B, Musshoff F. The significance of putative urinary markers of illicit heroin use after consumption of poppy seed products. *Ther. Drug Monit.* 2006;28:552.
89. El-Haj B M, Al-Amri AM, Ali HS, Ahmed I. GC–MS detection and characterization of thebaine as a urinary marker of opium use. *Forensic Toxicol* 2007;25:62–68.
90. Lewis R, Johnson R, Hatrup R Simultaneous detection of thebaine, 6-MAM, and six abused opiates in postmortem fluids and tissues using Zymark automated solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B* 2005;822:137–145.
91. Maas A, Krämer M, Sydow K, Chen P S, Dame T, Musshoff F et.al. Urinary excretion study following consumption of various poppy seed products and investigation of the new potential street heroin marker ATM4G. *Drug Testing and Analysis* 2016;
92. Paterson S, Cordero R. Comparison of the various opiate alkaloid contaminants and their metabolites found in illicit heroin with 6-monoacetyl morphine as indicators of heroin ingestion. *J. Anal. Toxicol.* 2006;30:267.

93. Chen P, Braithwaite R, George C, Hylands PJ, Parkin M C, Smith NW, Kicman T. The poppy seed defense: a novel solution. *Drug Test. Anal.* 2014;6:194.



## EKLER

**EK1:** Etik kurul izin belgesi.



T.C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : B.30.2.EGE.0.20.05.00/OY/  
Karar Nu: 15-3.1/3

675/62 7

18.5.15

Sayın

**Doç. Dr. Serap A. AKGÜR**

**Ege Üniversitesi Üniversitesi**

**Madde Bağımlılığı, Toksikoloji ve İlaç Bilimleri Enstitüsü**

Kurulumuza başvurusunu yaptığınız "**Haşhaş Tohumlarının Gıda Olarak Tüketen Kişilerin İdrarlarında Morfin Analizi**" konulu araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı ekte sunulmaktadır.

Ayrıca ilgili mevzuat gereği araştırmaya başlama bildiriminin, bir yıllık süreyi aşması durumunda Yıllık Bildirimlerin, 7 gün içinde Ciddi Advers Olay Bildirimlerinin, bitirme tarihinin ve Sonuç Raporunun Kurulumuza sunulması ve her türlü yazışmanın araştırma tam adı/kodu, karar tarih ve sayısı bildirilerek (Etik Kurul Bilgilendirme Formu ekinde) yapılması gerekmektedir.

Yazımızın bir örneğinin diğer araştırma merkezlerine ve destekleyiciye iletilmesi hususunda bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

  
**Prof. Dr. Ayşenur OKTAY**  
Başkan

EK: İlgili Etik Kurul Kararı



**ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAY BELGESİ**

<b>BAŞVURU BİLGİLERİ</b>	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Haşhaş Tohumlarını Gıda Olarak Tüketen Kişilerin İdrarlarında Morfin Analizi		
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	-		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç. Dr. Serap A. AKGÜR		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UZMANLIK ALANI	-		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ege Üniversitesi Madde Bağımlılığı, Toksikoloji ve İlaç Bilimleri Enstitüsü		
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI	-		
	DESTEKLEYİCİ	-		
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. kaynaklardan destek alanlar için)	-		
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	-		
<b>ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ</b>	FAZ 1 <input type="checkbox"/>	FAZ 2 <input type="checkbox"/>	FAZ 3 <input type="checkbox"/>	FAZ 4 <input type="checkbox"/>
	Gözlemsel İlaç Çalışması <input type="checkbox"/>	Tıbbi Cihaz Klinik Araştırması <input type="checkbox"/>		
	İn Vitro Tıbbi Tanı Cihazları İle Yapılan Performans Değerlendirme Çalışmaları <input type="checkbox"/>	İlaç Dışı Klinik Araştırma <input checked="" type="checkbox"/>		
	Diğer ise belirtiniz			
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>
<b>DEĞERLENDİRİLEN BELGELER</b>	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	29.01.2015	-	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	29.01.2015	-	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU	-	-	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
<b>KARAR BİLGİLERİ</b>	Karar Nu: 15-3.1/3	Tarih: 28.04.2015		
	Yukarıda başvuru bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmacının gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak Kurulumuzca incelenmiş, araştırma giderlerinin gönüllüye ve/veya bağlı bulunduğu sosyal güvenlik kurumuna ödenmediği koşullarda araştırmaya başlanmasının etik açıdan uygun bulunduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.			

**EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**

<b>ÇALIŞMA ESASI</b>	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu, Tıbbi Cihaz Klinik Araştırmaları Yönetmeliği					
<b>BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:</b>	Prof. Dr. Ayşenur OKTAY					
Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Ayşenur OKTAY Başkan	Radyodiagnostik	EÜ. Tıp Fakültesi Radyoloji AD	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Aytül ÖNAL Başkan Yardımcısı	Tıbbi Farmakoloji	E.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji AD.	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Suna TOKSAVUL Üye	Protetik Diş Tedavisi	E.Ü. Diş Hek. Fakültesi Protetik Diş Tedavisi AD.	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Sarenur GÖKBEN Üye	Çocuk Nörolojisi	EÜ. Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	

Etik Kurul Başkanının Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Ayşenur OKTAY	İMZA 	Araştırma Başvurusu Onay Belgesi	Belge Kodu 22	Rev. Tarihi / No.su: 28.09.2011/05	Sayfa 1/2
---	----------	----------------------------------	------------------	---------------------------------------	--------------



ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAY BELGESİ

KARAR BİLGİLERİ		Karar Nu : 15-3.1/3				
Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeliği	Uzmanlık Dali	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Abdullah SAYINER Üye	Göğüs Hastalıkları	EÜ. Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları AD	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	TOPLANTIYA KATILMADI
Prof. Dr. Bülent SEMERCİ Üye	Üroloji	E.Ü. Tıp Fakültesi Üroloji AD.	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Süheyla ALTUĞ ÖZSOY Üye	Halk Sağlığı Hemşireliği	EÜ. Hemşirelik Fakültesi Halk Sağlığı Hemşireliği AD.	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Murat PEHLİVAN Üye	Biyofizik	E.Ü. Tıp Fakültesi* Biyofizik AD.	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Doç. Dr. Çağatay ÜSTÜN Üye	Tıp Tarihi ve Etik	E.Ü. Tıp Fakültesi Tıp Tarihi ve Etik AD.	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Doç. Dr. Şafak TANER Üye	Halk Sağlığı	E. Ü. Tıp Fakültesi Halk Sağlığı AD.	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Doç. Dr. Ayşe EROL Üye	Tıbbi Farmakoloji	E.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji AD.	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Yard. Doç. Dr. Gülsün AYGÖRMEZ UĞURLUBAY Üye	Ceza Hukuku	Gediz Üniversitesi Hukuk Fakültesi	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Uzm. Ecz. Ebru BEDİR Üye	Eczacı	E.U. Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji AD.	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Uzm. Dr. Özlem EKER Üye	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	Serbest	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Fatma BÜYÜKAKKUŞ Üye	Ziraat Mühendisi	Emekli	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	

\* Araştırma ile İlişki  
\*\* Toplantıda Bulunma

ASLI GİBİDİR  
EÜTF Klinik Araştırmalar  
Etik Kurulu Başkanı

Etik Kurul Başkanının Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Ayşenur OKTAY	İMZA 	Araştırma Başvurusu Onay Belgesi	Belge Kodu 22	Rev. Tarihi / No.su: 28.09.2011/05	Sayfa 2/2
--	----------	----------------------------------	------------------	---------------------------------------	--------------



ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAY BELGESİ

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Haşhaş Tohumlarını Gıda Olarak Tüketen Kişilerin İdrarlarında Morfin Analizi		
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	-		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç. Dr. Serap A. AKGÜR		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UZMANLIK ALANI	-		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ege Üniversitesi Madde Bağımlılığı, Toksikoloji ve İlaç Bilimleri Enstitüsü		
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI	-		
	DESTEKLEYİCİ	-		
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. kaynaklardan destek alanlar için)	-		
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	-		
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1 <input type="checkbox"/>	FAZ 2 <input type="checkbox"/>	FAZ 3 <input type="checkbox"/>
	Gözlemsel İlaç Çalışması <input type="checkbox"/>	Tıbbi Cihaz Klinik Araştırması <input type="checkbox"/>		
	In Vitro Tıbbi Tanı Cihazları İle Yapılan Performans Değerlendirme Çalışmaları <input type="checkbox"/>	İlaç Dışı Klinik Araştırma <input checked="" type="checkbox"/>		
	Diğer ise belirtiniz			
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	29.01.2015	-	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	29.01.2015	-	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU	-	-	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
KARAR BİLGİLERİ	Karar Nu: 15-3.1/3	Tarih: 28.04.2015		
	Yukarıda başvuru bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak Kurulumuzca incelenmiş, araştırma giderlerinin gönüllüye ve/veya bağlı bulunduğu sosyal güvenlik kurumuna ödetilmediği koşullarda araştırmaya başlanmasının etik açıdan uygun bulunduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.			

EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu, Tıbbi Cihaz Klinik Araştırmaları Yönetmeliği
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Ayşenur OKTAY

Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Kabılım (**)	İmza
Prof. Dr. Ayşenur OKTAY Başkan	Radyodiagnostik	EÜ, Tıp Fakültesi Radyoloji AD	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Aytül ÖNAL Başkan Yardımcısı	Tıbbi Farmakoloji	E.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji AD.	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Suna TOKSAVUL Üye	Protetik Diş Tedavisi	E.Ü. Diş Hek. Fakültesi Protetik Diş Tedavisi	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Sarenur GÖKBEN Üye	Çocuk Nörolojisi	EÜ, Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	

Etik Kurul Başkanının Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Ayşenur OKTAY	İMZA 	Araştırma Başvurusu Onay Belgesi	Belge Kodu 22	Rev. Tarihi / No.su: 28.09.2011/05	Sayfa 1/2
---	----------	----------------------------------	------------------	---------------------------------------	--------------



ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAY BELGESİ

KARAR BİLGİLERİ		Karar Nu : 15-3.1/3				
Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Abdullah SAYINER Üye	Göğüs Hastalıkları	EÜ. Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları AD	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	TOPLANTIYA KATILMADI
Prof. Dr. Bülent SEMERCİ Üye	Üroloji	E.Ü. Tıp Fakültesi Üroloji AD.	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Süheyla ALTUĞ ÖZSOY Üye	Halk Sağlığı Hemşireliği	EÜ. Hemşirelik Fakültesi Halk Sağlığı Hemşireliği AD.	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Murat PEHLİVAN Üye	Biyofizik	E.Ü. Tıp Fakültesi Biyofizik AD.	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Doç. Dr. Çağatay ÜSTÜN Üye	Tıp Tarihi ve Etik	E.Ü. Tıp Fakültesi Tıp Tarihi ve Etik AD.	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Doç. Dr. Şafak TANER Üye	Halk Sağlığı	E. Ü. Tıp Fakültesi Halk Sağlığı AD.	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Doç. Dr. Ayşe EROL Üye	Tıbbi Farmakoloji	E.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji AD.	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Yard. Doç. Dr. Gülsün AYGÖRMEZ UĞURLUBAY Üye	Ceza Hukuku	Gediz Üniversitesi Hukuk Fakültesi	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Uzm. Ecz. Ebru BEDİR Üye	Eczacı	E.U. Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji AD.	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Uzm. Dr. Özlem EKER Üye	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	Serbest	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Fatma BÜYÜKAKKUŞ Üye	Ziraat Mühendisi	Emekli	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	

\* Araştırma ile İlişki  
\*\* Toplantıda Bulunma

ASLI GIBİDİR  
EÜTF Klinik Araştırmalar  
Etik Kurulu Başkanı

Etik Kurul Başkanının Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Ayşenur OKTAY	İMZA 	Araştırma Başvurusu Onay Belgesi	Belge Kodu 22	Rev. Tarihi / No.su: 28.09.2011/05	Sayfa 2/2
--	----------	----------------------------------	------------------	---------------------------------------	--------------



## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Adı– Soyad: Emine ÖZBUNAR

Doğum Tarihi: 07.04.1990

Cinsiyet: Bayan

Medeni Durum: Bekar

eposta Adresi: [emineozbunar@hotmail.com](mailto:emineozbunar@hotmail.com)

### Eğitim Bilgileri

Lisans : Ege Üniversitesi-Fen Fakültesi-Kimya Bölümü-2013

### Yayın

Yüksel Ü, Arar Ö, Özbunar E, Kırca S, A manuscript titled Influence of Surface Coating on Fluoride Removal by Magnetite. Analytical Letters

**Yabancı Dil** : İngilizce