

DİCLE ÜNİVERSİTESİ ECZACILIK FAKÜLTESİ
FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİMDALI



ECZ 420 FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ UYGULAMA DERSİ
LABORATUVAR FÖYÜ



Hazırlayan: Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Toksikoloji ABD

ÖĞRENCİ ADI SOYADI:

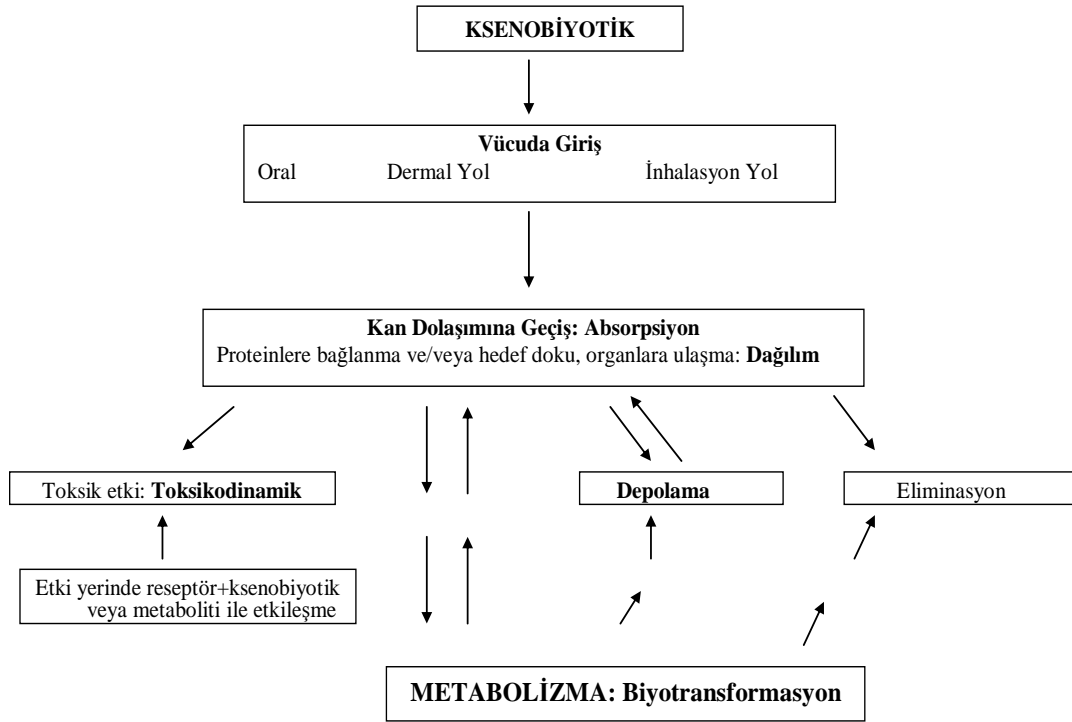
ÖĞRENCİ NUMARASI:

ÖĞRENCİ LABORATUVAR GRUBU:

KSENOBİYOTİĞİN VÜCUTTAKİ YAZGISI

Absorpsiyon, Dağılım, Metabolizma, Eliminasyon (ADME)

Ksenobiyotik: Canlı organizmaya çeşitli yollardan giren ilaç dahil tüm yabancı kimyasal maddelere denir.



Şekil 1. Ksenobiyotiklerin vücuttaki yazgısı

ABSORPSİYON: Ksenobiyotiğin alındığı andan itibaren kan ve/veya lenf dolaşımına geçmesidir. Birim zamanda (genelde 1 dk.) kan ve/veya lenf dolaşımına geçen madde miktarına absorpsiyon hızı denir.

ABSORPSİYONA ETKİ EDEN FAKTÖRLER

1. Temas yeri ile ilgili etmenler:

- Yüzeyin geçirgenliği: Hücre membranının bağlantı yerleri gevşekse absorpsiyon hızı artar.
- Yüzey Genişliği: Absorpsiyon yüzeyinin genişliği arttıkça absorpsiyon da artar. Absorpsiyon yüzeyindeki katman sayısının fazlalığı yüzey genişliğini arttırıcı bir etmendir.

- Temas yerindeki kan akım hızı: Kan akımı az ise, kapilleri geçen ksenobiyotik hemen uzaklaşamayacağından konsantrasyon gradiyenti (değişim derecesi) ortadan kalkar ve difüzyon sona erer.

2. Molekül ile ilgili etmenler:

- Alınan, temas edilen doz: Yüksek konsantrasyonda daha hızlı absorbe olur.
- Alınan, temas edilen fiziksel şekil: Sıvı, katı, gaz vb. gibi çeşitli şekillerde olabilir.
- Katı maddenin absorbe olabilmesi için disintegrasyon (parçalanma) ve dissolüsyon (çözünme) aşamalarından geçmesi gerekir, absorpsiyon gecikir.
- Maddenin fizyolojik/farmakolojik etkisi: (Örnek: alınan/temas edilen vazokonstriktör bir madde ise damarları büzüp kan akımını yavaşlatacağından dolayı absorpsiyonu geciktirir).
- Maddenin fizikokimyasal özellikleri:
 - a) Molekül büyüklüğü
 - b) Lipit çözünürlüğü
 - c) İyonizasyon derecesi
 - d) Polaritesi
 - e) Çözünürlüğü

Genellikle küçük moleküller iyonizasyon derecesi uygun olmasa da iyi absorbe olur. Maddenin lipid çözünür olması difüzyonla membran geçmede şarttır. Lipid çözünürlüğü genellikle partisyon katsayısıyla ifade edilir. Partisyon katsayısı deneysel olarak saptanabilir.

$$\text{Partisyon katsayısı (P}_{\text{yağ/su}}) = \frac{C_{\text{yağ}} (\text{Lipit fazdaki madde miktarı})}{C_{\text{su}} (\text{Sulu fazdaki madde miktarı})}$$

Partisyon katsayısı her bir kimyasal grup için sabit partisyon faktörleri yardımıyla teorik olarak da hesaplanabilir.

$$\text{Partisyon katsayısı (P}_{\text{membran/tampon}}) = \frac{C_{\text{membran}}}{C_{\text{tampon ya da su}}}$$

Partisyon katsayısı yüksek olan molekülün absorpsiyonu fazladır.

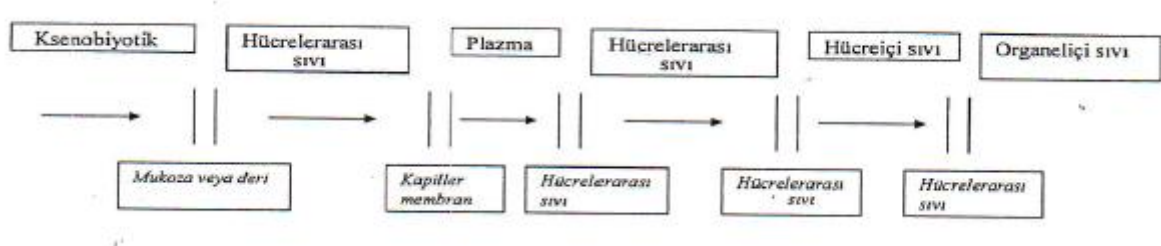
İyonizasyon derecesi pH partiyon teorisiyle (Henderson-Hasselbach denklemi ile) ifade edilir.

3. Veriliş yoluyla ilgili etmenler:

Oral yolla veriliş, iv. veriliş, transdermal veriliş, vb. Farklı ksenobiyotikler farklı veriliş yolu ile farklı zamanda absorpsiyona uğrarlar.

- Parenteral maruziyet yolları olarak bilinen intraperitoneal (i.p.), intramusküler (i.m.), intravenöz (i.v.) ve subkütanöz (s.c.) yollar ile vücuda giren yabancı moleküller, midenin asidik hidrolizi ve/veya barsaklardaki bakteriyel metabolizmadan etkilenmezler. Dolayısı ile nihai toksik etki daha hızlı görülebilmektedir.
- Dermal yoldan absorpsiyon, cilt yüzey alanı geniş olmasına rağmen geçirgenliğinin az olması sebebi ile bariyer etkisi göstermesi sonucu yavaş olabilmektedir.
- Akciğerlerden absorpsiyon genellikle süratle gerçekleşmekte ve temel organlara ksenobiyotiğın ulaşması daha hızlı olmaktadır.
- Oral yoldan alınıp gastrointestinal yolağā giren bazı maddeler ise karaciğerde ilk geçiş etkisine uğramaları sonucu absorpsiyon hızları diğerk maddelere göre farklı olabilmektedir..

DAĞILIM: Lenf ve kan dolaşımına geçmiş olan ksenobiyotiğın etki yerine ulaşması olayına denir.



şekil 2. Ksenobiyotiğın absorpsiyon ve dağılım sırasında geçtiğı vücut membranları

Kan içinde dağılım:

Kan veya lenf dolaşımına geçen madde kan proteinlerine çeşitli oranlarda bağlanır. Bu olaya kan içinde dağılım denir. Eritrositlere afinitesi olanlar eritrositlerde konsantre olabilir, bu da kan içinde dağılımdır. Proteinlere bağli ksenobiyotik membranları aşıp hedef yapıya ulaşamaz. Bağli kısım daima depo görevi görür. Serbest kalan ksenobiyotik membranları aşıp hedef yapıya ulaşır ve etki gösterir. Ksenobiyotikler vücutta çeşitli fizyolojik kompartmanlarda farklı oranlarda ya da homojen olarak dağılır. Fizyolojik sıvı

kompartmanları; plazma, hücrelerarası (interstisyel) ve hücre içi (intraselüler) sıvıdır. Plazma vücut ağırlığının %4'ünü, hücreler arası sıvı %13'ünü, hücre içi sıvı %41'ini oluşturur.

İ.v. yol dışındaki yollarla alınan ksenobiyotiklerin absorpsiyon ve dağılımla vücut membranlarından geçmesi gerekmektedir.

MEMBRAN GEÇME MEKANİZMALARI:

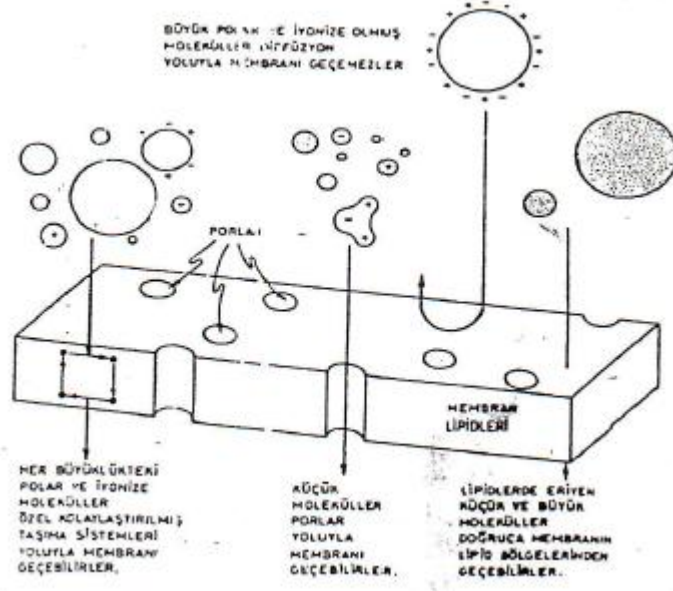
1. Pasif Transport-Taşınma (Difüzyon)

- a) Basit Difüzyon:** Vücuttaki membran geçiş olayları büyük oranda basit difüzyonla gerçekleşmektedir. Basit difüzyon yüksek konsantrasyondan düşük konsantrasyona membrandan geçiş olayıdır. 1. derece kinetiğe göre olur, difüzyon hızı konsantrasyon farkına bağlıdır. Membranın her iki tarafındaki konsantrasyon eşit olana kadar devam eder. Bu yolla çok polar maddeler geçemez. Lipid çözünür, iyonize olmamış formdaki maddeler bu yolla membranları geçerler. Fizikteki Fick kanununa uyar. pH partision (Henderson-Hasselbalch) eşitliği ile absorpsiyon oranı hesaplanabilir.
- b) Filtrasyon:** Konsantrasyon ve basınç farkına göre porlar aracılığıyla geçiştir.

2. Özel Transport

- a) Aktif Transport:** Düşük konsantrasyondan yüksek konsantrasyona geçiştir. Enerjiye (ATP), taşıyıcıya gerek vardır ve yarışma (doygunluk) söz konusudur. Seçicilik vardır. Çünkü her taşıyıcı, membranda her molekülü taşımaz. Aktif transport doyumluğa ulaşana kadar konsantrasyona bağlıdır. Doygunluktan sonra konsantrasyonla ilişkisi kalmaz. 0. derece kinetiğe uyar. Aktif transportla taşınabilmesi için molekülün ağırlığının yaklaşık 325'den büyük olması gerekir.
- b) Kolaylaştırılmış Difüzyon (Transport):** Yüksek konsantrasyondan düşük konsantrasyona taşıyıcılar aracılığıyla geçiştir. Enerji gerektirmez. Aktif taşınma ile benzer yönleri de mevcuttur. Spesifik taşıyıcılar aracılığıyla gerçekleştiği için doyumluk ya da yarışmalı inhibisyon görülür.
- c) Endositoz/Ekzositoz:** Sıvı veya katı maddelerin veziküller aracılığıyla hücre içine alınması ya da hücre dışına atılması olayıdır. Biyomekanik bir olaydır, enerji gerektirir.
- * **Pinositoz:** Sıvı molekül (su, bazı enzim ve hormonlar) pinositik veziküllerle hücre içine alınır ya da hücre dışına atılır.

* **Fagositoz:** Büyük katı moleküller (MA >1000, asbest, uranyum dioksit gibi maddeler) fagositik veziküllerle hücre içine alınır ya da hücre dışına atılır. Makrofajlar, fagositoz yeteneğine sahiptirler.



Şekil 3. Moleküllerin membranı geçmede kullandıkları birtakım yollar.

BİYOTRANSFORMASYON: Ksenobiyotiklerin uygulandıkları andan itibaren vücuttaki enzimler etkisiyle geçirdikleri tüm değişikliklerdir. Metabolik tepkimeler sonucu oluşan ürün ana üründen daha az toksik olabilir, daha az etkin olabilir, daha çok toksik olabilir. Eşit etkinlikte ya da toksik olmayan ürün meydana gelebilir. Daha az toksik, toksik olmayan ürün meydana geliyorsa detoksifikasyon; daha toksik, daha etkin ürün meydana geliyorsa biyoaktivasyon denir.

Vücut dışında etkin olmayan bir molekülün vücut içinde tedavi edici ve/veya toksik açıdan aktif haline dönüşmesi söz konusu olabilir. Böyle moleküllere ön ilaç (prodrug) denir. Son yıllarda gerçek ön ilaç ve taşıyıcılı ön ilaç kavramı geliştirilmiştir. Taşıyıcılı ön ilaç gerçek ön ilaç değildir. Mevcut etkisi taşıyıcı tarafından maskelenmiştir. Vücut içinde taşıyıcı grup kimyasal veya enzimatik yolla ayrılır ve mevcut etkisi açığa çıkar (örn. Tadı kötü bir ilacın tadını maskelemek için taşıyıcı grup kullanılabilir). Gerçek ön ilaçlar vücut dışında aktivitesi olmayan, vücut içinde genelde faz I reaksiyonlarından özellikle oksidasyon reaksiyonunu geçirip bir fonksiyonel grup eklenerek aktivite kazanan moleküllerdir.

Ön İlacın Avantajları

- İlacın stabilitesini artırır
- İlacın absorpsiyonunu artırır.
- İlk geçiş etkisini azaltır.
- Etki süresini uzatır (sürekli etki, depo etki).
- İlacın toksisitesini azaltır.
- Etki yerinde özgül aktivite gösterir.

Metabolizma ana olarak hepatik ve ekstrahepatik olarak ikiye ayrılır. Hepatik metabolizma karaciğerde, ekstrahepatik metabolizma ise akciğer, böbrekler, diş eti, santral sinir sistemi, cilt, ağız mukozası, plasenta, eritrosit, plazma gibi karaciğer dışındaki tüm organlarda gerçekleşmektedir.

Biyotransformasyon ana olarak mikrozomal enzimlerle gerçekleşir, mikrozomal olmayan enzimler (sitozolik enzimler) aracılıklı biyotransformasyon olayla da önemlidir. Başta karaciğer hücreleri (hepatositler) olmak üzere her doku ve organda mikrozomal olan ve olmayan enzimler vardır. Mikrozomlar, hücresel fraksiyonların 100.000 x g üzerinde çöktürülen düz endoplazmik retikulum (SER) kısımlarıdır.

FAZ I REAKSİYONLARI

Biyotransformasyon sonucu ana üründen daha az toksik, daha az etkin, daha çok toksik veya toksik olmayan ürün oluşabilir. Faz I enzimleri, hem endobiyotikleri hem de ksenobiyotikleri metabolize edebilir.

1. Oksidasyon Reaksiyonları: Biyoaktivasyon ve toksikasyon reaksiyonlarında son derece önemlidirler.

1.1. Mikrozomal Enzimler Aracılığıyla Gerçekleşen Oksidasyon Reaksiyonları

a) Karma fonksiyonlu oksidaz (sitokrom P450) enzim sistemi aracılığıyla gerçekleşenler:

- Aromatik halka hidroksilasyonları (ara reaksiyon epoksidasyon)
- Alifatik hidroksilasyon (yan zincir oksidasyonu)
- N-dealkilasyon
- N-oksidasyon

- Sülfoksidasyon
- O-dealkilasyon
- Oksidatif deaminasyon
- Desülfürasyon
- Oksidatif dehalojenasyon

b) Flavın monooksijenaz (FMO) enzim sistemi aracılığıyla gerçekleşenler:

Flavın monooksijenaz enzim sistemi, karma fonksiyonlu oksidaz enzim sisteminin gerçekleştirdiği reaksiyonların hepsini yürütebilir. Karbon oksidasyonu yapamaz, reaksiyonlar sonucunda farklı ürünler meydana gelir.

c) Ko-oksidasyon reaksiyonları: Peroksidazlar aracılığıyla gerçekleşen oksidasyondur. En önemli enzim prostagladin sentetazdır. P450 enzim sistemiyle aynı substratları kullanırlar. Ko-oksidasyon reaksiyonları ekstrahepatik dokuda önemlidir. Ayrıca mieloperoksidazlar ve diğer peroksidazlar da bu grupta sayılabilir.

1.2. Mikrozomal Olmayan (Sitozolik) Enzimler Aracılığıyla Gerçekleşen Oksidasyon Reaksiyonları

- Alkol dehidrogenaz reaksiyonu
- Alifatik dehidrogenaz reaksiyonu
- Mono-amin oksidaz reaksiyonu (MAO)
- Diamin oksidaz reaksiyonu (DAO)
- Ksantin oksidaz reaksiyonu
- Tirozin hidroksilaz reaksiyonu

2. Redüksiyon-Reaksiyonları: Redüktazlar aracılığıyla gerçekleşir.

- Azo grubunun redüksiyonu
- Nitroredüksiyon
- Redüktif dehalojenasyon

3. Kopma Reaksiyonları: Esterazlar aracılığıyla gerçekleşir.

- Hidroliz
- Dekarboksilasyon
- Glikozitlerin hidrolizi

FAZ II REAKSİYONLARI

Konjugasyon reaksiyonları olup transferazlar aracılığıyla gerçekleşirler. Bir ksenobiyotiğin uygun grubu varsa kendisinin veya Faz I reaksiyonu sonucu oluşan ürünün, endojen maddelerle veya başka bir molekülle kovalent bağlarla bağlanması olayına konjugasyon, oluşan ürüne ise konjugat denir. Faz II reaksiyonları genellikle detoksifikasyonla sonuçlansa da biyoaktivasyon görülebilir.

Tablo 1. Faz II reaksiyonları, reaksiyonlarda görev alan enzimler ve etkileşen fonksiyonel gruplar

Reaksiyon Adı	Enzim	Fonksiyonel Gruplar
Glukuronik asitle konjugasyon (Glukuronidasyon)	Üridin difosfoglukuronil/glukozil transferaz	-OH, -SH, -COOH, -NH ₂ , -C-C
Glukozidasyon		
Sülfatasyon	Sülfon transferaz	-OH, -NH ₂
Asetilasyon (N-asetilasyon yaygındır)	Asetil transferaz	-NH ₂ , -SO ₂ NH ₂
Metilasyon (O- ve N-metilasyon olabilir)	Metil transferaz	-NH ₂ , -SH, -OH
Amino asitlerle konjugasyon	Konjugaz	Epoksit, Organik halojen, -(=), - NO ₂ (Elektrofilik gruplar)
Glutatyon (GSH) konjugasyonu	Glutatyon S-transferaz	

En çok görülen Faz II reaksiyonu glukuronidasyondur. Bunu glutatyon konjugasyonu izler. Bu iki konjugasyon reaksiyonu, yabancı maddelere karşı organizmayı korur.

FAZ III REAKSİYONLARI

Glutatyon konjugatlarının ileri metabolizmasıdır. Ester bağlarını parçalayan dipeptidazlar aracılığıyla gerçekleşirler. Toksikasyon ve/veya detoksifikasyon görülebilir. Genellikle ekstrahepatik dokuda meydana gelir.

ELİMİNASYON: Etkili olan ksenobiyotik veya metabolitin plazmadan safra ya da idrara geçmesi olayıdır.

İlk Geçişte Eliminasyon: Hepatik ve enterosit (ekstrahepatik) ilk geçişte eliminasyon vardır.

- Hepatik İlk Geçişte Eliminasyon (Presistemik Eliminasyon): Oral yol ile vücuda alınan ksenobiyotiklerin bağırsaktan (intestin) absorbe olup vena porta ile karaciğere ulaştıklarında büyük oranda detoksifiye edilmelerine **ilk geçişte eliminasyon** denir. Bunun sonucunda sistemik dolaşıma daha az oranda aktif madde veya metaboliti ulaşacak ve beklenen etki gözlenmeyecektir.
- Enterisit Dokuda İlk Geçişte Eliminasyon: Bağırsaktan ilk geçişte eliminasyon önemli bir olaydır. Ksenobiyotik intestinal kanalda iken enzimler aracılığıyla detoksifiye olarak vena portaya geçer ve dolayısıyla karaciğere ulaşmadan elimine olur. Bu olay enterositlerde (bağırsak yüzeyel hücreleri) gerçekleştiğinden enterosit ilk geçişte eliminasyonu denir.

İTRAH

1. Böbreklerden itrah :

- a) Glomerüler Filtrasyon: Glomerüllerden porlar aracılığıyla süzülmedir. Glomerüler filtrasyon hızı normalde (GFH, GFR) her iki böbrekte bir dakikada oluşan glomerüler filtrat miktarına denir ve sağlıklı yetişkinde 125 mg/dk kreatin klerensi olarak ifade edilir. Bir pasif difüzyon olayıdır.
- b) Tübüler Salgılanma: Böbrek epitelinden tübüle salgılanmadır. Aktif transportla gerçekleşir.

İtrah mekanizması olmayan fakat itrahı etkileyen bir olay da **tübüler reabsorpsiyon (geri emilim) 'dur**. Tübüler reabsorpsiyon, ilaç veya metabolitinin genellikle pasif difüzyon yoluyla tübül lümeninden kapiller kan dolaşımına geçmesidir.

2. Akciğerden itrah : Kandaki gazlar ve uçucu maddeler pasif difüzyonla alveole difüze olurlar. Alveol boşluğundan ekspirasyonla (soluma) dışarı atılırlar.

3. Safra Yoluyla itrah : İlaçlar ve metabolitleri (özellikle konjugasyon ürünleri) karaciğer hücreleri tarafından safra kanalları içine aktif transportla salgılanır, buradan ince bağırsağa ulaşır ve daha sonra da feçesle dışarı atılır. Ancak safra içinde bağırsağa gelen ilaç, konjugazlarla hidroliz olduktan sonra tekrar absorbe edilip portal ven ile karaciğere dönebilir ve bu döngü ksenobiyotik tamamen vücuttan uzaklaşmaya kadar devam eder. Buna **enterohepatik döngü** denir.

4. Tükürük, ter, süt ve gözyaşı da ikincil atılım yollarıdır.

BIYOLOJİK ÖRNEKLERDE TOKSİKOLOJİK AÇIDAN ÖNEMLİ BAZI KSENOBİYOTİKLERİN SAPTANMASI

Bir ksenobiyotiğe maruziyet ile oluşan zehirlenmelerde nitel ya da nicel analizler yapılması zehirlenme nedenini saptamak için gerekmektedir. Dolayısıyla, bu aşamada hastadan alınacak biyolojik örneğin tipi, analiz öncesi örneğe uygulanacak işlemler, uygun analiz yönteminin seçilmesi ve uygulanması gibi bir dizi işlem uygulanmaktadır ve bu tedavide doğru yaklaşımın sağlanması için gereklidir. Şimdi sırası ile bu işlemler incelenecektir.

Örnek Seçimi ve Analizi

Toksikolojik analizlerde örnek seçimi çok önemlidir. Genellikle zehirler organizmada homojen dağılmazlar. Kimyasal yapı ve metabolizmalarına bağlı olarak belli yerlerde toplanırlar, örneğin kurşun (Pb) kemiklerde, arsenik (As) saç ve tırnakta birikmektedir. Etil alkol gibi bazı maddeler ise tüm vücut sıvılarında eşit dağılım gösterir. Doğru örnek seçimi için, aranılan toksik maddenin fiziksel ve kimyasal özelliklerini, absorpsiyon, dağılım, metabolizma ve itrah mekanizmalarını çok iyi bilmek gerekir. Zira bazen toksik maddeyi değil metabolitini aramak gerekebilir.

Aranacak zehir hakkında bilgi yoksa analiz için farklı biyolojik materyallerden yeterli miktarda örnek almak gerekir. Zehirlenme olaylarında hasta yaşıyorsa örnek olarak en çok kan, idrar, mide içeriği veya mide yıkama suyu alınır. Tükrük, feçes, safra, gözyaşı, saç, tırnak, beyin omurilik sıvısı (BOS), anne sütü ve ekshale (dışa verilen) hava örneği analizlerde kullanılmak üzere alınan diğer biyolojik örnekler olarak sayılabilir. Ölümle sonuçlanan olaylarda otopsi yapılmakta ve bu durumda çeşitli organlardan da örnek alınabilmektedir. Bunun dışında zehirlenmenin meydana geldiği yerdeki şüpheli her şeyden yararlanılır. Örneğin yemek kabı, su bardağı, ortam havası (mesleki zehirlenmelerde) gibi.

KAN

Kan örneği alma non-invaziv (girişimsel olmayan, hastaya fiziksel zarar verme potansiyeli düşük olan) bir yöntem olduğundan sıklıkla tercih edilmekte olup kan en çok alınan biyolojik örneklerden biridir. Homojen görünümlü, kırmızı, viskoz bir sıvıdır.

Örnek olarak alındığında üzerine pıhtılaşmayı (koagülasyonu) önleyici bir madde (antikoagülan) eklenirse pıhtılaşmaz, sıvı halde kalır. Bu yolla pıhtılaşması önlenmiş kan

santrifüj edildiğinde kan hücreleri ayrılır, geride kalan sarımtırak sıvıya plazma denir.

Plazma = Serum + Fibrinojen

Antikoagülan eklenmeden bekletilen kandan aynılan kısma ise serum denir. Plazmadan farkı serumun fibrinojen içermemesidir.

Kan Bileşenleri	≈ g/litre
Sodyum	3,2-3,4
Potasyum	0,15-0,21
Kalsiyum	0,09-0,11
Magnezyum	0,012-0,036
Klorür	3,5-3,8
Protein	70

Kan Proteinleri	≈ g/100m³
Albümin	4,6
Globülin	2,6
Fibrinojen	0,38
Antikorlar	1,5

İDRAR

Tüm biyolojik örnekler içerisinde alınması en kolay örnek idrardır. Çok miktarlarda alınabilir. İlaç ve ksenobiyotiklerin metabolitlerinin en önemli kaynağı olması nedeniyle metabolizma çalışmalarında özellikle tercih edilmektedir. Kan örneğine göre protein içeriği çok daha azdır. İdrar pH'si 4.0-8.0 arası geniş bir aralığa sahip olması nedeniyle analize başlamadan önce daima pH'sı kontrol edilmelidir.

FEÇES

Özellikle enterohepatik döngüye giren, safra içine itrah edilen ilaçlar serbest ya da metabolitleri halinde feçesle atılır. Bu tip maddelerin analizi için feçes örnek olarak alınabilir. Ayrıca kinetik, biyoyararlanım ve özellikle metabolizma çalışmalarında tercih edilen

biyolojik materyallerden biridir. Genellikle aliminyum kağıt içine alınır. Protein içeriği çok fazladır. Analiz edilecek maddeyle protein etkileşimi göz önünde bulundurulmalıdır.

Uygun biyolojik örnek (kan, idrar, feçes, vd.) seçilerek alındıktan sonra, uygun bir örnek tüpüne/kabına konulmalıdır. Örnek tüpü/kabı iyi cins cam veya özellikleri belirlenmiş iyi cins plastik olmalı, steril olmalı ya da kimyasal yolla önceden iyi temizlenmelidir. Örnek kabının üzerine etiket yapıştırılmalıdır. Örnek kabı kullanılıyorsa ağzı sıkıca kapatılmalı ve vakit kaybetmeden mümkün olduğunca çabuk analize gönderilmelidir .

Bu etikette:

.....

- Örneğin alındığı tarih, saat,
- Örnek cinsi,
- Kime ait olduğu,
- Örneği alan kişinin adı ve imzası bulunmalıdır.

Örnek kabı sıkıca kapatılır ve mümkün olduğunca çabuk analize gönderilir.

Analize Başlamadan Önce Yapılacak İşlemler:

1. Ambalajı açmadan önce örneğin büyüklüğü, şekli incelenir,
2. Ambalaj üzerindeki etiket okunur.
3. Adli bir olgu ise mührünün olup olmadığı incelenir,
4. Örneğin net ağırlığı belirlenir,
5. Örnek açılır, temiz, kuru, uygun bir kap içerisinde karıştırılır,
6. 1/3'ü gerektiğinde incelenmek üzere saklanır,
7. Geriye kalan örnek zehirlenmeye neden olan toksik etken hakkında kesin bir bilgi yoksa, ileri analizler için 6 eşit bölüme ayrılır, bu kısımlar;
 - i. Ön deneyler yapılması
 - ii. Uçucu bileşiklerin aranması
 - iii. Uçucu olmayan bileşiklerin aranması
 - iv. Metalik zehirlerin aranması
 - v. Özel nitelikteki zehirlerin aranması
 - vi. Nicel tayin yapılması için saklanır.

Eğer zehirlenme nedeni biliniyorsa doğrudan ilgili analize geçilir.

Biyolojik Örneğin Saklama Koşulları

Biyolojik örnek, seçilen örneğin cinsi ve özellikleri ile yapılacak analize bağlı olarak uygun sıcaklıkta saklanır (derin dondurucu, buzdolabı veya oda sıcaklığı).

Kontaminasyonu önlemek amacıyla biyolojik örneklerin içerisine alınıp saklandığı kabın ve kapağının uygun materyalden yapılmış olması gereklidir.

Örnek olarak kan örneği alınmışsa, örnekler alınırken kullanılan malzemelerin steril olmasına dikkat edilmelidir. Analizin gerçekleştirilebilmesi ve güvenilirliği açısından ise doğru antikoagülan seçimi yapılmalıdır. Heparin, sitrat, oksalat ve etilendiamintetraasetik asit (EDTA) sıklıkla kullanılan antikoagülanlardır. Hangisinin kullanılacağı, analiz ile etkileşimi dikkate alınarak belirlenir. Analizi yapılacak ilaçlar plazma esterazlarına duyarlı ise sodyum florür (NaF) gibi bir esteraz inhibitörü ilaç dekompozisyonunu önlemek için eklenmelidir.

Plazma ya da serum kullanılacaksa, taze tam kan hemen santrifüj edilip üst faz (süpernatant) uygun, temiz bir tüpe alınarak analize kadar uygun sıcaklıkta saklanır. Santrifüj süresi, hızı (devir/dk) ve sıcaklığı analizi yapılan maddeye bağlı olarak değişir. Ayrıca plazma veya serum örneğinin hangi sıcaklıkta (4°C, -20°C, -80°C) saklanacağı da içerisinde mevcut analizi yapılacak maddenin özelliğine göre belirlenir.

Ayrıca, aynı örneği birkaç kez çözüp dondurma işlemi, aranacak maddenin yapısını ve dayanıklılığını etkileyebileceğinden bu işlemden kaçınılmalıdır. Dolayısıyla örneklerin yeterli miktarlara bölünerek saklanması daha uygun olacaktır.

Protein Çöktürme ve Denatürasyon

Plazma, feçes, tükürük gibi biyolojik örnekler, ilaçları bağlama özelliği olan önemli miktarda protein içerirler. Dolayısı ile ksenobiyotikler (ilaçlar, kozmetikler, insektisitler, endüstriyel kimyasal maddeler, vd) daha ileri analizlere geçmeden önce bağlı olabilecekleri proteinlerden ayrılmalıdır. Bu amaçla uygulanabilecek çeşitli yöntemler mevcut olmakla birlikte analizi yapacak kişi, analiz edeceği ksenobiyotik hakkındaki detaylı bilgilerden yararlanarak (maddenin dayanıklılığı ve uygulanan işlem sonrası maddenin geri kazanımı gibi) kendisi için en uygun yöntemi seçmelidir. En sık kullanılan yöntemler:

1. Kuvvetli asit eklenmesi: Bu amaçla en çok trikloroasetik asit (TCA), perklorik asit (HClO₄) ya da 80°C’de 5 M HCl kullanılır.

2. Organik çözücüler ile çöktürme: Bu amaçla en sık kullanılan iki çözücü etanol ve asetonur. Bu çözücülerin, proteinlerin bulunduğu sulu çözeltiye eklenmeleri sonucu, suyun

hidrofilik protein moleküllerini çözme gücü azalacak, dolayısı ile proteinlerin agregasyonu ve takiben çökmeleri (presipitasyon) sağlanacaktır.

3. Tuzla çöktürme (Salting-out tekniği): Bu teknik esas olarak proteinin hidrofobik karakterine dayanır. Eklenen tuz iyonları suda çözünürken, ortamdaki protein moleküllerinin çözünürlüğü azalır. Bu azalma protein yapısındaki hidrofobik bölgeleri korunmasız hale getirir. Bu bölgeler birbirleri ile etkileşerek çöken agregatlar oluşturur.

4. Seçici denatürasyon: Ölçümü yapılacak proteinik yapıdaki enzim denatüre edilmeksizin, istenmeyen diğer proteinlerin denatüre edilmesidir. Bu amaçla sıklıkla aşırı ısı ya da pH uygulaması kullanılır. Örneğin bazı enzimler 55-60 °C gibi sıcaklıklarda fonksiyonel yapı ve/veya aktivitelerini kaybeder. Ancak belli bir süre oda sıcaklığı ya da buzdolabında bekletilmeleri orijinal aktivitenin geri kazanılmasını sağlayabilir. Oysa diğer enzimler aktivitelerini geri dönüşümsüz olarak kaybetmişlerdir. pH ile denatürasyon yönteminde ise çözelti (örnek) pH'si nispeten istenmeyen bir değere (pH 2-3 ya da 9-10 gibi) ayarlanır ve enzim çözeltisi bu pH'da belirli bir süre bekletilir. Daha sonra pH yeniden optimum aralığa getirilir ve analize geçilir.

Ksenobiyotik analizleri öncesi proteinlerin çöktürülmesi ve denatürasyonu amacıyla yaygın olarak uygulanan işlemler ya da kullanılan kimyasal maddeler Tablo 2'de özetlenmiştir.

Tablo 2. Protein çöktürme ya da denatürasyonu için uygulanan işlemler ve kullanılan kimyasal maddeler

Yöntem	Açıklama
90°C'de 5-15 dk. ısıtma	Pek etkin değildir, analiz edilecek materyalin yapısını bozabilir.
Tekrarlanan dondurma-çözme	Pek etkin değildir, zaman kaybına yol açar.
Amonyum sülfat (NH ₄) ₂ SO ₄ ile doyurma	Orta derecede etkilidir, süpernatanda tuz konsantrasyonu çok yüksek olur. Sonuçta pH yaklaşık 7,0'dir
Çinko sülfat (ZnSO ₄)/Sodyum dihidroksit (NaOH)	Mükemmel etkinlik gösterir. Çökeleğin son pH'si 7,0 civarındadır. Düşük ısılar için uygundur.
Meta fosforik asit (H ₃ PO ₄)	Mükemmel etkinlik gösterir. Asidite (pH3) analiz edilecek maddeyi de dekompoze edilebilir.
Perklorik asit (HClO ₄)	Mükemmel etkinlik gösterir. Patlama tehlikesi vardır. pH 3'den düşüktür. Dolayısı ile analiz edilecek maddeye zararı olabilir.

Trikloroasetik asit (TCA)	İyi etkinlik gösterir. Analiz edilecek maddeden uzaklaştırılması güç olabilir.
Etanol (EtOH, C ₂ H ₅ OH)	Tam bir denatürasyon için 2 hacim etanole gerek vardır. İlaç düşük pH'larda dayanıklı değilse uygundur.
Asetonitril (ACN, C ₂ H ₃ N)	Tam bir denatürasyon için 1,5 hacim asetonitril gereklidir.

Toksik Maddenin Biyolojik Örnekten Ayrılması ve Saflaştırılması

Nitel ve/veya nicel analizlere geçmeden önce ksenobiyotiklerin ve/veya metabolitlerinin biyolojik örnekten ayrılması (yalınlaştırılması) ve saflaştırılması gereklidir. Uygun pH koşullarında ekstraksiyon, uygun afinite kolonları ve santrifüjle ayırım gibi çeşitli ön işlemler uygulanabilir. Böylece analizlerde seçicilik ve hassasiyet sağlanabilir. Analiz esnasında biyolojik örnek içindeki diğer bileşenlerden kaynaklanabilecek girişimler de en aza indirilmiş olur.

Aşağıda toksikolojik analizler öncesinde kullanılan ayırma yöntemleri ve kullanılan yönteme göre zehirlerin sınıflandırılması yer almaktadır:

Zehirlerin İzolasyon Yöntemlerine Göre Sınıflandırılması:

1. Uçucu Zehirler:

Biyolojik materyalden distilasyon ve difüzyon yolu ile ayrılırlar.

Örnek olarak CO, etil alkol, siyanür verilebilir.

2. Uçucu Olmayan Zehirler:

Biyolojik materyalden sıvı ekstraksiyon yöntemi ile izole edilirler.

Örnek olarak barbitüratlar, alkaloidler verilebilir.

3. Metalik Zehirler:

Biyolojik materyalden kuru ya da yağ yıkılama işlemi ile ayrılırlar.

Örnek olarak kurşun, antimon, civa verilebilir.

4. Toksik Anyonlar:

Diyaliz ya da iyon değiştirme yöntemleri ile biyolojik ortamdan izole edilirler.

Örnek olarak klorat, fosfat verilebilir.

5. Özel Olarak Aranması Gereken Zehirler:

Örnek olarak insektisitler verilebilir.

EKSTRAKSİYON

Katı bir karışımdaki bir bileşenin uygun bir çözelti ile ayrılması ya da bir maddenin bir sıvı fazdan bununla karışmayan diğer bir sıvı faza aktarılması olayına ekstraksiyon denir. Katı karışımdan bileşenlerin uygun çözücü ile alınmasına katı-sıvı ekstraksiyonu, maddenin bir sıvı fazdan diğer bir sıvı faza alınmasına ise sıvı-sıvı ekstraksiyonu denir.

Sıvı-sıvı ekstraksiyonu biyolojik örnekte ileri analizler öncesi en yaygın olarak uygulanan tekniktir. Yöntemin esası **Nernst Kanunu**'na dayanmaktadır. Bu kanuna göre;

1. Birbiriyle karışmayan iki faza dağılmış bir maddenin her iki fazdaki konsantrasyonlarının birbirine oranı belli sıcaklık, pH ve basınçta sahip olup, çözünmüş maddenin konsantrasyonundan bağımsızdır.
2. Çok sayıda maddenin bir arada bulunması, her iki maddenin dağılma durumunu etkilemez ve her bir maddenin dağılma dengesi, **partisyon (dağılma) katsayısı**, ile ifade edilebilir.

$$K = \frac{C_2 \text{ (organik faz)}}{C_1 \text{ (sulu faz)}}$$

K: Partisyon katsayısı

C1: Maddenin içinde bulunduğu biyolojik örnekteki konsantrasyonu (biyolojik örnek genellikle sulu fazdır.)

C2: Maddenin geçilmek istendiği 2.faz (organik faz) içindeki konsantrasyonu

Partisyon katsayısını, dolayısı ile ekstraksiyonun verimini etkileyen etmenler:

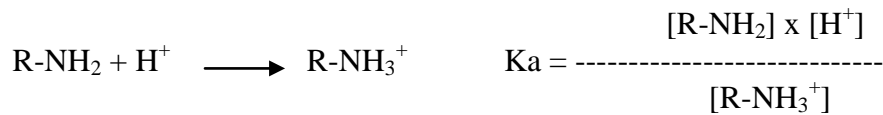
- Çözücü Seçimi
- pH
- Sulu fazın iyonik gerilimi

Çözücü seçiminde önemli olan kriterler:

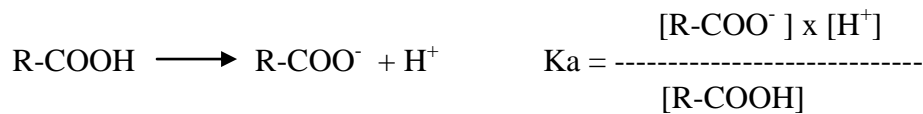
- ✓ Analiz edilecek ilaç, seçilecek çözücünde, içinde bulunduğu biyolojik örnekten daha fazla çözünmeli ve ilacın bu çözücündeki çözünürlüğü yüksek olmalıdır.
- ✓ Seçilen çözücü biyolojik örnek (sulu faz) ile karışmamalıdır.
- ✓ Gerekğinde kolayca uçurulabilmesi için nispeten düşük kaynama noktasına sahip olmalıdır.
- ✓ Ekstraksiyon sonrası yapılacak olan kristalizasyon, distilasyon gibi işlemlere uygun olmalıdır.
- ✓ Bunların ötesinde maliyeti ve toksisitesi düşük, alev almayan bir çözücü olması tercih sebebidir.

pH'nın kontrolü de başarılı bir ekstraksiyon için dikkate alınması gereken önemli bir etmendir. Çünkü çoğu ilaç kimyasal olarak zayıf asit ya da zayıf baz grubunda yer alır. Dolayısı ile güçlü bir asit ya da baz ile kolaylıkla tuzlarına dönüşebilir; bu halde de polaritesi yüksek olan su gibi çözücülerdeki çözünürlüğü artarken nonpolar çözücülerdeki (dietil eter gibi) çözünürlüğü azalır. Biyolojik örnekte yapılacak uygun bir pH ayarlaması ise iyonize haldeki ilacın non-iyonize forma geçmesini, dolayısı ile nonpolar çözücülerde daha iyi çözünmesini sağlayacak, böylece sulu faz (biyolojik örnek)'dan uzaklaştırılmasını kolaylaştıracaktır. Bu nedenle bilinen ilaç ya da metabolitin ekstraksiyonunun verimini arttırabilmek için uygun pH, Henderson-Hasselbach eşitliği yardımı ile hesaplanabilir.

Amin türevi bazik bir ilacın iyonizasyonu:



Karboksil grubu taşıyan bir asidin iyonizasyonu ise:



şeklinde formüle edilebilir. Zayıf asit ve bazların sulu bir ortamda iyonize olma oranları,

ortamın pH'sı ve ilacın pKa değeri ile ilişkilidir. Bu iki değer ile ilacın iyonize olma oranı arasındaki ilişkiyi Henderson-Hasselbach eşitliğinde görüyoruz. Eşitliğe göre:

$$\text{Asitler için:} \quad \text{Log} \frac{[\text{ni}] \text{ (iyonize olmamış ilaç)}}{[\text{i}] \text{ (iyonize ilaç)}} = \text{pKa} - \text{pH}$$

$$\text{Bazlar için} \quad \text{Log} \frac{[\text{ni}]}{[\text{i}]} = \text{pH} - \text{pKa}$$

$$\text{pH} = -\log \text{H}^+$$

$$\text{pKa} = -\log \text{Ka}$$

pKa: İlaç moleküllerinin %50'sinin iyonize, %50'sinin ise noniyonize olduğu durumdaki pH değerine eşittir. pH değeri 0-14 arasındadır. Güçlü asitlerde 0'a, güçlü bazlarda ise 14'e yakındır.

Örnek: İnsan idrar örneği içinde bulunan ve pKa değeri 9.8 olan amfetamini (baz özelliğinde ilaç) sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile organik bir çözücü içine almak istediğimizde verimimiz ne olur? (idrar pH'sı 6.0)

$$6 - 9,8 = \log \frac{[\text{ni}]}{[\text{i}]}$$

$$-3,8 = \log \frac{[\text{ni}]}{[\text{i}]}$$

$$\frac{[\text{ni}]}{[\text{i}]} = \frac{1}{6420}$$

Dolayısı ile idrar içinde amfetaminin 1 kısmı noniyonize halde iken 6420 kısmı iyonize haldedir. Bu durumda organik bir çözücü içinde çözünecek kısmı ancak %0.016'dır. Dolayısı ile idrarın pH'sı ilacın büyük kısmı noniyonize formda olacak şekilde ayarlanmalıdır. Genel kural, bazik ilacı pKa değerinin 2-3 ünite üzerinde bir pH değerinde ekstre etmek yönündedir. Asidik ilaçlar için ise ortam pH'sı, pKa değerinin 2-3 ünite altında bir pH değerine ayarlanır. Bu şekilde ilacın en az %99,9'luk kısmı non-iyonize formda olacaktır ve ekstraksiyon verimi yükselecektir.

Ortam pH'sını 13 yaptığımızı düşünelim:

$$13 - 9,8 = \log \frac{[ni]}{[i]}$$

$$3,2 = \log \frac{[ni]}{[i]}$$

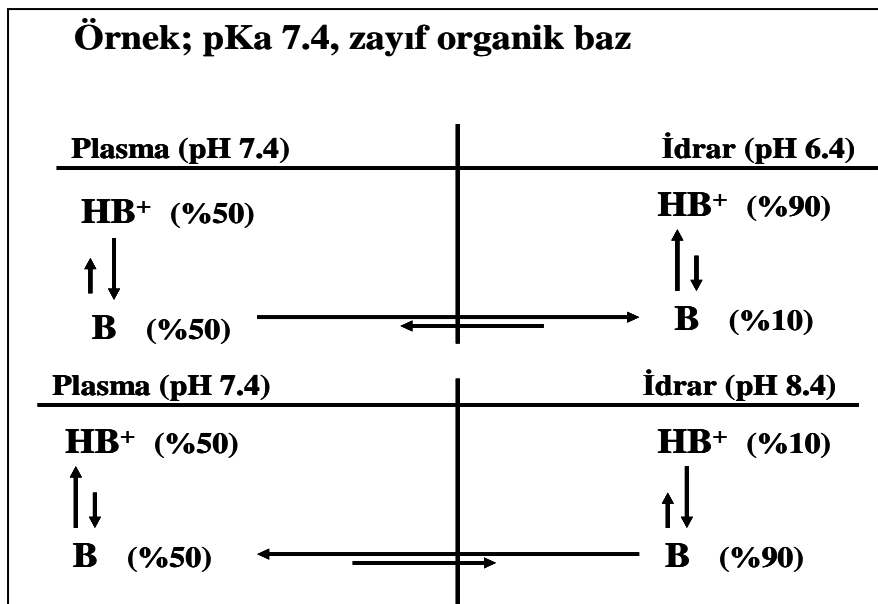
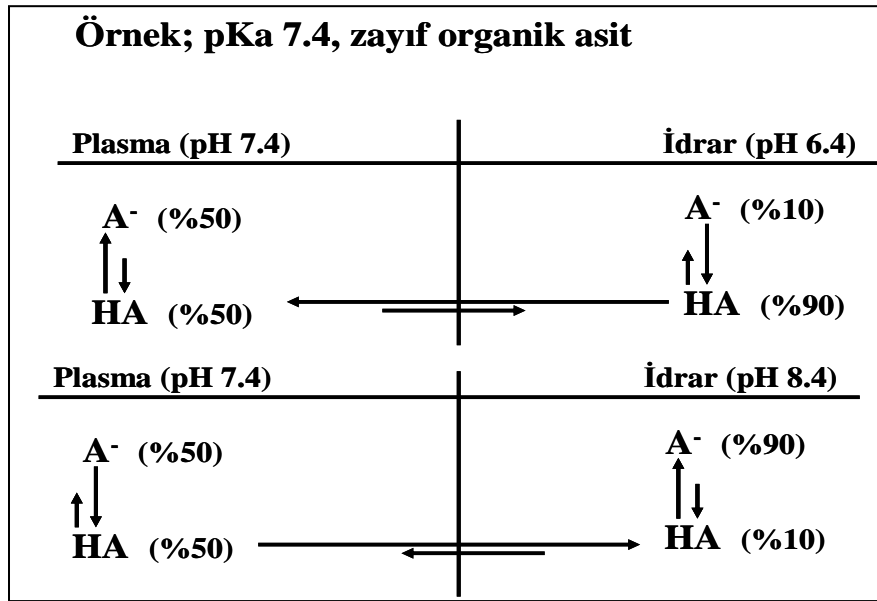
$$\frac{[ni]}{[i]} = \frac{1}{63 \times 10^{-5}}$$

Bu halde ilacın %99.87'si noniyonize formda olacak ve idrar gibi sulu fazdan kolaylıkla, çok daha iyi çözüldüğü organik faza geçecektir.

İlaçların vücutta absorpsiyon ve dağılımın dayandığı temel ilke ve aynı zamanda ayırma hunisinde gerçekleştirilen ekstraksiyon işleminin temel prensibi, kszenobiyotiklerin/ilaçların noniyonize halde iken lipidlerde/organik çözücülerde daha kolay çözünebilmesi; iyonize halde iken lipidlerdeki çözünürlüklerinin azalmasıdır. Hücre membranları lipidçe zengindir. Dolayısı ile ilaçların membrandan pasif difüzyonunda absorpsiyonun derecesi ve hızı açısından ilacın yağda çözünme eğilimi yani lipofilikliği önemli bir belirleyicidir. İyonize olan ilaç molekülleri lipidlerde iyi çözünmez, dolayısı ile absorbe edilemez veya güç absorbe edilir. Yukarıdaki prensibi tekrar şöyle yazabiliriz: Ortamın asiditesinin arttığı yani pH'sının azaldığı hallerde zayıf asit yapılı moleklüllerin iyonize olmayan kısımlarının oranı fazlalaşır. Bu nedenle absorpsiyonları kolaylaşır. Buna karşın ortamın asitleşmesi zayıf baz niteliği gösteren ilaçların iyonize olmamış kısımlarının oranını azaltır, dolayısı ile absorpsiyon hızlarını düşürür. İlaçların itrahını etkileyen olaylardan tübüler reabsorpsiyon da pasif difüzyon mekanizması ile işleyen bir olaydır. Böbrekte tübülüsler etrafındaki kapiller ağına gelen kanın içindeki ilaç konsantrasyonu, tübülüs lümeni içinde bulunan filtrattakine oranla çoğu kez daha düşüktür; çünkü kan glomerüllerden geçerken ilaç moleküllerinin büyük bir bölümü glomerüler filtrata aklarılır. Bu konsantrasyon farkı, lümeniden peritübüler kapillere doğru pasif difüzyonu yani reabsorpsiyonu sağlar. Filtratın yani idrarın asitleştirilmesi, zayıf asit yapılı bir ilacın büyük oranda iyonize olmamış halde bulunmasına neden olacak, tübülüslerden reabsorpsiyonu artıracak ve sonuçta itrahını azaltacaktır. Buna karşılık filtratın bazikleştirilmesi, asidik maddenin iyonize olmasına, reabsorpsiyonunun azalmasına, itrahın ise artmasına neden olur.

Öte yandan bazik yapılı ilaçların reabsorbsiyonu idrar asitleştirilince azalır ve bazikleştirilince artar.

Bu ilkedен hareketle pKa değеrleri 7.4 olan zayıf bir organik asit ile zayıf organik bazın plazma idrar arasındaki dağılımlarına, idrarın pH'sını değıştirmek suretiyle ilacın bu dağılımında meydana gelebilecek farklılıklar bir örnek ile incelenecek olursa:



Aşağıdaki tabloda çeşitli vücut sıvılarının pH değerleri verilmiştir.

<u>Vücut sıvısı</u>	<u>pH</u>
Mide sıvısı	1.0-3.0
İnce bağırsak (duodenum)	5.0-6.0
İnce bağırsak (ileum)	8.0
Kalın bağırsak	8.0
Plazma	7.4
Serebrospinal sıvı	7.3
İdrar	4.0-8.0

Ekstraksiyonu etkileyen üçüncü etmen, iyonik gerilimdir. Sulu bir faza, suda çözünürlüğü yüksek, NaCl gibi, iyonize bir tuz eklediğimizde su molekülleri ile çözelti içindeki inorganik iyonlar arasında yüksek miktarda etkileşme gözlenir. Noniyonize ilaç ile etkileşebilecek serbest su moleküllerinin sayısı azalmıştır. Dolayısı ile ilacın sulu fazdaki çözünürlüğü azalır ve böylece dağılımı nonpolar faz ya da organik fazın lehine artar. Ekstraksiyonda, sulu faz içerisine inorganik tuz katım tekniğine "**tuz ile uzaklaştırma**" (**salting out**) denir.

Ekstraksiyonda kuvvetli çalkalama sonucu her iki fazın birbiri içinde çözünmeksizin dağılması ile emülsiyon oluşur. Aşağıdaki işlemlerden biri uygulanarak emülsiyon giderilebilir:

1. Santrifüj uygulanır.
2. Fazlara tuz eklenir.
3. Karışıma 1-2 damla alkol eklenir.

KROMATOGRAFI

Kromatografi, Yunanca chroma (renk) ve graphein (yazmak) sözcüklerinin birleşmesiyle oluşmuş olup, ilk kez 1903 yılında Rus botanikçi Michael Tsvett tarafından renkli bitki pigmentlerini ayırma amaçlı kullanılmıştır. Kromatografi, bir karışımdaki bileşenlerin hareketli faz etkisiyle bir sabit faz üzerindeki farklı hızda hareket etmeleri sonucu birbirlerinden ayrılmalari işlemidir. Bu fazlardan biri hareketli (mobil) diğeri ise sabit (stasyoner) fazdır. Hareketli faz kromatografik bir sistem boyunca hareket eden fazdır. Sabit faz kromatografik bir sistemde sabit pozisyonda kalan, ayrımı sağlayan materyaldir. Destek ise kromatografik bir sistemde sabit fazı tutan maddedir.

Sabit faz, sıvı ya da katı, hareketli faz ise gaz ya da sıvı olabilir. Bir bileşenin kromatografik sistemde sürüklenme hızı dağılım dengesinin bir fonksiyonudur. Dağılım dengesi farklarından farklı sürüklenme hızları oluşmaktadır. Bunun sonucunda karışımdaki bileşenler birbirinden ayrılmaktadır.

Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması

Kromatografik yöntemler dayandıkları ilkelere göre, uygulama biçimine göre ve mobil fazın cinsine göre farklı şekillerde sınıflandırılmaktadır.

Dayandığı ilkeye göre 6 çeşit kromatografi tipi bulunmaktadır.

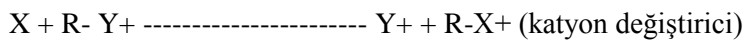
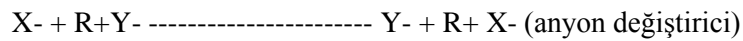
- a. Adsorpsiyon kromatografisi (sıvı-katı) (gaz-katı)
- b. Partisyon kromatografisi (sıvı-sıvı) (gaz-sıvı)
- c. İyon değıştirme kromatografisi
- d. Jel filtrasyon kromatografisi
- e. İyon çifti kromatografisi
- f. Afinite kromatografisi

a. Adsorpsiyon kromatografisi: Katı veya sıvı moleküllerin, sıvı veya gaz moleküllerini çekim kuvvetleri yardımıyla yüzeyde tutmasına adsorbsiyon denir. Burada sözü edilen adsorbsiyon fiziksel adsorbsiyondur. Zayıf Van der Waals, elektrostatik çekimler ve dipol-dipol etkileşimlerine dayanır, tersinirdir. Bu kromatografi mekanizmasında sabit faz aktif yüzeyli bir katıdır. Katılar yüzey enerjilerini azaltmak amacıyla çevrelerindeki maddeleri

kendilerine doğru çekerler ve bunları yüzeylerinde tutarlar. Bu tür kromatografide karışımın bileşenlerine ayrılması, sabit katı fazın tutucu kuvvetiyle, hareketli fazın itici kuvveti arasındaki yarışa bağlıdır. Sabit faz yüzeyine az tutunan bileşen, hareketli fazla daha çok etkileşeceğinden kolonu daha önce terk edecektir. Diğer yandan sabit faz ile çok etkileşen bir bileşen ise katı yüzeyine daha kuvvetlice tutunarak hareketli faz tarafından daha az sürüklenecek ve kolonu daha geç terk edecektir. Şeker, nişasta, selüloz, kalsiyum karbonat, magnezyum sülfat, alümina, silika jel ve kil gibi birçok madde adsorban katı faz olarak kullanılabilir. Hareketli faz olarak ise alkol, aseton, kloroform gibi bütün organik çözücüler kullanılabilir. Sabit ve hareketli fazın seçimi, ayrımı yapılacak bileşiklerin polaritesine kimyasal özelliklerine bağlı olarak yapılır. Genelde polar maddeler için polar çözücüler apolar maddeler için apolar çözücüler kullanılır.

b. Partisyon kromatografisi: Dağılım, bir karışımdaki maddelerin birden fazla çözücü içerisindeki çözünürlükleri oranında dağılmasıdır. Her madde, fiziksel ve kimyasal özelliklerine, yapısında bulundurduğu fonksiyonel gruplara göre farklı çözünürlüğe sahiptir (Bknz. Nernst Kanunu). Bu yöntemde, sabit sıvı faz, yüksek yüzey alanlı gözenekli bir katı destek maddesine emdirilmiştir. Hareketli faz ise sıvı veya gazdır. Ayrımı gerçekleştirilecek bileşikler hareketli ve sabit faz sıvılarında farklı çözünürler. Çözünürlük farkından dolayı bileşikler sistemi önce veya sonra terk ederler. Bu mekanizmanın etkin olduğu kromatografik yöntemlerde; sabit faz genellikle hidrofilitik, hareketli faz ise hidrofobiktir.

c. İyon değiştirme kromatografisi: Benzer yüklü iyonların tersinir şekilde yer değiştirmesine iyon değişimi denir. İyon değişimi; sabit fazın yüzeyinde kimyasal bağlarla bağlanmış yüklü grupların hareketli faz ile sürüklenen karışımda bulunan ve kendileriyle benzer yüke sahip gruplarla yer değiştirmesi üzerine kurulmuş bir mekanizmadır. Bu yer değiştirme istendiği anda geri döndürülebilmektedir. Böylece değiştirilebilir iyon taşıyan maddelerin (asitler, antibiyotikler, aminoasitler, alkaloidler vb.) ayrılması sağlanmış olmaktadır. Şehir sularının temizlenmesi ve yumuşatılmasında bu yöntem kullanılmaktadır. Yöntemin esası şöyle özetlenebilir:



X = Örnek iyonu; R= Değiştiricideki iyonik bölgeler; Y = Hareketli faz iyonu

d. Jel filtrasyonu: Jel filtrasyon mekanizması ile karışımdaki bileşenler büyüklük farkına dayanarak ayrılırlar. Herhangi bir karışım gözenekli bir jel içerisine döküldüğünde, karışım içindeki küçük moleküller gözeneklere tutunurken büyük moleküller jelden akarak geçerler. Böylece özellikle kromatografik saflaştırma sırasında bozunabilecek biyolojik bazı karışımlar

(protein, enzim, vb.) bu mekanizmanın etkin olduğu jel geçirgenlik kromatografisi ile ayrılabilir.

e. İyon ifti kromatografisi: Bu teknik, özellikle iyonlaşabilen asidik veya bazik maddelerin ayrılmasında kullanılır. Hareketli faza ilave edilen iyon çifti reaktif, sabit faz tarafından adsorplanır ve iyonize olmuş maddeler iyon çiftleri ile iyonik etkileşime girerek birbirinden ayrılır.

f. Afinite kromatografisi: Afinite, moleküllerin birbirine duyduğu ilgiyi ifade eder. Afinite kromatografisi, biyoteknolojide yaşanan gelişmelere paralel olarak önemi hızla artan ve biomakromolekllerin ayırma-saflaştırma işlemlerinde kullanılan bir tekniktir. Bu teknikte, biomakromoleklleri tanıyan ve ligand adı verilen moleküller katı bir destek üzerine tutturulur ve biomolekller ile etkileşmeleri sağlanır.

Genel olarak adsorpsiyon kromatografisi daha çok nonpolar bileşiklere uygulanırken partisyon kromatografisi az polar yada polar bileşiklere uygulanır. İyonize bileşikler ise en iyi iyon değiştirime kromatografisiyle ayrılır.

Uygulama Biçimine Göre Kromatografi eşitleri

- a. Kağıt kromatografisi
- b. İnce tabaka kromatografisi
- c. Kolon kromatografisi
- d. Gaz kromatografisi
- e. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC)
- f. Süper kritik akışkan kromatografisi

Kağıt kromatografisi:

Filtre kağıdı bir sıvıyı hareketsiz hale getirirken diğer sıvı da kağıt boyunca hareket eder. Kağıt kromatografisinin temeli bu prensibe dayalıdır. Kâğıt kromatografisi, mikro miktarlarda organik ve anorganik maddelerin ayırım ve tayininde kullanılır.

İnce Tabaka Kromatografisi

İnce tabaka kromatografisi, adsorpsiyon kromatografisine tipik bir örnektir. Uygun bir desteğe bağlanan 0,2-1 mm kalınlığında bir adsorban tabaka sabit fazı oluşturur. Destek materyal cam plaklar, alüminyum veya polimerik materyaldir. Uygulaması kolay ve ucuz bir tekniktir. Sabit faza düşük buhar basınçlı çözücüler adsorbe ettirilerek ince tabaka partisyon kromatografisi de uygulanabilir.

Plakların Hazırlanışı: Hazırlanmış adsorban bulamaçları cam plaklar üzerine 0,2-1 mm kalınlığında yayılır. Kurutulduktan sonra yapılan silikajel aktivasyonu sırasında sıcaklığa özellikle dikkat etmek gerekir. Çünkü yüksek sıcaklıkta silikajelin yapısını oluşturan silinol, silil eter ya da siloksan yapısına dönüşerek inaktif hale geçer.

Lekelerin Belirlenmesi:

- 1) **Kimyasal Yöntem:** Asit, oksidan gibi maddeler ve/veya renk reaktifleri püskürtülerek lekeler belirlenir.
- 2) Maddenin **floresans ya da fosforesans** özelliğinden yararlanarak lekeler belirlenir. Çalışılan maddenin böyle bir özelliği yoksa floresan özelliği olan bir reaktif kullanılmalıdır ya da yüzeye (adsorbana) floresan veren madde eklenir.
- 3) **Biyolojik Yöntem:** Maddenin mikroorganizmayı inhibe etmesinden ya da mikroorganizmanın üremesine yol açmasından yararlanır.
- 4) **Enzimatik Yöntem:** Plak ilgili bir enzimle kaplanır. Maddenin enzimi inhibe edip etmediğine bakılarak bir yorum yapılır.
- 5) **Radyoaktif Yöntem:** Belirlenecek maddenin radyoaktif özellik göstermesinden yararlanır.

Gaz Kromatografisi: Hareketli fazın uygun bir gaz, sabit fazın ise katı bir adsorban veya katı bir destek yüzeyine kaplanmış sıvı olduğu kromatografik tekniklere gaz kromatografisi adı verilir. Gaz kromatografisi, bir karışımda gaz halinde bulunan veya kolayca buharlaşabilen türlerin birbirlerinden ayrılmasında ve analizlerinde kullanılır. Bu yöntemde sabit faz, cihaz içine yerleştirilen ve içinde katı destek maddesi üzerinde emdirilmiş sıvı bulunan bir kolondur. Taşıyıcı faz ise, He veya N₂ gibi bir gazdır. Buna göre gaz kromatografisinin bir “gaz-sıvı dağılım kromatografisi” olduğu belirtilebilir. Gaz kromatografisinde maddelerin kütlece oranları, maddenin saf olup olmadığı ve reaksiyonun ilerleyişi görülebilir. Gaz kromatografisi yönteminde incelenen maddeler için belli sıcaklıktaki alıkonma sürelerinin birbirinden farklı olmasından yararlanarak nitel analiz yapılabilir. Bir maddenin alıkonulma süresi, belli bir kolon için, belli sıcaklıkta ve belli taşıyıcı gaz akış hızında sabit bir değerdir. Gaz kromatografisi yönteminde nicel analiz ise kromatogramdaki piklerin altlarında kalan alanların hesaplanması ile veya pik yüksekliğinin ölçülmesi ile yapılır.

Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Sıvı kromatografisi yönteminin özel bir uygulaması olan yüksek performanslı sıvı kromatografisi yönteminde, sabit faz olarak kullanılan dolgu maddelerinin tanecik boyutunun küçültülmesi sonucu hareketli faz ile etkileşen sabit faz yüzey alanı büyür ve böylece kolonun

etkinliği arttırılmış olur. Çok sıkı olarak doldurulmuş kolondan hareketli fazın belirli bir hızla geçebilmesi için basınç uygulanması gerekir.

Kolon kromatografisi

Kolon kromatografisi, ilk uygulanan kromatografik yöntemdir ve kromatografinin başlangıcıdır. Bu yöntemde ayrımı yapılacak karışım uygun bir çözücüde çözülerek bir kolon içine doldurulmuş katı sabit fazdan geçirilir. Kolonda bileşenler sabit faz tarafından adsorblanırlar. Sonra ayrılacak karışımın çözüldüğü çözücü ya da farklı polaritedeki çözücü veya çözücü karışımları kolondan geçirilerek bileşenler kolonun altından ayrı ayrı alınır. zcs buharlaştırılarak saf madde elde edilir.

Süper kritik akışkan kromatografisi

Süper kritik akışkan; bir madde, kritik sıcaklığının üzerine ısıtıldığı zaman elde edilen fiziksel haldir. Bu yöntemde, gaz ve sıvı kromatografilerinin avantajlı yönleri bir araya getirilmiştir. Hareketli faz olarak süper kritik bir akışkan kullanılır. Sabit faz, katı veya sıvı olabilir. En çok kullanılan hareketli faz ise süper kritik karbondioksittir.

Faz tiplerine göre kromatografi:

- a. Sıvı kromatografisi
Sıvı-katı kromatografisi
Sıvı-sıvı kromatografisi
- b. Gaz kromatografisi
Gaz-katı kromatografisi
Gaz-sıvı kromatografisi

KROMATOĞRAFİ YÖNTEMLERİNDE TEMEL KAVRAMLAR

Sabit (Stasyoner) Faz: Durgun (hareketsiz) fazdır.

Hareketli (Mobil) Faz: Durgun fazın üzerinde hareket ederek maddelerin ayrımını sağlayan fazdır.

Adsorban: Sabit faz olarak işlev gösteren katı maddedir.

Tatbik (Uygulama): Analizi yapılacak madde çözeltisinin sabit faza uygulanmasıdır.

Start: Örneğin tatbik edildiği nokta.

Front: Sürüklenen hareketli fazın kromatogram üzerinde ulaştığı en st düzey.

Kromatogram: Tatbik yapıp sürüklenme tamamlandıktan sonra madde ve standarta ait lekelerin kopyasının çıkarıldığı kağıttır.

Bir kromatogram ile şu bilgilerin de verilmesi gerekmektedir:

- Hareketli faz cinsi
- Sabit faz cinsi
- Sürüklenme sıcaklığı
- Sürüklenme süresi
- Lekelerin belirlenmesinde kullanılan yöntem ya da reaktif
- Madde ya da standartlara ait lekelerin Rf değerleri

Rf değeri (Retention Factor): İTK ve kağıt kromatografisinde kullanılan bir terimdir.

Rf 0-1 arasında bir değeri alır. Bir maddenin belirli koşullarda Rf değeri sabittir.

$$\text{Rf değeri} = \frac{\text{Maddeye ait lekenin starta uzaklığı}}{\text{Çözücünün kat ettiği yol (front)}}$$

Rf'e etki eden faktörler:

- Hareketli ve sabit fazın cinsi
- Sıcaklık
- Analiz yapılan madde çözeltisinin konsantrasyonu
- Havanın nemi
- Ayırma işleminin yapıldığı tankın çözücü buharları ile doygunluğu

Tüm toksik maddelerin nitel ve nicel analizlerinde kullanılan temel yöntemlerden biri olan spektroskopi konusu aşağıda detaylı bir şekilde incelenmektedir.

SPEKTROSKOPİ

Spektroskopi, elektromanyetik ışıma (radyasyon) ile atom ve moleküller arasındaki etkileşmeyi inceler.

Absorpsiyon : Bir maddenin üzerine gönderilen ışığın bir kısmını etkileşmeye girerek tutmasıdır. Valans elektronları moleküle gelen ışığın etkisiyle uyarılıp (*eksitasyon*) bir üst enerji seviyesine çıkar.

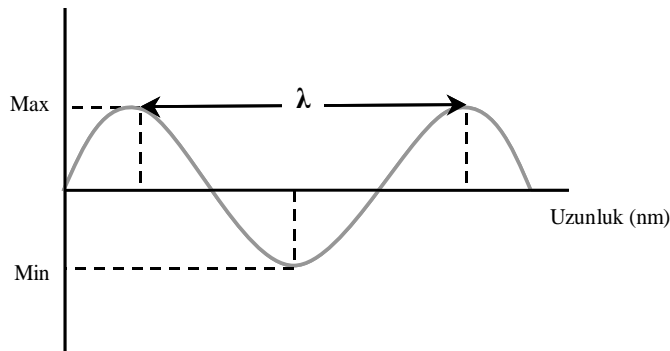
Emisyon : Uyarılmış (eksite) haldeki maddenin içerdiği fazla enerjiyi ışıma şeklinde vererek kararlı hale geri dönmesidir.

Elektromanyetik radyasyon (ışıma) radyan enerjinin bir şeklidir, yani maddenin temel yapısını oluşturan atomdan kaynaklanan bir enerji türüdür. Elektromanyetik ışımanın hem dalga hem de parçacık özelliği vardır.

Elektromanyetik Radyasyonu Karakterize Eden Nicelikler

Dalga Boyu (λ) : Art arda gelen iki maksimum veya iki minimum dalga arasındaki doğrusal uzaklıktır. nanometre (nm), Angstrom (\AA) veya milimikron (m μ) olarak ifade edilebilir.

$$1 \text{ nm} = 1 \text{ m}\mu = 10 \text{ \AA} = 10^{-9} \text{ m}$$



Frekans (ν) : Bir ışığın saniyedeki periyot sayısı olup belli bir noktadan birim zamanda geçen dalga sayısıdır (sn^{-1} veya Hertz (Hz)). (devir / sn)

Periyot (t) : Tam bir devir için gereken süredir, frekansla ters orantılıdır. (sn / devir)

Dalga Sayısı (ν) : 1 cm'deki dalga sayısıdır, λ ile ters orantılıdır.

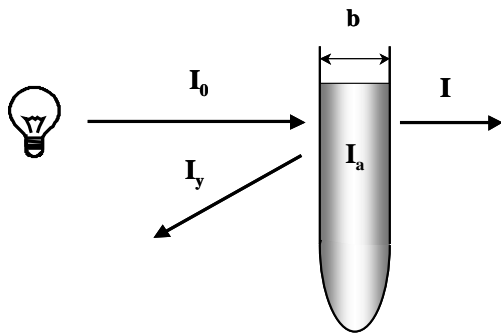
Tablo 3. UV, Görünür Bölge ve Yakın Kızılötesi (IR) Spektrum Özellikleri

Dalga Boyu (nm)	Bölge Adı	Gözlenen Renk
100 – 200	Vakum UV	Renk gözlenmez
200 – 380	Yakın UV	Renk gözlenmez
380 – 440	Görünür	Mor
440 – 500	Görünür	Mavi
500 – 580	Görünür	Yeşil
580 – 600	Görünür	Sarı
600 – 620	Görünür	Turuncu
620 – 750	Görünür	Kırmızı
750 – 2000	Yakın IR	Renk gözlenmez

Kolorimetri : Görünür bölge spektroskopisidir. 380 – 780 nm arasında çalışılır. Renkli bir çözeltinin verdiği absorbans ölçülür.

Tablo 2 : UV ve Görünür Bölge Özellikleri

Dalga Boyu (nm)	Bölge Adı	Kullanılan Küvet	Nedeni
100 – 200	Vakum UV	Vakum altında Quartz küvet	Ortamdaki oksijen ve cam materyal absorbans gösterir.
200 – 380	Yakın UV	Quartz küvet	Cam absorbans verir.
380 – 780	Görünür Bölge	Cam Küvet	Cam veya oksijen ile etkileşme gözlenmez.



$$I_0 = I + I_a + I_y$$

- I_0 = Çözeltiye giren ışık
- I_a = Çözeltinin absorpladığı ışık
- I_y = Küvetten yansıyan ışık
- I = Çözeltiden çıkan ışık

$$T = \frac{I}{I_0}$$

$$A = -\log \% T \Rightarrow A = \log \frac{I_0}{I}$$

Absorbans (A) : Bir çözelti tarafından absorplanan ışık miktarı. Optik dansite (OD) olarak da adlandırılır.

Transmittans : Bir çözeltiden geçen ışık miktarıdır. Genellikle % veya %T olarak ifade edilir. Absorbansla ters orantılıdır.

Lambert-Beer Kanunu

Beer yasasına göre, bir çözelti içinden geçen ve çözelti tarafından absorplanan ışın demetinin şiddeti, çözeltinin derişimi ile logaritmik olarak orantılıdır.

$$A = \log I_0 / I = a \times C$$

Lambert yasasına göre ise, bir çözelti içinden geçen ışın demetinin şiddeti çözeltinin derinliği, yani ışığın aldığı yol ile logaritmik olarak orantılıdır.

$$A = \log I_0 / I = b \times C$$



Lambert-Beer Yasası → Bir molekül tarafından absorbe edilen radyasyonun cinsi ve miktarı molekülün yapısına ve radyasyon ile etkileşen molekül sayısına bağlıdır.

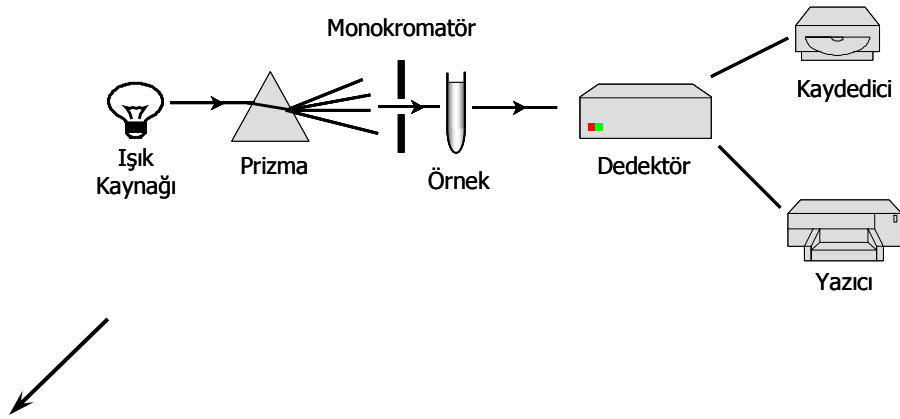
$$A = \log I_0 / I = a \times b \times C$$

Absorptivite (a = L / g / cm) : 1 cm'lik küvetteki 1 g/L'lik çözeltinin absorbansıdır.

Molar absorptivite = Molar Ekstinksiyon Katsayısı (ε = L / mol / cm) : 1 cm'lik küvetteki 1 M çözeltinin absorbansıdır.

Spesifik Ekstinksiyon Katsayısı (A₁ = A_{%1} = Σ) : 1 cm'lik küvetteki % 1'lik (a/h) çözeltinin absorbansıdır.

Spektrofotometre



Işık kaynağı : Hidrojen, Döteryum → 180 – 340 nm

Tungsten → 340 – 1000 nm

Işık kaynağı: Belirli dalga boyunda ışık yayar.

Monokromatör: Belirlenmiş dalga boylarındaki ışığın geçmesine izin verir.

Örnek: Farklı dalga boylarında gelen ışığı soğurur.

Dedektör: Örnekten yayılan ışığı elektrik sinyallerine dönüştürür.

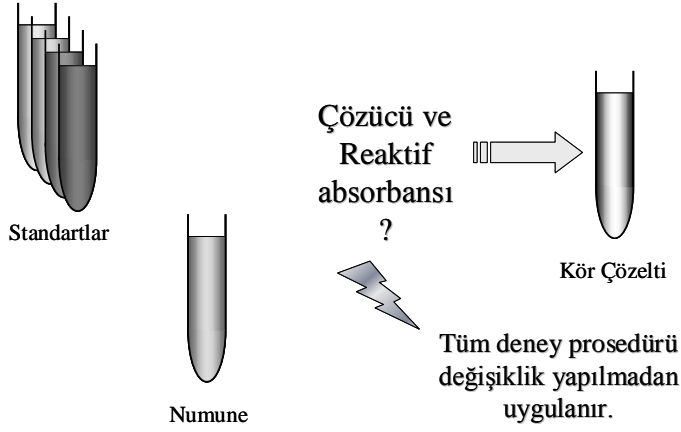
Spektrofotometri Yönteminde Temel Kavramlar

- ⌘ **Stok çözelti:** Analizi yapılacak maddeyi yüksek konsantrasyonda içeren çözeltidir.
- ⌘ **Standart çözelti:** Stok çözeltiden hazırlanan ve analizi yapılan maddeyi belirli konsantrasyonlarda içeren çözeltidir.
- ⌘ **Kör çözelti:** Analiz edilecek olan maddenin çözücüsü ve reaktiflerden gelen absorbansı engellemek için hazırlanan çözeltidir.

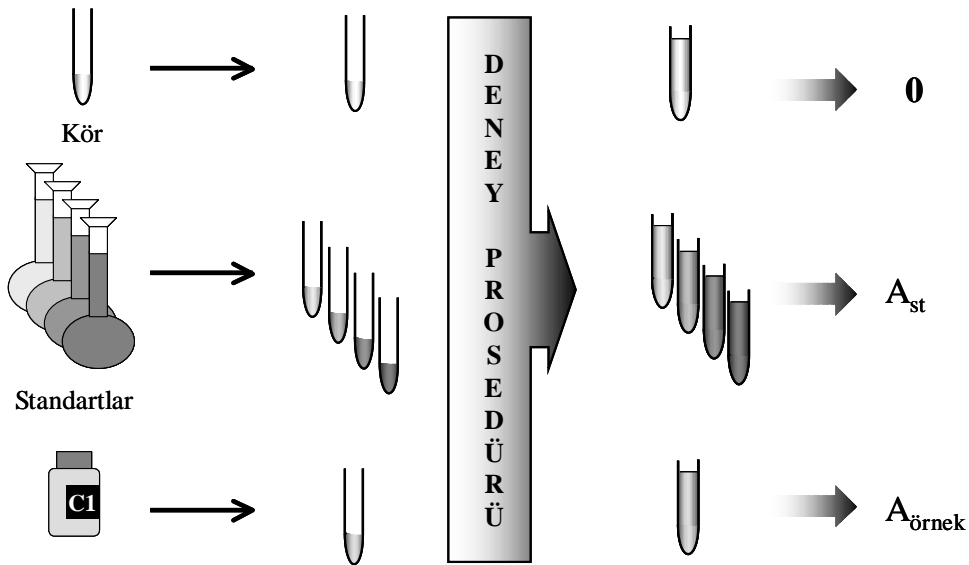
Spektrofotometrik yöntem ile miktar tayini yapılmadan önce :

- ⌘ Stok çözelti hazırlanır. **Stok çözelti**, analizi yapılacak maddeyi yüksek konsantrasyonda içeren çözeltidir.
- ⌘ Stok çözelti kullanılarak seyreltme yöntemi ile farklı konsantrasyonlarda bir dizi standart çözelti hazırlanır. **Standart çözelti**, stok çözeltiden hazırlanan ve analizi yapılan maddeyi belirli konsantrasyonlarda içeren çözeltidir. Standartlar analiz edilen örneğe mümkün olduğunca yakın olmalıdır. Bu nedenle çok dikkatli hazırlanmalı ve tüm deney prosedürü aynen uygulanmalıdır.
- ⌘ Kalibrasyon doğrusu çizmek için en az 4 standart çözelti hazırlanmalıdır.

- ⌘ Kör çözelti hazırlanır. **Kör çözelti**, analiz edilecek olan madde için çözünmüş ve reaktiflerden gelen absorbansı engellemek için hazırlanan çözeltidir. Analizi yapılacak madde haricindeki tüm reaktifleri içermeli, kör çözelti hazırlanırken tüm deney koşullarına uyulmalıdır.

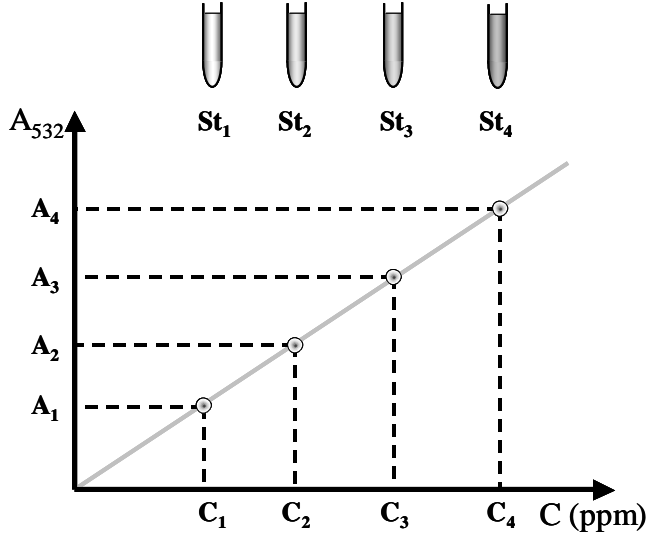


- ⌘ Hazırlanan standart çözeltilerden deney için gerekli miktarda alınarak deney tüpüne konur ve üzerine uygun reaktifler eklenir.
- ⌘ Bilinmeyen örnekten deney tüpüne konur ve üzerine uygun reaktifler eklenir.
- ⌘ Reaksiyonun tamamlanması için gerekli tüm işlemler (santrifüj, vorteks, inkübasyon, vb.) yapılır.
- ⌘ Kör çözelti ile spektrofotometrenin “0” ayarı yapılır.
- ⌘ Standartlar ve numunenin absorbansı ölçülür.



- ⌘ Standartlardan elde edilen absorbans değerleri ile kalibrasyon doğrusu çizilir. Kalibrasyon doğrusu çizilmesinin amacı, absorbans ve konsantrasyon arasında matematiksel bir ilişki

kurmaktır. Bu iki değişken arasında doğrusal bir ilişki kurmaya çalışılır. Bu nedenle, standart konsantrasyonları absorbans ile konsantrasyon arasındaki ilişkinin lineer olduğu aralıktan seçilir ve örneğin de bu aralıkta yer alması beklenir.



⌘ Elde edilen verilerle örnek konsantrasyonu hesaplanır.

Örnek Konsantrasyonunun Hesaplanması :

1. Formül Yöntemi (C_1)
2. Referans Yöntemi (C_2)
3. Grafik Yöntemi (C_3)

$$C_{\text{örnek}} = \frac{C_1 + C_2 + C_3}{3}$$

1. Formül Yöntemi :

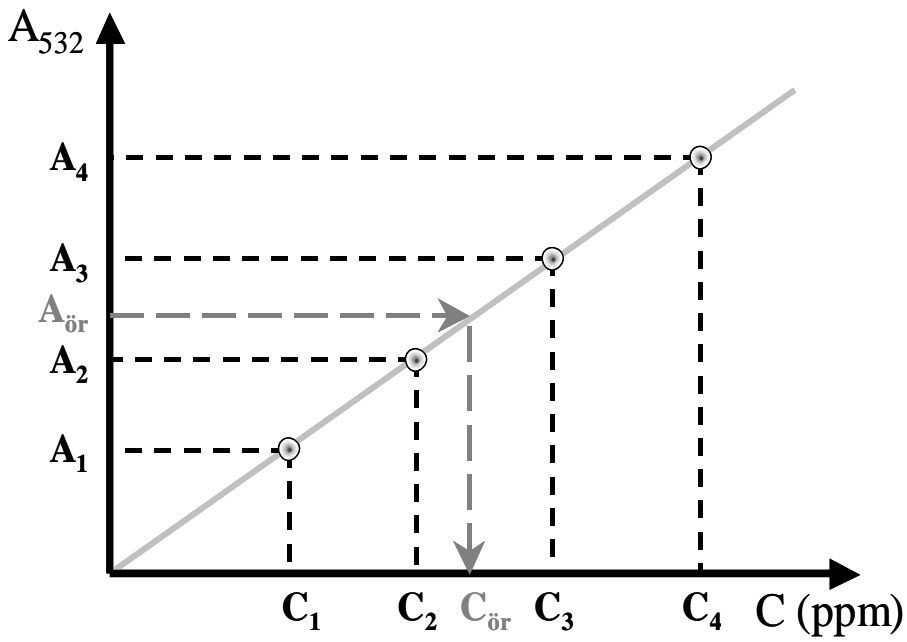
$$A_{\text{Standart}} = a \times b \times C_{\text{St}} \Rightarrow a = \frac{A_{\text{St}}}{b \times C_{\text{St}}}$$

$$A_{\text{Örnek}} = a \times b \times C_{\text{Ör}} \Rightarrow C_{\text{ör}} = \frac{A_{\text{ör}}}{a \times b}$$

2. Referans Yöntemi :

$$\frac{A_{\text{Standart}}}{A_{\text{Örnek}}} = \frac{a \times b \times C_{\text{St}}}{a \times b \times C_{\text{Ör}}} \Rightarrow \frac{A_{\text{Standart}}}{A_{\text{Örnek}}} = \frac{C_{\text{St}}}{C_{\text{Ör}}}$$

3. Grafik Yöntemi :



Toksikolojik Analizlerde Biyolojik Örneklerde Kullanılan Eser Düzeyler

Konsantrasyon Aralığı	Kısım (parts per)
1 – 999 mikrogram / ml ($\mu\text{g/ml}$) ($1 \mu\text{g} = 10^{-6} \text{ g}$)	ppm (parts per million; milyonda bir kısım)
1 – 999 nanogram / ml (ng/ml) ($1 \text{ ng} = 10^{-9} \text{ g}$)	ppb (parts per billion; milyarda bir kısım)
1 – 999 pikogram / ml (pg/ml) ($1 \text{ pg} = 10^{-12} \text{ g}$)	ppt (parts per trillion; trilyonda bir kısım)
1 – 999 femtogram / ml (fg/ml) ($1 \text{ fg} = 10^{-15} \text{ g}$)	ppq (parts per quadrillion; katrilyonda bir kısım)

Konsantrasyon Birimleri

$$1 \text{ g} = 1000 \text{ mg}$$

$$1 \text{ mg} = 1000 \mu\text{g}$$

$$1 \mu\text{g} = 1000 \text{ ng}$$

$$1 \text{ ng} = 1000 \text{ pg}$$

$$1 \text{ pg} = 1000 \text{ fg}$$

$$1 \text{ g} = 10^3 \text{ mg} = 10^6 \mu\text{g} = 10^9 \text{ ng} = 10^{12} \text{ pg} = 10^{15} \text{ fg}$$

$$1 \text{ mg} = 10^3 \mu\text{g} = 10^6 \text{ ng} = 10^9 \text{ pg} = 10^{12} \text{ fg}$$

$$1 \mu\text{g} = 10^3 \text{ ng} = 10^6 \text{ pg} = 10^9 \text{ fg}$$

Soru 1 : 100 ppm = ... mg/dl

$$\text{ppm} = \mu\text{g/ml}$$

$$100 \text{ ppm} = 100 \mu\text{g/ml} = 0,1 \text{ mg/ml} = \frac{0,1 \text{ mg}}{0,01 \text{ dl}} = 10 \text{ mg/dl}$$

Soru 2 : 1 mg/dl NaNO₂ içeren stok çözeltiden 100 ml’lik balon joje kullanarak 2 µg/ml’lik standart çözelti hazırlayınız.

$$1 \text{ mg/dl} = \dots \text{ g/ml}$$

$$1 \text{ mg/dl} = 1000 \text{ µg/100 ml}$$

$$1 \text{ mg/dl} = 10 \text{ µg/ml}$$

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$10 \text{ µg/ml} \times V_1 = 2 \text{ µg/ml} \times 100 \text{ ml}$$

$$V_1 = 20 \text{ ml}$$

1 mg/dl’lik stok çözeltiden 20 ml alınır balon jodede 100 ml’ye nitritsiz distile su ile tamamlanır.

Soru 3: Hazırlanan standart çözeltinin (2 µg/ml) absorbanası 0,360; örneğinizin absorbanası 0,450 olarak ölçülmüştür. Elinizdeki bu verilere dayanarak örneğinizin konsantrasyonunu referans yöntemi ile hesaplayınız.

$$\frac{A_{\text{Standart}}}{A_{\text{Örnek}}} = \frac{C_{\text{St}}}{C_{\text{Ör}}} \Rightarrow \frac{0,360}{0,450} = \frac{2 \text{ µg/ml}}{C_{\text{Ör}}} \Rightarrow C_{\text{Ör}} = 2,5 \text{ µg/ml}$$

Spektrofotometrik Analizde Dikkat Edilmesi Gereken Noktalar

- ♣ Kullanılan küvetler temiz olmalıdır.
- ♣ Çözeltiler bulanık olmamalıdır.
- ♣ Çözelti içinde partikül veya kabarcık olmamalıdır.
- ♣ Deney koşullarına uyulmalıdır.
- ♣ Standartların konsantrasyonları dikkatle hazırlanmalıdır.
- ♣ 0,700 üzerinde absorban veren çözeltilerin ölçümleri seyreltme yapılarak tekrarlanmalıdır.

TOKSİKOLOJİDE KULLANILAN İZOLASYON YÖNTEMLERİ

Aşağıda toksikolojik analizler sırasında kullanılan izolasyon yöntemleri ve kullanılan yöntemlere göre zehirlerin sınıflandırması gösterilmiştir:

1. Uçucu Zehirler
2. Uçucu Olmayan Zehirler
3. Metalik Zehirler
4. Toksik Anyonlar
5. Özel Olarak Aranması Gereken Zehirler

1. UÇUCU ZEHİRLER

Uçucu elementler veya bileşiklerin kaynama noktaları düşüktür. Uçucu organik bileşikler (Volatile Organic Compounds=VOCs) ise kaynama noktaları düşük olduğu için çabuk buharlaşıp atmosfere katılan bileşiklerdir.

1.1. Uçucu Zehirlerin Biyolojik Materyalden İzolasyonu

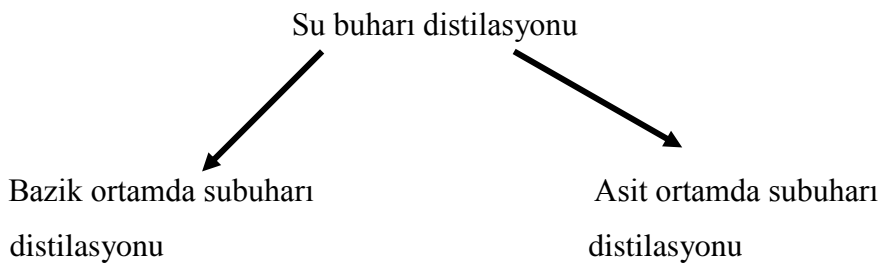
Siyanür, alkol, karbonmonoksit, klorluhidrokarbonlar, sülfürler ve organik çözücüler gibi uçucu zehirler biyolojik materyalden iki temel yöntemle ayrılabilir:

1. Distilasyon Yöntemi
2. Mikrodifüzyon Yöntemi

A. Distilasyon Yöntemi : Sıvı bir maddenin kaynama noktasına kadar ısıtılarak buhar haline getirilmesi ve bu buharın yoğunlaştırılarak ayrı bir kapta toplanması işlemidir. Uçucu zehirlerin biyolojik materyalden kazanılabilmesi kaynama noktalarına ve su buharı ile sürüklenmelerine göre iki şekilde yapılır:

a) Normal Distilasyon: Kaynama noktası 100°C'inin altındaki uçucu zehirler için uygulanır

b)



Genellikle kaynama noktaları suyunkinden (100°C'den) fazla olan uçucu zehirler için uygulanır.

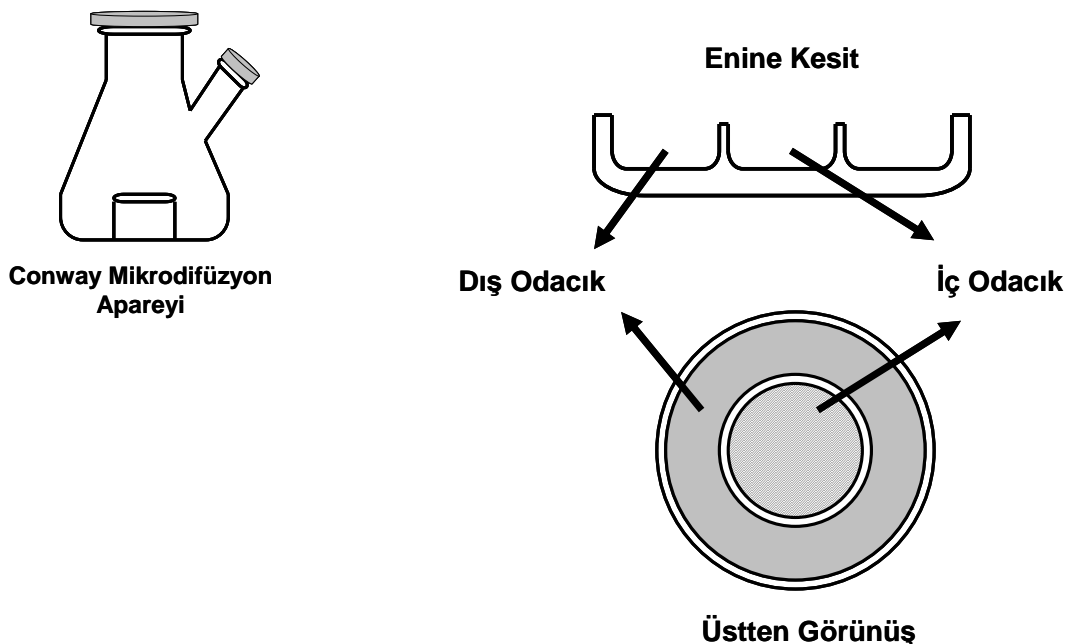
B. Mikrodifüzyon Yöntemi:

Çok az miktardaki uçucu zehirlerin biyolojik materyalden ayrılmasında mikrodifüzyon tekniği de kullanılır. Feldstein ve Klendshoj tarafından geliştirilen bu yöntemde kullanılan aparey, ilk kez Conway tarafından amonyak tayini için uygulandığından “Conway Mikrodifüzyon Apareyi” adı verilmiştir. Apareyin esası; Kapalı bir sistem içinde bulunan dış odacığa analizi yapılacak biyolojik materyal ve uçucu zehiri bu materyalden açığa çıkarıcı reaktif, iç odacığa ise serbest hale geçen zehiri tutan reaktif konur. Oda sıcaklığı ya da 37°C'de buharlaşan uçucu zehir, kapalı sistemde difüzyona uğrar ve iç odacıktaki çözücü içinde çözünerek sıvı faza geçer. Sistemde bozulan buhar basıncı dengesinin sağlanması için, biyolojik materyaldeki uçucu zehir bitinceye dek buharlaşma, difüzyon ve çözünme devam eder. İç odacığa özel reaktif ilavesi ile uçucu zehirin nitel yada yarı-nicel olarak saptanması mümkündür.

Mikrodifüzyon cihazı kullanarak bazı önemli uçucu zehirlerin izolasyon ve tanınmaları mikrodifüzyon tablosuna göre uygulanabilir. Dış odacığa biyolojik materyal ve uçucu zehiri açığa çıkaran reaktiften 1-1,5 ml, iç odacığa ise 1'er ml renk reaktifi ve tutucu reaktif ilave edilerek derhal ağzı kapatılır ve 37°C'de en az 10-15 dakika bekletilir.

Biyolojik sıvıların difüzyonu 1-1,5 saatte, dokularınki ise 2 saatte tamamlanır. Renk reaktifi ile belirleme için 10 – 15 dakika yeterlidir.

MİKRODİFÜZYON APAREYİ



Bir ksenobiyotiğe maruziyet ile gözlenen zehirlenmelerde nitel ya da nicel analizler yapılması gerekecektir. Bu aşamada hastadan alınacak biyolojik örneğin tipi, analiz öncesi örneğe uygulanacak işlemler, uygun analiz yönteminin seçilmesi ve uygulanması gibi bir dizi işlem yapılmaktadır.

1.2. Uçucu Zehirler

1.2.1. Karbon Monoksit (CO)

CO kimyasal formülüne sahip olan karbon monoksit renksiz, kokusuz ve tadı olmayan yüksek derecede toksik bir gazdır. Organik materyalin tam olmayan yanması ile oluşur. Nikel üretimi ve demir eritme gibi endüstriyel işlemler, sigara içimi, eksoz dumanı, iyi yanmamış soba ve mangal ateşi, yangın ve patlamalar CO kaynaklarıdır. CO zehirlenmeleri birçok ülkede sıklıkla rastlanır.

Etki Mekanizması ve Zehirlenme Belirtileri: CO'nin hemoglobinle (Hb) birleşerek çok dayanıklı “karboksihemoglobin” (COHb) oluşturması ve böylece kanın oksijen taşıma kapasitesini inhibe etmesi esasına dayanır. Bu duruma “anoksi” adı verilir. CO aynı zamanda miyoglobuline bağlanır. Miyoglobulinin CO'ye afinitesi oksijene olan afinitesinin 60 katıdır. CO aynı zamanda sitokrom oksidaza da bağlanır; ancak enzimin CO'ye olan afinitesi oksijenden oldukça azdır ve bu bağlanma intraselüler hipoksi ortaya çıktıktan sonra gerçekleşir. Havada 667 ppm gibi düşük konsantrasyonlarda olması bile vücuttaki Hb'nin %50'sinin COHb'e dönüşmesi için yeterlidir; kandaki COHb konsantrasyonu %40 ise letaldir. İstirahat halinde 500 ppm CO'ye 1 saat maruz kalınması durumunda bu oran %50'ye yükselebilir. 1000 ppm'i aşan konsantrasyonlarda 1 saat içerisinde ölüm görülebilir. Yangınlarda ortamda 5000-7000 ppm CO olduğu belirlenmiştir. Kalıcı santral sinir sistemi hasarı yapabilir. CO için TLV değeri 50 ppm'dir. Ev havasında ortalama 0.5-5 ppm konsantrasyonlarda olduğu belirlenmiştir. Havadaki CO konsantrasyonu ile toksik etkilerin oluşumu arasındaki ilişki aşağıdaki tabloda verilmiştir:

Konsantrasyon	Semptomlar
35 ppm (0.0035%)	6-8 saat maruziyette başağrısı ve baş dönmesi
100 ppm (0.01%)	2-3 saat maruziyette hafif baş ağrısı
200 ppm (0.02%)	2-3 saat maruziyette hafif baş ağrısı, karar verme yeteneğinde azalma
400 ppm (0.04%)	1-2 saat maruziyette frontal baş ağrısı
800 ppm (0.08%)	45 dak. maruziyette baş dönmesi, bulantı, konvülsiyonlar; 2 saat sonra duyarsızlaşma
1,600 ppm (0.16%)	20 dak. maruziyette baş ağrısı, taşikardi, baş dönmesi, bulantı; 2 saatten az bir sürede ölüm
3,200 ppm (0.32%)	5-10 dak. maruziyette baş ağrısı, taşikardi, baş dönmesi, bulantı; 30 dak.dan az bir sürede ölüm
6,400 ppm (0.64%)	1-2 dak.da baş ağrısı ve baş dönmesi; 20 dak.dan kısa sürede ölüm
12,800 ppm (1.28%)	2-3 solukta bilinçsizleşme; 3 dakikada ölüm

CO zehirlenmesinde COHb konsantrasyonu ile semptomlar arasındaki ilişki aşağıdaki tabloda verilmiştir:

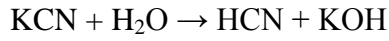
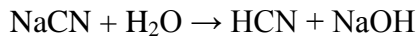
Semptomlar	% COHb
Hiçbir semptom görülmez	0-10
Alında gerginlik ve başağrısı	10-20
Baş ağrısı ve şakaklarda zonklama	20-30
Bulantı, kusma ile birlikte şiddetli baş ağrısı, bulanık görme	30-40
Senkop, taşipne, taşikardi	40-50
Koma ve konvülsiyonlar	50-60
Kardiyovasküler kollaps, solunum felci	60

Tedavi : Hasta CO'li ortamdan uzaklaştırılarak temiz havaya çıkartılır. Oksijen inhalasyonu yapılır. Hiberbarik oksijen de tedavide kullanılmaktadır. Tutarık, hipotansiyon, kardiyak anomaliler, pulmoner ödem ve asidoz gelişebileceği için bu semptomların da tedavi edilmesi gerekmektedir. Artmış kas aktivitesi ve tutarıkları tedavi için dantrolen veya diazepam verilebilir; ancak diazepam verilecekse, tam solunum desteği sağlanmalıdır. Hipotansiyonun tedavisi için i.v. sıvı tedavisi, miyokardiyel depresyonun önlenmesi için vazopresörler verilebilir. Ancak ciddi asidoz varsa sodyum bikarbonat verilebilir, aksi takdirde

kullanılmamalıdır. Beyin hasarı MRI veya CT ile belirlenmeli ve nörolojik hasar varsa tedavi edilmelidir.

1.2.2. Siyanür (CN⁻)

Siyanür karbon ile azot arasında üçlü bağ olan bir siyano grubu (C≡N) grubu içeren bileşiklerdir. İnorganik siyanürlere örnek olarak hidrojen siyanür (HCN), potasyum siyanür (KCN) ve sodyum siyanür (NaCN) verilebilir. HCN acı badem kokusunda renksiz bir gazdır. KCN ve NaCN oda ısısında beyaz toz olarak bulunan ve acı badem kokulu maddelerdir. Hidrolizleri ile HCN oluşur.

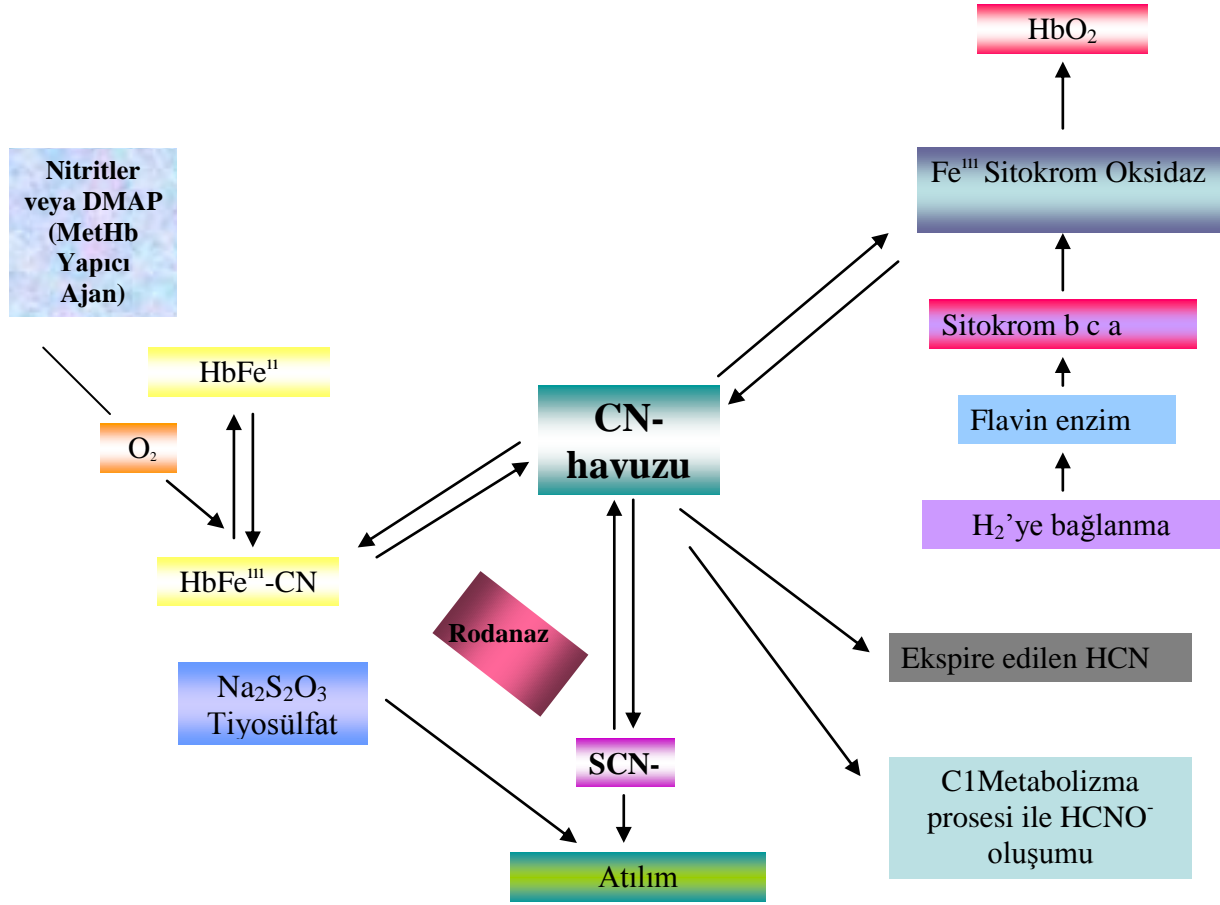


Madencilikte, balıkçılıkta, evlerde gümüş parlaticılarında, fumigasyonda (rodentisitlerde ve özellikle karınca öldürmek amacıyla) kullanılır. Ayrıca amigdalın olarak elma, şeftali, erik, kiraz ve badem çekirdeklerinde rastlanır. Özellikle badem çekirdeği ile zehirlenmelere ülkemizde çocuklarda çok rastlanmaktadır.

Etki Mekanizması ve Zehirlenme Belirtileri: Bütün hücrelerdeki sitokrom oksidaz sistemini inhibe etmesi sonucu hücre solunumunun engellenmesi esasına dayanır. En hızlı etki eden ve en öldürücü zehirlerden biridir. HCN'nin inhalasyonu birkaç dakikada ölüme neden olur. Zehirlenme inhalasyon, oral, ve cilt kontaminasyonu yoluyla olabilir. Zehirlenme belirtileri şu şekilde gözlenir:

- ❖ Düşük konsantrasyonlarda maruziyetle genel güçsüzlük hali, baş ağrısı, vertigo, konfüzyon ve solumada güçlük ortaya çıkabilir.
- ❖ Uzun süre düşük doz maruziyet güçsüzlük hissi ve takiben paralize neden olur.
- ❖ Yüksek konsantrasyonlarda siyanür inhalasyonu sonucu koma, tutarıklar, apne ve kardiyak arrest gelişir.
- ❖ Bilinçsizliğin ilk evrelerinde kişi yeterli ve hızlı solur, bunu ani koma, pulmoner ödem ve kardiyak arrest takip eder.
- ❖ Cilt oluşan süyanür-Hb kompleksi nedeniyle pembe bir renk alır. TLV değeri 10 ppm'dir. Letal doz HCN için 50-100 mg (1. 5mg/kg vücut ağırlığı) ve KCN/ NaCN için 200-300 mg'dır.

Oral, İnhalasyon veya Perkütanöz Siyanür Alımı



Tedavi : Hızla ortamdan uzaklaştırılıp solunum yolları açılır, intübasyon uygulanır. Sıkı giyecekler çıkarılır.

Antidotlar : Siyanür zehirlenmelerinde antidot kullanılabilir: Bu antidotlardan en bilineni “**Cyanokit**” adı verilen “amilnitrit, NaNO_2 ve $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ” dir. Uygulama şu şekilde gerçekleşir:

1. Hastaya 15-20 saniye/dakika süreyle ayrı ayrı 2 ampül amilnitrit (gazlı bez üzerine kırılarak) koklatılır.
2. Yetişkinlere 10 ml %3 NaNO_2 i.v. enjekte edilir. Bu esnada amilnitrit koklatılmaz.
Çocuklara başlangıç dozu 0.33 ml/kg’dır.
3. Takiben 50 ml %25’lik $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (yetişkinlerde) uygulanır.
Çocuklarda bu doz 1.65 ml/kg’dır. NaNO_2 ve $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ dozları tekrarlanabilir.

Alternatif olarak;

a. Hidroksikobalamin: Doğrudan siyanür bağlar.

b. 4-dimetilaminofenol (4-DMAP): Kontrollü olarak methemoglobin oluşturur.

- c. Dikobalt edetat: Kobaltın siyanüre afinitesi vardır. Bu nedenle siyanürü bağlar
- d. 4-merkaptopiruvat ön ilaçları
- e. Glikoz
- f. Oksijen terapisi
- g. Solusyon A ve B (A=> sitrik asitte ferröz sülfat, B=> sulu sodyum karbonat)

1.2.3. Fenoller

Fenoller karbonik asit olarak da bilinen toksik maddelerdir. Benzenin oksidasyonu ile sentezlenirler. Antiseptik olarak kullanılırlar. Ayrıca çeşitli ilaçların, herbisitlerin ve sentetik reçinelerin sentezinde kullanılırlar. Ayrıca güneşten koruyucular, saç boyaı dahil birçok kozmetikte bulunurlar. Eksfoliyant olarak kozmetik cerrahide kullanımları da bulunmaktadır.

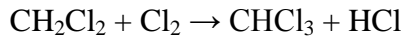
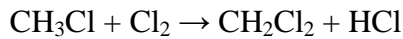
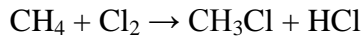
Etki Mekanizması ve Zehirlenme Belirtileri: Cilt teması ile iritan ve korrosif etki gösterebilir. Eğer kloroform ile karışmışsa toksisitesi artar. Ayrıca vazokonstriktör. Etkisi vardır. LD₅₀ değeri 2g, TLV değeri 5 ppm'dir

Tedavi :Fenolle zehirlenmiş hastaya semptomatik tedavi uygulanır.

1.2.4. Klorlu Hidrokarbonlar

1.2.4.1.Kloroform (CHCl₃)

Kloroform renksiz, alev almayan uçucu bir sıvıdır. Rahatsız edici olmayan bir kokusu vardır. Kloroform endüstride klorun klorometan veya metan ile 400-500 °C'de ısıtılması ile sentezlenir ve distilasyonla ayrılır.



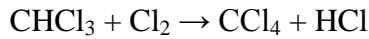
Günümüzde temel kullanımı HCFC-22 olarak dondurucularda ve Teflon sentezinde majör prekürsör olarak kullanılan tetrafloroetilenin prekürsörü R-22 (kloroflorometan) üretimindedir. Ayrıca solvan olarak farmasötik endüstride, boya ve pestisitlerin üretiminde kullanılır. Ayrıca DNA ve RNA ekstraksiyonlarında kullanılmaktadır.

Etki Mekanizması ve Zehirlenme Belirtileri: Kloroforma maruziyet oral, inhalasyon veya dermal olarak olabilir. Kloroform güçlü bir narkotik ve anesteziktir; kloroform buharlarının koklanmasıyla SSS depresyonu oluşur. 500 ppm konsantrasyona ulaşırsa hayatı tehdit eder. Kısa süre 900 ppm inhalasyonu ile baş dönmesi, güçsüzlük ve baş ağrısı görülür. Hedef organları karaciğer ve böbrektir; karaciğerde metabolizma sonucu fosgene dönüşür. Temas ile cildi ve mukoz membranları düşük oranda irrite eder. Hayvan deneylerinde oral olarak maruziyet sonucu renal tübüler hücre adenomaları ve adenokarsinomaları, hepatik adenofibrözis ve neplastik nodüllere rastlanmıştır. Oral Letal Dozu : 10-15 ml'dir. TLV'si 50 ppm'dir. Kloroform IARC'a göre Grup IIA karsinojendir.

Tedavi : Kloroform ile olan zehirlenmelerde semptomatik tedavi uygulanır.

1.2.4.2.Karbon Tetraklorür (CCl₄)

Karbon tetraklorür kloroformun ileri klorinasyonu ile elde edilir:



Karbon tetraklorür, yangın söndürücüler, kuru temizlemede kullanılan sıvılar, ve antihelmentiklerde bulunmaktadır. Ayrıca solvan olarak kullanılmaktadır.

Etki Mekanizması ve Zehirlenme Belirtileri: Karbon tetraklorür buharlarına maruziyet ile SSS depresyonu gözlenir. Özellikle sinir dokusu, karaciğer, böbrekler ve vasküler sistem için toksiktir ve uzun süre maruziyet kansere neden olabilir. Letal dozu 3-10 ml, TLV'si 10 ppm'dir. Karbon tetraklorür IARC'a göre Grup IIB karsinojendir. Hepatik hücre proliferasyonunu ve DNA sentezini indüklediği, mutajenik olduğu ve in vitro olarak anöploidiyi indüklediği bildirilmiştir.

Tedavi : Zehirlenmelerinde semptomatik tedavi uygulanır.

1.2.5. Karbon Sülfür (CS₂)

Karbon sülfür uçucu bir sıvıdır. Eter benzeri bir kokusu vardır. Karbon sülfür ve türevlerinin elde edilmesi (özellikle karbon tetraklorür) işlemlerinde, kükürt, lastik, kauçuk, yağ, reçine ve fosforun çözünmesi ve ekstraksiyonu ile ilgili işlemlerde, kibrit endüstrisinde, viskoz ipeği, yapay iplik, selülozik film ve selofan yapılan iş yerlerinde, etil ve bütül selüloz film üreten

işyerlerinde, bazı yapıştırıcıların su geçirmez çimento ve transparan kağıt yapımı ile ilgili işlerde kullanılır.

Etki Mekanizması ve Zehirlenme Belirtileri: En büyük toksik etkisi güçlü bir Monoamin Oksidaz (MAO) inhibitörü olmasından kaynaklanır. Güçlü bir sinir sistemi zehiridir. B₆ vitamini eksikliği yapar. MAK değeri 20 ppm (0.06 mg/L)'dir.

Tedavi : Zehirlenmelerinde semptomatik tedavi uygulanır.

1.2.5. Amonyak (NH₃)

Renksiz, keskin kokulu, havadan hafif bir gazdır. Amonyak, HNO₃ sentezi, sentetik reçine yapılması, aynacılık, leke çıkartmak, pamuk ipliklerinin bükülmesi işlemlerinde, yapay gübre, üre, kok ve havagazı fabrikalarında soğutucu olarak buz üretiminde kullanılır. Ayrıca evlerde temizlik ürünlerinin içinde yüksek derecede amonyak bulunur.

Etki Mekanizması ve Zehirlenme Belirtileri: Amonyak deri, göz, boğaz ve akciğerlere kuvvetli iritandır. Özellikle astım hastaları etkisine daha hassastır. Ciltte yanıklara sebep olur. Keratokonjonktivit, iris atrofisi, kornea ve lens bulanıklığı gibi toksik etkileri vardır ve körlüğe bile neden olabilir. Oral maruziyette ağız, boğaz ve mide yanıklarına neden olur. MAK değeri 50 ppm (35 mg/m³), yetişkinlerde oral MLD değeri 10 mg/ 70 kg dir.

Tedavi : Zehirlenmelerinde semptomatik tedavi uygulanır.

1.2.7. Alkoller

1.2.7.1. Metanol (CH₃OH)

Renksiz polar bir sıvıdır. Uçucudur, alev alır ve belirgin bir kokusu vardır. Metil alkol, odun alkolü, denatüre alkol, karbinol gibi sinonimleri vardır. Teksir makinelerini temizlemek için kullanılan çözücülerde, ilaç sanayinde, antifiriz, solvan, yakacak olarak ve temizleyici karışımlarda kullanılır. Ayrıca etanol denatürasyonu için ve biodizel üretiminde transesterifikasyon esnasında kullanılır.

2. Ciddi santral sinir sistemi depresyonu yapar.

Latent periyod ve kompanse edilebilir asidoz (12 saat), 12 saatten sonra kompanse edilemeyen asidoz ve oküler toksisite bulguları, temas süresi ve alınan miktara bağlı olarak gelişir. Bitkinlik, baş ağrısı, baş dönmesi, asidoz, görme bozuklukları, kusma, diyare, siyanoz, yerinde duramama, konfüzyon, ataksi, bilinç kaybı ve koma gelişir. Körlükle beraber periferik nevrit görülür. Göz bebekleri büyür. Kardiyak depresyon, böbrek hasarı gelişir. Ölüm solunum felcine bağlı olarak görülür.

Tedavi:

Antidotları:

a. Etanol

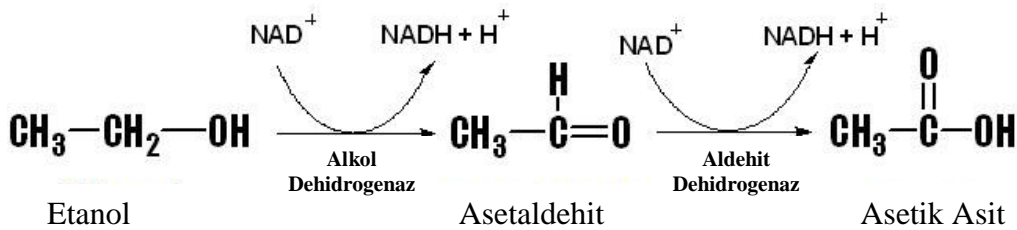
b. 4- metil pirazol (fomepizol, Antizol®, 1.5 ml vialler g 1500 mg fomepizol içerir) de verilebilir. 70 kg'lık bir kişi için 1050 mg yükleme dozunu takiben 12 saatte bir 700 mg ve 4 doz olarak 4-metil pirazol tek başına veya diyalizle beraber uygulanabilir. Takiben doz artırılarak 1050 mg 12 saatte bir metanol konsantrasyonu 20 mg/dl'nin altına düşene dek uygulanır. Ancak tedavisi çok pahalıdır. Bunun yanında semptomlara göre tedavi yapılır. Metanol kan düzeyi 50 mg/dl veya formik asit düzeyi 20 mg/dl'yi aşınca hemodiyaliz uygulanır.

c. Folik asit süplementasyonu

B- Etanol (CH₃-CH₂OH)

Etanol, etil alkol, hububat alkolü, saf alkol ve içki alkolü olarak adlandırılan, renksiz, uçucu, alev alan ve kendine özgü kokusu olan bir sıvıdır. İçki olarak, ilaçlarda taşıyıcı olarak, endüstride yakıt ve çözücü olarak kullanılır.

Etanol Metabolizması:



Etki Mekanizması ve Zehirlenme Belirtileri: Bazı kişilerde alkol intoleransı olabilir ve toksik etkiler çabuk görülmeye başlar. LD₅₀'si 70kg'lık bir kişi için 250-500g'dır (örneğin çok kısa süre içinde 500-1000 ml viski alınması durumunda – viski %40-50 alkol içerir). Kan düzeylerinin %0.5'i geçmesi ölüm nedenidir; %0.3-0.4'de bilinç kaybı başlar ve bazı kişilerde ölüm görülebilir. Saf etanol deri ve gözler için irritandır. Alınan miktarla görülen toksik etki arasında bir ilişki vardır. Etanol SSS depresanıdır, subletal dozlarda psikoaktif özellik de gösterir. Düşük dozlarda çok konuşma, muhakeme güçlüğü, uyku hali, doz arttıkça mide bulantısı, kusma, vertigo, konuşurken geveleme, göz bebeklerinin büyümesi, yüz kızarması, aşırı derecede terleme, koordinasyon bozukluğu ve ataksi görülür. Asidoz ve dispne'den sonra dolaşım kollapsı meydana gelebilir.

“Kan alkol içeriği (Blood Alcohol Content=BAC)” 100 ml kandaki etanol içeriğinin belirlenmesi için kullanılır.

Aşağıdaki tabloda BAC değerleri ve semptomlar arası ilişki gösterilmektedir:

BAC (mg/dL)	BAC (% v/v)	Semptomlar
50	0.05%	Öfori, aşırı konuşma, rahatlık hissi
100	0.1 %	SSS depresyonu, bulantı, kusma, motor ve sensör fonksiyonlarda azalma, bilinç azalması
>140	>0.14%	Beyin kan akımında azalma
300	0.3%	Uyuşukluk, sersemlik, bilinç kaybı
400	0.4%	Olası ölüm
>550	0.55%	Kesin ölüm

Hafif/Orta/Aşırı Alkol tüketimi sonucu oluşabilecek etkileri aşağıdaki şekilde özetlenmiştir:



Tedavi: İlk olarak hayati belirtiler tespit edilir (ABC= Airway, Breathing, Circulation => Havayolu, Solunum, Dolaşım). Solunuma yardım için endotrekeal tüp takılabilir. Akut zehirlenmelerde gelişen asidoz kanın pH'sı normal düzeylere ulaşana kadar i.v. %3-5 NaHCO₃ çözeltisi uygulanarak kontrol altına alınır. Vücut ısı normal düzeyde tutulmalıdır. Gerekğinde hemodiyaliz uygulanmalıdır. Hipoglisemi varsa %50 dekstroz infüzyonu verilmelidir. Tutarık gelişmesini önlemek için tiamin verilebilir. Üre ve elektrolit dengesi izlenir ve gerekirse sıvı replasmanı yapılır. Semptomlara göre tedavi uygulanır. Anksiyete, bulantı ve tremorlara karşı gerekli ilaçlar kullanılır.

2. UÇUCU OLMAYAN ZEHİRLER

Biyolojik materyalden sıvı ekstraksiyon yöntemi ile izole edilirler (Örn; barbitüratlar, alkaloidler)

3. METALİK ZEHİRLER

Metalik zehirlerin biyolojik materyalden izolasyonlarındaki prensip, biyolojik materyalin ihtiva ettiği organik maddeleri tahrip etmek (=yıkılamak =külleştirmek) ve böylece yıkılama işlemine dayanıklı olan metallerin anorganik ortamda bulunmasını sağlamaktır. Yıkılama işlemi iki şekilde gerçekleştirilebilir:

i. Kuru Yıkılama: Prensip, biyolojik materyalin önce kurutulması ve sonra organik maddelerin 450°C civarında yakılarak tahribine dayanır. Bu metod uçucu olan Hg, As ve Sb dışındaki bütün metallerin aranması için tatbik edilebilir. İki şekilde yapılabilir:

- a. Basit Külleştirme: 50-100 g kadar yıkılanmış doku, 100-1000 ml idrar veya 20-100 ml kan önce yavaş yavaş 110°C’de kurutulur. Kuru numune bir fırına konarak yavaş yavaş 450°C’ye dek ısıtılır. Uçucu bileşikler kaybolup gri beyaz kül elde edilinceye dek beklenir. Genellikle 5-6 saat gerektirir. Elde edilen kül, mineral asitlerden birinde (HCl gibi) çözünerek kalitatif ve kantitatif analiz için uygun hale getirilir.
- b. O₂ altında kül etme ve uçucu mineral bileşiklerin toplanması: Pratikte kullanılmaz.
- c. Kimyasal bir madde varlığında kül etme: Bu metodla biyolojik materyale kireç, manyezi (+KNO₃) gibi maddeler ilave edilir ve yakılır. Yanma esnasında bu ilave edilen kimyasal maddelerle karışımın yüzeyi genişler. Yanma kolaylaştığı gibi, külleşme de daha düşük bir sıcaklıkta gerçekleşir.

ii. Yaş Yıkılama: sulu ortamda organik maddelerin oksidan maddelerle parçalanması esasına dayanır. Bu amaçla kullanılan yöntemler şunlardır:

- Klorla yıkılama
- Asit ve asit karışımı ile yıkılama
- Diğer oksitleyici ajanlarla yıkılama (H₂O₂, kromil klorür gibi)

Bazı Metallerin Biyolojik Örnekte Yıkılanmadan (doğrudan doğruya) Aranmaları

Reinsch Deneyi:

Prensip: Reinsch deneyi biyolojik materyalde arsenik, civa, gümüş, bizmut, antimon, selenyum, tellür ve sülfür gibi metallerin aranması için uygulanan bir ön deneydir. Yıkılama işlemi gerekmeksizin doğrudan doğruya biyolojik madde (kan, idrar doku) kullanılabilir. Bakır levha veya bakır spiral tel üzerinde toplanan metal veya metal karışımlarının kesin tanımı, Gettler ve Kaya tarafından geliştirilmiş bir seri kimyasal deneyle yapılır.

Teknik: Biyolojik materyal olarak mide içeriği, böbrek veya idrar kullanılabilir; 25 g doku Waring blender veya benzeri bir homojenizatörde uygun miktar su ile mesere edilir. Numune olarak idrar kullanılacaksa 10 ml, organ içeriği kullanılacak ise 10 g alınır. Bir erlen içine konulan biyolojik madde üzerine 3-5 ml konsantre HCl ilave edilir.

GIDALARIN TOKSİKOLOJİK ANALİZLERİ

GIDALARDA KANTİTATİF OLARAK KATKI MADDELERİN VE PREZERVATİFLERİN ARANMASI

Kalite ve Standardizasyon Kavramları

Kalite ile ilgili ilk kayıtlar M.Ö. 2150 yılına kadar uzanır. Ünlü Hammurabi Kanunları'nın 229. maddesinde şu hükme yer verilmiştir: "Eğer bir inşaat ustası bir adama ev yapar ve yapılan ev yeterince sağlam olmayıp ev sahibinin üstüne çökerek ölümüne sebep olursa o inşaat ustasının başı uçurulur".

Ancak kalitenin bir kavram olarak ortaya çıkması 19. yüzyıla rastlar. Ancak bu dönemden sonra üreticiler kalite bilinciyle, ürünlerine kendi markalarını vurmaktan gurur duymaya başlamışlardır.

Standardizasyon Nedir?

Standardizasyon, Milletlerarası Standardizasyon Teşkilatı (ISO) tarafından şöyle tarif edilmektedir: "Standardizasyon; belirli faaliyetle ilgili olarak ekonomik fayda sağlamak üzere bütün ilgili tarafların yardım ve işbirliği ile belirli kurallar koyma ve bu kuralları uygulama işlemidir".

Üreticiye Faydaları

- Üretimin belirli plan ve programlara göre yapılmasına yardımcı olur.
- Uygun kalite ve seri imalata imkan sağlar.
- Kayıp ve artıklar en az seviyeye iner.
- Verimliliği ve hasılatı artırır.
- Depolamayı ve taşımayı kolaylaştırır, stokların azalmasını sağlar.
- Maliyeti düşürür.

Standart Nedir?

Standardizasyon çalışması sonucu ortaya çıkan belge, döküman veya esere standart adı verilmektedir. Standartlar bilimsel, deneysel ve teknik çalışmalarının kesinleşmiş sonuçlarını esas alır. Yalnız günümüzün şartlarını belirlemekle yetinmez, aynı zamanda geleceğin

gelişme imkanlarını da göz önünde bulundurur ve gelişmelere ayak uydurur. Kısaca standart; imalatla, anlamda, ölçmede ve deneyde beraberlik manasına gelmektedir.

Kalite Nedir?

Kalite, bir ürün veya hizmetin belirlenen veya olabilecek ihtiyaçları karşılama kabiliyetine dayanan özelliklerin toplamıdır.

Ekonomiye Faydaları

- Kaliteyi teşvik eder, kalite seviyesi düşük üretimle meydana gelecek emek, zaman ve hammadde israfını ortadan kaldırır.
- Sanayiye belirli hedeflere yöneltir. Üretimde kalitenin gelişmesine yardımcı olur.
- Ekonomide arz ve talebin dengelenmesine yardım eder.
- Yanlış anlamaları ve anlaşmazlıkları ve anlaşmazlıkları ortadan kaldırır.
- İhracatta ve ithalatta üstünlük sağlar.
- Yan sanayii dallarının kurulması ve gelişmesini sağlar.
- Rekabeti geliştirir.
- Kötü malı piyasadan kovar.

Tüketiciye Faydaları

- Can ve mal güvenliğini korur.
- Karşılaştırma ve seçim kolaylığı sağlar.
- Fiyat ve kalite yönünden aldanmaları önler.
- Ucuzluğa yol açar.
- Ruh sağlığını korur, stresi önler.
- Tüketicinin bilinçlenmesinde önemli rol oynar.

TSE'nin Belgelendirme Faaliyetleri

Türk Standartları Enstitüsü 1964 yılında uygulamaya koyduğu “TSE Marka Sistemi” ile standarta uygunluk belgelendirmesini başlatmış ve bu sistem ile üreticilerde standartlara uygun ve kaliteli mal üretme şuurunu yaygınlaştırmanın yanı sıra, tüketicilerin can ve mal güvenliğini korumayı; karşılaştırma ve seçim kolaylığı sağlayarak, kalite yönünden aldanmaları önlemeyi hedef almıştır.

Türk Standartları Enstitüsü'nden ürettiği mal için belge almak isteyen üretici, üretim yerinde ve üretmiş olduğu madde, mamül ve mahsül üzerinde yapılan incelemeler sonucu,

belge almaya hak kazandığında, bu hakkını Türk Standartları Enstitüsü ile bir sözleşme imzalayarak elde etmektedir.

Belgelendirme faaliyetleri bugün için 8 ana grupta yürütülmektedir. Bunlar;

1. Üretim yerlerinin,
2. Ürünlerin (madde, mamül, mahsül),
3. Parti mallarının,
4. İthal malların,
5. Laboratuvarların,
6. Hizmet yerlerinin,
7. Kalite sistemlerinin ve
8. Çevre yönetim sistemlerinin belgelendirilmesidir.

YAĞLAR VE TOKSİKOLOJİK ANALİZLERİ

En önemli 3 besin ögesinden biri olan yağlar, "lipid" adı verilen büyük bir grup maddenin alt grubudur. Lipidler; yağlar, yağ asitleri, fosfolipidler, steroller, mumlar gibi organik bileşikler içeren geniş bir gruptur.

Yağlar, yağ asitlerinin gliserinle yaptıkları triesterlerdir; trigliserit yapısındadırlar.

Yağların organizmadaki en önemli fonksiyonları enerji sağlamalarıdır.

(1 g yağ = 9 kcal) Ayrıca esansiyel yağ asitlerinin kaynağıdır, A, D, E, K gibi yağda çözünen vitaminlerin taşıyıcısıdırlar ve bu vitaminlerin bağırsaktan absorbe edilmesine yardım ederler.

Yağların ve tüm lipidlerin ana bileşeni "yağ asidi" denilen çeşitli karboksilik asitlerdir.

Yağ asitleri doymuş ve doymamış olmak üzere iki genel sınıfa ayrılabilirler.

Bitkisel (sıvı) yağların çoğu doymamış yağ asitleridir. En önemli doymamış yağ asitleri zeytin yağındaki oleik asit, soya yağındaki linoleik asit ile linolenik asit ve hayvansal dokularda bulunan araşidonik asitlerdir.

Yağlar kaynaklarına, fiziksel özelliklerine, kimyasal bileşenlerine göre sınıflandırılabilirler.

Kaynaklarına Göre Yağlar:

- Hayvansal Yağlar
- Bitkisel Yağlar

Bitkisel Yemelik Yağlar

Bitkisel yemeklik yağlar ayçiçeği, pamuk, mısır, soya fasulyesi, yer fıstığı, zeytin gibi çeşitli bitkilerin tohum, meyve veya çekirdek gibi kısımlarından elde edilen ve yemeklik özellik almaları için çeşitli işlemlere tabi tutulan yağlardır. Kendilerine has renk, tat ve kokuda olmalıdırlar. Elde edildikleri bitkilerin adlarına göre sınıflandırılırlar.

Zeytinyağları

Zeytin bitkisinin (*Olea europa*) olgun meyvelerinden sıkılmak suretiyle elde edilen, oda sıcaklığında sıvı olan bir yağdır. Niteliklerine göre 3 ana sınıfa ayrılır:

1. Natürel Zeytinyağları
2. Rafine Zeytinyağları
3. Tip Zeytinyağları

1) **Natürel Zeytinyağları:** Olgun zeytin tanelerinden sızdırma veya basınç gibi fiziksel yöntemlerle çıkarılan; takiben santrifüjleme, dinlendirme ve süzme gibi fiziksel ve mekanik işlemlere tabi tutulan, hiçbir kimyasal işlem görmeyen zeytinyağlarıdır.

a) **Sızma Zeytinyağları:** Serbest yağ asidi oranı % 1'i geçmez.

b) **Ekstra-Ekstra Zeytinyağları:** Serbest yağ asidi oranı % 1,5'u geçmez.

c) **Ekstra Zeytinyağları:** Serbest yağ asidi oram % 3'ü geçmez.

d) **Birinci Yemeklik Zeytinyağları:** Serbest yağ asidi oram % 4,5'u geçmez.

2) **Rafine Zeytinyağları:** Fiziksel yolla elde edilmiş olan natürel zeytinyağlarının nötralleştirme, ağartma, koku giderme gibi kimyasal işlemlere tabi tutularak arıtılması ile elde edilen zeytin yağlarıdır. Bu işlemlerde kullanılan kimyasal maddeler sağlığa zararlı olmamalıdır. Rafine yağlar arıtma işlemlerinde kullanılan maddelerden arındırılmış olmalı, serbest alkali veya sabun içermemeli ve serbest yağ asidi oranı % 0,3'ü geçmemelidir.

3) **Tip Zeytinyağları:** Natürel zeytinyağları ve rafine zeytinyağlarının karıştırılmasıyla elde edilen yağlardır. 3 tipi vardır:

a) **Riviera Tipi Zeytinyağları:** Serbest yağ asidi oranı % 1'i geçmez.

b) **A Tipi Zeytinyağları:** Serbest yağ asidi oranı %1,5'u geçmez.

c) **B Tipi Zeytinyağları:** Serbest yağ asidi oranı % 2,5'u geçmez.

Zeytinyağları

- Tüm zeytinyağları 20 °C'de sıvı, berrak, tortusuz, kendine has normal lezzette olmalı, yabancı koku içermemelidir.
- Herhangi bir yabancı yağ ile veya mineral yağ vb. sentetik yağlarla karıştırılmamalıdır.
- Renkleri altın sarısından yeşile kadar değişebilir. Rafine yağlar açık sarı olabilir. Boyanmış veya yabancı bir madde karıştırılmış olmamalıdır.
- Sağlık Bakanlığı tarafından uygun görülen cins ve miktarda antioksidan madde ilavesi yapılabilir.

TSE Tarafından Uygun Görülen Antioksidanlar

Antioksidan Adı	İzin verilen Maksimum Miktar
Propil Gallat Oktil Gallat Dodesil Gallat	100 mg/ 1 kg yağ
Bütillenmiş Hidroksi Toluen (BHT) Bütillenmiş Hidroksi Anisol (BHA)	200 mg/ 1 kg yağ
Tabii ve Sentetik Tokoferoller	200 mg/ 1 kg yağ

β-karoten TSE tarafından onaylanmış renk verici maddedir.

Yağlarda Kalite Kontrolü ve Numune Alma:

Yemeklik bitkisel yağ analizlerinde:

- Yağ sıvı ise, berrak yeşil veya tortulu ise numune kabında iyice karıştırılıp örnek alınmalıdır. Yağ katı ise beklenen erime noktasının 10 °C üzerinde bir sıcaklığa ayarlı bir etüvde ısıtılarak alınan numune çalışılır.
- Zeytinyağında yapılan tüm analizlerde oda sıcaklığında süzgeç kağıdından süzme yapılır, rutubet ve tortusu giderilmiş yağ kullanılır.

Zeytinyağlarında Yapılan Analizler

- 1) Fiziksel Analizler
 - a. Görünüm

- b. Kırılma indisi
- c. Dansite

- 2) Serbest Yağ Asitlerinin Tayini
- 3) Peroksit Sayısının Tayini
- 4) İyot Sayısının Tayini
- 5) Sabunlaşma Sayısının Tayini
- 6) Sabunlaşmayan Maddeler Tayini
- 7) Mineral Yağ Aranması
- 8) Yabancı Yağ Arama Deneyleri (pamuk yağı, susam yağı gibi)
- 9) Natürel, Rafine, Tip Zeytinyağlarının Tanımlanması
- 10) Antioksidan Tayini

Zeytinyağı haricindeki bitkisel ve yemeklik yağlar için 7. ve 9. maddeler haricindeki tüm analizler ve:

- Uçucu Madde (rutubeti de içine alan ve 105 °C'de uçan maddelerin toplamı) Tayini
- Eterde Çözünmeyen Yabancı Madde ile Kül Tayini (eterde çözünmeyen maddeler toprak, kum ve benzeri maddeleri, mineral maddeleri, karbonhidratları, azotlu maddeleri, bazı reçineler ile kalsiyum ve alkali sabunların bir kısmını içine alır).
- Sabun Miktarı Tayini
- Demir, Bakır Tayinleri
- Araşidonik asit ve Daha Yüksek Yağ Asitleri Miktar Tayini analizleri yapılmaktadır.

SUDA TOKSİKOLOJİK TEMEL ANALİZLER

Sağlık yönünden su analizleri:

- Fiziksel
- Kimyasal
- Bakteriyolojik yönden yapılır.

Ancak suyun temizliği hakkında karar verebilmek için bu analizlerin hepsinin aynı anda alınmış su örneği üzerinde yapılması gerekmektedir.

FİZİKSEL VE KİMYASAL ANALİZLER İÇİN NUMUNE ALMA

- Su numunesi laboratuvara gönderilerek kimyasal analizler yapılacaksa, en az 2 L suya ihtiyaç vardır. Bu miktar suların normal kimyasal analizleri için yeterlidir. Ancak ayrıca toksik maddelerin tayini de gerekiyorsa, en az 15 L numune almak gerekir.
- Su, polietilen, borosilikat cam (pyrex) veya polipropilen kaplara konulmalıdır. Aynı cins kapakla havayla teması kesilecek şekilde kapatılmalıdır.
- Numune almadan önce, kap incelenecek suyla 3 defa çalkalanmalıdır.
- Numune kabı üzerine etiket yapıştırılmalıdır.

Numune Etiketinde Şunlar Bulunmalıdır:

- Suyun adı
- Numunenin alındığı yer, tarihi, saati
- Numuneyi alan kişinin kimliği
- Numune kaynağındaki sıcaklık
- Yapılacak analizin adı
- Açıklama: Suyu daha önce bir işlem uygulanıp, uygulanmadığı, hava şartları, su düzeyi, akış hızı, mümkünse debisi gibi bilgiler yazılır.

Numune Alma Sıklığı

- Fiziksel ve kimyasal analizler için numune alırken;
 - fiziksel analizler için (bulanıklık, renk, tat ve koku tayinleri) haftada en az bir defa,
 - kimyasal analizler için ise, 6 ayda 1 defa yapılmalıdır.
- Zehirli maddelerin tespiti halinde daha sık numune alınmalı ve analizler daha sık yapılmalıdır.

İÇME SULARI VE TOKSİKOLOJİK ANALİZLER

- İçme suları berrak, tortusuz, renksiz olmalı; çürük, yosun, küf, hidrojen sülfür, amonyak vb. gibi maddeler bulundurmamalıdır ve kokusuz olmalıdır.

- İçme sularının fiziksel ve kimyasal özellikleri TS 266’da verilmiş standartlara uygun olmalıdır.

SU ANALİZLERİ İKİ SINIF ALTINDA İNCELENEBİLİR:

I. FİZİKSEL ANALİZLER

- Suyun kullanıma verilebilmesi için aranılan özellikler, berrak, renksiz, kokusuz olmasıdır.
- Fiziksel Analizler:
 - Suyun rengi (Saydam, renksiz)
 - Suyun bulanıklığı (Berrak)
 - Suyun kokusu (Kokusuz)
 - Suyun asiditesi (Memba suları: 6.5-8.5, Kullanma suları:6.5-9.2)
 - Elektriksel kondüktivite tayini (Suda çözünmüş tuzların göstergesi)

II. KİMYASAL ANALİZLER

- Suyun temizliği hakkında, kesin kararı bakteriyolojik analizler verse de, bakteriyel kontaminantlar dışında diğer kimyasal analizlerin de yapılması şarttır. Kimyasal analizlerin yapılmasındaki amaçlar şunlardır:

- Suların kirliliği ve temizliği hakkında fikir edinmek
- Temizlikleri saptanmış, işlem görerek temizlenmiş suların temizliklerini koruyup, korumadıklarını kontrol etmek
- Sağlığa zararlı bazı maddeleri içerip, içermediklerini araştırmak
- Sağlık için gerekli maddeleri içerip, içermediklerini ve bunların yeterli konsantrasyonda bulunup, bulunmadığını saptamak

Bu kapsam altında,

- Zehirli madde analizleri (kurşun, krom, kadmiyum gibi)
- Sağlığa zararlı madde analizleri (nitrit, nitrat ve florür gibi)
- İçilebilme özelliğine etki eden maddelerin ve özelliklerin analizleri (alkil benzen, deterjan, sülfonat, fenolik maddeler, pH, sertlik gibi)
- Kirlenmeyi gösteren maddelerin analizleri (amonyak, nitrit, organik maddeler gibi)
- Radyoaktiflik analizi
- Doğal olarak içme sularında bulunabilecek florür konsantrasyonunun saptanması verilebilir.

NİTRİTLER

•Nitritler organik maddelerin parçalanmasının ilk ürünü olan amonyağın okside olması ile meydana gelirler ve zehirli maddelerdir. Suda nitritlerin varlığı, organik maddelerin mineralizasyonunun tam olmadığını gösterir. TSE, içme ve kullanma sularında nitrit bulunmasına izin vermez. TSE'ye göre içme ve kullanma sularındaki nitrit miktarı 0.1-0.5 mg/L düzeyinde bulunabilir. Daha fazlasına izin verilmez.

SUDA NİTRİT TAYİNİ

- Suda nitrit tayini spektrofotometrik olarak yapılacaktır.
- Yöntemin esası, nitritin sülfanilik asit ile diazolar oluşturması ve diazolanmış sülfonilik asitin naftilamin HCl ile oluşturduğu kompleksin verdiği renk şiddetinin 520 nm'de kolorimetrik olarak ölçülmesine dayanır (Griess reaksiyonu).
- Diazo ışığa hassas olan diazonyum tuzlarına verilen genel addır. Gümüş nitratlar ve potasyum dikromat gibi diğer ışığa hassas maddeler gibi UV'ye hassastır ve UV ile parçalanabilir.

SÜT ÜRÜNLERİNDE TOKSİKOLOJİK AÇIDAN KALİTE KONTROLERİ

Süt ve süt ürünlerinin nitelikleri hakkında tam bir değerlendirme yapabilmek için şu inceleme ve analizlere ihtiyaç vardır:

1. Duyusal (Organoleptik) inceleme
2. Fiziksel analiz
3. Kimyasal analiz
4. Mikrobiyolojik analiz

Süt ve süt ürünlerinde yapılacak analizlerin doğru sonuç vermesi için, önce incelenecek örneğin tekniğe uygun olarak alınması gerekir. Örnek alma işlemi bu konuda yeterli teknik bilgiye sahip yetkili kişi tarafından yapılmalıdır. Örnek alırken bir tutanak hazırlanmalı ve bu tutanak örneği alan ve yanında hazır bulunan kişiler tarafından imzalanmalıdır.

Örnek almada kullanılan araç ve gereçler:

1. Kimyasal analizler için örnek kabı çok temiz ve kuru olmalıdır.
2. Bakteriyolojik analizler için örnek kabı steril olmalıdır.

Sütte Yapılan Analizler

1. Duyusal (Organoleptik) inceleme:

Sütün rengi, kokusu, tadı, görünüşü ve kıvamına bakılarak yapılır.

2. Fiziksel Analizler

Organoleptik incelemelerle tespit edilemeyen niteliklerin, bir fiziksel olaya dayalı olarak işleyen aletlerle tespitidir.

1. Özgül ağırlık tayini
2. Donma noktası tayini
3. Erime noktası tayini
4. Kaynama noktası tayini
5. Refraktometre indisi
6. Viskozite ölçümü
7. Isı derecesi
8. Sediment testi
9. Ağırlık
10. Boyutlar
11. pH

3. Kimyasal Analizler

- a. Kir miktar tayini
- b. Yabancı madde aranması
- c. Asitlik derecesi
- d. Yağ miktarı tayini
- e. Kuru madde ve yağsız kuru maddeler
- f. Sütte prezervatif madde aranması: Sütlere herhangi bir madde konması yasak olmakla birlikte bazen sütün dayanıklılığını artırmak, sütte bakteri üremesini engellemek ve bozulmayı önlemek amacıyla katılabilmektedir. Bu nedenle şüpheli görülen sütlerde prezervatif madde aranması gerekir.

En çok kullanılan prezervatif maddeler şunlardır:

- Formaldehit
- Karbonat
- Salisilik asit
- Hidrojen peroksit
- Borik asit
- Sütte redüktaz ve fosfataz deneyleri.

YOĞURTLARDA TOKSİKOLOJİK ANALİZLER

Yoğurt, çiğ sütlerin veya içinde uygun nitelikte süt tozu katılmış sütlerin özel şekilde ısıtıldıktan veya kaynatıldıktan sonra yoğurt mayası katılarak süt asidi ile fermente edilmesi sonucu ile elde edilir. Yoğurt kendine özgü lezzet ve kıvamda bir süt ürünüdür.

- Yoğurtlara sütün bünyesinde bulunan doğal unsurlardan farklı herhangi bir madde katılmamalıdır.
- Yoğurdun üzerinde veya içinde kirlilik belirtisi veya kendinden başka özellikte jelatin veya nişasta gibi kıvam verici herhangi bir madde katılmamalıdır.
- Yoğurt normal kıvamlı homojen bir kitle kıvamında bulunmalı, dipte tortu bulunmamalı, suyu ayrılmış olmalı, 1 ml'de 10'dan çok küf veya maya bulundurmamalıdır.
- Yoğurdun tadı ve kokusu kendine özgü olmalıdır, renk, koku, tat, aroma verici madde içermemelidir.
- Yoğurtlarda süt asidi cinsinden asitlik %0.8-1.575 arasında olmalıdır.
- Yoğurt yapımında kullanılan sütler usulüne uygun olarak ısıtılmalı veya kaynatılmalıdır.

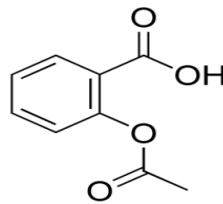
Uygulanan kimyasal analizler şunlardır:

- a. Yoğurtta asitlik tayini
- b. Kuru madde miktar tayini
- c. Yağ tayini
- d. Isıtılma ve kaynatılma kontrolü
- e. Jelatin aranması
- f. Nişasta aranması

SIKLIKLA ZEHİRLENMELERE NEDEN OLAN ASİDİK İLAÇLARIN BİYOLOJİK ÖRNEKTEN İZOLASYONU, TEMEL TANIMA TESTLERİ ve İNCE TABAKA KROMATOGRAFİSİ (İTK) ile BELİRLENMESİ

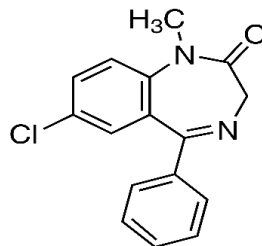
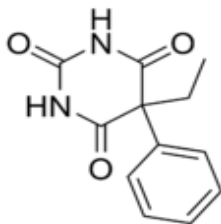
1. GENEL ÖZELLİKLER

En çok kullanılan salisilat türevi asetil salisilik asittir (ASA). Dünyada en yaygın olarak kullanılan ilaçlardan biri olan ASA (parasetamol), salisilik asitin fenolik hidroksil grubunun asetillenmesiyle elde edilir. ASA kristal yada beyaz toz halinde de bulunabilir. Aspirinin temel etki mekanizması, COX-1 ve COX-2 enzim aktivitelerini geri dönüşümsüz olarak inhibe etmesidir. Sonuçta prostoglandin oluşumu ve bilinen en güçlü aggregan ve vazokonstriktör ajan olan tromboksan A2 oluşumu azalmaktadır. ASA COX-1'i COX-2 göre daha fazla inhibe eder. ASA, analjezik, antipiretik ve antienflamatuar amaçlarla kullanılmaktadır. Antipiretik etki göstermez. Gebelik kategorisi 1.ve 2.trimester için C, 3.trimester için D olup, anne sütüne geçmektedir.



Şekil. Asetil salisilik asit yapısı

Barbitüratlar ve benzodiazepinler, sedatif hipnotik etkili ilaçlardır. Tüm benzodiazepinlerin genel yapısı, 2-aminobenzodiazepin-4-oksitatları içerir. Benzodiazepin grubu ilaçlar içerisinde en çok tercih edilen ilaç olan, diazepam beyaz veya beyaza yakın sarı renkte, hemen hemen kokusuz, kristal yapılu bir tozdur. Gebelik kategorisi D olup, emzirme döneminde kullanımından kaçınılmalıdır. Barbitüratlardan en çok tercih edilen ilaç olan fenobarbital, 5-etil-5-fenilbarbitürik asit yapısındadır. Fenobarbital renksiz kristaller veya beyaz, kokusuz kristal yapıda toz halinde bulunur. Gebelik kategorisi D olup, emzirme döneminde kullanımından kaçınılması gereken bir ilaçtır.



Şekil 4. Fenobarbital ve diazepam yapısı (sırasıyla)

2. ENDİKASYONLARI ve KULLANIM YERLERİ

ASA, ağrı, akut miyokard enfarktüs, anstabil anjina, ateş, dismenore, geçici iskemik kriz, migren, romatoid artrit ve soğuk algınlığı gibi pek çok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Diazepam, alkol yoksunluk sendromu, anksiyete, kas spazmı, kısmı nöbetler, sedasyonun indüksiyonu, tetanos ve tonik-klonik nöbetlerin tedavisinde kullanılır. Fenobarbital ise kısmı nöbetler, miyoklonik nöbet, sedasyonun indüksiyonu ve idamesi, status epileptikus, tonik-klonik nöbetler ve uykusuzluk tedavisinde kullanılmaktadır.

3. KULLANIM YOLU

Aspirin yetişkinlerde oral yoldan, çocuklarda ise rektal yoldan suppozituar formunda uygulanabilir. Fenobarbital oral ve parenteral; diazepam oral, rektal ve parenteral yoldan kullanılır.

4. FARMAKOKİNETİK

Aspirin, mide ve ince bağırsağın üst kısmından hızlı bir şekilde emilir. Alınımından 30-40 dakika sonra plazmada en üst düzeye ulaşır ve ortalama bir saat sonra trombosit inhibisyonu görülmektedir. Enterik kaplı aspirinlerde plazmada üst düzey konsantrasyona ulaşmak için 3-4 saat gerekmektedir. Oral biyoyararlanımı ortalama %40-50 arasındadır ve enterik kaplı, uzun salınımlı ve mikrokapsüllü formülasyonların biyoyararlanımı daha düşüktür. Aspirinin yarılanma ömrü 15-20 dakika olup, dolaşımdan hızla temizlenir.

Diazepam, oral yoldan verildiğinde en hızlı absorbe olan benzodiazepin türevidir. Vücutta geniş ölçüde dağılır ve % 99 oranında plazma proteinlerine bağlanır. Karaciğerde demetilasyon ve hidroksilasyon ile metabolize olur. Bütün metabolitleri glukuronidasyon sonucunda idrarla atılır.

Fenobarbitalin % 90'ı bağırsaklardan absorbe olur. Tedavide kullanılan barbitüratlar içinde en uzun etkili ilaçtır. İntravenöz yoldan verildiğinde etkisi 5 dakikada başlar. Plazma proteinlerine % 20-45 oranında bağlanır. Karaciğerde hidroksilasyona uğrayarak inaktif metabolitlerine dönüşür. Karaciğerde mikrozomal enzimlerle metabolize edilen diğer ilaçların da metabolizmasını hızlandırır. % 25'i idrarda değişmeden atılırken, kalan kısmı p-hidroksi, glukoronit ve sülfat konjugatları halinde atılır.

5. TERAPÖTİK DOZ

Aspirinin analjezik etkisi için gerekli serum konsantrasyonu 100 µg/ml, antienflamatuvar etkisi için 150-300 µg/ml'dir. Fenobarbital sedatif etkisini 10 µg/ml, antikonvülsan etkisini ise 10-40 µg/ml düzeyinde gösterir. Diazepam için terapötik kan konsantrasyonu 0,1-10 µg/ml aralığındadır.

6. TOKSİK DOZ

Kısa süre içerisinde 150-300 mg ASA alındığında hafif yada orta, 300 mg/kg'dan çok alındığında ciddi zehirlenmelere neden olur. Kronik zehirlenme ise 100 mg/kg/gün'den yüksek dozda ve iki günden uzun süre alınması ile ortaya çıkar.

Sedatif hipnotik ilaçlar olan barbitürat ve benzodiazepinlerin toksik dozları, alınan ilaca, kullanan kişinin yanıtına ve birlikte alınan diğer ilaçlara göre değişir. Alkolle birlikte alındıklarında, tedavi dozlarında bile toksik etkileri ortaya çıkabilir. Benzodiazepinlerin terapötik aralığı çok geniş olduğundan, ağız yoluyla önerilen tedavi dozunun 15-20 katı alındığında bile bilinç kaybı görülmeyebilir. Bununla birlikte diazepam, midazolam ve diğer benzodiazepinlerin ven içine hızla verilmesinden sonra solunum durması görülebilir. Barbitüratların toksik dozuna ise, hipnotik dozunun 5-10 katı alındığında ulaşılır.

7. TOKSİSİTE MEKANİZMASI

ASA zehirlenmelerinde toksisite, sindirim kanalı iritasyonu, solunum merkezinin uyarılması, metabolizma hızının artması, karbpnhidrat ve yağ metabolizması ile hemostazın bozulması sonucu ortaya çıkar. Barbitüratlar ve benzodiazepinler, gama amino bütirik asitin (GABA) etkinliğini artırıp koma ve solunum durmasına neden olurlar.

8. ZEHİRLENME BELİRTİLERİ

Aspirin ile hafif ve orta dereceli zehirlenmelerde, hipotermi, kulak çınlaması, sağırılık, bulantı, kusma, dehidratasyon, takipne, letarji ile birlikte şiddetli hiperpne, uyarılabilirlikte artma, solunumsal alkoloz, metabolik asidoz, konvülsiyon ve koma görülür. Ciddi dereceli zehirlenmelerde ise şiddetli hiperpne, konvülsiyon, koma, ensafalopati, beyin ödemi, ritim bozukluğu, akciğer ödemi, asidoz, pıhtılaşma bozukluğu, kan basıncında düşme görülür.

Barbitürat ve benzodiazepinlerle zehirlenmelerde, ağız yoluyla yüksek dozda alındıktan sonraki 30-120 dakika içinde hipotansiyon, bilinç bulanıklığı, konuşma bozukluğu, ataksi, nistagmus, hipotermi, koma ve solunum durması gelişir.

9. ZEHİRLENME TEDAVİSİ

ASA zehirlenmelerinde gerekliyse temel ve ileri yaşam desteği verilir;

- Metabolik asidoz varsa sodyum bikarbonat verilir.
- Dehidratasyon varsa % 0,9'luk NaCl verilir.
- Serum potasyum ve kreatinin düzeylerine bakılarak potasyum verilmelidir. İdrarın alkalileştirilmesi sırasında hipopotasemi riski artar. Anürik hastalara potasyum verilmemelidir.

- Hipoglisemi varsa ven içine dekstrozu verilir.
- Hipotermi varsa soğuk uygulama yapılır.
- Konvülsiyonların tedavisinde ilk seçenek benzodiazepinlerdir.

Hastaya verilebilecek özgül antidot ve ilaç bulunmamaktadır. ASA zehirlenmelerinde hasta kusturulmaz, zehirlenmeyi izleyen bir saat içinde mide yıkanır ve aktif kömür uygulanır. İlacın atılımının artırılması amacıyla, sodyum bikarbonat ile idrar alkalileştirilir. Hemodiyaliz şu durumlardan biri varsa uygulanır:

- Akut zehirlenmelerde serum salisilat düzeyi 100 mg/dL'nin üzerinde olması
- Kronik zehirlenmede serum salisilat düzeyi 60 mg/dL'nin üzerinde, bilinç değişiklikleri ve asidoz olması,
- Tedaviye dirençli asidoz varsa,
- Böbrek yetmezliği varsa,
- Konjestif kalp yetmezliği varsa,
- Akut akciğer yetmezliği varsa,
- Tedaviye dirençli merkezi sinir sistemi bozuklukları

Barbitürat ve benzodiazepinlerle zehirlenmelerde, temel ve ileri yaşam desteği uygulanır. Varsa koma ve hipotansiyon tedavi edilir. Belirti ve bulgusu olmayan hastalar ilaç alındıktan sonra en az 6 saat gözlenmelidir. Benzodiazepinlerin özgül antidotu flumazenil olup, barbitüratların özgül antidotu yoktur. Bu ilaçlarla zehirlenme vakalarında hasta kusturulmaz, mide yıkaması 1 saat içinde ve yüksek dozlarda alımlarda etkilidir. Aktif kömür bilinci açık hastalarda oral yoldan, bilinci kapalı hastalarda ise endotrakeal tüp konulmasından sonra nazogastrik sonda ile uygulanır. Atılımın artırılması amacıyla fenobarbital zehirlenmelerinde, yinelenen dozlarda aktif kömür verilerek ilacın yarı ömrü kısaltılır. Yine fenobarbital zehirlenmelerinde, sodyum bikarbonat uygulanarak idrar alkalileştirilir ve böylece ilacın atılımı artırılır. Hemodiyaliz ve hemoperfüzyon da sadece fenobarbital zehirlenmelerinde etkilidir.

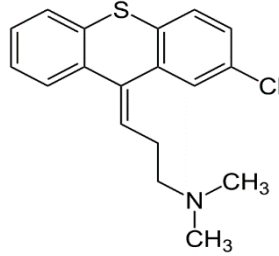
SIKLIKLA ZEHİRLENMELERE NEDEN OLAN BAZİK İLAÇLARIN BİYOLOJİK ÖRNEKTEN İZOLASYONU, TEMEL TANIMA TESTLERİ ve İNCE TABAKA KROMATOGRAFİSİ (İTK) ile BELİRLENMESİ

1. GENEL ÖZELLİKLER

Fenotiyazinler (Klorpromazin):

Klorpromazin alifatik fenotiyazin yapıda bir antipsikotik ilaçtır. Kokusuz veya çok hafif amin kokulu beyaz veya krem-beyaz renkte toz veya mumsu görünümlü katı bir madde olup, çözünürlüğü düşüktür.

Klorpromazin mezolimbik sistemdeki postsinaptik dopamin D₂ reseptörleri ile presinaptik D₂ reseptörleri (somatodendritik otoresptörler) bloke eder ve dopamin'in turnover'ini artırarak etki gösterir.

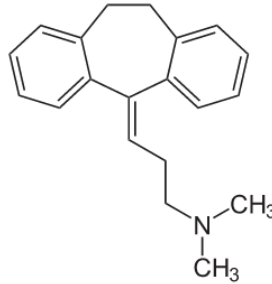


Şekil 5. Fenotiyazin (klorpromazin)

Amitriptilin:

Amitriptilin oral ve parenteral yoldan kullanılan trisiklik bir antidepresandır. Kokusuz veya hemen hemen kokusuz, renksiz kristaller veya beyaz ya da beyaza yakın bir toz olup, çözünürlüğü iyidir.

Trisiklik antidepresanların kesin etki mekanizmaları tam olarak anlaşılamamıştır, fakat en önemli etkilerinin noradrenalin ve serotonin gerialımını azaltmaları olduğu düşünülmektedir.



Şekil 6. Amitriptilin

2. ENDİKASYONLARI ve KULLANIM YERLERİ

Fenotiyazinler (Klorpromazin):

Akut intermitant porfiri, akut psikoz, bulantı/kusma, hıçkırık, şizofreni ve tetanusta kullanılmaktadır.

Amitriptilin:

Asıl olarak depresyonda kullanılmaktadır. Ayrıca diyabetik nöropati, fibromiyalji, hıçkırık, migren profilaksisi, nöropatik ağrı ve uykusuzlukta da kullanılabilir.

3. KULLANIM YOLU

- Klorpromazin oral ve parenteral yoldan kullanılabilir.
- Amitriptilin oral ve parenteral yoldan kullanılan trisiklik bir antidepresandır.

4. FARMAKOKİNETİK

Fenotiyazinler (Klorpromazin):

Klorpromazin oral yoldan verildiğinde hızla absorbe olur. Gastrik mukozada ve karaciğerden ilk geçiş sırasında yoğun ilk geçiş etkisine uğrar. Oral yoldan verilen klorpromazin'in biyoyararlanımı %19-51 arasındadır. Oral yoldan verildiğinde sedatif etkisi (antipsikotik etkisi değil) 30-60 dakika içinde görülür ve 4-18 saat kadar devam eder. Antipsikotik etkileri yavaş bir şekilde ortaya çıkar ve hastalar arasında önemli ölçüde değişkenlik gösterir. Klorpromazin vücuttaki dokulara ve vücut sıvılarına geniş ölçüde dağılır. Plazma proteinlerine başta α_1 -asit glukoproteinler olmak üzere %92-97 oranında bağlanır. Klorpromazin plasentayı aşar. Klorpromazin geniş ölçüde metabolize edilir. Çok sayıda metabolitleri belirlenmiştir. Yarı ömrü 23-37 saat arasında değişir ve enterohepatik döngüye girer. Bazı metabolitleri farmakolojik olarak aktiftir. Bir kısım metabolitleri konjugasyona uğrar ve konjuge olmayan diğer metabolitleri ile birlikte idrarla atılır. Yaklaşık %1 kadarı da değişmeden atılır. Klorpromazin kısmen safra yolu ve feçesle de atılıma uğrar.

Amitriptilin:

Amitriptilin gastrointestinal kanaldan iyi absorbe olmasına karşın, absorpsiyonu bireysel değişkenlik gösterebilir. Advers etkileri ilk dozdan hemen sonra görülürken, antidepresan etkisinin tam olarak ortaya çıkması için birkaç haftanın geçmesi gerekir. Oral ve intramüsküler (IM) verilişten sonra plazma doruk konsantrasyonlara ulaşması 2-12 saat içinde olur. Trisiklik antidepresanlar plazma ve dokularda proteinlere yüksek oranda bağlanırlar. Plazmada esas olarak α_1 -asid glikoprotein fraksiyonuna bağlanırlar. Amitriptilin'in yarı ömrü 10-50 saat arasında değişir. Amitriptilin karaciğerde lipofilik bir ilaç olan ve kan-beyin

engelini aşabilen nortriptilin'e metabolize olur. Gerek amitriptilin gerekse nortriptilin akciğerler, kalp, beyin ve karaciğere dağılır. Nortriptilin'in plasentayı aştığı ve anne sütüne geçtiği bilinmektedir. Her ikisi de enterohepatik sıklüse girerler. Nortriptilin gibi lipofilik metabolitlerinin enterohepatik sıklüse geldikleri bağırsaklardan tekrar absorbe edilerek daha ileri düzeyde metabolize edilmeleri yüksek bir olasılıktır. Amitriptilin'in tek bir dozunun %25-50'si 24 saat içinde idrarda aktif metabolitleri halinde atılıma uğrar. Feçesle de az miktarda atılıma uğrar.

5. TERAPÖTİK DOZ

Fenotiyazinler (Klorpromazin):

Yetişkin idame dozu = 75-300 mg/gün

Çocuklar için doz = 0.5mg/kg/gün

Amitriptilin:

Terapötik plazma düzeyi: 95 ng/mL

6. TOKSİK DOZ

Fenotiyazinler (Klorpromazin):

Ekstrapiramidal bulgular, antikolinerjik yan etkiler ve ortostatik hipotansiyon tedavi dozlarında bile görülür. Akut ilaç alınma durumlarında toksik doz değişkendir. Yetişkinlerde 200-2000 mg/gün alımlarda antikolinerjik etkiler, ekstrapiramidal bulgular, hipotansiyon, QT uzaması, agranülositoz, nötropeni görülebilir. Çocuklarda klorpromazinin 15 mg/kg dozlarında toksik etkiler görülebilir.

Amitriptilin:

Yaşamı tehdit eden doz 10-20 mg/kg olmakla birlikte daha düşük dozlarda bile ciddi zehirlenmeler görülebilir. Öldürücü dozu genellikle 1-3 g'ın üstündedir. Çocuklarda 15 mg/kg'ı öldürücü olabilir.

7. TOKSİSİTE MEKANİZMASI

Fenotiyazinler (Klorpromazin):

Toksik etkileri büyük oranda kalp damar sistemi üzerinedir. Antikolinerjik etkilerine bağlı olarak taşikardi, alfa adrenerjik reseptör blokörü etkilerine bağlı olarak ortostatik hipotansiyon, EKG'de QRS ve QT uzaması, ventrikül aritmileri (*Torsade de Pointes*) görülür. Merkezi sinir sistemindeki dopamin reseptörlerini bloke ederek ekstrapiramidal distonik reaksiyonlara, alfa adrenerjik reseptörleri bloke ederek miyozise neden olurlar. "Atipik antipsikotikler" olarak bilinen yeni kuşak antipsikotik ilaçların, merkezi sinir sistemindeki dopamin reseptörlerinin yanı sıra serotonerjik ve noradrenerjik reseptörler üzerine de etkileri vardır.

Amitriptilin:

TSA ilaçların toksik etkileri başlıca dolaşım ve merkezi sinir sistemi üzerinedir. Zehirlenme tablosu ilaçların kolinerjik ya da alfa adrenerjik reseptörleri bloke edici güçlerine ya da katekolamin geri alımını ve kalpte iletiyi baskılama özelliklerine bağlı olarak gelişir. Karaciğerde oluşan aktif metabolitleri ve enterohepatik dolaşıma girmeleri de toksik etkilerini artırır. Dokulara ve plazma proteinlerine yüksek oranda bağlanırlar. Bu nedenle dağılım hacimleri büyük ve yarılanma ömürleri uzundur.

8. ZEHİRLENME BELİRTİLERİ

Fenotiyazinler (Klorpromazin):

Hafif Zehirlenme: Sedasyon, miyozis, ortostatik hipotansiyon, antikolinerjik sendrom (ağız kuruluğu, deride kuruluk, taşikardi, idrar retansiyonu), klozapine bağlı tükürük salgısında artış

Ciddi Zehirlenme: Koma, konvülsiyon ve solunum durması, hipotermi veya hipertermi

* Malign Nöroleptik Sendrom: Kronik antipsikotik kullanımı sırasında rijidite, hipertermi, terleme, laktik asidoz, rabdomiyoliz

Amitriptilin:

Antikolinerjik bulgular: Uykuya eğilim, huzursuzluk, görsel ve işitsel sanrılar, deliryum, koma, miyozis, deri ve mukozalarda kuruluk, terlemede azalma, taşikardi, hipertansiyon, mide ve barsak hareketlerinde azalma, idrar retansiyonu, miyoklonik sıçramalar ve yüksek ateş

Kalp damar sistemi bulguları: Genellikle ilk 8 saat içinde gelişir, iletide bozulma, aritmiler ve hipotansiyon gözlenir. Sinüs taşikardisi, ventrikül taşikardisi ve fibrilasyonu görülebilir. Bradikardiler ciddi zehirlenme ve kötüye gidişin habercisidir.

Merkezi sinir sistemi bulguları: Konvülsiyonlar, miyoklonik sıçramalar, koma ve solunum baskılanması görülebilir. Konvülsiyonların yol açtığı kas yıkımına bağlı akut böbrek yetmezliği gelişebilir.

9. ZEHİRLENME TEDAVİSİ

Fenotiyazinler (Klorpromazin):

- Gerekirse temel ve ileri yaşam desteği verilir. Varsa koma, konvülsiyon ve hipotansiyon tedavi edilir. Malign Nöroleptik Sendrom'da ilaç kesilmeli, soğuk uygulama yapılmalıdır. Antipiretikler etkisizdir.
- Özgül antidot yoktur.
- Kusturma yapılmaz. Antipsikotiklerin antikolinerjik etkileri nedeniyle emilimi gecikebileceğinden yaşamı tehdit eden dozlar alınmışsa, bir saatten sonra bile mide yıkaması yapılabilir. Aktif kömür yararlıdır.

- Zorlu diürez, hemodiyaliz ve hemoperfüzyon etkili değildir.

Amitriptilin:

- Gerekliyse temel ve ileri yaşam desteği verilir. Varsa koma, konvülsiyon ve hipotansiyon tedavi edilir. Trisiklik antidepresanlara bağlı konvülsiyon tedavisinde kardiyotoksik etkiyi artırabileceğinden fenitoin kullanılmamalıdır. Nabız alınamayan ventrikül taşikardisinde öncelikle defibrilasyon yapılmalıdır. Bulguları olan tüm hastalar EKG ile izlenmeli, bulgusu olmayan hastalarda bile izlem en az 8 saat sürdürülmelidir.
- Özgöl antidotu yoktur. Fizostigmin kalpte ileti bozukluklarına, asistoliye neden olabileceği ve konvülsiyonları artırabileceğinden kullanılmamalıdır.
- Mide yıkaması, ilk 6 saat içinde ve yüksek dozlarda (>10 mg/kg) TSA alındığı durumlarda yapılmalıdır. Aktif kömür bilinci açık hastalarda ağız yolu ile, bilinci kapalı hastalarda endotrakeal entübasyondan sonra nazogastrik sonda ile verilir. Ciddi zehirlenmelerde 4-6 saat arayla yinelenen dozlarda uygulanır.
- Hemodiyaliz, hemoperfüzyon ve zorlu diürez etkili değildir.

Geçmişte madde bağımlısı olduğu bilinen, 22 yaşındaki erkek psikiyatri hastası, evde ailesi tarafından bilinci kapalı bir şekilde bulunarak acil servise getirilmiştir. Hastanın trisiklik antidepresan (amitriptilin) ve antipsikotik (klorpromazin) ilaç tedavisi gördüğü bilinmektedir. Aile, hastanın suistimal amaçlı kodein içeren öksürük şurubunu içmiş olabileceğinden şüphelenmektedir, ancak hastanın intihar amaçlı aşırı dozda ilaç almış olabileceği de ifade edilmektedir. Acil servise geldiğinde bilinci kapalı olan hastada taşikardi, hipotansiyon, hipotermi ve solunum depresyonu bulunmaktadır. Destekleyici tedavi yapılan hastanın idrar örneği, toksikoloji laboratuvarında incelenmek üzere gönderilmiştir. Yapılacak analizler sonrası, hastanın tam olarak hangi maddeden zehirlendiğini tespit edilecek ve ileri tedavisi bu doğrultuda yapılacaktır.

DENEYİN YAPILIŞI

Salisilatların Renk Testi İle Tanımlanmaları

Deneyin esası: Salisilatların, Demir-3-klorür ve fenol içeren Trinder reaktifi ile mor-menekşe renk vermesi esasına dayanır.

Yöntem: 1 ml idrara 1-2 damla Trinder reaktifi eklenir. Oluşan mor-menekşe renk, salisilat veya salisilamid varlığını gösterir. Aspirin ve aminosalisilik asidin tedavi edici dozlarında pozitif sonuç alınır.

Barbitüratların “Dithizon” Renk Testi İle Tanımlanmaları

Deneyin esası: Barbitüratların, dithizon reaktifi ile turuncu renk vermesi esasına dayanır.

Yöntem:

- 1) Santrifüj tüplerine, 1,5 ml örnek (kan, serum, plazma veya idrar) üzerinde 1,5 ml pH: 7,0 tamponu ve 1,5 ml diklorometan eklenir.
- 2) Tüplerin ağzı parafilm ile kapatılıp kısa bir süre vortekslendikten sonra 10 dk 3000 rpm’de santifüj edilerek üstteki su tabakası atılır.
- 3) Aynı tüp üzerine 1 ml dilüe civa klorür eklenir. Yavaşça karıştırılır, 5 dk 3000 rpm’de santrifüj edildikten sonra üst su fazı atılır.
- 4) 5 ml distile su eklenir. Vortekslenerek organik faz yıkanır. Sulu faz atıldıktan sonra diklorometan fazına 4-5 damla dithizon çözeltisi yavaşça eklenir, hafifçe karıştırılır.
- 5) Barbitürat varlığında renk turuncuya dönüşür. Renk değişmeyip mavi kaldığında örnekte barbitürat olmadığı anlaşılmaktadır.

Fenotiyazinler (Klorpromazin)

1 ml idrara 1 ml FPN reaktifi eklenir. Pembe - kırmızı renk fenotiyazin türevlerinin varlığını gösterir. Oluşan renkler kaybolabilir, bu yüzden renk oluşumu hemen gözlenmelidir.

(FPN: FeCl_3 + Perklorik asit + Nitrik asit)

Amitriptilin, imipramin, desipramin ve trimeprinin

0,5 ml idrara 3 ml Forrest reaktifi ilave edilir. İdrardaki ilaç miktarına bağlı olarak beyaz - açık yeşil (buğulu) renk hızla oluşur. Fenotiyazinler de pozitif sonuç verebilir.

Amitriptilin-2

0,5 ml idrara 1 ml Mandelin reaktifi ilave edilir. Koyu mavi ve hemen ardından koyu kahverengi rengin oluşması amitriptilin varlığını gösterir.

Ön tüp deneyleri sonucu bulduğunuz ilaç asidik ise asidik ilaçlar için uygulanacak itk yöntemine, şayet bazik ilaç bulunduğu takdirde bazik ilaçlar için uygulanacak itk yöntemine geçiniz.

Sıklıkla Zehirlenmelere Neden Olan Asidik Yapıdaki İlaçların İnce Tabaka Kromatografisi ile Tanımlanmaları

Deneyin esası: Asitlendirilmiş idrarın (pH 3) eter ile tüketilmesini takiben elde edilen ekstrede zayıf asit yapısındaki ilaçlar (salisilik asit, barbitüratlar) ince tabaka kromatografisi ile ayrılırlar. Daha sonra salisilatlar, trinder revalatörü ile turuncu; barbitüratlar ise cıva tuzları ile beyaz, difenilkarbazon ile de pembe-mor renkli leke verirler.

Deneyin Yapılışı:

- 1) 5 ml örneğin deney tüpüne alınmasını takiben 3-5 damla derişik HCl eklenerek örnek asitlendirilir. Asitlik düzeyi turnusol kağıdı ile kontrol edilir.
- 2) Asitlendirilen örnek üzerine 5 ml eter ilave edilerek zayıf asidik yapıdaki ilaçların non-polar faza ekstraksiyonu sağlanır. 30 saniye vortekslenir.
- 3) Kapsül içerisinde eter fazı 40-50°C'lik su banyosunda kuruluğa kadar uçurulur.
- 4) 0,25 mm kalınlığında aktive edilmiş Silika jel F adsorban plakları iki kısma ayrılır; plağa 1 ml metanolde çözülmüş idrar ekstresi ve salisilat, barbitürat referans standardı ve idrar ekstresi 9-10 defa tatbik edilir.
- 5) Referans standart olarak ilaçların 1 mg/ml konsantrasyonda metanol içinde hazırlanmış standart çözeltileri kullanılır.
- 6) Spot edilen noktalar UV lambası 366 nm de kontrol edilir.
- 7) Tatbik işlemi bittikten sonra plak hareketli faz çözeltisine daldırılır.
- 8) Hareketli faz olarak; Etil asetat-Metanol-Amonyak (85:10:5) kullanılır.
- 9) İnce tabaka plağı çözücü yüksekliği 10 cm olunca tanktan çıkarılır, kurutulur. UV lambası 366 nm de lekelerin yerleri işaretlenir.
- 10) Revelatör çözeltileri püskürtülür. Revelatörler;
 - a) *Barbitüratlar için:* cıva nitrat ve difenilkarbazon (Barbitüratlar cıva tuzları ile beyaz, difenilkarbazon ile de pembe-mor renkli leke verirler).
 - b) *Salisilat için;* Trinder reaktifi (Salisilatlar Trinder reaktifi ile turuncu renkli leke verirler).
- 11) Lekeler belirlendikten sonra Rf değerleri saptanır ve standartların Rf değerleri ile karşılaştırılarak sonuç belirlenir.

Sıklıkla Zehirlenmelere Neden Olan Bazik Yapıdaki İlaçların İnce Tabaka Kromatografisi ile Tanımlanmaları

Alkalilendirilmiş idrarın (pH 8) kloroform ile tüketilmesini takiben elde edilen ekstrede zayıf bazik yapıdaki ilaçlar (klorpromazin gibi fenotiyazin grubu nöroleptik ilaçlar, imipramin, amitriptilin gibi trisiklik antidepresanlar, diazepam, klordiazepoksit gibi benzodiazepin grubu tranklizanlar) ince tabaka kromatografisi ile tanımlanırlar.

Deneyin Yapılışı:

1. 5 ml numunenin deney tüpüne alınmasını takiben örnek 3-5 damla NH_3 eklenerek bazikleştirilir. Baziklik düzeyi turnusol kağıdı ile kontrol edilir.
2. Alkalilendirilmiş örnek üzerine 5 ml kloroform ilave edilerek zayıf bazik yapıdaki ilaçların non-polar faza ekstraksiyonu sağlanır. 30 saniye vortekslenir.
3. Kloroform fazı 40-50°C'lik su banyosunda kuruluğa kadar uçurulur.
4. 0,25 mm kalınlığında aktive edilmiş Silika jel F adsorban plakları kullanılır. Plağa 1 ml metanolde çözülmüş idrar ekstresi ve fenotiyazin, amitriptilin, kodein referans standardı ve idrar ekstresi 9-10 defa tatbik edilir.
5. Referans standart olarak ilaçların 1 mg/ml konsantrasyonda metanol içinde hazırlanmış standart çözeltileri kullanılır.
6. Spot edilen noktalar UV lambası 366 nm de kontrol edilir.
7. Tatbik işlemi bittikten sonra plak hareketli faz çözeltisine daldırılır. Hareketli faz olarak; Etil asetat-Metanol-Amonyak (85:12:3) kullanılır.
8. İnce tabaka plağı çözücü yüksekliği 10 cm olunca tanktan çıkarılır, kurutulur. UV lambası 366 nm de lekelerin yeri belirlenerek işaretlenir.
9. Revelatör çözeltileri püskürtülür. Revelatör olarak bazik ilaçlar için Dragendorf reaktifi püskürtülür. Dragendorf belirteci ile pek çok bazik madde turuncu leke verir.
10. Lekeler belirlendikten sonra R_f değerleri hesaplanır ve standartların R_f değerleri ile karşılaştırılarak sonuç belirlenir.

SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEMLE SUDA NİTRİT TAYİNİ (TSE)

Nitrit, organik maddelerin parçalanmasının ilk ürünü olan amonyağın (NH_3) okside olması ile meydana gelir ve zehirli bir maddedir. Ayrıca organik maddelerin mineralizasyonunun tam olmadığını göstermesi bakımından da suda bulunması sakıncalı kabul edilir. Kaynak veya içme ve kullanma sularında bulunmasına izin verilmez.

Yöntemin Esası : Nitritin sülfanilik asit ile diazolar oluşturması, diazolanmış sülfanilik asit ie naftilamin HCl'in verdiği renk şiddetinin kolorimetrik olarak ölçülmesine dayanır.

SUDA NİTRİT TAYİNİ

Stok ve Standart Çözeltilerin Hazırlanışı:

- **Stok Çözelti:** 1,232 g NaNO_2 10 ml nitritsiz suda çözülür, 1 ml kloroform ilave edilir. Çözelti hacmi 20 ml'ye tamamlanır. Stok çözelti 12,5 mg/ml nitrit azotu içerir.
- **Ara Stok:** 10 ml stok çözelti sülfanilik asit ile 50 ml'ye seyreltilir (Ara stok 2,5 mg/ml nitrit azotu içerir).
Ara stok çözelti taze hazırlanmalı ve ışıktan korunarak saklanmalıdır.
- **Deney için Stok Çözelti:** 1 ml ara stok çözeltisi 100 ml'ye nitritsiz su ile tamamlanır, karıştırılır (Deney stok çözeltisi 0,025 mg/ml nitrit azotu içerir).

Stok Çözeltiden Alınacak Hacim (ml)	Standart Çözelti Konsantrasyonu ($\mu\text{g/ml}$ Nitrit Azotu)
0,00	0,00
0,10	0,10
0,20	0,20
0,40	0,40
0,70	0,70
1,00	1,00
1,40	1,40
1,70	1,70
2,00	2,00
2,50	2,50

Yukarıdaki tabloda belirtilen hacimlerde NO₂ çözeltisinden alınır ve 25 ml'ye nitritsiz su ile tamamlanarak tabloda nitrit azotu üzerinden belirtilen konsantrasyonlardaki çalışma standartları hazırlanır.

Deneyin Yapılışı :

1. 5 ml standart çözelti 1 ml EDTA çözeltisi ve 1 ml sülfanilik asit karıştırılır, 5-10 dakika beklenir.
2. 1 ml naftilamin HCl eklenir.
3. 1 ml Na-asetat tamponu eklenip 10-30 dakika beklenir, renk şiddeti 520 nm'de okunur.
4. Absorbansa karşı nitrit azotu miktarı grafiğe geçirilir.
5. Aynı işlemler 5 ml bilinmeyen örnek ve distile su ile de yapılır. Distile su ile hazırlanan kör olarak kullanılır (5 ml ile çalışılacağı zaman reaktiflerde 1/10 oranında seyreltme yapılmalıdır).

ÇÖZELTİLER:

1. EDTA (5 g/L): 500 mg EDTA 100 ml suda çözülerek hazırlanır.
2. Sülfanik asit çözeltisi (5 g/L): 600 mg sülfanilik asit 70 ml sıcak nitritsiz suda çözülür. 20 ml'den HCl konur ve 100 ml'ye nitritsiz su ile tamamlanır.
3. Naftilamin HCl (6g/L): 600 mg naftilamin HCl (C₁₀H₉N.HCl), 1 ml derişik HCl ile karıştırılır, 100 ml'ye nitritsiz su ile getirilir.
4. Sodyum asetat tamponu (2N): 16.40 g Na asetat veya 27,2 Na-asetat trihidrat suda çözülüp 100 ml'ye getirilir, gerekiyorsa süzülür.

**UÇUCU ZEHİRLERİN BİYOLOJİK MATERYALDE KALİTATİF
TANIMLANMALARI (MİKRODİFÜZYON YÖNTEMİ VE
KARBOKSİHEMOGLOBİNİN NİTEL ANALİZİ)**

Tablo: Mikrodifüzyon apareyinde uçucu zehirlerin aranması

ARANACAK ZEHİR	İÇ ODACIK (1)		DIŞ ODACIK (2)
	Absorban reaktif	Renk reaktifi ve sonuç	Zehiri açığa çıkarmak için kullanılan reaktif (0.5 ml)
CO	—	PdCl_2 (siyah renk)	% 10 H_2SO_4
Siyanür	% 10 NaOH	% 5-10 $\text{FeSO}_4 + \text{HCl}$ (mavi çökelek)	% 10 H_2SO_4
Klorlu hidrokarbonlar (CHCl_3 , CCl_4 , ...)	0.1 ml saf toluen	1 ml %30 NaOH + 0.1 ml saf piridin (kırmızı renk)	—
Alkoller (etil, metil, izopropil, ...)	—	Ansties reaktifi (yeşil renk)	Doymuş Na_2CO_3
Metil alkol	H_2SO_4	0.1 ml 37.5 mM Kromotropik asit (pembe-viyole)	Doymuş Na_2CO_3
Fenoller	—	Millon reaktifi (koyu kırmızı)	% 10 H_2SO_4
Amonyak	—	Nessler reaktifi (turuncu renk)	—
Sülfür	% 10 NaOH	% 10 CdSO_4 (sarı çökelek)	% 10 H_2SO_4

DENEYİN YAPILIŞI :

1. İç odacığa adsorban reaktif ve renk reaktifi ilave edilir.
2. Dış odacığa 0.5 ml zehiri açığa çıkarmak için kullanılan reaktif ilave edilir.
3. Dış odacığa gerekli reaktiflerin ilavesinden sonra en son olarak 1 ml biyolojik materyal eklenir.

Mikrodifüzyon Yöntemi İçinde Kullanılan Çözeltiler

1. PdCl_2 çözeltisi
2. %10 FeSO_4
3. Der.HCl
4. %30 NaOH
5. Piridin
6. Kromotropik asit çözeltisi (37,5 mM)
7. Ansties reaktifi
3.70 g potasyum dikromat 150 ml distile suda çözülür. 280 ml der. H_2SO_4 yavaş yavaş karıştırılarak ilave edilir. Distile su ile 500 ml'ye tamamlanır.
8. % 10 H_2SO_4
9. Doymuş Na_2CO_3
10. %10 NaOH
11. Toluen
12. Millon reaktifi
10 g metalik Hg 20 ml der. HCl içinde çözülür ve eşit hacimde su ilave edilerek karıştırılır.
13. %10 FeCl_3
14. Nessler reaktifi
a) 2 g HgCl_2 , 6 g KI ile birlikte az miktarda suda çözülür. 17 g miktarı suda çözülerek ilave edilir. Karıştırıldıktan sonra 100 ml'ye tamamlanır.
b) 3,5 g Potasyum iyodür ve 1,25 civa 2-klorür (HgCl_2) 80 ml suda doymuş HgCl_2 çözeltisinden bu karışıma hafif kırmızı bir çökelek oluşuncaya dek karıştırılarak ilave edilir. 12 g KOH bu çözelti içinde çözülür, az miktarda doymuş HgCl_2 ilave edildikten sonra su ile 100 ml ye tamamlanır. Bir gece bekletilir, berrak kısmı ayrılarak kullanılır.
15. Paladyum klorür çözeltisi (PdCl_2)
a) 0,22 g PdCl_2 , 250 ml 0,01 N HCl de çözülür. Gerektiğinde hafifçe ısıtılır.
b) 1 g $\text{PdCl}_2\text{-H}_2\text{O}$ 100 ml seyreltik HCl de (35 ml konsantre HCl su ile 100 ml ye tamamlanır) çözülür. Çözünmenin tamamlanması için hafifçe ısıtılmalıdır.
16. %10 CdSO_4 çözeltisi
17. der. HNO_3

KAYNAKLAR

1. Vural M, Toksikoloji Lab. Kitabı, Ankara Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ankara, 1975.
2. Cooper P, Poisoning by Drugs and Chemicals, Plant and Animals 3rd Ed., 1974 Thomas Waide and Sons Ltd., Leeds, London.
3. Winchester H, Poisoning and Drug Overdose, H.B. Saunde Company, Philadelphia, USA.
4. Burookes V, Poisons, 3rd Ed., 1975 Robert E. Krieger Publishing Company, Huntington, New York.
5. Hinberg J, Wieth JO, Quantitation Determination of Methanol in Biological Fluids, J. Lab. and Clin. Med. 355-362, 1963.
6. Kaye S, Handbook of Emergency Toxicology, 3rd Ed. Charles and Thomas Publisher, Springfield, Illionis, USA.
7. Sunshine I, Methodology of Analytical Toxicology, 1975, CPC Press, Cleveland.

METALİK ZEHİRLER

Bazı Metallerin Biyolojik Örnekte Yıkılanmadan (doğrudan doğruya) Aranmaları

REİNSCH DENEYİ

DENEYİN YAPILIŞI :

1. Ucunda 1 cm²'den büyük bir bakır levha bulunan bakır tel önce (1:1) seyreltik HNO₃ içine ve daha sonra distile su içine daldırılarak temizlenir.
2. Temizlenmiş bakır levha asitli numune çözeltisi içine daldırılır ve kaynar su banyosu üzerinde 10-15 dakikada renkler oluşur. (Bizmut daha uzun süre bekleme gerektirir).
3. Yaklaşık 15 dakika sonra bakır levha alınır ve üzerinden distile su geçirildikten sonra filtre kağıdı arasında bastırmadan kurutulur. Bakır levha üzerinde toplanmış maddenin rengi, metalik zehirin cinsi hakkında bize ön bilgi verir.
 - a) Bakır levha üzerinde gümüşü renk : **Cıva**
 - b) Bakır levha üzerinde parlak siyah renk : **Arsenik**
 - c) Bakır levha üzerinde mat siyah renk : **Bizmut**
 - d) Bakır levha üzerinde mor renk : **Antimon** varlığını gösterir.

Bu test ile 20 ml çözeltide bulunan 50 ml cıva, 5 mg arsenik, 20 mg antimon, 20 mg antimon, 20 mg bizmut tanınabilir.

II – Bakır levha üzerinde toplanan metalin kesin tanımlanması (2. aşama deneyleri):

ÖNEMLİ NOT : Örneğiniz için sadece ön deneyler sonucunda var olduğunu düşündüğünüz metal ile ilgili 2.aşama deneyini yapınız. Her standart için o metale ait olan 2. aşama deneyi yapılacaktır.

Cıva Aranması :

1. Bir saat camına filtre kağıdı yerleştirilir ve sırayla 1-2 damla (KI+Na₂SO₄) ve 1-2 damla %5 CuSO₄ damlatılır.
2. Distile su geçirilmiş ve üzerinde cıva toplandığı düşünülen bakır levha karışıma temas edecek şekilde filtre kağıdının üzerine konur. Levhanın üstü saat camı ile kapatılır. 15 dakika bekletilir. Bakır levha üzerindeki birikinti cıva ise, filtre kağıdı üzerinde sarı-kırmızı bir renk belirir.

Bizmut Aranması :

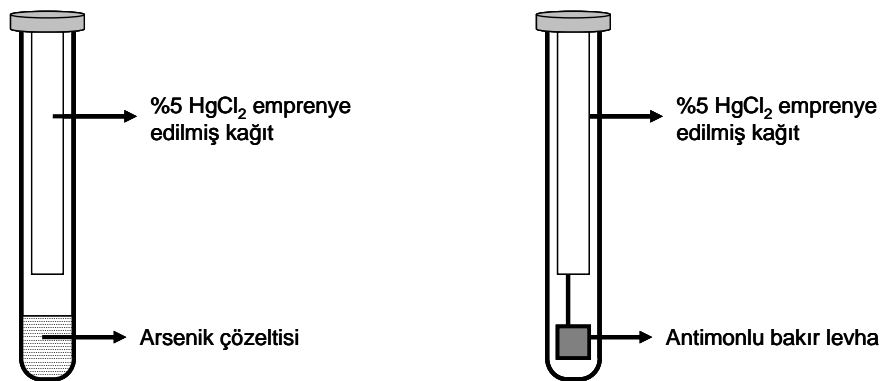
1. Üzerinde bizmut toplandığı düşünülen bakır levha bir tüpe konur. Üzerine sırayla 1 ml %5 Na_2SO_3 , 1 ml %15 HNO_3 konarak 5 dakika çalkalanır. Bizmut varsa çözeltiye geçer.
2. Çözelti diğer bir tüpe aktarılır. Üzerine 1 ml su, 1 ml kinin sülfat-KI reaktifi ilave edilir. Bizmut varsa turuncu renk oluşur.

Arsenik ve Antimon Aranması :

Arsenik ve antimonun aynı bakır levha üzerinde toplandığı durumlarda bakır levha 0.5 ml %10 KCN ile çalkalanır. Arsenik çözeltiye geçer. Antimon ise bakır levhada kalır. Bu nedenle arsenik aranması için çözelti, antimon aranması için ise bakır levha kullanılarak Gutzeit testi uygulanır.

Gutzeit Deneyi:

1. Bir tüp içine 1 ml çözelti (arsenik için) veya kalıntı bulunan bakır levha (antimon için) 1 ml %20 H_2SO_4 , 1-2 saf granül çinko. 1-2 damla SnCl_2 ilave edilir ve tüpün ağzı sıkıca bir mantar tıpa ile kapatılır.
2. Arsenik varsa, mantarın kenarından sarkıtılan %5 HgCl_2 veya AgNO_3 emprenye edilmiş filtre kağıdında, konsantrasyona bağlı olarak, sarı-turuncudan kahverengi-siyah renge kadar değişen renk tonları (AgNO_3 ile siyah) görülür.
3. Gutzeit testi antimon varlığında da pozitif sonuç verir. Fakat bu durumda oluşan renk sarı-siyahtır ve renk kaybolduğu halde arsenik ile oluşan renk sabit kalır.



Şekil : Gutzeit deneyinin basit uygulanması

Organik maddeleri asit dijestiyon ile yıkılanmış idrar, kan , saç, tırnak gibi biyolojik materyal çözeltileri de Gutzeit testinde kullanılabilir.

YOĞURTA NİŞAŞTA ARANMASI (TSE)

DENEYİN YAPILIŞI:

1. Bir deney tüpüne 2-3 ml yoğurt örneği alınır, üzerine 2-3 ml distile su eklenir.
2. Bir baget yardımıyla karıştırılarak ayran haline getirilir.
3. Üzerine 2-3 damla lugol çözeltisi (1 g iyot ve 2 g potasyum iyodürün 300 ml damıtık sudaki çözeltisi) damlatılıp karıştırılır.
4. Mavi renk nişasta varlığını gösterir.
5. Nişasta bulunmaması durumunda, çözelti sarı renk alır.

YOĞURTTA JELATİN ARANMASI

DENEYİN YAPILIŞI

1. 10 ml iyice karıştırılmış yoğurt örneği bir erlene alınır.
2. Üzerine 10 ml cıva(II)nitrat çözeltisi eklenir ve iyice çalkalanır.
3. 20 ml distile su katılarak yeniden çalkalanır.
4. 5-10 dakika bekletildikten sonra süzgeç kağıdından süzülür.
5. Fazla jelatin varsa çözelti bulanıktır, berrak değildir.
6. Bir deney tüpüne 5 ml süzüntü alınır ve üzerine 5 ml doymuş pikrik asit çözeltisi eklenerek yeniden çalkalanır.
7. Önemli miktarda (% 1 gibi) jelatin varsa sarı çökelek oluşur. Az miktarda jelatin varsa bulanıklık/bulutlanma görülür.

SÜTTE PREZERVATİF MADDE TAYİNİ

Sütlere prezervatif madde katılması uygun değildir. Bununla birlikte sütün dayanıklılığını arttırmak sütte bakteri üremesini engellemek veya fazla miktarda bakteri üremiş sütlerin bozulmalarını önlemek amacıyla süte sıklıkla formaldehit, salisilik asit, karbonatlar, borik asit, boratlar ve benzoik asit gibi bazı prezervatif maddeler katılabilmektedir.

Bu maddelerin, süt dışında bazı gıda maddelerine belli oranlarda eklenmesine izin verilse de sütlere hiçbir prezervatif maddenin katılması uygun değildir. Bu nedenle yukarıda bahsi geçen maddelerden en çok kullanılanlar bu laboratuvar kapsamında analiz edilecektir.

A - SÜTTE FORMALDEHİT ARANMASI

Formaldehit (formol) gıda maddelerinin dezenfeksiyonunda çok kullanılır, antiseptik özelliği yüksektir. Ancak süte eklenen formol kazeinin çözünürlük yeteneğini azaltır ve hazmı güçleştirir.

DENEYİN YAPILIŞI:

1. Kısım:

- İncelenecek süttten 2 ml deney tüpüne alınır ve üzerine 10 ml derişik HCl ve 3-4 damla %3'lük FeCl_3 çözeltisi eklenir.
- Bagetle karıştırılan ve pıhtılaşan karışım birkaç dakika su banyosunda tutulur.
- Menekşe-mor renk formol varlığını gösterir.

2. Kısım:

Bir deney tüpüne 2 ml süt konup üzerine 2-3 damla Nessler ayıracı eklendiğinde örnekte formol varsa siyah-kahve renk oluşur.

B - SÜTTE SALİSİLİK ASİT ARANMASI

DENEYİN YAPILIŞI:

1. 5 ml süt örneği bir erlene konur ve birkaç damla HCl ile asitlendirilip pıhtılaşmaya kadar çalkalanır ve pileli süzgeç kağıdından süzülür.
2. Süzüntü 5 ml eterle ekstre edilir.
3. Eter tabakası su banyosunda uçurulur.
4. % 3'lük FeCl_3 'den 1-2 damla damlatılır.
5. Viyole rengin oluşumu salisilik asit varlığını gösterir.

C - SÜTTE KARBONAT ARANMASI

Özellikle sıcakta kendi haline terk edilen sütte mikroorganizmalar çoğalıp süütün ekşimesine ve kesilmesine neden olurlar. Ancak süt kalevilendirildiğinde, ısıtıldığı zaman bozuk olsa dahi kesilmez. Bikarbonatlarla kalevilendirilmiş sütlerde mikroorganizmalar çok çabuk ürerler.

DENEYİN YAPILIŞI

Bir deney tüpüne 2 ml süt konur ve üzerine 5 ml alkol eklenir. Üzerine Rozalik asidin etanoldeki % 1 lik çözeltisinden 2-3 damla eklenip karıştırıldığında gül kırmızısı renk oluşması karbonat varlığını gösterir. Karbonat bulunmayan sütte hafif esmerimsi turuncu renk oluşabilir.

D - SÜTTE HİDROJEN PEROKSİT ARANMASI

Hidrojen peroksit az miktarda eklenirse süütün biraz daha uzun zaman dayanmasına ve ekşimemesine neden olur. Pişmemiş sütte hidrojen peroksit, katalaz ve diastazlar tarafından bozularak çabuk kaybolur. Hidrojen peroksit fazla toksik özellik göstermese de diğer prezervatifler gibi süütün vitaminlerini harap ettiğinden katılması istenmez.

DENEYİN YAPILIŞI:

- 1) Deney tüpüne 2 ml süt örneği konur.
- 2) 1-2 damla vanadin asit çözeltisi (vanadin oksit'in sülfürik asitteki %5'lik çözeltisi, 5g vanadin oksit 50 ml derişik sülfürik asitte çözülür, bu çözelti 50 ml distile su üzerine eklenir) süt örneğine yavaş yavaş eklenir.
- 3) Esmer kırmızı renk hidrojen peroksit varlığını gösterir.

ZEYTİNYAĞLARINDA ANTİOKSİDAN MADDE ARANMASI (TSE)

Bu deneyler zeytinyağlarına antioksidan bir madde katılıp katılmadığını ortaya çıkarmak için uygulanır.

A - FOSFOMOLİBDİK ASİT DENEYİ

1. 1 ml kadar incelenecek zeytinyağı, porselen bir kapsülde 5 damla %20'lik fosfomolibdik asit çözeltisi (etilen glikol monometileter içine) ile ezilerek karıştırılır.
2. 7 damla derişik amonyum hidroksit katıldıktan sonra mavi veya yeşil-mavi rengin korunması örnekte antioksidan madde bulunduğunu gösterir.

B - DEMİR (III) SÜLFOSİYANÜR DENEYİ

1. 1 ml kadar zeytinyağına bir deney tüpünde 2 ml etanol katılır.
2. Kaynayan su banyosunda 10 dakika tutulur ve akan su altında solutulur.
3. Demir (III) sülfosiyanür çözeltisinden (1 kısım % 0,2'lik demir (III) klorür + 1 kısım 0,1 N amonyum sülfosiyanür + 2 kısım su) eklenir.
4. Antioksidan bulunmayan zeytinyağlarında 0,1 ml çözelti ile uzun zaman kalıcı renk oluşur. Antioksidan katılmış yağlarda ise 1-2 dakikada renk gider.

C-TURNBOL MAVİSİ DENEYİ

1. 1 damla incelenecek zeytinyağı bir süzgeç kağıdına damlatılır ve bir dakika Turnbol mavisi reaktifine (100 ml % 2'lik demir (III)-sülfat çözeltisi, 100 ml % 0,1'lik potasyum demir (III)-siyanür çözeltisi, 200 ml su, 2 ml sülfirik asit) daldırılır.
2. Yağ lekesinin mavi bir renk alması numunede antioksidan bulunduğunu gösterir. Süzgeç kağıdı su ile yıkandıktan sonra alkole daldırılır ve kurutulursa renkli leke daha dayanıklı hale gelir.

**SIKLIKLA ZEHİRLENMELERE NEDEN OLAN ANALJEZİK İLAÇLARIN
BİYOLOJİK ÖRNEKTE TEMEL TANIMA TESTLERİ İLE NİTEL ve
SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEMLE NİCEL TAYİNİ
SALİSİLATLAR**

1. GENEL ÖZELLİKLER

Salisilatlar, non-steroidal antiinflamatuvar ilaçlar (NSAİİ) grubuna ait çok sık kullanılan bileşiklerdir. Asetilsalisilik asit (aspirin) ise en sık kullanılan salisilat türevidir. Sodyum salisilat, dietilamin salisilat, kalsiyum asetilsalisilat diğer salisilatlara örnek olarak verilebilir.

2. ENDİKASYON/KULLANIM YERLERİ

Analjezik, antipiretik ve antiinflamatuvar etkileri vardır. Aspirinin antitrombotik olarak kullanımı vardır. Romatoid artrit ve osteoartrit gibi romatizmal hastalıklar, ateş, dismenore, baş ağrısı, kas-iskelet kaynaklı ağrıda kullanılırlar.

3. KULLANIM YOLU

Genellikle oral ve dermal yoldan kullanılırlar.

4. FARMAKOKİNETİK

Hafif asidik özelliklerinden dolayı mide ortamında non-iyonize hale geçerler ve kolay absorbe olurlar. % 80-90 oranında serum proteinlerine bağlanırlar.

Aspirin $t_{1/2}$ = 13-20 dakika

Sodyum salisilat $t_{1/2}$ = 2-3 saat

Karaciğerde metabolize edilirler. Başlıca metabolitler salisilik asit ve onun glukronid konjugatlarıdır. İdrarla atılırlar.

5. TERAPÖTİK DOZ

Aspirin ve sodyum salisilat: 500-1000 mg/4-6 saat

Terapötik düzey: 15-30 mg/dl

6. TOKSİK DOZ

150-300 mg/kg arası hafif-orta derecede, 300 mg/kg üzeri dozda ciddi zehirlenmeler görülür. 500 mg/kg üzerindeki dozlar ölüme neden olabilir.

Serum salisilat düzeyi > 110 mg/dl: Letal

7. TOKSİSİTE MEKANİZMASI

Salisilat zehirlenmesinin belirti ve bulguları sindirim kanalının iritasyonu, solunum merkezinin uyarılması, oksidatif fosforilasyon zinciri, trombosit aktivite, karbonhidrat ve yağ metabolizması işlevlerinde bozulma sonucu oluşur.

8. ZEHİRLENME BELİRTİLERİ

Doz	Zehirlenmenin Derecesi	Semptomlar
150-300 mg/kg	Hafif-Orta	Hipertermi, kulak çınlaması, sağırılık, bulantı, kusma, dehidratasyon, takipne, letarji ile birlikte şiddetli hiperpne, uyarılabilirlikte artma, solunumsal alkaloz, metabolik asidoz, konvülsiyon ve koma
> 300 mg/kg	Ciddi	Şiddetli hiperpne, konvülsiyon, koma, ensefalopati, beyin ödemi, ritim bozukluğu, akciğer ödemi, asidoz, pıhtılaşma bozukluğu, kan basıncında düşme

9. ZEHİRLENME TEDAVİSİ

Acil yaşam desteği verilir. Hasta kusturulmaz. Mide yıkaması yapılabilir. Aktif kömür uygulanır. Hastanın klinik tablosu dikkatlice izlenmelidir (serum düzeyi, asit-baz dengesi, elektrolit durumu, nörolojik durum). Sodyum bikarbonat ile bazik diürez uygulanarak atılımın artırılması sağlanır. Ayrıca metabolik asidoz da bu yolla düzeltilmiş olur. Özgül antidotu yoktur. Semptomatik ve destekleyici tedavi uygulanır.

Serum Salisilat Düzeyine Göre İntoksikasyon Ağırlık Derecesinin Değerlendirilmesi

A. İlk Kan Düzeyi (1.KD)

- 1) 1. KD < 30 mg/dl

Hasta asemptomatik ise temas non-toksik kabul edilir ve hasta taburcu edilebilir.

- 2) 1. KD \geq 30 mg/dl

Hasta semptomatik ise 1. KD'den en az 2 saat sonra ikici bir kez kan düzeyi ölçülmeli ve 2. KD'ye göre hasta değerlendirilmelidir.

B. İkinci Kan Düzeyi (2.KD)

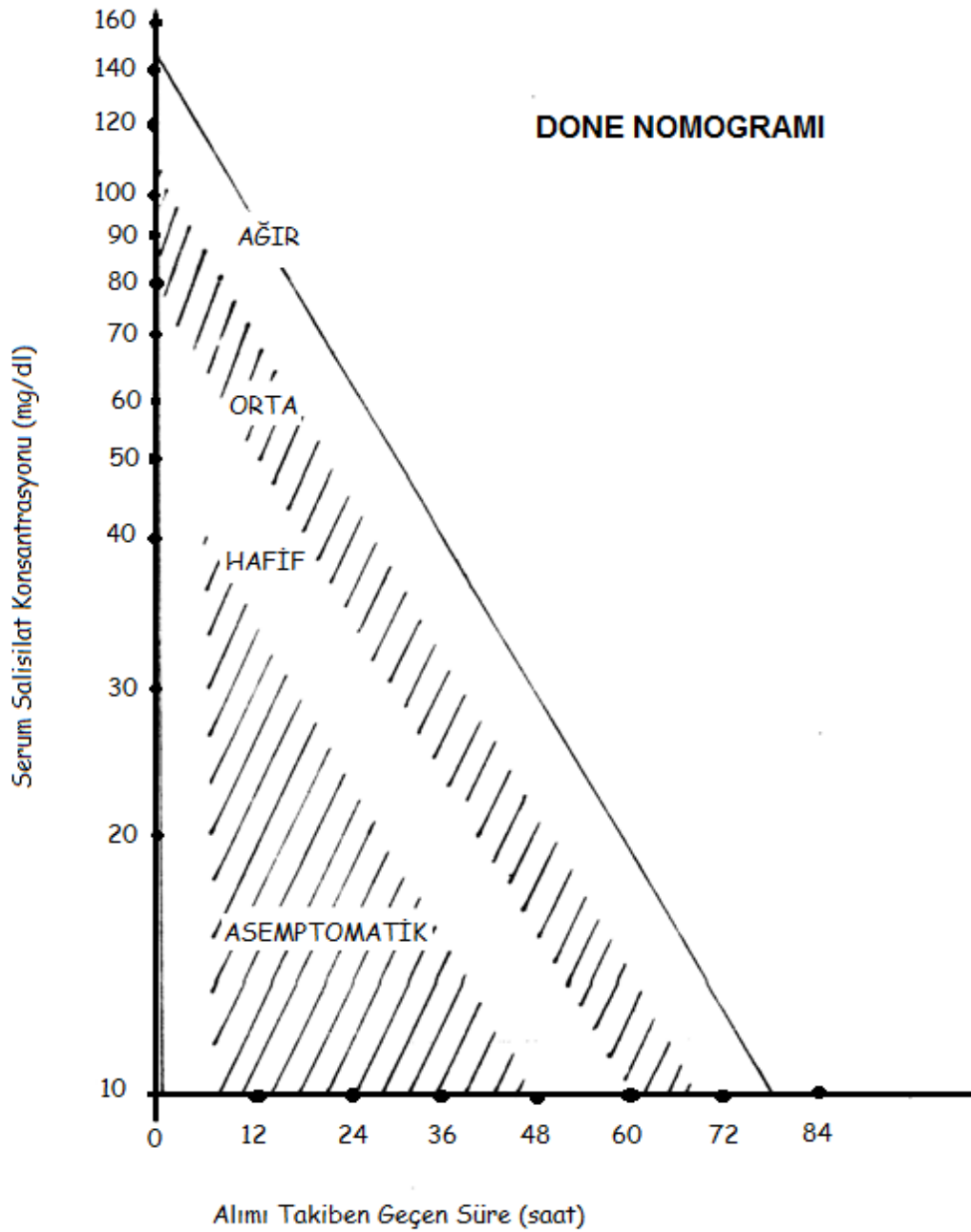
- 1) 1. KD > 2. KD,

2. KD < 40 mg/dl,

İlacın alımından en az 6 saat geçmiş ise ve hasta asemptomatik ise taburcu edilebilir (4-6 saat sonra hasta takip edilmelidir).

- 2) 2. KD nomogramda hafif sınıfına giriyorsa, hasta en az 4-8 saat süreyle gözlem altında tutulmalıdır (Arter gazları ölçülmeli ve iv. hidrasyona başlanmalıdır).

- 3) 2. KD nomogramda orta sınıfına giriyorsa ağır toksisite muhtemeldir, hastanede gözetim altında tutulmalıdır.
- 4) Hastanın eliminasyon yarı-ömrü hesaplandığında $t_{1/2}$ 15 saat bulunursa toksisite ağır demektir, hasta yoğun bakıma kaldırılmalıdır.
- 5) Hastada şu belirtilerden herhangi biri varsa, ağır toksisite vardır ve hasta yoğun bakıma kaldırılmalıdır: Ağır asidoz, ciddi metabolik bozukluk, koma veya konvülsiyonlar.



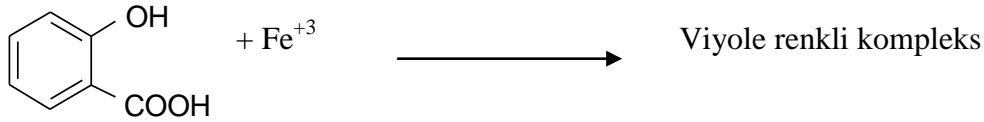
SERUMDA NİTEL ve SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEMLE NİCEL SALİSİLAT TAYİNİ

Serumda Nitel Salisilat Tayini

1. 1 ml örnek deney tüpüne alınır. Üzerine 1-2 damla Trinder reaktifi eklenir.
2. Oluşan menekşe renk salisilat veya salisilamid varlığını gösterir.

Serumda Spektrofotometrik Yöntemle Nicel Salisilat Tayini

Deneyin esası, demir iyonları ile fenoller arasında viyole renkli bir kompleks oluşması ve oluşan bu kompleksin renk şiddetinin 540 nm’de kolorimetrik olarak ölçülmesine dayanır. (Trinder reaktifi: $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 + \text{HgCl}_2 + \text{HCl} + \text{deiyonize su}$)



Bu deney salisilatlar için özgül değildir. Ancak hatalı negatif sonuçlar da vermez.

Stok Çözelti: 250 mg/dl Sodyum salisilat

Hazırlanacak Standartlar:

- Standart 1: 5 mg/dl
Standart 2: 10 mg/dl
Standart 3: 20 mg/dl
Standart 4: 30 mg/dl

Deneyin Yapılışı:

1. 1,0 ml serum santrifüj tüpüne alınır ve 5,0 ml Trinder reaktifi ilave edilir. 20 saniye vortekslenir.
2. Karışım 5 dakika 2400 rpm’de santrifüjlenir.
3. Kör olarak, 1,0 ml su ve 5 ml Trinder reaktifinin karışımından oluşan çözelti kullanılır.
4. Süpernatanın absorbansı 540 nm’de okunur. Renk 1 saat dayanıklıdır.
5. Standart eğri çizimi için bir dizi standart, aşağıdaki tabloda gösterildiği şekilde hazırlanır.
6. Standartlar da numuneler gibi çalışılır. 540 nm’de köre karşı absorbans değerleri okunarak kalibrasyon eğrisi çizilir. Eğer bilinmeyen numunenin absorbansı 0,7’den büyükse, numune seyreltilerek deney tekrarlanır.

Numune konsantrasyonları formül, referans ve kalibrasyon yöntemleri ile hesaplanır.

... / ... / 202.

Deneyin Adı :

Deneyin Amacı :

Deneyin Esası :

Sonuç :

Yorum :

Örnek No :

PARAF

BU SAYFAYA MİLMETRİK KAĞIT EKLEYELİM!!!!