



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**İDRARDA ETİL MORFİN TAYİNİ İÇİN TERBİYUM  
KOMPLEKSİNE DAYALI FLORİMETRİK YÖNTEM  
GELİŞTİRİLMESİ**

**İssoufou BOUREİMA MAHAMANE**

**ADLİ KİMYA VE ADLİ TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Doç. Dr. Mehmet Gökhan ÇAĞLAYAN**

**ANKARA**

**2020**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İDRARDA ETİL MORFİN TAYİNİ İÇİN TERBİYUM  
KOMPLEKSİNE DAYALI FLORİMETRİK YÖNTEM  
GELİŞTİRİLMESİ**

**İssoufou BOUREİMA MAHAMANE**

**ADLİ KİMYA VE ADLİ TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Doç. Dr. Mehmet Gökhan ÇAĞLAYAN**

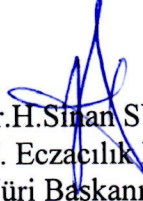
**ANKARA**


**2020**

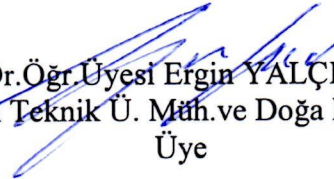
## KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Disiplinlerarası Adli Bilimler Anabilim Dalı  
Adli Kimya ve Adli Toksikoloji Tezli Yüksek Lisans Programında  
Issoufou BOUREIMA MAHAMANE tarafından hazırlanan  
“İdrarda Etil Morfin Tayini İçin Terbiyum Kompleksine Dayalı Florimetrik Yöntem  
Geliştirilmesi.” adlı tez çalışması  
aşağıdaki jüri tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak  
OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

13.01.2020

  
Prof. Dr. H. Sinan SÜZEN  
Ankara Ü. Eczacılık Fakültesi  
Jüri Başkanı

  
Doç. Dr. Mehmet Gökhan ÇAĞLAYAN  
Ankara Ü. Eczacılık Fakültesi  
Üye

  
Dr. Öğr. Üyesi Ergin YALÇIN  
İskenderun Teknik Ü. Müh. ve Doğa Bil. Fakültesi.  
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet AKAN  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## **Etik Beyan**

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans olarak hazırlayıp sunduğum “İdrarda etil morfin tayini için terbiyum kompleksine dayalı florimetrik yöntem geliştirilmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

İssoufou Boureima Mahamane

Tarih

İmza

## **Kabul ve Onay**

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Adli Kimya ve Adli Toksikoloji Anabilim Dalında

İssoufou Boureima Mahamane tarafından hazırlanan

“İdrarda etil morfin tayini için terbiyum kompleksine dayalı florimetrik yöntem geliştirilmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet AKAN  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## İçindekiler

Etik Beyan	i
Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	viii
Çizelgeler	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Etil-morfinin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	3
1.2. Etil morfinin Farmakokinetiği	3
1.3. Etil-morfinin Adli kimyadaki ve Toksikolojideki Önemi	5
1.3.1. Etil morfin İçin Kullanılan Sokak İsimleri	6
1.4. Floresans Spektroskopisi	6
1.5. Analitik Yöntemin Validasyon (Yöntem Geçerlik Testleri)	8
1.4.1. Tipik Validasyon Parametreleri	9
1.4.2. Doğruluk	9
1.4.3. Kesinlik:	10
1.4.4. Seçicilik	12
1.4.5. Teşhis Sınırı, Gözlenebilirlik Sınırı (LOD)	12
1.4.6. Tayin Alt Sınırı (LOQ):	14
1.4.7. Doğrusallık	15
1.4.8. Kalibrasyon Doğrusu (Grafiği):	16

1.4.9. Duyarlılık	17
1.4.10. Çalışma Aralığı	17
1.5. Çalışmanın Amacı	18
2. GEREÇ VE YÖNTEM	19
2.1. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler	19
2.1.1. Kullanılan Cihazlar	19
2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	19
2.1.3. Standart Maddelerin Stok Çözeltisi	20
2.2. Spektroflorimetri Çalışmaları	20
2.2.1. Yöntem optimizasyonu için yapılan çalışmalar	20
2.2.2. Yöntem Validasyon için yapılan çalışmalar	21
2.2.3. Termodinamik parametrelerin aydınlatılması	22
3. BULGULAR	24
3.1. Metot Optimizasyonu	24
3.1.1. pH Optimizasyonu	24
3.1.2. Tampon çeşidi optimizasyonu	26
3.1.3. Sitrata tamponu konsantrasyonu optimizasyonu	27
3.2. Metot Validasyonu	27
3.2.1. Kalibrasyon ve tespit limiti	28
3.2.2. Doğruluk ve Kesinlik	30
3.2.3. Termodinamik parametrelerin aydınlatılması	33
3.3. Yapay idrar Uygulamaları	37
4. TARTIŞMA	38
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	42

ÖZET	43
SUMMARY	44
KAYNAKLAR	45
ÖZGEÇMİŞ	49





## Önsöz

Tez kapsamında insan idrarındaki Etil morfinin tayini için terbiyum kompleksine dayanarak hassas bir florimetrik yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır. Adli toksikoloji, çeşitli ilaçların ve zehirlerin insanlar üzerindeki etkileri ve miktarlarıyla ilgili olan farmakoloji biliminin bir parçasıdır. Etil morfinin ölümcül zehirlenmelere neden olabileceği veya ölüme neden olabileceği birçok çalışmada göstermiştir. Etil morfinin tehlikelerinden dolayı, hassas, hızlı ve yerinde analize uygun olabilecek bir analitik yöntem geliştirilmesi adli bilimler açısından önemlidir. Bu tezde etil morfin için floresans temelli hassas, hızlı, ekonomik ve yerinde analize uygun bir analitik metot geliştirilmesi, validasyon testlerinin yapılması ve son olarak da yapay idrar örneklerine uygulanması gerçekleştirilmiştir. Bu etil morfin için geliştirilen ilk floresans temelli yöntemdir. Öncelikle bana analitik kimyayı sevdiren, her daim yanımda olan, tecrübeleriyle yolumu aydınlatan, çok değerli danışman hocam Doç.Dr. Mehmet Gökhan ÇAĞLAYAN 'ya sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Laboratuvarda birlikte çalıştığım ve tez çalışmamda her türlü desteği veren doktora öğrencisi Sezen İrem KAFTANOĞLU'na teşekkür ederim. Türkiye'ye geldiğimden beri her türlü desteği veren arkadaşım Kübra TAŞYÜREK'e teşekkür ederim. Yüksek lisans çalışmam boyunca hep yanımda olan, tecrübeleriyle bana yol gösteren, değerli zamanını bana ayıran Prof.Dr Sinan SÜZEN'e çok teşekkür ederim. Anabilim Dalının bütün hocalarına vermiş oldukları bilgiler için ve yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Beni yetiştiren, hayatımın her alanında bana maddi-manevi destek olan ve her şekilde güvenen aileme, sabır ve anlayışları için teşekkür ederim.

## Simgeler ve Kısaltmalar

LC-MS	Sıvı kromatografisi kütle spektrometresi
LC-MS/MS	Sıvı kromatografisi tandem kütle spektrometresi
GC-MS	Gaz kromatografisi kütle spektrometresi
GC-MS/MS	Gaz kromatografisi tandem kütle spektrometresi
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
LOD	Tespit sınırı
LOQ	Tayin Alt Sınırı
r	Korelasyon katsayısı
SS	Standart sapma
UV	Ultraviyole
$\Delta G$	Gibbs enerji değişimi
$\Delta H$	Entalpi değişimi
$\Delta S$	Entropi değişimi

## Şekiller

- Şekil 1.1** Etil morfin 2D Yapısı 3
- Şekil 1.2.** Floresans spektrofotometresinin şematik gösterimi (Ankara üniversitesi Analitik-Kimya-Laboratuvarı Föyü 3 Enstrümantal Analiz) 7
- Şekil 1.3** Kalibrasyon doğrusu (grafığı) ve eşitliği (ONUR, FEYYAZ 2011) 16
- Şekil 3.1.** Farklı pH'larda Tb<sup>+3</sup> Etil morfin kompleksinin floresans değişimini gösteren grafik 25
- Şekil 3.2.** Farklı tamponlarda Tb<sup>+3</sup>- etil morfin kompleksinin Floresans değişimini gösteren grafik 26
- Şekil 3.3.** Farklı sitrat tamponu derişimlerinde Tb<sup>+3</sup> – etilmorfin kompleksinin floresans değişimini gösteren grafik 27
- Şekil 3.4.** Etil morfin için kalibrasyon grafığı 28
- Şekil 3.5.** Tb<sup>+3</sup>- Etil morfin titrasyonun spektrumları. Sitrat tamponu (20mM; pH 5,5) içerisinde 200 µM Tb<sup>+3</sup> üzerine 0-400 µM etil morfin eklendiğinde elde edilen spektrumlar 29
- Şekil.3.6** Gün içi tekrar edilebilirlik seti spektrumları. 200 µM Tb<sup>+3</sup> üzerine sırasıyla a) 0, b) 60 µM, c) 140 µM ve d) 200 µM etil morfin eklendiğinde elde edilen spektrumlar 32
- Şekil 3.7.** Tb<sup>+3</sup> ile etil morfin titrasyon izotermi (25 °C) 34
- Şekil 3.8.** Tb<sup>+3</sup> ile etil morfin titrasyon izotermi (17,5 °C) 34
- Şekil 3.9.** Tb<sup>+3</sup> ile etil morfin titrasyon izotermi (32,5 °C) 35
- Şekil 3.10** Terbiyum klorür ile etil morfin titrasyonlarına ait Van't Hoff grafığı 36
- Şekil 3.11.** Etilmorfin eklenmiş İdrar örneklerinin spektrumları. 200 µM Tb<sup>+3</sup> üzerine sırasıyla etilmorfin içermeyen (kör), 20 µM ve 60 µM etilmorfin içeren idrar eklendiğinde elde edilen spektrumlar 37

## Çizelgeler

<b>Çizelge 3.1.</b> pH optimizasyonu için hazırlanan çözeltiler	25
<b>Çizelge 3.2.</b> Tb <sup>+3</sup> – etil morfin kompleksi için elde edilen bazı validasyon parametreleri	29
<b>Çizelge 3.3.</b> İdrarda etil morfin tayini için terbiyum kompleksine dayalı florimetrik yöntemi ile analizi yöntemine ait gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk analizi bulguları	31
<b>Çizelge 3.4.</b> Seçicilik çalışmasında belirlenen tolerans sınırları	33
<b>Çizelge 3.5.</b> Tb <sup>+3</sup> - etil morfin kompleks oluşumunun termodinamik parametreleri	36
<b>Çizelge 3.6.</b> Etil morfine eklenmiş idrar örneklerinin analiz sonuçları	37
<b>Çizelge 4.1.</b> Etil morfin tayini için yöntemlerin karşılaştırılması	40

# 1. GİRİŞ

Etil morfin (ayrıca diyonin veya 3-etoksimorfin olarak da bilinir), sıvı preparatlarda antitussif bir madde olarak kullanılan bir opioiddir. Moleküler yapısı morfine oldukça benzemektedir. Morfin ile tek fark 3.karbon konumunda ek bir etil grubudur. Etil morfinin opioid  $\mu$  reseptörüne afinitesi, morfinin afinitesinin sadece 1 ila 300'ü kadardır (Chen ve ark., 1991). Bir etil morfin dozunun yaklaşık %5-20'si genetik polimorf hepatik sitokrom P450 izoenzimi 2D6 (CYP2D6) ile morfine metabolize edilir. Etil morfinin farmakolojik etkilerinin çoğunun, morfine biyo-dönüşüm yoluyla gerçekleştiği düşünülmektedir (Aasmundstad ve ark., 1995). Etil morfin ABD'de bir çizelge II ilacıdır, ancak dünyadaki çeşitli ülkelerde kullanım için onaylanmıştır.

Etil morfinin ölümcül zehirlenmelere neden olabileceği veya ölüme neden olabileceği birçok çalışmada göstermiştir. Örneğin Demetz ve ark. 1983'de eroin bağımlısı bir genç erkekte aşırı dozdan kaynaklanan bir etil morfin aşırı ölümcül zehirlenme vakası raporlamışlardır. Yine aşırı doz etil morfinden ölen başka bir genç eroin bağımlısı olduğu Kintz ve ark. (1994) tarafından raporlanmıştır. Steentoft ve ark. (1989), 1984-1985 yıllarında İskandinav ülkelerinde etil morfin kullanımı nedeniyle altı kişinin zehirlenerek öldüğünü belirtmişlerdir. Helland ve ark. (1991) 10 aylık bir çocuğa akşam saatlerinde etil morfin uygulandığı ve ertesi sabah yatakta ölü olarak bulunduğunu, bu nedenle etil morfinin bu çocuğun ölümünden sorumlu olabileceğini belirtmişlerdir. Norveç'de en çok kullanılan opiatların kodein, morfin ve etil morfin olduğunu (Gjerde ve ark., 1991)

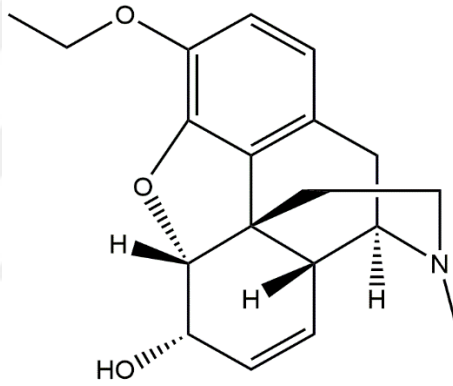
Etil morfinin yukarıda örneklenen tehlikelerinden dolayı, hassas, hızlı ve yerinde analize uygun olabilecek bir analitik yöntem geliştirilmesi adli bilimler açısından önemlidir. Bugüne kadar etil morfin için geliştirilen çalışmalar incelendiğinde birçok analitik çalışmanın yayınlandığı görülmektedir. Bu çalışmaların çoğunluğu kromatografik çalışmalardır. Değim ve ark. (2001) yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılarak, tablet formülasyonlarında kodein ve etil morfinin eşzamanlı olarak

tainlerini gerçekleştirmişlerdir. C18 kolonun kullanıldığı çalışmada bu iki maddenin analiz süresi 7 dakika olarak raporlanmıştır. Gjerde ve ark. (1991) kanda bulunan kodein, etil morfin ve morfinin miktar tayini için önce bir katı faz ekstraksiyonu ile analitleri ayırmışlar ardından ve gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) ile tainlerini gerçekleştirmişlerdir. Buy çalışmada etil morfinin tespit limit 25 nM'dır. Gundala ve ark. (2018) eş zamanlı olarak disiklomin ve etil morfinin tablet dozaj formunda tayini için bir ters faz (RP-HPLC) metodu geliştirip valide etmişlerdir. Bu iki maddenin tayini 5 dakikada tamamlanmıştır. Krizman-Matasic ve ark. (2019) atık sularda ve ırmaklarda sıvı kromatografi tandem kütle spektrometri (LC-MS/MS) kullanarak 27 opioid analjeziğin tainlerini gerçekleştirmişlerdir. Viane ve ark. (2016) ise insan plazmasında 16 opioid türü bileşen için LC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. Van Gansbeke ve ark. (2015) içlerinde etil morfinin de bulunduğu 120 tane yasaklı maddenin 16 dakikada analizi için gaz kromatografisi tandem kütle spektrometresi (GC-MS/MS) yöntemi geliştirmişlerdir. Eckart ve ark. (2015) 35 opioidin biyolojik sıvılarda tainleri için LC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir.

Etil morfin için geliştirilen yöntemler incelendiğinde, bu yöntemlerin kromatografi temelli yöntemler olduğu görülmektedir. Yukarıda bahsedilen yöntemler yüksek doğruluk, kesinlik ve seçicilik ile birlikte birden çok analitin numunelerde tayin edilebilmesi açısından önemli yöntemlerdir. Bununla birlikte bu yöntemler yerinde uygulamaya uygun değildir ve gerektikleri cihazlar açısından oldukça pahalı yöntemlerdir. Etil morfin için şimdiye kadar geliştirilen yöntemler incelendiğinde, yerinde analize uygun, basit cihazlarla uygulanabilecek ve hızlı bir yöntemle rastlanılmamıştır. Bu tezde etil morfin için floresans temelli bir analitik metot geliştirilmesi, validasyon testlerinin yapılması ve son olarak da yapay idrar örneklerine uygulanması gerçekleştirilmiştir.

## 1.1. Etil-morfinin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Etil morfin narkotik bir analjezik ve antitussiftir. Moleküler yapısı morfine benzer, tek fark 3 konumunda ek bir etil grubudur. Kapalı formülü  $C_{19}H_{23}NO_3$  olan etil morfin 'in moleküler ağırlığı 313.4 g/mol'dür. Etil morfin'in çözünürlüğü  $20^{\circ}C$ 'de sudaki 2610 mg/L'dir. (Seidell ve ark., 1941).



Şekil 1.1 Etil morfin 2D Yapısı

## 1.2. Etil morfinin Farmakokinetiği

Etil morfinin aktif metabolitleri, özellikle de morfin,  $\mu$ -opioid reseptörüne bağlanarak ve aktive ederek etkilerini gösterir. Bunun nedeni, opioidlerin yapısal olarak vücutta doğal olarak bulunan endojen endorfinleri taklit etmesi ve ayrıca  $\mu$ -opioid reseptör seti üzerinde çalışmasıdır. Opioidlerin bu doğal endorfinleri yapısal olarak taklit etme şekilleri öfori, ağrı ve anksiyolitik etkileriyle sonuçlanır. Bunun nedeni endorfinlerin ağrıyı azaltmak, uykululuk ve zevk duygularına neden olmaktan sorumlu olmasıdır. Acı, yorucu egzersiz, orgazm veya genel heyecana cevap olarak salınabilirler. Etil morfin, morfiden daha az

etkili ancak kodeinden biraz daha güçlü olarak tanımlanmıştır (Baumgartner ve ark., 1989).

Tek bir öksürük karışımı dozunun tatbik edilmesinden sonra Etil morfin'in farmakokinetiğinin incelendiği bir çalışma bir öksürük ilacı karışımı olan Cosylan'ın 10 sağlıklı denekte morfin ve morfin-glukuronid oluşumunu kanıtladığı bir çalışma mevcuttur (TOR A. ve ark.,1995). Son zamanlarda, insan gönüllülerinde etil morfininin bir metaboliti olarak morfinin oluşumu gösterilmiştir (Ripel ve ul., 1992). Etil morfin, çoğunlukla karaciğer homojenatlarında ve mikrozoamlarında N-demetilaz enzim reaksiyonları için bir model substrat olarak kullanılmıştır (George ve Tephyl 1968; Nerland ve Mannering 1978; Thompson ve Holtzman 1977; Jarvi ve diğerleri 1986; Ladona ve diğerleri 1989). Etil morfinin metabolik yollarından dolayı İzole Sıçan Hepatositlerdeki etil morfin metabolizmasını araştırmak amacıyla Xu ve ark. (1993) tarafından yapılan bir başka çalışmada, in vivo veya sağlam bir hücre sisteminde etil morfin karakterize edilmemiş, tespit edilen iki ana metabolik maddenin inkübasyon sırasında morfin ve noretilmorfin olduğunu kanıtlamışlardır.

1991 yılında Ripel ve ark. iki kadına (vücut ağırlığı 52 ve 55 kg) ve iki erkeğe (vücut ağırlığı 75 ve 85 kg), tek bir oral dozda 76 mg Etilmorfin (45 ml Cosylan) uygulamışlardır. Kan örnekleri uygulamadan 1, 3, 6, 12 ve 24 saat sonra alınmıştır. Serum elde etmek için kan örnekleri oda sıcaklığında bir saat sonra 1000 x g'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. İdrar numuneleri iki kişiden, ilk gün ve her sabah etil morfin alımından bir hafta sonrasına kadar toplanmıştır. Serum ve idrar örnekleri analizden önce -20 °C de saklanmıştır. Morfin ve etil morfin, serum ve idrarda GC-MS ile ölçülmüştür. Tespit edilebilir konsantrasyonlarda morfin ve normorfin, etil morfin alımından sonra morfin oluşumunu doğrulamıştır.



### 1.3. Etil-morfinin Adli kimyadaki ve Toksikolojideki Önemi

Adli toksikoloji, çeşitli ilaçların ve zehirlerin insanlar üzerindeki etkileri ve miktarlarıyla ilgili olan farmakoloji biliminin bir parçasıdır (Max, M ve ark., 2015). Başka bir deyişle, adli toksikoloji, kimyasalların insan vücudu üzerindeki zararlı etkilerinin tıbbi ve yasal yönleriyle ilgilenen bir bilimdir (Gupta, PK., 2001). Numunelerde bulunan ilaçların tespiti ve / veya miktar tayini ve elde edilen sonuçların yorumlanması analitik yöntemler olmadan yapılamaz.

Etil morfinin moleküler yapısı morfine benzemektedir, tek fark 3 konumunda ek bir etil grubudur ve esas olarak bir antitussiftir. Etil morfinin diğer afyonlarla ortak özelliği, kötüye kullanım potansiyelinin morfine biyotransformasyonu ile ilgili olmasıdır.

Ayrıca, önceki çalışmalar etil morfin ve kodeinini yapısal benzerliklere sahip olduğunu göstermiştir. Adli bilim araştırmacıları, antitüsif ilaç tedavisi için etil morfinin alkolikler ve uyuşturucu bağımlıları tarafından kötüye kullanıldığını ispatladılar. Etil morfinin ölümlere neden olduğu veya ölümcül zehirlenmelere neden olabildiği çeşitli makalelerde belirtilmiştir (Demetz ve ark. 1983; Kintz ve ark., 1994). Steentoft ve ark. (1989), 1984-1985 yıllarında İskandinav ülkelerinde etil morfin nedeniyle altı kişinin zehirlenerek öldüğünü bildirmiştir. Helland ve ark. (1999), 10 aylık bir çocuğa akşam saatlerinde etil morfin uygulandığı ve ertesi sabah yatakta ölü olarak buldukları bir vaka bildirmiştir. Etil morfinin bu gibi ölümlere neden olabilen özelliği onun bir silah gibi de kullanılabilme potansiyeli taşıdığını göstermektedir.

Etil morfin hem morfine hem de kodeine metabolize edilir ve sıklıkla örneğin eroin yokluğunda ilaç bağımlıları tarafından kullanılır, etil morfin içeren öksürük baskılayıcılar için reçete gerekmeyen birçok ülkede sıklıkla uyuşturucu bağımlıları tarafından kullanılmakta ve ölümlere yol açmaktadır.

### 1.3.1. Etil morfin için Kullanılan Sokak İsimleri

Tüm opioidlerin cadde isimleri vardır ve diğer karışımlarla birlikte kullanılırlar, morfinin sokak adı 'Miss Emma'.

Alkolsüz bir içecek ve şeker ile karıştırılan Kodein, alkol de dahil olmak üzere bazı değişkenler ile profesyonel Amerikan atletler ve güney rap müziği arasında popülerdir. Tek başına kodeinin sokak adları Kaptan Cody, Cody, küçük c ve okul çocuğu.

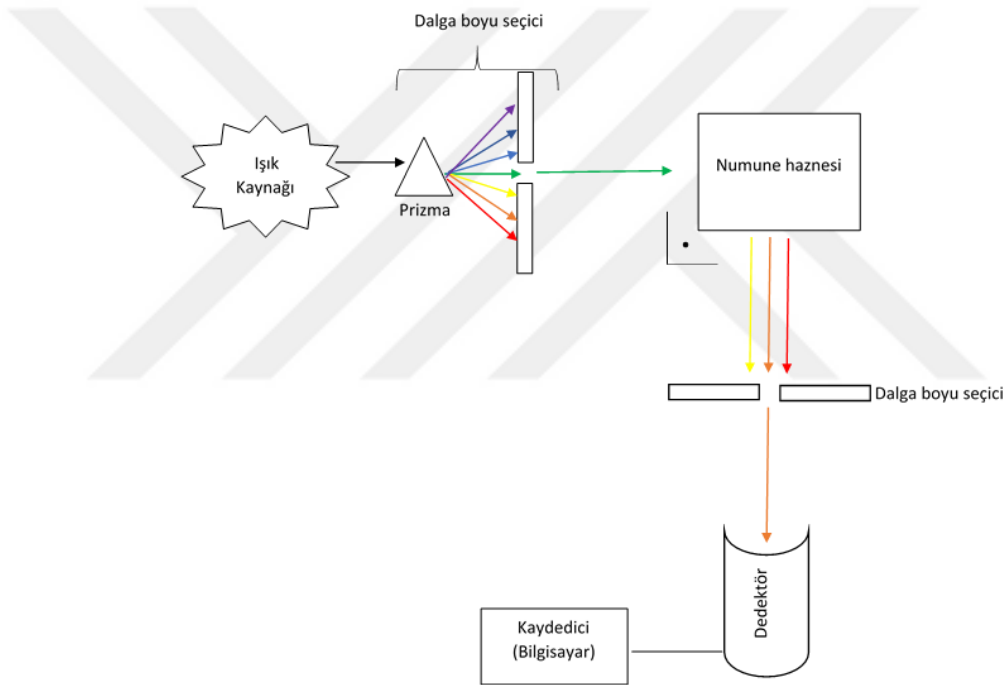
Etil morfin renksiz kristaller veya beyaz kristal tozlar olarak görünür. Alkolsüz içecek ve şekerleme kılıfı ile Etil morfin karışımı da bulunamamıştır. Etil morfin için de sokak isimleri bulunamamıştır.

### 1.4. Floresans Spektroskopisi

Işın elektromanyetik bir radyasyondur ve dalga boyu, frekans, dalga sayısı ve genlik gibi parametrelerle tanımlanır. Işın dalgalarının iki maksimum ya da minimum noktası arasındaki mesafeye dalga boyu denir ve  $\lambda$  ile gösterilir. Işığın 200-380 nm arası dalga boylarını içeren bölgesi mor ötesi (UV) bölge olarak adlandırılır. Gözle görülebilen bölge ise 380-780 nm aralığındadır (Poole ve Kalnieks, 2000). Işığın absorplayan türlerin uyarılmış hale geçtikten sonra ışık yayarak temel hale dönmelerine floresans adı verilir. Ancak maddeler absorpladıkları enerjiyi sadece ışık olarak yaymazlar ve bazı ışımsız süreçlerle de kaybedebilirler. Bu ışımsız durulmalar, iç dönüşüm, dış dönüşüm, bağ ayrılması, sistemler arası geçiş gibi süreçlerdir (Caglayan, 2014) Bir maddenin floresans yapıp yapmayacağı veya ne oranda floresans yapacağı ışımsız durulmalar ile floresans arasındaki rekabete göre belirlenir. Bir floresansının verimi floresans kuantum verimi ile ifade edilir:

$$\Phi = \frac{k_f}{k_f + k_t}$$

Bu basitleştirilmiş formüde  $\Phi$  floresans kuvantum verimini,  $k_f$  floresansın hızını,  $k_t$  ise ışımaz durulma olaylarının toplamının hızını ifade eder. Floresans sinyalleri spektrofotometreler ile ölçülürler. Şekil 1.2’de bir spektrofotometrenin blok diyagramı görülmektedir.



**Şekil 1.2.** Floresans spektrofotometresinin şematik gösterimi (Ankara üniversitesi Analitik-Kimya-Laboratuvarı Föyü 3 Enstrümantal Analiz)

Lantanitler serbest haldeyken zayıf floresans özellikleri göstermekle birlikte kompleksleştiklerinde yasaklı geçişlerin mümkün hale gelmesi nedeniyle floresans verimleri artabilmektedir. Bu yüzden lantanitlerle kompleksleşebilen maddelerin sayesinde mümkün hale gelen geçişler çeşitli floresans bantlarını serbest hale geçirmekte bu ligandların tayinlerini mümkün kılmaktadır (Lotfi ve ark., 2017).

## 1.5. Analitik Yöntemin Validasyon (Yöntem Geçerlik Testleri)

Herhangi bir analitik yöntemin amacı tutarlı, güvenilir ve doğru veriler sağlamaktır. Bu nedenle, kullanımdan önce, performansın ve yöntemin sınırlamaları ile bu özellikleri değiştirebilecek dış etkiler belirlenmelidir. Validasyon bu amaca ulaşmada büyük rol oynar (Huber, L.,2007). “Validasyon” kelimesi, Latince Validus teriminden gelir; değer / güçlü anlamına gelir, bu nedenle bir şeyin doğru, kullanışlı ve güvenilir olduğunu gösterir (Araujo, P., 2009). Validasyon en doğru tanımı ISO 9000: 2000 tarafından doğrulama olarak, ayrıntılı bir inceleme ve gerçekçi ve kesin kanıtlar elde edilmesi yoluyla prosedürün amaç için etkin bir şekilde uygulanabileceğinin göstergesidir. Validasyon, yöntem için seçilen herhangi bir yaklaşımın, stratejinin, deneysel prosedürün, işlemin, laboratuvar personelinin, enstrümantasyon, reaktiflerin ve oda koşullarının sabit koşullar altında uygun bir şekilde çalışacağını kanıtlama eylemidir. Ayrıca, bu faktörlerin uygunluğunu bireysel olarak değerlendirmek için kullanılabilir (Gowik.P. ,2009). Doğrulama, uygulanabilirliğin kapsamını ve koşullarını değerlendirir ve rutin analizde gelecekteki her ölçümün analitin gerçek değerine yeterince yakın bir konsantrasyonunu sağlayıp sağlayamayacağını kontrol eder. Ek olarak, ölçülen bir konsantrasyonun tesadüf derecesini ve gerçek değeri, sonuçla ilgili önyargı ve belirsizliğin hesaplanmasıyla da ölçülebilir. Bu nedenle, validasyon yöntemin bir kalite kontrol aracı olarak ve araştırma desteği için kullanılmaya uygun olup olmadığını doğrular. Metodu geliştirmede, laboratuvarların yüksek güvenilirlikle analitik veri üretebildiklerini kanıtlamak için uygulanması gereken önemli bir adımdır. Doğrulama, iyi tanımlanmış kalite parametrelerinin belirlenmesinden oluşur: istatistiksel (seçicilik, özgüllük, kalibrasyon eğrisi, doğrusallık, kalibrasyon aralığı, doğruluk, hassasiyet, geri kazanım, tespit limiti, ölçüm limiti (LOQ), sistem uygunluğu ve karşılaştırma diğer yöntemlerle) ve işletme / ekonomik (çapraz kirlenme, basitlik, analiz süresi, analiz başına fiyat, laboratuvar personeli için güvenlik ve çevresel etki)

### 1.4.1. Tipik Validasyon Parametreleri

Dikkate alınması gereken tipik Validasyon parametreleri (Skoog- Holler Nieman 1998).

Doğruluk

Kesinlik

Seçicilik

Teşhis Sınırı

Tayin Sınırı

Doğrusallık

Duyarlılık

Çalışma Aralığı

### 1.4.2. Doğruluk

Analitik bir yöntemin doğruluğu, bu yöntemle elde edilen test sonuçlarının gerçek değere yakınlığıdır. Bu bazen gerçeklik olarak adlandırılır. Doğruluğun, belirtilen aralığı kapsayan minimum üç konsantrasyon seviyesi üzerinden en az dokuz tekrar kullanılarak belirlenmesi önerilir (3 farklı konsantrasyon / 3 tekrar). Tahlil ile elde edilen analit yüzdesi olarak ölçülür. Kurtarma, denklem ile belirlenebilir:

$$\text{Geri Kazanım} = \frac{\text{Analitik Sonuç}}{\text{Gerçek Değer}} \times 100\%$$

#### 1.4.2.1. Referans standart ile karşılaştırmak:

Geliştirilen analiz yöntemi ile 3 farklı derişimde, 3'er ölçüm alınır ve bu değerler % geri kazanım değerlerine çevrildikten sonra tümü bir araya getirilir. Referans standartları, yüksek hassasiyetli bir karşılaştırmacı kullanarak birincil standartlarla karşılaştırılarak ve ideal olmayan ölçüm koşulları için uygun düzeltmeler yapılarak kalibre edilir.

Hesapla bulunan değerlerin çizelgede yer alan değerlerden küçük oluşu geliştirilen yöntemin en az referans olarak kabul edilen yöntem kadar hassas olduğunu gösterir. Sonuçların ortalamaları, % bağıl hata (BH) (% Bias) ile verilir.

$$\%BH = \frac{\bar{X} - \sigma}{\bar{\sigma}} \times 100$$

$\sigma$ : Referans değer,  $\bar{X}$ : Ortalama Değer

#### 1.4.3. Kesinlik:

Analitik yöntemin kesinliği, bir analitin tekrarlanan bireysel ölçümlerinin yakınlığını açıklar. Bir analitik prosedürün kesinliği, genellikle bir serideki standart sapma veya bağıl standart sapma (varyasyon katsayısı) olarak ifade edilir.

$$BSS (\%) = \frac{100}{\bar{x}} \left[ \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1} \right]^{1/2}$$

Burada,  $x_i$ , n ölçümü kümesindeki bireysel bir ölçümdür ve  $\bar{x}$ , kümenin aritmetik ortalamasıdır.

#### **1.4.3.1. Tekrarlanabilirlik:**

Tekrarlanabilirlik, analitik prosedürün bir laboratuvarında aynı ekipmanla aynı analist tarafından tekrar edilen deneylerin birbirlerine yakınlığını ifade eder. Tekrarlanabilirlik, prosedür için belirtilen aralığı kapsayan en az dokuz tespit kullanılarak (her konsantrasyonun üç konsantrasyonu ve üç kopyası veya test konsantrasyonunun %100'ünde en az altı tespit kullanılarak) değerlendirilmelidir.

#### **1.4.3.2. Orta-Kesinlik:**

Orta kesinlik laboratuvar içi deneysel farklılıkları belirten bir kesinlik derecesidir. Farklı günler, farklı analistler, farklı donanımlar, vb. gibi rasgele olaylardan dolayı laboratuvardaki varyasyonların sonucudur. Araştırılan her bir hassasiyet türü için standart sapma, nispi standart sapma (varyasyon katsayısı) ve güven aralığı rapor edilmelidir. Sonuçta, orta kesinlik elde edilen değerlerin %BSS'ı verilerek ifade edilir ve  $\%BSS \leq 2,0$  olmalıdır. Biyolojik numunelerle çalışırken %BSS değerleri 10-15'e kadar çıkabilmektedir.

#### **1.4.3.3. Tekrar Elde Edilebilirlik:**

Tekrar elde edilebilirlik özellikle ortak çalışma yapan farklı laboratuvarların uygulamaları sonucu elde edilen ve deneysel farklılıkları belirten bir kesinlik derecesidir. Tekrar elde edilebilirlik, laboratuvarlar arasındaki hassasiyeti ifade eder (genellikle metodolojinin standardizasyonunda uygulanan ortak çalışmalar). Sonuçta, tekrar elde edilebilirlik, ölçülen değerlerin %BSS'ı verilerek ifade edilir ve  $\%BSS \leq 2,0$  olmalıdır. Biyolojik numunelerle çalışırken %BSS değerleri 10-15'e kadar çıkabilmektedir.

#### 1.4.4. Seçicilik

“Seçicilik” ve “özgüllük” terimleri birbirlerinin yerine kullanılmaktadır (Rozet, E ve ark., 2011). Diğer bileşiklerin varlığında ve yöntemin enstrümantal koşulları altında analit için net bir sinyal üretme yeteneğini ifade ederler. Bu nedenle, en temel parametredir. Tanımlama, yalnızca analite atfedilen sinyal gerçekten ondan kaynaklanıyorsa ve diğer bileşiklerden veya araçlardan kaynaklanmadığında mümkündür. Hem niteliksel hem de niceliksel amaçlar için iyi bir seçicilik gereklidir.

Seçiciliği değerlendirmek için kullanılan metodoloji olası müdahale edici bileşiklerin doğasına bağlıdır. İki vakayı ayırt edebiliriz:

- Numune, matrisi ve normal safsızlıkları (plazmada bulunan proteinler, balık eti bileşiklerinde vb.) kendine özgü bir bileşik: Seçicilik, çeşitli kaynaklardan boş ve analit eklenmiş numunelerin test edilmesiyle belirlenir (Araujo.P., 2009).
- Numunede mevcut olan bir başka katkı maddesi veya analitin bozunma ürünü (diğer ilaçlar, plazmadaki analit ile birlikte, balık yetiştiriciliği için kullanılan diğer yasaklı ilaçlar, vb.): Seçicilik, beklenen tüm konsantrasyonlarda mümkün olan tüm girişim yapıcılar ile analit eklenmiş numuneleri, analitler varlığında ve analitler olmadan analiz ederek test edilmelidir.

#### 1.4.5. Teşhis Sınırı, Gözlenebilirlik Sınırı (LOD)

Tespit limiti, limit testlerinin bir özelliğidir. Belirtilen deneysel koşullar altında tespit edilebilecek, ancak zorunlu olarak nicelendirilemeyen bir numunedeki en düşük miktardaki analittir. Tespit limiti genellikle numunedeki analitin konsantrasyonu (örneğin yüzde) olarak ifade edilir. Enstrümantal olmayan yöntemler için, tespit limiti genellikle



bilinen analit konsantrasyonlarına sahip numunelerin analizi ve analitin güvenilir bir şekilde tespit edilebileceği minimum seviyenin belirlenmesi ile belirlenir (ICH Q2B., 2002). Enstrümantal prosedürler için, enstrümantal olmayanla aynı yöntem kullanılabilir. Resmi karşılaştırmalı yöntemler olarak değerlendirilmek üzere sunulan yöntemler söz konusu olduğunda, fiili tespit limitinin belirlenmesi neredeyse hiçbir zaman gerekli değildir. Aksine, bilinen tespit analit konsantrasyonları gerekli tespit seviyesinin üstünde ve altında olan numunelerin analizi ile tespit limitinin yeterince düşük olduğu gösterilmiştir. Örneğin, %0,1 seviyesinde bir kirliliği tespit etmek gerekirse, prosedürün bu düzeyde kirliliği güvenilir bir şekilde tespit edeceği gösterilmelidir.

Arka plan gürültüsü sergileyen enstrümantal analitik prosedürler durumunda, ICH kılavuzları bilinen düşük konsantrasyonlu analit numunelerinden alınan numuneleri ölçülen sinyalleri boş numunelerinkilerle karşılaştıran ortak bir yaklaşımı tarif eder. Analitin güvenilir bir şekilde tespit edilebileceği minimum konsantrasyon belirlenir. Tipik olarak, kabul edilebilir sinyal-gürültü oranı 3:1'dir. Diğer yaklaşımlar kalibrasyon eğrisinin eğiminin belirlenmesine ve kesimin standart sapmasına bağlıdır.

$$LOD = 3S / m$$

S : kesim değerinin veya kör çözültüsünün standart sapması m = kalibrasyon eğrisinin eğimi

S kör veya kalibrasyon eğrisinin SS'sine dayanarak gerçekleştirilebilir.

#### 1.4.6. Tayin Alt Sınırı (LOQ):

Tayin alt sınırı belirtilen deneysel koşullar altında kabul edilebilir doğruluk ve kesinlikle belirlenebilen bir numunedeki en düşük analit miktarıdır. Tayin alt sınırı numunedeki analitin konsantrasyonu (örneğin yüzde) olarak ifade edilir. Enstrümantal olmayan yöntemler için, tayin alt sınırı genellikle bilinen analit konsantrasyonlarına sahip numunelerin analizi ve analitin kabul edilebilir doğruluk ve kesinlikle belirlenebileceği minimum seviyenin belirlenmesi ile belirlenir. Enstrümantal prosedürler için aynı yöntem, enstrümantal olmayanlar için de kullanılabilir. Resmi karşılaştırmalı yöntemler olarak değerlendirilmek üzere sunulan yöntemler söz konusu olduğunda, fiili tayin alt sınırı belirlemek neredeyse hiçbir zaman gerekli değildir. Daha ziyade, bilinen analit konsantrasyonlarının kantitasyon seviyesinin üstünde ve altında olan numunelerin analizi ile kantitasyon limitinin yeterince düşük olduğu gösterilmiştir. Örneğin, bir analitin tablet başına 0,1 mg seviyesinde test edilmesi gerekiyorsa, yöntemin analitin bu seviyede güvenilir bir şekilde kantitatif olacağı gösterilmelidir. Arka plan gürültüsü sergileyen enstrümantal analitik yöntemler söz konusu olduğunda, ICH belgeleri, bilinen düşük konsantrasyonlarda analit içeren örneklerden gelen sinyalleri boş örneklerinkilerle karşılaştıran ortak bir yaklaşımı tarif eder. Analitin güvenilir bir şekilde ölçülebildiği minimum konsantrasyon belirlenir. Tipik olarak kabul edilebilir bir sinyal-gürültü oranı 10: 1'dir. Diğer yaklaşımlar kalibrasyon eğrisinin eğiminin ve standart sapmanın belirlenmesine bağlıdır:

$$LOQ = 10 s / m$$

Burada s kesimin veya kör çözeltinin standart sapması ve m kalibrasyon eğrisinin eğimidir.

### 1.4.7. Doğrusallık

Doğrusallık, yöntemden elde edilen cavbon belirli bir aralıktaki analit konsantrasyonuyla doğru orantılı olarak istatistiksel bir ilişki göstermesidir. İlk olarak, içeriğin analit konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak bir sinyal grafiğinin görsel olarak incelenmesiyle kurulmalıdır. Doğrusal bir ilişki olduğu görülüyorsa, test sonuçları uygun istatistiksel yöntemlerle yapılmalıdır. Regresyondan elde edilen veriler doğrusallık derecesinin matematiksel tahminlerini sağlar. Korelasyon katsayısı, y-kesişme ve regresyon çizgisinin eğimi belirtilmelidir. Belirli minimum aralıklar ile birlikte minimum beş konsantrasyon seviyesine sahip olmaları önerilir. Tahlil için, belirlenen minimum aralık, hedef konsantrasyonun %80-120'sidir.

Regresyon denklemi

$$Y = mx + b$$

m, regresyon çizgisinin eğimi ve b ise y-kesişimidir. Burada x, analit konsantrasyonunu ve y, sinyal cevaplarını temsil eder.

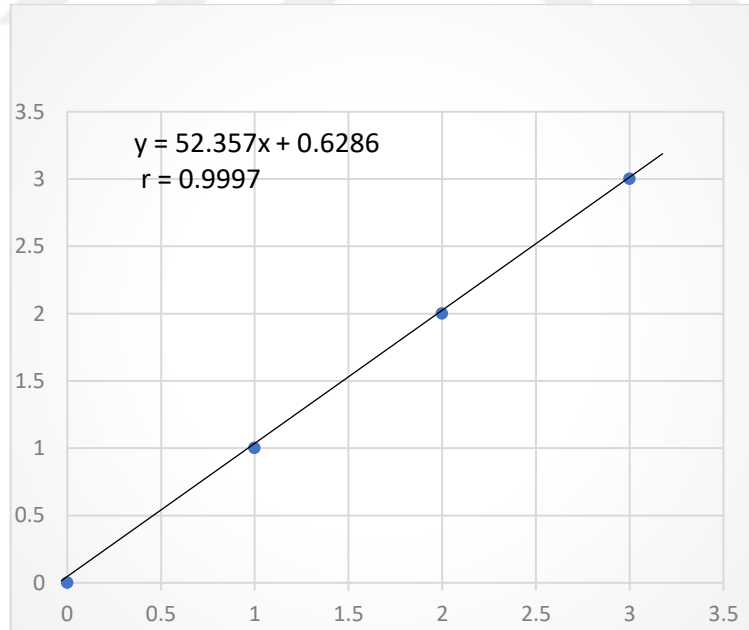
Korelasyon katsayısı,

$$r = \frac{\sum(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{[\sum(x_i - \bar{x})^2 \sum(y_i - \bar{y})^2]^{\frac{1}{2}}}$$

$x_i$ , n ölçümü kümesindeki bireysel bir ölçümdür ve  $\bar{x}$  kümenin aritmetik ortalamasıdır,  $y_i$ , n ölçümü kümesindeki bireysel bir ölçümdür ve  $\bar{y}$ , kümenin aritmetik ortalamasıdır.

#### 1.4.8. Kalibrasyon Doğrusu (Grafiği):

Analitin bilinen derişimler ile cihazlarda ölçülen değerler arasındaki ilişkidir. Bir kalibrasyon eğrisi hazırlanırken seçilen derişimler daha önce yapılan çalışmalarla belirlenir. Cihaz kalibrasyonu, ölçüm prosedürlerinde önemli bir aşamadır. Ölçüm sisteminin çıktısı (örneğin bir cihazın tepkisi) ile kalibrasyon standartlarının kabul edilen değerleri (örneğin mevcut analit miktarı) arasındaki ilişkiyi sağlayan bir dizi işlemdir. Çok sayıda analitik yöntem, bir cihazın kalibrasyonunu gerektirir. Bu, tipik olarak, söz konusu analitin bilinen bir miktarını içeren bir standart setinin hazırlanmasını, her bir standart için enstrüman yanıtını ölçmeyi ve enstrüman yanıtı ile analit konsantrasyonu arasındaki ilişkiyi oluşturmayı içerir. Bu ilişki, daha sonra, Şekil 1.3'de gösterildiği gibi, test numuneleri üzerinde yapılan ölçümleri mevcut analit miktarının tahminlerine dönüştürmek için kullanılır.



**Şekil 1.3** Linear regresyon ile değerlendirilmiş örnek bir kalibrasyon çalışması (ONUR, FEYYAZ 2011)

Numune olarak biyolojik örneklerle çalışıldığında kalibrasyonun aşağıdaki kriterlerin yerine gelmesi gerekir:

- Tayin alt sınırı derişiminde hazırlanacak örneklerin tayininde bağıl standart sapma %20 den fazla olmamalıdır.
- Tayin alt sınırı derişiminden daha büyük seçilen standartlardan elde edilen cevaplardaki bağıl standart sapmalar %15 den fazla olmamalıdır.

#### **1.4.9. Duyarlılık**

Duyarlılık, analit konsantrasyonundaki küçük değişimler arasında ayırım yapabilme yeteneğidir. Duyarlılık, kalibrasyon eğrisinin eğimi olarak hesaplanır. Ayrıca LOD tarafından değerlendirilir. Duyarlılık, numune matrisinde elde edilen verilerden hesaplanmalıdır. Bu parametre genellikle rutin kalibrasyonlarda izlenir (Thompson M ve ark., 2002).

#### **1.4.10. Çalışma Aralığı**

Bir analitik prosedürün aralığı, yazıldığı gibi prosedürü kullanarak uygun bir hassasiyet, doğruluk ve doğrusallık düzeyi ile belirlendiği kanıtlanmış olan (bu seviyeler dahil) analitin üst ve alt seviyeleri arasındaki aralıktır.

Aralık normal olarak analitik prosedürle elde edilen test sonuçlarıyla (örneğin, yüzde) aynı birimlerle ifade edilir. Aşağıdaki asgari belirtilen aralıklar dikkate alınmalıdır. Bir ilaç maddesinin (veya bir ilaç ürününün) tahlili için, aralık, test konsantrasyonunun %80 ila %120'si arasında olmalıdır.

## 1.5. Çalışmanın Amacı

Dünyada sıklıkla kullanılan opioid analjeziklerden biri olan etil morfin tespiti için terbiyum kompleksine dayalı bir spektrofotometrik bir yöntemin geliştirilmesi amaçlanmaktadır.

Bu amaca ulaşmak için belirlenen hedefler:

- Etil morfin ile terbiyum komplekslerinin oluşturulması ve kompleks oluşumu ile parametrelerin (bağlanma katsayısı, derişimler, çözücü ortamı, uyarma dalga boyu vs.) belirlenmesi ve optimizasyonları,
- Geliştirilen florimetrik yöntemin analitik validasyonlarının yapılması,
- Geliştirilen florimetrik yöntemin etil morfin katılmış yapay idrar örneklerine uygulanmasıdır.

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler

#### 2.1.1. Kullanılan Cihazlar

Spektrofotometrik çalışmalarda Agilent Cary Eclipse spektrofotometre (California, ABD) kullanılmıştır. Numuneler 1 cm'lik kuartz küvetlerde ölçülmüştür.

Florimetrik ölçümlerde Agilent Cary Eclipse spektroflorimetre (California, ABD) cihazı kullanılmıştır. 1 cm'lik kuartz floresans hücrelerinde yapılan ölçümler için uyarma/emisyon slitleri ve fotoçoğaltıcı tüpün voltajı optimize edilmiştir. Sıcaklık kontrolü “Agilent Cary Single Cell Peltier Accessory” ile sağlanmıştır.

Santrifüj işlemleri için Nüve NF 200 santrifüj (Ankara, Türkiye) kullanılmıştır. pH metre olarak Mettler-Toledo WTW model pHmetre (Ohio, ABD) kullanılmıştır ve her günün başında kalibre edilmiştir. Ultrasonik banyo olarak JP SELECTA (Barselona, İspanya), Vorteks karıştırıcı olarak Isolab (Almanya) kullanılmıştır.

#### 2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneylerde kullanılan kimyasalların tamamı analitik saflıktadır ve ayrıca bir saflaştırma işlemi uygulanmaksızın kullanılmışlardır. Etil morfin ve kodein Macfarlan Smith limited şirketinden Torpak Mahsülleri Ofisi aracılığıyla temin edilmiştir. Terbiyum klorür ( $TbCl_3$ ),  $AgNO_3$ , Askorbik asit,  $Cd^{+2}$ ,  $HgNO_3$ ,  $BaNO_3$ ;  $MgCl$ ;  $Ca(NO_3)_2$ ,  $KCl$ ; Üre, Sistein, Arjinin, Karnitin, Sodyum benzoat,  $NaCl$ ,  $CH_3COOH$ ,  $NaH_2PO_4$ ,  $NaF$ ,  $NaNO_3$  Sigma Aldrich firmasından temin edilmiştir.

### **2.1.3. Standart Maddelerin Stok Çözeltisi**

Deneylerde kullanılan etil morfin ve terbiyum (III) klorür 10 mM hassas bir şekilde tartılarak, 25 ml şu içerisinde 1000 µg mL<sup>-1</sup> derişimde stok çözeltileri hazırlanmıştır. İç standart olarak seçilen buffler 10 mM asetat, sülfat, sitrat tamponu tartılarak şu çözümlere 25 ml'ye tamamlanarak 100 µg mL<sup>-1</sup> derişimde hazırlanmıştır.

## **2.2. Spektroflorimetri Çalışmaları**

### **2.2.1. Yöntem optimizasyonu için yapılan çalışmalar**

Florimetrik çalışmalarda yapılan ön denemelerde etil morfin ile Tb<sup>+3</sup> arasında kompleks oluştuğu ve Tb<sup>+3</sup> floresansında ciddi artışlar gözlenmiştir. Bunun üzerine en yüksek floresans sinyalinin elde edileceği şartların belirlenmesi için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. İlk olarak pH taraması yapılarak floresans şiddetine pH etkisi incelenmiştir. Bunun için hazırlanan Britton-Robinson tamponları kullanılarak pH 2-12 arasında en yüksek sinyalin elde edildiği pH belirleme çalışmaları yapılmıştır. Deney tüplerinde 30 µL TbCl<sub>3</sub> (10 mM), 30 µL etil morfin ve 2940 µL ilgili pH'daki tampon çözeltisi eklenerek uyarma dalga boyu 280 nm, fotoçoğaltıcı tüp voltajı 700 V, uyarma ve emisyon slitleri 5 nm'de floresans spektrumları ölçülmüştür.

pH çalışmasından sonra hangi tampon sisteminin kullanılacağını belirlemek üzere fosfat, sitrat ve asetat tamponları hazırlanmış ve yine floresans sinyallerinin yüksekliği izlenerek optimizasyon gerçekleştirilmiştir. Deney tüplerinde 30 µL TbCl<sub>3</sub> (10 mM), 30 µL etil morfin ve 2940 µL ilgili tampon sistemi eklenerek yukarıda belirlenen cihaz ayarlarında ölçümler alınmıştır.



Son olarak belirlenen sitrat derişimi 10 mM ile 25 mM arasında değiştirilerek Floresans sinyallerine etkisi diğer optimizasyon deneylerinde olduğu gibi incelenmiştir.

### 2.2.2. Yöntem Validasyon için yapılan çalışmalar

Metot optimizasyonu deneylerinden sonra, belirlenen şartlarda tayin çalışmalarına başlanmıştır.

Optimum olarak belirlenen sitrat tamponu (pH 5.5; 10 mM) çözücü olarak kullanılmış ve stok çözelti olarak  $TbCl_3$  ve etil morfinin ayrı ayrı 10 mM'lık çözeltileri 10 mL'lik balon jodelerde hazırlanmıştır. Çözeltiler kullanılmadığında buzdolabında saklanmıştır. Üçer set halinde 3,33- 200  $\mu M$  arasındaki etil morfin derişimleri aralığında  $Tb^{+3}$  ile floresans titrasyonları gerçekteştirilmiştir. Bunun için 200  $\mu M$  3 mL  $Tb^{+3}$  çözeltisi küvete eklenerek floresans spektrumu ölçölmüş Ardından değişik oranlarda etil morfin eklenerek floresans spektrumları alınmıştır. Kalibrasyon eğrileri için iki farklı emisyon dalga boyu (352 nm ve 679 nm) kullanılabileceği belirlenmiş, ancak 352 nm'deki bantın daha hassas sonuçlar verebileceği belirlenmiştir.

Kalibrasyon denklemlerinin eğim ve kesim değerlerinin standart sapmaları ve ortalamaları kullanılarak yakalama sınırları (YS) ve tayin alt sınırları (TAS) belirlenmiştir:

$$YS = 3\sigma / m$$

$$TAS = 10\sigma / m$$

Burada  $\sigma$  kesim değerlerinin standart sapması, m ise kalibrasyon denklemlerinin eğimidir.

Yöntemin doğruluk ve kesinliğini sınamak için standart maddeler kullanılarak üçer set halinde etilmorfin (60, 140 ve 200 µM) çözeltileri hazırlanmış ve üç gün boyunca analiz edilerek, sonuçları değerlendirilmiştir. Elde edilen bağıl hata değeri yöntemin doğruluğunu gösterirken, varyasyon katsayısı değeri yöntemin kesinliğini göstermektedir.

Günler arası deneylerinde deney tüpleri ultrasonik banyoda 5 dakika bekletildikten sonra ölçümler alınmıştır. Bu veriler kullanılarak bağıl hata değerleri şu formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{Bağıl hata} = 100 \times \frac{(\text{bulunan} - \text{konulan})}{\text{konulan}}$$

Yapay idrar uygulamasına geçilmeden önce, validasyon parametrelerinden seçicilik deneyleri yapılmıştır. Seçicilik parametresi için Askorbik asit, üre, sistein, arjinin, karnitin, benzoat,  $\text{CO}_3^{-2}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Ba}^{+2}$ ,  $\text{Hg}^{+2}$  ve  $\text{Cd}^{+2}$  için son derişimleri 3 mM olacak şekilde yüksek derişimlerde test edilmiştir. Tolerans limitleri etil morfinin yukarıda test edilen moleküllerden Floresans cevabının  $\pm\%5$  etkilendiği derişim olarak belirlenmiştir.

Son olarak etil morfin stok çözeltilisinden yapay idrar örneklerine 20 ve 60 µM eklendikten sonra kör yapay idrar çözeltilisi ile birlikte tayin gerçekleştirilmiştir. Örnekler basit bir santrifüj işlemi sonrasında (4000 rpm 5 dk) katı partiküllerden arındırılmış ve doğrudan tampon içerisindeki 3 mL 200 µM  $\text{TbCl}_3$  üzerine eklenmiştir.

### **2.2.3. Termodinamik parametrelerin aydınlatılması**

$\text{Tb}^{+3}$  ile etil morfin arasında oluşan kompleksle ilgili bağlanma katsayısı, floresans titrasyonlarından elde edilen verilere uygulanan doğrusal olmayan regresyon üzerinden hesaplanmıştır. Ayrıca floresans titrasyonları üç farklı sıcaklıkta (290,5 K, 298 K ve 305,5

K) gerçekleştirilerek elde edilen bağlanma katsayıları van't Hoff eğrilerinin çizilmesinde ve kompleks oluşunun Gibbs enerjisi değişimi, entalpi değişimi ve entropi değişimi hesaplamalarında kullanılmıştır.



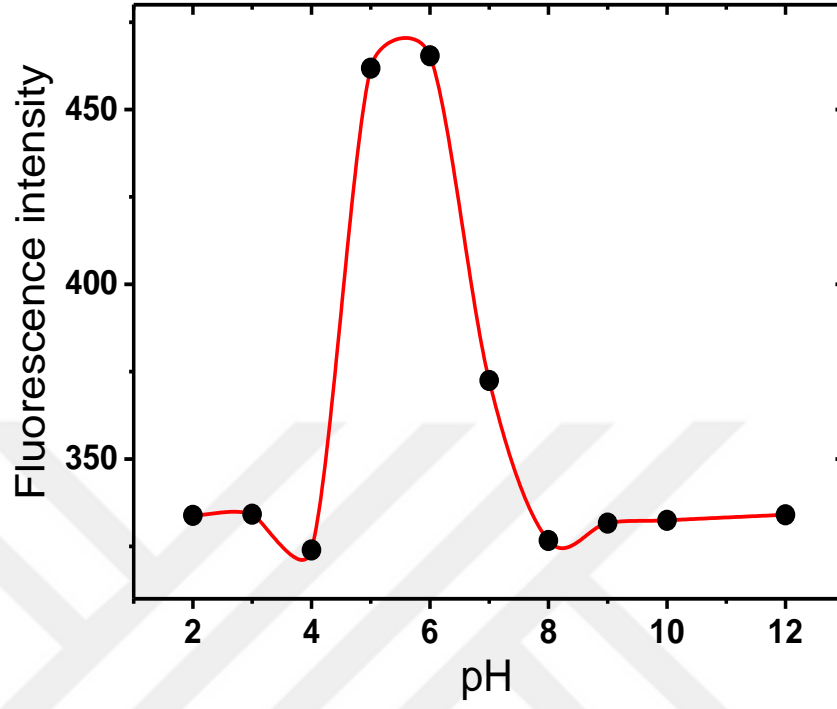
## 3. BULGULAR

### 3.1. Metot Optimizasyonu

Metot optimizasyonu için kompleks oluşumunun gerçekleşeceği pH, tampon çözeltisi çeşidi ve tampon çözeltinin derişimi parametrelerinin etkileri incelenmiştir.

#### 3.1.1. pH Optimizasyonu

pH'nin, Tb-Etilmorfin kompleksinin floresans yoğunluğu üzerindeki etkisi, pH=2 ila pH=12 aralığında incelenmiştir (Şekil 3.1). Bunun için hazırlanan floresans küvetlerine eklenen çözeltiler ve derişimleri Çizelge 3.1'de görülmektedir. Elde edilen sonuçlar pH değerinin 5-6 aralığında olmasının maksimum floresansa yol açtığını göstermiştir. pH 8'den daha büyük ve pH 4'den daha küçük pH değerlerinde floresansın hızla azaldığı gözlenmiştir. Yüksek pH'lardaki floresans cevabının düşüşü terbiyum hidroksitin olası çökmesine bağlı olabilir. Buna karşılık, daha düşük pH değerleri, muhtemelen etil morfinin yapısında bulunan ve kompleksleşmede rol oynayan azotun protonasyonundan dolayı kompleks oluşumunun zayıflamasından kaynaklanabilir. Bu nedenle floresans cevabının bu etkilerden uzak kalacağı pH değeri olan 5,5' değeri optimum değer olarak belirlenmiştir.



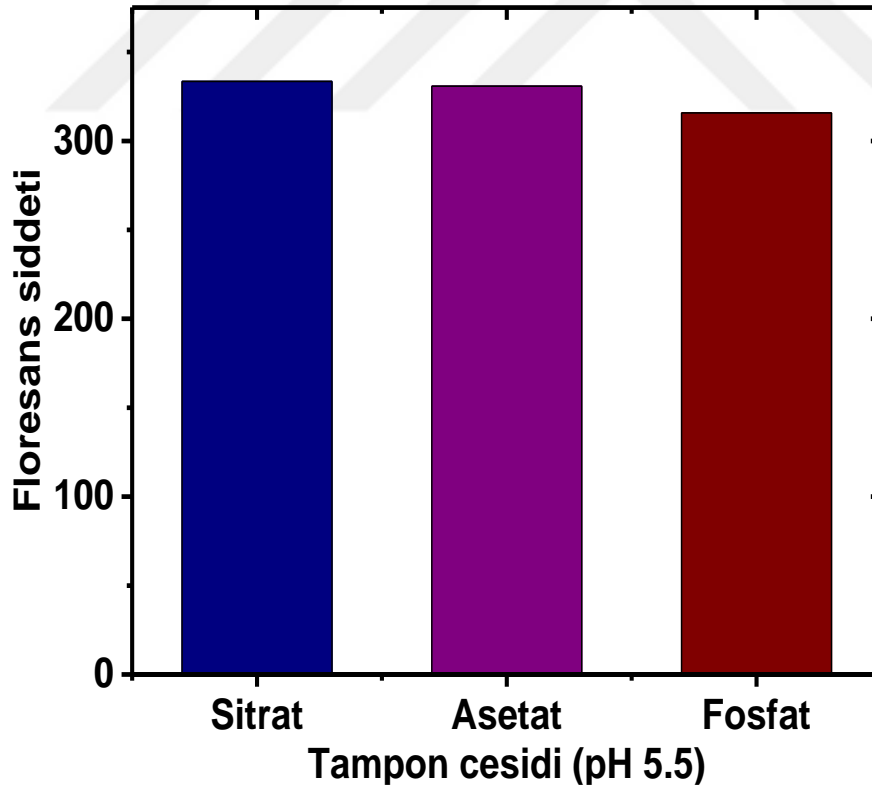
Şekil 3.1. Farklı pH'larda Tb+3 Etil morfin kompleksinin floresans değişimini gösteren grafik

Çizelge 3.1. pH optimizasyonu için hazırlanan çözeltiler

pH değeri	10 mM TbCl <sub>3</sub> (µL)	10 mM Etilmorfin (µL)	Tampon (µL)
2	30	30	2940
3	30	30	2940
4	30	30	2940
5	30	30	2940
6	30	30	2940
7	30	30	2940
8	30	30	2940
9	30	30	2940
10	30	30	2940
12	30	30	2940

### 3.1.2. Tampon çeşidi optimizasyonu

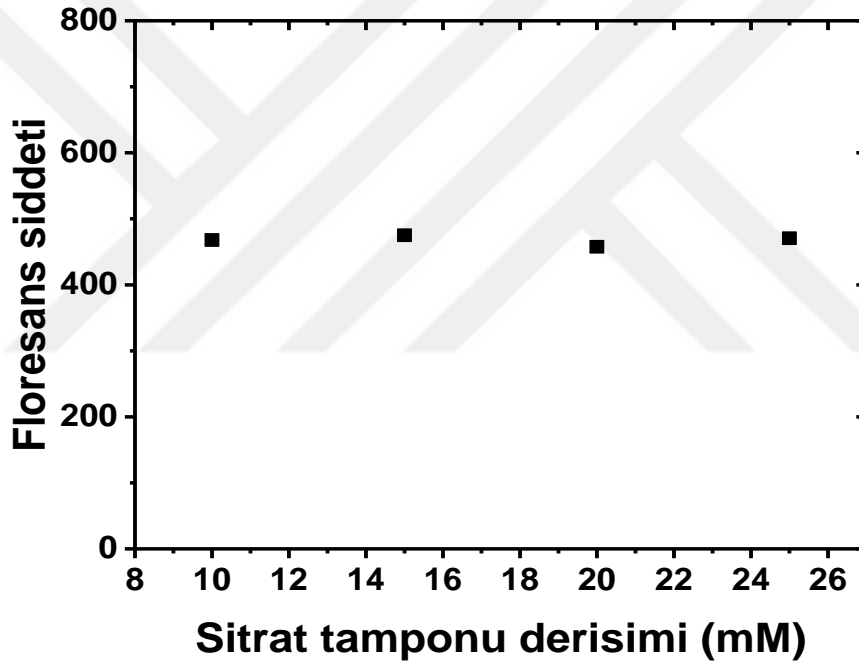
pH 5,5’de çalışabilecek üç farklı tampon çözelti (fosfat, sitrat, asetat) hazırlanarak bunların etkisi araştırılmıştır (Şekil 3.2). Tampon çeşitlerinin etkisinin dramatik değişimlere neden olmadığı gözlenmiştir. Ancak bu üç tampon arasından sitrat tamponu içerisinde en yüksek floresans sinyalinin elde edildiği gözlenmiştir. Fosfat tamponu kullanıldığında floresans sinyalinde gözlenen azalışın  $Tb^{3+}$  ile yüksek derişimdeki fosfat iyonları arasında kompleks oluşumlarından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Asetat tamponu kullanıldığında ise sitrat tamponuna göre az miktarda bir cevap azalışı gözlenmiştir. Hem cevaptaki bu küçük miktardaki azalış hem de asetat tamponunun uçucu bir tampon olması nedeniyle bu tampon tercih edilmemiştir.



Şekil 3.2. Farklı tamponlarda  $Tb^{3+}$ - etil morfin kompleksinin Floresans değişimini gösteren grafik.

### 3.1.3. Sitrat tamponu konsantrasyonu optimizasyonu

Çalışmalarımız, maksimum floresans cevabının pH 5,5'de sitrat tampon çözeltisi kullanılarak elde edildiğini göstermiştir. Son olarak sitrat tamponun konsantrasyonunun floresans sinyali üzerindeki etkisi incelenmiştir. Bu deneyde 10 – 25 mM sitrat konsantrasyonunda hazırlanan tamponların kompleks oluşumu ve dolayısıyla floresans cevabı üzerine anlamlı bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir.



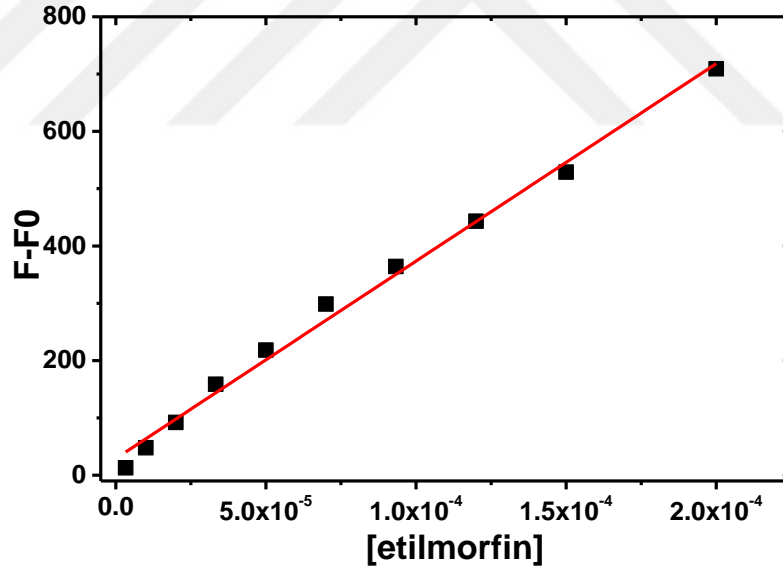
Şekil 3.3. Farklı sitrat tamponu derişimlerinde Tb<sup>+3</sup> – etilmorfin kompleksinin floresans değişimini gösteren grafik

### 3.2. Metot Validasyonu

Metot şartları optimize edildikten sonra metot validasyonu çalışmalarına geçilmiştir. Bu çalışmalarda doğruluk, kesinlik, seçicilik, tespit sınırı, tayin alt sınırı ve çalışma aralığı gibi parametreler aydınlatılmıştır.

### 3.2.1. Kalibrasyon ve tespit limiti

Optimum koşullar altında, floresans titrasyonları gerçekleştirilmiş ve kompleks oluşumunun tamamlanmaya başladığı ve floresans sinyallerinin doğruluktan sapmaya başladığı konsantrasyonlar belirlenmiştir. Deneysel parametreleri olarak uyarma dalga boyu 280 nm, emisyon başlangıç 290, emisyon bitiş 800 nm ve fotoçoğaltıcı tüpün voltajı 700 V. Bu çalışmada doğrusal çalışma aralığı 3,33 – 200  $\mu\text{M}$  olarak belirlenmiştir ve kalibrasyon çalışmaları bu aralıkta gerçekleştirilmiştir. Deneysel kör çözeltiye göre düzeltilmiş floresans şiddeti ( $\Delta F = F - F_0$ ) kullanılmıştır. Elde edilen korelasyon katsayısı  $r = 0,9929$ 'dir. Tayin alt sınırı (LOQ) 0,282  $\mu\text{M}$  olarak hesaplanmış, tespit sınırı (LOD) ise 0,0931  $\mu\text{M}$  olarak hesaplanmıştır.

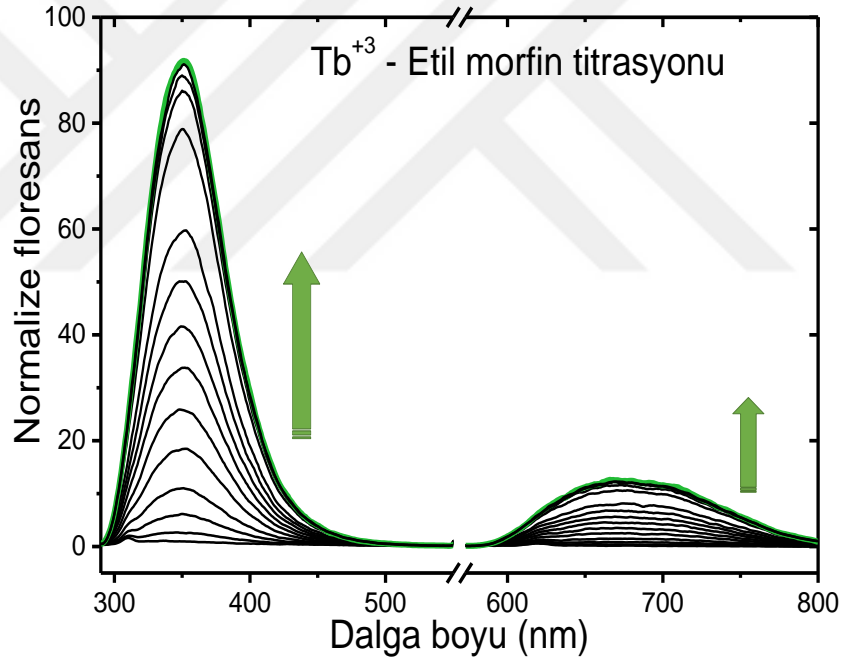


Şekil 3.4. Etil morfin için kalibrasyon grafiği



**Çizelge 3.2.**  $Tb^{+3}$  – etil morfin kompleksi için elde edilen bazı validasyon parametreleri

Parametreler	Sonuçlar
Eğim	29,03
Kesim	3,446
Korelasyon katsayısı	0,9929
Çalışma aralığı	3,33 – 200 $\mu M$
Tespit sınırı	0,0931 $\mu M$
Tayin alt sınırı	0,282 $\mu M$



**Şekil 3.5.**  $Tb^{+3}$ - Etil morfin titrasyonun spektrumları. Sitrata tamponu (20mM; pH 5,5) içerisinde 200  $\mu M$   $Tb^{+3}$  üzerine 0-400  $\mu M$  etil morfin eklendiğinde elde edilen spektrumlar.

Şekil 3.5 kalibrasyon çalışması sırasında elde edilen emisyon spektrumlarını temsil etmektedir. Terbiyum kompleksinde etil morfin derişimi arttıkça floresans şiddetinde artış

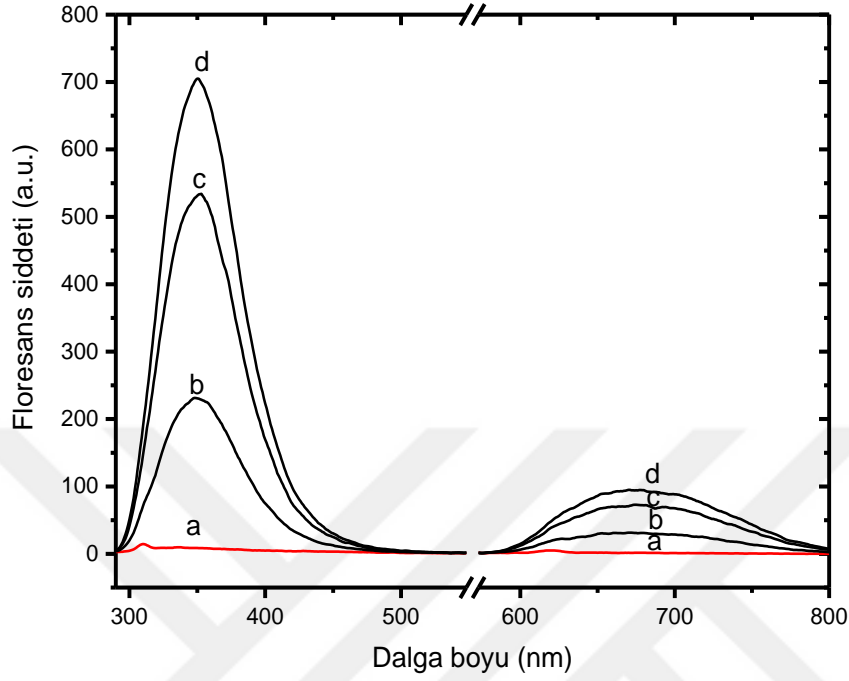
gözlenmektedir. Bunun nedeni,  $Tb^{+3}$  kompleksinin floresans şiddetinin etil morfin miktarına bağlı olduğunu göstermektedir.

### **3.2.2. Doğruluk ve Kesinlik**

İdrarda etil morfin tayini için terbiyum kompleksine dayalı florimetrik yöntemde kesinlik ve doğruluk çalışmaları için hazırlanan üç farklı konsantrasyondaki etil morfinin tayinleri ile gerçekleştirilmiştir. Etil morfin tayinleri 60, 140, 200  $\mu M$  derişimlerinde gerçekleştirilmiş, gün içi ve günler arası (n=6) değerlendirme sonuçları Çizelge 3.3 'de verilmiştir.

**Çizelge 3.3.** İdrarda etil morfin tayini için terbiyum kompleksine dayalı florimetrik yöntemi ile analizi yöntemine ait gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk analizi bulguları

Derişim ( $\mu\text{M}$ )	Gün içi sonuçları				Günler arası sonuçları			
	Bulunan ( $\mu\text{M}$ )	% Geri kazanım	Varyasyon katsayısı	Bağıl hata	Bulunan ( $\mu\text{M}$ )	% Geri kazanım	Varyasyon katsayısı	Bağıl hata
60	62,5				59,8			
	58,6	99,6	3,91	-0,36	60,4	101,2	2,14	1,18
	58,3				61,9			
140	140,8				141,6			
	141,6	101,2	0,58	1,17	150,8	103,7	3,18	3,71
	142,5				145,0			
200	208,2				207,9			
	206,7	103,9	0,49	3,93	209,4	104,3	2,15	4,33
	208,7				209,0			



**Şekil.3.6** Gün içi tekrar edilebilirlik seti spektrumları. 200  $\mu\text{M}$   $\text{Tb}^{+3}$  üzerine sırasıyla a) 0, b) 60  $\mu\text{M}$ , c) 140  $\mu\text{M}$  ve d) 200  $\mu\text{M}$  etil morfin eklendiğinde elde edilen spektrumlar.

Seçicilik çalışması için numuneler içerisinde bulunması olası bir grup anyon, katyon ve küçük molekül test edilmiştir. Seçicilik deneylerinde bu bileşenlerin etil morfin-terbiyum kompleksine eklenmesinin floresans sinyaline nasıl etki ettiği araştırıldı. Bunun için, belirlenen optimum şartlarda örnekler hazırlanıp, floresans şiddetleri ölçüldü. Elde edilen sonuçlar tolerans sınırları değerleri halinde Çizelge 3.4’de verilmiştir. Bu maddelerin deney sonuçlarını  $\pm\%5$  oranında etkilediği konsantrasyonlar tolerans limitleri olarak belirlenmiştir.

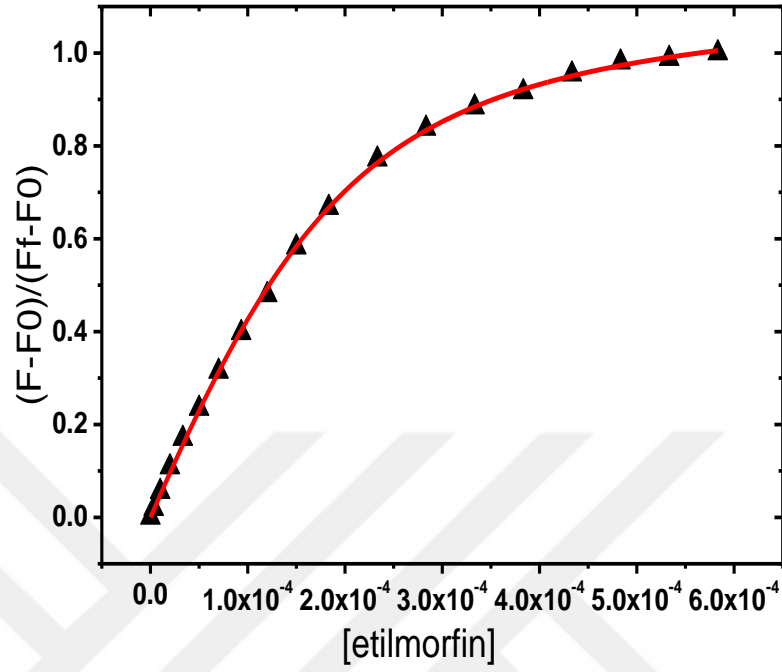
**Çizelge 3.4.** Seçicilik çalışmasında belirlenen tolerans sınırları

<b>Maddeler</b>	<b>Tolerans limiti (mM)*</b>
Askorbik asit	0,322
Üre	> 3
Sistein	> 3
Arjinin	> 3
Karnitin	> 3
Benzoat	> 3
CO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	> 3
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	> 3
F <sup>-</sup>	> 3
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	> 3
CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup>	> 3
Cl <sup>-</sup>	> 3
Na <sup>+</sup>	> 3
K <sup>+</sup>	> 3
Ca <sup>+2</sup>	> 3
Mg <sup>+2</sup>	> 3
Ba <sup>+2</sup>	> 3
Hg <sup>+2</sup>	> 3
Cd <sup>+2</sup>	> 3

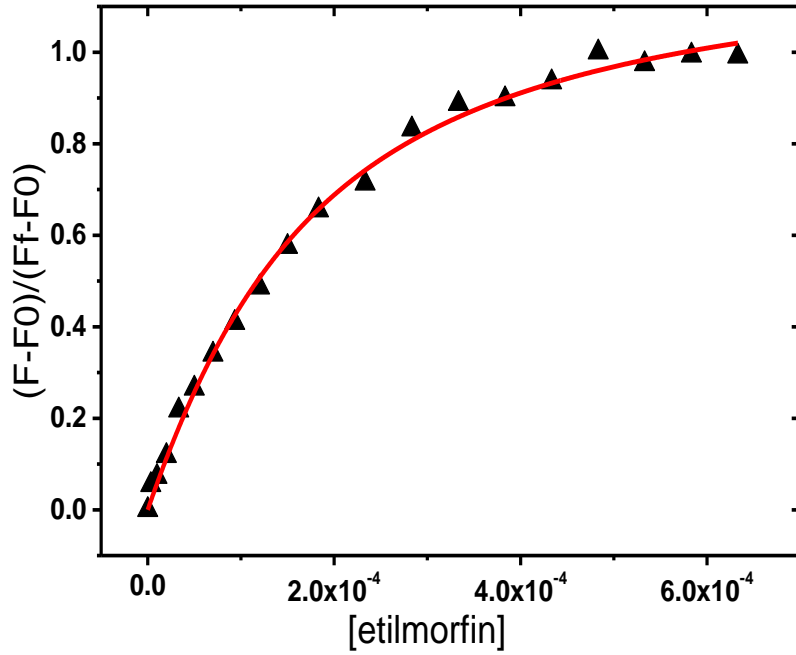
\*Tb<sup>+3</sup>-etilmorfin floresansın ±%5 değiştiren derişim

### 3.2.3. Termodinamik parametrelerin aydınlatılması

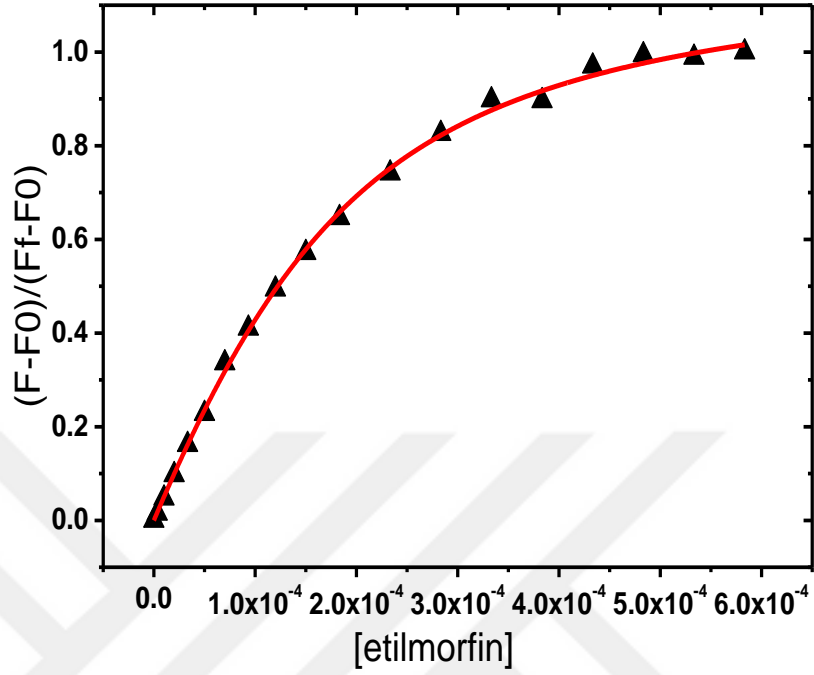
Kompleks oluşununun termodinamiğini incelemek amacıyla üç farklı sıcaklıkta floresans titrasyonları geręekleřtirilmiřtir. Ardından bu üç farklı titrasyondan elde edilen verilerden kompleks oluşum sabitleri (k) doğrusal olmayan regresyon yöntemleri kullanılarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.7.  $Tb^{+3}$  ile etil morfin titrasyon izotermi (25 °C).



Şekil 3.8.  $Tb^{+3}$  ile etil morfin titrasyon izotermi (17,5 °C).



Şekil 3.9. Tb<sup>+3</sup> ile etil morfin titrasyon izotermi (32,5 °C).

1/T'ye karşı ln k değerlerinin grafiğe geçirildiği van't Hoff grafiği (Şekil 3.10) çizilerek termodinamik parametreler bu grafiğin eğim ve kesim değerleri kullanılarak hesaplanmıştır. Bu grafiğin eğimi kullanılarak kompleks oluşum entalpi değişimi hesaplanmıştır:

$$m = -\Delta H/R$$

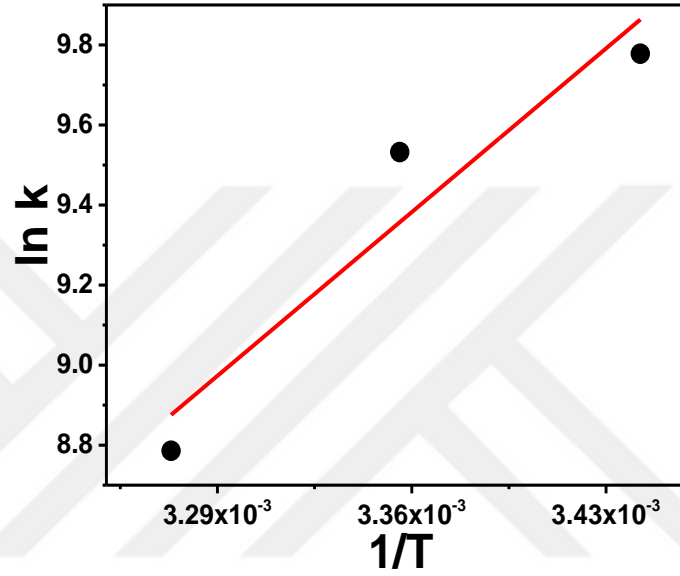
Bu regresyon eşitliğinin kesim değeri ise entropi değişiminin hesabında kullanılmıştır:

$$n = \Delta S/R$$

Ardından Gibbs enerji değişimi bu entalpi ve entropi değerleri kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Hesaplanan termodinamik parametreler Çizelge 3.5’de görülmektedir.



Şekil 3.10 Terbiyum klorür ile etil morfin titrasyonlarına ait Van't Hoff grafiği

Çizelge 3.5. Tb<sup>3+</sup>- etil morfin kompleks oluşumunun termodinamik parametreleri

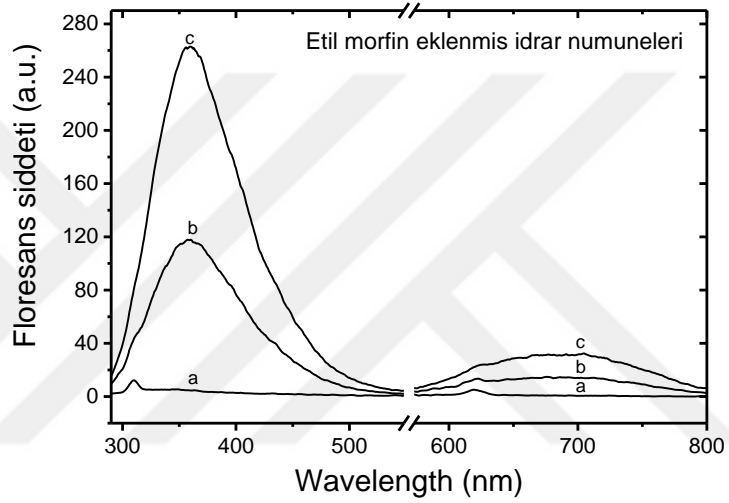
Sıcaklık (K)	K <sup>a</sup> (M <sup>-1</sup> )	ΔG <sup>o</sup> (kcal mol <sup>-1</sup> )	ΔS (cal K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> )	ΔH (kcal mol <sup>-1</sup> )
290,5	1,76x10 <sup>4</sup>	-5,69		
298,0	1,38 x10 <sup>4</sup>	-5,54	-20,37	-11,61
305,5	6,54 x10 <sup>3</sup>	-5,38		

<sup>a</sup> bağlanma katsayısı



### 3.3. Yapay idrar Uygulamaları

Yapay idrar örneklerine eklenen etil morfin (20 ve 60  $\mu\text{M}$ ) numuneleri ve kör idrar numunesinin tayinleri optimum şartlarda gerçekleştirilmiştir. Elde edilen spektrumlar şekil 3.11’de görülmektedir.



**Şekil 3.11.** Etilmorfin eklenmiş İdrar örneklerinin spektrumları. 200  $\mu\text{M}$   $\text{Tb}^{+3}$  üzerine sırasıyla etilmorfin içermeyen (kör), 20  $\mu\text{M}$  ve 60  $\mu\text{M}$  etilmorfin içeren idrar eklendiğinde elde edilen spektrumlar.

**Çizelge 3.6.** Etil morfine eklenmiş idrar örneklerinin analiz sonuçları

Eklenen ( $\mu\text{M}$ )	Bulunan ( $\mu\text{M}$ )	% Geri kazanım	Ortalama % geri kazanım	Varyasyon katsayısı
20	20,58	102,9	104,2	1,18
	21,07	105,4		
	20,84	104,2		
60	60,90	101,5	99,64	2,36
	58,20	97,00		
	60,25	100,4		

#### 4. TARTIŞMA

Lantanitlerin ligandlarla kompleks oluşumu sonrası liganddan Tb'ye (III) moleküller arası enerji transferi çok iyi bilinen ve ligandların spektroskopik tayini için uygulanabilen olaylardır (Kamruzzaman M ve arkadaşları 2012). Lantanitlerden biri olan terbiyum kendi halinde çok zayıf floresans bantları göstermektedir. Tez çalışmamızda terbiyumun etil morfin ile kompleks oluşturduğu ve bu kompleks oluşumunun floresans sinyallerinde yükselmeye yol açtığı görülmüştür. Etil morfinin yokluğunda ve varlığında Tb (III) için uyarma ve emisyon spektrumları kaydedilmiştir. Serbest Tb (III) iyonunun, düşük molar absorpsiyon katsayısına bağlı olabilecek çok zayıf bir emisyon spektrumu ürettiği gözlenmiştir. Bununla birlikte, Etilmorfin varlığında artan floresans şiddetleri gözlenmiştir. Bunun nedeni kompleks oluşumu ve uyarılmış Etil morfinden terbiyuma enerji transferidir. Tb-Etilmorfin 'in maksimum uyarma dalga boyu 280 nm'de gözlenmiştir. Maksimum emisyon dalga boyları sırasıyla Tb<sup>3+</sup> için normalde yasaklı geçişlerden olan ama kompleks oluşumu sayesinde floresans şiddetleri artan 352 ve 679 nm'deki bantlarıdır. Bu bantlardaki artışın etil morfinin konsantrasyonuna bağlı olduğu ve konsantrasyonla doğrusal bir şekilde arttığı gözlenmiştir. Bu sayede tez kapsamında idrarda etil morfin tayini için terbiyum kompleksine dayalı hızlı, basit ve duyarlı florimetrik yöntem geliştirilmeye çalışılmıştır.

Florimetrik yöntemin duyarlılığını artırabilmek için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalarda pH, tampon çeşidi ve tampon konsantrasyonlarının kompleks oluşumları ve floresans sinyali üzerinde etkileri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar pH değerinin 5-6 aralığında olmasının maksimum floresansa yol açtığını göstermiştir. pH 8'den daha büyük ve pH 4'den daha küçük pH değerlerinde floresansın hızla azaldığı gözlenmiştir. Yüksek pH'lardaki floresans cevabının düşüşü terbiyum hidroksitin olası çökmesine bağlı olabilir. Buna karşılık, daha düşük pH değerleri, muhtemelen etil morfinin yapısında bulunan ve kompleksleşmede rol oynayan azotun protonasyonundan dolayı kompleks oluşumunun zayıflamasından kaynaklanabilir. Bu nedenle floresans cevabının bu

etkilerden uzak kalacağı pH değeri olan 5,5' değeri optimum değer olarak belirlenmiştir. Tampon çeşidi ve tampon konsantrasyonu parametrelerinin pH ile karşılaştırıldığında çok önemli etkiler göstermediği gözlenmiştir. Denenen tamponlar arasında fosfat tamponu, fosfat ile Tb (III) arasında olası kompleks oluşumları nedeniyle floresans sinyallerinde bir miktar azalmaya yol açtığı gözlenmiş, sitrat tamponunun ise kompleks oluşumuna ve floresans sinyallerine herhangi bir negatif etkisinin olmadığı ve en yüksek sinyallerin sitrat tamponunda elde edildiği gözlenmiştir. Tampon konsantrasyon olarak ise daha az kimyasal sarfiyatı ve daha az atık üretme açısından 10 mM olarak seçilmiştir.

Metot optimizasyonu sonrası validasyon çalışmalarına geçilmiştir. Buradan elde edilen bağıl hata değerleri (<%5) yöntemin doğruluğunun kabul edilebilir seviyede olduğunu göstermektedir. Yöntemin kesinliğinin değerlendirilmesi için ise varyasyon katsayıları kullanılmış (<%4) ve elde edilen sonuçların birbirleriyle uyumlu olduğu görülmüştür.

Duyarlılık açısından floresans yönteminin avantajları sayesinde oldukça duyarlı bir yöntem geliştirildiği ve etil morfin için geliştirilen diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında yöntemin yüksek duyarlılığa sahip olduğu görülmüştür (Çizelge 4.1).

**Çizelge 4.1.** Etil morfin tayini için yöntemlerin karşılaştırılması

<b>Metot</b>	<b>LOD</b>	<b>Uygulama</b>	<b>Referanslar</b>
HPLC	0.035 µg/mL	Tablet	Değim ve ark., 2000
RP-HPLC	0.20 µg/mL	İlaç	Aruna Gundala ve ark., 2018
HPLC	0.5 µg/mL	Plazma	Gerben A. ve ark., 1992
HPLC	0.43 µg/mL	Plazma	J. Jarvi ve ark., 1985
HPLC	0.091 µg/mL	Kan	Hallvard. G ve ark.,1992
Floresans	0,029 µg/mL	Yapay idrar	Tez çalışması

Çalışma aralığı 3,3 – 200 µM arasında olduğu ve bu aralıkta etil morfin konsantrasyonu ile floresans şiddetinin doğrusal bir ilişki gösterdiği ( $r=0,9929$ ) görülmüştür.

Seçicilik çalışmalarında test edilen maddelerin askorbik asit hariç çok yüksek konsantrasyonlarda bile hiçbir girişim etkisi yapmadığı gözlenmiştir (tolerans limitleri > 3 mM). 321.7 µM askorbik asitin ise etil morfin – Tb (III) kompleksinin floresans şiddetini %5 değiştirdiği ve dolayısıyla bu konsantrasyondan sonra girişim yaptığı gözlenmiştir. Askorbik asit idrarda bulunabilen bir maddedir ancak normal idrar konsantrasyonları genellikle bu seviyenin altındadır. Ancak vitamin tabletlerinin kullanımı veya yoğun şekilde C vitamini içeren gıdaların tüketilmesi sonucu idrardaki konsantrasyonun bu seviyelerin çok üzerlerine (~2 mM) çıkabildiği bilinmektedir. Bu nedenle bu yöntem idrar

etil morfin miktarının kantitatif tayini için kullanılacaksa sonuç askorbik asit miktarıyla birlikte değerlendirilmelidir. Askorbik asidin, idrarda glukoz, bilirubin, lökosit, nitrit ve kırmızı kan hücresi testleri gibi basit idrar testlerine (dipstick testleri) önemli miktarda girişim etkisi yaptığı (Ko ve ark. 2015) ve bu dipstick testlerinin sonuçlarını güvenilmez kıldığı bilinmektedir. Bu nedenle bu basit testlerin uygulamalarında askorbik asit miktarının da test edilerek gerekli düzeltmelerin yapılması gerektiği önerilmiştir. Askorbik asitin kendi başına terbiyum ile kompleks oluşturmadığını spektrofotometrik ve spektroflorimetrik çalışmalarımızda gözlemledik. Dolayısıyla askorbik asitin muhtemel etkisi kuvvetli indirgen bir madde olması nedeniyle etil morfinin indirgenmesi ve indirgenmiş etil morfinin kompleks oluşturamaması olabileceği değerlendirilmiştir. Askorbik asitin etil morfin ve etil morfin metabolizması üzerine etkisi başka bir çalışmanın konusu olmakla birlikte bu florimetrik yöntemin düşük askorbik asit konsantrasyonlarında kantitatif olarak kullanılabileceği ancak yüksek askorbik asit konsantrasyonlarında sonuçların birlikte değerlendirilmesi gerekeceği sonucuna varılmıştır.

Kompleks oluşumunun termodinamiği incelendiğinde elde edilen Gibbs enerji değişimi sonuçlarının negatif olduğu ve kompleks oluşumun spontane olduğu sonucuna varılmıştır. Geliştirilen yöntem termodinamik olarak elverişli olduğu için oldukça hızlı ve uygulaması kolaydır.

Yapay idrar örneklerine yapılan uygulamalardan elde edilen sonuçlar yöntemin doğruluğunun ve kesinliğinin kabul edilebilir seviyelerde olduğunu göstermektedir. Bu nedenle bu yöntem sadece saf haldeki etil morfine değil, askorbik asit – etil morfin etkileşimi değerlendirilmek suretiyle idrar gibi örneklere de uygulanabilir.

## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında etil morfinin tayini için  $Tb^{+3}$  ile oluşturduğu kompleksin floresans şiddetinden yararlanılarak basit, hızlı, ekonomik ve hassas bir yöntem geliştirilmiştir. Kompleks oluşumunun spontane olduğu deneysel olarak bulunan Gibbs enerji değişimi değerlerinden görülmüştür. Yöntemde pH 5,5 sitrat tamponu (10 mM) içerisinde  $Tb^{+3}$  çözeltisine eklenen etil morfinin kompleks oluşturması ve bu kompleksin 280 nm'de uyarıldığında 352 nm ve 679 nm'de emisyon yapmasından yararlanılmıştır. Yapılan analitik validasyon çalışmalarında yüksek doğruluk ve kesinlik değerleri elde edilmiştir. Geliştirilen florimetrik yöntem etil morfin için geliştirilmiş ilk floresans temelli yöntemdir ve floresans tekniğinin en önemli avantajlarından biri olan yüksek hassasiyet sayesinde etil morfin için çok düşük konsantrasyonlarda tespit limiti değerlerine ulaşılabilmiştir. Literatürde etil morfin için geliştirilmiş yöntemlerle karşılaştırıldığında çok daha kolay ve hassas bir yöntem geliştirildiği görülmektedir. Ancak olası girişim yapabilecek maddelerden biri olan askorbik asit, her ne kadar  $Tb^{+3}$  ile herhangi bir etkileşim göstermese de etil morfin –  $Tb^{+3}$  kompleksi üzerine yüksek konsantrasyonlarda negatif girişim etkisi yarattığı bulunmuştur. Bu nedenle idrar gibi numunelerde kantitatif analiz yapılmak istendiğinde askorbik asit sonuçlarıyla birlikte değerlendirilmesi gerektiği bulunmuştur. Askorbik asit ile etil morfin arasında yaşanan kimyasal etkileşimlerin ileride yapılacak çalışmalarla aydınlatılması, askorbik asitin etil morfinin vücut içerisindeki etkinliğine herhangi bir etkisinin olup olmadığının ve ilaç-ilaç etkileşimlerinin aydınlatılması açısından da anlamlı olabilir.

## ÖZET

Bu çalışmada, insan idrarındaki etil morfinin tayini için terbiyum kompleksine dayanarak hassas bir florimetrik yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır. Etil morfin veya diğer adıyla dionin narkotik bir analjezik ve antitussiftir. Geliştirilen yöntem hassasiyeti artırmak üzere optimize edilmiştir ve 10 mM sitrat tamponu (pH 5,5) içerisinde en yüksek sinyallerin elde edildiği bulunmuştur. Analitik validasyon çalışmalarında yöntemin 3,3-200 µM etil morfin konsantrasyonu aralığında doğrusal Floresans cevabı ürettiği ve bu aralıkta korelasyon katsayısının 0,9929 olduğu bulunmuştur. Yöntemin tespit limiti 0,0931 µM, tayin alt limiti ise 0,282 µM olarak bulunmuştur. Yöntem laboratuvarında hazırlanmış farklı konsantrasyonlardaki etil morfin numunelerine uygulanmış ve doğruluk ve gün içi ve günler arası kesinlik parametreleri bulunmuştur. Son olarak yöntem etil morfin eklenmiş yapay idrar numunelerine başarıyla uygulanmıştır. Bu çalışmanın sonucunda daha önce hakkında Floresans temelli herhangi bir çalışma olmayan adli kimya ve toksikoloji açısından değerli bir analit olan etil morfin için hassas, basit, ucuz ve hızlı bir yöntem geliştirilmiştir. Bu etil morfin için geliştirilen ilk Floresans temelli yöntemdir.

**Anahtar Kelimeler:** Etil morfin, idrar, Floresans spektroskopisi, terbiyum kompleksleri

## SUMMARY

In this study, it is aimed to develop a sensitive fluorescence method for ethyl morphine based on complex formation with ascorbic acid. Ethyl morphine or Dionine is a narcotic analgesic and antitussive. The developed method was optimized to increase sensitivity and the highest fluorescence intensity was obtained in 10 mM citrate buffer (pH 5.5). In analytical validation studies, the working range was found as 3.33-200  $\mu\text{M}$  and the linear responses were obtained in this range with a correlation coefficient of 0.9929. Limit of detection and limit of quantitation values for the method are 0.0931  $\mu\text{M}$  and 0.282  $\mu\text{M}$ , respectively. The method was applied to synthetic ethyl morphine samples and accuracy and intra-day and inter-day precision values were investigated. Finally the method was successfully applied to ethyl morphine spiked artificial urine samples. As a result of this study, sensitive, simple, low-cost and quick analytical method was developed for ethyl morphine which is an important analyte for forensic chemistry and forensic toxicology. This is the first fluorescence based analytical method for ethyl morphine.

**Keywords:** Ethyl morphine, urine, fluorescence spectroscopy, terbium complexes



## KAYNAKLAR

- ABRAHİM A, AL-SAYAH M, SKRDLA P, BEREZNITSKI Y, CHEN Y, WU N (2010). Practical comparison of 2.7 microm fused-core silica particles and porous sub-2 microparticles for fast separations in pharmaceutical process development, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **51**: 131–137.
- ALAM AM, KAMRUZZAMAN M, LEE SH, KİM YH, KİM SY, KİM GM (2012). Determination of catecholamines based on the measurement of the metal nanoparticle- enhanced fluorescence of their terbium complexes. *Microchim Acta*; **176**:153–61.
- APOSTOL I, KRULL I ,KELNER. D (2012) Analytical method validation for biopharmaceuticals (Chapter 5), in *Analytical (Chemistry)*.
- ARAUJO P. (2009) Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *Journal. Chromatogram. B*, **877**:2224–2234.
- ARUNA GUNDA,DIYYA SREE KAMMURI ,PRASANATHI CHENGALVA (2018). RPHPLC method for simultaneous estimation of dicyclomine and Ethylmorphine in bulk and Pharmaceutical formulation.
- ASMUNDSTAD TA, XU BQ, JOHANSSON I, RIPEI A, BJORNEBOE A, CHRİTSOPHERSEN AS (1995). Biotransformation and pharmacokinetics of Ethylmorphine after a single oral Dose.
- ÇAĞLAYAN, MG (2014) aminoglikozidlerin altın ve g n ş nanoparacıklar kullanılarak spektroskopi. Ankara Üniversitesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı doktora Tezi.
- CHEN ZR, IRVINE RJ, SOMOGYI AA, BOCHNER F (1991). Mu receptor binding of some commonly used opioids and their metabolites. *Life Sci* 1991;48 **22**:216571.
- DEĞİM T, C AKAY,KBU"YU"KAFSAR,SCEVHEROĞLU (2000). Simultaneous determination of codeine and ethyl morphine HCL in tablet formulations using LC.
- DEMETZ P, DE WAELE M, VAN DER VERREN J, HEYNDRICKX A (1983) Application of the combined use of fused silica capillary columns and NPD for the toxicological determination of codeine and Ethylmorphine in a human overdose case. *J Anal Toxicol* **7** :113–115.

- GERBEN A, E VAN 'T KLOOSTER, FELICE M ,A. WOUTERSEN-VAN NIJNANTEN and HERMAN J KOLKER (1992). Improved high-performance liquid chromatographic method for the determination of Ethylmorphine and its metabolites in microsomal incubations and cell culture media.
- GJERDE H, MORLAND J (1991) .A case of high opiate tolerance: implications for drug analyses and interpretations. *Int J Legal Med* **104**:239–240
- GOWIK P. (2009) The validation of methods for regulatory purposes in the control of residues. *J. Chromatogram. A*, **1216**: 8051–8058.
- GUMUSTAS M, OZKAN SA (2011). The role of and the place of method validation in drug analysis using electroanalytical techniques. *The Open Analytical Chemistry Journal*, **5**: 1-21.
- GUPTA P K. (2001) *Fundamentals of Toxicology || Basic concepts of forensic toxicology.*
- HALLVARD GJERDE, UNNI FONGEN, HANS GUNDERSEN and ASBJBRG SCHRIKSTOPHERSEN(1991) evaluation quantification of codeine Ethylmorphine and morphine in blood .
- HALLVARD GJERDE, UNNI FONGEN, HANS GUNDERSEN and ASBJBRG S.CHRIKSTOPHERSEN ( 1991).evaluation of a method for evaluation for simultaneous quantification of Codeine, Ethylmorphine and morphine in blood .
- HEYDEN Y , V NIJHUIS, A SMEYERS VERBEKE, J VANDEGINSTE B G M , MASSART D L (2001) Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **24**: 723–753.
- HUBER L(2007) *Validation and Qualification in Analytical Laboratories*, CRC Press, New York, USA.
- ICH Harmonised Tripartite Guideline prepared within the Third International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH).
- ICH Q2B (2002)International Conference on Harmonization, Validation of analytical procedures. Methodology.

ISO (2000) 9000:2000, Quality Management Systems: Fundamentals and Vocabulary, ISO, Geneva, Switzerland,

J JARVI, JAMES C STOLZENBACH ,ROBERT E LARSON(1985) simultaneous quantification of Ethylmorphine 0-deethyase and N-demethylase activity by HPLC.

JANA N R., GEARHEART L, MURPHY C J (2001) Seeding Growth for Size Control of 5-40 nm Diameter Gold Nanoparticles, *Langmuir* **17**: 6782-6786.

KAMRUZZAMAN M, ALAM AM, KIM KM, LEE SH, SUH YS, (2012).Enhanced Luminescence of lanthanide complexes by silver nanoparticles for ciprofloxacin determination. *J Nanosci Nanotechnology* ;**12**:6125–30.

KINTZ P, JAMEY C, MANGİN P (1994) Ethylmorphine concentrations in human samples in an overdose case. *Arch Toxicology* **68** :210–211.

KO DAE-HYUN, JEONG TAE-DONG, KIM SOLLIP, CHUNG HEE-JUNG, LEE WOOCHANG, CHUN SAIL, MIN WON-KI (2015) Influence of Vitamin C on Urine Dipstick Test Results, *Annals of Clinical & Laboratory Science*, vol. 45, no. 4:391-395.

LOTFI A, MANZOORİ J L(2016), the determination of fluoxetine in pharmaceutical and biological samples based on the silver nanoparticle enhanced fluorescence of fluoxetine-terbium complex.

MAX M HOUCK PhD, FRSC JAY A SIEGEL PhD, (2015)in *Fundamentals of Forensic Science (Third Edition)*.

MAX HOUCK PHD,FRSC,JAY A,SIEGEL PHD ( 2015) in *Fundamentals of Forensic Science (Third Edition)*.

NAEEM KHAN M, SHAH J, RASUL JAN M, LEE SH (2012). A validated spectrofluorimetric method the determination of citalopram in bulk and pharmaceutical preparations based on the measurement of the silver nanoparticles-enhanced fluorescence of citalopram/terbium complexes. *J Fluoresce* 2;**23**:161–9.

ONUR F (2011) *Analitik Kimya II*, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayın No 101 s 135 149 Ankara.

RILEY C M, ROSANSKE T W (1996). *Development and Validation of Methods*. Elsevier Science Ltd., New York.

ROZET E, MARİNİ R.D, ZİEMONS E, BOULANGER B, HUBERT Ph.(2011)  
Advances in validation, risk and uncertainty assessment of bioanalytical methods.  
J. Pharm. Biomed. Anal., **55**:848–858.

DOUGALS A, SKOOG F , JAMES HOLLER, TIMOTHY A NIEMAN (1998).  
Principles of Instrumental Analysis. Brooks/Cole: 5th Ed.

STEENTOFT A, TEİGE B, VUORİ E, CEDER G, HOLMGREN P, KAA E,  
KRİSTİNSSON J, NORRMAN PT, PİKKARAİNEN J (1989) Fatal intoxications  
in the Nordic countries. A forensic toxicological study with special reference to  
young drug addicts. Z Rechtsmed **102** :355–3.

T Değim, C Akay , K BÜYÜKAFS AR, S CEVHEROĞLU (2000).Simultaneous  
determination of codeine and ethyl morphine.

VALIDATION OF COMPENDIAL PROCEDURES <1225>, The United States  
Pharmacopeia, 32th Rev., and The National Formulary, 27th Rev., Rockville, MD:  
The United States Pharmacopeia Convention Inc., 2009; **I**: 734.

Wikipedia [https://tr.wikipedia.org/wiki/T%C3%BCrk%C3%A7e\\_Vikipedi](https://tr.wikipedia.org/wiki/T%C3%BCrk%C3%A7e_Vikipedi) Erişim  
Tarihi:02.02.2019.

ZHENG HR, XU LM, ZHANG, DONG J,CHEN ST,ZHANG XL. (2010) fluorescence  
enhancement of acridine orange in a water solution by au nanoparticles.

## ÖZGEÇMİŞ

### I- BİREYSEL BİLGİLER

**Adı:** BOUREİMA MAHAMANE  
**Soyadı:** İSSOUFOU  
**Doğum Yeri ve Tarihi:** Niamey (Nijer) – 24/08/1989  
**İletişim adresi ve telefonu:** Niamey Nijer  
issoufoub650@gmail.com  
05380221120

### II- EĞİTİMİ

**Yüksek Lisans:** Ankara Üniversitesi, Adli Bilimler Enstitüsü, Adli Kimya ve Adli Toksikoloji Anabilim Dalı- Tezli yüksek lisans-2017-

**Lisans:** Abdou Moumouni Üniversitesi –Niamey (Nijer) matematik-kimya-fizik programı)- 2010–2014

**Yabancı dili:** İngilizce, Fransızca ve Türkçe

### III- MESLEKİ DENEYİMİ

09.2014-09.2015

CES Tera Lisesi (Nijer) – fizik  
Öğretmeni

09.2015-02.2019

Med koleji Ankara(Turkey) –  
İngilizce Öğretmeni (yarı zaman)

09.2015-02.2019

Ankara(Turkey) – İngilizce -  
Fransızca - Türkçe tercüman ( yarı  
zaman)