

## BİYOLOJİK MATERYALDE DEĞİŞİK METOTLARLA STRİKNİN ARANMASI

Niyazi SAVAŞ (\*)

### 1 . ÖNSÖZ

Striknin, doğada yaygın olarak bulunmamasının yanısıra kemoterapötik maddeler gibi yaygın bir kullanım alanına da sahip olmamasına rağmen, günümüzde rat zehiri olarak ve daha çok kırsal kesimde olmak üzere zararlı hayvanları yok etmede kullanılmaktadır

Belediyelerin sokaklarda başıboş gezen ve bulaşıcı hastalık etkeni taşıma tehlikesi bulunan köpekleri zehirleyerek ortadan kaldırmak için kullandıkları bir zehir türüdür. Ayrıca insanlar tarafından birbirlerinin hayvanlarına zarar vermek amacıyla da kullanıldığına rastlanmaktadır. Yanlışlıkla striknin'in hayvan yemlerine karışması sonucu zehirlenmeler de meydana gelmektedir.

Her ne şekilde olursa olsun striknin ile zehirlenme sonucu şekillenen rahatsızlıklar veya ölümlerin aydınlatılması için toksikoloji laboratuvarlarına büyük yükümlülükler düşmektedir. Bu nedenle analizlerin kısa sürede sonuçlandırılması ve güvenilir olması önem taşımaktadır.

Striknin aynı zamanda merkezi sinir sistemini uyarıcı özelliğinden dolayı, koşu atlarında doping maddesi olarak kullanılabilir. Günümüzde, doping amacıyla yeni birçok doping etkili ilaçlar kullanılmakla birlikte, doping amacıyla atlara halen striknin de verilmektedir. Bu nedenle yarış atlarının idrarlarında doping maddesi olarak striknin aranmaktadır.

Bu tez çalışmasında, konuya uygun olarak, değişik biyolojik materyallerden toplanan örnekler ve bunlara ek olarak deneysel olarak oluşturulan örneklerde, dört değişik metot ile striknin aranması ve bu metotların birbirine üstünlüklerinin araştırılması amaçlanmıştır.

---

(\*) Etlik Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsü

## 2. GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER

Striknin, molekül ağırlığı 334,4, molekül formülü  $C_{21}H_{22}N_2O_2$  olan, striknin hidroklorid  $C_{21}H_{22}N_2O_2 \cdot HCl \cdot 2H_2O$ :406.9, striknin nitrat  $C_{21}H_{22}N_2O_2 \cdot HNO_3$ : 397.4 ve sitriknin sülfat ( $C_{21}H_{22}N_2O_2$ )  $H_2SO_4 \cdot 5H_2O$ : 857 halleri bulunan temel alkaloidlerdendir (16). Stimülan ilaçlar genel olarak sentral sinir sistemine, beyin ve medüllaya etki ederler. Striknin ise direkt olarak spinal kord'a etki eder (3).

Striknin, Hindistan'da doğal olarak bulunan *strychnos nux vomica* adlı ağacın tohumlarında bulunur. Bu ağacın tohumlarında striknin'den başka brucin adlı bir alkaloid daha vardır. *Strychnos nux vomica*'nın tohumlarına *nux vomica* denir, bu tohumlar "quaker butons" diye de adlandırılır. Striknin, ilk olarak Batı Avrupa'ya 16. yüzyılda fare zehiri olarak girmiş, 18. yüzyılda insan ve hayvanların tedavisi için hekimlikte kullanılmaya başlanmıştır (3,12,21,22).

*Nux vomica*, hemen hemen her türlü deneysel çalışmada kullanılmıştır. Saf olarak kullanıldığında çok acı bir tadı vardır. Mide sekresyonunu stimüle etme etkisi vardır. Veteriner hekimlikte iyi yem yemeyen hayvanlarda iştah açmak için kullanılır. Mide sekresyonunu stimüle etmek dışında hiçbir sağaltıcı etkiye sahip değildir (3,16).

Sitriknin sülfat beyaz kristalize bir tozdur. Suda orta derecede çözünür. Çok şiddetli acı bir tadı vardır. Bu tadı yüksek seyreltmelerde bile hissetmek mümkündür. Bu striknin tuzu katı halde iken çok dayanıklıdır. Solüsyon haline geçince dayanıklılığı biraz azalır. Striknin *nux vomica*'nın aktive edilmiş halidir. Temel olarak spinal kordun stimulanıdır. Fakat yüksek dozlarda medüllayı da stimüle eder. İskelet kaslarında karakteristik konvülsif tonik titreme ve kasılmalara neden olur. Striknin hem sağaltım amaçlı hem de deneysel olarak kullanılmıştır. Günümüzde pek çok araştırmacı tarafından striknin'in veteriner ve beşeri hekimlikte sağaltıcı hiçbir rolü olmadığı görüşü benimsenmektedir. Genellikle, striknin sadece rat zehiri olarak kullanılmaktadır (1,3)

Striknin, refleksleri uyarır, sonra depresyona uğratar, ayrıca sentral sinir sisteminde spinal reflekslerin motorik etkilerini artırır ve latent periyodu azaltır (1).

Medülla spinalisteki sinir impulsları, inhibitör nöyonlar tarafından sınırlandırılırlar. Striknin bu inhibitör nöyonları inhibe etmek suretile karakteristik farmakolojik etkilerini meydana getirir. Böylece, sensorik uyarımların refleks etkilerinde büyük bir artış ve nöyronal aktivitede genel bir büyüme meydana gelir. Striknin, morfin'in meydana getirdiği solunum depresyonunu

antagonize etmekle birlikte, morfinin sentral sinir sistemi üzerine olan eksitator etkileri striknin'in bu tür etkilerine eklenir. Birçok post-sinaptik inhibitör proseslerin striknin tarafından bloke edilmesi ve bunun sonucunda irradiasyon artışı nedeniyle sinir impulsları, medulla spinalisde daha geniş ölçüde yayılır ve bir tek sinir impulsuna verilen yanıt normal durumlardakine göre daha çok sayıda kasları kapsar. Küçük bir sensorik uyarı bütün iradi kaslarda çok ağrılı, şiddetli konvülsiyonlara yol açar. Bunun ardından sentral sinir sisteminde depresyon ve kaslarda gevşeme şekillenir. Bu striknin konvülsiyonunda gövde ve bacaklar gerilemiş durumdadır. Çünkü hayvanlarda ekstensor kaslar, fleksorlardan daha kuvvetlidir. Bu pozisyon "apistonus" diye adlandırılır (1,3,12,21,22).

Striknin'in medulla oblongata üzerine de stimüle etkisi vardır. Striknin, eğer spinal konvülsiyon oluşturacak dozun altında verilirse sağaltım amaçlı kullanılabilir, fakat konvulsif dozun altındaki hiçbir dozun sağaltım amaçlı olmadığı gözönünde bulundurulması gerekir. Bu nedenle, striknin kullanımı anesteziyle deprese edilmiş hastalar dışında kontra endikedir. Striknin'in spinal stimülasyonu anesteziyle bloke edilir fakat medullaya stimülasyon etkisi devam eder, bu nedenle hiçbir zaman tavsiye edilmez. Güvenlik doz sınırı çok dardır (1).

### **Etki Mekanizması**

Striknin'in reseptör düzeyinde etki şekli glisinerjik ara nöronlarda glisin etkisini klorür kanalı düzeyinde bozmasıyla ilgilidir. Glisin omurilikte alt boynuzun gri maddesi ve beyin sapında bulunan inhibitör bir nörotransmitterdir. Özellikle, omurilik gri maddesindeki ara nöronların önemli bir kısmını glisinerjik ve GABA erjik nöronlar oluşturur. Glisinerjik ara nöronlardan salıverilen glisin, klorür kanalları ile kenetlenmiş durumda olan glisin reseptörlerini etkileyerek bu kanalların açılmasını sağlar. Böylece klorür hücreye girişini ve hücrenin hiperpolarizasyona yol açarak hücre zarının istirahat potansiyelini ve uyarıcı eşliğini yükseltir, yani inhibisyona sebep olur. İşte, striknin glisinin, klorür kanalı düzeyinde etkisini bozarak ara ve motor nöronlarda glisin baskısını kaldırıp, uyarı ve çirpimlere yol açar (3,12,21,22).

### **Absorbsiyon**

Striknin mide ve barsak kanalından çok çabuk absorbe edilir, enjekte edildiği dokuda da çok çabuk absorbe edilir. Deriden absorbsiyonu zayıftır (1,21).

## Metabolizma

Striknin vücutta karaciğerde, metabolizma edilir, dolayısıyla karaciğer ve böbreklerde birikir. Bu toksikolojik muayene açısından önem taşır. Striknin köpekler tarafından çok çabuk metabolizma edildi. Öldürücü doz 24 saat arayla bölünerek verilirse hiçbir toksik etki görülmez.

## Semptomlar ve Lezyonlar

Emildikten sonra strikнин etkisi hemen görülür. Vücutta bu zehire karşı bir tolerans meydana gelmez. Etki derecesi ve dolayısıyla ortaya çıkan semptomlar büyük ölçüde alınan dozla orantılıdır. Striknin'in lethal dozunun çocuklar için 15-30 mg, erişkin insanlar için 50-100 mg, at ve inekler için 0.5 mg/kg, köpekler için 0.75 mg/kg, kediler için 2 mg/kg, atlar için 3 mg/kg ve kanatlılar için 5 mg/kg olduğu bildirilmiştir (12,16,21).

Zehirlenmenin ilk semptomları sinirlilik, huzursuzluk, kas titremeleri, boyun tutukluğu şeklinde belirir. Durum ilerledikçe kas titremeleri daha belirginleşir ve aniden konsülviyonlar başlar. Tüm iskelet kasları antagonistik şekilde kontraksiyon yapar. Bacaklar gergin, boyun yukarı ve geriye doğru opistotonus biçimini alır. Zehirlenmenin ilk döneminde konvülsiyon aralıktır. Kısa süreli gevşemeler vardır. Bu gevşemeler bir gürültü, dokunma, küçük bir uyarı derhal karakteristik genel bir tetanik spazma yol açar. Göz pupillası genişlemiştir. Ölüm yaklaştıkça konvülsiyon daha hızlı ve şiddetle olarak birbirini izler. Ölüm solunum kaslarının felci sonucu asfeksiden ileri gelir (1,21,22).

Otopside karakteristik bir bulgu görülmez. Asfeksi görünümü, venöz kanın koyu renkli ve akıcı oluşu ile akciğerler ve serebral meninklerde hemoraji belli başlı lezyonlardır (21,22).

## Tanı ve Sağaltım

Semptomları oldukça karakteristik bir görünüm vermekle beraber, striknin ile zehirlenmelerde ortaya çıkan belirgin tipteki konvülsiyonlar, köpeklerin nitrofenidle ve insektisitlerle zehirlenmelerinde de gözlenebilir. Bu belirtiler tetanoza da benzerlik gösterir. Mide içeriğinde ve organlarda zehirin saptanması ile analitik tanı yapılabilir. Yüksek dozda striknin alınmasıyla kısa sürede ölüm şekillenmişse zehir midede çok, karaciğerde ise pek az bulunur, ancak öldürücü dozda alınmış ve ölüm uzunca bir sürede meydana gelmişse karaciğerde daha çok zehir vardır (1,3,12). Çeşitli araştırmacılar (10,16,17), striknin saptanmasında kullanılacak en iyi biyolojik materyalin mide içeriği olduğunu ayrıca karaciğerin de iyi bir analiz materyali olduğunu belirtmişlerdir.

Moffat ve arkadaşları (16), Oliver ve arkadaşlarına atfen, striknin zehirlenmesinden ileri gelen dokuz ölüm olayında postmortem doku konsantrasyonlarının, kanda beş olayda 0-61 µg/g (ortalama 25 µg/g), beyinde üç olayda 0.47, 4.2, 5 µg/g, böbrekte altı olayda 007-90 µg/g (ortalama 36 µg/g, karaciğerde sekiz olayda 0-209 µg/g (ortalama 95.5 µg/g), spinal kort'da üç olayda 0.1, 1.8, 1.9 µg/g ve idrarda üç olayda 1, 2.5, 7.7 µg/g olarak bulunduğunu bildirmişlerdir.

Clarke (4), Bogan ve arkadaşlarına atfen, striknin zehirlenmesi sonucu ölen bir kişinin ölümünden 8.5 saat sonra, ölüme neden olan zehir miktarının % 0.7 mg'ını idrardan, % 10.18 mg'ını spinal kord'dan, % 0.007 mg'ını böbrekten, % 0.047 mg'ını beyinden ekstre ettiklerini bildirmişlerdir. Yine aynı yazar (4) Jacoby ve Boyle tarafından, miktarı bilinmeyen bir dozda striknin ile zehirlenen iki yaşındaki bir kız çocuğunun, kusturucu ilaçlar, penobarbitan sodyum ve mefenezin uygulaması ile iyileştirildiğini ve kan, idrar ve mide içeriğinde striknin saptandığını bildirmiştir.

Sağaltımda iki yol izlenir. Birincisi konvülsiyonlar belirmeden önce emilmemiş haldeki zehiri vücuttan elimine etmek, ikincisi de konvülsiyonları önlemek ve yatıştırmaktır. Bu yollardan hangisine öncelik verileceği zehirlenmenin bulunduğu döneme göre belirlenir.

Midede emilmemiş halde bulunan striknin'i oksitlemek ve vücut dışına çıkarmak amacıyla seyreltik potasyum permanganat çözeltisi kullanılarak mide yıkaması yapılır veya tannik asit verilerek striknin'in çöktürülmesine çalışılır (3,12,21,22). Bunun için köpeklere 240 ml su içinde 0,25 g potasyum permanganat ve 0.6 g tannik asit veya 15 ml su içinde 1 ml iyot tentürü ya da fazla miktarda demli çay verilmesi yararlı görülmektedir. Kusmayı sağlamak için köpeklere ve kedilere deri altı yolla 3-6 mg apomorfine enjeksiyonu yapılabilir. Ancak konvülsiyonlar varken emetikler tehlikesi vardır (4).

Clarke (4), Swismann ve Jacoby'e atfen, % 0.2 striknin içeren rat zehiri ile zehirlenen 18 yaşındaki bir gencin midesinin yıkanması ve damar içi mefenezin uygulanması ile iyileştirildiğini bildirmiştir.

Striknin zehirlenmesinin sağaltımında en önemli kısmı şiddetli kasılmaların kontrol altına alınması oluşturur. Bu amaçla en sık kullanılan maddeler kısa etki süreli barbitüratlardır. Pentobarbital sodyum (nembutal) köpeklere damar içi yolla 30 mg/kg dozda verilir. Büyükbaş hayvanlara kloral hidrat tek başına veya pentobarbital ile karışım halinde uygulanır. Kloral hidrat atlara, ağızdan veya damar içi yolla 5 g/45 kg dozda verilir. Kloral hidrat - magnezyum sülfat - pentobarbita: (30 g + 15 g + 6.6 g + 1000 ml distile su) karışımından büyük hayvanlara 30-75 kg miktarlarda damar içi yolla uygulanır (22).

Kas gevşetici ve yatıştırıcı etkileri olan diazepam, striknin'i glisin reseptörlerinden kovar, ayrıca glisin benzeri bir etki de oluşturur. Ksilazin de damar içi ve kas içi yollarla kedi ve köpeklere 0.5-3 mg/kg, atlara 0.5-2 mg/kg, sığırlara 0.03-0.2 mg/kg miktarlarda uygulanır ve gerektiğinde tekrarlanır (22).

Morfin ve benzeri maddeler, solunum merkezini deprese etmeleri ve omuriliği uyarmaları, ketamin beynin motor etkinliğini artırması nedeni ile striknin zehirlenmesinin sağıtımında uygulama alanı bulmazlar (22).

Striknin ile zehirlenmiş hayvanlar ılık, sessiz ve loş bir yerde tutulmalı ve dış uyarılardan korunmalıdır.

Daha önceki yıllarda, laboratuvar çalışanları tarafından hazırlanan plaklar ile yapılan ince tabaka çalışması ve yine renk değişimine göre karar verilen ve miktar tayini ile bağlantısı olmayan kimyasal analizler, günümüzde çevre kirliliği ve kimyasal endüstriyel artıkların meydana getirdiği rezidü problemlerine cevap verememektedir.

Günümüzde ise toksikoloji laboratuvarlarında mikrosimik çalışmalarda yüksek performans ince tabaka, yüksek performans sıvı kromatografi, gaz kromatografi, kütle spektrofotometre, özel olarak hazırlanmış çeşitli kitler, Elisa, infrared spektrofotometre ve atomik absorpsiyon spektrofotometre ile yapılan teknik çalışmalar uygulamaya girmiştir (7,9,10,14,15,19).

Akman ve ark. (2) eski bir striknin örneği ile yaptıkları bir çalışmada, örneğin dokuz yıl önce imal edilmiş olmasına rağmen zehirliliğini koruduğunu saptadıklarını, ayrıca farelerdeki LD<sub>50</sub> miktarını 6.7 mg/kg olarak belirlediklerini açıklamışlardır.

Oguri ve ark. (18), striknin'i ratlara 0.5 mg/kg dozda uyguladıklarını, yedi gün boyunca idrar ve dışkılarını analize aldıklarını ifade etmişler ve en fazla miktarı ilk 24 saatte saptadıklarını ve farelere verdikleri miktarın % 30'unu idrardan, % 65'ini dışkıdan ekstre ettiklerini bildirmişlerdir. Ayrıca aynı araştırmacılar, çok az olmakla birlikte idrardan altı adet metabolit saptadıklarını kaydetmişlerdir.

Gratwohl (11) ve Sthal (19), gerek ince tabaka gerekse kağıt kromatografi yöntemleri ile yaptıkları striknin analizlerinde ekstraksiyonda Otto-Stas metodunu çok küçük değişikliklerle uygulamışlardır. Aynı araştırmacılar yaptıkları rekoveri çalışmasında rekoveri oranını % 80 olarak bildirmişlerdir.

Sunshine (20), aynı ekstraksiyon metodunu modifiye etmiş ve develope solvent olarak M/15 fosfat buffer (pH 7.4), 95°C ve ayrıca M/5 sodyum asetat, hidroklorik asit buffer (pH 4.58) kullanıldığını açıklamıştır.

Ehresman ve ark. (7), idrardan, bölünmesiz enjeksiyon ve kapiller kolon kullanarak gaz kromatografi ile türevlendirme işlemi gerektirmeyen ilaçların analizi üzerinde çalışmışlardır. Ayrıca materyal olarak serum ve diğer vücut sıvılarını da kullanmışlar ve bu tekniğin GC/MS için de kullanılabilirliğini açıklamışlardır. Asidik maddeler için ayrı, bazik ve nötral maddeler için farklı ekstraksiyon metotları uyguladıklarını, ancak morfin gibi bazı maddelerin metabolitlerinin bu yöntem ile saptanamadığını bildirmişler ve yöntemin duyarlılığının 1 µg/ml olduğunu rapor etmişlerdir.

Watts ve Simonc (23), kapillar kolon kullanmak suretiyle bazik ve nötral fraksiyondaki ilaçları birlikte ekstre ederek ve gaz kromatografi dedektörü olarak azot-fosfor dedektörü (NPD) kullanarak analizleri gerçekleştirmişler, internal standart olarak SKF-525 A kullanmışlar ve 110 değişik ilacın kullanılan metoda göre alakonma sürelerini belirlemişlerdir. Yine aynı çalışmada bölünmeli enjeksiyon modülasyonu kullanılarak, kullanılan dedektörün bazik ve nötral fraksiyon için çok uygun olduğu ve yöntem duyarlılığının 100 nl/ml olduğu bildirilmiştir.

Donike (6), doping maddeleri ile yaptığı bir çalışmada, doping maddesi olarak da kullanılabilen striknin'in gaz kromatografi analiz prosedürünü, ekstraksiyon modülasyonunu bildirmiş, materyal olarak hem idrar hem de kan örnekleri kullanmıştır. Bu çalışmada gaz kromatografi FID dedektör kullanarak, nötr ve bazik fraksiyondaki ilaçları türevlendirme işlemine tabi tutmamış ve elde ettiği sonuçları GC/MS ile teyid etmiştir. GC/MS'in duyarlılığının 20 nl/ml olduğunu açıklamıştır. Ekstraksiyon işleminde eter kullanmış, kloroform kullanılmasının duyarlılık açısından sakıncalı olduğunu vurgulamıştır.

Czarny ve Hornbeck (5), amfetamin ve diğer nötr ve bazik fraksiyondaki ilaçların analiz çalışmalarında, GC/MS sisteminin selektör iyon monitor (SIM) modunu kullanarak, yöntem duyarlılığının 10 ng/ml ve idrar örnekleri analizlerinde rekoveri oranının % 95 olduğunu bildirmişlerdir.

Foltz ve Fontimen (9) tarafından yapılan benzer bir çalışmada ise türevlendirme etkinliğinin saptanmadığı bildirilmiştir.

### 3. MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada değişik materyaller kullanılarak dört değişik metot ile striknin tesbiti yapıldı.

Biyolojik materyal olarak, Etilik Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsü Toksikoloji Laboratuvarına striknin'den zehirlenme şüphesi ile gelen 12 adet köpek içeriği, deneysel olarak toksik ve öldürücü dozda striknin uy-

gülenen 50 adet farenin mide içerikleri ile karaciğerleri ve deneysel olarak at idrarlarına striknin katılarak oluşturulan 50 adet idrar örneği olmak üzere toplam 112 numune üzerinde çalışıldı.

Dört değişik metotta (ince tabaka kromatografi, kağıt kromatografi, renk değişim metodu, GS/MS) farklı malzemeler kullanıldı.

### **İnce Tabaka Kromatografi**

Materyal olarak, strikninden zehirlenme şüphesi ile Etlik Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsü Toksikoloji Laboratuvarına getirilen 12 adet köpek mide içeriği ile deneysel olarak ağız yoluyla toksik dozda (2 mg/kg) ve öldürücü dozda (8 mg/kg) striknin verilen 25 adet farenin karaciğer ve mide içerikleri karıştırılarak analize alındı.

### **Alet ve malzemeler**

İnce tabaka kromatografi aygıtı ve ekleri (Desaga) UV lambası (Desaga, 366 nm ve 254 nm dalga boylarında) Kromatografik kolonlar (100 ml kapasiteli, 85 cm uzunluğunda büret)

Evaporatör (Rotanta-Hettich)

Çeşitli cam malzemeler

### **Kimyasal maddeler**

**Çözücüler** : Amonyum sülfat, hidroklorik asit, amonyak, kloroform (Merck)

Asidifiye idoplatinate püskürtme ayıracı

Metanol (Merck)

Slikajel 60 HF 254 (Merck, 7739)

Striknin standardı (Alteck, 4771) 5 g

Asidifiye idoplatinate püskürtme ayıracının hazırlanması : 1 g hekzaklorid platin tartılarak üzerine 10 g potasyum iyodür eklendi ve 500 ml distile su ilave edildi. Asidifiye yapmak için ise 10 ml hidroklorik asit eklenerek homojenize edildi.

Striknin standardının hazırlanması : 100 mg standart striknin tartılarak 100 ml distile su içinde homojen bir solüsyon oluşturuluncaya kadar çalkalandı.



## Metot

Widdop (24) tarafından alkaloidlerin analizi için bildirilen metotdan yararlanıldı.

## Ekstraksiyon İşlemi

Homojenize edilmiş 5 g karaciğer ve mide içeriği örneği 500 ml'lık erlene alındı, üzerine 3 ml hidroklorik asit ilave edildi ve bir bagetle karıştırıldı. Erlene 100 ml amonyum sülfat konularak karıştırıcıda 10 dakika karıştırıldı ve 2 saat beklemeye alındı. Karışım süzgeç kağıdından süzüldü ve pH'sı 10 olacak şekilde ayarlandı. pH'sı ayarlanmış olan bu süzüntü kolona döküldü ve üzerinden damlalar halinde 50 ml kloroform geçirildi. Kloroform tabakası, 10 g sodyum sülfat konulmuş olan süzgeç kağıdından geçirildi. Süzüntü evaporatür balonuna alındı ve kuruyuncaya kadar uçuruldu. Kalıntının üzerine 2 N asetik asitden 0.5 ml konulmak suretiyle striknin kalıntısı küçük tüplere alındı.

## Plakların hazırlanması

Daha önceden iyice yıkanıp temizlenerek kurutulmuş olan 20x20 cm ebatındaki cam plaklar, yayıcı tabakaya dizildi ve 30 g slikajel 60 254 HF ve 60 ml distile su ile hazırlanmış karışım ile 0.30 mm kalınlığında kaplandı. Oda derecesinde 15 dakika bekletildikten sonra 110°C'de 1 saat süreyle aktive edildi. Aktive edilen plaklar desikatöre alınarak kullanılmaya hazır halde bekletildi.

## Plakaya lekelerin uygulanması

Eluat kuruyuncaya kadar uçuruldu ve 250 µl alkol + kloroform (1:3) karışımında çözdürüldü, 2 µl'lik numune lekeleri ve 2 µl'lik standart lekesi aynı plaka üzerine uygulandı. Plaka, metanol:amonyak (100:1.5) çözücü sisteminde developpe edildi. Tanktan çıkarılan plaka havada kurutulduktan sonra 254 nm UV ışığı altında gözlemlendi. Standart ile karşılaştırmalı olarak numunede bulunan striknin lekeleri belirlendi. Asidifiye idoplatinate püskürtülerek doğrulama testi yapıldı.

## Kağıt Kromotografisi

Materyal olarak, 10'ar ml'lik 15 adet idrar örneğine artan miktarlarda (0.5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml...) standart katılmak suretiyle oluşturulan örnekler ile deneysel olarak ağız yoluyla toksik dozda (2 mg/kg) ve öldürücü dozda (8 mg/kg) striknin verilen 25 adet farenin karaciğer ve mide içerikleri analize alındı.

### **Alet ve malzemeler**

Kağıt kromatografi malzemeleri

UV lambası (Desega, 366 nm ve 254 nm dalga boylarında)

Kromatografik kolonlar (100 ml kapasiteli, 85 cm uzunluğunda bütet)

Evaporatör (Rotanta-Hettich)

Çeşitli cam malzemeler

### **Kimyasal maddeler**

Çözücüler : Kloroform, amonyak, sitrikasit, N-butanol, asetik asit (Merck)

Iodoplatinate püskürtme ayıracı

Striknin standardı (Alteck, 4771)

14x45 cm ebatlarında kağıt kromatografi kağıtları (Whatman, 3001 917)

Iodoplatinate püskürtme ayıracının hazırlanması : 1 g heksaklorid platin tartılarak üzerine 10 g potasyum iyodür eklendi ve 500 ml distile su ilave edildi.

Striknin standardının hazırlanması : 100 mg standart striknin tartılarak 100 ml distile su içinde homojen bir solüsyon oluşturuncaya kadar çalkalandı.

### **Metot**

Fox (10) tarafından karaciğer ve idrardan alkaloidlerin analizi için bildirilen metotdan yararlanıldı.

### **Ekstraksiyon işlemi**

Homojenize edilmiş 5 g karaciğer ve mide içeriği örneği 500 ml'lık erlene alındı, üzerine 3 ml hidroklorik asit ilave edildi ve bir bagetle karıştırıldı. Erlene 100 ml amonyum sülfat konularak karıştırıcıda 10 dakika karıştırıldı ve 2 saat beklemeye alındı. Karışım süzgeç kağıdından süzüldü ve pH'sı 11 olacak şekilde ayarlandı. pH'sı ayarlanmış olan bu süzüntü kolona döküldü ve üzerine damlalar halinde 50 ml kloroform konuldu, kloroform 10 g sodyum sülfat konulmuş olan süzgeç kağıdından geçirildi. Süzüntü evaporatör balonuna alınarak 5 ml kalıncaya dek uçuruldu. Sonra küçük tüplere alındı ve su banyosunda yoğunlaştırılıp kuruyuncaya kadar uçuruldu.

İdrar örneklerinden 10'ar ml alınarak pH'sı 11'e ayarlandı ve süzgeç kağıdından süzüldü. Süzüntüler kromotografik kolonlara döküldü ve üzerine damlalar halinde 50 ml kloroform konuldu, kloroform 10 g sodyum sülfat konulmuş olan süzgeç kağıdından geçirildi. Süzüntü evaporatör balonuna alınarak 5 ml kalıncaya dek uçuruldu. Sonra küçük tüplere alındı ve su banyosunda yoğunlaştırılıp kuruyuncaya kadar uçuruldu.

#### **Kromotografi kağıtlarının hazırlanması ve lekelerin uygulanması**

Kromotografi kağıtları 14x45 cm ebatlarında kesildi. 30x20x5x cm boyutlarındaki kromotografi tankı temizlenip hazır hale getirildi. Eluat, 250 µl 2 N asetik asitle çözülürerek kağıtlara önce 2 µl standart lekesi sonra 2 µl numune lekeleri uygulandı. Tanka, çözücü sistemi (4.8 g sitrik asit + 130 ml su + 870 ml N-butanol ) döküldü ve kağıtlar tanka yerleştirildi ve üstten bir mantar aracılığı ile birbirlerine değmemeleri sağlandı. Burada 11 saat developpe işlemine tabi tutuldu. Çıkarılan kağıt kromotogramlar kurutulularak 254 nm UV ışığı altında gözlemlendi. İdoplatinate püskürtülmek suretiyle doğrulama testleri yapıldı.

#### **Renk Testi**

Materyal olarak, strikninden zehirlenme şüphesi ile Etlik Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsü Toksikoloji Laboratuvarına getirilen 12 adet köpek mide içeriği ile deneysel olarak ağız yoluyla toksik dozda (2 mg/kg) ve öldürücü dozda (8 mg/kg) striknin verilen 25 adet farenin karaciğer ve mide içerikleri karıştırılarak oluşturulan örnekler ve 10'ar ml'lik 15 idrar örneğine artan miktarlarda (0.5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml...) standart katılmak suretiyle oluşturulan örnekler analize alındı.

#### **Alet ve malzemeler**

Evaporatör  
Porselen kapsüller  
Çeşitli cam malzemeler

#### **Kimyasal maddeler**

Eter, etil alkol, sodyum hidroksit, sülfürik asit (Merk)  
Potasyum bikromat (Merck)  
Striknin standardı (Alteck, 4771, 5 g)

## Metot

Clarke (4) tarafından modifiye edilen Otto-Stas metodundan yararlanıldı.

Mide içeriği ve homojenize edilmiş karaciğer örneklerinden 5 g alınarak 500 ml'lik erlene konuldu ve üzerine alkol + distile su (2:1) sisteminden 200 ml ilave edildi. Karıştırıcıda 5 dakika karıştırıldıktan sonra 2 saat bekletildi. Daha sonra 10 g sodyum sülfat konulmuş olan süzgeç kağıdından süzüldü. Süzüntü pH'sı 10-11'e ayarlandı. Süzüntü evaporatör balonuna alınarak % 70'i uçuruldu. Kalan kısım ayırma balonuna döküldü ve balona 50 ml eter ilave edilerek çalkalanmak suretiyle iki faz oluşturuldu. Eter fazı balondan porselen bir potaya alındı ve su banyosuda kuruyuncaya kadar uçuruldu. Bir başka potaya da sadece standart konuldu ve standart da uçuruldu. Her iki potaya da potasyum bikromat taneleri dikkatli bir şekilde bırakıldı ve üzerlerine bir kaç damla sülfürik asit ilave edildi. Cam bir çubukla karıştırılarak residü, potasyum ve sülfürik asidin reaksiyona girmeleri sağlandı ve renk değişimi (striknin kalıntısının sülfürik asidin etkisi ile ortamı mor renge dönüştürdüğü) gözlemlendi. Aynı işlem standart ile de yapıldı ve şekillenen renk değişimi karşılaştırıldı.

## GC/MS Sistemi

Materyal olarak, 5'er ml'lik 35 adet idrar örneğine (10 ng/ml, 20 ng/ml, 30 ng/ml...) artan konsantrasyonlarda striknin standardı ilave edilerek oluşturulan örnekler analize alındı.

## Alet ve malzemeler

Gaz kromatografi / Kütle Spektrometre, Bilgisayarlı sistem (Hewlett-Packard, 5971)

Temizleme kolonu (C18) (Altech, 8436)

Ön temizleme filtresi (Altech, 3274)

Mikro pipetler (5, 10, 100 µl)

Küçük şişeler (200 µl)

Santrifüj (5000 rpm)

Yüksek devirli karıştırıcı

Vakum tankı ve basınç uygulayıcı motor (Altech) Vorteks cihazı (Altech)

Çeşitli cam malzemeler (pipet, konki tüp vb.)

### **Kimyasal maddeler**

Çözücüler : Metanol, 1 N asetik asit, hekzan, metilen klorid, amonyum hidroksit

### **Metot**

Elsohly ve arkadaşlarının türevlendirme aşaması gerektirmeyen ilaçlar için bildirdikleri GC/MS analiz yönteminden yararlanıldı (8).

### **Ekstraksiyon işlemi**

İdrar örneklerinden 5'er ml alınarak pH'ları 3.5-5.5 olacak şekilde ayarlandı. Örnekler 5000 devirde 5 dakika santrifüj edildikten sonra vakum tankı vasıtasıyla ön filtrasyon işlemine tabi tutuldu ve konik tüplere alındılar.

### **Temizleme aşaması**

Temizleme kolonu önce iki kez 1 ml metanol, daha sonra iki kez 1 ml bidistile su ve en son iki kez 0.5 ml 1 N asetik asit geçirilerek şartlandırıldı. Şartlandırılan temizleme kolonuna idrar örneği döküldü ve vakum yardımı ile kolondan geçirildi, sonra üzerinden iki kez 1 ml distile su geçirildi ve 10 dakika kurumaya bırakıldı. Kuruma işlemi sonunda kolondan iki kez 1 ml hekzan geçirildi. Bu aşamaya kadar kolondan geçirilen idrar, su ve hekzan karışımları tankta toplandı ve atıldı.

### **Eluasyon**

Vakum tankına temiz tüp yerleştirildi ve kolondan metanol: amonyak (98:2) sisteminden iki kez 1 ml geçirilerek eluat toplandı.

### **GC/MS sisteminin analize hazır hale getirilmesi**

Bu sistemde bütün işlemler bilgisayar kontrolünde olduğu için bilgiler metot halinde bilgisayara yüklendi. Önce enjektör ünitesi verileri girildi. Sistem otomatik olarak 2 µl enjekte edecek, enjeksiyondan önce ve sonra olmak üzere iki kez enjektörü yıkayacak şekilde ayarlandı.

Fırın sıcaklığı komutları, başlangıç derecesi 100°C olacak ve dakikada 15°C yükselecek şekilde, daha sonra 200°C'de 3 dakika bekleyip bundan sonra dakikada 10°C yükselerek, analizi 290°C'de sonlandıracak şekilde ayarlandı. Ayrıca, yine bilgisayar komutları ile tespit edilen pikleri hafızasındaki referas pikler ile karşılaştırarak sonuçlandırması için gerekli olan bilgiler girildi. ppb düzeyindeki çalışmalarda (SIM) modu, ppm düzeyindeki çalışmalarda SCAN modu kullanıldı ve tüm çalışmalarda taşıyıcı gaz olarak, dakikada 0.5 ml akacak şekilde, helyum kullanıldı.

#### 4. BULGULAR

Dört değişik analiz metodu ile çalışılan numunelerde her metoda özgü farklı sonuçlar elde edildi ve ayrı ayrı değerlendirmeye alındı.

Analize alınan 12 adet köpek mide içeriğinin 9 adedinde (% 75) ince tabaka kromotografi ile striknin saptandı. Deneysel olarak toksik ve öldürücü dozda striknin verilen 25 farenin mide içeriği ve karaciğer homojenizatlarının hepsinde (% 100) striknin saptandı. Rf değeri 0.22, yarı-nicel olarak gerçekleştirilen rekovert oranı % 78 ve hassasiyet sınırı 0.1 ppm olarak belirlendi.

Kağıt kromotografi yöntemi ile, deneysel olarak toksik ve öldürücü dozda striknin verilen 25 farenin mide içeriği ve karaciğer homojenizatlarının hepsinde, standart katılarak oluşturulan 15 adet idrar örneğinden 0.5 µl/ml ve 1 µl/ml striknin standardı katılan idrar örnekleri dışındaki 13 örnekte striknin saptandı. Rf değeri 0.30 ve hassasiyet sınırı 1 ppm olarak belirlendi.

Renk testi ile, 12 adet köpek mide içeriğinin 7 adedinde (% 58.3), deneysel olarak ağız yoluyla toksik dozda striknin verilen 12 farenin karaciğer ve mide içeriğinin 10'unda (% 83.3) ve öldürücü dozda striknin verilen 13 adet farenin karaciğer ve mide içeriklerinin tümünde (% 100) ve 10'ar ml'lik 15 adet idrar örneğine artan miktarlarda (0.5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml...) standart katılmak suretiyle oluşturulan örneklerden 0.5 µg/ml striknin içeren örnek dışındakilerde (% 93.3) striknin saptandı. Hassasiyet sınırı 0.5 µg olarak belirlendi.

GC/MS sistemi ile materyal olarak, 5'er ml'lik 35 adet idrar örneğine (10 ng/ml, 10 ng/ml, 30 ng/ml...) artan konsantrasyonlarda striknin standardı ilave edilerek oluşturulan örneklerden 10 ng/ml striknin içeren örnek dışındaki tüm idrar örneklerinde (% 97.1) striknin saptandı. Nicel olarak yapılan rekovert çalışmasında rekovert oranı % 88 olarak belirlendi. Striknin'in alakonma zamanı uygulanan sıcaklık programına göre  $12 \pm 0.5$  dakika olarak belirlendi. Ayrıca hafızadaki referans pikleri karşılaştırmalarında % 90-97 arasında değişen oranlarda benzerlik elde edildi. Yöntemin hassasiyet sınırı 10 ppb olarak belirlendi.

#### TARTIŞMA VE SONUÇ

Striknin, doğal ortamda yaygın olarak bulunan bir zehir türü olmadığı için çevre sağlığını ve dolayısıyla geniş insan popülasyonlarını tehdit etmemektedir. Günümüzde sanayi atıkları, tarımda geniş kullanım alanı bulan pestisitler ve son yıllarda gündemde olan antibiyotikler, anabolikler gibi re-

zidü problemlerine neden olmaması da striknin'in bu gibi maddelerden ayrı olarak değerlendirilmesini gerektirmektedir.

Striknin'in zararlı hayvanları yok etmek amacıyla kullanılırken diğer canlıların da zarar görmesi, ayrıca hayvanlara zarar vermek amacıyla kasıtlı olarak kullanılması sonucu ortaya çıkan adli olaylar nedeniyle, toksikoloji laboratuvarlarında analizlerinin yapılması zorunlu hale gelmektedir.

Striknin'in karaciğerde metabolize olması, idrar ile dışarı atılması ve zehirlenmelerin daha çok ağız yoluyla alınmak suretiyle gerçekleşmesi, araştırmacıları biyolojik analiz materyali olarak mide içeriği, kan, karaciğer ve idrar kullanmaya yönlendirmiştir. Pekçok araştırmacı (9,10,15,16,17) tarafından, biyolojik materyal olarak en çok mide içeriği, karaciğer daha az olarak da idrar ve kan örnekleri kullanılmıştır. Bu çalışmada da biyolojik materyal olarak mide içeriği, karaciğer ve idrar örnekleri kullanıldı. Kullanılan materyal yönünden bu çalışma literatürler ile uygunluk içindedir.

Çeşitli araştırmacılar (4,6,19) alkoid analizleri için Otto-Stas tarafından bildirilen metodu modifiye ederek kullanmışlardır. Solvent sisteminde yapılan değişiklikler Rf değerlerini etkilemiştir.

Gradwohl (11) ince tabaka kromotografisinde uyguladığı metotta Rf değerini 0.56, rekoveri oranını % 80 olarak bildirirken, Sunshine (20) Rf değeri 0.79 olarak bildirmiştir. Bu çalışmada kullanılan ince tabaka kromotografi ve kağıt kromotografi metotları ile yapılan analizler sonucunda Rf değerleri sırasıyla 0.22 ve 0.30, ince tabaka kromotografisinde rekoveri oranı % 76 olarak bulunmuş olup bildirilen Rf değerlerinden ve rekoveri oranından farklılık göstermektedir. Rf değerlerindeki farklılıklar ekstraksiyon işlemlerinin farklı metotlarla yapılmış olmasından, rekoveri değerlerindeki farklılıklar ise ekstraksiyon işlemlerinin farklı metotlar ile yapılmış olması ve dolayısıyla solvent sistemlerinin farklı olmasından ve kullanılan plakların laboratuvar koşullarında hazırlanmasından ileri gelebilir.

Widdop (24) tarafından uygulanan ince tabaka kromotografisinde Rf değeri 0.22, Fox (10) tarafından uygulanan kağıt kromotografisinde Rf değeri 0.30 olarak bildirilmiştir. Bu çalışmada elde edilen Rf değerleri bu araştırmacıların bulguları ile uygunluk göstermektedir.

Renk deneyi ile yapılan çalışmalarda, Nicholson (17) tarafından kullanılan metotta yöntem hassasiyeti 0.5 µl olarak belirtilmiştir. Kandemir (13) tarafından yapılan benzer bir çalışmada da yöntem hassasiyeti 0.5 µl olarak bildirilmiştir. Bu çalışmada da yöntem duyarlılığı 0.5 µg olarak belirlenmiştir.

Striknin daha önceki yıllarda sadece ince tabaka kromotografi, kağıt kromoyografi ve renk deneyleri ile analiz edilirken son yıllarda laboratuvarların yeni teknik cihazlarla donanımı sonucu gaz kromotografi, infrared spektrofotometre, kütle spektrometre gibi cihazlarla ve doping laboratuvarlarının bu şekilde çalışmaktadırlar (5,6,14,15,23).

Striknin bazik fraksiyonda analiz edilen bir madde olduğu için kullanılan ekstraksiyon metotları aynı esasa dayanmaktadır.

Ehresman ve ark. (7), materyal olarak serum ve idrar örnekleri kullanarak strikнин'in diğer bazı fraksiyonda ekstre edilen ilaçlarla beraber gaz kromotografi ile analiz etmiş, analizlerinde FID dedektör kullanarak enjeksiyonları bölünmesiz olarak gerçekleştirmişler ve yöntem duyarlılığını 1 µ/ml olarak bildirmişlerdir.

Watts ve Simonick (23) de benzer bir çalışmayı NPD dedektörle gerçekleştirmişler ve bölünmeli enjeksiyon modülasyonunu kullanmışlardır. Yöntem duyarlılığını 100 ng/ml olduğunu ve kullandıkları dedektörün bazik ve nötral fraksiyonda analiz edilen ilaçlar için çok uygun olduğunu bildirmişlerdir.

Donike (6), doping maddelerinin analizleri konusunda yaptığı çalışmalarda strikнин'i nötr ve bazik ortamda ekstre edilen diğer maddelerle birlikte ele almış, bu maddelerin ekstraksiyon ve gaz kromotografi analiz prosedürlerini açıklamıştır. Örnekleri önce gaz kromotografisinde incelemiş, bu incelemede FID dedektörü kullanmış ve daha sonra aynı örnekleri GS/MS sistemine enjekte ederek analiz etmiş ve yöntem hassasiyetini 10 ng/ml olarak bildirmiştir.

Czarny ve Hornbeck (5), GC/MS sistemiyle yine bazik ve nötral fraksiyonda analiz edilen maddeler ile çalışmışlar, GC/MS sisteminin SIM modunu kullanarak analizlerini gerçekleştirmişler ve yöntem hassasiyetini 10 ng/ml, rekovery oranını ise % 95 olarak bildirmişlerdir. Faltz ve Fontimen (9) yaptıkları benzer bir çalışmada, türevlendirme etkinliği saptamadıklarını bildirmişlerdir.

Bu çalışmada GC/MS sistemi ile yapılan analizlerde materyal olarak idrar örnekleri kullanılarak bölünmesiz enjeksiyon uygulandı. Mikroşimik düzeyde yapılan çalışmalarda SIM modu kullanılarak yöntem hassasiyeti 10 ng/ml ve rekovery oranı % 88 olarak belirlendi.

Gaz kromotografi ve GC/MS sistemi ile yapılan analiz çalışmalarında bazı grup ilaçlar enjekte edilmeden önce türevlendirme işlemine tabi tutulurlar. Bunlar, vücutta biotransformasyona uğradıktan sonra konjugatları ile dışarı atılan diüretikler, hidroliz işleminin de gerektiği steroidler gibi maddelerdir. Striknin ise türevlendirme işlemine gerek görülmeden analiz edilebi-



len bir madde olduğundan, bu çalışmada da bu işlem yapılmadan analizler gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada rekoveri oranı Czarny ve Hornbeck (5) tarafından bildirilen rekoveri oranından % 7 daha düşüktür. Bu farklılığın, idrarlar ekstraksiyona alınırken ilk süzme işleminde kullanılan özel filtrelerde çok az bir miktar rezidünün tutulmasından ileri geldiği, elde edilen rekoveri oranının yeterli olması nedeniyle farkın önemli olmadığı kanaatine varıldı. At idrarları çok koyu kıvamlı olduğundan idrarların ön filtre işleminin ekstraksiyonun diğer aşamalarında kolaylık sağladığı görüldü.

Kağıt kromatografi yönteminin gerek hassasiyet açısından gerekse sonuçların güvenilirliği açısından uygulanabilirliği yüksek olmakla birlikte kalıntının develope edilme süresinin uzun olması sonuçların geç alınmasına neden olmaktadır.

Hassasiyet sınırının yüksek olması ve renk değişiminin izlenmesinde tecrübeli elemanlara ihtiyaç göstermediğinden, renk deneyi rutin analizlerde başka bir metotla birlikte kullanılması daha uygun olacaktır.

GC/MS sistemi ile yapılan çalışma günümüz teknolojisine en uygun yöntemdir. Bu yöntemde kullanılan ekstraksiyonda aynı anda birçok maddenin de analizinin gerçekleştirilebilmesi rutin doping analizlerinde kullanılmasına olanak vermektedir. Ancak, sistemin çok pahalı olması ve analiz için kullanılan malzemelerin çoğunun yurt dışından gelmesi analiz maliyetinin çok yüksek olmasına neden olmaktadır.

İnce tabaka kromatografi yöntemi ile analizlerin çabuk gerçekleştirilip, sonuçların rapor edilmesi, rekoveri %'sinin olumlu bulunması, güvenilir olması nedenleri ile rutin analizlerde kullanılabilir.

Sonuç olarak, dört değişik metot ile gerçekleştirilen analiz çalışmalarının hepsinin striknin analizi için uygun olduğu belirlendi. Ancak, ince tabaka kromatografi yöntemi ile sonuçların kısa sürede elde edilmesi, yöntemin uygulanma kolaylığı, rekoveri oranının yeterli olması, analiz maliyetlerinin düşük olması nedenleri ile bu yöntem rutin striknin analizlerinde kullanılabilir en uygun yöntem olarak belirlendi. Bununla birlikte GC/MS sistemi de aynı anda birçok maddenin analizinin gerçekleştirilebilmesine olanak sağladığından rutin doping analizlerinde tercih edilebilecek bir metot olarak görünmektedir.

## 6. ÖZET

Bu çalışmada ülkemizdeki toksikoloji laboratuvarlarında striknin analizi için kullanılabilir en çabuk, kolay, güvenilir ve ucuz yöntemin seçilmesi amacıyla ince tabaka kromatografi, kağıt kromatografi, renk testi ve GC/MS yöntemleri karşılaştırmalı olarak çalışıldı.

İnce tabaka kromatografi Rf değeri, 0.22, yarı-nicel olarak gerçekleştirilen rekoveri oranı % 78 ve hassasiyet sınırı 0.1 ppm olarak, kağıt kromatografi yöntemi Rf değeri 0.30 ve hassasiyet sınırı 1 ppm olarak, renk testi hassasiyet sınırı 0.5 µg olarak ve GC/MS sisteminde nicel rekoveri oranı % 88, hassasiyet sınırı ise 10 ppb olarak belirlendi.

Ülkemizdeki toksikoloji laboratuvarlarında bulunabilecek alet ve malzeme ile yapılabilmesi, çabuk, ucuz, kolay ve güvenilir olması nedeniyle ince tabaka kromatografi yönteminin rutin olarak kullanılabilirliği kanaatine varılmıştır. Ayrıca GC/MS sistemi de aynı anda birçok maddenin analizinin gerçekleştirilebilmesine olanak sağladığından rutin doping analizlerinde tercih edilebilecek bir metot olarak görünmektedir.

## 7. SUMMARY

In this study, the analysis of strychnine was carried out by using thin-layer chromatography, paper chromatography, colour test and GC/MS system to determine a rapid, easy, reliable and cheap method applicable to toxicology laboratories.

It was found that the Rf, semi-quantitative recovery and detection limit for thin-layer chromatography were 0.22, 78 % and 0.1 ppm, and for paper chromatography Rf and detection limit were 0.30 and 1 ppm respectively. Colour test's detection limit was 0.5 µg. Quantitative recovery and detection limit for GC/MS were 78 % and 10 ppb respectively.

It is concluded that thin-layer chromatography is applicable to toxicology laboratories, because it is rapid, easy to perform, reliable and applicable with the equipment and glassware present in all toxicology laboratories. In addition, GC/MS system which enables the analysis of many substances at the same time can be preferred for routine doping analysis.

## 8. TEŞEKKÜR

Bu çalışmada yardımlarını esirgemeyen Sayın Uzman Veteriner Hekim, Eczacı Aysel ÖZSOY'a, konu seçiminde yardımcı olan Sayın Uzman Veteriner Hekim Nesrin TUNCER'e, metotları uygulamada geniş bilgi birikiminden faydalandığım Sayın Uzman Veteriner Hekim Sebahattin KALAYCI'ya, Sayın Uzman Veteriner Ayman ÖNAL'a, Toksikoloji ve Doping Laboratuvarları teknisyenleri ve yardımcı personeline, tez çalışmamda bilgisinden yararlandığım Sayın Uzman Veteriner Hekim Fatma UYANIK'a ayrıca çalışmalarımın yürütülmesine olanak sağlayan Enstitü Müdürü Sayın Metin KERMAN'a sonsuz teşekkür ederim.

## 9. KAYNAKLAR

- 1- ALEXANDER, F. : Veteriner Farmakoloji. Ankara Üniv. Vet. Fak. Yay. No. 308. Yardımcı Ders Kitabı No. 209. s. 136-139. "Çeviri" Özkazanç, A.N. ve Ceylan, S. 1969.
- 2- AKMAN, M.S., GÜRTUNCA, Ş., OZAN, K. ve CEYLAN, S. : Letal doz tayini yoluyla eski bir striknin sülfat numunesinde aktivitenin incelenmesi. Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg., 19 (3): 413-418. 1972.
- 3- BOOTH, N.H. and McDONALD, L.E. : Veterinary Pharmacology and Therapeutics. Sixth Edition. Oowa State University Press. pp. 1073-1075. 1988.
- 4- CLARKE, E.G.C. : Isolation and Identification of Drugs in Pharmaceuticals Body Fluids and Post-mortem Material. the Pharmaceutical Press. pp. 33-37
- 5- CZARNY, R.J. and HORNBECK, C.L. : Quantitation of methamphetamine and amphetamine in urine by capillary GS/MS Part II: Derivatization with 4-carbethoxyhexafluorobutyryl chlorid. J. Anal. Tox. 13: 257-262. 1989.
- 6- DONIKE, M. : The detection of doping agents in blood. Br. J. Sports Med., 10 (3): 147-154. 1976.
- 7- EHRESMAN, J.D., PRICE, M.S. and LAKATUS, J.D. : Screening biological samples for underivatized drugs using a splitless injection technique on fused silica capillary column gas chromatography. J. Anal. Tox., 9: 55-62. 1985.
- 8- ELSOHLY, M.A., ELSOHLY, H.N. JONES, A.B., DIMSON, P.A. and WELLS, K.A. : GC/MS confirmation of stimulats. J. Anal. tox. 1983.
- 9- FOLTZ, R.L., FENTIMAN, A.F. and FOLTZ, R.B. : GC/MS assays for abused drugs in body fluid. National Institute on Drug abuse Research Monograph 32. pp. 175. 1980.
- 10- FOX, R.H. : Paper Chromatography. In: Clarke, E.G.C.: Isolation and Identification of Drugs in Pharmaceuticals Body Fluids and Post-mortem Material. The Pharmceutical Press. pp. 31-42. 1969.
- 11- GRADWOHL, R.B.H. : Clinical Laboratory Methods and Diagnosis. Fifth edition. the C.V. Mosby Com. s. 2320-2323. 1956.
- 12- GILMAN, A.G., GOODMAN, L.S. and GILMAN, A. : Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. Sixth edition. MacMillan Publishing Co., pp. 1072-1075. 1980.
- 13- KANDEMİR, I. : Tibbi toksikoloji. Ankara Üniv. Tıp Fak. Yay. s. 158-164. 1960.
- 14- KENYON, C.N., MELERA, A. and ERNI, F. : Use of the direct liquid inlet LC/MS system for the analysis of complex mixtures of biologicala origin. J. chromatogr. Sci., 18: 103-104. 1980.
- 15- MAYLIN, A.G., DEWEY, A.E. and HANION, D.J. : Determination of drugs in equine urine by gas chromatography-fourier transform infrared spectroscopy. Equine Drug Testig and Toxicology, New York State College of Veterinary Medicine, Cornell Universty. 1986.
- 16- MOFFAT, A.C., JACSON, J.V. MOSS, M.S. and WIDDOP, B. : Clarke's Isolation and Identification of Drugs in Pharmaceuticals Body Fluids ad Post-mortem Material. Second Edition. London Pharmaceutical Press. pp. 976,977. 1986.

Striknin aranması - Savaş

- 17- NICHOLSON, J.A. : Lander's Veterinary Toxicology. Third Edition. Bailliere, Tindall and Cox. pp. 123-124. 1947.
- 18- OGURI, K., TANIMOTO, V., MISHIMA, M. and VOSHIMURA, H. : Matabolic fate of strychnine in rats, Fac. Pharma. Sci., Kyushu Univ. 19 (2): 171-178. 1989.
- 19- STHAL, E. : Thin-Layer Chromotography. A Laboratory Handbook. Second edition. Springer-Verlag Berlin. pp. 446-449. 1969.
- 20- SUNSHINE, I. : CRC Handbook Series in Analytical Toxicology. CRC press. pp. 771. 1979.
- 21- ŞANLI, Y. ve KAYA, S. : Veteriner Farmokoloji ve İlaçla Sağıtım Seçenekleri. Medisan Yay. No. 4 s. 247-249. 1991.
- 22- ŞANLI, Y. ve KAYA, S. : Veteriner Klinik Toksikoloji. Medisan Yay. No. 5. s. 175-178.
- 23- WATTS, V. and SIMONICK, F.T. : Screening of basic durgs in biological samples using dual column capillary chromatography and nitrogen-phoshorus detectors. J. Anal. Tox. 10: 198-204. 1986.
- 24- WIDDOP, B. : Hospital toksikoloji and drug abuse screening. In: Moffat, A.C., Jacson, J.V., Moss, M.S. and Widdop, B.: Clarke's Isolatio and Identification of Drugs in Pharmaceuticals Body Fluids and Post-mortem Material. Second Edition. London Pharmaceu-tical Press. pp. 3-20.