

Amphetamin ve benzeri maddeleri kağıt kromatografisi yardımıyla birbirinden ayırmağa yarayacak ayraçların bulunması (*)

Sabahattin **KALAYCI**

Dr. Faik **ALP**

ÖNSÖZ

Amphetamin ve Amphetamin benzeri maddeler kuvvetli sitimulan tesire sahip maddeler olup bunlar tedavi sahasında kullanıldığı gibi, bu tesirlerinden dolayı doping sahasında kendilerinden geniş şekilde faydalanılmaktadır.

Çalışmamızda kullanılmakta bulunan bu grup maddeler ele alınmış ve bunları birbirinden ayırmada yararlı olabilecek ayraçlar aranmıştır.

Faydalı olabilecek ayraçları ortaya çıkarmış bulunuyoruz. Bunların kontrol laboratuvarlarında kullanılabilceğine inanıyoruz.

Bu hususta bize maddi ve manevi yardımları dokunan ve projemizin hazırlanmasında her türlü kolaylığı gösteren TÜRKİYE BİLİMSEL VE ARAŞTIRMA KURUMU'na teşekkürlerimizi sunarız.

(*) Bu araştırma Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumunun desteğiyle yapılmıştır.

GİRİŞ

Yarış atlarında performansı arttırmak için çeşitli doping maddeleri kullanılır. Bu maddelere hergün yenileri eklenmektedir. Doping maddesi olarak başlangıçta bazı bitkisel özgülardan veyahut yem rasyonlarından yararlanılmış ise de, sonraları daha etkili tabii ve sentetik maddelerden faydalanılmıştır. Bugün ise alkaloidler ön planda yer almaktadır.

SMİTH (16), ilk zamanlarda en önemli doping maddeleri olarak Strychnine ve nitrogliserin karışımının. MACKAY (9) ise son üç yıl içinde Morfin, xsilokain, apomorfin, xstantin türevleri ile yohinbin, butazolidin gibi bazı alkaloidlerin kullanıldığını bildirmiştir.

Memleketimizde ise doping olarak kafein, ve türevleriyle amfetamin ve amfetamin benzeri maddeler daha çok kullanılmıştır.

Amfetamin ve benzeri maddeler tesir bakımından benzerlik gösterirler. Halbuki kimyasal yapıları ise oldukça farklıdır. Bunları birbirinden ayırmak için çeşitli kimyasal araçlar kullanılmıştır. Bunların çoğu faydalı olmaktan uzaktır. Biz bu araştırmamızda, daha elverişli olabilecek araçları bulmak üzere yapmış bulunuyoruz.

LİTERATÜR BİLGİ

Doping tesir yapan şimik bileşikler : Stimulan maddeler, depresör maddeler, vitaminler ve hormonlar olmak üzere dört gruba ayrılırlar (2). Amfetamin ve benzeri maddeler, stimulan maddeler grubuna dahil bulunmaktadır.

Amfetamin, simpatikomimetik ilâçlar aarsında önemli yer tutar. Uykuyu önlemek, iş yapma gücünü arttırmak için harp zamanında askerler, imtihan günlerinde ise öğrenciler tarafından çokça kullanılmıştır. Merkezi sinir sistemini uyararak hareket organlarının, üstün bir gayretle çalışmalarını temin eder. Amfetamin, bronşların genişlemesine, kan basıncının ve metabolizmanın artmasına sebep olur. Bu sebeple stimulan bir madde olarak kullanılır.

Methylamfetamin, hydroxiampfetamin gibi maddeler de aynı tesire sahip bulunmaktadır. Methylamfetamin merkezi sinir sistemini uyarma bakımından amfetamin ve türevlerinden, damar kontraksiyonu yönünden de ephedrinden daha kuvvetli etkiye sahiptir (6).

Ėphedrine sempatikomimetik maddeler içinde özel bir yer tutar. Adrenalin sinirlerin post gangliyon liflerini tenbih ettiği halde, ephedrin sinir uçlarında bulunan aminoksidası inhibe etmek suretile tesir husule getirir. Ephedrin bronşları genişleterek, kolay ve derin nefes almayı sağlar. Ve kan basıncını arttırır.

Amphetamin ve benzeri maddelerin tesirleri biribirine yakın olmakla beraber kimyasal yapıları farklıdır.

Adrenalin, kimyasal yapısı itibarile hafif baz karakteri gösteren alkaloitler sınıfına sokulmuştur (7). Bu hormon arter ve kapillar damarlarda kontraksiyona sebep olur. Kalp damarlarını genişletir. Adeleinin iş yapma gücünü arttırması sebebiyle hayvanlarda doping maddesi olarak kullanılır. Kephirin, hem tesir ve hem de kimyasal yapı bakımından adrenaline benzer. Kan damarı üzerindeki etkisi, adrenaline nazaran daha azdır. Fakat devamlıdır (11). Ethylnoradrenalin tesir yönünden adrenaline benzer. Fakat sinirleri uyarma bakımından adrenalinden oldukça zayıftır.

Yukarıda bildirilen özelliklerinden dolayı amphetamin ve benzeri maddeler, tedavide kullanıldığı gibi, doping gayesile de kullanılmaktadır. Son kullanım şekli kanuna da aykırı olduğundan bu maddelerin idrar, salya, ter, kan ve gaitada aranması için çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Bu maddelerin ayraçlarla biribirinden ayrılmasında kâğıt kromatografisi metodundan çokca faydalanılmıştır. CURRY (4), bu alkaloitlerin kâğıt kromatografisine uygulanmasında faydalı olacak inkişaf solusyonları üzerinde çalışmıştır. MOORE (12) bazı amphetamin ve benzeri maddelerin saf şekillerinin, idrardan izolasyonu için, idrarı triklorasetik asitle işleme tabi tutmuş ve buradan elde ettiği maddeleri kâğıt kromatografisine uygulamıştır. NICKOLLS (13) muayene materyalini amonyum sulfatla işlemek suretile, alkaloitlerin ekstraksiyonu esnasında, güçlük doğuran emülsiyonlara mani olduğunu bildirmiştir. CURRY (5) doping gayesile gönderilen idrar ve salya için uygulanacak metod üzerinde çalışmış ve bu arada amphetamin için bazı renkli ayraçlar denemiştir. SMİTH (15) alkaloitleri biribirinden ayırd etmek için kâğıt kromatografisi metodundan faydalanmış ve değişik inkişaf solusyonları kullanmak suretile bunların ultraviyole ışınları altında renk özelliklerini, ayraçlarla verdiği reaksiyonları ve Rf değerlerini araştırmıştır. LUNDQUIST (8) amphetamin ve benzeri bazı maddeler üzerinde kâğıt kromatografisi metodu ile yapmış olduğu denemelerde kromatogramların inkişaf solusyonunda bekleme süresinin sonuçlara etki yaptığını ortaya koymuştur. CLARKE (3) alkaloitlerin kromatogramlara noktalanması üzerinde yeni bir metod yayınlanmıştır. PETER-

SON (14) ise en önemli doping maddelerinin saf şekilleri üzerinde kâğıt kromatografisi metodu ile çalışmış ve renkli ayraçlarla bunların birbirinden ayırd edilmesinin mümkün olduğunu bildirmiştir.

Biz bu araştırma ile amphetamin ve amphetamin benzeri maddeleri birbirinden ayırmağa yarıyan en uygun ayraçları bulmak için yaptık.

MATERYAL VE METOD

Bu çalışmada on çeşit amphetamin ve benzeri maddeler kullanılmıştır. Bunlar orijinal ambalajlar içinde «E. Merck AG, D. ARMSTAT ve Merck Inc. Rahvay, N.J.U.S.A.» dan temin edilmiştir. Bu maddelerin adları, sinonim ve şimik formülleri, tablo : 1 verilmiştir. Bu çalışmamızda bir dimensiyonlu assendes kâğıt kromatografisi metodundan faydalanılmıştır (4). Kromatoğramlar hiçbir işleme tabi tutulmamış watman I kâğıdı ile hazırlanmıştır (14). Araştırmaya konu olan amphetamin ve amphetamin benzeri maddeler % 1 glasiyal asit asetik solusyonunda % 1 oranında eritilmiştir. Bu solusyonlar mikropipetlerle damla halinde kromatoğramlara tatbik edilmiş ve sıcak hava yardımı ile damlaların geniş alana dağılması önlenmiştir. Kromatoğramlar özel ve nötr camdan yapılmış tanklar içersinde 12 saat müddetle çeşitli çözeltilerde bekletilmiştir. Bu müddetin bitiminden sonra kromatoğramlar 254 milimikron dalga uzunluğundaki ultraviyole lambası altında çeşitli renklerde görülen floresans veren adsorban lekeler işaretlenmiştir. Kâğıt kromatoğramlar üç çeşit çözeltili solusyonuna konmuştur. Bunlar,

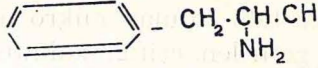
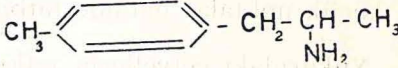
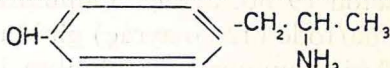
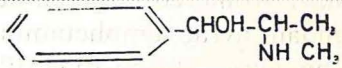
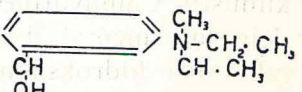
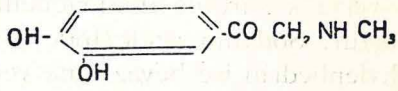
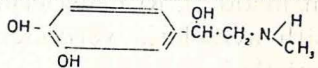
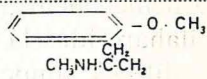
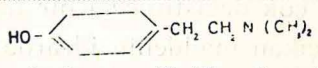
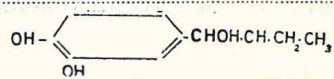
- 1 — BUC, N. Butanol — Glaciel asetik asit — su (6:1,5 : 2,5)
- 2 — BUB, N. Butanol — N. Sodyum asetat — N. Hcl (7 : 120 : 60)
- 3 — ETAM, Ethanol — Amonyak (0,88) — Su (180 : 10 : 10) dır.

Kromatoğramlara 30 ayraç tatbik edilmiştir. Ancak bunlardan tablo : 2 de gösterilen ayraçlar iyi sonuç vermiştir.

Bu çalışmamızda amphetamin ve amphetamin benzeri maddeler at idrarına ilâve edilmek suretile tanınmasına gayret edilmiş bu maksat için alkaloitlerin her biri 75 gama miktarında 100 cc at idrarına teker teker katılmıştır. NICKOLLS (13) ın tarif ettiği şekilde amonyum sulfat yardımı ile idrarın renkli ve proteinli maddeleri ayrıldıktan sonra, süzüntünün Ph amonyum hidroksitle 11-12 ayarlanmış, PETERSON (14) ve MOORE (12) tatbik ettikleri şekilde kloroform metanol karı-

AMHETAMİN VE AMHETAMİN BENZERİ MADDELER

TABLO : 1

Sıra No.	İsmi	Synonim	Formül
1	Amphetamin	Actedron Adipon Allodene	 1 x - Methylphenetyt - amine
2	Methylamphetamin	Pervitin Methedrine İsophan	 d - N - x - Diethylphenenthy- lamine
3	Hydoxy amphetamin	Paredrine Pulsoton Faredrinex	 1 - phenyl - 2 methyl aminapro- panol
4	Ephedrine	Ephedral Sanedrine Biophedrine	 1 - phenyl - 2 - methylaminop- ropanol
5	Etyhlephedrine	Menethyl Nethamine Novedine	 2 - Methylamino - 1 - phenyl - 1 - propanol
6	Kephrine	Strypone Stypnone Adrenalone	 3,4 - Dihydroxy - methyl - aminoacetophenone
7	Adrenalin	Epinephrine Adrenine Suprarerin Suprarenalin	 3,4 - Dihidroxy (1 - hydroxyphe- nil - 2 methylaminomethyl - benzyl alcohol
8	Methoxyphenamine	Orthoxine Ortodrinex	 a - (2 - methoxyphenyl) B - methylaminopropan
9	Hordenine	Anhaline	 p - hydroxy - N, N - diment- hylphenetylamine
10	Ethylnoradrenalin)	Ethylnor adrenalin Ethylnor epinephrine	 1 - (3,4 dihydroxyphenyl) - 2 amino - 1 butanol

şımı (100 + 5) ile 30 dakika çalkalanmıştır. Eriticinin sodyum sülfat anhidrid ile suyu alındıktan sonra 60 C° s ubanyosu üzerinde ve hava tabancası yardımı ile 5 cc kalıncaya kadar uçurulmuştur. 5 cc eriticiyi değişik hale getirmek için CLARKE (1) tarafından bulunan tarafımızdan değişikliğe tabi tutulan mikro uçurma cihazından yararlanılmıştır. Değişik hale getirilen eritici kalıntısı 0,01 Nhidroklorhidrik asit ve methanol karşımının (1 + 1) 0,1 cc de eritilmiş ve bilâhare kâğıt kromatoğramlara küçük noktalar halinde tatbik edilmiştir .

Yukarıdaki cetvellerin tetkikinden anlaşılacağı üzere amphetamin ve benzeri maddeler kolaylıkla birbirinden ayırt edilebilmiştir. İsatın/Aseton (9 no. ayraç), chinhidron/Methanol (10 No ayraç) ve sodyum azide/İode (12 no ayraç) gibi bu üç ayraçla amphetamin ve benzeri maddelerin tanınmasında oldukça iyi sonuçlar elde edilmiştir. Amphetamin ve benzeri maddeler kimyevî yapılarında bulunan amin grubundan dolayı bromcreosol green ile mavi renkte reaksiyon vermişlerdir. Bu bakımdan ayraç amphetamin grubu için özel sayılabilir. İsatın/Aseton (9 no. ayraç) Tablo 10 görüleceği üzere ephedrin için özel bir renk (Açık mavi) vermiş bu maddeyi diğer grup alkaloitlerden ayrılmasını mümkün kılmıştır. Chinhydron/Aseton (10 no ayraç) tablo 9 - 10 daki alkaloitler için tamamen değişik renk vermiştir. Özellikle yapı bakımından çok yakın olan hidroksumphetamin ve methylamphetamin grup özellikleri nazarı itibare alınmadan ayrılmaları imkân dahiline girmiştir. Bu ayraç methylamphetaminle vişne, hydrophyamphetaminle de kahve rengi vermek suretile iki maddenin birbirinden ayrılmasında faydalı olmuştur. Sodyum azide/İode (12 No Ayraç) ile ephedrin siyah renk ethylephedrin ise beyaz renk vermiştir.

Netice olarak tetkik ettiğimiz ve genellikle aynı tesire sahip on adet alkaloit maddesi, Rf değerlerine, ultraviyole ışını altındaki görünüşlerine ve çeşitli ayraçlarla verdikleri reaksiyonlarına göre birbirlerinden ayrılabilmiştir.

İdrar içine atılan alkaloitlerle, saf şekilleri, yapılan mauyenelerde birbirlerine hemen hemen yakın netice vermişlerdir. Ancak hayvana verilmiş ve bilahare idrarla dışarı atılan madde ile yapacağımız muayenelerde, elde edilecek sonuçlar hakkında kesin konuşmağa imkân yoktur. Vücuda verilmiş bir alkaloit, birçok dahili tesirler altında şimik yapısını az çok değiştireceği bir hakikattir. Bu şekilde değişikliğe uğrayıp dışarı çıkan maddenin idrardan elde edilmesinden sonra ,muhtelif ayraç, ultraviyole analiz sonuçlarının ayrı bir mesai halinde incelenmesi inanıyoruz ki çok faydalı olacaktır.

ALKALOİTLER İÇİN KULLANILAN AYRAÇLAR

TABLO : 2

Sıra No.	Terkibi	Literatür
1 —	Methylorange Distile su	0.1 gr. 100 ml. Peterson (14)
2 —	Bromcresolgreen Bromphenolblue Methanol	0.04 ml. 0.04 gr. 100 ml. Peterson (14)
3 —	Platinchlorürün % 5 lik sudaki solüsyonu Potassium iodür un % 4 lük sudaki solüs. Distile su	2 ml. 25 ml. 23 ml. Peterson (14)
4 — a)	Ammoniumvanadate Distile su	0.05 gr. 100 ml.
b)	Kesif sülfirik acid (Kâfi miktarda)	Lundquist (8)
5 — a)	Ammonium moliptad Distile su	0.5 gr. 100 ml.
b)	Kesif sülfirik acid (Küfi miktarda)	Lundquist (8)
6 — a)	Sodium moliptad Distile su	0.5 Gr. 100 ml. Lundquist (8)
b)	Kesif sülfirik acid (Kâfi miktarda)	
7 — a)	Sodium tungustade Distile su	0.5 gr. 100 ml. Lundquist (8)
b)	Kesif sülfirik acid (Kâfi miktarda)	
8 —	Marguis test Kesif sülfirik acid Formaldehit (% 40)	1 ml. 1—2 damla Lundquist (8)
9 —	İsatin Aseton	0.2 gr. 100 ml. Smith (15)
10 —	Chinhyrone Methanol	0.5 gr. 100 ml. Peterson (14)
11 —	Brom buharı Test 50 ml. kadar brom bromotogram tantına konur, kromatogramla 15 dakika tankın içerisinde asılı bırakılır.	
12 —	Sodium Azide 0.1 N. İode	5 gr. 100 ml. Smith (15)
13 —	P—Nitrainlin % 8 lik Hyrochloric Acid % 5 lik Sodium Nitrit	0.3 gr. 100 ml. 6 ml. Peterson (14)

14 — P—Nitranilin yerine sulphanilic acid kullanılarak ayraç aynen yukarıdaki gibi hazırlanır.

15 — 0.1 N. Gümüş Nitrat	50 ml.
Ammonia 50 (9) luk	16 ml.
Distile su ile	100 ml. ye tamamlanır.

16 — DRAGENDORF AYRACI

Ana solüsyon : Bizmut nitrat (2.5) gr.
20 ml. distile su içerisinde eritilir 10 ml.
distile su içerisinde eritilmiş (4) gr. potassium iodür ve (5) ml. asit asetik glasiyal bu önceki solüsyona ilâve edilir. Süzülerek koyu renkli şişelerde saklanır.

Stewart (17)

Ö Z E T

1 — Denemeye alınan üç adet inkişaf solusyonundan butanol/glasiyal asetik asit/su (6 : 1,5 : 2,5) karışımı ile en iyi sonuç alınmıştır.

2 — Saf ve at idrarına ilâve edilmiş olunan on adet çeşitli amphetamin ve benzeri maddeler için Rf değeri ve ultraviyole ışını altındaki görüntüleri tesbit edilmiştir.

3 — Kromatoğramlar inkişaf solusyonunda 12 saat müddetle bekletilmeleriyle alkalotilerin daha iyi ayrılabilceği anlaşılmıştır.

4 — Amphetamin ve benzeri maddeleri birbirinden ayırmak için 16 adet değişik ayraç kullanılmıştır. Bunlarla denemede kullandığımız 10 adet değişik amphetamin ve amhetamin benzeri maddeleri kesinlikle birbirinden ayırmak mümkün olmuştur.

Aynı kromotoğramlara, maddelerin saf şekilleri kontrol gayesile tatbik edilerek çalışmalar mukayeseli olarak yürütülmüştür. İdrardan izole edilen alkaloitlerin Rf değerleri saf şekillerine göre daha küçük bulunmuştur. Fakat ikinci bir temizleme işleminden sonra, idrardan elde edilen alkaloitlerin Rf değerleri saf şekillerinin Rf değerlerine ulaşmıştır.

TABLO : 3

BUC İNKİŞAF SOLÜSYONU İÇİNDE SAF ALKALOİDLERİN AYRAÇLARLA VERDİKLERİ REAKSİYONLAR

Maddelerin isimleri	İnkışa Sol.	UV Analiz	Rf Değer.	TESBİT AYRAÇLARI																
				1	2	3	4	5	6	7	8	Br 9	10	11	12	13	14	15	16	
Amphetamin	BUC	M	0.81 0.85	+ Aç Sr	+++ Mv	+++ Kl Rn	M	M	M	M	++ Tr	M	++ Kv	++ Sr	+	+++ K	++ Sr	M	M	
Methylamphe- tamin	BUC	M	0.80 0.84	++ Kr Sr	+++ Mv	+++ Bn Kl Rn	M	M	M	M	++ Tr	M	+++ Vş	++ Sr	+	+++ Sr	M	M	+++ K	
Hydroxyampe- tamin	BUC	Mr Ads. +	0.70 0.74	++ Ky Sr	+++ Mv	M	+++ Mv	++ Mv	++ Mv	+++ Aç Mr.	++ Sr	M	++ Kv Rn	++ Sr	+	+++ Aç Mr	+++ P. Kv.	M	M	
Ephedrine	BUC	M	0.78 0.80	++ Ky Sr	+++ Mv	+ Aç Mv	M	M	M	M	M	++ Aç Mv	++ S	++ Sr	+	+++ Sr	M	M	+ K	
Adrenalin	BUC	+++ Sr Yş F	0.46 0.49	+ Kv	+++ Mv	++ Mr	+++ Kv	+++ Ky Sr	+++ Ky Yş	++ Ky Yş	++ Ky Tr	++ Aç K	++ Kr Sr	++ Sr	+++ B Pb	+++ P. Mr	+++ K	+++ Ky Yş	K +++	
Kephrini	BUC	+++ F.Mv F	0.49 0.52	+ Kv	+ Mv	++ Kl Rn	+++ Kv	++ Ky Sr	+++ Sr	+++ Sr	++ P.Sr	++ Aç K	+++ K	++ Sr	+++ B.Pb	+++ P.Kv Rn	+++ Ky Sr	+++ S	++ Mr.K	
Hordenine	BUC	++ Mr Ads	0.66 0.68	M	++ Mv	+++ Mr	+++ Mv	++ Mv	+++ Mv	++ Aç.Mr	++ S	M	M	++ Sr	+	+++ P.K	+++ Tr	M	+++ K	
Methoxyphe- namin	BUC	+ Aç.Mv Ads	0.80 0.83	++ Aç.Yş	++ Mv	+++ Kl Rn	+++ Yş Kv	+++ K	+++ K	+++ K	+++ K	M	+++ Kv	++ Mr	+	+	AçSr	M	M	+++ K
Ethylephed- rine	BUC	M	0.70 0.75	M	++ Mv	++ Mr	M	M	M	M	M	M	M	++ Sr	+	M	M	M	++ K	
Ethylnor - adrenalin	BUC	++ F. Yş	0.45 0.50	M	++ Mv	M	+++ Kv Rn	+++ Ky Sr	+++ Ky Yş	++ Sr	+++ Kr.Sr	++ Ky Mv	+++ Ky Kv	++ Sr	+++ Pb.B	+++ Mr	+++ Aç.K	++ Ky.Kv	M	

SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu tartışmada amfetamin ve amfetamin benzeri maddeler gerek saf ve gerekse at idrarına ilâve edilmiş olarak tek dimensiyonlu asendes kâğıt kromatografi metodu ve ayraçlar yardımıyla birbirinden tefrik edilmiştir. (BUC) N. Butanol - Glasiel asetik asit - su (6 : 1,5 : 2,5), (BUB) N. Butanol — N. Sodyum asetat — N. HcL (7 : 120 : 60) ve (ETAM) Etanol — Amonyak (0,880) Su (180 : 10 : 10) gibi üç ayrı ayrı inkişaf solusyonu kullanılmış bunlardan (BUC) ile daha iyi sonuç elde edilmiştir. Bu inkişaf solusyonunda bulunan Rf değerleri Tablo 3-4 de gösterilmiştir. Bu değerler SMITH (15) tarafından bildirilen değerlere yakındır. (BUC) inkişaf solusyonu kullanmak suretile elde edilen kromatogramlarda alkaloit lekeleri yuvarlak keskin sınırlı olarak elde edilmiştir. Ayrıca ayraçlarla verdiği renkler ve ultraviyoledeki görüntüleri gayet net ve canlıdır. Kullanılan diğer inkişaf solusyonlarında aynı başarılı sonuçlar elde edilememiştir.

CURRY (4) tarafından bulunup LINDQUIST (8) tarafından aynı alkaloitlerin bazıları için denenen N. Butanol — su — sitrik asit (5 : 50 : 1 gr.) dan ibaret olan inkişaf solusyonundan da, amfetamin ve benzeri maddelerin saf şekillerinin % 5 lik dihidrojen sitrat solusyon ile ıslatılmış kromatogramlarda, elde edilen Rf değerleri daha küçük bulunmuştur. PETERSON (14) (BUC) inkişaf solusyonunu kullanmak suretile bazı amfetamin maddeleri için elde ettiği Rf değerleri bizim bulduğumuz değerlere yakındır. MOORE (12) amfetamin, ephedrin ve methylamfetamin üzerinde yaptığı çalışmada (BUC) ve N. Butanol — pentanol — glasiel asetik asit — su (2 : 2 : 1 : 1) gibi iki çözelti solusyonu ve M/15 potasyum dihidrojen fosfatla ıslatılmış watman 1 kâğıdı kullanmıştır. BUC da bulunduğu Rf değerleri, bizim bulduğumuz Rf değerlerine yakın olduğu halde, ikinci solusyondaki değerler daha düşük olmuştur. STEWARD (17) amfetamin ve ephedrin tanınması için yaptığı deneyde, N. Butanol — glasiel asetik asit - su (4 : 1 : 5), N. Butanol — Toluenglasiyal asetik asit — su (1 : 1 : 5 : 5), Ethil asetat — glasiel asetik - su (3 : 1 : 3) gibi inkişaf solusyonları kullanmış ve daha küçük Rf de değerleri elde etmiştir.

At idrarına ilâve edilerek bilâhare elde edilmiş Rf değerleri, aynı maddelerin saf şekillerinin Rf değerlerine göre daha küçük bulunmuştur. Meselâ, saf amfetaminin Rf değeri 0,81 - 0,85 (Tablo 3,) iken idrar içersinden tesbit edilmiş amphe taminin Rf değeri daha küçük olmak üzere 0,79 - 0,83 (Tablo 4) olarak bulunmuştur. Buna sebep, idrarın içerisinde bulunan ve alkali klorforma geçen ve alkaloitlerle birlikte kroma-

toğramlar üzerinde yürüyen maddeler gösterilebilir. Alkaloitler bu maddelerle aynı Rf değerinde olmadığından onlardan kurtulup serbest hale geçerek hakiki Rf değerindeki yerini alamamaktadır. Bu sebeple saf şekillerine göre daha küçük Rf değeri göstermektedir. SMİTH (15) göre bu maddeler phenolik asitlerdir. Alkaloidi phenclik asitlerden kurtarmak için lekeler kromatoğraflar üzerinden kesilmek suretile alınmış LİNDQUİST (8) in tavsiye ettiği gibi alkali klorformdan geçirilmiştir. Tekrar kromatoğramlara tatbik edilerek yabancı maddelerden arınmış olan bu maddelerin Rf değerleri yüksek ve asıllarına uygun olarak bulunmuştur.

Araştırmamızda Rf değerleri yüksek olan amphetamin ve benzeri, düşük Rf değerli ve idrarda normal olarak bulunan bazik maddelerden ayırabilmek için, kromatoğramlar 12 saat süre ile inkişaf solusyonu içerisinde bırakılmışlardır. LUNDQUİST (8) bu müddet saf maddeler için 6 saat, MOORE (12) ise 4-5 saat veyahut bir gece olarak kabul etmişlerdir. İdrardan elde edilecek maddeler için 11-12 saatlik bir süreye ihtiyaç vardır.

Saf veya ayrı at idrarına ilâve edilerek sonradan izole edilmiş amphetamin ve benzeri maddeler ultraviyole ışını altında değişik renkte görülmüşlerdir. Bunları floresans leke verenler, adsorban leke verenler ve reaksiyon vermeyenler gibi üç gruba ayırmak mümkündür.

Tablo : 6.

Ultraviyole analiz sonuçlarına göre alkaloitlerin gruplandırılması

T A B L O : 6

Reaksiyon verenler		
Floresans leke verenler	Adsorban leke	Reaksiyon vermeyenler
Adrenalin	Hydroksiamphetemin	Amphetamin
Kephrin	Hordenin	Mathylamphetamin
Ethylnoadenalin	Methokstphenamin	Ephedrin Ethylephedrine

Rf değerler floresans leke veren maddelerde düşük, adsorban leke verenlerde orta, reaksiyon vermeyenlerde yüksek bulunmuştur. Buna ait toplu neticeler (Tablo : 7) de gösterilmiştir.

Rf değerlerine göre alkaloidlerin gruplandırılması

TABLO : 7

Düşük Rf değerli olanlar		Orta Rf değerli olanlar		Yüksek Rf değerli olanlar	
Adrenalin	0,46 — 0,50	Hydroxyamfetamin	0,70 — 0,74	Amfetamin	0,81 — 0,85
Kephrine	0,49 — 0,52	Hordenin	0,66 — 0,68	Me. Amfetamine	0,80 — 0,84
Ethylnoradrenalin	45 — 0,50	Ethylephedrine	0,70 — 0,75	Ephedrin	0,78 — 0,80
				Methoksiphenamin	80 — 0,83

Rf değerlerine ve ultraviyole lambası altındaki görünüşlerine göre üç gruba ayrılmış olan amfetamin ve benzeri maddelere tatbik edilen elverişli ayraçlar ve elde olunan sonuçlar tablo 8-9-10 da verilmiştir.

Floresans leke veren alkaloidlerin ayraçlarla verdiği reaksiyonlar

TABLO : 8

Alkaloidler	A y r a ç l a r											
	1	2	3	6	7	9	10	13	14	15	16	12
Adrenalin	Kv	MV	Mr	Ky Yş	Ky Yş	Aç K	K	B Pb	P Mr	K	S	K
Kephrin	Kv	MV	Kl Nr	Sr	Sr	Aç K	K	B Pb	P Kv	Ky Sr	Ky Yş	Mr K
Ethylnoradrenalin	M	MV	M	Ky Yş	Sr	Ky Mv	Ky Kv	B Pb	Mr	Aç K	Ky Mv	M

TABLO : 9

Adsorban leke veren alkaloitlerin ayraçlarla verdiği reaksiyonlar

Alkaloitler	A y r a ç l a r											
	1	2	3	4	5	8	9	10	11	13	14	16
Hydroxyamphetamin	Ky	Mv	M	Mv	Mv	Sr	M	Kv	Sr	Aç	P	M
	Sr									Mr	Kv	
Hordenin	M	Mv	Mr	Mv	Mv	S	M	M	Sr	P	Tr	K
	Aç	Mv	Kl	Yş	K	K	M	Kv	Mr	K	M	K
Methoxyphenamin	Yş		Rn	Kv					K	Sr		

TABLO : 10

Ultraviyolede reaksiyon vermeyen alkaloitlerin ayraçlarla verdiği reaksiyonlar

Alkaloitler	A y r a ç l a r									
	2	3	8	9	10	12	13	14	16	
Amphetamin	Mv	Kl. Rn	Tr	M	Kv	Sr	K	Sr	K	
Methylamphetamin	Mv	Bn. Kl Rn	Tr	M	Vş	Sr	Sr	M	K	
Ephedrin	Mv	Aç. Mv	M	M	S	S	Sr	M	K	
Ethylephedrin	Mv	Mr	M	Aç. Mv	M	B	M	M	K	

KISALTMALAR

Mr	Mor
Sr	Sarı
Yş	Yeşil
P	Parlak
Mv	Mavi
Bn	Benekli
Kr	Kirli
Ky	Koyu
Kv	Kahve rengi
Pb	Pembe
Kl	Kül rengi
Aç	Açık
F	Floresans
Ads	Adsorp
ÜV	Ültraviole
RF	Rf değeri
(—)	Reaksiyon vermiyor
(+)	Zayıf reaksiyon veriyor
(++)	İyi reaksiyon veriyor
(+++)	Kuvvetli reaksiyon veriyor

SUMMARY

REAGENTS FOR IDENTIFICATION OF AMPHETAMINE AND ANALOGOUS SUBSTANCES SEPARATED PAPER CHROMATOGRAPHY

Separation and identification of amphetamine and its homologues and other organic bases used in veterinary medicine as sympathomimetics were performed by paper chromatography. The substances were eluted by (6 : 1,5 : 2,5) butanol/acetic acid/water mixture, The experiment were carried on by isolating the compounds from horse urine and pure substance mixtures by paper chromatography. The spots were classified as follows, (a) fluorescent (b) absorbing (c) non reacting under UV light source The extraction of the substances from urine was performed by ammonium sulphate method. The Rf values obtained for urine were found lower than those of the pure substances. The spots from the two sources were not identical when examined under UV. The results obtained from the pure and urinary substances corresponded to other when the urinary was purified 2-3 times, which is explained by the existence of other compounds interfering with the chromatographic separation.

LİTERATÜR :

- 1 -- **Clake, E.G.G. (1959)** : New appaatus a two stage mloro evaperature. Jour. Pharm. and Phamanology. 12; 509 - 511.
- Clarke, EGC. (1962)** : The doping of racehorses. Jour. Med. Leg. 30; 181 - 185.
- 3 -- **Clarke, E.G.C. — Sowter, S.A. (1964)** : Continuous flow spottig for paper chromatography. Nature. 202; 795 - 796.
- 4 -- **Curry, A.S. — Powwel, H. (1954)** : Paperchromatographyc examination of the alkaloid extract in toxicology. Nature. 173; 1143.
- 5 -- **Cury, A.S. (1960)** : Toxicologycal analysis. Jour Pharma. and Pharmacology 12; 321 - 339.
- 6 -- **Goodman, L.S. (1958)** : The Pharmacological basis of therapeutions. The Macmillan Company. Newyork. pp. 510 - 533.
- 7 -- **Kantemir, İ. (1960)** : Tedavinin esası farmakoloji. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi yayınları p. 207.
- 8 -- **Lundquist, F. (1962)** : Methods of forensic science. 1. Intersciencepublishers Newyork/London. Pp. 31, 32 - 41 - 33.
- 9 -- **Mackay, A. (1961)** : Some effects of drugs used in doping. New. Ze Vet. Jour. 9, 129 - 131.
- 10 -- **Merck Index (1960)** : Chemicals and drugs. Merck Co. Inc Rahway, H.J. U.S.A. Pp. 23, 59, 72, 328, 403, 430.
- 11 -- **Milks, H.J. (1949)** : Practical Veterinary pharmacology, materia medica and therapeuticks. Bailliers, Tindall and Co. London. p. 113.
- 12 -- **Moore, P.A. (1957)** : Detection of doping Vet. Rec. 69: 1079 - 1083.
- 13 -- **Nickolls, L.C. (1946)** : The scientific investigation of crime. Butterworth Co. London Pp. 374 - 382.
- 14 -- **Peterson, N. (1964)** : Methods for collection and analysis of horse salivo and urine for dedection of drugs. 148 07 Hillside Avenue Newyork, U.S.A.
- 15 -- **Smith (1960)** : Caromatographio and electrophoretic techniques. William Heines Medical books. London. Vol. 1. Fp. 84, 298.
- 16 -- **Smith, L.F. (1961)** : The changing pattern of doping in horse racing and its control, New. Ze. Vet. Jour. 9; 121, 128.
- 17 -- **Stewart, C.P. (1961)** : Toxicology. Vol. 1. Academic press. London Pp. 547, 570.