

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ADLİ TIP ANABİLİM DALI

**KOKAİN VE ANA METABOLİTİ
BENZOİLEKGONİNİN TAVŞAN KİLİNDİ VE
KANINDA GC/MS İLE BELİRLENMESİ**

Kimyager PINAR EFEOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DANIŞMANI
Doç. Dr. AHMET HİLAL**

ADANA-2010

**T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ADLI TIP ANABİLİM DALI**

**KOKAİN VE ANA METABOLİTİ
BENZOİLEKGONİNİN TAVŞAN KILINDA VE
KANINDA GC/MS İLE BELİRLENMESİ**

Kimyager PINAR EFEOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DANIŞMANI
Doç. Dr. AHMET HİLAL**

**Bu tez Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Bütçesinden
TF 2009-YL 14 nolu proje olarak desteklenmiştir.**

Tez No:

ADANA-2010

Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Adli Tıp Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütölmüş olan **Kokain ve Ana Metaboliti Benzoilekgoninin Tavşan Kılında ve Kanında GC/ MS ile Belirlenmesi** adlı çalışma aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 8/11/2010

Tez Sınav Jürisi

Doç. Dr. Ahmet Hilal
Çukurova Üniversitesi
Başkan

Prof. Dr. Mete Korkut Gülmen
Çukurova Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. Yusuf Karataş
Çukurova Üniversitesi
Üye

Yukarıdaki tez, Yönetim Kurulun2010 tarih
ve.....sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof.Dr.Halil KASAP
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tezimin oluşum ve çalışma aşamasında bilgi ve deneyimleri ile desteklerini esirgemeyen tez danışmanım Doç. Dr. Ahmet Hilal'e,

Eğitim ve tez dönemi içerisinde gösterdikleri ilgi ve destekleri için Anabilim Dalı ğretim yeleri Prof. Dr. Mete K. Gülmen, Prof. Dr. Necmi ekin, Prof. Dr. Behnan Alper'e,

Bu tezin laboratuvar çalışması ve yazım aşamasında gösterdiği sabır ve desteğiyle bir an olsun yüzünden gülümsemeyi eksik etmeyen Kimya Yüksek Müh. Nebile Dağlıoğlu'na,

Çalışmalarımın her safhasında yardımını sürekli gördüğüm değerli arkadaşım Fadile Yener ve Adli Tıp Anabilim Dalı alışanlarına,

Eğitimimin her aşamasında maddi ve manevi destek sağlayan, yol gösteren ve her zaman hoşgörüsüne sığındığım canım aileme,

TF 2009YL14 nolu proje olarak bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde maddi katkı sağlayan Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkür ederim.

Kimyager Pınar Efeoğlu

İÇİNDEKİLER

Kabul ve onay	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe	3
2.2. Kokain Eldesi	4
2.2.1. Kullanım Yolları	5
2.2.2. Kokain Yapısı	5
2.2.3. Kokainin Metabolizması	6
2.3. Kıl	8
2.3.1. Kılın Yapısı	9
2.3.2. Kılın Büyümesi	11
2.3.3. Kıl Analizlerinin Tarihçesi	12
2.4. Kıl İçerisine Madde Geçiş Mekanizması	13
2.5. Kılı Toplama ve Saklama İşlemi	15
2.6. Kıl Analizleri	16
2.6.1. Dekontaminasyon İşlemi	16
2.6.2. Kılın Hazırlanması	16
2.6.3. İnkübasyon	17
2.6.3.1. Bazik Parçalama	17
2.6.3.2. Asidik Parçalama	17
2.6.3.3. Enzimatik Parçalama	18

2.6.4. Ekstraksiyon	18
2.6.5. Analiz	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM	20
3.1. Kıl Örnekleri	20
3.2. Kan Örnekleri	20
3.3. Deneylerde Kullanılan Malzemeler	20
3.3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	20
3.3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	21
3.4. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	22
3.4.1. pH 7’de 0.1M KH ₂ PO ₄ Tamponunun Hazırlanması	22
3.4.2. 0.1 N HCl Çözeltisinin Hazırlanması	22
3.4.3. CH ₂ Cl ₂ : 2 propanol: NH ₄ OH Solüsyonunun Hazırlanması	22
3.4.4. 1 M KOH Çözeltisi	22
3.5. GazKromatografi/Kütle Spektrometresi Çalışma Şartları	23
3.6. Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması	24
3.7. Çalışma Örneklerinin Hazırlanması	25
3.7.1. Örneklerin Toplanması ve Yıkama İşlemi	25
3.7.2. Kıl Örneklerinin İnkübasyonu	25
3.7.3. Kıl örneklerinin Ekstraksiyonu	26
3.7.4. Kan örneklerinin Ekstraksiyonu	27
3.7.5. Veri Analizi	27
4. BULGULAR	28
5. TARTIŞMA	32
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	37
7. KAYNAKLAR	38
ÖZGEÇMİŞ	43

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kokainin yapısı	6
Şekil 2.2 Kokainin (COC) metabolitleri olan benzoilekgonin (BZE), ekgonin (ECG), ekgoninmetilester (EME), norkokain (NCOC), kokoetilen (CE), anhidroekgoninmetil estere (AEME) biyotransformasyonu	8
Şekil 2.3. Kılın folikülündeki formasyon	10
Şekil 2.4. Kılın yapısı	11
Şekil 2.5. Kıl içerisine madde geçişi	14
Şekil 3.1. Gaz kromatografi/ Kütle Spektrometresi (GC/MS)	23
Şekil 3.2. Kokainin kalibrasyon eğrisi	24
Şekil 3.3. Benzoilekgonin kalibrasyon eğrisi	25
Şekil 3.4. Katı-sıvı ekstraksiyon manifoldu	26
Şekil 4.1. 25ng/mg standart ve internal standart karışımının GC/MS’deki kromatogramı	28
Şekil 4.2. Tavşan kılında tespit edilen kokain ve benzoilekgonin pikleri	29
Şekil 4.3. Kan örneğinin GC/MS’deki kromatogramı	31

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Tespit edilen kokain miktarı	29
Çizelge 4.2. Grup 1 (5mg/kg)'de benzoilekgoninin bulunma sıklığı	30
Çizelge 4.3. Grup 2 (10 mg/kg)'de benzoilekgoninin bulunma sıklığı	30

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

µg: mikrogram
µl: Mikrolitre
BSTFA:TMCS: N-O-(bistrimetilsilil)trifloroasetamid: trimetilklorosilan
A.B.D: Amerika Birleşik Devletleri
BE: benzoilekgonin
cc: Cubic cantimeter
CH₂Cl₂: Diklorometan
cm: santimetre
coc: kokain
dk: dakika
FDA: saf besin ve ilaç bürosu
GC/MS: gaz kromatografi/ kütle spektrometresi
HCl : hidroklorik asit
HLB: Hidrophilic-Lipophilic Balance
kg: kilogram
KH₂PO₄: Potasyum Bifosfat
KOH: Potasyum hidroksit
L:litre
LC/MS: sıvı kromatografi/kütle spektrometresi
M.Ö. : Milattan önce
M.S. : Milattan sonra
m/z: kütle/yük oranı
M: molarite
MCX: Mixed-cation-exchange
mg: miligram
mm: milimetre
NaOH: sodyum hidroksit
ng: nanogram
°C: Celcius
pH: potansiyel hidrojen
ppm: milyonda bir kısım (mg/l)
RIA: radyoimmunoassay
rpm: Revolutions per minute / dakikadaki devir sayısı
SIM: seçerek iyon izleme
TLC: ince tabaka kromatografi
β: beta

ÖZET

Kokain ve Ana Metaboliti Benzoilekgoninin Tavşan Kılında ve Kanında GC/MS ile Belirlenmesi

Günümüzde gençler ve yetişkinler tarafından kullanımı gittikçe artan uyutucu/uyuşturucu maddelerin kişi ve toplumlar üzerindeki olumsuz etkileri ekonomik ve sosyal bir sorun oluşturmaktadır. Uyutucu/uyuşturucu madde kullanımının önlenmesi açısından bu maddeleri kullanan kişilerin belirlenmesi önem kazanmaktadır. Son zamanlarda kan ve idrar gibi biyolojik örneklerin yanı sıra kıl toksikolojik analizlerde rutin olarak kullanılmaktadır. Kılın kolay elde edilmesi, invaziv bir yöntem olmaması, saklama ve nakil kolaylığı ve kişinin madde kullanımı ile ilgili geriye dönük bilgi vermesi kıl analizlerine avantaj sağlamaktadır.

Bu çalışmada Yeni Zelanda cinsi tavşanlara intraperitoneal olarak tek doz kokain uygulanmıştır. Bunu takiben 12 gün boyunca kıl örnekleri toplanmıştır. Uygulamadan sonraki ilk beş gün kokain gözlemlenirken benzoilekgonin üç günden sonra tespit edilememiştir. Benzoilekgoninin bulunma sıklığı kokainden daha düşüktür. Dedeksiyon ve tespit limiti kokain ve benzoilekgonin için hesaplanmıştır. Gruplar arasında herhangi bir farka rastlanmamıştır.

Elde edilen sonuçlar kokain ve ana metaboliti benzoilekgoninin kılta GC/MS cihazı ile Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı Adli Toksikoloji Laboratuvarında rutin hizmette kullanılabilirliğini gösterilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Kıl, Kokain, Tavşan, Adli Toksikoloji

ABSTRACT

Determination of Cocaine and Its Major Metabolite Benzoylecgonine in Rabbit Hair and Blood by GC/MS

Nowadays, use of abused drugs is getting increasing between young people and adults. Negative influences of abused drugs constitute economic and social problems on individual and society. It is important to determine people who use these drugs to prevent the use of drugs. In recent years, Hair is routinely used on toxicological analysis as well as biological samples such as blood and urine. The major practical advantages of hair testing are larger detection windows; the sample collection is non-invasive; it is easy to transport and store it and also hair analysis can provide a retrospective calendar of an individual's drug use.

In this study, New Zealand rabbits were intraperitoneally administered a single dose of cocaine. It is following that hair samples were collected during 12 days. According to our data, while cocaine is appeared the first five days after single dose of cocaine administration, Benzoylecgonine is not detected after three days. Frequency of benzoylecgonine existence is lower than cocaine. Limit of Detection (LOD) and Limit of Quantification(LOQ) were calculated for cocaine and benzoylecgonine. We did not find differences between groups.

These results demonstrate that determination of cocaine and its metabolite cocaine in hair by GC/MS can be employed for routine analysis at the Forensic Toxicology Laboratory of the Çukurova University, Faculty of Medicine, Department of Forensic Medicine.

Keywords: Hair, Cocaine, Rabbit, Forensic Toxicology

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Genel adli tıp uygulamalarında, gerek klinik muayenelerde gerekse postmortem incelemelerde olguların değerlendirilmesi ve doğru bir şekilde yorumlanabilmesi için diğer inceleme yöntemlerinin yanı sıra toksikolojik inceleme önemli bir yer tutmaktadır.

Belli bir dozda alındığı zaman; kişinin sinir sistemi üzerinde etki ederek, akli, fiziki ve psikolojik dengesini bozan, fert ve toplum içerisinde sosyal çöküntü meydana getiren, alışkanlık ve bağımlılık yapan, kanunların kullanılmasını, bulundurulmasını ve satışını yasakladığı narkotik olarak tanımlanan maddelere denir.

Türk Ceza Kanunun 190. Maddesi uyarınca; kullanmak için uyuşturucu veya uyarıcı madde satın alan, kabul eden veya bulunduran kişi, bir yıldan iki yıla kadar hapis cezası ile cezalandırılır.

Uyutucu/uyuşturucu maddelerin varlığı ve kullanımı insanlık tarihi kadar eskidir. Kenevir, afyon, koka bitkileri ilkel ve gelişmiş toplumların dikkatini çekmiştir. Bu üç maddenin aromasında yer alan kimyasal maddelerin kimi zaman hastalıklarda, dinsel törenlerde ve keyif verici olarak kullanıldığı bilinmektedir. Uyutucu/uyuşturucu maddelerin çoğu hızla tolerans gelişimine yol açar. Aynı etkinin oluşabilmesi için giderek artan miktarda maddeye gereksinim duyulur.

Günümüzde gençler ve yetişkinler tarafından kullanımı gittikçe artan uyutucu-uyuşturucu maddelerin, kişi ve toplumlar üzerindeki etkileri ekonomik ve sosyal bir sorun oluşturmaktadır. Uyutucu-uyuşturucu maddelerin kullanımının önlenmesi açısından bu maddeleri kullanan kişilerin belirlenmesi önem kazanmaktadır. Uyutucu-uyuşturucu maddelerin biyolojik örneklerde tespiti adli toksikolojinin önemli uğraşlarından biridir. Kişilerin madde kullanıp kullanmadıkları genel olarak kan ve idrar analizleri sonucunda belirlenmektedir. Vücuda alınan uyutucu-uyuşturucu madde metabolize olduktan sonra çeşitli yollarla vücuttan atılmaktadır. Kullanılan maddenin türüne, dozuna, kullanılış şekline ve metabolizma yoluna bağlı olarak bu maddelerin kan ve idrardaki tayini kullanıldıktan sonraki birkaç gün için mümkün olabilmektedir. Halbuki kullanılan maddelerin çoğu metabolize olduktan sonra metabolitleri halinde

vücut kıllarına (saç, sakal, pubik kılları vb.) yerleşebilmekte ve kıl yapısında bozunmadan muhafaza edilmektedir. Kılın kolay elde edilebilmesi, gerektiğinde tekrar temini, saklama ve nakil kolaylığı, invaziv bir yöntem olmaması ve kişinin madde kullanımının geçmişi (günlerden aylara hatta yıllara kadar) ile ilgili bilgi vermesi kan ve idrar analizlerine göre üstünlük sağlamıştır¹⁻⁴.

Son yıllarda ülkemizde kokain kullanımının artması ülkemizin bu madde için hedef ülkelerden biri olma yolunda olduğunu ve yavaş yavaş bir kokain pazarının oluştuğunu göstermektedir. Bu nedenle, ülkemizde giderek artan bir kokain bağımlılığından söz edilebilir.

Uyutucu-uyuşturucu madde tayini pek çok çalışmada insan saçında yapılmasına rağmen bu çalışmada örnek toplamada yaşanan sıkıntılardan ötürü hayvan çalışması planlanmıştır.

Yapılacak çalışma ile adli ve klinik toksikoloji laboratuvarı olarak hizmet veren laboratuvarımız için uyutucu-uyuşturucu madde analizlerinde kan ve idrara göre daha kolay elde edilen ve daha güvenilir bir biyolojik örnek olan saçta madde analizi yöntemi geliştirilerek uygulamaya konulması planlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Kokain, *Erythroxylum coca* bitkisinin yapraklarında bulunan doğal olarak oluşan bir maddedir. Güney Amerika'ya özgü bu bitki aynı zamanda Afrika, Güney Asya ve Avustralya'da yetiştirilir. 3000 yıl önce güney Amerika yerlileri açlık hissini köreltmek ve bitkinliklerini azaltmak için koka bitkisinin yapraklarını çiğnemişlerdir¹. Cartmell ve ark. M.Ö. 2000 ve M.S. 1500 tarihleri arasında And dağları bölgesinde koka yapraklarını çiğneyen Şilili mumyaların kılında kokainin ana metaboliti olan benzoilekgonin varlığını radyoimmünosay analizleri yaparak dikkat çekici sonuçlar ortaya çıkarmıştır^{2,3}.

Kokain alkaloidinin izolasyonu ilk defa Almanya'da 1859 yılında Albert Niemann tarafından anestezik özellikleri ile birlikte karakterize edilmiştir. Niemann bu alkaloidin acı bir tadı olduğunu ve dilde tuhaf bir hissizlik, uyuşma meydana getirdiğini belirtmiştir. 1880 yılında Von Anrep kokainin deri altına infiltre edildiğinde derinin iğnenin batışına karşı duyarsız hale geldiğini görerek bu maddenin klinik uygulamada lokal anestezik olarak kullanılmasını önermiştir. Psikoanalizin babası olarak bilinen Sigmund Freud 1884 yılında kokainin fizyolojik etkileri üzerine genel bir araştırma yapmış ve meydana getirdiği neşe durumunu ve öforiyi tasvir ederek kokainin önemli bir terapötik potansiyele sahip olduğunu iddia etmiştir. Kokainin merkezi sinir sistemi (M.S.S.) üzerindeki etkisinden çok etkilenen Freud, kokaini bir meslektaşını morfin bağımlılığından kurtarmak için kullanmış ve bunda başarılı olmuştur. Ancak modern zamanın ilk kokain bağımlısını yaratmıştır. Aynı yıl Carl Koller göz ameliyatlarında, Hall ise diş hekimliğinde lokal anestezi olarak kokaini kullanmıştır. 1885 yılında Amerikalı cerrah Halsted kokainin sinir liflerinde uyarı iletimini bloke ettiğini göstererek cerrahide kullanmaya başlamıştır^{4,5,6}.

1863 yılında Angelo Mariani adlı bir kimyager Vin Mariani olarak adlandırdığı içerisinde kokain olan şarabı piyasaya sunarak kokainin popüler bir madde olmasına sebep olmuştur. Koka bitkisinden kokaini ekstrakte ettikten sonra şarapta çözücü olarak

etanölü kullanmıştır. 1886 yılında John Slith Pemberton kokain-kafein karışımını Coca-Cola ismi ile pazarlamaya başlamıştır¹.

1891 yılından itibaren kokainin çok ciddi tehlikeleri fark edilmiş ve 200 adet sistemik zehirlenme olayı rapor edilerek bu olayların 13 tanesi ölümle sonuçlanmıştır. 1906 yılında A.B.D. Saf Besin ve İlaç Bürosu (FDA) kokain kullanımını kontrol etmeye çalışmış ve Coca-Cola şirketi içeceklerinden kokaini çıkarmıştır. 1914 yılında Harrison Narkotik Bürosu A.B.D de kokaini, eroin gibi aynı sınırlamalar ve cezalar ile birlikte narkotik maddeler listesine koymuştur. 1970 yılında İlaç Suistimali Önleme ve Kontrol Komitesi kokaini suistimal oranı yüksek fakat tıbbi kullanımına yasal olarak izin verilen bir ilaç olarak sınıflandırmıştır. Kokainin kulak, burun ve boğaz ameliyatları için lokal anestezi ve vazokonstriktör olarak kullanımına yasal olarak izin verilmiştir^{5,6}.

Günümüzde klinik uygulamalarda daha az toksik olan sentetik anestezi ilaçlar kokainin yerini almıştır.

2.2. Kokain Eldesi

Koka bitkisinden kokain ekstrakte edilirken koka bitkisinin yaprakları yoğun bir madde izole edilene kadar kerosen gibi bir çözücüyle iyice ıslatılır. %40-80 kokain içeren bu madde hidroklorik asit ile muamele edilerek kokain hidroklorür tuzuna veya kokain tozuna dönüştürülür. Kokain tuzu suda çözülebilir ve enjekte edilebilir. Fakat piroliz boyunca yıkıldığı için sigara gibi içilemez. İçilmeden önce ya krak ya da serbest baz kokainin alkali formuna dönüştürülür. Her iki madde de aynı koka bitkisinden sentezlenip aynı kimyasal yapıyı paylaştıklarına rağmen farklı teknikler kullanılarak hazırlanmış olup farklı fiziksel özelliklere sahiptir.

Serbest baz kokaini (freebase) elde etmek için kokain hidroklorür tozu suda eritilir ve amonyak gibi bir baz eklenir. Daha sonra eter ya da benzer bir çözücü kokain bazını eritmesi için ilave edilir. Evaporasyon vasıtasıyla eter çözeltisinden serbest baz kokaini elde edilir. Krak kokain, kokain hidroklorür'ün soda veya sodyum bikarbonat ile yoğrulup ısıtılması sonucu oluşan beyaz bir çökeltidir. Bu formdaki kokain normal kokainden daha saf ve yoğundur^{1,5,7,8}.

Kokain içicilerinin en yaygın kullandıkları yöntem serbest bazdır. Serbest baz oldukça düşük sıcaklıklarda uçucu hale gelir. Organizma üzerinde en güçlü etkiyi serbest baz sağlar. Ancak krak kokain elde ederken organik çözücü kullanılmadığından dolayı yöntemin tehlikesiz ve basit olması krak kokain kullanımını arttırmıştır. Hangi şekilde hazırlanmış olursa olsun organizmaya giriş yoluna ve alınan doza bağlı olmaksızın kokainin sistemik dolaşımında uğradığı kimyasal değişiklikler birbirinin aynıdır^{5,6}.

2.2.1. Kullanım Yolları

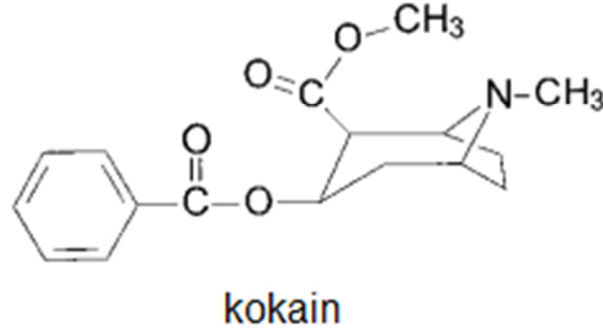
Kokain dünyanın pek çok yerinde en sık suistimal edilen maddelerden biridir. Kokain pek çok şekilde ve çok geniş doz aralıklarında kullanılır⁹. Kişiler kokaini sigara gibi içerek, çiğneyerek, buruna direkt çekerek, ağız yoluyla, dilaltından ve damar içi yoldan kullanırlar. Kokainin farmokokinetik özelliği fiziksel/kimyasal formuna, uygulama yoluna, genetik yapıya ve alkolle aynı anda tüketimine bağlıdır⁴.

Kokain kullananların büyük çoğunluğu, kokain tozunu burnun kapillerlerinden mukozasına çekmek suretiyle alırlar. Rahatlama etkileri 20-45 dakika içerisinde başlar. Uzun süre bu şekilde kokain kullanan kişilerde burun akıntısı, mukoza erozyonu ve daha seyrek olarak burun kıkırdak septumunda delinme olur⁵.

2.2.2. Kokain Yapısı

Kokain lokal anestezikler grubuna giren tropan halkası ihtiva eden ester yapılı, doğal kaynaklı bir alkaloittir. Benzoik asit ve bir azotlu halka olan metilekgonin içerir. Yapısal olarak hidrofobik ve hidrofilik grupları içerir. Hidrofobik kısım benzen halkası, hidrofilik kısım ise ikincil veya tersiyer amindir. Nem çekici özelliğe sahiptir ve erime derecesi yüksek olduğundan (197⁰C) ısıtma ile bozular. Suda kolayca çözünemediğinden intravenöz kullanıma uygundur. Serbest baz kokain erime derecesi düşük olduğundan (96-98⁰C) sigara ile içmeye uygundur.

Kokainin letal dozu 70 kg bir insan için 500 mg.dır. Bağımlılık kazanmış kişilerde bu doz 1-2 grama ulaşır^{5,10}.



Şekil 2.1. Kokainin yapısı

2.2.3. Kokainin Metabolizması

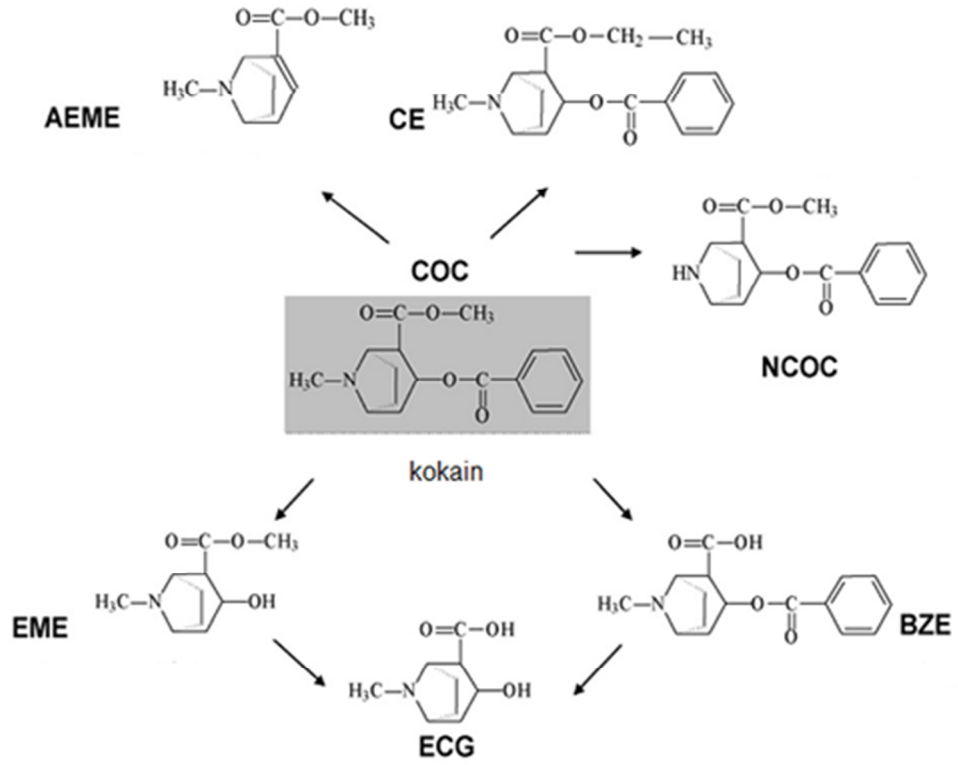
Sistemik olarak kokain; öfori etkisi oluşturan, fiziksel dayanıklılığı ve mental kapasiteyi arttıran, bitkinlik hissini ve iştahı azaltan, bazı zamanlarda cinsel ilgiyi arttıran, merkezi sinir sistemini uyaran bir maddedir. Bu uyarıcı etkilerinden dolayı kokain suistimal edilen bir ilaçtır. Aynı zamanda kişinin kan basıncının, sıcaklığının ve kalp atış hızının artmasına neden olur. Çok yüksek dozlarda ölüme sebebiyet verebilir. Kronik kokain kullanan kişilerde anksiyite artar, paranoya, halüsinasyonlar ve algısal değişimler gelişir. Kokain psikolojik olarak bağımlılık yapıcıdır.

Kokain zayıf bir bazdır. Kokain hızlı bir şekilde birçok metabolitine metabolize olur. Kokainin metabolizmasında esteraz enzimleri önemli bir rol oynar. İnsanlarda ve diğer memelilerde plazma ve karaciğer esteraz aktivitesinin en yüksek olduğu bölümlerdir. Kokainin metabolizması benzoilekgonin ve ekgonin metil ester oluşması için ester fonksiyonlarının hidroliziyle hızlı bir şekilde başlar. Benzoilekgonin biyolojik sıvılarda kendiliğinden oluşurken ekgonin metil esterinin hidrolizinden kandaki ve karaciğerdeki kolinesteraz enzimleri sorumludur. Kokain metabolizmasında N-Metilasyon ile kokainin norkokaine dönüşümü oldukça düşük bir orandadır. Kokaetilen

ise kokain ve alkolün aynı anda tüketilmesiyle karşılıklı esterleşme reaksiyonu sonucu oluşur^{4,10}

Ortalama kokain atılımı intranasal yolla 75 dakika, oral yol ile 48 dakika ve intravenöz yolla 54 dakikadır⁵. Yarılanma ömrü kişiler arasındaki kolinesteraz düzeylerindeki farklılığa, uygulanma yolu ve dozuna bağlı olarak değişmektedir¹.

Plazma ve karaciğer kolinesteraz enzimi kokaini benzoilekgonin ve ekgonin metil ester olarak hidroliz eder. Bu nedenle kokain tespit ederken değişmeden atılan kokain yerine idrardaki metabolitlerine bakılır. İdrar analizlerinin non-invaziv olması, analizi gerçekleştirecek cihazın uygun maliyetli ticari kit içermesi ve ilaç miktarının idrarda yüksek olması ön izleme testlerinde idrarın kullanılmasını arttırmıştır. Benzoilekgonin idrarda kromatografik yöntemler ile 24-72 saat içerisinde tespit edilebilir. Kanda kokainin yarılanma ömrü yaklaşık olarak 1 saattir. Kokain kanda ya da plazmada 5-6 saat sonra tespit edilebilir ve maksimum konsantrasyona ulaşır. Benzoilekgoninin pik plazma konsantrasyonu kokainin intravenöz uygulanması veya sigara gibi içilmesinden sonraki yaklaşık 90 dakika içinde meydana gelir¹¹⁻¹⁴.



Şekil 2.2 Kokainin (COC) metabolitleri olan benzoilekgonin(BZE), ekgonin (ECG), ekgoninmetilester (EME), norkokain (NCOC), kokoetilen (CE), anhidroekgoninmetil estere (AEME) biyotransformasyonu

2.3. Kıl

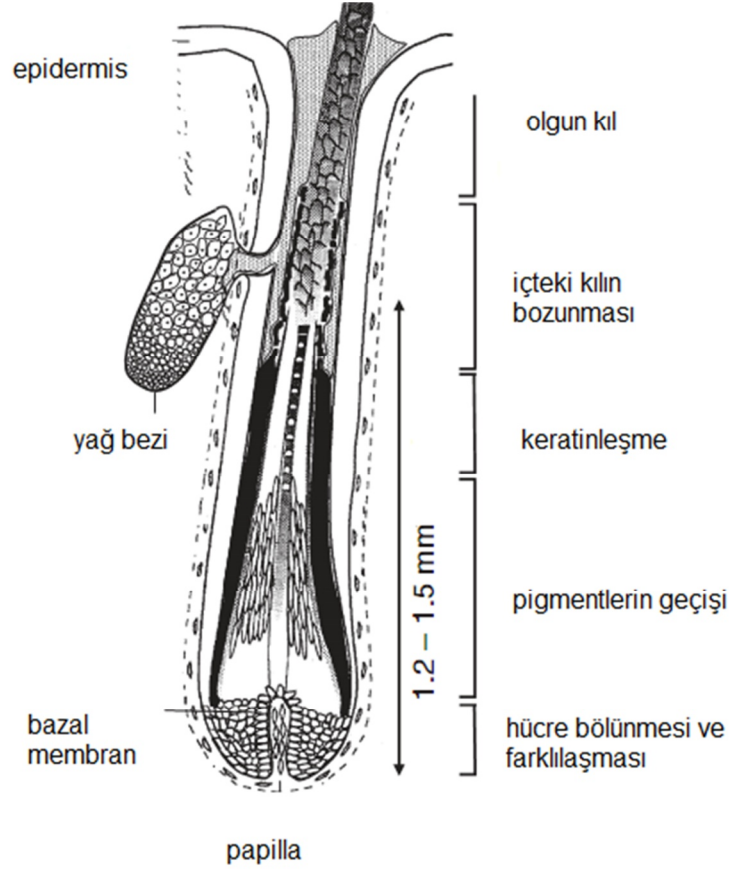
Son yıllarda uyuşturucu madde kullanımındaki artışa bağlı olarak klinik kimya, adli ve klinik toksikoloji alanlarında uyuşturucu madde tespiti için idrar ve kan numunelerine alternatif olarak kıl kullanılmaktadır¹⁵.

Kıl, kronik ve geçmiş tüketimin geriye dönük araştırmasını mümkün kılan daha uzun dedeksiyon penceresine sahip olmasından dolayı toksikolojik analizler için kullanılan kan ve idrar gibi diğer materyallerden farklılaşır. Örnek toplama işlemi non-invazivdir. Kıl sert ve dayanıklı yapısından dolayı spesifik ön hazırlıklar olmadan kolayca taşınabilir ve saklanabilir^{10,16,17}.

2.3.1. Kılın Yapısı

Kıl kişilerde renk, miktar ve şekil olarak farklı, yapı olarak aynı görünmesine rağmen insan anatomisinin çok karmaşık bir parçasıdır. Kıl memelilerin derisindeki farklılaşmış organların bir ürünü olup %65- 95 i protein (esasen keratin), %15-35 i su, geriye kalanı ise yağ ve minerallerden oluşmaktadır. Kıl iç ve dış olmak üzere iki ayrı alana sahiptir. Deri yüzeyinin 3-5 mm aşağısında yer alan kıl küçük bir keseye benzeyen, yağ ve apokrin bezleriyle birleşmiş folikül içerisinde büyür. Yağ bezleri kılın parlaklığı ve hacmi için gereklidir. Apokrin bezi ise içerdiği yağlı maddenin bozunmasıyla oluşan bir vücut kokusu verir. Kıl folikülü kılın büyümesi için gerekli olan aminoasit, enerji, oksijen sağlamak amacıyla etrafı zengin kapiler kan damarlarıyla çevrilidir.

Bir kılın filizlenmesi hücrelerin bölünüp farklılıklaştığı folikül tabanında bulunan matriks hücreleri (keratinosit ve melanosit) tarafından gerçekleştirilir. En hızlı gelişen insan dokularından birisi matrik hücre döngüsüdür. Hızlı mitozlar kılı kıl kökü ağzındaki doğrultuda olan keratinleşme bölgesine geçişi zorlar. Burada melanin ve keratin sentezlenir. Melanin, kıla rengini verir ve bazal membranda yer alan melanositler tarafından üretilir. Keratin, yüksek miktarda kükürt içeren özel proteinden meydana gelir ve kıl gövdesinde uzun lifler oluşturur. Hücreler keratinleşmeye başladığı zaman bozulmaya başlayarak çekirdeklerini yok ederler ve su açığa çıkarırlar.



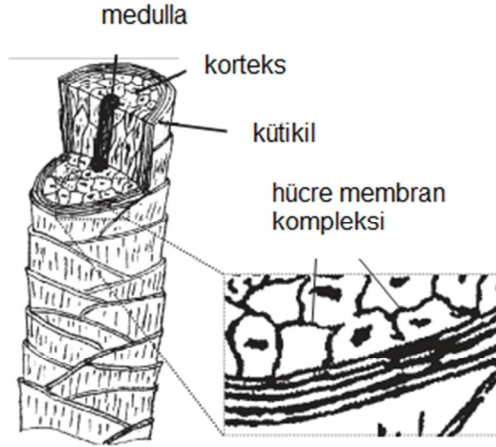
Şekil 2.3. Kılın folikülündeki formasyon

Hücre membran kompleksi protein ve protein-lipid kompleksinden meydana gelir. Kılın kimyasal ve mekanik etkiye dayanıklı olmasını sağlar. Bir kıl aynı türde bir telden oluşmamıştır. Onun yerine kütikıl, korteks ve medulla olarak adlandırılan üç ortak merkezli yapıyla birlikte hücre membran kompleksine yapışmış keratinize olmuş hücrelerden meydana gelir.

Kütikıl uzayan hücrelerin birbirinin üzerine bindiği tek bir tabakadan oluşur ve içteki lifleri korur. Pigmenti olmayan kütikıl kimyasal maddelerle bozunur, mekanik etkilerle yaralanır veya yaşlanırsa kıl gövdesi yıpranır ve dökülür.

Korteks kıl gövdesinin en hacimli kısmıdır. Pigmenti olan korteks stabilitenin ve renk kompozisyonunun kıl boyunca yayılmasından sorumludur. Korteks hücreleri arasında fusi olarak adlandırılan çok küçük boşluklar yer alır. İlk olarak fusi sıvı ile doldurulur. Fakat kıl büyüdüğü ve kuruduğu için sıvı hava ile yer değiştirir.

Medulla kılın en içteki merkezinde yer alır ve medular hücrelerden meydana gelir. Bir insanda medulla kıl miktarının çok küçük bir yüzdesini oluşturur. Genel olarak kıl fiberinin çapı arttığı için medullanın boyutu da artar^{18,19}.



Şekil 2.4. Kılın yapısı

2.3.2. Kılın Büyümesi

Yetişkin bir insanda yaklaşık olarak 5 milyon kıl folikülü olduğu tahmin edilmektedir. Bunun 1 milyonu baştadır.

Kıl sürekli olarak büyümeyi. Büyüme ve dinlenme dönemleri halinde büyür. Kıl anagen faz (büyüme), catagen faz (geçiş) ve telogen faz (dinlenme) olmak üzere üç dönemde uzar. Yaklaşık olarak kılın %85 i büyüme evresinde geri kalanı ise dinlenme döneminde.

Anagen kılın aktif olarak büyüme fazıdır. Folikülün bazal membranında yer alan hücreler hızlı bir şekilde bölünür. Kıl hücreleri foliküler kanal içerisinde yukarıya doğru yeni kılı iter. Kütikül, korteks ve medulla hücreleri farklılaşır ve keratinleşme başlar.

Catagen faz anagen fazı takiben gerçekleşen kısa geçiş evresidir. Bu faz boyunca hücre bölünmesi durur ve kıl gövdesi tamamıyla keratinize olur. Bu geçiş döneminden

sonra kıl folikülü talogen olarak adlandırılan bir dinlenme dönemine girer ve büyüme tamamen durdurulur. Kılın büyüme safhası 4-8 yıl, geçiş ve dinlenme fazları ise sırasıyla, birkaç hafta ve 4-6 aydır. Saç genelde bir ayda 0.6 cm ile 1.4 cm arasında uzar.

Anagen ve telogen safhalarındaki oran yani kılın uzama hızı ırka, cinsiyete, yaşa ve kişinin sağlık durumuna bağlı olarak değişir. Tüm kılların farklı hızlarda uzaması kıl analizlerinde kılın nereden alındığı ve sonuçların yorumlanması konusunda önemli kriterler oluşturur^{16,18,20}.

2.3.3. Kıl Analizlerinin Tarihçesi

İnsan kılında zehirlerin tespitinde ilk vaka 1858 yılında Hope tarafından Adli Tıp Uygulama Dergisinde yayımlandı. Hope 11 yıl sonra mezardan çıkarılan kişinin saçında arseniği tespit etti. Bunu takiben yaklaşık 100 yıl sonra, 1954 yılında Goldblum kobayların kılında amfetamin maddesini tanımladı.

1960 ve 1970 yıllarında kıl analizleri arsenik, kurşun, cıva gibi toksik ağır metallerle maruziyeti değerlendirmek için kullanıldı. Bu ng seviyede tespiti izin veren atomik absorpsiyon spektrometresi kullanılarak başarıldı. O zamanda organik maddeler özellikle uyuşturucu için kılın incelenmesi analitik metotların yeteri kadar hassas olmamasından dolayı mümkün değildi. Radyoaktif izotoplarla işaretlenmiş uyuşturucuların vasıtasıyla bu maddelerin kandan kıla taşınabileceği ve orada birikebileceği kanıtlandı. Bu ilk araştırmalardan 10 yıl sonra radyoimmunoassay (RIA) aracılığıyla kılda çeşitli organik uyuşturucuların varlığını göstermek mümkündü. 1979'da Baumgartner ve ark. RIA kullanarak eroin kullanan kişilerin kılında morfini tespit ederek ilk yayını yayımladılar. Kıl uzunluğu boyunca morfin konsantrasyonundaki farklılıkların uyuşturucu kullanım zamanıyla korelasyon halinde olduğunu buldular.

1981 yılında Smith ve Pomposini sodyum dodesülfat çözeltisi ile ekstraksiyon yaptıktan sonra RIA yöntemiyle fenobarbitali buldular. 1983 yılında ise Arnold ve Püschel barbitürat ve methaqualone tespiti için RIA kitlerini kullandılar. Fakat Arnold

kodeinin radyoimmunoassay ile iyi bir cross reaksiyonuna sahip olmasından ötürü bu kitleri morfin için spesifik olan kitlerle değiştirdi.

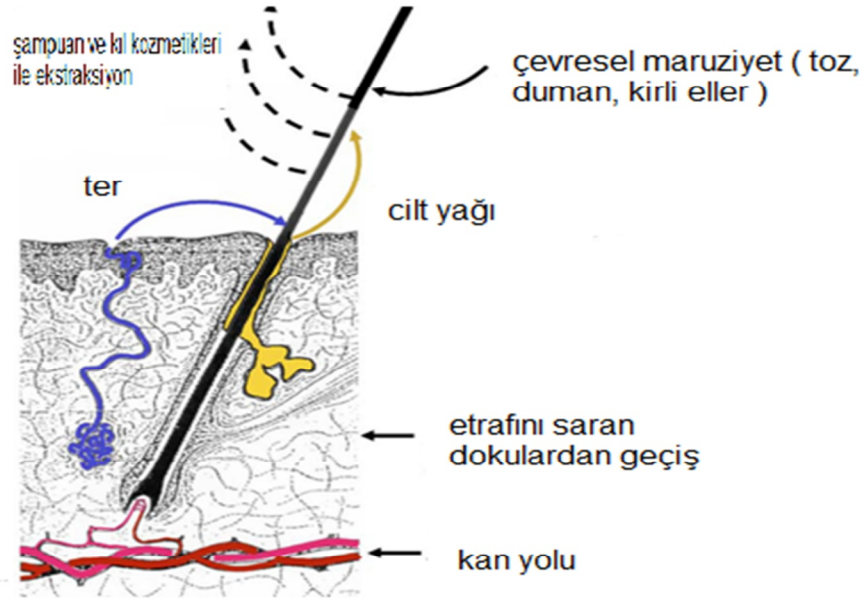
1985’de Hamburg’da yapılan olağan toplantıda sürekli kodein tüketen bir hastanın kıl analiz sonuçları sunuldu. Bu sonuçlar Arnold’un ağır eroin tüketiminde yer alan aralıktaki morfin konsantrasyonunu göstermiştir.

Günümüzde ise kütle spektrometresiyle birleşmiş olan gaz kromatografi kıl analizleri için seçilen bir yöntemdir. Bu teknoloji rutin olarak adli bilimler, uygulamalı tıp, klinik toksikoloji ve son zamanlarda spor alanında yinelenen uyuşturucu maruziyetini kayıt etmede kullanılmaktadır^{17,19,21}.

2.4. Kıl içerisine Madde Geçiş Mekanizması

Yapılan deneysel çalışmalar ilaçların kıl içerisine çeşitli mekanizmalarla girebileceğini göstermiştir. Kıl içerisine madde geçişi için amaçlanan en kesin model pasif transferdir. Bu modelde kimyasallar folikülün tabanında büyüyen kıl hücreleri içerisine kan dolaşımı ile taşınır ve kıl gövdesi içine sıkıca bağlanır. Bu geçiş alınan maddenin dozuyla ilişkili olarak kandaki konsantrasyonuna bağlıdır.

Diğer en önemli alternatif mekanizma tamamlanmış kıl gövdesi içerisine ter ve yağ salgılarından difüzyon ile geçiştir. Terin kanda bulunan ilaçları içerdiği bilinir. Çünkü kıl çok gözenekli bir yapıya sahip olduğundan su ve diğer sıvıları kolayca absorplayarak ağırlıklarını %12-18 arttırabilir. Ter vasıtasıyla ilaçlar kolayca kıl içerisine transfer olabilir. Havada, suda, şampuanlarda, sa spreylерinde, diğer kozmetik ajanlarda bulunan kimyasallar kıl üzerinde birikir. Böylece evresel maruziyet ile madde geçişi gerekleşir^{18,19}.



Şekil 2.5. Kıl içerisine madde geçişi

Yapısal bakış açısına göre üç faktör madde geçişini etkiler. Bunlar kılın melanine bağlanma afinitesi, lipofilitesi ve iyonizasyon durumudur. Kılın rengi ve kimyasal maruziyet kıl içerisine geçişte önemli bir rol oynar^{22,23}. Melaninin kokain ve metaboliti benzoilekgonin dahil olmak üzere pek çok ilacı bağlayan bir materyal olduğu tartışılmazken, kokainin keratin proteini dahil kıla geçen diğer şeylerin büyük bir kısmını da bağlar²⁴. Örneğin kır saçlı kişiler pigment etkisini göstermek için uygundur. Kıl kökü kanda aynı ilaç konsantrasyonuna maruz kalmasına rağmen pigmentli kıldaki madde miktarı pigmenti olmayan kıldan 10 kat daha yüksek bulunmaktadır. Yapılan kontrollü çalışmalarda benzer sonuçlar siyah, kahverengi, sarı ve kırmızı renkli saçları kıyaslayarak da bulunmuştur. Nakahara ve Kikura lipofilik özellik arttıkça kıl içerisine geçişin artacağını göstermiştir. Lipofilik organik moleküller kolayca membranlara nüfuz ederler. Ancak hidrofilik moleküller için membranlar su geçirmez bir bariyerdir²².

Diğer bir teori de kılda bolca bulunan sistinin –SH gruplarının kimyasal madde ile bağ yapmasıdır. Normalde –SH grupları karşılıklı S-S bağları oluşturarak protein lif ağını stabilize ederler. Bu nedenle büyüyen kıl hücrelerine giren maddenin sıkıca bağ yapma olasılığı bulunmaktadır²⁰.

2.5. Kılı Toplama ve Saklama İşlemi

Uyutucu-uyuşturucu maddelerin kıl analizi için toplama prosedürü standardize edilmemiştir. Yayınlanan çoğu çalışmalarda numune baş bölgesinden rastgele alınmaktadır. Ancak Saç Analizleri Derneği (Society of Hair Testing) tarafından tespit edilen pozitif kıl örneği için önerilen belli kriterler vardır²⁵. Bu kriterler;

- Kılın insanda en iyi toplandığı alan kafanın arkasındaki posterior vertex bölgesidir. Çünkü bu bölgede talogen safhada olan kılın oranı en düşüktür. Kıl yaş ve cinsiyet ile ilgili etkilere daha az bağlıdır. İnsanlarda en kolay örneklenebilen vücut kılı saçtır. Ayrıca sakal, koltuk altı ve pubik kılları da kullanılabilir.
- Tüm kıl örneklerine bir dekontaminasyon prosedürü uygulanmalıdır. Bu yöntemde ilk yıkama organik bir çözücü, ikinci yıkama olarak su veya tampon çözelti ve son yıkama da bir organik çözücüyü içermelidir.
- Pozitif olan ön izleme testleri GC/MS gibi daha iyi spesifiteye ve seçiciliğe sahip olan alternatif bir yöntemle doğrulanmalıdır.
- Pasif kontaminasyon olasılığını değerlendirmek için; metabolitlerin tanımlanması, cut-off değeri, metabolitin maddeye oranı değerlendirilir.
- Kokain için benzoilekgonin ve kokoetilen; eroin için 6-monoasetilmorfin ve morfin; THC için carboxy-THC metabolitlerine bakılmalıdır.
- Kokain için benzoilekgonin/kokain oranı > 0.05
Eroin için 6-asetilmorfin/morfin oranı > 1.3 olmalıdır.

Kullanılacak örnek hacmi ise laboratuvarlar arasında değişir. Analiz edilen maddeye ve testin yöntemine bağlıdır. Literatürde kaydedilen numune miktarı tek bir saç telinden 200 mg kadardır ve alınacak saç olabildiği kadar kafatasına yakın kesilmelidir.

Toplanan kıl için en basit yol alüminyum folyo içerisinde sarılmış kılı uygun şekilde etiketlenmiş kâğıt zarfta muhafaza etmektir. Kontaminasyona sebep vermesinden dolayı plastik poşette saklamadan kaçınılmalıdır. Aynı zamanda plastik madde kıldan lipofilik maddeleri ekstrakte eder²⁶.

2.6. Kıl Analizleri

Son yıllarda kıl analizleri için çok sayıda prosedür tanımlanmıştır. Analitik sonuçların benzerliğini ve kalitesini geliştirmek için analitik yöntemlerin standardizasyonu önemlidir. Kıl analizleri için genel bir yöntem oluşturmak ve analizlerin yeterliliğini sağlamak amacıyla Saç Analizleri Derneği (SoHT) tarafından farklı laboratuvarlar arasındaki metotlar karşılaştırılarak uygun prosedürler oluşturulmaya çalışılmıştır²⁷⁻³⁰. Genel olarak kıl analizleri beş basamakta gerçekleşir.

2.6.1. Dekontaminasyon İşlemi

Yıkama işleminin asıl amacı epidermal tabakaya penatüre olan kimyasal maddelerin yanı sıra kılın yüzeyinden yağı, kiri ve dış kirlilikleri uzaklaştırmaktır.

Kıl analizlerinde karşılaşılan en önemli konu uyuşturucuya pasif maruz kalarak yanlış pozitif test sonuçlarının ortaya çıkmasıdır. Çoğu laboratuvar da kıl analizleri dış kontaminasyonu uzaklaştırmak için bir yıkama işlemi ile başlar. Ancak tam anlamıyla yıkama yönteminde belli bir fikir birliği ve prosedür yoktur. Bu işlem metanol, etanol, aseton vb. yıkama; postmortem örnekler için %1 sodyum dodesilsülfat çözeltisi ve diğer ajanlarla yıkama; diklorometanla yıkama; fosfat tamponuyla ve organik çözücülerle yıkama olmak üzere genel olarak kategorilere ayrılmıştır³¹⁻⁴⁴.

Diklorometan veya aseton gibi non-protik organik çözücüler yıkama işlemi açısından daha avantajlıdır. Çünkü kılı şişirmeyerek kıldan materyaller kolaylıkla ekstrakte edilebilir^{45,46}. Bu sebeple yıkama işleminde diklorometan, su ve metanolle yıkama tercih edildi.

2.6.2. Kılın Hazırlanması

Segmentlere ayrılmış kıl pek çok vakada kişilerin madde kullanım süresi hakkında önemli bilgi sağlayabilir. Bu amaçla eğer kişinin madde kullanım zamanı tespit edilecekse segmentlere ayrılır. Romolo ve ark. yaptıkları çalışmada işlem öncesi

bilyalı değirmen kullanarak kıl örneklerini toz haline getirmiştir. Toz haline gelen kıl örneklerinin daha homojen ve daha uygun olduğunu düşünmüşlerdir⁴⁷.

Uygun segment uzunluğunu ayarlarken analiz yöntemi düşünülmelidir. İstismar edilen maddenin konsantrasyonu kıl kökünden dışa doğru azalır. Bu nedenle segmentlere ayırırken artan uzunluklarda parçalara ayrılmalıdır. Merkezden uzak olan kılda pasif kontaminasyon ile ilişkili hipotez olasıdır^{48,49}.

İstismar edilen maddenin kimyasal yapısı ve kullanılan ajanlara karşı duyarlılığı göz önünde bulundurulmalıdır.

2.6.3. İnkübasyon

2.6.3.1. Bazik Parçalama

Amfetamin, morfin, kannabinoid gibi alkali durumlar altında stabil olan maddeler analiz edildiğinde uygun olan yöntemdir. Genellikle kıl örneğinin 0.1-2.5 M NaOH ile 37 °C'de gece boyunca inkübasyonunu içerir. Bazik ekstraksiyon özellikle nikotin, amfetamin, esrar, antidepresan ve nöroleptikler açısından avantajlıdır⁵⁰.

2.6.3.2. Asidik Parçalama

Hemen hemen tüm maddelerle uyumlu olan prosedür su banyosunda 5-18 saat metanolle muamele etme işlemidir. Opiyat, kokain, amfetamin, metadon gibi maddeler proton verdiğinden ötürü pH 6.4-7.6 fosfat tamponu ile veya 0.01-0.5M HCl ile muamele edilir. Hidrofilik metanol difüzyon vasıtasıyla kıl matriksine nüfuz ederek kılın şişmesini sağlar ve istismar edilen maddenin serbest kalmasına neden olur. Bir organik çözücü olarak metanol nötral ve lipofilik bileşenleri çözer^{51,52,53}.

2.6.3.3. Enzimatik Parçalama

Kıl analizlerinde enzimlerin kullanılması ile kıl yapısı bozularak tampona maddelerin geçişi sağlanır. Bu amaçla β -glukorodinaz/ arilsülfat, proteinaz K, proteaz E gibi birkaç enzim kullanılır. Kılın enzimatik sindiriminin dezavantajında immunoassay aracılığıyla tespit edilen ilaçlarda kullanılan antikorların denatüre olduğu düşünülür¹⁰.

2.6.4. Ekstraksiyon

Sulu ekstraktlarda veya çözeltilerde bulunan safsızlıklardan dolayı direkt GC/MS enjeksiyonu yapmak olanaksızdır. Bu amaçla sıvı-sıvı veya katı-sıvı ekstraksiyon yöntemi tanımlanmasına rağmen otomatik sistemlerin uygulanabilirliği ve gelişmiş ekstraksiyon materyallerinden ötürü katı-sıvı faz ekstraksiyonu daha çok kullanılmaktadır. Son zamanlarda yeni bir teknik olan katı faz mikroekstraksiyon tekniği basitliği, hassaslığı, hızlılığı gibi avantajlarından ötürü tercih edilmeye başlanmıştır. Aynı zamanda çözücü gerektirmez^{54,55}.

2.6.5. Analiz

Uyutucu-uyuşturucu maddelerin toksikolojik analizi ön izleme ve doğrulama olmak üzere iki basamağı içerir. İmmunoassay işlemini takiben kromatografik analiz uygulanır. Radyoimmunoassay hassas ve güvenilir bir immunolojik tekniktir. Fakat radyoaktif olarak etiketlenmiş materyallerin kullanımı güven alanının dışında uygulanmasını önler. Bu yüzden radyoaktif olmayan metotlar tercih edilir. Enzim immunoassay güvenilir, çok hassas, ucuz ve basit olmasından dolayı alternatif bir yöntemdir. Bu analizlerde pozitif çıkan sonuçlar gaz kromatografi/ kütle spektrometresi gibi daha kesin bir teknikle konfirme edilir^{56,57}.

Literatürde saç telinde uyutucu/uyuşturucu maddelerin analizinde gaz kromatografi (GC), gaz kromatografi/kütle spektrometresi (GC/MS), radyoimmunoassay (RIA), ince tabaka kromatografi (TLC), sıvı kromatografi/kütle spektrometresi (LC/MS) gibi teknikler kullanılmıştır^{58,59,60}.

Analitik teknolojilerin gelişmesi analizlerin hassasiyetinin ve doğruluğunun artmasını sağlamıştır. Böylece test sonuçlarının bilimsel olarak daha iyi anlaşılıp daha kolay yorumlanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada dünyada ve ülkemizde kullanımı gittikçe artan kokainin kılda tespiti için 10 adet erkek Yeni Zelanda cinsi tavşan kullanıldı. Her grupta 5 tavşan olmak üzere iki grup oluşturuldu. Kokain hidroklorür normal tuz solüsyonunda çözülerek 1.gruba (5mg/kg) ve 2. gruba (10 mg/kg) intraperitoneal yolla tek doz verildi. 12 gün boyunca tavşanlardan kıl toplandı. Kıl örneklerinin konfirmasyonu için kan örnekleri 3 gün alındı. Hayvan çalışması için Çukurova Üniversitesi Tıbbi Bilimler Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi Etik Kurulundan onay alındı. Toplanan kıl ve kan örneklerinin Ana Bilim Dalımız Adli Toksikoloji Laboratuvarında bulunan Gaz Kromatografi/Kütle Spektrometre cihazı ile analizleri yapıldı. Bu çalışmanın gerçekleştirilebilmesi için Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi bütçesinden TF2009-YL14 no'lu proje ile parasal destek alındı.

3.1. Kıl Örnekleri

10 adet 2-2,5 kg ağırlığındaki Yeni Zelanda cinsi tavşan kokain uygulamasından önce kontrol grubunu oluşturmak amacıyla elektrikli alet ile tıraş edildi. Kokain uygulandıktan sonraki 12 gün kıl örnekleri tavşanın sırt bölgesinden alındı. Alınan bu örnekler alüminyum folyo ile sarılarak her birine numara verildi. Analize kadar karanlık ortamda, oda sıcaklığında saklandı.

3.2. Kan Örnekleri

Kokain uygulandıktan sonraki 3 gün boyunca tavşanların kulak venasından 2 cc kan örneği alındı. Düz tüplere aktararak her bir tüp numaralandırıldı. Analize kadar buzdolabında +4 °C saklandı.

3.3. Deneylerde kullanılan Malzemeler

3.3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kokain Hidroklorür (Macfarlon Smith Ltd, Edinburgh)

Benzoilekgonin

Kokain standardı (coc-d₃, Cerilant)
Benzoilekgonin standardı (BE-d₃, Cerillant)
Metanol (Carlo Arba)
Diklorometan (Merck)
n-hekzan (Merck)
2-propanol (Merck)
Fosforik asit
Amonyum hidroksit (Merck)
Hidroklorik asit (Merck, 1 N titrisol)
Potasyum dihidrojen fosfat (Sigma)
N-O-(bistritmetilsilil)trifloroasetamid: trimetilklorasilan (BSTFA:TMCS)Supelco

3.3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

Tüpler (10 ml'lik)
Mikropipet (200µl ve 5000µl)
Pastör pipeti (isolab)
Enjektör
Saf su (deiyonize su)
Balon joje
MCX ekstraksiyon kartuşu (Oasis, Waters)
HLB ekstraksiyon kartuşu (Oasis, Waters)
Hassas terazi (Mettler Toledo)
Vorteks (Elektromag M16)
Su banyosu (Elektromag)
pH metre (Mettler Toledo)
Gaz kromatografi/ Kütle spektrometresi (Agilent 6890 GC/5673 MS)

Santrifüj (5500devir/dk.- Hettich Universal 30F)

Katı-sıvı ekstraksiyon manifoldu (Agilent)

Kapiler kolon (HP-5MS,Agilent)

Helyum gazı (yüksek saflıkta)

Azot gazı

3.4. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

3.4.1. pH 7’de 0,1 M KH_2PO_4 Tamponunun Hazırlanması

13,61 g KH_2PO_4 1 L’ye tamamlanacak şekilde balon joje içerisinde distile suda çözüldü. Çözelti pH’sı 1M KOH ile ayarlandı. Hazırlanan bu fosfat tamponu buzdolabında muhafaza edildi.

3.4.2. 0,1 N HCl Çözeltisinin Hazırlanması

Saf suda çözülen 1 N titrisol (HCl) den 10 ml alınarak 100 ml balon jojede saf su ile seyreltili.

3.4.3. CH_2Cl_2 :2-propanol: NH_4OH Solüsyonunun Hazırlanması

100 ml balon joje içerisine 78 ml diklorometan, 20 ml isopropanol ve 2 ml amonyum hidroksit eklenir.

3.4.4. 1 M KOH Çözeltisi

56 g KOH distile suda çözülerek toplam hacim 1 L ye tamamlanır.

3.5. Gaz Kromatografi/Kütle Spektrometresi Çalışma Şartları

Kromatografik analizler Hewlett-Packard 5973 kütle seçici dedektörle eşleşmiş yine Hewlett-Packard 6890N marka gaz kromatografi cihazı ile yapıldı.

- Kolon : HP-5MS 0,25mm*30mm*0,25µm kapiler kolon
- Taşıyıcı gaz : Helyum 0,8ml/dk
- Fırın sıcaklığı : 90⁰C
- Dedektör sıcaklığı : 230⁰C
- Enjeksiyon sıcaklığı : 300⁰C
- Enjeksiyon hacmi : 2µl
- Transfer line : 280⁰ C

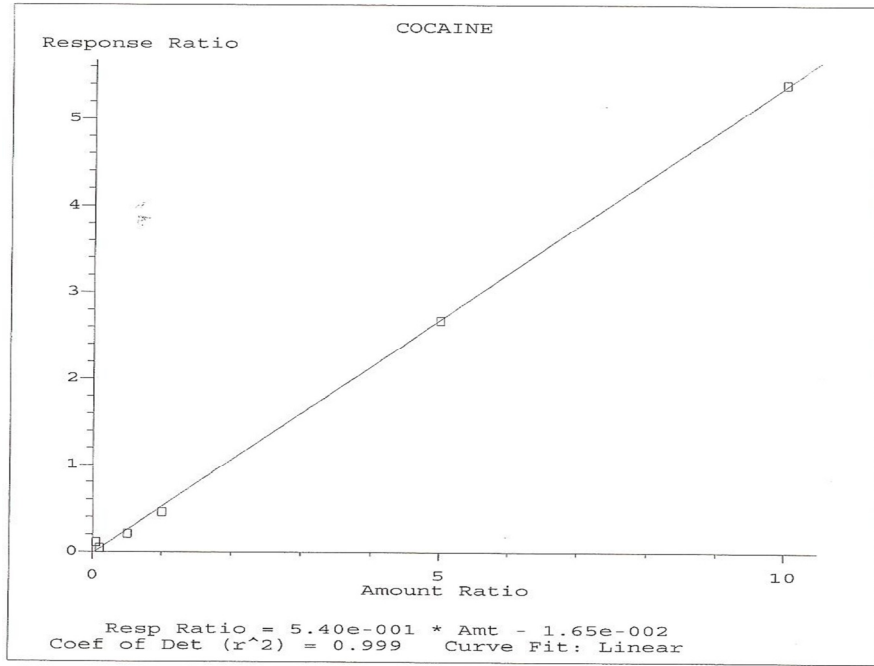
Kokainin tanımlanması için seçilen iyonun izlenmesi (SIM) modu kullanıldı. Kokain için seçilen iyonların m/z oranı 82,182, 303; benzoilekgonin için bu oran 82, 240 ve 361dir. Internal standart olan kokain- d3 ve benzoilekgonin-d3 için m/z oranı sırasıyla 185 ve 243tür.



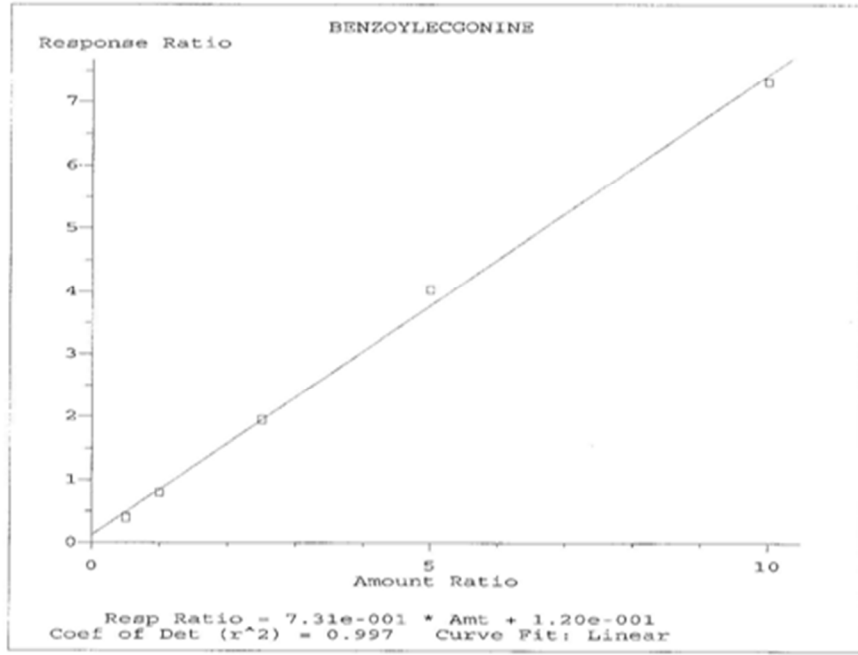
Şekil 3.1. Gaz kromatografi/ Kütle Spektrometresi (GC/MS)

3.6. Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması

Kalibrasyon eğrisi için 20 mg kokain hidroklorür tartılıp 100 ml metanolde çözüldü. Hazırlanan 200 ppm'lik çözeltiden farklı konsantrasyonlarda 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml, 1 µg/ml, 0.5 µg/ml standart çözeltileri hazırlanarak 7 tane kalibrasyon noktası oluşturuldu. Farklı 7 tüpe 20 şer mg kıl, 2ml metanol, 1 ml 0.1 N HCl, 20 µl internal standart ve hazırlanan standart çözeltilerden 20 µl ekleyerek 100ng/mg, 50 ng/mg, 25 ng/mg, 10 ng/mg, 5 ng/mg, 1 ng/mg, 0.5 ng/mg noktaları oluşturuldu. 200 ppm'lik stok benzoilekgonin çözeltisinden de aynı konsantrasyonlarda hazırlanarak benzoilekgonin için kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Kokain ve benzoilekgonin için kalibrasyon grafiği şekil 3.2 ve şekil 3.3 de verilmiştir. Kokain ve benzoilekgonin için korelasyon katsayısı sırasıyla 0.999 ve 0.997 dir.



Şekil 3.2. Kokainin kalibrasyon eğrisi



Şekil 3.3. Benzoilecgoninin kalibrasyonu

3.7. Çalışma Örneklerinin Hazırlanması

3.7.1. Örneklerin toplanması ve yıkama işlemi

10 adet Yeni Zelanda cinsi erkek tavşan iki grup halinde oluşturularak bir gruba 5 mg/ kg diğerine ise 10 mg/kg kokain intraperitoneal yolla verildi. Kokain uygulamasından sonraki 12 gün boyunca kıl örnekleri tavşanların sırt bölgesinden rastgele yerlerden olabildiği kadar deriye yakın elektrikli alet ile traş edildi. Ayrıca bu işlem yapılmadan önce blank kıl örneği de alındı. Toplanan kıl örneklerinde dış kontaminasyonu uzaklaştırmak için bir yıkama işlemi yapıldı. Kıllar sırasıyla diklorometan, deiyonize su ve metanol ile yıkanarak kurutulup alüminyum folyo ile sarılıp oda sıcaklığında karanlık ortamda muhafaza edildi.

3.7.2. Kıl Örneklerinin İnkübasyonu

20'şer mg kıl örnekleri 10 ml'lik cam tüplere tartılarak bu cam tüpler içerisine 2 ml metanol, 0.1 N hidroklorik asit ve 20µl 10ppm'lik internal standart karışımından eklendi. Bu solüsyon 65°C de 3 saat su banyosunda inkübe edildi^{61,62}.

3.7.3. Kıl örneklerinin Ekstraksiyonu

Kıl ekstraksiyonu için ön hazırlama işlemi yapıldı. İnkübasyonu tamamlanan tüpler 3500 rpm'de 3dk. santrifüj edildi. Dibe çöken kıl örneklerinin üst fazındaki çözelti (süpernetant) içerisinde 6 ml 0.1 M fosfat tamponu olan diğer tüplere pastör pipeti yardımıyla alındı.

İlk önce MCX ekstraksiyon kartuşu 2 ml metanol ve 2 ml deiyonize su ile şartlandırıldı. Önceden hazırladığımız süpernetant kolona yüklendi. Kolon yıkama işlemi sırasıyla 2'şer ml deiyonize su, 0.1 N hidroklorik asit, metanol: diklorometan (1:1) ve hekzan çözeltileri ile yapıldı.

Elüenti almadan önce kartuş 1 dk. vakum altında hızlı bir şekilde kurutularak 2 ml diklorometan: izopropanol: amonyum hidroksit (78:20:2) solüsyonu ile alındı.

Alınan bu örnek azot gazı altında uçuruldu.

100 µl BSTFA:TMCS (99:1) eklenerek vortekslendikten sonra 80⁰Cde 25 dk. türevlendirildi.

2 µl örnek gaz kromatografi/ kütle spektrometre cihazına enjekte edildi.



Şekil 3.4. Katı-sıvı ekstraksiyon manifoldu

3.7.4. Kan Örneklerinin Ekstraksiyonu

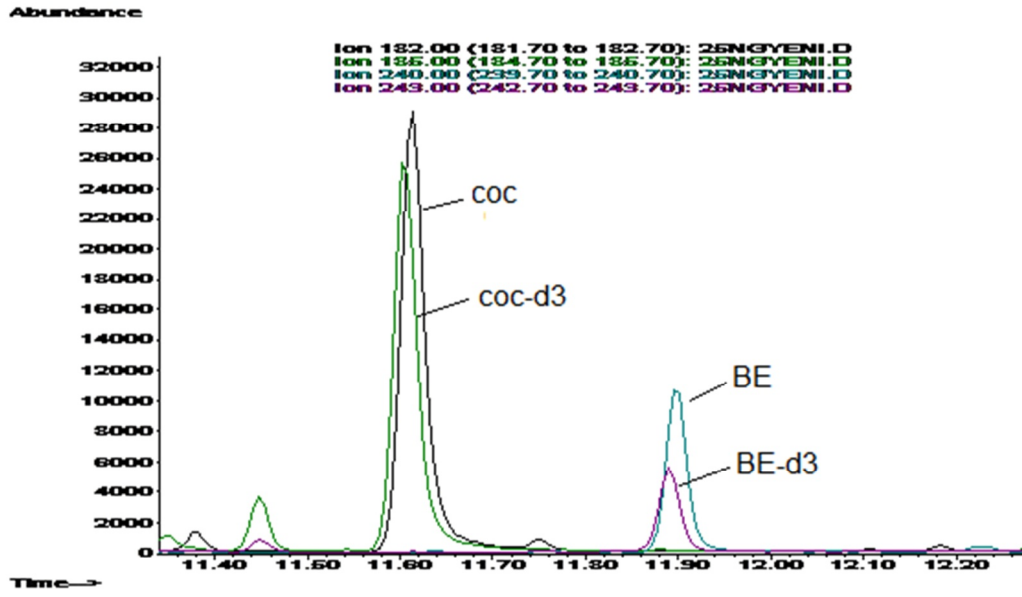
Ekstraksiyon işleminde ilk önce 1 ml metanol ve 1 ml su ile HLB kartuşu şartlandırıldı. 1 ml serum içerisine 20 µl fosforik asit eklenerek örnek kolona yüklendi. Daha sonra 1 ml %5 lik metanol çözeltisi ile kolon yıkandı. Elüent 1 ml metanol ile alındıktan sonra azot gazı altında uçuruldu. Son olarak 20 µl metanol vialle eklenerek vortekslendi. 2µl örnek cihaza verildi⁶⁵.

3.7.5. Veri Analizi

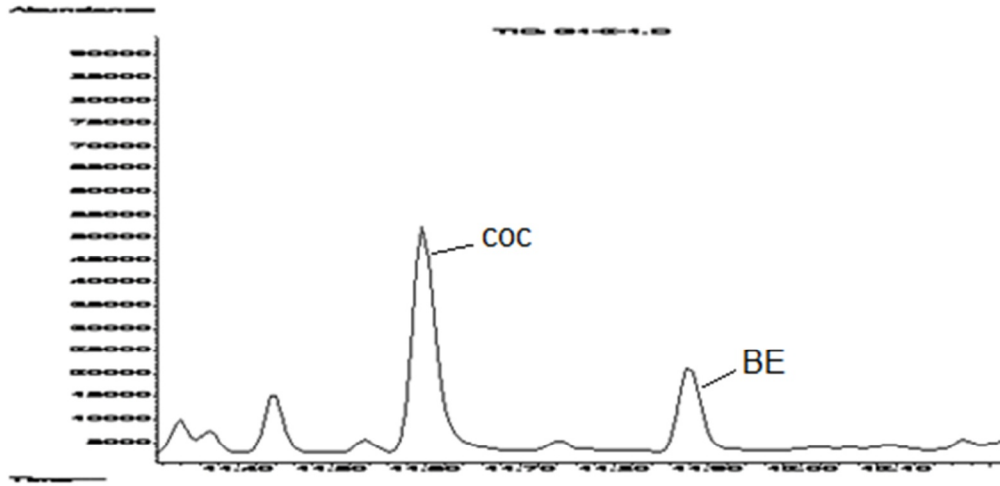
Ortalama değerler her bir grup için ayrı ayrı SPSS istatistik programı (Mann-Whitney ve ki kare testleri) kullanılarak hesaplandı. P değeri 0.05'ten küçük olanlar anlamlı olarak değerlendirildi.

4. BULGULAR

Standart olarak hazırlanan kokain, benzoilekgonin; internal standart olan kokain-d3 ve benzoilekgonin-d3'ün gaz kromatografi-kütle spektrometresi cihazında elde edilen kromatogramı şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1: 25ng/mg standart ve internal standart karışımının GC/MS'deki kromatogramı



Şekil 4.2. Tavşan kılında tespit edilen kokain ve benzoilekgonin pikleri

İki gruba ayrılan 10 adet tavşanın kokain uygulamasından sonraki 12 gün boyunca sırt bölgelerinden alınan kıllarında tespit edilen kokain miktarları Çizelge 4.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Tespit edilen kokain miktarı

	Grup 1 (5mg/kg) n=5				Grup 2 (10 mg/kg) n=5				p değeri
	$\bar{X} \pm S.S.^a$ (ng/mg)	Med	Min	Mak	$\bar{X} \pm S.S.$	Med	Min	Max	
1.gün	1,73 $\pm$ 0,33	1,68	1,42	2,22	1,18 $\pm$ 0,67	1,43	-	1,69	0,175
2.gün	1,64 $\pm$ 0,30	1,74	1,10	1,83	1,23 $\pm$ 0,71	1,46	-	1,79	0,209
3.gün	1,00 $\pm$ 0,58	1,22	-	1,52	0,92 $\pm$ 0,52	1,06	-	1,31	0,675
4.gün	0,56 $\pm$ 0,76	-	-	1,41	0,68 $\pm$ 0,63	1,07	-	1,18	0,911
5.gün	1,06 $\pm$ 0,71	1,40	-	1,44	0,55 $\pm$ 0,75	-	-	1,49	0,371
6.gün	-	-	-	-	-	-	-	-	1
7.gün	-	-	-	-	-	-	-	-	1
8.gün	-	-	-	-	-	-	-	-	1
9.gün	-	-	-	-	-	-	-	-	1
10.gün	-	-	-	-	-	-	-	-	1
11.gün	-	-	-	-	-	-	-	-	1
12.gün	-	-	-	-	-	-	-	-	1

a: aritmetik ortalama $\pm$ standart sapma

-: tespit edilemedi

Kokainin ana metaboliti olan benzoilekgoninin tavşan kılında bulunma sıklığı Çizelge 4.2.ve 4.3’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Grup 1 (5mg/kg) ’de benzoilekgoninin bulunma sıklığı

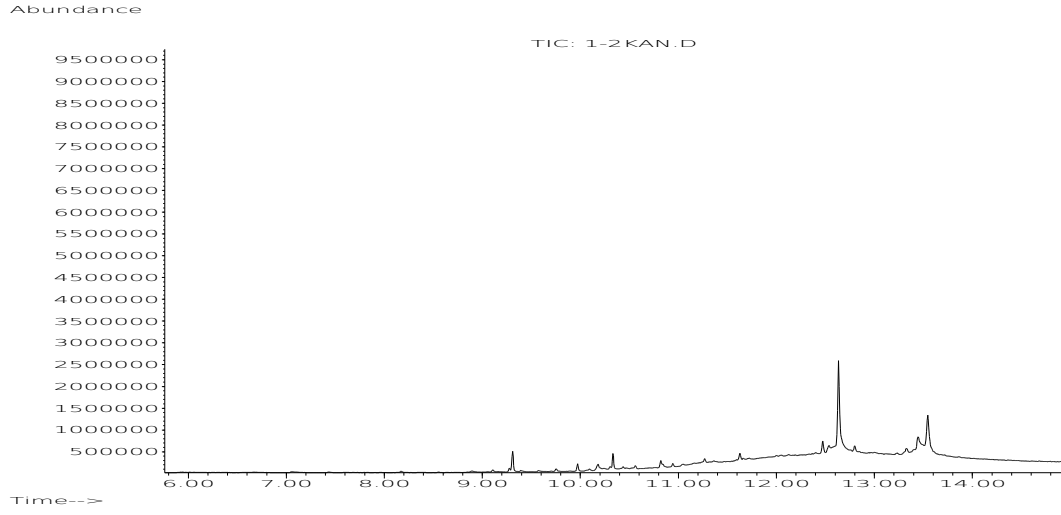
Grup1 5mg/kg	BE yok	TLA	BE var
1.gün	%60	-	%40
2.gün	%80	-	%20
3.gün	%40	%20	%40
4.gün	%100	-	-
5.gün	%100	-	-

Çizelge 4.3. Grup 2 (10 mg/kg)’de benzoilekgoninin bulunma sıklığı

Grup2 10mg/kg	BE yok	TLA	BE var
1.gün	%60	%20	%20
2.gün	%80	%20	-
3.gün	%40	%20	%40
4.gün	%100	-	-
5.gün	%100	-	-

TLA: teşhis limiti altında

Kan örneklerinin gaz kromatografisi/kütle spektrometresi ile yapılan analizinde kokaine rastlanmamıştır. Kan örneğinin kromatogramı şekil 4.3.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Kan örneğinin GC/MS'deki kromatogramı

5. TARTIŞMA

Günümüzde uyutucu ve uyuşturucu madde kullanımı gittikçe artmaktadır. Türkiye Büyük Millet Meclisi Araştırma Komisyonunun yaptığı çalışmalarda Türkiye’de uyuşturucu madde sıralamasında esrardan sonra ikinci sırayı kokain almaktadır. Aynı zamanda Birleşmiş Milletler Uyuşturucu ve Suç Ofisi (UNODC) tarafından yayınlanan 2010 yılı verilerine göre son 10 yılda 800 ile 1000 ton arasında saf kokain üretildiğine dikkat çekilmiştir. Bu veriler pek çok bölgede ve ülkede kokain kullanımına bir eğilim olduğunu göstermektedir. Avrupa Uyuşturucu ve Uyuşturucu Bağımlılığı İzleme Merkezi (EMCDDA) 13 milyon kişinin kokain kullanmakta olduğunu kaydetmiştir^{66,67}.

Bilim adamları 20 yıldır kılda uyutucu-uyuşturucu maddelerin analizi için analitik prosedürler geliştirmektedir¹⁸. Uyutucu-uyuşturucu maddelerin tespitinde pek çok ülke rutin olarak klinik toksikolojide, adli bilimlerde kıl testini kullanmaktadır. Bu testler özellikle idrar analizleri için tamamlayıcı bir yöntemdir. Kan ve idrar analizlerinin geçerliliği maddenin eliminasyon yarı ömrüne bağlıdır. Örneğin bu madde eliminasyon yarı ömrü 1 saatten daha az olan kokain olması halinde kan veya idrarda madde ve metabolitleri birkaç günden sonra tespit edilemezken kannabinoid gibi diğer uyuşturucu maddeler kullanımdan sonra maksimum 3-4 haftaya kadar bulunabilir. Kıl analizleri kişinin kıl gövdesinin uzunluğuna bağlı olarak şu anda ve geçmişte madde kullanımı ile ilgili bilgisini verir^{68,69}.

Rutin olarak tek doz madde kullanımının tespit edilmesinde genellikle tercih edilen biyolojik örnekler, kan veya idrar örnekleridir. Kan örneklerini almak invaziv bir yöntemdir ve hemşire gibi bir sağlık görevlisi tarafından alınmalıdır. İlacın tespit süresi de kısadır. İdrar örnekleri ise başka örneklerle karışma riski taşımaktadır. Özellikle seksüel saldırılarda kişi yaşadığı psikolojik travmanın etkisiyle kendine gelene kadar saatler hatta günler geçmektedir. Dolayısıyla bu vakaların çoğu birkaç gün sonra polise başvurmasına rağmen toksikolojik inceleme için gerekli olan kan ve idrar maddenin tayini için uygun olmayabilir. Bu nedenle gelişmiş analitik duyarlılıktan dolayı kıl analizleri tek doz uyuşturucu kullanımının tespitinde yararlı olabilmektedir¹⁹.

Çalışmamızın ilk kısmını dekontaminasyon işlemi oluşturmaktadır. Dekontaminasyon işlemi iki sebeple olasıdır. İlki ter, sebum ve tozun yanı sıra şampuan, kıl spreyi gibi kıl üzerindeki kalıntılar cihazdaki analitik gürültünün artmasına neden olmaktadır. Diğer neden ise uyutucu/uyuşturucu maddeler kıla çevresel maruziyet ile de bağlanabilmektedir. Bu da yanlış test sonuçlarına yol açmaktadır.

Literatürde yıkama işlemi için her laboratuvar farklı bir yöntem uygulamaktadır. Çalışmamızda ilk yıkama organik bir çözücü olan diklorometan ve onu takiben su, son yıkama da yine organik bir çözücü olan metanolle olmuştur^{53,68}. Böylece kılı şişirmeden dış kirlilikler uzaklaştırılmaya çalışılmıştır.

Uyutucu-uyuşturucu maddeler için kıl analizlerindeki en önemli ve zaman alıcı basamak inkübasyon işlemidir. Genellikle ultrasonik bir banyoda metanol veya sulu bir tamponla bu işlem gerçekleştirilmektedir. Valente ve ark. 0.1 M HCl, 0.1 M NaOH ve metanol kullanarak kokainin izolasyonu için ilk karşılaştırmayı yaparak metanolde 60°C’de kokainin %84’ünü geri kazanmışlardır⁴. Romolo ve ark. ise 0.1 N HCl ile parçalamanın daha iyi olduğunu söylemişlerdir⁴⁸.

Barroso ve ark. en iyi inkübasyon zamanını bulmak için üç farklı çözücü kullanarak kıyaslama yapmışlardır. Bu çözücü çeşitleri metanol, 0.1M HCl ve 2:1 oranında hazırlanmış metanol: 0.1M HCl karışımıdır. Bu çözücüleri 20 mg kıla ekleyerek ultrasonik banyoda 65°C’de kontrollü zaman aralıklarında (1,2,3,5 ve 18 saat) inkübe etmişlerdir. Aynı zamanda yaptıkları çalışmada inkübasyon süresini kısaltmak için sıcaklığı arttırmanın mümkün olmayacağını söylemişlerdir. Çünkü kokaininin belirgin bir biçimde benzoilekgonine dönüştüğünü belirtmişlerdir. Bu yüzden çalışmamızda seçilen inkübasyon durumu 65°C’de 3 saat metanol: 0.1 N HCl ile muamele işlemidir⁶⁴. NaOH alkali durumlar altında stabil olan maddeler için uygun bir yöntemdir. Kannobinoid ve amfetamin gibi alkali stabilitesi olan maddelerde yüksek verim elde edilir. Kokainin ekgonine dönüşmesini önlemek için alkali hidrolizi yapılmamıştır⁶⁸.

İnkübasyon işleminden sonra elde edilen çözelti yüksek oranda safsızlık içermektedir. Bu nedenle analiz öncesi sıvı-sıvı veya katı-sıvı faz ekstraksiyonu içeren

bir clean-up yöntemi uygulanmalıdır. Katı faz ekstraksiyon yöntemi sıvı faza göre daha fazla tercih edilmektedir. Bunun nedenleri;

- Pratik ve bütün laboratuvarlarda uygulanabilir bir metottur.
- Daha az çözücü ve ayırıcı madde kullanıldığından daha ekonomiktir.
- Geri kazanım oranı (recovery) yüksektir ve istenilen yoğunlukta örnekler elde edilebilir.
- Örnek, tutucu madde ve çözücüler arasında çapraz bulaşma riski düşük olduğundan yüksek doğrulukta sonuçlar elde edilir.
- Düşük miktarda örnek işlendiğinden sıvı-sıvı ekstraksiyondaki gibi emülsiyon oluşma problemi yoktur.
- En az düzeyde uçurma işlemine ihtiyaç duyulduğundan kararsız örnek oluşumu nadirdir.
- Çözücü ve örneklerin az miktarda kullanılmasından dolayı zararlı maddelerle temas daha azdır⁷⁰.

Laboratuvarımızın genel durumu ve yukarıda açıklanan avantajlar göz önüne alınarak çalışmamızda katı-faz ekstraksiyon yöntemi yapılmıştır.

Çalışmamızda 2-2,5 kg ağırlığındaki tavşanlara iki farklı konsantrasyonda (5 ve 10 mg/kg) kokain verilmiştir. Bunun nedeni tek dozun düşük miktarda tespit edilip edilmeyeceğidir. 12 gün boyunca tavşan kıllarında tespit edilen kokain miktarları verilmiştir (Çizelge 4.1.). İlk 5 gün her iki grupta da kokain tespit edilirken sonraki günlerde kokain bulunamamıştır. Kokainin çok çabuk metabolize oluşuna bağlı olarak çoğu biyolojik örnekte benzoilekgoninin baskın olmasına rağmen kılda bulunan ilk metabolit kokaindir. Cone ve ark. kokainin kılda metabolitleri üzerinde baskın durumda olduğunu ve benzoilekgoninin muhtemelen kılın içerisine geçtikten sonra üretildiğini göstermişlerdir³⁵. Çalışmamızda benzoilekgoninin kılda bulunma sıklığı daha azdır. Bu veriler çalışmamızın literatürle uyumlu olduğunu göstermektedir. Kokain kılda 1. günden itibaren 5 gün boyunca tespit edilmiştir. Benzoilekgonin ise 3.günden sonra gözlemlenememiştir.

Kılda uyutucu/uyuşturucu madde tespitinin günlerden aylara hatta yıllara kadar geniş bir dedeksiyon penceresine sahip olduğu bilinmektedir. Ancak bu süre kokaini tek

doz uygulamamızdan ötürü 5 günü geçememiştir. Jurado ve ark. ise dişi Fauve Bourgogne tavşanlarına tek doz (5mg/kg) kokain uygulayarak sırt kıllarında 1.gün kokain ve benzoilekgonini en yüksek miktarda tespit etmişlerdir. 10. gün ise kokain ve metaboliti olan benzoilekgonini bulamamışlardır⁷¹.

Kıl içerisine madde geçişinde ırk, cinsiyet, beslenme, genetik etkenler önemli bir rol oynamaktadır. Çalışmamızdaki kokain tespit süresinin Jurado ve ark. göre daha kısa olmasının nedeni olarak farklı ırkların, cinslerin kullanılması ile açıklanabilir.

Bu çalışmada iki farklı dozun kıl içerisine geçiş miktarı hemen hemen aynı olmuştur. Çalışmamızın istatistiksel olarak incelenen verilerinde p değeri 0.05'in üstünde çıkmıştır ($p \geq 0.05$). Dolayısı ile gruplar arasında doza bağlı herhangi bir fark bulunamamıştır.

Literatürde doz-cevap ilişkisini açıklarken genellikle kıyaslanacak dozlar 5 gün boyunca hayvanlara verilmiştir. Çalışmamızda doz-cevap ilişkisini tespit edememizin nedeni kokainin kronik olarak verilmemiş olmasıdır. Ayrıca yapılan kontrollü çalışmalarda pek çok uyuşturucu maddenin tercihsel olarak pigmentli kıl içerisine geçiş yaptığı saptanmıştır. Hubbard ve ark. Long Evans ratlarına intraperitoneal olarak kokain uygulamasından sonra pigmentli kılta daha fazla kokain bulgusuna rastlamışlardır^{72,73}.

Kıl analiz sonuçlarının yorumlanması zordur. Çünkü maddenin lipofilitesi, melanin afinitesi, pK_a 'sı gibi pek çok faktör kıl içine madde geçişini etkiler. Kılta kokainin pozitif olduğunun tanımlanabilmesi için tespit limitinin ($LOQ \leq 0.5 \text{ ng/mg}$, metabolitlerinin tespit limiti değeri ise $\leq 0.05 \text{ ng/mg}$ olması saç analizleri derneği tarafından önerilir. Bu çalışmada kokain ve benzoilekgonin için tespit limiti değeri (LOQ) sırasıyla 0.1 ve 0.3 ng/mg bulundu. Aynı zamanda dedeksiyon limiti (LOD) hesaplanarak kokain için 0.03ng/mg, benzoilekgonin için 0.08 ng/mg bulundu.

Kıl testini konfirme etmek amacıyla tavşanların kulak venasından alınan kan örneklerinde kokain tespit edilememiştir. Çünkü kan kokain verildikten sonraki gün (24 saat) alınmıştır. Su ve yeme kısıtlaması yapılmayan tavşanlarda kokain çabuk metabolize olduğundan idrarla atılmıştır.

Sonuç olarak bölümümüzde bulunan ve rutin olarak hizmet veren Adli Toksikoloji laboratuvarında kılda tek doz veya çoklu doz kokainin tespiti, çalışmamızda geliştirdiğimiz yöntemin uygulanması ile mümkün olacaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Bu çalışmada 10 adet Yeni Zelanda cinsi tavşana rastgele iki grup oluşturularak intraperitoneal yolla farklı miktarda (5 ve 10 mg/kg) kokain verilerek sırt bölgelerinden toplanan kıllarda kokain ve benzoilekgonin tespiti çalışıldı.
2. Kılta kokain tespitini konfirme etmek amacıyla kan örnekleri de çalışıldı.
3. Kıl ve kan örneklerinin analizi gaz kromatografi-kütle spektrometresi cihazı ile yapılmıştır.
4. Analizler sonucunda grup 1 ve 2 arasında istatistiksel bir farka rastlanmamıştır. 1.grupta 1.gün ortalama 1.7 ± 0.03 ng/mg kokaine rastlanırken grup 2’de ortalama 1.2 ± 0.06 ng/mg kokaine rastlanmıştır. Benzoilekgonin ilk 3 gün tespit edilmiştir. Bulunma sıklığı kokaine göre daha azdır.
5. Kılta kokain benzoilekgoninden daha yüksek konsantrasyonda bulunmuştur.
6. Kokainin çok çabuk metabolize olması ve kan örneklerinin 1 gün sonra toplanmasından ötürü kanda kokain tespit edilememiştir.
7. İn vitro ve in vivo çalışmalarda doz-cevap ilişkisini değerlendirirken kıyaslama yapılacak konsantrasyonlar belli bir süre uygulanmalıdır.
8. Şu anki ve geçmişe dönük kullanımı tespit ederken kan ve idrar analizlerinin yanı sıra kıl analizleri de yapılmalıdır.
9. Kıl testinin pozitif tanımlanabilmesi için saç analizleri derneği tarafından yayınlanan kriterler göz önünde bulundurulmalıdır.
10. Kılın pasif kontaminasyonundan kaçınmak için analiz öncesi yıkama işlemi uygulanmalıdır.
11. Adli ve klinik toksikoloji laboratuvarı olarak hizmet veren laboratuvarımız için uyutucu/uyuşturucu madde analizlerinde kan ve idrara göre daha kolay elde edilen ve daha güvenilir bir biyolojik örnek olan saçta uyutucu/uyuşturucu madde analiz yöntemi geliştirilip rutin hizmette kullanılabilecektir.

7. KAYNAKLAR

1. **Goldstein RA, DesLauriers C, Burda AM.** Cocaine: History, Social Implications, and Toxicity. *Disease a Month*, **2009**;55: 6-38
2. **Cartmell LW, AufderHeide A, Weems C.** Cocaine metabolites in pre-Columbian mummy hair. *J. Okla. State Med. Assoc.*, **1991**; 84: 11-12
3. **Musshoff F, Rosendahl W, Madea B.** Determination of nicotine in hair samples of pre-Columbian mummies. *Forensic Science International*, **2009**; 185: 84-88
4. **Garsiade D, Goldgerger BA.** Drug testing in hair: Chapter 6, CRC Press, New York, **1996**: 151-177
5. **Türkan T.** Kokain ve majör metabolitlerinin plazma-idrar örneklerinde gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) yöntemi ile tayini. Yüksek Lisans tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara, **1997**.
6. **Ülker ML.** Kokain ve metabolitlerinin kan, idrar, iç organlarda idantifikasyonu ve Adli Tıp açısından önemi. Uzmanlık tezi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, **1991**.
7. **Shanti CM, Lucas CE.** Cocaine and critical care challenge. *Crit Care Med*, **2003**; 31(6): 1851-1859
8. **Jickells S, Negrusz A.** Clarke's Analytical Forensic Toxicology. 3rd Ed., London-Chicago: Pharmaceutical Press, **2008**:48
9. **Bailey KM, Clay DJ, Gebhardt MA, Schmidt MJ, Haikal NA, Kraner JC.** Cocaine detection in postmortem samples following therapeutic administration. *J Anal Toxicol*, **2009**;33: 550-552
10. **Levine B.** Principles of Forensic Toxicology:Chapter 13, ACC Press, 2nd Edition, Washington, **2003**: 207-227
11. **Boumba VA, Ziavrou KS, Vougiouklakis T.** Hair as a Biological Indicator of Drug Use, Drug Abuse or Chronic Exposure to Environmental Toxicants. *International Journal of Toxicology*, **2006**; 25: 143-163
12. **Musshoff F, Madea B.** Cocaine and benzoylecgonine concentrations in fluorinated plasma samples of drivers under suspicion of driving under influence. *Forensic Science International*, **2010**; 200: 67-72
13. **Cone EJ.** Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cocaine. *J Anal Toxicol*, **1995**; 19: 459-478
14. **Jones AW, Holmgren A, Kugelberg FC.** Concentrations of cocaine and its major metabolite benzoylecgonine in blood samples from apprehended drivers in Sweden. *Forensic Science International*, **2008**; 177: 133-139
15. **Isenschmid DS, Fischman MW, Foltin RW, Caplan YH.** Concentration of cocaine and metabolites in plasma of humans following intravenous administration and smoking of cocaine. *J Anal Toxicol*, **1992**; 16: 311-314
16. **Selavka CM, Rieders F.** Determination of cocaine in hair. *Forensic Science International*, **1995**; 70: 155-164
17. **Kintz P, Villain M, Cirimele V.** Hair Analysis for Drug Detection. *Ther Drug Monit*, **2006**;28: 442-446

18. **Sachs H.** History of Hair Analysis. *Forensic Science International*, **1997**; 84: 7-16
19. **Pragst F, Balikova MA.** State of art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. *Clinica Chimica Acta*, **2006**; 370: 17-49
20. **Kintz P.** Value of hair analysis in postmortem toxicology. *Forensic Science International*, **2004**; 142: 127-134
21. **Varol İ.** Saç numunelerinden bazı suistimal edilen ilaçların kromatografik yöntemlerle analizi. Doktora tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, **1996**.
22. **Mieczkowski T.** The use of hair analysis for the detection of drugs. *Journal of Clinical Forensic Medicine*, **1996**; 3:59-71
23. **Hubbard DL, Wilkins DG, Rollins DE.** The incorporation of cocaine and metabolites into hair: Effects of dose and hair pigmentation. *Drug metabolism and disposition*, **2000**; 28: 1464-1469
24. **Kelly RC, Mieczkowski T, Sweeney SA, Bourland JA.** Hair analysis for drugs of abuse. Hair color and differentials or systematic differences in drug preferences? *Forensic Science International*, **2000**; 107: 63-86
25. **Mieczkowski T, Kruger M.** Interpreting the color effect of melanin on cocaine and benzoylecgonine assays for hair analysis: Brown and black samples compared. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, **2007**; 14: 7-15
26. **Society of Hair Testing.** *Forensic Science International*, **1997**; 84:3-6
27. **Wennig R.** Potential problems with the interpretation of hair analysis results. *Forensic Science International*, **2000**; 107: 5-12
28. **Jurado C, Sachs H.** Proficiency test for the analysis of hair for drugs of abuse, organized by Society of Hair Testing. *Forensic Sci Int*, **2003**; 133: 175-178
29. **Kintz P.** Interlaboratory comparison of quantitative determinations of drug in hair samples. *Forensic Sci Int*, **1995**; 70: 105-109
30. **Montogna M, Poletti A, Stramesi C, Groppi A, Vignali C.** Hair analysis for opiates, cocaine and metabolites: evaluation of a method by interlaboratory comparison. *Forensic Sci Int*, **2002**; 128: 79-83
31. **Deveaux M, Kintz P, Gouille JP, Bessard J, Pepin G, Gosset D.** The hair analysis proficiency testing program the French Society of Analytical Toxicology. *Forensic Sci Int*, **2000**; 107: 389-394
32. **Kintz P, Mangin P.** Opiate concentrations in human head, axillary, and pubic hair. *J Forensic Sci*, **1993**; 38:657-662
33. **Balikova MA, Habrdova V.** Hair analysis for opiates: evaluation of washing and incubation procedures. *J Chromatogr B*, **2003**; 789: 93-100
34. **Montagna M, Stramesi C, Vignali C, Groppi A, Poletti A.** Simultaneous hair testing for opiates, cocaine, and metabolites by GC-MS: a survey of applicants for driving licences with a history of drug use. *Forensic Sci Int*, **2000**; 107: 157-167
35. **Cone EJ, Yousefnejad D, Darwin WD, Maguire T.** Testing human hair for drugs of abuse. II. Identification of unique cocaine metabolites in hair of drug abusers and evaluation of decontamination procedures. *J Anal Toxicol*, **1991**; 15: 250-255

36. **Koren G, Klein J, Forman R, Graham K.** Hair analysis for cocaine: differentiation between systemic exposure and external contamination. *J Clin Pharmacol*, **1992**; 32: 671-675
37. **Goldberger BA, Caplan YH, Maguire T, Cone EJ.** Testing human hair for drugs of abuse.III. Identification of heroin and 6-acetylmorphine as indicators of heroin use. *J Anal Toxicol*, **1991**; 15: 226-231
38. **Harkey MR, Henderson GL, Zhou C, Jones RT.** Simultaneous determination of cocaine, benzoylecgonine and ecgonine methyl ester in human hair by gas chromatography-mass spectrometry. *J Anal Toxicol*, **1991**; 15: 260-265
39. **Nakahara Y, Takahashi K, Shimamine M, Saitoh A.** Hair analysis for drugs of abuse.IV. Determination of total morphine and confirmation of 6-acetylmorphine in monkey and human hair by GC/MS. *Arch Toxicol*, **1992**; 66: 669-674
40. **Tagliaro F, Valentini R, Manetto G, Crivellente F, Carli G, Marigo M.** Hair analysis by using radioimmunoassay, high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis to investigate chronic exposure to heroin, cocaine and/or ecstasy in applicants for driving licenses. *Forensic Sci Int*, **2000**; 107:121-128.
41. **Welch MJ, Sniegowski LT, Allgood CC, Habrum M.** Hair analysis for drugs of abuse: evaluation of analytical methods, environmental issues, and development of reference materials. *J. Anal. Toxicol*, **1993**; 17: 389-398
42. **Gaillard Y, Pepin G.** Screening and identification of drugs in human hair by high-performance liquid chromatography-photodiode-array UV detection and gas chromatography-mass spectrometry after solid-phase extraction: A powerful tool in forensic medicine. *J Chromatogr A*, **1997**; 762: 251-267
43. **Clauwert KM, Van Bocxlaer JF, Lambert WE, Van den Eeckhout EG, Lemiere F, Esmans EL, De Leenheer.** Narrow-bore HPLC in combination with fluorescence and electrospray mass spectrometric detection for the analysis of cocaine and metabolites in human hair. *Anal Chem*, **1998**; 70: 2336-2344
44. **Cairns T, Hill V, Schaffer M, Thistle W.** Amphetamines in washed hair of demonstrated users and workplace subjects. *Forensic Sci Int*, **2004b**; 145:137-142
45. **Blank DL, Kidwell DA.** Decontamination procedures for drugs of abuse in hair: are they sufficient? *Forensic Sci Int*, **1995**; 70: 13-38
46. **Schaffer MI, Wang WL, Irving J.** An evaluation of two wash procedures for the differentiation of external contamination versus ingestion in the analysis of human hair samples for cocaine. *J Anal Toxicol*, **2002**; 26: 485-488
47. **Cairns T, Hill V, Schaffer M, Thistle W.** Removing and identifying drug contamination in the analysis of human hair. *Forensic Sci Int*, **2004**; 145: 97-108
48. **Romolo FS, Rotolo MC, Palmi I, Pacifici R, Lopez A.** Optimized conditions for simultaneous determination of opiates, cocaine and benzoylecgonine in hair samples by GC-MS. *Forensic Sci Int*, **2003**; 138: 17-26
49. **Pragst F, Rothe M, Spiegel K, Sporkert F.** Illegal and therapeutic drug concentrations in hair segments- a timetable of drug exposure. *Forensic Sci Int*, **1998**; 102: 81-111
50. **Strano-Rossi S, Bermejo-Barrera A, Chiarotti M.** Segmental hair analysis for cocaine and heroin abuse determination. *Forensic Sci Int*, **1995**; 70: 211-216

51. **Wilkins D, Rollins DE, Seaman J, Haughey H, Krueger G, Foltz R.** Quantitative determination of codeine and its major metabolites in human hair by gas chromatography-positive ion chemical ionization mass spectrometry: a clinical application. *J. Anal. Toxicol*, **1995**, 19: 269–274
52. **Jurado C, Gimenez MP, Menendez M, Repetto M.** Simultaneous quantification of opiates, cocaine and cannabinoids in hair. *Forensic Sci Int*, **1995**; 70: 165-174
53. **Kintz P, Mangin P.** Simultaneous determination of opiates, cocaine and major metabolites of cocaine in human hair by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). *Forensic Sci Int*, **1995**; 73: 93-100
54. **Toledo FC, Yonamine M, Moreeau RL, Silva OV.** Determination of cocaine, benzoylecgonine and cocoethylene in human hair by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B*, **2003**;798: 361-365
55. **Bermejo AM, Lopez P, Alvarez I, Tabernero MJ, Fernandez P.** Solid-phase microextraction for the determination of cocaine and cocoethylene in human hair by gas chromatography-mass spectrometry. *Forensic Sci Int*, **2006**; 156: 2-8
56. **Cordero R, Paterson S.** Simultaneous quantification of opiates, amphetamines, cocaine and metabolites and diazepam and metabolite in a single hair sample using GC-MS. *J Chromatogr B*, **2007**; 850: 423-431
57. **Lachenmeier K, Musshoff F, Madea B.** Determination of opiates and cocaine in hair using automated enzyme immunoassay screening methodologies followed by gas chromatographic- mass spectrometric (GC-MS) confirmation. *Forensic Sci Int*, **2006**; 159: 189-199
58. **Gambelunghe C, Rossi R, Ferranti C, Rossi R, Bacci M.** Hair analysis by GC/MS/MS to verify abuse of drugs. *Journal of Applied Toxicology*, **2005**; 25: 205-211
59. **Gentili S, Cornetta M, Macchia T.** Rapid screening procedure based on headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry for the detection of many recreational drugs in hair. *J Chromatogr B*, **2004**; 801:289-296
60. **Shen M, Xiang P, Wu H, Shen B, Huang Z.** Detection of Antidepressant and Antipsychotic in human Hair. *Forensic Sci Int*, **2002**; 126:153-161
61. **Cognard E, Rudaz S, Bouchonnet S, Staub C.** Analysis of cocaine and three of its metabolites in hair by gas chromatography-mass spectrometry using ion-trap detection for CI/MS/MS. *J Chromatogr B*, **2005**; 826: 17-25
62. **Scheidweiler KB, Huestis MA.** Simultaneous quantification of opiates, cocaine, and metabolites in hair by LC-APCI-MS/MS. *Anal Chem*, **2004**; 76: 4358-4363
63. **Girod C, Staub C.** Analysis of drugs of abuse in hair by automated solid-phase extraction, GC/EI/MS and GC ion trap/CI/MS. *Forensic sci Int*, **2000**; 107: 261-271
64. **Barroso M, Dias M, Vieira DN, Queiroz JA, Lopez-Rivadulla.** Development and validation of an analytical method for the simultaneous determination of cocaine and its main metabolite, benzoylecgonine, in human hair by gas chromatography-mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, **2008**; 22: 3320-3326
65. **Waters Company.** Oasis Application Notebook: 61-62
66. [http://www.tubim.gov.tr / dosyalar/ istatistik](http://www.tubim.gov.tr/dosyalar/istatistik) Erişim 10.10.2010
67. [http://www.tubim.gov.tr / raporlar/ kür-içerik](http://www.tubim.gov.tr/raporlar/kur-icerik) European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction publications, **2010**

68. **United Nations**, United Nations International Drug Control Programme Guidelines for Testing Drugs under in International control in hair, sweat and saliva, New York, **2001**
69. **Klein J, Karaskov T, Koren G**. Clinical applications of hair testing for drugs of abuse-Canadian experience. *Forensic Sci Int*, **2000**; 107:281-288
70. **Telepchak MJ, August TF, Chaney GC**. Forensic and Clinical Applications of Solid Phase Extraction. Humana Press, New Jersey, **2004**, 1-40
71. **Jurado C, Rodriguez-Vicente C, Menendez M, Repetto M**. Time course of cocaine in rabbit hair. *Forensic Sci Int*, **1997**; 84: 61-66
72. **Scheidweiler KB, Cone EJ, Moolchan ET, Huestis MA**. Dose-related distribution of codeine, cocaine, and metabolites into human hair following controlled oral codeine and subcutaneous cocaine administration. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **2005**;313: 909-915
73. **Margariti MG, Tsatsakis AM**. Assessment of long-term subacute exposure to dimethoate by hair analysis of dialkyl phosphates DMP and DMTP in exposed rabbits: The effects of dose, dose duration and hair colour. *Environmental Research*, **2009**; 109: 821-829

ÖZGEÇMİŞ

Pınar Efeoğlu 1984 yılında Adana’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Adana’da tamamladıktan sonra, 2003-2007 yılları arasında Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde okuyarak mezun oldu.

2007 yılında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Adli Tıp Anabilim Dalı Yüksek Lisans eğitimine başladı.