

283820

T. C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ FAKÜLTESİ

**BAĞIMLILIK YAPAN VE SIK OLARAK ZEHİRLENMELERE
NEDEN OLAN İLAÇLARIN BİYOLOJİK SIVILARDA
ANALİZ YÖNTEMLERİ**

**ANALİTİK TOKSİKOLOJİ ve BROMATOLOJİ PROGRAMI
BİLİM UZMANLIĞI TEZİ**

Ecz. NURŞEN BAŞARAN

ANKARA — 1980

107

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ FAKÜLTESİ

BAĞIMLILIK YAPAN VE SIK OLARAK ZEHİRLENMELERE
NEDEN OLAN İLAÇLARIN BİYOLOJİK SIVILARDA
ANALİZ YÖNTEMLERİ

ANALİTİK TOKSİKOLOJİ ve BROMATOLOJİ PROGRAMI
BİLİM UZMANLIĞI TEZİ

Ecz. NURŞEN BAŞARAN

Rehber Öğretim Üyesi : Doç. Dr. FİLİZ HİNCAL

ANKARA - 1980

Çalışmalarında her türlü bilgi ve yardımlarını esirge-
meyen, araştırmamı yöneten değerli hocam Doç. Dr. Filiz
Hıncal'a teşekkürlerimi sunarım. Çalışmam sırasında göster-
miş olduğu yakın ilgiden dolayı Bölüm Başkanı sayın hocam
Prof. Dr. Suna Duru'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca çalışma arkadaşlarıma ve Ecz. Aşkın İşimer'e
çalışmalarım sırasında gösterdikleri yakın ilgi ve yardım-
larından dolayı teşekkür ederim.

İ Ç İ N D E K İ L E R

	<u>Sayfa No</u>
GİRİŞ ve AMAÇ	1
I. GENEL BİLGİLER	2
I.1. İlaç Suistimali	2
I.2. Sık Olarak Zehirlenmelere Neden Olan İlaçlar	4
I.3. İvedi Toksikolojik Tarama Testlerine Gereksinme	6
I.4. İvedi Toksikolojik Tarama Testlerinde Kullanılan Biyolojik Örnekler	8
I.5. İvedi Toksikolojik Tarama Testlerinde Kullanılan Yöntemler	9
I.5.1. Yöntem Seçiminde Dikkat Edilecek Hususlar	9
I.5.2. Biyolojik Örneklerde İlaç Analizinin Basamakları	10
I.5.2.1. Ayırma	10
I.5.2.1.1. Tüketme (Ekstraksiyon)	10
I.5.2.1.1.1. Sıvı-Sıvı Tüketmesi	10
I.5.2.1.1.1.1. Tüketme Verimi	11
I.5.2.1.1.1.2. Sıvı-Sıvı Tüketmesinin Toksikolojik Tarama Testlerindeki Uygulamaları	11
I.5.2.1.2. Kromatografik Ayırma Yöntemleri	14
I.5.2.1.2.1. Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması	14
I.5.2.1.2.2. İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) ve Toksikolojik Tarama Testlerindeki Uygulamaları	15
I.5.2.1.2.3. Toksikolojik Tarama Testlerinde Gaz Kromatografisi Uygulamaları	18
I.5.2.1.2.4. Toksikolojik Tarama Testlerinde Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi Uygulamaları	18
I.5.2.1.2.5. Toksikolojik Tarama Testlerinde Non-iyonik Reçine Kullanımı	19
I.5.2.2. Tanımlama Yöntemleri	21
I.5.2.2.1. Ön Tüketme Gerektiren Yöntemler	21
I.5.2.2.2. Ön Tüketme Gerektirmeyen Yöntemler	22

I.5.2.2.2.1. Elektron Spin Rezonans Tekniği (ESR)	22
I.5.2.2.2.2. Immunoassay Teknikleri	22
I.6. Çalışmada Kullanılan Referans Standartlar Hakkında Genel Bilgiler	24
I.6.1. Morfin	24
I.6.2. Kodein	26
I.6.3. Fenobarbital	27
I.6.4. Sekobarbital	29
I.6.5. Butalbital	30
I.6.6. Diazepam	30
I.6.7. Klordiazepoksit	32
I.6.8. Meprobammat	33
I.6.9. Difenilhidantoin (Fenitoin)	35
I.6.10. Klorpromazin	36
I.6.11. İmipramin	38
II. DENEYSEL KISIM	40
II.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	40
II.1.1. Kullanılan Araç ve Gereçler	42
II.1.2. Tarama Testi Çalışmaları	42
II.1.3. Kontrol İdrarlarının Hazırlanışı	43
II.1.4. Tüketme Yöntemi	43
II.1.4.1. Direkt Sıvı-Sıvı Tüketme İşlemi	43
II.1.4.2. Amberlit XAD-2 Reçinesi Kullanarak Tüketme İşlemi	44
II.1.4.2.1. Reçine Kolonlarının Hazırlanışı	44
II.1.4.2.2. İdrar Örneklerinin Amberlit XAD-2 Kolonlarından Geçirilmesi ve Organik Çözücü İle Tüketme	45
II.1.5. Kromatografi Yöntemi ve Tanı	45
II.1.5.1. Kromatografi Plaklarının Hazırlanışı	45
II.1.5.2. Kromatografik Çözücü (Sürüklenme) Sistemleri	45

II.1.5.3. Laboratuvar Koşulları	46
II.1.5.4. Kromatografi İşlemi	46
II.1.5.5. Tanımlama İşlemleri	46
II.1.5.6. Referans Standartların En Düşük Tayin Edilebilirlik Sınırlarının Saptanması	46
II.1.6. Tedavi Dozlarında İlaç Alınımını Takiben İdrar Örneklerinin Analizi	47
II.1.7. Zehirlenme Olgularından Alınan İdrar Örneklerinin Analizi	47
II.2. Doğrulayıcı - Ek Test Yöntemleri	47
II.2.1. Morfin ve Kodein İçin Doğrulayıcı - Ek Testler	48
II.2.2. Barbitüratlar İçin Doğrulayıcı - Ek Testler	48
II.2.2.1. Ditizon İle Renk Testi	48
II.2.2.2. Spektrofotometrik Yöntem	49
II.2.2.3. Barbitüratlar ve Difenilhidantoin İçin Ek İTK Testi	49
II.2.3. Benzodiazepinler İçin Doğrulayıcı - Ek Test	50
II.2.4. Meprobamat İçin Doğrulayıcı - Ek Test	50
II.2.5. Fenotiazinler İçin Doğrulayıcı - Ek Test	51
II.2.6. İmipramin İçin Doğrulayıcı - Ek Test	51
III. BULGULAR	52
III.1. Geliştirilen İvedi Toksikolojik Tarama Yönteminin Nitelikleri ve Uygulama Sonuçları	52
III.1.1. Kromatografi Yöntemi İle İlgili Bulgular	52
III.1.2. Tüketme Yöntemi İle İlgili Bulgular	55
III.1.3. Tanımlama İşlemleri İle İlgili Bulgular	56
III.1.4. Klinik Uygulamalar İle İlgili Bulgular	58
III.2. Doğrulayıcı - Ek Testler İle İlgili Bulgular	61
IV. SONUÇ ve TARTIŞMA	64
IV.1. Seçilen pH'nın Üstünlükleri	65

	<u>Sayfa No</u>
IV.2. Tüketme İşlemlerinin Üstünlükleri	66
IV.3. Geliştirilen İTK Yönteminin Üstünlükleri	67
ÖZET - Türkçe	73
ÖZET - Yabancı Dilde	75
KAYNAKLAR	77
EKLER	106
ÖZGEÇMİŞ	108

G İ R İ Ő v e A M A Ğ

Tekniğin çok ilerlediği, her geçen gün yeni ilaçların sentez edildiği çağımızda, tedavi amacıyla piyasaya sürülen ilaçlardan çoğunun gerçek amaçları dışında kullanılarak suistimal edildikleri görülmektedir. Özellikle hipnotik, sedatif, trankilizan, analjezik ve antidepresan ilaçların serbest ilaç piyasasında çok ve çeşitli Őekillerde bulunuŐu ve denetimsiz satışları suistimali kolaylaştırmaktadır. Bu tip ilaçların yıllık tüketimlerinin yarısından fazlasının, tedavi amaçları dışında kullanım ile olduğu bildirilmektedir (1-4).

Diğer taraftan, özellikle yukarıda sözü edilen ilaçlarla kazai ve intihar amaçlı zehirlenmeler sık görülmektedir. Zehirlenme olgularının klinik tanısı ve tedavisinde baŐarıya ulaŐmada, birden fazla ilacın aynı anda tanımına yönelik ivedi toksikolojik tarama testleri yararlıdır (5,6).

Bu alıŐma, suistimal edilen ve sık olarak zehirlenmelere neden olan ilaçların biyolojik sıvılarda tayini için hızlı, basit ve özgül bir tarama yöntemi geliştirmek amacıyla yapılmıştır. Ülkemizde özellikle, hastanelerimizde, bu tip olguların analitik yönden değerlendirilmesi ve böylece tedaviye analitik tanımla yardımcı olunması konusuna eğerilen laboratuvarlar yoktur. Geliştirilip kurulacak kolay, hızlı, duyarlı ve özgül bir tarama yönteminin etkeni bilinmeyen zehirlenme olgularının değerlendirilmesinde ve tanımında yararlı olacağı düşünülmüştür.

I . G E N E L B İ L G İ L E R

1.1. İlaç Suistimali

Geniş anlamda ilaç suistimali, ilaçların tıbbi indikasyon dışında kullanılması ve özellikle hekimin gerek görmediği durumlarda kişinin kendi isteği ve girişimi veya yetkisiz kişilerin önerileri ile tıbbi tedavi dışında ilaç kullanması olarak tanımlanır. Bu tanıma göre, tüm ilaçlar için suistimal söz konusudur. Böylece antibiyotiklerin, vitaminlerin, antasidlerin veya diğer birçok ilaçların suistimalinden söz edilebilir. Diğer taraftan ilaç suistimali, her çeşit ilaçla ve her çeşit tedavi uygulamalarında; hekim, hastane ve ilaç sağlayan kuruluşların tutumuna bağlı olarak kişisel, toplumsal, ekonomik nedenlerle ortaya çıkar ve kişisel, toplumsal, ekonomik zararlara yol açar (7-9).

Bu çalışmada söz konusu edilen ilaç suistimali, kişide bağımlılık yaptıkları için, yukarıda da tanımlandığı gibi, tıbbi amaçlar dışında, devamlı ya da periyodik olarak uzun süre ve genellikle giderek artan dozlarda kullanılan, bu nedenle de suistimale en yatkın olan ilaçlarla ilgilidir. Bu grup ilaçlar psikotrop ilaçlar olarak adlandırılan ve santral sinir sisteminde (SSS) önemli derecede stimülasyon veya depresyon oluşturan ve sonuçta algılama, mizaç, mental göstergeler, davranış ve bazen de motor işlevlerde bozukluk yapan ilaçlardır.

ilaç bağımlılığı, psikotrop bir ilaç ile SSS arasındaki etkileşmeden doğan, kendini psişik ve bazen de ek olarak somatik (fiziksel) belirtilerle gösteren ve ilaca karşı özlem veya açlık oluşturmamasından dolayı ilacın kişi tarafından devamlı ya da periyodik olarak kullanılması ile beliren bir durumdur. 1964 yılında Dünya Sağlık Örgütü tarafından tutkunluk (addiction) ve alışkanlık (habituation) terimleri yukarıda sözü edilen ilaç bağımlılığı kavramı altında birleştirilmiştir (10,11).

Suistimal edilen psikotrop ilaçların başlıcaları; morfin, kodein, heroin, metadon gibi narkotik analjezikler; alkol; barbitüratlar, metakualon, glutetimid, etklorvinol, kloralhidrat, meprobamat ve benzodiazepinler gibi sedatif hipnotikler; amfetamin, metamfetamin, d-amfetamin, kokain gibi psikomotor stimulanlar; esrar, LSD, meskalin, psilosibin gibi halusinojenler ayrıca monoaminoksidaz inhibitörleri, imipramin gibi antidepresanlardır.

Bireysel etkenlerin yanında toplumsal ve ekonomik nedenlerin de büyük rol oynadığı ilaç bağımlılığının, özellikle gelişmiş ülkelerde yaygın olduğu görülmektedir (12-20). Ülkemizde ise ilaç suistimali geçmişte oldukça düşük düzeyde iken ve sadece afyon, esrar, öksürük ilacı ve barbitüratlar ile sınırlı iken, son yıllarda Ankara, İstanbul, İzmir gibi büyük şehirlerde özellikle uyku ilaçları ve trankilizanları tıbbi amaç dışında kullananların sayısı artmıştır. Bu durum küçük kasaba ve köylerde bile giderek yaygınlaşmaktadır (21).

Kişinin ruh ve beden sağlığını bozarak çalışma gücünü yok eden, verim ve başarısını düşüren, toplumda itilen birey haline getiren, ayrıca ekonomik kayıplara neden olan sorunun etkenlerini bilmenin yararları büyüktür.

I.2. Sık Olarak Zehirlenmelere Neden Olan İlaçlar

Kazai ve istemli zehirlenmeler günümüz toplumlarında devamlı artan bir sorundur. İngiltere'de acil servislere yapılan başvurularda zehirlenmeler, miyokard infarktüsünden sonra % 20 ile ikinci sırayı almaktadır (13). A.B.D. de yılda ortalama 20.000 intihar olgusu ölümlle sonuçlanmakta ve bunların büyük kısmını ilaçlarla zehirlenmeler oluşturmaktadır. Aynı ülkede yılda 2 milyon çocuğun zehirlendiği ve bu zehirlenme olgularının 400'ünün ölümlle sonuçlandığı bildirilmektedir (12).

Özellikle SSS ilaçları ile kazai ve intihar amaçlı zehirlenmeler günümüzde sosyal ve tıbbi bir sorun olmaktadır. 1970 yılında İngiltere'de görülen intihar amaçlı zehirlenmelerin % 24'ünü barbitüratlar, % 33'ünü analjezikler, % 33'ünü trankilizanlar, % 10'unu ise antidepresanların oluşturduğu bildirilmiştir (15). Ülkemizde de serbest ilaç piyasasında bu tip ilaçların çokluğu ve çeşitliliği, denetimsiz satışları zehirlenme ve suistimalleri kolaylaştırmaktadır.

1972 yılında Türkiye'de bir senede 250 kg pentobarbital (Nembutal) (17 milyon doz), 6500 kg fenobarbital (Luminal) (367 milyon doz), 6000 kg meprobamat (15 milyon doz), 250 kg klordiazepoksit (Librium) (17 milyon doz), 375 kg diazepam (188 milyon doz), 1500 kg okzazepam (Serepax) (150 milyon doz), 2000 kg saf kodein (133 milyon doz), 2000 kg kodein fosfat (100 milyon doz), 10 kg morfin (1 milyon doz) kullanılmıştır (2). Günümüzde bu miktarların daha da arttığı düşünülürse, dışarıdan döviz karşılığı gelen bu ilaçların kişi sağlığı yanında, ülke ekonomisi için de yarattığı sorun belirginleşir.

1978 yılında İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi tarafından yapılan bir anket çalışmasında (22), İstanbul'u temsilen rastgele seçilen 125 ec-

zananın bir günlük satışlarından toplanan veriler değerlendirilmiştir. Reçete ile satılması gereken ilaçların, erişkinlerde % 63, çocuklarda % 47 gibi çok yüksek oranlarda reçetesiz olarak satıldığı saptanmıştır. Bağımlılık yapan ilaçların tüketiminin endişe verici bir düzeyde olduğu ve bu ilaçların erişkinlerde % 81, çocuklarda % 77 gibi yüksek oranlarda reçetesiz satıldığı belirlenmiştir.

1964-1973 yıllarında yapılan 7071 otopside 609'unun intihar olguları olduğu ve bunların % 23'ünün ilaç alma sonucu meydana geldiği bildirilmiştir (23). Diğer taraftan Köknel (2,21) intihar olaylarının % 45'inin uyku ilaçları ve trankilizanlarla olduğunu bildirmektedir.

1969-1973 yılları arasında, Hacettepe Üniversitesi Çocuk Hastalıkları Acil Polikliniğinde görülen 3217 olgunun % 15'ini zehirlenmeler oluşturmaktadır. Zehirlenmelerin de % 15'i optalidon ve aspirin, % 12'si barbiturat ve trankilizan, % 5'i ise öksürük ilaçları ile meydana gelmiştir (24).

1979 yılında yine Hacettepe Üniversitesi Çocuk Acil Polikliniğinde yapılan 5 aylık bir çalışmada toplam 692 kaza olgusu değerlendirilmiştir. Kazaların % 44'ünü zehirlenmeler teşkil etmektedir. Bu zehirlenmelerin % 17'sinde aspirin, % 18'inde optalidon, % 26'sında SSS depresanları ve trankilizanlar, % 3'ünde ise kodein ve diğer narkotik analjeziklerin kullanıldığı saptanmıştır. Ayrıca zehirlenmelere sebep olan toksik maddelerin hemen hepsinin açıkta rastgele bulunduruldukları veya ilaçların kilitli dolaplarda saklandığı belirlenmiştir (25).

Özellikle SSS ilaçlarının çocukların ulaşamayacağı kilitli dolaplarda saklanmaları, tedavi için verildiklerinde ise dozlarına özen gösterilmeleri gerekir. Ayrıca, suistimale ve zehirlenmelere sıklıkla neden

olan ilaçların piyasadaki satışlarının azaltılması, reçetesiz ilaç satışının kesin bir şekilde yasaklanması ve ilaç suistimalinden doğan zararlara dikkati çeken yayın ve toplantılara önem ve özen gösterilmesi, sorunu büyük ölçüde azaltabilecektir.

I.3. İvedi Toksikolojik Tarama Testlerine Gereksinme

Hastane acil servislerine kazai veya intihar amaçlı, yüksek dozda ilaç alım şüphesi ile getirilen hastaların en uygun şekilde tedavisi için, zehirlenme veya suistimale neden olan etken veya etkenlerin hızlı tanımı gerekir. Özellikle çeşitli nedenlerle ilacın alınma hikayesinin öğrenilemediği, hastanın koma halinde olup, ivedi tedaviye gereksinme gösterdiği durumlarda; hızlı, basit ve kesin kimyasal analizler yapılmalıdır. Hastanın klinik muayenesinden elde edilen fiziksel bulgulardan hareketle tedavi esas olmakla beraber, bazen etkene özgül olmayan bulgular ve yanlıgılar hastanın yaşamını tehlikeye sokabilir. Bu nedenle zehirlenme şüphesi ile tedaviye alınan hastanın öncelikle solunum ve dolaşım gibi temel yaşamsal işlevleri desteklenirken, diğer yandan da zehirlenme nedeni olan etkenlerin hızlı ve kesin olarak tanımına çalışılması son derece yararlı hatta zorunludur (26-28).

İlaç suistimali ve zehirlenme olgularının belirgin bir özelliği de entoksikasyonların çok yönlülüğü, diğer bir deyişle hastanın aynı anda birden fazla ilacı kullanabilmesidir. Bu nedenle de birden fazla ilacın aynı anda tanımına yönelik tarama yöntemleri, başvurulacak ilk ve ivedi işlem olarak kabul edilir.

Ayrıca bu tip tarama testleri, kanuna aykırı preparat kullanımlarının tanımlanmasında, doping testlerinde ve belirli bir ilacı alan hastaların tedaviyi uygulayıp uygulamadıklarının saptanmasında, dolayısıyla

ilaç izleme programlarında kolaylıkla kullanılabilir.

Tarama testlerinde birden fazla ilacın aynı anda araştırılması temel ilke olmakla beraber, suistimal edilen ve kazai veya istemli zehirlenmelere neden olan tüm ilaçların birlikte analizi olanaksız olduğundan, kararlı ve isabetli bir seçimle referans standart sayısının sınırlandırılması zorunludur. İvedi toksikolojik tarama testlerinde belirli bir ilaç veya onun benzerleri için referans olarak kullanılacak standartlar için aşağıdaki ölçütler geçerlidir (26).

- a) İlacın suistimal edilebilme olasılığı
- b) İlacın yüksek dozda yaşamı tehdit etme olasılığı (diğer bir deyişle terapötik aralığının darlığı)
- c) İlaç veya metabolitlerinin tayin edilebilme olasılığı
- d) Klinik yönden aynı gruptaki diğer ilaçlardan farklılık göstermesi
- e) Etkisinin doza bağımlılığı
- f) Klinik olarak analiz için yeterli miktarda elde edilebilme olasılığı.

Bu çalışmada hastane acil servislerinin istek ve gereksinimleri ön planda tutularak, yukarıda açıklanan ölçütleri karşılamaları, sıklıkla kullanılan ve suistimal edilen ilaçlar olmaları nedeniyle narkotik analjeziklerden morfin ve kodein, barbitürat tüdevi hipnotik sedatiflerden fenobarbital, butalbital, sekobarbital; benzodiazepin grubu minor trankilizanlardan diazepam ve klordiazepoksit, major trankilizanlardan klorpromazin, trisiklik antidepresanlardan imipramin, tıbbi karbamatlardan meprobamat ve antikonvülsanlardan difenilhidantoin referans standard olarak seçilmiştir.

Tarama testleri ile analizden amaç, yukarıda da belirtildiği gibi klinik-toksikolojik olgulara ivedi cevap vererek acil tanı ve tedaviye

yardımcı olmaktadır. Ancak elde edilen sonuçların en kısa zamanda diğer destekleyici özgül analizlerle de doğrulanması akılcı bir yaklaşımdır (1,5,6, 26,29-31).

I.4. İvedi Toksikolojik Tarama Testlerinde Kullanılan Biyolojik Örnekler

İlaç analizlerinde biyolojik örnek olarak kan, idrar, doku, mide içeriği ve tükürük kullanılabilir. Ancak ilaç tarama testlerinde, kimyasal analiz için en uygun ve kullanışlı biyolojik sıvı idrardır (29-32).

Kanın alınması sorun olabileceği gibi hastanın klinik durumu az miktarda da olsa kan vermeğe uygun olmayabilir. Örneğin pıhtılaşma olasılığı söz konusudur ayrıca aşırı dozda ilaç alınımında bile kanın taşıdığı toksik madde miktarı az olabilir (31). Bu nedenle rutin tarama yöntemlerinde, kan idrara oranla tercih edilmeyen bir sıvıdır.

Tükürük, bazı ilaçların itrahında önemli bir rol oynayan, suistimal edilen bazı ilaçların analizi için uygun bir vücut sıvısıdır. Örnek alınması kolaydır ve özel bir beceri gerektirmez. Ancak alınabilecek örnek miktarı azdır ve hasta şüursuz olduğunda alım güçleşir.

İdrar, tarama testleri için en uygun biyolojik örnektir. Alınması hızlı ve kolaydır. İstenen hacimde elde edilebilir. Kazai veya intihar amaçlı zehirlenmeler için olduğu kadar ilaç izleme programlarında ve metabolizma çalışmalarında da uygun ve yararlı bir şekilde kullanılabilir. Ancak ilaçların çoğu konjugatları halinde atıldığından, yanlış negatif sonuçların çıkmasını önlemek için ön hidroliz yöntemi gerekebilir. Analiz yapılmaya kadar idrar örneğinin buzdolabında saklanması ilaçların ve idrarın bozulmasını önler (32,33).

I.5. İvedi Toksikolojik Tarama Testlerinde Kullanılan Yöntemler

İvedi toksikolojik analizler için tarama testi olarak çeşitli yöntemler kullanılır. Ancak bu yöntemler ve onlarla ilgili örneklere geçmeden önce böyle bir analiz için yöntem seçiminde veya geliştirmesinde gözönüne alınacak hususları belirlemek yerinde olacaktır.

I.5.1. Yöntem Seçiminde Dikkat Edilecek Hususlar

İyi bir tarama yöntemi için geçerli ölçütler şöyle sıralanabilir (29-32,34-38) ;

a- Özgüllük : Yöntem sadece analizi amaçlanan ilaçlara özgül olması, aynı anda mevcut başka ilaçlar veya metabolitleri analizi bozmamalıdır.

b- Duyarlık : Yöntemin duyarlılığı, toksik düzeyde, hatta daha yararlı olarak terapötik düzeyde ilaç alımını takiben ulaşılabilen biyolojik sıvı konsantrasyonlarında tayine olanak verecek derecede yüksek olmalıdır. Yöntemin, ilacın kullanımından en az 24-48 saat sonra bile ilaç veya metabolitlerini tayin edebilecek duyarlıkta olması tercih edilmektedir.

c- Tekrarlanabilirlik : Sonuçlar tekrarlanabilmeli, dolayısıyla kesin olmalıdır.

d- Hızlılık : Tüm analiz süresi, ivedi bir olgunun tanı ve tedavisine katkıda bulunmayı sağlayacak derecede kısa olmalıdır.

e- Basitlik : Analiz için uygulanan işlemler çok yüksek bir eğitim, deneyim veya yeteneğe gereksinme göstermeyecek derecede basit ve kolay uygulanır olmalıdır.

f- Maliyet : Analiz giderleri az olmalıdır. Araç ve gereç seçimi rutin laboratuvar olanaklarını zorlamayacak şekilde yapılmalıdır.

I.5.2. Biyolojik Örneklerde İlaç Analizinin Basamakları

Tam bir analiz genel olarak 2 temel basamakta yapılır (37).

- a) Ayırma (separasyon)
- b) Tanımlama

I.5.2.1. Ayırma

Analitik işlemlerde tayini yapılacak bileşen veya bileşenlerin genellikle bazı ön işlemlerle saflaştırılması, doğal pigment, protein gibi kısımlarından arındırılması zorunludur. Yüksek duyarlıklılı modern yöntemlerin kullanıldığı hallerde bile etkin bir ayırma yöntemi başarılı bir analiz için ilk basamaktır. Ayırma genellikle tüketme ve kromatografi olmak üzere, temel ilkeleri aynı olan iki işlemle yapılır (39,40).

I.5.2.1.1. Tüketme (Ekstraksiyon)

Genel anlamda tüketme; uygun bir çözücü ile katı bir maddenin bileşenlerinin ayrılması veya bir maddenin bir sıvı fazdan, bu ilk fazla karışmayan ikinci bir faza alınmasıdır. Bunlardan ilkin katı-sıvı, ikincisine ise sıvı-sıvı tüketmesi adı verilir. Biyolojik sıvılarda analizde söz konusu olan sıvı-sıvı tüketmesidir.

I.5.2.1.1.1. Sıvı-Sıvı Tüketmesi

Tüm sıvı-sıvı tüketme yöntemleri Nerst'in dağılım yasasına dayanır. Bu yasaya göre çözünen maddenin iki karışmayan sıvıdaki aktivitelerinin (ki genellikle pratik nedenlerle aktivite yerine konsantrasyon kullanılır) oranı denge halinde sabittir. Dağılım yasası matematiksel olarak aşağıdaki eşitlikle ifade edilir.

$$k = \frac{C_u}{C_l} \quad (1)$$

k : Dağılım (partisyon) katsayısı
C_u : Üst fazdaki konsantrasyon
C_l : Alt fazdaki konsantrasyon

Dağılım katsayısı bir maddeden diğerine farklı olabildiği gibi kullanılan çözücüye ve ısıya bağlı olarak değişir.

İki bileşenin birbirinden ayrılmasında dağılım özelliklerinin farklarından yararlanılır. Şöyleki; iki bileşenin birbirinden ayrılması için 2 no'lu eşitlikle gösterilen ayırma faktörü, β'nin 1'den farklı olması gereklidir (39-43).

$$\beta = \frac{k_1}{k_2} \quad (2)$$

I.5.2.1.1.1.1. Tüketme Verimi

Tüketme verimi, birinci fazdan ikinci faza alınabilen çözünen madde miktarı yüzdesi olarak tanımlanır. Tüketme veriminin yükseltilmesi, uygun çözücü seçimi, pH ve iyonik güç denetimi ile sağlanır. Ayrıca aynı amaçla basit tüketme (tek-basamaklı tüketme) yerine kademeli tüketme (tekrarlanan veya çok basamaklı tüketme) veya devamlı tüketme, örneğin zıt akım dağılımı (Counter Current Distribution) (CCD) yöntemleri kullanılabilir.

İdeal bir tüketme yöntemi yüksek tüketme verimine ve yüksek tekrarlanabilirliğe sahiptir. Ancak her iki koşulun birden sağlanmasının güç olduğu hallerde yüksek tekrarlanabilirlik yüksek verime tercih edilir (39-43).

I.5.2.1.1.1.2. Sıvı-Sıvı Tüketmesinin Toksikolojik Tarama Testlerindeki Uygulamaları

Suistimal edilen ve zehirlenmelere neden olan ilaçların biyolojik

sıvılardan, özellikle idrardan tüketilmesi, ya direkt tüketme ile ya da asit hidroliz veya enzimatik hidrolizi takiben tüketmeyle yapılır. Ayrıca uygulanan pH koşullarına göre değişik pH'larda kademeli tüketme veya tek bir pH'da tüketme kullanılır.

Birçok araştırmacı kademeli tüketme uygulayarak barbitüratlar gibi asidik yapıdaki ilaçları asit pH'da, narkotikler, amfetaminler, fenotiazinler gibi bazik ilaçları ise bazik pH'da tüketmişlerdir (35,36,38,44-58). Goldbaum (44) kendi adıyla anılan tüketme yönteminde eter veya kloroform-izopropanol çözücü karışımlarını ve özgül pH'lara tamponlanmış çözeltileri kullanarak maddeleri grup ve alt gruplarına ayırmıştır. Sobolewski ve Nadeau (45) benzer bir yaklaşımla kademeli asit-baz tüketmesi kullanarak suistimal edilen çeşitli yapıdaki ilaçları değişik organik çözücülerle tüketip gruplara ayırmışlar, maddeleri çeşitli belirteçlerle verdikleri renklere göre tanımlamışlardır.

McIsaac (48) yine aynı temel yaklaşımı kullanarak barbitüratları pH 5'de, amfetamin, fenotiazin ve narkotikleri pH 9'da tüketmiştir.

Mulé (38) idrar örneklerini 3 ayrı kısma ayırarak pH 2.2, 9.3 ve 11'de, sırasıyla barbitürat, opiat ve amfetaminleri tüketmiştir. Aynı araştırmacı daha sonraki araştırmalarında barbitüratları pH 1'de kloroform ile, fenotiazin ve narkotikleri ise pH 10-11'de kloroform-etanol ile tüketmeyi önermiştir (50).

Kaistha ve Jaffe (29,36,51,52) barbitüratlar için pH 1'de narkotikler, amfetamin ve benzerleri için pH 10.1'de tüketme uygulamışlardır.

Broich ve diğerleri (53) ise asidik ve nötral ilaçları asit pH'da kloroform ile, narkotikler ve amfetaminleri ise pH 8.5-9'da kloroform-izopropanol ile tüketmişlerdir. Aynı araştırmacılar suistimal edilen

ilaçlar için, biyolojik sıvılardan liyofilizasyonu takiben sıvı-sıvı tüketmesine dayanan bir yöntem de önermişlerdir (54).

Benzer yaklaşımlar birçok araştırmacı tarafından kullanılmıştır (55-59).

Başta Davidow olmak üzere bazı araştırmacılar ise değişik pH'larda kademeli tüketme yerine tek bir pH'da tüketmeyi, toksikolojik tarama testlerinin ivedi özelliği nedeniyle tercih etmişlerdir. Bu tür çalışmalarda taranacak ilaçların tümünün optimum ölçüde tüketilebileceği bir pH seçilmesine özen gösterilmiştir. Nitekim toksikolojik tarama testleri arasında temel bir araştırma olarak kabul edilen Davidow yönteminde, kullanılan pH 9.5 da analjezik, antihistaminik, hipnotik ve sedatif, opiat, stimulan, trankilizanlar gibi çeşitli yapıda 90 kadar maddenin başarı ile tüketildiği ve bu pH'da sorun olması en muhtemel barbitüratların da önemli ölçüde tüketilebildiği bildirilmiştir (60,61). Çeşitli araştırmacılar özellikle bu araştırmadan hareketle pH 8.5-9.5 arasında tek bir pH'da tüketmeyi rutin toksikolojik tarama testleri için uygun bulmuşlardır (26,60-66).

Suistimal edilen ilaçların bazıları, özellikle narkotik analjezikler, idrarda glukuronatları halinde atıldıklarından, tayin edilebilecek serbest ilaç miktarını artırmak üzere idrar örneklerinin asit veya enzimatik hidrolizinden sonra tüketme kullanılmaktadır.

Asit hidroliz, genellikle, idrarın hidroklorik veya sülfürik asit gibi kuvvetli bir asitle otoklavda veya su banyosunda ısıtılması ile yapılır (örneğin 0.1 N HCl ile 100°C de 30 dakika ısıtarak). Hidroliz işlemini takiben hidrolizat soğutulur, nötralleştirilir ve sonra istenen pH ya getirip tüketme uygulanır (36,39,40,45,50,52,56,58,59,62).

Genellikle glusulaz gibi bir glukuronat-sulfataz enzim preparatı ile yapılabilen enzimatik hidroliz ise, asit hidrolize kıyasla maddenin

bozunmasını önlemesi gibi bir üstünlüğe sahiptir, fakat yavaş ve pahalı bir yöntemdir (27,67).

1.5.2.1.2. Kromatografik Ayırma Yöntemleri

Kromatografi, örnek bileşenlerinin birbiriyle karışmayan iki faz arasında dağılım dengeleri farklarına dayanarak ayrılmalarını sağlayan bir ayırma yöntemidir (68-70). Bu fazlardan biri, gaz veya sıvı olabilen "hareketli faz" diğeri bir sıvı veya katı olabilen "sabit faz" dır.

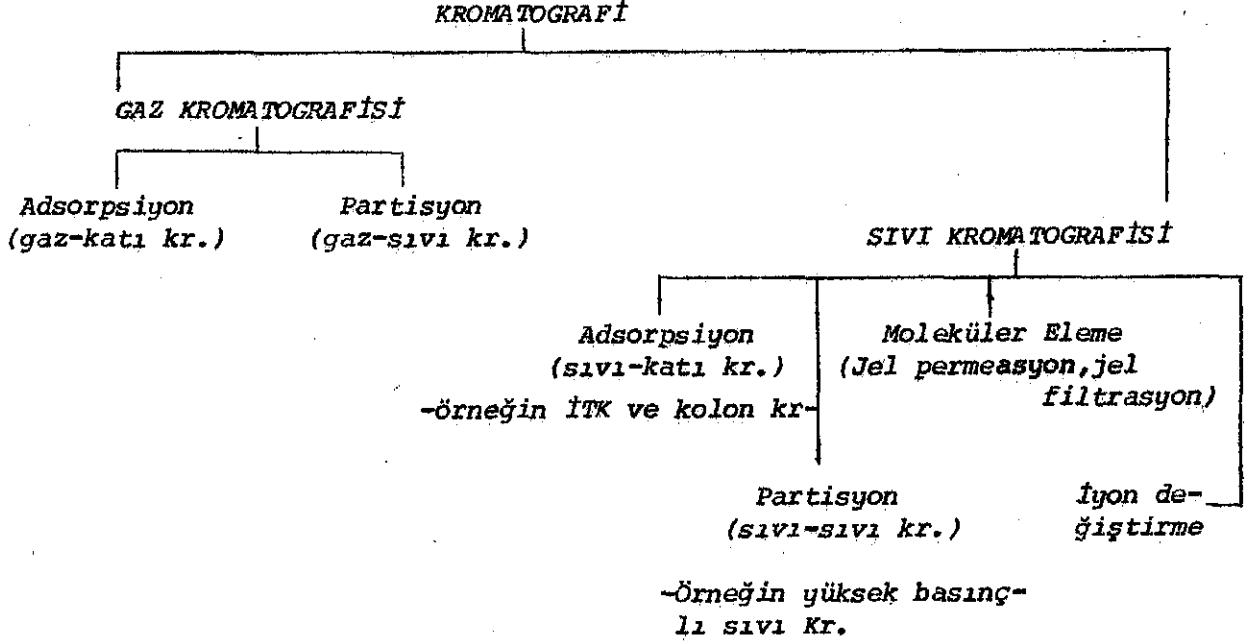
"Adsorpsiyon kromatografisinde" sabit faz, çok ince taneciklerden oluşmuş toz görünümünde bir katıdır. Dağılma (partisyon) kromatografisinde ise, geniş bir yüzey sağlamak üzere katı destek (adsorban) taneciklerine emdirilmiş bir sıvıdır.

Örneğin bileşenleri hareketli faz içinde kromatografik sistemde ilerler ve farklı dağılım dengelerinden doğan farklı sürüklenme hızları ayırımı (separasyonu) sağlar.

Ancak, kromatografik yöntemler ayırım yöntemleri olduğu kadar, uygun dedektörlerle birlikte kullanıldıklarında nitel ve nicel tayin olanağı da sağlayan analiz yöntemleridir. Böylece uygun kromatografi sistemlerinin kullanımı ile analizin ikinci basamağı da tamamlanabilir. Diğer taraftan kromatografi uygulamaları genellikle bir ön tüketme işlemini takiben yapılır.

1.5.2.1.2.1. Kromatografik Yöntemlerinin Sınıflandırılması

Kromatografik yöntemler uygulama biçimi ve hareketli ve sabit fazların cinsine göre aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilir (71).



Çok sayıda ilacın birlikte, kısa sürede, duyarlılıkla ve doğru olarak tayini ilkesine dayanan ivedi toksikolojik tarama testleri için literatürde en çok kullanılan yöntemlerin kromatografi yöntemleri olduğu, bu yöntemler içinde de en fazla ince tabaka kromatografisi (İTK) nin kullanıldığı görülmektedir. Bu nedenle ve bu araştırmada da kullanılan analiz yöntemi olması nedeniyle İTK'nin temel ilkelerinden kısaca söz edilmesi ve literatür örneklerinin verilmesi yararlı olacaktır. Ayrıca gaz kromatografisi ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi uygulamalarından da kısaca söz edilecektir.

1.5.2.1.2.2. İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) ve Toksikolojik Tarama Testlerindeki Uygulamaları

İTK genel anlamda bir adsorpsiyon kromatografisi şeklindedir. Ancak bazı çözücü sistemlerinin kullanımı ile partisyon ve adsorpsiyon etkileri bileşimi sonucu ayırım yapılabilir. Ayrıca son yıllarda direkt olarak partisyon kromatografisi uygulaması yapılabilen adsorbanlar ve İTK sistemleri geliştirilmiştir.

İTK'da, sabit faz olan adsorban, cam veya plastik gibi bir destek üzerine ince bir tabaka halinde yayılmıştır. Hareketli faz adsorban tabaka boyunca kapiller kuvvetle sürüklenir. Tatbik edilen örneğin bileşenleri hareketli faz içindeki çözünürlüklerine, polaritelerine ve çözücünün polaritesine bağlı olarak değişik hızlarda sürüklenirler. Bileşenlerin tatbik noktasından uzaklıklarının, çözücünün tatbik noktasına nazaran sürüklenme uzaklığına oranı R_f değeri olarak ifade edilir ve bu değer bileşene, çözücü sisteme ve adsorbana bağımlı bir değerdir. R_f değerlerinin referans standartlarla karşılaştırılması, floresan lekelerin U.V. ışığı altında incelenmesi ya da renk reaktifleri püskürtülmesini takiben tanıya gidilir. Ayrıca ilave yöntemlerle nicel tayinler de yapılabilir.

İTK ilaç ve metabolit analizlerinde en uygun yöntem olarak halen geniş bir kabul görmektedir. Çok daha gelişmiş yöntemlerin ve de gereçlerin kullanılabilirdiği laboratuvarlar da bile İTK, en azından bir ön yöntem olarak kullanılmaktadır. İTK yöntemi hızlıdır, minimum gerece gereksinme gösterir, minimum miktarda örnekle çalışılabilir ve alınan sonuçların güvenilirliği yüksektir. Ancak laboratuvarlar arasında görülebilen değişkenlikler bazen sorun yaratabilir. Bu değişkenlikler sisteme ve laboratuvar koşullarına bağlıdır. Adsorbanın aktivitesi, sürüklenme sisteminin bileşimi, kromatografi tankının doygunluğu, laboratuvar sıcaklığı ve nemi R_f değerlerini, leke büyüklüğünü ve şeklini dolayısıyla sonuçları etkileyen faktörlerdir. Bu faktörlerin kontrol altına alınması ve referans standartlarla karşılaştırma, değişkenlikleri minimuma indirebilir (72-74).

Günümüzde, suistimal edilen ve sık olarak zehirlenmelere neden olan ilaçların idrardan tayininde İTK yöntemi geniş bir uygulama görmektedir. İTK, iyi bir tarama yöntemi için I.5.1'de sözü edilen geçerli ölçütleri tam olarak karşılayan bir yöntemdir. Ayrıca bir tek sürüklenme ile aynı

anda çok sayıda ilaç veya metabolitleri tayin edilebilir ve kısa sürede çok geniş bilgi sağlanabilir (29-32,38,74).

Davidow, kendi adıyla anılan tarama yönteminde silikajel G adsorbanı ve etil asetat : metanol : amonyak (85:10:5) sürükleme sistemini kullanmıştır (60,61). Kromatografi işlemi 35 dakika sürmekte olup I.5.2.1.1.2. de de sözü edildiği şekilde çok sayıda madde analiz edilebilmektedir.

Cochin ve Daly (46,47) barbitüratların analizini, silikajel G adsorbanı ve (i) kloroform : aseton (9:1), (ii) benzen : asetik asit (9:1), (iii) dioksan : benzen : amonyak (20:75:5) sürükleme sistemlerini kullanarak 2-4 saat içinde yaptıklarını bildirmektedirler.

McIsaac (48) barbitüratlar için kloroform : aseton (9:1), amfetaminler için butanol : asetik asit : su (4:1:5), alkaloidler için etanol : dioksan : benzen : amonyak (5:40:50:5), fenotiazinler için ise etil asetat : asetik asit : su (5:2:2) sistemlerini silikajel G adsorbanı üzerinde kullanmışlardır.

Mulé, barbitüratlar için etil asetat : metanol : amonyak (85:5:2.5); opiat, fenotiazin ve benzerleri için ise kloroform : metanol : amonyak (90:10:1) ve etil asetat : metanol : amonyak : su (85:10:1:3) başta olmak üzere bir dizi sürükleme solvanını ve silikajel G adsorbanını ve bir dizi belirteçi kullanarak tanıya gitmiştir (35,50).

Broich ve diğerleri, asidik ve nötral ilaçları hekzan : etanol (93:7), bazik ilaçları ise etil asetat : metanol : amonyak (85:10:1) sürükleme solvanlarını deneyerek tayin etmişlerdir (53,54).

Yukarıda sözü edilen çalışmalardan ve özellikle Davidow yönteminden pek çok araştırmacı yararlanmışlardır. Literatürde değişik uyarlamalarla

yapılan uygulamalara ait bir çok çalışma vardır (26,35,36,38,45,49,52,55-59,63-66,74-87).

I.5.2.1.2.3. Toksikolojik Tarama Testlerinde Gaz Kromatografisi Uygulamaları

Gaz kromatografisi (GK), biyolojik sıvılardan ilaç ve metabolitlerinin tayininde yaygın kullanımı olan duyarlı ve özgül bir kromatografi yöntemidir. Ancak İTK'ya göre pahalıdır, kullanımı özel beceri ve eğitim gerektirir (1,27-31,37,50,55,56,58,59).

Gaz kromatografisi, morfin gibi bazı narkotik analjeziklerin tanısında oldukça duyarlı bulunmuştur (88-94). Mulé (88) serbest ilaç ve asetillenmiş türevlerinin alıkonma sürelerini karşılaştırarak 31 narkotik ilacın tanısını yapmıştır.

Barbitürat, difenilhidantoin, diazepam, meprobumat gibi çeşitli grup ilaçların biyolojik sıvılardan analizi için pek çok gaz kromatografik yöntem geliştirilmiştir (95-111). McGee (95) gaz kromatografisi kullanarak glutetimid ve çeşitli barbitüratların 20 dakikada kandan tayinini yapmıştır. . . Kananen ve diğerleri (96) de 1 ml kan veya idrardan çeşitli barbitüratları metillenmiş türevleri halinde çabuk ve güvenilir bir şekilde tayin etmişlerdir.

I.5.2.1.2.4. Toksikolojik Tarama Testlerinde Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi Uygulamaları

Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC), temelde bir sıvı kromatografisidir. Geleneksel kolon kromatografisinden farklı olarak çok küçük çaplı, yüksek yüzey alanlı partiküllerden oluşan materyelle doldurulmuş kolonlara, hareketli faz yüksek basınçlı bir pompa ile pompalanır. Böylece, çözüncünün kontrollü ve hızlı akışı sağlanır. Dolayısı ile analiz-

lerde yüksek tekrarlanabilirlik elde edilir. Nitel ve nicel tayinler, bağlanan çeşitli tipte dedektörlerle yapılabilir (71). Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi son yıllarda geniş uygulama gören duyarlı bir tekniktir.

Kabra ve diğerleri (112) 200 µl lik serum örneklerinde, pirimidon, metiprilon, fenobarbital, butabarbital, etklorvinol, pentobarbital, amobarbital, difenilhidantoin, glutetimid, sekobarbital, metakualen gibi çok kullanılan 12 sedatif ve hipnotik için 10 nanograma kadar duyarlıkta bir yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir.

Adams ve Vandemark (113), bazı antikonvulsanları 0.5 ml lik serum örneklerinde 20 dakikada, 0.1 mg/lt duyarlıkla tayin etmişlerdir.

Ayrıca, pek çok araştırmacı diazepam, N-desmetildiazepam, klordiazepoksit gibi antidepresanların, sedatiflerin ve antikonvulsan ilaçların tayinleri için yüksek basınçlı sıvı kromatografisinden yararlanmışlardır (114-125).

I.5.2.1.2.5. Toksikolojik Tarama Testlerinde Noniyonik Reçine Kullanımı

Son yıllarda polimerik özellikte adsorbanların bir ayırma aracı olarak kullanımı önem kazanmıştır. Bu grup maddelerden Amberlit XAD-2 ilaç tarama testlerinde başarılı uygulamaları olan poröz ve hidrofobik özellikli bir polistiren reçinedir. Stiren divinil benzen kopolimer makroretiküler yapısında olup büyük yüzey alanına sahiptir (67).

Amberlit XAD-2 reçinesi ile yapılan işlem, bir tüketme işlemi olduğu kadar bir kolon kromatografisi yöntemidir. İyonize olabilen gruplara sahip olmayan, noniyonik bir reçine olan Amberlit XAD-2 zayıf bir adsorban olarak hareket eder. Bu nedenle suda çözünen ve hidrofobik takılara sahip eser bileşenlerin, idrar gibi sulu ortamlardan ayrılmasında etkinliğe

sahiptir. Amberlit XAD-2 kolonlarındaki kaba, poröz taneciklere Van der Waals kuvvetleri ile adsorbe olan bileşikler, takiben bir organik çözücü ile geri elde edilebilirler. Eluat bir faz ayırıcı filtreden geçirilerek sulu kısım (idrara) uzaklaştırılır ve organik faz bir toplama kabına toplanır. Örnekte mevcut olan ilaçların yoğunlaştırılması için tam bir uçurma yapılır ve takiben bu kurutulmuş ekstre bir kaç ml organik çözücüde çözülerek ince tabaka kromatografisi veya diğer analizlerde kullanılabilir.

Amberlit XAD-2 reçinesi ile tüketmede, tüketme verimi aşağıdaki koşullara bağımlılık gösterir ;

- a- İdrarın pH'sı
- b- İdrarın kolondan akış hızı
- c- İdrar hacminin (ml) reçine ağırlığına oranı (ml/g)
- d- Elusyon çözeltisinin polaritesi
- e- Eluatın hacmi ve akış hızı.

İdrardan asidik, bazik ve amfoterik ilaçların uygun koşullarda tek bir pH'da tüketilmesinde Amberlit XAD-2 hızlı ve etkili bir tüketme sağlar ve peşpeşe tüketmeler için de uygundur. Ayrıca hemen analiz edilemeyecek örnekler reçine kolonlarına adsorbe edilmiş olarak buzdolabında saklanabilmektedir.

Toksikolojik tarama testlerinde Amberlit XAD-2 yi ilk kullanan Fujimoto ve Wang'dır (126). Bu araştırmacılar tedavi dozlarında insanlara verilen narkotik analjeziklerin idrar örneklerindeki analizinde, bu reçineyi kullanmışlar ve metanol ile yapılan tüketme işleminin 15 dakika da tamamlandığını göstermişlerdir.

Daha sonra Mulé ve arkadaşları bir seri araştırmalarında (127-129) aşırı dozlarda alınmış çeşitli ilaçların pH 8-9'da idrardan tüketilme-

sinde aynı reçineyi kullanarak verimli sonuçlar almışlardır. Kullandıkları kloroform-izopropanol tüketme sistemi ile özellikle barbitüratların tanısında reçine tüketmesinin üstünlüklerini göstermişlerdir.

Aynı şekilde Weissman ve Brandt (130,74) suistimal edilen ilaçlara yönelik tarama çalışmalarında Amberlit XAD-2 reçinesi kullanımının yararlarını vurgulamışlardır.

Sawada ve diğerleri (131), metanol ve etil asetat-metanol-asetik asit tüketme çözücülerini ile idrardan benzodiazepin türevi trankilizan ve metabolitlerinin ayırma ve tanısında Amberlit XAD-2 reçinesini kullanmışlardır.

Yukarıda sözü edilenler dışında bir çok çalışmada Amberlit XAD-2 reçinesi kullanımının zehirlenmelere sebep olan ve suistimal edilen pek çok ilacın biyolojik örneklerden analizinde, kolay, hızlı, duyarlı ve ucuz olduğu bildirilmektedir (27,132-134).

Ayrıca pek çok araştırmacı da, biyolojik örneklerden ilaç analizinde Amberlit XAD-2 gibi non-iyonik bir reçine yerine, Amberlit IR-120 (sodyum şekli) (Reeve Angel SA-2) gibi katyonik reçine yüklü kağıt kullanmayı önermişlerdir (35,36,49-52,56,75,77,78,84).

I.5.2.2. Tanımlama Yöntemleri

I.5.2.2.1. Ön Tüketme Gerektiren Yöntemler

Biyolojik örneklerde ilaç analizinin ikinci basamağı olarak isimlendirdiğimiz tanımlama yöntemleri çok sayıda analiz yöntemlerini içine alır.

I.5.2.1.2'de de sözü edildiği gibi çeşitli tipde dedektörlere bağlanabilen kromatografik sistemlerde ayırma ve tanı birlikte yapılabilir.

Bu dedektörler sıvı kromatografisi sistemlerine (örneğin kolon kromatografisi) bağlanabilen spektroskopik analiz dedektörleri olabilir. Diğer taraftan gaz kromatografisinde alev iyonizasyon, elektron yakalayıcı dedektörler veya kondüktometrik dedektörler kullanılır. Ayrıca gaz kromatografisi-kütle spektrometresi kombinasyonlarında kütle spektrometresi ile tanıya gidilebilir. Bu son sisteme bağlanan bilgisayar sistemlerinin başarı ile kullanıldığı acil toksikoloji laboratuvarları da vardır (28,59,70,110,135). Böylece çok hızlı ve kesin sonuçlar alınabilmektedir. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde U.V., flurometrik, refraktif indeks veya radyometrik tayin dedektörleri kullanılabilir (59,136).

Ayrıca İTK'da dansitometrik ölçümler, U.V. lambası altında floresans esasına dayalı tayinler ve son olarak da renk reaktifleri ile tayinler yapılabilir.

Diğer taraftan tanımlama, tüketmeyi takiben bağımsız olarak spektroskopik yöntemlerle yapılabilir.

I.5.2.2.2. Ön Tüketme Gerektirmeyen Yöntemler

I.5.2.2.2.1. Elektron Spin Rezonans Tekniği (ESR)

Antijen, antikor reaksiyonu temeline dayanan ve ilacın haptin rolü oynadığı bir yöntemdir. Direkt olarak idrar örneklerine uygulanabilir. Özellikle morfin ve benzerleri için başarılı uygulamaları vardır (29-32, 38,59). Ancak maliyeti yüksek ve genel olarak özgüllüğü düşük bir yöntemdir.

I.5.2.2.2.2. Immunoassay Teknikleri

a- RIA (Radioimmunoassay)

RIA, morfin ve benzeri opiatlar, metadon, amfetamin, barbitürat ve kokain gibi ilaçların biyolojik sıvılardan analizinde kullanılmaktadır.

Radyoaktif işaretli ilaç ile biyolojik sıvıdaki ilacın özgül antikora bağlanmak için yarışmaları esasına dayanır. Ön tüketme işlemini gerektirmeksizin 50-250 µl kadar küçük miktardaki sıvılarda analizler yapılabilir. Maliyeti fazla, analiz zamanı uzun, beceri isteyen bir teknik olmasına karşın öncelikle barbitürat ve amfetaminlerin analizlerinde yüksek duyarlı bir yöntemdir (29-32,38,137-143,59).

b- EMIT (Enzyme Multiplied Immunoassay)

Enzime bağlı ilaç ile örnekteki ilacın özgül antikora karşı yarışması temeline dayanır. Enzim aktivitesindeki farklılık ilaç varlığını gösterir. Fazla beceri gerektirmeksizin kullanılabilen, analiz süresi kısa fakat maliyeti yüksek bir tekniktir. Afyon alkaloidleri, barbitüratlar, amfetaminler için kullanılmaktadır (29-32,38,59,141,144,145).

c- Hemaglutinasyon İnhibisyon Tekniği (HIT)

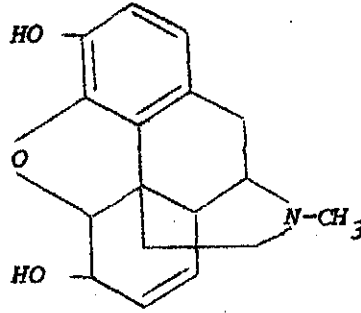
HIT ön tüketme işlemi gerektirmeksizin, özellikle barbitürat, morfin ve benzeri opiatlar, metadon ve kokain gibi ilaçlara oldukça duyarlı bir yöntemdir. Özgül antikora karşı ilacın ve alyuvarların yarışması temeline dayanır. İdrarda ilaç varlığında antikorla ilaç bağlandığından alyuvarların agglutinasyonu önlenir. Özel beceri gerektiren ve maliyeti yüksek bir tekniktir (29-32,38,59,141,146,147).

Biyolojik sıvılardan çeşitli ilaçların tayininde yukarıda sayılan tekniklerden başka, polarografi tekniği, mikrodifüzyon analizleri, mikrokristal testleri ve optik kristallografi yöntemleri kullanılabilir. Ancak bunların geniş tarama testlerinde fazla değeri yoktur.

I.6. Çalışmada Kullanılan Referans Standartlar Hakkında Genel Bilgiler

Bu bölümde, suistimal edilme ve zehirlenmelere neden olma olasılıklarının yüksek olması nedeniyle, I.3'de de söz edildiği gibi, referans standart olarak seçilen ve idrar örneklerinden analizi yapılan maddeler hakkında genel bilgi verilecektir. Bu bilgilerin, söz konusu maddelerin toksisitelerinin ve özellikle idrarda serbest halde tayin edilebilme olasılıklarının değerlendirilmesi yönünden yararlı olacağı düşünülmüştür.

I.6.1. Morfin



7,8-Didehidro-4,5-epoksi-17-metil-morfinan-3,6-diol (148).

Kullanılışı : Morfin narkotik analjeziklerin prototipi olarak tanımlanan fenatren türevi bir afyon alkaloididir. Oral veya parenteral olarak kullanılır. Mutat parenteral dozu 0.01 g olup, bir kezlik maksimum dozu 0.02 g, günlük maksimum dozu ise 0.05 g'dır (149).

Preparatları : Morphine sulfat inj. (150)

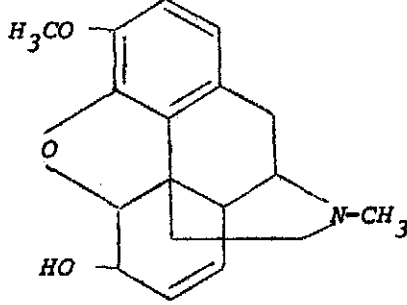
Absorpsiyonu, Metabolizma ve İtrahı : Morfin i.m. ve s.c. yoldan çabuk ve tam olarak absorbe olur. Ağız yolundan absorpsiyonunun yavaş olmasına karşın etki süresi daha uzundur. i.m. verildiğinde doruk plazma

konsantrasyonlarına 10-20 dakikada ulaşır. Biyolojik yarı ömrü, i.v. ve i.m. kullanımında 2 saattir (151,152). Verilen dozun % 90'ı 24 saatte elimine edilir. Karaciğerde fenolik hidroksil grubu üzerinden glukuronik asitle birleşerek inaktive edilir. Ayrıca, N-demetilasyonla normorfine dönüşür. % 90 oranında böbreklerden, % 10 oranında feçesle atılır. Verilen dozun % 10'u değişmeden, % 75'i konjuge halde, % 1'i normorfin ve % 4'ü konjuge normorfin halinde idrarla itrah edilir (90,91,151,153,154).

Toksisitesi : Morfinin, analjezik etkisi dahil birçok santral etkilerine karşı belirgin derecede tolerans gelişir. Morfin tipi bağımlılık olarak tanımlanan ve kompulsif derecede ilaç özlemiyle karakterize, kuvvetli fiziksel ve psişik bağımlılığa sebep olur. Bu nedenle uyuşturucu maddeler listesinin başında yer alır. İlacın kesilmesi yoksunluk sendromuna sebep olur. Morfin veya afyonun intihar amacıyla veya bağımlılar tarafından aşırı dozda alınmasıyla, koma, ileri derecede solunum depresyonu ve iğne başı pupiller ile karakterize akut morfin zehirlenmesi gelişir (155,156). Terapötik kan konsantrasyonu 0.01-0.05 mg/100 ml, toksik kan konsantrasyonu (koma halinde) 0.1-0.5 mg/100 ml dir (30).

Analizi : Zayıf bazik (pKa 9.85) bir ilaç olan morfinin biyolojik sıvılardan tayini serbest morfin düzeyi üzerinden yapılır. İTK ve GK (88,90-92,153,154,157-160), spektrofotometrik (88) ve radyoimmunoassay yöntemleri (137,138,151,152,159) ile tayin edilmektedir. Metabolizma sonucu morfine dönüşen heroinin tayini de aynı yöntemlerle yapılır.

1.6.2. Kodein



7,8-Didehidro-4,5α -epoksi-3-metoksi-17-metilmorfinan-6α-ol (148).

Kullanılışı : Metilmorfin yapısında bir afyon alkaloididir. Öksürük kesici ve analjezik olarak kullanılır. Ağız yolundan bir kezde 0.020 g (baz olarak) verilir. Maksimum dozu bir kezde 0.05 g günlük 0.2 g dır (149).

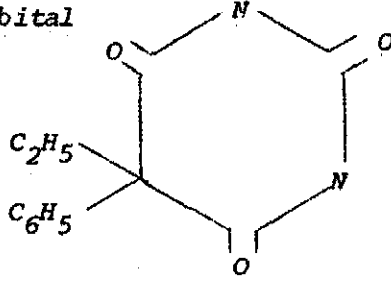
Preparatları : Geralgine, Pankopan, Kodis, Kodinal, Kodibeksin, Viradolor, Tussa-K, v.b. gibi birçok preparatı vardır. (Aspirin ve diğer ağrı kesicilerle birlikte verildiğinde aditif etki gösterir)(150).

Absorpsiyonu, Metabolizma ve İtrahı : Oral veya i.m. verilmeyi tabii olarak oldukça iyi absorbe edilir. Doruk plazma konsantrasyonuna 2 saatte ulaşılır. Lipitte çözünürlüğü fazla olduğu için kan-beyin engelini kolay aşar (161). Karaciğerde, glukuronik asitle konjugasyon, O-demetilasyon ve N-demetilasyonla metabolize edilir. İtrahı hızlıdır. Dozun 2/3'si 6 saat içinde idrarla atılır. 24 saat içinde itrah tamamlanmasına rağmen bir kaç gün sonra bile eser miktarda konjuge metabolitler tayin edilebilir. % 5-17'si serbest ilaç, % 32-46'sı konjuge kodein, eser miktarda serbest norkodein, % 10-21 konjuge norkodein, eser miktarda morfin ve % 5-13 konjuge morfin halinde itrah edilir (94,162,163).

Toksisitesi : Kodein morfinden daha az toksik olduğundan yüksek dozlarda bile morfinin karakteristik santral depresyonunu oluşturmaz. Ancak, morfine kıyasla düşük olmakla birlikte, bağımlılık yapma yeteneğine sahiptir. Maksimum dozun 200 mg olmasına karşın bağımlılar çok daha yüksek dozları tolere edebilirler. Letal dozu 800 mg dır (94,164). Ayrıca öksürük şuruplarının yaygın kullanımı nedeniyle kazai zehirlenme sıklığı da yüksektir. Toksik dozlarda konvülsiyon, baygınlık, şuursuzluk yapar. 1-4 saat içinde solunum felcinden ölüm görülebilir (165).

Analizi : Zayıf bazik (pKa 6.05) olan kodein biyolojik sıvılardan kendisi veya metabolitleri halinde spektrofotometrik (88,162), İTK (88, 92,94,157,158,163) ve gaz kromatografik (88,89,92-94) yöntemlerle tayin edilebilir.

1.6.3. Fenobarbital



5-etil-5-fenilbarbitürik asit (148).

Kullanılışı : Sedatif ve antikonvülsan olarak kullanılan uzun etkili bir barbitürat türevidir. Epileptik hastalarda 60-200 mg lık dozlarda oral olarak kullanılır (155,166). Oral bir kezlik mutad doz 0.01-0.1 g günlük doz ise 0.3 g dır. i.m. mutad doz ise 0.04-0.2 g olup maksimum doz 0.3-0.6 g dır (149).

Preparatları : Luminal, Luminalletten, Phenobarbital, Phenobarbitalum (Ayrıca başta analjezikler olmak üzere çeşitli ilaçlarla kombine preparatları vardır)(150).

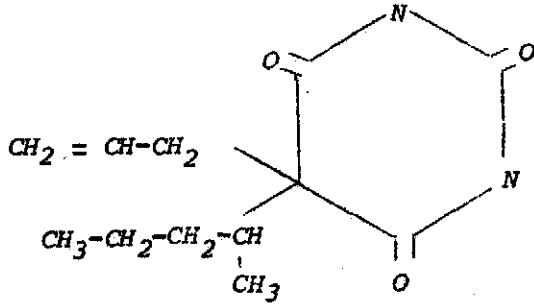
Absorpsiyonu, Metabolizma ve İtrahı : Mide-barsak kanalından absorpsiyonu yavaş olmasına karşın tamdır. Doruk plazma konsantrasyonlarına 4-5 saatte ulaşılır. Lipitte çözünürlüğünün yüksek olmasından dolayı tüm vücut sıvılarına dağılır. Plazma proteinlerine % 20 oranında bağlanır. Biyolojik yarı ömrü 24-96 saattir (166). Karaciğerde oksidasyonla inaktif p-hidroksifenobarbitale dönüşür. % 56'sı feçesle atılır. İdrarda % 10-25'i değişmeden, % 8'i serbest p-hidroksi fenobarbital, % 9'u konjugatı halinde itrah edilir (155,165-168).

Toksisitesi : Barbitüratlar intihar amacıyla en fazla tercih edilen ilaçlardır. Ayrıca barbitürat içeren analjezik preparatlarının reçetesiz ve denetimsiz satışları da özellikle çocuklarda kazai zehirlenmelerde önemli bir rol oynamaktadır. Barbitüratlar, fiziksel ve psişik bağımlılık ve tolerans yaparak barbitürat tipi diye tanımlanan bir bağımlılığa sebep olurlar. Yetişkinlerde minimum letal doz 5 g dır (156,164).

Terapötik plazma konsantrasyonu 10-30 mg/ml'nin altındadır. 60 mg/ml'den yüksek konsantrasyonlarda şiddetli toksik belirtiler gözlenir (169,170). Akut zehirlenmelerde bilinç kaybı ve koma görülür. Başlangıçta aşırı sersemlik hali, konfüzyon, ataksi ve konuşma bozukluğu vardır. İleri derecede SSS depresyonu, solunum depresyonu, hipotansiyon, hipotermi gelişir. Ölüm solunum depresyonu sonucudur (7,12,13,155,156,166).

Analizi : Zayıf asidik (pKa 7.3) yapıda bir ilaç olan fenobarbital biyolojik sıvılardan serbest veya aktif metabolitleri halinde kolorimetrik (171), İTK (171-173), kağıt (174-178) ve gaz kromatografisi (95,97, 100,101,179), UV spektrofotometresi (44,177,180-185) ile tayin edilmektedir.

I.6.4. Sekobarbital



5-allyl-5-(1-metilbutil) barbitürük asit (148).

Kullanılışı : Kısa etkili bir barbitürat türevidir. Sedatif ve hipnotik olarak kullanılır. Hipnotik olarak günde 3-4 kez 100-200 mg dozlar da verilir (7).

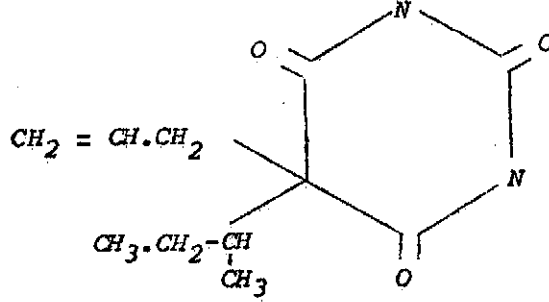
Preparatları : Sekonal (Ayrıca başta analjezik, anti gripal olmak üzere çeşitli ilaçlarla kombine preparatları vardır)(150).

Absorbsiyonu, Metabolizma ve İtrahı : Absorpsiyon ve dağılım özellikleri fenobarbitale benzer. Biyolojik yarı ömrü 19-34 saattir (186). Alınan dozun, 2 gün içinde, yaklaşık % 5'i değişmeden atılır. Geri kalanı 5-hidroksi-5-(1-metilbütil) barbitürük asit, 5-(1-metilbütil) barbitürük asit ve 5-(2,3-dihidroksipropil)-5-(1-metilbütil) barbitürük asit (sekodiol) şeklinde itrah edilir. Metabolitler 48 saatlik idrarda ilacın tek bir dozunun % 50'sini oluştururlar (165,166,187).

Toksisitesi : Yetişkinlerde minimum letal dozu 2 g dır (156,164). Terapötik kan konsantrasyonu 0.01-0.1 mg/100 ml, toksik kan konsantrasyonu ise 1.0-30 mg/100 ml olan (30) sekobarbitalin toksisitesi fenobarbital gibidir.

Analizi : Zayıf asidik (pKa 7.9) yapıda ilaç olan sekobarbital biyolojik sıvılardan serbest veya aktif metabolitleri halinde fenobarbitalde olduğu gibi tayin edilir.

I.6.5. Butalbital



5-allyl-5-isobutilbarbitürük asit (148).

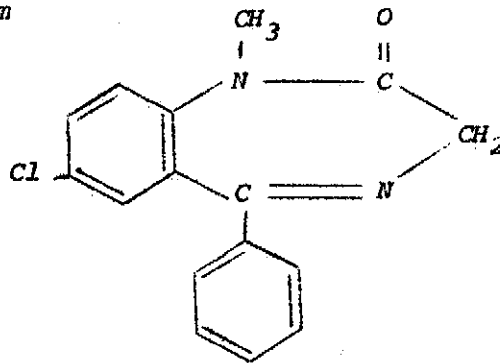
Kullanılışı : Orta etki süreli bir barbitürat türevidir. Sedatif ve hipnotik olarak kullanılır. Günde 3-4 kez 200-600 mg dozlarda hipnotik, 100-200 mg dozlarda ise sedatif etki gösterir (7).

Preparatları : Optalidon, Spasmo-panalgine, Sedaljin gibi asetaminofen, aspirin, kodein ve fenasetin gibi ilaçlarla kombine haldeki preparatlarının kullanımı yaygındır (150).

Absorpsiyonu, Metabolizma ve İttrahı : Absorpsiyon ve dağılım özellikleri fenobarbitale benzer. Dozun % 20'si idrarla değişmeden atılır. Yan zincirlerinin oksidasyon sonucu hidroksi ve karboksi türevlerine metabolize olduğu sanılmaktadır (164,165).

Toksisite ve Analizi : Fenobarbitalde söz edildiği gibidir.

I.6.6. Diazepam



7-Kloro-1,3-dihidro-1-metil-5-fenil,2H-1,4-benzodiazepin-2-on (148).

Kullanılışı : Benzodiazepin grubu bir ilaç olan diazepam, trankilizan, santral kas gevşetici ve antikonvülsan olarak kullanılır. Trankilizan olarak günde 3-4 kez 2-10 mg dozlarda etkilidir. Akut anksiyete veya panik reaksiyonlarında 5-15 mg dozda i.m. veya i.v. verilir (7,188,189).

Preparatları : Anksiyolin, Dia-Pam, Diazem, Lizan, Nervium, Valium, Valibrin, Zepam (150).

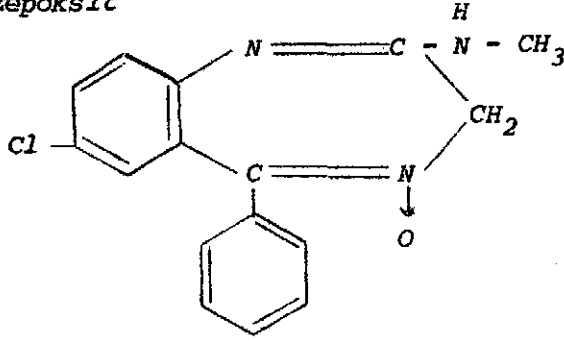
Absorpsiyonu, Metabolizma ve İtrahı : Mide-barsak kanalından hızla absorbe edilir. Doruk plazma konsantrasyonlarına 1 saatte ulaşır. Plazma proteinlerine bağlanır. Karaciğerde kısmen demetilasyona uğrar ve etkin metaboliti olan demetildiazepam dönüşür. Ayrıca hidrosilasyonla temazepam ve okzazepam çevrilir ve daha sonra konjugasyona uğrar. Eliminasyonu yavaştır. Hergün mutlak dozlarda alındığında kan düzeyi 1 haftada kararlı duruma gelir. Verilen dozun % 70'i idrarla atılır. % 0.05'i serbest ilaç, % 0.05'i demetildiazepam, % 33'ü okzazepam glukoronat, % 20'si demetildiazepam ve temazepam glukuronatları halinde atılır (105,188-194). Diazepam ve demetildiazepamın biyolojik yarı ömürleri sırasıyla 21-37 ve 50-99 saat olarak bulunmuştur (194).

Toksisitesi : Diazepam, santral sinir sistemini deprese ederek etki eder. Uzun süren kronik tedavi ve yüksek dozlarda diazepam fiziksel bağımlılık oluşur (188,189). Yüksek dozlarından sonra belirgin yoksunluk sendromu ve nöbetler oluşmasına rağmen uzun yarı ömrü ve aktif metabolitlerine çevrilmesinden dolayı belirtiler bir hafta içinde görülmeyebilir. İnsanda bulunmuş minimum letal doz 100-500 mg/kg'dır (164). En sık görülen yan etkileri sersemlik ve sarhoşluk duygusudur. Bazen görme bulanıklığı, baş ağrısı, hafıza kaybı, kabızlık, hipotansiyon oluşur. Yoksunluk belirtileri, uykusuzluk, hipereksitabilite, kusma, iştahsızlık ve bazen grand-mal epilepsi nöbetidir (155,188,189). 300-400 mg gibi, bir kezlik tedavi

dozunun 30-40 katı miktarda intihar amacıyla diazepam alan kimselerde koma gelişmediği, sadece uyuklama ve ataksi hali olduğu, belirtilerin de 8 saat içinde kaybolduğu bildirilmiştir (7).

Analizi : Bazik (pKa 3.4) bir madde olan diazepam biyolojik sıvılardan, İTK (106-109,131,195,196), GK (105-109), kolorimetrik (106,197) ve spektrofotometrik (106,109) yöntemlerle tayin edilir. Genellikle aktif metabolitleri üzerinden tayin yapılır. Ancak, duyarlı yöntemlerle eser miktardaki serbest diazepam da teşhis edilebilir.

I.6.7. Klordiazepoksit



7-Kloro-2-metilamino-5-fenil-3H-1,4-benzodiazepin-4-oksit (148).

Kullanılışı : Trankilizan etkisi en uzun süreli olan benzodiazepin türevidir. Antianksiyete ajanı, hipnotik, adale gevşetici ve antikonsülzan olarak kullanılır. Oral olarak 15-40 mg dozda günde 3-4 kez verilir. Delirium tremens de 50-100 mg i.v. veya i.m. olarak kullanılır (7,188,189).

Preparatları : Librium, Elibrin, Libertin, Reliberan (150).

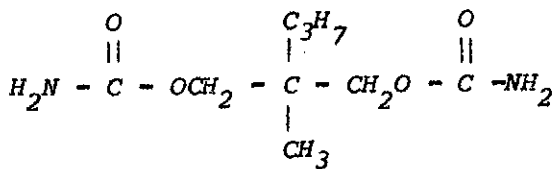
Absorpsiyonu, Metabolizma ve İtiraı : Mide-barsak kanalından hızlı ve tam olarak absorbe olur. Doruk plazma konsantrasyonlarına 4 saatte ulaşılır. Karaciğerde yoğun şekilde metabolize edilir ve en az 4 aktif

metaboliti oluşur. N-demetil türevi norklordiazepoksit ve bunun deamin şekli olan demokzazepam ana metabolitlerdir. Diğer iki aktif metabolit nordiazepam ve hidrosil şekli olan okzazepamdır. Verilen dozun % 1'den azı değişmeden, % 6'sı demokzazepam halinde ve geri kalanı okzazepam ve diğer hidroksilli metabolitlerinin glukuronat konjugatları halinde atılır (188,189,192,198).

Toksisitesi : Yüksek dozda uzun süre alanlarda bağımlılık gelişebilir ve bunlarda ilacın kesilmesi yoksunluk belirtilerine yol açar. Yaygın kullanımı nedeniyle kazai ve istemli zehirlenme olgularına sık rastlanır. Ancak benzodiazepin grubunun güvenlik sınırlarınının geniş olması nedeniyle ağır tablolar enderdir (155,188,189). İntihar amacıyla terapötik dozun çok üstünde (2 g dan fazla) alanlarda ataksi, dizartri, bazen uyku ve koma meydana geldiği bildirilmiştir (165). Terapötik serum konsantrasyonu 0.25-0.80 mg/100 ml, toksik serum konsantrasyonu 2-5 mg/100 ml dir (30).

Analizi : Bazik bir ilaç olan klordiazepoksit biyolojik sıvılardan İTK (106,107,195), GK (106,107,199), kolorimetrik (106,200) ve spektrofotometrik (106,201) yöntemlerle tayin edilir. Duyarlı yöntemler eser miktardaki serbest klordiazepoksiti teşhis etmesine karşın genellikle tayinler aktif metabolitleri üzerinden yapılır.

I.6.8. Meprobamat



2-metil-2-propil-1,3-propandiol dikarbamat (148).

Kullanılışı : Meprobamat, anksiyete tedavisinde kullanılan trankilizan bir ilaçtır. Ağız yoluyla günde 3-4 kez 400 mg dozunda kullanılır. Hipnotik dozu 800 mg dır (7).

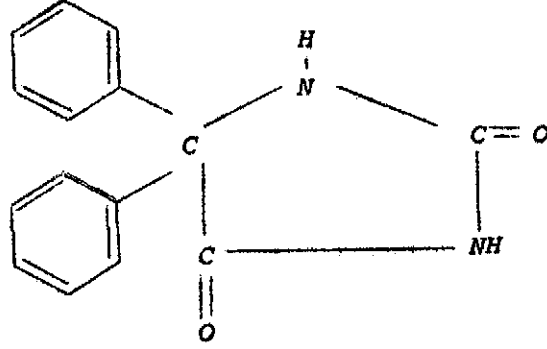
Preparatları : Equanil, Miltown, Trankilin, Relaksin, Mepro1 (150).

Absorpsiyonu, Metabolizma ve İtrahı : Mide-barsak kanalından iyi absorbe edilir. Bütün vücut dokularına dağılır. Doruk plazma konsantrasyonuna 1-2 saatte ulaşılır, yarı ömrü yaklaşık 10 saattir (202). Terapötik serum konsantrasyonu 1.0-5.0 mg/100 ml, toksik konsantrasyonu ise 15-20 mg/100 ml dir (30). Karaciğerde N-glukuronidasyona ve propil zincirinin oksidasyona uğramasıyla metabolize edilir. Karaciğer mikrozomal enzimlerini indükler, bu nedenle bu enzimlerle inaktive edilen ilaçların etkisini azaltır ve kendi metabolizmasını hızlandırabilir. İlacın % 10'u değişmeden, % 90'ı ise hidroksi meprobamat ve glukuronatı şeklinde idrarla atılır. Değişmemiş şekli 24 saat süreyle idrarda tanımlanabilir (202, 203).

Toksisitesi : Terapötik dozlarda barbitüratlardan 4-5 kez daha az toksiktir (204). Ancak yaygın kullanımı nedeniyle zehirlenme olguları sık görülür. 10-40 g gibi yüksek dozlarda toksik belirtiler görülür. Zehirlenme tablosu, bilinç kaybı, hipotansif reaksiyonlar, şok ve solunum depresyonu ile karakterizedir. Günde 2 g veya daha fazla doz alanlarda tolerans, fiziksel ve psişik bağımlılık gelişir. Yoksunluk belirtileri 36-48 saatte deliriyum ve konvulsiyonlar şeklinde görülür (155,156,204).

Analizi : Nötral bir ilaç olan meprobamatın biyolojik sıvılardan tayini genellikle serbest ilaç üzerinden yapılır. Bu amaçla kağıt kromatografisi (203), İTK (205-207), kolorimetrik analizler (202,206) ve gaz kromatografisi (104) uygulanır.

I.6.9. Difenilhidantoin (Fenitoin)



5,5-Difenil-2,4-imidazolidinedion (148).

Kullanılışı : Difenilhidantoin epilepsi tedavisinde kullanılan antikonvülsan bir ilaçtır. Özellikle grandmal epilepside kullanılır. Ağız yoluyla bir defada 0.01-0.1 g olmak üzere günde 0.3 g'a kadar verilir. Ayrıca i.v. olarak da kullanılır. Maksimum dozu günlük 0.6 g dır (149).

Preparatları : Epanutin, Epdantoin-simple, Om-Hydantoin. Ayrıca diğer ilaçlarla, özellikle barbitüratlarla, kombine preparatları vardır; Comital-L, Epdantoin Kompoze, Om-Hydantoin Kompoze, Antisacer Kompoze (150).

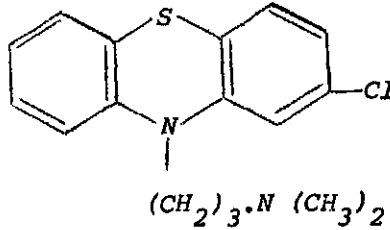
Absorpsiyonu, Metabolizma ve İtrahı : Mide-barsak kanalından absorpsiyonu yavaştır ve bireyler arası farklılık gösterir. Doruk plazma konsantrasyonlarına 8 saatte ulaşılır. Plazma proteinlerine yüksek oranda (% 70-95) bağlanır. Bütün vücut dokularına dağılır. Alınan dozun yarısından fazlası karaciğerde p-hidroksilasyonla inaktive edilir. Difenilhidantoinin metabolizması da bireysel farklılıklar gösterdiğinden biyolojik yarı ömrü 7-42 saat arasında değişir (Ortalama 32 saat). Alınan dozun % 5 kadarı değişmemiş olarak, geri kalanı ise p- ve m- hidroksidifenilhidantoin konjugatları halinde idrarla atılır (99,166,208-213).

Toksisitesi : Difenilhidantoin toksik aralığı dar olan bir ilaçtır.

0.3-0.4 g günlük dozlar genellikle toksisite göstermeksizin tolere edilebilirken 0.5 g dan fazlası nadiren tolere edilebilmektedir. Ayrıca bireysel metabolizma ve itrah yeteneğinin üzerinde doz alan hastalarda, ilaç birikme göstererek toksisiteye sebep olabilir. Terapötik plazma konsantrasyonu genellikle 10-20 mg/ml dir. 20 mg/ml konsantrasyonu aşıldığında toksik belirtiler gözlenir (166,169,170,214). Akut zehirlenmeler sersemlik, tremorlar ve görme bozukluğu ile başlar ve ağır hallerde kusma, yutma ve solunum güçlüğü, huzursuzluk, irritabilite, ataksi, konfüzyon, halüsinasyonlar ve deliryum görülür (166,215,216).

Analizi : Difenilhidantoin pKa'sı 8.3 olan zayıf asidik bir ilaçtır. İdrar ve kanda serbest ilaç veya metabolitleri halinde, spektrofotometrik (217), İTK (218,219), GK ve enzim immunoassay (99-103,220) teknikleri ile tayin edilmektedir.

1.6.10. Klorpromazin



2-Kloro-10-(3-dimetilaminopropil) fenotiazin (148).

Kullanılışı : Klorpromazin SSS'ni oldukça selektif bir şekilde deprese eden, özellikle akut ve kronik psikozların tedavisinde kullanılan fenotiazin grubu nöroleptik bir ilaçtır. Oral veya i.m. olarak günde 3 kez 25 mg'dan günlük 800 mg'lık doza kadar kullanılır (7).

Preparatı : Largactil (150).

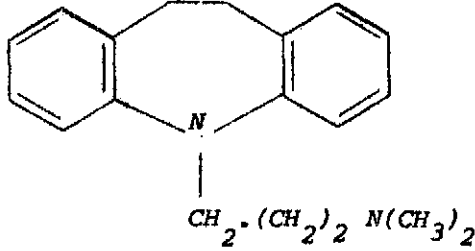
Absorpsiyonu, Metabolizma ve İtrahı : Absorpsiyon hızlı ve tamdır.

Bütün vücut dokularına dağılır. Doruk plazma konsantrasyonuna 2-3 saatte ulaşılır ve etkisi 6-12 saat sürer. Plazma proteinlerine % 90 oranında bağlanır. Terapötik serum konsantrasyonu 0.01-0.05 mg/100 ml, toksik serum konsantrasyonu ise 0.1-0.5 mg/100 ml civarındadır (30). Plazma yarı ömrü 6 saatten az olmakla beraber, enterohepatik siklusa girmesi nedeniyle vücuttan eliminasyonu yavaştır. Tedavinin kesilmesinden 2-6 hafta sonra bile idrarda serbest klorpromazin veya metabolitleri teşhis edilebilir. Böbreklerden kısmen değişmeden, kısmen de metabolitleri halinde atılır. 168 tane metabolitinin bulunması olasılığı bildirilmiştir ve bunların 20 si izole edilmiştir (165). Metabolitlerin % 20'sini konjuge olmamış sülfoksitler, % 80'ini ise hidroksilli türevler ve bunların konjugatları ile N-oksitleri ve tanımlanmamış metabolitleri oluşturur. % 1 den azı serbest klorpromazin halinde atılır. Ancak bu miktar ilacın idrardan tayini için yeterlidir (221-224).

Toksisitesi : Fenotiazinlerin çoğu psikiyatrik hastalıklarda sıklıkla kullanılan ilaçlardır. Bu nedenle klorpromazin ile zehirlenme sıklığı, gerek hastaların psişik durumları nedeniyle istemli zehirlenmeler, gerekse yaygın kullanım nedeniyle kazai zehirlenmeler yönünden yüksektir (225). Ayrıca diğer SSS depresanları ile sinerjik etkisi olduğundan polifarmasi uygulamaları yönünden önemlidir. 100 klorpromazin intoksikasyon olgusunda, 1.4 g dozda alım ile orta derecede, 6.2 g dozda alımı ile de ağır zehirlenmeler olduğu bildirilmiştir (226). Yetişkinde letal doz 15-150 mg/kg iken, çocuklarda 350 mg'dan az dozların bile letal olduğu bildirilmektedir (227). 5 g veya üzerindeki dozlarda SSS depresyonu ve akut ekstrapiramidal belirtiler görülür. Ağır hallerde klinik tablo nöbetler, distonik, reaksiyonlar, hipotansiyon, hipertermi, aritmiler ve giderek koma ve solunum depresyonu ile karakterizedir (155,156). İlacın sedatif etkilerine karşı tolerans oluşmakla birlikte genellikle bağımlılık gelişmez (228).

Analizi : Bazık bir ilaç olan klorpromazinin biyolojik sıvılardan tayini, ilacın kendisi veya metabolitlerinin kolorimetrik (229-238), spektrofluorometrik (239), spektrofotometrik (240-244), İTK (240,244-250) ve GK (240,245) analizleriyle yapılabilmektedir.

1.6.11. İmipramin



5-(3-dimetilaminopropil)-10,11-dihidro-5H-dibenz(b,f)azepin (148).

Kullanılışı : Trisiklik antidepresanlardan nöroleptik bir ilaçtır. Endojen depresyon olgularında ve çocuklarda gece işemelerine karşı kullanılır. Oral veya i.m. olarak 75-200 mg lık günlük dozlarda kullanılır (7).

Preparatları : Tofranil (150).

Absorpsiyonu, Metabolizma ve İtrahı : Mide-barsak kanalından yavaş fakat tama yakın absorbe edilir. Doruk plazma konsantrasyonuna 4 saatte ulaşılır. Plazma proteinlerine bağlanma nisbeti yüksektir (% 90'dan fazla). Karaciğerde demetilasyonu takiben aktif metaboliti olan desimipramin oluşur. Ayrıca N-oksidasyon, N-dealkilasyon, hidroksilasyon ve hidroksil türevlerinin konjugasyonu şeklinde metabolize edilir. Verilen dozun % 70'i 3 günlük süre içinde idrarla ve geri kalanı dışkıyla itrah edilir. % 0.3'ü değişmeden, aynı oranda desimipramin halinde ve büyük kısmı serbest veya konjuge hidroksilli metabolitleri halinde atılır (251-254).

Toksisite : İmipramin kateşolaminlerin adrenerjik nöronlardan geri alımını inhibe ederek antidepresan etki gösterir (255). Devamlı alınması

ile ilacın antikolinergic etkilerine tolerans gelişir. Halusinojenik etki meydana getirmesinden dolayı sistimal edilmektedir. Ağız kuruluğu, kabızlık, bulanık görme, taşikardi bağımlılık kazanmış kişilerde görülen belirtilerdir. Ayrıca depresyonlu hastada intihar eğiliminin fazlalığı nedeniyle imipraminle akut zehirlenmeler sık görülür (256). Çocuklarda 20 mg/kg'ı aşan dozlarda ağır belirtiler ve ölüm görülür, yetişkinler için letal doz ise 750 mg dır (156,164). Terapötik kan konsantrasyonu 0.01-0.05 mg/100 ml, toksik kan konsantrasyonu ise 0.1-0.5 mg/100 ml dir (30). Akut zehirlenmelerde belirtiler, atropin zehirlenmesine benzer. Ayrıca kalpte tehlikeli ritim bozuklukları ve hipertansiyon gelişir. Antikolinergic toksik belirtiler, hiperpreksi, konfüzyon, ajitasyon ileri dönemde konvülsiyon ve komadır. Ayrıca MAO inhibitörleri ile birlikte kullanımı, inaktivasyonu yapan enzimlerin inhibisyonu nedeniyle tehlikelidir. Alkol, hipnotikler ve diğer SSS depresanlarının sedatif etkilerini potansiyalize eder (7,156).

Analizi : Zayıf bazik bir ilaç olan imipramin biyolojik sıvılardan kolorimetrik (256,257), İTK ve GK yöntemleri ile (258-260) serbest ilaç veya metabolitleri halinde tayin edilir.

I I . D E N E Y S E L K I S I M

Bu bölümde I. Bölüm'de verilen genel bilgilerden hareketle ivedi bir toksikolojik tarama testi geliştirilmesi için yapılan çalışmaların yöntemleri verilmiş, ayrıca bazı doğrulayıcı ek yöntemler ve uygulamaları anlatılmıştır.

II.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Butalbital	(Sandoz)
Diazepam	(Deva)
Difenilhidantoin	(Parke Davis)
Fenobarbital	(Merck)
İmipramin	(Ciba-Geigy)
Klordiazepoksit	(Roche)
Klorpromazin	(Eczacıbaşı)
Kodein	(Knoll A.G.)
Meprohamat	(Atabay)
Morfin	(Mac Farlan Smith ltd.)
Sekobarbital	(Merck)
Amberlit XAD-2	(Rohms ve Haas)
Amonyak % 25	(Merck)

Amonyum vanadat	(Merck)
Bizmut subnitrat	(Merck)
Civa (II) oksit	(Riedel)
Civa (I) nitrat	(Merck)
Civa (II) klorür	(Merck)
Eter	(Merck)
Demir (III) klorür	(Merck)
1,2-Dikloroetan	(Merck)
1,5-Difenilkarbazon	(Merck)
Ditizon	(Merck)
Etil asetat	(Merck)
Furfural	(Merck)
Hekzakloroplatinik (IV) asit	(Merck)
Hidroklorik asit	(Merck)
İzopropil alkol	(Merck)
Kloroform	(Merck)
Kieselgel GF ₂₅₄ (Typ 60)	(Merck)
Metanol	(Merck)
Perklorik asit	(Merck)
Potasyum iyodür	(Mallinckrodt)
Potasyum hidroksit	(Merck)
Potasyum permanganat	(Merck)
Potasyum dikromat	(Merck)
p-Dimetilaminobenzaldehit	(Merck)
Sodyum dihidrojen fosfat	(Merck)
Sodyum borat	(Merck)
Sodyum nitrit	(Merck)
Sodyum sülfat	(Merck)
Sulfürik asit	(Merck)
N-(1-Naftil)-etilendiamin hidroklorür	(Merck)
Nitrik asit	(Merck)

II.1.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

Cam atomizer	(Camag)
Çalkalayıcı	(Mas Labor teknik)
Etüv	(Dedeoğlu)
Hamilton enjektör	(10-50 µl)
Mikropipet	(2-5 µl Brinkmann)
İnce Tabaka Kromatografi plakları	(20X20, Camag)
Polipropilen kolonlar	(1X9 cm) (Brinkmann)
Plak çekme aygıtı	(Shandon Unoplan)
pH metre	(Beckman)
Santrifüj	(Wirawka typ WE-2)
Su banyosu	(Dedeoğlu)
Spektrofotometre	(Hitachi 181)
Tank	(Camag)
U.V. lambası	(Camag)
Vakum pompası	(Karl Kolb)
Tatbik şablonu	(Camag)

II.1.2. Tarama Testi Çalışmaları

İvedi toksikolojik tarama testi geliştirme araştırmaları 4 ayrı basamakta yapılmıştır ;

- Referans standartların direkt olarak İTK'ya uygulanması
- Referans standart ilave edilmiş kontrol idrarlarından tüketme ve kromatografi
- Tedavi dozlarında ilaç alımını takiben idrar örneklerinden tüketme ve kromatografi
- Zehirlenme olgularından alınan idrar örneklerinin analizi

II.1.3. Kontrol İdrarlarının Hazırlanışı

Çalışmalarda kontrol idrarı olarak herhangi bir ilaç kullanmayan ve sigara içmeyen sağlıklı kişilerden alınan idrar örnekleri kullanılmıştır. Örnekler buzdolabında $4-7^{\circ}\text{C}$ de saklanmış, uzun süre saklanması gerekenler buzdolabında bekletilmiştir. Örnekler deneylerden önce çökelmiş kısımlarından kurtarılacak ve proteinlerini çöktürmek amacıyla $400\text{ g}'de$ 5 dakika süreyle santrifüje edilmiştir. Berrak kısmı ayrıldıktan sonra içine referans standartların herbiri için $1\ \mu\text{g/ml}$ konsantrasyonu sağlayacak şekilde bu maddelerin metanol içinde hazırlanan $1\ \text{mg/ml}$ konsantrasyondaki çözeltilerinden ilave edilmiştir (20 ml idrar için toplam 220 μl metanolik çözelti).

II.1.4. Tüketme Yöntemi

İdrar örneklerinden ilaçların tüketilmesi işlemi tek bir pH'da ;

a- Direkt sıvı-sıvı tüketmesi

b- Amberlit XAD-2 reçinesi ile tüketme,

olmak üzere iki şekilde yapılmıştır. Sonuçta kıyaslama yapılarak Amberlit XAD-2 reçine tüketme yöntemi tercih edilmiştir.

Tüketme işlemleri pH 9.5'da yapılmış olup, bunun için 20 ml kontrol idrarı, 1-2 ml sodyum karbonat-sodyum bikarbonat tamponu ile pH $9.5 \pm 0.1'e$ ayarlanmıştır. Tampon çözeltinin hazırlanışı Ek I'de verilmiştir.

II.1.4.1. Direkt Sıvı-Sıvı Tüketme İşlemi

Santrifüje edilerek proteinlerden kurtarılmış 20 ml idrar sodyum karbonat-sodyum bikarbonat tamponu ile pH $9.5 \pm 0.1'e$ ayarlandıktan sonra 45 ml organik çözücü ile, 5 dakika kuvvetle çalkalanarak tüketilmiştir. Organik çözücü olarak ;

II.1.4.2.2. İdrar Örneklerinin Amberlit XAD-2 Kolonlarından Geçirilmesi ve Organik Çözücü ile Tüketme

Hazırlanan reçine kolonları Şekil 1'de görülen örnek doldurma kabı ile birleştirildikten sonra 20 ml distile su ile nemlendirilmiştir. Distile suyun kolondan tamamen geçirilmesinden sonra pH 9.5'a ayarlanmış 20 ml kontrol idrarı kolondan geçirilmiştir. Takiben kolonun üst ucundaki pamuk tıkaç çıkarılmış, 3 kez 5 ml lik kısımlar halinde 15 ml tüketme çözücüsü kolondan geçirilmiştir. Vakum uygulaması ile tüketme çözücününün kolondan tamamen geçirilmesi sağlanmıştır.

Elde edilen eluat susuz sodyum sülfat ile muamele edilerek sulu fazdan kurtarılmış, takiben su banyosunda 85-90°C de organik çözücü uçurulmuştur. Kuruluğa kadar uçurmadan sonra artık, 50 µl metanolde çözülmüş ve ince tabaka plaklarına tatbik edilmiştir.

II.1.5. Kromatografi Yöntemi ve Tanı

II.1.5.1. Kromatografi Plaklarının Hazırlanışı

30 g Silikajel GF₂₅₄' 65 ml distile suyla 2-3 dakika kuvvetle çalkalanarak homojen bir bulamaç haline getirilmiştir. Karışım plak yayma aygıtı yardımı ile 20X20 cm boyutlu 5 cam plağa 0.25 mm kalınlığında yayılmıştır. Plaklar 15 dakika oda sıcaklığında kurutulduktan sonra etüvde 110°C de 1 saat aktive edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan plaklar sıcaklık ve nemi değişmeyen kurutma dolabında saklanmıştır.

II.1.5.2. Kromatografik Çözücü (Sürükleme) Sistemleri

I.Sistem : Etil asetat : metanol : amonyak (85:12:3)

II.Sistem : Kloroform : metanol (90:10)

Her iki sistem de verilen oranlarda karıştırılarak hazırlanmış, kromatografi küvetlerine konularak 35-45 dakika süreyle doyurulmayı takiben kullanılmışlardır.

II.1.5.3. Laboratuvar Koşulları

Tüm kromatografi işlemleri sırasında laboratuvar sıcaklığının 22-24°C de olmasına özen gösterilmiştir.

II.1.5.4. Kromatografi İşlemi

Hazırlanan plaklara 1 cm lik aralıklarla, 10 mg/ml madde içeren metanoldeki çözeltilerinden 1 µl lik miktarlarda referans standartlar, kontrol idrarı ekstresi ve boş idrar ekstresi tatbik edilmiştir. Leke çaplarının düzgün olmasına ve her tatbikten sonra lekelerin, soğuk havalı kurutucu ile tamamen kurutulmasına özen gösterilmiştir. Bundan sonra plak önce I. sürüklenme sistemine konularak çözücünün plakta 6 cm yükseklikte sürüklenmesi sağlanmıştır. Daha sonra sistemden çıkarılan plak soğuk hava akımı altında 2 dakika özenle kurutulmuştur. Bundan sonra plak II. sürüklenme sistemine konulmuş, çözücünün 12 cm sürüklenmesini takiben sistemden çıkarılan plaklar ilk basamakta olduğu gibi kurutulmuştur.

II.1.5.5. Tanımlama İşlemleri

Tamamen kurutulmuş plaklar önce U.V. lambası altında 254 nm dalga boyunda incelenmiştir. Bu koşullarda floresans gösteren (meprobamat hariç) bütün lekeler işaretlenmiştir.

Daha sonra renk belirteçleri püskürtülerek maddelerin verdikleri özgül renklere göre tanımlama yapılmıştır. Püskürtülen renk reaktiflerinin hazırlanışına ait bilgiler Ek II'de verilmişlerdir.

II.1.5.6. Referans Standartların En Düşük Tayin Edilebilirlik Sınırlarının Saptanması

Referans standartların, 1 µg/ml'dan 0.1 µg/ml'a kadar değişen konsantrasyonlar oluşturacak şekilde idrara ilavesiyle hazırlanan kontrol

idrarları II.1.4'de verilen tüketme yöntemleri ile tüketilmiştir. Takiben kromatografi ve tanımlama işlemleri uygulanmıştır. Gözlenebilen en düşük konsantrasyonlar, en düşük tayin edilebilirlik sınırları olarak saptanmıştır.

II.1.6. Tedavi Dozlarında İlaç Alınımını Takiben İdrar Örneklerinin Analizi

Sağlıklı deneklere veya yatan hastalara terapötik dozlarda ilaç verilmesini takiben alınan 24 saatlik idrar örneklerinin 20 ml'sine tüketme ve kromatografi işlemleri uygulanmıştır. Ancak gerektiğinde, tüketmede kullanılan idrar miktarı 2-3 katına çıkarılarak kromatografiye uygulanan idrar konsantrasyonu yüksek tutulmaya çalışılmıştır.

II.1.7. Zehirlenme Olgularından Alınan İdrar Örneklerinin Analizi

Hastane acil servislerinde karşılaşılan zehirlenme olgularından alınan idrar örneklerinin analizi II.1.6'da anlatıldığı gibi yapılmıştır. Yine II.1.6'da söz edildiği gibi kromatografiye uygulanan idrar konsantrasyonunu yüksek tutmak için gerektiğinde ve yeterli örnek olduğunda tüketmede kullanılan idrar miktarı 2-3 katına çıkarılmıştır.

II.2. Doğrulayıcı-Ek Test Yöntemleri

Analiz örneklerine kromatografik tarama testini takiben ya da tarama testine paralel olarak doğrulayıcı-ek test yöntemleri uygulanmıştır.

Amaç ;

- a- Klinik tanıya en kısa sürede yardımcı olmak
- b- Tarama testi sonuçlarını pekiştirmektir.

Uygulanan ek testler aşağıda verilmiştir. Bu testlerde kullanılan gözelti ve belirteçlerin hazırlanışı Ek III'de verilmiştir.

II.2.1. Morfin ve Kodein İçin Doğrulaıcı-Ek Test

İdrar örneklerinin tüketilmesi ve elde edilen ekstraların uçurulmasından sonra elde edilen artığa, narkotikler için özel olan leke testleri uygulanmıştır (261).

BELİRTEÇ	OLUŞAN RENK
Mandelin	Kırmızı -Mavi mor
Marquis	Solan kırmızı - mavi
Mecke	Mavi yeşil, ısı ile kahverengi
p-Dimetilaminobenzaldehit	Soğukta kırmızı
% 10 Demir-III-klorür	Morfin - Mavi Kodein - Renksiz

Ayrıca tayin edilebilecek morfin konsantrasyonunu artırmak için tüketmeden önce asit hidroliz uygulaması da yapılabilmektedir. Bunun için 20 ml idrar konsantre HCl ile 30 dakika su banyosunda ısıtılmıştır. Soğutulup pH 9.5'a ayarlandıktan sonra Amberlit XAD-2 reçinesi ile veya direkt olarak tüketilip İTK uygulanmıştır.

II.2.2. Barbitüratlar için Doğrulaıcı-Ek Testler.

II.2.2.1. Ditizon ile Renk Testi

4 ml idrar (kan, mide suyu v.b. biyolojik sıvılar da olabilir) 5 ml fosfat tamponu (pH 6.95) eklendikten sonra 20 ml kloroform ile 4 dakika kuvvetle çalkalanarak tüketilmiştir. Ayrılan organik faza 2 ml HgCl₂ çözeltisi eklenerek 4 dakika kuvvetle çalkalanmıştır. Ayrılan organik faz 20 ml distile suyla yıkandıktan sonra kloroform tabakasına yavaşça 2 ml ditizon çözeltisi eklenip hafifçe karıştırılmıştır. Barbitürat varlığında renk turuncu olmaktadır. Renk değişmeyip mavi kalırsa barbitürat olmadığı anlaşılmaktadır (262).






II.2.2.2. Spektrofotometrik Yöntem

25 ml idrara 5 ml % 20 sodyum borat çözeltisi eklenerek pH 9'a ayarlanmıştır. 60 ml eterle çalkalandıktan sonra ayrılan eter fazına 3 ml pH 11 sodyum dihidrojen fosfat çözeltisi (2.25 M) eklenmiştir. Çalkalanmadan sonra ayrılan sulu fazın 2 ml si küvete alınarak 2.25 M sodyum dihidrojen fosfat tampon çözeltisine karşı 305 nm, 260 nm, 240 nm 'de absorbanları okunmuştur.

Daha sonra küvetlere 1 ml 0.45 N KOH çözeltisi eklenerek daha alkali (pH 13) hale getirilen çözeltinin aynı dalga boylarında absorbanları okunmuştur. Bu absorbanlar 1.5 ile çarpılıp, pH 11'de elde edilen absorbanlardan çıkarılmıştır. Eğer barbitürat varsa 305 nm'de hiç fark görülmemekte, 260 nm'de azalma (negatif fark), 240 nm'de artma (pozitif fark) görülmektedir (263).

II.2.2.3. Barbituratlar ve Difenilhidantoin için Ek İTK Testi

II.1.4'de söz edildiği gibi tüketilen idrara sadece I.sürükleme sistemi kullanılarak İTK uygulanmıştır. Tanımlama $HgNO_3$ ve $KMnO_4$ belirteçleriyle yapılmıştır. Fenobarbital, sekobarbital, butalbital ve difenilhidantoin $HgNO_3$ ile beyaz renk vermektedir. $KMnO_4$ belirteci ile sadece sekobarbital koyu sarı leke, fenobarbital ve butalbital açık pembe leke oluşturmaktadır. Difenilhidantoin $KMnO_4$ belirteci ile renk vermemektedir.

Fenobarbital	Sekobarbital	Karışım	Butalbital	Difenilhidantoin
				

Adsorban : Silikajel GF₂₅₄

Sürükleme Sistemi : Etil asetat:metanol:
amonyak (85:12:3)

Renk Belirteci : HgNO₃ / KMnO₄

"I.sürükleme sistemini kullanarak barbituratlar ve difenilhidantoinin ayrımını gösteren kromatogram".

II.2.3. Benzodiazepinler İçin Doğrulayıcı-Ek Test

20 ml idrar, 4 ml derişik HCl ile 30-40 dakika kaynatılarak hidrolize edilmiştir. Soğutulduktan sonra kalevileştirilip, eter ile tüketilmiştir. Organik faz susuz sodyum sülfat ile suyundan kurtarıldıktan sonra eter uçurulmuş ve artık 2 ml 6N HCl'de çözülmüştür. 0.5 ml % 0.1 NaNO₂ çözeltisi eklendikten sonra çalkalanarak 3 dakika beklenmiştir. % 0.5 lik amonyum sülfamat çözeltisinden 0.5 ml eklendikten sonra zamanzaman çalkalanmış, 10 dakika sonra % 0.1 lik N-(1-Naftil) etilendiamin hidroklorür'den 0.5 ml eklenmiştir. Yavaş gelişen pembe mor renk benzodiazepin varlığını göstermektedir (263).

II.2.4. Meprobamat İçin Doğrulayıcı-Ek Test

Meprobamat, tarama yönteminde izlenen renk belirteçlerinden difenil-

karbazon ile soluk pembe leke oluşturmaktadır. Meprobamata şüphesi olan olgularda tüm tüketme ve kromatografi işlemleri ikinci bir plakla tekrarlanmış, tanımlama için furfural-hidroklorik asit belirteci püskürtülmüştür. Sadece meprobamata özgü mavi siyah leke ile tanı kesinleşmektedir.

II.2.5. Fenotiazinler İçin Doğrulayıcı-Ek Test

1 ml idrara 1 ml FPN renk belirteci (Demir (III) klorür-perklorik asit-nitrik asit) eklenmiştir. Hemen oluşan pembe kırmızıdan kahverengiye giden renk fenotiazin varlığını belirtmektedir (229,231,235).

II.2.6. İmipramin İçin Doğrulayıcı-Ek Test

0.5 ml idrara, 1 ml potasyum dikromat-sülfürik asit-perklorik asit-nitrik asit test çözeltisi eklenir, hemen oluşan açık yeşilden koyu yeşile giden renk imipramin varlığını belirtir (235).

I I I . B U L G U L A R

Bu bölümde geliştirilen tarama testi yönteminin özellikleri tanıtılacak ve yöntemin zehirlenme olgularından sağlanan idrar örneklerine uygulaması ile alınan sonuçlar verilecektir.

III.1. Geliştirilen İvedi Toksikolojik Tarama Yönteminin Nitelikleri ve Uygulama Sonuçları

III.1.1. Kromatografi Yöntemi ile İlgili Bulgular

Deneysel Bölümde verilen kromatografik sistemin referans standartlara uygulanması ile de elde edilen ayırımın bir örneği, U.V. lambası altında çekilen bir fotoğraf halinde Şekil 2'de görülmektedir (U.V. altında floresans vermeyen meprobumat dahil edilmemiştir).



Şekil 2 : "Geliştirilen kromatografi sistemi ile elde edilen ayırımın U.V. lambası (254 nm) altında çekilen fotoğrafı".

Tablo I'de aynı maddelerin Rf değerleri verilmiştir. Bu tabloda verilen değerler maddelerin direkt olarak ince tabaka plaklarına tatbiki ile elde edilmiştir. Ancak, kontrol idrarlarından tüketmeyi takiben elde edilen Rf değerleri de aynıdır. Maddelerin sağlıklı deneklere verilmesini takiben alınan idrar örnekleri ile de benzer sonuçlar alınmıştır ve gerek idrarın normal bileşenleri gerekse maddelerin metabolitleri ayrımı bozmamaktadır.

Referans Standart	Rf
Morfin	0.12
Kodein	0.27
İmipramin	0.44
Meprobamat	0.48
Klorpromazin	0.49
Klordiazepoksit	0.54
Fenobarbital	0.63
Sekobarbital	0.67
Butalbital	0.69
Difenilhidantoin	0.70
Diazepam	0.73

Tablo I : "Analizi Yapılan İlaçların Rf değerleri".

Kromatografi işlemi, I. sistemde sürüklenme 5-10 dakika ve II. sistemde sürüklenme 15-20 dakika olmak üzere toplam 20-30 dakika sürmektedir.

Tablo II'de maddelerin en düşük tayin edilebilirlik sınırları verilmiştir. Bu değerlerden anlaşılacağı ve tartışma bölümünde de geniş

olarak ele alınacağı üzere, geliştirilen yöntem maddelerin toksik dozlarda ve hatta terapötik dozlarda alımını takiben idrarda tayin edilebilirliklerini sağlayacak duyarlıktadır.

Referans Standart	En Düşük Tayin Edilebilirlik Sınırı (µg/ml)
Klorpromazin	0.1
İmipramin	0.1
Morfin	0.5
Kodein	0.5
Diazepam	0.5
Klordiazepoksit	0.5
Fenobarbital	0.6
Butalbital	0.6
Sekobarbital	0.6
Difenilhidantoin	0.6
Meprobamat	1.0

Tablo II : "Analizi Yapılan İlaçların En Düşük Tayin Edilebilirlik Sınırı".

III.1.2. Tüketme Yöntemi ile İlgili Bulgular

Kontrol idrarlarının pH 9.5'da direkt sıvı-sıvı tüketmesi ile tüketilmesinden sonra kromatografiye uygulandığında elde edilen kromatografik ayırım ve Rf değerleri referans standartların direkt uygulaması ile elde edilen sonuçlardan farklı değildir. Hernekadar idrardan geçen pigment ve normal bileşen sayısı fazla ise de kromatografik ayırımı büyük ölçüde bozmamaktadır. Buna karşılık; II.1.4.2. de verilen şekilde uygula-

nan XAD-2 reçine tüketmesi ile elde edilen ekstrakt, idrar pigmentleri yönünden daha temizdir. Ayrıca direkt sıvı-sıvı tüketme işlemi 30 dakika sürerken XAD-2 reçine kolonu ile tüketme 15 dakika sürmektedir. Bu nedenlerle ve genel bilgiler kısmında da sözü edilen ve tartışma bölümünde de daha geniş olarak anlatılacak olan nedenlerle XAD-2 reçine tüketme yöntemi tercih edilmiştir. Çalışmanın kantitatif amaçlı bir araştırma olmaması nedeniyle kantitatif tayinlere dayanan verim hesapları yapılmamıştır. Ancak, en düşük tayin edilebilirlik sınırları tablosundan (Tablo II) da görülebileceği üzere yöntemin duyarlılığı ve bu duyarlılığın her iki tüketme yöntemi ile de aynı oluşu verim hesabı işlemlerine gereksinmeyi ortadan kaldırmıştır.

III.1.3. Tanımlama İşlemleri İle İlgili Bulgular

Kromatografi uygulanan plaklar U.V. altında incelendikten sonra (Şekil 2) belirli bir sıra izlenerek renk belirteçleri püskürtülmüştür.

Önce difenilkarbazon belirteci püskürtülmüş; barbitüratlar, difenilhidantoin, meprobamatın verdiği renkler işaretlenmiştir. İlk iki grup maddenin tanısı daha sonra püskürtülen $HgSO_4$ belirteci ile verdikleri pembe mor renklerle pekiştirilmiştir.

Daha sonra $75^{\circ}C$ lik etüvde 3-4 dakika tutulan plaklarda klorpromazin varlığı, pembe renk oluşması ile belirlenmektedir. Etüvden alınan plaklara İyodoplatinat ve Dragendorff belirteçleri uygulandığında; morfin, kodein kırmızı-kahve; diazepam, klordiazepoksit, klorpromazin, imipramin mor, kırmızı-mor renkler vererek tanımlanmaktadır.

Tüm işlemler süresince püskürtülen renk belirteçleri ve elde edilen tamamlayıcı renkler Tablo III'de görülmektedir.

Referans Standart	Difenilkarbazon	HgSO ₄	Etüvde Isıtma	İyodoplatinat	Dragendorff
Morfin	-	-	-	Koyu mavi	Kırmızı kahve
Kodein	-	-	-	Koyu mavi	Kırmızı kahve
Fenobarbital	Pembe	Pembe mor	-	-	-
Sekobarbital	Pembe	Pembe mor	-	-	-
Butalbital	Pembe	Pembe mor	-	-	-
Diazepam	-	-	-	-	Kırmızı mor
Klordiazepoksit	-	-	-	-	Mor
Klorpromazin	-	-	Pembe	Koyu mavi	Kahverengi-mor
İmipramin	-	-	-	Koyu mavi	Eflatun mor
Difenilhidantoin	Pembe	Pembe mor	-	-	-
Meprobamat	Soluk pembe	-	-	-	-

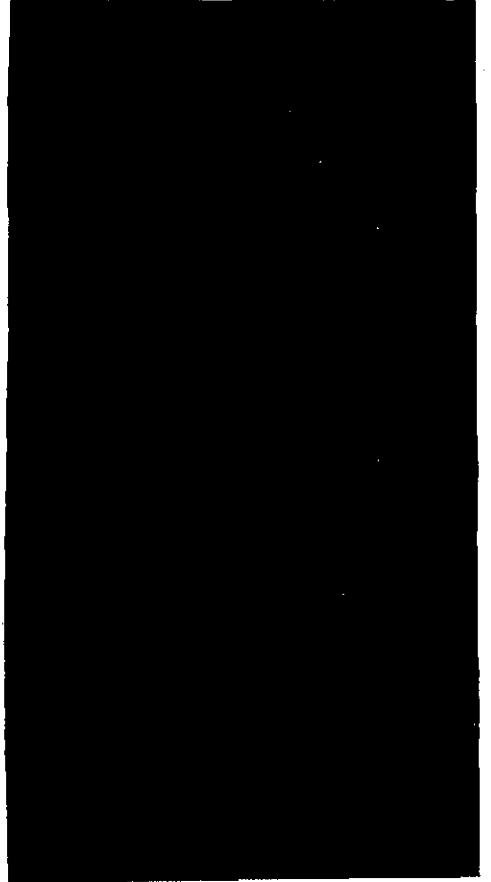
Tablo III : Analizi Yapılan İlaçların Renk Belirteçleri İle Verdikleri Renkler.

III.1.4. Klinik Uygulamalar ile İlgili Bulgular

Hacettepe Acil Servisi (Protokol No. 1159959 Erkek, 27 yaşında; Protokol No. 1164314, erkek, 40 yaşında) ve Gülhane Askeri Akademisinden (Protokol No. 0.13-9/80, erkek, 22 yaşında; Protokol No. 0.13-18/80, erkek, 21 yaşında; Protokol No. 0.13-96/80, kadın, 18 yaşında) gelen 5 optalidon zehirlenmesine ait idrarlara tarama testi uygulanmıştır. Hastanın ilaç alma hikayesine, ilaç kutusu gibi delil ve klinik bulgulara göre "Optalidon" zehirlenmesi şeklinde belirlenen 5 olguda da butalbital saptanmıştır. Bu örneklerden birine ait idrar örneğinin (Protokol No. 0.13-18/80) tatbik edildiği kromatografi plağı difenilkarbazon ve $HgSO_4$ belirteci ile renklendirildikten sonra Şekil 4 ve 5'de gösterilmiştir.



Şekil 4



Şekil 5

"Bir Optalidon Zehirlenmesi Olgusundan Alınan İdrar Örneğinin Ayırımını Gösteren Kromatogramlar".

Hacettepe Nöroloji Servisinden sağlanan, difenilhidantoin, (Protokol No. 1147862, kadın, 24 yaşında; Protokol No. 1064241, erkek, 30 yaşında) ve difenilhidantoin - fenobarbital (Protokol No. 1126463, erkek, 25 yaşında ve sağlıklı denek, erkek, 24 yaşında) alan hastalara ait idrar örneklerinin tatbik edildiği kromatografi plağı $HgSO_4$ ile renklendirildikten sonra Şekil 6'da gösterilmiştir.



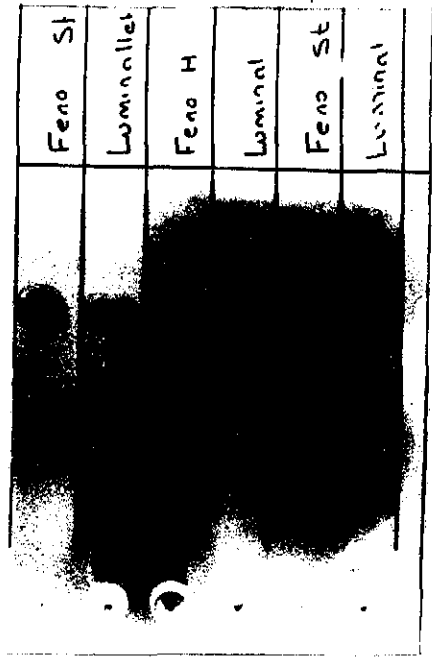
Şekil 6 : "Difenilhidantoin ve Difenilhidantoin - Fenobarbital'i Tedavi Dozlarında Alan Hastalardan Alınan İdrar Örneğinin Analizini Gösteren Kromatogram.

Hacettepe Çocuk Acil Servisinden (Protokol No. 1076597, erkek, 2 yaşında, Protokol No. 1183422, erkek, 4.5 yaşında) ve Sosyal Sigortalar Kurumu hastanesinden (Protokol No. 4331022, erkek, 32 yaşında) gelen Luminalletten (fenobarbital) zehirlenme olgularına ait idrarlara tarama testi uygulanmıştır. Şekil 7'de örneklerin difenilkarbazon belirteci, Şekil 8'de ise $HgSO_4$ belirteci ile renklendirildikten sonraki kromatogramları verilmiştir.



Şekil 7

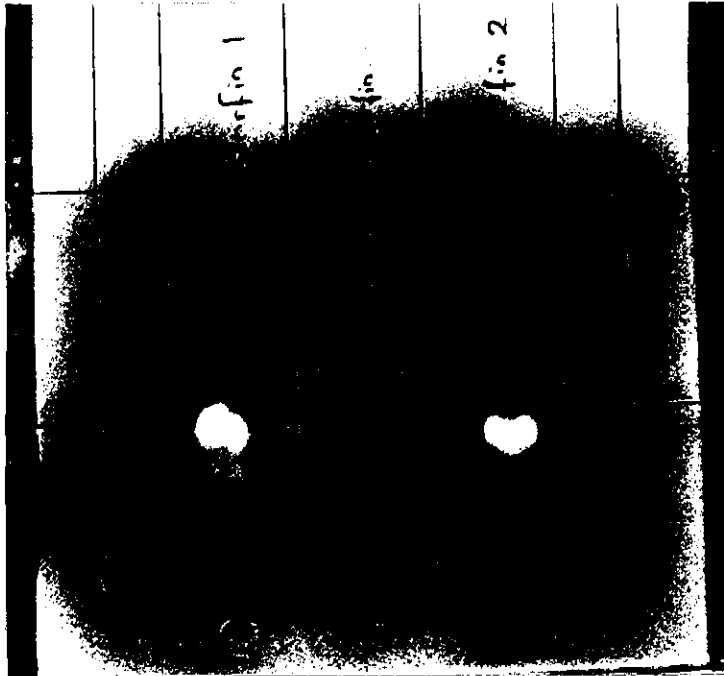
- 60 -



Şekil 8

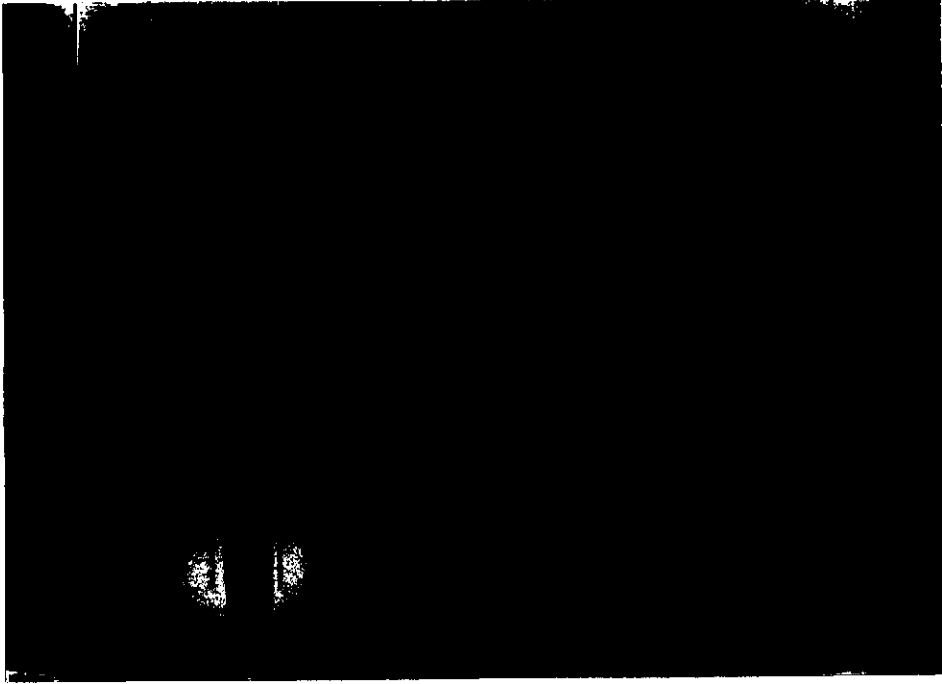
"Luminaletten Zehirlenmesi Olgusundan Alınan İdrar Örneğinin Analizini Gösteren Kromatogramlar".

Gülhane Askeri Tıp Akademisinden gelen (Protokol No. 0.13-308/79, erkek, 30 yaşında; Protokol No. 0.13-81/80, erkek, 25 yaşında) cerrahi dozda morfin alan hasta idrarları Amberlit XAD-2 reçinesi ile tüketilmiştir. Şekil 9'da bu olgulardan birine ait idrar örneğinin tatbik edildiği, kromatografi plağının iyodoplatinat belirteci ile renklendirildikten sonraki kromatogramı görülmektedir.



Şekil 9 : "Tedavi Dozunda Morfin Alan Hastadan Alınan İdrar Örneğinin Analizini Gösteren Kromatogram".

Gülhane Askeri Tıp Akademisinden gelen (Protokol No. 0.13-72/80, erkek, 20 yaşında) kodein zehirlenmesi olgusuna ait idrar örneğine tarama testi uygulanmıştır. Şekil 10'da iyodoplatinat belirteci ile renklendirilen kromatogram görülmektedir.



Şekil 10 : "Kodein Zehirlenmesi Olgusundan Alınan İdrar Örneğinin Analizini Gösteren Kromatogram".

III.2. Doğrulayıcı-Ek Testler İle İlgili Bulgular

Gülhane Askeri Tıp Akademisinden sağlanan ve cerrahi dozda morfin almış hasta idrarları ile yine Gülhane Askeri Tıp Akademisine gelen kodein zehirlenme olgusundan alınan idrara II.2.1.'de sözü edilen şekilde testler uygulanmıştır. Yapılan testlerde morfin idrarları Mandelin belirteci ile kırmızı-mavi, Marquis belirteci ile pembe, Mecke belirteci ile mavi-yeşil ısıtılınca kahverengi, p-dimetil amino benzaldehit ile kırmızı ve % 10 luk demir-III-klorür çözeltilisi ile mavi renk vermiştir. Aynı testler kodein idrarı için uygulandığında % 10 luk demir-III-klorür çö-

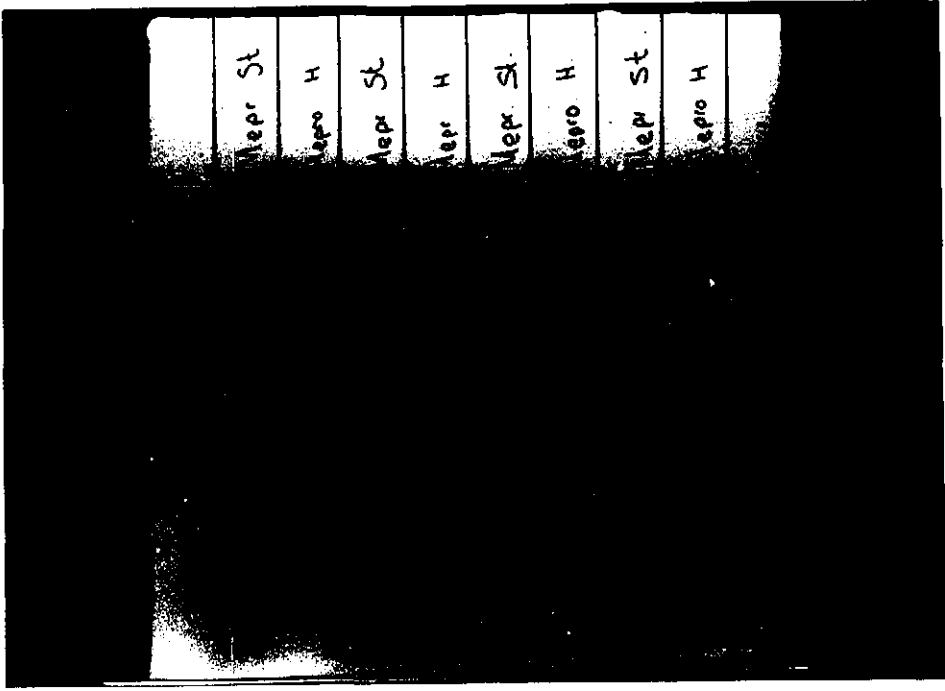
zeltisi ile farklı bir renk oluşmamış, diğer belirteçler ile morfin idrarlarında görülen sonuçlar alınmıştır.

Hacettepe Acil Servisi ve Gülhane Askeri Tıp Akademisine gelen butalbital (Optalidon) zehirlenme olgularından alınan idrarlara, Hacettepe Nöroloji Servisinden sağlanan ve tedavi dozlarında difenilhidantoin, difenilhidantoin ile birlikte fenobarbital almış hasta idrarlarına ve Hacettepe Çocuk Acil Servisine Gelen fenobarbital (Luminaletten) zehirlenme olgularından alınan idrarlara II.2.2.1.'de söz edilen ditizon ile renk testi uygulanmıştır. Barbitüratların varlığı hemen oluşan turuncu renk ile kanıtlanmıştır. Aynı deney morfin, kodein, diazepam gibi benzodiazepin grubu trankilizanlar ile meprobammat almış hasta idrarlarında da tekrarlandığında turuncu renk oluşmamakta ve renk mavi kalmaktadır.

Hacettepe Acil Servisi ve Gülhane Askeri Tıp Akademisine gelen butalbital (Optalidon) ve Hacettepe Çocuk Acil Servisine gelen fenobarbital (Luminaletten) zehirlenme olgularından alınan idrarlara II.2.2.2.'de anlatılan spektrofotometrik yöntem uygulanmıştır. pH 11 ve 13'deki çözeltilerinin 305 nm, 260 nm, 240 nm deki absorbanları okunduğunda 305 nm de absorbanlar arasında herhangi bir fark görülmemiştir. Buna karşın 260 nm deki absorbanlarda azalma, 240 nm deki absorbanlarda ise artma gözlenmiştir.

Tedavi dozlarında (2-10 mg) diazepam alan hasta idrarlarına II.2.3 de anlatıldığı gibi Bratton-Marshall testi uygulanmıştır. Oluşan pembe mor renk benzodiazepin varlığını göstermiştir. Deney aşırı dozda nitrazepam (Mogadon) ve okzazepam (Serepax) alan hasta idrarları ile tekrarlandığında da pembe-mor renk meydana gelmektedir. Sıcakta renk daha çabuk oluşmaktadır. Deney, morfin, kodein, butalbital, fenobarbital ve difenilhidantoin alan hasta idrarlarına uygulandığında pembe-mor renk görülmektedir.

Tedavi dozunda meprobamat alan örnek idrarına (Sağlıklı denek, erkek, 27 yaşında) tarama testi uygulanmıştır. Şekil 11'de idrar örneğinin tatbik edildiği kromatografi plağının furfural-hidroklorik asit belirteci ile renklendirilmesinden sonra elde edilen kromatogramı gösterilmiştir.



Şekil 11 : "Tedavi Dozunda Meprobamat Alan Hasta İdrar Örneğinin Ayırımını Gösteren Kromatogram".

Tedavi dozlarında klorpromazin (Largactil) ve tioridazin (Mellaril) alan 1'er ml hasta idrarlarına 1'er ml FPN belirteci eklendiğinde hemen oluşan pembe kırmızı renk fenotiazin varlığını göstermiştir.

Tedavi dozlarında imipramin (Tofranil) alan 1 ml hasta idrarına, potasyum dikromat-sülfürik asit-perklorik asit-nitrik asit test çözeltisi eklendiğinde ise oluşan yeşil renk ilacın varlığını göstermiştir.

I V . S O N U Ç v e T A R T I Ş M A

Bu araştırmada, suistimal edilen kazai veya istemli zehirlenmelere neden olan ve genellikle bağımlılık yapan ilaçların biyolojik sıvılardan tayini için; tek bir pH'da tüketme ve aynı kromatografi plağında ayırma ve tanımlama esasına dayalı basit, hızlı, kesin ve duyarlı bir tarama yöntemi geliştirme amaçlanmıştır.

Yukarıda sayılan olgularda veya amaçlarda kullanılan ilaçlar çok çeşitli olduğundan, bu tip ilaçların tümünün böyle basit, tek bir sistemle analizi güç hatta olanaksızdır. Bu nedenle belirli ölçütlere uyularak ve özellikle hastane acil servislerinin gereksinimleri, istekleri gözönünde tutularak analizi amaçlanan madde sayısı sınırlandırılmıştır. Ayrıca amaç ivedi olgulara çabuk cevap verebilmek ve böylece klinik tanıya analitik tanı yoluyla yardımcı olmak olduğundan, acil toksikoloji merkezlerinde ya da ülkemiz koşullarına daha uygun bir deyişle, hastane acil servislerinde ilk olarak başvurulacak bir ön tarama yöntemi geliştirmek planlanmıştır.

Çeşitli araştırıcılar (44-59), suistimal edilen ilaçları, genellikle, asit-baz tüketmesi ilkesine dayanan bir kademeli tüketme işlemine tabii tutmak ve elde edilen grupları ayrı ayrı tanımlamak şeklinde toksikolojik analizler önermişlerdir. Ancak ivedi olarak elde edilebilen biyolo-

jik sıvı (bu çalışmada idrar) miktarının sınırlı olması, kısımlara ayrılış örneklerde gruplayıcı analiz yapma olanağını sınırlandıracağı gibi bu tip çalışmalarda esas olan hızlilik ilkesinin uygulanmasını da engelleyebilecektir. Ayrıca kademeli tüketme daha yüksek maliyetlidir.

Seçilen ve geliştirilen yöntemin üstünlükleri şöyle açıklanabilir.

IV.1. Seçilen pH'nın Üstünlükleri

Bir maddenin optimum verimle tüketilmesinde ortamın pH'sı büyük önem taşır. Asidik maddeler pKa değerlerinin en az 2 birim altına karşılık gelen pH'larda, bazik maddeler ise pKa değerlerinin en az 2 birim üstüne karşılık gelen pH'larda optimum verimlerde (\gg %99) tüketilebilirler. Örneğin, pKa değerleri 7.6-8.1 arasında olan barbitüratlar için en yüksek verim pH 1-3'de elde edilebilmektedir. pKa 6.6-9.5 olan narkotikler için ise bu değer pH 9.5'dir (34).

Ancak sunulan tipte bir tarama çalışmasında değişik gruplardan ilaçların tüketilmesi söz konusu olduğundan, seçilecek tek bir pH'nın bu ilaçların tümü için optimum pH olmasına dikkat edilmelidir. Nötral ve bazik ilaçlar pH 9'un üzerinde optimum verimle tüketilebilirler. Diğer taraftan söz konusu referans standartlar içinde böyle bir pH'ya uymayan zayıf asidik yapıdaki barbitüratların, pH 9'un üzerinde tayin edilebilecek miktarlarda tüketilebildiği Stevenson (264) tarafından bildirilmiştir. Davidow'un (60,61) çalışmalarıyla da bu bulgu kanıtlanmıştır. Bu nedenle tek bir pH söz konusu olduğunda pek çok araştırmacının seçtiği pH 8.5-9.5'dan pH 9.5, çalışmamızda esas alınmıştır. Barbitüratlar için elde edilen en düşük duyarlık sınırı bu yöntemin yeterliliğini göstermektedir.

IV.2. Tüketme İşlemlerinin Üstünlükleri

Çalışmada gerek direkt sıvı-sıvı tüketmesi, gerekse Amberlit XAD-2 reçinesi ile tüketme yöntemlerinde aşağıda verilen 3 ayrı çözücü sistemi denenmiştir.

a- 1,2-Dikloroetan : etil asetat (4:6)

b- 1,2-Dikloroetan : etil asetat : izopropanol (9:10:2)

c- Kloroform : izopropanol (6:1)

Kesin verim hesaplamalarının yapılmamış olması nedeniyle bu üç sistem arasındaki nicel farkları kesinlikle söylemek olanaksızdır. Ancak genel olarak çok önemli farklar olmadığı söylenebilirse de alkol gibi polar çözücüler içeren organik çözücü karışımlarının, idrarın polar yapıdaki normal bileşenlerini fazla tükettiği ve daha fazla kirliliğe neden olduğu görülmüştür. Dolayısıyla 1,2-Dikloroetan-etil asetat (4:6) sistemi daha az miktarda idrar pigmenti tüketmesi ve sonuçta daha temiz bir kromatogram elde edilmesi nedeniyle tercih edilmiştir. Diğer taraftan Amberlit XAD-2 reçinesi ile tüketmede direkt sıvı-sıvı tüketmesine kıyasla idrar pigmentlerinden daha iyi temizlenmiş bir ekstrakt elde edildiği için tercih edilmiştir. Amberlit XAD-2 reçinesi ile tüketmenin diğer üstünlükleri şöyle sıralanabilir.

1- İşlem basit ve hızlıdır, Kolondan sadece 20 ml idrar geçirilmektedir ve bu miktar idrar, maddelerin Tablo II'de verilen duyarlık sınırlarında tayinlerine olanak vermektedir.

2- Zaman alıcı ayırma humili tüketme tekniklerinden kaçınıldığı için toplam analiz süresi önemli ölçüde azalmıştır. Tüketme süresi en fazla 15 dakikadır.

3- Direkt sıvı-sıvı tüketmesine kıyasla sadece 1/3 oranda tüketme çözücüsü kullanıldığından analiz maliyeti azalmıştır.

4- Ekstre daha az oranda polar veya non-polar kirliliklere sahiptir, dolayısıyla daha temizdir.

5- Reçine kolonundan idrar geçirilmesini takiben İTK'ya uygulamaya değin, kolonlar buzdolabında bozulma tehlikesi olmaksızın saklanabilirler.

6- Kullanılmış reçine kolonları metanol-su ile yıkanarak tekrar kullanılabilirlerinden maliyet azalmaktadır.






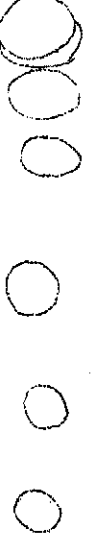





7- Aynı anda çok sayıda örnekle seri halde çalışma olanağı vardır.

Tüketme verimi hesaplamaları daha önce de belirtildiği gibi yapılmamıştır. Referans standartların direkt olarak İTK'ya uygulanmasını takiben saptanacak gözlenebilirlik sınırları esas alınıp, bu değerlerin, değişen konsantrasyonlarda ilaç taşıyan kontrol idrarlarının uygulanmasıyla saptanacak gözlenebilirlik sınırlarının kıyaslanmasıyla yarı-nicel verim hesabı yapılması düşünülmüştür. Ancak, özellikle idrar örneklerinden elde edilen ayırımada maddelerin renk belirteçleri ile verdikleri lekeler difüzyonla yayıldığından renk şiddetleri üzerinden duyarlı bir verim hesabı yapılamamıştır. Nitel amaçlı bir çalışmada önemli olan düşük duyarlılık sınırları olduğundan ve Tablo 2'de görülen bu sınırlar yeterli duyarlılığı sağlayacak düzeyde olduğundan daha detaylı nicel tayinlere gerek duyulmamıştır.

IV.3. Geliştirilen İTK Yönteminin Üstünlükleri












Çalışmalar sırasında pek çok çözücü sistemi denenmiştir. Ancak tanımlanması amaçlanan 11 maddenin hepsinin ayırımına olanak veren bir

sistemin sağlanması güç olmuştur. Literatürde bu tip çalışmalar için kullanılan çözücü sistemlerinin çoğu belirli bir grup ilaç için olduğundan ve bu çalışmada birden fazla ilaç grubunu içeren bir maddeler dizisi ile çalışıldığından tek bir çözücü sistemi ile maddelerin tümü için tam bir ayırım sağlanamamıştır. Geliştirilen kromatografi yöntemindeki I.sürüklenme sistemi esas itibarıyla Davidow (60,61)'dan esinlenilmiştir. Sadece ufak bir oran değişikliğini içermektedir. Ancak bu sistem de tek başına kullanıldığında çoğu maddelerin (diazepam, klorpromazin ve imipiramin ile, difenilhidantoin, sekobarbital ve meprobamat ile) Rf değerleri çakışmaktadır. Çakışan bu maddeler genellikle aynı gruptan olduklarından özgül belirteçlerle verdikleri renk üzerinden ayırmak zor olmaktadır. Bu durum Şekil 12'de de görülmektedir.

Difenilhidantoin	Librium	Meprobamat	Fenobarbital	Sekobarbital	St.Karışım	Diazem	Klorpromazin	İmpiramin	Morfin	Kodein
										

Şekil 12 : I.sürüklenme sistemi (Etil asetat : metanol : amonyak (85:12:3) yalnız başına kullanıldığında maddelerin ayırımını gösteren kromatogram.

II.sistem yalnız başına kullanıldığında ise I.sistemle ayrılan fenobarbital ile sekobarbital, difenilhidantoin ile librium birbirlerinden ayrılmazken I.sistemle ayrılmayan meprobamat ve diazepam diğerlerinden ayrılmaktadır. Bu durum Şekil 13'de görülmektedir.

Difenilhidantoin	Librium	Meprobamat	Fenobarbital	Sekobarbital	Standart Karışım	Diazem	Klorpromazin	İmpiramin	Morfin	Kodein
										

Şekil 13 : II.sistem (Kloroform : metanol (90:10) tek başına kullanıldığında maddelerin ayırımını gösteren kromatogram.

Bu nedenle bu iki sistemin birbirini takiben birleştirilmesi düşünülmüştür. Yöntemimizde uygulanan, I.çözücü sistemini (Etil asetat : metanol : amonyak (85:12:3) plağın yarısına kadar sürükledikten sonra plak soğuk hava akımında kurutulup 2.çözücü sistemi olan kloroform : metanol (90:10) da sürüklendiğinde çakışan çoğu maddelerin ayrıldığı görülmektedir. Şekil 2'de de görüldüğü gibi U.V. altında ve takiben renk belirteçleri ile iyi bir ayırım elde edilmiştir. Sürüklenme için 2 çözücü sistemi kullanmak çok fazla zaman almamaktadır. Total sürüklenme süresi 20-30 dakikayı geçmemektedir. Rf'leri birbirine yakın olarak görülen maddeler genellikle ayrı gruplar olduklarından renk belirteçleriyle ayrılabilirler. Örneğin; Rf değerleri çok yakın gibi görülen klorpromazin ve imipramin renk belirteçleriyle kolayca ayrılabilir, zira, HgSO₄ püskürtülüp etüvde 3-4 dakika tutulmanın sonunda sadece klorpromazine özgü pembe renk görülmektedir.

Diğer taraftan sekobarbital, butalbital aynı Rf ve renkleri verecek çakışmalarına karşın, bunlardan şüphelenildiği takdirde II.2.2.3'de anlatılan sistemle 15 dakika süren ikinci bir kromatografi işlemi ile birbirlerinden ayrılmaktadırlar. Aynı işlem aynı durumu gösteren difenilhidantoin için de söz konusudur. Aslında bu çalışmada analizi amaçlanan barbitürat türevi, uzun etkili fenobarbital; orta etki süreli butalbital ve kısa etkili sekobarbital olmak üzere üç ayrı grubu temsil etmektedir. Barbitürat zehirlenmelerinin genel belirtileri her üç madde içinde aynı olmakla beraber kısa ve orta etkili barbitüratlarla zehirlenmelerin çabuk gelişmesi nedeniyle teşhisleri dolayısıyla barbitürat cinsinin tayini önemlidir. Böylece geliştirilen tarama yöntemi ile butalbital, sekobarbital veya difenilhidantoin karşılık gelen Rf'de bir leke elde edildiğinde doğrulayıcı-ek İTK ile ayırım yapılabilir.

Ayrıca barbitürat grubu ve difenilhidantoin şüphesinin kuvvetli olduğu durumlarda geliştirilen tarama yöntemi renk belirteçlerini püskürtme işlemlerine kadar aynen uygulanıp sadece $KMnO_4$ belirteci püskürtülerek ayırıcı tanıya gidilebilmektedir. Bu durumda sekobarbital sarı renk, fenobarbital ve butalbital pembe renk (ki bu iki maddenin R_f 'leri farklıdır) verirken, U.V. altında floresans ile görülebilen difenilhidantoin renk vermektedir.

Genel tarama yönteminde belirteçlerin püskürtülmesinde genel bir sıra izlenmiştir. Ancak şüpheli durumlarda maddelere özgü pek çok belirteç de denenebilir. Meproamat, difenilkarbazon-civa sülfat ile çabuk solan pembe renk vermektedir. Meproamat şüphesinde furfural-hidroklorik asit belirteci püskürtülerek sadece meproamata özgü mavi-siyah renk ile tanı kesinleştirilebilir.

Diğer taraftan benzodiazepinlerin idrarda serbest halde itrah oranları oldukça düşüktür. Klordiazepoksit % 1'den az, diazepam ise % 0.05 den az oranlarda atılmaktadır. Bu nedenle, bu iki ilacın tedavi dozlarında alınımını takiben idrarda tarama testi ile tayin olanağı olmamıştır. Tayin ancak 10 mg klordiazepoksit alan 8 kişiden toplanan idrarlar tüketilip, ekstraler birleştirilerek İTK'ya uygulandığında mümkün olmuştur. Bu durum yüksek dozlarla meydana gelen zehirlenme olgularında klordiazepoksitin tayin edilebileceğini göstermektedir. (Bu çalışma süresince acil servisten klordiazepoksit zehirlenme olgusuna ait idrar örneği gönderilmemiştir).

Diazepamın itrah oranının çok daha düşük olması nedeniyle ve klordiazepoksit'de olduğu gibi bir zehirlenme olgusu idrarı ele geçirilemediğinden kesin bir şey söylemek zordur. Ancak 10 mg diazepam alan 20 denegün idrarı birleştirildiğinde tayin olanağı olmuştur. Bu nedenle yüksek

dozda ilaç alımında itrah edilen miktarı fazla olacağından ve zehirlenme olgularında başta metabolizma yolaklarının doygunluğa erişmesi gibi çeşitli nedenlerle itrah oranı da artacağından (örneğin salisilatların tedavi dozlarında serbest halde itrah oranı % 5 iken aşırı dozda % 80'e çıkmaktadır (7)) tayin olasılığının yüksek olacağı düşünülmektedir. Ayrıca doğrulayıcı test olarak kullanılan Bratton-Marshall testi benzodiazepinlerin tayininde iyi sonuç vermektedir.

Sonuç olarak geliştirilen tarama yöntemi ivedi klinik toksikolojik olgularda, ilaç bağımlılığı olgularında kullanılabilecek basit, hızlı, duyarlı bir yöntemdir. Tüm analiz süresi 45-50 dakikadır. Kurulu bir laboratuvarında teknisyen tarafından da yürütülebilir. Ayrıca hernekadar bu çalışmada idrar örnekleri kullanılmış ise de, yöntem başta kan olmak üzere diğer biyolojik örneklerle de uygulanabilir.

Yöntem metabolitlerin ayırımı bozmaması yönünden özgüdür. Ancak aynı anda alınacak çok çeşitli diğer grup ilaçların ayırımı bozup bozmadığını söylemek şimdilik olanaksızdır. Yöntem kullanıldıkça bu husus aydınlığa kavuşacaktır.

Ö Z E T

Bu çalışma suistimal edilen ve kazai veya intihar amaçlı zehirlenmelere neden olan ilaçların tayini için ivedi bir ön tarama yöntemi geliştirmek amacıyla yapılmıştır. Ülkemizde özellikle hastanelerimizde bu tip olguların analitik olarak değerlendirilmesi ve tedaviye analitik tanım yoluyla yardımcı olunması konusuna eğilen laboratuvarlar yoktur. Kolay, hızlı, duyarlı bir tarama yöntemi geliştirilip kurulmasının nedeni, özellikle etkeni bilinmeyen zehirlenme vakalarına bu yönden yardımcı olacağı düşüncesidir; ayrıca, ilaç suistimalinin saptanması için de kullanılması amaçlanmıştır.

Çalışmada kolaylığı, hızlılığı ve ekonomik oluşu nedeniyle ince tabaka kromatografisi yöntemi kullanılmıştır. Analizlerde idrar örneklerinden yararlanılmıştır.

Yukarıda belirtilen amaçlarla kullanılan ilaçlardan en sık karşılaşılanları ve genellikle bağımlılık yapmaları nedeniyle morfin, kodein, fenobarbital, sekobarbital, butalbital, diazepam, klordiazepoksit, klorpromazin, imipramin, difenilhidantoin ve meprobamat analiz edilecek ilaçlar olarak seçilmiştir.

İdrar örnekleri sıvı-sıvı ekstraksiyon veya Amberlit XAD-2 reçinesinden ekstraksiyon ile tüketilmiştir. Tüketilen örneklerin taşıdığı

maddeler, geliştirilen ince tabaka kromatografisi yöntemi ile birbirinden ayrılarak tanımlanmışlardır. Uygulanan yöntem kısaca şöyledir :

Adsorban : Silikajel GF₂₅₄

Sürükleme Sistemleri : I- Etil asetat : metanol : amonyak
(85 : 12 : 3)

II- Kloroform : metanol (90 : 10)

Plak önce I.sürükleme sisteminde 6 cm lik mesafeye kadar, daha sonra II.sürükleme sisteminde 12 cm yüksekliğe kadar sürüklenmeye bırakılmıştır. Bu işlem için geçen tüm süre 20-30 dakikayı geçmemektedir.

Ayrılan maddelerin tanımları ise Rf değerleri ve renk reaktifleri ile verdikleri özgül renklere dayanılarak yapılmıştır. Gerektiğinde ise doğrulayıcı-ek analizler yapılmıştır.

Sonuç olarak bu yöntem; bir acil toksikoloji laboratuvarı için ön tarama yöntemi olarak kullanılabilir nitelikte, basit, hızlı, duyarlı ve tekrarlanabilir bir yöntemdir.

S U M M A R Y

The purpose of this study is to develop an urgent screening test for drugs which cause accidental or intentional poisoning and for drugs of abuse. There is no laboratory in our country especially in our hospitals to determine such cases analytically and to help treatment by analytical identification. The aim of developing a simple, rapid, sensitive screening test is to be helpful in treating mainly unknown poisoning cases; also it can be used in determining drug abuse.

In this study, thin layer chromatography is used because of its simplicity, rapidity and its cheapness. In experiments urine is chosen as specimen.

Morphine, codeine, phenobarbital, secobarbital, butalbital, diazepam, chlordiazepoxide, chlorpromazine, imipramine, diphenylhydantoin and meprobamate are analysed as they are the most common drugs used for the purposes that mentioned above and cause addiction.

Urine specimens have been extracted by liquid-liquid extraction or by Amberlite XAD-2 resin extraction. The contents of the extract specimens have been separated and identified by the method developed in this study. Application of this thin layer chromatographic method has been as follows.

Adsorbent : Silica gel GF₂₅₄
Solvent Systems : I- Ethyl acetate : Methanol : Ammonia
(85 : 12 : 3)
II- Chloroform : Methanol (90 : 10)

The adsorbent coated plate has been left in the first solvent system till the solvent system has run up to 6 cm height in the plate. Then it has been taken to the second solvent system and has been left there till the system has run up to 12 cm height. This application has taken totally 20-30 minutes.

Identification of the separated substances has been done by Rf values and specific colors with spray reagents. Confirmatory tests have been applied if necessary.

As a result this method is simple, rapid, sensitive and can be used in an emergency toxicology center as a screening test.

K A Y N A K L A R

1. Sine, H.E., McKenna, M.J., Law, M.R., Murray, M.H. : Emergency drug analysis. *J. Chromatogr. Sci.*, 10, 297 (1972).
2. Köknel, Ö. : Türkiye'de afyon, esrar ve ilaç alışkanlığı. *Milliyet Gazetesi*, 21 Şubat (1972).
3. Stewart, R.B., Forgnone, M., May, F.E., Forbes, J., Cluff, L.E. : Epidemiology of acute intoxications : Patients characteristics, drugs and medical complications. *Clin. Toxicol.*, 7, 513 (1974).
4. Shulgin, A.T. : Drugs of abuse in the future. *Clin. Toxicol.*, 8, 405 (1975).
5. McCarron, M.M., Walberg, C.B., Lundberg, G.D. : Are emergency toxicology measurements really used? *Clin. Chem.*, 20, 118 (1974).
6. Lundberg, G.D., Walberg, C.B., Pantlink, V.A. : Frequency of clinical toxicology test-ordering (primarily over-dose cases) and results in a large urban general hospital. *Clin. Chem.*, 20, 121 (1974).
7. Kayaalp, O. : Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. Cilt 1. Garanti Basımevi, Ankara, 1978.

8. Jones, K.L., Shainberg, L.W., Byer, C.O. : *Drugs and alcohol*. Harper
ve Row, New York, 1969.
9. Jaffe, J.H. : *Drug addiction and drug abuse, "The Pharmacological
Basis of Therapeutics"* de. Ed. L.S. Goodman, A. Gilman, Mc Millan,
New York, 1975.
10. Eddy, N.B., Halbach, H., Isbel, H., Seevers, M.H. : *Drug dependence :
Its significance and characteristics*. Bull. Wld. Hlth. Org., 32,
721 (1965).
11. WHO Expert Committe on Drug Dependence, 18. Report, Wld. Hlth. Org.
Technical Report Series no. 460. Cenevre, 1970.
12. Murphee, H.B. : *The continuing problem of barbiturate poisoning*.
Am. Family. Pyscian., 8, 108 (1973).
13. Matthew, H., Lawson, A.A.H., (Ed) : *Treatment of common acute
poisonings*. Churchill Livinstone, Edinburg, 1975.
14. Cravey, R.H., Reed, D., Sedgwick, P.R., Turner, J.E. : *Toxicologic
data from documented drug-induced or drug-related fatal cases*.
Clin. Toxicol., 10, 327 (1977).
15. Mills, I.H. : *Self-Poisoning. A modern epidemic*. Proc. Eur. Soc. Tox.,
18, 11 (1977).
16. Buhl, S.N., Kowalski, P., Vanderlinde, R.E. : *Quantitative toxicology :
Interlaboratory and intermethod evaluation in New York State*.
Clin. Chem., 24, 442 (1978).
17. Ghodse, H.A. : *Drug overdoses : A comparison of drug dependent and*

- nondependent individuals attending London casualty departments.
Int. J. Add., 14, 365 (1979).
18. Retka, R.L., Lester, G.J. : Drug-related suicide : A dawn profile.
Ibid, 14, 599 (1979).
19. Gottschalk, L.A., McGuire, L.F., Heiser, J.F., Dinova, E.C., Birch, H.:
A review of psychoactive drug-involved deaths in nine major united
states cities. *Ibid.*, 14, 735 (1979).
20. Madsen, D.B. : Group discussion and drug abuse prevention. *Ibid.*, 14,
1117 (1979).
21. Köknel, Ö. : Türkiye'de ilaç alışkanlığı. Türkiye Bilimsel ve Tek-
nik Araştırma Kurumu, İlaç Alışkanlıkları Simpozyumu, 11-12 Mayıs,
1973 (Ankara).
22. Ulubelen, A., Binyıldız, O.P., Gökhan, N., Dayioğlu, N. : İstanbul'da
ilaç tüketimi ve buna etkili nedenler. *Tıp Fak. Mecm.*, 42, 213 (1979).
23. Aykaç, M. : İntiharlar. *Tıp Fak. Mecm.*, 40, 856 (1977).
24. Müftü, Y. : Çocukluk çağı kazaları. *Ço. Sağ. ve Hast. Der.*, 18, 78
(1975).
25. Gümüş, H. : Çocukluk çağı kazaları. *Yayınlanmamış Uzmanlık Tezi.*
Hacettepe Üniversitesi (1979), Ankara.
26. Sohn, D., Simon, J. : Rapid identification of psychopharmacologic
agents in cases of drug abuse. *Clin. Chem.*, 18, 405 (1972).
27. Rubin, M. : Requirements and problems in urinalysis for abuse drugs :
The role of gas chromatography. *Amer. J. Med. Tech.*, 39, 205 (1973).

28. Law, N.C. : A modern approach for drug identification. *Amer. J. Med. Tech.*, 39, 237 (1973).
29. Kaistha, K.K. : Drug abuse screening programs : Detection, procedures, development, costs, street sample analysis and field tests. *J. Pharm. Sci.*, 61, 655 (1972).
30. Wallace, J.E., Blum, K., Singh, J.M. : Determination of drugs in biologic specimens. *Clin. Toxicol.*, 7, 477 (1974).
31. Widdop, B., Braithwaite, R.A. : Analytical methods in clinical toxicology. *Proc. Eur. Soc. Tox.*, Vol. XVIII, 50 (1977).
32. DeAngelis, G.G. : *Testing and Screening for Drugs of Abuse*. Marcel Dekker, New York (1976).
33. Frings, C.S., Queen, C.A. : Preparation and use of a urine control for certain drugs of abuse. *Clin. Chem.*, 18, 1440 (1972).
34. Mannering, G.J. : Requirements and evaluations of narcotic tests. *Psychopharm. Bull.*, 3, 27 (1966).
35. Mulé, S.J. : Identification of narcotics, barbiturates amfetamines, tranquilizers and psychomimetics in human urine. *J. Chromatogr.*, 39, 302 (1969).
36. Kaistha, K.K., Jaffe, J.H. : Extraction techniques for narcotics, barbiturates and central nervous system stimulants in a drug abuse urine screening program. *J. Chromatogr.*, 60, 83 (1971).
37. Ramsey, J., Campbell, D.B. : An ultra rapid method for the extraction of drugs from biological fluids. *J. Chromatogr.*, 63, 303 (1971).

38. Stiller, R.L., Pierson, D. : Drugs of abuse detection in biological specimens, "Neurotoxicology" de. Ed. L.Roizin, H.Shiraki, N.Grčević, Raven Press, New York (1977).
39. Steward, C.P., Stolman, A. : Toxicology mechanisms and analytical methods. Academic Press, New York, 1960.
40. Jackson, J.V. : Extraction methods in toxicology, "Symposium identification of drugs and poisons", 15 (1965).
41. Brodie, L.B., Udenfriend, S., Baer, J.E. : The estimation of basic organic compounds in biological material. J. Biol. Chem., 168, 299 (1947).
42. Titus, E.O. : Isolation procedures-liquid extraction and isolation techniques. "Fundamentals of Drug Metabolism and Drug Disposition" da. Ed. B.N. LaDu, H.G. Mandel, E.L. Way, Williams ve Wilkins, Baltimore, 1971.
43. Ewing, G.W. : Instrumental methods of chemical analysis. Mc Graw-Hill, New York, 1954.
44. Goldbaum, L.R. : Determination of barbiturates. Ultraviolet spectrophotometric method with differentiation of several barbiturates. Anal. Chem., 24, 604 (1952).
45. Sobolewski, G., Nadeau, G.A. : Scheme for the rapid identification in urine of commonly used sedatives, hypnotics and tranquilizers. Clin. Chem., 6, 153 (1960).
46. Cochin, J., Daly, J.W. : The use of thin-layer chromatography for the analysis of drugs. Isolation and identification of barbiturates

- and nonbarbiturate hypnotics from urine, blood and tissues. *J. Pharm. Exptl. Ther.*, 136, 154 (1963).
47. Cochin, J. : Analysis for narcotic analgesics and barbiturates in urine by thin-layer chromatographic techniques without previous extraction and concentrations. *Psychopharm. Bull.*, 3, 53 (1966).
48. Mclsaac, W.M. : Establishment of a new drug addiction program. *Ibid*, 3, 40 (1966).
49. Heaton, A.H., Blumberg, A.G. : Thin-layer chromatographic detection of barbiturates, narcotics and amphetamines in urine of patients receiving psychotropic drugs. *J. Chromatogr.*, 41, 367 (1969).
50. Mulé, S.J. : Routine identification of drugs of abuse in human urine
I. Application of fluorometry thin-layer and gas-liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 55, 255 (1971).
51. Kaistha, K.K., Jaffe, J.H. : TLC techniques for identification of narcotics, barbiturates and CNS stimulants in a drug abuse urine screening program. *J. Pharm. Sci.*, 61, 679 (1972).
52. Kaistha, K.K., Jaffe, J.H. : Reliability of identification techniques for drugs of abuse in a urine screening program and drug excretion data. *J. Pharm. Sci.*, 6, 305 (1972).
53. Broich, J.R., Hoffman, D.B. : Andryauskas, S., Galante, L., Umberger, C.J. : An improved method for rapid, large scale thin-layer chromatographic urine screening for drugs of abuse. *J. Chromatogr.*, 60, 95 (1971).
54. Broich, J.R., Hoffman, D.B., Goldner, S.J., Andryauskas, S., Umberger, C.J., Liquid-solid extraction of lyophilized biological material for

- forensic analysis. I. Application to urine samples for detection of drugs of abuse. *J. Chromatogr.*, 63, 309 (1971).
55. Berry, D.J., Grove, J.: Improved chromatographic techniques and their interpretation for the screening of urine from drug-dependent subjects. *J. Chromatogr.*, 61, 111 (1971).
56. Baden, M.M., Valanju, N.N., Verma, S.K., Valanju, S.N. : Confirmed identification of biotransformed drugs of abuse in urine. *Amer. J. Clin. Pathol.*, 57, 43 (1972).
57. Berry, D.J., Grove, J. : Emergency toxicological screening for drugs commonly taken in over dose. *J. Chromatogr.*, 80, 205 (1973).
58. Sobota, J.J., Lummis, W.L. : Absence of drug abuse in prisoners in a major correctional institution. *Clin. Toxicol.*, 7, 531 (1974).
59. Goldbaum, L.R., Dominguez, A.M. : Detection of abused drugs in urine and tissues. "Drug Abuse Clinical and Basic Aspects" de. Ed. P.N. Sachindra, D.N. Samarendra, The C.V. Mosby Company, St.Louis, 1977.
60. Davidow, B. : Laboratory experience in drug abuse control. *Psychopharm. Bull.*, 3, 30 (1966).
61. Davidow, B., LiPetri, N., Quame, B.: A thin-layer chromatographic screening procedure for detecting drug abuse. *Amer. J. Clin. Pathol.*, 50, 714 (1968).
62. Bastos, M.L., Kananen, G.E., Young, R.M., Monforte, J.R., Sunshine, I. : Detection of basic organic drugs and their metabolites in urine. *Clin. Chem.*, 16, 931 (1970).

63. Blass, K.G., Thibert, R.J., Draisey, T.F. : A simple rapid thin-layer chromatographic drug screening procedure. *J. Chromatogr.*, 95, 75 (1974).
64. Stoner, R.E., Parker, C. : Single-pH extraction procedure for detecting drugs of abuse. *Clin. Chem.*, 20, 309 (1974).
65. Meda, J.M., Vanko, M. : Use of charcoal to concentrate drugs from urine before drug analysis. *Clin. Chem.*, 20, 184 (1974).
66. Howarth, A.T., Clegg, G. : Simultaneous detection and quantitation of drugs commonly involved in self-administered overdoses. *Clin. Chem.*, 24, 804 (1978).
67. Reid, E. : Sample preparation in the microdetermination of organic compounds in plasma or urine. *Analyst.* 101, 1 (1976).
68. Bobbitt, J.M. : *Thin-layer chromatography*. Reinhold. New York, 1963.
69. Stahl, E. : *Thin-layer chromatography*. George Allen and Urwin, Springer Verlag, Berlin, 1969.
70. Wilkinson, G.R. : Qualitative and quantitative applications of thin-layer, gas-liquid and column chromatography. "Fundamentals of drug Metabolism and Drug Disposition" da. Ed. B.N. LaDu, H.G. Mandel, E.L. Way, Williams and Wilkins, Baltimore, 1971.
71. Hadden, N., Baumann, F., Mac Donald, F., Munk, M., Stevenson, R., Gere, D., Zamaroni, F., Majors, R. : *Basic liquid chromatography*. Varian Aerograph, Walnut Creek, California, 1971.
72. Kirchner, J.G. : Thin-layer chromatography-yesterday, to day and tomorrow. *J. Chromatogr. Sci.*, 11, 180 (1973).

73. Kirchner, J.G. : *The scope of thin-layer chromatography. J. Chromatogr.* 82, 31 (1973).
74. Brandt, M.K. : *Thin-layer chromatography as a method of screening for narcotic usage. Amer. J. Med. Tech.,* 39, 217 (1973).
75. Dole, V.P., Kim, W.K., Englitis, I. : *Detection of narcotic drugs, tranquilizers, amphetamines and barbiturates in urine. JAMA,* 198, 115 (1966).
76. Kokoski, R.J. : *A practical application of thin-layer chromatography in the detection of narcotic drugs in the urine. Psychopharm. Bull.,* 3, 34 (1966).
77. Jaffe, J.H., Kirkpatrick, D. : *The use of Ion. Exchange Resin Impregnated paper in the detection of opiates, alkaloids, amphetamines, phenothiazines and barbiturates in urine. Ibid,* 3, 49 (1966).
78. Dole, V.P., Kim, W.K., Englitis, I. : *Extraction of narcotic drugs, tranquilizers and barbiturates by cation-exchange paper and detection on a thin-layer chromatogram by a series of reagents. Ibid,* 3, 45 (1966).
79. Montalvo, J.G., Klein, E., Eyer, D., Harper, B. : *Identification of drugs of abuse in urine. I. A study of the Dole technique. J. Chromatogr.,* 47, 542 (1970).
80. Neaman, R.L. : *The thin-layer chromatography of drugs. J. Chem. Educ .,* 49, 834 (1972).
81. Leopold, M., Kuo, C.T. : *Total analysis of an illicit or "street" narcotic sample by thin-layer chromatography. Bull. Narcotics,* XXIV, 35 (1972).

82. Brown, J.K., Shapazian, L., Griffin, G.D. : A rapid screening procedure for some "street drugs" by thin-layer chromatography. *J. Chromatogr.*, 64, 129 (1972).
83. Choulis, N.H. : Separation and quantitation of mixtures of the most commonly abused drugs. *J. Pharm. Sci.*, 62, 112 (1973).
84. Juselius, R.E., Barhart, F. : Detection of barbiturates, narcotics and amphetamines in urine. *Clin. Toxicol.*, 6, 53 (1973).
85. Pranitis, P.A., Stolman, A. : Specialized thin-layer chromatographic system for some common drug identification problems. *J. Chromatogr.*, 106, 485 (1975).
86. Masoud, A.N. : Systematic Identification of drugs of abuse II: TLC. *J. Pharm. Sci.*, 65, 1585 (1976).
87. Thunel, S. : Thin-layer chromatographic procedure for the detection, isolation and identification of basic psychotropic drugs in urine. *J. Chromatogr.*, 130, 209 (1977).
88. Mulé, S.J. : Determination of narcotic analgesics in human biological materials. Applications of ultraviolet spectrophotometry, thin-layer and gas liquid chromatography. *Anal. Chem.*, 36, 1907 (1964).
89. Schmeizler, E., Yu, W., Hewitt, M.I., Greenblatt, I.J. : Gas chromatographic determination of codeine in serum and urine. *J. Pharm. Sci.*, 55, 155 (1966).
90. Boiner, U., Abbott, S. : New observations in the metabolism of morphine. The formation of codeine from morphine in man. *Experientia*, 29, 180 (1973).

91. Yeh, S.Y. : Absence of evidence of biotransformation of morphine to codeine in man. *Experientia*, 30, 264 (1974).
92. Jain, N.C., Sneath, T.C., Budd, R.D., Leung, W.J. : Gas chromatographic thin-layer chromatographic analysis of acetylated codeine and morphine in urine. *Clin. Chem.*, 21, 1486 (1975).
93. Brunson, M.K., Nash, J.F. : Gas-chromatographic measurement of codeine and narcocodeine in human plasma. *Clin. Chem.*, 21, 1956 (1975).
94. Wright, J.A., Baselt, R.C., Hine, H.C. : Blood codeine concentrations in fatalities associated with codeine. *Clin. Toxicol.*, 8, 457 (1975).
95. Mac Gee, J. : Rapid identification and quantitative determination of barbiturates and glutethimide in blood by gas-liquid chromatography. *Clin. Chem.*, 17, 587 (1971).
96. Kananen, G., Osiewicz, R., Sunshine, I. : Barbiturate analysis - A current assessment. *J. Chromatogr. Sci.*, 10, 283 (1972).
97. Bloomer, H.A., Maddock, R.K., Sheehe, J.B., Adams, J. : Rapid diagnosis of sedative intoxication by gas chromatography. *Ann. Int. Med.*, 72, 223 (1970).
98. Rice, A.J., Wilson, W.R. : Rapid identification of drugs in body fluids of comatose patients. *Clin. Toxicol.*, 6, 59 (1973).
99. Chang, T., Glazko, A.J. : Quantitative assay of 5,5-diphenylhydantoin (Dilantin) and 5-(p-hydroxy phenyl)-5 phenylhydantoin by gas-liquid chromatography. *J. Lab. Clin. Med.*, 75, 145 (1970).
100. Brooker, H.E., Darcey, B.A. : Enzymatic immunoassay vs gas/liquid

- chromatography for determination of phenobarbital and diphenylhydantoin in serum. *Clin. Chem.*, 21, 1766 (1975).
101. Ritz, P.D., Warren, G.C. : Single extraction glc analysis of six commonly prescribed antiepileptic drugs. *Clin. Toxicol.*, 8, 311 (1975).
102. Orme, M.L., Borga, O., Cook, C.E., Sjoquist, F. : Measurements of diphenylhydantoin in 0.1 ml plasma samples : gas chromatography and radioimmunoassay compared. *Clin. Chem.*, 22, 246 (1976).
103. Vandemark, F.L., Adams, R.F. : Ultramicro gas-chromatographic analysis for anticonvulsants with use of a nitrogen-selective detector. *Clin. Chem.*, 22, 1062 (1976).
104. Maes, R., Hodnett, N., Landesman, H., Kananen, G., Finkle, B., Sunshine, I. : The gas chromatographic determination of selected sedatives (Ethchlorvynol, paraldehyde, meprobamate and carisoprodol) in biological material. *J. Foren. Sci.*, 14, 235 (1969).
105. Zingales, I.A. : Diazepam metabolism during chronic medication. Unbound fraction in plasma, erythrocytes and urine. *J. Chromatogr.*, 75, 55 (1973).
106. Cravey, R., Jain, N.C. : The identification of non-barbiturate hypnotics from biological specimens. *J. Chromatogr. Sci.*, 12, 237 (1974).
107. Hailey, D.M. : Chromatography of the 1,4-benzodiazepines. *J. Chromatogr.*, 98, 527 (1974).
108. Arnold, E. : A simple method for determining diazepam and its major metabolites in biological fluids : Application in bioavailability studies. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 36, 335 (1975).

109. Rejent, T.A., Wahl, K.C. : Diazepam abuse : incidence, rapid, screening and confirming methods. *Clin. Chem.*, 22, 889 (1976).
110. Pape, B.E. : Analytical toxicology : applications of element-selective electrolytic conductivity detection for gas chromatography. *Clin. Chem.*, 22, 739 (1976).
111. Vandemark, F.L., Adams, R.F., Schmidt, G.I. : Liquid-chromatographic procedure for tricyclic drugs and their metabolites in plasma. *Clin. Chem.*, 24, 87 (1978).
112. Kabra, P.M., Koo, H.Y., Morton, L.J. : Simultaneous liquid chromatographic determination of 12 common sedatives and hypnotics in serum. *Clin. Chem.*, 24, 657 (1978).
113. Adams, R.F., Vandemark, F.L. : Simultaneous high-pressure liquid chromatographic determination of some anticonvulsants in serum. *Clin. Chem.*, 22, 25 (1976).
114. Anders, M.W., Latorre, J.P. : High-speed ion-exchange chromatography of barbiturates, diphenylhydantoin and their hydroxylated metabolites. *Anal. Chem.*, 42, 1430 (1970).
115. Evans, J.E. : Simultaneous measurement of diphenylhydantoin and phenobarbital in serum by high performance liquid chromatography. *Anal. Chem.*, 45, 2428 (1973).
116. Atwell, S., Green, V., Haney, W. : Development and evaluation of a method for simultaneous determination of phenobarbital and diphenylhydantoin in plasma by high-pressure liquid chromatography. *J. Pharm. Sci.*, 64, 806 (1975).

117. Brown, P.R. : The use of high pressure liquid chromatography in pharmacology and toxicology. *Advan. Chromatogr.*, 12, 1 (1975).
118. Kabra, P.M., Gotelli, G., Stanfill, R., Marton, L.J. : Simultaneous measurement of phenobarbital, diphenylhydantoin and primidone in blood by high-pressure liquid chromatography. *Clin. Chem.*, 22, 824 (1976).
119. Bugge, A. : Quantitative high performance liquid chromatography of diazepam and N-desmethyldiazepam in blood. *J. Chromatogr.*, 128, 111 (1976).
120. Kabra, P.M., Marton, L.J. : High pressure liquid chromatographic determination of 5-(4-hydroxy-phenyl)-5-phenylhydantoin in human urine. *Clin. Chem.*, 22, 1672 (1976).
121. Kabra, P.M., Stevens, G.L., Marton, L.J. : High-pressure liquid chromatographic analysis of diazepam, oxazepam and N-desmethyl-diazepam in human blood. *J. Chromatogr.*, 150, 355 (1977).
122. Kabra, P.M., Stafford, B.E., Marton, L.J. : Simultaneous measurement of phenobarbital, phenytoin, primidone, ethosuximide and carbamazepine in serum by high-pressure liquid chromatography. *Clin. Chem.*, 23, 1284 (1977).
123. Adams, R.F. : The determination of anticonvulsants in biological samples by use high-pressure liquid chromatography. *Advan. Chromatogr.*, 15, 131 (1977).
124. Greizerstein, H.B., Wojtowicz, C. : Simultaneous determination of chlordiazepoxide and its N-demethyl metabolite in 50 ul blood samples by high pressure liquid chromatography. *Anal. Chem.*, 49, 2233 (1977).

125. Brodie, R.R., Chasseud, L.F., Taylor, T. : High-performance liquid chromatographic determination of benzodiazepines in human plasma. *J. Chromatogr.*, 150, 361 (1978).
126. Fujimoto, J.M., Wang, R.I.H. : A method of identifying narcotic analgesics in human urine after therapeutic doses. *Tox. App. Pharm.*, 16, 186 (1970).
127. Mulé, S.J., Bastos, M.L., Jukofsky, D., Saffer, E. : Routine identification of drugs abuse in human urine. II. Development and application of the XAD-2 Resin. *J. Chromatogr.*, 63, 289 (1971).
128. Bastos, M.L., Jukofsky, D., Saffer, E., Chedekel, M., Mulé, S.J. : Modifications on the XAD-2 resin column method for the extraction of drugs of abuse from human urine. *J. Chromatogr.*, 71, 549 (1972).
129. Bastos, M.L., Jukofsky, D., Mulé, S.J. : Routine identification of drugs of abuse in human urine. III. Differential elution of the XAD-2 resin. *J. Chromatogr.*, 81, 93 (1973).
130. Weissman, N., Lowe, M.L., Beattie, J.M., Demetriou, J.A. : Screening method for detection of drugs of abuse in human urine. *Clin. Chem.*, 17, 875 (1971).
131. Sawada, H., Hara, A., Asano, S., Matsumoto, Y. : Isolation and identification of benzodiazepine drugs and their metabolites in urine by use of amberlite XAD-2 resin and thin-layer chromatography. *Clin. Chem.*, 22, 1596 (1976).
132. Sohn, D., Simon, J., Hanna, M.A., Ghali, G. : Preparatory procedures in screening for drugs of abuse in "clean up" methods in current use. *J. Chromatogr. Sci.*, 10, 294, (1972).

133. Kullberg, M.P., Miller, W.L., McGowan, F.J., Doctor, B.P. : Studies on the single extraction of amphetamine and phenobarbital from urine using XAD-2 resin. *Biochem. Med.*, 7, 323 (1973).
134. Kullberg, M.P., Gorodetzky, C.W. : Studies on the use of XAD-2 resin for detection of abused drugs in urine. *Clin. Chem.*, 20, 177 (1974).
135. Hartman, C.H. : Gas chromatograph detectors. *Anal. Chem.*, 43, 124 (1972).
136. Skinner, R.F., Gallaher, E.J., Knight, J.B. : The gas chromatographic mass spectrometer as new and important tool in forensic toxicology. *J. Foren. Sci.*, 17, 189 (1972).
137. Spector, S., Parker, C.W. : Morphine : Radioimmunoassay. *Science*, 168, 1347, (1970).
138. Spector, S. : Quantitative determination of morphine in serum by radioimmunoassay. *J. Pharm. Exptl. Ther.*, 178, 253 (1971).
139. Skelley, D.S., Brown, L.P., Besch, P.K. : Radioimmunoassay. *Clin. Chem.*, 19, 146 (1973).
140. Harwood, C.T. : Radioimmunoassay : Its application to drugs of abuse. *Pharmacology*, 11, 52 (1974).
141. Mulé, S.J., Bastos, M.L., Jukofsky, D. : Evaluation of immunoassay methods for detection in urine, of drugs subject to abuse. *Clin. Chem.*, 20, 243 (1974).
142. Mulé, S.J., Whitlock, E., Jukofsky, D. : Radioimmunoassay of drugs subject to abuse critical evaluation urinary morphine, barbiturate and amphetamine assays. *Clin. Chem.*, 21, 81 (1975).

143. Cleeland, R., Christenson, J., Gomez, V.M., Heveran, J., Davis, R., Grunberg, E. : Detection of drugs of abuse by radioimmunoassay : A summary of published data and some new information. *Clin. Chem.*, 22, 712 (1976).
144. Schneider, R.S., Lindquist, P., Tong-in Wong, E., Rubenstein, K.E., Ullman, E.F. : Homogenous enzyme immunoassay for opiates in urine. *Clin. Chem*, 19, 821 (1973).
145. Van der Slooten, E.P.J., Van der Helm, H.J. : Comparison of the EMIT (Enzyme multiplied immunoassay technique) opiate assay and a gas chromatographic-mass spectrometric determination of morphine and codeine in urine. *Clin. Chem.*, 22, 1110 (1976).
146. Adler, F.L., Liu, C.T. : Detection of morphine by hemagglutination-inhibition. *J. Immunol.*, 106, 1684 (1971).
147. Adler, F.L., Liu, C.T., Catlin, D.H. : Immunological studies on heroin addiction. I. Methodology and application of a hemagglutination inhibition test for detection of morphine. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 1, 53 (1972).
148. *The Merck Index (1976). Ninth Edition.*
149. *Türk Farmakopesi 1974, Milli Eğitim Basımevi, İstanbul (1974).*
150. *İlaç Rehberi 1977, Apa Yayınevi (1977).*
151. Spector, S., Vesell, E.S. : Disposition of morphine in man. *Science*, 174: 421 (1971).
152. Berkowitz, B.A., Ngai, S.H., Yang, J.C., Hempstead, J., Spector, S. : The disposition of morphine in surgical patients. *Clin. Pharm. Therap.*, 17, 629 (1975).

153. Yeh, S.Y.: Urinary excretion of morphine and its metabolites in morphine dependent subjects. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 192, 201 (1975).
154. Boerner, U., Roe, R.L., Becker, C.E. : Detection isolation and characterization of normorphine and norcodeine as morphine metabolites in man. *J. Pharm. Pharmac.*, 26, 393 (1974).
155. Goodman, M.A., Gilman, A. : *The pharmacological basis of Therapeutics*, The Macmillan Co., New York, 1966.
156. Polson, C.J., Tattersall, R.N. : *Clinical Toxicology*. J.P.Lippincott Co., Philadelphia, 1969.
157. Steele, J.A. : Solvent systems for the identification of opiates in narcotic seizures by thin-layer chromatography. *J. Chromatogr.*, 19, 300 (1965).
158. Wallace, J.E, Biggs, J.D., Merrit, J.H., Hamilton, H.E., Blum, K. : A sensitive thin-layer chromatographic technique for determining morphine in urine. *J. Chromatogr.*, 71, 135 (1972).
159. Catlin, D.H. : A comparison of five current methods for detecting morphine. *Am. J. Clin. Pathol.*, 60, 719 (1973).
160. Gorodetzky, C.W. : Efficiency and sensitivity of two common screening methods for detecting morphine in urine. *Clin. Chem.*, 19, 753 (1973).
161. Oldendorf, W.H., Hyman, S., Braun, L., Oldendorf, S.Z. : Blood-brain barrier : Penetration of morphine, codeine, heroin and methadone after carotid injection. *Science*, 178, 984 (1972).

162. Adler, T.K., Fujimoto, J.M., Way, E.L., Baker, E.M. : The metabolic fate of codeine in man. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 114, 251 (1955).
163. Solomon, M.D. : A study of codeine metabolism. *Clin. Tox.*, 7, 255 (1974).
164. Clarke, E.G.C.: *Isolation and Identification of Drugs. The Pharmaceutical Press, London, 1969.*
165. Baselt, R.C. : *Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man. Volume I, Centrally-acting drugs. Biomedical Publications, Canton 1978.*
166. Woodburry, D.M., Penry, J.K., Schmidt, R.P. : *Antiepileptic Drugs. Raven Press, New York (1972).*
167. Sunshine, I. : Chemical evidence of tolerance to phenobarbital. *J. Lab. Clin. Med.*, 50, 127 (1957).
168. Whyte, M.P., Dekaban, A.S. : Metabolic fate of phenobarbital. A quantitative study of p-hydroxyphenobarbital elimination in man. *Drug. Metab. Disp.*, 5, 63 (1977).
169. Kutt, H., Penry, J.K. : Usefulness of blood levels of antiepileptic drugs. *Arch. Neurol.*, 31, 283 (1974).
170. Leal, K.W., Troupin, A.S. : Clinical pharmacology of anti-epileptic drugs : A summary of current information. *Clin. Chem.*, 23, 1964 (1977).
171. Huisman, J.W. : The estimation of some important anticonvulsant drugs in serum. *Clin. Chim. Acta.*, 13, 323 (1966).

172. Wang, R.I.H., Mueller, M.A. : Identification of barbiturates in urine. *J. Pharm. Sci.*, 62, 2047 (1973).
173. Polcaro, C.A. : A simple combination of Rf value and melting point determination for the identification of barbiturates. *J. Chromatogr.*, 125, 431 (1976).
174. Algeri, E.J., Walker, J.T. : Paper chromatography for identification of the common barbiturates. *Amer. J. Clin. Pathol.*, 22, 37 (1952).
175. Dybing, F., Paper chromatography of barbiturates using formamide and ethylene glycol as stationary phases. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 12, 333 (1960).
176. Podmore, D.A. : Rapid paper chromatography of barbiturates. *Clin. Chim. Acta*, 7, 176 (1962).
177. Street, H.V., McMartin, C. : Quantitative estimation and identification of barbiturates in blood in emergency cases. *Nature*, 199, 456 (1963).
178. Fastlich, E., Searle, B., Davidow, B. : Identification of barbiturates in blood by paper chromatography. *Clin. Chem.*, 11, 436 (1965).
179. Parker, K.D., Kirk, P.L. : Separation and identification of barbiturates by gas chromatography. *Anal. Chem.*, 33, 1378 (1961).
180. Lous, P.A. : A spectrophotometric method for determining barbituric acids in body fluids. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 10, 134 (1954).
181. Maher, J.R., Puckett, R.F., Baker, F. : Identification of barbiturates by ultraviolet absorption. *J. Lab. Clin. Med.*, 45, 806 (1955).

182. Broughton, P.M.G. : A rapid ultraviolet spectrophotometric method for the detection estimation and identification of barbiturates in biological material. *Biochem.*, 63, 207 (1956).
183. Williams, L.A., Zak, B., Determination of barbiturates by automatic differential spectrophotometry. *Clin. Chim. Acta.*, 4, 170 (1959).
184. Bjerre, S., Porter, C.J. : Simultaneous determination of barbiturates and salicylates by ultraviolet spectrophotometry. *Clin. Chem.*, 11, 137 (1965).
185. Jatlow, P. : Ultraviolet spectrophotometric analysis of barbiturates. *Amer. J. Clin. Pathol.*, 59, 167 (1973).
186. Breimer, D.D. : Clinical pharmacokinetics of hypnotics. *Clin. Pharmacokinetics*, 2, 93 (1977).
187. Waddell, J.W. : The metabolic fate of 5-allyl-5-(1-Methyl butyl) barbituric acid (secobarbital). *J. Pharm. Exptl. Therap.*, 149, 23 (1965).
188. Greenblatt, D.J., Shader, R.I. : *Benzodiazepines in Clinical Practice*, Raven Press, New York, 1974.
189. Garattini, S., Mussini, E., Randall, L.O. : *The Benzodiazepines*. Raven Press, New York, 1973.
190. Schwartz, M.A., Koechlin, B.A., Postma, E., Palmer, S., Krol, G. : Metabolism of diazepam in rat, dog and man. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 149, 423 (1965).
191. De Silva, J.A., Koechlin, B.A., Bader, G. : Blood-level distribution patterns of diazepam and its major metabolite in man. *J. Pharm. Sci.*, 55, 692 (1966).

192. Schreiber, E.C. : The metabolic alteration of drugs. *Ann. Rev. Pharm.*, 10, 77 (1970).
193. Kanto, J., Isalo, E., Lehtinen, V., Salminen, J. : The concentrations of diazepam and its metabolites in the plasma after an acute and chronic administration. *Psychopharmacologia*, 36, 123 (1974).
194. Kaplan, S.A., Jack, M.L., Alexander, K., Weinfeld, R.E. : Pharmacokinetic profile of diazepam in man following single intravenous and oral and chronic oral administrations. *J. Pharm. Sci.*, 62, 1789 (1973).
195. Beckstead, H.D., Smith, S.J. : Detection of impurities in medicinal 1,4-Benzodiazepines and related compounds by thin-layer chromatography. *Jahrang.*, 5, 529 (1968).
196. Sawada, H., Shinohara, K. : Detection and identification of nitrazepam and related compounds by thin-layer chromatography. *Arch. Toxikol.*, 36, 335 (1975).
197. Samuels, R.W. : A rapid screening test for diazepam in serum. *J. Anal. Tox.*, 1, 208 (1977).
198. Schwartz, M.A., Postma, E. : Metabolic N-demethylation of chlordiazepoxide. *J. Pharm. Sci.*, 55, 1358 (1966).
199. Zingales, I. : Determination of chlordiazepoxide plasma concentrations by electron capture gas-liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 61, 237 (1971).
200. Frings, C.S., Cohen, P.S. : Rapid colorimetric method for the quantitative determination of librium (Chlordiazepoxide Hydrochloride) in serum. *Amer. J. Clin. Pathol.*, 56, 216 (1971).

201. Jatlow, P. : Ultraviolet spectrophotometric measurement of chlor-diazepoxide in plasma. *Clin. Chem.*, 18, 516 (1972).
202. Hollister, L.E., Levy, G. : Kinetics of meprobamate elimination in humans. *Chemotherapia*, 9, 20 (1964).
203. Douglas, J.F., Ludwig, B.J., Smith, N. : Studies on the metabolism of meprobamate. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 112, 436 (1963).
204. Jenis, E.H., Payne, R.J., Goldbaum, L.R. : Acute meprobamate poisoning. *JAMA*, 207, 361 (1969).
205. Olesen, O.V. : Identification of meprobamate in serum and urine and its quantitative determination in serum by thin-layer chromatography. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 24, 183 (1966).
206. Heyndrickx, A., Schauvliege, M., Blomme, A. : Photometry and thin-layer chromatography of three tranquillizers N-non substituted carbamates. *J. Pharm. Belgique*, 3, 117 (1965).
207. Haywood, P.E., Horner, M.W., Rylance, H.J. : Thin-layer chromatography of neutral drugs. *Analyst*, 92, 711 (1967).
208. Dill, W.A., Kazenko, A., Wolf, L.M., Glazko, A.J. : Studies on 5,5' diphenylhydantoin (Dilantin) in animals and man. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 118, 270 (1956).
209. Butler, T.C. : The metabolic conversion of 5,5-Diphenyl hydantoin to 5-(p-Hydroxyphenyl)-5-phenyl hydantoin. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 119, 1 (1957).
210. Maynert, E.W. : The metabolic fate of diphenyl hydantoin in the dog, rat and man. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 130, 275 (1960).

211. Glazko, A.J., Chang, T., Baukema, J., Dill, W.A., Goulet, J.R., Buchanan, R.A. : Metabolic disposition of diphenylhydantoin in normal human subjects following intravenous administration. *Clin. Pharmacol. Therap.*, 10, 498 (1969).
212. Atkinson, A.J., MacGee, J., Strong, J., Garteiz, D., Gaffney, T.E. : Identification of 5-meta-hydroxy phenyl-5-phenylhydantoin as a metabolite of diphenylhydantoin. *Biochem. Pharm.*, 19, 2483 (1970).
213. Garrettson, L.K., Jusko, W.J. : Diphenylhydantoin elimination kinetics in overdosed children. *Clin. Pharmacol. Therap.*, 17, 481 (1974).
214. Lund, L. : Anticonvulsant effect of diphenyl hydantoin relative to plasma levels. *Arch. Neurol.*, 31, 289 (1974).
215. Laubscher, F.A. : Fatal diphenylhydantoin poisoning. *JAMA*, 198, 194 (1966).
216. Tenckhoff, H., Sherrand, J., Hickman, R.O., Ladda, R.L. : Acute diphenylhydantoin intoxication. *Amer. J. Dis. Child.*, 116, 422 (1968).
217. Wallace, J.E. : Simultaneous spectrophotometric determination of diphenylhydantoin and phenobarbital in biological specimens. *Clin. Chem.*, 15, 323 (1969).
218. Olesan, O.V. : A simplified method for extracting phenytoin from serum, and a more sensitive staining reaction for quantitative determination by thin-layer chromatography. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 25, 123 (1967).

219. McLennon, D.A., Rao, G.S. : Thin layer chromatographic analysis of phenytoin and its hydroxy metabolites. *J. Chromatogr.*, 137, 231 (1977).
220. Pruitt, A.W., Zwiren, G.T., Patterson, J.H., Dayton, P.G., Cook, C.E., Wall, N.E. : A complex pattern of disposition of phenytoin in severe intoxication. *Clin. Pharmacol. Therap.*, 18, 112 (1975).
221. Cochin, J., Daily, J.W. : The use of thin-layer chromatography for the analysis of drugs. Identification and isolation of phenothiazine tranquilizers and of antihistaminics in body fluids and tissues. *J. Pharm.*, 139, 160 (1963).
222. Bolt, A.G., Forrest, I.S., Serra, M.T. : Quantitative studies of urinary excretion of chlorpromazine metabolites in chronically dosed psychiatric patients. *J. Pharm. Sci.*, 55, 1205 (1966).
223. Wechsler, M.B., Wharton, R.N., Tanaka, E., Malitz, S. : Chlorpromazine metabolite pattern in psychotic patients. *J. Psychiat. Res.*, 5, 327 (1967).
224. Hollister, L.E., Curry, S.H., Derr, J.E., Kanter, S.L. : Studies of delayed-action medication plasma levels and urinary excretion of four different dosage forms of chlorpromazine. *Clin. Pharmacol. Therap.*, 11, 49 (1969).
225. Bell, J., Bass, G.E., Escobar, J.I. : Management of neuroleptic overdoses. *Clin. Tox. Cons.*, 2, 21 (1980).
226. Davis, J.M. : Overdoses of psychotropic drugs. *Dis. Nerv. Sys.*, 29, 157 (1968).

227. Hollister, L.E. : Overdoses of psychotherapeutic drugs. *Clin. Pharmacol. Therap.*, 7, 142 (1968).
228. Malek-Ahmadi, P., Chapel, J.L. : Tolerance to the phenothiazines in schizophrenic patients. *Gen. Pharmac.*, 7, 377 (1976).
229. Forrest, F.M., Forrest, I.S. : A simple test for the detection of chlorpromazine in urine. *Amer. J. Psychiat.*, 113, 931 (1956).
230. Leach, H., Crimmin, W.R.C. : The colorimetric estimation of 3-Chlorpromazine in biological fluids. *J. Clin. Pathol.*, 9, 164 (1956).
231. Pollack, B. : The validity of the forrest reagent test for the detection of chlorpromazine or other phenothiazines in the urine. *Clin. Chem.*, 115, 77 (1958).
232. Nadeau, G., Sobolewski, G. : Estimation of phenothiazine derivatives (especially chlorpromazine and levomepromazine) in urine : A convenient method. *Canad. M. A.J.*, 80, 826 (1959).
233. Heyman, J.J., Almudevar, M., Merlis, S. : A modification of the Forrest test for phenothiazines. *Clin. Chem.*, 116, 259 (1959).
234. Heyman, J.J., Bayne, B., Merlis, S. : The estimation of phenothiazines using chemically impregnated strips. *Amer. J. Psychiat.*, 116, 1108 (1960).
235. Forrest, F.M., Forrest, I.S., Mason, A.S. : Review of rapid urine test for phenothiazine and related drugs. *Amer. J. Psychiat.*, 118, 300 (1961).
236. Campbell, K.N. : Phenothiazine derivatives in urine "false negative results" with the Forrest colour test (FPN) and a method for their elimination. *Clin. Chem.*, 11, 914 (1965).

237. Browstein, H., Roberge, A.R. : Detection of phenothiazine derivatives in urine. An evaluation of 3 methods. *Clin. Chem.*, 12, 844 (1966).
238. Forrest, I.S., Forrest, F.M., Kanter, S.L. : Elimination of false negative results with the FPN Forrest Test for phenothiazine derivatives in urine. *Clin. Chem.*, 12, 379 (1966).
239. Tompsett, S.L. : The spectrofluorimetric determination of phenothiazine drugs in blood serum. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 26, 298 (1968).
240. Tompsett, S.L. : The detection and determination of phenothiazine drugs in urine. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 26, 303 (1968).
241. Haux, P., Natelson, S. : A practical method for the assay of phenothiazines in biological fluids. *Amer. J. Clin. Pathol.*, 53, 77 (1970).
242. Turner, W.J., Turano, P.A., March, J.E. : Quantitative determination of chlorpromazine metabolites in urine. *Clin. Chem.*, 16, 916 (1970).
243. Wallace, J.E., Biggs, J.D. : Determinations of phenothiazine compounds by UV spectrophotometry. *J. Pharm. Sci.*, 60, 1346 (1971).
244. Bonnichsen, R., Geertinger, P., Maehly, A.C. : Toxicological data on phenothiazine drugs in autopsy cases. *Z. Rechtsmedizin*, 67, 158 (1970).
245. Kofoed, J., Fabierkiewicz, C.K., Lucas, G.H. : Conversion of phenothiazine derivatives to the corresponding sulphoxides on thin layer plates. *Nature*, 211, 147 (1966).
246. Zingales, I. : Systematic identification of psychotropic drugs by thin layer chromatography Part II. *J. Chromatogr.*, 34, 44 (1968).

247. Mital, R.L., Jain, S.K. : Thin-layer chromatographic analysis of some phenothiazine sulphones. *J. Chromatogr.*, 47, 546 (1970).
248. DeLeenheer, A.D. : Thin-layer chromatography of phenothiazine derivatives and analogues. *J. Chromatogr.*, 75, 79 (1973).
249. Turano, P., Turner, W.J. : Thin-layer chromatography of chlorpromazine metabolites. Attempt to identify each of the metabolites appearing in blood urine and feces of chronically medicated schizophrenics. *J. Chromatogr.*, 75, 277 (1973).
250. Jain, N.C., Leung, W.J., Budd, R.D., Sneath, T.C. : Thin-layer chromatographic identification of phenothiazines in urine specimens. *Amer. J. Med. Tech.*, 65, 58 (1970).
251. Dingel, J.V., Sulser, F., Gillette, J.R. : Species differences in the metabolism of imipramine and desmethylimipramine. *J. Pharmacol.*, 143, 14 (1964).
252. Crammer, J.L., Scott, B. : New metabolites of imipramine. *Psychopharmacologia (Berl.)*, 8, 461 (1966).
253. Gram, L.F., Kofod, B., Christiansen, J., Rafaelsen, O.J. : Imipramine metabolism: pH-Dependent distribution and urinary excretion. *Clin. Pharmacol. Therap.*, 12, 239 (1970).
254. Gram, L.F., Christiansen, J. : First-pass metabolism of imipramine in man. *Clin. Pharmacol. Therap.*, 17, 555 (1975).
255. Berger, F.M. : Depression and antidepressant drugs. *Clin. Pharmacol. Therap.*, 18, 241 (1975).

256. Curry, A.S. : Seven fatal cases involving imipramine in man.
J. Pharm. Pharmacol., 16, 265 (1964).
257. Wallace, J.E., Biggs, J.D. : Colorimetric determination of imipramine in biologic specimens. *J. Foren. Sci.*, 14, 528 (1969).
258. Naggy, A., Treiber, L. : Quantitative determination of imipramin and desimipramin in human blood plasma by direct densitometry of thin-layer chromatograms. *J. Pharm. Pharmac.*, 25, 599 (1973).
259. Robinson, A.E., Coffey, A.I., McDowall, R.D. : Toxicology of some autopsy cases involving tricyclic antidepressant drugs.
Z. Rechtsmedizin, 74, 261 (1974).
260. Bailey, D.N., Jatlow, P.I. : Gas chromatographic analysis for therapeutic concentrations of imipramine and desimipramin in plasma, with use of a nitrogen detector. *Clin. Chem.*, 22, 1697 (1976).
261. Kaye, S. : *Handbook of Emergency Toxicology*. Charles C Thomas Publisher, Springfield (1970).
262. Helman, E.Z. : Emergency screening of urine, plasma or gastric contents for barbiturates. *Clin. Chem.*, 16, 797 (1970).
263. Sunshine, I. : *Methodology for Analytical Toxicology*, CRC Press, Cleveland, 1975.
264. Stevenson, G.W. : Spectrophotometric determination of blood barbiturate. *Anal. Chem.*, 33, 1374, (1961).

E K L E R

EK I : Tüketme işleminde Kullanılan Sodyum Karbonat Sodyum Bikarbonat
Tamponunun (pH : 9.5) Hazırlanışı :

Bir erlende 45 g sodyum bikarbonat 400 ml suya ilave edilir. İyice karıştırılır. 65 g sodyum karbonat diğer bir erlene konur. Üzerine 180 ml su ilave edilerek karıştırılır. Her iki çözelti de dinlenmeye bırakılır. Bir başka erlene 365 ml sodyum bikarbonat çözeltisi ile 135 ml sodyum karbonat çözeltisi ilave edilir. Karıştırılır. pH metrede $pH 9.5 \pm 0.1$ olacak şekilde ayarlanır.

EK II : Tanımlama İşlemlerinde Kullanılan Renk Belirteçlerinin Hazırlanışı :

1. Difenilkarbazon belirteci : Difenilkarbazonun aseton:su (1:1) karışımında hazırlanmış % 0.1 lik çözeltisidir. Direkt olarak karıştırma ile yapılır.

2. Civa sülfat belirteci : Civa sülfatın % 0.25 konsantrasyonunda % 10 luk sülfürik asit içinde hazırlanmış çözeltisidir. 0.5 g HgO 20 ml derişik sülfürik asit içinde çözülür. Su ile 200 ml ye tamamlanır.

3. İyodoplatinat belirteci : 1 g platin hidroklorürün 10 ml sudaki çözeltisi, 60 g potasyum iyodürün 200 ml sudaki çözeltisi ile karıştırılır. Distile su ile 250 ml ye tamamlanır. Belirteç buzlukta saklanmalı ve her iki haftada bir yenilenmelidir.

4- Dragendorff belirteci : Bir erlende 1.3 g bizmut subnitrat 60 ml su ile çözülür. Bir başka erlende 12 g potasyum iyodür 30 ml suda çözülüp 15 ml glasial asetik asit ilave edilir. Bu iki çözelti birbirleriyle karıştırılır. Üzerine 100 ml su ve 25 ml glasial asetik asit ilave edilir.

EK III : Doğrulamayı-Ek Testlerde Kullanılan Çözelti ve Belirteçler:

1. (0.066 mol/litre) Fosfat Tamponu pH 6.95 : 0.831 g sodyum hidrojen fosfat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ve 0.363 g potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) suda çözülür. Distile su ile 100 ml ye tamamlanır.

2. Civa klorür belirteci : 0.5 g civa klorür (HgCl_2) 3 damla nitrik asit içeren 50 ml suda çözülür. Bu çözeltiden 1 ml alınıp 50 ml distile su ile seyreltilir. Üzerine 0.42 g sodyum bikarbonat ilave edilir.

3. Ditizon (difeniltiokarbazon) çözeltisi : 1 mg ditizon tartılarak bir erlene alınır. 100 ml kloroformda çözülür.

4. Sodyum nitrit çözeltisi : 100 mg sodyum nitrit tartılarak bir erlene alınır. 100 ml suda çözülür.

5. Amonyum sülfamat çözeltisi : 500 mg amonyum sülfamat 100 ml suda çözülür.

6. Bratton-Marshall belirteci : 100 mg N-(1-naftil)etilendiamin hidroklorür tartılır. 100 ml suda çözülür.

7- PPN Renk belirteci : Bir erlene % 5 lik Demir-III-klorür çözeltisinden 5 ml, % 20 lik perklorik asit çözeltisinden 20 ml, % 50 lik nitrik asit çözeltisinden 50 ml alınarak karıştırılır.

8. İmipramin için Test Çözeltisi : Bir erlene % 0.2 lik potasyum dikromat çözeltisinden 25 ml, % 30 luk sülfürik asit çözeltisinden 25 ml, % 20 lik perklorik asit çözeltisinden 25 ml ve % 50 lik nitrik asit çözeltisinden 25 ml alınarak karıştırılır.

9. Mandelin belirteci : Bir erlene 1 g amonyum vanadat tartılır. Derişik sülfürik asit ile çözülerek 100 ml ye tamamlanır.

10. Marguis belirteci : Bir erlene % 10 luk formaldehit çözeltisinden 8 damla alınır. Üzerine 3 ml derişik sülfürik asit ilave edilir. Belirteç kullanılmadan önce hazırlanmalıdır.

11. 1 g civa nitrat, birkaç damla derişik nitrik asit içeren 100 ml suda çözülür.

Ö Z G E Ç M İ Ş

1955 yılında Ankara'da doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Ankara'da yaptım. 1973 yılında H.Ü. Eczacılık Fakültesine girdim. 1977 de mezun oldum, aynı yıl H.Ü. Eczacılık Fakültesi Analitik Toksikoloji ve Bromatoloji Bilim Dalı'nda asistan olarak göreve başladım. Halen aynı görevde çalışmaktayım.

