

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ- CERRAHPAŞA
ADLİ TIP VE ADLİ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

Danışman
Doç. Dr. Üyesi Zeynep TÜRKMEN

**Alkollü İçeceklerde Benzodiazepin Türevi Kalıntılarının HPTLC ile Hızlı
Belirlenmesi**

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Melis ATAÖZÜ

İSTANBUL, 2024

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ- CERRAHPAŞA
ADLİ TIP VE ADLİ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

Danışman
Doç. Dr. Üyesi Zeynep TÜRKMEN

**Alkollü İçeceklerde Benzodiazepin Türevi Kalıntılarının HPTLC ile Hızlı
Belirlenmesi**

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Melis ATAÖZÜ

İSTANBUL, 2024

ÖNSÖZ

Bu çalışmaya büyük ilgi ile yaklaşan, bilgisi ile çalışmayı birçok yönden katkıda bulunan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Üyesi Zeynep TÜRKMEN'e en derin saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen İÜC Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü, Adli toksikoloji laboratuvar ekibinin değerli üyelerine, Murat YAYLA ve Ömer KARATAŞ hocalarıma, tezin yürütülmesi sırasında verimli tartışmalar yaptığım, dostluğunu ve emeğini benden esirgemeyen Emre KALAYLAR ve Didem AYTÖN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Melis ATAÖZÜ

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil adı	Sayfa No
Şekil 1. DFC ve DFSA’larda Kullanılan Maddelerin Temsili Diyagramı	3
Şekil 2. GABA Kanallarının İşleyişi ve Sedatiflerin Bağlandığı Bölgeler	7
Şekil 3. Benzodiazepin Metabolizasyonunun Genel Şeması	10
Şekil 4. Benzodiazepin ve Alkolün GABA Reseptörlerinde Beraber Etkileşimi	11
Şekil 5. Türkiye’de 1990-2000 Yılları Arasında İncelenen Yeşil Reçeteli Benzodiazepinlerin Grafiği	14
Şekil 6. Diazepam’ın Kimyasal Formülü	15
Şekil 7. Diazepam’ın Metabolitlerini Oluşturma Süreci	17
Şekil 8. Flunitrazepam’ın Kimyasal Yapısı	18
Şekil 9. Benzene, Toluene ve Xylene Değerlerinin Sonuçları	26
Şekil 10. İyon Değiştirme Kromatografisi’nin Temel Prensibi	32
Şekil 11. Jel Filtrasyon Kromatografisinin Çalışma Prensibi	33
Şekil 12. Affinite Kromatografisi İşlem Süreci	34
Şekil 13. İnce Tabaka Kromatografisi Uygulama Prensibi	35
Şekil 14. Katı Faz Ekstraksiyonu Süreci	41
Şekil 15. Katı Faz Mikro Ekstraksiyonu Süreci	42
Şekil 16. HPTLC Bileşenlerinin Görünümü	48
Şekil 17. Bardak Cidarından Kalıntı Alınması.	49
Şekil 18. 230 Nm’de Bileşiklerin Dedektör Yanıtları	57
Şekil 19. 305 Nm’de Bileşiklerin Dedektör Yanıtları	57

Şekil 20. DIA - UV Spektrumu	58
Şekil 21. FLU - UV spektrumu	58
Şekil 22. Metanol İçinde Dizepam ve Flunitrazepam Etken Maddelerinin HPTLC Kromatogramında Görünümü	59
Şekil 23. Geliştirilen Metot ile Blank Örneklerin HPTLC Kromatogramında Görünümü	60
Şekil 24. İçecekten Ekstre Edilen Dizepam ve Flunitrazepam Etken Maddelerinin HPTLC Kromatogramında Görünümü	60
Şekil 25. Diazepam'ın 250nm'deki Dedektör Yanıtları	61
Şekil 26. Flunitrezepam'ın 250nm'deki Dedektör Yanıtları	62

TABLO LİSTESİ

Tablo adı	Sayfa No
Tablo I. Türkiye’de 1990-2000 Yılları Arasında İncelenen Yeşil Reçeteli Benzodiazepinler	13
Tablo II. Diazepam’ın Kimyasal Özellikleri	16
Tablo III. Flunitrazepam’ın Kimyasal Özellikleri	19
Tablo IV. DFC’lerin Suçlarında Kullanılan İlaçların Listesi	20
Tablo V. Hagemann Tarafından Yapılan Çalışma	23
Tablo VI. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Markaları	46
Tablo VII. Diazepam ve Flunitrazepamın Ticari Formlarının Marka-Konsantrasyonları	46
Tablo VIII. Çalışmada Kullanılan Cihaz ve Gereçlere Ait İsim ve Marka Bilgileri	47
Tablo IX. Diazepam ve Flunitrazepam Ana Stok Çözeltileri	51
Tablo X. DIA ve FLU İçin İki Farklı Ekstraksiyon Çözeltisi Kullanılarak İki Farklı Konsantrasyon ile Yapılan Geri Kazanım Sonuçlarının Karşılaştırması	63
Tablo XI. Kloroform- SSE Yöntemi ile DIA İçin Yapılan Çalışmalarının Bulguları	64
Tablo XII. Kloroform- SSE Yöntemi ile FLU İçin Yapılan Çalışmalarının Bulguları	64
Tablo XIII. Similasyon Örneklerinin Analiz Sonuçları	66
Tablo XIV. Çalışmada Kullanılan Mobil Faz Sistemleri	68

KISALTMALAR

DFSA	Uyuşturucuyla Kolaylaştırılmış Cinsel Saldırı
DFC	Uyuşturucuyla Kolaylaştırılmış Suç
BBC	British Broadcasting Corporation
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
HPTLC	Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi
TLC	İnce Tabaka Kromatografisi
BZD	Benzodiazepin
GABA	Gama Aminobütirik Asit
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
GHB	Gama Hidroksibütirat
DIA	Diazepam
FLU	Flunitrazepam

ÖZET

Dünya genelindeki araştırmalar göstermektedir ki; uyuşturucu madde kullanımıyla ilgili suçların sayısı her geçen gün artmaktadır. Bu suçların tanımlanmasında "Uyuşturucuyla Kolaylaştırılmış Cinsel Saldırı" (DFSA) ve uyuşturucu maddelerin diğer suçlarla birleşmesi durumu ise "Uyuşturucuyla Kolaylaştırılmış Suç" (DFC) olarak adlandırılır.

DFSA ve DFC’lerde uyuşturucu katkılı içecekler, istismar suçlarının işlenmesi amacıyla kullanıldığı bilinen ve sıvı içerisinde çözünürlüğünü kolaylaştıran tatsız, renksiz ve kokusuz özelliklere sahip maddeler içermektedir. Bu tür içeceklerin içine sıklıkla benzodiazepinler ve ketamin gibi sedatif-hipnotik maddeler eklenmektedir. DFSA ve DFC’lerde özellikle tıbbi amaçlar için anksiyete, uykusuzluk ve nöbetlerin tedavisinde reçete edilen benzodiazepinlerin (BZD), diazepam ve flunitrazepam türevleri kullanılmaktadır. BZD’lerin adli bilimlerde kullanılması, suçların araştırılmasına ve suçluların yakalanmasına önemli bir katkı sağlamaktadır. Suç mahalli incelemelerinde, tanık ifadelerinin değerlendirilmesinde ve trafik güvenliği olaylarının incelenmesinde bu ilaçların varlığı veya yokluğu kritik öneme sahiptir. Bu çalışma birer benzodiazepin türevi olan ve adli vakalarda sıklıkla karşılaşılan diazepam ve flunitrazepam maddelerinin belirlenmesini kolaylaştıracak bir yöntem sunmak amacıyla yapılmıştır. Bu yöntemin hızlı, etkili ve güvenilir olabilmesi amacıyla literatürde sıklıkla kullanılan MS sistemlerinin aksine HPTLC sistemi tercih edilmiştir.

Çalışmanın ana planı piyasada bulunan diazepam ve flunitrazepam içerikli ilaçların ticari formlarının en düşük miligramlarının kullanıldığı varsayılarak, yaklaşık 250-330 mL’lik viski, bira ve şarap çözeltilerine eklenebileceği düşüncesiyle belirlenmiştir. Bunun sebebi en kolay ulaşılabilir formlarının en düşük konsantrasyonlarda tayin edilip edilemeyeceğini anlamaktır. Diazepam piyasada Diaksi markasıyla 5 mg/2.5 mL ve 10 mg/2.5 mL, Diapam markasıyla da 10 mg/ 2mL olarak bulunur. Flunitrazepam ise Rahypnol adıyla 5 mg/2.5 mL şeklinde bulunmaktadır.

HPTLC analizi için, 20 x 10 cm boyutlarındaki silika jel 60 F254 HPTLC cam plakası (Merck Kat. No: 1.05649) tercih edilmiştir. Bu plakalar, benzodiazepinlerin tespitinde oldukça hassas sonuçlar sağlar. Söz konusu iki etken maddenin metanolde çözülerek hazırlanan çözeltilerinin eş zamanlı analizi için uygun bir hareketli faz belirleme çalışmaları 8 farklı çözelti veya çözelti karışımı ile klasik TLC tekniği ile denenmiştir.

Yöntem validasyonu, analitik prosedürlerin amaçlanan kullanıma uygun olduğunu ve ilaç maddelerinin ve ilaç ürünlerinin kimliğini, kalitesini, saflığını ve gücünü desteklediğini gösterme sürecidir. Çalışmamız validasyon prosedürlerine uygun olarak test edilmiş ve yöntem, test edilen tüm yöntem doğrulama parametreleri için tatmin edici veriler göstererek tamamen doğrulanmıştır.

Bu basit HPTLC yöntemi, DFSA ve DFC'lerde sıvı içeceğe eklendiği şüphesi olan iki sedatif-hipnotik ilacı (diazepam ve flunitrazepam) tespit etmek için başarıyla geliştirilmiştir. İyi düzeyde geri kazanımlar elde edilmesi yöntemin, şüpheli suç mahallinden ele geçirilen delillerin incelenmesi için uygun olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Cinsel Suçlar, Benzodiazepin, HPTLC, Kromatografi, DFSA, DFC, Diazepam, Flunitrazepam

ABSTRACT

Worldwide studies indicate that the number of crimes related to drug use is increasing every day. These crimes are identified as "Drug-Facilitated Sexual Assault" (DFSA) and the combination of drugs with other crimes is termed "Drug-Facilitated Crime" (DFC).

In DFSA and DFC cases, drug-facilitated beverages are known to be used for the commission of exploitation crimes and contain substances that are tasteless, colorless, and odorless, making them easily soluble in liquids. These beverages often contain sedative-hypnotic substances such as benzodiazepines and ketamine. Specifically, benzodiazepines (BZDs) prescribed for anxiety, insomnia, and seizures, such as diazepam and flunitrazepam derivatives, are commonly used. The forensic use of BZDs significantly contributes to the investigation of crimes and the apprehension of criminals. The presence or absence of these drugs is crucial in crime scene investigations, evaluating witness statements, and examining traffic safety incidents.

This study aims to present a method that facilitates the identification of diazepam and flunitrazepam, both benzodiazepine derivatives frequently encountered in forensic cases, in order to be rapid, effective, and reliable. Unlike the commonly used MS systems in the literature, an HPTLC system was preferred for the method's speed, effectiveness, and reliability.

The main plan of the study is based on the assumption that the lowest milligrams of commercially available diazepam and flunitrazepam-containing drugs are used and added to wine, beer and whiskey solutions of approximately 250-330 mL, considering that the easiest accessible forms may or may not be determined at the lowest concentrations. Diazepam is available in the market as Diaksi with 5 mg/2.5 mL and 10 mg/2.5 mL, and as Diapam with 10 mg/2 mL. Flunitrazepam is available as Rohypnol with 5 mg/2.5 mL.

For HPTLC analysis, silica gel 60 F254 HPTLC glass plates (Merck Cat. No: 1.05649) sized 20 x 10 cm were chosen, providing highly sensitive results in the detection of benzodiazepines.

The simultaneous analysis of the two active substances dissolved in methanol was tested with 8 different solutions or solution mixtures using classical TLC techniques.

Method validation is the process of demonstrating that analytical procedures are suitable for their intended use and support the identity, quality, purity, and strength of drug substances and drug products. Our study has been tested according to validation procedures, and the method has been fully validated by demonstrating satisfactory data for all tested method validation parameters.

This simple HPTLC method has been successfully developed to detect two sedative-hypnotic drugs (diazepam and flunitrazepam) suspected to be added to a liquid beverage in DFSA and DFC cases. The achieved high recoveries indicate the suitability of the method for examining evidence seized from suspected crime scenes.

Keywords: Sexual Offences, Benzodiazepine, HPTLC, Chromatography, DFSA, DFC, Diazepam, Flunitrazepam

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
ŞEKİLLER LİSTESİ	ii
TABLolar LİSTESİ	iv
KISALTMALAR	v
ÖZET	vi
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	x
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİ	5
2.1. Benzodiazepinler	5
2.1.1. Benzodiazepinlerin Kimyasal Özellikleri	5
2.1.2. Benzodiazepinlerin Etki Mekanizması	6
2.1.3. Benzodiazepinlerin Farmakokinetik Özellikleri	8
2.1.3.1. Benzodiazepinlerin alkolle birlikte kullanımı	10
2.1.4. Benzodiazepinlerin Adli Bilimlerde Yeri	11
2.1.5. Benzodiazepinlerin Kötüye Kullanımı	12
2.1.6. Diazepam	14
2.1.7. Flunitrazepam	18
2.2. İlaç Etkisi Altında İşlenen Suçlar (Drug Facilitated CrimesDFCS)	20

2.2.1. İlaç Etkisi Altında Kolaylaştırılarak İşlenen Cinsel Suçlar (Drug Facilitated Sexual Assaults – DFSAs)	21
2.2.2. İlaç Etkisi Altında Kolaylaştırılarak İşlenen Cinsel Suçların Adli Yönü ...	22
2.2.2.1. Örnek toplama ve delillendirme	24
2.2.2.2. Biyolojik örneklerden analizi	25
2.2.2.3. Fiziksel delil analizi	26
2.3. Kromatografi	28
2.3.1. Kromatografinin Sınıflandırılması	29
2.3.1.1. Ayırma mekanizmasına göre sınıflandırılması	29
2.3.1.1.1. Absorbsiyon kromatografisi.....	30
2.3.1.1.2. Dağılma kromatografisi	31
2.3.1.1.3. İyon değişirme kromatografisi.....	32
2.3.1.1.4. Jel filtrasyon kromatografisi (moleküler elek kromatografisi)	33
2.3.1.1.5. Affinite kromatografisi	34
2.3.2. Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi (HPTLC).....	35
2.3.2.1. Sabit faz / Plaka	38
2.3.2.2. Mobil faz / Çözücü sistemi	38
2.3.2.3. Densitometrik Yöntemler	39
2.3.3. Örnek Hazırlama Teknikleri / Çekitleme	40
2.3.2.1. Sıvı Sıvı Ekstraksiyonu	40
2.3.2.2. Katı Faz Ekstraksiyonu	41

2.3.2.3. Katı Faz Mikro Ekstraksiyonu	42
2.3.4. Kısmi Geçerli Kılma (Validasyon) Çalışması.....	42
2.3.4.1. Özgüllük	43
2.3.4.2. Seçicilik.....	43
2.3.4.3. Doğruluk.....	44
2.3.4.4. Doğrusallık ve Çalışma Aralığı	44
2.3.4.5. Tespit Limiti (LOD) ve Tayin Limiti (LOQ)	44
2.3.4.6. Sağlamlık.....	44
3. GEREÇ VE YÖNTEM	46
3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar	46
3.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Gereçler	47
3.3. Çalışma Planı Ve Similasyon Örneklerinin Oluşturulması.....	48
3.4. Diazepam Ve Flunitrazepam Analizi	50
3.4.1.Diazepam ve Flunitrazepam analizi için kullanılacak çözeltilerin hazırlanması.....	50
3.5. Örnek Hazırlama Prosedürü	51
3.6. HPTLC Sistemi ile Yöntem Geliştirilmesi	52
3.7. HPTLC Sistemi İle Diazepam Ve Flunitrazepam Analizinde Yöntem Geçerli Kılma Çalışmaları.....	53
3.8. Simülasyon Örneklerinin Analizi.....	54
4. BULGULAR	56
4.1. Geçerli Kılma Çalışmaları.....	64

4.1.1. Özgüllük	64
4.1.2. Seçicilik.....	65
4.1.3. Lineerite	65
4.2. Simülasyon Örneklerinin Ait Diazepam ve Flunitrazepam Sonuçları	65
5. TARTIŞMA.....	67
6. SONUÇ.....	73
7. KAYNAKLAR	74
ÖZGEÇMİŞ.....	84

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İstismar, fiziksel, psikolojik, ısrarlı takip, ekonomik ve cinsel saldırı gibi çeşitli şekillerde gerçekleşmektedir. İstismar mağdurları, istismardan kaynaklanan psikolojik sorunlar yaşamakta ve bu sorunlar, bireyi ve toplumu olumsuz yönde etkilemektedir.

Bireylere ve özellikle kadınlara yönelik istismar birçok şekilde görülmektedir. İstismar mağdurları, istismardan kaynaklanan psikolojik sorunlar yaşamakta ve bu sorunlar arasında depresyon, kaygı, korku, yas gibi psikolojik sorunlar yanında fiziksel yaralanmalar da yer alabilmektedir. İstismar, yalnızca bireyi etkilemez, aynı zamanda patolojik davranışlara (örneğin uyuşturucu bağımlılığı ve alkolizm) yol açarak toplumu da etkileyebilmektedir. Bu yüzden, adli tıp muayenesi için olaydan sonra mümkün olan en kısa sürede bildirim yapılması önemlidir. Ancak cinsel saldırılarda, olayın gerçekleştiği süre ile yetkililere bildirim süresi arasında genellikle bir gecikme olur. Bu gecikme, fiziksel ve psikolojik delillerin hızlı bir şekilde tespit edilmesini olumsuz etkilemektedir. Sonuç olarak, gerekli bilgilere erişilemediğinde hem istismar mağdurunun sağlığı açısından hem de adli tedbirlerde (örneğin suçun adli takibi) yanlış bir stratejiye yol açabilmektedir (1).

Uyuşturucu katkılı içecekler, istismar suçlarının işlenmesi amacıyla kullanıldığı bilinen ve sıvı içerisinde çözünürlüğünü kolaylaştıran tatsız, renksiz ve çözünebilir özelliklere sahip uyuşturucular içermektedir. Bu tür içeceklerin içine sıklıkla benzodiazepinler ve ketamin gibi sedatif-hipnotik maddeler eklenmektedir. Özellikle, tıbbi amaçlar için anksiyete, uykusuzluk ve nöbetlerin tedavisinde reçete edilen benzodiazepinler, özellikle diazepam ve nimetazepam gibi türevleri, kullanılmaktadır. Bu ilaçların suç amaçlı kullanılmasının yaygınlaşmasının arkasındaki nedenler arasında düşük maliyetleri ve bu maddelere çevrimiçi erişim kolaylığı da yer almaktadır. Ayrıca, benzodiazepinlerin alkollü içeceklere eklenmesi durumunda, bu iki madde arasında sinerjistik etkilerin ortaya çıkma olasılığı da göz önüne alınmalıdır. Bu

sinerjistik etkiler, alkol ve benzodiazepinlerin birlikte kullanılmasının beklenenden daha güçlü etkilere yol açabileceği anlamına gelir. Sonuç olarak, uyuşturucu katkılı içeceklerin kullanımı, suçlu faaliyetlerin yanı sıra sağlık ve güvenlik riskleri oluşturabilmektedir.

Cinsel suçların uyuşturucu madde kullanımıyla kolaylaştırılması durumu "İlaç Etkisiyle Kolaylaştırılmış Cinsel Saldırı" (DFSA) olarak adlandırılırken, uyuşturucu maddelerin diğer suçlarla birleşmesi durumu ise "İlaç Etkisiyle Kolaylaştırılmış Suç" (DFC) olarak tanımlanır (2). Bu iki ayrı tanım, bu tezin temel odak noktasını oluşturacak ve bu iki suç biçimi arasındaki ayrımı vurgulayacaktır. Tezin konusu gereği kullanılan maddeler bu iki suç biçimine de ilişkindir ve bu sınırları tanımlamak adli bilimler açısından önem arz etmektedir. Çünkü bu suçlardan biri maddi kayıplarla sonuçlanırken diğeri, kişinin beden bütünlüğüne verilen zararlarla sonuçlanmaktadır. Ancak her iki biçimde de kişinin varlığı ve yaşamla kurduğu ilişki tehdit edilmektedir.

Garcia ve arkadaşlarının 2021 yılında gerçekleştirdiği çalışma, uyuşturucu kullanımıyla kolaylaştırılan cinsel saldırılar ve diğer suçlar üzerine yapılan araştırmaları ülkeler bazında karşılaştırmaktadır. Pubmed ve Google Scholar veri tabanlarından taranan 673 makalenin 441'i çalışmanın ana konusuyla ilgisiz bulunmuş ve dışlanmıştır. Kalan 232 makale, belirlenen dışlama kriterlerine göre değerlendirilmiş, uygun veriler ve güvenilir sonuçlar sunan 33 çalışma detaylı incelemeye tabi tutulmuştur. Bu çalışma, dünya genelinde madde kullanımıyla ilgili suçların raporlanmasında karşılaşılan zorlukları ve eğlence amaçlı madde kullanımının istismar amaçlı kullanımlarla birleştiği temel problemleri göstermektedir (2).

Yukarıdaki çalışmanın verilerine dayanarak DFSA ve DFC'lerin dünya genelinde ilişkili olduğu maddeleri gösteren temsili diyagram Şekil 1'de gösterilmektedir.



Şekil 1: DFC ve DFSA’larda Kullanılan Maddelerin Temsili Diyagramı

Şekilde görüldüğü gibi, İspanya, Fransa, Hollanda, Belçika, Danimarka, Norveç, Kanada, Güney Afrika ülkelerinde yapılan DFSA çalışmalarında en çok kullanılan biyolojik örnekler kan ve idrar olmakla birlikte en çok kullanılan kromatografi teknikleri ise LC-MS ve GC-MS olarak gösterilmiştir. Ayrıca kullanılan maddeler açısından değerlendirildiğinde: Avrupa, Amerika, Okyanusya ve Afrika’da en çok rastlanan etanol, kannabinoidler, benzodiazepinler; Asya’da ise tam tersi olarak uyarıcı görülemezken daha sedatif etkili maddeler gözlenmiştir (2).

DFSA’lar haber bültenlerinde de karşılaşılan gündelik yaşamda ciddi etkileri görülen suçlardır. Euronews ve BBC’de yayınlanmış bir habere göre Almanya’da bir grup genç, arkadaşları cinsel istismara uğradığı için içkiye ilaç atılıp atılmadığını gösteren bir bileklik üretilmiştir. (3,4) Bu haberler sorunun ne kadar hayatın içinden olduğunu gösterir niteliktedir.

Görüldüğü gibi hem ülkemizde hem de dünya genelinde ilaç etkili suçlar giderek artmaktadır. Bu suçlar farklı biçimlerde kendini gösterebilmekte, toplumda ve bireyde birçok

olumsuz etki bırakabilmektedir. Örneğin, içeceklere eklenen ilaçlar veya yiyeceklere katılan sedatifler, özellikle hırsızlık ve cinsel istismar gibi suç olaylarını sıklıkla beraberinde getirmektedir. Bu maddelerin tanımlanması ve bu suçların aydınlatılması çabaları, özellikle madde tespiti aşamasında artan zorluklarla karşılaşmaktadır.

Bu tezin temel amacı, özellikle diazepam ve flunitrazepam maddelerinin yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi (HPTLC) yöntemi kullanılarak, bira, viski ve şarap matrislerinde hızlı bir şekilde belirlenmesini ihtiyacını ele almaktadır. DFC ve DFSA’larda mağdurların bilincinin kapanması veya kognisyonunun azalması sebebiyle mağduriyetin farkına varıldığında biyolojik örneklerden analiz yapılabilmesi için geç kalınabilmektedir. Bu aşamada fiziksel delillerin analizi ve analizin süresi önem kazanmaktadır. Daha hassas çalışmaların LC-MS, GC-MS gibi cihazlarla yapılması gerekmektedir. Ancak çalışmamızın amacı olan alkollü içeceklere konulabilecek en düşük miktar piyasada belirlenmiş olup, en düşük konsantrasyonları için çok düşük miktarların tayini gerekmemektedir. Ayrıca, bu cihazlarda tek tek örneklerin çalışılması ve cihazların hassasiyeti sebebiyle çalışma sürelerinin uzaması tespit zamanı açısından dezavantaj sağlamaktadır. Bu koşullar göz önüne alındığında HPTLC yönteminin geliştirilmesi, diazepam ve flunitrazepam maddelerinin etkisiyle işlenen suçları tespit edebilmeyi kolaylaştırarak adalet sistemine önemli bir katkı sağlayabilir.

2. GENEL BİLGİ

2.1. Benzodiazepinler

Benzodiazepinler (BZD) temel kimyasal yapısı bir benzen halkası ve bir diazepin halkasının füzyonu olan psikoaktif ilaçlardır. Bu ilaçlar, dünyada ve ülkemizde sıklıkla reçete edilen ancak bunun dışında toplumsal yapının bozulmasına sebep olacak şekilde çeşitli suçlarda da kullanılan sedatif etkili kimyasallardır. BZD'ler klinikte, anksiyete, uykusuzluk, kas gevşemesi, merkezi sinir sistemi patolojisinin neden olduğu spastisiteden kurtulma ve epilepsi dahil olmak üzere çok sayıda endikasyon için kullanılır (5,9). Akut veya kronik kullanımlarında doza ve kullanıcının duyarlılığına bağlı olarak anterograd amnezi (ilaca bağlı unutkanlık), nistagmus (istemsiz göz hareketleri), motor koordinasyonda bozulma ve ataksi (çoğunlukla fiziksel beceri kayıpları) gibi yan etkiler görülmektedir (6).

2.1.1. Benzodiazepinlerin Kimyasal Özellikleri

BZD'ler karbon ve hidrojen atomlarının oluşturduğu diazepin halkasına bağlı heterosiklik halka içinde bulunan azot (N) atomlarına bağlı halkalarla çeşitli substitüsyonlar (kayma, yer değiştirme) kaydıyla oluşturulur (9).

BZD'lerin moleküler formülü $C_{15}H_{11}N_2O$ 'dur ve atomik ağırlıkları 284.23 g/mol'dir. Ayrıca, BZD'lerin erime noktası 160-165 °C arasında ve kaynama noktası 200-205 °C arasındadır. Karakteristik ve keskin bir kokusu vardır. Bu, bu ilaçların kimyasal tanımlamasında kullanılabilir ve kimyasal analizlerde tanıma yardımcı olabilir. BZD'ler, suda az çözünürler ancak alkolde çözünebilirler. Bu çözünürlük özellikleri, ilaçların kullanımını ve hazırlanmasını etkilemektedir (37).

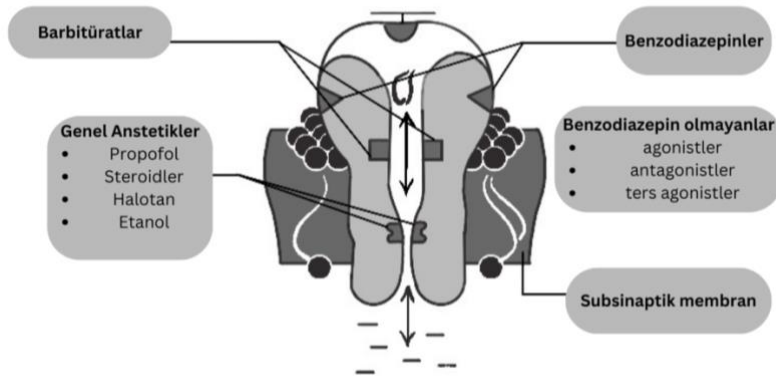
BZD'ler, temel kimyasal yapısı ve fiziksel özellikleri ile tanımlanan psikoaktif ilaçlardır. Bu ilaçların moleküler formülü, atomik ağırlığı, erime noktası, kaynama noktası,

koku ve çözünürlük gibi kimyasal özellikleri hem kimyasal analizlerde hem de ilaçların etkinliği ve kullanımıyla ilgili önemli bilgiler sunmaktadır. Bu özellikler, benzodiazepinlerin farmasötik formülasyonlarının tasarımı ve ilaçların dozajının belirlenmesi gibi klinik uygulamalarda da büyük öneme sahiptir.

2.1.2. Benzodiazepinlerin Etki Mekanizması

BZD'ler, beyinde γ -aminobütirik asit (GABA) reseptörlerine bağlanarak etki etmektedir. GABA merkezi sinir sisteminin temel inhibitör nörotransmitteridir. Korteks ve limbik sistemde yüksek konsantrasyonda bulunur (5). GABA inhibisyonu iki ana ve bir yardımcı reseptör aracılığıyla yapar. Bunlar GABAA GABAB ve GABAC reseptörleri olarak sınıflandırılmıştır. GABAA reseptörleri iyonotropiktir yani eksi yüklü klor iyonu çalışmasına etki eder, GABAB ise metabotropiktir yani mekanizmasını protein yapıda özel bileşikler aracılığıyla aktive eder (10). GABAC reseptörleri ise retinal sinyal iletiminde görevlidir (16).

BZD'lerin bağlandığı reseptörler GABAA reseptörleridir (5,9,11,12,13). GABAA reseptörleri her biri çoklu izoformlara sahip beş glikoprotein alt biriminden oluşur. Bireysel alt birimler, bir nörondaki sekans, ekspresyon seviyesi ve lokalizasyon açısından iyi karakterize edilebilir, ancak çoğu durumda, bir pentamerik reseptör oluşturmak için hangi alt birimlerin birlikte iş birliği yaptığı ve pentamerin alt birim dizilişi belli değildir (13). Şu ana kadar tanımlanmış bu beş alt birime işlevselliğini kazandıran altı alfa, dört beta, bir sigma ve iki rho (p) alt ünitesi belirlenmiştir (11).



Şekil 2: GABA Kanallarının İşleyişi ve Sedatiflerin Bağlandığı Bölgeler

Şekil 2’de gösterilen reseptörlerin alt üniteleri yatıştırıcı nitelikteki BZD, barbitüratlar ya da genel anestetiklerle ilişkilendirilerek klor iyonu kanallarının açılmasıyla işlev göstermektedir. Burada önemli olan özellik lipid çözünürlükleridir. Yüksek lipid çözünürlüğüne sahip BZD’ler, düşük lipid çözünürlüğüne sahip BZD’lere göre daha yüksek absorpsiyon oranlarına ve daha hızlı klinik etki başlangıcına sahiptir (5).

BZD’ler yukarıda anlatılan şekilde etki vücuda etki etmektedir. Bu ilaçların kullanımının beş temel nedeni bulunmaktadır. Bunlar aşağıda maddeler halinde verilmiştir.

- Anksiyete giderici etkileri, GABA adı verilen bir nörotransmitterin aktivasyonunu artırarak çalışır. Bu nedenle BZD’ler, sinir sisteminin aşırı uyarılmasını engelleyerek anksiyeteyi azaltır (38).
- BZD’ler, sedatif ve hipnotik etkilere sahip ilaçlardır. Bu ilaçlar, kortikal uyarılabilirlik eşiğini yükselterek çalışmakta, böylece beyindeki uyarıcı sinyallerin düşük seviyelerde kalmasına neden olmaktadır. Bununla birlikte, BZD’ler psikomotor işlevleri bozabilmektedir ve antikonvülsan etkilere de sahiptirler (38).

- Bazı BZD'ler, kas gevşetici özelliklere sahiptirler. Bu, kas spazmları veya kas gerginliği sorunu yaşayan kişilere yardımcı olabilir. Kasların daha rahatlamış bir duruma gelmesini sağlarlar (38).
- BZD'ler, aynı zamanda, amnestik özelliklere sahiptirler, yani anterograd amneziye yol açabilirler. Bu özellikleri, anestezi öncesi premedikasyon (uyuşturma öncesi ilaç tedavisi) olarak kullanılmalarını gerektirir (38).

Yukarıda sıralanan özelliklerin yanında BZD'lerin belirli yan etkileri de bulunabilmektedir. Bu farmakokinetik etkiler ise ilaçları kullanan insanlar da günlük yaşamlarının akışına fazlasıyla etki etmektedir.

2.1.3. Benzodiazepinlerin Farmakokinetik Özellikleri

BZD'ler psikoaktif ilaçlar sınıfına ait olan ve sinir sistemi üzerinde önemli etkilere sahip olan bileşiklerdir. Bu ilaçların farmakokinetik özellikleri, vücutta nasıl hareket ettiklerini, metabolize edildiklerini ve sonuçta etki ettikleri yerlere nasıl dağıldıklarını tanımlamaktadır.

BZD'ler, genellikle oral yolla uygulanır ve bu yolla vücuda alındıklarında iyi bir şekilde emilme işlemi gerçekleşir. Ancak emilim oranı, ilacın dozuna ve formülasyonuna bağlı olarak değişebilmektedir. Örneğin, uzun etkili BZD'ler kısa etkili olanlara göre daha yavaş emilirler.

Bu, ilacın ne kadar hızlı etki göstereceğini ve ne kadar süreyle etkili olacağını etkileyen önemli bir faktördür (38, 39).

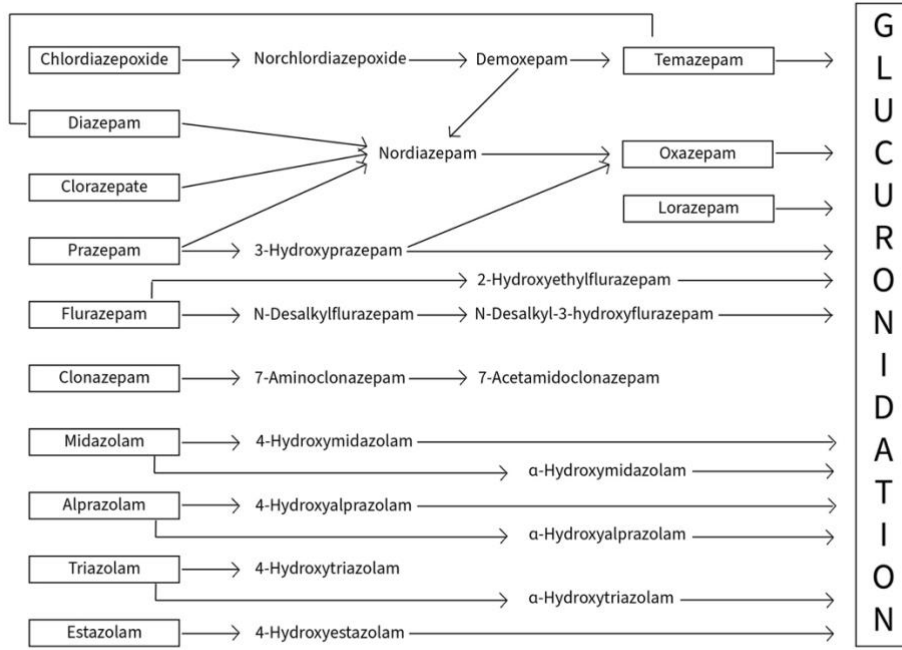
BZD'ler, vücut dokularına hızla dağılmaktadır. Bu dağılım, ilacın etkilerinin hedef organlara nasıl ulaştığını konusunda bilgi vermektedir. Özellikle beyin, karaciğer ve böbrekler, en BZD'ler yüksek konsantrasyonlara sahip olduğu organlardır. Bu, ilaçların bu organlarda özellikle etkili olduğunu göstermektedir. Vücutta karaciğerde metabolize edildikten sonra ilaçlar aktif veya inaktif formlara dönüştürülme işlemine girerler. BZD'lerin çoğu, aktif

metabolitler üretmektedirler. Bu metabolitler, ilacın etkilerini ve süresini etkilemektedirler (39). Şekil 3'te BZD türevlerinin aktif metabolitleri genel hatlarıyla gösterilmiştir.

BZD'lerin çoğu, vücuttan idrar yoluyla atılmaktadır. Ancak bazıları safra yoluyla da atılabilmektedir. Bu eliminasyon süreci, ilacın vücuttan ne kadar sürede temizlendiğini belirler. Atılma süreleri, ilacın yarılanma ömrü ile belirlenmektedir. Yarılanma ömrü, bir ilacın konsantrasyonunun vücuttan atılması için geçen süreyi ifade etmektedir. BZD'lerin yarılanma ömürleri, birkaç saatten birkaç güne kadar değişebilmektedir. Bu, ilacın vücutta ne kadar süreyle etkili olduğunu ve dozajının ne sıklıkla yeniden uygulanması gerektiğini belirlemektedir. (39).

BZD'lerin farmakokinetik özellikleri, bu ilaçların etkilerini büyük ölçüde etkilemektedir. Özellikle, ilacın emilimi, dağılımı ve atılma süresi, ilacın etki başlangıcı, süresi ve sonlanması üzerinde önemli rol oynamaktadır. Etki süresi uzun olan benzodiazepinler, kısa etkili olanlara daha fazla sedasyon ve bağımlılık potansiyeli taşıyabilmektedir.

Bu ilaçların farmakokinetik özelliklerini etkileyen bir dizi faktör bulunmaktadır. Bunlar arasında yaş, karaciğer hastalığı, böbrek hastalığı ve ilaç etkileşimleri yer almaktadır. Örneğin, yaşlı bireyler, gençlere göre benzodiazepinleri daha yavaş metabolize eder, böylece yaşlılarda ilacın birikme riskini artırabilmektedir. Aynı şekilde, karaciğer veya böbrek hastalığı olan kişiler, ilacın metabolizmasını etkileyebilir ve ilacın vücutta daha uzun süre kalmasına neden olabilmektedir. Kısaca, yaşlılarda veya karaciğer veya böbrek hastalığı olan kişilerde benzodiazepinlerin dozunu azaltmak gerekebilmektedir (38,39).

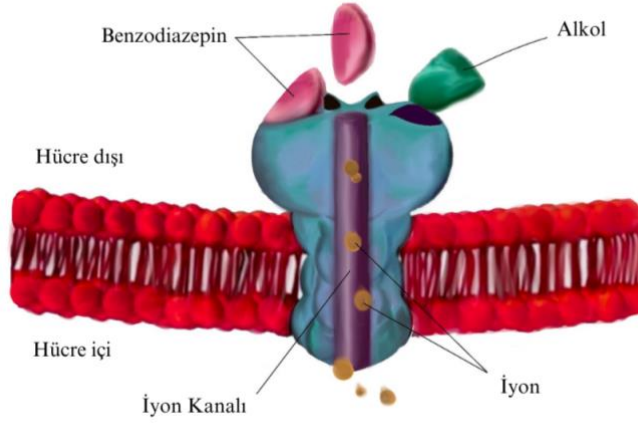


Şekil 3: Benzodiazepin Metabolizasyonunun Genel Şeması (40)

Sonuç olarak, benzodiazepinlerin farmakokinetik özelliklerini anlamak, bu ilaçların güvenli ve etkili bir şekilde kullanılması için kritik öneme sahiptir. Bu özellikler, ilacın dozajının belirlenmesi, yan etkilerin değerlendirilmesi ve ilaç etkileşimlerinin tahmin edilmesi gibi klinik uygulamalarda da büyük bir rol oynamaktadır.

2.1.3.1. Benzodiazepinlerin alkolle kullanımı

BZD'ler ve alkol, Merkezi Sinir Sistemi'nde (MSS) GABA reseptörleri ile etkileşime girmektedir. GABA, beyinde bir inhibitör nörotransmitterdir ve sakinleştirici ve uyku verici etkileri vardır. Benzodiazepinlerin ve alkolün GABA reseptörleri ile aynı anda etkileşime girmesi, GABA'nın etkilerini güçlendirir ve MSS depresyonuna neden olur (41). BZD'lerin ve alkol varlığındaki etki sistemi Şekil 4'te görselleştirilmiştir.



Şekil 4: Benzodiazepin ve Alkolün GABA Reseptörlerinde Beraber Etkileşimi

BZD’lerin alkol ile beraber kullanımının insan yaşamını tehdit eden birçok yan etkisi bulunmaktadır (41). Bu yan etkilerden bazıları aşağıdaki gibidir;

- Artmış sedasyon ve uyku hali durumu
- Zihinsel bulanıklık ve konfüzyon
- Dikkat ve koordinasyonda azalma
- Yürüme ve konuşma zorluğu
- Aşırı solunum depresyonu
- Bilinç kaybı
- Ölüm

2.1.4. Benzodiazepinlerin Adli Bilimdeki Yeri

BZD’ler, adli tıp uzmanları için önemli bir araç haline gelmiştir ve birçok suçun araştırılmasında ve suçluların yakalanmasında kritik bir rol oynamaktadır. Bu ilaçlar, suçun işlenmesi sırasında veya sonrasında kullanılmış olabileceklerini belirlemek için kullanılırlar.

Aynı zamanda, bu ilaçların varlığı veya yokluğu, tanık ifadelerinin değerlendirilmesinde ve yol güvenliği olaylarının incelenmesinde de önemlidir.

BZD'ler genel olarak kullanıldığı suçlar aşağıda sıralanmıştır.

- Cinayet Soruşturması
- Tecavüz Olayları
- Hırsızlık ve Soygunlar
- Trafik Kazaları

Bunlar gibi daha fazla suçlarda da kullanılmaktadır ve adli bilimlerde tespiti için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. BZD'lerin tespiti için genellikle Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS) yöntemi kullanılır. Ancak, kan ve idrardan tespit edilirken immünolojik yöntemler tercih edilmektedir. (40).

BZD'lerin adli bilimlerde kullanılması, suçların araştırılmasına ve suçluların yakalanmasına önemli bir katkı sağlamaktadır. Suç mahalli incelemelerinde, tanık ifadelerinin değerlendirilmesinde ve trafik güvenliği olaylarının incelenmesinde bu ilaçların varlığı veya yokluğu kritik öneme sahiptir.

2.1.5. Benzodiazepinlerin Kötüye Kullanımı

Benzodiazepinler belirli kişi ve kurumlar üzerinden kötü amaçlı kullanımı yaygınlaşmıştır. Kişisel olarak kullanımlarında bağımlılık etkisiyle dışarda satımının yanında izinsiz reçetelerle beraber bunun yaygınlaştırılması ve denetimsiz bir şekilde kullanılması kişiler üzerinde olumsuz etkileri daha fazla artırmaktadır.

1990 yılında, dünya çapında benzodiazepinler için 18 milyon reçete yazıldı. Benzodiazepinler, Birleşik Krallık'ta ilaç endüstrisine karşı açılan gelmiş geçmiş en büyük

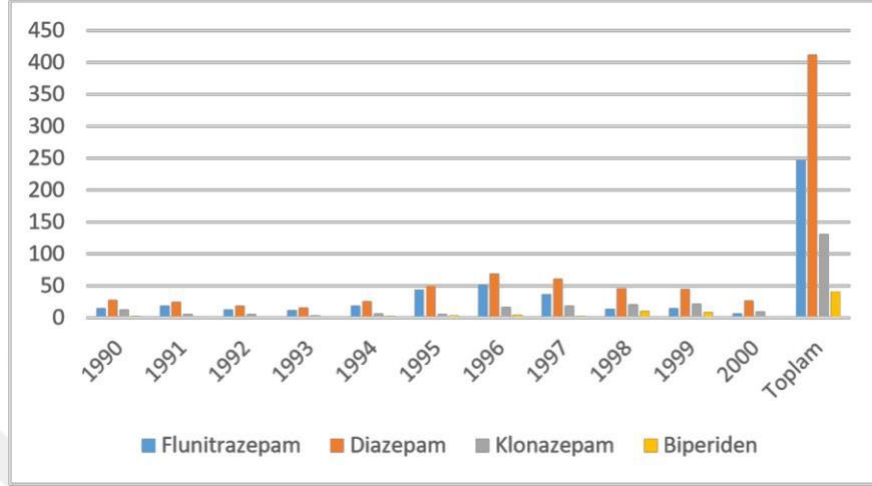
toplu davanın temelinde yer almaktadır. Yaklaşık 14.000 hasta ve 1.800 hukuk firması, benzodiazepin üreten ilaç firmalarının (örn. Hoffmann-LaRoche, Wyeth, and Upjohn) üreticilerin kapsamlı pazarlama ve promosyonunun tıp fakültelerinin eğitim geleneğiyle (yan etkilerin önemini azaltan) birleştiğinde sorunları artırdığı iddia edilmiş. Birleşik Krallık mahkeme sistemi davayla mücadele ederken, bireysel hastalar 117 pratisyen hekime ve 50 sağlık yetkilisine bağımlılık ve geri çekilme ile ilgili zararlar için dava açtı (17).

2007-2008 yılları arasında ise Amerika’da yapılan incelemede bir yılda 112.8 milyon benzodiazepin türevinin reçete edildiği ortaya kondu (5,7). Bunların %16’sı psikiyatristler, %55’i ise ilk yardım çalışanları, kalan %29’luk kısım ise farklı alanlarda uzman kişiler tarafından reçetelendirilmiştir (7).

Tablo I. Türkiye’de 1990-2000 Yılları Arasında İncelenen Yeşil Reçeteli Benzodiazepinler

YILLAR	FLUNİTRAZEPAM	DİAZEPAM	KLONAZEPAM	BİPERİDEN
1990	15	28	13	3
1991	19	25	6	2
1992	13	19	6	0
1993	12	16	4	0
1994	19	26	7	3
1995	44	50	6	4
1996	52	69	17	5
1997	37	61	19	3
1998	14	46	21	11
1999	15	45	22	9
2000	7	27	10	1
TOPLAM	247	412	131	41

Türkiye’de ise 1990-2000 yılları arasında Adli Tıp Kurumu’nda 2862 maddeye yapılan kimyasal analizlerin büyük çoğunluğunda yeşil reçeteli flunitrazepam ve diazepam maddelerine ilişkin oran oldukça fazla olduğu Tablo I’de ve Şekil 5’te görülmektedir (8).

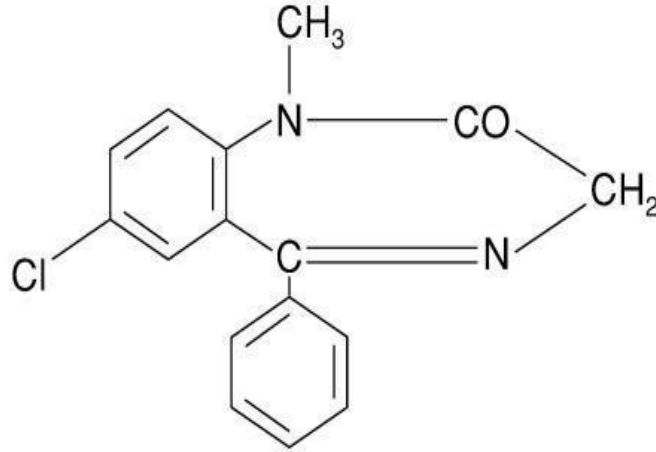


Şekil 5: Türkiye’de 1990-2000 Yılları Arasında İncelenen Yeşil Reçeteli Benzodiazepinlerin Grafiği

2.1.6. Diazepam

İlk kez 1963’te piyasaya sunulan "V" ticari markasıyla damgalanan ve Latince valere'ye (güçlü ol) dayalı olarak adlandırılan valium diğer adıyla diazepam güçlü bir anksiyete giderici ve sedatif etkiye sahip olma özellikleriyle öne çıkan bir BZD türevidir. (14,17) Genel olarak kaygı bozukluğu, kas spazmı, uyku bozukluğu şikâyeti olan hastalara 5-10 mg dan 40 mg’a kadar reçete edilen yatıştırıcı bir ilaçtır. (5,6,9) Ancak bu maddenin adli tıp açısından önemi giriş bölümünde bahsedilmiş olan DFSA ve DFC’lerde amnezik ve sedatif özelliklerinin yanında kolay ulaşılabilmesi açısından oldukça yaygın kullanılması gerek reçetelenmiş kişiler tarafından teminle gerek el altı yollarla özellikle cinsel saldırılarda, hırsızlıklarda ve hatta cinayetlerde oldukça karşılaşılan bir madde olmasıdır (19).

Diazepamın FDA onaylı reçetesinde kimyasal adı 7-kloro-1,3-dihidro-1-metil-5-fenil-2H-1,4-benzodiazepin-2-bir'dir. Suda çözünmeyen, renksiz ila açık sarı kristalli bir bileşiktir. Şekil 6'da gösterildiği gibi, ampirik formül $C_{16}H_{13}ClN_2O$ 'dur ve molekül ağırlığı 284.75'tir. Piyasada oral olarak alınan 2, 5 ve 10 mg'lık tabletler halinde bulunmaktadır (18).



Şekil 6: Diazepam'ın Kimyasal Formülü

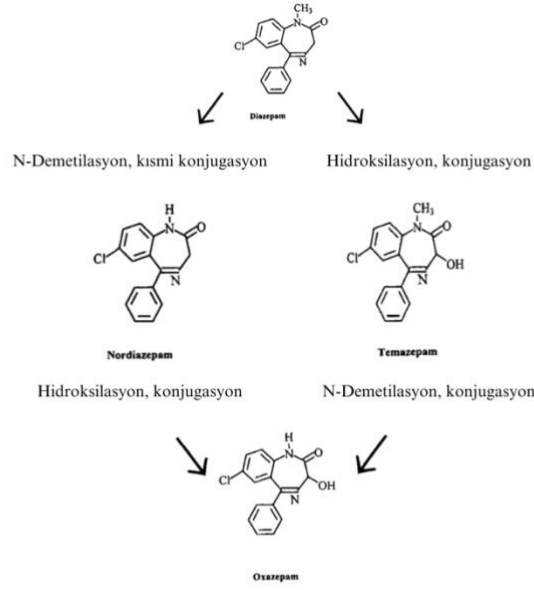
Diazepam, biyolojik olarak temin edilebilen, geniş çapta dağılmış (V_d 0,95–2,0 l/kg) lipide çözünür merkezi sinir sistemi penetrant bileşiğidir. Biyoyararlanım aralığı oral yolla %93 ile %100 ve rektal olarak %90 arasında yüksek düzeyde plazma protein bağlanmasıyla (%96-99) değişir. Doruk plazma seviyelerine oral yolla 30-90 dakikada, kas içi enjeksiyonla 30-60 dakikada ve rektal yolla 10-45 dakikada ulaşırken, kronik dozlama sırasında kararlı durum seviyelerine 5-14 gün sonra ulaşılmaktadır. Eliminasyon, absorpsiyondan sonra kas ve yağ dokusuna yeniden dağılan ve 24-48 saatlik bir yarı ömürle iki fazlı bir süreç yoluyla gerçekleşmektedir (14,23).

Diazepam, karaciğerde sitokrom P450 (CYP, monooksijenaz enzim ailesi: lipitleri, hormonları, toksinleri ve ilaçları metabolize etmek için ana sistemi oluşturan büyük ve çeşitli bir hepatik enzim grubudur. CYP genleri çok polimorfiktir ve ilaç metabolizmasının azalmasına, yok olmasına veya artmasına neden olabilir (22).) 2C19 tarafından nordiazepam

veya CYP 3A4 tarafından temazepamı metabolize edilir. Bu metabolitler, hidroksilasyon veya demetilasyon yoluyla oksazepamı dönüştürülür. Bu diazepamın Faz I metabolizmasıdır. (5, 15, 18). Hem temazepam hem de oksazepam, sırasıyla temazepam glukuronid (TG) ve oksazepam glukuronid (OG) oluşturmak için faz II metabolik yol boyunca glukuronik asit ile konjuge edilir ve kanda daha düşük temazepam ve oksazepam konsantrasyonlarına yol açar. (18) Diazepam ve metabolitleri, GABA iletimini artırmak ve sonraki süreçleri etkilemek için korteks, talamus ve serebellumda mitokondriyal membranda oldukça konsantre olan GABAA veya BZ1 reseptörünün alfa 1, 2 ve 3 alt ünitelerine bağlanır (5, 14). Tablo II’de diazepamın kimyasal özellikleri verilmiştir.

Tablo II. Diazepam’ın Kimyasal Özellikleri

Diazepam	Açıklamalar
Kimyasal Adı	7-kloro-1,3-dihidro-1-metil-5-fenil-2H-1,4-benzodiazepin-2-on
CAS numarası	4324-66-8
Kimyasal formülü	$C_{15}H_{11}ClN_2O$
Moleküler Ağırlığı	284.71
Çözünürlük	Suda, alkol ve eterde çözünür.
Fiziksel Özellikleri	Beyaz veya açık sarı, kristal toz

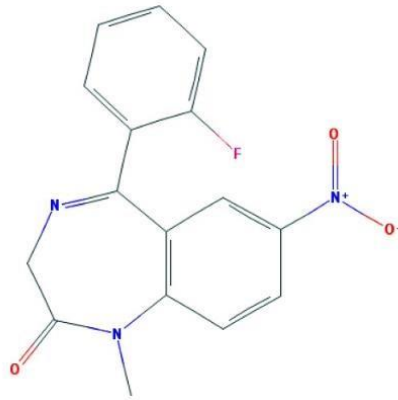


Şekil 7: Diazepam'ın Metabolitlerini Oluşturma Süreci

Diazepamın metabolitlerinin oluşma süreci Şekil 7'de verilmiştir. DFC'lerin giriş kısmında gösterildiği üzere en sık karşılaşılan maddelerinden biri olan diazepam ve metabolitleri için saçta, kanda, idrarda hatta tavşan sütünde çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Saçta yapılan çalışmaya göre diazepam ve metaboliti nordazepam tek dozla maruziyetten iki ay sonraya kadar tespit edilebilmiştir (19). Tavşan sütü ve plazma ile yapılan çalışmada ise, tavşan sütü insan sütünden daha yağlı olduğu için diazepam ve nordazepamı ekstraksiyona gerek kalmadan kromatografik ayırımla tespit edebilen çalışma sunulmuştur (21). Buradan anlaşılabileceği üzere çeşitli matrislerde uzun yıllardır çalışılan diazepam ve metabolitleri hızlı ve doğru tespit edilebilir metot arayışlarının konusu olmuştur.

2.1.7. Flunitrazepam

Flunitrazepam, BZD'ler sınıfına ait bir ilaçtır ve anksiyoliz (anksiyete giderme), hipnoz (uyku indüksiyonu), kas gevşetme ve epilepsi tedavisi gibi çeşitli kullanım alanlarına sahiptir. Flunitrazepam, provokatif bir etkiye sahip olduğu ve şiddet ve saldırganlıkla ilişkilendirildiği rapor edilmiştir. Flunitrazepam ayrıca, damar yoluyla ilaç kullanıcıları arasında özellikle yaygın bir tercih olmuştur ve bazen uyuşturucu kullanımı sonrası yatıştırıcı olarak kullanılmıştır. Ayrıca, "club-drug" ve bazı vakalarda diazepam gibi "date-rape drug" olarak adlandırılmıştır (24,25,28). Şekil 8'de flunitrazepamın kimyasal yapısı gösterilmiştir.



Şekil 8: Flunitrazepam'ın Kimyasal Yapısı

Norveç'te, 2001-2003 yılları arasında bir "flunitrazepam salgını" yaşanmıştır. Polis, artan sayıda Rohypnol tabletine el koymuştur. Şüphelenilen sürücülerin flunitrazepam etkisi altında araç kullanmaktan dolayı yakalanmalarının sayısı, 2000 yılından 2002 yılına kadar üç kat artmış ve 2002 yılında yaklaşık 2100 olguya ulaşmıştır. Bu dönemde, alkolsüz uyuşturucu kullanımı nedeniyle şüphelenilen sürücülerin kan örneklerinin yarısından fazlasında flunitrazepam pozitif olarak tespit edilmiştir (24).

Tablo III. Flunitrazepam'ın Kimyasal Özellikleri

Açıklamalar	
Flunitrazepam	
Kimyasal Adı	2H-1,4-Benzodiazepin-2-bir,1,3-dihidro-5-(2- fluorofenil)-1-metil-7-nitro
CAS numarası	1622-62-4
Kimyasal formülü	$C_{16}H_{12}FN_3O_3$
Moleküler ağırlığı	313.287
Çözünürlük	Suda çözünmez, alkol ve eterde kısmen çözünür, asetonda çözünür.
Fiziksel Özellikleri	Beyaz-açık sarı

Flunitrazepam'ın kimyasal özellikleri Tablo III'de gösterilmiştir. Ayrıca, flunitrazepam mide-bağırsak yolundan kolayca emilebilmektedir. Karaciğerde yoğun bir şekilde ana metabolitleri olan N-desmetilflunitrazepam'a ve inaktif olan 7-aminoflunitrazepam'a metabolize edilmektedir. Sitokrom P450 enzimleri CYP2C19 ve CYP3A4, bu iki metabolitin oksidatif metabolizmasına aracılık eder; diğer metabolitler arasında 3-hidroksiflunitrazepam, 3-hidroksi-7-asetamidoflunitrazepam ve 7-amino-1-desmetilflunitrazepam yer almaktadır. Flunitrazepam idrarla neredeyse tamamen hem serbest hem de konjuge metabolitler olarak atılır ve %1'den daha azı değişmemiş ilaç olarak kalmaktadır. Bir dozun yaklaşık %10'u dışkıyla elimine edilir. Flunitrazepam plasenta bariyerini geçer ve anne sütüne geçmektedir (26,27).

Bir vaka çalışmasında otopsi incelemesinde böbrek, pankreas, sol kalp kanı, dalak ve karaciğer gibi farklı dokularda 7-aminoflunitrazepam'in öne çıkan yüksek konsantrasyonları gözlemlenmiştir. Ancak, yağ dokusunda beklenenin aksine, bu metabolitin düşük düzeyde olduğu görülmüştür (25). Buradan flunitrazepam metabolitinin yağ dokusunda birikmediği sonucuna ulaşılabilir. Plazma proteinlerine yüksek oranda bağlanan flunitrazepam gibi ilaçlar

için hepatik aralığı esas olarak ilacın serbest dolaşımdaki fraksiyonuna bağlanmaktadır. Akut ve kronik karaciğer hastalıkları, plazma protein bağlanmasını esas olarak bağlayıcı proteinleri sentezleme kapasitesinin azalması sonucunda ilacın proteinlerin bağlanamaması ile sonuçlanmıştır (26).

2.2. İlaç Etkisi Altında İşlenen Suçlar (Drug Facilitated Crimes - DFCS)

Uyuşturucu madde kullanımı, dünya genelinde artan bir suç türü olarak göz önünde bulundurulmakta ve ciddi bir sosyo-medikal acil durum olarak kabul edilmektedir. Bu tür suçlar, mağdurların uyuşturucu maddelerin etkisi altındayken maruz kaldığı çeşitli suçları ifade etmektedir; bu suçlar arasında soygun, cinsel saldırı, para gaspı ve şiddet gibi olaylar yer almaktadır. Mağdurlar genellikle, uyuşturucu maddeleri kabul ettikleri kişilerle, şehir içi seyahatler sırasında veya iş yerlerinde bulunanlar gibi güvendikleri kişiler arasından seçilmektedir (42,43).

Bu tür suçların tedavi protokolleri, genellikle konservatif yaklaşımları içermekte olup, benzodiazepinler, DFC'lerin (İlaç Etkisi Altında İşlenen Suçlar) tedavisinde en sık kullanılan ilaçlar arasındadır. Bu ilaçlar, lorazepam, diazepam, nitrazepam, flunitrazepam, klonazepam, bromazepam gibi benzodiazepinlere ve ayrıca benzodiazepin olmayan sedatiflere, zopiklon ve zolpidem gibi maddelere dahildir (44).

Tablo IV’de DFCs suçlarında kullanılan ilaçlar alfabetik sırayla yer almaktadır.

Tablo IV DFC’lerin Suçlarında Kullanılan İlaçların Listesi

Kategori	İlaçlar ve Diğerleri
Antihistaminler	Bromfeniramin, Setirizin, Klorfeniramin, Siklobenzaprin, Difen Hidramin, Doksilamin, Hidroksizin, Niaprazin
Diğerleri	Aspromazin, Haloperidol, Asprometazin, İmipramin, Alimemazin, Amitriptilin, Kloral Hidrat, Klomipramin, Klonidin, Klozapin, Cyamazin, Desipramin, Dextrometorfan, Doxepin, Droperidol
Barbitüratlar	Amobarbital, Barbital, Butalbital, Pentobarbital, Fenobarbital

Benzodiazepinler ve Z-İlaçları	Alprazolam, Bromazepam, Chlordiazepoxid, Klonazepam, Clorazepat, Clotiazepam, Cloxazolam, Diazepam, Estazolam, Flunitrazepam, Lorazepam
Etanol (alkollü içecekler)	
Opioidler (yasal narkotik ağrı kesiciler)	Buprenorfin, Kodein, Deks-tropropoksi-fen, Hidromorfon, Metadon, Morfin, Oxikodon, Dihidrokodein, Fentanil, Hidrokodon, Difenhidramin, Polkodin, Tramadol
Yasadışı İlaçlar	
Kannabinoidler	Doğal (kenevir, IIIC), Sentetik kannabinomimetikler (spice vb.)
Opiatlar	Eroin, Morfin
Kokain	Kokain ve crack kokain
Amfetaminler	Amfetamin, PMA, MBDB, MOA, MDEA, MDMA, Metamfetamin
GHB	GHB, GBL, 1,4-BD, Valerolakton
Diğerleri	Atropin, Ayahuasca, Katinon ve Katinon türevleri, Kava-Kava, Ketamin, LSD, İSA, Meskalin, Mantarlar (halüsinojenik), Organik çözücüler (kloroform, n-dodekan, eter, toluen), Fenilsiklidin (PCP), Piperazin grubu, Popperlar, Salvinorin A, Skopolamin

Tablo IV'deki ilaçların gizlice bir kişiye verilmesi yoluyla gerçekleştirilen suçlar, bir kişinin davranışlarını, farkındalık seviyesini, algılarını, bilinç durumunu, yargılama yeteneğini, karar verme kapasitesini ve anterograd hafızasını bozmak amacı taşıyan suç eylemleridir. Bu suçlar, genellikle kokusuz veya tatsız olan maddelerle gerçekleştirilir ve içecekler (alkollü veya alkolsüz) içinde kolayca çözünebilirler. Bu maddeler, hızlı etki gösteren, düşük dozlarda etkili olan, kısa plazma yarı ömrüne sahip, güçlü merkezi sinir sistemi (MSS) depresanlarıdır. Ayrıca, şiddetli alkol zehirlenmesini veya sedasyonu taklit edebilirler ve mağdurlarda anterograd amneziye yol açabilirler (45).

2.2.1. İlaç Etkisi Altında Kolaylaştırılarak İşlenen Cinsel Suçlar (Drug- Facilitated Sexual Assaults - DFSAs)

Uyuşturucu içeceklerin, tecavüz gibi suçlarla ilişkilendirilen yiyecek ve içeceklerle bilinmeyen bir şekilde uyuşturucu maddeler eklenmesiyle üretildiği sıkça vurgulanmaktadır.

Bu uyuşturucu maddeler arasında etanol (alkol) ve tıbbi/dinlendirici uyuşturucular bulunmaktadır. Bu tür maddeler, sokak uyuşturucuları, hızlı etkili benzodiazepinler ve GHB (Gamma-Hidroksibütirat) gibi maddelerin kullanımını teşvik edebilmektedir. Bu maddelerin hızlı etkisi, kas gevşemesine ve bellek kaybına neden olabilirken, alkol kullanımı da bilişsel fonksiyonlarda bozulmaya yol açmakta ve yüksek alkol seviyeleri kişinin bilincini kaybetmesine neden olabilmektedir (46,47).

Adli toksikolojide, sıvı kromatografisi/kütle spektrometrisi (LC/MS) gibi yöntemler, özellikle BZD'lerin gibi ilaçların izlerini tespit etmek için kullanılmaktadır. Ancak, bazı ilaçlar hızla vücuttan atılabildiği veya mağdurun başvurusunun gecikmesi durumunda negatif sonuçlar elde edilebildiği için bu tür teşhisler zorlu olabilmektedir. Uyuşturucuyla kolaylaştırılmış tecavüz vakalarının teşhisi, mağdurların suçu bildirmeyi birkaç gün ertelemeleri nedeniyle daha da karmaşıklaşmaktadır. Doğrulayıcı testlerin yapılması da zorlu bir süreç olabilir çünkü bu ilaçlar düşük dozlarda etkili olabilir, kimyasal olarak kararsızdır, metabolize edilir ve vücuttan çok hızlı bir şekilde atılmaktadırlar (48).

Sonuç olarak, uyuşturucuyla kolaylaştırılan tecavüz vakalarının gerçek sayısının tahmin edilenden daha yüksek olduğu düşünülmektedir. Bu tür suçların anlaşılması ve mücadele edilmesi hem tıbbi hem de adli alandaki uzmanların iş birliği gerektirmektedir.

2.2.2. İlaç Etkisi Altında Kolaylaştırılarak İşlenen Cinsel Suçların Adli Yönü

Alkol, BZD'ler, antihistaminikler, antidepresanlar, marihuana, kokain ve gamahidroksibütirat (GHB) dahil olmak üzere birçok ilaç tek başına veya kombinasyon halinde cinsel saldırıyı kolaylaştırmak için kullanılma potansiyeline sahiptir. İster gönüllü ister gönülsüz olarak alınsın, bu tür ilaçlar genellikle mağdur bir cinsel saldırının gerçekleşmiş olabileceğinden şüphelenmeden önce metabolize edilir ve atılır. Bu durum, uyuşturucunun kolaylaştırdığı cinsel saldırıların (DFSA) eksik bildirilmesine katkıda bulunmaktadır. Son 20

yıl içinde hem polis hem de sağlık personeli uyuşturucu ile kolaylaştırılmış cinsel saldırı konusunda daha bilinçli hale gelmiştir. Kloral hidrat bayıltıcı damlaların kullanımı 1800'lü yıllara kadar uzanmaktadır ve bu damlalar soygunu kolaylaştırmak için kullanılmıştır. DFSA yeni bir olgu değildir (49,50).

İki farklı mağdur kategorisi görülmektedir. En sık rastlanan ilk kategori, failin zaten sarhoş olan birinden faydalanarak yeterli miktarda uyuşturucu veya alkolü gönüllü olarak alıp sarhoş olduğu fırsatçı (opportunistic) DFSA'dır. İkinci kategori ise proaktif DFSA'dır ve şüphelenmeyen bir mağdura gizlice uyuşturucu verilmektedir. Her iki durumda da potansiyel mağdurun bilinci bozulmuş ve istenmeyen cinsel girişimlere karşı koyma kabiliyeti azalabilmektedir (51,52).

Laboratuvar verilerini polis soruşturmalarından elde edilen bilgilerle birleştiren bir İngiliz çalışmada, sedatif ilaç bulgularının %2'sinden azının proaktif DFSA'ya atfedilebileceği, pozitif testlerin büyük çoğunluğunun ise gönüllü alımla açıklanabileceği bulunmuştur (53).

Tablo V Hagemann Tarafından Yapılan Çalışma (54)

Kategori Sayı	
Toplam hasta sayısı	264
Etanol ve/veya uyuşturucu pozitif	155 (%59)
Sadece etanol pozitif	105 (%40)
Etanol dışında bir veya daha fazla uyuşturucu pozitif	50 (%19)
Proaktif DFSA kurbanı olduğundan şüphelenilen hasta sayısı	57 (%22)
Kendi bildirdiği gönüllü alımla açıklanamayan yatıştırıcı ilaç bulgusu olan hasta sayısı	5
Kesin olarak proaktif DFSA ile ilişkilendirilen vaka sayısı	0

Tablo V'de de gösterildiği gibi, Hagemann tarafından yapılan bir çalışmada, dahil edilen 264 hastanın 155'inde (%59) etanol ve/veya uyuşturucu; 105'inde (%40) sadece etanol; 50'sinde (%19) ise etanol dışında bir veya daha fazla uyuşturucu testi pozitif çıkmıştır. Toplamda 57

hastanın (%22) proaktif DFSA kurbanı olduğundan şüphelenilmiştir, ancak sadece beşinde kendi bildirdiği gönüllü alımla açıklanamayan yatıştırıcı ilaç bulgularına rastlanmıştır. Hiçbir vaka kesin olarak proaktif DFSA ile ilişkilendirilememiştir (54).

Son olarak, etanol testi pozitif çıkan hastalar daha sık olarak halka açık bir yerde saldırıya uğradıklarını ve saldırganın yabancı olduğunu bildirmişlerdir ve saldırı anında tahmini kan alkol konsantrasyonu ne kadar yüksekse, proaktif DFSA'dan şüphelenme sıklığı da o kadar yüksektir. Sonuç olarak, gönüllü uyuşturucu ve/veya alkol tüketiminin cinsel saldırı mağduru olma riskini artırdığı söylenebilmektedir (53,54).

2.2.2.1. Örnek toplama ve delillendirme

Şüpheli DFSA'nın ana klinik tablosu (blank memory) "boş hafıza" olarak adlandırılmaktadır. Mağdur, genellikle klinik muayene ve adli testlerin tam olarak ne olduğunu belirleyeceğini düşünecektir. Bu nedenle hem klinik muayenenin hem de adli tıp testlerinin sınırlılıklarını açıklamak büyük önem taşımaktadır (55).

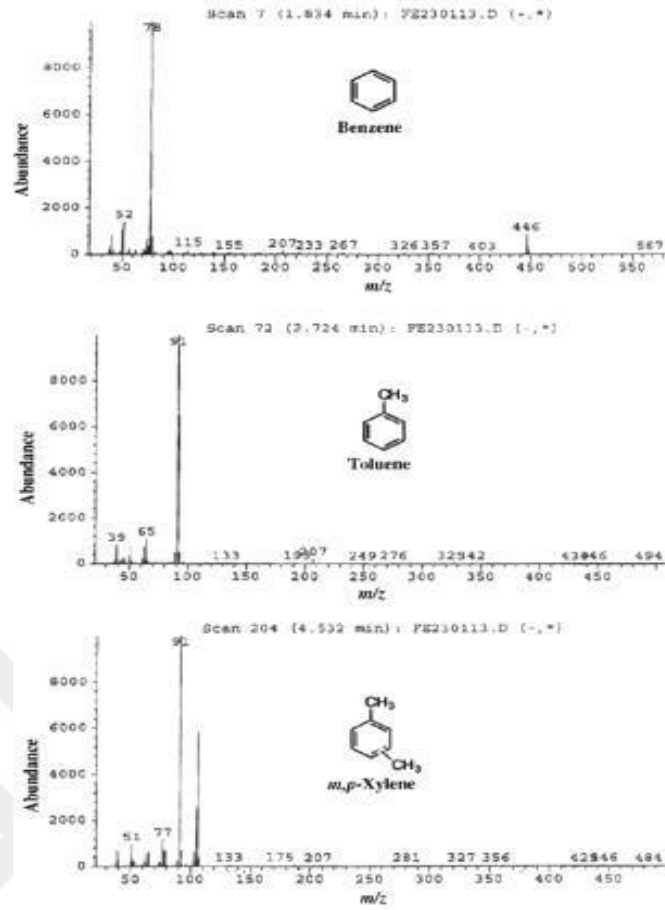
Özellikle DFSA vakalarında, genital organlarda, anüste veya ağızda yaralanmaların yanı sıra tüm vücutta yaralanmaların bulunması çok nadirdir. Bunun başlıca nedeni mağdurun sarhoş olması ve saldırının farkında olmamasıdır. Savunma yaraları özellikle nadirdir. Bu nedenle, cinsel saldırıya dair herhangi bir kanıt bulunmazsa, bu hiçbir şey olmadığı anlamına gelmez. Klinik tabloya hakim olan nöropsikiyatrik semptomların yanı sıra başka semptomlar da görülebilir. Bu belirtilerin aranması, bazen kullanılan ilaca dair bir fikir verebileceğinden önemlidir. Benzodiazepinler hipotoni ve miyorelaksasyona neden olabilir. Antihistaminik ilaçların (hidroksizin, alimemazin, prometazin, difenhidramin) veya Datura dahil atropinin ve tri- veya tetrasiklik antidepresanların emilimi, deliryum, dizatri, midriyazis, stresle şiddetlenen tremor, huzursuzluk ve klonik hareketlerle karakterize antikolinergik sendroma neden olabilir.

Ayrıca mukozal kuruluk, idrar retansiyonu, kabızlık ve taşikardinin otonomik belirtileri de vardır. Çoğu vakada hastalar bu belirtilerin hepsini göstermez. Opiyatlar solunum depresyonu, bradikardi ve miyoza neden olabilir. Bazı ilaçların görme bozuklukları (miyozis, midriyazis, akomodasyon bozukluğu), taşikardi, baş ağrısı, bulantı, kusma ve baş dönmesine neden olması da muhtemeldir. Skopolamin maruziyetinden sonra baş ağrıları bildirilmiştir (56,57).

Abondo ve arkadaşları MDMA (3,4 metilendioksi-N-metilamfetamin) içeren bir cinsel saldırı vakası bildirmişlerdir. Mağdur taşikardi, çene ve boyun sertliği ve şişmiş ayak izlenimi tarif etmiştir. Belinde ve kasıklarında ağrı ve abartılı hassasiyet (tat, dokunma ve koku alma) yaşamıştır. Hipertermi de tarif edilmiştir. Klinisyen bu farklı klinik tabloların farkında olmalıdır. Bu nörolojik belirtilerin yanı sıra, mağdur genellikle alt karın ağrısı, genital veya anal tahriş, vajinal akıntıdan bahsedecektir ve olası bir cinsel saldırı fikrine yol açan esas olarak bu jinekolojik belirtilerdir. Uyuşturucu veya alkol tüketimi nedeniyle neler olduğunu hatırlayamayan mağdur, tecavüze uğramış olma olasılığı konusunda şüpheli ve endişeli olacaktır. Klinisyen, "boşluk" dönemine kadar neler olduğuna ve mağdurun bilinci yerine geldikten sonra neler olduğuna dair net bir öykü elde etmek için mağdurun sorgusunun alınması gerekmektedir. Ana sorulardan bazıları mağdurun çevresine sorulması önemlidir (58,59).

2.2.2.2. Biyolojik örneklerden analiz

Martínez ve Ballesteros, 2006 yılında hazırladıkları bir raporda, 13 yaşındaki bir kız çocuğunun kaçırılması ve ardından uyuşturucu etkisiyle bilincini kaybetmesiyle ilgili bir araştırma yapmışlardır. Olayda, kız çocuğunun ağzına bir çözücü maddeyle ıslatılmış bir bez konulmuş ve bilincini kaybettikten sonra yarı çıplak bir şekilde sokakta uyanmıştır. Tıbbi muayenede herhangi bir yara izine rastlanmamış ve kan örneği alınarak kloroform veya benzer anesteziklerin kullanımını araştırmak amacıyla toksikolojik analiz yapılmıştır.



Şekil 9: Benzene, Toluene ve Xylene Değerlerinin Sonuçları

Şekil 9’da gösterilen analiz sonucunda, kurbanın kanında benzene 7.6 mg/L, toluene 24.8 mg/L ve xylene 0.6 mg/L (izomer karışımı) tespit edilmiştir. Ayrıca, diazepam da bulunmuştur. Bu olay, gaz kromatografisi ve kütle spektrometrisi gibi analitik yöntemler kullanılarak incelenmiştir.

2.2.2.3. Fiziksel örneklerden analiz

Fiziksel delillerin analizi, adli bilimlerdeki suç mahallindeki incelemelerin temelini oluşturur ve bu süreç, suçların çözülmesinde hayati bir role sahiptir. Bu alanda yapılan akademik çalışmalar, özellikle hassas kimyasal ve biyolojik analiz tekniklerinin geliştirilmesine

odaklanmaktadır. Bu teknikler, suç mahallinde bulunan çeşitli materyallerden -içecek ve yiyecek eşyaları, ilaç kutuları gibi- mikroskobik izleri veya kimyasal kalıntıları tespit etmekte kullanılır. Benzodiazepinlerin varlığını ve miktarını tespit etmek için, örneklerin ekstraksiyonu ve analizi için sıvı-sıvı ekstraksiyonu, katı faz ekstraksiyonu ve katı faz mikro ekstraksiyonu gibi farklı yöntemler kullanılır. (74, 75)

Vincenti ve arkadaşlarının yürüttüğü çalışmada (86), kullanılan yöntemler, suç mahallerinde bulunan içecek ve yiyecek eşyalarından benzodiazepin tespiti için etkili teknikler sunar. Bu yöntemler, suç mahallerinde bulunan içecek ve yiyecek eşyalarının yüzeylerinden uyuşturucu kalıntılarını toplamak için kullanılan tek kullanımlık dezenfektan mendiller ve dLLME (dağıtıcı sıvı-sıvı mikroekstraksiyon) tekniğini içerir. Bu teknikler, özellikle az miktarda veya kısmen bozulmuş kanıtların var olduğu durumlarda yüksek hassasiyet sağlayarak, adli bilimlerdeki delil analiz süreçlerini önemli ölçüde iyileştirmektedir (86).

Ekstraksiyon sonrasında, gaz kromatografisi (GC) ve sıvı kromatografisi (LC) gibi kromatografik yöntemler, BZD'lerin miktarını ve yapılarını belirlemek için kullanılır. Gaz kromatografisi, BZD'leri farklı uçuculuklarına göre ayırmak için bir gaz taşıyıcısı kullanılmaktadır. GC ile BZD analizi için elde edilen ekstrakt, bir GC kolonuna uygulanır ve kolon içinde ayrıştırılmaktadır. Bu aşamada, benzodiazepinlerin miktarları ve yapıları kütle spektrometrisi (MS) kullanılarak belirlenilmektedir (76).

Sıvı kromatografi ise, BZD'leri farklı çözünürlüklerine göre ayırmak için bir sıvı taşıyıcısı kullanır. LC ile BZD analizi için elde edilen ekstrakt, bir LC kolonuna uygulanır ve kolon içinde ayrıştırılır. Ayrılmış BZD'lerin miktarları ve yapıları ise UV-vis spektrofotometresi kullanılarak belirlenir (77).

Adli bilimlerdeki bu tür analizler, suç mahallerinden toplanan delillerin doğru bir şekilde değerlendirilmesi için gerekli olan detaylı teknik uzmanlık ve dikkat gerektirir. Bu analizler, suçun nasıl işlendiğini, failin kimliğini ve olayın olası senaryolarını ortaya çıkarmada

hayati önem taşır. Bu nedenle, bu alandaki araştırmalar, suç mahallerindeki delil toplama ve analiz süreçlerini daha da geliştirmeye yönelik yenilikçi yaklaşımlar sunmaktadır. Gelecekteki çalışmaların, bu teknikleri daha da ilerleterek suç mahallerindeki delil toplama ve analiz süreçlerine katkıda bulunması beklenmektedir (87).

2.3. Kromatografi

Biyobilimler ve kimyanın farklı dallarında kullanılan ve biyoanalitik tekniklerden biri olarak kabul edilen kromatografi, bileşiklerin ayırma, tanımlama ve saflaştırma işlemlerini gerçekleştirmede önemli bir rol oynamaktadır. Kromatografi, farklı kökenden, sınıftan ve doğadan gelen bileşiklerin karışımlardan nitel ve nicel olarak ayrılmasını sağlama görevinde kullanılmaktadır. İstenilen şekil, boyut, yük ve gruplara sahip bir bileşiğin ayrılması, bağlanma özgünlüğüne dayalı olarak gerçekleştirilebilir. Ayırma biliminde evrensel olarak kullanılması, laboratuvar ve endüstri ölçeğinde etkin bir şekilde ayırma amaçları için kullanılan birçok çeşidi olan çok yönlü bir teknik haline getirmiştir. Farklı fazlara, ayırma mekanizmasına, prensibe, prosedüre ve uygulamalara göre farklı kromatografik teknikler hakkında çeşitli tartışmalar bulunmaktadır (29).

Kromatografinin erken tarihi, 20. yüzyılın başlarına dayanır. 1872-1919 yılları arasında yaşayan Mikhail Tsvet, bitki renklerini incelemek için kullandığı yöntemle kromatografinin temelini atmıştır. Tsvet, bitkilerde bulunan pigmentlerin ayrılmasında kullanılan ilk kromatografik işlemi gerçekleştirmiştir. Ancak bu dönemde kromatografinin tam potansiyeli henüz anlaşılamamıştır. Kromatografinin gelişimi, özellikle 20. yüzyılın ortalarında hız kazanmıştır. 1940'larda ve 1950'lerde, Archer Martin ve Richard Synge tarafından "bölme kromatografisi" geliştirilmiştir. Bu yöntem, bileşenlerin farklı hareketliliklerine dayanarak ayrılmasını sağlar. Daha sonra Martin, Anthony James ile birlikte gaz fazında taşınan bileşenlerin sıvı fazında bir kolonda ayrılmasını sağlayan "gaz-sıvı kromatografisi"ni

geliştirmiştir. Kromatografi yöntemleri zamanla daha da gelişerek çeşitlenmiştir. Kağıt kromatografisi gibi farklı teknikler ortaya çıkmış ve kimyasal analizde yaygın olarak kullanılmıştır. Bunlardan sonra ise daha hassas ve hızlı analizler için yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) gibi modern varyasyonlar kullanılmaya başlanmıştır (31).

2.3.1. Kromatografinin Sınıflandırılması

Kromatografi, moleküllerin karışım halinde yüzeye veya katıya uygulandığı ve akışkan sabit fazın (sabit faz) hareketi ile birbirinden ayrıldığı bir prensibe dayanmaktadır. Bu ayrılma sürecine etki eden faktörler, sıvı-katı absorpsiyonu, sıvı-katı partisyonu ve moleküler ağırlıkları arasındaki farklar gibi moleküler özelliklerle ilgilidir. Bu farklılıklar nedeniyle karışımın bazı bileşenleri sabit fazda daha uzun süre kalırken, kromatografi sisteminde yavaş hareket ederler ve diğerleri hızla hareket ederek mobil fazına geçmekte ve sistemden daha hızlı ayrılmaktadır (29,30).

2.3.1.1. Ayırma mekanizmasına göre sınıflandırılması

Kromatografi, kimyasal analizlerde ve bileşenlerin ayrılmasında oldukça yaygın bir kullanıma sahip olan bir tekniktir. Bu teknik, karmaşık karışımlardaki bileşenlerin taşınma hızlarının farklılıklarına dayanarak çalışmaktadır. Kromatografi, çeşitli temel prensiplere dayandırılarak farklı yöntemlere ayrılabilir. Bu sınıflandırma, analitik kimyacıların belirli analizlerde en iyi sonuçları elde etmek için hangi kromatografi türünü kullanacaklarını seçmelerine yardımcı olur. Kromatografinin ayırma mekanizmalarına göre bu sınıflandırma aşağıda sıralanmıştır.

2.3.1.1.1. Absorbsiyon kromatografisi

Absorbsiyon kromatografisi, sabit bir fazın yüzeyindeki absorbsiyon kuvvetlerini kullanarak karışım bileşenlerini ayırmayı amaçlar. Bu tekniğin temelinde, sabit fazın, bileşenlerin farklı absorbsiyon kuvvetlerine sahip olması ve bu kuvvetlerin ayrılma mekanizmasını yönlendirmesi yatar.

Bu yöntem, sabit faz genellikle yüksek spesifik yüzey alanına sahip bir katı madde olarak kullanılmaktadır. Bu sabit fazın örnek karışım bileşenleriyle farklı absorbsiyon etkileşimleri vardır. Silika jel, aktif karbon ve polimerler sıkça kullanılan sabit fazlardır. Hareketli faz ise sıvı veya gaz olabilmekte ve bileşenlerin taşınmasını sağlamaktadır. Hareketli fazın türü, ayrılacak bileşenlerin özelliklerine bağlı olarak seçilmektedir. Kimyada, organik bileşiklerin ayrılması için kullanılabileceği gibi biyokimyada, proteinlerin ve DNA'nın ayrılmasında da etkilidir. Farmasötik endüstrisinde, ilaçların saflaştırılmasında büyük bir rol oynar ve çevre biliminde kirleticilerin ayrılması için değerli bir araçtır. Örneğin, silika jel üzerine absorbe olan bir karışımdaki bileşenler, farklı absorbsiyon kuvvetlerine sahip oldukları için farklı hızlarda hareket etmektedirler. Bu farklılıklar, karışım bileşenlerinin sabit fazda farklı noktalarda absorbe olmalarını ve böylece ayrılmalarını sağlamaktadır (61).

Absorbsiyon kromatografisi, karmaşık karışımların analizi ve bileşenlerinin ayrılması için güçlü bir araçtır. Bu yöntem, farklı absorbsiyon kuvvetlerine sahip bileşenlerin farklı hızlarda hareket etmelerini kullanarak çalışmaktadır. Çeşitli uygulama alanlarında kullanılabilir ve kimya, biyokimya, farmasötik, çevre bilimi ve gıda bilimi gibi birçok alanda önemli bir rol oynamaktadır.

2.3.1.1.2. Dağılma kromatografisi

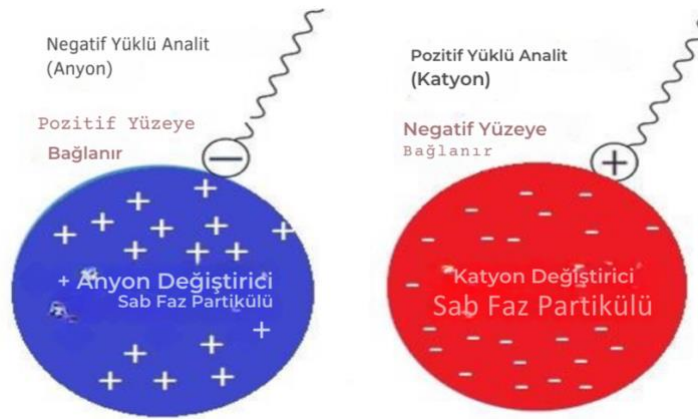
Dağılma kromatografisi, bir karışımdaki bileşenlerin sabit fazda (genellikle bir katı destek üzerine emdirilmiş bir sıvı) ve hareketli fazda (bir çözücü) farklı çözünürlüklere sahip olmalarına dayanmaktadır. Bu farklı çözünürlükler, bileşenlerin hareketli faz içindeki dağılım hızlarını etkilemektedir.

Bu yöntem, sabit faz karışımın ayrılmasında kritik bir rol oynamaktadır. Örnek olarak, kağıt kromatografisinde sabit faz, selülozdan oluşan bir katı destek üzerine uygulanan bir sıvıdır. İnce tabaka kromatografisinde ise silika jel veya poliamid film gibi katı destekler üzerine emdirilen bir sıvı kullanılmaktadır. Gaz-sıvı kromatografisinde ise sabit faz bir sıvıdır ve katı bir destek üzerine emdirilmektedir. Hareketli faz, ayrılacak bileşenlerin çözünürlüğüne bağlı olarak seçilmektedir. Kağıt kromatografisinde, hareketli faz genellikle bir çözücü veya çözücü karışımıdır. İnce tabaka kromatografisinde de benzer bir çözücü kullanılmaktadır. Gaz-sıvı kromatografisinde ise hareketli faz bir inert gazdır (62).

Dağılma kromatografisi, çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Kimya, organik bileşiklerin, pigmentlerin ve metal iyonlarının ayrılmasında kullanırken, biyokimya, proteinlerin, enzimlerin ve DNA'nın ayrılmasında da bu teknik benimsenmiştir. Farmasötik endüstrisi, ilaçların saflaştırılması için dağılma kromatografisini tercih eder ve çevre bilimi, çevresel kirleticilerin ayrılmasında bu yöntem kullanılmaktadır. Gıda bilimi, gıdalardaki bileşenlerin analizi ve ayrılması için dağılma kromatografisine başvurmaktadır. Temel çalışma prensipleri ve uygulamaları ile dağılma kromatografisi, kimya ve diğer bilim dallarında vazgeçilmez bir araçtır (63).

2.3.1.1.3. İyon değiştirme kromatografisi

İyon değiştirme kromatografisi, bir karışımdaki iyonların sabit fazda bulunan bir iyon değiştirici ile etkileşimlerine dayalı olarak ayrılmasına dayanmaktadır. Sabit faz, yüzeyinde yüklü gruplara sahip bir katı madde olan iyon değiştiriciden oluşmaktadır. Hareketli faz ise bir çözeltilidir. Bu yöntemde, karışım bileşenleri sabit fazdaki iyon değiştirici ile iyon değişimi etkileşimine girmektedir. Daha fazla iyon değiştirici ile etkileşen bileşenler, daha az iyon değiştirici ile etkileşen bileşenlerden daha hızlı hareket etmektedirler. Bu etkileşim, iyonların yükleri ve sabit fazın özelliklerine bağlıdır (63). şekil 10'da iyon değiştirme kromatografisinin temel prensibi gösterilmiştir.



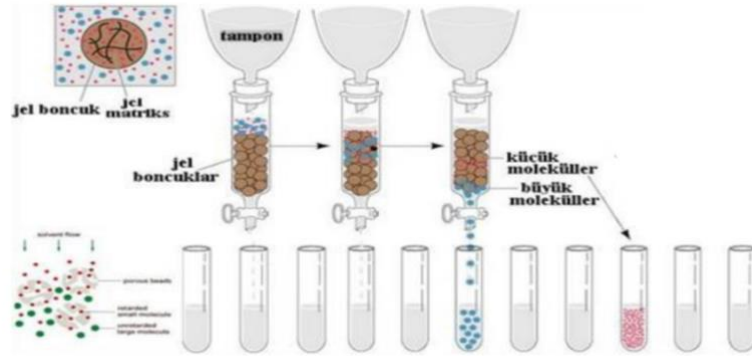
şekil 10: İyon Değiştirme Kromatografisi'nin Temel Prensibi

İyon değiştirme kromatografisinde kullanılan sabit faz, iyon değiştirici olarak adlandırılır ve yüzeyinde yüklü gruplar taşımaktadır. İyon değiştiricinin türü, ayrılacak iyonlara bağlı olarak seçilmektedir. Anyon değiştiriciler, negatif yüklü iyonlarla etkileşime girerken, katyon değiştiriciler pozitif yüklü iyonlarla etkileşmektedir. Hareketli faz, iyon değiştirme işlemini kontrol eden önemli bir faktördür. Genellikle tampon çözeltileri veya çözücüler

kullanılmaktadır. Tampon çözeltilerinin pH değeri, iyon değiştirme işlemini büyük ölçüde etkilemekte, bu nedenle doğru pH değeri seçimi kritik öneme sahiptir (64).

2.3.1.1.4. Jel filtrasyon kromatografisi (moleküler elek kromatografisi)

Jel filtrasyon kromatografisi, bir karışımındaki bileşenlerin, sabit fazdaki jel gözeneklerinin boyutlarına göre ayrıldığı bir kromatografi türüdür. Bu yöntem, özellikle proteinler, nükleik asitler ve diğer biyomoleküllerin saflaştırılması ve analizi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemde, karışım bileşenleri sabit fazdaki jel gözeneklerini doldurmaktadır. Daha küçük moleküller, jel gözeneklerinde daha fazla hareket özgürlüğüne sahip oldukları için daha hızlı hareket etmektedirler. Bu nedenle, karışım bileşenleri, kolonda farklı noktalarda ayrılmaktadırlar. Jel filtrasyonun temel prensibi, moleküler boyuta dayalı bu ayrılması gerekmektedir (63). Şekil 11’de jel filtrasyon kromatografisinin çalışma prensibi gösterilmiştir.



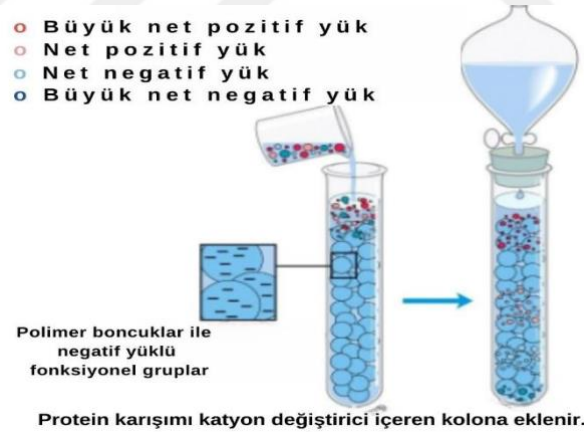
Şekil 11: Jel Filtrasyon Kromatografisinin Çalışma Prensibi

Sabit faz, jel filtrasyonunda kullanılan jeldir. Bu jel, bir polimerden oluşmaktadır ve gözenekli bir yapıya sahiptir. Örnek olarak, agaroz jel, Sephadex jel ve Styragel jel gibi çeşitli

jeller kullanılmaktadır. Jelin gözenek boyutları, ayrılacak moleküler boyuta bağlı olarak seçilmektedir. Hareketli faz ise bileşenlerin jel içinde hareket etmelerini sağlayan bir çözeltidir. Su, yaygın olarak kullanılan bir hareketli fazdır. Ayrıca, tampon çözeltileri ve çözücüler de hareketli faz olarak tercih edilebilmektedir. Bu çözeltilerin pH değeri, ayrılma mekanizmasını etkileyebileceğinden doğru seçim yapılması gerekmektedir (65).

2.3.1.1.5. Affinite kromatografisi

Affinite kromatografisi, karışım bileşenlerini sabit fazdaki özgül bir ligandla bağlama prensibine dayalı bir kromatografi türüdür. Sabit faz, bir liganddan oluşur ve bu ligandlar karışım bileşenlerinden birine özgül bir bağlanma özelliği taşımaktadır. Hareketli faz ise bir çözelti olarak işlev görmektedir. Affinite kromatografinin temel prensibi, bu özgül ligand-bileşen etkileşimine dayanmaktadır (63).



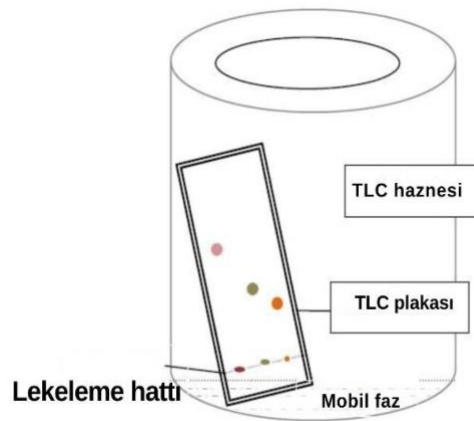
Şekil 12: Affinite Kromatografisi İşlem Süreci

Şekil 12’de gösterildiği gibi, affinite kromatografisinde, karışım bileşenleri sabit fazdaki ligandla etkileşime girmektedirler. Bu etkileşim, daha fazla özgül bağlanan bileşenlerin, daha az bağlananlara göre daha yavaş hareket etmelerine neden olmaktadır. Sonuç olarak, karışım

bileşenleri kolonda farklı noktalarda ayırmaktadırlar. Affinite kromatografisinin özgülüğü, sabit fazdaki ligandın seçimi ve bileşenlerin bu ligandlara özgü bağlanabilme yeteneğine dayanmaktadır. Sabit faz, affinite kromatografisinde kullanılan ligandı içermektedir. Bu ligandlar özel bir bağlanma yeteneğine sahiptir ve ayrılacak bileşenlere göre seçilmektedir. İmmobilize edilmiş enzimler, antikorlar veya reseptörler gibi farklı ligandlar kullanılabilir. Hareketli faz ise karışım bileşenlerini sabit fazdan uzaklaştıran çözeltileri içermektedir. Bu, karışım bileşenlerinin sabit fazdaki ligandlardan rekabetçi bir şekilde uzaklaştırılmasını sağlamaktadır (66).

2.3.2. Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi (HPTLC)

İnce tabaka kromatografisi (TLC), kimyasal bileşiklerin ayrılması ve analiz edilmesi için kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde bir sabit faz (ince tabaka) üzerine uygulanan numune, mobil faz (bir çözücü) yardımıyla yavaşça hareket ettirilir ve bileşikler farklı hızlarda sabit faz üzerinde yayılmaktadır. Bu hareketlilik sayesinde bileşikler ayrışır ve farklı noktalarda sabit faz üzerinde toplanılmaktadır. İnce tabakalar genellikle cam veya plastik plakalara sürülen ince bir tabaka malzemeden oluşmaktadır. Bu malzeme, polar (diğer moleküllerle etkileşime giren) veya apolar (diğer moleküllerle az etkileşime giren) özellikte olabilmektedir. TLC, özellikle bileşiklerin kimliklerini tespit etmek veya analiz etmek için kullanılmaktadır.



Şekil 13: İnce Tabaka Kromatografisi Uygulama Prensibi

Şekil 13'te gösterildiği gibi, TLC'nin geleneksel versiyonu, basit bir yapıya sahiptir ve genellikle kolayca temin edilebilen malzemelerle uygulanabilmektedir. Bu nedenle, özellikle endüstri laboratuvarlarında ve çeşitli analitik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Örneklerin hazırlanması genellikle diğer bazı kromatografik yöntemlere kıyasla daha az karmaşıktır, bu da analizin daha hızlı ve düşük maliyetli olmasını sağlamaktadır (33).

Geleneksel TLC, özellikle tanımlama ve yarı kantitatif analizlerde etkili bir şekilde kullanılabilmektedir. Bu yöntem, organik maddelerin ayrılması, miktarlarının belirlenmesi ve özelliklerinin analiz edilmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Gıda, çevre, eczacılık, klinik ve adli laboratuvarlarda sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir. Ancak, geleneksel TLC'nin tekrarlanabilirlik sorunları ve kullanıcı hatalarına duyarlı olma gibi zorlukları vardır. (33) Bu nedenle, Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi (HPTLC) geliştirilmiştir. HPTLC, daha gelişmiş tabakalar, modern dedektörler ve daha hassas ölçüm cihazları kullanarak daha yüksek çözünürlük, hassasiyet ve güvenilirlik sağlamaktadır (34).

HPTLC, ince tabaka kromatografisi (TLC) yöntemine dayanır ve daha yüksek çözünürlük, daha iyi hassasiyet ve daha az analitik süre gerektirmektedir. Bu yöntem, birçok farklı bileşiği aynı anda analiz etmek ve birçok farklı örnekteki bileşenleri ayırmak için kullanılabilmektedir. Örneklerin ince tabakalar üzerinde hareket ettirilmesi ve mobil fazın bileşenlerinin örnek bileşenleriyle etkileşime girerek ayrılması prensibine dayanmaktadır. Bu yöntemde, örneklerin ayrılması ve tanımlanması için birçok farklı parametre optimize edilmektedir. Bu parametreler arasında mobil faz bileşimi, doygunluk süresi, seyahat mesafesi ve dalga boyu gibi faktörler yer almaktadır (80).

HPTLC'de yaygın olarak silika jel gibi bir sabit faz kullanılmaktadır. Sabit fazın seçimi, ayrılmak istenen maddelerin asidik veya bazik özelliklerine göre yapılmaktadır. Asidik

karaktere sahip maddeler için genellikle silika jel gibi asidik absorbanlar, bazik karaktere sahip maddeler için ise alüminyum oksit veya talk gibi bazik absorbanlar tercih edilmektedir.

Absorbanın plakaya tutunmasını sağlamak için de kalsiyum oksit eklenir. Ticari ince tabaka plakaları genellikle 5 x 20, 10 x 10 veya 20 x 20 cm boyutlarında olup, tabaka kalınlığı 150-250 µm arasında değişir ve ortalama parçacık büyüklüğü 10-20 µm civarındadır (33,36).

HPTLC'nin en büyük avantajlarından biri, tek bir çalışma ile çok sayıda numunenin analiz edilebilmesidir. Bu özellikle yüksek miktarda numunenin analiz edilmesi gereken durumlarda büyük bir avantaj sağlamaktadır. HPTLC ayrıca, geleneksel TLC'ye göre daha kesin sonuçlar sunarak daha güvenilir analizler yapma yeteneği vardır. HPTLC'nin avantajları, gelişmiş tabakaların ve modern dedektörlerin kullanımıyla daha da artmıştır. Bu teknoloji ile örneklerin ince tabaka plakalarına daha etkili bir şekilde uygulanması ve analiz edilmesi sağlanmaktadır. Bu, daha yüksek çözünürlük, tekrarlanabilirlik ve daha hassas sonuçlar elde edilmesine olanak tanımaktadır (34,35).

Birçok araştırmada HPTLC yöntemi kullanılmaktadır. Örneğin, Misra ve arkadaşlarının 2008'de yaptığı bir çalışmada yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi (HPTLC) kullanılarak kinin miktarını belirlenmiştir. Öncelikle, kinin örnekleri farklı çözücülerde (n-heksan, kloroform, etil asetat ve metanol) değişen diethyl amine (DEA) konsantrasyonları ile ekstrakte edilerek kinin verimliliği optimize edilmiştir. En yüksek kinin verimliliği, %20 DEA ile modifiye edilmiş metanol kullanılarak elde edilmiştir. Daha sonra, örnekler HPTLC plakalarına uygulanmış ve kinin, uygun bir mobil faz kullanılarak ayrıştırılmıştır. Kinin, UV ışığı altında 254 nm'de tespit edilmiştir. Kinin miktarı, kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplanmıştır. Kalibrasyon eğrisi, farklı kinin konsantrasyonlarına karşılık gelen pik alanı yanıtı arasındaki doğrusal bir ilişkiyi göstermektedir. Bunun gibi çalışmaların çoğunda bu yöntem verilerin hesaplanmasında büyük bir öneme sahiptir (81).

2.3.2.1. Sabit faz / Plaka

HPTLC'de kullanılan sabit fazlar, ayrılacak analitik bileşiklerin özelliklerine ve kullanılacak çözücü karışımına bağlı olarak seçilmektedir. Bu faz her zaman katı faz veya katı bir destek yüzeyine absorbe edilmiş bir sıvı tabakası olarak oluşmaktadır. Üç yaygın sabit faz türü vardır: silika jel, selüloz ve polimerik maddeler (67).

- Silika Jel: Silika jel, HPTLC'de en yaygın olarak kullanılan sabit fazdır. Yüksek absorpsiyon kapasitesine sahip olması nedeniyle analitik bileşiklerin ayrılması için idealdir. Farklı boyutlarda ve porozitelerde üretilebilmektedir (67).
- Selüloz: Selüloz, daha az polar analitik bileşiklerin ayrılması için kullanılır. Silika jelden daha az absorpsiyon kapasitesine sahiptir ve farklı boyutlarda üretilebilmektedir (67).
- Polimerik Maddeler: Polimerik maddeler, daha polar analitik bileşiklerin ayrılması için tercih edilmektedir. Diğer sabit fazlara göre daha düşük absorpsiyon kapasitesine sahiptir (67).

HPTLC plakaları, sabit fazın kaplandığı ince cam veya alüminyum levhalardır. Plaka kalınlığı, sabit fazın yüzey alanını etkiler ve daha iyi ayrılmayı sağlayabilmektedir. İlaç, gıda, çevre ve biyokimya alanlarında kullanılan bu teknik, analitik kimyanın temel bir aracıdır. Sabit faz seçimi, plaka kalınlığı ve işlem aşamaları gibi faktörler, analizin başarısını etkiler.

2.3.2.2. Mobil faz / Çözücü sistemi

Mobil faz, HPTLC'nin temel bir bileşenidir ve analitik bileşiklerin ayrılmasını etkileyen çeşitli özelliklere sahiptir. Bu faz her zaman sıvı veya gaz halindeki bileşenlerden biri olarak oluşmaktadır.

- Polarite: Mobil fazın polaritesi, analitik bileşiklerin polaritesine göre seçilmektedir. Polar analitik bileşikler, polar mobil fazlarda daha iyi ayrılmaktadır (68).
- Derinlik: Mobil fazın derinliği, analitik bileşiklerin hareket hızını ve ayırma çözünürlüğünü etkilemektedir. Derin mobil faz, analitik bileşiklerin daha yavaş hareket etmesini ve daha iyi ayrılmasını sağlamaktadır (68).
- Akış Hızı: Mobil fazın akış hızı, analitik bileşiklerin ayırma süresini ve çözünürlüklerini etkilemektedir. Yüksek akış hızı, analitik bileşiklerin daha hızlı hareket etmesini ve daha az ayırma çözünürlüğü sağlamaktadır (68).

HPTLC'de kullanılan mobil fazlar, genellikle iki veya daha fazla organik çözücünün karışımından oluşmaktadır. Bu karışımlar, analitik bileşiklerin polaritelerine ve ayrılması istenen çözünürlük ve hassasiyete bağlı olarak özenle seçilmektedir. Mobil fazın bileşimi, analizin başarısını büyük ölçüde etkilemektedir. Mobil fazın polaritesi, derinliği ve akış hızını değiştirerek, analitik bileşiklerin hareket hızını ve ayırma çözünürlüğünü kontrol etmek mümkündür (68).

2.3.2.3. Densitometrik yöntemler

Densitometrik yöntemlerde, analitik bileşiklerin konumları, plakanın absorpsiyon veya floresans özelliklerini kullanarak belirlenmektedir. HPTLC'de absorpsiyon densitometrisi, analitik bileşiklerin konumlarını tespit etmek ve konsantrasyonlarını ölçmek için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde, analitik bileşikler, plakanın yüzeyindeki bir ışık kaynağı tarafından aydınlatılmaktadır. Analitik bileşikler, bu ışığı emerler ve emilen ışık miktarı, analitik bileşiklerin konsantrasyonuna bağlı olarak değişmektedir (69).

Floresans densitometrisi, absorpsiyon densitometrisine göre daha duyarlı bir yöntemdir. Bu yöntemde, analitik bileşikler floresan bir kaynak tarafından uyarılmakta ve uyarılmış

bileşikler floresan ışık yayarak tespit edilmektedir. Floresan ışığın yoğunluğu, analitik bileşiklerin konsantrasyonuna bağlıdır (70).

HPTLC'de densitometrik yöntemlerin uygulanması için temel olarak bir ışık kaynağı, bir detektör ve bir bilgisayar gereklidir. Işık kaynağı, analitik bileşikleri aydınlatmak için kullanılırken, detektör analitik bileşikler tarafından emilen veya yayılan ışığı ölçmektedir. Elde edilen veriler bilgisayar tarafından işlenmekte ve analitik bileşiklerin konumları ve konsantrasyonları görüntülenmektedir. Bu yöntem genellikle, ilaçların saflığının ve kimyasal bileşiminin belirlenmesinde, gıda ürünlerinin kalitesinin kontrolünde ve çevresel örneklerin analizinde sıkça kullanılmaktadırlar. (69,70).

2.3.3. Örnek Hazırlama Teknikleri / Çekitleme

HPTLC analizi öncesinde analiz edilecek maddeler belirli bir hazırlık aşaması bulunmaktadır. Bu aşamaların en önemlilerinden biri de örnek hazırlama ve çekitlemedir.

HPTLC analizinin doğruluğu ve güvenilirliği, örnek hazırlama tekniklerine ve çekitleme işlemine bağlıdır. Bu adımların doğru bir şekilde uygulanması, analitik sonuçların kesinliğini artırır ve analizlerin başarılı olmasını sağlar. Maddenin durumuna ve yapısına göre bu işlemler değişmektedir.

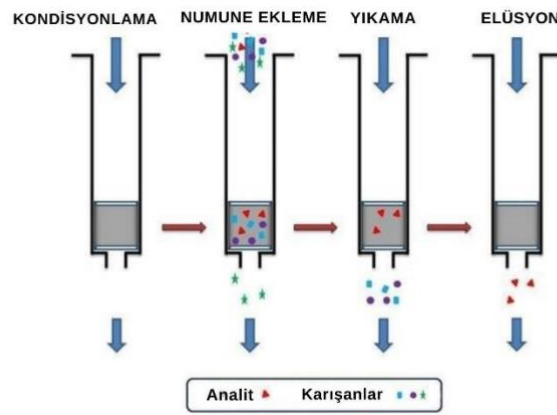
2.3.3.1. Sıvı - Sıvı Ekstraksiyonu

HPTLC için sıvı-sıvı ekstraksiyon, analitik örneklerin hazırlanmasında önemli bir aşamadır. Bu süreçte, örnekler önce uygun bir çözücü içinde çözülen veya süspanse edilen analitik bileşikleri içermektedir. Ardından, benzer polariteye sahip bir ekstraksiyon çözücüsü kullanılarak ekstraksiyon yapılmakta, bu da analitik bileşiklerin örnekten çekilmesini sağlamaktadır. Ekstrakt daha sonra HPTLC plakasına uygulanır, bu aşamada dikkatlice

kariştırılmaktadır. Sıvı-sıvı ekstraksiyonun avantajları arasında çok çeşitli analitik bileşiklerin başarılı bir şekilde ekstrakte edilmesi, yuğsek verim ve hassasiyet bulunurken, bu yuğntemin zaman alıcı olabileceği ve ekstraksiyon uğzucüsünün analitik bileşiklere zarar verebilme ihtimali vardır. Bu yuğntem, bitkisel uğrneklerde biyoaktif bileşiklerin izlenmesinden ilaçların kimyasal bileşiminin belirlenmesine kadar çeşitli uygulamalarda kullanılmaktadır (71).

2.3.3.2. Katı Faz Ekstraksiyonu

HPTLC için katı faz ekstraksiyonu, uğrneklerin analitik bileşiklerini uğzel bir absorban kullanarak ekstrakte etme yuğntemidir.

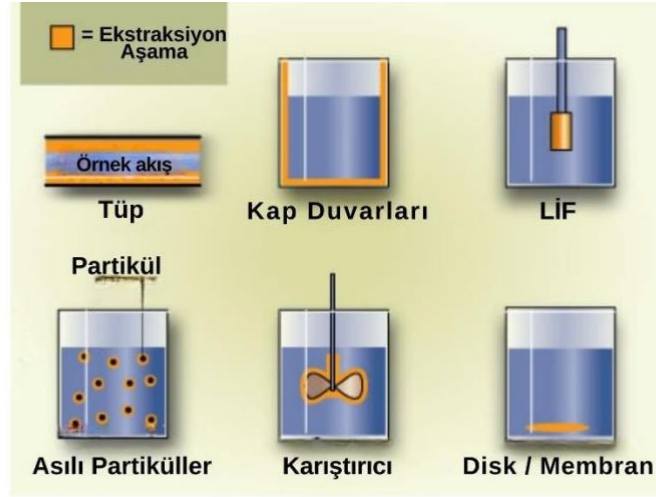


şekil 14: Katı Faz Ekstraksiyonu Süreci

şekil 14'deki gibi, uğrnekler uğnce uygun bir uğzucü içinde uğzölür veya süspanse edilmekte, ardından analitik bileşikleri bağlanarak ve mobil faza benzer polariteye sahip bir absorban kullanılarak ekstraksiyon yapılmaktadır. Elde edilen ekstrakt daha sonra HPTLC plakasına uygulanır ve analiz edilmektedir. Bu yuğntemin avantajları çok sayıda analitik bileşiğin verimli bir şekilde ekstrakte edilebilmesi, yuğsek hassasiyet ve zaman açısından etkili olmasıdır. Ancak absorbanın analitik bileşiklere etkisi dikkate alınması uğnemlidir. HPTLC için katı faz ekstraksiyonu, bitkisel uğrneklerden biyoaktif bileşiklerin izlenmesinden ilaçların kimyasal bileşiminin belirlenmesine kadar çeşitli uygulamalarda kullanılmaktadır (72).

2.3.3.3. Katı Faz Mikro Ekstraksiyonu

HPTLC için katı faz mikro ekstraksiyonu (SPME), hızlı ve hassas bir örnek hazırlama yöntemidir.



Şekil 15: Katı Faz Mikro Ekstraksiyonu Süreci

Şekil 15'teki gibi, örnekler bir çözücü içinde çözülür veya süspansiyon yapılır, ardından özel bir katı faz adsorbantı kullanılarak analitik bileşikler örnekten ekstrakte edilmektedir. Sonrasında elde edilen ekstrakt HPTLC plakasına uygulanarak analizi yapılmaktadır. Bu yöntemin avantajları, geniş bir analitik bileşik yelpazesini verimli bir şekilde ekstrakte edebilmesi, yüksek hassasiyet sağlaması, hızlı olması ve az miktarda örnek gerektirmesidir. HPTLC için katı faz mikro ekstraksiyonu, bitkisel örneklerden biyoaktif bileşiklerin izlenmesinden ilaçların kimyasal bileşiminin belirlenmesine kadar çeşitli uygulamalarda kullanılmaktadır (73).

2.3.4. Kısmi Geçerli Kılma (Validasyon) Çalışması

Analitik bir yöntemin geçerlilik çalışmaları, belirli bir test veya prosedürün, belirli bir kullanım amacı için uygun olup olmadığını doğrulamak için gerçekleştirilen işlemlerin bütünüdür. Green'in tanımına göre geçerlilik, analitik yöntemin istenen amaca uygun olmasını sağlayan işlemlerdir (82).

Bu çalışmalar, bir yöntemin yaptığı işlemlerin beklenen sonuçları elde ettiğini kanıtlamak amacı taşımaktadır. Bilimsel bütünlüğü ve uygunluğu sağlamak, gereken amaçlar için güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçlar elde etmek, analitik işlemlerin geçerliliği için temel hedeftir. Analitik bir yöntemin geçerlilik çalışmaları, bilimsel yöntemlerin güvenilirliğini ve doğruluğunu sağlamak için kritik bir adımdır. Bu çalışmalar, analitik işlemlerin belirli kullanım amaçlarına uygun olduğunu doğrulamak için gereklidir ve uluslararası standartlara uygun bir şekilde yapılmalıdır (83,84).

Analitik yöntemin geçerliliğini ve güvenilirliğini değerlendirmek için bir dizi kritik parametre incelenmelidir.

2.3.4.1. Özgüllük

Bir analitik yöntemin, belirli bir maddeyi veya maddeleri kesin olarak belirleyebilme yeteneğini ifade etmektedir. Bir analiti diğer bileşenlerden ayrıştırabilme yeteneği olarak kabul edilir. Testin özgüllüğü, yöntemin ne kadar hassas ve doğru olduğunu belirler.

2.3.4.2. Seçicilik

Analitik yöntemlerin olası dış etkenlere karşı direncini ifade eder. Bu etkenler, fiziksel veya kimyasal girişimler veya matriksteki diğer maddeler olabilir. Testin, hedeflenen bileşiği matriksteki diğer maddelerden ayırabilme yeteneği olarak tanımlanır. Bu, çevresel etkenlerin analit üzerindeki etkisini gözlemlemeyi içermektedir.

2.3.4.3 Doğruluk

Ölçülen bir değerin, referans bir standarda veya bilinen bir standart maddeye ne kadar yakın olduğunu ifade eder. Standart Referans Maddeler, uluslararası bağımsız laboratuvarlar tarafından belirlenen değerlere sahiptir ve test sonuçları bu değerlerle karşılaştırılır.

2.3.4.4. Doğrusallık ve Çalışma Aralığı

Bir analitik yöntemin doğrusallığı, standart kalibrasyon çözeltilerinden elde edilen sinyallerin, numune içindeki analit konsantrasyonuyla doğru orantılı olduğu konsantrasyon aralığıdır. Bu doğrulamayı yapmak için en az 3 farklı konsantrasyondan alınan 3'er enjeksiyonun analizi yapılır ve bu verilerle bir kalibrasyon eğrisi oluşturulur. İdeal durumda, bu eğrinin korelasyon katsayısı $r^2=1$ 'e yakın olmalıdır.

Doğrusallığın devam ettiği en düşük analit konsantrasyonundan en yüksek konsantrasyon aralığına kadar olan değerlerin bütününe kapsayan doğrusal aralıktır. Doğrusal aralık, oluşturulan kalibrasyon eğrisi üzerinde doğrusallığın sürdüğü ve güvenilir ölçümlerin yapılabileceği aralığı temsil eder.

2.3.4.5. Tespit Limiti (LOD) ve Tayin Limiti (LOQ)

LOD (limit of detection), matriks etkisine bağlı olarak tespit edilebilecek en düşük konsantrasyon değerini gösteren analit derişimidir. LOQ (limit of quantification) ise, belirli bir doğruluk ve kesinlik seviyesine göre ölçülebilen en düşük analit derişimidir.

2.3.4.6. Sağlamlık

Bir analitik yöntemin, küçük değişikliklerden etkilenmeden stabil kalabilme kapasitesidir. Bu kavram, yöntem parametrelerindeki (örneğin, mobil faz kompozisyonu,

kolonun yaşı, sıcaklığı vb.) ve çevresel faktörlerin (örneğin, oda sıcaklığı, nem gibi) küçük değişikliklerinden etkilenmemesi üzerine odaklanır.

Yöntem parametrelerinde yapılan değişikliklere rağmen, analitik yöntemle tespit edilen analitin miktarında bir değişiklik olmaması veya yöntem parametreleri değişse bile ölçüm limiti gibi kritik performans özelliklerinde istikrarlı bir şekilde sonuçların korunması şeklinde yorumlanabilir. Yani, parametrelerdeki değişikliklerin sonuçlara olan etkisinin minimum seviyede olması ve yöntemdeki değişikliklerin analiz sonuçlarını olumsuz etkilememesi beklenir. (85)

Tüm bu parametreler, bir analitik yöntemin güvenilirliğini ve doğruluğunu belirlemek için kritik öneme sahiptir. Analitik çalışmaların geçerli ve güvenilir sonuçlar üretmesi, bilimsel araştırmalardan endüstriyel uygulamalara kadar birçok alanda büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle, analitik yöntemlerin geçerliliği düzenli olarak değerlendirilmeli ve iyileştirilmelidir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışmada kullanılan kimyasallar

Çalışma süresince kullanılan kimyasal maddelerin isimleri ve marka bilgileri aşağıdaki tabloda (Tablo VI) belirtilmiştir.

Tablo VI. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Markaları

Kimyasal Madde Adı	Markası
Diazepam	Sigma
Flunitrazepam	Sigma
Etil asetat	Merck
Aseton	
Metanol	
Kloroform	
Asetik asit (glacial)	
Hekzan	

Çalışmada alkollü örneklerin içerisinde en az bir tablet konulmuş olması beklenecek piyasadaki diazepam ve flunitrazepam konsantrasyonları Tablo VII’de görüldüğü gibidir.

Tablo VII. Diazepam ve Flunitrazepamın Ticari Formlarının Marka-Konsantrasyonları

Benzodiazepin Türevleri	Marka Adları	Konsantrasyon
Diazepam	Diaksi	2.5 mg/mL
	Diapam	5.0 mg/mL
Flunitrazepam	Rahypnol	2.5 mg/mL

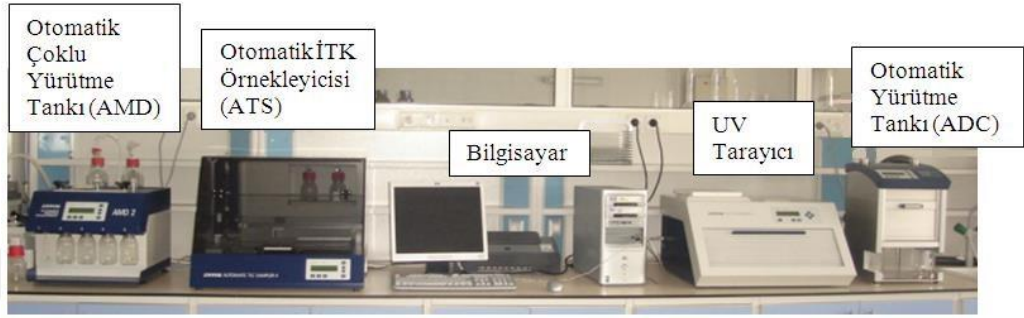
3.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Gereçler

Çalışmada kullanılan ekipmanların listesi, marka ve modelleriyle birlikte, Tablo VIII'de verilmiştir.

Tablo VIII. Çalışmada Kullanılan Cihaz ve Gereçlere Ait İsim ve Marka Bilgileri

ADI	MARKA MODEL
Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi (HPTLC) - Otomatik TLC Örnekleyci Ünitesi - Otomatik Yürütme Tankı Ünitesi - TLC Tarama 3 - Wincats İşletim Sistemi	CAMAG ATS4 ADC2 Scanner III 1.4.2. 8121
Hassas Terazı	Precisa XB220A
Vorteks	IKA
Santrifüj	Hettich
Otomatik Pipetler	Eppendorf
Çeker Ocak	Başaran
Buzdolabı (+4°C)	Arçelik
Cam Vial (2 mL)	CAMAG
Tüp sporları	ISOLAB
Falkon Tüp – 15 mL	Isolab
Falkon Tüp – 50 mL	Isolab
Azot altında uçurma düzeneği	Hyper Vap HV-300
Sertifikalı cam balon Joje (10 mL)	Isolab
Ultra Saf Su Cihazı	MilliQ Synthesis A10
HPTLC analitik cam plakaları 60F254 10x20 cm	Merck
Swap	Seha Medikal

Hazırlık adımları, HPTLC analizlerinin doğruluğunu ve güvenilirliğini sağlamak için kritik bir rol oynamaktadır. Bu adımların titizlikle uygulanması, BZD’lerin doğru bir şekilde tespiti için temel teşkil etmekte ve analiz sonuçlarının güvenilirliğini artırmaktadır. Bu çalışmada ise kullanılan HPTLC yöntemindeki bileşenler Şekil 16’da gösterilmektedir.



Şekil 16: HPTLC Bileşenlerinin Görünümü (85)

3.3 Çalışma Planı ve Similasyon Örneklerinin Oluşturulması

BZD’lerin tanımlanma ve analiz süreçleri ilaç etkisinde kolaylaştırılan suçlar ve cinsel saldırılar açısından adli bilimlerde büyük önem taşımaktadır. Bunun için hızlı ve etkili yöntemlerin geliştirilmesi bir suçun belirlenmesi ve tanımlanmasını kolaylaştıracaktır. Bu çalışmadaki ana fikir de bunu kolaylaştırmayı sağlayan ek yöntemler geliştirilmesidir.

Çalışmanın ana planı, piyasada bulunan DIA ve FLU içerikli ilaçların ticari formlarının en düşük miligramlarının kullanıldığı varsayılarak, yaklaşık 250-330 mL’lik çeşitli içkilere eklendiği düşünülmesiyle belirlenmiştir. Bunun sebebi en kolay ulaşılabilir formlarının en düşük konsantrasyonlarda tayin edilip edilemeyeceğini anlamaktır. Diazepam ve flunitrazepamın tiacri formları Tablo VII’de gösterilmiştir. İkisinin de en düşük 5 mg olarak bulunduğu göz önüne alındığında, 250 mL hacimli bir bardağa katılmasıyla bardağın cidarında bulunan kalıntı örneklerinde 20 ng/μl, 330 mL’lik bir bardakta ise 15 ng/μl bulunması beklenmektedir. Buradan yola çıkarak öncelikle HPTLC sisteminde bir örneğin

belirlenebilmesi için orta noktası 15 ng/ μ l olacak şekilde en düşük konsantrasyonu tayin etmeyi hedefleyeceğimiz bir kalibrasyon eğrisine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu yüzden Tablo IX’da gösterilen bilinen konsantrasyonlarla hazırlanmış 10 ana stok çözeltisi oluşturulmuştur. Ardından bu kısmı test etmek için konsantrasyonu bilinmeyen DIA-FLU mixi viski içerisine spike edilerek cihaza verilmiştir. Bu denemenin ardından örneğin konsantrasyonun tespit edildiği gözlemlendi, çalışmanın devamında simülasyon örneklerinin oluşturulması aşamasında bu veriye dayanarak viski, bira ve şarap içerisine atılan DIA ve FLU konsantrasyonu kalibrasyon aralığında kalması iki ayrı gün ve çalışmayla doğrulanmış oldu.

Bu aşamalardan sonra simülasyon örnekleri hazırlanırken belirlenmiş DIA ve FLU konsantrasyonları içeceklere tatbik edilerek bardakların boşaltılması ardından, aşağıdaki şekilde görüleceği gibi bir swap yardımıyla kalıntı örnekleri alınmıştır.



Şekil 17: Bardak Cidarından Kalıntı Alınması

Çalışmanın amacı bardağın cidarından alınan örneklerde bu konsantrasyonlardaki DIA ve FLU'nun HPTLC ile analiz edilmesi sonucunda bu miktarı belirleyebilecek bir sistem oluşturmak ve bunu bahsedilen koşullarda hazırlanmış similasyon örnekleriyle test ederek hızlı ve güvenilir bir yöntem geliştirmektir.

3.4. HPTLC ile Diazepam ve Flunitrazepam Analizi

3.4.1. Diazepam ve Flunitrazepam analizi için kullanılacak çözeltilerin hazırlanması

İlk adım olarak, DIA'nın ana stok çözeltisi hazırlandı. Bu çözelti, analizlerin referans noktasını oluşturur ve hassas ölçümler için temel teşkil etmektedir. DIA standardı, hassas bir terazi kullanılarak 1 mg miktarında tartıldı. Bu standardın metanol içindeki 10 mL çözeltiye dahil edilmesiyle 100 µg/mL konsantrasyonda bir ana stok çözelti elde edildi. Bu çözelti +4°C' de muhafaza edildi ve analiz yapılmadan önce oda sıcaklığına getirildi. Önemli bir nokta, kullanılan DIA standardının saflığının %99.0'dan daha yüksek olduğudur. Bu yüksek saflık, çözeltinin doğruluğunu ve güvenilirliğini artırır. Dolayısıyla, safsızlık oranı hesaplamalarda göz ardı edildi.

FLU analizi için ayrı bir ana stok çözeltisi hazırlanmıştır. Flunitrazepam standardı, 1 mg hassaslıkta tartılarak 10 mL metanol içinde çözüldü. Elde edilen çözelti 100 µg/mL konsantrasyonunda FLU ana stok çözeltisi olarak kullanıldı. Bu çözelti de +4°C'de saklanarak ve analiz öncesinde oda sıcaklığına getirildi. Aynı şekilde, FLU standardının da %99,0'dan daha yüksek saflığa sahip olduğu ve safsızlık oranının hesaplamalarda ihmal edildi.

100 µg/mL konsantrasyonundaki ana stok çözeltileri balon joje içerisinde 2500'er µL DIA ve FLU olacak şekilde eşit miktarda karıştırılarak 5 mL 50 ppm'lik mix çözeltisi hazırlandı.

Standart kalibrasyon çözeltileri her iki madde için ayrı ayrı 6-40 ppm olacak şekilde ana stoktan elde edilen mix ile hazırlandı.

Tablo IX. Diazepam ve Flunitrezepam Ana Stok Çözeltileri

Konsantrasyon (ng/μl)	Diazepam Kalibrasyon Çözeltisi (100 μg/mL)	Flunitrazepam Kalibrasyon Çözeltisi (100 μg/mL)	Metanol
0. Nokta (Blank)	---	---	1 mL'ye Metanol ile tamamlandı.
1. Nokta (6 ng/μl)	60 μL	60 μL	
2. Nokta (8 ng/μl)	80 μL	80 μL	
3. Nokta (10 ng/μl)	100 μL	100 μL	
4. Nokta (15 ng/μl)	150 μL	150 μL	
5. Nokta (20 ng/μl)	200 μL	200 μL	
6. Nokta (25 ng/μl)	250 μL	250 μL	
7. Nokta (30 ng/μl)	300 μL	300 μL	
8. Nokta (35 ng/μl)	400 μL	400 μL	
9. Nokta (45 ng/μl)	450 μL	450 μL	
10. Nokta (50 ng/μl)	500 μL	500 μL	

3.5. Similasyon Örnekleri Ekstraksiyonu ve Hazırlama Prosedürü

100'er μL mix swaba emdirildi. 3 adet swap 500 μL etil asetatla, 3 adet swap ise 500 μL kloroformda çözdürüldü. Bunlar geri kazanım çalışmaları ve ekstraksiyon yöntemi seçimi

için aynı gün içinde analiz edildi ve kloroform bölüm 2.3.3.1’de belirtildiği Şekilde sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi olarak belirlendi.

Similasyon rnekleri hazırlanması aşamasında bu HPTLC yönteminin BZD’lerin gerçek örneklerinde nasıl kullanılabileceği gösterilmiştir. İceklere eklendiğinden Şüphelenilen DIA ve FLU ilaç etken maddelerinin miktarlarının tespiti için bu prosedür uygulanmıştır.

Olay yerinde bulunabilecek delil örneklerinin kullanılmış bardaklar olabileceğinden yola çıkarak, simülasyon rnekleri Şu Şekilde oluşturuldu: Söz konusu etken maddeleri içeren içecekler, Tablo XIII’de görüleceği gibi 250 mL’lik 3 Şarap, 2 viski ve 3 bira olmak üzere toplam 8 kadehe eklendi ve her birinin içine 1’er tablet Diazem (DIA-10 mg) ve Rahypnol (FLU-5 mg) atıldı. Böylelikle DIA ve FLU için sırasıyla 40 µg/mL ve 4 µg/mL konsantrasyonda içecekler sağlandı. Bu içeceklerin her biri içerisine magnetik balık kullanılarak, manyetik karıŐtırıcıda oda sıcaklığında (20°C) 150 rpm’de homojen hale getirildi. Tüm rnekler başka bir kaba rasgele aktarılarak bardak yüzeyinde kalan sıvı bölüm 3.3’te belirtildiği gibi swap yardımıyla alındı. Tek kullanımlık plastik cımbızlar aracılığıyla numune 8 bardaktan 2 gün bekletilip kesilerek etüvde 55°C’de kurutuldu. Swapların uçları kesilerek dikkatlice 15 mL falkona alındı ve seçilen kloroform ekstraksiyon yöntemi swaplara uygulandı.

3.6. HPTLC Sistemi ile yöntem geliştirilmesi

HPTLC analizi için kullanılan hareketli faz, belirli bir karışımı gerektirir. Bu çalışmada, hekzan, etil asetat ve glacial asetik asit karışımı mL cinsinden (7:2.5:0.5) tercih edildi. Karışım, analizler öncesinde her seferinde taze olarak hazırlanmıştır. Bulgularda detaylı biçimde gösterileceği üzere 11 farklı mobil faz sistemi arasından hekzan, etil asetat ve glacial asetik asit karışımı mL cinsinden (7:2.5:0.5) seçildi ve bu seçim çalışmanın özgüllüğünü sağlamaktadır. Örnekleme sürecinde karışımın homojenliği ve doğru bileşimi sağlanmıştır.

HPTLC analizi için kalibrasyon çözeltileri, analiz edilecek bileşiklerin doğru konsantrasyonlarının belirlenmesi için kullanılır. Bu çalışmada, DIA ve FLU için kalibrasyon çözeltileri hazırlanmıştır. Her bir kalibrasyon noktası için 1.5 mL hacimli cam viallerde çözeltiler oluşturulmuş ve analizler için kullanılmıştır. Tablo IX’de belirtilen miktarlarda DIA ve FLU ana stok çözeltileri kullanılmıştır.

Çalışmanın sağlamlığını arttırması ve gerçek kalıntıları uygulanıp uygulanmayacağının anlaşılması için bölüm 3.5’de anlatıldığı gibi similasyon örnekleri hazırlanmış ve oluşturulan kalibrasyon eğrisinde bu örneklerdeki miktarın belirlenmesi üzerine çalışma tekrarlanmıştır.

Aşağıda uygulanan HPTLC koşulları detaylı olarak gösterilmiştir.

Enjeksiyon : Linomat 5
Dedektör : CAMAG TLC scanner
Sabit faz : silica gel GF aluminium sheets TLC plate
Mobil faz : hekzan: etil asetat: glacial asetik asit (7:2.5:0.5 V/V/V)
Tank satürasyonu : 15 dk
Bant genişliği : 5 mm
Uygulama noktası : 10 mm
Toplam göç mesafesi : 80 mm
Number of track : 18
X eksenini ilk tatbik noktası : 15 mm
Her bir bant arası mesafe : 10 mm
Y eksenini tarama başlama noktası : 5.0 mm
Tarama bitiş mesafesi : 85 mm
Slit boyutları : 6 x 0.3 mm micro
Optimize optik sistemi : light
Tarama hızı: 20 mm/S
Data çözünürlüğü : 100 µm/steps
Dalgaboyu : 254, 305 ve 230 nm
Lamba : D2 & W
Ölçüm tipi : Remission
Ölçüm modu : Absorption
Optik filtre : Second order
Dedektör modu : Automatic

3.7. HPTLC Sistemi ile Diazepam ve Flunitrazepam Analizinde Yöntem Geçerli

Kılma Çalışmaları

Bu çalışmada örnekler, şüpheli bir olay yerinde toplanan ve genellikle 2 mL miktarda sıvının geri kazanılabileceği bir içecek kalıntısı olarak tanımlanmıştır. Böylelikle çalışmada örneklerimiz, şüpheli bir suç mahallinde toplanan ve bardağın iç yüzeyine yapışan damlacıklar şeklinde bir miktar sıvının (genellikle < 1 mL) içindeki etken maddeleri belirleyebilmek adına, geri kazanılabileceği ve geçerlilik çalışmalarının gerçekleştirileceği içecek kalıntıları olarak tanımlandı.

Bölüm 3.4.1’de hazırlanışı açıklanan kalibrasyon çözeltileri aynı cam plaka üzerinde her kalibrasyon basamağından 3’er adet olmak üzere plakaya tatbik edildi ve bir plakada 3 seri kalibrasyon çözeltisi analiz edildi. Bu analizin sonucunda her bir kalibrasyon noktasından elde edilen DIA ve FLU pik alanlarının birbirlerine oranı (P/K) hesaplanarak kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Kalibrasyon eğrisinde korelasyon katsayısının kabul kriteri >0,99 olarak belirlendi.

LOD ve LOQ’yu tahmin etmek için sadece boş metanol altı kez analiz edildi. Daha sonra sinyal-gürültü oranı belirlendi. LOD 3:1 ve LOQ 10:1 olarak bulundu.

Geri kazanım deneyleri için iki farklı çözelti ile sıvı sıvı çekitleme yöntemi denendi. Bunlar: etilasetat ve kloroform şeklinde belirlendi. Her iki ekstraksiyon çözeltisi için iki farklı konsantrasyonda (10 ve 40 ng/μL) 6’şar tekrarlı analizler yapıldı. Geri kazanım için kabul kriterleri %80-120 olarak belirlendi. Her bir 6 tekrarlı yapılan geri kazanım çalışmalarından elde edilen standart sapma ve ortalama değerler elde edilerek bağıl standart sapma (%RSD) hesaplandı. Bu veriler için kabul kriteri %15 olacak şekilde belirlendi. Geri kazanım ve %RSD değerlerinden elde edilen sonuçlara göre çekitleme yöntemlerinden en yüksek geri kazanım yüzdesine sahip olan yöntem seçilerek gerçek numuneler analiz edildi.

3.8. Similasyon Örneklerinin Analizi

Çalışmamızda 20 x 10 cm boyutlarında silika jel 60 F254 HPTLC cam plaka (Merck Kat. No: 1.05649) kullanıldı. Tüm çözeltiler için enjeksiyon hacmi 1 μL olarak ayarlandı ve

bant uzunluğu 5 mm olacak şekilde plakaya uygulandı. Hareketli faz olarak 10 ml n-hekzan, etil asetat ve glacial asetik asit karışımı (7:2.5:0.5) çözücü sistemi olarak kullanıldı. Plaka 80 mm'ye kadar yürütüldü ve 5 dk. sıcak hava akımında kurutuldu. Ayrımın sağlanmasının ardından plaka densitometrik tarama ünitesine yerleştirildi. Tarama parametreleri; döteryum lambası dalga boyu, 254 nm; slit ölçüleri, 4.00 x 0.10 mm; tarama hızı, 20 mm/s olacak şekilde seçildi. Spektrumlar 200 ile 400 nm arasında 20 nm/s hızla kaydedildi. Kantitatif analiz için tek dalga boyu reflektans modunda elde edilen pik alanı dikkate alındı.

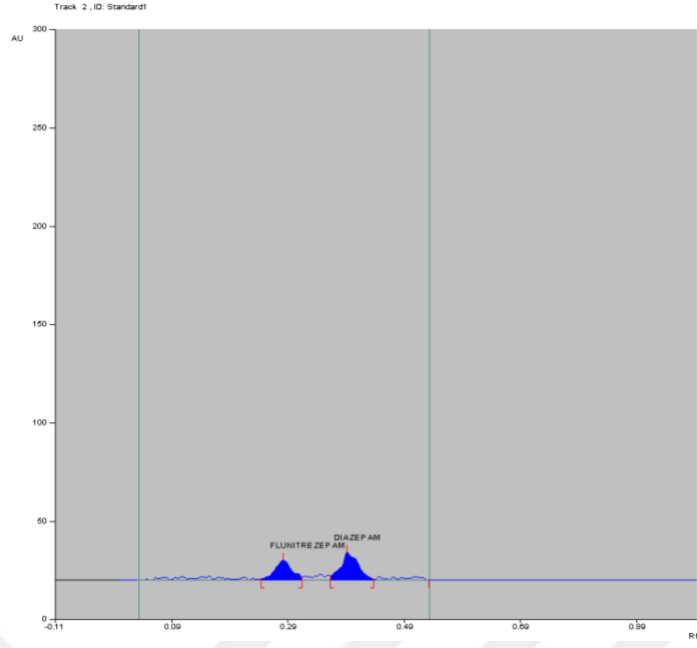
Analizi yapılan örnekler, densitometrik tarama ünitesine yerleştirilen plakalar üzerinde kaydedilmiştir. Dedektör optimizasyon çalışmalarına başlarken DIA (230 nm) ve FLU (305 nm)'ye özgü her bir UV dalga boyları altında görüntülemeler yapılmışsa da her iki maddenin kantitasyonu ortak 250 nm altında gerçekleştirilmiştir yani tarama sırasında döteryum lambası ile aydınlatılan dalga boyu 250 nm olarak belirlenmiş ve slit ölçüleri 4.00 x 0.10 mm olarak ayarlanmıştır. Spektrumlar, 200 ile 400 nm arasında 20 nm/s hızla kaydedilmiş ve elde edilen pik alanları kantitatif analiz için kullanılmıştır. Similasyon örneklerini çalışmadan önce yapılan analizde, plakaya içerisindeki miktarı bilinmeyen FLU ve DIA mixi içeren viski örneği tatbik edilmiştir. Ayrıca geliştirilen bu yöntemde miktar tayinleri yapılırken DIA ve FLU etken maddeleri analiz sırasında birbirilerine iç standart olarak da kullanılmışlardır.

4. BULGULAR

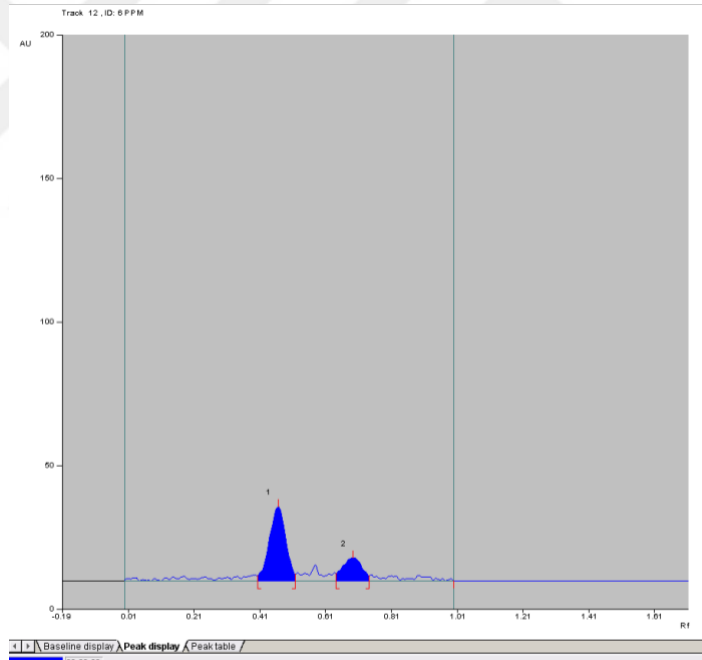
Bu çalışmada olay yerinde şüpheli bir suç mahallinde toplanan ve bardağın iç yüzeyine yapışan damlacıklar şeklinde bir miktar sıvının (genellikle <1 mL) içindeki DIA ve FLU etken maddelerini bir HPTLC sistemi ile belirleyebilmek için bir yöntem geliştirildi. Bu yöntem kullanılarak gerçeğe yakın hale getirilen simülasyon örneklerinde söz konusu ilaçların miktarı tespit edildi.

Diğer taraftan uygun dalga boyunun seçimi bir HPTLC yöntemi geliştirilirken önemli bir basamaktır. HPTLC'nin hassasiyeti seçilen dalga boyuna ve UV dedektörüne bağlıdır. İdeal dalga boyu, düşük konsantrasyonda tespit edilen ilaca maksimum absorbands ve iyi yanıt veren dalga boyudur. UV dedektörde 254 nm'de, absorblanan maddeler, bizim çalışmamızda olduğu gibi TLC plakasının bir floresan göstergesi yani F254 içermesi koşuluyla görünür hale gelir. Bu maddeler, parlak bir arka plan üzerinde koyu lekeler olarak görünür. Bu belirleme yöntemi için UV yoğunluğu ve görünür ışığın tamamen ortadan kaldırılması kritik bir aşama değildir. TLC Scanner III ünitesinde DIA (230 nm Şekil 18) ve FLU (305 nm – Şekil 19) özgül her bir UV dalga boyları altında görüntülemeler yapılmışsa da her iki maddenin kantitasyonu ortak ve evrensel olan 254 nm dalga boyu seçilerek gerçekleştirilmiştir. Böylece etken maddelere ilişkin Şekil 22'deki HPTLC kromatogramı elde edilmiştir.

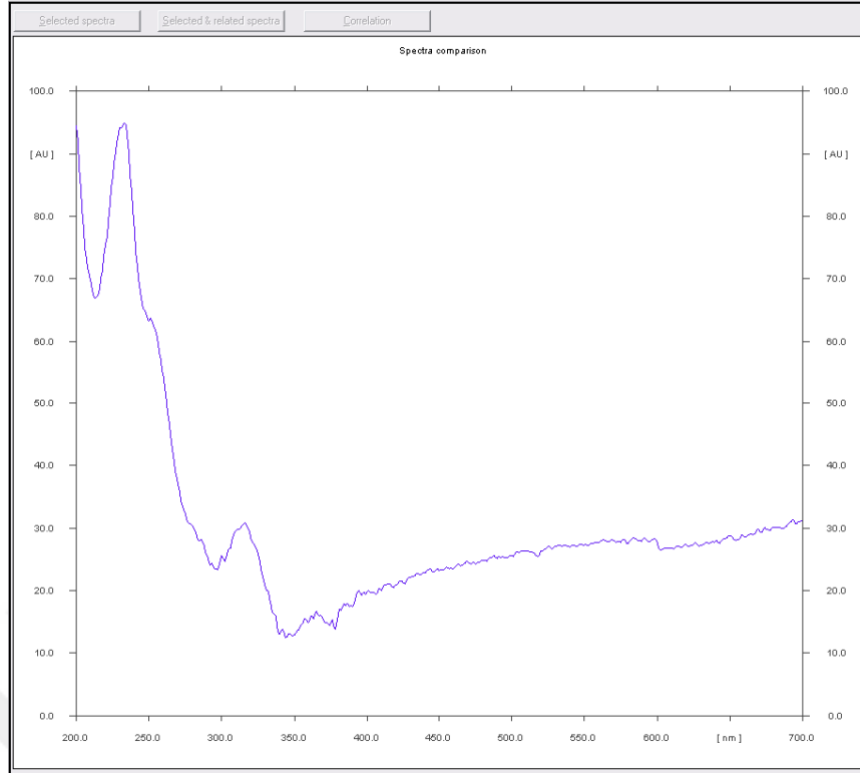
DIA'ya özgül 230 nm'de beklenildiğinin aksine DIA yanıtında hafif bir artış olurken FLU dedektör yanıtı belirgin şekilde azaldığı görülmüştür. FLU'ya özgül 305 nm'de beklenildiği gibi FLU dedektör yanıtı belirgin şekilde artarken DIA yanıtı azalmıştır. DIA ve FLU için 254 nm'de alınan UV spektrumları sırasıyla Şekil 20 ve Şekil 21'de verilmektedir.



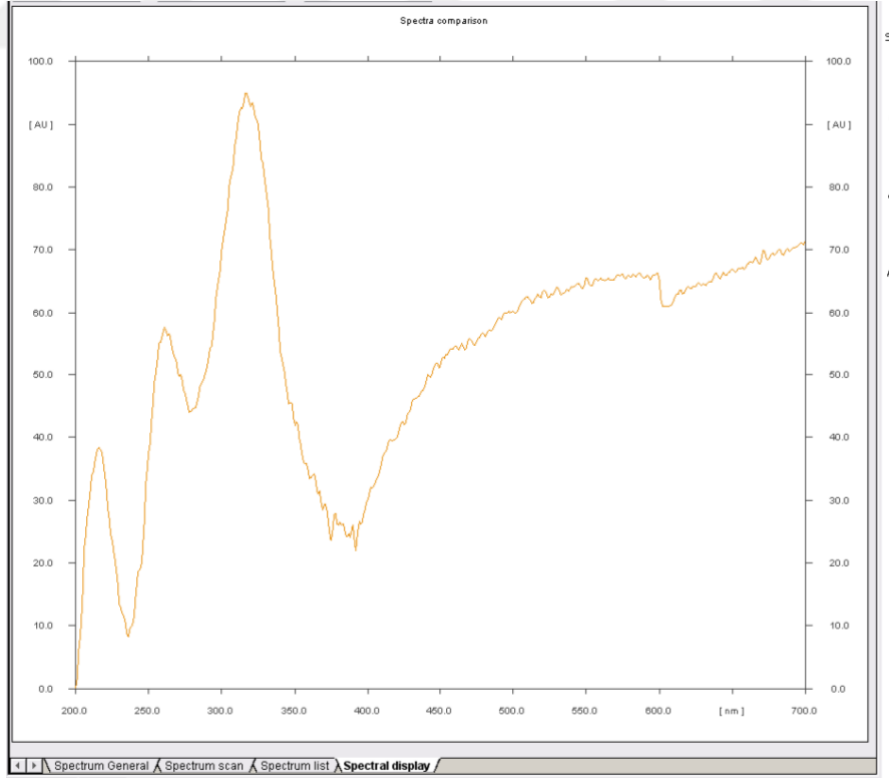
Şekil 18: 230 Nm’de Bileşiklerin Dedektör Yanıtları



Şekil 19: 305 Nm’de Bileşiklerin Dedektör Yanıtları



Şekil 20: DIA- UV Spektrumu

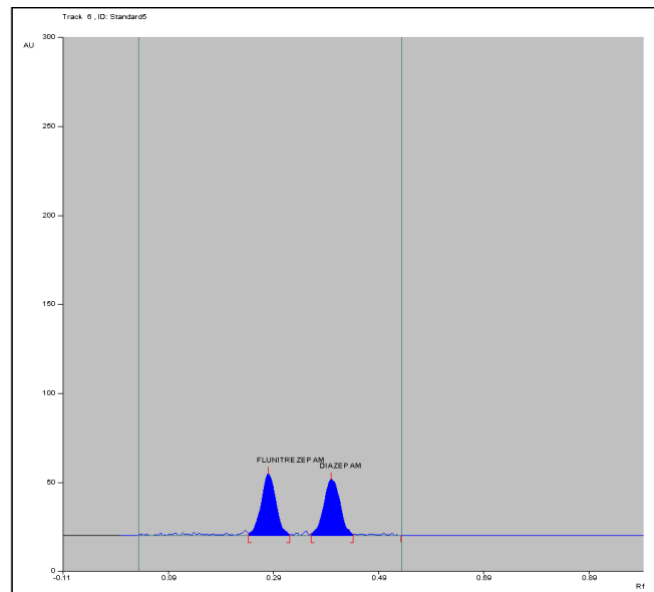


Şekil 21: FLU- UV spektrumu

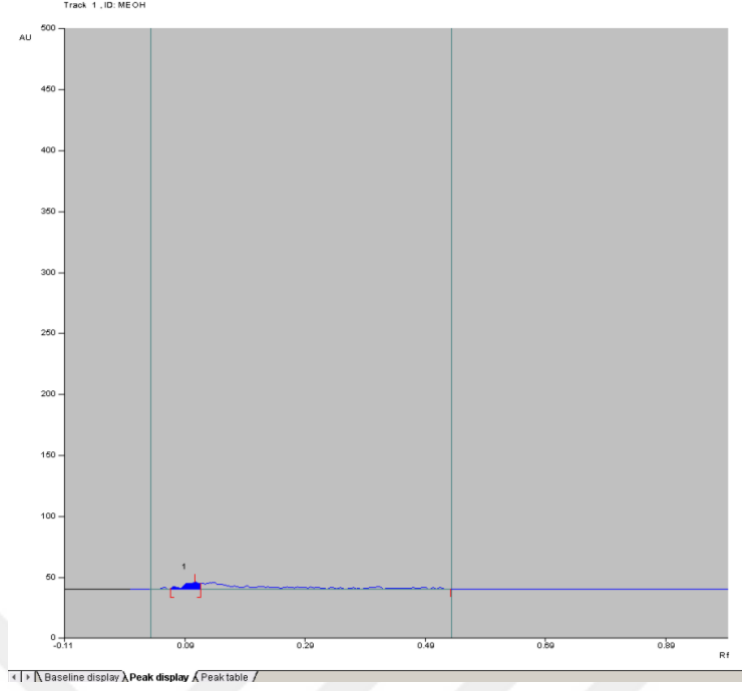
Validasyon, belirli bir faaliyetin sürekli olarak istenen sonucu üreteceğine dair yüksek derecede güvence sağlayan, belgelenmiş kanıt oluşturma sürecidir. Yöntem validasyonu, analitik prosedürlerin amaçlanan kullanıma uygun olduğunu ve ilaç maddelerinin ve ilaç ürünlerinin kimliğini, kalitesini, saflığını ve gücünü desteklediğini gösterme sürecidir.

Başarılı bir validasyon çalışması, analitik yöntemlerin hem teknik hem de düzenleyici hedeflerinin yerine getirildiğini garanti eder. Doğrulama sürecinin asıl amacı, yöntemi zorlamak ve yöntemi çalıştırmak için gereken koşullar için izin verilen değişkenliğin sınırlarını belirlemektir.

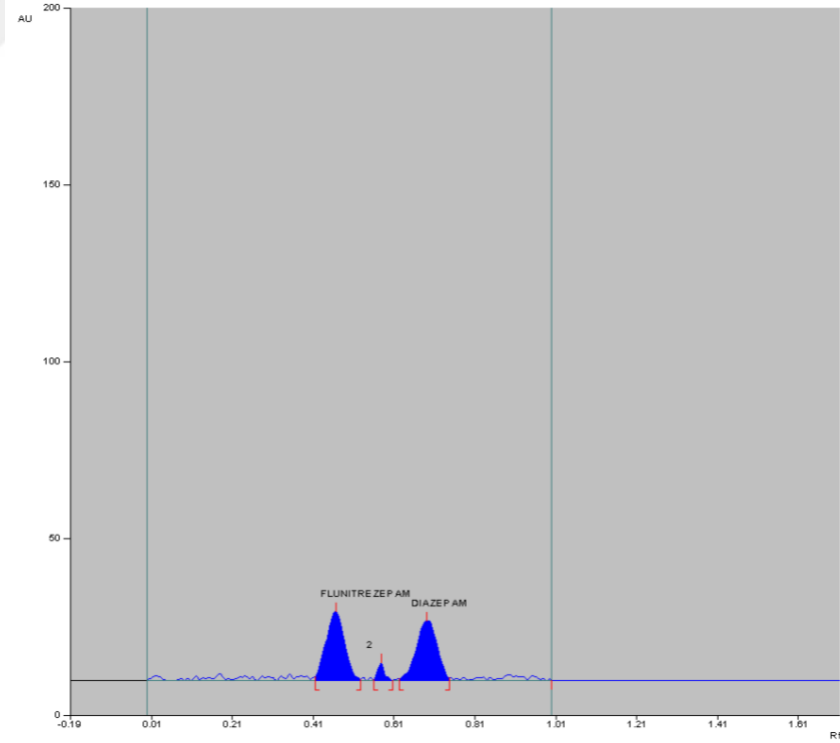
Özgüllük çalışması sonucu matriksten gelen bir girişim olmadığı görülmüştür (Şekil 22). Aynı şekilde viski, şarap ve bira içerisine etken maddeler eklenerek ve Bölüm 3.3’de belirtilen ekstraksiyon prosedürü uygulanarak elde edilen HPTLC kromatogramı Şekil 24’te gösterilmektedir. Her birinin tanımlanması, densitometrik tarama ünitesinin bölüm 3.5’de yer alan koşulları altında oluşturulan benzersiz spektrumların karşılaştırılmasıyla da sağlanmıştır (Tablo IX). Dizepam ve flunitrazepam etken maddelerinin alıkonma faktörleri sırasıyla, (R_f) 0,63 (±0,02) dak., olarak belirlenmiştir (Şekil 22).



Şekil 22: Metanol İçinde Dizepam ve Flunitrazepam Etken Maddelerinin HPTLC Kromatogramında Görünümü

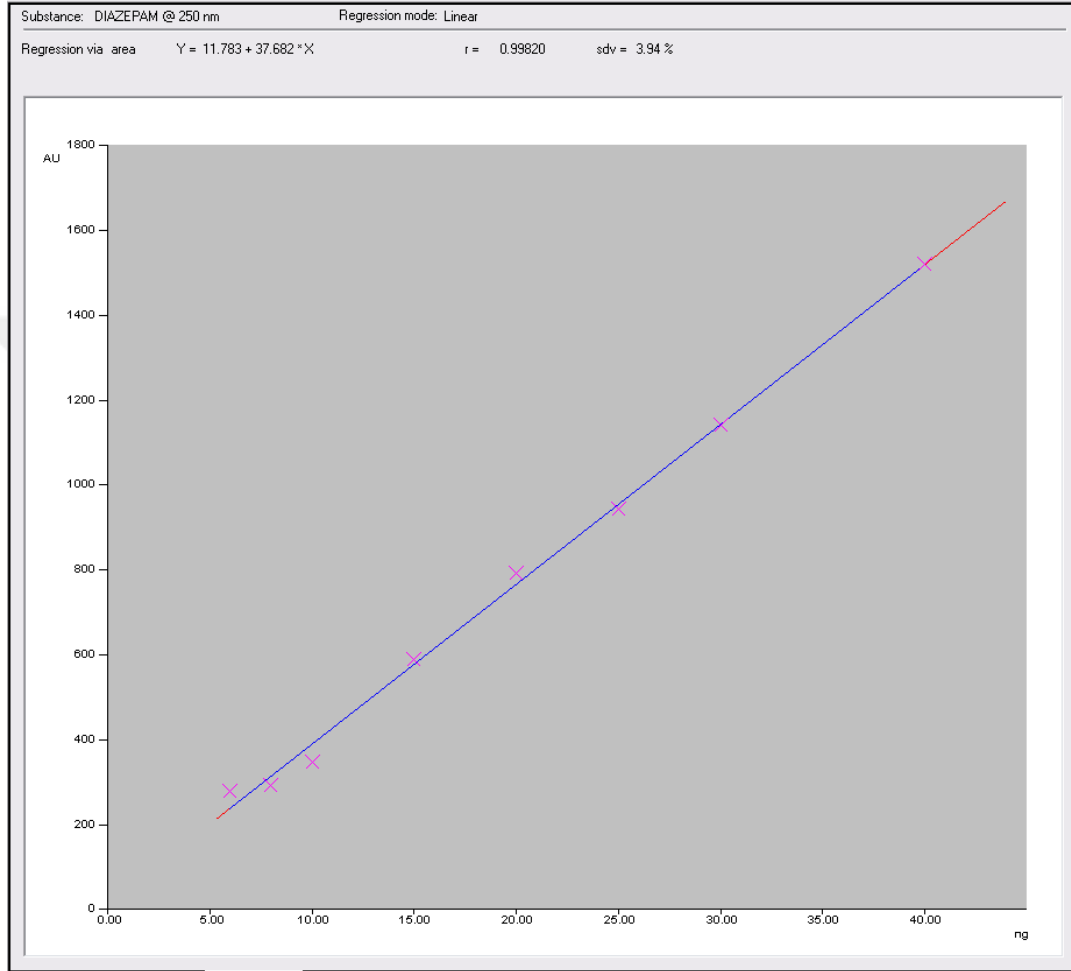


Şekil 23: Geliştirilen Metot ile Blank Örneklerin HPTLC Kromatogramında Görünümü

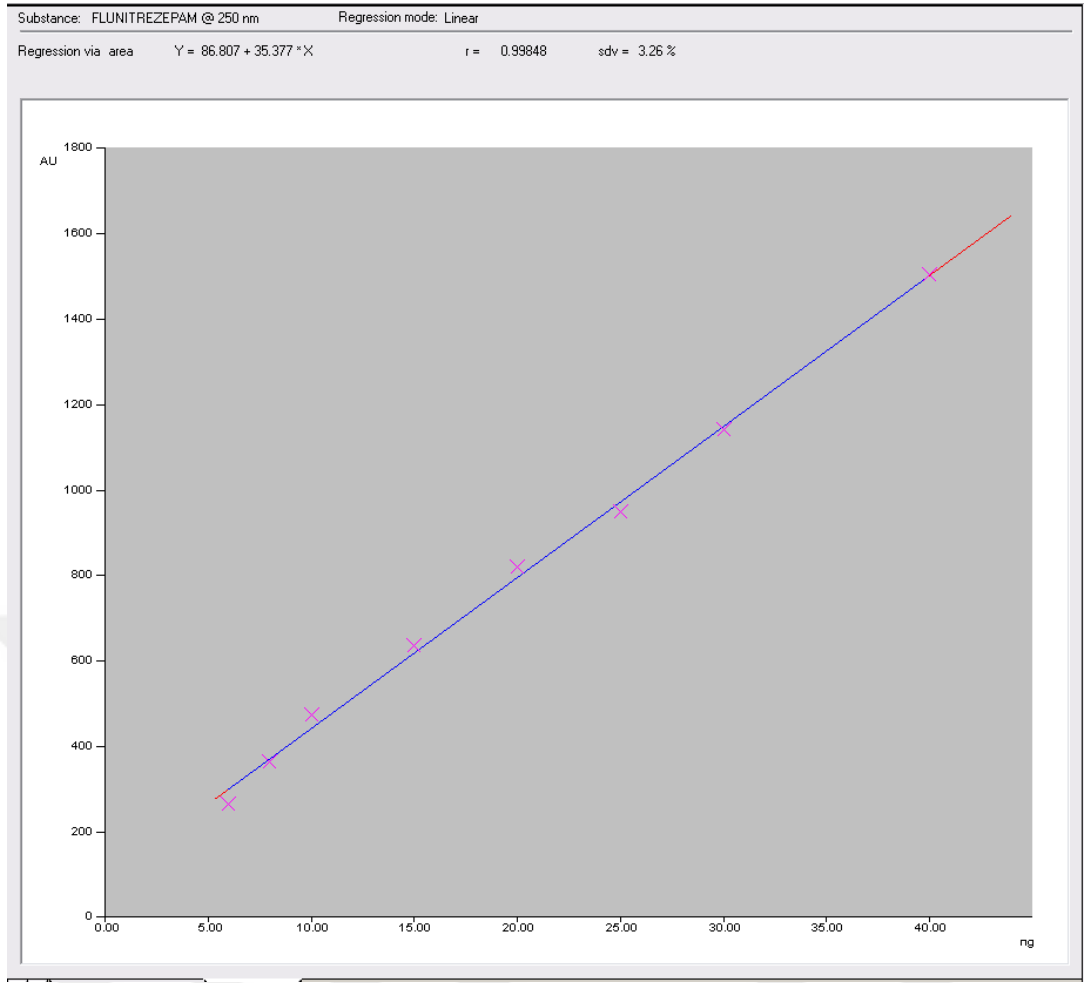


Şekil 24: İçecekten Ekstre Edilen Dizepam ve Flunitrazepam Etken Maddelerinin HPTLC Kromatogramında Görünümü

DIA ve FLU etken maddelerinin her ikisi için kalibrasyon aralıkları 6-50 ng/spot (6, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 45 ng/spot, 9 nokta) olarak belirlenmiştir. Kalibrasyon eğrisi, kalibrasyon denklemleri ve korelasyon katsayıları sırasıyla Şekil 25 ve 26’da gösterildiği gibidir.



Şekil 25: Diazepam’ın 254nm’deki Dedektör Yanıtları



Şekil 26: Flunitrezipam'ın 254nm'deki Dedektör Yanıtları

Kalibrasyon eğrileri korelasyon katsayıları DIA ve FLU etken maddeleri için sırasıyla 0.9982 ve 0,9985'dir. Bu değerler tatmin edici bulunmuştur. LOD ve LOQ'yu tahmin etmek için yalnızca boş metanol altı kez tespit edilmiş, bu şekilde DIA ve FLU etken maddeleri için hesaplanan LOD ve LOQ değerleri ise sırasıyla DIA için 3.0 ve 8.8 ng/μL (spot), FLU için 2 ve 5,8 ng/μL bulunmuştur. Bu değerler kalibrasyon aralığı içerisinde kaldığından kalibrasyon eğrisi geçerli sayılmıştır.

Yapılan geri kazanım çalışmalarından elde edilen sonuçlara göre DIA ve FLU için sırasıyla geri kazanım değeri ortalama 111,78 ve 110,53 bulunmuş ve en yüksek olan kloroform ile sıvı sıvı ekstraksiyon yöntemi seçilerek, bu ekstraksiyon simülasyon örneklerine de

uygulanmıştır. Geri kazanım çalışmaları, dşşk (15 ng/μL) ve yüksek (40 ng/μL) ara stok çözeltilerine ait konsantrasyonlarda, katım yapılarak hazırlanan 6 özdeş örneğin analizi ile tekrar etmek sureti ile karşılaştırması sonucu geri kazanım verimleri Tablo X'deki gibidir.

Tablo X. DIA ve FLU İçin İki Farklı Ekstraksiyon özeltisi Kullanılarak İki Farklı Konsantrasyon ile Yapılan Geri Kazanım Sonuçlarının Karşılaştırması

Ara Stok Noktaları	Sıvı-sıvı	Sıvı-sıvı
	Etilasetat	Kloroform
DIA 15 ng/μL (n=6)	107.86	114,73
FLU 15 ng/μL (n=6)	109,66	111,80
DIA 40 ng/μL (n=6)	106,65	108.82
FLU 40 ng/μL (n=6)	105,70	109.25

Tablo X'den de anlaşılacağı üzere kloroform çözeltisi matriks etkisinin en az görüldüğü, geri kazanım yüzdelerinin her 2 konsantrasyon da kabul edilebilir sınırlarda (%80-120) olduğu, en verimli çekitleme yöntemi olarak seçildi ve gerçek numuneler bu yöntem ile ekitlenerek analiz edildi. Kloroform özeltisi ile gerçekleştirilen sıvı-sıvı ekstraksiyon yönteminin geçerlilik çalışmalarına ait detaylı bilgi DIA ve FLU için sırasıyla Tablo XI ve XII'de gösterilmektedir.

Burada sunulan sonuçlara bakıldığında % geri kazanım her iki çözelti içinde kabul edilebilir aralıkta bulundu. Bu veriler ışığında çekitleme yönteminin doğruluğunu değerlendirmek için kullanılan kabul edilebilir hata yüzdelerinin $\leq 3,8$ olduğu tespit edildi. Her bir konsantrasyon için 6'şar kez yapılan tekrar edilebilirlik çalışmalarının standart sapma

değerleri ≤ 4 bulunurken, %RSD değerleri ise $\leq 1,57$ bulundu. Böylelikle geçerli bir çekitleme yöntemi belirlenmiş oldu.

Tablo XI. Kloroform- SSE Yöntemi ile DIA İçin Yapılan Geçerlilik Çalışmalarının Bulguları

	15 ng/ μ L			40 ng/ μ L		
	%GK	SD	%RSD	%GK	SD	%RSD
1. tekrar	17,69	0,49	2,0	43,09	0,46	1,0
2. tekrar	16,48			43,78		
3. tekrar	17,45			42,87		
4. tekrar	17,65			43,76		
5. tekrar	16,78			44,09		
6. tekrar	17,25			43,56		

Tablo XII. Kloroform- SSE Yöntemi ile FLU İçin Yapılan Geçerlilik Çalışmalarının Bulguları

	15 ng/ μ L			40 ng/ μ L		
	%GK	SD	%RSD	%GK	SD	%RSD
1. tekrar	17,71	0,91	5,4	43,45	0,42	0,95
2. tekrar	15,60			44,32		
3. tekrar	17,07			43,78		
4. tekrar	16,56			43,89		
5. tekrar	17,78			43,09		
6. tekrar	15,09			43,65		

4.1. Geçerli Kılma Çalışmaları

4.1.1. Özgüllük

DIA ve FLU'nun bir içeceğe eklenmesi ve belirlenen mobil fazda maddelerin tayin edilmesine yönelik sistemimiz her bir madde için o maddeye özgü pik vermiştir. Bu nedenle çalışmamız bu maddelerin belirlenmesinde özgüldür.

4.1.2. Seçicilik

Çalışmada doğrudan içkiye spike edilmiş maddelerimiz matriks etkisine rağmen kendi pik değerlerinde tayin edilebilmiştir. Daha sonra similasyon örnekleriyle yapılan 3'er tekrarlı çalışma bu değerleri doğrulamaktadır. Bunun yanı sıra yapılan ikinci bir seçicilik çalışması DIA ve FLU'nun evrensel UV spektrumlarında (sırasıyla 230 ve 305 nm) analizin tekrarlanmasıdır. Bunun snucunda DIA istenilen değerlerde ayırıcı bir pik vermemiş olsa da FLU için spektrum ayırıcıdır.

4.1.3. Lineerite

HPTLC ile gerçekleştirilen DIA ve FLU'nun belirlenmesinde kullanılan kalibrasyon eğrileri şekil 24 ve 25'te gösterildiği gibidir. 6-40 ppm'lik 10 farklı konsantrasyonun analiziyle kalibrasyon eğrisi çizdirilmiştir. Bu aralıktaki korelasyon katsayısı, DIA için 0.9982 ve FLU için 0,9985 olarak hesaplanmıştır. Korelasyon katsayısının 1'e yakın olması, çalışma aralığının doğrusal olduğunun göstergesidir.

4.2. Similasyon Örneklerinin Ait Diazepam ve Flunitrazepam Sonuçları

DFC vakalarında potansiyel olarak karşılaşılan senaryolar dikkate alınarak, uyuşturucu katkılı alkollü bir içecek (viski) üzerinde bir yöntem validasyon çalışması gerçekleştirildi. Ardından viski, bira, şarap içeren similasyon örnekleri validayon çalışmasına göre değerlendirildi. Uyuşturucu katkılı içecek numuneleri, ~25°C ortam sıcaklığına ve ~%50 nem oranına sahip bir adli toksikoloji laboratuvarında hazırlandı.

Söz konusu ilaç katkılı 8 örnek Bölüm 3.5'e göre hazırlanarak, örnek havuzundan ikili örnekler oluşturularak aynı örneğin iki kez analiz edilmesi sağlandı (Bölüm 3. İki hedef ilaç etken maddesi için geri kazanım yüzdesi ve bağıl standart sapma (RSD) hesaplandı. Analiz edilen 8 örneğe ait DIA ve FLU miktarları Tablo XIII'de verildiği gibidir.

Tablo XIII. Similasyon Örneklerinin Analiz Sonuçları.

Örnek No	DIA	FLU
	Miktarı (ng/spot)	Miktarı (ng/spot)
1-Viski	9,68	8,43
2-Viski	14,70	13,26
3-Şarap	14,85	14,75
4-Şarap	16,16	14,86
5-Şarap	16,89	15,54
6-Bira	17,09	16,01
7-Bira	17,15	16,28
8-Viski	17,40	16,94

5. TARTIŞMA

Faillerin bazı ilaçları gizlice mağdurun içeceğine veya yemeğine katarak onları sersemleterek karşı koymalarının önüne geçmeyi amaçladıkları ve bu şekilde soygun veya cinsel saldırı suçları işledikleri bilinmektedir. Bu tür suçlar, ilaç etkisi altında işlenen suçlar DFC ve DFSA kapsamında ele alınmaktadır. Dolayısıyla bu durum, olay yerindeki bir kaptaki bulunan kalıntıların tanımlanması adına potansiyel bir delil olmaktadır. Bu nedenle suç teşkil eden fiillerle bağlantılı olarak bu maddelerin varlığının belirlenmesine yönelik analitik yöntemlerin geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır.

Bu çalışma kapsamında geliştirilen HPTLC yöntemi ile, suç mahallinde yaygın olarak bulunan kadeh yüzeyinde DIA ve FLU gibi bu grupta en sık karşılaşılan iki etken maddenin, tek kullanımlık swapların kullanılması ile delillendirilmesini ve bu delillerin hassas, hızlı ve güvenilir şekilde analizini içermektedir.

DFC içerisinde özellikle cinsel saldırı suçları(DFSA), mağdurlarda ciddi fiziksel ve psikolojik travma yaratan bir durumdur. Bu tür olguları, tıbbi muayene ve mağdurun biyolojik örneğinin adli toksikolojik analizi yoluyla ortaya çıkaran pek çok olgu sunumu bulunmaktadır. Ancak olay yerindeki fiziksel delillerin sağlıklı şekilde toplanması ve güvenilir şekilde analiz edilmesi, mağdurların tıbbi bakımın sağlanmasına ve iyileşmeye giden yolculuklarında desteklenmesi kadar önemlidir. Adli bilimdeki ilerlemeler DFC vakalarının yarattığı zorlukların çözümünde hayati bir araç olarak ortaya çıkmıştır.

HPTLC birden fazla numuneyi aynı anda analiz etme kabiliyeti ve LC-MS, GC-MS gibi sistemlere göre maliyet verimliliği göz önüne alındığında son derece çok yönlü, hızlı ve güvenilir bir analiz yöntemidir. Adli ve hukuki vakalar çoğu zaman tamamlayıcı analitik yaklaşımlar gerektirdiğinden, HPTLC, çok çeşitli ve oldukça karmaşık, birden fazla numuneden, farmasötik ilaçlar kadar yasa dışı maddelerin varlığının şüphesinin giderilmesi için tarama amaçlı tercih edilen bir yöntemdir.

Numune içerisindeki hedef bileşik, referans standardının UV ve/veya kütle spektrumları karşılaştırılarak daha fazla doğrulama elde edilebilmeyi sağlamaktadır. Rutin analizlerde, geliştirilen yöntemdeki hedef bileşiklerin alıkonma faktörü değerlerine ve çeşitli spektral verilere dayalı olarak maddelere ilişkin bir veri tabanı oluşturulabilir. Daha doğru sonuçlar elde etmek için her analiz için HPTLC plakasında bir sistem uygunluk testi gerçekleştirilebilmektedir.

Çalışmanın ilk basamağını, hedef iki bileşiğin DIA ve FLU için uygun bir mobil faz belirlenmesi oluşturmuştur. Hangi çözelti sistemlerinin söz konusu iki bileşik için optimal ayrımını sağlayabileceğini belirlemek için literatürden ve laboratuvarı kılavuzlarından (Tablo XIV) altı mobil faz belirlenmiştir.

Her bir mobil fazın, bu iki maddenin alkollü içecekten analizinde ne kadar iyi performans gösterdiğini belirlemek için 2’şer kez analiz edildi.

En uygun mobil fazı belirlerken aşağıdaki üç kabul kriteri göz önünde bulunduruldu.

1. Bileşiklerin 254 nm’de görselleştirildiğinde 0.1 ile 0.9 arasında RF değerleri olması
2. Bileşiklerin RF değerlerinin > 2.0 olması
3. RF değerlerinin tekrarlanabilirliği (CV% < 10)

Tablo XIV. Çalışmada Kullanılan Mobil Faz Sistemleri

Mobil Faz #	Çözelti oranı	Çözelti veya çözelti karışımları
1	8:2	Kloroform:Aseton
1a	5:5	Kloroform:Aseton
2	7:1.5:0.5	Kloroform:Metanol:Etilasetat
3	%100	Kloroform

4	%100	Etilasetat
5	8:2	Kloroform:Etilasetat
5a	9:1	Kloroform:Etilasetat
5b	9.5:0.5	Kloroform:Etilasetat
6	9:1	Kloroform:Glasiyal Asetik asit
7	7:3	n-Hekzan:Etilasetat
7a	7:2.5:0.5	n-Hekzan:Etilasetat: Glasiyal Asetik asit

Tüm denemelerin sonucunda, mobil faz #7a, hedef bileşiklerin piklerinin birbirlerine yakınlığı ve biçimsel durumları daha ayırt edilebilir analiz sonuçları için uygun olduğuna karar verildi. Mobil faz #7a ile geliştirilen plakada (60F254 10x20 cm, Merck 105649.0001) DIA ve FLU için RF değerleri sırasıyla, 0,28 +0,01 ve 0,41 +0,01 olarak belirlenmiştir. Kamble ve arkadaşlarının (88) yaptığı çalışmada klasik TLC kullanılarak ve çözücü sistemi I: kloroform–aseton (8:2, V/V) ve çözücü sistemi II: kloroform-metanol-etil asetat (7:1.5:0.5, V/V) gibi iki farklı mobil faz kullanılarak DIA için RF değeri sırasıyla 0,72 ve 0,88 olarak belirlenmiştir. Bu değerler plakanın bitiş noktasına çok fazla yakın olup analiz hatalarına neden olabilir. Bizim RF değerlerimiz her iki madde için uygun bir değerde olduğu ve birbirleri ile de uyumlu olduğunu göstermektedir.

RF değeri kadar, plaka üzerindeki bileşiklere ait lekelerin, hangi dalga boyu ile spektrometrik analiz edileceği diğer bir önemli karardır. Bileşiklerin, UV spektrumlarında, DIA için 230'da, FLU'nun ise belirgin şekilde 305 nm'de tepe yaptıkları görülmektedir (Şekil 20 ve 21). Her iki bileşiğin de hassas kantitasyonu için kullanılmak istenen bu HPTLC yönteminde, bileşikler için ortak bir dalga boyu belirlenmesi hedeflenmiştir. Toplam 4 farklı dalga boyunda (230, 250, 254 ve 305 nm) denemeler yapılmış ve uygun olanın 250 nm dalga boyu olduğu

görülmüştür (Şekil 26 ve 27). Plaka mobil faz ile muamele edildikten sonra ya da önce, türevlendirme ya da görünürleştirme amacıyla herhangi bir kimyasala batırılmamış ya da kimyasal püskürtülmemiştir.

Bununla birlikte, bu yöntemin olası şüpheli delillerde miktar tayininde yeterli hassasiyeti gösterebileceğine yönelik endişemizdi. Bunun için her iki ilaç etken maddesinin, piyasadaki ticari formlarındaki dozları göz önüne alarak, olası olay yeri delillerinin yaratılması oldu. Bu sayede gerçek olayların simülasyonunu sağlayacak içecek örnekleri oluşturuldu. Piyasadaki DIA ve FLU bileşiklerinin sırasıyla 10 ve 1 mg olarak satışa sunulduğunu belirlenmiştir (Bölüm 3.7).

DIA ve FLU etken maddelerinin her ikisi için kalibrasyon aralıkları 5-45 ng/spot ve r değerleri >0.9980 olarak belirlenmiştir. Vincenti ve arkadaşları (86) tarafından HPLC-HRMS yöntemi ile geliştirilen metoda göre, kalibrasyon aralığı 0.5, 1, 2, 5, 10, 50, 100, 250, 500, 1000 pg olarak belirlendiği görülmektedir. Teoh ve arkadaşlarının (89) yaptığı adli soruşturmalarda ilaç katkılı içeceklerde uygulanan diğer bir çalışmada HPLC yöntemi ile kalıntı diazepam, ketamin, nimetazepam ve ksilazinin eşzamanlı belirlenmesi amaçlanmıştır. DIA'nın 0.25-5.00 µg/mL konsantrasyonu aralığında 6 noktada lineer olduğu ve LOD değerinin 78.1 ng/mL olduğu belirlenmiştir. Her iki HPLC yöntemindeki gerek lineer aralık gerekse LOD limitleri, bizim yöntemimizden oldukça daha düşük konsantrasyonlarda işlevliğini gösterse de olası senaryoların, kişiyi etkisiz hale getirmek için kullanılacak dozları göz önüne alındığında bir içecek cidarında belirlenebilecek ön görülen konsantrasyonlar için gereksiz hassasiyet seviyelerinde olduğu düşünülmektedir. Bizim çalışmamızda Dizepam ve Flunitrazepam etken maddeleri için hesaplanan LOD ve LOQ değerleri ise sırasıyla dizepam için 3.0 ve 8.8 ng/µL (spot), flunitrazepam için 2 ve 5,8 bulunmuştur. Bu da öngörülen 1'er tablet Diazem (diazepam-10 mg) ve Rohypnol (flunitrazepam – 1 mg) eklenerek oluşturulmuş sırasıyla 40 g/mL ve 4 g/mL konsantrasyonda içecekler için uyumlu değerlerdir.

Çalışmanın geri kazanım belirleme basamağı, her iki analitin için düşük (15 ng/μL) ve yüksek (40 ng/μL) ara stok çözeltilerine ait konsantrasyonlarda, katım yapılarak hazırlanan 6 özdeş örnek %100 Kloroform ve %100 Etilasetat olmak üzere iki farklı ekstraksiyon çözücüsü ile gerçekleştirilmiştir. Her iki çözücüde de matriks etkisinin en az görüldüğü, geri kazanım yüzdelерinin her 2 konsantrasyon da kabul edilebilir sınırlarda (%80-120) olduğu belirlense de kloroform değerleri daha iyi sonuç verdiği için, tüm örnekler kloroform-Sıvı sıvı ekstraksiyonu uygulanmıştır. Çalışmamıza yakın olan ve HPLC sistemleri kullanılarak gerçekleştirilen yöntemlerde örnekler filtrelendikten sonra direk sisteme verilerek analiz gerçekleştirildiği görülmektedir. Bu noktada bu aşamanın atlanmış olması elbetteki zaman kazandırıcıdır. Geliştirdiğimiz HPTLC metodunda, örneklerin alkollü içecek olması durumunda, swap örnekleminin doğrudan metanol ile çekilerek analiz edilebilmesi mümkündür.

Çalışmanın analitik basamakları değerlendirildiğinde olası olay yeri örneklerinde karşılaşılabilecek konsantrasyonları rahatlıkla tespit edilebildiği bir yöntem geliştirilmiş olduğu görülmektedir. Burada HPTLC plakaların partikül boyutlarından dolayı tayin limitinin geleneksel TLC plakalara göre daha hassas analizlere olanak tanımaktadır. HPTLC yönteminin avantajlarında biri de plakaya tatbik edilen örnek miktarının arttırılması yolu ile daha etkin analizin mümkün kılınmasıdır. Çalışmamız boyunca numune enjeksiyon hacmi 1 μL seçilmiştir. Numunenin enjekte edildiği bant genişliği artırılarak 50 μL'ye kadar örnek hacmi yüklemek mümkün olabilmektedir

Bu sayede 50 kat deriştirmeye izin vererek tayin limitlerini daha da düşürmek mümkündür. Bu tür bir uygulamalarda matriks etkisinin de beraberinde artması söz konusu olabilir ancak bu çalışmada seçilen Kloroform Sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi düşük matriks etkisi göstererek bir avantaj sağlamaktadır. HPTLC'de gerek plakaların tek kullanımlık olması gerekse dedektörün, gaz ya da sıvı kromatografisi gibi kapalı sistemlere kıyasla, plakaları farklı parametreler uygulanarak tekrar tekrar tarayabilmekte ve analiz sonuçlarını farklı şekillerde

değerlendirmeye imkan sağlamaktadır. Plakalar tek kullanımlık olduğu için analizler arası kontaminasyon riski otomatik olarak ortadan kalkmaktadır. Sistem, tamamen açık olması özelliği ile analiz sürecini gözlemlene ve aksaklıklara anında müdahale etme olanağı tanımaktadır. Bir plakada bant genişliğine bağlı olmak kaydı ile 30 örneğe kadar aynı anda uygulanabildiğinden; karşılaştırmalı analizlere, zaman ve maliyet kazancına olanak tanımaktadır.

Ana pik noktaları haricinde başka bir pik zirvesinin olmadığı ve dolayısıyla HPTLC yönteminin, şüpheli içecek kaplarının cidarındaki sıvıda varlığında DIA ve FLU'nun belirlenmesine özel olduğu sonucuna varılmıştır.

Yöntem, test edilen tüm yöntem doğrulama parametreleri için tatmin edici veriler göstererek tamamen doğrulanmıştır. Yukarıda tarif edilen yöntem her iki ilacın olay yerinden elde edilen içecek kabının cidarından toplanan sıvıdan ayırabildiğinden, yöntem başarılı bir şekilde kullanılabilir.

Geliştirilen bu HPTLC yönteminin spesifik, doğru, kesin, doğrusal olduğu ve her iki ilaç etken maddesinin (DIA ve FLU) belirlenmesi için rutin uygulamada kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

6. SONUÇ

Bu çalışmada içecek yüzeylerinde DIA ve FLU kalıntılarının tespiti için yenilikçi, hızlı ve uygun maliyetli bir yöntem önerilmiştir. Gerçeğe yakın şekilde simüle edilen içecek örneklerinde, geliştirilen bu analiz yöntemin şüpheli delillerin incelenmesinde uygunluğunu ortaya koymuştur.

Aslında önerilen yöntemin güçlü yönlerinden biri, delillendirmenin swaplarla yapılarak laboratuvara sağlıklı şekilde getirilmesi ve plakaların düşük tespit limitinin elde edilmesine olanak tanıyan yüksek kalitede gerçekleşebiliyor olmasıdır.

Bu basit HPTLC yöntemi, sıvı içeceğe eklendiği şüphesi olan iki sedatif-hipnotik ilacı (diazepam ve flunitrazepam) tespit etmek için başarıyla geliştirilmiştir. İyi düzeyde geri kazanımlar elde edilmesi yöntemin, şüpheli suç mahallinden ele geçirilen delillerin incelenmesi için uygun olduğunu göstermiştir.

7. KAYNAKLAR

1. Bertol E., Milia M.G.D., ve ark., Proactive drugs in DFSA cases: toxicological findings in an eight-years study, 2018. FSI 9456, <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2018.08.032>.
2. García M.G., P´erez-Cárceles M.D., Osuna E., Legaz I., Drug-facilitated sexual assault and other crimes: A systematic review by countries, 2021, Journal of Forensic and Legal Medicine, 79.
3. Congar K., İçkiye ilaç katılıp katılmadığını gösteren bileklik üretildi başlıklı haber, 2019, Euronews, <https://tr.euronews.com/2019/04/19/ickiye-ilac-tecavuz-hapi-katilip-katilmadiginigosteren-bileklik-uretildi>
4. Elliot C., İçkiye ilaç atılıp atılmadığını ölçen bileklik Almanya'da satışa sunuldu başlıklı haber, 2019, BBC News, <https://www.bbc.com/turkce/haberler-47988327>
5. Griffin C.E., Kaye A.M., Bueno F.E., Kaye A.D., Benzodiazepine Pharmacology and Central Nervous System–Mediated Effects, 2013, Ochsner J., 13(2), p.214-223.
6. Uzbay T., Yüksel N., Anksiyete Tedavisinde Kullanılan İlaçların Farmakolojisi ve Kullanım Güvenliği, 2002, Klinik Psikiyatri Ek-1, s.14-26.
7. Cascade E., Kalali A.H., Use of Benzodiazepines in the Treatment of Anxiety, 2008, Psychiatry (Edmond), 5(9), p.21-22.
8. Toprak S., Yıldırım A., 1990 ile 2000 Arasında Yakalanan Sentetik İlaç ve Uyuşturucular, 2009, GOÜ Tıp Fakültesi, 1, s.1-4.
9. Eradamlar N., Arkonaç O., Psikiyatri Kliniğinde Benzodiazepinler, 1990, The Journal of Psychiatry and Neurological Sciences, 3.

10. Ochoa-de la Paz L.D., D´Abril Ruíz-Leyja E., Gulas-Cañizo R., Sánchez-Castillo H., Parodí J., The role of GABA neurotransmitter in the human central nervous system, physiology, and pathophysiology, 2021, *Revista mexicana de neurociencia*, 22(2).
11. Sieghart W., Pharmacology of benzodiazepine receptors: an update, 1994, *J Psychiatry Neurosci.*, 19 (1), p.24-29.
12. Rijnsoever C., Tauber M., Choulli M.K., Keist R., Rudolph U., Mohler H., Fritschy J.M., Crestani F., Requirement of $\alpha 5$ -GABAA Receptors for the Development of Tolerance to the Sedative Action of Diazepam in Mice, 2004, *The Journal of Neuroscience*, 24(30), p.6785– 6790.
13. Sigel E., Steinmann M.E., Structure, Function, and Modulation of GABAA Receptors, 2012, *Journal of Biological Chemistry*, 287 (48), p.40224–40231.
14. Calcaterra N.E, Barrow J.C, Classics in Chemical Neuroscience: Diazepam (Valium), 2014, *ACS Chemical Neuroscience*, 5 (4), p.253- 260.
15. Luk S., Atayee R.S., Ma J.D., Best B.M., Urinary Diazepam Metabolite Distribution in a Chronic Pain Population, 2014, *Journal of Analytical Toxicology*, 38, p.135-142.
16. Zhan P., Pan Z.H., Awobuluyi M., Lipton S.A., Structure and function of GABA(C) receptors: a comparison of native versus recombinant receptors, 2001, *Trends Pharmacol Sci.*, 22(3), p.121-132.
17. Wick J.Y., The history of benzodiazepines, 2013, *The Consultant Pharmacist*, 28 (9), p.538548.
18. Wang L., Ren X., He Y., Cui G. Wei Z., Jia J., Cao J., Liu Y., Cong B., Niu Y., Yun K., Study on the Pharmacokinetics of Diazepam and Its Metabolites in Blood of Chinese People, 2020, *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 45 (4), p.477-485.

19. Wang X., Johansen S.S., Zhang Y., Jia J., Rao Y., Jiang F., Linnet K., Deposition of diazepam and its metabolites in hair following a single dose of diazepam, 2017, *Int J Legal Med*, 131 (1), p.131-141.
20. Marland A., Sarkar P., Leavitt R., The urinary elimination profiles of diazepam and its metabolites, nordiazepam, temazepam, and oxazepam, in the equine after a 10-mg intramuscular dose, 1999, *Journal of Analytical Toxicology*, 23, p.29-34.
21. Stebler T., Guentert T.W., Determination of diazepam and nordazepam in milk and plasma in the presence of oxazepam and temazepam, 1991, *Journal of Chromatography*, 564, p.330337.
22. Dean L., Diazepam Therapy and CYP2C19 Genotype, 2020, National Library of Medicine.
23. Klotz U., Antonin K.H., Bieck P.R., Pharmacokinetics and Plasma Binding of Diazepam in Man, Dog, Rabbit, Guinea Pig and Rat, 1976, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 199 (1), p.67-73.
24. Brmaness J.G., Skurtveit S., Mørland J., Flunitrazepam: Psychomotor impairment, agitation and paradoxical reactions, 2006, *Forensic Science International*, 159, p.83-91.
25. Hasegawa K., Wurita A., Minakata K., Gonmori K., Nozawa H., Yamagishi, Watanabe K., Suzuki O., Postmortem distribution of flunitrazepam and its metabolite 7-aminoflunitrazepam in body fluids and solid tissues in an autopsy case: Usefulness of bile for their detection, 2015, *Journal of Forensic Medicine and Toxicology*, 17 (5), p.394-400.
26. Coassolo C.D., Iliadis A., Coassolo P., Antoni M., Cano J.P., Pharmacokinetics of flunitrazepam following single dose oral administration in liver disease patients

- compared with healthy volunteers, 1990, *Fundamental Clinical Pharmacology*, 4(6), p.463-651.
27. Bylund D.B., Flunitrazepam, 2017, *Reference Module in Biomedical Sciences*, p.1-5.
28. Druid H., Holmgren P., Ahlner J., Flunitrazepam: an evaluation of use, abuse and toxicity, 2001, *Forensic Sciences International*, 122, p.136-141.
29. Kumari C., Patil S., Ramu R., Shirahatti P.S., Kumar N., Sowmya B.P., Egbuna C., Uche C.Z., Iwuanyanwu K.C.P., Chapter 5-Chromatographic techniques: types, principles, and applications, 2022, *Analytical Techniques in Biosciences*, p.73-101.
30. Coşkun Ö., Separation techniques: Chromatography, 2016, *Nothern Clinics of Istanbul*, 3(2), s.156-160.
31. Phillips C.S.G., Chromatography and the discovery process, 1989, *Journal of Chromatography A*, 468, p.34-42.
32. Bernard-Savary P., Poole C.F., Instrument platforms for thin-layer chromatography, 2015, *Journal of Chromatography A*, 1421, p.184-202.
33. Srivastava M. Ed., High-performance thin-layer chromatography (HPTLC), 2010, Springer Science & Business Media.
34. Wall P.E., Thin-layer Chromatography – A Modern Practical Approach, 2006, The Royal Society of Chemistry, 10, p.847-850.
35. Halkina T., Sherma J., Comparative evaluation of the performance of silica gel TLC plates and irregular and spherical-particle HPTLC plates, 2006, *Acta Chromatographica*, 261.
36. Esmaili K., Shetab-Boushehri S.V., Comparative verification study of silica gel-coated

- TLC and HPTLC plates' performances in separation of opium alkaloids on the basis of their physicochemical properties, 2017, Journal of Analytical Science and Technology, 8(1).
37. Sternbach, Leo H. The benzodiazepine story. Journal of medicinal chemistry, 1979, 22.1, p.1-7.
38. Ashton, Heather. The diagnosis and management of benzodiazepine dependence. Current opinion in Psychiatry, 2005, 18.3, p.249-255.
39. Gök Ş., Benzodiazepinler. Türkiye Klinikleri J Int Med Sci 2006; 2(1), s.1-10.
40. Valentine JL, Middleton R, Sparks C. Identification of urinary benzodiazepines and their metabolites: comparison of automated HPLC and GC-MS after immunoassay screening of clinical specimens. Journal of Analytical Toxicology 1996, 20, p.416-424.
41. Acikkol M, Mercan S, Karadayı S. Simultaneous determination of benzodiazepines and ketamine from alcoholic and nonalcoholic beverages by GC-MS in drug facilitated crimes, Chromatographia 2009, 70, s.1295-1298.
42. Zerbo, S., et al. Medico legal procedures related to sexual assault: a 10-year retrospective experience of a Daphne protocol application. Egyptian Journal of Forensic Sciences, 2018, 8, p.1-8.
43. Wang, Xin, et al. Hair analysis in toxicological investigation of drug-facilitated crimes in Denmark over a 8-year period. Forensic Science International, 2018, 285, p.1-12.
44. Piergiovanni, Maurizio, et al. Determination of benzodiazepines in beverages using green extraction methods and capillary HPLC-UV detection. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2018, 154, p.492-500.
45. Kintz, Pascal (ed.). Toxicological aspects of drug-facilitated crimes. Elsevier, 2014, p.11-
46. Chan, Kar-Weng; Ramlı, Suraya Hani. Development of an in-house HPLC method for the analysis of ecstasy-laced beverages. Egyptian Journal of Forensic Sciences, 2018, 8.1, p.1-8.

47. Tiemensma, Marianne; Davies, Bronwen. Investigating drug-facilitated sexual assault at a dedicated forensic centre in Cape Town, South Africa. *Forensic science international*, 2018, 288, p.115-122.
48. Grela, A., Gautam, L., Michael D. A multifactorial critical appraisal of substances found in drug facilitated sexual assault cases. *Forensic science international*, 2018, 292, p.50-60.
49. Kintz, P., Villain, M., Ludes, B., Testing for the undetectable in drug-facilitated sexual assault using hair analyzed by tandem mass spectrometry as evidence. *Therapeutic drug monitoring*, 2004, 26.2, p.211-214.
50. Wells, D. Drug administration and sexual assault: sex in a glass. *Science & Justice*, 2001, 3.41, p.197-199.
51. Du Mont, J., Macdonald, S., Rotbard, N., Asllani, E., Bainbridge, D., & Cohen, M. M., Factors associated with suspected drug-facilitated sexual assault. *CMAJ*, 2009, 180(5), p.513519.
52. Gisladdottir, A., Gudmundsdottir, B., Gudmundsdottir, R., Jonsdottir, E., Gudjonsdottir, G. R., Kristjansson, M., & Valdimarsdottir, U. A., Increased attendance rates and altered characteristics of sexual violence. *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica*, 2012, 91(1), p.134-142.
53. Scott-Ham, M., & Burton, F. C., Toxicological findings in cases of alleged drug-facilitated sexual assault in the United Kingdom over a 3-year period. *Journal of clinical forensic medicine*, 2005, 12(4), p.175-186.
54. Hagemann, C. T., Helland, A., Spigset, O., Espnes, K. A., Ormstad, K., & Schei, B., Ethanol and drug findings in women consulting a Sexual Assault Center–Associations with clinical characteristics and suspicions of drug-facilitated sexual assault. *Journal of forensic and legal medicine*, 2013, 20(6), p.777-784.

55. Slaughter, L., Involvement of drugs in sexual assault. *The Journal of Reproductive Medicine*, 2000, 45(5), p.425-430.
56. Peatfield, R., & Villalón, C. M., Headache after exposure to 'date-rape' drugs. *SpringerPlus*, 2013, 2(1), p.1-3.
57. Weir, E., Raves: a review of the culture, the drugs and the prevention of harm. *Cmaj*, 2000, 162(13), p.1843-1848.
58. Abondo, M., Bouvet, R., Baert, A., Morel, I., & Le Gueut, M., Sexual assault and MDMA: the distinction between consciousness and awareness when it comes to consent. *International journal of legal medicine*, 2009, 123, s.155-156.
59. Pelissier, A. L., Raul, J. S. Clinical Aspects of Drug-Facilitated Sexual Assault. In: *Toxicological Aspects of Drug-Facilitated Crimes*. Academic Press, 2014. p.283-286
60. Martínez, M. A., & Ballesteros, S., An unusual case of drug-facilitated sexual assault using aromatic solvents. *Journal of analytical toxicology*, 2006, 30(7), p.449-453.
61. Kiselev, A. V., Problems of molecular adsorption chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1970, 49, p.84-129.
62. Knox, J. H. (1999). Band dispersion in chromatography—a new view of A-term dispersion. *Journal of Chromatography A*, 831(1), p.3-15.
63. Liu, E. H., Qi, L. W., Cao, J., Li, P., Li, C. Y., & Peng, Y. B., Advances of modern chromatographic and electrophoretic methods in separation and analysis of flavonoids. *Molecules*, 2008, 13(10), p.2521-2544.
64. Rieman, W., & Walton, H. F., Ion exchange in analytical chemistry: international series of monographs in analytical chemistry. Elsevier, 2013, p.175-192
65. Konak, Ü. İ., Turhan, İ., & Certel, M., Proteinlerin kromatografik yöntemlerle saflaştırılması. *Akademik Gıda*, 2014, 12(2), s.79-87.

66. Engin, B., Sarkozin oksidaz enziminin afinite kromatografisi ile saflaştirılması (Doctoral dissertation, Anadolu University (Turkey)), 2017.
67. Bernard-Savary, P., & Poole, C. F., Instrument platforms for thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2015, 1421, p.184-202.
68. Hałka-Grysińska, A., Skop, K., Klimek-Turek, A., Gorzkowska, M., & Dzido, T. H., Thinlayer chromatogram development with a moving pipette delivering the mobile phase onto the surface of the adsorbent layer. *Journal of Chromatography A*, 2018, 1575, p.91-99.
69. Abou Al-Alamein, A. M., Abd El-Rahman, M. K., Abdel-Moety, E. M., & Fawaz, E. M., Green HPTLC-densitometric approach for simultaneous determination and impurity-profiling of ebastine and phenylephrine hydrochloride. *Microchemical Journal*, 2019, 147, p.1097-1102.
70. Gökbulut, A., High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) for the investigation of medicinal plants. *Current Analytical Chemistry*, 2021, 17(9), p.1252-1259.
70. Rote, A. R., & Kande, S. K., Development of HPTLC method for determination of cefpodoxime proxetil and ambroxol hydrochloride in human plasma by liquid-liquid extraction. *Pharmaceutical methods*, 2011, 2(4), p.242-246.
71. Guermouche, S., & Guermouche, M. H., Solid-phase extraction and HPTLC determination of isoniazid and acetylisoniazid in serum. Comparison with HPLC. *Journal of chromatographic science*, 2004, 42(5), p.250-253.
72. Felix, T., Hall, B. J., & Brodbelt, J. S., Determination of benzophenone-3 and metabolites in water and human urine by solid-phase microextraction and quadrupole ion trap GC-MS. *Analytica Chimica Acta*, 1998, 371(2-3), p.195-203.

73. Drummer, O. H., Methods for the measurement of benzodiazepines in biological samples. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1998, 713(1), p.201225.
74. Sioufi, A., & Dubois, J. P., Chromatography of benzodiazepines. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1990, 531, p.459-480.
75. Papoutsis, I. I., Athanaselis, S. A., Nikolaou, P. D., Pistos, C. M., Spiliopoulou, C. A., & Maravelias, C. P., Development and validation of an EI–GC–MS method for the determination of benzodiazepine drugs and their metabolites in blood: Applications in clinical and forensic toxicology. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 2010, 52(4), p.609-614.
76. Lensmeyer, G. L., Rajani, C., & Evenson, M. A., Liquid-chromatographic procedure for simultaneous analysis for eight benzodiazepines in serum. *Clinical chemistry*, 1982, 28(11), p.2274-2278.
77. <https://labakademi.com/wp-content/uploads/2021/06/ion-exchange-chromatography.jpg>
79. De Decker, J., Functionalized metal-organic frameworks as selective metal adsorbents (Doctoral dissertation, Ghent University), 2017.
80. Shah, P., Patel, J., Patel, K., & Gandhi, T., Development and validation of an HPTLC method for the simultaneous estimation of Clonazepam and Paroxetine hydrochloride using a DOE approach. *Journal of Taibah University for Science*, 2015, 11(1), p.121-132.
81. Misra, H., Mehta, B. K., & Jain, D. C., Optimization of Extraction Conditions and HPTLCUV Method for Determination of Quinine in Different Extracts of Cinchona species Bark. *Records of Natural Products*, 2008, 2(4).
82. Green, J. M., Peer reviewed: a practical guide to analytical method validation. *Analytical chemistry*, 1996, 68(9), 305A-309A

83. Lang, J. R., & Bolton, S., A comprehensive method validation strategy for bioanalytical applications in the pharmaceutical industry—1. Experimental considerations. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 1991, 9(5), p.357-361.
84. Özlem, S. E., & Kayalı, A., An overview on analytical method validation. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 2005, 34(1), 41-57.
85. Turkmen, Z., & Kurada, O. (2020). Rapid HPTLC determination of patulin in fruit-based baby food in Turkey. *JPC–Journal of Planar Chromatography–Modern TLC*, 33, 209-217.
86. Vincenti, F., et al., (2021). Finding evidence at a crime scene: Sensitive determination of benzodiazepine residues in drink and food paraphernalia by HPLC-HRMS/MS, *Forensic Chemistry*, 23.
87. Lee, H., & Pagliaro, E. M., (2013), Forensic Evidence and Crime Scene Investigation, *J Forensic Investigation*, 1(2): 5, <https://www.avensonline.org/fulltextarticles/JFI-2330-0396-01-0004.html>.
88. Kamble, A., Kennady, C.J., Badiye, A., Kapoor, N., (2022), Detection of diazepam in spiked drink using thin-layer chromatography, *Journal of Planar Chromatography Modern TLC*, 35, 543–546.
89. Teoh, W.K., Sadiq, N.S.M., Saisahas, K., Phoncai, A., Kunalan, V., Zuhartini, M., (2022), Simultaneous detection of residual diazepam, ketamine, nimetazepam, and xylazine by highperformance liquid chromatography: application in drug-spiked beverages for forensic investigation, *Australian Journal Of Forensic Sciences*.