T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA

ADLİ TIP VE ADLİ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Zeynep TÜRKMEN

SAÇTA OLANZAPİN'İN SIVI KROMATOGRAFİ TANDEM KÜTLE SPEKTROMETRESİ (LC-MS/MS) YÖNTEMİ İLE TAYİNİ

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYAGER MERVE OKA

İSTANBUL, 2020

T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA

ADLİ TIP VE ADLİ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Zeynep TÜRKMEN

SAÇTA OLANZAPİN'İN SIVI KROMATOGRAFİ TANDEM KÜTLE SPEKTROMETRESİ (LC-MS/MS) YÖNTEMİ İLE TAYİNİ

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYAGER MERVE OKA

İSTANBUL, 2020

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

Proje No: 31975

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın gerçekleşmesine fırsat veren İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü müdürü Sayın Prof. Dr. Faruk Aşıcıoğlu'na, çalışmamın her aşamasında bilgi ve deneyimleriyle yol gösteren danışmanım Sayın Dr. Öğretim Üyesi Zeynep Türkmen'e;

Kıymetli bilgileriyle daima yardımcı olan ve yol gösteren Sevgili Hocam Dr.Öğretim Üyesi Selda Mercan'a;

Tez çalışmamın laboratuvar aşamasında bilgi ve yardımlarını esirgemeyen Kimyager Tuğba Tekin, Laboratuvar Teknisyeni Murat Yayla, Arş. Gör. Merve Kuloğlu'na;

Hayatımın her anında olduğu gibi, tez çalışmam boyunca da desteklerini bir an olsun esirgemeyen kısacası hayatımı kolaylaştıran sevgili Annem ve Babam Sabiha-Ahmet Oka'ya, Ablam ve Eniştem Buse-Sercan Sarılar'a;

Sadece varlığıyla en büyük motivasyon kaynağım olan yeğenim Duru Ada'ya;

Sabrı ve sonsuz ilgisiyle tez yazım sürecim boyunca en büyük destekçim olan nişanlım Erdal Daşkın'a;

En içten teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim…

Kimyager Merve Oka

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR i

İÇİNDEKİLER ii

TABLOLAR LİSTESİ v

ŞEKİLLER LİSTESİ vi

KISALTMALAR vii

ÖZET viii

SUMMARY.....x

1. GİRİŞ VE AMAÇ.....1

2. GENEL BİLGİLER.....3

2.1. Adli Toksikoloji.....3

2.2. Adli Toksikolojide Kullanılan Biyolojik Örnekler.....4

2.3. Saçın Adli Toksikolojideki Önemi ve Tarihçesi..... 6

2.3.1.Saçın yapısı ve büyümesi..... 9

2.3.2. Maddelerin kıla geçiş yolları.....11

2.3.3. Saç örneğinin analizinden faydalanılan alanlar.....13

2.3.4. Saç örneğinin toplanması ve saklanması.....15

2.3.5. Örnek alımı ve örneğin dekontaminasyonu.....16

2.3.6. Saç örneğinin analize hazırlanması ve sıklıkla kullanılan analiz yöntemleri.....17

2.4. Olanzapin.....19

2.4.1. Olanzapinin kimyasal yapısı ve özellikleri.....20

2.4.2. Olanzapinin etki mekanizmaları ve farmakokinetik özellikleri…20

2.4.3. Olanzapinin klinik kullanımı ve yan etkileri.....22

2.4.4. Olanzapinin belirlenmesinde kullanılan analitik yöntemler……..23

2.4.5. Olanzapinin kötüye kullanımı ve adli bilimlerdeki yeri……..…25

2.5. Kromatografi……....26

2.5.1. Sıvı kromatografisi (Liquid Chromatography - LC)……..…27

2.5.2. Adli toksikolojide LC-MS uygulama alanları…….....29

2.5.3. Ardışık (Tandem) Kütle Spektrometresi - (MS)n……...31

2.5.4. Saç analizlerinde LC/MS-MS kullanımı ve önemi……..…32

2.6. Adli Laboratuvarda Yeterlilik Testleri……..…33

2.6.1. Saç Referans Standart Materyali ile Validasyon Çalışmaları..….34

2.6.1.1. *Kirletilmiş saç örnekleri yoluyla*……...……35

2.6.1.2. *Otantik uyuşturucu kullanıcısı olduğu bilinen kişilerin saç örneklerinin analizi yoluyla*…….…36

2.6.1.3. *Saça bulama şeklinde dâhil etme yoluyla*……36

2.7. Analitik Yöntemlerin Validasyonu……...…….36

2.7.1. Validasyon hazırlık çalışmaları…….37

2.7.1.1. *Kullanılacak materyaller*…….……37

2.7.1.2. *Konsantrasyon seviyelerinin belirlenmesi*…….……..39

2.7.1.3. *Parametrelerin uygulanması* ……..…39

3. GEREÇ VE YÖNTEM…….……..…43

3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler…….…….43

3.2. Çalışmada Kullanılan Cihaz ve Gereçler…….……44

3.3. Çalışma Planı……..45

3.4. Olanzapin Analizi…….……..45

3.4.1. Olanzapin analizinde kullanılan çözeltiler……..45

3.4.2. Olanzapin tayini için saç örneklerinin analize hazırlanması..…47

3.4.2.1. *Spike saç örneklerinin hazırlanması*……..47

3.4.2.2. *Katı faz ekstraksiyonu yöntemi*……....49

3.4.3. LC-MS/MS ile olanzapin analizi……50

3.5. Olanzapin Analizinin Validasyonu…….52

3.5.1. Seçicilik çalışmaları……..52

3.5.2. LOD ve LOQ hesaplamaları……....52

3.5.3. Doğrusallık çalışmaları ……...53

3.5.4. Kesinlik çalışmaları…….…53

3.5.5. Geri kazanım çalışmaları…….…54

3.5.6. Stabilite çalışmaları…….…55

4. BULGULAR…….…56

5. TARTIŞMA…….….68

6. SONUÇ……..…78

7. KAYNAKLAR.....80

8. ÖZGEÇMİŞ……..…92

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo adı **Sayfa No**

Tablo 1. Çalışmada kullanılan referans standart maddelerin ve kimyasal maddelerin isimleri ve markaları …… **43**

Tablo 2. Çalışmada kullanılan cihaz ve gereçlerin isimleri ve markaları ……. **44**

Tablo 3. Kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması ……. **47**

Tablo 4. Maddelerin alıkonma zamanları (dk) ve kütle spektrumundaki (MS) başlıca iyonları (m/z) (10 µg/mL) ……. **55**

Tablo 5. 0,1-100 ng/mL aralığında çizilmiş olan kalibrasyon eğrisinin denklemi ve korelasyon katsayısı ……. **62**

Tablo 6. 10 adet boş saç örneğinin bulunan miktarı (µg/mL), standart sapma ve %RSD değerleri …….. **63**

Tablo 7. Gün içi ve günler arası tekrar edilebilirlik sonuçlarının karşılaştırılması…… **64**

Tablo 8. 0,5 ng/mL olanzapin içeren saç numunesinin sonra spike geri kazanım tablosu.. **64**

Tablo 9. 5 ng/mL olanzapin içeren saç numunesinin sonra spike geri kazanım tablosu … **65**

Tablo 10. 50 ng/mL olanzapin içeren saç numunesinin sonra spike geri kazanım tablosu . **65**

Tablo 11. 1.0 ng/mL konsantrasyonla spike edilen CRM saç örneğinin önce spike ve sonra spike verilerinin kıyaslanması …… **66**

Tablo 12. 50 ng/mL olanzapin içeren saç numunesinin stabilite tablosu ……. **66**

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil adı **Sayfa No**

Şekil 1. Saç örneğinin analizinde kullanılan bir ölçek …… **8**

Şekil 2. Kılın yapısı ……. **10**

Şekil 3. Kıl içerisine madde geçişi ve çevresel faktörler …… **13**

Şekil 4. Katı faz ekstraksiyonunun şematik gösterimi …… **19**

Şekil 5. Olanzapinin kimyasal yapısı …….. **20**

Şekil 6. LC-MS sisteminin temel bileşenleri …… **28**

Şekil 7. Ardışık kütle spektrometresinin çalışma prensibi …… **32**

Şekil 8. Ekstraksiyon sırasında kullanılan şırınga ucu filtreler ……. **49**

Şekil 9. Ekstraksiyon düzeneği …….. **50**

Şekil 10. Olanzapin analizinin yapıldığı LC-MS/MS cihazı ……. **51**

Şekil 11. 5 ng/mL olanzapin çözeltisine ait LC kromatogramı …….. **56**

Şekil 12. 25 ng/mL olanzapin çözeltisine ait LC kromatogramı …… **56**

Şekil 13. 25 ng/mL Kokain-D3 (IS) çözeltisine ait LC kromatogramı …….. **57**

Şekil 14. 100 ng/mL Kokain-D3 (IS) çözeltisine ait LC kromatogramı …… **57**

Şekil 15. Sadece MeOH çözeltisine ait LC kromatogramı…….. **58**

Şekil 16. Sadece Olanzapin çözeltisine ait LC kromatogramı …… **59**

Şekil 17. Sadece önce spike edilen Olanzapin içeren saç örneğine ait LC kromatogramı …….. **59**

Şekil 18. Sadece önce spike edilen IS içeren saç örneğine ait LC kromatogramı..**60**

Şekil 19. Sadece sonra spike edilen Olanzapin içeren saç örneğine ait LC kromatogramı …….. **60**

Şekil 20. Sadece sonra spike edilen IS içeren saç örneğine ait LC kromatogramı.**61**

Şekil 21.0,1-100 ng/mL aralığında olanzapin için elde edilmiş kalibrasyon eğrisi**62**

KISALTMALAR

µL : Mikrolitre

AmOAC : Amonyum Asetat

BOS : Beyin Omurilik Sıvısı

CRM : Sertifikalı Referans Materyal

GC-MS : Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi

HPLC : Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

L : Litre

LC : Sıvı Kromatografisi

LC-MS/MS : Sıvı Kromatografisi Ardışık Kütle Spektrometresi

LOD : Tespit Limiti

LOQ : Tayin Limiti

MALDI : Matris Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyonu

MS : Kütle Spektrometresi

mg : Miligram

mL : Mililitre

MRM : Çoklu Reaksiyon İzleme (Multiple Reaction Monitoring)

pKa : Asitlik Sabiti

ppb : Milyarda bir birim

ppm : Milyonda bir biri

ppt : Binde bir birim

RSD : Relatif Standart Sapma

SD : Standart Sapma

UV : Ultra Viyole

ÖZET

Atipik antipsikotik ilaçlardan olan olanzapin, sadece yetişkinlerde değil aynı zamanda gençlerde de sıklıkla reçete edilen bir ilaçtır. Özellikle ani kalp ölümleri, epilepside azalmış nöbet eşik seviyesi ve buna bağlı gelişen ölümler, adli toksikolojide olanzapini önemli hale getirmektedir. Literatürde, adli ve klinik toksikolojide sıklıkla kullanılan biyolojik örneklerde (kan, idrar, tükürük ve BOS) kromatografik olarak geliştirilmiş, tek başına Olanzapin ya da metabolitine özgü veya çoklu psikiyatrik ilaçlarla eş zamanlı birçok çalışma bildirilmektedir.

Olanzapin kanda oldukça kararsız olduğu için postmortem olgularda kanda tespit edilmesi karmaşıktır. Bu olgular dışında, olanzapinin tedavi amaçlı kullanımının yanı sıra suistimal edildiği de görülmektedir. Akut olanzapin toksisitesinin ölüme katkıda bulunduğu görülen birçok olgu sunumu bulunmaktadır. Bu nedenle olanzapinin saç ve tırnak gibi biyolojik örneklerden tayinine yönelik analitik yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Referans Malzeme, bir etken madde için kalite kontrol çalışmalarında kullanılan saf veya bir matrikse özgü oluşturulmuş materyallerdir. Bir Referans Malzemenin, Sertifikalı Referans Malzeme (CRM) olabilmesi için kullanım amacına uygun şekilde matriksin her yerinde özgün bir homojenliğe ve metodun kararlılığının kanıtlanması için olası belirsizliklerin izlenebilirliğini sağlaması gerekmektedir.

Analitik yöntem validasyonunun amacı, bir analitik yöntemin belirlenen amaç doğrultusunda güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edebileceğinin onaylanmasıdır. Güvenilirliği bilinmeyen bir analitik sonucun hiçbir değeri yoktur. Bu çalışmada en hassas tayin yöntemlerinden biri olan LC-MS/MS ile hızlı ve ucuz bir yöntem valide edilmiş olup, adli toksikolojide olanzapinin dışlanması adına önemli fayda sağlayacağı düşünülmektedir.

Çalışmada, on noktalı kalibrasyon çözeltisi ile olanzapinin doğrusal aralığı 0,1-100 ng/mL olarak belirlendi. Bu aralıktaki korelasyon katsayısı R2= 0.9994 olarak bulundu. Elde edilen LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.36 ng/mL ve 0.39 ng/mL'dir. Saç örneği üzerinde yapılan sonra spike verilerine göre geri kazanım yüzdesi 0.5 ng/mL'lik konsantrasyonda %82.43±5.46; 5 ng/mL'lik konsantrasyonda %81.80±.2.97; 50 ng/mL'lik konsantrasyonda %96.46±1.69 bulundu. Önce spike ve sonra spike verileri ile matriks etkisinin anlaşılması için 1 ng/mL konsantrasyonda olanzapin ile yapılan 9 tekrarlı deneyler sonucunda, önce spike geri kazanım sonuçlarının (%58.5) sonra spike geri kazanım sonuçlarına (%91.6) göre yaklaşık yarı yarıya azaldığı görülmektedir. Tekrarlanabilirlik için 3 ayrı konsantrasyonda çalışılan geri kazanım numunelerinden; 0.5 ng/mL konsantrasyonundaki 6 adet örneğin ortalaması 0.412±0.027 ng/mL, bağıl standart sapma değeri 6.63, 5 ng/mL konsantrasyonundaki 6 adet örneğin ortalaması 4.09±0.15 ng/mL, bağıl standart sapma değeri 3.64, 50 ng/mL konsantrasyonundaki 6 adet örneğin ortalaması 48.23±0.85 ng/mL, bağıl standart sapma değeri 1.76 olarak tespit edildi. Stabilite çalışması için 7 gün ara ile analiz edilen örneklerdeki değişim %0.0054 bulundu. Bu değer %1'in altında kaldığından geliştirilen yöntemin stabilitesi böylelikle kanıtlamış oldu: Özetle oda sıcaklığında 1 hafta boyunca bekletilen numunedeki değişim oranının epey düşük olması yöntemin sağlamlığının da bir kanıtı olarak görülebilir.

Ülkemizde olanzapin etken maddesinin diğer biyolojik örneklerden belirlenmesine yönelik çalışmalar yapılmışsa da saç örneğinden tespitine yönelik bir çalışma olmadığından, bu çalışmanın literatüre katkısının önemli olduğu düşünülmektedir. İleriki çalışmalar ile daha düşük tayin limitlerine ulaşabilecek daha hassas yöntemlerin geliştirilmesi hedeflenmektedir.

SUMMARY

Olanzapine, one of the atypical antipsychotic drugs, is often prescribed not only in adults but also in young people. Especially sudden heart deaths, decreased seizure threshold levels in epilepsy and related deaths make the olanzapine important in forensic toxicology. In the literature, many studies are reported simultaneously in biological samples (blood, urine, saliva and BOS), which are frequently used in forensic and clinical toxicology, contemporaneously developed, alone with olanzapine or metabolite-specific or multiple psychiatric drugs.

In postmortem cases, detection of olanzapine is complex because of olanzapine is quite unstable in the blood. Apart from these cases, it is seen that the use of olanzapine for drug of abuse as well as therapeutic purposes. There are many reports of cases that appear to contribute to death of acute olanzapin toxicity. For this reason, analytical methods for the determination of olanzapin from biological samples such as hair and nails are needed.

Reference Material is pure or matrix-specific materials used in quality control studies for a active ingredient. In order a Reference Material to become a Certified Reference Material (CRM), it is necessary to ensure traceability of possible uncertainties in order to prove an original homogeneity and the stability of the method throughout the matrix in accordance with the purpose of use.

The purpose of analytical method validation is to confirm that an analytical method can achieve reliable and reproducible results for the specified purpose. An unreliable analytical result has no any value. In this study, a fast and inexpensive method was validated with LC-MS / MS, which one of the most sensitive methods of determination, and it is believed that it will provide significant benefits in the exclusion of olanzapine in forensic toxicology.

In the study, the linear range of olanzapin with ten-point calibration solution was determined as 0.1-100 ng/mL. The correlation coefficient in this range was R^2= 0.9994. The LOD and LOQ values was determined as 0.36 ng/mL and 0.39 ng/mL, respectively. According to after spike data in the hair sample was determined as 82.43±5.46% at a concentration of 0.5 ng/mL; 81.80±.2.97% at a concentration of 5 ng/mL; 96.46±1.69% at a concentration of 50 ng/mL.

In order to understand the matrix effect with before spike and after spike; 9 repeat experiments with olanzapine at a concentration of 1 ng / mL were carried out. According to these experiments, recovery results of before spike (58.5%) decreased approximately by half compared with recovery results of after spike (91.6%).

From the recovery samples studied in 3 different concentrations for reproducibility; the average of 6 samples with a concentration of 0.5 ng/mL was 0.412±0.027 ng/mL, the relative standard deviation value was 6.63, the average of 6 samples with a concentration of 5 ng/mL was 4.09±0.15 ng/mL, the relative standard deviation value was 3.64, the average of 6 samples with a concentration of 50 ng/mL was 48.23±0.85 ng/mL and the relative standard deviation value was 1.76. The change in the samples analyzed by a 7-day break was 0.0054% for stability study. Since this value remains below 1%, the stability of the method developed has thus been proven: In summary, the fact that the rate of change in the sample, which was held for 1 week at room temperature, can also be seen as proof of the robustness of the method.

Although studies have been carried out to determine the active ingredient of olanzapine from other biological samples in our country, there is no any study for the detection of olanzapin from hair sample. Therefore, the contribution of this study to the literature is considered to be important. With the further studies, it is aimed to develop more sensitive methods that can reach lower determination limits.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Adli bir olguda toksikolojik analiz, zehirlenmenin nedenini ve maruziyetin boyutunu anlamak için yapılmaktadır. Zehirlenmeye sebep olan madde veya madde grupları antemortem veya postmortem olgu örneklerinde idrar, kan, saç, tükürük, ter, gaita, organ vb. biyolojik matrikslerde aranır. Bu örnekler adli bilimlerde bir olayın aydınlatılmasında delil olarak karşımıza çıkmaktadır. Söz konusu matriks içinde toksik maddenin ne kadar sürede ve miktarda belirlenebileceğinin yanıtı, olayın çözümüne kuşkusuz katkı sağlayacaktır.

Antidepresan ve antipsikotik ilaçlar yaygın olarak kullanılan ilaçlardandır ve bağımlılık yapma potansiyeli olan bu maddelerin istismar edildiği bilinmektedir. Bu maddelerin reçeteli ve reçetesiz olarak satılıyor olması ve kötüye kullanılan maddeler olması sebebiyle adli olgularda sıkça karşılaşılmaktadır (1).

Atipik antipsikotik ilaçlardan biri olan olanzapin, sadece yetişkinlerde değil aynı zamanda gençlerde de sıklıkla reçete edilen bir ilaçtır. Tedavi sırasında karşılaşılan ilaca ait en önemli sağlık riskleri arasında kardiyovasküler komplikasyonlar, ani kalp ölümleri, epilepside azalmış nöbet eşik seviyesi ve buna bağlı gelişen ölümler, adli toksikolojide olanzapin önemli hale getirmektedir. Akut olanzapin toksisitesinin ölüme katkıda bulunduğu görülen birçok olgu bulunmaktadır. Bununla birlikte ilacın farmakokinetik özelliği nedeniyle maddenin kanda belirlenebilme zamanı değişkenlik göstermektedir. Özellikle kan ve serum örneklerinde analitik olarak belirlenebilme kabiliyeti uzun zamandan beri bilimsel yayınlarda tartışılmaktadır ve halen yöntem geliştirilmeye devam edilmektedir (2,3).

Alternatif bir biyolojik örnek türü olan saç, tıpkı bir "kayıt cihazı" gibi, oldukça uzun bir süre alınan doz geçmişini koruyan, son dönemde öne çıkmış önemli delilerden biridir. Gelişen analitik cihaz teknolojisi ile birlikte düşük konsantrasyonlarda ilaç etken maddesi içeren

biyolojik örneklere ait analiz sonuçlarının, olguların değerlendirilmesine katkıda bulunduğu bilinmektedir (4,5). Bu nedenle saç örneğinde ilaç/madde aranması günümüz teknolojisinin sunduğu imkanlar ölçüsünde gittikçe yaygınlaşmaktadır.

Bu çalışmanın amacı, olanzapin gibi aşırı doz ölümlerin görüldüğü, hem tedavi hem de suistimal amaçlı kullanımı olan bir ilaç etken maddesinin saç örneğinden kantitatif analizine özgü bir LC-MS/MS yöntemi geliştirmektir. Bu yöntem ile olanzapinin uzun süreli kullanımına ilişkin klinik ve adli toksikologlara değerli bilgiler sağlanması amaçlanmaktadır. Böylelikle geliştirilen yöntem, Adli Toksikoloji Laboratuarının analiz parametrelerine dâhil olacak ve rutin analize ve diğer araştırmalara hizmet etmesi sağlanacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Adli Toksikoloji

Adli toksikoloji, toksikolojinin hukuka hizmet amacıyla uygulanması ve kullanılmasıdır. Bu nedenle adli toksikolog, bir suçun varlığını araştıran ekibin bir parçası olarak vücutta bulunan olası ilaçları veya kimyasalları tanımlamak için vücut sıvıları ve doku örnekleri üzerinde bilimsel testler yapan kişidir. Bu yolla vücutta suça katkıda bulunmuş olabilecek maddeleri izole ederek ve tanımlayarak zehirlenmenin nedenini ve maruziyetin boyutunu anlayacaktır. Bir zehirlenmenin hukuksal açıdan değerlendirilmesinde, maruz kalınan kimyasal maddenin "neden-etki" ilişkisinin saptanması da oldukça önemlidir. Adli toksikoloji; post-mortem adli toksikoloji, insan performans toksikolojisi ve yasa dışı madde analizi olmak üzere başlıca 3 önemli inceleme alanına sahiptir.

Şüpheli bir ölüm vakasında ölüme bir kimyasalın neden olup olmadığının belirlenmesi post-mortem adli toksikolojinin çalışma alanına girmektedir. Kasıtlı veya kasıtsız zehirlenmelerin tespitinde maruz kalınan maddenin ve madde miktarının belirlenmesi, kronik olarak bir ilaç veya yasa dışı madde alımının tespiti adli toksikoloji ile mümkündür.

İnsan performans toksikolojisi, madde etkisi altındaki bireylerin çevresine olan davranış biçimi ve değişikliğini inceleyen bilim dalıdır. Bu tip davranış değişikliğine bağlı olarak gelişen suç niteliği taşıyabilecek olayların aydınlatılması; gereken önlemlerin alınması ve gerekli hukuki işlemlerin gerçekleştirilmesi oldukça önem arz etmektedir.

Bunun yanında sporda performans arttırmak amacıyla da sporcuların çeşitli kimyasal maddeler kullandığı görülmektedir. Dopingin ilk resmi tanımının 1963 yıllarında yapıldığı ve bu durumun sporcu tarihi kadar eski olduğu bilinmektedir. Suç niteliği taşıyan bu durumun belirlenmesi ise özel kuruluşlar tarafından doping kontrolü ile yapılmaktadır.

Aynı şekilde sürüş güvenliğini sıkıntıya sokacak ve kişide alkol veya psikoaktif maddelerin varlığının tespiti, bir suçun herhangi bir madde etkisi altında işlendiğinin veya saldırgan davranışlara sahip bir kişinin madde etkisi altında olduğunun ispatı da insan performans toksikolojisi ile ilişkilidir.(1,2)

Uyuşturucu dağıtıcılarının ve bağımlılarının cezai işlem ve tıbbi tedavileri için yasa dışı madde analizine ihtiyaç duyulmaktadır. Diğer taraftan düzenli ilaç kullanan bir hastanın ani ölümü sonucu, kanında kullanmakta olduğu ilacın aşırı konsantrasyonda olduğu ve buna bağlı olarak ölümün gerçekleştiği sonucuna da varılabilir. Örneğin, ilaçlarını düzenli alması gereken ve terapötik indeksi dar olan ilaçlar kullanmak zorunda kalan epilepsi hastalarında, kişinin bir nöbet geçirerek öldüğü varsayımını güçlüdür. Bu gibi durumlarda kan düzeyinin bulunması ölüm nedeninin belirlenmesinde önemlidir.

Adli toksikoloji, çeşitli ilaçlar ve zehirlerin insanlar üzerindeki miktarları ve etkileri ile ilgilenen bir bilimdir. Adli toksikolojide temel ilgi, söz konusu ilaç ve/veya zehrin kişinin zarar görmesine veya ölümüne ne ölçüde katkıda bulunmuş olabileceğidir. Bütün bu olgular adli toksikolojinin adalete sunduğu bilgilerin ne kadar önemli olduğunu göstermektedir (3).

Adli toksikolojik analizlerde doğru sonuca ulaşmada başlangıçtaki en önemli unsur delil niteliği taşıyan örneğin toplanması, korunması ve uygun koşullarda ilgili laboratuarlara ulaştırılmasıdır. Bu düzenin sağlanması ve analiz bulgularının doğru şekilde belgelenmesi için koruma zinciri prosedürlerinin uygulanması gerekir.

2.2. Adli Toksikolojide Kullanılan Biyolojik Örnekler

Adli toksikolojide; ilaç etken maddesi, yasa dışı madde kullanımı veya zehirlenmeye sebep olan gruplar, idrar, kan, tükürük, solunum havası, saç, ter ve gaita vb. biyolojik örneklerde aranır. Bu örnekler adli bilimlerde bir olayın aydınlatılmasında delil olarak karşımıza çıkmaktadır. Adli toksikolojide; post-mortem ve ante-mortem biyolojik örnekler, olay yeri incelemesinden elde

edilen çevresel ve biyolojik örnekler, ilaç ve yasadışı madde örnekleri, gıda ve tarım örnekleri analiz için kullanılan numunelerin başlıcalarıdır.

Post-mortem vakalarda kan, idrar, iç organ örneklemleri, kemik, kemik iliği, göz içi sıvısı, beyin omurilik sıvısı, mide içeriği gibi biyolojik örnekler sıklıkla kullanılan numunelerdir. Bunun yanı sıra eğer kronik maruziyetten (örneğin uyuşturucu bağımlılığına bağlı bir ölümden) şüpheleniliyorsa saç, tırnak gibi biyolojik örnekler sıklıkla tercih edilmektedir (3,4)

Ante-mortem vakalarda kan, saç ve idrar adli toksikoloji laboratuvarlarında en sık kullanılan biyolojik örneklerdir. Kan, ilk toksikolojik analizlerden bu yana adli toksikoloji laboratuarlarında en sık kullanılan biyolojik örneklerden biridir. Özellikle uyuşturucu madde tespiti için kanın kullanımı çok eskilere dayanmaktadır (5). Madde etkisi altında işlenen suçlarla ilgili kan örneğinden yapılan analizler kıymetlidir. Diğer taraftan postmortem örneklerde kan nispeten koyu ve pıhtı parçalara sahiptir. Bu nedenle örnek alımı genellikle şırınga ve geniş ayarlı iğneyle yapılmaktadır. Ayrıca birçok ilacın postmortem kan konsantrasyonun bölgeden bölgeye değişkenlik gösterdiği bilinmektedir (6). Kanın yapısında bulunan serum proteinleri, lipidler ve diğer büyük molekül ağırlıklı bileşikler nedeniyle analiz öncesi ekstraksiyon yöntemleri idrar örneklerine göre daha karmaşıktır. Aynı zamanda kan örneğinin toplama ve saklama koşulları saç ve idrar örneklerine kıyasla daha zordur. İdrarda kullanılan madde ve metabolitleri yüksek konsantrasyonda bulunmaktadır. Ancak, tıpkı kan örneği gibi kullanılan maddenin idrar yoluyla atılma süresi psikoaktif maddelerin çeşitlerine göre değişkenlik gösterir ve madde kullanımını takiben en fazla bir haftaya kadar tespit edilebilir.

Adli toksikolojide, kronik ilaç maruziyetinin ve/veya yasa dışı madde kullanımının belirlenmesi hususunda saç örneği, tüm biyolojik örnekler içinde özel bir yere sahip olmuştur. Bunlardan en önemlisi, saçın tıpkı bir kayıt cihazı gibi davranması ve örneğin analizi yolu ile

uzun süreli madde maruziyetinin tespit edilebilmesidir. Aynı zamanda saç örneklerinin toplama aşaması diğer örneklerin toplanmasından oldukça kolaydır. Saç örneği uzun süre muhafaza edilebilir. Bağımlılık potansiyeli olan ve keyif verici olarak kullanılan maddelerin tespitinde kullanılacak biyolojik örnekler uygun şekilde seçilmeli ve analiz edilmelidir. Analiz sonucunda elde edilen bilgiler ile belirlenen madde dozunun ölüme neden olup olmadığı, işlenen suçun uyuşturucu madde etkisi altında yapılıp yapılmadığı veya bir kişinin uyuşturucu madde kullanımını bırakıp bırakmadığı tespit edilebilmektedir. Bu yüzden adli toksikolojide uygun örnek seçimi, doğru analiz yöntemlerinin uygulanması, olayın açığa kavuşturulmasında oldukça önemlidir (7,8).

2.3. Saçın Adli Toksikolojideki Önemi ve Tarihçesi

Herhangi bir kimyasal maddeye maruziyetin belirlenmesi için analizi yoluyla saçtan faydalanmak yirmi yılı aşkın bir süredir aktif bir tartışma alanı olmuştur. Saç analizi adli ve çevresel toksikolojide ağır metal zehirlenmeleri, özellikle endüstri çalışanlarının cıva gibi çevresel kirletici maddelere maruz kalma durumlarını değerlendirmek için kullanılmıştır. İnorganik elementlerin saçta bulunabileceği ve sebep oldukları zehirlenme vakalarını belgelemek için saçtaki arsenik, kurşun veya cıva seviyelerinin başarıyla kullanıldığı bilinmektedir.

Söz konusu yasa dışı madde kullanımın saçtan belirlenmesi olduğu zaman, düşük konsantrasyonda saçta birikimi olan bu organik karakterli bileşiklerin o dönemdeki kromatografik tekniklerle analizlenmesi oldukça zordu. Saçta organik madde analizi ile ilgili ilk çalışmalardan biri, dermatit tedavisi üzerine yapılan bir çalışmadır. Melanine yapısal benzerlikleri nedeniyle, I-DOPA, alfametil DOPA, izoproterenol ve amfetamin gibi ilaçların melaninle birlikte saç pigmentlerine dâhil edilebileceği öne sürülmüştür. Bu alandaki ilk çalışmaların amacı, yasa dışı madde kullanımını saptamaktan ziyade cilt tarafından ilaç

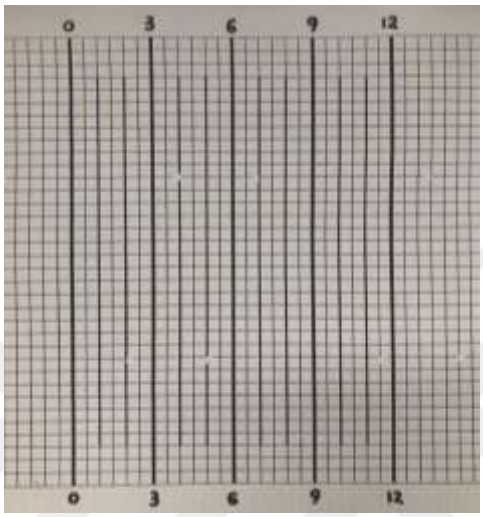
absorbsiyonu ve metabolizmasını incelemek olsa da, ilgili çalımalarda amfetamin ve benzer diğer keyif amaçlı alınan ilaçların tüketiminin belirlenmesinde saçtan yararlanılabileceği ifade edilmiştir (9,10).

1979'da Baumgartner ve ark. eroin kullanıcılarının saçlarındaki nanogram morfin seviyelerini belirlemek için bir radyoimmunoassay kullanılabileceğini bildirmiştir (11). Saç örneği hakkında önceki bulgulara ek olarak, saça girişim yapan bileşiğin saç şaftı boyunca konumlandığı ve bu konumlanmanın maruziyet süresi ile ilişkili olduğu iddia edilmiştir. Kısa süre sonra diğer araştırmacılar, aşırı dozda eroin kurbanlarının saçlarında morfinin tespit edilebildiğini göstermişlerdir ve saç analizinin ölen kişinin uyuşturucu kullanım geçmişini yeniden yapılandırmak için kullanılabileceğini öne sürülmüştür (12). O tarihten bu yana saç örneği dünya çapında artan sayıda adli toksikoloji laboratuvarı tarafından yasa dışı madde kullanımını tespit etmek için önemli bir adli örnek olarak kullanılmaktadır. Zaman içinde kokain (13-15), metamfetamin (16-18), feniklidin (19,20) ve nikotin (21,22) ile ilgili saç örneği üzerinde çeşitli araştırma çalışmaları yapılmıştır.

Geçmiş dönem çalışmaları, ölüm sonrası vakaları da dâhil olmak üzere saçta ilaç konsantrasyonlarının belirlenebildiğini göstermektedir. Diğer biyolojik örneklerde ilaç ve yasadışı madde tespiti, ilaç kullanımından sonra yalnızca birkaç gün içerisinde yapılabilmektedir. Ancak saç özellikle kronik ilaç kullanımın tespitinde önemli bilgiler verebilmektedir(23).

Saç, tıpkı bir “kayıt cihazı” gibi, oldukça uzun bir süre alınan doz geçmişini koruyan, adli bilimlerde de öne çıkmış önemli delilerden biridir. İlaç kullanım geçmişi, saç analizinde haftalar, aylar ve hatta yıllar öncesine kadar tespit edilebilmektedir. Örneğin bir uyuşturucu bağımlısının birkaç günlük aralıklarla aldığı ilacı kan ve idrar örneklerinin analiziyle tespit etmek oldukça güçtür. Ancak saç örneği analizi ile bu durum daha kuvvetli şekilde kanıtlanabilmektedir (24).

Saçın ortalama bir insanda ayda yaklaşık 1 cm olarak büyüdüğü bildirilmektedir. Kan dolaşımına katılan ilaç etken maddelerinin saçın büyümesi sırasında kök tarafından absorbe edildiği ve içeriye tutunduktan sonra saç uzasa da orada sabit kaldığı bilinmektedir. Saçın 1 cm'lik kesitlerinin analiziyle aylık bir zaman diliminde uyuşturucu madde kullanımının tespiti yapılabilir, bunun için Şekil 1'deki gibi ölçekler kullanılmaktadır.



Şekil 1. Saç örneğinin analizinde kullanılan bir ölçek

Kronik şekilde ilaç/madde kullanımı için yapılan bu tarihsel kayıt analizi, adli toksikoloji alanında bireyin uyuşturucu madde kullanım geçmişini tespit etmek, uyuşturucu madde kullanımında zaman içinde kademeli bir artış veya azalış olduğunu veya bireyin madde kullanımını sonlandırdığını belirlemek için kullanılır olmaya başlamıştır. Uzun bir belirleme süresinin olması saç örneğini, adli toksikolojide diğer biyolojik örneklerden üstün bir yere taşımaktadır (25). Saç analizleri aynı zamanda mezardan çıkarılmış insan bedenleri üzerinde de başarılı şekilde uygulanmıştır. Örneğin aynı evden art arda zehirlenerek ölen kardeşler gibi şüpheli zehirlenme olgularında fethi kabir yapılarak cesetten saç örneği alınarak analizi yapılmıştır. Bu sayede, çocuğun saçında belirlenen istismarı işaret eden uyutucu ilaçların belirlenmesi ile anne itiraf etmek zorunda kalmıştır (26,27).

Saçın, yıllar içerisinde kronik ilaç kullanımının tespiti için kullanımı artmıştır. Kronik ilaç kullanımına yönelik yapılan bir çalışmada saç köküne en yakın bölgeden başlanarak beş

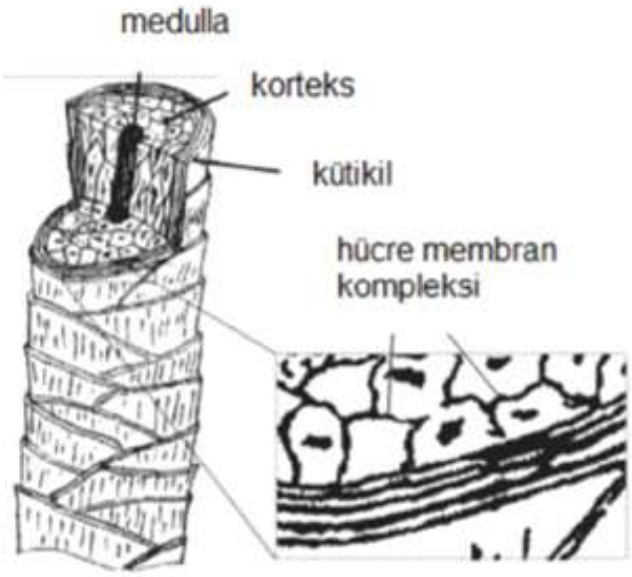
bölüm incelenmiş ve saç bölümlerindeki ilaç konsantrasyonlarının ilacın oral günlük dozu ile ilişkili olduğu gözlemlenmiştir (28).

Saçta yasa dışı madde analizleri üzerine özelleşmiş araştırmaların olduğu özellikle, kafanın farklı bölgelerindeki ve vücuttaki diğer bölgelere ait kıllar (pubik, koltuk altı kılları gibi) üzerinde farklı oranlarda birikim olduğu gösterilmiştir (29, 30). Derideki melanin seviyesinin de bu birikimde önemli faktör olduğunu kanıtlayan çalışmalar da mevcuttur (30, 31).

Saç örneği analizinin yasa dışı madde kullanımı (afyon, kokain, amfetaminler, kanabinoidler vb.), sanayide çeşitli organik kirleticilere maruziyet (pestisit) ve doping gibi kategorilerde yararlanılmasının yanı sıra (32), klinik alanda da kullanıldığı görülmektedir. Kan ve idrar gibi bilinen klinik örneklerle karşılaştırıldığında, saç örneğinin analizinden farklı şekillerde yararlanıldığı; özellikle toplama ve saklama koşulları açısından kan ve idrardan daha fazla avantajları olduğu, örnek alımının ve muhafazasının kolay, bozulma riskinin olmaması gibi sebeplerle toksikolojik analizde önemli matrikslerden biri olduğu kabul edilmektedir (6).

2.3.1.Saçın yapısı ve büyümesi

Saç, saç folikülünden sentezlenen kompleks bir epidermal büyümedir ve keratin adı verilen kükürt zengini bir protein yapısından oluşur. Keratin, saç şaftında sülfidril (tiyol, -SH) gruplarının disülfid (S-S) bağları ile yer değiştirmesi ve diğer proteinler ile kimyasal çapraz bağlanma yoluyla oldukça sert ve kararlı bir yapı oluştururlar. Saç üç farklı hücre tipinden oluşur. Bunlar dıştan içe sırasıyla kütikül, korteks ve medulla olarak adlandırılır (Şekil 2).



Şekil 2. Kılın yapısı (34)

Kütikül, folikül içindeki saç şaftını ve saçın içerisindeki lifleri korumakla görevlidir. Ancak kütikül; kimyasallar, ısı ve ışık gibi çeşitli etkenler sebebiyle zarar görebilir ve aşınabilir. Korteks, kıl şaftının kütlesini oluşturan bölümdür. Korteks hücreleri arasında fusi adı verilen küçük hava boşlukları bulunur. Saç kökünün canlı kısmında bu küçük boşluklar su ile doludur. Ancak saç uzadıkça ve kurudukça sıvının yerini hava aldığı bilinmektedir. Saçın yapısında melanin adı verilen temel bir pigment bulunmaktadır. Saç renginin, farklı dağılımda, farklı türde ve miktarda hücreler tarafından meydana geldiği bilinmektedir. Genellikle, medüller hücre sayısı ve lif çapı arttıkça artmaktadır. Bu nedenle ince yapıdaki hayvan kılları yalnızca kütikül ve korteks içerirken daha kalın yapılı hayvan kılları medüller hücre içermektedir. İnsan saçı medüller hücresi kıl kütlesinin yalnızca küçük bir kısmını oluşturur ve zamanla yok olabilir. İnsan sakal kılında medüller oldukça karmaşıktır ve bazı durumlarda çift modüller görülebilir.

İnsan saçı yaklaşık olarak 65-95% oranında protein, 15-35% oranında su ve 1-9% oranında lipitlerden ve 0.25-0.95% oranında minerallerden meydana gelir. Saçın yapısında hem temel eser elementler hem de ağır metaller bulunabilir. Aynı zamanda bunlara ek olarak yapısında çeşitli aminoasitleri içermektedir (33).

Her saç telinin büyüme döngüsü sırasıyla anajen, katajen ve telojen olmak üzere üç fazdan oluşmaktadır. Anajen aktif büyüme fazıdır ve 3 ile 7 yıl arasında sürmektedir. İnsan derisi üzerinde foliküllerin %90'ını oluşturur. Katajen fazda saçların büyümesi durur ve süre 2 ile 4 hafta arasındadır. Baş bölgesindeki saçların yaklaşık %1'i bu fazda bulunmaktadır. Telojen fazında ise saçın büyümediği ve süre olarak yaklaşık 4 ay bu fazda kaldığı bilinmektedir. Şampuanlandığında veya tarandığında dökülen saçların bu aşamada olduğu ve baş bölgesindeki saçların yaklaşık %10-15 'ini içerdiği bildirilmektedir (6). Telojen fazdaki saçlar, saça daha erken dönemde giren ilaçları taşımaktadır (25).

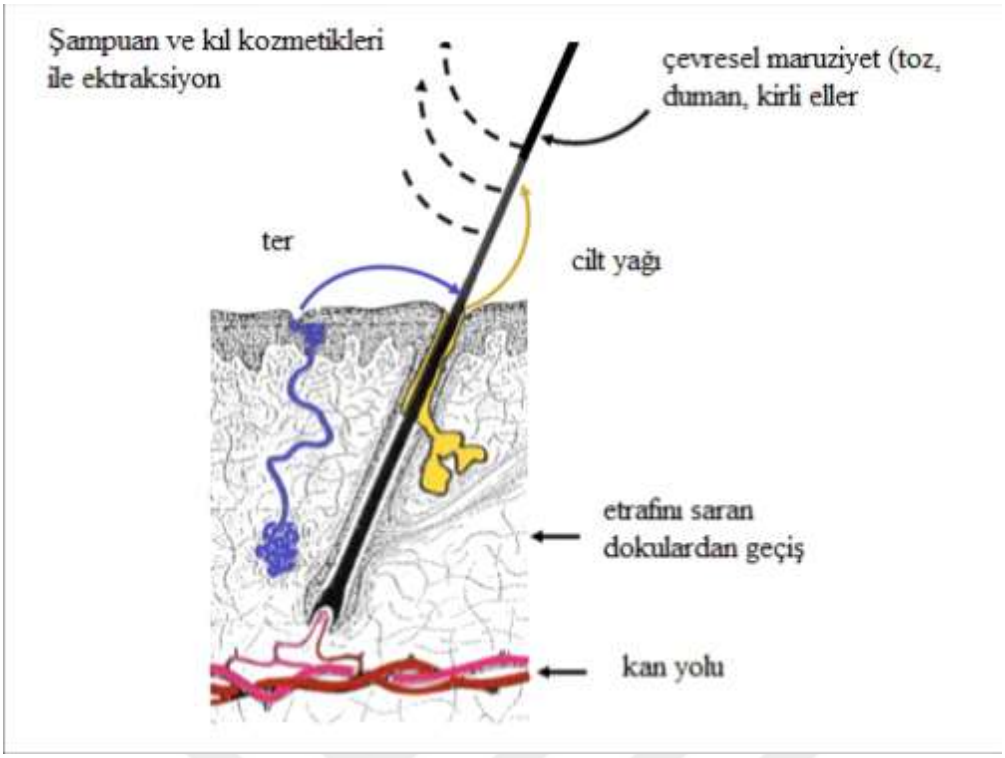
Saçın ayda 1 cm oranında büyüdüğü bununla birlikte, hem anajen/telojen saç oranlarında hem de çeşitli anatomik bölgelerde büyüme hızında önemli farklılıklar olduğu belirtilmektedir. Her iki parametre de ırk, cinsiyet, yaş ve sağlık durumuna doğrudan bağlı olduğunu ifade etmektedir (34).

2.3.2. Maddelerin kıla geçiş yolları

İlacın yada yasa dışı maddelerin saça geçiş mekanizmasının bilinmesi ile birlikte adli toksikolojide maruziyetin miktarının doğru bir şekilde yorumlanabilmesi için çok fazla araştırma gerçekleştirilmiştir. Geçmiş dönem çalışmalarında ilacın saça geçiş mekanizması, kimyasal maddelerin pasif difüzyon yoluyla saç folikülünün hızla büyüyen hücrelerine geçişi olarak tanımlanmaktaydı. Bu mekanizmada ilaç kan dolaşımından pasif difüzyon ile folikül tabanındaki büyüyen saç hücrelerine geçtikten sonra keratogenez sırasında saç şaftının içine sıkıca bağlandığı bildirilmekteydi. Bu modelin tanımlanmasıyla, saçın segmental analizi ile

ilacın kullanım zamanının belirlenebileceği düşünülmesine yol açmıştır. Ancak plazma ve saçtaki ilaç konsantrasyonu arasında zayıf bir korelasyon gözlendiği bildirilmektedir. Bu farklılığa numune hazırlama tekniği gibi laboratuvarlar arası farklılıkların, dış kontaminasyonların (hava, su, kozmetik uygulamaların vb.), bireyler arası farklılıkların (terleme oranı v.b.) sebep olabileceği düşünülmekteydi. Bu sebeple saç örneği; ağır metal ve ilaç analizi için bir "biyolojik belirteç" olarak tanımlanamıyordu. Bu durum olayı maddenin saça dahil oluşunu etkileyen faktörlerin daha detaylı incelenmesine ve bilinmesine taşımıştır (35).

İlerleyen dönemlerde yapılan çalışmalar, ilaçların veya kimyasalların matriks hücreleri ile keratinizasyon bölgesi sonu arasındaki bölgede bulunan ve 1.2 - 1.5 mm oranında büyüyen hücrelere kılcal damarlardan pasif difüzyon yoluyla dahil olduğunu varsaymıştır. Bu süre, yaklaşık 3 günlük ilaç maruziyetine karşılık gelmektedir. Bununla birlikte ilacın saça dahil olmasında alternatif mekanizmaların olduğu da bilinmektedir. Bu mekanizmalardan en önemlisi ter ve sebum sekresyonlarından maddenin saç şaftına dahil olmasıdır. Ek olarak toz, duman, kirli eller gibi çevresel etkenler de ilaç ve kimyasal maddelerin saçta birikimine neden olmaktadır (34). Tüm bu mekanizmaların yanı sıra pigmentasyonun da saçtaki ilaç konsantrasyonunu etkilediğini kanıtlayan, insan saçında (31,36) ve hayvan kılında (37,38) yapılan çalışmalar mevcuttur. Bu nedenle saçta ilaç konsantrasyonunun belirlendiği çalışmalarda sonuçların doğru şekilde yorumlanabilmesi için doğal saç rengi ve melanin içeriği de kaydedilmeli ve dikkate alınmalıdır.



Şekil 3. Kıl içerisine madde geçişi ve çevresel faktörler (34)

Bunlara ek olarak; kimyasal maddenin moleküler büyüklüğünün ve yapısının, mikro-ortam (konsantrasyon gradyanı / pH gradyanı), biyo-zarların doğası, kan akışı, plazma proteinine bağlanma, ilacın lipit çözünürlüğü (log P) ve iyonize maddelerin iyonize olmayan maddelere oranı (PK, Henderson-Hasselbalch denklemi) gibi parametrelerin büyüyen saç folikülünde maddenin birikimini matriks hücrelerinin etkilediği gösterilmiştir (39).

2.3.3. Saç örneğinin analizinden faydalanılan alanlar

Saç, hem klinik hem de adli toksikolojide alternatif ve tamamlayıcı bir matrikstir. Saç analizinden iş başvurusu süreçlerinde, klinik uygulamalarda ve suçla ilintili olgularda faydalanılmaktadır. Adli bilimlerde ante-mortem ve post-mortem analiz olmak üzere iki farklı durumda saç analizinden faydalanılmaktadır. Post-mortem analizlerde kan, ölümden kısa bir süre önce kullanılan ilaç konsantrasyonunu gösterirken saç, kronik ilaç kullanımına dair bilgi

verebilmektedir. Böylelikle kronik ilaç veya uyuşturucu madde kullanımına bağlı gerçekleşen ölüm vakalarında saç örneği, sonuca ulaşmada kullanılacak önemli bir biyolojik delildir. Yine aynı şekilde zehirlenme şüphesi olan postmortem olgularda saç analizi ile sonuca ulaşmak mümkündür.

Ante-mortem saç analizi ile uyuşturucu madde etkisi altında işlenen suçlarda, failin suçu işlerken herhangi bir uyuşturucu madde etkisi altında olup olmadığı belirlenebilmektedir. Bu tip vakalarda saç numunesi, olaydan en az 4-6 hafta sonra toplanmalıdır. Ante-mortem saç analizi ile kasıtlı veya kasıtsız zehirlenme, kronik yasa dışı madde ve alkol kullanımı gibi daha birçok olguda çözüme ulaşılabilmektedir (40).

Bunun yanı sıra saç analizi ile bebeklerde ve çocuklarda uzun süreli ilaç maruziyetini tespit etmek mümkündür. Örneğin annenin gebelik sırasında kullandığı yasa dışı ve/veya bağımlılık yapıcı maddeler (41) bebek için olumsuz sağlık etkileri yaratabilmektedir. Bu gibi durumlarda anne ve bebeğe uygulanabilecek tedavi yöntemlerinin belirlenebilmesi, gerekli önlemlerin alınması ve yasal işlemlerin gerçekleştirilmesi için yeni doğan bebeğin saçında yapılacak analiz ile hangi maddeye maruz kaldığı belirlenebilir.

Yine aynı şekilde annelerin emzirme döneminde kullandığı uyuşturucu madde, anne sütü ile bebeğe geçebilir. Bu gibi durumlarda bebek saçı da, olayın çözümüne ilişkin belirleyici bir unsurdur (41, 42).

Uzun yıllardır sporcular performans arttırmak amacıyla doping madde kullanmaktadır. Önemli bir biyolojik delil olan saç, doping kontrolü amacıyla da kullanılmaktadır. Saçın kronik kullanıma dair bilgi vermesi ve tamamlayıcı bir matris olması saçın bu alanda kullanılmasının başlıca sebeplerindendir (43).

2.3.4. Saç örneğinin toplanması ve saklanması

Saç numunesi toplanırken, başın arka kısmında iki kulak arası bölgesi kısım tercih edilir ve saç derisine en yakın şekilde örnek alınarak, deriye yakın ol kısım işaretlenir. Bu bölge başın diğer bölgelerine kıyasla büyüme oranında daha az değişim göstermekte, yaş ve cinsiyet gibi faktörlerden daha az etkilenmektedir. Analiz için bir kurşun kalem kalınlığında saç yeterli olmaktadır. Rutin testlere, ikinci bir analize ve onay testine yetecek miktarda saç örneği toplamak oldukça önemlidir. Baş kılının bulunmadığı durumlarda; kasık, koltuk altı ve sakal kılı gibi alternatif kıl numuneleri de analiz için kullanılmaktadır. Ancak bu bölgelerde kılın büyüme hızının kafa bölgesinden farklı olduğu göz ardı edilmemelidir. Saç numuneleri herhangi bir kontaminasyona sebep olmayacak güvenli alanlarda yetkili kişiler tarafından toplanmalıdır. Saç numunesi toplanırken talimatları ve gerekli tüm malzemeleri içeren bir saç toplama kiti sağlanmalı ve yetkili kişi tarafından delil toplama zinciri kurallarına uyulmalıdır. Post-mortem olgularda son ilaç kullanımı ile ilgili bilgi gerekli ise yukarıdaki prosedürlere ek olarak kökleri ile birlikte çekilmiş saç numuneleri de toplanmalıdır. Antemortem olgularda ise, yasa dışı madde kullanımının kolaylaştırdığı bir suç mevcut ise; saç numunesi iddia edilen olaydan en az 4-6 hafta sonra toplanması gerektiği bildirilmektedir. Şüpheli şahsın örnek toplama dönemleri arasında veya soruşturma bitene kadar saçı kesilmemeli ve herhangi kozmetik işlem görmemelidir (40).

Saç numunesi toplanırken saçın uzunluğu, saça uygulanmış kozmetik işlemler, saçın rengi, toplandığı bölge ve tarih kaydedilmelidir. Saç örneği toplandıktan sonra alüminyum folyo veya zarf içinde saklanmalıdır. Plastik potansiyel olarak saçtan lipofilik maddeleri çıkarabileceği için, saç örneğini saklamak için plastik torba kullanımından kaçınılmalıdır. Toplanan numuneler güneş ışığından uzak, kuru bir yerde oda sıcaklığında muhafaza edilmelidir. Maktulün ıslak olması durumunda saç örnekleri kurutularak saklanmalıdır (35).

2.3.5. Örnek alımı ve örneğin dekontaminasyonu

Son yıllarda daha hassas yöntemler getirilmesine rağmen, saç örnek alımı ve analize hazırlanmasında temel unsurlar değişim göstermediği görülmektedir. Çapı 3 ile 4 mm arasında olan bir tutam saç; kafatasına yakın kısmı ip ile sabitlenerek işaretlenmek suretiyle deri yüzeyinden dikkatlice kesilir. Adli olgularda, şahit numune gerektiği için itiraz gibi durumlarda kullanılmak üzere en az iki ayrı saç örneği alınmalıdır. Örnek miktarı doğrulamayı ve gerekli tekrarları içeren kapsamlı analiz için yeterli miktarda olmalıdır. Saç örneğinde birçok madde ve bunların metabolitleri çok kararlı şekilde bulunabilmektedir. Uygun toplama ve saklama koşullarında toplandıktan yıllar sonra bile tespit edilebilir.

Saç örneğinden yapılacak ilaç ve yasa dışı madde analizlerinde, dış kontaminasyonlar sebebiyle oluşabilecek yanlış pozitiflikleri önlemek için dekontaminasyona ihtiyaç duyulmaktadır. Saç bakım ürünleri, ter ve sebum gibi maddeler dış kontaminasyonlara örnek verilebilir. Ayrıca sigara dumanı gibi kıl şaftına sonradan dâhil olabilecek maddeler de yanlış pozitifliğe sebep olabildiği bildirilmektedir. Saç dekontaminasyonu için kullanılan çözücülerin dış kirlilikleri mümkün olduğunca saçtan uzaklaştırması ancak ilaç etken maddesini uzaklaştırmaması beklenir (34). Yapılan deneysel çalışmalar saç örneklerinin uygun yıkama çözeltileriyle kapsamlı bir şekilde yıkanması gerektiğini ortaya koymaktadır (44).

Saç numuneleri için dekontaminasyon prosedürleri arasında metanol, etanol, aseton vb. gibi organik çözücüler ile yıkama, sodyum dodesil sülfat çözeltisi veya diğer deterjanlarla yıkama ve bunlarla birlikte organik çözücüler ve fosfat tamponları ile tekrarlanan yıkamalar yer almaktadır (45).

2.3.6. Saç örneğinin analize hazırlanması ve sıklıkla kullanılan analiz yöntemleri

Saç örneğinde ilaç/madde analizi ile ilgili "Saç Analizi Derneği (Society of Hair Testing) tarafından özellikle adli olgularda kullanılacak analizlerde aşağıda yer alan basamaklar için standart bir tavsiye metni yayınlamıştır. Buna göre saç örneğinde madde analizi en az beş adımdan oluşmaktadır.

- Saçın dekontaminasyonu.
- Saçın hazırlanması: toz haline getirme, kısa bölümlere ayırma.
- İnkübasyon: Metanol, asit, sodyum hidroksit, tampon veya su çözeltilerinde.
- Ekstraksiyon: sıvı / sıvı, katı faz, katı faz mikro ekstraksiyonu.
- Analiz: MS veya MS/MS ile birleştirilmiş immünolojik test taraması (ELISA) veya / ve kromatografi (Gaz, Sıvı) (46).

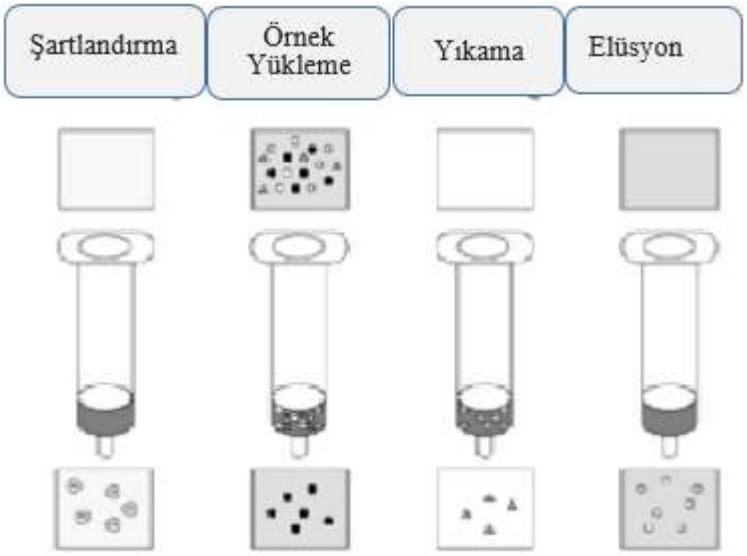
Katı faz ekstraksiyonu (Solid Phase Extraction – SPE) veya Sıvı-Sıvı ekstraksiyonu (Liquid-liquid Extraction – LLE) gibi ayrıntılı örnek hazırlama işlemlerinde tercih edilen ekstraksiyon teknikleri ile hem matriks etkisinden kurtulmak hem de aranan maddeye özgü konsantre edebilme yeteneğine bir de cihaz teknolojisindeki gelişmeler de eklenince pg seviyelerde seçiciliğin ve hassasiyetin artırıldığı görülmektedir.

İyi bir analitik ölçümleme yapabilmenin ilk adımı numune hazırlama basamağıdır. Bu durum söz konusu matristen ilgili analitlerin %100 çıkarılmasına izin verir nitelikte olmalıdır. Bu adım cihazın güvenirliği için de oldukça önemlidir. Rutin adli toksikolojik analizlerde kan ve idrar örnekleri sıklıkla kullanılmakta ise de bozulmuş ve kokuşmuş postmortem vakalarda geniş tespit penceresine sahip keratinize saç ve tırnak gibi numuneler tercih edilmektedir. Bu numunelerdeki keratinize matrisin karmaşık yapısı ve maddelerin düşük konsantrasyonlarda (ng/mg –pg/mg aralığı) akümülasyonu nedeniyle GC-MS/MS veya LC-MS/MS gibi analitik

yöntemlerle beraber ekstraksiyon verimliliği kabul edilebilir örnek hazırlama işlemleri gerekmektedir. Böylelikle analizi yapılacak maddelerin bulunduğu matristen uzaklaştırılarak uygun çözücüye alınması sağlanmış olur.

- ***Katı faz ekstraksiyonu :***

Katı faz ekstraksiyonu, analitin biri sabit, diğeri hareketli olan fazlar arasında dağılımı üzerine kurulmuştur. Hareketli faz analitin de içinde bulunduğu matriks, katı faz ise üzerine analitin tutunduğu sorbenttir (47). Bu yöntem dört aşamadan oluşur. Şartlandırma basamağında katı sorbent uygun bir çözücü ile şartlandırılır. Bu adım sorbentin ıslanmasını ve fonksiyonel grupların çözülmesini mümkün kıldığından oldukça önemlidir. Aynı zamanda bu aşamadaki amaç, başlangıçta sorbent veya işlemin uygulandığı kolondaki safsızlıkları gidermektir. Katı sorbentin şartlandırma ve numune yükleme aşamaları arasında kurumamasına dikkat edilmelidir aksi takdirde analitler etkin bir şekilde tutunamayacak ve yetersiz geri kazanım elde edilecektir. Numune yükleme aşamasında; numune çözeltisi katı fazdan geçirilerek analitin katı faz üzerine emilimi sağlanır. Numune kolona yerçekimi, pompalama, vakumlu veya otomatik bir sistemle uygulanabilir. Bu aşamada analit iyonları ile birlikte istenmeyen matriks bileşenleri de katı faza tutunabilir. Üçüncü aşama olan yıkama basamağında katı faz, üzerine tutunan matriks bileşenlerinin uzaklaştırılması amacıyla analiti etkilemeden uygun bir çözücüyle yıkanır. Son aşama, ilgili analitlerin uygun bir çözücü ile elüsyonundan oluşur. Etkili elüsyon sağlamak için akış hızı doğru şekilde ayarlanmalıdır. Katı-faz ekstraksiyon aşamaları Şekil 4'te şematik olarak gösterilmiştir (48).



Şekil 4: Katı faz ekstraksiyonunun şematik gösterimi (48)

Özellikle adli toksikolojide saçta ilaç tayinine yönelik yapılan analizlerde katı-faz ekstraksiyonu yaygın olarak kullanılmaktadır (49-51).

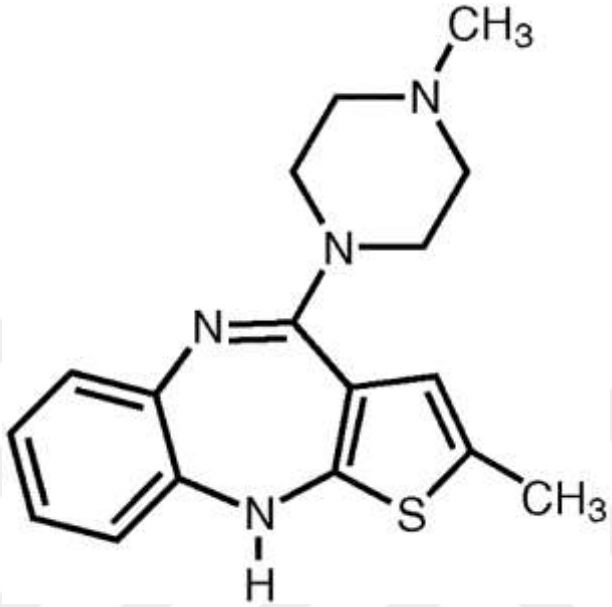
2.4 Olanzapin

Bir tiyenobenzodiyazepin türevi olan olanzapin 1982 yılında bir klozapin türevi olarak üretilmiştir.

Olanzapin (ABD'deki Zyprexa), 1996'dan beri antipsikotik bir ilaç olarak kullanılmakta olup, "Eli Lilly and Company" tarafından üretilen atipik bir antipsikotiktir. Şizofreni, Bipolar I bozuklukta akut veya karma manik ataklarda ve bipolar bozukluğun korunmasında (52) FDA (Food and Drug Administration) tarafından günlük 5 ile 20 mg doz aralığında tedavide kullanımı onaylanmıştır (53). Ülkemizde Eylül 1998 başlarında Zyprexa ticari adıyla pazarlanmaya başlanmıştır.

2.4.1. Olanzapinin kimyasal yapısı ve özellikleri

Olanzapin (IUPAC adı: 2-Metil-4-(4-metilpiperazin-1-il) -10H-tiyeno [2,3-b] [1,5] benzodiazepin), şizofreni ve bipolar bozukluk tedavisinde kullanılan atipik antipsikotik özelliklere sahip benzodiazepin türevidir.



Şekil 5. Olanzapinin kimyasal yapısı (54)

Olanzapinin moleküler formülü $C_{17}H_{20}N_4S$, moleküler ağırlığı ise 312.14 g/mol'dür. Sarı kristal katı yapısında bulunan olanzapinin erime noktası 195 ºC'dir. Kurutulmuş alkol ve metanolde az çözünür; propil alkolde çözünür; asetonitrilde az miktarda çözünür. Suda neredeyse çözünmez. pKa1, 4.01; pKa2, 7.24'tür(54).

2.4.2.Olanzapinin etki mekanizmaları ve farmakokinetik özellikleri

Şizofreni pozitif, negatif, dezorganize, bilişsel ve depresif belirtilerin bir araya gelmesiyle tanımlanan bir sendromdur. Birden çok nörokimyasal iletici şizofreni ile

ilişkilendirilmektedir. Şizofreni ile ilişkilendirilen dört temel nörotransmiter sistemi dopamin, seratonin, noradrenalin ve glutamat sistemleridir.

Olanzapin; serotonin, muskarinik (M), asetilkolin ve dopamin reseptörlerinin güçlü antagonisti olup özel olarak 5-HT2A ve D2 reseptörlerini bloke ettiği bilinmektedir (aynı zamanda ikinci nesil antipsikotik olarak da bilinir). Serotonin reseptör blokajının dopamin reseptör blokajına göre 8 kez daha güçlü olduğu bildirilmektedir. Ek olarak M1, H1, 5-HT2C, 5-HT3, 5-HT6, α1, D1 ve D4 reseptörlerini de bloke etmektedir. Özellikle 5-HT1A reseptörleri üzerine karşıt etki yaptığı bilinmektedir.

Gerek klasik gerekse atipik antipsikotiklerin beynin dopamin yolaklarındaki reseptörleri bloke ettiği ancak olanzapinin de içinde yer aldığı 2. nesil antipsikotiklerin birinci nesil olanlara göre hastalarda daha az parkinsonizm, vücut sertliği ve istemsiz titreme gibi ekstrapiramidal yan etki oluşturduğu iddia edilmektedir. Olanzapin esas olarak izoenzim 1A2 (CYP1A2) ve daha az ölçüde CYP2D6 ile sitokrom P450 (CYP) sistemi tarafından metabolize edildiği bilinen ve söz konusu mekanizmalar ile oral dozun ortalama %40'ından fazlasının hepatik ilk geçiş etkisi ile giderildiği bilinen bir antipsikotik yatıştırıcı ilaçtır.

Serotoninerjik, dopaminerjik, muskarinik M1-5, histamin H1 ve alfa-1-adrenerjik reseptörlere yüksek afinite ile bağlanırken; gamma-aminobütirik asit tip A, benzodiazepin ve beta-adrenerjik reseptörlere zayıf şekilde bağlanmaktadır (6,54) . Elektrofizyolojik çalışmalar da, olanzapinin akut uygulamasının, A10 birincil mesolimbik dopamin nöronlarının ateşlenmesini arttırdığını, ancak A9 nigrostriatal dopamin nöronlarının ateşlenmesini arttırmadığını ortaya koymaktadır. Olanzapin, gastrointestinal sistemden iyi emildiği ve 3-8 saat sonra yüksek konsantrasyona ulaştığı bilinmektedir. İlacın yarılanma süresi yaklaşık 33 saattir (55). Emilimi besinlerden etkilenmediği ve sistemik dolaşıma geçmeden önce dozun yaklaşık %40'ın metabolize edildiği bildirilmektedir (6). Dozun %7'si değişmemiş olarak idrardan

atılırken, bu da %93 oranında metabolize olduğunu göstermektedir. İlaç dozunun yaklaşık %57'si idrardan , %30'u ise metabolit olarak feçes yolu ile atılmaktadır. Ana metabolitler; 10-Nglukuronid, N-desmetil, 2-hidroksimetil, 2-karboksi, N-desmetil-2-karboksi ve 40-N-oksit olanzapin türevlerini içerir; bunlar farmakolojik etkinlikten yoksundur(56).

2.4.3. Olanzapinin klinik kullanımı ve yan etkileri

Klasik antipsikotik ilaçlar dopamin reseptör antagonisti olarak bilinmektedir. Özellikle pozitif semptomların olduğu şizofreni tedavisinde etkilidir fakat iyileştirme oranları oldukça düşüktür. Atipik antipsikotikler, seratonin-dopamin antagonistleridir ve şizofreni tedavisinde daha etkili olduğu görülmektedir (57).

Yaygın olarak kullanılan atipik antipsikotik ilaçlardan biri olan olanzapin; şizofreni ve buna bağlı psikoz hastalarında etki gösteren bir tiyenobenzodiazepin türevidir. Kendisi de bir atipik antipsikotik klozapine benzer yapısal ve farmakolojik özelliklere sahiptir. Aynı zamanda gelişmiş bir tolere edilebilirlik profiline sahip olduğu bildirilmektedir. Sağlıklı gönüllülerde olanzapinin, tek oral dozdan (2.5 - 12.2 mg) yaklaşık 5 saat sonra maksimum plazma konsantrasyonuna ulaştığı görülmektedir. Olanzapinin önerilen dozu, başlangıçta günde bir kez 5 ile 10 mg arasındadır, birkaç gün içinde günlük 10 mg doza ulaşması amaçlamaktadır. Dozaj, en az 1 hafta aralıklarla 5 mg artışlarla kullanılarak ayarlanabilir. Günlük 15 mg ve üstündeki dozları sadece klinik değerlendirmeden sonra uygulanmalıdır (58). Özellikle aşağıdaki koşullara sahip veya risk altında bulunan hastalarda dikkatle kullanılmalıdır: kardiyovasküler, serebrovasküler veya hipotansiyon gelişmesine yatkın olabilecek başka bir hastalık; karaciğer fonksiyon bozukluğu ve nöbetler. Olanzapinin eliminasyon ve yarı ömrünün uzadığı yaşlılar, bayanlar ve sigara içmeyen kişilerde başlangıç dozu düşük (5-10 mg/gün) tutulması gerektiği vurgulanmaktadır (59).

Olanzapinin şizofreni hastalarındaki ilk klinik kullanımında antipsikotik olarak etki gösterebileceği görülmüştür. Bir çalışmada olanzapinin diğer antipsikotiklere göre daha düşük yan etki profiline sahip olduğu, negatif ve pozitif semptomları hızlı bir şekilde ortadan kaldırdığı ve karaciğer fonksiyonlarını olumsuz yönde etkilemediği gözlemlenmiştir (60).
Olanzapinin plazma konsantrayonunun belirlenmesi hastaların tedavisi veya aşırı doz tespiti için oldukça önemlidir. Olanzapinin akut psikotik hastalarda da etki gösterip, iyileşme sağladığını gösteren çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalar olanzapinin oral dozuyla plazma konsantrasyonu arasında pozitif bir ilişki olduğunu göstermektedir (55).

Olanzapinin sık görülen yan etkileri; geçici sedasyon, ortostatik hipotansiyon, kilo artışı, buna bağlı metabolik bozukluklar, kabızlık, ağız kuruluğu ve diyabettir. Olanzapin kullanımına bağlı oluşan aşırı kilo, hiperlipidemi, yüksek tansiyon, Tip 2 diyabet, koroner kalp hastalığı, inme, safra kesesi hastalıkları, osteoartrit, uyku apnesi, solunum bozuklukları ve bazı kanser türlerinin riskini artırdığı bildirilmektedir (57).

2.4.4. Olanzapinin belirlenmesinde kullanılan analitik yöntemler

Literatürde, adli ve klinik toksikolojide sıklıkla kullanılan biyolojik örneklerde (kan, idrar, tükürük ve BOS) kromatografik olarak geliştirilmiş, tek başına Olanzapin ya da metabolitine özgü veya çoklu psikiyatrik ilaçlarla eş zamanlı birçok çalışma bildirilmektedir (61-66).

Bugüne kadar olanzapinin insan biyolojik örneklerinde belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalarda en çok kullanılan örneğin plazma, en sık tercih edilen yöntemin ise HPLC yöntemi olduğu görülmektedir.

Mauri ve ark., 54 akut şizofreni hastasının plazması üzerinde yaptıkları çalışmada, olanzapin konsantrasyonları ile klinikteki tedavi sonuçları arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. HPLC

yöntemiyle günlük 5 ile 20 mg olanzapin alan hastaların plazma olanzapin seviyelerini belirlemişlerdir. Plazma seviyelerinin herşeyden bağımsız olarak, hastanın yaşına, cinsiyetine ve hastalık durumuna değil, alınan olanzapin miktarına bağlı olduğu sonucuna varmışlardır (55).

Dusci ve ark., insan plazmasında olanzapin tayinine yönelik HPLC-UV kullanılarak hızlı bir yöntem geliştirmişlerdir. Metotta basit bir çözücü ekstraksiyonu kullanılmış, ardından 270 nm'de UV absorbansı ile piklerin belirlenmesi için ters faz HPLC kolonundan ayrıştırma yapılmıştır. Geliştirilen bu yöntemin, günlük 5 ile 40 mg arasında değişen çeşitli dozlardaki ilaç ile tedavi edilen hastalardaki olanzapin konsantrasyonlarının rutin olarak izlenmesinde ve ayrıca özel farmakokinetik çalışmalarda kullanılmasında gerekli yeterli duyarlılığa, doğruluğa ve hassasiyete sahip olduğu belirlenmiştir (67).

Ikeda ve ark. 60 hastadan alınan plazma örneğinde olanzapini belirlemek için GC-MS yöntemini geliştirmişlerdir. Çalışmada, 3 şizofreni hastasının plazmasında olanzapin konsantrasyonunu belirlemeyi başarmışlardır (61).

Bunlara ek olarak son dönemlerde, olanzapin çeşitli matrikslerde belirlenmesinde sıvı kromatografisi ardışık kütle spektrometrisi yöntemleri geliştirilmektedir.

Ansermot ve ark. insan plazmasında on psikotropik ilacın ve metabolitlerin hızlı bir şekilde belirlenmesi için duyarlı ve seçici bir ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi (UHPLC) ardışık kütle spektrometresi (MS/MS) yöntemi geliştirmiştir. Bu çalışmada; gerçeklik, tekrarlanabilirlik ve hassasiyet açısından iyi nicel performanslar elde edilmiştir. Bu nedenle, geliştirilen bu yöntem hem terapötik ilaç izleme hem de farmakokinetik çalışmalar için uygun bulunmuştur (63).

Ravinder ve ark., iç standart olarak duloxetin kullanarak insan plazmasında eşzamanlı fluoksetin ve olanzapinin miktar tayini için seçici, duyarlı ve hızlı bir sıvı kromatografi /

pozitif elektrosprey iyonizasyon / tandem kütle spektrometrisi yöntemi (LC/EI/MS-MS) geliştirmişlerdir. Bu çalışma, insan plazmasından fluoksetin ve olanzapinin belirlenmesi için, ekstraksiyon sonrası ilk kez LC-MS/MS yönteminin kullanıldığını bildirmektedir (68).

Olanzapinin saçta kromatografik olarak analizine özgü için şimdiye kadar bildirilen herhangi bir çalışma olmamakla birlikte, sadece MALDI-TOF tekniğinin gücünü ortaya koymak adına tek bir insan saçında olanzapinin varlığının belirlendiği bir çalışma mevcuttur (69).

2.4.5. Olanzapinin kötüye kullanımı ve adli bilimlerdeki yeri

Atipik antipsikotik ilaçlardan olan olanzapin, sadece yetişkinlerde değil aynı zamanda gençlerde de sıklıkla reçete edilen bir ilaçtır. Özellikle kardiyovasküler, serebrovasküler veya hipotansiyon gelişmesine yatkın olabilecek; karaciğer fonksiyon bozukluğu ve nöbet geçiren hasta gruplarında kullanımı riskli olduğundan özetle ani kalp ölümleri, epilepside azalmış nöbet eşik seviyesi ve buna bağlı gelişen ölümler, adli toksikolojide olanzapini önemli hale getirmektedir. Olanzapinin aşırı dozu, merkezi sinir sistemi depresyonu, taşikardi, hiperpreksi, lökositoz, yüksek kreatin fosfokinaz seviyeleri ve paradoksik miosis benzeri opioid veya alfa-2 agonisti zehirlenmesi ile ilişkilendirilmiştir. Olanzapinin postmortem olgularda kanda tespit edilmesi kanda oldukça kararsız olduğu için karmaşıktır.

Akut olanzapin toksisitesinin ölüme katkıda bulunduğu görülen birçok olgu sunumu bulunmaktadır. Bununla birlikte ilacın farmakokinetik özelliği nedeniyle maddenin kanda belirlenebilme zamanı değişkenlik göstermektedir. Özellikle kan ve serum örneklerinde analitik olarak belirlenebilme kabiliyeti on yıldan fazla süredir bilimsel yayınlarda tartışılmaktadır ve halen yöntem geliştirilmeye devam etmektedir (69,70).

Elian ve ark, bilinmeyen miktarda Zyprexa (olanzapin) tabletinin yutulduğu ifade edilen bir intihar vakasında kan ve mide içeriğindeki olanzapin konsantrasyonlarının günlük normal

dozdan 400 kat fazla olduğunun tespit edildiği bir rapor bildirmiştir. Kan numunesinin radyoimmünoassay ile rutin taramasında barbitüratlar, morfin, kokain ve metamfetamin açısından negatif olması ölümü olanzapin toksisitesi ile ilişkilendirmiştir (71).

Stephens ve ark.'nın yayınladığı bir dava raporunda, 43 yaşındaki psikiyatrik hasta bir erkeğin yaklaşık 600 mg kadar olanzapin yuttuktan sonra saatler içinde öldüğünü, ölüm sonrası kan ve idrar örneklerinde ilacın terapötik olarak uygulanmasından sonra beklenen seviyelerin üzerinde olanzapin konsantrasyonları verdiğini bildirmektedir. Bu vakanın olanzapin doz aşımı ile intihar teşebbüsü olduğu ifade edilmektedir (72).

Gerber ve Cawthon tarafından bildirilen bir seri olgu sunumunda, iki ölüm olgusunu olanzapin toksisitesi ile ilişkilendirmişlerdir. Yüksek miktarda kan olanzapin konsantrasyonları tespit edile bu iki olgudan biri intihar, diğeri ise doğrudan toksisiteye dayandırılmaktadır (73).

Bunlar gibi, olanzapin toksisitesi ile ilişkilendirilen birçok ölüm olgusu mevcuttur. Aynı zamanda birçok olgunun verisine kolayca erişilememesi nedeniyle ilaca bağlı olası toksisite olgularında toplam sayının daha fazla olduğu sanılmaktadır.

Bu olgular dışında, olanzapinin tedavi amaçlı kullanımının yanı sıra suistimal edildiği de görülmektedir. Olanzapinin suistimal amaçlı kullanımına bağlı gelişen ölüm vakalarında, kasıtlı-kasıtsız zehirlenme veya bir intihar girişimi sonucunda gerçekleşen ölüm vakalarında adli toksikolojiye önemli bir görev düşmektedir. Bu nedenle olanzapinin kan, saç, idrar gibi biyolojik örneklerden tayinine yönelik geliştirilen analitik yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır.

2.5. Kromatografi

Kromatografi bir karışımın bileşenlerinin, biri belirli bir yönde hareket ederken (mobil faz) , biri sabit olan (durağan faz) iki faz arasında dağıtıldığı fiziksel bir ayırma yöntemidir. Bu

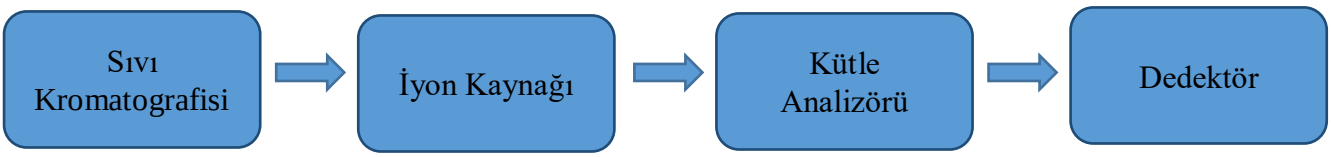
ayırma yöntemi ayrı ayrı bileşenlerin iki faz arasında bölünmesine veya farklı dağılımına bağlıdır. Durağan faz kapiler kolon duvarlarında veya küçük moleküllerin yüzeyinde bir film olarak bulunur. Böylece mobil faz için geniş bir yüzey alanı sağlar. Numune karışım mobil faza girer ve kromatografik sistem içinde hareket ederken mobil faz-durağan faz sınırında bir dizi bölümlenme veya adsorpsiyon etkileşimi geçirir. Karışımdaki bileşenler fiziksel ve kimyasal özelliklerinin farklılığı sebebiyle farklı hızlarda ilerleyerek sistemden farklı zamanlarda çıkar. Bileşenleri fiziksel ve kimyasal özelliklerinde sadece küçük farklılıklar ile ayırmayı mümkün kılan çok çeşitli durağan faz ve mobil faz kullanılabilir. Durağan faz sıvı veya katı özellikte olabilirken, mobil faz sıvı veya gaz özellikte olabilir(74).

2.5.1. Sıvı kromatografisi (Liquid Chromatography - LC)

Sıvı kromatografisi, 1900'lerin başında "klasik kolon kromatografisi" olarak bilinen bir şekilde başlamıştır. Bu düzenekte içi çeşitli türde adsorban maddeler içeren tozla dolu cam silindirin üst kısmına numune uygulanır ve ardından kolonun alt musluğu açılarak en üst kısmından çeşitli oranlarda ve polaritede organik çözücüler eklenmeye başlar. Akış sırasında doldukça musluk altına yeni balon joje yerleştirilir. Elde edilen ekstrelerin çözeltileri döner buharlaştırıcı ile uzaklaştırıldıkça kalan ekstreye sırayla numara verilerek tüm maddenin kolondan yer çekimi ile aşağı doğru akarken numuneyi oluşturan bileşenleri polarite farkından kolonun içinde farklı hızlarda hareket ederek birbirinden ayrılması amaçlanmaktadır. İlerleyen senelerde "kâğıt kromatografisi" denilen yeni bir sıvı kromatografi çeşidi kullanılmaya başlanmıştır. Kâğıt kromatografisinde; bir kâğıt şeridi kolona yerleştirilmekte ve ardından kâğıdın alt kısmına numuneler uygulanmaktadır. İçi çözücü dolu bir kaba yerleştirilen kâğıt şerit üzerinde numune bileşenlerinin farklı hızlardaki dağılımı sayesinde ayrıştırma gerçekleştiriliyordu. Daha sonra cam plaka üzerine kaplanan toz haldeki absorban tür olan silika jel, kâğıt kromatografisi ile yer değiştirdi. Bu teknik ince tabaka kromatografisi (İTK) olarak adlandırılmıştır.

HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi), sıvı kromatografisinin en geliştirilmiş, en modern halidir. Kolon içerisine otomatik olarak enjekte edilebilen ve çeşitli hacimlerde loop aracılığı ile kullanıcı tarafından numunenin bir çözücü içinde çözünmesi ve yüksek basınç altında kromatografik bir kolondan akmaya zorlanması prensibine dayalıdır. Farklı yürüme hızıyla ilerleyen içeriğin bileşenleri kolondan ayrılırken bir detektör tarafından sürekli olarak algılanır. Ve zamana karşı ortaya çıkan detektör sinyali ile bir kromatogram oluşturulur. Bütün işlem bir bilgisayar tarafından yürütülmekte, böylece işlem boyunca gereken tek manuel müdahale numunelerin sırayla bir tepsi üzerine dizilmesi ve otomatik olarak numune işlem sekansının yazılmasıdır. Bileşenlerin hızlı bir şekilde ayrılması için kullanılan yüksek basınçlı pompalar, ayırım gücünün artırılması için kullanılan daha etkili ve yeniden kullanılabilir kolonlar, daha kesin ve tekrarlanabilir sonuçlar için tüm işlemin daha iyi kontrol edilmesi HPLC sisteminin en büyük avantajlarıdır (75).

Kütle spektrometresi atom veya molekülleri iyonlaştırarak, oluşan iyonları kütle-yük (m/z) oranına göre sıralayan analitik bir tekniktir. Sıvı kromatografi-kütle spektrometresi (LC-MS), oldukça karmaşık karışımlarda bile analit veya analitlerin ayrılmasını ve ölçülmesini sağlayan iki seçici tekniğin birleşimidir. LC; bileşikleri fiziko-kimyasal özelliklerine ve farklı tutunma kapasitelerine göre birbirinden ayırırken, MS; bileşikleri ayrı ayrı kütle / yük oranlarına göre parçalar ve elde edilen parmak izi niteliğindeki Kütle spektrumu bileşiği tanımayı sağlar. Bu iki seçiciliğin bir araya gelmesi LC-MS 'i güçlü bir analitik yöntem haline getirmiştir (76).



Şekil 6. LC-MS sisteminin temel bileşenleri (76)

2.5.2. Adli toksikolojide LC-MS uygulama alanları

Gerek klinik gerekse adli toksikolojide; kan, plazma, serum veya saç gibi insan biyolojik örneklerinde bir kimyasal maddenin kalitatif ve kantitatif şekilde analiz edilebilmesi için doğruluğu ispat edilmiş analitik prosedürlere ihtiyaç vardır. Çünkü tek bir ekstrenin cihaza enjeksiyonu ile adli toksikolojiyi ilgilendiren tüm bileşiklerin bir kerede analizi sağlanamaz. Bununla baş edebilmek için, çeşitli madde gruplarının farklı matrikslerdeki davranışlarına bakılarak ardışık analiz edebilme yöntemleri geliştirilmiştir. Böylece analizlerde zaman ve kaynak tasarrufu sağlamış olunmaktadır. Farmasötik araştırma ve geliştirmede giderek daha fazla yer tutan, tek veya ardışık kütle spektrometreleri (MSn) GC veya LC ile kombine edilerek, ilacın farmakokinetik veya toksikolojik çalışmalarında düşük konsantrasyonlarda yüksek verimlilik ve etkinlik sunmaktadır.

Analitik toksikolojide yöntemin seçimi, çözülmesi gereken sorunlara bağlıdır. Adli toksikolojide belirlenmesi gereken bileşikler çoğunlukla bilinmemektedir. Bu nedenle, miktar tayininden önce ilk adım, olası şüpheli bileşiği (ilaç veya zehir) taramak ve tanımlamaktır. Temel adli analitik stratejide özellikle suistimal edilen ilaç/maddeye özgü tarama testi ve doğrulayıcı bir testin rol oynuyor olmasıdır. Yalnızca tek bir ilaç veya ilaç kategorisinin izlenmesi gerekiyorsa, öncelikle immünolojik tahliller veya ön tarama testleri ile şüpheli grup belirlenir ve daha sonra elde edilen pozitif sonuçların, en az tarama testi kadar hassas ve sonuçta yüksek derecede güven sağlayacak ikinci bir bağımsız metotla onaylanması sağlanmalıdır. Şimdiye kadar gaz kromatografi-kütle spektrometresi (GC-MS), analitik toksikolojide en yaygın kullanılan referans yöntem olmuştur. Ancak bu yöntem yalnızca yasalarla veya uluslarası spor kuruluşları tarafından belirlenmiş ilaçlar veya zehirlerin belirlenmesi gerektiğinde kullanılmaktadır. Ancak Dünya çapında birkaç bin ilaç veya pestisit bulunduğundan tarama stratejileri daha kapsamlı olmalıdır. Rutin analizlerde daha yüksek verimli tarama için, ince tabaka kromatografisi, ortak detektöre sahip gaz kromatografisi,

veya diyot dizinli detektör ile birleştirilmiş (DAD) yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) tekniklerinin sıklıkla uygulandığı görülmektedir (77,78). Klinik ve adli toksikoloji ve/veya doping kontrolünde ilaçların veya zehirlerin tespiti için taramada kromatografik tekniklerden faydalanma stratejileri son zamanlarda gözden geçirilmiştir (79). Maliyet açısından toksikoloji ve adli toksikoloji laboratuvarlarında LC-MS cihazı GC-MS cihazına nispeten daha az kullanılsa da, GC'den farklı olarak, türevlendirmenin neredeyse hiçbir zaman gerekli olmadığı gerçeği, polar ve termobil bileşiklerin analizi için LC'yi daha fazla desteklemektedir. LC-MS'in yarı uçucu bileşiklerde GC-MS'i tamamlayıcı hale geldiği, uçucu olmayan ve/veya yüksek moleküler ağırlıklı moleküller için GC-MS'den üstün olduğu bir gerçektir. LC-MS'in adli toksikolojide yasa dışı madde, istismar edilen ilaçlar ve bazı doğada bulunan zehirlerin tespitine kadar geniş bir kullanım alanı vardır (80). İnsan idrarında yasadışı maddelerin eş zamanlı tespiti için LC-MS cihazının kullanıldığı bir çalışmada, türevlendirme ve hidroliz olmadan etken maddeleri belirlemede LC-MS'in hızlı bir analitik prosedür sağladığı görülmüştür (81).

Antidepresan ilaçlara, depresyon tedavisinde yaygın olarak kullanıldığından acil toksikolojide fayda sağlayacak kromatografik tarama prosedürlerinde, suistimal edilen ilaçların belirlenmesinde ve intihar teşebbüsü olgularında sıklıkla rastlanılmaktadır. Sıvı kromatografi-kütle spektrometresi birçok ilacın spesifik olarak plazma seviyesi ölçümüne izin verdiğinden, terapötik ilaç izlenme kalitesini arttıran bir prosedür olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu bağlamda insan serumunda 13 antidepresan ve 5 nöroleptik ilacın birlikte izlenmesinin sağlandığı bir çalışma bildirilmektedir. Bu çalışmada LC-MS metodu ile ilgili ilaçların tespiti için basit ve hızlı bir prosedür sağlanmıştır (82).

Yapılan başka bir çalışmada, Elektronik Püskürtme Iyonizasyonu (ESI) tekniği ile LC-MS kullanılarak 20 antidepresan ilaç insan plazmasında eş zamanlı olarak belirlendiği

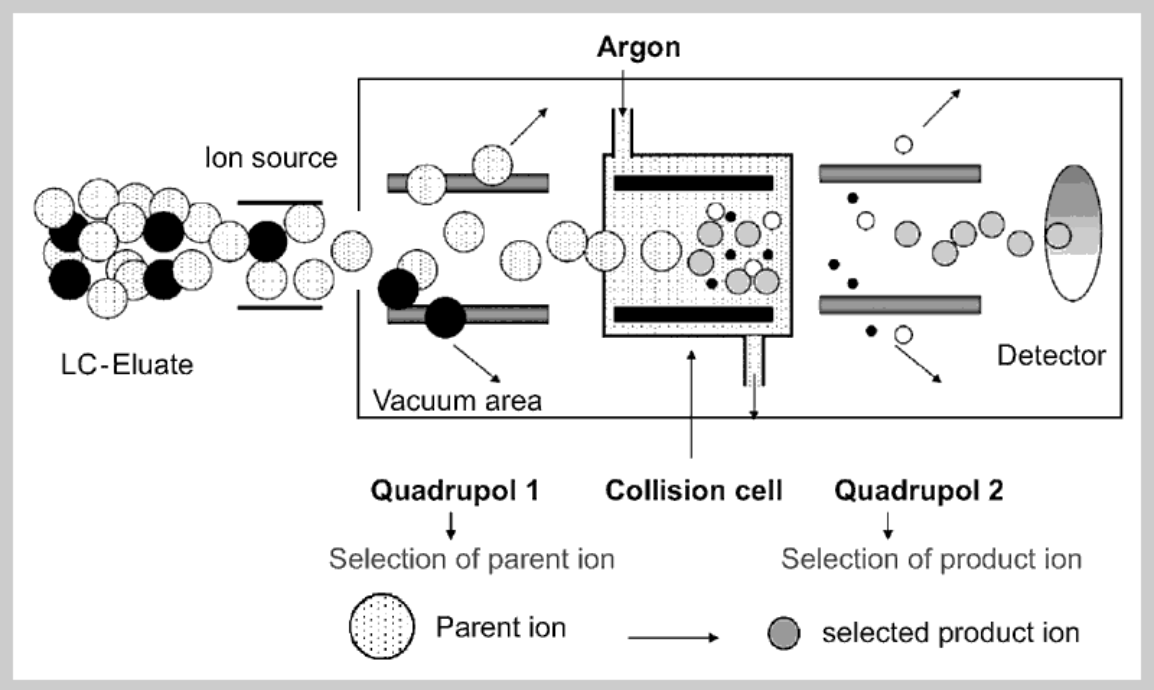
bildirilmektedir. Bu prosedür, acil toksikolojide antidepresanların belirlenebilmesi için basit hassas ve etkin bir tarama yöntemi sunmaktadır (83).

2.5.3. Ardışık (Tandem) Kütle Spektrometresi - (MS)n

Ardışık Kütle spektrometresinin temel prensibi, öncül iyonun seçimi, bu iyonun parçalanması, genellikle çarpışma tetikli parçalanma (collision-induced dissociation-CID) ve oluşan ürün iyonlarının kütle-yük oranının (m/z) ölçülmesi şeklindedir (76). Diğer bir deyişle, Ardışık kütle spektrometrisi birden çok sefer kütle spektrometrisi sağlayan araçtır. Genellikle bu farklı spektrometriler bazı molekül parçalarının oluşumu ile birbirinden ayrılır. Örneğin, bir kütle analizörü alete giren diğer bileşenlerden bir peptidi izole ederken ikinci kütle analizörü peptit iyonları gala çarpışırken peptit iyonlarını stabilize ederek bu iyonların çarpışma-tetikli parçalanmasına sebebiyet verir. Üçüncü kütle analizörü peptitten çıkan parçaları işler (sıralar). Ardışık MS aynı zamanda aynı kütle analizörünün tekrarı ile de oluşturulabilir.

Tandem kütle spektrometresinde iki adet kuadropol kütle filtresi birleştirilirmiş halde bulunur. Birinci kuadropolden gelen hedef analit molekülleri, bir çarpışma hücresindeki kontrollü bir parçalamaya maruz kalır. Elektro sprey iyonlaşması (ESI) ile oluşan iyonların tamamı ilk kuadropol kütle filtresine aktarılır. Burada, bozulmamış iyonlaştırılmış hedef analitin kütle-yük (m/z) oranı belirlenir, diğer tüm iyon türleri filtre edilir. Eşit kütle-yük oranını paylaşan seçili iyonlar sürekli olarak çarpışma hücresine aktarılır. MS analizörünün bu kısmında eser miktarlarda (10-3 mbar) çarpışma gazı (çoğu durumda argon ve nitrojen) bulunur. Birinci kuadropol tarafından seçilen iyonlar bu gaz molekülleri ile çarpışır ve karakteristik ürün iyonlarına parçalanır. Bu iyonların tamamı ikinci kuadropole yönlendirilir. İkinci analitik kuadropolün radyo frekans ayarları, yalnızca bir seçilmiş fragman iyonu geçecek şekilde ayarlanır ve geriye kalan tüm fragman iyon türleri filtrelenir. Böylece belirlenmiş bir “ana

iyon”dan, belirlenmiş bir 'ikincil iyon' nihayet iyon detektörüne ulaşır. Bu yöntem, bileşiğin karışımdaki diğer bileşenlerden ayrılıp, yüksek seçicilikte tanımlanmasını sağlar (84).



Şekil 7. Ardışık kütle spektrometresinin çalışma prensibi (84)

Ardışık kütle spektrometrometrik teknikler, bileşiğin yapısının tanımlanması ve seçici bileşik veya bileşik sınıfı analizlerinde, ayrıca iyon-molekül reaksiyonlarının analitik kullanımı ve çalışmasında kütle spektrometresinin (MS) gücünü yüksek oranda arttırmıştır (85).

Aynı zamanda, ardışık kütle spektrometresinin sıvı kromatografi ile kombine edilmesi, LC'nin zayıf kromatografik kapasitesini telafi etmiştir (84).

2.5.4. Saç analizlerinde LC/MS-MS kullanımı ve önemi

Kronik madde maruziyetinin ve buna bağlı zehirlenme öyküleri kadar madde kullanımının kolaylaştırdığı suçların belirlenmesinde de saç örneğinin LC-MS/MS ile analizi sayesinde adalete hizmet sağlanmaktadır. Özellikle ilaç etkisi altında cinsel istismar olgularında mağdurlar, çoğunlukla durumu 24-72 saatten fazla bir süre sonra bildirdikleri için, maddenin kan ve idrarda tespiti mümkün olmamaktadır. Aynı zamanda mağdurun kabul edildiği hastane

laboratuvarlarında kan ve idrarla çoğunlukla immünoassay tarama ve bazen HPLC-DAD ve GC-MS analizi yapılabilmektedir. Uyuşturucu ile kolaylaştırılmış suçlarda kullanılan ilaçların çoğu bu tekniklerle düşük seviyelerde tespit edilemediğinden, yanlış negatif sonuçlara neden olabilmektedir. Bu sebeplerden dolayı, bu çalışmalarda diğer tekniklere göre daha hassas olan LC-MS/MS tekniği kullanılmaktadır (86,87).

Son yıllarda, terapötik dozajlardan sonra rutin tarama yöntemleriyle tespit edilemeyen narkoleptik, nöroleptik ve yeni antidepresif ilaçlar geliştirilmiştir. Ölüm sonrası vakalarda da çeşitli maddeler GC-MS ve HPLC-DAD ile taranarak tanımlanamamaktadır. Bunlara ek olarak aşırı doz taramalarında maddelerin, GC/MS ile ihtiyaç duyulan hassasiyette tespit edilemediği bildirilmiştir. LC-MS/MS, özellikle saç analizinde daha büyük madde gruplarını kapsayan seçici ve hassas bir metoda duyulan ihtiyacı karşılamıştır.LC-MS/MS tekniği, adli toksikolojideki polar bileşiklerin hassas ve seçici bir şekilde tanımlanması için uygun bir yöntemdir. Bu tekniğin düşük konsantrasyonlu ve/veya karmaşık matrislerle karakterize edilen adli vakalarda saç analizlerine en verimli şekilde uygulanabileceği gösterilmiştir(88)

2.6. Adli Laboratuvarlarda Yeterlilik Testleri

Yeterlilik testi (Proficiency test), benzer hizmet sağlayıcısı olan ve/veya ölçüm yapan her bir laboratuvarların performansını ayrı ayrı belirlemeyi amaçlayan ve laboratuvarların performansının devamlılığını izlemek için kullandıkları bir uygulamadır ve zaman zaman "laboratuvarlar arası karşılaştırma" da denmektedir.

Yeterlilik testlerine katılmak için, öncelikle beş şey yapmak gerekir. İlk olarak hizmet verilen alanda ilgili analizleri denetlemek için bir Yeterlilik Test Sağlayıcısı bulunmalıdır. Bu sağlayıcıya, hizmet verilen analiz listesi verilerek yeterlilik test planının hazırlanması sağlanmalıdır. Daha sonra bunun için gerekli ücretler yatırılarak oluşturulan programa dâhil olunur. Laboratuvara yeterlilik testi için gönderilen örnek/örnekler üzerinde ilgili analizlerin

yapılmasını takiben sonuçlar incelenir, değerlendirilir. Son olarak da sonuçlar uygun şekilde ilgili Akreditasyon kuruluşunuza gönderilir.

Son yıllarda saç örneğinde organik madde analizi, postmortem toksikolojide, yasa dışı madde kullanımının kolaylaştırdığı suçlarda, işyerinde yasa dışı madde kullanımının sorgulanmasında, doping kontrolünde, bağımlılık tedavisi veya tedavi sürdürülme programlarında, klinikte tanı ve teşhis aşamalarında, terapötik ilaç izleme gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Saç analizi gerektiren olguların sayısı arttıkça, hassas analitik yöntemlerin geliştirilmesi, sonuçların yorumlanması, kalite kontrolü gibi saçta toksikolojik analizle ilişkili konular detaylı olarak tartışılmaya başlanmıştır. Saç kronik ilaç kullanımına dair bilgi edinilebilen bir matris olması sebebiyle adli toksikolojide oldukça önemli bir yere sahiptir. Bu nedenle, kalite güvence ve standartları, adli toksikoloji alanındaki saç testlerinde önemli bir sorun haline gelmektedir. Benzer özellikte hizmet veren laboratuvarların verdikleri hizmetlerin kalitesinin değerlendirilmesi anlamında zaman zaman ilgili biyolojik örnekte söz konusu analit veya analitleri temsil eden miktarı belirlenmiş referans standart materyaller kullanılır. Böylelikle benzer özellikteki çeşitli kurumların laboratuvarlarında buldukları değerin gerçeğe yakınlığı değerlendirilir. Referans materyaller, onaylı analit değerlerine sahip olması nedeniyle; yöntem geliştirme ve doğrulama, kalite kontrol veya yeterlilik testleri için oldukça faydalı modellerdir (89).

2.6.1 Saç Referans Standart Materyali ile validasyon çalışmaları

Söz konusu yeterlilik testlerinin amacı saç analizi için referans malzemelerin üretiminde yeni bir standart oluşturmaktır. Katı matrikslerde homojenlik, uygun kalite güvence standartlarının sağlanmasında dikkate alınması gereken ana hususlardan biri olduğundan, kritik homojenleştirme sürecine özellikle dikkat edilmelidir.

Saç referans materyalinin homojen olması, tüm katı matrikslerde olduğu gibi, daha büyük ölçeklerin işlenmesi ve fraksiyonlandırılmasının etkileneceği şekilde birikimin kaynağı olarak maddenin göç etme örüntülerine bağlı olduğundan hayati önem taşımaktadır. Bu tür referans malzemelerin heterojenliğini etkili bir şekilde önlemek için, bir seri içindeki sıkışık aralıklı partikül büyüklüğünün dağılımı çok önemlidir.

Bunun için benimsenen; kirletilmiş Saç örnekleri yoluyla, otantik uyuşturucu kullanıcısı olduğu bilinen kişilerin saç örneklerinin analizi yoluyla ve saça bulama şeklinde dahil etme yoluyla olmak üzere üç farklı yöntem vardır.

2.6.1.1. Kirletilmiş saç örnekleri yoluyla

Söz konusu analitlerden muaf olan bağışlanmış çok sayıda saç örneklerinden uygun miktarda alınarak iyice homojenize edilir ve eşit parçalara bölünür. Daha sonra saç yüzeyine tutturma yapılarak, istenilen konsantrasyon aralığında çalışma çözeltileri hazırlanır böylelikle ilgili analitler saça takviye edilmiş olur. Bu yöntem kan ve idrar örneklerinde izlenen yol ile aynıdır.

- Analitler kolayca ekstre edilebilir
- Analiz sonuçları ekstraksiyon prosedürünün etkinliğinden fazla etkilenmezler.

2.6.1.2.Otantik uyuşturucu kullanıcısı olduğu bilinen kişilerin saç örneklerinin analizi yoluyla

Bu yöntemde kesme ve homojen şekilde karıştırma dışında başka bir işlem uygulanmayan ve kronik uyuşturucu kullanımı olan kişilerin orijinal saç örnekleri kullanılır. Burada söz konusu analitlerin ekstre edilmesinin "normal şartlarda" gerçekleştiği varsayılır. Çeşitli faktörlere bağlı olarak (örn. yaşlanmaya bağlı süreçler, saç bakım alışkanlıkları ve kozmetik işlemlerin saç yapısı ve gözenekleri üzerindeki etkisi) madde kullanıcıların orijinal saç örneklerinde ilgili analitlerin ekstrakte edilebilirliği, kişiden kişiye değişebilen konsantrasyonda olduğu görülebilir.

2.6.1.3.Saça bulama şeklinde dahil etme yoluyla

İlaç içermeyen saç matriksine, söz konusu analitlerin dahil edilerek ("bulama şeklinde") içeriğinin değiştirilmesi yöntemidir ve saç yüzeyinde, kolay ekstre edilebilir özellik gösteren olası zayıf şekilde bağlandığı düşünülen analitleri ortamdan yıkama suretiyle uzaklaştırılır ve böylelikle kolay ekstre edilenlerin madde konsantrasyonunu arttırmasının önüne geçilmiş olur. Bu matriksin analiz edilmesi için etkili ekstraksiyon prosedürleri gereklidir.

2.7. Analitik Yöntemlerin Validasyonu (90)

Geçerlilik; bir cihazın veya analitik yöntemin hedeflenen işlem, elde edilmek istenen sonuçlar için uygunluğunun belirlenmesi amacıyla yapılan işlemler bütünüdür.

Analitik yöntem validasyonunun amacı, bir analitik yöntemin belirlenen amaç doğrultusunda güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edebileceğinin onaylanmasıdır. Böylelikle bilimsel bütünlük ve uygunluğun sağlanması amaçlanmaktadır. Güvenilirliği bilinmeyen bir analitik sonucun hiçbir değeri yoktur. Geçerli kılma işlemi; bir analiz için yeni bir yöntem geliştirildiğinde, analitik bir yöntem laboratuvarda ilk kez uygulandığında, geçerli kılınmış bir

yöntem farklı bir laboratuvarda uygulandığında veya uygulayan kişi veya kullanılan cihazda değişiklik yapıldığında, kullanılmakta olan bir yöntemde değişiklik yapıldığında, kalite kontrol testleri sonucunda bir yöntemin performansında zamanla değişim olduğu belirlendiğinde yapılır.

2.7.1 Validasyon hazırlık çalışmaları

Çalışmanın başında yöntem için hangi konsantrasyon seviyelerinde, hangi validasyon parametreleri ile çalışılacağı belirlenmelidir. Bu parametler yöntemin kapsamına göre yapılır.

2.7.1.1 Kullanılacak materyaller

- ***Kör numune:***

Standart ilave etmek için kör numune gereklidir. Analit içermeyen kör numune örnekleri yönteme göre hazırlanır, analiz edilir ve seçilen matriksin analit LOD seviyesinin altında olduğu kanıtlanır.

- ***Kör kimyasal:***

Analiz sırasında kullanılan kimyasal maddelerin ölçüm sinyalini ve kantitasyonu etkilememesi önemlidir. Numune olmadan kullanılan tüm kimyasalların uygulanıp analiz edildiği çözeltilerdir.

- ***Sertifikalı Referans Standart Materyal (CRM - Certified Reference Material):***

Referans Malzeme, metodun kalibrasyonu veya doğrulanması, ölçüm izlenebilirliğinin sağlaması, yeterlilik testi gibi kalite kontrol çalışmalarında kullanılan bir etken madde için saf veya bir matrikse özgü oluşturulmuş materyallerdir. Bir Referans Malzemenin, Sertifikalı Referans Malzeme (CRM) olabilmesi için kullanım amacına uygun şekilde matriksin her yerinde özgün bir homojenliğe ve metodun kararlılığının kanıtlanması için geçerliliği kabul edilmiş yöntemler kullanılarak elde edilen değerlerin veya olası belirsizliklerin

izlenebilirliğini sağlaması gerekmektedir. Bu sayede CRM'ler için elde edilen tüm bu bilgiler bir sertifika ile müşterilere sunulmaktadır.

Dolayısıyla uygulanan analiz yöntemi ile elde edilen sonuçların doğruluğunun kontrol edilmesi ve ölçüm izlenebilirliğinin sağlanması söz konusu ise CRM'ler kesinlikle kullanılmalıdır.

Söz konusu CRM'lere numune içinde analit de denilmekte olup saç gibi eser miktardaki kimyasal içeriğe sahip matriksler için karakterize edilmiş pek çok marka altında CRM'ler bulunmaktadır. Bu CRM'ler söz konusu içerik veya içeriklere sahip matriksin kendisinden veya matrikse bu içerik/içeriklerin ilavesi ile bazen de yapay/sentetik yoldan elde edilen matrikse söz konusu içerik/içeriklerin ilavesi yoluyla hazırlanırlar. Metod geliştirme, validasyon ve kalite kontrol amaçlı kullanılırlar.

Uygun bir CRM seçiminde;

- CRM'nin tanımlanmış kullanım amacı net şekilde ifade edilmiş olmalıdır. Ölçüm büyüklüğüne ve doğrusal aralığına dikkat edilmelidir. Yöntemin belirleme limitlerinden daha düşük sertifika değerine sahip CRM'ler uygun olmayacaktır.
- Matriks içindeki olası girişim kaynakları göz önünde bulundurulmalıdır.
- Referans malzeme üreticisinin yetkinliğine dikkat edilmelidir. Sertifikalandırma çalışmalarında görev alan laboratuvarların ISO/IEC 17025 akreditasyonları veya CIPM MRA CMC'leri (Kalibrasyon ve Ölçüm Kabiliyetleri) olup olmadığı irdelenmelidir.
- Referans malzemenin üretici tarafından tanımlanan şartlarda kullanıcıya en hızlı şekilde ulaştırılıp ulaştırılamayacağı sorgulanmalıdır

- ***Numuneler ve standartlar:***

Yöntem basamaklarına göre farklı konsantrasyonlarda standart hazırlanıp analiz edilir. En düşük tayin edilebilir konsantrasyon belirlenir ve diğer parametre konsantrasyonları ayarlanarak numuneler ve standartlar hazırlanıp analiz edilir ve hesaplanır.

2.7.1.2. Konsantrasyon seviyelerinin belirlenmesi

Belirlenen çalışma aralığı göz önünde bulundurularak düşük, orta ve yüksek olacak şekilde validasyon için (aksi belirtilmediği sürece) 3, doğrulama için 2 farklı konsantrasyon seviyesi olması önerilir.

Çalışma aralığı belirlenirken, yöntem uygulanırken karşılaşılması en olası konsantrasyon aralığı seçilmelidir. LOQ seviyesi en düşük konsantrasyon olarak alınabilir. Fakat rutin analizlerde LOQ seviyesinde örnek gelme olasılığı düşük ise bu gereksiz olabilir. Böyle durumlarda uygun görülen en düşük konsantrasyon belirlenir.

2.7.1.3. Parametrelerin uygulanması

- ***Tayin limiti (LOD) ve ölçüm limiti (LOQ):***

Çok düşük konsantrasyonlarda (µg/mL gibi) yapılan çalışmalarda en düşük tayin limiti oldukça önemli bir parametredir. LOD çalışması için; numune içinde analit olmayan çalışmalarda kör numuneler kullanarak, kromotagrafik yöntemlerde LOD seviyesine yakın konsantrasyonda analit içeren numuneler, kör numune bulunmayan durumlarda analit içermeyen çözücü (blank) körü hazırlanabilir. LOQ, LOD çalışmanın ardından birkaç yöntemle tayin edilebilir. Bazı analizler için (örneğin pH, nem gibi) tayin limitini bulmak mümkün değildir. Bir örnek içinde var ya da yok diyebileceğimiz bir analit aranıyorsa buna

tayin limiti uygulanabilir. Ancak, pH, kül, nem gibi mutlak bir değer veren parametrelerde tayin limiti bulunamamaktadır.

Tekrarlanabilirlik çalışması için hazırlanan en az 10 bağımsız analiz çalışması yapılıp, sonuçların ortalaması alınır ve LOD, LOQ hesabı için kullanılmak üzere standart sapmaları hesaplanır. Yöntemin gerekliliği ve sonuçların getirisine göre çeşitli hesaplamalardan biri kullanılabilir.

- ***Cihaz ve yöntem çalışma aralığı:***

Yöntemin kabul edilebilir bir belirsizlikte verdiği tüm sonuçların aralığı çalışma aralığı olarak adlandırılır. Alt sınır LOQ değeri olurken, üst sınır yöntemin güvenilir sonuç aldığı konsantrasyondur.

Kör ve seri konsantrasyonlarda hazırlanan standart çözeltilerin en az ikişer kez okutulması ve sonuçların hesaplanmasıyla cihaz çalışma aralığı belirlenir.

Numune körü ve bilinen konsantrasyonlardaki numuneler yöntem uygulanarak en az ikişer kez okutulur. Sonuçlar hesaplanarak yöntemin çalışma aralığı (lineer aralık) belirlenir.

Cihaz ve yöntem aralıkları belirlendikten sonra, sonuçlar ile kalibrasyon eğrisi çizilir. Daha sonra regrasyon analizi ile değerlendirilir. Korelasyon katsayısı (r), cihaz sinyali ile konsantrasyonlar arasındaki ilişki incelenerek hesaplanır. Yöntemlerin geçerli olması için korelasyon katsayısının yüksek olması beklenir. Korelasyon katsayısına rağmen doğrusallıktan şüphe duyulan durumlarda daha farklı istatiksel değerlendirmelere başvurulabilir.

- ***Seçicilik (Selectivity) / Spesifiklik (Spesificity) :***

Genel tanım olarak; yöntemin, numunede girişim oluşturabilme ihtimali olan diğer maddeler varlığında analiti ayırabilme ve tanımlayabilme gücüdür. Kör matrikste ve kullanılan çözücülerde analite girişim oluşturacak bir pik olmamalıdır.

- ***Doğruluk (Accuracy):***

Genel tanım olarak bir ölçüm sonucunun gerçek değerine yakınlığını tanımlar.

a) <u>Kesinlik:</u>

Ölçüm sonuçlarının birbirlerine yakınlığının değeridir ve ölçüm sonuçlarının ortalama değer etrafındaki dağılımını gösterir. Kesinlik; Standart Sapma (SD, s), Bağıl Standart Sapma (RSD), Varyans veya Varyasyon Katsayısı (Coefficient of variation, CV) ile ifade edilir . Tamamen elimine edilmese de dikkatli ve titiz çalışma teknikleri ile küçültülebilir.

a-1) Tekrarlanabilirlik:

Yöntemin aynı laboratuvarda, aynı cihazla, aynı uygulama koşulları altında, aynı kişi tarafından aynı veya benzer matrikslerde elde edilen ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığının değeridir. Standart sapma, rölatif standart sapma (RSD) veya % bağıl standart sapma (%RSD) ile ifade edilir.

Her seviye için en az 6 tekrarlı çalışma yapılarak sonuçlar değerlendirilir. Standart sapma, RSD ya da %RSD için aşağıda verilen formüller kullanılabileceği gibi office ya da çeşitli istatiksel programlar da kullanılabilir.

Standart sapma (σ) = $\sqrt{\sum |x - \bar{x}|^2} \Big/ n - 1$

$\sum$: toplam

x: veri kümesinde bir değer

$\bar{x}$: aritmetik ortalama

n:veri noktası sayısı

RSD = σ / $\bar{x}$ % RSD = σ / $\bar{x}$ *100

σ: standart sapma

$\bar{x}$: aritmetik ortalama

a-2) Tekrar üretilebilirlik:

Yöntemin farklı laboratuvarda, farklı cihazla, farklı kişi tarafından farklı kimyasallar kullanılarak geniş zaman aralığında, aynı veya benzer matrikslerde elde edilen ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığının değerlendirmesidir. Tekrarlanabilirlik ile aynı şekilde hesaplanır.

- ***Yöntem Sağlamlığı (Ruggedness):***

Analiz sonuçlarının, analiz koşullarındaki küçük değişiklikler karşısında etkilenmeden kalma gücüdür. Değişikliklere ne kadar az hassas olursa yöntem o kadar sağlamdır. Örnek miktarı, sıcaklık, basınç, pH, vorteks süresi, akış hızı, günler arası miktar değişimi gibi çeşitli parametreler değiştirilerek yöntemin sağlamlığı kontrol edilebilir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü Adli Toksikoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada olanzapin etken maddesi için LC-MS/MS ile kantitatif bir tayin yöntemi geliştirilmiştir. Yöntemin geçerli kılma çalışmaları tamamlandıktan sonra laboratuarlar arası karşılaştırmada kullanılan ve içerisinde olanzapin etken maddesi bulunmayan saç örneğine olanzapin katılarak geliştirilen yöntemin saç matriksi ile uyumu araştırılmıştır. Çalışmada ticari olarak temin edilmiş sertifikalı saç materyali kullınılmış olup, gerçek saç numunesi ile çalışılmadığı için etik kurul onayı gerekmemiştir.

3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan referans standart maddelere ve kimyasal maddelere ait bilgiler Tablo 1'deki gibidir.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan referans standart maddelerin ve kimyasal maddelerin isimleri ve markaları

Madde adı	**Marka**
Olanzapin (%99.9)	Abdi İbrahim
Kokain D3 (İç Standart) (%99.9)	LGC Standards
CRM (Saç matriksi) (%99.9)	LGC Standards (DHF 2/14-B)
Metanol (Ultra saf)	MERCK
Sodyum Hidroksit (NaOH) Pelet	Sigma
Hidroklorik asit (HCl) (%36.5)	MERCK
Kloroform (Ultra saf)	MERCK
Aseton (Ultra saf)	MERCK
Etil Asetat (Ultra saf)	MERCK

3.2. Çalışmada Kullanılan Cihaz ve Gereçler

Çalışmada kullanılan analitik sistemler, küçük laboratuvar aletleri ve gereçlere ait bilgiler Tablo 2'deki gibidir.

Tablo 2. Çalışmada kullanılan cihaz ve gereçlerin isimleri ve markaları

Cihaz-Gereç ismi	Marka
LC/MS-MS	Shimadzu 8045
Kolon	Restek HPLC Column: Raptor Biphenyl
Elektronik Hassas Terazi	Mettler Toledo XPE205 (Delta Range)
Balon Joje	Isolab
Falkon tüp (15,50 mL)	Isolab
Otomatik Pipet	Eppendorf
Pipet Ucu	Isolab
Pastör Pipeti	Isolab
Vorteks	IKA yellow line
Santrifüj	Hettich Universal
Steril Şırınga (10 cc)	Tıp Kim San
Şırınga Ucu Filtre	Minisart RC 25
Cam Vial	AIJIREN
İnsert Vial	AIJIREN
pH Test Çubuğu	MERCK
SPE Kartuşu	Welchrom® BRP
SPE Manifoldu	Cerex 48
SPE Vakum Motoru	Value VE 280 N
Azot Altında Uçurma Düzeneği	HyperVap HV-300 Gyrozen

3.3. Çalışma Planı

Bu çalışmada, katı haldeki Olanzapin standart maddesinin (%99.9 saflıkta) metanol içerisinde çözülmesi ile elde edilen ana, ara stok ve çalışma çözeltilerinin LC-MS/MS ile analizi için bir yöntem geliştirilmiştir. Kromatografik koşulları ve geçerlilik çalışmaları yürütülerek elde edilen verilerin ardından olanzapin içermeyen sertifikalı bir referans saç matriksine (LGC Standards), olanzapin katılması (spike) yoluyla oluşturulan örnekler ile olanzapin için bir ekstraksiyon yöntemi geliştirilmiş ve LC-MS/MS ile analiz edilmiştir.

Bu bağlamda öncelikle katı olanzapin standart maddesi ile matriks etkisi olmaksızın elde edilen seçicilik, doğrusallık, doğrusal aralık, tekrar edilebilirlik, doğruluk, LOD ve LOQ değerleri belirlenmiştir. Daha sonra matriks etkisini görmek adına saç matriksine özgü sertifikalı referans materyale (CRM) olanzapin spike edilerek hazırlanan örneklerde geri kazanım, doğruluk parametreleri de araştırılmış ve sonuçlar kıyaslanmıştır.

3.4. Olanzapin Analizi

3.4.1.Olanzapin analizinde kullanılan çözeltiler

- ***İç Standart (IS) çözeltisinin hazırlanması:***

Ticari formu sıvı halde bulunan 1000 mg/L kokain-d3 standart çözeltisinden 500 µL alındı 5 mL'lik balonjojede metanol ile seyreltildi. Bu sayede "ana stok çözeltisi (10 mg/L)" hazırlanmış oldu.

Kokain-D3 ana stok çözeltisinden (10 mg/L) 1 mL alınıp metanol ile 10 mL'ye tamamlandı ve "ara stok çözeltisi (1 mg/L)" hazırlandı. Hazırlanan çözeltiler parafilm ile kaplanarak +4^{o}C'de muhafaza edildi.

- ***Olanzapin standart çözeltilerinin hazırlanması:***

Ana stok çözeltisi (100 mg/L): 1 mg olanzapin (katı) tartılarak 10 mL metanol içerisinde çözüldü.

Ara stok çözeltisi (1 mg/L): Ana stok çözeltiden 1 mL alınıp, 9 mL metanol ile 10 mL'ye tamamlandı.

500 µg/L standart çözeltisi: Ara stok çözeltiden 5 mL alınıp, 5 mL metanol ile 10 mL'ye tamamlandı.

100 µg/L standart çözeltisi: Ara stok çözeltiden 1 mL alınıp 9 mL metanol ile 10 mL'ye tamamlandı.

- ***0.05 M NaOH çözeltisinin hazırlanması (saç ergitme çözeltisi olarak kullanılmak üzere)***

0.05 M 700 mL sodyum hidroksit çözeltisi hazırlamak için; 1 M' lık sodyum hidroksit stok çözeltisinden 35 mL tartılıp balon jojede ultra saf suda çözdürülerek 700 mL' ye tamamlandı.

- ***Kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması***

Bu çalışmada kullanılan kimyasallar ve markaları Bölüm 3.1.'de verilmiştir. Bu kimyasallar ile hazırlanan stok, ara stok ve çalışma çözeltileri aşağıdaki tabloda verilen miktarla, gerekli seyreltmeler hesaplanarak hazırlanmıştır. Bu şekilde 0,1 ng/mL ile 100 ng/mL arasında 10 noktalı bir kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur.

Tablo 3: Kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması

	100 ng/ml Olanzapin	**1000 ng/mL Kokain-D3 (IS)**	**MeOH**
Kör örnek:	-------	25 µL +	975 µL
0.1 ng/mL standart çözelti:	1 µL	25 µL +	974 µL
0.2 ng/mL standart çözelti:	2 µL	25 µL +	973 µL
0.5 ng/mL standart çözelti:	5 µL	25 µL +	970 µL
	1000 ng/mL Olanzapin		
1 ng/mL standart çözelti:	1 µL	25 µL +	974 µL
2 ng/mL standart çözelti:	2 µL	25 µL +	973 µL
5 ng/mL standart çözelti:	5 µL	25 µL +	970 µL
10 ng/mL standart çözelti:	10 µL	25 µL +	965 µL
25 ng/mL standart çözelti:	25 µL	25 µL +	950 µL
50 ng/mL standart çözelti:	50 µL	25 µL +	925 µL
100 ng/mL standart çözelti:	100 µL	25 µL +	875 µL

3.4.2. Olanzapin tayini için saç örneklerinin analize hazırlanması

3.4.2.1 *Spike saç örneklerinin hazırlanması*

Her biri 10’ar mg olan 20 adet saç matriksine özgü CRM tartılarak 50 mL'lik falkon tüplere konuldu. Örnekler iki gruba ayrıldı. İlk grup çekitlemeden kaynaklanan kayıplardan bağımsız şekilde değerlendirilmek üzere; ikinci grup ise geri kazanımı hesaplamak için kullanıldı.

Birinci gruptaki örnekler çekitleme öncesi aşağıdaki şekilde hazırlandı (sonra spike saç numuneleri) :

- 10 mg örnek üzerine 20 mL 0.05 M NaOH eklendi.
- 50 °C derecede 2 saat boyunca ultrasonik su banyosunda muamele edildi.
- İki saatin sonunda filtre kâğıdı ile süzüldü.
- Sıvıların pH'ları 9-10 arası ayarlandı.
- Bölüm 3.4.2.2.’de açıklanan çekitleme işlemi uygulandı.

- Çekitleme işlemi sonrasında on örnekten dokuz tanesinin üzerine 1µL 1000 ng/mL Olanzapin ve 25µL 1000 ng/mL Kokain-D3 eklendi (nihai konsantrasyon 1 ng/mL, nihai hacim 1000 µL). On örnekten bir tanesine ise sadece 25µL 1000 ng/mL Kokain-D3 (IS) eklendi (nihai konsantrasyon 25 ppb, nihai hacim 1000 µL).
- Numuneler azot altında kurutuldu.
- Azot altında kurutma işlemi tamamlandıktan sonra kalıntılar nihai hacim 1000 µL olacak şekilde metanol ile tamamlandı.
- Şırınga uçlu filtrelerle (Şekil 8) süzdükten sonra numuneler LC-MS/MS ile analiz edildi.

İkinci grup çalışmada (önce spike numuneler) ise on örneğin bir tanesine sadece 25µL 1000 ng/mL Kokain-D3 (IS) eklendi (nihai konsantrasyon 25 ppb, nihai hacim 1000 µL). Diğer dokuz örneğe 1µL 1000 ng/mL Olanzapin ve 25µL 1000 ng/mL Kokain-D3 eklendi (nihai konsantrasyon 1 ng/mL, nihai hacim 1000 µL).

- 10 mg örnek üzerine 20 mL 0.05 M NaOH eklendi.
- 50°C derecede 2 saat boyunca ultrasonik su banyosunda muamele edildi.
- İki saatin sonunda filtre kağıdı ile süzüldü
- Sıvıların pH'ları 9-10 arası ayarlandı.
- Bölüm 3.4.2.2.'de açıklanan çekitleme işlemi uygulandı.
- Numuneler azot altında kurutuldu.
- Azot altında kurutma işlemi tamamlandıktan sonra kalıntılar nihai hacim 1000 µL olacak şekilde metanol ile tamamlandı.
- Şırınga uçlu filtrelerle (Şekil 8) süzdükten sonra numuneler LC-MS/MS ile analiz edildi.



Şekil 8. Ekstraksiyon sırasında kullanılan şırınga ucu filtreler

3.4.2.2. *Katı faz ekstraksiyonu yöntemi*

Saçta olanzapinin LC-MS/MS sistemi ile tayinine yönelik geliştirilen bu yöntemde, numuneler analiz edilmeden önce katı faz ekstraksiyonu ön işleminden geçirildi.

SPE (Katı Faz Ekstraksiyonu) Aşamaları şu şekildedir:

- **Kartuş şartlama:** 2 mL Etil Asetat + 2 mL Metanol + 2 mL Distile Su ile kartuş şartlandı.
- **Numune Yükleme:** Bazik ortamda ultrasonik banyoda muamele edilen numuneler şartlanması tamamlanan kartuşlara ayrı ayrı yüklendi.
- **Kartuş Yıkama:** Kartuşlar 2x2 mL %5'lik Metanol ile yıkandı, yıkama işleminde hız yer çekimine bırakıldı.
- **Kartuş Kurutma:** Kartuşlar 5000 rpm 18°C'de 5 dk santrifüj edildi.

- **Elüsyon:** 2x1 mL Metanol + 2x1 mL Etil Asetat kartuşlara ilave edilerek numune tüplerde toplandı.

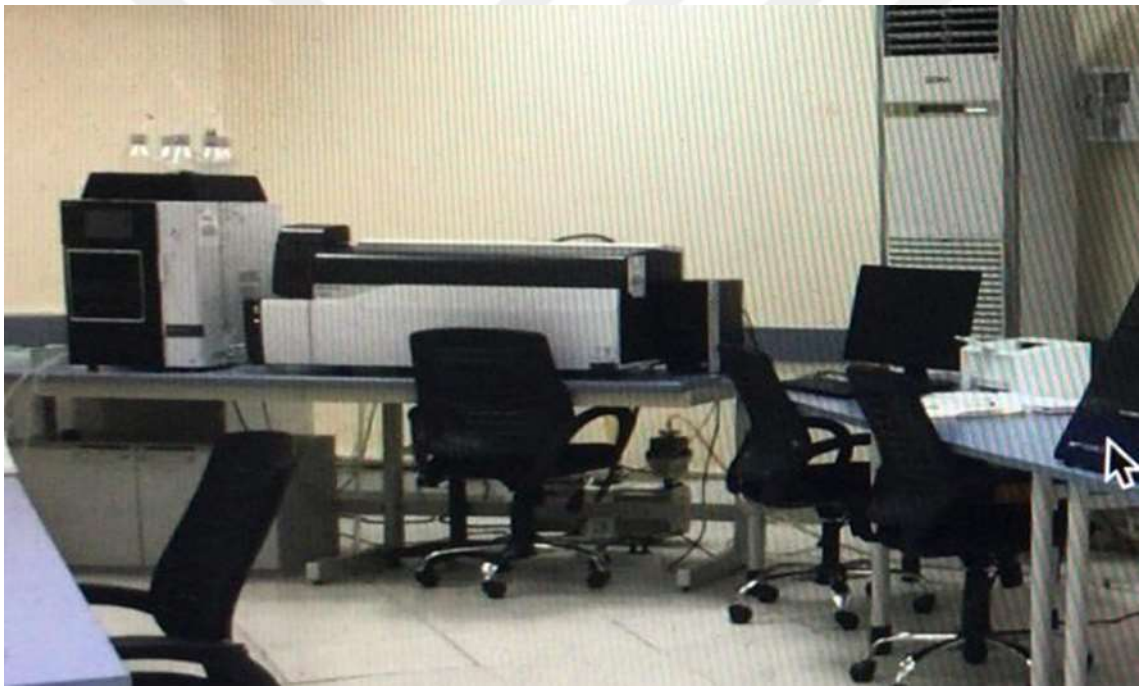


Şekil 9. Ekstraksiyon düzeneği

3.4.3. LC-MS/MS ile olanzapin analizi

Bu çalışma için Şekil 10'de gösterilen Schimadzu 8045 LC-MS / MS (Kyoto, Japonya) kullanılmıştır. Elektrosprey İyonizasyon (ESI) kısmında pozitif iyon modu için seçilmiştir. Örneklerin uçurulmasında azot altında uçurma düzeneği olarak PEAK Scientific Genius 1051'den (Glasgow, İskoçya) faydalanılmıştır. İyi bir ayrımın sağlanmasında mobil faz için, ultra saf su kullanılarak hazırlanmış %0.1 formik asit içinde 2 mM AmOAc çözeltisi (A) ve MeOH içinde % 0.1 formik asit içinde 2 mM AmOAc (B) kullanılmıştır. Kolon olarak Restek Raptor Bifenil (2.7 um, 100 x 2.1 mm) kullanılmıştır. Enjeksiyon hacmi 2 uL olarak

belirlenmiştir. Toplam analiz süresi 17 dakika, akış hızı dakikada 0.4 mL olacak şekilde düzenlenmiştir. Arayüz sıcaklığı 300° C ve kolon fırın sıcaklığı 50°C olarak ayarlanmıştır. Isıtma gazı akışı ve kurutma gazı akışı dakikada 10 L olarak ayarlanmıştır. Gradyan, mobil faz B'yi 8 dakika içinde %95'e yükselterek %5 ile başlatıldı ve 5 dakika boyunca analiz devam etti. Bundan sonra, çözücü B %5'e düşürüldü ve kolonun dengesi için 4 dakika tutuldu. Maksimum hassasiyet elde etmek için, kalma süresi 2.0 msn olarak seçilmiştir. MRM modunda izlenen iyonlar (m/z) olanzapin için 313, 256, 213'dır. LC-MS/MS sisteminde yapılan tüm analizler Lab Solutions yazılımı kullanılarak değerlendirilmiştir.



Şekil 10. Olanzapin analizinin yapıldığı LC-MS/MS cihazı

3.5. Olanzapin Analizinin Validasyonu

3.5.1. Seçicilik çalışmaları

Seçicilik çalışması için içerisinde analit olmayan çözücü (MeOH) kromatogramı ile blank olanzapin çözeltisine ait kromatogram karşılaştırıldı. Bunlara ek olarak önce ve sonra spike olanzapin içeren saç örneklerine ait kromatogramlar ile önce ve sonra spike IS içeren saç örneğine ait kromatogramlar karşılaştırıldı. Çözücüden ve matriksten kaynaklanan herhangi bir girişim olup olmadığı değerlendirildi.

3.5.2. LOD ve LOQ hesaplamaları

LOD ve LOQ çalışması için, içinde olanzapin olmayan, yalnızca 25 ng/mL IS (Kokain-D3) olan çalışma çözeltisi hazırlandı. Örnekler Bölüm 3.4.2.1'de açıklanan sonra spike saç numunesi hazırlama basamağına göre hazırlandı. Çekitleme sonrası numuneye 1000 ng/ml konsantrasyonda Kokain-D3 çözeltisinden 25µL eklendi. Azot altında kurutma işlemi yapıldıktan sonra kalıntılar nihai hacim 1000 µL olacak şekilde metanol ile tamamlandı. Şırınga uçlu filtre ile süzdükten sonra numuneler LC-MS/MS ile analiz edildi. On (10) tekrarlı analiz edilen örneklerden elde edilen olanzapin konsantrasyonunun ortalaması ve standart sapması hesaplandı. Ortalamaya standart sapmanın 3 katı eklenerek LOD, 10 katı eklenerek LOQ değerleri belirlendi.

LOD ve LOQ hesaplamaları aşağıda gösterilen şekilde yapıldı.

LOD= Ortalama blank konsantrasyonu + (3*σ)

LOQ= Ortalama blank konsantrasyonu + (10* σ)

σ = standart sapma

Elde edilen LOD ve LOQ değerleri belirlendikten sonra bu konsantrasyonlar ayrıca hazırlanarak 3'er defa analiz edilerek LOD ve LOQ değerlerinin doğrulaması yapıldı.

3.5.3. Doğrusallık çalışmaları

Olanzapin içeren kalibrasyon çözeltileri (0.1-100 ng/mL) ve kör çözelti (Blank, sadece IS içeren MeOH) Tablo 3'de gösterildiği şekilde hazırlanarak artan konsatrasyonlar şeklinde ve her bir kalibrasyon noktası 3'er tekrarlı olacak şekilde LC-MS/MS sisteminde analiz edildi. Elde edilen kalibrasyon eğrisine ait doğrunun denklemi ve korelasyon katsayısı (r^2) LC-MS/MS sisteminin yazılımı yardımı ile hesaplandı. Korelasyon katsayısı için kabul kriteri ≥0,99 olarak belirlendi.

3.5.4. Kesinlik çalışmaları

Kesinlik parametresi çalışmaları gün içi (tekrarlanabilirlik) ve günler arası (yeniden üretilebilirlik) olmak üzere düşük, orta ve yüksek üç farklı konsantrasyonda (0.5 ng/mL, 5 ng/mL, 50 ng/mL) katım (sonra spike) yapılmış örnekler ile ve her konsantrasyondan altı tekrar olacak şekilde yapılmıştır.

Gün içi tekrarlanabilirlik çalışması için; analit içermeyen 10 mg saç CRM örnekleri 3.4.2.1. bölümündeki sonra spike örnek hazırlama basamağına göre hazırlanıp çekitleme işlemi yapıldıktan sonra;

-0.5 ng/mL konsantrasyona sahip numuneleri hazırlamak için üzerine 5µL 100 ng/mL Olanzapin ve 25µL 1000 ng/mL Kokain-D3 eklendi.

-5 ng/mL konsantrasyona sahip numuneleri hazırlamak için: üzerine üzerine 5µL 1000 ng/mL Olanzapin ve 25µL 1000 ng/mL Kokain-D3 eklendi.

-50 ng/mL konsantrasyona sahip numuneleri hazırlamak için: üzerine 50µL 1000 ng/mL Olanzapin ve 25µL 1000 ng/mL Kokain-D3 eklendi. Numuneler azot altında kurutuldu. Azot altında kurutma işlemi tamamlandıktan sonra kalıntılar nihai hacim 1000 µL olacak şekilde metanol ile tamamlandı. Şırınga uçlu filtrelerle (Şekil 8) süzdükten sonra numuneler LC-

MS/MS ile analiz edildi. Analizden 7 gün sonra aynı işlem tekrar edildi. Böylece günler arası tekrar edilebilirlik çalışması yapılmış oldu.

Elde edilen sonuçların standart sapması (σ) ve bağıl standart sapması (RSD) aşağıdaki formüller kullanılarak tekrarlanabilirlik çalışmasında kullanılmak üzere hesaplandı.

Standart sapma (σ) = $\sqrt{\sum |x - \bar{x}|^2} \Big/ n - 1$

$\sum$: toplam

.x: veri kümesinde bir değer

$\bar{x}$: aritmetik ortalama

n:veri noktası sayısı

RSD = σ / $\bar{x}$ % RSD = σ / $\bar{x}$ *100

σ: standart sapma

$\bar{x}$: aritmetik ortalama

3.5.5. Geri kazanım çalışmaları

Geri kazanım çalışmaları yapmak için kalibrasyon noktalarından düşük, orta ve yüksek olmak üzere üç farklı konsantrasyon noktası seçildi (0.5, 5 ve 50 ng/mL).

Analit içermeyen 10 mg saç CRM örnekleri 3.5.4. bölümünde belirtilen şekilde ve miktarlarda (her bir geri kazanım numunesi 6 tekrarlı olacak şekilde) hazırlanıp çekitlenerek LC-MS/MS sisteminde analiz edildi. Elde edilen miktar tayinleri hesaplandı. % Geri kazanım hesabı aşağıda verilen formül kullanılarak yapıldı.

% Geri Kazanım = (c1 / c0) * 100

c0: Eklenen olanzapin konsantrasyonu

c1: Miktar tayini sonucu bulunan olanzapin konsantrasyonu

Elde edilen sonuçların standart sapması (σ) ve bağıl standart sapması (RSD) 3.5.4. bölümündeki formüller kullanılarak hesaplandı. Kabul edilebilir değerler standart sapma için <15, bağıl standart sapma yüzdesi için <%20 olarak belirlendi. Geri kazanım için kabul kriteri %80-120 arası olacak şekilde belirlendi.

3.5.6. Stabilite çalışmaları

Stabilite çalışması için bölüm 3.4.2.1'de belirtilen şekilde birinci grup (sonra spike) örnek hazırlama basamağına göre 6 adet 50 ng/mL'lik geri kazanım numunesi hazırlandı, çekitlendi, analiz edildi ve oda sıcaklığında muhafaza edilen aynı numuneler 7 gün sonra LC-MS/MS sisteminde yeniden analiz edildi. % Değişim hesabı aşağıda verilen formüle göre hesaplandı.

%Değişim= [c0-c1]/100

c0: ilk analizde tayin edilen olanzapin miktarlarının ortalaması

c1: ikinci analizde (7 gün sonra) tayin edilen olanzapin miktarlarının ortalaması

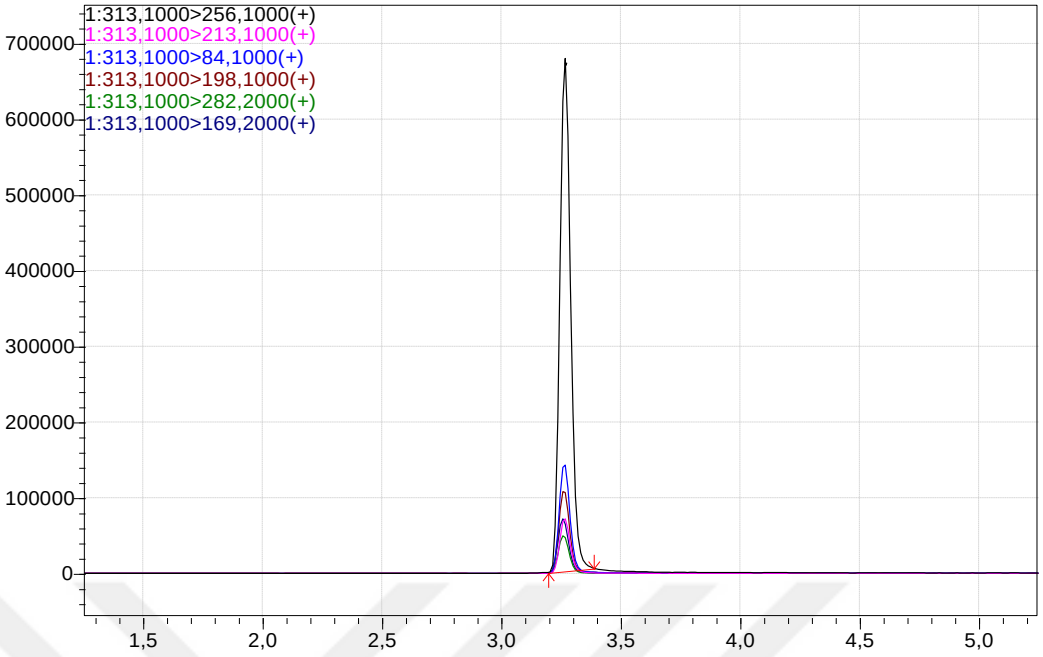
4. BULGULAR

Kullanılan yöntem parametrelerine göre 5 ng/mL standart çözelti ile yapılan çalışmada (n=6) olanzapin ve Kokain-D3 (IS) için belirlenen alıkonma zamanları (rt) ile başlıca m/z oranları Tablo 4'deki gibidir. Olanzapin için ortalama alıkonma zamanı 3,243±0,006 dk iken, Kokain-D3 için 4,495±0,002 dk bulundu.

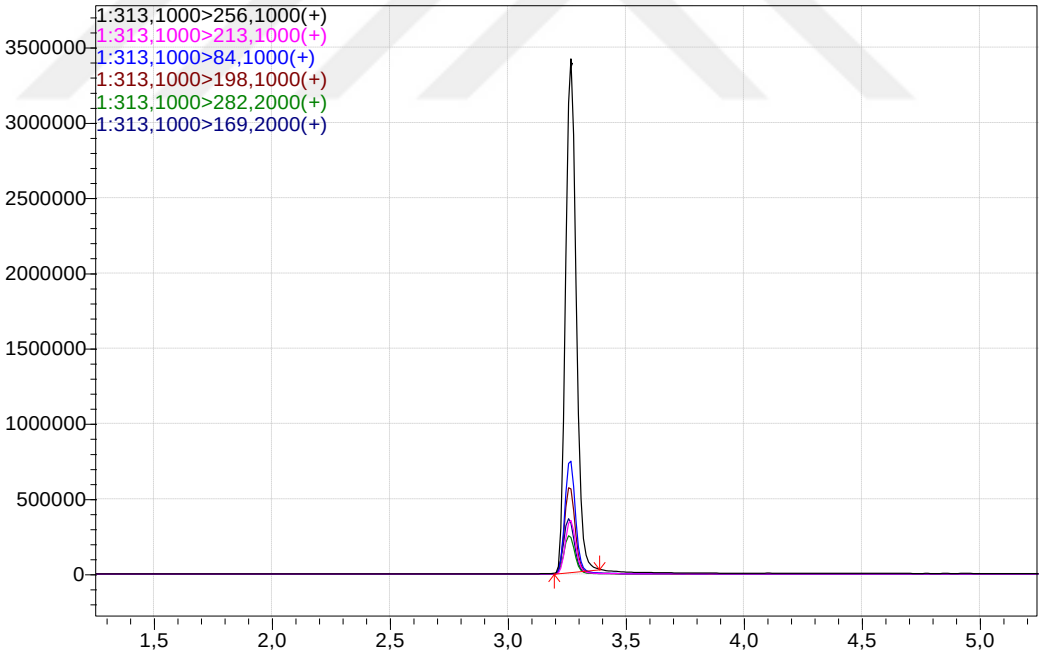
Tablo 4. Maddelerin alıkonma zamanları (dk.) ve kütle spektrumundaki (MS) başlıca iyonları (m/z) (5 ng/mL)

Analiz sayısı	**Olanzapin (dk.)**	**Kokain D3 (dk.)**
1. tekrar	3.234	4,494
2. tekrar	3.242	4,496
3. tekrar	3.239	4,495
4. tekrar	3.249	4,497
5. tekrar	3.245	4,493
6. tekrar	3.247	4,493
Ortalama rt	3.243	4.495
Standart sapma	0,0055	0,0016
% RSD	0.170	0,04
İyonları (m/z)	313, 256, 213	185, 85

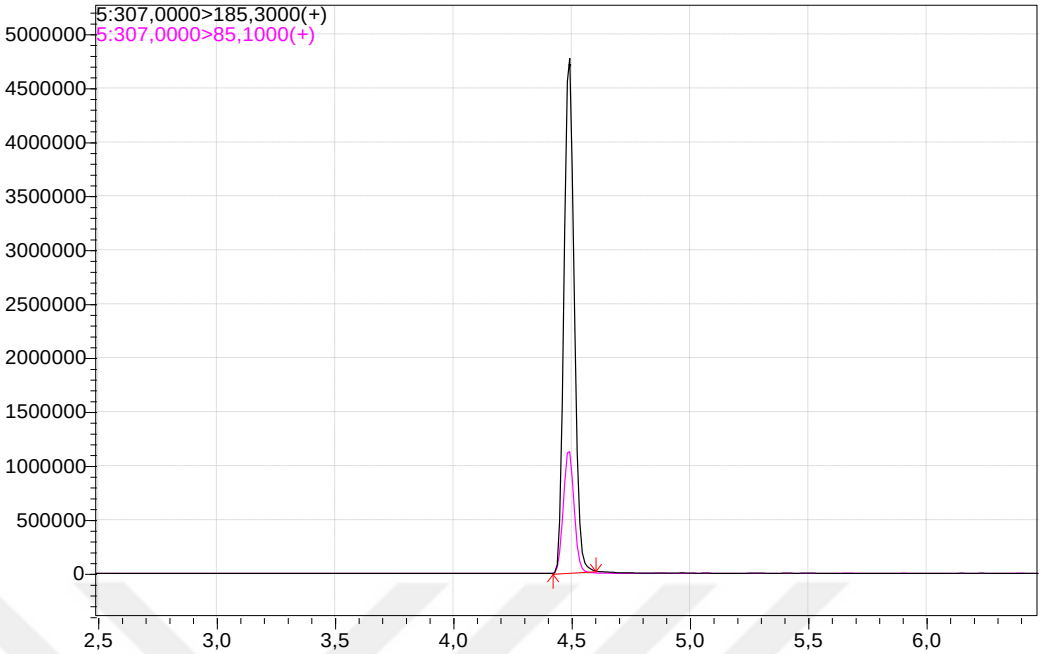
5 ng/mL ile 25 ng/mL konsantrasyonlardaki olanzapin ve 25 ng/mL ile 100 ng/mL ve IS çözeltilerinin analizinden elde edilen kromatogramları Şekil 11-14'te verilmiştir.



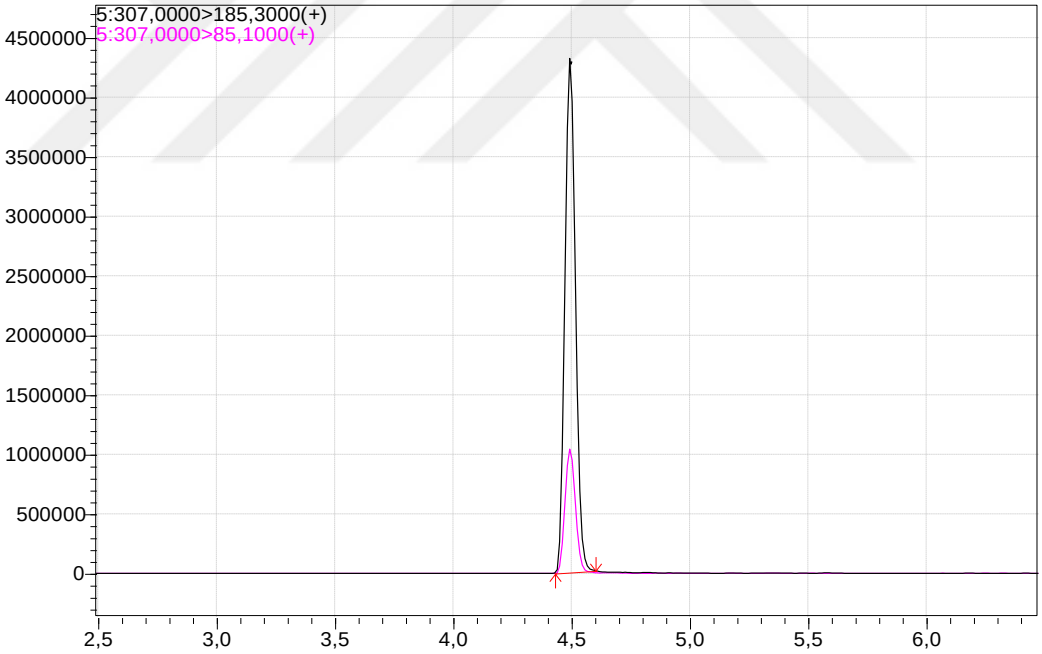
Şekil 11. 5 ng/mL olanzapin çözeltisine ait LC kromatogramı



Şekil 1. 25 ng/mL olanzapin çözeltisine ait LC kromatogramı



Şekil 13. 25 ng/mL Kokain-D3 (IS) çözeltisine ait LC kromatogramı

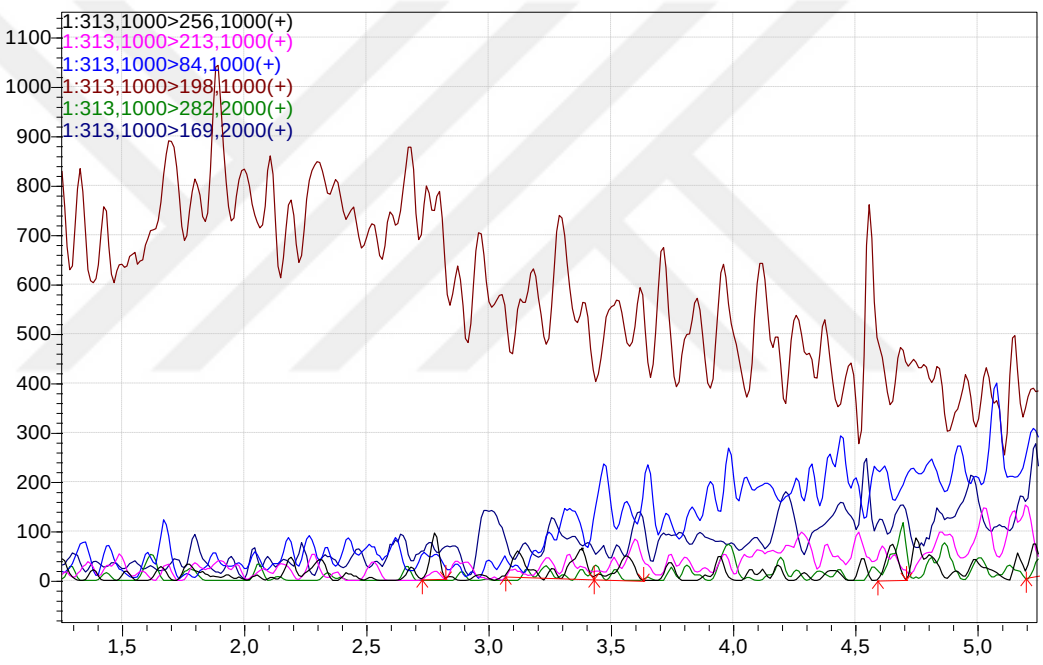


Şekil 14. 100 ng/mL Kokain-D3 (IS) çözeltisine ait LC kromatogramı

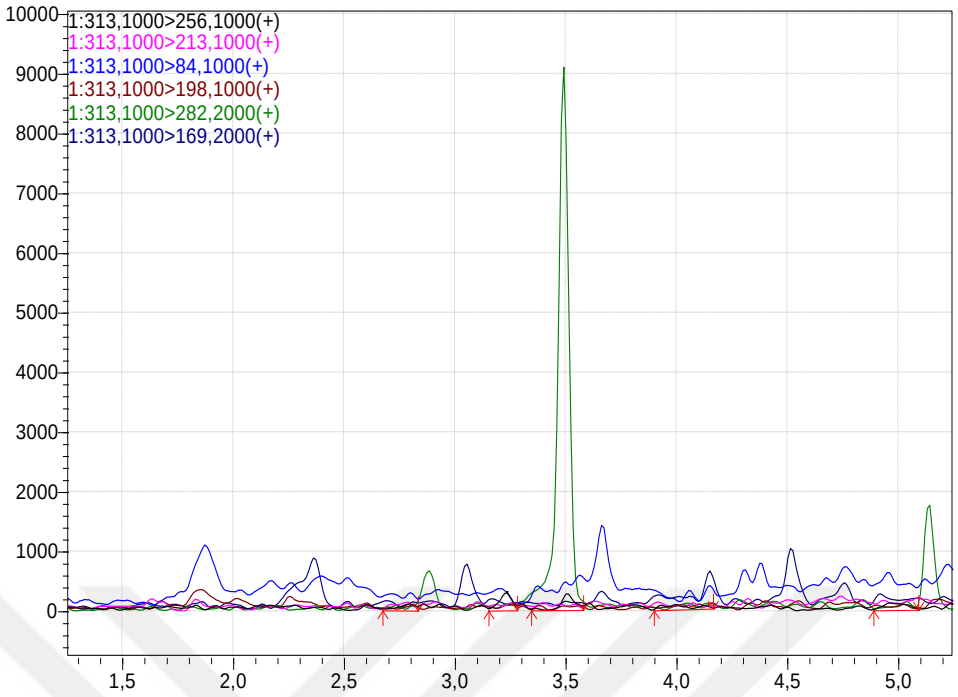
Seçicilik çalışması

Yapılan seçicilik çalışmalarında Olanzapin ve Kokain-D3 (IS) için belirlenen alıkonma zamanlarında (rt) herhangi bir girişim gözlenmemiş olup, sadece MeOH içeren kromatogram

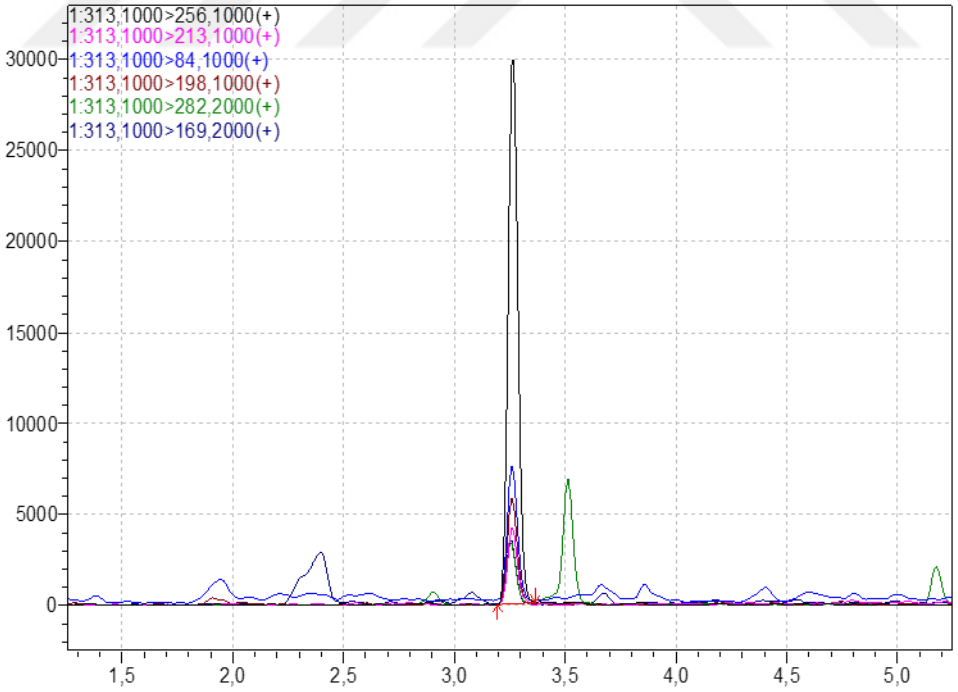
Şekil 15'de; Sadece Olanzapin çözeltisine ait LC kromatogramı Şekil 16'de; sadece önce spike Olanzapin içeren saç örneğine ait LC kromatogramı Şekil 17'de; sadece önce spike edilen IS (Kokain-D3) içeren blank saç örneğine ait kromatogram Şekil 18'de; sadece sonra spike Olanzapin içeren saç örneğine ait LC kromatogramı Şekil 19'da; sadece sonra spike IS içeren blank saç örneğine ait LC kromatogramı Şekil 20'de gösterildiği gibidir. Bu sonuçlardan yola çıkarak, organik çözücü veya saç matriksine ilişkin herhangi bir girişim olmadığı belirlenmiştir. Ayrıca tüm kantitatif basamaklar blank saç örneğine ilişkin değer çıkarıldıktan sonra hesaplanmıştır.



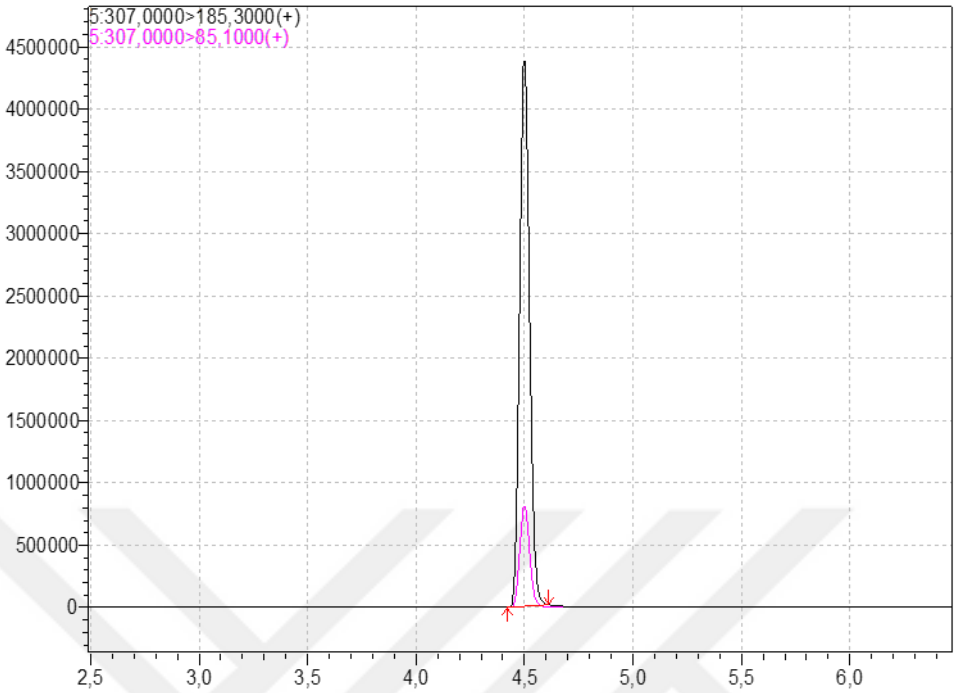
Şekil 15. Sadece MeOH çözeltisine ait LC kromatogramı



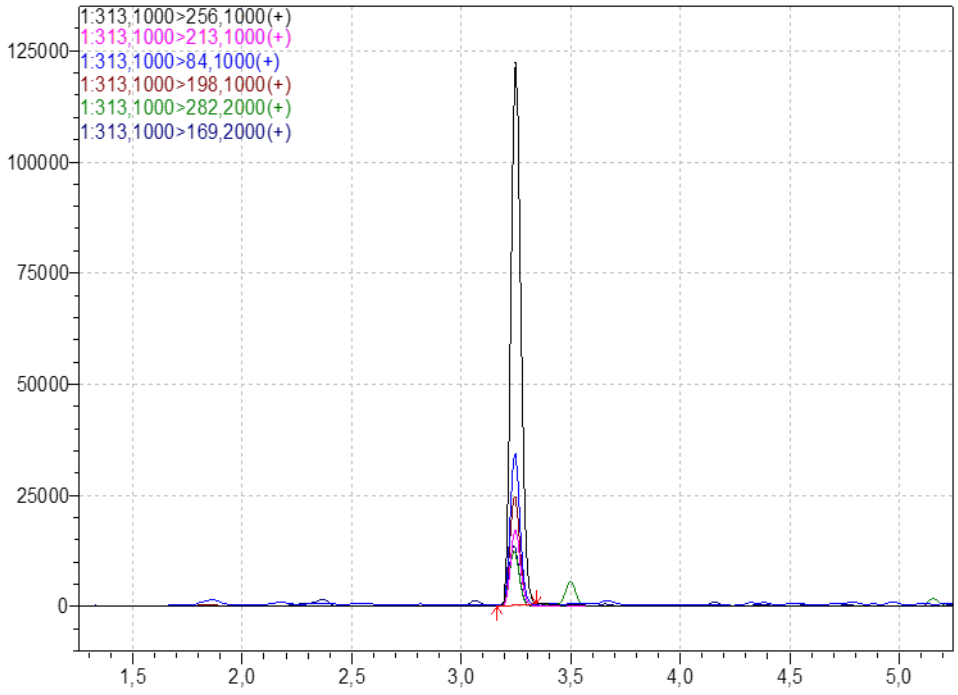
Şekil 16. Sadece olanzapin çözeltisine ait LC kromatogramı



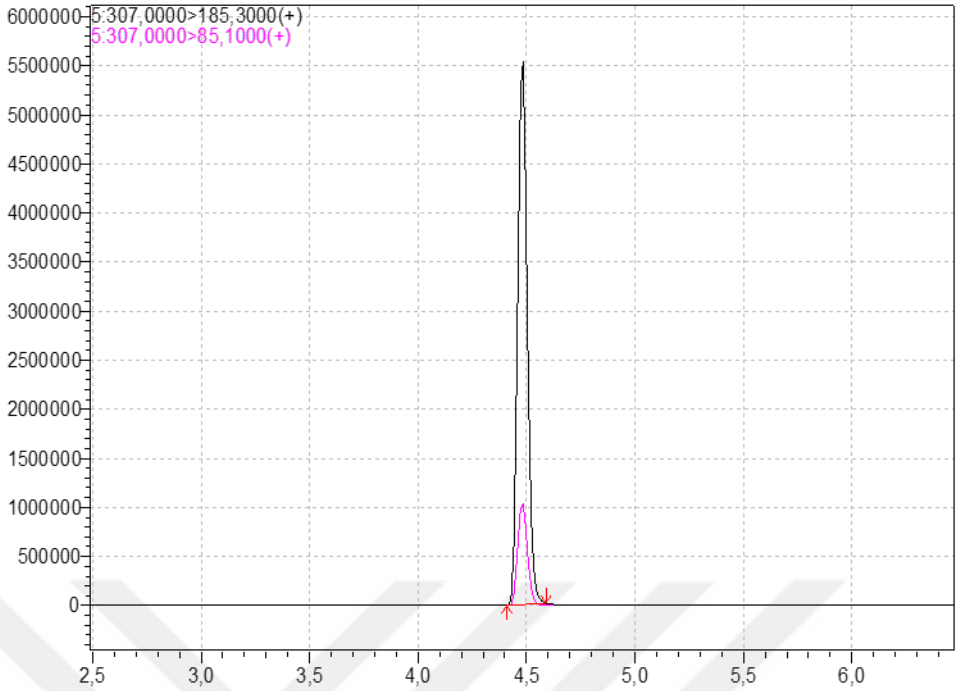
Şekil 17. Sadece önce spike Olanzapin içeren saç örneğine ait LC kromatogramı



Şekil 18. Sadece önce spike edilen IS (Kokain-D3) içeren blank saç örneğine ait kromatogram



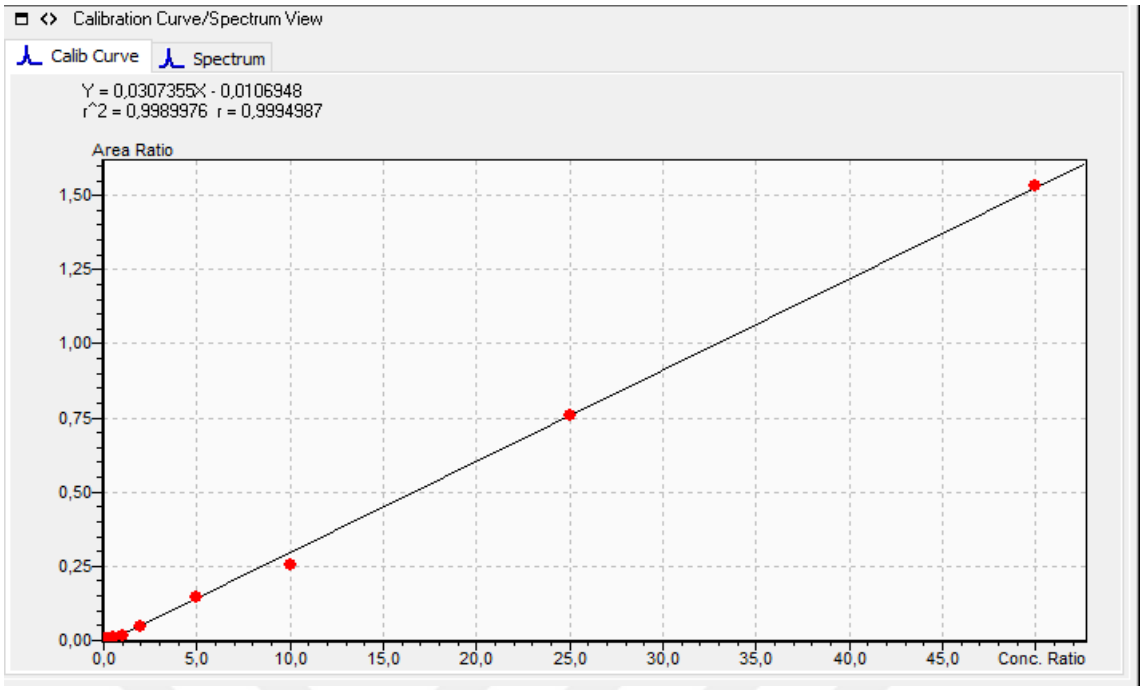
Şekil 19. Sadece sonra spike Olanzapin içeren saç örneğine ait LC kromatogramı



Şekil 20. Sadece sonra spike IS içeren blank saç örneğine ait LC kromatogramı

Olanzapine ait kalibrasyon eğrisi

Olanzapin için kalibrasyon aralığı 0.1-100 ng/mL olarak belirlendi. Bu aralıktaki korelasyon katsayısı $R^2 = 0.9994$ olarak hesaplandı. Kalibrasyon eğrisi Şekil 18'de verilmiştir.



Şekil 21. 0,1-100 ng/mL aralığında olanzapin için elde edilmiş kalibrasyon eğrisi (10 noktalı)

(response ratio: etken maddenin detektör cevabının IS'nın detektör cevabına oranı; concentration ratio: etken maddenin konsantrasyonun IS'ın konsantrasyonuna oranı)

Tablo 5. 0,1-100 ng/mL aralığında çizilmiş olan kalibrasyon eğrisinin denklemi ve korelasyon katsayısı

Doğrusal Aralık:	0,1-100 ng/mL
Denklem:	y = 0,0307x - 0,0107
Korelasyon Katsayısı (r^2)	0,9994

Analitin konsantrasyonundaki değişikliklere karşı cihazın ölçüm sinyalinde meydana gelen değişiklikler belirlendi ve söz konusu kalibrasyon noktaları, kalibrasyon denklemi ve korelasyon katsayısı belirlenmiştir (Tablo 5).

- ***LOD, LOQ sonuçları:***

LOD ve LOQ çalışması için hazırlanan 10 adet boş saç numunesi ile yapılan analizden elde edilen ortalama, standart sapma ve %RSD değerleri Tablo 6'da gösterildiği gibidir.

Tablo 6. 10 adet boş saç örneğinin bulunan miktarı (µg/mL), standart sapma ve %RSD değerleri

Boş saç analizi (n=10)	**Bulunan Miktar (ng/mL)**
1. tekrar	0,351
2. tekrar	0,349
3. tekrar	0,350
4. tekrar	0,350
5. tekrar	0,355
6. tekrar	0,357
7. tekrar	0,359
8. tekrar	0,354
9. tekrar	0,353
10. tekrar	0,356
Ortalama	0,353
Standart sapma	0,0034
%RSD	0.95

LOD ve LOQ hesaplamaları Gereç ve yöntemler bölümünde 3.5.2'de belirtilen formüller ile yapıldı. Olanzapin için LOD 0.36 ng/mL, LOQ 0.39 ng/mL bulundu.

- **Kesinlik sonuçları:**

Tekrarlanabilirlik çalışması için, 3 ayrı konsantrasyon için 6 tekrarlı olacak şekilde analizi yapılan saç örneklerinden sonra spike yapılarak elde edilen sonuçların ortalama, standart sapma ve bağıl standart sapma değerleri ve yedi gün sonra aynı çalışmanın tekrar edilmesi ile elde edilen sonuçlar Tablo 7'de gösterildiği gibidir.

Tablo 7. Gün içi ve günler arası tekrar edilebilirlik sonuçlarının karşılaştırılması

	Gün içi tekrar edilebilirlik			**Günler arası tekrar edilebilirlik**		
Numune (ng/mL)	**Ortalama sonuç**	**Standart sapma**	**%RSD**	**Ortalama sonuç**	**Standart sapma**	**%RSD**
0,5 ng/mL (n=6)	0,412	0,027	6,55	0,391	0,035	8,95
5 ng/mL (n=6)	4,09	0,15	3,67	3,95	0,27	6,83
50 ng/mL (n=6)	48,23	0,85	1,76	47,55	1,01	2,12

- ***Geri kazanım sonuçları:***

% Geri kazanım Tablo 8, Tablo 9 ve Tablo 10'da gösterildiği gibidir.

Tablo 8. 0,5 ng/mL olanzapin içeren saç numunenin sonra spike geri kazanım tablosu

0,5 ng/mL 'lik numune (n=6)	**Teorik miktar (ng/mL)**	**Ölçülen sonuç (ng/mL)**	**% GK**
1. tekrar	0.5	0,435	87,00
2. tekrar	0.5	0,382	76,40
3. tekrar	0.5	0,378	75,60
4. tekrar	0.5	0,429	85,80
5. tekrar	0.5	0,408	81,60
6. tekrar	0.5	0,441	88,20
		Ortalama %GK	82,43
		Standart Sapma	5,46
		%RSD	6,63

Tablo 9. 5 ng/mL olanzapin içeren saç numunesinin sonra spike geri kazanım tablosu

5 ng/mL 'lik numune (n=6)	**Teorik miktar (ng/mL)**	**Ölçülen sonuç (ng/mL)**	**% GK**
1. tekrar	5	4,24	84,80
2. tekrar	5	4,05	81,00
3. tekrar	5	3,88	77,60
4. tekrar	5	4,27	85,40
5. tekrar	5	4,11	82,20
6. tekrar	5	3,99	79,80
		Ortalama %GK	81,8
		Standart Sapma	2,97
		%RSD	3,64

Tablo 10. 50 ng/mL olanzapin içeren saç numunesinin sonra spike geri kazanım tablosu

50 ng/mL 'lik numune (n=6)	**Teorik miktar (ng/mL)**	**Ölçülen sonuç (ng/mL)**	**% GK**
1. tekrar	50	46,77	93,54
2. tekrar	50	48,19	96,38
3. tekrar	50	49,18	98,36
4. tekrar	50	47,98	95,96
5. tekrar	50	48,35	96,70
6. tekrar	50	48,92	97,84
		Ortalama %GK	96,46
		Standart Sapma	1,69
		%RSD	1,76

Tablo 11. 1.0 ng/mL konsantrasyonla spike edilen CRM saç örneğinin önce spike ve sonra spike verilerinin kıyaslanması

1.0 ng/mL 'lik numune (n=9)	**Sonra spike (ng/mL)**	**Önce spike (ng/mL)**
1. tekrar	1.081	0.556
2. tekrar	1.147	0.565
3. tekrar	1.078	0.579
4. tekrar	0.867	0.620
5. tekrar	0.877	0.604
6. tekrar	0.868	0.606
7. tekrar	0.763	0.571
8. tekrar	0.772	0.577
9. tekrar	0.795	0.584
Ortalama	0.916	0.585
Ortalama %GK	91.60	58.5
Standart Sapma	0.146	0.021
%RSD	15.99	3.61

- ***Stabilite sonuçları:***

Stabilite çalışması için 5 ng/mL'lik 6 adet saç numunesi hazırlandı ve 7 gün aradan sonra aynı numune LC-MS/MS sisteminde yeniden analiz edildi. Yapılan çalışmaların ortalamaları ve 7 gün arasındaki yüzde değişim Tablo 12'de gösterilmektedir.

Tablo 12. 5 ng/mL olanzapin içeren saç numunesinin stabilite tablosu

	Konsantrasyon (ng/mL)
1. çalışma (ort)	4,89
2. çalışma (ort)	4,35
%Değişim	0,0054

5. TARTIŞMA

Olanzapin (2-metil-4- (4-metil-1-piperazinil) -10H-tiyeno [2,3b] [1,5] –benzodiazepin) yaygın olarak kullanılan atipik antipsikotiklerden biridir. Şizofreni ve buna bağlı psikoz hastalarında etki gösteren bir tiyenobenzodiazepin türevidir ve 1996'dan beri antipsikotik bir ilaç olarak kullanılmaktadır. Ülkemizde Eylül 1998 başlarında Zyprexa ticari adıyla farklı dozlarda pazarlanmaya başlanmıştır. Bazı yan etkileri arasında kilo alımı, ağız kuruluğu ve mide bulantısı sayılabilir. FDA (Food and Drug Administration) tarafından günlük 5 ile 20 mg doz aralığında tedavide kullanımı onaylanmıştır (53). Olanzapinin kanda en yüksek konsantrasyonuna, oral uygulamayı takiben yaklaşık 5-8 saat sonra ortaya çıktığı görülmüştür (56).

Olanzapin gastro-intestinal kanaldan iyi emilime sahiptir ve ilk geçiş metabolizması, özellikle konjugatif ve oksidatif yollar ile elimine edilmektedir. Alınan dozunun yaklaşık % 40'ının sistemik dolaşıma ulaşmadan metabolize edildiği bildirilen olanzapinin, gıda ile alımının emilim oranını veya derecesini etkilemediği bildirilmektedir. Vücutta yaygın olarak dağılır ve metabolize olur. Alınan dozun yaklaşık % 7'sinin değişmeden idrarla atıldığı bildirilmekte dolayısıyla bu durum ilacın yüksek oranda metabolize olduğuna işaret etmektedir.

Emilimini takiben plazma proteinlerine büyük ölçüde (%90'dan fazla) bağlandığı bildirilmektedir. Yarılanma ömrü 30 saatten fazladır ve esasen karaciğerde metabolize edilir. Tüm olanzapin metabolitleri ana bileşikten önemli ölçüde daha az aktiftir. Literatürde sıklıkla intihar girişimi veya kazara yüksek doz olanzapin maruziyetine bağlı zehirlenme ve/veya buna bağlı ölüm olguları olduğu bildirilmektedir (91).

Olanzapinin erişkinlerde tedavide kullanımında kan seviyesi 10-50 ng/mL arasında bildirilirken, bireysel farklılıklar da göz önüne alındığında, kanda 100 ng/mL ve üzeri dozlarda zehirlenme bulgularının görülebildiği bildirilmektedir(70).

Plazmaya geçişi saatte ortalama 25 L civarındadır. Genelde erkeklere kıyasla kadınlarda %30 daha az ve sigara içenlerde sigara içmeyenlere kıyasla %40 daha fazla metabolize edildiği bilinmektedir(92).

Olanzapin bileşiği yüksek bir dağılım hacmine sahip olduğundan (kilogram başına 10-20 L) ve karaciğer seviyesi, kan seviyesinden önemli ölçüde yüksek olduğundan, post-mortem olguda özellikle yeniden dağılım (redüstribüsyon) olayının iyi irdelenmesi gerekmektedir. Ölümden sonra, karaciğerden merkezi kan örneklerine önemli ölçüde yeniden dağılım meydana gelir ve ölüm sonrası kandaki yüksek olanzapin konsantrasyonları, herhangi bir test farkından bağımsız olarak sürekli olarak gözlenir. Merkezi (kalp) kan örneklerinde periferik (femoral) kan örneklerine göre daha yüksek konsantrasyonlar gözlenir. Özellikle trisiklik antidepresanlara ve antipsikotiklere ilişkin zehirlenme sonrası ölüm olgularında doku yeniden dağılım göstereceğinden bu tür olgularda, karaciğer dokusundan ilaç seviyesinin belirlenmesi de daha güvenilir bir sonuca götürecektir. Dolayısıyla postmortem olanzapin kan seviyeleri gerçek antemortem veya perimortem kan seviyeleri ile doğru korele etmeyebilir dolayısıyla dikkatle yorumlanmalıdır.

Antemortem kan örneklerinin post-mortem kan örnekleri ile kıyaslanabildiği bir olanzapin doz aşımına bağlı ölümle sonuçlanan olguda; hastaneye yatışını takiben 2 saat sonunda hastanın öldüğü ve postmertem olanzapin kalp kanı seviyesinin, hastaneye gelişinde alınan antemortem kan seviyesinin yaklaşık 5 katı olduğu belirlenmiştir.

Ayrıca kan örneklerinin iyi saklanması gerektiği, saklama koşullarının ölüm sonrası kandaki olanzapinin stabilitesini etkilediği, bu durumun % 23-84 oranında kayıba neden olduğu bildirilmektedir. Olanzapinin kandaki dengesizliği nedeniyle, numune konsantrasyonları ölümden sonra mümkün olan en kısa sürede ölçülmelidir. Klinik uygulamada olanzapinin kan konsantrasyonlarındaki önemli değişiklik postmortem bulguları yorumlamayı zorlaştırmaktadır (70).

3 yıl boyunca çeşitli psikotik hastalıklara sahip 31 yaşındaki kadın hasta 800 mg olanzapin yutmuş ve ardından bir kliniğe gidip olanzapin alımını bildirmiştir. Şiddetli merkezi sinir sistemi depresyonu, aritmik olmayan taşikardi ilaç yutulduktan 2 saat sonra ortaya çıkmıştır. Bununla birlikte ciddi klinik yan etkiler (ateş, artmış lökosit sayısı, yüksek kreatin kinaz gibi) kendini göstermiş ve hasta bilincini kaybetmiştir. Entübasyon, bağırsak dekontaminasyonu ve destekleyici bakımdan sonra hastanın iyileştiği ve taburcu edildiği bildirilmiştir. Bu vaka aşırı doz olanzapinin zehirlenmeye sebep olduğunu gösteren vakalardan birisidir (93).

Olanzapine bağlı ilk ölüm olgusunun literatürde ilk olarak 1998 yılında bildirildiği görülmektedir. Olguda 59 yaşında bir kadının intihar amacıyla olanzapin kullandığı belirtilmektedir. Otopsi sırasında elde edilen kan ve mide içeriğinde sırasıyla 490 µg/dl ve 4100 µg/dl konsantrasyonlarda olanzapin belirlendiği, kan seviyesinin normal terapötik aralığı 400 kat aştığından ölümün olanzapin aşırı dozundan kaynaklandığı belirltilmektedir. Olguya ait örneklerin analizi GC-NPD ile belirlendiği ve GC-MS ile doğrulandığı, NPD dedektörle yapılan çalışmanın doğrusal aralığının 20-500 µg/dl konsantrasyon aralığında (0,996-korelasyon kat sayısı), geri kazanımının %92-97 aralığında belirlendiği görülmektedir (71).

1998 yılında bildirilen diğer bir olguda; psikiyatride tedavi görmekte olan 43 yaşında erkek hastanın 600 mg olanzapin kullandıktan sonra saatler içinde hayatını kaybettiği, ölüm sonrası alınan kan ve idrar örneklerinde GC-MS ile analiz edildiği ve olanzapin konsantrasyonlarının sırasıyla 1238 ve 6987 µg/L gibi yüksek seviyelerde belirlendiği görülmektedir. Toksikoloji bulguları sonucu ve önceden var olan intihar girişimi öyküsünden yola çıkarak hastanın aşırı doz olanzapin ile intihar ettiği düşünülmüştür (72).

Biri intihar amaçlı olmak üzere olanzapin ile ilişkili iki ölüm olgusunun ele alındığı bir çalışmada; iki olgunun da toksikolojik ve anatomik bulguları tanımlandığı görülmektedir. Olgulara ait kanda olanzapin düzeyi sırasıyla 0.237 µg/ml ve 0.675 µg/ml, mide lavajında sırasıyla 0.197 ve 17.400 µg/ml olarak belirlendiği görülmektedir. İntihar amaçlı olmayan

olgunun da orta derecede koroner ateroskleroz hastası olduğu belirtilmektedir. Her iki olgunun ölüm nedeni de olanzapin toksisitesi olarak rapor edilmiştir (73).

2010 yılında Üstündağ M ve ark. tarafından ülkemizde gerçekleştirilen bir vaka takdimi serisi, yüksek doz olanzapin alımının yaşamı tehdit ettiğini gösteren bir acil servis çalışmasıdır. Üç yıllık bir dönemi kapsayan 15 olguluk çalışmada olguların hastaneye getirilme nedeninin 50-600 mg arası dozlarda olanzapine maruz kalmaları olduğu, 13 hastanın taburcu edildiği, 2 hastanın yaşamını kaybettiği bildirilmiştir. Bu çalışma akut olanzapin zehirlenmesinin klinikte iyi tolere edilmesine karşın, özellikle diğer ilaçlarla birlikte ve yüksek doz alımlarında yaşamı tehdit edebileceğinin bildirilmesi, bu olgularda doz ile klinik özellikler ve prognoz arasında ilişki olduğunun vurgulanması açısından oldukça önemlidir (94).

Yetişkinlerde atipik antipsikotik ilaçların kullanım oranlarının artmasıyla, çocukluk çağı zehirlenme olgularında da bu ilaçlara rastlandığı görülmektedir. 2016 yılında ülkemizde Kihtir HS ve ark tarafından bildirilen bir vaka takdimi serisinde olanzapin zehirlenmesi ön tanısıyla kliniğe başvuran biri oldukça ağır dört çocuk olgunun değerlendirildiği görülmektedir. Yaşları 2-5 aralığında olan ve ilaç zehirlenmesi yoluyla getirilen hastaların kanındaki olanzapin, ve metaboliti olan desmetil-olanzapin düzeylerinin ve bunlara ilişkin klinik bulguların araştırıldığı, kan düzeyleri ile klinik bulgular arasındaki ilişki gözlemlendiği bildirilmektedir. Hastaneye getiriliş zamanına bağlı olmak üzere, 32,03-122,28 ng/mL aralığında kanda olanzapin seviyeleri gözlenirken, takibinin 5-8 saatleri arasında durumları stabil hale getirilen ilk 3 hastanın 24 saat sonunda taburcu edildiği görülmektedir.

Dördüncü olguda 5 yaşındaki erkek hasta sabah saatlerinde yanında olanzapin içeren ilaç kutularıyla oldukça zor uyandırıldığı, hastaneye getirilişini takiben, bilincin kapanması ile birlikte spontan solunumunun da baskılanması üzerine hasta entübe edilerek çocuk yoğun bakım ünitesine sevk edildiği bildirilmektedir. Gerekli tedavilerin uygulanmasının ardından toplamda 14 günün sonunda hastanın taburcu edilebildiği vurgulanmaktadır. Gerek ülkemizde

gerekse yurt dışında olgu gözlemleri ile; çoğunlukla güvenilir olarak bilinse de olanzapin ve diğer atipik antipsikotik ilaçlara bağlı gelişen zehirlenmelerin çocuklarda yakın takip edilmesi gerektiği sonucuna ulaşılmıştır (95).

2007 yılında olanzapin doz aşımını konu alan Morgan M ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada, kliniğe başvuran ve yaş ortalaması 30 olan 37 zehirlenme olgusunun incelendiği, doz aşımına bağlı sıklıkla taşikardi (% 73), merkezi sinir sistemi depresyonu (% 43), miyozis (% 39) ve deliryum (% 54) gibi yan etkiler olduğu bildirilmektedir. Bu belirtilerin bazı hastalarda kliniğe gelişte mevcut olduğu bazılarında 6 saat içinde ortaya çıktığı görülmüştür. Çalışmada kullanılan analitik yöntemin HPLC-UV olduğu ve olguların olanzapine bağlı yüksek dozda zehirlenme olduğunun belirlenmesinde ve doğrulanmasında oldukça etkili olduğu vurgulanmaktadır (96).

Literatürde, olanzapinin çeşitli biyolojik matrikslerde tayinine yönelik farklı amaçlar için geliştirilen çeşitli analitik yöntemlerin olduğu görülmektedir (64-69).

1997 yılında klinikte şizofreni hastaları üzerinde Aravagiri M. ve ark tarafından yapılan yapılan bir çalışmada, 1 mL örnek hacmi ile HPLC-ECD (Electrokimyasal Dedektör) yönteminin kullanıldığı, plazmada %94 geri kazanım oranına ulaşıldığı ve en düşük belirleme limitinin 0.25 ng/mL olduğu bildirilmektedir. Gün içi ve günler arası varyans (%CV) değerinin %10'dan az olduğu ve olanzapin için doğrusal aralığın 0.25 - 50 ng/ml olarak belirlendiği görülmektedir. Bu yöntemin, 10, 15 ve 20 mg günlük olanzapin dozu ile tedavi edilen şizofreni hastalarında, plazmada belirlenmesi için kullanılabileceği doğrulanmıştır. Sonuçlar, olanzapinin plazma seviyesinin, uygulanan günlük oral dozla doğrusal olarak arttığını göstermiştir ($r = 0.6889$, $p = 0.01$) (97).

Shugert ve ark.'nın 1998 yılında benzer şekilde LC-MS/MS yöntemi ile insan plazma ve serumunda olanzapinin belirlenmesine yönelik yaptığı çalışmada, 0.5 mL örnek hacmi kullanarak, 250 pg/mL - 50 ng/mL gibi oldukça geniş bir aralıkta, plazma için günler arası

kesinlik ve doğruluk değerlerinin sırasıyla, % 6.26 - 7.66 ve % 96,46 – 92,48, serum için sırasıyla % 3.46 – 8.76 ve % 91,24– 87,54 aralığında olduğu belirlenmiştir. Yöntemin, yüksek seviyede seçicilik ve hassiyet sağlaması ve kullanılan örnek hacmi dikkate alındığında önceden bildirilen analitik yöntemlere kıyasla daha avantajlı olduğu vurgulanmaktadır (98).

2012 yılında Cao J ve ark. Tarafından olanzapinin biyoyararlanırlığına ilişkin gönüllü hastalara uygulanan bir başka LC-MS çalışmasında, insan plazmasında olanzapinin belirlenmesine yönelik yönteminin doğrusal aralığının 0.5 – 50 ng/mL olduğu ve oldukça iyi doğruluk ve hassasiyet değerlerine sahip olduğu belirtilmiştir (99).

Çeşitli antipsikotik ilaçların saçta tespitine yönelik LC-MS/MS başta olmak üzere pek çok yöntemin uygulandığı bilinse de (100) yapılan inceleme sonucunda olanzapinin saçta kromatografik olarak analizine özgü şimdiye kadar bildirilmiş bir çalışma bulunmadığı görülmektedir. Bununla birlikte 2017 yılında Wang H ve ark.'nın MALDI-TOF tekniğinin belirlemedeki gücünü ortaya koymak adına kronik olanzapin kullanıcısının tek bir tel saçında olanzapinin varlığına ilişkin bir çalışması bulunduğu görülmektedir (69).

Bugüne kadar olanzapinin çoğunlukla insan kanında ve idrarında analizine özgü çalışmalar görülmektedir. Adli vakalarda antipsikotikler, ölüm nedenini belirlemek için sıklıkla taranan bileşik gruplarındandır. Bununla birlikte adli vakalarda kan ve idrar haricinde diğer biyolojik matrisler de sıklıkla kullanılmaktadır. Ölüm sonrası kan konsantrasyonlarının zor yorumlanması sebebiyle, madde varlığının tespiti ve miktar tayini için diğer numuneler de tercih edilmektedir. 2015 yılında antipsikotiklerin çeşitli matrislerde saptanması ve miktarının belirlenmesine ilişkin yapılan bir derlemede, son dört yıla ait analitik yöntemlerin değerlendirildiği görülmektedir. Bu çalışmaya göre LC-MS/MS tekniğinin özellikle antipsikotiklerin miktar tayini için son dönemde daha fazla tercih edildiği görülmektedir. Bu hassas tekniğin, sadece serum, plazma ve tam kanda değil, aynı zamanda oral sıvı, kurutulmuş kan lekeleri, saç, tırnak ve diğer vücut dokuları gibi düşük konsantrasyonları içeren alternatif

matrislerde de maddenin tayinini mümkün kıldığı görülmektedir (101). Ancak bir maddenin herhangi bir biyolojik örnekten belirlenmesinde hassas analitik tekniklerden daha önemlisi, maddenin matriksten ekstraksiyonunda uygulanacak manipülasyonun gücüdür. Dolayısıyla alternatif matrisler için geçerliliği kanıtlanış analitik teknikler hakkındaki mevcut literatürün hala sınırlı sayıda olduğu görülmektedir.

Ulusal Standartlar ve Teknoloji Enstitüsü (NIST - National Institute of Standards and Technology) misyonu gereği, metroloji bilimini, standartlarını ve teknolojisini geliştirerek yenilikçi ve endüstriyel rekabetçiliği teşvik eden bir kurumdur. Bu bağlamda adli toksikoloji hizmeti sunan laboratuvarlarda ölçüm kalitesinin de arttırılması gerekliliğinden yola çıkarak NIST 1990'larda, yasa dışı maddelerin saç matrisinde daha iyi kalitatif ve kantitatif ölçüm yapılması için bir dizi laboratuvarlar arası çalışma düzenlemiştir (102).

Katılımcı laboratuvarlara önceden hazırlanmış saç örnekleri gönderilmiş ve hangi bileşiklerin olduğunu ve konsantrasyonları hakkında bilgi vermeleri istenmiştir. Laboratuvarlar analiz için yöntem seçme konusunda özgür bırakılmışlardır. Laboratuarların çoğunun, GC/MS ve LC-MS/MS'e dayalı yöntemler kullandığı gözlenmiştir. Bu seri çalışmasından elde edilen sonuçlarla laboratuvarlar arasında rutin deneyimi fazla olanın deneyimi az olana göre gerçek değere daha yakın olduğu belirlenmiştir. Bu seri çalışmasında sunulan saç örnekleri, söz konusu etken maddenin çözeltileri ile muamele edilerek hazırlanan saç numunelerine benzer şekilde oldukça homojen olmasına rağmen sonuçların laboratuarlar arasında oldukça dağılım gösterdiği gözlemlenmiştir. Saçta yasa dışı madde analizleri ile ilgili diğer laboratuvarlar arası çalışmalar da benzer bulguları bildirmiştir (8,9).

Bir etken madde için saç analizinin yaygın olarak kabul görmesinden önce, idrar ve kan gibi örneklerde olduğu gibi etken maddenin benzer şekilde en az tayin limitlerinin belirlenmesine ihtiyaç duyulmuştur. Bu limit değerlerin belirlenmesi için de laboratuvarların, saçta bu

seviyelerde birikim yapan etken maddeler üzerinde iyi analiz yapma yeteneklerini göstermeleri gerekmiştir. Yukarıda belirtildiği gibi, NIST'in uyguladığı seri çalışmada laboratuvarların kantitatif sonuçlarında büyük farklılıklar gözlemlendiği için, bu ölçüm problemini gidermek adına insan saçı bazlı CRM geliştirmeyi üstlenmiştir. Daha önce NIST tarafından geliştirilen idrarda yasa dışı madde kullanımının tayini için beş CRM'ye ek olarak saçta iki farklı prototipte CRM üretilmesi takip etmiştir [10]. O dönemde CRM'deki söz konusu analitlerin GC/MS bazlı yöntemlerle belirlendiği görülse de, günümüzde bu hassas ölçümler için sıklıkla LC-MS/MS'in tercih edildiği görülmektedir. Bu çalışma adli toksikolojide önemli bir ilaç olan olanzapinin insan saçından belirlenmesinde matriks etkisinin anlaşılması için yöntem geliştirmeyi ve buna bağlı validasyon parametrelerini açıklamayı amaç edinmiştir. Söz konusu örnekler, olanzapin içermeyen CRM örneklerine olanzapinin uygun konsantrasyonlarını içeren çözeltiler spike edilerek hazırlandı. Analitin seviyeleri ve Kokain D-3 (IS) bir LC-MS/MS sistemi ile bağımsız yöntem kullanılarak ölçülmüştür.

Adli laboratuarlar hizmet verdikleri alanda yeterlilik programlarının planlanması ve uygulanması için ve kendi aralarındaki uyumun gözlenmesi için, yetkinliklerini kabul görmüş bir kurum ve bir dizi gereklilik yoluyla göstermek isterler. Bunun için analitik olarak madde miktarı belirlenmiş ve ilgili kurum tarafından gönderilmiş bir biyolojik örnek laboratuvara alınarak üzerinde analizler gerçekleştirilir ve laboratuvarda bulunan değerin gerçek değere yakınlığı değerlendirilir. Bu çalışmada olanzapin içermeyen sertifikalı bir referans saç matriksine (LGC Standards), olanzapin katılması (spike) yoluyla oluşturulan örnekler ile olanzapin için bir ekstraksiyon yöntemi geliştirilmiş ve LC-MS/MS ile analiz edilmiştir.

Çalışmaya ait doğrusallık sonuçları Tablo 5'de verildiği gibidir. On noktalı kalibrasyon çözeltisi sonuçlarına göre olanzapinin doğrusal aralığı 0,1-100 ng/mL olarak belirlendi. Bu aralıktaki korelasyon katsayısı R^2= 0.9994 olarak bulundu. Elde edilen LOD ve LOQ

değerleri sırasıyla 0.36 ng/mL ve 0.39 ng/mL'dir. Saç örneği üzerinde yapılan sonra spike ve verilerine göre geri kazanım yüzdesi 0.5 ng/mL'lik konsantrasyonda %82.43±5.46; 5 ng/mL'lik konsantrasyonda %81.80±.2.97; 50 ng/mL'lik konsantrasyonda %96.46±1.69 bulundu. Önce spike ve sonra spike verileri ile matris etkisinin anlaşılması için yapılan 9 tekrarlı deneyler sonucunda, önce spike geri kazanım sonuçlarının (%58.5) sonra spike geri kazanım sonuçlarına (%91.6) göre yaklaşık yarı yarıya azaldığı görülmektedir. Önce spike ve sonra spike geri kazanım verileri arasındaki bu farkın, ekstraksiyon çalışması sırasında yapılacak bazı değişikliklerle azaltılabileceği düşünülmektedir. Bu değişikliklere örnek olarak; ekstraksiyon sırasında daha fazla miktarda çalışma çözeltisi kullanmak, çalışılan kolonu değiştirmek gibi alternatif çözümler sıralanabilir. Gün içi tekrar edilebilirlik için 3 ayrı konsantrasyonda çalışılan geri kazanım numunelerinden; 0.5 ng/mL konsantrasyonundaki 6 adet örneğin ortalaması 0.412±0.027 ng/mL, bağıl standart sapma değeri 6.55, 5 ng/mL konsantrasyonundaki 6 adet örneğin ortalaması 4.09±0.15 ng/mL, bağıl standart sapma değeri 3.67, 50 ng/mL konsantrasyonundaki 6 adet örneğin ortalaması 48.23±0.85 ng/mL, bağıl standart sapma değeri 1.76 olarak tespit edildi. Günler arası tekrar edilebilirlik için 3 ayrı konsantrasyonda çalışılan geri kazanım numunelerinden; 0.5 ng/mL konsantrasyonundaki 6 adet örneğin ortalaması 0.391±0.035 ng/mL, bağıl standart sapma değeri 8.95, 5 ng/mL konsantrasyonundaki 6 adet örneğin ortalaması 3.95±0.27 ng/mL, bağıl standart sapma değeri 6.83, 50 ng/mL konsantrasyonundaki 6 adet örneğin ortalaması 47.55±1.01 ng/mL, bağıl standart sapma değeri 2.12 olarak tespit edildi. Hem güniçi hem de günler arası tekrar edilebilirlik çalışması sonuçlarında bağıl standart sapma değerlerinin <20% olduğu gözlemlendi. Bu da yöntemin tekrar edilebilir olduğunu göstermektedir. Stabilite çalışması için 7 gün ara ile analiz edilen örneklerdeki değişim %0.0054 bulundu. Bu değer %1'in altında kaldığından geliştirilen yöntemin stabilitesi böylelikle kanıtlamış oldu: Özetle oda

sıcaklığında 1 hafta boyunca bekletilen numunedeki değişim oranının epey düşük olması yöntemin sağlamlığının da bir kanıtı olarak görülebilir.

Çalışmamızdaki geri kazanım oranı kabul edilebilir sınırlarda olduğu görüldü. Bununla birlikte şimdiye kadar saçta olanzapin tayini yapan bir yöntemin olmamasına rağmen diğer biyolojik örneklerden olanzapin tayini çalışmaları ile karşılaştırıldığında benzer veya daha yüksek seviyede olduğu belirlendi (64,71,97,98). Çalışmamızda valide edilen LC-MS/MS yönteminin doğrusal aralığının, diğer analitik sistemlerden daha hassas özelliğe sahip olması neticesinde 10 basamaklı olarak ayarlandığı ve 0.999 gibi bir korelasyon katsayısı ile farklı dedektörlerle yapılan çalışmalardan daha hassas olduğu bu sayede, geniş aralıkta kantitatif analiz yapılabileceğini göstermektedir. Bu nedenle her türlü zehirlenme olgularında ya da cinsel istismar olgularında saç örneğinden savunulabilir bilimsel kanıtlara dayandırılabilir analiz imkanı sağlamaktadır. Saç örneğinden olanzapin gibi adli toksikolojide önem arz eden bir etken maddenin, SPE ve takiben LC-MS/MS gibi hızlı ve güvenilir yöntemlerle tayin edilmesi adli toksikolojide olanzapinin dışlanması adına önemli fayda sağlayacağı düşünülmektedir.

6. SONUÇ

Adli bir olguda toksikolojik analiz, zehirlenmenin nedenini ve maruziyetin boyutunu anlamak için yapılır. Zehirlenmeye sebep olan madde veya madde grupları antemortem örneklerde idrar, kan, tükürük, ter ve gaita vb. biyolojik örneklerde aranır. Bu örnekler adli bilimlerde bir olayın aydınlatılmasında delil olarak karşımıza çıkmaktadır. Söz konusu matriks içinde toksik maddenin ne kadar sürede ve miktarda belirlenebileceğinin yanıtı, olayın çözümüne katkı sağlayacaktır.

Saç tıpkı bir "kayıt cihazı" gibi, oldukça uzun bir süre alınan doz geçmişini koruyan, son dönemde öne çıkmış önemli delilerden biridir. Gelişen analitik cihaz teknolojisi ile birlikte düşük konsantrasyonlarda etken madde içeren saç ve tırnak gibi keratenize biyolojik örneklere ait analiz sonuçlarının, olguların değerlendirilmesine katkıda bulunduğu bildirilmektedir (4,5). Bu nedenle de saçta ilaç etken madde aranması günümüz teknolojisinin sunduğu imkanlar ölçüsünde gittikçe yaygınlaşmaktadır.

Bu çalışmada, olanzapin gibi aşırı doz ölümlerin sıklıkla görüldüğü, hem tedavi hem de suistimal amaçlı kullanımı olan bir ilaç etken maddesinin saç örneğinden kantitatif analizine özgü LC-MS/MS yöntemi geliştirmek amaçlanmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda, sertifikalı bir saç örneği kullanılarak etken maddenin matriks içindeki tayin limitleri ve analizdeki etkileri, geri kazanım verimliliği, doğruluk, kesinlik ve stabilite gibi pek çok önemli validasyon parametresi belirlenebilmiştir. Bu sayede düşük orta ve yüksek konsantrasyonlarda tekrarlanabilir, kesin, kabul edilebilir geri kazanım verimine sahip ve güvenilir aralıklarda sonuç veren bir yöntem valide edilmiş olup; geliştirilen bu yöntem uzun

süre arazide kalmış, pütrifiye olmuş dolayısıyla kan ve idrar gibi rutin biyolojik örneklerin bulunamadığı post-mortem olgularda saçta olanzapinin analizini mümkün kılacaktır.

Ülkemizde olanzapin etken maddesinin diğer biyolojik örneklerden belirlenmesine yönelik çalışmalar yapılmışsa da (103) saç örneğinden tespitine yönelik bir çalışma olmadığından, bu çalışmanın literatüre katkısının önemli olduğu düşünülmektedir. İleriki çalışmalar ile daha düşük tayin limitlerine ulaşabilecek, daha hassas yöntemlerin geliştirilmesi hedeflenmektedir.

7. KAYNAKLAR

(1) Battal, D. Adli Toksikoloji Analizlerinde Biyolojik Örnek ve Analitik Yöntem Seçimleri. Adli Tıp Dergisi, 27(1), 44-53.

(2) Drummer, O. H. (2004). Postmortem toxicology of drugs of abuse. Forensic science international, 142(2-3), 101-113.

(3) Levine, B. (Ed.). (2003). Principles of forensic toxicology. Amer. Assoc. for Clinical chemistry.

(4) Flanagan, R. J., Connally, G., & Evans, J. M. (2005). Analytical toxicology: guidelines for sample collection postmortem. Toxicological reviews, 24(1), 63-71.

(5) Moeller, M. R., Steinmeyer, S., & Kraemer, T. (1998). Determination of drugs of abuse in blood. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 713(1), 91-109.

(6) Culpepper, L. (2007) A Roadmap to Key Pharmacologic Principles in Using Antipsychotics, Primary Care Companion To The Journal of Association of Medicine and Psychiatry9 (6) 444–454 Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2139919/

(7) Kaya-Akyüzlü, D., Kayaaltı, Z. (2015). Kan, saç, idrar ve solunum havası örneklerinin bağımlılık yapan maddelerin analizinde kullanımı.

(8) Dinis-Oliveira, R. J., Carvalho, F., Duarte, J. A., Remiao, F., Marques, A., Santos, A., & Magalhães, T. (2010). Collection of biological samples in forensic toxicology. Toxicology mechanisms and methods, 20(7), 363-414.

(9) Harrison, W. H., R M. Gray and L. M. Solomon. (1974a). "Incorporation of Damphetamine into Pigmented Guinea Pig Hair." Brit. J. Dermatol. 91: 415-418.

(10) Harrison, W. H., R M. Gray and L. M. Solomon. (1974b). ulncorporation of L-DOPA, Lalpha-Methyldopa and DL-Isoproterenol into Guinea Pig Hair." Acta Dermatol. 54: 249-253.

(11) Baumgartner, A. M., P. F. Jones, W. A. Baumgartner and C. T. Black. (1979). "Rudioimmunoasay of Hair for Determining Opiate-Abuse Histories." J. Nucl. Med. 20: 748-752.

(12) Klug, E. (1980). "2ur Morphinbestimmung in Kopfhaaren." 2. Rechtsmed. 84: 189-193.

(13) Smith, F. P. and R. H. Liu. (1986a). "Detection of Cocaine Metabolite in Perspiration Siain, Menstrual Bloodstain, and Hair." J. Forensic Sci. 31 (4): 1269-1273.

(14) Smith, F. P. and R. H. Liu. (1986b). "Detection of Cocaine Metabolite in Perspiration Stain, Menstrual Bloodstain, and Hair." J. Forensic Sci. 31 (4): 1269-1273.

(15) Valente, D., M. Cassini, M. Pigliapochi and G. Vansetti. (1981). "Hair as the Sample in Assessing Morphine and Cocaine Addiction." Clin. Chern. 27(11): 1952-1953.

(16) Ishiyama, L, T. Nagai and S. Toshida. (1983). "Detection of Basic Drugs (Methamphetamine, Antidepressants, and Nicotine) from Human Hair." J. Forensic Sci. 28: 380-385.

(17) Niwaguchi, T., S. Suzuki and T. Inoue. (1983). "Determination of Methamphetamine in Hair after Single and Repeated Administration to Rat." Arch. Toxicol. 52: 157-164

(18) Suzuki, 0., H. Hattori and M. Asano. (1984). "Detection of Methamphetamine and Amphetamine in a Single Human Hair by Gas Chromatography/Chemical Ionization Mass Spectrometry." J. Forensic Sci. 29(2): 611-617.

(19) Baumgartner, A. M., P. F. Jones and C. T. Black. (1981). "Detection of Phencyclidine in Hair." J. Forensic Sci. 26(3): 576-681.

(20) Sramek, J. J., W. A. Baumgartner, J. A. Tallos, T. N. Ahrens, J. F. Heiser and W. H. Blahd, (1985). "Hair Analysis for Detection of Phencyclidine in Newly Admitted Psychiatric Patients." Am. J. Psychiatry. 142(8): 950-953.

(21) Haley, N. J. and D. Hoffman. (1985). "Analysis for Nicotine and Cotinine in Hair to Determine Cigarette Smoker Status." Clin. Chern. 31 (10): 1598-1600.

(22) Ishiyama, L, T. Nagai and S. Toshida. (1983). "Detection of Basic Drugs (Methamphetamine, Antidepressants, and Nicotine) from Human Hair." J. Forensic Sci. 28: 380-385.

(23) Kintz, A. Tracqui, P. Mangin, Detection of drugs in human hair for clinical and forensic applications, Int. J. Legal Med. 105 (1992) 1–4.

(24) Kintz, P., Villain, M., & Cirimele, V. (2006). Hair analysis for drug detection. Therapeutic drug monitoring, 28(3), 442-446.

(25) Tsanaclis, Lolita, and John FC Wicks. "Patterns in drug use in the United Kingdom as revealed through analysis of hair in a large population sample." Forensic Science International 170.2-3 (2007): 121-128.

(26) Ahrens, B., Rochholz, G., Sachs, H. W., & Schütz, H. (1995). Detection of clozapine in hair after 1 years burial in soil grave. Archiv fur Kriminologie, 196(5-6), 138.

(27)Gaillard, Y., Breuil, R., Doche, C., Romeuf, L., Lemeur, C., Prevosto, J. M., & Fanton, L. (2011). Detection of amitriptyline, nortriptyline and bromazepam in liver, CSF and hair in the homicidal poisoning of a one-month-old girl autopsied 8 months after death. Forensic science international, 207(1-3), e16-e18.

(28) Tsatsakis, A. M., Psillakis, T., Stefis, A., Assithianakis, P., Vlahonikolis, I. G., Michalodimitrakis, M. N., & Helidonis, E. (1998). Determination of phenytoin in sections of head hair: a preliminary study to evaluate the history of drug use. Bollettino chimico farmaceutico, 137(11), 459-466.

(29) Kintz, P., & Mangin, P. (1993). Opiate concentrations in human head, axillary, and public hair. Journal of Forensic Science, 38(3), 657-662.

(30) Huestis, M. A., Gustafson, R. A., Moolchan, E. T., Barnes, A., Bourland, J. A., Sweeney, S. A., .. & Smith, M. L. (2007). Cannabinoid concentrations in hair from documented cannabis users. Forensic science international, 169(2-3), 129-136.

(31) Joseph Jr, R. E., Su, T. P., & Cone, E. J. (1996). In vitro binding studies of drugs to hair: influence of melanin and lipids on cocaine binding to Caucasoid and Africoid hair. Journal of analytical toxicology, 20(6), 338-344.

(32) Boumba, Vassiliki A., Kallirroe S. Ziavrou, and Theodore Vougiouklakis. "Hair as a biological indicator of drug use, drug abuse or chronic exposure to environmental toxicants." International Journal of Toxicology 25.3 (2006): 143-163.

(33) Harkey, M. R. (1993). Anatomy and physiology of hair. Forensic science international, 63(1-3), 9-18.

(34) Pragst, F., & Balikova, M. A. (2006). State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. Clinica chimica acta, 370(1-2), 17-49.

(35) Henderson, G. L. (1993). Mechanisms of drug incorporation into hair. Forensic Science International, 63(1-3), 19-29.

(36) Rothe, M., Pragst, F., Thor, S., & Hunger, J. (1997). Effect of pigmentation on the drug deposition in hair of grey-haired subjects. Forensic Science International, 84(1-3), 53-60.

(37) Harrison, W. H., Gray, R. M., & Solomon, L. M. (1974). Incorporation of D-amphetamine into pigmented guinea-pig hair. British Journal of Dermatology, 91(4), 415-418.

(38) S.J. Green and J.F. Wilson, The effect of hair colour on the incorporation of methadone into hair in the rat. J. Anal. Toxicol., 20 (1996) 121-123.

(39) L. Potsch, G. Skopp, M.R. Moeller, Biochemical approach on the conservation of drug molecules during hair fiber formation, Forensic Sci. Int. 84 (1997) 25–35.

(40) Cooper, G. A., Kronstrand, R., & Kintz, P. (2012). Society of Hair Testing guidelines for drug testing in hair. Forensic science international, 218(1-3), 20-24.

(41) Ursitti, F., Klein, J., & Koren, G. (1997). Clinical utilization of the neonatal hair test for cocaine: a four-year experience in Toronto. Neonatology, 72(6), 345-351.

(42) Bar-Oz, B., Klein, J., Karaskov, T., & Koren, G. (2003). Comparison of meconium and neonatal hair analysis for detection of gestational exposure to drugs of abuse. Archives of Disease in Childhood-Fetal and Neonatal Edition, 88(2), F98-F100.

(43) Raul, J. S., Cirimele, V., Ludes, B., & Kintz, P. (2004). Detection of physiological concentrations of cortisol and cortisone in human hair. Clinical biochemistry, 37(12), 1105-1111.

(44) Schaffer, M. I., Wang, W. L., & Irving, J. (2002). An evaluation of two wash procedures for the differentiation of external contamination versus ingestion in the analysis of human hair samples for cocaine. Journal of analytical toxicology, 26(7), 485-488.

(45) Mutlu, E., & Aşıcıoğlu, F. (2018). Saçta İlaç ve Madde Birikimi. Turkiye Klinikleri Journal of Forensic Medicine and Forensic Sciences, 15(1), 29-38.

(46) Kintz, P. (2019). Hair analysis in forensic toxicology. Wiley Interdisciplinary Reviews: Forensic Science, 1(1), e1196.

(47) Praveen R. S., Daniel S., and Prasada Rao T., "Solid phase extraction preconcentration of cobalt and nickel with 5,7-dichloroquinone-8-ol embedded styrene-ethylene glycol dimethacrylate polymer particles and determination by flame atomic absorption spectrometry (FAAS)", Talanta, 66 (2), 513–20, (2005).

(48) Camel, V. (2003). Solid phase extraction of trace elements. Spectrochimica acta. Part B, Atomic spectroscopy, 58(7), 1177-1233.

(49) Lachenmeier, K., Musshoff, F., & Madea, B. (2006). Determination of opiates and cocaine in hair using automated enzyme immunoassay screening methodologies followed by gas chromatographic–mass spectrometric (GC–MS) confirmation. Forensic science international, 159(2-3), 189-199.

(50) Cognard, E., Rudaz, S., Bouchonnet, S., & Staub, C. (2005). Analysis of cocaine and three of its metabolites in hair by gas chromatography-mass spectrometry using ion-trap detection for CI/MS/MS. Journal of Chromatography B, 826(1-2), 17-25.

(51) Balıková, M. A., & Habrdová, V. (2003). Hair analysis for opiates: evaluation of washing and incubation procedures. Journal of Chromatography B, 789(1), 93-100.

(52) Vance, C., & McIntyre, I. M. (2009). , 33(1), 15-26.

(53) Evren, E.C. (1998). Olanzapin: Yeni "Atipik" Antipsikotik. Klinik Psikofarmakoloji Bülteni, 8(2) 74-80.

(54) https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Olanzapine (Erişim Tarihi: 09.09.2019)

(55) Mauri, M. C., Steinhilber, C. P. C., Marino, R., Invernizzi, E., Fiorentini, A., Cerveri, G., Baldi M.L., Barale, F. (2005). Clinical outcome and olanzapine plasma levels in acute schizophrenia. European psychiatry, 20(1), 55-60.

(56) Waring, W. S., Wrate, J., & Bateman, D. N. (2006). Olanzapine overdose is associated with acute muscle toxicity. Human & experimental toxicology, 25(12), 735-740.

(57) Albayrak, M. (2014). Atipik antipsikotik bir ilaç olan olanzapin'in farmasötik preparatlarda ve biyolojik ortamlarda biyoanalitik yöntem validasyonu (Doctoral dissertation).

(58) Fulton, B., & Goa, K. L. (1997). Olanzapine. Drugs,53(2), 281-298.

(59) Nemeroff CB. Dosing the antipsychotic medication olanzapine. Journal of Clinical Psychiatry, 1997, 58:45-49.

(60) Baldwin, D. S., & Montgomery, S. A. (1995). First clinical experience with olanzapine (LY170053): Results of an open-label safety and dose-ranging study in patients with schizophrenia. International clinical psychopharmacology.

(61) Ikeda K, Ikawa K, Kozumi T, Yokoshige S,Horikawa S, Morikawa N. Development and validation of a GC-EI-MS method with reduced adsorption loss for the quantification of olanzapine in human plasma. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2012, 403:1823–1830.

(62) Fisher DS, Partridge SJ, Handley SA, Couchman L, Morgan PE, Flanagan RJ. LC–MS/MS of some atypical antipsychotics in human plasma, serum, oral fluid and haemolysed whole blood. Forensic Science International, 2013, 229:145–150.

(63) Ansermot N, Brawand-Amey M, Kottelat A, Eap CB. Fast quantification of ten psychotropic drugs and metabolites in human plasma by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for therapeutic drug monitoring. Journal of Chromatography A, 2013, 1292:160–172.

(64) Josefsson M, Roman M, Skogh E, Dahl M. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for determination of olanzapine and N-desmethylolanzapine in human serum and cerebrospinal fluid. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2010, 53:576–582.

(65) Ravinder S, Bapuji AT, Mukkanti K, Reddy DC. Sımultaneous determınatıon of olanzapıne and fluoxetıne ın human plasma by lc-ms/ms and ıts applıcatıon to pharmacokınetıc study. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2013, 36:2651–2668.

(66) Fonseca BM, Moreno IED, Barroso, MS, Queiroz JA, Gallardo E. Determination of seven selected antipsychotic drugs in human plasma using microextraction in packed sorbent and gas chromatography–tandem mass spectrometry. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2013, 405:3953–3963.

(67) Dusci, L. J., Hackett, L. P., Fellows, L. M., & Ilett, K. F. (2002). Determination of olanzapine in plasma by high-performance liquid chromatography using ultraviolet absorbance detection. Journal of Chromatography B, 773(2), 191-197.

(68) Ravinder, S., Bapuji, A. T., Mukkanti, K., & Reddy, D. C. (2013). Simultaneous determination of olanzapine and fluoxetine in human plasma by LC-MS/MS and its

application to pharmacokinetic study. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 36(19), 2651-2668.

(69) Wang, Hang, et al. "Matrix-assisted laser-desorption/ionization mass spectrometric imaging of olanzapine in a single hair using esculetin as a matrix." Journal of pharmaceutical and biomedical analysis 141 (2017): 123-131.

(70) P. Chue and P. Singer. A review of olanzapine-associated toxicity and fatality in overdose. J. Psychiatry Neurosci. 28(4): 253–261 (2003).

(71) Elian AA. Fatal overdose of olanzapine. Forensic Sci Int 1998;91:231-5.

(72) Stephens BG, Coleman DE, Baselt RC. Olanzapine-related fatality. J Forensic Sci 1998;43:1252-3.

(73) Gerber JE, Cawthon B. Overdose and death with olanzapine. Am J Forensic Med Pathol 2000;21:249-51.

(74) Braithwaite, A., & Smith, J. F. (2012). Chromatographic methods. Springer Science & Business Media.

(75) Snyder, L. R., Kirkland, J. J., & Dolan, J. W. (2011). Introduction to modern liquid chromatography. John Wiley & Sons.

(76) Sargent, M. (2013). Guide to achieving reliable quantitative LC-MS measurements. RSC Analytical Methods Committee.

(77) Maurer, H. H. (2005). Multi-analyte procedures for screening for and quantification of drugs in blood, plasma, or serum by liquid chromatography-single stage or tandem mass spectrometry (LC-MS or LC-MS/MS) relevant to clinical and forensic toxicology. Clinical biochemistry, 38(4), 310-318.

(78)Maurer, H. H. (1998). Liquid chromatography–mass spectrometry in forensic and clinical toxicology. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 713(1), 3-25.

(79) Maurer HH. Position of chromatographic techniques in screening for detection of drugs or poisons in clinical and forensic toxicology and/or doping control [review]. Clin Chem Lab Med 2004; 42:1310– 24.

(80) Van Bocxlaer, J. F., Clauwaert, K. M., Lambert, W. E., Deforce, D. L., Van den Eeckhout, E. G., & De Leenheer, A. P. (2000). Liquid chromatography—mass spectrometry in forensic toxicology. Mass spectrometry reviews, 19(4), 165-214.

(81) Tatsuno, M., Nishikawa, M., Katagi, M., & Tsuchihashi, H. (1996). Simultaneous determination of illicit drugs in human urine by liquid chromatography-mass spectrometry. Journal of analytical toxicology, 20(5), 281-286.

(82) Gutteck, U., & Rentsch, K. M. (2003). Therapeutic drug monitoring of 13 antidepressant and five neuroleptic drugs in serum with liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. Clinical chemistry and laboratory medicine, 41(12), 1571-1579.

(83) Shinozuka, T., Terada, M., & Tanaka, E. (2006). Solid-phase extraction and analysis of 20 antidepressant drugs in human plasma by LC/MS with SSI method. Forensic science international, 162(1-3), 108-112.

(84) Vogeser, M., & Parhofer, K. G. (2007). Liquid chromatography tandem-mass spectrometry (LC-MS/MS)-technique and applications in endocrinology. Experimental and clinical endocrinology & diabetes, 115(09), 559-570.

(85) de Hoffmann, E. (1996). Tandem mass spectrometry: a primer. Journal of mass spectrometry, 31(2), 129-137.

(86) Chèze, M., Duffort, G., Deveaux, M., & Pépin, G. (2005). Hair analysis by liquid chromatography–tandem mass spectrometry in toxicological investigation of drug-facilitated crimes: Report of 128 cases over the period June 2003–May 2004 in metropolitan Paris. Forensic science international, 153(1), 3-10.

(87) Chèze, M., Villain, M., & Pépin, G. (2004). Determination of bromazepam, clonazepam and metabolites after a single intake in urine and hair by LC–MS/MS: Application to forensic cases of drug facilitated crimes. Forensic Science International, 145(2-3), 123-130.

(88) Thieme, D., & Sachs, H. (2003). Improved screening capabilities in forensic toxicology by application of liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Analytica Chimica Acta, 492(1-2), 171-186.

(89) Lee, S., Park, Y., Han, E., Choe, S., Lim, M., & Chung, H. (2008). Preparation and application of a fortified hair reference material for the determination of methamphetamine and amphetamine. Forensic science international, 178(2-3), 207-212.

(90) T.C. Gıda Tarım Ve Hayvancılık Bakanlığı Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı Kalıntı/Pestisit Birimi. Pestisit analizleri için metot validasyonu ve ölçüm belirsizliği hesaplanması açıklamalı uygulama rehberi, 2013 revizyon 1.

(91) Raggi, M. A., Mandrioli, R., Sabbioni, C., & Pucci, V. (2004). Atypical antipsychotics: pharmacokinetics, therapeutic drug monitoring and pharmacological interactions. Current medicinal chemistry, 11(3), 279-296.

(92) Moffat, A. C., Osselton, M. D., Widdop, B., & Watts, J. (2011). Clarke's analysis of drugs and poisons (Vol. 3). London: Pharmaceutical press.

(93) Cohen, L. G., Fatalo, A., Thompson, B. T., Bergeron, G. D. C., Flood, J. G., & Poupolo, P. R. (1999). Olanzapine overdose with serum concentrations. Annals of emergency medicine, 34(2), 275-278.

(94) Üstündag, M., Güloglu, C., Orak, M., Altunci, Y. A., Dogan, H., & Tamam, Y. (2010). Acil serviste olanzapin zehirlenmelerinin klinik özellikleri: Üç yillik tecrübemiz*/The clinical features of olanzapine overdose in emergency department; a three years experience. Anadolu Psikiyatri Dergisi, 11(2), 145.

(95) Kihtir, H. S., Yesilbas, O., Kihtir, Z., Yildirim, H. M., & Sevketoglu, E. (2016). Pediatrik Olanzapin Zehirlenmeleri ve Bir Olguda Plazma Degisimi Uygulamasi: Dört Olgu Sunumu/Pediatric Olanzapine Intoxications and Plasma Exchange Application in One Case: Four Case Reports. Dahili ve Cerrahi Bilimler Yogun Bakim Dergisi, 7(1), 34.

(96) Morgan, M., Hackett, L. P., & Isbister, G. K. (2007). Olanzapine overdose: a series of analytically confirmed cases. International Clinical Psychopharmacology, 22(3), 183-186.

(97) Aravagiri, M.; Ames, D.; Wirshing, W.C.; Marder, S.R. Plasma level monitoring of olanzapine in patients with schizophrenia: determination by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. Ther. Drug Monit., 1997, 19, 307-313.

(98) Berna, M.; Shugert, R.; Mullen, J. Determination of olanzapine in human plasma and serum by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. J. Mass Spectrom., 1998, 33, 1003-1008.

(99) Cao, J., Zhang, Z., Tian, Y., Li, Y., & Rui, J. (2012). Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Method for the Determination of Olanzapine in Human Plasma and Application to a Bioequivalence Study. Current Pharmaceutical Analysis, 8(3), 247-254.

(100) McClean, S., O'Kane, E. J., & Smyth, W. F. (2000). Electrospray ionisation–mass spectrometric characterisation of selected anti-psychotic drugs and their detection and determination in human hair samples by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 740(2), 141-157.

(101) Patteet, L., Cappelle, D., Maudens, K. E., Crunelle, C. L., Sabbe, B., & Neels, H. (2015). Advances in detection of antipsychotics in biological matrices. Clinica chimica acta, 441, 11-22.

(102) Tebbett, I. R. (2002). Drug analysis using hair. Robertson J.R. Forensic Examination of Hair. Canberra: CRC Press, 1999; 219-240.

(103) Mercan, S. Adli Farmakogenetikte CYP2D6 Polimorfizminin önemi. Adli Tıp Enstitüsü, Fen Bilimleri Anabilim Dalı, Doktora tezi, İstanbul; İstanbul Üniversitesi, 2012.

8. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Merve OKA

Doğum Tarihi/ Yeri:

E-posta:

EĞİTİM

 İstanbul Üniversitesi-Cerrahpa Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü, Fen Bilimleri Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı

2017- Devam Ediyor

 Abant İzzet Baysal Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya(İngilizce) Bölümü, 2011-2017

MESLEKİ DENEYİM

 Heybeliada Ortaokulu

Fen Bilimleri-Bilim Uygulamaları dersi- Ücretli öğretmen-2018

ALINAN EĞİTİMLER ve SERTİFİKALAR

 TSC YÖNETİM SİSTEMLERİ AKADEMİSİ-2015

-ISO 22716 : 2007 KOZMETİK İYİ ÜRETİM UYGULAMALARI-GMP

-ISO/IEC 17025 : 2005 DENEY VE KALİBRASYON LABORATUVARLARININ YETERLİLİĞİ

-GLP İYİ LABORATUAR UYGULAMALARI

-GMP İYİ ÜRETİM UYGULAMALARI