T.C

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ -CERRAHPAŞA

ADLİ TIP VE ADLİ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Selda MERCAN

ATIK SUDAN ALKOL TÜKETİMİNİN HESAPLANMASINDA ETİL SÜLFAT (EtS) BİYOBELİRTECİ KULLANARAK SIVI KROMATOGRAFİSİ-ARDIŞIK KÜTLE SPEKTROMETRESİ İLE YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYAGER DUYGU NUR MERT

İSTANBUL, 2020

T.C

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ -CERRAHPAŞA

ADLİ TIP VE ADLİ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Selda Mercan

ATIK SUDAN ALKOL TÜKETİMİNİN HESAPLANMASINDA ETİL SÜLFAT (EtS) BİYOBELİRTECİ KULLANARAK SIVI KROMATOGRAFİSİ-ARDIŞIK KÜTLE SPEKTROMETRESİ İLE YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYAGER DUYGU NUR MERT

İSTANBUL, 2020

Bu tez projesi İ.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 32800

TEŞEKKÜR

Öncelikle tez çalışmamın yürütülmesine imkân sağlayan İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü müdürü

Sayın Prof. Dr. Faruk Aşıcıoğlu'na,

çalışmamın her aşamasında bilgi ve engin tecrübesiyle yol gösteren danışmanım

Sayın Dr. Öğretim Üyesi Selda Mercan'a;

Tez çalışmamın laboratuvar aşamasında yardımlarını esirgemeyen

Arş. Gör. Merve Kuloğlu ve Kimyager TuğbaTekin'e

Gözümü açtığım andan beri sevgisini ve desteğini hiç esirgemeyen, tez çalışmam da dahil her an yanımda olan ve hayatımı anlamlı kılan

sevgili Annem ve Babam İlknur-Ahmet Mert'e ve

kardeşlerim Büşra-Azra Mert'e;

En içten teşekkürlerimi sunarım…

Duygu Nur MERT

Mayıs 2020

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR…….. …i

İÇİNDEKİLER…… ii

TABLO LİSTESİ…… …v

ŞEKİL LİSTESİ……..vii

KISALTMALAR…….....x

ÖZET…….....xiv

SUMMARY……xvi

1. GİRİŞ VE AMAÇ…….1

2. GENEL BİLGİLER……..3

2.1. Etil Alkol…….3

2.1.1. Etil alkolün fiziksel özellikleri…….3

2.1.2. Etil alkolün kimyasal özellikleri…….4

2.1.3. Etil alkolün elde edilme yöntemleri……6

2.1.3.1. *Fermantasyonla etil alkol eldesi*……..6

2.1.3.2. *Sentetik etanol eldesi*……8

2.1.4. Etil alkol içeren bazı içecekler…….....9

2.1.5. Etil alkolün kullanım alanları……...10

2.1.6. Etil alkol metabolizması……12

2.1.6.1. *Alkol metabolizması sonrası organizmada meydana gelen değişiklikler*……16

2.1.6.2. *Alkol emilim ve dağılım oranını etkileyen faktörler*…….18

2.1.7. Kan alkol konsantrasyonunun davranışlara etkisi…….22

2.1.8. Etil alkolün vücuda etkisi……..24

2.1.9. Etil alkol alımı tespitinde kullanılan biyobelirteçler……..31

2.1.10. Alkol tüketimi……...……....35

2.1.10.1. *Dünya'da alkol tüketimi*……....35

2.1.10.2. *Türkiye'de alkol tüketimi*……...41

2.1.11. Etil alkol ve adli tıp……..46

2.1.11.1. *Postmortem/antemortem etanol belirlenmesi*……46

2.1.11.2. *Etanolün suçlara etkisinin değerlendirilmesi*……48

2.1.11.3. *Alkol analiz örnekleri ve analiz yöntemleri*……...51

2.1.11.4. *Etanol analiz yöntemleri*……..……55

2.2. Atık Su Epidemiyolojisi …… 60

2.2.1. Atık su parametreleri ve tüketim miktarı hesaplamaları……..63

2.2.2. Atık suda alkol çalışmaları ve analiz yöntemleri……66

2.3. Kramotografik Analiz Yöntemleri……72

2.3.1. Sıvı kromatografisi…….....75

2.3.2. LC/MS……79

2.3.3 LC/MS-MS…….……..79

2.4. Yöntem Validasyonu……81

2.4.1. Seçicilik……....82

2.4.2. Doğrusallık ve ölçüm aralığı……..82

2.4.3. Doğruluk……..83

2.4.4. Tespit limiti (LOD) ve tayin limiti (LOQ)……....86

2.4.5. Sağlamlık……88

2.4.6. Stabilite……....88

3. GEREÇ VE YÖNTEM……...89

3.1. EtS Analizi……....89

3.1.1. Deneysel çalışmada kullanılan gereçler……...90

3.1.2. Çalışmada kullanılan kimyasallar……91

3.2. Standart Çözeltiler……...91

3.2.1. EtS standart çözeltisi……..91

3.2.2. İç standart çözeltisi……....91

3.2.3. Doğrusallık ve doğruluk çalışması için hazırlanan çözeltiler…….....92

3.3. Numunelerin Analize Hazırlanması……...93

3.4. LC-MS/MS Sistemi ile EtS Analizi……93

3.4.1. Sistem özellikleri……94

3.5. EtS Analizinde Validasyon Çalışmaları……....96

3.5.1. Seçicilik çalışmaları……..…96

3.5.2. LOD ve LOQ çalışmaları……....97

3.5.3. Doğrusallık çalışmaları……...97

3.5.4. Doğruluk çalışmaları……...97

3.5.4.1. *Kesinlik çalışmaları*……97

3.5.4.2. *Gerçeklik çalışmaları*……...99

3.5.5. Stabilite çalışmaları……..99

4. BULGULAR……..100

4.1. Seçicilik……100

4.2. Tespit Limiti ve Tayin Limiti……..107

4.3. Doğrusallık……109

4.4. Doğruluk……...110

4.4.1. Kesinlik……...110

4.4.2. Gerçeklik……112

4.5. Stabilite……116

5. TARTIŞMA……...118

6. SONUÇ……...130

7. KAYNAKLAR……..132

8. ÖZGEÇMİŞ……...149

TABLO LİSTESİ

Tablo No **Sayfa No**

Tablo I. Bazı içeceklerdeki etil alkol yüzdesi **9**

Tablo II. WHO tarafından belirlenen bölgelerde kişi başına düşen alkol tüketimi, 2016 **36**

Tablo III. DSÖ bölgesi ve Dünya'daki toplam nüfusta (15+) ve içiciler arasında (15+) kişi başına toplam alkol (L saf alkol) ve ağır epizodik içme (HED) (%) yaygınlığı, 2016 **38**

Tablo IV. 2007–2017 (en yakın yıl) en çok alkol tüketilen 7 ülkede alkol tüketimi **39**

Tablo V. 2007–2017 (en yakın yıl) en az tüketimin olduğu 7 ülkede alkol tüketimi **40**

Tablo VI. Türkiye damıtılmış alkollü içkilerin üretim ve satış miktarı **41**

Tablo VII. DSÖ 15 yaş üstü alkol tüketimi (saf alkol L) **42**

Tablo VIII. Alkol kullanım bozuklukları ve alkol bağımlılığı prevalansı (%), 2016 * **42**

Tablo IX. Bira hariç fermente alkollü içki üretimi ve ithalatının iç piyasaya arzı (L) **43**

Tablo X. Distile alkollü içki üretim ve ithalatının toplam iç piyasaya arzı (L) **43**

Tablo XI. Bira hariç fermente alkollü içki ihracatı (L) **44**

Tablo XII. Distile alkollü içki ihracatı **44**

Tablo XIII. Etil alkolün piyasaya arz verileri (mA L) **45**

Tablo XIV. Validasyon parametreleri **81**

Tablo XV. Verifikasyon parametreleri **82**

Tablo XVI. Deneysel çalışmalarda kullanılan gereçler **90**

Tablo XVII. Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasallar **91**

Tablo XVIII. LC-MS/MS sistem özellikleri **94**

Tablo XIX. Mobil fazın zamana bağlı akış değişimi **94**

Tablo XX. EtS analizi için kütle spektrometresi parametreleri **95**

Tablo XXI. Çeşme suyu blank ve spike edilen numunelerinin ortalama konsantrasyon değerleri **104**

Tablo XXII. Tespit ve tayin limiti için numune analiz sonuçları **107**

Tablo XXIII. 1-50 ng/mL aralığında EtS için kalibrasyon eğrisi denklemi, doğrusal aralığı ve korelasyon katsayısı **110**

Tablo XXIV. Çeşme suyu spike ile hazırlanan 2, 10 ve 25 ng/mL'lik çözeltilerinin gün içi ölçüm sonuçları **111**

Tablo XXV. Günler arası tekrarlanabilirlik sonuçları **112**

Tablo XXVI. 2 ng/mL atık su spike çözeltisi ölçüm ve geri kazanım sonuçları **113**

Tablo XXVII. 5 ng/mL atık su spike çözeltisi ölçüm ve geri kazanım sonuçları **113**

Tablo XXVIII. 10 ng/mL atık su spike çözeltisi ölçüm ve geri kazanım sonuçları **114**

Tablo XXIX. 25 ng/mL atık su spike çözeltisi ölçüm ve geri kazanım sonuçları **114**

Tablo XXX. Atık su blank ölçümleri **115**

Tablo XXXI. Çeşme suyuna spike ile hazırlanan 10 ve 25 ng/mL çözeltilerinin farklı günlerdeki geri kazanımları **115**

Tablo XXXII. Bir hafta sonraki çeşme suyu tekrarlanabillirlik çalışmalarının tekrar analizi **116**

Tablo XXXIII. Stabilite için bir hafta sonra çeşme suyu tekrarlanabillirlik çalışmalarının tekrar analizi **117**

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil No **Sayfa No**

Şekil 1. Etil alkol **3**

Şekil 2. Etanolün karboksilli asitlerle esterifikasyon reaksiyonları **4**

Şekil 3. Etil alkolün etilen oluşturma reaksiyonu **5**

Şekil 4. Etil alkolün dietil eter oluşturma reaksiyonu **5**

Şekil 5. Etil alkol metabolizması **13**

Şekil 6. Etanolün asetaldehite oksitlenmesi **14**

Şekil 7. Etanolün CYP2E1 enzimi ile asetaldehite metabolize oluşu **14**

Şekil 8. Katalaz enzimiyle etanolün asetaldehite oksitlenmesi **15**

Şekil 9. Asetaldehitin asetata oksitlenmesi **15**

Şekil 10. Etanol metabolizması **16**

Şekil 11. Alkolik karaciğer hastalık spektrumu **29**

Şekil 12. Aktifleşen HCS'ler sonucu oluşan fibroz **31**

Şekil 13. Etil alkolün metabolitleri **32**

Şekil 14. 15 yaş üstü kişi başına toplam alkol tüketimi (saf alkol L) **35**

Şekil 15. Kayıt dışı ve kaydedilen kişi başına (+15) saf alkol tüketimi (WHO) **37**

Şekil 16. 2000-2016 yılları arasında Dünya bölgelerinde alkol tüketimi (+15) **37**

Şekil 17. DSÖ bölgesi ve dünya toplam nüfusu (+15 yaş) ile karşılaştırıldığında, toplam 15–19 ve 20–24 yaş grubundaki mevcut içicilerin yüzdesi (% olarak), 2016 **38**

Şekil 18. WHO bölgesine göre litre saf alkol cinsinden kişi başına toplam alkol tüketimi (APC) (+15 yaş) tahminleri, 2016-2025 **39**

Şekil 19. Headspace yöntemi **59**

Şekil 20. Atık su epidemiyolojisinin kullanım alanları **61**

Şekil 21. Mikhail Tswett Kromatografi Deneyi **72**

Şekil 22. Kromatografi şeması **73**

Şekil 23. Kromatografik sistem **74**

Şekil 24. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması **74**

Şekil 25. LC sistemi **75**

Şekil 26. Kütle spektrometresi şeması **78**

Şekil 27. Tandem Kuadrupol MS/MS **80**

Şekil 28. EtS'nin kütle spektrumu **95**

Şekil 29. EtS-d5'in kütle spektrumu **96**

Şekil 30. EtS standardının alıkonma zamanına ait LC kromatogramı **100**

Şekil 31. EtS standardının alıkonma zamanına ait LC kromatogramı **101**

Şekil 32. Metanol çözücüsüne ait LC kromatogramı **101**

Şekil 33. 25 ng/mL EtS içeren standart çözeltisine ait LC kromatogramı **102**

Şekil 34. Çeşme suyu blank çözeltisine ait LC kromatogramı **103**

Şekil 35. 15 ng/mL çeşme suyu spike çözeltisine ait LC kromatogramı **103**

Şekil 36. 20 ng/mL çeşme suyu spike çözeltisine ait LC kromatogramı **104**

Şekil 37. Atık su blank çözeltisine ait LC kromatogramı **105**

Şekil 38. 10 ng/mL atık su spike çözeltisine ait LC kromatogramı **105**

Şekil 39. 25 ng/mL atık su spike çözeltisine ait LC kromatogramı **106**

Şekil 40. 0,1 ng/mL EtS içeren standart çözeltisi ne ait LC kromatogramı **108**

Şekil 41. 0,2 ng/mL EtS içeren standart çözeltisine ait LC kromatogramı **108**

Şekil 42. 0,5 ng/mL EtS içeren standart çözeltisine ait LC kromatogramı **109**

Şekil 43. 1-50 ng/mL aralığında EtS için Kalibrasyon Eğrisi **110**

KISALTMA LİSTESİ

µg: Mikrogram

µL: Mikrolitre

5-HTOL: 5-hidroksitriptofol

5-HT: Serotonin

5-HIAA: Hidroksiindolasetikasit

ADH: Alkol dehidrogenaz

AFR: Afrika

AMP: Amfetamin

AMR: Amerika

ALDH: Aldehit dehidrogenaz

APCI: Atmosferik basınç kimyasal iyonizasyon

ATT: Atık su arıtma tesisi

a: İlgili konsantrasyondaki ilk paralel değeri

b: İlgili konsantrasyondaki ikinci paralel değeri

B: Bias, mutlak hata

% B: Bağıl bias, bağıl hata

BE: Benzeilekgonin

BOS: Beyin Omurilik Sıvısı

Cm^3: Santimetre küp

C: Karbon

CE: Çarpışma enerjisi

CV: Değişkenlik katsayısı

CYP450: Sitokrom P450

CO_2: Karbondioksit

COC: Kokain

C_{EtS}: EtS konsantrasyonu (ng/L)

CF_{alkol}: Alkol düzeltme faktörü

DDD: EtS için tanımlanmış günlük doz(mg/1000 kişi)

dL: Desilitre

DNA: Deoksiribonükleik asit

EMCDDA: Avrupa Uyuşturucu ve Uyuşturucu Bağımlılığı İzleme Merkezi

EMR: Doğu Akdeniz bölgesi

E_R: EtS'nin vücuttan atılım hızı

ESI: Elektrosprey iyonizasyon

EUR: Avrupa

EtOH: Etanol

EtG: Etil glukronid

EtS: Etil sülfat

F: Akış hızı(L/gün)

FAS: Fetal alkol sendromu

GABA: Gama-aminobütirik asit

GGT: Gama glutamiltranferaz

GK: Geri Kazanım

H: Hidrojen

HCS: Hepatik stellat hücreleri

HSGC: Headspace-gaz kromatografisi

HS-GC-FID: Headspace-gaz kromatografisi-alev iyonlaştırma dedektörü

HED: Ağır Epizodik İçme

IR: Kızılötesi

ICADS : Integrated Camden Drug Service

ICAS: Integrated Camden Alcohol Service

kcal: Kilokalori

kj: Kilojul

K: Her bir noktada tekrar sayısı

KAK: Kan alkol konsantrasyonu

KAH: Koroner arter hastalığı

KC: Kupffer hücreleri

KYT: Karbonhidrattan yoksun transferin

LC: Sıvı kromatografisi

LC-MS/MS: Sıvı Kütlesi Ardışık Kütle spektrometresi

m: Kalibrasyon eğrisinin eğimi

mA: Mutlak alkol

mL: Mililitre

mg: Miligram

m/z: Kütle/yük

MeOH: Metanol

M_{EtOH}: Etanolün molekül ağırlığı

M_{EtS}: Etil sülfatın molekül ağırlığı

MDMA: 3,4-metilenedioksi-N-metilamfetamin

MEOS: Mikrozomal etanol oksitleyici sistem

METH: Metamfetamin

MRM: Çoklu Reaksiyon İzleme (Multiple Reaction Monitoring)

MS: Kütle Spektrometresi

MSA: Manyetik sensör analizörü

N: Gürültü

N^0: Ölçüm sayısı

N_0: Kalibrasyon noktası

NAD+: Nikotinamid adenin dinükleotid (indirgenmiş)

NADH: Nikotinamid adenin dinükleotid

NADPH: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat

NADP+: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (indirgenmiş)

O: Oksijen

OECD: Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü

OKH: Ortalama korpuskuler hacim

P: Popülasyon

PEth: Fosfatidiletanol

P_{EtOH}: Alkol yoğunluğu

Q: Kuadrupol

QSTAR: İyon kapanı kütle analizörü

r^2: Korelasyon katsayısı

rpm: Dakikada dönme sayısı

RNA: Ribonükleik asit

ROS: Reaktif oksijen türleri

RSD: Relatif standart sapma

s: Standart sapma

s_{xo}: Proses veya metot standart sapması (kalibrasyondan)

s_1^2: Residüel standart sapma

s_2^2: Yalın hata

S_o: Kör örnek sonuçlarının standart sapması

S: Sinyal

SCORE: Avrupa Atık Su Analizleri Grubu (Sewage Analysis COReGroup Europe)

SEAR: Güney Doğu Asya bölgesi

TOF: Uçuş zamanlı analizör

TÜİK: Türkiye İstatistik Kurumu

THCCOOH: 11-nor-9-karboksi-delta-9-tetrahidrokanabinol

VH: Virtöz Humor

V: Volt

WHO: Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)

WBE: Atık su Bazlı Epidemiyoloji

WPR: Batı Pasifik bölgesi

YAEE: Yağ asit etil esterleri

Yt: Eğrinin formülünde 'x'değeri yerine konulduğunda elde edilen 'y'

$\hat{}$ yi: Varsayılan "y" değeri

X_1: EtS eklenen numunelerin konsantrasyon ortalaması

X_2: EtS eklenmeyen numunelerin konsantrasyon ortalaması

X_3: Eklenen EtS konsantrasyonu

$\bar{x}$: Numune ortalaması

$\sum$: Toplam

X_i: i'inci ölçüm değeri

$X_{kör}$: Kör örneklerin ortalaması

X_a: Kirletilmemiş örneklerle yapılan analiz sonuçları ortalaması

X_b: Kirletilmiş örneklerle yapılan analiz sonuçları ortalaması

$X_{kirletilmiş}$: Kirletmek için kullanılan analit miktarı

X^1: Referans malzeme il yapılan analiz sonuçları ortalaması

X_{ref}: Referans değer

ÖZET

Toplum sağlığını gerçek zamanlı izlemek amacıyla ortaya çıkan atık su bazlı epidemiyoloji (WBE), yasa dışı maddeler, yasal ilaçlar ve maruz kalınan deterjan, tarım ilacı gibi kimyasalların analizine dayanan, nüfus düzeyi tahminine de olanak sağlayan bilimsel bir disiplindir. Yasa dışı madde analizleriyle başlayan WBE çalışmaları, alkol gibi kullanımının kişiye ve trafik kazası başta olmak üzere birçok suçta azmettirici olarak rol üstlenerek topluma zarar veren, yasal maddeler için de yaygınlaşmaktadır. Üretim istatistikleri, satış bilgileri gibi kaydedilen tüketime ek yasadışı üretim, stoklama, kaçakçılık durumlarıyla oluşan kayıt dışı tüketimi gözlemlemek adına yararlanılan anket verileri, nüfus kayıtları, tedavi başvuruları gibi yöntemlere alternatif olarak geliştirilen bir yaklaşımdır. Atık suda alkol çalışmalarıyla bir bölgedeki veya bir ülkedeki alkol kullanım eğilimlerini gözlemlemek, geri hesaplamalarla tüketim miktarını tahmin etmek, satış istatistikleriyle karşılaştırarak kayıt dışı üretimi tespit etmek ve toplum sağlığı adına alkol kullanımıyla mücadelede planlamalar yapmak mümkün hale gelmektedir.

Bu çalışmanın amacı, atık suda EtS biyobelirteciden yararlanarak LC-MS/MS sistemi ile yöntem geliştirmektir. Yöntemde validasyonun sağlanması amacıyla çeşme suyuna ve atık suya EtS ilave edilerek hazırlanan çözeltilerde; seçicilik, tespit ve tayin limiti, doğrusallık, doğruluk ve stabilite gibi geçerli kılma parametreleri çalışılmıştır. Çalışmada, EtS'nin doğrusal aralığı 1-50 ng/mL olarak belirlenip, bu aralıktaki korelasyon katsayısı r^2= 0,9992 olarak bulunmuştur. Tespit limit (LOD) 0,2 ng/mL, tayin limiti (LOQ) 0,5 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Kesinlik için yapılan tekraredilebilirlik çalışmalarında seçilen 2, 10 ve 25 ng/mL konsantrasyon numunelerinin % RSD değerleri sırasıyla 11,856, 4,967 ve 5,675 olarak bulunmuştur. Gerçeklik çalışması için çeşme suyuna ve atık suya EtS ve IS ilavesiyle hazırlanan çözeltilerden çeşme suyu için 2, 10 ve 25 ng/mL'luk numunelerin geri kazanım değerleri sırasıyla %85,4-92,8 olarak hesaplanmıştır. Atık suya EtS ve IS ilavesiyle hazırlanan 2, 5, 10 ve 25 ng/mL'lik

numunelerinin geri kazanımları ise %80,4 ile %115,5 aralığında bulunmuştur. Stabilite çalışması için 1 hafta oda sıcaklığında bekletildikten sonra tekrar analiz edilen çeşme suyu spike örneklerindeki değişim 2 ng/mL için %0,00102, 10 ng/mL için %0,00457 ve 25 ng/mL için %0,01034 olarak hesaplanmıştır. Değişim değerlerinin %1'in altında olması geliştirilen yöntemin stabilitesi ve sağlamlığı için uygunluğunun göstergesi kabul edilmiştir.

Ülkemizde atık suda yasa dışı madde analizine dair çalışmalar bulunmasına rağmen alkol analizine ait çalışma yapılmamış olması, bu çalışmanın belirlenen bölgelerde alkol tüketim eğilimini izlemek ve gereken durumlarda tüketim tahmini yapmak için literatüre katkı sağladığı düşünülmektedir. İleri dönem çalışmalarında alkol tüketim tahmini için hesaplamaların standartlaştırılması ve WBE'nin destekleyici yaklaşım olmaktan çok veri kaynağı olarak kullanılması hedeflenmektedir. Geliştirilen farklı madde analizleri hastalık, salgın gibi halk sağlığı çalışmalarında büyük rol üstlenecektir.

SUMMARY

Wastewater-based epidemiology (WBE) is a scientific discipline, which emerged to monitor public health in real-time. It allows real-time population census by depending on the analysis of narcotic substances, legal drugs, and chemicals such as detergents or pesticides. Starting with analysis on an illegal substance, WBE studies become increasingly prevalent for legal drugs (e.g. alcohol) which their usage may harm one's self or society in the case of leading crime (e.g. traffic accidents). This approach has developed an alternative to methods to observe unregistered consumption resulting from illegal production, stocking, and smuggling besides recorded consumption (e.g. production statistics and sales information) which already measured by survey studies, registers of persons, treatment applications. With wastewater-based alcohol studies, it becomes possible to observe the pattern of alcohol use in a region or a country, to estimate the amount of consumption by back calculations, to identify informal production by comparing it with sales statistics, and to make plans to deal with alcohol abuse in the favor of public health.

This study aims to develop a new method with the LC-MS/MS system, using EtS as biomarkers in wastewater. To ensure the method validation, in the solutions which prepared by adding EtS to tap water and wastewater; specific validation parameters (i.e. selectivity, the limit of detection and quantitation, linearity, accuracy, and stability) were analyzed. In the study, the linear range of EtS was specified as 1-50 ng/mL and the correlation coefficient was found as r^2 = 0,9992 in this range. The limit of detection (LOD) was calculated by 0,2 ng/mL and the limit of quantification (LOQ) was measured by 0,5 ng/mL. For the repeatability parameter which is used for precision, 2, 10, and 25 ng/mL concentration samples selected and their RSD% values were found to be 11,856, 4,967, and 5,675 respectively. For trueness of method, the recovery values of samples from tap water were calculated as 85,4% and 92,8%, the recovery values of those from wastewater were in the range of 80,4% and 115,5%. After standing at room

temperature for 1 week, the samples reanalyzed for stability, and the change was 0,00102% for 2 ng/mL, 0,00457% for 10 ng/mL, and 0,01034% for 25 ng/mL. The exchange value below 1% was accepted as an indicator of the stability and robustness of the method. Although studies are analyzing illegal substances in wastewater in our country, there is no direct wastewater analysis for alcohol. Thus, this study contributes to the literature, enabling us to monitor the alcohol consumption pattern in particular areas and make estimations when necessary. In further studies, it is aimed to standardize the calculations for estimation of alcohol consumption and to use WBE as a data source rather than a supportive analysis. Moreover, the development of analysis of different substances may play a major role in public health research, especially in diseases and epidemics.

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Metabolize olabilen bir alkol türü olan etil alkol, merkezi sinir sistemini etkileyen ve insan davranışlarında olumsuz sonuçlar doğmasına neden olan psikoaktif bir maddedir (1).

Adli tıpta gerek rutin analizlerde gerek zehirlenme olgularında gerekse kazalarda etki derecesinin belirlenmesi amacıyla en çok incelenen maddelerden biridir. Adli tıpta etil alkol analizi trafik kazalarında sürücünün alkol etkisinde olup olmadığı, alkol etkisindeyse konsantrasyonun kazaya sebebiyet verip veremeyeceği sorularına yanıt arayarak cezai durumun belirlenmesine katkı sağlamaktır. Bir diğeri ise ölüm sonrası mikroorganizmalar tarafından postmortem olarak da üretilen alkolün, otopsi sonucu ulaşılan konsantrasyonunun antemortem kullanıma ait olup olmadığı konusunda soru işaretleri oluşturduğu durumdur (2).

Etil alkolün postmortem/antemortem kaynaklı oluşunun belirlenmesi amacıyla etil sülfat (EtS), etil glukronid (EtG), yağ asit etil esterleri (YAEE), 5-Hidroksitriptofol (5-HTOL) ve Fosfatidiletanol (PEth) gibi alkol metabolitlerinden yararlanılan çalışmalar yapılmaktadır. Etil alkolün uçucu madde olması nedeniyle kanda belirlenebilme süresi kısıtlıdır. Kanda tespit edilemediği durumlarda ve postmortem olgularda biyobelirteçlerden yararlanılır. Özellikle EtS ve EtG biyobelirteçlerinin kanda ve idrarda bulunabilirlik süresinin uzun olması adli tıp çalışmalarında avantaj sağlamaktadır. EtG, EtS'nin postmortem üretilememesi, varlığının tespit edildiği durumlarda antemortem kullanımın kanıtı olarak kabul edilmektedir (3).

Atık su bazlı epidemiyoloji (WBE) yaklaşımı, atık suların yasa dışı, yasal ilaçlar ve diğer kimyasalların kullanımı hakkında toplum sağlığını ilgilendiren konular için veri sağlaması amacıyla oluşturulan bir disiplindir. İlk olarak yasa dışı maddelerin izlenmesi amacıyla oluşturulan çalışmalar, yaygınlaşarak halk ve çevre sağlığı ile ilgili değerlendirmelerde kullanılabilecek ürün yelpazesi genişletilmeye devam edilmektedir.

Nüfus büyüklüğünün tahmini, gerçek zamanlı madde tüketim eğilimlerinin gözlenmesi ve elde edilen biyobelirteç konsantrasyonlarıyla madde tüketim tahmini yapılması WBE yaklaşımının gerçekleştirilen ve gerçekleştirilmeye devam eden çalışmalarındandır (4).

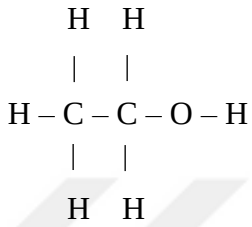
Yasa dışı maddelerle başlayan WBE çalışmaları alkol ve tütün gibi yasal olup kişi ve çevresine zarar veren maddelerin incelenmeye başlanmasıyla yaklaşıma yeni bir bakış açısı kazandırmıştır. Alkol ve tütün gibi yasal maddelerin çalışılmasıyla kaçakçılık, stoklama, yasa dışı üretimin önüne geçilmesi hedeflenmiş ve tüketim eğilimleri kısa sürede gözlemlenerek halk sağlığı için değerlendirme imkânı sunmaktadır. WBE, geleneksel yöntemlerin tamamlayıcısı niteliğindedir. Kısa sürede gerçek zamanlı sonuçlar verir (5). WBE çalışmaları salgın hastalıklar için de yayılımı izlemek ve engellemek amacıyla geliştirilmeye devam eden bililmsel bir yaklaşımdır.

Literatür taraması sonucunda Türkiye'de atık suda EtS analizine ait bir çalışmaya rastlanmamıştır. Alkol kullanımının mekansal ve zamansal değişimini gözlemlemek için hızlı ve güvenilir sonuç almak için gerçerliliği kanıtlanmış bir çalışmaya ihtiyaç duyulmuştur. Alkolün EtS biyobelirteci ile atık suda tayin edilmesi alkol tüketiminin izlenmesine imkân vererek literatüre katkı sağlayacak ve satış istatistikleri, anket sonuçları gibi uzun vadeli verilere karşı ucuz, hızlı ve güvenilir sonuçlar veren kaynak olacaktır. Bu tez çalışmasında Sıvı Kromatografisi-Ardışık Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS) ile atık suda EtS analizi için yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır. EtS için LC-MS/MS sisteminde yöntem geliştirilerek, yöntemin validasyonunun sağlanması amacıyla seçicilik, doğrusallık, tespit ve tayin limitleri, doğruluk, kesinlik, stabilite parametreleri çalışılmıştır. LC-MS/MS kullanılarak hızlı, kolay, özgün, düşük tayin limitli, tekrarlanabilirliği ve geri kazanımı yüksek bir yöntem geliştirilmesi hedeflenmiştir. Geliştirilen yöntemle atık suda EtS tespit edilebilecek ve örnek geri hesaplamayla tüketim miktarı belirlenebilecektir. Yöntemin adli toksikoloji laboratuvarına katkı sağlanması ve diğer araştırmalara hizmet etmesi amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Etil Alkol

Etil alkol; aralarında tek bir bağ olan iki karbon atomlu alkil grubundan oluşan bileşiğe hidroksil (-OH) grubunun bağlanmasıyla meydana gelen organik bileşiktir ve alkol denildiğinde kastedilen alkol türüdür (1). Etil alkolün yapısı Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Etil alkol (6)

Etanol; metanol, izopropil alkol gibi alkol türlerinden biridir, alkollü içeceklerde yer alan, eğlence amacıyla kullanılan ve metabolize olabilen bir alkol çeşididir (7). Alkollü içeceklerde ana bileşen olarak yer alan etanol psikoaktif bir maddedir. İçecek, çözücü, antifriz, yakıt amaçlı kullanımı yaygın kimyasaldır. Su, eter ve birçok organik bileşikle çözünür (8).

Etanol biyolojik yollarla ve sentetik olarak elde edilebilir. Doğal olarak tahılların, meyvelerin, nişastalı ve şekerli maddelerin mayalar tarafından fermante edilmesiyle elde edilirken, endüstriyel olarak bu ürünlerin distile (damıtma) işlemleri ve etilenin hidrasyonu yoluyla (petrokimyasal) üretilir (9).

2.1.1.Etil alkolün fiziksel özellikleri

C_2H_5OH veya C_2H_6O formülü ile gösterilir. EtOH şeklinde kısaltılmış kullanımı yaygındır. Etanol bileşiği %52,18 karbon (C) atomu, %34,78 oksijen (O) atomu ve %13,04 hidrojen (H) atomu içerir. Etanol renksiz, uçucu, yakıcı tada sahip, karakteristik kokuda ve yanıcı özellikte

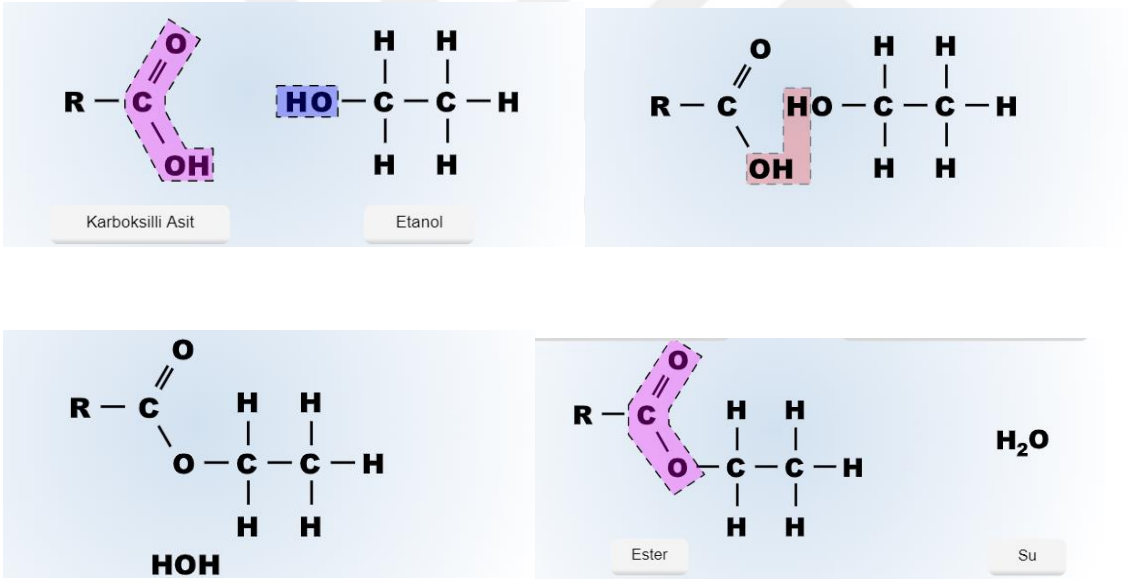
bir sıvıdır. Etil alkolün molekül ağırlığı 46,07g/mol, kaynama noktası 78,3 ˚C, erime noktası -114,5 ˚C, yoğunluğu 0,790-0,793 g/cm^3, buharlaşma ısısı ise 210 kcal'dir (8,10).

2.1.2.Etil alkolün kimyasal özellikleri

Etil alkolün kimyasal özellikleri oksidasyon, esterifikasyon, dehidrogenasyon ve dehidrasyon reaksiyonlarıyla ilişkilidir.

Esterifikasyon reaksiyonları:

Etanolün organik asitler, anorganik asitler ve asit anhidritleri reaksiyonuyla esterler oluşur. H_2SO_4 ve HCl gibi asit katalizörler kullanılarak, organik asit ve alkollerden suyun elimine edilmesiyle organik esterler oluşur. Esterleşme reaksiyonu Şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 2. Etanolün karboksilli asitlerle esterifikasyon reaksiyonları

$CH_3CH_2OH + H_2SO_4 \rightarrow CH_3CH_2OSO_3H + H_2O$

$2CH_3CH_2OH + H_2SO_4 \rightarrow (CH_3CH_2O)_2SO_2 + 2H_2O$

$CH_3CH_2OH + HONO_2 \rightarrow CH_3CH_2ONO_2 + H_2O$

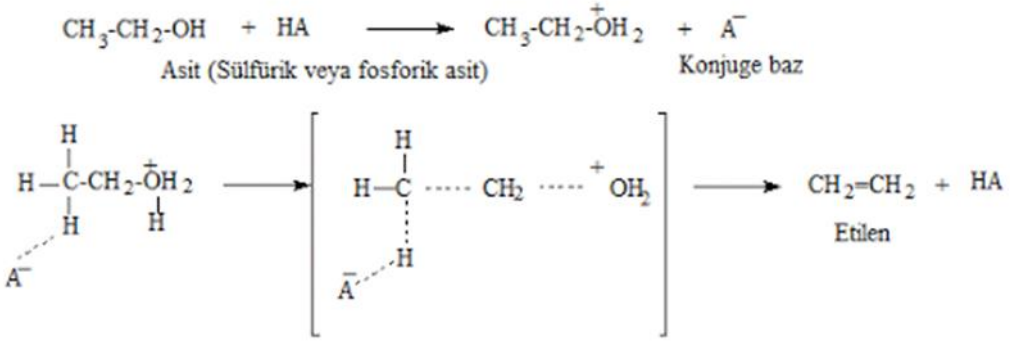
Etanolün asit anhidritleri reaksiyonuyla da benzer esterler oluşur.

$CH_3CH_2OH + (RCO)_2O \rightarrow RCOOCH_2CH_3 + RCOOH$

Dehidrasyon Reaksiyonu:

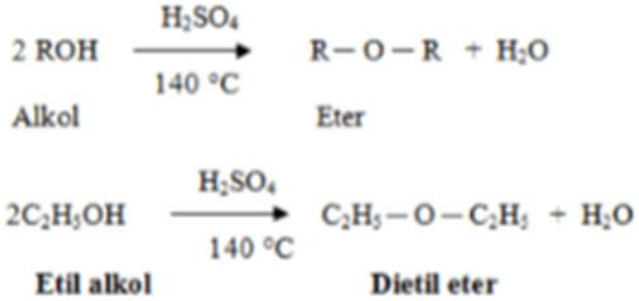
Etanol dehidrasyona uğrayarak, etilen veya dietil etere dönüşür.

Etilen reaksiyonu Şekil 3'de gösterilmiştir.



Şekil 3. Etil alkolün etilen oluşturma reaksiyonu

Dietil eter reaksiyonu Şekil 4'de gösterilmiştir.



Şekil 4. Etil alkolün dietil eter oluşturma reaksiyonu

Dehidrogenasyon reaksiyonu:

Etanol asetaldehite dehidrogene olur.

$CH_3CH_2OH \rightarrow CH_3CHO + H_2O$ (10)

2.1.3.Etil alkolün elde edilme yöntemleri

Etil alkolün eldesi iki esasa dayanır. Etanol üretimi söz konusu olduğunda biyoetanol ve etanol kavramlarıyla karşılaşılmaktadır. Etanol dendiğinde petrokimyasal süreçle üretilen etil alkol belirtilirken, biyoetanol dendiğinde biyolojik kaynaklardan mayalanma sonucu elde edilen etil alkol belirtilmektedir. Kimyasal olarak etanol ve biyoetanol aynı madde olmasına karşın üretimdeki farklılık bu ayrımın yapılmasına sebep olmaktadır (11).

2.1.3.1. *Fermantasyonla etil alkol eldesi*

Alkol fermentasyonu art arda gerçekleşen biyokimyasal olaylar sonucu oluşur ve tepkimeler sonucu ana ürünler ve yan ürünler oluşur. Ana ürünler etanol ve karbondioksitken, yan ürünler asetaldehit, gliserin, esterler, metil alkol vb.dir. Fermentasyonda kullanılan hammaddeler çeşitlilik gösterir ve üç grupta toplanır:

- Şekerli maddeler (sakkarozlu)
- Nişastalı maddeler
- Selülozik maddeler

➢ Şekerli maddeler; şeker pancarı, şeker kamışı, meyve suları, melas (fabrikada şeker kristalinden süzülen koyu kıvamlı şurup) bu grubu oluşturur. Hiçbir ön işlem gerektirmeksizin etanole dönüştürülmeleri mümkündür, ekonomik oldukları için tercih sebebidir. Şeker öncelikle mayalardaki invertaz enzimiyle sakkaroz, glukoz ve früktoza ayrılır, sonrasında bu şeker karışımı zimaz, pirüvat dekarboksilaz ve alkol dehidrogenaz enzimleriyle etanole dönüşür.

$$C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O \xrightarrow{invertaz} C_6H_{12}O_6 + C_6H_{12}O_6$$

Glukoz Früktoz

$$C_6H_{12}O_6 \xrightarrow{zimaz} 2\ C_3H_4O_3 \xrightarrow{pirüvat\ dekarboksilaz} 2\ CH_3COH \xrightarrow{alkol\ dehidrogenaz} 2\ C_2H_5OH$$

[O] pirüvik asit $-2CO_2$ asetaldehit etanol

(10)

- Nişastalı maddeler; nişasta bir biyopolimerdir ve D-glukoz içerir. Arpa, buğday, çavdar, mısır, pirinç gibi hububat ve patates nişasta içerikli ürünlerdir. Mısır gibi nişasta bitkileri için, nişasta ilk önce amilazlar olarak bilinen enzimler veya asitler tarafından basit glikoz şekerlerine ayrılır. Asitler veya selülaz enzimleri benzer şekilde selülozun glikoza ayrışmasını katalize eder, bu daha sonra etanole fermente edilebilir (12).

  Nişastadaki karbonhidrat zincirlerin koparılarak glikoz şurubuna parçalanmasının ardından gerçekleşen nişasta fermentasyonu şekerli hammaddelerininkine kıyasla daha karışık bir süreçtir. Asit hidrolizi ve enzim hidrolizi olmak üzere iki şekilde sağlanabilir (13).

  - Asit Hidrolizi: Nişasta seyreltik asitlerle kaynatılarak glukoza hidroliz edilir.

$$(C_6H_{10}O_5)_n + nH_2O \xrightarrow{seyreltik\ asit} n\ C_6H_{12}O_6$$

Nişasta glukoz

  - Enzimatik hidroliz: Suyla karıştırılan nişastaya malt (arpanın kısmen filizlenmiş formu) eklenir ve bir saat boyunca 50-60° C'de bekletilir. Malttaki diastaz enzimiyle nişasta maltoza dönüşür ve maya eklenir, mayadaki maltaz enzimi maltozu glukoza dönüştürür, glukozda zimaz enzimiyle etil alkol ve karbondioksite dönüşür.

$2\ (C_6H_{10}O_5)_n + nH_2O \xrightarrow{diastaz} n\ C_{12}H_{22}O_{11}$

Nişasta Maltoz

$C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O \xrightarrow{maltaz} 2\ C_6H_{12}O_6 \xrightarrow{zimaz} 4\ C_2H_5OH + 4\ CO_2$

Maltoz Glukoz Etanol (10)

- Selülozik maddeler; saman, odun, çimen, kâğıt atıkları, orman ürünleri atıkları ve tarım atıklarındaki selüloz, mineral asit ve özel enzimlerle glokuza hidroliz edilir. Dünyadaki en bol tekrarlanabilen kaynaktır. Düşük maliyet ve yüksek verim bu yöntemi avantajlı kılar. Ağırlıklı olarak yakıt olarak kullanılan biyoetanol üretimi için tercih edilir (13).

$(C_6H_{10}O_5)_n + nH_2O \xrightarrow{seyreltik\ HCl} n\ C_6H_{12}O_6 \xrightarrow{zimaz} 2n\ C_2H_5OH + 2n\ CO_2$

Selüloz Glukoz

2.1.3.2. *Sentetik etanol eldesi*

Etanol, sentetik olarak etilenden indirekt hidrasyon ve direkt hidrasyon süreçleriyle elde edilir.

İndirekt hidrasyon

Bu yöntemin ilk aşamasında sülfürik asit kullanılır.

$CH_2 = CH_2 + H_2SO_4 \rightarrow CH_3CH_2OSO_3H$ ΔH: -60 kj

monoetil sülfat

$2CH_2 = CH_2 + H_2SO_4 \rightarrow (CH_3CH_2O)_2SO_2$ sıcaklık: 70° C, basınç: 10-35 bar

dietil sülfat

İkini aşamada etil sülfatlar etanole hidroliz edilir.

$CH_3CH_2OSO_3H + H2O \rightarrow CH_3CH_2OH + H_2SO_4$

$(CH_3CH_2O)_2SO_2 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3CH_2OH + H_2SO_4$

$(CH_3CH_2O)_2SO_2 + CH_3CH_2OH \rightarrow CH_3CH_2OSO_3H + (CH_3CH_2)_2O$ (sıcaklık: 100 ° C)

Direkt Hidrasyon

Etilen seyreltik sülfürik asitle etanole hidrolize edilir.

$CH_2 = CH_2 + H_2O \rightarrow C_2H_5OH$ ΔH: -43.4 kj

$2C_2H_5OH \rightarrow (C_2H_5)_2O + H_2O$ (10)

2.1.4.Etil alkol içeren bazı içecekler

Etil alkol içeren alkollü içecekler fermantasyon ve damıtma olmak üzere iki şekilde elde edilebilirler. Hammedde fermantasyonu sonucu elde edilen düşük orandaki alkolün, berraklaştırma gibi basit işlemlere tabi tutulmasıyla bira ve şarap tüketime hazır hala gelmiş olur. Alkollü sıvıların damıtılarak alkol içeriklerinin yükseltilmesiyle de rakı, votka, viski, konyak, cin gibi yüksek alkollü içecekler elde edilir. Şarap eldesi için üzüm ve elmadan yararlanılırken, rakı için üzüm, erik ve pirinç, bira için arpa, viski içinse malt arpa kullanılır.

Alkollü içecekler içerisinde farklı miktarlarda etanol bulunur. Tablo I'de içeceklerin içerdiği etil alkol yüzdeleri belirtilmiştir.

Tablo I. Bazı içeceklerdeki etil alkol yüzdesi (14)

İçecek türü	**Alkol yüzdesi**
Bira	%3-5
Meyve Şarapları	%5-11
Bordo Şarapları	%7-12
Şampanya	%10-13
Vermut	%14-16
Rakı	%40-45
Konyak	%40-70
Viski	%40-70
Cin	%51-55

2.1.5. Etil alkolün kullanım alanları

Etanolün yaygın kullanımı eğlence ürünü niteliğinde tüketimidir. Tıbbi uygulamalarda antiseptik ve dezenfektan olarak kullanılır. Organik bileşiklerin sentezinde kimyasal bir çözücü olarak kullanılır. Birçok farklı imalat endüstrisinde kullanılan hayati bir maddedir. Ayrıca alternatif bir yakıt kaynağı olarak da kullanılır (6).

- ***Tıbbi uygulamalarda;***

- Enjeksiyon öncesi veya ameliyat öncesinde cildi dezenfekte etmek amacıyla kullanılır.
- Sağlık çalışanları uygulama öncesi el temizliğini sağlamak amacıyla kullanır.
- Ağız gargaralarında ağız ve çevresini bakterilerden arındırmak amacıyla kullanılır.

- ***Antiseptik olarak;***

Etanol; mantar, bakteri ve birçok virüse karşı etkili olduğu için etkili bir antiseptiktir, bu nedenle tıbbi mendillerde ve antibakteriyel jellerde kullanılır.

- ***Panzehir olarak;***

Etanol, etilen glikol ve metanol zehirlenmelerinde panzehir olarak kullanılabilir.

- ***Tıbbi çözücü olarak;***

- Genellikle yüksek konsantrasyonlarda, suda çözünmeyen birçok ilacı ve bileşiği çözmek için kullanılır.
- Ağrı kesici, soğuk algınlığı, öksürük ilaçlarının ve ağız yıkama sularının yaklaşık olarak %25'inde yer alabilir.
- Demir takviyeleri, asetaminofen, furosemid, ranitidin gibi sıvı ilaç preparatında antimikrobiyal koruyucu olarak yer alır.

- ***Farmakoloji;***

Ağız yoluyla alınan etil alkol karaciğer tarafından CYP450 enzimi yoluyla metabolize edilir, etanol midede birçok asit salgısını arttırır.

- ***Eğlence;***

Fermantasyonla elde edilen bira, şarap, meyve şarapları (elma, erik, kiraz vb.), pirinç şarabı, fermente çay gibi içeceklerde ve damıtma (disitlasyon) yoluyla elde edilen viski, votka, rom, soju, cin ve tekila gibi içeceklerde yer alan etanol, eğlence amaçlı tüketilir.

- ***Yakıt;***

Etanolün en büyük kullanım alanlarından biri motor yakıtı ve yakıt katkı maddesi olarak kullanımıdır. Brezilya'da benzin en az %25 susuz etanol içermektedir. Brezilya'da şeker kamışından etanol üretimi oldukça yaygındır ve bu biyokütle enerjisi açısından çevreye verilen zararı minimuma indirme çabası içerir. Diğer birçok ülkede de etanol-benzin karışımı kullanımı yaygındır. Roket yakıtı olarak da motorlu yarış uçaklarında kullanılmaktadır.

- ***Hammadde;***

Etanol önemli bir endüstriyel maddedir. Etil esterleri, asetik asit, etil halojenürler ve etil aminler gibi organik bileşikler için kullanılan öncü maddedir.

- ***Çözücü;***

Moleküler yapısı polar olan hidrofilik bileşiklerin ve polar olmayan hidrofobik bileşiklerin çözündüğü çok yönlü bir çözücüdür. Kaynama noktası düşük olduğu için başka bileşikleri çözmek için kullanıldığı çözeltilerden kolaylıkla ayrılabilir. Yağların ve balmumlarının eldesinde uygulanan ekstraksiyon işlemlerinde ekstraksiyon çözücüsü olarak rol alır. Ayrıca boya, deodorant, parfüm, ağız bakım suları gibi kişisel bakım ürünlerinde de yer alır. DNA ve RNA saflaştırılma işlemlerinde de kullanılır (6).

Etil alkol; eczacılık, tıp, veterinerlik, içecek, parfümeri, kimya sanayi ve motorlu taşıtlarda antifriz olarak kullanılmaktadır. Gıda sanayisinde yiyecek ve içeceklerin içerisinde de farklı miktarlarda etil alkol bulunmaktadır. Tüm kullanımların içinde en popüler olduğu alan eğlence sektörüdür (10).

2.1.6. Etil alkolün metabolizması

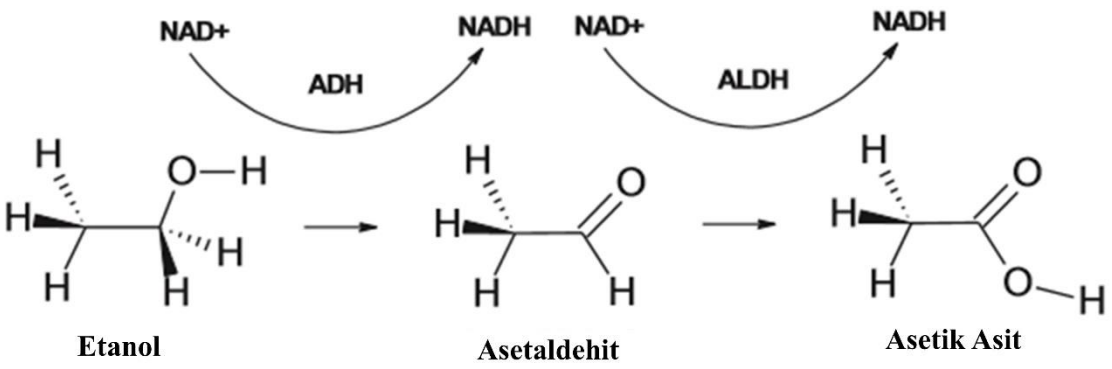
Alkol, oral alımın ardından mide- bağırsak sistemindeki mukoza epitellerince kolayca emilim gösterir. Emilimin %20-25'i midede gerçekleşirken, %75-80'i ince bağırsakta gerçekleşir. Mideki emilim ince bağırsağa göre daha yavaş gerçekleşir (15). Emilimin büyük kısmının ince bağırsakta gerçekleşmesinin nedeni, ince bağırsağın geniş yüzey alanına sahip olmasıdır (7). Etanol suda kolaylıkla ve her oranda karışabildiğinden sindirim sisteminden hızla kan dolaşımına katılarak vücuttaki tüm dokulara ulaşır (16). Alkol alımı sonrasında, alkol en yüksek kan seviyesine ortalama 30- 60 dakikada ulaşır (17). Midenin boş olması, alkolün hızlı alımı, cinsiyet, yaş, alışkanlıklar üst düzeye erişmesini etkiler (14).

Midede ilk geçiş metabolizması;

Oral yoldan alınan alkolün bir kısmı sistematik dolaşıma dahil olmaz, oksidasyonun büyük çoğunluğu karaciğerde gerçekleşirken az bir kısmı midede meydana gelir. Midedeki ADH izoformları ile oksidasyona uğrar. Midede gerçekleşen bu metabolizma ile alkol toksisitesi hafifletilir (18).

Alkolün %90'ı karaciğerde okside olurken %10'u değişime uğramadan atılır. %10'luk kısım içerisinde %5-8'i solunum ve idrarla dışarı atılırken %2-3'ü kadar ihmal edilebilecek kısım ter ve feçesle atılır (19,20).

Etanol metabolizması; etanolün asetaldehite, asetaldehitin asetik asite ve asetik asitin asetil-KoA'ya dönüşümü olarak 3 aşamada gerçekleşir. Etanol metabolizasyonu Şekil 5'de gösterilmiştir.



Şekil 5. Etil Alkol Metabolizması (21)

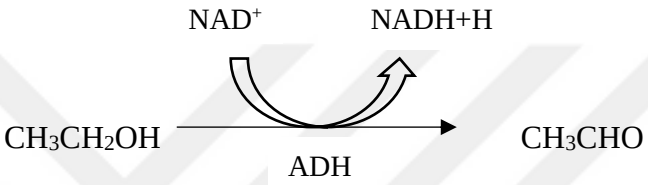
Birinci aşamada; etil alkol oksitlenerek asetaldehide dönüşür. Vücudun etil alkolü asetaldehide dönüştürmek için kullandığı 3 farklı enzimatik yol vardır. Bu sistemlerin üçü de iki hidrojen atomunu alkolden çıkarma esasına dayanır, böylelikle asetaldehide dönüşüm gerçekleşir (22,23).

Karaciğerdeki etanolün; %90'ı alkol dehidrogenaz (ADH) enzimi ile %8-10'u mikrozomal etanol oksitleyici sistem (MEOS) ile %0-2'si katalaz enzimleriyle asetaldehide metabolize olur (7,20).

1.yol: Alkolün ana yıkım yolu ADH enzimi ile gerçekleşen yoldur (24). Bağırsaktaki mikroorganizmalar tarafından üretilen endojen alkolü, eksojen etanolü ve diyetle alınan alkolü oksitlemede görev alan çinko içeren bir enzimdir. ADH en çok karaciğerde yer almakla birlikte, gastrointestinal sistem, böbrekler, burun mukozası ve testislerde de bulunur (18). ADH, alkolden indirgenen ürünleri kabul etmesi için koenzim olarak A vitamini ile ilişkili olan nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) enzimini kullanır. Reaksiyon sonucunda etanolün

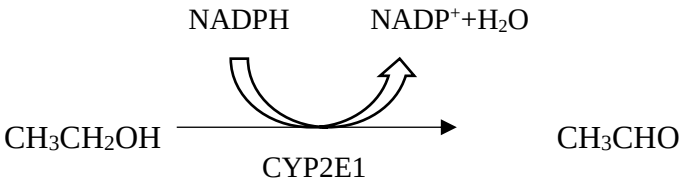
asetaldehide oksitlenmesi gerçekleşirken NAD enzimi NADH'a indirgenir ve $NADH/NAD^+$ oranı artar.

ADH reaksiyonu geri dönüşümlü bir reaksiyondur. ADH aslında alkolü parçalayan bir enzim ailesine verilen isimdir. Her biri farklı moleküler yapıya sahiptir ancak aynı kimyasal reaksiyonu oluşturur. ADH molekülündeki varyasyonlar farklı kişilerin alkole farklı tepkiler vermesini açıklamaya yardımcı olur (25,26). Alkol dehidrogenaz hücrenin hücresel sıvısında (sitozol) çalışmasını yapar. ADH enzimi ile asetaldehite oksitlenme Şekil 6'da gösterilmiştir.



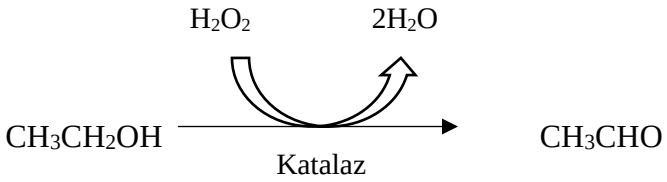
Şekil 6. Etanolün asetaldehite oksitlenmesi

2.yol: İlaçların toksik etkisinin giderilmesinde yer alan Sitokrom P450 enzim ailesinin üyesi 2E1(CYP2E1) enzimi, etil alkolün bir kısmını metabolize eder. Kronik alkol tüketimiyle indüklenir ve yüksek doz alkol alımının olduğu durumlarda aktifleşir. Reaksiyonda açığa çıkan hidrojen, su ve $NADP^+$ oluşturmak için oksijene ve NADPH'ye bağlanır. CYP2E1 çalışmalarını hücrenin mikrozomlarında yapar. Bu sistemde oluşan aldehit dokularda hasara yol açar (14,27). CYP2E1 enzimi ile oksitlenme Şekil 7'de gösterilmiştir.



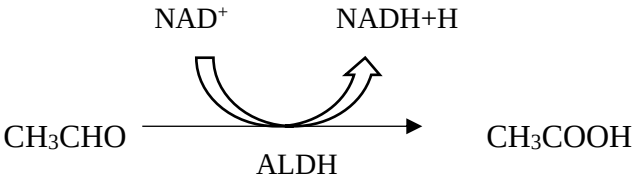
Şekil 7. Etanolün CYP2E1 enizimi ile asetaldehite metabolize oluşu

3.yol: Katalaz enzimi hidrojen peroksit kullanarak etanolü okside eder. Karaciğer hücrelerinde çok fazla miktarda peroksit bulunmaması nedeniyle 1.basamaktaki rolü oldukça azdır. Katalaz yolu karaciğere nazaran beyin dokusunda daha önemlidir. Beyinde katalaz aktivitesi küçük hücresel organellerde, mikroperoksizomlarda bulunur. Katalaz çalışmalarını peroksizomlarda gerçekleştirir (17,28). Katalaz enzimi ile oksitlenme Şekil 8'de gösterilmiştir.



Şekil 8. Katalaz enzimiyle etanolün esateldahite oksitlenmesi

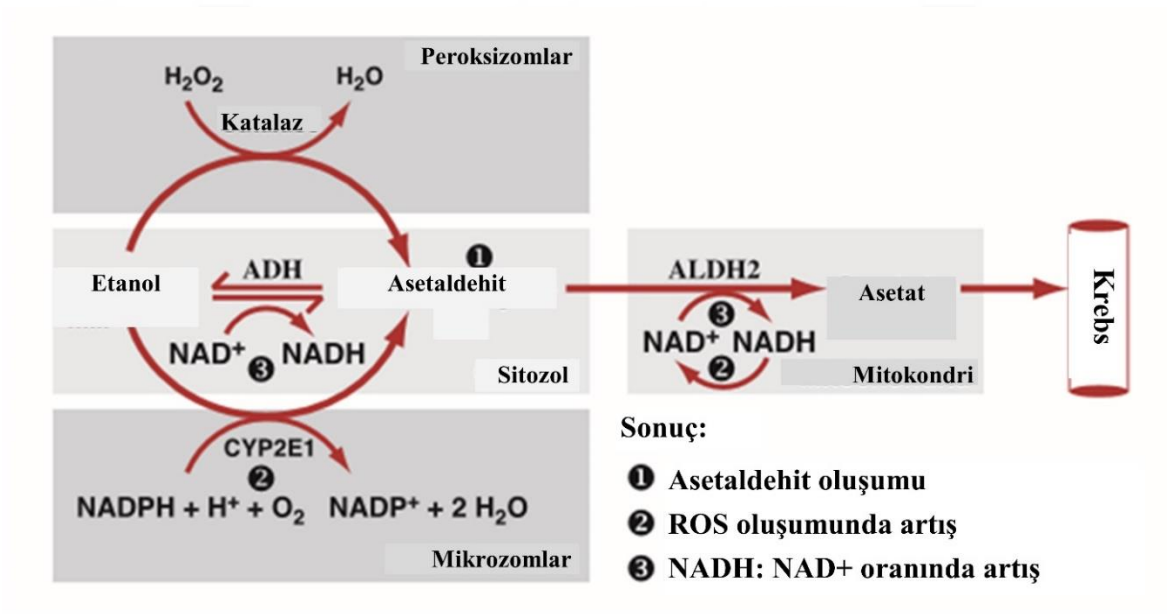
İkinci aşamada; Asetaldehit karaciğerde oksitlenerek asetata dönüşür bu basamakta aldehit dehidrogenaz (ALDH) veya ksantin oksidaz enzimi rol alır. Asetata yükseltgenirken, NAD kofaktörü ise NADH'a indirgenir. Aldehit dehidrogenaz enzimi vücudun birçok dokusunda yer almasına rağmen en yoğun şekilde karaciğerde bulunur. Aldehit dehihrogenaz hücrenin mitokondrisinde çalışır. ALDH reaksiyonu geri döndürülemez (14,22). İnsan vücudunda birkaç tür ALDH bulunur, asetatı parçalayan ALDH2 enzimidir (22,29). ALDH enzimi ile asetata oksitlenme Şekil 9'da gösterilmiştir.



Şekil 9. Asetaldehitin asetata oksitlenmesi (17)

Üçüncü aşamada; Asetaldehit oksidasyonuyla üretilen asetatın büyük kısmı karaciğeri terk ederek asetil koenzimA'nın aktifleştiği beyin, kalp ve iskelet kası dokularına taşınır, bu

dokularda asetil-KoA sentetaz enzimiyle asetil- KoA'ya dönüşür. Karaciğerdeki Asetil-KoA, lipid ve steroid sentezi için öncül madde görevi görür. Karaciğerde etil alkolden sentezlenen asetil-KoA'ların bir kısmı, yağ asitleri ve triaçilgliserol biyosentezine sokulur. Asetil-KoA aynı zamanda ana besin maddelerinden üretilen temel metabolittir. Böylece alkoldeki karbon atomları, karbonhidrat, yağ, proteinin oksitlenmesinden elde edilen CO_2, yağ asitleri, kolestrol gibi ürünler oluşturulur. Bu ürünler beslenmeye, enerji durumuna ve hormonlara bağlıdır. Asetil-KoA sitrik asit döngüsüne girerek oksitlenir, su ve karbondioksite kadar parçalanır (14,18,20,30). Asetil-KoA'nın karbondioksit ve suya parçalanması Şekil 10'da gösterilmiştir.



Şekil 10. Etanol Metabolizması (22)

2.1.6.1. *Alkol metabolizması sonrası organizmada meydana gelen değişiklikler*

Alkolün metabolizasyonu sonucunda NADH/NAD^+ oranı, reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumu ve asetaldehit oluşumunun artmasıyla vücuttaki bazı sistemlerin işleyişinde farklı etkiler gözlemlenir (22).

- *Artan NADH/NAD^+ oranının sonuçları:*

- Okside olan reaktanların konsantrasyonları azalırken, dehidrogenasyon tepkimelerinde artma meydana gelir (30).
- Sitrat döngüsü baskılanarak aktivitesi azalır, laktat/pirüvat oranı artar ve buna bağlı hiperlaktikasidemi gelişir.
- Laktat oluşumunun artmasıyla ürik asitin idrarla atılımı azalır ve buna bağlı hiperürisemi oluşur. Hiperürisemi en çok gut hastalığını tetikler.
- Glukoneojenez baskılanmasıyla hipoglisemi gelişir. Akut alımda kan şekerinde yükselme görülebilir.
- Kollajen sentezini arttıran prolil hidroksilazın aktif olmasıyla karaciğerdeki bağ dokusu sayısında artış gözlenir.
- Sitrat döngüsünün aktivitesinin azalmasıyla yağ asidi oksidasyonunun azalır böylece kandaki yağ asit miktarı artar ve hiperlipemi oluşur. Karaciğer yağlanmasına yol açar.
- Trigliserid ve lipoproteinlerde artış meydana gelir (14,16,31).

- *CYP2E1 aktivasyonunun sonucu:*

Alkol CYP2E1 enziminin aktifliğini arttırarak oksidatif stres denilen durumun oluşmasına neden olur. Oksidatif stres durumunun kaynağı serbest oksijen radikalleridir. Serbest oksijen radikalleri de ROS içerirler. Oksijen radikalleri veya ROS, CYP2E1 enzimi asetaldehit oluştururken meydana gelen yan ürünlerdir (32,33). Serbest oksijen radikallerinin membranlarda etkisi sonucu lipit peroksidasyonıı oluşur, membranlar kalsiyumu fazla miktarda geçirir ve hücre içinde biriken kalsiyum fibrozis, nekrozise sebep olur (34). Serbest radikaller DNA, lipit ve proteinlerle birleşip normal fonksiyonları önler, organları hızla yaşlandırır, kronik hastalıkları ağırlaştırır ve dolayısıyla karaciğerde hasara yol açar (32).

2.1.6.2. *Alkol emilim ve dağılım oranını etkileyen faktörler*

Genetik ve çevresel faktörler alkolün emilim (absorbsiyon) hızında, dağılımında ve dolayısıyla vücuttan atılımında değişiklikler meydana getirir (7,35). Emilim hızının belirlenmesinde en önemli etken midenin boşalma süresidir. Bunun dışında emilim hızı; tüketilen alkol yoğunluğuna, midenin boş olup olmama durumuna, vücut ısısına, alkolle birlikte ilaç alımına ve sigara tüketimine bağlıdır (1,31).

Yiyecek Tüketimi: Boş bir midede emilim çok hızlı gerçekleşerek kandaki alkol konsantrasyonu yükselirken, karbonhidrat, protein ve özellikle yağ içeren yiyeceklerin tüketimi sonucunda emilim yavaşlar. Alkol midede ne kadar fazla kalırsa kan alkol konsantrasyonu (KAK) o denli yavaş yükselir ve yavaş emilir (23). Boş bir mideyle içilen alkol sonucu kan alkol konsantrasyonu 0,5-2 saat içerisinde pik noktasına ulaşırken, tok bireylerde ise kan alkol seviyesi 1 ile 6 saat içerisinde pik noktasına ulaşır (36,37).

Alkol Yoğunluğu: Tüketilen alkol yoğunluğu ne kadar yüksek olursa emilim hızı o kadar yavaş gerçekleşir, çünkü alkol tahriş edicidir ve kaslarda hasar meydana getirir. %10-20 alkol yoğunluğu, emilimin en hızlı olduğu yoğunluktur (1,14). Bira besin maddesi içerdiğinden çok daha yavaş emilir. Alkol konsantrasyonun yüksek veya düşük olmasına karşın alkol emilimi 60-90 dakikada tamamlanır (14).

İlaç Kullanımı: Oral yolla alkol alımından sonra alkolün bir miktarı sistematik dolaşıma dâhil olmadan midede bulunan ADH'lerce oksitlenir bu ilk geçiş eliminasyonudur. Simetidin, aspirin, ranitidin gibi bazı ilaçlar midedeki ADH'yi inhibe ederek ilk geçiş metabolizasyonunu azaltır ve kan alkol konsantrasyonunu arttırır. Ayrıca sürekli içicilerde ilaçlara karşı hassasiyet oluşur, çünkü CYP2E1 enzimi ilaçların toksik etkisinin yok edilmesinde görev alır. İlaçla birlikte yüksek doz alkol alımında ilaçların metabolizasyonu yavaşlar, buna bağlı olarak ilaçların yarılanma ömrü uzar ve toksik etki artar. İlaç- alkol etkileşimi olumsuz sonuçlara

neden olur (38). Antidepresanlar, antipsikotik ilaçlar, benzodiazepinler gibi birçok ilacın alkolle birlikte alımı karşılıklı olacak şekilde etkileşimi arttırır, artan etkileşimle ilaçların etki süresi uzar. Böylelikle normal şartlarda ölümcül dozda olmayan ilaçlar ölüme sebep olabilir (14,39).

Sigara Kullanımı: Sigara içmek doğrudan etkilemese de mide boşalımını geciktirdiği için emilimi yavaşlatan bir faktördür (23).

İçecek Türü: Viski, votka, cin gibi yüksek alkol yoğunluğuna sahip içkiler hızlı emilirken, şarap ve bira daha yavaş emilir. Şampanya ise karbondioksit içerdiğinden diğer şaraplardan daha hızlı emilir (16).

CO_2 içeren içecek tüketimi: Alkolün CO_2 içeren içeceklerle birlikte tüketimi emilimi hızlandırır (14).

Ayrıca etil alkol tek bir doz olarak alındığında konsantrasyon grandyantı daha yüksek olacağı için, birkaç küçük doza karşılık daha yüksek kan alkol seviyesi piki oluşturur (18).

KAK; kişisel faktörlere (yaş, cinsiyet, fiziksel yapı, tolerans vb.), içim hızına, alkol alışkanlığına, alınan alkol miktarına, emilim hızına, mideden ne kadar hızlı boşaltıldığına ve metabolizasyon hızına bağlı değişkenlik gösterir (1,31). KAK, çevresel faktörlerden (alkol içme oranı, midede yiyecek varlığı ve alkollü içecek türü gibi) ve genetik faktörlerden (ADH ve ALDH'nin temel alkol varyasyonları) etkilenir. Alkol eliminasyon (atılımı) oranı da bireyler arasında büyük ölçüde değişiklik gösterir ve kronik alkol tüketimi, diyet, yaş, sigara içme ve günün saati gibi faktörlerden etkilenmektedir (18).

Alkol atılım oranını değiştiren faktörler;

Cinsiyet:

- Etil alkol yağ dokusunda çok az çözünür, kadınlarda yağ oranı erkeklere nazaran fazladır, yağ oranı fazla su hacmi az olduğu için alkol küçük vücut hacmine dağılır böylelikle KAK daha yüksek olur.
- Kadınlar erkeklere göre daha küçük bir vücut boyutuna sahiptir. Eşit miktar alkol tüketiminde kilosu az olanların, genellikle kadınların KAK'ı daha yüksektir.
- Etil alkolü parçalama yeteneği karaciğerin büyüklüğü ile sınırlıdır ve ortalama olarak kadınların erkeklerden daha küçük karaciğerleri vardır, bu nedenle metabolizma hızı azalır ve KAK yüksek seviyeye ulaşır.
- Aynı ağırlıkta kadın ve erkek aynı miktar alkol tükettiğinde, kadın midesindeki ADH daha az olduğu için kadınlardaki KAK daha yüksek seviyeye ulaşır. Eğer enjeksiyon yoluyla alkol alınırsa midedeki ADH anlam ifade etmeyeceğinden kadın ve erkekteki KAK seviyesi eşit olur.

Kadın vücudu erkeğe nazaran daha küçük ve yağ oranı daha az olduğu için etanol atılımı daha yüksektir (23).

Yaş: Yaşlanmayla birlikte karaciğer kütlesinde ve vücut su içeriğinde azalma olabileceğinden alkol eliminasyonunda düşüş meydana gelebilir.

Yiyecek: Alkol metabolizması aç hale göre besin alınmış durumda daha yüksektir, çünkü bu durumda ADH daha yüksek seviyededir. Fruktoz şekeri NADH'yi NAD1'e dönüştürmeye yardım ederek alkol metabolizmasını arttırır.

Tüketim hızı ve miktarı: Alkol ne kadar hızlı içilirse, KAK o kadar hızlı yükselir. Birden fazla içecek hızla tüketildiğinde, KAK daha yüksek seviyelere ulaşır çünkü karaciğerde içecek sayısına bağlı olmayan sabit bir metabolizma oranı vardır (7,40,41).

Hormon seviyeleri: Kadınların regl dönemleri öncesinde aldıkları alkol daha yüksek KAK'a neden olur.

Ruh hali: Depresyon, öfke vb. stres oluşturan duygular enzimleri etkileyerek alkol metabolizmasında dolayısıyla vücuttan atılımında değişikliğe neden olur.

Yorgunluk: Yorgun bünyede karaciğerin metabolizma hızı azalacağından KAK artar.

Biyolojik ritimleri: Alkol atılım oranı saatlere göre değişir ve gün sonundaki dönemde maksimum seviyeye ulaşır. Bu çeşitlilik vücut sıcaklık döngüsüyle ilişkilendirilebilir.

Alkolizm: Bazı kronik alkoliklerde alkol emilim metabolizması diğerlerine oranla iki kat daha yüksek olabiliyorken bazı alkol bağımlılarında tüketim sonucu oluşan karaciğer hasarlarının metabolizma hızını azalttığı görülür. Normal bir kullanıcının aldığı yüksek doz ölüme sebep olabilirken, kronik kullanıcı daha az hasarla bunu atlatabilir.

İlaçlar: ADH'yi inhibe eden veya mitokondriyal solunum zincirini azaltan ilaçlar alkol atılım oranını azaltır. Alkolizm tedavisini desteklemek için kullanılan disülfiram asetaldehit atılımını engelleyerek alkol metabolizmasını yavaşlatır (42).

Vücut ağırlığı: Vücut ağırlığı daha fazla olan bireylerde KAK daha yüksektir, bu nedenle kadın ve erkek bireyler aynı miktarda alkol kullansa dahi kadınların KAK'ı erkeklere oranla %25 daha fazladır genellemesi yapılmaktadır (18).

Metabolizma hızı: Etil alkolün metabolize olma hızı kişiden kişiye değişkenlik gösterir. Cinsiyet, kilo, kronik hastalıklar ve fiziksel özellikler kişiye göre değişkenlik gösteren unsurların başında gelir. Alkol metabolizma oranı vücut metabolizması ile ilişkilendirilir. Etanolün oksitlenme hızı, tipik besinlerin oksitlenme hızıyla paraleldir.

Ayrıca karaciğerdeki en ufak hasar alkol oksidasyonunu ve bununla birlikte vücuttan atılım oranını azaltır.

2.1.7. KAK'ın davranışlara etkisi

Etanol, depresan ilaçlar gibi merkezi sinir sistemini etkileyen hafif anestezik bir maddedir. Alkol alımından hemen sonra ruhsal davranışlarda sınırlanmalar meydana gelir, bir süre sonra karar verme yeteneği azalır, refleks hızı düşer, doza bağlı olarak daha ileri seviyelerde koma ve ardından ölüm meydana gelebilir. Nörotransmitterlerin, özellikle gamma amino bütürik asit (GABA), glutamın, dopamin ve endojen opiyatların etkisini değiştirerek sakinleştirici etki oluşturur. Etanolün yapmaya çalıştığı etkiye karşılık vücut glutamatın sayısını arttırarak, GABA reseptörlerinin ise sayısını azaltarak bu durumu dengeler. Etanol atılımı bir nebze hızlansa da reseptör sayılarının eski haline dönmesi uzun sürer ve bu sırada vücutta alkole karşı tepkiler gelişir (15,43). KAK, tüketimden yaklaşık 30-45 dakika sonra en üst seviyeye ulaşır (7). Alkolün oluşturduğu etkiler kandaki alkol konsantrasyonuyla ilişkilidir. KAK'a bağlı olan alkol etkisi; içme hızına, alkol konsantrasyonuna, kişisel faktörlere (yaş, cinsiyet, kilo), alkole karşı toleransa ve genetik duruma göre değişkenlik gösterir (20,44). Kan alkol konsantrasyonunda bir saatte meydana gelen azalma ortalama olarak %13-18 mg olarak kabul edilir. Ancak kan alkol konsantrasyonunu etkileyen tüm faktörler dikkate alındığında bu değer aralığının %10 ile %27 olabileceği de gözlenmiştir (44,46).

Alkol kullanımından oluşan etkilerden büyük ölçüde asetaldehit sorumludur, asetaldehit oldukça zararlı bir maddedir. Etil alkolü asetaldehide dönüştürmekten sorumlu enzim ADH ve asetaldehidi asetik aside dönüştürmekten sorumlu enzim ALDH, farklı izoformlara sahiptir. Kişilerdeki izoformlar dahil oldukları popülasyona göre değişir. Bu enzimlerin üretiminin sağlandığı genler DNA yoluyla aileden bireylere aktarılır. Dolayısıyla popülasyonu farklı olanlarda farklı gen varyantları gözlenmesi oldukça doğaldır. Bunun sonucunda bazı popülasyonlarda asetaldehit fazlalığı nedeniyle düşük seviyedeki alkol miktarı büyük etkilere sebep olabilir (1,43).

Alkolün gösterdiği belirtilerle kan alkol seviyesi arasında ilişki;

-Kan alkol konsantrasyonu %10-50 mg iken:

Bu kan düzeyine 180-360 cc şarap, 70-140 cc rakı ya da 900-1800 cc bira tüketimi sonucu ulaşılır. Artan güven, konuşkanlıkta orta dereceli artış (öfori), cesaret, atılganlık, cömertlik ve enerji artışıyla gelişen hareketlilik gözlemlenir. Rahatlama hissi meydana gelir (7,44).

-Kan alkol konsantrasyonu %50-100 mg iken:

Hafif sarhoşlukla birlikte görüş daralması, bulanık görme meydana gelirken koordinasyon bozukluğu oluşur, karar ve tepki verme yeteneği azalır. Konuşmada artış ve gülme gözlemlenir (1,45).

-Kan alkol konsantrasyonu %100-150 mg iken:

Konuşma ve yürümede bozukluklar, idrak etmede azalma ve reaksiyon süresinde uzama meydana gelir. Dikkat dağınıklığı gözlemlenir. Kişiler kırıcı, kavgacı, saldırgan, aşırı alıngan veya çocuksu olurlar. Çabuk üzülür ve ağlarlar ya da açık saçık küfürlü konuşurlar (14,44).

-Kan alkol konsantrasyonu %150-200 mg iken:

Bilişsel ve davranışsal bozukluklar oluşurken orta derece sarhoşluk gelişir. Konuşma, reaksiyon güçlüğü ve denge bozukluğu oluşur. Mide bulantısıyla birlikte orta derecede zehirlenme meydana gelir (7,14).

-Kan alkol konsantrasyonu %200-300 mg iken:

Belirgin görme bozukluğu, çift görme, düşünmede ağırlaşma, amnezya ve kusma belirtileri oluşur. Kuvvetli sarhoşluk hali gözlenir, bilinç bozukluğu meydana gelir ve komaya yatkınlık oluşur (7,38).

-Kan alkol konsantrasyonu %300-400 mg iken:

Koordinasyon, kalp ve akciğer fonksiyonları bozulur, solunum depresyonu durumu meydana gelir, kan basıncı düşer ve bilinç kaybı meydana gelir (47).

-Kan alkol konsantrasyonu %400-500 mg iken:

Akut alkol zehirlenmesi meydana gelir. Derin koma, ileri derece solunum bozukluğu ve genellikle ölüm görülür (48,49).

Etil alkolün zehirlenmeye veya ölüme neden olabilecek miktarı tüketen kişinin yapısına, içme hızına, tok/aç olma durumuna, alkol yoğunluğuna bağlı değişkenlik gösterir. Sürekli içicilerin (kronik alkoliklerin) toleransı yüksektir bu nedenle belirli miktardaki alkole toleransı düşük olan bir kişiyle, sürekli alkol tüketen kişinin verdiği tepki aynı olmaz, toleransı düşük olan kişide daha şiddetli belirtilerin meydana geldiği gözlemlenir. Genel olarak orta seviyeli içicilerde 70-80 mg/100 mL alkol tüketiminde sarhoşluk belirtileri gözlemlenebilir. 300 ile 500 mg/100 mL öldürücü nitelikte kabul edilirken, sürekli içicilerde bu değerin 1000 ile 1500 mg/100 mL seviyesine ulaştığı olgular literatürde yer almaktadır (18,48).

2.1.8. Etil alkolün vücuda etkisi

Alkol vücutta en çok merkezi sinir sistemini zarara uğratmakla birlikte periferik sinir sistemi, kardiyovasküler sinir sistemi ve gastrointestinal sinir sistemi gibi birçok sisteme zarar veren, sosyal ve ekonomik sonuçları olan bir maddedir. Merkezi sinir sisteminde beyinde sebep olduğu bozukluklarla bilişsel, duyuşsal ve duygusal davranışları etkileyip, değiştirir. Beyindeki ve dolayısıyla davranışlardaki etkisi yaşa, kullanılan miktarına, içme süresine, hızına göre değişiklik gösterir. Yaşlanıldıkça vücuttaki su oranı azalır, alkol de suda dağılımı yüksek bir madde olması nedeniyle düşük su hacminde yüksek kan alkol seviyesine ulaşır. Aynı zamanda metabolize etme hızı da gençlere nispeten daha düşüktür. Bu faktörler göz önünde bulundurulduğunda toksik etki yaşla beraber artış gösterir denilebilir (43,50).

Beyne etkisi: Etil alkolün merkezi sinir sistemine akut etkisi; saldırganlık, inhibasyon, antidepresan olarak yansırken, kronik etkisi; uyku bozukluğu, bağımlılık, tolerans gibi etkilerin yanı sıra genel zihinsel yetenek kaybı gelişir. Orta derecede alkol tüketimi GABA, dopaminerjik, serotonerjik sistemleri etkiler. Böylelikle motor hareketlerinde, refleks mekanizmasında, konuşmada, karar verme yeteneğinde sorunlar oluşur. Alkole devam durumunda beynin davranışlardan sorumlu prefrontal korteks dokusunda büzülme görülür (30,43). Etanolün akut kullanımı sonucu oluşan toksik etkiyle kan-beyin bariyer geçirgenliği artar. Etanolün membranlar içindeki hareketlere etkisiyle içinde proteinleri barındıran lipit ortamı bozulur. Buradaki enzim ve proteinler değişikliğe uğrar, sitoplazmadaki mitokondri sayısı artar. Çok sayıdaki mitokondri, damarları çevreleyen bölgede ödem meydana getirir. Artan tüketimle beyin hücrelerinde ölüm oluşur bu da hafızada erken yaşlanma etkisi gösterir. Ayrıca aşırı alkol bağımlılığı "Wernicke-Korsakoff Sendromu" adı verilen kalıcı beyin hasarına sebep olabilir (51).

Üreme organlarına etkisi: Alkol cinsel sorunların tetikleyicisi konumundadır. Erkeklerde testis fonksiyonunda olumsuz etki gösterir, erkeklik hormonunda azalmaya östrojen hormonunda ise artmaya yol açar. Ereksiyon bozukluğuna, testislerde küçülmeye, erkeklerde meme bezlerinin büyümesine hatta kısırlığa sebep olur. Kadınlarda adeti geciktirici etki oluşturabilir. Ergenlik döneminde alkol tüketen gençler daha geç üreme sistemi olgunluğuna ulaşır (30,51). Hamilelik döneminde alkol kullanan kadınlarda düşük, prematüre ve ölü doğuma yol açabilirken, kronik alkol kullanımı olan annelerde fetal alkol sendromu (FAS) adı verilen durum gelişir. Bu bebeklerde büyüme anormalliklerine, merkezi sinir sistemi hasarına neden olur (43,51).

İskelet ve kas sistemine etkisi: Kronik alkol kullanımı iskelet kası proteinininin kaybına neden olarak birçok olumsuz durumu beraberinde getirir. Güç kaybeden kemikler darbelere karşı hassaslaşır, kırıklar daha geç onarılır ve kramplar meydana gelebilir. İskelet kaslarıyla birlikte cilt, ince bağırsak ve kemik protein iskeletinde de azalmalar meydana gelir (52).

Endokrin sistemine etkisi: Ergenlik ve sonrası dönemde alkol hormonal dengeyi olumsuz etkileyerek kas, kemik ve organların gelişimine zarar verebilir. Gelişimi tamamlayan orta yaş erkek ve ileri yaş kadınlarda ise koroner arter hastalığı (KAH) üzerinde etki gösterir. Kadınlardaki over hormonları erkeklere nazaran daha düşük risk taşımalarına neden olur. Postmenopozal kadınlarda alkol kullanımı östrojen düzeyini arttırarak KAH riskini azaltıcı etki oluşturur (53,54). Ayrıca adrenal bezini etkileyerek kolestrolü düşürür, pitüiter bezi etkileyerek idrara çıkma sıklığını arttırır (16,44).

Kalbe etkisi: Alkol miyokardiyal depresan özelliğindedir. Kronik alkol kullanan kişilerde alkolün kalp kasına direkt etkisinden dolayı kardiomiyopati görülür. Düşük ile orta derece alkol tüketimi kan pıhtılaşma oranını azaltıcı etki yaparak kardiyovasküler riski düşürür hipertansiyonu veya kalp yetmezliğini bir nebze önleyebilir, ruhsal gelişimi azaltır fakat yüksek derece alkol tüketimi yüksek kan basıncına sebep olarak aritmilere ve dolayısıyla kalp yetmezliğine sebep olabilir. Ayrıca uzun süreli alkol tüketimi reaktif oksijen türlerini arttırıp gen ekspresyonunu inhibe eder. Ayrıca alkolün kalp atışı üzerine etkisi tüketilen doza bağlıdır (51,55).

Gastrointestinal sisteme etkisi: Alkolün tüketim miktarına bağlı olarak gastrointestinal sisteme zararı değişkenlik gösterir. Yüksek doz alkol tüketimiyle sindirim enzimleri bozulur dolayısıyla sindirim zorlaşır, midenin boşalma süresi gecikir ve mide spazmı meydana gelir. Sindirim sistemi dokularında hasara yol açarak bağırsaklarda besin maddelerinin ve vitaminlerin emilimini önleyerek yetersiz beslenmeye öncü olabilir. Aşırı alkol tüketimi mide iç yüzeyini tahriş ederek gastrit, şişkinlik, karında sertleşme, ishal, kusma, ağrılı dışkıya ve iç kanamaya sebep olabilir. Midede gastrin ve hidroklorik asit salgısını arttırır, mide mukoza bariyerini bozar (44,55).

Pankreas ve şeker seviyelerine etkisi*:* Karaciğerde alkol metabolizasyonu sırasında glikoz oksidasyonu azaldığından dolayı kan şekeri düşer. Vücudun insülin kullanımını ve glikoz

tepkisini düzenlemeden sorumlu pankreas da alkol nedeniyle görevini yerine getiremediğinde hipoglisemi (düşük kan şekeri) riski gelişir. Bunun dışında hasarlı pankreas, vücudun şekeri kullanmak için yeterli insülin üretimini gerçekleştiremeyerek hiperglisemi (yüksek kan şekeri) riski oluşturur. Vücudun kan şekeri seviyesini dengeleyebilmesini engelleyerek büyük hasarlara neden olabileceği için şeker hastalarının alkol kullanımı fazlasıyla tehlikelidir. Kronik alkol kullanımı pankreasta üretilen enzim aktivitesini anormal seviyelere ulaştırır. Etanolün oksidatif olmayan metabolizması sonucu oluşan yağ asidi esterleri, pankreatit adı verilen iltihaplanmaya sebep olur (51,56,57).

Hipertansiyona etkisi: Kan basıncı ve alkol ilişkisi tüketilen doza bağlı olarak U ve J şekilleriyle bağdaştırılır. Günde bir kadeh alkolün kan basıncında azaltıcı yönde etkisi varken, günde orta derecede (30 g) alkolün etkisi minördür. Ancak yüksek dozda (4 kadehten fazla) alkol alımı hipertansiyon riskini tetikleyerek ağır sonuçlar oluşturabilir. Bu nedenle hipertansiyon hastaları alkolden kaçınmalıdır (31,54).

İnmeye etkisi: Orta doz alkol tüketimiyle inme etkileşimi yaşa, cinsiyete, içme hızına ve içecek türüne bağlı değişirken, ağır alkol tüketimi sonucu inme riski artar, özellikle intraserebral ve subaraknoid kanamalar artış gösterir **(**31,54,58).

Sigara kullanımı etkisi: Sigaranın başlı başına birçok organa zarar veren bir madde olmasının yanında alkolle birlikte tüketimi pozitif birlikteliği sebep olarak etkiyi yüksek seviyelere çıkarır. Özellikle kardiyovasküler hastalıklarda riski arttırarak alkolün küçük bir dozunun koruyucu etkisini ortadan kaldırır (31,59).

Solunum sistemine etkisi: Az ve orta dozdaki alkol kullanımı, solunum merkezini stimüle ederek solunumu hızlandırıcı etki oluştururken ağır alkol kullanımında ise solunumun baskılandığı gözlemlenir (60).

Böbreklere etkisi: Maddeleri ve metabolitleri kandan alarak idrarla dışarı atılmasından sorumlu olan böbrek aynı zamanda bazı enzimlerin üretilmesinde de görev alır. Etanol tüketiminden sonra etanol ve metabolitleri böbreklerden geçer ve idrarla dışarı atılır. Etanol üretimi sonrası böbrekte glomerül ve tübüller şişer, mesanjiyal hücrelerin proliferasyonu ve tübüler epitel hücrelerinde hiyalin düşer (51).

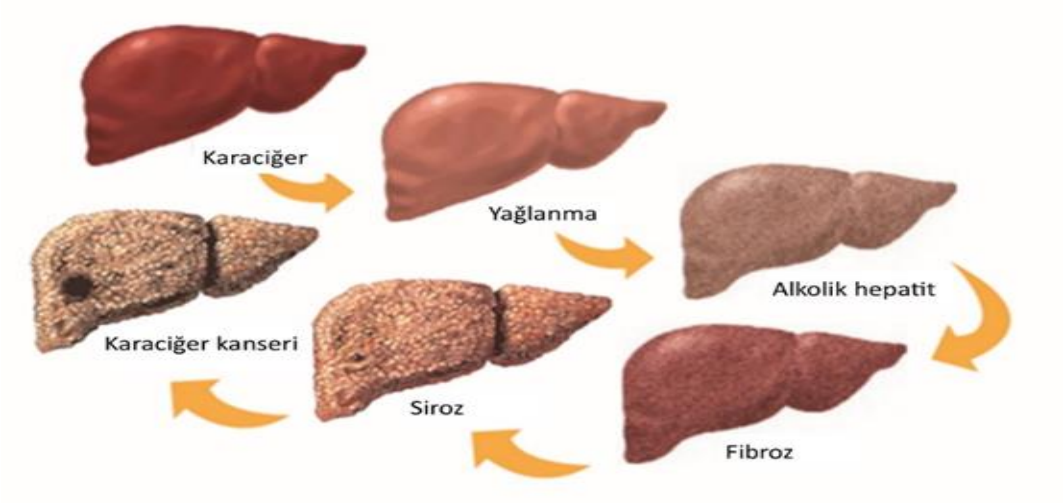
Cilde etkisi*:* Kişinin var olan cilt hastalığı ağır alkol tüketimiyle artabilir (61).

Bağışıklık sistemine etkisi: Alkol vücudun doğal bağışıklık sistemini olumsuz etkiler. Vücut mikrop ve virüslere karşı zayıf kalır, direnci düşer. Ağır alkol tüketiminde zatürre ve tüberküloza eğilim artar (51).

Karaciğere etkisi: Karaciğer merkezi sinir sisteminin yanında alkol kullanımından en çok zarar gören organdır. Alkol metabolizmasının çok büyük bir çoğunluğu karaciğerde gerçekleştiğinden dolayı zararı da büyük oranda olur. Karaciğer vücuda alınan veya vücutta oluşan zararlı maddelerin toksik etkisinin yok edilmesinden, besinlerin depolanmasından, antikor ve protein yapımı ve safra üretiminden sorumlu organdır ve bu işlemi mikrozomal fraksiyonda yer alan P450 sistemiyle gerçekleştirir. Kronik alkol alımında etanolün asetaldehite dönüşümü CYP2E1 tarafından yani P450'de gerçekleştirilir. Sitokrom P450 sistemi bir tarafta etil alkolü ve diğer tarafta toksiksizleştirme işlemini metabolize ederken, sistem etil alkolün oksidasyonu tarafına kayar ve zararlı bileşiklerin zararsız hale dönüştürülmesi sekmeye uğrar, böylece karaciğerde ve kanda toksik madde konsantrasyonu artar. Bu durum önce karaciğere ve sonrasında birçok organa zarar verir. Etanolün oksidasyonu sırasında oluşan asetaldehit lipitlere, proteinlere bağlanarak onların yapısını ve işlevini bozar, biyosentez metabolizmalarını olumsuz etkiler. Bağırsaktan emilip kana geçen maddelerin yararlı hala dönüştürüldüğü ve özellikle karaciğerden artık maddeleri uzaklaştıran safra sıvısını salgılayan hepatositler, oluşan asetaldehitin zararlı etkisini azaltmak için ALDH enzimine ihtiyaç duyar, ALDH enzimi etkisiyle de NADH üretimi artar ve NAD+/NADH oranı azalır. Oranın azalması metabolik

yolaklarda bozulmalara neden olur. Meydana gelen değişimler ve bozukluklar karaciğerde yağ birikimini tetikler.

Kronik alkol tüketiminde ise CYP2E1 enzimi ile oluşan hızlandırılmış alkol metabolizmasıyla fazla aldehit üretimi gelişir oluşan aldehit endoplazmik retikulumda serbest radikaller oluşturur, serbest radikallerin en etkilisi süperoksitlerdir. Süperoksitler de oksidatif strese yol açarak lipit ve proteinleri ikincil reaksiyona sürükler bunun sonucunda lipit peroksidasyonu oluşur. Aynı zamanda oksidatif stres sonucu karaciğerde A, C ve E vitamini gibi antioksidan faktörler azalır. Karaciğeri çevreleyen hepatositlerde oluşan yağlanma, alkol alım devamıyla orta hepatositlere, alkol bağımlılığıyla ise damar hepatositlere ulaşıp alkolik hepatit ve en ağırı olan siroz gibi hastalıklara yol açar (62,63). Karaciğer hastalığı spektrumu Şekil 11'de gösterilmiştir.



Şekil 11. Alkolik karaciğer hastalığı spektrumu (64)

-Karaciğer yağlanması: Karaciğerde lipoproteinlerin salgılanması, proteinlerin sentez metabolizmalarının ve diğer birçok metabolik yolakların bozulması sonucu yağ birikimi sonucu oluşan durumdur. Karaciğer yağlanması yıl boyunca günde yaklaşık olarak 4-5 standart alkollü içecek tüketicilerde, alkoliklerinse yaklaşık %80'nde görülür, genellikle karaciğer büyür ve ağrı hissi oluşur. Alkol alımına devam edildiğinde alkolik hepatit ve siroz gelişebilir. Eğer alkol

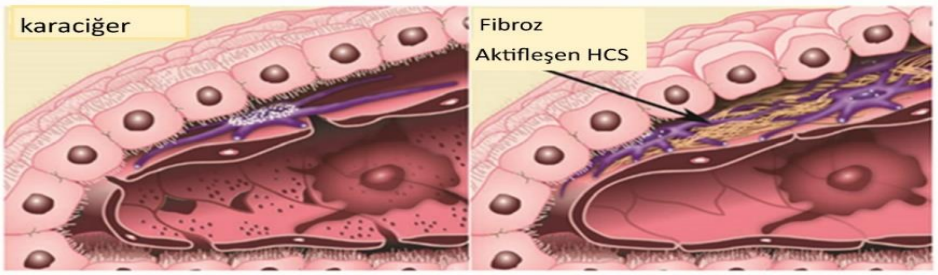
tüketimi sonlandırılırsa bir süre sonra karaciğer eski haline dönebilir, bu reaksiyon geri dönüşümlüdür (62,65).

-Alkolik Hepatit: Kronik etanol kullanımı, düşük beslenme ya da enerji gerektiren ekstra durumlarda kullanmak adına fazla kalorileri depolayan yağ dokusunda yağların parçalanma metabolizmasını arttırır. Parçalanmayla oluşan yağ asitleri karaciğerde bulunan Kupffer hücreleri (KC) ve hepatik stellat hücrelerinin (HCS) aktifliğini arttırarak sitokin üretir. Sitokinler de yağ asitlerine bağlanarak onları çoğaltır ve hepatositlerde yağlanmanın yanı sıra iltihaplanarak şişmenin meydana geldiği daha ağrılı ve şiddetli karaciğer hastalığı oluşturur. Alkoliklerin yaklaşık %20'sinde görülür. Alkolik hepatit belirtileri arasında sarılık, bulantı, kusma, iştah kaybı, karında su toplanması görülebilir, alkol alımının bırakılması ve uygun tedavilerle durum toparlanabilir fakat alkol alımı devam ederse siroz veya karaciğer yetmezliği meydana gelebilir. Alkol alımına devam eden alkolik hepatit hastalarının %50'sinde siroza dönüşüm görülür. Ağır vakalarda ölüm riski vardır (43,51).

-Alkolik Siroz: Sirozda kilit nokta HCS'lerdir, HCS'ler Disse boşluğunda hareketsiz duran hücrelerdir. Kronik alkol alımına devam edildiğinde HCS'lerin aktivasyonu karmaşıklaşır, yara izi oluşturan hücre dışı proteinler salgılanır, sitokin üretimi artar bunların yanı sıra lökositler uyarılır. Uyarılan lökositler hepatositlere saldırır ve onları yok eder, bu da fibroziso neden olur. Alkol alımı durdurulduğunda düşük ihtimalde olsa geri döndürülebilir. Eğer alkol alımı devam ettirilirse karaciğerde parankimi (görev gören doku) ile skar doku (yaralı doku) yer değiştirir buna siroz adı verilir. Siroz gelişimi ilerlerse skar doku tüm karaciğeri kaplayarak kendini yenileme özelliğini kaybettirir, iş görmez hale getirir ve karaciğer yetmezliği sonucu oluşan komayla ölüm meydana gelir. Alkoliklerin %8-10'inde ölüm riski vardır (43,62,64).

Karaciğer yağlanması, alkolik hepatit ve siroz ayrı ayrı veya ikisi birlikte görülebilir. Hastalığın ciddiyeti kullanılan ilaçlara, genetiğe ve beslenme alışkanlığına bağlıdır. Hastalardaki belirtiler değişiklik gösterir. Bazı durumlarda siroz olduğunda dahi belirti görülmeyebilir. Bunları

önlemek için alkol tüketen kişiler, periyodik muayenelere dikkat etmelidir (43). Fibroz oluşumu Şekil 12'de gösterilmiştir.

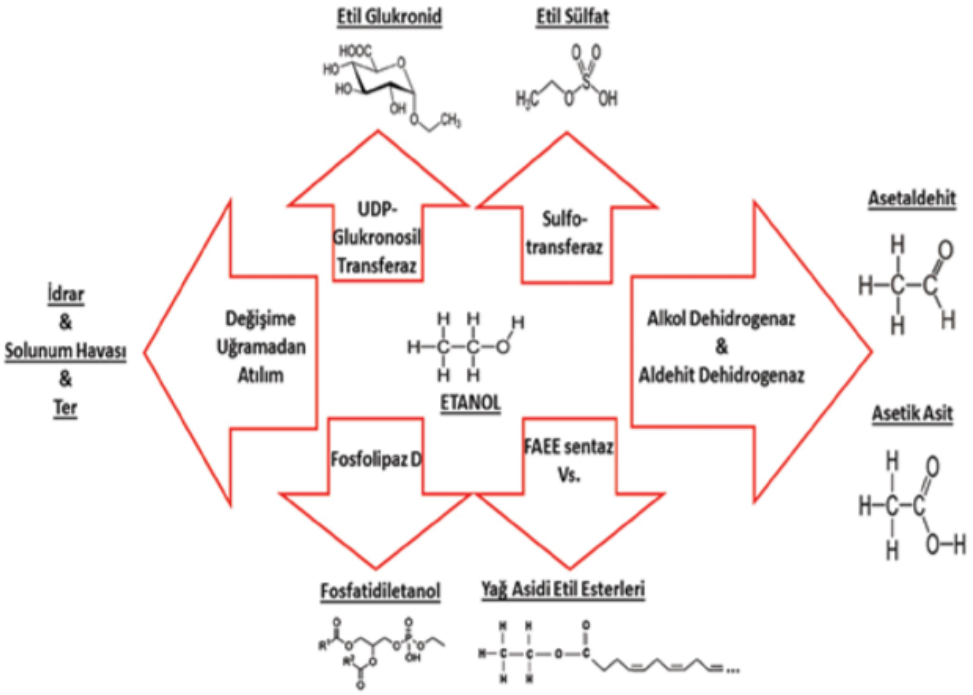


Şekil 12. Aktifleşen HCS'ler sonucu oluşan fibroz (64)

Alkol birçok besin maddesinin eksikliğine de yol açmaktadır. Uzun süre alkol kullanımı vücutta protein, niasin, B_6 vitamini, folik asit, magnezyum, potasyum, çinko ve B_{12} vitamini eksikliklerini ortaya çıkarır. Bunun dışında, alkol vücut içi ısısını düşürdüğü için enfeksiyonlara karşı direnci azaltır. Ayrıca iştahı arttırdığı için kilo alımına sebep olabilir (16,44).

2.1.9. Etil alkol alımı tespitinde kullanılan biyobelirteçler

Etil alkol, vücut sıvılarında rahatlıkla belirlenmesine rağmen etanolün hızlı atılımı, kişilerdeki metabolizma hızının farklılığı gibi faktörler sebebiyle alınan alkol miktarını ölçmede sadece etanol tespiti yeterli olmaz farklı testler de kullanılır. Alkol alımı kronik ve akut alkol alımı olarak iki başlıkta ele alınabilir. Kronik alkol alımında gama glutamiltranferaz (GGT), ortalama korpuskuler hacim (OKH) ve karbonhidrattan yoksun transferin (KYT) testleri uygulanırken, akut alkol alımında ise etil glukronid (EtG), etil sülfat (EtS), yağ asit etil esterleri (YAEE), 5-Hidroksitriptofol (5-HTOL) ve Fosfatidiletanol (PEth) gibi alkol metabolitleri ile çalışmalar yapılmaktadır (66,67). Etanol metabolitleri Şekil 13'de gösterilmiştir.



Şekil 13. Etil alkolün metabolitleri (68)

- **Etil glukronid (EtG):**

EtG etanolün non-oksidatif minör metabolitlerindendir. Non oksidatif metabolizmaya uğrayarak minör metabolitlerine dönüşen çok az miktardaki etanolün %0,6-1,5'lık kısmı EtG içerir. UDP-glukuronosiltransferaz enziminin etanole bir glukuronik asit eklemesiyle kimyasal formülü $C_8H_{14}O_7$ olan EtG sentezlenmektedir. EtG'nin moleküler ağırlığı 222,193 g/mol'dur (67).

Yapılan çalışmalar sonucunda etil alkolün 3-4 saat sonra kanda tespit edilemez düzeylere ulaşmasına rağmen, EtG 'nin 16 saate kadar kanda, 35 saat süresincede idrarda tespit edilebildiği belirlenmiştir. Ayrıca EtG kanda, alkol alımından 30-45 dakika sonra idrarda da alkol alımından 1 saat sonra gösterilebilir seviyeye erişmektedir.

- **Etil sülfat (EtS):**

EtS, etanolün non-oksidatif minör metabolitlerindendir. Non oksidatif metabolizmaya uğrayarak minör metabolitlerine dönüşen çok az miktardaki etanolün %0,010-0,016'lık kısmı EtS içerir. Sülfotransferaz enziminin etanole sülfat grubu eklemesiyle EtS oluşur. EtS'nin kimyasal formülü $C_2H_6O_4S$ ve moleküler ağırlığı 126,13 g/mol'dür. Yapılan çalışmalarla EtS'nin alkol alımından sonra idrarda yaklaşık 36 saate kadar kalabildiği kanda ise maksimum düzeye eriştiği belirlenmiştir (67,68).

- **5-Hidroksitriptofol (5- HTOL):**

Serotonin (5-HT) vücutta esansiyel bir aminoasit olan triptofandan oluşmaktadır. Metabolize olurken öncelikle oksidatif deaminasyon ile 5-hidroksiindolasetaldehite (5-HIAL), sonra ALDH enzimi ile 5-hidroksiindolasetikasite (5HIAA) veya alkol redüktaz ve alkol dehidrogenaz enzimleri ile 5-HTOL'a dönüşür. 5-HTOL idrara glukronik asit veya sülfatla konjuge bir şekilde salınır. Alkol alımı sonrası asetaldehit seviyesinin yükselmesi veya NADH oranının artmasıyla, ALDH enzimi inhibe olur ve böylece idrarda 5-HTOL artar. 5-HTOL'un kreatinin veya 5hidroksi-3-asetik asite (5-HIAA) oranına bakılarak alkol alımı belirlenmeye çalışılır. Etanolün idrarda kaybolmasından 6-20 saat sonra bile 5-HTOL'un seviyesinin yüksek kaldığı gözlemlenmiştir. Ayrıca gıdalarda 5-HT nedeniyle yalancı pozitif sonuç vermemesi için 5HIAA ile oranına bakılır (66,69**).**

- **Fosfatidiletanol (PEth):**

PEth; etanolün, yüksek sensitiviteye sahip olduğu bilinen bir metabolitidir. PEth, etanol varlığında fosfotidilkolinin fosfolipaz D enzimi ile yıkımı sırasında hücre membranında oluşur. Beyin, kan hücreleri ve karaciğer gibi pek çok dokuda tespit edilebilmektedir. Alkolikler üzerinde yapılan çalışmalarda yüksek PEth oranı bulunan olgularda dört haftaya kadar olan

alkol alımının saptanabileceği belirlenmiştir. In vitro koşullarda kolay bozulabilen bir metabolit olduğundan dolayı örnekler -80° C'de saklanmalıdır (66).

- **Yağ asit etil esterleri (YAEE):**

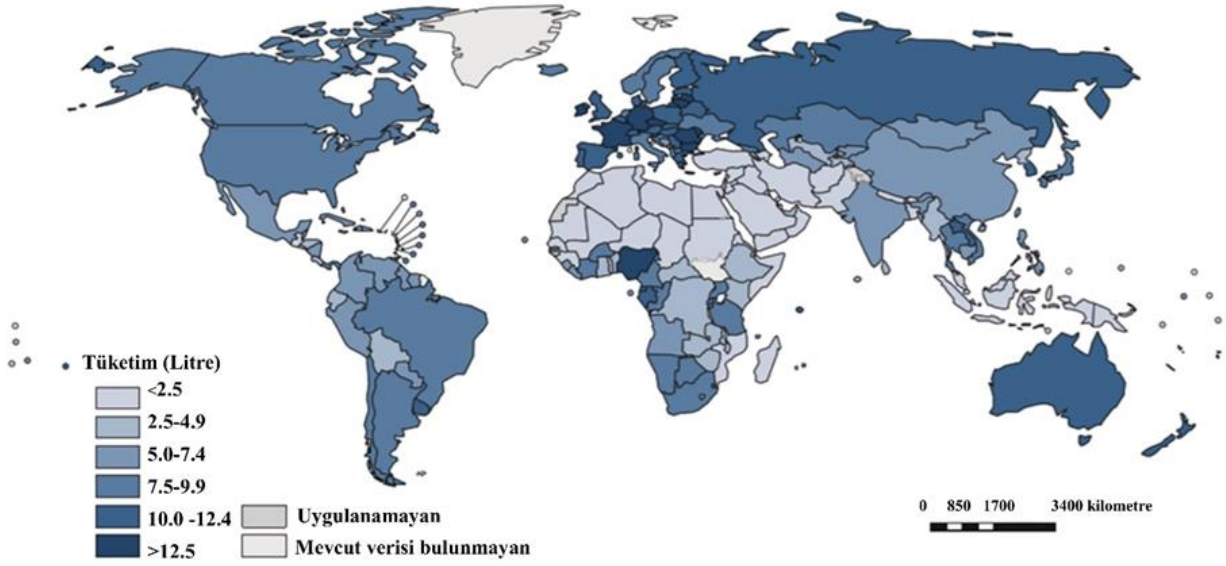
Yağ asit etil esterleri etanol metabolizmasının non-oksidatif metabolizması sonucu oluşur. Pankreas ve karaciğerde, endojen yağ asitlerinin alkol ile esterleşmesi sonucu bu ürünler oluşur. Bu reaksiyonlarda YAEE sentaz ve açil-Koa/etanol O transferaz olmak üzere iki değişik enzimatik aktivite rol alır. YAEE'ler karaciğer ve pankreasta sentezlenip, lipoprotein ve albumine bağlı olarak kanda taşınır ve yağ dokuya iletililir. YAEE'ler kan, yağ dokusu, saç, sebum gibi biyolojik materyallerde bulunmaktadır. YAEE'ler, EtG ve EtS'ye nazaran daha az polar özellik gösterdiğinden gaz kromotografi çalışmalarında daha uygundur (66).

2.1.10. Alkol tüketimi

Alkolün yasal olması ve toplum tarafından kabul gören bir madde olması nedeniyle kullanımı yaygındır. Özellikle eğlence ve macera amacıyla tüketimi onu daha da popüler hala getirmektedir. Dünyada alkol kullanımı, eğlence mekanlarının artışıyla artış göstermekte ve sonuç olarak birey sağlığı ve halk toplum sağlığını tehlikeye düşürmektedir.

2.1.10.1. *Dünya'da alkol tüketimi*

Dünya Sağlık Örgütü'nün 2018 yılında paylaştığı rapordaki 2016 yılında 15 yaş üstü kişi başı toplam alkol tüketimi Şekil 14'de gösterilmiştir.



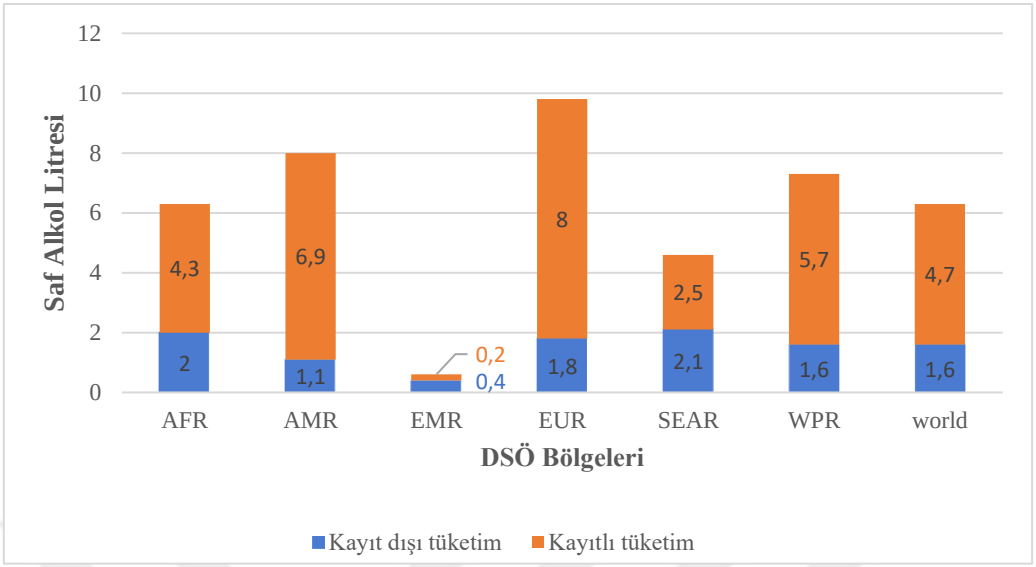
Şekil 14. 15 yaş üstü kişi başına toplam alkol tüketimi (saf alkol litresi) (70)

DSÖ'nün belirlenen bölgelerde 2016 yılına ait kişi başı alkol tüketimi Tablo II'de gösterilmiştir.

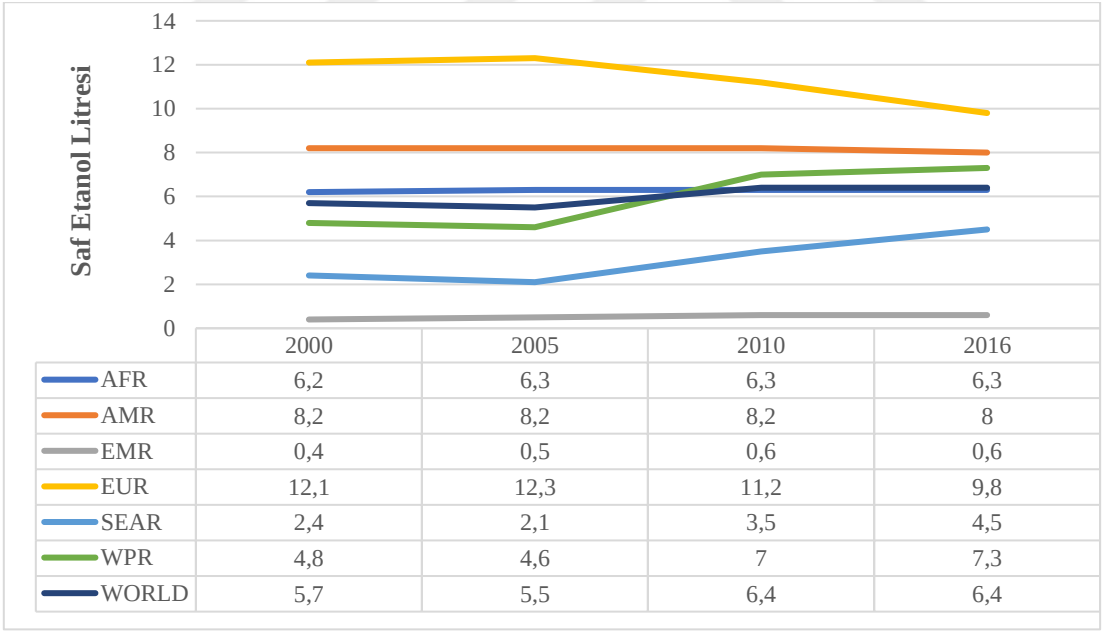
Tablo II. DSÖ tarafından belirlenen bölgelerde kişi başına düşen alkol tüketimi; (2016) (70)

	Herkes		**Yalnızca içiciler**			
Dünya bölgeleri	**Litre**	**Gram/gün**	**Litre**	**Gram/gün**	**Mevcut İçiciler (%)**	**İçiciler/tüm gram/gün**
Afrika	6,3	13,6	18,4	40,0	32,2	2,9
Amerika	8,01	17,4	15,1	32,8	54,1	1,9
Doğu Akdeniz	0,6	1,2	21,2	46,1	2,9	38,3
Avrupa	9,8	21,3	17,2	37,4	59,9	1,8
Güneydoğu Asya	4,5	9,8	12,1	26,3	33,1	2,7
Batı Pasifik	7,3	15,8	13,8	30,0	53,8	1,9
Dünya	6,4	13,9	15,1	32,8	43,0	2,4

WHO tarafından belirlenen bölgelerdeki 2016 yılında kayıt dışı ve kaydedilen kişi başı alkol tüketimi Şekil 15'de, 2000-2016 yılları arasındaki alkol tüketimi Şekil 16'da, 2016 yılında WHO bölgesi ve Dünya'daki toplam nüfusta ve içiciler arasında kişi başına toplam alkol ve ağır epizodik içme (HED) (%) yaygınlığı Tablo III'de, 2016 yılındaki DSÖ bölgesi ve Dünya toplam nüfusu ile karşılaştırıldığında, toplam 15–19 ve 20–24 yaş grubundaki mevcut içicilerin yüzdesi Şekil 17'de ve WHO bölgesine göre 2016-2025 yılları kişi başına toplam alkol tüketimi tahminleri Şekil 18'de gösterilmiştir.



Şekil 15. Kayıt dışı ve kaydedilen kişi başına (15+) saf alkol tüketimi (WHO) (70)

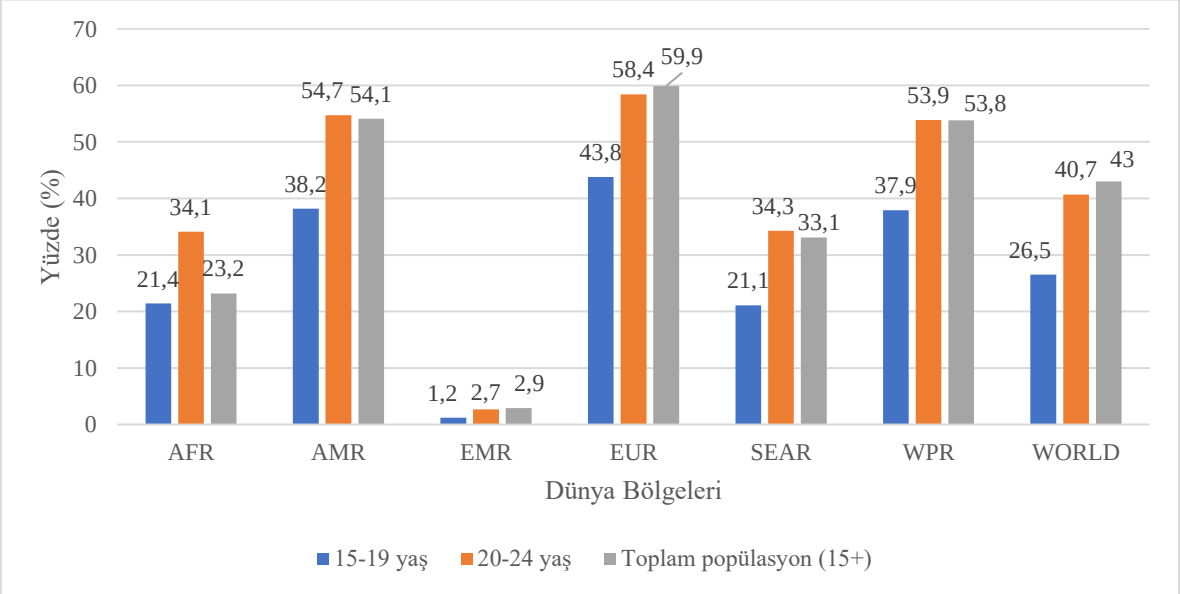


	2000	2005	2010	2016
AFR	6,2	6,3	6,3	6,3
AMR	8,2	8,2	8,2	8
EMR	0,4	0,5	0,6	0,6
EUR	12,1	12,3	11,2	9,8
SEAR	2,4	2,1	3,5	4,5
WPR	4,8	4,6	7	7,3
WORLD	5,7	5,5	6,4	6,4

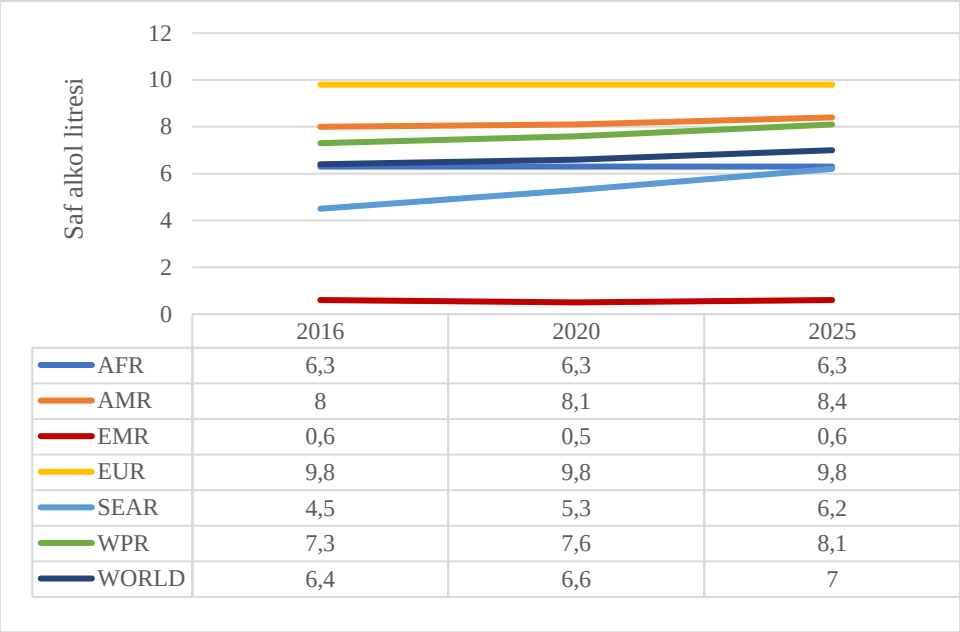
Şekil 16. 2000-2016 yılları arasında Dünya bölgelerinde alkol tüketimi (+15) (70)

Tablo III. DSÖ bölgesi ve Dünya'daki toplam nüfusta (+15) ve içiciler arasında (+15) kişi başına toplam alkol (litre saf alkol) ve HED % yaygınlığı, 2016 (70)

	Tüm İçiciler		**İçiciler Arasında**		
Dünya Bölgeleri	**Toplam Alkol Tüketimi**	**Ağır Epidozik İçme (%)**	**Toplam Alkol Tüketimi**	**Ağır Epidozik İçme (%)**	**Ağır İçici Sayısı**
AFR	6,3	17,4	18,4	50,2	100,881
AMR	8,0	21,3	15,1	40,5	163,853
EMR	0,6	0,5	21,2	10,4	2,262
EUR	9,8	26,4	17,2	42,6	197,913
SEAR	4,5	13,9	12,1	40,7	195,746
WPR	7,3	21,9	13,8	40,6	332,368
WORLD	6,4	18,2	15,1	39,5	993,023



Şekil 17. DSÖ bölgesi ve Dünya toplam nüfusu (+15 yaş) ile karşılaştırıldığında, toplam 15–19 ve 20–24 yaş grubundaki mevcut içicilerin yüzdesi, 2016 (70)



Şekil 18. Kişi başı toplam alkol tüketim (+15 yaş) tahminleri (L), 2016-2025 (70)

OECD 2019 yılında yayınladığı "Health at a glance 2019" raporunda belirlediği ülkelerde 2007 ve 2016, 2017 ve 2018 yıl aralığında en son ölçüm yapılan yıldaki veri karşılaştırmaları ve buna bağlı belirlenen ilk 7 ülke Tablo IV'de, son 7 ülke Tablo V'de gösterilmiştir (71).

Tablo IV. 2007–2017 (en yakın yıl) aralığında en çok tüketimin olduğu 7 ülkedeki yetişkin kişilerde alkol tüketimi (71)

İlk 7 Ülke	**Yıl**	**Litre**	**Yıl**	**Litre**
Litvanya	2007	13,9	2017	12,3
Avusturya	2007	12,9	2016	11,8
Fransa	2007	12,9	2017	11,7
Çekya	2007	12,1	2017	11,6
Lüksemburg	2007	12,2	2016	11,3
İrlanda	2007	13,2	2016	11,2
Letonya	2007	12,1	2016	11,2

Tablo V. 2007–2017 (en yakın yıl) aralığında en az tüketimin olduğu 7 ülkedeki yetişkin kişilerde alkol tüketimi (71)

Son 7 Ülke	**Yıl**	**Litre**	**Yıl**	**Litre**
Kolombiya	2007	4,6	2016	4,5
Meksika	2007	4,1	2016	4,4
Kosta Rika	2007	4,3	2018	3,8
Hindistan	2007	1,6	2016	3,0
İsrail	2007	2,3	2016	2,6
Türkiye	2007	1,3	2017	1,4
Endonezya	2007	0,1	2016	0,3

2.1.10.2 *Türkiye'de alkol tüketimi*

TÜİK verilerine göre Türkiye'deki damıtılmış alkollü içki üretim ve satış miktarı Tablo VI'da gösterilmiştir.

TABLO VI. Türkiye Damıtılmış Alkollü İçkilerin Üretim ve Satış Miktarı –TÜİK (72)

YIL	**ÜRETİM MİKTARI (L)**	**SATIŞ MİKTARI (L)**
2005	(1)*	(1)*
2006	60.373,281	62.174,607
2007	57.059,637	55.413,041
2008	72.685,948	64.731,500
2009	77.979,431	72.146,325
2010	95.586,752	93.099,729
2011	92.470,553	88.110,347
2012	106.864,694	99.219,767
2013	105.387,192	100.586,050
2014	120.236,018	109.706,601
2015	92.972,183	78.711,345
2016	(1) *	(1) *
2017	79.281,975	71.221,084
2018	77.447,839	69.702,008

(1) *; Gizli Veri

DSÖ'nün 2018 yılında yayınladığı raporda Türkiye'de 2010 ile 2016 yılları arasındaki alkol tüketim karşılaştırması Tablo VII'de gösterilmiştir.

Tablo VII. DSÖ 15 yaş üstü alkol tüketimi (saf alkol litresi) (70)

	2010*		**2016***	
Kayıtlı	1,5		1,3	
Kayıtsız	0,8		0,7	
Toplam**	2,2		2,0	
Toplam erkek/kadın	4,1	0,4	3,7	0,4
DSÖ Avrupa Bölgesi	11,2		9,8	

*: Kayıtlı ve Kayıtsız Tüketim için 2009-2011 ve 2015-2017 yıllarının üç yıl ortalama verileri

**: Turist tüketimine göre ayarlı veriler

DSÖ'ye göre 2016 yılında Türkiye'deki alkol kullanım bozuklukları ve alkol bağımlılığı prevalansı yüzdesi Tablo VIII'de gösterilmiştir.

Tablo VIII. Alkol kullanım bozuklukları ve alkol bağımlılığı prevalansı (%), 2016 * (70)

	Alkol Kullanım Bozuklukları	**Alkol Bağımlılığı**
Erkek	8,1	2,5
Kadın	1,7	0,7
Tümü	4,8	1,6
Avrupa Bölgesi	8,8	3,7

Tütün ve Alkol Daire Başkanlığı 2017 yılında yayınladığı faaliyet raporunda 2013-2017 yıllar arasında, bira harici fermente edilmiş alkollü içkilerin üretim ve ithalatı Tablo IX'da, distile ürünlerin ki Tablo X'da, bira harici ürünlerin ihracatı Tablo XI'de, distile alkol ürünlerinin ihracatı Tablo XII'de ve etanolün piyasaya arz verileri Tablo XIII'de gösterilmiştir (73).

Tablo IX. Bira hariç fermente alkollü içki üretimi ve ithalatının toplam iç piyasa arzı (L) (73)

Bira hariç fermente alkollü içkiler						
Yıl	**Bira (2203)**	**Köpüren Şarap (2204.10)**	**Şarap (2204.21-29)**	**Vermut (2205)**	**Diğer (2206.00)**	**Kanyak, brendi (2208.20)**
2013	878.912,869	641,885	62.240,038	283,024	2.336,865	347,793
2014	943.317,457	633,151	63.743,551	191,221	2.637,234	330,750
2015	908.197,848	413,440	63.626,641	136,236	2.940,048	295,786
2016	900.341,561	488,622	51.293,001	103,537	3.223,407	147,136
2017	915.104,416	1.127,797	66.427,742	118,433	5.654,409	218,939

Tablo X. Distile alkollü içki üretim ve ithalatının toplam iç piyasaya arzı (L) (73)

Distile alkollü içkiler							
Yıl	**Viski (2208.30)**	**Rom (2208.40)**	**Cin (2208.50)**	**Votka (2208.60)**	**Likör (2208.70)**	**Rakı (2208.90.48-71)**	**Diğer (2208.90)**
2013	4.902,898	593,234	1.745,813	14.908,720	1.722,530	42.336,790	693,525
2014	6.111,099	714,385	2.052,407	16.082,279	2.071,922	40.570,702	742,287
2015	7.015,857	641,646	1.839,522	14.130,725	1.663,371	39.201,309	831,208
2016	6.863,938	348,494	1.318,622	11.243,141	1.108,371	35.447,822	697,988
2017	8.214,105	555,919	1.827,431	13.276,952	1.664,863	37.316,029	832,356

Tablo XI. Bira hariç fermente alkollü içki ihracatı (L) (73)

Bira hariç fermente alkollü içkiler				
Yıl	**Bira (2203)**	**Köpüren Şarap (2204.10)**	**Şarap (2204.21-29)**	**Diğer (2206.00)**
2013	104.832,598	18,357	2.774,409	50,278
2014	86.826,206	14,790	2.630,874	9,923
2015	79.948,603	11,829	2.811,045	7,876
2016	62.816,266	17,849	2.922,481	12,262
2017	53.042,292	25,559	2.934,197	22,726

Tablo XII. Distile alkollü içki ihracatı (73)

Distile alkollü içkiler					
Yıl	**Cin (2208.50)**	**Votka (2208.60)**	**Likör (2208.70)**	**Rakı (2208.90.48-71)**	**Diğer (2208.90)**
2013	0	12,643	5,950	3.254,795	0
2014	0	22,602	685	3.107,686	0
2015	0	27,241	1,929	3.873,522	0
2016	0	28,677	628	3.382,471	0
2017	3.024	82,959	19,125	3.463,098	7,330

Tablo XIII. Etil Alkolün Piyasaya Arz Verileri (mA litre) (73)

Etanol (mA, L)		**Ambalajlı**	**Dökme**	**Toplam**	**Genel toplam**
2013	**Üretim**	284,195	72.854,792	73.138,987	158.243,373
	İthalat	2.949,460	72.410,226	75.359,686	
	İhracat	65,799	9.678,901	9.744,700	
2014	**Üretim**	760,540	93.843,943	94.604,483	187.756,214
	İthalat	3.587,260	80.672,051	84.259,311	
	İhracat	133,321	8.759,099	8.892,420	
2015	**Üretim**	662,838	102.019,195	102.682,033	193.541,349
	İthalat	3.402,368	80.962,307	84.364,675	
	İhracat	116,258	6.378,383	6.494,641	
2016	**Üretim**	790,953	104.615,687	105.406,640	191.392,177
	İthalat	3.972,090	80.318,046	84.290,136	
	İhracat	35,772	1.659,629	1.695,401	
2017	**Üretim**	2.829,536	108.236,438	111.065,974	205.187,336
	İthalat	4.926,390	86.760,445	91.686,835	
	İhracat	70,361	2.363,896	2.434,527	

mA: mutlak alkol (%100 alkol)

2.1.11. Etil alkol ve adli tıp

Etil alkol oluşturduğu ekonomik sorunların yanı sıra olumsuz sosyal etkileriyle halk sağlığı sorunu olarak karşımıza çıkmakta ve hem klinik hem de adli araştırmalarda önemli yer tutmaktadır. Klinik araştırmalarda akut veya kronik alkol tüketimi sonucunda oluşan hastalık ya da zehirlenme durumuna müdahale edilebilmek için kan alkol seviyesi belirlenmektedir. Adli araştırmalarda ise toksisiteyi de barındıran adli olguların tümünü kapsamaktadır (74). Kişilerin beden ve ruh sağlığının bozulmasına ya da ölümüne neden olan, harici etkenler sonucu oluşan darp, ateşli silah, kesici delici alet yaralanmaları, trafik kazası, iş kazası, intihar ve cinsel istismar gibi olaylar adli olgu kapsamına girmektedir. Alkol etkisiyle meydana gelen ya da geldiği düşünülen adli olguların aydınlatılması ve postmortem vakalarda rutin alkol ölçümü adli tıbbın araştırma alanıdır (75). Adli olguların incelenip verilen adli raporun adalet sisteminin hızlı ve doğru işlemesinde büyük etkisinin olduğu dikkate alınmalıdır. Etanol analizinde toksikolojik etkinin ve cezai kararın belirlenmesinde en önemli nokta KAK seviyesini tespit etmektir. Gerek zehirlenmelerde zehirlenme derecesini belirlemek gerekse adli olgularda cezai sorumluluğu belirlemek amacıyla KAK'ın yorumlanması, sonucu değiştirebilecek önemli bir parametredir (76).

2.1.11.1. *Postmortem/antemortem etanol belirlenmesi*

Adli tıpta etil alkol üzerinde yapılan testlerde cevaplanması gereken en önemli sorulardan biri postmortem durumda alınan kandaki alkol seviyesinin antemortem kullanımdan mı postmortem üretimden mi kaynaklandığıdır. Ayrıca adli otopsilerde ölüme neden olan maddenin etil alkol olup olmadığı, diğer toksinlere ek olarak rol oynayıp oynamadığı, toksin olmadığı zaman tek başına ölümden sorumlu olup olmadığı, postmortem tespit edilmiş miktarın ölümden önceki davranışa etkisinin ne kadar olduğu, gecikmiş ölüm vakalarında yaralanma zamanındaki KAK'ın ne kadar olduğu hakkındaki sorulara yanıt aranmaktadır (1).

Postmortem dönemde ciltteki ve bağırsaktaki mikroorganizmaların meydana getirdiği çürümeyle etanol oluşur. Sıcaklık ve dışarıdan oluşan kontaminasyon da postmortem oluşumda etkilidir. Postmortem alınan kan ve idrarda, etil alkol seviyesinin mikroorganizmalara bağlı 400 mg/dL'ye kadar yükseldiği gözlenmiştir. Çürüyen dokularda etil alkol oluşumu mikroorganizmanın varlığına, cinsine ve sayısına bağlıdır. Postmortem etanol oluşumu otopsi sonucu tespit edilen miktarın değerlendirilmesini etkilemektedir. Otopsi olgularında tespit edilen miktar postmortem oluşuma, antemoretm etanol alımına veya her ikisine bağlı olabilir. Postmortem ve antemortem ayrımı yol, hava ve deniz kazalarında kullanılmaktadır. Bu ayrımı yapmak amacı ile EtG, EtS ve 5-HIAA gibi etanol metabolitlerinden yararlanılmaktadır. EtS ve EtG belirteçlerinin yarılanma ömrünün etanole göre daha uzun olması sebebiyle kanda etanol tespit edilemeyen durumlarda, idrarda, kanda, saç, tırnak ve virtöz humorda alımı gösterirler. Vücutta sadece enzimatik metabolizmayla üretilebildikleri, postmortem oluşamadıkları için antemortem alımı temsil ederler. EtG yüksek oranda putreaktif cesetlerde stabilitesini koruyamadığı ve bazı durumlarda yalancı pozitifliğe neden olabildiği için hassasiyeti arttırmak amacıyla EtS ile birlikte kullanılır. Ayrıca postmortem idrar örneklerinde etanol alımı için 5-HTOL/5-HIAA oranı da belirleyici olmaktadır. 5HTOL ve 5HIAA'nin birbirine oranının 15'in üzerinde olduğu durumlarda antemortem kullanım olduğu tanımlanabilir. Bu oran alkol alımından 10-20 saat sonrasına kadar tespit edilebilir düzeyde kalır (1,77). Ayrıca sadece kanda değil idrarda da belirteç analizi yapılmalıdır. Otopsi sonucunda belirteçlerdeki pozitiflik ölüm öncesi alkol alımını temsil etmektedir ancak bu postmortem üretimin olmadığı anlamına gelemeyeceği için ana kaynağı saptamak amacıyla GC-MS veya LC-MS ile miktarsal analiz gerçekleştirilmelidir. Otopsi ve yapılan analizler dışında vaka öyküsü, cesedin bulunduğu olay yeri şartları, vücut sıvılarındaki alkol dağılımı ve alınan örneğin saklanma ve korunma koşulları postmortem/antemortem ayrımında önemli faktörlerdendir (44,77,78).

2.1.11.2. *Etanolün suçlara etkisinin değerlendirilmesi*

Alkol merkezi sinir sistemini baskılayarak davranışlara etki etmekte ve hırsızlık, cinayet, intihar, cinsel istismar, darp, trafik kazaları ve iş kazaları gibi suçların oluşumuna sebep olmaktadır. Yasal olması ve eğlence amacıyla tüketimi hem kolay ulaşılabilirliğini hem de toplumca kabul edilebilirliğini arttırmaktadır. Suç işleyenlerin, suçu işlemeden önce cesaret almak isteyenlerin ya da mağduru etkisiz hale getirmek amacıyla tüketimi sağlanan suça meylettirici bir maddedir. Alkol, kullanan kişiye ve sosyal çevresine zarar verir. Otomobil kazalarında %75, cinayette %50, intiharda %25 oranında etkisi vardır (31). Alkol kullanımı ile en sık karşılaşılan problemlerden biri trafik kazalarındaki rolüdür. Trafik kazaları ağır yaralanma, ölüm ve maddi hasar oluşturan olaylardır. Motorlu araç kullanımı dikkat ve hızlı refleks gerektirir, alkol dikkat dağınıklığına ve refleks hızında düşüşe sebebiyet verdiği için trafik kazalarında birinci derecede etkendir (76). Alkol alımıyla birlikte kişide cesaretle birlikte özgüven gelişir ve risk alma eğilimi artar. Manevralar ve yüksek hız sonucu hem sürücünün hem de etrafındaki insanların oluşabilecek kazalarda zarar görme ihtimali artar. Alkol aynı zamanda uyuşturucu gibi baş ağrıtıcı, refleks azaltıcı, kontrol yeteneğini kaybettirici etkiler oluşturarak birçok insanın hayatının tehlikeye atılmasına neden olur. Trafik kazalarında kişinin alkollü olup olmaması, alkollüyse KAK, bu değerin davranışlara etkisi yanıt aranan konuların başında gelmektedir. Özellikle KAK'ın belirlenmesi sürücü kusurunun tespitinde en belirleyici faktördür (79-81).

Alkol, sürücüler üzerinde reaksiyon verme süresinde bozulma etkisi gösterirken, reflekslerde gecikmeye ya da kontrolsüzce fren yapmaya, fazla gaz vermeye sebep olabilir. Sürücüde dikkat dağınıklığı, algılamada gecikme meydana getirir. Cisimler netlik kaybeder, sürücü mesafe tahmini yapamaz hale gelir ve kazalar oluşur. Kaza sonucu mahkeme tarafından verilecek kararda tüketilen alkol miktarının bilinmesi etkilidir. Bu sebeple bazı ülkelerde sarhoşken araç kullanımı yasaklanırken bazılarında araç kullanırken alınabilecek alkol miktarları

sınırlandırılarak önlem alımı amaçlanır (82,83). Ermenistan, Maceristan ve Çek Cumhuriyeti'nde alkollü araç kullanımına insiyatif tanınmazken, Norveç'te yasal alkol limiti 0,5 promil, Fransa, Danimarka, Belçika, İsviçre ve Almanya'da 0,8 promil, Amerika Birleşik Devletleri eyaletlerinin çoğunda 1,0 promil'dir. İtalya, İspanya ve Portekizde ise sarhoşluk halinde araç kullanılması yasaklanmasına rağmen miktar kısıtlaması bulunmamaktadır (44,84). Ülkemizde ise Trafik Yönetmeliği'nin düzenlenen 97. Maddesinde taksi, dolmuş, otomobil, kamyon, çekici gibi araçlarla kamu hizmeti, yük ve yolcu taşıyan ve resmi araç sürücüleri hariç olmak üzere 0,5 promildir (50 mg/dL). Alkollü araç kullanımı suçunun yanı sıra 5237 sayılı Türk Ceza Kanunu ile "Trafik Güvenliğini Tehlikeye Sokma" başlığında yeni bir ceza tanımlanmıştır. Bu yasaya göre sürücünün alkol veya uyuşturucu madde etkisiyle ya da başka bir sebeple emniyetli şekilde idare edemeyecek halde olmasına rağmen araç kullanması suç kabul edilmiştir. Emniyetli şekilde idare edemeyecek halde olması tanımı için belirli bir limit tanımlanmamış olması kararda karışıklığa sebep olmaması amacıyla bilirkişi görüşüyle verilmektedir. Adli tıp kurulu 5.İhtisas Kurulu raporlarına göre 0-30 mg/dL alkol seviyesi altında araç sürme güvenliğinin bozulmadığına, 31-100 mg/dL arasında bozulup bozulmayacağının tespit edilemeyeceği olay yerindeki görgü şahitleri ve polis tutanaklarına başvurulacağına, 101 mg/dL üzerinde ise sürüş güvenliğinin bozulduğunun kabul edilebilirliğine yer verilmiştir. 31- 100 mg/dL arası kullanımının, bilirkişinin yorumu dışında hekimle muayenesi sonucu değerlendirilmesinin daha güvenilir olduğu önerilmektedir.

Yönetmelikte belirtilen miktar üzerinde alkol kullanan sürücülerin suç tarihinden geriye dönük 5 yıl içinde ilk aşımda altı ay süreyle sürücü belgeleri geri alınarak, para cezası uygulanır. İkinci kez gerçekleştiğinde sürücü belgesi 2 yıl süreyle geri alınır ve sürücü davranışlarını geliştirme eğitimi verilir, eğitimi başarıyla tamamlayanlara süre sonunda sürücü belgeleri iade edilir. Üç ve fazlası olduğunda ise sürücü belgeleri 5 yıl süreyle geri alınarak 6 aydan az olmamak şartıyla

hafif hapis cezası ve para cezası verilir. Psikoteknik değerlendirme ve psikiyatri muayenesine tabi tutulan sürücülere uygun görülmesi sonucunda süre sonunda belgeleri iade edilir.

Alkollü araç kullanımının yanı sıra yönetmelikte solunum havasından ölçüm yapan cihazların sahip olması gereken özellikler de belirtilmiştir. Cihazın ölçüm tarihi ve saati, ölçüm sonucu ve seri numarasını gösteren çıktı verebilirliği, kalibrasyon ayarı belirtilen özelliklerdendir. Daha fazla özellikle ulusal standartlaşmaya gidilmesi, ulusal kabul görmüş partisyon katsayısının belirlenmesi ve kullanımı için kamu görevlilerine eğitim verilmesi, sonuçların daha net yorumlanmasına kolaylık sağlar (84).

İlk ölçümlerde belirlenen alkol seviyesinin düşük olduğu durumlarda ikinci ölçüme gidilmelidir. Zaman geçtikçe alkol vücuttan atılacağı için ikinci ölçümün EtS, EtG gibi belirteçlerle belirlenebildiği kan ve idrarda yapılması daha güvenilir sonuçlar verecektir. İdrarda ki alkol kaybı daha geç ve belirteçlerin belirlenebilirliği daha uzun süreli olacağı için kanda da düşük olan durumlarda tercih sebebidir (1,84).

Ülkemizde de trafikte uyuşturucu denetimine ilişkin düzenlemenin uygulamaya girmesi ile birlikte yol kenarı testler kullanılamaya başlanmıştır. Trafik Kanunu'nda 2013 yılı Mayıs ayında yapılan değişikliğin ardından pilot bölge seçilen Ankara'da trafik polisleri, mobil cihazlarla ya da sağlık kuruluşları aracılığıyla uyuşturucu-uyarıcı madde kullandığı tespit edilen sürücülere ceza uygulamaya başlamıştır (80).

Alınabilecek önlemler;

- Olay yerine ulaşan ilk yetkililer alkol muayenesini yapıp, zaman kaybını önlemek için rapora kaydetmelidir.
- Kazaların sık görüldüğü yer ve mekânlarda kontroller arttırılmalıdır.
- Olay saati ve raporun tutulduğu saat mutlaka rapora kaydedilmelidir (82).

Alkol gerek klinik gerek adli tıp boyutunda araştırmalara konu olan en zararlı psikoaktif maddelerden biridir. Yalnızca kullanan kişiye değil etrafındakilere de zarar vermesi nedeniyle toplum sağlığı çalışmalarında ilk sıralarda yer alır. Kişinin sağlığına olan etkileri önlemek ve suçlara sebep olabilirliğini engellemek amacıyla geçmişte olduğu gibi bugün de kuruluşlar ve çalışmalar varlığını sürdürmektedir. ICADS (Integrated Camden Drug Service) alkolle ve yasa dışı maddelerle mücadele eden birçok toplum sivil kuruluşlarıyla bağlantılı Dünya'daki alkol kullanımı ve etkilerini araştıran en büyük oluşumlardan birisidir. Uyuşturucu kullanımını azaltmak ve bırakmak isteyen 18 yaş üstünde kullanıcılara hizmet vermek ve toplum sağlığına katkıda bulunmak amacıyla kurulan bu oluşum ICAS (Integrated Camden Alcohol Service) başlığı altında alkolle mücadeleye yer vermektedir. Bu oluşum alkolün depresif, gergin ve kaygı bozukluğu gibi etkilerinin sebeplerini araştırarak bunların giderilmesine yönelik farklı tedavi yöntemleri uygulayarak hizmet vermektedir. Yalnızca kullanıcılara değil kullanıcı davranışlarından etkilenen yakınlarına da danışmanlık imkanları tanımaktadır. Yasal olmasına rağmen bu denli zarar verici olması alkol için yapılan çalışmaların uzun yıllar daha süreceğine işaret etmektedir. En yaygın kullanım nedeninin eğlence ve cesaret amaçlı olması kullanımının sınırlandırılması önerisini oluşturmaktadır (85).

2.1.11.3. *Alkol analiz örnekleri ve analiz yöntemleri*

Alkol analizinde kullanılacak en yaygın biyolojik örnekler:

Kan, idrar, nefes, ağız içi sıvısı ve göz içi sıvısı alkol analizinde kullanılan en yaygın biyolojik örneklerdir. Örnek alımının geciktiği durumlarda kan, idrar örneği yerine saç, tırnak, ter gibi rutin olmayan örnek türleri tercih edilir (80).

Alkol tespiti için yaşayan kişilerden venöz ve kapiller kan, idrar, gözyaşı, salya, nefes, ter örnekleri alınırken, postmortem vakalardan mikrobiyal etkilerden dolayı, kan alkol tayini için en uygun kan örneği kaynağı femoral ven'dir. Kafa ve boyun venleri de postmortem kan alımı

için ideal örneklerken kalp kanı endojen alkol oluşumu sebebiyle uygun değildir. Kan dışında göz içi sıvısı, safra, sinovyal sıvı, iskelet kası ve karaciğer dokusu da alınabilir (1,44).

Adli tıp açısından etil alkol analizi için en uygun biyolojik materyal kan ve idrardır.

Kan ve kan ürünleri

Tüm alkol tespit çalışmaları içerisinde tercih edilebilirliği en yüksek olan örnek kandır, alımı ve miktarı yeterli olmadığı durumlarda diğer matrikslerden yararlanılır. Kan, KAK'ı belirlerken tercih edilen ilk örnektir. Alınan kapların düşük sıcaklıkta saklanması, uygun şekilde kapatılması, koruyucuların eklenmesi gibi hususlara dikkat edilerek KAK'da meydana gelebilecek değişimler önlenebilir. Ekzojen alkolün (örneğin, alkol içeren antiseptik çubuklardan) kan örneğine sokulmaması da harici olarak uygulanan etanolün yanlış pozitif sonuçlar üretilmesini engelleyebilir (17,18). Ayrıca kanda etanol belirleme çalışması olay anında ya da 24 saati geçmeyecek zaman zarfında gerçekleştirilmeli sonrasında KAK'daki azalma sonuçları etkilemektedir (80,86).

Nefes

Özellikle trafikte alkol kullanımı ile ilgili vakalarda alkolmetreyle gerçekleştirilen nefes testleri olay anında uygulanabilirliği, laboratuvar dışında gerçekleştirilebilirliği, sonuçların hızlı olması yönüyle avantaj sağlarken, numunenin saklanamaması, yeniden test edilememesi ve profesyonel personellerle gerçekleştirilmemesi nedeniyle büyük dezavantajlar oluşturur (74).

İdrar

Etanol analizlerinde idrarın numune olarak kullanımı oldukça yaygındır. İdrar numunesinin toplanması için bilimsel personel ve özel ekipman gerekmez, kandan daha kolaydır. En az 20 dakika sonra, kandaki etanol konsantrasyonunun daha doğru sonucu için ikinci bir adli idrar örneği istenir. İkinci idrar örneği daha sonra etanol için analiz edilebilir ve sonuçlar, yaygın

olarak kabul edilen idrar/kan etanol oranı 1,32 kullanılarak kan alkol eşdeğerine dönüştürüldükten sonra rapor edilebilir. İdrar örneği alkol tüketiminden 30-60 dakika sonra alınmalıdır. Diyabeti olan kişilerde idrar alkol konsantrasyonu güvenilir olmayabilir. Son olarak, literatürde idrar/kan etanol oranının hem sürücülerde hem de ölenlerde oldukça geniş bir aralıkta olması sebebiyle idrardan kan etanol konsantrasyonu hesaplanmaya çalışılırken dikkat gerektirir (74,87).

Ağız İçi Sıvısı

Ağız içi sıvısı, madde analizinde kan ve idrara alternatif olarak önemli bir örnektir. Ağız içi sıvısı, diğer biyolojik örneklere kıyasla daha kolay toplanması, testi uygulamak için özel yetenek gerektirmemesi, yol kenarında ve kolay uygulanabilmesi avantajlarıyla popülerlik kazanmaktadır. Ayrıca gerektiği durumda adli toksikoloji laboratuvarında toplanabilir, saklanabilir ve yeniden test edilebilir. Son yıllarda ağız içi sıvısı ile kan etanol konsantrasyonları arasındaki oranın 1,079 ila 1,12 arasında sabit kaldığını, yüksek derecede korelasyon olduğunu gösteren kapsamlı çalışmalar sunulmuştur (88). Ağız içi sıvısında etanol enzimatik yollarla veya headspace kramotografi ile tespit edilebilir, olay yerinde bu tespit yapılabilir. Yalnız ağızdaki askorbik asit yanlış pozitifliğe sebep olabilir.

Safra

Safra bazen otopside toplanan bir örnektir. Safra kesesinde depolanan safranın anatomik yeri, yaralanmaya karşı dayanıklılığı gibi avantajlarla etanol analizinde yarar sağlayabilir fakat postmortem dağılımdan etkilenebilirliği göz önünde bulundurulmalıdır. Bildirilen kan/safra etanol oranı ortalama 1,03'dır ancak 0,32 ila 2,91 arasında değişkenlik göstermesi nedeniyle, ölçülen safra etanol konsantrasyonundan kan etanol konsantrasyonlarını tahmin etme çalışması dikkat gerektirir (89).

Beyin

Beyin, farklı bölümlerinin farklı oranda su içermesi ve değişen kan akışına sahip olması nedeniyle heterojen yapıya sahiptir. Bu nedenle beyin etanol ölçümünden, kandaki alkol konsantrasyonunun tahmin edilme çalışması doğru ve güvenilir sonuçlar vermeyebilir (74).

Beyin omurilik sıvısı

Beyin omurilik sıvısı (BOS), deneyimli patologlar tarafından dahi kontamine olmamış şekilde otopsi sırasında toplanması zor bir örnektir. Ayrıca BOS'tan etanol konsantrasyonuna ulaşmak, uzun süre kaybına sebep olacağından kan etanol konsantrasyonunu tahmin etmek için uygun görülmemektedir (74).

Vitröz humor

Vitröz humor (VH) göz içi sıvısıdır ve otopsi sırasında toplanması kolaydır yalnızca etanol değil eğlence amaçlı kullanılan diğer maddelerin analizi içinde ideal bir örnektir. VH etanol konsantrasyonu ile kan alkol konsantrasyon oranı 0,90 ila 1,38 arasındadır. Bakteriler tarafından fermantasyondan etkilenmeyen, iyi korunan bir örnektir (74).

Diğer organlar

Karaciğer, kas, böbrek ve testis gibi biyolojik örneklerden de etanol konsantrasyonunun belirlendiğine dair vaka raporları bulunmakla birlikte genellikle bu tür örneklerde alkol analizinin zor olduğu, bozulmanın ileri derecede olduğu elzem durumlarda işlenebilirliği görüşü yaygındır (74). Rutine dönüşmediği için yorumlanması bakımından bir standartlaşma söz konusu değildir.

2.1.11.4. *Etanol analiz yöntemleri*

Etanolün başlıca analiz yöntemleri kimyasal, enzimatik, otomatik yöntemler ve kromatografik yöntemlerdir. Gaz kromatografisine bağlanan alev iyonizasyonu, kütle spektrometresi, heaspace gibi çeşitli detektörlerle analizlenir. Gaz kromatografisi yöntemi, kimyasal ve enzimatik yöntemlere göre daha hassas ve spesifiktir. Etil alkolün diğer alkol ve aldehitlerden ayrımı headspace gaz kromatografi ile çok daha iyi yapılabilmektedir. Bu teknikle uçucu maddeler için farklı alıkonma zamanları elde edilebilinir (90). Birçok adli toksikoloji laboratuvarında tarama ve doğrulayıcı analizler kullanılmaktadır. Genellikle iki farklı kromatografik sütun kullanılarak yanlış pozitif sonuçlar ve yanlış konsantrasyon raporlanmasını önlemek hedeflenir (91,92).

Kimyasal yöntemler

Biyolojik matristen ayrıldıktan sonra, etanol, kimyasal denkleme göre potasyum dikromat veya benzer bir oksitleyici madde ile kantitatif oksidasyonuna göre ölçülebilir:

$$2K_2Cr_2O_7 + 3CH_3CH_2OH + 8H_2SO_4 \rightarrow 2Cr_2(SO_4)_3 + 3CH_3COOH + 2K_2SO_4 + 11H_2O$$

Bu, etanolün kendisi asetaldehit, asetik asit veya karbon dioksit ve suya oksitlendiği için sarı-turuncu dikromat iyonunun mavi-yeşil kromik iyona indirgenmesi nedeniyle bir renk reaksiyonudur. 20. yüzyılın başlarından bu yana, literatürde Conway difüzyon hücreleri veya Erlenmeyer reaksiyon şişeleri kullanılarak kuruma veya damıtma içeren redoks denkleminden yararlanan birkaç dikromat yöntemi çalışması yapılmıştır (74).

Biyokimyasal (enzimatik) yöntemler

Etanol, koenzim NAD varlığında ADH enzimi ile asetaldehite oksitlenir:

$$CH_3CH_2OH + NAD^+ \leftrightarrow CH_3CHO + NADH + H^+$$

Oluşan NADH'ın değişim hızı etanol konsantrasyonu ile doğru orantılı olduğu için 340 nm'de herhangi bir spektrofotometre kullanılarak ölçülebilir. Metanol ve aseton ADH ile reaksiyona girmemesine rağmen butanol ve izopropanol gibi bileşikler reaksiyona girerek bu tekniğin etanol spesifitesini azaltır. ADH'nin seçiciliğinin olmaması hastane ortamında izopropanol ve butanolle etkileşmesi yanlış sonuçlara sebep olabilmektedir (74,92).

Alkolmetre ile nefes testi

Solunum havasından alkol seviyesini belirlemek için kullanılan alkolmetrelerin kalibrasyonu ve bakımı belirli aralıklarda düzenli olarak yapılmalıdır. Alkolmetre ile yapılan nefes testi etanol varlığını belirleyebilir fakat miktarını belirleyemez bu nedenle kan veya idrarla miktar tayinine gidilmelidir. Bilinç kaybı, koma ya da ölüm gibi vakalarda kan ve diğer vücut sıvılarından alkol tespiti yapılır.

Kızılötesi spektroskopisi ile nefes testi

Kızılötesi (IR) spektroskopisi ile nefes etanolünü ölçen aletler, enstrümantal örnek odasına giren ve çıkan belirli dalga boylarındaki enerjiyi ölçerek bunu yapar. Etanol molekülleri tarafından emilen IR enerji miktarı, örnekteki etanol konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Etanol ölçümü için en sık kullanılan dalga boyu 3,30 ile 3,50 mikron arasındadır. Etanol dışında farklı bileşiklerinde bu dalga boyundaki enerjiyi emebileceği için etanole özgünlüğü arttırmak amacıyla iki veya daha fazla dalga boyu kullanılmaktadır. IR teknolojisine sahip nefes test cihazları, ağız etanolü varlığını izleme yeteneğine de sahiptir (21).

Organik yapı karakterizasyonunda maddenin saflığından emin olmak amacıyla molekülün kızılötesi spektrumlarının alımı gerçekleştirilir, sonrasında kütle spektrumu kaydedilir. MS'deki sinyaller yorumlanarak karakterizasyon yapılır. Son olarak elementel analiz ölçümleri yapılır.

Yakın kızılötesi spektroskopisi (NIR) ile etil alkol molekülü analiz edilir. Dedektör tarafından okunan absorpsiyon, numunenin hacmen alkol miktarını belirlemek için kullanılır. Alkollü içkilerde etil alkolün 1150-1200 nm dalga boyları arasında spesifik absorpsiyon göstermesi alkol miktarının belirlenmesini mümkün kılar. Bu aralıkta herhangi başka bir bileşik etkileşim yapmaz (93).

Yakıt hücresi ile nefes testi

Bir yakıt hücresi cihazında, etanol yakıt hücresinde asetik aside dönüştürülür ve işlemde her etanol molekülü için iki elektron serbest bırakılır. Bu elektronlar, nefesteki etanolü ölçmek için kullanılan elektrik akımı meydana getirir. Metanol, izopropanol ve asetaldehit gibi diğer bileşiklerin de yakıt olarak işlev görmesi nedeniyle özgüllük derecesi azalabilir. Yakıt hücresi üzerinde asetik asit birikimi de yanlış sonuçlara sebep olabilir (74).

İkili dedektör ile nefes testi:

Son zamanlarda analitik sonuçlar elde etmek ve doğrulamak için herhangi bir dedektör kombinasyonunu kullanmak üzere programlanabilen araçlar önerilmiştir. Kızılötesi ve yakıt hücresi birlikte kullanılarak güvenilirlik arttırılır. Bu yeni yöntem, nefes etanolünün ölçümü için eşzamanlı olarak çift analitik metodolojinin kullanılmasına izin verir.

Hangi analiz yapılırsa yapılsın her analiz için dikkat edilmesi gereken ortak özellikler vardır.

1. Koruyucu maddeler içeren test tüplerini kullanarak uygun ve yeterli biyolojik örnekler toplanmalıdır.

2. Gözetim zinciri altında numunelerin analiz edileceği laboratuvara zamanında iletilmesine ilişkin talimatlara uyulmalıdır (74).

Gaz kromatografik yöntemler

Gaz kromatografisi (GC), adli toksikoloji laboratuvarlarında etanol tayininde en sık kullanılan analitik yöntemdir. GC, bir numunenin iki faz arasındaki dağılımının ayrımı prensibine dayanır. İki fazdan biri taşıyıcı gaz olan mobil fazken diğeri sabit faz olan kolondur. GC yöntemi kanda alkol tayini için ilk kez 1958 yılında Cadman ve Johns tarafından uygulanmıştır (91,92). Alev iyonizasyon dedektörü veya headspace otomatik örneklemesini içeren gaz kromatografiler yaygın olarak kullanılmaktadır (94). Kütle spektrometrelerine bağlı gaz kromatografik sistemlere dayalı yöntem kullanımı da doğrulama amacıyla uzun yıllardır var olan bir yöntemdir. Çoğu adli toksikoloji laboratuvarında, etanol ve ilgili uçucu bileşiklerin analizi için alev iyonizasyon detektör kullanımı tercih edilmektedir. Alkol analizinde ise hassas ve kesin sonuçlar almak için headspace gaz kromatografisi yönteminin kullanımı son derece yaygındır (1). Bu teknikler adli bilimler için uygun, hızlı, duyarlı ve seçicidir.

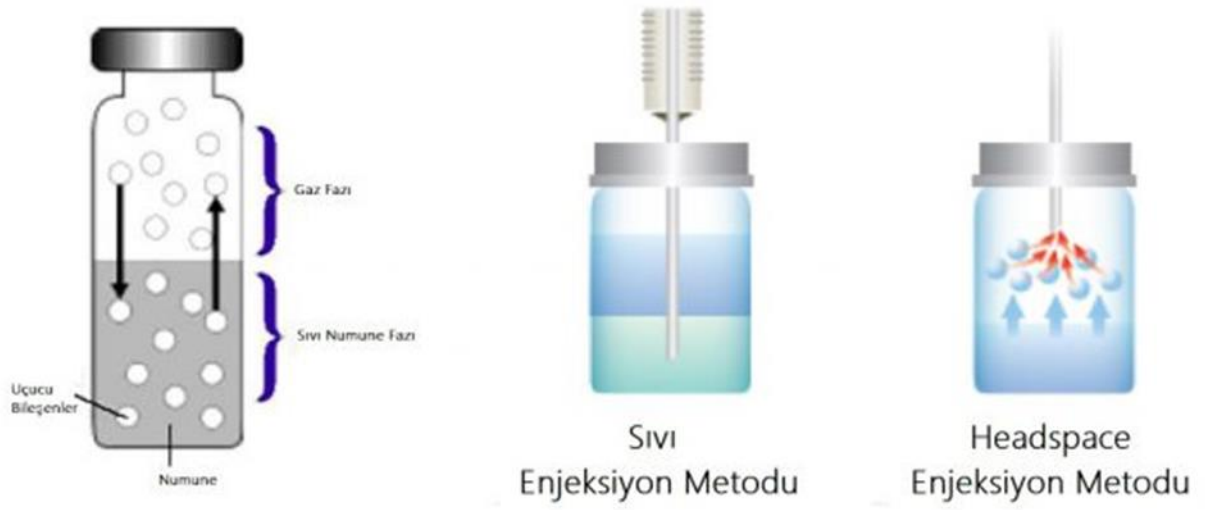
Headspace gaz kromatografisi yöntemi

Gaz kromatografisinde düşük sıcaklıklarda buhar haline geçebilen bileşiklerin tespit edilmesi için headspace yönteminden yararlanılır. Headspace örneklemesi numune zenginleştirmede kullanılan yöntemdir. Headspace yöntemi kullanılarak, enjektörde uçucu olmayan maddelerin birikmesi ve kolonda oluşabilecek kirleticiler önlenir. Ayrıca sistem performansının tutarlı kalmasını sağlayarak kolon ömrünü uzatır. Headspace gaz kromatografisi (HSGC) sıvı ve katı örneklerdeki uçucu bileşenlerin hızlı tespiti için kullanılan bir metottur. Özellikle kanda alkol ya da çözünür maddeleri analiz etmek için tercih edilen bir yöntemdir (91,94).

Headspace gaz kromatografisi genellikle alev-iyonlaştırma dedektörü (HS-GC-FID) ile birlikte kullanılmaktadır. HS-GC–FID, hassasiyet, doğruluk ve özgünlüğü arttırır. Spesifiteyi arttırmak için, birçok HS-GC– FID prosedüründe çift kolon kullanılarak daha özgül sonuçlar elde edilir. Artan özgüllük için tercih edilmesiyle birlikte, az miktardaki etanol analizi için kütle

spektrometrik (MS) yönteminin kullanımı yaygındır. Yapılan çalışmalarda 0,2 g/dL etanole kadar HS-GC ile kanda etanol konsantrasyonunun belirlendiği görülmüştür.

HS- GC örneklemesi, uçucu analitlerin numuneden ekstrakte edildiği ve sonra analiz için gaz kromatografi sistemine enjekte edildiği bir analiz tekniğidir. Uçucu numune bileşenleri, vialin içine alınıp ağzı sıkıca kapatılıp belirli sıcaklık ve hacimde ısıtılır, numunedeki uçucu bileşenler numune üstündeki boşluğa yani gaz faza geçer. GC enjektörü numuneden gaz fazı çekerek cihaza enjekte eder (91,94,95). Headspace yöntemi Şekil 19'da gösterilmiştir.



Şekil 19. Headspace yöntemi (94)

Özellikle doğrudan cihaza sıvı olarak verilemeyecek biyolojik numuneler için bu yöntem kullanılır. Numunenin tamamın cihaza enjekte edilmemesi gerektiği durumlarda tercih edilir. Özellikle 290 ̊C altında uçucu olan bileşikler için kullanımı uygundur.

Headspace analizi; atık suda uçucu organik bileşikler, tekstil, plastik ürünleri, kandaki alkol ve yiyecek, içeceklerde aroma bileşenleri üzerinde uygulanabilir (94,96).

Adli tıpta alkol kontrol testlerinde yanıltıcı bir sürü etken bulunmaktadır. Merkezi sinir sistemine etki eden depresanlar, anasonlu yiyecek tüketimi, kazalar sonucu oluşan kafa

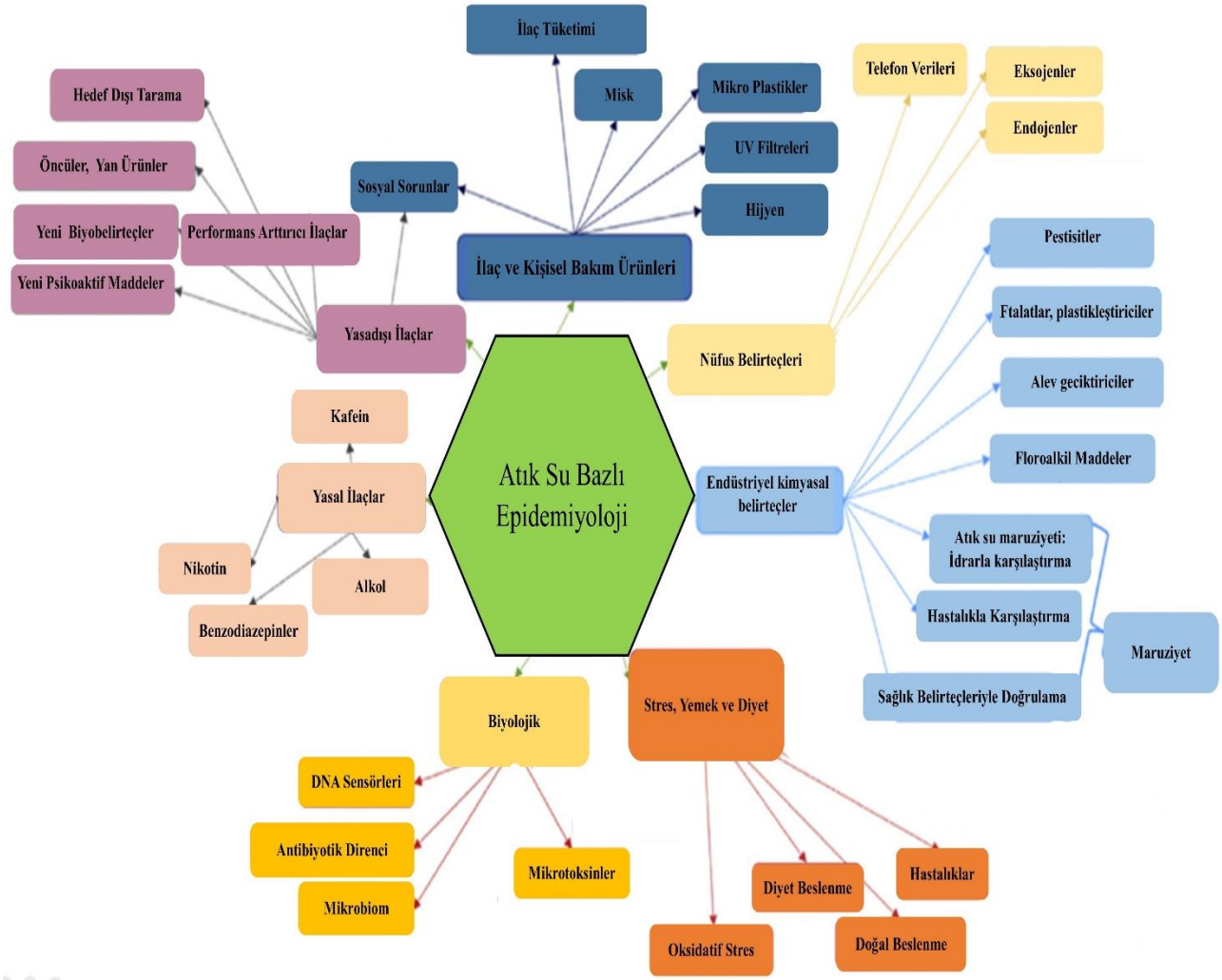
tramvaları yanıltıcı etkiye sebep olan faktörler arasında sayılabilir. Ayrıca antemortem zamanında uygulanan tedaviler postmortem sonrası etanol sentezini etkilediği için, örneğin geciktirmeden alınması sonuçların doğruluğunu arttıran etkenlerdendir. Bunun dışında postmortem vakalarda alınan kanın alınma zamanı, ölümün üzerinden ne kadar sürenin geçtiği, alınma yöntemi ve alınma yeri bilinmelidir. Kan örneğinin transferi oldukça dikkat arz eden bir durumdur. Kanın konulduğu cam tüp üzerinde zaman, vaka no, saat ve kanın alındığı bölge mutlaka belirtilmelidir (1).

2.2. Atık Su Epidemiyolojisi

Belirli bir popülasyonda sağlıkla ilgili durumların dağılımlarının belirlenmesi ve sebeplerinin incelenmesi adına çalışmalar yapılması ve bu çalışmaların sağlıkla ilgili problemlerin kontrolünde kullanılması durumuna epidemiyoloji denir. Epidemiyolojik çalışmalarda amaç insan topluluğudur, çalışmalar belirli bir bölgeyi, zamanı ve topluluğu kapsar (97).

Kimyasal madde tüketimini tahmin etmek ve aşırı tüketimi azaltmak için kullanım yaygınlığını belirlemek amacıyla çeşitli anketler yapılmaktadır. Anketlerin zaman alıcı, maliyeti yüksek ve düşük güvenilirlikli olması sebebiyle atık su bazlı epidemiyoloji (WBE) adıyla yeni bir yaklaşım oluşturulmuştur. WBE; ilk kez Daughton tarafından 2001 yılında önerilirken 2005 yılında İtalya'da Zuccato ve ark. tarafından kokain araştırmasıyla ilk uygulama gerçekleştirilmiştir. 2008 yılında Zuccato ve ark. çalışmalarını genişleterek amfetamin, metamfetamin, kannabinoid ve MDMA (3,4 metilendioksi-N-metilamfetamin) gibi yasa dışı ilaçların tüketimini araştırmışlar ve WBE yaklaşımının öncüsü olmuşlardır (98,99,100). Bu yaklaşım diğer geleneksel yaklaşımlara kıyasla kimyasal madde tüketimi hakkında hızlı, ekonomik ve nesnel veriler sağlar. WBE; insan vücuduna girip metabolize olan ve idrar ya da dışkıyla birlikte kanalizasyon sistemine atılan bileşiklerin incelenmesi esasına dayanan, belirteç konsantrasyonu üzerinden yapılan geri hesaplamalarla tüketilen madde miktarını belirlemeye yarayan bir yaklaşımdır. WBE belirli bir popülasyondaki kimyasal madde tüketimi ve maruz

kalımı hakkında veri sağlar, çalışmanın kapsadığı alan sınırlıdır. Yasadışı ve yasal ilaçlar; farmasötikler ve kişisel bakım ürünleri, nüfus belirteçleri, endüstriyel kimyasal belirteçleri, stres, gıda ve diyet markörleri ve biyolojik markörler WBE'nin çalışma alanıdır, bu alanlar Şekil 20'de gösterilmiştir. Tüm bu çalışmalar için analitik kimya, farmakoloji, çevre kimyası gibi farklı disiplinler bir araya gelir. WBE sürecinin ilk adımında atık su arıtma tesislerinden (ATT) numuneler toplanır. Numunelerdeki analit maddeler uygun analitik yöntemle analiz edilir. Analiz sonrası atık su akış hızı gibi ve kanalizasyon özellikleri göz önünde bulundurularak hesaplama yapılır. Çıkan sonuçlar popülasyon büyüklüğü ile karşılaştırılır (101).



Şekil 20. Atık su epidemiyolojisinin kullanım alanları (102)

WBE ile yapılan analizler sonucunda elde edilen sonuçlar, farklı büyüklükteki ve yerdeki popülasyonlarla karşılaştırılır ve veri paylaşımı gerçekleştirilerek iş birliği yapılır, standartlaştırılma amaçlanır. Atık su analizi için kullanılan yaklaşımları standartlaştırmak ve ortak bir prosedür oluşturmak, uluslararası çalışmaları koordine etmek için 2010 yılında Avrupa çapında bir ağ (Kanalizasyon analizi CORe grubu-Avrupa (SCORE)) kurulmuştur (102). Avrupa Uyuşturucu ve Uyuşturucu Bağımlılığı İzleme Merkezi (EMCDDA) ile uyuşturucu kullanım verileri paylaşılarak, bilgiler desteklenir. Ayrıca Dünya Sağlık Örgütü tarafından yayınlanan resmi anketler ve satış verileriyle karşılaştırma olanağı sunarak geleneksel yöntemlerin desteklenmesi sağlanır (103,104).

WBE yaklaşımı kullanılarak aynı popülasyonda farklı zamanlarda yapılan analizlerle tatil, festival gibi farklı durumlardaki değişimler gözlenebilir. Alkol tüketimi ulusal satış istatistiklerinden yola çıkılarak belirlenebilir olsa da kaçakçılık, yasa dışı üretim, depolama veya endüstriyel atık bu tür verileri etkileyebilir. Satış istatistiklerinin haricindeki kullanımının tahmini için atık suda yapılan nicel analiz, mevcut epidemiyolojik temelli yaklaşımları tamamlayıcı nitelikte olup, kanıta dayalı bilgiler sağlar (102). WBE yardımıyla tüketimde meydana gelen değişimler hızlıca algılanır ve önleyicilikteki etkinliği arttırır. WBE'nin sağladığı kolaylıklar dışında örnek alımı, analitik ölçüm ve biyobelirteçlerin kanalizasyon sistemindeki kararlığıyla ilgili bazı sınırlamaları da mevcuttur. Örnekleme koşulları sırasında numunenin zamanında toplanması, saatlik akış, soğukta numune alma ve taşıma işlemlerinin protokole uygun gerçekleştirilmesi gerekmektedir ve belirli bir standardı olmalıdır. Analitik ölçüm yapılırken atılım oranı standardı ve standardın belirlendiği popülasyon (yaş, cinsiyet, ırk, metabolizma) dikkate alınmalıdır. Tek bir atılım oranı belirlemek için etanol metabolizması üzerinde yapılan çalışmalara ağırlık verilmelidir. Ayrıca popülasyon boyutu belirlenirken belirli bir standart olmadan yalnızca sayım verilerinden ve tesis kapasitesinden yararlanılması yanıltıcılığı arttırarak yöntemi sınırlandırmaktadır. WBE yaklaşımının avantajları ve

eksiklikleri dikkate alındığında, çalışmalar arttırılıp prosedürde standartlaşmaya gidildiğinde WBE'nin destekleyici bir yaklaşımdan çok kanıtlar bir yaklaşım olması kaçınılmazdır. Sivil toplum kuruluşları, halk sağlığı kurumları, adli tıp kurumları gibi yasa dışı ve yasal ilaç kullanımını önlemek ve zararını en aza indirgemek amacıyla çalışan disiplinler bir araya gelerek verilen fikirlerle WBE gelişimine katkıda bulunulabilir. Gelişen süreçte tüm ülkeyi ve uzun bir süreci barındıran çalışmalar yapılması WBE'nin geçerliliğini ve tek başına kullanılabilirliğini arttırır (102,105).

2.2.1. Atık su parametreleri ve tüketim miktarı hesaplamaları

Atık su bazlı epidemiyolojide yasa dışı/yasal madde kullanım miktarı tahmininin yapılabilmesi, mekânsal ve zamansal izlenimlerin gerçekleştirilebilmesi için belirli parametrelerden yararlanılır. Atık su hacmi, akış hızı, biyobelirteç konsantrasyonu, biyobelirtecin vücuttan atılım hızı ve popülasyon büyüklüğü başlıca WBE parametrelerindendir (98).

Nüfus büyüklüğü, analiz sonuçlarının hesaplanması ve yorumlanmasında önemli bir parametredir. ATT'de kişi başına düşen yaklaşık tüketim miktarı göz önünde bulundurularak nüfus büyüklüğü belirlenebilir. Sayım gibi geleneksel yollarla belirlenebilen nüfus hacmi hatalı sonuç oluşturabileceği için daha kesin veriler almaya yönelik biyobelirteç analizini esas alan çalışmalar kullanılır. Ev kimyasalları, kullanılan ilaçlar gibi kimyasalların biyobelirteçleri ile belirlenebilen tüketim miktarı kısa zamanlı nüfus ölçüm aracı niteliği görebilir (106).

WBE çalışmalarında kullanılan biyobelirteçleri 4 başlıkta toplamak mümkündür (103):

1. Yaşam tarzı faktörleri ve madde kullanımı ile ilgili bilgi sağlayan biyobelirteçler
2. Çevrede ve gıdada kullanılan toksik maddelere maruz kalmayı tahmin etmeye yardımcı biyobelirteçler
3. Halk sağlığı ve hastalıkları hakkında bilgi veren biyobelirteçler
4. Nüfus büyüklüğünü tahmin etmek için kullanılan biyobelirteçler

WBE çalışmaları sonucunda elde edilen verilerle doğru tahminler yapılabilmesi için seçilen biyobelirteçin sahip olması gereken bazı özellikler vardır (103):

i. WBE açısından, uygun bir biyobelirteç esas olarak idrar ve idrardaki konsantrasyon seviyeleri yoluyla atılmalıdır.
ii. Atık suda tespitinin gerçekleştirilebilmesi için µg/L aralığında olmalıdır.
iii. Atık su şartlarında kararlı olmalıdır.
iv. Araştırılan bileşiğe ve insan metabolizmasına özgü olmalıdır.
v. Tespiti kolay ve hızlı olmalıdır.

Belirteçler yoluyla popülasyon büyüklüğünün belirlenmesi, daha güvenilir sonuçlar elde edilmesine ve yapılan analizlerle madde kullanımı, halk sağlığı, yaşam tarzı faktörleriyle ilgili değerlendirmeler yapılabilmesine olanak sağlar.

Atık suda popülasyon büyüklüğü aşağıdaki formül ile hesaplanır: (104)

Popülasyon: $\frac{(CEtS \times F \times ER)}{DDD}$

C_{EtS}: EtS konsantrasyonu (ng/L)

F: Akış hızı (L/gün)

E_R: EtS'nin vücuttan atılım hızı

DDD: EtS için tanımlanmış günlük doz (mg/1000 kişi)

Hesaplanan popülasyon değeri, günlük 1000 kişi için alkol kullanımın hesaplanmasına bilgi sağlamaktadır.

Popülasyonun bilindiği durumlarda, günlük tüketim aşağıdaki formülle hesaplanır: (107,108)

Alkol Tüketimi (V_{ALKOL}): $\frac{(CEtS \times F \times CFalkol)}{P \times P_{EtOH}}$

C_{EtS}: EtS konsantrasyonu (ng/L)

F: Akış hızı(L/gün)

CF_{alkol}: Alkol düzeltme faktörü

P: Popülasyon

P_{EtOH}: Etanol yoğunluğu (0,789 g/mL)

Düzeltme faktörü ise (107):

$$CFalkol = \frac{MEtOH}{MEtS \times \%Atılım\ faktörü}$$

M_{EtOH}: Etanolün molekül ağırlığı

M_{EtS}: Etil sülfatın molekül ağırlığı

%Atılım faktörü: Alkolün vücuttan atılım yüzdesi

Örnek Hesaplama:

EtS konsantrasyonu: 28.869 ng/mL (C_{EtS})

Yapılan hesaplamada, atılım faktörü 0,012 (108) ve düzeltme faktörü 3042 (107) olarak kullanılmıştır. 2.500.000 kişi kapasitesine sahip ATT için akış hızı 3000 L/gün kabul edilmiştir.

$$\frac{28.87\ \frac{ng}{mL} \times 3042 \times 3000\ \frac{L}{gün}}{2500000 \times \frac{0.789\ g}{mL}} =$$

$$\frac{28.87 \times 10^{-9}\ \frac{g}{mL} \times 3042 \times 3000 \times 10^{3} \frac{mL}{gün} \times}{2500000 \times \frac{0.789\ g}{mL}} = 13\text{x}10^{-5}\ \text{mL/gün/kişi}$$

2.2.2. Atık suda alkol çalışmaları ve analiz yöntemleri

Atık su çalışmalarında halk sağlığı ve madde kullanımı bilgilerine anketler dışında daha güvenilir ve hızlı bir şekilde ulaşmak için biyobelirteçlerden yararlanılır. Alkol biyobelirteçleri olan EtS, EtG, 5-HTOL, YAEE metabolitlerin kararlılığı, atılımı ve kanalizasyon suyunda tespit edilebilirliği birbirinden farklıdır. Yapılan birçok çalışmada etil alkol biyobelirteçlerinin uygunluğu araştırılmıştır.

EtG ve EtS'nin vücuttan birkaç saat içinde atılımı ve uzun sürede idrarda tespit edilebilirliği, bu metabolitleri diğerlerinden ayırarak alkol tüketiminin göstergeleri haline getirmiştir. 2006 yılında Wrust ve ark. yaptığı çalışmada EtS ve EtG belirteçlerinin bozunma ve atılım farklılıklarını belirlemeyi ve madde kullananlarda yoksunluğu izlemeyi amaçlamıştır. EtG 20,6 saat, EtS ise 21,2 saatte idrarda belirlenme sınırına ulaşmıştır. EtG 2,8, EtS'nin ise 2,1 saat sonra maksimum seviyeye ulaştığı görülmüştür. Bir gönülleden belirlenen etanol atılımı %0,022 olarak tespit edilmiştir. 98 idrar örneğinden 27'sinin EtS için, 20'sinin EtG için pozitif çıktığı gözlenmiştir. Tüm veriler göz önüne alındığında EtS'nin etanol için uygun biyobelirteç potansiyelinde olduğu, EtG'nin ise hassasiyeti arttırmak için birlikte çalışılabileceği sonucuna varılmıştır (109). 2008 yılında ise Hoiseth ve ark. idrarda etanol, EtS, EtG ve GTOL/5-HIAA'nın duyarlılıklarını ve belirlenme sürelerini karşılaştıran ilk kontrollü deney çalışmasını yapmıştır. İdrarda ki etanol belirleme süresiyle biyobelirteçlerin belirlenme sürelerini karşılaştırdıklarında GTOL/5-HIAA'nın etanole göre 5 saat daha uzun, EtG ve EtS'nin ise 25 saat daha uzun olduğu belirlenmiş ve GTOL/5-HIAA'nın EtS ve EtG'ye nazaran kısa bir algılama alanı olduğu görülmüştür. 10 gönüllü sağlıklı erkek bireye belirli miktarda etanol verilerek EtG ve EtS'nin atılımı süreleri karşılaştırılmış çalışma sonunca EtG'nin atılma faktörü %0,019 iken EtS'nin %0,011 olarak tespit edilmiştir (69).

EtS'nin vücuttan kısa sürede atılımı, idrarda uzun süreye kadar tespit edilebilirliği gibi avantajlarıyla etanol takibinde en uygun biyobelirteç olarak belirlenmesi atık suda alkol tüketim

tahmininde belirleyici biyobelirteç olma potansiyeli üzerine çalışmaları yoğunlaştırmıştır. Atık suda alkol kullanım takibi esasına dayanan ilk çalışma 2011 yılında Norveç'te Reid ve ark. tarafından gerçekleştirilmiştir. 25 günlük dönemde toplanan örneklerde EtS ve EtG analiziyle alkol tüketimi tahmin edilerek sonuçlar satış istatistikleriyle karşılaştırılmıştır. Yapılan çalışma sonunda EtS 16-246 nm aralığında ölçülebilir ve kanalizasyon suyunda 1 hafta bozunmadan kararlı yapıda bulunurken, EtG'nin yaklaşık %50'sinin bozunduğu gözlenmiştir. Satış istatistikleriyle yapılan karşılaştırmada EtS miktarının (4900-7800 kg/gün) istatistiklerdeki miktarla (6,750 kg/gün) tutarlı olduğu belirlenmiştir. Alkol tüketimininse hafta içine kıyasla hafta sonu belirgin artış gösterdiği saptanmıştır (110). Mastrionni ve ark. ise 2014'de yayınlanan makalelerinde Barselona bölgesinden aldığı atık su örnekleri çalışması için iyon çifti sıvı kromatografisi ve kütle spektrometrisine (LC-MS/MS) dayanan bir analitik yöntem optimize ederek alkol tüketimini belirlemek amacıyla EtG'ye göre kanalizasyon suyunda stabilitesi yüksek olan EtS biyobelirteci analizi yapmıştır. Çalışma sonunda alkol tüketiminin kişi başına 18 mL/gün olduğu ve hafta sonu tüketimin arttığı tespit edilmiştir (111). Rodriguez ve ark. 2014 yılında EtS'nin atık suda doğrudan belirlenmesi için LC-MS/MS ile yöntem geliştirmiş, numuneye iyon çifti ilave edilerek yeni yöntem tayin etmiştir. EtS'nin atılım oranı %0,010 ile 0,016 arası ortalama 0,012 olarak belirlenirken, EtS'nin atık sudaki kararlılığı test edilmiş ve atık suda bir hafta boyunca, oda sıcaklığında (20 ˚C) ise 1 ay kalabildiği belirlenmiştir. Yöntem İspanya şehrinden hafta boyunca toplanan örneklere uygulanmıştır. Etanol tüketimi 9-24 mL/gün/ kişi olarak belirlenmiştir. Üçlü dörtlü enstrüman (QqQ) ile dörtlü uçuş sistemi (QTOF) karşılaştırıldığında, QTOF sistemi LOD'u atık suda tanımlamaya yeterli yanıt verirken QqQ olumlu tanımlamaya izin vermediği ve çalışmanın sonucunda LC – QTOF – MS ile atık sudaki EtS tayininin, LC-QqQ – MS/MS'den üstün olduğu tespit edilmiştir (112). Rodriguez ve ark. 2015 yılında yayınlanan makalelerinde ise İspanya ve İtalya'da 3 yıllık izleme çalışması yapmış, etanol göstergesi olarak etil sülfatı kullanarak LC-MS/MS ile analiz

etmiştir. EtG'nin de atık suda tespit edilebilir olduğu ancak bulunduğu matrikste düşük kararlılığı nedeniyle güvenilir biyobelirteç olarak kabul edilemezliği sonucuna ulaşılmıştır. Alkol tüketim hesabında düzeltme faktörü değeri 3047 kabul edilmiş ve Santiago'da 13,6 L/gün/1000 kişi ile 5,1 L/gün/1000 kişi olan Milano'dan yüksek olduğu tespit edilmiştir (113).

Gracia-Lor ve ark. 2016 yılında yaptıkları çalışmada biyobelirteçleri epidemiyolojik bilgi kaynağı olarak kullanmanın mevcut durum değerlendirmesini konu edinmiştir. EtS'nin etanolün kesin göstergesi haline gelmesinin en önemli nedeni kanalizasyon suyunda EtG'nin 18 saat sonra gösterdiği bozunmaya karşılık EtS'deki bozunmanın çok çok daha az olması belirtilmiştir (103). Van Wel ve ark. ise 2016 yılında yayınlanan makalelerinde Belçika'da ikişer haftalık 4 dönem için toplanan atık sularda alkol tüketimini belirlemek için EtS analizi yapmış ve sonuçları anket verileriyle karşılaştırmıştır. Çalışmada alkol tüketimi hesaplamasında EtS konsantrasyonundan yararlanılmasının nedeni olarak insan metabolizması için seçiciliği ve atık sudaki kararlılığı gösterilmiştir. Ayrıca 2015 yılında Redriguez ve ark. tarafından yapılan çalışmada hesaplamalara düzeltme faktörünün eklenmesiyle atık sudaki tüketim tahminlerinde büyük bir değişim olduğuna değinilmiş, daha standardize olmuş ve güvenilir veriler elde etmek adına düzeltme faktörünün ve bağlı olduğu atılım faktörüne dayalı çalışmaların arttırılması gerekliliği önerilmiştir. Atılım oranının 0,012, düzeltme faktörünün 3047 alındığı çalışmada günde ortalama kişi başına 290,630 g alkol tüketildiği belirlenmiştir. Elde edilen sounçlar anket verileriyle karşılaştırıldığında, anketlerde alkol kullanımının daha az yansıtıldığı ve anket yerine daha güvenilir karşılaştırma parametrelerinin kullanılması gerekliliğine değinilmiştir (114). Aynı yıl Boogaerts ve ark. yayınlanan makalede 2013-2015 yılları arasında Belçika'da farklı popülasyonlarda alkolün mekânsal ve zamansal eğilimini izlemek amacıyla EtS biyobelirteci kullanarak analiz yapmıştır. EtS ve EtG'nin popülasyon kullanımını belirlemek için potansiyel biyobelirteç olmalarının yanı sıra EtG'nin atık sudaki kararsızlığıyla mimlenmiş olması uygunsuzluğuna sebep olarak gösterilmiştir. Çalışma

sonucunda şehirlerde kırsala nazaran daha çok alkol tüketiminin olduğu ve yılda ortalama kişi başına 5,6 L alkol tüketildiği belirlenmiştir (115). 2016 yılında hız kazanan alkol tüketim çalışmalarının bir tanesi de 4-20 Mart 2014 tarihleri arasında gerçekleşen Fallas şenliğini kapsayan Valencia çevresinde Andres-Costa ve ark. tarafından gerçekleştirilmiştir. Kararlılığı nedeniyle EtS belirteci kullanılarak hesaplanan tüketim 1,07-56,11 mL/gün/kişi tespit edilmiştir (116). Aynı yıl Yunanistan'ın Lesvos adasında 22 farklı ilaç ve alkol metabolit varlığı araştırılarak tüketim tahmini yapılan çalışmada Gatidou ve ark. alkol tüketimi için EtS biyobelirtecini kullanmıştır. Sonuçlarda tüketimin günlük 5,4 mL/gün/kişi olduğu ve şehirdeki kullanımın kırsala nazaran fazla olduğu tespit edilmiştir (117). 2016 yılında Ryu ve ark. daha geniş bir çalışmaya imza atarak 11 ülkede 20 şehirde ortak protokolle 1 hafta boyunca toplanan atık su örnekleriyle EtS biyobelirteci kullanılarak alkol tüketim tahmini çalışması yapmıştır. EtS konsantrasyonuyla yapılan tüketim hesabında atılım oranı 0,012 kullanılarak 20 şehirdeki ortalama tüketim 6,4 – 44,3 L/gün/1000 kişi olarak tespit edilmiş, hafta sonu gerçekleşen tüketim artışı bu çalışmada da yer almıştır (118).

2017 yılında yayımlanan Mastrionni ve ark. nın Barselona'da 2011- 2015 Mart ayında yaptığı çalışmada alkol göstergesi olarak EtS kullanılmış, atılım oranı 0,01, düzeltme faktörü 3320,4 kabul edilerek ortalama tüketim 18 mL/gün/kişi olarak tespit edilmiştir (119). Banks ve ark. ise 2017 yılında kanalizasyon reaktörleri kullanarak farklı kanalizasyon koşullarında alkol ve nikotin biyobelirteçlerinin stabilitesini değerlendirme çalışması yapmıştır. EtG'nin kanalizasyon kanalındaki kararsızlığı dolayısıyla WBE'de kullanımının uygun olmadığı belirtilmiştir. EtS ise yalnızca atık suda stabilken simüle edilmiş kanalizasyon koşullarında degredasyonunun arttığı gözlemlenmiştir. Kanalizasyon koşulları dikkate alınarak saha çalışması yapılmasının doğruluğu arttıracağı önerilmiştir (120). 2017 yılında Choi ve ark. Avustralya'da yaptığı çalışmada yüksek hidrofilik özelliği, alkol kullanımından sonra çok düşük dozlarda atılmasına rağmen doğrudan enjeksiyonla dahi LC-MS/MS ile analiz

edilebilirliği onu EtG'nin önüne geçirmiştir. Atık suda EtS'nin kararlılığı, EtG'den yüksek olduğu için literatürdeki birçok çalışmada, etanol tüketimini tahmin etmek için EtS'nin kullanıldığı bilinmektedir (102).

Avustralya'da 2018 yılında Foon Yin Lai ve ark. nın makalesinde Mart- Nisan 2014 ile Mart-Mayıs 2015 arası süreçte 18 atık su tesisinden toplanan örneklerde alkol ve tütün tüketim tahmini yapılmış ve anket verileriyle karşılaştırılmıştır. Çalışmaların yaygın olarak Avrupa'da yapılmasının en çok kullanımın orda olmasından kaynaklandığı ve stabilitesinin yükseliğiyle EtS kullanıldığı belirtilmiştir. Sonuç olarak ortalama tüketim yaklaşık 7-24 L/gün/1000 kişi olduğu tespit edilmiş ve Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) sonuçlarını aştığı belirlenmiştir (121). Lağım içi bozulma alkol tüketim tahmini yorumlanması için oldukça önemlidir. Gao ve ark. da 2018 yılında alkol ve tütün tüketimi için kullanılan belirteçlerin atık suda kararlılığını incelemiştir. EtS'nin degredasyon hızı saatte %8 iken EtG'nin yarılanma ömrünün 1,9 saat olması EtS'nin stabilitesinin kanıtlanmasını sağlamıştır (122).

2019 yılında Zheng ve ark. alkol ve tütün tüketim tahmini konusundaki belirsizlikleri önlemek ve gelecekteki WBE çalışmalarına yön vermek amacıyla değerlendirmeler içeren bir çalışma yapmıştır. Alkol göstergesi olarak oda sıcaklığında 1 hafta, -20 ˚C' de dondurulduğunda ise 1 ay boyunca bozunmadan kalması ve yer çekimi kanalizasyonunda, yükselen ana reaktörde saatte sadece %8 bozulma göstermesi sebebiyle EtS'nin EtG' ye karşı kabul edilebilirliğine yoğunlaşılmıştır. İspanya, Yunanistan, Norveç, İtalya, Belçika ve Avustralya gibi Avrupa ülkelerinde çalışmalar yapılmış ve belirteç olarak kararlılığından dolayı EtS tercih edilmiştir. Ortalama alkol tüketimi 1-50 mL/gün/kişi tespit edilmiş ve genellikle her çalışmada hafta sonu alkol tüketiminin arttığı gözlemlenmiştir, haftalık değişimin dikkate alınması yönünde öneride bulunmuşlardır (123).

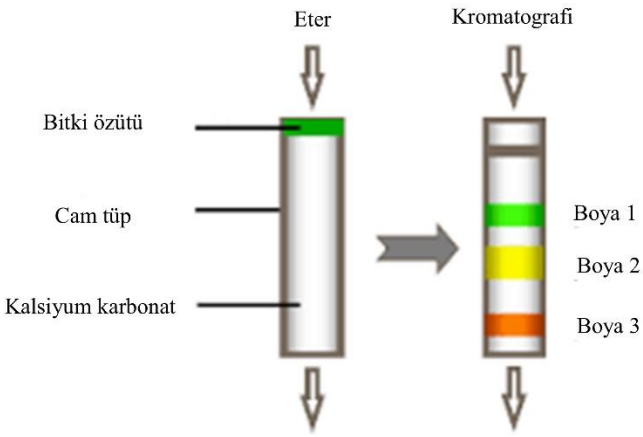
Türkiye'de atık su epidemiyolojisi yaklaşımıyla yasa dışı madde analizi çalışmaları İstanbul ve Adana'da 2017 yılında başlamıştır. Mercan ve ark. Türkiye'de (İstanbul) ilk kez atık su bazlı

yaklaşımla amfetamin (AMP), metamfetamin (METH), 3,4-metilendioksimetamfetamin (MDMA), kokain (COC) (benzoilekgoninden) ve esrarın (THCCOOH'dan) tüketim seviyelerini araştırmıştır. Çalışma sonucunda AMP, METH, MDMA, COC ve esrar için günlük tüketim sonuçları sırasıyla 27,2, 322, 331, 385 ve 1224 mg/gün/1000 bulunmuştur (5).

Atık su epidemiyolojisi yaklaşımında, toplum sağlığını değerlendirmek, sosyo-ekonomik planlamalar yapmak ve elde edilen verilerle salgın hastalıklar için yayılımı tahmin etmek ve erken aşamada önlemek amacıyla daha geniş ürün yelpazesi oluşturmaya yönelik araştırmalar ve çalışmalar yürültülmeye devam edilmektedir. Günümüzde halk sağlığını yakından ilgilendiren ve 11 Mart 2020 tarihinde DSÖ tarafından küresel salgın hastalık (pandemi) olarak ilan edilen, ilk olarak Çin'in Wuhan bölgesinde, 2019 yılı Aralık ayının başında görülüp, resmi adı SARS-CoV-2 (Şiddetli Akut Solunum Sendromu-Koronavirus-2) olarak belirlenen virüsün neden olduğu Covid-19 hastalığı için de WBE çalışmaları başlatılmış ve hızla devam etmektedir. Sars- CoV-2 taşıyıcı ajanlarının atık suda tespit edilebilirliğine dair çalışmalar literatürde yer almaya başlamıştır. Patojen yayılımını ve halk sağlığına tehditi en aza indirmek amacıyla atık su bazlı epidemiyoloji hızlı sonuç verilebilirliği ile avantaj oluşturmaktadır. Taşıyıcıların tespitiyle karantina gibi önlemler alınarak, doğru ve zamanında tedaviye imkân sağlamaktadır. Atık suda Covid-19 ile çalışma yapmak için kâğıt tabanlı cihazların hassas ve kolay taşınabilirliği kullanım sonrası yakılıp kontaminasyonu önleyebilirliği açısından uygun olduğu tartışılmaktadır (124).

2.3. Kromatografik Analiz Yöntemleri

Kromatografi, ilk kez 1903 yılında renkli bitki pigmentlerini ayırmak amacıyla Rus botanikçi Mikhail Tswett tarafından kullanılmıştır. Çeşitli pigmentler içeren çözeltiyi, toz halinde kalsiyum karbonatla ($CaCO_3$) doldurulmuş bir cam kolondan geçirerek birbirinden ayrılmasını sağlayan Tswett, maddelerin farklı zamanlarda ayrıldığını ve kolonda farklı renkte bölmeler oluştuğunu gözlemleyerek renkli fotoğraf/yazı anlamına gelen kromatografi adını kullanmıştır (125,126). Tswett'in kromatografi deneyi Şekil 21'de gösterilmiştir.



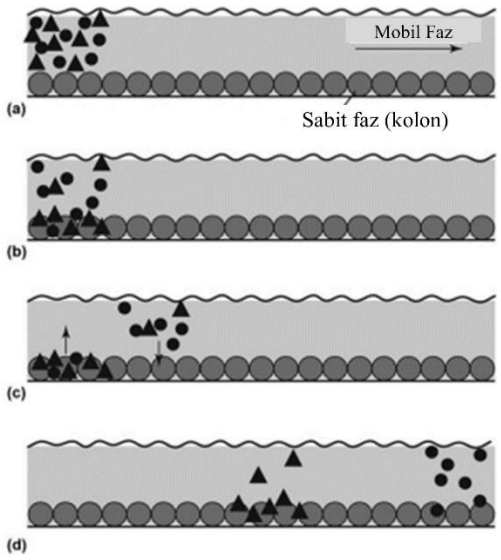
Şekil 21. Mikhail Tswett Kromatografi Deneyi (127)

Zamanla kimyasal ve fiziksel özellikleri birbirine çok yakın bileşenlerden olan karışımdaki bileşenleri ayırmak ve saflaştırma için kullanılan analitik bir yöntem haline gelmiştir. Kromatografi günümüzde karışımı oluşturan türlerin belirlenmesi olan nitel analiz ve miktar tayini olan nicel analizde en çok kullanılan metottur. Numunedeki maddelerin sabit ve hareketli fazlar yardımıyla ayrılması esasına dayanır. İki ya da daha fazla bileşenin hareketli faz yardımıyla sabit faz üzerinde değişik hızlarda hareket etme (ayrılma) işlemidir (128).

Mobil faz; sabit fazın üzerinden ya da arasından geçen bileşenleri sabit faz boyunca taşıyan, çeşitli kimyasal ve fiziksel özellikleri olan çözücü veya çözelti karışımıdır. Sabit faz (kolon) ise mobil fazla birlikte gelen bileşenlerin alıkonulduğu fazdır. Tekniğin türüne göre farklı ölçülerde

farklı materyallerden farklı sabit fazlar üretilir. Numunedeki bileşenin sabit fazda kalması olayına alıkonma, numunenin kolona uygulandığı süreden sistemi terk edip detektöre ulaştığı ana kadar geçen süreye ise alıkonma zamanı (Rt) denir. Bu değer, kimyasalın durağan faz ile etkileşime girdiği müddetçe artar. Her bileşen için farklılık gösteren alıkonma zamanı maddelerin kimliği hükmündedir. İki kimyasalın kromatografi ile ayrılması için, bu kimyasalların alıkonma zamanının farklı olması gerekir (129).

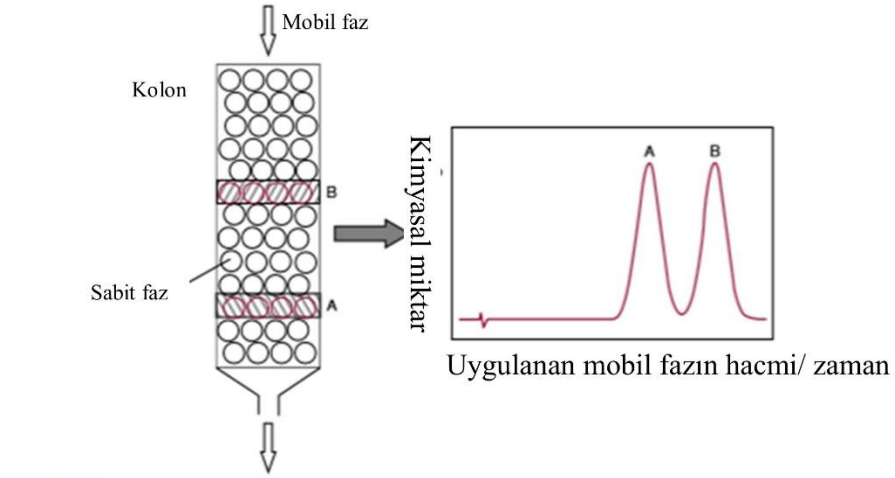
Kromatografi tekniğinin çalışma prensibi Şekil 22'de gösterilmektedir.



Şekil 22. Kromatografi Şeması (130)

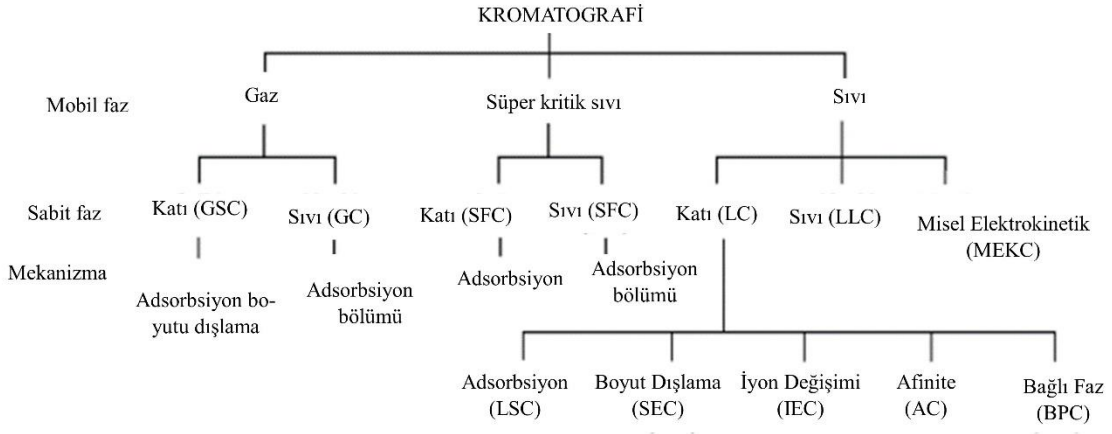
a. Mobil faz sistemi numune uygulandıktan sonra numuneyi beraberinde taşır.
b. Sabit faz sistem içinde bir destekle tutulur ve hareket etmez.
c. Numune bileşenleri sistemden geçerken sabit fazla güçlü etkileşime giren bileşenler daha yavaş hareket ederken, zayıf etkileşim oluşturan bileşenler ise daha hızlı hareket eder.
d. Oluşan etkileşimler bileşenlerin hareket hızı ve sistemden ayrılmalarında farklar oluşturur (130).

Kolon çıkışında yer alan dedektör cihazı görüntünün yansıtılmasını sağlar, kolondan çıkan bileşenlerin miktarı uygun yöntemle ölçülerek elde edilen yanıtın, zamana veya hareketli fazın hacmine karşı grafiği oluşturulur, oluşturulan grafiğe kromatogram denir, sistem Şekil 23'de gösterilmiştir (131).



Şekil 23. Kromatografik sistem (132)

Kromatografik yöntemleri ayrılma mekanizması, uygulama biçimleri, faz türleri gibi çeşitli sınıflandırılmalar içermekle birlikte kullanılan mobil faza göre gaz, sıvı ve süperkritik sıvı olarak üçe ayrılır (132,133). Sınıflandırma Şekil 24'de gösterilmiştir.

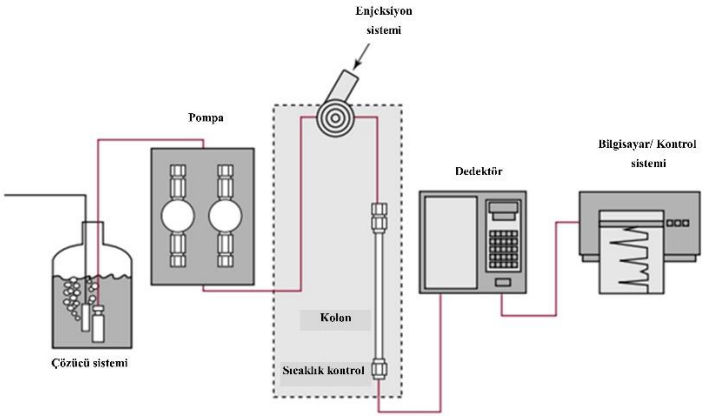


Şekil 24. Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması (133)

2.3.1. Sıvı (likit) kromatografisi

Mobil fazı sıvı olan kromatografilere sıvı kromatografisi (LC) adı verilir. Kolon kromatografisinde en çok kullanılan yöntemdir. LC'de numune hareketli fazda çözülerek enjekte edilir, numuneler için uçuculuk şartı yoktur. Yüksek kaynama noktasına sahip bileşenlerin ayrılmasında kullanılır (129). Basınç uygulanmadan yapılan sıvı kromatografisi karışımı ileri kromatografik yöntemler için daha saf hale getirmek için tercih edilirken 1960'larda geliştirilen yüksek basınç uygulamasıyla karışımdaki bileşenler daha ayrıntılı ayrışabilir hale getirildi ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) adıyla da kullanılmaya başlandı. Kantitatif tayinlere kolaylıkla uyarlanabilir olması, duyarlılığı, uçucu olmayan ve sıcaklıkla kolayca bozunabilen bileşiklerin ayrılmasına uygunluğu ve dar pik oluşumu avantajlarıyla kimyasal analizlerde tercih edilen otomatik yöntem haline gelmiştir (131,132). Uygun dedektörle birlikte ilaç metabolitleri, proteinler, amino asitler, pestisitler ve karbonhidratlar gibi uçucu olmayan kimyasal ve biyolojik bileşenlerin kantitatif analizini yapar.

LC; örneğin sisteme girdiği enjektör kısmı, maddelerin ayrıldığı kromatografi kısmı ve maddelerin tanındığı dedektör kısmından oluşmaktadır. Tüm kısımları içeren genel şeması Şekil 25'de verilmektedir (131).



Şekil 25. LC sistemi (132)

- Hareketli Faz Hazneleri ve Çözücü sistemleri

Mobil faz metanol veya asetonitrille oluşturulan sulu çözeltiler veya organik solventler çözücü rezervuarlarında bulunur. Çözücü rezervuarları pompaya bağlanan şişelerden oluşur. Mobil faz polaritesi çalışılan analite göre belirlenir. Tek bir fazla yapılan ayırma izokratik elüsyon olarak adlandırılırken, genellikle ayırma verimliliğini arttırmak adına etkileşimin kuvvetlenmesi için mobil fazlar değiştirilerek gradiyent elüsyonu oluşturulur. Mobil faz şişelerinin yanı sıra mobil faz hareketi sırasında oluşan hava kabarcıklarının kolona ve dedektör sistemine bozucu etkilere sebep olmasını önleyen degazer de çözücü sisteminde yer alır. Degazerler genellikle çözücüde bulunabilecek toz ve partiküllerin enjeksiyon sistemine zarar vermemesi ve kolonu tıkamaması için filtre içerir (131,134).

- Pompalama sistemi

Bu teknikte pompa, mobil fazın yüksek basınçla hareketini sağlar. Farklı tipte pompalar kullanılır. LC için düşük basınçta peristaltik pompalar kullanılırken HPLC'de yüksek basınçlara çıkmak için pistonlu veya şırıngalı pompalar kullanılır. Pompaların puls içermeyen basınç çıkışına, 0.1 ile 10 mL/dk arası akış değerine ve korozyona karşı stabil parçalara sahip olması uygunluk göstergelerinden bazılarıdır.

- Numune Enjeksiyon Sistemleri

Numunelerin kolon ve dedektöre gönderilmesini sağlayan sistemdir. Manuel ve otomatik olmak üzere temel olarak iki yöntemi vardır. Manuelde numune şırıngaya çekilip valf sistemiyle sisteme gönderilirken, dikkat edilmesi gereken en önemli nokta enjektör sisteminde hava kalmamasıdır. Otoörnekleyicide ise işlem cihaz tarafından yapılır. Bazı otoörnekleyicilerde türevlendirme yapabilmek için ısıtma, seyreltme, soğutma gibi özellikler bulunur. Otoörnekleyicilerde dikkat edilmesi gereken nokta, numunenin temiz olması ve sistemde kirliliğe ve tıkanmaya yol açmamasıdır. Manuelde de otoörnekleyicide de gereken en önemli

özellikler; tekrarlanabilirlik, enjeksiyon hacmi ve enjeksiyondan sisteme aktarım kısmıdır. Sıvı kromatografik analizlerde ölçme kesinliğini belirleyen etmen numunenin kolona aktarımının tekrarlanabilirliğidir (131,132,134).

- Kolon

Kolonlar sahip oldukları çaplar, dolgu maddesi ve uzunluklarla farklı kombinasyonlar içerebilir. Günümüzde çelikten yapılmış kolonlar yaygındır. Kolonlar genellikle silika veya polimer bazlı dolgu maddeleri içerir. Modern kolon teknolojisiyle daha küçük iç hacmine sahip kolonlar üretilmiştir bunun nedeni kütle spektrometresi gibi diğer yöntemlerle rahatlıkla birleşebilmesidir. Modern kolonlarda gözenekli destek parçacıklarının çapları 1.8 ile 10 mm aralığında tipik 5 mm değerindedir. Verimliliği arttırmak için monolitik destek de kullanılmaktadır. İnorgik veya organik polimerlerden oluşan gözenekli yapıya sahiptir. Analitik kolonun ömrünü arttırmak amacıyla analitik kolonun önüne daha kısa kolon yerleştirilerek çözücü içindeki yabancı maddelerin ve numune içindeki durgun fazla tersinir olarak bağlanan bileşenlerin tutulması da sağlanır. Kolon sıcaklık kontrolü LC ölçümünün tekrarlanabilirliğini ve verimliliğini belirleyen faktörlerdendir. LC'de genellikle sabit bir kolon sıcaklığı hedeflenir. Kolon sıcaklığı, derecenin onda birkaçı hata ile sabit tutulduğunda verimlilik artar, daha iyi kromatogramlar elde edilir.

- Dedektör

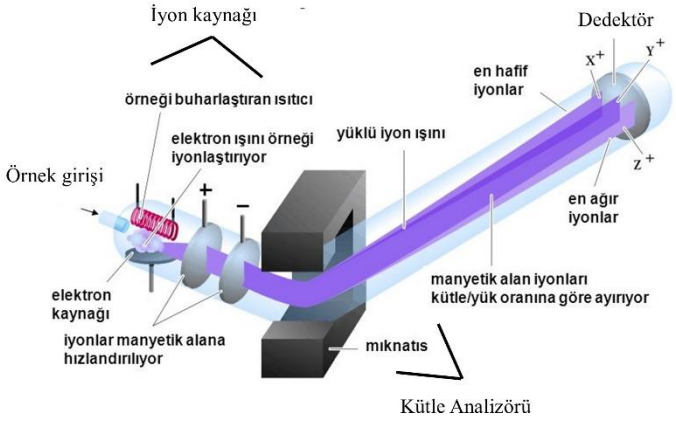
LC'de analit maddelerin özelliklerine göre absorbans, floresans, elektrokimyasal, kırılma inidisi ve kütle spektrometresi gibi farklı dedektörler kullanılmaktadır (132,134). Bu dedektörlerin çoğu için önemli olan nokta, mobil fazın ve kolondan çıkan bileşiklerin geçmesi gereken akışlı hücredir. Bileşenler detektöre doğru ilerledikçe ayrışan maddeleri izlemek ve miktarını ölçmek için sinyal üretilir. Birçok LC dedektörü ayrı ayrı ya da birbirine bağlı olarak

kullanılabilir. Daha güçlü sinyale sahip ürünler elde etmek amacıyla kolon ve dedektör arasında bir kolon sonrası reaktör konulabilir.

-Kütle spektrometresi

Kütle spektrometresi, analitteki maddelerin ne olduğunu saptamakta ve miktar tayini yapmada kullanılan bir araçtır. Kütle spektrometresinde örnekler elektriksel bölgeye girerek iyonlaşır, oluşan pozitif ve negatif iyonlardan pozitif olanlar daha fazladır. Negatifleri iyonları dışarda bırakmak amacıyla, iyonlar negatif yüklü potansiyel olan bölgeye yollanarak pozitiflerin hızla çekilmesi sağlanır. Bölgeye giren pozitif yükler elektriksel alanda hızlandırılıp kütle/yük oranına göre dizilimin olduğu kütle analizörüne yollanır. Kütle analizöründe manyetik alandan geçen iyonlar kütle/yük oranına göre ayrılır, düşük olanlar içe yüksek olanlar dışa yönelerek dedektöre ulaşır. Kütle analizörlerinden bazıları; manyetik sensör analizörü (MSA), kuadrupol analizör (Q), zaman-yol bağımlı analizör (TOF) ve iyon kapanı kütle analizörü (QSTAR)'dir (126,131,134).

Kütle spektrometresi örnek girişi, iyon kaynağı, kütle analizörü ve dedektör olmak üzere 4 bölümden oluşur, sistem şeması Şekil 26'da gösterilmiştir.



Şekil 26. Kütle Spektrometresi Şeması (134)

2.3.2. LC-MS

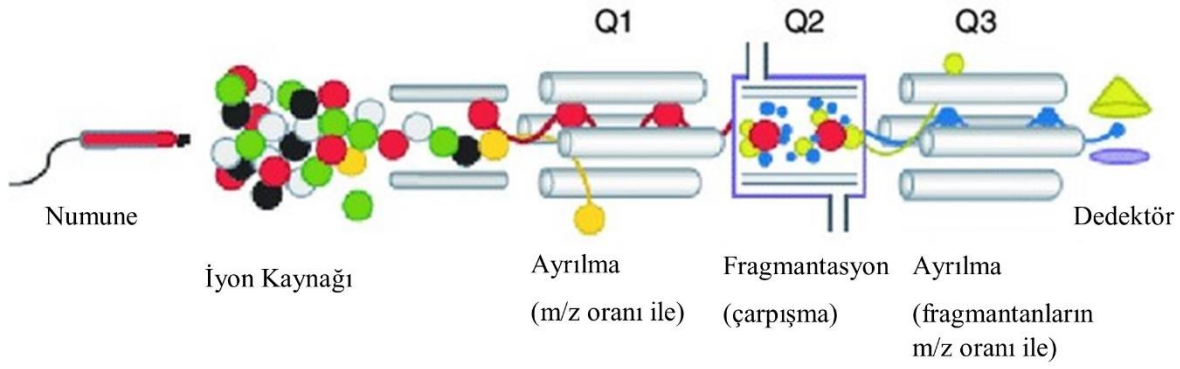
LC, kütle spektrometresi ile birleştirildiğinde LC-MS tekniği elde edilir. Bu teknik, klinik ve araştırma laboratuvarlarında metabolik ve küçük molekül analizi gibi alanlarda uygulanabilir. Hem kimyasalların ölçülmesini hem de iyonların kütlelerine dayanarak tanımlanmasını sağlar. Çoğu iyona veya tüm iyonlara bakmak için tam tarama modunda kullanıldığında, LC-MS'deki kütle spektrometresi genel dedektör rolü oynarken, belirli iyonlara bakmak için kullanıldığında ise seçici bir dedektör görevi görür. LC-MS'de çeşitli iyonizasyon yöntemleri ve kütle analizörleri kullanılabilir. Yaygın olarak, dört kutuplu kütle analizörü (kuadrupol) ile elektrosprey iyonizasyonu (ESI) kullanılIr. LC-MS'de kullanılabilecek diğer olası iyonizasyon yöntemleri kimyasal iyonizasyon veya fotoiyonizasyondur (131,134).

2.3.3. LC-MS/MS

İki ya da daha fazla analitik teknik ya da cihazın birleştirilmesiyle oluşan ikili yöntemlerin en çok kullanılanlardan bir tanesi de bir kütle spektrometresi ile başka bir kütle spektrometresinin birleştirilmesidir. İlk spektrometre, karışımdaki bileşiklerin iyonlarını izole etmede kullanılırken, ikinci spektrometrede her iyon ayrı ayrı kütle spektrumu verecek şekilde parçalanır. Bu tekniğin adı tandem kütle spektrometredir (MS/MS) (134). MS/MS'in LC ile birleştirilerek kullanıldığı sistem sıvı kromatografi ardışık spektrometrisidir (LC-MS/MS). Bu yöntem analiz süresini uzatmadan karışık matristeki tekli ve çoklu bileşenlerin tespitini sağlar. Bunun dışında eser düzeydeki madde analizinde, küçük bileşiklerden büyük proteinlerin tayinine kadar, uçucu olmayan bileşiklerin miktarı, yapısı ve molekül ağırlığı hakkında bilgi verir.

LC, karışımları çoklu bileşenlere ayırırken MS, yüksek algılama duyarlılığı ve moleküler özgüllük özelliğiyle bileşenlerin yapısal kimliğini belirler. LC'de ayrışan analitler iyonlaştırılarak MS/MS ünitesine gönderilmesinin ardından, MS/MS' de iyonlar ilk basamakta

kuadrupolden kütle/yük (m/z) oranlarında ayrıştırılır, ikinci basamakta collision cell olarak bilinen girişim hücresinde yüksek saflıktaki gazla çarpıştırılıp parçalanır ve ikinci kuadrupole gönderilirler. İkinci kuadrupolde bu ikinci iyonlar da kütle/yük (m/z) oranlarında ayrıştırılarak miktarları tayini edilir. LC ve üçlü kuodrupolden oluşan LC-MS/MS sistemi genellikle ESI ve atmosferik basınç kimyasal iyonizasyon (APCI) iyon kaynaklarını içerir ve böylelikle analiz aralığı genişler (135). MS/MS şeması Şekil 27'de gösterilmiştir.



Şekil 27. Tandem Kuadrupol MS/MS (136)

Kütle/yük oranı aynı olan birçok molekül olabilmesine rağmen, parçalanma iyonları aynı olan moleküler çok çok azdır, doğada bulunma oranı 1/10000'dir. Bu nedenle LC-MS/MS tekniği, karmaşık örneklerde yaygın olarak bulunan bileşikleri analiz etmede kullanılır.

İlaç metabolitleri, adli tıp, gıda, pestisit, kan, idrar gibi biyolojik numune analizleri ve suda kirlilik tayininde doğru ve hassas sonuçlar almak için kullanılan en yaygın yöntemdir (137).

Adli toksikoloji laboratuvarlarında adli tıbbın temel çalışma alanı olan ölüm ve zehirlenme sebeplerini araştırmak için GC-MS ile birlikte en çok kullanılan sistem LC-MS/MS'tir. Polar ve ısıya karşı dayanıksız olan bileşikleri tespit edebilme, çok düşük konsantrasyonlarda çalışılabilme gibi avantajlarla ilaç, uyuşturucu, alkol gibi maddelerin analizinde ölüme sebep olup olmadığı, zehirlenmede ne kadar etkili olduğu sorularına yanıt aramak için kullanılmaktadır (138).

2.4. Yöntem Validasyonu (Geçerli Kılma)

Ulusal ve uluslararası standartlara göre bir analitik metodun hedeflenen amaçlara uygunluğunun onaylanması için yapılan test ve ölçümler bütünüdür.

Standart metot bir laboratuvarda ilk kez uygulanacağında, analiz için yeni yöntem geliştirildiğinde, kullanılan yöntemde değişikliğe gidildiğinde, belirlenmiş yöntem farklı bir laboratuvarda veya farklı bir cihazda uygulanmak istendiğinde, yöntemin performansında değişim gözlendiğinde validasyon işlemi gerçekleştirilir.

Valide edilen yöntemle çalışıldığında analist, analit, cihaz ve laboratuvar koşulları gibi faktörlerin analiz sonucuna etkisi belirlenip, yapılan işlemin kesin, doğru, tutarlı, geçerli ve güvenilir olduğu kanıtlanmış olur.

Metot geliştirmede kullanılan validasyon parametreleri Tablo XIV'de gösterilmiştir (139,140)

Tablo XIV. Validasyon parametreleri (139)

Seçicilik/Spesifiklik
Doğrusallık/Ölçüm aralığı
Doğruluk a. Kesinlik * Tekrarlanabilirlik * Tekrar üretilebilirlik b. Gerçeklik *Bias (sapma) * Geri Kazanım
Sağlamlık
Tespit Limiti (LOD)
Tayin Limiti (LOQ)
Analitik Duyarlılık

Verifikasyon;

Geçerli kılınmış yöntemin kullanılmadan önce denenerek laboratuvar şartlarında uygulanabilirliğinin ispat edilmesi işlemidir. Verifikasyon parametreleri Tablo XV'de gösterilmiştir.

Tablo XV. Verifikasyon parametreleri (139)

Tespit limiti
Tayin limiti
Doğrusallık
Doğruluk a. Kesinlik b. Gerçeklik (bazı analizlerde kullanılır)

2.4.1. Seçicilik

Bir yöntemin, aranan analiti diğer analitlerin bulunduğu örnek içinde ayırt edebilme özelliğidir. Seçiciliğin belirlenebilmesi için kör numunelere aranan analit eklenir ve etkileşim olup olmadığı gözlemlenir (141).

2.4.2. Doğrusallık ve Ölçüm Aralığı

Ölçüm aralığı, yöntemin uygulama aralığının belirlenebilmesi amacıyla yapılır. Kalibrasyon eğrisi, ölçülen konsantrasyon ve dedektör yanıtının doğru orantılı bir şekilde görüldüğü aralığı temsil eden grafiktir. Konsatrasyonlar, ölçüm aralığı baz alınarak planlanır.

Standart eğri, metoda bağlı sınırlı sayıda ölçüm noktası ile belirlenir. İçinde miktarı bilinen referans örnekle veya kör örneğe eklenmiş analitin bilinen konsantrasyonu ile eğri oluşturulur. Çizilen eğride alt ve üst sınırlar belirlenir. Eğrinin en alt noktası metodun tayin limiti olmalıdır. Regresyon formülü ile korelasyon katsayısı belirlenerek çalışma aralığının doğrusal olup olmadığı tespit edilir. Korelasyon katsayısı ≥0,99 olmalıdır. Korelasyonun yanı sıra F değeri ile

karşılaştırılarak da değerlendirilebilir. F değeri; tablodaki değerden küçükse eğri doğrusaldır yorumu yapılır.

Residüel standart sapma; s_1^2

Yalın hata; s_2^2

$S_1^2 = \frac{\sum(y - yt)}{N^0 - 2}$ $S_2^2 = \frac{\sum(a-b)}{N_0K - N^0}$

Yt: eğrinin formülünde ‘x’değeri yerine konulduğunda elde edilen ‘y’

a: ilgili konsantrasyondaki ilk paralel değeri

b: ilgili konsantrasyondaki ikinci paralel değeri

N^0: ölçüm sayısı (örneğin 6 noktada 2 paralel için değer =12)

K: her bir noktada tekrar sayısı (örneğin 2 paralel ise değer = 2)

N_0K: N_0*K (örneğin 12 toplam sayı*2 tekrar =24)

N_0: kalibrasyon noktası

Kalibrasyon eğrisindeki tekrar sayısı 2’den fazlaysa yalın hata formülünde NK-N yerine 2n yazılarak hesaplama yapılmalıdır (141).

2.4.3. Doğruluk

Doğruluk ölçülen değer ile ölçülenin gerçek değeri arasındaki yakınlığın ifadesidir, kesinlik ve gerçeklik olmak üzere iki parametreyi içerir.

a) Kesinlik

Ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığının ifadesidir, rastgele hataların dağılımını ifade eder.

Kesinliği etkileyen 4 faktör aşağıda belirtilmiştir,

1. Zaman; kısa veya uzun zaman aralığı
2. Kalibrasyon; yeniden kalibrasyon yapılıp yapılmadığı
3. Operatör; aynı veya değişik ekipmanlar
4. Ekipman; aynı veya değişik ekipmanlar

Standart sapma veya varyasyon katsayısı (CV, RSD) ile ifade edilir (141).

- **Tekraredilebilirlik**

Bir yöntemin aynı laboratuvarda, aynı cihazla, aynı şartlarda aynı analist tarafından aynı günde, aynı veya benzer matriksle çalışılmasına **gün içi tekrarlanabilirlik**, aynı laboratuvarda aynı şartlarda belirli bir zaman aralığında çalışılmasına ise **günler arası tekrarlanabilirlik** denir. Tekrar edilebilirlik ulaşılan sonuçların birbirine yakınlığının ölçütüdür. Standart sapma, relatif standart sapma (RSD) veya %relatif standart sapma (%RSD) ile ifade edilir.

Tekrarlanabilirlik için en az 6 tekrarlı çalışma yapılarak veriler elde edilir. Her bir çalışma için büyük farklar içeren değerlerin bulunup bulunmadığı tespit edilir (139,141).

- **Tekrar Üretilebilirlik**

Aynı yöntemle, farklı laboratuvarda, farklı ekipman ve farklı analist tarafından uzun zaman aralığında yapılan çalışmalarda ulaşılan sonuçların birbirine yakınlığının ifadesidir. Tekrar üretilebilirlikte istatistiksel testlerle, veriler arasındaki farkın büyüklüğü belirlenir ve büyük bir fark gözlemleniyorsa işlem tekrar edilir.

Tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik konsantrasyona bağlı ifadeler olduğu için düşük, orta ve yüksek konsantrasyonda numunelerle çalışılmalıdır (139,142).

b) Gerçeklik

Belirli sayıdaki analiz sonuçları ortalamasının referans değere yakınlığının ifadesidir. Gerçeklik değerlendirmesi için sistematik hata hesabı yani bias yapılır. Bias, metodun gerçek sonucu verebilme ölçüsüdür, bu hesap için referans değer (yeterlilik testleri sonucu, valide edilmiş metot ölçümü sonucu, sertifikalı referans materyallerden) bilinmelidir. Matriks ve konsantrasyon seviyesine bağlı değişkenlik göstereceğinden çalışmanın yapılacağı koşullar belirtilmelidir.

- Geri kazanım:

Geri kazanım gerçeklik parametresi adı altında yapılan bir çalışmadır. Geri kazanım çalışmaları sertifikalı referans metaryalle veya kirletilmiş metaryelle gerçekleştirilir.

1. Sertifikalı referans materyal ile gerçeklik çalışması için 6 bağımsız çalışma yapılır.

B= X^1– Xref %b = $\frac{X^1-Xref}{Xref}$*100 %GK = $\frac{X^1}{Xref}$*100

B: Bias, mutlak hata

%B: bağıl bias, bağıl hata

X^1: referans malzeme il yapılan analiz sonuçları ortalaması

Xref: referans değer (referans materyalin sertifika değeri)

%GK: geri kazanım oranı

2. Kirletilmiş materyal ile gerçeklik çalışması

Bu çalışma için kör örneklere ihtiyaç vardır. Kör örnekler, belirlenen miktarda analitle kirletilen örneklerle beraber çalışılır. 6 bağımsız çalışma uygulanır, uygunsa kesinlik değerleri kullanılabilir.

%GK = $\frac{Xa - Xb}{Xkirletilmiş}$*100

X_a: Kirletilmemiş örneklerle yapılan analiz sonuçları ortalaması

X_b: Kirletilmiş örneklerle yapılan analiz sonuçları ortalaması

Xkirletilmiş: Kirletmek için kullanılan analit miktarı (eklenen konsantrasyon)

Geri kazanım sonuçlarının %80-%120 arasında değişkenlik göstermesi başarı ifadesidir. Sonuçlar konsantrasyona bağlı olduğu için yapılan analizlerde düşük konsantrasyonlarda da çalışılmalıdır (139).

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

Düşük derişimlerde nicel analiz için kullanılan analitik metotların geliştirilmesi, geçerli kılınması ve sonuçlarının yorumlanmasında güvenilir ölçüm yapılabilen en düşük derişim bilinmelidir. Bu parametrenin hesaplanması için farklı alanlarda farklı hesaplamalar ve terimler kullanılır.

Tespit limiti, analit miktarının kesin olarak ölçülemediği fakat örnekteki varlığının belirlenebildiği en düşük konsantrasyondur. Tayin limiti, miktarsal olarak net bir şekilde tespit edilen en düşük analit konsantrasyonudur. Tespit limiti çok düşük konsantrasyonlarla yapılan çalışmalarda uygundur.

Tespit limiti 3 farklı şekilde hesaplanır;

1). Kör örneklerin sonuçlarının standart sapması ile

$X_{LOD} = 3*S_O + X_{KÖR}$ $X_{LOQ} = 10*S_O + X_{KÖR}$

S_o = kör örnek sonuçlarının standart sapması

$X_{kör}$ = kör örneklerin ortalaması

Eğer analiz sonucundan kör örnekler çıkarılacaksa, $X_{kör}$ eşitlikte yer almaz.

Formüldeki 3 ve 10 güven aralığı a =0,01'in karşılığıdır.

2). Metodun standart sapması ile

Bu hesaplamada lineer kalibrasyon eğrisinin değerleri kullanılır.

Metodun standart sapması üzerinden hesaplamada linear kalibrasyon eğrisinin değerleri kullanılarak aşağıdaki formülle tespit limiti hesaplanır.

$xLD = 4 \times s_{xo}$

$s_{xo} = s_1^2 / m$

$s_1^2 = \sqrt{\frac{(\sum(yi - \hat{}yi)2}{N^0 - 2}}$

S_{XO} = Proses veya metot standart sapması (kalibrasyondan)

s_1^2 = Residüel standart sapma

ˆ yi= Eğrinin formülünde "x" değerinin yerine konulduğu zaman elde edilen"y" değeri (varsayılan"y" değeri)

m = kalibrasyon eğrisinin eğimi

N^0= Ölçüm sayısı

3). Sinyal / Gürültü oranı ile

Genellikle doğrudan cihaza verilen bir numunenin analizi veya bir kromatogram elde edilmişse sinyal (S)/gürültü (N) oranı ile cihazın tespit yeteneği elde edilebilir. Örnekte S/N oranının 3 olduğu analit konsantrasyonu LOD olarak ve S/N oranının 10 olduğu analit konsantrasyonu LOQ olarak kabul edilebilir (139).

LOD = 3.3 x S/N

LOQ = 10 x S/N

S: Sinyal N: Gürültü (143)

Tespit ve tayin limitinin doğrulanması gerekir. Bu aşamada kör örneğe hesaplanan LOD ve LOQ seviyesinde spike yapılır. Hem kör numune hem de spike yapılmış kör numune aynı koşullarda çalışılır. Spike yapılmış kör numunelerin ortalaması, maksimum kör numune değerinden fazlaysa tespit limiti doğrulanmış kabul edilir (139,141).

2.4.5. Sağlamlık

Metot içindeki parametreler üzerinde değişiklikler yapılarak metodun standardize edilmesi ve laboratuvardaki küçük sapmaların sonuçlara etkisinin incelenmesi işlemleridir.

pH, sıcaklık, basınç, akış hızı, kolon sıcaklığı, uçuculuk gibi parametrelere uygulanan değişikliklerden, sonuçları önemli derecede etkileyenler metot protokolünde tanımlanır. Parametrelerdeki değişikliklerin analiz sonucuna etkisinin azlığı metodun sağlamlığını arttırır (139,140).

2.4.6. Stabilite

Numunedeki analitin saklama koşullarında kararlılığının yetersiz olması analiz sonuçlarında sapmalara neden olabilir. Valide edilmiş bir metodun kontrolü standart üzerinden tespit ediliyorsa, standardın hangi sıcaklıkta ve ne kadar süre kararlı kaldığı bilgisi önemlidir. Örnek içindeki analitin de ne kadar süreye kadar tespit edilebilirliği, ne kadar süre sonunda bozunduğu bilgisi için stabilite çalışması yapmak analizin kalitesini arttıran çalışmalardandır (134,140).

3.GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu tez çalışması İstanbul-Cerrahpaşa Üniversitesi, Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü, Adli Toksikoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. EtS Analizi

Çalışmada etanol metaboliti olan EtS'nin analizi için LC-MS/MS ile analiz yöntemi geliştirilmiştir. Katı etil sülfat standart maddesinden ana ve ara stok çözeltiler hazırlanıp, bu çözeltilerin seyreltilmesiyle oluşturulan belirli konsantrasyonlardaki numuneler doğruluk ve doğrusallık çalışmalarında kullanılmıştır. Geri kazanım, tekrar edilebilirk, stabilite vb parametrelerin izlenmesi amacıyla çeşme suyuna ve atık suya EtS standardı ve IS eklenerek (spike) yöntemin geçerliliği izlenmiştir.

Çalışmalarda kullanılan atık su örnekleri Büyükçekmece atık su arıtma tesisinden, sabah 9 da başlayarak bir sonraki gün sabah 8'e kadar 24 saatlik kompozit numune olarak toplandı. Örnek toplama günü seçilirken resmî tatiller, festivaller gibi özel etkinliklerden kaçınıldı. Numuneler, 15 dakika aralıklarla yaklaşık 100 mL olacak şekilde atık su toplandı ve toplandıktan sonra homojenize edildi. Örnekleme sırasında fırtına ve yağmur meydana gelmedi. Atık su numunesi analiz edilinceye kadar -20 ˚C'de muhafaza edildi. Analizden önce ise ilk olarak 0,75, sonra 0,45 µm filtreden geçilerek süzüldü.

3.1.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan gereçler

Laboratuvar çalışmalarında kullanılan araç, gereç ve cihazlar Tablo XVI'de gösterilmiştir.

Tablo XVI. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Gereçler

GEREÇ	**MARKA/MODEL**
LC-MS/MS Sistemi	Shimadzu 8045 LC – MS/MS (Kyoto/Japan)
Analitik Kolon	Restek Raptor Biphenyl 2.7 µm, 100 × 2.1 mm
Guard Kolon	Welch HPLC Guard Kolon 3 µm, 120A, 4.6 ×10 mm
Azot Jeneratörü	Peak Scientific Genius 1051
Yazılım	LSSMain Window
Distile Su Cihazı	ELGA Purelab Flex
Santrifüj	Hettich
Vorteks Cihazı	VELP Scientifica
Hassas Terazi	Sartorius ACCULAB
Buzdolabı	Sanyo Labcool
Derin Dondurucu (-20˚C)	Samsung CooltechPlus
Otomatik Pipet	LLG Labware
Balonjoje	ISOLAB
Vial	ISOLAB
Falkon tüpler	ISOLAB
Şırınga ve filtre	Minisart RC 25

3.1.2. Çalışmada kullanılan kimyasallar

Laboratuvarda yapılan çalışmalarda kullanılan kimyasallar Tablo XVII'de gösterilmiştir.

Tablo XVII. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasallar

Kimyasal	**Markası**
Metanol	Sigma- Aldrich
Amonyum format	Fluka, eluent additive for HPLC-MS
Formik asit	Fluka, eluent additive for LC-MS
EtS	TRC
EtS-d_5 (iç standart)	TRC

3.2. Kullanılan Standart Çözeltiler

Çalışılacak tüm standart çözeltiler, iç standart (IS) olarak belirlenen EtS-d_5 ile hazırlandı. Tüm stok çözeltiler ağzı parafilm ile kaplanarak +4°C' de muhafaza edildi. Kalibrasyon noktalarını belirlemek için gereken çözeltiler, bu stok çözeltiler seyreltilerek hazırlandı.

3.2.1.Etil sülfat standart çözeltisi

Ana stok çözeltisi (100 µg/mL): 1,184 mg sodyum etil sülfat (katı) tartılıp 10 mL metanol içerisinde çözülerek hazırlandı.

Ara stok çözeltisi (1 µg/mL): Ana stok çözeltiden 100 µL alınıp metanol ile 10 mL'ye tamamlandı.

3.2.2. İç standart (IS) çözeltisi

Ana stok çözeltisi (100 µg/mL): 1,17 mg sodyum etil sülfat- d_5 (katı) tartılıp 10 mL metanol içersinde çözülerek hazırlandı.

Ara stok çözeltisi (10 µg/mL): Ana stok çözeltiden 1000 µL alınıp metanol ile 10 mL'ye tamamlandı.

Tüm çözeltilere son hacimde 10 µg/L olacak şekilde IS eklendi.

3.2.3. Doğrusallık ve doğruluk çalışmaları için hazırlanan çözeltiler (Kalibrasyon)

1 ng/mL standart çözelti: EtS ara stok çözeltisinden 1 µL, EtS-d_5 IS çözeltisinden 10 µL alınıp 989 µL metanol eklendi ve vorteks karıştırıcı ile karıştırıldı.

2 ng/mL standart çözelti: EtS ara stok çözeltisinden 2 µL, EtS-d_5 IS çözeltisinden 10 µL alınıp 988 µL metanol eklendi ve vorteks karıştırıcı ile karıştırıldı.

5 ng/mL standart çözelti: EtS ara stok çözeltisinden 5 µL, EtS-d_5 IS çözeltisinden 10 µL alınıp 985 µL metanol eklendi ve vorteks karıştırıcı ile karıştırıldı.

10 ng/mL standart çözelti: EtS ara stok çözeltisinden 10 µL, EtS-d_5 IS çözeltisinden 10 µL alınıp 980 µL metanol eklendi ve vorteks karıştırıcı ile karıştırıldı.

25 ng/mL standart çözelti: EtS ara stok çözeltisinden 25 µL, EtS-d_5 IS çözeltisinden 10 µL alınıp 965 µL metanol eklendi ve vorteks karıştırıcı ile karıştırıldı.

50 ng/mL standart çözelti: EtS ara stok çözeltisinden 50 µL, EtS-d_5 IS çözeltisinden 10 µL alınıp 940 µL metanol eklendi ve vorteks karıştırıcı ile karıştırıldı.

100 ng/mL standart çözelti: EtS ara stok çözeltisinden 100 µL, EtS-d_5 IS çözeltisinden 10 µL alınıp 890 µL metanol eklendi ve vorteks karıştırıcı ile karıştırıldı.

150 ng/mL standart çözelti: EtS ara stok çözeltisinden 150 µL, EtS-d_5 IS çözeltisinden 10 µL alınıp 840 µL metanol eklendi ve vorteks karıştırıcı ile karıştırıldı.

200 ng/mL standart çözelti: EtS ara stok çözeltisinden 200 µL, EtS-d_5 IS çözeltisinden 10 µL alınıp 790 µL metanol eklendi ve vorteks karıştırıcı ile karıştırıldı.

Blank (kör) çözelti: EtS-d_5 IS çözeltisinden 10 µL alınıp 990 µL çözücü eklendi ve vorteks karıştırıcı ile karıştırıldı.

3.3.Numunelerin Analize Hazırlanması

Atık suda ve çeşme suyunda etanol analizi için numuneler LC-MS/MS sisteminde analiz edilmeden önce ön işlemlere tabii tutularak hazırlandı.

- Numune homojenize edilip, ana şişeden 1500 µL numune eppendorfa alındı.
- 8000 rpm de 5 dakika santrifüjlendi.
- Santrifüj işlemi sonrası dibe çöken katı partiküllere temas edilmeksizin üst sıvı fazdan 990 µL alındı.
- 10 µg/mL EtS-d_5 iç standardından 10 µL alınarak üst faza eklendi.
- Vorteksleme işlemi yapıldı.
- 0,22 µm'lik şırınga ucu ile filtreleme yapıldı.
- 8000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi.
- Santrifüj işlemi sonrası dibe çöken katı partiküllere temas edilmeksizin üst sıvı faz viale alındı.

3.4. LC-MS/MS Sistemi ile EtS Analizi

LC-MS/MS sistemi ile analizin gerçekleştirilebilmesi için iyonizasyon koşulları, uygun kolon, sıcaklık, enjeksiyon hacmi, akış zamanı gibi parametreler literatür taraması ile belirlendi. Etil alkolün özelliklerine uygun mobil faz seçildi ve belirli konsantrasyondaki EtS çözeltileri sisteme verilerek analiz gerçekleştirildi. Sistem için gereken parametreler Tablo XVIII ve XIX'da gösterilmiştir.

3.4.1.Sistem özellikleri

Tablo XVIII. LC-MS/MS Sistem Özellikleri

Mobil Faz A	1 L su + %0,1 formik asit + 2 mM amonyum format
Mobil Faz B	1 L metanol + %0,1 formik asit + 2 mM amonyum format
Kolon	Raptor Biphenly (2,7 µm, 100 × 2,1 mm)
Guard Kolon	Welch (3 µm, 120A, 4,6 ×10 mm)
Analiz süresi	9 dk
İyonizasyon Modu	Elektrosprey İyonizasyonu
Enjeksiyon hacmi	2 µL
Akış hızı	0.2500 mL/dk
Kolon sıcaklığı	50 ˚C
Arayüz sıcaklığı	300 ˚C
Isıtma gaz akışı	10 L/dk
Kurutma Gaz Akışı	10 L/dk
Tarama Tipi	MRM

Tablo XIX. Mobil fazın zamana bağlı akış değişimi

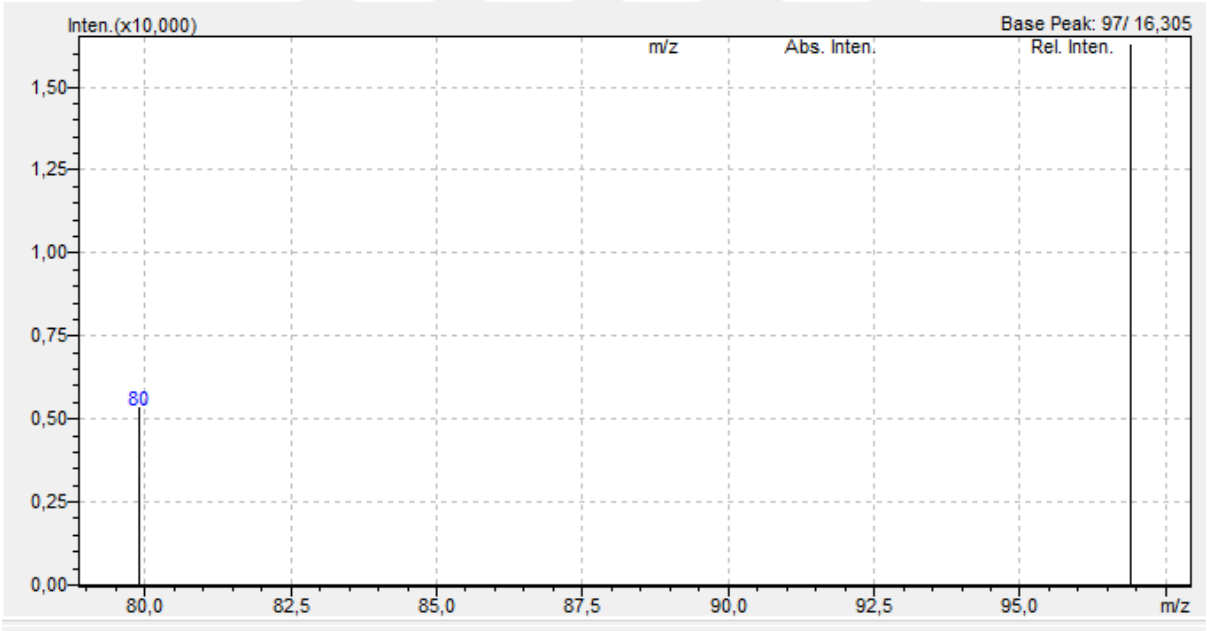
Zaman (dk)	**Akış Hızı (mL/dk)**	**Mobil Faz B %**	**Mobil Faz A %**
2.00	0,25	40	60
3.50	0,25	95	5
4.50	0,25	95	5
4.51	0,25	5	95
9.00	0,25	5	95

Analitler için LC-MS/MS alıkonma zamanları (R_T), çapışma enerjileri (CE) ve iyonları Tablo XX'de gösterilmiştir.

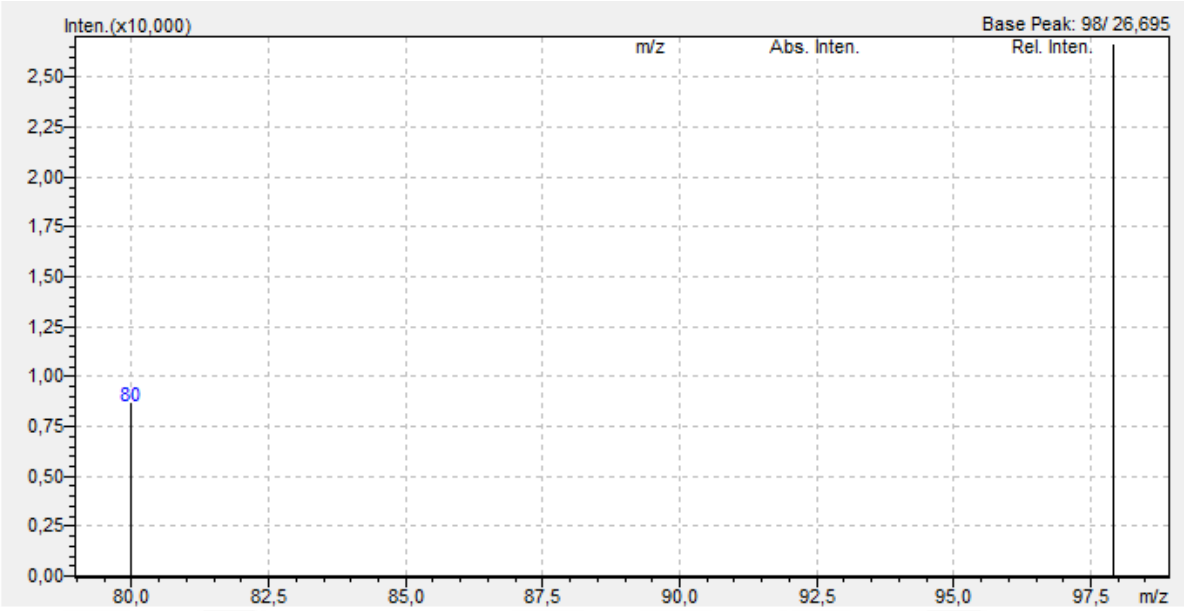
Tablo XX. EtS analizi için kütle spektrometresi parametreleri

Analit	**Q1**	**Q3**	**R_T (dk)**	**CE (V)**
EtS	125,2	96,9	1,684	17,0
	125,2	79,9	1,684	30,0
EtS-d_5	130,2	97,9	1,661	18,0
	130,2	80,0	1,661	28,0

EtS ve EtS-d5'e ait kütle spektrumları Şekil 28 ve Şekil 29'da gösterilmiştir.



Şekil 28. EtS'nin kütle spektrumu



Şekil 29. EtS-d5'in kütle spektrumu

3.5.EtS Analizinde Validasyon Çalışmaları

3.5.1. Seçicilik çalışmaları (Selectivity)

Seçicilik değerlendirme çalışmaları için analit içermeyen MeOH çözücüsü ile metanol içerisine EtS ara stok çözeltisinden 25 µL ve EtS-d5 IS çözeltisinden10 µL eklenerek hazırlanan 25 ng/mL'lik standart çözeltisinin pikleri karşılaştırıldı. Çözücünün pik oluşturmaması, hiçbir girişime neden olmadığının ve seçiciliğin göstergesi olarak değerlendirildi.

- ***Matriks etkisi***

Matriksten gelen bir ya da daha fazla bileşenin analit miktarı ölçümüne etkisi olarak bilinen matriks etkisini incelemek amacıyla çözücüdeki analit değeriyle, matrikste hazırlanan analit değerinin karşılaştırılması yapıldı. Bu çalışmada matriks etkisini gözlemlemek adına çeşme suyu ve atık suya spike yapılarak hazırlanan numuneler çalışıldı. Çeşme suyu ve atık su matriksindeki farklı bileşenlerin sonuçlara etkisi değerlendirildi.

3.5.2. LOD ve LOQ çalışmaları

Tespit ve tayin limiti çalışmaları için kalibrasyon aralığının altında 0,1, 0,2 ve 0,5 ng/mL olacak şekilde üç nokta seçilerek nunumeler 9 tekrarla hazırlandı ve analiz edildi.

Ölçüm sonuçları sonrası sinyal/gürültü ile tespit ve tayin limiti hesaplama formüllerinden yararlanılarak hesaplama yapıldı.

LOD = 3.3 x S/N

LOQ = 10 x S/N

S: Sinyal N: Gürültü

3.5.3. Doğrusallık çalışmaları (Linearite)

Doğrusallık çalışmaları için EtS içeren 1, 2, 5, 10, 25, 50, 100, 150 ve 200 ng/mL standart çözeltileri içinden kalibrasyon aralığı 1- 50 ng/mL olarak belirlendi ve yalnızca iç standart içeren kör çözelti beraberinde numuneler 3'er tekrarlı olacak şekilde hazırlanıp LC-MS/MS ile analiz edildi. Oluşturulan kalibrasyon eğrisi yardımıyla doğru denklemi ve korelasyon katsayısı (r^2) hesaplandı. Korelasyon katsayısı için ölçüt ≥0,99 olarak kabul edildi.

3.5.4. Doğruluk çalışmaları (Accuracy)

Kesinlik için tekrarlanabilirlik, gerçeklik içinse geri kazanım çalışmaları yapıldı.

3.5.4.1 *Kesinlik (Precision)*

Kesinlik çalışmaları, gün içi tekrar edilebilirlik ve günler arası tekrar edilebilirlik parametreleriyle değerlendirildi.

Tekrar edilebilirlik;

Ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığın ifadesi olan kesinlik parametresinin değerlendirilmesi için tekrarlanabilirlik çalışmaları yapıldı. Bu çalışma için çeşme suyunda spike ile hazırlanan; düşük (2 ng/mL), orta (10 ng/mL) ve yüksek (25 ng/mL) olmak üzere üç konsantrasyon seçildi. Seçilen her bir konsantrasyon aynı gün, aynı laboratuvarda, aynı ekipman ve aynı analist tarafından 6'şar tekrarla hazırlanıp analiz edilerek gün içi tekrarlanabilirlik değerlendirildi. Bir hafta sonra, çeşme suyuna EtS eklenerek (spike) hazırlanan 5, 10, 15, 20 ve 25 ng/mL konsantrasyonları içinden seçilen 10 ve 25 ng/mL çözeltileri aynı laboratuvarda, aynı ekipman ve aynı analist tarafından, aynı matriksle 6'şar tekrarlı çalışılarak günler arası tekrarlanabilirlik gerçekleştirildi. Farklı laboratuvar, farklı analist ve farklı ekipman gerekmesi nedeniyle tekrarüretilebilirlik çalışması gerçekleştirilemedi.

Tekrar edilebilirlik sonuçları ortalama, standart sapma ve % bağıl standart sapma (%RSD) değerleri ile değerlendirildi. RSD değerlerinin <%20 olması uygunluk ölçütü olarak kabul edildi. Bağıl standart sapma aynı zamanda varyasyon katsayısı (CV) olarak da adlandırılır.

Standart sapma (s) = $\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N}(X_i-\bar{X})}{N^0-1}}$

$\sum$ = toplam

X_i: i'inci ölçüm değeri

$\bar{X}$: numune ortalaması

N^0: ölçüm sayısı

Bağıl standart sapma (RSD) = $\frac{s}{\bar{x}}$

s = standart sapma

$\bar{x}$ = numune ortalaması

% Bağıl standart sapma (%RSD) = $\frac{s}{\bar{x}}\times 100$

3.5.4.2. *Gerçeklik çalışmaları*

Gerçeklik çalışmaları geri kazanım parametresiyle değerlendirildi.

Geri kazanım çalışması;

Geri kazanım çalışması çeşme suyu ve atık su matrikslerine EtS ilave edilerek gerçekleştirildi. Atık su içine EtS ve IS eklenerek hazırlanan 2 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL ve 25 ng/mL konsantrasyon çözeltileri kullanılırken, çeşme suyu için tekraredilebilirlik çalışmaları için seçilen 2, 10 ve 25 ng/mL konsantrasyonlu numuneler kullanıldı. Analit içermeyen kör örnekler 6 tekrarlı olarak çalışıldı. Elde edilen ölçüm sonuçlarından blank ortalama konsantrasyon değeri çıkarılarak geri kazanım hesaplandı. Sonuçların, %80-%120 aralığında olması çalışmaların uygunluk kriteri olarak kabul edildi.

$$\%GK = \frac{X1 - X2}{X3} * 100$$

X_1: EtS eklenen numunelerin konsantrasyon ortalaması

X_2: EtS eklenmeyen numunelerin konsantrasyon ortalaması

X_3: Eklenen EtS konsantrasyonu

3.5.5. Stabilite çalışmaları

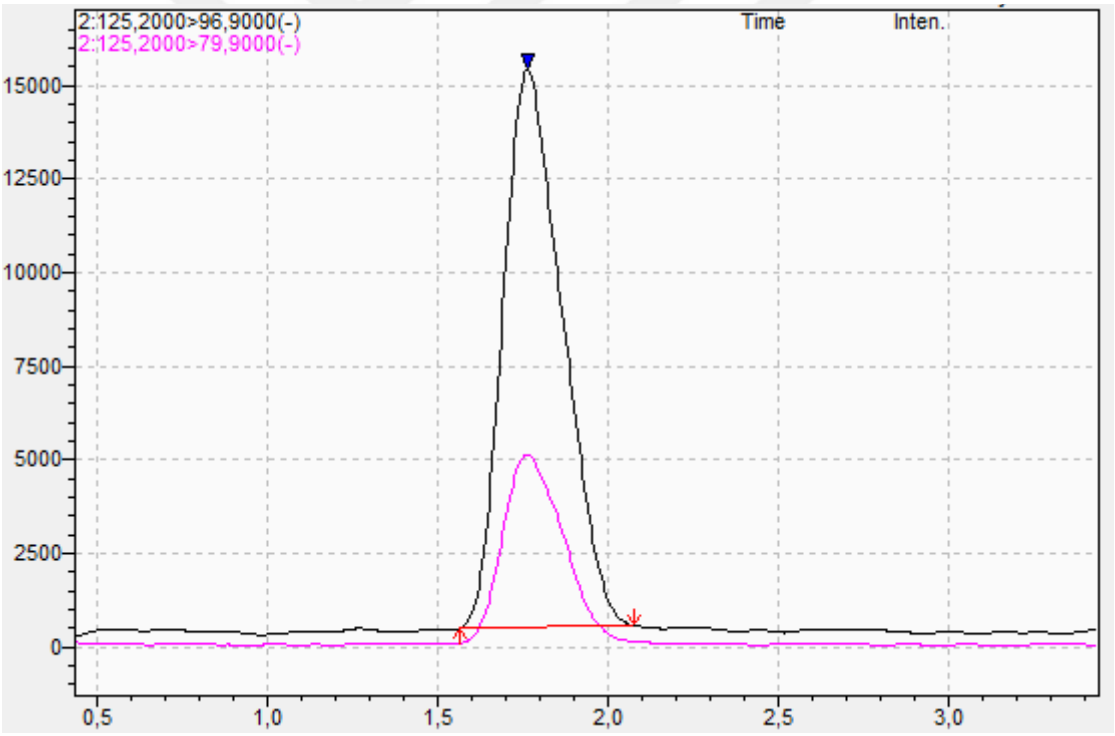
Stabilite çalışmaları için tekrarlanabilirlik çalışmalarında kullanılan çeşme suyunda 2, 10 ve 25 ng/mL konsantrasyonundaki çözeltiler, sonuçlarda meydana gelebilecek değişimleri gözlemlemek adına bir hafta oda koşullarında bekletildikten sonra vortekslenip analiz edildi ve 6'şar tekrarlı olacak şekilde analiz edildi.

4. BULGULAR

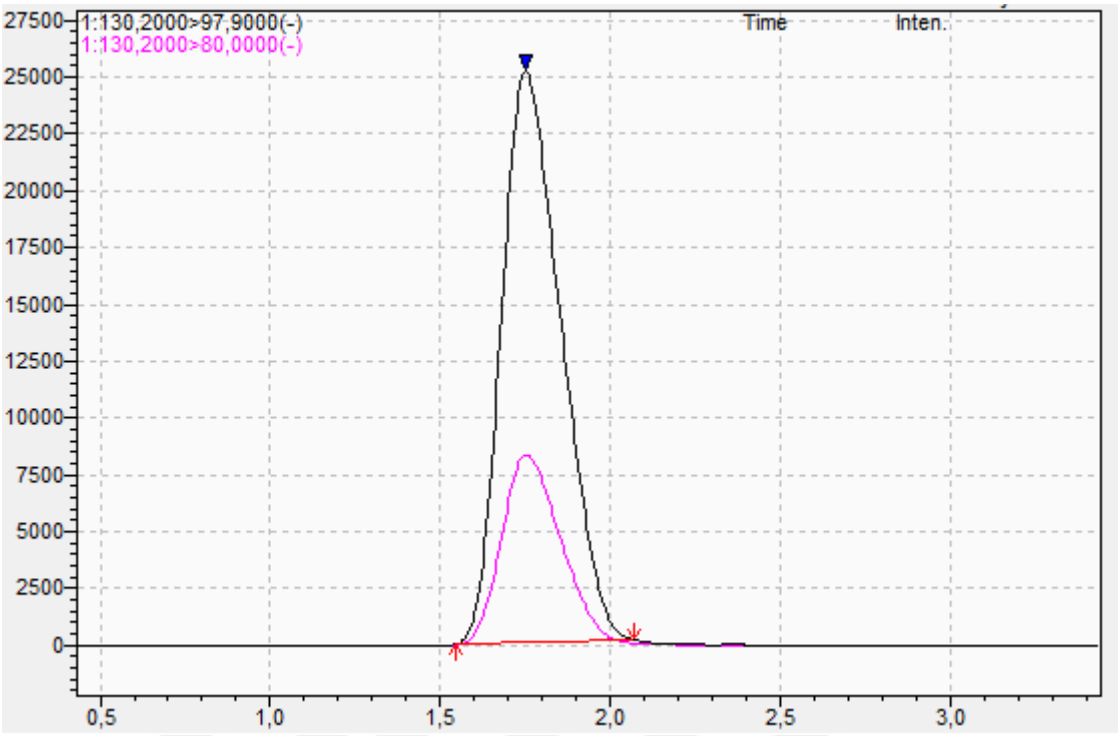
4.1.Seçicilik

Seçicilik çalışması için analit içeremeyen MeOH ile metanol içerisine 10 µL EtS-d5 IS çözeltisinden ve 25 µL EtS ara stok çözeltisinden eklenerek hazırlanan 25 ng/mL'lik standart çözeltinin pikleri karşılaştırıldı. 1,684 dk olarak belirlenen EtS ve 1,661 dk olarak belirlenen EtS-d_5 alıkonma zamanında metanol çözücüsünün hiçbir girişime sebep olmadığı belirlendi. EtS ve Ets-d5'e ait alıkonma zaman pik kromatogramları Şekil 30 ve 31'de gösterilmiştir.

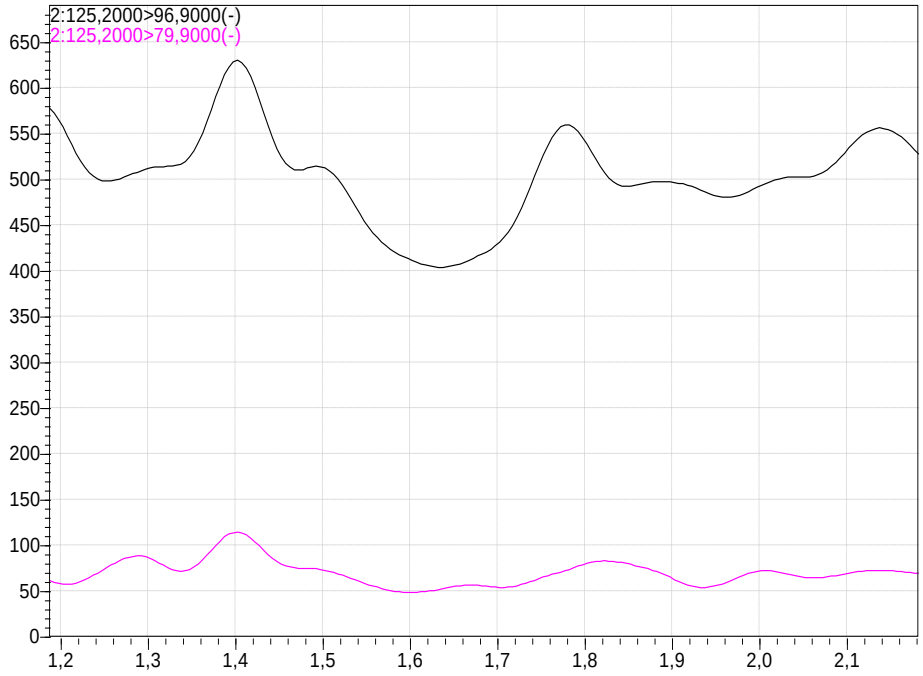
Yalnızca MeOH içeren kromatogram Şekil 32, 25 ng/mL konsantrasyonlu çözelti Şekil 33'de gösterilmiştir.



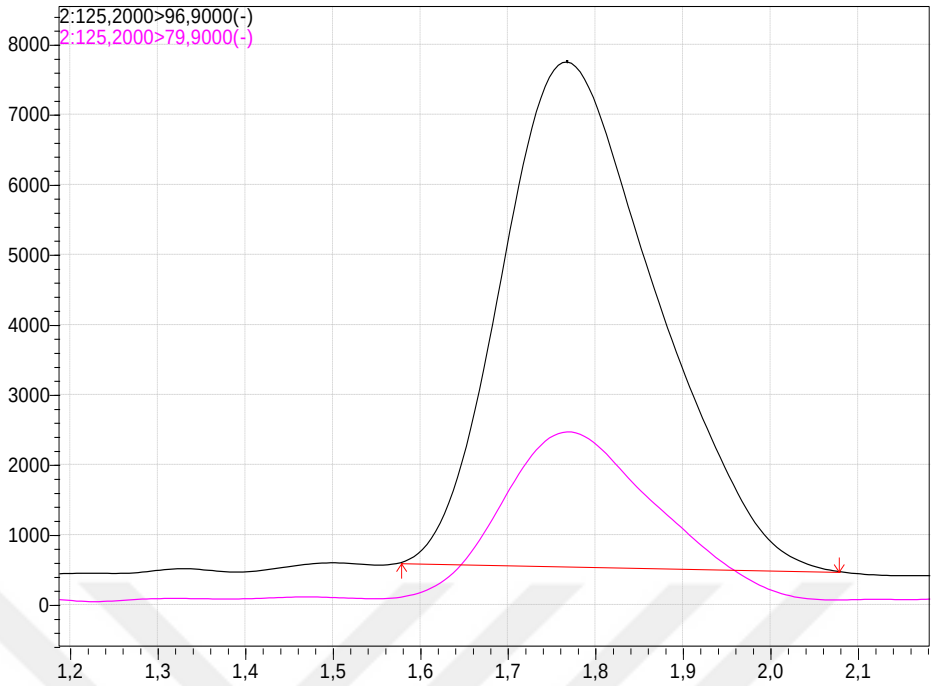
Şekil 30. EtS standardının alıkonma zamanına ait LC kromatogramı



Şekil 31. EtS-d5 iç standardının alıkonma zamanına ait LC kromatogramı



Şekil 32. Metanol çözücüsüne ait LC kromatogramı

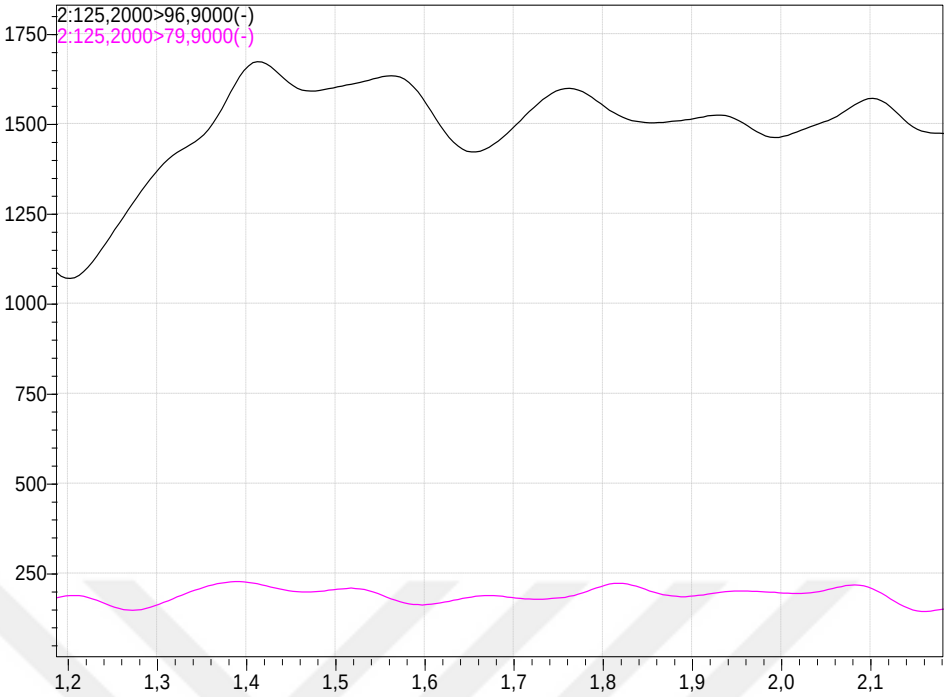


Şekil 33. 25 ng/mL standart çözeltisine ait LC kromatogramı

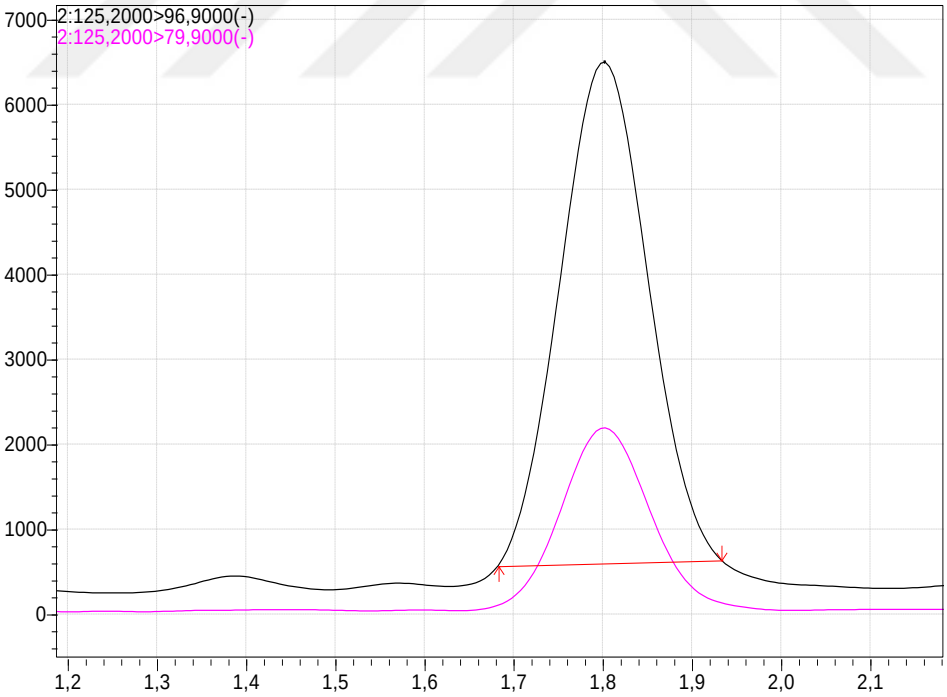
- ***Matriks etkisi***

Matriks etkisini değerlendirebilmek adına blank çeşme suyunun piki, EtS ve IS ilave edilen çeşme suyu numunelerinin pikleri ve atık su boş numune pikleri ile atık su spike numune pikleri karşılaştırıldı. Çeşme suyu kör numunelerinin belirli bir değere sahip olmaması matrikse bağlı girişim olmadığı anlamına gelmektedir. Atık su ile yapılan tüm hesaplamalar, blank atık suyu konsantrasyon ortalamaları çıkarılarak yapıldı.

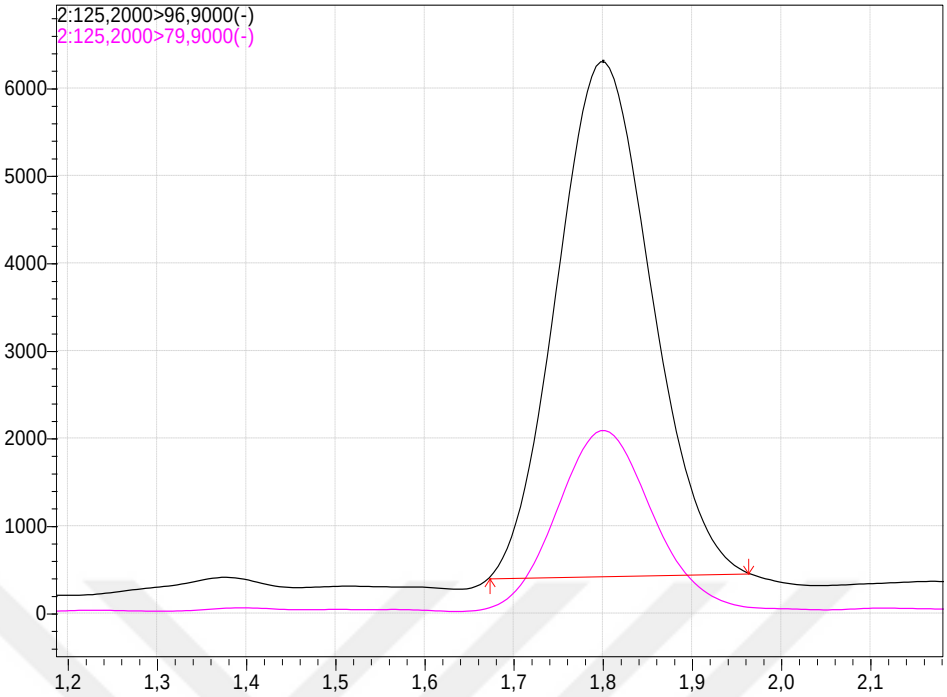
Çeşme suyu blank çözeltisine ait kromatogram Şekil 34'de, 15 ve 20 ng/mL konsantrasyonlu çeşme suyu spike çözeltilerinin kromatogramları ise sırasıyla Şekil 35 ve 36'da gösterilmiştir. Çeşme suyu blank ve spike edilen numunlerin ortalama konsantrasyon değerleri de Tablo XXI'de belirtilmiştir. Atık su blank çözeltisi kromatogramı Şekil 37'de, 10 ve 25 ng/mL atık su spike çözeltileri kromatogramları sırasıyla Şekil 38 ve 39'da gösterilmiştir.



Şekil 34. Çeşme suyu blank çözeltisine ait LC kromatogramı



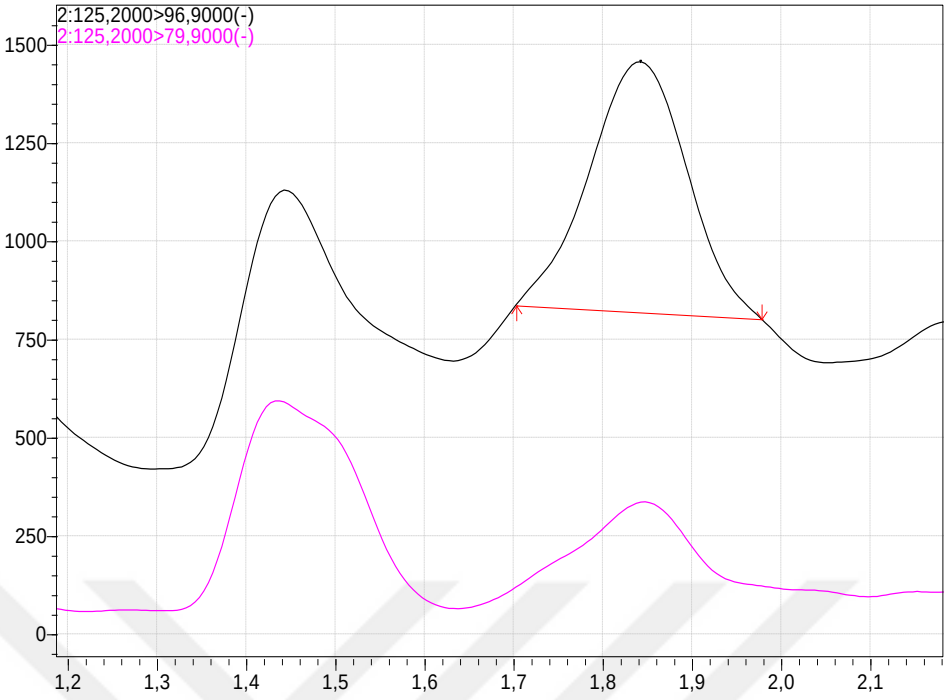
Şekil 35. 15 ng/mL çeşme suyu spike çözeltisine ait LC kromatogramı



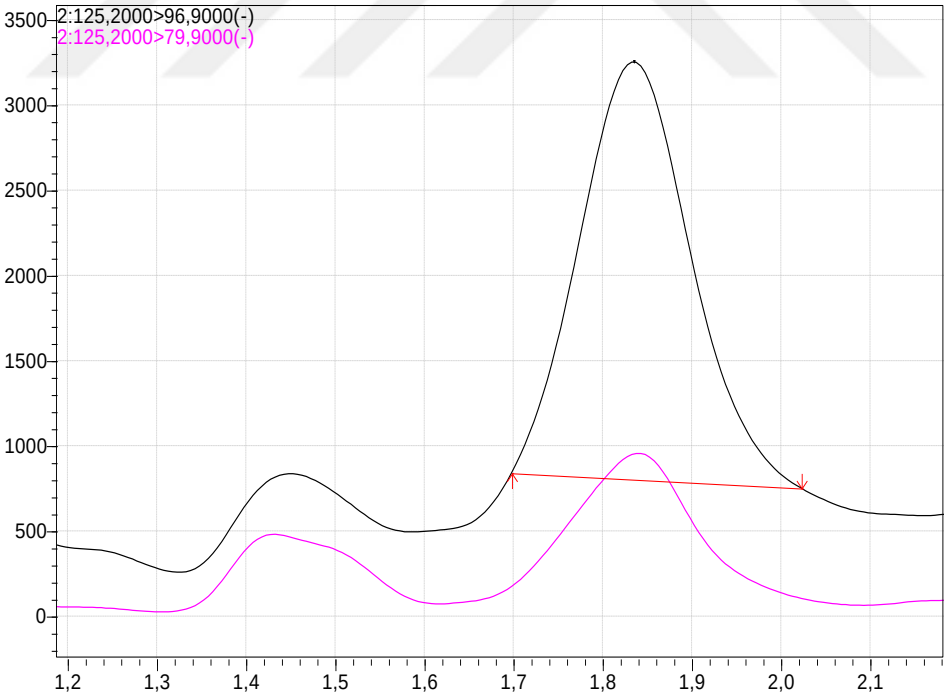
Şekil 36. 20 ng/mL çeşme suyu spike çözeltisine ait LC kromatogramı

Tablo XXI. Çeşme suyu blank ve spike edilen numunlerin ortalama konsantrasyon değerleri

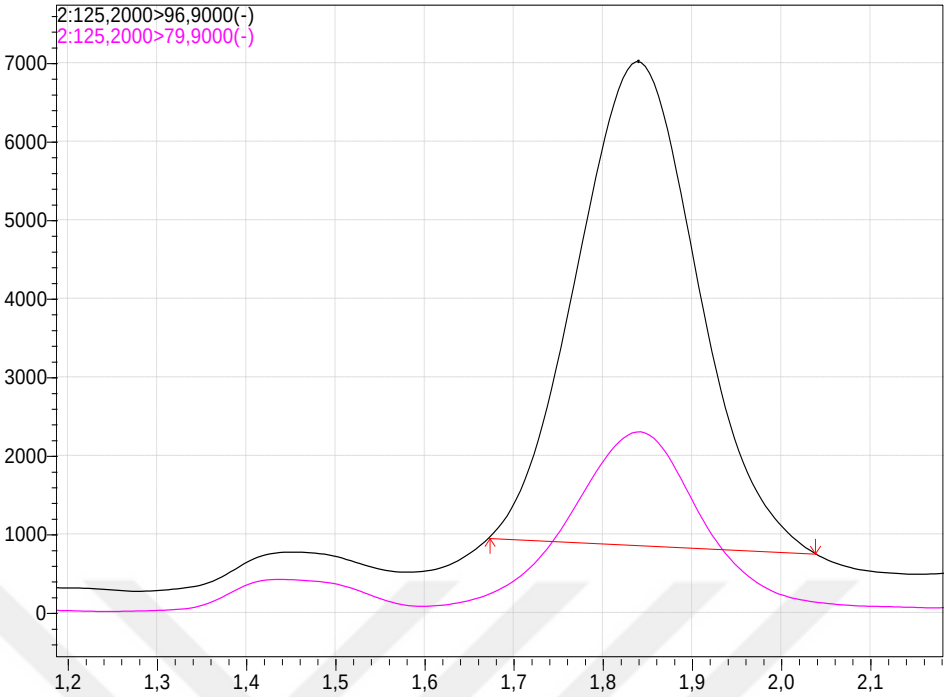
Çeşme Suyu Numunleri	**Ortalama Konsantrasyon (ng/mL)**
Blank	-
5 ng/mL	3,882
10 ng/mL	10,343
15 ng/mL	15,846
20 ng/mL	19,571
25 ng/mL	33,777



Şekil 37. Atık su blank çözeltisine ait LC kromatogramı



Şekil 38. 10 ng/mL konsantrasyonlu atık suya spike çözeltisine ait LC kromatogramı



Şekil 39. 25 ng/mL konsantrasyonlu atık suya spike çözeltisine ait LC kromatogramı

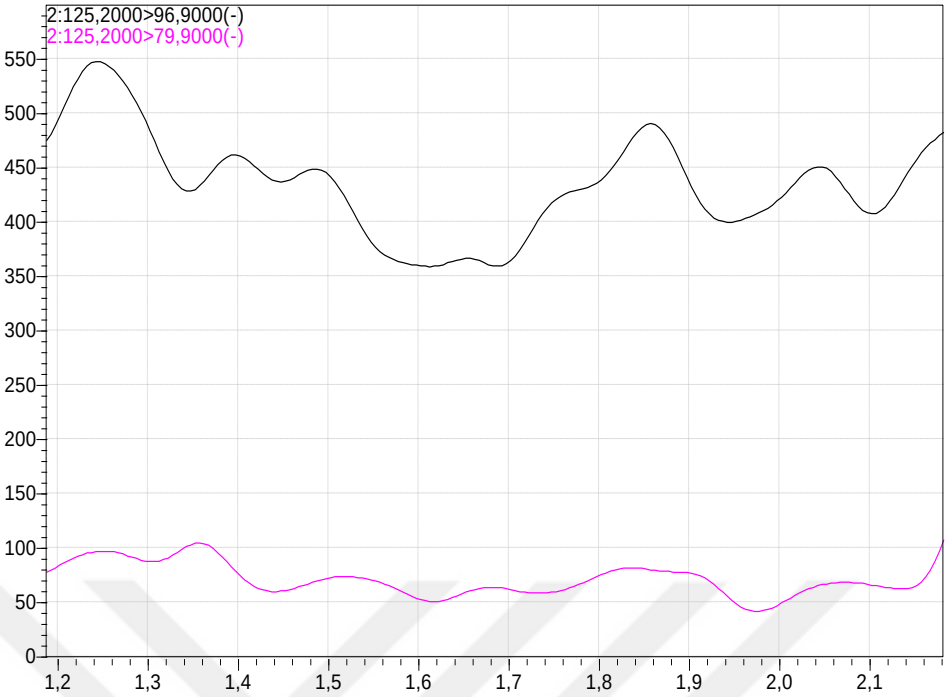
4.2. Tespit Limiti ve Tayin Limiti

LOD ve LOQ çalışmalarında kalibrasyon aralığının altında 0,1 ng/mL, 0,2 ng/mL ve 0,5 ng/mL konsantrasyonlu standart çözeltiler 3 tekrarlı ve 3 cihaz okumasıyla analiz edildi. Sonuçları Tablo XXII'de gösterildi.

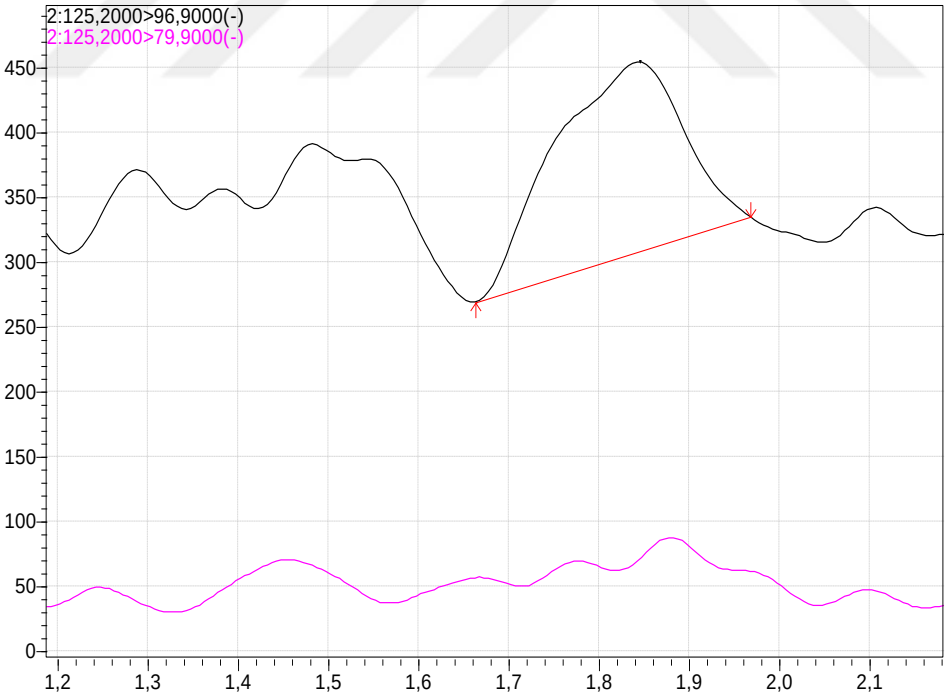
Tablo XXII. Tespit ve tayin limiti için numune analiz sonuçları

		0,1 ng/mL	**0,2 ng/mL**	**0,5 ng/mL**
1.tekrar	**1.ölçüm**	-	-	0,166
	2.ölçüm	-	-	0,25
	3.ölçüm	-	-	-0,061
2.tekrar	**1.ölçüm**	-	-	0,118
	2.ölçüm	-	-	0,273
	3.ölçüm	-	-0,114	0,367
3.tekrar	**1.ölçüm**	-	-0,014	-0,048
	2.ölçüm	-	0,161	0,451
	3.ölçüm	-	-0,118	0,512

LOD ve LOQ için seçilen 0,1 ng/mL, 0,2 ng/mL ve 0,5 ng/mL konsantrasyonlu EtS standart çözeltilerine ait kromatogramlar sırasıyla Şekil 40, 41 ve 42'de gösterilmiştir.



Şekil 40. 0,1 ng/mL standart çözeltisi LC kromatogramı



Şekil 41. 0,2 ng/mL standart çözeltisi LC kromatogramı

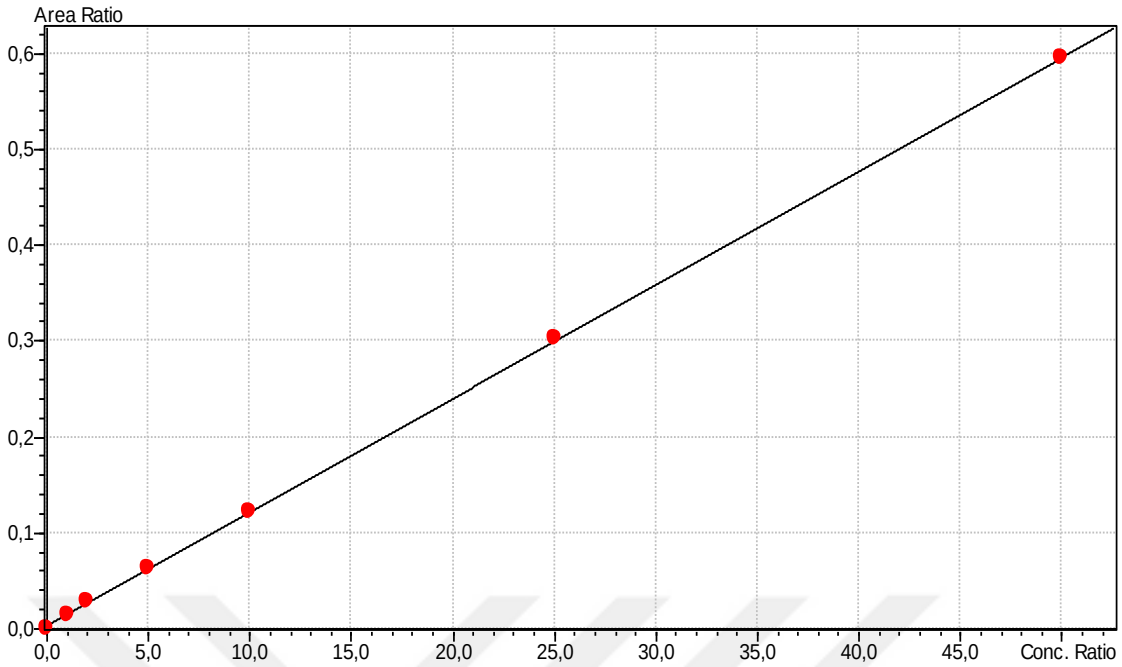


Şekil 42. 0,5 ng/mL standart çözeltisi LC kromatogramı

S/N formülleri ile yapılan hesaplamalar sonucunda EtS için LOQ değeri 0,5 ng/mL bulunurken LOD değeri 0,2 ng/mL olarak tespit edildi.

4.3.Doğrusallık

1-50 ng/mL olarak belirlenen kalibrasyon aralığı için blank, 1, 2, 5, 10, 25 ve 50 ng/mL olacak şekilde hazırlanan standart çözeltiler 3 tekrarlı olarak çalışıldı. Korelasyon katsayısı, doğrunun eğimi ve kesim noktası hesaplandı. Kalibrasyon eğrisi Şekil 43'de, denklem ve bilgileri Tablo XXIII'de gösterilmiştir. Kalibrasyon eğrisi EtS konsantrasyonunun EtS-d5 konsantrasyonuna oranına karşı, EtS'nin dedektör sinyalindeki değişikliklerin (alana) EtS-d5'in dedektör sinyalindeki değişiklikleri oranına bağlı oluşturulmuştur.



Şekil 43. 1-50 ng/mL aralığında EtS için kalibrasyon eğrisi

Tablo XXIII. 1-50 ng/mL aralığında EtS için kalibrasyon eğrisi denklemi, doğrusal aralığı ve korelasyon katsayısı

Doğrusal aralık	1-50 ng/mL
Denklem	0,0118475x + 0,00332710
Korelasyon katsayısı (r^2)	0,9992

4.4.Doğruluk

4.4.1. Kesinlik

Tekraredilebilirlik;

Doğruluk için tekraredilebilirlik çalışmaları gerçekleştirildi. Aynı laboratuvar, aynı analist, aynı matriks ve aynı cihazla 2, 10 ve 25 ng/mL konsantrasyonunda EtS ve IS içeren standart çözeltiler çeşme suyunda 6 tekrarla çalışıldı ve her konsantrasyon ölçümü 2 kez yapıldı. Ölçüm sonuçları Tablo XXIV' de gösterildi.

Tablo XXIV. 2, 10 ve 25 ng/mL konsantrasyonlu standart çözeltilerinin gün içi ölçüm sonuçları

Gerçek Değer	**2 ng/mL**	**10 ng/mL**	**25 ng/Ml**
1.Ölçüm	1,556	8,876	21,622
	1,618	9,365	21,914
2.Ölçüm	1,727	8,415	23,418
	1,431	8,813	24,325
3.Ölçüm	1,634	8,500	25,234
	1,405	8,478	24,652
4.Ölçüm	1,532	9,655	21,994
	2,131	9,672	21,366
5.Ölçüm	1,720	8,821	23,389
	1,498	9,456	23,529
6.Ölçüm	1,656	9,055	24,169
	1,792	8,844	23,220
Ortalama	1,642	8,996	23,194
Standart sapma	0,195	0,447	1,316
% RSD	11,856	4,967	5,675

Ölçüm sonuçlarında % RSD verileri, <%20 kriterini sağladığı için sonuçlar gün içi tekrarlanabilirlik açısından uygun bulundu.

Günler arası tekrarlanabilirlik çalışması amacıyla; çeşme suyuna spike yapılarak hazırlanan 10 ve 25 ng/mL konsantrasyonlu çözeltilerle, bir hafta sonra yapılan 6 tekrarlı 10 ve 25 ng/mL konsantrasyonlu çözeltilerin ölçümü Tablo XXV'de karşılaştırıldı.

Tablo XXV. Günler arası tekrarlanabilirlik sonuçları

Derişim	**10 ng/mL**		**25 ng/mL**	
	1.Gün	**8.gün**	**1.Gün**	**8.Gün**
Ortalama (n=6)	10,343	8,996	33,777	23,194
Standart sapma	0,462	0,447	0,598	1,316
%RSD	4,464	4,967	1,771	5,675

Günler arası tekraredilebilirlik sonuçları için tüm %RSD değerlerinin <%20 değerinin altında ve birbirleriyle uyum içinde olduğu gözlendi.

4.4.2.Gerçeklik

Geri kazanım;

Geri kazanım çalışmaları 2, 5,10 ve 25 ng/mL konsantrasyonlu atık suya ve çeşme suyuna EtS ve IS ilavesiyle hazırlanan tekraredilebilirlik örnekleriyle gerçekleştirildi. Ölçülen konsantrasyonlardan ortalama blank konsantrasyon değeri çıkarılarak geri kazanım hesaplandı. Atık su spike için yapılan geri kazanım değerlendirilmesi sonucu %80,4 -115,5 iken, çeşme suyu spike için %85,4-92,8 olarak belirlendi. 2 ng/mL atık su spike çözeltisi için sonuçlar Tablo XXVI'da, 5 ng/mL atık su spike için Tablo XXVII'de, 10 ng/mL için Tablo XXVIII 'de ve 25 ng/mL için Tablo XXIX'de gösterildi. Blank çözeltisi için konsantrasyon değerleri ise Tablo XXX'da verildi.

Tablo XXVI. 2 ng/mL atık su spike çözeltisi ölçüm ve geri kazanım sonuçları

2 ng/mL atık su EtS spike çözeltisi	**Ölçüm Sonucu (ng/mL)**	**Blanksiz konsantrasyon (ng/mL)**	**%GK**
1.tekrar	2,927	1,279	63,950
2.tekrar	2,820	1,172	58,600
3.tekrar	3,408	1,760	88,000
4.tekrar	3,067	1,419	70,950
5.tekrar	2,882	1,234	61,700
6.tekrar	4,443	2,795	139,750
Ortalama	3,258	1,610	80,492

Tablo XXVII. 5 ng/mL atık su spike çözeltisi ölçüm ve geri kazanım sonuçları

5 ng/mL atık su EtS spike çözeltisi	**Ölçüm Sonucu (ng/mL)**	**Blanksiz konsantarsyon (ng/mL)**	**%GK**
1.tekrar	8,112	6,464	129,280
2.tekrar	8,038	6,390	127,800
3.tekrar	7,905	6,257	125,140
4.tekrar	6,853	5,205	104,100
5.tekrar	5,337	3,689	73,780
6.tekrar	6,607	4,959	99,180
Ortalama	7,142	5,494	109,880

Tablo XXVIII. 10 ng/mL atık su spike çözeltisi ölçüm ve geri kazanım sonuçları

10 ng/mL atık su EtS spike çözeltisi	**Ölçüm Sonucu (ng/mL)**	**Blanksiz konsantarsyon (ng/mL)**	**%GK**
1.tekrar	15,397	13,749	137,490
2.tekrar	14,157	12,509	125,090
3.tekrar	11,685	10,037	100,370
4.tekrar	12,740	11,092	110,920
5.tekrar	11,697	10,049	100,490
6.tekrar	12,970	11,322	113,220
Ortalama	13,108	11,460	114,597

Tablo XXIX. 25 ng/mL atık su spike çözeltisi ölçüm ve geri kazanım sonuçları

25 ng/mL atık su EtS spike çözeltisi	**Ölçüm Sonucu (ng/mL)**	**Blanksiz konsantarsyon (ng/mL)**	**%GK**
1.tekrar	32,403	30,755	123,020
2.tekrar	30,468	28,820	115,280
3.tekrar	24,714	23,066	92,264
4.tekrar	24,652	23,004	92,016
5.tekrar	34,952	33,304	133,216
6.tekrar	35,915	34,267	137,068
Ortalama	30,517	28,869	115,477

Tablo XXX. Atık su blank ölçümleri

Blank Ölçümü	**Ölçüm sonucu (ng/mL)**	
	1.ölçüm	**2.ölçüm**
1.tekrar	1,239	0,842
2.tekrar	1,264	1,496
3.tekrar	2,210	1,890
4.tekrar	1,215	1,458
5.tekrar	1,298	1,186
6.tekrar	2,647	3,029
Ortalama	1,648	

Çeşme suyuna EtS ve IS ilavesiyle hazırlanan 10 ve 25 ng/mL'lik günler arası tekrarlanabilirlik çalışması numunelerinin geri kazanım sonuçları Tablo XXXI'de gösterilmiştir.

Tablo XXXI. 10 ve 25 ng/mL çeşme suyu spike çözeltilerinin farklı günlerdeki geri kazanımları

Konsantrasyon	**10 ng/Ml**		**25 ng/mL**	
	1.Gün	**8.Gün**	**1.Gün**	**8.Gün**
Ortalama	8,996	8,539	23,194	22,160
%GK	89,96	85,39	92,78	88,64

Tüm geri kazanım sonuçları %80-120 arasında bulunduğu için gerçeklik çalışmasına uygun bulunmuştur.

4.5.Stabilite

Stabilite çalışması için tekrarlanabilirlik çalışmalarında kullanılan çeşme suyuna EtS ve IS spike edilmesiyle hazırlanan 2, 10 ve 25 ng/mL konsantrasyonlu numuneler bir hafta LC-MS/MS cihazında bekletilerek tekrar analiz edildi. Tablo XXIV'daki çeşme suyu tekrarlanabilirlik çalışmasında gösterilen ortalama konsantrasyon değerleri ile bir hafta sonraki ölçüm sonuçlarının ortalaması karşılaştırıldı. Stabilite için bir hafta sonra yapılan analiz sonuçları Tablo XXXIII'de, karşılaştırma verileri ise Tablo XXXIII'de gösterildi.

Tablo XXXII. Bir hafta sonraki çeşme suyu tekrarlanabillirlik çalışmalarının tekrar analizi

Gerçek Değer	**2 ng/mL**	**10 ng/Ml**	**25 ng/mL**
1.Ölçüm	1,385	8,753	20,590
	1,961	8,468	20,999
2.Ölçüm	1,523	9,174	23,097
	2,101	8,353	23,697
3.Ölçüm	1,108	8,394	23,740
	1,640	8,373	23,719
4.Ölçüm	1,683	8,590	20,291
	1,534	8,909	19,925
5.Ölçüm	1,205	8,438	22,847
	1,279	8,424	23,226
6.Ölçüm	1,263	8,351	21,693
	1,794	8,242	22,100
Ortalama	1,540	8,539	22,160
Standart sapma	0,310	0,274	1,424
% RSD	20,114	3,205	6,425

Tablo XXXIII. Çeşme suyu spike 2, 10 ve 25 ng/mL numune sonuçlarının stabilite tablosu

	2 ng/mL	**10 ng/mL**	**25 ng/mL**
1. Ortalama	1,642	8,996	23,194
2. Ortalama	1,540	8,539	22,160
% Değişim	0,00102	0,00457	0,01034

Değişim değerlerinin %1'in altında bulunması numunelerin saklama koşulları bakımından kararlı olduğunu gösterdi.

5.TARTIŞMA

Evsel, endüstriyel, tarımsal ve diğer kullanımlar sonucunda kirlenen veya özellikleri değişen suların oluşturduğu atık su, bu kullanımlar dışında şehir cadde ve sokaklarındaki yağışların yüzey altı sularına dönüşmesiyle gelen suları ve maden ocaklarında, cevher hazırlama tesislerinde kullanılan suları da kapsamaktadır.

Dünya'daki su kaynaklarının sınırlı olması ve insanın doğaya verdiği zararla meydana gelen küresel ısınma sorununun suyu daha da sınırlaması sebebiyle büyük hacim kaplayan atık suların arıtımı önem arz etmektedir. Atık su tesislerinde yapılan arıtma işlemleri sonucu geri kazanılan sular; tarım ve yeşil alan sulamalarında, yangın söndürme, yol yıkama ve tuvalet rezervleri gibi kentsel kullanımda, su zenginleştirmede, yer altı sularını beslemede, endüstride ve yapay gölet oluşturmada kullanılmaktadır. Bunlara ek olarak yüzey sularında toksik etki yapan eser miktardaki antibiyotik, endokrin bozucu madde, deterjan kalıntısı, antidepresanlar ve diğer sentetik organikleri tespit etmek için yapılan analiz çalışmaları atık su tabanlı çalışmalara örnektir (105, 144).

2000'li yılların başından itibaren atık su çalışmaları hız kazanmış ve halk sağlığını ilgilendiren çalışmalara imza atılmıştır. İlaç, yasa dışı madde, endokrin bozucular ve pestisitlerin analizi için veri sağladığı belirtilerek, bu bileşiklerin etken maddeleri yardımıyla kullanımının zamana karşı izlenmesi çalışmalarıyla atık su bazlı epidemiyoloji tanımı oluşturulmuştur. 2001 yılında ilk kez Daughton tarafından önerilen atık su bazlı epidemiyolojisi 2005 yılında İtalya'da Zuccato ve ark. tarafından kokain araştırmasıyla ilk uygulama geçirilmiştir. 2008 yılında Zuccato ve ark. amfetamin, metamfetamin, kannabinoid ve MDMA gibi yasa dışı ilaçların tüketimini araştırarak çalışmaları genişletmişlerdir (98,99,100). Sıvı kromatografi ve kütle spektrometri sistemi yasa dışı maddeleri ve metabolitlerini atık sularda çok düşük konsantrasyonda tespitine imkân sağladığı için yöntem geliştirmede bu sisteme yer verilmiştir (145).

Avrupa ülkelerinde kullanılmaya başlanan atık su bazlı epidemiyoloji yöntemi, evrensel bir sorun olan madde kullanımıyla mücadele de yeni bir döneme geçiş fırsatı sunmuştur. Anket sonuçları, tedavi başvuruları, emniyet verileri, genel toplum araştırmaları ve kullanıma bağlı hastalık istatistikleri gibi geleneksel yöntemler madde kullanımı için önemli veriler oluşturmakla birlikte, belirli bir kesimi temsil etmesi, belirli aralıkla yinelenmesinin zorluğu ve anket gibi cevabı kişi insiyatifine kalması gibi dezavantajlar sebebiyle doğrulayıcı bir yöntem ihtiyacı doğmuştur. Atık su bazlı epidemiyoloji; bu gereksini karşılayan, toplumun geneline hitap eden gerek küçük bölgelerde gerekse ülke çapında zamana bağlı madde kullanımının izlenebildiği ve popülasyonun büyüklüğünün belirlenerek konsantrasyon üzerinden geri hesaplamalarla kişi başı tüketimin dahi hesaplanabildiği modern bir yaklaşımdır (145). Çalışmaların yaygınlaşmaya başlamasıyla, elde edilen verilerin birbiriyle karşılaştırılabilmesi için 2010 yılında yasadışı uyuşturucu analizi üzerine çalışan Avrupa ülkeleri uluslararası çalışmalar yürütmek amacıyla SCORE grubu oluşturmuş ve SCORE'un yasa dışı madde kullanım verilerini EMCDDA ile paylaşmasıyla daha geniş bir Avrupa ağı kurulmuştur (144). 2011 yılında Thomas ve ark. tarafından 19 Avrupa şehrini kapsayan ilk geniş çaplı atık su bazlı epidemiyolojisi yapılmıştır. Yapılan çalışmada 19 şehirde eş zamanlı ve tekdüze prosedürle çalışılarak 1 hafta boyunca toplanan numunelerde kokain, amfetamin, ekstazi, metamfetamin ve esrarın biyobelirteçleri analiz edilmiş ve konsantrasyonlardan tüketim miktarı hesaplanarak laboratuvarlar arası karşılaştıma yapılmıştır (146). 2012 yılında 11 Avrupa ülkesinde 23 şehri kapsayan, 2013 yılında 21 ülkede 42 şehri kapsamayan çalışma literatürde yerini almıştır. Çalışmada beş yasadışı ilacın (kokain, amfetamin, ekstazi, metamfetamin, esrar) metabolitleri analiz edilerek mekânsal ve zamansal değişim gözlenmiştir (147).

Çok karmaşık kimyasal karışım içeren atık su içersindeki insan metabolitleriyle toplulukların yaşam tarzıyla ilgili farklı bilgiler sağlar. İlk literatür çalışmalarında yasa dışı maddelerin izlenmesi çalışmalarının yanı sıra, gelişen çalışmalarda alkol, tütün gibi insan sağlığını ve

etkileriyle sebep olduğu suçlarla toplum sağlığını tehlikeye atan, ölüme sebep olan ve diğer maddelerle birlikte kullanıldığında toksisiteyi arttıran yasal psioktif maddelerin tüketim tahmini de yer almaya başlamıştır. Alkolün yasal olması, eğlence amacıyla tüketiminin yaygınlaşması ve trafik denetimleri dışında denetlebilirliğinin bulunmaması onu daha da zararlı hale getirmiş ve adli olgularda üzerine en çok araştırma yapılan maddelerden biri yapmıştır. Diğer maddelerle kullanımında toksisiteyi arttırması, özellikle trafik kazası olmak üzere birçok suça azmettirme gibi sebeplerle kişi ve halk sağlığı üzerinde oluşturduğu olumsuz etkiyi azaltmak, ortadan kaldırmak için WBE çalışmalarında yerini almış maddelerden biridir. Alkolün WBE çalışmalarıyla elde edilen verileri yardımıyla zamansal ve mekansal değişim gözlemlenip, tüketimi tahmin edilebilir.

Kaçakçılık, yasa dışı üretim, stoklama durumları alkol tüketim tahmininin satış istatistikleri üzerinden değerlendirilmesini etkileyebileceği için WBE'de alkol çalışması ayrı bir önem arz etmektedir. Bu amaçla yapılan çalışmalarda etil alkolün kullanımını gösterebilecek belirteçler arasında etil sülfat (EtS), etil glukronid (EtG), fosfatidiletanol, yağ asidi etil esterleri yer almakla birlikte atık suda en kararlı biyobelirtecin EtS olduğu birçok çalışmada belirtilirken sonrasında geliştirilen atılım faktörü ile yapılan hesaplamalarla alkol tüketim miktarının tespit edildiği çalışmalar literatürde yerini almıştır (111).

EtS ve EtG kararlılığıyla ilgili çalışma 2006 yılında Wrust ve ark. tarafından EtS ve EtG belirteçlerinin bozunma ve atılım farklılıklarını belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. İç standart olarak EtG-d5 ve EtS-d5 kullanılarak LC-MS/MS cihazıyla analiz yapılmıştır. Yapılan çalışma iki kısıma ayrılmıştır. (a) Ortalama yaşın 34,1 yıl, ortalama oral alımın 0,2 g/kg olduğu altı sağlıklı gönüllü tarafından gerçekleştirilen 9 içme deneyinde 74 idrar örneği toplanmıştır. (b) 36 madde bağımlısı hastadan rehabilitasyon sürecinde 98 idrar örneği alınmıştır. EtG'nin 20,6 saatte, EtS'nin ise 21,2 saatte idrarda belirlenme sınırına ulaştığı ve çalışma sonunda maksimum seviyeye ulaşma sürelerinin EtG için 2,8, EtS içinse 2,1 saat olduğu belirlenmiştir.

Bir gönülleden belirlenen etanol atılımı %0,022 olarak tespit edilmiştir. İncelenen 98 idrar örneğinin 27'sinin EtS, 20'sinin EtG için pozitif çıkması ve diğer tüm veriler ışığında EtS'nin etanol takibi için daha uygun belirteç olduğu, hasssiyeti arttırmak amacıyla EtG ile desteklenebileceği kanaatine varılmıştır. Çalışma sonucunda EtS ve EtG arasında korelasyon katsayısı 0,87 ($P<0.001$) bulunurken EtS-100 (100'lük kreatinin ile standartlaştırılmış) ile EtG-100 arasında korelasyon katsayısı 0,84 olarak belirlenmiştir. EtG için LOD değeri 0,5 mg/L iken EtS için 0,11 mg/L tespit edilmiştir. Üç hafta boyunca EtS ve EtG'nin pozitif olan üç örneği oda sıcaklığı, +4 ˚C ve -20 ˚C olmak üzere farklı sıcaklıklarda analiz edildiğinde 18 sonucun 17'sinde stabilite için standart sapmanın %10'nun altında olduğu gözlenmiştir. Hastalarda yoksunluğun izlenme çalışmalarında ise EtS ve EtG arasında korelasyon katsayısı 0,838 iken EtS-100 ile EtG-100 arasında korelasyon katsayısı 0,823 olarak belirlenmiştir (109). Hoiseth ve ark. 2008'de idrarda alkol kullanım göstergesi olan etanol, EtS, EtG ve HTOL/5-HIAA 'nın duyarlılıklarını ve belirlenme sürelerini karşılaştıran ilk kontrollü deney çalışmasını gerçekleştirmiştir. 10 gönüllü sağlıklı erkek bireye belirli miktarda etanol verilerek, etanol ve belirteçlerin belirlenme süresi karşılaştırıldığında, son pozitif idarar örneğinden hesaplanan tespit süresi etanol için 5,9, EtG için 30, EtS için 32, HTOL/5-HIAA içinse 9,8 saat olarak belirlenmiştir. HTOL/5-HIAA'nın etanole göre 5 saat daha uzun, EtG ve EtS'nin ise 25 saat daha uzun olduğu belirlenmiş ve HTOL/5-HIAA 'nın EtS ve EtG'ye nazaran kısa bir algılama alanı olduğu görülmüştür. EtG ve EtS'nin atılımı süreleri karşılaştırıldığında EtG'nin atılma faktörü %0,019 iken EtS'nin %0,011 olarak tespit edilmiştir. Çalışma sonunda idrardaki etanol için LOD değeri 0,005 g/L olarak tespit edilirken üzerindeki değerler pozitif olarak bildirildi (69).

WBE, 2008'den beri alkol ve nikotin tüketimi için tamamlayıcı izleme yaklaşımı oluşturulurken, alkol için ilk çalışma 2011 yılında Reid ve ark. tarafından yapılmıştır. 25 günlük dönemde toplanan örneklerde EtS ve EtG analiziyle gerçekleştirilen alkol tüketim tahmini

çalışması sonuçları satış istatistikleriyle karşılaştırılmıştır. EtS ve EtG'nin kantitatif ölçümü için yeni bir iyon değişim aracılı kromatografik yöntemle gerçekleştirilmiş ve kromatografik retansiyon süreleri EtG için 1,55 dakika, EtS için ise 1,87 dakika olarak tespit edilmiştir. Kantitasyonun alt sınırları (LOQ) EtS için 8 nM (S⁄N 27,7, CV =%4,6) ve EtG için 9 nM (S⁄N 11,8, CV =%20) belirlenmiştir. EtS 16-246 nm aralığında ölçülebilir ve kanalizasyon suyunda 1 hafta bozunmadan kararlı yapıda bulunurken, EtG'nin yaklaşık %50'sinin bozunduğu gözlemlenmiştir. Satış istatistikleriyle yapılan karşılaştırmada EtS miktarının (4900-7800 kg/gün) istatistiklerdeki miktarla (6,750 kg/gün) tutarlı olduğu gözlenmiştir (110).

2014 yılında Barselona'da Mastroianni ve ark. alkolün oluşturduğu sağlık sorunları ve sebep olduğu ölümlerin artışı dolayısıyla alkol kullanımının takibi ve buna bağlı uygun çözümlerin geliştirilmesi adına yaygınlaşmaya başlayan atık sudan EtS belirteci ile analiz çalışmalarına bir diğerini daha ekleyerek literatürde yer edinmişlerdir. İyon çifti sıvı kromatografisi ve MS'e dayanan yöntem optimize ederek analizler gerçekleştirilmiştir. Kişi başına ortalama saf alkol tüketimi 18 mL/gün belirlenirken, kalibrasyon aralığı 0,1–200 µg/L, regresyon katsayısı; 0,9993, 10 ve 100 µg/L numunelerinin 5 tekrarlı çalışmalarının %RSD'si 1.5/2.3, LOD değeri 0,02 µg/L, LOQ değeri ise 0,07 µg/L olarak hesaplanmıştır (111). 2015 yılında ise Rodriquez ve ark. kokain ve alkol tüketimini tahmin etmek ve karşılaştırmak amacıyla İspanya ve İtalya'nın şehirlerinde 3 yıllık izleme gerçekleştirmişler ve biyobelirteç analizi için LC-MS/MS ile ölçüm yapılıp hesaplamalarda düzeltme faktörü kullanmışlardır. Santiago'da 13,6 L/1000 kişi iken Milano'da 5,1 L/1000 kişi alkol kullanımı hesaplanmıştır. EtS'nin atılım oranı %0,012 olarak hesaplanırken, etanol kütlesinin EtS kütlesine oranının atılım oranına bölünmesiyle düzeltme faktörü 3047 olarak hesaplanmıştır (113).

Booagaerts ve ark. 2016 yılında Belçika şehirlerinde 8 atık su tesisinde 2013-2015 yılları arasında alkol tüketiminin zamansal ve emkansal değişimini izlemek amacıyla yaptıkları WBE çalışmasında EtS ve EtS- d5 kullanılarak LC-MS/MS cihazıyla analiz yapmıştır. Kalibrasyon

eğrisi oluşturmak için 1,5-100 µg/L aralığında yedi nokta seçilmiş ve her numuneye 50 µg/L EtS-d5 ilave edilmiştir. Kalibrasyon için r^2>0.99 olduğunda doğrusallık kabul edilmiş ve kalibratörlerin geri hesaplanan, konsantrasyonların %85-115 arasında doğruluğa sahip olduğu belirlenmiştir. Kalibratörlerle belirlenen yöntem hassasiyeti için rölatif standart sapma %10'un altında, LOQ değeri kallibrasyon eğrisinin en düşük noktasıyla 1,5 µg/L olarak hesaplanırken, geri kazanımın %80 ila 120 arasında olduğu belirlenmiş ve rölatif standart sapma %20 olarak tespit edilmiştir. Belçika'da 15 yaş üstü için yılda kişi başına 5,6 L saf alkol tüketimi olduğu hesaplanmıştır. Kentlerde kırsala nazaran daha çok alkol tüketildiği ve hafta sonu eğlence mekanlarında doluluğun ve dolayısıyla tüketimin atış gösterdiği de sonuçlara kaydedilmiştir (115).

Maria Andres Costa ve ark. 2016 yılında, yeni iyon çifti LC-MS/MS ile etil sülfat tayin etme metodolojisi geliştirmek için Valencia'da 4-20 Mart 2014'de Fallas festivalini kapsayan süreçte WBE çalışması yapmıştır. 0,999 değerinden düşük bir r^2 değeri ile iyi bir doğrusallık ve izotopik iç standart kullanımıyla düşük matriks etkisi elde edilmiştir. EtS konsantrasyonu 1,46 ila 19,85 µg/L arasında değişkenlik gösterirken, alkol tüketimi 1,07 ila Fallas festivali süresince en yüksek tüketim olan 56,11 mL/gün arasında değişkenlik göstermiştir. EtS öncü iyonu 125 m/z ve 97 m/z'e karşılık gelen bir ürün iyonu [HSO4], 80 m/z [SO3]. EtS-d5 öncü iyonu 130 m/z ve 98 m/z'de karşılık gelen ürün iyonları [DSO4] ve 80 m/z [SO3]. EtS ve EtS-d5 için alıkonma süresi 3,805 dakika olarak belirlenmiştir. Kalibrasyon aralığı 0,1- 500 µg/L olacak şekilde 9 nokta seçilmiş, her nokta üç kez enjekte edilmiştir. Algılama limiti (LOD) ve miktar tayini limiti (LOQ) için deneysel olarak azalan enjeksiyon yöntemi ile belirlenmiştir. Sinyal-gürültü oranı ile belirlenen LOD ve LOQ'u; (S / N) >3 ve 10 sırasıyla LOD için 0,1 µg/ L ve LOQ için 0,3 µg /L değerinde bulunmuştur. Yöntemin gün içi ve günler arası hassasiyeti 3 konsantrasyonda (1, 50 ve 100 µg/L) aynı gün ve 5 farklı günde 5 kez tekrarla çalışılmış, RSD olarak ifade edilen kesinlik sonuçları gün içi kesinlik için %2,81 ve günler arası kesinlik için

%2,97 olarak hesaplanmıştır. Matris etkisi, ultra saf su ve 0,1–500 µg/L arasında değişen konsantrasyonlardaki atık su örnekleriyle çalışılmış ve hesaplama sonucu %73,02 bulunmuş, EtS'nin sinyal baskılanması giderilmesi için EtS-d5 iç standart ilavesi yapılmıştır (116).

2016 yılında Yunanistan'ın Lesvos adasında farklı büyüklükteki üç kanalizasyon arıtma tesisinden, turistik olmayan sezonda toplanan örneklerde 22 kötüye kullanım ilacı metabolitleri ve alkol metaboliti EtS varlığı araştıran ve geri hesaplamayla tüketim tahmini amaçlayan Gatidou ve ark., çalışma sonunda kokain (COC), benzoilekgonin (BE), MDMA, 11-nor-9-karboksi-delta-9-tetrahidrokanabinol (THC-COOH) ve EtS varlığını tespit edebilmiştir. Lesvos'ta alkol tüketiminin 1,7 ile 11.2 mL/gün arasında değiştiği belirlenmiş ve A tesisi için kişi başına ortalama tüketim 5,4 mL/gün iken, B tesisi için 3,4 mL/gün olarak hesaplanmıştır. DSÖ ile karşılaştırıldığında verilerin daha yüksek olduğu bunun satış istatistikleri ve nüfus sayımındaki belirsizliklerden kaynaklandığı şeklinde yorumlanmıştır. EtS için LOQ değeri 1700 ng/L olarak belirlenmiştir (117). Aynı yıl Ryu ve ark. 11 ülkenin 20 şehrinde alkol tüketim ölçümü gerçekleştirmek adına LC-MS/MS ile yöntem geliştirmiştir. Kalibrasyon eğrisi 2–200 ng/mL aralığında seçilen 7 nokta ile oluşturulmuş ve çalışma sonucunda kişi başına düşen ortalama tüketim 6,4 ile 44,3 L/gün/1000 arasında değişmektedir (118).

2018 yılında Foon Yin Lai ve ark. Avustralya'da alkol ve nikotin tüketiminin zamansal ve mekansal değişimini izlemek amacıyla WBE çalışması yapmıştır. Matriks etkisini yok etmek amacıyla EtS-d5 iç standardı eklenmiştir. Farklı konsantrasyonlarda (0,5-50 µg/L; IS 10 µg/L) kalibrasyon çözeltileri ile birlikte, numunelerdeki hedef analitler tanımlanmış ve sıvı-kromatografi ile birlikte kütle spektrometresi kullanılarak hesaplanmıştır, direkt enjeksiyon yoluyla sisteme enjekte edilerek analiz gerçekleştirilmiştir. Tespit ve tayin limiti, sırasıyla 3 ve 10 sinyal/gürültü oranını gösteren kimyasalın en düşük standardında hesaplanmıştır. EtS için LOQ değeri 1 µg/L olarak hesaplanmıştır. İç standartın geri kazanımı etil sülfat-D5 için ortalama %80, RSD değeri %12 olarak tespit edilmiştir. EtS için gün içi kesinlik %RSD

değerleri; n=2 için %5,48, n= 4 için %2,12 belirlenirken, günler arası kesinlik için %RSD değeri 2 gün sonraki için %4,12 bulunmuştur. EtS için matriks-spike geri kazanımı %102 iken %RSD değeri %5,3 olarak hesaplanmıştır. r^2 değeri kesirli polinomdan 0,91 olarak ölçülmüştür. Tüketim hesaplamalarında atılım oranı %0.012 olarak kullanılmıştır. Ülke çapında, kişi başına günlük ortalama tüketimin (15-79 yaş arası) yaklaşık 2,5 sigara ve 1,3-2 standart içki (hafta içi-hafta sonu) alkol olduğu tahmin edilmiştir (121).

2019 yılında Zheng ve ark. WBE çalışmalarında alkol ve tütün tüketimi hesaplanmasındaki belirsizlikler ile ilgili bir araştırma yapmıştır. Biyobelirteçlerin stabilitesi ve atılım oranlarının standartlaştırılabilmesi gerekliliği sonucuna ulaşmışlardır. Tüm WBE çalışmalarında olduğu gibi, analitik belirsizliği azaltmak için laboratuvarlar arası yöntem validasyonu önerilmiştir. Alkol tüketimi hesaplamalarında EtS için atılım faktörünün; Wrust ve ark. tarafından 4 erkek ve 2 kadından elde ettiği %0,0218 atılım oranının, Høiseth ve ark. nın sağlıklı erkeklerden elde ettiği %0,011 oranının, Jatlow'un 11 erkek ve 7 kadından ulaştığı 0,01-0,04 değeri olmak üzere 3 çalışmadan yararlanılarak yapılması ve Rodrıguez-Avarezlvarez ve ark., nüfus ağırlıklı bir ortalama kullanarak bulduğu %0,012 oranının kullanılması belirsizlikler için en önemli sebep gösterilmiştir. Bu çalışmalarda ağır epizodik içmeyle ilişkili sağlık bozuklukları nedeniyle atılımın değişebileceği göz önünde bulundurulmadığından ve bazı bölgelerdeki ağır epizodik alkol tüketicilerinin yüzdesinin arttığına dikkat çekilmiş ve atılım profili için daha çok farmokinetik veriye ihtiyaç duyulduğu belirtilmiştir (123). Zheng ve ark. 2020 yılındaki makalelerinde Avustralya'da uzun süreli alkol ölçümü çalışmış, direkt enjeksiyonla LC-MS/MS'e verdiği numunlerle kalibrasyon aralığını 0,05 µg/L- 100 µg/L olarak belirlemişlerdir. Çalışılan tüm numuneler için %RSD değeri %8,2 olarak hesaplanmıştır. EtS için LOQ değeri 0,5 µg/L bulunmuştur. Tüketim tahmini sonucu 2012-2017 yılları arasındaki tüketim 16,1 ±4,9 ile 19,6 ±4,6 µg/L arasında bulunmuştur (148).

2019 yılında Chen ve ark. Avrpa'da yaygın olarak kullanılan WBE çalışmalarının ABD'de azlığından yola çıkarak birden fazla Amerika şehrinde uzun süreli ve eş zamanlı gerçekleştirilen ilk çalışmayı yaparak, üç ABD topluluğunda alkol ve nikotin tüketim eğilimlerini atıksu bazlı epidemiyoloji ile belirlemeye çalışmışlardır. EtS için iç standart eklenen numuneler doğrudan enjeksiyonla LC-MS/MS sisteminde analiz edilmiştir. Bildirilen tüm konsantrasyonlar 0,01 ila 50 ng / mL arasındaki konsantrasyonlarda 5 ila 8 veri noktası içeren eğrilere göre belirlenmiştir. Korelasyon katsayısı (r^2) için kabul kriteri ≥0,99 olarak belirlenmiştir. Ortalama geri kazanım değeri %73 ila %109 arasında hesaplanmıştır. LOD ve LOQ değerleri 3 ila 10 arasındaki sinyal/gürültü oranına göre belirlenmiştir. Metot belirleme limiti EtS için 73 ng/L olarak hesaplanmıştır. Çalışma sonucunda EtS konsantrasyonu 1,6- 25,1 µg/L, geri hesaplama sonucunda alkol tüketimi günlük olarak 5,7-92,9 mL/gün ortalama 29,4 mL/gün olarak hesaplanmıştır ve bulunan sonuçlar daha önce yapılan 2014 Mastrionni 18 mL/gün (111), 2014 Rodriquez 16,3 mL/gün (112), 2016 Andres Costa 1,1-56,1 mL/gün (116), 2016 Booagerts 5,3-33,3 mL/gün (115), 2016 Ryu 20,6 mL/gün (118) ve 2016 Gatidou 5,3 mL/gün (117) çalışmaların sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır (108).

Gao ve ark. 2020 yılında yayınladıkları makalelerinde Çin'in bazı büyük şehirlerinde WBE ile alkol ve tütün tüketim tahmini çalışması yapmış ve sonuçları DSÖ verileriyle kaşılaştırmıştır. Çalışmada EtS numuneleri iç standart ilave edilerek direkt enjeksiyonla LC-MS/MS sisteminde analiz edilmiştir. 2014 yılında EtS konsantrasyonu 3,1±1,4 µg/L olarak tespit edilirken 2016 yılında 5,7 ±4,0 µg/L şeklinde tespit edilmiştir. 2014 yılında yapılan geri hesaplamayla alkol tüketimi 4,7 ±3,0 mL/kişi/gün olarak hesaplanırken, 2016 yılında 8,1±7,0 mL/kişi/gün olarak belirlenmiştir. Validasyon parametreleri çalışmaları sonucunda EtS alıkonma zamanı 3,11 dk iken EtS-d5 için 3,10 dk belirlenmiştir. EtS 1 için iyon m/z oranları Q_1: 125,1, Q_3: 97,0, EtS 2 için iyon m/z oranları Q_1: 125,1, Q_3: 80,0 ve EtS-d5-1 için iyon m/z oranları Q_1: 130,0, Q_3: 98,0, EtS-d_5-2 için iyon m/z oranları Q_1: 130,0, Q_3: 80,0 ölçülmüştür. EtS için LOD değeri 0,20

µg/L, LOQ değeri 0,50 µg/L olarak tespit edilmiştir. Tüketim için geri hesaplamalarda düzeltme faktörü 3042, alkol yoğunluğu 0,789 g/mL kabul edilmiştir (107).

2020 yılında Brandeburová ve ark. Slovakya'da psikoaktif maddeler ve alkol tüketim çalışmasında direkt enjeksiyon yöntemiyle LC-MS/MS sisteminde gerçekleştirdiği geri kazanım ve tekrarlanabilirlik için 30 µg/L konsantrasyonunda 3 tekrarla çalışmıştır ve sonucunda geri kazanımı %101 olarak hesaplamıştır. Tekrarlanabilirlik için tüm RSD'ler %14'ten düşük bulunmuştur. LOQ değeri içinse sinyal/gürültü oranının 10'a karşılık gelen değeri seçilmiştir ve EtS için 0,18 µg/L bulunmuştur (149).

Yaptığımız literatür taramasına göre ülkemizde atık suda EtS analizi, EtS analizi ile alkol tüketim eğilimin izlenmesi, analiz sonucundaki verilerle alkol tüketiminin geri hesaplanabilmesine ait çalışmalara rastlanmamıştır. Bir bölgede ya da ülke genelinde alkol tüketimini gerçek zamanlı izlemek ve veriler elde etmek için hızlı ve geçerliliği kanıtlanmış bir çalışmaya ihtiyaç duyulmuştur. Alkolün EtS biyobelirteci ile atık suda tayin edilmesi alkol tüketiminin zamana ve mekâna bağlı değişiminin izlenmesine imkân vererek literatüre katkı sağlayacak ve satış istatistikleri, anket sonuçları gibi uzun vadeli verilere karşı ucuz, hızlı ve güvenilir sonuçlar veren kaynak olacaktır. Bu çalışmanın amacı, adli tıpta büyük yeri olan alkolün atık suda EtS biyebelirteci yardımıyla tayini için yöntem geliştirmek ve yöntemin geçerliliğinin sağlanması için validasyon parametrelerini açıklamaktır. EtS için uygun mobil faz, analitik kolon, internal standart, akış programı seçilerek LC-MS/MS'de analiz yöntemi geliştirilmiştir.

Yöntemde doğusallık çalışması için kalibrasyon aralığı 1-50 ng/mL belirlenmiş ve kalibrasyon eğrisinin korelasyon kasayısı (r^2) 0,992 bulunmuştur. LOD ve LOQ değerleri, doğrusallık aralığının altında seçilen konsantrasyonlarda 9 tekrarlı çalışma yapılarak sinyal/gürültü oranından hesaplanmıştır. LOD değeri 0,2 ng/mL, LOQ değeri 0,5 ng/mL bulunmuştur. Doğruluk çalışmalarında kesinlik için gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışmaları

gerçekleştirilmiştir. Çeşme suyuna EtS standardı ve IS ilave edilerek 2, 10 ve 25 ng/mL olmak üzere düşük, orta ve yüksek konsantrasyonda hazırlanan numunelerde %RSD değerleri hesaplanmıştır. 2 ng/mL için %RSD değeri 11,856, 10 ng/mL için 4,967 ve 25 ng/mL için 5,675 bulunmuştur. Doğruluk çalışmalarında gerçeklik için çeşme suyu ve atık su matriksine EtS standardı ve IS spike edilerek geri kazanım hesaplanmıştır. Çeşme suyu için çalışılan tekrarlanabilirlik çözeltileri (2, 10 ve 25 ng/mL numuneleri) için geri kazanım çalışmaları %85,4-92,8, atık su için çalışılan 2, 5, 10 ve 25 ng/mL konsantrasyonlu numunler içinse %80,4-115,5 arasında bulunmuştur. Stabilite değerlendirmesi için 1 hafta sonra tekrarlanabilirlik örnekleri tekrar analiz edilerek değişim değeri hesaplanmış ve 2, 10 ve 25 ng/mL numuneleri için sırasıyla %0,00102, 0,00457 ve 0,01034 bulunmuştur. Belirlenen EtS konsantrasyonundan (28,87 µg/mL) yapılan örnek hesaplama sonucu günlük tüketim $13x10^{-5}$ mL/gün/kişi bulunmuştur.

Yöntemde numuneler LC-MS/MS sistemine verilmeden önce şırıngayla filtreleme ön işleminden geçirilmesiyle kolon kirliliğin önlenmesi ve numune zenginleştirme amaçlanmıştır. Çalışma sonuçlarımızın parametreleri yukarıda detayları verilen literatür çalışmaları ile karşılaştırıldığında geri kazanım değerlerinin benzer seviyede ve kabul edilebilir sınırlar içerisinde olduğu belirlendi. LOQ değerinin bazı çalışmalarla aynı (107,148) olduğu ve düşük tayin limitine uygun olduğu gözlendi. Tekrarlanabilirlik sonuçlarının karşılaştırıldığında ise RSD değerlerinin de benzer çalışmalarla uyum içerisinde olduğu ve genellikle tüm literatür çalışmalarındaki gibi %15'in altında olduğu gözlendi. Kalibrasyon aralığının diğer çalışmalara göre daha dar olması çalışmanın kısıtlılığı gibi görülse de numune hazırlama sırasında uygulanacak seyreltme/deriştirme işlemleri ile çalışma aralığı içerinden analiz yapılması mümkündür; ancak yine de ileriki çalışmalarla daha geniş doğrusal aralık için yöntem geliştirilmesi daha geniş sepktrumlu analizler için faydalı olacaktır.

Gelişen atık su epidemiyolojisi yaklaşımında, alkol çalışmalarının halk sağlığı açısından önlem alınmasında ve satış istatistikleriyle karşılaştırılabilir veri sağlamasında önemli bir aşama olduğu düşünülmektedir. Atık suda EtS biyobelirteciyle alkol analizinin gerçekleştirilmesi için yöntem geliştirilmesi çalışmamızın ülkemizde diğer maddeler ve biyobelirteçlerinin çalışılmasına imkân sağlaması hedeflenmektedir. Günümüze kadar yapılan tüm çalışmalarda belirlenen EtS konsantrasyonundan geri hesaplamalarla tahmini sağlanan alkol tüketim çalışmalarında kullanılan atılım faktörü, düzeltme faktörü gibi parametrelerin standarda ulaşması daha doğru ve kesin verilere ulaşılmasını sağlayacaktır kanaati yaygındır. Bunun için tüketim tahmini çalışmalarının arttırılması ve ortak bir prosedürle çalışılması gerekmektedir. Belirlenen prosedürde örnekleme yöntemindeki belirsizliklerin giderilmesi, laboratuvarlar arası standardizasyonun sağlanması, geriye dönük hesaplamalarda farklılıkların giderilmesi esas alınmalıdır.

6.SONUÇ

Toplum sağlığı için alkol, nikotin ve kafein gibi yasal ilaçların tüketimini doğru bir şekilde belirleyebilme ihtiyacı vardır. Yapılan literatür çalışmaları sonucunda ülkemizde yasadışı maddeler için atık su epidemiyolojisi çalışmalarına rastlanırken, alkol analizi için mevcut çalışma bulunmamaktadır. Alkol tüketimi satış istatistiklerinden, üretim verilerinden ya da anket sonuçlarından tahmin edilebilse de kaçakçılık, yasa dışı üretim, stoklama bu tür verileri etkileyebilir. Atık suda gerçekleştirilecek EtS biyobelirteci ile alkol tüketiminin izlenmesi çalışmaları sayesinde satış istatistiklerinin haricindeki kullanımının tahminine veri sağlanacak, alkol tüketiminin mekâna ve zamana bağlı değişimi gözlemlenebilecektir ve biyobelirteç konsantrasyonundan toplumun alkol tüketimi hesaplanabilecektir. Bu çalışmada alkol tüketiminin atık sudan tayin edilebilmesi için etil sülfat biyobelirtecini kullanarak bir Sıvı Kromatografisi-Ardışık Kütle Spektrometresi yöntemi geliştirmek amaçlanmıştır. Atık sulardaki biyobelirteçlerin miktar tayini için sıvı kromatografinin ayrıcı özellikleri ile kütle spektrometrisinin analitik özelliklerini birleştiren bir sistem olması, hassasiyet ve spesifitesinden dolayı LC-MS/MS tercih edilmiştir. Belirlenen yöntemle yapılan çalışmalar sonucunda, etil alkol biyobelirteci olan etil sülfatın belirlenebilirlik sınırı (LOD), tayin sınırı, (LOQ), ortalama tüketim oranı, standart sapma, %RSD değerleri ve geri kazanım değerleri hesaplanarak validasyon çalışması yapılmıştır.

Etil sülfat analiziyle bölgelerde alkol tüketimi incelenebilir. Bunun neticesinde, alkol tüketimi istatistikleri ile atık su verileri karşılaştırılıp gerekli kurumlar bilgilendirilebilir ve kural ihlallerine karşı gerekli önlemler alınabilir, öte yandan yüzey sularında EtS tayini yapılarak yüzey sularına atık su karışmış olma durumu bu yöntem sayesinde ortaya çıkarılabilir. Yapılan bu çalışmalarla ölçülen biyobelirteç konsantrasyonu ile bir popülasyonda kullanılan madde miktarını örnek geri hesaplama yaparak atık sudan alkol miktarı tayinine yönelik yöntem geliştirilme çalışmalarına imkân tanınması amaçlanmaktadır.

Sonuç olarak yapılan çalışmanın benzer yayınların sayısını arttırark alkol tüketimi için halk sağlı çalışmalarına katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Atık su epidemiyolojisi çalışmalarında farklı maddeler çalışılması için yönlendirici nitelikte olup toplum sağlığı için bağımlılıkların, hastalıkların mücadelesinde kullanılan yöntem haline gelmesi hedeflenmektedir. Günümüzde tüm Dünya'nın ortak sorunu olan Covid-19 gibi salgın hastalıkların yayılımınıı izlemede, bulaşmasını önlemede, doğru ve zamanında tedavi geliştirmede, erken uyarı sistemi olarak kullanılmasında WBE çalışmalarının arttırılması adına katkı sağlaması amaçlanmaktadır.

7.KAYNAKLAR

1. Baduroğlu E, Durak D. Alkol İle İlgili Adli Tıp Sorunları. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2010; 36: 65-71.

2. O'Neal, C. L., & Poklis, A. (1996). Postmortem production of ethanol and factors that influence interpretation: a critical review. The American journal of forensic medicine and pathology, 17(1), 8-20.

3. Andresen-Streichert, H., Müller, A., Glahn, A., Skopp, G., & Sterneck, M. (2018). Alcohol biomarkers in clinical and forensic contexts. Deutsches Ärzteblatt International, 115(18), 309.

4. Sims, N., & Kasprzyk-Hordern, B. (2020). Future perspectives of wastewater-based epidemiology: monitoring infectious disease spread and resistance to the community level. Environment International, 105689.

5. Mercan, S., Kuloglu, M., Tekin, T., Turkmen, Z., Dogru, A. O., Safran, A. N., ... & Asicioglu, F. (2019). Wastewater-based monitoring of illicit drug consumption in Istanbul: Preliminary results from two districts. Science of The Total Environment, 656, 231-238.

6. https://tr.wikipedia.org/wiki/Etanol -Son erişim tarihi: 29.05.20

7. "2014-2016 Yılları Arasındaki Etil Alkol Verilerinin İstatistiksel Olarak Retrospektif Değerlendirilmesi [Yüksek Lisans Tezi], 2019, Tez No: 579373, YÖK Tez Merkezi"

8. "Çukurova Bölgesinde Üretilen Boğma Rakıların Kimyasal Bileşimleri Üzerine Bir Araştırma [Yüksek Lisans Tezi], 2010, Tez No: 256408, YÖK Tez Merkezi"

9. Bengisu, G. (2014). Alternatif yakıt kaynağı olarak biyoetanol. Alınteri Zirai Bilimler Dergisi, 27(2), 43-52.

10. “Özütleme Fermantasyonu ile Etil Alkol Üretimi [Yüksek Lisans Tezi], 1998, Tez No: 77929, YÖK Tez Merkezi”

11. MELİKOĞLU, M., & ALBOSTAN, A. (2011). Türkiye’de biyoetanol üretimi ve potansiyeli. Gazi Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi, 26(1).

12. Neves, M. A. D. (2006). Bioethanol production from wheat milling by-products (Doctoral dissertation, PhD Thesis, University of Tsukuba, Japan).

13. Balat, M., Balat, H., & Öz, C. (2008). Progress in bioethanol processing. Progress in energy and combustion science, 34(5), 551-573.

14. “Gıda ve İçeceklerde HS-GC-MS Yöntemiyle Etil Alkol Tayini ve Sürücüler Üzerindeki Risk Faktörü [Yüksek Lisans Tezi], 2013, Tez No: 344070, YÖK Tez Merkezi”

15. Thomasson, H. R. (2002). Gender differences in alcohol metabolism. In Recent developments in alcoholism (pp. 163-179). Springer, Boston, MA.

16. Ekinciler, T. (1973). Alkolün Sağlık ve Beslenmeye Etkisi. Beslenme ve Diyet Dergisi, 2(1), 26-37.

17. Crabb, D. W., Bosron, W. F., & Li, T. K. (1987). Ethanol metabolism. Pharmacology & therapeutics, 34(1), 59-73.

18. Cederbaum, A. I. (2012). Alcohol metabolism. Clinics in liver disease, 16(4), 667-685.

19. Coşkunol, H., & Altıntoprak, E. (1999). Alkol kullanımının genetik yönleri. Klinik Psikiyatri Dergisi, 2(4), 222-229.

20. Vonghia, L., Leggio, L., Ferrulli, A., Bertini, M., Gasbarrini, G., Addolorato, G., & Alcoholism Treatment Study Group. (2008). Acute alcohol intoxication. European Journal of Internal Medicine, 19(8), 561-567.

21. Westland, J. L., & Dorman, F. L. (2013). Comparison of SPME and static headspace analysis of blood alcohol concentration utilizing two novel chromatographic stationary phases. Forensic science international, 231(1-3), e50-e56.

22. Zakhari, S. (2006). Overview: how is alcohol metabolized by the body? Alcohol Research, 29(4), 245.

23. Meier-Tackmann, D., Leonhardt, R. A., Agarwal, D. P., & Goedde, H. W. (1990). Effect of acute ethanol drinking on alcohol metabolism in subjects with different ADH and ALDH genotypes. Alcohol, 7(5), 413-418.

24. Edenberg, H. J. (2007). The genetics of alcohol metabolism: role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase variants. Alcohol Research & Health, 30(1), 5.

25. Whitfield, J. B. (1994). ADH and ALDH genotypes in relation to alcohol metabolic rate and sensitivity. Alcohol Suppl, 2, 59-65.

26. Agarwal, D. P., & Yin, S. J. (2001). Functional polymorphism of alcohol and aldehyde dehydrogenases: Alcohol metabolism, alcoholism, and alcohol-induced organ damage. In Alcohol in health and disease (pp. 15-40). CRC Press.

27. Lieber, C. S. (1997). Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism. Clinica chimica acta, 257(1), 59-84.

28. ZIMATKIN, S. M., & DEITRICH, R. A. (1997). Ethanol metabolism in the brain. Addiction Biology, 2(4), 387-400.

29. Bennion, L. J., & Li, T. K. (1976). Alcohol metabolism in American Indians and whites: Lack of racial differences in metabolic rate and liver alcohol dehydrogenase. New England Journal of Medicine, 294(1), 9-13.

30. ÇELİK, C. (1991). Alkolizm ve Moleküler Patolojisi. Turkiye Klinikleri Journal of Gastroenterohepatology, 2(3), 178-188.

31. Yenigün, M. ALKOL TÜKETİMİ VE TIP.

32. Lieber, C. S. (2003). Relationships between nutrition, alcohol use, and liver disease. Alcohol Research & Health, 27(3), 220.

33. KARAKAN, M., & NAZLIKUL, H. OKSİDATİF STRES VE SERBEST RADİKALLERİN VÜCUT ÜZERİNDEKİ ETKİSİ. Bilimsel Tamamlayıcı Tıp Regülasyon ve Nöral Terapi Dergisi, 11(2), 7-11.

34. Cengiz, O., & Bengi, G. (2019). Alkolik Karaciğer Hastalıkları. Güncel Gastroenteroloji, 23(2), 65-71.

35. Graham, K., Wilsnack, R., Dawson, D., & Vogeltanz, N. (1998). Should alcohol consumption measures be adjusted for gender differences?. Addiction, 93(8), 1137-1147.

36. Rogers, J. O., SMITH, J., Starmer, G. A., & Whitfield, J. B. (1987). Differing effects of carbohydrate, fat and protein on the rate of ethanol metabolism. Alcohol and Alcoholism, 22(4), 345-353.

37. Hahn, R. G., Norberg, Å., Gabrielsson, J., Danielsson, A., & Jones, A. W. (1994). Eating a meal increases the clearance of ethanol given by intravenous infusion. Alcohol and Alcoholism, 29(6), 673-677.

38. Özden S. İlaç dışı diğer ksenobiyotikler (2016-2017), Ders 8 [PDF]

Alıntı: https://avesis.istanbul.edu.tr/stopuz/dokumanlar

39. Willumeit, H. P., Ott, H., Neubert, W., Hemmerling, K. G., Schratzer, M., & Fichte, K. (1984). Alcohol interaction of lormetazepam, mepindolol sulphate and diazepam measured by performance on the driving simulator. Pharmacopsychiatry, 17(02), 36-43.

40. Storm, T., & Cutler, R. E. (1981). Observations of drinking in natural settings: Vancouver beer parlors and cocktail lounges. Journal of Studies on Alcohol, 42(11), 972-997.

41. Hunter, P. A., Hannon, R., & Marchi, D. (1982). Alcohol consumption in natural settings as a function of sex, age and income level. Journal of studies on alcohol, 43(3), 387-392.

42. Dorian, P., Sellers, E. M., Kaplan, H. L., Hamilton, C., Greenblatt, D. J., & Abernethy, D. (1985). Triazolam and ethanol interaction: kinetic and dynamic consequences. Clinical Pharmacology & Therapeutics, 37(5), 558-562.

43. Alcohol and human health (2016), The Open University, Walton Hall, s.11-20

44. Vural, N., & Sayın, H. (1996). Kan Alkol Düzeyini Etkileyen Faktörlerin Adli Tıp Açısından Değerlendirilmesi. The Bulletin of Legal Medicine, 1(2), 74-81.

45. Shepherd, R. (2003). Simpson's forensic medicine. CRC Press.

46. Can, M., Gürpınar, S. S., İşler, H., Varol, N., Gürpınarlı, Z., & Kocaağa, İ. (2008). Alkol Alan Kişilerin Kan Alkol Düzeyinin Solunum Havasındaki Alkol Düzeyi ile Karşılaştırılması ve Karaciğer Enzimlerine Etkisinin Araştırılması. Van Tıp Dergisi, 15(3), 75-80.

47. Lara Psikiyatri, “Alkol nedir, etkileri nelerdir?” [Blog yazısı]. Alıntı:

http://www.larapsikiyatri.com/psikiyatri-makaleleri/alkol-nedir-etkileri-nelerdir Son erişim tarihi: 29.05.2020

48. Paton, A. (2005). Alcohol in the body. Bmj, 330(7482), 85-87.

49. Grant, S. A., Millar, K., & Kenny, G. N. C. (2000). Blood alcohol concentration and psychomotor effects. British journal of anaesthesia, 85(3), 401-406.

50. Koçuk, N. (2010). Alkolün beyin yapısı ve bilişsel işlevler üzerine etkileri (Doctoral dissertation, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi).

51. Mukherjee, S., Das, S. K., Vasudevan, D. M., & Cochin, E. P. (2007). Effects of ethanol consumption on different organs-a brief overview. Asian Journal of biochemistry, 2(6), 386-394.

52. Preedy, V. R., Patel, V. B., Reilly, M. E., Richardson, P. J., Falkous, G., & Mantle, D. (1999). Oxidants, antioxidants and alcohol: implications for skeletal and cardiac muscle. Front Biosci, 4, e58-e66.

53. U.S. Department of Health & Human Services/ Alcohol Alert/Underage Drinking Number:67 – January 2006 https://pubs.niaaa.nih.gov/publications/AA67/AA67.pdf

54. ÇELİK, S., GÖRGÜLÜ, Ş., & TEZEL, T. (2002). Alkol tüketimi ve koroner kalp hastalığı. Türk Kardiyol Dern Arş, 30(10), 634-639.

55. Ögel, K., Karali, A., Tamar, D., & Çakmak, D. (1998). Alkol Ve Madde El Kitabi. Bakırköy Ruh ve Sinir Hastalikları Hastanesi.

56. Deng, X., Wood, P. G., Eagon, P. K., & Whitcomb, D. C. (2004). Chronic alcohol-induced alterations in the pancreatic secretory control mechanisms. Digestive diseases and sciences, 49(5), 805-819.

57. Kaphalia, B. S., & Ansari, G. A. (2001). Fatty acid ethyl esters and ethanol-induced pancreatitis. Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France), 47, OL173-9.

58. Bleich, S., Degner, D., Kropp, S., Rüther, E., & Kornhuber, J. (2000). Red wine, spirits, beer and serum homocysteine. The Lancet, 356(9228), 512.

59. Polich, J., & Ochoa, C. J. (2004). Alcoholism risk, tobacco smoking, and P300 event-related potential. Clinical Neurophysiology, 115(6), 1374-1383.

60. Yalçin, İ., İnan, S. Y., & Aksu, F. (2003). Etanol ve santral sinir sistemi nöromediyatörleri. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi, 12(2).

61. Smith, K. E., & Fenske, N. A. (2000). Cutaneous manifestations of alcohol abuse. Journal of the American Academy of Dermatology, 43(1), 1-18.

62. Mırsal, H., Özkan Pektaş, D., Kalyoncu, A., & Beyazyürek, M. (2002). ALKOL BAĞIMLILARINDA KARACİĞER FONKSİYON TESTLERİ İLE SOSYODEMOGRAFİK-KLİNİK ÖZELLİKLER ARASINDAKİ İLİŞKİLER. Bagimlilik Dergisi, 3(1), 27-30.

63. Donohue Jr, T. M. (2007). Alcohol-induced steatosis in liver cells. World journal of gastroenterology: WJG, 13(37), 4974.

64. Osna, N. A., Donohue Jr, T. M., & Kharbanda, K. K. (2017). Alcoholic liver disease: Pathogenesis and current management. Alcohol research: current reviews, 38(2), 147

65. di Bisceglie, A. M., Goodman, Z. D., Ishak, K. G., Hoofnagle, J. H., Melpolder, J. J., & Alter, H. J. (1991). Long-term clinical and histopathological follow-up of chronic posttransfusion hepatitis. Hepatology, 14(6), 969-974.

66.KETEN, A., KANBUROĞLU, Ç., TÜMER, A. R., & ODABAŞI, A. B. (2011). Adli Bilimlerde Alkol Alımının Belirlenmesinde Kullanılan Belirteçler. Turkiye Klinikleri Journal of Forensic Medicine and Forensic Sciences, 8(1), 37-45

67. "Etanol Alımını Takiben Etil Glukuronid ve Etil Sülfatın Kan ve İdrar Konsantrasyonları Kinetiğinin Türk Toplumunda Gösterilmesi [Yüksek Lisans Tezi], 2013, Tez No: 347878, YÖK Tez Merkezi

68. Aşırdizer, M., Etli, Y., Gümüş, O., Kartal, E., & Hekimoğlu, Y. Vücut sıvılarında Antemortem-Postmortem Etil Alkol Düzeyinin Belirlenmesinde Kullanılan Biyobelirteçler. Adli Tıp Dergisi, 30(2), 153-161.

69. Høiseth, G., Bernard, J. P., Stephanson, N., Normann, P. T., Christophersen, A. S., Mørland, J., & Helander, A. (2008). Comparison between the urinary alcohol markers EtG, EtS, and GTOL/5-HIAA in a controlled drinking experiment. Alcohol & Alcoholism, 43(2), 187-191.

70. World Health Organization. (2019). Global status report on alcohol and health 2018. World Health Organization.

71. OECD (2019), Health at a Glance 2019: OECD Indicators, OECD Publishing, Paris, https://doi.org/10.1787/4dd50c09-en.

72. TÜİK (2016). www.tuik.gov.tr Erişim tarihi: 18/03/2016

73. TAPDK (2016). www.tapdk.gov.tr Erişim tarihi: 18/03/2016

74. Lemos, N. P. (2014). Ethanol analysis in postmortem and human performance forensic toxicology cases. Academic Forensic Pathology, 4(2), 138-145.

75. Koylu, S., & Karbeyaz, K. (2018). Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı'na Başvuran Adli Nitelikli Olgular ve Alkol İlişkisinin Değerlendirilmesi. Osmangazi Tıp Dergisi, 41(3), 216-225.

76. Perry, P. J., Doroudgar, S., & Van, P. D. (2017). Ethanol Forensic Toxicology. The journal of the American Academy of Psychiatry and the Law, 45(4), 429-438.

77. Wang, H., Xu, H., Li, W., Li, B., Shi, Q., Ma, K., ... & Chen, L. (2019). Forensic appraisal of death due to acute alcohol poisoning: three case reports and a literature review. Forensic Sciences Research, 1-7.

78. AŞICIOĞLU, F., MUTLU, E., & BELCE, A. (2019). Adli Vakalarda Etil Glukuronid ve Etil Sülfat Analizinin Önemi: Olgu Bildirileri. Turkiye Klinikleri Journal of Forensic Medicine and Forensic Sciences, 16(1), 64-69.

79. Alkan, N., & Demircan, T. (2001). KİŞİLERİN OLAY ANINDAKİ KAN ALKOL SEVİYELERİNİN TESPİT EDİLMESİNİN ADLİ-TIBBİ ÖNEMİ (OLGU SUNUMU).

80. MERCAN, S., & AÇIKKOL, M. (2014). Madde Kullanımının Kolaylaştırdığı Suçlar: Maddeler ve Etkileri; Deliller ve Analizleri. Turkiye Klinikleri Journal of Forensic Medicine and Forensic Sciences, 11(2), 78-96.

81. Kadı, G., Çekiç, E. G., Erbaş, M., & Balcı, Y. (2017). Otopsisi Yapılan Olgularda Etil Alkol Düzeyinin Değerlendirilmesi/Evaluation of Ethonol Levels in Autopsied Cases. Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Tıp Dergisi/Mugla Medical Journal, 3(3), 1-4.

82. YORULMAZ, F., AZMAK, D., & CETIN, G. (1994). TRAFİK KAZASINA KARIŞMIŞ SÜRÜCÜLERDE MUAYENEYE GETİRİLME SÜRESİNİN KAN ALKOL KONSANTRASYONUNDA YAPTIĞI DEĞİŞİKLİKLER. Turkish Journal of Forensic Medicine, 10(Supp: 1-2-3-4), 49-55.

83. ÇOLTU, A. (1986). Alkolün Adli Tıp Açısından Değerlendirilmesi. Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences, 6(1), 75-79.

84. AŞICIOĞLU, F., Yapar, B., Tütüncüler, A., & Belce, A. Trafik Güvenliğini Tehlikeye Sokma Suçu Açısından Alkol. Adli Tıp Dergisi, C, 23, 3.

85. ICADS - www.icadscamden.org.uk - Recovery in Camden, Your guide to putting drugs and alcohol behind you, January 2017

86. Dubowski, K. M. (1977). Manual for analysis of ethanol in biological liquids (No. DOT-HS-802-208). United States. National Highway Traffic Safety Administration. Research Institute.

87. Payne, J. P., Foster, D. V., Hill, D. W., & Wood, D. G. (1967). Observations on interpretation of blood alcohol levels derived from analysis of urine. British medical journal, 3(5569), 819.

88. Jones, A. W. (1979). Inter-and intra-individual variations in the saliva/blood alcohol ratio during ethanol metabolism in man. Clinical chemistry, 25(8), 1394-1398.

89. Winek, C. L., Henry, D., & Kirkpatrick, L. (1983). The influence of physical properties and lipid content of bile on the human blood/bile ethanol ratio. Forensic science international, 22(2-3), 171-178.

90. Acikkol, M., Mercan, S., & Ziyalar, N. (2011). A FORENSIC AND SOCIAL APPROACH TO DRUG-FACILITATED CRIMES. Journal of Current Issues in Crime, Law & Law Enforcement, 4(4).

91. VURAL, N., & SAYGI, Ş. (1981). Kan Alkolünün (Mikroyöntemle) GLK île Tayini ve Yöntemin Trafikte Uygulanması.

92. Wigmore, J. G., & Leslie, G. M. (2001). The effect of swallowing or rinsing alcohol solution on the mouth alcohol effect and slope detection of the Intoxilyzer 5000. Journal of analytical toxicology, 25(2), 112-114.

93. DARICI, M., & Cabaroğlu, T. (2018). ALKOLLÜ İÇKİLERİN KALİTE KONTROLÜNDE KULLANILAN FARKLI ALKOL TAYİN METOTLARININ KARŞILAŞTIRILMASI VE NIR (YAKIN KIZILÖTESİ SPEKTROSKOPİSİ) METODUNUN VALİDASYONU. *Gıda*, *43*(1), 90-100.

94. Head-Space gaz kromatografik yöntemle biyolojik sıvılarda tolüen analizi [Yüksek Lisans Tezi],2006, Tez No: 193808, YÖK Tez Merkezi

95. https://labakademi.com/gaz-kromatografisi-headspace-analizi/ Son erişim: 21.05.2020

96. Tiscione, N. B., Alford, I., Yeatman, D. T., & Shan, X. (2011). Ethanol analysis by headspace gas chromatography with simultaneous flame-ionization and mass spectrometry detection. Journal of analytical toxicology, 35(7), 501-511.

97. Bonita, R., Beaglehole, R., & Kjellström, T. (2006). Basic epidemiology. World Health Organization.

98. Daughton, C. G. (2001). Illicit drugs in municipal sewage: proposed new nonintrusive tool to heighten public awareness of societal use of illicit-abused drugs and their potential for ecological consequences.

99. Zuccato, E., Chiabrando, C., Castiglioni, S., Calamari, D., Bagnati, R., Schiarea, S., & Fanelli, R. (2005). Cocaine in surface waters: a new evidence-based tool to monitor community drug abuse. Environmental Health, 4(1), 14.

100. Zuccato, E., Chiabrando, C., Castiglioni, S., Bagnati, R., & Fanelli, R. (2008). Estimating community drug abuse by wastewater analysis. Environmental health perspectives, 116(8), 1027-1032.

101. Ort, C., Banta-Green, C. J., Bijlsma, L., Castiglioni, S., Emke, E., Gartner, C., ... & Van Nuijs, A. L. (2014). Sewage-based epidemiology requires a truly transdisciplinary approach. GAIA-Ecological Perspectives for Science and Society, 23(3), 266-268.

102. Choi, P. M., Tscharke, B. J., Donner, E., O'Brien, J. W., Grant, S. C., Kaserzon, S. L., & Mueller, J. F. (2018). Wastewater-based epidemiology biomarkers: Past, present and future. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 105, 453-469.

103. Baz-Lomba, J. A., Salvatore, S., Gracia-Lor, E., Bade, R., Castiglioni, S., Castrignanò, E., ... & McCall, A. K. (2016). Comparison of pharmaceutical, illicit drug, alcohol, nicotine and caffeine levels in wastewater with sale, seizure and consumption data for 8 European cities. BMC public health, 16(1), 1035

104. Gracia-Lor, E., Castiglioni, S., Bade, R., Been, F., Castrignanò, E., Covaci, A., ... & Lai, F. Y. (2017). Measuring biomarkers in wastewater as a new source of epidemiological information: Current state and future perspectives. Environment international, 99, 131-150.

105. Rico, M., Andrés-Costa, M. J., & Picó, Y. (2017). Estimating population size in wastewater-based epidemiology. Valencia metropolitan area as a case study. Journal of hazardous materials, 323, 156-165

106. Daughton, C. G. (2012). Real-time estimation of small-area populations with human biomarkers in sewage. Science of the Total Environment, 414, 6-21.

107. Gao, J., Zheng, Q., Lai, F. Y., Gartner, C., Du, P., Ren, Y., ... & Thai, P. K. (2020). Using wastewater-based epidemiology to estimate consumption of alcohol and nicotine in major cities of China in 2014 and 2016. Environment International, 136, 105492.

108. Chen, J., Venkatesan, A. K., & Halden, R. U. (2019). Alcohol and nicotine consumption trends in three US communities determined by wastewater-based epidemiology. Science of The Total Environment, 656, 174-183.

109. Wurst, F. M., Dresen, S., Allen, J. P., Wiesbeck, G., Graf, M., & Weinmann, W. (2006). Ethyl sulphate: a direct ethanol metabolite reflecting recent alcohol consumption. Addiction, 101(2), 204-211.

110. Reid, M. J., Langford, K. H., Mørland, J., & Thomas, K. V. (2011). Analysis and interpretation of specific ethanol metabolites, ethyl sulfate, and ethyl glucuronide in sewage effluent for the quantitative measurement of regional alcohol consumption. Alcoholism: Clinical and Experimental Research, 35(9), 1593-1599.

111. Mastroianni, N., de Alda, M. L., & Barcelo, D. (2014). Analysis of ethyl sulfate in raw wastewater for estimation of alcohol consumption and its correlation with drugs of abuse in the city of Barcelona. Journal of Chromatography A, 1360, 93-99.

112. Rodríguez-Álvarez, T., Rodil, R., Cela, R., & Quintana, J. B. (2014). Ion-pair reversed-phase liquid chromatography–quadrupole-time-of-flight and triple-quadrupole–mass spectrometry determination of ethyl sulfate in wastewater for alcohol consumption tracing. Journal of Chromatography A, 1328, 35-42.

113. Rodríguez-Álvarez, T., Racamonde, I., González-Mariño, I., Borsotti, A., Rodil, R., Rodríguez, I., ... & Castiglioni, S. (2015). Alcohol and cocaine co-consumption in two European cities assessed by wastewater analysis. Science of the Total Environment, 536, 91-98.

114. Van Wel, J. H. P., Gracia-Lor, E., van Nuijs, A. L. N., Kinyua, J., Salvatore, S., Castiglioni, S., ... & Van Hal, G. (2016). Investigation of agreement between wastewater-based epidemiology and survey data on alcohol and nicotine use in a community. Drug and alcohol dependence, 162, 170-175.

115. Boogaerts, T., Covaci, A., Kinyua, J., Neels, H., & van Nuijs, A. L. (2016). Spatial and temporal trends in alcohol consumption in Belgian cities: A wastewater-based approach. Drug and alcohol dependence, 160, 170-176.

116. Andrés-Costa, M. J., Escrivá, Ú., Andreu, V., & Picó, Y. (2016). Estimation of alcohol consumption during “Fallas” festivity in the wastewater of Valencia city (Spain) using ethyl sulfate as a biomarker. Science of the Total Environment, 541, 616-622.

117. Gatidou, G., Kinyua, J., van Nuijs, A. L., Gracia-Lor, E., Castiglioni, S., Covaci, A., & Stasinakis, A. S. (2016). Drugs of abuse and alcohol consumption among different groups of population on the Greek Island of Lesvos through sewage-based epidemiology. Science of the Total Environment, 563, 633-640.

118. Ryu, Y., Barceló, D., Barron, L. P., Bijlsma, L., Castiglioni, S., de Voogt, P., ... & de Alda, M. L. (2016). Comparative measurement and quantitative risk assessment of alcohol consumption through wastewater-based epidemiology: An international study in 20 cities. Science of the Total Environment, 565, 977-983.

119. Mastroianni, N., López-García, E., Postigo, C., Barceló, D., & de Alda, M. L. (2017). Five-year monitoring of 19 illicit and legal substances of abuse at the inlet of a wastewater treatment plant in Barcelona (NE Spain) and estimation of drug consumption patterns and trends. Science of the Total Environment, 609, 916-926.

120. Banks, A. P., Lai, F. Y., Mueller, J. F., Jiang, G., Carter, S., & Thai, P. K. (2018). Potential impact of the sewer system on the applicability of alcohol and tobacco biomarkers in wastewater-based epidemiology. Drug testing and analysis, 10(3), 530-538.

121. Lai, F. Y., Gartner, C., Hall, W., Carter, S., O'Brien, J., Tscharke, B. J., ... & Bruno, R. (2018). Measuring spatial and temporal trends of nicotine and alcohol consumption in Australia using wastewater-based epidemiology. Addiction, 113(6), 1127-1136.

122. Gao, J., Li, J., Jiang, G., Yuan, Z., Eaglesham, G., Covaci, A., ... & Thai, P. K. (2018). Stability of alcohol and tobacco consumption biomarkers in a real rising main sewer. Water research, 138, 19-26.

123. Zheng, Q., Tscharke, B., O'Brien, J., Gerber, C., Mackie, R., Gao, J., & Thai, P. (2019). Uncertainties in estimating alcohol and tobacco consumption by wastewater-based epidemiology. Current Opinion in Environmental Science & Health

124. Mao, Kang, Hua Zhang, and Zhugen Yang. "Can a paper-based device trace COVID-19 sources with wastewater-based epidemiology?." (2020): 3733-3735.

125. Milli Eğitim Bakanlığı/ Kimya Teknolojisi-Kromatografik Analizler,Ankara 2013

126. Fox, A., Kozar, M. P., & Steinberg, P. A. (2000). Gas Chromatography and Gas Chromatography} Mass Spectrometry.

127. https://www.slideshare.net/manzara/chromatography-78757410 Erişim Tarihi: 22.05.2020

128. Coskun, O. (2016). Separation techniques: chromatography. Northern clinics of Istanbul, 3(2), 156.

129. Cheremisinoff, N. P. (1996). Polymer characterization: laboratory techniques and analysis. William Andrew.

130. Meyer, V. R. (2013). Chromatography| Principles.

131. Kromatografi ve uygulamaları/ Yalın Yayıncılık/İstanbul- 2015

132. Hage, D. S. (2018). Chromatography. In Principles and Applications of Clinical Mass Spectrometry (pp. 1-32). Elsevier.

133. Poole, C. F., Cooke, M., & Wilson, I. D. (2000). Encyclopedia of Separation science.40-64

134. Kılıç E., Köseoğlu F., Yılmaz H.,1.Baskı, Enstrümental Analiz İlkeleri, s.528-738, Bilim Yayıncılık (Skoog, Holler, Nieman, Principles of Instrumental Analysis)

135. https://slideplayer.biz.tr/slide/2719231/ Son Erişim Tarihi: 01.05.2020

136. Chappell, D. L., Lee, A. Y., Castro-Perez, J., Zhou, H., Roddy, T. P., Lassman, M. E., ... & Laterza, O. F. (2014). An ultrasensitive method for the quantitation of active and inactive GLP-1 in human plasma via immunoaffinity LC–MS/MS. Bioanalysis, 6(1), 33-42.

137. Eskişehir Osman Gazi Üniversitesi- SIVI KROMATOGRAFİ-KÜTLE SPEKTROMETRESİ (LC-MS/MS)(2018),[Blog yazısı]

Alıntı: https://arum.ogu.edu.tr/Sayfa/Index/72/sivi-kromatografi-kutle-spektrometresi-lc-msms Son Erişim Tarihi: 02.05.2020

138.http://www.antteknik.com/Upload/ProductAppAreasLiteratur/tr/d06bd2ec2c1d4bf619af0ca0449015b8.pdf Son Erişim Tarihi: 01.05.2020

139. Kimyasal ve fiziksel analizlerde metot validasyonu/verifikasyonu rehberi – Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı

140. Metodun Geçerli Kılınması ve Doğrulanması İçin Bilgilendirme Klavuzu – Türk Akreditasyon Kurumu, 2019 (TÜRKAK)

141. Kimyasal Analizlerde Metot Validasyonu ve Verifikasyonu – TURKLAB/ Kalibrasyon ve Deney Laboratuvarları Derneği

142. Eurachem - Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement -Third Edition

143. Guideline, I. H. T. (2005, November). Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). In International Conference on Harmonization, Geneva, Switzerland (pp. 11-12).

144. Kasprzyk-Hordern, B., Bijlsma, L., Castiglioni, S., Covaci, A., de Voogt, P., Emke, E., ... & Thomas, K. V. (2014). Wastewater-based epidemiology for public health monitoring. Water and Sewerage Journal, 4, 25-26.

145. AŞICIOĞLU, F. (2015). Atık Sulardan Uyuşturucu Analizi: Lağım Suyu Epidemiyolojisi. Turkiye Klinikleri Forensic Medicine-Special Topics, 1(3), 16-20.

146. Thomas, K. V., Bijlsma, L., Castiglioni, S., Covaci, A., Emke, E., Grabic, R., ... & de Alda, M. L. (2012). Comparing illicit drug use in 19 European cities through sewage analysis. Science of the Total Environment, 432, 432-439.

147. Ort, C., Van Nuijs, A. L., Berset, J. D., Bijlsma, L., Castiglioni, S., Covaci, A., ... & Hernández, F. (2014). Spatial differences and temporal changes in illicit drug use in E urope quantified by wastewater analysis. Addiction, 109(8), 1338-1352.

148. Zheng, Q., Tscharke, B. J., Krapp, C., O'Brien, J. W., Mackie, R. S., Connor, J., ... & Thai, P. K. (2020). New approach for the measurement of long-term alcohol consumption trends: Application of wastewater-based epidemiology in an Australian regional city. Drug and Alcohol Dependence, 207, 107795.

149. Brandeburová, P., Bodík, I., Horáková, I., Žabka, D., Castiglioni, S., Salgueiro-González, N., ... & Mackuľak, T. (2020). Wastewater-based epidemiology to assess the occurrence of new psychoactive substances and alcohol consumption in Slovakia. Ecotoxicology and Environmental Safety, 200, 110762.

8. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Duygu Nur MERT
Doğum Tarihi: 23.08.1992
Doğum Yeri: İstanbul
Sürücü Belgesi: B (2011)
Adres Bilgileri: Derviş Ali Mah. Zülüflü Sk. No: 19 Fatih/ İSTANBUL
Cep Telefonu: 90 (537) 737 53 43
E-Posta : duygunurmerttt@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans 2017 - Devam İstanbul Üniversitesi / Adli Tıp Enstitüsü - Fen Bilimleri

Lisans 2011 – 2015 Kocaeli Üniversitesi / Fen Edebiyat Fakültesi - Kimya Ort:3.29/4

2010 – 2011 Kocaeli Üniversitesi/ İngilizce Hazırlık

Bilgisayar Becerileri

Microsoft Office programları

İŞ DENEYİMLERİ

Kimya Öğretmenliği- Yedikule Anadolu Lisesi/09.2019- 03.2020

Kimya Öğretmenliği - Neslişah Kız Anadolu İmam Hatip Lisesi /09.2018 -06.2019

Fen Bilimleri Öğretmenliği - Sancaktar Hayrettin Ortaokulu / 2016- 2018

Kimya Öğretmenliği- Uluslararası Fatih Sultan Mehmet Anadolu İmam Hatip Lisesi / 03.2016 - 06.2016

Ortaokul Matematik Öğretmenliği- Özel Bindeğer Etüt Merkezi (12.2015 - 06.2016)

STAJ DENEYİMLERİ

Stajyer / Tübitak Marmara Araştırma Merkezi- Gıda Enstitüsü 06.2014-07.2014 (1 ay) Kocaeli

SERTİFİKA BİLGİLERİ

Pedagojik Formasyon Program Sertifikası - Kocaeli Üniversitesi / 2015- 15