

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
ADLİ TIP ENSTİTÜSÜ
FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

Danışman: Prof. Dr. Salih CENGİZ

İDRARDAKİ KETAMİN VE METABOLİTLERİNİN
YÜKSEK PERFORMANSLI İNCE TABAKA
KROMATOĞRAFİSİ (YPİTK) VE SIVI KROMATOĞRAFİSİ
-KÜTLE SPEKTROMETRESİ (LC-MS/MS) İLE ANALİZİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NAZLI DEMİRTAŞ

Kimyager

İstanbul - 2010

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezimin hazırlanması süresince öncelikle bilgi ve deneyimleriyle yol gösteren danışman hocam sayın Prof.Dr.Salih CENGİZ'e teşekkür ederim. Çalışmamın yürütülmesindeki çok değerli yardım ve desteklerinden dolayı Araş.Gör. Zeynep Türkmen'e teşekkür ederim. Anestezi uzmanı Dr.Tamer Salihoğlu, Esra Damla Ahi ve Araş.Gör. Selda Mercan'a da yardımları için ayrıca teşekkür ederim.

Yüksek lisans öğrenimim sırasındaki yardım ve anlayışlarından dolayı öncelikle İ.Ü.Adli Tıp Enstitüsü Müdürü sayın Prof.Dr. İmdat ELMAS olmak üzere Adli Tıp Enstitüsü'nde çalışan herkese ve İ.Ü Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yanık birimi çalışanlarına teşekkür ederim.

Sağladıkları her türlü destek ve moral için arkadaşlarım Fulya Özsoy, Selda Darı ve Gülden Onur Kondakçı'ya teşekkür ederim. Yüksek lisans sırasındaki maddi ve manevi yardımlarından ötürü Olga Nehir Öztel ve Fatma Öztel'e çok teşekkür ederim.

Dostluğu ve fedakarlığıyla her zaman örnek olan Derya Ahmetler'e, manevi yardımları ve öğütleri için Çiğdem Tunay'a teşekkür etmek yetersiz kalır. En önemlisi bu dönemdeki anlayış ve sabıllı davranışlarından dolayı öğrencilerime teşekkür ederim.

Son ve en özel olarak verdiğim kararlara duydukları saygı ve güven için aileme çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	I
İÇİNDEKİLER	II
ŞEKİL LİSTESİ.....	IV
TABLO LİSTESİ	V
SEMBOL LİSTESİ	1
1. GİRİŞ	2
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. KETAMİNİN FARMAKOLOJİK ÖZELLİKLERİ.....	7
2.2. KETAMİN SUİSTİMALİ	15
2.3. KETAMİNİN ADLİ BİLİMLER AÇISINDAN ÖNEMİ	16
2.4. DÜNYA GENELİNDE KETAMİN SUİSTİMALİ VERİLERİ	16
2.5. KETAMİNİN ANALİZİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER.....	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM	27
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	27
3.2. KULLANILAN CİHAZLAR	27
3.3. ÇALIŞMA NUMUNELERİNİN SAĞLANMASI	28
3.4. ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI.....	28
3.5. EKSTRAKSİYON YÖNTEMLERİ.....	29
3.6. YPİTK ÇALIŞMA KOŞULLARI	30
3.7. LC-MS/MS ÇALIŞMA KOŞULLARI	32
4. BULGULAR	33
4.1. KALİBRASYON GRAFİKLERİ	35
4.2. HASTA ÖRNEKLERİ	40
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	42
6. SUMMARY	47
7. ÖZET	48

KAYNAKLAR	49
EK 1	53
ÖZGEÇMİŞ	54

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	: Fensiklidin ve ketaminin kimyasal yapısı	3
Şekil 2.2	: Ketamin kristalleri	6
Şekil 2.3	: Ketaminin metabolik yolları	8
Şekil 2.4	: Ketaminin enantiomerleri; S-(+), R-(-) ketamin.....	9
Şekil 2.5	: Bölgesel olarak ele geçirilen ketamin miktarları.....	17
Şekil 4.1	: Ketamin kalibrasyon eğrisi.....	32
Şekil 4.2	: Standart ketamin kalibrasyon eğrisi.....	33
Şekil 4.3	: Norketamin kalibrasyon eğrisi.....	33
Şekil 4.4	: Standart norketamin kalibrasyon eğrisi.....	34
Şekil 4.5	: Ketamin UV spektrumu.....	35
Şekil 4.6	: Ketamin pikine ait alana göre doğrusallık verileri grafiği.....	35
Şekil 4.7	: Hasta örneği analizi sonucu.....	36
Şekil 4.8	: Hasta örneği analizi sonucu hesaplaması.....	36
Şekil 4.9	: Seçicilik çalışması analizi.....	37
Şekil 4.10	: Ketamin LC-MS/MS piki.....	37
Şekil 4.11	: Norketamin LC-MS/MS piki.....	38
Şekil 4.12	: Ketamin ve norketamin LC-MS/MS piki.....	39

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1	: Suistimal edilen ketamin dozları	12
Tablo 2.2	: Kanada Metamfetamin Bileşimi, 2001-2007	18
Tablo 2.3	: Kanada 'Ekstazi' Bileşimi, 2001-2007	18
Tablo 2.4	: Vietnam'da ele geçirilen ATS tabletlerinin bileşimi, 2006.....	19
Tablo 4.1	: YPİTK sistemiyle hesaplanan değerler	34
Tablo 4.2	: LC-MS/MS sistemiyle hesaplanan değerler	35
Tablo 4.3	: Hastaların idrar örneklerindeki ketamin ve norketamin derişimleri	39

SEMBOL LİSTESİ

ATS	: Amfetamin türü uyarıcı (Amphetamine type stimulant)
CK	: Ketamin ve kokainin kombinasyonu
CPRS-1	: Kompleks bölgesel ağrı sendromu tip1
DEA	: Drug Enforcement Agency
DFSA	: Drug facilitated sexual assault
DHMK	: Dehidronorketamin
EAA	: Uyarıcı Amino Asitler (Excitatory Amino Acids)
FDA	: Federal Drug Agency
GC-FID	: Alev-İyonlaştırıcı Dedektörlü Gaz Kromatografisi
GC-MS	: Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometresi
GC-NPD	: Nitrojen-Fosfor Dedektörlü Gaz Kromatografisi
GHB	: Gama hidroksibütirat
HS-SPME-GC-MS:	headspace katı-faz mikroekstraksiyon gaz kromatografi-kütle spektrometresi
ICPO	: International Criminal Police Organization
İTK	: İnce Tabaka Kromatografisi
IM	: intra muscular, kas içine
K	: Ketamin
LC-MS	: Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
LC-MS/MS	: Sıvı Kromatografisi-Tandem Kütle Spektrometresi
LOD	: Limit of detection, tayin edilebilme limiti
LOQ	: Limit of quantification, görülebilme limiti
LSD	: lizerjikasit dietilamit
MDMA	: 3,4-metilendioksi- N-metilamfetamin
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
NIDA	: National Institute on Drug Abuse
NK	: Norketamin
NMDA	: N-metil-d-asparatın
PCP	: fensiklidin
SPME	: Katı faz mikroekstraksiyon
UNODC	: United Nations Office on Drugs and Crime
YPİTK	: Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi
YPSK	: Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi

1.GİRİŞ

Yasal veya yasadışı psikoaktif ilaçlar da sıklıkla ani veya şiddetli ölümlerde rol oynayabilmektedirler. Pek çok yasadışı ilacın toksik etkisi, kişilerin ölümündeki garip veya riskli davranışı açıklayabilir. Ayrıca postmortem toksikolojik testler değerli epidemiolojik ve istatistiksel veri sağlamaktadır. Adli toksikologlar, genelde yeni madde suistimali salgınından ve karşılaşılan ilaçların tehlikelerinden medikal topluluğu ilk uyarılar arasındadırlar. Benzer şekilde genelde suistimal edilen psikoaktif ajanların analoglarının, ‘tasarlanan ilaçlar’ mesela ‘china white’ (metil fentanil) ve ‘ekstazi’ (metilendioksimetamfetamin) de dahil, kimyasal kimliğini ve toksisitesini belirlemektedirler. Bugün toksikolojide pek çok çalışma alanı bulunmaktadır, adli toksikolog ise mahkemede ölüm nedenini belirlemede yardımcı olmakla yükümlüdür (Klaassen C.D. 2001).

Yüzyıllar boyunca, keyif vermesi veya dini amaçlarla kimyasalların kullanılması pek çok kültürün parçası olmuştur. Kraliçe Viktoria zamanında afyon ruhu ve afyon toplumun saygın üyeleri tarafından kullanılmıştır. Kokain, Vin Mariani ve orijinal Coca-Cola gibi preparatların içeriğinde bulunmuştur. 1960 başlarında modern gençlik kültürü keyif verici daha güçlü ilaçlar kullanmaya başlamıştır. Bu kimyasallar eroin, ekstazi (3,4-metilendioksi-N-metilamfetamin, MDMA) ve kokain gibi yasadışı preparatlar içermektedirler. Bu yasadışı bileşiklerin yanı sıra medikal kullanımdaki çeşitli ilaçlar da suistimal edilmişlerdir. Özellikle benzodiazepinler (diazepam ve temazepam) yaygın olarak eroin ve dihidrokodeini içeren opiyatlar gibi kötüye kullanılmıştır. Ketamin, metadon, trisiklik antidepresanlar ve dekstropoksifen reçeteli ilaçların, adına reçetelenmeyen bireyler tarafından suistimalinin diğer örnekleridir (Galloway J.H. ve ark. 1999).

Daha önce tıbbi amaçlı kullanımına karşın son yıllarda yüksek sesli elektronik müzik eşliğinde partilerde suistimal edilmesi, ayrıca tecavüz olaylarında gama hidroksibütiratın (GHB) dışında ketaminin de kullanılmaya başlanması ile ketamin adli bilimler açısından önemli bir madde haline gelmiştir. Bu çalışma ile Adli Tıp

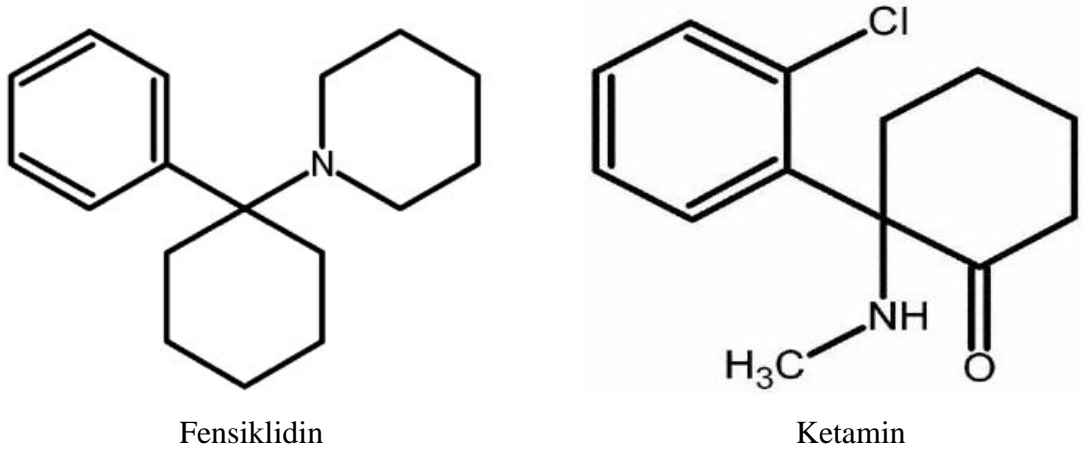
Enstitüsü'ndeki cihazlarda daha sonraki ketamin analizleri için uygun veriler elde edilmesi ve en uygun yöntemin belirlenmesi araştırması yapılacaktır.

1970'lerden beri ketamin ve metabolitlerinin insan idrarı, kanı, saçı ve plazmasındaki tayini ile ilgili bazı analitik metodlar geliştirilmiştir. Bu çalışmada, ketamin ve metaboliti norketaminin Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi (YPİTK) sistemi ile taranması daha sonra LC-MS/MS ile doğrulama yapılması amaçlanmaktadır. Geliştirilen bu metodun işlevselliğini ortaya koyabilmek adına, 1 aylık örnek toplama süresince İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Anesteziyoloji ABD'de çalışmaya katılmayı kabul eden gönüllü hastaların, cerrahi müdahale sonrası belirli zaman aralıklarında idrarlarının toplanarak analiz edilmesi hedeflenmiştir. Aynı zamanda örneklerin LC-MS/MS ile analiz sonuçların karşılaştırılması ve YPİTK sisteminin yeterliliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Böylelikle, adli bilimlerde önemli yer tutan ketaminin, idrardan hassas bir şekilde analizinin tamamlanması ve rutin çalışmaya kazandırılması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

Ketamin hayvanlar ve insanlarda cerrahi işlemler sırasında kullanılan, hızlı etki eden anestetiktir. Kimyasal yapısı, etki mekanizması ve farmakolojik etkileri bakımından fensiklidine (PCP) benzer, fakat ketamin fensiklidinden daha az potansiyele sahiptir (Kim E. ve ark. 2008). Ketamin sentetik anestetik olarak sınıflandırılır, sedasyon, amnezi ve hareketsizliğe neden olmaktadır. İlaç, uygun dozlarda trans benzeri amnezi ile kataleptik durum oluşturduğu için genelde dissosiyatif anestezi olarak tanımlanmaktadır (Hijazi Y. ve ark. 2001, Huang M. ve ark. 2005).

Fensiklidin veya 1-(1-fenilsikloheksil) piperidin, ketamine yapısal benzerliği olan arilsikloheksamindir. Fensiklidin orijinal olarak sentezlenip Parke-Davis tarafından Sernyl® ticari adıyla insanlarda anestezi ajanı olarak damar içi uygulamada kullanılmak üzere pazarlanmıştır. 1963'te dağıtımını başlatmış, fakat ameliyat sonrası yüksek oranda (% 10 ile 20 arasında) deliryum ve psikoz görülmesinden dolayı 1965'te sona ermiştir. Buna rağmen PCP alım satımının tamamen yasaklandığı ve kontrollü maddelere girdiği yıl olan 1978'e kadar büyükbaş hayvanlarda veteriner sakinleştiricisi olarak kullanılmaya devam edilmiştir. PCP'nin halüsinojenik olarak ilk kötüye kullanımı 1967'de San Francisco'da bildirilmiştir. İlk önce oral olarak kullanılmış, fakat sonra aşırı dozu daha iyi kontrol ettiği için sigara gibi içmek popülerlik kazanmıştır. Yasadışı sentezinin kısmen kolay ve ucuz olması 1970'lerde ve 1980'lerin başında yaygın bir şekilde kullanılmasına yol açmıştır (Steven B.K. 2008).



Şekil 2.1: Fensiklidin ve ketaminin kimyasal yapısı [1]

Ketamin, fensiklidin ve dekstrometorfan disosiyatif anestetiklerdir. Disosiyatif anestetik ameliyat sırasındaki ağrıyı ve tedirginliği kontrol etmek için kullanılmaktadırlar. Lizerjikasit dietilamit (LSD) ile birlikte halüsinojenik ilaçlar olarak sınıflandırılabilir. Suistimal edilen ketaminin bilinen kaynakları hırsızlık ve veteriner kliniklerindeki farmakolojik ürünlerin yasadışı satışıdır. İlacın bir kısmı Meksika'daki eczanelerden dönüştürülerek elde edilmektedir. PCP oluşturabileceği psikolojik ve davranışsal etkilerin yelpazesi geniş olduğu ve cevap şekli tahmin edilemediği için çok tehlikeli bir ilaçtır (Stripp R.A. 2007).

Ketamin [C₁₃H₁₆CINO], N-metil-D-aspartat reseptör antagonisti, disosiyatif anestetik özelliklerinden dolayı yasal olarak kullanılmaktadır (Lin H. ve ark. 2005, Parkin M.C. ve ark. 2008, Shiue C. ve ark. 1997).

1972'den beri anestetik başlatma ajanı olarak parenteral uygulanmaktadır ve sedatif, anestetik ve analjezik özellikleri vardır. Pediatrik, obstetrik (gebelikle ilgili), kardiyovasküler, veterinerlik ve travma ameliyatında anestezi amaçlı ve yanık hastalarında analjezi için kullanılmaktadır (Rofael H.Z. ve ark. 2002, Shiue C. ve ark. 1997).

İlk önce cerrahi anestetik olarak tasarlanmıştır. Ketamin ilk kez 1962'de Calvin Stevens tarafından Parke Davis Labs'da, PCP'nin istenilen özelliklerini içermesi fakat deliryum oluşturmaması amacıyla sentezlenmiştir. Bu çabalar kısmen başarıya ulaşmıştır. PCP veterinerlikte ya da insan cerrahisinde kullanılmazken ketamin hala yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. 1962 ve 1965 arasında yapılan müteakip çalışmalar ketaminin istenilen anestetik özelliklere sahip olduğunu doğrulamıştır (Mozayani A. 2002, Stripp R.A. 2007).

1966'da ketamin hidroklorür insanlarda ve hayvanlarda kullanmak üzere patentlenmiş ve Avrupa ve Asya'da 'Ketalar' adı altında alınabilmiştir. Veteriner ilacı, Vetalar ve Ketaset adıyla ticari olarak pazarlanmıştır. Aynı zamanda Profesör Edward Domino ketamini potansiyel psikodelik ilaç olarak tanımlamıştır. Ketamin, 1970'de Ketalar® ve Ketaject® ticari isimleriyle insanlarda, bazen çocuk ve yaşlı hastalarda genel anestetik olarak kullanılması için FDA'nın (Food and Drug Administration, Gıda ve İlaç İdaresi)

onayını almıştır. 1970'lerin ortasında ketaminin rekreasyonel ve teröpatik kullanımı tüm dünyaya yayılmıştır. İngiltere, İsveç, Rusya ve Avustralya'da ilgi artmış ve Arjantin'de regresyon terapide kullanılmaya başlanmıştır. Ketamin suistimaliyle ilgili ilk raporlar 1970'lerin başında San Francisco ve Los Angeles'ta ortaya çıkmıştır. 1978'de ketamin kullanımı, Marcia Moore ve Howard Alltounian'ın kişisel deneyimlerini yazdıkları "Journeys into the Bright World" ve John Lily'nin "The Scientist" kitapları ile popülerliği artmıştır [2].

İlk önce medikal personel tarafından halüsinojenik etkileri yüzünden suistimal edilmiştir. 1990'ların başında Avrupa'da partilerde giderek popüler olmuş sonra dünyanın diğer yerlerine de yayılmıştır (Chen C. ve ark. 2007).

İlacın düşük dozlarında disosiyatif ve halüsinojenik etkileri hızla oluşmaktadır. 1966 ve 1970 yılları arasında dünya genelinde bilimsel literatürde 100'den fazla ketamin anestezisi ve disosiyatif özellikleri ile ilgili makale yayınlanmıştır. Ketaminin hayvanlarda kullanımı ile ilgili makaleler 1969'larda görülmeye başlamıştır. 1970'lerin başında, ameliyat edilen hastalarda anestezi sürecinde ortaya çıkan renkli ve canlı rüyalar, vücut dışına çıkma ve deliryum gibi görülen yan etkilerini araştıran bireyler tarafından ketamin yasal kullanımdan, illegal ilaç piyasasına değiştirilmiştir. 1995'te ketamin, DEA'nin (Drug Enforcement Agency) yeni ortaya çıkan ilaçlar listesine eklenmiş ve 1999'da Amerika'da III. Çizelge Kontrollü Madde olmuştur (Chou S. ve ark. 2004, Lin H. ve ark. 2005, Stripp R.A. 2007).

Ketaminin Fiziksel Özellikleri: Hafif karakteristik kokulu, beyaz kristalize bir tozdur. Su ve metanolde çok hızlı, alkol ve kloroformda yavaş çözünür. S+ ve R- olmak üzere iki optik enantiyomeri vardır. Ketamin terapötik amaçlı resemat halinde kullanılır. Tatsız, renksiz ve kokusuzdur. Molekül kütlesi $C_{13}H_{16}ClNO$: 237.7, Kristal Erime Noktası: 92°- 93°C dir (Saraçoğlu A. 2005).



Şekil 2.2: Ketamin kristalleri [3].

Ketamin hidroklorür çözeltisinin ısıtılmasıyla oluşan ketamin kristalleri şekil 2.2 deki gibidir.

2.1 KETAMİNİN FARMAKOLOJİK ÖZELLİKLERİ

2.1.1. Ketaminin Farmokinetik Özellikleri

Ketaminin yasadışı alımın genel yolları oral, rektal, kasiçine enjeksiyon (IM) ve burundan çekmedir. IM sonrasında etkiler 2 dakika içinde hissedilmektedir. Burundan çekilmişse 5-10 dak. içinde, ağızdan alınmışsa 15-20 dak. içinde etkileri ortaya çıkmaktadır. Anestezi etkisi IV uygulamada 5-10 dak. ve IM uygulamada 10-25 dak. bitmektedir. Sokak kullanımında pek çok kullanıcı yumuşak, rüyamsı etki için, küçük çizgiler ya da tümsekler halinde burnundan çekmektedirler. 100 mg doz genelde K-boşluk için yeterlidir. ‘K boşluk’ kullanıcının çok iyi hissetmesi, halüsinasyonlar, farklı bilinç hissedilmesi, farkındalığın artması ve vücut dışı deneyim durumudur. IV alımıyla ilgili raporlar da bulunmaktadır fakat bu çok tehlikelidir. Ketamin hemen beyine ulaşır ve diğer dokulara nüfuz etmektedir (Mozayani A. 2002, Saraçoğlu A. 2005).

Oral alımdan veya IM enjeksiyondan sonraki plazma seviyeleri ile ilgili birkaç rapor vardır. IM 1 g tek doz uygulanması kan seviyesinde 27 µg/mL görülmesine neden olur. 900 mg öldürücü ketaminin IM uygulaması sonucunda 7 µg/mL seviyede oluşmaktadır (Mozayani A. 2002).

Damariçine 4 mg/kg uygulamada plazmadaki pik seviyesi ketaminin alımından 5 dakika sonra 6.3 µg/mL oluşmaktadır. Cerrahi anestetik olarak uygulanması sırasında 2 mg/kg yüklemesini müteakip 41 µg/kg/dak sürekli IV enfüzyonu (enfüzyon süresi 3 saat) ortalama derişimi 2.21 µg/mL yapar, norketamin ve dehidronorketamin metabolitleri enfüzyonun sonuna yakın pik derişimlerine ulaşır (Karch S.B. 2008, Mozayani A. 2002).

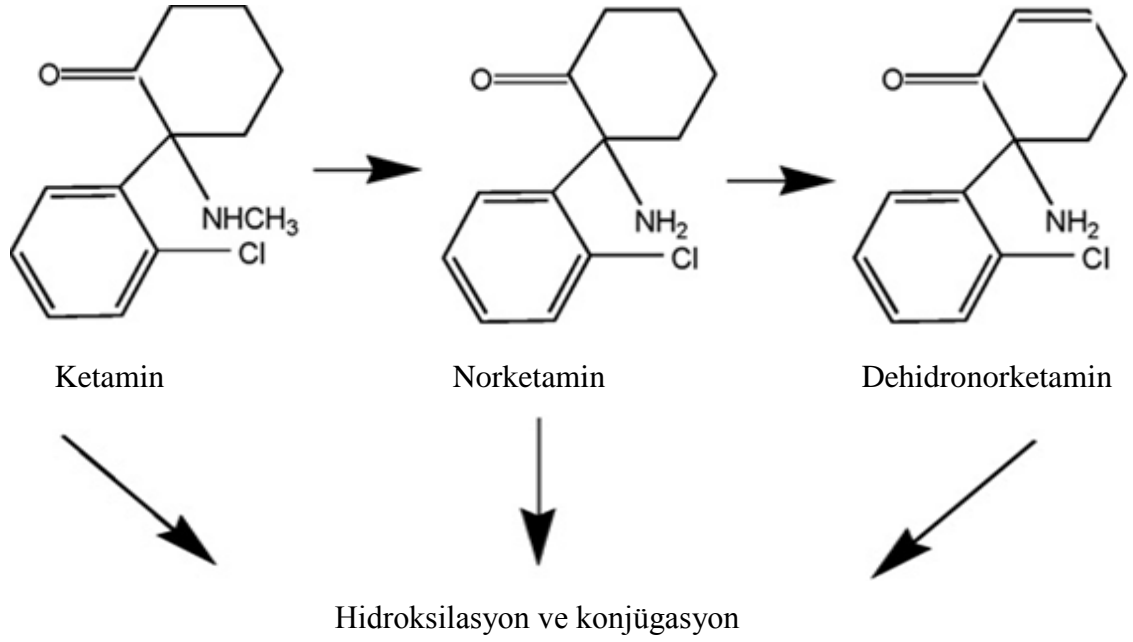
Ketamin 3-4 saat yarı ömrü ile metabolize olur ve görünen dağılım hacmi 3–5 L/kg'dır. Her iki metabolit de ketamininkine benzer serum derişimlerine ulaşmaktadırlar. Atılım yolları temelde renal (% 90) ile % 5 dışkıyla ve % 4 alınan dozun idrarda değişmeden atılmasıdır (Karch S.B. 2008), [4].

2.1.2. Etki Mekanizmaları

Ketamin [2-(*o*-klorofenil)-2-(metilamino)-sikloheksanon], sentetik, sedatif, barbitürat olmayan ve hızlı etki eden anesteziiktir. N-metil-d-aspartat (NMDA) reseptörünü bloke edebilmektedir ve opiyat, adrenerjik, kolinerjik ve seratonin reseptörlerini de etkilediği düşünölmektedir. Hızlı atılımına ve etkisinin kısa sürmesine bağlı olarak hem insan hem de hayvanlarda kısa süreli cerrahi müdahalelerde kullanılması tercih edilmektedir. Ketamin karaciğer sitokrom P450 enzimi yardımıyla N-demetilasyon ile norketamine (NK) metabolize olur (Hijazi Y. ve ark. 2002, Karch S.B. 2008, Lin H. ve ark. 2005).

Sikloheksanon halkası, ikinci metabolit olan dehidronorketamini (DHNK) oluşturmak için oksidatif metabolizmaya uğrar. Ketamin ve fensiklidin (PCP) aynı sikloaril-alkilamin yapısındadır ve bazı halüsinojenik etkileri oluşturma kapasitesine sahiptirler (Chen C. ve ark. 2007, Saraçoğlu A. 2005).

Dozun yaklaşık % 90'ı idrarla 72 saatte, bu miktarın da yaklaşık % 2'si değişmemiş ilaç, % 2'si norketamin, % 16'sı dehidronorketamin ve % 80'i hidroksillenmiş metabolitlerin konjugatları olarak atılır (Clarke, Karch S.B. 2008). Halüsinasyon için oral uygulamada 200-525 mg ketamin, kas içine enjeksiyonda 50-70 mg veya inhalasyon ve rektal alımda 100-250 mg gerekmektedir (Kim E. 2008, Wua G. ve ark. 2007).

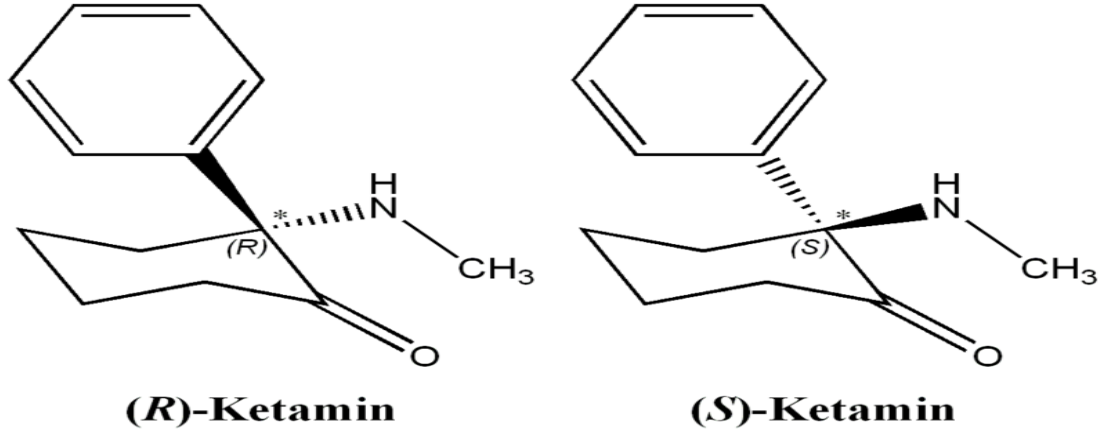


Şekil 2.3: Ketaminin [2-(2-klorofenil)-2-metilaminosikloheksan-1-on] metabolik yolları

*Kaynak: Kim E.ve ark. 2008, Analysis of Ketamine and Norketamine in Urine by Automatic Solid-Phase Extraction (SPE) and Positive Ion Chemical Ionization–Gas Chromatography–Mass Spectrometry

CYP3A4, ketaminin karaciğer mikrozomlarında teröpatik derişimlerde norketamine biyotransformasyonundan sorumlu temel enzimdir. Araştırma sonuçları CYP2C9 ve CYP2B6'nın *in vivo* ketamin *N*-demetilasyonundaki rollerinin az olduğunu göstermektedir (Hijazi Y. ve ark. 2002, Saraçoğlu A. 2005).

Uyarıcı amino asit nörotransmitterleri (EAAs) beyindeki en etkili uyarıcı nörotransmitterlerdir. Ketamin bu EAA reseptörlerinden birine, *N*-metil-*D*-aspartat (NMDA) reseptörüne etki eder ve bu bakımdan diğer disosiyatif anestetiklere örneğin, nitroz oksite benzer. NMDA reseptörünün inhibasyonu (*status epilepticus*) katalepsiye neden olur. Ketamin NMDA'nın bloke edilmesine bağlı fizyolojik etkilerde PCP'ye göre 10-50 kez daha az potansiyele sahiptir. R-ketamin, S-izomere göre yaklaşık 7–10 kat daha fazla bağlanır (Börteçine N.A. 2005, Lin H. ve ark. 2005, Kohrs R. ve ark. 1998).



Şekil 2.4: Ketaminin enantiomerleri; S-(+), R-(-)ketamin

Disosiyatif anestezi terimi değişik, trans benzeri durumu ifade eder, birey hissizleşmektedir. Bu durumda iken hasta acıya karşı son derece hissizdir, fakat gözleri açık olabilir. Aynı şartları sağlayan diğer ilaçlar PCP ve nitroz oksittir. Solunum fonksiyonu ve gırtlığa ait refleksleri etkilenmemektedir. Deliryum genel yan etkidir, hastaların % 5-30'unda gözlenmektedir ve yetişkinlerde, çocuklara ve yaşlı hastalara göre daha çok görülmektedir (Mozayani A. 2002).

Sigtermans M.J. ve ark. (2009) yaptıkları çalışmada kompleks bölgesel ağrı sendomu tip 1 (CPRS-1) hastalardan çok fazla ağrısı olanlara 4 gün sürekli düşük doz ketamin kullanılan bireylerde klinik olarak 11 hafta boyunca süren ağrı azalması yaşadıkları gözlenmiştir. Tedavi haftasında yan etki oluşumu fazla olmasına rağmen enfüzyondan sonra bitmiştir. Ağrının tersine fonksiyonel durumda bir gelişme olmamıştır.

2.1.2.1. Ketaminin Etkileri

PCP ve lizerjikasid dietilamide (LSD) benzer şekilde ketamin, genellikle yaklaşık bir saatte biten, aşırı şiddetli vücuttan ayrılma deneyimine neden olmaktadır. Bazen ketamin kokain, metamfetamin, 3,4-metilendioksimetamfetamin (MDMA) gibi ilaçlarla karıştırılarak kullanılmaktadır. PCP'ye yapı benzerliğinden dolayı ketamin insan beynindeki uyarıcı amin reseptörünü bloke etmektedir (Cheng J.Y.K. ve ark. 2004).

Sub-anestetik dozlardaki ketaminin analjezik özellikler gösterdiği bilinmektedir. Norketamin, ketaminin %20-35 anestetik potansiyeline sahiptir. Son 15 yılda

yetişkinlerde akut postoperatif ağrının tedavisinde düşük doz ketaminin etkisini tanımlayan çok sayıda klinik vaka yayınlanmıştır. Buna rağmen çocukların ketamin alımıyla ağrı tedavisi ile ilgili çok az veri mümkündür (Legrand T. ve ark. 2008).

İki tane psikedelik anestetik vardır: biri fensiklidin diğeri ise ketamindir. Fensiklidin tıbbi anestetik olarak girmiştir. Fakat kanlarında bu ilacı yüksek seviyelerde içeren hastalarda kişinin yer ve zaman kavramının bulunmaması, deliryum ve halüsinasyonlar gibi alışılmadık reaksiyonların görüldüğü bildirilmiştir. Sonuç olarak fensiklidin ve analogu ketamin, disosiyatif anestetikler sınıfına dahil oldu, bu ilaçları kullananlar diğerlerinden ve çevrelerinden uzaklaştırılmış veya ayrılmış hissetmektedirler. Yüksek dozlarda kişi nadiren komaya girebilir ve kurtulursa uzun süreli bilinç bulanıklığı veya hatta birkaç ayda biten psikoza girebilmektedir. Ketamin aynı psikolojik ve fizyolojik reaksiyonları oluşturabilmesine rağmen psikedelik ajan olarak daha az potansiyele sahiptir (Fenton J. 2001).

Ketaminin kısa süreli vakalarda yüksek dozlarda kullanılması postoperatif psikomimetik davranış değişikliğine yol açabilmektedir. Bu yüzden ketaminin premedikasyon olarak kullanıldığı vakalarda cerrahi süre kısa ise düşük dozlarda kullanılması gerekmektedir (Türköz A. ve ark. 1999).

Ketamin (\pm)-2-(2-klorofenil)-2-(metilamino) sikloheksanon olarak bilinir. Ticari üründe R- ve S- optik izomerlerinin karışımı halinde bulunmaktadır. S-izomeri, R-izomerinin potansiyelinin 3-4 katı fazlasına sahiptir. Ketamin sentezi uzman kimyager ve donanımlı bir laboratuvarında doğrudan yapılabilir, fakat yasadışı sentez olanağını kısıtlayacak kadar karmaşıktır. Yapı karmaşık görünmemesine rağmen asıl sentez çelik basınçta birkaç gün ısıtma gibi bazı kompleks adımlar gerektirmektedir. Ketaminin çoğunun yasal kaynaklardan, özellikle IM enjeksiyon için veteriner ilaç çözeltilerinden elde edildiği bilinmektedir. Sonuçta gizli faaliyet gösteren laboratuvarlarda, uygun kontrol edilmeyen sentezlerden kaynaklanan safsızlıklar ketaminde nadiren görülmektedir (Kohrs R. ve ark. 1998, Mozayani A. 2002).

2.1.2.2. Ketaminin Yan Etkileri

NIDA (National Institute on Drug Abuse) tarafından ‘klüp ilacı’ olarak etiketlenmiştir. Ketaminin boşaltım sistemi üzerindeki etkisini tanımlayan sadece bir rapor vardır: ketaminle ilgili ülseratif sistit hakkında dokuz vaka bulunmuştur. Ketaminin sistit oluşturma mekanizması net değildir. Ketamin ve aktif metabolitlerinin mesane rahatsızlığına sebep olması mümkündür. Ketaminin keyif verici olarak kullanımının giderek artması yüzünden ketamin ilişkili sistitin genç yetişkinlerde daha yaygın olacağı beklenmektedir (Colebunders B. ve ark. 2008).

Disosiyatif anestetik olan ketaminin kardiyovasküler etkileri sınırlıdır ve spontan solunumu korur. Bu özellikleri nedeniyle kafa travmalı hastalarda havayolu sağlamak için kullanılabileceği düşünülmektedir [5].

2.1.3. Farmakodinamik

Çocuklarda, yetişkinlere göre daha az deliryum oluşmasına rağmen ketaminin tek başına kullanımındaki deliryum frekansı % 20-25’tir ve midazolam ile kullanılırsa yan etkiler daha az oluşmaktadır. Çocuklarda deliryumla birlikte solunum olayları, kusma, kabuslar, halüsinasyonlar ve ciddi ajitasyon içermektedir. Ketaminin ilk davranış etkileri ameliyat edilen hastalarda anesteziye yakın gözlenmiştir. Anestetik olarak kullanıldığı zaman ilaç yoğun anestezi, analjezi, amnezi ve katalepsi oluşturmaktadır. Gözler açık veya kapalı olabilir. Korneal refleksler normal kalır ve yavaş göz bebeklerinde titreme olabilir. Hasta uyanık görünebilir fakat iletişimsizdir. Fiziksel etkiler konuşurken geveleme, koordinasyon eksikliği, kas sertleşmesi ve bronkodilatasyon içermektedir. Psikolojik etkiler halüsinasyon, rüya gibi durumlar, zarar görmeyeceği hissi, psikolojik ölüm yakını deneyimleri, paranoya ve agresif davranışlardır. Ketamin kullanımında gözlenen etkilerin pek çoğu diğer medikal koşulların tedavisi için veya başka hastalık durumlarını araştırırken bulunmuştur. Ketamin kullanıcılarındaki disosiyatif durum bazı açılarından şizofreniye benzer ve araştırmacılar bu disosiyatif durumların her ikisinin de NMDA reseptördeki etkilere, belki de 2-deoksiglukoz alımına veya dopamin salınımındaki değişikliğe bağlı olabileceğini bulmuşlardır. Ketaminin katalepsi ve kas sertleşmesine neden olabilmesi onun epileptik nöbetlerin tedavisi için antikonvulsan olarak kullanılmasının

araştırılmasına yol açmıştır. Uzun süreli status epileptikus durumunda fenobarbital nöbetleri kontrol edemediği halde ketamin hala etkilidir. Ketaminin dirençli status astmatikus tedavisinde kullanımıyla ilgili çok araştırma yapılmıştır. Bu durumda ketamin kullanımı, ketaminin bronşiyal düz kas gevşetici etkisine bağlıdır (Mozayani A. 2002), [4].

Ketaminin kullanıcıyı duyularıyla algılarının ayırabilme kapasitesi kronik ağrının tedavisinde ilacın düşük dozlarda kullanılmasına yol açmaktadır. İnme kurbanları, geleneksel tedaviye cevap vermeyen ağrı tecrübe edenler bazen ketamine cevap verebilmektedir. Ketaminin istenmeyen yan etkileri benzodiazepinlerle azaltılmaktadır. Kanserin ileri safhalarındaki yaşanan ağrı bazen morfine refraktif olabilmektedir. Bu ağrı da, lif dokusu iltihabı ağrısı gibi ketamin tarafından başarıyla tedavi edilmiştir. Ketamin ayrıca migren ve depresyon tedavisi için de önerilmiştir (Mozayani A. 2002).

Kötüye kullanımda, ketamin kullanıcısı davranışsal etkilerin maksimum olduğu, fakat tam anesteziye geçilmediği duruma ulaşmak istemektedir. Bu geçiş noktasına 'line' denir ve bu duruma geçmek için kullanılan doza, line doz (çizgi dozu veya eşik dozu denir) denir. Line dozu genelde oral alındığında 5 mg/kg ya da ortalama bir insan (50-75 kg) için 300-400 mg'dır. IM enjeksiyon için line dozu yaklaşık 1 mg/kg'dır. Bazı raporlar ketaminin oral alındığında etkisinin olmadığını bildirmekte ise de, fakat 'sokak' raporları farklıdır. Düşük dozlarda yumuşak, nitroz okside benzer şekilde, rüyamsı hisler oluşturmaktadır. Kullanıcılar 'boşlukta' ve biraz vücut dışı deneyim hissini bildirmişlerdir. Ellerde ve ayaklarda hissizlik genelde görülmektedir. Yüksek dozlar halüsinojenik etkiler oluşturmakta ve vücuttan bayağı uzakta hissedilmesine neden olmaktadır. Bu deneyim K-boşluğa girmek olarak bilinir ve ölüme yakın deneyimlerle birinin vücudundan uzaklaştığını hissetmesiyle karşılaştırılmaktadır (Mozayani A. 2002, Saraçoğlu A. 2005).

Pek çok kullanıcı ketamin deneyimini ruhsal açıdan anlamlı bulurken diğerleri korkutucu bulmaktadırlar. K boşlukta hareket etmek oldukça zordur. İnsanlar genelde bu deneyimleri süresince oturuyor ya da uzanmaktadırlar. Kullanıcı iletişim gücünü çekmektedir ve diğer insanları görmeyebilir ya da işitmeyebilir. Yüksek dozlar bilinci ve nefes almayı zorlaştırırken, düşük dozlardaki ketamin kalp atış hızını

arttırabilir. Bu depresan özellikleri ketaminin alkol, diazepam ya da gamma hidroksibütirat (GHB) gibi diğer MSS depresanları ile kombinasyonunu oldukça tehlikeli kılmaktadır (Mozayani A. 2002).

Nadir kullanımlar bilinci engelleyip, nevroza ya da diğer zihinsel bozukluklara yol açabilmektedir. Ketamin çok büyük bir psikolojik bağımlılığa neden olabilmektedir. Ketaminle birlikte tecrübe edinilen zihinsel disosiyasyon bazı insanlar için oldukça çekici olabilir ve ketamin bağımlılığının birçok örneği mevcuttur. Ketaminle kişinin bilincinden uzaklaşması deneyimi bazı insanlara çok çekici gelebilmektedir. İlaç kullanılmaya başlandıktan birkaç hafta sonra tolerans gelişmektedir ve günlük olarak alınan ketamin dozu 4 grama kadar yükseltilebilmektedir. Suistimal edilen ketaminin kullanma yollarına göre dozları tablo 2.1 de verilmiştir (Mozayani A. 2002, Saraçoğlu A. 2005).

Tablo 2.1: Suistimal edilen ketamin dozları

Yol	Doz
IM Enjeksiyon	1.0 mg/kg veya 50–75 mg
Burundan Çekme	2–5 mg/kg veya 100–250 mg
Oral	4–7 mg/kg veya 200–525 mg
Rektal	2–5 mg/kg veya 100–250 mg

Ketamin kullanımının asıl etkileri sedasyon ve görsel bozukluklardır. Ketamin 35 yıldan fazladır yasal ve yasal olmayan ilaçların içinde olmasına rağmen farmakolojisi ile ilgili bazı bilgiler hala gizlidir (Mozayani A. 2002). Özellikle kokain bağımlılığı geçmişi olan hastalarda anestezinin ketaminle yapılması tehlikelidir. Ketamin, kokaini ekgonin metil estere hidroliz eden ana plazma enzimi olan bütirikolinesterazı inhibe eder. Kokain ketaminle birlikte alındığında, toksisite potansiyelini arttırabilir (Rofael H.Z. ve ark. 2002).

2.2. KETAMİN SUİSTİMALİ

Klüp ilaçları genellikle 'rave' denilen çılgın partilerde, gece klüplerinde ve müzik festivallerinde algısal uyarıtıyı ve sosyal yetiyi artırmak için kullanılmaktadır. Bunlar ucuzdur ve küçük haplar, toz veya sıvı formlarda kolaylıkla dağıtımı yapılmaktadır. Ağızdan alınır ve genellikle etkisini artırmak için alkol veya diğer ilaçlarla kombine edilmektedir. Klüp ilaçları özellikle gençler arasında keyif vermesi açısından popülerdir. En yaygın kullanılan klüp ilaçlarından biri olan ketamin, parenteral uygulanan anestezi ajanıdır, sedatif, amnestik ve analjezik özelliklere sahiptir. Ketamin anestezi amaçlı kullanımdan daha yüksek dozda suistimal edilirse, lizerjikasit dietilamit (LSD) kullanımındaki görsel etkiler ile fensiklidinin oluşturduklarına benzer etkiler ortaya çıkmaktadır (Cheng P. 2007, Stripp R.A. 2007).

Ketaminin sokak isimleri K, özel K, vitamin K, Ketalar SV, Süper Asit, Süper C, Kit Kat, Cat Valiums, Jet, Special LA Coke, Ket, Keller, 'Kelly's day', 'Blind squid', Yeşil, Mor olarak da bilinmektedir. Sokak kullanımı için bu küçük farmasötik şişeler açılıp içerik küçük bir tabağa boşaltılır ve sıvı yavaşça ısıtılır. Bu ısı suyun buharlaşmasını sağlar ve çekilebilen beyaz toz yani ketamin hidroklorür kalır (Mozayani A. 2002).

1990'larda ketaminin sosyal-keyif verici kullanımı alt kültürlerde 'asit ev müziği' olarak bilinen müzik fenomeninin içeriği olarak tekrar ortaya çıkmıştır. Geniş çaplı partiler, genellikle çılgın partiler, ketamin kullanımı ile asit evi müziğinin birleşimidir. DEA tarafından toplanan verilere göre ketamin suistimali artmaktadır (Rofael H.Z. ve ark. 2002).

Ketamin ve kokaine eş zamanlı maruziyet vaka sayısının fazla olduğu görülmüştür. Ketamin tozu kokaine çok benzer ve Siegel 1978'de kokainin ketamin kristallerinde en çok bulunan psikoaktif seyreltici madde olduğunu beyan etmiştir. Ketamin ve kokainin kombinasyonuna "CK" denir. 1977'de Siegel keyif verme amaçlı ketamin kullanıcıları örneğini inceledi ve %100'ünün aynı zamanda kokainin sosyal-rekreasyonel kullanıcıları olarak sınıflandırıldığını bulmuştur. 1991'de Knisley ve diğ. tarafından idrar toksikoloji çalışmalarında gelişigüzel yapılan seçimlerde hamile kadınların % 10-25'inin kokain ve ketamin suistimal ettiğini belirtmiştir (Rofael H.Z. ve ark.2002).

Yapılan çalışma, kokain-ketamin kombinasyonunun her bir ilacın tek başına kullanımına göre daha fazla teratojenik hasara yol açtığını ve kokain bağımlılarının genel anestetik kullanımı gerektiğinde, yaşamı tehdit eden birçok komplikasyona maruz kalabileceğini göstermiştir (Rofael H.Z. ve ark.2002).

2.3. KETAMİNİN ADLİ BİLİMLER AÇISINDAN ÖNEMİ

KT tatsız ve kokusuz olduğu için fark edilmeden içeceklere katılabilir, amneziye yol açmaktadır. Bu gibi özelliklerinden dolayı ilaç bazen cinsel tacizde suistimal edilmektedir, günlük-tecavüz uyuşturucusu olarak da bilinmektedir (Kim E. 2008, Turfus S.C. ve ark.2009).

Ketamin bazen kokain, metamfetamin, 3,4-metilendioksimetamfetamin (MDMA) ve benzodiazepinler gibi ilaçlarla birlikte suistimal edilmektedir. Bu yüzden ketamin illegal ilaçların görüntüleme listesine dahil edildi ve diğer birçok suistimal edilen ilaçla birlikte kantifiye edilmektedir (Chen C. ve ark. 2007).

Ketamine, Çin'de K tozu da denir, tuzları ve preparatları da dahil olmak üzere birinci sınıf psikotrop ilaç olarak sınıflandırılır. Asıl suistimalcilerin gençler olması suçta artışa neden olmaktadır (Xiang P. ve ark. 2006).

2.4. DÜNYA GENELİNDE KETAMİN SUİSTİMALİ VERİLERİ

2009 Uluslararası Narkotik Kontrol Strateji Raporuna göre dünya genelindeki ketamin suistimali aşağıda belirtildiği gibidir:

Burma'dan sentetik ilaçların (amfetamin türü uyarıcılar, kristal metamfetamin ve ketamin) üretimi ve ihracatı kesintisiz devam etmektedir. Malezya'da yerel ilaç talep ve tüketimi çok sınırlıdır, fakat daha çok Hindistan'dan kaçırılan kristal metamfetamin, ekstazi ve ketamin Malezya üzerinden Tayland, Singapur, Çin, Avustralya'daki tüketicilere gitmektedir. Hindistan'dan gelen ketaminin Malezya'daki popülerliği giderek artmaktadır. İstatistikler ulusal ilaç bağımlılarının daha çok 19 ile 39 yaşları

arasında ve liseyi bitirmemiş olanlar olduğunu göstermektedir. Kamboçya da ketamin suistimalinin görüldüğü ülkelerdendir.

Çin ekonomisinin büyümesi ve toplumun son çeyrekte açılması ile ülke gençliği artan gelirin ve özgürlüğün tadını çıkarmaya başlamışlardır. Sonuç olarak büyük ve orta ölçekli şehirlerde ilaç suistimali artmıştır. Yeni ilaçları suistimal edenlerin sayısı artmaktadır ve kristal metamfetamin, ekstazi, ketamin ve triazolam gibi ilaçlar daha popüler olmuştur. Çin'de 2007'de 6 ton ketamin (2006'daki tonun 3.35 katı) ele geçirilmiştir (2008 Çin Yıllık İlaç Kontrol Raporu). 2008'in ilk yedi ayında ise 3.59 ton ketamin yakalanmıştır.

Filipinler'de ketamin talebi düşüktür. Uluslararası ilaç grupları ülkeyi ketamin tozu ürettikten sonra bölgedeki Çin ve Tayland gibi diğer yerlere ithali için kullanmaktadırlar. PDEA, 2008'de 51 milyon pezo (\$1,085,000) değerinde ketamin ele geçirildiğini bildirmiştir.

Finlandiya Avrupa'nın en düşük kannabis kullanma oranına sahip olmuştur. Ekstazi, GHB, Ketamin ve diğer MDMA Ekstazi-tipi ilaçlar Helsinki ve başka büyük şehirlerde gençler arasında ve klüp kültürüyle ilişkili olarak yoğunlaşmıştır.

Hong Kong'da son 10 yılda psikotrop madde suistimalinde artış vardır. Psikotrop maddelerin içinde en çok ketamin (ilaç suistimalcilerin yüzde 34.2'si) suistimal edilmektedir.

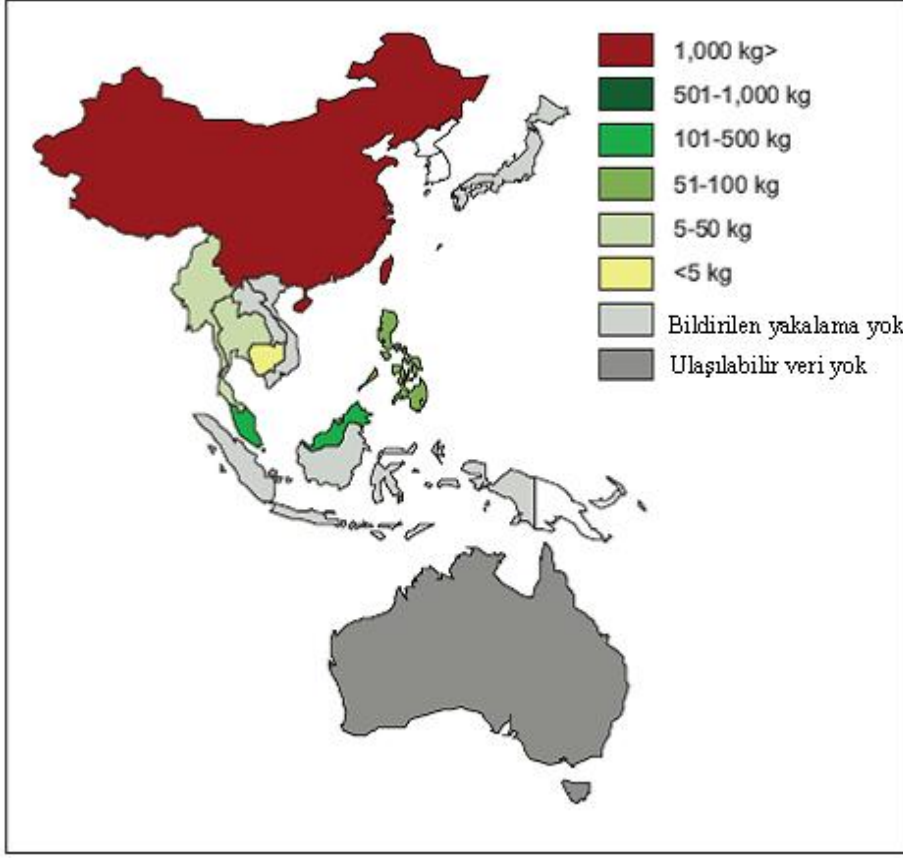
İrlanda'da ele geçirilen ketamin 52,1 gram, 2.082 tablet, vaka sayısı ise 28'dir.

Singapur'da 2007'de tam tersine MDMA, Ketamin ve nimetazepam suistimalcilerinin sayısında azalma görülmüştür.

2008'de Tayvan'da Hindistan, Avrupa ve Çin kaynaklı ketamin yakalanmış, yerel yasadışı ketamin üretiminde artış gözlenmiştir.

UNODC 2003 Global Illicit Drug Trends raporuna göre Tayland'da 1999'da 269.620 kg ketamin ele geçirildi (ICPO, International Criminal Police Organization).

Filipinler’de 2005 yılında 4 adet yasadışı laboratuvar yakalanmıştır (Regional Centre for East Asia and the Pacific).



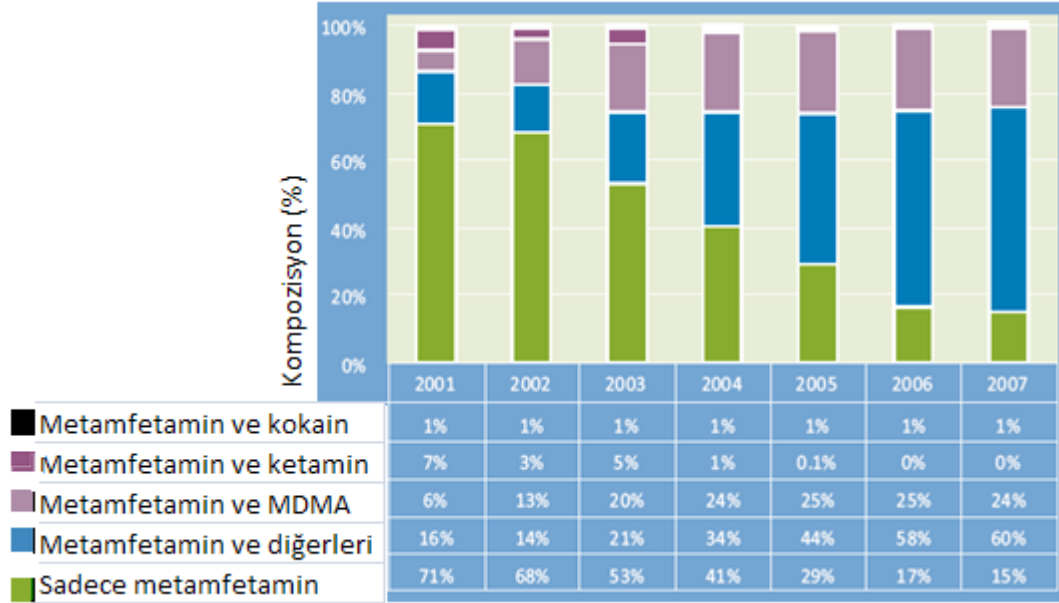
Şekil 2.5: Bölgesel olarak ele geçirilen ketamin miktarları, 2006

*Kaynak: United Nations Office on Drugs and Crime Regional Centre for East Asia and the Pacific, Patterns and Trends of Amphetamine-type Stimulants (ATS) and Other Drugs of Use in East Asia and the Pacific 2006

Bu alandaki kısıtlamalara rağmen elde edilebilen adli bilgiler, kullanıcıların ‘ekstazi’ (mesela MDMA içeren) sandıkları ilacın, pek çok ülkede genelde farklı , uluslararası kontrol altında olmayan, örneğin ketamin gibi çeşitli maddeler olduğunu söylemektedir. Mesela, Kanada’da aktif içeriği sadece MDMA olan ekstazi tabletleri 2001’de % 69 iken 2007’de % 3’e düştü. Kanada düzenli olarak adli bilginin elde edilebildiği birkaç ülkeden biridir. Ketamin yıllarca keyif verici halüsinojen olarak kullanılmış, Doğu-güney doğu Asya ATS pazarına son birkaç yıldır ‘ekstazi’ tabletlerinin içeriği olarak - başlangıçta çok farkedilmeden- girmiştir.

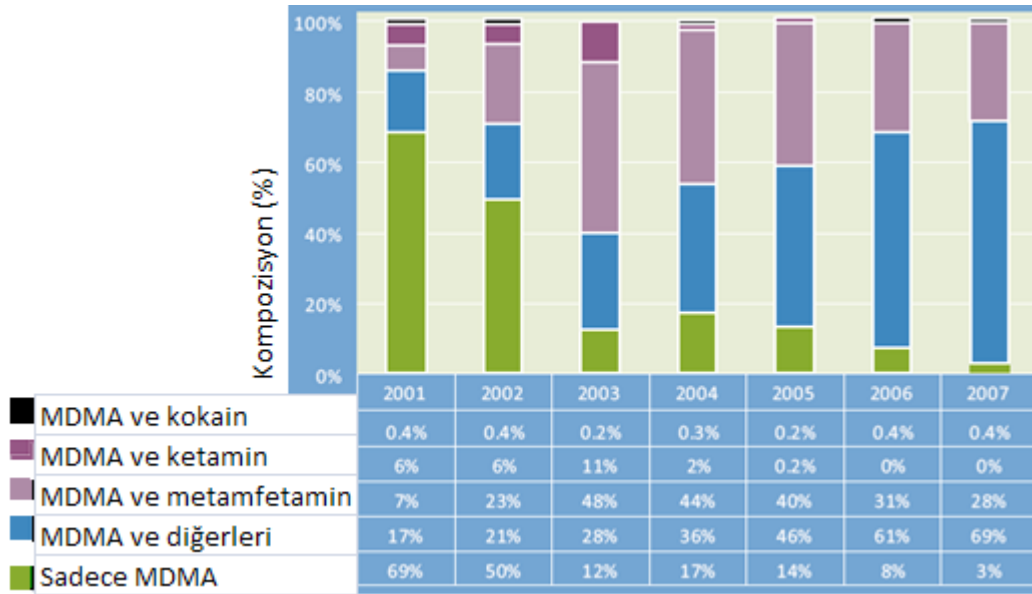
Kanada’da ele geçirilen ATS’nin adli testleri metamfetamin ve MDMA ile diğer ilaçların karıştırılmasında artış olduğunu göstermektedir. Aynı olay ‘ekstazi’ tabletleri testlerinde de yaşanmıştır (Global ATS Assessment, 2008).

Tablo 2.2: Kanada Metamfetamin Bileşimi, 2001-2007



*Kaynak: Health Canada Drug Analysis Service, *Illicit Drug Surveillance*, (2008); *Illicit Synthetic Drugs Surveillance in Canada*,









Tablo 2.3: Kanada ‘Ekstazi’ Bileşimi, 2001-2007



*Kaynak: Health Canada Drug Analysis Service, *Illicit Drug Surveillance*, (2008); *Illicit Synthetic Drugs Surveillance in Canada*, presentation at the Expert Meeting for Global Illicit Synthetic Drug Monitoring Programme, Tokyo, Japan (Feb 2008)

2006'da Viet Nam'daki sınırlı adli analizlerinin sonuçları 'ATS' tabletleri olarak ele geçirilenlerin, değişen konsantrasyon aralığında farklı maddeler içerdiğini göstermiştir. Bunlar metamfetamin (% 0 ile % 30 arasında), MDMA (% 0 ile % 80 arasında) ve pek çok vakada ketamin (kantifiye edilmemiş) içermektedir (Global ATS Assessment, 2008).

Tablo 2.4 : Vietnam'da 2006 yılında ele geçirilen ATS tabletleri bileşenleri

Tablet	Boyut	Ağırlık	MA içeriği (%)	MDMA içeriği (%)	Katkılar
	0.8 x 0.5	0.358	0.52	0	Parasetamol, kafein ve ketamin
	0.9 x 0.4	0.320	0.87	0	Parasetamol, kafein ve ketamin
	0.8 x 0.4	0.342	33.18	0	Parasetamol, kafein ve ketamin
	-	0.238	0.03	21.15	Ketamin
	0.7 x 0.4	0.299	0.03	25.18	Ketamin
	0.7 x 0.4	0.263	1.68	66.86	Ketamin
	0.8 x 0.4	0.365	0	36.69	Ketamin
	0.6 x 0.5	0.191	0	81.96	Ketamin

*Kaynak: UNODC Regional Centre for East Asia and the Pacific, Patterns and Trends of Amphetamine-type Stimulants (ATS) and Other Drugs of Use in East Asia and the Pacific 2006 (June 2007)

Japonya'da 2003-2006 yılları arasında, el konulmuş 420 tabletin rastgele seçilmesiyle yapılan analiz verilerine göre ekstazi tabletlerinin % 8'inde ketamin bulunmuştur (Global ATS Assessment, 2008).

Ketamin üretimindeki artış, bildirilen yasadışı laboratuvarların (2006'da 17'den 2007'de 44'e) sayısından ve bölgedeki ilaç taleplerinin artmasından da açıkça görülebilir. Ketamin yasal olarak farmasötik, yasadışı ise halüsinojen olarak kullanılmaktadır. Ketamin şu anda uluslararası kontrol altında bulunmamaktadır (World Drug Report, 2009).

2007/08 Endonezya otoriteleri bazı yasadışı metamfetamin laboratuvarlarında ketamin bulunduğunu, ketaminin kullanımının artmasıyla yerel üretim olasılığının da arttığını bildirmişlerdir (World Drug Report, 2009).

2007 için uzmanların % 40'ı Asya'daki ekstazi grubu kullanım probleminin arttığını belirtmektedirler. Bunlardan birçoğu Çin, Endonezya, Tayland ve Vietnam'ı içeren Doğu ve Güney Doğu Asya'dadır. Fakat diğer bölgelerde olduğu gibi adli bilimsel kapasitedeki yetersizlikler yüzünden ekstazi-grup maddelerinin gerçekten MDMA veya ketamin gibi diğer psikoaktif maddeleri içerip içermediği bilinmemektedir. 'Klüp ilaçları'nın, ketamin gibi başka maddelerle yer değiştirilmesi artmaktadır. Mesela Hong Kong, Çin'de pazar 2000'den sonra hızla ve çarpıcı şekilde değişmiş, 1998'de neredeyse adı duyulmamış olan ketamin ise ekstazi kullanımının yerini almıştır. Ketamin ilaç kullanımında bildirilen vaka sayısı 2005 ile 2007 arasında iki katına çıkmış ve yeni bildirilen vakaların tamamının % 29'u Hong Kong, Çin'dedir (World Drug Report, 2009).

2.5. KETAMİN ANALİZİNDE KULLANILAN ANALİTİK YÖNTEMLER

Yakın zamanda ketamin suistimalinin dünya çapında artması, yeterli görüntüleme ve doğrulama metodlarının geliştirilmesini gerektirmektedir. 1970'lerden beri ketamin ve metabolitlerinin insan idrarı, plazması ve saçında tayini için bazı analitik metotlar geliştirilmiştir. Bu metotlar alev-iyonlaştırıcı dedektörlü gaz kromatografisi (GC-FID), nitrojen-fosfor dedektörlü gaz kromatografisi (GC-NPD) ve yüksek performans sıvı kromatografisidir (YPSK). Daha spesifik metotlar ise kütle spektrometresini dedektör olarak kullananlar, mesela gaz kromatografi-kütle spektrometresi (GC-MS) ve sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi (LC-MS) bildirilmiştir. Yakın zamanda sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometresi (LC-MSMS) ve headspace katı-faz mikroekstraksiyon gaz kromatografisi-kütle spektrometresinin (HS-SPME-GC-MS) yeterli 'görüntüleme' metotları arasında olduğu savunulmuştur (Cheng P. 2007).

Teorik olarak ketamin varlığının test edilmesi mümkün, fakat pratikte testin yapılması yaygın değildir. Belirli bir sebep olmadığı sürece, mesela otopsi vakası gibi, spesifik ketamin testleri normalde yapılmamaktadır. Son birkaç yıldır ketamin popüler medyada

geniş bir şekilde bilinmeye başladı ve bazı test şirketleri 'Klüp ilaç' testi bataryasına ketamini eklemişlerdir. Buna rağmen bilindiği kadarıyla ketamin tayini için tasarlanmış bir immünoassay kiti ticari olarak henüz mevcut değildir. Ketaminin bazı ilaç görüntüleme analogu olan fensiklidin için yanlış pozitif neden olabileceği iddia edilmiştir. Yakın zamanda katı-faz ekstraksiyon ve katı-faz mikroekstraksiyon da ayrıca örnek hazırlama metotları için uygulanmaktadır. Tayin için genelde İTK, GC (elektron yakalama dedektörü) veya sıvı kromatografisi (UV veya fotodiyot ışın dedektörü) bildirilmiştir (Chou S.L. ve ark. 2004), [2] .

Ketaminin at yarışlarının sonuçlarını etkilemek için kullanılmasından şüphelenildiğinden, ekuin/kanin laboratuvarları rutin olarak ketamin görüntülemeyi alkalik ekstraktın ince tabaka kromatografisiyle yapılırlar. Katı faz mikroekstraksiyondan (SPME) sonra saçta ketaminin analizi için GC/MS metodu da bildirilmiştir. Ketaminin ve metabolitlerinin türevlendirilmesi GC performansını arttırmaktadır. Ketamin sekonder amin olduğu için ketamin ve konjüge olmayan metabolitleri için sekonder aminlerle tepkimeye girebilecek olan herhangi bir türevlendirme ajanı kullanılabilir. Ketaminin izomerlerinin ayrılması kiral sabit faz kullanılarak YPSK ile yapılabilir. Bu ayrılma insan plazmasındaki ketamin ve norketamin izomerlerinin seviyelerini belirlemek için de kullanılabilir. Ketaminin tayinin, idrar ve beyin örneklerinde gaz kromatografisi-kütle spektrometresi, plazmada yüksek performans sıvı kromatografisi-ultraviyole dedektör ve diğer matriks sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi insan sıvılarında ve kapiler elektroforez için pek çok analitik metot denenmiştir (Mozayani A. 2002).

Ketaminin idrar ve kan örneklerindeki tayini için yayınlanan metodlar arasında, HPLC-DAD ve HPLC-MS-MS te vardır. Sıvı-sıvı ekstraksiyonundaki örnek hazırlama ve uzun kromatografik akış süreleri yüzünden bu metodlar işlem hacmi fazla olan laboratuvarların rutin ketamin araştırması için uygun değildir (Cheng J.Y.K. ve ark. 2004, Moore K.A. ve ark. 2001).

Tırnaktaki ketaminin GC-MS ile analizi Kim J.Y. ve ark. (2009) tarafından ilacı suistimal edenlerden alınan tırnak örnekleri ile yapılmıştır.

3,4 metilendioksiamfetaminler genelde karaborsada tablet şeklinde satılmaktadır. Bu tabletler çok çeşitli grafik dizaynlarında ve ticari logolarla, 3-pırlanta (“Mitsubishi” markası), kuşlar, hayvanlar vb. diğer yüzlerinde basılmaktadır. Bazı GC/MS ve LC/MS çalışmaları bunların primer ajan olarak değişik miktarlarda MDA (pek çok vakada tablet başına 50 ile 150 mg aralığında), bazen küçük miktarlarda amfetamin ve/ya diğer kafein ve ketamin gibi farmakolojik ajanlar içerdiğini ortaya çıkarmıştır (Suzuki O. ve ark. 2005).

2.5.1. Analitik Yöntemler

Önceleri yaygın olarak uygulanan spektroskopik yöntemler duyarlılığın ve seçiciliğın az olması nedeniyle kullanılmazken, uzun yıllardır uygulanmakta olan kromatografik yöntemlerle birlikte immunoassay yöntemleri de, teknik koşulların gelişmesi nedeniyle günümüzde uygulama sıklığı gittikçe artan yöntemlerdir.

Kromatografik Yöntemler:

Sabit fazın bir dolgu maddesi üzerinde yayılmış bir sıvı filmi olarak uygulandığı durumda yöntem *sıvı-sıvı kromatografisi* adını alır. Bileşenler hareketli ve sabit fazlar arasındaki farklı dağılma eğilimlerinden ötürü birbirlerinden ayrılırlar. Kullanılan sıvıların birbirleriyle karışmamaları için polarlıkları farklı olmalıdır. Normalde hareketli faz apolar, sabit faz ise polardır. *Ters-faz sıvı-kromatografisinde* ise hareketli faz polar bir sıvı, sabit faz ise apolar bir sıvıdır. Sabit sıvı fazın katı dolgu maddesi üzerinde film olarak yerleştirilmeyip katı taneciğe kimyasal olarak bağlanması durumunda hem adsorpsiyon hem de dağılım etkileşmesi söz konusudur, buna *bağlı-faz sıvı-kromatografisi* denir. *Kağıt kromatografisi* yönteminde ise süzgeç kağıt sıvıya daldırılır ve kılcallık etkisiyle sıvı bileşenleri sürükler.

Sabit fazın katı dolgu maddesi olduğu yöntem ise *sıvı-katı kromatografisidir*. Bileşenlerin katı yüzeyindeki farklı adsorpsiyon ilgilerinden dolayı bileşenler ayrılır. Cam plaka üzerine sürülmüş katı fazın sabit faz olduğu kromatografiye *ince tabaka kromatografisi* denir.

Sıvı kromatografisinde hareketli fazın kolon boyunca ilerlemesi genelde yavaş olur. Dolgu maddesinin çapının küçültülmesi ve kolon boyunun uzatılması kromatografik ayrılmasının süresini iyice uzatır. Son yıllarda çok ince taneciklerin küçük çaplı kolonlarda hareketli fazı basınç uygulayarak kolon içinde ilerletmek mümkün olmuştur. Yüksek basınç altında (100-200 atm) gerçekleştirilen sıvı-sıvı kromatografi türüne *yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)* denir.

Katı sıvı türü kromatografi yönteminde katı faz genelde silika yada alümina kullanılır. Bu yöntemde hareketli faz sıvısı çeşitli polarlıktaki çözücüler olabilir. Çok polar bir çözücünün kullanıldığı durumda çözücü katı madde üzerinde kuvvetli bir biçimde tutunmuş maddeleri iyi ayırır, fakat sabit fazda zayıf tutunmuş bileşenler kolonu hızlı ve birbirinden iyi ayrılmamış olarak terkederler. Polarlığı az olan çözücünün kullanıldığı durumlarda ise kolona zayıf bir biçimde tutunmuş bileşenler iyi ayrıldıkları halde, kuvvetli tutunmuş olanlar ya kolondan çok geç çıkar ya da hiç çıkmazlar. Bu güçlükleri ortadan kaldırmak için '**çözücü programlaması**' adı verilen yöntem kullanılır. Bu yöntemde önce kolona polarlığı az olan bir çözücü verilir ve ortama daha polar bir çözücü, giderek artan miktarlarda eklenerek çözücünün polarlığı artırılır. Böylece kolona hem zayıf hem de kuvvetli tutunmuş bileşenlerin tümü kesin pikler halinde kolondan çıkarlar. Ayrım işlemi tamamlandıktan sonra kolon yeniden ilk çözücü ile uzunca bir süre yıkanarak tekrar kullanılabilir hale getirilir.

Kağıt veya cam levhaya kaplanmış katı madde üzerinde birbirinden tam ayrılamayan birleşenler, kağıt yada cam levha bir dik açı kadar döndürülerek bir başka çözücü içine yerleştirilir ve ayrılma işlemi bir kez daha tekrar edilir. Bu işleme *iki boyutlu ince tabaka* ya da *kağıt kromatografisi* denir. Böylece belli bir polarlığı olan bir çözücü ile birbirinden ayrılamayan bileşenler, başka bir polarlığa sahip bir ikinci çözücü ile birbirinden ayrılmış olur.

İnce tabaka kromatografisinde kullanılan katı maddeler, cam levha üzerinde sulu bir bulamaç halinde sürülür ve levhalar kullanılmadan önce 11⁰C de ısıtılarak kurutulur. Bu amaçla kullanılan katı maddeler, silika jel, alumina, sellüloz, poliamidler ve iyon değiştirici reçinelerdir. Cam levhaya katı maddenin iyi tutunmasını sağlamak için, katı

maddeye % 5-10 miktarında CaSO₄ ilave edilir. Cam levha üzerine sürülen katı tabakanın kalınlığının yaklaşık 0.2 mm olması sağlanır (Yıldız A. ve ark.1997).

Kullanılan fazlara göre kromatografi türlerini sıralayacak olursak; hareketli faz olarak gaz, sabit faz olarak sıvı kullanılırsa bu sisteme gaz-sıvı (GL) kromatografisi; hareketli faz olarak gaz, sabit faz olarak katı kullanılırsa bu sisteme gaz (GC) kromatografisi; hareketli faz olarak sıvı, durgun faz olarak da katı kullanılırsa bu sisteme likit (LC) kromatografi denir. Kromatografi, bugün için toksikolojide en sık kullanılan yöntemdir. Kromatografik ayırmada kantitatif, kalitatif ve preparatif olmak üzere üç temel amaç gözetilmektedir.

Kantitatif analiz: Kromatografi pik altındaki alan mevcut madde miktarına bağlıdır. Pik alanları genellikle elektronik integratör veya bilgisayar ve bir yazılım ile hesaplanır.

Kalitatif analiz: Maddenin bilinen alıkonma zamanları ile karşılaştırma yapılır. Numune içindeki bilinmeyen maddenin alıkonma zamanıyla (Rt) standart alıkonma zamanı kıyaslanarak teşhis yapılır.

Preparatif ayırma: Numune saflaştırmada ya da küçük miktarlarda saf madde elde etmek için kullanılır.

Kütle Spektrometresi

Kütle spektrometresi yönteminde, atom veya moleküllerden gaz fazında iyonlar oluşturulur ve bu iyonlar kütlelerine göre birbirinden ayrılarak kaydedilir. İyonların bağıl miktarlarının (kütle/yük) oranlarına göre çizilmiş grafiğine kütle spektrumu denir. Kütle spektroskopisinde hem pozitif hem de negatif iyonlar incelenebilir, ancak pozitif iyonların incelenmesi daha yaygın bir uygulamadır. Bir maddenin kütle spektrumunun elde edilebilmesi için önce gaz fazına geçirilmesi daha sonra iyonlaştırılması gerekmektedir.

Bir kütle spektrometresi ile ikinci bir kütle spektrometresi birbirine bağlanarak birlikte kullanılabilir (MS/MS). Bu yöntemde birinci kütle spektrometresinde yumuşak iyonlaştırma yoluyla belli bir maddenin molekül iyonu bol miktarda üretilir ve ikinci

kütle spektrometresinde bu molekül iyonunun parçalanma ürünleri daha duyarlı bir biçimde saptanır. Ayrıca, iki kütle spektrometresini ardarda bağlamakla birinci spektrometreyi belli bir (m/e) değerine ayarlayarak örnekte bulunan maddeleri birbirinden hızlı bir şekilde ayırmak ve ikinci spektrometre ile de ayrılan bu iyonu veya parçalanma ürünlerini izlemek mümkün olur. Böylece, GC-MS veya LC-MS yöntemlerinde kullanılan kromatografi aletlerinde olduğu gibi, örnekteki birleşenlerin kromatografi kolonundan çıkışını belli bir süre beklemek gerekmez (Yıldız A. 1997).

Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografi (YPİTK) yöntemi özellikle bitkisel araştırmalarda, çevre analizlerinde, gıda güvenliğinde, klinik uygulamalarda, metabolizma çalışmalarında, farmasötik uygulamalarda ve adli incelemelerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Teknik, adli incelemelerde, özellikle narkotik sistematik toksikoloji doğal psikoaktif madde analizi ve belge inceleme gibi araştırmalarda öne çıkmaktadır (Türkmen Z. ve ark. 2008).

Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografi (YPİTK)

YPİTK cihazı tek bir yazılım ile bilgisayardan kontrol edilebilen farklı cihazlardan oluşur. ATS4 otomatik olarak plakaya en fazla 72 örnek uygulayabilen otomatik enjeksiyon sistemine sahip olan örnekleyicidir. Viallerdeki numunelerin plakaya önceden verilen bant sayısına uygun genişlikte ve seçilen x-y düzlemi mesafesine göre azot gazı altında tatbik edilmesini sağlar. Daha sonra plaka yürütme tankına numune bileşenlerine ayrılmasını diye bırakılır. İki çeşit yürütme tankı vardır; izokratik ve gradient. İzokratik tank ünitesi (ADC2), geleneksel İTK'deki kapalı tank sistemi gibidir. Bu otomatik cihazla tank içindeki sıcaklık, nem, kurutma ve saturasyon kontrolü sağlanmaktadır. ADC2 ünitesi bölmeye yerleştirilen plakayı otomatik olarak tanka indirerek, mobil faz ile plakanın bileşenlerinin yürütülmesini ve ardından plakanın otomatik olarak kurutulmasını sağlar. Daha sonra plaka değerlendirilmesi için üçüncü cihaz olan tarayıcı ünitesine (TLC Scanner3) yerleştirilir. Densitometri, plaka üzerine gönderilen ışığın şiddetinden, yansıyan ışığın şiddeti çıkartılarak elde edilen spektrumdan bileşenin, miktarına ilişkin bilgi elde etmeye olanak vermektedir. Lekelerin yerlerinin uygulama noktasına uzaklığının, tüm analiz mesafenin uzunluğuna oranından lekenin bu sistemdeki alıkonma değeri olan "Rf" hesaplanır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

Asetik Asit, CH₃COOH Merck
Kloroform, CHCl₃ Merck
Diklorometan, Sigma
Etil Asetat, C₄H₈O₂ Merck
Potasyum Hidroksit, KOH Merck
Sodyum Hidroksit, NaOH Riedel-de-Haen
Hidroklorik asit, HCl Merck
Metanol, CH₃OH Sigma
Amonyak, NH₃ Merck
Aseton, CH₃COCH₃ Merck
Norketamin, Cerilliant
Toluen, Merck

3.2. KULLANILAN CİHAZLAR

Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi: Camag
Sıvı Kromatografisi/Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS): Zivak Tandem Gold LC-MS/MS
Hassas Terazisi: Precisa
Santrifüj Cihazı: Universal 320-R Hettich
Vortex Karıştırıcı: Yellow Line TTS-2
Otomatik Pipet ve Uçları: Eppendorf Research 10-100 µl ve uçları, Eppendorf Research 200-1000 µl ve uçları, Eppendorf Research 10 ml ve uçları
pH indikatör kağıdı: Merck Universal indikatör
pH metre: Thermo
Etüv: Termal Laboratuvar Aletleri
Ultra Sonic Banyo: Bandelm Sonarex

3.3. ÇALIŞMA NUMUNELERİNİN SAĞLANMASI

İstanbul Üniversitesi Acil Tıp AD. Başkanlığı'na yanık tedavisi için gelen hastaların idrar örnekleri toplandı. Toplanan numuneler sıra ile kliniğe müracaat saat/tarih, hastanın adı, soyadı, cinsiyeti, yaşı, ağırlığı ve anestezi sırasında verilen ketaminin miktarı bilgileri de alındı. Gelen idrar numuneleri analizin yapılacağı zamana kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

3.4. ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI

Ketamin stok çözeltisi (1,0 mg/ml): 10,0 mg ketamin tartıldı, 10,0 ml hacme balon jode metanol ile tamamlandı.

Ketamin test çözeltisi (1,00 µg/ml): Hazırlanan 1,0 mg/ml'lik stok çözeltisinden 10,0 µl alındı 10,0 ml hacme metanol ile tamamlandı.

Ketamin test çözeltisi (500,0 ng/ml): Hazırlanan 1,0 µg/ml'lik test çözeltisinden 0,1 ml alındı 2,0 ml hacme metanol ile tamamlandı.

Ketamin test çözeltisi (250,0 ng/ml): Hazırlanan 500,0 ng/ml'lik test çözeltisinden 1,0 ml alındı 2,0 ml hacme metanol ile tamamlandı.

Ketamin test çözeltisi (100,0 ng/ml): Hazırlanan 250,0 ng/ml'lik test çözeltisinden 800,0 µl alındı 2,0 ml hacme metanol ile tamamlandı.

Ketamin test çözeltisi (50,0 ng/ml): Hazırlanan 100,0 ng/ml'lik test çözeltisinden 1,0 ml alındı 2,0 ml hacme metanol ile tamamlandı.

Ketamin test çözeltisi (25,0 ng/ml): Hazırlanan 50,0 ng/ml'lik test çözeltisinden 1,0 ml alındı 2,0 ml hacme metanol ile tamamlandı.

Norketamin test çözeltisi (1,0 µg/ml): 1,0 mg/ml'lik norketamin standart çözeltisinden 10,0 µl alındı 10,0 ml hacme metanol ile tamamlandı.

Norketamin test çözeltisi (500,0 ng/ml): Hazırlanan 1,0 µg/ml'lik test çözeltisinden 1,0 ml alındı 2,0 ml hacme metanol ile tamamlandı.

Norketamin test çözeltisi (250,0 ng/ml): Hazırlanan 500,0 ng/ml'lik test çözeltisinden 1,0 ml alındı 2,0 ml hacme metanol ile tamamlandı.

Norketamin test çözeltisi (100,0 ng/ml): Hazırlanan 250,0 ng/ml'lik test çözeltisinden 800,0 µl alındı 2,0 ml hacme metanol ile tamamlandı.

Norketamin test çözeltisi (50,0 ng/ml): Hazırlanan 100,0 ng/ml'lik test çözeltisinden 1,0 ml alındı 2,0 ml hacme metanol ile tamamlandı.

Norketamin test çözeltisi (25,0 ng/ml): Hazırlanan 50,0 ng/ml'lik test çözeltisinden 1,0 ml alındı 2,0 ml hacme metanol ile tamamlandı.

3.5. EKSTRAKSİYON YÖNTEMLERİ

Ketamin ve norketaminin idrardan izolasyonları için sıvı sıvı ekstraksiyon ve katı faz ekstraksiyon teknikleri denenmiştir.

3.5.1. Sıvı sıvı ekstraksiyon yöntemi:

İdrar numunesi maddelerin analizleri için uygulanan bu yöntem önce seçilen ketamin ve norketamin ilaç standartlarının boş idrar örneklerine ilave edilerek yapılmıştır. Daha sonra optimize edilen ekstraksiyon protokolü hasta numunelerine uygulanmıştır.

1,0 ml idrar numunesinin pH sı 10-11'e 0.10 N NaOH ile ayarlandı.

Numune ultrasonik banyoda 50°C de 45 dakika bekletildi.

Numune üzerine eşit hacimde diklorometan ilave edildi.

2400 de 7 dakika vortekslendi.

Daha sonra numune 4000 rpm'de 5 dk. santrifüjlendi.

Santrifüjlenen numune 40°C'de N₂ gazı ile çeker ocak altında çözücü uçuruldu.

Kalan kısım 200,0 µl metanol ile çözülerek LC-MS/MS cihazına insertli viallerle koyulup analize hazır hale getirildi.

3.5.2. Katı Faz Ekstraksiyon Yöntemi:

İdrara katım yapılan ketaminin katı faz ekstraksiyonu yönteminde 4 ana basamak prosedürü uygulandı. Bu basamaklar şartlanma, adsorbsiyon, adsorbanın yıkanması, elüsyon'dur.

Şartlanma:

- 2,0 ml metanol 1 damla/sn olacak şekilde KF kartuşundan geçirildi.
- Daha sonra KF kartuşuna 2,0 ml distile su 1 damla/sn olacak şekilde eklendi.
- Bunun ardından 2,0 ml borat tamponu - pH 9,7- 1 damla/sn olacak şekilde eklendi.
- Son olarak KF kartuşu 1 dakika vakum altında kurutuldu.

Adsorbsiyon:

- İdrar numunesi vakum altında KF kartuşuna konuldu 1 damla/sn akış olacak şekilde geçirildi.

Adsorbanın yıkanması:

- 2,0 ml deiyonize su: %10 sıvı asetonitril (1,0 ml) kartuştan geçiş hızı 1 damla/sn olacak şekilde geçirildi
- Süzülen materyal atıldı

Elüsyon:

- Yeni bir tüp kartuşun altına yerleştirildi
- Analiz için numune, 2,0 ml metanol 1 damla/sn akış olacak şekilde geçirildikten sonra temiz 1 tüpe toplandı.
- Toplanan eluat azot gazı varlığında kuruluğa kadar uçuruldu.
- Atık üzerine 200,0 µl metanol ilave edilerek karıştırılarak çözüldü.
- Bu çözeltilerden 1,0 µl LC–MS/MS’de analiz yapıldı.

3.5.3. Hasta örneklerinde ekstraksiyon

Acil Tıp Bölümünde yanık tedavisi olan hastalarda anestezi amaçlı kullanılan ketaminin damariçine ekstraksiyonundan sonraki ketaminin idrar yoluyla atılmasını incelemek amacıyla gönüllü olarak çalışmaya katılanlardan belirlenen 2, 12, 24, 48, 72 saat sonra alınan idrar örnekleri toplanması sürecinde -20⁰C’de buzdolabında saklanmıştır. İdrar örnekleri üzerinde sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi uygulandı. Toksikolojik analiz işlemleri için yukarıda belirtilen sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi uygulanmıştır. Ekstraksiyon işlemi 1,0 ml hasta idrar örneği üzerinde yapılmıştır. Katı faz ekstraksiyon denemesi sonucunda ketaminin tayin edilmediği için numunelere sıvı faz ekstraksiyon uygulanmıştır.

3.6. YPİTK ÇALIŞMA KOŞULLARI

Çalışmada ketaminin uygun sistemle görüntüleme analizinin yapılması hedeflendi. Bu amaçla, önce manuel uygulama yapıldı, sonra uygun olabileceği düşünülen çözücü sistemleri CAMAG YPİTK’de denendi. Bu sistemlerin içinden Toluen:Aseton:Etanol:NH₃ (%25) (67:25:5:3) hareketli faz olarak belirlendi. Merck Kat.

No: 1.05649, 60F₂₅₄ 10x20 cm özelliğindeki normal faz YPİTK cam plaka kullanıldı. Ketamin, 50,0 - 250,0 ng/μL (250, 200, 150, 100, 50 ng/μL) derişim aralığında, tek plaka üzerine artan miktarlarda ve bant genişliğı 6 mm. olacak şekilde 1,0'er ve 2,0'şer μl tatbik edildi. 5 dakika nem kontrolü, 3 dakika tank saturasyonu sağlaması için beklendikten sonra plaka, 80 mm.'ye kadar yürütüldü ve 3 dakika kurutuldu. Ayrımın sağlanmasının ardından plaka densitometrik tarama ünitesine yerleştirilerek, 279 nm'de 20 nm/sn hızla tarama yapıldı ve spektrumlar 200 ve 400 nm arasında 5 nm artışla kaydedildi. Nitel analiz için pik alanı kullanıldı. Ketaminin alıkonma süresi 'Rf' ise 0,37 dir.

YPİTK Çözücü Sistem Denemeleri

YPİTK yöntemi için ketamine özgü sistem denemeleri öncelikle manuel yapıldı, daha sonra uygun olabileceğı düşünölen çözücü sistemleri CAMAG YPİTK cihazında denendi.

- Diklorometan:Aseton (95:5), Mor lekeler UV 254 nm'de gözlendi. Dragendorff püskürtüldü.
- Diklorometan:Toluen:Aseton (9:1:0,5), Mor lekeler bant şeklinde UV 254 nm'de gözlendi. Dragendorff püskürtüldü
- Diklorometan:Toluen:Aseton (7:2:1), Mor lekeler bant şeklinde UV 254 nm'de gözlendi. Dragendorff püskürtüldü
- Etilasetat:Metanol:Amonyak (%25) (85:10:5), leke görülmedi. Davidow Sistemi (TE sistemi)
- Toluen:Aseton:Etanol:Amonyak (67:25:5:3), Mor lekeler UV 254 nm'de gözlendi. Dragendorff püskürtüldü
- Hekzan:Etilasetat (1:1), Mor lekeler UV 254 nm'de gözlendi. Dragendorff püskürtüldü.
- Hekzan:Etilasetat (1:2), Mor lekeler UV 254 nm'de gözlendi. Dragendorff püskürtüldü.
- Toluen:Aseton:Etanol:Amonyak (25%), (45:45:7:3), bant gözlenmedi.
- Diklorometan:Aseton (7:3) Mor lekeler UV 254 nm'de gözlendi. Dragendorff püskürtüldü.

- Hekzan:Etilasetat:Toluen (4:6.5:1), Mor lekeler UV 254 nm'de gözlemlendi. Dragendorff püskürtüldü
- Diklorometan, Leke değil bant şeklinde gözlemlendi.
- Kloroform:Etanol (90:10), (TAJ sistemi, Clarke)
- Metanol:Amonyak (25%), (100:1.5), 0.10 M KOH spreyleneş plaka kurutulduktan sonra cihazda yürütme işlemleri yapıldı (TA Sistemi, Clarke).
- H₂O:Metanol (9:1), Ters faz denemesi yapıldı. Leke gözlenmedi

3.7. LC-MS/MS ÇALIŞMA KOŞULLARI

Kullanılan cihaza ait optimize edilmiş analiz koşulları aşağıda verilmiştir.

Dedektör: 1300V

CID Gaz Basıncı: 2.40m Torr

ESI needle voltage (+): 5500.00 Volt

ESI shield voltage (+): 600.00 Volt

Drying gaz sıcaklığı: 400.00°C

API housing sıcaklığı: 65.00 °C

Nebulizer gaz basıncı: 55.00 PSI

Drying gaz basıncı: 30.00 PSI

Kolon Fırın Sıcaklığı: 40 °C

Analiz Süresi: 8 dak.

Pompa programı:

<u>Zaman</u>	<u>% A</u>	<u>% B</u>	<u>Akış</u>
0.00	50.0	50.0	0.300 (mL/dak)
8.00	50.0	50.0	0.300 (mL/dak)

Mobil A: 5mM Amonyumformat (suda)

Mobil B: 5mM Amonyumformat (metanolde)

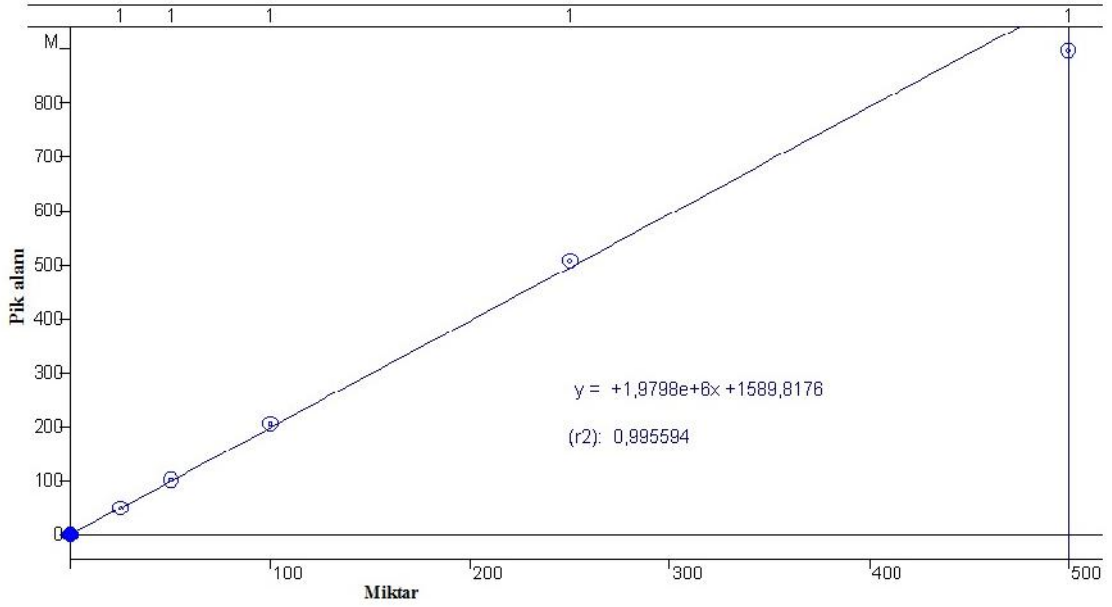
	<u>Q1</u>	<u>Q3</u>	<u>Kapiler V.</u>	<u>Çarpışma E.</u>	<u>Dwell Time</u>
Ketamin	238	125	66.0V	23.0V	0.350
Norketamin	224	207	520V	10.0V	0.300

Taşıyıcı gaz : Azot

4. BULGULAR

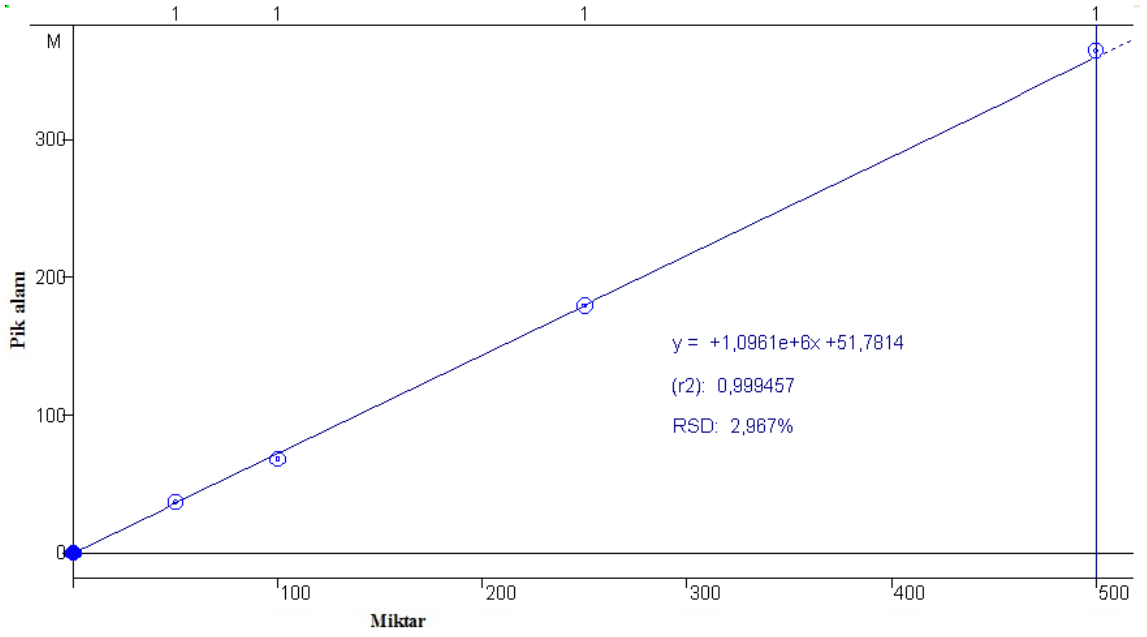
4.1 KALİBRASYON GRAFİKLERİ

Ketamine ait LC-MS/MS cihazında çizilen kalibrasyon eğrisi şekil 4.1 de sunulmuştur.



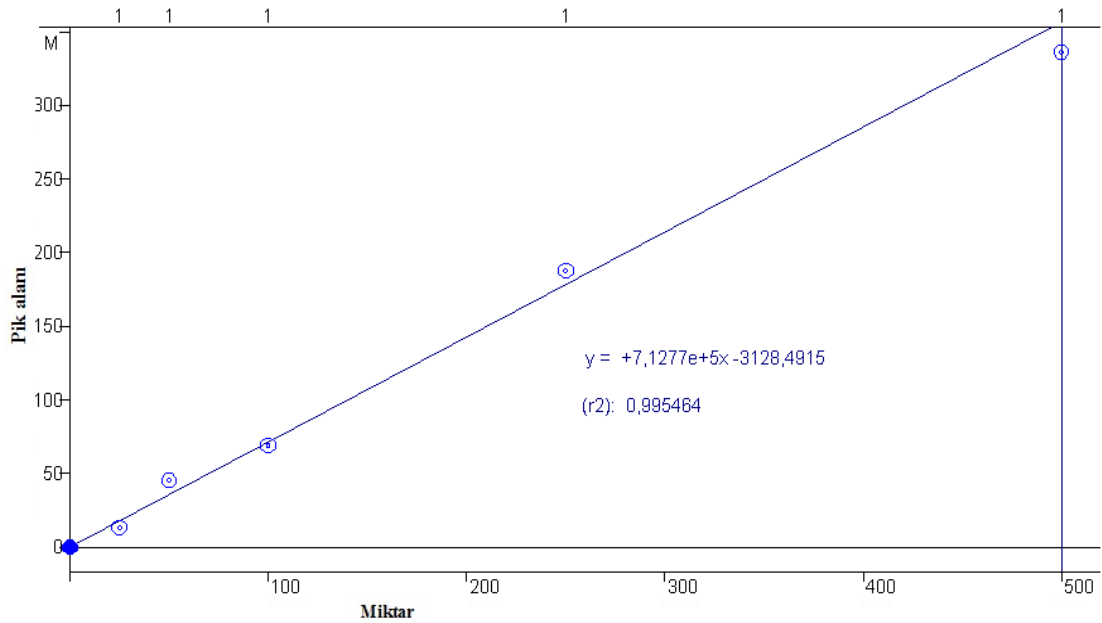
Şekil 4.1: İdrar örneklerine katım yapılmış ketaminin LC-MS/MS cihazındaki kalibrasyon eğrisi

1,0 ml idrar örneklerine ketamin ve norketeminin 25,0, 50,0, 100,0, 250,0 ve 500,0 ng/mL derişimleri karışım halinde katım yapıldı. Her bir derişim için altı tekrarlı ölçüm yapıldı. Sıvı sıvı ekstraksiyon sonucu elde edilen örnekler LC-MS/MS cihazında analiz edilerek kalibrasyon eğrisi çizildi. 25,0-500,0 ng/mL derişimler arasında R^2 değeri 0.995594 dir ve RSD: 5,478 % olarak saptanmıştır.



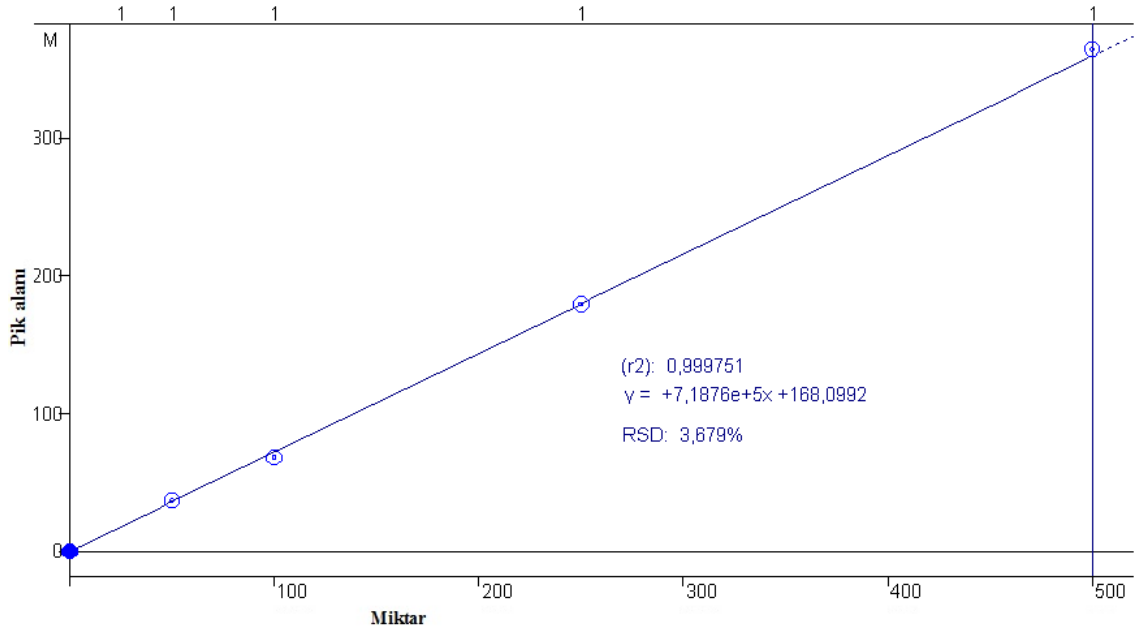
Şekil 4.2: Standart ketamin çözeltilerinin LC-MS/MS cihazındaki kalibrasyon eğrisi

Standart 1,0 mg/ml ketamin çözeltisinin seyreltilmesiyle hazırlanan 50,0, 100,0, 250,0 ve 500,0 ng/ml derişimlerdeki çözeltilerin LC-MS/MS cihazındaki kalibrasyon eğrisi şekil 4.2 de verildiği gibidir. R^2 değeri 0.999457 , RSD: 2,967 % dir.



Şekil 4.3: İdrar örneklerine katım yapılmış norketaminin LC-MS/MS cihazındaki kalibrasyon eğrisi.

1,0 ml idrar örneklerine ketamin ve norketaminin 25,0, 50,0 100,0, 250,0 ve 500,0 ng/mL derişimleri karışım halinde katım yapıldı. Herbir derişim için altı tekrarlı ölçüm yapıldı. Sıvı sıvı ekstraksiyon sonucu elde edilen örnekler LC–MS/MS de analiz edilerek kalibrasyon eğrisi çizildi. Norketamine ait LC–MS/MS cihazında çizilen kalibrasyon eğrisi şekil 4.3 te sunulmuştur. 25-500 ng/mL derişimler arasında R^2 değeri 0.9954, RSD ise % 18,76 olarak saptanmıştır.



Şekil 4.4 : Standart norketamin çözeltilerinin LC-MS/MS cihazındaki kalibrasyon eğrisi

Standart 1,0 mg/ml norketamin çözeltilisinin seyreltilmesiyle hazırlanan 50, 100, 250, 500 ng/ml derişimlerdeki çözeltilerin LC-MS/MS cihazındaki kalibrasyon eğrisi şekil 4.4 te verildiği gibidir. R^2 değeri 0.999751 , RSD: % 3,679 dur.

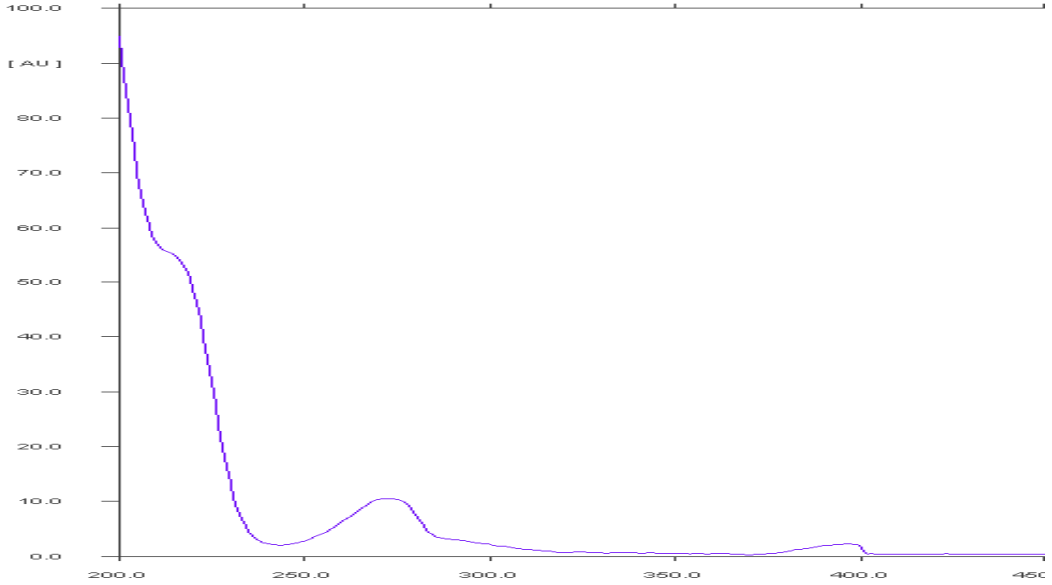
			Gerikazanım (%)	
	LOD	LOQ	50ng/ml	100ng/ml
Ketamin	50	92.9	65	79

Tablo 4.1: YPİTK sistemiyle hesaplanan değerler (n:6)

			Gerikazanım (%)	
	LOD	LOQ	50ng/ml	100ng/ml
Ketamin	28,05	30,41	94	79
Norketamin	28,95	31,81	83	77

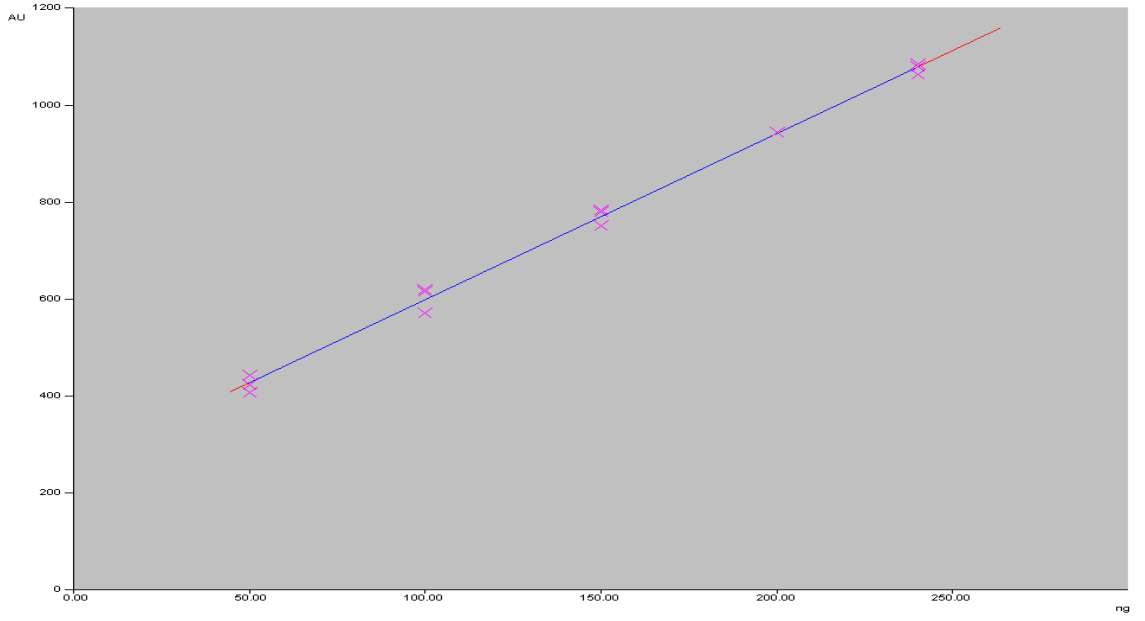
Tablo 4.2: LC-MS/MS yönteminde hesaplanan değerler (n:6)

Standart ketaminin YPİTK Sistemi kullanılarak çizilen 200-400 nm aralığındaki UV spektrumu $\lambda_{\max}=276$ Şekil 4.5'te verildiği gibidir.



Şekil 4.5: Ketamine ait UV spektrumu

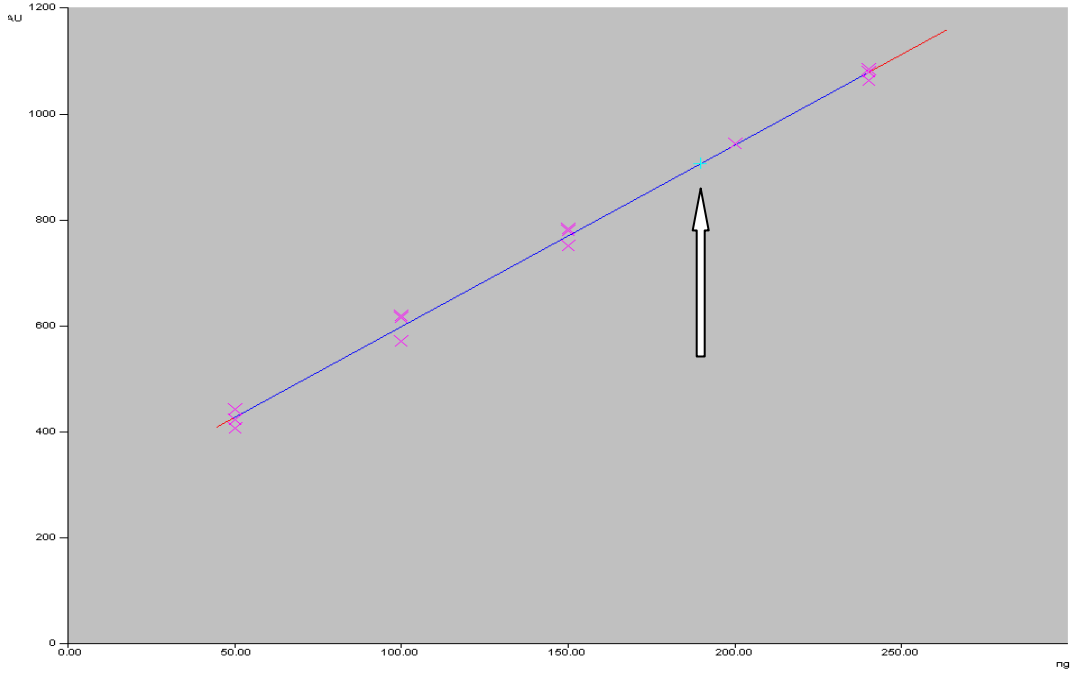
Standart ketamine ait YPİYK sistemiyle çizilen kalibrasyon grafiği Şekil 4.6 da verildiği gibidir. $Y=2.555,727 + 3,425x$ ve R^2 değeri 0.9979 olarak saptanmıştır.



Substance summary Graph height Graph area

Şekil 4.6: Ketamin pikine ait YPİTK sistemiyle alana göre doğrusallık verileri grafiği (Doğrusal aralık 50-250 ng/ml)

Substance:	KETAMIN @ 254 nm	Regression mode:	Linear
Regression via:	area	Y = 255,727 + 3,425 * X	r = 0,99797 sdv = 2,25 %



Substance summary Graph height Graph area

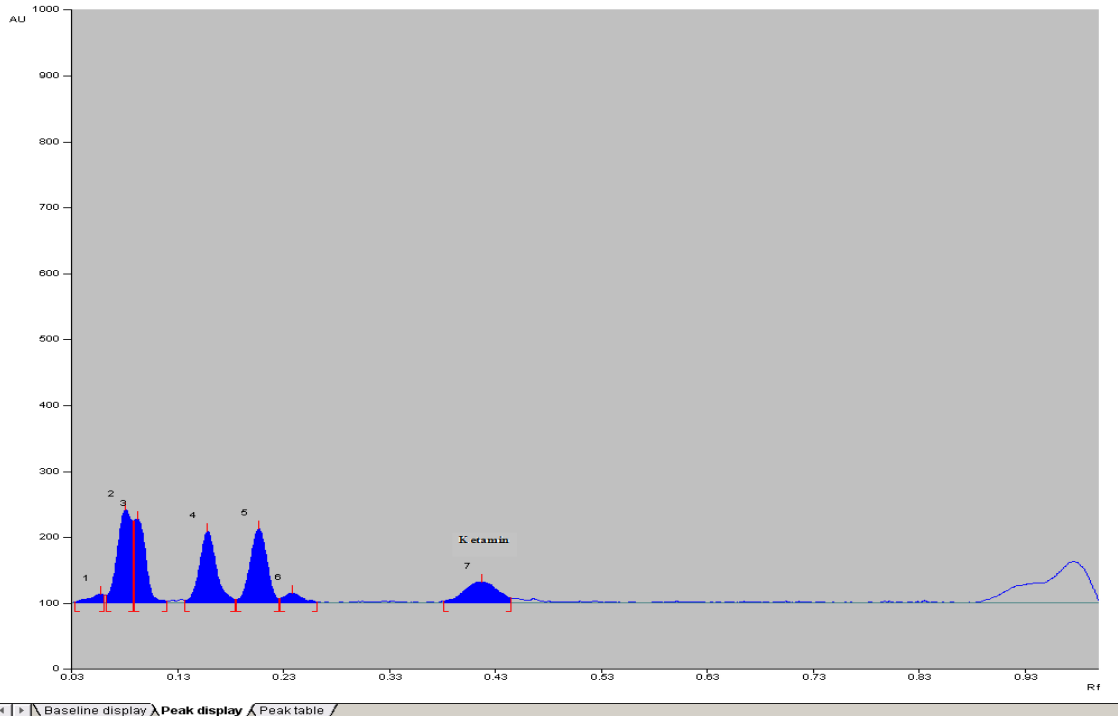
Şekil 4.7 : YPİTK hasta örneği analizi sonucu

Substance: KETAMIN @ 254 nm Regression mode: Linear

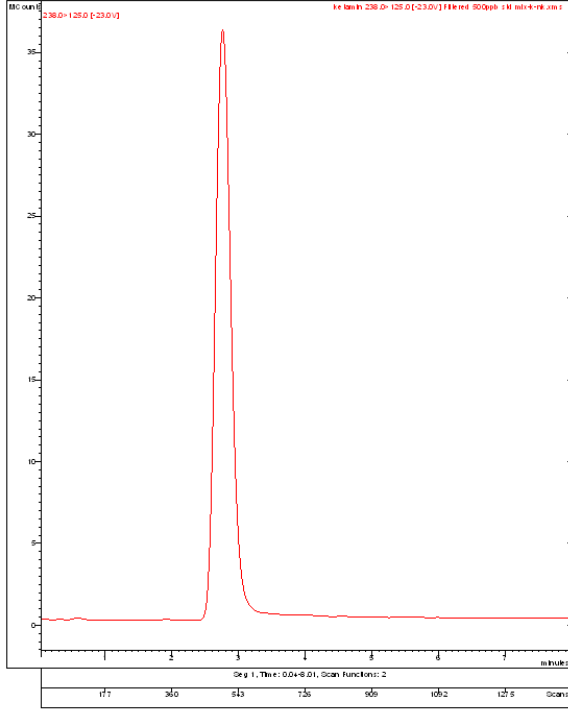
Regression via height $Y = 10.16 + 0.07583 * X$ $r = 0.99424$ $sdv = 2.98 \%$
 area $Y = 255.7 + 3.425 * X$ $r = 0.99797$ $sdv = 2.25 \%$

Track	Vial	Rf	Amount Fraction	Height	X(calc)	Area	X(calc)	Remark
1	A1							Std Level 1 not evaluated
2	A2	0.37	240.00 ng	27.30		1079.47		Std Level 2
3	A3							Std Level 3 not evaluated
4	A4	0.35	150.00 ng	21.60		750.47		Std Level 4
5	A5	0.35	100.00 ng	17.10		570.67		Std Level 5
6	A6	0.34	50.00 ng	13.88		406.22		Std Level 6
7	A1							Std Level 1 not evaluated
8	A2	0.37	240.00 ng	28.60		1063.36		Std Level 2
9	A3	0.36		24.46	188.56 ng	905.50	189.71 ng	Sample Ketamin 200 ng
10	A4	0.36	150.00 ng	22.78		779.22		Std Level 4
11	A5	0.35	100.00 ng	18.30		619.14		Std Level 5
12	A6	0.33	50.00 ng	13.90		441.88		Std Level 6
13	A1							Std Level 1 not evaluated
14	A2	0.37	240.00 ng	28.84		1083.83		Std Level 2
15	A3	0.36	200.00 ng	24.77		943.18		Std Level 3
16	A4	0.36	150.00 ng	21.78		782.71		Std Level 4
17	A5	0.34	100.00 ng	17.72		614.53		Std Level 5
18	A6	0.34	50.00 ng	13.56		423.34		Std Level 6

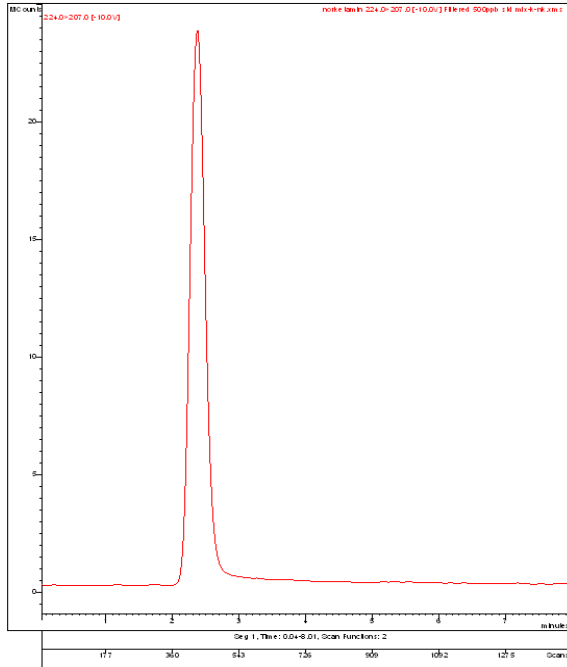
Şekil 4.8: Hasta örneği analiz sonucu hesaplaması



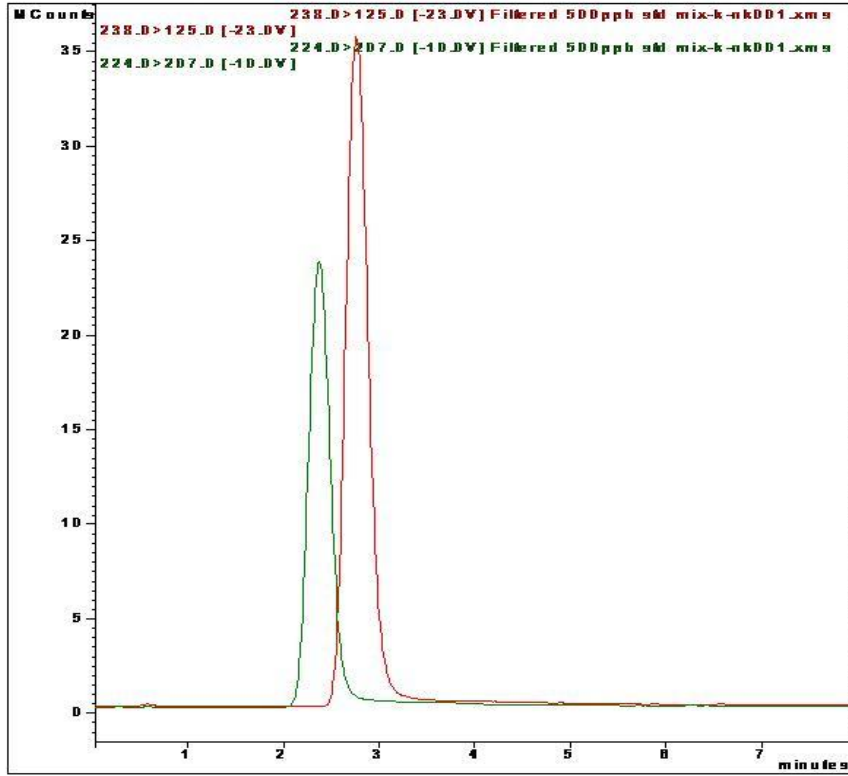
Şekil 4.9: YPİTK sistemi hasta idrar örneği analizi



Şekil 4.10: Ketamin LC–MS/MS piki
Ketaminin alıkonma süresi 2,5 dakikadır.



Şekil 4.11: Norketamin LC–MS/MS piki
Norketaminin alıkonma süresi 2,1 dakikadır. Kromatografik akış 8 dakikadır.



Şekil 4.12: Ketamin ve norketamin LC–MS/MS piki

4.2. HASTA ÖRNEKLERİ

İstanbul Üniversitesi Acil Tıp'ta yanık tedavisi olan hastalara anestezi sırasında verilen ketamin miktarları aşağıdaki gibidir:

<u>Hasta</u>	<u>Ketamin(mg/kg/saat)</u>
1	4
2	3
3	8,6
4	4
5	3,3

Hastalardan 2., 6., 12., 24., 48. ve 72. saatlerde alınan idrar örneklerinden sıvı sıvı ekstraksiyon sonrasında LC-MS/MS ile yapılan analiz sonuçları Tablo 4.1 de gösterilmiştir.

Tablo 4.3: Hastalardan alınan idrar örneklerindeki ketamin ve norketamin derişimleri (ng/ml)

		2 saat	6 saat	12 saat	24 saat	48 saat	72 saat
1.Hasta	Ketamin			803	405		X
	Norketamin			1427	1109		148
2.Hasta	Ketamin		5300	1004	393		
	Norketamin		3850	1260	3852		
3.Hasta	Ketamin	4492	1747	377	91	X	
	Norketamin	6725	1931	311	X	X	
4.Hasta	Ketamin	6184			269		
	Norketamin	3376			5591		
5.Hasta	Ketamin	1170	1618	1584	397	X	X
	Norketamin	7365	8648	6673	1302	291	129

X işaretli idrar analizlerinde madde bulunmamıştır. Boş bırakılan analiz saatlerinde ise idrar örneği alınmamıştır. Derişimler ng/ml cinsinden belirtilmiştir. 48. saate kadar alınan idrar örnekleri 10-50 kere seyreltildikten sonra analiz edilmiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Adli bilimlerde toksikolojik analizde kullanılan yöntem ve cihazların duyarlılık, seçicilik ve doğruluk açısından önemi büyüktür. Farmokinetik olarak ketaminin dağılım ve eliminasyon yarı-ömrü oldukça kısadır; alfa-eliminasyon fazı sadece birkaç dakikada sonlanır ve beta-eliminasyon için ise yarı-ömrü 2-3 saattir. Bundan dolayı, vücut sıvısında ketamin miktarının tayini için hızlı, hassas ve güvenilir analitik metodun geliştirilmesi klinik ve adli bilimlere için çok önemlidir (Chung-Yu.Chen, 2007)

Çalışmamızda son yıllarda yasadışı kullanımı giderek artan ketaminin önce tarama için YPİTK, daha sonra doğrulama için LC-MS/MS cihazlarında uygun metodların kullanılmasını amaçladık. Çalışma sonuçlarının daha anlamlı olması için ketamini idrara katım yaptıktan sonra analiz etmek yerine yasal olarak, medikal amaçlı kullanılan ketaminin metabolik yolla belirlenen saatlerde atılmasını ölçme amaçlanmıştır. Matriksin idrar olması yüzünden doğal olarak idrar alma saatlerinde farklılıklar olmuş, zorunlu haller yüzünden belirlenen saatler dışına çıkmıştır. Ketamin farmakolojik olarak en az iki ana bileşiğe metabolize olur: *N*-demetilasyon ile norketamine (NK), bu daha sonra dehidrojenasyon ile dehidronorketamine (DHNK) dönüşmektedir. Norketamin metabolitini, YPİTK sistem denemelerinde ketamin ve norketaminin molekül yapıları benzediği ve molekül kütleleri yakın olduğu için ayıracak sistemi bulamadığımızdan sadece LC-MS/MS cihazında inceledik. Ketamini görüntülemek tarama amaçlı yeterli olduğu için YPİTK sisteminde norketamin incelemesi yapılmamıştır. Ancak daha sonraki çalışmalarda ise idrardaki madde varlığını daha uzun bir sürede yapabilmek için norketamin ile ketamini ayıracak sistem denemeleri daha fazla yapılabilir.

LC-MS/MS'de ketamin ve norketamin için belirlenen tayin edilebilme limiti (LOD) 25 ng/ml'dir. Sonuç olarak Eun mi Kim ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada buldukları LOD değeri ile aynı çıkmıştır. Eun Mi Kim ve arkadaşlarının idrardaki ketamin ve norketaminin tayini için yaptıkları çalışmada polis tarafından 6 adet ketamin şüpheli idrar kullanmışlardır. Çalışmamızda yanık tedavisi gören hastaların disosiyatif anestezi sırasında aldıkları ketaminin idrar yoluyla atılması incelenmiştir.

Ketamin alımından 24 saat sonra norketamin derişimleri doza bağlı olarak artış göstermişlerdir. Bütün alım gruplarında norketamin, ketaminden daha yüksek derişimde bulmuşlardır. Ekstraksiyon için katı faz ekstraksiyon yöntemini kullanmışlardır. Ketamin ve norketamin için tayin limitini (LOD) 25 ng/ml ve kantitasyon limitini ise (LOQ) 50 ng/mL olarak belirlemişlerdir. Ketamin ve norketamin için üç farklı konsantrasyondaki (86, 430 ve 860 ng/mL) geri kazanımlar sırasıyla % 53.1 ile 79.7 ve 45.7 ile % 83.0 olarak hesaplamışlardır. 48 saatlik idrar örneklerinde norketamin eser miktarda tayin edilmesine rağmen, 72 saatlik idrarda ketamin ve norketamin saptamamışlardır. Eğer örnek 1000ng/ml den daha büyükse 10-100 kez seyreltmışlerdir. 6 ketamin şüpheli idrardaki ketamin ve norketamin derişimleri 0.03-56.16 ve 0.42-29.31 mg/ml arasında bulmuşlardır. LC-MS/MS cihazıyla yaptığımız analiz sonucunda 72 saat sonra alınan idrar örneğinde ketamin bulunmadı fakat norketamin düşük derişimde de olsa bulunmuştur.

Pai-Sheng Cheng ve ark. ELİSA testi ile idrardaki ketamin ve metabolitlerinin görüntülenmesi ardından türevlendirmeden otomatik katı faz ekstraksiyon ile kombine edilmiş GC-MS ile doğrulama testinin yapılmasıyla ilgili yaptıkları çalışmada bütün analitler için ketaminin derişimi norketaminin derişiminden düşük çıkmıştır. Hasta idrar örneklerinde yaptığımız analiz sonuçlarında da benzer şekilde ilk saatle dışında ketamin derişimi norketamin derişiminden düşük çıkmıştır.

Chung-Yu Chen ve ark.nın yaptıkları çalışmada idrardaki ketamin ve metabolitlerinin LC-MS kullanılarak tayini için analitik yöntem geliştirmişlerdir. Ketaminin, norketaminin ve dehidronorketaminin tayin limitini 0,95, 0,48 ve 0,33 ng/mL olarak bulmuşlardır. Metot ketamin ve metabolitlerinin gönüllü kişilerin idrarlarının analizi ile test edilmiştir. Sonuçlar ketamin enjeksiyonundan sonra idrardaki derişim pikinden (131 ng/ml) alımdan 1 saat sonra ana bileşenin asıl ilaç olduğunu gösterdiğini bildirmişlerdir. Daha sonra atılım süresiyle derişim azalmıştır. Alımdan 24 saat sonra bütün vakalarda ketamin idrar derişimi tayin limitinin altında bulmuşlardır. Norketamin ve ketamin için idrar derişimleri alım saatinden 1 ile 2 saat sonra artar, sonra zamanla azalır. Gönüllülere verilen 10 mg ketamin sonrasındaki ketamin derişimleri 1. saat sonrasında azalma gösterirken, Norketamin ve DHNK 1 ve 2. saatte önce artış ardından azalma

gözlemişlerdir. 0-2 saatlik aralıkta aldığımız idrar numunesi analizinde de ketaminin derişimi norketaminden daha yüksek çıkmıştır.

Jack Y.K. Cheng ve ark.nın yaptıkları çalışmada idrardaki ketaminin LC-MSMS ile tayinini araştırmışlardır. Bundan dolayı hızlı görüntüleme-doğrulama metodu, ketamin için tayin limiti 5ng/ml olarak LC-MS/MS de geliştirmişlerdir. Otomatik katı faz ekstraksiyondan sonra idrar ekstraktı ketamin için 2,5 dak kromatografik (run) akış ile analiz etmişlerdir. LC-MS/MS cihazındaki yaptığımız ketamin analiz süresi ise şartlanma da dahil 8 dak.dır. İdrar örneklerindeki ketaminin geri kazanımları 20 ng/ml de % 89 ve tayin limiti (S/N \leq 3) yaklaşık 5 ng/ml dir.

Wing-Chi Cheng ve ark.nın yaptıkları çalışmada gerikazanım için idrar numunelerine ekstraksiyon öncesi ve sonrasında standart ketamin ve norketamin çözeltisi katım yapmışlardır. Daha sonra ekstraksiyon önce katım yapılan analitin pik alanları ile ekstraksiyondan sonra katım yapılan pik alanları kıyaslanarak gerikazanım hesaplamışlardır. Geri kazanım için aynı işlemleri uygulanmıştır fakat ketamin için hesapladıkları gerikazanımları %101 dir. LOD ve LOQ 2 ile 5 ng/ml dir.

YPİTK sisteminde ise LOD değeri 50,0 ng/ml olarak hesaplanmıştır. 50,0 ile 250,0 ng/ml derişimleri arasında doğrusallık göstermiştir. LC-MS/MS de ketaminin kalibrasyonundan hesaplanan R² değeri 0.9956 dir ve kabul edilebilir sınırlar içindedir. Ketamin ve norketamin için yapılan gerikazanım çalışmasında 50,0 ve 100,0 ng/ml derişimlerindeki 4 çözelti ve matriks etkisini hesaplamak için 3 blank idrar hazırlanmıştır. Ketamin için gerikazanım 50,0 ng/ml de %94, 100,0 ng/ml de %79 olarak norketamin için ise 50,0 ng/ml de %83, 100,0 ng/ml de %77 olarak bulunmuştur.

İnsan idrarındaki ketamin ve onun aktif metaboliti olan norketaminin tayini için, 0,5 ng/mL ile 25,0 ng/mL arasında değişen tayin limitlerinde pek çok prosedür tanımlanmıştır. Fakat sadece bir grup, ketaminin terapötik amaçlı damariçine verilen örneklerinin analizini kullanarak norketamin için tayin limiti (LOD) 0,05 ng/mL ile metot belirtmiştir. Ketamin analizindeki bu incelemelerinin yanında, ketamin ve norketaminin oral yoldan alımının idrarla eliminasyonu ile ilgili veri yetersizliği vardır.

Wieber ve ark. ketaminin idrardaki $t_{1/2}$ 3.37 ± 0.14 sa. (22 saatten sonra tayin edilemez), norketaminin $t_{1/2}$ 4.21 ± 0.35 sa. (22 saatten sonra tayin edilemez), ve dehidronorketaminin $t_{1/2}$ 7.21 ± 1.39 sa. (60 saatten sonra tayin edilemez) olduğunu bildirmişlerdir.

Ketamin için tamamen valide edilmiş immünoassay testi piyasada bulunmadığı için pek çok laboratuvar ketamini sıvı-sıvı ekstraksiyondan sonra kromatografik yöntemlerle analiz etmektedir.

Metot doğrusallık, tayin edilebilme limiti (LOD), kesinlik, doğruluk ve kararlılık için valide edilmiştir. Doğrusallığı sağlamak amacıyla her derişim için 6 tekrarlı analiz yapılmıştır ve ketamin ve norketaminin kalibrasyon eğrilerinde kantifikasyon için pik alanları kullanılmıştır.

Mark C. Parkin ve ark.nın DFSA şüpheli vakalar için yaptıkları çalışmada idrardaki ketamin ve metabolitlerini gönüllü 6 kişiye 50 mg oral farmakolojik ketamin vererek çalışmışlardır. İdrar örneklerini 0sa., 2sa., 4sa., 6sa., 8sa. ve sonra 12sa., 24sa., 30sa. ve 2., 3., 4., 5., 6., 7., 8., 9., 10. günlerde alarak katı faz ekstraksiyon sonrası UPLC-MS/MS ile incelemişlerdir. Araştırma sonucunda ketamin ortalama 3 gün, norketamin 5.gün, dehidronorketamin ise 7 gün sonra tayin edilebilmiştir.

Dehidronorketaminin vücuttan atılmasına bağlı olarak bundan sonraki çalışmalarda diğer metabolit olan dehidronorketamin standardı kullanılarak daha uzun tayin edebilme süresi elde edilebilir. Ketaminin cinsel taciz sırasında kullanılmasında genellikle kokusuz ve tatsız olduğu için içeceğe karıştırılmaktadır. Anestezi sırasında kullanılan ketamin damar içine uygulandığı için incelediğimiz idrar örnekleri IV alım sonucundaki idrar atımları ile çalıştık. Daha sonra oral alımla ilgili çalışma yapılabilir. İdrar örnekleri toplama fiziksel açıdan zorluklar içermektedir. Özellikle ameliyattan sonraki alımlarda hastanın genellikle bilinci açık değildi. Bazen de idrar toplama sırasında saatlerle ilgili sıkıntılar yaşadık. Bu konuda elde edilen verilerden ketamin ile norketaminin derişim oranlarına bakarak da alımın ne zaman olduğuna karar verebiliriz.

Sonuç olarak gerek klinik uygulama dozlarında gerekse kötüye kullanımında ketaminin idrar düzeylerini tayininde YPİTK ve LC-MSMS yöntemleri acil toksikoloji ihtiyaçlarına yanıt verecek duyarlık ve sağlamlıkta yöntemler olarak optimize edilmişlerdir.

6. SUMMARY

Ketamine [2-(2-chlorophenyl)-2-methylaminocyclohexan-1-one] is a N-methyl-d-aspartate receptor antagonist used legitimately for its dissociative anaesthetic properties. Recreational use of ketamine has gained popularity worldwide over the last 10 years, with users experiencing hallucinations and a cataleptic state called the 'K-hole'.

The cataleptic state brought on by administration of ketamine can also produce stupor and sedation, that together with possible amnesia and difficulty in fighting off an assailant, has led to its recent implication in drug-facilitated sexual assault (DFSA).

DFSA incidents are often reported later than 24 h after the alleged assault, when very little drug will remain in the victim. Similarly, late samples are often collected from children where suspicion of non-accidental poisoning may only come to light after routine clinical evaluation has been performed. This has led to several groups reporting the use and need for highly sensitive assays that can provide sufficient retrospective detection for ketamine together with other classes of fast acting sedative drugs.

In our study, liquid-liquid extraction of ketamine from urine is used to prepare samples. Ketamine dosage which is used clinically or abused is determined at urine levels by HPTLC and LC-MS/MS methods are done urgent toxicological needs with sensitivity and stability are optimized.

7. ÖZET

Analitik kimyada nicel ve nitel analiz sonuçları önemlidir. Fakat adli bilimlerde toksikolojik analiz sonuçları insan hayatına etkileri bakımından daha da önem kazanmaktadır. Bu amaçla yapılan analizlerin sonuçlarının güvenilirliğinin yüksek olması gerekmektedir.

Ketaminin rekreasyonel kullanımının popülaritesi, halüsinasyonlar ve ‘K-boşluk’ denilen kataleptik hali tecrübe eden kullanıcılarla, son 10 yılda dünya genelinde artmıştır. Ketamin alımıyla gerçekleşen kataleptik durumda uyuşukluk ve sedasyon da oluşabilir, bununla birlikte olası amnezi ve saldırgan karşı koymadaki güçlük, onun yakın zamanda cinsel saldırıyı madde ile kolaylaştırmada (drug facilitated sexual assault, DFSA) kullanılmasına yol açmıştır. DFSA şüpheli vakalar saldırıdan 24 saat sonra bildirilir ki bu esnada kurbanda çok az miktarda ilaç kalmıştır. Bundan dolayı bazı gruplar, ketaminin diğer hızlı etki eden sedatif ilaç sınıfındakilerle birlikte yeterli retrospektif tayini için fazla hassas analizlerin kullanım ve gerekliliğini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda ketaminin biyolojik sıvılardan ekstraksiyonu için sıvı-sıvı ve katı faz ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak hazırlanan örneklerin klinik uygulama dozlarında ve/veya kötüye kullanımında erişilen dozlarda ketaminin idrar düzeylerini tayininde gerek YPİTK gerekse LC-MSMS yöntemleri acil toksikoloji ihtiyaçlarına yanıt verecek duyarlık ve sağlamlıkta yöntemler olarak optimize edilmişlerdir.

KAYNAKLAR

Bertholf, R.L. and Winecker, R.E. (2007) *Chromatographic Methods in Clinical Chemistry and Toxicology*, John Wiley & Sons Inc., Wiltshire, 978-0-470-02309-9

Bolze, S. and Boulieu, R. (1998) HPLC determination of ketamine, norketamine, and dehydronorketamine in plasma with a high-purity reversed-phase sorbent, *Clinical Chemistry*, 44:560-564

Börteçine, N.A. (2005) Kompleks Bölgesel Ağrı Sendromu Tip1 Tedavisinde Gabapentin Kullanımının Fizik Tedavi Programına Etkisinin Değerlendirilmesi, Uzmanlık Tezi, T.C. Sağlık Bakanlığı Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Kliniği, İstanbul

Biberoğlu, G. (2003) Kütle Spektrometresi ve Tıp Alanında Kullanımı, *T. Klin Tıp Bilimleri* 23:491-498

Chen, C., Lee, M., Cheng, F., Wu, G. (2007) Determination of Ketamine and Metabolites in Urine by Liquid Chromatography–Mass Spectrometry, *Talanta*, 72 1217–1222

Cheng, J.Y.K., Mok, V.K.K. (2004) Rapid Determination of Ketamine in Urine by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry for a High Throughput Laboratory, *Forensic Science International*, 142 9–15

Cheng, P., Fu, C., Lee, C., Liu, C., Chien, C. (2007) GC–MS Quantification of Ketamine, Norketamine, and Dehydronorketamine in Urine Specimens and Comparative Study Using ELISA as the Preliminary Test Methodology, *Journal of Chromatography B*, 852 (2007) 443–449

Chou, S., Yang, M., Ling, Y., Giang, Y. (2004) Gas chromatography-isotope dilution mass spectrometry preceded by liquid–liquid extraction and chemical derivatization for the determination of ketamine and norketamine in urine, *Journal of Chromatography B*, 799 37–50

Clarke's Analysis of Drugs and Poisons

Colebunders, B., Erps, P. (2008) Cystitis due to the use of ketamine as a recreational drug: a case report, *J Med Case Reports*; 2: 219.

Fenton, J. (2001) *Toxicology : a case-oriented approach*, CRC Press LLC

Galloway, J.H. and Marsh, I.D. (1999) Detection of drug misuse--an addictive challenge, *J. Clin. Pathol.*, 52;713-718 doi:10.1136/jcp.52.10.713

Global ATS Assessment (2008) United Nations Office on Drugs and Crime, Amphetamins and Ecstasy, *United Nations Publication*

Hijazi, Y., Bolon, M. and Boulieu, R. (2001) Stability of Ketamine and Its Metabolites Norketamine and Dehydronorketamine in Human Biological Samples, *Clinical Chemistry* 47, No. 9,

Hijazi, Y., Boulieu, R. (2002) Contribution of CYP3A4, CYP2B6, and CYP2C9 Isoforms to *N*-Demethylation of Ketamine in Human Liver, *Drug Metabolism And Disposition*, Vol.30 No.7

Huang, M., Liu, C., Li, J., Huang, S. (2005) Quantitative detection of ketamine, norketamine, and dehydronorketamine in urine using chemical derivatization followed by gas chromatography–mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, 820 165–173

Jain, G.K., Jain, N., Iqbal, Z., Talegaonkar, S., Ahmad, F.J. and Khar, R.K. (2007) Development and Validation of an HPTLC Method for determination of Minocycline in Human Plasma, *Acta Chromatographica*,19

Karch, S.B. (2008) *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Abused Drugs*, Taylor & Francis Group, Boca Raton, 978-1-4200-5458-3

Kim, E., Lee, J., Choi, S., Lim, M., Chung, H. (2008) Analysis of Ketamine and Norketamine in Urine by Automatic Solid-Phase Extraction (SPE) and Positive Ion Chemical Ionization–Gas Chromatography–Mass Spectrometry (PCI–GC–MS), *Forensic Science International*, 174, 197–202

Kim, Y.J, Shin, S.H., Kyo, In M. (2009) Determination of amphetamine-type stimulants, ketamine and metabolites in fingernails by gas chromatography–mass spectrometry, *Forensic Science International*, doi:10.1016/j.forsciint.2009.10.023

Klaassen, C.D. (2001) Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, 6th edition, *McGraw-Hill Professional*

Kohrs, R. and Durieux, M.E. (1998) Ketamine: Teaching an Old Drug New Tricks, *Anesth Analg*, 87:1186-93

Legrand, T., Roy, S., Monchauda, C., Grondina, C., Duval, M., Jacqz-Aigraina, E. (2008) Determination of ketamine and norketamine in plasma by micro-liquid chromatography–mass spectrometry, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 48 (2008) 171–176

Lin, H., Lua, A. (2005) Fast Screening Procedure for Ketamine and Norketamine in Urine Samples with a Gas Chromatography-Nitrogen Phosphorus Detector, *Tzu Chi Med J* 17 No. 4 213-217

Molins-Legua, C., Campins-Falc'ó, P., (2005) Solid phase extraction of amines, *Analytica Chimica Acta*, 546, 206–220

Moore, K.A., Sklerov, J., Levine, B., Jacobs, A.J. (2001) Urine Concentrations of Ketamine and Norketamine Following Illegal Consumption, *Journal of Analytical Toxicology*, Vol.25,583-588

Mozayani, A. (2002) Ketamine —Effects on Human Performance and Behavior, *Forensic Sci Rev*, 14:123

Parkin, M.C., Turfus, S.C., Smith, N.W., Halket, J.M., Braithwaite, R.A., Elliott, S.P., Osselton, M.D., Cowan, D.A., Kicman, A.T. (2008) Detection of ketamine and its metabolites in urine by ultra high pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, 876 137–142

Rofael, H.Z. and Abdel-Rahman, M.S. (2002) Development and Validation of a High-performance Liquid Chromatography-Method for the Determination of Cocaine, its Metabolites and Ketamine, *J. Appl. Toxicol.* 22, 123–128 DOI:10.1002/jat.837

Saraçoğlu, A. (2005) Ketamin: Popüler bir keyif verici ilaç, *Türkiye Klinikleri J Med Sci.* 20 429-435

Shiue, C., Valhbahosulu, S., Wolf, A.P., Dewey, S.L., Fowler, J.S., Schlyer, D.J., Amett, C.D. and Zhou, Y. (1997) Carbon-11 Labelled Ketamine-Synthesis, Distribution in Mice and PET Studies in Baboons, *Nuclear Medicine & Biology*, Vol. 24, pp. 145-150

Sigtermans, M.J., Hilten, J.J., Bauer, M.C.R., Arbous, M.S., Marinus J., Sarton, E.Y., Dahan, A. (2009) Ketamine produces effective and long-term pain relief in patients with Complex Regional Pain Syndrome Type 1, *Elsevier B.V International Association for the Study of Pain* Volume 145. Issue 3, Pages 304-311

Stripp, R.A. (2007) *Inside Forensic Science: The Forensic Aspects of Poisons*, Chelsea House, New York, 978-0-7910-9197-5

Suzuki, O. and Watanabe, K. (2005) *Drugs and Poisons in Humans: A Handbook of Practical Analysis*, Springer, European Union, 3-540-22277-4

Turfus, S.C., Parkin, M.C., Cowan, D.A, Halket, J.M., Smith, N.W., Braithwaite, R.A., Elliott, S.P., Steventon, G.B., Kicman, A.T. (2009) Use of Human Microsomes and Deuterated Substrates; An Alternative Approach for the Identification of Novel Metabolites of Ketamine by Mass Spectrometry, *DMD Fast Forward*, doi:10.1124/dmd.108.026328

Türkmen, Z., Mercan, S., Cengiz, S. (2008) Eroin, Morfin, Kokain ve MDMA'nın Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi ile Eşzamanlı Tayini, *Adli Tıp Dergisi*, 2008 (1) 13-24.

Türköz, A., Sağıroğlu, E. (1999) Ketamin ve Anesteziden Ayrılma Reaksiyonu, *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi*, 6(2)

United Nations Office on Drugs and Crime Regional Centre for East Asia and the Pacific, *Patterns and Trends of Amphetamine-type Stimulants (ATS) and Other Drugs of Use in East Asia and the Pacific 2006*, (June 2007),

United Nations Office on Drugs and Crime (2003) Global Illicit Drug Trends Report

United States Department of State, International Narcotics Control Strategy Report, *Bureau for International Narcotics and Law Enforcement Affairs*, Volume II Money Laundering and Financial Crimes, March 2009

United States Department of State, International Narcotics Control Strategy Report, *Bureau for International Narcotics and Law Enforcement Affairs*, Volume I, Drug and Chemical Control, March 2009,

World Drug Report (2009) United Nations Office on Drugs and Crime, *United Nations Publication*

Wua, G., Chan, H., Leed, M., Chen, C., Yange, D. and Cheng, F. (2007) Simultaneous Measurement of Urinary Ketamine, Norketamine, and Dehydronorketamine by Liquid Chromatography-atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry, *Journal of the Chinese Chemical Society*, 54, 351-355

Xiang, P., Shen, M., Zhuo, X. (2006) Hair analysis for ketamine and its metabolites, *Forensic Science International*, 162 131–134

Yıldız, A., Genç, Ö., Bektaş, S. (1997) *Enstrümental Analiz Yöntemleri*, Hacettepe Üniversitesi Yayınları, 2. Baskı, Ankara, 975

İnternet Kaynakları

1. http://www.erowid.org/chemicals/show_molecule.php?i=ketamine/ketamine_2d.jpg Son erişim tarihi: 11.1.2010
2. <http://www.erowid.org/chemicals/ketamine/ketamine.shtml> Son erişim tarihi: 11.07.2009
3. http://www.erowid.org/chemicals/show_image.php?i=ketamine/ketamine10.jpg Son erişim tarihi: 11.1.2010
4. http://lokman.cu.edu.tr/anestezi/iv_cag/disosiatif.htm Son erişim tarihi: 11.09.2009
5. <http://www.istanbulanestezi.org/dosyalar/KAFATRAVMAANESTEZI.ppt#17> Son erişim tarihi: 11.07.2009
6. <http://www.bath.ac.uk/news/2008/5/12/ketamin.html> Son erişim tarihi: 11.08.2009
7. <http://drugreport.wordpress.com/2006/10/21/ketamine-floods-into-bc/> Son erişim tarihi: 24.07.2009
8. <http://www.justice.gov/dea/pubs/abuse/8-hallu.htm> Son erişim tarihi: 11.02.2010
9. <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/en/4/46/PCP.png> Son erişim tarihi: 14.12.2009
10. <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Ketamine-enantiomers-correct.png> Son erişim tarihi: 11.10.2009

EK 1

BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAY FORMU

Araştırmanın Yürütüldüğü Kuruluş: İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü, Fen Bilimleri Anabilim Dalı

Araştırmanın Adı: İdrardaki Ketaminin ve Metabolitlerinin Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi (YPİTK) ve Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (LC-MS-MS) ile Analizi

Amaç:

Bu çalışma, standardize edilmiş bir toksikoloji laboratuvarında dünyada gün geçtikçe kullanımı artan ketaminin insan idrarındaki metabolitlerinin belirli zaman aralıklarında incelenmesine yöneliktir. Böylece ketaminin en son ne zaman alındığına dair inceleme yapılacaktır. Acile gelen yanık vakalarında anestezi amaçlı olarak kullanılan ketaminin idrarda incelenmesiyle metabolitlerinin ve ketaminin bulunma olasılığı ve miktarı incelenecektir.

Çalışma sırasında araştırma amacıyla yapılacak analiz giderleri için hastanın kendisinden veya bağlı olduğu sosyal güvenlik kuruluşundan hiçbir ücret talep edilmeyecektir, hasta yazılı onay vermiş olsa da araştırmanın her hangi bir döneminde araştırmadan vazgeçmekte özgürdür, hastanın kimlik bilgileri ve tüm kayıtları saklı tutulacaktır.

Bu araştırmaya hiçbir baskı olmaksızın, kendi rızamla katıldığımı beyan ederim.

Hastanın;

Adı:

Soyadı:

İmzası:

Cinsiyeti:

Yaşı:

***Hasta reşit değilse yasal temsilcisinin;**

*Adı:

*Soyadı:

*İmzası:

Tez Yürütücüsü: Nazlı Demirtaş

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Nazlı Demirtaş

Doğum Yeri ve Tarihi: Lüleburgaz - 1978

Eğitim ve Kariyer

İlk ve orta öğrenimi: Ceyhan Anadolu Lisesi

Üniversite: Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü

Yüksek Lisans: Çukurova Üniversitesi Kimya Öğretmenliği Tezsiz Yüksek Lisans

Yüksek Lisans: İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü Fen Bilimleri Anabilim Dalı

Meslek: Kimya Öğretmeni