

GC/MS METODU İLE İDRARDA AYNI ANDA MORFİN, KODEİN VE 6-MONOASETİLMORFİN TAYİNİ

SIMULTANEOUS DETERMINATION OF MORPHINE, CODEINE AND 6-MONOACETYLMORPHINE IN URINE BY GC/MS METHOD

Yalçın DUYDU*

**Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim
Dalı 06100 Tandoğan, Ankara.**

ÖZET

Bu çalışmada idrarda morfin, kodein ve 6-monoasetilmorfin (6-MAM)' nin aynı anda tespit edilebilmesine yönelik bir yöntem kurulmuştur. Bu yöntemde tüketme, katı faz tüketimi (Solid Phase Extraction) kolonlarında yapılmış ve N,0,bis (trimetilsilil) trifloroasetamid (BSTFA) ile %1 trimetilklorosilan (TMCS) kullanılarak türevlendirme yapılmıştır. Ölçümler kütle dedektörlü gaz kromatografisinde (GC/MS), SIM modu (seçici iyon modu) kullanılarak yapılmış ve kullandığımız opiatların her üçü içinde % 90 nın üzerinde verim (geri kazanılabilirlik) değerleri elde edilmiştir. Çalışmamızda ayrıca morfin kullanan bir şahsın idrarında da kurmuş olduğumuz bu yöntem uygulanmıştır.

Anahtar kelimeler: Morfin, Kodein, 6-MAM, İdrar, GC/MS.

ABSTRACT

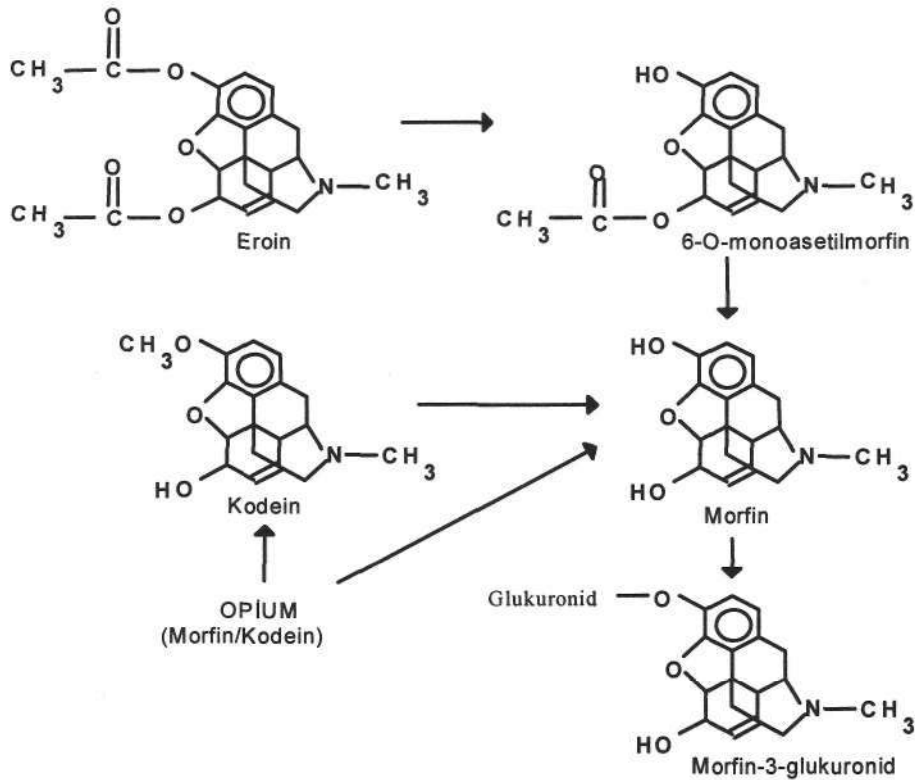
In the present study a method was developed for simultaneous determination of morphine, codeine and 6-MAM (6-monoacetylmorphine) in urine. We used SPE (Solid Phase Extraction) method in combination with the BSTFA + 1 % TMCS derivatization method. Morphine, codeine and 6-MAM were determined in urine by using GC/MS method. We determined recovery rates over 90 % for the opiates mentioned above. This method was also applied for the urine obtained from a morphine addict.

Key words: Morphine, Codeine, 6-MAM, Urine, GC/MS.

GİRİŞ

Dünya' da eroin kullanımı geçmişte olduğu gibi günümüzde de önemini korumakta ve temel bir toplumsal problem olarak karşımıza çıkmaktadır (1). Bu nedenle bu tip suistimali yapılan bağımlılık yapıcı maddelerin biyolojik sıvılardaki tayinleri de önemini gün geçtikçe arttırmaktadır (1). Günümüzün ileri enstrümantal analiz teknikleri sayesinde kan, idrar, salya, ter ve saç gibi biyolojik sıvılarda çok düşük miktarlardaki opiatlar kolaylıkla tespit edilebilmektedir (1,2,3).

Eroin, buruna çekmek, sigara gibi içmek, deri altına enjekte etmek ve damar içine enjekte etmek gibi pek çok şekillerde kullanılabilir (4). Eroin alındıktan sonra vücutta süratle 6-monoasetilmorfine (6-MAM) metabolize olmaktadır (1). Daha sonra daha yavaş olmak üzere morfine kadar metabolize olur ve morfin-3-glukuronid şeklinde idrarla atılır (Şekil 1) (1).



Şekil 1. Opiatların metabolizması (1).

Damardan alınan eroinin 20-40 saat sonra idrardaki temel metabolitlerinin morfin-3-glukuronid (uygulanan dozun % 38.2 si), serbest morfin (% 4.2), 6-MAM (% 1.3) ve eroin (%

0.1) olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (1). Kanun dışı yollardan üretilen eroinin içinde safsızlık olarak az da olsa asetilkodein bulunabilir (5). Bu asetilkodeinin deasetilasyonu sonucunda bir miktar kodein oluşabilir ve eroir alan kişilerin idrarlarında tayin edilebilir ancak kodein eroinin bir metaboliti değildir (1,5).

Eroir alan bir şahsin idrarında eroir tespit etmek, eroinin süratle 6-MAM' e ve morfine metabolize olması nedeniyle mümkün olamamaktadır (6). Bu nedenle idrarda eroinin temel metaboliti olan morfin tayini yapılır. Ancak idrarında morfin tayin edilen bir kişinin morfin ya da eroinden hangisini kullandığına karar vermek mümkün değildir (6). Çünkü hem morfin hem de eroir kullanıldığında idrarda morfin tayin edilebilmektedir (6). Bir şahsin eroir ya da morfiden hangisini kullandığını belirlemek için şahsin idrarında 6-MAM tespit edilmelidir (6,7). Ancak böyle bir durumda şahsin kesin olarak eroir kullandığı söylenebilir (1,6,7). Bununla birlikte idrarda 6-MAM tayin edilebilmesi için farklı bir tüketim şemasının uygulanması gerekmektedir (8,9). 6-MAM tayini yapabilmek için idrar hidroliz edilmeden kullanılmalıdır (8,9). Aksi takdirde 6-MAM, morfine hidroliz olacağından tespit edilemeyecektir (8,9).

Bu çalışmada öncelikle idrarda kodein, morfin ve 6-MAM in aynı anda tespit edilmesinde kullanılacak bir yöntem kurulmuştur. Bu yöntemin diğer yöntemlerden en önemli farkı tüketmenin katı faz tüketimi (SPE) kolonlarında yapılması ve opiatlar için en uygun türevlendirme maddesi olan BSTFA ile % 1 TMCS nin kullanılmış olmasıdır. (Çalışmamızda ayrıca bir morfin kullanıcısından alınan idrar numunesine 2 farklı tüketme yöntemi uygulanarak (idrara hidroliz yapılmadan ve asit hidroliz yapılarak) aradaki fark gösterilmiş ve yorumlanmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Hidroliz uygulamadan kullandığımız numune hazırlama yöntemi:

Kullanılan iç standartlar: Morfin-D₃ (2.5 ng/μl), 6-MAM-D₃ (1 ng/μl).

Numune Hazırlanması: Uygun bir test tüpüne 1 ml idrar numunesi, her bir iç standart dan 200 μl (Morfin-D₃ ve 6-MAM-D₃) ve 3 ml fosfat tamponu (pH:7) koyulmuş ve pH 6.5 - 7.5 arasına ayarlanmıştır. Tüplerin hacimleri 7 ml ye distile su ile tamamlanmıştır.

Tüketme: SPE kolonları sırası ile 3 ml metanol ve 3 ml distile su geçirilerek aktive edildikten sonra yukarıda hazırlanmış olduğumuz numune, kolondan geçirilmiştir. Kolondaki istenmeyen maddelerin temizlenmesi için kolondan sırası ile 3 ml distile su, 2 ml 0.1 M asetat tamponu (pH:

4.5) ve tekrar 3 ml distile su geçirilmiş ve kolon vakum ile 2 dakika kurutulmuştur. Son olarak kolondan 2 ml metilen klorür : isopropil alkol (80:20) geçirilerek uygun bir tüpte eluat toplanmıştır.

Türevlendirme: Yukarıda elde edilen eluat 40 °C lik su banyosunda azot gazı altında uçurulmuştur. Kalıntı üzerine 100 µl BSTFA, % 1 TMCS koyulmuş ve tüpün ağzı hava almayacak şekilde kapatılarak 70 °C de 1 saat bekletilmiştir. Böylece sililleme işlemi yapılmıştır. Türevlendirme işlemi bittikten sonra çözeltinin soğuması beklenmiş ve bu çözeltiden 1 µl GC/MS' e enjekte edilmiştir.

Asit hidroliz uygulayarak kullandığımız numune hazırlama yöntemi:

Numune Hazırlanması: Uygun bir test tüpüne 1 ml idrar numunesi, 200 µl iç standart (Morfin-D₃) ve 1 ml 6 N HCl ilave edilerek otoklavda 120 °C de 20 dk hidroliz edilmiştir. Süre sonunda tüplerin oda sıcaklığına kadar soğuması için beklendikten sonra vortekslenmiş ve pH larının 6.5 ile 7.5 arasında olmaları sağlanmıştır. Tüplerin pH' sı kontrol edildikten sonra hacimleri 7ml ye distile su ile tamamlanmış ve 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Bu aşamadan sonra yapılan işlemler hidroliz uygulamadan kullandığımız numune hazırlama yönteminde olduğu gibi yapılmıştır.

Standart idrar numunesi: Morfin ve kodein içermediğinden emin olduğumuz idrar (boş idrar) içine her birinin konsantrasyonu 1000 ng/ml olacak şekilde morfin, kodein ve 6-MAM standartları ilave edilmiştir.

Standartların hazırlanması:

1000 ng/ml: 1000 µl standart idrar numunesi + İS*

500 ng/ml: 500 µl standart idrar numunesi + 500 µl boş idrar + İS

200 ng/ml: 200 µl standart idrar numunesi + 800 µl boş idrar + İS

100 ng/ml: 100 µl standart idrar numunesi + 900 µl boş idrar + İS

50 ng/ml: 50 µl standart idrar numunesi + 950 µl boş idrar + İS

20 ng/ml: 20 µl standart idrar numunesi + 980 µl boş idrar + İS

Blank: 1000 µl boş idrar + İS

*İS: (İç Standart) 200 µl Morfin-D₃ + 200 µl 6-MAM-D3

Tüm standartlar hidroliz uygulamadan kullandığımız numune hazırlama yöntemine göre tüketilmiş ve türevlendirilmiştir.

GC/MS koşulları: Bütün analizler Hawlett Packard' m 5890 Model seri II Gaz kromatografisi ve 5971 MSD kullanılarak yapılmıştır. Cihaz 7673 model bir otomatik örnekleyici' de içermektedir. Cihazda 12 m x 0.2 mm x 0.33 μ m film HP Ultra 1 kapiler kolon kullanılmıştır. Çalışmalar esnasında kullandığımız parametreler aşağıda verilmiştir.

Kolon basıncı: 8.5 psi, kolon akış hızı: 1.04 ml/sn, kolon sıcaklığı 1: 60°C, zaman: 1 dakika, artış hızı: 30°C/dakika, kolon sıcaklığı 2: 235°C, zaman: 5 dakika, artış hızı: 20°C/dakika, kolon sıcaklığı 3: 290°C, zaman: 8 dakika, enjeksiyon sıcaklığı: 250°C.

GC/MS analizleri esnasında SIM modu (seçilmiş iyon modu) kullanılmıştır. Analizler esnasında kullandığımız iyon numaraları aşağıda verilmiştir:

Kodein-TMS: 371, 234, 343. Morfin-TMS: 429, 287, 324 Morfin-D₃-TMS: 432, 290, 327 6-MAM-TMS: 399, 340, 287 6-MAM-D₃-TMS: **402**, 343, 290. Miktar tayini her bir maddenin iyon oranının kendisine analog olan dötöro (D₃) iç standardının iyon oranına bölünerek hesaplanmıştır. Ancak kodein için iç standart olarak morfin-D₃ kullanılmıştır. Buna göre kantitatif tayinde kodein için m/z 371/432, morfin için m/z 429/432 ve 6-MAM için m/z 399/402 iyon oranları kullanılmıştır.

Doğrusallık: 20-1000 ng/ml konsantrasyonları arasında yukarıda görüldüğü şekilde hazırlanan standartlar hidroliz uygulanmadan numune hazırlama metoduna göre tüketilip türevlendirildikten sonra GC/MS e verilerek çalışma aralığımızda doğrusallık olup olmadığı araştırılmıştır.

Tekrarlanabilirlik: Morfin, kodein ve 6-MAM nin her biri için 20 ve 200 ng/ml konsantrasyonlarındaki standartları hidroliz uygulanmadan numune hazırlama metoduna göre tüketilip türevlendirildikten sonra GC/MS e verilmiş ve tekrarlanabilirlikleri % değişim katsayısı (%CV) hesaplanarak değerlendirilmiştir. Bu çalışmada her bir konsantrasyon için 5 uygulama yapılmıştır.

Verim (Geri kazanılabilirlik): Morfin, kodein ve 6-MAM için yaptığımız tüketmenin verimini hesaplamak için her birinin boş idrar içinde 100 ng/ml konsantrasyonunda standart çözeltileri hazırlanmıştır. Ancak bu aşamada hiç birine iç standart koyulmamıştır. Bu şekilde hazırlanan standartlar hidroliz uygulanmadan numune hazırlama metoduna göre tüketildikten sonra iç standart ilave edilmiş ve türevlendirilerek GC/MS e verilmiştir. Bu çalışmaya paralel olarak yine Morfin, kodein ve 6-MAM için standartların hazırlanması bölümünde anlatıldığı gibi 100 ng/ml konsantrasyonunda standartlar (iç standartlar da koyularak) hazırlanmış ve yine hidroliz uygulanmadan numune hazırlama metoduna göre tüketilip türevlendirildikten sonra GC/MS e verilmiştir. Bu her iki uygulama arasındaki farktan faydalanarak tüketmenin % verimi

hesaplanmıştır. Hesaplamalar 5 uygulamanın ortalaması alınarak yapılmıştır.

Morfin kullanan bir şahsın idrarında yapılan işlemler: Morfin kullandığı gerekçesi ile polis tarafından yakalanan bir şahsın idrarında kurmuş olduğumuz yöntemler denenmiştir. Bu idrar hem hidroliz edilerek hem de hidroliz edilmeden yukarıda açıkladığımız yöntemlere göre analiz edilmiş ve sonuçlar değerlendirilmiştir.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu çalışmada ekstraksiyonlar katı faz tüketimi (SPE) kolonları ile yapılmış ve ekstrakt BSTFA (% 1 TMCS) ile türevlendirilmiştir. Ölçümlerin tamamı GC/MS'de SİM modu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu kombinasyon sayesinde özellikle elde edilen tekrarlanabilirlik ve geri kazanılabilirlik değerlerinin benzer çalışmalardan daha iyi oldukları tespit edilmiştir (10,11,12). Özellikle katı faz tüketiminin sağladığı faydalardan daha önceki çalışmamızda detaylı bir şekilde bahsedilmiştir (13).

Çalışmamızda en düşük tayin sınırı olarak (Limit of detection, LOD) morfin, 6-MAM ve kodein için sırası ile 15 ng/ml, 10 ng/ml ve 15 ng/ml bulunmuştur. Bu tayinler International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)'ın tanımlamalarına göre yapılmıştır (14).

Bu çalışmada Morfin, 6-MAM ve kodein için elde edilen geri kazanılabilirlik değerleri % 90 nın üzerinde bulunmuştur (Tablo 1). Yapılan benzer çalışmalarda geri kazanılabilirlik değerlerinin çoğu % 90 nın altında olduğu gözlenmektedir. O'Neal ve arkadaşları yaptığı benzer bir çalışmada opiatlar için % 68 ile % 98 arasında geri kazanılabilirlik değerleri bildirmiştir (10). Fuller ve arkadaşları ise yine benzer bir çalışmada kodein için % 90, Morfin için % 88 ve 6-MAM için ise % 85 geri kazanılabilirlik değerleri bildirmektedir (11). Bizim bu çalışmada elde ettiğimiz değerlere bakılacak olursa (Tablo 1) daha iyi geri kazanılabilirlik değerleri elde edildiği görülebilmektedir.

Tablo 1. Verim (geri kazanılabilirlik) çalışmalarının sonuçları.

Opiatlar	Ortalama*	Sınırlar
Morfin	93,4	93,1-95,3
Kodein	96,7	94,1-97,6
6-MAM	94,1	92,6-95,2

* Ortalamalar 5 ayrı uygulama yapılarak elde edilmiştir (100 ng/ml için).

Çalışmamızda elde ettiğimiz tekrarlanabilirlik değerleri incelendiğinde (Tablo 2) yine benzer çalışmalardan ya daha iyi olduğu veya birbirine çok yakın oldukları görülecektir.

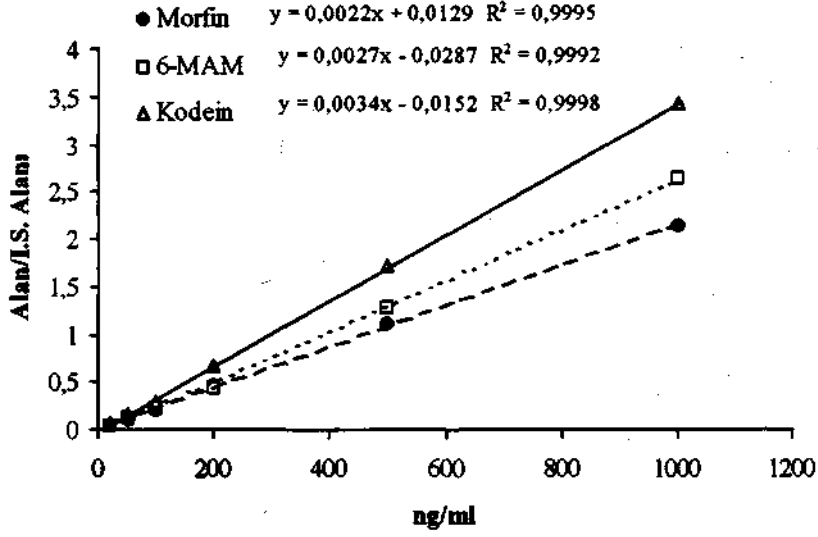
O'Neal ve arkadaşları yaptıkları çalışmada tekrarlanabilirliğin bir ifadesi olarak kullanılan varyasyon katsayısını (CV) % 10 un altında bulduklarını bildirmişlerdir (10). Giovanni ve arkadaşları ise kullandıkları yöntemde opiatlar için CV değerini % 7 nin altında tespit etmişlerdir (12). Bizim çalışmamızda ise özellikle 200 ng/ml konsantrasyonunda yapmış olduğumuz tekrarlanabilirlik çalışmalarının sonucunda CV değeri Morfin, kodein ve 6-MAM için % 5 in altında tespit edilmiştir (Tablo 2). 20 ng/ml konsantrasyonunda yaptığımız tekrarlanabilirlik çalışmasında ise her üç opiat içinde CV değerleri daha yüksek bulunmuştur (Tablo 2) ancak 20 ng/ml' nin tayin sınırına çok yakın bir konsantrasyon olduğu göz önünde bulundurulmalıdır. Fuller ve arkadaşları da benzer bir çalışma yapmış ve CV değerlerini kodein için % 4.1, morfin için 3.2 ve 6-MAM için ise 5.7 olarak bulmuşlardır (11). Bizim elde ettiğimiz değerler ile Fuller ve arkadaşlarının elde ettiği değerlerin birbirine oldukça yakın oldukları görülmektedir.

Tablo 2. Tekrarlanabilirlik çalışmalarının sonuçları.

Opiatlar	İdrara katılan ng/ml		Bulunan* ng/ml		St.Sapma ng/ml		% Değişim katsayısı (CV)	
Morfin	20	200	20,07 (17,67-21,44)	207,78 (197,99-216,81)	1,52	7,87	7,6	3,8
Kodein	20	200	19,07 (17,60-20,49)	195,89 (180,01-202,07)	1,35	9,12	7,2	4,7
6-MAM	20	200	19,55 (18,10-21,77)	201,83 (192,62-210,88)	1,36	8,84	6,9	4,4

- Bulunan ortalama değerler 5 ayrı uygulamanın ortalamalarıdır.

Çalışmamızda 20 ng/ml ile 1000 ng/ml arasındaki konsantrasyonlarda doğrusallık da araştırılmış bu konsantrasyonlar arasında kantitatif tayin yapılabilmesi için gerekli olan doğrusallığın var olduğu tespit edilmiştir (Şekil 2) (15). Bu çalışmada morfin, 6-MAM ve kodein için sırası ile 0.9995, 0.9992 ve 0.9998 R² değerleri hesaplanmıştır.

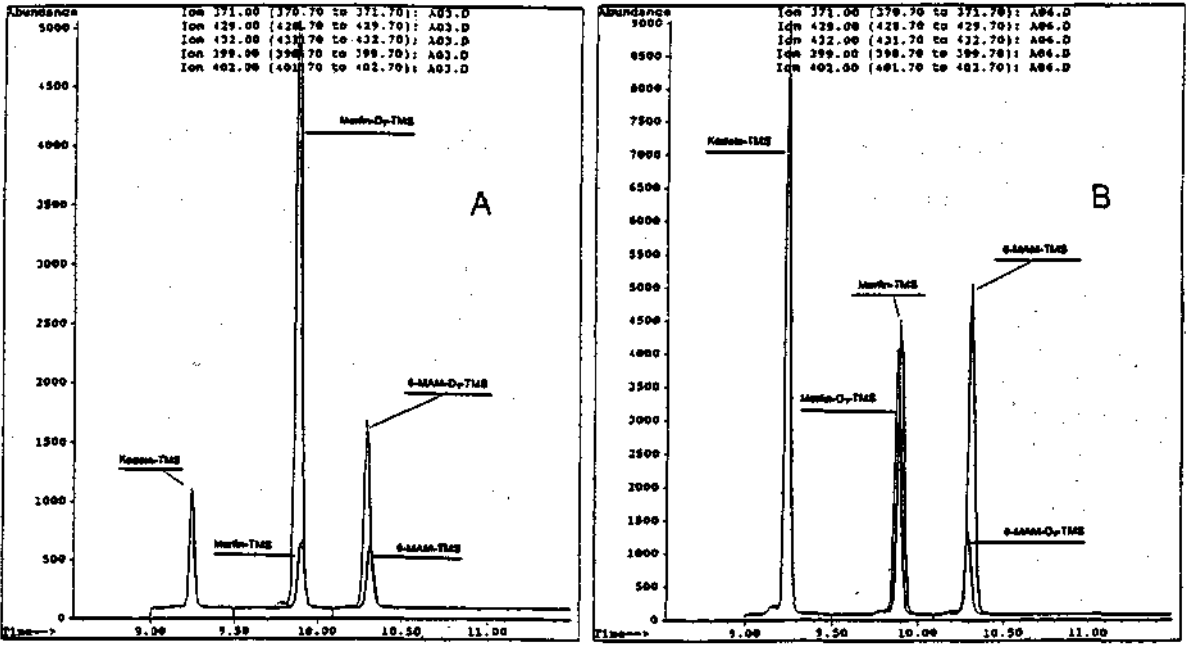


Şekil 2. Morfin, kodein ve 6-MAM 'nin 20 - 1000 ng/ml konsantrasyonları arasında (idrarda) tespit edilen standart eğrileri.

Çalışmamızda hidroliz uygulamadan numune hazırlama yöntemine göre hazırlanan standartlara ait iki kromatogram Şekil 3' de verilmiştir. Bu kromatogramlarda morfin, 6-MAM ve kodein piklerinin birbirinden oldukça iyi ayrılabilirdiği görülmektedir. Bu sayede yöntem her üç opiatın aynı anda tayin edilebilmesine olanak sağlamaktadır. Materyal metod kısmında da bahsedildiği gibi opiatlar GC/MS' e verilmeden önce sililleme yapılmıştır. Bu nedenle Şekil 3' deki kromatogramlarda görülen pikler opiatların silillenmiş türevlerine aittir (morfin-TMS, 6-MAM-TMS gibi). Gaz kromatografisi yöntemlerinde silillemenin önemi ve faydalarından daha önceki çalışmamızda bahsedilmiştir (13). Kromatogramlardan da anlaşılacağı gibi kodein için iç standart olarak kodein-D₃ kullanılmamış, bunun yerine kodein konsantrasyonları morfin-D₃ ye göre hesaplanmıştır. Morfin ve 6-MAM için ise sırası ile morfin-D₃ ve 6-MAM-D₃ iç standart olarak kullanılmış ve konsantrasyonları buna göre hesaplanmıştır.

Bu çalışmada kullanılan morfin-D₃ ve 6-MAM-D₃ gibi deuterated internal standartlar kromatogram üzerinde sırası ile morfin ve 6-MAM ile aynı alıkonma zamanına (retention time) sahip pikler vermektedirler (Şekil 3). Bu durum özellikle GC/MS uygulamalarında önemli bir avantaj sağlamaktadır. Özellikle kalabalık piklerin bulunduğu bir kromatogramda, kromatogram üzerinde ayrı bir yer işgal etmemeleri önemli bir avantajdır. Böylece iç standardın bir başka piki gölgelemesi söz konusu olmayacaktır. Avantajlarının yanında bu tip internal standartların en önemli dezavantajı sadece GC/MS uygulamalarında kullanılabilir olmasıdır (1). Çünkü bu internal standartlar ana molekül ile aynı alıkonma zamanına sahip olduklarından sadece GC/MS de SIM modu kullanıldığında görüntülenebilirler. Bu nedenle bu tip iç standartlar gaz

kromatografisi uygulamalarında ana molekül ile aynı yerde tek bir pik olarak görüleceklerinden kullanılamazlar (1).



Şekil 3. Hidroliz uygulanmadan numune hazırlama yöntemi kullanılarak elde edilen morfin, 6-MAM, kodein ve iç standart kromatogramları. A: 50 ng/ml konsantrasyonunda hazırlanan standartlar; B: 500 ng/ml konsantrasyonunda hazırlanan standartlar.

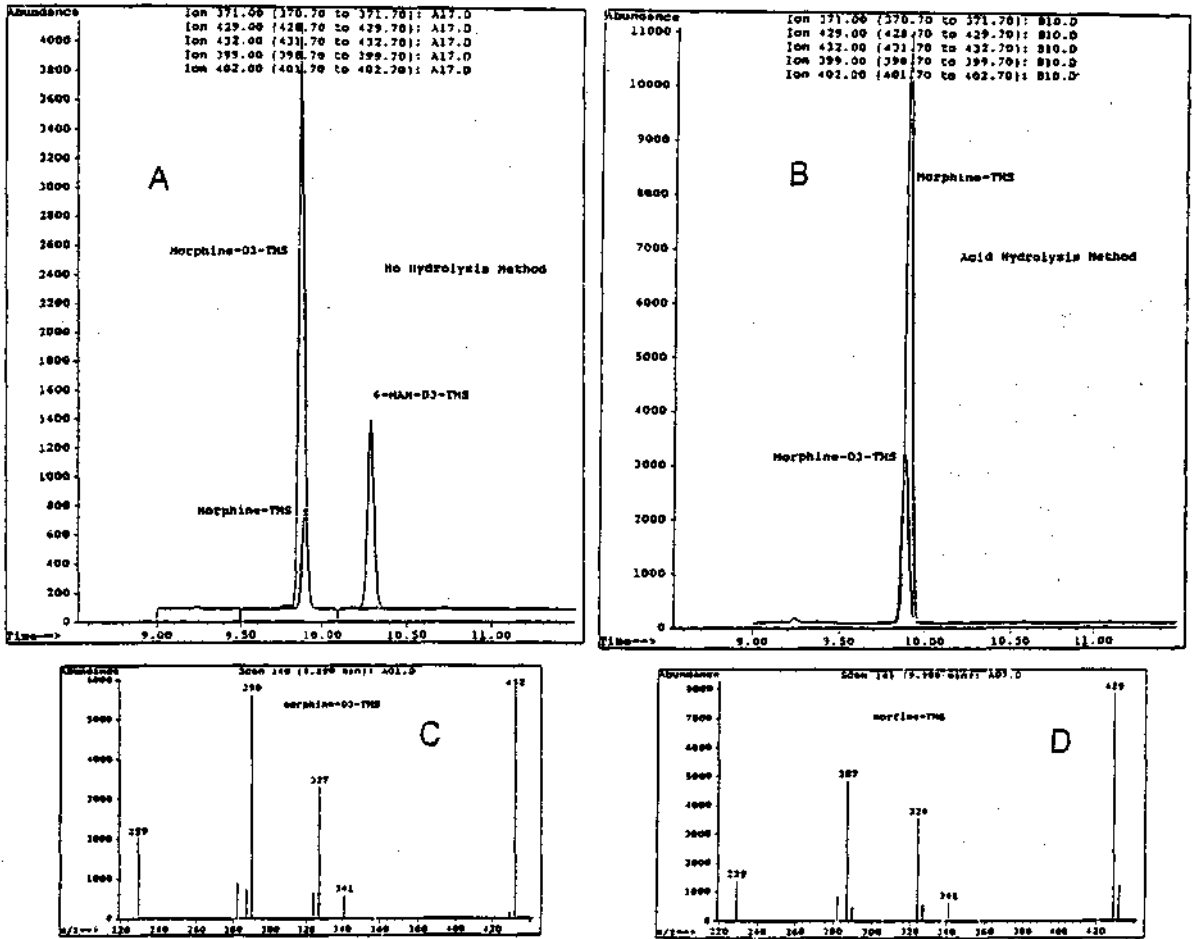
Çalışmamızda morfin, kodein ve 6-MAM için hem hidroliz uygulanmadan hem de hidroliz uygulanarak numune hazırlama yöntemleri tanımlanmıştır. Hidroliz uygulanmadan numune hazırlama yönteminde sadece idrardaki serbest kodein, serbest morfin ve 6-MAM tespit edilebilir (16,17). Daha önce de bahsettiğimiz gibi alınan eroin veya morfinin yaklaşık % 4.2 si idrarda serbest halde bulunurken yaklaşık % 38.2 si morfin-3-glukuronid şeklinde bulunur (1). Ancak idrarda morfini sadece kalitatif olarak tespit etmek amaca hizmet ediyorsa (ki pek çok

durumda idrarda morfin tespit etmek kişinin morfin yada eroin kullandığını kesin olarak göstermesi açısından yeterli olur) hidroliz uygulamadan numune hazırlama yöntemi, yukarıdaki verilerden de anlaşılacağı gibi yeterli, güvenilir ve hızlıdır. Hidroliz uygulamadan numune hazırlama yönteminin diğer bir önemli avantajı ise, kişinin morfin yada eroinden hangisini kullandığının kesin olarak tespit edilebilmesidir (6,7). Opiatların metabolizmasında da görülebileceği gibi (Şekil 1) eroin önce 6-MAM e oradan da morfine metabolize olur. Eğer idrarda 6-MAM tespit edilebilir ise kişinin kesin olarak eroin kullandığı söylenebilir (1,6,7). Ancak 6-MAM çok kolay hidroliz olabilmektedir (6,7). Bu nedenle idrarda 6-MAM tespit edebilmek için hidroliz uygulamadan numune hazırlama yönteminin kullanılması gerekmektedir (1,6,7). Ancak bu koşullarda idrarda 6-MAM tespiti mümkün olabilir ve kişinin eroin yada morfinden hangisini kullandığı kesin olarak söylenebilir (1,6,7,8,9).

Ancak bazı durumlarda idrardaki morfin konsantrasyonu daha büyük önem kazanabilir. Bu gibi durumlarda idrar, hidroliz uygulayarak numune hazırlama yöntemi kullanılarak hazırlanmalıdır (18). Bu durumda idrarda tayin edilecek olan morfin (veya kodein) konsantrasyonu, hidroliz uygulamadan numune hazırlama yöntemi kullanılarak tespit edilen morfin konsantrasyonundan daha yüksek olacaktır (18). Çünkü hidroliz uygulayarak numune hazırlama yöntemi kullanıldığında idrardaki morfin-3-glukuronid' de hidroliz olacak ve serbest hale geçecektir (18). İdrardaki morfin-3-glukuronid alınan dozun %38.2 sini oluşturduğu düşünülürse bu yöntem ile idrarda tayin edilecek olan morfin miktarının yaklaşık ne kadar artabileceği tahmin edilebilir (1).

Çalışmamızda ayrıca morfin kullandığı bilinen bir şahsın idrarında, kurmuş olduğumuz yöntem uygulanmıştır. Morfin kullandığı bilinen bu şahsın idrarına hidroliz uygulamadan ve hidroliz uygulayarak numune hazırlama yöntemleri uygulanmış (Bu numunelerin hazırlanması esnasında ortama kodein-D₃ ilave edilmemiştir) ve şekil 4' deki kromatogramlar elde edilmiştir. Hidroliz uygulamadan numune hazırlama yöntemine göre hazırlanmış olan idrara ait kromatograma bakıldığında 6-MAM-D₃' yi (iç standart) görmek mümkün olduğu halde 6-MAM piki tespit edilememiştir. 6-MAM pikinin kromatogramda tespit edilememesi kişinin kesin olarak eroin değil morfin kullandığının bir göstergesidir (1,6,7,8,9). Hidroliz uygulayarak numune hazırlama yöntemine göre hazırlanmış olan idrara ait kromatograma bakıldığında ise morfin konsantrasyonunda yukarıdaki açıklamalarımızı destekler yönde önemli bir artış görülmektedir (18). Bu şahsın idrarındaki morfin miktarı asit hidroliz uygulamadan numune hazırlama yöntemine göre (Kromatogram A) 82.1 ng/ml olarak tespit edilirken asit hidroliz

uygulayarak numune hazırlama yöntemine göre (Kromatogram B) 1367.2 ng/ml olarak tespit edilmiştir (Şekil 4). Şekil 4' de ayrıca morfin ve morfin-D₃ nin kütle spektrumları da görülmektedir. Bu spektrumlarda morfin-TMS (429, 287, 324) ve morfin-D₃-TMS (432, 290, 327) için seçilmiş olan iyon numaraları açıkça görülebilmektedir. Böylece idrar numunesinden elde edilen kromatogramdaki pikin morfine ait olduğu da doğrulanmış bulunmaktadır. Gerçek idrar numunesi ile yapmış olduğumuz bu çalışma ile de kurduğumuz yöntemin güvenilirliğini destekler yönde sonuçlar elde edilmiştir.



Şekil 4. Morfin kullandığı bilinen bir şahsın idrarından elde edilen kromatogram ve spektrumlar. A: hidroliz uygulanmadan, B: asit hidroliz uygulayarak hazırlanan numune idrar kromatogramları. C ve D' de ise sırası ile silillenmiş morfin-D₃ ve morfin e ait kütle spektrumları görülmektedir.

Sonuç olarak morfin, 6-MAM ve kodeinin idrarda aynı anda tespit edilebilmesi amacı ile geliştirdiğimiz bu yöntem elde edilen tekrarlanabilirlik, geri kazanılabilirlik ve çalışma aralığında gösterdiği doğrusallık göz önüne alındığında güvenilir bir yöntem olarak değerlendirilebilir. Hidroliz uygulayarak ve uygulamadan olmak üzere farklı amaçlara ve isteklere hizmet edebilecek iki farklı tüketme yöntemi tanımlanmış ve uygulanmıştır. Yapılan uygulamalar esnasında da morfin, 6-MAM ve kodein piklerinin birbirinden çok iyi ayrılmaları, her üç opiatın bir arada tayin edilmesine olanak sağlamaktadır. Bütün bunlar göz önünde bulundurulduğunda bu yöntem rutin olarak opiat analizleri yapan laboratuvarlar için önerilebilecek bir yöntem olarak değerlendirilebilir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma İtalya'da CBFT laboratuvarında yapılmıştır. Bu nedenle bilimsel ve teknik yardımlarından dolayı S.D. Ferrara, L. Tedeschi ve laboratuvar çalışanlarına teşekkür ederim. Bu çalışma esnasında tenkitleri ve bilimsel yönden yardımları ile bana yol gösteren değerli hocam N. Vural'a da ayrıca teşekkür etmek isterim.

Kaynaklar

1. "Recommended methods for the detection and assay of heroin and cannabinoids in biological specimens" *Manual for use by National Laboratories*, ST/NAR/23, United Nations, New York, (1993).
2. **Konstrand R.** "Incidence of opiates, amphetamines and cocaine in hair and blood in fatal cases of heroin overdose" *Forensic Sci. Int.*, 92(1), 29-38 (1998).
3. **Wilkins D.G., Haughey H.M., Krueger G.G., Rollins D.E.** "Disposition of codeine in female human hair after multiple-dose administration" *J. Anal. Toxicol.*, 19(6), 492-498 (1995).
4. **Finkle B.S.** "Forensic toxicology of drug abuse: Astatus report" *Anal. Chem.*, 44, 18-31 (1972).
5. **Cone E.J., Jufer R., Darwin W.D., Needleman S.B.** "Forensic drug testing for opiates. VII. Urinary excretion profile of intranasal (snorted) heroin" *J. Anal. Toxicol.*, 20(6), 379-392 (1996).
6. **Cone E.J., Welch P., Mitchel J.M., Paul B.D.** "Forensic drug testing for opiates: I. Detection of 6-acetylmorphine in urine as an indicator of recent heroin exposure; Drug and assay considerations and detection times" *J. Anal. Toxicol.*, 15, 1-7 (1991).
7. **Paul B.D., Mitchel J.M., Mell L.D.** "Gas chromatography/electron impact mass fragmentometric determination of urinary 6-acetylmorphine, a metabolite of heroin" *J. Anal. Toxicol.*, 12, 2-7 (1989).
8. **Fish F., Hayes T.S.** "Hydrolysis of morphine glucuronide" *J. Forens. Sci.*, 19, 676-683 (1974).
9. **Predmore D.B., Christian G.D., Loomis T.A.** "Recovery of morphine from biological samples by hydrolysis and solvent extraction" *J. Forens. Sci.*, 23, 481-489 (1974).

10. **O'Neil C.L., Poklis A.** "Simultaneous determination of acetylcodeine, monoacetylmorphine and other opiates in urine by GC/MS" *J. Anal. Toxicol.*, 21 (6), 427-432 (1997).
11. **Fuller D.C., Anderson W.H.** "A simplified procedure for the determination of free codeine, free morphine and 6-acetylmorphine in urine" *J. Anal. Toxicol.*, 16, 315-318 (1992).
12. **De Giovanni N., Strano Rossi S.** "Simultaneous detection of cocaine and heroine metabolites in urine by solide-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry" *J. Chromatogr. B. Biomed. Appi*, 658(1), 69-73 (1994).
13. **Duydu Y.** "Procedure for determination of amphetamine and methamphetamine in urine by GC/MS methode" *FABAD J. Pharm. Sci.*, 23, 11-16, (1998).
14. **Long G.L., Winefordner J.D.** "Limit of detection; A closer look at the IUPAC definition" *Anal. Chem.*, 55, 712-724(1983).
15. **Needleman S. B., Romberg R.W.** "Limits of linearity and detection for some drugs of abuse" *J. Anal. Toxicol.*, 14, 34-38 (1990).
16. **Zezulak M., Snyder J.J., Needleman S.B.** "Simultaneous analysis of codeine, morphine and heroin after (-glukuronidase hydrolysis" *J. Forensic Sci.*, 38(6), 1275-1285 (1993).
17. **Yeh S.Y., Gorodetzky C.W., Krebs H.A.** "Isolation and identification of morphine 3- and 6-glucuronides, morphine 3,6-glucuronide, morphine 3-etheral sulfate, normorphine and normorphine 6-glucuronide as morphine metabolites in humans" *J. Pharm. Sci.*, 66(9), 1288-1293 (1977).
18. **Jenisson T.A., Wozniak E., Nelson G., Urry F.M.** "The quantitative conversion of morphine 3-(3-D-glucuronide to morphine using (i-glucuronidase obtained from *Patella vulgata* as compared to acid hydrolysis" *J. Anal. Toxicol.*, 17, 208-210 (1993).