

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Yayın No: 84

TOKSİKOLOJİ

LABORATUVAR KİTABI

Prof. Dr. Nevin VURAL
Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı

Ankara • 2000

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Yayın No: 84

TOKSİKOLOJİ

LABORATUVAR KİTABI

Prof. Dr. Nevin VURAL
Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı

Ankara • 2000

ISBN
975-482-512-2

Ankara Üniversitesi Basımevi --2000

ÖNSÖZ

Mesleki veya çeşitli nedenlerle oluşan akut veya kronik zehirlenmelerin toksikolojik analizlerini içeren bu kitap, ilk kez 1975 yılında yazılmış olan “Toksikoloji Laboratuvar Kitabı”nın yeniden düzenlenmesi ve daha gelişmiş yöntemlerin ilavesiyle hazırlanmıştır.

Kitap Eczacılık Fakültesinde okutulan “Toksikoloji Pratik” derslerine yönelik hazırlanmakla beraber, açıklanan yöntemler adli tıp, işçi sağlığı ve zehirlenme danışma merkezleri gibi kurumların toksikoloji laboratuvarlarında da uygulanabilecek niteliktedir. Adı geçen kurumlar için yardımcı olacağını ümit ederim.

İki bölümden oluşan kitapta 1. bölümde toksikoloji uygulaması ve toksikolojik analiz prensipleri hakkında genel bilgilere; 2. bölümde ise sık zehirlenmelere neden olabilen kimyasal maddelerin analizleri (monograf şeklinde) açıklanmıştır. Yöntemlerin bir kısmı rutin laboratuvar imkanları ile yapılabilecek düzeydedir. Bir kısmı da Anabilim Dalımızda çeşitli tez ve proje çalışmalarında uygulanabilirliği gösterilen yöntemlerdir.

Kitabın hazırlanmasında büyük emekleri geçen Anabilim Dalımız sekreteri Nurcan Bölükbaş, Polis Akademisi hocalarından Mustafa Dönmez ve eşi Somay Dönmez, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı araştırma görevlileri Ahmet Oğuz Ada ve İlker Ateş’e teşekkürü bir borç bilirim.

Prof. Dr. Nevin VURAL

Temmuz 2000

İÇİNDEKİLER

1. BÖLÜM

TOKSİKOLOJİK ARAŞTIRMALARDA KULLANILAN YÖNTEM ve TEKNİKLER

1. ANALİTİK YÖNTEMLERİN TOKSİKOLOJİK ARAŞTIRMALARDA

UYGULANMASI..... 1

2. SİSTEMATİK TOKSİKOLOJİK ANALİZ 6

2.1. Numune seçimi ve alınması..... 6

2.2. Postmortem toksikolojik analiz için alınacak biyolojik örnekler 8

2.3. Numunenin korunması ve laboratuvara gönderilmesi 9

2.4. Toksikolojik analizde izlenecek yol 11

2.5. Toksikolojik analizi etkileyen faktörler..... 11

2.6. Analitik bulguların değerlendirilmesi..... 14

3. ZEHİRLERİN BİYOLOJİK MATERYALDE DOĞRUDAN ARANMASI . 16

3.1. Ön denemeler 17

3.2. Biyolojik materyale doğrudan uygulanan testler 18

3.3. Bazı metalik zehirlerin biyolojik materyalde doğrudan aranması 26

Reinsh deneyi..... 26

4. ZEHİRLERİN BİYOLOJİK MATERYALDE İZOLASYON

TEKNİKLERİ 31

4.1. Uçucu zehirlerin biyolojik materyalden distilasyonla izolasyonları 31

4.2. Uçucu zehirlerin mikrodifüzyon yöntemi ile izolasyonları 37

4.3. Uçucu olmayan organik zehirlerin biyolojik materyalden izolasyonları 40

4.4. Enzim yıkılama yöntemi ile organik zehirlerin izolasyon ve aranmaları 46

5. ZEHİRLERİN TARAMA YÖNTEMLERİNDE KULLANILAN

ENSTRUMENTAL TEKNİKLER..... 51

5.1. İnce tabaka kromatografisi 51

5.2. UV ve görünür alan spektrofotometresinin toksikolojik analizlerde kullanılması .. 59

5.3. Gaz kromatografisinin toksikolojik analizlerde kullanılması 62

5.4. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi 65

5.5. Atomik absorpsiyon spektrofotometresi..... 66

5.6. Nötron aktivasyon analizi 67

5.7. İmmunoassay'ın toksikolojik analizlerde kullanılması..... 68

2. BÖLÜM

ÖNEMLİ ZEHİRLERİN BİYOLOJİK MATERYALDE ANALİZLERİ.....	77
1. UÇUCU ZEHİRLER	79
1.1. Karbon monoksit.....	79
1.2. Siyanür	93
1.3. Metil alkol.....	102
1.4. Etil alkol.....	107
1.5. Formaldehit	121
1.6. Formik asit ve format	123
1.7. Klorlu hidrokarbonlar	126
1.8. Aromatik hidrokarbonlar.....	130
1.9. Fenoller	140
2. UÇUCU OLMAYAN ORGANİK ZEHİRLER.....	148
2.1. Barbitüratlar	148
2.2. Benzodiazepinler	156
2.3. Salisilatlar	161
2.4. Parasetamol	165
2.5. Fenasetin	169
3. KULLANIMI KONTROL ALTINDA OLAN MADDELER (ve NARKOTİKLER).....	
4. DOPİNG MADDELERİ	179
4.1. Organik bazlar	180
4.2. Anabolik steroidler	
5. PESTİSİTLER	194
5.1. Organik klorlu pestisitler.....	
5.2. Organik fosforlu pestisitler.....	
6. METALİK ZEHİRLER	207
6.1. Reinsch deneyi	208
6.2. Kurşun.....	208
Ek.1. LABARATUVARDA İLK YARDIM	
Ek.2. ÖNEMLİ REAKTİFLERİN HAZIRLANMASI.....	
İNDEKS.....	
KAYNAKLAR.....	

TOKSİKOLOJİK ARAŞTIRMALARDA KULLANILAN YÖNTEM VE TEKNİKLER

1. Bölüm

1. ANALİTİK YÖNTEMLERİN TOKSİKOLOJİK ARAŞTIRMALARDA UYGULANMASI

Kimyasal maddelerin (zehirlerin) kaynakları, fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri, canlı organizmada uğradığı değişimler ve etki mekanizmaları, toksik dozları, zehirlenmelerin tedavileri, zehirlerin izolasyonu, nitel ve nicel analizleri, güvenli kullanımları için risk analizleri ve standardizasyonlarının yapılması bugünkü modern toksikolojinin uğraş alanıdır. Uygulamalı bir bilim olan toksikolojinin tarihi gelişiminde analitik yöntemlerin yeri tartışmasızdır. Özellikle 1960'lı yıllardan itibaren enstrümental tekniklerin toksikolojiye girmesi ile çok duyarlı ve spesifik analizlerin yapılabilmesi, moleküler düzeyde araştırmalara inilebilmesi toksikoloji alanında büyük çığır açmıştır.

Modern toksikolojinin tarihinde analitik toksikoloji ve forensik (adli) toksikoloji ilk gelişen dallardır. Analitik toksikolojinin içeriği ve uygulamaları bilinmeksizin forensik toksikolojiyi incelemek mümkün olamaz.

Analitik toksikoloji, canlı organizmaya zarar veren kimyasal maddelerin doku ve vücut sıvılarından izolasyonları, identifikasyonları, kalitatif (nitel) ve kantitatif (nicel) analizleri için gerekli yöntemleri araştırır, geliştirir. Genel olarak analizin yapıldığı biyolojik ortam kompleks yapılı ve aranacak madde, miktarı çok düşük olduğu için, kullanılan mikro yöntemlerin

duyarlı, güvenilir ve tekrarlanabilir olması gerekir. Bunun için de “analitik toksikologun” analitik kimyanın yöntemlerini ve tekniklerini çok iyi bilmesi ve kullanması gerekir. Diğer taraftan analizi yapılacak madde çoğunlukla, bir ksenobiyotik, organizmada metabolik olaylar sonucunda değişime uğramıştır. Bu nedenle vücut sıvı ve dokularında kimyasal madde yanında metabolitlerinin de araştırılması gerekir. Gerek biyolojik ortamın yapısı ve gerekse aranacak ksenobiyotik ve metabolitlerin analizi analitik toksikologun çözeceği problemleri oluşturur.

Forensik toksikoloji, “ toksikolojinin yasal amaçlarla kullanımı” olarak tanımlanır. Her ne kadar bu geniş tanım, düzenleyici (regulatory) toksikoloji, ilaç suistimali ve bağımlılığının biyolojik materyalde identifikasyonu gibi alanları kapsamakta ise de : tarihi gelişimi içinde forensik toksikolojinin uygulaması daha çok kriminal olaylarda görülen ölüm, yaralanma, fizyolojik ve davranış bozukluğuna neden olabilecek kimyasal maddelerin nitel ve nicel analizleri ile sonuçlarının yorumu alanında uygulanır. Bu nedenle analitik toksikoloji ve forensik toksikoloji tarihi gelişimleri içinde birbirinden yararlanan toksikoloji dallarıdır.

Diğer taraftan forensik toksikoloji, “pozitif bilimlerin hukuka uygulanması” olarak tanımlanan forensik (adli) bilimlerin de önemli bir dalıdır. Geniş anlamda adli bilimler, adli tıp, adli toksikoloji, adli odontoloji, adli antropoloji, adli psikoloji, adli kimya ve kriminalistik dallarını kapsar. Adli bilimler geçmişte olan bir olayı bilimsel yöntemlerle yeniden canlandırarak hukuk ve yasalar açısından değerlendirilmesine yardımcı olur. Genellikle bu olay bir suçun işlenmesi ile ilgilidir; suçun işlendiği olay yerinin incelenmesi, gerekli delillerin toplanması ve bu delillerin analizleri ile suçlu kişiyi belirlemek adli bilimlerin konusudur.

Adli toksikoloji , adli bilimler tarihinde adli tıptan sonra gelişen ikinci daldır. Modern toksikolojinin kurucusu olarak bilinen Mathiev J.B. Orfila (1783-1853) ilk kez adli olaylarda bilimsel delilin gerekliliğini toksikolojik açıdan göstermiştir. XIX. Yüzyıla kadar doktorlar, hakimler ve diğer hukuk görevlileri (savcı, avukat gibi) zehirlenmenin semptom ve işaretleri hakkında son derece yanlış nosyona sahiptiler.

O zamanlar eğer ceset siyah, mavi veya yer yer lekeli ise veya kötü kokuyorsa kurbanın zehirlenme sonucu öldüğüne inanılırdı. Arsenikle ölen kişilerin kalbinin veya vücutlarının ateşle tahrip edilemeyeceği gibi yanlış düşünceler vardı. Eğer zehirleyici kişi suçüstü yakalanamazsa kurbanın zehirlenmeden öldüğünü gösterebilecek herhangi bir yol (delil) yoktu.

İşte ilk kez Orfila 1814’de zehirlerin kimyasal ve fiziksel yapısının incelenmesine sistematik bir yaklaşım getirmiştir. Toksikolojinin babası olarak bilinen Orfila’nın rolü o zamanlarda olan meşhur öldürme olaylarında “ekspert tanıklık” yapmasıdır. Örneğin o yıllarda “zehirleyici” olarak isim yapan Marie Lafarge’nin mahkemesinde, arsenik (As) zehirlenmesinden şüpheli ölüm olaylarında, ölen kişinin iç organlarında, Marsh testini kullanarak, ölüm nedeninin zehirlenme (As ile) ile olduğu bilimsel olarak göstermiştir.

Adli toksikolojinin gelişimi kimyasal maddelerin analizi ile ilgili analitik yöntemlerin bulunması ve geliştirilmesi ile beraber olmuştur. Örneğin, ilk kez İngiliz kimyager James M. Marsh 1836’da dokularda arsenik tayini için güvenilir bir yöntem geliştirmiştir. (Marsh testi). Arkadan, arsenik, antimon, bizmut ve cıva gibi metalik zehirlerin ayrılması ve analizi için kombine bir yöntem olan Reinsch testi (1841); zehirlerin genel olarak taranmasında Fresenius (1845) ve von Babo (1847) tarafından geliştirilen yöntemler; alkaloidlerin ekstraksiyonu ve ayrılmasında kullanılan ve halen tüm uçucu olmayan zehirlere uygulanan Stas-Otto yöntemi (1851) ve fosfor

identifikasyonunda kullanılan Mitscherlich deneyi (1855) gibi (bilim adamlarının isminin verildiği) yöntemler sayılabilir. Zehirlenmelerin neden olduğu ölüm olaylarında postmortem toksikolojik analiz, alkol ve ilaçların neden olduğu trafik suç kazalarının araştırılması, madde bağımlılığının neden olduğu advers etkilerinin toksikolojik analizleri forensik toksikolojinin uygulama alanıdır. Bir kimyasal maddenin biyolojik sistemlerde analitik yöntemlerle araştırılması ve sonucun pozitif bir delil olarak kullanılmasının adli bilimlerde önemli bir yeri vardır.

Toksikolojinin diğer bir uygulama alanı terapötik ilaç izlenmesidir. (therapeutic drug monitoring). Genellikle bir ilaca verilen terapötik cevap ilacın uygulanan dozundan çok kandaki konsantrasyonu ile ilişkilidir. Bir ilacın belirli zaman aralıklarında plazma konsantrasyonunun izlenmesi, ortalama plazma düzeyinden sapmayı gösterir ve buna göre doz artırılır veya azaltılır. Özellikle terapötik indeksi küçük ve yan etkileri açısından önemli olan ilaçların (fenitoin, lityum, prokainamid, teofilin, amitriptilin, digoksin, valproik asit gibi) terapötik izlenmeleri gereklidir. Bu ilaçların kan serumu düzeylerinin kantitatif analizlerinde kesinlik çok önemlidir. Bu nedenle de kullanılan metodolojinin özellikle seçici olması gerekmektedir. Örneğin kantitatif tayinde o ilacın hem kendisinin hem de metabolitinin birlikte ölçülmesi terapötik amaç açısından ideal değildir. Analizi yapılan ilacın özelliğine göre değişik yöntemler (kromatografi, immuno assay gibi) seçilmelidir. Böylece terapötik ilaç izlemesi, temelde analitik toksikolojiye dayanmaktadır.

Endüstriyel toksikoloji ve regulatory (düzenleyici) toksikoloji uygulamalarında kimyasal maddelerin analizleri, maruziyetin biyolojik ve çevresel izlenmelerinde analitik yöntemlere ihtiyaç vardır. Endüstride kimyasal maddeye maruziyetin belirli standartlara göre analizi ve yorumlanması “çevresel izleme”, kişisel maruziyetin ise biyolojik

parametrelere göre biyolojik sıvılarda analizi ise “biyolojik izleme” olarak ifade edilir. Örneğin aromatik bir hidrokarbon olan toluenin işyeri ortamında TLV-TWA olarak tayini, çevresel izleme, maruz kalan kişilerin kanlarında toluen , idrarlarında metabolitleri olan hippurik asit ve o-krezol tayini “biyolojik izlemeye” örnektir. Bu analizler duyarlı ve güvenilir (standard) analitik yöntemlerle gerçekleştirilir.

İş ortamında iyi endüstriyel hijyenik koşulların sağlanması için işçilerin maruz kaldığı zararlı miktarda, tehlikeli maddelerin idendifiye etmek amacı ile çevresel izlenmeleri yapılır. Ancak çevresel izleme yanında maruz kalınan internal dozun incelenmesi (biyolojik izleme) maruziyetin daha iyi bir göstergesi olarak kabul edilir. Bu amaçla da maruz kalınan kimyasal madde veya karışımlarının kan, idrar, saç gibi biyolojik materyalde kendileri ve/veya metabolitlerinin kalitatif veya kantitatif analizleri yapılır. Analizde kullanılan yöntemlerin her kimyasal maddeyi tanımlayacak spesifiklikte olması gerekir. Ayrıca kompleks yapıdaki biyolojik materyalde ise çok düşük miktarda bulunduklarından dolayı bu yöntemlerin duyarlılıkları yüksek, ve yeterli derecede tekrarlanabilir olmalıdır.

Sonuç olarak adli toksikologlar tarafından toksikolojide uygulaması başlatılan analitik yöntemlerin çeşitliliği ve gelişmesi devam etmektedir. Zamanımızda toksikolojinin her alanında, toksikolojik problemlerin çözülmesinde bir çok yeni analitik teknik ve cihazdan yararlanılmaktadır.

Toksikolojide analitik yöntemlerin uygulanmasına yönelik olan bu kitapta zehirlenmelerde ve kimyasal maddelere maruziyetin belirlenmesinde kullanılan genel analiz yöntemleri ile önemli toksik maddelerin biyolojik materyalde idendifikasyonu ve tayinlerinde kullanılan yöntemlere örnekler verilecektir.

2. SİSTEMATİK TOKSİKOLOJİK ANALİZ

Zehirlenme olaylarının identifikasyonunda doğru numune seçimi, numune alma şekli, numunenin saklanması, laboratuvara gönderilmesi ve analize hazırlanması belirli bir sistematik düzen içinde yapılır. Numuneyi alan kişinin ve analizi yapan toksikoloğun kimyasal maddenin bozulması, metabolizması, metabolitleri ve kontaminantlarının neler olabileceği, analizi nasıl etkileyeceğini bilmesi gerekir. Zehirlenmelerde zehirlenmeye neden olan kimyasal maddenin identifikasyonu, kalitatif ve kantitatif analizinde izlenen yöntem aşağıdaki sıraya göre yapılır :

2.1. Numune seçimi ve alınması

Akut zehirlenmelerde, mesleki veya çevresel kimyasal maddelere akut ve kronik maruz kalmanın değerlendirilmesinde, ilaç suistimali ve bağımlılığının araştırılmasında ve terapötik ilaç izlenmesinde, ölüm olaylarında toksikolojik analiz için “biyolojik materyal” olarak tanımlanan vucut sıvı ve dokularından örnek alınır. İdrar ve kan genelde en çok kullanılan örneklerdir.

Alınan numunelerin uygun numune kaplarına alınması ve etiketlenmesi gerekir. Etiketle numunenin kime ait olduğu, numune cinsi ve numunenin alındığı tarih ve saat yazılır.

İdrar : Toksikolojik analizlerde bir çok kimyasal maddeler ve metabolitlerinin taranmasında tercih edilen bir sıvıdır. En önemli üstünlüğü; ilaç ve kimyasal maddelerin idrardaki konsantrasyonunun kana göre daha yüksek (100 kere daha fazla olabilir) olması ve proteinlere bağlı olmadan atılmasıdır. Ancak bazı ilaçlar idrarla sadece metabolitleri şeklinde atılır ve ana madde bulunmaz. Örneğin ρ^9 -tetrahidrokannabinol ve birçok

benzodiazepinler metabolitleri şeklinde atılır. Böyle durumlarda ilacın kendisinin diğer bir vücut sıvısı (kan) veya dokusunda aranarak identifikasyonu yapılmalıdır (Moffat, A.C. ve ark. 1986). Genel olarak 100 ml idrar örneği yeterlidir. Kural olarak hiçbir koruyucu konulmamalıdır.

Bilinci olmayan hastalardan idrar kataterize edilerek alınır. Bu durumda idrar örneğinin kateter sıvısı (çoğu kez lidocaine gibi bir lokal anestetik içerir) ile kontamine olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

Ölüm olaylarında alınabildiği kadar idrar örneği toplanmalıdır. İdrar kesesinin boş görüldüğü durumda idrar kesesinden “temas” yolu ile örnek alınır. Boş idrar kesesinde bulunabilecek glukoz veya aseton mikro yöntemle tayin edilir. Bu analiz özellikle diabet durumunun belirlenmesinde yararlıdır. Çünkü postmortem kanda glukoz tayini bu açıdan bir önem taşımaz.

Kan : İlaçların tanımlanmasında ve kantitatif analizinde en uygun örnektir. Akut zehirlenmelerde, hastaneye getirilen hastadan 2-3 şekilde kan örneği alınır :

10 ml. Heparinize edilmiş kan örneği (CO ve birçok ilaç zehirlenmesinin teşhisi için); %1 NaF içeren 2 ml. kan örneği (alkol tayini için) ve hiçbir koruyucu veya antikoagulan içermeyen 10 ml kan örnekleri ayrı ayrı tüplere alınır. Kan alınırken, alkol veya heparin içeren fenollü koruyucuları içeren dezenfektan “swab”ler kullanılmamalıdır.

Postmortem kan örneği en az 2 tane alınır. Ölümünden hemen sonra kalp kanı alınabilir, fakat perifer kan (femoral ven) tercih edilmelidir. Vücut boşluğuna sızan kan hiçbir zaman alınmamalıdır. Çünkü diğer vücut sıvıları, mide içeriği ile kontamine olabilir. Rutin analizlerde 20-30 ml kan yeterlidir. CO, siyanür, alkoller, diğer depresanlar, trankilizan gibi birçok ilaç ve toksik maddeler için koruyucu konmaz. Alkol analizi için en az %1 oranında NaF içeren 10-20 ml kan örneği ayrıca alınır. Sodyum florür, prezervatif olarak

kullanılır ve kanın mikrobiyel putrifikasyonunu ve böylece “endojen alkol oluşumunu veya alkol kaybını” önler.

Cam tüplere alınan kan örnekleri ağzı sıkıca kapatılarak analize kadar buzdolabında saklanır.

Mide içeriği veya mide yıkama suyu : Mide içeriği, mide yıkama suyu, kusmuk ve elbise üzerinde kalan kusmuk kalıntısı analiz için kullanılır. İlk mide yıkama suyu toksikolojik analiz için daha önemlidir. Numuneler ayrı ayrı alınır. Her birinin total hacimleri kaydedilir. Kantitatif değerlendirme için bu gereklidir. Mide içeriği ile ilgili örnekler plastik kaplar içinde toplanır. Analiz için en az 50 ml numune gereklidir.

Mideden alınan örnekler ilaçların ve toksik maddelerin taranması için uygundur. Henüz absorbe olmamış ve bozulmamış ilaç kapsülleri, tabletleri, bitki parçacıkları gözle bile görülebilir. Oral yolla zehirlenmelerde genel olarak toksik madde en yüksek konsantrasyonda mide içeriğinde bulunur.

Ölüm olayında ayrıca mide içeriği ile birlikte mide de alınır. İki tarafından ligatüre edilerek, mümkün mertebe şekli bozulmadan uygun bir kap içinde laboratuvara gönderilir.

2.2. Postmortem toksikolojik analiz için alınacak biyolojik örnekler

Yukarıda açıklanan idrar, kan, mide (ölüm halinde) ve içerikleri hem ölüm olmayan zehirlenmelerde (antemortem) hem de ölümden sonra (postmortem) toksikolojik analiz için alınır. Ölümden sonra otopsi sırasında en çoğunlukla mide muhtevası, kan, idrar, karaciğer, safra, beyin ve böbrek örnek olarak alınır. Tablo 1’de postmortem toksikolojik analizde kullanılan biyolojik materyal, miktar ve hangi zehirlenmelerde seçilecekleri gösterilmiştir.

Tablo 1- Otopsi sırasında toksikolojik analiz için alınacak biyolojik materyal.

<u>Numune</u>	<u>Miktar</u>	<u>Kullanıldığı analiz</u>
Beyin	100 g	Alkol ve diğer uçucu zehirler
Karaciğer	100 g	Bir çok toksik maddeler
Böbrek	50 g	Metaller (Hg, Cd gibi), sulfanamitler
Kan (kalp)	25 ml	Alkol, CO, CN, depresanlar, trankilizanlar
Kan (femoral ven)	10 ml	Alkol, CO, CN, depresanlar, trankilizanlar
Vitröz humor	Hepsi	Alkol
Safra	Hepsi	Morfin, metadon, glutetimid ve diğer ilaçlar
İdrar	Hepsi	Metaller, uyku ilaçları gibi birçok ilaçlar
Mide muhtevası	Hepsi	Zehirlenmeden veya ölümden kısa bir süre önce alınan zehirler
Akciğer	200 g	Inhalasyon zehirleri

Yöntemler geliştikçe alınması gereken biyolojik örnek miktarı da azalmaktadır. Örneğin karaciğer örneğinde daha önceleri 250-500 g alınması istenirken son yıllarda 100 g yeterli görülmektedir. (Cravey, H.R. ve Baselt R.C., 1975; Poklis, A. 1995) Eğer şüphelenilen zehir uçucu bir madde ise beyin (100 gram) ve akciğer örneği (200 gram) istenir. Cesetin bozulması durumunda beyinden her zaman örnek alınmalıdır. Pestisitler gibi yağ dokusunda biriken maddelerle zehirlenmelerde (klorlu hidrokarbonlu insektisitler, PCB'ler gibi) adipoz dokudan (50 gram) da örnek alınmalıdır.

Kronik metal zehirlenmelerinde kemik dokusundan örnek almak gerekir. Saç örneği ise hem ölüm olmayan kronik zehirlenmelerde ve hem de postmortem analizlerde kullanılan önemli bir biyolojik materyaldir.

Olay yeri kalıntıları : Zehirlenme olayının olduğu yerde (olay yeri), zehirlenen kişi ve ölünün çevresinde bulunan şişeler, kaplar, diğer şüpheli materyal zehirlenme olayı ile ilgili olabilir. Bu nedenle “olay yeri kalıntısı “ olarak isimlendirilen bu materyal analiz için alınır. Bu tip materyalden alınan numuneler ancak destekleyici olabilir. Değerlendirmede asıl olan biyolojik numunedir.

Olay yeri kalıntısından birkaç miligram örnek yeterli olabilir. Alınan örnek katı ise birkaç mililitre su veya uygun bir organik çözücü içinde çözülür. Her test için küçük bir miktar kullanılır.

2.3. Numunenin korunması ve laboratuvara gönderilmesi

İdeal olan numunenin alımından hemen sonra laboratuvara gönderilmesi ve analizin yapılmasıdır. Ancak analize kadar numunenin bir süre beklemesi gereklidir. Bu durumda bekletme sırasında analizi yapılacak maddenin (biliniyorsa) bozulmama koşulları sağlanmalıdır. Genel olarak ise gerek antemortem gerekse postmortem alınan örnekler birkaç gün içinde analizi yapılacaksa $(+4)^{\circ}\text{C}$ de ; daha uzun süre bekleyecek örnekler ise $(-20)^{\circ}\text{C}$ de saklanır. Ancak bu durumda alınan numunenin analizden önce iyice ezilip, homojenize edilmesi gerekir. -10°C den aşağı sıcaklıklarda numunenin saklanması sırasında CO , H_2S ve özellikle HCN 'in çözülmüş oldukları organ sıvılardan ayrılacakları hatırlanmalıdır. Koruyucu madde ilavesinden çoğunlukla kaçınılır. Ancak doku ve sıvıların bozunmasından etkilenecek toksik madde analizlerinde numuneye %1 oranında sodyum florür ilavesi yapılabilir. Özellikle etil alkol analizinde bu ilave zorunludur.

2.4. Toksikolojik analizde izlenecek yol

Laboratuara gönderilecek biyolojik materyalde toksikolojik analiz aşağıdaki şemaya göre gerçekleştirilir :

1. Numunenin ambalajı açılmadan önce dış görünüşü (büyüklüğü, ambalaj şekli, mühürü ve üzerindeki etiket) incelenir.
2. Numunenin net ağırlığı veya hacmi saptandıktan sonra 1/3'ü analiz için hazırlanır, diğer kalan kısmı gerektiğinde incelenmek üzere saklanır.
3. Mide içeriği, idrar ve kanda, izolasyon yapmadan önce, ön denemeler uygulanır.
4. Biyolojik materyalden kimyasal maddenin ayrılması için izolasyon yöntemleri (mikrodifüzyon, ekstraksiyon, enzim, dijestiyonu gibi) uygulanır.
5. İzole edilen zehirlerin nitel (kalitatif) analizleri için genel tarama testleri uygulanır. Ultraviyole spektroskopisi (UV), ince tabaka kromatografisi (İTK) ve gaz kromatografisi (GLK) en çok kullanılan yöntemlerdir. İmmunoassay de tarama testleri arasında sayılmaktadır.
6. Kimyasal maddenin kesin identifikasyonu (destekleyici testleri) ve kantitatif tayini yapılır. Bu amaçla GLK, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ve gerektiğinde gaz-kütle spektrometresi (GC-MS) kullanılır.
7. Metalik zehirler için Reinsch testi; atomik absorpsiyon ve emisyon spektroskopisi ile kalitatif ve kantitatif analiz yapılır.
8. Toksik anyonların dializ yöntemi ile ayrılması ve analizleri yapılır.

2.5. Toksikolojik analizi etkileyen faktörler

- 1) Toksikolojik analize başlamadan önce bazı faktörlerin göz önüne alınması gerekir. Bu faktörler arasında, alınabilen numune miktarı, aranacak

kimyasal maddenin mahiyeti ve zehirlenmeye neden olduğu düşünölen şüpheli maddenin biyotransformasyonu ve özellikle postmortem doku veya sıvılarda oluşabilecek bozunma maddeleri hakkında bilgi edinilmelidir.

Oral yol ile zehirlenmelerde öncelikle mide içeriğı analiz edilir. Çünkü letal doz veya üstünde bir miktarda alınan zehirin absorbe olmamış kısmını içerebilir. Arkadan idrar analizine geçilir. Çünkü böbrek bir çok zehirlerin atılım organıdır, bu nedenle yüksek konsantrasyonda toksik madde ve /veya metabolitlerini içerebilir. İlaç ve zehirler gastrointestinal sistem ve diğeryollarıdan absorbe olduktan sonra, genel sistemik dolaşımdan önce karaciğere taşınırlar. Bu nedenle kimyasal maddenin karaciğerdeki konsantrasyonu kana göre çok yüksek (enaz 100 misli) olabilir. Eğer belirli bir maddeden şüpheleniliyorsa veya biliniyorsa bu durumda toksikolog öncelikle zehrin konsantre olduğu doku veya sıvıları analiz materyali olarak seçer. Örneğın CO zehirlenmesi şüphesi varsa kan (COHb şeklinde bulunur) öncelikli analiz sıvısı olarak kullanılır.

Toksikolojik analiz yapan kişinin (kimyasal toksikolog) ilaç ve kimyasal maddelerin biyotransformasyonunu bilmesi gerekir. Ana madde ile birlikte (ana majör) metabolitinin de izole edilmesi gerekir. Bazı durumlarda sadece metabolitlerin bulunması zehirlenme nedeni olan ilaç veya zehir için bir delil olabilir. “İmmunoassay” gibi tarama yöntemleri ana maddeden çok idrardaki metabolit analizine dayanır. Örneğın kokain bağımlılığının saptanmasında, başlangıç testi olarak immunoassay yöntemi ile idrarda majör metaboliti olan benzoilekgonin aranır. Eğer tükürük veya saç biyolojik materyal olarak kullanılacak ise o zaman doğrudan kokain aranır. Daha ileri testlerle (GC ve GC/MS gibi) kokain ve majör metabolitleri (benzoilekgonin ve ekgonin metil esteri) ayrılarak kantitatif analizleri yapılır.

Kural olarak ölümden sonra, otopsi ve toksikolojik analiz en kısa zamanda yapılmalıdır. Çeşitli nedenlerle otopside ve numune almadaki gecikmeler, analizi etkileyen birçok interfere edici maddelerin oluşmasına neden olur.

Ölümden sonra oluşan “Thanatokimyasal” değişimleri bilmek çok önemlidir. Cesedin bekletilmesi sırasında, ortamın sıcaklığı, nemi ve süresi gibi çeşitli etkenlerle cesette enzimatik ve nonenzimatik proseslerle bozunma olur. Ayrıca mikrobiyel metabolizma cesette bulunan zehiri parçalayabilir veya “ptomain” veya “kadaverik alkaloidler” adı verilen diaminlerin (putresin ve kadaverin) oluşmasına neden olur. Bu kadaverik alkaloidlerin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin sıklıkla rastlanılan zehirlere benzediği ve bozunmuş cesetten izole edilen bu maddelerin morfin ve benzeri ilaçlar gibi aynı renk reaksiyonlarını verdikleri 1870’li yıllarda bile biliniyordu. Daha sonraları oluşan diğer endojen maddelerin de ilaçlara benzer özellikleri gösterilmiştir. (örneğin fenil alaninin bakteriyel dekarboksilasyonu ile oluşan feniletilaminin amfetamine çok yakın özellik göstermesi gibi.) Cesete kötü koku veren bu aminler dışında, mikrobiyel bozunma sonucu birçok endojen maddeler oluşur. Analizi etkileyen bu maddelerin mahiyeti, fiziksel ve kimyasal özellikleri ile ilgili bir çok ayrıntılı çalışmalar bulunmaktadır. Putrefaksiyonun derecesi ve mikrobiyel aktiviteye bağlı olarak kandaki CO (COHb), siyanür, etil alkol gibi maddelerin konsantrasyonları azalabilir veya artabilir. Bunun yanında barbitüratlar, striknin ve civa gibi toksik maddeler ise çok dayanıklıdır ve ölümden uzun yıllar sonra bile tanımlanabilirler. (Stolman, 1969; Gadamer, 1965; Poklis, 1995)

2) Reaktifler ve ilaç standartları : Kullanılan kimyasal maddeler saf olmalıdır. Üzerlerindeki etiketlerinde spesifikasyonları belirtilenler

kullanılmalıdır. Kimyasal maddelerin ve standartların gerektiğinde ince tabaka kromatografisi ve UV spektrumları ile saflıkları kontrol edilmelidir.

3) Analiz niteliğinin güvenirliliği (quality assurance) : Analiz yapılacak numune ile birlikte bilinen pozitif ve negatif kontrol numunelerle paralel çalışmalıdır. Negatif kontrol numunesi (blank: kör), analiz sırasında kullanılan cam v.s. gibi malzeme ve reaktiflerden gelebilecek “yanlış pozitif sonucu” kontrol etmek için kullanılır. Şüpheli pozitif sonuç görüldüğünde kullanılan malzemenin kimyasal olarak temizliği tekrarlanmalı, reaktiflerin doğru hazırlanmış olması ve stabilitesi kontrol edilmelidir. Pozitif kontrol numunesi, analizi yapılacak madde ile hazırlanmış standardı içerir.

Kantitatif testlerde yöntemin doğruluğu, tekrarlanabilirliği ve verimi araştırılmalıdır. Analizi yapılacak madde standardı ile beraber ve gerektiğinde yöntemin kontrolü için dış veya iç standartlar kullanılır. Kullanılan yöntemin duyarlılığı (mg/l veya µg/ml olarak), deteksiyon limiti (kullanılan cihaz ile ilgili), ve seçiciliği ile ilgili parametreler de incelenerek, analiz sonucu verilecek raporda belirtilmelidir.

2.6. Analitik Bulguların Değerlendirilmesi

Numunenin analizinden sonra toksikolog, bulgularını ve konsantrasyonunu tayin ettiği maddenin ilgili kişinin üzerindeki fizyolojik ve davranış etkilerini yorumlamalıdır. Maddenin uygulama yolu ve dozu hakkında değerlendirme yapmalı, biyolojik materyalde saptanan konsantrasyonun kişinin ölümü için yeterli olup olmayacağı veya kişinin davranışlarını değiştirerek ölümüne neden olup olmayacağı cevabını vermelidir. Adli toksikoloğun çoğunlukla karşılaştığı en güç problem, analitik bulguların fizyolojik anlamını yorumlamaktır.

Uygulama yolunun belirlenmesi için, toksikolog çeşitli biyolojik sıvı ve doku örneklerinde yaptığı analiz sonuçlarına bakmalıdır. Genel bir kural

olarak, zehir uygulama yerinde en yüksek konsantrasyonda bulunur. Bu nedenle zehirin gastrointestinal (GI) sistem ve karaciğerde daha yüksek konsantrasyonda bulunması oral yolla alımını; diğer organlara göre akciğerde daha yüksek konsantrasyonda bulunması ise inhalasyonla alındığını gösterir. Kokain, eroin ve fensiklidin gibi bağımlılık yapan maddeler çoğunlukla sigara ile içme şeklinde alınır. Bu durumda bu maddelerin kendileri yanında piroliz (yanma) ürünleri de inhalasyonla alınır. Bu maddelerin kendileri ile birlikte yanma ürünlerinin de idrar, diğer vücut sıvıları ve dokularında bulunması duman şeklinde alındığını gösterir. Örneğin duman şeklinde alınan kokainin piroliz ürünü “crack” anhidrekgonin metilesteridir. Bu maddenin idrar veya diğer vücut sıvılarında ve kokainle birlikte yüksek miktarda bulunması, kokainin “sigara içme” şeklinde alındığını gösterir.

Genel olarak, ilaçların ve ksenobiyotiklerin , kan serum veya plazma konsantrasyonları ile fizyolojik etkileri arasında bir korelasyon vardır. Kimyasal maddelerin kandaki düzeyleri normal (ilaç durumunda terapötik), toksik ve letal olarak sınıflandırılabilirler.

Ölüm durumunda kimyasal maddenin “postmortem kandaki” konsantrasyonu değerlendirilir. Postmortem kan düzeyine, ilaçların alımı ile ölüm arında geçen süre, postmortem değişimler, kanın alındığı bölge ve diğer farmakokinetik özellikler etki eder. Kalp kanı, femoral ven, thoracic aorta gibi değişik yerlerden alınan kan örneklerinde analizi yapılan maddenin konsantrasyonları arasında önemli farklar bulunabilir. Etil alkol, digoksin ve imipramin gibi maddelerle yapılan araştırmalarda bu farklılık gösterilmiştir (Poklis.A. 1996). Bu farklılıkların bilinmesi ölüm nedeninin yorumunda faydalı olur. Bu nedenle; toksikolojik analizin (özellikle adli olaylarda) değerlendirilmesinde farklı yerlerden alınan kan ve doku örnekleri ile sonuçların birlikte incelenmesi gerekir.

Toksikolojik analiz sonucu bir rapor şeklinde hazırlanarak ilgili makama gönderilir. Adli toksikolojik analiz sonucu ile ilgili raporda:

- a) Otopsi yapılan kişiye ait genel bilgiler;
- b) Alınan numune çeşitleri ve miktarı ;
- c) Numunelere uygulanan izolasyon ve identifikasyon, kantitatif analiz yöntemleri (yararlanılan literatür de belirtilir);
- d) Vücut sıvı ve dokularında saklanan madde miktarının ölüme neden olup olmayacağının yorumunu ve analizi yapan toksikologun imzası bulunmalıdır.

Ölümlle sonuçlanmayan akut zehirlenmelerde ve madde bağımlılığına yönelik toksikolojik analiz sonuçları da benzeri şekilde belirli rapor örneklerine göre hazırlanır.

3. ZEHİRLERİN BİYOLOJİK MATERYALDE DOĞRUDAN ARANMASI

Akut zehirlenmelerde en önemli olay mümkün olan en kısa süre içinde zehirlenmeye neden olan maddenin identifikasyonu ve gerektiğinde kantitatif analizinin yapılmasıdır. Kişinin kurtarılmasında, antidot ve diğer tedavinin yapılabilmesinde zehirlenme etkeninin belirlenmesi hayati önem taşır. Zehirlenmeye neden olabilecek maddelerin sınıfı ve sayısı çok çeşitlilik gösterir. Genelde zehirlenmeye neden olabilecek maddelerin sayısı en az 1500'ün üstündedir ve bunlardan 250-300 kadarı ile de sık zehirlenmeye rastlanmaktadır (Fazla bilgi için Vural,N. 1996 ve Ellenhorn, M.J. 1997' ye bakınız).

Bilinmeyen bir madde ile zehirlenmede, mümkün olan en kısa sürede zehirlenmenin mahiyeti hakkında bilgi toplamak gerekir. Bu nedenle mide muhtevası, idrar ve kanda önce doğrudan (direkt) ön denemeler yapılır. Daha sonra izolasyon ve destekleyici tarama testlerine geçilir.

3.1. Ön denemeler

Zehirlenmeye neden olan maddenin identifikasyonunda yardımcı olacak ve kısa zamanda sonuca ulaştıracak ön denemeler mide içeriği, idrar ve kan örneklerine uygulanır. Bu örneklerde yapılacak organoleptik öncelemeler (renk, koku), pH ve kimyasal testler aşağıda açıklanmıştır. Bu testlerde kullanılan reaktiflerin hazırlanması kitabın sonunda verilmiştir.

Numunenin kokusu : Karakteristik kokusu olan maddeler numuneye kendi spesifik kokularını verirler. Bu nedenle idrar ve mide içeriğinde bu kokular algılanabilir. Örneğin :

a) Aromatik kokular

Fenolik koku -----> fenoller, krezoller;

Eterli koku -----> eter;

Tatlımsı koku -----> kloroform, aseton;

Acı badem kokusu -----> siyanür;

Menekşe kokusu -----> turpentin;

Tütün kokusu -----> nikotin;

Meyvemsi koku -----> alkol ve esterler;

Ayakkabı cilası kokusu ----> nitrobenzen;

Armut kokusu -----> kloralhidrat;

ile ilgilidir. Bunun dışında hidrojen sülfür, karbon tetraklorür, benzen, piridin, naftalin, metil salisilat, formaldehit, anilin, merkaptanlar, amilnitrit, bromoform, iyodoform, vanilin gibi maddeler kendine özgü kokuları ile tanınırlar.

b) Batıcı koku : Anorganik asitler, uçucu organik asitler ve formaldehit ile alınır.

c) Sarımsak kokusu : Elementel beyaz fosfor ve arsenik (kakodil oksit deneyinden sonra) ile ilgilidir.

d) Burunda aksırtıcı etki ve koku salisilik asit ve veratrin tarafından verilir.

Numunenin rengi : Renkli bileşikler bulunduğu biyolojik sıvıda çözünerek, numuneyi boyarlar.

a)Mide suyunun rengi : Anorganik tuzlar veya boyalar mide suyuna kendi renklerini verirler. Örneğin:

Potasyum permanganat : pembe, viyole ;

Bakır tuzları : yeşil, mavi;

Nikel tuzları : yeşil;

Kobalt tuzları : pembe;

Pikrik asit, nitrik asit : sarı;

Merkurokrom : parlak kırmızı renklenmeye neden olurlar.

Sülfirik asit, okzalik asit ile siyah ve kahve telvesi şeklinde granüller görülür. İlaç kapsülleri boyaları ile mide suyunu renklendirirler. Örneğin, sekonal kırmızı; nembutal, efedrin ve pronestil sarı; delvinal turuncu renk verir.

b) İdrarda renklenme : İdrarda kahverengi siyah rengin bekleme ile şiddetlenmesi, fenoller, naftol, nitrobenzen, pirogallol, rezorsinol, krezol, porfirinler ve melanin ile görülür.

Kırmızı kahverengi klorokin, ibuprofen, pamakin, fenasetin, fenotiazinler, fenitoin, trinitrofoneller ile oluşur. Alkali idrarda ise bu renk, antrokinon laksatifleri, levodopa, metildopa, parahidroksifen, piruvik asit ve fenazopiridin ile görülür.

Kırmızı veya pembe renk aminopirin, anilin boyaları, antipirin, iboprufen, fenasetin, fenitoin gibi maddelerle görülür. Alkali ortamda antrakininon laksatifleri, eosin, rubarb, santinin, brom sulfalein; asit ortamda anisindion, pancar ve böğürtlen idrara pembe veya kırmızı renk verir.

Asit idrarda anisindion, metronidazol, methemoglobin sarı kahverengi renk verir (Ellenhorn, M.S ve ark. 1997).

3.2. Biyolojik materyale doğrudan uygulanan testler

Renk reaksiyonları : Bir çok ilaç ve zehirler, yeterli konsantrasyonda ve intaferans yapan maddelerin yokluğunda, uygun reaktiflerle karakteristik renk verirler. Bu testlerin bir kısmı pratik açıdan spesifiktir. Ancak aynı fonksiyonel grubu içerenler de reaksiyona girerler. Kullanılan renk reaksiyonlarının bu özelliklerini ayırt etmek gerekir.

Renk reaksiyonları deney tüpünde, küçük porselen kapsül ve tüplerde uygulanabilir. Kullanılan malzeme ve reaktiflerin saflığını kontrol etmek için (yalnış pozitif kontrolü) kör (blank) deney yapılmalıdır. Ayrıca aranacak madde standardı ile (yalnış kontrolü) paralel olarak renk testi uygulanmalıdır.

İdrara doğrudan uygulanan testler

Glukoz ve ketonlar “Labstix” testi veya Fehling deneyi ile aranır. “Labstix” gibi uygun bir reaktifle emprenye edilerek hazırlanmış şeritler 10-15 saniye idrar içine daldırıldıktan sonra okunur. İdrarda glukoz mevcudiyetinde, kan glukoz konsantrasyonunda tayin edilerek aralarındaki korelasyon araştırılır.

Keton için pozitif sonuç alınması durumunda aseton veya izopropilalkol ile zehirlenmeden şüphelenilir. Bu test ayrıca açlıkta veya diabetik ketozisde de pozitif çıkar.

Fehling deneyi : İdrarda glukoz ve ketonlar için Fehling deneyi de uygulanabilir: 1 ml idrar, 1 ml Fehling reaktifi (Fehling I ve II karışımı) ile yarım saat kaynar su banyosunda bekletilir. Sarı kırmızı çökeleğin meydana gelmesi, serbest aldehit veya keton grubu olan bileşiklerin (glukoz, fruktoz, glukuronik asit, laktoz, mannoz) varlığını gösterir. Ayrıca kloroform, kloralhidrat, trikloroetilen, çok değerli fenoller, morfin, salisilatlar, amigdalın,

mentol, α -naftil tioüre (ANTU) gibi bileşikler de Fehling, deneyine pozitif cevap verirler.

Uçucu indirgen bileşikler (alkol ve aldehitler) dikromat testi ile aranır : Deney tüpüne, 1 ml idrara 1 ml %10 sodyum dikromat (%50 H_2SO_4 içinde) ilave edilir. Eğer idrarda %50 mg üstünde etil alkol varsa 10 saniyede ; %75 mg alkol varsa 45 saniye içinde oda sıcaklığında yeşil renk meydana gelir. Deney, sıcakta yapılırsa (karışım kaynar su banyosunda en az 2 dakika bekletilirse) %20 mg alkolün tanınması mümkün olur.

Etil alkol dışında diğer alkoller (metil alkol, izopropil alkol gibi) ve aldehitler de dikromatı indirgeyerek bu deneyle pozitif sonuç verirler.

Demir-3- klorür deneyi (genel) : Bir deney tüpünde, 2 ml idrara, 2 damla %5 lik demir-3-klorür (ferri klorür: $FeCl_3$) çözeltisi damlatılır. Soğukta salisilatlarla viyole renk oluşur. bunun dışında fenol, enol grubu içeren bileşiklerle : a) 1 dakika soğukta bekletme; b) sıcakta; c) 3 damla 2 N HCl ilavesinden sonra ısıtma ile aşağıdaki renkler elde edilir. (Tablo 2)

Tablo 2- FeCl₃ testi ile renk veren kimyasal maddeler

Çözelti veya çözeltinin rengi			
Oda ısısında 1 dakika sonra	Sıcakta	3 damla 2 N-HCl ilavesinden ve ısıtmadan sonra	Renk veren maddeler
Renkler			
Mavi	Kırmızı		Pirogallol
Mavi-viyole	Kahverengi	Açık Sarı	Bir değerli fenoller (fenol, krezol, mor- fin, dilaudid gibi)
Mavi-viyole	Kahverengi açık sarı	Açık sarı	Floroglusin, pira- zoller(piramidon, novaljin, veramon), rezorsin
Viyole	Viyole	Viyole	Salisilik asit ve sa- lisilatlar, kodein, santonin
Yeşil	Kırmızı, kahverengi	Kırmızı, kahverengi	Apomorfin, adrena- lin, guajakol
Yeşil	Beyaz çökelek	---	β-naftol
Kırmızı	Açıkkırmızı	Açık kırmızı	Antipirin
Çökelek			
Kırmızı sarı	Kırmızı sarı	Çözünme olur	Benzoat, ftalat ve kafur
Beyaz	Viyole	Çözünme olur	α-naftol
Mavi	Mavi	Mavi	Ferrosiyanür
Mavi	Mavi	Çözünür	Gallik asit ve tuzları

Salisilat aranmasında destekleyici deney olarak **Trinder** testi uygulanır: 1 ml idrara 5 damla Trinder reaktifi (FeCl_3 , HgNO_3 ve HCl ile hazırlanır) damlatılır. Viyole renk salisilat veya salisilamid varlığını gösterir. Terapötik dozda alınan aspirin veya aminosalisilik asit pozitif sonuç verir. Trinder reaktifi, salisilatların tayininde kantitatif amaçla da kullanılır (özel bölüme bakınız.)

Trikloro bileşikleri için Fujiwara deneyi : 1 ml idrara 1 ml %10 NaOH ve 1 ml tekrar distillenmiş piridin ilave ederek 2 dakika kaynar su banyosunda tutulur. Hiçbir renk meydana gelmezse 2 ml idrar ilave edilir ve tekrar ısıtılır. Piridin fazında pembe kırmızı rengin meydana gelmesi trikloro bileşiklerinin (kloroform, kloral, klorbutal, trikloroetanol, trikloroasetik asit) bulunduğunu gösterir. Deney , blank (kör) olarak seçilen idrar ve standart trikloroasetik asit çözeltisi ile (kontrol) paralel olarak yapılır. Çünkü laboratuvar ortamının reaktiflerle kontamine olması pozitif sonuç verebilir.

Karbon tetraklorürün metabolitleri (triklorometil bileşikleri) Fujiwara testi ile pozitif sonuç verebilir. Ancak karbon tetraklorür kısmen triklorometile metabolize olduğu için, her zaman pozitif sonuç alınmayabilir. Bu nedenle CCl_4 zehirlenmesinden şüphelenildiğinde, ayrıca hepatotoksosite testleri yapılmalıdır.

İmipramin, desipramin ve trimipramin için Forrest deneyi : 1 ml idrara, 1 ml Forrest reaktifi ilave edilir. İmipramin, desipramin veya trimipramin olduğunda yeşil renk meydana gelir.

Fenotiazinler için FPN deneyi : 1 ml idrara 1 ml FPN reaktifi ilave edilir. Fenotiazin türevlerinden birinin mevcudiyetinde pembe, kırmızı, turuncu viyole ve maviye kadar giden bir renk değişimi görülür.

Primer aminler için α naftol-sodyum nitrit deneyi : Seyreltik hidroklorik asitle asitlendirilmiş 2 ml idrara, 3 damla %1 Na NO_2 ve 3 damla

taze hazırlanmış %1 α -naftol %10 NaOH içine ilave edilir. Pembe rengin varlığı p-aminofenol veya diğer primer amin içeren bileşiklerden birinin varlığını gösterir. p-aminopenol fenasetin, parasetamol ve anilinin metabolitidir.

Parasetamol için krezol-amonyak testi : 0.5 ml idrara 0.5 ml hidroklorik asit ilave edilir ve 100°C de 10 dakika kaynatılır. Diğer bir tüpte, karışımın 2 damlasına 10 ml su, 1 ml %10 luk krezol (su içinde hazırlanmış) ve 4 ml 2M amonyum hidroksit ilave edilir. Mavi rengin oluşması parasetamol varlığını gösterir. Test çok duyarlıdır ve terapötik dozlarda da pozitif sonuç elde edilir. Aşırı dozda alımından günlerce sonra ana madde ve konjuge metabolitleri tanımlanabilir. Pozitif sonuç alındığında, hemen parasetamol plazma düzeyi tayin edilmelidir.

Etklorvinil için difenilamin testi : 2 ml idrar üstüne birkaç mg difenilamin sülfat serpilir. Tüp eğilerek yandan 1 ml sülfirik asit ilave edilir. Etklorvinil varlığında difenilamin kristalleri üzerinde kırmızı renk oluşur. Bu test spesifik ve terapötik dozda da pozitif sonuç verecek duyarlıktadır.

Parakuat ve dikuat için ditionit testi : 1 ml idrara taze hazırlanmış %0.1 lik sodyum ditionit çözeltisinden (1 M-sodyum hidroksit içinde) ilave edilir. Mavi rengin belirmesi parakuatı gösterir. Dikuat ile yeşil renk elde edilir, ancak parakuat da bulunabilir.

Parakuatın alımından 4 saat sonra alınan idrar örneğinde de koyu mavi renk elde edilmesi iyileşmenin gerçekleşmediğini gösterir. Zehirlenmenin şiddeti plazma-parakuat düzeyinin ölçülmesi ile desteklenir.

Mide içeriğinde uygulanan ön deneyler

Mide içeriği yukarda açıklandığı gibi önce koku, renk, görünüş (bitki parçaları, yemek artıkları, yabancı madde kalıntıları) olarak incelenir. pH'ı saptanır. pH'nın yüksek olması alkali alındığını gösterir.

Salisilatlar: Trinder testi ile aranır. 2 ml numuneye 2 ml 0.1 M hidroklorik asit ilave edilir. 10 dakika kaynatıldıktan sonra gerekirse süzülür. Süzüntü 0.1 M sodyum hidroksitle nötralize edilir ve 3 damla Trinder reaktifi ilave edilir. Viyole renk salisilat varlığını gösterir. Aspirin hidroliz edildikten sonra, Trinder reaktifi ile pozitif sonuç verir.

Oksidan maddelerin (hipoklorit, bromat, klorat, iyodat, nitrat ve nitritler) için difenilamin testi uygulanır. 2 damla numune mide içeriği süzüntüsü sülfirik asit içinde hazırlanan 1 ml %1 lik difenilamin çözeltisine ilave edilir. Hemen oluşan koyu mavi renk oksidan bir anyonun varlığını gösterir. Özellikle oksidan anyonların diğer anyonlardan ayrılmasında kullanılan bir testtir.

Açık mavi renk organik maddeden kaynaklanabilir ve bu nedenle göz önüne alınmamalıdır. Etlerde prezervatif olarak kullanılan nitrit ve nitratlar da (mide içeriğinde bulunabilecek etten kaynaklanan) pozitif reaksiyon verirler.

Ferro (Fe^{++}) ve ferrik (Fe^{+++}) iyonlarının tanımlanmasında ferrosiyanür ve ferrisiyanür deneyi kullanılır. 2 damla örneğe 3 damla 2 M hidroklorik asit ve 1 damla %1 lik potasyum ferrisiyanür çözeltisi ilave edildiğinde oluşan mavi çökelek (Turnbull mavisi) ferro iyonunun mevcudiyetini gösterir. Test, ferrisiyanür çözeltisi yerine ferrosiyanür çözeltisi kullanılarak tekrarlanır. Bu durumda oluşacak koyu mavi çökelek (Berlin mavisi) ferri iyonunun varlığını gösterir.

Organik fosfat yapısındaki ve diğer kolinesteraz inhibitörlerinin aranması : Kolinesteraz inhibisyonu reaksiyonuna dayanır. 2 ayrı tüpe 3 ml ditiyobisnitrobenzoik asit çözeltisi 0.1 ml %5 asetil tiyokolin iyodür ve 20 mikrolitre (µl) normal serum ilave edilir. Birinci tüpe 0.2 ml su (kör deney), ikinci tüpe 0.2 ml mide içeriği süzüntüsü ilave edilerek 2 dakika bekletilir. 2 tüp arasındaki renk farkı, organik fosfat esterleri veya başka bir kolinesteraz inhibitörü varlığını gösterir.

Fenotiyazinler, imipramin grubu, trikloro bileşikler, etklorvinil, parakuat ve dikuat mide içeriği süzüntüsünde daha önce idrarda açıklanan testlerle aranır.

Kana doğrudan uygulanan testler

Kanda glukoz ve üre tayini yapılır. Kan şekeri insülin, hipoglisemik maddeler şeker ve alkolle düşer. Ayrıca parasetamol zehirlenmesinde oluşan karaciğer hasarının ilk döneminde de hipoglisemi görülür.

Kanda (serum veya plazma) salisilatlar, uçucu indirgen maddeler ve kolinesteraz inhibitörleri daha önce açıklanan yöntemlerle aranabilir. Bu yöntemler kantitatif amaçla da kullanılır. Yöntemlerin ayrıntısı ilgili maddeler bölümünde açıklanacaktır.

Karbonmonoksit, karboksihemoglobin (COHb) şeklinde aranır. Kan örneği 0.01 M amonyak ile (1:20) oranında seyreltilir. Beraberinde deney normal kan ile tekrarlanır. Amonyakla seyreltilen normal kanın rengi hemen sarıya dönerken %20 ve üstü oranda karboksihemoglobin içeren kan birkaç dakika dayanan pembe renk verir. Sonucun diğer deneylerle de desteklenmesi gerekir.

Destekleyici deney olarak spektroskopik incelemeler ile yapılır : Kan örneği 0.01 M amonyum hidroklorürle 1:200 oranında seyreltilir. COHb sarı ve sarı-yeşil alanda (568 ve 538 nm de) maksimum absorpsiyon gösterir. Normal

kanda oksihemoglobin (O₂Hb) daha uzun dalga boyunda (576 ve 541 nm de) maksimum absorbans gösterir. Kanda %40 ve üstünde COHb olduğunda O₂Hb ve COHb bandlar ayrılabilir. COHb bandlarının daha iyi görülmesi için numuneye indirgen (sodyum ditionit gibi) bir madde ilave edilir. Bu durumda O₂Hb bandı kaybolur, 555 nm de daha az şiddetle hemoglobin (Hb) den ileri gelen maksimum absorbans görülür ve COHb bandları daha belirgin olarak seçilir.

3.3. Bazı metalik zehirlerin biyolojik materyalde doğrudan aranması

Arsenik, antimon, cıva, bizmut, selenyum ve tellüryum gibi bakırdan daha soy metalik zehirler (metal ve ametaller) biyolojik materyalde izolasyon yapmadan doğrudan aranabilirler. Ön deneyler grubuna göre bu testler arasında en önemlisi Reinsch deneyidir.

Reinsch Deneyi

Reinsch deneyinin prensibi, asit ortamda bakırdan daha soy metal veya ametal iyonlarının (cıva, gümüş, bizmut, arsenik, antimon, telleryum, selenyum, kükürt) metalik hale geçerek bakır levha üzerinde toplanmasına dayanır. Doğrudan doğruya, yıkılama işlemi gerekmeksizin, biyolojik madde (kan, idrar, doku) kullanılabilir. Bakır levha veya bakır spiral tel üzerinde toplanan metal veya metal karışımlarının kesin tanımlanmaları, Gettler ve Kaye (1961) tarafından geliştirilmiş bir seri destekleyici deneylerle (confirmatory tests) gerçekleştirilir. Bu testler yarı kantitatif amaçla da kullanılabilir.

Deneyin yapılışı : Biyolojik materyal olarak mide içeriği, böbrek veya idrar kullanılabilir. 25 g doku Waring blender veya benzeri bir

homojenizatörde uygun bir miktar su ile masere edilir. Numune olarak idrar kullanılacaksa 10 ml, organ içeriğinden ise 10 g alınır.

Bir erlenmayer içine konulan biyolojik madde üzerine 3-5 ml konsantre hidroklorik asit (HCl) ilave edilir, numunenin asit konsantrasyonu %2-8 arasında kalmalıdır.

1 cm² den daha büyük olmayan bir bakır levha kullanılır. Bakır levhayı tutmak için platin veya nikrom telden yararlanılır. Bakır levha (1:1) seyreltik HNO₃ içine ve sonra distile su içine daldırılarak temizlenir. Bakır levha biyolojik materyal ve asit ilave edilerek hazırlanan karışım içine daldırılır ve kaynar su banyosu üzerinde 1-2 saat ısıtılır. (bizmut 2 saat ister). Karışımın azalan hacmi, ısıtma esnasında %10 HCl ilave edilerek, tamamlanır. 1 saat sonra bakır levha alınır ve distile su ile yakandıktan sonra levha, filtre kağıdı arasında bastırmadan kurutulur.

Bakır üzerinde toplanmış maddenin rengi, metalik zehirin cinsi hakkında bize ön bilgi verir. Şöyle ki:

Tel üzerindeki gümüşü bir renk : cıva (Hg)

Parlak siyah renk : bizmut (Bi)

Mat siyah renk : arsenik (As)

Mor renk : antimon (Sb) olduğunu gösterir. (Bu test ile 20 ml çözeltide bulunan 50 µg cıva, 5 µg arsenik, 20 µg antimon, 20 µ bizmut tanınabilir).

Bakır levha üzerinde toplanan metallerin kesin identifikasyonları (Destekleyici deneyler):

Cıva aranması : Bir saat camına filtre kağıdı yerleştirilir ve sırası ile : 1-2 damla (100 ml suda 5 g potasyum iyodür ve 20g sodyum sülfat : KI+Na₂SO₃ 7 H₂O ile hazırlanan) çözeltiden ve 1-2 damla %5 bakır sülfat (5g CuSO₄. 5 H₂O, 100 ml 1 N-HCl içinde çözülür) ilave edilir. Distile su ile yıkanmış ve kurutulmuş bakır levha bu karışımın (küpöz iyodür : Cu₂ I₂)

üzerine konur. Saat camı ile kapatılır. 1 saat bekletilir. Bakır levha üzerindeki birikinti cıva ise, Cu_2I_2 ile reaksiyona girerek , sarı kırmızı bir renk (kupröz merkurik iyodür) belirir.

Bizmut aranması : Hg aranmasından sonra bakır levha alınır bir tüpe konur. Üzerine sırası ile 1ml %5 lik sodyum sülfat, 1 ml %15'lik nitrik asit (HNO_3) konarak karışım 5 dakika çalkalanır. Bizmut varsa çözeltiye geçer. Çözelti diğer bir tüpe aktarılır. Üzerine 1 ml distile su, 1 ml kinin-Ki reaktifi (1 g kinin sülfat, 100 ml %0.5 lik HNO_3 içinde çözülür. 2 g KI ilave edilir, (çözünmesi sağlanır). Bizmut olduğunda turuncu renk oluşur. (kinin-bizmut-iyodür.)

Arsenik ve antimon aranması : Bakır levha 0.5 ml %10 (KCN) ile çalkalanır. As çözeltiye geçer. Bu nedenle çözeltide As, bakır levhada ise antimon Gutzeit testi aranır.

Gutzeit Deneyi

1) Gutzeit deneyi en basit şekli ile bir tüp içinde yapılır. (Şekil 1a) Deney tüpünün içinde 1 ml yukarda hazırlanan KCN'lü çözelti (veya kalıntı olan bakır levha), 1 ml %20 lik H_2SO_4 , 1-2 saf granül çinko, 1-2 damla kalay klorür (SnCl_2) ilave edilir ve tüpün ağzı sıkıca bir mantar tıpa ile kapatılır. Arsenik varsa, mantarın kenarındaki Cıva-2-klorür %5 lik (HgCl_2) veya gümüş nitrat (AgNO_3) ile emprenye edilmiş filtre kağıdında konsantrasyona bağlı olarak sarı, turuncu, kahverengi ve siyah renge kadar değişen renk tonları (AgNO_3 ile siyah) görülür. Gutzeit testi, antimon mevcudiyetinde de pozitif sonuç verir. Fakat bu halde meydana gelen renk sarı-siyahtır ve renk daha geç meydana gelir. Ayrıca konsantre HCl dumanları ile temasta, antimon ile meydana gelen renk kaybolduğu halde arsenik ile meydana gelen renk sabit kalır.

Gutzeit deneyinde, Reinsch testi uygulanan bakır levha kullanılabildiği gibi, organik maddeleri yıkılanmış idrar, kan, saç, tırnak gibi biyolojik materyal (asit dijestiyon çözeltisi) de kullanılabilir. (yıkılama ve külleştirme için bakınız: Kaya, S., 1961; Güley, M., Vural, N., 1975)

2) Gutzeit deneyi: As için yarı kantitatif olarak da uygulanabilir. Bu amaçla Şekil 1b deki aparey kullanılır.

Şekil 1b de görülen erlenmayenin ağzına lastik bir tıpa ile yerleştirilen kurutma tüpüne kurşun asetat ile nemlendirilmiş pamuk konur. Bu tüpün üstüne hazır olarak sağlanan veya yaptırılabilen kanatlar yerleştirilir. Kanatların ölçüsü ve şekli şekil 1b de gösterilmiştir. Bu kanatlar arasına cıva-2 bromür (merküric bromür) ile empenye edilmiş kuru filtre kağıdı (Whatman no:40 yuvarlak filtre kağıdı, %95 lik alkolde %5 konsantrasyonda hazırlanan cıva-2 bromür ile 2 dakika empenye edilmiş) yerleştirilir.

Erlenmayer içine, Reinsch testi uygulanmış bakır levha veya yıkılama uygulanmış biyolojik materyalin asit dijestiyon çözeltisinden 20 ml konur, 15 ml %10 luk sülfirik ve 5 g arsenik içermeyen çinko granül ilave edilir. Hidrojen ve arsin gazlarının açığa çıkması için 30 dakika (gerektiğinde 1 saat) bekletilir.

Reaksiyon sonucu arsin $HgBr_2$ ile empenye edilmiş filtre kağıdında konsantrasyona bağlı olarak sarıdan kahverengiye kadar değişen renk verir. Safsızlık olarak bulunabilecek kükürtlü hidrojen, kurşun asetatlı pamuk tarafından tutulur.

Standart arsenik çözeltisi ile hazırlanan renk skalası ile karşılaştırılarak test yarı kantitatif olarak da kullanılabilir. 5 µg arsenik detekte edilebilir.

Zehirlerin izolasyon yöntemlerine göre sınıflandırılmaları

Analitik amaçla bir çok toksikologlar, zehirleri uygulanan izolasyon tekniklerine göre başlıca beş sınıfta toplar:

a) **Uçucu zehirler** : Biyolojik maddeden distilasyon veya difüzyon yolu ile ayrılırlar. (CO, siyanür gibi gazlar ve alkoller, benzen gibi organik çözücüler).

b) **Uçucu olmayan organik zehirler** : Biyolojik ortamdan sıvı ekstraksiyon yöntemi ile izole edilirler (barbitüratlar, alkaloidler, birçok ilaçlar).

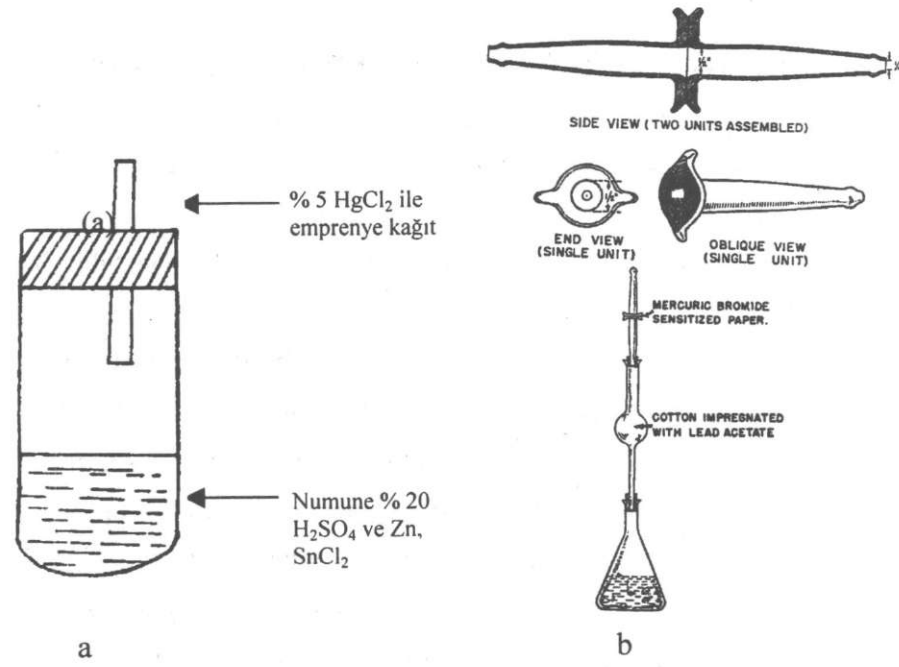
c) **Metalik zehirler**: Biyolojik maddeden kuru veya yaş külleştirme (oksidasyon) işlemi ile ayrılırlar (kurşun, kadmiyum, cıva gibi).

d) **Toksik anyonlar** : Biyolojik ortamdan dializ veya iyon değiştirme (ionexchange) teknikleri ile ayrılırlar (klorat, fosfat, tiosiyanat gibi).

e) **Çeşitli zehirler** : (Özel olarak aranması gerekenler): Yukarıdaki izolasyon teknikleri ile aranamayan ve her biri için özel ekstraksiyon işlemleri, iyon değiştirme, iyon çifti oluşturma gibi yöntemlerin uygulanması gereken maddeleri kapsar (pestisitler, proteinler, glikozitler gibi).

4.1. Uçucu zehirlerin biyolojik materyalden distilasyonla izolasyonları

Bilindiği gibi distilasyon sıvı bir maddeyi, kaynama noktasına kadar



Şekil 1- Basit (a) ve modifiye (b) Gutzeit apareyi

4. ZEHİRLERİN BİYOLojİK MATERYALDEN İZOLASYON TEKNİKLERİ

Toksikolojik analizlerde, çok sayıda çeşitli kimyasal maddelerin (2000 üstünde) aranması gerekmektedir. Bu maddelerin analizleri için değişik analitik kimya ve fizikokimyasal tekniklerden yararlanılmaktadır. Çoğunlukla aranan zehirli madde çok az miktarda (miligram ve hatta mikrogram düzeyinde) olduğundan öncelikle bunların bulunduğu ortamdan ayrılması ve saflandırması için kullanılacak izolasyon yöntemleri çok önemlidir. Analitik toksikolojide, zehirler bu ayırma yöntemlerine göre sınıflandırılmıştır. Bilinmeyen veya şüpheli bir zehir önce bu genel izolasyon yöntem ve tekniklerine göre ayrıldıktan sonra, nitel ve nicel analizleri yapılır.

yavaş distile edilir. Bu şekilde soğutucudan geçerek buz içinde soğutulan toplama kabında distilat toplanır. Bu distilat uçucu zehirlerin aranması için kullanılır.

Kaynama noktası 100° altında olan önemli uçucu zehirlere örnek olarak: Eter, etil bromür, petrol eteri, aseton, kloroform, metil alkol, etil alkol, izopropil alkol, benzen, etilen klorür, trikloroetilen verilebilir.

Su buharı distilasyonu ile ayırma : Her sıvı maddenin sıcaklık derecesine bağlı olarak belirli bir buhar basıncı vardır. Bir gaz akımı ile buhar sıvı üzerinden uzaklaştırılırsa, o madde tekrar dengeyi sağlamak için buharlaşır. Uygulamada bu amaçla su buharı kullanılır. Genellikle kaynama noktaları suyunkinden oldukça yüksek olan maddelerin içine su buharı yollandığı zaman, bu maddeler o sıcaklıktaki buharlaşma basıncı oranında buharlaşır. Sonra bu buharlar, su buharı ile birlikte soğutucudan geçerek yoğunlaşırlar.

Şekil (2) de su buharı distilasyonu apareyi görülmektedir. Numune "B" balonuna 1/3 ünü geçmeyecek şekilde konur ve gelen su buharını yoğunlaşmaması için önceden balon "B" ısıtılır. Balona uygun bir soğutucu bağlandıktan ve önüne toplama kabı (C) yerleştirildikten sonra, kuvvetli bir su

Zehirlerin izolasyon yöntemlerine göre sınıflandırılmaları

Analitik amaçla bir çok toksikologlar, zehirleri uygulanan izolasyon tekniklerine göre başlıca beş sınıfta toplanır:

a) Uçucu zehirler : Biyolojik maddeden distilasyon veya difüzyon yolu ile ayrılırlar. (CO, siyanür gibi gazlar ve alkoller, benzen gibi organik çözücüler).

b) Uçucu olmayan organik zehirler : Biyolojik ortamdan sıvı ekstraksiyon yöntemi ile izole edilirler (barbitüratlar, alkaloidler, birçok ilaçlar).

c) Metalik zehirler: Biyolojik maddeden kuru veya yaş külleştirme (oksidasyon) işlemi ile ayrılırlar (kurşun, kadmiyum, cıva gibi).

d) Toksik anyonlar : Biyolojik ortamdan dializ veya iyon değiştirme (ionexchange) teknikleri ile ayrılırlar (klorat, fosfat, tiosiyanat gibi).

e) Çeşitli zehirler : (Özel olarak aranması gerekenler): Yukarıdaki izolasyon teknikleri ile aranamayan ve her biri için özel ekstraksiyon işlemleri, iyon değiştirme, iyon çifti oluşturma gibi yöntemlerin uygulanması gereken maddeleri kapsar (pestisitler, proteinler, glikozitler gibi).

4.1. Uçucu zehirlerin biyolojik materyalden distilasyonla izolasyonları

Bilindiği gibi distilasyon sıvı bir maddeyi, kaynama noktasına kadar ısıtarak buhar haline getirmek ve bu buharı yoğunlaştırarak ayrı bir kapta toplamaktır. Uçucu zehirlerin distilasyonu, kaynama noktası ve su buharı ile sürüklenmelerine göre 2 şekilde yapılmaktadır.

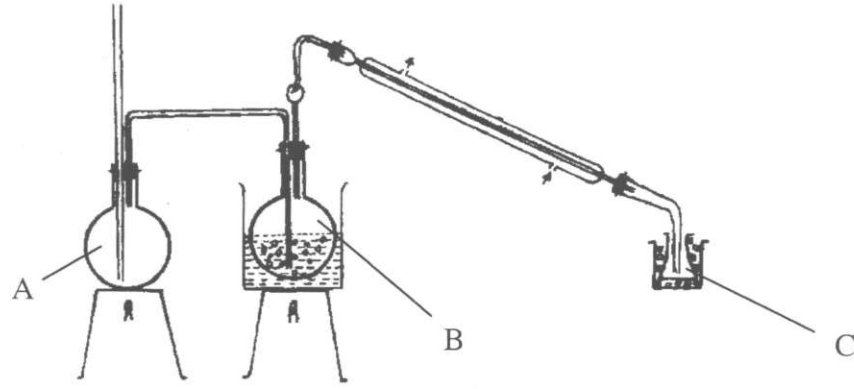
Normal distilasyonla kaynama noktaları (k.n.) 100°C altında zehirlerin ayrılmaları: Bunun için normal distilasyon apareyi kullanır. Distilasyon balonuna bir miktar mide içeriği, kusmuk, idrar veya kan gibi

incelenen örnek konur ve kaynar su banyosunda veya bek alevinde yavaş yavaş distile edilir. Bu şekilde soğutucudan geçerek buz içinde soğutulan toplama kabında distilat toplanır. Bu distilat uçucu zehirlerin aranması için kullanılır.

Kaynama noktası 100° altında olan önemli uçucu zehirlere örnek olarak: Eter, etil bromür, petrol eteri, aseton, kloroform, metil alkol, etil alkol, izopropil alkol, benzen, etilen klorür, trikloroetilen verilebilir.

Su buharı distilasyonu ile ayırma : Her sıvı maddenin sıcaklık derecesine bağlı olarak belirli bir buhar basıncı vardır. Bir gaz akımı ile buhar sıvı üzerinden uzaklaştırılırsa, o madde tekrar dengeyi sağlamak için buharlaşır. Uygulamada bu amaçla su buharı kullanılır. Genellikle kaynama noktaları suyunkinden oldukça yüksek olan maddelerin içine su buharı yollandığı zaman, bu maddeler o sıcaklıktaki buharlaşma basıncı oranında buharlaşır. Sonra bu buharlar, su buharı ile birlikte soğutucudan geçerek yoğunlaşırlar.

Şekil (2) de su buharı distilasyonu apareyi görülmektedir. Numune "B" balonuna 1/3 ünü geçmeyecek şekilde konur ve gelen su buharını yoğunlaşmaması için önceden balon "B" ısıtılır. Balona uygun bir soğutucu bağlandıktan ve önüne toplama kabı (C) yerleştirildikten sonra, kuvvetli bir su buharı akımı (A) balon içinde geçirilmeye başlanır. Distilasyona soğutucudan akan damlalar berrak oluncaya kadar devam edilir. Toplama kabı buz içinde soğutulur.



Şekil 2- Su buharı distilasyon apareyi.

Tablo-2 Su buharı ile uçan zehirler

Aldehitler	Fuzel Yağları	Ksilen
Alkoller	Guayakol	α - ve β -nofrol
Aseton	İyodoform	Nikotin
Benzen	Kafur	Nitrobenzen
Benzin	Karbon tetraklorür	Paraldehit
Benzoik asit	Karbon sülfür	Piridin
Esansiyel yağlar	Kloral hidrat	Salisilik asit ve esterleri
Eter	Kloroform	Siyanür
Fenoller	Koniin	Tribromoetanol
Formaldehit	Krezoller	Timol
Fosfor (sarı)	Kroton yağı	Toluen

Su buharı ile uçan zehirleri, distilasyon ortamına göre ikiye ayırabiliriz:

1) Asit ortamda su buharı ile uçan zehirler : Asit veya nötral yapıdaki uçucu bileşikler asit ortamda su buharı ile uçarlar. Bunun için analiz maddesinin 1/6 sı balona konur. Eğer numune asit ise önce doymuş sodyum bikarbonat çözeltisi ile nötrleştirilir. Sonra %10 tartarik asit veya seyreltik sülfirik asitle pH 5'e getirilir ve 50 ml distilat toplanacak şekilde su buharı ile distile edilir.

2) Kalevi ortamda su buharı ile uçan zehirler : Numune seyreltik NaOH veya katı magnezyum oksit (MgO) ile pH 8 olarak şekilde kalevilendirilir. Anilin, amfetamin, kloral, hidrat, kloroform (kloral hidrat kalevi ortamda kloroforma dönüşerek distile olur), nikotin, koniin alkali ortamda distile olurlar.

Distilatta uçucu zehirlerin aranması :

Elde edilen distilatta uçucu zehirler, aşağıdaki şekilde aranır:

- a) Distilatın kokusu kontrol edilir. Bir çok bileşikler karakteristik kokusu ile tanımlanabilir (fenol, benzen, CS₂ gibi)
- b) Distilatın reaksiyonu kontrol edilir (Turnusol kağıdı ile asit veya kalevi özelliği araştırılır).
- c) Distilatta kimyasal ön denemeler yapılır.

Bu ön denemeler için çok çeşitli reaksiyonları yapmak mümkünse de, en uygun olan fonksiyonel gruplara dayanarak yapılan genel deneylerdir. Organik bileşiğe alkol, aldehit, keton gibi özelliği veren grupların tanıma reaksiyonları ile distilattaki maddenin kimyasal sınıfını tayin etmek mümkündür. Bu reaksiyonlar ya renkli bileşiklerin oluşumuna (kromotropik asit, Fujiwara deneyleri gibi), karakteristk koku oluşmasına (iyodoform deneyi, izonitril deneyi gibi) veya çökelek (karakteristik renkte) oluşmasına (ksentogenat deneyi gibi) dayanmaktadır.

d) Genel fonksiyonel grubu belirlenmiş maddeyi, hem kendi grubu içinde hangi bileşik olduğunu ve hem de yukarıdaki ilk bulguların sonuçlarını kesinleştirmek için özel reaksiyonlar tatbik edilir. Uçucu organik zehirlerden başka, uçucu olmayan organik zehirlere de uygulanan bu genel ve ayırt edici özel reaksiyonlar tablo 4'de gösterilmiştir. Deneylerin yapılışı zehirlerin özel aranmaları bölümünde açıklanmıştır. Bu deneylerin bir kısmı daha önce "biyolojik sıvılara doğrudan uygulanan deneyler kısmında da açıklanmıştır.

4.2. Uçucu zehirlerin mikrodifüzyon yöntemi ile izolasyonları

Az miktarda uçucu zehirlerin dokulardan izole edilmesinde kullanılan diğer bir teknik mikrodifüzyon yöntemidir. İlk kez Feldstein ve Klendshoj tarafından uygulanan bu teknik için Conway'in mikrodifüzyon düzeneği kullanılmaktadır. (Şekil 3) Bu yöntemle ayrıca uçucu zehirlerin identifikasyonu ve kantitatif analizi de yapılabilir.

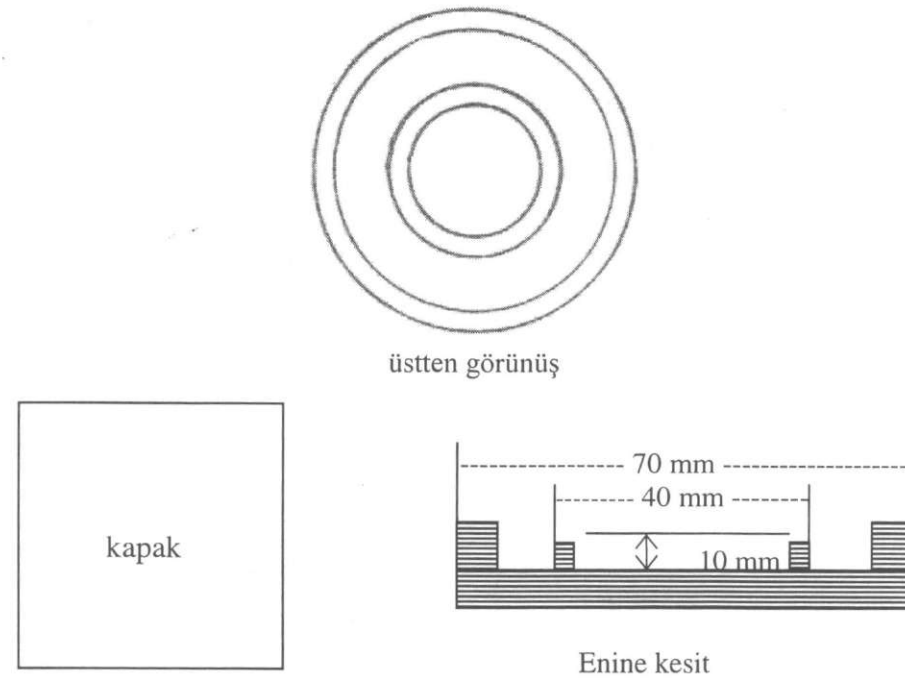
Prensip : Kapalı bir sistemde analizi yapılacak biyolojik materyal ve bu örnekten uçucu zehiri açığa çıkaracak reaktif (liberating agent) dış odacıkta ve serbest hale geçen uçucu zehiri tutan çözücü (absorban) ise iç odacıkta bulunur. Oda sıcaklığı veya 37°C de dış odacıkta buhar veya gaz haline geçen uçucu zehir, bu kapalı sistemde difüzyona uğrayarak iç odacıktaki çözücü içinde çözünür. Bu şekilde sistemde bozulan buhar basıncı dengesinin sağlanması için biyolojik materyaldeki uçucu zehir bitinceye kadar, buharlaşma, difüzyon ve iç odacıktaki absorpsiyon olayı devam eder. Böylece biyolojik maddedeki uçucu bileşiğin saf bir çözücü içine aktarılması yani izole edilmesi mümkün olur. İç odacığa ilave edilen uygun bir reaktifle uçucu bileşiğin tanınması iç odacıkta yapılabildiği gibi, uçucu maddenin çözündüğü çözelti bir mikro tüpe alınarak kalitatif ve kantitatif analizini yapmak mümkündür.

Tablo 4- Distilasyonu ile izole edilen uçucu zehirlerin grup reaksiyonları:

Genel reaksiyonlar	Uygulandığı gruplar
Asit ortamda kromatla oksitleme	Alkoller, aldehytler, doymamış hidrobarbonlar
Fehling çözeltisinin indirgenmesi	Aldehytler, kloroform, kloralhidrat
Nesslerreaktifi ile:	
a. Renk reaksiyonu	Küçük moleküllü aminler, amonyak ve amonyum tuzları.
b. İndirgenme	Aldehytler, primer ve sekonder alkoller, kloroform, kloralhidrat
Schiff reaktifi ile renk reaksiyonu	Aldehytler ve alkoller (oksitlendikten sonra)
Kromotropik asit deneyi	Formaldehit, metil alkol (oksitlendikten sonra)
Legal deneyi (pentasiyano nitrozo demir-3 ile)	Aktif metilen grubu olan bileşikler (ketonlar, asetil aseton, indol, pirol, rezorsin gibi)
Fujiwara reaksiyonu (piridin+NaOH+ısı)	Polihalojenik bileşikler (kloroform, trikloroasetik asit gibi)
İzonitril reaksiyonu (Anilin+NaOH+ısı)	Klorlu hidrokarbonlar, primer aminler ve hidrolizle bu bileşikler verenler
İndofenol reaksiyonu (Fenol+Oksijen veya nitroz asitle)	Anilin ve hidrolizle anilin veren bileşikler (asetanilid, fenasetin, anestezin, novakain, sülfonamid, dulsin gibi)
Demir-3-klorürle	Fenol ve fenol türevleri, enol grubu veren maddeler (asetil aseton, piramidon, tiyosülfat, ferrosiyanür)
Millon reaksiyonu (Metalik cıva+HNO ₃ ile nitrolama)	Fenoller (serbest ve p-substitüe fenoller)
Diazo reaksiyonu	Aromatik primer aminler (anilin ve hidrolizle anilin veren bileşikler)
Ksentogenat reaksiyonu (ROH+CS ₂ +KOH)	CS ₂ , primer alkoller
İyodoform reaksiyonu (Etil alkol+iyot+NaOH)	Etil alkol, asetaldehit, aseton, laktik asit
Prusya mavisi oluşması	Siyanürler
Guignard deneyi (izopurpurat oluşması)	Siyanür ve pikrik asit

Conway mikrodifüzyon apareyi : Mikrodifüzyon yöntemini ilk defa Conway , biyolojik materyalde amonyak tayini için uygulamıştır. Bu amaçla geliştirdiği apareye “Conway mikrodifüzyon cihazı” adını vermiştir.

Deneyin Yapılışı : Şekil 4’de görüldüğü gibi Conway mikrodifüzyon apareyi petri kutusuna benzeyen cam, porselen veya polietilen iki odacıkla, dışa sızıntı vermeyen kenarları traşlı bir kapaktan meydana gelmiştir. Genel olarak uygulama aşağıdaki şekilde yapılır:



Şekil 3- Conway mikrodifüzyon apareyi.

a) Conway mikrodifüzyon cihazının dış odacığına, uçucu zehirin aranacağı biyolojik materyal ilave edilir. Genellikle 2-5 ml kan, idrar veya

homojenize organ numunesi konur. Aynı yere uçucu zehri serbest hale geçirecek reaktiften 1 ml ilave edilir.

b) İç odacığa ise bu uçucu zehri aborbe edecek ve renk reaksiyonu verecek olan reaktiflerden 2'şer ml ilave edilir.

c) Bu işlemlerden sonra apareyin ağzı derhal kapatılır ve difüzyon için bekletilir. Genellikle kan ile çalışırken oda sıcaklığında 2 saat, dokularla çalışırken 37°C de 3 saat beklemek yeterlidir.

Tablo 5'de, çeşitli uçucu zehirlerin Conway mikrodifüzyon cihazı ile aranmasında kullanılan reaktifler gösterilmiştir.

Tablo 5- Conway mikrodifüzyon apareyinde uçucu zehirlerin aranması

Aranacak Zehir	DIŞ ODACIK	İÇ ODACIK	
	Zehiri açığa çıkaran reaktifler	Absorban reaktifler	Renk reaktifleri ve sonuç
CO	% 10 H ₂ SO ₄	----	PdCl ₂ → Siyah
Siyanür	% 10 H ₂ SO ₄	% 10 NaOH	FeSO ₄ +HCl→mavi ↓
Klorlu hidrokarbonlar	----	1 ml saf toluen	1 ml % 30 NaOH+ saf piridin→kırmızı
Alkoller (etil-metil-, izopropil-)	Doymuş Na ₂ CO ₃	----	Ansties reaktifi→Yeşil (K ₂ Cr ₂ O ₄ +H ₂ SO ₄)
Metil alkol	Doymuş Na ₂ CO ₃	H ₂ SO ₄	Kromotropik asit→viyole
Fenoller	% 10 H ₂ SO ₄	% 10 NaOH	Folin-fenoltalein→mavi
Fosfür	Doymuş Na ₂ CO ₃	HNO ₃	% 5 AgNO ₃ →kahverengi ↓ % 10 Amonyum molibdat+ ısı→ sarı ↓
Sülfür	% 10 H ₂ SO ₄	% 10 NaOH	a)% 10 Pb asetat→siyah ↓ b)% 10 Cd asetat→ sarı ↓

4.3. Uçucu olmayan organik zehirlerin ekstraksiyonla biyolojik materyalden izolasyonları

Uçucu olmayan organik maddeler, analitik ve forensik toksikologların ilgilendiği en büyük grubu (hemen tüm maddelerin %90'ı) oluşturur. Bu grupta kaynama noktaları yüksek sıvı ve katı haldeki maddeler örneğin tıbbi ilaçlar, bağımlılık yapan maddeler, pestisitler, doğal kaynaklı zehirler, çevre kirleticileri, endüstriyel maddeler bulunur. Bu maddelerin biyolojik materyalden izolasyonlarında sıvı-sıvı, katı-sıvı gibi fraksiyonlu ekstraksiyon yöntemleri kullanılır. Ekstraksiyon koşullarına göre organik zehirler, tekrar alt sınıflara ayrılır.

Akut zehirlenmelerde, biyolojik materyal olarak kullanılan kan, idrar ve mide içeriği gibi örneklerle ekstraksiyon işlemleri doğrudan uygulanır. Ancak ölüm halinde, karaciğer ve diğer doku örneklerine doğrudan ekstraksiyon uygulanamaz. Doku homojenatlarına ön işlem olarak çok eski bir yöntem olan **Stas-otto**, çok daha yeni bir teknik olan **enzim dijestiyon yöntemi** uygulanır. Bu yöntemlerin prensibi kısaca aşağıda açıklanmıştır.

Sulu fazın hazırlanması için kullanılan toksikolojik yöntemlerin çoğunun dayandığı prensip, biyolojik maddenin ihtiva ettiği protein, lipit, selüloz, boya gibi maddeleri uygun çözücü ve işlemlerle uzaklaştırmağa dayanmaktadır.

Bu amaçla kullanılan yöntemlerin en eskisi ilk kez Stas (1850) tarafından postmortem dokudan nikotini izole etmek için geliştirilen "Stas" yöntemidir. Daha sonra bu yöntem Otto tarafından modifiye edilerek "Stas-Otto" yöntemi olarak literatüre geçmiştir. Klasik bir yöntem olan Stas-Otto tekniği ile alkaloidlerin ve diğer organik zehirlerin dokulardan izolasyonu uzun ve yorucu bir çalışma gerektirdiği ve ayrıca yabancı maddelerin tamamen uzaklaştırılmaması nedeniyle daha sonraki araştırmacılar tarafından

modifiye edilmiştir. Bu tekniklerde, çeşitli organik zehirlerin asit veya kalevi ortamdaki çözünürlükleri ile birlikte seçici çözünürlükleri de göz önünde tutulmuştur.

Stas-Otto-Ogler, Feldstein-Klendshoj, Umberger, Daubney-Nikolls'un yöntemleri bu prensiplere göre geliştirilmiştir.

Aşağıda uygulama alanı geniş ve yüz yıldan daha fazla bir zamandan beri kullanılmakta olan modifiye Stas-Otto tekniği açıklanmıştır. Bu yöntem halen ülkemizde Adli Tıp Kurumunun toksikoloji laboratuvarlarında kullanılmaktadır.

Modifiye Stas-Otto Yöntemi : 200 g dondurulmuş ve kıyılmış (homojenize edilmiş) doku, tartarik asitle asitlendirilir, 400 ml etil alkol ile blenderde homojenize edilir. Karışım su banyosunda bir saat bekletilir. Isıya dayanıksız alkaloidler olma ihtimali varsa, sıcaklık 60°C altında tutulmalıdır. Daha iyisi karışım bir gece bekletilmelidir. (Doku+etil alkol) karışımı soğutularak süzülür. Aynı işlem bir kere daha kalıntıya etil alkol ilave edilerek tekrar edilir. Geniş ağızlı bir kapsül içinde birleştirilen süzüntüler hafif sıcak hava akımında su banyosu üzerinde uçurulur (vakumda distilasyon tercih edilir). 100 ml sıcak etanol ilavesiyle şurup kıvamında bir çözelti elde edilir. 100 ml sıcak etil alkol, küçük porsiyonlar halinde ilave edilerek karıştırılır. Elde edilen ekstrakt dekante edilir.

Sonuçta granül halde kuru bir kalıntı kalır. Eğer kalıntı halen yapışkan görünümde ise o zaman sıcak alkolle aynı işleme devam edilir. Dekante edilen süzüntüler birleştirilerek uçurulur. Elde edilen bu kalıntılar birkaç damla sülfirik asitle asitlendirilmiş 100 ml su ile ekstrakte edilir ve mümkünse bir gece bekletilir. Aksi halde bir erlenmayer içinde asitli su ile 1 saat çalkalanır. Eğer bakiye yağlı ise sulu ekstrakt dekante edildikten sonra 100 ml asitli su ile ekstraksiyon tekrarlanır. İki ekstrakt soğutulduktan sonra

birleştirilir ve süzülür (pilili Whatman No 1 filtre kağıdından). Böylece elde edilen süzüntü ikinci kademedeki fraksiyonlu ekstraksiyon için hazırlanmış olur.

Ekstraksiyonla İzolasyon

Bilindiği gibi ekstraksiyon sulu fazda çözünmüş bir maddenin, su ile karışmayan organik bir çözücüye çalkalayarak bu organik faza geçirilmesi işlemidir. Sulu fazda çözünmüş bir çok maddeler içinden, uygun ortam ve çözücü seçimiyle arayacağımız organik zehri organik faza alarak saflandırmak mümkün olur. Biyolojik materyalden ön işlemlerle (Stas-Otto veya modifiye metodları) elde edilen ekstrakt veya kan, idrar, mide içeriği gibi sıvılardan ekstraksiyonla organik zehirler ayrılabilir. Prensip olarak, iyonize halde olmayan organik maddeler, organik çözücü fazına geçirilebilirler. Bu nedenle uçucu olmayan organik zehirlerin ekstraksiyonunda 2 faktör rol oynar :

- a) Organik maddelerin kimyasal yapısı (asit, baz, nötral veya amfoter özelliği);
- b) İyonlaşmamış halde olan organik maddenin, organik çözücünde çözünebilme özelliği.

Çözücü olarak en çok eter veya kloroform kullanılır. Bunun dışında etil asetat, izopropil alkol, bütül alkol, petrol eteri, sikloheksan da koşullara göre kullanılabilir.

Sulu fazda bir maddenin iyonlaşma derecesi, o maddenin kimyasal yapısına bağlı olarak pKa değerine göre değişir. Buna göre asit karakterdeki maddeler asit ortamda, katevi yapıdaki maddeler ise alkali ortamda serbest organik molekül (noniyonize) halde bulunurlar:



Nötral maddeler ise asit veya kalevi ortamda organik faza geçebilirler, çünkü ortamın pH'ına bağlı olmaksızın çoğunlukla iyonlaşmamış şekildedirler.

Uçucu olmayan zehirlerin ekstraksiyon koşullarına göre sınıflandırılmaları

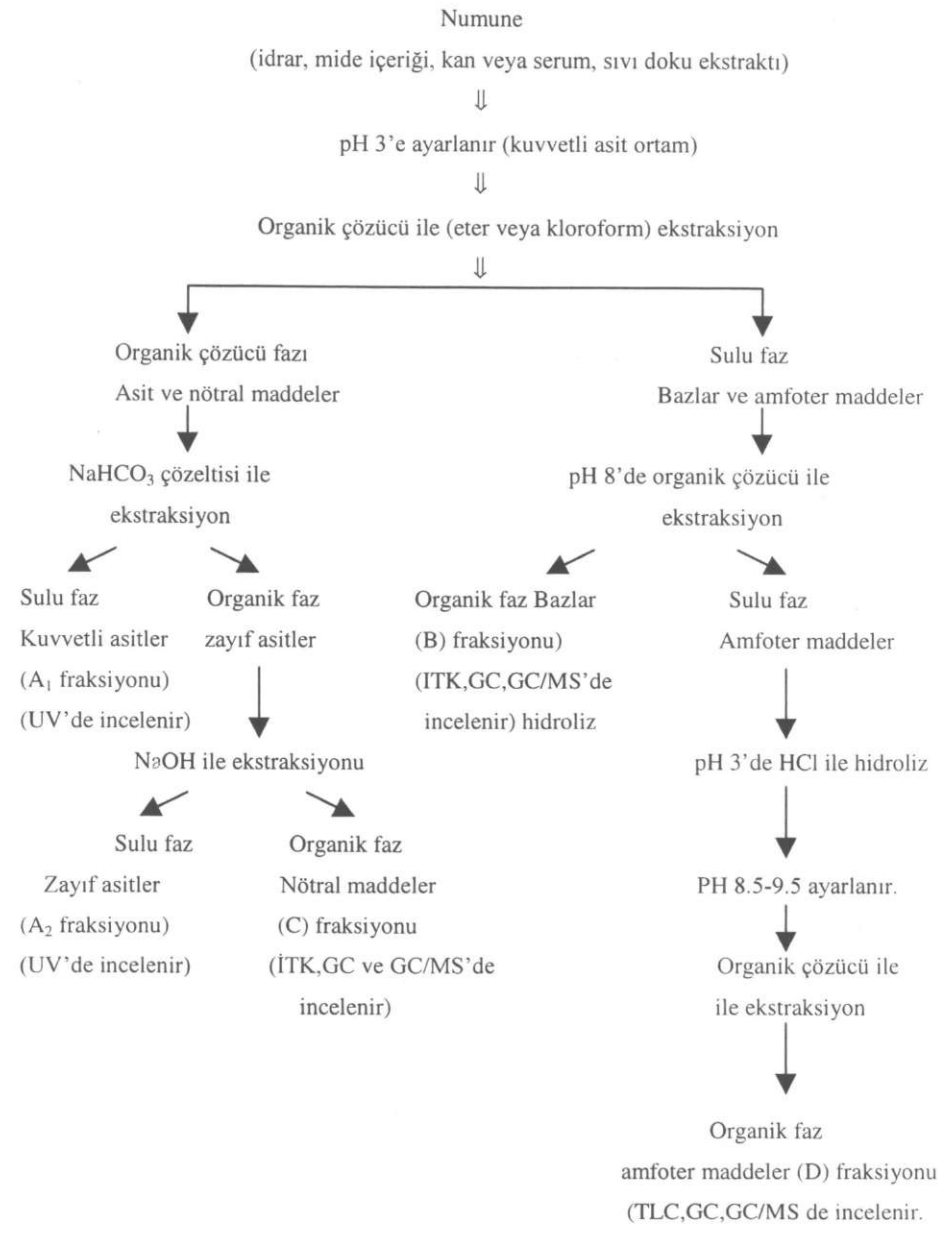
Uçucu olmayan organik zehirleri, organik faza geçebildiği ekstraksiyon koşullarına göre 5 sınıfta toplamak mümkündür. Organik kuvvetli asitler; organik zayıf asitler; organik bazlar; organik nötral maddeler ve organik amfoterik maddeler.

A) Asit ortamda ekstrakte edilebilen zehirler (Organik asitler ve nötral maddeler): Bu maddeler asitli sulu ortamdan (pH 2) eter veya kloroformla ekstrakte edilebilirler. Asit ortamdan organik çözücüye geçen organik maddeler kuvvetli asit, zayıf asit veya nötral özellikte olabilir. O halde bu grubu 3 alt sınıfta toplayabiliriz :

a₁) Kuvvetli asitler : asitli ortamda eter veya kloroform fazına geçen bu maddeler, sulu sodyum bikarbonatla (NaHCO₃, pH 7.5) ile ekstrakte edilebilirler. (A₁ fraksiyonu)

Asetil salisilik asit, p-amino benzoik asit, çinkofen (cinchophen) sitrik asit, okzalik asit, sakkarin, salisilik asit, sulfisoksazol (sulfisoxazole) örnek verilebilir.

a₂) Zayıf asitler : Bu grup maddeler ise, eter veya kloroform fazından daha kuvvetli kalevi ortamda (NaOH li ortamda) sulu faza geçerler. NaHCO₃ çözeltisinde (pH 7.5) çözünmezler. (A₂ fraksiyonu) Barbitüratlar, glutetimid, fenil butazon, parasetamol örnek verilebilir.



a₃) Hidrofob nötral maddeler : Asit eterde çözünen maddeler, NaOH veya NaHCO₃'lı sulu faza geçildikten sonra eter veya kloroform fazında nötral maddeler kalır. Bunlar organik fazda çözünbilme özelliğinde olduklarından "hidrofob nötral maddeler" adını alırlar.(C fraksiyonu)

Asetaniliid, asetofenetidin, amidopirin, antipirin, bromural, kafein, emetin, mebrobamat, fenil salisilat örnek verilebilir.

B) Kalevi ortamda seyreltik NaOH ile kalevilendirilmiş eter veya kloroforma geçen bileşikler :

b₁) Kalevi özellikte maddeleri içerirler. Bir çok alkaloidler, amfetamin, amitriptilin, imipramin, kafein, kinin gibi azotlu bazlar bu gruba girerler. (B fraksiyonu)

b₂) Sulu faz ise organik amfoter (morfin gibi) maddeleri içerir. Bu maddeler, sulu fazın konsantre HCl ile ısıtılmasından sonra, pH 8,5 - 9,5 da organik çözücü ile ekstrakte edilerek ayrılırlar (amfoter madde : D fraksiyonu).

Şekil 4'de kan, idrar ve mide sıvısına uygulanan fraksiyonlu ekstraksiyon şeması (sistemik ekstraksiyon) gösterilmiştir.

4.4. Enzim yıkılama yöntemi ile organik zehirlerin izolasyon ve ayrılımları

Adli toksikolojide, postmortem mide içeriği, kan ve idrardan toksik maddeler yukarıda açıklanan ekstraksiyon yöntemleri ile izole edilebildikleri gibi "immunoassay yöntemleri" ile de doğrudan analizleri yapılabilir. Ancak ölümle sonuçlanan olaylarda karaciğer gibi doku örnekleri de analiz için kullanılır.

Dokulardan zehirlerin izolasyonunda kullanılan Stas-Otto ve ekstraksiyon yöntemi, klasik protein çöktürme yöntemleri yanında "enzimatik

yıkılama: dijestiyon yöntemi” zehirlerin genel tarama yöntemlerinde, ön işlem olarak tercih edilen bir tekniktir. Böylece proteini uzaklaştırılmış doku filtratına sistematik ekstraksiyon uygulanabilir. Aşağıda anabilim dalımızda çeşitli pestisit ve ilaçların karaciğer homojenatında uygulanan “enzimatik yıkılama” yöntemi kısaca açıklanmıştır. (Ayrıntılı bilgi için :Vural, N, Aksu, Şan, N., 1994’e bakınız.)

Enzimatik yıkılama yönteminin prensibi, plazma ve dokularda proteine bağlanmış ilacın (protein-ilac) proteolitik bir enzimle serbest hale geçirilmesinden sonra ekstraksiyona tabi tutulmasıdır. Bu amaçla papain, tripsin, subtilisin gibi enzimler kullanılır. Bu enzimlerle doku homojenatı, enzimin maksimum aktivite gösterdiği optimum koşullarda (örneğin papain ve tripsin için optimum pH 7-8, optimum sıcaklık 30°C dir) belirli bir süre inkübe edilir.

Teknik : Zehirlenme şüphesi ile alınan karaciğer dokusundan 5 gram kesit tartılarak, 10 ml su ile teflon başlıklı homojenizatörde homojenize edilir. Yıkılama için papain kullanılacaksa, homojenata gram doku başına 500 mg papain (500 mg papain/g doku), 0,002 M EDTA ve 25 ml 0.02 M pH 7.4 olan fosfat tamponu ilave edilir. 37°C de 2 saat termostatlı çalkalamalı su banyosunda inkübe edilir. Tripsin kullanıldığında 1 mg tripsin /g doku olarak enzim ve pH 7.4 olan fosfat tamponu kullanılır. İnkübasyon 37°C de 3 saat olarak uygulanır.

İnkübasyondan sonra karışım 30 dakika elektrikli su banyosunda ısıtılır ve süzülür. Süzüntüden genel ekstraksiyon şemasına göre uçucu olmayan organik zehirler (ve ilaçların) izolasyonu yapılır. İzolasyon verimini arttırmak için Amberlite XAD-2 (batch) yöntemi ile ekstraksiyon yapılması uygun olur. Aşağıda bu yöntem açıklanmıştır.

Amberlit XAD-2 ile organik zehirlerin ekstraksiyonu

Polimerik özellikte adsorbanların zehirlerin biyolojik materyalden izolasyonları son 20-30 yılda önem kazanmıştır. Amberlit XAD-2 poröz ve hidrofobik özelliğe sahip olan çapraz bağlı polistiren divinil benzen polimeridir. 20-50 mesh büyüklüğünde, beyaz suda çözünmeyen kürelerdir. Geniş yüzey alanı ve noniyonik özelliği nedeniyle bu reçine suda özünen organik maddeleri adsorbe eder. Bu adsorbe edilen maddeler polimerden uygun bir çözücü ile (elüsyon çözücüsü) geri elde edilebilirler (elüe edilebilirler). Amberlit XAD-2 reçinesi ile ekstraksiyonda, ekstraksiyon verimi (1) biyolojik materyalin (idrara, kan, doku homojenatından elde edilen süzüntünün) pH'si; (2) numune (ml)/reçine (g) oranına; (3) elüsyon çözücüsünü polaritesine bağlıdır.

Amberlit XAD-2 ile izolasyon ve ekstraksiyon işlemi idrara, kan, safra suyu ve karaciğer homojenatına (doğrudan veya enzimatik yıkılama işleminden sonra) veya biyolojik materyalden hazırlanan örneğe reçine ilave ederek (batch tekniği) uygulanabilir. Aşağıda batch yöntemi açıklanmıştır. (Vural,N; Burgaz, S 1984; Vural, N; Şan, N; 1994).

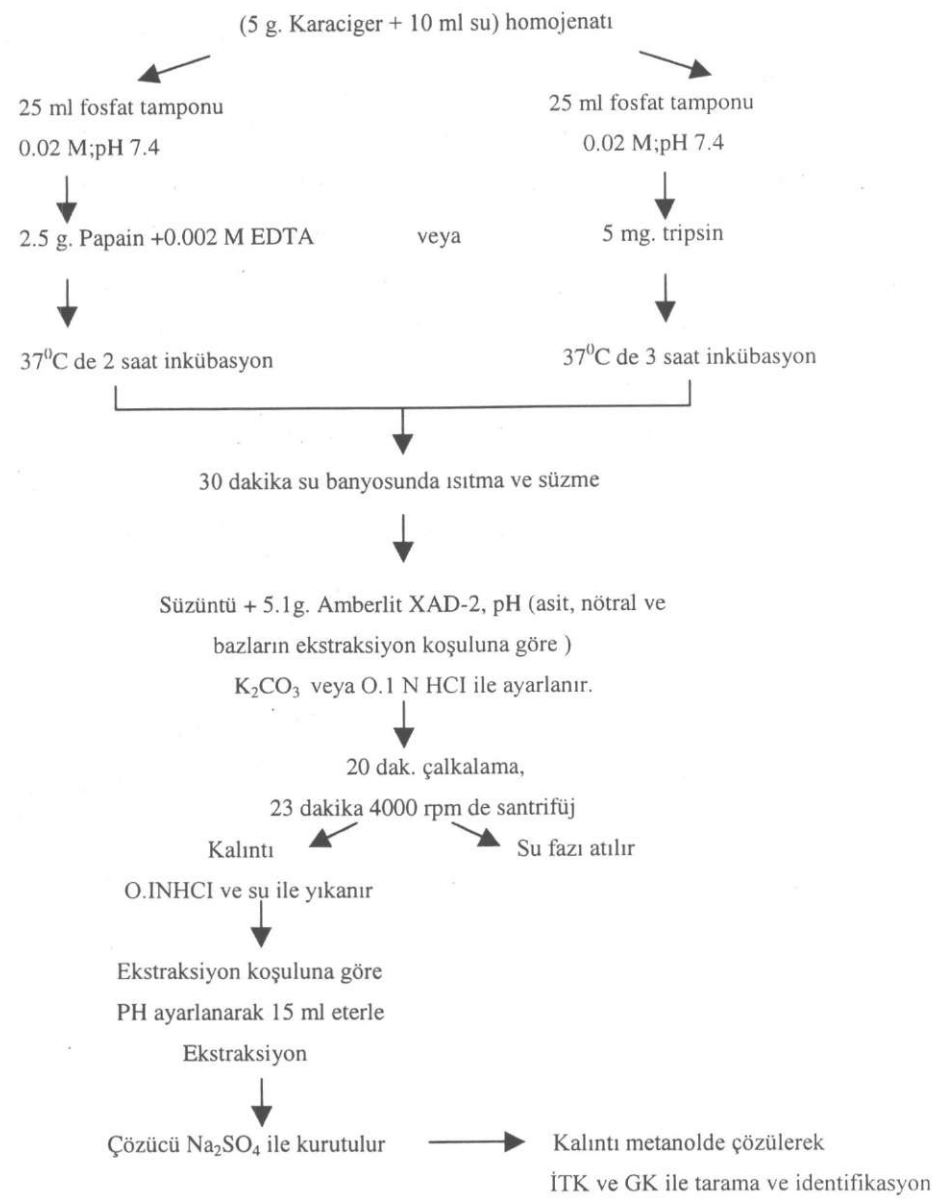
Reçinenin hazırlanması : Amberlit XAD-2 reçinesi en az 6 saat etil asetat ile sürekli Soxhlet aparatında ekstrakte edilerek saflaştırılır. Sonra reçine (1:1) oranında uzaklaştırılır. İşlem üst faz berraklaşınca kadar (4-5 kez) tekrarlanır. Metanolü uzaklaştırmak için 8-10 kez distile su ile yıkanır. Reçine ağzı cam kapta distile su içinde +4°C de saklanır.

5 gram karaciğerden hazırlanan homojenat, filtrat ve enzim yıkılmasından elde edilen filtrat; veya idrara çalışılacaksa 20 ml 2500 rpm de santrifüj edilerek berraklaştırılan idrara örneği, 5.1 gram yaş XAD-2 (g kuru reçine karşılığı) içeren polipropilen tüplere konur. Bazik ilaçların

ekstraksiyonu için ortamın pH'sı 0.01 N K_2CO_3 ile pH 10, nötral ilaçlar için pH 7; asidik ilaçlar için 0.1 N HCl ile pH 3, organik fosfat esterleri için pH (2-3)'e ayarlanır. Karışım 20 dakika çalkalanır, 3 dakika 4000 rpm de santrifüj edilerek su fazı ayrılır. Kalıntı 2 kez (0.1 N HCl ve su ile) yıkandıktan sonra elüsyon için tüpe 15 ml eter ve 5 ml 0.1 N HCl ilave ederek 20 dakika çalkalanır. 5 dakika 4000 rpm de santrifüj edilir. Elüsyon çözeltisi susuz Na_2SO_4 den geçirilerek uçurulur. Kalıntıda kimyasal maddeler tarama yöntemleri ile (İTK ve GLK gibi) aranır.

Amberlit XAD-2 ile bazik, nötral ve asidik ilaçların çoğu; pestisitlerden organik fosfat esterlerinin ekstraksiyonlarında oldukça yüksek verim elde edilir. Amberlit XAD-2 dışında Dowex 50 AGW-X8 (100-200 mesh) batch tekniği ile idrardan dipiridil grubu herbisitlerin ekstraksiyonunda kullanılabilir. Katyon değiştirici bir reçine olan Zeokarb 225 (H^+) ise kolon tekniği ise parakuat ve dikuatın idrardan ekstraksiyonunda kullanılabilen verimi daha yüksek olan bir yöntemdir. (Vural,N; Burgaz,S; 1984).

Şekil 5'da enzimatik yıkılama ve Amberlit XAD-2 batch tekniği ile karaciğer homojenatından organik zehirlerin izolasyonu ve ekstraksiyonları için kullanılan teknik şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 5 : Enzimatik yıkılama ve Amberlit XAD-2 “batch” yöntemi ile organik zehirlerin karaciğerden izolasyonları.

5. ZEHİRLERİN TARAMA ve İDENTİFİKASYONLARINDA KULLANILAN ENSTRUMENTAL ANALİZ TEKNİKLERİ

Biyolojik materyalden daha önce açıklanan yöntemlerle izole edilen kimyasal maddelerin identifikasyonları ve kesin tanımları, kantitatif analizleri klinik toksikoloji ve adli toksikoloji açısından büyük önem taşır.

Toksikolojik tarama testleri sonucunda, zehirlenmeye neden olan madde veya maddelerin belirlenmesi, zehirlenmenin spesifik (antidot) tedavisinin yapılabilmesi için gereklidir. Kimyasal maddelerin kan ve serum düzeylerinin kantitatif olarak saptanması zehirlenmenin şiddeti hakkında bilgi verir. Ayrıca kantitatif analizin belirli aralarla yapılması “terapötik ilaç izlenmesinde” de önemlidir.

Diğer taraftan kimyasal madde ve ilaçların toksikolojik tarama testleri sonucunda, analizin yorumu, bulunan madde cinsine göre değişir. Örneğin suistimal edilen veya bağımlılığa neden olan bir maddenin kişinin o anda alınan idrar örneğinde identifikasyonu, bağımlılık durumu ve kullanma sıklığı ve şekil açısından bir bilgi vermez. Diğer klinik bulgularla desteklenmesi gerekir.

Forensik (adli) toksikolojik analizde, postmortem dokularda toksik maddelerin taranması ve kantitatif analizi ölüm nedeninin açıklanmasına yardımcı olur. Karbon monoksit, etil alkol, benzodiazepinler, antidepresanlar, d-propoksifen, asetaminofen, salisilatlar, barbitüratlar gibi bir çok maddelerin postmortem analizleri bu nedenle önemlidir.

Kimyasal maddelerin biyolojik materyalde identifikasyonları ve kantitatif analizlerinde kullanılan teknikleri aşağıdaki şekilde sıralayabiliriz:

1) Kromatografik Yöntemler

İnce tabaka kromatografisi (İTK)
Gaz-katı ve gaz-sıvı kromatografisi (GK ve GSK)
Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC)

2) Spektroskopik Yöntemler :

Ultraviyole spektrofotometresi (UV-Spektrofotometre)
Görünür alan spektrofotometresi (Visible spektrofotometre)
Infrared spektrofotometresi (IR spektrofotometre)
Emisyon spektrofrafisi
Atomik absorbsiyon spektrofotometresi (AAS)
Plazma emisyon spektrofotometresi (PES)
Spektroflorimetri
Kütle spektrometresi (MS)
Nötron aktivasyon analizi (NAA)

3)Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GK-MS)

4) Immunoassay teknikleri

5) Diğer yöntemler (Elektrometrik yöntemler, optik kristallografi gibi)

Yukarıda adı geçen teknikler, maddenin fizikokimyasal özelliklerine göre geliştirilmiş enstrumental analiz yöntemleridir. Bu yöntemlerin prensibi, buna göre geliştirilen aletlerin yapısı, kullanım şekilleri ve uygulamaları ile ilgili bilgiler başka derslerde ayrıntılı olarak verilmektedir. Bu nedenle, bu kitapta bu aletlerin rutin toksikolojik analizlerde kullanımlarından bahsedilecektir.

5.1 İnce tabaka kromatografisi

Kromatografi, kimyasal yapıları birbirine yakın madde karışımlarının birbirinden ayrılmasında kullanılan bir tekniktir. Kromatografi deyimi, ilk kez

İzolasyon işlemleri

1) Asidik ekstraktın hazırlanması (ekstrakt A): 30 ml lik santrifüj tüpü içine analizi yapılacak idrar örneğinden 10 ml konur. 1 ml seyreltik hidroklorik asit ve 10 ml kloroform ilave edilir. Çalkalayarak 5 dakika karıştırılır ve 10 dakika santrifüj edilir.

Kloroform fazı (alt faz) 15 ml lik kapalı bir cam tüpe alınır. Ekstrakt su banyosunda 60°C de hava akımında kuruluğa kadar uçurulur.

2) Bazik ekstraktın hazırlanması (Ekstrakt B): İdrar örneğinden 10 ml daha alınarak 30 ml lik diğer bir santrifüj tüpüne konur. 2 ml amonyum klorür tamponu ve 10 ml (kloroform:propan-2-ol:9:1) karışımı ilave edilir. 5 dakika çalkalandıktan sonra 10 dakika santrifüj edilir. Organik faz (alt faz) 15 ml lik kapaklı cam tüpe aktarılır. 0.5 ml metanollü hidroklorik asit ilave edilir (uçucu bazların kaybını önlemek için). Ekstrakt 60°C deki su banyosunda hava akımında kuruluğa kadar uçurulur.

Mide içeriği ekstraksiyonunun purifikasyonu

Mide içeriği, idrar örneğine uygulanan şekilde (ekstrakt A ve ekstrakt B) uçurma işlemine kadar hazırlanır. Ekstraktlara geçebilen ve İTK de interferansa neden olabilen maddelerin uzaklaştırılması için daha ileri ekstraksiyonlarla aşağıda açıklanan şekilde purifikasyonu yapılır.

1) A ekstraktına (uçurma işlemi yapılmadan önce) 5 ml seyreltik sodyum hidroksit; B ekstraktına 5 ml seyreltik hidroklorik asit ilave edilir; 5 dakika çalkalandıktan sonra (tercihan mekanik karıştırıcı ile), 10 dakika santifüj edilir. Organik fazlar atılır.

2) A ekstraktından elde edilen sulu NaOH fazına 5 ml seyreltik hidroklorik asit; B ekstraktından elde edilen sulu hidroklorik asit fazına 5 ml amonyum klorür tamponu ilave edilir. 5 dakika çalkalandıktan sonra

(tercihan mekanik karıştırıcı ile) 10 dakika santrifüj edilir. Organik fazlar atılır.

3) Ekstraktlar kuruluğa kadar 60°C de hava akımında uçurulur.

İnce tabaka kromatografisine uygulama :

1) Durucu faz olarak 20x20 cm boyutunda cam levha üzerine 0.25 mm kalınlığında kaplanan silikagel G (20 µm tanecik büyüklüğünde) tabaka kullanılır.

Silikagel ile kaplanmış tabaka kurşun kalemle 8 kolona ayrılır. Tabakaya 1 cm yükseklikte hafif bir çizgi çizilir. Developman yüksekliği 10 cm olarak işaretlenir. (Şekil 6)

2) Numune ekstraktları 100 µl (kloroform:propan-2-ol) karışımında çözülür. 25 µl ekstrakt A, 25 µl ekstrakt B, şekilde görüldüğü kolonlardaki numune uygulama yerlerine uygulanır.

3) Standart ilaç karışımlarından şekilde işaretlendiği şekilde (asidik, bazik ve fenotiazin karışımları) 10 µl uygulanır.

4) Kurutulan tabaka (etil asetat: metanol: konsantre amonyum hidroksit: 85:10:5) karışımından oluşan developman çözeltisi ile devolope edilir. (Şekil 6)

5) İşaretlenen yüksekliğe kadar devolope edilen tabaka tanktan çıkarılır ve çeker ocakta hava akımında kurutulur.

6) Kurutulmuş tabaka UV de 254 nm ve 366 nm de incelenerek floresan veren lekeler işaretlenir.

7) Tabaka ters çevrilerek:

a) 1 ve 2. kolonlara merküröz nitrat reaktifi;

b) 3 ve 4. kolonlara asitlendirilmiş iyodoplatinat reaktifi;

c) 7 ve 8. kolonlara (500 ml/l) oranında sulandırılmış sülfirik asit püskürtülür (Şekil 7).

A ₁	A ₂	B ₁	B ₂	B ₁	B ₂	C	B ₂
10 µl	25 µl	10 µl	25 µl	10 µl	25 µl	10 µl	25 µl
---	---	---	---	---	---	---	---
1	2	3	4	5	6	7	8

Şekil 6- İlaç ekstraktlarının İTK ya uygulanması

N : Numune uygulama (başlangıç) yeri ; S : developman sınırı; A₁ : Asidik ilaç karışımı (1); A₂ : Asidik numune ekstraktı (2); B₂ : Bazik ilaç karışımı (3,5); B₂ : Bazik numune ekstraktı (4, 6, 8); C : Fenotiazinler karışımı

A ₁	A ₂	B ₁	B ₂	B ₁	B ₂	C	B
Merküröz Nitrat reaktifi		Asitlendirilmiş İyodoplatinat Reaktifi		Mandelin Reaktifi		Sülfirik asit (500 ml/l)	
1	2	3	4	5	6	7	8

Şekil 7- Kromatogramların püskürtme reaktifleriyle görünürleştirilmesi.

Her reaktifle püskürtmede, püskürtme yapılmayacak kolonlar temiz bir cam levha ile maskelenir. (Reaktiflerin hepsi çok toksik olduğundan, püskürtme işlemi çeker ocak içinde yapılmalıdır.)

8) Püskürtmeden sonra levha tekrar UV de (254 nm ve 366 nm de) incelenir. Özellikle Mandelin reaktifi püskürtülen kolon önemlidir.

9) Mandelin reaktif ile elde edilen lekelerin rengi, gerekirse 100°C de 10 dakika bir etüvde bekletilerek rengin kuvvetlenmesi sağlanır.

Elde edilen kromatogramların R_f değerleri ve renkleri standartlarla karşılaştırılır.

Labratuvarımızda yapılan bir araştırmada asidik, bazik ve nötral yapıdaki ilaçların değişik developman sistemlerinde verdikleri R_f değerleri ve renk reaksiyonları Tablo 6'da gösterilmiştir (Şanlı, N., 1995).

Bu tabloda I, II, III ve IV rakamları ile gösterilen developman sistemleri aşağıda açıklanmıştır:

- I: Etil asetat : metanol : derişik amonyak (85:10:5)
- II: Kloroform : aseton (4:1)
- III : Metanol : derişik amonyak (100 : 1,5)
- IV: Kloroform : metanol (90 : 10)

Tablo 6 : Bazı asidik, bazik ve nötral ilaçların İTK verileri

İlaç Adı	Kullanılan Reaktif	Çözücü Sistemi (Rf)*		Renk
		I	II	
Asetaminofen	%5 FeCl ₃	0,52	0,20	---
"	%1 KMnO ₄			Açık kahverengi
Salisilik asit	%5 FeCl ₃	0,14	0,06	Viyole
"	%1 KMnO ₄			Açık kahverengi sarı
"	UV (254 nm)			Açık sarı floresans
Metokarbamol	%1 KMnO ₄	0,66	0,16	Kahverengi
"	Asidik iyodoplatinat çözeltisi			Koyu menekşe
İndometasin	%1 KMnO ₄	0,07	0,04	Açıksarı kahverengi
"	Asidik iyodoplatinat çözeltisi			Kızıl kahverengi
Fenobarbital	Cıva Oksit / Difetil-karbazon	0,77	0,45	Mor menekşe
"	Zwicker			Pembe
Asetil salisilik asit	UV (254 nm)	0,17	0,09	Açık sarı floresans
		III	IV	
Klorpromazin	Dragendorf	0,69	0,44	Turuncu
"	Ninhidrin			Açık sarı
"	FPN			Sikleman pembe
"	Marquis			Pembe
"	Asidik iyodo platinat			Koyu kahverengi
Klorfeniramin maleat	Dragendorf	0,46	0,24	Koyu turuncu
"	Ninhidrin			Sarı
"	FPN			Açık mave
"	Marquis			Viyolo
"	Asidik iyodo platinat			Kızıl Kahverengi
İmipramin	Dragendorf	0,55	0,47	Turuncu
"	Ninhidrin			Sarı
"	FPN			Mürekkep mavisi
"	Marquis			Mavi
"	Asidik iyodoplatinat			Kızıl kahverengi
Amitriptilin	Dragendorf	0,6	0,47	Turuncu
"	Asidik iyodoplatinat i			Kızıl kahverengi
Niketamid	Asidik iyodoplatinat	0,8	0,65	Kahverengi
"	Ninhidrin			Sarı

5.2. UV ve görünür alan spektrofotometresinin toksikolojik analizlerde kullanılması

Özel bölümde maddelerin kantitatif analizlerinde UV (200-400 nm) ve görünür alan (400-800 nm) spektrofotometrisine dayanan yöntemler açıklanmıştır. Bu teknikte karşılaşılan en büyük sorun, analizi yapılacak madde dışında bulunabilecek maddelerin interferansıdır. Bu nedenle önce analizi yapılacak madde veya maddelerin biyolojik materyalden izolasyonları ve purifikasyonları gerekir (ekstraksiyon, mikrodifüzyon gibi yöntemlerle).

Spektrofotometrik analizlerde güvenilir sonuç almada monokromatörün doğru çalışması önemlidir. Monokromatörün kontrolü, bilinen bir referans çözeltisinin maksimum absorpsansları (λ_{max}) ölçülerek yapılır. Bu amaçla en çok sulu sülfirik asitte (0.005 mol/l) hazırlanan % 0.6 lik (60.00 mg/l) potasyum dikrormat çözeltisi kullanılır. Bu çözeltinin 235 nm ; 257 nm; 313 nm ve 350 nm de gösterdiği spesifik absorpsanslar sırası ile 124.5 ; 144.0; 48.6 ve 106.6 olmalıdır.

Ayrıca spektrofotometre küvetlerinin standardizasyonu ve temizliği önemlidir. UV spektrofotometrelerinde kuartz, görünür alan spektrofotometrelerinde ise cam veya belirli özellikte plastik küvetler kullanılır.

Spektrofotometrik analizde en önemli sorun, ekstraksiyon işlemi sırasında beraber ekstrakte edilen endojen ve diğer yabancı maddelerinin intereferans riskidir. Numune ekstraktının UV spektrumunun incelenmesi ekstraktın purifikasyonu hakkında bilgi verebilir.

Mide içeriği ekstraktı ve olay yerinden alınan örneklerin UV spektrumlarının incelenmesi kalitatif bilgi açısından yararlı olabilir.

UV Spektrofotometresi ile ekstraksiyon fraksiyonlarının taranması

UV spektrofotometresi maddelerin kalitatif ve kantitatif analizinde kullanılır. Maddenin identifikasyonunda (nitel analizinde), o maddenin UV alanında maksimum absorbans gösterdiği dalga boyu (λ_{max}) kullanılır. Ayrıca maddenin spesifik ve molar absorbansı ve minimum absorpsiyon gösterdiği dalga boyundan da yararlanılabilir.

Toksikolojik analizde, uçucu olmayan organik maddelerin izolasyonlarından sonra fraksiyonlara ayrılan ekstraktların aşağıda kısaca açıklandığı şekilde UV spektrofotometresinde spektrumları incelenir. Ancak biyolojik idrar, mide içeriği ve kan ekstraktları ile çalışıldığından biyolojik materyalde bulunan endojen maddelerin ilaç spektrumlarını interfere edeceği bilinmelidir. Özellikle postmortem toksikolojik analizlerde, çeşitli nedenle numune alımının gecikmesi, analizde yanıltıcı olabilir. Bu nedenle destekleyici deneylerin yapılması gerekir.

Bilinmeyen ilaç tabletleri veya biyolojik olmayan numunelerle daha güvenilir sonuçlar alınır.

Zayıf asit (B) fraksiyonunun incelenmesi

Sistematik ekstraksiyonda kuvvetli asitler ayrıldıktan sonra eter fazında 0,5 M NaOH ile ayrılan zayıf asitleri içeren fazının (B fraksiyonu) doğrudan UV spektrofotometresinde spektrumu alınır. Blank (kör deney) olarak 0.5 M NaOH kullanılır.

Nötral maddeleri içeren eter fazı (C fraksiyonu) uçurulduktan sonra 3 ml. kuru metanolde çözülerek, 220 nm. ile 320 nm. arasında taranır. Blank olarak metanol kullanılır.

Barbitüratların araştırılması: Zehirlenmelerde barbitürat zehirlenmelerine sıklıkla raslanır. Bu nedenle bilinç kaybı olan kişilerde öncelikle barbitüratlar aranmalıdır.

Burada açıklanmış olan UV yöntemi ile barbitüratların birbirinden ayrılması ve B fraksiyonuna geçen diğer maddelerin de taranması yapılır.

B fraksiyonunun UV spektrumları üç farklı pH'da (pH:13,10 ve <2) incelenir.

0.5 M NaOH ile ayrılan B fraksiyonunu (pH 13), UV spektrofotometresinde 220-400 nm arasında 0,5 M NaOH'e karşı (kör) taranır, maksimum absorbans gösteren dalga boyları kaydedilir.

B fraksiyonu (numune) ve blank'a 1 ml %16 lık amonyum klorür ilave edilerek pH 10'a düşürülür. 220-400 nm arasında spektrumları tekrar alınır.

Küvette bulunan numune ve köre, birkaç damla 10 M sülfirik asit ilave ederek pH'nin 2 veya daha altında olması sağlanır. UV alanında (220 - 400 nm) tarama tekrarlanır.

Ekstraksiyon şemasında B fraksiyonuna geçen maddelerin farklı pH'da maksimum absorbans gösterdikleri dalga boyları tablo 7 de gösterilmiştir. (Moffat ve ark. 1986)

Tablo 7- B fraksiyonuna geçen maddelerin çeşitli pH'larda maksimum absorbans gösterdikleri dalga boyları (λ)

Madde	λ max (nm)		
	pH 13	pH ₁₀	pH < 2
Klorpropamid	232	---	232
Parasetamol	257	---	245
Fenilbutazon	264	264	237
Barbitüratlar			
N-metil substitüe	246	246	absorbansın sonu
5.5 substitüe	254	239	absorbansın sonu
S-substitüe	303	303	285

C ve D fraksiyonlarının incelenmesi:

Nötral maddeleri içeren eter fazı (C fraksiyonu) uçurulduktan sonra 3 ml kuru metanolde çözülerek, 220 nm ile 320 nm arasında taranır. Blank olarak metanol kullanılır.

Bazik maddeleri içeren kloroform fazı (D fraksiyonu) uçurulduktan sonra kalıntı 4 ml. 0.05 M sülfirik asitle çözülür. 220 - 360 nm. de UV'de taranır. Asitli numune seyreltik NaOH ile kalevi yapıldıktan sonra tekrar taranır. Ayrıca kalan çözelti kloroformla ekstrakte edilerek UV'de işlem tekrarlanır.

5.3. Gaz kromatografisinin toksikolojik analizlerde kullanılması

Gaz kromatografisi analitik ve forensik toksikolojide biyolojik materyalden izole edilen kimyasal maddelerin tarama testlerinde ve kantitatif analizlerinde kullanılır. ITK ve UV ile ön taramalar yapılan maddelerin kalitatif analizlerinde gaz kromatografisi destekleyici (confirmatory) deney olarak önem taşır.

Gaz kromatografisinde hareketli faz gazdır. Sabit faz ise kolon içine yerleştirilmiş adsorban bir maddedir. Bu durumda gaz-katı kromatografisi adını alan sistemde (GK) maddelerin ayrılması adsorbsiyona dayanır ve daha çok basit gazların analizinde kullanılır.

Gaz kromatografisinin daha çok kullanılan şekli gaz-sıvı kromatografisi (GSK) dir. Bu sistemde kolon içindeki yüzeyi geniş deaktive edilmiş katı madde, kaynama noktası yüksek yağimsı bir sıvı ile kaplanır. Burada maddelerin dağılım katsayısına göre ayrılmalarını sağlayan bu sıvı - sabit faz - görevini görür. 700'ün üstünde olan bu sıvı maddeler kaynama noktaları ve polaritelerine göre sınıflandırılmışlardır. Maddelerin sistematik ayrılmasında sabit faz maddesi çok önem taşır.

Gaz kromatografisinde kolon çeşidi de önem taşır. Normal kromatografik analizlerde dolgu kolon kullanılır. Cam veya çelik olan kolonların iç çapı 3.2 mm. ile 4 mm.; dış çapları 3.2 mm. ile 6.4 mm.; uzunlukları da 0.5 m. ile 4 m. arasında değişir. Kapiler kolonlarla ayırma işlemi daha etkin olur. Alıkonma zamanı (Retention time) çok yakın olan maddeler ayrılabilirler. Kapiler kolonlar çok ince (0.2 mm-0.5 mm. iç çapında) ve çok uzundurlar (10 m. - 60 m. uzunluğunda) .

Toksikolojik analizlerde (Head - Space) denilen düzenekleri içeren gaz kromatografisi tekniğinden de çok yararlanır. Bu teknikle doğrudan kan, serum gibi biyolojik sıvılarda uçucu maddelerin identifikasyonları yapılabilir ve bu şekilde kolon materyalinin kirlenmesi minimuma indirgenir. Küçük bir cam tüpe (7 ml. kadar sıvı alabilecek büyüklükte), 0.2 - 0.5 ml. numune konur, ağzı politetrafloroetilen yapısında bir kapakla sıkıca kapatılır. Bu şekilde hazırlanan numuneler kromatografteki "head-space" düzeneğine yerleştirilerek uygun bir sıcaklıkta 10 dakika dengeye bırakılır. Böylece uçucu madde gaz fazına geçmiş olur. Bu gaz fazındaki numune minimum otomatik sistemle kolona enjekte edilir. Bu düzenekle kanda alkol ve diğer uçucu bileşikler, evlerde vernik, cila gibi karışımların içindeki uçucu maddelerin analizleri yapılabilir.

Gaz kromatografisinde maddelerin ayrılmasında sıvı fazın cinsi, taşıyıcı gazın hızı, kolonun etkinliği, boyutları ve sıcaklığı, kullanılan detektör tipi rol oynayan önemli faktörler arasındadır.

Gaz kromatografisi ayrıca kantitatif amaçla da kullanılır. (Uygulama ile ilgili örnekler özel bölümde verilmiştir).

Biyolojik materyalden izole edilmiş zehirlerin gaz kromatografisi ile taranmaları

Daha önce bahsedilen izolasyon (ekstraksiyon) işleminden sonra uçucu olmayan organik zehirlerin gaz kromatografisi ile ayrılmasında en çok dimetilsilikon durucu fazı (SE-30; OV-17; OV-101) kullanılır. Uçucu aminlerin ayrılmasında ise potasyum hidroksitle kaplanmış Apiezon L gibi alkali kolonlar etkili olur. Detektör olarak en çok Alev İyonlaştırıcı Detektör (FID: Flame Ionization Detector) kullanılır.

Gaz sıvı kromatografisi uçucu olan maddelerin (gazlar ve sıvılar) taranmasında da uygun bir yöntemdir. Gaz kromatografisinde maddelerin ayrılması kaydedici ile kaydedilir. Elde edilen kromatogramda maddeler aynı koşullarda standartlarla elde edilen kromatogramla karşılaştırılır. Bu karşılaştırmada en önemli kriter alıkonma zamanı (Retention time) dır. Kantitatif analiz ise elde edilen "piklerin" büyüklüğü çeşitli yöntemlerle ölçülerek ve iç veya dış standard kullanarak yapılır.

5.4 Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ayırma gücü ve duyarlılığı gaz kromatografisine göre daha yüksek olan bir tekniktir. İlk kez 1969'da kullanılmaya başlanmıştır. 1970'lerin sonunda rutin analiz yapan pek çok laboratuvarında kullanıma geçmiştir.

HPLC, sütun kromatografisinin bir şeklidir. Bazı yönleri ile gaz kromatografisine benzemesine karşın (kalitatif ve kantitatif tayinin aynı işlemle gerçekleştirilmesi, karışımdaki maddelerin ayrı ayrı pikler vermesi gibi), mobil fazın sıvı olması ve yüksek basıncın güçlü bir pompayla sağlanması bakımından gaz kromatografisinden ayrılır. Güçlü bir pompa ve basınca dayanıklı bir sistemle mobil fazın kolonda bulunan sabit fazdan geçişi kolaylaşmakta ve kısa zamanda bu ayrılma sağlanabilmektedir. Mobil faz

olarak kullanılan çözücü önce güçlü bir pompa yardımı ile tüm sistemden geçirilir. Daha sonra ayrılması istenen karışım, bir mikroenjektörle sisteme verilir. Mobil fazla sürüklenen maddeler kolona geçerler, kolonda (sabit faz içerir) maddeler dağılım, adsorbsiyon, iyon değiştirme özelliklerine göre ayrılırlar. Kolonu bu şekilde terkeden maddeler gaz kromatografisinde olduğu gibi uygun bir detektörle (UV absorbsiyonu, refraksiyon, floresans ölçen) kalitatif ve kantitatif değerlendirmeleri (kaydedici ile piklerden alınan kromatogramlar ile) yapılır.

HPLC'nin gaz kromatografisine göre üstünlüğü, daha iyi bir ayırma ve duyarlık dışında, bozunan maddeler, iyonik maddeler ve yüksek molekül ağırlıklı maddelerin (proteinler, peptitler gibi) analizinde kullanılabilmesidir.

Toksikolojik analizlerde HPLC'nin geniş bir uygulama alanı vardır. Bir çok organik çözücülerin biyolojik izlenmelerinde (metil alkol, benzen, toluen, ksilen gibi), fenolik maddelerin birbirlerinden ayrılmalarında (fenol ve krezoller gibi) HPLC tercih edilmektedir (Özel bölüme bakınız).

5.5. Atomik absorbsiyon spektrofotometresi (AAS)

1955 yılından sonra geliştirilmiş olan atomik absorbsiyon spektroskopisi (AAS) yüksek sıcaklıkta gaz halinde bulunan element atomlarının elektromagnetik ışınları absorblaması üzerine kurulmuştur. Absorblanan elektromagnetik ışınlar genellikle ultravyole ve görünür alan ışınlarıdır.

AAS, genelde alev spektroskopisinin bir şeklidir. Alev spektroskopisi, serbest atomlar üzerine kurulmuş bir spektroskopi dalıdır. Alev spektroskopisinde, moleküler spektroskopide görülen absorbsiyon bantları yerine absorbsiyon ve emisyon çizgileri görülür.

Serbest atomlar elde etmek için madde ya alevde veya bir elektrik düzeneğinde ısıtılır. Bunun için analiz yapılacak elementi bileşik halinde

(tuzu) içeren çözelti, özel bir düzenekle çok küçük kürecikler halinde alev içine püskürtülür. Alev içine püskürtülen çözeltinin önce suyu buharlaşır, geride kalan tuzlar gaz molekülleri haline dönüşürler. Gaz halindeki tuz molekülleri ise ayrılarak serbest element atomlarını verirler.

Gaz halindeki atomların alev sıcaklığında termal enerji absorblaması ve ondan sonra absorbladığı enerjiyi kısmen veya tamamen spektral çizgi halinde vermesi olayı atomik emisyon veya alev emisyon spektroskopisi adını alır. Alev içinde bulunan, bir atom türünün, dışarıdan başka bir kaynaktan alev içine gönderilen kendine özgü ışın demetini kısmen absorblaması ve geride kalan karakteristik ışın şiddetinin derecesini ölçme üzerine kurulmuş spektroskopi dalına da atomik absorbsiyon spektroskopisi denir. Bu amaçla geliştirilmiş cihazlara da atomik absorbsiyon spektrofotometresi (AAS) adı verilir.

AAS, adli bilimlerde (patlayıcı madde kalıntısında antimon, baryum, kurşun gibi elementlerin identifikasyonunda), adli ve analitik toksikolojide ağır metal zehirlenmelerinin biyolojik materyalde tayininde sık kullanılan bir cihazdır. Ayrıca ağır metallere mesleki maruziyetin biyolojik izlenmesinde de kullanılır.

5.6 Nötron aktivasyon analizi (NAA)

Nötron aktivasyon analizi diğer spektroskopik yöntemlerden farklıdır. NAA birçok elemente uygulanabilen hassas bir elementel analiz yöntemidir.

Prensibi :Numune, nükleer bir reaktörün merkezi gibi yavaş hareketli bir nötron (termal nötron) kaynağının içine yerleştirilir. Bu nötronların çoğu atomun çekirdekleri ile birleşerek stabil olmayan veya radyoaktif çekirdekler (radyo izotoplar) oluştururlar. Bu radyoaktif atomların oluşumu aktivasyon basamağıdır. Bu basamaktan sonra, örnek reaktörden çıkarılır ve gama (γ) ışını spektrometresine yerleştirilir. Aktivasyon basamağında oluşan

readyoaktif çekirdek bozunarak kendine özgü enerji ile birlikte γ ışını yayınlar. Bu gama ışını spektrumunun incelenmesi ile numunedeki elementin identifikasyonu ve miktar tayini yapılır.

NAA, yüksek spesiflik, dayanıklılık (her metal için değil) ve miktar tayinine imkan veren bir yöntemdir. Ancak pahalı ve komplike bir teknik olduğu için ancak bu konuda gelişmiş özel laboratuvarlarda bulunur. (De Frost, P. ve ark. 1983 ; Piemento G. ve ark. 1987; Gündüz, T., 1988'e bakınız).

NAA ile zamanımızda yaklaşık 77 element tayin edilebilmektedir. Yöntem sulara, kayalara, arkeolojik maddelere, alaşımlara ve biyolojik numunelere uygulanabilmektedir.

Adli toksikolojide uygulamasına tarihi bir örnek olarak, Napolyon Bonapart'ın saç örneğinin NAA ile tayini örnek verilebilir. NAA yöntemi ile arseniğin deteksiyon limiti (1 ng), AAS'e göre (100 ng/ml) daha duyarlıdır. Ancak NAA ile deteksiyon limitinin duyarlılığı, AAS ile karşılaştırıldığında, element cinsine göre değişir. Örneğin AAS ile kurşun analizinde dedeksiyon limiti (2 pg/ml) NAA'ye göre (0.1 μ g) daha duyarlıdır. (Fazla bilgi için bakınız: Gündüz,T. 1988 ve Piemento G. ve ark. 1986)

5.7. İmmunoassay'ın toksikolojik analizlerde kullanılması

"İmmunoassay" biyolojik sıvılarda ilaçların doğrudan analizine kısa zamanda imkan veren (antijen-antikör) reaksiyonlarına dayanan yöntemlerdir. "Terapötik ilaç izlenmesinde", bağımlılık yapan maddelerin ve ilaç suistimalinin idrarda (sınırlı olarak kanda) aranması ve akut zehirlenmelerin araştırılmasında uygulanmaktadır. 1960'lı yılların başında immunoassay yöntemlerinden "radyoimmunoassay" (RIA) biliniyordu. Daha sonraki gelişmelerle çeşitli immunoassay teknikleri ortaya çıkmıştır.

İmmunoassay tekniğinin prensibi : Bu yöntemde analizi yapılacak maddeye (antijen) karşı geliştirilen spesifik "antikor" ve analizi yapılacak bu maddenin işaretlenmiş şekli kullanılır. Tayini yapılacak moleküllere karşı antikorların elde edilmesi immunoassayin en önemli bölümüdür. Genel olarak ilaçların molekül ağırlığı çok düşük olduğundan antijen özelliği göstermezler. Bu nedenle gerekli antikoru elde etmek için enjeksiyondan önce ilaç-protein konjugatı hazırlanır. Çoğunlukla bu amaçla albumin kullanılır. Böylece ilaç taşıyıcıya bağlanarak kendisi için spesifik antikor hazırlanmasına uygun hale getirilir. Burada ilaç "haptin", ilaç-protein konjugatı ise "immunojen" özelliği gösterir.

Analizi yapılacak kimyasal maddeyi (ilacı) içeren biyolojik sıvıya, belirli konsantrasyonda antikor ve işaretlenmiş ilaç ilave edildiğinde karışımla aşağıdaki reaksiyon gerçekleşir:



Antikor yarışmalı olarak serbest işaretlenmiş ilaç (ilaç*) ve analizi yapılacak ilaçla kompleks (bağlı ilaç) oluşturur. Bu karışımda "bağlı işaretlenmiş ilaç" moleküllerinin, "bağlı işaretlenmemiş ilaç" moleküllerine oranı serbest ilacın miktarı ile ters orantılıdır.

Uygun bir analitik yöntemle ölçüm yapılır ve sonuçlar kalibrasyon grafiği ile karşılaştırılır. Kalibrasyon grafiği ilaç konsantrasyonuna karşı "bağlı işaretli ilacın" oranı (% bağlı ilaç) tayin edilerek hazırlanır.

İmmunoassay sınıflandırılması: İlacın işaretlenmesi çeşitli tekniklerle yapılır. İmmunoassay teknikleri bu işaretleme yöntemlerine göre de bir çok alt sınıflara ayrılır:

Radyo immunoassay (RIA) : Antijen radyoaktif madde ile işaretlenir. Miktar tayini radyoaktivite ölçülmesi ile yapılır.

Enzim immunoassay (EIA) : İşaretleme enzim ile yapılır. Enzim aktivitesi tayin edilerek analizi yapılacak maddenin miktarı saptanır.

Floro immunoassay (FIA) : İşaretleme florofor bir madde ile yapılır. Miktar tayini spektrofotometre ile saptanır.

İmmuno kemiluminesans : İşaretleme kemiluminesans veren bir madde ile yapılır.

İmmunoassay tekniği, karışıma doğrudan uygulanabiliyorsa "homojen immunoassay" ; eğer karışımdan işaretli ilacın ayrılmasından sonra analitik yöntem uygulanabiliyorsa "homojen immunoassay" adı verilir. RIA heterojen; EIA, FIA ise homojen immunoassay'lere örnek verilebilir.

Radiyoimmunoassay'da analiz yöntemi radyoaktivitenin ölçülmesine dayanır. Bu amaçla β - veya γ - ışını veren radyoaktivite β - sıvı sintilasyon sayıcısı; yalnız γ - ışını veren radyoaktivite ise γ - katı sintilasyon sayıcısı ile ölçülür.

Enzim veya floresan bir madde ile işaretleme yapılan immunoassay yöntemleri ile ölçme ise ultraviyole absorpsiyonunun, floresans veya luminesansın ölçülmesine dayanır. Bu yöntemlere de "optik immunoassay" adı verilir.

Aşağıda bazı önemli immunoassay yöntemlerinin prensibi ve uygulama alanları kısaca açıklanmıştır.

Radyoimmunoassay (RIA)

Radyoimmunoassay, radyoaktif atomların immuno-kimyasal reaksiyonlarda kullanılarak maddelerin miktar tayinlerinin yapıldığı yöntemidir. RIA ilk kez 1959 yılında plazmada insülin tayini için kullanılmıştır. Daha sonra bu teknik klasik biyokimyasal yöntemlerle tayini mümkün olmayan ve vucutta çok düşük miktarlarda bulunan (10^{-10} - 10^{-12}

gram gibi) 250 den fazla biyokimyasal maddelere uygulanmıştır. Sınırlı da olsa biyolojik sıvılarda ilaç analizinde de (amfetaminler, barbitüratlar, digoksin, metadon, morfin, nikotin, penisilinler, fenitoin, tetrahidrokannabinol, tübokürarin gibi) kullanılmaktadır. RIA yöntemi duyarlı, mikro bir yöntem olup 10-100 µl numuneye ön işlem uygulanmadan madde analizine imkan vermektedir. Bu nedenle zamanımızda endokrinoloji, farmakoloji, toksikoloji alanlarında kullanımı artmaktadır.

RIA Yönteminin prensibi ve uygulama tekniği: Radyoimmunoassay yönteminde temel komponentler: Analizi yapılacak maddenin (ilacın) uygun bir radyoizotopla işaretlenmiş analiz yapılacak madde (ilaç) ile hazırlanmış standartlar, bu ilaca karşı önceden hazırlanmış antikor içeren antiserumdur.

İlacın radyoaktif izotopla işaretlenmesinde en çok trityum (^3H), karbon-14 (^{14}C) ve iyot-125 (^{125}I) kullanılır. Bu radyoizotoplarda trityum ve karbon-14, β -ışınları, iyot-125 ise X ve γ ışınları yayınlamaktadır. Ancak az sayıda ilaç molekülünde iyot bulunduğundan, sentez sırasında molekülün iyotlu türevi hazırlanır. Örneğin I-125 ile işaretli digoksin hazırlanmasında molekülüne iyot ilave edilmiş tirozinle digoksin türevi hazırlanır.

Uygulamada, bir tüpe belirli bir miktarda antikor ve belirli miktardaki radyoaktif işaretlenmiş ilaç (standart) ve analizi yapılacak ilaç içeren numune (serum veya idrar) bir tüpe konur. Bu karışımda, işaretli ve işaretlenmemiş ilaç aynı antikora bağlanmak için yarışır. İşaretsiz ilacın miktarı ne kadar çoksa, o kadar az işaretli ilaç antikorla bağlanır. Bu nedenle radyoaktif işaretlenmiş bağlı ilaç moleküllerinin miktarı işaretlenmemiş ilaç moleküllerinin miktarı ile ters orantılıdır. Karışımda reaksiyon dengeye ulaşıncaya, ayırma işlemine geçilir (heterojen immunoassay). RIA tekniğinde, ilacın

konsantrasyonu, antikorla bağlı işaretlenmiş ilacın veya serbest ilacın radyoaktivitesinin llmesine dayanır.

Radyoaktivite lmnde (sıvı sintilasyon veya - sayıcısı) serbest veya bağlı ilacın ayırımı yapılamaz. Bu nedenle yukarda açıklanan ve dengeye ulaşmış karışıma ayırma işlemi uygulanır. Bu amaçla aktif kömürle adsorbsiyon, çift antikor tekniği gibi yöntemler uygulanır. Radyoaktivite lm bu ayırma işleminden sonra yapılır. Bu yöntem "heterojen Immunoassay'e de örnektir (Fazla bilgi için Moffat A.C. ve ark. 1988'e bakınız).

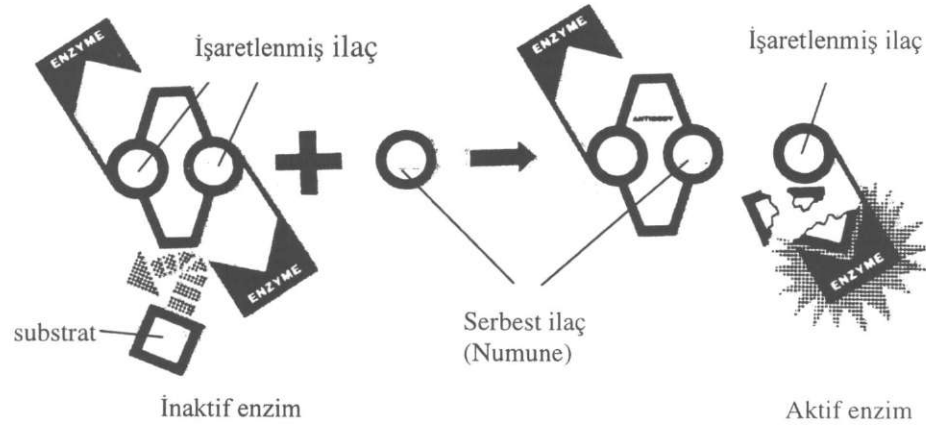
Optik immunoassay'ler : Optik immunoassay'ler RIA'ya göre birçok üstünlük taşır. Bu yöntemlerde kullanılan reaktifler dayanıklıdır ve ayırma işlemi yapılmaksızın analiz yapılabilir. İşaretleme enzimlerle, floresan ve kemilmnesan maddelerle yapılabilir ve bu nedenle uygulama alanları daha geniştir. Analitik yöntemler maddenin optik özelliğine (ultraviyole, absorpsiyonu, bulanıklık, floresans) dayandığı için bu yöntemlere "optik ummonoassay'ler"adı verilmiştir. Bunlar içinde en çok kullanılan enzim immunoassay (E I A) ve floresans immunoassay (F I A) yöntemlerinden bahsedilecektir.

Enzim İmmunoassay (E I A) : Yarışmalı bir reaksiyon kinetiğine dayanan E I A, ilk kez 1971 yılında kullanılmıştır. Rutin analizlere de homojen bir yöntem olarak uygulanan E I A, daha duyarlı bir analiz istendiğinde serbest ve bağlı ilacın ayrılmasına dayanan heterojen E I A olarak uygulanır.

Homojen E I A' da analiz yapılacak ilaç, uygun bir enzimle kovalan olarak işaretlenir. Bu yöntemle antiepileptik ilaçların, astma ilaçlarının, antineoplastik ilaçların, suistimal edilen ve bağımlılık yapan bir çok ilaçların

analizi yapılabilir. Syva firması EMIT (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique) patenti altında bu yöntemi geliştirmiştir.

Bu yöntemin dayandığı biyokimyasal prensip:1) enzimle işaretlenmiş ilaça karşı geliştirmiş antikora bağlanarak inaktive olur ; 2) arkadan çok az serbest ilaç veya metaboliti de yarışmalı olarak bağlanarak, antikor tarafından inaktive edilen enzim indüklenir. Enzimin aktivitesi analizi yapılacak serbest ilaç konsantrasyonu ile orantılıdır. Bu nedenle karışımda enzim aktivitesinin ölçümünden ilaç konsantrasyonuna geçilir. Şekil 8'de homojen immunosay tekniği (EMIT) şematik olarak gösterilmiştir.



Floroimmunoassay (FIA) teknikleri : Floresans veren bileşiklerin immunokimyasal işaretleyici olarak kullanılabileceği ilk kez 1941 yılında ortaya atılmıştır. Analizi yapılacak maddenin floresans özelliğindeki değişmelere dayanan bu yöntemde madde florofofor bir molekül ile işaretlenir. Floresan izotiyosiyanat, rodamin B, izotiyosiyanat, umbelliferon gibi florofofor maddeler işaretlemede kullanılır. Floresans immunoassay, enzim

immunoassay'e göre daha duyarlıdır. Uygulama şekline göre çeşitli teknikler kullanılır.

Homojen floreoimmunoassay yöntemleri içinde substratla işaretlenmiş floreoimmunoassay tekniği ticari olarak geliştirilmiştir. Bu teknik florofor maddeyi serbest hale geçiren bir enzim kullanılır. Analizi yapılacak ilaç standartı florojen bir madde ile (örneğin β -galaktoz-umbelliferon) ile işaretlenir. Bu madde enzim substratıdır. Florojen madde ile işaretlenmiş ilaçta floresans maskelenmiştir. Ancak ilave edilen enzimle, floresansı örten molekül florojen molekülden ayrıldıktan sonra işaretlenmiş ilaç floresan özellik gösterir. Örneğin burada yukarda adı geçen florojen madde kullanıldığında enzim olarak β -galaktosidaz enzimi kullanılır. β -galaktosidoz hidrolizle florojen maddeden β -galaktozun ayrılmasını sağlar. Böylece işaretli ilacın floresan özelliği açığa çıkar.

İlaca karşı geliştirilmiş antikorla bağlanmak için işaretli ilaç ve numunedeki serbest ilaç yarışır. Enzim antikorla bağlı işaretli ilacı kataliz edemez. Ancak bağlanmamış ilacı hidroliz eder. Bu nedenle floresans özelliği açığa çıkan ilacın floresans şiddeti numunedeki ilaç konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

Floresans polarizasyon immunoassay (FPI) tekniği: Bu teknikte, bağlı ve serbest florofor molekülle işaretlenmiş ilacın polarize ışık düzlemini çevirme farkı ölçülür. Işık polarize edici bir mercek veya prizma aracılığı ile demet halinde düz bir zemin üzerine düşürülür. Polarize ışık, floroforla işaretli ilaç üzerine düşürüldüğünde ışığın şiddeti (eksitasyon) molekül tarafından polarize ışık düzleminde emisyon yapar. Floresans eksitasyon ışınına dik olarak giden emisyon ışınının ölçülmesi ile saptanır. Floresans mekanizması ile ilk defa 1970 yılında Dandliker ve arkadaşları tarafından

denenmiştir. Floresans veren bir maddeyle (florofor) işaretlenmiş olan ilaç serbest halde iken çok yavaş bir floresans polarizasyonu yapar. Antikorla bağlandıktan sonra kompleks molekülün hareketi yavaşlar ve floresans polarizasyonu artar. Polarizasyondaki bu değişim ilaç konsantrasyonu ile orantılıdır. Yöntem otomasyona yakındır. İlk kez 1981 yılında Abbot firması tarafından bu yöntem otomasyona adapte edilmiştir. TDX cihazı olarak bilinen bu cihaz "terapötik ilaç izlenmesi" ve bir çok ilaçlarla akut zehirlenmelerde ilaç düzeylerinin tayininde kullanılmaktadır. (Deniz, G., Saygı, Ş, 1989; Küpçü, Ş; Vural, N, 1992). Bu teknikte duyarlılık oldukça yüksektir. Örneğin serum digoksin düzeyinin ölçülmesinde duyarlılığın 0.2 ng/ml olduğu bildirilmiştir.

İmmunoassay'ın uygulama alanları

İmmunoassay tekniklerinden RIA, özellikle kardiyak glikozitler, insülin, lizerjid, kannabioids ve opiatlar gibi kanda konsantrasyonlar düşük ilaçların analizinde veya numune miktarının az olduğu durumlarda tercih edilen yöntemdir. RIA ile pg/ml (10^{-12} g/ml) duyarlılıkta analiz yapılabilir. EMIT ile duyarlılık daha düşüktür (ng/ml. 10^{-9} g/ml).

İmmunoassay ayrıca ilaç suistimalinin taranmasında, akut zehirlenmelerin analitik olarak araştırılmasında ve terapötik ilaç izlenmesinde kullanılırlar. İstenilen duyarlılık ve spesifikliğe göre RIA, EMIT veya FPI teknikleri seçilebilir. Bu yöntemler yarı veya tam otomatik düzeneklere adapte edilmiştir.

Genel olarak RIA ve EMIT idrarda çok çeşitli ilaç analizi için uygundur. Ancak geliştirilen çeşitli antikorlar diğer ilaçlarla çapraz reaksiyon verirler. Geniş bir spesifikliği olan antikor, numunede olan bir veya birden fazla aynı grup ilaçla bağlanabilir. Bunu ayırd etmek için her ilaç ve

metaboliti yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ile fraksiyonlara ayrılarak immunoassay yöntemine adapte edilebilir.

Akut zehirlenmelerde immunoassay uygulanmasında da benzeri interferans olabilir. Örneğin akut zehirlenmelerde benzodiazepin grubu ilaçların EMIT ile taranmasında farmakolojik olarak aktif metabolitler de antikorla etkileşirler. Tek bir ilacın birden fazla metabolitinin çapraz reaksiyon vermesi, sonucun yorumlanmasını zorlaştırır.

Zorluğuna karşın, benzodiazepinleri immunoassay yöntemi ile ayırt etmek mümkün olduğu halde, barbitüratlar ancak grup olarak tayin edilebilir. Bu durumda pozitif sonuç alındığında, diğer yöntemlerle hangi barbitürat olduğu ayırt edilmelidir.

Terapötik ilaç izlenmesinde ise immunoassay ile aminoglikozit antibiyotikleri için çabuk ve kesin sonuçlar alınabilir.

Sonuç olarak immunoassay ile kan ve idrarda yukarıda belirtilen amaçlarla ilaç analizinde hızlı, duyarlı ve kesin sonuçlar alınabilir. Ancak her yöntemin (RIA, EMIT, FPI) uygulama alanı ve analitik özelliklerini bilerek seçmek gerekir.

ÖNEMLİ ZEHİRLERİN BİYOLOJİK MATERYALDE ANALİZLERİ

2. Bölüm

Bu bölümde akut zehirlenmelerde, endüstride ve yakın çevrede çeşitli nedenlerle maruz kalınan bazı önemli kimyasal maddelerin biyolojik materyalde kalitatif ve kantitatif analizlerine yer verilecektir. Ayrıca maddelerin biyolojik izlenmelerinde kullanılan metabolit ve biyokimyasal parametrelerin analizine de o madde ile ilgili yerde değinilecektir.

Biyolojik materyal olarak rutin analizlerde en çok idrar ve kan örneğinden yararlanılır. Toksik madde konsantrasyonu 24 saatlik toplanan idrarda yapılmalıdır. Ancak pratik olarak bu mümkün olmadığından o anda alınan örnekte -spot örnek- analiz gerçekleştirilmektedir. Ayrıca mesleki maruziyetlerde bazı ksenobiyotik veya metabolitleri maruziyet sırasında veya maruziyetten hemen sonra atılırlar. O anda idrarla atılan madde konsantrasyonuna etki eden dilüsyon etkisinin düzeltilmesi gerekir. Bu nedenle de bulunan konsantrasyon değerlerinin ya idrarın standart özgül ağırlığına (1.024) göre veya (g) idrar kreatinin miktarına göre düzeltilmesi gerekir. Kreatinine göre düzeltme yapıldığında "spot idrar" örneğinde kreatinin tayini yapılmalıdır. Standard özgül ağırlığa göre düzeltmede ise idrarın yoğunluğu ölçülmelidir, (Trevisan, A., 1990)

Bu bölümde idrarda kreatinin tayini ve idrar ksenobiyotik düzeyinin kreatinine göre düzeltilmesi açıklanmıştır.

İdrarda kreatinin tayini

Kreatinin idrarda doğrudan spektrofotometrik yöntemle tayin edilebilmektedir. Pikrik asitle oluşturduğu renkli bileşiğin absorbansı 530 nm

de spektrofotometrede okunur ve kalibrasyon eğrisinden kreatinin miktarı tayin edilir (Baselt, R.C. 1980).

Uygulama : 5 ml idrar örneği 2000 devirle 15 dakika santifüj edilerek süzülür. Bu süzüntüden 0.1 ml. alınarak distile su ile 8.0 ml'ye tamamlanır (dilüsyon oranı 1:80). Seyreltilen çözeltiden 5 ml alınır, 2.5 ml suda doymuş pikrik asit (% 1.175 lik) ve 0.5 ml %10 luk NaOH çözeltisi ilave edilir. Karışım reaksiyonun tamamlanması için 10 dakika bekletilir ve 15 dakika içinde 530 nm de spektrofotometrede köre karşı absorbansı okunur. Standardlarla hazırlanan kalibrasyon eğrisinden absorbansa karşı gelen konsantrasyon okunur.

Kalibrasyon doğrusunun hazırlanması: Standart kreatinin çözeltisi, stok kreatin çözeltisinin seyreltilmesi ile hazırlanır.

Stok çözelti, 0,1 gram kreatinin bir miktar 0,1 N HCl içinde çözüldükten sonra 0,1 N HCl ile 100 ml 'ye tamamlanarak hazırlanır. Çözeltiye koruyucu olarak 2-3 damla toluen katılır ve buz dolabında saklanır (Stok çözelti:100 mg kreatinin/100 ml).

Standard kreatinin çözeltileri ise, stok çözeltiden sıra ile 25;50;75;100 ve 125 µl alınarak distile su ile 5 ml'ye tamamlanarak hazırlanır. Böylece 0,5mg/100 ml; 1 mg/100 ml; 1,5 mg/100ml; 2 mg/ 100 ml ve 2,5 mg / 100 ml 'lik kreatinin standard çözeltileri elde edilir.

5 ml standard çözeltilere 2,5 ml pikrik asit çözeltisi ve 0,5 ml % 10 NaOH çözeltisi ilave edilerek yukarıda açıklandığı şekilde 10 dakika bekledikten sonra 530 nm de absorbanslar köre karşı okunur. Konsantrasyona karşı okunan absorbanslar işaretlenerek kalibrasyon doğrusu hazırlanır.

Kreatinine göre düzeltme: İdrarda konsantrasyonu tayin edilen bir maddenin, kreatinine göre düzeltilmesi aşağıdaki örnekle açıklanmıştır.

Örnek : Alınan anlık (spot) idrar örneğinde florür konsantrasyonu 1.227 mg/l ve kreatinin ise 1.315 g/l bulunmuş olsun.

Bulunan florür düzeyi gram kreatinine göre düzeltildiğinde :

$$1.227 \text{ mg/l} \times \frac{1000}{1315} = 0,933 \text{ mg F/g kreatinin değeri bulunur.}$$

Genel olarak kreatinin miktarı 0,5 g/l altında (çok seyreltik idrar) ve 3 g/l üstünde (çok konsantre) bulunan idrarlarda kreatinine göre düzeltilme yapılmaz ve değerlendirmeye alınmaz (Trevisan, A., 1990).

1. UÇUCU ZEHİRLER

1.1. Karbon monoksit (CO)

Karbon monoksit ile zehirlenme solunum yolu ile olur. Endüstride başlıca maruziyet kaynaklarını havagazı, sentetik gaz (su gazı), jeneratör fırınları, egzoz gazı ve tam yanmamış yakıtların dumanı oluşturur. Diklorometan maruziyetinde de metabolizması sonucu invivo CO oluşur.

Endüstri dışında otomobil egzoz gazları, ısınmada kullanılan tam ve iyi yanmayan yakıt sistemleri yangın sırasında oluşan dumanlar karbon monoksit kaynağıdır. Ayrıca sigara dumanı da aktif ve pasif içici olarak kişilerin CO'e maruz kalmasına neden olur.

Karbon monoksit kanda hemoglobin ile birleşerek karboksihemoglobin (COHb) meydana getirir. Kanda oksijen yerine karbonmonoksitle birleşen hemoglobin yüzdesine "karboksihemoglobin satürasyon % si" denmektedir. Kanda COHb satürasyonu %20 üstünde olduğunda akut zehirlenme belirtileri başlar. Bu değer %60'a ulaştığında koma ve ölüm görülebilir. Sigara içenlerde COHb yüzdesi, içilen sigara miktarına göre % 3-8 arasında değişir. Çok fazla (günde 30-50 sigara) içenlerde ise bu değer %10 COHb düzeyini

aşabilir. Karbonmonoksit zehirlenmesinin şiddeti kanda % COHb tayini ile belirlenir. Endüstride CO'e maruziyet derecesinin biyolojik izlenmesi kandaki COHb veya ekspirasyon havasında CO tayini ile yapılır. Ayrıca iş yeri ortamında (çevresel izleme) CO tayin edilmelidir.

Kanda %20 ve üstünde COHb satürasyonunun saptanması
(ön deneyler)

i) İki küçük porselen kapsül alınır. Birine 1 ml zehirlenme şüphesi olan kan, diğerine 1 ml normal kan konur ve su banyosunda yavaşça ısıtılır. Normal kan kömürleşerek kahverengi-siyah renk aldığı halde, diğeri tuğla kırmızısı renkte kalır (duyarlık % 40 COHb satürasyonudur).

ii) 1 damla, nümune kan, bir tüpte 10-15 ml su ile seyreltilir. Aynı şekilde seyreltilmiş normal kan ile karşılaştırılır. Karbonmonoksit bulunan kanın rengi pembedir (duyarlık %50 satürasyonudur).

iii) Yukarıda açıklandığı şekilde seyreltilen kan nümunelerine, 5 er damla %20 NaOH ilave edilerek karıştırılır. Normal kan, hemen saman sarısı renge dönüştüğü halde CO içeren kan pembe rengini bir süre devam eder. Pembe rengin şiddeti miktarı ile orantılı olduğundan kantitatif tayin de yapılabilir. Bu deney CO için özel olup, duyarlığı %20 COHb satürasyonudur.

Pirotannik asitle COHb %'si tayini (yarı kantitatif)

Yarı kantitatif özel bir deney olan bu testle %20 ve üstündeki COHb satürasyonu saptanabilir Bunun için 1 ml kan cam kapaklı 25 ml lik bir tüp veya mezür içinde 9 ml su ile seyreltilir. 10 ml pirotannik asit çözeltisi ilave edilir. Tüpün ağzı kapatılır ve çalkalandıktan sonra 15 dakika bekletilir. Normal kan gri kahverengi bir çökelek verdiği halde, CO ihtiva eden kan pembe renk alır. Rengin şiddeti satürasyon derecesine bağlıdır. Renk şiddeti belli miktarda CO ihtiva eden kan nümuneleri ile hazırlanmış standartlarla karşılaştırılarak miktar tayini yapılır.

Not : a) Pirotnnik asit hazırlanması : 1 g pirogallik (pyrogallie) asit ve 1 g tannik (tannic) asit 100 ml suda çözölür.

b) CO ihtiva eden kan standardlarının hazırlanması : Normal kan %100 COHb verecek şekilde saf CO ile doyurulur %20-100 COHb ihtiva eden standardlar uygun miktarda normal kanla seyreltilerek hazırlanır. Deney kısmında olduğu gibi, normal kan ve COHb ihtiva eden standart kanlarla, pirotannik asitle çöktürme işlemi yapılır. Bu standartlar ağızları sıkı kapalı olarak karanlıkta saklanırsa 6 ay bozulmadan kalabilir.

Spektroskopik yöntemle COHb analizi

COHb tayininde absorbsiyon spektrumuna dayanan yöntemler 1900'lı yıllardan beri kullanılmaktadır.

Bu yöntemler hemoglobin (Hb) bileşiklerinin (Hb, O₂Hb, MetHb ve COHb gibi) Soret bandı (410-430 nm) ve görünen alanda verdikleri absorbsiyon bandlarına dayanmaktadır.

Kanda COHb analizinde kullanılan en eski yöntem spektroskopik yöntemlerdir. COHb sarı-yeşil alanda (568 ve 538 nm de) 2 absorbsiyon çizgisi verir. Kanın uygun bir şekilde dilüsyonu ile bu absorbsiyon çizgileri görülebilir. Normal kanda ise O₂Hb ile ilgili daha uzun dalga boylarında (576 ve 541 nm'de) maksimum absorbans görülür.

Kanda COHb %40 ve üstünde olduğunda COHb'ne ait absorbsiyon çizgileri, O₂Hb yanında ayırd edilebilir, ancak yeterli derecede tanınamaz. Bu nedenle oksihemoglobini hemoglobine indirgeyen maddeler kullanılır. Bu şekilde O₂Hb'nin absorbsiyon bandları kaybolur ve yerine 555 nm de maksimum absorbans gösteren Hb bandı ortaya çıkar. Bu şekilde COHb absorbsiyon bandları daha iyi görülür.

Teknik : COHb aranacak kan ve normal kan örnekleri su, %0.1 amonyak veya %0.1 sodyumbikarbonat (NaHCO_3) çözeltisi ile (1:100) oranında seyreltilir. Spektroskopla (bu amaçla Winkel-Zeiss el spektroskopu veya Hardridge Reversion spektroskopları kullanılabilir) absorpsiyon bandları görülen dalga boyları incelenir.

Seyreltilmiş 20 ml kan örneklerine 10 mg sodyum ditiyonit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) v 5-10 damla taze hazırlanmış amonyum sülfür çözeltisi ilave edilir. İndirgeme işleminden sonra [U1][U2]tekrar spektroskopla incelenir. COHb mevcudiyetinde COHb absorpsiyon bandları daha iyi seçilir. Bu yöntemle %20 COHb ve üstü tayin (yarı kantitatif) edilebilir (Graf. E. ve Preuss F.R. 1969)

Spektroskopik yöntemle COHb tayini; otopsi başında (el spektroskopu kullanarak) yapılabilir. Bu şekilde CO zehirlenmesi hakkında çabuk bilgi edinilmesi açısından (ön deney olarak) önem taşır.

Spektrofotometrik yöntemlerle COHb tayini

Hemoglobin ve türevlerinin Soret bandında (400-430 nm) ve görünür alanda verdikleri karakteristik absorpsiyon bandlarından yararlanarak kanda COHb identifikasyonu ve miktar tayini yapılabilir. Alkali çözeltide oksihemoglobin 576-578 ve 540-542 nm. de; karboksihemoglobin 538-540 nm'de maksimum absorbans verir. İndirgenmiş hemoglobin (Hb) ise 555 nm'de geniş bir band gösterir. Zayıf bir alkali seyreltilmiş kan örneği sodyum ditiyonit gibi bir indirgen ilavesinde O_2Hb (varsa methemoglobin: MetHb) indirgenmiş hemoglobin (Hb) ne dönüşür, COHb etkilenmez.

COHb saturasyon yüzdesinin tayininde kullanılan birçok spektrofotometrik yöntemler bulunmaktadır. Bu yöntemlerin dayandığı genel prensip, 2 veya daha fazla seçilmiş dalga boylarında; veya seçilen tek dalga boyunda absorbansın okunması arkadan karışımda bulunan ve istenilen Hb

bileşimini değiştiren uygun bir kimyasal madde ilavesinden sonra seçilen tek dalga boyunun ölçülmesine dayanmaktadır. Aradaki absorbans farkı ve oranından yararlanarak COHb yüzdesi hesaplanır.

Burada, laboratuvarımızda araştırmalarda kullandığımız mikrospektrofotometrik bir yöntem olan Buchwald yöntemi ile; postmortem kan örneklerine de uygulanabilen klasik bir spektrofotometrik yöntem olan Dubowski yöntemi açıklanacaktır.

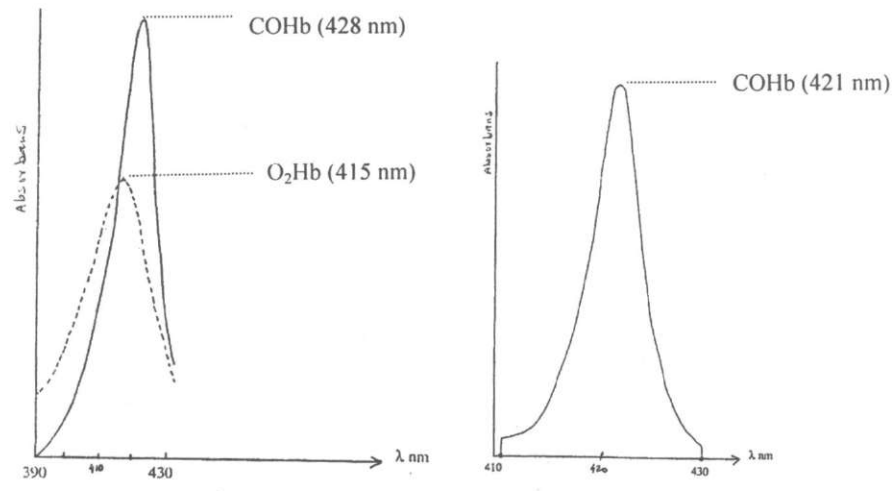
i) Modifiye Buchwald yöntemi (mikrospektrofotometrik yöntemi)

Bu yöntemin prensibi COHb, Soret bandında %100 O₂Hb ne karşı %100 COHb içeren kan ve analizi yapılacak kanın 414 nm, 421 nm ve 428 nm de absorbanslarının ölçümüne dayanır. 414 ve 428 nm sırası ile O₂Hb ve COHb nin maksimum absorbans gösterdikleri dalga boyunu; 421 nm ise O₂Hb'ne karşı COHb'nin gösterdiği maksimum absorbans farkıdır (resultant absorbans, Şekil 9).

Teknik: 0.02 ml heparinize kan örneği bir balon jode seyretilik amonyak ile (yoğunluğu 0.88 olan 1 ml amonyak deiyonize su ile 800 ml ye seyretilir) 26 ml ye tamamlanır. Karışım alt üst edilerek homojenize edilir. Seyretilen kan çözeltisinden 6'şar ml alınarak 3'e bölünür:

a) İlk 6 ml doğrudan doğruya spektrofotometrede ölçüm için küvete konur (numune: I) ve ağzı sıkıca kapatılır. b) İkinci 6 ml kan örneği bir deney tüpüne aktarılır ve içinden 15 dakika oksijen gazı geçirilir (%100 O₂Hb, II no.lu tüp). c) Üçüncü 6 ml diğer bir tüpe konur içinden 2 dakika saf CO gazı geçirilir (%100 COHb, III no.lu tüp).

II ve III no.lu tüpler sepektrofotometre küvetlerine konularak, %100 O₂Hb referans olmak üzere, numune (I) ve %100 COHb'nin (III) absorbansları (a ve A) 414, 421 ve 428 nm de spektrofotometrede okunur.



Şekil 9- Soret bandında O₂Hb, COHb ve O₂Hb'ne karşı COHb (diferansiyel) spektrumları.

Değerlendirme : Numunenin içerdiği % COHb oranı aşağıdaki eşitlikten hesaplanır:

$$\% \text{ COHb} = 100 a_1 / A_3$$

burada, a_1 ve A_{III} aşağıdaki eşitliklerden bulunur:

$$a_1 = a_{421} - 1/2 (a_{414} + a_{428})$$

$$A_{III} = A_{421} - 1/2 (a_{414} + a_{428})$$

Yöntemin standardizasyonu : 1) Yukarda açıklandığı şekilde hazırlanan %100 O₂Hb ve % COHb içeren kan örneklerinin absorbansları suya karşı spektrofotometrede 400-430 nm de taranarak, maksimum absorbans gösterdikleri dalga boyları saptanır. Bu dalga boyları (λ_{mak}) % O₂Hb için 414 nm, %100 COHb için 428 nm olmalıdır.

2) Oksijen ve CO, saf olmalıdır. Bu amaçla hazırlanmış gaz tüplerinden (LB % 999 saflıkta) yararlanılır.

3) Mikrobir yöntem olduğu için kan örnekleri parmak uçundan heparinize kapiler tüpler içine alınarak tüplerin iki ucu parafilm ile sıkıca kapatılır. Analize kadar buz dolabında (+4 °C de) saklanır.

Yöntemin duyarlılığı ve pratikliği nedeni ile mesleksel CO'e maruziyetin biyolojik izlenmesinde de kullanılabilir (Vural,N., Motaceded,Z. 1978).

4) Kullanılan spektrofotometrede, 2 nm den daha küçük dalga boyu aralıklarında absorbens ölçülebilmelidir.

ii) Dubowski yöntemi

Yöntemin prensibi: Seyreltik kan hemolizatına sodyum ditionit ilave edildiğinde oksihemoglobin ve methemoglobin indirgenir, karboksihemoglobin ise etkilenmez. Çözeltinin absorbensı 480 ve 555 nm de ölçülür, absorbensların (A) A_{555} / A_{480} oranı hesaplanır. % COHb konsantrasyonu, COHb standartları ile hazırlanan kalibrasyon grafiginden bulunur.

Kan örnekleri : Heparinize kan tercih edilir. Ağzı sıkıca kapatılan kan örnekleri buzdolabı sıcaklığında uzun bir süre saklanabilir.

Teknik : 0.5 ml kan örneğı, 10 ml seyreltik amonyum hidroksitle (14.3 ml konsantre NH_4OH su ile 1 litreye tamamlanır) seyreltilir, karıştırılır ve hemoliz tamamlanıncaya kadar beklenir. Seyreltik kan spektrofotometrenin küvetine konur, 10 mg sodyum ditiyonit ($Na_2S_2O_4$) ilave edilir, karıştırılır. Seyreltik amonyağı karşı (kör) numunenin 555 ve 480 nm'de absorbensı (A) okunur. Absorbens oranı (A_{555} / A_{480}) hesaplanır ve karboksihemoglobin konsantrasyonu kalibrasyon doğrusundan tayin edilir.

Kalibrasyon doğrusu için COHb standartları hazırlanır: Yakın zamanda karbonmonoksite maruz kalmamış ve sigara içmeyen kişilerden kan örnekleri sağlanır. Kan örneklerinden 10 ml kadar, iki burgulu kapaklı 500 ml lik reaktif şişelerine konur.Şişelerin birinin içinden en az 30 dakika saf

oksijen gazı (saf O₂ tüpü: LB%99.9 gibi) geçirilir. Böylece %100 O₂Hb (%0 COHb) standardı hazırlanmış olur.

Diğer şişeden benzer şekilde saf CO gazı küçük saf CO tüpü kullanarak (LB % 99.9 CO gibi) geçirilir. (CO gazı geçirirken CO tüpü zaman zaman çalkalanmalıdır. Gaz geçirme işlemi çeker ocak içinde yapılmalıdır). Böylece %100 COHb standardı hazırlanmış olur.

Hazırlanan %100 O₂Hb ve %100 COHb kan standardlarından 0.05 ml alınarak, yukarda açıklandığı şekilde, amonyakla seyreltilip, sodyum ditiyonit ilave edildikten sonra spektrofotometrede amonyağa karşı 555 ve 480 nm de absorbansları okunur. Her iki standardın absorbans oranları (A_{555} / A_{480}) hesaplanır.

Absorbans oranı %100 O₂Hb için 3.1; %100 COHb için 1.95 civarında olmalıdır. Kalibrasyon grafiği doğrusal olduğu için iki nokta genelde yeterlidir. Ancak istenirse, %100 O₂Hb ve % COHb belirli oranlarda karıştırılarak ara standardlar (%80; %50; %20 gibi) hazırlanabilir. Grafik %COHb oranına karşı absorbans oranları işaretlenerek hazırlanır.

Daha pratik fakat daha az kesin olacak standardlar şu şekilde de hazırlanabilir: Kan örnekleri amonyakla seyreltildikten sonra iki tüpe bölünür ve birinden 2 dakika CO ve diğerinden 2 dakika O₂ geçirilir (%100 COHb ve %100 O₂Hb standardları).

Yöntemin uygulanmasında dikkat edilecek noktalar:

1) Kalibrasyon için hazırlanan her COHb standardı ile en az 3 ölçüm yapılmalıdır.

2) Numuneler ağız sıkı şekilde kapalı helyum gazı altında saklanabilirse daha uzun zaman korunurlar.

3) Çok duyarlı çalışmalarda ara COHb standartları hazırlanırken (%0 ve %100 dışında) önce %100 COHb standardında serbest bulunabilecek CO'in 5 dakika azot gazı geçirilerek uzaklaştırılması gerekir.

4) Kullanılan spektrofotometrede, 2 nm 'den daha küçük dalga boyu aralıklarında absorbans ölçülebilmelidir. Kalibrasyon filtreleri ve spektrofotometre standartları ile kullanılan cihazın dalga boyları ve diğer karakteristikleri kontrol edilmelidir.

5) Bu yöntemle %1 ve altındaki COHb düzeyi ölçülebilir. Heparinize postmortem kan örneklerine de uygulanabildiği için adli toksikoloji labrotuarlarında kullanılabilir.

Diğer bir spektrofotometrik yöntemle COHb tayini

Heparinize (veya edetik asit, florür, okzalat da kullanılabilir) tam kana uygulanan bu yöntemde 540 ve 579 nm'deki absorbanlar kullanılmaktadır.. Prensip olarak bir önce açıklanan yöntemle aynı olmakla beraber uygulaması daha pratiktir (Flanagan , R.J. ve ark.).

Teknik : 0.2 ml kan örneği, 25 ml seyreltik amonyum hidroksit içine (1ml /l su) ilave edilir ve karıştırılır.

Seyreltilmiş kan örneği eşit olarak 3'e ayrılarak ağzı kapaklı tüplere konur (a, b, c) . İlk tüpün içinden 5-10 dakika saf CO veya CO/N₂ gazı geçirilir. Köpük oluşmamasına dikkat edilir. (a tüpü : %100 COHb).

Üçüncü tüp (c tüpü) içinden 10 dakika saf oksijen gazı veya basınçlı hava geçirilir (% 100 O₂ Hb veya % 0 COHb). İkinci tüp (b tüpü) COHb tayini kullanılır.

Her üç tüpe de 20 mg kadar sodyum ditionit ilave ederek karıştırılır. Ayrıca 10 ml amonyum hidroksit çözeltisi içeren diğer bir tüp (kör) içine de sodyum ditionit ilave edilerek iyice karıştırılır.

a, b ve c tüplerindeki çözeltilerin absorbensları (A) 540 nm ve 579 nm de ditionitle işlem görmüş amonyak çözeltisine karşı okunur.

Sonucun değerlendirilmesi : Numune kandaki (b tüpü) COHb yüzdesi aşağıdaki eşitlikten hesaplanır:

$$\% \text{ COHb} = \frac{(A_{540} / A_{579} \text{ a tüpü}) - (A_{540} / A_{579} \text{ c tüpü})}{(A_{540} / A_{579} \text{ b tüpü}) - (A_{540} / A_{579} \text{ c tüpü})}$$

Yöntemle ilgili uyarılar : 1) %100 COHb ile absorbens oranı (A_{540} / A_{579} a tüpü) yaklaşık 1.5; %0 COHb ile ise absorbens oranı 1.1 olmalıdır. Kişilerin Hb miktarı farklı olduğu için ön deneme ile bu oranın sağlanmasında yukarıda verilen seyreltme oranını değiştirme gereği olabilir.

2) Bu yöntem MetHb (580-600 nm mak. absorbens) oranı yüksek olduğunda, güvenilir değildir.

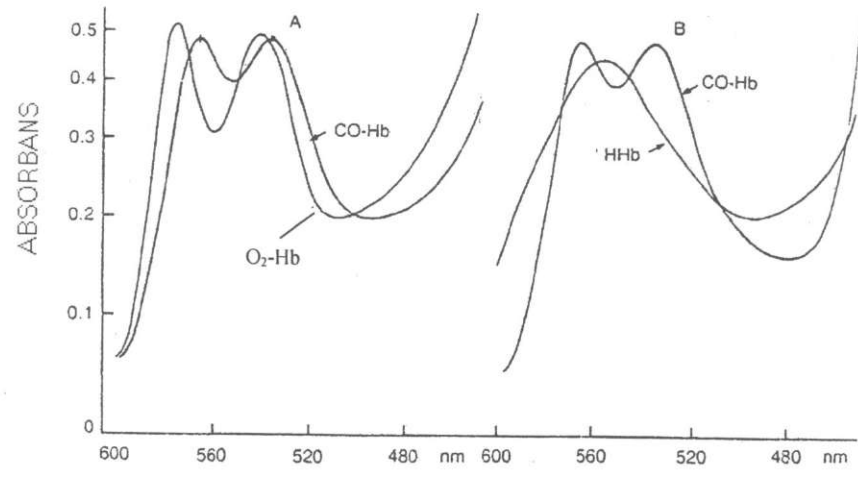
3) Lipemik kan bulanık çözeltiler verebilir. Bu nedenle sonuç güvenilir olmaz.

4) Maksimum absorbens farkının alındığı bu deneyde (COHb : λ_{max} 540 nm) ve O₂Hb ve COHb için eşit olan düşük dalga boyu (izobestik nokta : 579 nm) spektrumda dik bir düşmenin noktasında olduğu için seçilmiştir. Dalga boyu çok kritiktir. Bu nedenle aşağıdaki kontrolün yapılması gerekir:

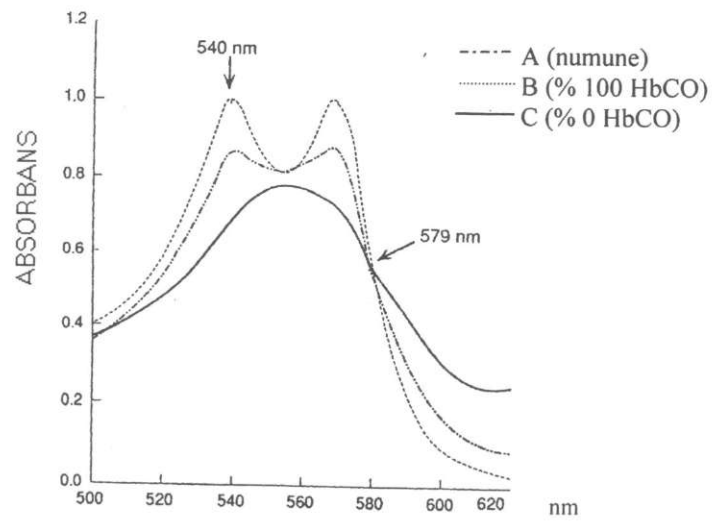
a) %0 COHb içeren (a tüpündeki) çözeltinin absorbens oranı (A_{540} / A_{579}), 1.1 olmalıdır.

b) Eğer bu gözlenemezse, aletin dalga boyu ayarlanır veya her üç çözeltinin (a,b,c) spektrumları alınarak ölçümler buna göre yapılır.

Şekil 10 ve 11 de O₂Hb ve COHb nin, görünür alandaki absorpsiyon spektrumları ve açıklanan yöntemlerde kullanılan maksimum absorbens dalga boyları gösterilmiştir.



Şekil -10. Dubowski yönteminde kullanılan (COHb ve O₂Hb (A) ve sodyum ditiyonitle işlem görmüş COHb ve O₂Hb (HHb'ye dönüşür) spektrumları



Şekil 11- Görünür alanda maksimum fark ve iyobestik noktadan yararlanılarak COHb tayini.

Conway Mikrodifüzyon Yöntemi ile CO tayini

Bu yöntem yarı kantitatif veya kantitatif olarak kanda COHb tayini için kullanılabilir. Yöntemin prensibi, kana ilave edilen asit etkisi ile, kandan açığa çıkan CO'nin palladyum klorürle (PdCl₂) reaksiyona girerek metalik Pd'u açığa çıkarmasına dayanır:



Yarı kantitatif tayin : Mikrodifüzyon apareyinin (Şekil 3) dış odacığına 1 ml kan ve 2 ml %10 H₂ SO₄ konur. İç odacığa 2 ml 0.001 N PdCl₂ konduktan sonra, daha önce çok hafif yağlanmış kapak hemen sıkıca kapatılır.

Kör deney olarak, işlemler dış odacığa konan CO'e maruz kalmamış kişiden alınan kan örneğine paralel olarak uygulanır.

Yarı kantitatif tayin için, %10 ile %50 arasında COHb içeren kan örnekleri ile (%10 COHb; %20 COHb ve %50 COHb standartları) paralel uygulama yapılır. Oluşan metalik palladyumun verdiği renk şiddeti numunenin verdiği renk ile karşılaştırılır.

Karışım oda sıcaklığında 2 saat bekletilir. Bu süre içinde iç odacıkta CO miktarına bağlı olarak açığa çıkan Pd, ince siyah bir zar şeklinde iç odacıktaki PdCl₂ üzerinde toplanır.

Kantitatif tayin : Conway mikrodifüzyon yöntemi ile kandaki CO miktarı (hacmen) kantitatif olarak da tayin edilebilir. Ancak bu durumda, kanda Hb tayini de yapılarak COHb miktarının hesaplanması gerekir. Genel olarak 1 gram hemoglobin (Hb) 1.34 ml (bazı kaynaklarda 1.36 ml) CO gazı ile (O⁰C de 760 mm Hg basıncında) birleştiği kabul edilir. Bu bilgiden hareketle, Conway yöntemi ile tayin edilen %CO (hacmen) miktarından:

$$\% \text{ COHb} = \frac{\% \text{ CO (hacmen)}}{\% \text{ Hb (kan)} \times 1.34} \text{ formülü ile hesaplanır.}$$

(Fazla bilgi için Feldstein, M., 1967; Curry A.S. 1972'e bakınız.)

CO oximeter

Kanda COHb miktarının %10'un altında olması halinde de uygulanabilir bir yöntemdir. Ayrıca kan örneklerinin taze veya postmortem olması analiz sonucunu etkilememektedir. COHb miktarının çabuk ve güvenli şekilde ölçülmesini mümkün kılan bu cihazın prensibi, özel bir absorpsiyon spektrofotometresi olup, internal analog bir bilgisayarla kombine edilmiştir. Otomatik olarak seyreltilerek hemoliz edilen kan örneğinin 548, 568 ve 578 nm'de absorpsansları ölçülür. Ölçümler çok kısa zamanda (15 saniye gibi), dijital göstergede % Hb, % O₂Hb ve % COHb şeklinde okunur. Bulunması muhtemel olan MetHb'nin bozucu etkisi sodyum bisülfid ilavesi ile giderilir.

Bu amaçla geliştirilmiş otomatik cihaz (CO Oximeter II 182) gelişmiş laboratuarlarda COHb tayini için kullanılmaktadır.

% COHb düzeyinin yorumu :

Karbon monoksitle akut zehirlenmede baş ağrısı, bulantı, kusma, hiperventilasyon, kardiyak aritmi, pulmoner ödem, koma ve akut böbrek yetmezliği başlıca görülen belirtilerdir. Şiddetli hipoksi durumunda bile cilt ve mukozalar pembe kalır. Ölüm solunum yetmezliği sonucu oluşan kandaki COHb düzeyinin yorumu aşağıdaki Tablo 10'da gösterilmiştir.

Tablo 10 % COHb değerinin klinik yorumu.

% COHb	Belirtiler
3-8	Sigara içenler (20-30 sigara/gün)
< 15	çok sigara içenler (30-50 sigara/gün)
20	Akut zehirlenme başlangıcı (kalp hastaları için tehlikeli)
20-50	Ağır akut zehirlenme (mental ve fi-ziksel koordinasyon kaybı)
> 50	Koma, konvulizyon, kalp ve solunum durması, lm.

CO zehirlenmesinin tedavisinde antidot olarak oksijen tedavisi uygulanır.

Anabilim dalımızda yapılan bir araştırmada, Dubowski yöntemi ile CO'le zehirlenme sonucu ölen 18 kişide postmortem COHb düzeyi tayin edilmiştir. Bu kişilerde COHb düzeyi ortalama ($\%73.11 \pm 6.90$) ve aralık ($\%63.00$ - $\%88.00$) bulunmuştur. Sigara içmeyen kişilerde (n:44), COHb düzeyi ortalama 0.89 ± 0.05 (aralık: $\%0.50$ - $\%1.40$ COHb); 1 paketten fazla (günde 20 taneden fazla) sigara içenlerde ise ortalama $\%COHb 4.36 \pm 0.14$ (aralık: $\%3.40$ - 5.00 COHb) olarak saptanmıştır (Vural,N., Kahraman R. 1994)

1.2 Siyanür

Siyanürle zehirlenme hidrosiyanik asitin (HCN) inhalasyonu veya NaCN, KCN gibi tuzlarının oral yolla alınması ile oluşur. Bir çok bitki dokusunda, şeftali, kayısı gibi meyvelerin çekirdeklerinde, lima fasulyesinde bulunan siyanogenetik glikozitler (amigdalın gibi) hidrolizle invivo olarak siyanür verirler. Etil tiyosiyanat ve metil tiyosiyanat gibi tiyosiyant esterleri organizmada metabolize olarak siyanür verirler ve ciddi zehirlenmelere yol açabilirler.

Siyanür ayrıca sodyum nitroprusiyat (vazodilatör) ve bazı organik nitril bileşiklerinin de metabolitidir.

Potasyum ferrisiyanür gibi kompleks siyanür bileşikleri ise invivo siyanür vermezler ve bu açıdan toksisiteleri çok düşüktür.

Siyanür bileşikleri, endüstride metal cilası, altın gümüş gibi metallerin zenginleştirilmesinde ve metallerin elektrolizle kaplanmasında, fotoğrafçılık gibi çeşitli iş kollarında kullanılır.

Özellikleri : HCN çok uçucu bir sıvıdır (k.n. 26°C) ; KCN ve NaCN kristal tuzlardır ve alkali reaksiyon gösterirler.

Toksik dozları (MLD 70 kg insanda) HCN için 100 mg; KCN için 150 mg ve NaCN için 200 mg'dır.

Siyanürle zehirlenmelerde, kanda siyanür, ölüm olaylarında ise ayrıca dokularda siyanür aranır.

Mide içeriğinde, kalitatif analiz için bir çok renk reaksiyonları vardır.

Doku ve vücut sıvılarında doğrudan siyanür aranması

Schönbein deneyi : Kan, mide içeriği veya dokulara doğrudan uygulanan bu yöntemde, şerit halinde kesilmiş filtre kağıdı önce %10 alkollü guayak reçinesi ve arkadan %0.1 lik bakır-2- sülfat çözeltisi ile emprenye edilir. Siyanür aranacak biyolojik materyal (10 g kadar) küçük bir balona konur ve asetik asitle asitlendirilir. Ağzı sıkıca kapatılarak emprenye filtre kağıdı kapakla birlikte yerleştirilir. Kaynar su banyosu üzerinde ısıtılır. Siyanür mevcudiyetinde emprenye kağıdın renginin mavileşmesi (guayak mavisi) siyanür olabileceğini gösterir. Bu yöntem çok duyarlıdır. 100 gr maddedeki 0.005 mg siyanür tanınabilir. Ancak diğer oksidanlarla (hidrojen peroksit, ozon, klor, azot oksitleri gibi) da pozitif sonuç alınır. Renk oluşması hemen veya miktara bağlı olarak 15 dakika içinde görülür.

Distilatta siyanür aranması

Siyanür biyolojik materyalden asit ortamda su buharı distilasyonu ile izole edilir. (Genel bölüme bakınız) Distilat siyanür kaybını önlemek için, %10 NaOH içinde toplanır. Distilatta siyanür aşağıdaki renk reaksiyonları ile aranır.

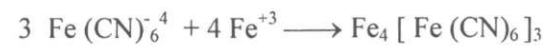
İzopurpurik asit deneyi : 4 ml alkali distilata 3 ml doymuş pikrik asit ilave edilir ve hafifçe ısıtılır. Meydana gelen kırmızı renk (purpurik asit) siyanür varlığını gösterir. Kreatin ve kan şekeri de bu reaksiyon ile pozitif sonuç verir.

Prusya (Berlin) mavisi reaksiyonu ile siyanür aranması : 5 ml distilat (doğrudan mide içeriği de olabilir), 1 ml %15 NaOH ile kalevilendirilir. 3 damla taze hazırlanmış %10 demir -2- sülfat (ferröz sülfat) ve 3 damla taze hazırlanmış %3 demir -3- klorür (ferriklorür) ilave edilir. Karışım kaynama noktasına kadar ısıtılır ve soğutulur. Kahverengi demir hidroksit çözününceye kadar karışıma konsantre HCl ilave edilir. Mavi renk (Berlin mavisi) oluşması siyanürün bulunduğunu gösterir. Mavi renk zamanla çökelek haline geçer.

Bu yöntemle 20 µg HCN / ml tanınabilir. Siyanür için spesifik bir testtir. Bu reaksiyonda önce oluşan demir hidroksit ortamda bulunan siyanür iyonu ile ferrosiyanür kompleksini verir.



Ferrosiyanür, seyreltik demir -3- klorür çözeltisi ile ferrik ferrosiyanürden ibaret önce kolloidal sonra tüpün dibine çöken mavi renkli ince çökelek verir (Berlin mavisi):



Mikrodifüzyon yöntemi ile siyanür tayini

Kantitatif tayinde heparinize tam kan (0.1 -10 ml) kullanılır. Analizde herhangi bir gecikme durumunda, kan örneği +4°C da 1-2 gün saklanabilir. (Siyanür, kanda oda sıcaklığında veya -20 °C de daha az dayanıklıdır).

Conway mikrodifüzyon apareyi ile siyanür tayininde değişik renk reaktifleri (en eskisi FeSO₄ / HCl in kullanıldığı Feldstein-Klendshoj yöntemi; p-nitrobenzaldehit /0-dinitrobenzen yöntemi ve piridin/barbitürik asit yöntemi) kullanılabilir.

i) p-Nitrobenzaldehit / 0 - dinitrobenzen yöntemi

3 tane mikrodifüzyon apareyi kullanılır. Bunlardan birincisi (kör) olarak, ikincisi standard siyanür çözeltisi ile, üçüncüsü de numune ile çalışılmak üzere hazırlanır. Bu amaçla, her üç mikrodifüzyon apareyinin iç odacığına :

- a) 0.5 ml p - nitrobenzaldehit (0.05 mol / l, 2-metoksietanolde hazırlanmış) çözeltisi ;
- b) 0,5 ml 0- dinitrobenzen çözeltisi (0.05 mol / l, 2-metoksietanolde hazırlanmış) ;
- c) 0.1 ml NaOH çözeltisi (0.5 mol/l) ilave edilir.

Dış odacıklara ise sırası ile 0.1 ml saf distile su (kör deney); 0.1 m 10 mg/l KCN çözeltisi (4 mg/m siyanür iyonu içeren standart) ve üçüncü apareyin dış odacığına da 0.1 ml kan numunesi ilave edilir.

Her dış odacığa 0.5 ml saf su ve odacığın karşı tarafına 1.0 ml seyreltik sülfirik asit (3.6 mol/l) konur.

Apareylerin kapakları vazelin (veya silikon yağı) ile yağlanarak kapatılır ve dış odacıktaki çözeltiler dikkatle karıştırılır. Oda sıcaklığında 20 dakika inkübasyona bırakılır. Arkadan iç odacıklara 1 ml sulu metanol (1:1) ilave edilir.

İç odacıktaki karışım, 5.0 ml lik balonjojelere aktarılarak sulu metanol (1:1) ile 5.0 ml'ye tamamlanır. Oluşan kırmızı renk 15 dakika dayanır. Standart siyanür ve numuneyi içeren karışımların absorbensı 560 nm de köre karşı bir spektrofotometrede okunur.

Numune kandaki siyanür konsantrasyonu standart siyanür çözeltisini içeren karışımın absorbensını karşılaştırarak hesaplanır. Bu yöntemin duyarlılığı 0.5 mg/l siyanürdür.

ii) Piridin/barbitürik asit yöntemi

Kullanılan reaktifler

- 1) Seyreltik sodyum hidroksit çözeltisi (0.1 mol/l)
- 2) Kloramin T çözeltisi (2.5g/l; katı kloramin T dayanıklı değildir. Bu nedenle ambalaj sık sık değiştirilmelidir).
- 3) Sodyum hidrojen ortafosfat çözeltisi (fosfat tamponu; 1 mol/l).
- 4) Piridin-barbitürik asit reaktifi : 6 g barbitürik asit, 6 ml konsantre hidroklorik asit içinde karıştırılır (d:1.18) ve 30 ml piridin ile seyreltilir. Çözelti su ile 100 ml ye seyreltilir. Bu çözelti taze hazırlanmalıdır.
- 5) Seyreltik sülfirik asit (1 mol/l suda).

Standard siyanür çözeltisi : Önce 50 mg potasyum siyanür 100 ml seyreltik sodyum hidroksit (0.1 mol/l) içinde çözülerek stok çözelti hazırlanır. Bu çözelti 200 mg/l siyanür iyonu içerir.

Kalibrasyon için standard siyanür çözeltisi, stok çözeltinin (200 mg siyanür/l), seyreltik sodyum hidroksit ile (0.1 mol/l), (1:99) oranında seyreltilmesi ile hazırlanır. Bu çözelti 2 mg siyanür/l içerir.

Teknik: Kantitatif tayini için (7) mikrodifüzyon apareyi kullanılması önerilir. (Flanagan R.J., ve ark. WHO 1985). Ancak eldeki olanaklara göre daha az sayıda Conway mikrodifüzyon hücresi de olabilir. 1 den 7 ye kadar numaralandırılan apareylerin iç odacıklarına 0.1 mol/l NaOH çözeltisinden

2'şer ml ilave edilir. Dış odacıklara ise aşağıdaki tablo 11 gösterilen miktarlarda reaktifler konur.

Tablo 11- Piridin-barbitürik asit yöntemi ile siyanür tayininde kullanılan reaktif miktarları (ml)

Dış odacık No	CN standardı*	Su	Sülfürik asit (1 mol / l)	Kan
1 (kör)	--	2.0	0.5	--
2 (numune)	--	1.0	0.5	1.0
3 (numune)	--	1.0	0.5	1.0
4 (CN 0.2 mg / l)	0.1	1.9	0.5	--
5 (CN 1.0 mg / l)	0.5	1.5	0.5	--
6 (CN 2.0 mg / l)	1.0	1.0	0.5	--
7 (CN 4.0 mg / l)	2.0	--	0.5	--

Dış odacığa sülfirik asit çözeltisi ilave ederken önce ilave edilen reaktiflerle karışmaması için odacığın karşı tarafına ilave edilir.

Apareyin ağzı yağlanarak sıkıca kapatılır, dikkatle dış odacıktaki reaktiflerin karışması sağlanır ve oda sıcaklığında 4 saat inkübasyona bırakılır.

İnkübasyondan sonra iç odacıklardaki çözeltiden 1 'er ml alınarak 1 den 7 ye kadar numaralı kapaklı tüplere aktarılır. Sırası ile 2 ml fosfat tamponu , 1 ml kloramin T çözeltisi, 3 ml piridin - barbitürik asit reaktifi ilave edilerek karıştırılır. Oda sıcaklığında 10 dakika bekletilir.

Siyanür varlığında kırmızı-mavi renk oluşur. Bu rengin absorbansı spektrofotometrede 587 nm de hazırlanan köre karşı okunur. Standartlarla

hazırlanan kalibrasyon eğrisinden numunedeki siyanür konsantrasyonu hesaplanır.

Yöntemin duyarlılığı 0.2 mg/l siyanürdür. (Bu yöntemde katı kloramin T nin dayanıklı olmaması nedeni ile sık sık yeni ambalaj kullanılmalı; piridin-barbitürik asit reaktifi her deneyde yeniden hazırlanmalıdır).

Analiz sonucunun değerlendirilmesi

Siyanürle zehirlenmenin tanısı, HCN veya tuzlarına maruz kalma hakkında bilgi olmadığında zordur. Kusmukta siyanürün kendisine özgü kokusunun algılanması tanımlanmada yardımcı olabilir.

Normal kişilerin kanında 100 ml de 15 mikrograma (μg) kadar siyanür bulunabilir. Fazla sigara içenlerde bu değer 30 $\mu\text{g}/100$ ml ye çıkabilir. Siyanür tuzları (oral yol) ve HCN ile (inhalasyon yolu) ciddi zehirlenmelerde kandaki siyanür düzeyi 0.2-2 mg/100 ml arasında değişir. Kalitatif siyanür testleri kandaki bu değerleri saptamak için yetersizdir. Kantitatif deneyler ise akut zehirlenme hakkında bilgi verir, ancak zehirlenme şüphesi olduğunda analiz sonucunu beklemeden hemen tedaviye geçmelidir.

Siyanürle zehirlenme yangına maruz kalmış kişilerde de görülür. Yün, ipek, poliüretan ve poliakrilonitril gibi sentetik polimerlerin kısmı yanması ve pirolizi sonucu HCN oluşması bu zehirlenmelere neden olur. Böyle olaylarda kandaki siyanür miktarı 20-100 $\mu\text{g}/100$ ml ye ulaşabilir.

Ölüm halinde kan dışında, mide ve bağırsak içeriği, karaciğerde de siyanür analizi yapılmalıdır. Postmortem analizde siyanür ölümden 2.5-6 aya kadar tanınabilir. Siyanür vucutta aldehit ve keton grupları ile dayanıklı siyanhidrin bileşiklerini oluşturur. Bu nedenle uzun süre (HCN nin uçuculuğuna karşın) organizmada kalır. Siyanür zehirlenmesinin tedavisinde

antidot olarak sodyum tiyosülfat kullanılır. Antidot tedavisinden önce sodyum nitrit kullanımı ise antidot tedavisinin etkinliğini artırır.

1.3. Metil Alkol (CH₃OH)

Metanol, odun alkolü ve denatüre alkol metil alkolün sinonimleridir. Molekül ağırlığı 32, kaynama noktası 65°C dir. Endüstride formaldehit ve formik asit yapımında, laboratuarlarda çözücü olarak kullanılır. Antifriz içinde (etilen glikol ile beraber), araba camları yıkama suyunda bulunur. Endüstriyel etil alkol içinde bulunan metil alkol zehirlenmelere neden olabilir. Ancak saf metil alkol daha ciddi zehirlenmelere yol açar. Yetişkinlerde oral yolla 20-50 ml metil alkol ölüme neden olabilir.

Toksikolojik analiz : Metil alkole akut maruziyetten hemen sonra kanda metil alkol düzeyinin tayini toksisitenin en iyi belirleyicisidir. Latent periyottan sonra metil alkol ve toksik metaboliti olarak formik asit düzeyleri birlikte değerlendirilmelidir. Serumdaki format düzeyinin tayini toksisitenin şiddetini gösteren en iyi biyolojik göstergedir.

Metil alkolün identifikasyonu

İndirgen uçucu bileşikler için genel test: Bu test su buharı distilatı, idrar ve mide içeriğine uygulanabilir. Bir tüpe bir ml idrar veya mide içeriği konur. 50 µl potasyum dikromat reaktifi ile emprenye edilmiş filitre kağıdı, numuneyi içeren tüpün boynuna yerleştirilir. Tüpün ağzı gevşek olarak kapatılır ve 2 dakika kaynar su banyosunda bekletilir. Portakal rengin yeşile dönmesi metanol gibi uçucu indirgen maddelerin bulunduğunu gösterir (etil alkol, metaldehit, paraldehit, asetaldehit, formaldehit gibi).

(Potasyum dikromat reaktifi : 25 g/l konsantrasyonda, 1/1 oranında su ile seyreltilmiş sülfirik asit içinde hazırlanır).

Destekleyici deney (kromotropik asit ile) : 0.1 ml potasyum dikromat reaktifi yukarıda açıklandığı şekilde hazırlanan), 1 ml idrara (mide içeriği

veya distilat) ilave edilerek oda sıcaklığında 5 dakika beklenir. Bu karışıma 0.1 ml etanol ve 10 mg katı kromotropik asit ilave edilir. 1 ml. sülfirik asit tüpün kenarından dipte ayrı faz oluşturacak şekilde konur.

İki faz arasında viyole renk oluşması metanol varlığını gösterir. Formaldehit de bu testle pozitif sonuç verir. Bu reaksiyon formaldehitin kromotropik asitle oluşturduğu p-kinoidal yapıda kondensasyon ürünü ile ilgilidir ve formaldehitin tanınması için özel bir deneydir. Bu test, metanol için de (formaldehite oksitlendikten sonra) kullanılır. Bu yöntemle 5 mg metanol (100 ml kanda) tanımlanabilir.

Sujbert yöntemi (Kromotropik asit) ile kanda metanol tayini

Bu yöntemin prensibi, metil alkolün formaldehite yükseltgenmesi ve oluşan formaldehitin kromotropik asitle verdiği renkli kondensasyon bileşiğinin spektrofotometrik tayinine dayanmaktadır (Sujbert, L., 1966).

Teknik : Bir tüp içerisine 1.0 ml distile su ve 0.05 ml kan örneği konur. 0.2 ml %20 fosforik asit çözeltisinden, 0.2 ml %5 potasyum permanganat çözeltisinden ilave edilir, karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 5 dakika bekletilir. Potasyum permanganatın fazlası %10 sodyum bisülfid damlatılarak (renk gidinceye kadar) giderilir. 0.5 ml suda hazırlanmış %0.5 kromotropik asit çözeltisi, 8.0 ml konsantre sülfirik asit eklenir. Karışım 15 dakika 60 °C de su banyosunda ısıtılır. Metil alkol varlığında viyole renk oluşur. Ayrıca metanol içermeyen kanla deney paralel olarak yapılır (kör deney). Metanol olmadığında karışımın rengi kahverengi - sarı olur.

Kantitatif tayin için oluşan rengin absorbansı 578 nm de köre karşı spektrofotometrede okunur ve konsantrasyon kalibrasyon eğrisinden okunur.

Kalibrasyon için: Konsantrasyonları 0-300 mg/100 ml arasında değişen metil alkol standartları (0 ; 20 ; 50 ; 100 ; 200 ; 300 mg/100 ml) kullanılır. 1 ml distile su içeren tüplere 0.05 ml standard çözelti konarak,

yukardaki açıklanan işlem uygulanır. Oluşan renkli çözeltilerin absorbanı köre karşı 578 nm'de spektrofotometrede okunur ve absorbanlara karşı konsantrasyon işaretlenerek kalibrasyon grafiği hazırlanır. Kör (blank) deney metil alkol içermeyen kanla hazırlanır.

Metanol standartlarının hazırlanması: a) Stok metanol çözeltisi, 1.265 ml metanol (yoğunluğu 0.79 g/ml), 50 ml distile su içeren 100 ml lik balonjoje içine pipetle konur. Su ile 100 ml ye tamamlanır. Bu çözeltinin konsantrasyonu %1 (g/100 ml) dir. (+4°C) de saklanır.

b) Standart metanol çözeltileri ise, stok metanol standart çözeltisinden sıra ile 0;2;5;10;20 ve 30 ml alınarak su içeren 100 ml balonjojeye konarak 100 ml ye tamamlanır ve karıştırılır. Böylece konsantrasyonlar (0-300 mg/100 ml) arasında olan seri standard çözeltiler hazırlanmış olur.

Not: Yöntemin verimi (recovery) hesaplanmasında, standart metanol çözeltileri, su yerine metil alkol içermeyen kanla hazırlanır.

Bu yöntem biyolojik materyaldeki su buharı distilasyonu ile elde edilen distilat ve idrara da uygulanabilir. Yöntemin duyarlılığı 10µg metanol (20 mg metanol/100 ml kan) dır.

Conway Mikrodifüzyon Yöntemi ile biyolojik materyalde metil alkol tayini

Conway mikrodifüzyon apareyi kullanarak kan, idrar ve mide içeriği gibi biyolojik sıvı ve dokularda metil alkol tayini daha genel bir reaksiyon olan dikromatla veya formaldehit için spesifik olan kromotropik asit reaksiyonu ile tayin edilebilir.

Toksikolojik analizlerde etil alkol yanında, metil alkolün tanımlanması ve miktar tayininin yapılabilmesi önem taşır. Bu açıdan metil alkolün kalitatif ve kantitatif analizinde kromotropik asit reaksiyonu tercih edilir. Burada Conway mikrodifüzyon apareyi ile metil alkol tayini açıklanmıştır.

Teknik : Apareyin (Şekil 3'e bakınız) iç odacığına 2.2 ml sülfirik asit, dış odacığa 0.5 ml kan örneği (veya diğer biyolojik sıvı); ve 1.0 ml doymuş potasyum karbonat çözeltisi ilave edilir. Apareyin kapağı yağlanarak sıkıca kapatılır ve ara sıra karıştırılarak dış bölmedeki sıvıların karışması sağlanır. Difüzyonun tamamlanması için oda sıcaklığında 2 saat bekletilir.

Bu süre sonunda iç odacıktaki sülfirik asit çözeltisinden 1.0'ler ml alınarak iki ayrı tüpe konur. Tüplerden birine %5 KMnO_4 dan bir damla ilave edilir ve karıştırılarak 5 dakika beklenir. Arkadan permanganatın rengi doymuş sodyum bişülfid damlatılarak giderilir.

İkinci tüp formaldehit bulunması olasılığına karşı kontrol olarak kullanılır, permanganat ile muamele edilmez.

Blank (kör) olarak 1.0 ml distile su içeren üçüncü bir tüp hazırlanır. Tüplerin herbirine % 0.5 kromotropik asit çözeltisinden 0.2 ml eklenir ve buz banyosuna yerleştirilir. Her tüpe 4.0 ml konsantre sülfirik asit ilave edilir ve iyice karıştırılır. Oda sıcaklığına kadar soğutulduktan sonra 10 ml lik balonjölere aktarılır ve distile su ile 10 ml ye tamamlanır. Soğuduktan sonra eksilen hacim su ile tekrar 10 ml ye tamamlanır.

Numunelerin absorbensları 580 nm'de köre karşı okunur. Formaldehit yokluğunda kontrol tüpü renksiz kalır. Ancak az miktarda bulunabilecek formaldehit nedeni ile renk oluşumu varsa, bu oksitlenmenin (kontrol) örneğinin absorbensı, oksitlenmiş örneğin absorbensından çıkarılır. Metanol miktarı, standard metanol çözeltileri ile hazırlanan kalibrasyon grafiğinden hesaplanır.

Kalibrasyon doğrusunun hazırlanması : Standard metil alkol çözeltilerinden 0.5 ml alınarak Conway mikrodifüzyon apareyinde yukarıda açıklanan şekilde işlem yapılır. Kromotropik asitle reaksiyondan sonra absorbenslar 580 nm de köre karşı (%0 metanol içeren kan) okunur.

Konsantrasyona karşı absorpsiyonlar işaretlenerek kalibrasyon grafiğı hazırlanır.

(Standard metil alkol çözeltileri (suda ve kanda) Suşbert yönteminde açıklandığı şekilde hazırlanır).

Gaz kromatografisi yöntemleri ile kanda metil alkol tayini

Biyolojik sıvılarda metanol analizi için en çok tercih edilen teknik gaz kromatografisidir. Gaz kromatografisinin (GLC) başlıca üstünlükleri, ön işlemlere ihtiyaç duymadan, çok küçük hacimdeki biyolojik örneklerle değişik alkollerin aynı zamanda ve hızlı olarak kalitatif ve kantitatif analizinin yapılabilmesidir.

Gaz kromatografisi ile metil alkol analizinde Carbowax 20 M; Porapak Q, polietilen glikol-400 gibi sıvı fazları içeren cam, paslanmaz çelikten yapılmış kolonlar (yaklaşık 2 m uzunluğunda, 2 mm iç çapında) kullanılır.

"Head Space" tekniğı : Head-space, katı ve sıvı örnekler içerisindeki yalnız uçucu bileşiklerin gaz kromatograf sistemine enjeksiyonunu sağlayan bir ünedir. Bu yöntem "Head Space Gaz Kromatografisi (HSGC)" yöntemi denir.

HSGC ile yapılan analizlerde, katı veya sıvı örnek (0,2-0,5 ml) HSGC'nin şişelerine konur ve ağzı sıkıca lastik bir septumla kapatılır. Bu şişeler, ısıtıcı ve termostat yardımı ile, uçucu bileşiğın buhar fazına geçerek oluşan gaz fazı ile örnek arasında denge sağlanıncaya kadar belirli bir sıcaklıkta tutulur. Denge sabiti, her bileşik için karakteristiktir. Kantitatif analizde bu değerlerin bilinmesi gerekmektedir. Kalibrasyon buhar fazında analiz yapılacak sıvı maddenin standart örnekleri ile yapılır.

Metil alkol ve diğer bazı alkollerin analizinde kullanılan GLK yöntemleri etil alkol kısmında açıklanmıştır.

1.4. Etil Alkol (C₂ H₅ OH)

Etil alkol, molekül ağırlığı 46 ve k.n. 78°C olan bir sıvıdır. Etanol, hububat alkolü sinonimleridir, genel olarak "alkol" denildiğinde etil alkol anlaşılır. Alkolik olmayan yetişkin insanda 250-500 gram alkol ölüme neden olur (MLD).

Etil alkolle zehirlenmeler en çok alkollü içki alınması ile görülür. Endüstriyel alkol ile ayrıca içerdiği metil alkol gibi denatüranlarla da zehirlenmelere rastlanır.

Etil alkolün identifikasyonu (kalitatif testler)

Etil alkol, oksitlenebilen indirgen uçucu maddelere ait genel ve spesifik reaksiyonlarla aranabilir. Bu testler biyolojik materyalden elde edilen su buharı distilatına, idrara, mide içeriğine, olay yerinden elde edilen kalıntılara uygulanabilir.

Oksitlenebilen maddeler için (alkoller, aldehitler gibi) genel reaksiyonu olan (potasyum dikromat + sülfirik asit) testi : 1 ml numune içeren tüpün kenarına 50 µl potasyum dikromat reaktifi (500 ml/l oranında su ile seyreltilmiş sülfirik asit içinde 25 g/l konsantrasyonda hazırlanmış) damlatılmış şerit halindeki filtre kağıdı konur. Tüpün ağzı hafifçe kapatılarak kaynar su banyosunda 2 dakika bekletilir.

Portakal renginden yeşil renge değişim etanol ve / veya diğer indirgen uçucu maddeler olduğunu gösterir (ön denemeler kısmına da bakınız).

Ksentogenat deneyi (genel) : 1 ml distilata 0.2 gram potasyum hidroksit ilave edilerek ısıtılır. Soğutulduktan sonra 2-3 damla karbon sülfür konarak tüp iyice çalkalanır. Ortam asetik asit ile asitlendirildikten sonra 1 damla % 1 CuSO₄ (bakır sülfat) ilave edilir. Sarı bir çökeleğin oluşması primer veya sekonder alkol olduğunu gösterir.

İyodoform deneyi (etil alkolü metil alkolden ayırt edici özel test) : 3 ml distilat % 10 NaOH ile kalevilendirilir. 3 - 5 damla iyot çözeltisi ilave edilir ve karıştırılarak hafifçe ısıtılır. Etil alkol varsa iyodoform oluşur. İyodoform karakteristik kokusu ve sarı kristalleri ile tanınır (aynı reaksiyonu asetaldehit ve aseton da verir).

Biyolojik materyalde etil alkol tayini

Alkol tayini için biyolojik materyal olarak kan, idrar ve solunum havası kullanılabilir. En çok kan alkol düzeyi tayin edilir. Adli tıpta alkol ile zehirlenmenin şiddeti ve trafikte yasal alkol limitinin aşılp aşılmadığının değerlendirilmesinde hem antemortem (canlı kişilerde) hem de postmortem kanda (ölümden sonra) etil alkol tayini önem taşır. Daha sonra açıklanacağı gibi trafikte alkol solunum havasında da tayin edilir ve sonuçlar kan alkol düzeyi olarak hesaplanır.

Kan alınırken, deri yüzeyinin $HgCl_2$ çözeltisi ile (alkol içermeyen sıvılarla) temizlenmesi gerekir. Kan örnekleri (10 ml) % 1 NaF (sodyum florür) içerecek şekilde NaF bulunan tüplere alınır. Tüpün ağzı sıkıca kapatılarak analize kadar buz dolabında saklanır (NaF, antikoagülan ve antibakteriyel etkilidir). Bu şekilde hazırlanan kan örnekleri + 4°C de 1 ay kadar dayanıklıdır.

Postmortem kan örnekleri ise tercihan femoral damarlardan alınmalıdır. Eğer çürüme yoksa kalbin yırtılmamış odacıklarından alınır. Postmortem kanda, numune alma yerine göre kan alkol konsantrasyonu değişiklik gösterebilir (Marraccini, J.V. ve ark. 1990; POKLİS, A, 1996; VURAL, N; SAYIN, H. 1994) . Adli tıp açısından en uygun kan örneği venöz kandır. Alınan kan örnekleri (10 ml) %1 NaF içerecek şekilde, sodyum florürle korunur.

Biyolojik materyalde (kan, idrar ve solunum havası) alkol tayininde kimyasal, enzimatik ve gaz kromatografik yöntemlerle tayin edilir.

Mikrodifüzyon yöntemi ile etil alkol tayini

Mikrodifüzyon yöntemi; etil alkol için yarı kantitatif bir teknik olarak kullanılabilir. Pozitif sonuç alındığında daha duyarlı ve spesifik bir yöntemle kantitatif analizin yapılması gerekir.

Reaktifler :

Asit - dikromat çözeltisi : 3.70 g saf potasyum dikromat 150 ml distile suda çözülür. 280 ml konsantre sülfirik asit dikkatlice ilave edilir. Soğutulur ve distile su ile 650 ml'ye tamamlanır.

Potasyum dikromat çözeltisi : Potasyum karbonatın suda doymuş çözeltisi hazırlanır.

Alkol Standartları :

Stok alkol standardı : 0.200 ml etil alkol (% 96'lık, d: 0.8 g / ml), 50 ml lik bir balon jode 40 ml distile su üzerine konur. Su ile 50 ml ye tamamlanır. Karıştırıldıktan sonra ağzı sıkıca (parafilm ile) kapatılır ve + 4 °C de saklanır. Bu stok karışım % 320 mg etil alkol içerir.

Kalibrasyon için kullanılacak etil alkol standartları : Yukarıda hazırlanan stok etil alkol standardı % 1 NaF içeren su ile uygun oranda seyreltilerek % 20 ; % 80 ve % 160 mg alkol standartları hazırlanır.

Alkol standartları ayrıca, %1 NaF içeren alkolsüz kanla yukarıda açıklandığı şekilde hazırlanır. Bu standartlar yöntemin verimini hesaplamak için kullanılır.

Teknik : Conway - mikrodifüzyon apareyinin birinin dış odacığına 0.8 ml analizi yapılacak kan örneği ; diğerine yakında hazırlanmış olan alkol standardı (tercihan % 160 mg lık standart) ; her iki dış odacığa 1 ml doymuş potasyum karbonat konur. İç odacıklara 2 ml asit-dikromat reaktifi konur.

Apareyin kapağı yağlanarak (silikonla) hemen sıkıca kapatılır. Diğer üçüncü Conway aparayı blank “kör” deney için kullanılır. Bunun için dış odacığa 0.8 ml numune kan (alkol içermeyen) 1 ml doymuş potasyum karbonat, iç odacığa 2 ml asit dikromat reaktifi konur ve apareyin ağzı sıkıca kapatılır. 37 °C 'lik Etüv'de 1 saat inkübasyon için bekletilir. Difüzyon tamamlandıktan sonra otomatik bir pipet yardımıyla iç odacıktaki asit-dikromat çözeltisi 10 ml'lik cam kapaklı balon jojelere alınır. Eksik hacim distile su ile 10 ml'ye tamamlanır. Daha sonra 450 nm'de spektrofotometre'de suya karşı okunur.

Kalibrasyon : Kanda ve suda hazırlanan alkol standartları ile (konsantrasyonları % 20 ile % 320 mg arasında değişen) Conway mikrodifüzyon apareyi ile yukarıda açıklanan şekilde, kör deney de yapılarak çalışılır. 450 mm de absorbanslar okunur. Konsantrasyona karşı absorbanslar işaretlenerek doğru çizilir.

Alkol miktarı hazırlanan kalibrasyon grafiğinden hesaplanabileceği gibi, tek standart kullanarak ta aşağıdaki formülle hesaplanabilir:

$$C_n = C_s \left(\frac{a - a_s}{a - a_n} \right)$$

C_n : Kan örneğindeki alkol konsantrasyonu (mg/100 ml kan)

C_s : Alkol standardının konsantrasyonu (mg/100 ml kan)

a : Kör deneyin absorbansı

a_n : Numunenin absorbansı

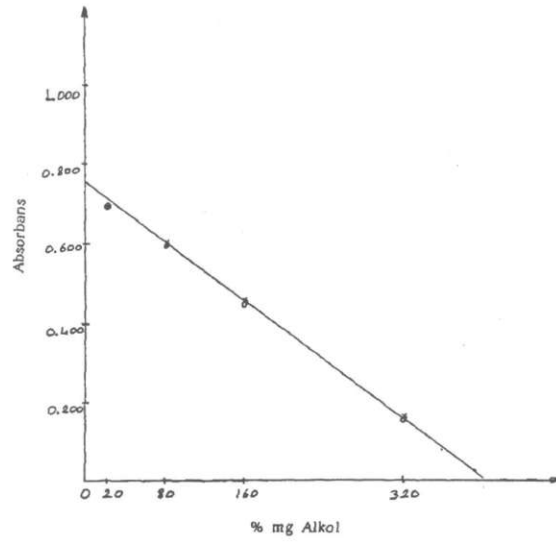
a_s : Standardın absorbansı

Yöntemin Değerlendirilmesi :

Bu yöntemde, reaksiyona girmeyen potasyum dikromat çözeltisinin absorbansı okunduğu için, konsantrasyonla absorbans ters linearite gösterir.

Standartla çalışma, numune ile beraber tekrarlanmalıdır. Elde edilen kalibrasyon grafiğine bir örnek Şekil 13 de gösterilmiştir.

Conway mikrodifüzyon yöntemi ile kanda etil alkol tayini ön bir tarama testi olarak toksikoloji laboratuvarlarında kullanılmaktadır. Bu yöntemle 20 mg /100 ml kan alkolü tayin edilebilir. Ancak potasyum dikromat, metil alkol ve diğer indirgen uçucu bileşikler ile de aynı reaksiyonu verir.



Şekil 13- Conway mikrodifüzyon yöntemi ile etil alkolün tayininin kalibrasyon doğrusu.

Conway mikrodifüzyon yönteminin daha kısa sürede (5 dakikada) sonuç veren modifiye şekilleri küçük laboratuvarlar, ilaç bağımlılığı merkezlerinde ve acil olaylarda ön bir teknik olarak önerilmektedir. Kan ve serumda kesin kantitatif değerlendirme için destekleyici daha duyarlı yöntemler için kullanılması gerekmektedir. (Serrano,L. ve ark. 1988)

Enzimatik yöntemle kanda etil alkol tayini

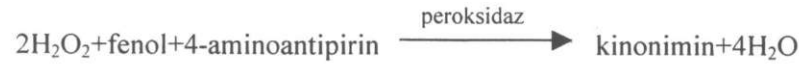
i) Enzimatik yöntemle alkol tayininde prensip, alkol dehidrogenaz (ADH) enzimi katalizörlüğünde, etil alkolün nikotinamid adenin dinükleotid

(NAD) tarafından oksitlenmesine dayanır. Bu reaksiyonda, 1 mol NAD, 1 mol etil alkolü oksitler ve kendisi de NADH'ye indirgenir. NADH'nın doğrudan UV alanında (340 nm) veya florimetrik olarak ölçülmesi ile alkol miktarı tayin edilebilir. Veya NADH diaforez enzimi karşısında, uygun bir kromojenle (tetrazolyum tuzları, fenazin metosülfat gibi) reaksiyona girerek görünür alanda spektrofotometrik yöntemle tayin edilir :



Burada MT, monotetrazolyum boyar maddesidir.

ii) Diğer bir enzimatik yöntemde ise alkol oksidaz ve peroksidaz enzimleri kullanılıp, renk reaksiyonu fenol ve 4-amino antipirin ile gerçekleştirilir.



Enzimatik yöntemler için hazır kitler bulunmaktadır. Bu kitler standard alkol çözeltisi, o yöntem için kullanılacak enzim, renk reaktifleri ve tamponları; yöntemle ilgili teknik prospektüsü içermektedir. (Fazla bilgi için: Sayın,H. 2000'e bakınız).

Gaz kromatografisi yöntemi ile etil alkol tayini

Gaz sıvı kromatografisi (GSK) kanda alkol tayini için ilk kez 1958 de uygulanmıştır. Daha sonra bir çok araştırmacılar tarafından geliştirilmiştir. Gaz kromatografisi ile çok az miktarda (0.2 ml ve daha az) çalışılarak, etil alkol, asetaldehit (metaboliti), metil alkolün (çeşitli nedenlerle etil alkolle

beraber az miktarda bulunur) ayrılabilmekte, kalitatif ve kantitatif analizleri yapılabilir. Sıvı faz olarak en çok Porapak Q, Polypak-2, PEG-400 (veya 600,1500) kullanılmakta, alev iyonlaştırıcı detektör (FID) tercih edilmektedir. Normal kolonlar yerine kapiller kolon kullanıldığında ayrılma daha iyi olmaktadır. "Head space" tekniği ile çok sayıda numune ile otomatik çalışma olanağı vermektedir. Burada laboratuvarımızda uyguladığımız GSK yöntemi açıklanmıştır (Vural, N., Saygı, Ş., 1981).

Yöntemin Uygulanması : Kan örnekleri yukarıda açıklandığı şekilde %1 NaF içerecek biçimde alınır.

Standart alkol çözeltileri : (% 0; % 50; % 80; %100 ve %200 mg) kan içinde hazırlanır. Bunun için önce mutlak alkol, %96'lık etil alkolün kalsiyum oksitle (CaO) geri soğutucu altında kaynatılarak ve arkadan distile edilmesi ile hazırlanır.

Mutlak alkolden 1 gram, su içinde tartılarak distile su ile 100 ml 'ye tamamlanır. (10 mg etanol / ml'de) bu çözeltiden 0; 0.5;0.8; 1.0 ve 2.0 ml alınarak %1 sodyum florürle korunmuş, alkol içermeyen kanla cam kapaklı fiyoller içinde 10 ml 'ye tamamlanır. Buz dolabında (+ 4°C'de) saklanır.

İç standart olarak n-propil alkol kullanılır. Önce %0.1 'lik stok çözelti hazırlanır. Bu çözeltiden 2 ml alınarak %100 ml 'ye tamamlanır. Böylece 0.2 mg n-propanol/ml içeren çözelti " internal : iç standart (i.s.)" olarak kullanılır.

Gaz kromatografisi koşulları : %10 PEG-400 (Chromosorb W-AW, 80/100 mesh üzerinde) sıvı faz içeren cam kolon (2 m uzunluğunda x 0.4 mm iç çapında); detektör: FID; enjeksiyon giriş sıcaklığı: 110 °C ; kolon sıcaklığı : 90 °C; detektör sıcaklığı : 110 °C; taşıyıcı gaz : azot (30 ml/dak.); attenuation : 8; range : 2.5×10^{-11} amper; kaydedici hızı : 0.5 cm/dak.

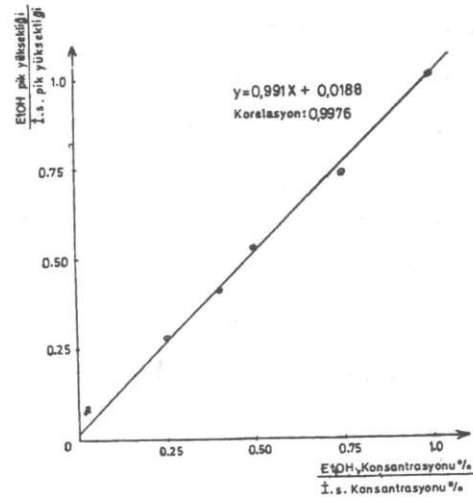
Teknik : Küçük bir tüpe 0.1 ml analizi yapılacak kan örneğine 1 ml i.s. ilave edilir, vortekste karıştırılır. Karışımdan 1 µl gaz kromatografa enjekte

edilir. Deney en az iki defa yapılır. Elde edilen kromatogramda, etil alkol ve i.s.'ın" pik yükseklikleri "bulunarak, oranları hesaplanır. (N: etil alkol pik yüksekliği/propil alkol pik yüksekliği). Bulunan bu oranın kalibrasyon doğrusunda karşılığı olan (etil alkol % / mg / i.s. % mg) oranı bulunarak, etil alkol konsantrasyonu hesaplanır.

Kalibrasyon doğrusunun hazırlanması : Yukarıda açıklandığı şekilde kanda % 0 ile % 200 mg arasında, hazırlanan alkol standartlarından tüplere 0.1 ml konur. Her birine 1 ml i.s. ilave edilip, vortekste karıştırılır. Karışımdan 1 µl gaz kromatografa enjekte edilir. Her standartla çift çalışılır.

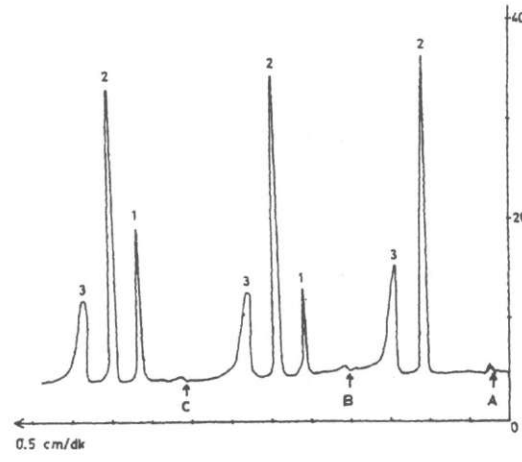
Kromatogramlar elde edildikten sonra, her standarta ait (etil alkol pik yüksekliği / i.s. pik yüksekliği) oranları hesaplanır.

Yukarıda açıklandığı şekilde hazırlanan kan örneği gaz kromatografa enjekte edilerek kromatogramlar elde edilir. Bu kromatogramlardaki pik yükseklikleri oranından numunedeki alkol konsantrasyonu grafikten hesaplanır (Şekil-14).



Şekil 14- Etil alkolün kalibrasyon grafiği

Şekil 15'de kanda, standart alkol çözeltileri ile elde edilen kromatogram görülmektedir.



Şekil 15- GLK'da Kan Alkolü Kromatogramları. A: %200 mg. İ.S. ilave edilmiş kan; B : İ.S. ve %50 mg etil alkol ihtiva eden kan ; C : İ.S. ve % 100 mg etil alkol ihtiva eden kan enjeksiyonu. 1- Etanol piki; 2- İ.S. piki; 3-su

Solunum havasında etil alkol tayini

Adli olaylarda (ölüm olmadığı zaman) ve özellikle trafik kazalarında kişilerin alkol alıp almadığı önce solunum havasında (ekspirasyon) etil alkol tayini yapılarak araştırılır. Bu amaçla geliştirilmiş bir çok teknikler vardır. Kullanılan apareyler solunum havasındaki alkol miktarını tayin eder, fakat sonuçlar kandaki alkol miktarına göre kalibre edilmiştir. Kinetik olarak, ortalama: kan alkol konsantrasyonu/solunum havası alkol konsantrasyonu: 1/2300 bildirilmiştir. (Bazı kaynaklarda 1/2100) (Fazla bilgi için: Saferstein. R., 1987; Emerson, V.J. 1998).

Alkolmetre

Lion laboratuvarları tarafından geliştirilen Lion-Alcometer SD-2, elektrokimyasal detektör ve digital göstergeye sahiptir. 1/2300 kan/nefes

oranına göre kalibre edilmiştir. Bu alete farklı nefes alma tüpleri takılarak, baygın kişilerde de ölçüm yapılabilir.

Ülkemizde, Adli Tıp Kurumunda, adli olaylarda alkol kontrolü, "Lion Alcometer" ile yapılmaktadır. Bu aletle alkol testi şu şekilde yapılmaktadır.

a) Cihazın hazır kontrolü yapılır ve SET düğmesine basılı durumda bulundurulur.

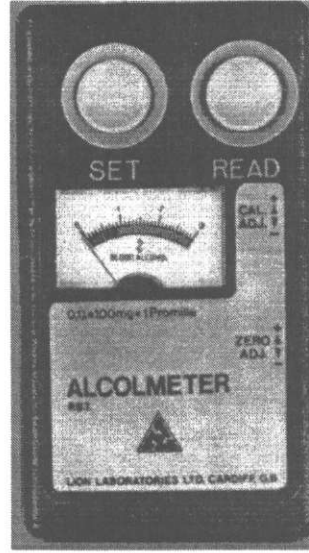
b) Cihazın örnekleme bölümü, ağızlığın kenarındaki deliğe takılır.

c) Test yapılacak kişiden, ciğerlerini havayla doldurması, ağızlığın kalın ucundan düzenli ve tek bir üfleme yapması istenir. "A" lambasını yakacak kadar kuvvetli, "B" lambasını yakana kadar üflemesi sağlanır. "B" lambası yandığında "Read" düğmesine basılır ve üfleme durdurması istenir. "Read " düğmesine basılı vaziyette gösterge maksimum değere ulaşana kadar ortalama 30 sn. beklenir ve değer okunur.

Gösterge normal olarak kan alkol konsantrasyonunun 100 ml'de kanda mg alkol cinsinden gösterir. (Alkol konsantrasyonu promil olarak da ifade edilebilir)

1 promil = 1 g alkol /l kan = 100 mg/100 ml kan

Aşağıdaki resimde LİON ALKOLMETRE görülmektedir.



Resim – 1. Alkolmetre

Analiz Sonucun yorumlanması

Etil alkol ince bağırsaktan hızlı absorbe olur ve bulanık görme, baş dönmesi, inkordinasyon, konfüzyon, bulantı ve şiddetli olaylarda komaya neden olur.

Genel olarak kan alkol düzeyinin klinik değerlendirmesi için aşağıdaki tablo (12) kullanılır.

Tablo 12- Kan alkol düzeyinin klinik yorumu

Kan alkol düzeyi (g/l = promil)*	Belirtiler
0.5	yüzde kızarma, öfori : yetişkinlerde belirgin bir klinik etki görülmez. Genç çocuklarda hipoglisemi görülebilir.
1.0	İnkoordinasyon, konuşmada bozukluk.
1.5	Belirgin inkoordinasyon, sendeleme, pupil dilatasyonu, nistagmus.
3.0	Gros inkoordinasyon, çevre ilgisizliği, kusma
5.0	Koma ve ölüm

* Alkol konsantrasyonu 1 promil=1g alkol / l kan =100 mg alkol / 100 ml kan

Widmark faktörleri

İlk kez alkol kinetiğini inceleyen Widmark, 1919 yılında birim zamanda kan alkolünün düşme miktarının (eliminasyon hızı) negatif bir eğilim gösterdiğini ve bu düşme hızını da β ile ifade etmiştir. Ayrıca alkolün tüm vücut sıvısında homojen olarak dağılmasından dolayı kişinin aldığı total alkol miktarı (r) sabiti kullanarak hesaplanabilir. (β) ve (r) Widmark faktörleri olarak bilinir (Fazla bilgi için Vural N. 1996'e bakınız).

Kan alkol düzeyinin tayininde, Widmark faktörleri olarak bilinen değerlerle : 1) Kişilerin aldıkları total alkol miktarı ; 2) Kişide kan alkolü tayini için alınan kan örneğinin "adli olay" sırasındaki gerçek alkol düzeyi hesaplanabilir.

$$1) \text{ Widmark faktörlerinden } (r) = \frac{\text{vücuttaki total alkol miktarı (\% g)}}{\text{Kandaki alkol miktarı (\% g ml)}}$$

olarak ifade edilir. (r) erkeklerde ortalama 0.67 (0.46-0.86), kadınlarda biraz daha düşüktür. Kandaki alkol düzeyinden, bir kişinin aldığı alkol miktarı ve içki cinsi de biliniyorsa içki miktarı hesaplanabilir.

Örneğin : 70 kg ağırlığındaki insanın kan alkolü %0.12 g saptansın. Acaba bu kişinin vücudundaki alkol miktarı ne kadardır? Bu içki cinsi votka ise ne kadar votka içmiştir?

Widmark faktörü 0.67 alındığında ;

$$\% 0,12 \times 0.67 = \% 0,080 \text{ g vücut alkol konsantrasyonudur. 70 kg. İnsan}$$

için :

$$\text{Total alkol miktarı : } 0,080 \times 10 \times 70 = 56 \text{ gram alkol}$$

İçki cinsi votka (% 40 ağırlık/hacim alkol içerir) ise, kişi:

$$56 \times \frac{100}{40} = 140 \text{ ml votka almıştır.}$$

2) Diğer bir Widmark faktörü β ile gösterilir ve alkolün eliminasyon hızı ile ilgilidir.

Widmark 1919 yılında, kan alkolündeki düşme hızını ortalama :

$$\beta = 16 \text{ mg/100 ml/saat (10 - 25 mg/100 ml/saat) önermiştir.}$$

Bu faktör alınan alkol miktarı ; beslenme, alınan içki cinsi , hormonlar, vitaminler, diğer ilaçların etkisi ile değişebilir. Ancak pratikte bu değer 16 mg /100 ml kan/saat (veya saatte 0.16 promil) alınır. Bu faktörün adli tıpta uygulanmasına aşağıda örnek verilmiştir :

Trafik kazası yapmış bir sürücünden kan örneği, kazadan 2 saat sonra alınmış olsun. Yapılan analizde kan alkol düzeyi % 45 mg (0.45 promil) bulunsun. Acaba bu kişinin kaza anındaki gerçek alkol düzeyi nedir?

$$\text{a) } \%16 \times 2 = \% 32 \text{ mg (0.32) promil kan alkolündeki düşme}$$

$$\text{b) Kaza anındaki alkol } \% \text{ mg} = \% 45 + \% 32 = \% 77 \text{ mg (0.77 promil)}$$

Türkiye’de özel oto sürücüleri için yasal kan alkol limiti % 50 mg (0.50 promil) dir. Yukarıdaki örnekte eğer alınan kan örneğinde bulunan alkol düzeyine göre değerlendirme yapılırsa kişi alkol açısından trafik suçu işlememiş olarak kabul edilir. Gerçekte ise kan alkolü olay anında yasal limitin üstündedir.

Ülkemizde trafik kazalarına yönelik trafik sigorta işlemlerinde β faktörü kullanarak değerlendirme yapılmaktadır. Bunun dışında diğer trafik suç ve kazalarında henüz kullanılmamaktadır (Vural, N., Sayın, H., 1996).

1.5. Formaldehit (HCHO)

Formaldehit molekül ağırlığı 30 olan renksiz, yanıcı olmayan bir gazdır. %40'lık çözeltisi halinde kullanılır. Formalin, formol sinonimleridir.

Sıvı haldeki formaldehitin (formalin) keskin batıcı bir kokusu vardır. Göz yaşartıcıdır, uçucu olup, k.n : 21⁰C'dır. Formalin, stabilizör olarak metanol içerir.

Formalin dezenfektan, antiseptik ve dokuların korunmasında (fiksasyon çözeltisi) kullanılır. Polimerize formaldehit (para formaldehit) fumigan, diğer polimerleri için yapıştırıcı, izolasyon maddelerinin hazırlanmasında kullanılır.

Formaldehit çok çabuk olarak (in vivo) formata metabolize olur. Metil alkolün de ara metabolitidir. Akut formaldehit zehirlenmesine az rastlanır. 30 ml formalin insanlarda öldürücü olabilir (MLD).

Formaldehit aranması (Kalitatif test)

Biyolojik dokulardan su buharı distilasyonu veya mikrodifüzyonla ayrılabilir. Distilata veya doğrudan idrara uygulanan testler :

Oksitlenebilen uçucu bileşiklere uygulanan dikromat - sülfirik asit testi ve Schiff reaksiyonu formaldehitte de pozitif sonuç verir (ön denemelere bakınız).

Formaldehit için spesifik test (Kromotropik asit ile): 0.5 ml test çözeltisine 100 mg kadar kromotropik asit ilave edilir ve vortex ile 5 dakika karıştırılır. Dikkatle 1.5 ml konsantre sülfirik asit ilave edilir. Mor-viyole rengin oluşması formaldehit mevcudiyetini gösterir. Yöntemin duyarlılığı 20 µg / ml dir.

Fenil hidrazin ile : 10 ml distilata (idrara) 10 damla %5' lik fenilhidrazin hidroklorür çözeltisi, 3 damla %0.5 lik sodyum nitroprussiyat çözeltisi ve 10 damla %10' luk sodyum hidroksit çözeltisi damlatılır. Mavi renk oluşumu formaldehit varlığını gösterir. Asetaldehit kırmızı renk verir.

Formaldehit tayini

1) Kromotropik asit testi spektrofotometrik yöntemle formaldehitin

kantitatif analizi için de kullanılır (Metil alkole bakınız).

2) 2,4 dinitrofenolle hidrazin oluşturularak, HPLC ile de formaldehit tayin edilir. Bu yöntem çok duyarlıdır (μg düzeyinde). Biyolojik materyalden izole edilen distilatta, iş yeri ortamında formaldehit tayini için kullanılabilir (Fazla bilgi için Usanmaz, S., 1994'e bakınız).

1.6. Formik asit (HCOOH) ve Format

Formik asit, molekül ağırlığı 46 olan renksiz, sulu çözüldür ve çok korosiftir. Bir çok (descaling) kepek döken çözümler 500-600 ml / l formik asit içerir. Formatlar, sodyum format (HCOONa) olarak boya, baskı ve tabaklama (deri) endüstrisinde ve sentetik ara ürün olarak kullanılır. Metil alkol ve formaldehitin toksik metabolitidir. Minimum letal doz (MLD), yetişkinler için 30 ml olarak verilmiştir.

Formik asit'in identifikasyonu (kalitatif testler)

Mide içeriği ve olay yerinden alınan örneklere uygulanır.

1) Ön deney : 0,5 ml test çözeltisine, 1 ml sitrik asit-asetamid reaktifi (5 g/l sitrik asit ve 100 g/l asetamid, propan-2-ol içinde); 0.1 ml sodyum asetat (300 g/l), 3.5 ml asetik anhidrid ilave edilir. Vorteks'de 5 saniye karıştırıldıktan sonra 10 dakika kaynar su banyosunda ısıtılır.

Kırmızı renk oluşması formik asit varlığını gösterir. Formaldehit ve format tuzları bu testle pozitif reaksiyon vermezler. Yöntemin duyarlılığı 50 $\mu\text{g/ml}$ 'dir.

2) Destekleyici deney (kromotropik asit deneyi : 0.1 ml numuneye 0.1 ml seyreltik hidroklorik asit (2 mol/l) ilave edilir, vortekte 5 saniye karıştırılır. 100 mg kadar magnezyum tozu gaz çıkışı duruncaya kadar yavaş yavaş ilave edilir. 100 mg kromotropik asit ilave edilir ve vortekte 5 saniye karıştırılır.

Dikkatle 1.5 ml konsantre sülfirik asit ilave edilir. 60°C deki su banyosunda 10 dakika bekletilir.

Mor-viyole renk oluşumu formik asit ve formatların varlığını (Mg tozu ile formaldehite indirgenmiş) gösterir. Aynı reaksiyonu formaldehit ön işlem yapılmaksızın, metil alkol ise KMnO_4 ile oksitlendikten sonra verirler.

Bu yöntemin duyarlılığı 50 µg/ml dir.

Formik asitin kantitatif analizi

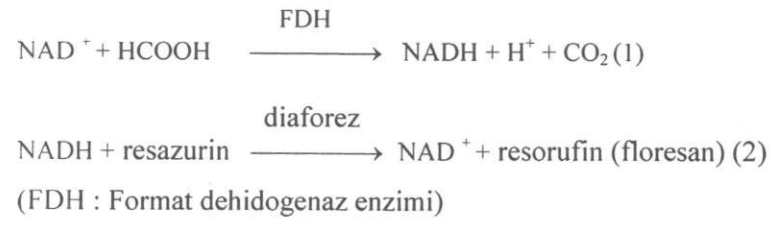
Gaz kromatografik yöntem : GSK ile formik asit doğrudan veya türevleri oluşturulduktan sonra tayin edilebilir.

Formik asit metil format veya dimetil formamit, formanilid türevleri şeklinde, FID detektör kullanarak GLK ile tayin edilebilir. Duyarlık 10 µg/ml olarak bildirilmiştir. Head space tekniği ile deteksiyon limiti 2,5 µg/ml dir.

Enzimatik Yöntemler

Formik asitin biyolojik sıvılarda enzimatik yöntemle tayini, formatın bakteriyel "format dehidrogenaz" enzimi ile karbondioksit ve suya oksidasyonu sırasında NAD^+ 'nin NADH 'a indirgenmesi reaksiyonuna dayanır. Burada oluşan NADH , diyaferez enziminin katalizörlüğünde indirgendiğinde floresan oluşturan bir substrat ile reaksiyona sokulur. Bu amaçla kullanılan maddelerden biri resazurindir. NADH ile indirgenen resazurin, resofurin isimli floresan madde verir. Bu madde 565 nm de ekstinksiyon ve 590 nm de emisyon dalga boylarında spektrofotometrik olarak tayin edilir. Buradan formik asit miktarına geçilir. Yöntem çok duyarlıdır (0.2 µg/ml) ve spesifiktir.

Reaksiyon denklemi aşağıda gösterilmiştir:



Analiz Sonucunun yorumu

Biyolojik sıvılarda formik asit (format) tayini metanol ile akut zehirlenmelerde önem taşır. Ancak serum format düzeyleri için rutin laboratuvar testleri yaygın değildir.

Kanda endojen format düzeyi 0-6,3 mg/100 ml arasında değişebilir. Genel olarak üst sınır 1.2 mg/100 ml kabul edilir. Ağır zehirlenmelerde 93 mg/100 ml'ye kadar çıkabilen değerler bildirilmiştir.

Aşağıda Tablo 13'de metanol zehirlenmesi sonucu oluşan 2 ölüm olayında, postmortem formik asit analizi sonuçları gösterilmiştir (Tanaka, E. ve ark.1991).

Tablo 13 formik asitin postmortem dağılımı

Biyolojik örnek	olay 1	olay 2
Kan (mg/ml)	0.32	0.23
İdrar (mg/ml)	2.27	0.47
Beyin (mg/g)	0.11	1.17
Karaciğer (mg/g)	0.54	0.51
Böbrek (mg/g)	0.13	1.19
Mide içeriği (total, mg)	108	23.2

2.7. Klorlu Hidrokarbonlar

Toksikolojik önemi olan halojenli hidrokarbonlara doymuş haloalkanlardan metil klorür, metil bromür, kloroform, karbon tetraklorür, metil kloroform; etilen yapısında halojenli doymamış hidrokarbonlara ise trikloroetilen ve tetrakloretilen örnek verilebilir. Burada, aşağıda açıklanan “Fujwara” reaksiyonu ile kendilerinin ve/veya metabolitlerinin analizi yapılabilen klorlu hidrokarbonlardan bahsedilecektir (Genel bölüme de bakınız).

Kloroform (CHCl_3) : Triklorometan yapısında; molekül kütlesi 119 dur. Anestetik ve tıbbi amaçla dezenfektan olarak kullanıldığı gibi, endüstride çözücü olarak ta önemli bir yeri vardır. MLD: 7 g / 70 g insandır.

Kloroformun önemli bir kısmı değişmeden akciğerler ve idrarla atılır. Az bir kısmı metilen klorür, CO_2 ve potent hepatorenal toksik bir madde olan fosgene (COCl_2) metabolize olur.

Karbon tetraklorür (CCl_4) : Tetraklorometan yapısında molekül kütlesi 154 olup, piren ve karbona sinominleridir. Temizleme, yağ eritici ve yağ uzaklaştırıcı olarak, yangın söndürmede, kuru temizlemede kullanılır. MLD : yaklaşık 4 ml / 70 kg insandır.

Karbon tetraklorürün başlıca toksik etkisi karaciğer ve böbrek hasarına neden olmasıdır.

Karbon tetraklorüre yoğun maruz kalma, Fujwara reaksiyonu ile detekte edilebilir. Bu reaksiyonu CCl_4 vermez. Bu nedenle bu reaksiyonun muhtemelen CCl_4 üminör metaboliti ve içerebileceği kontaminant olan kloroformdan kaynaklandığı düşünülmektedir.

1,1,1,-Trikloroetan (Metilkloroform : CCl_3CH_3) : Molekül kütlesi 133 dür. Metilkloroform kuru temizlemede çözücü, yağ uzaklaştırır ve daktilo yazılarını düzeltme sıvılarında (daksil) kullanılır. Akut zehirlenme kazaen

yoğun bir şekilde maruz kalma veya amaçlı inhalasyonla (uçucu çözücü suistimali) olur. Absorbe olan 1,1,1,-trikloroetanin %2 si 2,2,2, trikoroetanole ve sonra trikoasetik asite metabolize olur. Bu metabolit de idrarda fujiwara testi ile aranır.

Trikloroetilen ($\text{CHCl} = \text{C Cl}_2$) : Trilen, trikol, tiriol gibi sinominleri vardır. Molekül kütlesi 131'dir. Yağlı madde ekstraksiyonunda, ilaç ve parfüm endüstrisinde, kuru temizlemede ayrıca insektisit olarak kullanılır. Tıpta genel anestetik olarak kullanılır.

Başlıca toksik etkisi MSS üzerinedir, narkotik etkilidir. Narkotik etkisi trikoetanol (TKE) metaboliti ile ilgilidir. Önemli bir kısmı (% 80). TKE üzerinden trikloroasetik asit (TKAA) metabolitine dönüşür. Bu metabolitte idrarda Fujiwara testi ile detekte edilir. Kloral hidrat, dikloralfenazon gibi hipnotik ilaçlar da TKAA metabolitine dönüşürler). Akut zehirlenme kazaen yoğun maruz kalma veya amaçlı inhalasyon (uçucu çözücü skistimalı) sonucu oluşur.

Tetrakloroetilen : (Perkloroetilen, tetrakloroetilen)

$\text{CCl}_2 = \text{CCl}_2$: Molekül kütlesi 166 dır.

Tetrakloroetilen antihelminitik ve kuru temizlemede çözücü, buharla yağ uzaklaştırıcı olarak kullanılır. Akut zehirlenme kazaen yoğun maruz kalma ve amaçlı inhalasyon sonucu oluşur.

Absorbe olan tetrakloro etilenin ancak % 0.5'i trikloroasetik asite metabolize olur. Bu miktardaki metabolit de idrarda Fujiwara testi ile tanınabilir.

Klorlu hidrokarbonların biyolojik materyalde aranmaları
(Fujiwara deneyi ile)

Klorlu hidrokarbonlar doku ve kandan su buharı distilasyonu ile izole edilirler. Asit ortamda bütün klorlu hidrokarbonlar su buharı ile sürüklenirler.

Distilat veya idrarda klorlu hidrokarbonların kalitatif ve kantitatif analizinde en çok kullanılan genel renk reaksiyonu Fujiwara testidir.

Deneyin uygulanması : Bu test su buharı distilasyonu ile izole edilen distilata ve/veya idrara uygulanabilir. Deney numune, blank (kör) ve standard (trikloroasetik asit) ile paralel olarak yapılır.

Distilat ile çalışıldığında 5 ml distilata (veya 2 ml idrar) 2 ml %20 lik NaOH ve 2 ml saf piridin ilave edilerek dikkatle karıştırılır. Karışım kaynar su banyosunda 5 dakika bekletilir. Piridin fazında koyu kırmızı menekşe rengin oluşması trikloro bileşiklerinin olduğunu gösterir.

Laboratuar ortamında kloroform gibi aynı reaksiyonu veren kontaminatları dışlamak için distilat yerine 5 ml saf su kullanarak kör deney (Blank) yapılır.

Ayrıca standard olarak suda hazırlanmış %1 lik trikloroasetik asit (10 mg/l) ile deney paralel yürütülür.

Bu deneyin duyarlılığı 1mg/l trikloroasetatdır. Klorlu hidrokarbonlar (kloroform, trikloroetilen, metilkloroform, tetrakloroetilen) ve metabolit olarak oluşum trikloroasetik asit dışında kloralhidrat, diklorofenazon gibi trikloroasetik asit metabolize olan ilaçlar da Fujiwara reaksiyonu ile pozitif sonuç verirler.

Klorlu hidrokarbonların Fujiwara reaksiyonu ile kantitatif analizleri

1 ml toluen fazına (klorlu hidrokarbon distilatının toplandığı), 10 ml saf piridin (tekrar distillenmiş veya taze analitik özellikte) ve 5 ml 20 NaOH ilave edildikten sonra, karışım tam 5 dakika kaynar su banyosunda bekletilir. Buz banyosunda soğutulduktan sonra renkli piridin fazı hemen ayrılır.

Piridin fazı, distile su ile 15 ml ye seyreltilir. Bu renkli çözeltinin absorbans 530 nm de köre karşı bir spektrofometrede okunur. Konsantrasyon

aynı şekilde standart hidrokarbon çözeltileri ile hazırlanmış kalibrasyon eğrisinden hesaplanır. Bu teknikte, 1 ml toluen içinde en fazla 0.4 mg hidrokarbon tayin edilebilir.

Habgood ve Powell 1 ml aseton ilavesi ile karbon tetraklorürün piridin fazında verdiği rengin şiddetlendiğini, kloroform olduğunda azaldığını ve trikloroetilen ile meydana gelen rengin ise etkilenmediğini göstermişlerdir.

İdrarda Fujiwara reaksiyonu ile trikloroasetik asit (TKAA) tayini (Soucek ve Vlachova modifikasyonu)

Trikloro asetik asite metabolize olan klorlu hidrokarbonlara maruz kalmanın biyolojik izlenmelerinde idrarda TKAA tayini yapılması pratik açıdan daha uygundur.

Bunun için 2 ml idrara, 8 ml saf piridin ve 5 ml % 20 NaOH ilave edilir. Karışım 70 °C de 15 dakika su banyosunda bekletilir. Buz banyosunda soğutulduktan sonra piridin fazı (7.5 ml) 3 ml su ilave edilerek seyreltilir. Renkli çözeltinin optik dansitesi 530 nm de köre karşı okunur. Sonuç, 1-100 mikrogram arasında hazırlanan TKAA standartlarıyla elde edilen kalibrasyon eğrisinden hesaplanır.

Sonucun Yorumu :

Bu yöntem en çok trikloroetilene maruz kalmada kullanılır. İdrarda 20 mg/l TKAA bulunması, önemsiz derecede trikloroetilene maruz kalındığını, bu değerin (150 mg/l TCAA) üstünde bulunması ise havada müsaade edilen limit üstünde trikloroetilene maruz kalındığını ifade eder.

Klorlu hidrokarbonların gaz kromatografik yöntemle analizi

Kan ve idrarda klorlu hidrokarbonların gaz kromatografisi yöntemi ile taranmaları ve kantitatif analizleri duyarlı olarak yapılır.

Gaz kromatografisi yöntemi ile GA veya tercihen GI sistemi ile taramaları yapılabilir. (Moffat, A.C., ve ark. 1986)

a) Sistem G.A. : %2.5 SE-30 ile kaplanmış 80-100 mesh chromosorb (asitle yıkanmış : AW ve dimetildiklorosilanla işlem görmüş) kolon kullanılır. Destek maddesinin tamamen deaktive edilmiş olması gerekir. 2 m x 4 mm iç çapında cam kolon tercih edilir. Gaz kromatografisi koşulları : Kolon sıcaklığı 35⁰C da 2 dakikaya ve sonra dakikada 5⁰C yükselecek şekilde 175⁰ C ye kadar programlanır. 175⁰C da en az 8 dakika tutulur. Taşıyıcı gaz olarak azot (45 ml /dakika akış hızında) FID dedektör kullanılır.

Sistem GI: 80-100 mesh carbopak C üzerine kaplanmış % 0.3 carbowax 20 M içeren kolon (2 m x 2 mm iç çapında) kullanılır. Kolon sıcaklığı yukarda açıklandığı şekilde 35⁰C ile 175⁰C arasında programlanır. Taşıyıcı gaz olarak azot (30 ml/dak. akış hızında) kullanılır.

Kantitatif analizde ise "head-space" düzeneği içeren gaz kromatografisi tercih edilir.

1.8. Aromatik Hidrokarbonlar

Aromatik hidrokarbonların en basit ve dayanıklı bileşiği olan benzen ve homologları (toluen, ksilen izomerleri, etil benzen) endüstriyel ve ticari kimyasal maddeler olarak önem taşırlar. Yakıt, çözücü ve kimyasal maddelerin sentezinde başlangıç maddesi olarak kullanılırlar. Bu nedenle, çevrede, iş yerlerinde ve endüstride çevresel ve biyolojik izlenmeleri önem taşır.

Benzen (C₆H₆)

En basit aromatik hidrokarbondur. Benzol, fenilhidrid ve kömür naftası sinonimleridir. Kendisine özgü kokusu olan, uçucu bir organik sıvıdır. K.n. 81⁰C dir.

Akut benzen zehirlenmesinde başlıca semptomlar MSS depresyonu ile ilgilidir. Kronik maruz kalmada ise hematopoetik sistem etkilenir. Anemi ve

lösemiye neden olduğu gösterilmiştir. MLD : 15 ml /70 kg insan olarak verilmiştir.

Kronik benzen toksisitesinden benzenin aktif metabolitleri olan fenolik metabolitleri sorumludur. Benzene maruz kalmanın biyolojik izlenmesinde kanda benzen, idrarda fenol tayini yapılır.

Benzenin biyolojik materyalden izolasyonu ve kalitatif analizi

Benzen dokulardan, asit ortamda su buharı distilasyonu ile izole edilir. Bunun için 10 g doku (veya 4 ml kan) distilasyon balonuna konarak 50 ml su ile karıştırılır. (Şekil 2). 1 ml konsantre H_2SO_4 ilavesinden sonra, uzun soğutuculu bir su buharı distilasyonu apareyinde distillenir. Soğutucunun uç kısmının nümune toplama kabının karbon tetraklorür ihtiva eden kısmına kadar uzanan bir adaptörle tespit edilmesi, benzenin uçmasını engeller. Benzen kokusu duyulmayıncaya kadar distilasyona devam edilir. Nümune kabında toplanan, distilat toplanır ve CCl_4 fazının ayrılması için beklenir. Benzen CCl_4 içinde çözüneceğinden bu faz alınarak benzen aranır:

Bir tüpe alınan (5ml benzen-karbon tetraklorür) karışımına, 9 ml sülfürik asit ve 6 ml nitrik asit ilave edilir. Asitlerin ilavesi sırasında tüp devamlı karıştırılır ve karışımın sıcaklığı $60^{\circ}C$ altında tutulur. Karışım, 1 saat $60^{\circ}C$ de su banyosunda ısıtılır. Benzen mevcudiyetinde nitrobenzen (k.n: 206°) oluşur. Karışımın soğutulmasından sonra, nitrobenzen karakteristik, ayakkabı cilası kokusu ile tanınır.

Benzenin kan ve dokuda araştırılması kronik benzen zehirlenmesi bakımından önemlidir. Ayrıca, idrarla atılan metaboliti fenol olduğundan kronik benzen zehirlenmesinin saptanmasında diğer araştırmalar (kan formülü, hemogram, hematokrit gibi) yanında, fenol tayini değerli bir kriterdir (fenol bölümüne bakınız).

Toluen (Metil benzen) :C₆H₅CH₃

Bağıl Molekül kütlesi 92 ve kaynama noktası 109⁰-111⁰C olan bir organik çözücüdür. Toluen yapıştırıcı, boyalar için çözücü olarak ve ayrıca endüstride yaygın olarak kullanılır. Çözücü olarak çoğu kez, tiner gibi ticari karışımlar (dikloro-metan, ksilen, metil etil keton gibi diğer çözücüler içerir) şeklinde kullanılır. Akut toluen zehirlenmesi yoğun şekilde toluene maruz kalma veya bağımlılık şeklinde inhalasyonu ile (yapıştırıcı koklama, uçucu çözücü tipi bağımlılık) görülür.

Toluenin önemli bir kısmı (%80 i) benzoik asite metabolize olur. Benzolik asit glisinle konjuge olarak idrarla hippurik asit (HA) şeklinde atılır. Çok az miktarda da krezollere (o-, p- ve m-krezol) dönüşür. o-krezol spesifik minör metaboliti olup son yıllarda, düşük konsantrasyonda toluene maruz kalmanın biyoindikatörü olarak idrarda tayini tercih edilmektedir.

Toluene çevresel ve mesleki maruziyetin biyolojik izlenmesinde kanda ve alveolar havada toluen, idrarda hippurik asit tayini yapılır. Fenolik metabolitleri olan krezollerin (özellikle o-krezol) tayini de spesifik metabolit olarak önem kazanmıştır.

Kanda toluenin gaz kromatografik yöntemle tayini

Toluen kan ve dokularda gaz kromatografisi yöntemi ile tayin edilebilir. Sistem olarak GA veya GI kullanılır. Alıkonma zamanı 24.8 dakikadır (Moffat, A.C. 1986).

İdrarda HA tayini

Spektrofotometrik yöntemler

Hippürik asit, mg/l düzeyinde renk reaksiyonları ile spektrofotometrik yöntemle tayin edilebilir. Renk reaktifi olarak (piridin + benzensulfonil klorür) veya p-dimetilbenzaldehit kullanılır. Burada hippürik asitin p-

dimetilbenzaldehitte kondanse olarak oluşturduğu renkli bileşiğin 458 nm de llmesine dayanan spektrofotometrik yöntem açıklanacaktır. (Flanagan ve ark. WHO, 1995)

Reaktifler :

Seyreltik hidroklorik asit (0,05 mol/l)

Dimetilaminobenzaldehit reaktifi : p-dimetilaminobenzaldehit (40 g/l) konsantrasyonda, içinde birkaç kristal (0,5 g kadar) susuz sodyum asetat içeren asetik anhidrid içinde hazırlanır.

Sodyum klorür (katı)

Çöktürülmüş silika

Standardlar : Kr (blank) olarak idrar kullanılır. Standardlar kr olarak kullanılan idrarda hippurik asit 0,2; 0,5 ; 1,0 ve 2.0 g/l konsantrasyonda olacak şekilde hazırlanır. Bu zeltiler +4°C de karanlıkta saklandığında 1 ay dayanır.

Teknik : 1 ml idrar rneği (veya standard) hidroklorik asit çözeltisi ile 2 ml ye seyreltilir ve doyunluğa kadar sodyum klorür ilave edilir.

Çözeltiye 2 ml dietileter : metanol (9:1) ilave ederek, vortekste 1 dakika karıştırılır. 5 dakika santrifüj edilir. şt faz atılır ve ikinci kez ekstraksiyon işlemi dietileter : metanol (9:1) ile tekrarlanır.

Eter ekstraktları birleştirilir ve içinde 0,5 g silika içeren tüpe, ekstraktan 1 ml ilave edilir. Eter fazı hava veya azot akımında uzaklaştırılır. Kalıntıya 3 ml dimetilaminobenzaldehit reaktifi ilave edilerek 135°C de 5 dakika ısıtılır.

Soğutulan karışıma 4 ml metanol ilave edilir 1 dakika vortekste karıştırılır, 5 dakika santrifüj edilir.

Metanol ekstraktı diğer bir tüpe aspire edilir. Kalan silika fazı ikinci bir (4 ml) metanolla ekstrakte edilir.

Metanol ekstraktları birleştirilir ve 460 da absorbansı, aynı şekilde hazırlanmış "kör idrar" ekstraktına karşı okunur.

Kalibrasyon : Kalibrasyon eğrisi, idrara ilave edilmiş hippurik asit standartları ile yukarıda açıklandığı şekilde analizleri yapılarak (absorbansa karşı konsantrasyon) hazırlanır. Numune ile elde edilen absorbansın hippurik asit düzeyi, kalibrasyon eğrisinden hesaplanır.

Benzoat içeren diyetlerin alımı nedeni ile HA atılımı normal kişilerde de olduğu için, kör ve standard hazırlamada aynı idrar örneği kullanılmaktadır.

Yöntemin duyarlılığı 0,1 g/l hippuattır.

İdrarda gaz kromatografisi yöntemi ile HA ve MHA tayini

İdrarda GLK ile HA tayininde, HA'in metanol ile metil türevi oluşturulur. İç standart olarak heptadekanoik asit kullanılır. Aynı yöntemle, ksilenin metaboliti olan metil hippurik asit (MHA) tayini de yapılır. .

Burada laboratuvarımızda, tiner kullanımı nedeni ile toluen ve ksilen maruziyetinin araştırılmasında idrarda HA ve m-MHA tayini için kullandığımız yöntem açıklanmıştır (Doğanyigit., R. 1999).

Kullanılan reaktif ve standartlar :

Türevleme reaktifi : 4 ml % 37 lik hidroklorik asit, susuz metil alkolle (maksimum %0,001 H₂O içeren) balonjoje içinde 100 ml ye tamamlanır.

İnternal (iç) standard : 50 mg heptadekanoik asit metil alkol ile 100 ml ye tamamlanır.

Standard HA çözeltileri : 50-250 mg/50 ml arasında konsantrasyonlar değişen, seri standard HA çözeltisi metil alkol içinde hazırlanır.

Standard metil hippurik asit (m-MHA) çözeltileri : 25-150 mg/ 50 ml arasında değişen konsantrasyonda olacak şekilde, m-MHA, metil alkolde çözülerek standard çözeltiler hazırlanır.

Gaz kromatografisi koşulları :. Kolon dolgu maddesi %3 SE-30 (Chromosorb WHP, 80-100 misli üzerinde); detektör: FID; Enjeksiyon giriş sıcaklığı; 240°C; fırın sıcaklığı : 200 °C; taşıyıcı gaz (azot) akış hızı: 30 ml/dk.; hidrojen akış hızı : 300 ml/dk.

Teknik : 1 ml idrara 200 µl iç standart ve 200 µl iç standart ve 200 µl 0,5 N-HCl ilave edilerek 3 ml etil asetat ile çalkalayarak 20 dakika ekstrakte edilir. Karışım 4000 rpm de 4 dakika sentrifüj edilir. Organik faz 15 ml lik tüpe aktararak oda sıcaklığında azot akımında uçurulur. Kalıntı üzerine 1 ml türevleme reaktifi ilave edildikten sonra, su banyosunda 60 °C da 45 dakika bekletilir. Karışım soğutulduktan sonra 2 ml distile su ilave edilir ve 1 ml kloroform ile 20 dakika karıştırılarak ekstrakte edilir. 3000 rpm de 2 dakika santrifüj edildikten sonra kloroform fazından 2 µl doğrudan gaz kromatografa enjekte edilir.

Kalibrasyon : Mesleki olarak maruz kalmayan kişilerde alınan idrarın 1 ml sine, her seri standart çözeltiden 200 µl HA ve 200 µl m-MHA ilave edilerek, yukarda açıklanan işlemle (200 µl internal standard ilavesinden sonra) uygulanır. Kalibrasyon grafiği, konsantrasyona karşı, pik oranı işaretlenerek (standart / internal standart) çizilir.

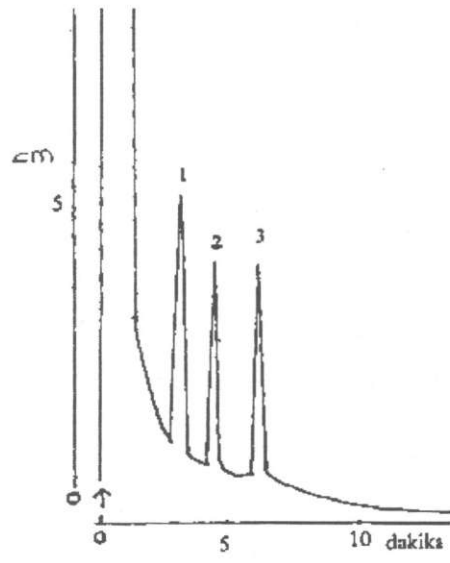
Numune ile elde edilen pik yüksekliği oranı (nümune/internal standart) kromatografadan saptanarak, yöntemle ilgili şartları konsantrasyon kalibrasyon eğrisinden hesaplanır.

Yöntemle ilgili uyarılar :

1) Standardlar hazırlanırken, normal kişilerde de HA atılımı beslenmeye bağlı olarak değişen oranda bulunabileceğinden aynı idrardan alınan örneklerle HA standartları ilave edilir.

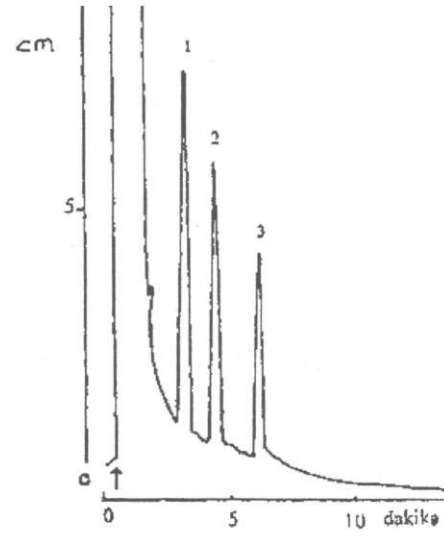
2) Yöntemin verimi (recovery) hesaplanırken, normalde idrarda bulunan HA konsantrasyonu, standarddan çıkartılır. Bunun için, kalibrasyon grafiği hazırlanırken idrar örneği ile de çalışma yapılır.

3) Ksilen o-, p- ve m- izomerlerinin karışımı olarak bulunduğu için, idrarda m- dışındaki MHA metabolitleri olabilir ve alıkonma zamanları GLK de yakındır. Ancak m-ksilen izomeri, karışımda % 70-80 gibi yüksek oranda ve p-izomeri %5 in altında olduğu için pratikte bu interferans önemli değildir. Son yıllarda, bu izomerlerin ayrılmasına yönelik yöntemler geliştirilmektedir. Şekil 16'da GLK ile HA ve m-MHA'in kromatogramları görülmektedir.



(a)

Şekil 16- (a) HA (1); m-MHA (2) ve heptadekonoikasit (iç standart, 3) standardlarının (0.5 µg) GLK kromatogramları



(b)

Şekil 16- (b) Mobilya işçilerinin idrarından elde edilen ekstraktın gaz kromatogramları. (1) HA, (2) m-MHA, (3) iç standart

HPLC ile idrarda HA tayini :

Toluen ve ksilenin metabolitlerinin tayininde HPLC duyarlık ve spesifite açısından son yıllarda en çok kullanılan tekniklerden biridir. Bu teknik genelde zaman alır ve iyi donanımlı yüksek performanslı kromatografa ihtiyaç vardır. Ancak, rutin analizlerde kullanılabilecek basit ve çabuk sonuç veren HPLC yöntemleri de geliştirilmiştir. Burada laboratuvarımızda modifiye edilen oldukça basit ve çabuk sonuç veren HPLC yöntemi ile HA tayini açıklanmıştır (Duydu ve ark. 1999)

HPLC cihaz ve çalışma koşulları : Kromatograf sistemi bir HPLC pompası, UV/VIS detektörü ve Li Chrosorb RP-18-5 içeren 200x4.6 mm kolon içermektedir.

Mobil faz olarak 5 mM KH_2PO_4 (pH : 2.5) ve aseto nitril (CH_3CN) karışımı (90/10 oranında) kullanılır.

Mobil faz akış hızı : İlk 2,6 dakikada 0,8 ml/dak ; 2.9-7.5 dakika arasında 2 ml/dak ve 8.0-9.0 dakika arasında 0.8 ml/dak. olarak programlanmıştır. Efluentin absorbansı 225 nm de okunur ve total tayin oda sıcaklığında yapılır.

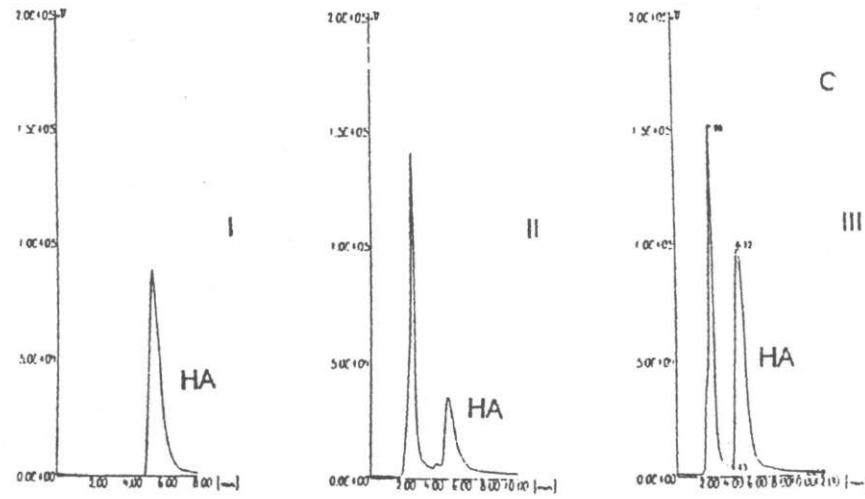
Teknik : 1 ml idrara 1 ml metil alkol ilave edilir ve 2500 rpm de 5 dakika santifüj edilir. Supernatant'tan 3 μl , HPLC cihazına enjekte edilir.

Kalibrasyon: Kalibrasyon eğrisi konsantrasyona karşı pik alan keratinine göre verilecekse (tercih edilir), ayrıca kontrol idrarda kreatinin tayin edilir. Bu durumda kalibrasyon eğrisinde konsantrasyon HA, g/g kreatinin olarak işaretlenir.

Stok HA çözeltisi metanol içinde hazırlanır (1 g/l). Kalibrasyon için stok çözelti su ve idrarla seyreltilerek, HA konsantrasyonu 0-2 mg/ml

arasında değişecek şekilde 2 ayrı standard (su ve idrar) seri standard çözeltileri hazırlanır. Yöntem bu standartlara uygulanır.

şekil 17'de HPLC ile standard HA, normal idrar ve HA ilave edilmiş idrar örneğinin kromatogramları görölmektedir.



şekil 17- HA'nin HPLC de kromatogramı I-Standard HA; II-Normal idrar (endojen HA görölmekte); III-HA ilave edilmiş idrar.

Ksilen ($C_6H_4(CH_3)_2$)

Renksiz, aromatik kokulu bir sıvı olup, moleköl ağırlığı 106.13 tür. Kaynama noktası $130^{\circ}C$, alev alma noktası $29^{\circ}C$ dır. Ticari olarak orto, meta ve para izomerleri şeklinde bulunur. Ancak o-ksilen, en yüksek oranda (%60-80) bulunur.

Toluenle birlikte tiner içinde bulunur. Ksilenin, idrarla atılan başlıca metaboliti, metil hippürik asittir (MHA). En çok meta izomeri (m- MHA) şeklinde atılır. Bu nedenle ksilene maruziyette idrarda başlıca m-MHA tayini yapılır. Son yıllarda, diğer izomerlerin ayrılması ile ilgili çalışmalar vardır.

Ksilene maruziyette, idrarda MHA tayini yapılır.

MHA tayini :

İdrarda MHA tayininde gaz kromatografik ve HPLC yöntemleri kullanılır. Toluene kısmında, HA'nın gaz kromatografisi ile analizinde m-MHA tayinde açıklanmıştır.

Sonucun yorumu

Akut toluene zehirlenmesinde ataksi, bulantı, kusma, solunum depresyonu, koma ve kardiyak aritmi görülür. Hepatorenal hasar genelde yoktur.

İdrarda normal HA konsantrasyonu 0,1-0,2 g/l olarak verilmektedir. 1 g/l üstünde değerler toluene ön maruziyeti gösterir. Ancak diyet veya diğer nedenlerle alınan benzoatın dışlanması gerekir. Akut zehirlenmelerde, ölüm, hippurik asit atılımı yükselmeden oluşabilir.

Toluene mesleki maruziyetin biyolojik izlenmesinde, HA düzeyi (g/g kreatinin) şeklinde verilmesi, değerlendirmede daha geçerlidir. Daha önce kreatinine göre düzeltmeden ve idrardaki kreatinin tayini açıklanmıştı. Bu düzeltmeye göre, idrarda HA için kabul edilen maksimum değer, biyolojik maruz kalma indeksi (BEI) 2,5 g/g kreatinindir. (Lauwrys, L.K., 1986). m-MHA ise normalde atılan bir metabolit değildir.

Tiner kullanan iş yerlerinde (mobilya işçileri, otomobil boyacıları gibi) maruziyet derecesine göre HA ve mMHA atılımı artar. Yaptığımız bir çalışmada mobilya cilalama işleminde çalışan kişilerde (n:57), idrarla atılan HA miktarı 2.99 ± 0.38 g/2 kreatinin bulunmuştur (bakınız: Doğanyigit, R., 1999 doktora tezi).

1.9 Fenoller : C₆H₅OH

Sinonimleri : (C₆H₅OH) : Karbolik asit, asit fenik ; Türevleri : Krezoller (o,p,m-CH₃,C₆H₄OH); timol (C₆H₃CH₃C₃H₇,OH)

Kullanma yerleri: Dezenfektan, prezervatif, antiseptik antipruritik (kaşıntılara karşı) ve endüstride kullanılır. MLD : Yaklaşık 10 ml/70 kg insan (adi fenol için).

Fenollerin biyolojik materyalden izolasyonları ve identifikasyonları

Fenoller, kan, idrar veya dokulardan asit ortamda su buharı distilasyonu ile izole edilir. Bunun için su buharı distilasyonu apareyinin (Şekil-3) B balonuna 25 ml kıyılmış doku veya idrar, 4 ml (1+1) oranında seyreltilmiş sülfirik asit konur ve 5 ml su ile balon yukarıdan aşağıya doğru yıkanır. Karışım su buharı akımında distile edilir, distilasyona 100 ml distilat toplanıncaya kadar devam edilir.

Distilatta fenol aranması :

i) Para pozisyonu substitüe edilmemiş veya nitro grubu bulunmayan fenollere Liebermann'ın indofenol testi, genel grup deneyi olarak uygulanabilir. Deney şöyle yapılır :

10-20 ml distilat, 2 defa 20 ml eterle ekstrakte edilir. Birleştirilen eter ekstresi bir kaç gram susuz Na_2SO_4 ilâvesiyle kurutulur. Cam pamuğundan süzülür ve 2 ml kalıncaya kadar uçurulur.

Böylece konsantre edilmiş eterli ekstreden bir kaç damla, küçük bir porselen kapsülde oda ısısında uçurulur.

Kalıntıya, 1 damla taze %1 NaNO_2 Konsantre sülfirik asit içinde hazırlanmış çözeltisi konur, bir bagetle karıştırıldıktan sonra bir damla su ilâve edilir. Genellikle su ilâvesi rengin şiddetlenmesine sebep olur. Karışım soğutulduktan sonra 1 damla 4 N NaOH ile kalevilendirilir ve meydana gelen renk değişmesi kaydedilir. Fenol ile mavi → kırmızı → yeşil; krezollerle koyu

kahverengi; timol ile yeşil → kırmızı → mavi renkler görülür. Bu deneyle 1 mikrogram (μg) fenol tanınabilir.

ii) FeCl_3 ile arama : 1 ml distilata; 1 damla %10 FeCl_3 ilâve edildiğinde viyole renk meydana gelir. Salisilik asitten farklı olarak, bu renk, mineral asit, amonyak veya alkol ilâvesiyle kaybolur. (Bu deney doğrudan doğruya 10 ml idrara 1 ml % 10 FeCl_3 ilâvesiyle de yapılabilir. Meydana gelen viyole renk ısıya dayanıklıdır).

iii) Millon deneyi : Küçük bir kapsüle, 1 damla distilat veya eterli ekstreden konur ve 1 damla Millon reaktifi damlatılır. Karışım bir kaç dakika bekletilir. Eğer bir renk değişimi görülmezse ısıtılır. Fenol, soğukta Millon reaktifi ile kırmızı renk verdiği halde, diğer fenoller ancak ısıtmadan sonra renk verirler. Bu deneyle 1 μg fenol tanınabilir. (Millon reaktifi: 10 g cıva, 20 ml konsantre nitrik asitte çözülür ve eşit hacimde su ilave ederek hazırlanır).

İdrarda fenolün diazolandırılmış p-nitroanilin ile tayini

Standard fenol çözeltileri (Kalibrasyon için)

a) Stok fenol çözeltisi : 0,5g saf fenol 10 ml suda çözülür. 4 ml hidroklorik asit ilavesinden sonra su ile 500 ml'ye tamamlanır (1 g fenol/l).

b) Seyreltilmiş fenol çözeltisi : 1 ml stok fenol çözeltisi su ile 100 ml'ye seyreltilir (10 μg fenol/ml)

Reaktifler :

1) Diazo Reaktifi : a) p-nitroanilin çözeltisi : 0,75 g p-nitroanilin 10 ml suda çözülür, 20 ml konsantre hidroklorik asit ilave edilir. Su ile 250 ml ye tamamlanır. b) Sodyum nitrit çözeltisi (% 5 lik NaNO_2) : 5 g sodyum nitrat suda çözülerek 100 ml ye tamamlanır. Kullanmadan hemen önce 25 ml (a) çözeltisi, 1.5 ml (b) çözeltisi ile karıştırılarak reaktif hazırlanır.

2) Sodyum asetat çözeltisi (% 50 lik)

Distilatta anilin aranması

İzonitril deneyi : 5 ml distilata veya 0.5 ml eterle konsantre edilen kalıntı 0.5 ml kloroform ve 2 ml % 20 NaOH ilâve edilir. Karışım kaynatılır. Anilin varsa izonitrilin karakteristik kokusu duyulur.

İndofenol (hipoklorit) deneyi : 0.5 distilata 3-5 damla kalsiyum veya sodyum hipoklorit çözeltisinden ilâve edilir. Anilin varsa karışımın rengi viyole-mavi veya mor-viyole olur ve zamanla renk kirli kırmızıya dönüşür. 2-3 damla % 2 fenol ve amonyak ilâvesiyle tekrar sabit mavi renk meydana gelir. Bu deney çok duyarlıdır.

Diazo deneyi : Kalıntı veya 0.5 ml distilat 2 N HCl ile asitlendirilir. 2 damla % 5 NaNO₂ ve 2 damla % 0.2 β-naftol (2N NaOH de hazırlanmış) ilâve edilir. Anilinle kırmızı renkli diazo-boyar maddesi meydana gelerek çöker. Bu deneyle 0.5 mikrogram anilin tanınabilir.

p-aminofenol aranması

Anilinin %80 kadarı aminofenole dönüşerek idrarla atılır. Bu nedenle anilinle zehirlenmelerde idrarda p-aminofenol aranır. Bunun için: 1 ml idrar 2-3 damla % 10 HCl ile asitlendirilir ve soğutulur. 2-3 damla % 1 NaNO₂, 2-3 damla taze %1 α-naftol çözeltisi (% 10 NaOH de hazırlanmış) ilâve edilir. Kırmızı renk p-aminofenol olduğunu gösterir. (Kontrol deneyi yapılmalıdır. Fazla miktarda α-naftol yanıltıcı sonuç verebilir. p-aminofenol tayini için parasetamole bakınız).

Methemoglobin tayini (spektrofotometrik yöntem)

Anilinle zehirlenmelerde, kanda methemoglobinemi oluşur. Bunun için methemoglobin tayini zehirlenmenin teşhisinde yardımcı olur. Burada laboratuvarımızda yapılan bir araştırmada kullanılan methemoglobin tayini açıklanmıştır (Vural, N.; Kahraman, R. 1988).

Yöntemin Prensipleri : Methemoglobin (MetHb) seyreltik asitli ortamda 630 nm'de karakteristik bir absorpsiyon bandı verir. Siyanür ilavesi ile MetHb, siyanmethemoglobine (CNMetHB) dönüşür ve absorpsiyonda düşme olur. Bu absorbans farkı MetHb miktarı ile orantılıdır. MetHb yüzdesinin ölçülmesi için, kan örneğinin diğer kısmını potasyum ferri siyanürle muamele edilir ve kandaki tüm hemoglobin, methemoglobine dönüştürülür. Siyanür ilavesinden sonraki absorbans değişimi total Hb miktarını verir.

Reaktifler :

0.07 M fosfat tamponu (pH 6,6) : 5,67 g anilin monopotasyum fosfat (KH_2PO_4) ve 3,55 g disodyum fosfat (Na_2HPO_4) suda çözülerek 1 litreye tamamlanır. pH kontrol edilir, gerekirse ayarlaması yapılır.

0.017 M fosfat tamponu (pH 6,6) : Stok 0,07 M fosfat tamponu 1:4 oranında seyreltilerek hazırlanır.

Potasyum siyanür (KCN), saf granüle.

Potasyum ferri siyanür ($\text{K}_3(\text{CN})_6$), kristal.

Triton-X 100 veya diğer bir noniyonik aktif madde.

Teknik : İyi karıştırılmış 0,2 ml 0,17 M fosfat tamponu içine ilave edilir. Küçük bir damla Triton-x 100 ilave ederek, tersyüz edilir. Karışım analiz tamamlanıncaya kadar bekletilir. Eğer tam berrak değilse, santrifüj edilir.

Hemoliz olmuş kanın bir kısmı spektrofotometre küvetine aktarılır ve 630 nm'de fosfat tamponuna karşı (kör) absorbans oluşur (A_1). Küvete birkaç mikrogram KCN ilave edilir ve karıştırılır. Tekrar absorbans 630 nm. de okunur (A_2). Eğer absorbans değişmeli ise ($A_1 = A_2$), o zaman MetHb yoktur ve işleme devam edilmez.

Kan örneğinin diğer bir kısmı, yukarıda açıklandığı şekilde fosfat tamponu ile seyreltilir ve hemoliz edilir. 5 mg potasyum ferrisiyanür ilave

edilerek karıştırılır. Karışım, temiz bir spektrofotometre küvete aktarılır. Absorbans 630 nm’de fosfat tamponuna karşı okunur (A₃)

Birkaç miligram potasyum ferro siyanür ilavesinden sonra karıştırılır ve tekrar fosfat tamponuna karşı 630 nm ile absorbansı okunur (A₄).

Kalibrasyon :

Yukarıda ölçülen absorbanslar aşağıdaki formüle konarak % MetHb hesaplanır.

$$\frac{A_1 - A_2}{A_3 - A_4} \times 100 = \% \text{ MetHb (saturasyon yüzdesi)}$$

Sonucun değerlendirilmesi : Normal kişilerde % 0,5 g kadar MetHb bulunabilir. MetHb nemi yapan ilaçlar ve kimyasal maddeler MetHb düzeyi artabilir. MetHb düzeyi % 10–15 olduğunda siyanozis görülür.

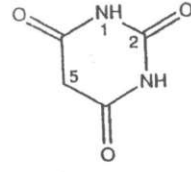
Ayrıca MetHb düzeyi yangın olaylarında, ekzos gazına bağlı zehirlenmelerde yükselebilir.

MetHb tayininde heparinize venöz veya arteriyal kan kullanılabilir. Hemoliz olmamış kan örnekleri buz dolabında birkaç saat saklanabilir. Fakat analiz tercihen en kısa zamanda yapılmaktadır. Çünkü alınan kan örneğindeki MetHb oldukça tuzlu bir şekilde bozunabilir (Bauer, S.D., 1970).

3. UÇUCU OLMAYAN ORGANİK ZEHİRLERİN BİYOLOJİK MATERYALDE ANALİZLERİ

Bu bölümde sık zehirlenmelere neden olan ilaçlar kullanılmaz kontrol altında olan ilacın maddelerle, toksikolojide önemli olan bazı pestisitlerin analizinden bahsedilecektir. Uçucu olmayan organik bileşik yapısında olan bu maddeler biyolojik materyalden ekstraksiyonla izole edilirler.

2.1. Barbitüratlar



Barbitüratlar, barbitürik asitin 5,5- disubstitüe türevleridir. Ayrıca 1 no'lu pozisyondaki azot da metillenebilir (metil fenobarbital gibi). Çok kullanılan barbitüratlara örnek olarak amobarbital (5-etil- 5- izopen-tilbarbitürik asit), barbital (5,5 dietilbarbitürik asit), pentobarbital (5-etil-5) (1-metilbütül) barbitürik asit), fenobarbital (5-etil-5-fenilbarbitürikasit), secobarbital (5-allil-5 (1-tilbütül) barbitürik asit) ve tiyopental (5-etil-5 (1 metilbütül)-2- tiyobarbitürik asit) örnek verilebilir.

Barbitüratların moleköl ağırlıkları yaklaşık 226 ile 242 arasında değişir. Genel olarak kokusuz, acı lezzette beyaz toz kristal halindedirler. Zayıf asit yapıda olup, suda çözünmezler.

Barbitüratlar, potent hipnotik ve sedatif etkilidirler. Barbitüratlardan sadece tiyopental (iv yolla) ve fenobarbital geniş bir alanda kullanılırlar. Bağımlılık yapan maddelerdir. Ülkemizde suistimallerinin engellenmesi için kullanımları "yeşil reçeteye" bağlanmışır.

Barbitüratlarla akut zehirlenmede, uzun, kısa veya orta etkili barbitürat zehirlenmesi olup olmadığı belirlenmelidir. Bunun nedeni, uzun etkili barbitüratların (barbital veya fenobarbital gibi) atılımı alkali diürezis ile hızlandırılabilir, fakat diğerlerinin atılımlarını etkilemez. Barbitüratların insanda minimal letal dozları 1-6 g/kg arasında değişir.

Barbitüratların genel olarak tanımlanmaları için ekstrakta uygulanan bazı renk reaksiyonlar vardır. Ancak kalitatif analizleri için en iyi yöntem, idrar, mide muhtevası veya olay yerinden elde edilen örneklerden ekstraksiyonla izole edildikten sonra İTK ile identifikasyonlardır. Bu şekilde barbitürat cinsini de saptamak mümkün olabilir.

Barbituratların total tayinleri spektrofotometrik yöntemle yapılabilir. Bu yöntem numunenin ekstraksiyondan sonra, pH 11 den pH 2 ye kadar spektrol kaymalarının karakteristik olmasına dayanır. Aşağıda bu yöntem açıklanmıştır. Ancak bu analiz için "çift ışın demetli" spektrofotometre gereklidir.

Barbitüratların ayrılması ve ayrı ayrı tayinleri duyarlı ve kesin olarak, GLK veya HPLC ile gerçekleştirilebilir.

Barbitüratların idrardan izolasyonları ve tanınmaları

Barbitüratlar idrardan asit ortamda ekstraksiyonla izole edilirler. 100 ml idrar bir ayırma hunisine konularak N HCl veya seyreltik H₂SO₄ getirilir. 2 defa 50 ml eterle ekstrakte edilir. Eter ekstraktları 2 katlı kuru filtre kağıdından süzülerek eser miktardaki suyun uzaklaştırılması sağlanmış olur. Eter fazı ılık su banyosunda uçurulur.

Kalıntı sarı renkte ise, 15 ml kloroformda çözülür. Az bir miktar (kibrit çöpü başı büyüklüğünde) hayvansal kömür konularak karıştırılır. Karışım küçük bir behere süzülür. 1-2 ml kalıncaya kadar uçurulur.

Kloroform ekstraktında barbitüratların aranması :

Parri deneyi : Birkaç damla kloroform ekstraktı mikro bir tüpe konur. 2 damla %1 kobalt nitrat veya kobalt asetat (susuz metil alkolde hazırlanmış) ilave edilir. Karışıma 3 damla %5 izopropilamin (susuz metil alkol içinde) yavaşça damlatılır.

HgNO₃ ile çökme deneyi : Kloroform kalıntısından bir miktar alınarak suda doymuş çözeltisi hazırlanır. 1 damla (Hg +HNO₃) reaktifinden damlatılır. Fenobarbital (luminal), noktal (noctal), fanadorn (phanadorn), barbital (veronal) ile beyaz bir çökelek olmaz.

KMnO₄ ile indirgeme : 0.2 g kadar kalıntı, 2 ml su ile ısıtılır ve soğuduktan sonra süzülür. Süzüntüde, doymamış bağlı radikaller ihtiva eden

barbitüratlardan (evipan, noktal, fanadorn gibi) varsa, iki damla % .1 KMnO_4 çözeltisi damlatıldığında, bir dakika içerisinde permanganatın rengi kaybolur. Luminal, veronal, prominal ise çift bağlı radikalleri olmadığından indirgenmezler.

Barbitüratların İTK ile identifikasyonları

İdrardan yukarıdaki teknikle izole edilen kalıntıların İTK ne uygulanarak hangi barbitürat olduğunu tanımlamak mümkündür. İTK ile daha az miktarda idrarla (20 ml) sonuç alınabilir.

Aşağıdaki laboratuvarımızda uyguladığımız ekstraksiyon İTK tekniği verilmiştir.

Gerekli reaktifler :

Barbitürat standartları (Saf aktif maddeler) : (Metanolde % 0.1 lik); Barbitol (Dietil barbitürik asit); Feobarbitol (Etilfenil barbitürik asit); Phnobarbitol (Etilpentil barbitürik asit); Phanadorn - ((İpnos) (Siknohekzenil etil barbitürik asit); Itobarbitol (Allil isobutil Phnobarbitol barbitürik asit)

Püskürtme reaktifleri:

a) % 2 HgNO_3 (%1 HgNO_3 'te) ; b) % 0.1 Rhodamin B (Etil alkolde). Kullanılmadan önce (a) ve (b) eşit hacimde karıştırılır.
c) % 0.04 Flourscein (Etil alkolde)

Developman çözeltileri :

(Kloroform : absölü etanol : % 25 NH_3) : (50:40:10) hacmen (D_1)
(Kloroform : aseton : % 25 NH_3) : (40:72:8) hacmen (D_2)
(Sitrat tamponu (pH 2.2) : a) 1.187 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ distile su ile 100 ml ye tamamlanır. b) 0.1M sitrik asit. 20 ml (a) çözeltisi ile 950 ml (b) çözeltisi karıştırılır.

Aktif kömür (hayvansal):

Teknik : 20 ml idrara, 10 ml tampon (pH 2.2) ve 15 ml kloroform ilavesinden sonra cam kapaklı bir erlenmayerde 15 dakika sık aralarla çalkalanır. Santrifüj tüpüne aktararak 1500 r.p.m. de 30 dakika santrifüj edilir. Kloroform fazı ayrıldıktan sonra, aynı işlem 15 ml kloroform ile tekrarlanır. Birleştirilen kloroform fazları 500 mg aktif hayvansal kömürle 5 dakika kadar çalkalanır ve süzildükten sonra da oda ısısında uçurulur.

Kalıntı pek az metanolde çözülerek, adsorban tabakaya (Silikagel – G) 20 µl kadar nümune uygulanır. Developmandan sonra kromatogramlarının değerlendirilmesi için yalnız HgNO₃ veya HgNO₃ ve arkadan (HgNO₃ + Rhodamin B) reaktifi püskürtülür. Barbitüratlar HgNO₃ ile beyaz leke verir (duyarlılık 5 µg) HgNO₃ ve Rhodamin B + HgNO₃ reaktiflerinin kombine uygulanmasında ise pembe – viyole renk elde edilir. Tablo 15’de bazı barbitüratlarla elde edilen R_f degerleri görülmektedir.

Tablo 15 - Bazı developman çözeltileri ile barbitüratların silikagel – Gtabakada verdikleri R_f değerleri.

	R _{f1}	R _{f2}
Fenobarbital	0.45	0.25
Barbital	0.59	0.30
Fanadorn	0.66	0.32
Itobarbital	0.68	0.38
Pentobarbital	0.78	0.48

Not : R_{f1}:D₁; R_{f2}:D₂ ile elde edilen değerler (Barbitüratların İTK ile ayrılmaları için genel bölüme bakınız.)

Barbitüratların kanda ultraviyole alanda spektral kayma yöntemi ile kantitatif analizleri

Bu amaçla biyolojik materyal olarak tam kan, plazma veya serum kullanılabilir.

1) 5 ml numune 1 damla %5 lik sülfirik asit ile hafif asitlendirilir ve 25 ml kloroform ile ekstrakte edilir. Kloroform fazı süzülür ve 5 ml 0,5 N sodyum hidroksit ile çalkalanır. Sodyum hidroksit fazı ayrılır, kalabilen kloroform damlaları santifüjle ayrılır. UV alanında (220-300 nm) arasında spektrumu alınır.

Barbitüratlar bazik ortamda, 255 nm de maksimum, 235 nm de ise minimum absorbans gösterirler. 255 nm de gösterilen absorbans ölçümünden, standardla hazırlanan eğimden yararlanarak kantitatif tayin yapılabilir. Bu testin duyarlılığı 2 µg/5 ml kandır.

2) Barbitüratların, farklı pH:2 ve pH:10 da gösterdikleri absorbans kaymasından yararlanarak daha duyarlı ve spesifik tayini ise aşağıda açıklanmıştır.

Reaktifler :

- Borat tamponu (pH 8.4) : 22.4 g disodyum tetraborat 76 ml sulu hidroklorik asit (1 mol/l) ile karıştırılır ve saf su ile 2 litreye tamamlanır.
- Seyreltik hidroklorik asit (2 mol/l)
- Konsantre sülfirik asit (d:1.84)
- Konsantre amonyum hidroksit (d:0,88)
- Sodyum sülfat / aktif kömür karışımı : 100 mg aktif kömür, 100 g susuz sodyum sülfat ile karıştırılır ve bir 100°C de 8 saat ısıtılır. Soğuduktan sonra ağzı sıkı kapalı bir şişede saklanır, ısıtılır. Soğuduktan sonra ağzı sıkı kapaklı bir şişede saklanır.

Standardlar :

İnsan plazması içinde 5,10,25 ve 50 µg/l konsantrasyonda barbital içerecek şekilde stok sodyum barbital çözeltisinden (1.12 g/l : 1.00 g/l dietil barbitürik asite eşdeğer) seri standardlar hazırlanır.

Teknik : 250 ml lik bir ayırma hunisine 5 ml nümune (kan, serum ve plazma), 2 ml hidroklorik asit ve 60 ml dietil eter konur. Huninin kapağı su ile ıslanarak kapatılır ve dikkatle 2 dakika çalkalanır. Karışım 5 dakika bekletilir, fazlar ayrıldıktan sonra alt (sulu) faz, huninin altından uzaklaştırılır.

Dietil eter fazı, ikinci bir hunide bulunan 10 ml borat tamponu üzerine aktarılır ve 1 dakika çalkalanır. 5 dakika bekledikten sonra alt faz atılır. Huninin iç çevresi 5 ml su ile temizlenir, 5 dakika beklenir ve tekrar alt faz atılır. Eter traktına 4 g kadar sodyum sülfat / aktif kömür karışımı ilave edilir, karıştırılır.

Ekstrakt, faz ayıran filtre kağıdından 150 ml lik bir balonjojeye süzülür. Ayırma hunisine 20 ml daha eter ilave edilerek ekstraksiyon yapılır. Ekstrakt, önceki ekstraktı içeren balonjojeye süzülür. Ekstraktlar basınçlı hava veya azot akımında 40°C de kuruluğa kadar uçurulur.

Kalıntıya 5.0 ml distile su ilave edilerek dikkatle karıştırılır, 5 dakika bekletilir. Çözelti, faz ayırıcı filtre kağıdından 12,5 ml lik bir test tüpüne süzülür.

Filtrattan 4 ml alınarak, spektrofotometre küvetine aktarılır. 50 µl konsantrasyon amonyum hidroksit ilave ederek, pH'nın 10 civarında olup olmadığı universal pH kağıdı ile kontrol edilir.

Sıfır ayarı 240 nm de kontrol edilmiş "double beam" bir spektrofotometrede, karışımın absorbansı 240 nm de suya karşı okunur. Eğer,

mümkünse, spektrofotometrede 200 - 450 nm arasında çözeltinin spektrumu alınır spektrofotometrede okunur ve tarama işlemi 5 dakika sonra tekrarlanır.

Küvete 0.1 ml konsantre sülfirik asit ilave edilerek, karıştırılır ve pH'nın 2 olup olmadığı kontrol edilir. 240 nm de karışımın absorbansı okunur, 200-450 nm de spektrumu alınır.

Sonuç: UV absorpsiyonu ve spektrumunu birçok maddeler interfere edebilir. Örneğin glutetmid, kalevi ortamda hidroliz olarak, 240 nm de (pH 11 de) absorbansın belirgin şekilde düşmesine neden olur. Metakualon, fenazon gibi maddeler 200-450 nm arasında spektromu etkileyebilirler. pH'si 10 olan ekstrakta 0.1 ml seyreltik sodyum hidroksit (2 mol/l) çözeltisi ilave edilerek, (pH 14) tekrar spektrumu alındığında oluşan spektral değişme, barbitüratların kalitatif analizler için yararlı olur.

Kantitatif analiz : pH 2 ve pH 10 da, 240 nm deki absorbans farkı ölçülür. Standard barbitürat çözeltileri ile hazırlanan kalibrasyon eğrisinden yararlanarak miktar tayini yapılabilir.

Veya aşağıdaki formülle barbitürat konsantrasyonu (C) hesaplanabilir.

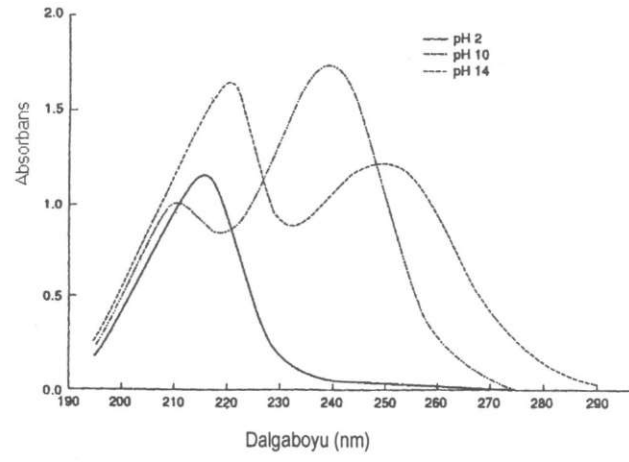
$$c \text{ (mg / l)} = a_{10} - a_2 \times 25 \times \text{dilüsyon faktörü (varsa)}$$

a_{10} : pH 10 daki absorpsiyon

a_2 : pH 2 daki absorpsiyon

yöntemin duyarlılığı 2 ml barbitürat /l dir.

Şekil 18'de, sodyum barbitalin çeşitli pH de UV alanındaki spektrumları görülmektedir.



Şekil 18- Sodyum barbitalin değişim değişik pH da UV spektrumu

Barbituratların GLK ile identifikasyon ve tayinleri

GLK ile serum veya plazmada barbitüratların identifikasyonu için genelde SE-30 ve poly A 103 sıvı fazlar kullanılır.

Burada SE-30 içeren kolon kullanarak, GLK ile barbitürat analizi açıklanmıştır. (Moffar A.C ve ark. 1986; Vural. N ve Aksu. N., 1992)

Standartlar : 10 µg/ml konsantrasyonda barbitürat standartları (barbital, butobarbital, pentobarbital gibi) kloroform içinde hazırlanır.

Teknik: 100 µl serum 10 µl fosfat tamponu (pH 5.6) ilave edilir ve 100 µl kloroform ile ekstrakte edilir. İç standard olarak tetrafenil etilen (10 µg/ml) ekstraksiyondan önce kloroform içine ilave edilir. Ekstraksiyon için karışım 30 saniye çalkalanır. 5-10 dakika 3000 rpm de santrifüj edilir. Kloroform ekstraktı doğrudan gaz kromatografa enjekte edilir.

Gaz kromatografisi koşulları : Sabit faz %3 SE-30 "Chromosorb WHP 80-100 misli üstünde", Detektör : FID; kolon 2m x 3 mm iç çap ; Enjeksiyon giriş sıcaklığı : 220-240°C ; Detektör sıcaklığı : 220°C ; fırın sıcaklığı : 180-

220⁰ C; taşıyıcı gaz (ozon) akış hızı : 40 ml/dakika ; hidrojen akış hızı : 30 ml/dakika; hava akış hızı ; 300 ml/dakika.

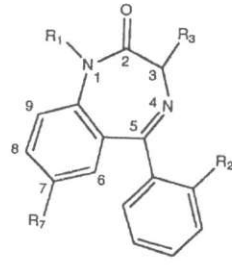
Elde edilen kromatogramların alıkonma zamanları ve pik yükseklikleri standartlarla karşılaştırılarak kalitatif ve kantitatif değerlendirme yapılır.

Analiz sonucunun yorumu

Aşırı dozda barbitürat alımı, periferel vazodilatasyon, hipotansiyon, şok, hipoventilasyon, hipotermi, koma, konvülsiyonlar ve renal yetmezliğe neden olur. Ölüm solunumu veya kalp solunumu durması sonucu oluşur.

Plazma barbitürat düzeyi uzun etkililer için 10 mg/l üstünde olduğunda (barbital ve fenobarbital için 50 mg/l) toksisite şiddetlidir. Koma görülebilir. Kısa ve orta etkililer için 3 mg/l üstünde şiddetli toksisite ve ölüm görülebilir.

2.2. Benzodiazepinler



Benzodiazepinlerin genel yapısı aşağıda gösterilmiştir. Sayıları 60 kadar olan bu grup ilaçların arasında diazepam, flurazepam, klordiazepoksit, klornazepam, lorazepam, nitrazepam, oksazepam en çok bilinenlerdir.

Tablo 16'da önemli benzodiazepinler gösterilmiştir.

Benzodiazepinler genelde trankilizan; bazıları ise (Klobazam, klonezepam ve diazem) ayrıca antikonvülzan olarak kullanılırlar. Temazepam özellikle diğer ilaçlarla birlikte suistimal edilir. Benzodiazepinlerin çoğu tamamen metabolize olurlar ve bu gruptaki birçok benzodiazepinler diğerlerinin metabolitidir. Örneğin diazepam, nordazepam, oksazepam (3-

hidroksinordazepam) ve temazepam (3-hidroksidiazepam) metabolize olarak glukuronid veya sülfat konjugatı şeklinde atılır.

Tablo 16. Bazı önemli benzodiazepinler

Bileşik	Kimyasal ismi	Molekül kütlesi
Klordiazepoxid	7-kloro-2-metilamino-5-fenil(3H-1,4-benzodiazepin 4-oksit	300
Klobazam	7-kloro-1-metil-5-fenil-1H-1,5-benzodiazepin-2,4(3H,5H)-dion	301
Klonazepam	5-(2-klorofenil)-1,3-dihidro-7-nitro-2H-1,4-benzodiazepin-2-on	316
Diazepam	7-kloro-1,3-dihidro-1-metil-5-fenil-2H-1,4-benzodiazepin-2-on	285
Flurazepam	7-kloro-1-(2-dietilaminoetil)-5-(2-florofenil)-1,3-dihidro-2H-1,4-benzodiazepin-2-on	388
Lorazepam	7-kloro-5-(2-klorofenil)-1,3-dihidro-3-hidroksi-2,H-1,4-benzodiazepin-2-on	321
Nitrazepam	1,3-dihidro-7-nitro-5-fenil-2,H-1,4-benzodiazepin-2-on	281
Oxazepam	7-kloro-1,3-dihidro-3-hidroksi-5-fenil-2,H-1,4-benzodiazepin-2-on	287
Temazepam	7-kloro-1,3-dihidro-3-hidroksi-1-metil-5-fenil-2,H-1,4-benzodiazepin-2-on	301

Benzodiazepinler için güvenilir bir renk reaksiyon yoktur. Bununla beraber, birçok benzodiazepinler ve konjugatları, asit hidrolizle aminobenzofenonları verirler. Bu hidroliz ürünler ekstrakte edilip İTK ile identifikasyonlar yapılabilir. Bu amaçla iki farklı renk reaksiyon kullanılır. Bunlardan biri nitrik asit/N-(1-naftil) etilendiaminle verdikleri renk reaksiyonu (Bratton–Marshall reaksiyonu); diğeri ise p-dimetilamino-kinnamaldehytle oluşturdıkları renk reaksiyonudur.

Benzofenonların İTK ile kalitatif analizleri

Reaktifler :

- Konsantre (d:1.18) ve sulu hidroklorik asit (1 mol/l)
- p-dimetilamino sinnamaldehit çözeltisi (5 g/l suda)
- Trikloroasetik asit çözeltisi (500 g/l suda)
- Sülfürik asit (500 ml/l)
- Sodyum nitrit çözeltisi (10 g/l, taze hazırlanmış)
- Amonyum sülfamat çözeltisi (50 g/l)
- N- (1-naftil) etilen diamin hidroklorür (10 g/l) seyreltik hidroklorik asit içinde (1 mol/l)

Standartlar : Değişik benzodiazepinlerin (klordiazepoksit, oksazepam, diazepam, nitrazepam gibi) , 100 mg/l konsantrasyonda (sulu HCl içinde) çözeltileri hazırlanır.

Yöntem : İdrar, mide içeriği ve olay yerinden elde edilen kalıntılara uygulanabilir.

10 ml örneğe, 30 ml lik cam kapaklı bir tüpte 3 ml konsantre hidroklorik asit ilave ederek karıştırılır. Tüpün kapağı açılarak, çeker ocakta, kaynar su banyosunda 30 dakika bekletilir.

Karışım soğuduktan sonra, 10 ml petrol eteri ilave edilir, tüpün ağzı kapatılır ve 10 dakika dikkatle karıştırılır. 5 dakika santrifüj edildikten sonra, üst faz temiz bir tüpe aktarılır. Ekstrakt basınçlı hava veya azot akımında 60°C de kuruluğa kadar uçurulur.

Benzodiazepin standartlarına da aynı işlem uygulanır.

İTK ya uygulama : Kalıntı 100 µl petrol eterinde çözülür. Silikagel-G ile kaplanmış, 10x20 cm boyutundaki cam levhalar dört kolona (2 çift kolon)

ayrılır. Her bir çift kolona sırası ile 25 µl nümune ve standard ekstraktları damlatılır.

Numune ve standart uygulanmış silikagel-G tabaka, toluen/buzlu asetik asit (97:3) le önceden doyurulmuş kromatograf tankında, developze edilir. Çözücü yüksekliği 10 cm ye kadar ilerledikten sonra, levha tanktan çıkarılır ve kurumaya bırakılır.

Renklendirme : İlk 2 kolona p-dimetilaminosinnam aldehit çözeltisi ve ardından trikloroasetik asit çözeltisi püskürtülür.

Kalan diğer iki kolona sırası ile sülfürik asit, sodyum nitrit çözeltisi, amonyum sulfamat çözeltisi ve N-(1-naftil) etilendiamin hidroklorür çözeltisi püskürtülür (Bratton –Marshall reaksiyonu). Her reaktif püskürtülmesinden sonra, tabakanın kuruması için bekletilir. Oluşan renkler standartlarla karşılaştırılır.(Tablo 17)

Tablo 17- : Benzofenonların İTK da renk reaktifleri ile verdikleri renkler.

Benzofenon	Oluştugu benzodiazepin	A*	B**
Metilaminoklorobenzofenon	Diazepam Temazepam		mor
Aminoklorobenzofenon	Oksazepam Klordiazepoksit Nordazepam	mor	mor
Aminodiklorobenzofenon	Lorazepam	mor	mor
Aminonitrobenzofenon	Nitrazepam	pembe	mor
Diaminobenzofenon	Nitrazepam	mor	Mavi
Aminonitroklorobenzofenon	Klonazepam	pembe	Mavi

A* ; renk reaktifi : p-dimetil amino cinnamaldehit, trikloroasetik asit;

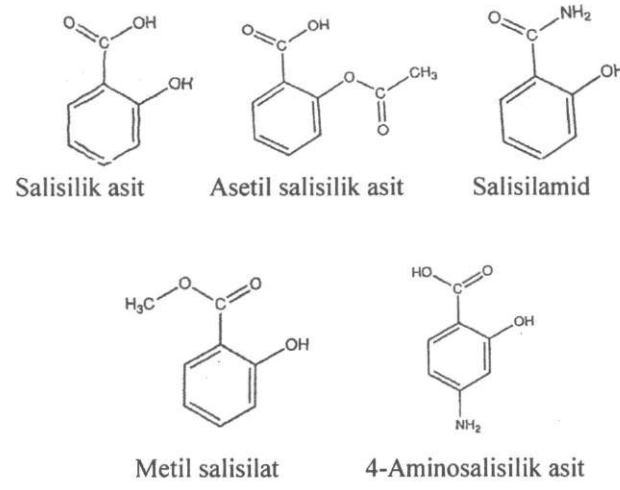
B* ; Bratton –Marshall reaksiyonu

Bu yöntemle, bir çok benzodiazepinler idrarda hidrolizle metilamino-klorbenzofenon ve/veya aminokloro benzofenon verdikleri için, sonucun yorumu zorlaşabilir. Örneğin temazepam veya oksazepam ile diazepam veya nordazepamı ayırt etmek mümkün değildir.

Bunun dışında, medazepam, triazolam, klobazam, norklobazam ve midazolam hidroliz ile benzofenon vermezler.

Bu yöntemle 1 mg/l (aminoklorobenzofenon olarak) madde tanınabilir

2.3. Salisilik Asit ve Türevleri



Genel olarak nonnarkotik analjezikler grubunda olan salisilik asitin başlıca türevleri aşağıda açıklanmıştır.

Salisilik asitin (2-hidroksibenzoik asit) ($C_7H_6O_3$) kendisi topikal olarak çeşitli dermatolojik bozuklukların tedavisinde kullanılır. Molekül kütlesi 138 dir. Asetik salisilik asitin plazmadaki başlıca metaboliti salisilik asittir. Ayrıca metil salisilat ve salisilamidin de metabolitidir. İdrarla başlıca

glisin konjugatı (salisilürik asit) şeklinde atılır. Salisilik asit türevlerinin kullanma yerleri aşağıda kısaca açıklanmıştır

Asetil salisilik asit (aspirin) : ($C_9H_8O_4$) salisilik asitin ilaç olarak en çok kullanılan türevidir. Molekül kütlesi 180 dir. Asetilsalisilik asit analjezik olarak kullanılır. Minimum letal dozu 15 g dır. Plazma esterazları tarafından in vivo olarak çok çabuk salisilik asite hidroliz olur ve glisin konjugatı şeklinde idrarla atılır.

p-aminosalisilik asit : PAS veya 4-amino-2-hidroksi benzoik asit ($C_7H_7NO_3$), molekül kütlesi 151 dir. Tüberküloz tedavisinde kullanılır.

Metil salisilat : Metil-2-hidroksibenzoat, salisilik asit metil esteri ($C_8H_8O_3$), molekül kütlesi 152 dir. Metil salisilat (keklik üzümü yağı), oda sıcaklığında sıvı bir madde olup kuvvetli bir kokusu vardır ve topikal ilaçlar içinde yaygın olarak kullanılır. Oral yolla asetil salisilik asite göre daha çok toksiktir. Çünkü daha çabuk absorbe olur. Oral yolla çocuklarda 4 ml, yetişkinlerde 30 ml, genelde ölüme neden olur. Metil salisilat, kısmen in vivo olarak salisilik asite metabolize olur.

Salisilamid : 2 hidroksibenzamid ($C_7H_7NO_2$), molekül kütlesi 137 dir. Analjezik olarak kullanılır. Hidrolizle salisilik asit verir.

Salisilatlar, demir-3- (ferri) iyonları ile mor renk verir. Bu reaksiyona dayanan kalitatif ve kantitatif yöntemlerin uygulanması aşağıda açıklanmıştır.

Asetilsalisilik asit ve metil salisilat, ferri iyonları ile bu reaksiyonu vermezler. Bu nedenle alınan örneklerin (mide içeriği olay yeri kalıntıları) analizden önce hidrolizleri gerekir. Salisilamid de idrarda ancak hidrolizden sonra tanınabilir.

Salisilatların kalitatif analizi

Bu deney mide içeriği, idrar ve olay yerinden alınan örneklerle (zehirlenen kişi çevresinde bulunan ambalaj, şişe veya diğer kalıntılara) uygulanır.

Salisilatların kalitatif ve kantitatif analizinde en çok, demir-3- iyonunu viyole renkli kompleks vermelerine dayanan renk reaksiyon kullanılır. Bu amaçla, Trinder reaktifi kullanılır.

Trinder reaktifi : 40 g merkür (cıva -2) klorür, 850 ml saf su ve 120 ml sulu hidroklorik asit (1 mol/l) içinde çözülür, 40 g sulu demir -3- nitrat ilave edilir, su ile 1 litreye tamamlanır.

Yöntem : 2 ml örneğe 0,1 ml Trinder reaktifi ilave edilerek 5 saniye karıştırılır. İdrar, mide içeriği, olay yerinden elde edilen örneklerde asetilsalisilik asit ve metil salisilat, ayrıca idrarda salisilamid aranacaksa: önce 1 ml örnek 1 ml sulu hidroklorik asit (0,1 mol/l) 10 dakika kaynatılır, soğuduktan sonra gerekirse süzülür. Süzüntü 1 ml sodyum hidroksitle (0,1 mol/l) nötralize edilir. Sonra 1 ml Trinder reaktifi ilave edilerek 5 saniye karıştırılır. Viyole rengin oluşması, salisilatların varlığını gösterir. Koruyucu madde olarak asit varsa, bu deneyle kuvvetli reaksiyon verir; idrarda yüksek konsantrasyonda keton cisimleri varsa, hafif (yanlış) pozitif sonuçlar alınır.

Bu deneyle tedavi dozunda alınan salisilik asit ve türevlerinin tanınması mümkün olur.

Salisilatların spektrofotometrik yöntemle tayini

Serum, plazma, idrar veya serebrospinal sıvıda salisilatlar demir-3 klorürle verdikleri renk reaksiyonuna dayanarak ile tayin edilebilir. Serumda proteinlerin çöktürülmesi cıva-2- klorürle ($HgCl_2$) yapılır. Bu nedenle, $HgCl_2$ ve hidroklorik asit içeren kombine Trinder reaktifi kullanılır.

Trinder reaktifi (kombine) : Kalitatif testte açıklandığı şekilde hazırlanır. Ortamda fazla hidroklorik asit olması, viyole rengin şiddetini azaltabilir. Bu nedenle reaktifin asiditesi 0,12 N'den fazla olmamalıdır.

Standart salisilat çözeltileri : 0, 200, 400 ve 800 mg/l konsantrasyonlarda salisilik asit içerecek şekilde su içinde hazırlanır. +4°C de saklanır.

Kanda (plazma veya serumda) salisilat tayini :

1 ml plazma veya serum 5 ml Trinder reaktifi ilave edilir. 30 saniye vortekste karıştırılır. 5 dakika santrifüj edilir.

Süpernatant (üst faz) bir tüpe aktarılır. Salisilat varlığında oluşan Viyole renkli çözeltinin absorbansı 540 nm de spektrofotometrede köre karşı okunur. Kör (blank) 1 ml ilaç içermeyen serum 5 ml Trinder reaktifi ilave ederek, numunede olduğu gibi paralel çalışarak hazırlanır. Duyarlık 50 mg salisilat/l dir.

Hazırlanan standartlarla, numunede olduğu gibi aynı teknik uygulanır. Konsantrasyona (apsis) karşı absorbans (ordinat) işaretlenerek grafik hazırlanır. Serum salisilat düzeyi, bu hazırlanan kalibrasyon eğrisinden hesaplanır.

İdrarda salisilat tayini : Trinder yöntemi esas alınarak, Chiou ve Onyemelukwe'nin (1974) geliştirdiği spektrofotometrik yöntemi ile tayin edilebilir. (Aksoy,H, N., 1997 Y.Lisans tezi)

Teknik : 3 ml idrara, 2 ml konsantre hidroklorik asit ilave edilir. Bir gece (17 saat) 100°C de hidroliz için inkübasyona tabi tutulur. Tüp soğuduktan sonra 0,5 ml 6 N HCl ve 6 ml kloroform ilave edilir. 5 dakika santrifüj edilir, sulu faz atılır. 3 ml lik kloroform fazı başka bir tüpe aktarılır. 6 ml civa-2- klorür içermeyen Trinder reaktifi ilave edilir. (40g 8 mol su içeren demir-3- nitratla 10 ml konsantre hidroklorik asit ilave edilir, iyice çözüldükten sonra distile su ile 1 litreye tamamlanır.)

Tüp 10 dakika çalkalanır ve santrifüj edilir. Kloroform tabakası aspüre edilir. Sulu fazın absorbanşı 540 nm de idrarla hazırlanan köre karşı okunur.

Kalibrasyon : Standartlarla (0,125; 0,25; 0,5; 1 ve 2 mg/l salisilat içeren) deney uygulanır. Hazırlanan eğriden, idrar salisilat konsantrasyonu hesaplanır.

Not : İdrarda salisilat seruma uygulanan teknikle de tayin edilebilir. Ancak önce idrar 10-40 mg salisilik asit /100 ml idrar içerecek şekilde su ile seyreltilir. Genelde idrar örneğine santifüj uygulaması yapılmaz. Ancak gerektiğinde santrifüj edilir. Bu durumda salisilat içermeyen idrara (kör) da aynı işlem uygulanmaktadır (Trinder, P., 1954).

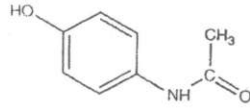
Analiz sonucun yorumu

Salisilat zehirlenmesinde metabolik asidozis karakteristiktir. Bu nedenle kan gazları analizi zehirlenmenin şiddeti hakkında bilgi verir. Akut zehirlenme şüphesi olduğunda, plazma salisilat konsantrasyonu tayin edilmelidir. Tedavide salisilat konsantrasyonunun izlenmesi ve kan pH sınırın ölçülmesi önemlidir.

Yetişkinlerde tedavi sırasında plazma salisilat düzeyi 30 mg/100 ml ye kadar yükselebilir. Şiddetli zehirlenmelerde, bu değer, 90-120 mg/100 ml; orta derecede zehirlenmelerde ise 65-90 mg/100 ml arasındadır. Kandaki salisilat düzeyi 120 mg/100 ml yi aştığında letal dozda salisilat alınmıştır, koma ve ölüm görülür. Genel olarak letal doz 30 gram civarındadır. (325 mg lik aspirin tabletinden 105 adet alındığında).

Yaptığımız bir araştırmada, salisilat zehirlenmelerinde çocuklarda ortalama kan salisilat düzeyi 28.53 ± 13.22 mg/100 ml; yetişkinlerde ise 52.73 ± 30.87 mg/100 ml saptanmıştır (Küpçü,Ş., Vural.N., 1993).

2.4. Parasetamol



Nonnarkotik analjeziklerden olan parasetamol veya sinonimi olan asetaminofen; N-asetil-p-aminofenol: $C_8H_9NO_2$ yapısında, bağıl molekül kütlesi 151 olan bir maddedir.

Parasetamol çok yaygın kullanılan bir analjeziktir. Fenasetin ve benorilat'ın metabolitidir. Kendisi başlıca idrarla glukuronik asit ve sülfat konjugatı olarak atılır.

Sülfat ve glukuronid konjugatlarının konsantre hidroklorik asitle hidrolizi p-aminofenol verir. Bu madde de o-krezol ile konjuge olarak renkli bir boya oluşturur. Bu reaksiyon, parasetamolün kalitatif analizinde duyarlı bir test olarak kullanılır. Aynı test, kantitatif amaçla da kullanılır.

Parasetamolunu identifikasyonu (kalitatif test)

Parasetamol, biyolojik sıvıda asitle hidrolizle edilir. Oluşan p-aminofenole aşağıdaki yöntem uygulanır:

0,5 ml numuneye (idrar, mide içeriği veya olay yerinden elde edilen kalıntılar), 0,5 ml konsantre hidroklorik asit ilave edilir. Karışım 10 dakika kaynatılır ve soğutulur. 0,2 ml hidrolizata 1 ml o-krezol çözeltisi (10 g/l suda) ve 2 ml amonyum hidroksit çözeltisi (4 mol/l) ilave edilir, karışım 5 saniye karıştırılır.

Kuvvetli, koyu mavi rengin hemen oluşması parasetamol varlığını gösterir. Bu test çok duyarlıdır ve terapötik dozda alınan parasetamolün 24-48 saat sonra bile deteksiyonu mümkün olur. Duyarlık 1 mg/l p-aminofenol'dür.

Sadece aromatik aminler (anilin gibi, idrarda p-aminofenol şeklinde atılırlar) reaksiyonu interfere ederler. Etilendiamin (aminofilin'in metaboliti) bu testle yeşil renk verir.

Serumda parasetamolün spektrofotometrik yöntemle tayini

Zehirlenmenin tedavisinde serum parasetamol düzeyinin izlenmesi büyük önem taşır. Parasetamolün serumda tayininde a) asit hidrolizle verdiği p- aminofenolün o- krezolle verdiği renk; b) veya parasetamolün nitroz asitle verdiği renk reaksiyonlarından yararlanarak spektrofotometrik yöntemle tayin edilir.

o-krezol ile parasetamol tayini

Bu yöntemin prensibi, parasetamolün asit hidroliz ile oluşan p- aminofenolün o-krezol ile konjugasyonu sonucu verdiği karakteristik mavi renkli ürünün 615 nm de absorbansının ölçülmesine dayanır.

Teknik : 0.2 ml seruma, 0.8 ml %5 trikloroasetik asit çözeltisi ilave edilir. 2 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant başka bir tüpe aktarılır. Tüpün ağzı kapatılarak 20 dakika kaynar su banyosunda bekletilir.

Oda sıcaklığında soğutulan tüplere 1 ml o-krezol çözeltisi (10 g/l) ilave edilerek karıştırılır. Karışıma 2 ml amonyum hidroksit çözeltisi (4 mol/l) ilave edilerek 2 dakika daha kaynar su banyosunda bekletilir.

Tüpler oda sıcaklığında soğutularak oluşan mavi renkli çözeltinin absorbansı 615 nm de köre karşı okunur.

Kör deney, serum yerine su alınarak aynı işlemlerin uygulanması ile hazırlanır.

Kalibrasyon : Standart parasetamolün su içinde 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8 ve 1.0 mg/l çözeltileri hazırlanır. 0.2 ml standart çözeltilerle teknik kısımda açıklanan şekilde çalışılır. Absorbanslar 615 nm'de okunarak, konsantrasyona göre grafik çizilir.

Numunenin konsantrasyonu kalibrasyon doğrusundan bulunur, sonuç mg/100ml serum olarak verilir.

Not : K r ve standart parasetamol çözeltiler hazırlanırken su yerine ilaç almamış kişilerde elde edilen kan (serum) kullanılması, daha uygun olmaktadır (WHO, 1997)

Parasetamolün nitröz asitle tayini

Bu yöntemin prensibi, parasetamolün nitröz asitle reaksiyona girmesi sonucu oluşan 2-nitro-5-asetaminofenol n alkali ortamda verdiği sarı rengin absorbansının 430 nm de  l  lmesine dayanmaktadır.

Teknik : Bir tüpte 1 ml serum veya plazmaya, 2 ml triklorik asit (100 g/l) ilave edilir, karıştırılır ve 5 dakika santrifüj edilir.

Ayrı bir tüpe 1 ml hidroklorik asit (6 mol/l) ve 2 ml sodyum nitrit çözeltisi (100 g/l, taze hazırlanmış) ilave edilir, karıştırılır. (Bu işlemde dikkatli olunmalıdır. Kahverengi azot dioksit dumanları çıkabilir!)

Trikloroasetik asitle protein çöktürülen ve santrifüj edilen karışımın süpernatantından 2.0 ml alınarak, nitröz asit (HNO₂) oluşturulan tüpe ilave edilir, karıştırılır ve oda sıcaklığında 2-3 dakika bekletilir.

Fazla nitröz asitin giderilmesi için, karışıma 2 ml amonyum sülfamat çözeltisi (150 g/l) damla damla ilave edilir.

2 ml sodyum hidroksit çözeltisi (6 mol/l) ilavesinden sonra, vorteksle karıştırılır, böylece kalabilen gaz damlacıkları uzaklaştırılır. Oluşan sarı rengin absorbansı plazma ile hazırlanan köre karşı 430 nm de okunur.

Kalibrasyon : Standart parasetamol çözeltileri blank plazma içinde 0; 50; 100; 200 ve 400 mg/l konsantrasyonda hazırlanır (Bu standart çözeltiler +4  C de dayanıksızdır. Bu nedenle, ya haftalık hazırlanmalı veya -20 C de saklanmalıdır).

Standartlar ve ilaç ilave edilmemiş plazmaya yukarıda açıklanan işlem uygulanır. Nitröz asitle oluşan renklerin absorbansı 450 nm de köre karşı

okunur. Kalibrasyon grafiği hazırlanır. Numunedeki parasetamol konsantrasyonu grafikten hesaplanır.

Not : Parasetamolün diğer metabolitleri, bu yöntemi interfere etmezler. Ancak, yöntem, ilaç alımından 4-24 saat içinde sonuç verir. Yöntemin duyarlığı 50 mg/l dir. Üremide serumla hassasiyet daha azdır (100 mg/l).

Salisilik asit az miktarda yöntemi interfere eder. Şöyle ki, serumda 1 g/l konsantrasyonda bulunan salisilat, 50 mg/l konsantrasyonda görünen parasetamol düzeyi gösterir. 4-aminosalisilik asit ise reaksiyonu daha çok interfere eder.

(100 mg/l 4-aminosalisilik asit, 320 mg/l konsantrasyonda görünen parasetamol düzeyi gösterir.)

Levodopa, mukoz heparinle kontamine örnekler ve prezentatif olarak okrezol içeren çözeltiler de bu yöntemi interfere ederler.

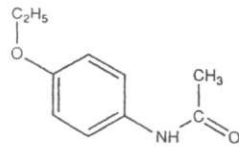
Klinik değerlendirme

Parasetamol zehirlenmesi, önce mide bulantısı , kusma gibi hafif semptomlarla başlar. Ancak zehirlenmenin şiddetine göre ileri dönemlerde (24-48 saat içinde) hepatik hasar başlar, daha sonra da (3-5 günler arası) hepatoksik belirtiler ortaya çıkar. Tedavide metionin veya N-asetil sistein, zehirlenmeden sonraki dönemde 12-15 saatler arasında verilirse hepatik hasara karşı korunabilir.

Zehirlenmenin tedavisinde serum (plazma) parasetamol düzeyinin ölçülmesi ve izlenmesi büyük önem taşır. Özellikle parasetamol alımından sonra ilk 4-10 saat içinde ölçülmelidir. Eğer aradan 24 saat veya daha uzun zaman geçmişse kalitatif test yapılması yararlı olur.

Terapötik dozda alınan parasetamolün serumdaki düzeyi 0.5-2.0 mg/100 ml dir. 12 mg/100 ml ve üstünde hafif zehirlenme, 30 mg/100 ml ve üstünde ise hepatik nekroz oluşur. (Gossel, A, T.,Bricker, J, A., 1984)

2.5. Fenasetin



Fenasetin (p-etoksiasetanilid; asetofenetidin); $C_{10}H_{13}NO_2$ molekül kütlesi 179 olan bir analjeziktir. Ancak kullanımı, uzun süre alımında nefrotoksisiteye neden olduğu için bırakılmıştır.

Fenasetin, başlıca parasetamole metabolize olur. Bu nedenle, idrarda, o-krezol/amonyak testi ile fenasetin atılımı detekte edilebilir (parasetamol'e bakınız).

Klinik değerlendirme

Akut toksik dozda fenasetin alımı baş dönmesi, öfori, siyanozis, hemolitik anemi, solunum depresyonu ve kardiyorespiratuar durmaya neden olur. Çoğunlukla methemoglobinemiye neden olur (koyu çikolata renkli kan!). Kanda methemoglobin (MetHb) ölçülebilir. Ancak MetHb dayanıksızdır ve nümune hemen alınır alınmaz tayin edilmelidir. Parasetamole metabolize olmakla beraber, fenasetin akut hepatorenal nekroza neden olmaz. Tedavisi semptomatik ve destekleyici tedavi şeklinde yapılır.

(Met Hb tayini için : Anilin'e bakınız)

3. KULLANIMI KONTROL ALTINDA OLAN MADDELER (VE NARKOTİKLER)

Adli Bilimler açısından uyuşturucu (narkotik) madde deyimi yerine bugün kullanılan uluslararası ve ulusal düzeydeki yasalara göre "kontrollü maddeler" (controlle substances) deyimi daha çok tercih edilmektedir. Narkotikler bu maddelerin bir bölümünü içermektedir.

Yasal olarak kontrol altında olan maddelere bağımlılık yapan maddeler (psikotrop maddeler) ve narkotikler girmektedir. Bu maddeler çeşitli açılardan (bağımlılık tipi, farmakolojik etkileri, toksikolojik özellikleri, kullanımlarını

düzenleyen yasalara göre) ve orjinlerine göre sınıflandırılabilirler. (Fazla bilgi için: Siegel, j.A (Saferstenin,R.) 1988; Vural.N.,1996; Ellenhor J.M.1997 'ye bakınız).

3.1. Kontrollü maddelerin "adli tıp ve toksikolojik açıdan analizleri

Adli Bilimler açısından kontrollü maddelerin analizinde dikkat edilecek başlıca noktalar, bu maddelerin analizlerinin uluslar arası laboratuvar kalitesi ve analizin standartlarına uyması ve sonuçlarının yasalar açısından değerlendirilmesidir.

Genel olarak hangi grup veya hangi madde olduğu bilinmeyen bir nümunenin analizi aşağıdaki analiz şemasına göre yapılır.

- 1) Tarama testleri (genellikle spot testler ve mikroskopik inceleme)
- 2) Ayırma testleri
- 3) Destekleyici testler
- 4) Gerekğinde kantitatif analiz
- 5) Biyolojik materyalde analizleri

3.2. Spot testler

"Spot testler", "damla deneyi" veya "renk deneyi" olarak da isimlendirilir. Bu testlerin uygulanması küçük bir tüp, saat camı veya tüpfil içinde yapılır. Uygulamada, analizi yapılacak çok az miktarda numune üstüne renk reaktif damlatılır ve karıştırılır. Karakteristik rengin oluşması belirli gruba giren maddelerin varlığını gösterir. Ancak hiçbir "spot test" tek bir madde için spesifik değildir. Renk oluşmaması ise o maddenin yokluğunu gösteren iyi bir indikatördür.

Çok kullanılan renk reaktifleri ve reaksiyonları

Froehde reaktifi : 50 mg molibdik asit veya sodyum molibdat 10 ml sıcak, konsantre sülfirik asit içinde çözülür (çözelti renksiz olmalıdır). Uygulamada bir damla reaktif, çok az miktardaki numune üzerine damlatılır.

Mandelin reaktifi : 1 g amonyum vanadat 100 ml konsantre sülfirik asit içinde çözülür. Uygulamada bir damla reaktif, çok az miktardaki numune üzerine damlatılır.

Marquis reaktifi : 10 ml konsantre sülfirik asit içine %40 lık formaldehitten 10 damla damlatılır. Uygulamada bir damla reaktif, çok az miktardaki numune üzerine damlatılır.

Mecke reaktifi : 0,125 g selenöz asit 25 ml konsantre sülfirik asit içinde çözülür. Uygulamada bir damla reaktif çok az miktardaki numune üzerine damlatılır.

Vitali deneyi : 1 damla dumanlı nitrik asit, çok az miktardaki numune üzerine damlatılır. Oluşan renk gözlenir. Çözelti kaynar su banyosu üzerinde kuruluğa kadar bekletilir, varsa renk değişimi not edilir. Kalıntı yeni hazırlanmış etanollü potasyum hidroksit çözeltisi ile nemlendirilir ve oluşan renk gözlenir.

Liebermann reaktifi : 1 g potasyum nitrit 10 ml konsantre sülfirik asit içinde çözülür. Beyaz bir porselen tüpfilde çok az miktardaki numuneye bir damla reaktif ilave edilir. (Kokain için kullanılır)

Kobalt tiyosiyanat : 6.8 g kobalt klorür ve 4.3 g amonyum tiyosiyanat 100 ml suda çözülür. Kokain için kullanılan bir renk reaksiyonunun uygulanmasında, toz halindeki numunenin çok az miktar üzerine 0,5 ml reaktiften ilave edilir. Mavi tabaka şeklindeki çökelek kokain olma olasılığını gösterir. Baz kokain ile negatif sonuç alınır. Bu nedenle numunenin önce hidroklorik asitle asitlendirilmesi gerekir.

Scott (Ruybal) testi : Kokain için kobalt tiyosiyanata göre daha spesifik bir testdir. Reaktif, 6.8 g kobalt klorür ve 4.3 g amonyum tiyosiyanat bir kaç damla gliserin içeren 50 ml suda çözülerek hazırlanır.

Az miktardaki numune üzerine 0.5 ml reaktif ilave edilir. Eğer kokainin hidroklorik asit tuzu varsa, mavi renkli bir çökelek oluşur. Bu mavi çökelek çözülünceye kadar konsantre hidroklorik asit damlatılır. Mavi çökelek pembe renkli çözeltiliye dönüşür. 0.5 ml kloroform ilave edilerek çalkalanır. Kloroform fazında turkuaz veya mavi renk oluşur. Serbest kokain bazı varsa kobalt tiyosiyanat ile çökelek vermez. Bu nedenle konsantre hidroklorik asit damla damla ilave edilir. Bu durumda kokain bazı ile çökelek oluşur, ancak sonra kaybolur.

Duquenois-Levine reaktifi (D-L) : Marijuana (esrar) tanınmasında kullanılır. Reaktif, 10 damla asetaldehit ve 1 g vanilinin 50 ml %95 etanol içinde çözülmesi ile hazırlanır. Ağzı kapaklı cam şişede saklanır. Renk, sararırsa kullanılmaz.

Uygulamada, 30-100 mg numunenin petrol eteri ile çalkalanmasından elde edilen ekstrakt veya doğrudan kuru bitki maddesi kullanılır. Tüp içindeki numuneye 2 ml D-L reaktifi ve arkadan çalkalayarak 1 ml konsantre hidroklorik asit ilave edilir. Mor renk oluşması esrar mevcudiyetini (olasılığını) gösterir. 2 ml kloroform ilave edilir ve çalkalanır.

Bu test, esrar için spesifik değildir. Bazı bitkisel ekstraktlar, yağlar ve bazı kahve ekstraktlarının yanlış pozitif sonuç verdiği gösterilmiştir. (Siegel, J.A. 1988).

Bu nedenle esrar identifikasyonu mikroskop testi ve İTK ile desteklenmelidir.

Beam testi : Esrar için kullanılır. Bir spatül ucu ile alınan numune 0.5 ml petrol eteri ile çalkalanır. Petrol eteri süzülerek bir kapsüle alınır, su banyosunda uçurulur. Üzerine alkolde hazırlanmış KOH çözeltisinden 2-3 damla ilave edilir. Esrar ya da reçinesi varsa mor kırmızı renk oluşur.

Zwicker reaksiyonu : Barbitüratlar için kullanılan en eski testtir. Numune üzerine 0,5 ml %0,5 lik bakır sülfat çözeltisi ve 0,5 ml kloroform içinde hazırlanmış %5 lik pridin çözeltisi ilave edilir. Çalkalandıktan sonra fazların ayrılması için beklenir. Kloroform fazında mor renk oluşması barbitürat (asit veya tuzu) olduğunu gösterir. Parlak yeşil renk oluşması ise tiyobarbitüratla ilgilidir. Buzlu (glasiyal) asetik asit ilavesi ile mor rengin açık maviye, yeşil rengin ise açık sarı yeşile dönüşmesine neden olur.

Dillie-Koppany testi : Barbitüratlar için kullanılan Zwicker reaksiyonunun modifikasyonudur.

0.1 g kobalt asetat 100 ml suda çözülür ve 0.2 g glasiyal (buzlu) asetik asit ilave edilir.

Uygulamada, alınan az miktardaki toz numune üzerine 1 damla kobalt asetat çözeltisi damlatılır ve çalkalanır. Üzerine 1 damla %5 lik izopropil amin (metanolde hazırlanmış) ilave edilir. Kırmızımsı mor renk barbitürat olduğunu gösterir.

Renk reaktifleri (spot test) ile maddelerin aranmaları :

Bazı maddelerin renk reaktifleri ile verdikleri "spot test" sonuçları aşağıda gösterilmiştir :

Kokain :

- Kobalt tiyosiyanat ile : mavi çökelek
- Scott (Ruybal) deneyi : kloroform fazında maviden turkuaz rengine kadar değişim.
- Lieberman reaktifi ile : sarı

Morfin :

- Marquis reaktifi ile : mor
- Fruehde reaktifi ile : mor → grimor → mor
- Nitrik asit ile : turuncu – kırmızı → sarı
- Demir-3- klorürle (%10 luk) : mavi-yeşil → yeşil
- Liebermann reaktifi ile : siyah
- Mandelin reaktifi ile : mavi-gri
- Vitali reaktifi ile : sarı-turuncu

Eroin :

- Marquis reaktif ile : mor
- Froehde reaktifi ile : mor → yeşil
- Nitrik asit ile : sarı → yeşil
- Mandelin reaktifi ile : açık mavi-gri
- Vitali reaktifi ile : açık sarı - turuncu

Fensiklidin (1-(1-fenilsikloheksil):PCP) :

- Marquis reaktifi ile : açık pembe
- Mandelin reaktifi ile : turuncu (kaybolur)

Amfetaminler :

- Marquis reaktif ile : turuncu-kırmızı → kahverengi, bir damla su ilave edildiğinde uzun dalgalı UV de floresan verir
- Mandelin reaktifi ile : yeşil-koyu yeşil ; ısıtılırsa kırmızı

Barbitüratlar :

- Dillie-Koppany reaktifi ile : kırmızı-viyole
- Zwikker reaktifi ile : mor, asetik asit ilavesi ile açık mavi
- Zwikker reaktifi ile : yeşil, asetik asit ilavesi ile açık yeşil (tiyotarbitüratlar)

LSD (d-lizerjik asit dietilamid) :

- Erhlich reaktif ile : mor
- Marquis reaktif ile : turuncu → kahverengi-mor
- Froehde reaktif ile : zeytin yeşili - mavi ve yeşil
- Mandelin reaktif ile : turuncu - yeşil - gri
- Mecke reaktif ile : zeytin yeşili → mavi-siyah
- Vitali reaktif ile : kahverengi-kahverengimsi mor

Marihuana (Esrar) :

- Duquenois-Levine : kloroform fazında mor
- Beam testi : mor-kırmızı

Meskalin :

- Marquis reaktif ile : turuncu
- Mecke reaktif ile : turuncu
- Froehde reaktif ile : yeşil - mavi
- Vitali reaktif ile : donuk kırmızı - kırmızı kahverengi

Psilosibin :

- Marquis reaktif ile : donuk turuncu
- Mecke reaktif ile : yeşilimsi → kahverengimsi yeşil
- Mandelin reaktif ile : yeşil
- Froehde reaktif ile : zeytin yeşili - sarı

3.3. Mikroskopla inceleme

Bu deneyler ya bitkisel orijinli numunenin mikroskop altında bitki dokusunun ya doğrudan veya uygun bir reaktif ilavesinden sonra incelenmesine dayanır. Esrar örnek verilebilir.

Diğer bir teknik de, numunenin kimyasal yapısı ile ilgili mikrokristalizasyon tekniğidir. Mikrokimyasal bir yöntemdir. Çok az miktardaki bir maddenin, uygun bir reaktifle verdiği kristal şeklinin mikroskopla incelenmesine dayanır.

Normal mikroskop dışında polarizasyon mikroskopu da kullanarak çeşitli kristallerin birbirinden ayrılması mümkün olmaktadır.

Organik kimyada, mikrokristalizasyon özellikle azotlu bileşikler için kullanılır. Geçmişte en çok alkaloidlerin ayrılması için kullanılıyordu. Zamanımızda ise antihistaminikler, sentetik narkotikler ve benzer bileşik ve ilaçlar içinde kullanılmaktadır.

Bazı önemli narkotik gruba giren maddelerin mikroskop ve mikrokristalizasyon tekniği ile aranmaları aşağıda açıklanmıştır.

Esrar

Esrar olduğu kuşkusu olan bitki nümunesinden bir spatül ucu ile lam üzerine konur. Üstüne bir damla %1 Fast Blue reaktifi (%1 kloralhidrat içinde hazırlanmış) damlatılıp lamelle kapatılır. Numune esrar ise mikroskopla incelendiğinde salgı tüylerinin kırmızı mor renk aldığı görülür.

3.4. Kodein ve morfinin mikrokristalizasyon tekniği ile ayrılması

Reaktif : Önce 10 g iyot, 35 g potasyum iyodürle birlikte 100 ml suda çözülür. Bu şekilde hazırlanan potasyum iyodür-iyot ($KI.I_2$) reaktifi buz dolabında saklanır. Hazırlanan bu reaktifden 0,4 ml alınır üzerine 20 ml buzlu asetik asit ve 2.0 ml fosforik asit (H_3PO_4) ilave edilir.

Teknik : Çok iyi temizlenmiş küçük bir porselen kapsül içine bir damla reaktif ve bir damla test çözeltisi ilave edilir. Bir bagetle iyice karıştırılır. 5-10 dakika bekletilir. Karışımdan bagetle bir damla alınarak lamele konur. Lamel ters çevrilerek çukur lam üzerine kapatılır, mikroskopla incelenir. Kodein üçgen şeklinde dikroik (çeşitli renkler gösteren) kristaller verir. Morfin ise siyah igneler halinde kümelenir veya kahverengi kırmızı levha veya koyu kırmızı şekilde kristallenir (Duyarlık 10 mg civarındadır.)

Kokain :

Reaktif : 2 g KMnO_4 , 5 damla fosforik asit su ile 100 ml ye tamamlanır. Kokain hafif asitli ortamda KMnO_4 ile çok karakteristlik olan bir kenarı kırık dikdörtgen şeklinde kristaller verir.

3.5. Narkotiklerin İTK ile ayrılması

Narkotiklerin ve diğerk bağımlılık yapan maddelerin içerdikleri dolgu maddesi, seyreltici ve diğerk benzeri etkili maddelerin indentifikasyonları ve birbirlerinden ayrılmalarında en çok kullanılan teknik ince tabaka kromatografisidir.

Bu maddelerin İTK ile ayrılmasında : Adsorban tabaka olarak Silikagel-G ; developman sistemi olarak : toluen/dioksan/etanol/konsantre amonyak/etil asetat/metanol/konsantre amonyak tercih edilmektedir. Kromotogramlar önce UV'de (254 nm de incelenir). Spot testlerde kullanılan renk reaktifleri ile indentifikasyonları yapılır. (Bu tekniklerle ilgili ayrıntılı bilgi için için kitabın İTK ile ilgili bölümüne bölümüne bakınız).

4. DOPİNG MADDELERİ

Spor yarışmalarında, sportif performansı arttırmak için ilaç kullanımı "doping" olarak tanımlanır. Doping yapma ise bir ilaç suistimalidir. "Uluslararası Olimpiyat Komitesi (IOC) Medikal Komisyonu" tarafından sporda kullanımı yasaklanmış ilaçlar (doping maddesi) listesini belirli aralarla gözden geçirerek ilan eder. Sporcuların doping yapmaları, ilgili ulusal ve uluslararası yönetmeliklere göre bir suçtur. Bu nedenle birçok ülkede doping analizi yapan, belirli standartlara göre kurulmuş ve lisans almış (akredite olmuş) "doping analiz labratuarları" bulunmaktadır. Ülkemizde de böyle bir labratuar kurulması çabası 1988 yılından beri devam etmektedir.

Doping maddelerinin analizinde duyarlık, spesifiklik ve doğruluk açısından herhangi bir şüpke olmamalıdır. Bu nedenle gerek laboratuvar

donanımı ve gerekse analiz yapan kişiler açısından belirli kritere göre standardize edilmiş olmalıdır.

Burada, doping maddeleri listesinde olan ve rutin çalışmalarda da analitik toksikolojide önemli olan "aromatik amin yapısındaki uyarıcılarla", anabolik steroidlerden testosteronun idrardan izolasyonu, İTK ile identifikasyonu ve GLK ile tayin yöntemleri açıklanmıştır (Vural, N., Saygı, Ş., 1983 ; Vural, N; Süzen S; 1989).

4.1. Organik baz yapısındaki maddelerin İTK ile analizleri

Bu gruba giren maddelere amfetamin, metamfetamin, dimetilamfetamin, metoksifenamin, fentermin, tranilsipromin, p-hidroksiampetamin, dietilpropion, efedrin, niketamid, foledin örnek verilebilir.

Standart maddeler : Yukarıda adı geçen saf etken maddelerden metil alkolde 1 mg/1 ml konsantrasyonda çözeltiler hazırlanır.

Kondensasyon maddesi : 7-klor-4-nitrobenzofurazin (NBD) etil asetat içinde (4 mg/ml) konsantrasyonda hazırlanır. Bu madde primer ve sekonder aminlerin tanınmasında kullanılır.

Diğer renk reaktifleri : Ninhidrin (0,5 mg/ml asetonda); sülfirik asit (%0.5 su içinde); Dragendorff reaktif : (KI.B.I₃) ve potasyum permanganat (%1 suda) hazırlanır.

İTK Takımı : Silikagel GF₂₅₄ ile kaplanmış plaklar kullanılır. Developman (etil asetat/metil alkol/konsantre amonyak : 85/10/15) karışımı renk reaktifleri için; (Sikloheksan/etilasetat/eter: 40/40/20) karışım, kondensasyon ürünü için kullanılır.

İdrar ekstraktlarının hazırlanması : 5 ml idrar örneğine 2.5 N NaOH damlatarak pH 12-12,5 'a ayarlanır. Katı NaCl ile doyurulduktan sonra 3 defa 5 ml eterle vortekste karıştırılarak ekstrakte edilir. Birleştirilen eter fazları susuz Na₂SO₄ geçirilerek sudan kurturulur. Eter fazı üzerine 1 ml 2

İç standart olarak 30 µg/µl konsantrasyonda amfetamin (dimetamfetamin ve tranilspronin için), dimetamfetamin (amfetamin ve metamfetamin için), niketamid (metoksifenamin için), difenilamin (kardiazol için) kullanılır. Efedrin için dış standart olarak norefedrin kullanılır.

1 ml standart çözeltilerin pH si 2.5 N NaOH ile 12-12.5'a ayarlanır ve 300 µl kloroformla (iç standart içeren) ekstrakte edilir. Kloroform fazından 3 µl alınarak faz kromatografa enjekte edilir. Pik yükseklikleri oranı (standart / iç standart), konsantrasyona karşı işaretlenerek kalibrasyon grafiği çizilir.

Gaz kromatografisine uygulama

Bu teknikte 2 farklı kolon kullanılır. Ayrıca türevleme yapılarak da gaz kromatografisi ile duyarlılık artırılır.

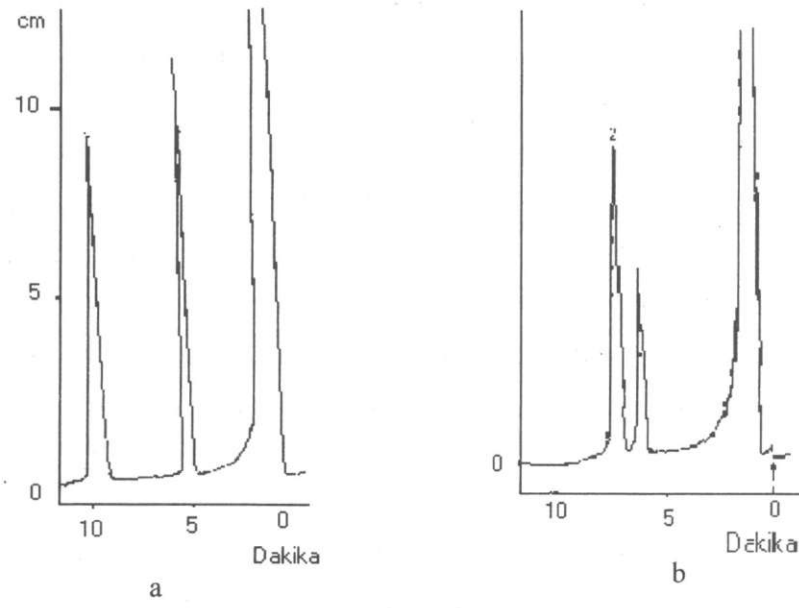
1) %3 SE-30 (Chromosorb WHP 80-100 misli) sabit faz üzerinde; detektör : FID ; taşıyıcı gaz (azot) : 40 ml/dk akış hızında; fırın sıcaklığı : 140-250°C; deaktör sıcaklığı : 200-275°C, enteksiyon giriş sıcaklığı: 200-275°C arasında programlanır.

2) %10 Apiezon-2/%10 KOH (Chromosorb W-AW, 80-100 misli üzerinde) sabit faz içeren kolon; detektör: FID; taşıyıcı gaz azot 40ml/dak; fırın sıcaklığı 160-200°C ; detektör ve enjeksiyon giriş sıcaklığı 200-220°C arasında ayarlanır.

3) N-Asetil türevlerinin oluşturularak SE-30 sabit fazında uygulama : N-asetil türevi asetanhidrit kullanarak kolon üzerinde türevleme işlemi yapılır. Bu amaçla 1 µl ilaç (idrar ekstraktı) çözeltilisi üzerine 1 µl asetik anhidrit enjektöre çekilerek karışım birlikte kolona enjekte edilir. Koşullar SE-30 da yukarda açıklandığı şekilde yürütülür. Yalnız fırın sıcaklığı 160-210°C arasında değiştirilir.

Sonuç : Gaz kromatografisi ile iki farklı kolon kullanarak organik baz yapısındaki maddelerin (yukarıda açıklanan koşullarda) ayrışmaları mümkün olmaktadır. Ayrıca primer ve sekonder amin yapısında olanların asetil türevlerinin oluşturularak GLK ile ayrışmaları ve tayinleri destekleyici deney özelliği taşımaktadır.

Genel olarak gaz kromatografisi yöntemi ile 0.5-0.1 µg duyarlıkta kalitatif ve kantitatif analiz gerçekleştirilebilmektedir. Kromatogramlar Şekil-21'de gösterilmiştir. (Vural, N., Saygı, Ş. 1983).



Şekil-21 Bazı organik bazların gaz kromatogramları : (a): amfetamin (I; 0.3 µg); dimetamfetamin (II. 0.3 µg); (b) : efedrin (I; 0.5 µg); nefedrin (2: 0.6 µg)

4.2. Anabolik steroidler

Anabolik steroidler içinde yer alan testosteron ve türevleri klinikte terapötik amaçlar dışında, sporda doping amacı ile kullanılır. İlaçlar arasında

da yer almaktadır. Son yıllarda sporcular arasında daha çok suistimal edilen bu maddenin vucutta doğal olarak sentezlendiği ve bu nedenle de suistimalinin anlaşılamayacağı düşüncesi ile kullanımı yaygınlaşmıştır.

1976 yılından beri IOC tarafından yasaklanan testosteronun (T) doping amacı suistimal edildiğini gösterilmesinde metaboliti olan epitestosteronun (E) de tayin edilerek T/E oranının saptanması gerekmektedir. Bu oranın 6/1 den büyük olması halinde testosteronun doping amacı ile kullanıldığı kabul edilmektedir (Domike, M., 1986).

Testosteron ve epitestosteronun idrarda asit hidrolizden sonra İTK ile saflaştırılması ve GLK de türevleme yöntemi ile tayin edilmesi ve yöntemin doping analizi amacı ile kullanılabileceği (laboratuvarımızda uyguladığımız yöntem) aşağıda açıklanmıştır. (Vural, N., Süzen, S, 1989)

Testosteron, epitestosteron ve diğer sentetik anabolik steroidlerin İTK ile identifikasyonları

Anabolik steroidlerin (testosteron, nandrolon, nandrolon fenilpropionat, oksimetolon, metiltestosteron gibi) birbirlerinden ayrılımları İTK ile standartlarla karşılaştırılarak yapılabilir.

Standartlar 1 µg/ml konsantrasyonunda kloroform içinde hazırlanır.

Adsorban olarak silikagel G kullanılır. Cam levhalar 0.25 mm kalınlığında kaplanarak, oda sıcaklığında kurutulur, 110°C’de etüvde 1 saat aktive edilir.

Developman için değişik sistemler kullanılabilir: kloroform-etil asetat (80:20); metilen klorür-aseton (80:20); kloroform-buzlu asetik asit (90:10) örnek verilebilir.

Renk reaktifleri :

1. Vanilin-sülfürik asit reaktifi : 3g vanillin 100 ml absölü etanol ile çözölür ve 0.5 ml, konsantre sülfürik asit ilave edilerek karışırılır.

2. Asetik asit anhidr - sülfürik asit reaktifi : 5 ml anhidr asetik asit, 5 ml konsantre sülfürik asit ile dikkatlice karışırılır. Karışım soğutularak, 50 ml alkole yavaşça katılır.

Steroidlerin idrardan izolasyonları : 5 ml idrar örneğİ, 5ml eter ile 2 kez ekstrakte edilir. Ekstraktlar birleştirilerek, sodyüm sülfat ile suyundan kurtarılır. Oda sıcaklığında azot gazı altında uçurulur. Kalıntı metanolde çözölürerek İTK'ya uygulanır.

Standard çözeltilerden ise 10 µl İTK'ya uygulanır.

Uygulama : Plaklar 12 cm ye kadar developpe edildikten sonra, plaklara renk reaktifleri püskürtölür :

a) Vanilin-sülfürik asit reaktifi püskürtölüdükten sonra, plaklar 120°C'de lekeler görölüne kadar bekletilir. Görölün lekelerin yeri işaretlenir, oluşan renk kaydedilir. Rf değeri hesaplanır.

b) Asetik anhidrik- sülfürik asit reaktifi ise püskürtmeden önce plaklara 110 °C'de 10 dakika bekletilir ve UV altında renkleri kaydedilir.

Testesteron vanilin H₂SO₄ ile kırmızı renk; asetik asit anhidrit-H₂SO₄ ile görölünen ışıkta gri-kahverengi, UV de parlak sarı renk verir. Tablo 15 çeşitli anabolik steroidlerin renk reaktifleri) İTK'da verdikleri renkler ve Rf değeri görölmemektedir (Fazla bilgi için Süzen, S. Y. Lisans Tezi, 1988'e bakınız).

Tablo 15- Çeşitli steroid yapısındaki ilaçların İTK verileri

İlaç Aldı	Renk reaktifleri			Rf ve developman sistemi					
	Vanilin – H ₂ SO ₄	Gün ışığı		I	II	III	IV	V	VI
Testosteron	Kırmızı-kahverengi	Gri - kahverengi	Parlak sarı	0.27	0.53	0.61	0.58	0.61	0.37
Metenelon enentat	Koyu kırmızı	Kırmızı-kahverengi	Parlak	0.61	0.80	0.95	0.87	0.85	0.82
Oksimetolon	Gri – kırmızı	Pembe	Parlak	0.31	0.49	0.82	0.73	0.62	0.67
Nandrolon	Mavi – kahverengi	Kahverengi	Parlak	0.23	0.51	0.60	0.53	0.59	0.36
Nandrolon fenilpropionat	Gri – mavi	Sarı – kahverengi	Parlak	0.65	0.79	0.93	0.75	0.85	0.73
Nandrolon p-heksiloksifenilpropionat	Kırmızı – siyah	Sarı - kahverengi	Parlak	0.70	0.84	0.95	0.83	0.88	0.86
4-hidroksi-19-nortestosteron siklopentilpropionat	Kırmızı – kahverengi	Sarı – kahverengi	Parlak	0.75	0.85	0.96	0.86	0.85	0.91

I : Kloroform – etil asetat (80:20);

IV : Kloroform sikloheksan glasiyal asetik asit (70:20:10)

II : Kloroform – aseton (80:20)

V : Metilen klorür – aseton (80:20)

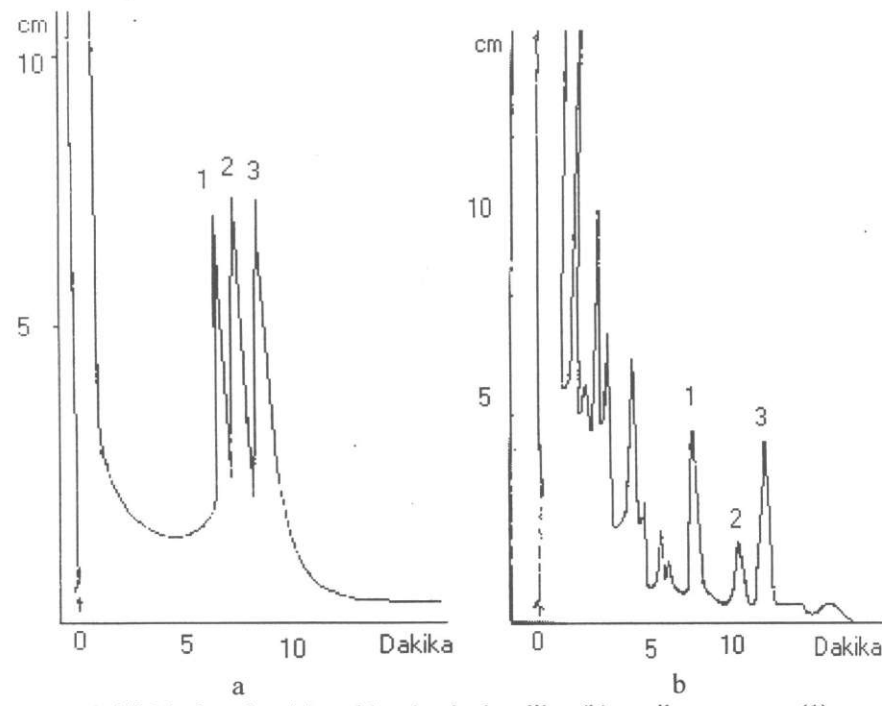
III : Kloroform – glasiyal asetik Asit (80:10)

IV : Metilen klorür – glasiyal asetik asit (90:10)

Testosteron ve epitestosteronun GLK ile tayini

(Enzimle Hidroliz Yöntemi)

İdrarda testosteron ve epitestosteronun konjugatları asit hidroliz yerine β -glukuronidaz ile "enzim hidroliz" yöntemi kullanılabilir. 100 ml idrarın pH sı 5'e ayarlandıktan sonra β -glukuronidaz (130000 ünite) ilave edilir. 55°C de 2.5 saat inkübe edilir.



Şekil 20- Standart (a) ve idrardan izole edilen (b) metil testosteron (1), Epitestosteron (2), testosteronun (3) kromatogramları

Soğuduktan sonra 3 kez eterle ekstrakte edilir. Bileştirilen eter ekstraktları % 20 NaOH, ardından su ile yıkanarak susuz sodyum sülfattan geçirilerek suyundan kurtarılır.

Eter fazı uçurulduktan sonra, asit hidrolizde olduğu gibi, kalıntıya 50 µg/ml metil testosteron (iç standart) ilave edilerek 5 µl gaz kromatografa enjekte edilir.

GLK de sabit faz olarak %3 SE-30 (Chromosorb WHP 80-100 misli üzerinde) ve FID detektör kullanılır. Fırın sıcaklığı 260 °C; enjeksiyon giriş sıcaklığı 280 °C; detektör sıcaklığı 300 °C; taşıyıcı gaz (azot) akış hızı 30 ml/dk. Hidrojen akış hızı 50 ml/dak; hava akış hızı 300 ml/dak. Olarak ayarlanır.

Kromatogramların pik yükseklikleri ölçülerek, kalibrasyon grafiğinden hesaplanır. Şekil 20 (a ve b) de testosteron ve epitestosteronun kromatogramları (standart ve idrardan izole edilen) görülmektedir.

Kalibrasyon : Stok testosteron asetat ve epitestosteron asetat (1 mg/ml), standart çözeltilerinden kloroformla seyreltilerek 10-100 µg/ml arasında 5 seri çözelti hazırlanır.

İç standart olarak metiltestostem 50 µg/ml olmak üzere standartlar ilave edilir. Hazırlanan seri çözeltilerden 5 µl gaz kromatografa enjekte edilerek yukarıdaki koşullarda çalışılır.

Standart / iç standart pik yüksekliğine karşı konsantrasyon alınarak kalibrasyon grafiği çizilir.

Sonuç

Testosteron ve epitestosteronun, idrarda asit hidroliz yöntemi -İTK kombinasyonunu takiben GLK ile tayini, yönteminde enzimatik yöntemine göre daha yüksek verim elde edilir, ayrıca yöntem enzim hidroliz yöntemine göre daha ekonomiktir. Ancak ekstraksiyonun benzenle yapılması, yöntemin sağlık açısından sakınca oluşturmaktadır. Duyarlık 0.2 µg dir. Metilleme ile duyarlık sınırı 0.05 µg kadar inileilir (Süzen, S., 1988)

Yaptığımız bir araştırmada, normal kadınlarda idrarda testosteron (T) 0.51 ± 0.19 µg/ml; epitestosteron (E) 0.19 ± 0.07 µg/ml ve T/E oranı 2.62 ± 0.32 bulunmuştur. Normal erkeklerde ise T, E ve T/E için sırası ile 2.40 ± 0.59 µg/ml; 1.33 ± 0.67 µg/ml ve 1.96 ± 0.62 değerleri elde edilmiştir. Testosteron türevi ilaç (sustanon 250) kullanan hastalarda ise T 5.94 ± 87 µg/ml; E 1.25 ± 48 µg/ml ve T/E oranı 4.88 ± 78 bulunmuştur. İlaç kullanımı ile T/E oranı artmaktadır. Bu oran 6 ve üstünde olduğunda ise sporcu dopingli kabul edilmektedir. (Donike, M. 1936; Vural, N., Süzen, S., 1989)

5. PESTİSİTLER

Besin maddelerinin üretimi, tüketimi ve depolanmaları sırasında, besin değerini bozan, besinleri yok eden ve zarar veren haşereleri, mikroorganizmaları yok etmek için kullanılan fiziksel, kimyasal ve biyolojik savaş maddelerine "pestisitler" denir.

Pestisitlerle, mesleki maruziyet dışında, çeşitli nedenlerle kronik, akut ve ölümlü sonuçlanan zehirlenme olaylarına ülkemizde sıklıkla rastanmaktadır (Vural, N., 1996).

Pestisitlerin analitik ve adli toksikoloji açısından analizleri önem taşır. Burada çevrede kalıcılıkları nedeni ile kronik toksisite açısından da önem taşıyan klorlu hidrokarbon yapısındaki pestisitlerle, akut toksisite açısından önem taşıyan organik fosforlu insektisitlerin rutin toksikolojik analizleri açıklanmıştır.

5.1. Organik klorlu pestisitler

Klorluhidrokarbon yapısındaki (organoklorlu) pestisitler yapılarında klor bulunan aromatik veya alifatik bileşiklerdir.

İlk sentezi yapılan klorlu hidrokarbon yapısında olan DDT ve klorlu siklodien yapısındaki dieldrin, aldrin gibi insektisitlerin çevrede kalıcı ve karsinojenik etkili olmaları nedeni ile kullanımları kısıtlanmış ve daha sonraları da yasaklanmıştır. Ancak kalıcılıkları nedeni ile halen canlıların adipoz dokusunda ve insanlarda anne sütünde bulundukları gösterilmiştir (Fazla bilgi için Vural, N., 1996'ya bakınız).

Aldrin, dieldrin ve endrin (akut letal dozları yetişkinlerde 5 g), DDT (letal doz 30 g) ye göre daha çok toksiktirler.

Çözücü ile numuneden ekstrakte edildikten sonra İTK ile kalitatif analizleri yapılabilen bu maddeler için basit ve güvenilir yöntemler yoktur.

Ancak GLK ve GK-MS kombinasyonları ile kendilerinin ve metabolitlerinin kesin analizleri yapılabilir.

İTK ile kalitatif analizleri

Bu yöntem aldrin, dieldrin, heptaklor ve dokofan için kullanılır. Numune olarak mide muhtevası ve olay yerinden elde edilen kalıntılara uygulanabilir.

Teknik : 10 ml numune, 5 ml petrol eteri (kaynama noktası 40-60°C fraksiyonu) ile 5 dakika karıştırılarak ekstrakte edilir.

Fazların ayrılması için 5 dakika bekletilir ve üst faz ayrılır. Ekstraksiyon 2. kez 5 ml petrol eteri ile tekrarlanır. Ayrılan petrol eteri fazları birleştirilir ve sırası ile 5 ml saf su; 5 ml sodyum hidroksit (20 g/l) ve 5 ml saf su ile yıkanır.

Yıkanmış ekstrakt, 5 g sodyum sülfat üzerinde kurutulur ve basınçlı hava veya azot akımında kuruluğa kadar uçurulur.

İTK'ya uygulama : Ekstrakt 100 µl metil alkol içinde çözülür. Silikagel G ile kaplanmış kromatografi plağının (5x20 cm boyutunda ve 20 µm partikül büyüklüğünde) ilk kolonuna 20 µl tatbik edilir. Standard madde karışımından (metil alkol içinde hepsini 1 g/l konsantrasyonda içeren karışım) 20 µl 2. kolona uygulanır.

Kromatogram, sikloheksanla doyurulmuş tankta develop (10 cm, yükselinceye kadar) edilir ve kuruluğa kadar uçurulur.

Kromatogramların belirtilmesi için potasyum permanganat çözeltisi (0.1 mol/l) püskürtülür, arkadan yavaşça 2-amino- etanol (etanolamin) püskürtülür. 100°C de etüvde 20 dakika bekletilir.

Soğutma için bekletildikten sonra, nitrik asit ile seyreltilmiş gümüş nitrat çözeltisi [0.1 mol/l gümüşnitrat çözeltisi, konsantre nitrik asit ile (10:1) oranında seyreltilir] püskürtülür ve 15 dakika UV (254 nm) altında bekletilir.

Sonuç : Klorlu hidrokarbonlar kahverengi/siyah lekeler verir. İdentifikasyon standart kromatogram ile karşılaştırılarak yapılır. Dieldrin ve endrin bu koşullarda detekte edilemezler.

Bu teknikte yaklaşık R_f R_f değerleri : lindan 0.9; dikofan 26; heptaklor 34 ve aldrin 41 elde edilir. (Flanagan R.J. ve ark. 1995)

Yöntemin duyarlılığı organik klorlu pestisitlerin yapısına bağlı olarak 2.5 mg/l ile 10 mg/l arasında değişir.

Klinik değerlendirme

Organik klorlu pestisitler, başlıca MSS'ni etkilerler. Akut zehirlenmede kusma, ekstremitelerde zayıflık ve uyuşukluk, uyarılma, diyare, kaslar tremor ve konvülsiyonlar, solunum depresyonu görülür. Zehirlenmenin tedavisinde, semptomatik ve destekleyici tedavi uygulanır.

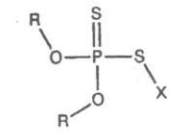
5.2. Organik fosforlu pestisitler

Organik fosforlu pestisitler, geniş bir grubu oluşturmaktadırlar. Çoğu insektisit olarak kullanılır. Bazıları herbisit olarak da kullanılır ve insanlarda toksiteleri oldukça düşüktür.

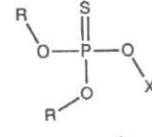
Organik fosforlu insektisitler, genelde sıcak kanlılara ve insanlara toksiktirler ve çeşitli nedenlerle sıklıkla akut zehirlenmelere ve ölüme neden olmaktadır. Başlıca toksik etkileri asetilkolin esterase inhibisyonuna dayanır. Zehirlenme belirtileri muskarinik, nikotinik ve merkezi sinir sisteminin aşırı stimülasyonu şeklindedir.

Organik fosforlu insektisitlerin batıcı (sarımsak) kokuları, tanıda yararlı olabilir. Önemli bir kısmı (azinfos metil, diazinon ve malation gibi)

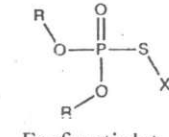
bazik ortamda hidroliz olurlar, asit ortamda da dayanıklı değillerdir. Bu nedenle analiz sırasında mide muhtevası ve olay yerinden elde edilen örneklerin pH sını analizden önce 7 ye ayarlamak gerekir. Organik fosforlu indetisitleri çok geniş bir grup olup, temel yapıları ve bazı örnekler aşağıda verilmiştir.



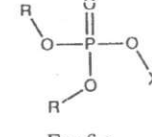
Fosforoditioat



Fosforotioat



Fosforotiolat



Fosfat

Zehirlenmenin toksikolojik açıdan tanısında :

1) Vücut sıvılarında (kan, idrar ve ölüm halinde vücut dokularında) organik fosforlu insektisitler ve metabolitleri aranır. Örneğin parationla zehirlenmede, metaboliti p-nitrofenol analizi de yapılır.

2) Bazı dimetil ve dietil organik fosfor yapısında olan organik fosforlu insektisitlere maruz kalmanın araştırılmasında alkil fosfat metabolitlerinin tayini yapılabilir. Örneğin:

Fosfamidon, diklorvos, dimetilfosfat ve paration ile dietilfosfat; disulfotan ve forat ile dietiltiyofosfat metabolitleri oluşur.

Dialkilfosfat metabolitleri düşük maruziyetlerde de iyi bir indikatördür. Ancak dialkil fosfatlar idrarda düşük konsantrasyonda oldukları için gerek izolasyon ve gerekse identifikasyon ve analizleri dikkat ister (Besbelli, N., 1993).

3) Organik fosforlu insektisitler kolinesteraz inhibitörüdürler. Bu nedenle zehirlenmelerde, destekleyici deney olarak plazma asetilkolinesteraz aktivitesi (AChE) tayin edilir. Aktivitedeki düşme oranı, zehirlenme şiddeti hakkında bilgi verir.

Organik fosforlu insektisitlerin İTK ile kalitatif (nitel) analizleri

i) Yöntem mide muhtevası ve olay yerinden elde edilen kalıntılara uygulanabilir. Yöntemin prensibi, organik fosfat esterlerinin 4-(p-nitrobenzil) piridin (asetonda 20 g/l) ve aseton: tetra etilenpentamin (9:1) kombine reaktifleri ile mor lekeler vermesine dayanır. Standart olarak çeşitli organik fosfat esterleri (metadon, methidation, dioksation ve klorprifos gibi) metil alkolde (1g/l) konsantrasyonda karışım halinde hazırlanır.

Teknik : 10 ml örnek alınır ve gerekiyorsa pH, katı sodyum bikarbonatla 7 ye ayarlanır. 5 ml metil tersiyer-bütileter ile 5 dakika karıştırıcı kullanarak ekstrakte edilir.

Fazların ayrılması için 5 dakika bekletilir. Üst faz ayrılır ve ikinci kez 5 ml metil tersiyer bütileterle ekstraksiyon tekrarlanır.

Ekstraktlar birleştirilir, faz ayıran filtre kağıdından temiz bir tüpe süzülür. Basınçlı hava veya azot akımında kuruluğa kadar uçurulur.

İTK'ya Uygulama : Ekstrakta 100µl metil alkol ilave edilir ve 20µl silikagel G ile (5x20 cm boyutunda, 20 µm ortalama tanecik büyüklüğünde) kaplanmış levhaya uygulanır. İkinci kolona da 10µl standart karışım uygulanır.

Kromatogram (sikloheksan/aseton/kloroform: 70/25/5) karışımında 10 cm. yüksekliğe kadar develope edilir. Tanktan çıkartıldıktan sonra kurutulur.

Tabakaya 4-(p-nitrobenzil) piridin çözeltisi (asetonda, 20 g/l oranında) püskürtülür ve 110°C da 30 dakika bekletilir. Soğutulduktan sonra aseton /tetraetilenpentamin (9/1 oranında) karışımı püskürtülür.

Sonuç : Organik fosforlu insektisitler açık kahverengi zemin üzerinde mor lekeler verir. Lekeler standartlarla karşılaştırılır ve R_f değerleri hesaplanır. (Örneğin, İTK' da bu yöntemle dimetoat ile : 0.11 ; malation ile : 0.42 ; bromofos ile : 0.54 ; klorprifos ile : 0.58 R_f değerleri elde edilir.

ii) İTK ile kalitatif analizde diğer bir renk reaktif olarak (gümüş nitrat - bromfenol) karışımı kullanılabilir:

Olanaklar açısından daha pratik olan bu yöntem aşağıda açıklanmıştır. Yöntem mide içeriği veya olay yerinden elde edilen numunelere uygulanabildiği gibi insektisit formülasyonlarada uygulanabilir.

Renk reaktifi : a) %1 $AgNO_3$ (3:1 oranında su/aseton karışımında); b) %0.5 bromofenol çözeltisi (asetonda) kullanılırken 100 ml (a) çözeltisi, 10 ml (b) çözeltisi ile karıştırılır.

Devolopman çözeltisi : (Benzen/aseton) : (80/20) oranında

Adsorban : Al_2O_3 (20x20 cm levha üzerinde)

Standardlar : Daha önce açıklandığı şekilde hazırlanır.

Uygulama : Mide içeriği veya olay yeri kalıntısından izolasyon daha önceki İTK tekniğinde olduğu gibi yapılır. İnsektisit formülasyonunda izolasyon işlemi ise aşağıda açıklanmıştır.

Formülasyonlardan organik fosforların izolasyonu : Emülsiyon veya toz halindeki numuneden 200 mg alınır. 10 ml asetonla sık sık çalkalanarak oda sıcaklığında ekstrakte edilir (Cam kapaklı bir erlen veya daha iyisi bir mezür içinde). Şartlar uygunsa bir gece bekletmek yerindedir. İcabında süzülerek belirli bir hacme (10 ml ye) tamamlanır.

Numunenin İTK'ya tatbiki : Önceden hazırlanmış 0.04 ml numune (kantitatif tayinde miktar önemli) çapları 5 mm yi geçmeyecek şekilde damlatılır. Oda ısısında kurutulur.

Adsorban tabaka, daha önceden developman sistemini içeren ve çözücü atmosferi ile doymuş tanka yerleştirilerek genellikle çözücü yüksekliği başlangıçtan 10-12 cm yükselineye kadar bekletilir. Developman zamanı ve oda sıcaklığı kaydedilir.

Tanktan çıkarılan adsorban tabaka, oda sıcaklığında kurutulur.

Kromatogramların belirli hale getirilmesi : Reaktif karışımı adsorban tabakaya püskürtülür ve levha 50-60°C de 10 dakika kurutulur. Mavi zemin üzerine, tiyoorganik fosforlu insektisitler, viyole renk tonları verir. Bu rengin belirgin hale gelmesi için, %1 lik sitrik asit püskürtülerek veya levha brom buharına tutularak mavi olan zemin rengi giderilir.

Çok hafif renkli olan lekeler ise 5-10 dakika U.V. de bekletildiğinde belirgin hale gelirler. Kromatogramların R_f değerleri saptanarak standartlarla karşılaştırılır. Böylece organik fosforlu insektisitlerin indentifikasyonu yapılır.

Genel olarak organik fosforlu insektisitler (bromfenol mavisi+gümüş nitrat ile) mavi (rogor); viyole (gusathion); mavi viyole (paration ve diazinon) renkleri verirler.

Asetilkolin esteraz aktivitesinin tayini

Organik fosfat ester ve karbamade yapısındaki insektisitler asetilkolin esteraz enzimini inhibe ederek serinin iletimini bozarlar.

Kolin esteraz başlangıç olarak karaciğerde oluşur, ancak plazmada da bulunur. Plazma kolinesteraz inhibisyonunun fizyolojik olarak önemli düşünülmez. Kolinesteraz ve asetilkolin esteraz farklı enzimlerdir. Plazma kolinesteraz hemen hemen tamamen inhibe olabilirken, eritrositlerdeki asetilkolin esterazın halen %50 si aktivitesini koruyabilir. Bu durum

maddelerin relatif inhibisyonuna, giriş yollarına, maruziyet derecesine bağlıdır.

Pratikte plazma kolinesteraz aktivitesinin tayini organik fosforlu insektisitler veya karbamatlara maruziyetinin belirlenmesi için uygun bir indikatördür. Aktivitenin normal olması, bu maddelere maruziyetin olmadığını gösterir. Aktivitenin düşük bulunması halinde, toksik madde ve /veya metabolitinin biyolojik sıvılarda bulunması ile zehirlenme olayı ve nedeni desteklenmiş olur.

Hem eritrosit ve hem de plazma ChE düzeyinin düşük olması, organik fosfat veya karbamat grubu pestisitlerle zehirlenme olasılığını güçlendirir.

Kolinesteraz aktivitesinin tayininde kullanılan 1) yarı kantitatif basit bir yöntem 2) daha duyarlı olan diğer bir yöntem aşağıda açıklanmıştır.

1) Asetil kolinesteraz inhibisyonunun yarı kantitatif değerlendirilmesi

Yöntemin prensibi, substrat olarak kullanılan asetiltiyokolinin, AChE tarafından asetil ve tiyokoline hidroliz olması; oluşan tiyokolinin 5,5'-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit) ile sarı renkli kompleks vermesine dayanır. Oluşan sarı rengin şiddeti pralidoksim (organik fosfat esterlerinin inhibisyonunda reaktivatör içeren numune ile karşılaştırılarak yorumlanır.

Yöntem serum veya plazmaya uygulanır.

Reaktifler :

Dithiobisbenzoat reaktifi : 5,5'-nitrobenzoik asit (DTNB), 0,2 g/l konsantrasyonunda sodyum dihidrojen ortofosfat tamponu (0.1 ml, pH 7.4) içinde hazırlanır.

Asetiltiyokolin iyodür çözeltisi: Suda 5 g/l konsantrasyonda hazırlanır.

Pralidoksim klorür çözeltisi: Suda 200 g/l konsantrasyonda hazırlanır.

Kör (veya kontrol) olarak kullanılacak plazma veya serum maruz kalmamış kişilerden sağlanır.

Uygulamada : 3 tane 10 ml lik tüplerin herbirine 2.0 ml DTNB reaktifi ve 1.0 ml asetiltiyokolin iyodür çözeltisi konur. Birinci tüpe 20 µl kontrol plazma, ikinci tüpe ise 20 µl numune plazma konur. Üçüncü tüpe ise 20 µl pralidoksim çözeltisi ve 20µl numune plazma ilave edilir. Her üç tüp te vorteksle karıştırılır ve oda sıcaklığında 2 dakika bekletilir.

Sonuç : a) Kontrol tüpte oluşan sarı renk, test tüpüne göre (2. Tüp) daha koyu ise, asetilkolin esterase inhibitörü bu maddenin varlığını gösterir. İlaveten pralidoksim içeren tüpteki karışımın (3.tüp) rengi, kontrol tüpü ile aynı ise, o zaman organik fosfat esteri ile ilgili bir AChE inhibitörü vardır. Bunun diğer deneylerle desteklenmesi gerekir. (Organik fosfat esteri pestisit grubu veya metabolit analizi ile).

2) AChE aktivitesi tayini

Yukarıda AChE'nin nitel analizi için uygulanan yöntem kantitatif amaçla da kullanılabilir. İlk kez Ellman tarafından uygulanmıştır. (Ellman,G., 1959; WHO, 1987)

Reaktifler :

DTNB tampon çözeltisi : 100 mg DTNB; 4.472 g disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4) ve 250 g potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4), 800 ml distile suda çözülür. 4.5 g sodyum klorür ilave edilir ve distile su ile 1 litreye tamamlanır, pH kontrol edilip, 7.6'ya ayarlanır. (Seyreltik HCl veya NaOH ile). Bu çözelti buzdolabında en fazla 1 hafta dayanır.

Substrat olarak propioniltiyokolin kullanılır: 150 mg madde 80 ml su içinde çözülür, distile su ile 100 ml ye tamamlanır. Bu çözelti günlük hazırlanır.

AChE inhibitörü olarak eserin salisilat (fizostigmin salisilat) kullanılır. 50 mg madde 40 ml suda çözülür, distile su ile 100 ml ye tamamlanır. Çözelti baz dolabında en fazla 2 hafta dayanır.

Teknik : Yöntem tam kan, eritrosit veya plazmaya uygulanabilir. Kan örnekleri heparinize tüplere alınır. Yöntem postmortem kana da uygulanabilir. Heparinli kan örnekleri +4°C de saklanır.

Uygulamada 20 µl kana 20 ml DTNB tampon çözeltisi ilave edilir. Seyreltilmiş kan örneğinden üç tüpe 4'er ml konur. (1. Tüp kör kan deneyi için: 2. Tüp kan numunesi, geriye kalan seyreltilmiş kan, 3. Tüp 3000 rpm de 5 dakika santifüj edilir. Süpernatanttan, 4'er ml 2 ayrı tüpe konur. (3. Tüp plazma kör; 4. Tüp plazma numunesi).

Kör deney olarak ayrılan (1. ve 3. tüplere) kan ve plazmaya 50 µl eserin salisilat çözeltisi (ChE inhibitörü) ilave edilerek, vortekste karıştırılır.

Bütün tüpler (kör ve numune içeren tüpler), 5 dakika 30°C de su banyosunda inkübasyon için bekletilir. Hepsine substrat olarak 1 ml propionil tiyokolin ilave edilir. Tekrar 30°C de 10 dakika inkübasyon için bekletilir.

İnkübasyondan sonra, numune plazma ve kanı içeren tüpler 50 µl eserin salisilat çözeltisi ilave edilir. 1 ve 2 nolu tüpler (kanlar) 3000 rpm de 5 dakika santifüj edilir.

Oluşan sarı renkli çözeltilerin absorbansları (her 4 tüpteki çözeltiler), distile suya karşı, 405 nm de okunur.

Kalibrasyon

Sistein hidroklorür standart olarak kullanılır. 63.05 mg sistein hidroklorür 900 ml distile suda çözülür. Distile su ile 1000 ml ye tamamlanır (0.4 m mol l). Çözelti kullanılacağı zaman hazırlanmalıdır.

Kalibrasyon eğrisinin çizilmesi için 0; 0.20; 0.40; 0.60; 0.80 ve 1.0 ml sistein standart çözeltilerine, 4 ml DTNB tampon çözeltisi ile siyreltilir. Distile su ile 5 ml ye tamamlanır. Oluşan renklerin absorbansı, (1 ml distile suya 4 ml DTNB çözeltisinin ilavesi) ile hazırlanan köre karşı 405 nm de okunur. Absorbansa karşı, sistein konsantrasyonu işaretlenerek doğru çizilir.

Hesaplama : Kolinesteraz aktivitesi tayini için aşağıdaki formül kullanılır.

$$\text{ChE (aktivitesi)} = \frac{A(T-B)}{A(S)} \times \frac{C(S) \times T.V}{t \times SV} \text{ IU/ml}$$

A (T-B) : Tam kan veya plazmanın absorbansından tam kan (kör) veya plazma (kör)ün absorbansının çıkartılması ile elde edilen absorbans ($A_n - A_k$)

A(S) : En yüksek konsantrasyondaki standart çözeltinin (genellikle 0.40 μ mol/ml sistein) absorbansı (A_s)

C(S) : Standart çözeltinin en küçük konsantrasyonu (genellikle 0.08 μ mol/ml sistein)

T.V. : Toplam hacim (5 ml)

S.V. : Örnek hacmi (absorbansı okunan 20 μ l : 5 = 0.004 ml)

t : Reaksiyon zamanı (10 dakika)

IU/ml : Uluslararası ünite birimi μ mol substrat/dakika

Teknik kısımda anlatılan koşullarda çalışıldığında değerler yerine konulursa;

$$\text{ChE aktivitesi} = \frac{A(T-B)}{A(S)} \times \frac{0.08 \times 5}{10 \times 0.004} = \frac{A(T-B)}{A(S)} \times 10 \text{ IU/ml}$$

$$\text{ChE (IU/ml)} = \frac{A_n - A_k}{A_s} \times 10 \text{ şeklinde f rm le edilebilir.}$$

Eritrosit kolinesteraz aktivitesi : (Tüm kan kolinesteraz aktivitesi-plazma kolinesteraz aktivitesi) e itiği ile hesaplanır.

Sonucun yorumu

Organik fosforlu insektiflere maruz kalmamış (normal) kişilerin kolinesteraz değerleri:

Tam kan : 4.5-7.0 IU/ml; Plazma : 1.5-3.5 IU/ml;

Eritrosit : 2.6-4.1 IU/ml arasındadır.

Organik fosfat esterlerin maruziyette AChE inhibisyon % si daha uygun bir kriterdir. Bu amaçla kişilerde maruziyet öncesi ve sonrası AChE aktivitesi ölçülür. AChE düzeyindeki d  me % si (inhibisyon %) :

$$\frac{\text{Maruziyet  ncesi AChE} - \text{maruziyet sonrası AChE}}{\text{Maruziyet  ncesi AChE}} \times 100 \text{ formülü ile hesaplanabilir.}$$

Kolinesteraz düzeyinin % 50-60 inhibisyonu hafif ; % 60-90 inhibisyonu orta, % 90-100 inhibisyonu ise şiddetli zehirlenme olarak kabul edilmektedir (Maron , M., 1986).

Ölüm olaylarında, postmortem kanda kolinesteraz aktivitesi tayini, ölüm nedeni hakkında bir bilgi verebilir.

Yaptığımız bir araştırmada, çeşitli nedenlerle ölen kişilerin (postmortem) kanlarında AChE aktivitesi tayin edilmiştir. Bu bulgulara göre solunum yetmezliğinden kalp hastalığından, CO zehirlenmelerinden ölen kişilerde AChE aktivitesi d  k bulunmuştur. Ancak en fazla d  me organik fosforlu insektisitlerle zehirlenmede g vr lm  t r (Ka ifoğlu, N., 1995).

6. METALİK ZEHİRLER

Metallerle zehirlenmelere çok eski yıllardan beri rastlanmaktadır. Bu nedenle biyolojik materyalde metalik zehirlerin analizi ile ilgili yöntemlerde paralel olarak gelişmiştir. Arsenik zehirlenmesinin Orfila tarafından biyolojik materyalde (saçta) Marsch deneyi ile aranması adli ve analitik toksikolojinin başlangıcı olmuştur.

Zamanımızda metal zehirlenmeleri, akut ve kazaen zehirlenmelerden çok mesleki ve çevresel maruziyet nedeni ile önem kazanmıştır (Kurşun, kadmiyum, civa, krom, nikel gibi). Geliştirilen yeni tekniklerle (atomik emisyon ve absorpsiyon spektrofotometresi : AES ve AAS ; anodik stripping voltametresi : ASV, polarografi, nötron aktivasyon: NAA) eser miktarda metallerin çevrede ve biyolojik materyalde duyarlı ve spesifik analizleri mümkün olmaktadır.

Akut zehirlenme, mesleki maruziyet, iatrogenik zehirlenmelerin araştırmalarında atomik absorpsiyon spektrofotometresi (AAS) ve İndüktif Coupled Plasma Spektrofotometresi (ECP) en çok tercih edilen yöntemlerdir. Çünkü her iki teknikle de hemen bütün elementlerin analizi yüksek duyarlılıkla olarak yapılabilmektedir. Ayrıca aynı örnekle multielementlerin kantitatif analizi hızlı olarak yapılabilmektedir.

ICP pahalı bir tekniktir. Bu nedenle toksikolojik analizlerde yeterli duyarlılıkta, iyi sonuç veren bir teknik olan AAS rutin olarak kullanılan bir yöntemdir (Fazla bilgi için: Borriella, R., ve Gagliano Candela, R.,1987).

Bu bölümde Reinsch deneyi, endüstri ve çevre açısından önemli olan kurşunun toksikolojik analizi açıklanacaktır.

6.1. Reinsch deneyi

Bakırdan daha soy elementlerin biyolojik materyalde aranmaları için kullanılan bu test ve destekleyici deneyler kitabın genel bölümünde açıklanmıştır.

Bazı metallerin (As, Sb, Hg, B, Se ve Te) biyolojik materyalde doğrudan aranmalarında uygulanan Reinsch testi klasik bir yöntem olup, rutin toksikoloji laboratuvarlarında halen kullanılması gereken bir deneydir.

6.2. Kurşun

Kurşun ağır bir metal olup, anorganik ve organik bileşikleri vardır. Kurşun ve anorganik kurşun bileşikleri (kurşun nitrat, kurşun karbonat, gibi) boya akümülatör, seramik, porselen, insektisit, vulkanize kauçuk, lehim, alaşım yapımı ve endüstrisinde kullanılır. Organik kurşun bileşiklerinden tetra etil kurşun (TEK) ve tetrametil kurşun (TMK) benzine geri tepmeyi önlemek için ilave edilir. Alkil kurşun bileşiklerini (TEK, TMK gibi) toksisitesi ve çevre kirliliği nedeni ile kullanımları yasaklanmış veya sınırlanmış olmasına karşın halen bir çok ülkelerde önemini korumaktadır (Fazla bilgi için Vural, N : 1996 ve Duydu, Y: Vural, N. 1997'ye bakın).

Kurşunun mesleki ve çevresel izlenmesinde kandakurşun, idrarda kurşun, idrarla porfirin atılımı ve delta aminolevülinik asit (d-ALA) tayinleri yapılır. Laboratuvarımızda bu amaçla kullanılmış yöntemler aşağıda açıklanmıştır.

Kanda ve idrarda AAS ile kurşun tayini

Biyolojik materyalde AAS ile kurşun tayininde değişik yöntemler uygulanabilir. Doğrudan alevli AAS, alevli yöntemde duyarlılığı arttırmak için yarıklı kuvars tüpü uygulaması veya grafit fırın (alevsiz yöntem) yöntemi kullanılabilir (Vural, N., Güvendik, G., 1983; Duydu, Y; Vural, N., 1998; Tümtürk, N., 1998).

1) Alevli AAS yöntemi ile kanda kurşun tayini

Kanda kurşun tayini için, kan örnekleri kurşun içermeyen heparinize tüplere alınır.

Yöntemin prensibi, kurşun sodyum pirolidin ditiyokarbamatla komplekse alınır ve oluşan kompleks su ile doyurulmuş metilisobütilketonla (MIBK), pH: 2-4 aralığında ekstrakte edilir. Organik fazın 217 nm de absorbansı MIBK (kör) e karşı okunur. Kalibrasyon grafiginden konsantrasyon hesaplanır.

Reaktifler :

1. Triton X -100 (Alkil fenoksi politoksi etanol) : 5 ml Triton X-100, noniyonize su ile 100 ml ye tamamlanır.
2. Amonyum (veya sodyum) pirolidin ditiyokarbamat (SDDC): 2 g madde diyonize su ile 100 ml ye tamamlanır.
3. Metiliobütilketon (MIBK) : su ile doyurularak kullanılır.
4. Asetik asit (1.N)

Teknik : 5 ml heparinize kan örneğine 1 ml Triton-X-100 ilave ederek hemoliz edilir. Hemolizi hızlandırmak için vorteksle karıştırılır ve 10 dakika bekletilir. 1 ml amonyum pirolidin ditiyokarbamat çözeltisi, 0.25 ml 1 N asetik asit ilave edilir. Her çözelti ilavesinden sonra vorteksle karıştırılır. 5 ml suda doyurulmuş MIBK ilave edilerek, karıştırılır, 5 dakika 2000 devir/dak santirifüj edilir. Üstte ayrılan organik fazın absorbansı 217 nm de atomik absorbsiyon spektrofotometresinde okunur. Kalibrasyon eğrisinden hesaplanır. (Daha ilerde açıklanmıştır).

2) Atomik absorbsiyon Spektrofotometresinde yarıkli kuvars tüp uygulaması

Alevli atomik abrosbsiyon spektrofotometresinde (FAAS) yarıkli kuvars tüp – atom yakalama tekniği uygulanarak aletin duyarlılığı arttırılır. Bu

amaçla kullanılan yarıklı kuars tüp (Slotted Tube Atom Trap; STAT) uygun bir düzenele alevin üzerine yerleştirilir ve alevin yarıklı kuars tüpün yarıkları arasında geçmesi sağlanır. Kuars tüpün ışık yolunu kapatmaması için yatay ve dikey ayarlar yapılır.

Yarıklı kuars tüpün kaplanması : Bu amaçla % 1'lik lantanyum klorür çözeltisi yarıklı kuars tüp üzerine FAAS çalışır durumdayken püskürtülür. Bu şekilde 20 dakika tüpün alt kısmı, 10 dakikada tüpün üst kısmı kaplanır. Bu kaplama sayesinde tüp ısıya daha dayanıklı hale getirilmiş olur.

Cihazın sıfır ayarı suda doyurulmuş MIBK ile yapılır. Okunan absorpsiyon, günlük hazırlanan kalibrasyon eğrisinden değerlendirilir.

Kullanılan atomik absorpsiyon spektrofotometresinin koşulları : Lamba akımı : 5 mA; dalga boyu 217 nm; yarık (slit) genişliği : 1 nm; yakut asetilen-hava karışımı.

Kalibrasyon : Stok kurşun çözeltisinin seyreltilmesi ile standart karışım seri çözeltileri hazırlanır.

Stok kurşun çözeltisi 0.159 g Pb (NO₃)₂, deiyonize su ile %1 oranında (hacim/hacim) seyreltilmiş sulfirik asitde çözülerek 100 ml ye tamamlanır. Bu çözelti 1 mg/ml kurşun içerir.

Standart kurşun çözeltisi (10 µg/ml), 1 ml stok çözeltisinin deiyonize su ile seyreltilmiş %1 lik nitrik asitle 100 ml ye seyreltilerek hazırlanır. Çözeltiden 0; 0.1 ml; 0.2 ml; 0.3 ml; 0.4 ml ve 0.5 ml alınarak deiyonize su ile 5 ml ye tamamlanır. Böylece 5 ml kan ile çalışıldığında 0; 20; 40; 60; 80 ve 100 µg/100 ml konsantrasyonda karışıma karşılık gelecek standart çözeltiler hazırlanmış olur.

Bu standart çözeltilere, kan örneğine uygulanan işleme tabi tutulur. Organik fazın absorbansı okunur. Aletin sıfır ayarı MIBK'e karşı yapılır. Absorbansa karşı konsantrasyonlar işaretlenerek kalibrasyon grafiği hazırlanır.

3) AAS - yarıklı kuvars tüp kullanarak kanda kurşun tayini

Alevli atomik absorpsiyon spektrofotometresinin (FAAS) duyarlılığı; yarıklı kuarz tüp-atom yakalama tekniği kullanarak arttırılabilir. Daha önce açıklanan MIBK ile selasyon oluşturdudan sonra ekstraksiyonla kurşun tayinine göre duyarlık 2.5 kez arttırılabilir (Duydu, Y., ve ark. 1998).

Bu yöntemin prensibi, analizi yapılan ve atomize edilen metal atomlarının ışık yolu üzerinde yarıklı kuarz tüp kullanımı ile daha yoğun ve daha uzun süre kalmasına dayanmaktadır.

Teknik : Yarıklı kuarz tüp (hazır olarak sağlanır), açıklandığı şekilde %1 lik lantanyum klorürle kaplanır.

Kanda kurşun tayini yapılırken, daha önce açıklanan MIBK'la olan selasyon-ekstraksiyon işlemi uygulanır. Organik faz, yarıklı kuarz tüpü içeren FAAS cihazına çalışırken püskürtülür ve 217 nm de absorbans okunur.

4) İdrarda FAAS ve FAAS-STAT kombinasyonu ile kurşun tayini

Bu yöntemin prensibi, idrardaki kurşunun sodyum dietilditiyokarbam (SDDC) ile selasyon oluşturma ve MIBK fazına alınarak, doğrudan FAAS'de absorbansının ölçülmesidir.

İdrarda kurşun total, anorganik ve organik kurşun olarak tayin edilebilir. Organik kurşun (tetra etil kurşun gibi) bileşiklerine maruziyette, kurşunun bir kısmı organik kurşun metabolitleri (trietil kurşun, dietil kurşun gibi) şeklinde, bir kısmı da anorganik kurşun iyonu şeklinde atılır. Bu nedenle idrarda organik kurşun (PbO) ve anorganik (inorganik) kurşun (PbI) atılımının

ayrı ayrı tayini ve oranları (PbO/PbI), organik kurşun bileşikleri maruziyetin bir ölçüsü olarak değerlendirilebilir (Duydu, Y. Ve ark. 1998).

Total kurşun atılımı ise genel kurşun maruziyetinin bir ölçüsü olarak kullanılır.

İdrarda total kurşun (PbT) tayini : 10 ml idrar numunesi, asit dijestiyon fırınının özel tüplerine konur ve 5 ml konsantre nitrik asit ilave edilir. 130°C da 90 dakika bekletilir. Süre sonunda, çözelti bir erlene aktararak 1 ml 1 M dibazik amonyum sitrat ilave edilir. Seyreltik amonyak çözeltisi ile pH 7 ye aralanır. 2 ml %3 SDDC ilavesinden sonra 2 ml MIBK ile ekstrakte edilir. Organik fazın absorbansı su ile doyurulmuş MIBK 'a karşı 217 nm de okunur. Kalibrasyon eğrisinden konsantrasyon hesaplanır.

Kalibrasyon eğrisi için, stok kurşun çözeltisi 100 mg/100 ml, önce 1 ml alınarak deiyonize su ile 100 ml ye tamamlanır (1 mg/100 ml). Bu çözelti uygun şekilde seyreltilerek 0.5 µg/ml ve 7 µg/ml lik standart kurşun çözeltileri hazırlanır.

Standart çözeltilerden 10 ml alınarak, idrarda total kurşun tayini yöntemi uygulanır. Elde edilen absorbanslara karşı konsantrasyonlar işaretlenerek kalibrasyon eğrisi hazırlanır.

Not : Aynı yöntem, yarıkıl kuarz sistemini içeren FAAS ile de duyarlılığın artırılması için kullanılabilir.

Pb maruziyetinde idrarda δ-ALA tayini

İdrarda δ-aminolevülinik asit (ALA) artışının kurşun maruziyetinin tanısında kullanılabileceği (biyomarker) 1960'lı yıllardan beri bilinmektedir. Kandaki ALA ile idrardaki ALA konsantrasyonu arasında doğrusal bir ilişki olduğu gösterilmiştir. Uygulamada idrar ALA konsantrasyonunun tayini daha çok kullanılmaktadır.

İdrarda ALA tayininde prensip, ALA'nın etil asetoasetat ile kondensasyonu sonucu oluşan 2-metil-3-karbetoksi-4-(3-piropiyonik asit) pirolun (kısaca ALA-pirol), etil asetat ile ekstrakte edilmesi ve Ehrlich reaktifi ile verdiği viyole rengin absorbensinin 553 nm de ölçülmesine dayanır.

Kullanılan reaktifler :

Stok ALA çözeltisi : 50 mg/100 ml (suda) konsantrasyonda hazırlanır. Bu çözelti +4°C de en az 2 ay dayanıklıdır.

Standart ALA çözeltileri; 0.6; 1.2; 3.0; 5 ve 6 ml stok çözeltiden alınarak su ile 100 ml ye seyreltilir. Böylece 0.3; 0.6; 1.5; 2.5 ve 3 mg/100 ml konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlanmış olur.

Asetat tamponu (pH: 4.6) : 70 ml su üstüne, 5.7 ml glasiyal (konsantre) asetik asit ve 13.6 g sodyum asetat trihidrat ilave edilerek çözülür. Distile su ile 100 ml ye tamamlanır.

Ehrlich reaktifi : 30 ml glasiyal asetik asit üzerine 1 g p-dimetilaminobenzaldehit ve 5 ml %60 perklorik asit ilave edilir. Glasiyal asetik asit ile 100 ml ye tamamlanır.

Teknik : Kapaklı 2 ayrı tüpe 1'er ml idrar ve 1'er ml asetat tamponu (pH: 4.6) ilave edilir. Tüplerden birine 0.2 ml etil asetoasetat ilave edildikten sonra her iki tüp vorteksle karıştırılır (etil asetoasetat ilave edilen tüp blank olarak kullanılır). Tüplerin her ikisi de kaynayan su banyosunda 10 dk. bekletilir. Tüpler soğutulduktan sonra her ikisine de 3'er ml etil asetat ilave edilir ve elde çalkalanarak ALA-pirol ekstrakte edilir. 3 dk. 3000 rpm'de santrifüj edildikten sonra üst fazda kalan etil asetat dan 2'şer ml alınıp ayrı tüplere aktarılır. Her iki tüpe de 2 ml Ehrlich reaktifi ilave edildikten sonra 10 dk. beklenir ve 553 nm de absorbensleri okunur.

İdrardaki ALA konsantrasyonunu tayin etmek için etil asetoasetat ilave edilen (A) ve ilave edilmeyen (B) tüplerinin absorbensleri ayrı ayrı ölçülür. B

tüpünden elde edilen absorbans A tüpünden elde edilen absorbans dan çıkarılır ve elde edilen absorbans değerine karşılık gelen ALA konsantrasyonu standart eğriden hesaplanır.

Kalibrasyon doğrusu : Daha önce hazırlanmış olan standart ALA çözeltilerine, numunelerde ALA tayininde açıklanan işlemler aynen uygulanır ve 553 nm de okunan absorbanslara karşı konsantrasyonlar belirlenerek kalibrasyon eğrisi hazırlanır.

Kurşun maruziyetinde porfirinlerin tayini

Kurşun maruziyetinde, hem metabolizmasında oluşan porfirinlerin atılımının hızlandığı yıllardan beri bilinmektedir. Porphirinler arasında en çok uroporfinin ve koproporfinin atılımı araştırılır. Ayrıca kurşun maruziyetinde eritrositlerde porfirinlerin de düzeyi artar. Bu porfirinlerin çoğu protoporphirin şeklindedir. Eritrositlerdeki protoporphirin artışı kurşun zehirlenmesinin tanısında biyolojik indeks olarak kullanılır.

1) İdrarda uroprofinin tayini :

Yöntemin prensibi, idrar örneğine disodyumhidrojen fosfat (Na_2HPO_4) ve kalsiyum klorür (CaCl_2) ilavesiyle çöken porfirinlerden, uroporphirinler kalsiyum fosfat üzerinde absorbe olur. Çökelek hidroklorik asitte çözülür ve 380, 405 ve 430 nm de absorbansları okunarak, konsantrasyon hesaplanır.

Teknik : 5 ml idrar örneği deney tüpüne konarak, 1 ml 1 M asetik asit, 4 ml 1 M sodyum asetat ilave edilir. Çözeltinin pH sı 5-5.5'e ayarlanmış olmalıdır. 15 ml lik santifüj tüpüne pH sı ayarlanmış idrar örneğinden 2 ml konur. Üzerine 2 damla %5 lik Na_2HPO_4 ve 2 ml 1 N NaOH ilave edilir. Vorteksle karıştırıldıktan sonra 30 dakika bekletilir 10 dakika santrifüj, 2000 dak/devirle santrifüj edilir.karıştırıldıktan sonra 30 dakika bekletilir 10 dakika santifüj (2000 dak/devirle) edilir.

Üst faz atıldıktan sonra tüpe 2 ml 0.1 N NaOH ilave edilir. Tekrar vorteksle 10 dakika karıştırılarak santrifüj edilir. Üst faz atılır. Kalıntıya 2 ml su ilave ederek, vorteksle karıştırma ve santrifüj işlemi tekrarlanır. Üst faz atılır, alt faz süzülür. Çökelek 10 ml 0.5 N-HCl içinde çözülür. Çözelti spektrofotometre küvetine aktarılarak, 380; 405 ve 430 nm de 0.5 N-HCl'e karşı absorbansları spektrofotometrede okunur.

Uroporfirin miktarı aşağıdaki formülle hesaplanır :

$$\mu\text{g uroporfirin/ml} = 0.831 \times [2 A_{405} (A_{380} + A_{430})]$$

Burada : A absorbansı göstermektedir. Sonuçlar kreatinin'e göre düzeltilir.

2) İdrarda koproporfinin tayini

Yöntemin prensibi: Asitlendirilmiş idrardan koproporfirinler eter ile ekstrakte edilir. Eter fazı 0.1 N HCl ile ekstrakte edilerek, 380, 401 ve 430 nm de absorbanslar spektrofotometrede okunur.

Teknik : Bir ayırma hunisine 15 ml idrar örneği alınır. 1 ml glacial asetik asit ilave ederek, numunenin pH si 2.5 - 3.0'e ayarlanır. 30 ml eter ilave ederek, huninin ağzı kapalı olarak 2 dakika çalkalanır. Sulu faz atılır, eter fazına 10 ml su ilave ederek tekrar çalkalanır.

Fazlar ayrıldıktan sonra, sulu faz atılır. Eter fazı temizleninceye kadar su ile yıkama (ekstraksiyon) işlemi bir kaç kez daha tekrarlanır. Eter fazına / ml 0.1 N HCl ilave edilerek çalkalanır. Eter fazının 1 ml 0.1 NHCl ile ekstraksiyonu 5 kez tekrarlanır. Birleştirilen asit ekstraktları 5 dakika 2000 devir/dakikada santrifüj edilir. Üst faz, 1 cm lik spektrofotometre küvetine konarak, 380; 401 ve 430 nm de 0.1 NHCl'e karşı absorbansları okunur.

İdrarda koproporfirin konsantrasyonu aşağıdaki formülle hesaplanır.

$$\mu\text{g koproporfirin/ml ekstraktı} = 0.817 [2 \times A_{401} - (A_{380} + A_{430})]$$

$$\text{Toplam koproporfirin } (\mu\text{g}) = (\text{koproporfirin } (\mu\text{g})/\text{ml ekstrakt} \times \frac{5}{15}) \times 24 \text{ saatlik idrar ml}$$

Alınan idrar örneği "spor" idrar örneği olduğu için, toplam koproporfinin miktarından önce, koproporfinin konsantrasyonu kreatinine göre düzeltilmelidir.

Analiz sonuçlarının yorumu

Kurşuna maruziyet derecesinin belirlenmesinde biyolojik materyalde (kan, idrar, saç, kemik gibi) kurşun tayini, kurşun absorpsiyonunun derecesini gösterir.

Rutin çalışmalarda, kan kurşun düzeyinin ölçülmesi yakın zamanda kurşun maruziyeti için bir indekstir. İdrarda kurşun atılımı daha uzun süreli maruziyetlerin gösterilmesi için daha uygun bir kriterdir. Özellikle organik kurşun bileşiklerine maruziyette total kurşun tayini yanında anorganik kurşun ve organik kurşun tayini de önem taşır.

Kurşun maruziyetinde "hem" metabolizması da etkilenir. Bu nedenle maruziyet derecesi ve kurşun entoksikasyonlarda biyolojik indeks olarak hem metabolizması ara. ürünleri olan d-ALA ve porfirinlerin de analizi yapılır.

Kurşun absorpsiyonu ve kurşundan etkilenmenin tanısında en iyi kriter kan kurşunun tayinidir. Vucutta toplam kurşun birikiminin yaklaşık %2 si kanda bulunur. Kan kurşununun %90'ı eritrositlerde toplanmıştır. Yapılan araştırmalara göre normalde kurşuna mesleki olarak maruz kalmayan kişilerde, çevre kirliliğine bağlı olarak, yetişkin ve çocuklarda kurşun düzeyi 100 ml kanda 0-40 μg arasında değişir.(0-40 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ kan). Kandaki kurşunun 80-120 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ arasında olması absorpsiyonun arttığını gösterir.

Şiddetli zehirlenmelerde ve tehlikeli durumlarda kan kurşun düzeyi 120 µg/100 ml kan üstüne çıkar.

İdrarda devamlı kurşun atılımı yüksek miktarda kurşun alınmasını gösterir. İdrarda litrede 80 µg kadar kurşun normal; 80-150 µg/l kabul edilebilir; 150-200 µg/l arasında ise artmış kabul edilir. Zehirlenme olaylarında bu miktar 250 µg/l üstüne çıkar.

Porfirinler ve ALA için normal ve yüksek değerler ise :

a) İdrarda ALA (mg/l) : 0-6 normal; 6-20 mg artmış; 20-40 mg/l kabul edilebilir; 40 mg/l ise tehlikeli;

b) İdrarda koproporfin III (KP III ise) µg/l olarak normal kişilerde 0-150 µg/l arasındadır. 150-500 µg/l kabul edilebilir, 500-1500 µg/l artmış; 1500 µg/l üstü ise tehlikeli;

c) Eritrosit protoporfirin düzeyi ise normal kişilerde 0-0.75 µmol/l; mesleki maruz kalanlarda ise 1.5 µmol/l üstüne çıkar.

[Anabilim Dalımızda çevresel ve mesleki kurşun maruziyetinin araştırılması ile ilgili çalışmalar ve bulguları içeren literatürler kitabın sonunda verilmiştir].

EK -1

LABORATUVARDA İLK YARDIM

Kimya laboratuvarlarında çeşitli nedenlerle kazalara rastlanmaktadır. Bu kazalar, kullanılan apereylerin kırılması, patlaması ile ilgili olabildiği gibi, çoğu kez çalışılan toksik kimyasal maddelerin inhalasyonu, göz, deri veya ağıza temasla veya ağız yolu ile sindirim yoluna geçmesi ile meydana gelen zehirlenmeler şeklinde olmaktadır. Bu gibi durumlarda ilk yardım olarak laboratuvarda hemen uygulanması gereken önlemler vardır. Her kimya laboratuvarında çalışanların bilmesi gereken bu önlemler aşağıda açıklanmıştır:

1) Laboratuvarda çalışırken, korunması gereken en önemli organ **gözlerdir. Vakum veya yüksek basınç** altında çalışan apereyleri (vakum desikatörü, otoklav) kullanırken, patlama tehlikesi olasılığına karşı, kalın camlı sağlam bir korunma gözlüğü takmalıdır.

Patlayıcı maddelerle çalışırken de korunma gözlüğü takmak zorunludur. Bilinmeyen bir maddenin patlayıcı olup olmadığını, bu maddenin az bir kısmı metal spatülle alevde ısıtılarak anlaşılabılır.

Metalik sodyum ve potasyum bu tür kazalara yol açan iki metaldir. Bu nedenle bu metallerin kırıntıları açık havada bırakılmamalı, lavabo veya çöp sepetlerine atılmamalıdır. Ayrıca bunlarla yapılan reaksiyonlar, su banyosu yerine yağ veya kum banyosunda yapılmalıdır. Bu metaller miktarlarının 15-20 misli alkolle yok edilmeli veya orijinal şişeleri içinde saklanmalıdır.

Bu nedenle yukardaki koşullarda çalışırken, hiç olmazsa normal bir gözlük takmak yerinde olur.

2) Eter ve diğer uçucu yanabilen organik çözücülerle çalışırken bunların yanında alev bulundurmamalıdır. Yangın çıktığı taktirde yanabilen

her şey uzaklaştırılır. Alev üzerine ıslak paçavra veya karbon tetraklorür dökerek yangın söndürülür. En iyisi, yangın bombası kullanmaktır.

3) Gaz veya çözücü buharlar ile çalışırken inhalasyon yolu ile bir zehirlenme olduysa, kişi derhal laboratuvardan uzaklaştırılır ve yatırılarak sıcak tutulur. Solunumu zorlayan elbise, saat kayışı gibi eşyalar gevşetilir. Hafif şok görüldüğünde çay veya kahve verilebilir.

Tıbbi bir bakım gerekip gerekmediği, hastanın bu ilk yardımdan sonraki durumuna bağlıdır. Amonyak, hidroklorik asit buharı ile hafif bir inhalasyon halinde bile hasta hemen hastaneye yollanır veya doktor çağrılır.

4) Ağız, deri veya gözün kimyasal madde buharı veya kendisi ile temasında, ilk yapılacak iş bol su ile temas yerini yıkamaktır. Arkadan, eğer asit özellikte bir madde ise, sodyum bikarbonat çözeltisi ile; kalevi bir madde ise seyreltik asetik asitle temas yerini yıkamak gerekir. Çoğunlukla bu maddeler cilt üzerinde tahriş edici etkiye sahip olduklarından yıkama işleminden sonra, bir yanık pomadı (vazelin v.s) sürmelidir. Özellikle, gözde bu durum olduysa tıbbi bakım da yapılmalıdır. Yıkama için her laboratuvarda bulundurulması, mümkün olan aperey (Şekil 23) görülmektedir.



Şekil 21- Göz yıkama şişesi

5. Özel antidotlar :

Korozif ve zehirli kimyasal maddelerle çalışan laboratuvarlarda, bu maddelerin özel antidotlarının bulunması gerekir. Örneğin:

a) Brom, formik asit, hidroflorik asit ve benzeri, diğer yakıcı asitlerle oluşan deri yanıklarının tedavisinde (magnezyum+gliserin) pomadı kullanılabilir. 200 g magnezyum oksit, 240 ml gliserinle pasta haline getirilir ve bundan yanık kısma doğrudan doğruya sürülür. Ayrıca 1 hacim amonyağın (d: 0.88) su ile 15 kere sulandırılması ile elde edilen seyreltik amonyak, brom, formik asit ve hidroflorik asitle oluşan yanık şiddetini azaltmakta yararlıdır.

b) Hidrosiyamik asit, siyanür tuzları ve nitrillerle (hidrolizle HCN verirler) oluşan zehirlenmelerde, aşağıdaki şekilde hazırlanan antidot karışımı, hemen ilk yardım olarak hastaya verilebilir.

A) 158 g demir-2- sülfat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ve 3 n sitrik asit BP soğuk suda eritilerek bir litreye tamamlanır (Bu çözelti bozulduğunda kullanılmamalıdır).

B) 60 g susuz Na_2CO_3 bir litre suda çözülür. (A) çözeltisinden 50 ml geniş ağızlı ve polietilen kapaklı bir şişeye konur. Üstüne açıkça okunacak şekilde "SİYANÜR ANTİDOTU A" yazılı bir etiket yapıştırılır. Aynı şekilde (B) çözeltisinden de 50 ml alınarak ikinci bir şişeye konulur ve "SİYANÜR ANTİDOTU B" yazılır. Ani bir zehirlenmede, bu iki şişe içindeki çözelti birbiriyle karıştırılır ve hastaya içirilir. Bu şekilde, demir-2-hidroksit hem emetik olarak etkir, hem de siyanürle toksik olmayan demir bileşiği oluşturur.

Burada önemle belirtilecek nokta şudur : Siyanür zehirlenmesinde ancak yukardaki şekilde bir ilkyardım laboratuvarında uygulanabilir. Bunun dışında hemen doktora başvurulmalıdır. İntravenöz olarak antidot uygulamasını ancak doktor yapabilir.

6) İyot içilmesi halinde, derhal % 1'lik sodyum tiyosülfat içilmelidir. Deri üstündeki iyot lekeleri de, aynı şekilde sodyum tiyosülfat çözeltisi kullanarak uzaklaştırılabilir.

7) Fosforla cilt yanmalarında, yanık yer %3 bakır sülfat ile yıkanmalıdır.

8) Ayrıca büyük laboratuvarlarda, solunum zehirlenmelerinde yapay solunum yaptıran apereyler bulundurulması da yararlıdır.

9) Amonyak tamponu (pH : %): g amonyum 40 ml 5 M amonyak içinde çözülür, su ile 1000 ml ye tamamlanır.

EK -2

ÖNEMLİ REAKTİFLERİN HAZIRLANMASI

Ansties reaktifi : 3.70 g saf potasyum dikromat 150 ml distile suda çözülür. 280 ml saf konsantre sülfürik asit yavaş yavaş karıştırılarak ilave edilir. Distile su ile 500 ml ye tamamlanır.

Alkol Standart çözeltisi : 100 ml lik balonjojeye 50 ml distile su konur. 2.53 ml absölü mutlak etil alkol hassas bir pipet veya büretten ilave edilir. Bu sırada büret veya pipetin ucu su yüzeyine çok yakın olmalıdır. Su ile 100 ml ye tamamlanır. Bu şekilde hazırlanan alkol standardı %2 liktir.

Alkollü potasyum hidroksit çözeltisi : 35 g KOH, 20 ml distile suda çözülür. Saf etil alkol ile 1 litreye tamamlanır.

Bakır sülfat çözeltisi (Reinsch deneyi Hg için) : 5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, 100 ml 1 N HCl de çözülür.

Borat tamponu (pH 9.4) : 24.8 g H_2BO_3 (borikasit), 0.2 N NaOH ile 1 litreye tamamlanır. Bu çözeltiden 80 ml alınarak tekrar 20 ml 0.2 N NaOH ilave edilir.

Brillant green (yeşili) reaktifi : 1 g Brilliant yeşili, 100 ml %25 etil alkolde çözülür.

Bromfenol mavisi reaktifi (TLC de org. fosforular için) : 0.05 g bromfenol mavisi 10 ml asetonda çözülür ve 100 ml %1 AgNO_3 (Aseton + su : 1 + 3 da hazırlanmış) ile karıştırılır.

Bromlu su : 5 g sıvı brom cam kapaklı bir şişeye konarak 100 ml su ilave edilir.

Civa-2-klorür (veya bromür) çözeltisi (Gutzeit deneyi) : 0.05 g bromfenol mavisi 10 ml asetonda çözülür ve 100 ml ye tamamlanır.

Asetat tamponu (pH 5) : 13.6 g Sodyum asetat ve 6 ml asetik asit yeterli miktarda suda çözülür ve su ile 1000 ml'ye tamamlanır.

Civa nitrat çözeltisi (Barbitüratlar için) : ($\text{HgO} - \text{HNO}_3$) çözeltisi : 0.1 g HgO 10 damla %25 HNO_3 içinde çözülür. Berrak kısım kullanılır.

Demir-3-klorür (ferri klorür) çözeltisi : % 5 lik : 5 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 100 ml suda çözülür.

Diazo çözeltisi (fenol tayini için) : a) p-nitroanilin çözeltisi : 0.75 g p-nitroanilin 10 ml suda çözülür ve 20 ml konsantre HCl ilavesinden sonra 250 ml ye tamamlanır. b) % 5 lik NaNO_3 (suda).

Kullanmadan hemen önce 1,5 ml (b) çözeltisi, 25 ml (a) çözeltisi ile karıştırılır.

Dragendorff reaktifi : a) 2 g bizmut subnitrat, 25 ml asetik asit ve 100 ml suda çözülür. b) 40 g potasyum iyodür 100 ml suda çözülür.

Kullanırken 10 ml (a), 10 ml (b), 20 ml asetik asit ve 100 ml su karıştırılır. Raktif 2 günde bir yenilenmelidir.

Fehling reaktifi : a) 35 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 50 ml suda çözülür. (Fehling I). b) 5 g Sodyum hidroksit, 17.5 g senyet tuzu (sodyum potasyum bitartarat) 50 ml suda çözülür. (Fehling II)

Kullanılmadan önce, iki çözelti eşit hacimde karıştırılır.

Fenol çözeltisi : a) Stok (Standart çözelti) : 0.5 g saf fenol 10 ml suda çözülür ve 4 ml konsantre HCl ilavesinden sonra su ile 500 ml ye tamamlanır. b) Seyreltilmiş fenol standardı : 1 ml stok fenol çözeltisi su ile 100 ml ye seyreltilir. Bu çözelti 1 ml de 10 mikrogram (μg) fenol ihtiva eder.

Flourscein reaktifi (İTK için) : 0.04 g flourscein 100 ml etil alkolde çözülür.

Forrest reaktifi : 25 ml % 0.2 potasyum dikromat (suda); 25 ml % 30 sülfürik asit (hacim/hacim); 25 ml % 20 perklorik asit (ağırlık/ağırlık) -ve 25 ml % 50 nitrik asit (hacim/hacim) karıştırılarak hazırlanır.

FPN reaktifi : % 5 ferriklorür, 45 ml % 20 perklorik asit (ağırlık/ağırlık) ve 50 ml % 50 nitrik asit (ağırlık/ağırlık) birbiriyle karıştırılır.

Fröhde reaktifi : 0.1 g sodyum molibdat 100 ml konsantre sülfürik asit içinde çözülür.

Gibbs reaktifi : 0.1 g 2,6-dibromokinon-klorimid 25 ml % 95 etanolde çözülür. Cam kapaklı renkli şişede ve buzdolabında saklanmalıdır. Çözeltinin rengi kahverengiye dönüştüğünde kullanılmaz.

İyot çözeltisi : a) Genel (%2) : 2 g iyot ve 4 g potasyum iyodür 100 ml suda çözülür. N-iyot çözeltisi : 12-13 g I ve 20-25 g KI 100 ml suda çözülür.

İyodoplatinat çözeltisi : 1 g platin klorür 10 ml suda çözülür ve 200 ml % 30 luk KI içine ilave edilir. Su ile 200 ml ye tamamlanır. Karışım karanlıkta saklanmalıdır.

İzopropilamin çözeltisi (Barbitüratlar için) : 5 g izopropilamin 100 ml susuz metil alkol içinde çözülür.

Kinin-KI reaktifi (Bizmut için) : 1 g kinin sülfat 100 ml % 0.5 lik HNO te çözülür. 2 g KI ilave edilir. Kahverengi şişede saklanır.

Kobalt nitrat çözeltisi (Barbitüratlar için) : 1 g kobalt nitrat veya kobalt asetat 100 ml susuz metil alkol içinde çözülür.

Kromotropik asit çözeltisi : 0.5 g kromotropik asit (1,8-dihidroksi naftalin-3,6-disülfonik asit) su ile 100 ml ye tamamlanır.

Kurşun asetat çözeltisi : 10 g kurşun asetat suda çözülür ve 100 ml ye tamamlanır.

Mandelin reaktifi : 1 g amonyum vanadat 100 ml konsantre sülfürik asit içinde çözülür.

Marme reaktifi : 30 g kadmiyum iyodür ve 60 mg potasyum iyodür 180 ml suda çözülür.

Marquis reaktifi : 3 ml konsantre asite 3 damla % 40 lık formaldehit (formalin) damlatılır. Kullanılmadan hemen önce hazırlanmalıdır.

Mayer reaktifi : 1.4 g civa-2-klorür (merkür klorür, HgCl) ve 5 g potasyum iyodür 100 ml suda çözülür.

Mecke reaktifi (alkaloidler için) : 0.5 g selenyöz asit 100 ml konsantre sülfürik asitte çözülür.

Millon reaktifi : 10 g civa, 20 ml konsantre nitrik asitle çözülür ve eşit hacimde su ilave edilerek karıştırılır.

N-1-naftiletilendiamin reaktifi : 100 mg N-1-naftiletilendiamin etil alkolde çözülerek, 100 ml'ye tamamlanır.

Nessler reaktifi : a) 2 g HgCl_2 6 g KI ile birlikte az miktar suda çözülür. 17 g KOH az miktar suda çözülerek eklenir. Karıştırıldıktan sonra 100 ml'ye tamamlanır.

b) 3.5 g potasyum iyodür ve 1.25 g cıva-2-klorür (HgCl_2) 80 ml su da doymuş HgCl_2 çözeltisinden bu karışıma hafif kırmızı bir çökelek meydana gelinceye kadar karıştırılarak ilave edilir. 12 g KOH bu çözelti içinde çözülür, az miktar doymuş HgCl_2 ilave edildikten sonra su ile 100 ml ye tamamlanır. Bir gece bekletilir, dekante edilerek berrak kısım kullanılır.

Palladyum klorür çözeltisi (CO için) : a) 0.22 g PdCl_2 , 250 ml 0.01 N HCl'de çözülür. Gerekğinde hafifçe ısıtılır. b) 1 g $\text{PdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 100 ml seyreltik HCl de (35 ml konsantre HCl su ile 100 ml ye tamamlanır) çözülür. Çözünmenin tamamlanması için hafifçe ısıtılmalıdır.

p-dimetilamin benzaldehit reaktifi (alkaloidler için) : a) (Alkollü çözelti) : 1 g madde, 100 ml etil alkolde çözülür ve 2 damla konstantre sülfürik asit damlatılır. b) (Asitli çözelti) : 1 g madde 40 ml konstantre H_2SO_4 ihtiva eden 100 ml seyreltik asitli suda çözülür. c) (Asitli çözelti) : 1 g madde 100 ml konsantre H_2SO_4 içinde.

Pikrik asit çözeltisi (alkaloidler için) : Suda doymuş çözeltisi hazırlanır.

Potasyum triiyodür (KI-I) çözeltisi (asitli)

Mikrokristalizasyon için : 10 g iyot 35 g KI 100 ml suda çözünür. Bu çözeltinin 0.4 ml'sine 20 ml glacial asetik asit ve 2.0 ml fosforik asit (H_3PO_4) ilave ederek karıştırılır.

Potasyum iyodür- Na_2SO_3 (Reinsch deneyi için) : 5 g KI ve 20 g $\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 100 ml suda çözülür.

Potasyum permanganat çözeltisi : a) (Kromotropik asit deneyi için) : 1.5 g KMnO_4 , 7.5 ml % 85 fosforik asit içinde çözülür ve su ile 50 ml ye tamamlanır.

b) Mikrokristalizasyon için: 2 g KMnO_4 su ile 100 ml'ye tamamlanır ve 5 damla H_3PO_4 ilave edilir.

Pirotannik asit çözeltisi (CO için) : 1 g pirogallik asit ve 1 g tannik asit 100 ml suda çözülür.

Rhodamin B : a) (İTK'de püskürtme reaktifi): 0.1 g Rhodamin B 100 ml de çözülür. b) Talyum için: 0.05 g Rhodamin B 100 ml konsantre HCL içinde çözülür.

Schiff reaktifi : 0.2 g bazik füksin veya p-rozanilin hidroklorür 120 ml sıcak suda çözülür. Soğuduktan sonra, 20 ml distile suda çözülmüş 2 g anhidr sodyum sülfür ve 2 ml konsantre HCl ilavesinden sonra ağzı sıkı kapalı şişede saklanır.

Scott-Wilson reaktifi : a) 5 g cıva-2-siyanür 300 ml suda çözülür. b) 90 g sodyum hidroksit 300 ml suda çözülür. c) 1.45 g gümüş nitrat 200 ml suda çözülür.

(c) çözeltisine tamamen soğuk (b) çözeltisi ilave edilir ve karıştırılır sonra (a) çözeltisi ilave edilirken devamlı karıştırılır. Bu reaktif 6 ay daya nabilir. Bulanıklık veya çökelek oluşması halinde atılır. Zehirli olduğu için pipet kullanılmamalıdır.

Sitrat tampon çözeltisi (pH:2.2) : a) 1.187 g $\text{NaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ distile su ile 100 ml'ye tamamlanır. b) 0.1 M sitrik asit. 20 ml (a) ile 980 ml (b) çözeltisi karıştırılır.

Trinder reaktifi : 40 mg merkürük (Hg) klorür 850 ml suda çözülür, 120 ml M hidroklorik asit ve 40 g hidrate ferriklorür eklenir, su ile 1000 ml ye tamamlanır.

KAYNAKLAR

- Baselt, R.C.**, (1980). Biological Monitoring of Industrial Chemicals. California Biomedical Publications. Davis. C.A.
- Bauer, J.D.**, (1980). "Carboxyhemoglobin, Methemoglobin and Sulfhemoglobin" in Gradwohl's Clinical Laboratory and Diagnosis. Volume 1, Saint Louise the C.V. Mosby Company. London. 397-405.
- Borriello, R., Gagliano Candela, R.**, (1988) "Trace Element Analyse In Forensics" in Development in Analytical Methods in Pharmaceuticals, Biomedical and Forensics Sciences. Pimento G., Tagliora F., Marigo M., Frigeno A. (Eds) Plenum Press, New York, 67-74.
- Clarke, E.G.C.**, (1975). Isolation and Identification of Drugs Vol. 2, the Pharmaceutical Press. London. 964-978.
- Corvalho, O., Lanchote, V.L., Bonato, P.S., Queiraz, R.H.C., Santos, A.C., Dreoss, S.A.C.**, (1991). "A new derivatization, procedure for the analysis of hippuric acid and m-methyl hippuric acid by gas chromatography" *Int. Arch. Occup-environ. Health*. 63: 33-37.
- Cox, R.A., Crifasi, J.**, (1990). "A comparison of a commercial microdiffusion method and gas chromatography for ethanol analysis" *J. Anal. Toxicol.* 14: 211-212.
- Curry, A.S.**, (1972). Advances in Forensic and Clinical Toxicology, C.R.C. press. Ohio.
- Donike, M.**, (1986). "List of doping classes and methods", Beauftragter für Dopinganalytik Des Bundesinstituts für Sportwissenschaft.
- Duydu, Y., Süzen, S., Aydın, A., Sayal, A., Işimer, A., Vural, N.**, (1998) "Urinary excretion of total and inorganic lead in tetraethyl exposed workers" *Bull: Environ. Contam. Toxicol.* 60: 395-401.
- Duydu, Y., Süzen, S., Erdem, N., Uysal, H., Vural, N.**, (1999) "A modified method for determination of hippuric acid in urine by HPLC" *Ankara Ecz. Fak. Derg.* 28(1), 37-46.
- Duydu, Y., Vural, N.**, (1996). "Haşış içindeki majör kannabinoidler olan THC, CBD'nin İTK ve kapiler gaz kromatografisi yöntemleri ile tayinleri" *GATA Bülteni*, 38, 292-296.
- Duydu, Y., Vural, N.**, (1998). "Urinary excretion of lead and δ -aminolevulinic acid in workers occupationally exposed to tetraethyl lead" *Biological trace element research* 63: 185-194.
- Ellenhorn, M., Schwald, S., Ordog, G., Wasserberger, J.**, (1997). Ellenhorn's Medical Toxicology. Williams & Wilkins a Waverly Company, 2. baskı, 50-64.
- Emerson, V.J.**, (1998). "Alcohol Analysis" in Essentials of Forensic Science, White P., (Edt). The Royal Society of Chemistry. London. 263-287.
- Feldstein, M.**, (1967). "Methods for the Determination of Carbon Monoxide" In Progress In Chemical Toxicology Stolman, A. (Edt), Academic Press, London:99-119.
- Flanagan, R., Braitwaite, R., Brown, S.S., Widdop, B., de. Wolff, F.A.**, (1995). Basic Analytical Toxicology, WHO Genova.

- Graf, E., Preuss Fr., R.**, (1969). *Gadamer's Lehrbuch der Chemischen Toxikologie und Anleitung zur Ausmittlung der Gifte*, Vandenhoeck & Ruprecht in Göttingen, Band I. II 3. baskı.
- Güley, M., Vural, N.**, (1975). *Toksikoloji Laboratuvar Kitabı*, Ulucanlar Matbaacılık Sanayii. (Ankara. A.Ü.Ecz. Fak.Yayınları, No: 37).
- Gündüz, T.**, (1988). *Instrümental Analiz*. A.Ü. Fen Fak. Yayınları, (no, genel: 147, analitik: 6) A.Ü. Basımevi. Ankara.
- Kaye, S.**, (1961). *Handbook of Emergency Toxicology*, Charles & Thomas publisher. Springfield Illinois. 2. baskı.
- Küpçü, Ş., Vural, N.**, (1993) "Sık zehirlenme nedeni olan ilaçların terapötik ve toksik kan düzeylerinin araştırılması", *Türk Hij. Der. Biyol. Derg.* 50, 103-114.
- Lowry, L. K.**, (1986). "Biological exposure index as a complement to the TLV", *J. Occup. Med.* 28, 578-582.
- Moffat, A.C., Jackson, J.V., Moss, M.S., Widdop, B.**, (1986). *Clarke's Isolation And Identification Of Drugs*. The Pharmaceutical Press, London 2. baskı.
- Pannel, L.K., Thomson, B., Wilkinson, L.F.**, (1983). "A modified method for the analysis of carbon monoxide in postmortem blood", *J Anal. Toxicol.* 1-6.
- Poklis, A.**, (1996). "Analytical / Forensic Toxicology" in Cassarett & Doull's Toxicology Klaasser C.D (Edt) 5. baskı Mc Graw Hall New York , 951-969.
- Serrano, L., Capshaw, B., Quattrocchi, F.**, (1988) "A Comparison of a microdiffusion method for ethanol and the Abbot TDx ethanol assay", *J. Anal. Toxicol.* (12):348-349.
- Siegel, J.A.**, (1988). "Forensic Identification Of Controlled Substances" in Forensic Science Handbook, V:II Saferstein, R.(Edt), Prentic Hall, 70-131.
- Stolman, A.**, (1963). *Progress in Chemical Toxicology V:1*, Academic Press, London 1. baskı.
- Trevisan, A.**, (1990). "Concentration adjustment of spot samples in analysis of urinary xenobiotic metabolites", *Am. J. Ind. Med.* 17: 637-642.
- Vural, N.**, (1996). *Toksikoloji*. A.Ü. Basımevi, Ankara (A.Ü. Ecz. Fak. Yayınları, No: 73).
- Vural, N., Burgaz, S.**, (1984). "Türkiye'de kullanılan klorlu fenoksiasetik asit grubu herbisitlerin idrarda tayini için bir yöntem". *Doğa Seri C*, 8, 406-412.
- Vural, N., Güvendik, G.**, (1983). "Ankara'da hava ve insanlarda kan kurşun seviyesinin araştırılması". *Doğa Bilim Dergisi: T p (7)* 192-200.
- Vural, N., Kahraman, R.**, (1994). "Karbonmonoksit zehirlenmesi ile ölenlerde ve sigara içenlerde karboksihemoglobin ve methemoglobin düzeyleri", *Ankara Ecz. Fak. Der.* 23 (1-2): 11-20.

- Vural, N., Motacedded, Z.** (1978). "Standardization of carboxyhemoglobin by microspectrophotometric method and application of the method to workers occupationally exposed to carbonmonoxide", *A.Ü. Ecz. Fak. Mec.* 8(1): 55-68.
- Vural, N., Saygı, Ş.** (1981). "Kan alkolünün (mikroyöntemle) GLK ile tayini ve yöntemin trafikte uygulanması", *A.Ü. Ecz. Fak. Mec. (II)* 2: 190-199.
- Vural, N., Saygı, Ş.** (1983). "Organik baz yapısındaki stimulanların (doping maddelerinin) idrarda İTK ve GLK ile nitel ve nicel analizleri", *A.Ü. Ecz. Fak. Mec.* 13(1-2): 65-77.
- Vural, N., Sayın, H.** (1995). "Effect of time interval between the traffic case and alcohol on the legal blood alcohol limit in traffic accidents", *A.Ü. Ecz. Fak. Derg.* 24(2): 83-94.
- Vural, N., Sayın, H.** (1996). "Kan alkol düzeyini etkileyen faktörlerin adli tıp açısından değerlendirilmesi", *Adli Tıp Bülteni* 1(2): 74-81.
- Vural, N., Süzen, S.** (1989). "İdrarda testosteron ve epitestosteronun ince tabaka kromatografisi ve gaz sıvı kromatografisi ile tayini", *A.Ü. Ecz. Fak. Derg.* 19(1-2): 59-70.
- Vural, N., Ünlü, H.** (1996). Methylmercury in hair of fishermen from Turkish coasts. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 57:315-320.

YARARLANILAN TEZLER

- Aksu Şan, N.** (1993). Bazı İlaç ve Pestisitlerin Enzimatik Yıkılma ile Postmortem Analizleri (A.Ü. Adli Tıp Ens. Doktora Tezi, Danışman: Prof. Dr. N. Vural) (A.Ü.: Araştırma fonu. Proje No: 90-20-00-01).
- Alıkaşifoğlu, N.** (1995). Postmortem Kanda Kolinesteraz Aktivite Tayininin Adli Toksikoloji Açısından Değerlendirilmesi. (A.Ü.Sağlık Bilimleri Ens. Yüksek Lisans Tezi, Danışman: Prof. Dr. N. Vural).
- Bahardoğan, N.** (1996). Metil Alkol Zehirlenmesinde Biyolojik Materyalde Biyokimyasal Değişikliklerin İncelenmesi (A.Ü. Sağlık Bilimleri Ens. Yüksek Lisans Tezi, Danışman: Prof. Dr. N. Vural).
- Besbelli, N.** (1993). Organik Fosforlu İnsektisitlere Mesleki Ve İndirekt Maruz Kalmanın Toksikolojik Yönden İzlenmesi (A.Ü.Sağlık Bilimleri Ens., Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Danışman: Prof. Dr. N. Vural).
- Burgaz, S.** (1983). Türkiye'de Kullanılan Dipiridil Grubu Ve Klorlu Fenoksiasetik Asit Grubu Herbisitlerin Analitik Toksikoloji Açısından İncelenmesi (A.Ü. Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi, Danışman: Prof. Dr. N. Vural).
- Doğanyigit, R.** (1999). Aromatik Hidrokarbonlara Mesleki Maruziyetin Biyolojik ve Çevresel Olarak İzlenmesi (A.Ü.Sağlık Bilimleri Ens., Disiplinlerarası Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Danışman: Prof. Dr. N. Vural).

- Duydu, Y.** (1995). Alkil Kurşun Bileşiklerine Maruziyetin Biyolojik İzlenmesi (A.Ü. Sağlık Bilimleri Ens. Doktora Tezi, Danışman: Prof. Dr. N. Vural) (A.Ü. Araştırma Fonu, Proje No: 91300007).
- Ergun, B.** (1986). Modifiye Bogen ve Gaz Sıvı Kromatografisi Yöntemleri ile Kanda Etil Alkol Tayininin Analitik Toksikoloji Açısından Araştırılması. (Yüksek Lisans Tezi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, Danışman: Prof. Dr. N. Vural).
- Güvendik, G.,** (1982). Ankara'da Hava ve İnsanlarda Kurşun Seviyesinin Araştırılması (A.Ü.Ecz.Fak. ve TÜBİTAK Tıp Araştırma Grubu: Proje No : TAG 433; Doktora Tezi, Danışman: Prof. Dr. N. Vural).
- Karakaya, A.,** (1982). Türkiye'de Sık Olarak Zehirlenmelere Neden Olan İlaç ve Pestisitlerin Xad-2 ile İdrardan İzolasyon Koşullarının Araştırılması ve Bir Toksikolojik Analiz Tarama Yönteminin Geliştirilmesi (A.Ü. Ecz.Fak.Toksikoloji Bilim Dalı Doktora Tezi, Danışman: Prof. Dr. N.Vural).
- Motaceded, Z.** (1977) Mikrosspektrofotometrik Yöntemle Karboksihemoglobin Tayininin Standardizasyonunu ve Bu Yöntemle Mesleki Olarak Karbonmonoksit Maruz Kalanlarda Karbonmonoksit İnhalasyonunun Saptanması (A.Ü. Ecz. Fak. Toksikoloji Kürsüsü Doktora Tezi, Danışman: Prof. Dr. N. Vural).
- Saygı, Ş.** (1982). Organik Baz Yapısındaki Stimülanların (doping maddelerinin) İdrarda İTK ile Nitel ve Nicel Analizleri. (A.Ü. Ecz.Fak. Toksikoloji Bilim Dalı Doktora Tezi, Danışman: Prof.Dr. N. Vural).
- Sayın, H.,** (2000). Alkol Hassasiyeti ve Alkol Metabolizması Enzimlerinin Postmortem Araştırılması ve Adli Toksikoloji Açısından Değerlendirilmesi (A.Ü.Sağlık Bil. Ens. Doktora Tezi, Danışman: Prof. Dr. N. Vural).
- Süzen, S.** (1988) Anabolik Siteroitlerin İdrardan İzolasyonları ve Tanımlanmaları. Testosteron Ve Epitesteronun GSK ile Tayini (A.Ü. Sağlık Bil. Ens. Y. Lisans tezi, Danışman: Prof. Dr. N. Vural, A.Ü. Araştırma Fonu No: 87-30-0012).
- Tümtürk, N.,** (1998). Düşük Düzeyde Kurşun Maruziyetinde Bazı Biyokimyasal Parametrelerin Araştırılması (A.Ü. Sağ. Bil. Ens. Doktora Tezi, Danışman: Prof. Dr. G. Güvendik).
- Usanmaz, S.,** (1994). İş Yeri Ortamında Formaldehitin Çevresel İzlenmesi (A.Ü.Adli Tıp Ens. Y.Lisans Tezi.Danışman: Prof. Dr. N.Vural).

İNDEKS

- A -

AAS. 50. 64. 65. 66. 194. 195. 196. 198
 Aldehitler. 20. 36. 104
 Aldrin. 182. 183. 184
 Alkaloidler. 13. 31. 40. 44. 211. 212
 Alkil fosfat. 185
 Alkil kurşun. 195
 Alkolmetre. 112. 114
 Amberlit XAD-2. 46. 47. 48
 Amfetamin. 34. 44. 172. 174. 175. 176
 Amfoter maddeler. 43
 Aminoklorobenzofenon. 154
 Aminolevülinik asit. 195
 Amobarbital. 52. 142
 Amonyum pirolidin ditiyokarbamat. 196
 Anilin. 17. 18. 36. 138. 139. 140. 159
 Antijen. 66. 67
 Antikor. 66. 67. 69. 70. 71. 73
 Antimon. 3. 26. 27. 28. 65
 Antipirin. 18. 44. 109
 Apomorfin. 21
 Aromatik primer aminler. 36
 Arsenik. 26. 28. 194
 Asetamid. 118
 Asetaminofen. 49. 159
 Asetil tiyokolin. 25
 Aseton. 7. 17. 19. 32. 36. 56. 105. 124. 144. 177. 179. 186. 187
 Asidik ilaç. 52
 Asidik iyodoplatinat. 57
 Aspirin. 22. 155. 158
 Atomik absorpsiyon spektrofotometresi. 65. 194

- B -

Bakır. 26. 27. 28. 29. 91. 104. 167. 208
 Barbital. 142. 143. 147. 149. 150
 Barbitüratlar. 13. 31. 49. 60. 69. 74. 144
 Beam testi. 169
 Benzen. 17. 31. 32. 34. 46. 64. 125. 126. 127. 137
 Benzodiazepinler. 150. 151.
 Benzofenon. 154

Berlin mavisi. 24. 92
 Bizmut. 3. 26. 27. 28. 210
 Bratton-Marshall. 151. 153
 Buchwald. 81

- C -

Cıva. 3. 26. 27. 28. 29. 31. 36. 52. 136. 156. 212. 213
 Cıva-1. 52
 Cıva-2. 157. 211
 Conway mikrodifüzyon. 37. 38. 88. 95. 96. 101. 102. 107. 108
 Çinkofen. 42

- D -

5,5'- ditiyobis (2-nitrobenzoik asit). 189
 DDT. 182
 Demir-2-hidroksit. 207
 Demir-3-klorür. 20. 93
 Desipramin. 22
 Dializ. 11. 31
 Diazepam. 150. 152. 154
 Diazinon. 184. 188
 Diazo reaksiyonu. 36
 Dieldrin. 182. 183
 Dietileter. 128
 Dietilfosfat. 185
 Dietilpropion. 172
 Difenilamin. 23. 24. 175
 Digoksin. 4. 15. 69. 73
 Diklorvos. 185
 Dikromat testi. 20
 Dikuat. 23. 25
 Dillie-Koppany testi. 167
 Distilasyon. 31. 34. 40. 126. 138
 Ditiyonit. 80. 83. 84
 Dokofan. 183
 Doping. 171. 172. 176. 177. 214. 216.
 Dowex 50. 47
 Dragendorff. 173. 210
 DTNB. 189. 190. 191. 192
 Dubowski yöntemi. 81. 90
 Duquenois-Levine reaktifi. 166

- E -

Elfedrin, 18, 172, 176
Ekstraksiyon, 39
Emetin, 44
Enzim dijestiyon yöntemi, 39
Enzim yıkılama yöntemi, 44,
Epitestosteron, 176, 180
Eroin, 15
Eserin salisilat, 191
Esrar, 166, 170
Eter, 17, 41, 44, 47, 147, 172, 180, 202
Etil alkol, 20, 32, 40, 99, 103, 104, 112
Etil benzen, 125
Etilen klorür, 32

- F -

FAAS, 196, 197, 198, 199
Fehling deneyi, 19, 20
Feldstein ve klendshoj, 35
Fenasetin, 18, 23, 36, 163
Fenil butazon, 42
Fenil hidrazin, 117
Fenil salisilat, 44
Fenilpropiyonat, 177, 179
Fenitoin, 4, 18, 69
Fenobarbital, 57, 143, 145
Fenoller, 33, 36, 38, 134, 135,
Fenotiyazinler, 25
Fentermin, 174
Ferri klorür, 20
Ferrosiyanür, 24, 36, 92
Fizostigmin salisilat, 191
Floresans polarizasyon immunoassay, 72
Floroglusin, 21
Formaldehit, 17, 99, 101, 102, 117, 118,
119, 211
Formalin, 117, 211
Formalin, 116, 117
Formik asit, 99, 118, 119, 120, 207
Formol, 116
Fpn reaktifi, 22
Fraksiyonlu ekstraksiyon, 39, 41, 44
Froehde reaktifi, 165
Fujiwara deneyi, 22

- G -

Gallik asit, 21

Gaz kromatografisi, 50, 61, 62, 103, 125,
174, 176
Gottler-goldbaum yöntemi, 94
Glukoz, 7, 19, 20, 25
Glutetimid, 9, 42
Guayak reçinesi, 91
Guayakol, 33
Guignard deneyi, 36
Gutzeit, 28, 29, 30, 209

- H -

Head space, 103
Heptadekanoik asit, 129
Heptaklor, 183, 184
Hidrofor nötral maddeler, 44
Hippürik asit, 127
HPLC, 11, 50, 63, 74, 118, 132, 134, 143

- İ -

İlaç + antikor, 67
İmmunoassay, 12, 44, 66, 67, 68, 69, 70, 71,
74
İnce tabaka kromatografisi, 11, 14, 51
İndofenol reaksiyonu, 36
İyodoform deneyi, 35
İzonitrit deneyi, 35
İzopurpurik asit, 92

- K -

Kadaverin, 13
Kadmiyum, 31, 194, 211
Kafein, 44
Kafur, 21
Karboksihemoglobin, 25, 77, 80, 83, 215
Karbolik asit, 134
Karbon monoksit, 49, 77,
Karbon tetraklorür, 17, 22, 121, 126, 206
Ketonlar, 19, 20, 36
Kinin, 28, 44, 211
Kloral, 22, 34
Kloralhidrat, 17, 20, 36, 123, 170
Klordiazepoksit, 150, 152
Klorfeniramin maleat, 57
Klorlu hidrokarbonlar, 122
Klorlu siklodien, 182
Kloroform, 17, 20, 32, 41, 52, 61, 121, 139,
157, 177, 186

Klorpromazin. 57
Kobalt tiyosiyanat. 166
Kodein. 170
Kokain. 15. 165. 166. 167. 171
Kolinesteraz. 25. 186. 188. 189. 193
- Aktivitesi. 186
Koniin. 33
Kontrollü maddeler. 163
Kreatinin. 75. 76. 77. 132. 134. 202
Kreatinin tayini. 75. 134
Krezol. 5. 18. 21. 23. 127. 159. 160. 162. 163
Kromatografik yöntemler. 50
Kromotropik asit. 34. 99. 100. 101. 117. 118. 211
Ksentogenat deneyi. 104
Ksilen. 64. 125. 127. 129. 131. 133
Kupröz iyodür. 27
Kurşun. 194. 195. 201. 203. 211.

- L -

Labstix. 19
Lantanyum klorür. 197
Legal deneyi. 36
Liebermann'ın indofenol. 135
Lindan. 184
Lorazepam. 150
LSD. 169

- M -

Malation. 184. 187
Mandelin reaktifi. 52. 56. 168. 169
Marquis reaktifi. 168. 169
Marsh testi. 3
Meeke reaktifi. 169
Mefenamik. 52
Metalik zehirler. 26
Metamfetamin. 172. 175
Metanol. 56. 99. 100. 101. 102. 128. 129
Methb. 79. 80. 86. 89. 140. 141. 163
Methemoglobin. 19. 80. 83. 139. 163. 215
Metil alkol. 20. 99. 101. 104. 108. 183
Metil hippürik asit. 129
Metil kloroform. 121
Metil salisilat. 17. 154. 155. 156
Metil testosteron. 180
Metoksifenamin. 172. 175

Mikrodifüzyon. 11. 35. 37. 58. 95. 96. 106.
Mikroskopik inceleme. 164
Millon reaktifi. 136
M-MHA. 129. 130. 131. 133. 134
Morfin. 9. 168. 170

- N -

N- (1-naftil) etilen diamin. 152
Nandrolon. 177
Narkotikler. 163.
N-asetil-p-aminofenol. 159
NBD. 172. 173. 174
Nessler reaktifi. 36
Niketamid. 57
Nikotin. 17. 34. 52. 69
Ninhidrin. 57. 172
Nitrobenzen. 17. 18. 126
Nitröz asit. 161
Nordazepam. 150
Norefedrin. 174
Nötral maddeler. 42. 43. 44
Nötron aktivasyon analizi. 50. 65

- O - Ö -

O-krezol. 127
Okzalik asit. 18. 42
Organik asitler. 17
Organik bazlar. 42
Organik fosfat esterleri. 47. 186
Ön denemeler. 17

- P -

Palladyum klorür. 88
P-aminofenol. 23. 138. 139. 159
P-aminosalisilik. 155
Papain. 45
Parakuat. 23. 25. 47
Parasetamol. 23. 60. 159. 162
Paration. 185. 188
Parri deneyi. 143
P-dimetilaminobenzaldehit. 128. 200
Pentobarbital. 145
Perfenazin. 52
Pestisitler. 31. 39. 182. 184
Pikrik asit. 18
Piridin. 17. 22. 36. 38. 95. 96. 97. 98. 123. 124. 127. 186. 187

Piridin-barbitürük asit. 96, 97
Pirogallik asit. 212
Pirokannik asit. 78
P-nitroanilin. 136, 210
P-nitrofenol. 138, 185
Porfirinler. 18
Pralidoksim klorür. 189
Primer aminler. 36
Protoporfirin. 201, 204
Putresin. 13

- R -

Reinsch deneyi. 194.
Renk reaksiyonları. 56, 91, 92, 127

- S -

Sakkarin. 42
Salisilamid. 22, 156
Salisilatlar. 24, 155
Salisilik asit. 18, 42, 57, 155, 156, 157, 158
Santonin. 19, 21
Schiff reaksiyonu. 117
Schiff reaktifi. 36
Scott (Ruybal) testi. 166
Sekonal. 18
Sekonder aminler. 172
Sekonder aminlerin. 173
Selenyum. 26
Sistein. 162, 192
Siyanür. 33, 36, 38, 90, 91, 92, 93, 95, 97, 98, 140, 207
Siyanürler. 36
Sodyum florür. 10, 105
Soret bandı. 79
Spektroskopi. 64, 65
Spektroskopik yöntemler. 50
Spot testler. 164
Stas-otto. 4, 39, 40, 41, 44
Striknin. 13
Su buharı distilasyonu. 32
Sujbert yöntemi. 100
Sülfür. 17, 33, 80, 104

- T -

1,1,1.-trikloroetan. 121
T/E oranı. 181

TDX. 215
Tellüryum. 26
Temazepam. 150, 151, 153
Teofilin. 4, 52
Testosteron. 177, 179, 181, 216
Tetra etil kurşun. 195, 198
Tetrahidrokannabinol. 7
Tetrametil kurşun. 195
Tiyopental. 142
Tiyoridazin. 52
Toksik anyonlar. 31
Toluen. 33, 127, 132, 134
Tranilsipromin. 172
Trikloro bileşikler. 22
Trikloroetanol. 22
Trikloroetilen. 20, 32, 121, 123, 124
Trimipramin. 22
Trinder reaktifi. 22, 24, 156, 157
Trinder testi. 22, 24
Tripsin. 45, 48
Triton x-100. 196
Tübokürarin. 69

- U -

Uçucu olmayan organik zehirler. 31
Uçucu zehirler. 9, 34
Uroporfirin. 202
UV spektrumları. 14, 60
UV-spektrofotometre. 50

- V -

Vanilin-sülfürik asit. 178
Vitali deneyi. 165

- W -

Walkley et al. 137
Widmark faktörleri. 115

- Y -

Yarıklı kuvars tüp. 196

- Z -

Zayıf asitler. 42, 43
Zwicker reaksiyonu. 167
Zwicker reaktifi. 168

ISBN: 975-482-512-2

Ankara Üniversitesi Basımevi • 2000