

**T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ADLI TIP ANABİLİM DALI**

ETANOL METABOLİTİ ETİL GLUKURONİTİN SAÇTA BELİRLENMESİ

Kimyager FADİLE YALDIZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DANIŞMANI
Doç. Dr. AHMET HİLAL**

ADANA-2011

**T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ADLI TIP ANABİLİM DALI**

ETANOL METABOLİTİ ETİL GLUKURONİTİN SAÇTA BELİRLENMESİ

Kimyager FADİLE YALDIZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DANIŞMANI
Doç. Dr. AHMET HİLAL**

**Bu tez Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Bütçesinden
TF 2009-YL 15 nolu proje olarak desteklenmiştir.**

Tez No:

ADANA-2011

Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Adli Tıp Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütölmüş olan **Etanol Metaboliti Etil Glukuronitin Saçta Belirlenmesi** adlı çalışma aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

Yukarıdaki tez, Yönetim Kurulun2011 tarih
ve.....sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof.Dr.Halil KASAP
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans Tezimin yönetiminde ve oluşumunda aynı zamanda tez çalışmam süresince bilgi ve deneyimleri ile desteklerini esirgemeyen tez danışmanım Doç. Dr. Ahmet Hilal'e,

Eğitim ve tez dönemi içerisinde gösterdikleri ilgi ve destekleri için Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Mete K. Gülmen, Prof. Dr. Necmi Çekin, Prof. Dr. Behnan Alper'e,

Çalışmalarım süresince her türlü yardım ve manevi desteği gösteren Dr. Nebile Dağlıoğlu'na,

Çalışmalarımın her safhasında yardımını sürekli gördüğüm değerli arkadaşım Pınar Efeoğlu ve Adli Tıp Anabilim Dalı çalışanlarına,

Deneysel çalışmalarımın sonlanmasında sabır ve anlayışla yardımlarını esirgemeyen İrfan Ünlüsayın'a,

Karşılaştığım her zorlukta hep yanımda olan değerli eşim Ümit Yıldız'a,

Eğitimimin her aşamasında maddi ve manevi destek sağlayan, beni büyük bir ilgi ve sevgiyle bugünlere getiren aileme,

TF 2009YL15 nolu proje olarak bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde maddi katkı sağlayan Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkür ederim.

Kimyager Fadile Yıldız

İÇİNDEKİLER

Kabul ve onay	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe	3
2.2. Etil Alkolün Tanımı ve Genel Özellikleri	3
2.2.1. Alkollü İçkiler	4
2.2.2. Etil Alkolün Absorbsiyonu, Dağılımı ve Eliminasyonu	4
2.2.3. Etil Alkolün Metabolizması	6
2.2.4. Etil Alkolün Toksisitesi	8
2.2.5. Alkol Bağımlılığı, Kronik Alkol Zehirlenmesi	10
2.3. Kıl	11
2.3.1. Kılın Yapısı	12
2.3.2. Kılın Büyümesi	14
2.3.3. Kıl Analizlerinin Tarihçesi	15
2.4. Kıl İçerisine Madde Geçiş Mekanizması	16
2.5. Kılı Toplama ve Saklama İşlemi	18
2.6. Kıl Analizleri	20
2.6.1. Dekontaminasyon İşlemi	20
2.6.2. Kılın Hazırlanması	21
2.6.3. İnkübasyon	21
2.6.3.1. Bazik Parçalama	21
2.6.3.2. Asidik Parçalama	22
2.6.3.3. Enzimatik Parçalama	22
2.6.4. Ekstraksiyon	22

2.6.5. Analiz	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM	24
3.1. Saç Örnekleri	24
3.2. Deneylerde Kullanılan Malzemeler	24
3.2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	24
3.2.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	24
3.3. LC-MS/MS Çalışma Şartları	25
3.4. Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması	26
3.5. Çalışma Örneklerinin Hazırlanması	27
3.5.1. Saç Örneklerin Hazırlanması	27
4. BULGULAR	28
5. TARTIŞMA	31
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	36
7. KAYNAKLAR	37
EKLER	43
Ek-1	43
Ek-2	44
ÖZGEÇMİŞ	45

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Etil alkolün oksidasyon basamağı	7
Şekil 2.2. Etil glukuronitin oksidasyon basamağı	8
Şekil 2.3. Kılın folikülündeki formasyon	13
Şekil 2.4. Kılın yapısı	14
Şekil 2.5. Kıl içerisine madde geçişi	17
Şekil 3.1. LC-MS/MS	25
Şekil 3.2. Etil glukuronitin kalibrasyon eğrisi	26
Şekil 4.1. 20 pg/mg etil glukuronit standartının LC-MS/MS'deki kromatogramı	28
Şekil 4.2. 20 pg/mg etil glukuronitin kromatogram alanı	28
Şekil 4.3. 20 pg/mg standartta bulunan internal standart (EtG-d ₅) kromatogramı	29
Şekil 4.4. Toplanan saç örneklerinde tespit edilen EtG pikleri	30

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Alkolün vücut sıvıları ve solunum havasındaki dağılım oranları	5
Çizelge 4.1. Tespit edilen etil glukuronit miktarı	29

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

µg:	Mikrogram
µl:	Mikrolitre
cc:	Cubic cantimeter
CH ₂ Cl ₂ :	Diklorometan
cm:	Santimetre
dk:	Dakika
d ₅ -EtG:	D ₅ -Etil glukuronit
EtG:	Etil glukuronit
FDA:	Saf besin ve ilaç bürosu
GC/MS:	Gaz kromatografi/ kütle spektrometresi
HILIC:	Hydrophilic Interaction Chromatography
kg:	kilogram
KOH:	Potasyum hidroksit
L:	litre
LC/MS:	sıvı kromatografi/kütle spektrometresi
M.Ö. :	Milattan önce
M.S. :	Milattan sonra
m/z:	kütle/yük oranı
M:	molarite
mg:	miligram
mm:	milimetre
MRM:	Multiple Reaction Monitoring
NaOH:	sodyum hidroksit
ng:	nanogram
°C:	Celcius
pH:	potansiyel hidrojen
ppm:	milyonda bir kısım (mg/l)
RIA:	radioimmunoassay
rpm:	Revolutions per minute / dakikadaki devir sayısı
SIM:	seçerek iyon izleme
TLC:	ince tabaka kromatografi

ÖZET

Etanol Metaboliti Etil Glukuronitin Saçta Belirlenmesi

Alkol lkemizde kullanımı gittikçe yaygınlaşan maddelerden biridir. Alkolün; trafik kazaları, yaralama-yaralanma, doğal ölümler ve diğer adli olgularda kolaylaştırıcı bir faktör olduğu bilinen bir gerçektir. Alkolizm olarak adlandırılan alkol bağımlılığı, en sık karşılaşılan bağımlılık türlerinden biridir. Alkol bağımlılığının olumsuz etkileri kişi ve toplumlar üzerinde ekonomik ve sosyal problemler oluşturmaktadır. Alkol alındıktan uzun bir süre sonra kullanımının belirlenmesi klinik ve adli uygulamalarda önem kazanmaktadır. Son zamanlarda kan ve idrar gibi biyolojik örneklerin yanı sıra sa toksikolojik analizlerde rutin olarak kullanılmaktadır. Saçın kolay elde edilmesi, invaziv bir yöntem olmaması, saklama ve nakil kolaylığı ve kişinin madde kullanımı ile ilgili geriye dönük bilgi vermesi kıl analizlerine avantaj sağlamaktadır.

Bu çalışmada sa örneklerinde EtG'in belirlenebilmesi için sıvı kromatografi - tandem kütle spektrometresi cihazı kullanılarak yeni bir metot geliştirilmiştir. Ayrıca polar maddelerin analizi için HILIC (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography) kolon kullanılmış ve böylece sa örneklerinin hepsinde EtG yüksek duyarlılıkla belirlenmiştir. Belirleme ve miktarlandırma limit değerleri sırasıyla 0.05 pg/mg ve 0.18 pg/mg olarak bulunmuştur.

Elde edilen sonuç ile saçta belirlenen EtG konsantrasyonunun kişilerin günlük alkol tüketimi hakkında bilgi verebileceği gösterilmiştir.

Anahtar sözcükler: Etil Glukuronit, Sa, Alkol Bağımlılığı, HILIC

ABSTRACT

Determination of Etil Glucuronide, Metabolite of Ethanol, in Human Hair

Alcohol is one of the substances which usage is becoming widespread more and more. It is a known fact that alcohol is a facilitative factor for the traffic accidents, injuries, natural deaths and other forensic cases. Alcohol addiction named as alcolism is one of the most common addictions. Negative influences of alcohol abused constitute economic and social problems on individual and society. Detection of the use of ethanol for a relatively long period of time after intake could be very important for monitoring abstinence in clinical and forensic context. In recent years, Hair is routinely used on toxicological analysis as well as biological samples such as blood and urine. The major practical advantages of hair testing are larger detection windows; the sample collection is non-invasive; it is easy to transport and store it and also hair analysis can provide a retrospective calendar of an individual's alcohol use.

A method for the determination of ethyl glucuronide (EtG) in hair samples, using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), was developed. Furthermore, Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC) column was used for analyzing polar molecules and so EtG was detected in all hair samples with high sensitivity. Limit of Detection (LOD) and Limit of Quantification (LOQ) were calculated 0.05-0.18 pg/mg, respectively.

These results demonstrate that determination of EtG concentration in hair can be give information about the daily alcohol intake.

Keywords: Ethyl Glucuronide, Hair, Alcohol Addiction, HILIC

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Genel adli tıp uygulamalarında, gerek klinik muayenelerde gerekse postmortem incelemelerde olguların değerlendirilmesi ve doğru bir şekilde yorumlanabilmesi için diğer inceleme yöntemlerinin yanı sıra toksikolojik inceleme önemli bir yer tutmaktadır.

Toksikoloji, insan sağlığı üzerine zararlı maddelerin etkilerinin araştırılması, tanınması ve organizmada oluşturdıkları bozukluklarla, bunların giderilmesini inceleyen bir bilim dalıdır.

İnsan ve hayvan organizmaları, yabancı birçok kimyasal maddeye maruz kalmaktadırlar. Toksikoloji başlıca, organizmanın normal metabolizması için gerekli olmayan bu yabancı kimyasal maddeler (ksenobiyotikler) ile ilgilenir. Ancak, canlı organizma için endojen olan maddeler (hormonlar, bazı aminoasitler gibi) veya vücut için gerekli ekzojen kaynaklı maddeler (vitaminler, yemek tuzu gibi) yüksek dozlarda toksik etki gösterdiklerinden toksikolojinin araştırma alanına girerler^{1,2}.

Rönesans devri bilginlerinden olan Paracelsus (M.S. 1493-1541), bilim ve felsefe arasında yer alan bir ekolün temsilcisiydi. O zamanki birçok görüş bugünkü toksikoloji disiplininin konularına girmektedir. “Bütün maddeler zehirdir, zehir olmayan hiçbir madde yoktur. Zehirle devayı (ilacı) birbirinden ayıran onun dozudur” şeklindeki görüşü ile ilk kez biyolojik etkide doz-cevap ilişkisinin önemini vurgulamıştır^{1,2}.

Adli Bilimler, en genel anlam ile bilimin yasalara uygulanmasıdır. Geniş anlamda adli bilimler; adli tıp, adli patoloji, adli toksikoloji, adli seroloji, adli odontoloji, adli antropoloji, adli kimya ve kriminalistik gibi pek çok bilim alanını içerir. Adli bilimler geçmişte olan bir olayı bilimsel yöntemlerle yeniden canlandırarak hukuk ve yasalar açısından değerlendirilmesine yardımcı olur^{3,4}.

Adli bilimler içerisinde yer alan adli toksikoloji, kimyasal maddelerin insanlar üzerindeki zararlı etkilerinin teşhis ve tedavisi ile uğraşır, zehirlenmeleri adli tıp açısından inceler. Zehirlenmenin (kaza veya kasıtlı), hukuksal açıdan değerlendirilmesinde, maruz kalınan kimyasal maddenin neden-etki ilişkisinin saptanması önemlidir. Bu ilişkinin saptanması ise biyolojik materyalden (kan, idrar, doku ve organlar) alınan örnekteki toksik maddenin miktarını saptamak, bulunan miktarın ise doz-etki açısından yorumunu yapmaktır^{1,3}.

Alkol ülkemizde kullanımı gittikçe yaygınlaşan maddelerden biridir. Alkolün; trafik kazaları, yaralama-yaralanma, doğal ölümler ve diğer adli olgularda tetikleyici ya da kolaylaştırıcı bir faktör olduğu bilinen bir gerçektir. Alkolizm olarak adlandırılan alkol bağımlılığı, en sık karşılaşılan bağımlılık türlerinden biridir. Kişi üzerindeki ve çevresindeki etkileri nedeniyle önemli tıp, halk sağlığı ve toplum sorunları ortaya çıkarmasıyla adli incelemelerle yakından ilgili olmakta aynı zamanda alkol kullanımının biyolojik örneklerde tespiti adli toksikolojinin önemli uğraş alanlarından birini oluşturmaktadır.

Kan, idrar, nefes ve tükürük, etil alkol analizi için en sık kullanılan örneklerdir. Özellikle nefes ve tükürük iş yerlerinde, trafikte alkol kullanımını belirlemede önemli sonuçlar oluşturmakla birlikte alkole bağımlılığın belirlenmesinde etkili değildir. Etil alkol yıkımının ana metaboliti etil glukuronittir (EtG). EtG uçucu olmayan, suda çözülebilen, vücut sıvılarında, saçta ve dokularda belirlenebilen bir metabolittir. Birkaç hafta ya da birkaç ay önce alınan alkol tüketiminin belirlenebilmesi için saçta etil glukuronit analizi yapılabilmektedir.

Bu araştırmada, gönüllü kişilerden alınan saç örnekleri ile çalışılacaktır. Saç örneklerinde etil glukuronit analizi LC-MS/MS cihazı kullanılarak yapılacaktır.

Adli ve klinik toksikoloji laboratuvarı olarak hizmet veren laboratuvarımızda kanda etil alkol analizi yapılmaktadır. Bu çalışma ile standart yöntemlerle kanda ve idrarda belirlenemeyen etil alkolün kullanıldığına dair bilgi elde etmek için etil alkolün bir metaboliti olan etil glukuronitin (EtG) saçta tespiti amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Alkol, Arapça kökenli bir kelime olup ince öğütülmüş pudra haline getirilmiş toz ya da göze çekilen sürme anlamına gelen “kuhl” kelimesinden (al-kohl al-kuhl) kaynaklanmaktadır. Ele gelmezliği, hafifliği ifade etmek üzere alkollü içecekler için kullanılmıştır. İspanyolca’ya “alcohol”, Fransızca’ya “alcool” şeklinde girmiştir. Etil alkol içeren içeceklere “alkollü içecekler” denir. Alkollü içeceklerin muhtemelen ilk defa tarihin ilk devirlerinde rastlantısal olarak bal, tahıl ve meyve sularının fermentasyonu sonucu yapılmış olduğu varsayılmaktadır. Böylece ilk olarak şarap ve bira gibi mayalı içkiler keşfedilmiştir. Eski Mısır, Sümer, Babil ve Yunan kültüründe belirgin bir öneme sahip olup mitolojiye girmiştir. Bununla birlikte değişik toplumlarda zaman zaman yasaklanmıştır. M.Ö. VI. Yüzyılda Solon Kanunları ile idama kadar varan cezalar uygulanmıştır. Günümüzde de değişik toplumlarda birçok İslam ülkesinde olduğu gibi yasal kısıtlamalar, ağır cezalar uygulanmaktadır⁵.

2.2. Etil Alkolün Tanımı ve Genel Özellikleri

Alkoller kimyasal olarak diğer üç bağı dolu olan bir karbon atomuna hidroksil (OH) bağlanmasıyla oluşan $C_nH_{2n}+OH$ formülü ile belirtilen bileşiklerdir. Genellikle ne asit ne baz özelliği gösteren nötr maddelerdir. Etil alkol, kimyasal formülü CH_3CH_2OH ; renksiz, uçucu, yanıcı ve kendine özgü kokusu olan bir sıvıdır. Kaynama noktası 78°C, erime noktası 117,3°C, yoğunluğu 0,789 g/cm³, molekül ağırlığı 46 g/mol, alev alma noktası 12°C’dir.

Hububat alkolü, şarap ruhu, kolonya ruhu etil alkolün (etanol) sinonimlerdir. Etil alkol endüstride 300’den fazla işyerinde kullanılır. Çözücü özelliğinden başka birçok kimyasal maddenin antifriz maddesi ve patlayıcı madde hazırlanmasında kullanılır. Etil alkol endüstri ve laboratuvarında kullanılma dışında, alkollü içkilerde de bulunmaktadır⁶.

2.2.1 Alkollü İçkiler

Etil alkol içeren içeceklere alkollü içecekler denir. Etil alkol başlıca 2 yoldan elde edilebilir:

1. Fermantasyon yolu: Başlıca yaş veya kuru meyve ve tahılların içinde bulunan şekerler ile polisakkaritlerin maya mantarları tarafından fermantasyonu ile elde edilir. Fermantasyon ortamında alkol konsantrasyonu % 15-17'ye eriştiğinde, yüksek alkol düzeyi mantarları öldürdüğünden fermantasyon durur. Bu yolla daha yüksek konsantrasyonda alkol elde edilemez. Bu şekilde elde edilen içkilere bira, şarap, vermut, likör örnek verilebilir.

2. Distilasyon yolu: Fermantasyon sonucu elde edilen ve sudan daha küçük kaynama noktasına sahip bulunan etil alkolün uçurularak sudan ayrılması ve toplanması esasına dayanır. Rakı, votka, cin, viski, kanyak distilasyon yolu ile elde edilen içki örnekleridir.

Fermantasyon yolu ile elde edilen bira hacim olarak % 4-8, şarap % 9-14, distilasyon yöntemi ile elde edilen rakı, votka, cin, viski, rom, brendy gibi içkiler ise % 35-45 oranında etil alkol içerir. Ancak ülkelere ve üretime bağlı olarak çok farklı oranda etil alkol içeren içki türleri bulunmaktadır⁷.

2.2.2 Etil Alkolün Absorbsiyonu, Dağılımı ve Eliminasyonu

Etil alkolün vücuda alınımlı yolu sıklıkla oral olmakla birlikte, intravenöz yöntemde olabilmektedir. Dermal ve inhalasyon yoluyla alınımlı nadirdir. Oral alınımlı sonrası alkol özafagustan hızlıca mideye geçer. Alkolün emilimi % 20 oranında mide, % 80 oranında ince barsak mukoza yüzeylerinden kana geçiş şeklinde olur. Alınan alkolün miktarı ve içim hızı, içecek içindeki alkol oranı (alkol oranı % 10-30 arasındaki içecekler en hızlı emilir), içecekten alınan diğer yiyeceklerin varlığı (yağlı besinler alkol emilimini yavaşlatır, mide boşken emilim en hızlı olur) ile kişiye ait faktörlere bağlı olarak farklılıklar gösterir. Kişiye ait faktörler içerisinde tolerans başta olmak üzere; cinsiyet, kilo, fiziksel yapı, gastrointestinal mukoza yüzey alanı, kanlanması ve hareketliliği; diabet, gastrektomi vb. durumlar, psikojenik faktörler sayılabilir⁷.

Mide boşken tek bir doz alkol alınımlı takiben 1 saat içinde kan alkol düzeyi en yüksek düzeydedir. Sosyal içicilerde olduğu üzere saatler boyunca birden fazla alkol

alımı olduğu durumlarda, son alkol alımından sonraki yarım saatte kan alkol düzeyi en yüksek noktaya ulaşır. Kronik alkol içiciler diğeri içicilere göre alkolü daha hızlı metabolize ederler. İçilen alkolün yaklaşık % 90'ı karaciğerde metabolize olurken, % 10 kadarı metabolize olmadan akciğerler ve böbreklerden atılmaktadır.

Alkol alımının bitiminden sonraki saatler içerisindeki kan alkol değerlerinin belirlenmesi ile ilgili olarak çeşitli formüller geliştirilmiştir. Kan alkol düzeyindeki 1 saatlik düşüş ortalama olarak erkeklerde 18 mg/100 ml kadınlarda 15 mg/100 ml olmak üzere her iki cinsten 10-25 mg/100 ml arasında değişmektedir⁷.

Etil alkol klinikte MSS depresanı olarak etki eder. Ancak düşük dozlarda ilk olarak inhibitör merkezler etkilendiğinden stimulan etki oluşur. Alkol entoksikasyonundaki kişi baş dönmesi, bulantı, kusma, konuşma güçlüğü, terleme, sıkıntı hissi, yürüme bozukluğu gibi şikayetlerden bilincin bozuk ya da kapalı olduğu çok ağır tablolara kadar değişen belirtilerle kliniğe başvurulabilirler⁷.

Organizmada çabuk dağılıma uğrayan etil alkol denge halinde iken, vücut sıvıları ve solunum havasındaki dağılım oranları Çizelge 2.1'de gösterilmiştir⁶.

Çizelge 2.1 Alkolün vücut sıvıları ve solunum havasındaki dağılım oranları (kana göre).

Kan	1.0
Serum	1.16
İdrar	1.25
Tükrük	1.20
Omurilik sıvısı	1.14
Alveol havası	1/2100

2.2.3. Etil Alkolün Metabolizması

Alkolün karaciğere olan toksik etkisinin doğrudan metabolizması ile ilgili olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle alkol metabolizmasında rol alan enzimlerle ilgili çalışmalar ve tartışmalar önem kazanmıştır. Alkolün biyotransformasyonunda ilk basamak asetaldehite oksitlenmesidir. Bu oksidasyon basamağından üç enzim sorumludur. Bunlardan en önemlisi, karaciğerde yüksek konsantrasyonda bulunan, sitozolik bir enzim olan alkol dehidrogenaz (ADH)'dır. Bu enzim koenzim olarak nikotinamid adenin dinükleoid (NAD) kullanır. Oksidasyon sonucu etil alkol asetaldehite oksitlenir, NAD'ade NADH'a (NAD'nın indirgenmiş şekli) indirgenir.

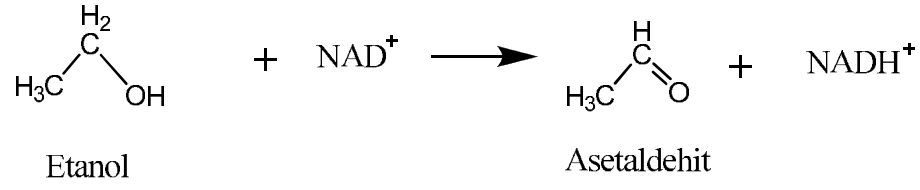
Etil alkolün asetaldehite oksitlenmesinde rol alan diğer bir enzimde katalazdır. Bu enzim oksidasyonu hidrojen peroksiti kullanarak gerçekleştirir. Bu enzimin alkol metabolizmasındaki etkisi, hepatositlerde az miktarda peroksit olması sebebiyle sınırlıdır. Alkol metabolizmasındaki rolü % 10'dan daha fazla değildir.

Etil alkolü asetaldehite oksitleyen üçüncü enzim ise düz endoplazmik retikulumda yerleşmiş olan mikrozomal etil alkol oksitleyici sistem (MEOS)'dir. Bu enzim sistemi NADPH'a (indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat) bağımlıdır ve sitokrom P450 2E1 (CYP2E1)'i içerir. Bu enzimin alkol metabolizmasındaki rolü % 20 civarındadır. Ancak indükleyici etkenlerle % 30 veya üstüne çıkabilir.

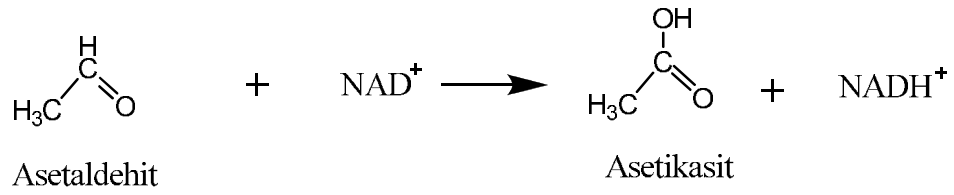
Etil alkol oksidasyonunda ikinci basamak asetaldehitin oksidasyonudur. Bu basamakta rol alan en önemli enzim, sitozolik bir enzim olan ve NAD kullanan asetaldehit dehidrogenaz (ALDH) enzimidir. Oksidasyon sonucunda asetaldehit karaciğerde asetata oksitlenir. Ayrıca asetat (asetil CoA), yağ asitleri, keton cisimleri, amino asitler ve steroidlere yol açan biyokimyasal reaksiyonlara girer.

Etil alkol metabolizmasındaki asıl basamak asetaldehitten asetik asitin olduğu oksidasyon basamağıdır (Şekil 2.1). Ancak etanolün küçük bir yüzdesinin konjugasyonu ile etil glukuronit ve etil sülfatın olduğu basamakta bulunmaktadır⁸.

Alkol Dehidrogenaz



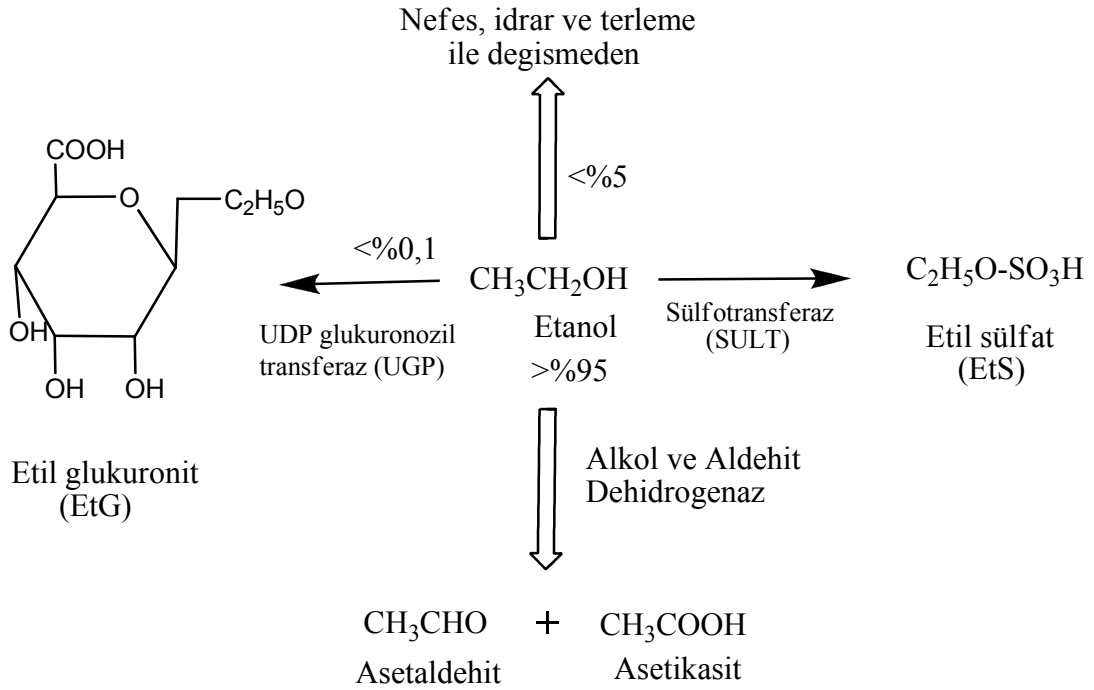
Aldehit Dehidrogenaz



Şekil 2.1 Etil alkolün oksidasyon basamakları

Etil glukuronit etanol metabolizmasına bağlı direk bir metabolittir. EtG, UDP-glukuronosil transferaz enzimin katalizlediği glukuronik asit ile etanolün konjugasyonundan oluşmaktadır⁹⁻¹³ (Şekil 2.2). Alınan alkolün yaklaşık % 0.02-0.06'sı EtG'e metabolize olmaktadır¹⁴. Moleküler formülü C₈H₁₄O₇, molekül ağırlığı 222 g/mol ve erime noktası yaklaşık 150 °C'dir¹⁵. EtG uçucu olmayan, suda çözülebilen, vücut sıvılarında ve dokularında (postmortem örneklerde bile), kanda, idrarda ve saçta belirlenebilen bir metabolittir¹⁶⁻²⁰.

EtG kan alkol konsantrasyonuna bağı olarak alkolden 2-3 saat sonra kanda ortaya çıkmaya başlamaktadır. EtG'in kanda yarılanma ömrü 2-3 saat olarak belirlenmiştir²¹⁻²³. Etil alkol vücuttan tamamen elimine edildikten sonra 18 saate kadar kanda, 80 saate kadar idrarda belirlenebilmektedir. Diğer birçok madde gibi, etanolün bu direk metaboliti saçta birikebilmektedir. Alkol kullanımının bir belirleyici olan EtG'in saçta belirlenmesi hem maddelerin saçta birikmesi hem de örnek toplamada saçın non-invasiv olması nedeniyle son yıllarda önerilen bir yöntemdir²⁴. Böylece standart analizlerle belirlenemeyen alkol kullanımını göstermek için duyarlı ve özgün bir belirleyeci olan EtG önemli bir spektrum sağlamaktadır¹⁵.



Şekil 2.2 Etil glukuronitin oluşum mekanizması

2.2.4. Etil Alkolün Toksisitesi

Etil alkolle zehirlenme daha çok alkollü içki alınması ile olmaktadır. Oral yolla fatal doz 250-500 g arasında verilmektedir. Ancak fatal ve akut toksik doz, alınan içkinin cinsi, biyolojik, genetik, çevresel etkiler ve bireysel faktörlere göre değişmektedir. Önceden alınan tranquilizan, antihistaminik ve barbitürat gibi ilaçlar alkolün etkisini artırarak toksik dozu etkiler^{1,3,6}.

Kan alkol düzeyindeki 1 saatlik düşüş ortalama erkeklerde 18 mg/100 ml, kadınlarda 15 mg/100 ml olmak üzere her iki cinsten 10-25 mg/100 ml arasında değişmektedir. Örneğin, yetişkin bir erkekte bir trafik kazasından 4 saat sonra kan alkol değeri 40 mg/100 ml ölçülmüş ise olay anında kan alkol değeri 112 mg/100 ml olarak hesaplanır. Fakat bu değerlendirmeler kronik alkolikler için geçerli değildir. Kronik alkoliklerde karaciğer fonksiyonlarının tamamen yitimine kadar karaciğer enzimleri daha etki rol oynayarak daha fazla etil alkolün metabolize olmasına yol açar^{1,5,6,26,27}.

Etil alkol potent bir merkezi sinir sistemi depresanıdır. Etil alkol, alınan alkol miktarına bağlı olarak MSS'yi korteksten medullaya kadar etkiler. Alkolün etkisi, alkollü içkiyi alma hızı, miktarı, içki sıcaklığı, kişinin tokluğu, beraberinde alınan besin ve kişinin duyarlılığı ile ilgilidir.

Etil alkolün MSS üzerindeki etkisi alkol konsantrasyonuna bağlı olarak değişmektedir.

- Kandaki etil alkol miktarı %25 mg'dan aşağı olduğunda kişi çok hafif olarak etkilenir.
- Kandaki etil alkol miktarı %25-100 mg arasında ise beyin korteksi depresyona uğrar. Motor ve psişik aktivite artar. Kişi hareketlidir, çok konuşur, güler ve öfoli hali görülür. Ancak hareketlerdeki koordinasyon ve fikirlerdeki bağılılık bozulur.
- Kandaki etil alkol miktarı %100-200 mg arasında olduğunda, kişinin alkol aldığı anlaşılır. Koordinasyon bozukluğu, konuşmada dil dolaşması gözlenir.
- Kandaki alkol miktarı %200-300 mg arasında olduğunda, bilinç kaybolur. Görme bozulur, solunum ve nabız hızlanır, his kaybolur. Musküler inkoordinasyon dikkati çeker. Kişi sendeleyerek yürür. Kusma ve hıçkırık görülebilir.
- Kandaki alkol konsantrasyonu %300-500 mg arasında his yoktur, bulanık ve çift görülür, ciddi zehirlenme belirtileri ortaya çıkar.
- Kandaki etil alkol miktarı %500 mg üstünde olduğunda solunum yavaşlar. Her an solunum felci beklenir. Refleksler azalır, his kaybolur, koma ve ölüm bu konsantrasyonlar da kesindir.

Alkol MSS üzerindeki etkisi dışında, koroner ve cilt damarlarını genişletir, serebrospinal sıvı sekresyonunu artırıcı ve basıncını yükseltici etkisi vardır. Solunum sistemini (düşük miktarlarda) hızlandırdığı halde, ağır zehirlenmelerde aksine deprese eder^{1,5,6}.

2.2.5. Alkol bağımlılığı, kronik alkol zehirlenmesi

Alkol, psişik ve fiziksel bağımlılık oluşturan ve böylece kişiyi kompulsif olarak alkol içmeye sevkedeabilen bir maddedir. Alkol bağımlılığı, diğer bazı ilaç bağımlılığı durumlarında olduğu gibi kendini psikotik belirtilerle gösterir. Alkole fiziksel bağımlılık gelişmesi genellikle geç olarak ve belirgin derecede tolerans geliştikten sonra olur. Diğer bağımlılık tiplerinden farklı olarak alkol bağımlılığında karaciğer, beyin, miyokard ve çizgili kaslarda anatomopatolojik bozukluklar da gelişir. Bu nedenle alkol bağımlılığı aynı zamanda kronik alkol zehirlenmesidir; alkol bağımlılığı, alkolizm diye de adlandırılır. Alkolizm, çeşitli ülkelerde ilaç bağımlılığı ile ilgili en önemli sosyal sorunu oluşturan bağımlılık türüdür. Alkolizm ile nonadiktif kronik alkol kullanılışını birbirinden ayırt etmek gerekir. Kronik olarak alkollü içki kullanan her kişi mutlaka alkolik değildir, fakat ona adaydır.

Alkol bağımlılığının gelişmesinde kişilik bozuklukları, sosyokültürel faktörler ve genetik yapıda rol oynar. Alkoliklerde; alkolle ilgili semptomlar, kalıtım kalıbı ve kişilik yapısı bakımından iki alt grup ayırt edilmiştir. Bunlar tip 1 ve tip 2 alkolizm diye adlandırılmıştır. Ancak bütün alkoliklerin bu iki gruptan birine girdiği anlaşılmamalıdır. Bu iki tip uç (ekstrem) alt grupları temsil ederler ve alkoliklerin geri kalan büyük kısmı bu iki uç arasında yer alırlar.

Tip 1 alkol bağımlılığı; genellikle 25 yaşından sonra başlar, kişide devamlı alkol arama davranışı vardır, alkolik olmaktan suçluluk ve korku duymalarına rağmen içerler, antisosyal değildirler, olaya ve şiddete genellikle neden olmazlar. Kişilik yapıları “pasif bağımlı” kişiler yapısına uyar, başkalarına duygusal olarak bağımlı, yardım edici, sempatik, kötümser, düzenli, ayrıntılara dikkat eden, sebatlı ve maceradan hoşlanmayan kimselerdir.

Tip 2 alkol bağımlılığı; daha çok gençlerde görülür ve genellikle 25 yaşından önce başlar, bu tür bağımlılar alkolden uzun süre uzak durabilirler fakat bir kez başladıkları zaman aşırı miktarda alırlar, alkol almayı kesemezler ve kadehi kaldıramaz

duruma gelene kadar içerler. Alkole psikişik bağımlılıkları, ilk tipin aksine belirgin değildir. İçme krizi esnasında olaya ve şiddete sıklıkla neden olurlar. Alkol kullandıkları için suçluluk veya korku duymazlar. Antisosyal kişilik yapısına sahiptirler, atak, düzensiz, çevreye önem vermeyen, soğuk, pervasız, sebatsız ve macera sever kişilerdir.

Kronik alkol kullananlarla (akşamcılar), alkolikleri ayırttiren başlıca kriterler şunlardır;

- 1) Alkolik alkolü kontrolsüz bir şekilde mutad yer, zaman ve vesileler dışında da kullanır.
- 2) Kronik alkol kullanan aldığı alkolün günlük uğraşlarını etkilemesinden çekinecek kadar bilinçlidir, alkolik ise günlük uğraşlarının alkol alımını etkilemesinden çekinecek kadar bilinçsizdir.
- 3) Alkolikte alkollü içki sağlama obsesyon halindedir ve alkolsüz kalma dayanılmaz bir korku derecesindedir.
- 4) Alkolik, alkolün sağlığını, çevresi ile ilişkilerini, çalışma yaşamını, ailesine karşı görevlerini ve ekonomik durumunu bozduğunu umursamayacak kadar tutkunluk içindedir, bunları bilmesine rağmen içer.

Alkolik, alkolün kronik toksik belirtileri, akut alkol intoksikasyonu, alkol yoksunluk sendromu, alkol etkisi altında kaza yapma veya kazaya maruz kalma riskinin artması gibi nedenlerden dolayı tıbbi sorun oluşturur.

Alkolizmin kronik toksik belirtileri şunlardır; kilo kaybı, gastroenterit, iştahsızlık, karaciğer sirozu, polinevrit, kol ve bacaklarda motor ve duyu kaybı, optik atrofi, mental bozukluk, hafıza kaybı, kardiyak beriberi, pellegra ve anemidir⁶.

2.3. Kıl

Son yıllarda alkol ve uyuşturucu madde kullanımındaki artışa bağlı olarak klinik kimya, adli ve klinik toksikoloji alanlarında alkol ve uyuşturucu madde tespiti için idrar ve kan numunelerine alternatif olarak kıl kullanılmaktadır²⁸.

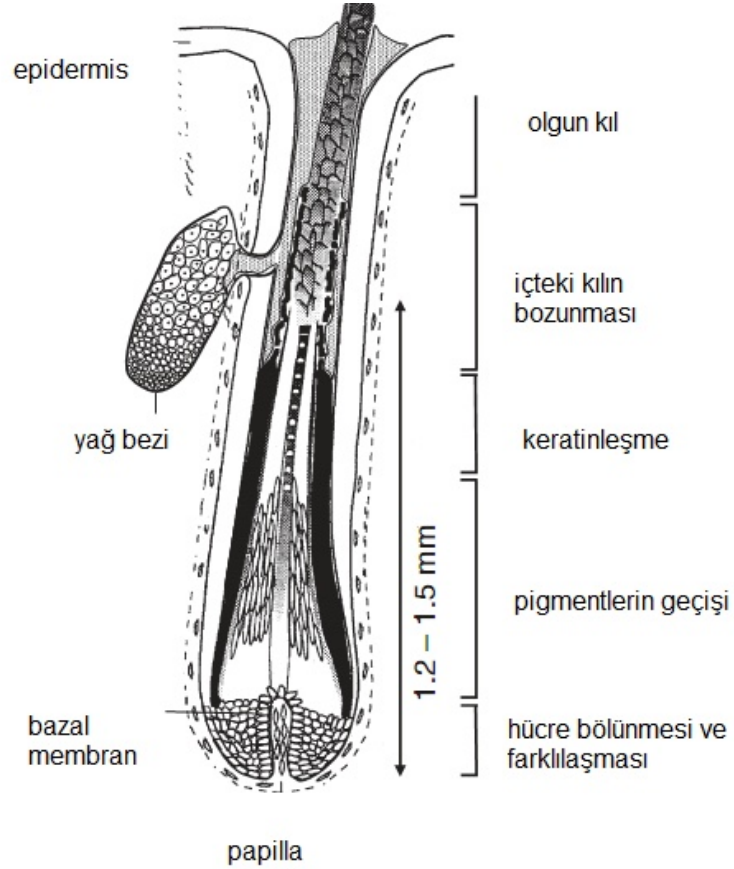
Kıl, kronik ve geçmiş tüketimin geriye dönük araştırmasını mümkün kılan daha uzun dedeksiyon penceresine sahip olmasından dolayı toksikolojik analizler için kullanılan kan ve idrar gibi diğer materyallerden farklılaşır. Örnek toplama işlemi non-

invazivdir. Kıl sert ve dayanıklı yapısından dolayı spesifik ön hazırlıklar olmadan kolayca taşınabilir ve saklanabilir^{29,30,31}.

2.3.1. Kılın Yapısı

Kıl kişilerde renk, miktar ve şekil olarak farklı, yapı olarak aynı görünmesine rağmen insan anatomisinin çok karmaşık bir parçasıdır. Kıl memelilerin derisindeki farklılaşmış organların bir ürünü olup %65- 95'i protein (esasen keratin), %15-35'i su, geriye kalanı ise yağ ve minerallerden oluşmaktadır. Kıl iç ve dış olmak üzere iki ayrı alana sahiptir. Deri yüzeyinin 3-5 mm aşağısında yer alan kıl küçük bir keseye benzeyen, yağ ve apokrin bezleriyle birleşmiş folikül içerisinde büyür. Yağ bezleri kılın parlaklığı ve hacmi için gereklidir. Apokrin bezi ise içerdiği yağlı maddenin bozunmasıyla oluşan bir vücut kokusu verir. Kıl folikülü kılın büyümesi için gerekli olan aminoasit, enerji, oksijen sağlamak amacıyla etrafı zengin kapiler kan damarlarıyla çevrilidir.

Bir kılın filizlenmesi hücrelerin bölünüp farklılaştığı folikül tabanında bulunan matriks hücreleri (keratinosit ve melanosit) tarafından gerçekleştirilir. En hızlı gelişen insan dokularından birisi matriks hücre döngüsüdür. Hızlı mitozlar kılı kıl kökü ağzındaki doğrultuda olan keratinleşme bölgesine geçişi zorlar. Burada melanin ve keratin sentezlenir. Melanin, kıla rengini verir ve bazal membranda yer alan melanositler tarafından üretilir. Keratin, yüksek miktarda kükürt içeren özel proteinden meydana gelir ve kıl gövdesinde uzun lifler oluşturur. Hücreler keratinleşmeye başladığı zaman bozulmaya başlayarak çekirdeklerini yok ederler ve su açığa çıkarırlar.



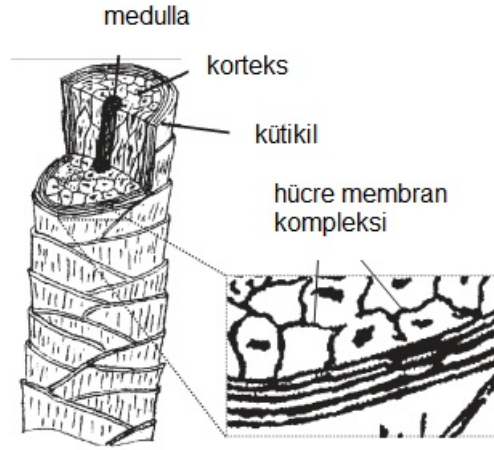
Şekil 2.3. Kılın folikülündeki formasyon

Hücre membran kompleksi protein ve protein-lipid kompleksinden meydana gelir. Kılın kimyasal ve mekanik etkiye dayanıklı olmasını sağlar. Bir kıl aynı türde bir telden oluşmamıştır. Onun yerine kütikıl, korteks ve medulla olarak adlandırılan üç ortak merkezli yapıyla birlikte hücre membran kompleksine yapışmış keratinize olmuş hücrelerden meydana gelir.

Kütikıl uzayan hücrelerin birbirinin üzerine bindiği tek bir tabakadan oluşur ve içteki lifleri korur. Pigmenti olmayan kütikıl kimyasal maddelerle bozunur, mekanik etkilerle yaralanır veya yaşlanırsa kıl gövdesi yıpranır ve dökülür.

Korteks kıl gövdesinin en hacimli kısmıdır. Pigmenti olan korteks stabilitenin ve renk kompozisyonunun kıl boyunca yayılmasından sorumludur. Korteks hücreleri arasında fusi olarak adlandırılan çok küçük boşluklar yer alır. İlk olarak fusi sıvı ile doldurulur. Fakat kıl büyüdüğü ve kuruduğu için sıvı hava ile yer değiştirir.

Medulla kılın en içteki merkezinde yer alır ve medular hücrelerden meydana gelir. Bir insanda medulla kıl miktarının çok küçük bir yüzdesini oluşturur. Genel olarak kıl fiberinin çapı arttığı için medullanın boyutu da artar^{32,33}.



Şekil 2.4. Kılın yapısı

2.3.2. Kılın Büyümesi

Yetişkin bir insanda yaklaşık olarak beş milyon kıl folikülü olduğu tahmin edilmektedir. Bunun bir milyonu baştır.

Kıl sürekli olarak büyümür. Büyüme ve dinlenme dönemleri halinde büyür. Kıl anagen faz (büyüme), catagen faz (geçiş) ve telogen faz (dinlenme) olmak üzere üç dönemde uzar. Yaklaşık olarak kılın %85 i büyüme evresinde geri kalanı ise dinlenme döneminde.

Anagen kılın aktif olarak büyüme fazıdır. Folikülün bazal membranında yer alan hücreler hızlı bir şekilde bölünür. Kıl hücreleri foliküler kanal içerisinden yukarıya doğru yeni kılı iter. Kütikül, korteks ve medulla hücreleri farklılaşır ve keratinleşme başlar.

Catagen faz anagen fazı takiben gerçekleşen kısa geçiş evresidir. Bu faz boyunca hücre bölünmesi durur ve kıl gövdesi tamamıyla keratinize olur. Bu geçiş döneminden sonra kıl folikülü telogen olarak adlandırılan bir dinlenme dönemine girer ve büyüme tamamen durdurulur. Kılın büyüme safhası 4-8 yıl, geçiş ve dinlenme fazları ise

sırasıyla, birkaç hafta ve 4-6 aydır. Saç genelde bir ayda 0.6 cm ile 1.4 cm arasında uzar.

Anagen ve telogen safhalarındaki oran yani kılın uzama hızı ırka, cinsiyete, yaşa ve kişinin sağlık durumuna bağlı olarak değişir. Tüm kılların farklı hızlarda uzaması kıl analizlerinde kılın nereden alındığı ve sonuçların yorumlanması konusunda önemli kriterler oluşturur^{30,32,34}.

2.3.3. Kıl analizlerinin tarihçesi

İnsan kılında zehirlerin tespitinde ilk vaka 1858 yılında Hope tarafından Adli Tıp Uygulama Dergisinde yayımlandı. Hope 11 yıl sonra mezardan çıkarılan kişinin saçında arseniği tespit etti. Bunu takiben yaklaşık 100 yıl sonra, 1954 yılında Goldblum kobayların kılında amfetamin maddesini tanımladı.

1960 ve 1970 yıllarında kıl analizleri arsenik, kurşun, cıva gibi toksik ağır metallere maruziyeti değerlendirmek için kullanıldı. Bu ng seviyede tespiti izin veren atomik absorpsiyon spektrometresi kullanılarak başarıldı. O zamanda organik maddeler özellikle uyuşturucu için kılın incelenmesi analitik metotların yeteri kadar hassas olmamasından dolayı mümkün değildi. Radyoaktif izotoplarla işaretlenmiş uyuşturucuların vasıtasıyla bu maddelerin kandan kıla taşınabileceği ve orada birikebileceği kanıtlandı. Bu ilk araştırmalardan 10 yıl sonra radyoimmunoassay (RIA) aracılığıyla kılda çeşitli organik uyuşturucuların varlığını göstermek mümkündü. 1979'da Baumgartner ve ark. RIA kullanarak eroin kullanan kişilerin kılında morfini tespit ederek ilk yayını yayımladılar. Kıl uzunluğu boyunca morfin konsantrasyonundaki farklılıkların uyuşturucu kullanım zamanıyla korelasyon halinde olduğunu buldular.

1981 yılında Smith ve Pomposini sodyum dodesülfat çözeltisi ile ekstraksiyon yaptıktan sonra RIA yöntemiyle fenobarbitali buldular. 1983 yılında ise Arnold ve Püschel barbitürat ve methaqualone tespiti için RIA kitlerini kullandılar. Fakat Arnold kodeinin radyoimmunoassay ile iyi bir cross reaksiyonuna sahip olmasından ötürü bu kitleri morfin için spesifik olan kitlerle değiştirdi.

1985'de Hamburg'da yapılan olağan toplantıda sürekli kodein tüketen bir hastanın kıl analiz sonuçları sunuldu. Bu sonuçlar Arnold'un ağır eroin tüketiminde yer alan aralıktaki morfin konsantrasyonunu göstermiştir.

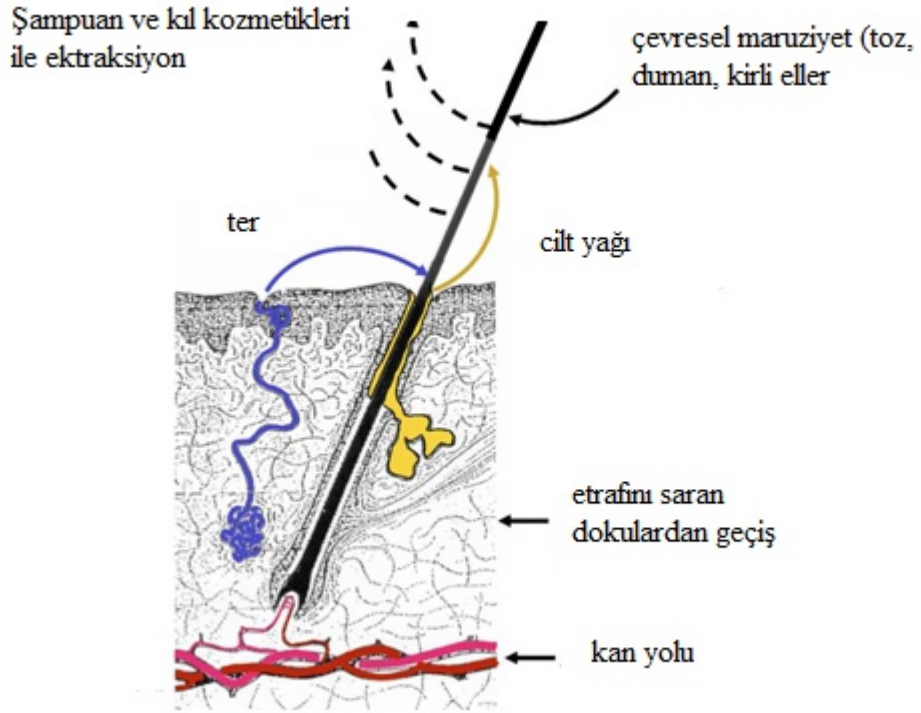
1993 yılında Sachs ilk olarak saçta etil glukuroniti (EtG) belirlemiştir. Zaman içerisinde dedeksiyon limit değeri ve miktarsal belirleme limit değeri gibi analitik metotlar geliştirilmiştir. 1994 yılında Aderjan GC/MS/EI metodunu kullanarak, 2001 yılında Yegles GC/MS/NCI metodunu kullanarak ppm düzeylerinde saçta EtG'i belirlemişlerdir¹⁶.

Günümüzde ise kütle spektrometresiyle birleşmiş olan gaz kromatografi kıl analizleri için seçilen bir yöntemdir. Bu teknoloji rutin olarak adli bilimler, uygulamalı tıp, klinik toksikoloji ve son zamanlarda spor alanında yinelenen alkol ve uyuşturucu maruziyetini kayıt etmede kullanılmaktadır^{31,33,35}.

2.4. Kıl içerisine madde geçiş mekanizması

Yapılan deneysel çalışmalar ilaçların kıl içerisine çeşitli mekanizmalarla girebileceğini göstermiştir. Kıl içerisine madde geçişi için amaçlanan en kesin model pasif transferdir. Bu modelde kimyasallar folikülün tabanında büyüyen kıl hücreleri içerisine kan dolaşımı ile taşınır ve kıl gövdesi içine sıkıca bağlanır. Bu geçiş alınan maddenin dozuyla ilişkili olarak kandaki konsantrasyonuna bağlıdır.

Diğer en önemli alternatif mekanizma tamamlanmış kıl gövdesi içerisine ter ve yağ salgılarından difüzyon ile geçiştir. Terin kanda bulunan ilaçları içerdiği bilinir. Çünkü kıl çok gözenekli bir yapıya sahip olduğundan su ve diğer sıvıları kolayca absorplayarak ağırlıklarını %12-18 arttırabilir. Ter vasıtasıyla ilaçlar kolayca kıl içerisine transfer olabilir. Havada, suda, şampuanlarda, saç spreylerinde, diğer kozmetik ajanlarda bulunan kimyasallar kıl üzerinde birikir. Böylece çevresel maruziyet ile madde geçişi gerçekleşir^{32,33}.



Şekil 2.5. Kıl içerisine madde geçişi

Yapısal bakış açısına göre üç faktör madde geçişini etkiler. Bunlar kılın melanine bağlanma afinitesi, lipofilitesi ve iyonizasyon durumudur. Kılın rengi ve kimyasal maruziyet kıl içerisine geçişte önemli bir rol oynar^{36,37}. Melaninin kokain ve metaboliti benzoilekgonin dahil olmak üzere pek çok ilacı bağlayan bir materyal olduğu tartışılmazken, kokainin keratin proteini dahil kıla geçen diğer şeylerin büyük bir kısmını da bağlar³⁸. Örneğin kırmızı saçlı kişiler pigment etkisini göstermek için uygundur. Kıl kökü kanda aynı ilaç konsantrasyonuna maruz kalmasına rağmen pigmentli kıldaki madde miktarı pigmenti olmayan kıldan 10 kat daha yüksek bulunmaktadır. Yapılan kontrollü çalışmalarda benzer sonuçlar siyah, kahverengi, sarı ve kırmızı renkli saçları kıyaslayarak da bulunmuştur. Nakahara ve Kikura lipofilik özellik arttıkça kıl içerisine geçişin artacağını göstermiştir. Lipofilik organik moleküller kolayca membranlara nüfuz ederler. Ancak hidrofilik moleküller için membranlar su geçirmez bir bariyerdir³⁶.

Diğer bir teori de kılda bolca bulunan sistinin –SH gruplarının kimyasal madde ile bağ yapmasıdır. Normalde –SH grupları karşılıklı S-S bağları oluşturarak protein lif

ağını stabilize ederler. Bu nedenle büyüyen kıl hücrelerine giren maddenin sıkıca bağ yapma olasılığı bulunmaktadır³⁴.

2.5. Kılı toplama ve saklama işlemi

Uyutucu-uyuşturucu maddelerin kıl analizi için toplama prosedürü standardize edilmemiştir. Yayınlanan çoğu çalışmalarda numune baş bölgesinden rastgele alınmaktadır. Ancak Saç Analizleri Derneği (Society of Hair Testing) tarafından tespit edilen pozitif kıl örneği için önerilen belli kriterler vardır³⁹. Bu kriterler;

- Kılın insanda en iyi toplandığı alan kafanın arkasındaki posterior vertex bölgesidir. Çünkü bu bölgede talogen safhada olan kılın oranı en düşüktür. Kıl yaş ve cinsiyet ile ilgili etkilere daha az bağlıdır. İnsanlarda en kolay örneklenebilen vücut kılı saçtır. Ayrıca sakal, koltuk altı ve pubik kılları da kullanılabilir.
- Tüm kıl örneklerine bir dekontaminasyon prosedürü uygulanmalıdır. Bu yöntemde ilk yıkama organik bir çözücü, ikinci yıkama olarak su veya tampon çözelti ve son yıkama da bir organik çözücüyü içermelidir.
- Pozitif olan ön izleme testleri GC/MS gibi daha iyi spesifiteye ve seçiciliğe sahip olan alternatif bir yöntemle doğrulanmalıdır.
- Pasif kontaminasyon olasılığını değerlendirmek için; metabolitlerin tanımlanması, cut-off değeri, metabolitin maddeye oranı değerlendirilir.

Kullanılacak örnek hacmi laboratuvarlar arasında değişir. Analiz edilen maddeye ve testin yöntemine bağlıdır. Literatürde kaydedilen numune miktarı tek bir saç telinden 200 mg kadardır ve alınacak saç olabildiği kadar kafatasına yakın kesilmelidir.

Toplanan kıl için en basit yol alüminyum folyo içerisinde sarılmış kılı uygun şekilde etiketlenmiş kâğıt zarfta muhafaza etmektir. Kontaminasyona sebep vermesinden dolayı plastik poşette saklamadan kaçınılmalıdır. Aynı zamanda plastik madde kıldan lipofilik maddeleri ekstrakte eder⁴⁰.

Kronik alkol tüketimi için saç analizleri üzerine 2009 yılında Saç Analizleri Derneği tarafından benimsenen bir rapor hazırlanmıştır⁴¹. Bu rapora göre;

- Alkol birçok ülkede yasal bir bileşiktir ve diğer maddelerle kıyaslandığında daha yüksek miktarlarda tüketilir ve nüfusun büyük çoğunluğu tarafından kullanılır. Diğer maddelerle karşılaştırıldığında saç analiziyle kronik alkol tüketiminin belirlenmesi bazı özel karakterlere sahiptir.
- Şu anda Dünya Sağlık Örgütü'nün raporuna ve bir literatür araştırmasına göre aşırı kronik alkol içimi birkaç ay boyunca hergün 60 g saf etanolden daha fazla tüketimine karşılık gelmektedir.
- Klinik ve adli amaçlar için kronik alkol tüketimini belirlemek gerekmektedir.
- Saçta etanolün kendisini direk belirlemek uçuculuğu ve dışsal kaynaklardan absorpsiyonu yüzünden mümkün değildir.
- Absorpsiyondan sonra etanolün küçük bir kısmı EtG'nin olduğu faz II reaksiyonu boyunca glukuronik asitle birleşir.
- EtG polar, suda çözünen bir maddedir, kararludur fakat kozmetik işlemlere hassas değildir ve doğal saç rengi ile ilgili değildir.
- Hem GC/MS/MS'te hem de LC/MS/MS'te internal standart olarak d₅-EtG ile saçta EtG analizi yapılabilir.
- Aşırı kronik alkol tüketimini güçlü bir şekilde öngören saçta EtG cut-off değeri kafa derisine 0-3 cm yakın parçada ölçülen 30 pg/mg olarak önerilmektedir.
- Kanda ve insan dokularında farklı enzimlerle alkol tüketiminden sonra yağ asit etil esterleri (FAEEs) oluşur.
- FAEE suda çözülmez ve nötral pH'da kararludur fakat alkali pH'da saç analizlerinde duyarlıdır.
- Farklı esterlerden etil myristat, etil palmitat, etil oleat ve etil stearatlardan hesaplanabilir. Yorumlamak için, bu dört ester toplamı kullanılabilir.
- GC/MS ile birleştirilmiş Headspace katı-faz mikroekstraksiyon ve internal standart olarak döteryum FAEEs kullanımı saçta FAEE'nin belirlenmesi için uygun bir tekniktir.

- Aşırı kronik alkol tüketimine güçlü bir şekilde öngören saçta dört esterlin toplamının cut-off değeri saç derisine 0-3 cm' ye yakın bölümde ölçülen değeri 0,5 ng\mg olarak önerilmektedir.
- FAEE kozmetik uygulamalara duyarlıdır fakat onların birleşmesi doğal saç rengiyle ilgili değildir.
- Hem EtG hem FAEE aşırı kronik alkol tüketimini değerlendirmek için bağımsız bir şekilde kullanılabilir. İki taraflı konfirmasyon için ve yanlış pozitiflik veya yanlış negatiflik dışında her iki parametrenin değerlendirilmesi bazı özel olgularda kullanılabilir.
- EtG ve FAEE belirlenmesinde farklı laboratuvarlarda analiz ve yorumlamaların eşit standartlarda olabilmesi için yeterlilik analizleri tavsiye edilmiştir.
- Bu rapor 16 Haziran 2009' da Roma' da düzenlenen toplantıda saç analizleri derneği tarafından belirlenmiştir ve sonraki iki yıl içerisinde gözden geçirecektir.

2.6. Kıl analizleri

Son yıllarda kıl analizleri için çok sayıda prosedür tanımlanmıştır. Analitik sonuçların benzerliğini ve kalitesini geliştirmek için analitik yöntemlerin standardizasyonu önemlidir. Kıl analizleri için genel bir yöntem oluşturmak ve analizlerin yeterliliğini sağlamak amacıyla Saç Analizleri Derneği (SOHT) tarafından farklı laboratuvarlar arasındaki metotlar karşılaştırılarak uygun prosedürler oluşturulmaya çalışılmıştır⁴²⁻⁴⁵. Genel olarak kıl analizleri beş basamakta gerçekleşir.

2.6.1. Dekontaminasyon işlemi

Yıkama işleminin asıl amacı epidermal tabakaya penatüre olan kimyasal maddelerin yanı sıra kılın yüzeyinden yağı, kiri ve dış kirlilikleri uzaklaştırmaktır.

Kıl analizlerinde karşılaşılan en önemli konu uyuşturucuya pasif maruz kalarak yanlış pozitif test sonuçlarının ortaya çıkmasıdır. Çoğu laboratuvarında kıl analizleri dış kontaminasyonu uzaklaştırmak için bir yıkama işlemi ile başlar. Ancak tam anlamıyla yıkama yönteminde belli bir fikir birliği ve prosedür yoktur. Bu işlem metanol, etanol, aseton vb. yıkama; postmortem örnekler için %1 sodyum dodesilsülfat çözeltisi ve diğer

ajanlarla yıkama; diklorometanla yıkama; fosfat tamponuyla ve organik çözücülerle yıkama olmak üzere genel olarak kategorilere ayrılmıştır⁴⁶⁻⁵⁹.

Diklorometan veya aseton gibi non-protik organik çözücüler yıkama işlemi açısından daha avantajlıdır. Çünkü kılı şişirmeyerek kıldan materyaller kolaylıkla ekstrakte edilebilir^{60,61}.

2.6.2. Kılın hazırlanması

Segmentlere ayrılmış kıl pek çok vakada kişilerin madde kullanım süresi hakkında önemli bilgi sağlayabilir. Bu amaçla eğer kişinin madde kullanım zamanı tespit edilecekse segmentlere ayrılır. Romolo ve ark. yaptıkları çalışmada işlem öncesi bilyalı değirmen kullanarak kıl örneklerini toz haline getirmiştir. Toz haline gelen kıl örneklerinin daha homojen ve daha uygun olduğunu düşünmüşlerdir⁶².

Uygun segment uzunluğunu ayarlarken analiz yöntemi düşünülmelidir. İstismar edilen maddenin konsantrasyonu kıl kökünden dışa doğru azalır. Bu nedenle segmentlere ayırırken artan uzunluklarda parçalara ayrılmalıdır. Merkezden uzak olan kılda pasif kontaminasyon ile ilişkili hipotez olasıdır^{63,64}.

İstismar edilen maddenin kimyasal yapısı ve kullanılan ajanlara karşı duyarlılığı göz önünde bulundurulmalıdır.

2.6.3. İnkübasyon

2.6.3.1. Bazik parçalama

Amfetamin, morfin, kannabinoid gibi alkali durumlar altında stabil olan maddeler analiz edildiğinde uygun olan yöntemdir. Genellikle kıl örneğinin 0.1-2.5 M NaOH ile 37 °C'de gece boyunca inkübasyonunu içerir. Bazik ekstraksiyon özellikle nikotin, amfetamin, esrar, antidepresan ve nöroleptikler açısından avantajlıdır⁶⁵.

2.6.3.2. Asidik parçalama

Hemen hemen tüm maddelerle uyumlu olan prosedür su banyosunda 5-18 saat metanolle muamele etme işlemidir. Opiyat, kokain, amfetamin, metadon gibi maddeler proton verdiği için pH 6.4-7.6 fosfat tamponu ile veya 0.01-0.5M HCl ile muamele edilir. Hidrofilik metanol difüzyon vasıtasıyla kıl matriksine nüfuz ederek kılın şişmesini sağlar ve istismar edilen maddenin serbest kalmasına neden olur. Bir organik çözücü olarak metanol nötral ve lipofilik bileşenleri çözer⁶⁶⁻⁶⁸.

2.6.3.3. Enzimatik parçalama

Kıl analizlerinde enzimlerin kullanılması ile kıl yapısı bozularak tampona maddelerin geçişi sağlanır. Bu amaçla β -glukorodinaz/ arilsülfat, proteinaz K, proteaz E gibi birkaç enzim kullanılır. Kılın enzimatik sindiriminin dezavantajında immunoassay aracılığıyla tespit edilen ilaçlarda kullanılan antikorların denatüre olduğu düşünülür²⁹.

2.6.4. Ekstraksiyon

Sulu ekstraktlarda veya çözeltilerde bulunan safsızlıklardan dolayı direkt GC/MS enjeksiyonu yapmak olanaksızdır. Bu amaçla sıvı-sıvı veya katı-sıvı ekstraksiyon yöntemi tanımlanmasına rağmen otomatik sistemlerin uygulanabilirliği ve gelişmiş ekstraksiyon materyallerinden ötürü katı-sıvı faz ekstraksiyonu daha çok kullanılmaktadır. Son zamanlarda yeni bir teknik olan katı faz mikroekstraksiyon tekniği basitliği, hassaslığı, hızlılığı gibi avantajlarından ötürü tercih edilmeye başlanmıştır. Aynı zamanda çözücü gerektirmez^{69,70}.

2.6.5. Analiz

Uyutucu-uyuşturucu maddelerin toksikolojik analizi ön izleme ve doğrulama olmak üzere iki basamağı içerir. İmmunoassay işlemini takiben kromatografik analiz uygulanır. Radyoimmünassay hassas ve güvenilir bir immunolojik tekniktir. Fakat radyoaktif olarak etiketlenmiş materyallerin kullanımı güven alanının dışında uygulanmasını önler. Bu yüzden radyoaktif olmayan metotlar tercih edilir. Enzim immunoassay güvenilir, çok hassas, ucuz ve basit olmasından dolayı alternatif bir yöntemdir. Bu analizlerde pozitif çıkan sonuçlar gaz kromatografisi/ kütle spektrometresi

ya da sıvı kromatografi/kütle spektrometresi gibi daha kesin bir teknikle konfirme edilir^{71,72}.

Literatürde saç telinde birçok maddenin analizinde gaz kromatografi (GC), gaz kromatografi/kütle spektrometresi (GC/MS), radyoimmunoassay (RIA), ince tabaka kromatografi (TLC), sıvı kromatografi/kütle spektrometresi (LC/MS) gibi teknikler kullanılmıştır⁷³⁻⁷⁵.

Analitik teknolojilerin gelişmesi analizlerin hassasiyetinin ve doğruluğunun artmasını sağlamıştır. Böylece test sonuçları bilimsel olarak daha iyi anlaşılıp daha kolay yorumlanmaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada etanolün bir metaboliti olan etil glukuronitin saçta belirlenebilmesi için 10 gönüllü kişi kullanıldı. Örnekler alınmadan önce kişiler bilgilendirildi ve yaş, cinsiyet, kilo ve günlük alkol tüketimi gibi sorular soruldu.*¹ Onlardan rıza formu doldurmaları istendi.** Çalışma için Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulundan onay alındı. Toplanan saç örneklerinde etil glukuronit analizi Likit Kromatografi- Tandem Kütle Spektrometresi cihazı ile yapıldı. Bu çalışmanın gerçekleştirilmesi için Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi bütçesinden TF2009-YL15 no'lu proje ile parasal destek alındı.

3.1. Kıl Örnekleri

10 gönüllü kişiden alınan saç örnekleri deriye en yakın posterior vertex bölgesinden makasla toplandı. Alınan bu örnekler alüminyum folyo ile sarılarak her birine numara verildi. Analize kadar karanlık ortamda, oda sıcaklığında saklandı.

3.2. Deneylerde Kullanılan Malzemeler

3.2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Etil Glukuronit (Medichem, Germany)

Etil Glukuronit-D₅ (Medichem, Germany)

Metanol (Merck)

Asetonitril (Merck)

3.2.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

Tüpler (10 ml'lik)

Mikropipet

Pastör pipet

Enjektör

Makas

* Ek-1'de verilmiştir.

** Ek-2'de verilmiştir.

Deiyonize su

Balon joje

Hassas terazi (Mettler Toledo)

Vortex (Elektromag M16)

Ultrasonikatör (Bandelin Sonorex)

Filtre (Econofilter, 0.45 µm, Agilent)

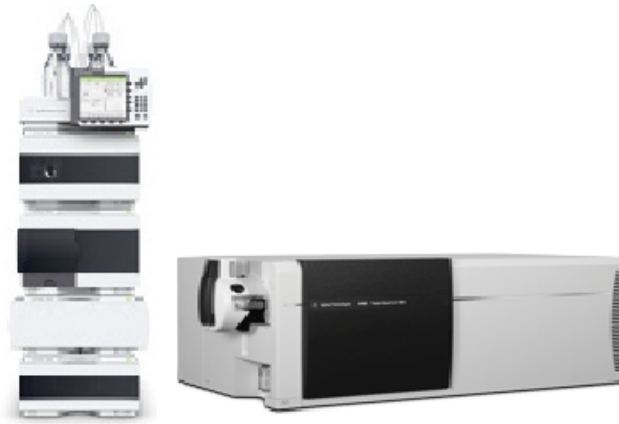
Santrifüj (5500 devir/dk- Hettich Universal 30F)

3.3. LC-MS/MS Çalışma Şartları

Sağta EtG belirlenmesi için kromatografik analizler Agilent 6460 Triple Quadrupole Jet Stream teknolojisine sahip sıvı kromatografi cihazı ile yapıldı.

- Kolon : Zorbax Hilic Plus, Rapid Resolution 4.6x50mmx2, 3.5 µm kolon
- Gaz Sıcaklığı : 350 °C
- Gaz Akışı : 11 l/dk
- Nebulizer : 50 psi
- Sheath Gaz Sıcaklığı : 400 °C
- Sheath Gaz Akışı : 11 l/dk
- Kapiler Voltaj : 4000 V

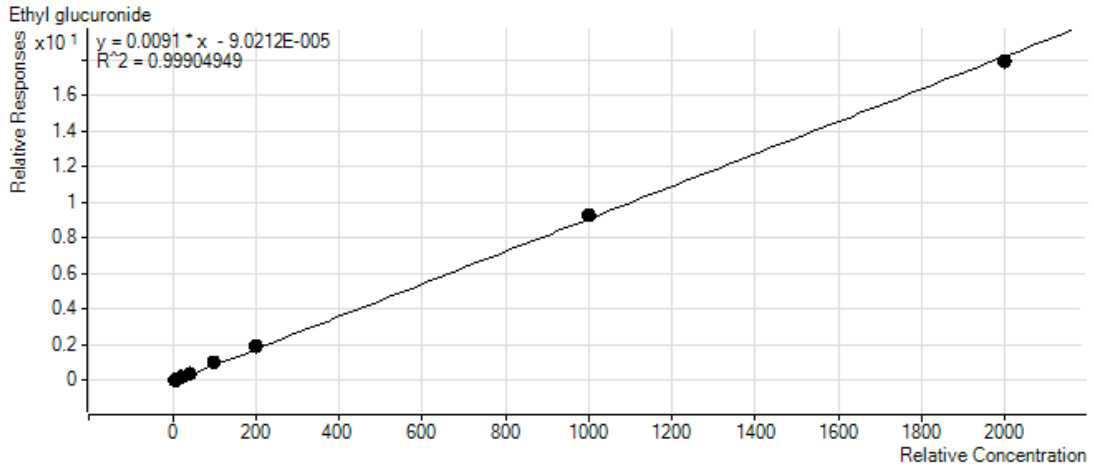
Etil glukuronitin tanımlanması için MRM (Multiple Reaction Monitoring) modu kullanıldı. Etil glukuronit ve etil glukuronit-d₅ için miktarı belirleyici iyon m/z oranı sırasıyla 221→75 ve 226→75 olarak kullanıldı. Data verileri MassHunter Workstation yazılımı (2003-2010 versiyon, Agilent) ile verildi.



Şekil 3.1. LC-MS/MS cihazı

3.4. Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması

Kalibrasyon eğrisi için hem EtG hem de D₅-EtG standartları 1 mg/ml'lik konsantrasyonlarında metanolde hazırlandı. Hazırlanan EtG çözeltisinden farklı konsantrasyonlarda 0.015, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 5 ve 10 mg/l çalışma çözeltileri hazırlanarak 9 kalibrasyon noktası oluşturuldu. D₅-EtG çalışma çözeltisi ise standarttan 0.5 mg/l olarak yeniden hazırlandı. Farklı dokuz tüpe 2 ml asetonitril/su solventi, 40 µl internal standart olarak hazırlanan EtG-D₅ (0.5 mg/l), 40 µl hazırlanmış EtG çalışma çözeltileri eklendi. 3, 5, 10, 20, 40, 100, 200, 1000 ve 2000 pg/mg olarak hazırlanan her kalibrasyon noktası analiz edilerek kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Etil glukuronit için kalibrasyon grafiği şekil 3.2'de gösterilmiştir.

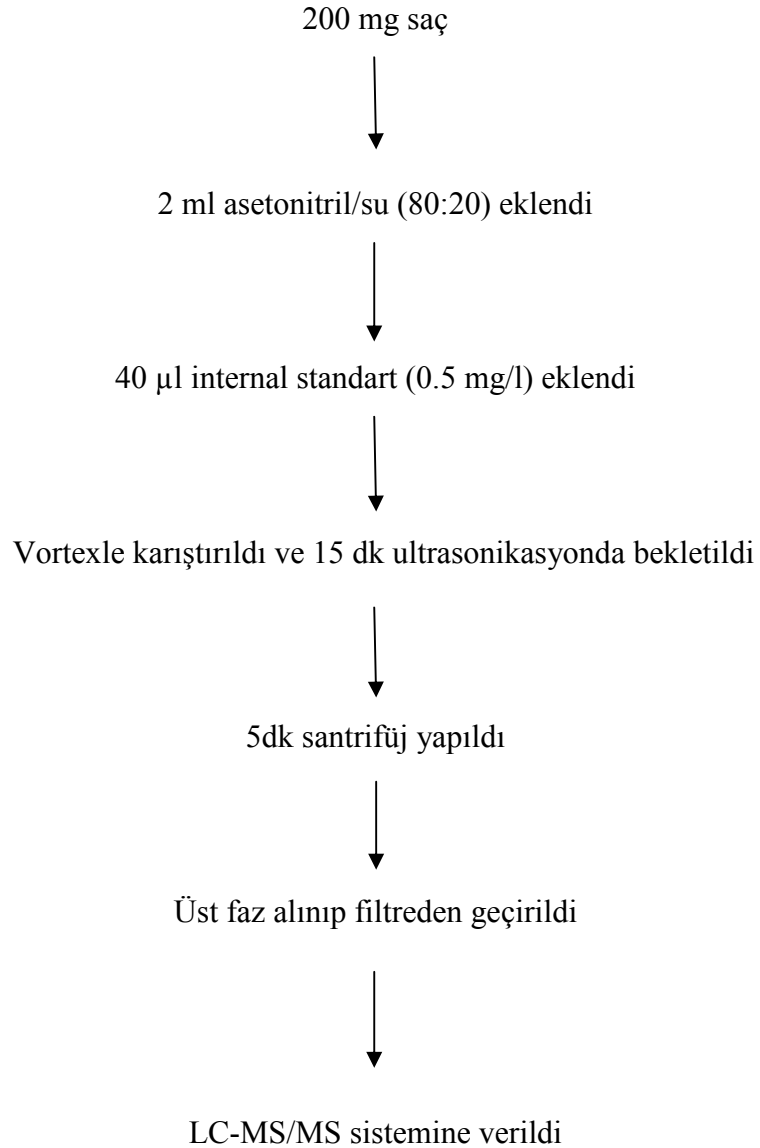


Şekil 3.2. Etil glukuronitin kalibrasyon eğrisi

3.5. Örneklerin Hazırlanması

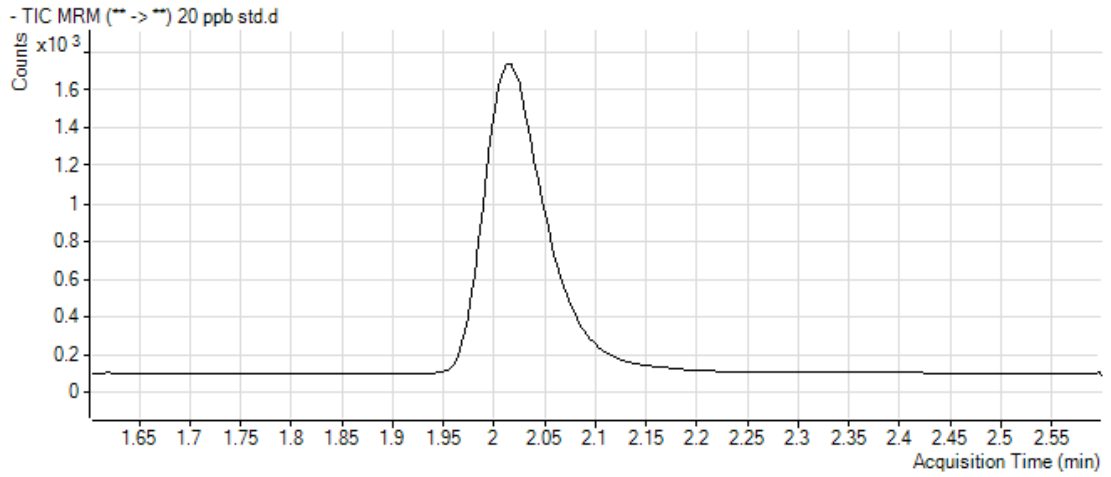
3.5.1. Saç örneklerinin hazırlanması

Analize kadar alimünyum folyoya sarılarak oda sıcaklığında bekletilen saç örnekleri 1-2 mm boyutlarında makasla kesildi. 200 mg saç örnekleri 10 ml'lik cam tüplere tartılarak bu tüpler içerisine 2 ml asetonitril/su solventi (80:20), 40 µl internal standart (d₅-EtG, 0.5 mg/l) eklendi. Bu solüsyon vortexle karıştırılıp 15 dk ultrasonikasyonda bekletildikten sonra 3500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Üst faz şırınga ile alınıp naylon filtreden geçirildikten sonra LC-MS/MS sistemine enjekte edildi.

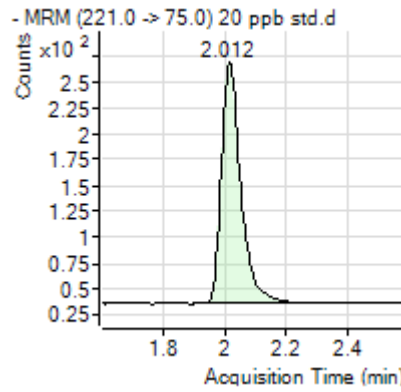


4. BULGULAR

Standart olarak hazırlanan 0.1 mg/l (20 pg/mg) etil glukuronitin likit kromatografi/kütle spektrometresi cihazında elde edilen kromatogramı ve kromatogram alanı sırasıyla Şekil 4.1 ve Şekil 4.2.'de gösterilmiştir.

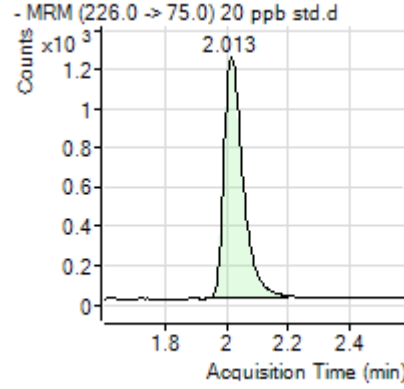


Şekil 4.1. 20 pg/mg etil glukuronit standartının LC-MS/MS'deki kromatogramı



Şekil 4.2. 20 pg/mg etil glukuronitin kromatogram alanı

Hazırlanan 20 pg/mg etil glukuronit standartında bulunan internal standart etil glukuronit-d₅'in kromatogramı Şekil 4.3.'de gösterilmiştir.



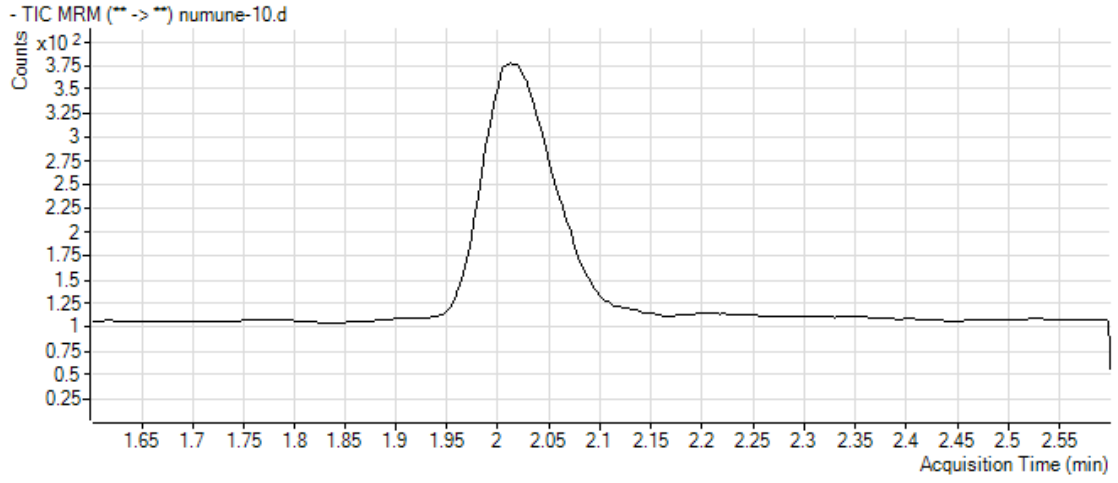
Şekil 4.3. 20 pg/mg standartta bulunan internal standart (EtG-d₅) kromatogramı

Gönüllü 10 sosyal içiciden alınan saç örneklerinde tespit edilen etil glukuronit miktarları Çizelge 4.1.'de gösterilmiştir. Konsantrasyon ortalaması 7.88 pg/mg, minimum değer 1.34, maksimum değer 33.6 olarak bulunmuştur.

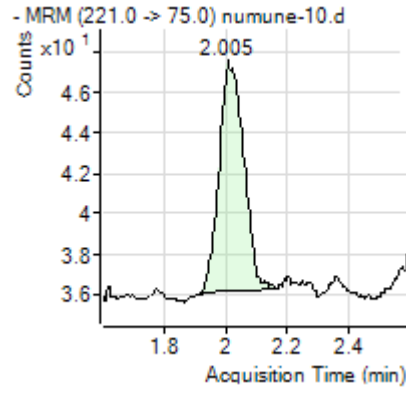
Çizelge 4.1. Tespit edilen etil glukuronit konsantrasyonu

Örnek numarası	Yaş	EtG Konsantrasyonu (pg/mg)	Günlük alkol alımı (g/day)
1	30	9,47	70
2	40	1,35	9
3	25	1,34	9
4	28	2,54	16
5	33	4,54	32
6	43	4,67	35,5
7	28	33,60	85
8	32	1,75	19
9	49	6,04	45
10	54	13,46	65

Saç örneklerinde tespit edilen EtG'e ait kromatogram ve kromatogramdaki alan
Şekil 4.4.'de gösterilmiştir.



(a)



(b)

Şekil.4.4. Toplanan saç örneklerinde tespit edilen EtG pikleri (a), kromatogram (b), kromatografik alan

5. TARTIŞMA

Alkol alımı yüzyıllar boyunca insanlığın ilgi odağı ve sorunu olmuştur. Kişilerin gelirlerinin ve refah düzeylerinin artması alkole ulaşmayı kolaylaştırmakta ve arttırmaktadır⁷⁶. Alkol, kötüye kullanımı tüm dünyada “felaket” oluşturacak düzeyde etkileri olan bir durumdur. Örneğin Amerika Birleşik Devletleri’nde alkol ile ilişkili bozukluklarda yılda 14.000.000 kişi etkilenmekte ve bu etkilenmenin yıllık maliyeti yaklaşık 148 milyar dolar tutmaktadır. Bu veriler alkol bağımlılığının oluşmasını önlemek, tanımak ve tedavi etmek ile ilgili daha fazla çaba gösterilmesi gerektiğini düşündürmektedir⁷⁷.

Bugüne kadar alkol tüketiminden sonra idrarda, kanda ve nefeste etil alkolün kendisinin belirlenmesini sağlayan testler uygulanmıştır. Bu testler ucuz ve çoğu zaman kullanışlı olmasına rağmen etil alkolün alındıktan sonra hızlı bir şekilde metabolize olması yüzünden yetersiz kalmaktadır. Alkol kullanımını gösteren kanda CDT (Carbohydrate-Deficient Transferrin), GGT (Gama Glutamil Transferaz), AST-ALT (Aspartat Amino Transferaz-Alanin amino Transferaz) ve MCV (Mean Corpuscular Volume) gibi diğer belirleyiciler araştırılmış ancak klinik ve yasal olarak yararlı olabilmesi için yeterli hassasiyet ve özgünlüğe sahip olamamıştır. Skipper ve ark.⁷⁸ güvenilir bir testte olması gereken şeyin kullanımdan sonra en az birkaç gün içinde alkol tüketimini gösterebiliyor olması olarak belirtmişlerdir. Etanolün bir metaboliti olan EtG ise, adli ve klinik uygulamalarda alkolün kullanımı veya yokluğunu göstermek için tanı koymada önemli bir belirleyici olmaktadır. Dünya Sağlık örgütünün raporuna göre günde en az 40 g alkol alan erkekler ile en az 20 g alkol alan kadınlar ağır içici olarak belirlenmiştir⁷⁹.

Çalışmamızın ilk basamağı EtG ‘ün saçta tespiti için uygun ekstraksiyon yönteminin belirlenmesiydi. Örnekler alkol tedavisi altındaki 20 gönüllü kişiden toplandı. Bu kişiler bilgilendirilip onlara rıza formu imzalatıldı. Kişilere yaş, ağırlık, günlük alkol alımı ve en son ne zaman alkol aldığı gibi sorular soruldu. Bu şekilde kullandığı alkol miktarı ile saçta bulunacak EtG miktarı arasındaki ilişki belirlenmiş olacaktı.

Çalışmamızda Saç Analizleri Derneği’nin raporunda da belirtildiği gibi ilk olarak dekontaminasyon işlemi uygulandı. Dekontaminasyon işlemi iki sebeple yapılmaktadır. İlki ter, sebum ve tozun yanı sıra şampuan, kıl spreyi gibi kıl üzerindeki

kalıntılar cihazdaki analitik gürültünün artmasına neden olmaktadır. İlk yıkama organik bir çözücü olan diklorometan ve onu takiben yine organik bir çözücü olan metanolle olmuştur. Ardından Morini ve ark.⁸⁰ kullandığı yöntem uygulanarak ekstraksiyon yapıldı ve LC-MS/MS sistemine verildi. Ancak uygulanan metoda göre kromatogramda hiçbir pik görülemedi. Hazırlanan standart karışımlardaki internal standart EtG-d₅'de gözlemlenemedi. Piklerin görülememesinin nedeni olarak EtG standartlarının ve internal standartın saçtan uygulanan ekstraksiyon yöntemi ile ayırlamadığını göstermektedir. Ayrıca EtG etil alkol metabolizmasının çok küçük bir kısmını oluşturduğu için saçta düşük miktarlarda aradığımız bir metabolittir. Literatüre göre standartların hepsinin metanolde hazırlanması gerekmektedir. Bu bize etil glukuronitin metanolde çözüldüğünü gösterir. Yıkama işlemi yaparken de metanol kullandığımızdan aradığımız maddeyi kaybetmiş olma ihtimalimiz yüksektir. Morini ve ark. yıkama işlemi sırasında EtG kaybını % 2.3 olarak belirtmişler. Bizim çalışmamızda bu oranın belirtilenden çok daha yüksek olduğu görüşündeyiz.

Literatürdeki bilgilere dayanılarak yapılan çalışmada 100 mg saç kullanıldı. Bu saç örnekleri ile yapılan analizde yukarıda belirtildiği gibi EtG belirlenemedi. 100 mg saç yüksek bir miktar olduğundan ve elimizde yeterli miktarda saç olmadığından farklı metotlar uygulanamadı. Bu yüzden 10 gönüllü sosyal içiciden tekrar saç örneği toplandı.

Çalışmamızın ikinci kısmına yeni bir metodun uygulanması ile devam edildi. İlk olarak örnek hazırlama sırasında literatürlerde göz ardı edilen EtG kaybını önlemek için yıkama işlemi yapılmadan ekstraksiyona başlandı. Rastgele seçilen 40 ppb'lik EtG standartı ile çalışıldı. Saçın tüplerde çeperlere yapışmasını önlemek için asetonitril:su (80:20) karışımı solvent olarak kullanıldı. Literatürlerde "spike" olarak geçen içinde saçında bulunduğu zenginleştirilmiş örnek karışımında ultrasonikasyondan önce ve sonra EtG'de bir bozunma olmadı. Ultrasonikasyon işleminden sonra karışımdan alınan üst faz bazı safsızlıklar içerir. Bu safsızlıkların kromatogramda analitik gürültü yaratmaması için alınan faz filtreden geçirildi. Bunun için üst faz, PTFE (Politetrafloroetilen) ve naylon filtrelerden geçirildi. Asetonitril solventi için PTFE filtrenin değil naylon filtrenin uygun olduğu ve naylon filtreden geçirilen örneklerin kromatogramlarının daha iyi pik alanlarına sahip olduğu gözlemlendi.

İlk metot ile belirlenemeyen EtG'in polar yapısı göz önüne alınarak literatür de daha önceden EtG için kullanılmayan farklı bir kolon kullanıldı. Kullanılan kolon yüksek organik mobil fazlı silika kolondur. Bu HILIC (Hydrophilic Interaction Chromatography) olark bilinmektedir. Kütle spektrometresi ile eşleşmiş HILIC biyolojik materyallerde polar moleküllerin analizi için önemlidir. Polar moleküller ters faz (RP) kolonlarda çok sınırlı alıkonma zamanlarına sahiptir. Matriks etkisinden analiti ayırmak için çok düşük organik bileşenli ters faz HPLC mobil faz kullanılmalıdır. ESI-MS kullanıldığında çok yüksek sulu mobil faz düşük iyonizasyon etkisine neden olur. HILIC diğer ters faz kromatografinin aksine seçicilikte fark sağlayan polar analitlerin alıkonması için kullanışlı bir tekniktir. HILIC'te kullanılan yüksek uçucu organik mobil faz artan ESI-MS duyarlılığı sağlar. Ayrıca HILIC kolonda analitin alıkonması onun polaritesiyle belirlenir⁸¹. Çalışmamızda kullanılan HILIC kolon ile saç örneklerinde düşük miktarlardaki EtG'in bile belirlenebilmesi mümkün olmuştur.

1990'larda Sachs ve ark. EtG'in saçta analizi üzerine çalışmaları olmasına rağmen bu materyalin analizi çok yaygın değildi ve 2000 yılına kadarda ilerleme olmadı. 2000 yılında Pragst ve ark. 3 ağır içicinin saç örneklerinde EtG'i belirlemişlerdir. Yine 2000 yılında Alt ve ark. alkol bağımlılığı hikayesi olduğu bilinen 16 kişinin otopsisinden alınan saç örneklerinde EtG konsantrasyonunu 218 ve 4025 pg/mg arasında belirlemişlerdir. Tedavi altındaki alkol hastalarında 119 ve 388 pg/mg arasında bulunmuştur. Ancak günde 20 g altında alkol tüketen sosyal içicilerin saç örneklerinde ve çocukların saç örneklerinde EtG'i belirleyememişlerdir¹⁵.

Janda ve ark.⁸² 2002 yılında 5 sosyal içicinin saç örneği ile çalışmışlar ve belirleme limitini 51 pg/mg olarak belirlemişlerdir. Bu belirleme limiti ile örneklerin sadece birisinde ölçülebilir EtG konsantrasyonu bulabilmişlerdir. Yegles ve ark.⁸³ 2004 yılında alkol bağımlısı, sosyal içici, alkol kullanmayan ve alkol bağımlılığı öyküsü olan postmortem olguların saç örneklerinde EtG'i incelemişler ve sosyal içiciler için belirleme limitini 2 pg/mg olarak bulmuşlardır. İstatistiksel değerlere göre günlük alkol tüketimi ile saçta EtG konsantrasyonu arasında pozitif bir korelasyon bulunmuştur. Yüksek doz daha yüksek EtG konsantrasyonuna neden olmaktadır⁸⁴⁻⁸⁶. Bu genel korelasyona göre etil alkol tüketimi günde 60 g'dan az ise sosyal içici, 60-120 g arasında ise risk grubunda olan içici, 120 g'ın üzerinde ise aşırı alkol tüketen ya da alkol bağımlısı olarak adlandırılmıştır⁸⁷.

Bizim çalışmamızda da sosyal içici grubuna giren 10 bireyden saç örnekleri toplandı ve 10 örneğin hepsinde EtG konsantrasyonu alkol kullanımının bir göstergesi olarak belirlenebilmiştir. Yeni oluşturduğumuz yöntemle göre EtG için miktarlandırma limiti (LOQ) 0.18 pg/mg, belirleme limiti (LOD) 0.05 pg/mg olarak bulunmuştur. Hesapladığımız limit değerler literatürdeki değerlerin altında değerlerdir ve bu yöntemimizin çok iyi çalıştığını, sosyal içicilerde bile yüksek duyarlılıkta ve hassasiyette EtG’i belirleyebileceğimizi göstermektedir.

Saç örneklerinde EtG konsantrasyonları 1.34 ile 33.60 pg/mg değerleri arasında bulundu. Bu örneklerin ortak özellikleri bağımlılık derecesinde olmayıp hergün alkol kullanmalarıdır. Düşük miktarda EtG bulunanlarla yüksek miktarda EtG bulunanlar arasındaki fark günlük tükettikleri alkol miktarıdır. Çünkü EtG saç konsantrasyonu ile günlük etil alkol alımı arasında bir korelasyon bulunmaktadır.

Wurst ve ark.²⁰ GC/MS metodunu kullanarak kan alkol konsantrasyonu ortalama 183 mg/dl olan alkol kullanan kişilerin idrarlarında EtG’i belirlemişlerdir. Bu metotta internal standart olarak t-bütıl glukuroniti kullanmışlardır. Bundan sonraki yıllarda “son altın standart” olarak adlandırılan döteryum işaretli etil glukuronit (EtG-d₅) internal standart olarak uygun bulunmuştur. Bizim çalışmamızda da internal standart olarak kimyasal ve fiziksel özelliklerinin uygunluğu nedeniyle EtG-d₅ kullanılmıştır.

Saç testlerinin amacı şüpheli alkol kullanımını kanıtlamak ve önceden alkol bağımlısı olduğu bilinen kişilerde alkol tüketimi olup olmadığını kontrol etmektir. Sosyal içiciler ile alkol bağımlılığı arasındaki fark etil glukuronitin cut-off değerlerine bağlıdır. Farklı laboratuvarlar tarafından farklı yorumların yapılmaması için Saç Analizleri Derneği’nin 2009 raporuna göre saçta EtG cut-off değeri 30 pg/mg olarak belirlenmiştir. Bu değerin üzerindeki konsantrasyonlar güçlü bir şekilde aşırı alkol tüketimini hatta alkol bağımlılığını göstermektedir.

Appenzeller ve ark.⁸⁸ günde 60 g’dan daha fazla alkol tüketen bireyleri ağır içici olarak nitelendirmişler ve ağır içiciler için 23 pg/mg cut-off değerini önermişlerdir. Pragst ve Yegles⁸³ 25 pg/mg cut-off değerini, Bendroth ve ark.⁹ ise post-mortem örneklerde karaciğer histolojisine bağlı olarak alkol bağımlılığı tanısının konması için 30 pg/mg cut-off değerini kullanmışlardır. Literatürde alkol bağımlıları gibi aşırı alkol tüketen kişilerin saç örneklerinde çalışılmış ve EtG yüksek konsantrasyonlarda belirlenebilmiştir. Çalışmamızda 30 pg/mg’ın üzerinde olan bir örnek bulunmuştur.

Diğer değerler Saç Analizleri Derneği'nin raporuna göre belirlenen cut-off değerinin altındadır. Bu bize saç örneklerinin alındığı kişilerin alkol bağımlısı olmadıklarını net bir şekilde göstermektedir. Çalışmadan beklenen zaten daha düşük miktarlarda da EtG'i saçta belirleyebilmektir. Oluşturulan yöntem ve daha önce EtG analizi için kullanılmamış HILIC kolon ile sosyal içici grubunun saç örneklerinde çok düşük miktarlardaki EtG tespit edilebilmiştir.

EtG'in biyolojik örneklerde tespiti ile ilgili ülkemizde yapılan tek çalışma Keten ve ark.'nın⁸⁹ 2009 yılında yaptığı çalışmadır. Keten ve arkadaşları postmortem örneklerde alkol tüketiminin belirlenmesi için serebrospinal sıvı ve kanın aksine, oldukça kararlı bir materyal olan vitröz sıvıda etil glukuroniti belirlemişlerdir. Vitröz sıvı postmortem örneklerde alkol alımını göstermek için kan ve idrara göre alınması daha kolay olduğundan alternatif bir örnek olarak kullanılabilir. Ancak alkol aldığından şüphelenen yaşayan kişilerde etil alkole göre yarılanma ömrü daha uzun olan EtG'in belirlenmesi önem kazanmaktadır. Bizim çalışmamızda da kan ve idrara göre toplanması daha kolay, invaziv olmayan bir yöntemle alınan saç örneklerinde etil alkol metaboliti olan EtG yüksek duyarlılıkla belirlenebilmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Bu çalışmada günde 60 g'dan az alkol tüketen 10 gönüllü kişiden alınan saç örneklerinde etil glukuronitin (EtG) tespiti çalışılmıştır.
2. Saç örneklerinde EtG analizinin yapılabilmesi için yüksek duyarlılıkta Likit Kromatogarfi- Tandem Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS) cihazı kullanılmıştır.
3. Saçta EtG tespiti için yeni bir analiz metodu geliştirildi ve önceki çalışmalarda EtG analizi için kullanılmayan HILIC kolon kullanılmıştır.
4. Yeni oluşturduğumuz yöntemde EtG için miktarlandırma limiti (LOQ) 0.18 pg/mg, dedeksiyon limiti (LOD) 0.05 pg/mg olarak bulunmuştur.
5. Analizler sonucunda tüm saç örneklerinde EtG konsantrasyonu yüksek duyarlılıkta ve hassasiyette alkol kullanımının bir belirleyicisi olarak belirlenebilmiştir.
6. Saç örneklerinde belirlenen EtG konsantrasyonlarından biri hariç diğer konsantrasyonların hepsi Saç Analizleri Derneği'nin önerdiği 30 pg/mg cut-off değerinin altındadır. Yani çalışma grubumuz olan sosyal içicilerin EtG konsantrasyonlarını göstermektedir.
7. Günlük alkol alımı ile tespit edilen EtG konsantrasyonu arasında bir korelasyon olduğu gösterilmiştir.
8. Şu ana kadar saçta alkol kullanımının tespitine yönelik EtG'in saçta belirlenmesi ile ilgili bilimsel bir çalışma ülkemizde yapılmamıştır.
9. Bu çalışma alkol kullandığından şüphelenilen kişilerde doğru, gerçekçi ve karşılaştırılabilir bir tanının konulmasını sağlayacak çalışmalara veri tabanı oluşturacaktır.
10. Şu anki ve geçmişe dönük kullanımı tespit ederken kan ve idrar analizlerinin yanı sıra saç analizleri de yapılmalıdır.
11. Adli tıbbi incelemelerde, postmortem kanda tespit edilen alkolün antemortem alım nedeniyle mi yoksa postmortem sentezle mi oluştuğu arasındaki ayırımı yapmak amacı ile EtG çok uygun bir örnek olmaktadır.
12. Çalışmanın yapılması sırasında kazanılan bilgi ve deneyimlerin daha sonra makro düzeydeki projelerde rahatlıkla kullanılması mümkün olacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. **Vural N.** *Toksikoloji*. Ankara: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, **1996**; 73:484-496
2. **Ferner RE.** *Forensic Pharmacology*. NewYork:Oxford University Pres, **1996**; 113-139.
3. **Vural N.** *Toksikoloji Laboratuvar Kitabı*. Ankara: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, **2000**; 84:1-5,104-113.
4. **Richardson T.** Pitfalls in Forensic Toxicology. *Ann Clin Biochem*, **2000**; 37:20-44.
5. **Aliustaoglu S.** Etil Alkolün Postmortem Ölçümlerde Vücut Sıvılarında Dağılımı. Uzmanlık Tezi, Adalet Bakanlığı İstanbul Adli Tıp Kurumu Başkanlığı, İstanbul, **1998**.
6. **Sayın H.** Alkol Hassasiyeti ve Alkol Metabolizması Enzimlerinin Postmortem Araştırılması ve Adli Toksikoloji Açısından Önemi. *Doktora Tezi*, Ankara Üniversitesi, Ankara, **2000**.
7. **Turan N, Tırtıl L, Koç S.** Alkol, Uyuşturucu, Uyarıcı ve Benzeri Madde Entoksikasyonların Adli Tıbbi Özellikleri. *Klinik Gelişim*, **2009**; 22:130-140.
8. **Jickells S, Negrusz A.** Clarke's Analytical Forensic Toxicology.3rd Ed.,London-Chicago: Pharmaceutical Press, **2008**: 300.
9. **Bendroth P, Kronstrand R, Helander A, Greby J, Stephanson N, Krantz P.** Comparison of Ethyl Glucuronide in Hair with Phosphatidylethanol in Whole Blood as Post-mortem Markers of Alcohol Abuse. *Forensic Science International*, **2008**; 176:76-81.
10. **Hegstad S, Johnsen L, Morland J, Christophersen AS.** Determination of Ethyl Glucuronide in Oral Fluid by Ultra-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, **2009**; 33:204-207.
11. **Rosano TG, Lin J.** Ethyl Glucuronide Excretion in Humans Following Oral Administration of and Dermal Exposure to Ethanol. *Journal of Analytical Toxicology*, **2008**; 32:594-599.
12. **Bergström J, Helander A, Jones AW.** Ethyl Glucuronide Concentrations in Two Successive Urinary Voids from Drinking Drivers:Relationship to Creatinine Content and Blood and Urine Ethanol Concentrations. *Forensic Science International*, **2003**; 133:86-94.
13. **Paul R, Kingston R, Tsanaclis L, Berry A, Guwy A.** Do Drug Users Use Less Alcohol Than Non-Drug Users? *Forensic Science International*, **2008**; 176:82-86.
14. **Stephanson N, Dahl H, Halender A, Beck O.** Direct Quantification of Ethyl Glucuronide in Clinical Urine Samples by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Therapeutic Drug Monitoring*, **2002**; 24:645-651.
15. **Wurst FM, Skipper GE, Weinmann W.** Ethyl Glucuronide-The Direct Ethanol Metabolite on The Threshold from Science to Routine Use. *Addiction*, **2003**; 98:51-61.
16. **Jurado C, Soriano T, Gimenez MP, Menendez M.** Diagnosis of Chronic Alcohol Consumption Hair Analysis for Ethyl-Glucuronide. *Forensic Science International*, **2004**;145:161-166.
17. **Alt A, Janda I, Seidl S, Wurst FM.** Determination of Ethyl Glucuronide in Hair Samples. *Alcohol&Alcoholism*, **2000**; 35(3):313-314.

18. **Janda I, Alt A.** Improvement of Ethyl Glucuronide Determination in Human Urine and Serum Samples by Solid-Phase Extraction. *Journal of Chromatography B*, **2001**; 758:229-234.
19. **Wurst FM, Kempter C, Metzger J, Seidl S, Alt A.** Ethyl Glucuronide: A Marker of Recent Alcohol Consumption with Clinical and Forensic Implications. *Alcohol*, **2000**; 20:111-116.
20. **Wurst FM, Kempter C, Seidl S, Alt A.** Ethyl Glucuronide-A Marker of Alcohol Consumption and a Relapse Marker with Clinical and Forensic Implications. *Alcohol&Alcoholism*, **1999**; 34(1):71-77.
21. **Skopp G, Schmitt G, Pötsch L, Drönner P, Aderjan R, Mattern R.** Ethyl Glucuronide in Human Hair. *Alcohol&Alcoholism*, **2000**; 35(3):283-285.
22. **Pragst F, Spiegel K, Sporkert F, Bohnenkamp M.** Are there possibilities for the detection of chronically elevated alcohol consumption by hair analysis? A report about the state of investigation. *Forensic Science International*, **2000**; 107:201-223.
23. **Morini L, Politi L, Zucchella A, Polettoni A.** Ethyl Glucuronide and Ethyl Sulphate Determination in Serum By Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Clinica Chimica Acta*, **2007**; 376:213-219.
24. **Appenzeller BMR, Agirman R, Neuberg P, Yegles M, Wennig R.** Segmental Determination of Ethyl Glucuronide in Hair: A Pilot Study. *Forensic Science International*, **2007**; 173:87-92.
25. **Battal D.** Postmortem Kan-Vitröz Sıvı Etanol Düzeylerinin Saptanması ve Adli Tıpta Önemi. *Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi, Adana*, **2004**.
26. **Jones AW.** Disappearance Rate of Ethanol from the Blood of Human Subjects Implications in Forensic Toxicology. *JFSCA*, **1993**; 38: 104-118.
27. **Zuba DZ, Piekoszewski W, Pach J, Winnik L, Parczewski.** Concentration of Ethanol and Other Volatile Compounds in the Blood of Acutely Poisoned Alcoholics. *Alcohol*, **2002**; 26:17-22.
28. **Isenschmid DS, Fischman MW, Foltin RW, Caplan YH.** Concentration of cocaine and metabolites in plasma of humans following intravenous administration and smoking of cocaine. *J Anal Toxicol*, **1992**; 16: 311-314.
29. **Levine B.** Principles of Forensic Toxicology:Chapter 13, ACC Press, 2nd Edition, Washington, **2003**: 207-227.
30. **Selavka CM, Rieders F.** Determination of cocaine in hair. *Forensic Science International*, **1995**; 70: 155-164.
31. **Kintz P, Villain M, Cirimele V.** Hair Analysis for Drug Detection. *Ther Drug Monit*, **2006**; 28: 442-446.
32. **Sachs H.** History of Hair Analysis. *Forensic Science International*, **1997**; 84: 7-16.
33. **Pragst F, Balikova MA.** State of art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. *Clinica Chimica Acta*, **2006**; 370: 17-49.
34. **Kintz P.** Value of hair analysis in postmortem toxicology. *Forensic Science International*, **2004**; 142: 127-134
35. **Varol İ.** Saç numunelerinden bazı suistimal edilen ilaçların kromatografik yöntemlerle analizi. Doktora tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, **1996**.

36. **Mieczkowski T.** The use of hair analysis for the detection of drugs. *Journal of Clinical Forensic Medicine*, **1996**; 3:59-71.
37. **Hubbard DL, Wilkins DG, Rollins DE.** The incorporation of cocaine and metabolites into hair: Effects of dose and hair pigmentation. *Drug metabolism and disposition*, **2000**; 28: 1464-1469.
38. **Kelly RC, Mieczkowski T, Sweeney SA, Bourland JA.** Hair analysis for drugs of abuse. Hair color and differentials or systematic differences in drug preferences? *Forensic Science International*, **2000**; 107: 63-86.
39. **Mieczkowski T, Kruger M.** Interpreting the color effect of melanin on cocaine and benzoylecgonine assays for hair analysis: Brown and black samples compared. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, **2007**; 14: 7-15.
40. **Society of Hair Testing.** Forensic Science International, **1997**; 84:3-6
41. **Society of Hair Testing.** Consensus of the Society of Hair Testing on hair testing for chronic excessive alcohol consumption, Roma, **2009**.
42. **Wennig R.** Potential problems with the interpretation of hair analysis results. *Forensic Science International*, **2000**; 107: 5-12
43. **Jurado C, Sachs H.** Proficiency test for the analysis of hair for drugs of abuse, organized by Society of Hair Testing. *Forensic Sci Int*, **2003**; 133: 175-178
44. **Kintz P.** Interlaboratory comparison of quantitative determinations of drug in hair samples. *Forensic Sci Int*, **1995**; 70: 105-109
45. **Montagna M, Poletti A, Stramesi C, Groppi A, Vignali C.** Hair analysis for opiates, cocaine and metabolites: evaluation of a method by interlaboratory comparison. *Forensic Sci Int*, **2002**; 128: 79-83
46. **Deveaux M, Kintz P, Goulle JP, Bessard J, Pepin G, Gosset D.** The hair analysis proficiency testing program the French Society of Analytical Toxicology. *Forensic Sci Int*, **2000**; 107: 389-394
47. **Kintz P, Mangin P.** Opiate concentrations in human head, axillary, and pubic hair. *J Forensic Sci*, **1993**; 38:657-662
48. **Balikova MA, Habrdova V.** Hair analysis for opiates: evaluation of washing and incubation procedures. *J Chromatogr B*, **2003**; 789: 93-100
49. **Montagna M, Stramesi C, Vignali C, Groppi A, Poletti A.** Simultaneous hair testing for opiates, cocaine, and metabolites by GC-MS: a survey of applicants for driving licences with a history of drug use. *Forensic Sci Int*, **2000**; 107: 157-167
50. **Cone EJ, Yousefnejad D, Darwin WD, Maguire T.** Testing human hair for drugs of abuse. II. Identification of unique cocaine metabolites in hair of drug abusers and evaluation of decontamination procedures. *J Anal Toxicol*, **1991**; 15: 250-255
51. **Koren G, Klein J, Forman R, Graham K.** Hair analysis for cocaine: differentiation between systemic exposure and external contamination. *J Clin Pharmacol*, **1992**; 32: 671-675
52. **Goldberger BA, Caplan YH, Maguire T, Cone EJ.** Testing human hair for drugs of abuse. III. Identification of heroin and 6-acetylmorphine as indicators of heroin use. *J Anal Toxicol*, **1991**; 15: 226-231

53. **Harkey MR, Henderson GL, Zhou C, Jones RT.** Simultaneous determination of cocaine, benzoylecgonine and ecgonine methyl ester in human hair by gas chromatography-mass spectrometry. *J Anal Toxicol*, **1991**,15: 260-265
54. **Nakahara Y, Takahashi K, Shimamine M, Saitoh A.** Hair analysis for drugs of abuse.IV. Determination of total morphine and confirmation of 6-acetylmorphine in monkey and human hair by GC/MS. *Arch Toxicol*, **1992**; 66: 669-674
55. **Tagliaro F, Valentini R, Manetto G, Crivellente F, Carli G, Marigo M.** Hair analysis by using radioimmunoassay, high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis to investigate chronic exposure to heroin, cocaine and/or ecstasy in applicants for driving licenses. *Forensic Sci Int*, **2000**; 107:121-128.
56. **Welch MJ, Sniegowski LT, Allgood CC, Habrum M.** Hair analysis for drugs of abuse: evaluation of analytical methods, environmental issues and development of reference materials. *J. Anal. Toxicol*, **1993**; 17: 389-398
57. **Gaillard Y, Pepin G.** Screening and identification of drugs in human hair by high-performance liquid chromatography-photodiode-array UV detection and gas chromatography-mass spectrometry after solid-phase extraction:A powerful tool in forensic medicine. *J Chromatogr A*, **1997**; 762: 251-267.
58. **Clauwert KM, Van Bocxlaer JF, Lambert WE, Van den Eeckhout EG, Lemiere F, Esmans EL, De Leenheer.** Narrow-bore HPLC in combination with fluorescence and electrospray mass spectrometric detection for the analysis of cocaine and metabolites in human hair. *Anal Chem*, **1998**; 70: 2336-2344.
59. **Cairns T, Hill V, Schaffer M, Thistle W.** Amphetamines in washed hair of demonstrated users and workplace subjects. *Forensic Sci Int*, **2004b**; 145:137-142.
60. **Blank DL, Kidwell DA.** Decontamination procedures for drugs of abuse in hair: are they sufficient? *Forensic Sci Int*,**1995**; 70: 13-38.
61. **Schaffer MI, Wang WL, Irving J.** An evaluation of two wash procedures for the differentiation of external contamination versus ingestion in the analysis of human hair samples for cocaine. *J Anal Toxicol*, **2002**; 26: 485-488.
62. **Cairns T, Hill V, Schaffer M, Thistle W.** Removing and identifying drug contamination in the analysis of human hair. *Forensic Sci Int*, **2004**; 145: 97-108
63. **Romolo FS, Rotolo MC, Palmi I, Pacifici R, Lopez A.** Optimized conditions for simultaneous determination of opiates, cocaine and benzoylecgonine in hair samples by GC-MS. *Forensic Sci Int*, **2003**; 138: 17-26.
64. **Pragst F, Rothe M, Spiegel K, Sporkert F.** Illegal and therapeutic drug concentrations in hair segments- a timetable of drug exposure. *Forensic Sci Int*,**1998**; 10/2: 81-111.
65. **Strano-Rossi S, Bermejo-Barrera A, Chiarotti M.** Segmental hair analysis for cocaine and heroin abuse determination. *Forensic Sci Int*, **1995**; 70: 211-216.
66. **Wilkins D, Rollins DE, Seaman J, Haughey H, Krueger G, Foltz R.** Quantitative determination of codeine and its major metabolites in human hair by gas chromatography-positive ion chemical ionization mass spectrometry: a clinical application. *J. Anal. Toxicol*, **1995**, 19: 269-274.
67. **Jurado C, Gimenez MP, Menendez M, Repetto M.** Simultaneous quantification of opiates, cocaine and cannabinoids in hair. *Forensic Sci Int*, **1995**; 70: 165-174.

68. **Kintz P, Mangin P.** Simultaneous determination of opiates, cocaine and major metabolites of cocaine in human hair by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). *Forensic Sci Int*, **1995**; 73: 93-100.
69. **Toledo FC, Yonamine M, Moreeau RL, Silva OV.** Determination of cocaine, benzoylecgonine and cocoethylene in human hair by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B*, **2003**;798: 361-365.
70. **Bermejo AM, Lopez P, Alvarez I, Tabernero MJ, Fernandez P.** Solid-phase microextraction for the determination of cocaine and cocoethylene in human hair by gas chromatography-mass spectrometry. *Forensic Sci Int*, **2006**; 156: 2-8.
71. **Cordero R, Paterson S.** Simultaneous quantification of opiates, amphetamines, cocaine and metabolites and diazepam and metabolite in a single hair sample using GC-MS. *J Chromatogr B*, **2007**; 850: 423-431.
72. **Lachenmeier K, Musshoff F, Madea B.** Determination of opiates and cocaine in hair using automated enzyme immunoassay screening methodologies followed by gas chromatographic-mass spectrometric (GC-MS) confirmation. *Forensic Sci Int*, **2006**; 159: 189-199.
73. **Gambelunghe C, Rossi R, Ferranti C, Rossi R, Bacci M.** Hair analysis by GC/MS/MS to verify abuse of drugs. *Journal of Applied Toxicology*, **2005**; 25: 205-211.
74. **Gentili S, Cornetta M, Macchia T.** Rapid screening procedure based on headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry for the detection of many recreational drugs in hair. *J Chromatogr B*, **2004**; 801:289-296.
75. **Shen M, Xiang P, Wu H, Shen B, Huang Z.** Detection of Antidepressant and Antipsychotic in human Hair. *Forensic Sci Int*, **2002**; 126:153-161.
76. **İlter T, Tekin F.** Alkol Metabolizması. *Güncel Gastroenteroloji*, İzmir, **2005**; 58-62.
77. **Mırsal H, Kalyoncu ÖA, Pektaş Ö.** Alkol Kullanımının Biyokimyasal Belirleyicileri ve Klinik Uygulamaları. *Bağımlılık Dergisi*, **2002**; 3(3): 165-172.
78. **Skipper GE, Weinman W, Wurst FM.** Ethylglukuronide (EtG): A New Marker to Detect Alcohol Use in Recovering Physicians. *Journal of Medical Licensure and Discipline*, **2004**; 90(2): 14-17.
79. **Politi L, Morini L, Poletti A.** Ethyl Glucuronide in Hair: Is It a Reliable Marker of Chronic High Levels of Alcohol Consumption? *Methods and Techniques*, **2006**;101:1408-1412.
80. **Morini L, Politi P, Groppi A, Poletti A.** Determination of Ethyl Glukuronide in Hair Samples by Liquid Chromatography/Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *J Mass Spectrom*, **2006**; 41:34-42.
81. **Xu RN, Fan L, Rieser MJ, Tawakol A.** Recent advances in high-throughput quantitative bioanalysis by LC-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2007**; 44: 342-355.
82. **Janda L, Weinmann W, Kuehnle T, Lahode M, Alt A.** Determination of Ethyl Glukuronide in Human Hair by SPE and LC-MS/MS, *Forensic Sci Int*, **2002**; 128: 59-65.
83. **Yegles M, Labarthe A, Auwarter V, Hartwig S, Vater H, Wennig R, Pragst F.** Comparison of Ethyl Glucuronide and Fatty Acid Ester Concentrations in Hair of Alcoholics, Social Drinkers and Teetotallers, *Forensic Science International*, **2004**;145:167-173.

84. **Auwarter V, Sporkert F, Hartwig S, Pragst F, Vater F.** Fatty Acid Ethyl Esters in Hair as Markers of alcohol consumption, Segmental Hair Analysis of Alcoholics, Social Drinkers, and Teetotaler, *Clin Chem*, **2001**; 47: 2114-2123.
85. **Hoiseth G, Morini L, Polettini A.** Ethyl Glucuronide in Hair Compared with Traditional Alcohol Biomarkers- A Pilot Study of Heavy Drinkers Referred to an Alcohol Detoxification Unit, *Alcohol Clin Exp Res*, **2009**; 33: 812-816.
86. **Appenzeller BMR, Schuman Marc, Yegles M, Wennig R.** Ethyl Glucuronide Concentration in Hair is Not Influenced by Pigmentation. *Alcohol&Alcoholism*, **2007**; 42(4):326-327.
87. **Pragst F, Rothe M, Moench B, Hastedt, Herre S, Simmert D.** Combined Use of Fatty Acid ethyl Esters and Ethyl Glucuronide in Hair for Diagnosis of Alcohol Abuse: Interpretation and Advantages, *Forensic Sci Int*, **2010**; 196: 101-110.
88. **Appenzeller BMR, Agirman R, Neuberg P, Yegles M, Wennig R.** Segmental Determination of Ethyl Glucuronide in Hair: A Pilot Study. *Forensic Science International*, **2007**; 173: 87-92.
89. **Keten A, Tümer AR, Balseven-Odabaşı A.** Measurement of Ethyl Glucuronide in Vitreous Humor with Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Forensic Science International*, **2009**; 193:101-105.

EKLER

EK-1

BİLGİLENDİRME FORMU

Bu çalışmanın amacı, alkol kullanan bireylerden alınan biyolojik örneklerde etil alkol metaboliti olan etil glukuronit miktarının tespit edilmesidir.

Bu amaçla bireylerden 300 mg saç örnekleri alınarak uygun ekstraksiyon yöntemleri ile analiz edilecektir. Elde edilen sonuçlar Adli Tıp Anabilim Dalı'na yapılacak çalışmalarda kişilerin ad, soyad veya onların tanıtıcı herhangi bir işaret belirtilmeden veri olarak kullanılabilir. Sonuçlar çalışmaya katılan kişilere istedikleri takdirde yazılı olarak bildirilecektir.

Örnek alma işlemi öncesi bu çalışmaya onay verdiğinizize dair rıza formunu imzalamanız gerekmektedir.

RIZA FORMU

Aşağıda imzası olan ben yukarıda belirtilen çalışma hakkında tam olarak bilgi aldım. Bu çalışma için 300 mg saç örneği alınmasına onay vermekteyim.

Onay Veren

Bilgi İçin:

Ç.Ü. Tıp Fak. Adli Tıp ABD

Tlf: 322 3386060/3429

EK-2

ANKET FORMU

Örnek numarası	Yaş	Kilo	Günlük alkol alımı
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			

ÖZGEÇMİŞ

Fadile Yıldız 1982 yılında Gaziantep’te doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Adana’da tamamladıktan sonra, 2000-2004 yılları arasında Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünden mezun oldu. 2004 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans Programına başladı. 2007 yılında “Pektinaz Enziminin Farklı İki Destek Üzerine İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu” başlıklı teziyle Yüksek Lisans eğitimini tamamladı.

2008 yılında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Adli Tıp Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans Eğitimine başladı.