

MORFIN, KODEİN VE EROİNİN KROMATOĞRAFİK YÖNTEMLERLE TAYİNİ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

Kimya Müh. Şuayip MAVİŞ

TEZ YÖNETİCİSİ

Prof. Dr. Tülin SÖYLEMEZOĞLU



T E Ş E K K Ü R

Çalışmalarımnda göstermiş olduğu ilgi ve yardımlarından ötürü değerli hocam sayın Prof.Dr. Tülin SÖYLEMEZOĞLU'na, Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Elemanlarına ve Diyarbakır Bölge Kriminal Polis Laboratuvarı Müdürümüz sayın Mehmet METE'ye teşekkürlerimi sunarım.

Şuayip MAVİŞ

İ Ç İ N D E K İ L E R

1. Giriş ve Amaç	1
2. Genel Bilgiler	2
2.1 Morfin	3-6
2.2 Kodein	6-7
2.3 Eroin	7
2.4 İnce Tabaka Kromatografisi	8-9
2.5 Gaz Sıvı Kromatografisi	9-10
2.6 Sıvı Kromatografisi	10-11
3. Deneysel Kısım	12
3.1 Gereç	12
3.2 Yöntem	13-18
4. Bulgular	19-23
5. Tartışma ve Sonuç	24-26
6. Özet	27
7. Kaynaklar	28-33

1. G İ R İ Ş V E A M A Ç

Uyuşturucu maddelerin kullanımı çağımız için belli başlı sorunlardandır. Kullanılan uyuşturucu maddeler sadece kullananların sağlığını bozmakla kalmayıp, kişilerin uyuşturucu madde se lamak amacıyla yasa dışı yollara sapması gibi toplumsal zararlar la birlikte birçok hastalığın (AIDS, Sarılık v.s.) yayılmasına d olaylı neden olarak toplum sağlığını tehdit etmektedir. Bu açı dan uyuşturucu maddelerle savaşta, narkotik analiz laboratuvar larına büyük görevler düşmektedir.

Türkiyede narkotik maddelerin illegal yollardan alınıp satılması ve kullanımı açısından hızlı bir trafik vardır. Bu Türkiye'nin afyon üreticisi bir ülke olmasından çok coğrafi ko numundan kaynaklanmaktadır. Bu trafik içinde eroin ve morfin önemli yer tutmaktadır (1).

Ayrıca bulunduğumuz yöre de, coğrafi konum nedeniyle özellik gösterdiğinden yakalanan uyuşturucuların hızlı ve stan dart yöntemlerle tayin edilmesi gerekmektedir. Bu amaca yönelik olarak çalışmamızda morfin, eroin ve kodeinin kromatografik yön temlerle kalitatif ve kantitatif tayinleri yapılmış, yöntemler koşullarımıza uygun şekilde standardize edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

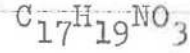
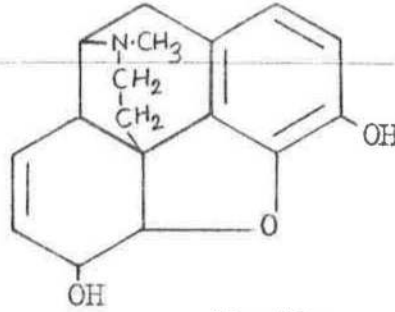
Haşhaş (Papaver somniferum) M.Ö.4000 yıllarından beri Anadolu topraklarında yetiştiği bilinen ve Sümer,Eski Mısır Yunan ve Roma kültürlerinden kalan kaynaklarda kullanımından söz edilen bir bitkidir (2). Bu kaynaklarda haşhaştan,çocukları sakinleştiren ve bir çok ağrıya iyi gelen bir madde olarak söz edilmektedir (3). Friedrich Sertürner tarafından 1805 yılında afyondan bir alkaloid izole edilmiş ve uyku tanrısı Morpheus'a izafeten morfin adı verilmiştir(3). Daha sonra (1832) kodein de afyondan izole edilmiştir. Eroin ise 1874 yılında morfinin asetilasyonu ile elde edilmiştir (4).

Afyonun gerek tedavi edici amaçlarla gerekse keyf verici olarak kullanımı çok eski devirlere uzanmakla birlikte morfinin iki amaçla da kullanımı Amerikan iç savaşı yıllarına rastlar,ilki kez bu dönemde hipodermik iğnelerin bulunmasıyla kullanılmaya başlanan morfin aynı zamanda bir bağımlılık türünü de başlatmıştır (5). Bu savaş sırasında ağrılara karşı morfin enjeksiyonları yaygınlaşmış ve savaştan sonra görülen bağımlılık olaylarına asker hastalığı "Soldiers disease" adı verilmiştir (6). Daha sonra kodein ve eroinin de değişen derecelerde bağımlılık yaptığı ortaya çıkmıştır.

Günümüzde morfin,kodein ve eroin uluslararası kontrol altında olan narkotikler sınıfına dahildirler. Morfin ve kodein tıbbi amaçlarla kullanılırken eroinin kullanımı yasaklanmıştır (7).Ancak,dünyada yasal olmayan yollarda işleyen hızlı bir uyuşturucu trafiği vardır ve burada eroin önemli bir yer almaktadır

2.1.1 M O R F İ N :

Morfin afyon içinde en yüksek oranda bulunan alkaloiddir. Afyon içinde % 8-15 oranında bulunur, fenantren grubu alkaloidlerdendir.



Morfin

MW : 285.3

Morfinin kimyasal özellikleri:

Morfinin yapısal formülü 1925 de ortaya çıkarılmış ve total sentezi 1952 de gerçekleştirilmiştir (8). Levo isomeri D (-) farmakolojik aktiviteden sorumludur. Kristal morfinin monohidrat bazı 254-256°C de erir, PK_a sı 8.02-8.05 dir. Morfin sülfat acı tadı olan, kokusuz kristaller halindedir. Suda kolaylıkla erir ve sudaki doymuş çözeltilerinin PH sı 4.3-5.0 dir.

Morfinin mutad analjezik dozu subkutan enjeksiyonla 8-15 mg. yavaş i.v. enjeksiyonla 2.5-15 mg.dir (4). Morfin ağızdan alındığında az, parenteral yollardan ise hızla absorbe olur. Farmakolojik etkilerini bir saat içinde gösterir. Morfinin enjekte edildiği yerden kana geçişi pasif difüzyonla olur ve bazen dokuya yağda eriyen iyonize olmamış moleküller şeklinde geçer. Absorbsiyondan sonra morfin hızla kanı terkeder ve bütüncü olarak, karaciğer, akciğer ve dalak gibi dokulara az oranda da iskelet kaslarına geçer. Kan-Beyin engelini geçemediğinden daha az oranlarda da beyne geçer. Dokuda toplanması plazma konsantrasyonunun hızla düşmesi ile sonuçlanır ve doku düzeyleri ancak 24-48 saatte düşer (4).

İnsanda alınan morfinin büyük kısmı ilk 24 saat içinde idrarla ve metabolitleri halinde atılmaktadır. Serbest morfin atılan kısmın sadece % 7 sini oluşturur. Safra ile morfinin % 1 ile % 10 u atılır. Akciğerler yolu ile ise alınan dozun % 3-6 sı atılmaktadır (9).

İnsanlarda morfinin majör metaboliti morfin-3-glukuronitdir, en yüksek konsantrasyonda böbreklerde bulunur. Morfin metabolizmasında tür ve sekse göre farklılıklar da bildirilmiştir (9). Morfinin 3 pozisyondan glukuronit konjugasyonu bir çok memeli türünde detoksikasyon için majör yoldur (9).

Morfinin en önemli farmakolojik etkisi analjezidir. Ağrının algılanmasını her zaman engellemediği halde ağrıya bağlı reaksiyonu azaltıp kişinin dayanma kapasitesini artırır. Hastanın endişe, anksiyete ve ruhi gerginliğini azaltarak öfori yapar. İnsanda sedasyon yapar, morfin verilenlerin % 90'ında uyusukluk oluşturur. Mental bulanıklık geliştirir, mental etkinlikte ve belirli bir düşünceye konsantre olmada azalma görülür. Hareketler azalır, harekete karşı isteksizlik olur. Bazı kimselerde sedasyon uykuya yol açacak kadar fazla görülür. En önemli yan etkisi solunumu deprese etmesidir. Solunumun hem hızını hem derinliğini azaltır. Akut zehirlenme halinde solunum sayısı 3-4 e kadar düşer, düzensiz veya periyodik solunum ortaya çıkar. Morfin öksürük merkezini de deprese eder, ancak antitussif olarak kullanılmaz.

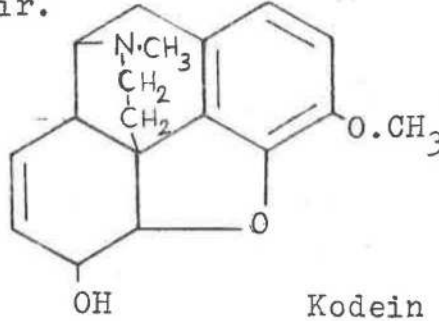
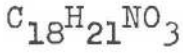
Morfinin santral sinir sistemi ile ilgili olmayan periferik etkileri de vardır. Bunlardan en önemlisi gastrointestinal etkilerdir. Midenin hidroklorik asit salgısını ve motilite-

sini azaltır, boşalmasını geciktirir. Mide tonusunu artırır, ince barsaklarda tonusu artırır, sonuçta ince barsak boyunca içeriğin geçiş süresi uzar ve barsak içeriğinden su absorpsiyonu artar, bu durum morfinin yaptığı konstipasyonda rol oynar.

Morfinin mutad günlük dozlarda devamlı olarak bir iki hafta uygulanması, genellikle analjezik etkisi dahil bir çok santral etkilerine karşı tolerans oluşmasına neden olur. Tolerans gelişmesi başlangıçtaki analjezik etkinin elde edilebilmesi için dozun artırılmasına yol açar. Morfine ileri derecede tolerans kazanmış kimseler, bu ilacın günde 3-4 gr. gibi yüksek dozlarına dayanabilirler. Mutad dozda günde 3 kez morfin injekte edilen hastalarda 1-2 hafta içinde bağımlılık meydana gelmektedir. Morfine bağımlılık kazanmış bir kimsede morfinin kesilmesi son dozdan 8-12 saat sonra başlayan yoksunluk sendromuna neden olur. Yoksunluk belirtilerinin şiddeti kişiye ve ilaca bağımlılık derecesine göre değişir. Lakrimasyon, rinore, terleme ve esneme görülür, uyku döneminden sonra irritabilite, tremör, midriyazis, kan basıncında artma, taşikardi, bulantı ve kusma, diyare, karın krampları gibi belirtiler ortaya çıkar. Belirtiler 36-72 saat sonra hafifler. Morfinin parenteral 30 mg'a ve ağızdan 120 mg'a kadar olan miktarlarda alınması ciddi bir zehirlenme yapar. Daha yüksek dozlarda intihar amacıyla veya bağımlılar tarafından aşırı dozda alınması sonucu akut morfin zehirlenmesine neden olur. Koma, ileri derecede solunum depresyonu, pupillalarda ileri derecede büzülme görülür. Ölüm solunum durması sonucu olur. Zehirlenmelerde tedavi amacıyla naloksan kullanılır. Morfin ağızdan alınmışsa % 0.02 lik potasyum permanganat solusyonu ile mide yıkanır ve sodyum sülfat pürgatif olarak verilir (7).

2.2. K O D E İ N :

Afyon alkaloididir. Morfinin fenolik metoksi grubundan metillenmiş türevidir.



Kodein MW : 299.4

Kodein morfinden metilasyonla elde edilir, coğrafik kökene bağlı olarak afyonda % 0.7 ile 2.5 oranında bulunur. Monohidrat bazı kristaller şeklindedir ve 154-156°C de erir. PK_a sı 8.22-8.55 arasındadır. Suda çözünür, organik çözücülerde daha fazla çözünür.

Kodein analjezik ve solunum depresanı olarak ağırlığına göre morfinden daha az potenttir. Tolerans, fiziksel bağımlılık ve çapraz tolerans geliştirir. Morfinden farklı olarak kodein analjezik ve antitussif ajan olarak muhtemelen daha iyi absorbe olması nedeniyle ağızdan etkilidir. Kodeinin analjezik dozu oral veya subkutan olarak 15-60 mg.dır (4).

İnjesiyonundan 15-30 dakika sonra serbest ve metabolitleri halinde plazmada ve serbest kodein olarak beyinde maksimum düzeye ulaşır. Beyin-plazma oranı 2:1 dir (10).

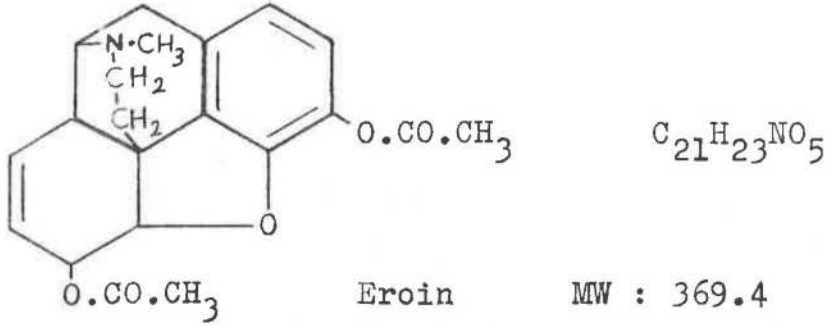
Kodeinin büyük bir kısmı morfin ve morfin-3-glukuronid şeklinde, küçük oranda da norkodein ve normorfin şeklinde atılır (11,12).

Kodeinin farmakolojik etkilerinden sorumlu maddeler olarak morfin ve normorfin düşünülmektedir (13).

Hafif ve orta şiddetteki ağrılara karşı ağızdan kullanılır. Düşük dozlarda (10-15 mg.) antitussif etki oluşturduğu halde analjezik etki yapmaz, 20 mg'ın üstünde analjezik etkilidir.

2.3. E R O İ N :

Eroin 1874 de morfinin asetilasyonu ile elde edilmiştir.



Renksiz kristallerin erime noktası $173^{\circ}C$ dir. Karakteristik acı bir tadı vardır. Suda az, organik çözücülerde iyi çözünür. Hava-ya uzun süre maruz kaldığında açık pembeye döner ve hidrolizden dolayı asetik asit kokusu duyulur. Suda çözünen hidroklorür tuzu $243-244^{\circ}C$ de erir.

Eroin, morfinden analjezi ve öfori verme açısından 2 ile 10 kez daha potenttir, çok yüksek bağımlılık yapma özelliği vardır (4). İnsan da dahil tüm türlerde eroin parenteral yollardan bir kaç dakika içinde sistemik etkiler oluşturacak şekilde hızla absorblanır. Eroin hızla 6-monoasetilmorfine ve daha az oranda da morfine hidroliz olur (15-17).

Eroinin farmakolojik etkilerinin 6-monoasetilmorfin ve morfinden kaynaklandığı bilinmektedir (17,18).

Eroin bağımlıları üzerinde yapılan çalışmalar idrardaki metabolitlerinin % 6 serbest morfin ve % 47 morfin konjugatları şeklinde olduğunu göstermiştir. Daha düşük oranlarda da 6-monoasetilmorfin şeklinde atılmaktadır (16-19).

2.4. İ N C E T A B A K A K R O M A T O G R A F İ S İ

İnce tabaka kromatografisi bağımlılık yapan ilaçların tanınmasında ve rutin idrar ve diğer biyolojik maddelerde yapılan tarama testlerinde kullanılan basit,hızlı ve duyarlı bir yöntemdir (20).

Yasal açıdan,özellikle eroinin yasa dışı trafiğini saptama yönünden hızlı bir analiz gerekmektedir. Böylece safsızlıkları ve oranı saptanarak kökeni konusunda kanıya varılabilmesi söz konusu olabilir (21,22).

İnce tabaka kromatografisi(TLC) ile eroinin başarılı olarak ayrılmasına ait ilk çalışma aktive edilmiş silikagel tabakalarda butanol-butileter-amonyum hidroksit (25:70:5) çözücü karışımı kullanılarak yapılmıştır (22). Diğer bir çalışmada alumina plaklarda benzen,metanol,amonyum hidroksit (90:10:0.2) çözücü karışımı kullanılarak eroin,morfin,3 asetilmorfin ve 6 asetilmorfin ayrımı yapılmıştır (23).Holcomb ve arkadaşları (24). silikagel plaklarda kloroform,metanol,dietilamin (80:15:5) çözücü karışımı kullanarak morfin,psödomorfin ve morfin N-oksid ayrımı yapmışlardır. Morfin ve metabolitlerinin TLC ile ayrılması konusunda yapılan çalışmada silikagel plaklarda çeşitli çözücü karışımları kullanılmıştır (25).

Önceden kaplanmış silikagel plaklarda etilasetat,metanol amonyum hidroksit (85:10:5) çözücü karışımı ile narkotiklerin tarama testi yapılmıştır (26). Sherma ve arkadaşları (27) geliştirdikleri TLC sistemi ile morfinin densitometrik miktar tayinini yapmışlardır. Manura ve arkadaşları (28), dört ayrı çözücü sistemi kullanarak eroini 56 kimyasal olarak benzer maddeden

ayırmak için yöntem geliştirmişlerdir. Clark (29), Eroin ve çeşitli narkotikleri TLC ile ayırmak için çeşitli çözücü sistemleri denemiş, kloroform, sikloheksan, dietilamin (8:10:3) çözücü karışımı ile eroin, morfin, kodein ve 6 asetilmorfini ayırmayı başarmış, ancak bazı durumlarda eroin içine karıştırılan kafeini 6 asetilmorfinden ayırmak için kafeinin reaksiyon vermediği iyodoplatinat reaktifini kullanmıştır. Morfinin kantitatif analizi ve bozunma ürünlerinin analizi kieselgel 60 F₂₈₅ plaklar üzerinde kloroform, etanol, aseton, amonyum hidroksit (20:20:5:1) çözücü karışımı kullanılarak yapılmıştır (30).

TLC ile saptanabilen en küçük miktar morfin için 1.5 mikrogram, kodein ve eroin için 2 mikrogramdır (31).

Narkotiklerin TLC ile saptanabilmesi için N 2;6 trikloro-P.benzoquinoneimine (32), ninhidrin (33) gibi reaktifler de kullanılmakla birlikte iyodoplatinat reaktifi tüm narkotiklerle renk vermektedir (21).

2.5. G A Z S İ V İ K R O M A T O G R A F İ S İ :

Narkotikleri GLC ile saptama amacıyla uygulanan yöntemler doğrudan alev iyonlaşma detektörü (FID) kullanılarak yapılanlarla, bir türevleme yönteminden sonra elektron yakalayan detektör (ECD) kullanarak yapılan çalışmalar olmak üzere ikiye ayrılır. ECD kullanıldığında hem saptanabilen en düşük duyarlık düzeyi düşmekte, hem de narkotiklerin polar yapısından dolayı ortaya çıkan güçlükler söz konusu olmamaktadır (21).

Curry ve Patterson (34) eroin, kodein, asetilkodein ve 6-asetilmorfini sikloheksan dimetanol suksinat (CDMS) taşıyan

bir kolonla 253°C da ayırmışlardır. Bir çok araştırmacı metil veya metilpentil silikonu stasyoner faz olarak kullanmışlardır (35-37). Ancak özellikle morfin bu araştırmacılar tarafından yüksek polaritesi nedeniyle adsorblandığı için kromatografide güç ayrılan bir madde olarak düşünülmektedir.

De Zan ve Fasanello (38) % 3 OV-1 stasyoner fazı eroin ve kininin miktar tayini için kullanmışlardır, bu çalışmada asetilkodein ve 6 asetilmorfinin birbirinden ayıramadığı bildirilmektedir.

Moore ve Bene (39) OV-1 stasyoner faz kullanarak eroin, morfin, kodein, asetilmorfinler, papaverin, metadon ve bazı lokal anestezikleri birbirinden ayırmışlardır. Van Der Slooten ve Van Der Helm (40) SE-30 ve QF-1 stasyoner faz kullanarak çeşitli numunelerde eroin, morfin ve 6 asetilmorfin oranını ölçmüşlerdir. Nakamura ve arkadaşları (41) GLC ile kütle spektroskopisini combine ederek eroini prokainden ayırmışlardır. Gough ve Baker (42) eroin, morfin, kodein, asetilkodein, 6 asetilmorfin ve kafeinin ayırımı ve kantitatif tayininde çeşitli stasyoner fazları denemiler ve en uygun olarak silanize OV-210'u bulmuşlardır.

Tüm bu çalışmalar narkotiklerin özellikle morfinin adsorbsiyon nedeniyle GLC kolonunda kayıplara uğradığını ortaya koymaktadır (21). Türevleme yöntemleri ise genelde toksikolojik analizlerde duyarlık ve seçicilik sağlamak amacıyla uygulanmaktadır (43-48).

2.6. S I V I K R O M A T O G R A F İ S İ :

Cashman ve Thornton (49) HPLC yöntemini eroin, morfin ve

6 asetilmorfin analizinde ilk kez kullanan araştırmacılarıdır. UV absorpsiyon detektörü kullanarak 210 ve 400 nm de Porasil T kolonla çalışmışlardır. Wittwer (50) ve Knox ve Jurand (51) aiyon alkaloidlerini ayırma amacıyla iyon değiştirme kromatografisi kullanmıştır.

Reverse faz kromatografisinde Bondapak C₁₈ kolon kullanılarak eroin,morfin ve metadon ayrımı Trinter ve Reuland (52) tarafından yapılmıştır.Huizer ve arkadaşları (53) eroin,kodein,asetilkodein,6 asetilmorfin ve kafeini silika kolonlarda ayrımını sağlamışlardır. Albanbauer (54) Reuland ve Trinter (55) Rasmussen ve arkadaşları (56) Fehner ve arkadaşları (57) Lurie (58) benzeri çalışmalar yapmışlardır. Tüm bu çalışmalarda UV absorpsiyon temeline dayanan detektörler kullanılmıştır. Wallace ve arkadaşları (59) elektrokimyasal detektörle çalışmışlardır.

Araştırıcılara göre GLC ve HPLC ile yapılan analizlere göre TLC narkotik analizlerinde ekonomik oluşu,tarama yöntemi olarak kullanılabilmesi açısından hala önemli bir yer tutmaktadır (21).

3. DENEYSEL KISIM

3.1. GEREÇ

3.1.1. İNCE TABAKA KROMATOĞRAFİSİ (TLC) :

Linomat III - Camag otomatik TLC spot cihazı.

Plak : Silikagel 60 F₂₅₄ 20x20 cm. 0.25 mm. Merck.

3.1.2. GAZ SIVI KROMATOĞRAFİSİ (GLC) :

Varian 3700 Gaz kromatografi cihazı ve Vista 401 elektronik integratör.

3.1.3. SIVI KROMATOĞRAFİSİ (HPLC) :

Varian 5500 Sıvı kromatografi cihazı ve Vista 401 elektronik integratör.

3.1.4. REAKTİFLER :

3.1.4.1. İyodoplatinat spray reaktifi :

0.25 gr. Platin IV klorür ve 5 gr. Potasyum İyodür saf suda çözülerek 100 ml.ye tamamlanır.

3.1.4.2. Dragendorf spray reaktifi :

(a)-2 gr.Bizmut subnitrat önce az suda çözülür.25 ml.asetik asit ilave edilir,saf su ile 100 ml. ye tamamlanır.

(b)-40 gr. Potasyum iyodür saf suda çözülerek 100 ml. ye tamamlanır.

10 ml.(a) + 10 ml.(b) + 20 ml.Asetik asit + 100 ml.su karışımı spray reaktifi olarak kullanılır.

3.2. Y Ö N T E M

3.2.1. İNCE TABAKA KROMATOĞRAFİSİ :

Plak : Silikagel 60 F₂₅₄ 20 x 20 cm. 0.25 mm.

Solvent : Etil asetat:Metanol:Amonyak (85:10:5).

Benzen:Dioksan:Etanol:Amonyak (50:40:5:5).

1 mg/ml konsantrasyonda metilalkolde çözölmüş standart morfin, kodein ve eroin numuneleri,TLC plakası üzerine ya kapiler cam boru ile ya da Linomat III otomatik spot cihazı ile belirli aralıklarla ve değişik miktarlarda (1-2-...10 mikrolitre) damlatılır. İç yüzeyi Temiz bir süzgeç kağıdı ile kaplanmış TLC tankına yeterli miktarda çözöcü sistemi (mobil faz) konulur. Tankın iç yüzeyinin süzgeç kağıdı ile kaplanması,tank içerisindeki havanın çözöcü buharlarıyla doymasını sağlamak için yapılmaktadır.Tankın havasının çözöcü buharlarıyla doyurulması kromatogramda lekelerin yeri ve birbirlerinden ayrılması üzerinde önemli etkisi olduğu bildirilmektedir.

Analiz örneğı plaka üzerine standart çözeltiilerle yan yana tatbik edilmelidir. Çözöcü sistemi adsorban tabaka üzerinde kapiler hareketle yükselirken,analiz örneğindeki bileşenler adsorban tabakaya olan ilgileri oranında mobil faz tarafından farklı farklı yerlere taşınır ve böylece numuneler birbirinden ayrılmış olur. Bu işleme developpe işlemi denir. Mobil faz tank içersine 3-10 mm. yükseklikte olacak şekilde konulur. Plak tank içersine dikkatli bir şekilde konulduktan sonra mobil fazın plaka üzerinde düzgün yükseldiğı kontrol edilmelidir. Mobil faz plaka üzerinde 10-15 cm. kadar yükselince plak tanktan çıkarılır,çözö-

cü seviyesi işaretlendikten sonra plak üzerine hava üflenerek kurutulur. Görünmeyen lekelerin yerleri önce UV ışık altında incelenerek lekelerin yerleri saptanır. Daha sonra görünmeyen lekeleri görünür hale getirmek için dragendorf ya da asitli iyodo-platinat reaktiflerinden biri ile spray edilir. Plak kurutulduktan sonra maddelerin R_f değerleri saptanır. R_f değeri kromatogramda maddelerin taşınma mesafeleri ile ifade edilir.

R_f :numunelerin plak üzerine uygulandığı nokta ile lekenin merkezi arasındaki mesafenin (A),uygulama noktası ile çözücü sisteminin mesafesine (B) oranı olup, bu değer adsorban tabakanın kalınlığına ve uniformluğuna,havanın sıcaklığına ve nemine göre değişir. Bu koşullar standart hale getirildiklerinde R_f değerleri maddelerin tanınmasında önemli verilerdir (şekil 1-2).

$$R_f = \frac{\text{maddenin taşınma mesafesi}}{\text{çözücünün mesafesi}} = \frac{A}{B}$$

Maddelerin kromatografik incelenmesi yapılırken konsantrasyonları bilinen numuneler,referans standart çözeltilerin belli miktarları ile ve aynı koşullarda analiz edilmesi sonucunda,lekelerin büyüklüklerinin karşılaştırılması ve son tekniklerin de uygulanması ile kantitatif analiz yapmak mümkün olabilmektedir. İnce tabaka krōmatografisi ile duyarlık bir mikrogram düzeyindedir.

3.2.2. GAZ SIVI KROMATOĞRAFİSİ :

cihaz : Varian 3700 gaz kromatografisi ve Vista 401 elektronik İntegratör.

Kolon : % 3 OV-17 ve % 3 OV-101 Chromosorb WHP 80/100 mesh, 2 m - 2 mm

Fırın sıcaklığı	:	240°C
Detektör sıcaklığı	:	300°C
İnjektör sıcaklığı	:	280°C
Detektör	:	FID
Taşıyıcı gaz	:	Azot 30 ml/dak.
Hidrojen	:	30 ml/dak.
Kuru hava	:	300 ml/dak.
Kağıt hızı	:	3 mm/dak.
Attenuation	:	4
Range AMPS/MV	:	10 ⁻¹⁰

Gaz kromatografisinde maddeler, biri çalışma sıcaklığında sıvı halde olan sabit faz, diğeri hareketli faz arasındaki dağılıma dengesine göre ayrılırlar. Sabit sıcaklık ve sabit gaz akış hızı koşulu altında maddelerin kolondan taşınarak detektöre gelmesi için geçen süreye alıkonma zamanı (Retention time) ve bu süre zarfında geçen gaz hacmine da alıkonma hacmi (Retention volume) denir. Alıkonma zamanı her maddeye özgü bir değerdir, sistemde başka maddelerin bulunmasından etkilenmez. Bu nedenle R_t değerlerinden kalitatif tayinde, kromatogramdaki her pike altında kalan alan ise o pike neden olan madde miktarı ile orantılıdır. Bu özellikten de kantitatif tayinde yararlanılır.

Gaz haldeki örnekler cihaza doğrudan "Head Space" tekniği ile, sıvı ve katı haldeki maddeler organik bir çözücüde çözüldükten sonra mikro enjektörlerle, geriye kaçmayı önleyecek özel bir septum bulunan ve önceden ısıtılmış injeksiyon ünitesinden cihaza verilir. İnjesiyon ünitesinde maddeler ısı ile

hemen buharlaşarak taşıyıcı gaz ile kolona sürüklenir. Maddeler kolonda sabit ve hareketli fazlar arasındaki dağılma katsayılarına, kolon temperaturüne, kolonun fiziksel özelliklerine ve kolondaki sabit fazın adsorbsiyon ve absorbsiyonuna bağlı olarak ayrılır ve taşıyıcı gaz ile kolon boyunca taşınarak farklı farklı zamanlarda detektöre gelirler. Detektöre gelen maddeler detektör sinyalinde artmaya neden olur ve bu sinyaller amplifikatörde kuvvetlendirildikten sonra yazıcıda zamanın fonksiyonu olarak kaydedilirler (şekil 3).

Kantitatif analizde morfin, kodein ve eroinin belli miktarları iç standart içeren metanolde çözüldükten sonra gaz kromatografi sistemine 1 mikrolitre injekte edilir. Elde edilen kromatogram referans kromatogramdır (şekil 3-4). Kaydedici bu kromatograma göre kalibre edilir. Pik alanları oranının konsantrasyon oranlarına karşı grafiği çizilirse kalibrasyon eğrisi elde edilir. Yine belirli tartımda analiz örneği iç standart içeren metanolde çözüldükten sonra sisteme injekte edilir. Elde edilen kromatogramdan bilinmeyen numunedeki madde miktarı kalibrasyon eğrisinden bulunur (şekil 5).

Gaz kromatografisi çok etkili bir ayırma yöntemidir. Ayırılan maddeleri tanımadaki duyarlık, ayrılmanın hızlı oluşu ve uygulamadaki kolaylık bakımından üstün bir analiz yöntemidir. Gaz kromatografisi ile duyarlık alt sınırı morfin için 1 mikrogram, kodein ve eroin için 0.1 - 0.2 mikrogram düzeyindedir.

3.2.3. SIVI KROMATOGRAFİSİ :

Cihaz : Varian 5500 sıvı kromatografisi ve Vista 401 elektronik İntegratör.

Kolon : Bondapak MCH-10, 30 cm - 4 mm.

Detektör : UV-200 Absorbans detektör, 235 nm. 0.1 AU/mv

Solvent : A % 40 Asetonitril - B % 60 0.2 M Fosfat tampon çözeltisi.

Akış hızı : 1 ml/dak.

Basınç : 72 atmosfer.

Kağıt hızı : 3 mm/dak.

Attenuation : 4

Sabit akış hızında her maddenin belli bir bağıl alıkonma zamanı (Retention Time) vardır. Bu özellik her madde için karakteristiktir ve bu özellikten kalitatif tayinde yararlanılır. Yüksek basınçlı çözücü sistemi (mobil faz) tarafından maddeler kolondan ayrılarak taşınır ve farklı farklı zamanlarda detektöre gelirler. Detektörde belli dalga boyundaki (235 nm.) UV ışını madde tarafından absorblanır. Absorblanan ışın miktarındaki azalma sonucu detektörde bir sinyal oluşur. Bu sinyaller amplifikatörde yükseltilerek yazıcıda zamanın fonksiyonu olarak kaydedilirler. Elde edilen kromatogramlar referans standart maddelerin kromatogramları ile karşılaştırılarak maddelerin niteliği saptanır. Kromatogramlarda piklerin altında kalan alan ise o pike neden olan maddenin miktarı ile orantılıdır. Bu özellikten de kantitatif tayinde yararlanılır.

Belli miktarlarda ve iç standart içeren metanolde çözülmüş standart morfin, kodein ve eroin çözeltilerinden ayrı ayrı 10 mikrolitre cihaza injekte edilir. elde edilen kromatogramlar referans kromatogramlardır (şekil 6). kaydedici bu kromatograma

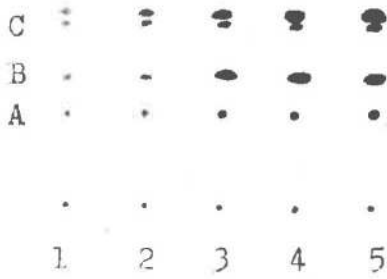
göre kalibre edilir. Pik alanları oranına karşı konsantrasyon oranları grafiği çizilirse kalibrasyon eğrisi elde edilir (şekil 7). Bundan sonra belli tartımda ve iç standart içeren metanolde çözülmüş örnek numuneler analiz edilerek elde edilen kromatogramdan numunedeki madde miktarı kalibrasyon eğrisinden bulunur.

Sıvı kromatografisinde hassasiyet nanogram düzeyinde madde miktarlarını saptayabilecek seviyededir.

4. B U L G U L A R

4.1. İNCE TABAKA KROMATOĞRAFİSİ (TLC) :

TLC ile elde edilen sonuçlar şekil 1 ve 2 de görülmektedir. Tablo 1 de ise iki ayrı çözücü sistemi ile elde edilen R_f değerleri görülmektedir.



Şekil:1.Morfin,kodein ve eroinin kromatogramları.

(A:Morfin,B:Kodein,C:Eroin)

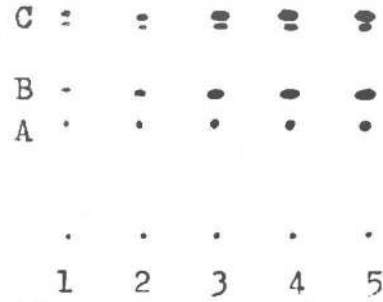
1:1 µg, 2:2 µg, 3:5 µg

4:10 µg, 5:20 µg,

Çözücü:Etil asetat:Metanol:

Amonyak (85:10:5).

Spray : Asitli İyodoplatinat reatifi .



Şekil:2.Morfin,kodein ve eroinin kromatogramları.

(A:Morfin,B:Kodein,C:Eroin)

1:1 µg, 2:2 µg, 3:5 µg, 4:10 µg,

5:20 µg.

Çözücü:Benzen:Dioksan:Etanol:

Amonyak (50:40:5:5).

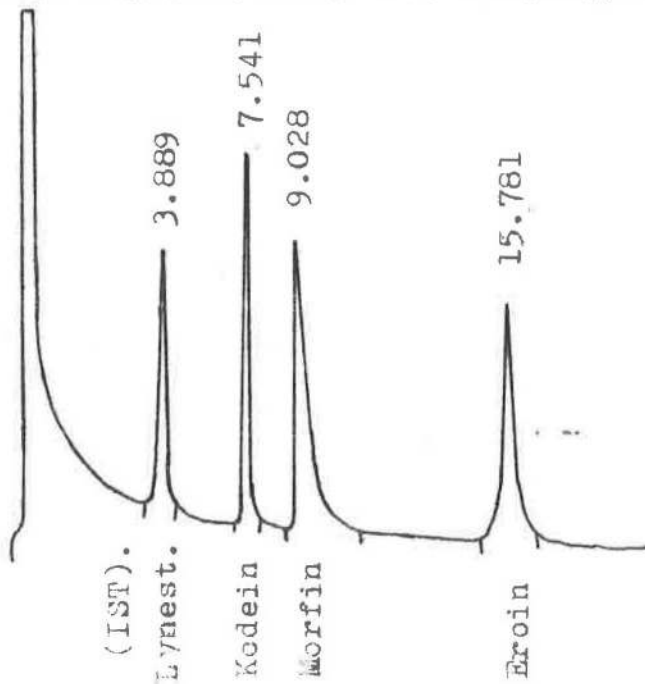
Spray : Dragendorff reaktifi.

Maddeler	Çözücü sistemi 1	Çözücü sistemi 2
Morfin	0.24	0.29
Kodein	0.32	0.35
Eroin	0.48	0.56

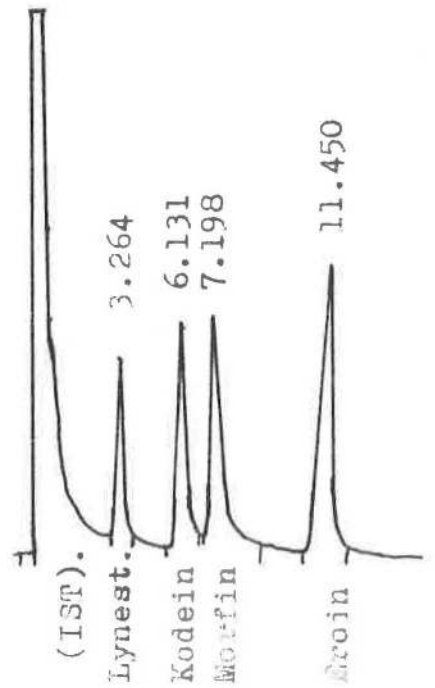
Tablo:1 İki ayrı çözücü sistemi ile saptanan R_f değerleri.

4.2. GAZ SIVI KROMATOĞRAFİSİ (GLC) :

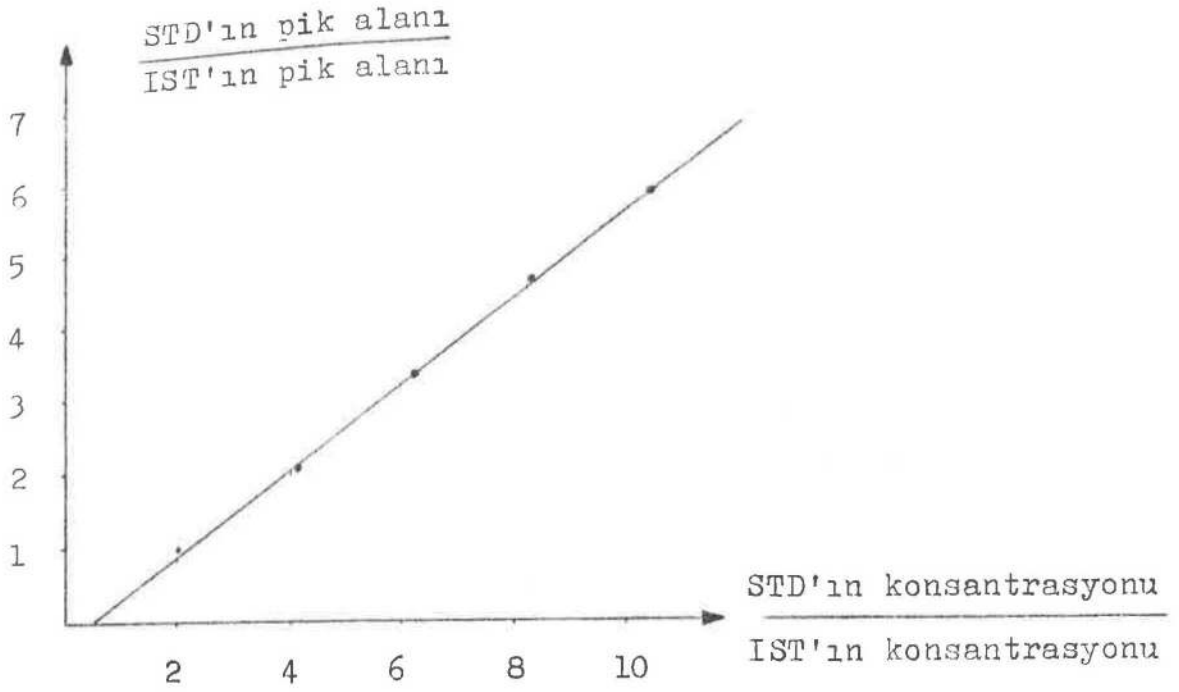
Morfin,kodein ve eroinin gaz kromatogramları şekil 3 ve 4 de, standart çözeltilerle elde edilen kalibrasyon eğrisi ise şekil 5 de görülmektedir. Tablo 2 de gaz kromatografisiyle bulunan alıkonma zamanları verilmiştir.



Şekil:3.0% OV-17 kolonu elde edilen morfin,kodein ve eroinin GLC kromatogramları.



Şekil:4.0% OV-101 kolonu ile elde edilen morfin,kodein ve eroinin GLC kromatogramları.



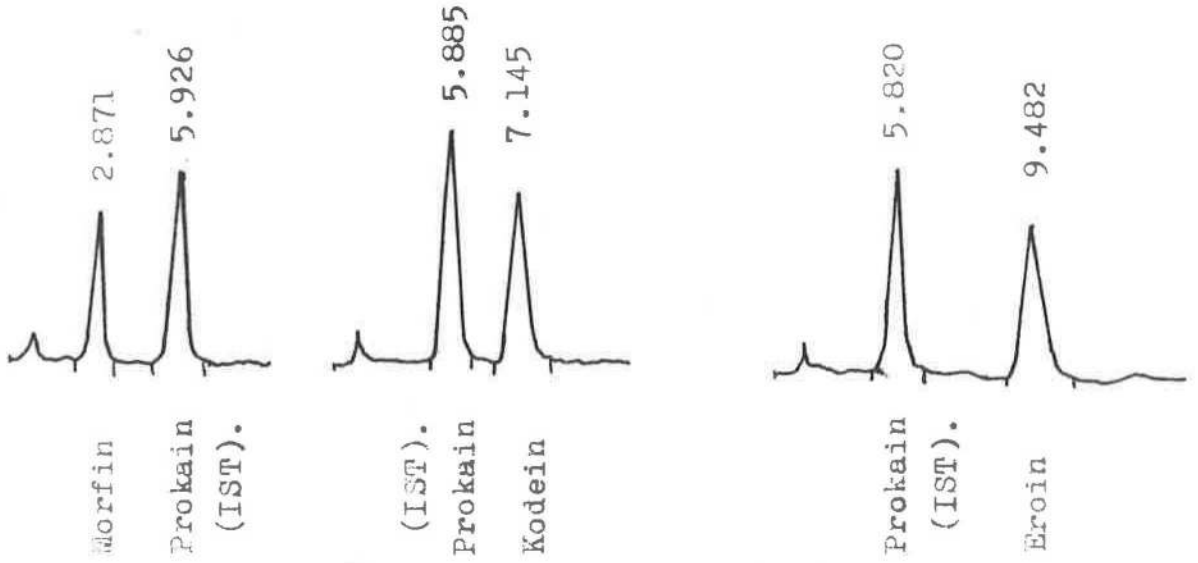
Şekil:5 Standart çözeltilerle çizilen kalibrasyon eğrisi.

Maddeler	% 3 OV-17 R_t	% 3 OV-101 R_t
Lynestrenol(IST).	3.889	3.264
Kodein	7.541	6.131
Morfin	9.028	7.198
Eroin	15.781	11.450

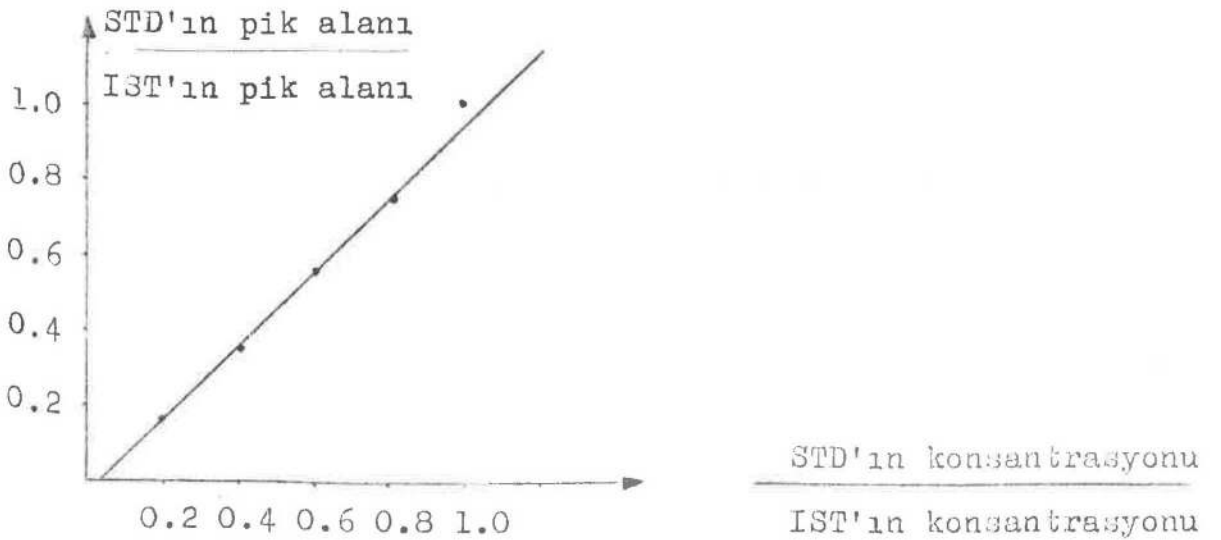
Tablo:2 Kodein, morfin ve eroinin iki ayrı kolonda saptanan R_t değerleri.

4.3. SIVI KROMATOĞRAFİSİ (HPLC) :

HPLC ile elde edilen kromatogramlar şekil 6 da görülmektedir. Şekil 7 de HPLC de standart çözeltilerle çizilen kalibrasyon eğrisi, tablo 3 de morfin, kodein ve eroinin alıkonma zamanları verilmiştir.



Şekil:6. Morfin,kodein ve eroinin HPLC kromatogramları.



Şekil:7. Standart çözeltilerle çizilen kalibrasyon eğrisi.

Maddeler	R_t değerleri
Morfin	2.781
Prokain (IST).	5.926
Kodein	7.145
Eroin	9.482

Tablo:3 Morfin,kodein ve eroinin HPLC'de saptanan R_t değerleri

5. T A R T I Ş M A V E S O N U Ç

Son yıllarda narkotik maddelerin kullanımı tüm dünya ülkelerinin ilgilendiği bir sorun haline gelmiştir. Afyon ve afyondan elde edilen narkotik maddeler ise Türkiye'de kullanımında ve ticaretinde en büyük paya sahip olduklarından özel önem taşımaktadırlar (1). Bu açıdan bu maddelerin analizi de önem kazanmaktadır.

Narkotik maddelerin TLC ile analizlerinde genellikle silikagel ve alüminyum oksitle kaplanmış plaklar kullanılmaktadır (20). Silikagel 60 F₂₅₄ maddesi ile kaplanmış plaklar aktive edildiğinde sonra kullanılmaları halinde, lekelerin yerlerinin daha belirgin ve ayrılmanın daha iyi olduğu gözlenmiştir (21). Değişmeyen deney koşullarında ve aynı plakların kullanılması ile tekrarlanabilir sonuçların elde edileceği bildirilmektedir (22).

İki ayrı çözücü sistemi ile morfin, kodein ve eroinin analizleri yapılmış, elde edilen kromatogramlar şekil 1 ve 2'de. hesaplanan R_f değerleri ise tablo 1'de görülmektedir. Etil asetat:metanol:Amonyak (85:10:5) çözücü sisteminde spray reaktifi olarak asitli iyodoplatinat; Benzen:dioksan:etanol:amonyak (50:40:5:5) çözücü sisteminde ise Dragendorff reaktifi spray reaktifi olarak kullanıldı (29). Her iki çözücü sisteminin de yeterli ayrım sağladığı sonucuna varılmıştır.

GLC'de morfin, kodein ve eroinin analizinde, kullanılan stasyonier fazın cinsi ve özelliği, kolon dolgu maddesinin partikül büyüklüğü ve kolonun fiziksel özellikleri ile kolon sıcaklığına bağlı olarak değişiklik görülmektedir. Kolon sıcaklığı

yüksek olunca analiz süresi kısaltmakta fakat kromatogramda pikler birbirine girdiğinden ayırım iyi olmamaktadır. Yüksek sıcaklık stasyoner sıvı fazın bozunmasına ve kısa süre sonra kolon veriminin düşmesine neden olmaktadır. Düşük sıcaklıkta ayırım iyi olmakta fakat analiz süresi uzamakta, piklerin yayvanlaşması ve kırılması analiz sonuçlarını hatalı kılmaktadır (34). Bu ve benzeri sorunları ortadan kaldırmak için deneyerek ya optimum kolon sıcaklığı bulunur ya da sıcaklık programlaması yapılır. Kolon sıcaklığı, analizin uygun bir sürede tamamlanmasını sağlayacak kadar yüksek, iyi bir ayırım sağlayacak kadar düşük olmalıdır.

Stasyoner sıvı fazın kompozisyonu ve katı destek materyalinin görmüş olduğu işlemin de iyi bir ayırım üzerine etkili olduğu bilinmektedir. Kolon dolgu maddesi silanize edilmemiş olursa, morfin ve benzeri polar yapıları adsorbe ederek hem analiz süresinin uzamasına, hem de sonuçların eksik bulunmasına neden olmaktadır (35-37).

Gaz kromatografisinde FID detektörle birlikte % 3 OV-17 ve % 3 OV-101 kolonlar kullanılmıştır. Her iki kolonla elde edilen kromatogramlar şekil 3 ve 4 de, standart çözeltilerle çizilen kalibrasyon eğrisi ise şekil 5 de ve saptanan alıkonma zamanları (R_t) tablo 2 de görülmektedir.

HPLC de kullanılan çözücülerin saflığı ve polariteleri de maddelerin ayrılmaları üzerine etki eden faktörlerden biridir. İyi bir ayırım sağlayabilmek için kolon materyalinden başka çözücü kompozisyonu ve çözücü akış hızının da optimum olduğu koşullar gereklidir. UV-200 absorpsiyon detektörü ve mikro bondapak MCH-10 kolonu kullanılarak narkotik maddelerin analizi yapılmış-

tır (52).Elde edilen kromatogramlar şekil 6 da, standart çözeltilerle çizilen kalibrasyon eğrisi şekil 7 de ve saptanan alıkonma zamanları (R_t) ise tablo 3 te gösterilmiştir.

Sonuç olarak : Narkotik maddelerin analizinde TLC sistemi, tarama testlerine olanak veren etkili ve çabuk sonuç alınan ekonomik bir yöntemdir.Kantitatif analiz söz konusu olduğunda GLC sistemi ile tutarlı sonuçların alındığı,uygulaması kolay ekonomik bir ayırma yöntemidir.Analiz örneğinde bulunan safsızlıkların niteliği ve oranı saptanarak maddelerin kökeni hakkında bilgi edinmek mümkün olmaktadır.TLC ve GLC sistemleri ile mikrogram düzeyindeki maddelerin analizleri yapılabilirken HPLC ile nanogram düzeyindeki madde miktarlarını kalitatif ve kantitatif olarak analiz etmek mümkün olmaktadır.

Tüm bu bilgilerin ışığı altında her üç yöntemin de kullanma amacına yönelik olarak üstünlükleri olduğunu söyleyebiliriz.

6. Ö Z E T

Bu çalışmada morfin, kodein ve eroinin İnce tabaka, Gaz likit ve Sıvı kromatografisiyle tanınmaları ve kantitatif tayinlerinin yapılması amacıyla laboratuvarımız koşullarına uygun olan yöntemler standardize edilmiştir.

Bu amaçla ince tabaka kromatografisinde çeşitli çözücü sistemleri denenmiş, Etil asetat:metanol:amonyak (85:10:5) ve Benzen:dioksan:etanol:amonyak (50:40:5:5) çözücü sistemlerinin yeterli ayırım sağladığı sonucuna varılmıştır. İnce tabaka kromatografisinde lekeleri görünür hale getirmek amacıyla asitli İyodoplatinat ve Dragendorf reaktifleri kullanılmıştır. İnce tabaka kromatografisi ile saptanabilen en düşük madde miktarı 1 mikrogramdır.

Gaz likit kromatografisinde FID detektörle çalışılmıştır. Değişik kolonlar denendikten sonra Chromosorb WHP üzerinde hazırlanmış % 3 OV-17 ve % 3 OV-101 kolonlar kullanılmıştır.

Her iki kolonla da iç standart ve numuneler arasında yeterli ayırım gözlenmektedir. Gaz likit kromatografisinde duyarlık morfin için 1 mikrogram, kodein ve eroin için ise 0.1 - 0.2 mikrogram düzeyindedir. 0.1 - 20 mikrogram standartla çalışıldığında yeterli lineariteyi gösteren kalibrasyon eğrisi elde edilebilmektedir.

Sıvı kromatografisinde UV-200 Absorbans detektör ve MCH-10 Bondapak kolonlar kullanılmıştır. Bu yöntemle duyarlık nanogram düzeyine inmektedir.

7. K A Y N A K L A R

- 1- Narcotics Control in Turkey. Republic of Turkey Ministry of Health and Social Assistance General Directorate of Pharmaceuticals Ankara (1988).
- 2- MEYERS, F.H., JAWETZ, E., GOLDFEEN, A.: Review of Medical Pharmacology. S.266., Large Medical Publications Los Altos, California, (1976).
- 3- FISHMAN, J., HAHN, E.: The opiates Medical Aspects of Drug abuse S.37 Ed. R.W. RICHTER, M.D. HARPER, Row Publisher, Hagerstown Maryland (1975).
- 4- MISRA, A.L.: Disposition and metabolism of drugs of dependence. Chemical and Biological aspects of drug dependence. Ed. Mule, Brill CRC Press Ohio (1972).
- 5- REES, L.: Drug Addiction Royal Society of Health Journal 84 (5) 276-281 (1964).
- 6- KÖKNEL, Ö.: Alkolden Eroine Kişilikten kaçış, Altın kitaplar Yayınevi (1983).
- 7- KAYAALP, S.O.: Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji cilt 2. Ankara (1984).
- 8- GATES, M., TSCHUDI, G.: The Synthesis of Morphine. J. Am. Chem. Soc. 74.1109 (1952).
- 9- PAERREGAARD, P.: Extraction of Morphine in Urine of Addicts Acta Pharmacol. Toxicol. 14, 53 (1957).
- 10- WAY, E.L., ADLER, T.K.: The Biological Disposition of Morphine and its surrogates. World Health Organization. Geneva (1962).

- 11- YEH, S.Y., WOODS, L.A.: Physiologic disposition of N¹⁴-C-Methyl-codeine in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 166, 86 (1969).
- 12- YEH, S.Y., WOODS, L.A.: Isolation of morphine-3-glucuronide from urine and bile of rats injected with codeine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 175, 96 (1970).
- 13- KUHN, F.H., FRIEBEL, H.: Die Ausscheidung von codeine und codeine metaboliten im Horn codeine gewöhnter rattem und meerschweinchen. *Med. Exp.* 7, 255 (1962).
- 14- ADLER, T.K.: The Comparative Potencies of codeine and demethylated metabolites after ventricular injection in the mause. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 140, 155 (1963).
- 15- KEMP, J.W., WAY, E.L.: Invitro studies on the metabolism of Heroin. *Fed. Proc.* 18, 409 (1959).
- 16- WAY, E.L., KEMP, J.W., YOUNG, J.M., GRASETTI, D.R.: The Pharmacologic effects of heroin in relationship to its rate of biotransformation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 129, 144 (1960).
- 17- WAY, E.L., YOUNG, J.M., KEMP, J.W.: Metabolism of heroin and its Pharmacologic Implications. *Bull. Narcotics.* 17, 25 (1965).
- 18- WAY, E.L.: Brain uptake of morphine and its implications *Fed. Proc.* 26, 1115 (1967).
- 19- WAY, E.L.: Pharmacologic Implications of some factors in Influencing the brain uptake of morphine. *Arch. Biol. Med. Exp.* 4, 92 (1967).
- 20- STAHL, E.: Thin-Layer Chromatography Springer Verlag New-York (1969).

- 21- ROUGH, T.A., BABER, P.B.: Identification of Major Drugs of Abuse Using Chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* 20, 289 (1982).
- 22- NAKAMURA, G.K.: Separation of asetilcodeine from illicit heroin by Thin Layer Chromatography. *J. A. O. A. C.* 49, 1086 (1966).
- 23- DAVEY, E.A., MURRAY, J.B., ROGERS, A.R.: The determination of di-morphine by thin layer chromatography. *J. Pharm. Pharmacol.* 20, 51 (1968).
- 24- HOLCOMB, I.J., IJERS, R.B., FUSARI, S.A.: Chromatographic separation and assay of morphine in injectables. *J. Pharm. Sci.* 62, 1504 (1973).
- 25- YEH, S.Y.: Separation and identification of morphine its metabolites and congeners. *J. Pharm. Sci.* 62, 1827 (1973).
- 26- DAWIDOW, B., PETRI, N.L., QUAME, B.: A thin layer chromatographic screening procedure for detecting drug abuse. *Amer. J. Chem. Path.* 50, 714 (1968).
- 27- SHERME, J., DOBBINS, M.F., TOUCHSTONE, J.C.: Quantitative Spectro-densitometry of morphine and amphetamine on thin layer chromatograms. *J. Chromatogr. Sci.* 12, 300 (1974).
- 28- MANURA, J.O., CHAO, J.M., SAFERSTEIN, R.: The Forensic identification of heroin. *J. Forens. Sci.* 23, 44 (1978).
- 29- CLARK, C.C.: A study of procedures for the identification of heroin. *J. Forens. Sci.* 22, 418 (1977).
- 30- EBEL, S., ROST, D.: Determination of morphine and its degradation products in drug by TLC. *Arch. Pharm.* 313, 337 (1980).
- 31- ENGELKE, B.F., VINCENT, P.G.: Thin layer chromatography combined with colour spot test reactions for preliminary identification of papaveraceous alkaloids. *J. A. O. A. C.* 62, 538 (1979).

- 32- VINSON, J.A., HOOYMAN, J.E., WARD, C.E.: Identification of street drugs by thin layer chromatography and a single visualization reagent. *J. Forens. Sci.* 20, 552 (1975).
- 33- DUTT, M.C., POH, T.T.: Use of ninhydrin as a spray reagent for the detection of some basic drugs on thin layer chromatograms. *J. Chromatogr.* 195, 133 (1980).
- 34- CURRY, A.S., PATTERSON, D.A.: A procedure for the analysis of illicit diamorphine samples. *J. Pharm. Pharmacol.* 22, 198 (1970).
- 35- PARKER, K.D., FONTEN, C.R., KIRK, P.L.: Rapid gas chromatographic method for screening of toxicological extracts for alkaloids, barbiturates, sympathomimetic amines and tranquilizers. *Anal. Chem.* 35, 356 (1963).
- 36- BROCKMAN-HANSEN, E., FONTAN, C.R.: Gas Chromatography of alkaloids with polar stationary liquids. *J. Chromatogr.* 19, 296 (1965).
- 37- McMARTIN, C., STREET, H.V.: Gas-liquid Chromatography of sub-micro gram amounts of drugs. *J. Chromatogr.* 22, 274 (1966).
- 38- DEZAN, P., FASANELLO, J.: The quantitative determination of heroin in illicit preparations by gas chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* 10, 333 (1972).
- 39- MOORE, J.M., BENE, F.E.: Rapid gas chromatographic assay for heroin in illicit preparations. *Anal. Chem.* 44, 385 (1972).
- 40- VAN DER SLOOTEN, E.P.O., VAN DER HELM, H.J.: Analysis of heroin in relation to illicit drug traffic. *Forens. Sci.* 6, 83 (1975).
- 41- NAKAMURA, G.R., NOGUCHI, T.T., JACKSON, D., BANKS, D.: Forensic identification of heroin in illicit preparations using integrated gas chromatography and mass spectrometry. *Anal. Chem.* 44, 408 (1972).

- 42- GOUGH, T.A., BAKER, P.B.: The selection of gas chromatographic stationary phases and operating conditions for the separation and quantitation of heroin and structurally related compounds. *J. Chromatogr. Sci.* 19, 227 (1981).
- 43- IKEKAWA, N., TAKENYAMA, K., HOSAYE, E., OKA, T.: Determination of morphine in urine by gas chromatography. *Anal. Biochem.* 28, 156 (1969).
- 44- WILKINSON, G.R., WAY, E.L.: Submicrogram estimation of morphine in biological fluids by gas-liquid chromatography. *Biochem. Pharm.* 18, 1435 (1969).
- 45- WALLACE, J.E., HAMILTON, H.E., BLUM, K., PETTY, C.: Determination of morphine in biologic fluids by electron capture gas-liquid chromatography. *Anal. Chem.* 46, 2107 (1974).
- 46- DIGREGORIO, G.J., O'BRIEN, C.: Chromatographic detection of narcotic antagonists in human urine. *J. Chromatog.* 101, 424 (1974).
- 47- DAHLSTROM, B., PAALZOW, D.: Quantitative determination of morphine in biological sample by gas-liquid chromatography and electron capture detection. *J. Pharm. Pharmacol.* 27, 172 (1974).
- 48- YEH, S.Y., MCQUINN, R.L.: GLC determination of heroin and its metabolites in human urine. *J. Pharm. Sci.* 64, 1237 (1975).
- 49- CASHMAN, P.J., THORNTON, J.I.: The separation of heroin O⁶-monoacetyl morphine and morphine. *J. Forens. Sci. Soc.* 12, 417 (1972).
- 50- WITTWER, J.O.: Liquid chromatographic determination of morphine in opium. *J. Forens. Sci.* 18, 138 (1973).
- 51- KNOX, J.H., JURAND, J.: Separation of morphine alkaloids heroin, methadon and other drugs by ion exchange chromatography.

- j.Chromatogr.82,398 (1973).
- 52- TRINTER,W.A.,REULAND,D.J.: Rapid screening of cocain,heroin, methadon and morphine by reverse phase HPLC.J.Forens. Sci.Soc.15,153 (1975).
- 53- HUIZER,H.,LOGTENBERG,H.,STEENSTRA,A.J.: Heroin in the Netherlands.Bull.Narc.XXIX,65 (1977).
- 54- ALBANBAUER,J.,FEHN,J.FURTNER,W.,MEGGES,G.: Quattitative high performance liquid chromatography of narcotic drugs. Heroin and its formulations.Arch.Krim.162,103 (1978).
- 55- REULAN,D.J.,TRINTER,W.A.: An unequivocal determination of heroin in simulated street drugs by combination of high performance liquid chromatography and infrared spectro- photometry using micro sampling techniques.Forens.Sci. 11,195 (1978).
- 56- RASMUSSEN,K.E.,TONNESEN,F.,NIELSEN,B.,LUNDE,B.ROC,J.: Liquid chromatographic determination of morphine in aqueous and organic poppy extracts.Medd.Norsk.Form.Selsk.40,117 (1978).
- 57- FEHNER,I.,SZCPESY,L.,SZANTO,J.: The separation of opium al- kaloids by high pressure liquid chromatography.Mrg.Kem. Foly.85,337 (1979).
- 58- LURIE,I.:Application of reverse phase ion-pair partition chromatography to drugs of forensic interest.J.A.O.A.C. 60,1035 (1977).
- 59- WALLACE,J.E.,HARRIS,S.C.,PECT,M.W.:Determination of morphine by liquid chromatography with elektrochemical detection. Anal.Chem.52,1328 (1980).