T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA

ADLİ TIP VE ADLİ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

Danışman

Doç. Dr. Zeynep Türkmen

PETİDİN VE METABOLİTİ NORPETİDİNİN İDRAR ÖRNEĞİNDE GAZ KROMATOGRAFİSİ KÜTLE SPEKTROMETRESİ (GC-MS) İLE EŞZAMANLI BELİRLENMESİ

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOG ZEYNEP ARSLAN

İSTANBUL, 2022

T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA

ADLİ TIP VE ADLİ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

Danışman

Doç. Dr. Zeynep Türkmen

PETİDİN VE METABOLİTİ NORPETİDİNİN İDRAR ÖRNEĞİNDE GAZ KROMATOGRAFİSİ KÜTLE SPEKTROMETRESİ (GC-MS) İLE EŞZAMANLI BELİRLENMESİ

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOG ZEYNEP ARSLAN

İSTANBUL, 2022

Bu tez projesi İ.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 24503

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmamın gerçekleşmesine olanak sağlayan İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü Müdürü Sayın ***Prof. Dr. Erdinç Öztürk***'e, çalışmamın her aşamasında bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen, pozitif enerjisi ve güler yüzlülüğü ile beni destekleyen ve yardımcı olan danışman hocam ***Doç. Dr. Zeynep Türkmen*** ve ***Doç. Dr. Selda Mercan***'a,

Çalışmamın laboratuvar aşamasında yardımlarını esirgemeyen, pozitif enerjileri ile beni her zaman destekleyen ***Biyolog Murat Yayla***, ***Araştırma Görevlisi Merve Kuloğlu*** ve ***Kimyager Tuğba Tekin***'e,

Hasta örneklerimin toplanması ve araştırmalarım sırasında yaptığı yardımlardan ve manevi desteğinden dolayı, ***Dr. Öğr.Üyesi Fatma Ferda Kartufan***'a,

Her türlü manevi desteklerini hissettiğim arkadaşlarım ***Nur Meydan***, ***Göknur Toptan***, ***Melike Altun***, ***Buse Çakın, Yaren Çelenk, Ayça Nur Budak, Deniz Bora, Mihriban Dilan Kılıç, Simge Zengin, Akın Demir*** ve ***kuzenlerime***,

Ayrıca her zaman yanımda olan, beni sorgusuz sualsiz her koşulda destekleyen, maddi manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, biricik ***aileme*** teşekkür ederim.

Zeynep Arslan

İstanbul, Nisan 2022

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR ..... **i**

İÇİNDEKİLER ..... **ii**

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **v**

TABLOLAR DİZİNİ ..... **viii**

KISALTMALAR DİZİNİ ..... **ix**

ÖZET ..... **xii**

SUMMARY ..... **xv**

1. GİRİŞ VE AMAÇ **1**

2. GENEL BİLGİLER **4**

2.1. Opioidler 4

2.2. Petidin 7

2.2.1. Petidin'in fizikokimyasal özellikleri 9

2.2.2. Petidin'in farmakokinetiği 10

2.2.3. Petidin'in farmakolojisi 13

2.2.4. Petidin'in yan etkileri 15

2.2.5. Petidin'in adli bilimler açısından önemi 16

2.3. Kromatografi 19

2.3.1. Gaz kromatografisi (GC) 20

2.3.1.1. Gaz kromatografisi bileşenleri 21

2.3.2. Gaz kromatografisi- Kütle Sprektrometresi (GC-MS) 25

2.3.2.1. GC-MS tarama teknikleri 27

2.3.2.2. GC-MS'in adli bilimlerdeki önemi 28

2.3.2.3. GC-MS analizleri için numune hazırlanması 28

2.3.3.Petidin ve metabolitlerinin tespiti için yapılmış analizler 31

2.4. Analitik Yöntemlerin Validasyonu 33
2.4.1. Validasyon hazırlık çalışmaları 34
2.4.2. Validasyon parametreleri 36
2.4.2.1. Özgüllük 36
2.4.2.2. Seçicilik 36
2.4.2.3. Doğrusal çalışma aralığı 36
2.4.2.4. Tespit ve tayin limiti (LOD, LOQ) 38
2.4.2.5. Doğruluk 38
3. GEREÇ VE YÖNTEM 41
3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler 41
3.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Gereçler 42
3.3. Çalışma Planı, İdrar Örneklerinin Toplanması ve Bireylere Ait Özellikler 43
3.4. Petidin ve Metabolitlerinin Analizi 45
3.4.1. Petidin ve metabolitlerinin analizinde kullanılan çözeltiler 45
3.5. Örnek Hazırlama Prosedürü 53
3.5.1. Petidin ve Norpetidin analizi için örnek hazırlama basamağı 53
3.5.2. Petidinik Asit analizi için örnek hazırlama basamağı 56
3.6. Yöntemin GC-MS Sistemi ile Geliştirilmesi 56
3.7. Petidin ve Metabolitlerinin Validasyon Çalışmaları 58
3.8. Hasta İdrar Örneklerinin Analizi 61
4. BULGULAR 64
4.1.Özgüllük 64
4.2. Seçicilik 66
4.3. Doğrusal çalışma aralığı 70
4.4. Tespit ve tayin limiti (LOD, LOQ) 72

4.5.Doğruluk 73
4.5.1. Geri kazanım 73
4.5.2. Kesinlik 74
4.5.2.1. Tekrar edilebilirlik 74
4.5.2.2. Tekrar üretilebilirlik 75
4.6. Hasta İdrar Örneklerinin Sonuçları 76
5. TARTIŞMA 80
6. SONUÇ 88
7. KAYNAKÇA 89
EKLER 104
ÖZGEÇMİŞ 112

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Olgunlaşmamış Haşhaş kapsülünün çizilmesiyle elde edilen afyon 4

Şekil 2: Tıbbi olan ve tıbbi olmayan opioidler 5

Şekil 3: Tıbbi amaçlar için kullanılan ve uluslararası kontrol altındaki (hazırlıklar hariç) opioid miktarlarının bölgelere göre dağılımı gösteren grafik, 2019..... 6

Şekil 4: Pet ve Fentanil'in 1998-2017 yılları arasındaki tüketim miktarları 8

Şekil 5: Pet, NPet ve PetA'nın moleküler yapısı 9

Şekil 6: Pet'in metabolizması 11

Şekil 7: 100 mg Pet kas içi enjeksiyonundan sonraki 48 saatlik süre boyunca asidik idrarda Pet ve NPet atılım oranlarını gösteren grafik 13

Şekil 8: Pet'in, ağrı azaltıcı presinaptik ve postsinaptik etki mekanizmasını gösteren şekil... 14

Şekil 9: Pet'in ağrı uyarılarını azaltma mekanizmasını gösteren şekil 15

Şekil 10: Tipik GC sisteminin şeması..... 21

Şekil 11: Split enjeksiyon sistemi 22

Şekil 12: Splitless enjeksiyon sistemi 23

Şekil 13: Gaz kromatografisi kolon çeşitleri 24

Şekil 14: GC–MS sisteminin ana bileşenlerinin şematik çizimi..... 26

Şekil 15: Bir GC veya GC-MS'den kromatogram çıktısı 27

Şekil 16: SPE yöntemi 30

Şekil 17: LLE yöntemi 31

Şekil 18: Validasyon parametrelerinin validasyon ve verifikasyon ayırımı..... 34

Şekil 19: Kalibrasyon eğrisi..... 37

Şekil 20: 10 mL'lik balon jojede hazırlanan 50 ppm'lik Pet ara stok çözeltisi..... 46

Şekil 21: Çalışmada kullanılan referans standart (Normeperedine, 1,0 mg/mL, Lipomed).... 47

Şekil 22: 10 mL'lik balon jojede hazırlanan 100 ppm'lik NPet ana stok çözeltisi 47

Şekil 23: 5 mL'lik balon jojede hazırlanan 2 ppm'lik PetA ara stok çözeltisi 48

Şekil 24: Çalışmada kullanılan referans standart (Varenicline Tartrate, 5 mg, Sigma) 49

Şekil 25: Türevlendirmede kullanılan referans standart (BSTFA+ %1 TMCS) 52

Şekil 26: Türevlendirme aşamaları 52

Şekil 27: 10 mL blank idrar örneği ve Asetonitril eklenip santrifüjlenmiş idrar örneği 53

Şekil 28: Spike idrar örnekleri 55

Şekil 29: Analizlerin yapıldığı GC-MS sisteminin görüntüsü 58

Şekil 30: Doğruluk çalışması için SPE'ye hazırlanmış idrar örnekleri 60

Şekil 31: Hasta idrar örnekleri 62

Şekil 32: SPE için hazırlanan idrar örnekleri 62

Şekil 33: GC-MS sistemi ile analiz edilen idrar örnekleri 63

Şekil 34: Analizi tamamlanan parafilmlenmiş idrar örnekleri 63

Şekil 35: Pet'in kütle spektrumu 65

Şekil 36: NPet'in kütle spektrumu 65

Şekil 37: Türevlendirilmiş PetA'nın kütle spektrumu 65

Şekil 38: Vareniklin'in (IS) kütle spektrumu 66

Şekil 39: MeOH çözeltisine ait SIM metodu kromatogramı 66

Şekil 40: İçerisinde sadece IS bulunan MeOH çözeltisine ait SIM metodu kromatogramı ... 67

Şekil 41: Kör idrar örneğine ait SIM metodu kromatogramı 67

Şekil 42: İçerisinde sadece IS bulunan idrar örneğine ait SIM metodu kromatogramı 67

Şekil 43: İdrar matriksinde 0,125 µg/mL Pet, 1 µg/mL NPet'in SIM metodu kromatogramı. 68

Şekil 44: İdrar matriksinde 0,75 µg/mL Pet, 6 µg/mL NPet'in SIM metodu kromatogramı... 68

Şekil 45: İdrar matriksinde 1,25 µg/mL Pet, 10 µg/mL NPet'in SIM metodu kromatogramı. 68

Şekil 46: MeOH matriksinde 0,125 µg/mL Pet, 1 µg/mL NPet'in SIM metodu kromatogramı 69

Şekil 47: MeOH matriksinde 0,75 µg/mL Pet, 6 µg/mL NPet'in SIM metodu kromatogramı 69

Şekil 48: MeOH matriksinde 1,25 µg/mL Pet, 10 µg/mL NPet'in SIM metodu kromatogramı 69

Şekil 49: 2 µg/mL PetA için MeOH çözeltisinde elde edilen tarama metodu kromatogramı . 70

Şekil 50: Çalışmada yer alan tüm analitlerin SIM metodu kromatogramında bir arada görünümü 70

Şekil 51: Pet kalibrasyon eğrisi (0,125-25 µg/mL)..... 71

Şekil 52: NPet kalibrasyon eğrisi (1-20 µg/mL)..... 71

Şekil 53: PetA kalibrasyon eğrisi (0.5-20 µg/mL)..... 72

Şekil 54: Hasta idrarlarından elde edilen sonuçların istatiksel gösterimi 79

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo I. Opioidlerin yapılarına göre ayrılması 5

Tablo II. Pet'in yıllara göre satış miktarları 8

Tablo III. Pet, NPet ve PetA'nın moleküler formülü, moleküler ağırlığı ve CAS numarası .. 10

Tablo IV. Pet kullanan kişilerin yaş, cinsiyet, maruziyet yolu ve olgu hikayesi 17

Tablo V. Kromatografik yöntemin sınıflandırılması 20

Tablo VI. Kesinlik ifade türleri 39

Tablo VII. Çalışmada kullanılan kimyasal ve standart maddelerin isimleri ve markaları 41

Tablo VIII. Çalışmada kullanılan cihaz ve gereçlerin isimleri ve markaları 42

Tablo IX. Çalışmaya dahil edilen hastalara verilen Pet miktarları ve özellikleri 44

Tablo X. İlaç ya da madde kullanan hastaların kullandıkları ilaçlar 45

Tablo XI. IS seçimi için denenen maddelerin molekül ağırlıkları ve alıkonma zamanları 49

Tablo XII. MeOH'de kalibrasyon noktalarının hazırlanması 50

Tablo XIII. MeOH'de PetA için kalibrasyon noktalarının hazırlanması 51

Tablo XIV. İdrar spike konsantrasyon için hesaplamalar 54

Tablo XV. GC-MS parametreleri 57

Tablo XVI. Doğruluk parametresi, idrar spike konsantrasyon için hesaplamaları 60

Tablo XVII. Maddelerin alıkonma zamanları 64

Tablo XVIII. Pet ve NPet içermeyen idrar örnekleri ile yapılan LOD ve LOQ sonuç tablosu ..... .73

Tablo XIX. Pet ve NPet'in geri kazanım çalışması sonuç tablosu 74

Tablo XX. Pet ve NPet'in tekrar edilebilirlik çalışması sonuç tablosu 75

Tablo XXI. Pet ve NPet'in günler arası tekrar üretilebilirlik çalışması sonuç tablosu 75

Tablo XXII. Hasta idrarlarından elde edilen sonuçlar 77

KISALTMALAR DİZİNİ

CV	Varyasyon Katsayısı
RSD	Bağıl Standart Sapma
$\bar{x}$:	Aritmetik Ortalama
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
7TM	Yedi Transmembranlı
C18	18 Karbon Uzunluğu
C8	8 Karbon Uzunluğu
Ca^{2+}	Kalsiyum
cAMP	Siklik Adenozin Monofosfat
dk.	Dakika
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
ECD	Elektron Yakalama Dedektörü
EMCDDA	Avrupa Uyuşturucu Ve Uyuşturucu Bağımlılığı İzleme Merkezi
FID	Alev İyonizasyon Dedektörü
g	Gram
G.K.	Geri Kazanım
GC	Gaz Kromatografisi
GC-MS	Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometresi
SID	Yüzey İyonizasyon Dedektörü
GPCR	G Proteinine Bağlı Reseptörler
HCl	Hidroklorik Asit
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

IS	İç Standart
ISO	Uluslararası Standardizasyon Örgütü
IUPAC	Uluslararası Saf ve Uygulamalı Kimya Birliği
κ	Kappa
K^+	Potasyum
L	Litre
LC	Sıvı Kromatografisi
LLE	Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon
LLOQ	En Düşük Miktar Ölçüm Limiti
LOD	Tespit Limiti
LOQ	Tayin Limiti
M	Molar
MAOI	Monoamin-Oksidaz İnhibitörleri
MeOH	Metanol
mg	Miligram
MIM	Çoklu İyon İzleme
mL	Mililitre
MS	Kütle Spektrometresi
NaOH	Sodyum Hidroksit
NPD	Azot Fosfor Dedektörü
NPet	Norpetidin
NPetA	Norpetidinik Asit
Ort	Ortalama
Pet	Petidin
PetA	Petidinik Asit

PID	Fotoyonizasyon Dedektörü
ppm	Milyonda Bir (Parts-Per Million)
RSD	Bağıl Standart Sapma
Rt	Alıkonma Zamanları
S.S.	Standart Sapma
SCAN	Tam Tarama
S-DDD	İstatistiksel Amaçlar İçin Tanımlanmış Günlük Dozlar
SIM	Seçilmiş İyon İzleme
SPE	Katı Faz Ekstraksiyon
TCD	Isı İletkenlik Dedektörü
TLC	İnce Tabaka Kromatografisi
UHPLC	Ultra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
ULOQ	En Yüksek Ölçüm Limiti
μ	Mu
x	Veri Kümesinde Bir Değer

ÖZET

Ağrı algısı, insan varlığının ayrılmaz parçası olan önemli bir mekanizmadır. Birey için her ne kadar rahatsız edici olsa da ağrının algılanması bedeni zarardan korumak için elzemdir. Bu algı, kişide rahatsızlığın sebebine bir açıklama aramasına neden olmuştur. Ondokuzuncu yüzyılın başlarında morfinin ilk olarak Alman eczacı Friedrich Wilhelm Adam Ferdinand Serturner tarafından izole edildiği günden bu zamana kadar toplumda emsalsiz bir yere sahip olan opiodler, ağrı giderilmesi için geçmişten beri kullanılan ve hala kullanılmaya devam eden en etkili ve temel ilaçlardır. Opioidlerin, ağrı sinyallerinin beyne yayılması üzerinde engelleyici etkileri olan mu (μ) reseptörlerinin uyarılması yoluyla hareket ettikleri bilinmektedir.

Fenilpiperidin sınıfına dahil sentetik bir opioid olan Petidin, insanlarda ağrı giderme amacı ile kullanılmaktadır. Günümüzde de ağır cerrahi operasyonlarda, ampütasyon geçiren olgularda ve doğum sırasında ağrı eşiği düşük hastalarda şiddetli ağrı tedavisi için kullanıldığı bilinmektedir. Petidin'in oluşturabileceği yan etkileri ve diğer opioidlerden daha güvenli olmadığının farkedilmesi üzerine son yıllardaki kullanımı eskisine nazaran azaldı ancak hala yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu ilacın, kolay erişilebilir, düşük maliyetli, etkili ve kolay kullanıma sahip olmasından dolayı sağlık çalışanları ve hastalar tarafından sıklıkla kötüye kullanıldığı bildirilmektedir. Petidin temin edemeyen kişilerin yasadışı yollarla ilacı temin etmeye çalıştıkları, temin edemedikleri zamanda başka uyuşturucu maddelere yöneldikleri görülmektedir. Bu durumlar, Petidin'in kötüye kullanımının suç işleme ile bir ilişkisinin olduğunu da bizlere göstermektedir. Literatürde pek çok ilaç etken maddesinde olduğu gibi Petidin ile alakalı kötüye kullanım, intihar ve cinayet olguları bulunmaktadır. Bu durumlar göz önüne alındığında, adli mercilere konu olmuş olguların aydınlatılabilmesi için Petidin ve metaboliti Norpetidin'in tayininin hassas, güvenilir, doğru bir şekilde yapılması ve yorumlanabilmesi çok önemli olup, biyolojik materyallerde tekrarlanabilir ve hızlı bir analiz yöntemine ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışmada, gaz kromatografisi kütle spektrometresi (GC-MS) sistemi kullanılarak Petidin ve ana metaboliti Norpetidin'in idrardan eşzamanlı tayini için hızlı, güvenilir, doğru, yüksek geri kazanımlı ve kolay bir ekstraksiyon ile yöntem geliştirilmiş, iç standart olarak Vareniklin kullanılmıştır. Yöntemimiz özgüllük, seçicilik, doğrusal çalışma aralığı, tespit ve tayin limiti (LOD ve LOQ), doğruluk (geri kazanım ve kesinlik) parametreleri ile test edilerek valide edilmiştir. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla Petidin için 0,052206 µg/mL ve 0,090953 µg/mL, Norpetidin için 0,492051 µg/mL ve 0,855003 µg/mL olarak bulunmuştur. Ekstraksiyon yüzde geri kazanımı Petidin için %113,357± (4,149); Norpetidin için %104,367± (10,724) olarak hesaplanmıştır. Kesinlik parametresinin sonuçları tekrar edilebilirlik ve tekrar üretebilirlik çalışmalarından elde edilmiştir. Tekrar edilebilirlik %RSD sonuçları Petidin için %8,629± (3,300); Norpetidin için %9,292± (1,296) olarak hesaplanmıştır. Tekrar üretilebilirlik %RSD sonucu Petidin için %6,880± (1,802); Norpetidin için %7,543± (2,017) olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar neticesinde yöntemimizin toksikolojik analizler için uygun değerler aralığında olduğu görülmüştür.

Geliştirilen yöntem, Medistanbul Hastanesi, Plastik Cerrahi Kliniğinde operasyon öncesi (bazı hastalara operasyon sonrası 2.doz verilmiştir) anestezi için Petidin kullanılan gönüllü on sekiz hastadan, Petidin alımını takiben 1. ve 3. saatlerde alınan idrar örneklerine uygulanmıştır. Yöntemimiz hem Petidin hem de Norpetidin'in aynı anda tayin edilmesine olanak sağlayarak, Petidin kötüye kullanımını belirlemek için de tek bir analitin analizine göre daha avantajlı olduğunu göstermektedir.

Çalışmamız ile ülkemizde ilk defa GC-MS ile idrarda ana etken madde ve iki metabolitini birarada belirleyebilen, ana etken madde ve Norpetidin için miktar tayini yapabilen bir yöntem geliştirilmiş ve yöntemin analitik parametreleri on sekiz hastadan temin edilen idrar örneklerinde başarılı bir şekilde gerçekleştirilerek değerlendirilmiştir. Sınırlı sayıda hastalardan elde edilen idrar örnekleri, küçük çapta da olsa farmakokinetik parametrelerin

değerlendirilmesine olanak sağlamıştır. Geliştirdiğimiz bu yöntemin Petidin'in kötüye kullanımının takip edilebilmesi, belirlenebilmesi ve buna bağlı adli olguların aydınlatabilmesine katkı sağlayacağı ve hem ülkemiz hem de dünya da Petidin bağımlılığı yüzünden oluşan bireysel ve toplumsal sorunların çözülmesine yardımcı olacağı kanısındayız.

Anahtar Kelimeler: Petidin, Meperidin, Aldolan, Norpetidin, Petidinik Asit, GC-MS

SUMMARY

Pain perception is an integral part of human existence and is an important mechanism. Although it is uncomfortable for the individual, the perception of pain is essential to protect the body from harm. This perception caused the person to seek an explanation for the cause of the discomfort. Opiods, which have a unique place in society since the first isolation of morphine by the German pharmacist Friedrich Wilhelm Adam Ferdinand Serturner in the early nineteenth century, are the most effective and essential drugs that have been used for pain relief from the past and still continue to be used. Opioids are known to act mainly through the stimulation of μ-receptors, which have inhibitory effects on the propagation of pain signals to the brain.

Pethidine, a synthetic opioid included in the phenylpiperidine class, is used for pain relief in humans. Today, also used for the treatment of severe pain in severe surgical operations, in cases undergoing amputation and in patients with a low pain threshold during delivery. It is still widely used, although its use has decreased in recent years due to the side effects of Pethidine and the realization that it is not safer than other opioids. It has been reported that this drug is abused in healthcare workers and patients due to its easy access, low cost, easy use and strength. It is seen that people who cannot find Pethidine try to obtain the drug illegally, and when they cannot find it, they turn to other drugs. These cases also show us that Pethidine abuse has a relationship with committing crimes. There are many cases of abuse, suicide and murder related to Pethidine as many of drug substances in the literature. Considering these situations, precise, reliable, accurate determination and interpretation of Pethidine and its metabolite Norpethidine have a very important place in order to clarify the cases that have been the subject of judicial authorities, and there is always a need for a reproducible and rapid analysis method in biological materials.

In this study, fast, reliable, accurate, high-recovery easy extraction method was developed for the analysis of the simultaneous determination of Pethidine and Norpethidine

from urine using the gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) system, Varenicline is used as internal standard in our study. Our method has been validated by testing with parameters specificity, selectivity, linear range, limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ), accuracy (recovery and precision). LOD and LOQ values were found to be 0.052206 μg/mL and 0.090953 μg/mL for Pethidine, 0.492051 μg/mL and 0.85503 μg/mL for Norpethidine. Extraction percent recovery was calculated as %113.357± (4.149) for Pethidine and 104,367± (10,724) for Norpethidine. The results of the precision parameter were obtained from repeatability and reproducibility studies. Repeatability %RSD results were calculated as 8.629± (3,300%) for Pethidine and 9.292± (1.296%) for Norpethidine. Reproducibility %RSD result were calculated as 6,880± (1,802) for Pethidine and 7.543± (2,017) for Norpethidine. As a result of the results obtained, it has been seen that our method is in the range of appropriate values for toxicological analysis.

The developed method was applied to urine samples taken at the 1st and 3rd hours following Pethidine ingestion from eighteen volunteer patients who used Pethidine for anesthesia before the operation (some patients were given a second dose after the operation) in the Plastic Surgery Clinic of Medistanbul Hospital. Our method allows the simultaneous determination of both Pethidine and Norpethidine, showing that it is also more advantageous than a single analyte analysis for detecting Pethidine abuse.

With our study, a method that can determine the main active substance and its two metabolites together in the urine by GC-MS, can quantify the main active substance and Norpethidine, has been developed for the first time in our country, and the analytical parameters of the method have been successfully performed and evaluated in urine samples obtained from eighteen patients. It also allowed the evaluation of pharmacokinetic parameters, albeit on a small scale, with urine samples obtained from a limited number of patients. We believe that the method we have developed will contribute to the monitoring and identification of Pethidine

abuse and the clarification of related forensic cases, and will help solve individual and social problems caused by Pethidine addiction both in our country and in the world.

Keywords: Pethidine, Meperidine, Aldolan, Norpethidine, Pethidinic Acid, Abuse, GC-MS

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Toplumda emsalsiz bir yere sahip olan opioidler, ağrı giderilmesi için geçmişten beri kullanılan ve hala kullanılmaya devam eden en etkili ve en temel ilaç gurubudur. Opiat terimi afyondan elde edilen "Benzylisoquinoline" türev bileşikleri ifade etmek için kullanılırken, opioid terimi hem doğal hem sentetik olarak, beyindeki opioid reseptörlerine (antagonistleri dahil olmak üzere) bağlanan bütün maddeleri ifade etmek için kullanılır. Son yıllarda, özellikle gençler arasında, opioid kötüye kullanımının ve bağımlılığının arttığı görülmektedir (1-4). Günümüzde opioid bağımlılığı tüm dünyada küresel bir sorun haline gelmiştir (5,6). Hem kötüye kullanımları hem de tedavi amaçlı kullanımların dolayı opioidlerin avantajları ve dezavantajlarına dair tartışmalar hala devam etmektedir (7). Tıp Tarihi, zararsız ilaçlar olarak tanıtılan, daha sonra kötüye kullanım ve bağımlılık potansiyeline sahip olduğu kanıtlanan maddelerin örnekleriyle doludur. Bunlardan en iyi bilineni sentetik bir opioid olan Petidin'dir (8).

Petidin'in (Pet), ilk defa 1939 yılında Eisleb ve Schaumann tarafından Almanya'da sentezlendiği, Meperedin, Dolantin, Dolantal, Demerol gibi çeşitli ticari isimler altında satıldığı bilinmektedir. Pet'in insanlarda ağrı giderme amacı ile kas içine enjekte edilebilen ilk sentetik opioid olduğu bildirilmektedir (7,9,10). Hem hayvanlar hem de insanlar üzerinde yapılan araştırmalar sonucu Pet'in etkinliğini doğrulayan birçok makale yayınlanmış ve klinik uygulamalarda kullanılabilmesi için araştırmalar yapılmıştır (7). Güvenilirliği henüz netleşmeden 1950'de doğumhanelerde ağrı eşiği düşük kişilerde kullanımı için onaylandığı görülmektedir (11). Sonrasında Pet kullanımının hem yeni doğan hem de anne üzerinde oluşturabileceği olası yan etkileri konu alan pek çalışma bulunmaktadır (7,12,13). Pet genellikle dahiliye, genel cerrahi, nöroloji ve plastik cerrahi kliniklerinde kullanılmaktadır (14-16). Morfin ile aynı analjezik etki mekanizmasına sahip olan Pet'in, morfine göre daha güvenli ve iyi bir alternatif olduğu düşünülmesine rağmen bunun kesinliğine dair net bir bilgi

bulunmamaktadır (17-20). Pet'in veya kendisi gibi bir sentetik opioid olan Fentanil'in, güvenli olmadığının farkedilmesi üzerine son yıllardaki kullanımı eskisine nazaran azalsa da hala yaygın olarak kullanılan ilaçlar oldukları görülmektedir (17,21,22). Pet'in yaygın olarak kullanılma nedenlerine düşük maliyetli, kolay kullanılabilir, kolay ulaşılabilir olması ve hızlı etki göstermesi örnek verilebilir (7,23,24). Pet, kötüye kullanılma ve bağımlılık oluşturma potansiyeline sahip güçlü bir ilaçtır. Yapılan birçok araştırma da bu tezi destekler niteliktedir. Pet, bağımlılık oluşturma potansiyelinin yanı sıra aktif metaboliti Norpetidin 'in (NPet) yüksek toksisitesi nedeniyle de 2003 yılında Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) sağlık sistemindeki en etkili ve güvenli ilaçlar listesi olan temel ilaçlar listesinden çıkartılmıştır (25).

Pet'in kötüye kullanımının en fazla görüldüğü meslek grubu maalesef sağlık sektörüdür (20,21). Bu zamana kadar bildirilen, madde bağımlısı doktorlar hakkındaki raporlardan, tüm ilaç kötüye kullanım vakalarının %25'inin Pet olduğu, ülkemizde de doktorlar arasında en sık görülen bağımlılık yapıcı 2. ilaç türünün Pet olduğu bildirilmektedir (18,26). Birçok ülkede de benzer kötüye kullanım vakaları bildirilmiş ve hala bildirilmeye devam edilmektedir (14, 20). Pet'in sağlık çalışanlarında daha çok görülmesinin nedeninin ilaca kolaylıkla ulaşabilmeleri, uzun ve stresli çalışma saatlerinin olduğu düşünülmektedir. Pet'i kötüye kullanan sağlık çalışanlarının performanslarının etkileyebileceği ve bakımları altındaki hastaları da tehlikeye atabilecekleri unutulmamalıdır (18).

Pet bağımlılığı gelişen kişilerde bir süre sonra ilaca karşı tolerans oluşmaya başlar. Bu durum alınan Pet miktarının yetersiz gelmesine ve daha fazla ilaç alma isteği duymasına neden olur. Kişi, ilacı kullanmayı bıraktığında ya da dozunu azalttığında, yoksunluk sendromu belirtileri hissetmeye başlar ve bu etkileri dindirebilmek için Pet kullanmaya çalışır. Pet'e ulaşmakta sorun yaşayan bağımlıların karaborsadan, hırsızlık yaparak, reçeteler üzerinde oynama yaparak ya da yaptırarak, hastalık veya yaralanmayı taklit ederek temin etmeye çalıştıkları, bazen de başka uyuşturucu maddelere yöneldikleri görülmektedir (27-31).

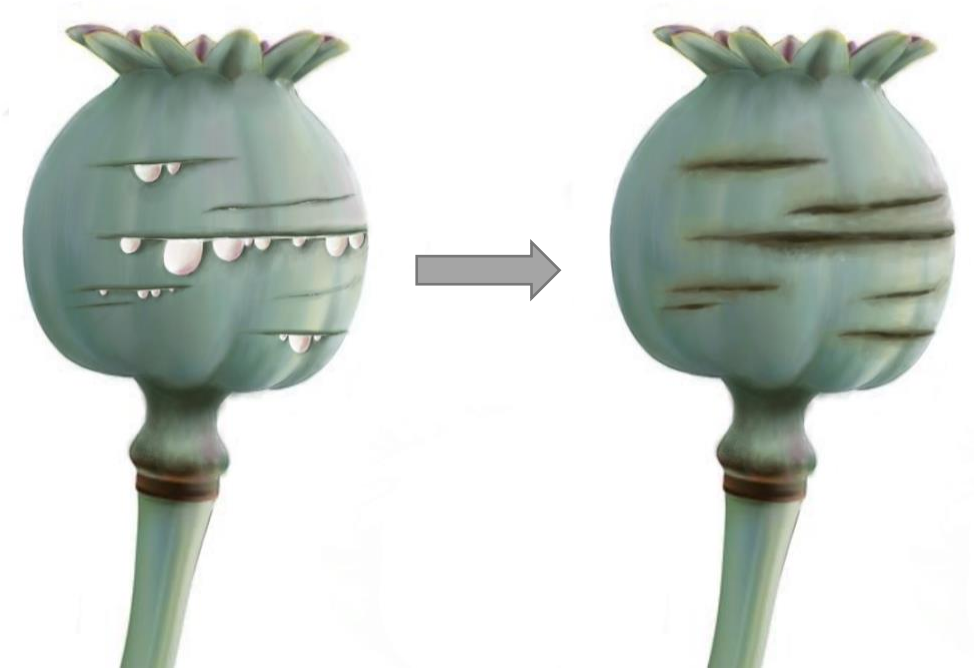
Her ne kadar Pet'in ağrı tedavisindeki etkinliği fazla ise de bağımlılık yapıcı özellikleri hakkındaki çalışmalar azdır. Literatür taramasından elde ettiğimiz vakaların çoğu Pet kötüye kullanım olguları olsa da intihar ve cinayet olgularına da rastlamak mümkündür. Özellikle kasten adam öldürme olgularında mağdurların zaten hastalık tedavisi gören kişiler olması, olayın önceden tasarlanmış olup olmadığının kanıtlanmasında ve adaletin sağlanmasında zorluklar oluşturarak, failler tespit edilse bile davadan ceza almadan kurtulabileceklerini göstermektedir (32).

Bazen literatüre bazen de magazinlere konu olmuş çeşitli olgular göz önünde bulundurularak, dünya genelinde en çok kötüye kullanılan ilaçlardan biri olan, adli mercilere konu olmuş Pet ile ilgili benzer şüpheli olguların aydınlatılmasında yardımcı olacağını düşündüğümüz bu çalışmamızda, idrardan Pet ve metaboliti olan NPet'in GC-MS sistemi ile eş zamanlı belirlenmesi amaçlanmıştır. Bunun için referans standart maddeler kullanılarak ekstraksiyon ve kromatografik prosedürler ile valide bir yöntem geliştirilmiştir. Geliştirilen bu yöntemin, hastalarda Pet uygulanmasını takiben 1. ve 3. saat alınan idrar örnekleri üzerinde uygulanarak hem etkinliği değerlendirilmiş hem de hasta profillerine göre ilacın farmakokinetik özelliği ve doz alımları değerlendirilmiştir. Böylelikle Pet ve metabolitleri için geliştirilen bu yöntemin optimize edilmesi, rutin hizmete kazandırılması ve adalete hizmet etmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Opioidler

Haşhaş bitkisi olarak bilinen *Papaver somniferum,* tıbbi amaçlarla kullanılabilen bir bitki türüdür (33-35). *Papaver somniferum* ağırlıklı olarak Hindistan, İran, Türkiye, Yugoslavya ve Japonya'da yetiştirilmektedir (36). Geçmişte de halk arasında ağrı kesici olarak kullanıldığı bilinen bitkinin, tam olgunlaşmadan önce sabah erken saatlerde dış yüzeyine keskin bir bıçak vb. yardımı ile çizikler atıldığı, bu çiziklerden süte benzer beyaz bir sıvı çıktığı (35,37), bu sıvı da güneş, sıcaklık, rüzgâr vb. gibi faktörlerin etkisi ile kahverengi sakıza benzer bir maddeye dönüşmekte ve bu maddenin hasadı yapılmaktadır (Şekil 1). Elde edilen bu maddeye "afyon sakızı" ya da "opium" denilmektedir (38).



Şekil 1: Olgunlaşmamış Haşhaş kapsülünün çizilmesiyle elde edilen afyon

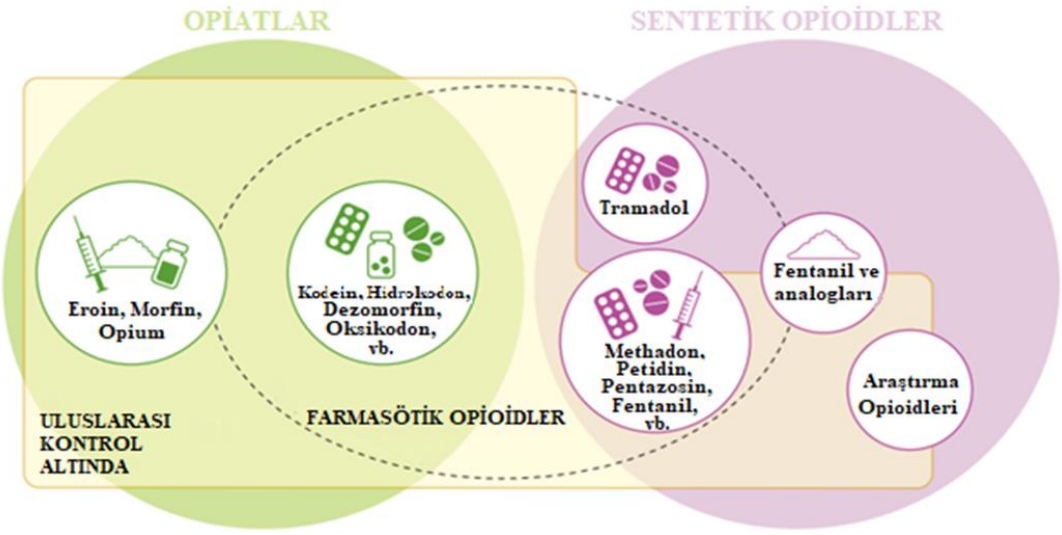
Afyondan elde edilen opium adı verilen bu doğal bileşiklerin içinde, morfin, kodein ve tebain psikoaktif özellik gösterirken, papaverin ve noskapin gibi 24 farklı türevdeki maddelerin ise psikoaktif özelliği bulunmamaktadır. Sentetik opioidler ise laboratuvar ortamında

sentezlenen, beyinde analjezik etkiler üretmek için doğal opioidler ile aynı mekanizma üzerinden hareket eden maddelere denilmektedir (39). Opioidler yapılarına 3 grupta incelenmektedir (Tablo I) (3).

Tablo I. Opioidlerin yapılarına göre ayrılması (3)

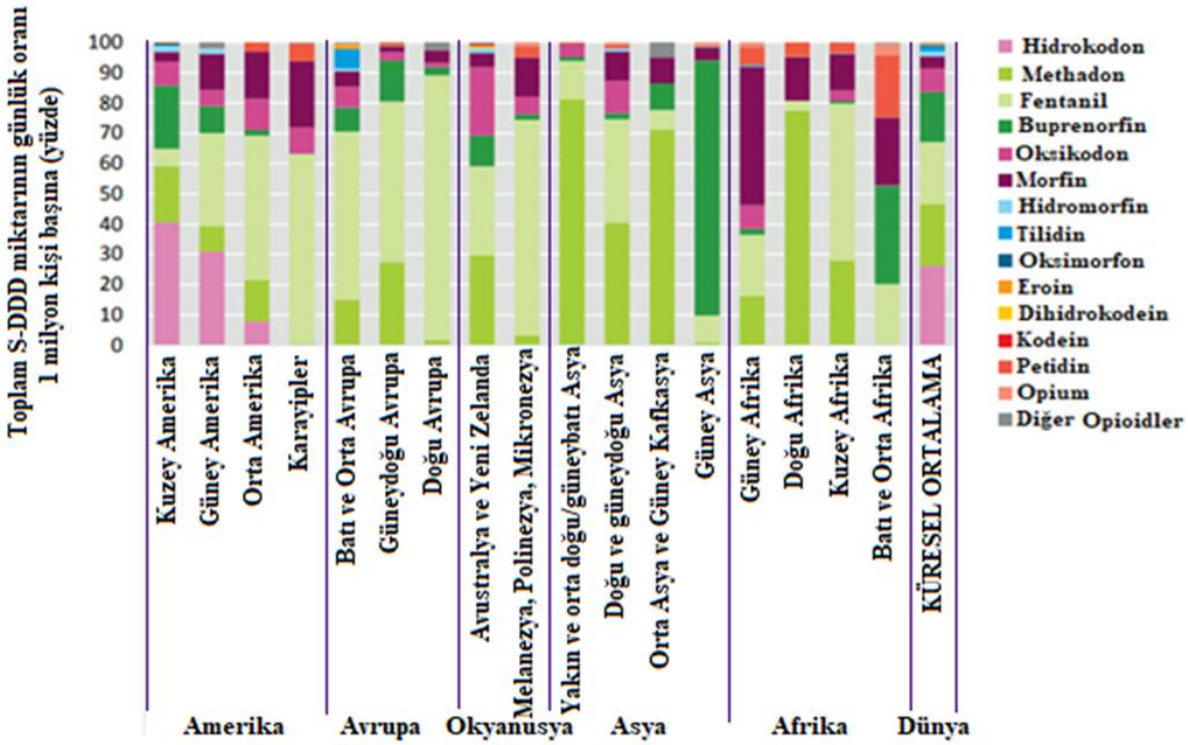
Doğal Opioidler	• **Fenantren türevleri:** Morfin, Kodein, Tebain • **Benzilizokinolin türevleri:** Papaverin
Sentetik Opioidler	• **Morfinan türevleri:** Levorfanol • **Difenilpropilamin ve ya methadon türevleri:** Methadon, d-propoksifen • **Benzomorfin türevleri:** Pentazosin, Fenazosin • **Fenilpiperidin türevleri:** Fentanil, Sufentanil, Alfentanil, **Petidin**, Remifentanil
Yarı Sentetik Opioidler	• **Tebain türevleri:** Oksimorfon ve oksikodon • Diamorfin (Eroin) • Dihidromorfon

Toplumda benzersiz bir role sahip olan opioidler ağrı giderilmesi için yaygın olarak kullanılan en etkili ve temel ilaçlardan biridir (2,3). Güçlü analjezik ve yatıştırıcı özelliklere sahip olmakla beraber farklı farmakokinetik özelliklere sahiptirler (40). Bu ilaçların avantajları ve dezavantajları konusunda tartışmalar günümüzde de hala devam etmektedir (7).



Şekil 2: Tıbbi olan ve tıbbi olmayan opioidler (41)

Tıbbi olan ve tıbbi olmayan opioidler Şekil 2'de verilmektedir. 2019 yılında tıbbi amaçlar için kullanılan ve kontrol altında olan (hazırlıklar hariç) opioid miktarlarının bölgelere göre dağılımı Şekil 3'te gösterilmektedir (41). Burada, söz konusu ilaçların istatistiksel amaçlar için tanımlanmış günlük dozlarının çoğunu sentetik opioidlerin oluşturduğu ve Petidin kullanımının en çok Afrika kıtasında olduğu görülmektedir.



Şekil 3: Tıbbi amaçlar için kullanılan ve uluslararası kontrol altındaki (hazırlıklar hariç) opioid miktarlarının bölgelere göre dağılımı gösteren grafik, 2019 (S-DDD: istatistiksel amaçlar için tanımlanmış günlük dozlar) (41)

Son yıllarda opioidlerin kötüye kullanımı ve bağımlılığı daha da artmıştır (2, 3). Opioid bağımlılığı hem dünyada hem de ülkemizde giderek yaygınlaşan önemli bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir (5,6). Özellikle gençler arasında opioid kullanımı her geçen gün artmaya devam etmektedir (4). Hızlı şekilde oluşan bağımlılık sonrası, sosyal, ekonomik, psikiyatrik ve tıbbi sorunlar da hızla artmaya devam etmektedir (5,6). Avrupa Uyuşturucu ve Uyuşturucu

Bağımlılığı İzleme Merkezi (EMCDDA) 2021 yılında, dünyada bir milyon yüksek riskli opioid kullanıcısı olduğunu, son dönemde doz aşımı ölümlerin %76'sında opioid tespit edildiğini ve 2019 yılında, 510.000 opioid kullanıcısının ikame tedavisi gördüğünü bildirmektedir (42). Tedaviyi reddeden opioid bağımlılarında görülen ilave sağlık sorunları arasında aşırı doz alımı, karaciğer ve/ veya böbrek yetmezliği, psikiyatrik semptomlar ve bunların yanı sıra Hepatit C ve HIV enfeksiyon risklerinin bulunduğu ifade edilmektedir (5,42).

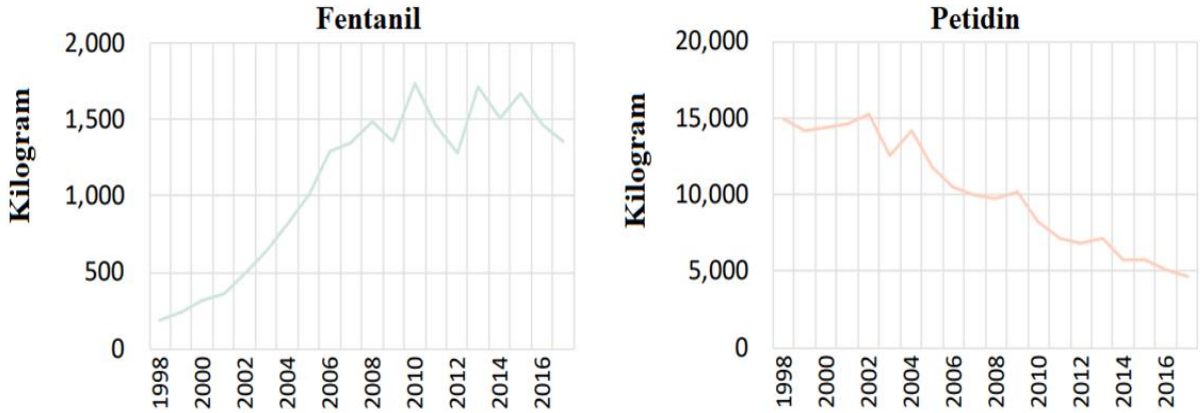
2.2 Petidin

Petidin, diğer adıyla Meperidin atropin benzeri antikolinerjik aktiviteye sahip bileşiklerin araştırılması sırasında Eisleb ve Schaumann tarafından ilk kez 1939'da Almanya'da sentezlenmiştir (7,10). Dolantin, Dolantal ve Demerol gibi ticari isimlerle piyada satışı olan Pet'in, insanlarda ağrı giderme amacı ile kas içine enjekte edilebilen ilk sentetik opioid olduğu bilinmektedir (7,9).

Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmaları takiben, Cousins ve arkadaşları ilk olarak insanlarda kanserin neden olduğu ağrının tedavisinde Pet kullanıldıklarını bildirmişlerdir (7,43). Yayınlanan bu rapordan sonra ağrı tedavisi için Pet'in etkinliğini doğrulayan birçok makale yayınlanmış ve klinik uygulamalarda kullanımı için araştırmalar yapılmıştır (7). 1950'de yılında güvenilirliği henüz netleşmemişken doğumhanelerde ağrı giderilmesi amacıyla kullanımı için onaylandığı görülmektedir (11). Sonrasında Pet kullanımının hem yeni doğan hem de anne üzerinde oluşturabileceği olası yan etkileri konu alan pek çalışma bildirilmiştir (7,12,13).

Pet, dahiliye, genel cerrahi, nöroloji ve plastik cerrahi klinikleri gibi birçok alanda kullanılmakla beraber genel olarak kazaya bağlı organ kaybı (ampütasyon), doğumlarda oprasyon öncesi ya da sonrası tedavide kullanılmaktadır **(**14-16**).** Klinikteki olası yan etkileri nedeniyle zamanla kullanımı azalsa da (Şekil 4) hala en yaygın ve kötü amaçla kullanılan

ilaçlardan birisi olduğu görülmektedir (17,21,22). 1950'lerin sonunda sentezlenen ve kimyasal yapısı Pet'e benzeyen ancak Pet'den 500 kat daha güçlü ve etkin bir ağrı kesici olan Fentanil, kısa sürede etki etmesi ve daha az yan etkileri olması nedeniyle Pet'e alternatif olarak kullanılmaya başlanmıştır (44-46). Pet ve Fentanil için 1998–2017 yılları arasında tıbbi kullanım için tüketilen mevcut küresel miktarlar kilograma göre Şekil 4'teki gibidir. Bu maddeler 1961 Sözleşmesi kapsamında kontrol edilmektedir (47).



Şekil 4: Pet ve Fentanil'in 1998-2017 yılları arasındaki tüketim miktarları (47)

Pet'in ticari sunuş şekilllerinin oral (tablet) ve enjeksiyon (intramüsküler, intravenöz ve subkütanöz) olduğu görülmektedir (15). Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı'ndan alınan verilere göre ülkemizde 2017-2018 Temmuz ayı ile 2020 Ocak-Aralık ayı Pet satış miktarları Tablo II'de verilmektedir.

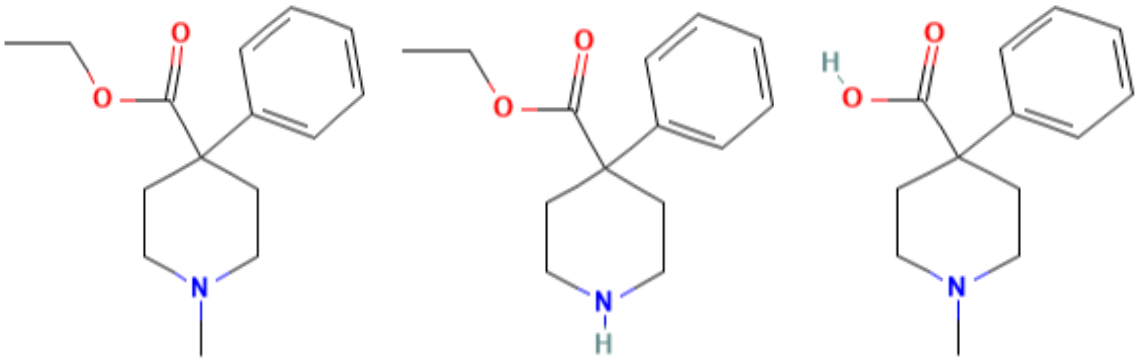
Tablo II. Pet'in yıllara göre satış miktarları

Etkin Madde	İlaç Adı	2017-2018 Temmuz	2020 Ocak-Aralık
	Aldolan 100mg/2mL ampul, 25 Adet	2295	0
	Aldolan 100mg/2mL ampul, 5 Adet	300425	120251
	Aldolan 50mg/1mL ampul, 100 Adet		

Petidin	*Aldolan 50mg/1mL ampul, 25 Adet*	Veri mevcut değil	Veri mevcut değil
	Aldolan 50mg/1mL ampul, 3 Adet		
	Aldolan 50mg/1mL ampul, 5 Adet		
	Aldolan 50mg/1mL ampul, 50 Adet		
Petidin Hidroklorür	*Petholan, 100mg/2mL enjeksiyonluk çözelti, 5 Adet*	1700	6107
	Petisel, 100mg/2mL enjeksiyonluk çözelti içeren ampül	302	28601
	Aldine, 100mg/2mL enjeksiyonluk çözelti, 5 Ampul	Veri mevcut değil	Veri mevcut değil
	Cedeptin, 100mg/2mL enjeksiyonluk çözelti, 10 Adet		

2.2.1. Petidin'in fizikokimyasal özellikleri

Pet, IUPAC isimlendirmesi etil 1-metil-4-fenilpiperidin-4-karboksilat olan, fenilpiperidin sınıfına dahil sentetik bir opioiddir (9,17,25). Pet ve başlıca metabolitleri Norpetidin (NPet) ile Petidinik Asitin (PetA) moleküler yapısı Şekil 5'te gösterilmektedir.



Petidin Norpetidin Petidinik Asit

Şekil 5: Pet, NPet ve PetA'nın moleküler yapısı

Pet ve metabolitleri, moleküler ağırlıkları ve pKa gibi özellikleri bakımından birbirleri ile ilişkili olmakla beraber benzer fizikokimyasal özelliklere de sahip bileşiklerdir. Pet, NPet ve PetA'nın moleküler formülü, moleküler ağırlığı ve CAS numarası Tablo III'te verilmektedir. Pet'in kanda proteine bağlanma oranı %65-75'tir (48).

Tablo III. Pet, NPet ve PetA'nın moleküler formülü, moleküler ağırlığı ve CAS numarası

	Petidin	**Norpetidin**	**Petidinik Asit**
Moleküler Formülü	$C_{15}H_{21}NO_2$	$C_{14}H_{19}NO_2$	$C_{13}H_{17}NO_2$
Moleküler Ağırlığı	247.33	233.31	219.28
CAS Numarası	57-42-1	77-17-8	3627-48-3

Pet, düşük maliyetli, kolayca temin edilebilir, hızlı etki eden ve kolay kullanımı olan bir ilaçtır (7,23,24). Orta düzeyde lipid çözünürlüğüne sahip olması nedeniyle de ağrı kesici olarak kullanılan diğer opioidlere göre daha avantajlı konumda olabilmektedir (7). Morfine benzer farmakolojik etkiler gösteren Pet, morfine göre daha güvenli ve daha iyi bir alternatif olduğu düşünülmesine rağmen bunun kesinliğine dair net bilgiler bulunmamaktadır (17-19).

2.2.2. Petidin'in farmakokinetiği

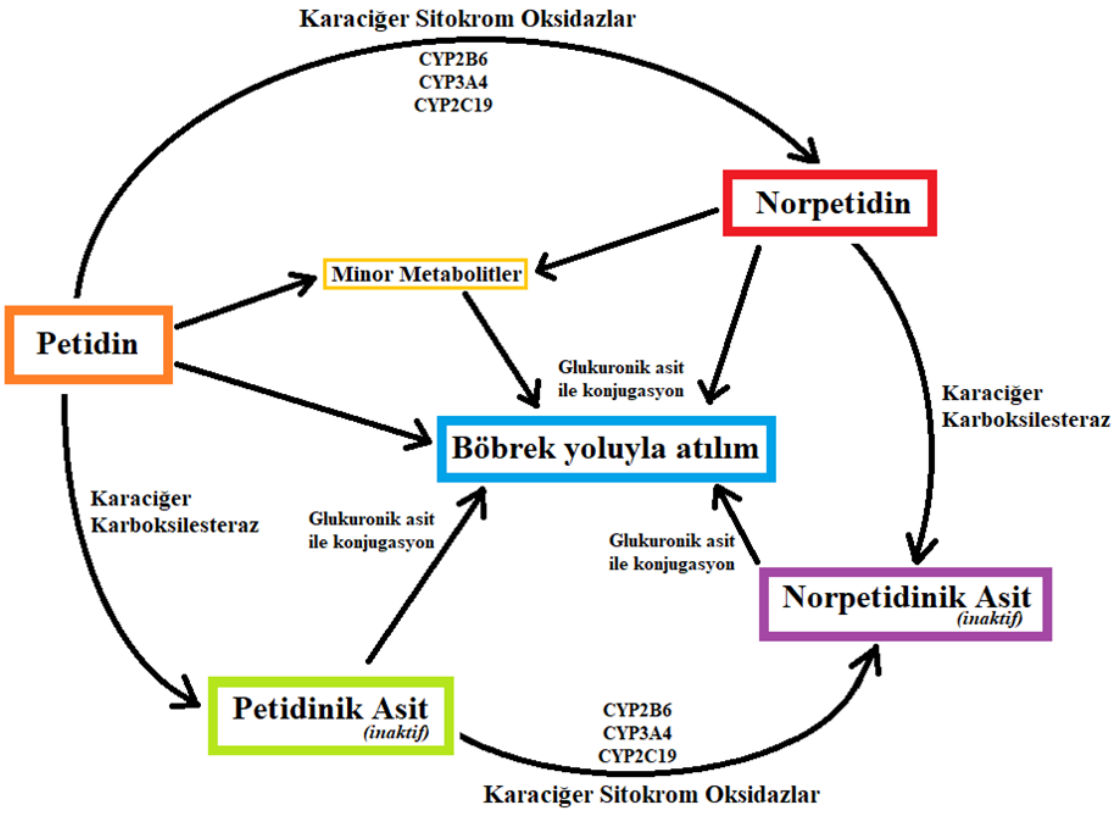
Absorpsiyon (Emilim)

Pet, oral kullanımdan sonra kolaylıkla emilip, hızla dokulara dağılmaktadır (20). Oral alım sonrası, analjezik etkinin maksimum 20 ila 60 dakika (dk.) sürdüğü ancak kas içine enjeksiyonla 40 dk. içinde maksimum doza ulaşarak 2-3 saatlik bir etki sağladığı, damar içi enjeksiyonda maksimum doza ulaşma süresinin daha da kısa sürdüğü ve etki süresinin daha uzun olduğu bildirilmektedir (43,49). Bu nedenle intramüsküler, intravenöz veya ikisi beraber olacak şekilde enjeksiyon daha sıklıkla kullanılmaktadır (9). Epidural enjeksiyon ile beyin omurilik sıvısında maksimum doz seviyelerine 15 ila 43 dk. içerisinde ulaştığı gözlenmiştir (7). Pet ve NPet'in plasentadan bebeğe de geçtiği bilinmektedir (43,50). Yenidoğanlar ve

bebeklerde kan-beyin bariyeri işlevsel olarak tam etkili olmadığı için ilacın daha derinlemesine nüfuz edebileceği ve advers reaksiyonlara neden olabileceği düşünülmektedir (51). Ayrıca anne sütünden bebeğe geçmesinden kaynaklanan herhangi bir toksitite ile ilgili klinik bir durum bildirilmemiş olsa da olası riskler henüz tam olarak bilinmemektedir (7).

Metabolizma

Petidin büyük ölçüde başlıca sitokrom P450 (CYP2B6, CYP3A4 ve CYP2C19) yoluyla karaciğerde metabolize edilmektedir. %90'ı demetilasyonla NPet'e ve hidrolizle PetA'ya dönüşmektedir (7, 52-57). Diğer metabolitleri arasında Norpethidinik asit (NPetA) ve bu asitlerinin konjugatları bulunmaktadır (52). Şekil 6'da Pet'in metabolizması gösterilmektedir.



Şekil 6: Pet'in metabolizması

Pet'in farmakolojik olarak bilinen tek aktif metaboliti NPet'dir (50,57). NPet hem analjezik hem de toksik etkilere sahiptir. NPet'in, Pet'in analjezik etkisinin yaklaşık yarısına, toksisitesinin ise iki katına sahip olduğu gösterilmiştir (22,50,58). Pet, karaciğerde metabolize

olduğundan, uzun süreli veya sistemik kullanılması, özellikle karaciğer ve böbrek fonksiyon bozukluğu olan hastalarda, NPet birikmesine neden olabilmektedir (19,59). Bu metabolitin, merkezi sinir sisteminde aşırı uyarılmaya neden olarak, hiperrefleksi, miyoklonus, deliryum ve nadiren de olsa nöbetleri tetikleyebileceği bildirilmektedir (19, 60).

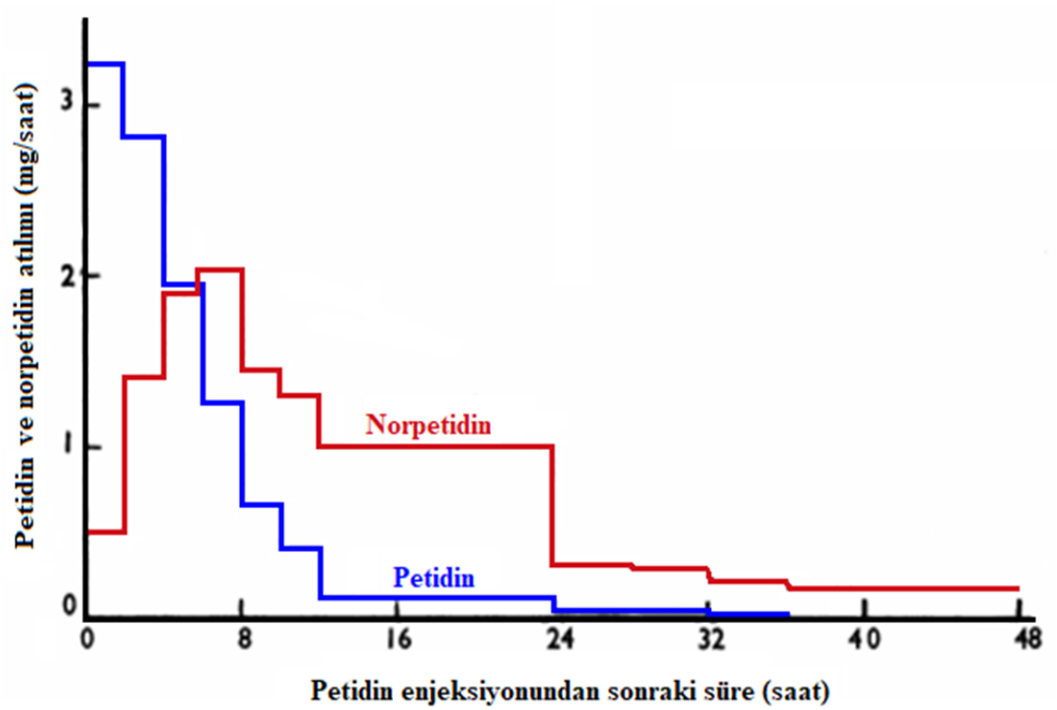
Atılım

Pet 3 ila 6, NPet ise 8 ila 12 saatlik bir yarılanma ömrüne sahiptir. Ancak bu yarılanma ömrünün süresi böbrek yetmezliği olan hastalarda artabilmektedir (7). Pet'in büyük bir kısmının metabolize edildiği, idrarla sadece küçük bir kısmının değişmeden atıldığı bilinmektedir. Bununla beraber, çoğu çalışma, pH değişikliklerinin Pet atılımı üzerindeki etkisini göz ardı etmiştir (61). Pet ve metabolitlerinin atılımı idrar pH'ındaki değişikliklerden etkilenebilmektedir (61,62). PetA, NPetA ve bunların konjugatları ise hem asidik hem de bazik köklere sahip oldukları için idrar pH'ındaki değişikliklerden etkilenmemektedirler (61).

Normal kişilerde, 24 saat içerisinde, alınan dozun yaklaşık %70 kadarı idrarla atılmaktadır. Bunun %10 kadarı değişmemiş halde Pet, %10'u NPet, %20'si PetA, %16'sı konjuge PetA, %8'i NPetA ve %10'u konjuge NPetA olarak atılmaktadır. İdrar asitli ise alınan bir dozun yaklaşık %30 kadar fazlası, idrar alkali ise %5'ten azı Pet ve NPet olarak atılmaktadır (63). Kısaca, asidik idrar Pet atılımını artırırken, alkali idrar Pet atılımını azaltmaktadır. Ayrıca yapılan deneylere göre Pet atılım miktarının, gençlere göre yaşlı bireylerde daha yavaş olduğu belirlenmiştir (62).

Pet atılımı, enjeksiyondan sonraki ilk 2 saat içinde en yüksek seviyelerine ulaşmaktadır, sonrasında ise logaritmik olarak düşüşün başladığı görülmektedir. 2 gün içerisinde Pet atılımı yok denecek kadar azalsa da 3. veya 4. gün de tespit edilme olasılığı hala bulunmaktadır. 100 mg Pet'in tek bir deri altı enjeksiyonundan sonraki 48 saatlik sürede Pet ve NPet'in yüksek asitli idrarda ortalama atılım oranları Şekil 7'de gösterildiği gibidir (61). Yapılan birkaç

karşılaştırmalı çalışmada, Pet farmakokinetiğine ve çeşitli etnik gruplardaki eğilimine bakılmış, idrarda Pet ve majör metabolitlerinin yüzde geri kazanım oranlarında etnik açıdan farklılık göstermediği belirlenmiştir (64). Ancak kadın cinsiyet hormonlarının yüksek konsantrasyonda bulunması, Pet metabolizmasının ve atılım mekanizmasında değişimin olması olası görünmektedir *(*65).



Şekil 7: 100 mg Pet kas içi enjeksiyonundan sonraki 48 saatlik süre boyunca asidik idrarda Pet ve NPet atılım oranlarını gösteren grafik (61)

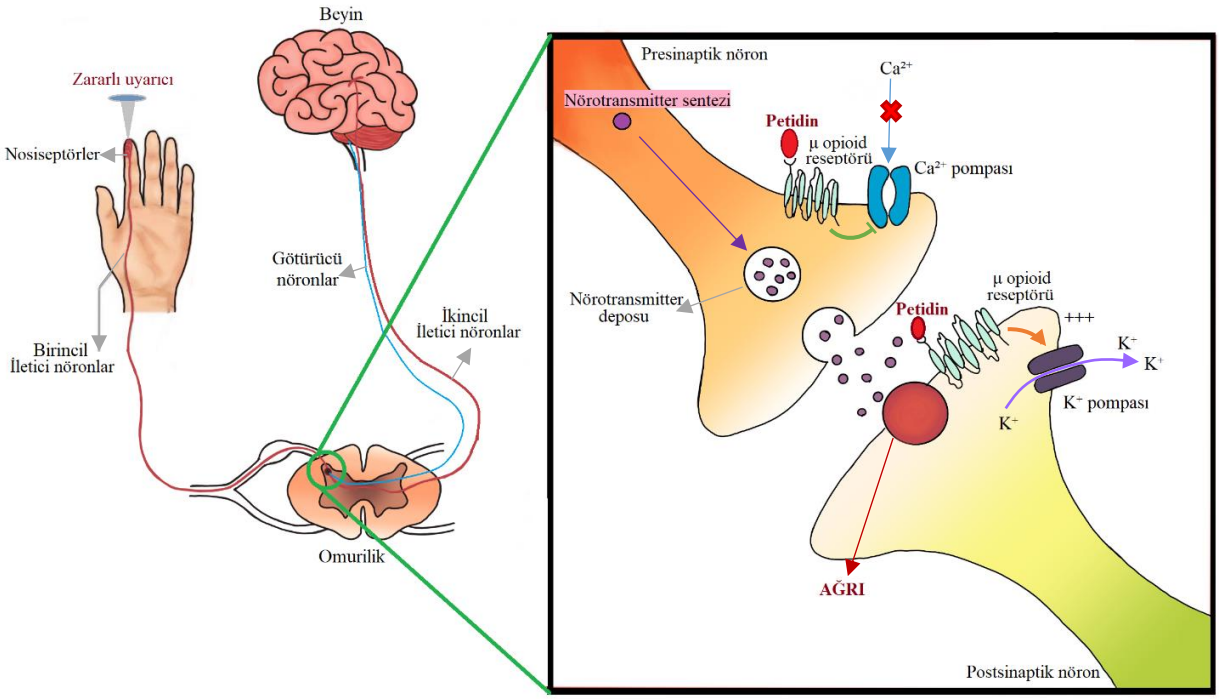
2.2.3. Petidin'in farmakoloji

Pet, ağrı azaltıcı etkisini mu (μ) opioid reseptörlerinin**,** titreme önleyici etkisini ise kappa (κ) opioid reseptörlerinin uyarılması yoluyla göstermektedir (7,20,25). Pet'in sinir sistemi üzerindeki etkileri hem in vivo hem de in vitro çalışmalar ile doğrulanmıştır (7). Pet, morfin ile aynı ağrı azaltıcı etki mekanizmasına sahiptir ancak morfin kadar etkili değildir. Kas içine uygulanan 80-100 mg Pet, aynı yoldan verilen 10 mg morfinin etkisini göstermektedir (7,20).

Vücut dokusunda oluşan hasar sonucu, vücutta ağrı hissi oluşturan reseptörlere nosiseptör denilmektedir. G proteinine bağlı reseptörler (GPCR) ya da diğer adı ile yedi

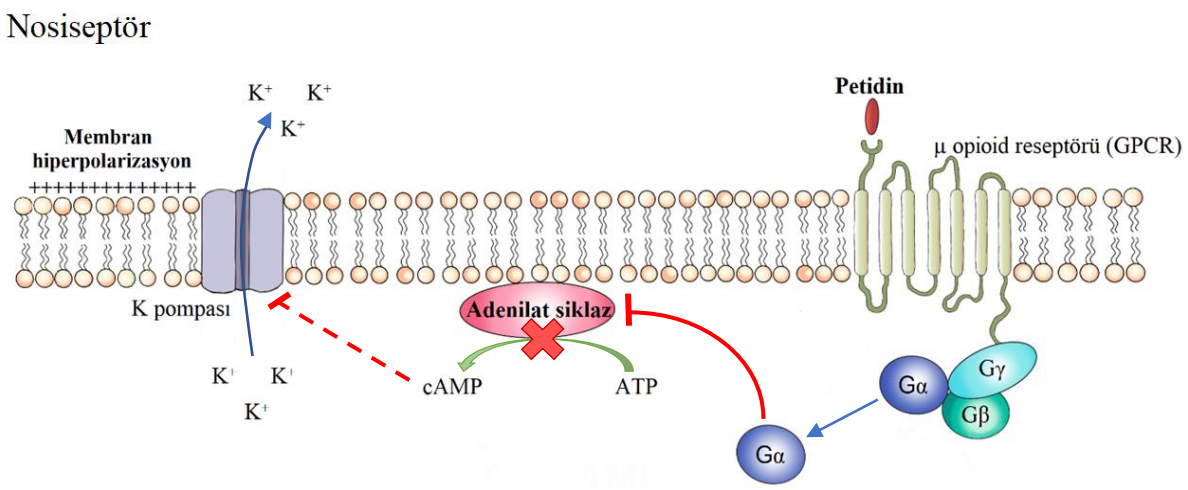
transmembranlı (7TM) reseptörler grubuna ait olan μ opioid reseptörü hücresel etkisini G protein kompleksi ile birleşerek göstermektedir (66-68). Pet'in μ reseptörü ile etkileşimi, G protein kompleksinin Gα ve Gβγ olmak üzere ikiye ayrılmasına neden olmaktadır. Aktif hale geçen Gα alt birimi adenilat siklaza bağlanarak siklik adenozin monofosfat (cAMP) oluşumunu engellemektedir. Bu durum ortamdaki cAMP oranının azalmasına neden olmakta (69-71), cAMP oranının azalması da kalsiyum (Ca^{2+}) ve potasyum (K^{+}) pompalarını etkileyerek iki şekilde etki gösterebilmektedir:

1. Presinaptik nöronlarda cAMP'nin azalması, gen ifadesinde değişikliğe sebep olmaktadır. Bu durum Ca^{2+} pompalarını inhibe edilerek, hücre içine Ca^{2+} girişi azaltmakta, Ca^{2+} girişinin azalması da nörotransmitter salınımını engellemektedir. Böylece postsinaptik nöronların uyarılmasını azaltarak ağrının azalmasına neden olmaktadır (69,72). Şekil 8'de Pet'in, ağrı uyarılarını azaltan presinaptik ve postsinaptik etki mekanizması verilmektedir.



Şekil 8: Pet'in, ağrı azaltıcı presinaptik ve postsinaptik etki mekanizmasını gösteren şekil

2. Postsinaptik nöronlarda cAMP'nin azalması, K^+ pompalarını aktive ederek hücre dışına K^+ geçişine ve nöron membranının hiperpolarize olmasına neden olmaktadır (25,69). Bu durum nöronun inaktif olmasını ve nöronlardan gelen ağrı uyarıların azalmasını sağlamaktadır (69). Şekil 9'da postsinaptik nöronda K^+ pompaları ile ağrı uyarılarının azaltılma mekanizması verilmektedir.



Şekil 9: Pet'in ağrı uyarılarını azaltma mekanizmasını gösteren şekil

2.2.4. Petidin'in yan etkileri

Pet'in güvenilirliğini ölçmek için yapılan, aralarında Türkiye'nin de bulunduğu 17 çalışma derlemesinde Pet kullanım riskinin, uygulama yolu ve kullanılan doz miktarına da bağlı olduğu belirlenmiştir (24). Görülen tepkilerin oluşma riski genellikle dozla doğru orantılı olarak artmaktadır (7). Yaygın olarak görülen tepkiler arasında; çarpıntı, baş ağrısı, döküntü, kaşıntı, görme bozuklukları, istemsiz hareketler, bulantı, kusma, kabızlık, terleme, ajitasyon, halsizlik bulunurken; ciddi olarak görülen tepkiler arasında şok, koma nöbet, titreme, halüsinasyon, bradikardi, kalp durması, şiddetli hipotansiyon, potansiyel opioid bağımlılığı, ilacın aniden kesilmesine bağlı oluşabilecek yoksunluk semptomları ve solunum depresyonu bulunmaktadır (25,56). Pet'in aşırı doz kullanımı ya da monoamin-oksidaz inhibitörleri (MAOI'ler) ile

kullanılması durumunda ciddi tepkilerle beraber ölümcül vakalarda gözlemlenebilmektedir (18,25).

Vücutta NPet birikmesinin, nörolojik advers potansiyelini arttırdığı ve bu nörolojik etkinin genellikle merkezi sinir sisteminde aşırı uyarılmaya (serotonin arttırma gibi) neden olduğu bildirilmektedir. NPet'in nörotoksisitesi, sinirlilik, huzursuzluk, titreme, kafa karışıklığı ve nöbetlere kadar bir dizi semptomla sonuçlanabilmektedir (18). Ayrıca daha önce yayınlamış raporlar arasında, Pet toksisitesine bağlı deliryumun potansiyel bir nedeni olarak Pet'in antikolinerjik aktivitesinden de bahsedilmiştir (73). Pet kötüye kullanılma, NPet'in toksisitesi gibi tehlike arz eden durumlardan dolayı, 2003 yılında Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) sağlık sistemindeki en etkili ve güvenli ilaçlar listesi olan temel ilaçlar listesinden çıkartılmıştır (25).

2.2.5. Petidin'in adli bilimler açısından önemi

Zararsız olarak tanıtılan, daha sonra kötüye kullanım ve bağımlılık potansiyeline sahip olduğu kanıtlanan birçok ilaç bulunmaktadır. Bunlardan en iyi bilinlerden birisi morfin diğeri ise Pet'dir (8). Tedavi merkezlerinde bulunan 81 bağımlı üzerinde yapılan bir çalışmada, bağımlıların %70'inin morfin, %27'sinin Pet kullandığı belirlenmiştir (74).

Pet'in kötüye kullanımı sağlık çalışanları tarafından çok sık görülürken, diğer sektörlerde kullanımı neredeyse yok denecek kadar azdır (20,21). Bunun sebebinin, uzun süren stresli çalışma saatleri ve ilaca kolay erişimlerinin olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu zamana kadar bildirilen, madde bağımlısı doktorlar hakkındaki raporlardan tüm ilaç kötüye kullanım vakalarının %25'inin Pet olduğu, ülkemizde ise doktorlar arasında en sık görülen bağımlılık yapıcı 2. ilaç türünün Pet olduğu bildirilmektedir (18,26). Tıbbi nedenler dışında opioid kullanımları nedeniyle 1985-1994 yılları arasında ilaç yazma hakları ellerinden alınan 79 doktorun 66'sının Pet kullandığı saptanmıştır. Olguların 34'ü, 2 yıldan daha uzun süre madde kullandıktan sonra başkaları tarafından madde kullandıklarının fark edildiğini

bildirmişlerdir. Bu doktorlarda daha sonra ölüm oranının da yüksek olduğu bulunmuştur (75). Birçok ülkede de benzer kötüye kullanım vakaları bildirilmiş hala da bildirilmeye devam etmektedir (14,20). Pet'i kötüye kullanan sağlık çalışanlarının performanslarının kötü yönde etkilenebileceği ve bakımları altındaki hastaları da tehlikeye atabilecekleri asla unutulmamalıdır (18).

Pet'e ulaşmakta sorun yaşayan bağımlıların yasadışı yollar kullanarak (karaborsa, hırsızlık vb.), reçeteler üzerinde oynama yaparak ya da yaptırarak, hastalık veya yaralanmayı taklit ederek temin etmeye çalıştıkları görülmektedir (27-30). Endişe verici olan bir başka durum ise Pet ilacının enjeksiyon yolu ile kullanan kişilerin, enjektörlerini paylaşarak Hepatit ve HIV gibi enfeksiyonlara açık hale geliyor olmalarıdır (74). Tablo IV'te Pet kullanımına dair bazı olgu örnekleri ve bu olgulardaki kişilerin yaş, cinsiyet, maruziyet yolları ve olgu hikayelerine yer verilmiştir.

Tablo IV. Pet kullanan kişilerin yaş, cinsiyet, maruziyet yolu ve olgu hikayesi

Yaş	Cinsiyet	Maruziyet yolu	Olgu Hikayeleri	Referans
37	Kadın	Damardan enjeksiyon	Kötüye kullanım	76
43	Kadın	Damardan enjeksiyon	Kötüye kullanım	29
23	Kadın	Farklı ilaçlarla beraber	Kötüye kullanım	77
61	Erkek	Damardan enjeksiyon	Kötüye kullanım	78
41	Erkek	Enjeksiyon	Olası intihar	30
43	Kadın	Oral Tablet	İntihar	79
53	Erkek	Oral Tablet	Aşırı Doz Zehirlenme	80

24	Erkek	Kas içi enjeksiyon ve farklı ilaç kullanımı	Serotonin Sendromu	81
44	Erkek	Tablet	İlk ölümcül Pet zehirlenmesi	82
34	Erkek	Enjeksiyon	Kötüye kullanım	53
58	Erkek	Damardan enjeksiyon	Kötüye kullanım	83
30	Erkek	Deri altı enjeksiyon	Kötüye kullanım	84
32	Erkek	Farklı ilaçlarla beraber	Birleşik Zehirlenme	85
17	Kadın	Oral	Aşırı doz	86
36	Erkek	Enjeksiyon	Kötüye kullanım	5
40	Erkek	Kas altı ve damardan enjeksiyon	Kötüye kullanım	87
34	Erkek	Enjeksiyon	Pet azaltılmasına bağlı Yoksunluk sendromu	31
35	Kadın	Farklı ilaçlar ile damardan enjeksiyon	Cinayet	88
88	Kadın	Damardan enjeksiyon	Cinayet	32

Pet kullanımının diğer yasa dışı maddelere göre kadın, orta yaşlı, evli, çocuklu ve belli bir eğitim düzeyine sahip kişiler tarafından daha sıklıkla kullanıldığı belirtilmektedir (89). Literatürde Pet'in kötüye kullanımına dair birçok olgu sunumu bildirilmiştir (Tablo IV). Literatür taramasından elde ettiğimiz verilere göre, 19 vakanın 11 tanesinin enjeksiyon yolu ile ilacı aldığı, yaş ortalamasının 40 olduğu ve 19 vakanın 12'sinin erkek olduğu görülmektedir.

Tablo IV'te de görülebileceği gibi bu vakaların çoğu kötüye kullanım olguları olsa da kasıtlı adam öldürme olgularına da rastlamak mümkündür.

2.3 Kromatografi

Bilinmeyen madde analizleri adli toksikolojide önemli bir yere sahiptir. Bilinmeyen madde analizlerinin yapılabilmesi için çoğunlukla tanıma ve ayrışma adı verilen iki işlem uygulanmaktadır. Gelişmiş tanıma ve ayrışma özellikleri bakımından en çok kullanılan yöntemler, kromatografik yöntemlerdir (90,91). Kromatografi terimi, Yunanca renkli yazmak anlamına gelen chromos (renk) ve grafein (yazma) kelimelerinden türetilmiştir (92,93). Kromatografi ilk olarak Rus botanikçi ve biyokimyacı olan M. S. Tswett tarafından 20. yüzyılın başında yaprak pigmentlerini ayırmak için kullanmıştır. Uluslararası Saf ve Uygulamalı Kimya Birliği'nin (IUPAC) tanımında kromatografi "bileşenlerin ayrılacağı bir ayırma yöntemi" olarak geçmektedir (91,92). Bu tanımı biraz daha açacak olursak kromatografi, çeşitli maddelerin farklı kimyasal ve farklı fiziksel özelliklerine göre hareketli (mobil) fazla ile sabit fazın üzerinde farklı hızlarla ilerlemesi sonucu birbirinden ayrılması esasına dayanan bir analitik yöntemdir (91).

Adli toksikolojide toksik maddelerin analizini yapabilmek için birçok kromatografik yöntem yer almaktadır. Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometresi (GC-MS), Sıvı Kromatografisi Kütle Spektrometresi (LC-MS), İnce Tabaka Kromatografisi (TLC), Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) en çok kullanılan yöntemlerdir (94-96). Tablo V'te kromatografik yöntemlerin ayırma mekanizmasına, kullanılan düzeneğe ve faz tiplerine göre sınıflandırılması verilmektedir. Farklı kromatografik yöntemler seçilerek, ilgili maddenin varlığı ya da yokluğuna dair yorumlar yapılabilirken, maddenin var olması durumunda madde miktarına ilişkin analizlerde yapılabilmektedir (97).

Tablo V. Kromatografik yöntemin sınıflandırılması

Ayırma Mekanizmasına Göre

- Adsorpsiyon Kromatografisi
- Dağılma Kromatografisi
- İyon Değiştirme Kromatografisi
- Jel Filtrasyon Kromatografisi
- Affinite Kromatografisi

Kullanılan Düzeneğe Göre

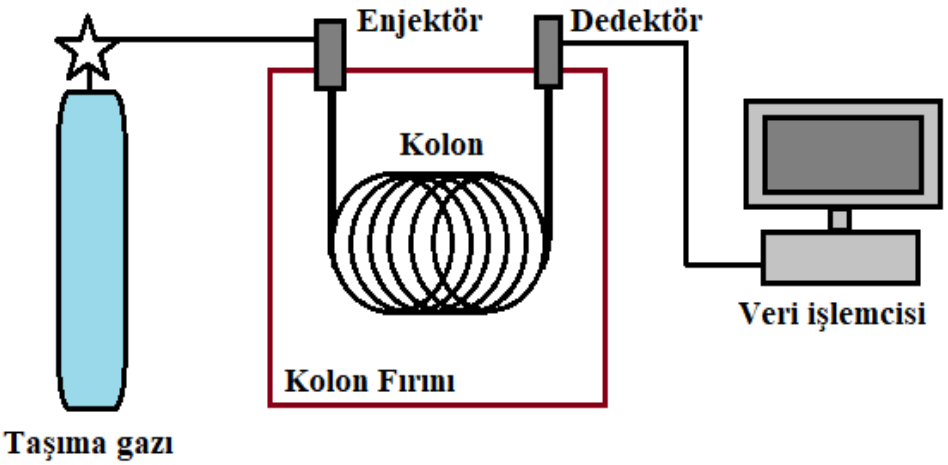
- **Düzlemsel Kromatografisi**
  - Kağıt Kromatografisi
  - İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)
- **Kolon Kromatografisi**
  - Sıvı Kromatografisi (LC)
  - Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)
  - Gaz Kromatografisi (GC)

Faz Tiplerine Göre

- Sıvı Kromatografi
- Sıvı-Katı Kromatopgrafisi
- Sıvı-Sıvı Kromatografisi
- Gaz Kromatografisi

2.3.1. Gaz kromatografisi (GC)

1952'de icat edilmesinden bu yana GC, günümüzde en karmaşık olan karışımları bile ayırabilme özelliğinden dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle, kütle spektrum kütüphanesinin bulunması nedeniyle gıda, ilaç ve petrokimya endüstrisi başta olmak üzere pek çok alanda büyük bir öneme sahiptir (92,98). GC, uçucu ya da yarı uçucu maddeleri ayırmak için kullanılmaktadır (91). Şekil 10'da GC sisteminin tipik bir şeması verilmiştir. GC kabaca taşıma gazı, enjektör, kolon fırını, kolon, dedektör ve veri işlemcisinden oluşmaktadır. GC, hızlı, nispeten basit, doğru, güvenilir, uygun maliyetli, yüksek algılama hassasiyeti ve yüksek çözünürlükle birlikte düşük miktarda numune kullanımı gibi birçok avantaja sahiptir (92).



Şekil 10: Tipik GC sisteminin şeması

2.3.1.1. Gaz kromatografisinin bileşenleri

Fazlar (91,92)

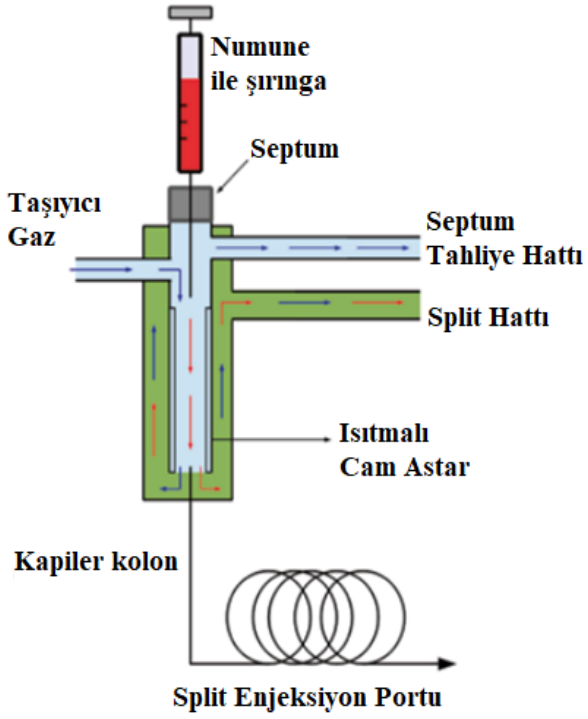
GC, birbirine yakın temas halinde olan, biri sabit (kolon) diğeri ise hareketli olan iki fazdan oluşmaktadır. Sabit ve mobil faz arasındaki analit dağılımı; afinite, çözünürlük, polarite, moleküler ağırlık ve iyonik güç gibi faktörlere bağlı olarak değişebilmektedir. Sabit fazın üzerinden ilerleyen hareketli faz, gaz veya sıvı halde kullanılabilmektedir. Hareketli faz olarak sıvı kullanılıyor ise sıvı kromatografi, gaz kullanılıyor ise gaz kromatografisi olarak adlandırılmaktadır. Yüksek saflıkta bulunan hidrojen, helyum ya da azot gibi inert gazlar çoğunlukla hareketli faz olarak kullanılmaktadır. Hareketli faz analitlerin sabit faz boyunca taşınmasından sorumludur.

Enjektörler (92,99)

Enjektör, gaz veya sıvı numunelerin kolonun başlangıcına aktarılmasını sağlamaktadır. Bu işlem hızlı bir şekilde gerçekleştirilmelidir. Numuneler buhar fazında çeşitli enjeksiyon sistemleri ile kolona aktarılmaktadır. Analiz, numunenin kolona aktarılması ile başlamaktadır. Kolonlar için enjektörler bölünmüş (split), bölünmemiş (splitless) ve doğrudan kolona enjeksiyon olmak üzere 3 şekilde kullanılabilmektedir. Sıvı numuneler için genellikle

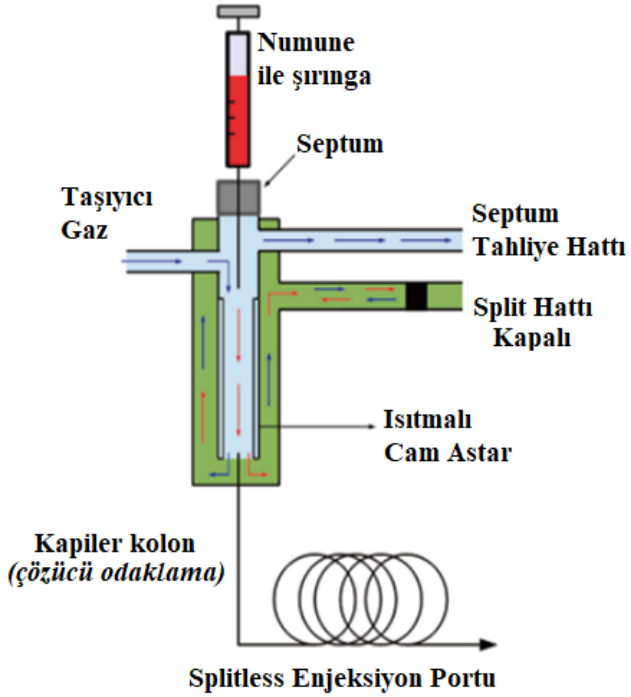
mikrolitre şırınga, gazlar için gaz geçirmez şırınga ya da gaz valfleri kullanılmaktadır. Numune şırınga yoluyla ısıtılmış bölgeye verilir, bu durum numunenin ve numune matrisinin buharlaşmasını kolaylaştırmaktadır.

- **Split enjeksiyon (99,100):** Buharlaşan numune taşıyıcı gazla karıştırılır ve bu karışımın sadece bir kısmı kolona enjekte edilirken geri kalanı bölünmüş hattan (havalandırma) atılmaktadır. Bölünmüş hat açıksa, buharlaşan numunenin çoğu bu hat yoluyla atık olarak atılmakta ve numunenin sadece küçük bir kısmı kolona verilmektedir. Bu strateji, kapiler kolonun aşırı yüklenmesini önleyerek hızlı numune enjeksiyonunu kolaylaştırmaktadır. Düşük miktarda analit içeren eser analizler için en uygunudur. Şekil 11'de Split enjeksiyon sistemleri için şemayı göstermektedir.



Şekil 11: Split enjeksiyon sistemi (98)

- **Splitless enjeksiyon (99,100):** Splitless enjeksiyon, split ile neredeyse aynı şekilde kullanılmaktadır. Bölünmüş hat, enjeksiyon süresi boyunca kapalı kalır, bu nedenle taşıyıcı gazla karışmış bütün buharlaştırılmış numune kolona enjekte edilmektedir. Şekil 12'de splitless enjeksiyon sistemleri için bir şema gösterilmektedir.



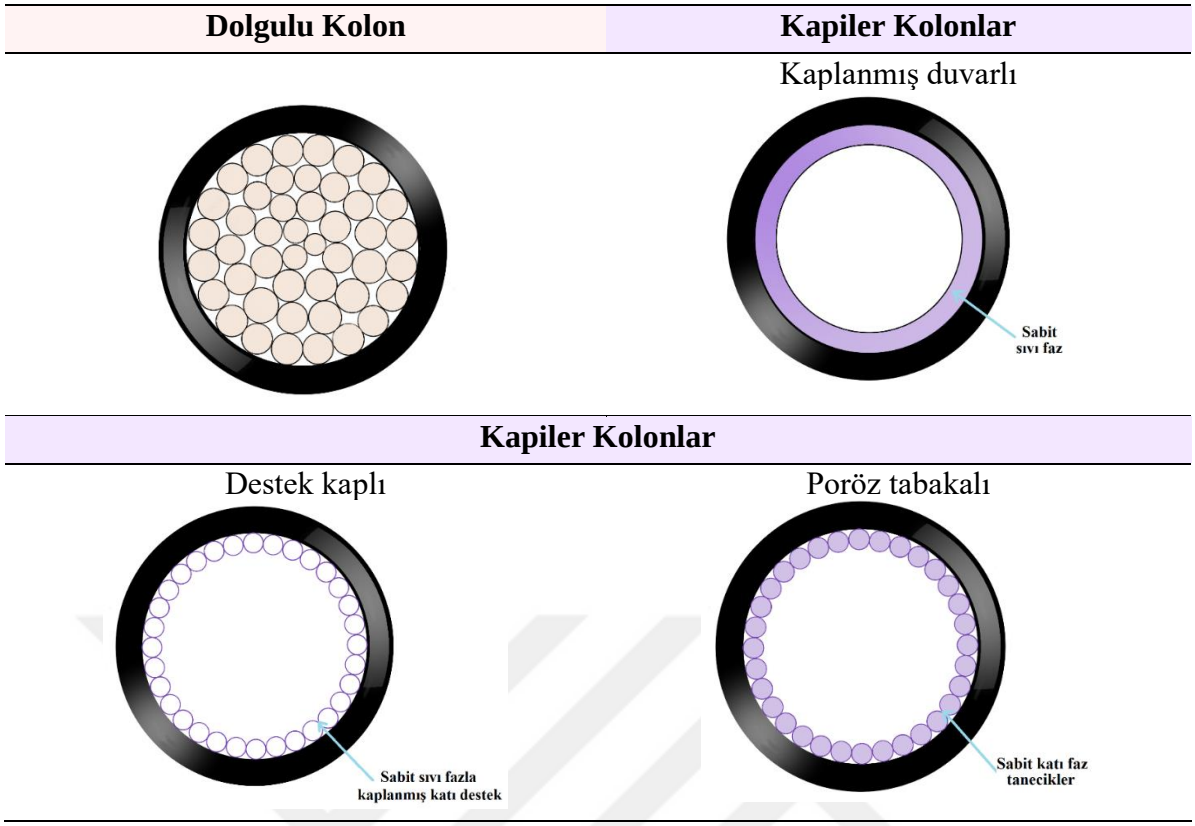
Şekil 12: Splitless enjeksiyon sistemi (98)

- **Doğrudan kolona enjeksiyon (100):** Bu enjeksiyon türünde, numune, herhangi bir ısı olmadan kolona doğrudan verilmektedir, kolona sıvı olarak girdiği için buharlaşma olmamaktadır. Buharlaştırma, kolonun sıcaklık programı ile sağlanmaktadır.

Kolon (92,98)

Kolon, bir GC sisteminin kalbi olarak kabul edilmektedir. GC sisteminde dolgulu ve kapiler olmak üzere 2 tip kolon kullanılmaktadır (Şekil 13). Belirli bir ayırma yöntemi için uygun olan kolonun seçimi; numunenin, numune matrisinin ve çözücünün kimyasal doğasına bağlıdır. Bir kolonun ömrü kolonun yapısından çok maruz kaldığı kimyasal ve fiziksel etkilere bağlıdır.

- **Dolgulu kolonlar:** Parçacıklı malzemelerle doldurulmuş cam veya paslanmaz çelik tüptür.
- **Kapiler kolonlar:** Tipik bir kapiler kolon, sıvı faz, adsorban malzeme ile kaplanmış veya kimyasal bir bağlanma tabakasına sahip olan ince, silika cam bir tüptür.



Şekil 13: Gaz kromatografisi kolon çeşitleri

Kolon fırını (92)

Kolon fırını içerisinde kolonu bulundurmaktadır. Fırın, kolonda sabit sıcaklık veya sıcaklık artışını sağlamak için bir hava termostatı görevi görmektedir.

Dedektörler (101-103)

Dedektörler, kolondan çıkan analitlerin varlığını ve miktarını saptamak için kullanılmaktadır. Kromatografik yöntemlerin her birinin kendine özgü farklı dedektör tipi vardır. Uygun dedektör seçerken analitin özellikleri dikkate alınmaktadır. Dedektörler arasında en güçlü olanı Kütle Spektrometresi (MS) olmakla beraber yaygın olarak kullanılan dedektörler aşağıdaki gibidir:

- Kütle Spektrometresi (MS),
- Elektron Yakalama Dedektörü (ECD),
- Alev İyonizasyon Dedektörü (FID),

- Isı İletkenlik Dedektörü (TCD),
- Fotoyonizasyon Dedektörü (PID),
- Azot Fosfor Dedektörü (NPD).

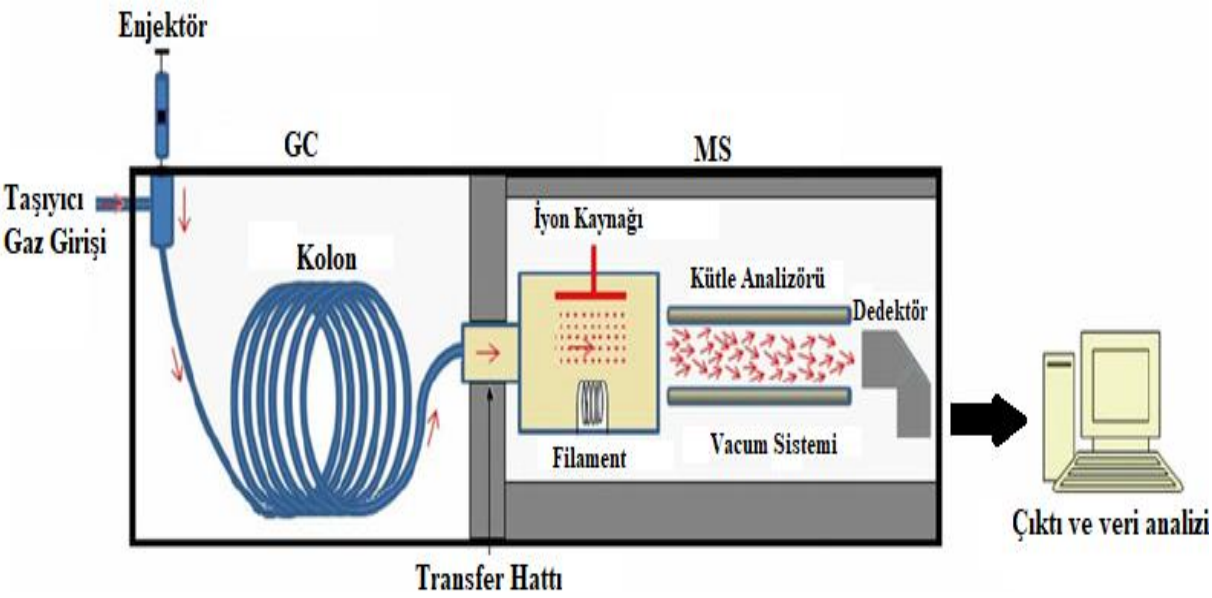
Kütle spektrometresi (101,104,105): MS, küçük miktarlarla bile kalitatif ve kantitatif analitik veriler sağlayabilen, son derece hassas ve spesifik bir analitik tekniktir. MS, gaz fazındaki numunenin iyonlaşmasına ve parçalanmasına dayanmaktadır. Kolondan çıkan numune, MS sisteminin giriş kısmına gelmektedir. Burada elektron çarpmalı iyon kaynağı tarafından iyonlaştırılmaktadır. Parçalanan moleküller kütle analizine girmekte ve burada kütle/yük oranlarına göre sıralanmaktadır (Şekil 14). Böylece kromatogram maddenin alıkonma zamanını belirlerken, MS numune içerisindeki maddelerin tespitini yapmaktadır. MS, ucuz ve kullanımının kolay olması nedeniyle sıklıkla kullanılmaktadır. Adli bilimlerde MS, kontrole tabi maddeler dahil olmak üzere birçok kanıt ve bulgunun kesin olarak tanımlanmasını sağlamaktadır. MS genellikle GC ya da LC sistemi ile birleştirilerek kullanılmaktadır.

Veri işlemcisi (92)

Verileri kaydetmek, depolamak ve analiz etmek için kullanılmaktadır.

2.3.2. Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS)

MS sisteminin GC sistemi ile kullanılması sonucu GC-MS sistemi oluşmaktadır. Şekil 14'te GC–MS sisteminin ana bileşenlerinin şematik bir çizimi verilmektedir. Her iki sistemde gaz fazında kullanılmakta, çalışma sıcaklık aralığı karşılaştırılabilmekte ve düşük madde miktarları çalıştırılabilmektedir. Analitlerin yapıları hakkında elde edilen mevcut bilgiler, GC-MS sisteminin sağlayabileceği en büyük kazanımlardan biridir (92,101,106).



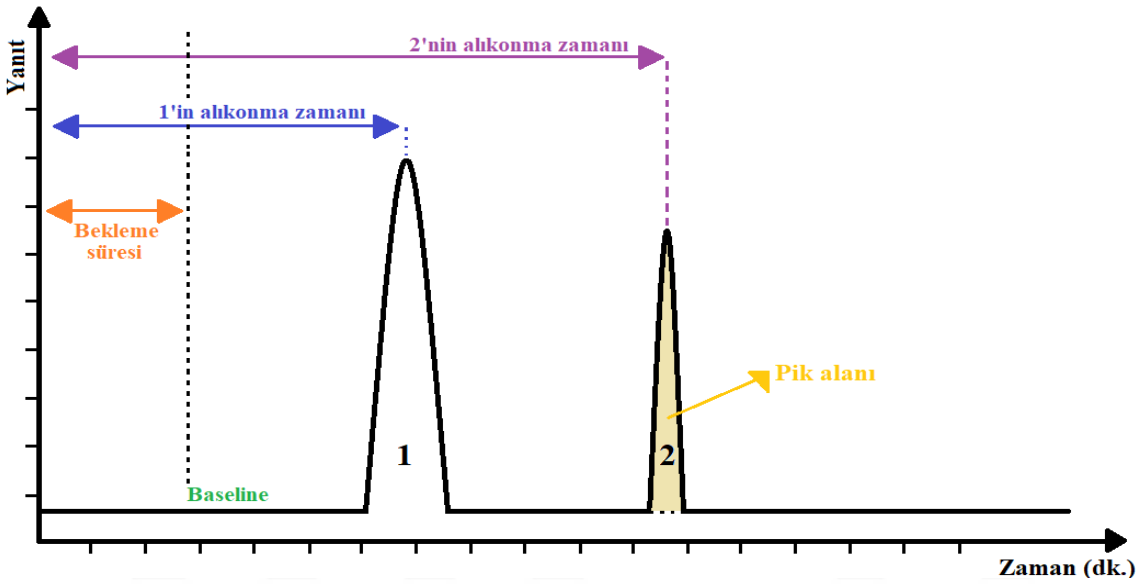
Şekil 14: GC–MS sisteminin ana bileşenlerinin şematik çizimi (107)

Analizi yapılacak olan numune GC bölümünde, bileşenlerine ayrılmaktadır. Kolondan farklı zaman aralıklarında ayrılan bileşenler MS sisteminin girişine gelerek iyonlarına ayrıştırılmaktadır. İyonlar kütle analizine girerek kütle yük oranlarına göre ayırmakta ve veri sistemine gönderdiği elektronik bir sinyalleri bir grafiğe dönüştürmektedir, buna kromatogram denilmektedir. MS, analiz edilen piklerin adlandırılmasını ve nicel analizlerinin yapılmasını mümkün kılmaktadır. Düşük konsantrasyondaki analitler daha küçük pikler, yüksek konsantrasyondaki analitlerse daha yüksek pikler göstermektedir. Şekil 15'te iki farklı bileşen için varsayımsal gaz kromatogramı verilmektedir, pikler tipik bir Gauss şekline sahiptir. Enjeksiyon hızı, maddenin akış hızı ve kolon sıcaklığı gibi özellikler pik boyutunu etkileyebilmektedir (92,94,101).

İç standart (IS)

Analizlerde oluşabilecek belirsizlikleri önlemek için numuneye belirli miktarda iç standart (IS) eklenmektedir (94). Neredeyse tüm biyoanalitik testler, numuneyle beraber işlenen IS kullanımını içermektedir. IS, numuneden numuneye görülebilecek farklılıkları telafi etmeye yardımcı olmakta ve tüm numunelere eşit miktarlarda eklenmektedir (108). IS'nin eklenmesinin

faydaları, numune hazırlama sırasında oluşabilecek kayıpları, enjeksiyon hacmindeki değişiklikleri ve iyon bastırma nedeniyle MS yanıtındaki analit kayıplarını düzeltmek veya telafi etmektir. IS'nin analizi yapılacak analit ile benzer fizikokimyasal özelliklere sahip olması ve benzer davranış göstermesi beklenir ancak analitin herhangi bir dönüştürülmüş ürününe benzer olmamalı veya dönüşmemelidir (109).



Şekil 15: Bir GC veya GC-MS'den kromatogram çıktısı

2.3.2.1 GC-MS tarama teknikleri (99,106)

Tam tarama metodu (SCAN):

Tam tarama analizinde, tanımlanmış bir kütle aralığı içindeki ve belirli bir yoğunluk eşiğinin üzerindeki tüm iyonlar saptanmaktadır. Numunede ilgilenilen türlerin tanımlanması ve miktar tayini için araştırmayı sınırlamadan önce numunenin tam tarama metodu ile bir taramasının yapılması gerekmektedir. Tam tarama metodu, yaygın olarak kullanılan kütle spektral kütüphanelerinin temelidir.

Seçilmiş iyon izleme metodu *(SIM):*

SIM metodu belirli bir analite özgü olarak kütle/yük oranını kaydetmeye odaklandığından, analitleri yüksek oranda seçmeye yarayan, hedef analizi için kullanılan bir

tarama tekniğidir. SIM modunda, tam tarama metodundaki gibi bütün iyonlar saptanmaz. Bir yerine birden fazla analite bakılıyorsa "çoklu iyon izleme metodu" (MIM) olarak adlandırılmaktadır. SIM metodunda hedef analit haricindeki maddeler saf dışı bırakılmakta, böylece artan sinyal gücü ile analiz daha hassas hale getirilmektedir. Yüksek örnekleme hızı, sinyal eşlemenin doğruluğunu artırmaktadır. Bir SIM analizi için maddeye özel hedef iyonların seçimi, spektral veri tabanlarından veya daha iyisi referans bileşiğin GC tam tarama analizinden çıkarılabilen analitin kütle spektrumu bilgisini gerektirmektedir. İyon başına daha uzun algılama süresi ve daha yüksek örnekleme oranları, SIM metodunu, tam tarama metodundan 10-100 kat daha hassas yapmaktadır.

2.3.2.2. GC-MS'in adli bilimlerdeki önemi (110-112)

İçeriği bilinmeyen karışımlardan bileşenleri ayırabilme, tanımlayabilme ve analiz edebilme yeteneğinden dolayı GC-MS adli toksikoloji alanında altın standart olarak kabul edilmektedir. Bunun sebebi kolondan ayrılan maddelerin standart 70 elektron volt parçalanma enerjisi ve aynı parçalanma metodu ile dünyanın heryerinde aynı şekilde kullanılmasından kaynaklanmaktadır. Bu sayede bütün maddelerin kütle spektrumları ile geniş bir kütüphane oluşturulmaktadır. Bu da GC-MS sistemini, adli toksikolojide yapılan analizlerde eşsiz kılmaktadır.

2.3.2.3. GC-MS analizleri için numune hazırlanması (90,113,114)

Çoğu numune, doğrudan GC sisteminde analiz edilmeye uygun değildir. Kolon dolgusunun su ile temas etmemesi gerektiği için, su bazlı tüm örneklerin ön işleme tabi tutulması gereklidir. Numune hazırlama olarak da adlandırılan bu ön işlemler, belirli bir prosedür ile yapılmalıdır. Cihazdan doğru ve güvenilir sonuçlar alabilmek için numune hazırlama, analizden önceki en önemli adımdır. Numunenin karmaşıklığına bağlı olarak numune hazırlama süreci birden fazla aşamadan da oluşabilmektedir. Karışık bir numunenin içerisindeki maddeleri analiz edebilmek için çeşitli işlemler ile olabildiğince saf hale

getirilmelidir. Numunemiz sıvı ise çekitlemeyle, katı ise uygun çözücüde çözerek, hedef bileşikleri (analit) matriks ortamından uzaklaştırıp, ona uygun olan bir çözücüye hapsetmek amaçlanmaktadır. Analitin özelliklerine göre ekstraksiyon, hidroliz, türevlendirme ya da protein çöktürme gibi analiz öncesi farklı yöntemlerin birkaçı veya hepsi kullanılabilmektedir.

Türevlendirme (115)

Türevlendirme; amin, hidroksil, asit gibi sübstitüentleri olan ve yüksek kaynama noktasına sahip bileşiklerin, GC'de kuyruklu pik vermemesi için, ticari olarak satılan alkilleme ajanları ile reaksiyona girmeleri sağlanarak, uçucu hale getirilmesi ve böylece GC'de analizi uygun hale getirilmesidir. Böylece uçuculuğu az ve/veya polar özellikli maddeler, türevlendirme ile kararlı, uçucu ve apolar özellikli türevlere dönüştürülmektedir. Artık türevli bu bileşiğin dolayısıyla farklı kütle spektrumu olacağı akıldan çıkarılmamalı, ortaya çıkan yeni iyonların çokluğu tanı değerini de olumlu yönde etkileyebilmektedir. Opium ürünlerinden biri olan morfin, GC ile doğrudan analiz edilemez, türevlendirmesi için genellikle sililasyon ve asilasyon kullanılmaktadır. Bu tür analitlerin türevlendirilmesinde en çok kullanılan reaktifler, ticari olarak piyasada yer alan BSTFA veya MSTFA'dır.

Protein çöktürme (116)

Numune içerisinde bulunan proteinlerin saf dışı bırakılmasını amaçlayan hızlı ve basit bir tekniktir. Metanol, Asetonitril gibi organik çözücüler kullanılacak yönteme uygun seçilip, numune ile karıştırılmakta, santrifüj edilen numunenin üst kısmı ile alt kısım karıştırılmadan alınarak analiz için kullanılmaktadır. Bu teknikte kullanılacak çözücü seçimi çok önemlidir.

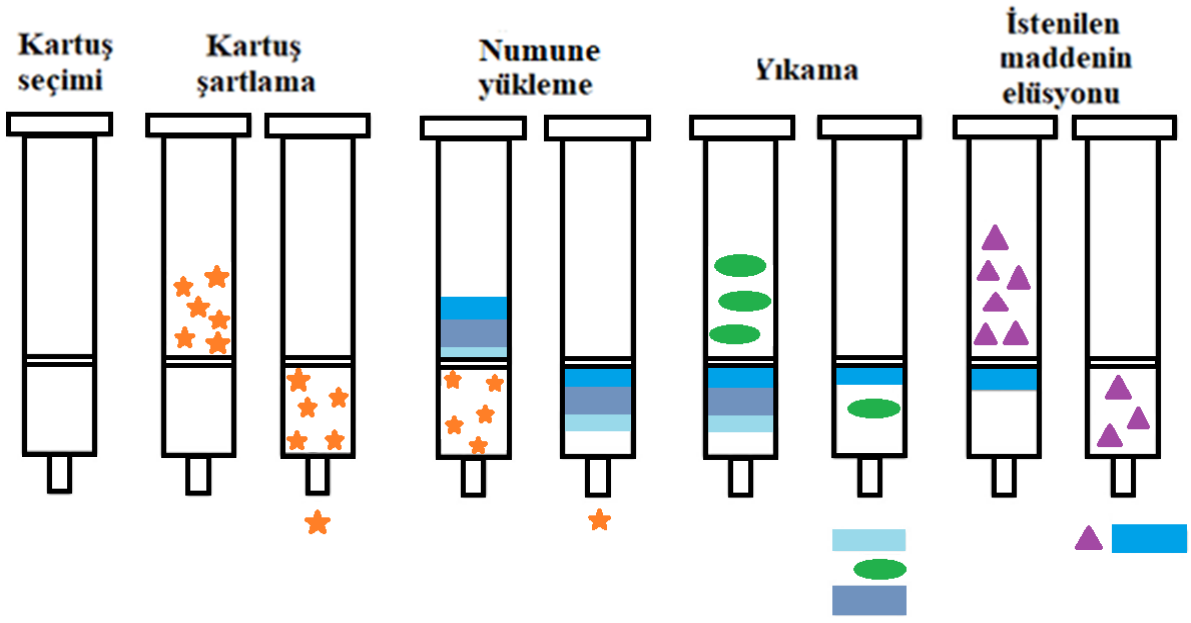
Ekstraksiyon yöntemleri

- *Katı faz ekstraksiyon (SPE):*

SPE, genellikle gaz veya sıvı fazdan, seçilen analitlerin izolasyonu için yaygın olarak kullanılan bir numune hazırlama yöntemidir. SPE'nin temel amaçları maddenin

yoğunlaştırılması, kullanılan matrisin temizlenmesi ve kromatografik sistem için uygun çözücüye geçirilmesi amacıyla ortam değişimidir. SPE, seçili analitleri izole etmek için spesifik reçinelerden yapılmış bir katı faz kullanılmaktadır. Böylece numune katı fazdan geçerken, bu fazın hidrofilik veya hidrofobik doğası tarafından tutulmaktadır. SPE Genel olarak dört adımdan oluşmaktadır (Şekil 16) (98,113,117):

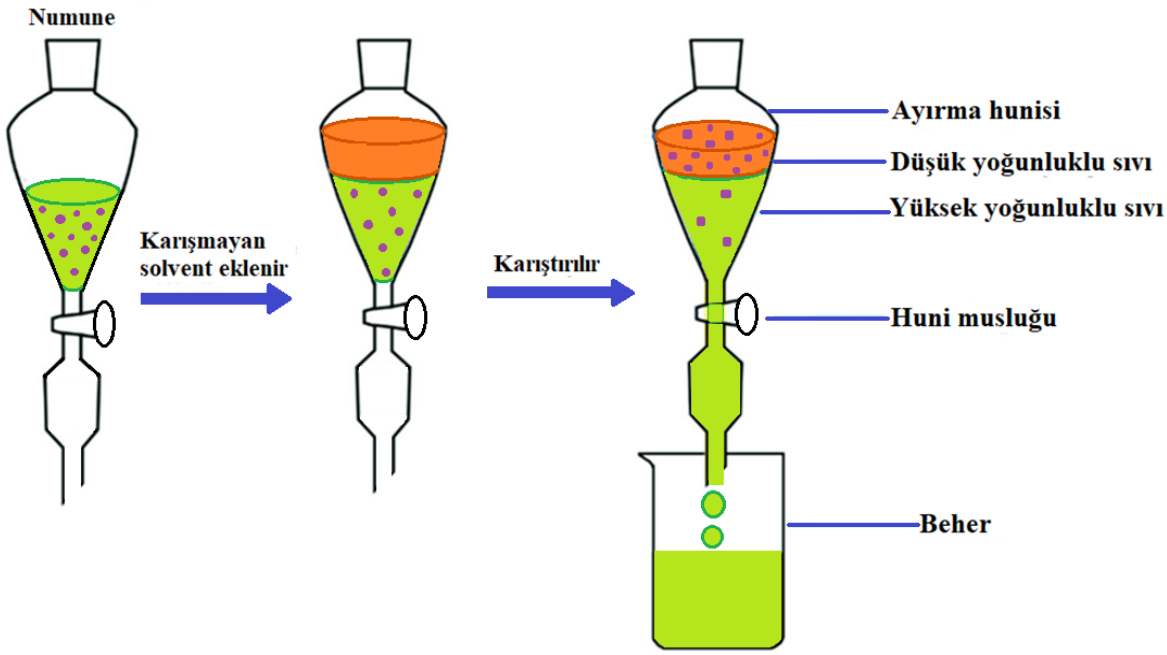
1) **Kartuş şartlama veya ön yıkama**: SPE kartuşu çözücü ile yıkanarak şartlanır.
2) **Numune yükleme**: Numune kartuştan geçirilir. Kartuşlar, C8 (8 karbon uzunluğu) veya C18 (18 karbon uzunluğu) gibi değişken hidrofobik özelliğe sahiptir.
3) **İstenmeyen kirleticileri gidermek için yıkama:** İstenilen maddenin alınabilmesi adına çözücü ile yıkanır.
4) **Analitin elüsyonu:** Absorbe edilen analitler, uygun bir yıkama solventi ile geri kazanılır. Elüsyon edilen numune, kullanılacak yönteme göre uygun bir çözücüye aktarılır.



Şekil 16: SPE yöntemi

- *Sıvı sıvı ekstraksiyon (LLE):*

LLE, hedef molekülün (analit) iki sıvı faz arasında farklı dağılımına dayanan ucuz, verimli ve zahmetli bir ayırma işlemidir (118). Ayrıca ekstraksiyon işlemi uzun sürer ve çevreye zararlı olabilecek büyük miktarlarda kimyasal kullanımı gerektirebilmektedir (119,120). Analiti içeren numune bir huniye yerleştirilmekte, üzerine numune ile karışmayacak ve numuneye yakın hacimde olan bir çözücü (örneğin; Diklorometan, Hekzan, Kloroform, Etilasetat) eklenerek çalkalanmakta ve bu iki sıvı arasında faz oluşturulmaktadır. Analit özelliğine göre tercihli olarak üzerine eklenen çözücü içine geçmeye teşvik edilmektedir (Şekil 17). İçerisinde istediğimiz analitin bulunduğu kısıma ekstrakt, geri kalan ve atık kısma ise rafinat denilmektedir (118,119).



Şekil 17: LLE yöntemi

2.3.3. Petidin ve metabolitlerinin tespiti için yapılmış analizler

Adli toksikolojide biyolojik örneklerden uyuşturucu ya da ilaç kullanımının belirlenmesi oldukça önemlidir. Kötüye kullanılan ilaçların analizi için genellikle plazma, idrar ve oral sıvılar kullanılmaktadır (57,121,122). Örnekleme için mevcut birden fazla biyolojik

materyalin varlığı, incelecek analit için en uygun örneğin seçilebilmesine olanak sağlamaktadır (123). İdrar, toksikolojide geniş bir dedeksiyon penceresine sahip olması avantajı nedeni ile ilacın kimyasal özelliğine göre kişinin geçmiş kullanımını belirlenmesinde çok önemli bir biyolojik örnektir. Ayrıca idrar analiz kolaylığı, numune hazırlama prosedürünün basit olması ve kana göre nispeten daha az bozunma göstermesi gibi avantajlar sağlamaktadır (57,115,122). İdrar invaziv olmayan bir şekilde toplanabilir, idrar toplamak için eğitimli personel gerekli değildir (115,125,126). Bu nedenlerle, idrar analizi diğer biyolojik örneklerden daha çok tercih edilmektedir (57).

Ana ilaç ve metabolitlerinin seviyelerini belirlemek için hassas, tekrarlanabilir ve hızlı bir analiz yöntemine ihtiyaç vardır (22). Pet en çok kötüye kullanılan ilaçlardan biridir (57). Bu nedenle, insan vücut sıvılarında Pet'in kötüye kullanımını belirlemek için analiz yöntemlerine ihtiyaç vardır. Literatürde, plazma ve idrar gibi biyolojik sıvılarda, Pet ve metabolitlerinin belirlenmesi için çeşitli yöntemler tarif edilmiştir (125). Pet analizi için, GC-ECD, GC-yüzey iyonizasyon dedektörü (GC-SID), GC–MS/MS, LC – MS, GC-MS, UHPLC-MS / MS gibi birçok kromatografik yöntem bildirilmiştir (20,57,121,122,127,128). Bazı prosedürler türevlendirme gerektirmektedir (50,122). Pet ve metabolitlerinin bir arada türevlendirilmesi sırasında yaşanan en büyük sorun, Pet ve NPet'in sıklıkla aynı maddeye dönüşmesidir (20, 50). PetA gibi asitler ise, türevlendirilmedikçe GC tarafından ayırma işlemi gerçekleşmez ve analiz edilemez, saptanamaz (120). Literatürden elde edilen sonuçlara göre PetA, Pet ve NPet'den daha yüksek konsantrasyonda atıldığı için idrarda bulunmaması, kişinin Pet kullanmadığını gösteren güçlü bir kanıt olacaktır (21), Ayrıca NPet, Pet'e oranla idrarda daha çok bulunur bu nedenle Pet'in kötüye kullanımını belirlemek için Pet'den daha avantajlı olabileceği düşünülmektedir (20,21).

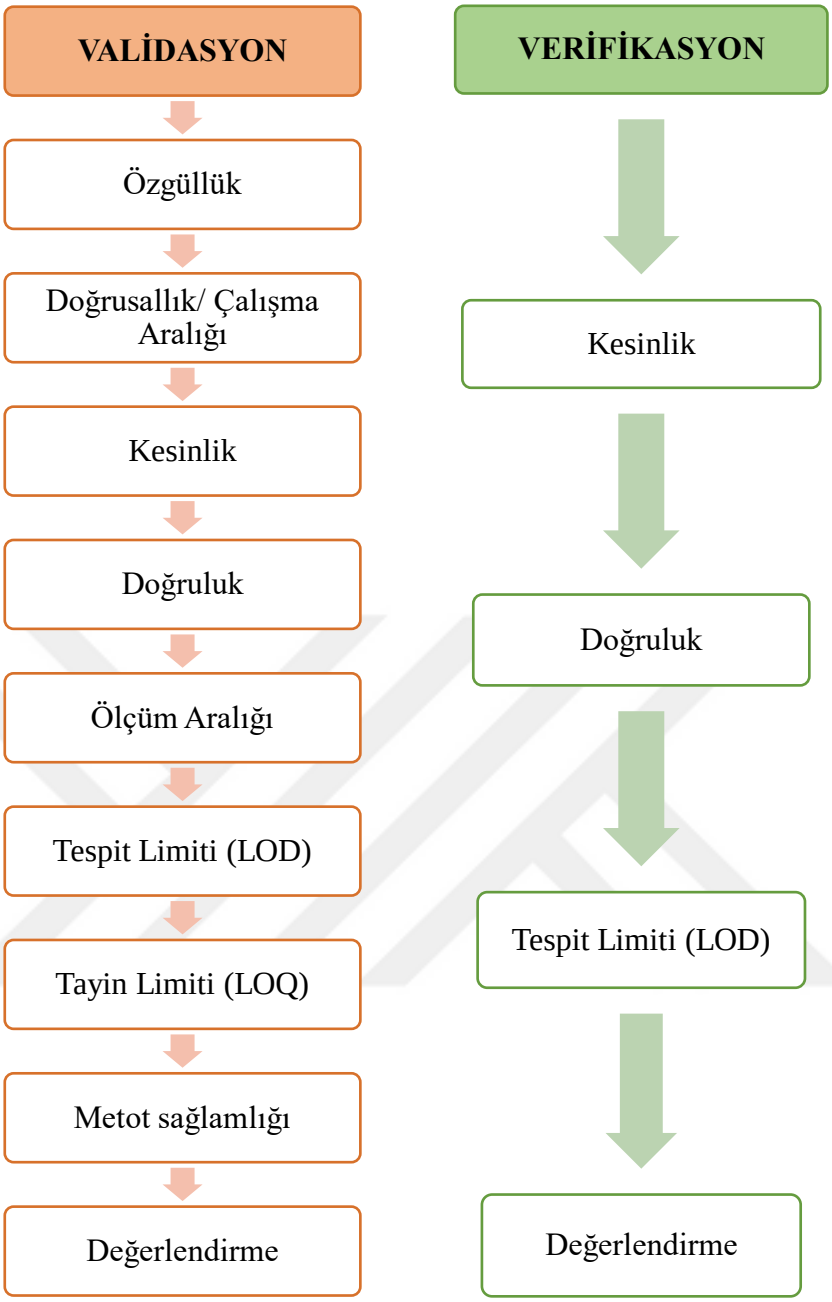
2.4 Analitik Yöntemlerin Validasyonu

Adli ve klinik toksikolojide yapılacak yeni analitik yöntemler, güvenilir bir yöntem geliştirmeyi ve ardından bu yöntemin detaylı bir doğrulamasını gerektirmektedir (129). Bir yöntemin, bir analizde kullanımının uygun olup olmadığını doğrulamak için bu yöntem valide edilmeli yani geçerli kılınmalıdır (130). Validasyon ile verifikasyon terimi sıklıkla karıştırılmaktadır (131). Validasyon, Ulusal ve Uluslararası standartlara göre; bir yöntemin belirli bir amaç doğrultusunda, güvenilirliğinin ve uygunluğunun oluşturulduğu çalışmalar bütünü tanımlanmaktadır (132, 133). Validasyon; yeni bir analitik yöntemin geliştirilmesi, yerleşik analitik bir yöntemin performansını arttırmak için yapılacak modifikasyonlarının geliştirilmesi gibi durumlarda yapılmaktadır (130). Verifikasyon diğer adı ile doğrulama; geçerli kılınmış bir metotun, kullanılmadan önce tekrardan laboratuvar şartlarında kanıtlanmasıdır (131, 133). Yöntemin tekrar valide edilmesine gerek yoktur. Tekrarlanabilirlik çalışmaları yapılarak bulunan değerler karşılaştırılabilmektedir (134).

Analitik yöntemler, biyolojik örneklerde maddelerin taranması ve tanımlanması, miktarlarının belirlenmesi için kullanılmaktadır. Kantitatif biyoanalitik prosedürlerde genellikle kullanılan validasyon parametreleri aşağıdaki gibidir (129,131,133,134):

- Özgüllük
- Seçicilik
- Doğrusal Çalışma Aralığı (Kalibrasyon Eğrisi)
- Tespit Limiti (LOD) ve Tayin Limiti (LOQ)
- Doğruluk: Kesinlik (Tekrar edilebilirlik ve Tekrar üretilebilirlik) ve Gerçeklik (Geri Kazanım ve Bias)

Kimyasal analizlerde kullanılan validasyon parametrelerinin validasyon ve verifikasyon ayırımına dair akış şeması Şekil 18'de verilmiştir (131).



Şekil 18: Validasyon parametrelerinin validasyon ve verifikasyon ayırımı (131)

2.4.1. Validasyon hazırlık çalışmaları

İlk aşamada analizi yapılacak madde belirlenmelidir. Birden fazla maddenin analizi yapılacaksa validasyon her madde için yapılmalıdır (134). Çalışılacak analitik yöntem için kullanılacak maddelerin hangi konsantrasyonlarda olması gerektiği, hangi matrikslerde

çalışılacağı, hangi validasyon parametrelerinin kullanılacağı yöntemin içeriğine göre belirlenmelidir (133).

Kullanılacak materyaller (133)

Kör numune

İçerisinde aradığımız analiti içermeyen boş matrikse kör numune (blank), belirli konsantrasyonlarda analit koyulmasına yani kirletilmesine ise spike denir. Spike edilen kör numuneler, seçilen yönteme göre hazırlanarak analiz edilmektedir. Gerek validasyon gerekse verifikasyon işlemlerinde, spike yapmak için kör numune gerekmektedir.

Kör kimyasal

Numune analizi yapılmadan önce, analizde kullanılan bütün kimyasalların analiz edildiği çözeltilere kör kimyasal ya da Reagent blank denilmektedir. Böylece analizde kullanılan bütün kimyasalların, analiz sonuçlarını etkileyip etkilemediğine bakılabilmektedir.

Numuneler ve standartlar

Numuneler, analiz yöntemlerine göre hazırlanıp analiz edilmekte ve içerisinde bulunan analitin konstantrasyon oranı/oranları belirlenmektedir. Çalışılacak metota uygun olmasına bakılarak referans standartlar (saflığı bilinen kimyasal maddeler) ya da içerisinde ne kadar analit içerdiği bilinen sertifikaya sahip maddeler seçilmektedir.

Konsantrasyon seviyelerinin belirlenmesi (133)

Doğrusal çalışma aralığında elde edilen aralık göz önünde bulundurularak düşük, orta ve yüksek olmak üzere üç farklı konsantrasyon noktası belirlenmelidir. Çalışma aralığı belirlerken, gerçek numune örneklerde karşılaşması en olası gözüken konsantrasyon seviyelerinin seçilmesine özen gösterilmelidir. Seçilecek düşük konsantrasyon seviyesi LOQ

değeri olabilir. Eğer seçilen LOQ değeri gerçek numunede gözlenemeyecek kadar düşük ise, analist öngördüğü düşük bir seviye belirleyebilmektedir.

2.4.2. Validasyon parametreleri

2.4.2.1. Özgüllük

Özgüllük, belirli şartlar altında içerisinde var olması beklenen bileşenlerle, beklenen analitin açık bir şekilde değerlendirilebilme yeteneğine denir. Kısaca numunedeki analitin, numune içerisindeki diğer maddelerden ayırt edilebilme yeteneğidir. Özgül olmayan analitik metotlar, farklı analitik yöntemlerle telafi edilebilmektedir (133, 134).

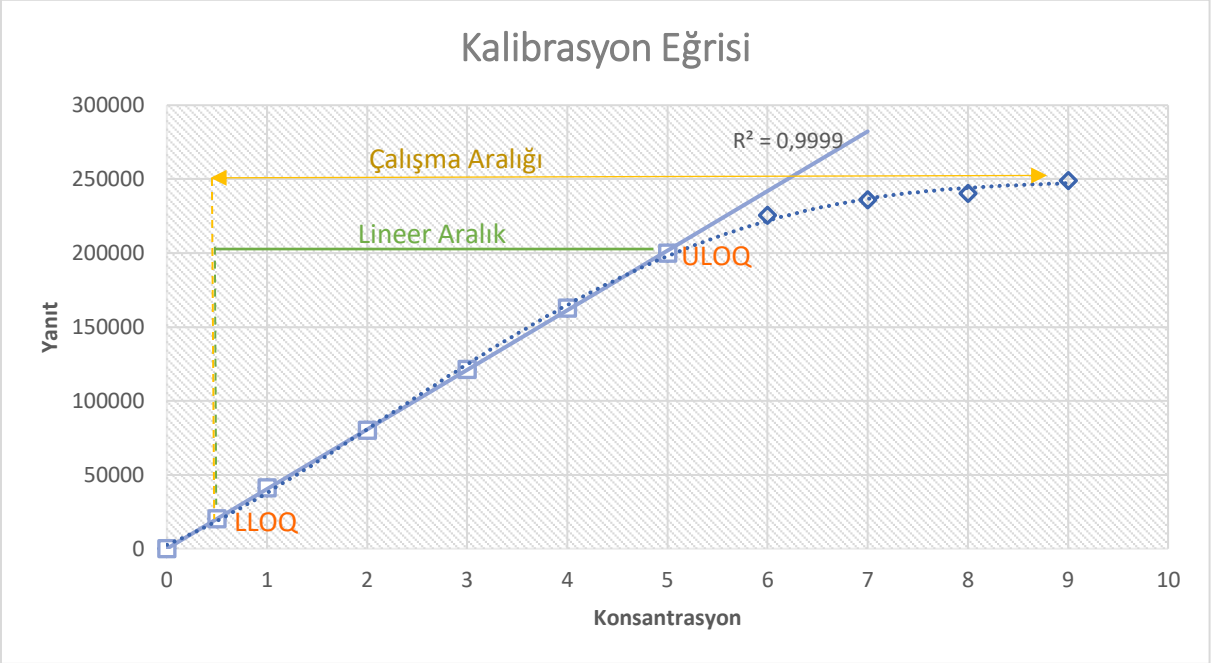
2.4.2.2. Seçicilik

Seçicilik, analitik yöntemin, numune ve matrikslerde aranan analitin ve IS'nin varlığını kesin olarak ölçebilme ve diğer maddelerden ayırt edebilme yeteneğine denir (135). Bir yöntemin seçici olabilmesi için iki yol biçimi benimsenmiştir. Birinci yol; aranan analitin boş matrikste yanıtının olmaması gerekmektedir. Boş matriks, en az 6 kez analiz edilerek olası girişimler açısından değerlendirilmelidir (129). İkinci yol ise; sadece nicel prosedürler için geçerli olup doğruluk ve kesinlik parametrelerinin sınırları içerisinde kaldığı müddetçe küçük boyutlardaki girişimlerin kabul edilebileceğine dayanmaktadır. Bu yolda düşük miktar ölçüm limitinin (LLOQ) doğruluk ve kesinlik parametreleri geçerli sayılırsa yöntem seçici olarak kabul edilebilmektedir (129,133).

2.4.2.3. Doğrusal çalışma aralığı

Analitik yöntemler açışından çalışma aralığı, en düşük (LLOQ) ve en yüksek (ULOQ) konsantrasyonlar dahil olmak üzere yöntemin bütün sonuçlarını içermektedir (131,134). Çalışma aralığı belirlendikten sonra kalibrasyon numuneleri hazırlanarak ve analiz edilmektedir (134,136). Elde edilen sinyal yanıtı ile analit konsantrasyonu arasında korelasyon vardır ve bu

korelasyona göre kalibrasyon eğrisi çizilmektedir (130). Kalibrasyon eğrisi çalışmadaki her analit için hazırlanmalıdır (134). Kalibrasyon eğrisi regresyon analiziyle değerlendirilerek sinyaller, konsantrasyonlar ve korelasyon katsayısı arasındaki ilişki hesaplanır böylece çalışma aralığının doğrusal olup olmadığına bakılmaktadır. Lineerlik diğer adı ile doğrusallık, analitin konsantrasyonu ile doğru orantılı olacak şekilde sonuç verebilme yeteneğine denir (131). Bir kalibrasyon eğrisinin lineer olabilmesi için kolerasyon katsayısının 1'e yakın olması beklenir (131,133). Şekil 19'da örnek bir kalibrasyon eğrisi verilmektedir.



Şekil 19: Kalibrasyon eğrisi

Çalışma aralığının tanımı herkes tarafından kabul görmekte iken; her konsantrasyon noktasının kaç kez tekrarlanması gerektiği konusunda fikir ayrılıkları yaşanmaktadır (129). Birçok literatür en az 5 kalibrasyon noktası ve bu kalibrasyon noktalarının en az 5 tekrarlanması gerektiğini belirtmektedir (130,134,136). Eurachem rehberine göre en az 6 kalibrasyon noktası ve her nokta için 3 tekrar yapılması, Uluslararası Standardizasyon Örgütü (ISO) 11095'e göre en az 3 kalibrasyon noktası ve her kalibrasyon noktası için en az 2 tekrar yapılması gerektiği belirtilmiştir (131,136).

2.4.2.4. Tespit ve tayin limiti (LOD, LOQ)

LOD, bir numunede içerisindeki analit miktarının tespit edilebildiği ancak nicelleştirilmesi gerekmeyen en düşük konsantrasyondur. LOQ, bir numunede içerisindeki analit miktarının tespit edilebildiği ve nicel olarak belirlenebildiği en düşük konsantrasyondur (134,136). Tüm analiz yöntemleri için LOD ve LOQ çalışmaları yapılmalıdır. Bu çalışmalar için en az 6, tercihen 10 analiz yapılarak bulunan sonuçların ortalamaları, standart sapmaları hesaplanmalıdır (129,130,136). LOD ve LOQ çalışmaları için çeşitli yaklaşımlar mevcuttur (130,133).

2.4.2.5. Doğruluk

Doğruluk, ölçüm sonucu elde edilen değerin referans değerine yakınlığını yüzde cinsinden ifade etmektedir. Doğruluk parametresi, gerçeklik ve kesinlik olmak üzere 2 bileşenden oluşmaktadır (131,133,134).

Gerçeklik (Geri kazanım ve Bias)

Gerçeklik, belirli sayıda ölçülen değerlerin ortalaması ile referans değerin ne kadar yakın olduğunun göstergesidir. Gerçeklik; bias ve geri kazanım olarak incelenmektedir. Ölçülen değerler ile referans değeri arasındaki farka bias denir ve yöntemin gerçek sonuç verebilme yeteneğini göstermektedir. Biasin hesaplanabilmesi için referans değerin bilinmesi gerekmektedir (131,133). Geri kazanım; zenginleştirilmiş boş matriksteki analit konsantrasyonunun, tespit edilen analit konsantrasyonuna oranı olup yüzde olarak ifade edilmektedir (133). Geri kazanım çalışmalarında orijinal matriksin kullanılması çalışmalar için büyük avantaj sağlamaktadır (131). Geri kazanım sonuçlarının %80-120 arasında olması çalışmanın başarılı olduğunu göstermektedir (138). Eurachem rehberine göre; geri kazanım çalışmaları için çalışma aralığına göre birkaç kalibrasyon noktası belirlenmeli ve bu kalibrasyon

noktaları en az 6 kez tekrar edilmelidir (131). Yüzde geri kazanım (%G.K.) hesaplamalarında kullanılan formül aşağıda verildiği gibidir (133).

$$\%G.K. = (G1 / G0) \times 100$$

G0: Eklenen analit konsantrasyonu, G1: Miktar tayini sonucu bulunan analit konsantrasyonu)

Kesinlik (Tekrar edilebilirlik ve Tekrar üretilebilirlik)

Bir yöntemin kesinliği, aynı numunenin belirli şartlar altındaki ölçüm sonuçları arasındaki yakınlığını ifade etmekte ve ölçüm sonuçlarının ortalama değer etrafındaki dağılımını göstermektedir. Kesinlik parametresi tekrar edilebilirlik ve tekrar üretilebilirlik (laboratuvarlar arası ve laboratuvar içi) olmak üzere 2'ye ayrılmaktadır. Kesinlik ifade türleri Tablo VI'da verilmektedir (131,133,134). Çalışma koşulları, numune, analist, laboratuvar, cihaz, laboratuvar (lab) imkânları, ortam şartları ve zaman aralığını kapsamaktadır.

Tablo VI. Kesinlik ifade türleri

Çalışma türü		**Çalışma koşulları**				
		Numune	*Analist*	*Cihaz, Lab imkânları, Ortam şartları*	*Zaman aralığı*	*Lab*
Tekrar edilebilirlik	*Aynı Laboratuvar*	Aynı	Aynı	Aynı	Kısa	Aynı
Tekrar üretilebilirlik	*Aynı Laboratuvar*	Aynı	Aynı/ Farklı	Aynı/ Farklı	Uzun	Aynı
	Laboratuvarlar Arası	Aynı	Farklı	Farklı	Uzun	Farklı

Kesinlik için düşük, orta ve yüksek konsantrasyonlar belirlenmelidir. Belirlenen düşük, orta ve yüksek konsantrasyonlarda en az 6 kez tekrar edilmesi önerilmektedir (131). Kesinlik parametresi, standart sapma, bağıl standart sapma (RSD) ve varyasyon katsayısı (%CV) cinsinden ifade edilebilmektedir. %RSD *d*eğerinin %*20*'den büyük olmaması tercih edilmektedir (131,136,139). Standart sapma, RSD ve %RSD aşağıda belirtilen formül ya da çeşitli programlar kullanılarak hesaplanabilmektedir.

$$\text{Standart sapma (S.S)} = \sqrt{\sum |x - \bar{x}|^2} \Big/ n - 1$$

($\sum$: toplam, x: veri kümesinde bir değer, $\bar{x}$: aritmetik ortalama, n: veri noktası sayısı)

$$\text{RSD} = \text{S.S.} / \bar{x} \qquad \% \text{ RSD} = \text{S.S.} / \bar{x} \times 100$$

- <u>Tekrar edilebilirlik</u>

Tekrar edilebilirlik, bir yöntemin Tablo VI'da belirtilen çalışma koşulları altında elde edilen ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığının değerlendirilmesidir (131,133,134). Koşulların aynı olması nedeni ile beklenen kesinliğinde küçük olması beklenmektedir (131). Belirlenen düşük, orta ve yüksek konsantrasyonlarda en az 6 kez tekrar edilecek şekilde çalışma yapılarak tekrar edilebilirlik verileri elde edilmektedir (133,134).

- <u>Tekrar üretilebilirlik</u>

Tekrar üretilebilirlik, bir yöntemin Tablo VI'da belirtilen çalışma koşulları altında elde edilen ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığının değerlendirilmesidir (131,133,134). Eurachem rehberine göre tekrar üretilebilirlik, laboratuvarlar arası (inter-laboratory) ve laboratuvar içi (intra-laboratory) olmak üzere ikiye ayrılmıştır (131). Belirlenen düşük, orta ve yüksek konsantrasyonlarda farklı günlerde en az 6 kez tekrar edilecek şekilde çalışma yapılarak tekrar üretilebilirlik verileri elde edilmektedir (133,134).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin isim ve markalarına ait bilgiler Tablo VII'de verilmiştir.

Tablo VII. Çalışmada kullanılan kimyasal ve standart maddelerin isimleri ve markaları

MADDE ADI	MARKA
Meperedine HCl (1,0 mg/mL, referans standart madde)	Lipomed
Normeperedine HCl (1,0 mg/mL, referans standart madde)	Lipomed
Pethidine Acid (0,1 mg/mL referans standart madde)	LGC
Varenicline tartrate (≥98%) (iç standart, IS)	Sigma-Aldrich PZ0004-5MG
BSTFA+ %1 TMCS	Supelco
Metanol (MeOH)	Merck
Etil Asetat	Merck
Sodyum Hidroksit	Merck
Distile Su	MilliQ
Asetonitril	Sigma-Aldrich 34851 HPLC, gradient grade, ≥ 99.9%
Hidroklorik Asit	Merck

3.2.Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Gereçler

Çalışmada kullanılan cihazlar ve gereçlerin isim ve markalarına ait bilgiler Tablo VIII'de verilmiştir.

Tablo VIII. Çalışmada kullanılan cihaz ve gereçlerin isimleri ve markaları

CİHAZ / GEREÇ İSMİ	MARKA
Gaz Kromatografisi	Agilent 7820A
Kütle Spektrometresi	Agilent 5977E
Yazılım	Chemstation Data Analysis
Kolon	HP-5MS
Santrifüj	Hettich Universal 320R
Elektronik Hassas Terazi	Mettler Toledo
Evaporatör	Hyper Vap HV-300
Vorteks	Weightlab Instruments WN-V2800
Balon Joje (5,10 mL)	ISOLAB
Falkon Tüp (15, 50 mL)	ISOLAB
Otomatik Pipet (20, 100, 200, 1000, 5000 µL)	Eppendof
Pipet Ucu	ISOLAB
Pastör Pipeti	ISOLAB
Cam Vial	Agilent
Insert Vial	Agilent
pH Test Çubuğu	McolorpHast Universal Indicator
Kartuş	OASIS HLB Cartridge
SPE Düzeneği	CEREX 48
Distile su cihazı	MilliQ Synthesis A10

Tüp sporları	ISOLAB
Eppendorf	ISOLAB
Buzdolabı	Samsung
Parafilm	ISOLAB
Etüv	Thermal 540 SD
Çeker Ocak	İTK 120

3.3. Çalışma Planı, İdrar Örneklerinin Toplanması ve Bireylere Ait Özellikler

26.04.2017 tarihinde S.B. Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi İlaç Dışı Klinik Araştırmaları Etik Kurulu tarafından gerçekleştirilen toplantıda 480 sayılı karar ile çalışmamızın etik kurallara uygun olduğuna karar verildi (Ek-1). S.B. Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nden örnek toplanamamasından kaynaklı, örnek sayısının arttırılması amacı ile "Gönüllü Onam Formu ve Numune Kabul Kriterleri" protokolü çerçevesinde Dr. Öğr. Üyesi Fatma Ferda Kartufan öncülüğünde Medistanbul Hastanesi ile iş birliği yapılabilmesi için 22.02.2022 tarihli 320055 sayılı yazısı ile izin alındı (Ek-2).

Çalışmamızda kullanılan idrar örnekleri, Medistanbul Hastanesi, Plastik Cerrahi Kliniğinde operasyon öncesi anestezi için Pet kullanılan hastalardan gönüllü olarak alındı. Her hastaya araştırmanın amacı, araştırmanın detaylı bilgileri ve bunları anlayarak katılacağına dair onay vermesi gerektiği bilgilendirilerek hasta onam formları imzalatıldı (Ek-3). Toplam 18 hastadan, Pet'in enjekte edilmesinden itibaren 1. ve 3. saatlerinde olmak üzere her hastadan 50 mL'lik steril vida kapaklı idrar kabına 25-30 mL idrar alındı. Toplanan biyolojik numuneler analiz edilinceye kadar +4 derecede (°C) saklandı. İdrar örneklerinin toplanması aşamasında çalışmaya katkı sağlaması amacı ile hastalara ait bazı bilgiler "Olgu Rapor Formu" ile kayıt altına alındı (Ek-4). Tablo IX'da çalışmaya dahil edilen hastaların cinsiyeti, yaşı, boyu, kilosu,

ilaç ya da madde kullanımının olup olmadığı ve hastalara operasyon öncesi (Perop) ve operasyon sonrası (Postop) verilen Pet miktarları verilmektedir. Tablo X'da ilaç ya da madde kullanımı olan hastaların kullandıkları ilaç ya da madde adları verilmektedir.

Tablo IX. Çalışmaya dahil edilen hastalara verilen Pet miktarları ve özellikleri

Hasta No	Cinsiyet	Yaş	Boy (cm)	Kilo (kg)	İlaç Ya Da Madde Kullanımı	Pet Miktarı (mg)	
						Perop	*Postop*
1	Erkek	45	168	75	Var	30	-
2	Kadın	23	160	60	-	30	-
3	Erkek	52	176	96	-	30	-
4	Kadın	40	163	65	Var	30	-
5	Kadın	26	170	78	Var	30	-
6	Kadın	47	165	50	Var	30	-
7	Kadın	24	167	80	-	30	-
8	Kadın	30	167	68	Var	30	-
9	Kadın	26	160	62	-	30	
10	Kadın	28	174	65	-	30	
11	Kadın	47	165	73	Var	30	20
12	Kadın	33	169	73,6	-	30	20
13	Kadın	29	169	90	-	30	30
14	Kadın	29	158	61	-	30	20
15	Kadın	32	162	73	-	30	20
16	Kadın	24	163	89	Var	30	20
17	Kadın	38	168	89	Var	30	20
18	Kadın	35	157	69	Var	30	20

Tablo X. İlaç ya da madde kullanan hastaların kullandıkları ilaçlar

Hasta No	Kullanılan ilaç ya da maddenin adı
1	Dexilant 60 mg, Duspatolin 135 mg, Lyrica 75 mg
4	Levotiron 25 mg
5	Esram 30 mg
6	Mesalatin
8	Marihuana
11	Collogen
16	Vitamin
17	Ventolin Puff
18	İbuprofen

Kontrol grubu olarak, aralarında akrabalık ilişkisi olmayan, herhangi bir ilaç kullanmayan kişiler seçilerek, araştırmanın amacı, araştırmanın detaylı bilgileri ve bunları anlayarak katılacağına dair onay vermesi gerektiği bilgilendirilerek hasta onam formları imzalatıldı. Gönüllü kişilerden 50 mL'lik steril vida kapaklı idrar kabına 25-30 mL idrar örnekleri alındı. Alınan idrar örneklerine Pet ve metabolitlerini eklemek amacı ile GC-MS cihazıyla bir yöntem geliştirildi. Çalışmamızda yeni doğan ve böbrek yetmezliği olan hastalarda ilacın yarılanma ömrü artmakta olduğu için bu hasta grubu dışlanmıştır.

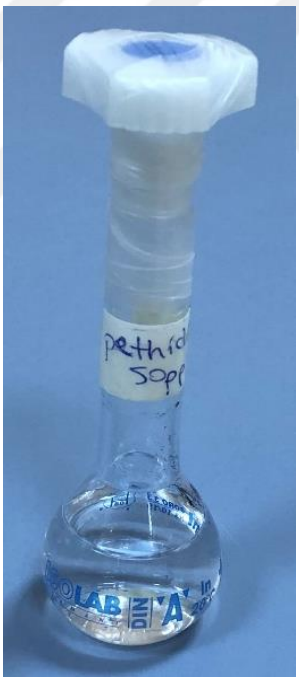
3.4.Petidin ve Metabolitlerinin Analizi

3.4.1. Petidin ve metabolitlerinin analizinde kullanılan çözeltiler

Hazırlanan bütün çözeltiler parafilm ile kaplanarak +4ºC'de buzdolabında muhafaza edildi.

Petidin çözeltisinin hazırlanması

- **100 ppm (µg/mL) ana stok çözeltisi:** 1,0 mg/mL Pet referans standart maddesinden 1000 mikrolitre (µL) alınıp 10 mL'lik balon joje içerisinde 10 mL'ye kadar MeOH ile tamamlandı.
- **50 ppm ara stok çözeltisi:** 100 ppm ana stok çözeltisinden 5000 µL alınıp 10 mL'lik balon joje içerisinde 10 mL'ye kadar MeOH ile tamamlandı.
- **5 ppm ara stok çözeltisi:** 100 ppm ana stok çözeltisinden 500 µL alınıp 5 mL'lik balon joje içerisinde 5 mL'ye kadar MeOH ile tamamlandı.
- **2 ppm ara stok çözeltisi:** 100 ppm ana stok çözeltisinden 400 µL alınıp 10 mL'lik balon joje içerisinde 10 mL'ye kadar MeOH ile tamamlandı.



Şekil 20: 10 mL'lik balon jojede hazırlanan 50 ppm'lik Pet ara stok çözeltisi

Norpetidin çözeltisinin hazırlanması

- **100 ppm ana stok çözeltisi:** 1,0 mg/mL NPet referans standart maddesinden 1000 µL alınıp 10 mL'lik balon joje içerisinde 10 mL'ye kadar MeOH ile tamamlandı.

- **50 ppm ara stok çözeltisi:** 100 ppm ana stok çözeltisinden 5000 µL alınıp 10 mL'lik balon joje içerisinde 10 mL'ye kadar MeOH ile tamamlandı.
- **20 ppm ara stok çözeltisi:** 100 ppm ana stok çözeltisinden 4000 µL alınıp 5 mL'lik balon joje içerisinde 5 mL'ye kadar MeOH ile tamamlandı.



Şekil 21: Çalışmada kullanılan referans standart (Normeperedine, 1,0 mg/mL, Lipomed)



Şekil 22: 10 mL'lik balon jojede hazırlanan 100 ppm'lik NPet ana stok çözeltisi

Petidinik asit çözeltisinin hazırlanması

- **100 ppm ana stok çözeltisi:** 0,1 mg/mL referans standart maddesi (Pethidine Acid) ana stok çözeltisi olarak kullanılmıştır.

- **2 ppm ara stok çözeltisi:** 100 ppm ana stok çözeltisinden 5000 µL alınıp 5 mL'lik balon joje içerisinde 5 mL'ye kadar MeOH ile tamamlandı.



Şekil 23: 5 mL'lik balon jojede hazırlanan 2 ppm'lik PetA ara stok çözeltisi

- **Çözeltiler için iç standart seçimi**

Pet ve NPet'in GC-MS yöntemiyle tayininde kullanılacak iç standart seçimi için Diazepam, N-Dokosan, Amitriptilin, Scopoletin, Tetrametrin ve Vareniklin denenmiş ve bu maddelerin moleküler ağırlıkları ve alıkonma zamanları Tablo XI'de gösterilmektedir. Diazepam ve Tetrametrin'in alıkonma zamanları göz önüne alındığında hedef bileşiklerimizinki ile oldukça farklı zamanda olduğu, N-dokosan'ın ekstraksiyon yöntemi olarak belirlenen SPE için uygun olmadığı, Scopoletin'in ise türevlendirilmeden belirlenmediği, Amitriptilin'in ise Pet ile beraber kullanımına dair literatürde (140) kaynaklar bulunduğundan dolayı söz konusu bu maddeler IS olarak kullanılamamıştır. Moleküler ağırlığı Pet ve NPet'e benzer ve sigara bırakma tedavisinde kullanılan bir ilaç (141) olan Vareniklin'in alıkonma zamanı hedef bileşiklerimize yakın olup ekstraksiyon yöntemimize de uygun olduğu için IS olarak seçilmiştir.

Tablo XI. IS seçimi için denenen maddelerin molekül ağırlıkları ve alıkonma zamanları

Denenen Maddeler	Molekül Ağırlıkları	Alıkonma Zamanları (dk.)
Diazepam	284,7 g/mol	12,880dk.
N-Dokosan	310,6027 g/mol	6,836dk.
Amitriptilin	277,403 g/mol	7,033dk.
Scopoletin	192,16 g/mol	14,978dk.
Tetrametrin	331,406 g/mol	8,213dk.
Vareniklin	211,267 g/mol	6,299dk.

IS çözeltisinin hazırlanması:

- **100 ppm ana stok çözeltisi:** 1 mg %98 Vareniklin standardı tartıldı. 10mL'lik balon joje içerisinde koyularak 10 mL'ye kadar MeOH ile tamamlandı.
- **10 ppm ara stok çözeltisi:** 100 ppm ana stok çözeltisinden 500 µL alınıp 10 mL'lik balon joje içerisinde 10 mL'ye kadar MeOH ile tamamlandı.



Şekil 24: Çalışmada kullanılan referans standart (Varenicline Tartrate, 5 mg, Sigma)

0.5 M Sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisinin hazırlanması:

0,1g NaOH tartıldı, balon jojede ultra saf suda çözdürülerek 5 mL'ye tamamlandı.

0,1M Hidroklorik asit (HCl) çözeltisinin hazırlanması:

1M HCl'den 5000 µL alınıp, 50 mL'lik balon joje içerisinde 50 mL'ye kadar MeOH ile tamamlandı.

MeOH'de Pet ve NPet için kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması

İlk kalibrasyon noktası saf matriks (kör numune) olacak şekilde kalibrasyon noktaları belirlendi. 7. kalibrasyon noktasına kadar Pet 2 ppm ara stok çözeltisinden, NPet 50 ppm ara stok çözeltisinden, 7. ve 8. Kalibrasyon noktası Pet 100 ppm ana stok çözeltisinden, NPet 50 ppm ara stok çözeltilerinden hazırlandı. Her kalibrasyon noktasına 100 ppm olacak şekilde ana stoktan 75 µL Vareniklin (15 µg/mL) eklendi. MeOH'de kalibrasyon noktalarının hazırlanması Tablo XII'deki gibi hazırlandı. Cam vialler içerisinde nihai hacimleri 500 µl olacak şekilde MeOH ile tamamlandı. Hazırlanan çözeltiler analiz için GC-MS cihazına verildi.

Tablo XII. MeOH'de kalibrasyon noktalarının hazırlanması

Kalibrasyon Noktaları	Hazırlama Yöntemi (Cam Vialde)
0. Nokta (Blank)	75 µL Vareniklin + 425 µL MeOH
1. Nokta (Pet 0,125 µg/mL + NPet 1 µg/mL)	75 µL Vareniklin + 31,25 µL Pet + 10 µL NPet + 383,75 µL MeOH
2. Nokta (Pet 0,25 µg/mL + NPet 2 µg/mL)	75 µL Vareniklin + 62,5 µL Pet + 20 µL NPet + 342,5 µL MeOH
3. Nokta (Pet 0,5 µg/mL + NPet 4 µg/mL)	75 µL Vareniklin + 125 µL Pet + 40 µL NPet + 260 µL MeOH
4. Nokta (Pet 0,75 µg/mL + NPet 6 µg/mL)	75 µL Vareniklin + 187,5 µL Pet + 60 µL NPet + 177,5 µL MeOH
5. Nokta (Pet 1 µg/mL + NPet 8 µg/mL)	75 µL Vareniklin + 250 µL Pet + 80 µL NPet + 95 µL MeOH

6. Nokta (Pet 1,25 µg/mL + NPet 10 µg/mL)	75 µL Vareniklin + 312,5 µL Pet + 100 µL NPet + 12,5 µL MeOH
7. Nokta (Pet 12,5 µg/mL + NPet 15 µg/mL)	75 µL Vareniklin + 62,5 µL Pet + 150 µL NPet + 212,5 µL MeOH
8. Nokta (Pet 25 µg/mL + NPet 20 µg/mL)	75 µL Vareniklin + 125 µL Pet + 200 µL NPet + 100 µL MeOH

MeOH'de PetA için kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması

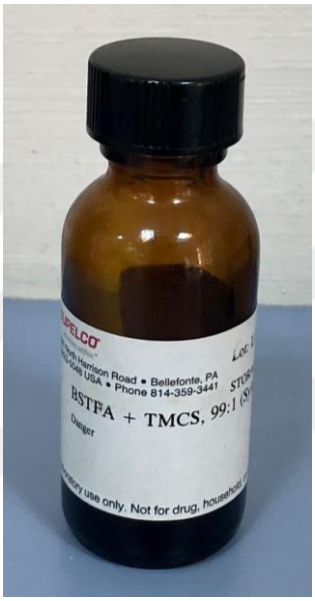
PetA için 100 ppm ana stok çözeltisinden ilk kalibrasyon noktası saf matriks olmak sureti ile kalibrasyon noktaları belirlenip hazırlandı. Her kalibrasyon noktasına 100 ppm olacak şekilde ana stoktan 75 µL Vareniklin (15 µg/mL) eklendi. Tablo XIII'te PetA için belirlenmiş kalibrasyon noktalarının konsantrasyonları ve 100 ppm'lik ana stok çözeltisinden alınacak miktarlar verilmektedir. Nihai hacimleri MeOH ile 250 µl olacak şekilde tamamlanarak insert vialler içerisinde hazırlanan çözeltiler türevlendirilerek analiz için GC-MS cihazına verildi.

Tablo XIII. MeOH'de PetA için kalibrasyon noktalarının hazırlanması

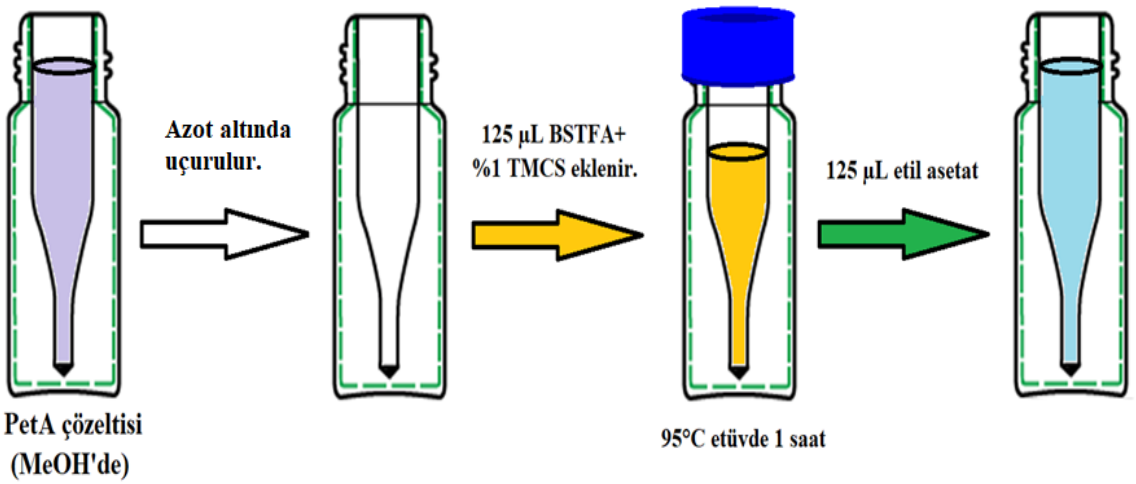
Kalibrasyon Noktaları	Hazırlama Yöntemi (Insert Vialde)
0. Nokta (Blank)	75 µL Vareniklin + 175 µL MeOH
1. Nokta (PetA 0,5 µg/mL)	75 µL Vareniklin + 1,25 µL PetA + 173,75 µL MeOH
2. Nokta (PetA 1 µg/mL)	75 µL Vareniklin + 2,5 µL PetA + 172,5 µL MeOH
3. Nokta (PetA 2 µg/mL)	75 µL Vareniklin + 5 µL PetA + 170 µL MeOH
4. Nokta (PetA 5 µg/mL)	75 µL Vareniklin + 12,5 µL PetA + 162,5 µL MeOH
5. Nokta (PetA 10 µg/mL)	75 µL Vareniklin + 25 µL PetA + 150 µL MeOH
6. Nokta (PetA 15 µg/mL**)**	75 µL Vareniklin + 37,5 µL PetA + 137,5 µL MeOH
7. Nokta (PetA 20 µg/mL)	75 µL Vareniklin + 50 µL PetA + 125 µL MeOH

- **Türevlendirme**

Her bir kalibrasyon noktası için hazırlanan çözeltiler azot altında uçurulmaya bırakıldı. Tamamen uçan çözeltilere türevlendirme işlemi için çeker ocak altında 125 µL BSTFA+ %1 TMCS (Şekil 25) eklendi. Hazırlanan çözeltiler 1 saat boyunca 95°C etüvde ağzı sıkıca kapalı olacak şekilde bekletildi. Soğuması için oda sıcaklığına alındı ve her çözeltiye 125 µL etil asetat eklendi (Şekil 26). Nihai hacimleri 250 µL olan örnekler analiz için GC-MS cihazına verildi.



Şekil 25: Türevlendirmede kullanılan referans standart (BSTFA+ %1 TMCS)



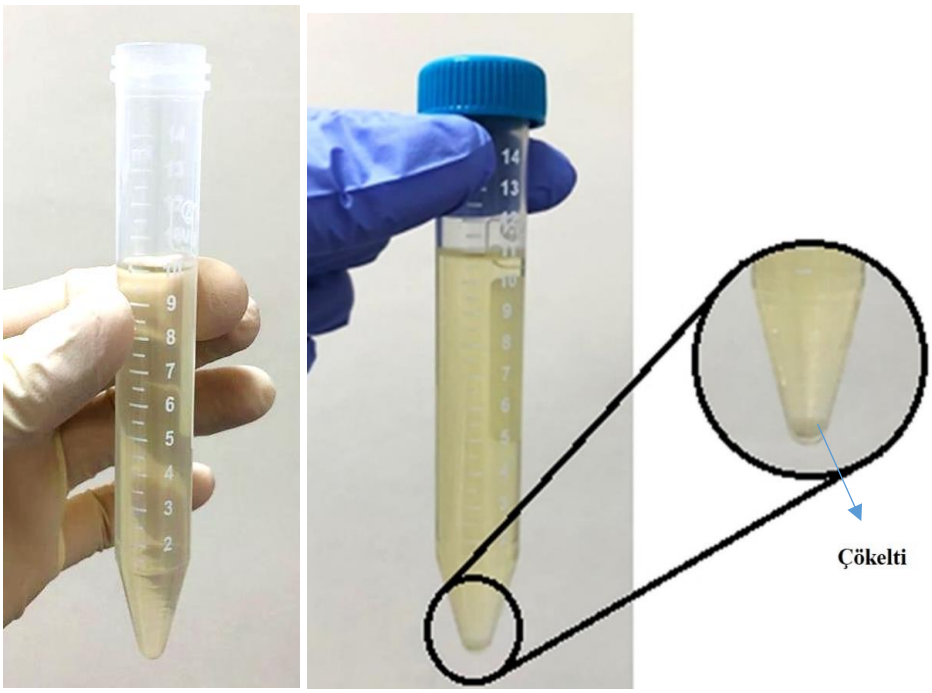
Şekil 26: Türevlendirme aşamaları

3.5. Örnek Hazırlama Prosedürü

Pet ve NPet analizi için geliştirdiğimiz yöntemde, numuneler GC-MS sisteminde analiz edilmeden önce ekstraksiyon ön işleminden geçirildi. Çeşitli konsantrasyonlarda Pet ve NPet standart çözeltisi ile zenginleştirilen boş idrar numuneleri, LLE ve SPE işleminden geçirilerek ölçümleri yapıldı. LLE ile elde edilen ekstraktın idrar matriksinden kaynaklı artalanda gürültü çok yüksek olup analitlerimizi baskıladığı için ekstraksiyon işlemi olarak daha temiz bir artalana sahip olan SPE tercih edildi. Ekstraksiyon işleminden elde edilen sonuçlar validasyon değerlerinin hesaplanması için kullanıldı.

3.5.1. Petidin ve Norpetidin analizi için örnek hazırlama basamağı

Oda sıcaklığında ve steril vida kapaklı idrar kabında bulunan, içerisinde hiçbir ilaç içermediğinden emin olduğumuz saf matriksten (idrar) 15 mL'lik falkon tüpe 10 mL koyuldu. İdrarda berraklık elde etmek için üzerine 1 mL Asetonitril eklenip, 4500 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi. Şekil 27'de görülebileceği gibi pipetleme yolu ile dipteki çökeltiden kurtulan idrar örneği başka bir 15 mL'lik falkona aktarıldı.



Şekil 27: 10 mL blank idrar örneği ve Asetonitril eklenip santrifüjlenmiş idrar örneği

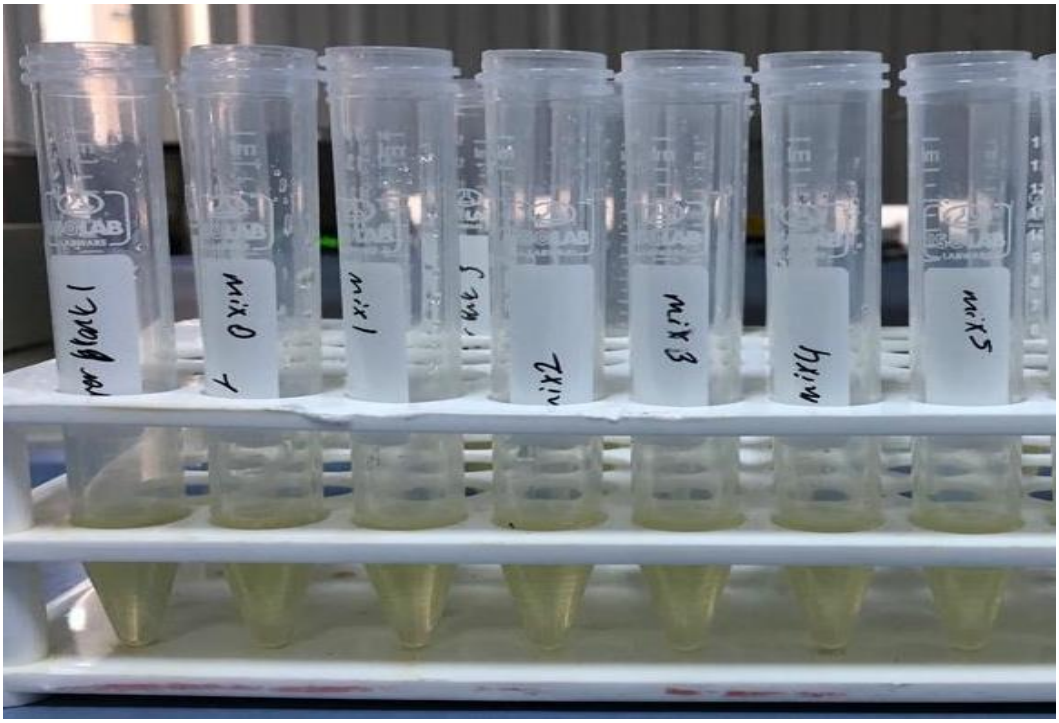
İdrar örneklerinin pH'ları 0,5 M NaOH eklenerek 10'a ayarlandı. Örneklerimiz pH kâğıdı ile kontrol edildikten sonra 1 dk. boyunca vortekslendi. Her bir kalibrasyon noktası için 15 mL falkonlar isimlendirildi ve bu falkonların her birine pH değeri 10'a ayarlanmış idrar örneklerinden 2 mL koyuldu.

Spike işlemler basamağı için kör numuneler ilk kalibrasyon noktası olacak şekilde kalibrasyon noktaları belirlendi. 7. kalibrasyon noktasına kadar Pet 2 ppm ara stok çözeltisinden, NPet 50 ppm ara stok çözeltisinden, 7. ve 8. Kalibrasyon noktası Pet 100 ppm ana stok çözeltisinden, NPet 50 ppm ara stok çözeltilerinden hazırlandı. Her kalibrasyon noktasına 100 ppm olacak şekilde ana stoktan 75 µL Vareniklin (15 µg/mL) eklendi. Nihai hacim 500 µL olmak üzere boş idrar örneklerine Tablo XIV'te gösterildiği miktarlarda Pet, NPet ve IS ile spike yapıldı (Şekil 28).

Tablo XIV. İdrar spike konsantrasyon için hesaplamalar

Kalibrasyon Noktaları	Hazırlama Yöntemi
0. Nokta (Blank)	75 µL Vareniklin
1. Nokta (Pet 0,125 µg/mL + NPet 1 µg/mL)	75 µL Vareniklin + 31,25 µL Pet + 10 µL NPet
2. Nokta (Pet 0,25 µg/mL + NPet 2 µg/mL)	75 µL Vareniklin + 62,5 µL Pet + 20 µL NPet
3. Nokta (Pet 0,5 µg/mL + NPet 4 µg/mL)	75 µL Vareniklin + 125 µL Pet + 40 µL NPet
4. Nokta (Pet 0,75 µg/mL + NPet 6 µg/mL)	75 µL Vareniklin + 187,5 µL Pet + 60 µL NPet
5. Nokta (Pet 1 µg/mL + NPet 8 µg/mL)	75 µL Vareniklin + 250 µL Pet + 80 µL NPet
6. Nokta (Pet 1,25 µg/mL + NPet 10 µg/mL)	75 µL Vareniklin + 312,5 µL Pet + 100 µL NPet

7. Nokta (Pet 12,5 µg/mL + NPet 15 µg/mL)	75 µL Vareniklin + 62,5 µL Pet + 150 µL NPet
8. Nokta (Pet 25 µg/mL + NPet 20 µg/mL)	75 µL Vareniklin + 125 µL Pet + 200 µL NPet



Şekil 28: Spike idrar örnekleri

Spike yapılan örnekler 1 dk. boyunca vortekslendi, üzerine 2 mL distile su eklendi. SPE aşaması için, her bir SPE kartuşu her bir kalibrasyon noktası için isimlendirildi. Kartuşlar 3 mL Etil asetat, 3 mL MeOH ve 3 mL distile su ile şartlandı. Şartlanma işleminden sonra spike edilmiş örnekler kartuşlara yüklendi. Örnekler yüklendikten sonra kartuşlar 3 mL distile su ile üç tekrarlı olacak şekilde yıkandı. Her kartuş tam kuruluğa ulaşana kadar azot altında yüksek basınçta bekletildi. Kuruma işlemi bittikten sonra kartuşlara 2 mL MeOH ve 2 mL etil asetat eklenerek elüsyon yapıldı. Elüe edilen örnekler azot altında uçurulmaya bırakıldı. Tamamen uçan örnekler nihai hacmi 500 µL olacak şekilde MeOH eklendi. Örnekler 1 dk. vortekslendikten sonra cam viallere alındı ve analiz için GC-MS cihazına verildi.

3.5.2. Petidinik Asit analizi için örnek hazırlama basamağı

Oda sıcaklığında ve steril vida kapaklı idrar kabında bulunan, içerisinde hiçbir ilaç içermediğinden emin olduğumuz saf matriksten (idrar) 15 mL'lik falkon tüpe 10 mL koyuldu. İdrarda berraklık elde etmek için üzerine 1 mL Asetonitril eklenip, 4500 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi. Pipetleme yolu ile dipteki çökeltiden kurtulan idrar örneği başka bir 15 mL'lik falkona aktarıldı. İdrar örneklerinin pH'ları 0,1 M HCl eklenerek 3'e ayarlandı. Örneklerimiz pH kâğıdı ile kontrol edildikten sonra 1 dk. boyunca vortekslendi. Her bir kalibrasyon noktası için 15 mL falkonlar ayrı ayrı isimlendirildi ve bu falkonların her birine pH değeri 3'e ayarlanmış kör idrar örneklerinden 2 mL koyuldu. Spike işlemi için 2 ppm ara stoktan 250 µL PetA koyuldu. Spike yapılan örnekler 1 dk. boyunca vortekslendi ve üzerine 2 mL distile su eklendi.

SPE aşaması için, SPE kartuşları her bir kalibrasyon noktası için isimlendirildi. Kartuşlar 3 mL Etil asetat, 3 mL MeOH ve 3 mL distile su ile şartlandı. Şartlanmış kartuşlara spike edilmiş örnekler yüklendi. Örnekler yüklendikten sonra kartuşlar 3 mL distile su ile üç tekrarlı olacak şekilde yıkandı. Her kartuş tam kuruluğa ulaşana kadar azot altında yüksek basınçta bekletildi. Kuruma işlemi bittikten sonra kartuşlara 2 mL MeOH ve 2 mL Etil asetat eklenerek elüsyon yapıldı. Elüe edilen örnekler azot altında uçurulmaya bırakıldı. Tamamen uçan örneklere 250 µL MeOH eklendi. Örnekler 1 dk. vortekslendikten sonra insert viallere alındı. Viallerdeki örnekler türevlendirilerek analiz için GC-MS cihazına verildi. Türevlendirme işlemi 3.4.1 bölümünün "MeOH'de PetA için Kalibrasyon Çözeltilerinin Hazırlanması" başlığı altında anlatıldığı gibi gerçeklelştirildi.

3.6. Yöntemin GC-MS Sistemi ile Geliştirilmesi

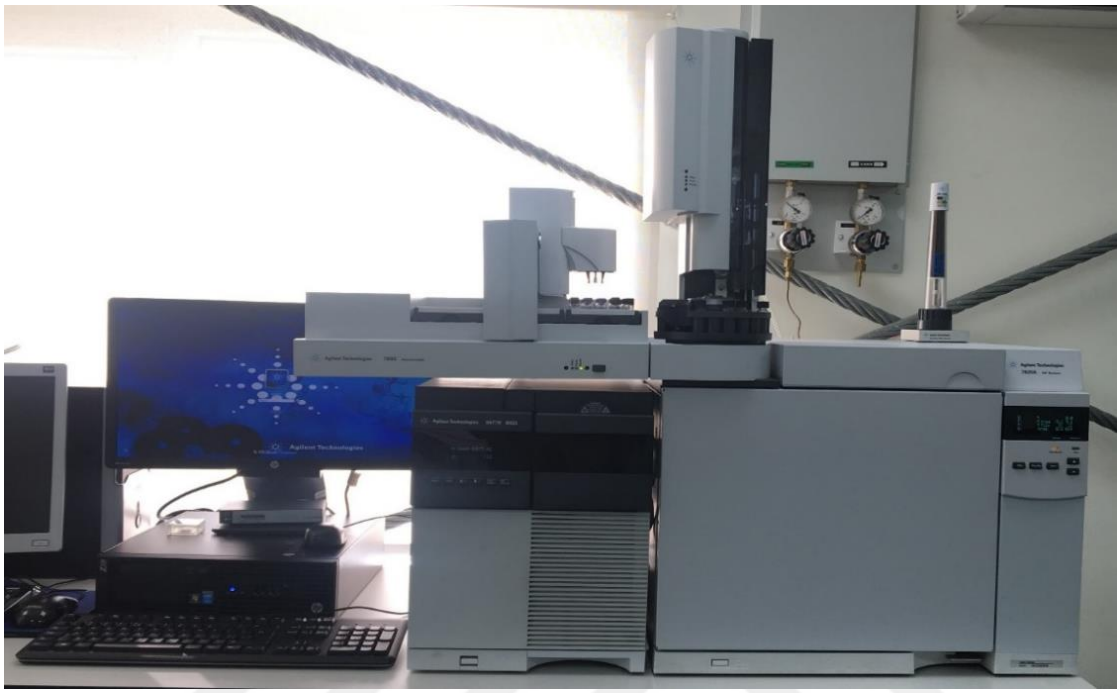
GC-MS sistemi ile yöntem geliştirmek amacıyla Pet ve metabolitleri için hazırlanan kalibrasyon standartları çalışıldı. Çalışmada, her bir analit ayrı ayrı analize tabi tutludu ve her analite uygun olacak bir fırın sıcaklık programı belirlendi. Pet, NPet ve PetA kalibrasyon

çözeltilerinden orta konsantrasyonlar alındı, uygun örnek hazırlama yöntemleri ile hazırlanarak GC-MS sisteminde analiz edildi ve alıkonma zamanları belirlendi. İyi bir ayırım ve seçicilik için Pet ve metabolitlerinin uygun şekilde pikleri elde edilmeye çalışıldı. Farklı konsantrasyonlarda çalışılan Pet, NPet ve PetA'nın pik alanlarına göre yöntemin duyarlılığı değerlendirilerek validasyon parametreleri çalışıldı. GC-MS sistemi için belirlenen parametreler Tablo XV'te verilmektedir. Çalışmada SCAN ve SIM metotları birlikte kullanılmakla beraber SCAN metotunda en düşük kütle 40, en yüksek 450 olmak üzere, SIM metotunda ise Tablo XV'te belirtilen kütle spektrum iyonları seçilmek üzere çalışıldı. Değerlendirmeler SIM metodu üzerinden yapıldı.

Tablo XV. GC-MS parametreleri

Akış Hızı	1 mL/dk.	
Toplam Analiz Süresi	6,9 dk.	
Kolon Türü	HP-5MS (30m*250µm*0.25µm)	
Solvent Delay	4 dk.	
Başlangıç Sıcaklığı	160°C	
Bekleme Süresi	2 dk.	
160°C'de 2 dk. bekledikten sonra cihaz dakikada 25°C artarak 280°C'ye ulaşır.		
Enjeksiyon Hacmi	1 µL	
Split Oranı	10:1	
Taşıyıcı Gaz	Helyum	
SIM Metotu İçin Kullanılan İyonlar *(m/z)*	Pet	172,218,247
	NPet	158,233
	PetA	103,276,291
	Vareniklin	168,181,211

Bu çalışmada Şekil 29'da gösterilen Agilent 7820A Gaz Kromatografisi ve Agilent 5977E Kütle Spektrometresi kullanıldı. GC-MS sistemi ile yapılan bütün analizler Chemstation Data Analysis yazılımı (G1701FA versiyonu) kullanılarak değerlendirildi.



Şekil 29: Analizlerin yapıldığı GC-MS sisteminin görüntüsü

3.7. Petidin ve Metabolitlerinin Validasyon Çalışmaları

- **Özgüllük**

Çalışmada yer alan analitler (Pet, NPet ve IS) sırasıyla analiz edilerek her birine ait kromatogramlar elde edildi. Seçilen yöntem, analitleri tayin edebilme yeteneği açısından değerlendirildi. Her bir analitin standart çözeltileri ile yapılan ve 6 çalışma sonucu elde edilen pikler alıkonma zamanları (Rt) açısından değerlendirildi, %RSD cinsinden hesaplandı.

- **Seçicilik**

Geliştirilen yönteme göre, Pet, NPet ve IS'nin alıkonma zamanlarında kullanılan maddelerden veya matriksten gelen herhangi bir girişim olup olmadığını gözlemlemek için; kör

numune, sadece IS içeren ve analitlerle (Pet, NPet ve IS) zenginletirilmiş MeOH ve idrar matrikslerinde analiz edildi. Elde edilen piklere göre olası bir girişimin olup olmadığı değerlendirildi.

- **Doğrusal çalışma aralığı**

Tablo XII'de verilen hesaplamalara göre hazırlanan kalibrasyon çözeltileri geliştirilen yöntem kullanılarak en az iki kez olmak üzere analiz edildi. Elde edilen sonuçlara göre kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Doğrunun denklemi ve korelasyon katsayısı hesaplanarak doğrusal çalışma aralığı belirlendi.

- **Tespit ve tayin limiti (LOD, LOQ)**

İçerisinde sadece IS içeren idrar blank örnekleri ile geliştirilen yöntem kullanılarak en az 10 kez tekrarlanmak üzere analiz edildi. Kör idrar örneği, 3.5.1. bölümünde anlatılan örnek hazırlama basamağına göre hazırlanıp, ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildi. Tüm örnekler Bölüm 3.6.'da geliştirilen parametrelere göre GC-MS sistemi ile analiz edildi. Kör numunelerden elde edilen sonuçların ortalaması alınıp standart sapmaları hesaplandı. Standart sapma, LOD ve LOQ hesaplamaları için aşağıda verilen formüller kullanıldı.

LOD = Ortalama blank konsantrasyonu + (3*S.S.)

LOQ = Ortalama blank konsantrasyonu + (10*S.S.)

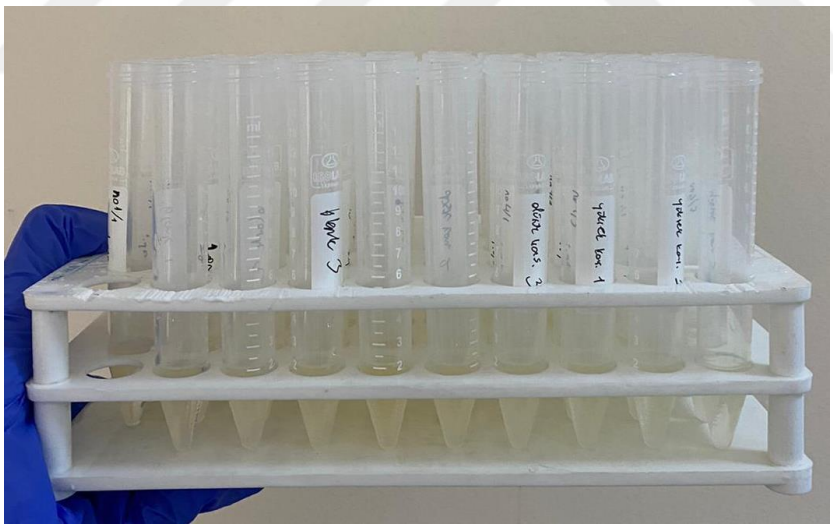
- **Doğruluk: Gerçeklik ve Kesinlik**

Geliştirilen yöntemin doğruluk parametresi; gerçeklik (geri kazanım) ve kesinlik (tekrar edilebilirlik ve tekrar üretilebilirlik) çalışmaları ile sağlandı. İdrar örneğinde geri kazanım ve kesinlik çalışmaları için kalibrasyon çözeltilerinden düşük, orta ve yüksek olmak üzere üç farklı konsantrasyon noktası (1, 4 ve 6) seçildi. Kör idrar örneklerine Tablo XVI'da belirtilen

miktarlarda Pet 2 ppm ara stoktan, NPet 50 ppm ara stoktan, IS 100 ppm ana stoktan olmak üzere spike yapıldı. Her bir idrar örneği 3.5.1. bölümündeki örnek hazırlama prosedürüne göre hazırlanıp ekstraksiyon edildi (Şekil 30).

Tablo XVI. Doğruluk parametresi, idrar spike konsantrasyon için hesaplamaları

Kalibrasyon Noktaları	Hazırlama Yöntemi
1. Nokta (Pet 0,125 µg/mL + NPet 1 µg/mL)	75 µL Vareniklin + 31,25 µL Pet + 10 µL NPet
4. Nokta (Pet 0,75 µg/mL + NPet 6 µg/mL)	75 µL Vareniklin + 187,5 µL Pet + 60 µL NPet
6. Nokta (Pet 1,25 µg/mL + NPet 10 µg/mL)	75 µL Vareniklin + 312,5 µL Pet + 100 µL NPet



Şekil 30: Doğruluk çalışması için SPE'ye hazırlanmış idrar örnekleri

İdrar örnekleri Bölüm 3.6'da geliştirilen parametrelere göre seçilen her kalibrasyon noktası 6 kez tekrar edilmek üzere GC-MS sistemi ile analiz edildi. Elde edilen sonuçlar ile gerçeklik ve kesinlik değerleri hesaplandı. Bu sonuçların standart sapması, bağıl standart sapması (RSD), yüzde bağıl standart sapması ve yüzde geri kazanım değerleri (%G.K.) 2.4.2.5.

bölümünde verilen formüller ile hesaplandı. Yüzde geri kazanım için %80-120 arası, standart sapma için <15, bağıl standart sapma yüzdesi için <%20 değerlendirme kriteri olarak belirlendi.

3.8. Hasta İdrar Örneklerinin Analizi

Pet enjeksiyonunu takiben 1. ve 3. saatlerde 18 hastadan toplanan, steril vida kapaklı idrar kabında bulunan 36 idrar örneği analiz gününe kadar +4 ºC'de bekletildi. Ekstraksiyon için buzdolabından çıkartılan örneklerin oda sıcaklığına gelmesi sağlandı (Şekil 31). Her hastadan 2 adet (1. ve 3.saat) örnek olacak şekilde ayrı ayrı H1-1, H1-3, H2-1, H2-3,…, H18-1, H18-3 şeklinde etiketlendi. İdrardan analizi yapılacak hedef analitlerin pH durumundan etkilenebilme ihtimaline karşı her idrar örneğinin pH'ı kontrol edildi. Bütün hastaların idrar pH'ları 6-7 aralığında olduğu belirlendi. 14. hastanın idrar renginin normalden daha koyu (turuncumsu) olduğu not edildi. pH kontrolleri ve idrarların renk gözlemleri yapıldıktan sonra her hasta idrarından 15 mL'lik falkon tüplere tekrar analizlerinde de kullanmak üzere 10'ar mL idrar koyuldu. Üzerine 1 mL Asetonitril eklenip 4500 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi (Şekil 32). Dipte kalan çökeltiden kurtulan idrar örneklerinden 2 mL'si (örnek hacmi) 15 mL'lik temiz bir falkona aktarıldı. İdrar örnekleri pH kâğıdı ile kontrol ederek NaOH ile pH 10'a ayarlandı. Her bir örneğe 100 ppm ana stok çözeltisinden 75 µL IS (15 µg/mL) ve 2 mL distile su eklenip 1dk. boyunca vortekslendi.

SPE aşaması için, OASIS HLB kartuşlar 3 mL Etil asetat, 3 mL MeOH ve 3 mL distile su ile şartlandı. Şartlanan kartuşlara sırası ile hasta örnekleri yüklendi ve kartuşların her biri 3'er kez 3 mL distile su ile yıkandı. Her kartuş tam kuruluğa ulaşana kadar azot altında yüksek basınçta bekletildi. Kuruma işlemi biten kartuşlara 2 mL MeOH ve 2 mL Etil asetat eklenerek elüsyon yapıldı. Elüe edilen örnekler azot altında uçurulmaya bırakıldı. Tamamen uçan örneklere 500 µL MeOH eklendi. Örnekler 1 dk. vortekslenip cam viallere alındı. Hazırlanan idrar örnekleri, analiz için GC-MS cihazına verildi (Şekil 33). Analiz edilen her örnek şekil 34'teki gibi parafilmlenerek -20 ºC'de buzdolabında muhafaza edildi.



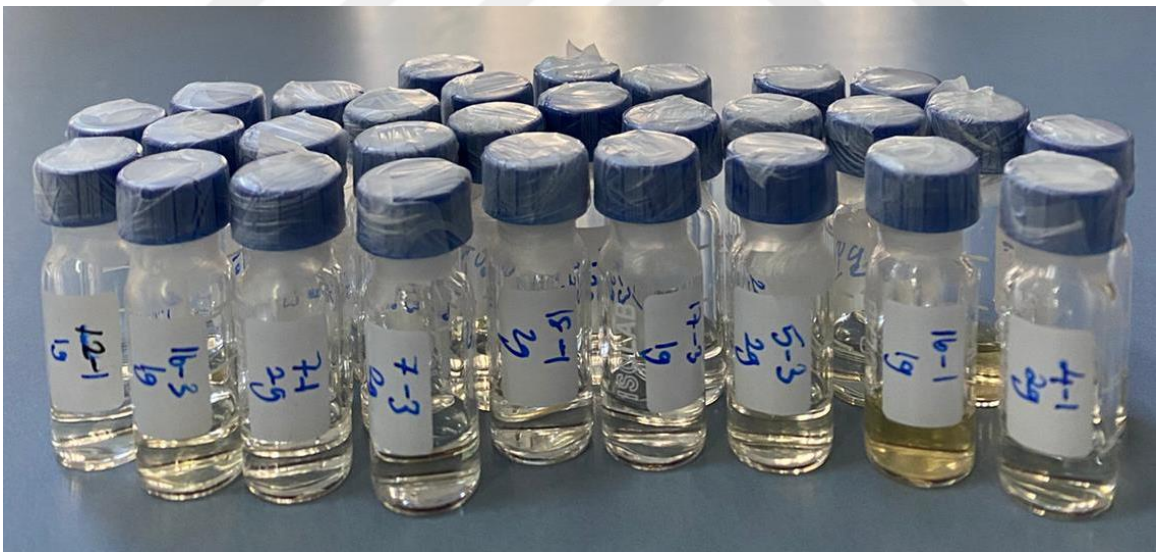
Şekil 31: Hasta idrar örnekleri



Şekil 32: SPE için hazırlanan idrar örnekleri



Şekil 33: GC-MS sistemi ile analiz edilen idrar örnekleri



Şekil 34: Analizi tamamlanan parafilmlenmiş idrar örnekleri

4. BULGULAR

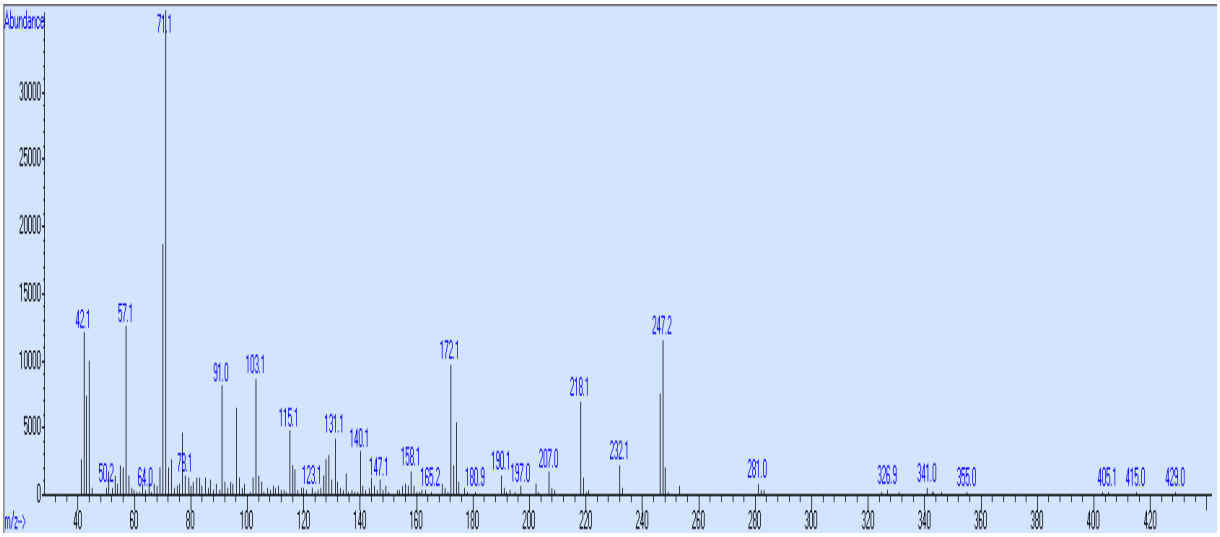
4.1. Özgüllük

GC-MS sistemi ile idrar ve MeOH matriklerinde yapılan 4 analitin (Pet, NPet, PetA ve IS) analizi sonucunda, seçilen yöntemin tüm maddeler için uygun olduğu görülmüştür. PetA için türevlendirmeye dayalı ekstra bir basamak gerçekleştirilmiştir. GC-MS için analitlerin her birine ait alıkonma zamanları, standart sapma (S.S) ve %RSD, gereç ve yöntemde belirtilen formüller ile hesaplanmış, Tablo XVII'de verilmiştir. Ortalama (Ort.) alıkonma zamanı Pet için 4,973±0,005 dk., NPet için 5,136±0,001 dk., PetA için 5,039±0,032 dk., IS için 6,299±0,001 dk. olarak hesaplanmıştır. Pet, NPet, PetA ve IS'nin kütle spektrumları Şekil 35-38'de verilmiştir.

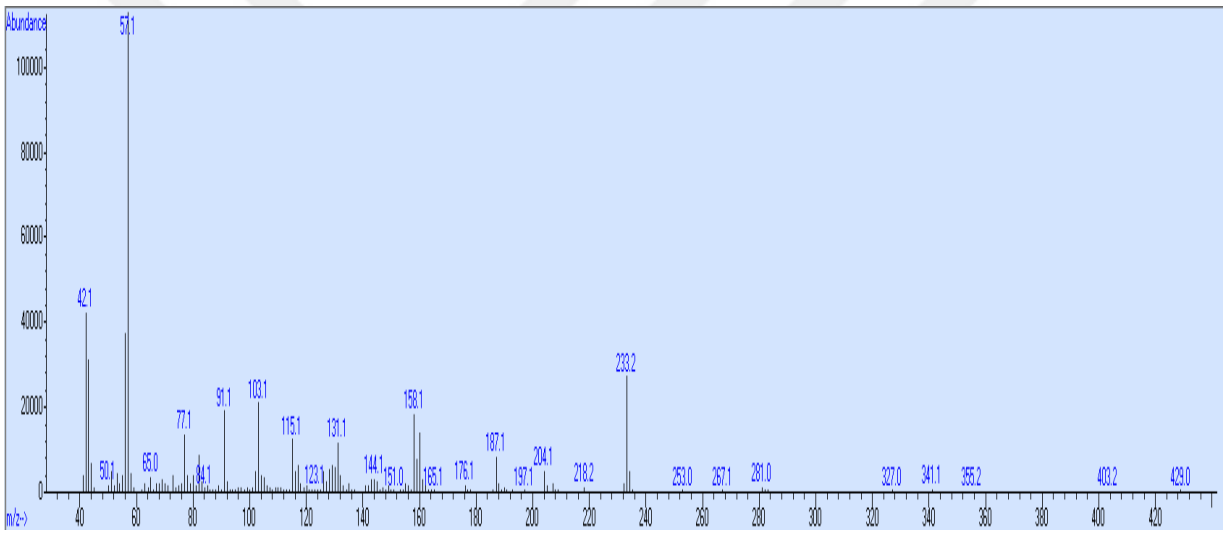
Tablo XVII. Maddelerin alıkonma zamanları

Analiz sayısı	Pet (dk.)	NPet (dk.)	IS (dk.)	PetA (dk.)
1. tekrar	4,968	5,136	6,298	5,018
2. tekrar	4,978	5,136	6,299	5,087
3. tekrar	4,978	5,136	6,299	5,008
4. tekrar	4,978	5,137	6,300	5,009
5. tekrar	4,968	5,136	6,298	5,076
6. tekrar	4,968	5,135	6,299	5,033
Ort. RT	4,973	5,136	6,299	5,039
S.S.	0,005	0,001	0,001	0,032
% RSD	**0,101**	**0,011**	**0,011**	**0,628**

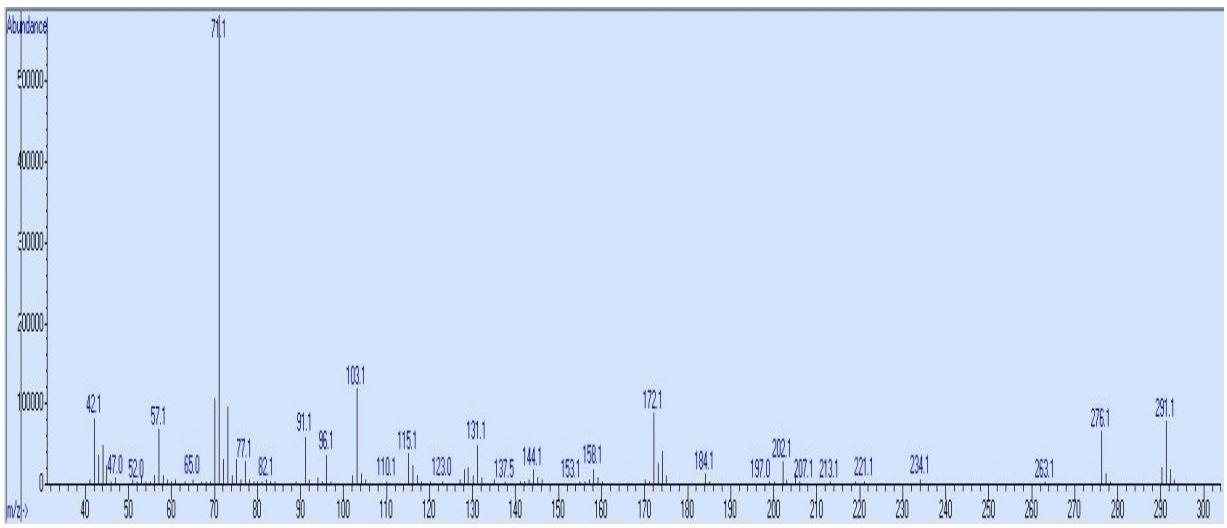
PetA'nın Türevlendirme Basamağı: PetA türevlendirilmeden GC-MS sisteminde görülemediği için Bölüm 3.4.1'deki yöntemle hazırlanıp türevlendirilerek GC-MS ile tayin edilmiştir.



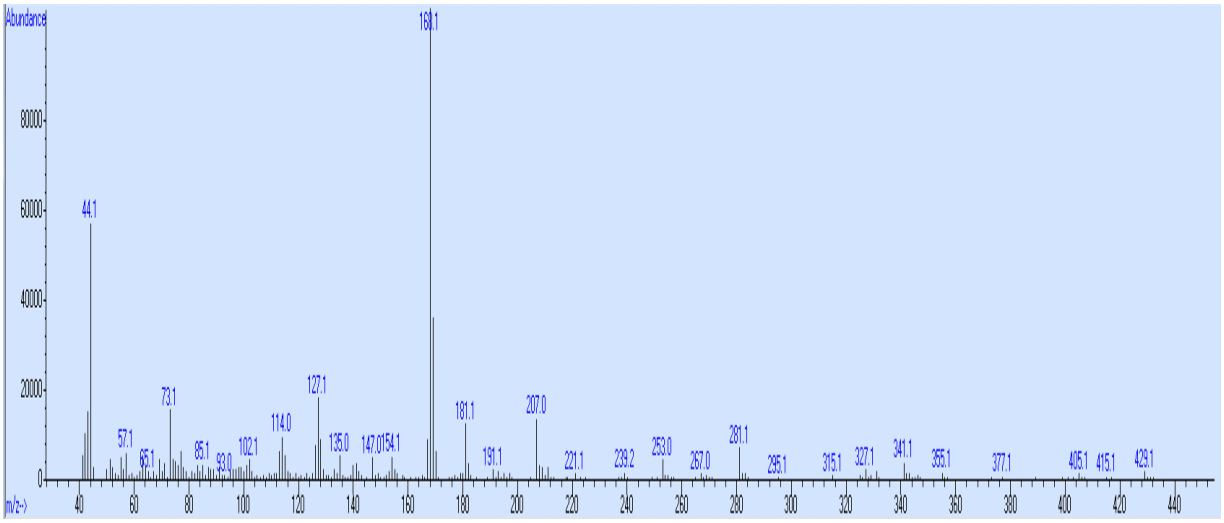
Şekil 35: Pet'in kütle spektrumu



Şekil 36: NPet'in kütle spektrumu



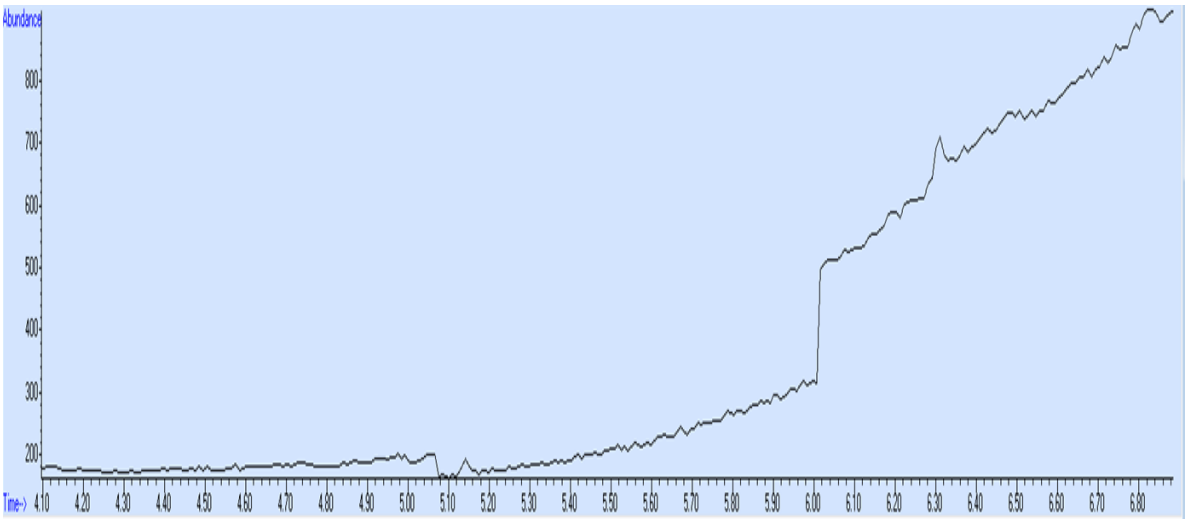
Şekil 37: Türevlendirilmiş PetA'nın kütle spektrumu



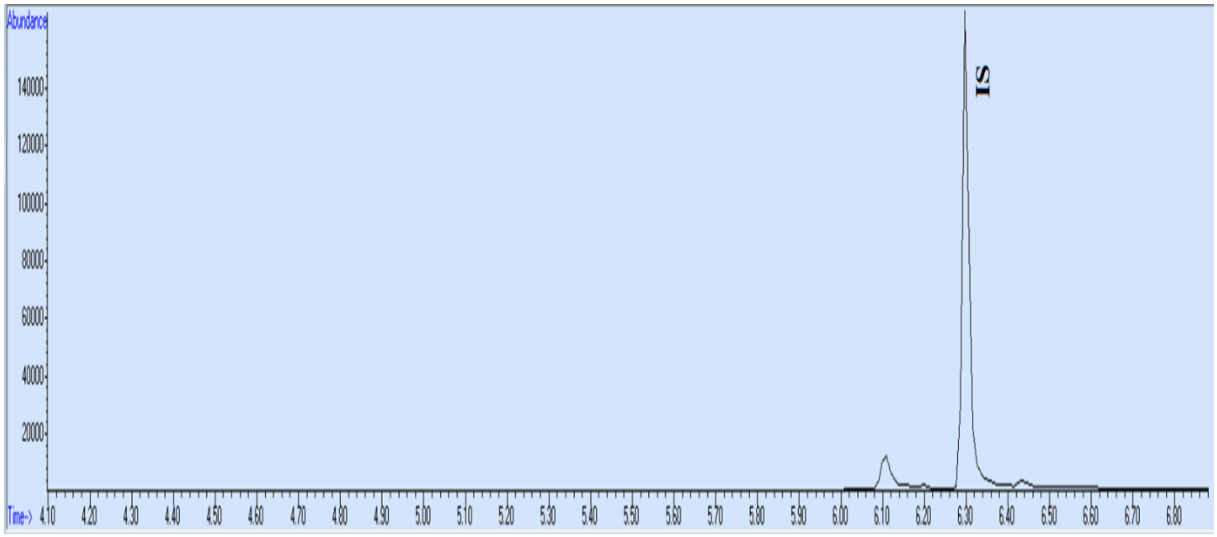
Şekil 38: Vareniklin'in (IS) kütle spektrumu

4.2. Seçicilik

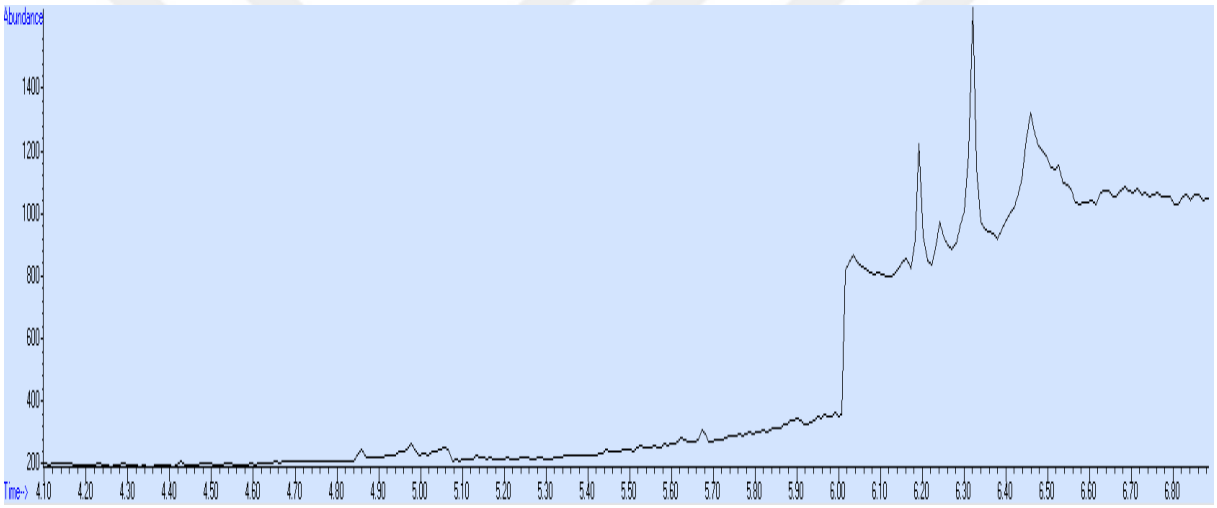
Yapılan seçicilik çalışmalarında herhangi bir girişim olup olmadığını gözlemlemek için; kör numune, içerisinde sadece IS içeren numune ve seçilen üç kalibrasyon noktasına (düşük, orta ve yüksek) göre analitler spike edilmiş MeOH ve analit spike edilmiş idrar matriksleri karşılaştırılmıştır. Elde edilen kromotogramlardan, analitlerin tespit edildiği alıkonma zamanlarında, herhangi bir girişim görülmediği tespit edilmiştir. Analiz sonucu elde edilen tarama ve SIM metod kromatogramları Şekil 39-50'de verilmiştir. Miktar tayini işlemleri için SIM metodu kullanılmıştır.



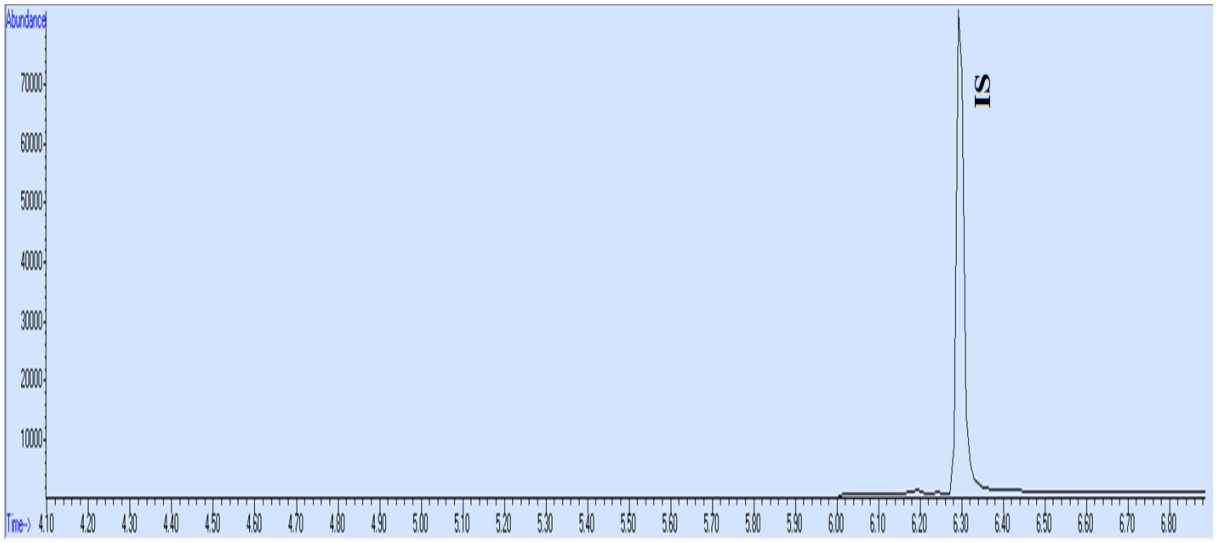
Şekil 39: MeOH çözeltisine ait SIM metodu kromatogramı



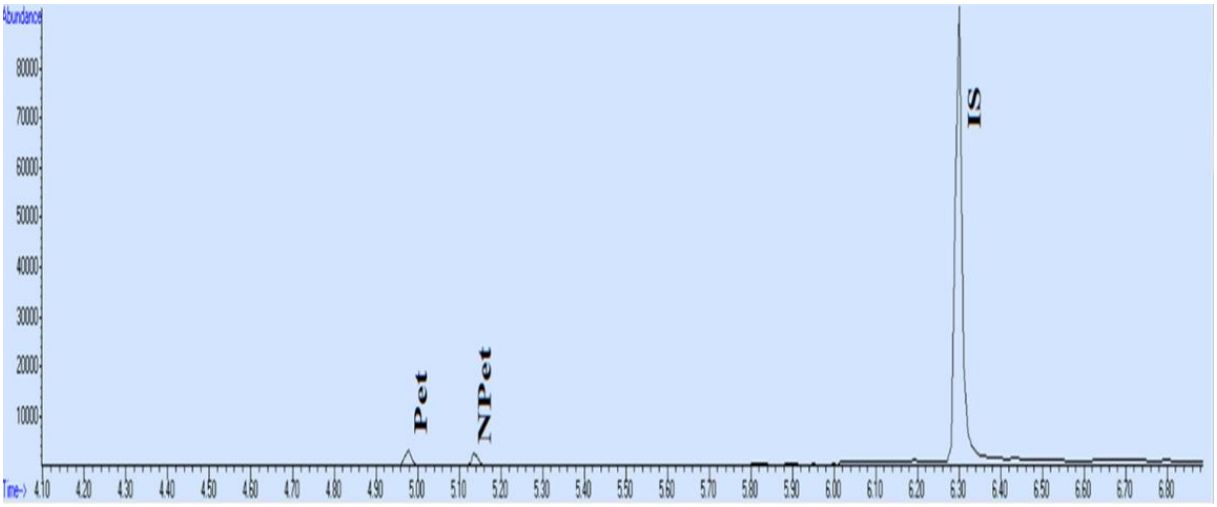
Şekil 40: İçerisinde sadece IS bulunan MeOH çözeltisine ait SIM metodu kromatogramı



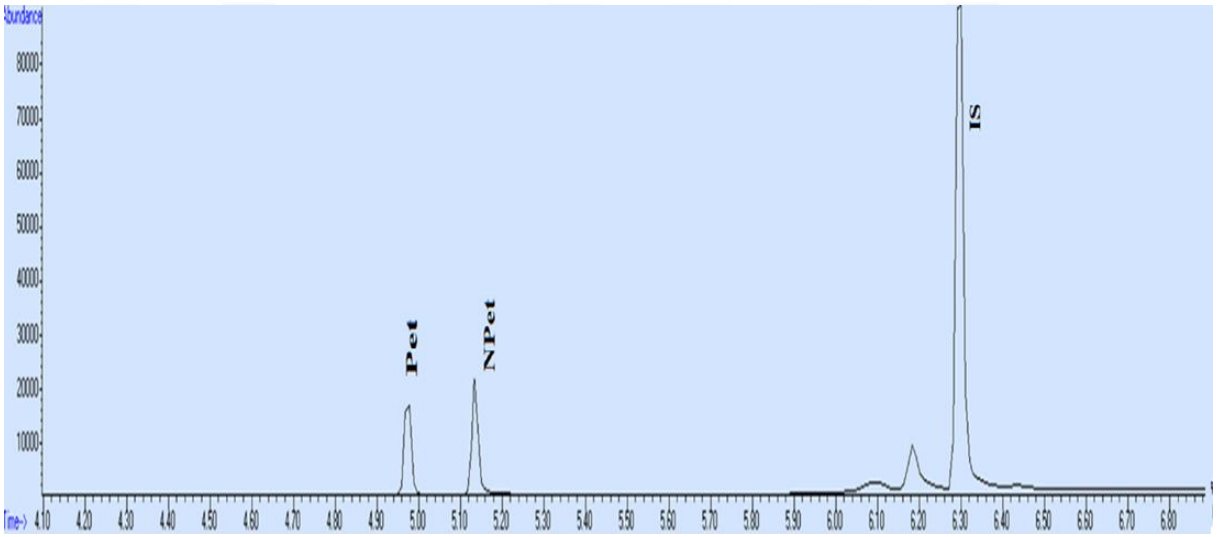
Şekil 41: Kör idrar örneğine ait SIM metodu kromatogramı



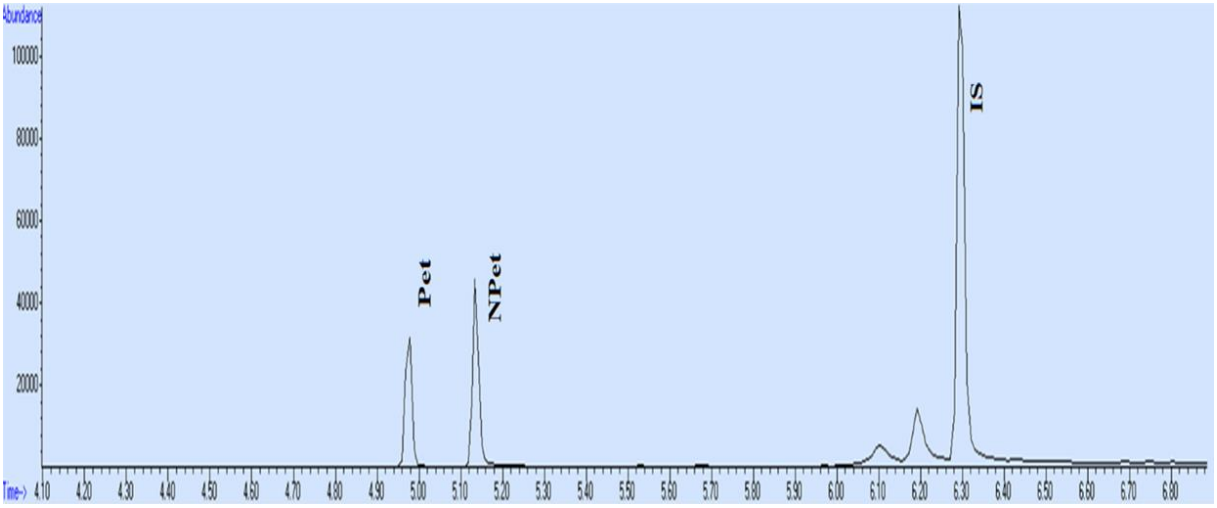
Şekil 42: İçerisinde sadece IS bulunan idrar örneğine ait SIM metodu kromatogramı



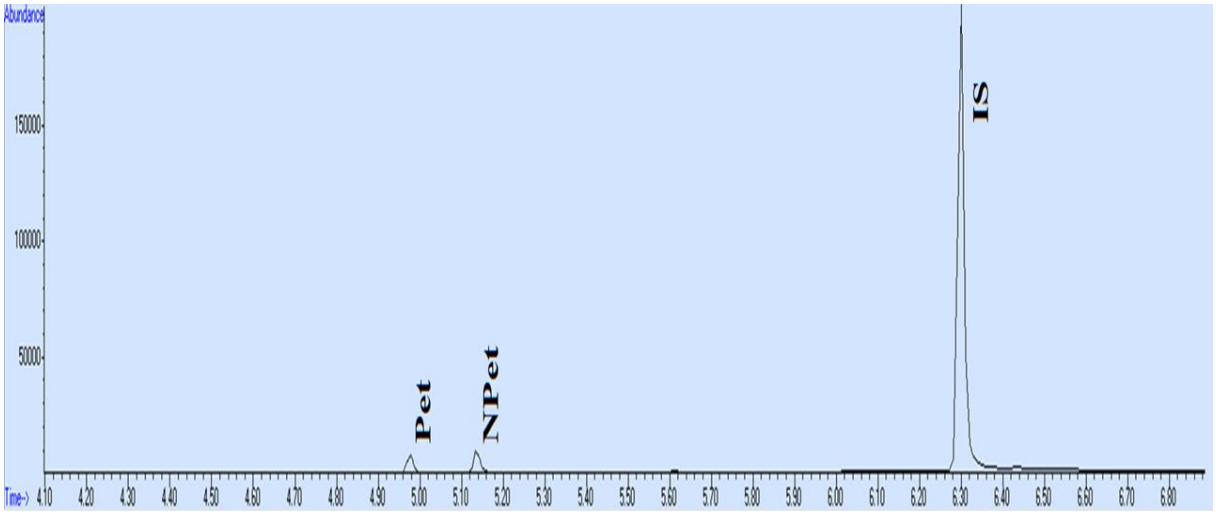
Şekil 43: İdrar matriksinde 0,125 µg/mL Pet, 1 µg/mL NPet'in SIM metodu kromatogramı



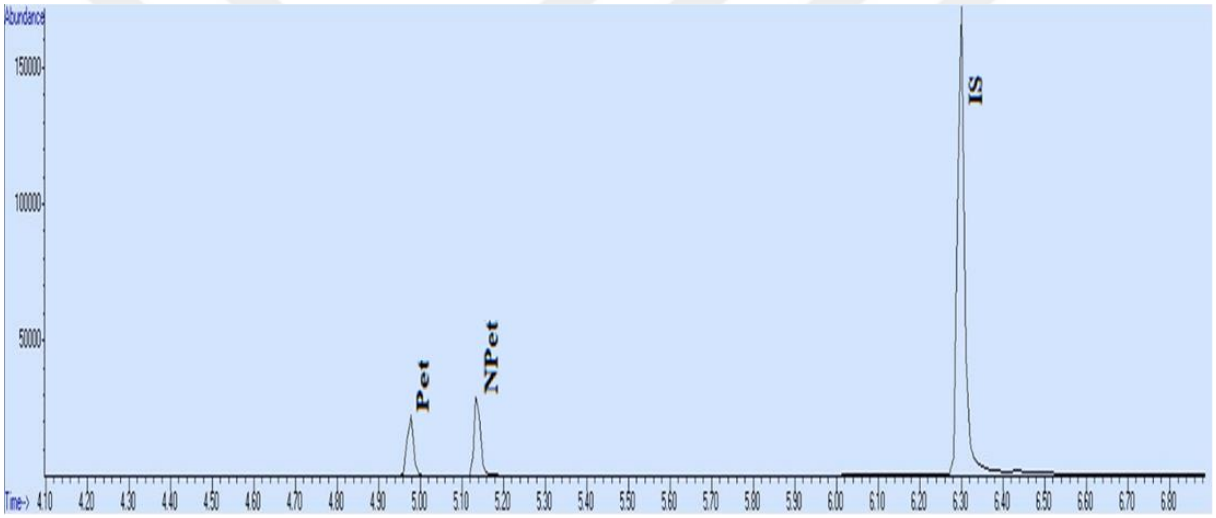
Şekil 44: İdrar matriksinde 0,75 µg/mL Pet, 6 µg/mL NPet'in SIM metodu kromatogramı



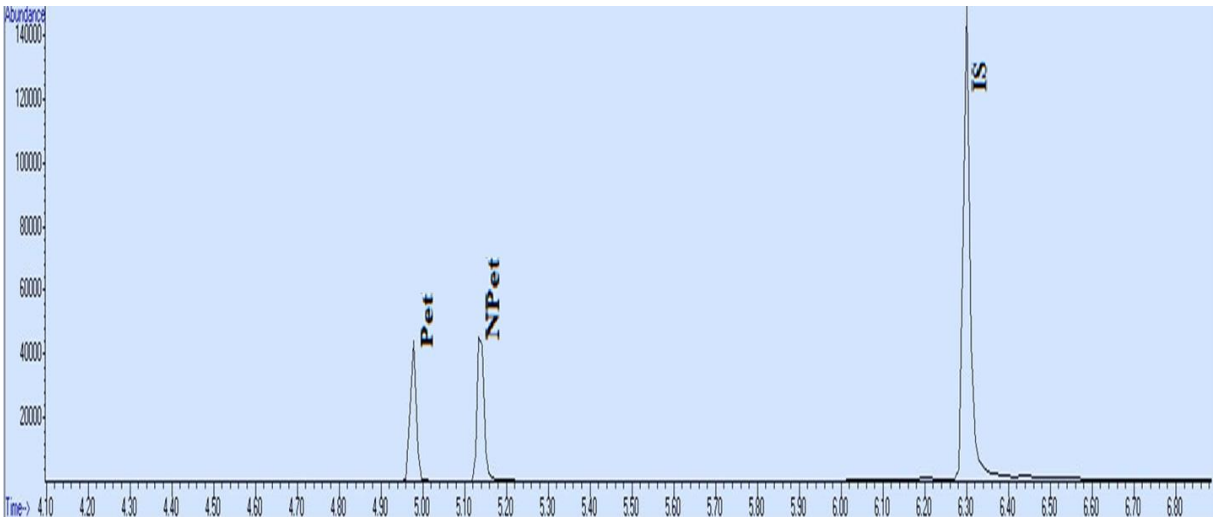
Şekil 45: İdrar matriksinde 1,25 µg/mL Pet, 10 µg/mL NPet'in SIM metodu kromatogramı



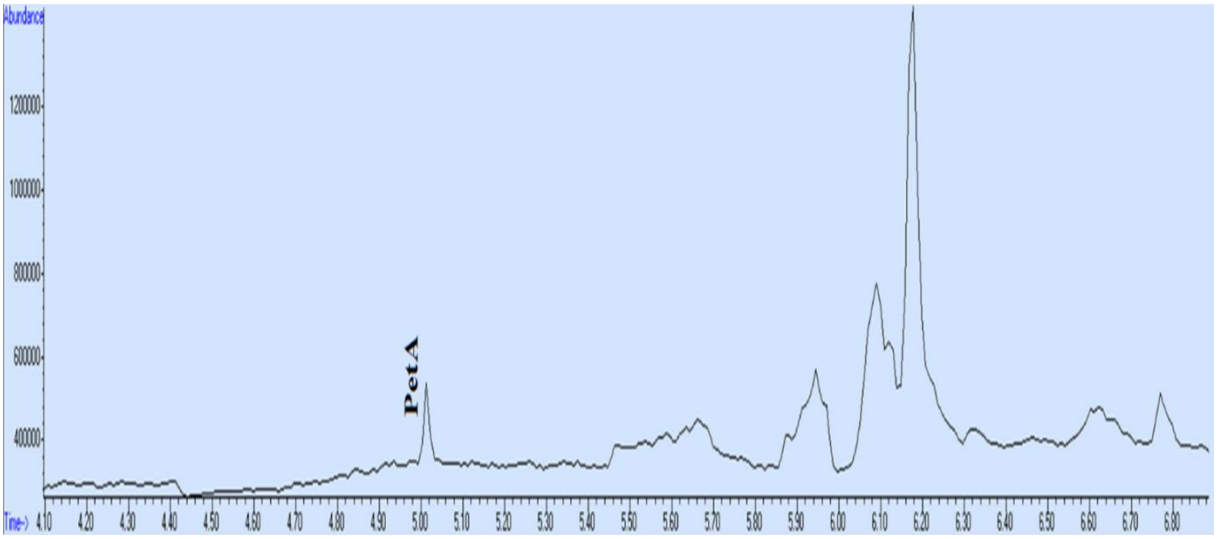
Şekil 46: MeOH matriksinde 0,125 µg/mL Pet, 1 µg/mL NPet'in SIM metodu kromatogramı



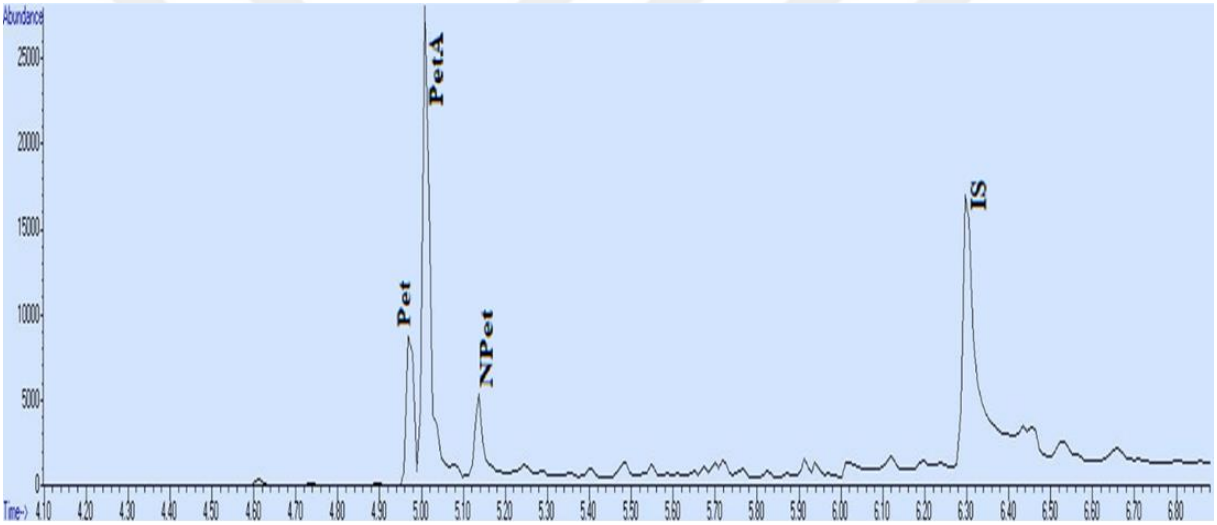
Şekil 47: MeOH matriksinde 0,75 µg/mL Pet, 6 µg/mL NPet'in SIM metodu kromatogramı



Şekil 48: MeOH matriksinde 1,25 µg/mL Pet, 10 µg/mL NPet'in SIM metodu kromatogramı



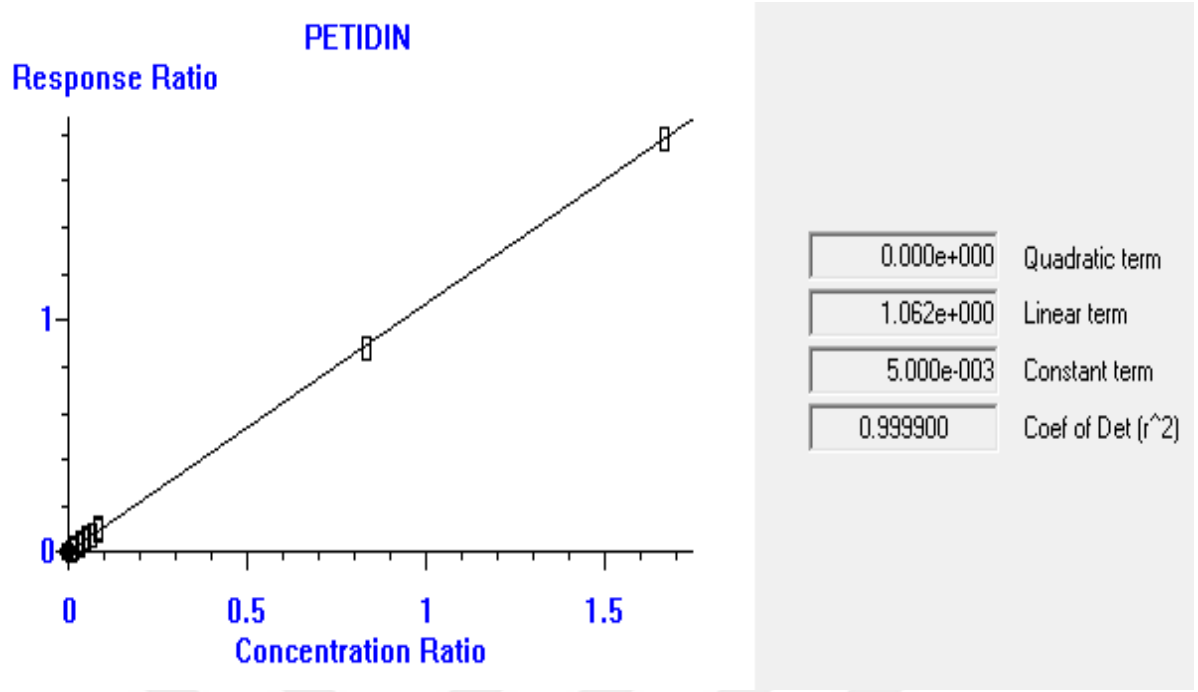
Şekil 49: 2 µg/mL PetA için MeOH çözeltisinde elde edilen tarama metodu kromatogramı



Şekil 50: Çalışmada yer alan tüm analitlerin SIM metodu kromatogramında bir arada görünümü

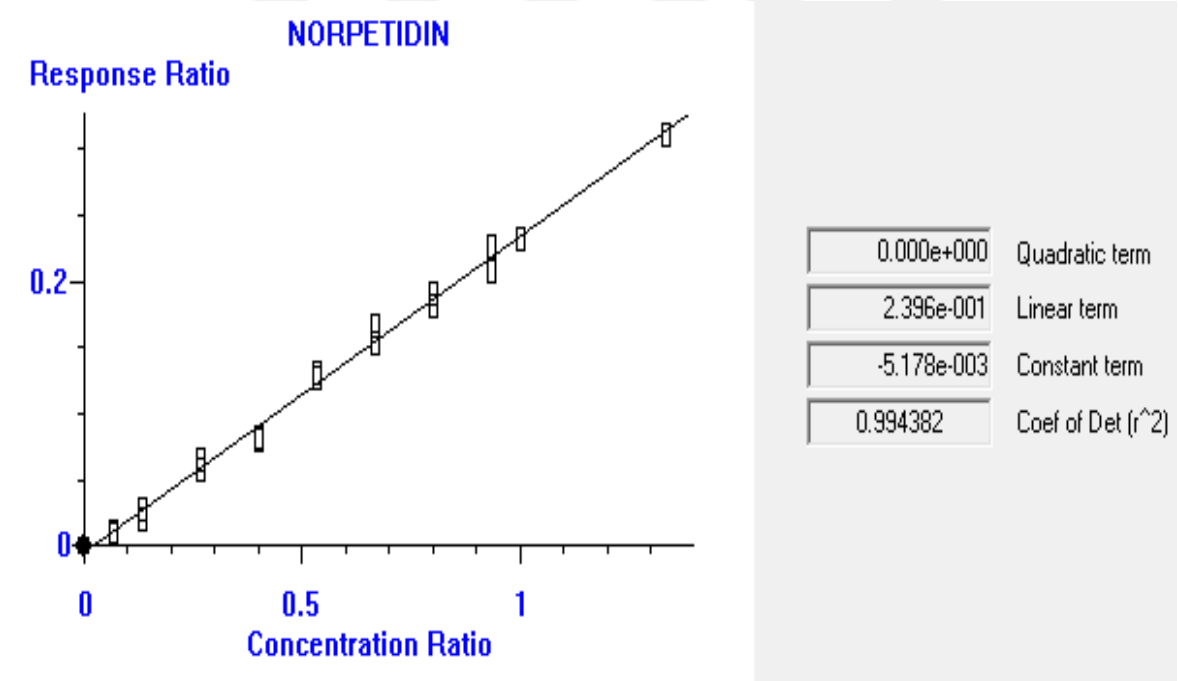
4.3. Doğrusal Çalışma Aralığı

GC-MS sistemi ile gerçekleştirilen idrarda Pet ve NPet analitlerinin belirlenmesinde kullanılan kalibrasyon eğrileri aşağıdaki gibidir. Çalışma aralığı Pet için 0,125-25 µg/mL, NPet için 1-20 µg/mL arasındadır. Bu aralıktaki korelasyon katsayısı Pet için 0.999900, NPet için 0.994382 olarak hesaplanmıştır. Korelasyon katsayısının 1'e yakın olması, çalışma aralığının doğrusal olduğunun göstermektedir. Pet ve NPet'e ait kalibrasyon eğrileri Şekil 51 ve 52'de verilmiştir.



Şekil 51: Pet kalibrasyon eğrisi (0,125-25 µg/mL)

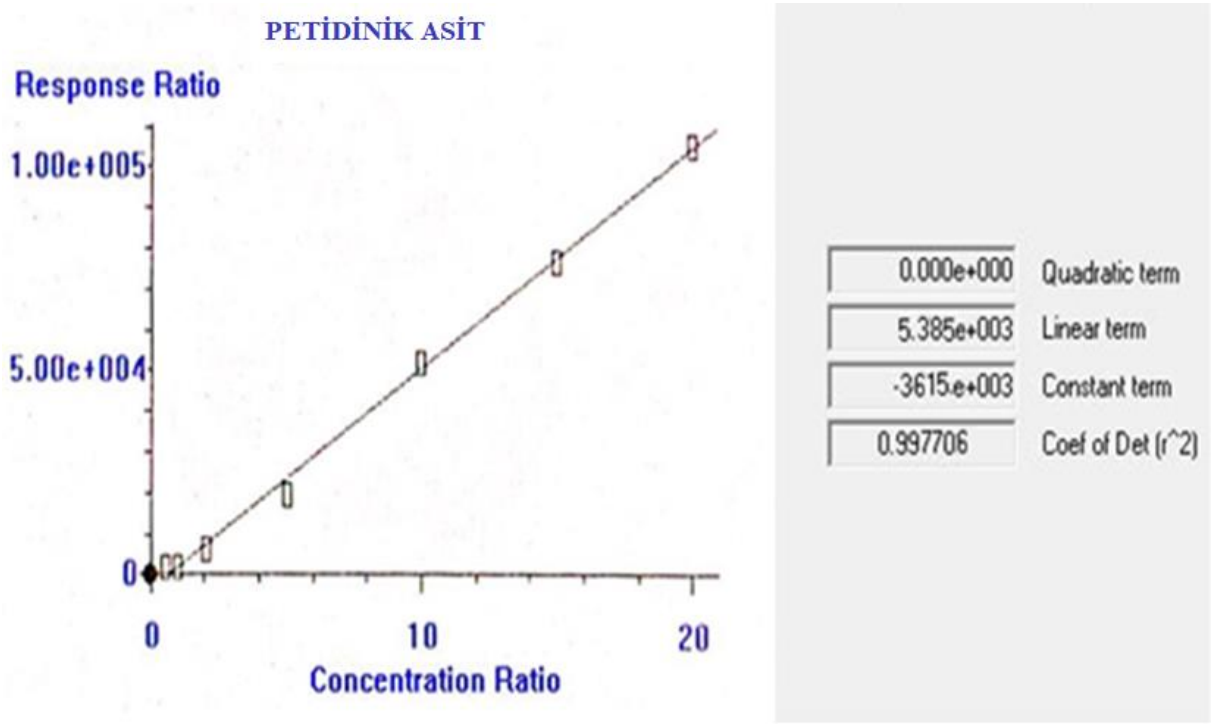
(response ratio: etken maddenin detektör cevabının iç standart detektör cevabına olan oranı; concentration ratio: etken maddenin konsantrasyonun iç standart konsantrasyonuna oranı)



Şekil 52: NPet kalibrasyon eğrisi (1-20 µg/mL)

(response ratio: etken maddenin detektör cevabının iç standart detektör cevabına olan oranı; concentration ratio: etken maddenin konsantrasyonun iç standart konsantrasyonuna oranı)

GC-MS sistemi ile gerçekleştirilen MeOH'de PetA analitinin belirlenmesinde kullanılan kalibrasyon eğrisi aşağıdaki gibidir. PetA için çalışma aralığı 0,5-20 µg/mL olarak belirlenmiştir. PetA'nın bu aralıktaki korelasyon katsayısı 0.997706 olarak hesaplanmıştır. PetA'ya ait kalibrasyon eğrisi Şekil 53'te verilmiştir.



Şekil 53: PetA kalibrasyon eğrisi (0.5-20 µg/mL)

(response ratio: etken maddenin detektör cevabının iç standart detektör cevabına olan oranı; concentration ratio: etken maddenin konsantrasyonun iç standart konsantrasyonuna oranı)

4.4. Tespit ve Tayin Limiti (LOD, LOQ)

LOD ve LOQ değerleri sadece IS içeren kör numunelerin sonuçlarından elde edilmiştir. Kör numunelerin 10 kez tekrarı ile elde edilen ortalama, standart sapma ve bu değerlerden elde edilen LOD ve LOQ sonuçları Tablo XVIII'de verilmektedir. LOD ve LOQ hesaplamaları gereç ve yöntemlerde belirtilen formüller ile hesaplanmıştır. Pet için LOD değeri 0,052206 µg/mL, LOQ değeri 0,090953 µg/mL, NPet için LOD değeri 0,492051 µg/mL, LOQ değeri 0,855003 µg/mL bulunmuştur.

Tablo XVIII. Pet ve NPet içermeyen idrar örnekleri ile yapılan LOD ve LOQ sonuç tablosu

	Pet (µg/mL)	**NPet (µg/mL)**
Tekrar 1	0,041	0,281
Tekrar 2	0,036	0,342
Tekrar 3	0,03	0,421
Tekrar 4	0,043	0,237
Tekrar 5	0,034	0,368
Tekrar 6	0,034	0,367
Tekrar 7	0,037	0,354
Tekrar 8	0,031	0,377
Tekrar 9	0,044	0,283
Tekrar 10	0,026	0,335
Ort.	0,0356	0,3365
S.S.	0,005535	0,05185
LOD	**0,052206**	**0,492051**
LOQ	**0,090953**	**0,855003**

4.5. Doğruluk

4.5.1. Geri kazanım

Geri kazanım hesaplamaları yapmak için kalibrasyon çözeltilerinden düşük, orta ve yüksek (Pet için 0,125, 0,75, 125 µg/mL, NPet için 1, 6, 10 µg/mL) olmak üzere 3 farklı konsantrasyon noktası seçilmiştir. 6 tekrarlı geri kazanım çalışmalarından elde edilen sonuçların ortalama, standart sapma ve yüzde geri kazanım değerleri tablo XIX'da verilmektedir. Geri kazanım sonuçları gereç ve yöntemde belirtilen formüller ile hesaplanmıştır.

Tablo XIX. Pet ve NPet'in geri kazanım çalışması sonuç tablosu

	Pet (µg/mL)			NPet (µg/mL)		
	0,125 µg/mL	**0,75 µg/mL**	**1,25 µg/mL**	**1 µg/mL**	**6 µg/mL**	**10 µg/mL**
Tekrar 1	0,15	0,8	1,26	1,26	6,27	9,43
Tekrar 2	0,14	0,63	1,3	1,01	5,10	10,93
Tekrar 3	0,15	0,89	1,26	1,28	4,84	8,20
Tekrar 4	0,14	0,9	1,32	1,25	5,84	9,44
Tekrar 5	0,16	0,9	1,59	1,22	5,72	10,92
Tekrar 6	0,15	0,96	1,41	1,12	5,93	11,36
Ort.	0,148	0,847	1,357	1,190	5,617	10,047
S.S.	0,007	0,108	0,116	0,096	0,493	1,113
%G.K.	**118,66**	**112,88**	**108,53**	**119,00**	**93,60**	**100,50**

4.5.2. Kesinlik

Çalışmanın kesinliği, tekrar edilebilirlik ve laboratuvar içi tekrar üretilebilirlik bakımından değerlendirildi. Değerlendirme kriteri %RSD <20 olarak belirlenmiştir.

4.5.2.1. Tekrar edilebilirlik

Tekrar edilebilirlik değerleri, geri kazanım sonuçlarından elde edilmiştir. Pet ve NPet'in geri kazanım hesaplamaları için belirlenen 3 farklı kalibrasyon noktası 6 kez tekrar edilecek şekilde çalışılmıştır. İdrar örneklerinde yapılan analizden elde edilen sonuçların ortalama, standart sapma ve %RSD değerleri Tablo XX'de verilmiştir. Hesaplamalar, gereç ve yöntemde belirtilen formüller ile yapılmıştır.

Tablo XX. Pet ve NPet'in tekrar edilebilirlik çalışması sonuç tablosu

	Pet (µg/mL)			NPet (µg/mL)		
	0,125 µg/mL	**0,75 µg/mL**	**1,25 µg/mL**	**1 µg/mL**	**6 µg/mL**	**10 µg/mL**
Tekrar 1	0,15	0,8	1,26	1,26	6,27	9,43
Tekrar 2	0,14	0,63	1,3	1,01	5,10	10,93
Tekrar 3	0,15	0,89	1,26	1,28	4,84	8,20
Tekrar 4	0,14	0,9	1,32	1,25	5,84	9,44
Tekrar 5	0,16	0,9	1,59	1,22	5,72	10,92
Tekrar 6	0,15	0,96	1,41	1,12	5,93	11,36
Ort.	0,148	0,847	1,357	1,190	5,617	10,047
S.S.	0,007	0,108	0,116	0,096	0,493	1,113
%RSD	**4,633**	**12,715**	**8,540**	**8,031**	**8,770**	**11,074**

4.5.2.2. Tekrar üretilebilirlik

Tekrar üretilebilirlik çalışması için, kalibrasyon çözeltilerinden düşük, orta ve yüksek olmak üzere üç farklı konsantrasyon noktası seçilmiş, 3 kez tekrar edilecek şekilde günler arası analiz yapılmıştır. Günler arası elde edilen 3 tekrarlı sonuçlar, bu sonuçların ortalamaları, standart sapma ve %RSD değerleri Tablo XXI'de verilmiştir. Hesaplamalar, gereç ve yöntemde belirtilen formüller ile yapılmıştır.

Tablo XXI. Pet ve NPet'in günler arası tekrar üretilebilirlik çalışması sonuç tablosu

	Gün	**Konsantrasyon**	**1.Tekrar**	**2.Tekrar**	**3.Tekrar**	***Ort.***	***S.S.***	***%RSD***
Pet	**1.gün**	***0,125 µg/mL***	0,18	0,16	0,17	0,170	0,008	**4,803**
		0,75 µg/mL	0,80	0,63	0,86	0,763	0,097	**12,761**
		1,25 µg/mL	1,26	1,30	1,23	1,263	0,029	**2,270**
		0,125 µg/mL	0,17	0,14	0,17	0,160	0,014	**8,839**

NPet	2.gün	*0,75 µg/mL*	0,89	0,68	0,89	0,820	0,099	**12,073**
		1,25 µg/mL	1,26	1,40	1,40	1,353	0,066	**4,877**
	3.gün	*0,125 µg/mL*	0,18	0,18	0,16	0,173	0,009	**5,439**
		0,75 µg/mL	0,90	0,90	0,96	0,920	0,028	**3,074**
		1,25 µg/mL	1,32	1,59	1,41	1,440	0,112	**7,795**
	1.gün	*1 µg/mL*	1,12	1,01	1,21	1,113	0,082	**7,346**
		6 µg/mL	6,27	5,10	6,26	5,877	0,549	**9,345**
		10 µg/mL	9,43	10,93	9,26	9,873	0,750	**7,600**
	2.gün	*1 µg/mL*	1,36	1,04	1,22	1,207	0,131	**10,855**
		6 µg/mL	4,84	5,37	4,98	5,063	0,224	**4,429**
		10 µg/mL	8,20	11,33	8,65	9,393	1,382	**14,709**
	3.gün	*1 µg/mL*	1,35	1,33	1,22	1,300	0,057	**4,397**
		6 µg/mL	5,84	5,72	5,93	5,830	0,086	**1,476**
		10 µg/mL	9,44	10,92	11,36	10,573	0,821	**7,767**

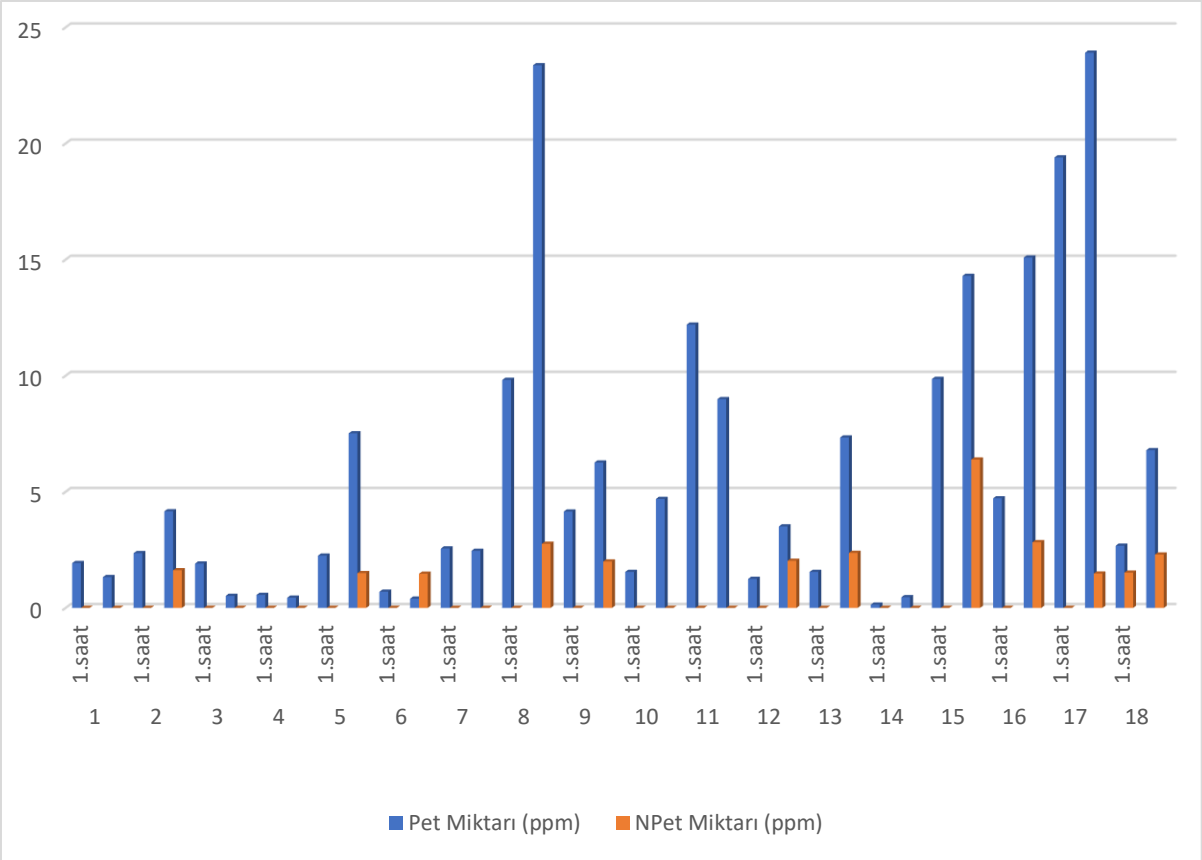
4.6. Hasta İdrar Örneklerin Sonuçları

Çalışmamızda idrar örneğinden Pet ve metabolitlerinin GC-MS ile tayini için geliştirilen metodunun yukarıda belirtilen idrar örneklerinden ortalama geri kazanım değerleri göz önüne alınarak 18 hastanın idrar örneklerinde incelenmiştir. Her hasta örneği 3 tekrarlı olacak şekilde çalışılmıştır. Analiz sonucu edilen Pet ve NPet miktarları Tablo XXII'de verilmektedir. Bütün değerler µg/mL (ppm) cinsinden verilmiştir. Çoğu NPet değeri, LOQ değerinin altında olduğu için hesaplanamamıştır.

Tablo XXII. Hasta idrarlarından elde edilen sonuçlar

Hasta No	Örneğin Alındığı Saat	Konsantrasyon (µg/mL)							
		1.Tekrar		2.Tekrar		3.Tekrar		Ortalama	
		Pet	NPet	Pet	NPet	Pet	NPet	Pet	NPet
1	***1.saat***	1,74	< LOQ	2,23	< LOQ	1,83	< LOQ	**1,93**	**< LOQ**
	3.saat	1,21	< LOQ	1,41	< LOQ	1,39	< LOQ	**1,33**	**< LOQ**
2	***1.saat***	2,49	< LOQ	2,29	< LOQ	2,30	< LOQ	**2,36**	**< LOQ**
	3.saat	3,39	< LOQ	5,25	1,73	3,85	1,52	**4,16**	**1,62**
3	***1.saat***	2,05	< LOQ	1,86	< LOQ	1,83	< LOQ	**1,91**	**< LOQ**
	3.saat	0,34	< LOQ	0,66	< LOQ	0,57	< LOQ	**0,52**	**< LOQ**
4	***1.saat***	0,51	< LOQ	0,64	< LOQ	0,55	< LOQ	**0,56**	**< LOQ**
	3.saat	0,43	< LOQ	0,47	< LOQ	0,42	< LOQ	**0,44**	**< LOQ**
5	***1.saat***	2,01	< LOQ	2,53	< LOQ	2,22	< LOQ	**2,25**	**< LOQ**
	3.saat	6,42	< LOQ	8,93	1,74	7,21	1,26	**7,52**	**1,50**
6	***1.saat***	0,61	< LOQ	0,76	< LOQ	0,73	< LOQ	**0,70**	**< LOQ**
	3.saat	0,41	1,45	0,40	1,47	0,40	1,52	**0,40**	**1,47**
7	***1.saat***	2,42	< LOQ	2,71	< LOQ	2,56	< LOQ	**2,56**	**< LOQ**
	3.saat	2,35	< LOQ	2,88	< LOQ	2,17	< LOQ	**2,46**	**< LOQ**
8	***1.saat***	7,79	< LOQ	13,26	< LOQ	8,42	< LOQ	**9,82**	**< LOQ**
	3.saat	24,78	2,42	21,74	3,10	23,61	2,77	**23,37**	**2,76**
9	***1.saat***	3,11	< LOQ	5,48	< LOQ	3,86	< LOQ	**4,15**	**< LOQ**
	3.saat	5,94	2,02	6,47	1,82	6,37	2,18	**6,26**	**2,00**
10	***1.saat***	1,32	< LOQ	1,74	< LOQ	1,59	< LOQ	**1,55**	**< LOQ**
	3.saat	3,67	< LOQ	6,09	< LOQ	4,33	< LOQ	**4,69**	**< LOQ**
11	***1.saat***	2,57	< LOQ	28,00	< LOQ	6,05	< LOQ	**12,20**	**< LOQ**

	3.saat	8,52	< LOQ	9,64	< LOQ	8,81	< LOQ	**8,99**	**< LOQ**
12	***1.saat***	0,88	< LOQ	1,69	< LOQ	1,20	< LOQ	**1,25**	**< LOQ**
	3.saat	2,82	1,92	3,96	2,09	3,77	2,08	**3,51**	**2,03**
13	***1.saat***	1,28	< LOQ	1,73	< LOQ	1,64	< LOQ	**1,55**	**< LOQ**
	3.saat	6,26	2,35	9,09	2,40	6,69	2,36	**7,34**	**2,37**
14	***1.saat***	0,15	< LOQ	0,14	< LOQ	0,13	< LOQ	**0,14**	**< LOQ**
	3.saat	0,40	< LOQ	0,48	< LOQ	0,52	< LOQ	**0,46**	**< LOQ**
15	***1.saat***	10,38	< LOQ	9,02	< LOQ	10,18	< LOQ	**9,86**	**< LOQ**
	3.saat	12,11	4,47	16,40	9,65	14,40	5,05	**14,30**	**6,39**
16	***1.saat***	5,00	< LOQ	4,59	< LOQ	4,57	< LOQ	**4,72**	**< LOQ**
	3.saat	13,58	2,71	16,02	2,88	15,68	2,92	**15,09**	**2,83**
17	***1.saat***	20,63	< LOQ	18,65	< LOQ	18,93	< LOQ	**19,40**	**< LOQ**
	3.saat	24,71	1,62	22,77	1,12	24,26	1,71	**23,91**	**1,48**
18	***1.saat***	2,54	1,49	2,99	1,57	2,52	1,50	**2,68**	**1,52**
	3.saat	8,80	2,53	5,53	2,26	6,06	2,13	**6,79**	**2,30**



Şekil 54: Hasta idrarlarından elde edilen sonuçların istatiksel gösterimi

5. TARTIŞMA

Toplumda büyük bir öneme sahip olan opioidler, ağrı giderilmesi için geçmişten günümüze kadar yaygın olarak kullanılmış ve kullanılmakta olan en etkili ilaçlardır. Son yıllarda opioidlerin kötü amaçla kullanımı ve buna bağlı olarak opioid bağımlılığının arttığı bildirilmektedir (2,3). Opioid bağımlılığı dünyada çok önemli bir sorun haline gelmiştir. Hem tedavi amaçlı hem de kötüye kullanımlarından dolayı opioidlerin kullanımına dair tartışmalar yüzyıllardır devam etmektedir. Bir diğer önemli sorun ise medikal amaçlarının dışında kötüye kullanılan reçeteli ilaçlardır. Kontrole Tabi İlaç grubunda olup, istismarı ile dikkatleri üzerine çeken Pet, insanlarda ağrı kesici olarak kullanılan ilk sentetik opioiddir (7,9). Meperidin, Aldolan gibi isimleriyle de tanınmakta olan Pet, genellikle genel cerrahi, nöroloji ve plastik cerrahi alanlarında ağrı tedavisi için kullanılmaktadır (14-16). Literatürdeki birçok çalışma Pet'in kullanım açısından güvenilirliğini bildirirken (24), son yıllarda hızla artan kötüye kullanımı, bağımlılık yapıcı etkileri ve aktif metaboliti NPet'in toksitetesi nedeni ile Pet 2003 yılında DSÖ tarafından güvenli ilaçlar listesinden çıkartılmıştır (17-25,50).

1947 yılında, ilk ölümcül Pet zehirlenme vakası bildirilmiştir (82). Bu olgudan sonra Pet'in adli bilimler açısından önemi fark edilmeye başlanmış, Pet üzerine çalışmalara yoğunlaşılmıştır. Pet zehirlenme olgularında bu zamana kadar bildirilmiş en yüksek doz Dr. Pinkerton'un hastası olan 53 yaşında bir erkeğe aittir. Hastanın tedavi dozunun çok üstünde (40 tablet 50 mg) Pet aldığı bildirilmiştir (80). Plummer ve arkadaşları ise NPet toksitesini konu alan üç olgu bildirmişlerdir. Bu üç olgu için kandan elde ettikleri Pet ve NPet konsantrasyonlarının ortalaması sırasıyla 793.33 ng/ml, 3,093 ng/ml'dir (142).

Literatürde bildirilen Pet kötü kullanım olgularının çoğunda, sağlık sektöründe çalışan kişilerin olduğu görülmektedir (14,20,21,26). Bunun sebebinin, Pet'in kolayca temin edilebilmesi ve kullanımının kolay olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (7,23,24).

Bunlara ek olarak güçlü yoksunluk sendromu belirtileri gösteren Pet'in, adli bilimlerde sıkça karşılaşılan suçlarla da ilişkili olduğu olgular görülmektedir. Bu olgularda Pet'e ulaşmakta zorlanan kişilerin adi suçlar dediğimiz hırsızlık, dolandırıcılık, karaborsa gibi olaylara karıştığı ve hatta yasadışı bilinen farklı uyuşturuculara yöneldikleri de bilinmektedir (27-32).

Özellikle sağlık çalışanları arasında görülen, Pet kötüye kullanımına ilişkin bir olgu sunumunda, 37 yaşındaki bir hemşirenin, 31 yaşında geçirdiği bir ameliyat sonrasında ağrısını azaltabilmek için Pet ile tanıştığı ve zamanla bağımlılık geliştirdiği, mesleğinden dolayı ilk başlarda ilacı bulmakta sorun yaşamadığı, ancak ilacı temin edemediği zamanlarda yoksunluk krizi geçirdiği, bunun sonucunda da klinikten Pet çaldığı bildirilmektedir. Sürecin devamında işini kaybettiği ve akabinde eşinden de boşanmak zorunda kaldığı ifade edilmektedir. Kişinin işten atıldıktan sonra da arkadaş ziyaretleri bahanesi ile gittiği yerlerden kırmızı reçete çalarak ya da hasta olduğuna dair yalanlar söyleyerek Pet almaya devam ettiği görülmektedir. Son olarak, yoksunluk sendromunun yan etkilerinden dolayı fizyolojik olarak bitkin, kendine karşı ilgisiz ve vücudunda enjeksiyonlara bağlı ekimoz izleri görüldüğü çok geçmeden de aşırı doz Pet'den hayatını kaybettiği bildirilmiştir (76).

Literatürde Pet'e dair bildirilen kötüye kullanım olgularının yanısıra cinayet amaçlı olgulara da rastlamak mümkündür. Araştırmalar sonucu Pet ile işlenmiş 2 cinayet olgusuna rastlanmıştır. İlk olgu; 35 yaşında, hasta bir kadının eşi tarafından ölü bulunmasını konu almaktadır. Otopsi sonrası yapılan toksikolojik analiz sonucu, kişinin kanında ve vücut dokularında yüksek konsantrasyonda cıva, siyanür ve Pet rastlamışlardır. Klinik öykü, otopsi incelemesi ve toksikolojik analiz bulgularına dayanarak, ölüm nedeninin akut Pet ve sodyum siyanür ile komplike olan kronik cıva zehirlenmesi olduğunu, ölüm şeklinin ise cinayet olduğunu bildirmişlerdir (88). İkinci olgu; 88 yaşında, oldukça zengin ve hasta olan bir kadının, öldürülmesini konu almaktadır. Ölüm nedeni araştırması için bağımsız olarak toksikolojik analizler yapan üç farklı kurumdan sonuçlar elde edilmiş, bu sonuçlara göre femur, kalp ve

beyin dokusu örneklerinde ortalama Pet miktarları sırasıyla 6,3 mg/L, 7,6 mg/L, 12,2 mg/L bulunmuş, Pet enjeksiyonundan sonra gerçekleşen üç farklı ölüm olgusunda da ortalama kan konsantrasyonunun 4,3 mg/L olduğu bildirilmiştir. Pet'e ek olarak kurbanın kanında pentazosin, prometazin ve metoklopramid maddelerine de rastlamışlardır. Femur ve beyin dokusunda bulunan yüksek Pet konsantrasyonlarının, kurbanın ölümünden kısa bir süre önce yüksek dozda Pet'e maruz kaldığını doğrulamaktadır (32). Bu olgu postmortem doku örneklerinde Pet'in belirlendiği önemli bir cinayet olgusudur. Şüpheli bir zehirlenme vakasında, kişinin zaten kronik olarak kullandığı bir ilaç nedeniyle ölümün gerçekleşmesi, tüm etken maddeler için adli toksikologlara her daim zorluklar teşkil etmektedir. Postmortem olguların analizinde, tüm kan ve doku örneklerden belirlenen ilaç konsantrasyonlarının birlikte değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu sayede hastanın bir kerede terapötik dozun üzerinde bir ilaca maruz kalıp kalmadığı belirlenebilecektir.

Pet etken maddesinin analizi ile ilgili yapılan analitik çalışmalara bakılacak olduğunda, plazma ve idrar gibi farklı biyolojik matrikslerde farklı analitik teknikler (GC-MS/MS, GC-ECD, GC-SID, LC-MS vs.) ile birçok analiz yapıldığı görülmektedir (20,57,121-128).

İnsan vücut sıvılarında Pet belirlenmesini açıklayan ilk rapor Ishii ve arkadaşlarına (20) aittir. Pet ve IS'yi (4'-Piperidinoacetophenone) Bond Elut C18 kartuşları ile kan ve idrardan ekstrakte ederek GC–MS/MS ile analiz etmişlerdir. Her iki analit için geri kazanımları %85'in üzerinde, kalibrasyon eğrileri 1.25-40 ng/mL aralığında, tespit limitlerinin ise yaklaşık 0,5 ng/ml olduğunu belirtmişlerdir.

Chan ve arkadaşları (52), idrardan Pet ve metabolitlerinin tayini için GC-Nitrojen-Fosfor Dedektörü (NPD) ile yöntem geliştirmişlerdir. Yöntemlerinin geri kazanımının %61,6 ±5.14 olduğu, çalışma aralıklarını Pet ve NPet için 0.4-6.4 µg/mL, PetA ve NPetA için 0.8-12.8 µg/mL olarak belirtmişlerdir. Çalışmalarında sekiz hastaya kas içinden 1 mg/kg tek doz Pet

verdiklerini ve bu hastalardan alınan idrar örneklerini iki tekrarlı olacak şekilde analiz ettiklerini bildirmişlerdir.

Pet'in idrarda belirlenmesine yönelik ülkemizde gerçekleştirilen bir diğer çalışmada, Kul ve arkadaşları (57), Pet ve NPet'in aynı anda tayini için UHPLC-MS/MS sistemine 10 µL numune enjekte ederek analiz yaptıklarını, iç standart olarak UR-144 5-pentanoik asit metaboliti-d5 seçtiklerini bildirmişlerdir. Geliştirdikleri yöntemi 9-1800 ng/mL aralığında Pet ve NPet için matris etkileri, seçicilik, LLOQ, taşıma, doğruluk, kesinlik, kalibrasyon eğrisi performansı, seyreltme bütünlüğü ve stabiliteye göre doğrulamış, Pet ve NPet için LLOQ değerini 9 ng/mL olarak belirlemişlerdir. Çalıştıkları yöntemi Pet kötüye kullanımı nedeniyle hastaneye kaldırılan 1'i kadın 1'i erkek olan 2 hasta üzerinde denemişlerdir. İdrarda Pet ve NPet konsantrasyonlarını erkek hasta için 15.2 ve 450.5 ng/mL, kadın hasta için 11.8 ve 336.7 ng/mL olarak bulmuşlardır.

Yukarıda bahsi geçen çalışmalarda Pet etken maddesi ve metabolitleri farklı analitik teknikler kullanılarak farklı matrikslerde analiz edilmiştir. Her analitik tekniğin çalışılacak farklı matrikslere (idrar, kan, saç vb.) göre değişkenlik gösterebilen performans parametreleri ve analiz limitleri bulunmaktadır. Bizim çalışmamızda Pet ve metaboliti NPet'in idrardan aynı anda analizi için GC-MS sistemi ile kolay, hızlı, doğru ve güvenilir bir analiz yöntemi geliştirilmiştir. Yöntemimiz Pet ve NPet için, özgüllük, seçicilik, doğrusal çalışma aralığı, LOD ve LOQ, doğruluk parametreleri ile test edilerek tam valide edilmiştir. Pet ile NPet türevlendirildiklerinde sıklıkla aynı türevleri verdikleri (20,50), PetA'nın ise türevlendirilmeden GC-MS ile analiz edilememesi (120) ve stokta az miktarda PetA (100 µg/mL) bulunmasından dolayı, çalışmamızda PetA tam valide edilememiştir. İdrar, ana ilaç ve metabolitlerinin seruma göre daha uzun belirleme süresine sahip olması, test kolaylığı sağlaması, numune hazırlama prosedürünün basit olması, nispeten düşük maliyetli olması,

invaziv olmayan şekilde toplanabilmesi, eğitimli personel gerektirmemesi sebepleri ile çalışmamızda biyolojik matriks olarak seçilmiştir (115,124-126).

Geliştirdiğimiz yöntemde analiz süresinin kısa olmasına, kesin ve net ayırım gücü ile etken madde ve metabolitletinin piklerini elde etmeye çalışıldı. Pet, NPet, PetA ve IS için alıkonma zamanları sırasıyla 4,973± (0,005), 5,136± (0,001), 5,039± (0,032), 6,299± (0,001) dk. olarak tespit edilmiştir. Analizler için SIM metotunda bakılacak iyonlar (m/z) Pet için 172, 218, 247; NPet için 158, 233, PetA için 103, 276, 291, Vareniklin için 168, 181, 211 olarak seçilmiştir. Yapılan bütün çalışmalara Vareniklin (15 µg/mL) iç standardı eklenmiş böylece oluşabilecek hataları önleme, giderebilme, standardize etme ve yüksek verimli sonuçlar elde edebilme amaçlanmıştır. Seçicilik parametresi için yapılan çalışmalarda, kör ve sadece IS içeren matriksler karşılaştırılmış, böylece kullanılan malzeme ve matrikslerden kaynaklı oluşabilecek herhangi bir girişim olup olmadığı gözlemlenmiştir. Kör MeOH ve idrar matrikslerine düşük, orta, yüksek konsantrasyonlarda spikelar yapılmış; konsantrasyon arttıkça analitlerin pik alanlarının konsantrasyonlarla doğru orantılı olarak arttığı belirlenmiştir. Böylelikle çalışmamız için geliştirdiğimiz yöntemin, Pet ve metaboliti NPet'in tespitinde seçici ve hassas olduğuna karar verilmiştir. Doğrusallık parametresi sonuçlarına göre; çalışma aralığı Pet için 0,125-25 µg/mL, NPet için 1-20 µg/mL, PetA için 0,5-20 µg/mL olarak belirlenmiştir. Bu aralıktaki korelasyon katsayısı Pet için 0.999900, NPet için 0.994382, PetA için 0.997706 olarak hesaplanmıştır. Kör numunelerin 10 kez tekrarı ile elde edilen LOD ve LOQ değerleri sırasıyla Pet için 0,052206 ve 0,090953 µg/mL, NPet için sırasıyla 0,492051 ve 0,855003 µg/mL bulunmuştur. Kalibrasyon çözeltilerinden Pet ve Npet için 3 farklı konsantrasyon noktası seçilmiştir. 6 tekrarlı yapılan çalışmalarda Pet için geri kazanım yüzdesi %113,357± (4,149); NPet için %104,367± (10,724) olarak hesaplanmıştır. Kesinlik parametresinin sonuçları 6 tekrarlı yapılan tekrar edilebilirlik ve tekrar üretebilirlik çalışmalarından elde edilmiştir. Tekrar edilebilirlik %RSD sonuçları Pet için %8,629± (3,300); NPet için %9,292±

(1,296) olarak hesaplanmıştır. Günler arası ve gün içerisinde 3'er tekrarlı olarak elde edilen tekrar üretilebilirlik %RSD sonucu ortalaması Pet için %6,880± (1,802); NPet için %7,543± (2,017) olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar neticesinde yöntemimizin toksikolojik analizler için uygun değerler aralığında olduğu görülmüştür.

Çalışmamızın geri kazanım değerleri açısından diğer çalışmalar ile karşılaştırıldığında benzer veya daha yüksek verimli olduğu, çalışma aralığımızın analitik sistemlerde ve farklı dedektörlerle yapılan çalışmalar kadar hassas olmadığı gözlense de literatürden elde edilen olgular göz önüne alındığında madde konsantrasyonlarını tayin edebilecek çalışma aralığına sahip olduğu düşünülmektedir (20,52,87).

Ishıı ve arkadaşlarının kan ve idrardan Bond Elut C18 kartuşları ile %85 geri kazanımla çalıştıkları, bizim çalışmamızda ise OASIS HLB kartuşları ile SPE yapılarak %100 üzeri geri kazanım elde edildiği görülmektedir. SPE yüksek geri kazanım verimine sahip, kesinliği ve tekrar edilebilirliği yüksek bir yöntem olarak bulunmuştur. Bunlara ek olarak Kul ve arkadaşlarının aksine GC-MS sistemine numuneden 1 µL enjekte edilerek analiz yapılarak daha az numune kullanılması sağlanmıştır. Chan ve arkadaşları ise bizim geliştirdiğimiz yöntemden farklı olarak NPetA'i de çalışmalarına dahil etmişlerdir. Bizim çalışmamızda Pet ve NPet'in tayinini yapılmış, PetA belirlenebilmiştir.

LC-MS/MS, GC-MS'e göre daha güçlü bir teknik olduğu için PetA'ı türevlendirmeden analiz edebilecek özelliklere sahiptir. Türevlendirme basamağı olmayacağı için Kul ve arkadaşlarının PetA tayinini yapabilmeleri çok daha kolay olacaktır. Ancak çalışmalarına idrarda yüksek konsantrasyonda atılan ve kişinin Pet kullanıp kullanmadığını gösteren güçlü bir kanıt (21) olan PetA dahil etmemişlerdir. Bunlara ek olarak çalışmamızda geliştirdiğimiz metodun geçerliliğini göstermek adına 20 mg ile 50 mg arasında Pet verilen on sekiz hastadan farklı zamanlarda alınan idrar örnekleri üzerinde üç tekrarlı olacak şekilde, kısa bir analiz süresi

ile analiz yapılarak küçük çaplı farmakokinetik parametrelerin değerlendirilmesine de olanak sağlanmıştır. Çalışmamız ile ülkemizde ilk defa GC-MS ile idrarda ana etken madde ve iki metabolitini birarada belirleyebilen, ana etken madde ve NPet için miktar tayini yapabilen bir yöntem geliştirilmiş ve yöntemin analitik parametreleri on sekiz hastadan temin edilen idrar örneklerinde başarılı bir şekilde gerçekleştirilerek değerlendirilmiştir. Hastalardan elde edilecek verilere bakacak olursak;

Elde edilen en düşük Pet ve NPet konsantrasyon miktarı sırasıyla 0,14 µg/mL, 1,47 µg/mL, en yüksek Pet ve NPet konsantrasyon miktarı sırasıyla 23,91 µg/mL, 6,39 µg/mL olarak bulunmuştur. 1, 3, 4, 7 ve 11. hastalarda Pet miktarı zaman geçtikçe azalmaya başlamış, NPet, LOQ değerinin altında olduğu için tespit edilememiştir. Yaşlı kişilerde Pet atılım miktarının gençlere göre daha yavaş olduğu bilinmektedir (62). Bu beş hastanın 4'ünün 40 yaşından büyük olması, Pet'in yavaş atılmasına neden olmuş olabileceğini düşündürmektedir.

Pet'in en düşük bulunduğu konsantrasyonun, hem perop hemde postop olarak toplamda 50mg Pet alan 14. hastaya ait olduğu, hastanın idrar renginin diğer hastalara göre daha koyu (turuncu) olduğu not edilmiştir. Koyu idrar rengi az sıvı tüketimi veya böbreğe az sıvı geldiğini işaret etmektedir. Turuncu renk idrar, bazı gıdaların tüketiminden (havuç gibi), bazı kan sulandırıcılardan, bazı vitamin/antibiyotik veya kemoterapi ilaçlarının kullanımı sonucunda oluşabilmektedir (145). 14. hastamızın gıda tüketimine dair herhangi bir bilgimiz olmamakla beraber 29 yaşında, ilaç/madde kullanımı bulunmayan bir birey olduğunu bilmekteyiz. Çalışmamıza Pet yarılanma ömrünü arttırabileceği için böbrek hastalığı olduğu bilinen kişilerin dahil edilmediği göz önünde bulundurularak, 50mg Pet almış 14. hastamızın bilinmeyen ya da tespit edilmemiş bir böbrek rahatsızlığı olabileceğini düşünülmektedir.

2, 5, 8, 9, 12, 13, 15, 16, 17 ve 18. hastaların hem Pet hem de Pet metabolizine bağlı olarak NPet konsantrasyonlarının arttığı görülmektedir. 10 hastanın yaş aralığı 23-38 arasında değişmektedir. 10. hastadan sonraki hastalarda, 1. saatte toplanan idrardan sonra postop bir doz

daha Pet verildiği için 3. Saatteki Pet konsantrasyondaki artış anlamlı bulunmuştur. 8. Hastanın Pet konsantrasyonunun, tek doz Pet almasına rağmen oldukça fazla olduğu görülmektedir. Karaciğer fonksiyon bozukluğu olan kişilerde normalden daha fazla Pet atıldığı bilinmektedir. Marihuana kullanımı olduğu bilinen bu hastanın, marihuana kullanımına bağlı karaciğer sorunu olabileceği bu nedenle Pet konsantrasyonunun normalden fazla olabileceği düşünülmektedir. Büyük miktarda marihuana tüketiminin karaciğer sağlığını olumsuz etkileyebileceği yönünde düşünceler mevcuttur (146).

1. saatinde NPet tespit edilen tek hasta 18. hastadır. 18. hastanın ağrı kesici bir ilaç olan İbuprofen kullandığı bilinmektedir. İbuprofende Pet gibi karaciğerde sitokrom P450 (CYP2C) ile metabolize edilmektedir. (52, 147) Karaciğer işlev bozukluğu olan kişilerde, bozukluğun derecesine göre kullanılan ilaçların metabolize olması da değişiklik göstermektedir. Bu sebeple Pet'in hızlı metabolize olduğu ve NPet'in diğer hastalara göre daha erken tespit edildiği düşünülmektedir.

Genel olarak ilaçların metabolize edilmesini etkileyen en önemli etkenler genetik polimorfizm (örneğin CYP3A4'ün olmaması), etkileşimler (greyfurt gibi), hastalıklar (karaciğer, böbrek yetmezliği) ve yaştır. Çalışmamızdaki hastaların sonuçlarından da görülebileceği üzere bu etkenler; metabolize edilme hızını ve atılımı değiştirebilmektedir (148).

6. SONUÇ

Çalışmamız ile ülkemizde ilk defa GC-MS sistemi ile Pet etken maddesi ve metabolitlerinin analizi için bir yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmamız kısa sürede analiz edebilme, kolay örnek hazırlama basamaklarna sahip olma, tekrarlanabilme, yüksek geri kazanıma sahip olma, hem düşük hem de yüksek konsantrasyonlarda bile güvenilir analiz yapabilme avantajlarına sahiptir. Geliştirdiğimiz yöntem, çeşitli parametrelerle valide edilmiş olup; hen idrara maddenin katılması sureti ile hem de gerçek hastalardan alınan idrar örnekleri ile test edilmiştir.

NPet miktarının belirlenmesinin, Pet'in kötüye kullanımını belirlemede önemli bir etken olduğu, çalışmamızın daha kapsamlı olabilmesi için hastalardan başka saatlerde de idrar alınmasının gerektiği, böylece hem saatler arasında metabolize edilmelerine göre hem de NPet'in konsantrasyonlarına dair daha kesin yorumlar yapılabileceği düşünülmektedir. Bunlara ek olarak Pet ve NPet'den daha yüksek oranda atılan PetA'nın tam valide edilerek analiz kapsamının genişletilmesi amaçlanmakta, ileriki çalışmalar ile daha düşük LOQ değerlerine ulaşabilecek, daha hassas yöntemlerin geliştirilmesi ile bütün analitlerin aynı anda tespit edilebilmesi hedeflenmektedir.

Medikal kullanımı ile beraber kötüye kullanımı da artmakta olan Pet, kasıtlı ya da kasıtsız zehirlenmelere sebep olması, kişinin hayat kalitesini düşürmesi gibi birçok olumsuz özellikleri bakımından adli bilimler açısından önemli bir yere sahiptir. Pet hem tek başına hem de diğer maddeler ile kullandıldığında oluşturabileceği etkilerin daha ayrıntılı araştırılması olduça elzemdir. Ülkemizde de bu konuda, sınırlı sayıda çalışma olduğundan çalışmamızın; Pet'in kötüye kullanımının takip edilebilmesi, belirlenebilmesi ve buna bağlı adli olguların aydınlatabilmesine katkı sağlayacağı ve hem ülkemiz hem de dünya da Pet bağımlılığı yüzünden oluşan bireysel ve toplumsal sorunların çözülmesine yardımcı olacağı kanısındayız.

7. KAYNAKÇA

1. NORN, Svend; KRUSE, Poul R.; KRUSE, Edith. History of opium poppy and morphine. Dansk medicinhistorisk arbog, 2005, 33: 171-184.
2. Portenoy RK, Payne R, Passik SK. Lowinson JH, Ruz P, Millman RB, Langrod JG. Substance Abuse: A Comprehensive Textbook. 4th ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkens; 2004. Acute and Chronic Pain; pp. 863–904.
3. FOUNTAS, Athanasios, et al. Mechanisms of endocrinology: endocrinology of opioids. European journal of endocrinology, 2018, 179.4: R183-R196.
4. XU, Fangmin; LIU, Lingyun. Simultaneous determination of free methamphetamine, pethidine, ketamine and tramadol in urine by dispersive liquid–liquid microextraction combined with GC–MS. Forensic Sciences Research, 2019, 4.2: 188-194.
5. MAILA, Brian, et al. Treatment of Opioid Use Disorder With Buprenorphine-Naloxone at Chainama Hills College Hospital in Lusaka, Zambia: A Case Report. European Journal of Medical and Health Sciences (EJMED), 2020, 2.4: 1-3.
6. EVREN, Cuneyt, et al. Predictors of outcome during a 6-month follow-up among heroin dependent patients receiving buprenorphine/naloxone maintenance treatment. Klinik Psikofarmakoloji Bülteni-Bulletin of Clinical Psychopharmacology, 2014, 24.4: 311-322.
7. KEE, WD Ngan. Epidural pethidine: pharmacology and clinical experience. Anaesthesia and intensive care, 1998, 26.3: 247-255.
8. SAXENA, Shekhar; D MOHAN, Adityanji. Pentazocine abuse: review and a report on eighteen cases. Indian Journal of Psychiatry, 1985, 27.2: 149.
9. GALLEN, Bedelia; PRESCOTT, Frederick. Pethidine as an obstetric analgesic. British Medical Journal, 1944, 1.4335: 176.

10. MURPHY, Maureen. Intravenous pethidine. Irish Journal of Medical Science (1926-1967), 1951, 26.11: 535-540.
11. ROBINSON, Catherine; HOWIE, Lorna A. Non-neuraxial analgesia in labour. Anaesthesia & Intensive Care Medicine, 2016, 17.7: 320-323.
12. FLEET, Julie-Anne. A Comparison of Intranasal Fentanyl, Subcutaneous Fentanyl and Intramuscular Pethidine during Childbirth: A Randomised Controlled Trial. 2015. PhD Thesis. Flinders University, School of Nursing & Midwifery.
13. BRICKER, Leanne; LAVENDER, Tina. Parenteral opioids for labor pain relief: a systematic review. American journal of obstetrics and gynecology, 2002, 186.5: S94-S109.
14. CHENG, I.-Chen; CHANG, Chih-Shiuh; TSAY, Wen-Ing. Long-term usage of narcotic analgesics by chronic intractable noncancer pain patients in Taiwan from 2003 to 2012. Journal of the Formosan Medical Association, 2016, 115.9: 773-778.
15. DESAI, K. B.; RIBBANS, W. J.; TAYLOR, G. J. Incidence of five common fracture types in an institutional epileptic population. Injury, 1996, 27.2: 97-100.
16. JAAFARPOUR, Molouk, et al. The effect of intrathecal meperidine on maternal and newborn outcomes after cesarean section: a systematic review and meta-analysis study. Anesthesiology and Pain Medicine, 2020, 10.2.
17. QUAGLIA, M. G., et al. Determination of MPTP, a toxic impurity of pethidine. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2003, 33.1: 1-6.
18. KREDO, Tamara; ONIA, Rudy. Pethidine-does familiarity or evidence perpetuate its use?: clinical practice: SAMJ forum. South African Medical Journal, 2005, 95.2: 100-101.

19. HARVEY, Susan C., et al. Stability of meperidine in an implantable infusion pump using capillary gas chromatography–mass spectrometry and a deuterated internal standard. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 1999, 21.3: 577-583.
20. ISHII, Akira, et al. Sensitive determination of pethidine in body fluids by gas chromatography–tandem mass spectrometry. Journal of chromatography B, 2003, 792.1: 117-121.
21. LEWIS, John; SHIMMON, Ronald; FU, Shanlin. Pethidinic Acid: Corroboration of a Doctor's Denial of Pethidine Re-Use. Journal of analytical toxicology, 2013, 37.3: 179-181.
22. KINTZ, P., et al. Simultaneous determination of pethidine (meperidine), phenoperidine, and norpethidine (normeperidine), their common metabolite, by gas chromatography with selective nitrogen detection. Forensic science international, 1989, 43.3: 267-273.
23. USING PETHIDINE, Subarachnoid Saddle Block. PRACTICAL TECHNIQUES IN DEVELOPING COUNTRIES. Analgesia, 1987, 66: 235-40.
24. NUNES, Rogevando Rodrigues; COLARES, Paulo Giordano Baima; MONTENEGRO, Juliana Pinto. Is pethidine safe during labor? Systematic review. Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia, 2017, 39: 686-691.
25. YASAEI, Rama; ROSANI, Alan; SAADABADI, Abdolreza. Meperidine. In: StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing, 2021.
26. ÜNSALAN, Nasibe, et al. Yatarak tedavi gören madde bağımlılığı (alkol ve alkol dışı) tanısı konan hekimlerin özellikleri. Anatolian Journal of Psychiatry, 2004, 5: 148-153.
27. KIM, Jihyun, et al. Simultaneous determination of 18 abused opioids and metabolites in human hair using LC–MS/MS and illegal opioids abuse proven by hair analysis. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2014, 89: 99-105.

28. JEYARETNAM, J., et al. Disease and injury among veterinarians. Australian Veterinary Journal, 2000, 78.9: 625-629.
29. REIFENSCHWEILER, D. O. H., et al. Pethidine abuse. Reactions, 2013, 1481: 28-7.
30. FRANK, Matthias, et al. Lethal intoxication while driving a car. Archiv fur Kriminologie, 2009, 224.1-2: 10-16.
31. TURAL, S., et al. Pethidine abuse Drug dependence and withdrawal syndrome: case report. Reactions, 2010, 1307: 26.
32. DALDRUP, Th. A forensic toxicological dilemma: the interpretation of post-mortem concentrations of central acting analgesics. Forensic science international, 2004, 142.2-3: 157-160.
33. DASGUPTA, Amitava. Analytical true positive: poppy seed products and opiate analysis. In: Critical issues in alcohol and drugs of abuse testing. Academic Press, 2019. p. 449-462.
34. JANICK, Jules (ed.). Horticultural Reviews, Volume 30. John Wiley & Sons, 2003.
35. ER, C.; YILDIZ, M. Tütün, ilaç ve baharat bitkileri. Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri Bölümü. II. Baskı, 1997.
36. FURUYA, T.; IKUTA, A.; SYŌNO, K. Alkaloids from callus tissue of Papaver somniferum. Phytochemistry, 1972, 11.10: 3041-3044.
37. KAPOOR, L. Opium poppy: botany, chemistry, and pharmacology. CRC Press, 1995.
38. BAŞKANLIĞI, KOM Daire. Kaçakçılık ve Organize Suçlarla Mücadele, 2011 raporu. KOM Yayınları: Ankara, erişim www. kom. gov. tr, erişim tarihi, 2022.
39. YAKSH, Tony L.; WALLACE, Mark S. Opioids, analgesia, and pain management. Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics, 2011, 481-526.

40. HOLSTEGE, Christopher P.; BOREK, Heather A. Toxidromes. Critical care clinics, 2012, 28.4: 479-498.
41. UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS; CRIME. World drug report. Set Of 3 Booklets, 2021.
42. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA), European Drug Report, 2021: Trends and Developments. Luxembourg: Publications Office of the European Union. Erişim: https://www.emcdda.europa.eu/publications/edr/trends-developments/2021_en. (Erişim tarihi 16 March 2022).
43. COUSINS, M. J., et al. Selective spinal analgesia. The Lancet, 1979, 313.8126: 1141-1142.
44. MORGAN, G. Edward; MIKHAIL, Maged S.; MURRAY, Michael J. Clinical anesthesiology. 2002.
45. STANLEY, Theodore H. The history and development of the fentanyl series. Journal of pain and symptom management, 1992, 7.3: S3-S7.
46. HANSEN, M. S., et al. Intranasal fentanyl in the treatment of acute pain–a systematic review. Acta anaesthesiologica scandinavica, 2012, 56.4: 407-419.
47. UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS; CRIME. World drug report. 2019.
48. CENTER, Millennium Pain. Pharmacology of opioids in the treatment of chronic pain syndromes. Pain physician, 2011, 14: E343-E360.
49. BUCHAN, A. S.; BAULD, H. W. Blood-gas changes during trichloroethylene and intravenous pethidine anaesthesia. BJA: British Journal of Anaesthesia, 1973, 45.1: 93-99.
50. TODD, E. L.; STAFFORD, D. T.; MORRISON, J. C. Determination of meperidine and normeperidine in serum by gas chromatography/mass spectrometry. Journal of Analytical Toxicology, 1979, 3.6: 256-259.

51. MISIOŁEK, Hanna, et al. Postoperative pain management—2018 consensus statement of the section of regional anaesthesia and pain therapy of the polish society of anaesthesiology and intensive therapy, the polish society of regional anaesthesia and pain therapy, the polish association for the study of pain and the national consultant in anaesthesiology and intensive therapy. Anaesthesiology Intensive Therapy, 2018, 50.3.
52. CHAN, K.; LAU, O. W.; WONG, Y. C. Determination of pethidine and its major metabolites in human urine by gas chromatography. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 1991, 565.1-2: 247-254.
53. BOZDAĞ, Z., ŞAMDANCI, E. T., ŞAHİN, N., AYDIN, N. E., & SAYIN, S. (2013). Petidine bağlı ani ölüm. *Adli Tıp Dergisi*, *27*(1), 76-80.
54. KANG, Kai-Hsiang, et al. Trends in major opioid analgesic consumption in Taiwan, 2002–2014. Journal of the Formosan Medical Association, 2017, 116.7: 529-535.
55. JAMEY, Carole; LUDES, Bertrand; RAUL, Jean-Sébastien. Sensitive determination of pethidine and its metabolite in human hair by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Toxicologie Analytique et Clinique, 2014, 26.3: 165-168.
56. RAGHU, T. A Prospective, Randomized Clinical Trial For Comparison Of Pethidine And Dexmedetomidine For The Control Of Intraoperative Shivering Under Spinal Anaesthesia. 2018. PhD Thesis. BLDE (Deemed to be University).
57. KUL, Aykut; OZDEMIR, Murat; SAGIRLI, Olcay. Determination of pethidine of abuse and relevant metabolite norpethidine in urine by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2020, 186: 113320.
58. AUSTIN, K. L.; STAPLETON, J. V.; MATHER, L. E. Rate of formation of norpethidine from pethidine. British Journal of Anaesthesia, 1981, 53.3: 255-258.

59. SHEE, J. Charles. Dangerous potentiation of pethidine by iproniazid, and its treatment. British Medical Journal, 1960, 2.5197: 507.

60. MEHTA, Nandita, et al. Adjuvant Drugs to Local Anesthetics. In: Topics in Local Anesthetics. IntechOpen, 2020.

61. ASATOOR, A. M., et al. The excretion of pethidine and its derivatives. British Journal of Pharmacology and Chemotherapy, 1963, 20.2: 285-298.

62. HOLMBERG, L., et al. Comparative disposition of pethidine and norpethidine in old and young patients. European journal of clinical pharmacology, 1982, 22.2: 175-179.

63. MCQUAY, H. J.; MOORE, R. A. Opioid problems, and morphine metabolism and excretion. In: The Pharmacology of Pain. Springer, Berlin, Heidelberg, 1997. p. 335-360.

64. HOUGHTON, I. T., et al. Biotransformation of pethidine: a comparative study of 24 h urine in three ethnic groups. European journal of drug metabolism and pharmacokinetics, 1993, 18.3: 285-288.

65. CRAWFORD, J. SELWYN; RUDOFSKY, SUSANNA. The placental transmission of pethidine. British Journal of Anaesthesia, 1965, 37.12: 929-933.

66. TRESCOT, Andrea M., et al. Opioid pharmacology. Pain physician, 2008, 11.2 Suppl: S133-53.

67. WALDHOER, Maria; BARTLETT, Selena E.; WHISTLER, Jennifer L. Opioid receptors. Annual review of biochemistry, 2004, 73.1: 953-990.

68. PILTONEN, Marjo, et al. Alternative splicing of the delta-opioid receptor gene suggests existence of new functional isoforms. Molecular neurobiology, 2019, 56.4: 2855-2869.

69. PERGOLIZZI, Joseph V., et al. “New-Look” Opioids: Biased Ligands. Pharmacology & Pharmacy, 2018, 9.07: 242.

70. CHILDERS, Steven R.; SNYDER, Solomon H. Guanine nucleotides differentiate agonist and antagonist interactions with opiate receptors. Life sciences, 1978, 23.7: 759-761.
71. CUITAVI, Javier; HIPÓLITO, Lucía; CANALS, Meritxell. The life cycle of the mu-opioid receptor. Trends in Biochemical Sciences, 2021, 46.4: 315-328.
72. TORRECILLA, Maria, et al. Pre-and postsynaptic regulation of locus coeruleus neurons after chronic morphine treatment: a study of GIRK-knockout mice. European Journal of Neuroscience, 2008, 28.3: 618-624.
73. EISENDRATH, Stuart J., et al. Meperidine-induced delirium. Am J Psychiatry, 1987, 144.8: 1062-5.
74. GIBNEY, L., et al. Behavioural risk factors for HIV/AIDS in a low-HIV prevalence Muslim nation: Bangladesh. International journal of STD & AIDS, 1999, 10.3: 186-194.
75. SADOCK, Benjamin J.; SADOCK, Virginia A. Kaplan & Sadock's concise textbook of clinical psychiatry. Lippincott Williams & Wilkins, 2008.
76. ANNAGÜR, Bilge Burçak. A nurse with pethidine addiction. European Journal of General Medicine, 2012, 9.1.
77. BILICI, R., et al. Pheniramine/diazepam/pethidine abuse. Reactions, 2013, 1458: 29.
78. AHMADI, J. Pethidine Abuse: A Novel Finding.(2016) J Addict De-pend 2 (2): 1-3. Mini review, 2016.
79. ROMER, C. Acute Pethidine Poisoning. British Medical Journal, 1952, 2.4794: 1135.
80. PINKERTON, J. R. H.; ROLFE, D. W. M. Pethidine Poisoning. British Medical Journal, 1953, 1.4812: 728.
81. ALHAMDAN, L., et al. Recovery from serotonin syndrome after the use of propofol: 9AP2-10. European Journal of Anaesthesiology| EJA, 2012, 29: 137.

82. FROM PETHIDINE, A. Death. Current opics, Etc. The Indian Medical Gazette, 1947.
83. MBUVAH, Farayi; VENUR, Vyshak Alva; KISTANGARI, Gaurav. The clinical picture: an intravenous drug user with persistent dyspnea and lung infiltrates. Cleveland Clinic journal of medicine, 2014, 81.4: 223-224.
84. ROZAS-MUÑOZ, Eduardo; GARCÍA-MURET, Maria Pilar; PUIG, Lluís. Chronic ulceration and fibrosis of the forearm. JAMA dermatology, 2015, 151.3: 331-332.
85. ALHA, A.; KARLSSON, M.; KORTE, T. Fatal combined anileridine-pethidine poisoning. A gas chromatography, thin layer chromatography and mass spectrometry investigation. Zeitschrift für Rechtsmedizin, 1975, 75.4: 293-298.
86. KARUNATILAKE, Harindra; BUCKLEY, Nicholas A. "Severe neurotoxicity following oral meperidine (pethidine) overdose". Clinical Toxicology, 2007, 45.2: 200-201.
87. GEORGE, Philip, et al. Patients that benefit from buprenorphine-naloxone on medically assisted treatment for opioid dependence in Malaysia. Med J Malaysia, 2015, 70.4: 251.
88. YAN, Ping, et al. Homicide due to intravenous metallic mercury injection followed by sodium cyanide injection. The American Journal of Forensic Medicine and Pathology, 2012, 33.3: 273-275.
89. EVREN, E. C.; OGEL, K.; CAKMAK, D. Comperison the properties of inpatient meperidine (pethidine) and cannabis abusers. *Anat J of Psych (2002) 3: 20*, 2002, 27.
90. MOZAYANI, Ashraf. Toxicology in the Forensic Lab. In: The Forensic Laboratory Handbook Procedures and Practice. Humana Press, 2011. p. 385-402.
91. COSKUN, Ozlem. Separation techniques: chromatography. Northern clinics of Istanbul, 2016, 3.2: 156.
92. DETTMER-WILDE, Katja; ENGEWALD, Werner. Practical gas chromatography. A Comprehensive Reference. Springer, 2014, 902.

93. LACOURSE, Margaret E.; LACOURSE, William R. General instrumentation in HPLC. In: Liquid Chromatography. Elsevier, 2017. p. 417-429.
94. CARVALHO, J. L. Toxicological analyzes and its use in forensic science. Forensic Res Criminol Int J, 2018, 6.6: 376-381.
95. STOUT, Peter R. Forensic toxicology. In: Information Resources in Toxicology. Academic Press, 2009. p. 293-296.
96. PETERS, Frank T. Recent developments in urinalysis of metabolites of new psychoactive substances using LC–MS. Bioanalysis, 2014, 6.15: 2083-2107.
97. BURCU, E. S. E. R.; DINÇEL, Aylin SEPICI. Kromatografiye giriş, yüksek performanslı sıvı kromatografi kullanımında basit ipuçları. Journal of Health Services and Education, 2018, 2.2: 51-57.
98. WAGNER, Jarrad R. Introduction to forensic toxicology. In: An Introduction to Interdisciplinary Toxicology. Academic Press, 2020. p. 445-459.
99. SÁNCHEZ-GUIJO, Alberto; HARTMANN, Michaela F.; WUDY, Stefan A. Introduction to gas chromatography-mass spectrometry. In: Hormone assays in biological fluids. Humana Press, Totowa, NJ, 2013. p. 27-44.
100. Chasteen, Thomas G. "Split/Splitless and On-Column Gas Chromatographic Injectors". Retrieved October 6, 2019.
101. J & W Catalogue "Gas chromatography" 1998.
102. HARTMANN, Charles Harold. Gas chromatography detectors. Analytical Chemistry, 1971, 43.2: 113A-125a.
103. Beşergil B. Gaz - sıvı kromatografisi [Blog yazısı]. Alıntı: blog-page_558.html.
104. SMITH, Robert W., et al. Direct analysis of potentially genotoxic impurities by thermal desorption-field asymmetric waveform ion mobility spectrometry-mass spectrometry. Analytical Methods, 2013, 5.16: 3799-3802.

105. MELLON, F. A. Mass spectrometry| principles and instrumentation. 2003.

106. MOEDER, Monika. Gas chromatography-mass spectrometry. In: Practical Gas Chromatography. Springer, Berlin, Heidelberg, 2014. p. 303-350.

107. EMWAS, Abdul-Hamid M., et al. Gas chromatography–mass spectrometry of biofluids and extracts. In: Metabonomics. Humana Press, New York, NY, 2015. p. 91-112.

108. PRABU, S. Lakshmana; SURIYAPRAKASH, T. N. K. Extraction of drug from the biological matrix: a review. IntechOpen, 2012.

109. OLIVEIRA, Elcio Cruz de, et al. Internal standard versus external standard calibration: an uncertainty case study of a liquid chromatography analysis. Química Nova, 2010, 33: 984-987.

110. GIN, Joanna; IMWINKELRIED, Edward J. Gas Chromatography-Mass Spectrometer (GC/MS): In Scientific Evidence, Even'Gold Standard'Techniques Have Limitations. UC Davis Legal Studies Research Paper, 2018.

111. BRIDGE, Candice M.; JONES, Kaitlin; MARIC, Mark. GC× GC–MS for Forensic Analysis. 2018.

112. KYLE, Patrick B. Laboratory methods in toxicology. In: Toxicology Cases for the Clinical and Forensic Laboratory. Academic Press, 2020. p. 19-26.

113. FALAKI, Foujan. Sample preparation techniques for gas chromatography. In: Gas Chromatography-Derivatization, Sample Preparation, Application. IntechOpen, 2019.

114. DE KONING, Sjaak; JANSSEN, Hans-Gerd; BRINKMAN, Udo A. Th. Modern methods of sample preparation for GC analysis. Chromatographia, 2009, 69.1: 33-78.

115. LEVINE, Barry. Forensic toxicology. Analytical chemistry, 1993, 65.5: 272A-276A.

116. ROŠKAR, Robert; LUŠIN, Tina Trdan. Analytical methods for quantification of drug metabolites in biological samples. Chromatography–The Most Versatile Method of Chemical Analysis, 2012, 79-126.

117. POOLE, Colin F. New trends in solid-phase extraction. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2003, 22.6: 362-373.

118. MÜLLER, Eckart, et al. Liquid–liquid extraction. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 2000.

119. TARGUMA, Sarem; NJOBEH, Patrick B.; NDUNGU, Patrick G. Current applications of magnetic nanomaterials for extraction of mycotoxins, pesticides, and pharmaceuticals in food commodities. Molecules, 2021, 26.14: 4284.

120. SILVESTRE, Cristina IC, et al. Liquid–liquid extraction in flow analysis: a critical review. Analytica chimica acta, 2009, 652.1-2: 54-65.

121. WANG, Xianqin, et al. Determination of pethidine in human plasma by LC–MS/MS. Biomedical Chromatography, 2011, 25.7: 833-837.

122. LINDBERG, Claes; BONDESSON, Ulf; HARTVIG, Per. Investigation of the urinary excretion of pethidine and five of its metabolites in man using selected ion monitoring. Biomedical Mass Spectrometry, 1980, 7.2: 88-92.

123. ÁLVAREZ-SÁNCHEZ, B.; PRIEGO-CAPOTE, F.; DE CASTRO, MD Luque. Metabolomics analysis I. Selection of biological samples and practical aspects preceding sample preparation. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2010, 29.2: 111-119.

124. ADATSI, Felix K. Forensic Toxicology. 2014.

125. DE CAMPOS, Eduardo Geraldo, et al. Alternative matrices in forensic toxicology: a critical review. Forensic Toxicology, 2021, 1-18.

126. MOHAMED, Gihan Seif Elnasr, et al. Comparative study between the addition of pethidine Vs fentanyl to hyperbaric bupivacaine for spinal anesthesia in caesarean section. The Egyptian Journal of Hospital Medicine, 2018, 73.1: 5813-5817.

127. LINDBERG, Claes, et al. A selected ion monitoring method for the determination of pethidine and norpethidine in plasma. Comparison with a gas chromatographic method using electron capture detection. Biomedical Mass Spectrometry, 1978, 5.9: 540-543.

128. HARTVIG, Per; FAGERLUND, Christina. A simplified method for the gas chromatographic determination of pethidine and norpethidine after derivatization with trichloroethyl chloroformate. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 1983, 274: 355-360.

129. PETERS, Frank T.; DRUMMER, Olaf H.; MUSSHOFF, Frank. Validation of new methods. Forensic science international, 2007, 165.2-3: 216-224.

130. SCIENTIFIC WORKING GROUP FOR FORENSIC TOXICOLOGY. Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) standard practices for method validation in forensic toxicology. Journal of Analytical Toxicology, 2013, 37.7: 452-474.

131. YILMAZ, A. Kimyasal analizlerde metod validasyonu ve verifikasyonu. Turklab Rehber, 2012, 01.

132. NO, O. E. C. D. 34: Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment. 2005.

133. Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü, KİMYASAL VE FİZİKSEL ANALİZLERDE METOT VALİDASYONU/VERİFİKASYONU REHBERİ 2018. Nisan 2018. Erişim: https://www.tarimorman.gov.tr/GKGM/Belgeler/DB_Gida_Kont/Kimyasal_Fiziksel_Val_Ver_Rehberi.pdf (Erişim tarihi 27.03.2022)

134. ERTAŞ, Doğrulama Aşamasında Kullanılan Kromatografik Yöntemler, 2018. Temel Adli Toksikoloji Kitabı (pp.235-260)

135. SHAH, Vinod P., et al. Bioanalytical method validation—a revisit with a decade of progress. Pharmaceutical research, 2000, 17.12: 1551-1557.

136. PETERS, Frank T.; MAURER, Hans H. Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology—a review. Validation in chemical measurement, 2002, 1-9.

137. COMMITTEE FOR MEDICINAL PRODUCTS FOR HUMAN USE, et al. Guideline on bioanalytical method validation. European Medicines Agency, 2011, 21.

138. Gıda ve Yemde Pestisit Kalıntıları Analizi İçin Analitik Kalite Kontrol ve Metot Validasyonu Prosedürleri (SANTE/2019/12682), EURL, 2019b, 46s., Erişim: https://www.tarimorman.gov.tr/GKGM/Belgeler/DB_Gida_Kont/Pestisit_El_Kitabi.pdf (Erişim tarihi 27.03.2022)

139. EURACHEM / CITAC Guide CG 4 Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement Second Edition QUAM:2000.1.

140. DOUGHERTY, J. A., et al. Amitriptyline/pethidine/venlafaxine. Reactions, 2002, 932: 14.

141. KEATING, Gillian M.; SIDDIQUI, M. Asif A. Varenicline. CNS drugs, 2006, 20.11: 945-960.

142. PLUMMER, John L.; GOURLAY, Geoffrey K.; CHERRY, David A. Norpethidine toxicity. Pain Reviews, 2001, 8.3: 159.

143. CASE, Mary ES; POKLIS, Alphonse; MACKELL, M. Ann. Homicide by intravenous injection of naphtha. Journal of Forensic Science, 1985, 30.1: 208-212.

144. KUMAR, A., et al. Intravenous administration of metallic mercury with homicidal intent. 1992.

145. SINGH, Akhilesh Kumar, et al. Differentials of abnormal urine color: a review. Ann Appl Biosci, 2014, 1: R21-R25.

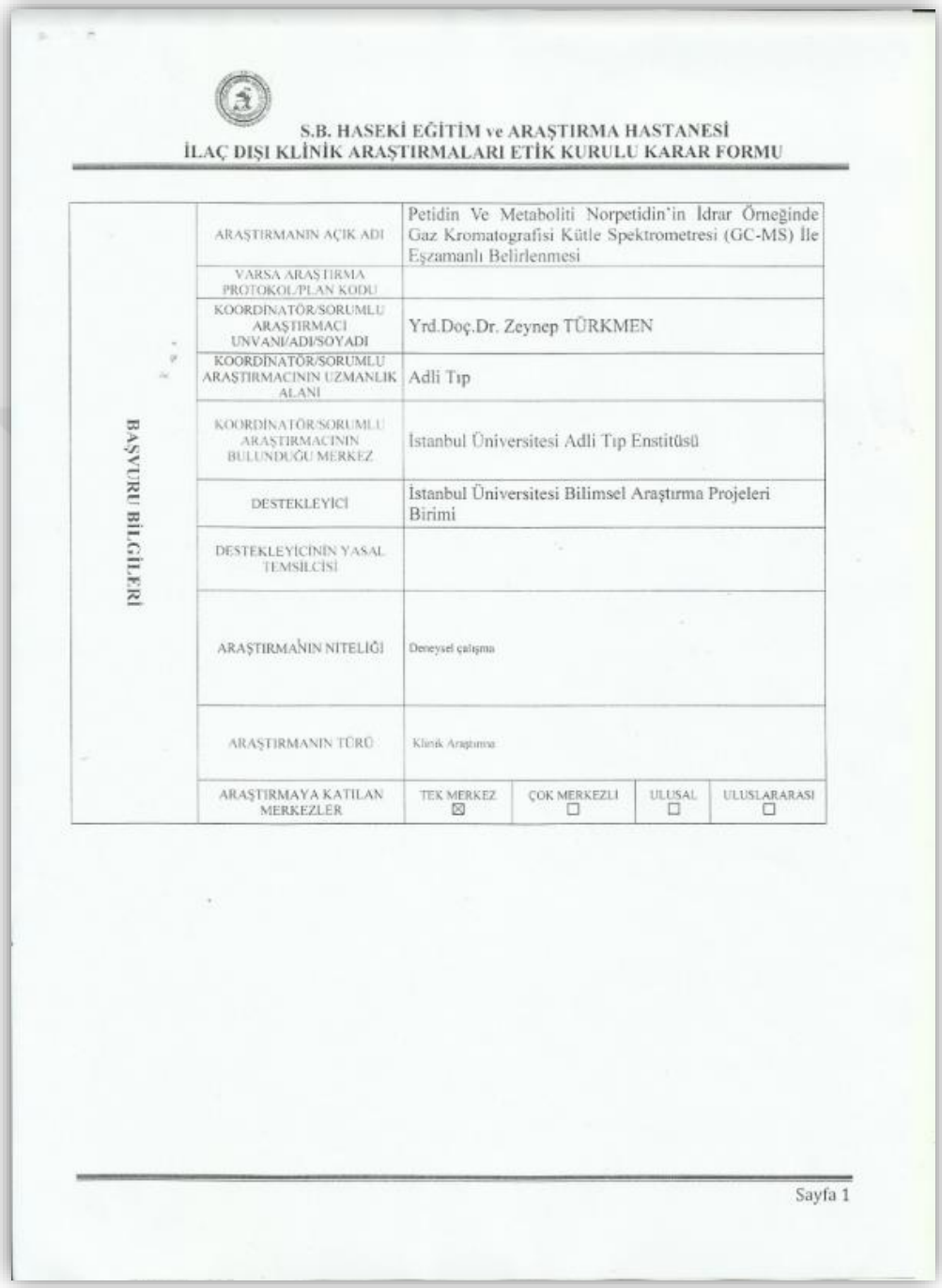
146. BRUNET, Laurence, et al. Marijuana smoking does not accelerate progression of liver disease in HIV–hepatitis C coinfection: a longitudinal cohort analysis. Clinical Infectious Diseases, 2013, 57.5: 663-670.

147. KRASNIQI, Valon; DIMOVSKI, Aleksandar; BOŽINA, Nada. How polymorphisms of the cytochrome P450 genes affect ibuprofen and diclofenac metabolism and toxicity. 2016.

148. YÜKSEL, Nevzat, et al. Sitokrom P450 Enzim sistemi ve ilaç etkileşmeleri. Klinik Psikiyatri, 2001, 1: 5-16.

EKLER

Ek 1- Etik Kurul Kararı



S.B. HASEKİ EĞİTİM ve ARAŞTIRMA HASTANESİ
İLAÇ DIŞI KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Petidin Ve Metaboliti Norpetidin'in İdrar Örneğinde Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometresi (GC-MS) İle Eşzamanlı Belirlenmesi			
	VARSA ARAŞTIRMA PROTOKOL/PLAN KODU				
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Yrd.Doç.Dr. Zeynep TÜRKMEN			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Adli Tıp			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü			
	DESTEKLEYİCİ	İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	Deneysel çalışma			
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Klinik Araştırma			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☐	ULUSLARARASI ☐

Sayfa 1



S.B. HASEKİ EĞİTİM ve ARAŞTIRMA HASTANESİ
İLAÇ DIŞI KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

Mustafa OSMANOĞLU	Avukat	Serbest	E☒	K☐	E☐	H☒	E☒	H☐	
Saffet Kaan ERTEKİN	Serbest Girişimci	Serbest Girişimci	E☒	K☐	E☐	H☒	E☒	H☐	

* :Toplantıda Bulunma

Ek 2- Medistanbul Hastanesi ile iş birliği yapılabilmesi için izin belgesi



Ek 3- Bilgilendirilmiş onam formu

Ek3 – Bilgilendirilmiş Onay Formu

BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAY FORMU

GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Petidin ve metaboliti norpetidin'in idrar örneğinde Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometresi (GC-MS) ile eşzamanlı belirlenmesi

Sayın **Yrd. Doç. Dr. Zeynep Türkmen** tarafından, **İstanbul Üniversitesi, Adli Tıp Enstitüsü Fen Bilimleri Anabilim Dalı**'na bağlı **Adli Toksikoloji Laboratuarı**'nda deneysel bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya "katılımcı" olarak davet edildim.
Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.
Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağının bilincindeyim. Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim.

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, **Yrd. Doç. Dr. Zeynep Türkmen, (0212) 414 30 00/22801** numaradan ve İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü Cerrahpaşa İstanbul adresinden arayabileceğimi biliyorum.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımıma ve hekim ile olan ilişkime herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde "katılımcı" olarak yer alma kararını aldım. **Bu çalışma kapsamında yalnızca idrar örneğimi vereceğimi biliyorum.** Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.
İmzalı bu form kâğıdının bir kopyası bana verilecektir.

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün
Adı-soyadı: İmzası:
Adresi:
Telefon no:

Gönüllünün Yakının
Adı-soyadı: İmzası:
Adresi:

Telefon no:

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin
Adı-soyadı: İmzası:
Adresi:

Telefon no:

Proje Yürütücüsü: Yrd. Doç. Dr. Zeynep Türkmen (Öğretim Görevlisi)
İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü, Fen Bilimleri Anabilim Dalı
Tel: 0212 414 3000/22838

Ek 4- Olgu rapor formu

OLGU RAPOR FORMU

ÇALIŞMANIN ADI
Petidin ve metaboliti norpetidin'in idrar örneğinde Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometresi (GC-MS) ile eşzamanlı belirlenmesi
ÇALIŞMAYA / ARAŞTIRMAYA DAHİL <u>EDİLME</u> KRİTERLERİ
Çocuk (10-18 yaş) ise ailesi bilgilendirilmek koşulu ile Bilgilendirilmiş gönüllü olur formu onayı olan, Operasyon öncesi Petidin ilacı verilen hastalar.
ÇALIŞMAYA /ARAŞTIRMAYA DAHİL <u>EDİLMEME</u> KRİTERLERİ
Yeni doğan, Böbrek rahatsızlığı olan hastalar.

OLGU RAPOR FORMU

Hasta Kodu				
Cinsiyet	Kadın		Erkek	
Yaş				
Boy (cm)				
Kilo (kg)				
Operasyon				
Petidin Veriliş Saati	Perop			
	Postop (verildi ise)			
Verilen Petidin Miktarı	Perop			
	Postop (verildi ise)			
Alınan İdrar Miktarı	1.Saat			
	3.Saat			
Lasix Kullanımı	Var		Yok	
Kronik Hastalık				
İlaç Kullanımı	Var		Yok	
	Varsa			
Madde Kullanımı	Var		Yok	
Özel Durum Varsa				

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Zeynep Arslan

Doğum Yeri ve Tarihi :

E-posta :

Eğitim Bilgileri	İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Adli Tıp ve Adli Bilimler
2019 – Devam ediyor	Enstitüsü, Fen Bilimleri Anabilim Dalı (Tezli Yüksek Lisans Programı)
	Üsküdar Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
2014 – 2019	İstanbul Üniversitesi, Sosyoloji Bölümü
2016 – 2020	