

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

Danışman: Prof.Dr.Salih CENGİZ

METİLFENİDAT'IN KÖTÜYE
KULLANIMINDA İDRAR VE TÜKRÜKTE
BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Emine Şevik Saburlu
Biyokimyager

İstanbul-2010

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezimin gerçekleştirilmesinde ve hazırlanması süresince değerli katkı ve yardımlarından dolayı danışman hocam sayın Prof.Dr.Salih CENGİZ'e, ayrıca İ.Ü.Adli Tıp Enstitüsü Müdürü sayın Prof.Dr. İmdat ELMAS'a, tezimin deney aşamasında benimle paylaştıkları bilgilerinden dolayı Araş.Gör.Zeynep TÜRKMEN ve Araş.Gör.Selda MERCAN'a, bu çalışmada bana sağladıkları her türlü destek ve moral için çok değerli arkadaşlarım Fulya ÖZSOY, Nazlı DEMİRTAŐ ve Esra Damla AHİ'ye, bugünlere gelmemde büyük katkısı olan saygıdeğer abim Osman OKYAY'a, benimle birlikte geçirmesi gereken vaktinden çaldığım biricik kızım Ecrin Zehra'ya, ayrıca bana her zaman destek olup sabır ve sevgilerini hiç esirgemeyen eşime ve aileme, çok teşekkür ederim.

Emine ŞEVİK SABURLU

Bu tez çalışması 2310 proje numarasıyla İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

Kısaltmalar

Şekil Listesi

Tablo Listesi

I. GİRİŞ ve AMAÇ	1
1.1. GİRİŞ	1
1.2. GENEL BİLGİ	2
1.2.1. Amfetamin	2
1.2.2. Dikkat Eksikliği Hiperaktivite Bozukluğu	3
1.2.2.1.Epidemiyoloji	4
1.2.2.2.Klinik Gidiş	5
1.2.2.3. Etiyoloji	5
1.2.2.4. DEHB'de Tedavi Seçenekleri	5
A.DEHB ilaç tedavileri Tarihi	6
1.2.3. Metilfenidat	7
1.2.3.1. Metilfenidat Dozu	7
1.2.3.2. Farmakolojik Özellikleri	7
2.3.3. Metilfenidatın Etki Mekanizması	9
1.2.3.4. Farmakokinetik özellikleri	10
A. Emilim	10
B. Dağılım	10
C. Biyotransformasyon	10
D. Eliminasyon	10
1.2.3.5. Yan Etkiler	11
1.2.3.6. Kötüye Kullanım Riski	12
1. 2.4.Türkiye'de Durum	17

1.2.5. Metilfenidat Analizinde Kullanılan Yöntemler	18
1.2.5.1. Ekstraksiyon Yöntemleri	19
A. Katı-Faz Ekstraksiyon (KFE)	19
B. Sıvı-sıvı ekstraksiyon (SSE)	20
1.2.5.2. Analitik Yöntemler	20
A. İnce Tabaka Kromatografisi	21
A.1. Yüksek performanslı İnce Tabaka Kromatografisi	23
1.2.6. Metod Validasyonu	26
1.2.6.1. Seçicilik (selectivity)	27
1.2.6.2. Hassasiyet (sensitivity)	27
1.2.6.3. Doğrusallık/ölçüm aralığı (linearity/workingrange)	27
1.2.6.4. Sağlamlık (robustness/ruggedness)	27
1.2.6.5. Tanımlama limiti (limit of detection-LoD)	28
1.2.6.5.1. $CC\alpha$ ve $CC\beta$	29
1.2.6.6. Ölçüm Limiti (LOQ)	30
1.2.6.7. Doğruluk (Accuracy)	30
1.2.6.8. Kesinlik (Precision)	30
1.2.6.9. Gerçeklik (trueness)	31
1.3. AMAÇ	32
II. MATERYAL ve METOD	33
2.1. Kimyasallar	33
2.2. Araç ve Gereçler	33
2.3. Standart Çözeltinin Hazırlanması	34
2.4. Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi Koşulları	35
2.5. Metod Validasyon Basamakları	36
Seçicilik (selectivity)	36
Doğrusallık/ölçüm aralığı (linearity/workingrange)	37
Tanımlama limiti (limit of detection-LoD)	37
Ölçüm Limiti (LOQ)	37
Doğruluk (Accuracy)	37

Kesinlik (Precision)	37
Gerçeklik (trueness)	38
2.6. Ekstraksiyon	38
LC-MSMS Çalışma Koşulları	39
III. BULGULAR	40
IV. TARTIŞMA ve SONUÇ	47
V. ÖZET	49
VI. SUMMARY	50
VII. KAYNAKLAR	51

I. GİRİŞ ve AMAÇ

1.1. GİRİŞ

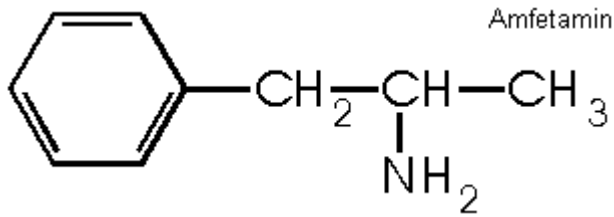
Adli Bilimlerde Kullanım kolaylığı ve hızlı sonuç vermesinden dolayı uygulandığından beri immünassay yöntemlerine ilgi büyüktür. Fakat bu analizler mükemmel değildir. Eğer sonuçlar GC-MS, LC-MS-MS, gibi ikinci bir analiz yöntemiyle teyid edilmezse immünassay yöntemle alınan yanlış pozitif sonuçlar ciddi tıbbi ve sosyal kaosa neden olabilirler.

Amfetamin ailesinin bir üyesi olan Metilfenidat, Novartis firması tarafından üretilen ritalin adlı ilacın hammaddesidir. Afyon, kokain ve morfin ile birlikte cetvel II kategorisinde yer alan, güçlü bağımlılık yaratan, yoksunluğu psikoza ve intihara kadar sürükleyebilen yasal bir ilaçtır. Ülkemizde, uyarıcı ilaçlardan kısa etkili metilfenidat (Ritalin) 10 mg'lık tablet ve uzun etkili OROS metilfenidat (Concerta) kapsül şeklinde bulunmakta ve kırmızı reçete ile satılmaktadır. Dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu (DEHB)'nin tedavisinde sık olarak kullanılan metilfenidat, semptomimetik ve psikostimülan etki gösteren bir ilaçtır. Özellikle katekolaminlerin geri alımını bloke etmekte ve bu santral etkisini norepinefrin üzerinden daha çok dopamin aracılığıyla yaptığı benzer etki mekanizmasından dolayı sentetik kokain olarak da adlandırılan Metilfenidat'ın sıvı olarak enjekte edildiğinde madde bağımlılarınca çok sevilerek kullanıldığı belirtilmektedir (Vastag 2001).

1. 2. GENEL BİLGİ

1.2.1. Amfetamin

Amfetamin (alfa-feniletülamın) narkolepsi ve Dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu dahil çeşitli bozuklukların tedavisinde, kilo kontrolünde, iştah azaltıcı olarak kullanılan sentetik bir uyarıcıdır (stimülan). Özellikle DEHB tedavisinde ilaç olarak yaygın kullanımları sebebiyle rahatlıkla elde edilebilir. Bu sebeple yasadışı olarak en sık kullanılan uyarıcı maddelerden biridir. Amfetaminler; ruhsal yaşantıyı uyanan ilaçlar arasında yer alır. Amfetaminlerin temel yapısını, feniletülamın çekirdeği oluşturur (Şekil1).



Şekil 1: Amfetamin (alfa-feniletülamın) yapısı

Kimyasal yapılarına göre, uyarıcı etkileri birbirinden farklı, değişik amfetaminler vardır; en çok tanınanları şöyle sıralanabilir:

- Amfetamin (benzedrin)
- Amfetamin (Dexedrine)
- Metamfetamin (Desoksyn)
- Metilfenidat (Ritalin)
- Fenmezatin (Preludin)

Amfetaminler genellikle hızlandırıcı adıyla bilinen bir uyarıcı türüdür. Bu türün en çok bilinen örnekleriyse, gerek keyif gerekse tedavi amacıyla kullanılan, metamfetamin ve deksamfetamin'dir. Doktorlar tarafından en sık önerilen amfetamin türevi ise, benzer davranışsal etkiler yaratan ancak kimyasal yapısı bir bakıma farklı olan metilfenidat'tır . Tüm amfetamin türleri dopamin ve noradrenalin, kimi zaman da serotonin ve glutamat düzeylerini arttırmak suretiyle beyni etkilemektedirler. Bu da bireyi daha dikkatli, çok daha zinde ve enerjik kılarken, bir yandan da iştahını tıkamakta ve uyku gereksinimini azaltmaktadır.

1920 yılında ABD’de solunum yolları ve benzeri hastalık tedavisinde kullanılan efedrinden daha etkili bir madde araştırılırken amfetaminler rastlantı sonucu bulunmuştur. Önceleri ağız ve burun yoluyla kullanıldığında sadece solunum yollarını genişlettiği sanılan bu maddenin beyin ve merkezi sinir sistemi üzerindeki etkilerinin tanınması 1930 yılına kadar süren çalışmalar sonucu gerçekleşmiştir.1940 yılından sonra değişik hastalıkların tedavisi için oldukça geniş uygulama alanı bulan amfetaminlerin tedavi sınırları bağımlılık yapmaları ve yan etkileri sebebiyle gittikçe daraltılmış 1970’li yıllardan sonra da belirli bir-iki hastalığa indirilmiştir.

Dünyada zayıflama amacıyla amfetamin ya da bu maddeyi içeren ilaçları kullananlarda bağımlılık yapması yan etkisi olması ve ruh hastalıklarının ortaya çıkması nedeniyle uygulama alanlarından kaldırılmıştır. Bugün; amfetaminler ender olarak aşağıdaki durumlarda kullanılmaktadır:

- Narkolepsi adı verilen, gün içinde özellikle tekdüze işlerin yapıldığı sırada ortaya çıkan önüne geçilmez derecede güçlü bir uyuklama durumu olan ve ender görülen bu hastalığın tedavisinde;
- Bazı sara(epilepsi) türlerinde yardımcı ilaç olarak;
- Bu ilaçlar ruhsal çöküntü durumların tedavisinde, yalnız ya da diğer antidepresan ilaçlarla birlikte
- Hiperaktif adı verilen, aşırı derecede hareketli olan çevreye uyumu güç ve okul başarısı düşük olan, beyin zedelenmesi geçirmiş çocukların tedavisinde kullanılmaktadır.

Kullanılan amfetaminlerin kaygı, tedirginlik, intihar eğilimleri ve eylemlerini arttırdığı görülerek bu tür uygulamalardan vazgeçilmiştir.

1.2.2.Dikkat Eksikliği Hiperaktivite Bozukluğu:

Dikkat Eksikliği Hiperaktivite Bozukluğu 20. yüzyılın başında tanımlanmış olan ilk çocuk psikiyatrisi bozukluğudur (George Stil 1902). DEHB tedavisinde bugün de ilk seçenek olanak stimülanların tedavideki etkinliğine ilişkin ilk bilimsel yayınlar 1937’de başlamış (Bradley ve ark. 1937) ve 1960’lı yıllarda DEHB tedavisinde stimülanların rutin kullanımı düzenleyici kurumlar tarafından onaylanmıştır (Doyle 2004).

Yaklaşık olarak bir asır önce klinik tanımlanmasının yapılmasına ve yarım asırdır başarıyla tedavi edilmesine karşın DEHB'nin tanınasal geçerliliği çok uzun yıllar tartışmalara konu olmuştur (Biederman & Faraone 2005). Oysa DEHB sadece psikiyatride değil tüm tıp alanları içerisinde tüm yönleriyle en iyi araştırılmış olan hastalıklardandır. Son 40 yıldır başta Kuzey Amerika ve Avrupa olmak üzere tüm dünyada, DEHB'nin epidemiyolojisi, etiyojisi, tedavisi ve klinik gidişi konusunda sayısız bilimsel araştırma yapılmıştır.

1.2.2.1.Epidemiyoloji:

Tüm dünyada DEHB sıklığı ile ilgili yapılmış olan en önemli çalışmaların incelenmesiyle gerçekleştirilen son derece kapsamlı bir araştırmanın sonucunda DEHB'nin tüm dünyada çocuk ve ergenlerin %5.29'unu etkileyen bir hastalık olduğu bildirilmiştir(Polanczyk ve ark. 2007).

Geçmiş yıllarda ABD ve Kanada'ya oranla dünyanın diğer bölgelerinde ve Avrupa'da daha düşük DEHB sıklığı bulunmuş olmasının araştırmalarda farklı yöntemlerin ve tanı kriterlerinin kullanılmasına bağlı olduğu ve tüm dünyada DEHB sıklığının benzer bir dağılım gösterdiği ortaya konmuştur (Faraone ve ark. 2003).

Epidemiyolojik çalışmalarda, okul çağındaki çocukların %3-6'sının DEHB için tanı kriterlerini karşılmasına rağmen, ABD'de psikostimülan kullanımının çok daha az olduğu belirtilmektedir (Hoagwood ve ark. 2000). DEHB tanısı konanların yaklaşık yarısının ilaç kullandığını gösteren çalışmaların yanı sıra (Warner ve ark. 2004, Bussing ve ark. 2005), ilaç kullanım oranını 1/8 olarak bildiren toplum örneklemleri çalışmaları bulunmaktadır (Jensen ve ark. 1999a, Sawyer ve ark. 2002). Diğer yandan, psikostimülan kullanan çocukların ABD'de yarısının (Jensen ve ark. 1999a) ve bir başka çalışmada %57'sinin (Angold ve ark. 2000) Avustralya'da %22.9'unun (Sawyer ve ark. 2002) DEHB için DSM (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders) kriterlerini tam olarak karşılamadığı bildirilmektedir. Gerçekten doğru çocukların DEHB tanısıyla ilaç kullandığı konusunda kanıtların yetersiz olduğu belirtilmektedir (Marcovitch 2004).

Uygulamadaki bu özellikler tanınasal kategorinin geçerliliği ile ilgili tartışma yaratmaktadır. DEHB için geçerli ve güvenilir tanınasal testin olmaması, psikostimülan tedaviden yararlanacaklarla ilgili bir tanınasal DEHB eşliğinin eksikliği ve değerlendirme sürecindeki öznellik bu konuda eleştirilen başlıca konulardır (NIH 2000,Perring 1997).

1.2.2.2.Klinik Gidiş:

DEHB olan çocukların çok önemli bir bölümü ergenlik (%80) ve erişkinlik dönemlerinde (%65) de DEHB tanısı almaya devam ederler (Barkley 1996, Weiss & Hechtman 1993). Ayrıca çocukluğunda DEHB olanlar olmayanlara oranla çok daha yüksek oranda antisosyal kişilik bozukluğu ve alkol-madde kullanım bozuklukları gibi psikiyatrik; kapasitenin altında okulbaşarısı gösterme veya okuldan atılma gibi akademik; sık kazaya uğrama, kazalara neden olma, sık boşanma, erken yaşta gebelik, düşük iş başarısı veya işsizlik gibi sosyal risklere maruz kalmaktadırlar (Barkley 2004).

1.2.2.3.Etiyoloji:

DEHB etiyolojisinde en önemli faktör kalıttır ve bugüne kadar yapılmış ailesel yüklülük, ikiz ve evlat edinme çalışmaları DEHB etiyolojisinde kalıtımın en önemli etken olduğunu açıkça ortaya koymaktadır. Birbirinden bağımsız 20 ikiz çalışmasının sonuçları değerlendirildiğinde kalıtımın DEHB etiyolojisindeki rolünün % 76 olduğu ortaya konmuştur (Faraone ve ark. 2005).

Son 20 yılda çok büyük ilerleme gösteren beyin görüntüleme çalışmalarında çok çeşitli anatomik ve fonksiyonel bulgular elde edilmiş ve DEHB ile en fazla ilişkili beyin bölgelerinin prefrontal korteks, kaudat çekirdekler ve anterior singulat girus olduğu gösterilmiştir (Bush ve ark. 2005).

1.2.2.4.DEHB'de Tedavi Seçenekleri:

DEHB tedavisi tıpta en fazla araştırılmış olan konulardan birisidir. Yapılan araştırmalar DEHB tedavisinde en etkin yöntemin kombine tedavi olduğunu ortaya koymaktadır. Kombine tedavi olgunun klinik durumuna göre gerekli görülen tedavi yöntemlerinin birarada uygulanmasıdır. DEHB genetik ve biyolojik temelleri çok belirgin olan bir hastalık olduğundan ilaç tedavisi kombine tedavi uygulamaları içerisinde hemen her zaman yer almaktadır. Esasen DEHB'de tedavi seçenekleri tek başlarına ele alındığında ilaç tedavisinin en etkin yöntem olduğu görülmektedir. Son 50 yılda DEHB tedavisi konusunda yapılmış olan sayısız araştırmanın sonucunda kesinleşmiş olan bu bilgiler MTA çalışmasıyla tekrar doğrulanmıştır.

DEHB'de tedavi seçeneklerinin değerlendirildiği en önemli araştırma olan MTA çalışmasında sadece ilaç tedavisi alan olgularla kombine tedavi alan grup (ilaç tedavisi + yoğun davranışçı

tedavi) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamış; ancak davranışçı tedavilerin öneminin göz ardı edilmemesi önemle belirtilmiştir (İnternet Ref. No:1).

A.DEHB ilaç tedavileri Tarihi

Dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğunun tedavisinde kullanılan temel ilaç grubu stimulanlardır. Bir stimulan grubu olan amfetaminler DEHB tedavisinde ilk seçenek olarak kullanılmaktadır. Fakat ülkemizde bulunmamaktadır.

Amfetamin ilk kez 1887 yılında Edeleano tarafından sentez edilmiştir (Edeleanu L. 1887). Amfetamin sülfat (250 mg) içeren benzedrine inhaler, Smith Kline ile birlikte bir Fransız ilaç şirketi tarafından 1932 yılında bir burun ve bronş dekonjestanı olarak tanıtılmıştır. Bu inhaler beklenmedik bir biçimde çok popüler olmuş ve sık sık suistimale uğramıştır. Amfetamin Narcolepsy için bir tedavi olarak tablet şeklinde ilk kez 1935 yılında üretilip pazarlanmıştır (Rasmussen N. 2006).

1937 yılında, Charles Bradley gazetesinden " benzedrin alan çocukların davranışı " adlı yazıyı yayınlamış, şimdilerde DEHB temel belirtileri olarak kabul edilen belirtilerin, uyarıcı ilaç ile iyileştirilebileceği görüşüne yer vermiştir (Bradley 1937). Günümüzde psikostimulanlar (Merkez sinir sistemi üzerinde doğrudan doğruya uyarıcı etki gösteren ilaçlar)18 yaşından küçüklerde en yaygın kullanılan psikotroplardır (Jensen ve ark. 1999b). Giderek daha fazla çocuk (özellikle kızlar), ergen ve erişkine DEHB tanısı konduğu, psikostimulan uygulandığı ve çocukların daha uzun süreli tedavi edildiği bildirilmektedir (Goldman ve ark. 1998, Santosh ve Taylor 2000). Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) 1987-1996 arasında psikostimulan kullanımının %0,6'dan %2,4'e çıktığı (Olfson ve ark. 2002), Kanada'da ise 1993-1997 arasında okul çağı çocukların metilfenidat kullanımının üç kat arttığı bildirilmiştir (Minde 1998). Avrupa ülkelerinde psikostimulanlarla ilgili yoğun sınırlama ve denetimler olmasına karşın (Huther 2002) kullanım oranları ABD dışındaki gelişmiş ülkelerde de artma eğilimindedir (Marwick 2003). Örneğin, Hollanda'da 1995-2000 arasında psikostimulan kullanımı 5 kat artarak binde 7.4'e çıkmıştır (Schirm ve ark. 2001).

Ülkemizde stimülanlar arasında çok araştırılmış olanı ve ilk tedavi seçeneği olarak tercih edileni metilfenidattır. Metilfenidat ülkemizde Ritalin® 10mg ve Concerta® 18, 27, 36, 54mg formlarında bulunmaktadır.

1.2.3. Metilfenidat:

Metilfenidat (Ritalin ve Concerta isimleri altında satılmaktadır) bir santral sinir sistemi uyarıcısıdır ve bir amfetamin izomeri olan dekstroamfetamin yapısındadır . 1954'de dekstroamphetamine'nin piperidin türevi olarak sentezlenmiştir (Şekil 2). 1970'li yıllarda popüler basın bir "efsane" olarak Ritalin'in etkilerini konu almış ve çocuklar üzerinden "zihin kontrolü" için bir araç olduğunu iddia etmiştir. İsveç'te metilfenidatın kötüye kullanımındaki aşırı artış ise 1971 yılında ABD'de metilfenidatın şudelle II de kabul edilmesine neden olmuştur (Diller, 1996). DEHB tedavisinde metilfenidat kullanımının yararları daha sonra yavaş yavaş yeniden kabul edilmeye başlanmıştır.

1991 ve 1995 yılları arasında Sınıf II Kontrollü Madde için nadir görülen bir şekilde metilfenidat'ın ABD üretimi % 500 artış ile 10.410 kilogramdır. ABD'de üretim hızı büyümeyi sürdürmüş ve 2001 yılında 17.618 kilogram olduğu bildirilmiştir (Diller, 1996) .

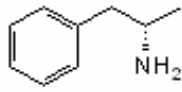
1.2.3.1. Metilfenidat Dozu

Metilfenidat günde 3 kez 5 mg başlanıp etki ve yan etkiye göre iki haftada bir doz artırılarak en uygun etkin doz bulunarak tedaviye devam edilir. Günlük maksimum metilfenidat dozu 60 mg/gün olarak belirtilmesine karşın uygulama kılavuzları 70 kilogramın üstündeki gençlerde 100 mg/güne kadar çıkılabileceğini belirtmektedirler.

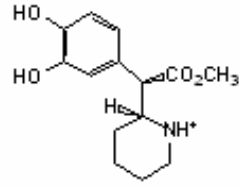
Toksosite: Ciddi toksik doz aşımı nedeniyle birkaç örneğin bildirilmiş olmasına rağmen yetişkinler için tahmini minimum öldürücü oral doz 2 gr, I.V. doz 40 mg olarak belirtilmiştir (Levine et al.,1986)

1.2.3.2. Farmakolojik Özellikleri:

Metilfenidat (Ritalin ve Concerta isimleri altında satılmaktadır) bir santral sinir sistemi uyarıcısıdır ve bir amfetamin izomeri olan dekstroamfetamin yapısındadır. 1954'de dekstroamphetamine'nin piperidin türevi olarak sentezlenmiştir (Şekil 2).



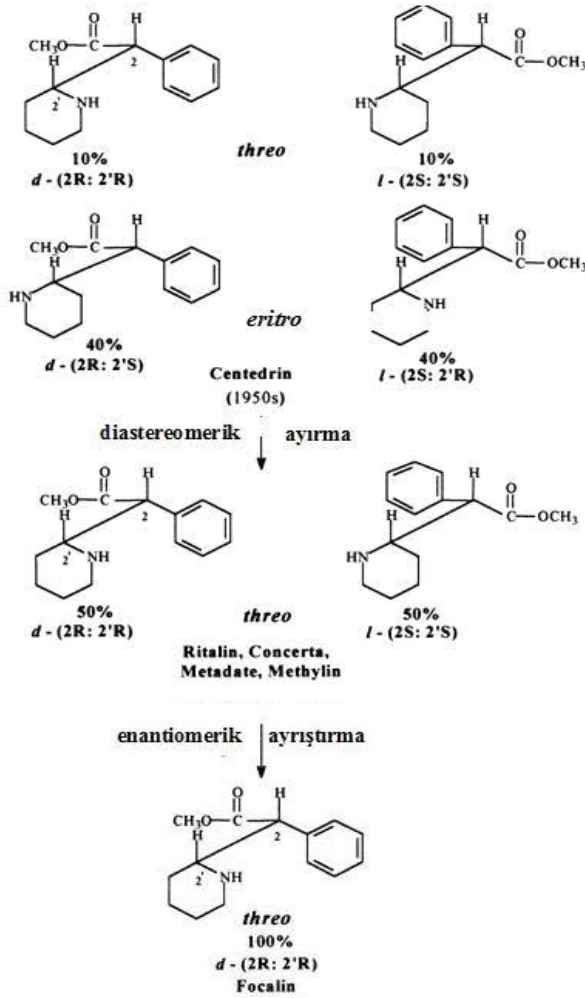
dekstroamfetamin



Ritalin

Şekil 2. Metilfenidat dekstroamfetaminin piperidin türevidir.

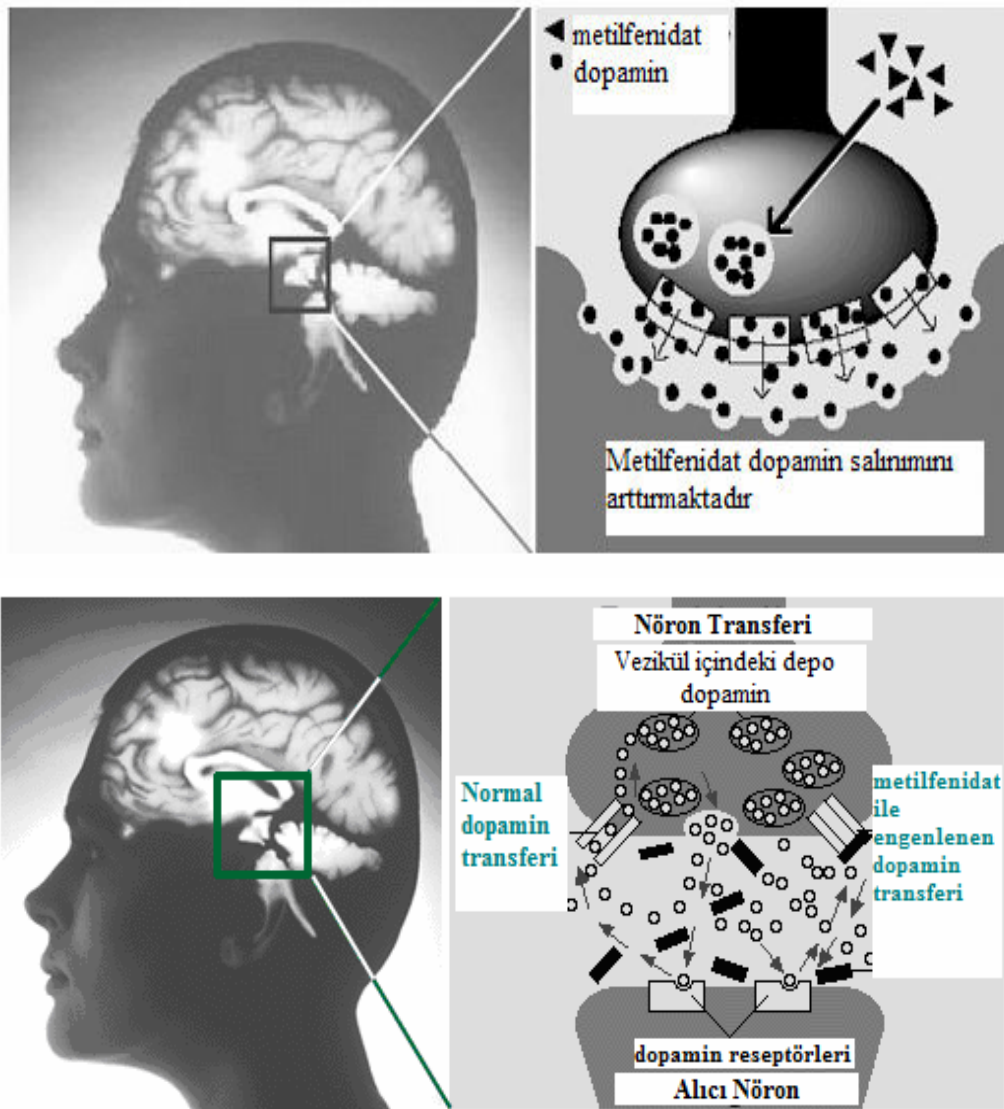
Metilfenidat içeren tüm ürünler d ve l-threo enantiomerlerinden oluşmakla birlikte sadece d-threo enantiomeri aktiftir (Kimko ve ark, 1999). Fakat Focalin (saf dextro-metilfenidat- ilacın hızlı etkin formu) vücut tarafından hızla absorbe edilir ve heterojen bileşiğe göre daha kısa bir zamanda pik değerine ulaşır (Şekil 3).



Şekil 3. Ritalin d ve l threo enantiomerlerinin gösterimi (Kimko ve ark, 1999).

1.2.3.3. Metilfenidatın Etki Mekanizması :

Ritalin bir merkezi sinir sistemi uyarıcısı olup belirgin etkisi motor aktivite yerine mental aktivite üzerinedir. İnsandaki etki mekanizması tamamen anlaşılmamıştır, fakat Metilfenidatın frontal lob fonksiyonlarında etkili olduğu bilinen dopamin ve noradrenalin düzeylerini artırarak etkili olduğu düşünülmektedir. Metilfenidat sinaptik bölgeye dopamin ve noradrenalin salınımını artırarak ve presinaptik bölgeden dopamin ve noradrenalin geri alımını engelleyerek bu iki nörotransmitterin sinaptik aralıktaki düzeyini artırmaktadır (Şekil 4).



Şekil 4. Sinaptik bölgeye dopamin ve noradrenalin salınımını ve presinaptik bölgeden dopamin ve noradrenalin geri alımının engellenmesi (İnternet Ref. No: 2,3)

1.2.3.4.Farmakokinetik özellikleri

A. Emilim

Oral yoldan alındıktan sonra etkin madde (metilfenidat hidroklorür) hızla ve hemen hemen tamamen emilir. Yoğun ilk geçiş metabolizması nedeniyle sistemik biyoyarlanımı dozun ancak % 30' u (% 11-51) kadardır. Besinlerle alınması emilimini hızlandırır fakat emilen miktarı etkilemez. 0.30 mg/kg alınmasından ortalama 1-2 saat sonra yaklaşık 40 nmol/L (11 ng/mL) olan doruk derişimlere erişilir. Ancak doruk derişimler hastalar arasında belirgin derecede farklılıklar gösterir. Derişim-zaman eğrisi altında kalan alan (AUC) ve doruk plazma derişimleri (Cmax) doz ile orantılıdır.

B. Dağılım:

Kanda metilfenidat ve metabolitleri plazma (% 57) ve eritrositler (%43) arasında dağılır. Metilfenidat ve metabolitleri plazma proteinlerine düşük oranda (% 10 - 33) bağlanırlar. Sanal dağılım hacmi yaklaşık 13,1 L/kg'dır.

C. Biyotransformasyon:

Metilfenidatın biyotransformasyonu hızlı ve geniş kapsamlıdır. Ana metabolit olan, ester grubu uzaklaştırılmış, α -fenil-2-piperidin asetik asit (ritalinik asit) metaboliti metilfenidatın alınmasından yaklaşık 2 saat sonra plazmada, değişmemiş maddeninkinden 30 – 50 defa daha yüksek olan doruk derişimlere ulaşır. α -fenil-2-piperidin asetik asidin yarılanma ömrü metilfenidatın yarılanma ömrünün yaklaşık iki katıdır ve ortalama sistemik klirensi 0.17 L/saat/kg'dır. Hidroksillenmiş metabolitler (yani, hidroksimetilfenidat ve hidroksiritalinik asit) ancak küçük miktarlarda tespit edilirler. Terapötik etkinliğinin esas olarak ana maddeye bağlı olduğu sanılmaktadır.

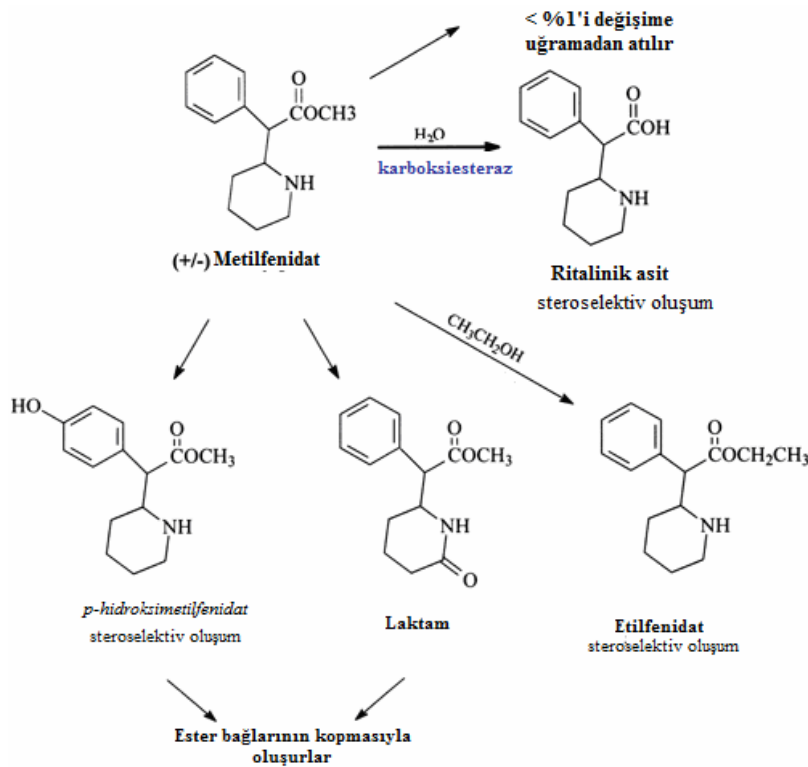
D. Eliminasyon:

Metilfenidat plazmadan ortalama 2 saatlik bir yarı ömür ile elimine edilir. Sanal ortalama sistemik klirensi 10 L/saat/kg'dır. Oral alınmasından sonra 48-96 saat içinde dozun %78-97'si idrar, % 1-3'ü dışkı ile, metabolitleri şeklinde atılır. Değişikliğe uğramamış metilfenidat ancak küçük miktarlarda (< % 1) idrarda görülür. Dozun

çoğunluğu(%60-86) idrarla, α -fenil-2-piperidin asetik asit (ritalinik asit) şeklinde atılır (Şekil 5).

Hastalardaki özellikleri

Metilfenidatın hiperaktif çocuklarda ve normal erişkinlerde farmakokinetik davranışları arasında görünür fark yoktur. Eliminasyon bilgileri, böbrek fonksiyon bozukluğu olması halinde böbrek fonksiyonları normal olan hastalardakine göre değişmemiş metilfenidatın böbreklerden atılmasının çok az miktarda azalacağını göstermektedir. Bununla birlikte α -fenil-2-piperidin asetik asit metabolitinin böbreklerden atılması azalabilir.



Şekil 5. Metilfenidat metabolitleri (*pharmachotherapy* © 2003 *pharmachotherapy publication*)

1.2.3.5. Yan Etkiler

Psikostimülanlardan kaynaklanan santral uyarılma sempatik sinir sistemi aktivasyonu ve stereotipik hareket oluşumuna yol açabilir (Santosh ve Taylor 2000). İştahsızlık, büyüme geriliği, uykusuzluk, merkezi sinir sistemi hasarı, kardiyovasküler hasar, hipertansiyon, kompulsif hareketler ve halüsinasyonlar gibi yan etkiler ortaya çıkabilir (NIH 2000).

Genellikle tedavinin başlangıcında ortaya çıkan bu yan etkiler kısa bir süre beklenerek, doz düşürülerek veya ilaç verilmiş zamanı düzenlenerek ortadan kalkabilir.

Tablo 1'de 4 pilot çalışmada elde edilen metilfenidat ve plasebo verilen DEHB'li olgulardaki yan etki görülme sıklıkları verilmiştir. Tablo 1'de görülebileceği gibi metilfenidat ve plasebo alan olgularda oldukça benzer oranda yan etkiler görülmektedir.

Tablo 1: Metilfenidat ve Plasebo yan etki oranları

Yan etki	Metilfenidat	Plasebo
Karın ağrısı	%11.3	%7.0
Baş ağrısı	%13.0	%8.4
İştahsızlık	%14	%6.4
Bulantı	%3.5	%3.2
Uykusuzluk	%7.8	%7.2
Sinirlilik	%13.4	%17.4

(Biederman ve ark. 2002, MTA Cooperative group 2002, Connor 2006)

Psikostimülanların çocuklardaki kısa ve uzun süreli yan etkileri konusunda araştırmalar yetersizdir. Gelişmekte olan organizma üzerindeki uzun süreli etkileri bilinmediğinden özellikle uzun vadede ciddi yan etkilerle ilgili endişeler yaygındır (Perring 1997, Jensen ve ark. 1999b, NIH 2000). Çocuklarda ilaç etkileşimleri bilinmeden ve güvenlik bilgileri yetersizken çoklu tedavi (polifarmasi) uygulanması da bu alanda kaygı uyandıran diğer bir noktadır (Kaplan 1999).

1.2.3.6. Kötüye Kullanım Riski

ABD'de okullarda şiddet içeren davranış sorunlarının artışı ile psikostimülan kullanımındaki artışın paralel gittiği öne sürülmektedir (Wiseman 1999). Kötüye kullanılabilen psikostimülanların (NIH 2000, Oltman ve Pivrotto 2003) madde kötüye kullanımı gibi davranış sorunları için yüksek risk taşıyan DEHB olgularının tedavisinde kullanılması tartışılmaktadır.

Psikostimülanların tekrarlayan kullanımları motivasyon, ödüllendirme davranışları ve lokomotor cevaplar açısından beynin duyarlılığının artmasına ve bağımlılık gelişmesine neden olur. Yani, beyin bu davranışları (motivasyon, ödüllendirme) ya da lokomotor etkinliği arttıracaklarını öğrendiği maddenin kullanımını arar, teşvik eder, yoksunluk belirtileri

göstermeye başlar. Örneğin, hayvan deneylerinde denekler kendi kendilerine kullanımı arttırırlar.

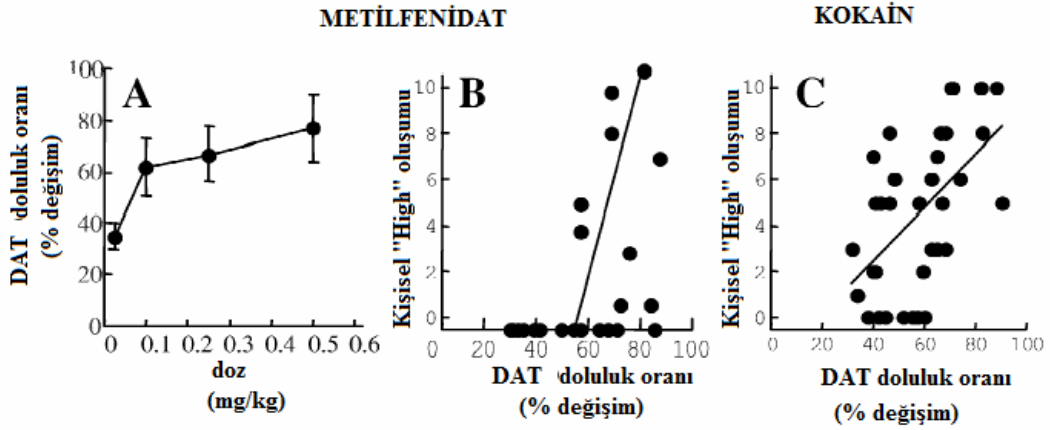
Psikostümölanlar arasında çapraz duyarlılaşma bulunduğu için amfetaminlerle kokain ve eroin arasında çapraz tolerans ve duyarlılık gelişme riski vardır ve bu durum bağımlılığa yol açabilir. Farklı da olsa her psikostümölan maddenin tekrarlayan kullanımı diğer tüm psikostümölan maddeler için kompulsif madde arama davranışı, ödüllendirme etkileri gibi davranış duyarlılaşmaları ile çekilme belirtileri, tolerans gelişimi ve dolayısıyla ilaç bağımlılığı riskini arttırır . Psikostümölan madde ve ilaçların damar ya da kas yoluyla alınmaları ve gece saatlerinde kullanılmaları durumunda bağımlılık oluşturma riskleri artar.

Bugün ABD'de dört milyon çocuk Metilfenidat kullanmaktadır. Çünkü ilaçla tedavi çok hızlı cevap üreten, ebeveynlerin ve öğretmenlerin işini kolaylaştıran bir yoldur. 1990'dan bu yana ilacın üretimi % 700 artmıştır. Okullarda ve kreşlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. İlacın kokainle aynı tesiri yaptığı ABD'de yayınlanan raporlarda belirtilmektedir (Simon ve Schuster, 1999). Metilfenidatın beyin üzerindeki etkisi kokain ile benzerdir İlaç ağızdan yutulması sonrasında hızla beyne ulaşır ve beynin katekolaminerjik sistemlerinde toplanır. Beyinde dopamin salınımına neden olur ve başta dopamin olmak üzere tüm katekolaminlerin (adrenalin, serotonin) geri alınımını engelleyerek etkilerini uzatır

Bağımlılık davranışı gelişmesi, psikoz, aşermenin ortaya çıkmasında dopaminin yeri büyüktür. 1995 yılında Metilfenidatın etkilerinin kokaine benzer şekilde dopamin transportörleri (otoreseptörler) aracılığıyla gerçekleştiği, aralarındaki farkın kokainin saniyeler içinde etkilemesine karşın metilfenidatın alındıktan bir saat kadar sonra etki etmeye başlaması olduğu belirtilmektedir. Kokain otoreseptörlerin %50'sini bloke ederken, metilfenidatın % 70'inde blokaja yol açtığı saptanmıştır (Vastag 2001).

DAT (Dopamin transporter)'in % 50 sinin blokajı için 0.075 mg/kg intravenöz MPH(metilfenidat) gerekirken, 0.13 mg/kg intravenöz kokain yine aynı işi görebilmektedir (Şekil 6).

Fakat intravenöz 0.1 mg/ kg MPH, DAT 'ın % 60'ını bloke ederek ('high') adı verilen güçlü bir etki yaratmaktadır (Volkow et al. 2002).



Şekil 6 : Metilfenidat ve kokainin DAT üzerine etkileri (Volkow et al. 2002).

Psikostimülanlarla kokainin etki mekanizmaları açısından benzerliği, DEHB olgularının madde kötüye kullanım riskinin fazlalığı ile birleşince tartışmalar yoğunlaşmaktadır. Bu alandan psikostimülan tedavinin çocukları daha güçlü ve tehlikeli ilaçlara götüren bir basamak olduğu şeklindeki görüşlerin karşısında, psikostimülanla tedavi edilen çocukların sonraki yaşamlarında kokain ve alkol kullanmaları olasılığının daha az olduğunu belirten görüşler de yer almaktadır (Oltman ve Pivrotto 2003). Her iki görüşü de destekleyen çeşitli izleme çalışmaları bulunmakla birlikte bu konuda henüz fikir birliğine varılamamıştır ve araştırmalar sürmektedir (Lambert ve Hartsough 1998, Biederman ve ark. 1999, Barkley ve ark. 2003, Wilens ve ark. 2003, NIMH 1999, NIH 2000).

Psikostimülanların yaygınlaşmasının, dağıtım kontrolünün zorlaşması nedeniyle toplumu riske attığı ileri sürülmektedir (NIH 2000, Santosh ve Taylor 2000, Goldman ve ark. 1998). Metilfenidat kimyasal olarak sentezlenmesi güç bir madde olduğundan dolayı başlıca kötüye kullanım yolu reçete yazımından kaynaklanan dağılım olarak belirtilmektedir (Klein-Schwartz ve McGrath 2003).

Psikostimülanların okulda da kullanılan ilaçlar olması bu dağılımı kolaylaştırmaktadır (Oltman ve Pivrotto 2003); bir araştırmada DEHB'lilerin %79'unun okulda da ilaç kullandığı saptanmıştır (Safer ve Krager 1988).

Metilfenidat'ın yasadışı kullanımını genellikle tabletlerin ezilip burundan çekilmesi ve hızlı bir şekilde kan dolaşımına geçmesiyle gerçekleştirir. Bazı kullanıcılar tabletleri suda çözerek karışımı enjekte etmektedir. Metilfenidat'ın bu kadar hızlı sisteme girmesinin sonucu olarak,

kullanıcılarda kokain ve amfetamin alınmış hissi uyandırmaktadır. Bu nedenle Metilfenidat kullanımı bağımlılığa neden olabilir. Eğer Metilfenidat, düşük dozlarda öngörülen biçimde oral alınırsa, bir yasadışı etki üretmemektedir. Fakat DEHB tanısındaki artışla gençler için diğer sınıf arkadaşlarından reçetesiz Metilfenidat eldesi kolaylaşmıştır. Bu gençler arasında Metilfenidat'ın kötüye kullanımında bir artışa yol açabilmektedir

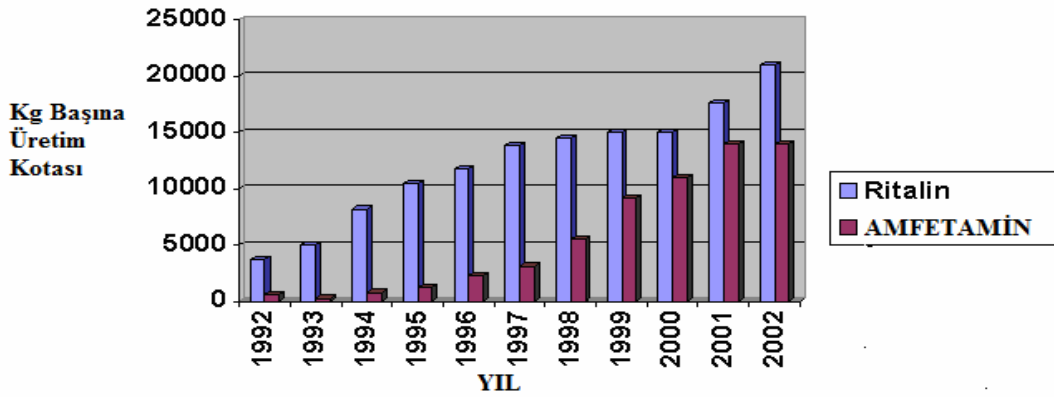
Reçete yazılan çocukların, ağızdan veya ezdikten sonra burundan çekme / suda eritip enjekte etme yoluyla psikostimülan kullanan arkadaşlarına ilaçlarını satabilecekleri ileri sürülmektedir (Klein-Schwartz ve McGrath 2003). Psikostimülan kötüye kullanımı veya başkalarına dağılımının arttığı konusunda kanıt olmadığı belirtilmekle birlikte (Santosh ve Taylor 2000, Goldman ve ark. 1998); 13549 7-12.sınıf öğrencisinden oluşan toplum örneğinde yapılan bir araştırmada; psikostimülan kullanan (%5.3) öğrencilerin %14.7'si ilaçlarını zaman zaman arkadaşlarına verdiğini, %7.3'ü ilaçlarını sattığını, %4.3'ü çaldırdığını ve %3.0'ü ilaçlarını vermeye zorlandığını bildirmiştir. Psikostimülan reçetesi olanların sayısının artışıyla tıbbi nedenli olmayan psikostimülan kullanımı artışı ilişkili bulunmuştur (Poulin 2001). Başka araştırmalarda B tedavi amacıyla ilaç kullananların %16'sı arkadaşlarının ilacı satın almayı istediğini bildirirken, lise öğrencileri arasında en az bir kez, reçete olmadan psikostimülan denemesi %13 oranında saptanmıştır (Klein-Schwartz ve McGrath 2003).

İlacı yazan hekimlerin; çocuğun ailesi, akranları veya okulda ilaç dağıtanlar tarafından kötüye kullanım açısından dikkatli olması ve uygun kullanımı takip etmesi önerilmektedir (Santosh ve Taylor 2000, NIH 2000, Klein-Schwartz ve McGrath 2003)Reçete edilen ilaçların çoğu gibi, sağlık çalışanları tarafından aşırıya kaçmadan kullanıldığında zarara neden olması olası değildir. Ancak daha önceden de sık sık belirtildiği üzere bu reçeteli ilacın yasadışı kullanımının suistimali daha tehlikeli uyuşturucuları kullanmak için bir ara geçiş olabilmektedir. Bu nedenle Metilfenidat kullanımını önermek makul ve izlenebilir olmalıdır.

Ayrıca Psikostimülan kullanımı, cinsel isteği arttırması nedeniyle kontrolsüz cinsel ilişkiyi teşvik ederek, dolaylı yoldan cinsel yolla bulaşan hastalıkların (HPV, AIDS gibi) yayılmasına neden olabilir. Ayrıca psikostimülanların erken yaşta kullanımının beynin çeşitli bölümlerinde hücre gelişimini engellediği ve ileriki yaşlarda beyinde hücre kaybına ve uzun süreli hafıza bozukluklarına yol açabildiği gösterilmiştir. Bu maddelere beynin erken yaşta maruz kalması durumunda, yıllar sonra ortaya çıkabilecek birtakım sorunların temeli

atılabilmektedir. Bunların sonucunda beynin ödüllendirme sisteminde erişkinlikte de süren bozulmalar, depresif belirtilerde ömür boyu sürebilecek artışlar (kendini iyi hissedememe, hiçbir şeyden keyif alamama gibi) görülebilmektedir. Bütün bunlar yeni ilaçların ve başka tedavilerin daha fazla kullanımını gerektirecek psikiyatrik sorunlarla ömür boyunca boğuşmak gerekeceği anlamına gelmektedir.

ABD amfetaminlerin yarattığı olumsuz etkilerin hiç de yabancıları değil. Son on yıl içinde uyuşturucu bağımlılığının giderek bir salgına dönüştüğü ve amfetaminlerin ülkenin bir numaralı uyuşturucusu kokaini bile gölgede bıraktığı belirtiliyor. 1992-2002 yılları arasında amfetamin bağımlılığına bağlı olarak tedaviye gereksinim duyanların sayısında çarpıcı bir artış meydana geldiğine tanık olunuyor. Amfetaminler dünyada en çok kullanılan uyarıcılar arasında Hint kenevirinden (cannabis- esrar) sonra ikinci sırada yer alıyor. BM tarafından yapılan istatistiklere göre, her yıl yaklaşık 26 milyon kişi bu tür uyarıcıları kullanıyor.



Şekil 7. A.B.D. de Ritalin ve Amphetamine için Üretim Kotaları (1992-2002) D.E.A(*İnternet Ref. No:4*)

1.2.4.TÜRKİYE'DE DURUM

Ülkemizde DEHB ile ilgili bilimsel çalışmalar ve basındaki tartışmalar son dönemde giderek artmaktadır. Topluma ilaç tanıtımı ve ilaç tedavisinin yaygınlaştırılması açısından etkili yöntemler arasında yer alan toplumsal tarama uygulaması, DEHB konusunda ülkemizde Milli Eğitim Bakanlığı öncülüğünde yakın zamanda gündeme geldiğinde, çocuklara hastalık tanısıyla etiketlenmesi ve ilaç tüketimini arttırma riski nedeniyle yoğun şekilde tartışılmıştır .

Sadece çocuk psikiyatrisi, nöroloji ve erişkin psikiyatrisi uzmanları tarafından, en fazla bir aylık dozda (4 kutu) yazılabilen bu psikostimülanın dağıtımı Sağlık Bakanlığı tarafından yakından denetlenmektedir (İnternet Ref. No:5). Metilfenidat Türkiye'de 1985 yılından beri "kontrole tabi uyuşturucu madde ve müstahzarların reçeteleri" (kırmızı reçete) kapsamındadır (SB 1985). 1998 tarihinde ruhsat alınarak ithal edilene kadar (İnternet Ref. No:6), Metilfenidat'ın dağıtımı Sağlık Bakanlığı tarafından sadece Ankara'da bir hastane eczanesinde gerçekleştirilmiştir. 1998'de 2 kg olan Metilfenidat ithalatının 2002'de 23 kg'a çıkarak hızlı bir artış gösterdiği dikkati çekmektedir (İnternet Ref. No:7). Metilfenidat'ın 2002'de 72 bin kutu satıldığı; satışların %37'sinin İstanbul ve Trakya'da, %21'inin İzmir ve çevresinde, %20'sinin Ankara ve çevresinde olduğu bildirilmektedir . 2002 yılında ülkemizde tahminen 10 bine yakın çocuğun Metilfenidat kullandığı belirtilmektedir.DEHB tanısındaki artışla gençler için diğer sınıf arkadaşlarından reçetesiz Metilfenidat eldesi kolaylaşmıştır. Bu gençler arasında Metilfenidat'ın kötüye kullanımında bir artışa yol açabilmektedir.

Memleketimizde son zamanlarda ilaç kontrolü sorunu, bu konu ile doğrudan ilişkisi olsun olmasın, herkesin zihnini kurcalayan bir önem kazanmıştır. Bu alanda güvenilir metodların uygulanarak yanılmaya meydan vermeyecek analiz sonuçlarına ulaşılması zorunlu olmaktadır.

1.2.5. METİLFENİDAT ANALİZİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER

Yakın zamanda metilfenidat suistimalinin dünya çapında artması, yeterli görüntüleme ve doğrulama metodlarının geliştirilmesini gerektirmektedir. Metilfenidatın kötü kullanımının ülkemizde de yaygınlaşmasından dolayı yüksek hacim idrar taraması ve kötüye kullanımın izlenebilirliği yönünde büyük talep oluşmaktadır.

Toksikoloji laboratuvarında tarama ve doğrulama testleri için kullanılan idrar ,kan, saç,tükrük,ter sıvısı gibi bazı biyolojik örnekler farklı düzeylerde spesifiklik,duyarlılık, ve doğruluk sağlamaktadırlar. Örnek ve metabolitlerinin seruma göre idrarda daha uzun dedeksiyon süresine sahip olması ve örnek alma kolaylığından dolayı idrarda madde taramasında en çok kullanılan yöntemdir.

Kullanım kolaylığı ve hızlı sonuç vermesinden dolayı immünassay metodlara ilgi artmıştır. Fakat bu analizler mükemmel değildir. Eğer sonuçlar LC-MS-MS,GC-MS-MS gibi ikinci bir analiz yöntemiyle konfirme edilmezse immünassay yöntemle alınan yanlış pozitif sonuçlar ciddi tıbbi ve sosyal kaosa neden olabilmektedirler.

Bir kütle spektrometresi ile ikinci bir kütle spektrometresi birbirine bağlanarak birlikte kullanılabilir (MSMS). Bu yöntemde birinci kütle spektrometresinde kimyasal 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, GCMS veya LCMS yöntemlerinde kullanılan kromatografi aletlerinde olduğu gibi, örnekteki birleşenlerin kromatografi kolonundan çıkışını belli bir süre beklemek gerekmez (Yıldız A. ve arkadaşları , 1997).

Teorik olarak Metilfenidatın varlığının test edilmesi mümkün, fakat pratikte testin yapılması yaygın değildir. Belirli bir sebep olmadığı sürece, mesela otopsi vakası gibi, spesifik metilfenidat testleri normalde yapılmaz. Tayin için genelde ince tabaka kromatografisi, gaz kromatografisi (elektron yakalama dedektörü) veya sıvı kromatografisi (ultraviyole veya fotodiyot ışın dedektörü) teknikleri bildirilmiştir (İnternet Ref. No:8) .

Dugal ve ark.(1978) yaptığı çalışmada İdrar numunelerinde Gaz kromatografisi kullanımında metilfenidat için tanımlama limiti LOD 30 µg/L , Vu-Duc T. ve Vernay A.,(1992) birlikte yürüttüğü çalışmada gaz kromatografisi kullanımında ritalinik asit için tanımlama limiti LOD 50 µg/L olarak ifade edilmiştir.

Milberg R. M. ve ark.(1994) gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi ile yürüttüğü çalışmada metilfenidat ve ritalinik asit için yaklaşık tanımlama limit değerleri 2 µg/L ve 60 µg/L olarak bildirilmektedir.

Tek basamaklı bir ekstraksiyon tekniği ve ince tabaka kromatografisiyle çok çeşitli ilaç kötüye kullanımının tespiti mümkündür. Bu teknikler önemli ekonomik faydaları ve kliniğe yardımlarından dolayı idrar analizlerinde sıklıkla kullanılmaktadırlar.

Madde analizi için yapılan analizler tarama testleri ve doğrulayıcı testler olmak üzere iki aşamalıdır. Tarama testleri ekonomik ve etkin olmalıdır. Bu testlerde kullanılan yöntemin duyarlılığı yüksektir ve bu testlerle maddenin varlığı araştırılır. Bulunan sonuç, doğrulayıcı testler sonuçlanıncaya değin sadece olasılık olarak düşünülür. Yöntemler "duyarlılık" ve "en düşük saptanabilecek miktarla" kısıtlıdır. Doğrulayıcı testlerde ise, hatalı olumlu sonuçlar olmamalı ve aranması hedeflenen madde için yeterince duyarlı ve tarama testlerinden daha seçici olmalıdır (Söylemezoğlu T., Çeçen ŞŞ., 2003).

Maddelere özel toksikolojik analiz yöntemleri sayıca fazla değildir. Bu nedenle toksikolojik analiz için belli iyon, atom grubu ve moleküllerin aynı şekilde cevap verdikleri seçici analiz yöntemleri oldukça sık kullanılır. Bu yöntemler kullanılarak analiz yapıldığında örnekteki bir bileşenin tayinine spesifik reaksiyonlar ile erişilemiyorsa, örnek içinde bulunan diğer bileşenlerin tayini istenenden ayrılması gerekir. Bu işleme ekstraksiyon adı verilir. Ekstraksiyon, kromatografik analiz sürecinin büyük önem taşıyan bir parçasıdır. Sürecin bu bölümünde yapılacak hata sonucu doğrudan etkileyecektir. Bu nedenle bir örneğin kalitatifveya kantitatif analizi için içerdiği maddelerin kimyasal ve fiziksel özelliklerine göre özel ekstraksiyon ve analiz metotlarına tabi tutulması gerekir (Ellenhorn MJ et al., 1997).

1.2.5.1. Ekstraksiyon Yöntemleri:

Katı-Faz Ekstraksiyon (KFE) :Katı faz ekstraksiyon tekniği biyolojik materyalden maddelerin izolasyonları için kullanılan bir ekstraksiyon metodudur. Örnek hazırlamada hızlı, seçici ve etkili bir metot olması ve saflaştırma, çözücü değiştirme (örneklerin sıvı fazdan organik faza geçmesi), türevleme,sınıflandırarak fraksiyon gibi pek çok işleme imkan vermesinden dolayı tercih edilmektedir.KFE Yöntemi temel olarak numune hazırlanması,

kolon koşullanması, kolonun dengelenmesi, numune uygulanması, karışımın ayrıştırılması ve analitin ayrılması basamaklarından oluşmaktadır (United Chemical Technologies Inc, 1999).

Maddelerin KFE yöntemi ile ekstraksiyon işleminde kolonun şartlandırılarak ekstraksiyonu yapılacak maddenin afinitesi kadar, ortamın pH ve pKa'sı, maddenin ortamdan çekilebilmesi için son derece önemlidir (Rozman KK, Klaassen CD., 2001). KFE ekstraksiyonda sıvı kromatografisi kolonlarına benzer şekilde sabit bir faz kullanılmaktadır. Sabit faz cam veya plastik bir kolon içinde, iki filtrenin arasında bulunur. Ayrıca çözeltinin kontrollü akışını sağlayan bir musluk da bulunur. KFE kartuşları 1-10 ml arasında olabilirler ve tek kullanımlıktırlar (Ronald E., 2002).

Sıvı-sıvı ekstraksiyon (SSE) : İdrar, kan gibi vücut sıvılarında bulunan maddelerin bu sıvılarla karışmayan ve aranan maddenin çözüldüğü sıvılar ile ekstrakte edilmesi işlemidir. Biyolojik materyaldeki maddeler değişik pH derecelerinde SS ekstraksiyon işlemine tabi tutularak içerdikleri asidik, nötral ve bazik maddeler birbirinden ayrılır (Flanagan JR et al., 1995). Zayıf asit ve zayıf baz karakterde olan maddelerin pKa değeri o maddenin % 50'sinin iyonize % 50'sinin ise non-iyonize olduğu ortam pH derecesidir. Buna göre zayıf asitler pKa değerinin 1 tam sayı altındaki pH ortamında % 90 non-iyonize, zayıf bazlar ise ortam pKa değerinin 1 tam sayı üzerindeki pH ortamında % 90 non-iyonize halde bulunurlar (Rozman KK., Klaassen CD., 2001).

Basit ekstraksiyon metotları ile toksikolojik öneme sahip morfin, paratyon, kafein, barbitüratlar ve benzodiazepinler araştırma materyallerinden kolayca ayrılabilirler. Ekstraksiyon vücut atık veya artıklarından yapılıyorsa, glukuronik ve sülfürik asit gibi birleşme ürünlerinden aranan maddenin ayrılması gerekir. Bu durum özellikle idrarın toksikoloji yönünden araştırılmasında önem taşır; ayırma işlemi glukuronidaz ve arilsülfataz gibi enzimler kullanılarak gerçekleştirilir. SSE ekstraksiyon işleminden, bugün laboratuvarlarda zehirlerin ayrılması yanında, istenmeyen maddelerin (yağ gibi) ortamdan uzaklaştırılarak daha temiz bir ekstrakt elde edilmesi için de sıkça yararlanılmaktadır (Söylemezoğlu T., Çeçen ŞŞ., 2003).

1.2.5.2. Analitik Yöntemler:

- a. Kromatografik Yöntemler
- b. Spektroskopik Yöntemler
- c. İmmunoassay teknikler
- d. Diğer yöntemler olarak sınıflandırılabilir.

Önceleri yaygın olarak uygulanan spektroskopik yöntemler duyarlılığın ve seçiciliğin azlığı nedeniyle terkedilmişken, uzun yıllardır uygulanmakta olan uygun kromatografik yöntemler yanında, immunoassay yöntemleri de, teknik koşulların gelişmesi nedeniyle günümüzde de uygulama sıklığı giderek artmakta olan yöntemlerdir . Kabaca kromatografi, karışım içindeki bileşenleri fiziksel olarak ayırma veya ayrıştırma işlemine verilen genel addır. Ayırma işlemi karışımdaki maddelerin biri hareketli (mobil) diğeri hareketsiz (stasyoner) iki fazda sürüklenerek geçişleri sırasında birbirlerinden ayrılmaları esasına dayanır. Karışımdaki her maddenin hareket hızı dağılma katsayısı ile belirlenir. Hareketli fazda daha çok dağılıma uğrayan maddeler daha hızlı hareket ederken; sabit fazda dağılımı fazla olan maddeler daha yavaş hareket ederler.

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 (R_t) standart alıkonma zamanı kıyaslanarak teşhis yapılır (Moffat AD et al, 1986).

Preparatif Ayırma: Numune saflaştırmada yada küçük miktarlarda saf madde elde etmek için kullanılır.

Kromatografik yöntemler içinde uygulama kolaylığı ve yöntemin bilinirliği açısından en sık kullanılan tipleri ince tabaka kromatografisi ve gaz kromatografisidir.

A. İnce Tabaka Kromatografisi:

İnce Tabaka Kromatografisinin kapsamı:

1. Bir ince tabaka plakasının, bir cam levha yüzeyinin adsorblayıcı tabaka ile kaplanarak hazırlanması. Ticari olarak satın alınabilecek ince tabaka plakalarını (cam, plastik ya da alüminyum folyo destekli) kullanabilirsiniz.
2. Uygun çözücüde çözülmüş, ayrılacak maddelerin küçük miktarlarda plakaya uygulanması.
3. Kromatogramın geliştirilmesi (yürümenin gerçekleştirilmesi).
4. Ayrılan maddelerin UV lambası yardımı ile ya da boyar maddeler ile boyanarak gözlenir hale getirilmesi.

İnce tabaka kromatografisinde adsorblayıcı madde olarak en sık silika jel ($\text{SiO}_2 \cdot x \text{H}_2\text{O}$) ve alüminyum oksit kullanılır. Silika jel kullanıldığında, organik çözücü ya da su içerisindeki adsorblayıcı madde bulamacı cam (yaklaşık 4x10 cm ebadında) yüzeyine düzgün ve ince bir tabaka (0.1-5 mm kalınlıkta) oluşturacak şekilde kaplanır. Çözücü uçurularak plaka kurutulur. Ticari adsorblayıcı maddeler, çoğunlukla cam yüzeye daha iyi yapışması için bağlayıcı (genelde CaSO_4) içerir. Plakanın kenarına yakın bir noktaya karışım çözeltisi uygulanır. İnce tabaka kromatografisinin başarısı için uygulanan örneğin miktarı (çapı ve şekli) önemlidir. Uygulanan çözelti nokta şeklinde ve yeterince küçük olmalıdır. Çözelti aşırı konsantre ya da nokta çok geniş olursa, örnekteki bileşikler iyi şekilde ayrılmayabilir. Uygulanan örnek kuruduktan sonra kromatogram, yürütme kabına yerleştirilir. İyi bir kromatografik çözümlenme için ayırma kabının içi, çözücü buharı ile dolana kadar beklenmelidir. Kolon kromatografisinde olduğu gibi, çözücünün taşıyıcılık gücü ne kadar fazlaysa adsorblanan maddeler plaka üzerinde o kadar daha hızlı hareket edeceklerdir (Ersoy L., 1989).

Çözücü 7 cm kadar ilerledikten sonra, plaka yürütme kabından alınır. Çözücünün ulaştığı seviye kurşun kalemle hafifçe işaretlenir ve çözücünün buharlaşması sağlanır. Renksiz maddelerin ayrılması gerçekleştirildiyse bazı metotlarla görünür hale getirilirler. Bazı ticari plakalardaki adsorblayıcı maddeler, florasan indikatör boyalar içermektedir. Plaka UV lambasının altına yerleştirildiğinde, spotlar belirgin hale gelirler.

Kromatogram, her bir spot için Rf değeri adındaki sayı cinsinden kaydedilir Rf değeri belirli koşullar altında belirli bileşikler için karakteristik bir değerdir. Aşağıdaki gibi hesaplanır:

$$R_f = \frac{\text{Bileşiğin uygulama noktasından itibaren aldığı yol}}{\text{Çözücünün orijinden itibaren aldığı yol}} = \frac{d_{\text{madde}}}{d_{\text{çözelti}}}$$

Lekelerin yerlerinin tatbik noktasına uzaklığının, tüm analiz mesafenin uzunluğuna oranından, lekenin bu sistemdeki alıkonma değeri olan “Rf” hesaplanır. Kalitatif ve kantitatif standardizasyon için laboratuvarlar arası çalışmaların aynı sonucu vermesi beklendiğinden Rf

değerleri mutlaka göz önünde bulundurulmalıdır. Rf değerlerinin tekrar edilebilirliğinin yüksek olması ise standardizasyona uygun cihazlarla olur.

Bir kromatogramın oluşmasında not edilmesi gereken önemli veriler;

- a. adsorban madde, b. kalınlığı ve aktivasyon koşulları, c.kullanılan çözücü sistemi, d. örneğin şekil ve çapı, e. spotu görünürleştirme yöntemi, f. Rf değerleri ve aynı koşullardaki standartların Rf değerleridir (Gündüz T., 2004).

A.1. Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi (YPİTK(ing. HPTLC):

Kromatografi bilimin tüm branşlarında uygulanabilen güçlü bir ayırma tekniğidir. 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. Geleneksel İTK' nin hala birçok narkotik laboratuvarında rutin analizlerde yoğun olarak kullanıldığı bilinmektedir (Türkmen Z ve ark.2008).

Farmasötiklerin, uyuşturucuların ve bitkilerin analitik testlerinde YPİTK nin son derece popüler olması aşağıdaki özellikleri sebebiyledir:

1. Örnek ve standartın aynı anda çalıştırılması ile daha az internal standartla daha iyi analitik kesinlik ve doğruluk
2. Bazı analistler aynı anda çalışabilir
3. Daha düşük maliyet ve daha kısa analiz süresi
4. Düşük bakım maliyeti
5. Örnek hazırlama kolaylığı
6. Solventler için filtrasyon ve gaz uçurma gibi ön işlemler yok
7. Her örnek için az miktar mobil faz kullanımı
8. Her bir analiz için taze durağan ve mobil faz hazırlanması gerektiğinden önceki analizlerden kalma kontaminasyonlar görülmemektedir.
9. UV de görünmeyen bileşikler kromatografi sonrası türevlendirme ile görünür kılınabilir.
10. Kalitatif, kantitatif ve ön hazırlık analizleri aynı sistemde mümkündür.

YPİTK Uygulama Basamakları

1. Plaka seçimi
2. Örnek ve standartın hazırlanması
3. Plakaların ön yıkama yapılması
4. Plakaların şartlandırılması
5. Örnek ve standartın uygulanması
6. Kromatografik yürütme
7. Spotların belirlenmesi
8. Tarama
9. Kromatogramların dökümantasyonu

Kromatografik Tabaka Seçimi

1. Önkaplama yapılmış plakalar-farklı destek materyalleri-farklı absorbanlar mevcuttur
2. Analizlerin % 80'i silica gel GF-temel maddeler, alkaloidler ve steroidler,alimünyum oksit
3. Amino asitler,dipeptidler,şekerler ve alkaloidler – selüloz
4. Non-polar maddeler, yağ asitleri, karotenoidler, kolesterol- RP2, RP8 and RP18
5. Koruyucular, barbüratlar, analjezik ve fenotiazinler –hibrit plakalar -PWF254s

Örnek ve Standart Hazırlama

1. Safsızlık ve su buharından kaçınılmalıdır.
2. Düşük sinyal gürültü oranı- düz taban çizgisi- LOD'un oluşturulması
3. Metanol, kloroform: Metanol (1:1), Etil asetat: Metanol (1:1), - kloroform: Metanol: Amonyak (90:10:1),Metilen klorid: Metanol (1:1), 1% Amonyak yada % Asetik asid çözücüleri kullanılabilir.
4. Plakalar kuru ve temiz olmalıdır

Önkaplama Yapılmış Plakaların Aktivasyonu

1. Yeni açılan plaka kutusu için aktivasyon gerekmemektedir.
2. Yüksek neme maruz kalan ve elle tutulan plakalar aktive edilmelidir.

3. Spotlama öncesi 110-120 °C de 30' bekletilir.
4. Alimünyum yapraklar iki cam plaka arasında saklanır ve 110-120°C de 15' bekletilir.

Örnek ve Standartların Uygulanması

1. Derişim aralığı 0.1-1µg / µl
2. Bu derişimden daha yükseği zayıf ayırmaya neden oluyor.
3. Linomat IV (otomatik aplikatör) – örnek ve standart TLC plakalar üzerine band şeklinde ve Azot gazı altında şırınga edilmektedir.
4. Band şeklinde uygulama –daha iyi ayırma – yüksek densitometrik yanıt

Mobil Faz Seçimi

1. Deneme yanılma yöntemi
2. Herkesin kendi deneyim ve litaratürü
3. 3-4 bileşenli mobil faz seçiminden kaçınılmalıdır.
4. İki taraflı hazne için 10-15 ml mobil faz yeterli olmaktadır

Ön şartlandırma

1. Doyurulmamış hazne yüksek Rf değerine neden olmaktadır.
2. Uygulama öncesi filtre kağıdı ile 30 dakika hazne doyurulması-çözücü buharının homojen dağılması- örneğin yürütülmesi için daha az çözücü kullanımı- daha düşük Rf değeri

Kromatografik ilerleme ve Kurutma

1. Yürütmeden sonra plakanın çıkartılması ve mobil fazın uzaklaştırılması sırasında lab. ortamından kontaminasyon olmamalıdır. Vakum altında kurutulmalı

Dedeksiyon ve Görünürleştirme

1. UV altında dedeksiyon ilk tercihtir.
2. Floransans bileşiklerin spotları 254 nm ya da 366 nm de görünebilmektedir.
3. Floransans olmayan bileşiklerin spotlarında silica jel GF gibi floransans durağan faz kullanılarak spotlar görülebilmektedir.
4. UV absorbsiyonu olmayan bileşiklerde plaka % 0.1 lik iyot solüsyonu içine daldırılır.
5. Bileşenler UV de yanıt vermiyorsa türevlendirme yapılmalıdır.

Miktar Belirleme

1. Yürütmeden sonraki kromatogram taramasında örnek ve standart aynı plak üzerinde olmalıdır.
2. Camag TLC tarayıcı III absorban ya da floresan mod kullanılarak yansıma veya geçirgenlik esasına göre kromatogramın tabaka görüntüsü oluşturulur-tarama hızı 100mm/s 'e kadar çıkartılabilir-spekturum alımı hızlıdır-36 trak ile 100 pik penceresi oluşturulabilir.
3. RSD vb istatistikler otomatik olarak hesaplanmaktadır. (İnternet Ref. No:9)

1.2.6. Metod Validasyonu

Bir metodun performansının belirlenen analiz ihtiyacına uygun olduğunu belirlemek ve göstermek için metot validasyonu yapılmalıdır. Ancak metodun belirlenen amaca uygun sonuç verdiğiinden emin olunduktan sonra bu metot analiz yapmak amacıyla rutin olarak kullanılabilir.**Metot Validasyonu Ne Zaman Yapılmalıdır;**

- ✓ Herhangi bir metot bir laboratuvarda ilk defa uygulanacağı zaman
- ✓ Bir analiz için yeni metot geliştirildiği zaman
- ✓ Kullanılmakta olan metotta değişiklik yapıldığı zaman
- ✓ Kalite kontrol testleri sonunda metodun performansında zamanla bir değişme olduğu anlaşıldığında
- ✓ Valide edilmiş bir metot başka bir laboratuvarda kullanılacağı zaman veya farklı bir kişi veya farklı bir cihazla kullanılacağı zaman;
- ✓ İki metodu karşılaştırmak için. Örneğin standart bir metotla yeni geliştirilmiş bir metot karşılaştırılacağı zaman.

Kimyasal analiz yöntemleri; analizi yapanların ihtiyaçlarına cevap verecek belirli kriterlere sahip olmalıdır. Uygulanabilirlik (applicability), maliyet, zaman ihtiyacı, ekipman ihtiyacı, analist için ihtiyaç duyulan eğitim altyapısı gibi Pratik karakteristikler yöntemin yararlılığının değerlendirilmesini sağlar. Kesinlik (precision), gerçeklik (trueness, bias), tanımlama limiti (limit of detection-LoD), ölçüm limiti (limit of quantitation-LoQ), seçicilik/özgünlük (selectivity/specificity), hassasiyet (sensitivity), doğrusallık/ölçüm aralığı (linearity) (linearite/workingrange), sağlamlık (robustness/ruggedness) gibi bilimsel karakteristikler ise,

yöntemle elde edilen analitik dataların güvenilirliği hakkında bilgi verir. (internet Ref. No:10).

1.2.6.1. Seçicilik (selectivity)

Yöntemin aranan analiti örnek matriksindeki diğer maddelerden ayırabilme özelliğidir. Analist; örnekte analitin birden fazla formda olabileceğini ve interferenslerin analitle çok benzer davranabileceğini her zaman gözönünde tutmalıdır.

1.2.6.2. Hassasiyet (sensitivity)

Analitin bir birim artışının, sinyal büyüklüğüne etkisini gösteren bir kriterdir.

$$\text{hassasiyet} = \frac{\text{ölçüm sinyali}}{\text{konsantrasyon}}$$

1.2.6.3. Doğrusallık/ölçüm aralığı (linearite/workingrange)

Ölçüm aralığı; yöntemin kesinlik, gerçeklik gibi kriterleri kabul edilebilir düzeylerde karşılayabildiği analit konsantrasyonu aralığıdır. Ölçüm aralığının alt sınırı ölçüm limiti (LoQ) dir.

1.2.6.4. Sağlamlık (robustness/ruggedness)

Yöntemin deney koşullarındaki küçük sapmalara karşı hassasiyet derecesini gösterir. Genellikle aşağıdaki parametreler test edilmektedir:

- Matriks kompozisyonu,
- Kimyasal madde parti/marka değişimi,
- Ekstraksiyon zamanı,
- Sıcaklık,
- Akış hızı
- Analitin uçuculuğu vb

Sağlamlık testlerinden elde edilen bilgi, yöntemin uygulanabilir olduğu koşulların tanımlanmasını sağlar.

1.2.6.5. Tanımlama limiti (limit of detection-LoD)

Tespit limiti; analitin, bir “boş” örnektekinden istatistiksel olarak önemli ölçüde farklı olan en düşük konsantrasyon düzeyidir.

1.yöntem :Boş örneğin tekrarlı analizleri ile;10 ayrı boş örnek analiz edilir,Ortalama ve standart sapmaları hesaplanır.

2. yöntem :Analiti çok düşük düzeyde içeren örneğin tekrarlı analizleri ile;10 ayrı spiked örnek analiz edilir ve standart sapmaları hesaplanır.

3. yöntem: Analiti düşük düzeyde farklı konsantrasyonlarda içeren örneklerle oluşturulan kalibrasyon denklemi ile hesaplanır (çalışmamızda 3. yöntem kullanılmıştır) (İnternet Ref. No: 10)

Kimyasal ölçümlerde kullanılan IUPAC tarafından tanımlanmış tespit limiti ve tanımlama yeteneği bir ölçüm sürecinin önemli performans özellikleridir. Tanımlama yeteneği ISO tarafından minimum algılama değeri olarak nitelendirilir. Bu ve daha yakından ilgili özellikler karşılaştırılır ve teorikte analizlenir. Kimyasal ölçümler ilgili bileşeni çok küçük miktarlarda içeren örneklerle ilgili olabilir. Ölçüm belirsizliğine gelince genellikle küçük miktarları sıfırdan ayırt etmek zordur. Bir ölçüm sürecinin önemli bir performans özelliği olan tanımlama yeteneği, genellikle analitin en küçük konsantrasyonu olarak ifade edilmesine rağmen güvenilir bir biçimde sıfırdan ayırt edilerek analizlenen madde bileşenini temsil etmektedir. Maddenin analit olduğu ya da olmadığı ölçülen veriye bağlıdır. Tespit kararı örnekle ilgili istatistiksel karşıt iki hipotez arasındaki seçime bağlıdır. **Null hipotezi** sıfır/başlangıç hipotezi olarak da bilinir. H_0 ile gösterilir. Mevcut veriler null hipotezinin doğruluğu hakkında şüphe uyandırdığında kıyas yapmak için ortaya sunulan ikinci hipotez **alternatif hipotezdir**. Yapılan işlemler eğer H_0 'ı yanlış çıkarırsa bu H_1 'nın kabulü anlamına gelir (İnternet Ref. No: 11) .

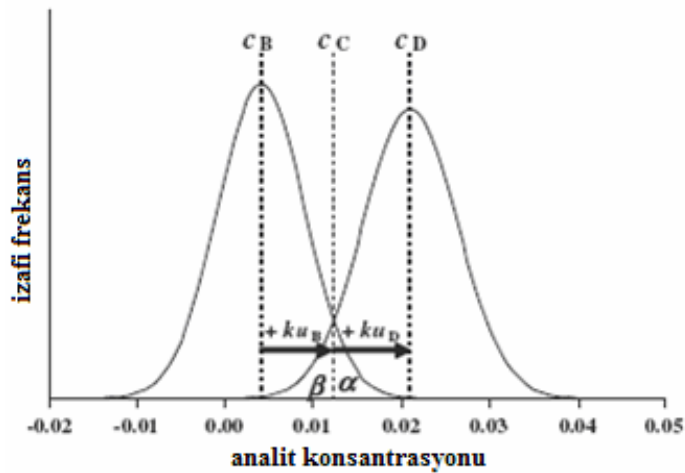
Tablo 2: 1.tip ve 2.tip hata (İnternet Ref. No: 11)

Alınan Karar	Null hipotezi doğru	Null hipotezi yanlış
Null Hipotezi Kabul Etme	Doğru karar	Tip 2 Hata(yanlış negatif)
Null Hipotezi Kabul Etmeme	Tip 1 Hata (yanlış pozitif)	Yorumsuz

Null hipotezi H_0 durumu : örnek analit içermemektedir. Alternatif hipotez H_1 durumu : örnek analit içermektedir, örnek pozitif miktarda analit içermektedir. Bir hipotez testi sırasında null

hipotezinin doğruluk/yanlışlık ve kabul/reddedilme durumlarına göre 2 tip hata yapılabilir.(1.tip ve 2.tip hata) Null hipotezi doğru iken reddedilirse Tip 1 hata(α) yanlış pozitif yanlış iken kabul edilirse Tip 2 hata (β) yanlış negatif yapılabilir. Eğer örnek analit içermiyorsa tip 1 hata, eğer örnek analit içeriyorsa tip 2 hata mümkündür.

1.2.6.5.1. $CC\alpha$ ve $CC\beta$



C_B : Matriks konsantrasyonu, C_D : Dedeksiyon limiti, C_C : Kritik konsantrasyon değeri

Şekil 8: Tahmini C_B ve C_D ile ilişkilendirilmiş normal olasılık dağılım fonksiyonları .

(Accred Qual Assur (2010))

Son yıllarda analitik yöntemlerin performansı ve sonuçların yorumlanmasıyla ilgili olarak iki istatistiksel limit hesaplanması önerilmektedir. $CC\alpha$ ve $CC\beta$ yanlış karar alınmasındaki istatistiksel riskin ve metodun değişkenliğinin dikkate alınmasındaki kritik konsantrasyonların değerlendirilmesine olanak vermektedir. Negatif (compliant) örneğin pozitif (non-compliant) olarak ifadesiyle yanlış pozitiflik değerlendirilmesinde (α -error) riski baz alınır. Pozitif (non-compliant) örneğin Negatif (compliant) örnek olarak ifadesiyle yanlış negatiflik değerlendirilmesinde (β -error) riski baz alınmaktadır. ISO standart no.11843'den elde edilen hesaplama özellikle lineer kalibrasyon için metodoloji uygulandığı zaman metodun tanımlama kapasitesinin değerlendirilmesinde rutin olarak uygulanır(Accred Qual Assur (2010))

Kimyasal ölçümlerde tanımlama yeteneğinin ölçümü olarak sık sık kullanılan tanımlama limiti, LOD, IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry, Uluslararası Temel

ve Uygulamalı Kimya Birliği) tarafından tanımlanmıştır. İlgili klavuzların geliştirilmesi sırasında ISO ve IUPAC çalışma grubu üyeleri işbirliğine rağmen son dökümanlar arasında farklılıklar bulunmaktadır. Çoğunlukla kimyasal literatürde kullanılan LOD, ISO kritik seviye C_C ile aynı ve LOQ, minimum tespit değeri C_D ile oldukça benzerdir.

1.2.6.6. Ölçüm Limiti (LOQ)

Ölçüm limiti; kabul edilebilir kesinlik(precision) ve gerçeklikle (trueness) ölçülen en düşük analit konsantrasyonudur. Çoğu kez LOD'nin 2.5-3 katı olarak hesaplanır.

1.2.6.7. Doğruluk (Accuracy)

Bir ölçüm yönteminin doğruluğunu tanımlamak için iki terim kullanılır : kesinlik (precision) ve trueness(gerçeklik)

1.2.6.8. Kesinlik (Precision)

Spesifik analiz koşulları altında elde edilen bağımsız analitik sonuçlar arasındaki uyumun derecesidir.Bu sonuçlar arasındaki değişimi;

- Analist;
- Ekipman ve ekipmanın kalibrasyonu;
- Çevre koşulları (sıcaklık, nem, hava kirliliği vb)
- Ölçümler arasında geçen zaman etkilemektedir.

Kesinlik yalnız tesadüfi hataların dağılımı ile ilişkilidir, gerçek değerle ilgisi yoktur. Bir yöntemin kesinliği, tekrarlanabilirlik (repeatability) ve yeniden yapılabilirlik (reproducibility) değerleri ile ifade edilir.

Tekrarlanabilirlik koşulları :Aynı yöntem, aynı test örneği, aynı lab., aynı analist, aynı ekipman, kısa zaman aralığı.

Yeniden yapılabilirlik koşulları :Aynı yöntem, aynı test örneği, farklı lab., farklı analist, farklı ekipman.

Kesinlik; standart sapma, rölatif standart sapma (RSD) veya güven aralığı olarak ifade edilebilir.

- Tek ölçümlerin standart sapması (s):

$$S = \sqrt{\frac{\sum(x_i - x_{\text{ort}})^2}{n-1}}$$

x_i : ölçüm sonucu
 i : 1,2,3.....n
 n : ölçüm sayısı

–Paralel ölçümlerin standart sapması (s):

$$S = \sqrt{\frac{\sum(a_i - b_i)^2}{2d}}$$

a_i : 1.ölçüm sonucu
 b_i : 2.ölçüm sonucu
 i : 1,2,3.....d
 d : par.ölçüm sayısı

Rölatif standart sapma:

$$\text{RSD}(\%) = (s/x_{\text{ort}}) * 100$$

Horwitz eşitliği :

$$\text{RSD}_R = 2^{(1-0.5 \log c)}$$

1.2.6.9.Gerçeklik (trueness)

Ölçüm (analiz) sonuçları ile, örnekteki gerçek analit miktarı arasındaki uyumun derecesidir.

Gerçeklik, sistematik hatanın bir göstergesidir.

Gerçeklik çalışmaları:

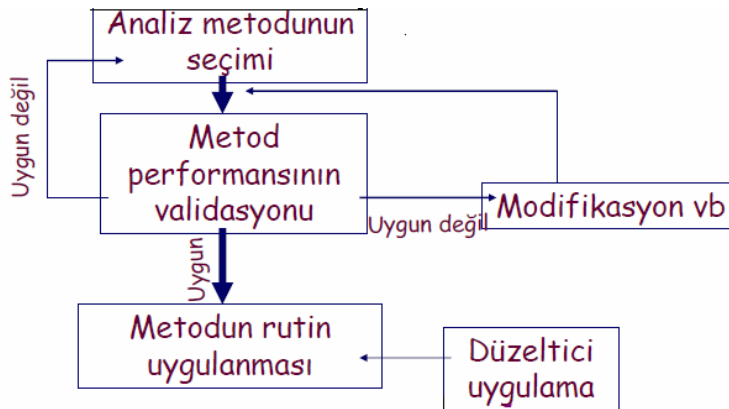
–Sertifikalı referans materyal (CRM) ile,

–Yeterlilik testi örneği ile,

–“spiked” örneklerle (geri alma-recovery testleri) yapılabilir.

Tablo 3 : Bir analitik yöntemin validasyonu/verifikasyonun hangi durumlarda ve nasıl yapılması gerektiğini gösteren tablo (İnternet Ref. No: 10)

Eksternal Validasyon Derecesi	Yapılması önerilen lab.-içi validasyon
Eksternal olarak valide edilmiş	Gerçeklik ve kesinliğin verifikasyonu
Eksternal olarak valide edilmiş, ancak yeni bir matrisde veya yeni cihaz/cihazlarla kullanılacak	Gerçeklik, kesinlik ve ihtiyaç duyulursa LoD
İyi geliştirilmiş, fakat test edilmemiş yöntem	Verifikasyon ve mümkünse daha genişletilmiş validasyon
Bilimsel bir literatürde yayınlanmış ve önemli metod performans karakteristikleri belirlenmiş yöntem	Verifikasyon ve mümkünse daha genişletilmiş validasyon
Bilimsel bir literatürde yayınlanmış ancak metod performans karakteristikleri belirlenmemiş yöntem	Tam validasyon
Internal olarak geliştirilmiş yöntem (in-house method)	Tam validasyon



Şekil 9 : Validasyon/verifikasyon çalışmalarının yeni bir yöntemin rutin kullanıma alınmadan önce yapılmasının gerekliliğini gösteren şema (İnternet Ref. No: 10)

1.3. Amaç

Bu durum, bilgi ve özellikler dikkate alınarak belirlenen tezimizin konusu olan Metilfenidat'ın tükürük ve idrar örneklerinde belirlenmesini sağlayacak metodun geçerli kılınmasıyla her iki örnek türünde de Metilfenidat'ın istismarının bulgularını destekleyen laboratuvar delillerinin doğru ve kesin bir biçimde elde edilmesi amaçlanmıştır. Dolayısıyla, tükürük ve idrar numunelerinde ritalin ve metabolitinin yüksek geri kazanımı için uygun bir ekstraksiyon tekniği belirlenmesi, metoda ait kalibrasyon eğrisi oluşturularak metodun LOD ve LOQ değerlerinin yanında doğrusal olduğu bölge ve tekrarlanabilirliğinin tespit edilmesi planlanmış, daha sonra metilfenidat içermeyen tükürüğe ve idrara metilfenidat spike edilerek oluşturulan deneme örnekleri ile gerçek örneği temsil eden örneklerde öncelikle metodun geçerliliği kanıtlandıktan sonra idrarda ve tükürükte metilfenidat veya metabolitinin miktar analizinin yapılması amaçlanmıştır.

II. METARYAL ve METOD

2.1. Kimyasallar

Ritalin® -methylphenidate HCl (novartis),
NaOH (Fluka),
Diklorometan (DCM)(Merck),
Fluram (Fluka),
Sodyum tetra borat (Fluka),
Potasyum iyodid (KI) (Fluka),
Ninhidrin (tri- Ketohydrindene hydrate) (Merck),
Dragendorffs Overspray (Merck),
Bismuth subnitrat (Sigma),
Bakır II klorit (Aldrich),
Heptafluorobutirik Anhidrit (Aldrich),
Piridin (Merck), Etil Asetat (Merck),
Ritalinik asit (sigma),
Metanol (Sigma),
Amonyak NH₃ (Merck),
Aseton (Merck)

2.2. Araç ve Gereçler

Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi: Camag

Sıvı Kromatografisi/Kütle Spektrometresi (LC/MSMS): 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 1 ml ve uçları

pH indikatör kağıdı: Universal indikatör MERCK

pH metre: Thermo

Etüv: Termal Laboratuvar Aletleri

Ultra Sonic Banyo: Bandelm Sonarex

2.3. Standart Çözeltinin Hazırlanması

10 mg ritalin ® havanda ezilip toz haline getirilmektedir. 10 ml metanol içinde çözündürülür, böylece 1 mg/ml standart çözelti elde edilmiş olur. 1500 ml vialler içersine belirlenen derişimlerde hazırlanmakta ve uygun Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi(YPİTK) koşullarında sisteme uygulanmaktadır.

Ritalin stok çözeltisi (1000µg /ml): 20 mg ritalin tartıldı, 20 ml hacme balon jodede metanol ile tamamlandı.

Ritalin test çözeltisi (750 µg/ml): Hazırlanan 1000µg /ml'lik stok çözeltisinden 7.5 ml alındı 10 ml hacme balon jodede metanol ile tamamlandı.

Ritalin test çözeltisi (500 µg/ml): Hazırlanan 1000µg /ml'lik stok çözeltisinden 5 ml alındı 10 ml hacme balon jodede metanol ile tamamlandı.

Ritalin test çözeltisi (250 µg/ml): Hazırlanan 1000µg /ml'lik stok çözeltisinden 2.5 ml alındı 10 ml hacme balon jodede metanol ile tamamlandı.

Ritalin test çözeltisi (100 µg/ml): Hazırlanan 1000µg /ml'lik stok çözeltisinden 1 ml alındı 10 ml hacme balon jodede metanol ile tamamlandı.

Ritalin test çözeltisi (50µg/ml): Hazırlanan 1000µg /ml'lik stok çözeltisinden 0.5 ml alındı 10 ml hacme balon jodede metanol ile tamamlandı.

Ritalin test çözeltisi (25 µg/ml): Hazırlanan 1000µg /ml'lik stok çözeltisinden 0.25 ml alındı 10 ml hacme balon jodede metanol ile tamamlandı.

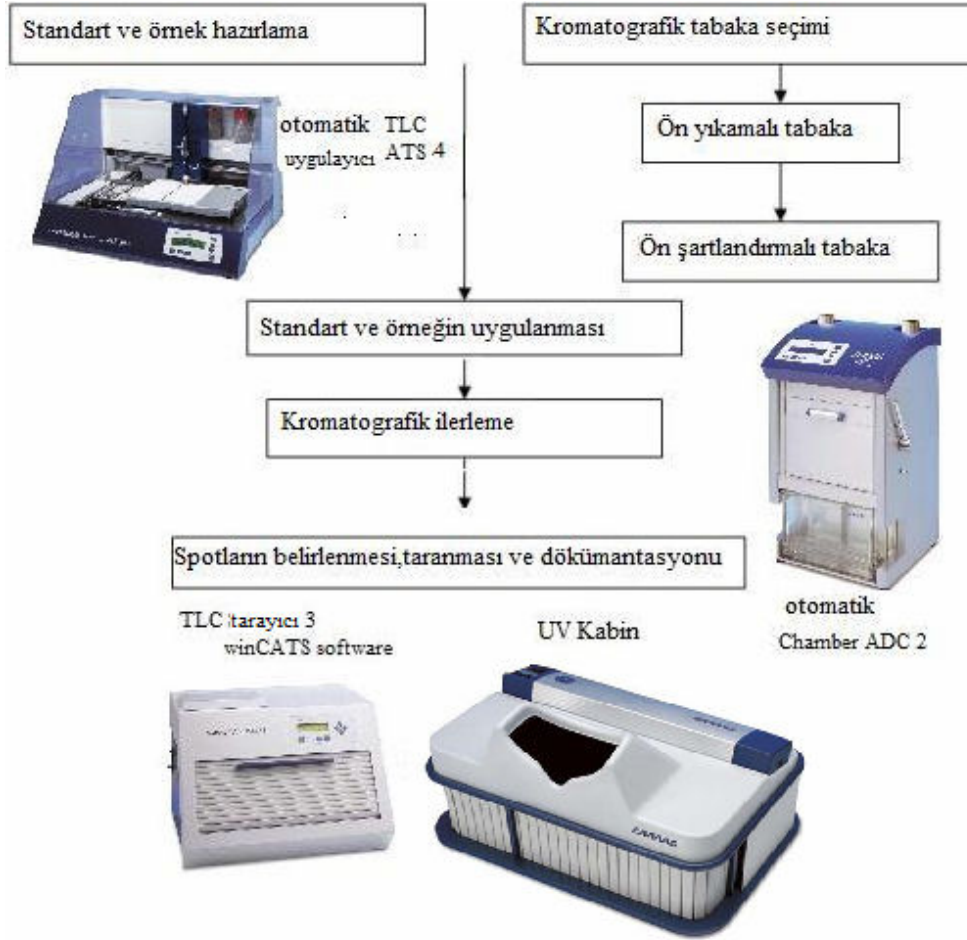
Ritalin test çözeltisi (100 µg/ml): Hazırlanan 1000µg /ml'lik stok çözeltisinden 0.10 ml alındı 10 ml hacme balon jodede metanol ile tamamlandı.

Stok çözeltileri, kalibrasyon eğrilerini hazırlamada ve geri kazanım çalışmalarında kullanıldı.

2.4. Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi Koşulları

1 mg/ml stok Ritalin® çözeltisi Wincats software 1.3.2 (Camag, Switzerland) kontrolündeki plakaya en az 36, en çok 72 numune tatbik edebilen, robotik bir şırınga sistemine sahip örnekleyici (ATS 4) yardımıyla numunelerin, belirlenen miktarda x-y düzleminde, uygun mesafelerde azot gazı altında, bant veya spot şeklinde uygulanmıştır. Bu yolla Plakalar üzerine hapsedilen numuneler ADC 2(Camag, Switzerland) yardımıyla yürütüldü. İzokratik tank ünitesi (ADC2), geleneksel İTK' deki kapalı bir tank sistemini temsil eder. Bu otomatik cihaz sayesinde tank içindeki sıcaklık, nem, kurutma ve saturasyon kontrolü sağlanmakta ve bu sayede bir validasyon parametresi olan tekrar edilebilirliğe olanak tanımaktadır. Bütün tayinlerde Pre-coated silica gel aluminium plates 60 F254 (20 · 10)(Merck, Darmstadt, Germany) plakaları kullanılmıştır. Daha sonra plaka, ayırımı gerçekleşen lekelerin densitometrik olarak değerlendirilmesi için üçüncü cihaz olan tarayıcı ünitesine (TLC Scanner3) uygun şekilde yerleştirilmiştir. Densitometri, plaka üzerindeki her bir lekeye gönderilen ışığın şiddetinden, yansıyan ışığın şiddeti çıkartılarak elde edilen spektrumdan bileşenin derişimine, miktarına ilişkin bilgi elde etmeyi sağlamaktadır.

Slit dimension(yarık aralığı) 4.0 mm-0,20 mm, tarama dalga boyu 200nm, tarama hızı 20mm/s ve veri toplama 100 □m/bsk olarak belirlenmiştir. D₂ ve W lambaları kullanılmış, Mobil faz diklorometan- aseton- amonyak (7:3:0.2 v/v) sistemi olarak belirlenmiştir. Her bir kromatografi için 10 ml mobil faz kullanılmış, mobil faz için saturasyon zamanı bağıl nemin 60 % ± 5 olduğu oda sıcaklığında (25 % C ± 2) 20 dk. olarak belirlenmiştir. Kromatografik plakalar yürütüldükten sonra 4dk kurutulmakta ve 200 nm de Wincats software 1.3.2 (Camag, Switzerland) kontrolündeki dansitometrik tarayıcı 3 yardımıyla taranmaktadır. Değerlendirme lineer regresyon ve pik alanları ölçülerek yapılmaktadır.



Şekil 10: Yüksek Basınçlı İnce Tabaka kromatografisi Prosedür şeması

2.5. Metod Validasyon Basamakları

Seçicilik (selectivity)

Mobil faz olarak sırasıyla etanol:amonyak(100:1.5),

etilasetat:metanol:amonyak (85:10:5),

toluen:aseton:etanol:amonyak(%25)(67:25:5:3),

etilasetat:metanol:amonyumhidroksit(90:7:3),

diklorometan:aseton(80:20) ve diklorometan:aseton:amonyak(7:3:0.2) sistemleri denenmiş en uygun yürütücü sistem olarak Diklorometan:Aseton:Amonyak (7:3:0.2) sistemi seçilmiştir.

1 mg/ml standart Ritalin® çözeltilisinin 200- 400 nm aralığındaki spektrum taraması yapılmıştır. Linearite her bir konsantrasyondan(100,250,500,750,1000 ng) üçer kez TLC plakasına uygulanarak hesaplandı. Pik alanı ve konsantrasyon parametreleriyle kalibrasyon eğrisi ve correlation coefficient hesaplanmış, standart Ritalin® kromatogramı Şekil 12’te gösterilmiştir.

Doğrusallık/ölçüm aralığı (linearite/workingrange)

Ölçüm aralığı; yöntemin kesinlik, gerçeklik gibi kriterleri kabul edilebilir düzeylerde karşılayabildiği analit konsantrasyonu aralığıdır. Ölçüm aralığının alt sınırı ölçüm limiti (LoQ) dir. Lineer aralığımız 100-1000 ng/ml, LoQ Değerimiz 225 ng/spot olarak bulunmuştur.

Tanımlama limiti (limit of detection-LoD)

Tespit limiti; analitin, bir “boş” örnektekinden istatistiksel olarak önemli ölçüde farklı olan en düşük konsantrasyon düzeyidir. Analiti düşük düzeyde farklı konsantrasyonlarda içeren örneklerle oluşturulan kalibrasyon denklemi ile LoD hesaplaması yapılmıştır. Çalışmamızda tanımlama limiti hesaplama yöntemlerinden 3. yöntem kullanılmıştır.

Ölçüm Limiti (LOQ)

Ölçüm limiti; kabul edilebilir kesinlik(precision) ve gerçeklikle (trueness) ölçülen en düşük analit konsantrasyonudur. Çalışmamızda LOD’nin 3 katı olarak hesaplanmıştır.

Doğruluk (Accuracy)

Bir ölçüm yönteminin doğruluğunu tanımlamak için iki terim kullanılır : kesinlik (precision) ve trueness(gerçeklik)

Kesinlik (Precision)

Tekrarlanabilirlik koşulları :Aynı yöntem, aynı test örneğiyle aynı lab.da, aynı analist ve aynı ekipmanla aynı gün içinde yapılmıştır.

Çalışmamızda kesinlik; rölatif standart sapma (RSD) olarak ifade edilmiştir.

Gerçeklik (trueness)

Ölçüm (analiz) sonuçları ile, örnekteki gerçek analit miktarı arasındaki uyumun derecesidir. Gerçeklik çalışmaları madde içermeyen numuneye madde ilavesiyle oluşturulan örneklerle (geri alma-recovery testleri) yapılmıştır.

2.6. Ekstraksiyon

Bulgusu aranan maddelerin biyolojik materyalden izolasyonları için Sıvı sıvı ekstraksiyon (SSE) tekniği uygulanmıştır.

Sıvı sıvı ekstraksiyon (SSE) yöntemi:

İdrar ve tükürük numunelerindeki maddelerin analizleri için uygulanan bu yöntem önce seçilen ritalin® standartlarının boş idrar ve tükürük örneklerine ilave edilerek yapılmıştır.

- 1'er ml idrar ve tükürük numunelerinin içersine eşit hacim çeşitli derişimlerde Ritalin® ilave edilerek pH-10-12'a 0.1 N NaOH ile ayarlandı.
- Numune üzerine 2 ml diklorometan ilave edildi.
- 2 dakika vortekslendi.
- Daha sonra numune 3500 rpm'de 2 dk. santrifüjlendi.
- Santrifüjlenen numune 40⁰C'de N₂ gazı ile çeker ocak altında kuruluğa kadar uçuruldu.

Kalan kısım 1 ml metanol ile çözülerek Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi (YPİTK) cihazı viallerine koyulup analize hazır hale getirildi.

LC-MSMS Çalışma Koşulları

Metil fenidat'ın nitel olarak teyidini yapmak üzere kullanılan **LC-MSMS yönteminde** cihaza ait optimize edilmiş analiz koşulları aşağıdaki şekilde verilmiştir.

Dedektör: 1300V

CID Gas Pressure: 2.40m Torr

ESI needle voltage (+): 5000.00 Volt

ESI shield voltage (+): 600.00 Volt

Drying gas temperature:300.00°C

API housing temperature: 65.00 °C

Nebulizer gas pressure: 55.00 PSI

Drying gas pressure: 35.00 PSI

Kolon Fırın Sıcaklığı: 30 °C

Pompa programı:

<u>Zaman</u>	<u>% A</u>	<u>% B</u>	<u>Akış</u>
0.00	50.0	50.0	0.300 (mL/dak)
10.00	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>Capiller</u>	<u>Coll.E.</u>	<u>Dwell Time</u>
Ritalinik asit	220	84	40.0V	15.0V	0.20

Taşıyıcı gaz : Azot

Elde edilen LC MS/MS Ritalinik asit (220 - 84) piki şekil 16'da verilmiştir.

III. BULGULAR

İ.Ü.Adli Tıp Enstitüsü Adli Toksikoloji Labotaruvarı'nda gerçekleştirilen bu çalışma, Ritalin® 'in Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi(YPİTK) ile UV spektrumunun alınması, Ritalin®'e ait kalibrasyon çözeltilerinden oluşan toplu kromatogramlarının gösterimi ve bu kromatogramların yorumlanarak Ritalin®'e ait kalibrasyon grafiğinin elde edilmesiyle gerçekleştirildi.

Çalışmanın aşamaları aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir.

- Uygun mobil faz elde etme çalışmaları
- Ritalin® 'in Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi(YPİTK) ile UV spektrumunun alınması
- Kalibrasyon grafiğinin çizilmesi
- LOD ve LQD değerlerinin belirlenmesi
- Geri kazanım

Uygun Mobil Faz Eldesi:

Sırasıyla etanol:amonyak(100:1.5), etilasetat:metanol:amonyak (85:10:5), toluen:aseton:etanol:amonyak(%25)(67:25:5:3),etilasetat:metanol:amonyumhidroksit(90:7:3), diklorometan:aseton(80:20) ve diklorometan:aseton:amonyak(7:3:0.2) istemleri denenmiş en uygun yürütücü sistem olarak Diklorometan:Aseton:Amonyak (7:3:0.2) sistemi seçilmiştir.

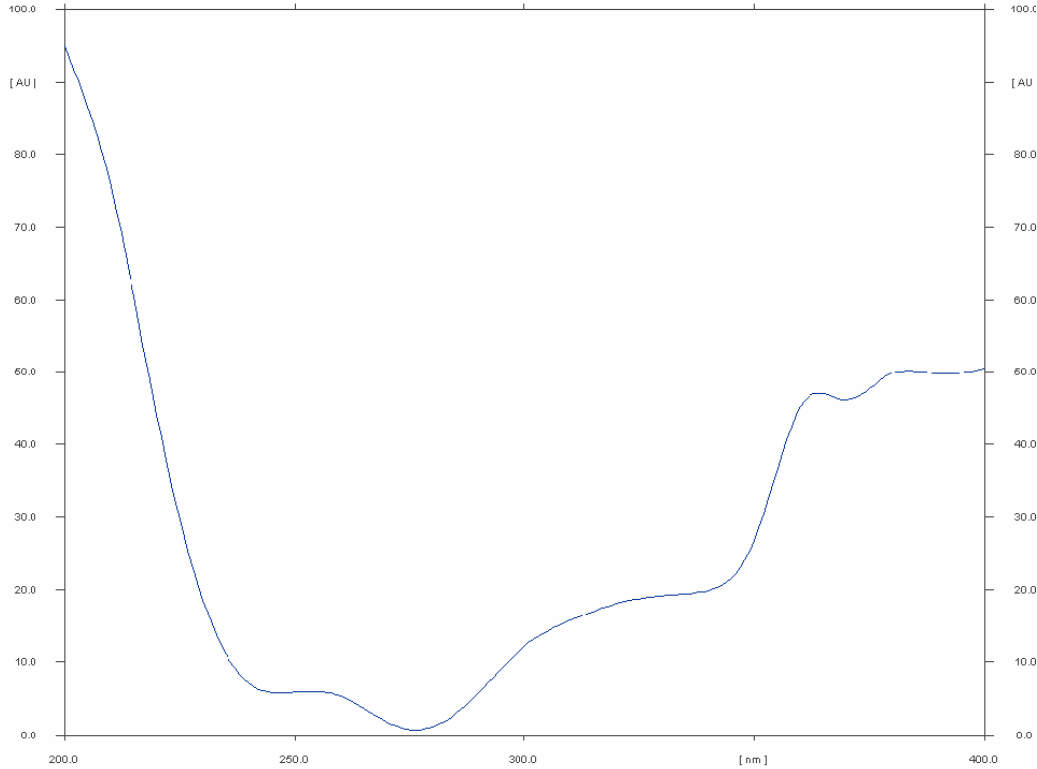
Ritalin® 'in Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi (YPİTK) ile UV Spektrumu:

1 mg/ml standart Ritalin® çözeltisin 200- 400 nm aralığında spektrumunun görüntülenmiştir. Birinci absorpsiyon 200 nm (max) ikinci absorpsiyon 254 nm de belirlenmiştir.

Kalibrasyon Eğrisi:

100-1000 ng/spot derişim aralığındaki doğrusallığı $r^2 = 0.99931$ olarak bulundu. Linearite her bir derişimden(100,250,500,750,1000 ng) üçer kez TLC plakasına uygulanarak hesaplandı. Pik alanı ve derişim parametreleriyle kalibrasyon eğrisi ve correlation coefficient hesaplandı.

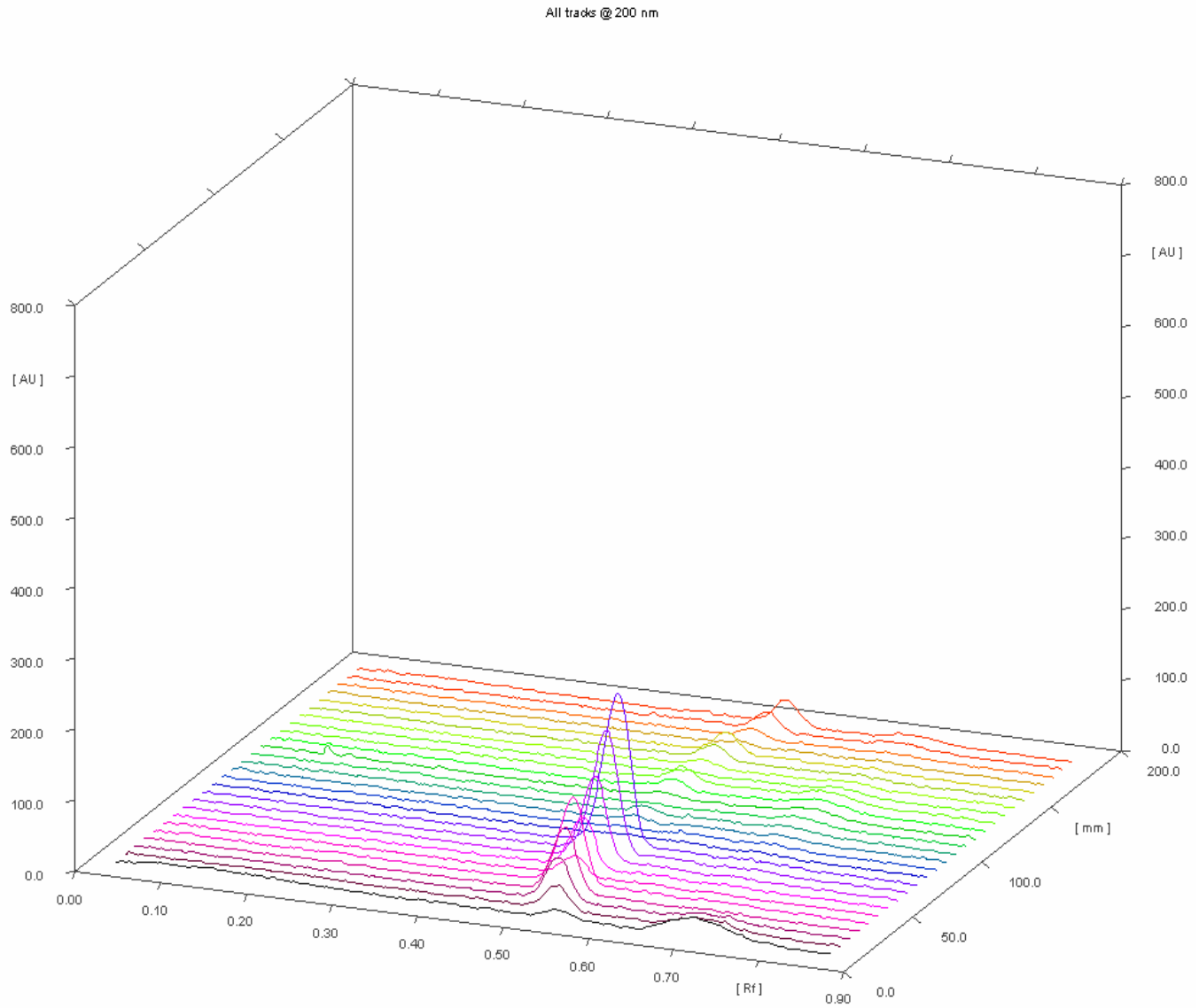
RSD %0.06 olarak bulundu. Metod validasyon parametreleri Tablo 4'te gösterildi. Standart Ritalin® kromatogramı Şekil 12'te gösterildi.



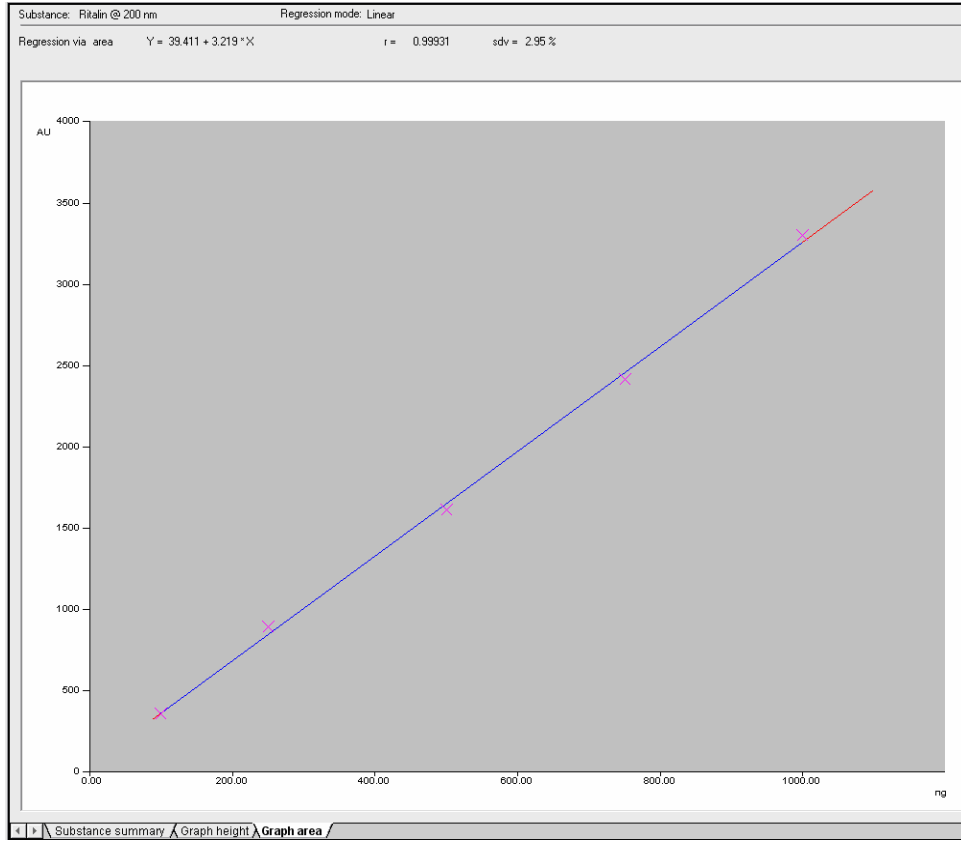
Şekil 11 : Ritalinin UV spektrumu

Tablo 4:Ritalin® tayini için TLC densitometrik methodun geçerli kılınması

Validation parametreleri	Sonuçlar
Linearite aralığı (ng /spot)	100–1000
Korelasyon katsayısı (r2)	0.99931
Kalibrasyon denklemi	$Y = 3.219 X + 39.411$
RSD Rölatif Standart sapma (%)	0.06
LOD (ng/ spot) (dedeksiyon limiti)	75
LOQ (ng/ spot) (ölçüm limiti)	225
Tükruk geri kazanım	% 93
İdrarda geri kazanım	% 75
X: Pik alanı, Y:derişim (ng/spot)	



Şekil 12: Ritaline ait kalibrasyon çözeltilerinden oluşan toplu kromtaogramlarının gösterimi
(Kalibrasyon Çözeltileri sırasıyla 100, 250,500,750,1000 ng/spot) Rf:0.52



Şekil 13 :Ritalinin elde edilen sistemde doğrusal aralığını gösteren kalibrasyon grafiği (100-1000 ng/spot)

Kesinlik: örnek uygulama ve pik alanlarının ölçüm tekrarlanabilirliği için % RSD 0.06 idi.

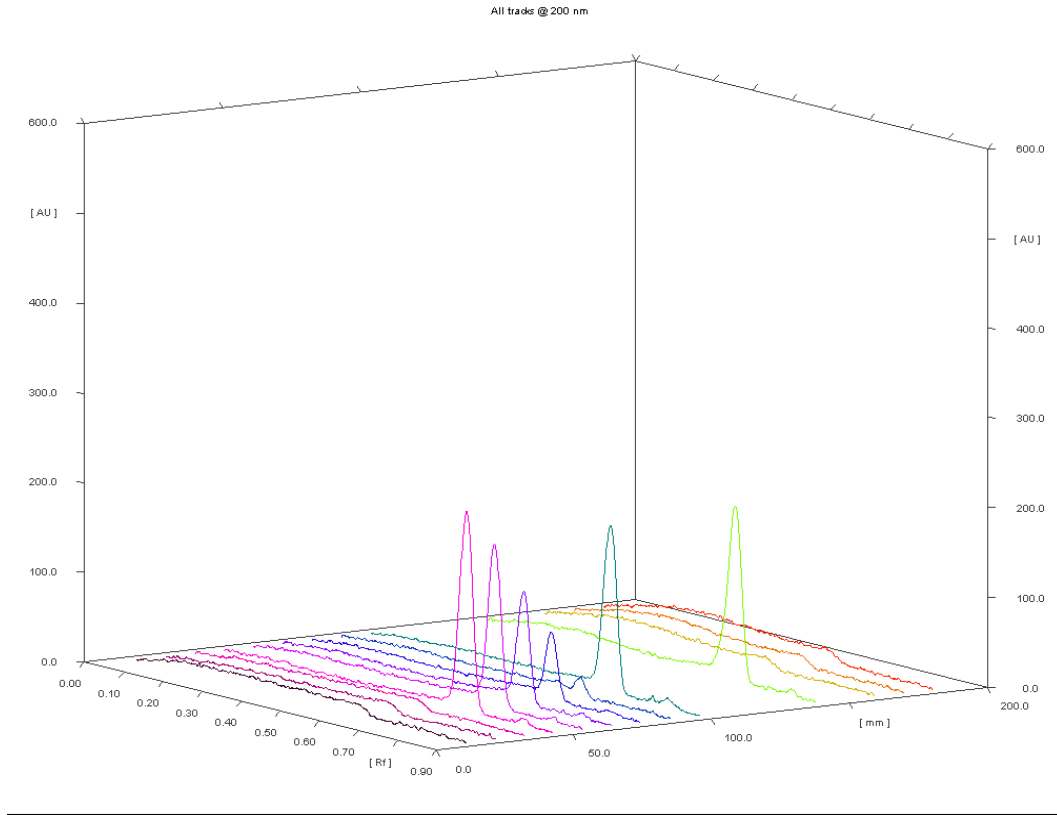
farklı derişimlerde pik alanın ölçülmesi sonucu RSD değerinin düşük değeri (<1%) öngörülen metod kesinliğinin mükemmelliğini göstermektedir.

LOD ve LOQ :

Farklı derişimlerde (10,25,50,100 ng/spot) hazırlanan standart çözeltilerden TLC plak üzerine farklı hacimlerde ekimler yapıldı. Elde edilen Kalibrasyon grafiği yardımıyla ölçülebilir en küçük değer olan LOD (ng/ spot) değeri 75 ng/spot,LQD (ng/spot) değeri 225 (ng/spot) olarak belirlenmiştir.

Geri Kazanım (recovery): Uygun matrislere spike edilen örneklerin ölçümü için

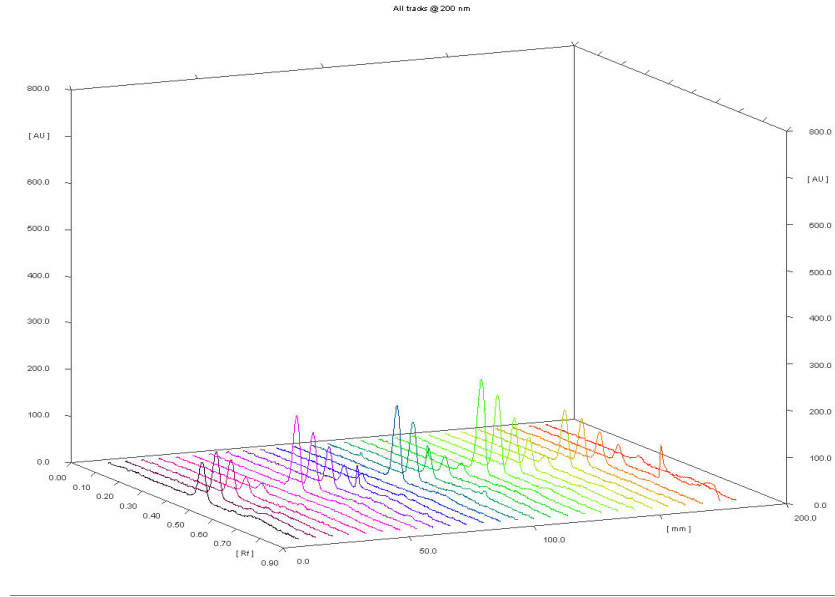
önerilen yöntemin kullanılması ile elde edilen ortalama geri kazanımlar idrar ve tükürükte sırasıyla %75 ve % 93 tür



Şekil 14: Tükürük geri kazanım kromatogramı (1000ng/spot)

Tablo 5 : tükürük geri kazanım veri tablosu

Tükürük geri kazanımı (1000ng/spot) height x (calc)	1	2	3	4	5	standart
% 93	5778,91	6445,7	5879,2	6325	6292,35	6544



Şekil 15: İdrarda geri kazanım (1000-750-500-250-100ng/spot

Tablo 6 : İdrar geri kazanım veri tablosu

İdrar geri kazanım % 75	1	2	3	4	5	standart
İdrar geri kazanım (1000ng/ml) height x (calc)	4036.52	4042.01	4035.03	4041.09	4036.42	5533,22
İdrar geri kazanım (750ng/ml) height x (calc)	2921.3	2881.20	2958.16	2920.2	2883.21	3883
İdrar geri kazanım 500ng/ml) height x (calc)	1960.58	1963.36	1422.69	1962.10	1961.63	2472,1
İdrar geri kazanım 250ng/ml) height x (calc)	854.02	899.45	967.41	899.25	855.55	5967,57
İdrar geri kazanım 100ng/ml) height x (calc)	404.9	398.69	488.78	405.01	397.01	558,5

spot)

spot)

Chromatogram Plot

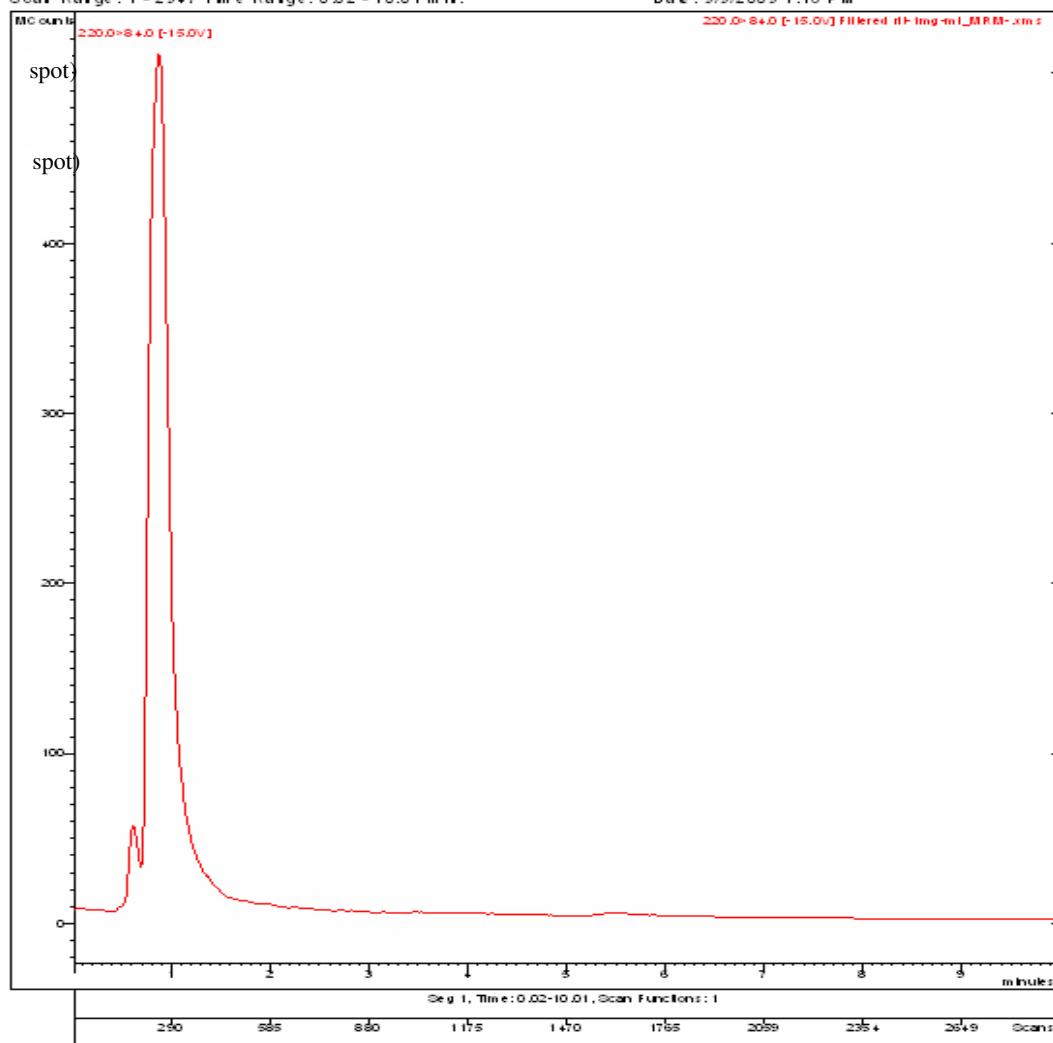
File: d:\dmg method\ritalinik asit\rit-1mg-m_Lm_m-.xms

S: spot) rit-1mg-m_LMRM-

Scan Range: 1 - 2947 Time Range: 0.02 - 10.01 min.

Operator:

Date: 9/9/2009 1:18 P M



Şekil 16: LC MS/MS Ritalinik asit pik

IV. TARTIŞMA ve SONUÇ

Kötüye kullanılan veya kullanılma ihtimali olan maddelerin analizi sonucunda verilen analiz sonucu ve raporu bir laboratuvar delili niteliğinde olduğundan, bu sınıftaki tüm maddelerin analiz metodunun veya metotlarının performansının istatistiksel olarak değerlendirilmesi en temel adımdır. Ritalin bu sınıftan bir madde olduğundan araştırmalarında kullanılan bütün metotlar gerçek örnek analizine başlamadan önce mutlaka geçerli kılınmalı ve performans kriterleri tayin edilmelidir. Bu adımlar analiz süresince ortaya çıkabilecek problemler ve şüpheler için bir sigortadır. Validasyonla ortaya çıkan sorunlar en az düzeye indirilebilir. Bir laboratuvar istenilen limitlere göre çok hassas bir metot geliştirse bile bu düzenli aralıklarla kullanım süresince yeniden geçerli kılınmalıdır.

Geliştirdiğimiz metodumuzun doğrusal aralığı 100-1000 ng/spot'dir. Ritalin®'in uyguladığımız YPİTK de Rf değeri 0.52 olarak bulunmuştur. Tekrarlan 4 analiz bulgusunda Rf değeri 0.53-0.52-0.52-0.52 şeklindedir. Elde edilen Ritalin® spektrumlarımız (Şekil 11) deki gibidir. Bu spektrumların tekrarlanan analizlerdeki spektrumlarının aynı verilere sahip olması yani 200, 254, 315 ve 360 nm lerde en yüksek absorbans λ_{max} göstermesi ve bu dalga boylarında elde edilen kalibrasyon eğrimizin elde edildiği düşünüldüğünde önümüze gelen numunenin $Y = 3.219 X + 39.411$ denklemine sahip kalibrasyon grafiği yardımıyla Ritalin® nitel ve nicel analiziyle sağlam delil elde edilmesinde yardımcı olacaktır.

Levine B. ve ark. (1986) çalışmasında Metilfenidatın aşırı doz İntravenöz enjeksiyonu sonucu ölümle sonuçlanan kazada Postmortem doku konsantrasyonları: kan 2.8 mg/L, safra 5.7 mg/L, böbrek 3.0 µg/g, karaciğer 2.1 µg/g, mide içeriği 1.6 mg (total) şeklindedir. B. Schubert çalışmasında elde ettiğimiz bilgilere göre uyuklama ya da hiperaktivite belirtileri gösteren tutuklanan 6 sürücünün metilfenidat idrar konsantrasyonlarının 0.8 ile 40 mg/L (ort.16) arasında olduğu bildirilmiştir (İnternet Ref. No:8) .

Dugal ve ark.(1978) yaptığı çalışmada İdrar numunelerinde Gaz kromatografisi kullanımında metilfenidat için tanımlama limiti LOD 30 µg/L , Vu-Duc T. ve Vernay A.,(1992) birlikte yürüttüğü çalışmada gaz kromatografisi kullanımında ritalinik asit için tanımlama limiti LOD 50 µg/L olarak ifade edilmiştir.

Milberg R. M. ve ark.(1994) gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi ile yürüttüğü çalışmada metilfenidat ve ritalinik asit için yaklaşık tanımlama limit değerleri 2 µg/L ve 60 µg/L olarak bildirilmektedir.

Yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi ile yaptığımız çalışmada tanımlama limiti LOD 75 ng/spot ve hesaplama limiti 225 ng/spot olarak bulunmuştur. Bu bulgular tabakaya bir tek uygulama ile elde edilmiştir. Uygulamaların üst üste tekrarlanmasıyla bu limitlerin çok daha altına inileceği anlaşılmıştır. İdrar ve tükürük örneklerinin geri kazanımlarındaki %75 ve % 93 lük başarı ile geliştirdiğimiz yöntem sayesinde günümüzde artmakta olan Ritalin® suistimali vakalarının aydınlatılmasında bize ışık tutması beklenmektedir. Rölatif Standart sapmasının (% RSD) düşük olması, gün içi değişimlerde sapmanın büyük değişiklikler göstermemesi, metodun güvenilirliğini ortaya koymaktadır.

Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi (YPİTK) sistemleri için oluşturulan ve geçerli kılınan metot; Uyuşturucu-uyarıcı madde analizleri ile uğraşan herhangi bir laboratuarda genel bir tarama testi olarak kullanılabilir, bunun yanı sıra metilfenidat ve metabolitlerini ihtiva eden numuneler için nicel çalışmada da kullanılabilir. Metot, türevlendirme ve çekitleme gibi bir ön hazırlık istemediğinden uygulanma maliyeti düşük olacak ve zamandan kazandıracaktır.

Adli Tıp Kurumu'ndan alınan izinler çerçevesinde yapılan arşiv taramalarında son 10 yıl içerisinde Adli Tıp Kurumu'nda Metilfenidatla ilgili bir rapora rastlanmamıştır. Fakat amfetamin kullanımı ile ilgili genelleme yapılarak pek çok raporun verilmiş olduğu gözlemlendi. Son yıllarda artan metilfenidat'ın kötüye kullanımıyla ilgili gelişen vakaların ve bu vakaların artışının Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi (YPİTK) ile geliştirdiğimiz metod gibi bir metodun daha önce kullanılmamasından kaynaklı bir amfetamin genellemesiyle gözden kaçabilmiş olabileceği düşünülmektedir.

V.ÖZET

Son yıllarda metilfenidat üretimi artmış bulunmaktadır ve bunun % 90'ı A.B.D. de tüketilmektedir. İlacın elde edilebilirliğinin artması kötüye kullanımı korkusunu da arttırmaktadır; daha çok gençler Ritalin'i ezerek burundan üflemede ve reçete edilen ilacın tek tableti 5 \$'a satılmaktadır. Son yıllarda acil servise gelen metilfenidat'ın kötüye kullanımı ile ilgili olgular da gözönüne alındığında, dikkatleri bu konuya çevirebilmek için “metilfenidat'ın kötüye kullanımında idrar ve tükürükte belirlenmesi” konulu çalışma yapılmıştır.

Bu nedenle metilfenidatın analizi için yeni, basit, duyarlı, doğru ve kesin yüksek performanslı ince tabaka kromatografik metodu geliştirildi ve valide edildi. Optimizasyon çalışmaları İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü Toksikoloji Laboratuvarında 5 basamakta gerçekleştirildi. Bu çalışmada validasyon çalışmaları için incelenmekte olan parametreler : yürütme oda sıcaklığında 2 bölmeli cam kabin içinde, mobil faz olarak Diklorometan:Aseton:Amonyak (7:3:0.2) (v/v) kullanılarak gerçekleştirildi. Metilfenidat için Rf değeri ($R_f 0.52 \pm 0.02$) olarak elde edildi. Tarama 200 nm absorbansta gerçekleştirildi. Kalibrasyon eğrisinin doğrusal regresyon analizi 100–1000 ng/ ml konsatrasyon aralığında pik alanları arasındaki iyi doğrusallık ilişkisi ($r^2 = 0.99931$) olarak gösterildi. Metod kesinlik, geri kazanım, spesifiklik, tanımlama ve ölçüm limitleri için valide edildi. Tanımlama ve ölçüm limitleri sırasıyla 75 ve 225 ng/spot' dir. İdrar ve tükürükteki geri kazanım % 75 ve % 93 bulundu.

VI.SUMMARY

At last recent years the production of ritalin is increased and 90 % of these are consumed in U.S.A. The easy purchase of the drug increase the fear of abuse mostly the young people crush ritalin snorting and the one tablet of prescribed drug is sold for 5 dollars lastly. At the last recent years the cases consulted of abuse of ritalin to the emergency room in Turkey is taken into account for call attention to this issue the subject investigation of methylphenidate abuse in urine and saliva is done as thesis .

Therefore a new, simple, sensitive, accurate and precise high-performance thin-layer chromatographic method for quantification of methylphenidate was developed and validated. Optimization studies take form 5 steps at Toxicology Laboratory of Forensic Science Institute, İstanbul University. In this study, the following parameters were taken under consideration for validation studies : linear ascending development with Diklorometan:Aseton:Amonyak (7:3:0.2) (v/v) as the mobile phase was performed at room temperature ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$) in a twin-trough glass chamber. Compact bands ($R_f 0.52 \pm 0.02$) were obtained for methylphenidate . Scanning was performed in absorbance mode at 200 nm. Linear regression analysis of the calibration plots showed good linear relationship between peak area ($r^2 = 0.99931$) in the concentration range 100–1000 ng/ spot. The method was validated for precision, recovery, robustness, specificity, and detection and quantification limits. The limits of detection and quantification were 75 and 225 ng/spot ,respectively. The average urine and saliva recovery of the method was 75 % and 93 %.

VI. KAYNAKLAR

Angold A, Erkanlı A, Egger HL, Costello EJ (2000) Stimulan Treatment for children:community perspective. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, Aug 39(8): 975-984

Barkley R.A. (1996). "Attention deficit/hiperaktivite disorder", içinde *Child Psychopathology*, Mash E.J. ve Barkley R.A. (der.), Guilford Press, New York. Weiss G. ve Hechtman L. (1993), *Hyperactive Children Grown Up*, Guilford Press, New York

Barkley, R. A., Fischer, M., Smallish, L., & Fletcher, K. (2004). Young adult follow-up of hyperactive children: Antisocial activities and drug use. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, 45, 195-211.

Barkley, R. A. (2003). Issues in the diagnosis of attention-deficit/hyperactivity disorder in children. *Brain & Development*, 25, 77-83.

Baykara A, Miral S, Boztok A (1992) Çocuk psikiyatrisinde ilaç kullanımı. *izmir Devlet Hastanesi Tıp Dergisi*, 3:449-454.

Biederman J, Wilens T, Mick E ve ark. (1999) Pharmacotherapy of attention-deficit/hyperactivity disorder reduces risk for substance use disorder. *Pediatrics*, 104(2):20.

Biederman J, Faraone SV. Attention-deficit hyperactivity disorder. *Lancet* 2005; 366:237-248.

Bradley C: The behavior of children receiving benzedrine. *Am J Psychiatry* 1937; 94:577-585

Bush G, Valera EM, Seidman LJ ve ark. (2005) Functional neuroimaging of attention deficit hyperactivity disorder: a review and suggested future directions. *Biol Psychiatry*, 57:1273-1284.

Bussing R, Zima BT, Mason D ve ark. (2005) Use and persistence of pharmacotherapy

for elementary school students with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *J Child Adolesc Psychopharmacol*, 15(1):78-87.

Doyle R: The history of adult attention-deficit hyperactivity disorder *Psychiatry Clin. N. Am* 27:203-214 , 2004

Edeleanu L. "Über einige Derivate der Phenylmethacrylsäure und der Phenylisobuttersäure". *Ber Deutsch Chem Ges.* 1887;Vol 20:616

Ellenhorn MJ, Schonwald S, Ordog G, Wasserberger J (1997) : *Ellenhorn's Medical Toxicology:Diagnosis and Treatment of Human Poisoning*, 2nd ed., Williams & Wilkins, Maryland, pp 3-65, 1997

Faraone SV, Sergeant J, Gillberg C ve ark. (2003) The worldwide prevalence of ADHD: It is an American condition? *World Psychiatry*, 2: 104-113

Faraone SV, Biederman J. What is the prevalence of adult ADHD? Results of a population screen of 966 adults. *J Atten Disord* 2005; 9:384-391.

Fischer, M., Barkley, R. A., Smallish, L., & Fletcher, K. (2004). Hyperactive children as young adults: Deficits in inhibition, attention, and response perseveration and their relationship to severity of childhood and current ADHD and conduct disorder. *Developmental Neuropsychology*, 27, 107-133.

Flanagan JR, Braitwaite RA, Brown SS, Widdop B, Wolff de FA (1995) *Basic Analytical Toxicology*, World Health Organization, Geneva, 1995

Goldman LS, Genel M, Bezman RJ ve ark. (1998) Diagnosis and treatment of attention - deficit / hyperactivity disorder in children and adolescents *JAMA*, 279(14):1100- 1107.

Hoagwood K, Kelleher KJ, Feil M ve ark. (2000) Treatment services for children with ADHD; A national perspective. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 39(2):198-206.

Huther G (2002) Hiperaaktif çocukların sorunları ön beyinde gizli (Çeviren: Dede N) *Cumhuriyet Bilim Teknik* (25.05.2002) 792:2.

Jensen PS, Kettle L, Roper MT ve ark. (1999a) Are stimulants overprescribed ?

Treatment of ADHD in four US communities, *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*,
38(7):797-804.

Jensen PS, Bhatara VS, Vitiello B ve ark. (1999b) Psychoactive medication prescribing practices for US children: Gaps between research and clinical practice. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 38(5):557-565

Kaplan A (1999) Medication prescribing practices for children and research needs. *Psychiatric Times*, Sep, Vol XVI, Issue 9.

K L Friedman, J D Diller, B M Ferguson, et al. Access the most recent version at
doi:10.1101/gad.10.13.1595 *Genes Dev.* 1996 10: 1595-1607

Klein-Schwartz W, McGrath J (2003) Poison Centers' experience with methylphenidate abuse in pre-teens and adolescents. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 42(3):288-294.

Kimko H.C.¹; Cross J.T.¹; Abernethy D.R.² Volume 37, Number 6, December 1999 , pp. 457-470(14)

Lambert NM, Hartsough CS (1998) Proppective study of tobacco smoking and substance dependencies among samples of ADHD and non-ADHD partipicants. *J Learn Disabil*, 31(6):533-544.

Levine et al.(1986) Fatality resulting from methylphenidate overdose. *J.Anal.Tox.*10:5 september pp.209-210

Macherey-Nagel. Sample Preparation, Solid Phase Extraction. In: Macherey-Nagel
Catalogue 2004:184-241.

Marcovitch H (2004) Use of stimulants for attention deficit hyperactivity disorder:
Against. *BMJ*,329:908-909.

Marwick C (2003) US doctor warns of misuse of prescribed stimulants *BMJ*, 326:67.

Milberg R. M. *et al.*, *Biomed. Mass Spectrom.*, 1975, **2**, 2–8. In urine: methylphenidate and ritalinic acid—A. Solans *et al.*, *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.*, 1994, **658**, 380–384

Minde K (1998) The use of psychotropic medications in preschoolers: Some recent developments. *Can J Psychiatry*, 43:571-575.

Moffat AD., Jackson JV, Moss MS, Widdop B (1986) Clarke's Isolation and Identification of Drugs, 2nd ed., Pharmaceutical Press London, pp 10-12, 1986

NIH (National Institutes of Health) (2000) Consensus Development Conference Statement: Diagnosis and Treatment of Attention - Deficit / Hyperactivity Disorder (ADHD) (special communication) *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 39(2):182-193.

Nora D. Volkow; Wei Zhu; Christoph A. Felder; Klaus Mueller; Tomihisa F. Welsh; Gene J. Wang; Mony J. de Leon. *Changes in brain functional homogeneity in subjects Alzheimer's disease Psychiatry Research* **114**(1):39-50, 2002.

Olfson M, Marcus S, Weissman M *et al.* (2002) National trends in the use of psychotropic medications by children. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 41(5):514-521.

Perring C (1997) Medicating children: The case of ritalin. *Bioethics*, 11(3&4):228-40.

Polanczyk G, Rohde LA. Epidemiology of attention-deficit/hyperactivity disorder across the life span. *Curr Opin Psychiatry* 2007; 20:386- 392.

Poulin C (2001) Medical and nonmedical stimulant use among adolescents: from sanctioned to unsanctioned use. *CMAJ* 165(8):1039-1044.

Rasmussen N (July 2006). "Making the first antidepressant: amphetamine in American medicine, 1929–1950". *J Hist Med Allied Sci* **61** (3): 288–323.

Reduced Solvent Volume Extraction Columns, United Chemical Technologies Inc, USA, pp 1-26, 1999.

Ronald E. (2002) Majors: New Chromatography Columns and Accessories at the 2002 Pittsburgh Conference, Part II. LCGC North America, 20(4): 332-44

Rozman KK, Klaassen CD.(2001) Absorption, Distribution, And Excretion Of Toxicants, In Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons 6th edition , (Ed) , Klaassen CD, McGraw-Hill Medical Publishing Division, New York , pp 107-132

Santosh PJ, Taylor E (2000) Stimulant drugs. Eur Child Adolesc Psychiatry, 9:27-43.

Safer DJ, Krager JM (1988) A survey of medication treatment for hyperactive/inattentive students. JAMA, 260:2256-2258.

Sawyer MG, Rey JM, Graetz BW ve ark. (2002) Use of medication by young people with attention-deficit/hyperactivity disorder. MJA, 177(1):21-25.

Schirm E, Tobi H, Zito JM ve ark. (2001) Psychotropic medication in children: A study from the Netherlands. Pediatrics, 108(2):25.

Soldin S. J. *et al.* (1979) *Clin. Chem.*,1979, **25**, 401–404.

Söylemezoğlu T, Çeçen ŞŞ (2003): Katı Faz Ekstraksiyon Yöntemi Ve Analitik Toksikolojide Uygulanması, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 2003: 1-15

Still GF (1902) Some abnormal psychical conditions in children Lancet 1: 1008-12, 1077-82, 1163-68

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.

Warner LA, Pottick KJ, Mukherjee A (2004) Use of psychotropic medications by youths with psychiatric diagnosis in the U.S. Mental Health System. *Psychiatr Serv*, 55(3):309-311.

Weiss M, Weiss G (2002) Attention deficit disorder. *Child and Adolescent Psychiatry-A Comprehensive Textbook*, 3. Baskı, M Lewis (Ed), Lippincott Williams & Wilkins, USA, s.645-669.

Wilens TE, Faraone SV, Biederman J ve ark. (2003) Does stimulant therapy of Attention - Deficit Hyperactivity Disorder beget later substance abuse? A Meta - analytic review of the literature. *Pediatrics*, 111:179-185.

Wiseman B (1999) Ritalin Kids: Prescription Drug and Murder. <http://www.oikos.org/ritalinkids.htm> (11.08.2003).

Vastag B (2001) Pay attention: Ritalin acts much like cocaine. *JAMA*, 286(8):905-906.

Vu-Duc T. and Vernay A.(1992) *J. Pharm. Biomed. Anal.*,1992, **10**, 187–191.

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

Referans Alınan İnternet Siteleri

1. <http://www.yankiyazgan.com/admin/articlefiles/presentation/antipsikotikler> (29/01/2009)
2. <http://www.recoverysolutionsmag.com> (25/2/2009)
3. <http://www.methamphetaminetx.com> (2/5/2008)
4. <http://w.w.w.bioethics.gov>(7/8/2008)
5. <http://www.ssk.gov.tr/sskdownloads/saglik/>(2/11/2008)
6. <http://www.novartis.com.tr/pharma/files/Ritalin> (9/10/2009)
7. http://www.incb.org/pdf/e/tr/psy/2004/psychotropics_schedule (2/5/2008)
8. <https://www.medicinescomplete.com/mc/clarke/current> (6/7/2009)
9. <http://www.pharmainfo.net/reviews/basic-principles-hptlc>(12/10/2009)
10. <http://www.atal.tubitak.gov.tr/ankara/SennurOzkaya.pdf>.(1/1/2010)
11. <http://ocw.ankara.edu.tr:81/eduCommons/isletme/istatistik/materyal/8> (2/12/2009)
12. <http://www.farmanet.net.tr/odalar/mevzuat12.htm> (12/1/2010)
13. <http://www.saglik.gov.tr/sb>