

T. C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
ADLİ TIP ENSTİTÜSÜ
DANIŞMAN: DOÇ. DR. MÜNEVVER AÇIKKOL

FENTANİL VE METABOLİTİ NORFENTANİLİN İDRARDAN
SIVI KROMATOĞRAFI - TANDEM KÜTLE
SPEKTROMETRESİ
(LC-MS/MS) SİSTEMİ İLE YAN YANA TAYİNİ

FEN BİLİMLERİ ANA BİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

FATMA ÇAVUŞ

Biyolog

İSTANBUL, 2012

T. C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
ADLİ TIP ENSTİTÜSÜ
DANIŞMAN: DOÇ. DR. MÜNEVVER AÇIKKOL

FENTANİL VE METABOLİTİ NORFENTANİLİN İDRARDAN
SIVI KROMATOĞRAFI - TANDEM KÜTLE SPEKTROMETRESİ
(LC-MS/MS) SİSTEMİ İLE YAN YANA TAYİNİ

FEN BİLİMLERİ ANA BİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

FATMA ÇAVUŞ

Biyolog

İSTANBUL, 2012

Bu tez projesi İ.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 16538

Annem, Babam ve Babaannem' e,

ÖNSÖZ

Tez çalışmamı Adli Tıp Enstitüsü Laboratuvarı'nda yapmama olanak sağlayan Adli Tıp Enstitüsü Müdürü Sayın Prof. Dr. İmdat ELMAS'a,

Eğitimim süresince her türlü olanağı sağlayan, çalışmalarım sırasında yakın ilgi ve önerileriyle beni yönlendiren, bilgi ve deneyimleri ile manevi desteğini esirgemeyen, her türlü araştırma olanağını sağlayan hocam Sayın Prof. Dr. Salih CENGİZ'e (İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü Fen Bilimleri Anabilim Dalı Başkanı),

Yüksek lisans eğitimim boyunca desteğini sürekli yanımda hissettiğim, tez danışmanlığımı üstlenerek, tez çalışmamın ortaya çıkmasında deneyimleriyle benden yardımlarını ve manevi desteğini esirgemeyen, sabırla yol gösteren danışman hocam Sayın Doç. Dr. Münevver AÇIKKOL'a,

Çalışmalarımın deney aşamalarında bana her türlü desteği sunan, verdiği destekten dolayı beni yüreklendiren Dr. Ecz. Beril ANILANMERT'e,

Çalışmalarımı takip eden ve deneyimleriyle bana yol gösteren Araş. Gör. Selda MERCAN'a,

Tezin hazırlanmasında sırasında yardımcı olan ve tezim üzerinde çalışmama imkan sağlayan mesai arkadaşlarıma, özellikle Murat YAYLA ve Gülten RAYIMOĞLU'na,

Hasta örneklerimin toplanması ve araştırmalarım sırasında yaptığı yardımlardan ve manevi desteğinden dolayı, sevgili arkadaşım Ayşe TORUN' a,

İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Ağrı Bilim Dalı çalışanlarına ve özellikle Sayın Doç. Dr. Kader KESKİNBORA'ya,

Burada ismini sayamadığım İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü bünyesinde çalışan, doğrudan veya dolaylı olarak bana yardımcı olan herkese;

Kendisine ayırmam gereken zamandan çalarak tamamladığım yüksek lisans eğitimim süresince manevi desteğiyle sürekli yanımda olan, hayatın her alanında yardım ve desteğini esirgemeyen, yaşam kaynağım Halil YONAR' a,

Hayatım boyunca her konuda sonsuz olanaklar sağlayan, hiçbir zaman maddi ve manevi desteklerini eksik etmeyen, büyük emeklerle beni bu günlere getirip, beni ben eden Anneme ve Babama,

Bu dünyada olmasa da, benim varlığını her an yüreğimde hissettiğim Babaanneme,

Minnet ve teşekkürü bir borç bilirim.

Araş. Gör. Fatma Çavuş

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMALAR LİSTESİ	vii
ŞEKİL LİSTESİ	x
TABLO LİSTESİ	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Ağrı Tanımı ve Sınıflandırılması	5
2.1.1. Başlama Sürelerine Göre Ağrılar	6
2.1.2. Nörofizyolojik Etkilerine Göre Ağrılar	7
2.1.3. Kaynaklandığı Bölgeye Göre Ağrılar	9
2.2. Ağrı Tedavisi	10
2.3. Ağrı Tedavisinde Kullanılan İlaçlar	10
2.4. Opioid Analjezikler	12
2.4.1. Opioidlerin Klinik Kullanımı	13
2.4.2. Opioidlerin Farmakolojisi	14
2.5. Fentanil ve Norfentanil	16
2.5.1. Fentanilin Fizikokimyasal Özellikleri	20
2.5.2. Fentanilin Farmakolojik ve Farmakokinetik Etkileri	25
2.5.3. Fentanilin Olası Yan Etkileri	27
2.5.4. Fentanil İle İlaç Etkileşimleri	27

2.5.5. Fentanilin Uygulama Yolları.....	28
2.5.6. Fentanilin İstismarı ve Yanlış Kullanımı.....	36
2.6. Biyotransformasyon.....	38
2.6.1. Ksenobiyotiklerin Biyotransformasyon Mekanizması.....	40
2.6.2. Sitokrom P450 (CYP450) Enzimleri.....	41
2.6.3. CYP450 Enzim Sisteminin Polimorfizmi.....	42
2.6.4. Biyotransformasyonla İlgili Bazı Temel Kavramlar.....	44
2.7. Madde Bağımlılığı.....	46
2.8. Sıvı Sıvı Özütleme (SSÖ) Yöntemi.....	50
2.8.1. SSÖ ile Ayırma ve Zenginleştirme.....	51
2.8.2. SSÖ Verimini Etkileyen Faktörler.....	52
2.9. Kromatografi İle İlgili Genel Bilgiler.....	55
2.10. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	56
2.11. Kütle Spektrometresi.....	60
2.12. Sıvı Kromatografisi Kütle Spektrometrisi (LC-MS)	66
2.13. Ardışık Kütle Spektrometrisi (MS/MS)	67
2.14. Sıvı Kromatografisi Ardışık Kütle Spektrometrisi (LC-MS/MS)....	68
2.14.1. Kromatografi de Kantitatif Analiz.....	73
2.14.2. LC-MS/MS Uygulama Alanları.....	75
2.15. Validasyon (Geçerlilik Testi) da Kullanılan Parametreler.....	76
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	82
3. 1. Çalışmada Kullanılan Gereçler.....	82
3. 2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	84
3. 3. İdrar Örneklerinin Toplanması ve Bireylere Ait Özellikler.....	85

3. 4. Çalışmanın Kromatografik ve Spektrometrik Basamakları.....	86
3. 4. 1. Çalışmada Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	87
3. 4.1.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması.....	87
3.4.1.2. Çalışma İçin Gerekli Diğer Çözeltilerin Hazırlanması.....	91
3.4.2. Sıvı Sıvı Özütleme.....	93
3.4.2.1. İdrar Örneklerinin Hazırlanması.....	95
3.4.2.2. Etken Maddeyi İçermeyen Kör İdrar Örneğine Katım Yapılarak Hazırlanmış Olan ÖÖK Kalibrasyon Örneklerinin Hazırlanması.....	98
3.5. Kromatografik ve Spektrometrik Analiz Koşulları.....	100
3.6. Seçicilik Çalışmaları.....	104
3.7. Kalibrasyon Eğrilerinin Hazırlanması.....	104
3.7.1. Standart Çözeltiler İle Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması.....	104
3.7.2. Katım Örnekleri İle Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması.....	105
3.8. Tayin Alt Sınırı (LOQ)’ nın Ve Gözlenebilme (Teşhis) Alt Sınırının Belirlenmesi.....	105
3.9. Geri Kazanım Çalışmaları.....	106
3.10. Çalışmanın Bilgi ve Bulgularının Değerlendirilmesi.....	108
4. BULGULAR.....	109
4.1. Geçerli Kılma Parametrelerinin Uygulanması.....	109
4.1.1. Yöntemin Metanolde ve İdrarda Seçiciliği.....	110
4.2. Kalibrasyon Eğrisi, Doğrusallık ve LOQ Değerleri.....	114

4.2.1. Standart Çözeltilerin Kalibrasyon Eğrisi, Doğrusallık ve LOQ Verileri.....	114
4.2.2. Özütleme Öncesi Katım (ÖÖK) Çözeltilerinin Kalibrasyon Eğrisi, Doğrusallık, LOD ve LOQ Verileri.....	119
4.3. Geri Kazanım (Recovery).....	125
4.4. Hasta Bulgularının Değerlendirilmesi.....	127
4.4.1. Hasta Örneğine Ait Kromatogramlar.....	129
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	130
6. ÖZET.....	145
7. SUMMARY.....	147
8. ÖZGEÇMİŞ.....	149
9. KAYNAKLAR.....	150
10. EKLER.....	170
Ek 1: Etik Kurul Onay Yazısı.....	171
Ek 2: Bilgilendirilmiş Onam Formu Örneği.....	172
Ek 3: Hasta Bilgi Formu Örneği.....	173

KISALTMALAR LİSTESİ

µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
akb	Atomik Kütle Birimi
APCI	Atmosferik Basınç Kimyasal İyonizasyon
APPI	Atmosferik Basınç Kimyasal Fotoiyonizasyon
CA	Çarpışma Aktivitesi
CI	Kimyasal İyonizasyon
CID	Çarpışma Kaynaklı Parçalanma
cm ²	Santimetre Kare
CO ₂	Karbondiyoksit
dak	Dakika
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EI	Elektronik İyonizasyon
EOS	Endojen Opioid Sistemi
ESI	Elektrospray İyonizasyon
F	Noniyonize Fentanil
F+	İyonize Fentanil
G	Gram
g/mol	Gram/mol
GC-MS	Gaz Kromatografisi – Kütle Spektrometresi
h	Saat

HPLC	Yüksek Basıncılı (Performanslı) Sıvı Kromatografisi
IASP	Uluslararası Ağrı Araştırmaları Derneği Taksonomi Komitesi
IUPAC	Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (International Union of Pure and Applied Chemistry)
İV	İntravenöz
İM	İntramuskuler
KBB	Kan Beyin Bariyeri
kg	Kilogram
L	Litre
LC	Sıvı Kromatografi
LC-MS/MS	Sıvı Kromatografi-Ardışık Kütle Spektrometresi
LOD	Gözlenebilme (Teşhis) Alt Sınırı (Limit of Detection)
LOQ	Tayin Alt Sınırı (Limit of Quantification)
L/kg	Litre/Kilogram
M	Molar
m/z	Kütle/Yük
mg	Miligram
mg/kg	Miligram/Kilogram
mL	Mililitre
ml/kg/dak	Mililitre/Kilogram/Dakika
mm	Milimetre
MRM	Çoklu Reaksiyon İzleme
MS	Kütle Spektrometresi
MS/MS	Ardışık Kütle Spektrometresi

n	Analiz Sayısı
ng	Nanogram
ng/mL	Nanogram/Mililitre
No	Numara
NSAII	Nonsteroid Antienflamatuvar İlaçlar
°C	Santigrat Derece
ort	Ortalama
ÖÖK	Özütleme Öncesi Katım
ÖSK	Özütleme Sonrası Katım
pH	Hidrojenin Gücü (Power of Hydrogen)
pKa	Dağılım Katsayısı
RSD	Bağıl Standart Sapma
SD	Standart Sapma
sn	Saniye
SSÖ	Sıvı Sıvı Özütleme
SSS	Santral Sinir Sistemi
TDF	Transdermal Fentanil
TTS	Transermal Terapötik Sistem
UM	Ultra hızlı metabolizör
vb	Ve Benzeri
v/v	Hacim/hacim
w/v	Kütle/hacim

ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 2.1.** Fentanilin Molekül Yapısı
- Şekil 2.2.** Fentanilin Üç Boyutlu Görüntüsü
- Şekil 2.3.** Fentanil Molekülünün Parçalanma Şekli
- Şekil 2.4.** Norfentanilin Kimyasal Yapısı
- Şekil 2.5.** Norfentanil Molekülünün Parçalanma Şekli
- Şekil 2.6.** Fentanilin Metabolizasyonu Sonucu Oluşan Metabolitleri
- Şekil 2.7.** Oral Transmukozal Fentanilin Uygulanışı
- Şekil 2.8.** Oral Transmukozal Fentanilin Farmakokinetiği
- Şekil 2.9.** TDF Sisteminin Tabakaları
- Şekil 2.10.** Maddelerin Tayin Yöntemleri
- Şekil 2.11.** Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Cihazının Şematik Görünüşü
- Şekil 2.12.** Bir LC-MS/MS Sisteminin Genel Yapısı
- Şekil 2.13.** Kuadropol'ün Yapısı
- Şekil 2.14.** Bir LC-MS/MS Cihazının Temel Bileşenleri
- Şekil 2.15.** LC-MS ve LC-MS/MS Sistemlerinde İyonizasyon Kaynakları
- Şekil 2.16.** Atmosferik Basınç İyonizasyonu
- Şekil 4.1.** (a) Kör İdrar Örneği, (b) 12,5 ng/mL Konsantrasyondaki Fentanil ile (c) 25 ng/mL Konsantrasyondaki Norfentanil ve (d) 5 ng/mL Konsantrasyondaki İç Standart Papaverinin LC-MS/MS Kromatogramları

- Şekil 4.2.** (a) Boş Metanol Çözücüsü İle (b) 25 ng/mL Konsantrasyondaki Fentanil ve (c) 125 ng/mL Konsantrasyondaki Norfentanil Etken Maddelerini İçeren Metanolün LC-MS/MS Kromatogramları
- Şekil 4.3.** (a) Etken Maddeleri İçermeyen İdrar Özütü İle, (b) Fentanil İçeren ÖSK ve (c) ÖÖK İdrar Örneklerinin; (d) Norfentanil İçeren ÖSK ve (e) ÖÖK Kör İdrar Örneklerinin LC-MS/MS Kromatogramları
- Şekil 4.4.** 500 ng/mL' lik Fentanil Etken Maddesinin MS/MS Spektrumu
- Şekil 4.5.** 500 ng/mL'lik Norfentanil Etken Maddesinin MS/MS Spektrumu
- Şekil 4.6.** 500 ng/mL'lik Papaverin İç Standardının MS/MS Spektrumları
- Şekil 4.7.** Fentanil ve Norfentanil Standart Çözeltileri Kullanılarak, Özütleme Çalışmaları Öncesinde IS Yardımıyla Çizilen Kalibrasyon Grafikleri
- Şekil 4.8.** Fentanil ve Norfentanil İçin Standart Çözeltilerine Ait %RSD Grafiklerine Göre LOQ Değerleri
- Şekil 4.9.** Fentanil ve Norfentanil İçin Özütleme Öncesi Katım Örneklerine Ait Kalibrasyon Grafikleri
- Şekil 4.10.** Fentanil ve Norfentanil İçin ÖÖK Örneklerine İlişkin % RSD Grafiklerine Göre LOQ Değerleri
- Şekil 4.11.** (a) 2 No'lu Hasta İdrarındaki Fentanile Ait ve (b) 2 No'lu Hasta İdrarındaki Norfentanile Ait Kromatogram

TABLO LİSTESİ

- Tablo 2.1.** Klinikte Kullanılan Bazı Opioidlerin Etki Dozları
- Tablo 2.2.** Transdermal Veriliş Sisteminin Yapı ve İçeriği
- Tablo 2.3.** Bağımlılık Tipleri ve Özellikleri
- Tablo 2.4.** Yaygın Kullanılan Bazı Çözücülerin Özellikleri
- Tablo 3.1.** Çalışmada Kullanılan Gereçlerin Adları, Marka ve Modelleri
- Tablo 3.2.** Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler
- Tablo 3.3.** Çalışmaya Dahil Edilen Hastaların Kullandıkları Fentanil Etken Maddeli İlaçların Günlük Dozları
- Tablo 3.4.** Etken Madde ve İç Standart İçin Belirlenen MS/MS İyonları ve Enerjileri
- Tablo 3.5.** Çalışmanın Kromatografik (HPLC) Parametreleri
- Tablo 3.6.** Çalışmanın Spektrometrik (MS/MS) Parametreleri
- Tablo 4.1.** Çalışmada Yer Alan Maddelerin Alıkonma Zamanları, Standart Sapmaları (n=15)
- Tablo 4.2.** Standart Çözeltiler Kullanılarak, Özütleme Çalışmaları Öncesinde Çizilen Kalibrasyon Grafiklerine İlişkin Veriler
- Tablo 4.3.** Standart Çözeltilere Ait %RSD Değerleri

Tablo 4.4. ÖÖK Örneklerine Ait Olan Kalibrasyon Grafiklerine İlişkin Veriler

Tablo 4.5. ÖÖK Örneklerine Ait %RSD Değerleri

Tablo 4.6. 5,00, 50,00, 250,00 Ve 500,00 ng/mL Derişimlerdeki Fentanil Etken Maddesi İçin, Ortalama Bağlı Standart Sapma (%RSD), Standart Sapma Ve Geri Kazanım Bulguları ($n \geq 6$)

Tablo 4.7. Hastaların İdrarlarında Bulunan Etken Madde (Fentanil) Ve Metabolit (Norfentanil) Miktarları ($n \geq 3$)

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnsanın geçmişteki deneyimlerine dayanan, hoş olmayan duygusal ve duyumsal bir his olan ağrının tedavisinde; zamanında, yerinde ve gerektiğinde ilaç uygulaması gibi temel ilkelere uyulması koşulu ile kuvvetli opioid ilaçlardan yararlanılması oldukça kabul görmektedir. Bununla birlikte; hastaların uyuşturucu bağımlısı olmasından korkulması, opioidlerin yan etkileri, kırmızı reçete bulundurma gerekliliği ve fobisi gibi nedenlerle opioidlerin kullanımından kaçınılmaktadır. Bu sakıncaları; ağrı için yeterli dozda ilacın verilmesi, kontrollü ilaç tüketiminin bağımlılığa yol açmayabileceği, ağrının şiddetine uygun dozda verilen opioidlerin hayati sorun oluşturmayacağı vb. gibi bazı bilgilere sahip olarak ortadan kaldırmak olasıdır. Bu bilgilerin eksikliğinde veya dikkatsiz kullanım sonucu oluşabilecek istenmeyen durumlar adli toksikolojinin konularından biridir (Meyer U.A., 2000).

İlaç vücuda alındıktan sonra organizmada etkileşime uğramaktadır. Fentanil gibi gerek tedavi amaçlı, gerekse istismar amaçlı kullanılan maddeler, organizmada pek çok farklı netice gösterebilmektedir. Bu nedenle vücuda alınan herhangi bir maddenin etkileştiği yerde insana ve maddeye özgü tüm bilim dalları devreye girmekte ve oluşacak sonuçların bilinebilmesi hedeflenmektedir (Leon, J. ve ark. 2006; Meyer U.A., 2000). Adli bilimlerde toksikolojik analizler insan hayatına ve olayların çözümüne olan etkileri bakımından günümüzde giderek önem kazanmaktadır. Bu amaçla yapılan analizlerin sonuçlarının güvenilirliğinin yüksek olması gerekmektedir. Bu aşamada analitik kimyada nitel ve nicel analiz sonuçlarının önemi giderek artmakta ve mahkemeye ölüm nedeni belirlenmesi

için yardımcı olmakla yükümlü olan adli toksikologlara büyük görevler düşmektedir (Tuncer, S., 2006; Coopman, V., 2007).

Kronik ağrı tedavisinde güçlü opioidler içerisinde yavaş salınımlı opioidler tercih edilmektedir. Yavaş salınımlı opioidler içerisinde fentanil, morfine tercih edilen bir analjeziktir. Bunun sebebi de opioid kullanımına bağlı olarak ortaya çıkan solunum depresyonu, ciddi depresyon, psikolojik bağımlılık gibi yan etkilerin fazla gözlenmemesi, molekül ağırlığının düşük, yağda çözünürlüğünün ise yüksek olması ve fentanilin morfinden 100 kat daha güçlü etkiye sahip bir opioid analjezik olmasıdır (Corinna, C., 2008). Fentanilin ana metaboliti olan norfentanil biyolojik olarak aktif olmadığından; fentanilin analjezik etkisini arttırmamakta ve güvenlik profilini etkilememektedir. Ayrıca fentanilin aktif metabolitlerinin olmaması da, bu maddenin farmakolojik olarak sık sık tercih edilmesini sağlamaktadır (Özcan. H., 2005; Coopman, V., 2007).

Yukarıda sayılan sebepler doğrultusunda günden güne dünyada fentanilin yasal tüketimi ve üretimi artmaktadır. Fentanilin günümüzde daha çok tıbbi amaçlı kullanımına karşın suistimal edilmesi, ayrıca yasadışı kullanılmaya başlanması da fentanili adli bilimler açısından önemli bir madde haline getirmektedir. Yasadışı olarak fentanil özellikle uyuşturucu etkisinden yararlanmak suretiyle veya intihar amacıyla kullanılmaktadır. Fentanil kırmızı reçete ile kontrol edilen opioidlerden olmasına rağmen, yapılan bir araştırmaya göre sokakta uyuşturucu kullanıcıları arasında da fentanil kullanımı çok yaygındır. Elde edilen bulgulara göre de küresel fentanil üretimi ve tüketiminin 2001-2005 yılları arasında 3 kat arttığı saptanmıştır (Goldman, B., 2009). Tedavi amacı ile kullanımında dahi fentanil zehirlenmeleri ve ani ölümler görülebilmektedir. Son yıllarda kronik ağrı sebebi

ile hastaneye yatırılan olgularda fentanile bağılı aşırı dozda ölümler tespit edilmiştir (Jin, M., 2005; Jonathan, G., 2007; Zhang, W., 2009). Bu sebeple yurtdışında bazı birimlerde fentanil, rutin uyuşturucu analizleri içerisinde yer almaktadır (Winecker, E., 2006; Denton, S.J., 2008).

Opiat kullanıcılarında zamanla oluşan bağımlılığın yanı sıra; yoğun bakım ünitelerinde, ameliyathanelerde ve ağrı kliniklerindeki çevresel maruziyet ve bu ortamlarda çalışanların kişisel hassasiyetine bağılı olarak, fentanil bu bölümlerde çalışan kişilerde mesleki maruziyete, kötüye kullanıma ve bağımlılığa da neden olabilmektedir (Mark, S., 2006).

Fentanil esas olarak karaciğerde CYP3A4 enzimleri ile hızla inaktif metabolitlerine metabolize olur. Fentanili metabolize eden enzimi kodlayan CYP3A4 geninde görülen polimorfizm, fentanil metabolizasyonunu etkilemektedir. Polimorfik yapılara bağılı olarak bu maddeyi kullanan kişilerde ciddi toksikolojik etkiler meydana gelmektedir. Hızlı metabolizasyon sonucu etkin tedavi gerçekleşmemekte veya aktif metabolitin toksik etkisi ortaya çıkmakta; yavaş metabolizasyon sonucu ise ana maddenin atılımı yavaşlayacağından buna bağılı intoksikasyon ve ölüme varan sonuçlar görülebilmektedir. Ayrıca son dönemlerde kronik ağrı tedavisinde Transdermal Terapötik Sistem olarak bantların kullanımında 72 saatlik dozun aşımı ile akut zehirlenme olması, bu bantların intihar amaçlı kullanımı, çevresel ve mesleki maruziyet ve bağımlılık, yasadışı üretim ve tüketim gibi nedenler fentanil maddesini adli bilimler, adli toksikoloji ve klinik açıdan önemli bir madde haline getirmektedir (Jin, M., 2005; Zhang, W., 2009).

Bilinen bu gerçeklerden yola çıkarak dünya genelinde adli olguların bir bölümünü

oluşturan fentanil bağımlılığı ve buna bağlı oluşan ani ölüme kadar varabilen olguların aydınlatılmasında katkısı olacağı düşüncesi ile bu çalışmada fentanil ve metaboliti norfentanilin idrarda yan yana tayinleri için; LC-MS/MS sistemi kullanılarak seçici, hassas ve sağlam bir yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır (Johansson, M., 2004; Verplaetse, R., 2010; Labroo, R., 1997). Ayrıca bu yöntemin acil toksikoloji ihtiyaçlarına yanıt verecek duyarlılıkta bir yöntem olarak optimize edilmesi ve rutin hizmete kazandırılması yanında, bireysel tedavide fentanil ile etkin tedavinin sağlanabilmesi için, fentanil metabolizasyonunda etkin olan CYP3A4 enzimlerini kodlayan gen bölgelerinde meydana gelen polimorfizmlerin belirlenmesine yönelik çalışmalara da destek olması hedeflenmiştir (Robert, P., 2006; Moore, C., 2007) .

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ağrı Tanımı ve Sınıflandırılması

Günümüzde “Dayanılabilen tek ağrı başkasının ağrısıdır.” sözü oldukça kabul görmüş olup Algoloji Kongrelerinin açılış sözünü oluşturmaktadır.

Ağrı, Latince “poena” (ceza, intikam, işkence) sözcüğünden gelen ve tanımı oldukça güç bir kavramdır. Uluslararası Ağrı Araştırmaları Derneği Taksonomi Komitesi (IASP) tarafından yapılan ve en çok kabul gören tanımlamaya göre ağrı; vücudun belirli bir bölgesinden kaynaklanan, bir doku harabiyetine bağlı olan veya olmayan, insanın geçmişteki deneyimleriyle de ilgili hoş olmayan emosyonel (duygusal) ve sensoriyel (duyumsal) bir duydur (Trescot, A.M. ve ark., 2008; Özcengiz D. ve ark., 1998). Bir başka deyişle ağrı, zararlı bir etkiye karşı verilen fizyolojik yanıttır ve davranışsal veya sosyokültürel ölçüler arasındaki karmaşık etkileşim ile değişir (Ducharme J. ve ark., 2011). Bireysel ağrı tecrübesi bu nedenle sabit değildir, o anki ve geçmiş medikal öyküye, fiziksel ve duygusal olgunlaşmaya, ağrının anlamına, ailevi alışkanlıklara, kültüre ve çevreye bağlı olarak değişkenlik gösterir (Ducharme J. ve ark., 2011). Bu nedenle ağrı öznel, bireysel ve yüksek oranda karmaşık bir fenomendir (Wheeler E. ve ark., 2010).

Akut veya kronik ağrı hem insana olan ızdırabı, hem de üretkenlik kaybı yönünden sağlık sistemlerine maliyet açısından büyük yük getirmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), dünya popülasyonunun %20’sinin gereksiz yere ağrıdan yakındığını ve bu grubun %33’ünün yaşam kalitesinde düşme olduğunu saptamıştır. Bu sebeple yakın zamana kadar bir çok hastalığın semptomu olarak

görülen ağrı, artık günümüzde bir sendrom olarak ele alınmakta ve tedavi edilmektedir (Esener Z.,1991; Wheeler, E. ve ark., 2010).

Ağrı aşağıda gösterildiği şekilde gruplara ayrılmaktadır (Trescot, A.M. ve ark., 2008; Erdine S., 2000):

1. Başlama Sürelerine Göre

- a. Akut Ağrı
- b. Kronik Ağrı

2. Mekanizmalarına Göre

- a. Nosiseptif Ağrı
- b. Nöropatik Ağrı
- c. Deafferantasyon Ağrısı
- d. Reaktif Ağrı
- e. Psikojenik Ağrı

3. Kaynaklandığı Bölgeye Göre

- a. Somatik Ağrı
- b. Visseral Ağrı
- c. Sempatik Ağrı

2.1.1. Başlama Sürelerine Göre Ağrılar

Akut Ağrı

Ani olarak başlayan, neden olan lezyon ile arasında yer, zaman, şiddet açısından yakın ilişkinin olduğu doku hasarıyla başlayıp, yara iyileşme süresince giderek azalan ve kaybolan ağrı tablosudur. Nedeni; hastalık, anormal kas veya organ fonksiyonu gibi zararlı uyarılardır. En sık izlenen şekli, ameliyat sonrası oluşan

ağrılarıdır. Çok kere, birkaç günlük veya birkaç haftalık bir tedavi sonucu nedenin yok olmasıyla ağrı da geçer. Akut ağrının yüzeysel, derin somatik (bedensel) ve visseral (iç organlarda oluşan ağrı) olmak üzere üç şekli bulunmaktadır (Ferrante, F.M., 2000) .

Kronik Ağrı

Eğer ağrı akut hastalığın normal seyrini aşar ve belli bir süreden sonra da devam ederse ağrının kronikleştiği kabul edilir. Bu süre 1-6 ay arası olabilir. Bu ağrıların oluşmasında psikolojik ve çevresel faktörler de çok kere önemli rol oynamakla birlikte bazen de hiçbir neden bulunamaz. Bu ağrılar kişinin hayat kalitesini değiştirip, kişiyi anormal davranışlara yöneltebilir. Belirtiler ve tedavinin etkinliğinde kişisel, ailesel, sosyal veya ekonomik problemler gibi birçok çevresel etkenin rolü vardır. Kronik ağrı en çok; kas-iskelet, kronik organ hastalıklarında ve merkezi sinir sistemi lezyonlarında izlenir (Morgan, E.G., 1998).

2.1.2. Nörofizyolojik Etkilerine Göre Ağrılar

Nosiseptif Ağrı

Nosiseptörler, sinir sistemi dışında tüm doku ve organlarda bulunan reseptörlerdir. Ağrı ileten lifler ile ağrıyı omuriliğe, oradan da talamusa ileten ve serebral korteks tarafından algılanan uyarılar, nosiseptörler tarafından algılanır. İzlenen bu yol, ağrının en kısıtlı tarifini yapmakta da kullanılmaktadır. Nosiseptif sınıflama, somatik ve visseral ağrı olarak iki alt gruba ayrılır. Bu ikisi arasındaki temel farklılık, somatik ağrının duyuşal lifler ile; visseral ağrının ise sempatik lifler ile taşınmasıdır (Morgan, E.G., 1998).

Nöropatik Ağrı

Somatik sinir sistemin anormal uyarılmasına bağlı olarak ortaya çıkarlar. Ağrı kendiliğinden ortaya çıkabilir ve ağrı eşiği düştüğü için normalde ağrısız olan uyarı ağrı yapabilir. Ağrı hissi sağlam bölgelere yansıyabilir. Bu grup ağrılar genel olarak opioidlere daha az cevap vermektedirler (Ferrante, F.M., 2000) .

Deafferantasyon Ağrısı

Somatik sinir sistemi uyarı iletiminin yaralanma sonucu merkezi sinir sistemine akışının kesilmesi ile ortaya çıkan ağrılardır (Ferrante, F.M., 2000).

Reaktif Ağrı

Motor ya da sempatik afferentlerin (=duyu organlarımızdan beyne ve omuriliğe bilgi taşıyan nöronların) refleks aktivasyonu sonucu nosiseptörlerin uyarılmasına bağlı olarak ortaya çıkan ağrılardır (Ferrante, F.M., 2000) .

Psikojenik Ağrı

Psişik (ruhsal) sorunların arttığı depresyon gibi durumlarda ağrı olarak tanımlanan duygulardır. Ağrılı bir durum mevcut olabilirse de, asıl sorun psikolojik olup hastanın nörofizyolojik duyarlılığının artması ile önemsiz bir doku sorununun aşırı şekilde hissedilmesidir (Morgan, E.G., 1998; Ferrante, F.M., 2000).

2.1.3. Kaynaklandığı Bölgeye Göre Ağrılar

Somatik Ağrı

Somatik sinirlerden kaynaklanan, ani ve keskin başlayan, tanısı kolay olan ağrılardır. Kökeni; kas, tendon (=kasların iskelete bağlandığı yer, kas kirişi), eklem veya kemiklerdir. Somatik doku hasarına bağlı olarak oluşur ve sızlama, bıçak batar gibi, basınç hissi, zonklama şeklinde tarif edilirler. Uyarının süresine göre de lokalizasyonu farklı olabilir. Örneğin, dirsekteki kısa ve küçük bir travma sonucu ağrının lokalizasyonu sadece dirsektedir. Fakat şiddetli ve uzun süren travma sonucu ağrı bütün kola yayılır (Morgan, E.G., 1998; Ferrante, F.M., 2000).

Visseral Ağrı

İç organların veya onları örten oluşumların (perikard (=kalbi bir kese gibi sararak örten zar), periton (=karındaki organları saran iki katlı karın zarı) vb.) fonksiyonlarının bozulması sonucu oluşan ağrıdır. Yavaş başlar. Künt ve sızlayıcıdır, kramp tarzındadır. Çok kere sempatik veya parasempatik aktivite (kusma, bulantı, terleme, kan basıncında ve kalp atım sayısında değişiklikler) ile birlikte gelişmektedir. Ağrı visseral doku hasarına bağlı ise kemirici ve kramp şeklinde, organ kapsülü de etkilenmişse sızlama, keskin ve zonklama şeklindedir. İç organın ellenmesi, hatta kesilmesi ağrı doğurmazken gerilmesi ağrıyı başlatabilir (Morgan E.G., 1998).

Sempatik Ağrı

Sempatik sinir sistemi aktivasyonu ile ortaya çıkan ağrılardır. Yanma tarzında olup ağrıyan bölgede solukluk, üşüme değişikliklerinden yakınılır (Ferrante, F.M., 2000).

2.2. Ağrı Tedavisi

Tedavinin amacı; ağrının en kısa sürede geçirilmesi ve tekrarının önlenmesidir. Hastaya ağrının geçeceğine dair güven verme, iyi iletişim kurma, ağrının kabullenilmesinin engellenmesi ve hasta katılımının sağlanması önemlidir. Disiplinler arası koordinasyon zorunludur ve ağrı tedavisi tüm bakım planının entegre kısmıdır. Tedavi devamlı olmalı, ajanlar sürekli değiştirilmemeli, hastalığın seyrine ve hastanın aktivite kapasitesine uygun olmalıdır. Örneğin; cerrahi, radyoterapi, kemoterapi ve hormonal tedavi ile (kanser veya tümör sebebi ile oluşan ağrının giderilmesinde); nonsteroid, antienflamatuvar ilaçlar ve opioidler ile (enfeksiyon kaynaklı ağrının giderilmesinde), fiziki tedavi ile (sıcak, soğuk, masaj ile cilt stimulasyonu, egzersiz, pozisyon değişikliği), psikoterapi ile, ağrıyı arttıran nedenlerin (fiziksel, ruhsal, psikososyal) tedavisi yardımıyla, çeşitli ağrıların tedavisine yönelik uygulamalar yapılmaktadır (Marcus, D.A., 2005).

2.3. Ağrı Tedavisinde Kullanılan İlaçlar

Ağrı tedavisinde kullanılan analjeziklerin seçimi, ağrının tipine ve şiddetine göre değişmektedir. Bu analjeziklerin kullanımı DSÖ' nün önerdiği basamak sistemine göre düzenlenir. Buna göre hafif ağrılarda tedaviye nonsteroid antienflamatuvar ilaçlar (NSAII) ile başlanmaktadır. Birine yanıt vermeyen ağrı diğerine yanıt verebileceği için ikinci basamağa geçilmeden önce ajan değiştirilebilmektedir. NSAII'a cevap vermeyen orta şiddetteki ağrıda zayıf opioid ajanlar eklenmekte (kodein, oksikodon, tramadol), yanıt yoksa güçlü opioidlere (morfin, fentanil) geçilmektedir (Melanson, S.E. ve ark., 2009; World Health Organization, 1992).

Analjezik kullanımında öncelikle en basit, güvenli ve ucuz olan oral yol tercih edilmektedir. Analjezikleri oral kullanamayan, şiddetli bulantı-kusması olan ve gastrointestinal sistem patolojisi olanlarda rektal, transdermal vb. gibi yollar kullanılmaktadır (Ashburn, M.A. ve ark., 1993; Portenoy, R.K. ve ark., 1999; Camu, F. ve ark., 2002).

Ağrı tedavisinde analjezik seçimi ve tedavinin düzenlenmesinde ağrı tipinin belirlenmesi, hastanın özellikleri ve ilacın klinik farmakolojisinin iyi bilinmesi gerekir. Yaş etkileri ve organ toksisiteleri çok iyi değerlendirilerek uygun ilaç seçilmeli, daha sonra bunun uygulama yolu ve dozu ayarlanmalıdır. Burada önemli olan ağrı duyulmaya başlandıkça ilaç verilmesi değil, ilacın kan düzeyinin belirli bir değerde tutulmasıdır. Aksi takdirde hastanın ağrıyla duymaya başlamadan önce verilecek dozlar, özellikle anksiyetinin (kaygı, endişe) de artması ile beklenen etkiyi daha güç sağlamaktadır (Melanson, S.E. ve ark., 2009; Baselt, R.C., 2004).

Analjezik ilaçlar; NSAII (aspirin ve ibuprofen vb.), opioidler (kodein, oksikodon, tramadol, fentanil, morfin vb.), lokal anestezipler (kokain, prokain, lidokain vb.) olmak üzere 3 grupta toplanabilirler (Güzeldemir M.E. ve ark., 1995).

Önemli analjeziklerden biri olan morfin gibi güçlü opioidleri kullananlarda daha belirgin olmak üzere, ilacın kesilmesi son dozdan 8–10 saat sonra başlayan akut yoksunluk sendromuna neden olur. Akut dönemden sonra, kronik yoksunluk dönemi gelir ve bu dönem 26–30 hafta kadar sürer (Kayaalp, S.O. ve ark., 2009). Bağımlı olduğu maddeyi veya onun yerini tutabilen bir diğerini temin edebildiği sürece, kişinin günlük yaşantısını, çalışmasını ve çevre ile olan ilişkilerini normal düzeyde sürdürebilmesi mümkündür. Ancak maddenin düzenli temini çoğu zaman

mümkün olmadığından, bağımlılar önemli kişisel ve sosyal sorunlar yaratmaktadırlar (Kayaalp, S.O. ve ark., 2009; Uzbay, İ.T. ve ark., 2003).

2.4. Opioid Analjezikler

Geçmişte, gelincik ailesinden bir bitki olan *Papaver somniferum* (haşhaş)'un tam olgunlaşmadan çizilen kapsüllerinden çıkan afyon sakızları halk arasında ağrı kesici ilaç olarak kullanılmıştır ve elde edilen bu sakıza afyon (*opium*), afyondan elde edilen doğal maddelerle benzeri sentetik maddelere ise opiyatlar veya opioidler adı verilmektedir (Kayaalp, O.,1998; Gutstein, H.B. ve ark., 2006). Opioid terimi opium ile ilişkili ve benzeri olan bütün bileşikler içermektedir. Opioid kelimesi Yunanca'da özsü anlamına gelen ve afyon çiçeğinin öz suyundan elde edilen ilaç için kullanılan *opos* kelimesinden türemiştir (Schmidhammer, H., 1998).

Haşhaş bitkisi ülkemizde Afyonkarahisar başta olmak üzere devlet tarafından izin verilen birkaç ilde kontrollü bir şekilde ekilmekte, kapsülleri tamamen kurutulduktan sonra kırılarak içindeki tohumları alınmaktadır. Bu tohumlar haşhaş yağı kaynağı veya yiyeceklerde katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (Kayaalp, O.,1998).

Opiumdan elde edilen ve prototipi morfin olan opioidler, vücuttaki sinir uçlarında kendilerine özel reseptörlere bağlanarak morfin benzeri etki gösterirler. Bunlar doğal veya sentetik ekzojen maddelerdir. Vücutta ağrı iletiminden sorumlu maddelerin salınımını ve beyinde ağrının algılanmasını inhibe ederler.

“Narkotikler” olarak da tanımlanan opioidlerin tavan etkileri ve maksimum dozları yoktur. Elde edilişlerine göre; doğal olanlar (morfin, kodein vb.), yarı

sentetik (semisentetik) olanlar (eroïn, hidromorfon, oksimorfon, vb.), sentetik olanlar (fenilpiperidin türevleri, fentanil, sufentanil, alfentanil, remifentanil, metadon vb.) şeklinde 3 ana gruba ayrılırlar (Kayaalp, O.,1998; Gutstein, H.B. ve ark.,2006).

2.4.1. Opioidlerin Klinik Kullanımı

Opioidlerin özellikle acil serviste ve akut ağrı tedavisinde önemli bir yeri vardır. Ancak, çeşitli nedenlerle hekimlerin kullanımdan kaçındıkları bir ilaç grubudur. Oysa opioidler hızlı ve güçlü analjezik etkiye sahip olmaları nedeniyle akut ağrı tedavisinde daha sıklıkla ancak kontrollü olarak kullanılmalıdır. İlaçların etki ve yan etki mekanizmalarının doğru bir şekilde bilinmesi tedavide, doğru opioidin seçilme oranını ve hastalarda opioidlere karşı oluşan cevabın etkisini arttırmaktadır (Ducharme, J. ve ark., 2011). Son dönemlerde opioidlerin popüler kullanım alanı akut ağrıdır. Opioidler, birçok farklı yollarla vücuda verilmektedir; spinal epidural, inhalasyon, intranasal, oral, intravenöz (İV), intramuskular (İM), rektal, transdermal ve transmukozal vb. Ayrıca hastalar birçok opioidin analjezi dışındaki etkilerinden de yararlanırlar. Acil serviste akut ağrı tedavisinde kullanılan opioidler sıklıkla İV veya transdermal yoldan hastaya verilmektedir. Klinikte kullanılan bazı opioidlere ait özellikler ve etki dozları Tablo 2.1' de özetlenmektedir (Nelson L.S. ve ark., 2009; Miner, J.R. ve ark., 2010).

Tablo 2.1. Klinikte Kullanılan Bazı Opioidlerin Etki Dozları (Ducharme, J. ve ark., 2011; Miner, J.R. ve ark., 2010; Karcioğlu, Ö., 2008).

İlaç	Başlangıç Dozu		Veriliş Yolu	Etki süresi
Fentanil	1	µg/kg	İV	30-60 dakika
Morfin	0.10-0.15	mg/kg	İV	3-5 saat
	10	mg/kg	İM	
Meperidin	0.75-1.50	mg/kg	İV	2-3 saat
Oksikodon	0.10	mg/kg	İV	3-4 saat
Kodein	1.30	mg/kg	İV	2-4 saat

2.4.2. Opioidlerin Farmakolojisi

Opioid reseptörlerinin her biri farklı bir etkiden sorumlu olup her opioid farklı reseptöre, farklı derecede affinite gösterir. Opioid reseptörlerin aktivasyonu, nöronlardan salgılanan asetilkolin gibi nörotransmitterlere verilen tepkileri inhibe eder. Bu etkilerin hücre mekanizması, kalsiyum ve potasyum iyonlarındaki değişimlere bağlanmaktadır (Miner, J.R. ve ark., 2010).

Opioid ilaçların kötüye kullanımı çabuk gelişen bir bağımlılığa neden olmaktadır. Fiziksel bağımlılık çabuk başlar, bununla birlikte tolerans gelişir. Kullanma süresi arttıkça gerek fiziksel bağımlılığın derecesi ve gerekse toleransın derecesi paralel olarak artar. 7–10 gün devamlı opioid uygulanması, ilaç kesildiğinde, hafif fakat fark edilebilir yoksunluk belirtilerine neden olur. Genellikle aşırma derecesinde ilaç özlemi ve dolayısıyla güçlü psişik bağımlılık görülür. Maddeyi bıraktıktan

sonra yeniden başlama oranı (nüks) yüksektir. Örneğin, insanda tek bir terapötik doz olarak verilen morfinin ilk dozundan itibaren fiziksel bağımlılığın başladığı ileri sürülmektedir. Madde temini sorunu olmaksızın uzun süre, düzenli kullanan bağımlılarda günlük doz, normal günlük dozun yaklaşık 125 katına kadar çıkabilir. Opioidlerin öfori yapıcı (keyif verici) etkisine, sedatif etkisine ve santral sinir sistemi üzerindeki diğer etkilerinin çoğuna karşı tolerans geliştiği halde, az sayıda bazı etkilerine karşı (miyozis gibi) tolerans gelişmez (Ducharme, J. ve ark., 2011).

Çeşitli opioid grubu maddelerin bağımlılık yapma potansiyelleri farklı derecelerdedir. Güçlü öfori etkisi olan heroin en yüksek bağımlılık yapma potansiyeli gösteren maddedir ve ilaç olarak kullanılması pek çok ülkede yasaklanmıştır. Buna karşılık, bazı opioidler, örneğin öksürük ilacı olarak kullanılan kodein (metilmorfin) ile benzomorfan türevi sentetik opioidler bağımlılık potansiyeli nisbeten düşük olan ilaçlardır. Opioidlerin intravenöz verilmesi beyindeki konsantrasyonu, hızlı olarak yüksek bir düzeye çıkardığından, diğer yollardan verilise göre aşırı bir öfori (“rush”, zevkten çatlama) yapar (Katz, N. ve ark., 2002; Uzbay, İ.T. ve ark., 2003).

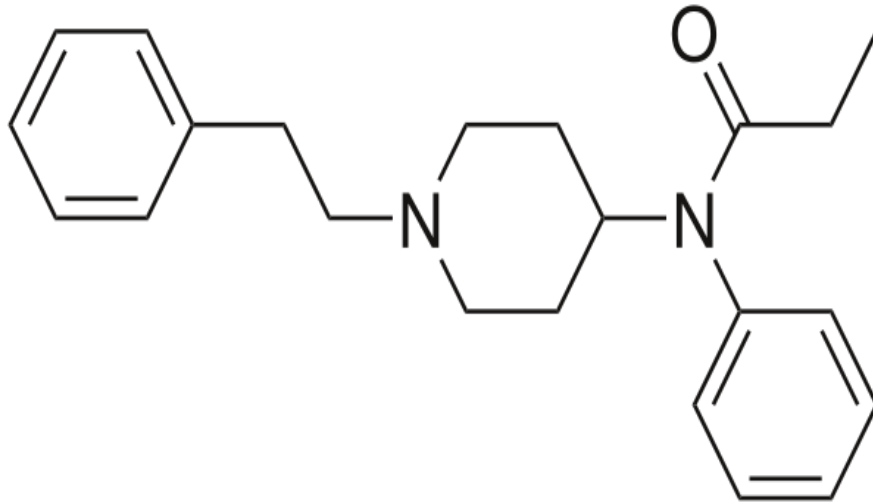
Opioidlerin faydalı etkilerinin yanı sıra, toksik yan etkilerinin olduğu ve bağımlılık riski taşıdıkları da yüzyıllardır bilinen bir gerçektir. Yan etkilerin azaltılabilmesi için sentetik opioid analjezikler üretilmiş ancak bunların da doğal opioidlerle benzer yan etkilere sahip oldukları görülmüştür. Fentanil de bir sentetik opioiddir (Fukuda, K., 2005; Reves, J.G., 2005).

2.5. Fentanil ve Norfentanil

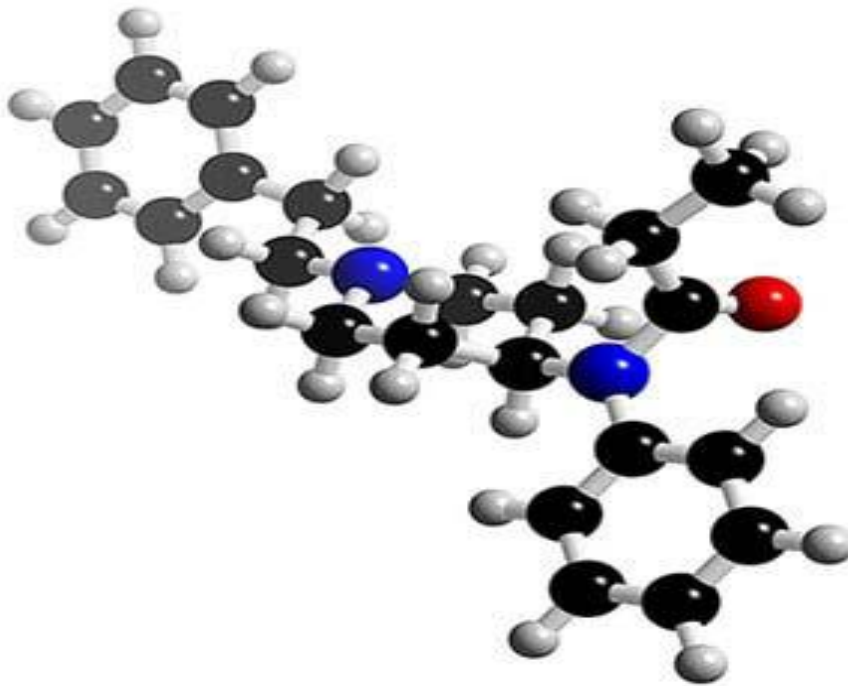
Fentanil

4-anilopiperidin serisine ait sentetik bir fenilpiperidin olan fentanil ilk olarak 1950' lerin sonunda Belçika'da bulunan *Janssen Pharmaceutica*® tarafından sentezlendi. 1970'li yıllarda ise Amerika İlaç Piyasasında yerini aldı (Smialek J.E. ve ark. ,1994). Anestezi sırasında ve postoperatif ağrı tedavisinde ağrı kesici olarak kullanılan fentanil, DSÖ'nün yaptığı uyuşturucu madde sıralamasına göre 3. derecede yer alan bir analjeziktir. Kimyasal yapısı petidine benzeyen, fakat bir petidin türevi olmayan; morfinden yaklaşık 80 kez, meperidinden ise 500 kat daha etkin ve güçlü bir analjezik aktiviteye sahip olmasının yanında daha az yan etkileri olan güçlü, sentetik, narkotik, analjezik bir opioiddir (Morgan, E.G., 2002; Stanley, T.H., 1992).

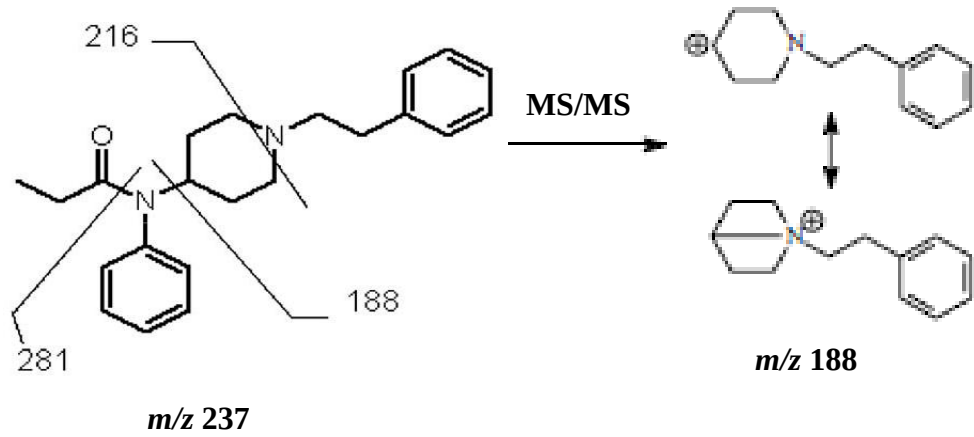
Fentanil, *Sublimaze*® ticari adı altında bir intravenöz anestetik olarak 1960'larda tıbbi çalışmalarda kullanılmaya başlandı. Preparatlarda Fentanil Sitrat halinde bulunan fentanil etken maddesi, analjezik etkisini endojen opioid nörotransmitterlerin spesifik reseptörlerde oluşturduğu etkiyi taklit ederek meydana getirmektedir (Biley, P.L. ve ark., 1994; Stanley, T.H., 1992). Fentanil maddesinin molekül yapısı, üç boyutlu görüntüsü ve parçalanma şekli aşağıdaki şekillerde gösterilmektedir (Şekil 2.1, Şekil 2.2 ve Şekil 2.3)



Şekil 2.1. Fentanilin Molekül Yapısı (Korhonen, A. ve ark., 2003).



Şekil 2.2. Fentanilin Üç Boyutlu Görüntüsü (Korhonen, A. ve ark.,2003).



Şekil 2.3. Fentanil Molekülünün Parçalanma Şekli (Koch, D.E. ve ark., 2004; Peer, C.J., 2007).

Kapalı Kimyasal Formülü: $C_{22}H_{28}N_2O$

Açık Formülü: N-fenil-N-(1-(2-feniletıl)-4-piperidinil) propanamid (IUPAC)

Molekül Ağırlığı: 336.471 g/mol

Dağılım Katsayısı (pKa): 8.4

Çözünürlük: Eterde kısmen çözünür; etanol, kloroform, metanol, etilasetat, n-hekzan, heptanda iyi çözünür.

Ergime Noktası: 87.5 °C

Biyoyararlanım: %92

Proteine Bağlanma: %80-85

Yarılanma Ömrü: 3-12 saat

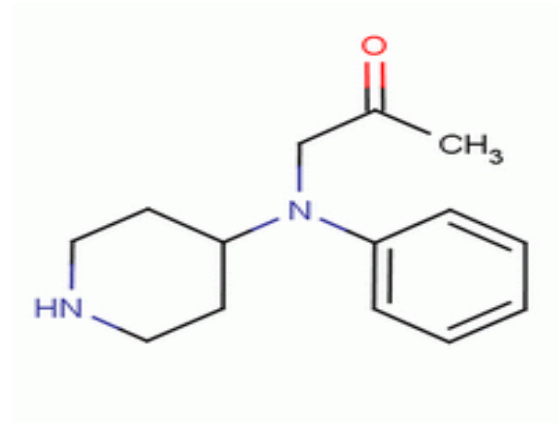
Atılım: Böbreklerden idrar ile atılır.

Uygulanma Yolu: Oral, intravenöz, intramuskular enjeksiyon, epidural, transmukozal, transdermal, rektal (Papich, M.G., 2001; Pascoe, P.J., 2000).

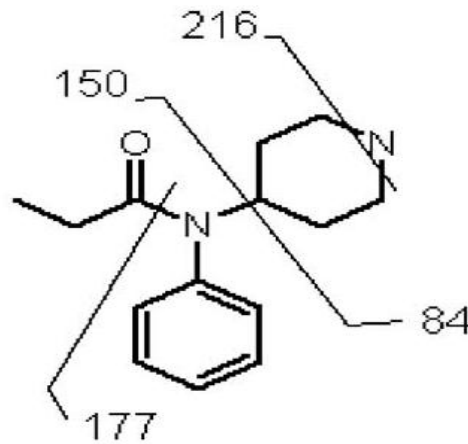
Norfentanil

Fentanilin ana metaboliti norfentanildir. Biyolojik olarak aktif olmadığından fentanilin analjezik etkisini arttırmaz ve güvenlik profilini etkilemez. Ayrıca norfentanilin nörotoksisiteye yol açtığına dair ciddi bir kanıt da yoktur. Ancak, hassas kişilerde, opioidler belli bir nörotoksisite meydana getirebilir. Opioidlerin sebep olduğu kognitif problemler son on yılda artış göstermiştir (Coopman, V. ve ark., 2007).

Norfentanilin molekül yapısı, kimyasal özellikleri ve parçalanma şekli aşağıda açıklandığı şekildedir (Şekil 2.4 ve Şekil 2.5).



Şekil 2.4. Norfentanilin Kimyasal Yapısı (Pascoe, P.J., 2000).



Şekil 2.5. Norfentanil Molekülünün Parçalanma Şekli (Koch, D.E. ve ark., 2004).

Kapalı Kimyasal Formülü: C₁₄H₂₁N₂O

Açık Formülü: N-fenil-N-piperidinil-4-propionamid

Molekül Ağırlığı: 233.33 g/mol

Kaynama Noktası: 359.8 °C

Alevlenme Noktası: 171.4 °C

2.5.1. Fentanilin Fizikokimyasal Özellikleri

pKa'sı 8.43 olup bazik bir amin olan fentanil yüksek lipid çözünürlüğü, hızlı ve etkili dağılımı nedeniyle etkin bir opioid olup intramuskular, intravenöz, transdermal, transmukozal ve solutma gibi değişik yollarla kişilere uygulanabilmektedir. Bireysel özelliklere göre plazma konsantrasyonun da 1 ng/mL'lik miktarı solunum depresyonuna neden olabilme riski olmasına rağmen, 1,5–2 ng/mL konsantrasyonda iyi bir postoperatif analjezi sağlar. Etkisi 30–60 saniye içinde başlar ve 30-60 dakika sürer. Maksimum analjezik etki düzeyi 3–6 dakika içinde sağlanır. Tekrarlayan ve uzun süreli uygulamalarda inaktif dokular doymuş olduğundan etki süresi uzamaktadır (Ronald, D.M., 2010; Egan, T.D., 2000).

Fentanil analogları olan alfentanil, sufentanil ve remifentanilin etki güçleri morfin ve meperidine göre çok yüksektir. Morfinin etki gücü 1 kabul edilirse sufentanilinki 1000, remifentanilinki 300, fentanilinki 100, ve alfentanilinki 15, meperidininki 0.1 olarak ifade edilmektedir (Myles, P.S. ve ark., 2002).

Fentanil İV uygulandıktan sonra plazma konsantrasyonu hızla düşmektedir. Enjekte edilen dozun % 98'i plazmadan 1 saat içinde kaybolur. Hızlı dağılım 1-2

dakika sürer ve ikinci dağılım fazıda 10-30 dakikadır. Beyin fentanil seviyesi plazma seviyesi ile paralellik göstermektedir (Stein, C., 2004; Filiz, T., 2010).

Fentanil büyük oranda yağ dokusunda tutulur ve plazmadaki konsantrasyonu yağdaki konsantrasyonunun altına düşünce, yavaş olarak dolaşıma geri salınır. İnaktif dokulara geçmesi plazma konsantrasyonunun devamlılığını sağlamaktadır. Bu sayede plazma konsantrasyonu belirli bir seviyede kalır ve plazma eliminasyon yarı ömrü uzar (Morgan, E.G., 2002).

Fentanilin fizyolojik pH'da iyonize olmayan fraksiyonu (F) < %10'dur. pKa'sı yüksek olduğundan çoğunlukla iyonize şekilde bulunmaktadır. Asidoz durumunda ortamdaki iyonize yapıdaki fentanilin artması; etken maddenin etkisinin artmasına, etki süresinin uzamasına neden olur ve sonuçta bu mekanizmayla solunum depresyonu riski artar. Kanda aşırı miktarlarda alkalinin (baz) bulunduğu alkaloz denen anormal durumlarda ise ortamdaki fentanilin lipiddeki çözünürlüğü artarak noniyonize formu artar. Böylelikle beyin fentanil seviyesi alkaloz ile yükselmektedir (Sear, J.W., 1998; Myles, P.S. ve ark., 2002; Kayhan, Z., 2004; Morgan, E.G., 2002).

Opioid reseptörleri hücre yüzeyinde yer aldıklarından, fentanilin farmakolojik etkisini belirleyen, hücre sıvısındaki iyonize fentanil (F+) konsantrasyonudur. Fentanilin serbest baz formu ise, hücre içerisine girer ve sitomembranlara, mikrosomlara, diğer yapılara bağlanarak hücre içerisinde birikir. %80'i plazma proteinlerine bağlanan fentanilin, önemli bir kısmı da (%40' ı) eritrosit denen kırmızı kan hücreleri tarafından alınır. Fizyolojik pH'da sadece %8.4'ü noniyonize forma dönüşen fentanil pH 7,4'de yaklaşık %80, pH 7,2'de ise %60 oranında proteinlere bağlanmaktadır. Hücre dışındaki alanın pH'sındaki en ufak

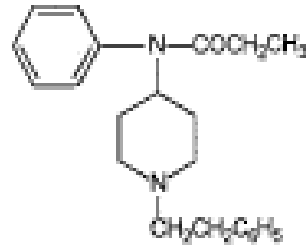
düşüş F ve F+ arasındaki dengeyi F+ lehine bozar. pH'daki 0.2 birimlik düşüş, iyonize fraksiyonu ve dolayısıyla farmakolojik etkiyi ikiye katlar. Fentanilin iyonize olmayan şekli lipofilik olduğundan biyolojik membranlardan geçişi hızlıdır (Garg, A. ve ark., 2010; Fukuda, K., 2005).

Lipid çözünürlüğü oldukça yüksek bir madde olduğundan, kan beyin bariyerini (KBB) hızla geçerek (morfinden 156 kat fazla) merkezi sinir sistemine giriş yapabilir. Dolayısıyla etki başlangıç süresi kısadır ve dağılım hızı fazladır. Dağılım hızının büyük olmasının nedeni, yağda fazla erimesi ve böylece dokulara hızlı geçmesidir. Bu sayede hızla kandan ayrılarak geniş olarak vücut içinde dağılıma uğramaktadır. Klirensi 10-12 mL/kg/dak, dağılım hacmi 3-5 L/kg ve buna bağlı olarak eliminasyon yarı ömrü 3-12 saat arasında değişir. Yağda yüksek oranda eriyebilirliği sayesinde, uygulandıktan 5 dak sonra SSS'de en fazla etkisini gösterir (Hug, C.C. ve ark., 1981; Ratan, A. ve ark., 2001; Ronald, D.M., 2010). Yüksek lipofilik özelliğe sahip olması nedeniyle fentanil akciğerlerde belirgin olarak "ilk geçişte birikim"e uğramaktadır (yaklaşık % 70–85). Akciğerde birikim sadece geçici olmaktadır ve fentanil kısa sürede geri bırakılmaktadır (0.2–5.8 dak). Fakat kas ve yağ dokularından uzaklaşma süresi, başlangıçtaki yayılım hızına oranla oldukça düşüktür. Bunun sebebi de lipid çözünürlüğü ve molekül ağırlığının yüksek olması şeklinde açıklanmaktadır (Hug, C.C., 1984; Coda, B.A., 1996).

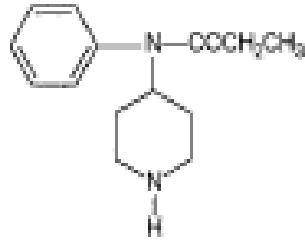
Vücuda alınan fentanilin %85'i ilk 72 saat içinde vücuttan atılır; %7'si değişmeden (%6 idrar, %1 dışkı), %78'i karaciğerde metabolize olarak (%70 idrar, %8 dışkı) atılmaktadır. Vücutta hepatik kan akımının azalması fentanilin

eliminasyonunu geciktirir. Çünkü fentanil klirensi esas olarak hepatik metabolizma ile oluşmaktadır (Parker, R.K., 1999).

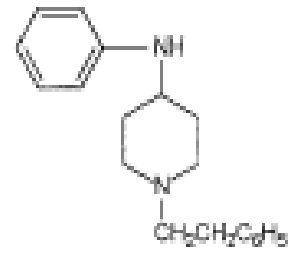
Vücutta geniş bir alana dağılan fentanil, vücuda dağılımından sonra kana tekrar döner ve büyük oranda karaciğerde N-dealkilasyon ve hidroksilasyona uğrayarak norfentanil'e [4-N-(N-propionilanilin)piperidin] metabolize olmaktadır. Norfentanilin (majör) yanında hidroksifentanil, hidroksinorfentanil (minör) gibi diğer inaktif metabolitlerine dönüşebilen fentanil etken maddesi böbrekler yolu ile atılır (Poklis, A., 2004). Van Rooy ve arkadaşları plazmada değişen oranlarda norfentanil ve despropionil fentanil [1-(2-feniletil)-4-N-anilinopiperidin] bulmasına rağmen başka bir metabolit gösterememiştir. Bir başka çalışmada hastaların idrarında en fazla miktarda norfentanil bulunmakla birlikte az olarak da hidroksinorfentanil [4-N-(N-hidroksipropionilanilin) piperidin] bulunmuştur. Hidroksinorfentanil, hidroksifentanil veya norfentanilden oluşabilir, ama gerçek metabolik kaynağı bilinmemektedir (Morgan, G.E. ve ark., 2002). Metabolitleri enjeksiyon sonrasında 1,5 dakika kadar kısa süre içinde plazmada belirlemeye başlarlar. Norfentanil, insanlarda İV enjeksiyon sonrasında 48 saat gibi uzun bir süre idrarda bulunabilir. Metabolitlerinin etkileri tam anlaşılamamıştır ancak minimal etkilerinin olduğu düşünülür (Şekil 2.6) (Fukuda, K., 2005). Primer olarak insan CYP3A4 izoenzim sistemi ile metabolize edilen fentanilin halen insan metabolizmasındaki diğer yıkım yolları hakkında çok az şey bilinmektedir (Zhang, W. ve ark., 2010; Barkin, R.L. ve ark., 2001; Grond, S. ve ark., 2000; Muijsers, R.B.R. ve ark., 2001).



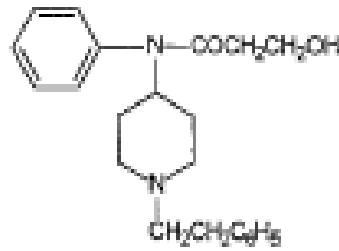
Fentanil



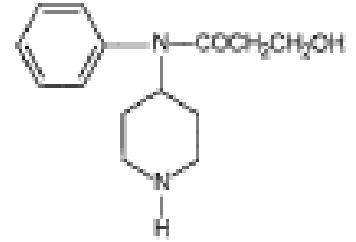
Norfentanil



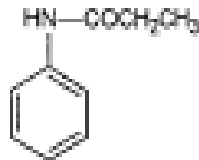
Despropionilfentanil



Hidroksifentanil



Hidroksinorfentanil



N-fenilpropinamid

Şekil 2.6. Fentanilin Metabolizasyonu Sonucu Oluşan Metabolitleri (Silverstein, J. H. ve ark.,1993; Labroo, R. B. ve ark.,1995).

Fentanil metabolitlerinin belirgin bir farmakolojik aktivitesi olmadığı için, terapötik açıdan önemli bir ilaç maddesidir. Etken maddenin vücuda alım şekillerine göre biyoyararlanım değerleri değişkenlik göstermektedir. Oral transmukozal emilim için düzenlenmiş fentanilin katı sukroz matriksinin oral biyoyararlanımı %50'dir ki, bu da hem hızlı transmukozal absorpsiyon, hem de daha uzamış gastrointestinal sistem emilimi demektir. Bu şekilde alınan fentanilin yaklaşık % 25'i bukkal mukozadan emilir, dolayısıyla ilk geçiş metabolizmasına uğrar. Kalan %75' lik kısım bu eliminasyondan kurtulur. Gastrointestinal yolla emilen fentanil karaciğerde ilk geçiş metabolizmasına uğrar. Ayrıca insan düodenum ve jejunumunda ve az miktarda ileumda, belirgin miktarda sitokrom P450 izoformları vardır (Yuan, R. ve ark., 2011). Bu nedenle ağızdan emilen fentanil ince bağırsakta da ilk geçiş metabolizmasına uğrayabilir. Ancak bağırsak fentanil metabolizmasının varlığı ve önemi tam olarak bilinmemektedir (Stannard, C. ve ark., 2004).

Fentanil dağılımı karaciğer yetmezliğinden etkilenmez. Ancak karaciğer kan akımını değiştiren karaciğer yetmezliği ve diğer bazı klinik durumlar fentanilin farmakokinetiğini değiştirebilir. Örneğin karaciğer kan akımını azaltan durumlar (karaciğer hastalığı, şok vb.) fentanilin plazma konsantrasyonundaki azalmayı geciktirebilmektedir (Ronald, D.M., 2010; Davies, G. ve ark., 1996; Tegeder, I. ve ark., 1999; Scholz, J. ve ark., 1996).

2.5.2. Fentanilin Farmakolojik Ve Farmakodinamik Etkileri

Pek çok çalışma fentanilin analjezik etkisinin belirgin yan etkisi olan solunum depresyonunun fentanil konsantrasyonu ile ilgili olduğunu söylese de aslında asıl

önemli olan etki bölgelerindeki yani; beyin ve spinal korddaki opioid reseptörlerindeki fentanil konsantrasyonudur (Stannard, C. ve ark., 2004; Austin, K.L. ve ark., 1980).

Loper, K.A. ve ark. (1990) tarafından yapılan çalışmada fentanil konsantrasyonu ile solunum depresyonu arasında yakın ilişki olduğu ortaya konmuştur. Solunum depresyonunun yaşla, yapılan operasyonla, farmakodinamik yanıtlarla değişebilirliğinin olmasına karşın, genel anlamda plazma fentanil konsantrasyonunun 2 ng/ml'yi aşması durumunda klinik olarak solunum depresyonu gözlenebilmektedir (Loper, K.A. ve ark., 1990).

Fentanilin kardiyovasküler sistem üzerine etkisi oldukça azdır. Analjezik ve anestezik dozlarda, nadiren hipotansiyona neden olur ve bu da genellikle bradikardi sonucu oluşmaktadır. Tüm hemodinamik parametreler (kalp hızı, kan basıncı vb.) fentanil kullanımı sırasında değişmeden kalır (Austin, K.L. ve ark., 1980; Keay, K.A. ve ark., 1997).

Opioidlerin, solunumu baskılayıcı etkileri en ciddi istenmeyen etkileridir. Fentanil de eşit dozdaki morfinden çok daha çabuk ve daha kısa süreli bir solunum depresyonu oluşturur. Fentanilin bulantı ve kusma yapıcı etkisi ile solunum yolu salgılarında artış etkisi morfinden daha azdır, bu nedenle hastalar için en iyi opioid analjezik ve anesteziiktir (Morgan, G.E. ve ark., 2002; Fukuda, K., 2005; Stein, C. ve ark., 2004).

Fentanil SSS'de bilinç kaybı olmadan sersemlik ve mental bulanıklığa neden olmaktadır. Oksijenin metabolik hızını azatlarak damarların CO₂'ye duyarlılığını artırır (Fukuda, K., 2005; Glass, P.S. ve ark., 1999; Michael, A. ve ark., 2003).

Fentanilin bulantı, kusma, miyozis, kabızlık ve safra yolları basıncında artmaya

neden olma gibi etkileri de görülebilir. Histamin salınımına neden olmaması da fentanilin uygulamadaki avantajlarından biridir (Stannard, C. ve ark., 2004).

2.5.3. Fentanilin Olası Yan Etkileri

Solunum depresyonu, apne, kas rijiditesi, hipotansiyon, bulantı, kusma, baş dönmesi, alerjik reaksiyonlar, üriner sistem bozuklukları vb. (Myles, P.S. ve ark., 2002; Erdine, S., 2002; Ratan, A. ve ark., 2001). İleri yaşlarda fentanil farmakokinetik değişiklikleri de minör rol oynarken, farmakodinamik değişikliklerden dolayı yaşlılarda doz azaltmak gereklidir. Yaşlılarda fentanil, intravenöz uygulamasından sonra daha hızlı pik plazma seviyesine ulaşır. Bu da dağılım hacminin azalmasıyla ilgilidir. Fentanilin kilo ile uygun dozda verilmesinde ideal olan, yağsız vücut ağırlığına göre verilmesidir. Ancak bunun klinik uygulaması zor olduğu için ideal vücut ağırlığına göre ilaç uygulanmaktadır. Yeni doğanlar dışında fentanil farmakokinetiği yaşa bağımlı değişimler göstermemektedir (Bailey, P.L. ve ark., 2000).

2.5.4. Fentanil İle İlaç Etkileşimleri

Fentanil karaciğerde CYP3A4 izoenzimi tarafından metabolize edildiğinden CYP3A4' e karşı etkili inhibitörler, fentanilin biyoyararlanımını artırabilir ve sistemik klirensini düşürebilir. Bu da daha fazla ve uzun etkiye yol açabilir. Benzer bir etki CYP3A4' ü inhibe ettiği bilinen greyfurt suyunun birlikte tüketilmesi sonucunda da görülebilir. Bu nedenle fentanilin CYP3A4

inhibitörleriyle aynı anda verilmesi konusunda dikkatli davranılması gerekmektedir (Sear, J.W., 1998).

2.5.5. Fentanilin Uygulama Yolları

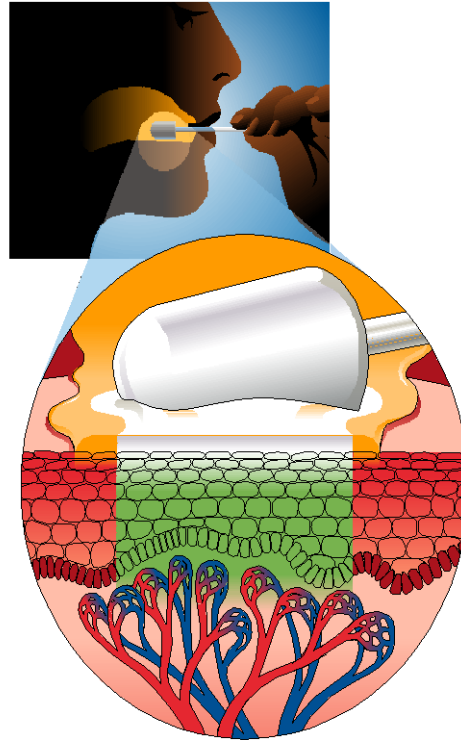
Fentanilin uygulama sistemleri *Alza Corporation Firması*® (ABD) tarafından geliştirilmiş ve 1991’de *Johannsen Cilag*® tarafından (Belçika) piyasaya sürülmüştür. Derinin dışında invaziv olmayan opioid uygulama yerleri olarak ağız, burun ve solunum yolu mukozaları bulunmaktadır. Mukoza, deriye kıyasla, daha fazla kan akımı ve daha az bariyer özelliğine sahip olduğundan daha hızlı emilim ve doz ayarlaması sağlamaktadır (Grond, S. ve ark., 2000).

Oral Transmukozal Uygulama

Şekerli bir matrikse emdirilmiş ve pastil şeklinde şekillendirilmiş fentanil, opioid uygulamasının yeni bir şeklidir. Erişkin gönüllülerle yapılan çalışmalarda oral transmukozal fentanil uygulamasının sedasyon ve analjezide doza bağlı artış sağladığı izlenmiştir. Bu fentanil pastilleri çocuklarda kullanım için uygundur. Ancak, yüksek dozlarda solunum depresyonu, şiddetli kaşıntı, bulantı ve kusma gibi yan etkileri görülebilir. Opioidleri korkutucu olmayan ve psikolojik olarak çekici gelen bir yolla vermek olumlu görülmektedir (Grond, S. ve ark., 2000; Erdine, S., 2002).

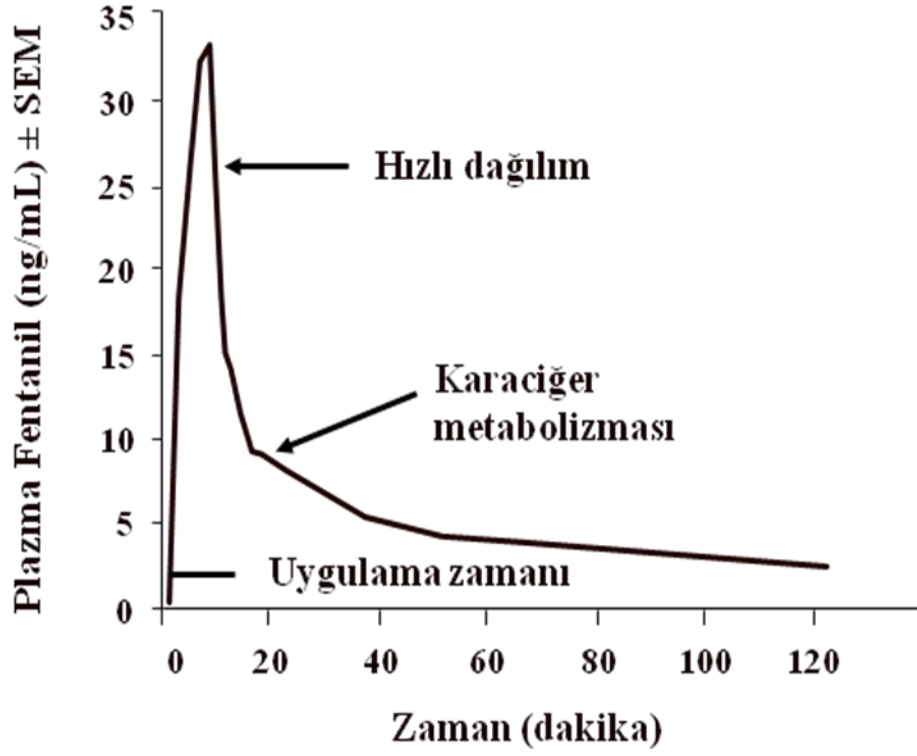
Oral transmukozal yolla kullanılan fentanilin en önemli avantajı analjezinin hızlı başlamasıdır. Fentanilin pastil formları; yüksek seviyede geçirgen olan oral mukozadan doğrudan ve hızla emilerek, fentanilin ilk geçiş metabolizmasına uğramadan sistemik dolaşıma geçmesini sağlar (Şekil 2.7) . Böylece toplam dozun

%25' i ilk geçiş metabolizmasına maruz kalmadan oral mukozadan doğrudan kan dolaşımına girer (Christie, J.M. ve ark., 1998). Kalan doz (%75 yutulur ve üçte ikisi ilk geçiş metabolizmasına uğrar), gastrointestinal yoldan daha yavaş emilerek analjezik etkinin biraz daha uzun sürmesini sağlar. 15 dakika içinde tüketilen pastiller ile fentanil; 20-40 dakika içinde pik düzeyine ulaşır ve beyin, kalp, akciğer, böbrek ve dalak gibi çeşitli organlara dağılır (Liappas, I.A. ve ark, 2004). Fentanilin pastil formunun en büyük avantajı bir pastilin bitmesinden sonra en az 1 saat boyunca analjezik etkinin sürmesidir. Fentanil etken maddeli pastilin yanlışlıkla çiğnenmesi veya yutulması halinde İV uygulanmaya oranla daha düşük biyoyararlanıma ve pik konsantrasyonlara sahiptir (şekil 2.8) (Streisand, J.B. ve ark.,1991) .



şekil 2.7. Oral Transmukozal Fentanilin Uygulanışı (Christie, J.M. ve ark., 1998).

Oral Transmukozal Uygulama



Şekil 2.8. Oral Transmukozal Fentanilin Farmakokinetiği (Streisand, J.B. ve ark. 1991).

Intranazal Uygulama

Intranazal uygulama, intramuskular uygulamaya oranla daha az travmatik, rektal uygulamaya oranla daha estetik ve çocuklar tarafından olumlu karşılanır. Intranazal olarak kullanımında orta veya şiddetli ağrıyı tedavi etmek için kullanılmaktadır. Yüksek doz alan çocuklarda ($4.5 \mu\text{g/kg}$) intranazal fentanil uygulaması kusma, solunumda azalma, kaslarda sertliğe yol açmasına rağmen

intranazal fentanil yanma hissine neden olmamaktadır (Grond, S. ve ark., 2000; Erdine, S., 2002).

İntravenöz Uygulama

İntravenöz uygulamadan sonra plazma yarılanma ömrü kısa olduğu için opioidlerin analjezik etkisinde kullanımı sık yapılan intravenöz enjeksiyonlar veya sürekli infüzyon ile kısıtlıdır. Bu da kandaki konsantrasyonunda sürekli değişikliklere neden olur (Lilleng, P.K. ve ark., 2004).

Transdermal Uygulama

Cilt dışarıdan uygulanan çeşitli krem ve benzeri ilaçları emerek sistemik etkinin meydana gelmesini sağlar. 800 dalton moleküler ağırlığın altındaki su ve yağda eriyen birçok madde ciltten geçebilir. Transdermal verici sistemlerin çoğu cilde yapıştırılan bir filminden belirli bir oranda ilacın geçmesine dayanır. Fentanil, deriye uyumlu olması, düşük moleküler ağırlığı, yüksek etkisi ve lipidde çözünürlüğünün fazla olması nedeniyle kolaylıkla transdermal tedavi sistemine (Transdermal Terapötik Sistem) adapte edilmiştir. Transdermal yol ile belirli süre belirli oranda ilaçların verilmesi mümkündür. (Grond, S. ve ark., 2000; Erdine, S., 2002).

İlk piyasaya sürülen transdermal bantlar günümüzden 40 yıl önce *Alza Corporation Firması*® tarafından Kaliforniya da geliştirilmiştir. Geliştirilen bantlar nitrogliserin içermektedir ve vücuda sürekli non-invaziv olarak analjezik salınımını sağlamaktadırlar. Transdermal bantlar, 1991 yılında Amerika’da ve 1992 yılında Kanada’da onaylanarak satışa sunulmuştur (Southam M., 1993).

Fentanil, deriye uyumlu olması, yüksek etkisi ve lipide çözünürlüğünün fazla olması gibi özellikleri ile küçük bir cilt alanından terapötik dozlarının emilimini mümkün kılar. Bu sistemde 12-100 µg/saat şeklinde farklı konsantrasyonlarda dozlar içeren fentanil flasterleri, ciltten emilip kana yayılarak etki gösterecek şekilde tasarlanmıştır (Kornick, C.A. ve ark., 2003; Jea, W. ve ark., 1995; Southam, M.A., 1995).

Transdermal fentanil (TDF) kronik ağrı tedavisinde etkin ve iyi tolere edilebilen bir ajandır. TDF formları mikrosirkülasyona girmeden önce cilt tabakalarının üstünde bir depo şeklindedir. TDF, cilde uygulandıktan sonra, fentanilin serum konsantrasyonu yavaş yavaş artmakta ve 12-24 saatlerde kanda en üst düzeye çıkmaktadır ve yamanın uzaklaştırılmasını takiben 3-12 saatlik yarılanma ömründe yavaşça seviyesi azalır. Oral opioidlerle karşılaştırıldığında TDF'in daha düşük insidans ve yoğunlukta yan etkilerinin olması (bulantı, kusma v.s.), yaşam kalitesinin artması, 72 saatte bir uygulama rahatlığı, kurtarıcı ilaçların kullanımının azalması hasta rahatlığının artması ve daha fazla hasta uygunluğu gibi avantajları mevcuttur. Ayrıca bu sistemdeki fentanilin biyoyararlanımı yüksektir ve yapılan çalışmalarda fentanilin %92'sinin değişmeden sistemik dolaşıma geçtiği tespit edilmiştir (Kornick, C.A. ve ark., 2003; Jea, W. ve ark., 1995).

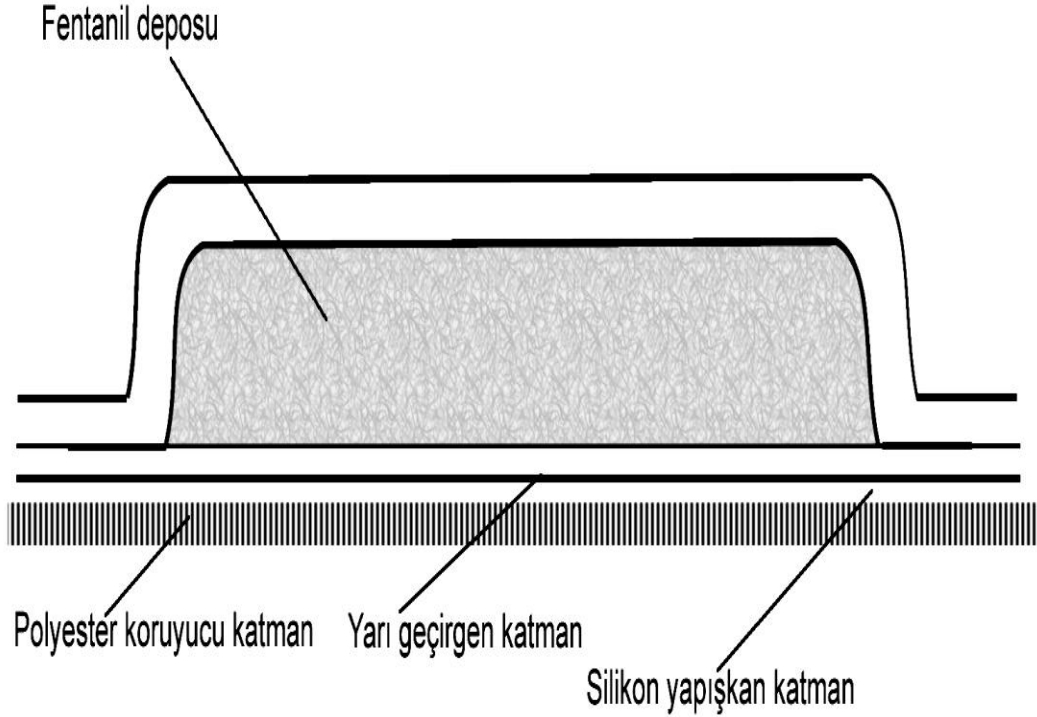
TDF ve oral morfinin kıyaslandığı 256 hastanın katıldığı bir çalışmada %65.1 hasta TDF'yi, %27.8 hasta morfin tableti tercih etmiştir. Aynı çalışmada fentanil ve oral morfin kullanan hastaların değerleri karşılaştırılmış ve fentanil kullanan grupta ağrı, sosyal fonksiyonlar ve mental sağlık alt başlık skorlarında anlamlı

derecede düzelme saptanmıştır (Kornick, C.A. ve ark., 2003; Allan, L. ve ark., 2001).

Fentanil; transdermal veriliş sistemi kullanılarak, pasif difüzyon ile hız limitli bir membrandan absorpsiyon yoluyla uygulanır. İlaç salınımı; yamadaki satüre fentanil solüsyonu ile ciltteki düşük konsantrasyon arasındaki gradient farkı ile yönetilir. Normal fizyolojik koşullarda hız limitli membran fentanili cilt yüzeyine salar ve bundan daha yavaş olarak ilaç doku içine ve mikrosirkülasyona geçer (Lehmann, K.A. ve ark., 1992).

Transdermal fentanil bantlar koruyucu kaldırılabilen bir kat ve dikdörtgen, şeffaf ve 4 fonksiyonel katmanı bulunan bantlardır. Deriye yapışan iç yüzeyden dışa doğru sırasıyla (Pascoe, P.J., 2000);

1. Silikon yapışkan katman: Deriye bantın direkt olarak yapışmasını sağlar ve bu tabaka ilacın ve uygulamanın başlangıcında yükleme dozunun salınımına izin verir.
2. Etilen-vinil-asetat kopolimer katman: Yarı geçirgen olan bu katman fentanilin salınma hızını kontrol eden bir hız kontrol edici membrandır.
3. Fentanil ve alkolün hidroksietil selüloz ile jelleştiği katman: Fentanilin depolandığı ve üç günlük rezervuarının olduğu katmandır. Burada fentanil (2,5 mg/10 cm²) ve etanol (0,1 mL/10 cm²) bulunmaktadır (etanol fentanilin emilimi için deri geçirgenliğini artırmaktadır).
4. Polyester katman: Bantı dıştan gelen mekanik zararlardan koruyarak, fentanil kaybını ve çevreye yayılımını önleyen; bir fiziksel bariyer olan arka tabakadır (Şekil 2.9) (Stannard, C. ve ark., 2004).



Şekil 2.9. TDF Sisteminin Tabakaları (Janssen Pharmaceutica, 2001).

TDF sistemi vücuda uygulanmadan önce koruyucu tabaka çıkarılır. Deriye basınç duyarlı, silikon bazlı yapışkan temas ettirilir. Transdermal sistemden fentanil salınımı, başlangıç uygulamayı takiben iki farklı aşama ile karakterizedir. Birinci aşama sırasında yapışkan yüzeyin teması ile bu alandan hızlı bir yükleme dozu absorbe olur. Bunu fentanilin yama rezervuarından sabit bir hızla salındığı plato fazı izler (Roberge, R.J. ve ark., 2000).

Deri yolu ile vücuda fentanil salınımında tek bir banttın üç gün süre ile verim alınabilmektedir. Bu üç günlük süre zarfında rezervuarda yeterli miktarda fentanil bulunmaktadır. Öldürücü bir intoksikasyona neden olmamak için bahsedilen bu özel kaplama sistemleri geliştirilmiştir (Likar, R. ve ark., 2001).

TTS'nin toplam kalınlığı 0,5 mm kadardır. Eş zamanlı olarak doz ayarlaması

için birçok yama kullanılabilmektedir. Fentanil yamalarının dört farklı boyutu Tablo 2.2’ de özetlenmiştir. Fentanilin salınım oranı bantın yüzey alanı ile orantılıdır ($25 \mu\text{g/h}/10\text{cm}^2$). Transdermal fentanilin saatlik devamlı dağılım hızları $25\mu\text{g/sa}$, $50\mu\text{g/sa}$, $75\mu\text{g/sa}$ ve $100\mu\text{g/sa}$ olan dört farklı ticari formları mevcuttur (Tablo 2.2) (Grond, S., 2000).

Tablo 2.2. Transdermal Veriliş Sisteminin Yapı ve İçeriği (Duragesic® (Fentanyl Transdermal System), Full Prescribing Information, 2005).

Boyut (cm²)	Fentanil içeriği (mg)	Veriliş hızı ($\mu\text{g/sa}$)	Veriliş hızı (mg/gün)
10	2,5	25	0,6
20	5	50	1,2
30	7,5	75	1,8
40	10	100	2,4

Difüzyona bağlı gerçekleşen geçişte, fentanil difüzyonunu stratum korneum kalınlığı etkilemektedir. Bazı ilaçların emilimi anatomik bölgeden de etkilenirken fentanil göğüs, karın ve kalçadan eşit oranda emilmektedir (Kornick, C.A. ve ark., 2003; Southam, M.A., 1995).

Uygulamada, transdermal bantların tatbikinden itibaren 72 saat boyunca deri aracılığı ile kana fentanil salınımı gerçekleşir. Transdermal bantın vücuda yapıştırılmasından sonraki 1-2 saat içinde fentanilin kan-serum konsantrasyonunda artış gözlenmektedir. Serum konsantrasyonu uygulamadan sonraki 12-24 saatleri arasında sabittir (Southam, M., 1993).

Transdermal bantlar, sadece kronik ağrı görülen ve opioid analjezikler ile uzun süreli tedavi gerektiren hastalarda kullanılmaktadır. Tedavi sırasında hastaların hareketlerine herhangi bir kısıtlama getirmemesi ve uzun süre rahat bir şekilde kullanımı sayesinde, bu bantlar kişilere büyük avantajlar sağlamaktadır. Yapılan çalışmalar, transdermal bant kullanan hastaların %80'inin yaşam kalitesinde artış olduğunu göstermektedir (Nugent M. ve ark., 2001, Radbruch L. ve ark., 2001, Zimmermann M. ve ark., 2005, Clark A.J. ve ark., 2004).

2.5.6. Fentanilin İstismarı ve Yanlış Kullanımı

Fentanilin kötüye kullanıldığı ve istismar edildiği durumlar sonucu intoksikasyona bağlı olarak zehirlenmeler görülebilmektedir. Özellikle TDF'nin piyasada yerini alması ile birlikte bu maddenin istismarında ciddi bir artış olduğu saptanmıştır. Bu bantların kötüye kullanımı ve su istismali çeşitli yollarla yapılmaktadır (Reeves & Ginifer, 2002).

Transdermal fentanil bantlarının kullanımında doz aşımaları da gözlenebilmektedir. Analjezik etkisinin artırılması amacı ile birkaç bantın aynı anda kullanımı sonucu meydana gelen doza bağlı zehirlenmeler sık karşılaşılan durumlardandır (Arvanitis, M.L. ve ark., 2002)

Edinboro L.E. ve ark. (1997)'nin tespit ettiği bir olguda, fentanil bantlar ile tedavi gören 83 yaşındaki bir kadın, birkaç bantı aynı anda yapıştırmak kaydı ile saatte 300 µg fentanil etken maddesinin vücuduna alınmasını sağlayarak hayatının ölümle sonuçlanmasına sebep olmuştur (Edinboro, L.E. ve ark., 1997).

Başka bir olguda ise bir hasta saatte 100 µg fentanil salınımı olacak şekilde birden fazla TDF bantlarını vücuduna yapıştırarak kullanmıştır (Klockgether-Radke & Neumann, 2002).

Grobosch, T. ve ark. (2007)' nın tespit ettiği bir olguda ise 54 yaşındaki bir erkek vücudunda, saatte 75 µg fentanil salınımı olacak şekilde transdermal bantları cinsel organına yapıştırmış ve aşırı doz sonucu oluşan intoksikasyon nedeni ölüm ile sonuçlanmıştır. Ayrıca TDF bantların rektal kullanımı ile de zehirlenme olguları, literatür araştırmaları sırasında tespit edilmiştir (Grobosch, T. ve ark., 2007).

Coon, T.P. ve ark., (2005)' nın tespit ettiği bir olguda 41 yaşındaki bir erkek saatte 100 µg salınımı olacak şekilde 3 adet fentanil bantı aynı anda kullanarak, bu maddenin sersemletici sarhoşluk hissinden faydalanmaya çalışmıştır. Sıcaklık artışı ile emilimin arttığı rektal bölgede TDF bantların uygulanması çok tehlikelidir (Coon, T.P. ve ark., 2005).

Kramer, C. ve ark. (1998)' nın tespit ettikleri 31 yaşındaki, solunum depresyonu sebebiyle acil servise başvuran bir erkek hastanın kısa bir zaman içinde ölümü ile sonuçlanan başka bir olguda, yapılan otopsi sonucunda ölen kişinin ağız boşluğunda (saatte 75 µg fentanil salınımı) ve ikinci bir yamanın ise kişinin sağ kalçasında (saatte 75 µg fentanil salınımı) tespit edilmiştir (Kramer, C ve ark., 1998).

Bu bantlar kazayla zehirlenmeyi ve etken maddenin istismarını önlemek amacı ile geliştirilmesine rağmen intravenöz olarak kötüye kullanım amacıyla çoğu durumda kullanılmış transdermal bantlardan fentanil jelleri elde edilmekte ve bazı ön işlemlerden geçirilerek bir şırınga yardımı ile intravenöz olarak vücuda

uygulanmaktadır. Transdermal bantların istismarı dışındaki bir başka sorun ise kusurlu bantların kullanımı sonucu oluşan kaza ile fentanil intoksikasyonunun görülmesidir. Bu tehlikeleri önlemek için günümüzde daha iyi bantlar geliştirilmektedir. Teorik olarak bantların kesilmesi fentanilin serbest bırakılmasında bir artışa sebep olmazken, bu konuda herhangi bir veri bulunmamasına rağmen üretici firmalar bantların kesilmemesini önermektedirler (Grond, S., 2005; Arvanitis, M.L. ve ark., 2002).

2.6. Biyotransformasyon

Tüm organizmalar devamlı ve kaçınılmaz bir şekilde doğal veya sentetik kimyasal veya ksenobiyotiklere (ilaçlar, endüstriyel kimyasal maddeler, pestisidler, sekonder bitki metabolitleri ve toksinler, hava ve suyu kirleten atıklar, egzoz ve sigara dumanı vb.) maruz kalmaktadır. Besinle alınan doğal bileşikler dışında kalan ve çeşitli yollardan vücuda giren kimyasal maddelere, ilaçlar dahil, “ksenobiyotikler” denilir (Gelal, A., 2003).

Deri, akciğerler veya gastrointestinal sistem yoluyla birçok ksenobiyotiğin emilebilmesi onların lipofilik olmalarından kaynaklanır. Ksenobiyotiklerin eliminasyonu, suda çözünebilir kimyasal maddelere çevrilebilmelerine bağlıdır. Toksik maddeleri elimine eden/uzaklaştıran, vücutta toksik madde oluşumunu engelleyen, toksik maddeleri (ilaçları vb.) enzimlerin etkisi ile değişikliklere uğratan olaylara biyotransformasyon (metabolizasyon) denilir. Biyotransformasyonda amaç, ilacın polaritesini (sudaki çözünürlüğünü) artırarak idrar veya safra yolu ile vücuttan atılabilir hale gelmesini sağlamaktır.

Biyotransformasyonun önemli bir sonucu ksenobiyotiğin fiziksel özelliklerinin değişmesidir. Biyotransformasyon olmaksızın lipofilik ksenobiyotikler yavaş atıldığından, organizmanın yaşamı tehlikeye girer. Biyotransformasyon sonucu lipofilik maddeler, daha polar hidrofilik bileşiklere dönüştürülmektedirler. Böylece bu maddelerin lipid katsayıları azalmakta ve suda çözünürlükleri artarak vücuttan atılmaları kolay hale gelmektedir. Vücutta sadece ilaçlar değil, diğer bütün kimyasallar da biyotransformasyona uğramaktadırlar (Weinshilboum, R., 2003).

Biyotransformasyon sonucu ilaçlar genellikle daha az etkili veya etkisiz bileşikler haline getirilir. Bu yüzden biyotransformasyon, biyoinaktivasyon veya detoksifikasyon (zehirsizlenme) olarak da bilinmektedir. Biyotransformasyon sonucu oluşan yeni maddeye “metabolit” denir. Metabolitler, genellikle ana maddeden farklı farmakokinetik, fizikokimyasal özelliklere sahiptirler ve toksisiteden de sorumlu olabilirler. Metabolitler sıklıkla ana molekülden daha az aktiftirler, ancak ana molekülden daha aktif olabilirler (Gelal, A., 2003).

Biyotransformasyon yapan enzimlerin bazıları az veya çok tüm hücrelerde bulunmakla birlikte, birçoğu spesifik olarak belirli organlarda (karaciğer, böbrek, akciğer ve diğer yapılarda) mevcuttur. Metabolizmada biyotransformasyonda başrol oynayan organ karaciğerdir. Karaciğer dışında akciğerler, mide, bağırsaklar (mikrofloraları ile birlikte), cilt, böbrekler, burun mukozası ve göz de ksenobiyotiklere maruz kalan ve biyotransformasyon yapan organlardır. Büyük ölçüde karaciğerde bulunan, ilaçları metabolize eden enzimler hücrenin endoplazmik retikulumunda bulunurlar ve mikrozomal enzimler olarak

tanımlanırlar. Karaciğer dışındaki bazı bölgelerde de biyotransformasyon karaciğerdeki kadar hızlıdır. Ancak bu bölgeler (nazal epitel gibi) küçük boyutlarda olduğu için ksenobiyotik biyotransformasyonuna katkıları da az olmaktadır (Kuralay, F., 2003).

2.6.1. Ksenobiyotiklerin Biyotransformasyon Mekanizması

Enzimatik Olaylar

Enzimatik olaylar Faz I ve Faz II olmak üzere iki aşama içermektedir. Faz I reaksiyonları daha çok oksidasyon, redüksiyon ve hidroliz olaylarını kapsarken Faz II reaksiyonları konjugasyon, asetilasyon ve metilasyonları kapsamaktadır. Faz I reaksiyonları yükseltgenme, indirgenme ve hidroliz gibi reaksiyonlar ile substrata aktif grup ekleyerek, Faz II konjugasyon reaksiyonlarına substrat hazırlarlar. Faz II de sülfat, asetat gibi endojen maddeler ile konjugasyon reaksiyonları gerçekleşir ve ara metabolitin polaritesi artırılarak böbrek ya da gastrointestinal sistemden atılımı sağlanır. Bütün bu basamaklarda görev alan enzimler genetik polimorfizm gösterebileceği gibi gelişimsel basamak, çevresel etmenler, birliktelik gösteren diğer hastalıklar ve ilaçlardan da etkilenebilirler (Guengerich, F.P., 2001; Lee, W.M., 2003).

Faz III Reaksiyonları (transport proteinleri=taşıyıcı proteinler)

Suda çözünen maddelerin böbreklere geçmeden önce, transport proteinleri aracılığıyla membranlardan geçerek safra veya plazmaya taşınmasıdır. Faz III

reaksiyonlarda taşıyıcı p-gliko proteinleri aktif rol oynarlar (Lee W.M., 2003; Staud, F. ve ark., 2010).

2.6.2. Sitokrom P450 (CYP450) Enzimleri

CYP450 enzimleri, çok sayıda enzimden oluşan geniş bir enzim ailesidir. Ökaryot (gelişmiş organizmalar: bitki, hayvan, fungus vb.) ve prokaryot (bakteri, mavi-yeşil algler) canlı türlerinde günümüze kadar 150 den fazla P450 geninin varlığı saptanmıştır. Ingelman- Sundberg, M., Nebert, D.W., ve Daly, A.K.' nin editörlüğünü yapmakta olduğu "CYP450 Alel Terminoloji Komitesi" nin internet sayfasında CYP450 alellerinin tümü ve adları ile mutasyonları birlikte belirtilmektedir (<http://www.cypalleles.ki.se/>). İsimlendirilmeleri; CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4 vb. şeklindedir. "CYP", sitokrom P450'yi ifade eder. "Sonraki sayı" ailesi numarasını, bunu izleyen "harf" alt aileyi, "daha sonraki sayı" bu alt ailedeki bireysel enzimlerin numarasını gösterir. Bazı ailelerde tek üye bulunduğu için sadece aile numarasıyla (örnek CYP 19 gibi) ifade edilebilirler (Zengeroğlu, S., 2001; Kimura, S., 1989; Daly, A.K., 2003).

Faz I metabolizması büyük ölçüde P450 enzimleri ile gerçekleşir. Bunlar birincil olarak karaciğerde bulunan "hem" içeren proteinlerdir ve "450" rakamı; "hem" içeren karaciğer pigmentlerinin, karbonmonoksit bağlandıktan sonra absorbe ettiği ışığa ait dalga boyunun nanometre olarak en yüksek değerini ifade eder. P450 enzim sistemi; dışarıdan alınan ilaçlar, kimyasal maddeler, vb. maddeleri metabolize eden sistemdir (Zengeroğlu, S., 2001; Kimura, S., 1989).

2.6.3. CYP450 Enzim Sisteminin Polimorfizmi

İlaçların klinik etkinliklerini, farmakolojik etkilerini veya toksisitelerini; genetik polimorfizm, ilaç etkileşimleri, hastalıklar, yaş vb. gibi faktörler değiştirebilmektedir. Bu faktörlerden en önemlisi genetik polimorfizmdir (Iyer, L. ve ark., 2010; Daly, A.K., 2003).

Bireyler arasındaki metabolik farklılıkların önemli bir nedeni genetik yapıdaki farklılıklardır. Bu farklar genetik polimorfizm olarak bilinirler. Faz I, Faz II ve Faz III aşamalarında görev alan enzimleri kodlayan genlerdeki polimorfizmler, ilaç etkinliğini ve istenmeyen etkilerin niteliğini ve niceliğini değiştirmektedirler. Belirli bir enzim tarafından metabolize edilen bir ilacın ve metabolitinin kan veya idrar düzeyleri tayin edilerek, metabolit konsantrasyonunun ilaç konsantrasyonuna oranı bulunur. Bu oranların niceliğine göre kişiler yavaş, normal, hızlı ve çok hızlı metabolize edenler olarak ayrılabilirler (Gaedigk, A. ve ark., 2002; Iyer, L. ve ark., 2010; Meyer, U.A., 2001). Hızlı metabolize ediciler de enzim aktivitesi yüksektir ve ilaçlar hızla metabolize edilerek atılırlar. Bu grupta yan etkiler de daha az izlenir. Yavaş metabolize ediciler de ise enzim aktivitesi düşüktür ve yan etkilere daha duyarlıdırlar (Meyer, U.A., 2001; Daly, A.K., 2003).

İlaç geliştirmede ne denli yol kat edilirse edilsin, ilaç yanıtının kişisel farklılığı konusu henüz çözülememiştir. 2008 yılında varfarin kullanan bir şirket yöneticisinin ani ölümü önümüzde hala uzun bir yol olduğunu göstermektedir. Farklı bireylerde farklı polimorfizm örneklerinin olabileceği ve bu enzim sisteminin tamamen tanınmadığı bilinmelidir. Bu nedenle hekim ilaç yazarken dikkatli olmalı, izleme süresince olgudan alacağı her bilgiyi değerlendirmelidir (Collett, B., 1998).

Bir popülasyonda çevresel ve mesleki olarak kimyasal ve/veya kontaminantlara maruziyet, ilaçlara ve yaşam tarzına bağlı olarak bireysel alışkanlıklar (sigara, alkol, çay, kahve vb gibi) sonucu maruz kalınan kimyasal madde/lere karşı verilen bireysel cevapların geniş ölçüde değişkenlik gösterdiği ve aynı zamanda popülasyonlar arasında da farklılıkların bulunduğu bilinmektedir. İlaçlar dahil olmak üzere organizmaya giren yabancı bütün kimyasalların kinetiğinin ve bireyin ilaçlara karşı verdiği cevabın genetik yapıya göre bireyler ve popülasyonlar arasında değişkenlik göstermesi, farklı popülasyonlarda elde edilecek genetik veri tabanlarının kullanımı ile “bireye özel tedavi” yaklaşımlarının geliştirilmesini gündeme getirmiştir (Iyer, L. ve ark., 2010; Meyer, U.A., 2001). Farmakodinamik ve farmakokinetik temelli olan ilaç cevabındaki farklılıklar, ilaçların metabolizmasından sorumlu enzimler, ilaç taşıyıcıları (transporter), reseptörler veya kofaktörlerde rol oynayan proteinleri kodlayan genlerdeki varyasyonlardan (DNA' daki genetik bilgide küçük farklılıklar) etkilenebilmektedir. Günümüzde yaş, cinsiyet ve patolojinin yanı sıra farmakogenomiğin de ilaç etkinliği ve toksisitesindeki bireysel farklılıkların belirlenmesindeki önemi bilinmektedir. Bu alandaki çalışmalar, ilaç metabolize edici enzimlerdeki genetik farklılıklar üzerine olan geniş araştırmaların yapılmasından ilaç reseptör ve taşıyıcılarının araştırılmasına kadar uzanmaktadır. Popülasyonun en az % 1' inde görülmesiyle tanımlanan “gen polimorfizmleri”, bu polimorfizmlerin hastalık gelişimi ve yaşam tarzına bağlı gen-çevre etkileşimleri ve ilaçların farmakolojik etkilerine yönelik çalışmaların hız kazanmasına rağmen, ilaç taşıyıcı sistemlerinde fonksiyonel rol

oynayan genlerdeki polimorfizmlerin klinik önemi halen tam aydınlatılamamıştır (Daly, A.K., 2003). Klinikte hastaların genetik yapısına yönelik olarak doz ayarlaması yapılması, bir opioid olan fentanilin yüksek dozda uygulanması ile mortaliteye neden olabilecek ilaca bağlı komplikasyonlardan veya düşük dozda uygulanması ile oluşacak analjezi ve sedasyon yetersizliğinden kaçınılmasında oldukça önemlidir (Iyer, L. ve ark., 2010).

2.6.4. Biyotransformasyonla İlgili Bazı Temel Kavramlar

Farmakodinamik

İlaçların canlılardaki (insan veya deney hayvanı) etkileri ile etki mekanizmalarını araştırarak, ilaçların organizmaya ne yaptığı sorusuyla ilgilenir. İlaç vücuda uygulandıktan sonra farmakokinetik süreçler içinde kan dolaşımı ile etki göstereceği organa ve dokuya taşınır. İlacın dozunun artması ile konsantrasyonu yükselmekte, bunun sonucunda da ilacın o bölgedeki etkisi artmaktadır. Ancak belirli bir düzeyden sonra ilaç konsantrasyonu arttığı halde etki daha fazla artmaz. İlacın istenen etkilerinin dışında kalan etkilerine istenmeyen etki, yan etki, advers etki, toksik etki gibi isimler verilir (Lee W.M., 2003).

Farmakokinetik

İlaç ve diğer maddelerin emilim, dağılım, metabolizasyon ve atılım süreçlerinin hızlarının incelenmesidir. Farmakokinetik, ilaç araştırmalarında ve adli olgularda, bir dozun zaman ve miktarının tahminine izin verebilmektedir. (Lee W.M., 2003; Collett, B., 1998).

Emilim (Absorbsiyon)

İlacın uygulama yerinden kan veya lenf dolaşımına geçmesidir (Lee W.M., 2003).

Dağılım (Distribüsyon)

İlacın uygulandığı yerden emildikten sonra önce kan dolaşımına ardından da tüm vücuda dağılması olayıdır (Lee W.M., 2003).

Eliminasyon

Biyotransformasyonla daha zararsız ve suda çözünen ksenobiyotiğin veya metabolitinin idrar, safra veya nefes vb gibi yollarla vücuttan atılmasıdır (Collett, B., 1998).

Kararlı Durum Konsantrasyonu

İlaç uygulamalarında başlangıçta giderek yükselen bir kan konsantrasyon eğrisi elde edilir. Bu durum ilacın vücuttan eliminasyon hızı, absorpsiyon hızına eşit duruma gelinceye dek sürer. Belirli bir zaman sonra ilacın plazma konsantrasyonu sabit kalır, bu duruma kararlı durum konsantrasyonu (Css-Steady-State Concentration) adı verilir (Lee W.M., 2003)

Biyoyararlanım

Etkin maddenin veya onun terapötik molekül kısmının farmasötik şekilden absorbe edilerek sistemik dolaşıma geçme ve böylece vücuttaki etki yerinde veya

onu yansıtan biyolojik sıvılarda (genellikle serum veya plazmada) var olma hızı ve derecesidir (Collett, B., 1998).

2.7. Madde Bağımlılığı

Bağımlılık; bir nesneye, kişiye, ya da bir varlığa duyulan önlenemez istek veya bir başka iradenin altına girme durumudur. DSÖ' ne göre madde bağımlılığı, ilaç niteliğine sahip bir maddenin beyni etkilemesinden kaynaklanan, maddenin keyif verici etkilerini duyumsamak veya yokluğundan kaynaklanan huzursuzluktan sakınmak için, devamlı veya periyodik olarak madde alma arzusu ve bazı davranış bozukluklarıyla karakterize bir beyin hastalığı olarak tanımlanabilir. Madde bağımlılığı, önüne geçilemez gereksinme yahut arzu, kullanılan miktarı artırma eğilimi ortaya çıkarak fiziksel ve ruhsal bağımlılığa neden olmaktadır (Uzbay, İ.T. ve ark., 2003).

Madde bağımlılığı; biyolojik ve psikolojik eğilimi olan hastalarda kronik bir yan etki ve nörobiyolojik bir hastalıktır. Psikolojik bağımlılık, ilacın psikolojik etkileri için o ilacı elde etmeye yönelik patolojik davranışlarla karakterize bir sendromdur. Fiziksel bağımlılık ise madde kullanımı kesildiğinde veya alışılan dozun altına inildiğinde ortaya çıkan karakterize fizyolojik bir durumdur. Fiziksel bağımlılıkta, mahrum kalınan maddeye aşırı şekilde gereksinim duyma durumu ortaya çıkacak ve ilaç tekrar verildiğinde kısmen ya da tamamen rahatlama şeklinde fizyolojik bir adaptasyon hali oluşacaktır (Kayaalp, S.O. ve ark., 2009). Bağımlılık yapan maddelerin farmakolojik profili, bağımlılığa eşlik eden psikolojik ve fiziksel bağımlılığın nitelikleri ve çeşitli yönleri, kötüye kullanım ve

bağımlılığın yol açtığı kişisel, toplumsal ve halk sağlığı ile ilgili zararların boyutu, bağımlılık yapan madde grupları arasında değişiklik gösterir (Ashburn, M.A. ve ark., 1999; Portenoy, R.K. ve ark., 1999; Camu, F. ve ark., 2002).

Önemli miktarlarda bağımlılık yapıcı maddenin devamlı kullanımı, maddenin etki gücünün ilerleyici olarak azalmasına ve aynı düzeyde etki sağlayabilmek için daha fazla ilaç gereksinimin oluşmasına neden olur. Eroin, morfin gibi maddeleri ve kokain gibi uyarıcıları yoğun bir biçimde kullananlarda önemli ölçüde tolerans gelişebilir. Tolerans, madde kullanımına fizyolojik cevaptır ve farklı hızlarda oluşabilir. Hastanın ilaç ihtiyacının artmasıyla karakterizedir ve ilacın tekrarlayan dozları nedeniyle etkisinin azalması söz konusudur Tolerans gelişiminin derecesi morfin gibi bazı ilaçlarda normal dozun 125 misline kadar çıkmaktadır. Tedavi sırasında oluşan doz artışı gereksiniminin sebebi genellikle hastalığın ilerlemesi veya psikolojik strestir. Hastalar ilaçların yan etkileri konusunda uyarılmalı, yan etkiler mutlaka tedavi edilmelidir (K. ve ark., 1999; Camu, F. ve ark., 2002).

Aynı farmakolojik gruptaki maddelerden birine karşı tolerans gelişmişse bu grubun diğer üyelerine karşı da tolerans gelişimi söz konusudur. Buna “çapraz tolerans” denir. Çapraz tolerans ilaç grupları arasında da olabilir; örneğin alkol, barbitüratlar ve benzodiazepinler vb. Ayrıca toleransın zamana bağımlı olarak gelişen iki tipi de bulunmaktadır; tolerans ilaç veya madde alındıktan hemen sonra, kronik tolerans ise ilacın veya maddenin sürekli alımı esnasında zaman içinde gelişir. Tolerans gelişimi nonspesifik veya spesifik nitelikli de olabilir. Nonspesifik toleransa genel tolerans adı da verilir. Bu durumda bir maddenin birden fazla etkisine tolerans gelişimi söz konusudur. Spesifik tolerans da ise bir

maddenin sadece bir etkisine karşı tolerans gelişir. Tablo 1’ de gösterildiği gibi tolerans gelişiminin derecesi fiziksel veya psişik (=psikolojik) bağımlılık gelişimi ile bir paralellik göstermeyebilir (Kayaalp, S.O. ve ark., 2009).

Uzun süre yoğun bir biçimde kullanılan maddenin, kullanımı kesildiğinde veya alışılan dozun altına inildiğinde, kanda ve dokulardaki madde düzeyi düşmeye başladığında, ortaya çıkan fizyolojik ve bilişsel belirtiler ve bunlara eşlik eden uyumu bozan davranışsal değişiklikler yoksunluk olarak adlandırılmaktadır (Uzbay, İ.T., 2004). Bağımlılık tipleri ve özellikleri Tablo 2.3’ te açıklanmaktadır.

Tablo 2.3. Bağımlılık Tipleri ve Özellikleri (Kayaalp, S.O. ve ark., 2009).

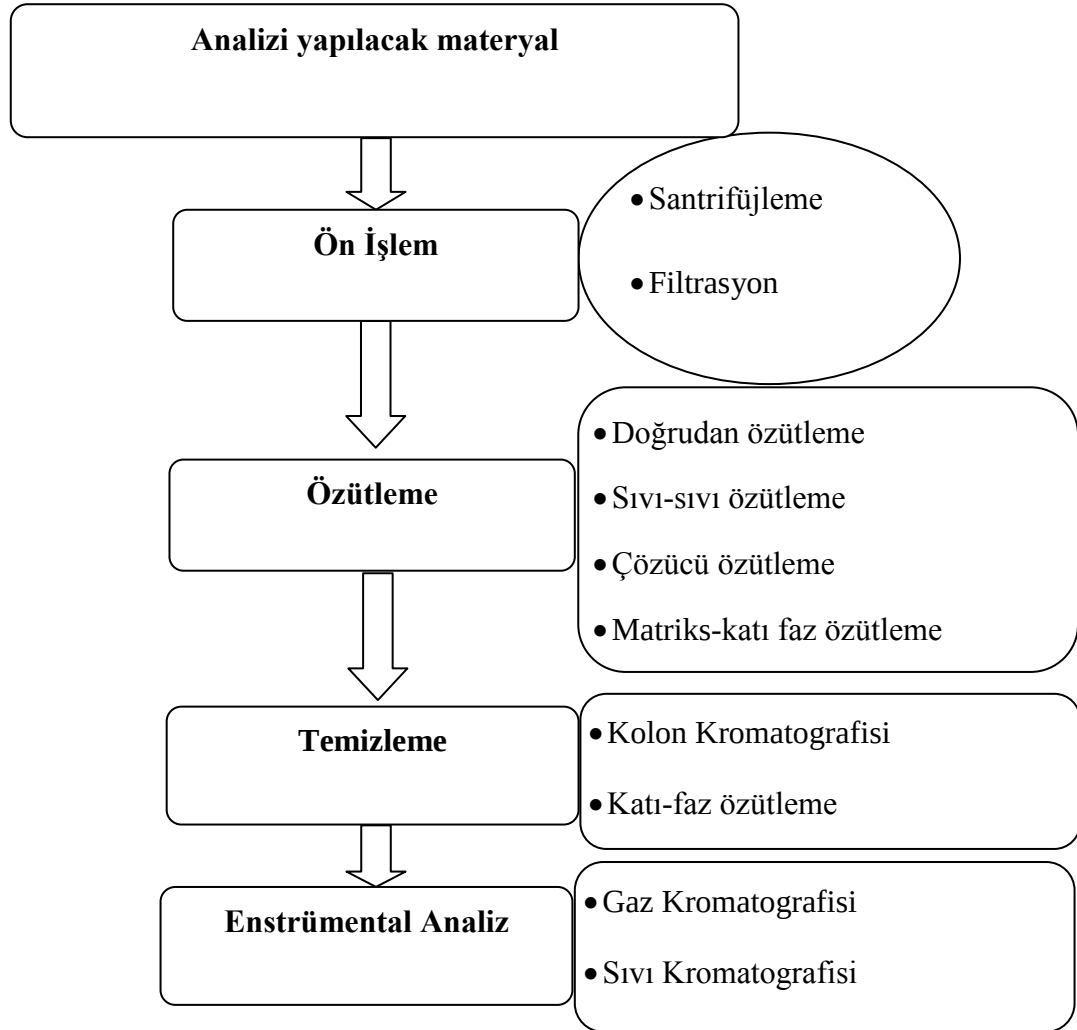
Madde	Tolerans	Psikolojik Bağımlılık	Fizyolojik Bağımlılık
Esrar	++++	+++	++
Kokain	-	+++	-,+
Opioid	++++	++++	++++
Halüsinojen	++,+++	++	-
Alkol-barbitürat	++	+++	+++

Fiziksel bağımlılık oluşturma dereceleri ve kullanım süresi ile artan şiddette ve kullanılan maddenin ani olarak kesilmesi veya maddenin temin edilememesine bağlı olarak yoksunluk sendromu ortaya çıkar. Ancak yoksunluk sendromunun şiddeti; kullanım süresi ve gelişen fiziksel bağımlılığın derecesine bağlı olarak değişmektedir (Uzbay, İ.T., 2004).

Kullanılan maddenin cinsine göre ortaya çıkan yoksunluk belirtileri farklılık gösterir ve 72 saat içerisinde en yüksek düzeye ulaşır. Yoksunluk belirtileri; şiddetli bir madde arayışı (maddeyi elde etmek için suç işlemeyi göze alabilecek seviyede), artmış kaygı, gerginlik, ajitasyon ve çıldırma hali, kalp çarpıntısı, kalpte ritim bozuklukları ve hipertansiyon, bulantı ve kusma, uyku bozukluğu, terleme, esneme nöbetleri, göz bebeklerinde genişleme veya küçülme, şiddetli karın krampları, sesli veya ışıklı uyarılara aşırı duyarlı olma, epilepsi nöbetleri, vücut ısısında aşırı yükselme veya düşme vb. belirtiler şeklindedir. Bu hoş olmayan yoksunluk belirtilerinin ortaya çıkması ile kişi tekrar madde kullanarak bu belirtilerden kaçmaya veya bu belirtileri hafifletmeye çalışır (Yücel, A., 1997).

2.8. Sıvı Sıvı Özütleme (SSÖ) Yöntemi

Kimyasal analizi yapılacak örneklere Şekil 2.10' da belirtilen işlemler uygulanmaktadır.



Şekil 2.10. Maddelerin Tayin Yöntemleri (Cole, J.M. ve ark., 2010).

Kimyasal analizi yapılacak biyolojik, kimyasal, tıbbi, çevresel veya gıda gibi örnekler, genellikle aranan madde dışında birçok bileşenin yer aldığı karışık bir matriks içerirler. Bu nedenle örnek hazırlama; enstrümental analizler öncesinde

uygulanması gereken çok önemli bir basamaktır. Örnek hazırlama başlıca iki amaç için yapılmakta, örneklerin istenmeyen bileşenlerden temizlenmesi ve yoğunlaştırılmasıdır. Temizleme işlemi ile analizin yanlış sonuçlanmasına neden olabilecek, aranan maddenin tespit edilmesini engelleyebilecek veya analiz cihazlarının kirlenmesine neden olabilecek kirliliklerin, matriksten uzaklaştırılması sağlanır (Alizadeh, N. ve ark., 2002; Cole, J.M. ve ark., 2010).

Özütleme işlemi materyalin çeşidine, tayin edilmek istenen bileşiklere ve kullanılan analitik metoda bağlı olarak değişmektedir. Özütleme işleminde ilk basamak olan materyalin ezilmesi, ya da öğütülmesi ile yüzey alanının arttırılması ve böylece materyalin özütleme çözeltisiyle daha iyi etkileşmesi sağlanmaktadır. Materyallerin çoğu örnek hazırlama işlemi sırasında asidik, bazik ya da enzimatik hidroliz içererek, bileşikleri serbest hale getirilir (Wolf, C.E. ve ark., 2005).

2.8.1. Sıvı Sıvı Özütleme (SSÖ) Yöntemi ile Ayırma ve Zenginleştirme

Kimyasal ayırma yöntemlerinin en eskisi olan SSÖ, organik bileşik ve metal iyonlarının saflaştırılmasında, deriştirilmesinde ve ayırmada kullanılan en etkili metotlardan birisidir (Alizadeh, N. ve ark., 2002; Cole, J.M. ve ark., 2010).

Ayırmada birbiriyle karışmayan iki sıvı fazda maddenin element veya bileşiklerin çözünürlüklerinin farklı olması temeldir. Genellikle ilk faz su, diğer faz su ile karışmayan organik çözücüdür. Basitliği, geniş ve hızlı uygulanabilirliği sebebiyle analiz işlemlerinde önemli bir yere sahip olan bu yöntem, genellikle sıvı kromatografisi ile yapılan analizlerde kullanılmaktadır (Wolf, C.E. ve ark., 2005; Cole, J.M. ve ark., 2010).

Örneklerdeki etken maddelerin tayin edilebilmesi için, sinyalin dedektörün ölçülebilir dinamik aralığı içerisinde olması gerekir. Bu nedenle SSÖ hem matriks etkilerini elimine eden hem de analiti deriştiren etkili bir zenginleştirme yöntemidir. SSÖ' nin en tipik problemi örnek ve organik çözücünün büyük miktarda gerekli olmasıdır (Wolf, C.E. ve ark., 2005). SSÖ de tuz veya karbonatın etkisi, suda kısmen çözünebilir çözücülerin kullanıldığı özütlemelerde verimi iyileştirmektedirler (Wolf, C.E. ve ark., 2005; Smith, E.T. ve ark., 2000).

Organik faza doğru madde komplekslerinin özütlenmesi, sulu fazdaki hidrojen iyonunun derişimine bağılı olarak değışmektedir. Bu nedenle özütleme için pH kontrolü önemlidir. Kullanılan çözücünün hacmi ve iş fazlalığı gibi dezavantajlarının yanı sıra; standart metotlar için yöntemin genel kabulü, yüksek örnek kapasitesi, iyi tekrarlanabilirlik ve geliştirilen yöntemin basitliği SSÖ' nin avantajlarındandır (Lord, H. ve ark., 2000).

2.8.2. SSÖ Verimini Etkileyen Faktörler

Özütleme işlemini ve verimini etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Bunlardan bazıları şunlardır:

pH Etkisi

İyonların sulu bir çözeltiden, organik bir çözücüye geçiş esasına dayanan özütleme ile yapılan ayırmalarda oluşan denge pH' ya bağılıdır ve sulu fazın pH'sı kontrol edilerek istenilen iyonların ayrılması mümkün olmaktadır (Skoog, D.A. ve ark., 1998).

Madde Derişiminin Etkisi

Derişimi yüksek olmamak şartı ile (10^{-3} M'in aşığısında) çok küçük element veya bileşik derişimlerinde dağılma katsayıları aynı kalır. Bu durum oldukça önemlidir. Bununla birlikte eğer ki madde derişimleri belli bir değerin ötesinde artarsa, dağılma katsayısı azalmaktadır (Lord, H. ve ark., 2000; Cole, J.M. ve ark., 2010).

Sıcaklığın Etkisi

Özütleme üzerinde sıcaklığın etkisini önceden tahmin etmek güçtür. Sıcaklıktaki bir değışim, özütlemeye etki eden tüm sabitlerdeki değışime eşlik eder. Genel olarak sıcaklığın etkisi azdır, fakat aşırı derecede ortam sıcaklığının artması ile özütleme işleminde bozunmalar olabilmektedir (Lord, H. ve ark., 2000; Wolf, C.E. ve ark., 2005).

Çözücü Etkisi

Organik çözücünün doğası genelde özütleme üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Sulu çözeltide organik çözücünün çözünürlüğü önemli olup, özütün kaybına neden olur ve bu durum özütlemenin verimini etkiler. Çözücünün seçimi pratikte maddelerin nasıl tayin edileceğine bağlıdır. Çözücü mümkün olduğu kadar suda çözünmemelidir. Çözücünün yoğunluğu sudan farklı olmalı ve fazlar arasında bağ oluşturmamalıdır. Çözücünün yüksek kaynama noktasına sahip olması iyi değildir. Çünkü istenilen hacme getirmek için çözücünün buharlaşması güç olur. Organik çözücünün bozunmasından kaçınılmalıdır. Bozunma ürünleri istenmeyen etkileri üretebilir. Ayrıca çözücünün saf olması da önemlidir. Düşük erime

noktasına sahip çözücüler özel durum gerektirirler. Bu tür çözücüler (25-100°C) oda sıcaklığının üzerinde erime noktasına sahiptirler. Bazı çözücülerin genel özelliği Tablo 2.4' de verilmektedir (Cole, J.M. ve ark., 2010).

Tablo 2.4. Yaygın Kullanılan Bazı Çözücülerin Özellikleri (Lu, J.F. ve ark., 1989).

Çözücü	Kaynama Noktası °C	Yoğunluk g/cm ³	Çözünürlük %w/v, 20°C' de	
			Suda	Çözücüde suyun
Hekzan	69	0.66	0.001	-
Benzen	80	0.88	0.08	0.06
Toluen	111	0.87	0.05	0.06
Kloroform	61	1.49	0.80	0.97
Bütanol	118	0.81	2.27	9.10
Etil Asetat	77	0.90	7.94	3.01
Ksilen	139	0.86	0.01	0.04
İzobütanol	108	0.81	8.50	16.4

Özütleme çalışmalarında kullanılan çözücüler farklı şekillerde sınıflandırılır. Özütleme sistemi üzerindeki etkinliğine göre apolar ve polar çözücü olarak sınıflandırılırken (Skoog, D.A. ve ark., 1999) , özellikleri açısından ise pratik

önemdeki özellikler ve mekanizmayı etkileyen özellikler olarak iki gruba ayrılırlar. Yüzey gerilimi, yoğunluk gibi çözücülerin fiziksel özelliklerini içeren ilk grup; hızlı ve iyi bir şekilde fazların ayrılmasında etkilidir. Oda sıcaklığında buharlaşma basıncı yüksek çözücüler çok uçucu olduğundan kullanımları zahmetlidir. Bu nedenle kaynama noktası yüksek çözücüler tercih edilmelidir. Çözücülerin fiziksel uygunluğu, polarlık, molar hacim, hidrojen bağı, asit-baz gücü gibi kimyasal özellikler de bir çözücünün davranışı için önemlidir. Bu durumlar organik maddenin sudaki çözünürlüğünü etkiler. Eğer uygun bir çözücü seçilmişse, sıvı kromatografisi başarıldığı zaman karşılaştırılabilir iyi sinyaller elde edilebilir (Cole, J.M. ve ark., 2010).

2.9. Kromatografi İle İlgili Genel Bilgiler

Kromatografi, karışım halinde bulunan bir örnekteki bileşenlerin ayrılması, tanınması ve tayini için kullanılan yöntemlerin genel adıdır. Diğer ayırma yöntemlerinden hiç birisi kromatografik yöntemler kadar etkili olmayıp uygulamada yaygın bir şekilde kullanılmazlar. Bu nedenle de kromatografik yöntemler daha çok araştırma amacıyla kullanılmaktadır. Kromatografi ilk olarak yirminci yüzyılın başında Rus bilim adamı botanikçi Michail Tswett tarafından bulunmuştur. Twesttt yeşil yapraklardan elde ettiği çözeltiyi toz haline getirilmiş kalsiyum karbonatla doldurulmuş olan cam bir kolondan geçirerek çözeltide bulunan klorofil ve ksantofil gibi renkli maddeleri, kolonda renkli bantlar şeklinde ayırmayı başarmıştır. Bu renkli batlardan esinlenerek yaptığı işlem kromatografi olarak isimlendirilmiştir (Stan, H.J. ve ark., 1996; Paradis, C. ve ark., 2002). Kromatografi kelime anlamı olarak ise, renkli yazılım (Chromatography: chroma

renk, graphy ise yazılım) anlamına gelmektedir (Skoog, D.A. ve ark., 1998; Lehotay, S.J. ve ark., 2002).

Kromatografi yönteminin uygulandığı sistemler çok çeşitli olmakla beraber, tümünün ortak özelliği, sistemde bir hareketli faz ile bir sabit faz kullanılmasıdır. Bu yöntemlerde genellikle belli uzunluktaki bir kolon, bir dolgu maddesiyle doldurulmakta ve bu madde sabit faz adını almaktadır. Örnek, kolona verildikten sonra hareketli faz yardımıyla kolonun bir ucundan öteki ucuna kadar sürüklenerek taşınmaktadır. Karışımındaki bileşenlerin ayrılması, bunların kolon içinde ilerleme hızlarının farklı olması sonucu gerçekleşmektedir. Kromatografik yöntemlerin en temel şekilde sınıflandırılması, hareketli fazın sıvı (sıvı kromatografisi) veya gaz (gaz kromatografisi) olmasına dayanılarak yapılmaktadır (Decaestecker, T.N. ve ark., 2004; Yıldız, A. ve ark., 1997).

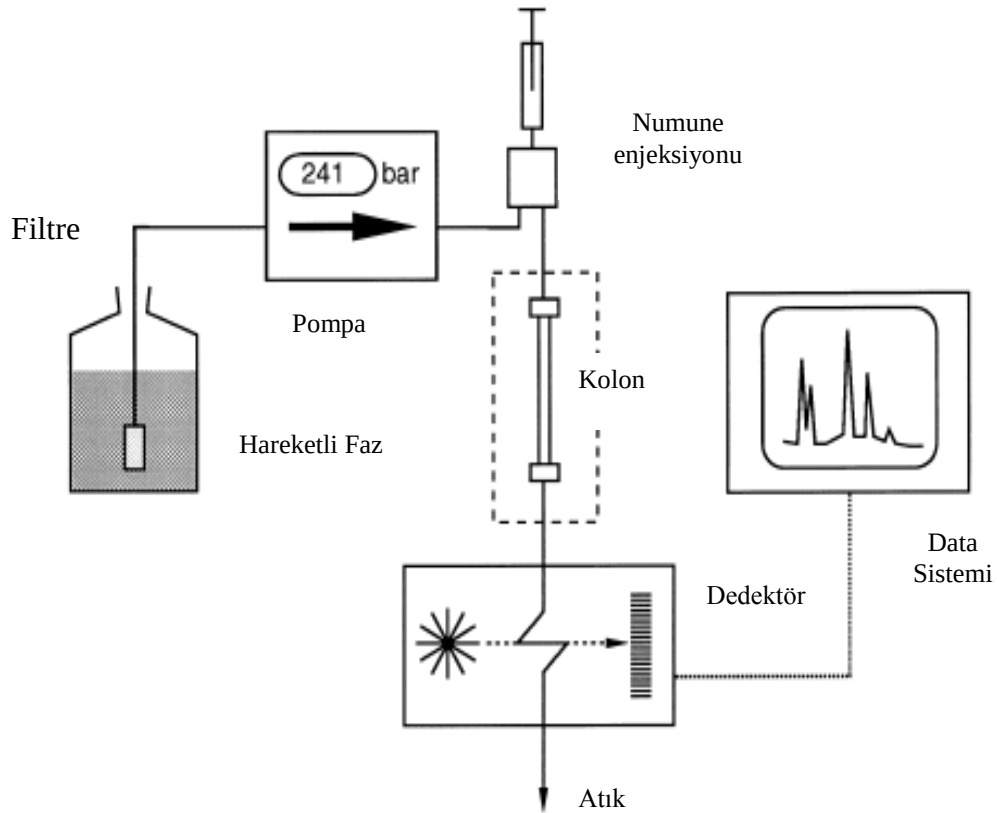
2.10. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Klasik sıvı kromatografisinde numune bir çözücü (hareketli faz) yardımıyla bir kolon içerisinden geçirilmesi suretiyle numunedeki bileşenlerin bantlar halinde ayrılmaları esasına dayanılarak yapılmaktadır. En iyi sonuç için analiz sırasında uzun kolonlar tercih edilmektedir. Bu uzun kolonlar ile yapılan işlemlerde, analiz sürelerinin uzun olduğunu gören bilim adamları, kullanılan kolonların ebatlarını küçülterek içerisindeki sabit fazın tane büyüklüğünü de kullanılan kolona göre küçültmüşlerdir. Böylece hareketli fazın kolon içerisindeki akış süresini azaltmak için basınç uygulanmıştır. Bunun neticesi olarak da basınçlı sıvı kromatografileri

kullanılmaya başlanmıştır (Lehotay, S.J. ve ark., 2002; Van der Hof, G.R. ve ark., 1999).

Bileşiklerin saflaştırma sürelerinin azaltılması ile kolon kromatografisi ile izolasyon çalışmalarının da temelleri atıldı. Günümüzde Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) terimi kullanılarak ifade edilen bu yöntem, 1970'li yılların ortalarında geliştirildi. Kolon paketleme materyallerinin geliştirilmesi ve dedektörlerin ilavesi ile hızlı bir ilerleme kaydedildi. 1980 yılından sonra da HPLC, kimyasal bileşiklerin ayrılmasında yaygın bir şekilde kullanılmaya başlandı. HPLC yönteminin bu kadar yaygın olmasının sebepleri arasında; duyarlılığı, doğru kantitatif tayinlere kolaylıkla uyarlanabilir olması, uçucu olmayan maddelerin ve hepsinden de önemlisi halkın birinci derece ilgilendiği maddeleri de kapsayan geniş bir madde analizi yelpazesi yer almaktadır (Van der Hof, G.R. ve ark., 1999).

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi cihazı, çözücü tankı, pompa, enjektör, kolon, dedektör ve kaydedici olmak üzere Şekil 2.11' de görüldüğü gibi altı ana bölümden oluşan bir sistemdir (Meyer, V.R., 2004).



Şekil 2.11. Yüksek Performanslı Sıvı kromatografisi Cihazının Şematik Görünüşü
(Meyer, V.R., 2004).

Kolonlar

Sıvı kromatografisi yöntemlerinde genellikle belli uzunluktaki bir kolon, bir dolgu maddesiyle doldurulmakta ve bu madde sabit faz adını almaktadır. Sıvı kromatografi kolonları sistemin en önemli kısımlarından biri olup normal olarak düzgün iç çaplı paslanmaz çelik borulardan imal edilirler. Tipik bir HPLC kolonun çapı 3-4 mm, uzunluğu 10-40 cm dir. Dolgu maddesi olarak kullanılan silikajel parçacıklarının boyutları 5-10 μm dir. Son zamanlarda iç çapı 1-4,6 mm ve uzunluğu 3-7,5 cm olan yüksek performanslı mikro kolonlar da üretilmeye başlanmıştır. Böyle kolonların dolgu maddelerinin parçacık boyutları 3-5 μm ’ dir.

Tabaka sayısı 100000'e kadar çıkmaktadır. Bu mikro kolonlar ile az miktarda çözücü ile hızlı bir şekilde ayırım yapılabilir. Analitik kolonların ömrünü uzatmak için analitik kolondan önce ön (klavuz ya da guard) kolon denilen kolonlar kullanılır. Bu kolonlar analitik kolonlara göre daha ucuz olup bunların görevi hem hareketli fazdaki hem de numune içerisinde bulunan muhtemel kirleri ve partikülleri tutarak uzaklaştırmaktır. Emniyet kolonunun dolgusunun bileşimi ile analitik kolonunki benzer olmalıdır (Anderson, R.A. ve ark., 2007; Skoog, D.A. ve ark., 1998). Örnek, kolona verildikten sonra bir hareketli faz ile kolonun bir ucundan öteki ucuna kadar sürüklenerek taşınmaktadır (Flanagan, R.J. ve ark., 2007).

Pompalar

Pompalar, sıkıca doldurulmuş kolon içinden hareketli fazın akışını sağlayan aletlerdir. Her birinin kendine göre üstünlük ve sakıncaları bulunan üç tip pompa vardır (Skoog, D.A. ve ark., 1998; Sojo, L.E. ve ark., 2003).

Pistonlu pompalar; cihazların %90'ında kullanılan pompalardır. Motor kontrollü bir pistonun ileri ve geri hareketi ile çözücünün pompalandığı küçük bir silindirden meydana gelmektedir. Bu pompaların üstünlüğü; küçük iç hacimleri, yüksek çıkış basıncı ve kolon geri basıncından büyük ölçüde bağımsız olan sabit akış hızlarıdır. Pulsu bir akış ürettiklerinden dolayı sakıncalıdır. Sürgülü pompalar; bir kademeli motordan güç alan vidalı güdüm mekanizması ile kumanda edilen pompalardır. Geri basınçtan bağımsız bir akış üretirler. Sakıncası sınırlı çözücü kapasitesi ve çözücü değiştirilmesinde karşılaşılan güçlüklerdir. Pnömatik pompalar; en basit pompa tipidir. Akış normaldir ancak kapasitesi

sınırlı olup, çıkış basıncı düşüktür (Flanagan, R.J. ve ark., 2007; Sojo, L.E. ve ark., 2003).

Enjektörler

İlk zamanlarda HPLC sistemine numune verme sistemi şırınga ile manuel enjeksiyondur. Bu amaçla 100 atm basınca kadar dayanıklı mikro şırıngalar kullanılırdı. Bu tekniğin avantajı basitliğidir. Günümüzde ise otomatik enjeksiyon sistemleri en yaygın olarak kullanılan yöntemdir. Birçok sıvı kromatografisi cihazının ayrılmaz bir parçası olan bu şırınga, değiştirilebilir nitelikte olup 5,00 μL –500,00 μL arasında değişen hacimlerde numune enjeksiyonu yapabilmektedir (Skoog, D.A. ve ark., 1999; Sojo, L.E. ve ark., 2003).

Dedektörler

Hareketli faz ile taşınarak kolon çıkışına gelen numunelerin sinyallerinin elektrik enerjisine çevrilip tanınmasına yardımcı olan cihazlardır (Liang, H.R. ve ark., 2003; Skoog, D.A. ve ark., 1998).

2.11. Kütle Spektrometresi

Kütle Spektrometresi (MS) uzun yıllardan beri kullanılmakta olup ilk kez bir kütle spektrumu 1898’de Wien tarafından elde edilmiştir. 1905’ de ise Thompson kararlı izotopların bulunduğunu göstermek için yapmış olduğu deneyde farklı pozitif iyonların kütle/yük (m/z) oranlarının farklılık gösterdiğini tespit etmiştir. Kütle Spektrometresi, evrensel, kütle bağımlı ve yıkıcı (parçalayan) bir

dedektördür. Her numune için sinyal verir (Ardrey, R.E., 2003; Liang, H.R. ve ark., 2003).

Kütle spektrometrisi halen tüm analitik yöntemlerin içerisinde en geniş uygulama alanı olanıdır ve maddelerin elementel bileşimlerinin belirlenmesinde, inorganik, organik ve kimyasal moleküllerin yapılarının aydınlatılmasında, karmaşık (kimyasal, biyolojik, tıbbi vb.) karışımların kalitatif ve kantitatif analizlerinde, katı yüzeylerin yapılarının ve bileşimlerinin aydınlatılmasında ve bir numunedeki atomların izotopik oranlarının bulunmasında kullanılan oldukça yararlı bir yöntemdir (Liang, H.R. ve ark., 2003; Cody, R.B., 2002).

Numune giriş sistemi, iyon kaynağı, kütle analizörü, dedektör, sinyal işleyici ve gösterge kütle spektrometresinin ana parçalarıdır. Numune giriş sisteminin amacı, çok az miktardaki numuneyi kütle spektrometresinin içine verebilmektir. Kütle spektrometrelerinin iyon kaynakları, numune bileşenlerini iyonlara dönüştürmektedir. Çoğu kez iyon kaynağı ile giriş sistemi birleştirilmiştir. Her iki durumda da pozitif veya negatif iyonlar (çoğunlukla pozitif iyonlar) kütle analizörüne doğru hızlandırılmaktadırlar. Kütle analizörünün işlevi, fotonların dalga boylarına göre ayrılması yerine m/z oranına göre ayrılması işlevini gerçekleştirmektir (Anderson, R.A. ve ark., 2007; Cody, R.B., 2002).

Kütle spektrometrelerinde bulunan karakteristik özellik, sinyal işleme ve gösterge kısımları hariç, cihazın diğer bütün bileşenlerinde sağlanmış ileri vakum (10^{-4} – 10^{-8} torr) sistemidir. Yüksek vakuma olan gereksinme, yüklü parçacıklar ve elektronların atmosfer bileşenleriyle etkileşmesi ve sonuçta yok olması problemidir. Sıradan bir kütle spektrometresi saf bileşiklerin tanınması için güçlü

bir araç olmakla beraber, en basit karışımların analizinde bile farklı m/z değerlerindeki iyonların çokluğu nedeniyle sınırlı kullanıma sahiptir. Bu nedenle üreticiler kütle spektrometrelerinin değişik ayırma yöntemleri ile birleştirilmesi üzerine yöntemler geliştirmişlerdir. İki veya daha fazla analitik teknik ya da cihazın daha etkili bir düzenek oluşturmak üzere birleştirilmesi olayına enstrümantal analizde ikili yöntem adı verilmektedir. Örneğin, LC-MS' de MS'in LC dedektörü olarak kullanılmasında toplanacak bilgilerin çoğunluğu asıl nedeni oluşturmaktadır (Anderson, R.A. ve ark., 2007). Bütün organik bileşik sınıflarında ve tüm organik bileşiklerde ortak bir fiziksel özellik olan kütleye cevap verebilme en büyük özelliktir.

Kütle Spektrometrisini temel şekilde açıklarsak; sisteme yüklenen numune, yüksek enerjili elektronlarla çarpışarak elektronlarını kaybeder ve pozitif yüklü farklı iyonlar haline dönüşür. Hızlandırılan bu katyonlar manyetik ve/veya elektrik alanında sapdırılmaktadır. İyonların sapması kütlelerine, yüklerine ve hızlarına bağlıdır. Eğer yük, hız ve sapdırıcı güç sabit ise; sapma ağır parçacıklarda az, hafif parçacıklarda çok olacaktır (Brian, M., 2000; Anderson, R.A. ve ark., 2007).

Kütle Spektrometresi şu kısımlardan oluşmaktadır:

Numune Giriş Sistemi

Numune giriş sisteminin amacı çok az miktarda numuneyi numune giriş sisteminin içine almaktır. Bu kısım vakum altında bulunur ve numune alma esnasında vakum düşmez. Numunenin cihaza alınması buharlaştırma, doğrudan

veya kromatografi düzeneğinden geldiği gibi olmak üzere başlıca üç şekilde yapılır (James, K., 2004).

İyon Kaynağı

Molekülleri iyonlaştırma bölümüdür. Bir molekül, atom veya iyondan bir elektron uzaklaşması olayına iyonizasyon denir. İyonlaştırma teknikleri; gaz, sıvı ve katı gibi maddenin farklı fiziksel durumuna ve maddenin ısısal kararlılığına bağlı olarak seçilir. Günümüzde en çok kullanılan iyonlaştırma teknikleri elektronik iyonizasyon ve kimyasal iyonizasyondur (Anderson, R.A. ve ark., 2007).

Elektronik iyonizasyon (EI), kısaca analit molekülünün enerjili elektronlarla bombardıman edildiği iyonizasyon yöntemi olarak tanımlanır. Sıcak bir bölmeden çıkan elektronlar bölme boyunca odaklanırlar ve 70 eV'luk bir potansiyele sahip bir elektrot tarafından çekilirler. Böylece her bir elektron 70 eV'luk bir enerji kazanır ve ortama giren numune ile çarpışarak bir seri parçalanma tepkimeleri oluşur. Moleküldeki bağların kırılması tüm pozitif ve negatif iyonların oluşmasını sağlar. Çoğu organik molekül için pozitif iyon oluşumu enerji açısından daha çok tercih edilir. Elektronun sahip olduğu enerji bütün bağları kırmak için yeterli enerjidir. 70 eV'lık enerjinin kullanılması kararlı, tekrarlanabilir ve moleküle özgü kütle spektrumlarının oluşmasını sağlar. Elektron bombardımanı ile oluşan iyonların bağlı büyüklükleri, iyonize edici elektronların enerjileri ve iyonizasyonun olduğu sıcaklığa bağlıdır (Cody, R.B., 2002).

Kimyasal İyonizasyon (CI)'nin esası iyon-molekül tepkimelerine dayanır. Yüksek enerjili iyonlar çarpıştıkları moleküle ya proton aktarırlar ya da ondan hidrür ve elektron koparırlar. Kimyasal iyonlaşmalı kütle spektrometrisinde (CI-MS), iyon

kaynağına reaktif gaz verilerek yüksek basınç elde edilmektedir. Reaktif gaz numune molekülleri ile iç etkileşime girecek reaktif iyonlarını oluşturmak üzere elektron demeti tarafından iyonize edilmektedir. Ortamdaki yüksek basıncın etkisiyle reaktif iyon ile numune iç etkileşime girer. EI'ya göre enerji daha düşüktür (James, K., 2004; Anderson, R.A. ve ark., 2007).

Kütle Analizörü

İyon kaynağından çıkan iyonlaşma ürünleri analizöre yönlendirilir. Analizör, m/z oranlarına göre maddelerin ayrımının sağlandığı bölümdür. Bugün en çok kullanılan kütle analizörleri kuadropol kütle analizörüdür (James, K., 2004; Constantin, E. ve ark., 1990).

Dedektör

Kütle analizörlerinden geçen iyonlar elektron çoğaltıcı dedektöre ulaşır. Elektron çoğaltıcıda çarpışmadan dolayı oluşan akım önce analog voltaja, sonra da dijital sinyale dönüşür. Dedektörler sinyali 10^7 değerine kadar arttırabilirler. MS'den milisaniye aralıklarla gelen verilerin kaydedilmesi ve depolanması gereklidir ki bu da bir bilgisayarla kolayca sağlanabilmektedir. LC-MS sistemi, ara bağlantı ve veri toplama basamaklarında ki problemlerin çözülmesinden sonra, daha yaygın kullanılmaya başlanmıştır. Bunlardan başka aletin kalibrasyonunun otomatik yapılıp, sonuçlarının alınabilmesi, analiz koşullarının kolayca girilmesi, aletin kontrolünün yapılıp verilerin alınabilmesi, analiz sonrası veri değerlendirmenin yapılabilmesini bilgisayar sağlamaktadır (Brian, M., 2000; Constantin, E. ve ark., 1990).

Kütle spektrometrisi ile analizlerde 3 tip iyon tarama şekli vardır:

1. *Toplam İyon Taraması (TIC)*: Bir analiz sırasında ayırım yapmadan tüm iyonların 10-800 akb aralığında taratılması ile gerçekleştirilir.
2. *Seçilen İyonun Taraması (SIM)*: Aranılan bileşik için en karakteristik olan, kararlı ve çokluğu fazla olan m/z değerleri seçilip, taratılır. Seçici iyon taramasında seçilen iyonların tarama süresi (dwell time) analizci tarafından seçilir.
3. *Tek İyon Taraması*: Tek iyon taratılır. Çok hassastır, ancak kesin tanımlama yapılamaz (Brian, M., 2000).

Vakum Sistemleri

MS cihazı 10^{-6} - 10^{-8} torr civarında çalışmaktadır. MS' de vakum sisteminin olmasını gerektiren nedenler şöyle sıralanabilir (Anderson, R.A. ve ark., 2007);

1. Basınç arttıkça kütledeki çoğaltıcı, kaynak ve analizörde yüksek voltaj kırılmaları olabilir.
2. Kütle spektrometresinin iyon kaynağında bulunan gaz, spektral geri zemine katılabilir.
3. Kütle spektrometresinde düşük basınç sağlamanın en önemli nedeni, analiz edilen iyonlar arasındaki çarpışmayı en aza indirmektir. Çünkü iyon sürekli diğer moleküller ve yüzeyler ile çarpışıyorsa, iyonları belli bir yolda yönlendirmek yararsız olacaktır.

4. Yüksek basınç ile analizörün, iyon kaynağının ve odakların kirlenmesi artmaktadır.
5. Yüksek basınç ile spektrum almak ve yorumlamak zordur.
6. Basınç artarken iyon kaynağının doğru olan elektron düzeltmeleri zorlaşır.
7. Vakum sistemi analizörün işlemini gerçekleştirmesi için gereken moleküler ortalama yolu sağlar (Brian, M., 2000).

Bu nedenlerden dolayı MS için vakum sistemleri çok önemlidir. MS de cihaz içindeki basınç 10^{-6} torr civarında tutmak için değişik pompalar kullanılmaktadır (Flanagan, R.J. ve ark., 2007)

2.12. Sıvı Kromatografisi- Kütle Spektrometrisi (LC-MS)

Sıvı Kromatografisi- Kütle Spektrometrisi (LC-MS) cihazı sıvı kromatografisinin fiziksel ayırma özellikleri ile kütle analizine olanak tanıyan MS teknolojisinin birleşmesiyle oluşan sistemdir. LC-MS birçok amaç için kullanılan yüksek seçiciliğe ve hassasiyete sahip çok güçlü bir tekniktir. Genellikle belli bir karışım içerisinde özellikle uçucu olmayan karmaşık organik ve biyokimyasal karışımlardaki kimyasal maddenin miktarını belirlemek için kullanılır. Bu uygulamada kromatografik kolondan çıkan bileşikler için ayrı ayrı spektrumlar toplanmaktadır. Bu spektrumlar daha sonra işlenmek üzere bir bilgisayarda depolanmaktadır (Suelter, C.H. ve ark., 1990).

2.13. Ardışık Kütle Spektrometrisi (MS/MS)

Bir diğer ikili yöntemde bir kütle spektrometresinin bir başka kütle spektrometre ile birleştirilmesidir. Bu birleştirmede ilk spektrometre, bir karışımdaki farklı bileşiklerin moleküler iyonlarını izole etmede kullanılmaktadır. Bu iyonlar sonra ikinci bir kütle spektrometreye gönderilebilmekte ve ilk spektrometrede oluşan her bir iyon için ayrı ayrı bir dizi kütle spektrumu vermek üzere parçalanmaktadırlar. Bu tekniğe Tandem Kütle Spektrometresi adı verilmekte ve kısaca MS-MS olarak gösterilmektedir (Skoog, D.A. ve ark., 1999; Suelter, C.H. ve ark., 1990; Anonim, 2008).

Kütle spektrometresiyle elde edilen yapısal bilgiye iki kütle spektrometresinin bir cihazda birleştirilerek daha ileri bir boyuta götürülebilir. Bu teknik kütle spektrumunda seçilen pikin parçalanma iyonlarını ikincil iyon ölçmeye izin verir. Birinci kütle spektrometresi karışımlar için ayırıcı cihaz olarak kullanılır. Seçilen bir iyon ayrıldıktan sonra ikinci kütle analizöründe ayrılmak üzere bu iyon enerji uygulanır ve parçalanma iyonları oluşturulur. Bu kütle spektrum daha sonra seçilen iyon için yapısal karakterizasyonda kullanılır. Teorik araştırmada bu method, yapıyı ve molekülün parçalanma iyonlarının kararlılıklarını araştırmak için kullanılırken, kalıntı analizlerinde teknik CI gibi yumuşak iyonlaştırma teknikleriyle oluşturulan moleküler türlere uygulanabilir. Burada molekül genellikle çok az parçalanmaya uğrar. Buda molekül ağırlığının tespitinde kullanışlı olurken yapısal bilgi sağlamaz. MS/MS ölçümlerinde kullanılan ilk cihazda 3 kuadrapol bir araya getirilmiştir. Bu yüzden üçlü kuadrapol olarak adlandırılmaktadır. İlk kuadrapol ayırma cihazı olarak ve üçüncüde parçalanma

işleminin ürünlerini izlemek için kütle analizörü olarak kullanılır. Bu parçalanma merkez kuadrapolde hedef gaz ile çarpışma sonucunda oluşturulur ve çarpışma aktivitesine (CA) ya da çarpışma kaynaklı parçalanmaya (CID) denk gelir. Böyle bir CID kütle spektrumu EI spektrumunun olduğu kadar bileşiğin yapısı ya da kimliği için tanımlayıcıdır. MS/MS cihazı sıvı kromatografisi ile normal bir kütle spektrometresinin birleştirildiği gibi birleştirilebilir ve cihaz tamamen bilgisayar kontrolü altında olduğundan özel teknikler uygulanabilir (Lehotay, S.J. ve ark., 2002).

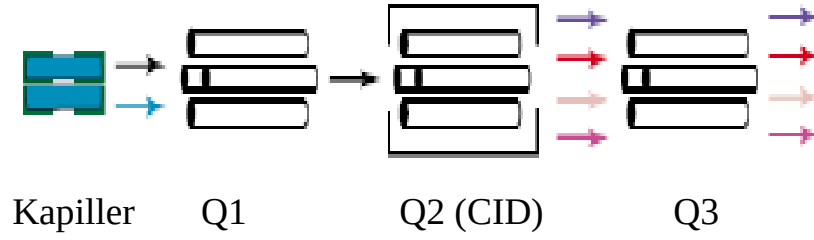
MS/MS analizi tarif edildiği üzere, bir ana iyonun birinci kuadrapolde ayrılmasından sonra CID çarpışma hücresi olarak hizmet veren ikinci kuadrapole veya oktapole gönderilir. Sonuçta oluşan iyonlar üçüncü kuadrapolde ölçülür.

2.14. Sıvı Kromatografisi Ardışık Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS)

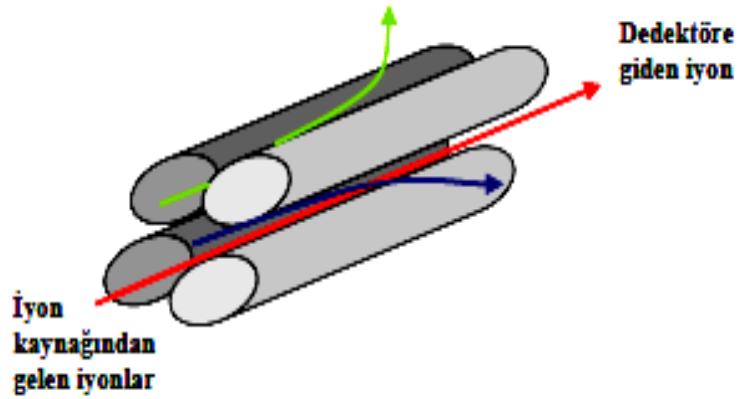
Son dönemde, kompleks matrikslerde örnek hazırlama işlemlerinde kullanılan sistemlerin gelişmiş gereksiniminin minimum düzeyde olması, seçiciliği ve hassasiyetinin gün geçtikçe artması, kalitatif ve kantitatif değerlendirmelerin oldukça kolay yapılabilmesi nedeniyle, LC-MS/MS'ler tercih edilmeye başlanmıştır (Hernandez Avila, C.A., 2006).

LC-MS/MS sistemlerin çalışma prensibi likit kromatografi kullanılarak ayrıştırılan örnek moleküllerinin, gaz faza geçirilerek kütle dedektörü ile analizlenmesi şeklindedir. Ancak, likit sistemden gelen fazla miktardaki

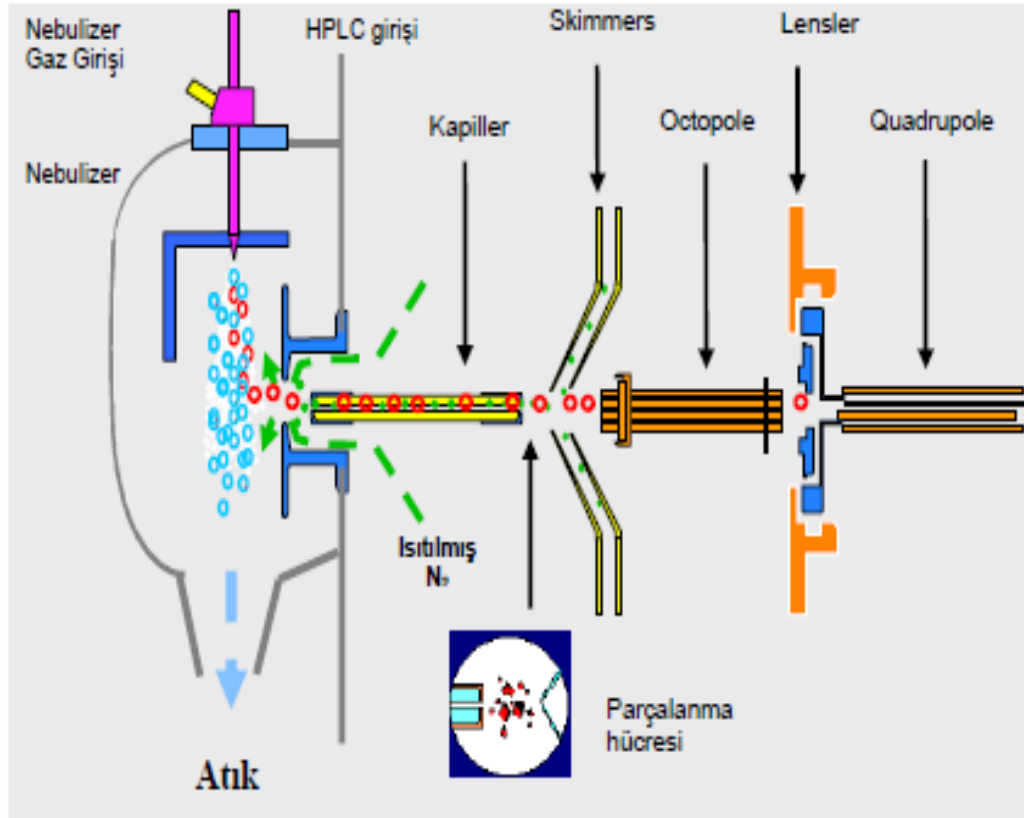
çözücünün uzaklaştırılması amacıyla, özel bir ara yüzey kullanılmaktadır (Suelter, C.H. ve ark., 1990; Anon., 2001). LC-MS/MS sisteminin yapısı ve bileşenleri Şekil 2.12, Şekil 2.13 ve Şekil 2.14’ de gösterilmektedir.



Şekil 2.12. Bir LC-MS/MS Sisteminin Genel Yapısı (Flanagan, R.J. ve ark., 2007).

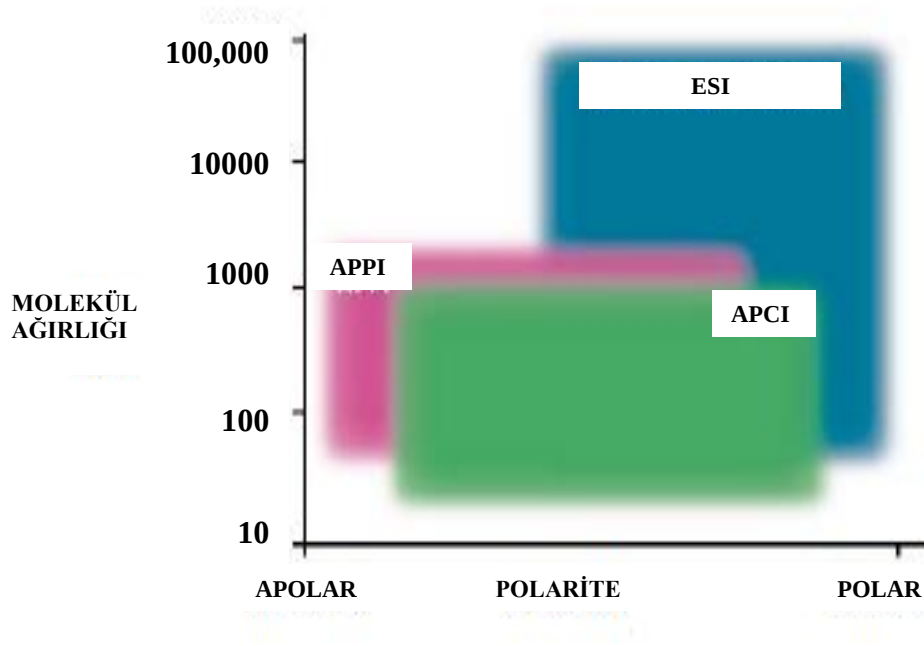


Şekil 2.13. Kuadropol 'ün Yapısı (Flanagan, R.J. ve ark., 2007)



Şekil 2.14. Bir LC-MS/MS Cihazının Temel Bileşenleri (Flanagan, R.J. ve ark., 2007).

LC-MS ve LC-MS/MS sistemler kullanım amaçlarına göre atmosferik basınç altında çalışan üç farklı tip iyon kaynağı taşıyabilmektedirler. Bunlar elektrosprey iyonizasyon (ESI), atmosferik basınç kimyasal iyonizasyon (APCI) ve atmosferik basınç fotoiyonizasyon (APPI) sistemleridir (Anon., 2001). LC-MS ve LC-MS/MS sistemlerinin iyonizasyon kaynakları Şekil 2.15' de gösterilmektedir.

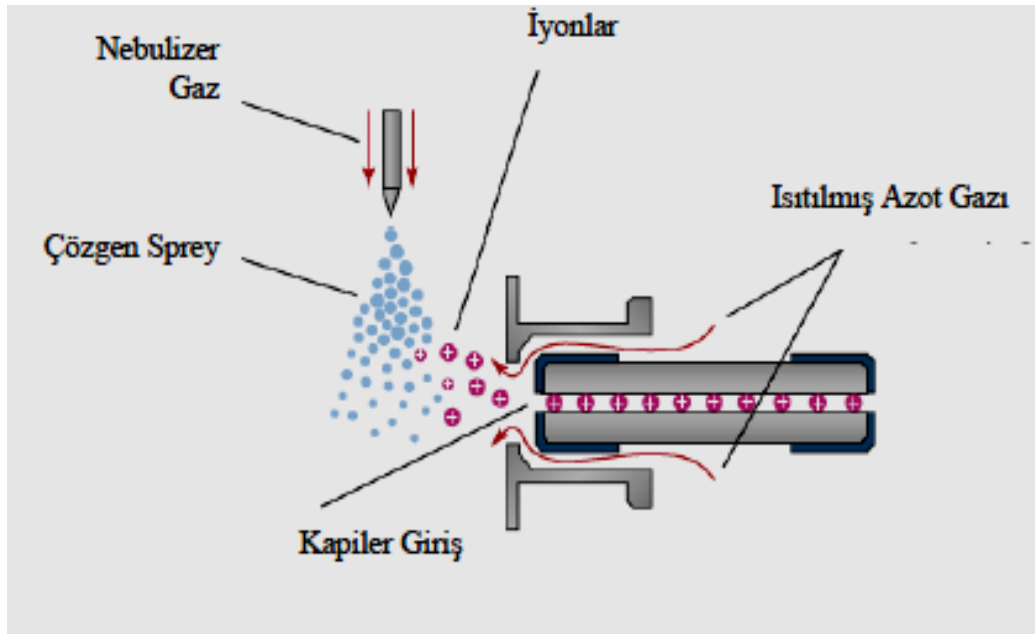


Şekil 2.10. LC-MS ve LC-MS/MS Sistemlerde İyonizasyon Kaynakları (Flanagan, R.J. ve ark., 2007).

İyonlaşması hedeflenen bir etken maddenin pKa değerinin ortam pH sı ile olan ilişkisi, o bileşiğin iyonlaşma derecesini belirleyen önemli bir faktördür. Ortam pH değerinin maddenin pKa değerinden ± 2 birim aralığında olduğu durumlarda, analizi yapılacak maddenin % 90'ından fazlasının iyonlaştığı söylenebilir (Skoog, D. A. ve ark., 1998; Anon., 2001;).

Bizim çalışmamızda elektrosprey iyonizasyon (ESI) kullanılmış olup, bu teknikte analit, likit kromatografiden gelen çözücü ile birlikte püskürtülmekte, bu esnada ısıtılmış kurutucu gaz ve güçlü bir elektrik alan uygulaması ile kütle dedektörüne girmeden önce iyonlaşmaktadır (Skoog, D. A. ve ark., 1998).

Atmosferik basınç iyonizasyon (API) tekniği, yumuşak bir iyonizasyon tekniği olarak tanımlanmakta olup, bu teknikte iyonizasyon sırasında ortamda genellikle moleküler iyon, protonlanmış molekül, basit bağlı iyonlar ve su gibi bazı yapıları kaybeden formlar oluşmaktadır (Anon., 2001). API' nin yapısı Şekil 2.16' da gösterilmektedir.



Şekil 2.16. Atmosferik Basınç İyonizasyonu (API) (Anon., 2001).

Yine kütle dedektörü olarak çok çeşitli sistemlerin likit kromatografi ile kombinasyonları mümkün olmaktadır. Bu sistemler kuadrupol, TOF (time-of-flight), iyon yakalama (IT, ion trap) ve FT (Fourier Transform) kütle analizörleridir. Kuadrupol analizör sistemler, kare kesit oluşturacak şekilde birbirine paralel dört manyetik çubuktan oluşmaktadır. Analiz sırasında iyonlaşan

moleküller, bu yapının orta boşluğuna doğru hareketlendirilirler (Şekil 2.16). Gerilim uygulanan çubukların oluşturduğu elektromanyetik alandan yararlanılarak hedeflenen iyonların sistemde ilerletilmesi, istenmeyen iyonların da ortamdan uzaklaştırılması bu yolla sağlanmaktadır (Anon., 2001).

2.14.1. Kromatografi de Kantitatif Analiz

Kromatografi de kantitatif analiz, analit pikinin yüksekliği veya alanının bir veya daha çok sayıda standart değerleriyle karşılaştırılması temeline dayanmaktadır. Şartlar uygun biçimde ayarlanırsa, bu parametrelerin ikisi de konsantrasyonla doğrusal olarak değişir (Shah, V.P. ve ark., 2000).

Pik Yüksekliğine Dayalı Analizler

Bir kromatografi pikinin yüksekliğini ölçmek için pikin iki yanındaki zemin çizgisi bir doğru ile birleştirilir ve bu doğrudan pikin yüksekliği düşey olarak belirlenir. Numune ve standart kromatogramlarının alındığı süre içinde pik genişliğini etkileyecek kolon şartları değişmez ise bu ölçüm yeterince tekrarlanabilir şekilde yapılabilir ve doğru sonuçlar alınabilir. İyi bir şekilde denetlenmesi gerekli şartlar, kolon sıcaklığı ve numune enjeksiyon hızıdır. Bunlara ek olarak, kolonu aşırı yüklemekten kaçınmak gerekir. Numune enjeksiyon hızının etkisi, kromatogramda erken gelen pikler için önemlidir. Şırınga ile yapılan enjeksiyonlarda %5 ile % 10' a varan bağıl hatalar sıkça görülebilmektedir (Shah, V.P. ve ark., 2000).

Pik Alanına Dayalı Analizler

Pik alanı, bir önceki paragrafta anlatılan değişkenlerle oluşan genişleme etkilerinden bağımsızdır. Bu bakımdan analitik parametre olarak pik alanının ölçümü pik yüksekliğinin ölçümünden daha uygundur. Öte yandan pik yüksekliğinin ölçülmesi daha kolay olup özellikle dar piklerde daha doğru olarak ölçülebilmektedir. Modern kromatografi cihazlarının çoğunda bağlı pik alanlarının tekrarlanabilir şekilde ölçülmesini sağlayan elektronik integratörler vardır. Bu tür bir olanak yoksa ölçüm elle yapılmalıdır. Simetrik piklerde oldukça başarılı olan bir metot pik yüksekliğinin yarı yükseklikteki pik genişliği ile çarpılmasıdır (Shah, V.P. ve ark., 2000).

Standartlarla Kalibrasyon

Kantitatif kromatografi analizlerinde en çok kullanılan metot, bilinmeyen bileşimine benzer bir dizi standart çözelti hazırlamaktır. Bundan sonra kromatogramlar alınır ve pik yükseklik veya alan değerleri konsantrasyona karşı grafiğe geçirilir. Böyle bir grafik sıfır noktasından geçen bir doğru şeklinde olmalıdır; analizler bu grafikte yapılır. En doğru sonuçların alınması için kalibrasyonun sık sık yapılması gereklidir. Kalibrasyon standartlarına dayalı analizlerde en önemli hata kaynağı, genellikle numune hacmindeki belirsizliktir, enjeksiyon hızı da bazen etken olabilmektedir. Numuneler genellikle küçük olup bu denli küçük bir hacmin mikro şırınga ile verilmesindeki tekrarlanabilirlik bağlı hatası yüzde birkaç düzeyindedir (Schmidt, G. ve ark., 2003).

İç Standart Metodu

Kantitatif kromatografide en iyi kesinlik, iç standartlar kullanılarak elde edilir. Çünkü, bu metot ile numune enjeksiyonu, akış hızı ve kolon şartlarındaki değişmelerle oluşan belirsizlikler en aza indirilir. Bu metotta standart ve numune çözeltilerinin her birisine dikkatle ölçülmüş miktarda bir iç standart katılır. Analit pik alan değerinin iç standart iç alanı değerine oranı analitik parametredir. Bu metodun başarılı olabilmesi için iç-standart piki numunedeki diğer bileşenlerin piklerinden belirgin şekilde ayrılmalı, ancak analit pikine de yakın olmalıdır (Skoog ve ark., 1999; Schmidt, G. ve ark., 2003).

Standart Sapma

Çok sayıda verinin kesinliğinin bir ölçüsü olan gerçek standart sapma hesaplanarak tespit edilir (Shah, V.P. ve ark., 2000).

2.14.2. LC-MS/MS ‘in Uygulama Alanları

LC-MS/MS ilaç ile ilgili olan çalışmalarda oldukça sık başvurulan bir yöntemdir. Bundan dolayı farmakokinetik ve biyoanaliz çalışmalarında yaygın bir kullanım alanı vardır. Bu çalışmalarda en kısa sürede ilacın kanda, idrarda ve organlarda tayinini yapmak çok önemlidir. MS/MS hassasiyetinin, analiz süresinin ve seçiciliğinin üst düzeyde olması nedeni ile diğer yöntemlere tercih edilmektedir (Atilla, A., 2006).

MS/MS kullanımındaki en büyük avantajlardan biri de dedektörün sadece belli bir iyonun ölçülmesine programlanabilmesidir. İşlem genelde bir seçim işlemidir fakat görüldüğünden daha komplekstir. MS/MS yöntemi ile analiz süresi bir dakika ve altına düşürülebilmektedir. Bu analiz süresi HPLC'nin ortalama 10 dakikalık analiz süresi ile karşılaştırıldığında oldukça hızlı görünmektedir. LC-MS/MS yöntemi yüksek çözünürlükteki kütle spektroskopilerinde çakışan moleküllerin analizinde dahi kullanılır (Atilla, A., 2006).

2.15. Validasyon (Geçerlilik Testi) da Kullanılan Parametreler

Geçerlilik testi (validasyon), ürünlerin değerlendirme prosesinde, kalitatif veya kantitatif analizlerde seçilen yöntem ya da yöntemlerin bu analiz işlemlerinde uygulanabilir olduğunu göstermek için yapılan testlerin tümüdür (Validation of Analytical Procedures, 1996).

Neden yapılır:

- Çeşitli alanlarda verilmesi gereken birçok karar, yapılan kimyasal ölçümlerin sonucuna dayanılarak verilebilmektedir (örneğin Adli Toksikoloji). Doğru karar verebilmek için analitik ölçüm sonucunun doğru-yeterli kesinlik ve hassasiyete sahip olmasının yanında güvenilir olması gerekmektedir.
- Bir yöntemle yapılan ölçümün sonuçları birçok faktöre bağlıdır (Laboratuvar koşulları, cihaz, kullanılan kimyasal madde, standart, operatör deneyimi). Bu nedenle yöntemin ölçüm sonucuna etki eden parametreleri tek tek ölçülerek ölçüm

sonucuna etkileri belirlenmeli ve ölçülmelidir (Validation of Analytical Procedures, 1996).

Ne zaman yapılır:

- Herhangi bir yöntem bir laboratuvarında ilk defa uygulanacağı zaman,
- Bir analiz için yeni yöntem geliştirildiği zaman,
- Kullanılmakta olan yöntemde değişiklik yapıldığı zaman,
- Valide edilmiş bir yöntem başka bir laboratuvarında kullanılacağı zaman, farklı bir kişi veya farklı bir cihaz kullanılacağı zaman,
- İki metodu karşılaştırmak için,
- Kalite kontrol testleri sonunda yöntemin performansında zamanla bir değişme olduğu anlaşıldığında (Validation of Analytical Procedures, 1996).

Nasıl yapılır:

- Geçerli kılma protokolü ve geçerli kılma için bir strateji oluşturulur.
- Yöntemin uygulama amacı, kapsamı belirlenir.
- Yöntemin performans parametreleri ve kriterleri belirlenir.
- Geçerli Kılma deneyleri tanımlanır.
- Kullanılacak cihazların performansının yöntem için yeterli olup olmadığı doğrulanır.
- Kullanılacak maddelerin (kimyasal, standartlar) kalitesi belirlenir (Validation of Analytical Procedures, 1996).

Seçilen analitik yöntemin geçerliliğini göstermek için kullanılan parametreler:

1. Seçicilik
2. Doğrusallık ve kalibrasyon eğrisi
3. Tayin Alt Sınırı (Limit of Quantification, LOQ)
4. Gözlenebilme (Teşhis) Alt Sınırı (Limit of Detection, LOD)
5. Doğruluk (Geri kazanım)

Farmasötik preparatlarda ve biyolojik ortamlarda etkin maddelerin miktarların belirlenmesinde uygulanan yöntemlerin geçerlilik testlerinin yapılmış olması gerekmektedir.

Seçicilik

Numunede bilinen parçalanma ürünlerinin varlığında bir analitin llebilme yeteneğidir (Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation, 2001).

Yöntemin analite özgü olup olmadığını gösterir. Seçicilik için tayin edilecek maddenin standart zltilerinin piklerinin elde edildiği kromatogramlar, etken madde hariç diğer maddelerin içinde zlmş halde bulunduğu matriks (kr idrar rneği) kromatogramı ile kıyaslanır. Maddenin pikinin geldiği alıkonma zamanında zcden kaynaklanan bir girişim olmadığı gözlenirse, optimize edilmiş cihaz parametrelerinde enstrümental yöntemin seçici olduğuna karar verilir. Eğer madde, biyolojik sıvılar, toprak, karaciğer vs. gibi bir matriksten ekstrakte edilecekse özütleme sonunda elde edilen madde kromatogramında, matriksin kendisinden ve özütleme işlemlerinde kullanılan kimyasallardan gelen

herhangi bir pik girişimi olmadığı da test edilmelidir. İçine bildiğimiz miktarda analit katılmış olan örneklerle aynı şekilde ztlenmiş kr matriks kromatogramı kıyaslanarak maddenin cihazdaki sinyaline herhangi bir girişim olup olmadığı anlaşılır. Bu şekilde de genel olarak yöntemin seçiciliği ortaya konmuş olur (Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation, 2001).

Doğrusallık ve Kalibrasyon Eğrisi

En düşük derişimden en yüksek derişime doğru bir seri çözelti hazırlanarak, yapılan analizler sonucunda elde edilen verilerden hareketle elde edilen eğrinin doğrusal olduğu aralığa yöntemin doğrusallığı denir. Bir analitik yöntemin doğrusallığı, belli bir derişim aralığında test sonuçlarının örneklerdeki analit derişimleriyle doğru orantılı olarak artmasıdır. Çalışılan rnek derişimleri ve doğruluk için test edilen örnekler, yöntemin doğrusal olduğu aralıkta olmalıdır. Eğer doğrusal aralıkta değillerse bu derişim aralığına denk gelecek şekilde seyreltilmelidir. Doğrusal derişim aralığı, bir dizi artan derişimde standart çözelti içeren örnekler hazırlanıp analiz edilerek derişime karşı sinyal grafiği (kalibrasyon grafiği) izildikten sonra belirlenebilmektedir. Doğrunun denklemi $y = ax + b$ ve regresyon katsayısı R^2 belirlenir. Bir kalibrasyon grafiğinin doğrusal olduğunun göstergesi R^2 değerinin ± 1 'e yakın olmasıdır (Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation, 2001).

Yöntemin doğrusal olduğu aralık belirlendikten sonra çözeltinin derişimine karşı elde edilen cevaplar grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi türetilir. Ağırlıklı ve ağırlıksız en küçük kareler yöntemi uygulanarak kalibrasyon eğrisinin regresyon

analizi yapılarak standart eğrinin doğru denklemi ve regresyon katsayısı elde edilir. Kalibrasyon doğrusunun eğimi, doğrusallığın matematiksel bir ölçüsüdür (Validation of Analytical Procedures, 1996; Yıldız, A. ve ark., 1997).

Tayin Alt sınırı (Limit of Quantification, LOQ)

Belirlenen deney koşulları altında, analitik yöntemin tayin alt sınırı değeri numune içindeki analitin uygun doğruluk ve kesinlik ile tayin edilebildiği en düşük derişimdir. Çeşitli yöntemlerle tayin edilebilmektedir. Eurochem' e göre LOQ tayini için kalibrasyon grafiğinden elde edilen %RSD değerleri, denk gelen derişime karşı grafiğe geçirilir ve %15 RSD (düşük tekrarlanabilirliği olan yöntemlerde %20) değerinde tekrarlanabilirliğe sahip olan konsantrasyon LOQ olarak alınır. Bir derişim düzeyinde doğru bir sonuç elde edilmek isteniyorsa, bu derişimde yöntem tekrarlanabilir sonuçlar vermelidir. Aksi takdirde bu derişimin sinyali ancak analitin örneğin içinde var olup olmadığına dair bir bilgi edinmek için kullanılabilir (Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation, 2001).

Gözlenebilme (Teşhis) Alt Sınırı (Limit of Dedection, LOD)

Bir analitik işlemin LOD sınırı, bir örnekteki incelenen bileşiğin belirlenebilen en düşük miktarıdır ancak burada belirlenen derişim kantitatif tayin için tam olarak kesinlik ifade eden bir değer olmayıp sadece bir sınır değeridir. (Validation of Analytical Procedures, 1996; Yıldız, A. ve ark., 1997). Analiti çok düşük düzeyde içeren, aynı derişimdeki en az 6 ($n \geq 6$) farklı katım örneği analiz edilir ve standart

sapmaları hesaplanır ($LOD = t \cdot s / e_{\text{ğim}}$; $t=3,3$ ve $s=\text{standart sapma}$) (Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation, 2001).

Doğruluk (Geri Kazanım)

Doğruluk diğer bir ifade ile gerikazanım, bir analitik yöntemde elde edilen sonuçların gerçek değere yakınlığı olarak ifade edilir. Yöntemin doğruluğunun bulunması için yöntemin geri kazanımı test edilir. Belli derişimlerde hazırlanmış olan özütleme öncesi ve özütleme sonrası analit standardı katımı yapılmış olan matrikslerden, geliştirilen metod uygulanarak analiz gerçekleştirilir. Çoğunlukla analit matriksle etkileştiğinden, yöntemin geri kazanımı, özütleme sonrası katım yapılmış örneklerin özütlerinin sinyali %100 kabul edilir. Özütleme öncesi katım yapılmış örneklerden elde edilen sinyal, özütleme sonrası katım yapılmış örneklerin sinyaline oranlanır ve 100 ile çarpılarak verim tespit edilir. Buradaki geri kazanım, özütleme prosedürünün doğruluğunu gösterir (Özütlemeyen önce kattığımız analitin ne kadarını, özütleyebildiğimizi gösterir). Bu da bağıl veya mutlak hata ile ifade edilir (Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation, 2001; Yıldız, A. ve ark., 1997).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan Gereçler

Çalışma boyunca kullanılan tüm gereçler, bunların marka ve modelleri Tablo 3.1’de verildiği gibidir.

Tablo 3.1. Çalışmada Kullanılan Gereçlerin Adları, Marka ve Modelleri.

Kullanılan gereç	Marka-Model
Otomatik pipet 2.5- 20 µL 10- 100 µL 100- 1000 µL 1000-5000 µL 1000-10000 µL	Eppendorf (Tüm pipetlerin kalibrasyonları İstanbul Üniversitesi’ne bağlı Biyomedikal Mühendislik Birimi’nde gerçekleştirilmiştir.)
Buzdolabı (+4°C)	Sharp (Deodorizer-kalibre edilmiştir.)
Derin dondurucu (-20°C)	Arçelik (kalibre edilmiştir)
Derin dondurucu (-86°C)	Hettich
Analitik terazi	Precisa XB 220 A

Tablo 3.1.' in devamı	
Ultra saf su cihazı	Millipore Direct Q3
Santrifüj	Hettich
pH metre	Thermo Orion 3 Star
Vorteks karıştırıcı	Heidolph
Manyetik karıştırıcı	IKA RH Basic KT/C
Etüv	Termal Laboratuvar Malzemeleri
Azot altında örnek zenginleştirme düzeneği	Techne Dri-Block DB-3D
Koruyucu ön kolon	Security Guard Cartridge (C18 4x2.0 mm ID)
Kromatografik kolon	Agilent, Poroshell 120, EC-C18, 2.7 µm, 30x100mm, Analitik Ters Faz
LC-MS/MS (Pompa, degazer, kolon fırını, termostatlı otomatik örnekleyici, ardışık kütle spektrometresi, bilgisayar)	Zivak Tandem Gold (Deneyler öncesinde kalibrasyonu gerçekleştirilmiştir.)

3.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin adları, marka ve özellikleri Tablo 3.2’de belirtildiği gibidir.

Tablo 3.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler.

Malzemenin Adı	Markası	Özelliği
Metanol	Merck	HPLC Grade
Etil Asetat	Merck	HPLC Grade
n-Hekzan	Merck	extra pure
Asetonitril	Merck	HPLC Grade
Formik Asit	Merck	HPLC Grade
Potasyum Karbonat	Sigma	Analitik Saflıkta
Fentanil	Lipomed	%99.9 analitik saflıkta (standart)
Norfentanil	Lipomed	%99.9 analitik saflıkta (standart)
Papaverin (Papaverin HCL)	İ.Ü. Eczacılık Fak.	%99.9 analitik saflıkta (standart)

Kullanılmış olan kimyasalların tamamı analitik saflıktadır. Sulu çözeltiler bidistile su kullanılarak hazırlandı.

3.3. İdrar Örneklerinin Toplanması ve Bireylere Ait Özellikler

Helsinki Bildirgesi'ne ve Etik Kurallara uygunluğu, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından 10 Mart 2011 tarihli ve 2011-388 sayılı yazı ile onaylanan (Ek 1) bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Ağrı Bilim Dalı ile yapılan işbirliği çerçevesinde yürütülerek kromatografik ve spektrometrik analiz basamakları Adli Tıp Enstitüsü Toksikoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Bu çalışmada İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Ağrı Bilim Dalı'nda fentanil etken maddeli ilaçlar ile tedavi görmekte olan ve "Bilgilendirilmiş Onam Formu"nu (Ek 2) okuyup imzalayarak çalışmaya katılmayı kabul eden 3 hastanın idrar numuneleri toplandı. Numunelerin toplanması aşamasında çalışmaya katkı sağlaması bakımından hastalara ait bazı bilgiler "Hasta Bilgi Formu" ile kayıt altına alındı (Ek 3). Kontrol grubu olarak ise; aralarında akrabalık ilişkisi olmayan, herhangi bir ilaç kullanmayan ve "Bilgilendirilmiş Onam Formu"nu (Ek 2) okuyup imzalayarak çalışmaya katılmayı kabul eden 5 sağlıklı bireyden idrar numuneleri toplandı. Toplanan idrar numuneleri steril, plastik idrar kaplarına alındı. İdrar örnekleri analiz edilinceye kadar uygun koşullarda muhafaza edildi.

Çalışmada yer almayı kabul etmiş 3 hastanın tamamı kanser nedeni ile ve yatarak fentanil bantları ile tedavi görmektedirler. Fentanil etken maddeli ilaçları kullanan hastaların, günlük olarak aldıkları doz miktarları Tablo 3.3' de liste halinde verilmektedir.

Tablo 3.3. Çalışmaya Dahil Edilen Hastaların Kullandıkları Fentanil Etken Maddeli İlaçların Günlük Dozları.

Hasta Kodu	Kullanılan Fentanil Miktarı (µg/saat)
1	100
2	100
3	50

Çalışmada, geliştirilen uygun özütleme ve analiz yöntemi kullanılarak hastaların idrarlarındaki etken madde ve/veya metabolit konsantrasyonları belirlendi. Çalışmanın tüm detayları diğer bölümlerde açıklanmaktadır.

3.4. Çalışmanın Kromatografik Ve Spektrometrik İşlem Basamakları

Kullanılan laboratuvar malzemelerinden kaynaklanabilecek kimyasal kirlenmeleri ve analit kayıplarını önlemek amacıyla her analiz öncesinde temizleme işlemi yapıldı. Örneklerin aktarıldığı plastik ve cam tüpler ile çalışmada kullanılan diğer tüm malzemeler, önce deterjanla yıkanıp sonra bol çeşme suyu ile durulandı. Daha sonra bidistile su ile yıkandı. Bu şekilde ön temizliği yapılan kaplar 3-5 defa metanolden geçirilip bir gece boyunca 60 °C’ de bekletilerek kurutuldu.

3.4.1. Çalışmada Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

3.4.1.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Standart Çözeltiler

Fentanil, norfentanil maddelerine ve papaverin iç standart maddesine ait çözeltiler aşağıda belirtildiği şekilde hazırlandı. +4 °C de muhafaza edildi ve kullanımlarından önce oda sıcaklığına getirildi. Tüm stok ve test çözeltileri kullanımdan önce taze olarak hazırlandı.

- **1,00 mg/mL Fentanil Ana Stok Çözeltisinin Hazırlanması**

Analitik saflıktaki fentanil standardından hassas terazide 10,00 mg tartıldı ve 10,00 mL hacimli sertifikalı balon jojeye dikkatli bir şekilde aktarıldı. Metanolde çözülerek hacmine tamamlandı. Bu stok çözelti çalışma boyunca +4°C’de muhafaza edildi.

- **1,00 mg/mL Norfentanil Ana Stok Çözeltisinin Hazırlanması**

Analitik saflıktaki norfentanil standardından hassas terazide 10,00 mg tartıldı ve 10,00 mL hacimli sertifikalı balon jojeye dikkatli bir şekilde aktarıldı. Metanolde çözülerek hacmine tamamlandı. Bu stok çözelti çalışma boyunca +4°C’de muhafaza edildi.

- **1,00 mg/mL Papaverin Ana Stok Çözeltisinin Hazırlanması**

Analitik saflıktaki papaverin standardından hassas terazide 10,00 mg tartıldı ve 10,00 mL hacimli sertifikalı balon jojeye dikkatli bir şekilde aktarıldı. Metanolde çözülerek hacmine tamamlandı. Bu stok çözelti çalışma boyunca +4°C’de

muhafaza edildi.

- **50000,00 ng/mL’ lik Bir Arada Fentanil-Norfentanil Ara Stok Çözeltisinin Hazırlanması**

1,00 mg/mL konsantrasyonlu fentanil ve norfentanil ana stok çözeltilerinden 500,00’ er μ L alındı, 10,00 mL hacimli sertifikalı balon jojeye dikkatli bir şekilde aktarıldı. Metanolde çözülerek hacmine tamamlandı. Bu stok çözelti çalışma boyunca +4°C’de muhafaza edildi.

- **12500,00 ng/mL’ lik Bir Arada Fentanil-Norfentanil Ara Stok Çözeltisinin Hazırlanması**

1,00 mg/mL konsantrasyonlu fentanil ve norfentanil ana stok çözeltilerinden 125,00’ er μ L alındı, 10,00 mL hacimli sertifikalı balon jojeye dikkatli bir şekilde aktarıldı. Metanolde çözülerek hacmine tamamlandı. Bu stok çözelti çalışma boyunca +4°C’de muhafaza edildi.

- **5000,00 ng/mL’ lik Bir Arada Fentanil-Norfentanil Ara Stok Çözeltisinin Hazırlanması**

1,00 mg/mL konsantrasyonlu fentanil ve norfentanil ana stok çözeltilerinden 50,00’ şer μ L alındı, 10,00 mL hacimli sertifikalı balon jojeye dikkatli bir şekilde aktarıldı. Metanolde çözülerek hacmine tamamlandı. Bu stok çözelti çalışma boyunca +4°C’de muhafaza edildi.

- **500,00 ng/mL’ lik Bir Arada Fentanil-Norfentanil Ara Stok Çözeltisinin Hazırlanması**

5000,00 ng/mL konsantrasyonlu fentanil ve norfentanil ana stok çözeltilerinden 1,00 mL alındı, 10,00 mL hacimli sertifikalı balon jojeye dikkatli bir şekilde aktarıldı. Metanolde çözülerek hacmine tamamlandı. Bu stok çözelti çalışma

boyunca +4°C’de muhafaza edildi.

- **50,00 ng/mL’ lik Bir Arada Fentanil-Norfentanil Ara Stok Çözeltisinin Hazırlanması**

5000,00 ng/mL konsantrasyonlu ara stok çözeltiden 100,00 µL alındı, 10,00 mL hacimli sertifikalı balon jojeye dikkatli bir şekilde aktarıldı. Metanolde çözülerek hacmine tamamlandı. Bu ara stok çözelti çalışma boyunca +4°C’de muhafaza edildi.

- **25,00 ng/mL’ lik Bir Arada Fentanil-Norfentanil Ara Stok Çözeltisinin Hazırlanması**

5000,00 ng/mL konsantrasyonlu ara stok çözeltiden 50,00 µL alındı, 10,00 mL hacimli sertifikalı balon jojeye dikkatli bir şekilde aktarıldı. Metanolde çözülerek hacmine tamamlandı. Bu ara stok çözelti çalışma boyunca +4°C’de muhafaza edildi.

- **200,00 µg/mL Papaverin Ara Stok Çözeltisinin Hazırlanması**

1,00 mg/mL konsantrasyonlu ana stok çözeltiden 2,00 mL alındı, 10,00 mL hacimli sertifikalı balon jojeye dikkatli bir şekilde aktarıldı. Metanolde çözülerek hacmine tamamlandı. Bu ara stok çözelti çalışma boyunca +4°C’de muhafaza edildi.

- **20,00 µg/mL Papaverin Ara Stok Çözeltisinin Hazırlanması**

200,00 µg/mL konsantrasyonlu ana stok çözeltiden 1,00 mL alındı, 10,00 mL hacimli sertifikalı balon jojeye dikkatli bir şekilde aktarıldı. Metanolde çözülerek hacmine tamamlandı. Bu ara stok çözelti çalışma boyunca +4°C’de muhafaza edildi.

Kalibrasyon Çözeltileri

- **1250,00 ng/mL' lik Bir Arada Fentanil-Norfentanil Standart Çözeltilisinin Hazırlanması**

5000,00 ng/mL konsantrasyonlu ara stok çözeltiden 2,50 mL alındı, 10,00 mL hacimli sertifikalı balon jojeye dikkatli bir şekilde aktarıldı. 20,00 µg/mL konsantrasyona sahip Papaverin iç standart çözeltisinden 20,00 µL ilave edildi. Metanolde çözülerek hacmine tamamlandı. Bu standart çözelti çalışma boyunca +4°C'de muhafaza edildi.

- **625,00 ng/mL' lik Bir Arada Fentanil-Norfentanil Standart Çözeltilisinin Hazırlanması**

5000,00 ng/mL konsantrasyonlu ara stok çözeltiden 1,25 mL alındı, 10,00 mL hacimli sertifikalı balon jojeye dikkatli bir şekilde aktarıldı. 20,00 µg/mL konsantrasyona sahip Papaverin iç standart çözeltisinden 20,00 µL ilave edildi. Metanolde çözülerek hacmine tamamlandı. Bu standart çözelti çalışma boyunca +4°C'de muhafaza edildi.

- **125,00 ng/mL' lik Bir Arada Fentanil-Norfentanil Standart Çözeltilisinin Hazırlanması**

5000,00 ng/mL konsantrasyonlu ara stok çözeltiden 250,00 µL alındı, 10,00 mL hacimli sertifikalı balon jojeye dikkatli bir şekilde aktarıldı. 20,00 µg/mL konsantrasyona sahip Papaverin iç standart çözeltisinden 20,00 µL ilave edildi. Metanolde çözülerek hacmine tamamlandı. Bu standart çözelti çalışma boyunca +4°C'de muhafaza edildi.

- **12,50 ng/mL’ lik Bir Arada Fentanil-Norfentanil Standart Çözeltisinin Hazırlanması**

5000,00 ng/mL konsantrasyonlu ara stok çözeltiden 25,00 µL alındı, 10,00 mL hacimli sertifikalı balon jojeye dikkatli bir şekilde aktarıldı. 20,00 µg/mL konsantrasyona sahip Papaverin iç standart çözeltisinden 20,00 µL ilave edildi. Metanolde çözülerek hacmine tamamlandı. Bu standart çözelti çalışma boyunca +4°C’de muhafaza edildi.

- **1,00 ng/mL’ lik Bir Arada Fentanil-Norfentanil Standart Çözeltisinin Hazırlanması**

50,00 ng/mL konsantrasyonlu ara stok çözeltiden 200,00 µL alındı, 10,00 mL hacimli sertifikalı balon jojeye dikkatli bir şekilde aktarıldı. 20,00 µg/mL konsantrasyona sahip Papaverin iç standart çözeltisinden 20,00 µL ilave edildi. Metanolde çözülerek hacmine tamamlandı. Bu standart çözelti çalışma boyunca +4°C’de muhafaza edildi.

3.4.1.2. Çalışma İçin Gerekli Diğer Çözeltilerin Hazırlanması

- **Potasyum Karbonatın (K_2CO_3) Hazırlanması (0,363 M)**

13,60 g Potasyum Karbonat tartılarak 100,00 mL saf suda çözüldü. 0,363 M’ lık çözelti manyetik karıştırıcı eşliğinde iyice karıştırıldı. Ultrasonik su banyosunda 10 dakika boyunca degaze edildi. Çözelti çalışma boyunca oda sıcaklığında muhafaza edildi.

- **n- Hekzan: Etilasetat Karışımının Hazırlanması**

n-Hekzan: Etil asetat (7:3, v/v oranlarında) çözeltisi 500,00 mL'lik sertifikalı balon jodede hazırlanarak ultrasonik su banyosunda 10 dakika boyunca degaze edildi. Çalışmaya hazır hale getirilen örneklere bu çözeltinin katım aşamasında, çözeltinin homojenizasyonun sağlanması amacıyla kolay karıştırılabilmesi için ağzı kapaklı, dereceli cam şişeye aktarıldı.

- **LC-MS/MS İçin Gerekli Mobil Fazların Hazırlanması**

- *Mobil Faz A: %0,01 M Formik Asit (pH=2,6)*

2000,00 mL'lik erlen mayerde 1000,00 mL ultra saf su içine 2,00 mL derişik formik asit eklendi. Manyetik karıştırıcı eşliğinde karıştırıldı ve pH metre ile pH kontrolü yapıldı (pH=2.6). Çözelti 2000,00 mL'lik sertifikalı balon jodeye aktarıldı ve üzeri hacme tamamlandı. Daha sonra mobil faz şişesine alınan çözelti ultrasonik su banyosunda 10 dakika boyunca degaze edilerek çalışmaya hazır hale getirildi.

- *Mobil Faz B: Asetonitril*

Kromatografik saflıktaki asetonitril mobil faz şişesine konuldu. 10 dak boyunca ultrasonik su banyosunda degaze edilerek çalışmaya hazır hale getirildi.

- **İğne yıkama çözeltisi**

Metanol: Distile Su (95:5; v/v) çözeltisi 1000,00 mL'lik sertifikalı balon jodede hazırlandı. İğne yıkama şişesine aktarılan çözelti ultrasonik su banyosunda 10 dakika boyunca degaze edilerek çalışmaya hazır hale getirildi.

3.4.2. Sıvı Sıvı Özütleme

Çalışılan etken maddeler ile ilgili Coopman, V. ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmadan alınan sıvı sıvı özütleme yöntemi çerçevesinde geri kazanım verimine karıştırma zamanının etkisi, örnek hacminin etkisi, çözücü etkisi ve basamak sayısının etkisi vb. analitik değişkenlerle değişimi incelendi (Coopman, V. ve ark. 2007).

Karıştırma Zamanının Etkisi

Sıvı-sıvı özütleme de fentanilin geri kazanım verimleri üzerine karıştırma zamanının etkisi incelendi. Bunun için 3, 5 ve 7 dakika gibi değişik karıştırma zamanları özütleme işlemi sırasında ayrı ayrı ÖÖK (Özütleme Öncesi Katım) örneklerinde denendi. Geri kazanımın en fazla 7 dakikalık karıştırmanın yapıldığı örnekte olduğu gözlemlendi.

Örnek Hacminin Etkisi

Örnek hacmi, yüksek geri kazanım elde edebilmek ve düşük tayin limitlerine inebilmek için önemli bir değişkendir. Geliştirilen yöntemin biyolojik örneklerde uygulanması hedeflendiğinden ve etken maddenin idrar örneklerinde düşük derişimlerde olması nedeniyle farklı hacimlerde (1,00, 2,00 mL) ÖÖK

örneklerinde yapılan denemeler sonucunda optimum örnek hacminin 1, 00 mL olduğu saptandı.

Etken Maddenin Geri Kazanılmasında Çözücü Etkisi

Sıvı-sıvı özütleme yöntemi ile çalışılan etken maddenin geri kazanılmasında çözücü etkisini incelemek için değişik organik çözücülerle özütleme çalışması yapıldı. Optimum şartlar altında, yani; K_2CO_3 çözeltisi sayesinde pH = 11,50-12,00 ve 1,00 mL örnek hacmi, 7 dakika karıştırma zamanı ile değişik organik çözücülerin geri kazanmadaki etkisi karşılaştırıldı. Sonuç olarak 7,00 mL n-hekzan: etilasetat (7:3, v:v) organik çözücü karışımında kantitatif olarak geri kazanılabildiği saptandı.

Özütlemeye Basamak Sayısı

Etken maddenin geri kazanılmasında n-hekzan: etilasetat (7:3, v:v) organik çözücüsü ile toplamda 7,00 mL olacak şekilde 2 basamaklı özütleme yöntemi denendi. Ancak tek basamaklı ve iki basamaklı özütleme yöntemi arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi. Fazla zaman gerektirmemesi ve etken maddenin diğer koşullara geri kazanım verimliliğini düşürmemesi açısından tek basamaklı özütleme sistemi tercih edildi.

3.4.2.1. İdrar Örneklerinin Hazırlanması

- **Yöntemin ÖÖK İçin Takip Edilen Basamakları**

- Optimize edilen yöntem ile gerçekleştirilen geçerli kılma sürecinde; sağlıklı gönüllülerden alınan 1,00'er mL kör idrar örnekleri 15,00 mL' lik polipropilen yapıdaki vida kapaklı test tüpüne konuldu.
- Son konsantrasyonları 500,00, 5000,00, 12500,00, 50000,00 ng/mL olacak şekilde hazırlanan standart çözeltilerden önceden belirlenen miktarlarda kör idrar örneklerine katıldı. 20,00 µg/mL'lik papaverin iç standart çözeltisinden 20,00 µL ilave edildi. 40,00 µL' lik katım hacminin tamamlanması için gerek görülen konsantrasyonlara değişen oranlarda metanol eklendi. Tüm konsantrasyon gruplarının yanında 1'er adet kör idrar örneği çalışıldı.
- Katım sonrası her tüp 30 saniye vorteks ile karıştırıldı.
- Her tüpe (kör idrar örnekleri dahil) 1,00 mL 0,363 M K₂CO₃ ilave edilerek her tüp tekrar vorteks ile 30 saniye karıştırıldı.
- pH' ları kontrol edilen tüplere 7,00 mL n-Hekzan: Etilasetat çözeltisi ilave edildi.
- 7 dakika boyunca vortekslendi.
- 5000 rpm' de 5 dakika boyunca santrifüj edildi.
- Üst faz 15,00 mL'lik cam tüpe alındı.
- Cam tüp içindeki organik faz 35° C'de azot altında kuruluğa kadar uçuruldu.
- İçerikleri uçurulan tüplere 400,00'er µL metanol ilave edildi.
- Tüpler 1'er dakika vortekslendi ve 3 dakika ultrasonik su banyosunda bekletildi.

- Ultrasonik su banyosundan alınan tüpler 30' ar saniye vortekslenerek etiketlenen viallere aktarıldı.
- 10,00 µl LC-MS/MS sistemine enjeksiyon yapıldı.

- **Yöntemin ÖSK (Özütleme Sonrası Katım) İçin Takip Edilen Basamakları**

- Optimize edilen yöntem ile gerçekleştirilen geçerli kılma sürecinde; sağlıklı gönüllülerden alınan 1,00'er mL kör idrar örneklerine 15,00 mL' lik polipropilen yapıdaki vida kapaklı test tüpüne konuldu.
- Tüm konsantrasyon gruplarının yanında 1'er adet kör idrar örneği çalışıldı.
- Analitik hassasiyet bakımından ÖÖK örnekleri ile hacim farkı olmaması için 40,00 µL hacimde metanol eklendi.
- Her tüpe (blank dahil) 1,00 mL 0,363 M K₂CO₃ ilave edilerek her tüp tekrar vorteks ile 30 saniye karıştırıldı.
- pH' ları kontrol edilen tüplere 7,00 mL n-Heptan: Etilasetat çözeltisi ilave edildi.
- 7 dakika boyunca vortekslendi.
- 5000 rpm' de 5 dakika boyunca santrifüj edildi.
- Üst faz 15,00 mL'lik cam tüpe alındı.
- Cam tüp içindeki organik faz 35°C'de azot altında kuruluğa kadar uçuruldu.
- İçerikleri uçurulan tüplere 360,00'ar µL metanol ilave edildi.
- Son konsantrasyonları 500,00, 5000,00, 12500,00, 50000,00 ng/mL olacak şekilde hazırlanan standart çözeltilerden önceden belirlenen miktarlarda kör idrar örneklerine katıldı. 20,00 µg/mL'lik papaverin iç standart çözeltisinden

20,00 µL ilave edildi. 40,00 µL' lik katım hacminin tamamlanması için gerek görülen konsantrasyonlara değişen oranlarda metanol eklendi. Tüm konsantrasyon gruplarının yanında 1'er adet kör idrar örneği çalışıldı.

- Tüpler 1'er dakika vortekslendi ve 3 dakika ultrasonik su banyosunda bekletildi.
- Ultrasonik su banyosundan alınan tüpler 30' ar saniye vortekslenerek etiketlenen viallere aktarıldı.
- 10,00 µl LC-MS/MS sistemine enjeksiyon yapıldı.

- **Hasta ve Kontrol Grubu İdrar Örneklerinin Hazırlanması**

Bu çalışma kapsamında analiz edilecek idrar örnekleri 100,00 mL'lik plastik, ağzı kapaklı kaplara yerleştirildi. Toplanan örnekler -80 °C de muhafaza edildiler. -80 °C' de saklanan örnekler, özütleme işlemi öncesinde -20 °C, +4 °C, +25 °C' de olmak üzere kademeli bekletme-ısıtma işlemi ile oda sıcaklığına getirildiler. Oda sıcaklığına gelen örnekler aşağıda belirtildiği şekilde hazırlandılar.

- Optimize edilen yöntem ile gerçekleştirilen geçerli kılma sürecinde; fentanil etken maddeli ilaçlar ile tedavi gören hastalardan alınan 1,00'er mL idrar 15,00 mL' lik polipropilen yapıdaki vida kapaklı test tüpüne konuldu.
- Her tüpe 20,00 µg/mL konsantrasyona sahip papaverin çözeltisinden (IS) 20,00 µL ilave edildi ve 30 sn vorteks ile karıştırıldı.
- Her tüpe 1,00 mL 0,363 M K₂CO₃ ilave edilerek her tüp vorteks ile 30 saniye karıştırıldı.

- pH' ları kontrol edilen tüplere 7,00 mL n-Hekzan: Etilasetat çözeltisi ilave edildi.
- 7 dakika boyunca vortekslendi.
- 5000 rpm' de 5 dakika boyunca santrifüj edildi.
- Üst faz 15,00 mL'lik cam tüpe alındı.
- Cam tüp içindeki organik faz 35°C'de azot altında kuruluğa kadar uçuruldu.
- İçerikleri uçurulan tüplere 400,00' er µL metanol ilave edildi.
- Tüpler 1'er dakika vortekslendi ve 3 dakika ultrasonik su banyosunda bekletildi.
- Ultrasonik su banyosundan alınan tüpler 30' ar saniye vortekslenerek etiketlenen viallere aktarıldı.
- 10,00 µl LC-MS/MS sistemine enjeksiyon yapıldı.

3.4.2.2. Etken Maddeyi İçermeyen Kör İdrar Örneğine Katım Yapılarak Hazırlanmış Olan ÖÖK Kalibrasyon Örneklerinin Hazırlanması

- **Fentanil Katılmış İdrar (500,00 ng/mL)**

Plastik tüp içine konulan 1,00 mL etken maddeyi içermeyen kör idrar örneği üzerine, 50,00 µg/mL' lik ana stok çözeltisinden alınan 10,00 µL' lik hacim ve 20,00 µg/mL' lik iç standart ara stok çözeltisinden alınan 20,00 µL' lik hacim ilave edildi. 10,00 µL hacminde metanol ilavesi ile katım hacmi 40,00 µL' ye tamamlandı.

- **Fentanil Katılmış İdrar (250,00 ng/mL)**

Plastik tüp içine konulan 1,00 mL maddeyi içermeyen kör idrar örneği üzerine, 12500,00 $\mu\text{g/mL}$ lik ara stok çözeltisinden alınan 20,00 μL lik hacim ve 20,00 $\mu\text{g/mL}$ lik iç standart ara stok çözeltisinden alınan 20,00 μL lik hacim ilave edildi.

- **Fentanil Katılmış İdrar (50,00 ng/mL)**

Plastik tüp içine konulan 1,00 mL maddeyi içermeyen kör idrar örneği üzerine, 5,00 $\mu\text{g/mL}$ lik ara stok çözeltisinden alınan 10,00 μL lik hacim ve 20,00 $\mu\text{g/mL}$ lik iç standart ara stok çözeltisinden alınan 20,00 μL lik hacim ilave edildi. 10,00 μL hacminde metanol ilavesi ile katım hacmi 40,00 μL ye tamamlandı.

- **Fentanil Katılmış İdrar (10 ng/mL)**

Plastik tüp içine konulan 1,00 mL maddeyi içermeyen kör idrar örneği üzerine, 500,00 $\mu\text{g/mL}$ lik ara stok çözeltisinden alınan 20,00 μL lik hacim ve 20,00 $\mu\text{g/mL}$ lik iç standart ara stok çözeltisinden alınan 20,00 μL lik hacim ilave edildi.

- **Fentanil Katılmış İdrar (5 ng/mL)**

Plastik tüp içine konulan 1,00 mL maddeyi içermeyen kör idrar örneği üzerine, 500,00 $\mu\text{g/mL}$ lik ara stok çözeltisinden alınan 10,00 μL lik hacim ve 20,00 $\mu\text{g/mL}$ lik iç standart ara stok çözeltisinden alınan 20,00 μL lik hacim ilave edildi. 10,00 μL hacminde metanol ilavesi ile katım hacmi 40,00 μL ye tamamlandı. Her bir derişim düzeyinde ÖÖK ve ÖSK ile yapılmış örneklerden en

az 6'şar analiz sonucu elde edildi. ÖÖK ile gerçekleştirilen analize ilişkin fentanil için 4 noktalı, norfentanil için 3 noktalı kalibrasyon grafiği çizildi. Aynı derişim düzeyleri için ÖSK analizleri de yapıldı. ÖSK ve ÖÖK prosedürüne göre gerçekleştirilen analiz sonuçlarından geri kazanım değerleri hesaplandı.

3.5. Kromatografik ve Spektrometrik Analiz Koşulları

Cihazla ilgili ölçüm parametreleri, fentanil standart çözeltileri için tek tek optimize edildi. İnternal standart yöntemine göre çalışıldı. Ölçümler, manuel integrasyonla elde edilen pik alanları esas alınarak gerçekleştirildi.

- **LC-MS/MS Sistemi Parametreleri**

Yöntem için belirlenen kütle/yük oranları ile parçalanma sonrası oluşan iyonlar ile kolondan elüsyon zamanları, ana iyon, ikincil iyon (MS/MS) ve parçalanma enerjileri (CE) sırasıyla Tablo 3.4' de verildiği gibidir.

Tablo 3.4. Etken Madde ve İç Standart İçin Belirlenen MS/MS İyonları ve Enerjileri.

	Ana İyon Q1	İkincil İyon Q3	Kapiler Voltajı (V)	Çarpışma Enerjisi (V)	Veri Toplama Zamanı (saniye)
Fentanil	337,00 →	188,00	+90,000 V	20,000	0,150
Norfentanil	233,20 →	150,10	+60,000 V	13,000	0,150
Papaverin (IS)	340,10 →	202,00*	+92,000 V	22,500	0,150
	340,10 →	324,00	+92,000 V	26,000	0,150

*IS tayin edilirken kullanılan iyon.

Yöntem validasyonu aşamasında, hareketli faz seçimi için yürütülen çalışmalara öncelikle farklı izokratik hareketli faz sistemlerinin denenmesi ile başlandı. İzokratik sistemler, göreceli basit bileşimleri, kolay hazırlanabilir olmaları gibi kromatografik avantajlara sahip olmaları nedeniyle analiz işlemlerinde sıklıkla tercih edilmektedir. Bu düşünceden yola çıkılarak, metanol, asetonitril, su ve benzeri genel kullanıma ait ters faz çözücülerinden oluşan farklı bileşimlerde bir kaç hareketli faz denendi ve sonuçları değerlendirildi.

Çalışmalar sonucunda %0,1 M'lık formik asit içeren su karışımı (Mobil Faz A) ve analitik saflıkta asetonitril (Mobil Faz B) en uygun mobil fazlar olarak seçildi ve gradient çözücü programı uygulandı.

Fentanil, norfentanil ve papaverin maddeleri LC-MS/MS ile analiz edildi. Bu maddelerin analizinde iyon kaynağı olarak elektrospray iyonlaşma, iyon modu olarak pozitif mod ve kolon olarak Agilent, Poroshell 120, EC-C18, 2.7 µm, 30x100mm, Analitik Ters Faz kolonu ile 10,00 µL lik enjeksiyon hacminde 0,3 ml/dak akış hızı ile çalışıldı. Kütle spektrometresi analizleri TANDEM GOLD Triple Quadrupole LC-MS/MS sistemi (Zivak Teknoloji, Türkiye) kullanılarak gerçekleştirildi.

HPLC sistemi koşulları Tablo 3.5' de, maddelerin belirlenen MS/MS iyonları ve enerjilerine ait bilgiler Tablo 3.6' da verilmektedir. Fentanil, norfentanil ve papaverin maddelerinin iyon belirlenmeleri esnasında sisteme 500,00 ng/mL'lik ana stok çözeltilerden hazırlanan çözeltilerinden 10,00 µL verildi.

Tablo 3.5. Çalışmanın Kromatografik (HPLC) İle İlgili Parametreleri.

Analiz Parametresi	Koşul		
Yazılım	Varian MS Workstation System Control (Versiyon No: 6.9.1)		
Mobil Faz A	%0,1 Formik asit (pH=2.6)		
Mobil Faz B	Asetonitril		
Kolon Fırın Sıcaklığı	+60°C		
Otomatik Örnekleyici Sıcaklığı	+4°C		
Kromatografik Kolon	Agilent, Poroshell 120, EC-C18, 2.7 µm, 30x100mm, Analitik Ters Faz Kolon		
Koruyucu ön kolon	C18 4x2.0 mm		
Enjeksiyon hacmi	10 µL		
Analiz Süresi	5 dak		
Pompa programı:			
Süre (dak)	Mobil Faz A (%)	Mobil Faz B (%)	Akış hızı (mL/dak)
0:00	50	50	0,3
5:00	50	50	0,3

Tablo 3.6. Çalışmanın Spektrometrik (MS/MS) Parametreleri.

Analiz Parametresi	Koşul
İyon Kaynağı	Elektro Spray İyonlaştırma (ESI)
İyonlaştırma Türü	Pozitif
Dedektör voltajı	1500,00 Volt
Argon gazı (CID) basıncı	2.40 mTorr
ESI iğne voltajı (+)	5500,00 Volt
ESI shield (koruyucu kalkan) voltajı (+)	600,00 Volt
Kurutucu Gaz (Azot=API) Sıcaklığı	400,0 °C
Kurutucu Gaz (Azot) Basıncı	30,00 PSI
Nebulizer Gaz (Sisleştirici) basıncı	55,00 PSI
API gövde (housing) sıcaklığı	65,00 °C
SIM Genişliği	1,500 amu
Veri Toplama Zamanında Geciktirme Süresi	0,00 dakika
Tarama Aralığı	0,1 saniye
Gürültü ölçümü	Peak to peak
Kalibrasyon Tipi	İç Standart
Ölçüm Tipi	Pik Alanı
Entegrasyon aralığı	±0,250 dak.

3.6. Seçicilik Çalışmaları

Yöntemin seçiciliğinin belirlenmesi için, yöntemle $n \geq 6$ olacak şekilde etken maddeyi içermeyen fakat reaksiyon ortamındaki diğer bileşenleri (K_2CO_3 , n-Hekzan : Etilasetat vb.) içeren idrar ve metanol analiz edildi. Kromatogramlarda fentanil ve norfentanilin beklenen alıkonma zamanlarında çakışma olup olmadığı (sinyaller, pik izleri, iyon izleri vb.) incelendi. Ayrıca fentanil ve norfentanil etken maddelerine ait piklerin geldiği alıkonma zamanlarında çözücünden ve matriksten kaynaklanan bir girişim olup olmadığına bakıldı.

3.7. Kalibrasyon Eğrilerinin Hazırlanması

Belirlenen yöntem için kalibrasyon eğrileri diğer bölümlerde belirtilen konsantrasyonlara karşı pik alanlarının ortalamalarının grafiğe geçirilmesiyle elde edildi. Aynı şekilde her bir seviye için standart sapma değerleri de kalibrasyon eğrilerinde fark çizimleri ile gösterildi.

3.7.1. Standart Çözeltiler İle Kalibrasyon Eğrilerinin Hazırlanması

Fentanil ve norfentanil etken maddesinin derişime karşı sinyalinin doğrusal olarak arttığı derişim aralığını bulabilmek amacıyla hazırlanan 1,00, 12,50, 25,00, 125,00, 625,00, 1250,00, ng/mL' lik fentanil-norfentanil bir arada standart çözeltilerinden fentanil ve norfentanil için ayrı ayrı kalibrasyon eğrileri çizildi

3.7.2. Katım Örnekleri İle Kalibrasyon Eğrilerinin Hazırlanması

İdrar matriksine özütleme öncesi 500,00, 5000,00, 12500,00, 50000,00 ve ng/mL’ lik standart çözeltilerin katılması ile 5,00, 10,00, 50,00, 250,00 ve 500,00 ng/mL konsantrasyon içeren kör idrar örneklerinden fentanil ve norfentanil ayrı ayrı kalibrasyon eğrileri çizildi. Her bir derişim düzeyinde ÖÖK (özütleme öncesi katım) yapılmış örneklerden en az 6’şar analiz gerçekleştirildi.

3.8. Tayin Alt Sınırı (LOQ)’ nın Ve Gözlenebilme (Teşhis) Alt Sınırının Belirlenmesi

Bu tez çalışmasında tayin ve ölçüm limitlerinin hesaplanması için doğrusallık çalışmasında elde edilen verilerden yararlanıldı. LOQ değerleri Eurachem’e göre belirlendi (Eurachem, 1998). Özütleme öncesi katılmış örneklerde hesaplanan derişimlere karşılık gelen % RSD değerlerinin grafiğı çizildi. % 15,00 RSD değerine denk gelen derişim, LOQ değeri olarak kabul edildi.

Kalibrasyon eğrisinin eğimi ile alan oranlarının relatif standart sapmalarına dayanan formülden yararlanarak LOD hesaplandı (Weinmann, W., 2000).

$$\text{En Düşük Ölçüm Limiti (LOD)} = 3,3\sigma / S$$

(S: Regresyon doğrusunun eğimi; σ : Alan oranlarının standart sapması)

3.9. Geri Kazanım Çalışmaları

İdrar örnekleri için 5 ayrı konsantrasyonda her biri en az 6 tekrar olmak üzere geri kazanım çalışmaları yapıldı. Belirlenen konsantrasyonlar doğrusal aralığın en düşük, orta ve en yüksek konsantrasyonlarını temsil eden noktalar olmasına dikkat edilerek seçildi. Fentanil ve norfentanil için 5,00 10,00, 50,00, 250,00 ve 500,00 ng/mL' lik derişimlerde yapılan geri kazanım çalışmaları sonrasında % ortalama geri kazanım oranları hesaplandı.

Bu çalışmalar da kalibrasyon için hazırlanmış çözeltiler etken maddeyi içermeyen (kör) idrar örneklerine katılmak sureti ile yapıldı ve idrar örnekleri ÖÖK ve ÖSK prosedürüne göre özütlendi. İdrar için hazırlanan kalibrasyon eğrileri ile elde edilen geri kazanım bulguları aşağıdaki formül yardımı ile hesaplandı. Geri kazanım bulguları için kabul değerleri %80 ile %110 arasındadır. Bu aralığın dışındaki sonuçlar tekrar edildi.

$$\% \text{Geri Kazanım} = \frac{\text{Bulunan konsantrasyon}}{\text{Eklenen konsantrasyon}} \times 100$$

- *500,00 ng/mL için özütleme öncesi katım çalışması*

Plastik tüp içine konulan 1,00 mL etken maddeyi içermeyen idrar örneği üzerine, 50000,00 ng/mL'lik ana stoktan 10,00 µL ve 20,00 µg/mL' lik ara stoktan 20,00 µL papaverin (IS) hacmi ve 10,00 µL metanol hacmi eklendi ve katım hacmi

40,00 μL ' ye tamamlandı. Geri kalan özütleme prosedürüne 3.4.2.1.' te anlatıldığı şekilde devam edildi.

- *250,00 ng/mL için özütleme öncesi katım çalışması*

Plastik tüp içine konulan 1,00 mL etken maddeyi içermeyen idrar örneği üzerine, 12500,00 ng/mL'lik ara stoktan 20,00 μL ve 20,0 $\mu\text{g/mL}$ ' lik ara stoktan 20,00 μL papaverin (IS) hacmi eklendi. Geri kalan özütleme prosedürüne 3.4.2.1.' te anlatıldığı şekilde devam edildi.

- *50,00 ng/mL için özütleme öncesi katım çalışması*

Plastik tüp içine konulan 1,00 mL etken maddeyi içermeyen idrar örneği üzerine, 5000,00 ng/mL'lik ara stoktan 10,00 μL ve 20,0 $\mu\text{g/mL}$ ' lik ara stoktan 20,00 μL papaverin (IS) hacmi eklendi. Geri kalan özütleme prosedürüne 3.4.2.1.' te anlatıldığı şekilde devam edildi.

- *10,0 ng/mL için özütleme öncesi katım çalışması*

Plastik tüp içine konulan 1,00 mL etken maddeyi içermeyen idrar örneği üzerine, 50,00 ng/mL'lik ara stoktan 20,00 μL ve 20,00 $\mu\text{g/mL}$ ' lik ara stoktan 20,00 μL papaverin (IS) hacmi eklendi. Geri kalan özütleme prosedürüne 3.4.2.1.' te anlatıldığı şekilde devam edildi.

- *5,0 ng/mL için özütleme öncesi katım çalışması*

Plastik tüp içine konulan 1,00 mL etken maddeyi içermeyen idrar örneği üzerine, 50,00 ng/mL'lik ara stoktan 10,00 μL ve 20,00 $\mu\text{g/mL}$ ' lik ara stoktan 20,00 μL papaverin (IS) hacmi ve 10,00 μL metanol hacmi eklendi ve katım hacmi 40,00

μL ' ye tamamlandı. Geri kalan özütleme prosedürüne 3.4.2.1.' te anlatıldığı şekilde devam edildi.

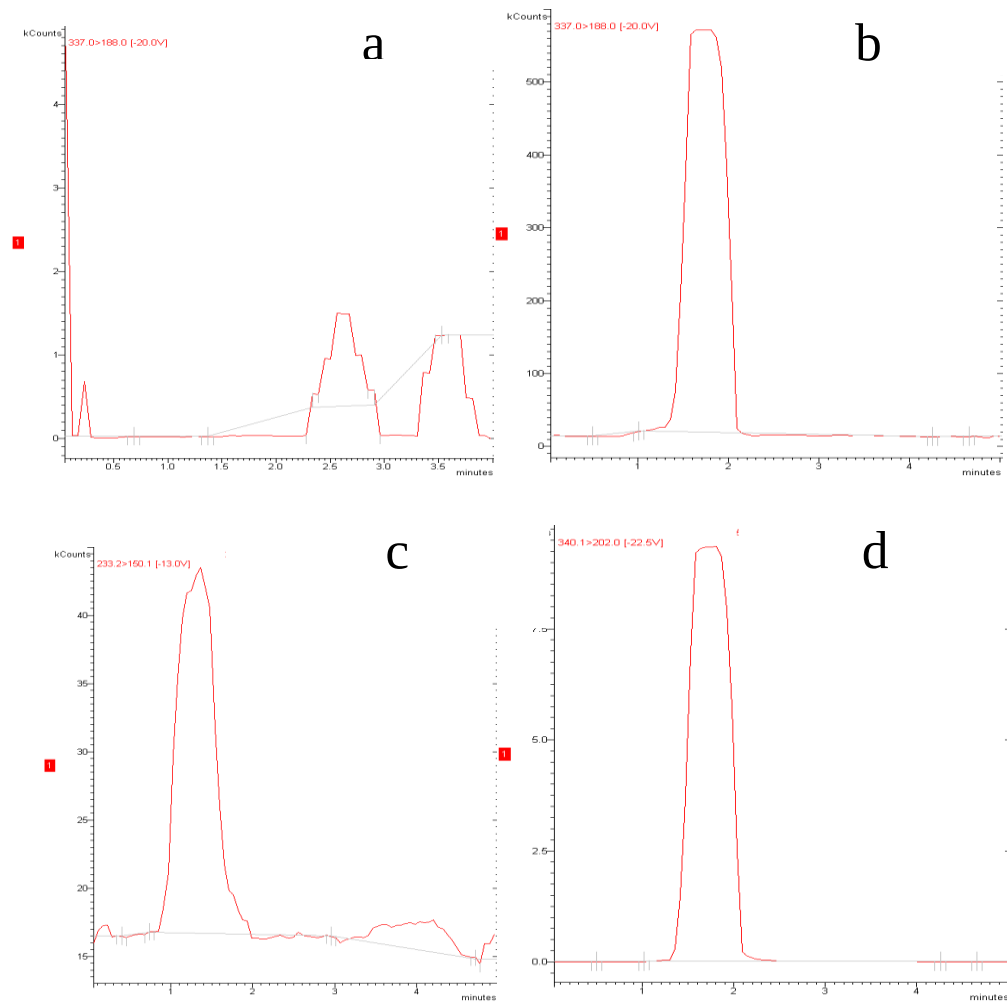
3.10. Çalışmanın Bilgi ve Bulgularının Değerlendirilmesi

Çalışmanın değerlendirilmesinde fentanil ve norfentanil etken maddelerinin LC-MS/MS ile miktar tayininde ve yöntemin analitik parametrelerinin değerlendirilmesinde ortalama, standart sapma, bağıl standart sapma gibi değerler Microsoft Office Excel 2010 programında yapıldı.

4. BULGULAR

4.1- Geçerli Kılma Parametrelerinin Uygulanması

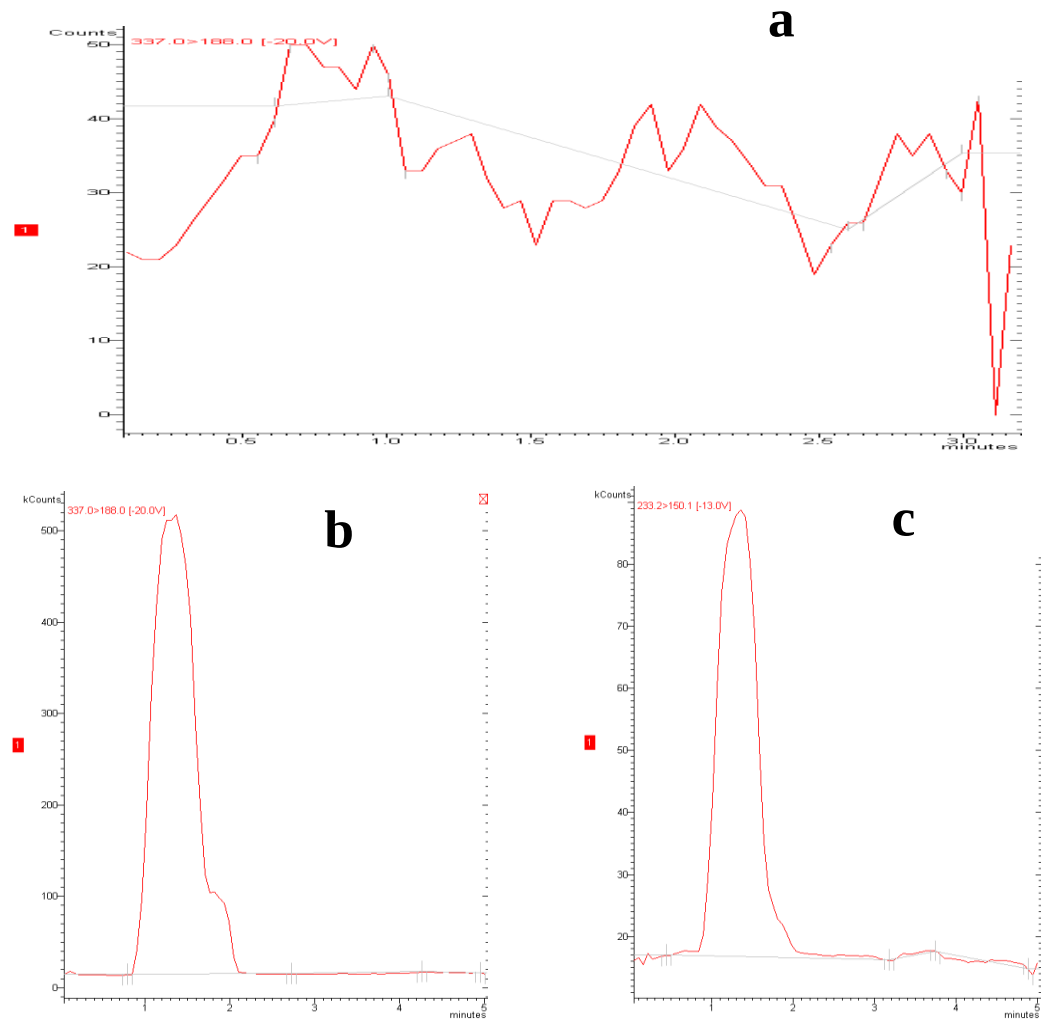
Cihazın MRM (multiply reaction monitoring) modu kullanılarak özütleme öncesi kör idrar matriksine katım yapılan fentanil, norfentanil maddeleri ve etken maddeyi içermeyen kör idrar örneğinin (sinyal, gürültü düzeyindedir) analizi sonucu elde edilen kromatogramlar Şekil 4.1' de görülmektedir.



Şekil 4.1. (a) Kör İdrar Örneği, (b) 12,5 ng/mL Konsantrasyondaki Fentanil ile (c) 25 ng/mL Konsantrasyondaki Norfentanil ve (d) 5 ng/mL Konsantrasyondaki Papaverinin (IS) LC-MS/MS Kromatogramları.

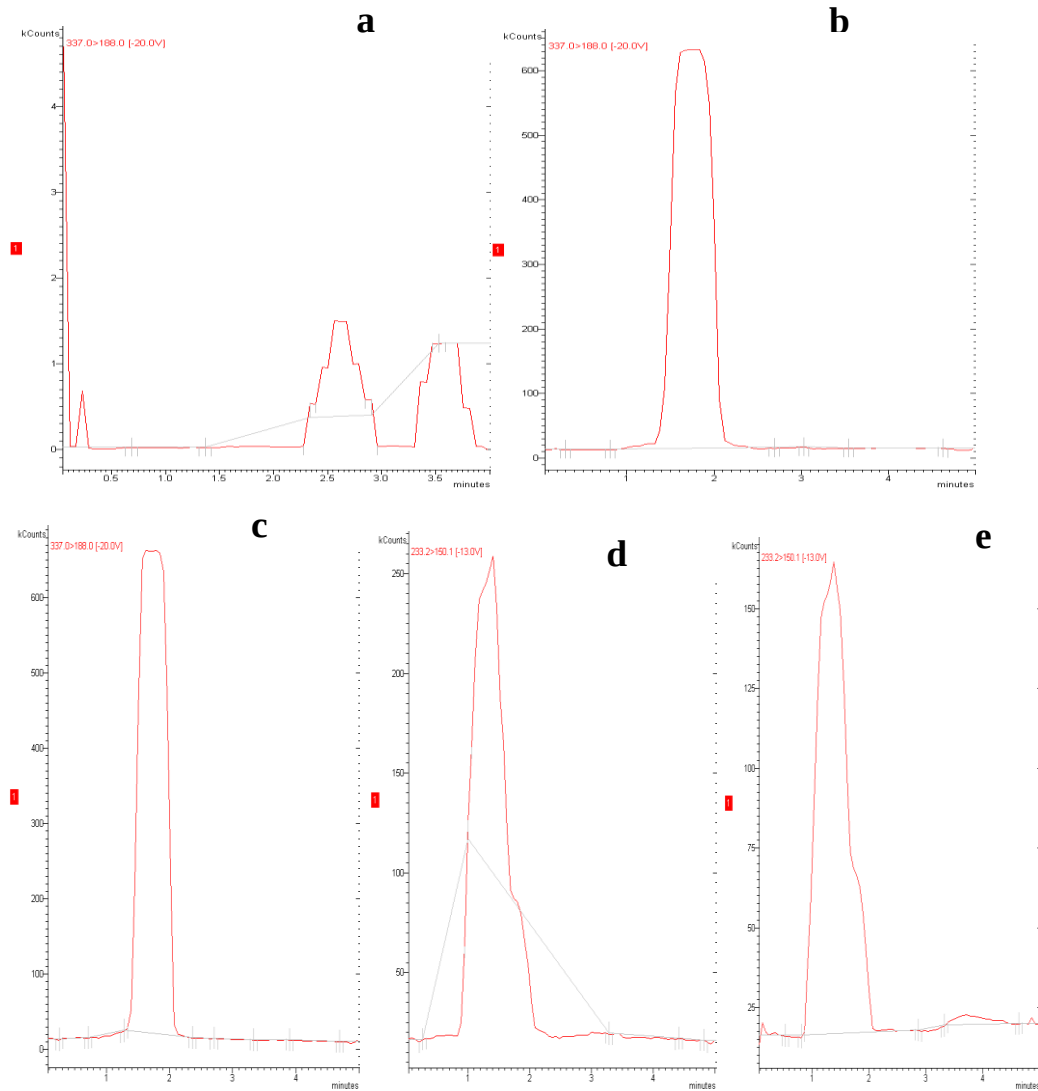
4.1.1- Yöntemin Metanolde ve İdrarda Seçiciliği

Standart çözeltilerde, LC/MS/MS yöntemin seçiciliğini gösteren boş metanol çözücüsünün kromatogramı ile, 25 ng/mL konsantrasyondaki fentanil ve 125 ng/mL konsantrasyondaki norfentanil standardını içeren metanol çözeltisinin LC-MS/MS kromatogramları Şekil 4.2' de görülmektedir.



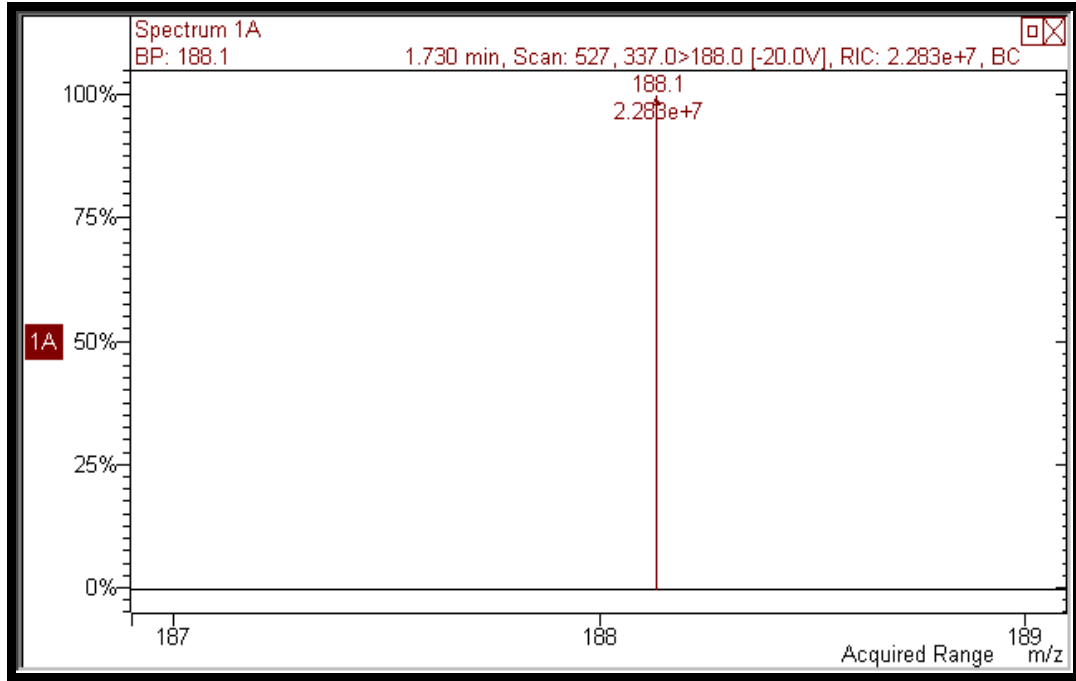
Şekil 4.2. (a) Boş Metanol Çözücüsü İle (b) 25 ng/mL Konsantrasyondaki Fentanil ve (c) 125 ng/mL Konsantrasyondaki Norfentanil Etken Maddelerini İçeren Metanolün LC-MS/MS Kromatogramları.

LC/MS/MS ile geliştirilen yöntemin seçiciliğini gösteren etken maddeleri içermeyen idrar özütüne ilişkin kromatogram ile ÖSK ve ÖÖK yapılarak elde edilmiş fentanile ve norfentanile ait özütlerin kromatogramlarının karşılaştırılması Şekil 4.3’ de görülmektedir (kör idrar örneği özütünün özellikle 1,00-2,00 dakika arasındaki kromatogramı gürültü seviyesindedir).

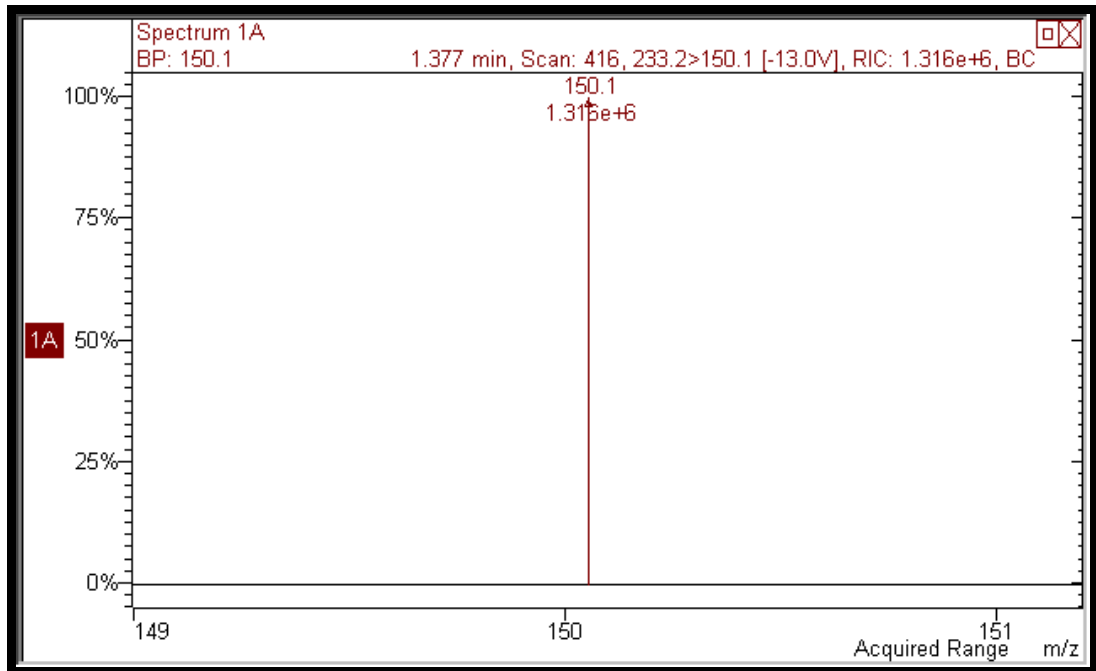


Şekil 4.3. (a) Etken Maddeleri İçermeyen İdrar Özütü İle, (b) Fentanil İçeren ÖSK Kör İdrar Örneği ve (c) ÖÖK İdrar Örneklerinin; (d) Norfentanil İçeren ÖSK ve (e) ÖÖK İdrar Örneklerinin LC-MS/MS Kromatogramları.

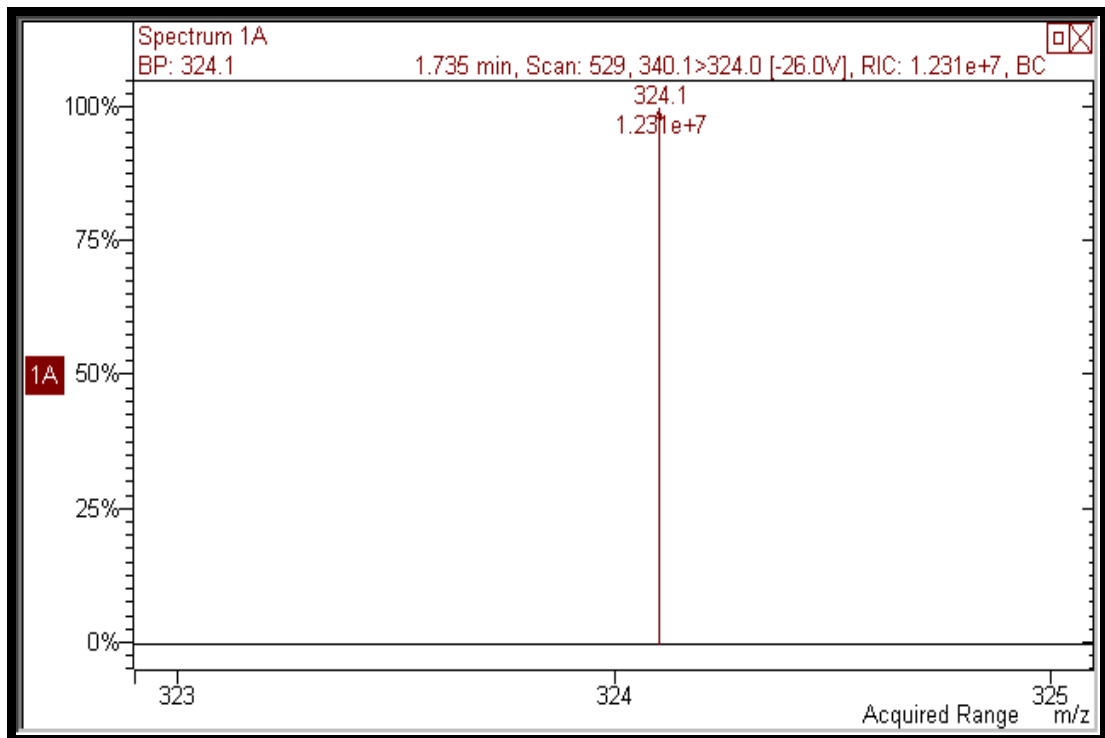
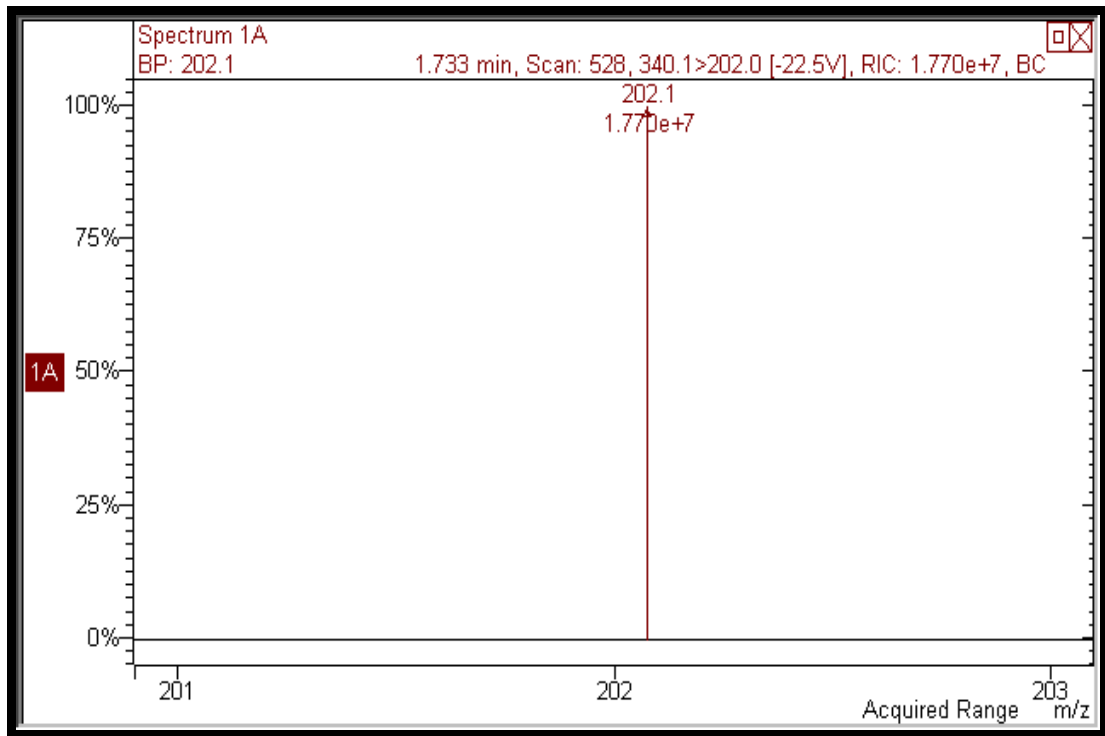
Fentanil, norfentanil ve papaverin etken maddelerinin MS/MS spektrumları şekil 4.4, Şekil 4.5 ve Şekil 4.6’ da gösterildiği gibidir.



Şekil 4.4. 500 ng/mL’ lik Fentanil Etken Maddesinin MS/MS Spektrumu.



Şekil 4.5. 500 ng/mL’lik Norfentanil Etken Maddesinin MS/MS Spektrumu.



Şekil 4.6. 500 ng/mL'lik Papaverin İç Standardının MS/MS Spektrumları.

Analizlerden elde edilerek hesaplanan etken maddelerin (Fentanil, Norfentanil) ve iç standardın (Papaverin) alıkonma zamanları, standart sapmaları aşağıdaki Tablo 4.1’ de verildiği gibidir.

Tablo 4.1. Çalışmada Yer Alan Maddelerin Alıkonma Zamanları (n=10).

Madde adı	Alıkonma zamanı (dak.)	Standart Sapma
Fentanil	1,730	$\pm 0,005$
Norfentanil	1,377	$\pm 0,006$
Papaverin (IS)	1,733	$\pm 0,003$

4.2. Kalibrasyon Eğrisi, Doğrusallık, LOD ve LOQ Değerleri

4.2.1. Standart Çözeltilerin Kalibrasyon Eğrisi, Doğrusallık ve LOD Ve LOQ Verileri

- Kalibrasyon Eğrisi ve Doğrusallık Verileri**

1,00-1250,00 ng/mL arasında artan konsantrasyonlardaki kalibrasyon çözeltilerinin idrar ortamındaki doğrusallık verileri aşağıdaki şekil ve tablo da verildiği gibidir. Her bir kalibrasyon noktasından elde edilen veriler değerlendirilerek Excel yazılımında hesaplamaları yapıldı. Fentanilin 1,00 ng/mL - 1250,00 ng/mL; norfentanilin 12,50 ng/mL – 1250,00 ng/mL konsantrasyon aralıklarında doğrusal

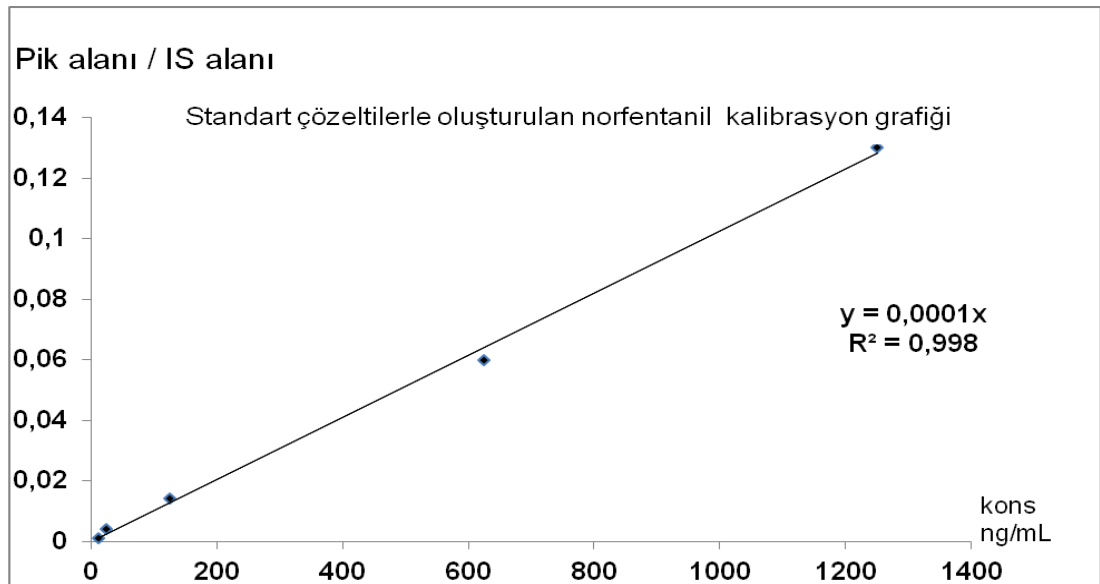
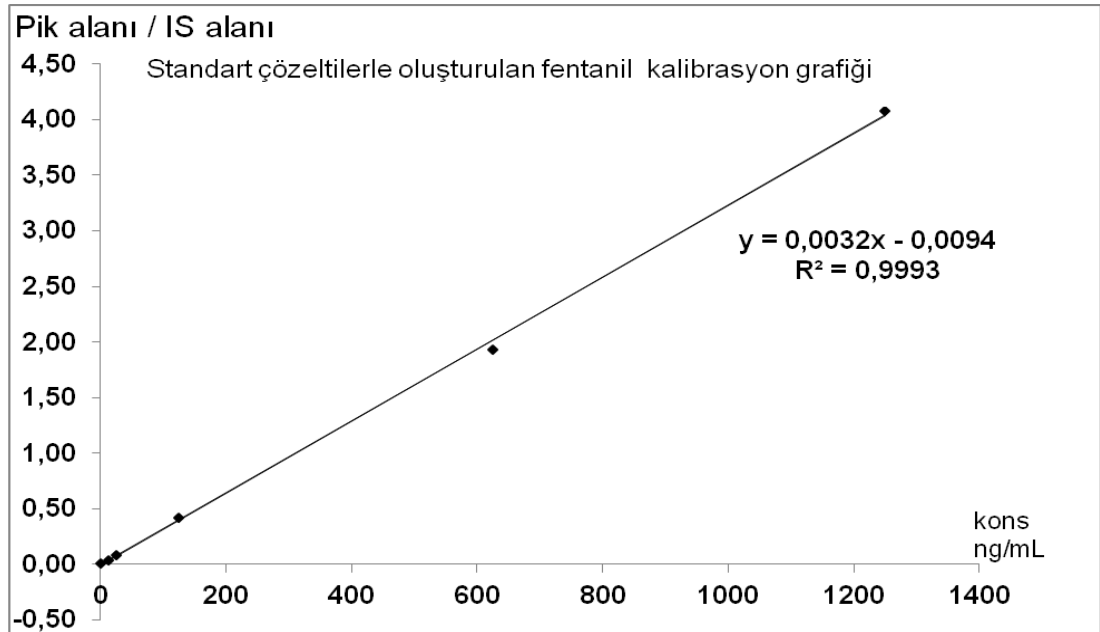
olduğu bulundu. 1,00, 12,50, 25,00, 125,00, 625,00 ve 1250,00 ng/ml metanol çözücüsündeki fentanil ve norfentanil etken maddesine ait standart çözeltiler kullanılarak, özütleme çalışmaları öncesinde çizilen kalibrasyon grafiğine ilişkin veriler Tablo 4.2’ de görüldüğü gibidir ($n \geq 6$) (Internal Standart Konsantrasyonu = IS = 400 ng/ml) .

Tablo 4.2. Standart Çözeltiler Kullanılarak, Özütleme Çalışmaları Öncesinde Çizilen Kalibrasyon Grafiklerine İlişkin Veriler.

FENTANİL DERİŞİM (ng/mL)	ORT (ALAN/IS ALANI)	%RSD
1,00	0,004	16,12
12,50	0,037	4,30
25,00	0,081	3,38
125,00	0,416	1,90
625,00	1,929	2,04
1250,00	4,082	0,78
NORFENTANİL DERİŞİM (ng/mL)	ORT (ALAN/IS ALANI)	%RSD
1,00	-	-
12,50	0,001	56,50648
25,00	0,004	14,6817
125,00	0,014	11,36147
625,00	0,060	5,069147
1250,00	0,130	5,260336

(-) Veri Elde Edilemeyen Konsantrasyon.

1,00, 12,50, 25,00, 125,00, 625,00 ve 1250,00 ng/mL metanol çözücüsündeki etken maddelere ait standart çözeltiler kullanılarak, özütleme çalışmaları öncesinde IS' ye göre çizilen kalibrasyon grafiğinin görünümü Şekil 4.7' de görülmektedir (IS derişimi = 400 ng/mL; 1,00 ng/mL derişimdeki norfentanil için veri alınamadı).



Şekil 4.7. Fentanil ve Norfentanil Standart Çözeltileri Kullanılarak, Özütleme Çalışmaları Öncesinde IS Yardımıyla Çizilen Kalibrasyon Grafikleri.

Metanol çözücüsündeki standart çözeltilerinin EXCEL’ de çizilen kalibrasyon eğrileri sonucu bulunan fentanile ait R^2 değeri 0,9993, norfentanile ait R^2 değeri 0,9980 olarak bulundu.

- **LOD ve LOQ Değerlerine Ait Veriler**

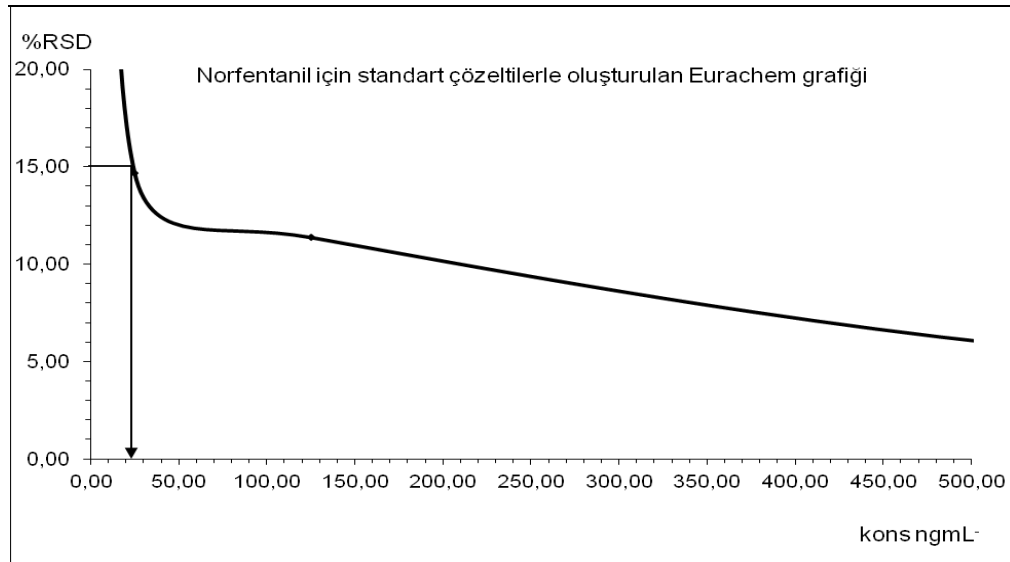
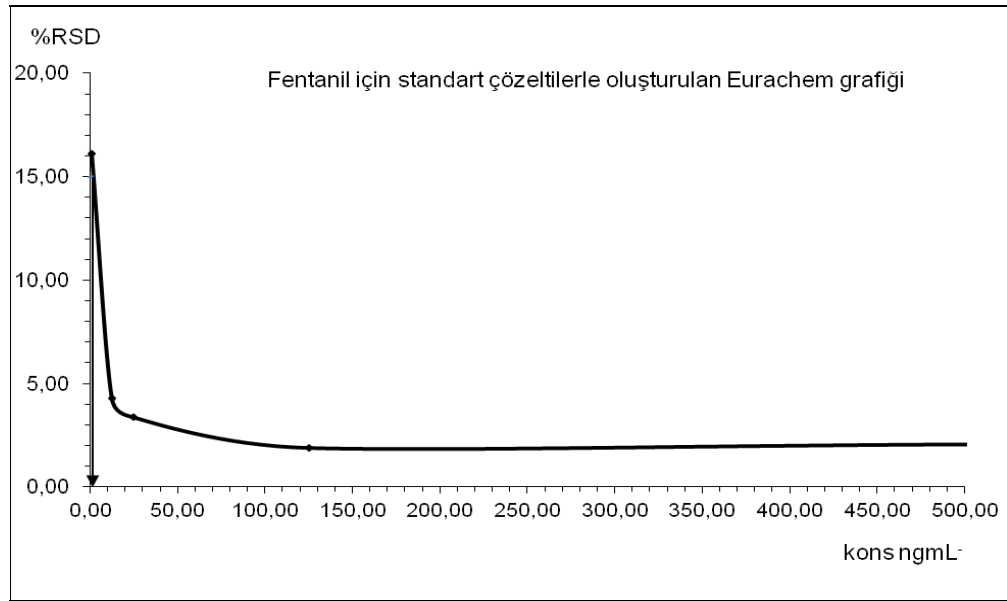
LOD ve LOQ hesaplamaları yapılırken doğrusal aralığın en düşük konsantrasyonuna ait standart sapması kullanıldı.

1,00, 12,50, 25,00, 125,00, 625,00 ve 1250,00 ng/ml metanol çözücüsündeki etken maddelerine ait standart çözeltiler kullanılarak, Eurachem tarafından tavsiye edilen yöntemle LOQ değerinin bulunması için tayin edilen fentanil ve norfentanil derişimlerine karşı bulunan %RSD değerleri Tablo 4.3’de gösterildiği gibidir.

Tablo 4.3. Standart Çözeltilere Ait %RSD Değerleri ($n \geq 6$).

FENTANİL KONSANTRASYONU (ng/mL)	%RSD
1,00	16,12
12,50	4,30
25,00	3,38
125,00	1,90
625,00	2,04
1250,00	0,78
NORFENTANİL KONSANTRASYONU (ng/mL)	%RSD
1,00	-
12,50	56,51
25,00	14,68
125,00	11,36
325,00	5,07
1250,00	5,26

Özütleme çalışmaları öncesinde hazırlanmış olan 1,00, 12,50, 25,00, 125,00, 625,00 ve 1250,00 ng/ml metanol çözücüsündeki fentanil etken maddesine ait standart çözeltiler kullanılarak, Eurachem tarafından tavsiye edilen yöntemle LOQ değerinin bulunması için tayin edilen derişimlere karşı %RSD grafiğı Şekil 4.8' de gösterildiğı gibidir.



Şekil 4.8. Fentanil ve Norfentanil İçin Standart Çözeltilerine Ait %RSD

Grafiklerine Göre LOQ Değerleri.

Fentanil için 1,00 ng/mL ve norfentanil için 1,00 ve 12,50 ng/mL' ye ilişkin %RSD değerleri %15 ten büyük olduğu için Eurochem grafiğine alınmadı (Fentanil için LOQ= 2,50 ng/mL ve LOD= 0,015 ng/mL, norfentanil için LOQ= 24,00 ng/mL ve LOD= 0,013 ng/mL; Şekil 20' de görülen grafiklerdeki, %15,00 RSD değerine tekabül eden konsantrasyonlar LOQ değerleri olarak alındı; IS konsantrasyonu 400,00 ng/ml) ($n \geq 6$).

4.2.2. Özütleme Öncesi Katım (ÖÖK) Çözeltilerinin Kalibrasyon Eğrisi, Doğrusallık, LOD ve LOQ Verileri

- **Kalibrasyon Eğrisi ve Doğrusallık Verileri**

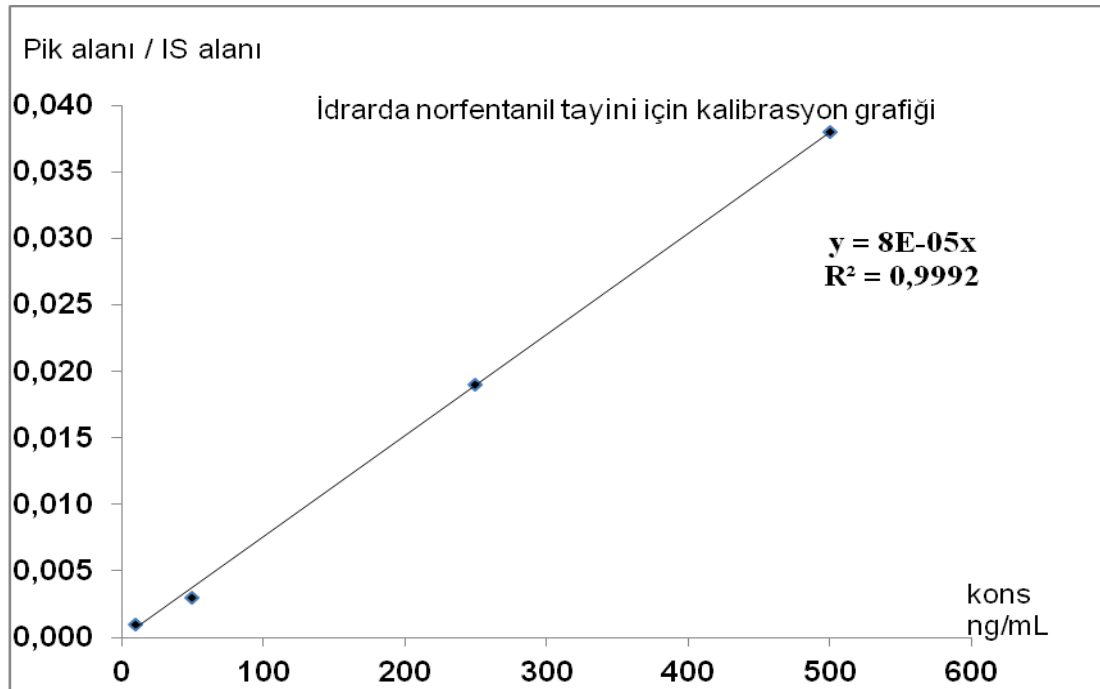
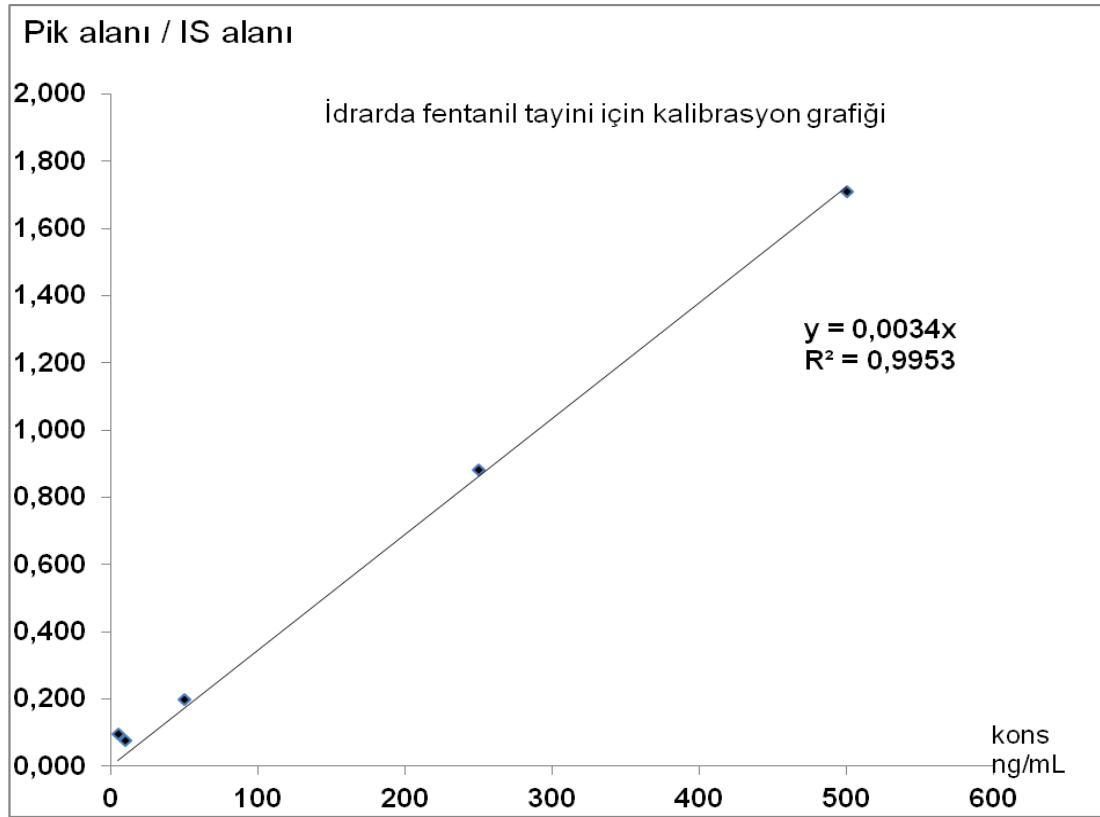
5,00-500,00 ng/mL arasında artan konsantrasyonlardaki kalibrasyon çözeltilerinin idrar ortamındaki ÖÖK işlemi sonucu doğrusallık verileri aşağıdaki Şekil 4.9 ve Tablo 4.4' de verildiği gibidir. Her bir kalibrasyon çalışmasından elde edilen veriler değerlendirilerek Excel yazılımında hesaplamaları yapıldı. Fentanil etken maddesinin 5 ng/mL - 500 ng/mL ve norfentanilin 10 ng/mL - 500 ng/mL konsantrasyon aralıklarında doğrusal olduğu bulundu.

İdrar matrisine özütleme öncesi 500,00, 5000,00, 12500,00 ve 50000,00 ng/mL fentanil ve norfentanil bir arada etken maddelerine ait standart çözeltiler katılması (ÖÖK) ile 5,00, 10,00, 50,00, 250,00, 500,00 ng/mL derişimlerine karşılık bulunan pik alanları yardımıyla fentanil ve norfentanil tayin yöntemi için oluşturulmuş olan kalibrasyon grafiğine ilişkin veriler Tablo 4.4' de ve kalibrasyon grafikleri Şekil 4.9' da görüldüğü gibidir.

Tablo 4.4. ÖÖK Örneklerine Ait Olan Kalibrasyon Grafiklerine İlişkin Veriler
(n≥6).

FENTANİL DERİŞİM (ng/mL)	ORT (ALAN/IS ALANI)	%RSD
5,00	0,097	41,26
10,00	0,076	18,60
50,00	0,198	5,13
250,00	0,883	6,99
500,00	1,709	3,15
NORFENTANİL DERİŞİM (ng/mL)	ORT (ALAN/IS ALANI)	%RSD
5,00	-	-
10,00	0,001	51,75
50,00	0,003	13,65
250,00	0,019	8,33
500,00	0,038	6,56

“(-)” Veri Alınamayan Konsantrasyonlar (n≥6).



Şekil 4.9. Fentanil ve Norfentanil İçin Özütleme Öncesi Katım Örneklerine Ait Kalibrasyon Grafikleri.

Özütleme öncesi katım yapılmış çözeltilerin EXCEL’de çizilen kalibrasyon eğrileri sonucu bulunan R^2 değeri Fentanil İçin 0,9953; Norfentanil İçin 0,9992 olarak saptandı.

- **LOD ve LOQ Verileri**

LOD ve LOQ hesaplamaları yapılırken doğrusal aralığın en düşük konsantrasyonuna ait standart sapması kullanıldı.

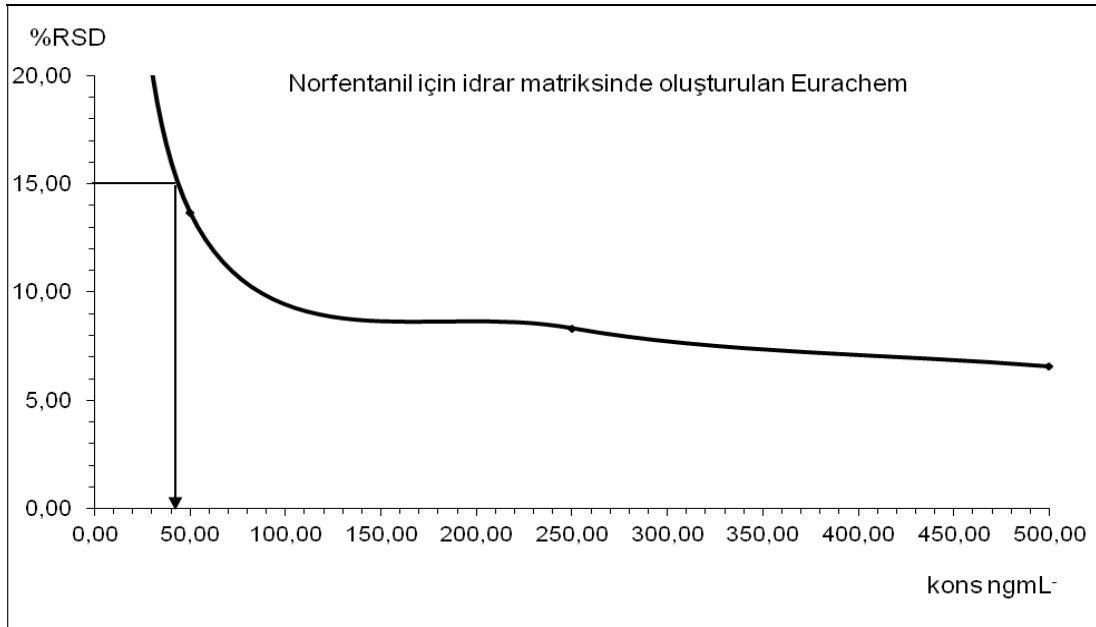
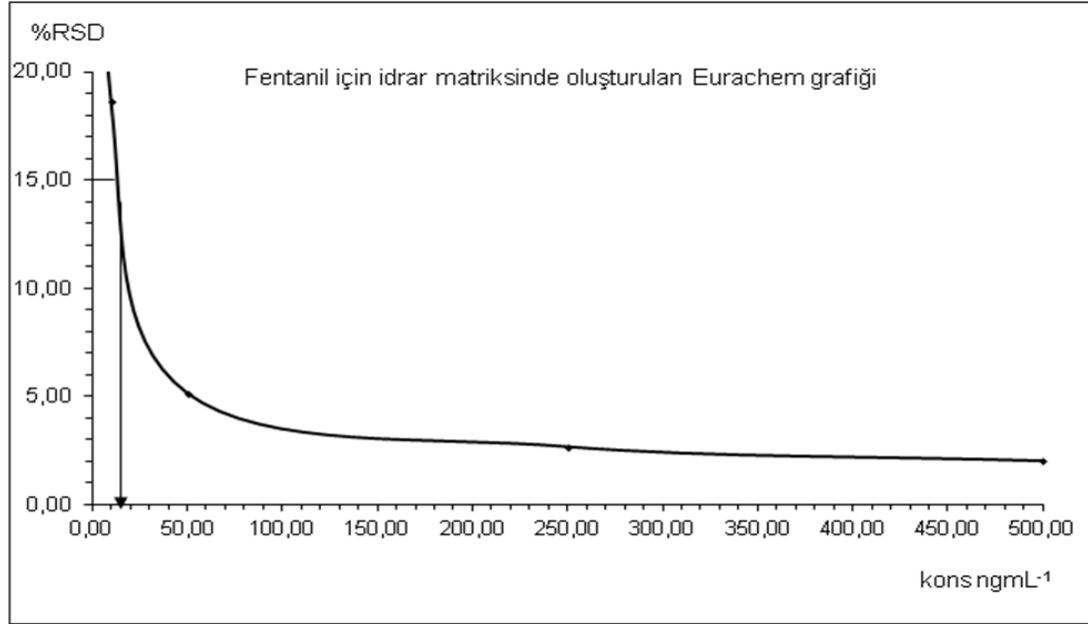
Sonuçlar aşağıdaki Tablo 4.5 ve Şekil 4.10’ daki grafikte gösterildiği gibidir. İdrar matriksine özütleme öncesi 50000,00, 12500,00, 5000,00 ve 500,00 ng/mL fentanil ve norfentanil etken maddelerine ait standart çözeltiler katılması (ÖÖK) ile 500,00, 250,00, 50,00, 10,00, 5,00 ng/mL derişimlerine karşılık bulunan pik alanları yardımıyla, Eurachem tarafından tavsiye edilen yöntemle göre LOQ değerinin bulunması için katılan etken madde derişimlerine karşı bulunmuş olan %RSD değerlerine ait veriler Tablo 4.5’ de gösterildiği gibidir.

Tablo 4.5. ÖÖK Örneklerine Ait %RSD Değerleri ($n \geq 6$).

FENTANİL DERİŞİM (ng/mL)	%RSD
5,00	41,26
10,00	18,60
50,00	5,13
250,00	2,65
500,00	1,99
NORFENTANİL DERİŞİM (ng/mL)	%RSD
5,00	-
10,00	51,75
50,00	13,65
250,00	8,33
500,00	6,57

İdrar matriksine özütlemeye öncesi 50000,00, 12500,00, 5000,00 ve 500,00 ng/mL fentanil ve norfentanil etken maddelerine ait standart çözeltiler katılması (ÖÖK) ile 500,00, 250,00, 50,00, 10,00, 5,00 ng/mL derişimlerine karşılık bulunan pik alanları yardımıyla, Eurachem tarafından tavsiye edilen yöntemle göre LOQ değerinin bulunması için katılan etken madde derişimlerine karşı karşı çizilen % RSD grafiği Şekil 4.10' da gösterildiği gibidir. Fentanil ve Norfentanil İçin 5,00 ve 10,00 ng/mL; derişimlerindeki değerler diğer noktaların takip ettiği eğride sapma gösterdiğinden

grafiğe alınmadılar. %15,00 RSD değerine denk gelen derişim, LOQ değeri olarak alındı ($n \geq 6$).



şekil 4.10. Fentanyl ve Norfentanyl İçin K örneklerine İlişkin % RSD Grafiklerine Göre LOQ Değerleri.

Analiti çok düşük düzeyde (5,00 ng/mL) içeren örneğin tekrarlı analizleriyle; standart sapmaları ile LOD Değerleri= $3.3 \times s / \text{eğim}$ formülüne göre hesaplandı. İdrar matrisine özütleme öncesi fentanil standart çözeltilerinin katılması (ÖÖK) ile hazırlanan örneklerin analizinden elde edilen Fentanil İçin LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 1,65 ng/mL ve 14,00 ng/mL; Norfentanil İçin LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 16,50 ve 42,00 ng/mL olarak bulundu.

4.3. Geri Kazanım (Recovery)

Geri kazanım çalışmaları doğrusal aralık içinde bulunan en düşük, orta ve en yüksek konsantrasyonları temsilen 4 noktada ve en az 6 tekrar olacak şekilde çalışıldı. Elde edilen verilerin % Geri Kazanım Bulguları, % RSD değerleri Tablo 4.6' da gösterildiği gibidir. Geri kazanım bulgularının kabul edilebilir sınırlar içinde olduğu tespit edildi.

Tablo 4.6. 5,00, 50,00, 250,00 Ve 500,00 ng/mL Derişimlerindeki Fentanil Etken Maddesi İçin, Ortalama Bağlı Standart Sapma (%RSD), Standart Sapma Ve Geri Kazanım Bulguları (n≥6).

Fentanil			
Katılan	%RSD	Standart	% Geri Kazanım
(ng/mL)		Sapma	
10,00	5,95	5,46	91,65
50,00	4,75	4,63	97,54
250,00	7,51	7,07	94,09
500,00	4,81	4,62	96,10
Norfentanil			
Katılan	%RSD	Standart	% Geri Kazanım
(ng/mL)		Sapma	
10,00	34,34	26,54	77,28
50,00	16,29	11,18	68,65
250,00	3,90	2,75	70,60
500,00	7,70	5,39	69,91

4.4. Hasta bulgularının değerlendirilmesi

İdrar örnekleri toplanan 3 hastanın etken madde ve metabolitin miktarlarının tayini LC-MS/MS sisteminde gerçekleştirildi. Bu analizden elde edilen bulgular (ng/mL) Tablo 4.7’ de gösterildiği gibidir. Hastaların idrarlarındaki madde miktarları değişken olduğundan, kontaminasyonu engellemek için, örnek analiz listesine her örnekten sonra boş metanol çözücüsü eklendi ve analiz edildi. Çalışma sonunda her bir boş metanol çözücüsünden alınan kromatogram incelendi ve herhangi bir kontaminasyon olmadığı görüldü.

Hastalarda analizler sonucunda verilerden yola çıkarak fentanil ve norfentanil konsantrasyonları ÖÖK kalibrasyon grafikleri denkleminde;

$$\text{Fentanil}_{\text{Bulunan}}; X=Y/0,0034$$

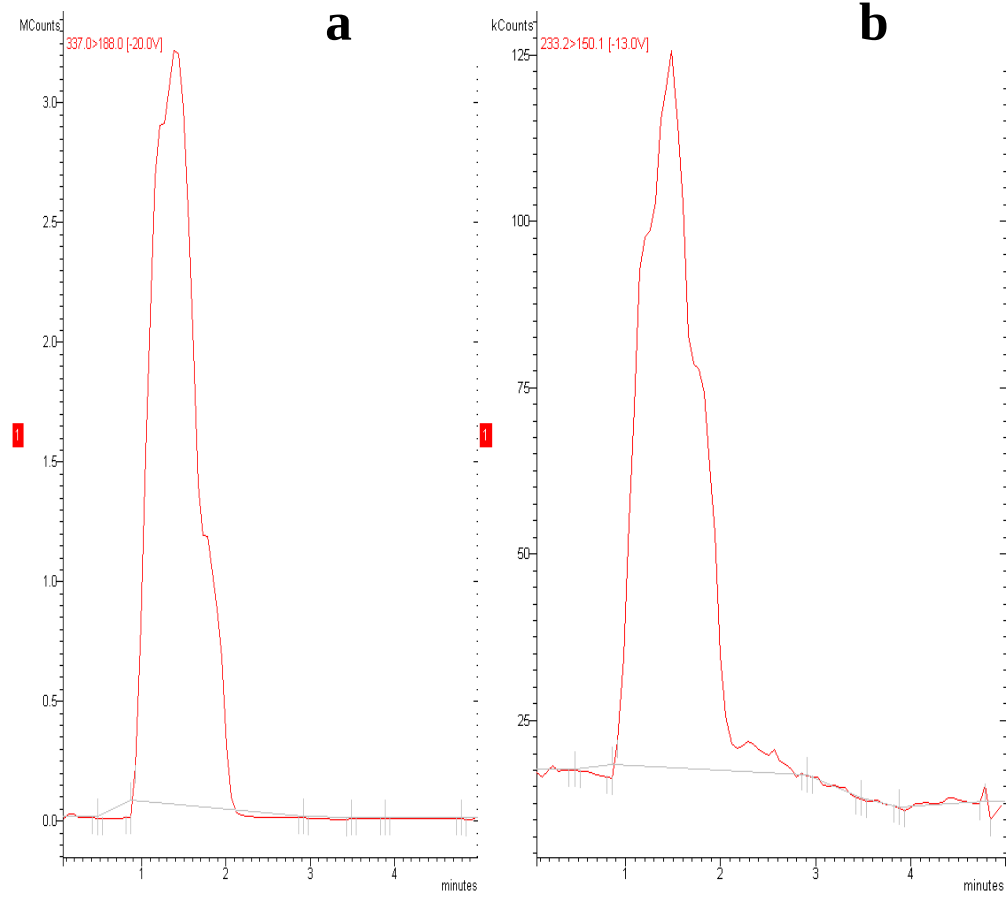
$$\text{Norfentanil}_{\text{Bulunan}}; X=Y/0,00008 \text{ şeklinde tespit edilen formüller ile hesaplandı.}$$

Tablo 4.7. Hastaların İdrarlarında Bulunan Etken Madde (Fentanil) Ve Metabolit (Norfentanil) Miktarları (n≥3).

Örnek No	1	2	3
Kullanılan Fentanil Miktarı (µg/saat)	100 µg/saat	100 µg/saat	50 µg/saat
Son Fentanil Alımı (İdrar örneği toplanmasından önceki)	5 Gün Önce	2 Gün Önce	1 Gün Önce
Bulunan Fentanil Konsantrasyonu (ng/mL)	32,60	111,27	44,94
Fentanil SD	0,50	4,43	2,73
Fentanil %RSD	1,52	3,98	6,08
Bulunan Norfentanil Konsantrasyonu (ng/mL)	267,19	182,96	151,32
Norfentanil SD	28,08	19,49	18,87
Norfentanil %RSD	10,51	10,65	12,47

4.4.1. Hasta Örneğine Ait Kromatogramlar

2 no'lu hastaya ait kromatogramlar Şekil 4.11' de verildiği gibidir.



Şekil 4.11. (a) 2 No'lu Hasta İdrarındaki Fentanile Ait ve (b) 2 No'lu Hasta İdrarındaki Norfentanile Ait Kromatogram.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Hastalıkları tedavi etmek amacıyla kullanılan tüm ilaçlar ve maddeler aslında bir zehirdir. Zehir ile tedavi edici olanı ayıran şey sadece dozudur (*Paracelsus 1493-1541*). Günümüzde ağrı tedavisinde en sık kullanılan maddeler, binlerce yıldır ulaşılabilirliği mümkün olan maddelerdir ve Opium'un bilinen en az 5000 yıllık bir kullanımı vardır. Bitkiler, hayvanlar, bakteriler gibi doğal kaynakların yanı sıra günümüzde kimyasal sentez yolu da ilaç üretiminde kullanılmaktadır. Biyoinformatik ve bilgisayar destekli kimyanın birlikte kullanılması ile etkililiği yüksek ilaçların geliştirilmesi kolaylaşmaktadır (Kuralay, F., 2003). Ancak buna rağmen klinisyenler, zaman zaman yan etkilerinden ve bağımlılık yapmasından korktukları için ağrı tedavisinde opioidleri kullanmaktan kaçınmaktadırlar. Opium ve türevlerinin kullanımı asırlardır önemli bir sorun alanı olarak göze çarpmaktadır. Opioidlerin etkileri ve yan etkileri hekimler tarafından bilinmeli, hastalar, opioid analjeziklerden olan fentanil gibi maddelerin faydaları ve riskleri konusunda bilgilendirilmeli ve kontrollü bir şekilde bu maddenin kullanımından kaçınılmamalıdır. Fentanilin terapötik değerinin yaygın bir şekilde kabul edilmesi son yıllarda bu maddenin tüketiminde de anlamlı bir artışa neden olmaktadır. Ameliyathane ve ameliyathane dışı anestezi uygulamalarında, acil servislerdeki tanı ve tedavi amaçlı ağrılı her türlü girişimlerde, potent bir opioid ajan olan fentanil sıklıkla tercih edilmektedir. Fentanil yüksek dozlarda kullanılmadığı ve doz ayarı yapılarak verildiğinde, yan etkileri çok nadir görülmektedir (Beyazyürek, M. ve ark., 2000; Mind, M., 1998).

Yasadışı uyuşturucu-uyarıcı piyasasının en çok bilinen ürünleri, suistimali tüm dünyada yasaklanmış olan esrar, eroin, kokain, ecstasy, afyon gibi uyuşturucu-uyarıcı maddelerdir. Bu maddelerin sebep olduğu fiziksel ve psikolojik bağımlılık, bu piyasanın büyümesini ve devamını sağlayan en önemli faktör olarak karşımıza çıkmaktadır. Sayılan bu yasadışı maddelerin dışında, uyuşturucu sorununun önemli bir boyutu daha bulunmaktadır. Bu da, medikal amacın dışında kullanılarak suistimal edildiğinde, benzer etki ve fiziksel bağımlılık gösteren reçeteli ilaçların suistimalidir. Bu grubun tipik örneği olan fentanil etken maddeli reçeteli ilaçların temin edilmesinde, kişilerin, hasta ve hasta yakınlarının doktorları yanlış bilgilerle yönlendirdiği, sahte reçetelerin kullanıldığı, eczanelerin soyulduğu, bu ilacı kullanan kişilerden ya da uyuşturucu tacirlerinden satın alındığını görmekteyiz. Reçeteye tabi ilaçların suistimalinde fentanil gibi tedavi amaçlı üretilen ilaçların yasadışı kullanımı, gelişmiş batı ülkeleri başta olmak üzere tüm dünyada hissedilen uyuşturucu sorunlarından birisidir. Başlangıçta hastalar; çektikleri kronik bir ağrı, ciddi bir yaralanma, ameliyat ağrıları gibi sebeplerle doktor kontrolünde kendilerine verilen fentanil etken maddeli ilaçları kullanmaya başlamaktadırlar. Daha sonra bazıları mevcut rahatsızlığından dolayı almaya başladığı bu ilacı, kendini iyi hissetmek için de kullanmaya devam eder ki bu durum tehlike ve risklerin kaçınılmazlığını gösterir. Çünkü ardından gelen aşama, bu maddeye karşı kullanıcıda toleransın oluşması ve bu ilacı daha fazla alma ihtiyacı içine girmesidir. Bağımlılık evresinde ise, fentanilin alınması kullanıcı için artık zorunlu hale gelmektedir. Bağımlı ağır, dayanılması zor bir yoksunluk dönemi geçirir ki çoğu bu dönem bitmeden tekrar madde kullanarak rahatsızlıktan kurtulmaya çalışır. Öyle ki, kişi yoksunluktan kurtulmak için madde

kullanma eylemini "tedavi olma" şeklinde algılar ve kişi bu dönemde çok kolaylıkla suç işleyebilir ya da maddeyi elde etmek için her şeyi yapabilir. Bu durum fentanille bağlantılı zehirlenme olguları yanında, madde istismarının suç işleme ile reddedilemez bir ilişkisi olduğunu da göstermektedir (Gold, M.S. ve ark., 2006; Smart, R.G., 1997). Literatürde fentanilin daha çok kötüye kullanımı bildirilmiş olsa da bağımlılık açısından da dikkatle ele alınması gerekli bir maddedir. Ve fentanil gibi kısa sürede etki gösteren opioidlerin tolerans riskinin daha yüksek olduğu unutulmamalıdır. (Geçici, Ö. ve ark., 2010; Kanner, R., 2003; McClain, B.C., 2000; Lo, C.C., 2004).

Uluslararası ilaç kontrol anlaşmaları, bağımlılığa neden olabilecek fentanil gibi maddelerin kötüye kullanımını engellemek için oluşturulmuştur. Anlaşmaların evrensel olarak kabul görmesi ve uygulanması, ilaçların uluslararası ticarete yasal piyasalardan yasadışı piyasalara sapmasını önleme ve toplumu bağımlılığın sonuçlarından koruma konusunda da son derece etkili olmaya devam etmektedir (Hernandez-Avila, C.C. ve ark., 2000; Lo, C.C., 2004).

Gezici Ö. ve ark. (2010)'nın ülkemizde tespit ettikleri tıbbi endikasyon olmaksızın gelişen fentanil bağımlılığı vakasında 59 yaşındaki bir erkek transdermal fentanil bantları kullanmış ve bağımlılık gelişmiştir. Fentanil kullanımına bağlı vücutta belirli yan etkilerin oluşumu ve alkol kullanımı sebebi ile hastaneye başvurduğu sırada TDF bantları kullandığı tespit edilmiştir. Önceleri bantları vücuduna yapıştırarak, ilerleyen zamanlarda ise bu bantları her 3 günde bir yiyerek kötüye kullanmıştır. İlk zamanlarda 25 µg/saat dozda bu bantları

tüketmeye başlasa da zamanla gelişen tolerans ile birlikte doz miktarı 100 µg/saat' e kadar yükselmiştir. Kişide eşini kaybetme durumunun oluşturduğu depresyon, madde bağımlılığı konusunu ortaya çıkarmıştır. Transdermal bantları, eşinin kanser tedavisi sırasında doktor tarafından verilmiş olması ve eşinin vefatı sonucu girdiği bunalımla bu bantları kullanması ise, fentanil temini ve istismarı konusuna apayrı bir boyut kazandırmaktadır. Bu olgu örnek alınarak, kronik ağrı tedavisinde fentanil maddesi kullanan kişilerin kendisi ve/veya ailesi dikkatli olmalı, gereken tedbirler alınmalıdır. Özellikle kişinin ve ailesinin geçmiş öyküsü iyi bilinmelidir (Geçici, Ö. ve ark., 2010). 2004 yılında yapılan bir araştırmaya göre Amerikan toplumunda 16 - 59 yaş arası madde bağımlılığı olan hastaların sıklığı %34 olarak bildirilmiştir. Tedavi edilen hastaların %10-16' sı ve hastanede yatan hastaların %25-40' ında ilaç bağımlılığı öyküsü mevcuttur. Özellikle fentanil tedavisi başlanması planlanan hastalarda bağımlılık öyküsü iyi araştırılmalıdır (McGuire, D.B., 2004; Lo, C.C., 2004). Hastanın ilaç ihtiyacında artış tolerans dışında, mevcut hastalıkta ilerlemeyi, ilacın başkası tarafından kullanılma ihtimali ve ilaç bağımlılığını da düşündürmeli ve tablo doğru değerlendirilmelidir. Ayrıca sağlık çalışanları hastanın yakınlarının da bağımlılık potansiyeli taşıyabileceğini ve hastanın ilaçlarını kullanabileceklerini akılda tutmalıdırlar (Jage, J., 2005; Kettler, R.E., 2006).

Papich, M.G. (2000)' nın, Pascoe, R.J. (2000)' nın, Proddutturi, S. ve ark. (2009)' nın ve Manral, R. ve ark. (2009)' ın birbirlerinden bağımsız yaptıkları araştırmalara göre, TDF emilimi yapıştırıldığı yüzey ısısına göre değişmektedir. Bantın yapışkan yüzü derideki yağlarla etkileşirse sistemin difüzyon özellikleri

değişebilmektedir (Papich, M.G., 2000). Buna bağlı olarak TDF bantlarının sık kullanıldığı ülkelerde bantın ısınmasından kaynaklanan pek çok ölüm olgusu bildirilmektedir. Literatürlerde özellikle ısıtmalı battaniye üzerine yatırılan hastalarda yüksek dozda fentanil emilimine bağlı olarak ortaya çıkan ölüm olguları dikkati çekmektedir (Pascoe, R.J., 2000).

Topluma göre fentanil suistimali ve bağımlılığına, sağlık çalışanları arasında daha sık rastlanmaktadır. Bunun sebebi, bu ilacın hastanede kolay bulunabilmesidir. Sağlık çalışanları arasında fentanil ile ilgili olarak, transdermal fentanile bağımlılık gelişmeyeceği, uzun süre kullanılsa bile istendiğinde kolay bırakılabileceği ve hastalarda fentanile bağımlılık gelişmediği için kendilerinde de olmayacağı gibi yanlış inanışlar vardır. Ayrıca, diğer yasadışı kullanılan maddelerin aksine içeriğinin tam olarak bilinmesi ve kullanıcı da “yasal olduğuna göre pek zararı olmaz” düşüncesi, kişileri bu tür maddelerin suistismaline itmektedir (Ersoy, Ö., 2010; Marcus, D.A., 2005; Kirsh, K.L. ve ark., 2006). Hemşire ve/veya hastane çalışanının fentanil preparatlarını dolaptan çalması veya hastane içinde yasadışı yollardan temin etmeleri olguları ile özellikle anesteziyoloji bölümünde çalışanların ortamdaki hava ile veya TDF bantları hastalara uygulama esnasında deri yolu ile bu maddeye maruz kalmaları veya bu yolla bu maddeyi istismar etmeleri birçok literatüre konu olmuştur (Law, B.F. ve ark., 2010; McAuliffe, P.F. ve ark., 2006; Magdalan, J., 2009).

Dünya üzerinde fiziki uzaklık kavramını ortadan kaldıran internetin hayatımıza yerleşmesi ile birlikte, reçeteye tabi ilaçların satışında da internet önemli bir aracı

olmaktadır. Her hangi bir lisansa ve denetime sahip olmayan internet eczaneleri, reçeteye tabi ve içinde uluslar arası kontrol altında tutulan fentanilin de olduğu preparatları yasadışı olarak satışa sunmaktadır. Reçete aranmaksızın satılan ve dünyanın her yerine gönderilebilen fentanil gibi ilaçların önemli bir kısmının sahte çıktığı ve o ilaçları alanlar açısından ölümcül sağlık risklerini de ciddi oranlarda arttırdığı tespit edilmiştir (Brill, S. ve ark., 2006; Brown, R. ve ark., 2004; Ersoy, Ö., 2010).

Yapılan bir araştırmaya göre 2002 yılında Rusya'nın Çeçen ölüm timinin 800 kişiyi rehin aldığı Moskova Tiyatrosu baskınına karşı düzenlenen operasyonda, fentanil maddesinin gaz formu şeklinde kullanılması sonucu, operasyonda bu gaza maruz kalan 119 kişi ölmüştür. Bu operasyona bağlı yasal süreçte dönemin Rusya Sağlık Bakanı'nın yaptığı açıklama da "operasyonda uluslar arası sözleşmelerin yasakladığı hiçbir kimyasal madde kullanılmadı" ibaresi, anestezi bir bileşim olan fentanilin bilinçsiz suistismaline bir örnektir. Burada rehinelere, yüksek dozda fentanili solunum ile vücutlarına aldıklarından solunum depresyonunu takiben oksijensizlikten ölmüşlerdir. Buna benzer bir örnekte Pennsylvania Üniversitesi'nden yapılan bir araştırma ile ortaya çıkarılmıştır. Bu araştırmaya göre 2000 yılında Amerikan ordusu kızgın çeteleri sakinleştirmek için fentanili gaz formunda kullanmışlardır (Lo, C.C., 2004; Law, B.F. ve ark., 2010; McAuliffe, P.F. ve ark., 2006; Gold, M.S. ve ark., 2006).

Çoklu uyuşturucu kullanımı, alınan uyuşturucunun daha fazla ve hızlı etkide bulunabilmesi için diğer bir yasal veya yasadışı bağımlılık yapıcı madde ile

kullanılmasıdır ki bu yöntem istismar amaçlı fentanil kullanımında da tercih edilmektedir. Bu konuda çoklu uyuşturucu kullanımının yaygın olduğu Avrupa ve Amerika’da yapılan araştırmalar, doz aşımı nedeniyle hayatını kaybedenlerin önemli bir kısmının fentanil etken maddesi ile birlikte birden çok uyuşturucu madde kullanmış olduklarını göstermektedir (Hull, M.L ve ark., 2007; Wong S.C. ve ark., 2008).

Ülkemizde özel olarak kayıtları tutulan kırmızı reçete ile satılan morfin ampullerinin fiyatı ucuz, yurt dışından ithal edilen fentanil bantlar ise pahalıdır. TDF kullanımında bant çıkarıldıktan sonra, deri tabakalarında fentanil varlığını sürdürmeye devam ettiğinden, İV uygulamaya kıyasla serum konsantrasyonu kademeli olarak azalmaktadır. Ekonominin ön planda olduğu çağda bu durum göz önüne alınması gereken önemli bir konudur ve TDF bantlarının kullanımına ilişkin en önemli avantajlarından birisidir. Ayrıca ağrı tedavisi gören hastalarda; transdermal fentanilin; diğer analjezikler gibi infüzyon için ihtiyaç duyulan infüzyon pompası ve intavenöz yol gerektirmemesi, kolay uygulanabilirliği, 72 saat gibi uzun süre içerisinde değiştirilmeye ihtiyaç duyulmaması nedeniyle ağrı yönetiminde ideal bir seçenek olarak kullanılmaktadır (Grond, S. ve ark., 2000; Ketene, A. ve ark., 2004).

Bağımlılık yapıcı maddelerden biri olan fentanil ağrı tedavisinde her zaman var olacak opioidlerden biridir. Bu opioide karşı gelişen bağımlılık sorunun herhangi bir kişinin kişisel sorunu olmaktan çok toplumsal bir sorun olduğu kabul edilmeli ve bu konuda kurumlaşmaya gidilmelidir. Özellikle 1980’li yıllardan sonra

ülkemiz için de çok önemli bir sorun haline gelen madde kullanımı için uluslararası işbirliği sağlanarak, fentanil gibi kontrolsüz kullanımı bağımlılık yapabilen maddelerin yasadışı ticareti en alt düzeye indirilmeye çalışılmalıdır. Eğitim tedbirleri alınmalı ve hastalıkların tedavisinde kullanılan fentanilin kontrollü tüketimi sağlanmalıdır. Ruhsal durumu değiştiren herhangi bir maddenin tedavi dışı kullanımı hiçbir zaman normal kabul edilmemeli, özellikle gençler korunmalıdır. Özellikle uyuşturucu amacı ile fentanilin sokak uyuşturucu piyasası arasındaki yaygınlığı İsviçre, İsveç, Kanada, Amerika, İngiltere, Finlandiya gibi batı ülkeleri başta olmak üzere birçok ülkede gerekli araştırmaların yapılması ve önlemlerin alınmasının gerekliliğini gözler önüne sermektedir (Kronstrand, R. ve ark, 1997; Martin, T.L., 2006; Wang, W.L., 1993; Moon, J. ve ark, 2007; Kuhlman, J. ve ark., 2003).

Fentanil gibi uyuşturucu madde içeren ecza ürünlerinin denetimi konusunda ulusal birimlerin birbirini desteklemesi gerekmektedir. İstismara açık olan bu tür ilaçların satışı ve pazarlanmasına karşı, diğer yasadışı uyuşturucularla mücadelede uygulanan tedbirlere başvurulmalıdır. Ayrıca toplumunun fentanil ürünlerinin kullanımı ile ilgili tehlikeler konusunda eğitilmesi gerekmektedir. Fentanil ürünlerinin istismarının yalnız kanunları ihlal etmek anlamına gelmediği, kendi sağlıkları için de hayati riskler taşıdığı konularında bilinçlendirilmeleri gerekmektedir (Jin, M. ve ark., 2005). Uygunsuz fentanil kullanımı riskini en aza indirmek için hasta seçimi, tedavi ve takip konusunda dikkat edilmelidir. Hastanın tıbbi kayıtları incelenerek tedavi hedefleri, tedavi öncesi ve sonrasında hastanın durumu detaylı olarak kaydedilmelidir. Hastada gözlenmiş madde bağımlılığı ve

kronik ağrı mevcutsa tedaviyi, ağrı uzmanıyla beraber bağımlılık konusunda uzman bir kişi birlikte yapmalıdır. Bağımlılıkla uzmanının tedaviye dahil edilme sebebi, hastanın madde suistimali riski taşıyor olabileceğidir. Ayrıca fentanili kötü amaçla kullanım riski olan hastalara zaman zaman idrarda toksikolojik testler yapılması gerekmektedir (Mehta, V. ve ark., 2006; Wasan, A.D. ve ark., 2005) .

Fentanil ve metaboliti norfentanilin ante-mortem ve post-mortem olmak üzere idrardan, diğer biyolojik sıvı ve dokulardan ve ayrıca formülasyonlarından tayini için birçok yöntem geliştirilmiştir (Nelson, M. ve ark., 2010; McGrath, K.K. ve ark., 2009; Moore, C. ve ark., 2008; Lafreniere, N.M. ve ark., 2009; Wang, W.L., 1993; Kingsbury, D.P. ve ark., 1995).

Huynh, N.H. ve ark. (2005), sıvı sıvı özütlemeye ile LC-MS/MS tekniğini kullanarak, internal standart için (d_5 -fentanil) kullanmak suretiyle fentanil ve norfentanilin idrardan ve plazmadan tayinini gerçekleştirmişlerdir. İdrar bulguları olarak fentanil için 0.100 - 50,00 ng/mL, norfentanil için 0.102-153,00 ng/mL doğrusal aralık; yine sırasıyla 0.100 ng/mL ve 0.102 ng/mL konsantrasyonlarda LLOQ değeri saptamışlardır. Fentanil için ortalama % 96 ve norfentanil için ortalama % 89 oranında geri kazanım elde etmişlerdir. Plazmada elde edilen geri kazanımlar, %81-96, LLOQ ise 0.02 olarak belirlenmiştir.

Verplaetse, R. ve ark. (2010), fentanil ve norfentanilin idrardan tayini için SPE ve UPLC-MS/MS (Ultra performans likit kromatografi/MS/MS) sisteminden yararlanmışlar ve internal standart olarak (d_5 -fentanil) kullanılmışlardır. LOD

değerini fentanil ve norfentanil için sırasıyla 2.50 pg/mL ve 5,00 pg/mL olarak saptamışlardır. Ultra performans likit kromatografi/MS/MS sistemi adından da anlaşılacağı üzere hassasiyeti oldukça yüksek bir yöntemdir.

Ebrtahimzadeh H. ve ark. (2008) yaptıkları çalışmada, fentanil ve norfentanilin, biyolojik sıvılarla, su örneklerinden tayininde internal standart olarak alfentanil kullanarak, “Tek Damla-Sıvı Sıvı-Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyon-Single-Drop (LLLME)” sistemi yardımıyla HPLC-UV yöntemi geliştirmişlerdir. İdrar bulguları için doğrusallık 0.50 - 1000,00 ng/mL arasında, LOD ve LOQ değerleri ise idrar için sırasıyla 0.10 ng/mL ve 0.30 ng/mL’ dir. %95-102 aralığında geri kazanım elde etmişlerdir.

Snyder, M.L. ve ark. (2011) reçeteli, kronik opioid tedavisi gören 307 hastanın idrarında “fentanil homojen enzim immunoassay - HEIA ” yöntemi ile fentanil tayini yapmış ve sonuçların doğrulanmasında LC-MS/MS yöntemini kullanmışlardır. HEIA yöntemindeki cut off değerlerinin, fentanil için 5,00 ng, norfentanil için 100,00 ng olduğunu belirtmişlerdir. Fentanilin pH’ sı 5.00 - 11.70 arasında iken HEIA cevabı bağımsız olduğundan idrardan oluşacak protein, kreatinin, üre, glikoz benzeri bileşiklerin interferansının ihmal edilebileceğini gözlemlemişlerdir.

Day, J. ve ark. (2003), fentanil ve norfentanilin LC-MS sistemi ile internal standart olarak (d₅- fentanil) kullanmak suretiyle plazmadan direkt analizini

yapmışlar ve LLOQ değerini her iki bileşen için 0.05ng/mL ve yöntemin doğruluğunu % 2 - 12 aralıkta bulmuşlardır.

Chuan, L. ve ark. (2010) geliştirdikleri sıvı kromatografi-isotop seyreltme kütle spektrometri yöntemini Çin de yaşayan kronik ağrı hastalarına uygulamışlar ve ortalama plazma tedavi konsantrasyonunun 1,00 - 2,00 ng/mL olduğunu saptamışlardır. Uyguladıkları yöntemin, doğrusal aralığının 0.02 - 10,00 ng/mL; LLOQ nin 0.02 ng/mL; geri kazanımının ise %98 - 104 aralıkta olduğunu belirtmişlerdir.

Bagheri, H. ve ark. (2007), HS-SPME-GC tekniği kullanarak, fentanilin plazmadan tayinini gerçekleştirmişlerdir. Yöntemin, doğrusal aralığının 0.10 - 2000,00 ng/mL; LOD' nin 0.03 ng/mL, LOQ' nun 0.10 ng/mL olduğunu saptamışlardır.

Fentanilin tıbbi formülasyonlarından tayini için de çalışmalar yapılmıştır. Peng, L.J. ve ark. (2002), fentanil sitrat enjeksiyon preparatlarından, potansiyometrik yöntem ile Amerikan Farmakopesi (United States Pharmacopeia XXII) içinde yer alan standart prosedürde bildirilen sınırlar ile uyumlu sonuçlar aldıklarını bildirmişlerdir.

Kingsbury D.P. ve ark. (1995) ise, fentanil sitrat enjeksiyon formülünde GC/MS yöntemi ile fentanil tayinini gerçekleştirmişler, yönteme ait doğrusal aralığın 1,00 - 60,00 µg/mL, LOD nin 0.40 µg/mL, olduğunu, geri kazanımın da %69 - 104 arasında değiştiğini ifade etmişlerdir.

Opioid analjeziklerden olan fentanilin gerek tedavi sürecinde, gerekse kötü amaçla kullanımında, çeşitli nedenlerle intoksikasyon ve/veya ölüm riski ile karşılaşılabileninden, sözü edilen olası olayların aydınlatılmasına katkı sağlamak amacıyla, fentanil ve metaboliti norfentanilin idrardan yan yana tayini için, sıvı-sıvı özütleme ve sıvı kromatografi - tandem kütle spektrometrisi (LC-MS/MS) yöntemi geliştirildi ve yöntemimiz; seçicilik (yöntemin spesifikliği), doğruluk (geri kazanım), doğrusallık, gözlenebilme alt sınırı (LOD) ve tayin alt sınırı (LOQ), kesinlik yönünden test edilerek geçerli kılındı.

İdrar, elde edilmesi kolay ve dış etkenlere daha az maruz kalan, metabolitlerin analizinde en çok kullanılan biyolojik örneklerden olup, fentanilin yarılanma ömrüne bağlı olarak en uzun süre tespit edilebileceği biyolojik materyal (Katz, N. ve ark., 2002) olduğundan, çalışmada, biyolojik matriks olarak seçildi. Çalışmamızda, etken maddelerin organik faza alınması ve matriks bileşenlerinin çözeltide bırakılmasını esas alan, oldukça etkin ve basit bir yöntem olarak tanımlanan sıvı-sıvı özütleme yöntemi tercih edildi.

Fentanil ve norfentanil için bulunan alıkonma zamanı sırasıyla 1,730 ($\pm 0,005$) ve 1,377 ($\pm 0,006$) dakikadır. Analizlerde 337,00 m/z öncül iyon ve 188,00 m/z ikincil iyon fentanilin için ve 233,20 m/z öncül iyon ve 150,10 m/z ikincil iyon norfentanilin için seçilmiştir. İç standart olan papaverin için bulunan alıkonma zamanı ise 1,733 ($\pm 0,003$) dakika ve 340,10 m/z öncül iyon ve 202,00 m/z ile 324,00 m/z ikincil iyon olarak belirlenmiştir.

Maddeleri içermeyen çözücüye ve kör idrara ait kromatogramlar, fentanil ve norfentanil kromatogramları ile kıyaslanarak yöntemin seçici olduğu görüldü. Standart fentanil ve norfentanil çözeltilerine ait kalibrasyon eğrisinin R^2 değeri fentanil için 0,9993 ve norfentanil için 0,9980; doğrusal aralık fentanil için 1,00 - 1250,00 ng/mL, norfentanil için 12,50 - 1250,00 ng/mL' dir. Özütleme öncesi idrara katılmış fentanil ve norfentanil bir arada standart çözeltileri ile bulunan R^2 değeri ise fentanil için 0,9953 ve norfentanil için 0,9992; doğrusal aralık fentanil için 5,00 - 500,00 ng/mL ve norfentanil için 10,00 - 500,00 ng/mL' dir. Standart çözeltiler ile hazırlanan çözeltilerin analizinden elde edilen LOD ve LOQ değerleri sırasıyla fentanil için 0,015 ve 2,50 ng/mL; norfentanil için 0,013 ve 24,00 ng/mL' dir. İdrar matriksine özütleme öncesi standart çözeltilerinin katılması (ÖÖK) ile hazırlanan örneklerin analizinden elde edilen LOD ve LOQ değerleri ise sırasıyla fentanil için 1,65 ve 14,00 ng/mL; norfentanil için 16,50 ve 42,00 ng/mL olarak bulundu. Elde edilen bu değerler ilaç takibi ve toksikolojik analizler için uygun değerlerdir. 5,00, 10,00, 50,00, 250,00 ve 500,00 ng/mL derişimlerde, fentanil için ortalama % 94,50 ($\pm 5,44$) ve norfentanil için ortalama % 71,61 ($\pm 11,47$) oranında geri kazanım elde edildi. Ortalama % RSD fentanil için 5,755, norfentanil için 15,558 olarak bulunmuştur.

Geliştirilen yöntem, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Ağrı Bilim Dalı'nda fentanil etken maddesini kullanan hastalardan alınan idrar örneklerine uygulandı, ancak, yaz mevsiminde, hastaların yatarak değil, evde tedaviyi tercih ettikleri ve bu nedenle yatan hasta sayısının yazın azalması nedeniyle, temin edilen idrar örneği sayısı çok az olmuştur. İlerleyen zamanda idrar örnekleri alınmaya devam

edilecek ve çalışma ile ilgili verilerde yeterli sayıya ulaşılmış olacaktır. Özütleme işleminin ardından fentanil ve norfentanil miktarları hesaplandı. Saptanan en düşük fentanil miktarı 32,60 ng/mL ve en yüksek fentanil miktarı 111,27 ng/mL olarak bulundu. En yüksek bulunan değerin ait olduğu hastaya ait olan bilgiye göre, son fentanil alımının, idrar örneği alımından iki gün önce olduğu, 100 µg/saat doz uygulandığı, ilaç uygulamasının 72 saat aralıklarla sürdürülmüş olduğudur. Saptanan en düşük norfentanil miktarı 151,32 ng/mL ve en yüksek norfentanil miktarı 267,19 ng/mL olarak bulundu. Norfentanilin en düşük bulunduğu hastaya ait olan bilgiye göre, 50µg/saat doz uygulandığı, ilaç uygulamasının hastanın aksatması nedeniyle 72 saat aralıklarla tekrarlanmamış olduğudur. Aynı miktarda fentanil alan hastaların idrar örneklerindeki fentanil ve norfentanil miktarlarının farklı çıkması, bireysel özellikleri (cinsiyet, yaş, enzim polimorfizmi, fentanil ile birlikte alınmış gıda maddeleri ve diğer ilaçlar, idrar konsantrasyonu v.b.), ilaç uygulamasının periyodik uygulanıp uygulanmadığı gibi nedenlerden olabileceği kanaati uyandırmıştır. Bu bireyler arası farklılıklar yanında, zaman zaman, tedavi sırasında bireylerin kendi içlerinde de fark gözlemlendiği ifade edilmektedir (Solassol, I. ve ark., 2011).

Tüm bu bilgi ve bulguların sonucunda;

İdrardan fentanil ve metaboliti norfentanilin tayini için geliştirdiğimiz yöntemin, basit (hidroliz işlemi gerektirmemesi, özütlemenin tek basamaklı olması vb.), ucuz (özütlemenin son derece ucuz olması), hızlı (toplamda 20 dakika özütleme süresinin, 5 dakika analiz süresinin olması), hassas, seçici, doğruluğu yüksek ve düşük derişimde (LC-MS/MS sistemi) fentanil ve norfentanil tayinine olanak

vermesi, fentanil tedavisi gören kişilerin takibinde, fentanil kullanımına bağlı adli olguların aydınlatılmasında, fentanil kullanan kişilerdeki CYP3A4 geninin polimorfizm varlığının desteklenmesinde katkı sağlayacağı düşüncesiyle birlikte, bilim dünyasına ve ülkemize faydalı olacağı kanısındayız.

6. ÖZET

İlaçlar ile tedavi yüzyıllardır uygulanmakta olan bir yöntemdir. Opioidler opiumdan elde edilen ilaçlardır ve morfin, kodein, tebain gibi doğal ürünleri ve birçok semisentetik türevlerini içerir. Ağrı, zararlı bir stimulusa karşı verilen fizyolojik yanıttır; davranışsal ve sosyokültürel ölçüler arasındaki karmaşık etkileşim ile değişir. Son dönemlerde opioidlerin popüler kullanım alanı akut ağrıdır. Klinikte kullanılan en önemli opioidlerden birisi fentanildir. Fentanil intravenöz cerrahide ve tanı operasyonlarında kullanılan güçlü bir aneljizik ilaçtır. Fentanil oral transmukosal olarak veya transdermal depo bantlar şeklinde son zamanlarda özellikle kanser hastalarında kronik ağrı tedavisinde kullanılmaktadır. Opioidlerin etkileri ve yan etkileri hekimler tarafından bilinmeli, kullanımından kaçınılmamalıdır. Yanlış dozda kullanımı sonucu aşırı doz ölümlerine veya başka ilaç maddeleri ile birleşimi sonucu toksisitesinin artması ile ölümlere sebep olabilmektedir. Bunun için postmortem durumlarda fentanil konsantrasyonları kişinin medikal öyküsü ve otopsi bulguları bağlamında yorumlanması gerekmektedir. Dünyaya paralel olarak ülkemizde de hızla artış gösteren yasadışı madde kullanımı ve bunun suç artış oranı ile reddedilemez paralellik göstermesi, bu maddenin biyolojik örneklerde hızlı, güvenilir ve ucuz yöntemlerle tespiti için çalışmaların hızlanmasını doğurmuştur.

Bu çalışmada, LC-MS/MS yöntemi kullanılarak fentanil ve ana metaboliti norfentanilin idrardan yan yana tayini amacıyla idrarda hızlı, düşük tayin limitli, güvenilir, ucuz, yüksek geri kazanımlı ve pratik bir yöntem geliştirildi ve papaverin iç standart olarak kullanıldı.

Yöntem geçerli kılmada, seçicilik, doğrusallık, gözlem limiti (LOD), tayin limiti (LOQ) ve doğruluk parametreleri belirlendi. Özütleme yönteminin geri kazanımı fentanil ve norfentanil için sırasıyla 94,50 ($\pm 5,44$) ve 71,61 ($\pm 11,47$)' dir. Yönteme ilişkin idrarda gözlem limiti (LOD) fentanil ve norfentanil için sırasıyla 1,65 ng/mL, 16,50 ng/mL; tayin limiti (LOQ) fentanil ve norfentanil için sırasıyla 14,00 ng/mL, 42,00 ng/mL olup, yöntemin fentanil için 5,00 ng/mL - 500,00 ng/mL ve norfentanil için 10,00 ng/mL - 500,00 ng/mL değerleri arasında doğrusallık gösterdiği tespit edildi.

Geliştirilen yöntem ile İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Ağrı Bilim Dalı'nda fentanil tedavisi görmekte olan hastalardan alınan idrar örneklerinde fentanil ile ana metaboliti norfentanil oranlarının tayini için 5'i kontrol grubu 3'ü hasta olmak üzere toplam 8 kişi üzerinde çalışıldı.

İdrardan fentanil ve metaboliti norfentanilin tayini için geliştirilen yöntemin, fentanil ve norfentanil tayinine olanak vermesi, fentanil tedavisi gören kişilerin takibinde, fentanil kullanımına bağlı adli olguların aydınlatılmasında, fentanil kullanan kişilerdeki CYP3A4 geninin polimorfizm varlığının desteklenmesinde katkı sağlayacağı umulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Fentanil, Norfentanyl, Opioid, Akut Ağrı, LC-MS/MS, Tayin, İdrar, Geçerli Kılma.

7. SUMMARY

Drug therapy method has been practiced for centuries. Opioids are drugs derived from opium, and they include the natural products morphine, codeine, thebaine, and many semisynthetic derivatives. Pain is the physiologic response to a noxious stimulus; and modified by the complex interaction of behavioral, and sociocultural dimensions. Currently the popular clinical application of opioids is for acute pain relief. Fentanyl is one of the most important of the opioids which used in the clinic. Fentanyl, a potent analgesic drug, has traditionally been used intravenously in surgical or diagnostic operations.

Formulations with fentanyl in oral transmucosal delivery system and in transdermal depot-patch have also been developed against breakthrough pain in cancer patients. Physicians should know the effects and adverse effects of opioids and should not avoid using opioids. Urine norfentanyl concentrations found in cases where fentanyl alone was determined to be the cause of death were similar to cases where fentanyl was part of a mixed drug overdose. There was also considerable overlap between fentanyl concentrations in fentanyl-related overdose deaths compared to hospitalized patients being treated for chronic pain. Fentanyl concentrations in postmortem cases must be interpreted in the context of the deceased's past medical history and autopsy findings. This study explores practices and risk Dynamics associated with Fentanyl abuse, also considering public health implications. Illegal drug use in our country, paralel to the world and its parrallelity with the increase of crime in the world, caused acceleration of the studies for determination of these drug in biological materials,

using fast, reliable and economical methods.

In this report, LC–MS/MS methods to determine fentanyl as well as fentanyl and its main metabolite, norfentanyl, in human urine are presented together with validation data. Fentanyl and Norfentanyl quantitation from urine by LC-MS/MS, Papaverine were used as internal Standard.

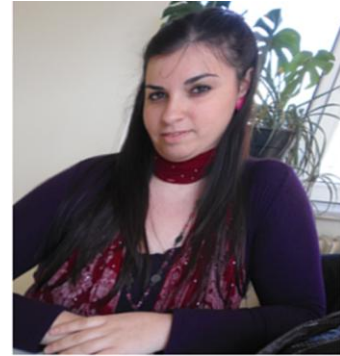
Specificity, linearity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ) and accuracy system suitability parameters were determined in the validation study. The recovery of the extraction method was for fentanyl 94,50 ($\pm 5,44$) and for norfentanyl 71,61 ($\pm 11,47$). It was found that the detection and quantification limits for the method were for fentanyl 1,65 and 14,00 ng/mL; for norfentanyl 16,50 and 42,00 ng/mL, in order. The method showed linear response between the values for fentanyl 5,00 – 500,00 ng/mL and for norfentanyl 10,00 - 500,00 ng/mL.

Overall, the this method better results compared to the underivatized one in terms of linearity, stability of samples and limit of detection and quantitation. This study consisted of 3 patients and 5 control group. In this study, a based liquid chromatography/ tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for the quantitative determination of total fentanil in urine has been developed.

Keywords: Fentanyl, Norfentanyl, Opioid, Acute Pain, LC-MS/MS, Determination, Urine, Validation.

8. ÖZGEÇMİŞ

Adı, Soyadı : Fatma ÇAVUŞ
Baba Adı : Ahmet
Anne Adı : Jale
Uyruğu : T.C.
Doğum yeri, tarihi : İstanbul, 08.04.1986
Telefon : 212 414 30 00 / 22840
İş Adresi : İstanbul Üniversitesi, Adli Tıp Enstitüsü, 34303, Cerrahpaşa, İstanbul
e-posta : ftmcvs@gmail.com
Yabancı Dil : Almanca (ileri seviyede), İngilizce (orta düzeyde)
Kullandığı programlar: MS Ofis 2009 (İyi Düzeyde), MS Windows (İyi Düzeyde)



SERTİFİKALAR

- Deutsches Sprachdiplom (Alman Dil Diploması)
- İngilizce Yabancı Dil Sertifikası
- Bilgisayar İşletmenliği - Operatör Sertifikası

EĞİTİM DURUMU

Yüksek Lisans : İstanbul Üniversitesi, Adli Tıp Enstitüsü, 2009-
Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği Bölümü, 2009
Lise : Gaziosmanpaşa Anadolu Lisesi, 2004

İŞ DENEYİMİ

1- Kasım 2011 – : İstanbul Üniversitesi, Adli Tıp Enstitüsü, Araştırma Görevlisi
2- 2009 – Haziran 2011: Gaziosmanpaşa Anadolu Lisesi, Biyoloji Öğretmenliği

9. KAYNAKLAR

- Alizadeh, N. (2002) Liquid-Liquid Extraction Of Palladium(II) From Hydrobromic Acid Media By Hexadecylpyridinium Bromide, *Anal. Sci. A.*, 18: 307-311.
- Allan, L., Hays, H., Jensen, N.H., Waroux, B.L., Bolt, M., Donald, R. (2001) Randomized Crossover Trial Of Transdermal Fentanyl And Sustained Release Oral Morphine For Treating Chronic Non Cancer Pain, *B.M.J.*; 322:1154-1158.
- Anonymous (2001) Basics of LC/MS, www.agilent.com/chem.
- Ardrey, R.E. (2003) Liquid Chromatography – Mass Spectrometry, An Introduction, John Wiley & Sons, West Sussex, England.
- Anderson, R.A., Al-Asmari, A.I. (2007) Method For Quantification Of Opioids And Their Metabolites In Autopsy Blood By Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry, *J. Anal. Toxicol.*, 31:394–408.
- Arvanitis, M.L., Satonik, R.C. (2002) Transdermal Fentanyl Abuse And Misuse, *Am J. Emerg. Med.*, 20: 58-59.
- Atila, A. (2006) HCL'nin Biyoanalitik Yöntem Validasyonu, Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
- Bagheri, H., Es-haggi, A., Khalilian, F., Rouini, M. (2007) Determination Of Fentanyl In Human Plasma By Head-Space solid-Phase Microextraction And Gas Chromatography- Mass Spectrometry, *Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*, 43:1763-1768.
- Bailey, P.L., Egan, T.D., Stanley, T.H. (2000) Intravenous opioid anesthetics, *Anesthesia*, Philadelphia, Churchill Livingstone, 273-376.
- Banks, J.F., Shen, S., Whitehouse, C.M., Fenn, J.B. (1994) Ultrasonically Assisted Electrospray Ionization For LC/MS Determination

- Of Nucleosides From A Transfer RNA Digest, *Anal. Chem.*, 66: 406-414.
- Bardsley, C.H., Marx, J.A., Hockberger, R.S., Walls, R.M., Adams, J.G., Barsan, W.G., Biros, M.H. (2010) *Rosen's Emergency Medicine Concepts and Clinical Practice*, An Imprint of Elsevier, 2:2047-2051.
- Barkin, R.L., Barkin, D. (2001) Pharmacologic Management Of Acute And Chronic Pain: Focus On Drug Interactions And Patient Specific Pharmacotherapeutic Selection, *South Med. J.*, 94:756-770.
- Baselt, R.C. (2004) Disposition Of Toxic Drugs And Chemicals In Man, In Baselt RC (Hrsg.) *Biomedical Publications*, Foster City, California, USA, 7th Ed.
- Beyazyürek, M., Şatır, T. (2000) Madde Kullanım Bozuklukları, *Psikiyatri Dünyası*, 4:50-56.
- Bökesoy, T.A., Çakıcı, İ., Melli, M. (2000) *Farmakoloji Ders Kitabı*, Türk Farmakoloji Derneği, 45-56.
- Brian, M. (2000) Introduction to Mass Spectrometry (MS), The Chemistry Hypermedia Project.
- Brill, S., Ginosar, Y., (2006) Davidson EM. Perioperative Management Of Chronic Pain Patients With Opioid Dependency, *Curr Opin Anaesth.*, 19:325-331.
- Brown, R., Kraus, C., Fleming, M., Reddy, S. (2004) Methadone Applied Pharmacology And Use As Adjunctive Treatment In Chronic Pain, *Postgrad Med. J.*, 654-659.
- Camu, F., Vanlersberghe, C. (2002) Pharmacology Of Systemic Analgesics, *Best Practice and Research Clinical Anesthesiology*, 4:475- 488.
- Chace, D.H., Diperna, J.C., Naylor, E.W. (1999) Laboratory Integration And Utilization Of Tandem Mass Spectrometry In Neonatal Screening A Model For Clinical Mass Spectrometry In The Next Millennium, *Acta. Paediatr.*, 432:45-47.

- Christie, J.M., Simmonds, M., Patt, R. (1998) Dose-Titration, Multicenter Study Of Oral Transmucosal Fentanyl Citrate For The Treatment Of Breakthrough Pain In Cancer Patients Using Transdermal Fentanyl For Persistent Pain, *J. Clin. Oncol.*, 16(10):3238-3245.
- Chuan, L., Jia, J.Y., Gui, Y., Liu, G., Shi, X., Li, S., Yu, C. (2010) Development Of A Liquid Chromatography- Isotope Dilution Mass Spectrometry Method For Quantification Of Fentanyl In Human Plasma, *Biomedical Chromatography*, 24:711-716.
- Clark, A.J., Ahmedzai, S., Allan, L.G., Camacho, F., Horbay, G.L., Richarz, U., Simpson, K. (2004) Efficacy And Safety Of Transdermal Fentanyl And Sustained Release Oral Morphine In Patients With Cancer And Chronic Non-Cancer Pain, *Curr Med. Res. Opin*, 20(9): 1419-1428.
- Clayton, P.T. (2009) Applications Of Mass Spectrometry In The Study Of Inborn Errors Of Metabolism, *J. Inher. Metab. Dis.*, 24: 139-150.
- Coda, B.A. (1996) Opioids, *Clinical Anesthesia*, 3rd edition, Philadelphia, Lippincott-Raven: 329-358.
- Cody, R.B. (2002) Electrospray Ionization Mass Spectrometry History, Theory, and Instrumentation in, *Applied Electrospray Mass Spectrometry Practical Spectroscopy Series*, Cilt 32, CRC Press, 409-432.
- Cole, J.M., Best, B.M., Pesce, A.J. (2010) Variability Of Transdermal Fentanyl Metabolism And Excretion In Pain Patients, *J. Opioid Manag.*, 6:29–39.
- Collett, B. (1998) Opioid Tolerance, The Clinical Perspective, *Br. J. Anaesth.*, 81: 58-68.
- Coon, T.P., Miller, M., Kaylor, D., Jones-Spangle, K. (2005) Rectal Insertion Of Fentanyl Patches, A New Route Of Toxicity, *Ann. Emerg. Med.*, 46(5): 437-38.
- Coopman, V., Cordonnier, J., Pien, K., Varenbergh, D.V. (2007) LC-MS/MS Analysis of Fentanyl and Norfentanyl in a Fatality

- Application of Multiple Durogesic® Transdermal Therapeutic Systems, *Forensic Science International*, 169: 223-227.
- Corinna, C. (2008) Korrelation Von Fentanyl- Und Midazolamserumspiegeln Mit Eeg-Befunden Und Sedierungstiefe Bei Beatmetem Pädiatrischen Intensivpatienten, Universität Freiburg, 8-10.
- Daly, A.K. (2003) Pharmacogenetics Of The Major Polymorphic Metabolizing Enzymes, *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 17:27-41.
- Davies G, Kingswood C, Street M. (1996) Pharmacokinetics Of Opioids In Renal Dysfunction, *Clin. Pharmacokinet.*, 31(6):410-422.
- Day, J., Slawson, M., Lugoand, R.A., Wilkins, D. (2003) Analysis Of Fentanyl And Norfentanyl In Human Plasma By Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Using Electrospray Ionization, *Journal Analytical Toxicology*, 27:513.
- Dean, A.J., Lee, D.C. (2010) Bedside Laboratory and Microbiologic Procedures, *Clinical Procedures in Emergency Medicine*, 5th ed, Saunders, An Imprint of Elsevier, 1289-1294.
- Decaestecker, T.N., Casteele, S.R., Wallemacq, P.E., Van Pethem, C.H., Defore, D.L., Van Bocxlaer, J.F. (2004) Information-Dependent Acquisition-Mediated LC-MS/MS Screening Procedure With Semiquantitative Potential, *Anal. Chem.*, 76: 6365-6373.
- Dhawan, B.N., Cesselin, F., Raghubir, R., Reisine, T., Bradley, P.B., Portoghese, P.S. (1996) International Union of Pharmacology XII. Classification of Opioid Receptors, *Pharmacological Reviews*, 48(4):567-586.
- Ducharme, J., Tintinalli, J.E., Stapczynski, J.S., Ma, O.J., Cline, D.M., Cydulka, R.K., Meckler, G.D. (2011) Acute Pain Management in Adults, *Tintinalli's Emergency Medicine, A Comprehensive Study*, 511-512.
- Duragesic® (2005) Fentanyl Transdermal System, Full Prescribing Information.

- Ebrahimzadeh, H., Yamini, Y., Gholizade, A., Sedighi, A., Kasraee, S. (2008) Determination Of Fentanyl İn Biological and Water Samples Using Single-Drop Liquid-Liquid-Liquid Mikroextraction Coupled With High-Performance Liquid Chromatography, *Analytica Chimica Acta*, 626:193-199.
- Edinboro, L.E., Poklis, A., Trautmann, D., Lowry, S., Backer, R., Harvey, C.M. (1997) Fatal Fentanyl İntoxication Following Excessive Transdermal Application, *J. Forensic Sci.*, 42(4):741-743.
- Erdine, S. (2000) Ağrı, 1. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri: 118-147; 494-509.
- Esener, Z. (1991) Klinik Anestezi, Logos Yayıncılık, Samsun, 76-78.
- Ersoy Ö. (2010) Küresel Uyuşturucu Sorununda Gri Alanlar, *Stratejik Düşünce Enstitüsü*, 10: 5-8.
- Eurachem (1998) The Fitness for Purpose of Analytical Methods, A Laboratory Guide to Metod Validation and Related Topics, (www.eurachem.org/guides/valid).
- Ferrante, F.M., Vadebonconer, T.R. (2000) Postoperative Pain Management, Philadelphia, Churchill Livingstone Inc.:1549-1585.
- Flanagan, R.J., Taylor, A., Watson, I.D., Whelpton, R. (2007) Fundamentals of Analytical Toxicology, John Wiley & Sons, England: 249-279.
- Fukuda, K. (2005) Intravenous Opioid Anestheticsü, *Miller's Anesthesia Vol 1*, Elsevier, Churchill Livingstone, USA: 379-439.
- Gaedigk, A., Bradford, L.D., Marcucci, K.A., Leeder, J.S. (2002) Unique CYP2D6 Activity Distribution And Genotype-Phenotype Discordance İn Black Americans, *Clin. Pharmacol. Ther.*, Jul,72(1): 76-89.
- Garg, A., Solas, D.W., Takahashi, L.H., Cassella, J.V. (2010) Forced degradation of fentanyl: Identification and analysis of impurities and Degradants, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 53:325–334.

- Geçici, Ö., Gökmen Z., Nebioglu M. (2010) Fentanyl Dependence Caused by the Non-Medical Use: A Case Report Klinik Psikofarmakoloji Bülteni, 20:255-257.
- Gelal, A. (2003) Ksenobiyotiklerin Emilim, Dağılım Ve Eliminasyonu, Farmakoloji Özel Dergisi, Volume: 1, No: 1.
- Glass, P.S., Gan, T.J., Howell, S. (1999) A Review Of The Pharmacokinetics And Pharmacodynamics Of Remifentanyl, Anesth. Analg., 89: 7 - 14.
- Gold, M.S., Melker, R.J., Dennis, D.M., Morey, T.E., Bajpai, L.K., Pomm, R., Frost A. K. (2006) Fentanyl Abuse And Dependence: Further Evidence For Second Hand Exposure Hypothesis., J. Addict. Dis., 25:15–21.
- Goldman, B. (2009) Fentanyl Use Among Street Drug Users In Toronto, Canada Behavioural Dynamics And Public Health Implications, International Journal of Drug Policy, 20: 91-92.
- Grauwiler, S.B. (2008) Development And Application Of A LC-MS/MS Method For The Analysis Of Plasma Bioavailabilities Of Different Cannabinoids After The Administration Of "Cannabis Sativa L." Extracts And Marinolm., Doktora Tezi, University Of Basel, Faculty Of Science.
- Grobosch, T., Weniger, S., Lampe, D. (2007) Fentanyl Analytics In A Case Of Fatal Misuse Of Transdermal Fentanyl, Bulletin of the international Association of Forensic Toxicologists, 37(2): 26-28.
- Grond, S. (2005) Wechsel Zwischen Verschiedenen Pflastersystemen- Sind Transdermale Therapeutische Systeme (TTS) in der Schmerztherapie Austauschbar Klinikarzt, 34(7): 10-12.
- Grond, S., Radbruch, L., Lehmann, K.A. (2000) Clinical Pharmacokinetics Of Transdermal Opioids Focus On Transdermal Fentanyl, Clin. Pharmacokinet., 38: 59-89.

- Guengerich, F.P. (2001) Common And Uncommon Cytochrome P450 Reactions Related To Metabolism And Chemical Toxicity, *Chem. Res. Toxicol.*, 14: 611-650.
- Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation (2001) Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center, <http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.html>.
- Gutstein, H.B., Akil, H., Brunton L.L., Lazo, J.S. (2006) Opioid Analgesics eds. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 11: 23-25.
- Güzeldemir, M.E. (1995) Kanser Ağrı Tedavisinde Temel Yaklaşımlar, *GATA Bülteni*, Cilt 37, 394-405.
- Hernandez-Avila, C.A., Burleson, J.A., Poling, J., Tennen, H., Rounsaville, B.J., Kranzler, H.R. (2000) Personality And Substance Use Disorders As Predictors Of Criminality, *Comprehensive Psychiatry*, 4: 276-283.
- Hochstrasser, D.F., Sanchez, J.C., Appel, R.D. (2002) Proteomics And Its Trends Facing Nature's Complexity, *Proteomics*, 2:807-12.
- Hoffmann, E., (1996) *J. Mass Spectrom.*, 31: 129.
- Hopson, L.R., Schwartz, R.B., Roberts, J.R., Hedges, J.R., Custalow, C.B. (2010) Pharmacologic Adjuncts to Intubation Clinical Procedures in Emergency Medicine, An Imprint of Elsevier, 5th ed Saunders.
- Hull, M.J., Juhascik, M., Mazur, F., Flomenbaum, M.A., Behonick, G.S. (2007) Fatalities Associated With Fentanyl And Co-Administered Cocaine Or Opiates, *J. Forensic Sci.*, 52:1383–1388.
- Huynh, N.-H., Tyrefors, N., Ekman, L., Johansson, M. (2005), Determination Of Fentanyl Plasma And Fentanyl And Norfentanyl In Human Urine Using LC-MS/MS, *Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*, 37:1095-1100.
- Iyer, L., Ratain, M.J. (1998) Pharmacogenetics And Cancer Chemotherapy, *Eur. J. Cancer.*, 34(10): 1493-1499.

- Jage, J. (2005) Opioid Tolerance And Dependence - Do They Matter, *Eur. J. Pain*: 157-160.
- Mehta, V., Lanford, L.M. (2006) Acute Pain Management For Opioid Dependant Patients, *Anaesthesia*: 259-276.
- James, K. H. (2004) Mass Spectrometry for Chromatographers, The Univerty of Akron.
- Janssen Pharmaceutica (2001) Duragesic (Fentanyl Transdermal System), Titusville (NJ), J. Janssen Pharmaceutica Products.
- Jeal, W., Benfield, P. (1997) Transdermal Fentanyl, A Review Of Its Pharmacological Properties And Therapeutic Efficacy In Pain Control, *Drugs*, 53(1):109-38.
- Jin, M., Gock, S.B., Jannetto, P.J. (2005) Pharmacogenomics as molecular autopsy for forensic toxicology: genotyping cytochrome P450 3A4*1B and 3A5*3 for 25 fentanyl cases, *J. Anal. Toxicol.* 29:590–598.
- Jin, M. (2005) Pharmacogenomics As Molecular Autopsy For Forensic Toxicology, Genotyping Cytochrome P450 3A4-1B And 3A5-3 For 25 Fentanyl Cases, *J. Anal. Toxicol.*, 29:590-595.
- Johansson, M. (2004) Determination Of Fentanyl In Human Plasma And Fentanyl And Norfentanyl In Human Urine Using LC-MS/MS, *Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*, 37: 1095-1100.
- Jonathan, G. (2007) Fentanyl Concentration In 23 Postmortem Cases From The Hennepin County Medical Examiner's Office, *Journal Forensic Science.*, 52: 978-981.
- Kanner, R. (2003) Addiction And Pain Management in, *Pain Management Secrets*, Hanley & Belfus, 2nd Ed: 210-213.
- Karcioğlu, Ö. (2008) Acil Serviste Girişimsel Sedasyon ve Analjezi, *Klinik Gelişim*, 21(4): 10-21.
- Karen, L. (2008) Oral Abuse of Fentanyl Patches (Durasic®): Seven Case Reports, *Journal Forensic Science*, 53: 222-225.

- Katz, N., Fanciullo, G.J. (2002) Role Of Urine Toxicology Testing İn The Management Of Chronic Opioid Therapy, Clin. J. Pain., 18(4):76–82.
- Kayaalp, S.O. (1998) Tıbbi Farmakoloji. 8. Baskı, Hacettepe Tas Kitapçılık, Ankara. 986-991.
- Kayaalp, S.O., Uzbay, İ.T. (2009) İlaç Kötüye Kullanımı Ve İlaç Bağımlılığı, In: Kayaalp Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, 11. Baskı, Pelikan Yayıncılık, Feryal Matbaacılık San. ve Tic. Ltd. Şti., Ankara: 816-836.
- Kayaalp, S.O. (2009) Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmako., 12. Baskı:34-36.
- Kayhan Z. (2004) Narkotik Analjezikler, Klinik Anestezi, Ankara, Logos Yayıncılık: 104-108.
- Keay, K.A., Crowfoot, A.J., Floyd, N.S. (1997) Cardiovascular Effects Of Microinjection Of Opioid Agonists Into The ‘Depressor Region’ Of The Ventrolateral Periaqueductal Gray Region, Brain Res., 762:61-71.
- Ketene, A., Köse, M.F., Şekerci, S., Hergüner, A., Oral, H., Dede, H. (2004) Postoperatif Ağrıda Transdermal Fentanil Kullanımı, Ankara Üniv Dikimevi Sağ. Hiz. Mes. Yük. Der., 2: 9-16.
- Kettler, R.E. (2006) How To Provide Practical And Safe Long Term Opioid Therapy For Chronic Pain in, Pain Medicine The requisites in Anesthesiology, USA,: 69-70.
- Kirpekar, F., Nordhoff, E., Larsen, L.K., Kristiansen, K., Roepstorff, P., Hillenkamp, F. (1998) DNA Sequence Analysis By Maldi Mass Spectrometry, Nucleic Acids Res., 26: 2554-2559.
- Kimura, S., Umeno, M., Skoda, R.C., Meyer, U.A., Gonzalez, F.J. (1989) The Human Debrisoquine 4-Hydroxylase (CYP2D) Locus: Sequence And Identification Of The Polymorphic CYP2D6 Gene, A Related Gene, And A Pseudogene, Am. J. Hum. Genet. 45: 889-904.

- Kirsh, K.L., Pasik, S.D. (2006) Palliative Care Of The Terminally İll Drug Addict, *Cancer Invest*, 24: 425-431.
- Klinik Anesteziyoloji (2004) Non Volatil Anestezik Ajanlar, Lange 3.baskı, Güneş Kitabevi Ankara: 167-168.
- Klockgether-Radke, A.P., Gaus, P., Neumann, P. (2002) Opioidintoxikation Durch Transdermales Fentanyl, *Anaesthesist*, 51(4): 269-71.
- Koch, D.E., Isaza, R., Carpenter, J.W., Hunter, R.P. (2004) Simultaneous Extraction And Quantitation Of Fentanyl And Norfentanyl From Primate Plasma With LC/MS Detection, *Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*, 34:577-584.
- Kornick, C.A., Palma, J.S., Moryl, N., Payne, R., (2003) Benefit Risk Assessment Of Transdermal Fentanyl For The Treatment Of Chronic Pain, *Drug Safety*, 26:951-973.
- Korhonen, A., Valanne, J., Jokela, R., Ravaska, P., Korttila, K. (2003) İntrathecal Hyperbaric Bupivacaine 3 Mg + Fentanyl 10 Mg For Outpatient Knee Arthroscopy Whit Tourniquet, *Acta Anaesthesiol Scand*, 47: 342-346.
- Kornick, C.A., Palma, J.S., Moryl, N., Payne, R. (2003) Obbens EAMT, Benefit Risk Assessment Of Transdermal Fentanyl For The Treatment Of Chronic Pain, *Drug Safety*, 26: 951-973.
- Kramer, C., Tawney, M. (1998) A Fatal Overdose Of Transdermally Administered Fentanyl, *J. Am Osteopath Assoc*, 98(7): 385.
- Kronstrand, R., Druid, H., Holmgren, P., Rajs, J. (1997) A Cluster Of Fentanyl-Related Deaths Among Drug Addicts İn Sweden, *Forensic Science International*, 88:1885-1895.
- Kuhlman, J., McCauly, R., Valouch, T. (2003) Fentanyl Use, Misuse, And Abuse: A Summary Of 23 Postmortem Cases, *J. Anal. Toxicol.* 2003;23: 499–504.
- Kuralay, F. (2003) Toksikolojide Mekanizmalar, Detoksikasyon Mekanizmaları, *Farmakoloji Özel Dergisi*, Volume: 1, No: 1.
- Labroo, R. (1997) Fentanyl Metabolism By Human Hepatic And Intestinal CYP450 3A4, Implications For Interindividual Variability İn

- Disposition, Efficacy, And Drug Interactions, Drug Metabolism And Disposition, 25: 1072-1079.
- Labroo, R. B., Thummel, K. E., Kunze, K. L., Podoll, T., Trager, W. F., Kharasch, E. D. (1995) Catalytic Role Of Cytochrome P4503A4 In Multiple Pathways Of Alfentanil Metabolism, Drug Metab. Dispos, 23:490–496.
- Law, B. F., Hettick, J.M., Myers, J.H., Siegel, P.D. (2010) Analytical Methodology and Assessment of Potential Second-Hand Exposure to Fentanyl in the Hospital Surgical Setting, Journal Of Addictive Diseases, 29:51-58.
- Lee, W. (2003) Drug Induced Hepatotoxicity, N. Engl. J. Med., 349: 474-485.
- Lehmann, K.A., Zech, D. (1992) Transdermal Fentanyl Clinical Pharmacology, J. Pain Symptom Manage, 7: 8-16.
- Lehotay, S.J., Hajslova, J. (2002) Trends Anal. Chem., 21: 686.
- Leon, J., Armstrong, S.C., Cozza, K.L., (2006) Clinical Guidelines for Psychiatrists for the Use of Pharmacogenetic Testing for CYP450 2D6 and CYP450 2C19, Psychosomatics, 47: 75–85.
- Liang, H.R., Foltz, R.L., Meng, M., Bennett, P. (2003) Ionization Enhancement In Atmospheric Pressure Chemical Ionization And Suppression In Electrospray Ionization Between Target Drugs And Stable-Isotope-Labeled Internal Standards In Quantitative Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry, Rapid Commun. Mass Spectrom, 17: 2815-2821.
- Liappas IA, Dimopoulos NP, Mellos E, (2004) Oral Transmucosal Abuse Of Transdermal Fentanyl, J. Psychopharmacol., 18:277-280.
- Likar, R., Sittl, R., (2001) Transdermale Therapeutische Systeme- Eigenschaften Und Anwendungen/ Transdermales Fentanyl (Durogesic®) Zur Schmerzbekämpfung In: Praxis Der Transdermalen Schmerztherapie, Science, 1: 14-26; 44-67.

- Lilleng PK, Mehlum LI, Bachs L. (2004) Deaths After Intravenous Misuse Of Transdermal Fentanyl, *J. Forensic Sci.*, 49:1364-1366.
- Lo, C.C. (2004) Sociodemographic Factors, Drug Abuse And Other Crimes, How They Vary Among Male And Female Arrestees, *Journal of Criminal Justice.*, 5: 399-409.
- Loper, K.A., Ready, B., Downey, M., Sandler, A.N., Nessly, M., Rapp, S., Badner, N. (1990) Epidural And Intravenous Fentanyl Infusions Are Clinically Equivalent After Knee Surgery, *Anesth. Analg.*, 70: 72-75.
- Lord, H., Pawliszyn, J. (2000) Microextraction Of Drugs, *Journal of Chromatography A.*, 902: 17-63.
- Magdalan, J. (2009) Severe Nonfatal Poisoning After Intravenous Abuse Of Transdermal Fentanyl-A Case Report *Przegl. Lek.*, 66:341-342.
- Manral, L., Gupta, P. K., Suryanarayana, M. V. S., Ganesan, K., Malhotra, R. C. (2009) Thermal Behaviour Of Fentanyl And Its Analogues During Flash Pyrolysis, *Journal Of Thermal Analysis And Calorimetry*, 96:531–534.
- Marcus, D.A. (2005) Opioids In Chronic Pain In: *Chronic Pain A Primary Guide To Practical Management*, Humana Press, USA, 275-284.
- Marino, P.L. (1997) Intravenous Opioids In *The ICU Book* 2. Ed. Williams&Wilkins, Pennsylvania, USA, 2(8): 124-127.
- Mark, S. (2006) Fentanyl Abuse and Depedence, Further Evidence For Second Hand Exposure Hypothesis, *Jornal of Addictive Diseases*, 25: 15-21.
- Martin, T.L., Woodall, K.L., McClellan, B.A. (2006) Fentanyl-related deaths in Ontario, Canada, toxicological findings and circumstances of death in 112 cases (2002–2004), *J. Anal. Toxicol.*, 30:603–610.
- Mayatepek, E., Zelezny, R., Lehmann, W.D., Hammond, J.W., Hoffmann, G.F.

- (2000) Defects In The Synthesis Of Cysteinyl Leukotrienes A New Group Of Inborn Error S Of Metabolism, *J. Inher. Metab. Dis.*, 23: 404-412.
- McAuliffe, P.F., Gold, M.S., Bajpai, L., Merves, M.L., Frost-Pineda, K., Pomm, R.M., Goldberger, B.A., Melker, R.J., Cend'an, J.C. (2006) Second-hand exposure to aerosolized intravenous anesthetics propofol and fentanyl may cause sensitization and subsequent opiate addiction among anesthesiologists and surgeons, *Med. Hypotheses*, 66: 874–82.
- McClain, B.C. (2000) Organization Of Pain Management Services For Children In *Practical Management Of Pain* Raj P.P., 3rd ed, Mosby, USA, 64-65.
- McGrath, K.K., Jenkins, A.J. (2009) Detection Of Drugs Of Forensic Importance In Postmortem Bone, *Am. J. Forensic Med. Pathol.*, 30:40–44.
- McGuire, D.B. (2004) Occurrence Of Cancer Pain, *J. Natl. Cancer Ins Monogr.*, C Pain Management, *Neurosurg Clin. N.*, 32:51-56; 297-306.
- Melanson, S.E., Kredlow, M.I., Jarolim, P. (2009) Analysis And Interpretation Of Drug Testing Results From Patients On Chronic Pain Therapy: A Clinical Laboratory Perspective, *Clin. Chem. Lab. Med.*, 47(8): 971–976.
- Meng, C.K., Fenn, J.B. (1990) Analyzing Organic Molecules With Electrospray Mass Spectrometry, *Biotechnol Lab.*, 8: 54-60.
- Meyer, U.A. (2001) Pharmacogenetics-Clinical Viewpoints in *Pharmacogenomics*: 135-150.
- Meyer, U.A. (2000) Pharmacogenetics And Adverse Drug Reactions, *Lancet*, 356: 1667-1671.
- Meyer, V.R. (2004) *Practical High- Performance Liquid Chromatography*, 4. Edition, John&Wiley Sons, Switzerland: 9.
- Michael, A., Frakes, R.N. (2003) Rapid Sequence Induction Medications An Update *Journal Of Emergency Nursing* Volume 29, Issue 6 , December: 533-540.

- Milenkova, K., Dimitrovska, A., Ugrinova, L., Jolevska, S.T. (2003) Simultaneous Determination Of Paracetamol, Pseudoephedrine Hydrochloride And Dextromethorphan Hydrobromide In Tablets By HPLC, Bulletin of the Chemists and Technologists of Macedonia, 22: 33-37.
- Miner, J.R., Paris, P.M., Yealy, D.M. (2010) Pain Management Rosen's Emergency Medicine Concepts and Clinical Practice, Vol 2. 7th ed, Saunders, An Imprint of Elsevier Inc.: 2410-2428.
- Moon, J.M., Byeong, J. C. (2007) Fentanyl Intoxication Caused By Abuse Of Transdermal Fentanyl, The Journal Of Emergency Medicine, 40: 37-40.
- Moore, C., Marinetti, C., Coulter, C., Crompton, K. (2008) Analysis of Pain Management Drugs, Specifically Fentanyl, in Hair, Application to Forensic Specimens, Forensic Science International, 176: 47-50.
- Morgan EG. (2002) Clinical Anesthesiology, A Lange Medical Book, Third Edition, Los Angeles, A Division of the McGraw Hill Companies:164.
- Morgan, E.G., Mikhail, M.S. (1998) Clinical Anesthesiology, Third Edition, Appleton and Lange Publishing, 37: 221-225.
- Morgan, E.G., Mikhail, M.S., Murray, M.J., Larson, C.P. (Eds) (2002) Clinical Anesthesiology, New York, Mc Graw Hill Co.: 127-77, 819-48.
- Muijsers, R.B.R., Wagstaff, A.J. (2001) Transdermal Fentanyl An Updated Review Of Its Pharmacological Properties And Therapeutic Efficacy In Chronic Cancer Pain Control, Drugs, 61: 2289-2307.
- Myles, P.S., Hunt, J.O., Fletcher, H., Watts, J., Bain, D., Silvers, A., Buckland, M.R. (2002) Remifentanyl, Fentanyl, And Cardiac Surgery, A Double-Blinded, Randomized, Controlled Trial Of Costs And Outcomes, Anesth. Analg., Oct, 95(4): 805-812.
- Naylor, E.W., Chace, D.H. (1999) Automated Tandem Mass Spectrometry For

- Mass Newborn Screening For Disorders In Fatty Acid, Organic Acid And Amino Acid Metabolism, *J. Child Neurol*, 14: 4-8.
- Nelson L., Shwaner, R. (2009) Transdermal Fentanyl: Pharmacology And Toxicology, *J. Med. Toxicol*, 5: 230–241.
- Nelson, M., L., James, H. W. (2010) Detection Of Acute Fentanyl Exposure In Fresh And Decomposed Skeletal Tissues Part II: The Effect Of Dose–Death Interval, *Forensic Science International*, 194: 60-66.
- Nugent, M., Davis, C. (2001) Long-Term Observations Of Patients Receiving Transdermal Fentanyl After A Randomized Trial, *J. Pain Symptom Manage*, 21(5): 385-391.
- Özcan, H. (2005) İnhalasyon İndüksiyonu Uygulanan Koroner Arter Revaskülarizasyon Operasyonlarında İki Farklı Hipnotik Düzeyin Hemodinamik Parametrelere Etkisi (Uzmanlık Tezi).
- Özcengiz, D., Özbek, H. (1998) Anestezi El Kitabı, 1. Baskı-Adana, Nobel Tıp Kitabevi, 441-459.
- Papich, M.G. (2000) Pharmacologic Considerations For Opiate Analgesic And Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs, *J. Vet. Clin., Of North Am.*, 30(4): 815-837.
- Paradis, C., Dufresne, C., Bolon, M., Boulieu, R. (2002) Solid-Phase Microextraction Of Human Plasma Samples For Determination Of Sufentanil By Gas Chromatography– Mass Spectrometry, *Ther. Drug Monit.*, 24: 768–774.
- Parker, R.K. (1999) Postoperative Analgesia, Systemic Techniques in. Chestnut OH, Obstetric Anesthesia Principles and Practice. Mosby, Inc. Second Edition: 509-520.
- Pascoe, P.J. (2000) Opioid Analgesics, *J. Vet. Clin. Of North Am.*, 30(4): 757-772.
- Peer, C.J., Shakleya, D.M., Younis, I.R., Kraner, J.C. and Callery, P.S. (2007) Direct-Injection Mass Spectrometric Method For The Rapid

Identification Of Fentanyl And Norfentanyl In Postmortem Urine Of Six Drug-Overdose Cases, *J. Anal. Tox.*, 31: 515-522.

Peters, F.T., Drummer, O.H., Musshoff, F. (2007) Validation Of New Method, *Forensic Science International*, 165: 216-224.

Poklis, A., Backer, R. (2004) Urine Concentrations Of Fentanyl And Norfentanyl During Application Of Duragesic Transdermal Patches, *J. Anal. Toxicol.*, 28(6): 422-425.

Portenoy, R.K., Lesage, P. (1999) Management Of Cancer Pain, *Lancet*, 353: 1695-1700.

Proddutur, S., Sadrieh, N., Wokovich, A.M., Doub, W.H., Westenberger, B.J., Buhse, L., Transdermal Delivery Of Fentanyl From Matrix And Reservoir Systems: Effect Of Heat And Compromised Skin, *Journal Of Pharmaceutical Sciences*, 99: 2357-2366.

Radbruch, L., Sabatowski, R., Petzke, F., Radbruch, A.B., Grond, S. (2001) Transdermal Fentanyl For The Management Of Cancer Pain, A Survey Of 1005 Patients, *Palliat Med.*, 15(4): 309- 321.

Ratan, A., Robert, H., Habib, E., Tong, J.G. (2001) Remifentanyl Prevents the Hemodynamic Response to Orotracheal Intubation *the Journal of Applied Research in Clinical and Experimental Therapeutics*.

Reisine, T., Pasternak, G. (1996) Opioid Analgesics And Antagonists, Goodman and Gilman's *The Pharmacological Basis Of Therapeutics*, New York (NY), McGraw-Hill: 543-544.

Reves, J.G., Glass, P.S.A., Lubarsky, D.A. (2005) Intravenous Nonopioid Anesthetics, *Miller's Anesthesia*, Vol 1 (Ed. R.D. Miller)'de, Elsevier, Churchill Livingstone, USA: 317-379.

Reeves, M.D., Ginifer, C.J. (2002) Fatal Intravenous Misuse Of Transdermal Fentanyl, *Med. J. Aust.*, 177(10): 552-553.

Rieder, M.J., Brosen, K. (1996) Are Pharmacokinetic Drug Interactions With The SSRI's An Issue., *Int. Clin. Psychopharmacol.*, 11: 23-27.

Roberge, R.J., Krenzelok, E.P., Mrvos, R. (2000) Transdermal Drug Delivery

- System Exposure Outcomes, *J. Emerg. Med.*, 18:147-151.
- Robert, P. (2006) Comparison of Fentanyl Extraction from Two Different Transdermal Patch, *Journal Forensic Science*, 51: 939.
- Ronald, D. M. (2010) *Miller's Anesthesia*, Seventh Edition, Churchill Livingstone Elsevier: 795-803.
- Schmidhammer, H., (1998) Opioid Receptor Antagonists, *Progress in Medicinal Chemistry*, 35-83.
- Schmidt, G., Herbold, M., Peters, F. (2003) *Methodenvalidierung Im Forensisch Toxikologischen Labor*, Arvecon GmbH.
- Scholz J, Steinfath M, Schulz M. (1996) Clinical Pharmacokinetics Of Alfentanil, Fentanyl And Sufentanil, An Update, *Clin Pharmacokinet*, Oct, 31(4): 275-292.
- Schug, S.A., Zech, D., Grond, S. (1992) Adverse Effects Of Systemic Opioid Analgesics, *Drug Safety*, 7: 200-213.
- Sear, J.W. (1998) Recent Advances And Developments In The Clinical Use Of Iv Opioids During The Perioperative Period, *Br. J. Anesth.*, 81:38-50.
- Shah, V.P., Midha, K.K., Findlay, J.W. (2000) Bioanalytical Method Validation – A Revisit With A Decade Of Progress, *Pharm Res*, 17: 1551.
- Silverstein, J. H., Rieders, M. F., McMullin, M., Schulman, S., Zahl, K. (1993) An Analysis Of The Duration Of Fentanyl And Its Metabolites In Urine And Saliva. *Anesth. Analg.*, 76: 618–621.
- Skoog, D.A., Holler, J.F., Nieman, T.A. (1998) *In Principles Of Instrumental Analysis, Molecular Mass Spectrometry*, Philadelphia, Saunders College Publishing: 498-534.
- Skoog, D.A., Holler, F.J., Timothy, A.N. (1999) *Principles of Instrumental Analysis*, Tercüme, Kılıç, E., Köseoğlu, F., Yılmaz, H., *Enstrümental Analiz İlkeleri*, Ankara, Bilim Yayıncılık: 299-351; 725-777.

- Smart, R.G. (1997) The Reflection On The Epidemiology Of Heroin And Narcotic Addiction From The Treatment Data, National Institute.
- Smith, E.T., (2000) The Salting Out Of Ethanol And Water: A Colorful Illustration Of Intermolecular Forces, 502-506.
- Smialek, J.E., Levine, B., Chin, L., Wu, S.C., Jenkins, A.J. (1994) A Fentanyl Epidemic In Maryland, J. Forensic Sci., 39(1): 159-164.
- Snyder, M.L., Jarolim, P., Melanson, S.E.F. (2011) A New Automated Urine Fentanyl Immunoassay: Technical Performance And Clinical Utility For Monitoring Fentanyl Compliance, Clinica Chimica Acta, 412: 946-951.
- Sojo, L.E., Lum, G., Chee, P. (2003) Internal Standard Signal Suppression By Co-Eluting Analyte In Isotope-Dilution LC-ESI-MS, The Analyst, 128: 51-54.
- Solassol, I., Bresolle, F., Caumette, L., Garcia, F., Paujol, S., Culine, S., Pinguet, F. (2011) Inter- And Intraindividual Variabilities In Pharmacokinetics Of Fentanyl After Repeated 72-Hour Transdermal Applications In Cancer Pain Patients, Clinica Chimica Acta, 412:946-951.
- Southam, M. (1995) Transdermal Fentanyl Therapy, System Design, Pharmacokinetics And Efficacy, Anticancer Drugs, 3: 29-34.
- Stan, H.J., Linkerhagner, M. (1996) J. Chromotogr. A.: 369-750.
- Stanley, T.H. (1992) The History And Development Of The Fentanyl Series. J Pain Symptom Manage, 7: 3-7.
- Stannard, C., Boot, S. (2004) The Opioids, Pain, Edinburgh, Elsevier Churchill Livingstone 2'nd Edit, 4: 46-76.
- Staud, F., Ceckova, M., Micuda, S., Pavsek, P. (2010) Expression And Function Of P-Glycoprotein In Normal Tissues, Effect On Pharmacokinetics, Methods Mol. Biol., 596: 199-222.
- Stein, C., Rosow, C.E. (2004) Analgesics, Anesthetic Pharmacology- Physiologic Principles And Clinical Practice, (Ed. A.S. Evers, M. Maze)'de. Elsevier, Churchill Livingstone, USA: 457-471.

- Stephens, E. (2011) Toxicity, Opioids, Emedicine From M.D., 32: 153-158.
- Stoelting, R.K. (1999) Opioid Agonist And Antagonist. Pharmacology & Physiology in Anesthetic Practice 3th edition, Lippincott-Raven, Philadelphia: 77-111.
- Streisand, J.B., Varvel, J.R., Stanski, D.R. (1991) Absorption And Bioavailability Of Oral Transmucosal Fentanyl Citrate, Anesthesiology, 75:223-229.
- Suelter, C. H., Watson, J.T. (1990) Practical Aspect of Gas Chromatography-Mass Spectrometry, New York, John Wiley and Sons Ltd., 2-42.
- Trescot, A.M., Glaser, S.E., Hansen, H., Benyamin, R., Patel, S., Manchikanti, L. (2008) Effectiveness of opioids in the treatment of chronic non-cancer pain, Pain Physician, 11:181-200.
- Tuncer, S. (2006) Nöropatik ağrıda Transdermal Fentanil Kullanımı, Olgu Sunumu, Clinical Concepts and Commentary, Ağrı, 18:4.
- Tüzüner, F. (2010) Anestezi Yoğun Bakım Ağrı, Mn Medikal & Nobel: 214.
- Uzbay, İ.T. (2004) Psikofarmakolojinin Temelleri ve Deneysel Teknikler, Çizgi Tıp Kitabevi, Ankara: 306-312.
- Uzbay, İ.T., Yüksel, N. (2003) Madde Kötüye Kullanımı Ve Bağımlılığı, Psikofarmakoloji, Çizgi Tıp Kitabevi, Yenilenmiş 2. Baskı, Ankara: 485-520.
- Validation of Analytical Procedures (1996) Proceedings of the International Conference on Harmonisation (ICH), Commission of the European Communities.
- Van Der Hof, G.R., Van Zoonen, P. (1999) J. Chromatogr. A., 843 301.
- Verplaetse, R., Tytgat, J. (2010) Development and Validation of a Sensitive Ultra Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Method for the Analysis of Fentanyl and its Major Metabolite Norfentanyl in Urine and Whole Blood in Forensic Context, Journal of Chromatography B., 1-10.
- Wadelius, M. (2006) Possible Fluconazole- Fentanyl Interaction-A Case Report, Journal Clinical Pharmacology, 62: 491-492.

- Wang, W.L., Cone, E.J., Zacny, J. (1993) Immunoassay Evidence For Fentanyl In Hair Of Surgery Patients, *Forensic Sci. Int.*, 61:65–72.
- Wasan, A.D., Wootton, J., Jamison, R.N. (2005) Dealing With Difficult Patients In Your Pain Practice, *Reg Anesth Pain Med*, 30(2): 184-192.
- Weinmann, W., Vogt, S. , Goerke, R., Müller, C., Bromberger, A. (2000) Simultaneous Determination Of THC-COOH And THC-COOH-Glucuronide In Urine Samples By LC/MS/MS, *Forensic Science International*, 113: 381-387.
- Weinshilboum, R. (2003) Inheritance And Drug Response., *N. Engl. J. Med.*, 348: 529-537.
- Wheeler, E., Hardie, T., Klemm, P., Ibrinke, A., Schonewolf, E., Scott, J. (2010) Level of Pain and Waiting Time in the Emergency Department, *Pain Manag. Nurs.*, 11(2): 108-114.
- Winecker, E. (2006) Hydrocodone and Fentanyl Abuse is Growing Problem, *Clinical & Forensic Toxicology News*, September: 1-6.
- Wolf, C.E., Poklis, A. (2005) A Rapid HPLC Procedure For Analysis Of Analgesic Pharmaceutical Mixtures For Quality Assurance And Drug Diversion Testing. *J. Anal. Toxicol.*, 29: 711–4.
- Wong, S.C., Curtis, J.A., Wingert, W.E. (2008) Concurrent Detection Of Heroin, Fentanyl, And Xylazine In Seven Drug-Related Deaths Reported From The Philadelphia Medical Examiner' s Office, *Journal Forensic Science*, 53: 495-498.
- World Health Organization Expert Committee (1992) Cancer Pain Relief And Paliative Care, Geneva, Switzerland.
- Wu, Q., Cheng, X., Hofstadler, S.A., Smith, R.D. (1996) Specific Metal-Oligonucleotide Binding Studied By High Resolution Tandem Mass Spectrometry, *J. Mass Spectrom.*, 31: 669-75.
- Yıldız, A., Genç, O., Bektaş, S., (1997) Enstrümental Analiz Yöntemleri, *Hacettepe Üniversitesi Yayınları*, 257: 417-419.
- Yuan, R., Zhang, X., Deng, Q., Wu, Y., Xiang, G. (2011) Impact Of CYP3A4*1G Polymorphism On Metabolism Of Fentanyl In Chinese

- Patients Undergoing Lower Abdominal Surgery, *Clinica Chimica Acta*, 412: 755-760.
- Yücel, A. (1997) Hasta Kontrollü analjezi, 1. Baskı, MER Matbaacılık & Yayıncılık, İstanbul, 64-76.
- Zengeroğlu, S., Zengeroğlu, A. M. (2001) Lippincott's Illustrated Reviews, Güneş Kitabevi, 2. Baskı, 67-73.
- Zhang, W. (2009) CYP3A4*1G Genetic Polymorphism Influences CYP3A4 Activity And Response To Fentanyl In Chinese Gynecologic Patients, *Journal Clinical Pharmacogenetics*, 66: 61-66.
- Zimmermann, M., Waap, I. (2005) Individuelle Aspekte Der Lebensqualität Von Patienten Mit Chronischen Schmerzen. Anwendungsbeobachtung Zur Therapie Mit Fentanyl- TTS, *MMW- Fortschr. Med.*, 1: 33-40.
- Zhang, W., Chang, Y.Z., Kan, Q.C. (2010) CYP3A4*1G Genetic Polymorphism Influences CYP3A Activity And Response To Fentanyl In Chinese Gynecologic Patients, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 66: 61-66.

Web kaynakları

- <http://www.cypalleles.ki.se/>

(Son erişim: 15 Temmuz 2012)

10. EKLER

Ek 1. Etik Kurul Onay Yazısı.

 **T.C. İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ**
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
DEKANLIĞI

Sayı : 8954
Konu :
İstanbul / /
09 Mart 2011

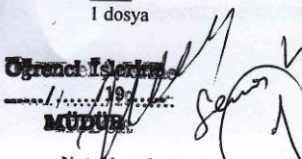
I.Ü. Adli Tıp Enstitüsü Müdürlüğüne

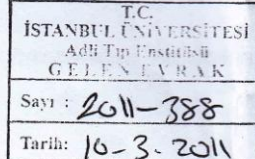
İLGİ: 10.02.2011 tarihli, 208 sayılı yazınıza:

Enstitünüz Fen Bilimleri Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç.Dr. Münevver AÇIKOL'un danışmanlığında Yüksek Lis. Öğr. Biyolog Fatma ÇAVUŞ'un yürüteceği "Fentanil ve Metaboliti Norfentanilin İdrardan Sıvı Kromatografi – Tandem Kütle Spektrometrisi (LC-MS/MS) Sistemi İle Yana Yana Tayini" başlıklı Yüksek Lisans Tezi hakkında ilgi yazınız ve ekleri 01 Mart 2011 tarihinde toplanan Fakültemiz Klinik Araştırmalar Etik Değerlendirme Kurulunca müzakere edilmiş olup, etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinizi, durumun adı geçen anabilim dalı başkanlığına bildirilmesini saygılarımla rica ederim.

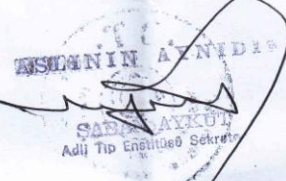
Eki:
1 dosya


Prof.Dr.Fatih ALTINDAŞ
Dekan Yardımcısı ve Klinik Araştırmalar Etik Değerlendirme Kurulu Başkanı


T.C. İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
Adli Tıp Enstitüsü
GELEN EVRAK
Sayı : 2011-388
Tarih: 10-3-2011


Öğrenci İstektir
1/...../.....
MÜDÜR

Not: Yanıtlarda yazmanızın gün sayısının belirtilmesi rica olunur.Tel(0212)4143000


Adli Tıp Enstitüsü Sekreteri

Ek 2. “Bilgilendirilmiş Onam Formu” Örneği.

Projenin Yürütüldüğü Kuruluş: İstanbul Üniversitesi, Adli Tıp Enstitüsü Fen Bilimleri Anabilim Dalı.

Projenin Adı: Fentanil ve Metaboliti Norfentanilin İdrardan Sıvı Kromatografi -Tandem Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS) Sistemi İle Yan Yana Tayini

Projenin Amacı: Fentanil metaboliti olan Norfentanil’in, idrardan tayini için güvenilir bir analiz metodu geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu analiz için kullanılacak yöntem yüksek basınçlı sıvı kromatografisi/ kütle spektroskopisi yöntemidir.

Bu çalışma için bireylerden idrar örneklerinin alınması esnasında, bireye herhangi bir zarar verilmesi ve tehlike oluşması söz konusu değildir. Araştırmanın katılımcıya herhangi bir etkisi yoktur. Kişi yazılı onay vermiş olsa da araştırmanın herhangi bir döneminde araştırmadan vazgeçmekte özgürdür. Bu durumda araştırmacı, katılımcının örneklerini derhal imha edecektir. Ayrıca, araştırmacı tarafından da gerek görüldüğünde katılımcının araştırma dışı bırakılabileceği bildirilebilir.

Kişinin kimlik bilgileri ve tüm kayıtları saklı tutulacaktır, hiçbir surette kimse ile paylaşılmayacaktır. Bilgilerin kullanımında şifre kullanılacaktır. Katılımcının çalışmadan herhangi bir nedenle ayrılması durumunda; tüm kayıtları silinecektir.

Çalışma sırasında araştırma amacıyla yapılacak analiz giderleri için kişinin kendisinden veya bağlı olduğu sosyal güvenlik kuruluşundan hiçbir ücret talep edilmeyecektir. Ayrıca kendisine de bir ödeme yapılmayacaktır.

Bilgilendirilmiş onam: Bilgilendirilmiş onam formunu okudum ve anladım yukarıda adı geçen çalışma için biyolojik örnek vermeyi kabul ediyorum. İ.Ü Adli Tıp Enstitüsü’nün toksikolojik inceleme sonuçlarımı anonim bir şekilde bilimsel yayınlarda kullanmalarını kabul ettiğimi beyan ederim.

Araştırmaya Gönüllü Katılan Kişinin

Adı:
Soyadı:
Cinsiyeti:
Yaşı:
İmzası:

Proje Yürütücüsü: Fatma Çavuş

İmza:
Tel: 5447257039
e-posta: ftmcvs@gmail.com

Kişi reşit değilse yasal temsilcinin:

Adı:
Soyadı:
İmza:

Tanık Hastane Personelinin:

Adı:
Soyadı:
İmza:

Ek 3. “Hasta Bilgi Formu” Örneği.

“FENTANİL VE METABOLİTİ NORFENTANİLİN İDRARDAN SIVI KROMATOĞRAFI -TANDEM KÜTLE SPEKTROMETRESİ (LC-MS/MS) SİSTEMİ İLE YAN YANA TAYİNİ” başlıklı yüksek lisans tezi için biyolojik örnek alınan hastaya ve kullandığı ilaç(lar)a özgü bilgiler:

Hastanın			
Adı Soyadı:			
Yaşı:			
Cinsiyeti:			
Kilosu:			
Teşhis:		Teşhis tarihi:	
Tedavi şekli:	Yatan: ()	Ayakta: ()	
Kullanmakta olduğu ilaçlar:			
İlacın adı:	Kullanım süresi:	Günlük dozu:	Hekimin Görüşü:
Sahip olduğu başka diğer hastalık(lar):			
Var:		Yok:	
		Varsa adı:	
Varsa kullandığı diğer ilaçlar ve günlük dozu:			
İlaç dışında kullandığı maddeler:			
Sigara:			
Alkol:			
Uyutucu/Uyuşturucu:			
Diğer:			

İlaca özgü bilgiler:

İlacın adı:	Alındığı saat:	Alınma miktarı:	Formulasyonu (Tablet, ampul vb)

Alınan biyolojik örneğe özgü bilgiler:

İdrar Miktar(lar)ı:

Alınma saat(ler)i: