

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
ADLİ TIP ENSTİTÜSÜ

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi SELDA MERCAN

ZOLPIDEM'İN GC/MS İLE TAYİNİ VE ADLİ BİLİMLER AÇISINDAN ÖNEMİ

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOG NURDAN SANDIKÇI KENAN

İSTANBUL, 2019

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
ADLİ TIP ENSTİTÜSÜ

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi SELDA MERCAN

ZOLPIDEM'İN GC/MS İLE TAYİNİ VE ADLİ BİLİMLER AÇISINDAN ÖNEMİ

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOG NURDAN SANDIKÇI KENAN

İSTANBUL, 2019



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

Proje No: 30720

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın gerçekleşmesine fırsat veren İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Adli Tıp Enstitüsü Müdürü Sayın Prof. Dr. Faruk Aşıcıoğlu'na, çalışmamın her aşamasında bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, desteklerini her zaman hissettiğim Fen Bilimleri

Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Münevver Açikkol ve danışmanım Sayın Dr. Öğretim

Üyesi Selda Mercan'a;

Çalışmamın laboratuvar aşamasındaki yardımlarından dolayı Laboratuvar Teknisyeni Murat Yayla, Arş. Gör. Merve Kuloğlu ve Kimyager Tuğba Tekin'e;

Her zaman yanımda olan ve maddi manevi desteklerini hissettiğim, hayatımın her anında olduğu gibi bu sürecin de başından bu yana kolaylaşmasını sağlayan başta canım annem ve babam Hatice-İsmail Sandıkçı'ya, kardeşlerim İrem, Burak ve Beyza'ya;

Desteklerini her zaman hissettiğim kayınvalidem ve kayınpederim Naciye-Av. Azmi Kenan'a, abim ve ablam Memiş-İkbal Kenan'a;

Her zaman yanımda olup, beni güçlü kılan kuzenim Hilal Sağkol ile arkadaşlarım Şule Şakiroğlu ve Esra Fırat'a;

Maddi manevi desteği ve varlığıyla, her şey için biricik eşim Serhat Kenan'a;

Ve isimlerini sayamadığım kocaman aileme teşekkür ederim.

Biyolog Nurdan Sandıkçı Kenan

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
TABLolar LİSTESİ	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	v
KISALTMALAR	vii
ÖZET	ix
SUMMARY	xi
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Zolpidem.....	3
2.1.1.Zolpidemin kimyasal özellikleri	3
2.1.2.Zolpidemin etki mekanizmaları ve farmakokinetik özellikleri.....	5
2.1.3.Zolpidemin içeceklerde çözünürlüğü ve gözlenen değişimler.....	12
2.1.4. Zolpidemin kötüye kullanımı ve adli bilimlerdeki önemi	13
2.2. Analitik Yöntemlerin Validasyonu.....	16
2.2.1. Validasyon hazırlık çalışmaları.....	17
2.2.2. Kullanılacak materyaller	17
2.2.3. Konsantrasyon seviyelerinin belirlenmesi	18
2.2.4. Parametrelerin uygulanması.....	18
2.3. Kromatografi	22
2.3.1. Ayırma mekanizmasına göre kromatografi.....	23
2.3.2. Kullanılan düzeneğe göre kromatografi.....	25
2.3.3. Gaz kromatografisi (GC)	28
2.3.4. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS).....	34
2.3.5. GC-MS analizleri için numune hazırlanması.....	35
2.3.6. Zolpidemin analiz yöntemleri	37
2.4. Adli ve Klinik Olgularda Zolpidem Analizleri.....	39
3.GEREÇ VE YÖNTEM	42
3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler	42
3.2.Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Gereçler	43
3.3. Çalışma Planı.....	44

3.4.Zolpidemin Analizi.....	44
3.4.1.Zolpidemin analizinde kullanılan çözeltiler.....	44
3.4.2.Zolpidem analizi için örnek hazırlama basamağı	46
3.4.3.GC-MS ile zolpidemin analizi	47
3.5.Zolpidem Analizinin Validasyonu.....	48
3.5.1.Doğrusallık çalışmaları	48
3.5.2. LOD ve LOQ hesaplamaları	49
3.5.3.Geri kazanım ve tekrar edilebilirlik çalışmaları.....	49
3.5.4. Stabilitate	51
4. BULGULAR	52
5. TARTIŞMA	63
6.SONUÇ	69
KAYNAKLAR.....	70
EKLER	79
Ek 1. Etik Kurul Onay Yazısı.....	79
ÖZGEÇMİŞ	79

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. Validasyon/verifikasyonu tamamlanmış yöntemlerde değişiklikler olduğunda uygulanacak parametreler.....	17
Tablo 2. Zolpidem analiz yöntemleri.....	37
Tablo 3. Çalışmada kullanılan standart ve kimyasal maddelerin isimleri ve markaları.....	42
Tablo 4. Çalışmada kullanılan cihaz ve gereçlerin isimleri ve markaları.....	43
Tablo 5. Kalibrasyon noktalarının konsantrasyonları ($\mu\text{g/mL}$).....	46
Tablo 6. Geri kazanım çalışması için belirtilen çözeltilerden alınan miktarlar (μL).....	50
Tablo 7. Maddelerin alıkonma süreleri (dk.),MS spektrumundaki başlıca iyonları (m/z).....	52
Tablo 8. 10 adet boş idrar örneğinin bulunan miktarı ($\mu\text{g/mL}$), standart sapma ve %RSD değerleri	59
Tablo 9. 15 $\mu\text{g/mL}$ zolpidem içeren numunenin geri kazanım tablosu.....	60
Tablo 10. 20 $\mu\text{g/mL}$ zolpidem içeren numunenin geri kazanım tablosu.....	60
Tablo 11. 50 $\mu\text{g/mL}$ zolpidem içeren numunenin geri kazanım tablosu	60
Tablo 12. Tekrarlanabilirlik çalışması sonuç tablosu	61
Tablo 13. 50 $\mu\text{g/mL}$ zolpidem içeren numunenin stabilite tablosu.....	61

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Zolpidemin kimyasal formül yapısı	4
Şekil 2. Zolpidem hemitartratın kimyasal formül yapısı.....	4
Şekil 3. Glia hücreleri	7
Şekil 4. Nöron yapısı.....	8
Şekil 5. Nörotransmitter iletimi	9
Şekil 6. GABA-A çalışma mekanizması.....	10
Şekil 7. Kromatografinin sınıflandırılması	23
Şekil 8. Kağıt kromatografisi	25
Şekil 9. İnce tabaka kromatografisi (TLC)	26
Şekil 10. Sıvı kromatografisi (LC).....	27
Şekil 11. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC).....	27
Şekil 12. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) çalışma prensibi	28
Şekil 13. Gaz kromatografisi	29
Şekil 14. Gaz kromatografisi kolon çeşitleri.....	30
Şekil 15. Split (a) ve splitless (b) enjeksiyon işlemleri.....	31
Şekil 16. Doğrudan kolona enjeksiyon	32
Şekil 17. Kütle analizörünün şematik görüntüsü	33
Şekil 18. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS)	34
Şekil 19. ZOL Hızlı Test Paneli çalışma mekanizması	39
Şekil 20. Zolpidem analizinin yapıldığı GC-MS sisteminin görüntüsü.....	47
Şekil 21. Zolpidem etken maddesinin kütle spektrumu	53
Şekil 22. Clozapine (IS)'nin kütle spektrumu.....	53
Şekil 23. 10 µg/mL zolpidem çözeltisinin tarama ve SIM yöntemi kromatogramları.....	54
Şekil 24. 25 µg/mL zolpidem çözeltisinin tarama ve SIM yöntemi kromatogramları.....	54
Şekil 25. Boş olarak okutulan çözücü MeOH'a ait tarama ve SIM yöntemi kromatogramı ...	56
Şekil 26. Sadece IS katılmış MeOH çözücüsüne ait tarama ve SIM yöntemi kromatogramı .	55
Şekil 27. Sadece IS eklenmiş olan boş idrar örneğine ait tarama ve SIM yöntemi kromatogramları	57
Şekil 28. Boş idrar örneğine 10 µg/mL zolpidem katılarak elde edilen tarama ve SIM yöntemi kromatogramları	57
Şekil 29. Boş idrar örneğine 20 µg/mL zolpidem katılarak elde edilen tarama ve SIM yöntemi kromatogramları	57

Şekil 30. Zolpidemin kalibrasyon eğrisi	58
Şekil 31. Stabilite için hazırlanan idrar numunesinin (50 µg/mL) ilk çalışmasına ait tarama ve SIM yöntemi kromatogramları.....	62
Şekil 32. Stabilite için hazırlanan idrar numunesinin (50 µg/mL) ikinci çalışmasına ait tarama ve SIM yöntemi kromatogramları	62



KISALTMALAR

AED	: Atomik emisyon dedektörü
cm	: Santimetre
ECD	: Elektron yakalama dedektörü
FDA	: Food and Drug Administration (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi)
FID	: Alev iyonizasyon dedektörü
g	: Gram
GABA	: Gama aminobütirik asit
GC-MS	: Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi
GLC	: Gaz – Sıvı Kromatografisi
GSC	: Gaz – Katı Kromatografisi
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
IS	: İç Standart
IUPAC	: Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
L	: Litre
LC/MS/MS	: Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
LD₅₀	: Ortalama öldürücü doz
LLE	: Sıvı-sıvı çekitleme yöntemi
LOD	: Tayin limiti
LOQ	: Ölçüm limiti
MeOH	: Metanol
mL	: Mililitre
mg	: Miligram
MS	: Kütle spektrometresi
MSS	: Merkezi sinir sistemi
m/z	: Kütle-yük oranı
ng	: Nanogram
NPD	: Azot fosfor dedektörü
pg	: Pikogram

µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
PID	: Fotoiyonizasyon dedektörü
RSD	: Bağlı standart sapma
SCAN	: Tarama Modu
SIM	: Seçilmiş İyon İzleme
SPE	: Katı faz çekitleme yöntemi
TCD	: Termal iletkenlik dedektörü
WHO	: Worl Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)
ZCA	: Zolpidem 6 karboksilik asit
ZPCA	: Zolpidem fenil 4 karboksilik asit

ÖZET

1993'te İsviçre Cenevre'de yapılan Dünya Sağlık Örgütü (WHO) toplantısında uykusuzluk teriminin; yeterli uyku elde edilemeyen, kronik uyku yetersizliği içeren şikayetler için toplu olarak kullanılması uygun görülmüştür. Genel olarak uykusuzluk üç grup altında toplanır: uykuya dalmada çekilen zorluklar, sık sık uykudan uyanma, sabah erken uyanıp tekrar uykuya dalamama. Zolpidem, uykusuzluk tedavisinde kullanılan bir maddedir. Zopiklon ve zaleplon ile Z-ilaçları adı altında gruplandırılmıştır. Bu maddeler benzodiazepin yapısında olmayan, imidazopiridin türevleridir. Fakat benzodiazepinlerin etki mekanizmaları ile benzerlik göstermelerine rağmen kimyasal yapıları gereği onlar gibi ertesi gün yan etkileri olmadıkları için sıkça tercih edilirler.

Yukarıda belirtilen özellikleri nedeniyle uykusuzluk tedavisinde yaygın kullanımı olan zolpidemin; yarı ömrünün kısa olması nedeniyle etkisini kısa sürede göstermesi, içeceklere karıştırıldığında içeceğin tadında ve renginde bir fark yaratmaması (yüksek dozlar dışında) bu maddenin suça karışmasını kaçınılmaz kılmıştır. Cinsel saldırı, gasp, hayata kast etme gibi nedenlerle ikinci kişiler tarafından suça alet edilmesinin yanı sıra; intihar vakalarında ya da yanlış kullanım sonucu doz aşımı yüzünden ölümlerde rol aldığı da bildirilmiştir. Tüm bu nedenlerden dolayı adli bilimlerde önemli yeri olan zolpidemin birçok tayin yöntemi vardır. Bu çalışmada en hassas tayin yöntemlerinden biri olan gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) ile hızlı ve ucuz bir yöntem valide edilmiş olup; yöntemin akut zehirlenme ve postmortem adli vakalarda biyolojik örnekten ve içecek-yiyeceklerden tayininde Adli Toksikoloji Laboratuvarlarının rutin hizmetlerine katkı sağlaması hedeflenmiştir.

Çalışmada; zolpidemin doğrusal aralığı 10-200 µg/mL, korelasyon katsayısı $R^2 = 0.9972$ bulundu. Seçicilik için yapılan çalışmalar sonucunda, herhangi bir girişim gözlenmedi. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.28 µg/mL ve 0.35 µg/mL'dir.

Geri kazanım yüzdesi 15 µg/mL konsantrasyonda 93.5 ± 9.73 , 20 µg/mL konsantrasyonda 93.40 ± 8.32 , 50 µg/mL konsantrasyonda 94.41 ± 9.84 olarak bulundu. Tekrarlanabilirlik için 3 ayrı konsantrasyonda çalışılan geri kazanım numunelerinden; 15 µg/mL konsantrasyonundaki 6 adet örneğin ortalaması 14.03 ± 1.46 µg/mL, bağıl standart sapma değeri 10.41, 20 µg/mL konsantrasyonundaki 6 adet örneğin ortalaması 18.68 ± 1.66 µg/mL, bağıl standart sapma değeri 8.91, 50 µg/mL konsantrasyonundaki 6 adet örneğin ortalaması 47.21 ± 4.92 µg/mL, bağıl standart sapma değeri 10.42 olarak tespit edildi. Stabilitate çalışması için 7 gün ara ile analiz edilen örneklerdeki değişim oranının %0.017 olduğu saptandı.

Adli bilimler açısından birçok konuda önemi olan zolpidem etken maddesinin GC-MS sistemi ile tayini için hızlı, ucuz, geçerliliği kanıtlanmış bir analiz yöntemi geliştirildi. Yöntemin rutin adli ve klinik analizlerde ve yiyecek-içecekten zolpidem tayninde kullanılması beklenmektedir.

Anahtar Kelimeler: Zolpidem; Cinsel suç; Gaz kromatografi-kütle spektrometri; Adli Bilimler; Adli toksikoloji; Z-ilaçları

SUMMARY

In 1993, the World Health Organization (WHO) meeting held in Geneva, Switzerland; It was found appropriate to use it as a collective for complaints with chronic sleep insufficiency. Generally, insomnia is grouped into three groups: the difficulties of falling asleep, often waking up from sleep, waking up early in the morning and not being able to fall asleep again. Zolpidem is a substance used in the treatment of insomnia. Zolpidem, Zopiclone and zaleplone are grouped under the name Z-drugs. These agents are imidazopyridine derivatives which are not benzodiazepine. However, although benzodiazepines have similarity to their mechanism of action, they are frequently preferred because they do not have the next day side effects due to their chemical structure.

Zolpidem, which is widely used in the treatment of insomnia due to the above mentioned properties; because of its short half-life, the effect of this substance in a short period of time, the fact that it does not make a difference in the taste and color of the beverage when mixed with beverages (except in high doses) makes this substance inevitable. Such as; sexual assault, extortion, life-like reasons the tool to be committed by the second person; It has also been reported involving in deaths due to overdose as a result of misuse or suicide cases. For all these reasons, zolpidem has an important role in forensic sciences. In this study, a quick and inexpensive method with gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) is partially validated. The aim of the method is to contribute to the routine analyses of Forensic Toxicology Laboratories in the cases of acute poisoning, postmortem specimens or determination of the substance from food/beverages.

In this study; the linear range of zolpidem was 10-200 $\mu\text{g} / \text{mL}$, the correlation coefficient was $R^2 = 0.9972$. As a result of studies for selectivity, no interference was observed. The LOD and LOQ values were 0.28 $\mu\text{g} / \text{mL}$ and 0.35 $\mu\text{g} / \text{mL}$, respectively.

The recovery percentage was 93.5 ± 9.73 at the concentration of $15 \mu\text{g}/\text{mL}$, 93.40 ± 8.32 at the concentration of $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ and 94.41 ± 9.84 at the concentration of $50 \mu\text{g}/\text{mL}$. For the reproducibility, 3 different recovery concentrations were studied. The mean of 6 samples at a concentration of $15 \mu\text{g}/\text{mL}$ was $14.03 \pm 1.46 \mu\text{g}/\text{mL}$, the relative standard deviation rate was 10.41, the mean of 6 samples at a concentration of $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ was $18.68 \pm 1.66 \mu\text{g}/\text{mL}$, and the relative standard deviation rate was 8.91, at the concentration of $50 \mu\text{g}/\text{mL}$. The mean age of the sample was $47.21 \pm 4.92 \mu\text{g}/\text{mL}$ and the relative standard deviation rate was 10.42. For the stability study, the rate of change in the samples analyzed at 7 days intervals was found to be 0.017%.

A fast, inexpensive, validated method has been developed for the determination of zolpidem active substance with GC-MS system in forensic sciences. The method is expected to be used in routine forensic and clinical analyzes and for the determination of zolpidem from food/beverage.

Key Words: Zolpidem; Sexual crime; Gas chromatography-mass spectrometry; Forensic Sciences; Forensic toxicology; Z-drugs

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Adli bilimler doğası gereği multidisipliner bir bilim dalıdır. Amacı, suç unsuru bulunan adli nitelikteki olaylarda; eldeki bulgu ve sonuçları değerlendirip; suçu aydınlatacak biçimde hukukun yararlanacağı delil haline getirmektir. Adli bilimler alanındaki bilim dalları, birbirleriyle iç içe geçmiş ve çoğu kez bunları kesin sınırlar ile ayırmak mümkün olmayabilir. Adli patoloji, adli biyoloji, adli mikrobiyoloji, adli osteoloji, adli diş hekimliği, kriminalistik bunlardan bazılarıdır. Zehirlerin yapılarının, işlevlerinin; kasıtlı ya da kasıtsız zehirlenme olgularının aydınlatılması amacıyla incelenip, değerlendirildiği bir bilim dalı olan adli toksikoloji de adli bilimlerin en önemli alt birimlerindendir. Zehirlenmelerde kişilerden alınan -postmortem olgular da dahil- kıl, tükürük, kan, idrar, iç organ parçaları, vücut sıvıları gibi materyaller toplanıp incelenir. Bunun yanı sıra alınan gıdalarda toksik madde varlığı ya da yokluğunun tayini, kullanılan maddenin türü, belirlenen miktarın ölüme yol açıp açmadığı, maddenin hangi yolla alındığı, genel olarak bir maddenin toksisitesi ve farmakolojik yapısı gibi konular incelenir. Bu incelemeler; ölüm zamanı tayini, olayın kasıtlı ya da kasıtsız mı olduğu, maddenin vücuda alınma süresi ve etkileri, birden çok madde varlığında bunların birbirleriyle ve biyolojik materyallerle olan ilişkileri gibi soruları aydınlatır.

Kriminal nedenlerle bir kişinin davranışını değiştirmek için kimyasal maddelerin kullanılması yeni değildir. Bu şekilde suça karışma sebebiyle, kişiye karşı işlenen suçların üzeri çoğu zaman örtülü kalmaktadır. Adli toksikolojide de içecek ve yiyeceklere psikoaktif maddeler karıştırılması sıkça rastlanan bir sorundur. Bu maddeler uyuşturucular ile beraber kolaylaştırılmış cinsel saldırı ya da soygun durumunda uyuşukluk gibi etkiler elde etmek için bir araya getirilir. Bunların yanı sıra bu tür maddeler, kasıtlı ya da kasıtsız zehirlenme durumlarına sebep olarak adli toksikolojinin çalışma alanına girerler.

Amerika’da 1993’te Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanarak Ambien adıyla (1), Avrupa’da 1986’dan bu yana Stilnox adıyla (2), uykusuzluk tedavisinde en çok reçetelendirilen ilaç etken maddelerinden olan zolpidem de bu amaçlar için kullanılan nonbenzodiazepin türevi, uyuşturucu-uyarıcı sınıfından bir maddedir. İkinci kişiler tarafından içeceklere karıştırıldığında fiziksel ve tat olarak bir değişiklik yapmaması, hedef seçilen kişi tarafından fark edilmesini güçleştirir (3). Bunun yanı sıra vücuda alındıktan sonra iki saat içinde %70’e kadar metabolize olması (4) tayinini zorlaştıran özelliklerindendir. Kasıtlı-kasıtsız zehirlenmelerde özellikle başka ilaç ya da alkol ile beraber alımında koma ve ölüme varan etkileri olması zolpidemi, adli bilimler açısından dikkate alınması gerektiren bir madde haline getirmektedir.

Bu tez çalışmasında, adli bilimler açısından önemi belirtilen zolpidemin tayini için kolay, pratik ve yüksek hassasiyette sonuç verecek bir yöntem geliştirilmesi, maddenin idrara katımı (spike) ile yöntemin geçerlilik çalışmalarının yapılması amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

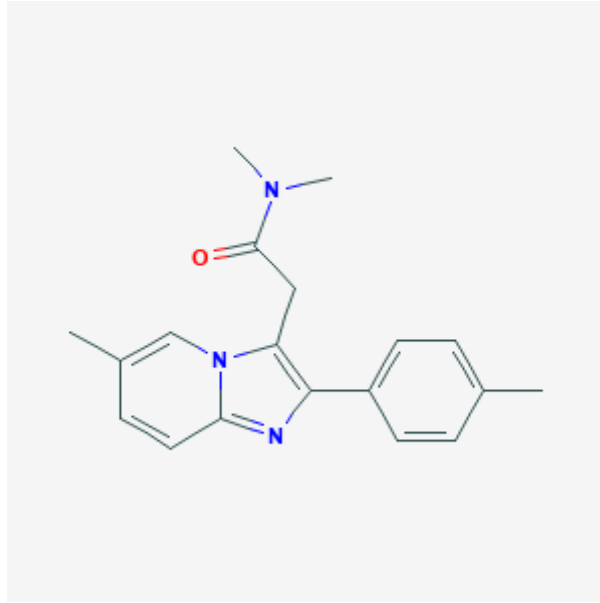
2.1. Zolpidem

Zolpidem, piyasada 5 ve 10 mg'lık dozlarda tartarat tuzu olarak reçeteli ilaç halinde bulunur (1). 1986'dan bu yana Avrupa'da Stilnox adıyla uykusuzluk tedavisi için kullanılırken 1993'te Ambien adıyla FDA tarafından onaylanmıştır (2,5). Adormix, Ambien, Ambien CR, Edluar, Damixan, Hypnogen, Ivedal, Lioran, Myslee, Nytamel, Sanval, Somidem, Stilnoct, Stilnox, Stilnox CR, Sucedal, Zoldem, Zolnod, and Zolpihexal gibi çeşitli tescil isimleri ile piyasada bulunur (6). FDA ilaç listesine göre kontrollü içerik ve kısa dönem uykusuzluk tedavisinde kullanılan 4. ilaç sınıfındadır (7).

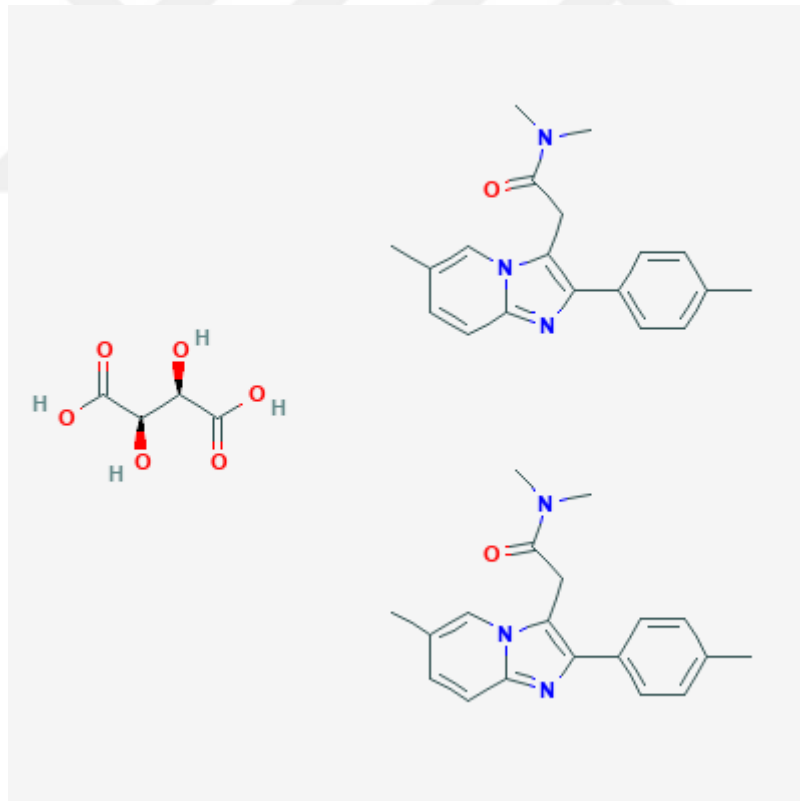
Ülkemizde henüz zolpidem içerikli ilaçlar bulunmamasına karşılık, 17 Ocak 2007 tarihli, 26406 sayılı resmi gazetede yayınlanan Dış Ticarete Standardizasyon Tebliği, Tebliğ No: 2007/20'de Ek I'de özel izin alınması gereken maddeler sınıfına dahil edilmiştir (8).

2.1.1.Zolpidemin kimyasal özellikleri

Zolpidemin kimyasal formülü $C_{19}H_{21}N_3O$ (Şekil 1) olup, moleküler ağırlığı 307.397 g/mol'dür. Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC) ismi N,N,6-Trimetil-2-(4-metilfenil)-imidazo[1,2-a]piridin-3-asetamit olarak bilinir. Piyasadaki ilaç formlarında $C_{42}H_{48}N_6O_8$ formülü ile zolpidem hemitartarat tuzu şeklinde bulunur (Şekil 2). Bilinen benzodiazepin, barbitürat ya da diğer kimyasal maddelerden farklı bir kimyasal yapısı olan uyuşturucu-uyarıcı sınıfından, imidazopridin türevi bir maddedir. İmizadopiridin çekirdeği içinde N,N-dimetilasetamit yan zinciri ile ilişkili 3 azot atomuna sahiptir. Zolpidem, kimyasal olarak piridin sınıfında bulunur (9).



Şekil 1. Zolpidemin kimyasal formül yapısı (9)



Şekil 2. Zolpidem hemitartratın kimyasal formül yapısı (9)

Zolpidem metanolde yüksek çözünürlük gösterirken suda çözülmez. Bunun yanı sıra zolpidem tartarat suda 20°C'de 23g/L oranında çözünür. Görünümü beyazımsı olup, kristal toz şeklindedir ve higroskopik bir yapıdadır (6). Erime derecesi 196°C ve pKa'sı 6.2 'dir. Hava geçirmez, korunaklı bir kapta normal şartlar altında kararlı olduğuna dair bilgiler mevcuttur (10).

2.1.2.Zolpidemin etki mekanizmaları ve farmakokinetik özellikleri

Uykusuzluk; WHO tarafından yeterli uyku elde edilemeyen, kronik uyku yetersizliği içeren şikayetler için toplu olarak kullanılır. Daha ayrıntılı olarak; uykuya dalma ya da uykuyu sürdürme zorluğu çekme, ertesi gün dinlenememiş uyanma da uykusuzluk tanımı içinde değerlendirilir. Yetişkinlerin %33-50'sinde uykuya dalma ya da derin uykuda uzun süre kalamama olarak kendini gösteren uykusuzluk problemi; yaklaşık %10-20'sinde kronik olarak seyreder. Bu durum günlük yaşam kalitesini düşürür. Kronik uykusuzluk uzun süreli psikolojik ve fiziksel rahatsızlıklardan doğar. Fakat %20-25 oranla sebep sadece merkezi sinir sistemi (MSS) bozuklukları olabilir (11). Kronik uykusuzluk tedavisi için çağdaş bir psikoterapi şekli olan bilişsel davranışçı terapi önerilirken, kısa süreli tedavi için benzodiazepin benzeri ilaçlar kullanılır. Uykusuzluk tedavisinde terapötik dozda alınan benzodiazepin benzeri hipnotik ilaçlar ile barbitüratlar; ertesi gün yan etkilerinin fazla olması, psikomotor performansları üzerine etkileri, yoksunluk etkisi, gündüz sedasyonları, davranış verimliliğinde düşüş ve ileriye dönük unutkanlık oluşumu gibi dezavantajlar oluşturur. Bu yan etki kalıntıları yaşlı bireylerde ya da kronik ağrısı olanlarda daha yoğun biçimde gözlenebilir (12). Uykusuzluk tedavisinde diğer ilaçlara alternatif olarak kullanılan, etkileri benzodiazepinlerle benzerlik gösteren zolpidem, zopiklon ve zaleplon hep beraber Z-ilaçları olarak adlandırılırlar. Bunların arasından zolpidem, minimum ertesi gün yan etkileri sebebiyle en çok tercih edilendir (3).

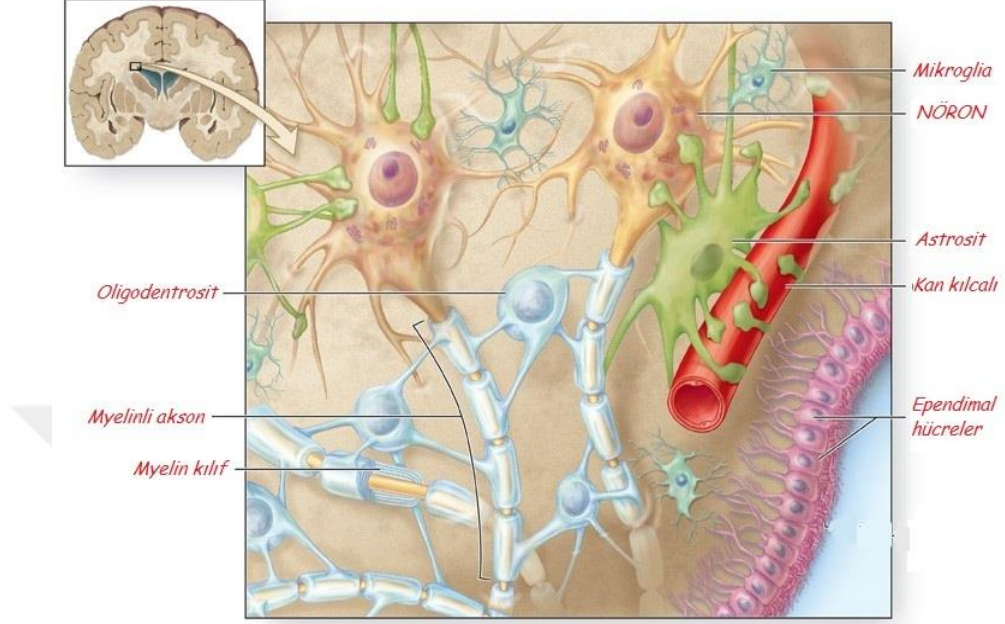
Zolpidem; non-benzodiazepin yapısında, imidazopiridin türevi, hipnotik (yatıştırıcı-uyuşturucu sınıfından) bir maddedir. Uykusuzluk tedavisinin yanı sıra antikonvülsan, anksiyolitik ve minör kas gevşetici özellikleri de bulunur (13). Benzodiazepinlerden kimyasal yapısı ve farmakolojik profili ile ayrılır. Zolpidem vücuda alındıktan sonra gastrointestinal sistemden hızla absorbe edilir. Etkisini MSS üzerinden gama aminobütirik asit (GABA)-A agonist reseptörü olarak gösterir (9).

Sinir sistemi; canlıların vücut içi veya dışı olayları, çevrelerini anlamalarına sebep olan, veriyi elde edip bunu işleyen ve belirli bir cevap halinde ilgili bölgeye gönderen (hücreler ağı sayesinde sinyaller ile), bunun ile beraber tüm metabolizma aktivitelerini düzenleyen bir sistemdir. Sinir dokusu anatomik olarak ikiye ayrılır: vücudun her noktasından alınan bilgileri merkeze taşıyan ve merkezden gelen çıktıları ilgili vücut birimine götürmekle görevli çevresel (periferik) sinir sistemi, beyin ve omurilikten (spinal kord) oluşan merkezi sinir sistemi (14). Sinir sisteminde başlıca iki tür hücre bulunur:

- ***Glia hücreleri:***

Şekil 3'te gösterilen, sinir sisteminde en çok bulunan hücre türüdür. Görevleri, nöron gövde veya aksonları arasında yerleşip destek görevi görmektir. *Ependimal hücreler*; boşlukların ve merkezi kanalın çevresini örterler ve beyin-omurilik sıvısı salgırlar. *Mikroglia hücreleri*; fagositoz yapan özelleşmiş makrofajlardır. Özellikle hücre ölümünden sonra kalan atıkları temizlerler. *Astrosit hücreler*; bağlantıları ile kan-beyin bariyerini oluştururlar, toksik maddelerin kandan beyine geçmesine engel olurlar. Beyin gelişimi sırasında hücrelere rehberlik ederler. Büyüme faktörleri salgılayarak, nöronların gelişmesine sebep olurlar. Nörotransmitterleri bulundukları ortamdan uzaklaştırırlar. *Oligodendrosit hücreler*; sinirsel iletimin hızlı şekilde sağlanması için akson üzerinde miyelin kılıf oluşturur. Merkezi sinir

sisteminde beyin ve omurilikte bulunur. *Schwann hücreleri*; çevresel sinir sisteminde miyelin kılıfını oluşturur (15).

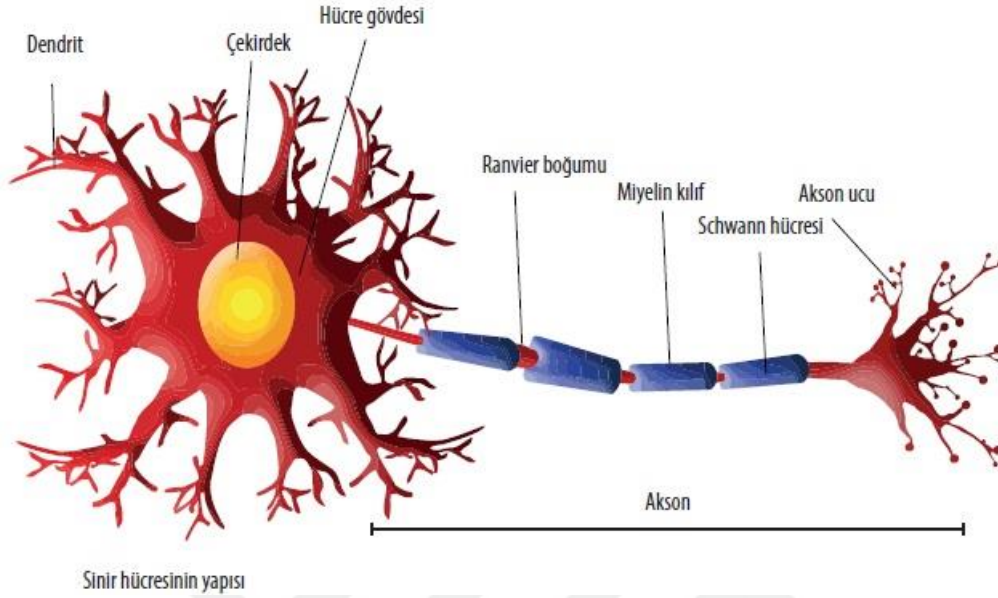


Şekil 3. Glia hücreleri (16)

▪ **Nöronlar:**

Şekil 4’te gösterilen nöronlar, işlevsel olarak sinir sisteminin temel hücreleridir. Yapısal bakımdan vücudun diğer hücreler ile benzerlik göstermesine rağmen, bazı özellikleri ile özelleşmiş hücrelerdir. *Dendrit*; dallanmış liflerden oluşup, komşu nörondan gelen sinyalleri karşılamaktan sorumludur. *Soma*; hücrenin gövde kısmını oluşturup, hücre çekirdeği ve sitoplazmayı içerir. Nöronlar bölünemediği için bu kısım sentrozom organeli taşımaz. *Akson*; sinirsel iletimin diğer hücrelere aktarılmasını sağlayan, miyelin kılıfla kaplı uzun kısımdır. *Akson terminali*; aksonun son kısmı olup, içinde barındırdığı nörotransmitter keselerini sinaptik boşluğa salar ve diğer hücrelere bilgi aktarımı yapar. *Miyelin kılıf*; boğum (ranvier boğumları) şeklinde oluşan, aksonları çevreleyip sinirsel iletimin daha hızlı olmasını sağlayan yapıdır. Yeteri kadar büyük olan uyarılar, dendritlerde toplandıktan sonra hücre gövdesinde

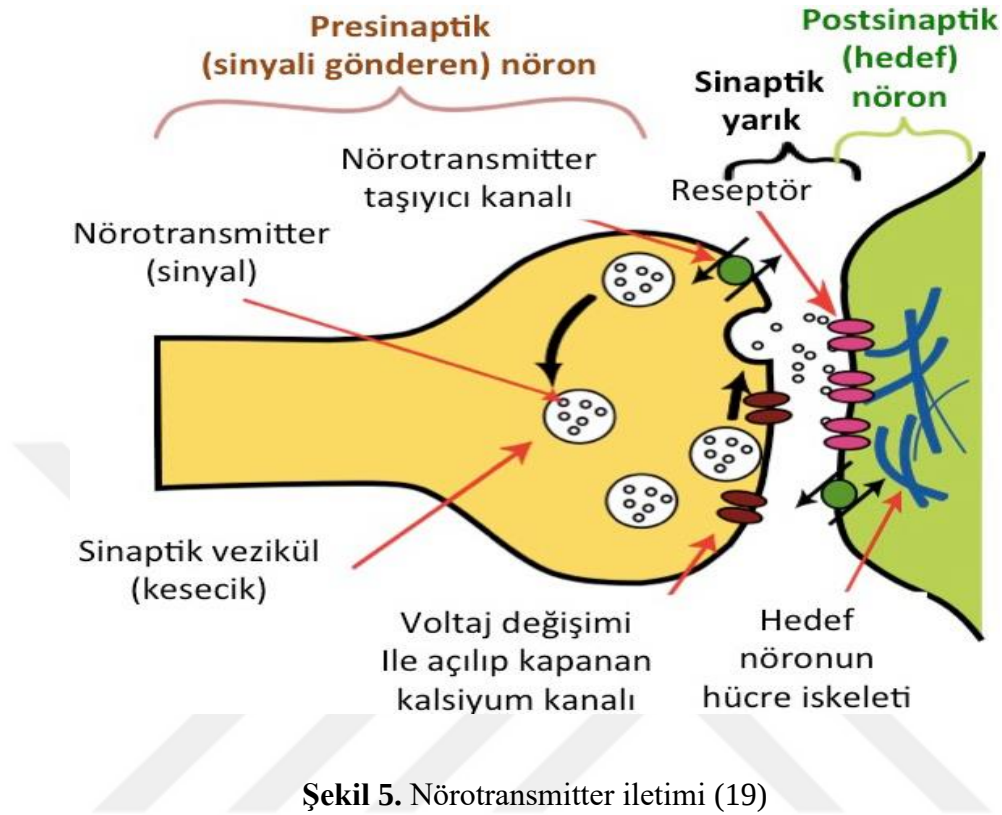
aksiyon potansiyeli oluşmasına sebep olabilir. Oluşan bu potansiyel akson boyunca ilerleyip, akson terminaline gelir ve sinirsel bilgi diğer hücreye aktarılmış olur (17).



Şekil 4. Nöron yapısı (18)

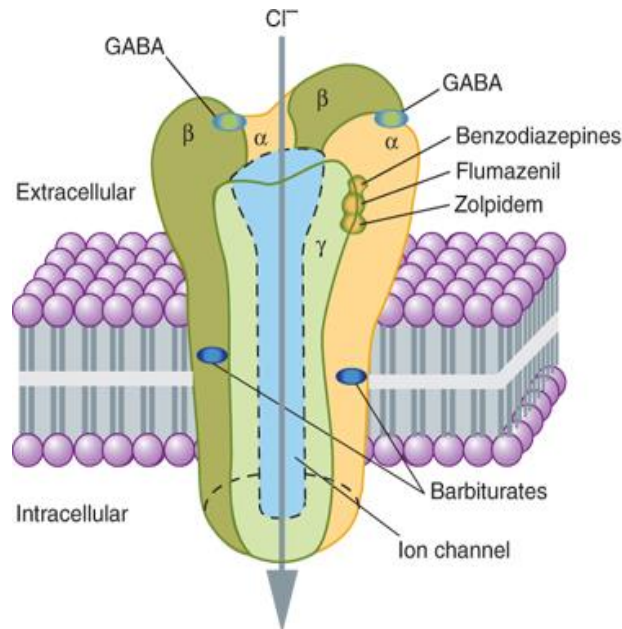
Sinir hücreleri elektriksel yolla uyarılmalarına rağmen bu uyarıyı bir diğer sinir hücresine elektriksel yolla değil, salgıladıkları kimyasal madde ile iletirler. Sinir dokusu içerisinde bulunan nöron hücreleri tarafından; presinaptik membrandan sinaps aralığına salınarak post sinaptik membranda bir reseptöre bağlanıp burada aksiyon potansiyeli oluşturarak uyarıyı ileten kimyasallar olan nörotransmitterler salgılanır. İki sinir hücresi arasındaki kavşağa sinaps adı verilir. Nörotransmitterler bu aralığa salgılanır (Şekil 5). Nörotransmitter salgılayan nörona presinaptik membran (sinaps öncesi), nörotransmitterden etkilenen nörona post sinaptik membran (sinaps sonrası) denir (15). Nörotransmitterler genel olarak iki gruba ayrılır; eksitatör nörotransmitterler membran depolarizasyonuna sebep olurken, inhibitör nörotransmitterler membrandaki kanallar aracılığı ile reseptöre bağlanarak konformasyonel

değişiklik yapıp kanalları açar ve klor gibi anyonlar içeri girerek hiperpolarizasyona sebep olur (14).



GABA, duyuşal sinir sonlanmalarından serbestlenen ve sinapsis üzerinden nörondan nörona geçen sinir uyarıcısı gibi görev yapan inhibitör bir nörotransmitterdir. Reseptörleri filtrelemeden ve beyne giden duyuşal sinyalleri düşürmekten sorumludur. Bir kere serbestlendikten sonra, sinaptik sinir sonundaki hücre zarında tutunur. Sinaptik sinir sonundaki zar, klorit iyonlarına karşı geçirgen hale gelir ve böylece siniri stabilize eder ve merkezi sinir sistemini baskılar (9). Beyin dokusunda sedatif ve depresif etkileri düzenler, gevşeme ve rahatlama etkilerinin yanı sıra bazı epileptik hastalıklarda da etkili olduğu düşünülmektedir (20,21). GABA eksikliğinde; epilepsi, uykusuzluk, anksiyete gözlemlenebilir. Zolpidemin aktif bileşeni imidazopiridin halkası uykuyu indükleyici madde görevi yapıp, GABA-A reseptör kompleksinin benzodiazepin bağlayıcı kısmı ile etkileşime girer ve GABA-A agonist reseptörü olarak adlandırılır. GABA-A reseptörü aynı zamanda GABA-

benzodiazepin (GABA-BZ) olarak da adlandırılır. Zolpidemin bu reseptöre bağlanması nedeniyle uyuşturucu-uyarıcı sınıftaki maddelerin özelliklerine sahip olduğu düşünülmektedir. Böylece kimyasal yapı olarak benzodiazepinler ile benzerlik göstermeyen zolpidemin, farmakolojik açıdan benzerlikler gösterdiği görülmektedir. Benzodiazepinlerden farklı olarak farmakodinamik etkisi sayesinde kısa sürede uykuyu başlatır. Bu, zolpidemin inaktif ve nispeten polar, kolay atılabilen metabolitlere dönüşmesinden kaynaklıdır. Buna karşın benzodiazepinler genellikle farmakolojik olarak aktif içerikli, tam olarak nonpolar metabolitlere dönüşürler. GABA-A 3 alt birimden oluşur; omega-1 serebellumda, omega-2 ve omega-3 omurilik ve periferik dokularda etkilidir. Omega-1 sedasyon, omega-2 ve omega-3 kas gevşetici, antikonvülsan ve epileptik ilaç etki kısımlarıdır. Bunların etkinlik spektrumu, kullanılan ilaç grubuna göre değişir. Benzodiazepinler 3 omega grubuna bağlanırken, zolpidem sadece omega-1'e bağlanarak bu reseptör miktarını yükselterek derin uykunun oluşması ve korunmasına yol açar (Şekil 6). Bu nedenle uykusuzluk tedavisi için önemlidir (13).



Şekil 6. GABA-A çalışma mekanizması (22)

Oral alımdan itibaren hızlı ve tamamen gastrointestinal sistem tarafından absorbe edilen zolpidem, etkisini çabuk göstermesi ve kısa yarı ömrü (1.4-4.5 saat) ile karakterizedir. Vücuda alındıktan sonra karaciğerde p450 enzim sisteminden CYP3A4 ve CYP2C9 ile 2 adet farmakolojik olarak inaktif metabolite çevrilir. Bunlar; zolpidem 6 karboksilik asit (ZCA) ve zolpidem fenil 4 karboksilik asit (ZPCA)'dır. Zolpidemin karaciğerdeki biyotransformasyon süreci, fenil grubunda metil oksidasyon yolu ile, imidazopiridin halkasında metil oksidasyon veya hidroksilasyon ile gerçekleşir (5).

Terapötik doz olan 10 mg'lık oral alımda; biyoyararlanımı %70 civarı, protein bağlama oranı %92.5 civarı olan zolpidem, farmakolojik olarak inaktif olan metabolitlere dönüştürülerek idrardan atılır. Yaklaşık %1'i değişmeden idrarda kalır. 48 saate kadar kandan, 72 saate kadar idrardan tayin edilebilir (21). 2600 hastada yapılan 30'dan fazla klinik çalışmalarda yetişkinler için olan 10 mg ve daha yaşlılar için önerilen 5 mg dozlarında minimum ertesi gün etkisi gözlenmiştir. Yüksek dozlarda bulantı ve kusma gözlenebilir (12). Zolpidem alan insanlarda görülen yan etkiler; uyku sersemliği %5, baş dönmesi %5, baş ağrısı %3, gastrointestinal semptomlar %4, hafıza problemleri %1-%2 ve kabuslar %1-%2 olabilir (23). Zolpidem intoksikasyonu sonucu flumazenil ile tedavi söz konusu olabilir (13). Bir maddenin kısa süreli toksisitesini göstermek için LD₅₀ (ortalama öldürücü doz) terimi kullanılır. Zolpidem için LD₅₀ değeri 695 mg/kg'dır (9).

Karaciğer hastalarında ve farmakodinamik etkileri bilinmediğinden pediatrik hastalarda kullanımına dikkat edilmelidir. Alkol gibi MSS deprese eden başka maddeler ile beraber ölüme sebebiyet verebilir (12). Ölüm vakaları genel olarak diğer psikotropik ilaç ya da alkol ile beraber alım sonucu olmuştur (4). Bunların yanı sıra son dönemlerde yapılan çalışmalara göre; beyin hasarı sonrası vejetatif durumdaki hastalarda; hasar beyin kök bölgelerinde ise, hasar görmüş beyin hücrelerinin ve anormal metabolizmalarının onarılmasında etkili olmakla beraber bunun nedeni henüz bilinmemektedir (13).

2.1.3. Zolpidemin içeceklerde çözünürlüğü ve gözlenen değişimler (3)

Zolpidemin suya alet edilmesi genellikle, kurban seçilen kişinin içeceklerine piyasa formundaki tabletlerin katılması ile olur. Bu tabletlerin belirli içeceklerde çözünürlüğü ve zolpidemin içekte meydana getirdiği fiziksel değişimler yapılan bir çalışmada gözlenmiştir. Bir kişi yatağında beklenmedik şekilde, yanında boş bardak ve teneke kutularla ölü bulunmuştur. Polis yaptığı inceleme sonucunda kişinin zolpidem ile zehirlenmiş olabileceğini söylemiştir. Yapılan incelemede zolpidem için periferik kan konsantrasyonu 2.7 mg/mL bulunmuştur (bu konsantrasyon yaklaşık 150 mg zolpidem alımı sonucuna uyan bir düzeydedir.). Bu durum sonucunda polis bilirkişileri çağırıp hangi konsantrasyon sonucu bu kan konsantrasyonunun ortaya çıkabileceğinin ve tayin edilen konsantrasyonun içeceklere katılması durumunda hangi değişikliklerin gözlenebileceğinin belirlenmesini talep etmiştir. Bunun üzerine ezilmiş ya da bütün zolpidem tabletleri; su ya da karbonatlı içeceklere katılarak, tat ve görüntüde bir değişiklik olup olmadığı gözlemlenmiştir. Tabletler oda sıcaklığında olan; 250 mL saf suya (pH 7.30-7.70), maden suyuna (pH 5.0-5.4) ve elma şarabına (%4.5 etanol miktarı, pH>4) eklenmiştir. İki ya da 15 tablet ezilerek veya bütün olarak içeceklere katılarak hepsi dörder kez karıştırılmıştır. Bardağın üst kısmındaki 50 mL'den (içeceği yudumlarken alınan yaklaşık bir ağız dolusu miktar) 5 mL numune 2, 5, 15 ve 30. dakikalarda test edilmiştir. Yaklaşık 30 dakika sonra koku için bakıldığında bir değişiklik gözlenmemiştir. Belirtilen zamanlarda yapılan gözlemlerde renk değişimi gözükmemiş olup, sıvıların hepsinde bir köpük oluşumu belirlenmiştir. Karbonatlı sıvılarda tabletler asılı kalırken, saf suda dibe çöktüğü gözlenmiştir. Tat değişikliğinin ise sadece 15 ezilmiş tablet eklenen suda belirgin olduğu gözlemlenmiştir. Sonuç olarak zolpidemin karbonatlı içeceklerde suya göre daha çok çözüldüğü belirtilmiş olup; içeceğe bir madde eklenip eklenmediğinin belirlenmesi için bulunulan yerin ışık durumu ile kurbanın tecrübeli ve ayık olma durumlarının önemi dile getirilmiştir.

2.1.4. Zolpidemin kötüye kullanımı ve adli bilimlerdeki önemi

Hajak ve ark. 1966 ve 2002 yılları arasında zolpidemin kötüye kullanım veya bağımlılık değerlendirmesinin yer aldığı 36 vaka tanımlamışlardır. Vakalar kadın ve erkekler arasında eşit olarak bölünmüştür. Bazı vakalarda belirlenen seviyelerin, önerilen dozların 30 ila 120 katı üzerinde olduğu görülmüştür. Bununla birlikte, zolpidem için kötüye kullanım veya bağımlılık görülme sıklığının, benzer tedaviler için önerilen benzodiazepinlerden önemli ölçüde düşük olduğu belirlenmiştir. Yazarlar, alkol bağımlılığı veya diğer psikiyatrik durumları olan hastalara zolpidem reçetelendiğinde dikkat edilmesini önermişlerdir (24).

Zolpidem, diğer yatıştırıcı ilaçlar gibi, bir MSS baskılayıcı etkisine sahiptir ve diğer MSS baskılayıcı ilaçlar ile birlikte uygulandığında oldukça dikkatli olunmalıdır. Piergies ve ark. zolpidem (10 mg) ve fluoksetin (prozac-20 mg) arasındaki farmakokinetik ve farmakodinamik etkileşimleri değerlendirmişlerdir (25).

Garnier ve ark., 344 akut zolpidem zehirlenmesi vakasının bir analizini rapor etmişlerdir. Bu çalışmada, ölümlerin vakaların % 6'sını oluşturduğunu; fakat zolpidem ile doğrudan ilişkili olmadığını bildirmişlerdir. Alkol ve/veya diğer psikotropik ilaçları tüketen ve vakaların yarısını oluşturan bireylerde tayin edilen zolpidem miktarının 10 ila 1400 mg arasında değiştiği görülmüştür. Hastaların yaklaşık üçte birinde zehirlenme belirtileri (uyuşukluk, tutarsız konuşma, yürüyüş bozuklukları) gözlendiği bildirilmişlerdir (26).

Muhtemel tıbbi yan etkiler için değerlendirilmeye ek olarak, psikoaktif bileşiklerin genellikle bilişsel, davranışsal ve motor performans becerilerine etkisi olduğu bilinmektedir. Alkol, zolpidem ve diğer bazı yatıştırıcıların terapötik dozlarda etkisi, Mattila ve ark. tarafından incelendiğinde; zolpidemin bilişsel becerileri diğer ajanlardan daha çabuk bozduğunu; bununla birlikte, bazı hafıza bozulmaları meydana gelirken, bu etkilerin alkol de dahil olmak üzere diğer test edilen yatıştırıcılardan herhangi birinden daha az olduğu saptanmıştır (27).

54 yaşında bir erkeğin düzensizce araba kullandığı gözlenmiştir. Sürücünün; camı gözlere, sert konuşmaya, yavaş hareketlere ve son derece zayıf koordinasyona sahip olduğu anlaşılmış, nefes alkolünün negatif olduğu gözlenmiştir. Toksikolojik analiz sonucunda kanında zolpidem (100 ng/mL), fluoksetin (25 ng/mL), norfluoksetin (90 ng/mL) ve hidroksidon (8.8 ng/mL) olduğu saptanmıştır (28).

Sabah işe doğru yola çıkmadan önce yanlışlıkla 10 mg zolpidem alan bir kadın; direksiyon başında ataksi, kafa karışıklığı ve uyku hali sergilemesinin üzerine tutuklanıp kanında yapılan analiz sonucu, zolpidem miktarı 0.119 mg/L bulunmuştur (29).

Sarhoşken araç kullandıkları tayin edilen 15 vakanın incelemesi sonucu, 4 vakada zolpidem tek bulunan ilaç olmuştur ve kan konsantrasyonu 0.11-0.54 mg/L olarak saptanmıştır (30).

Zolpidemin cinsel gelişmeyi teşvik etme kabiliyetinin yanı sıra, hızlı emilimi, uykuyu başlatma ve sürdürme etkinliği; uyuşturucu ile kolaylaştırılan cinsel saldırılarda kullanılan diğer ilaçlar ile ortak özelliklerindendir (31).

Villain ve ark. zolpidem kullanımı ile kolaylaştırılmış iki cinsel saldırı vakası belirtmişlerdir. İlk vakada genç bir kadın mide rahatsızlığı şikayeti ile hastaneye başvurmuştur. Bir erkek tarafından kahve ikram edildikten sonra bilinçsiz hale gelip, uyandıktan sonra cinsel tacize uğradığını fark etmiştir. Olayı 6 gün sonra bildirmiş olup, saldırıdan 15 gün sonra toksikolojik analiz için saç örneği toplanmış, saçın 2 cm'lik kısmı LC/MS/MS ile analiz edilip 4.4 pg/mg zolpidem içerdiği tayin edilmiştir. İkinci vakada bir içkinin ardından arkadaşı tarafından saldırıya uğrayan 37 yaşında bir kadından, saldırıdan 9 saat sonra kan örneği alınmıştır. Sonuç olarak 390 ng/mL zolpidem içeriği bulunmuştur (32).

Kintz ve ark. 12 yaşındaki bir kız çocuğunun, bakıcısının erkek arkadaşı tarafından defalarca cinsel saldırıya uğradığı olayı incelemişlerdir. Bahsi geçen kız, saldırılara dair bir hatırası olmamasına rağmen, her saldırı sonrası şiddetli zihinsel karışıklık yaşadığını belirtmiştir. Olay

yeri inceleme sonrasında bakıcının evinde boş zolpidem kutuları bulununca iddia edilen son saldırıdan yaklaşık 2 hafta sonra toksikolojik analiz için saç toplanmış ve 6.7 ng/mg konsantrasyonda zolpidem varlığı tayin edilmiştir (33). Zolpidem ile ilgili ölüm vakalarının çoğunun alkol ya da diğer ilaçlar ile beraber kullanımı sonrasında olduğu görülmüştür (31). Tracqui ve ark. asepromazin ile bağlantılı zolpidem içeren ilk ölümü bildirmişlerdir. Her iki ilacın da karşılıklı toksik etkilerinin güçlendiği ve ölüme sebebiyet verdiği tayin edilmiştir (34).

1995 yılında Meeker ve ark. 39 yaşında obez, depresyon ve uykusuzluk tedavisi gören; uyuşturucuya bağlı çoklu ilaç toksikasyonu sonucu ölen bir kişinin postmortem örneklerini analiz etmişlerdir. Kalp kanında 2.91 µg/mL, periferik kanda 1.4 µg/mL ve idrarda 2.13 µg/mL zolpidem bulunmuştur. Ayrıca kalp kanında 0.16 mg/L hidroksidon ve 0.04 mg/L morfin bulunmuştur ve bu narkotiklerin büyük ihtimalle zolpidemin neden olduğu MSS baskısını çoğaltıcı etkisi olduğu öne sürülmüştür (7).

68 yaşında bir kadın, en az 30 Ambien tableti alması sonucu evinde ölü bulunmuştur. Yapılan analizler sonrasında kanda 4.1 mg/L zolpidem, 19.3 mg/L meprobamat ve 2.3 mg/L karisoprodol varlığı gözlenmiştir (1).

Keller ve ark. bilinmeyen miktarda zolpidem aldığı bildirilen kasıtlı bir zehirlenme vakasında postmortem yapılan çalışmada; kalp kanında 0.75 mg/L, femoral kanda 0.52 mg/L ve idrarda 1.32 mg/L olduğunu bulmuşlardır (5).

İki ay süreyle turist olarak ülkemize gelmiş, İngiliz vatandaşı olan 57 yaşındaki erkek hasta; bilinç bozukluğu ve kasılmalarının olması nedeniyle Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi hastanesinin acil servisine getirilmiştir. Olgunun depresyon tedavisi için antidepresan kullandığı ve günde 2 doz halinde 10 mg'lık zolpidem içerikli ilaç kullandığı, bir süre sonra antidepresanı kendi kendine kesmiş olup zolpidem kullanımını günde 8 tablete çıkardığı

bilgisi eşinden alınmıştır. Zolpidemin sabah dozunu aldıktan sonra akşam dozunu almadan nöbet geçirdiği belirlenmiştir. Tedavi sırasında da bir nöbet daha geçiren hastanın durumu diazepam ile kontrol altına alınmıştır. Yapılan tetkikler sonrasında zolpidem kullanımına bağlı yoksunluk sendromu nedeniyle nöbet geçirdiği sonucuna varılmıştır. Olgu 3 yıldır günde 80 mg'lık zolpidem kullanıyor olup, akşam dozunu geciktirdiği için yoksunluk sendromu nedeniyle nöbet geçirmiştir (20). Zolpidemin terapötik dozlarda tolerans geliştirmedği bilinse de, benzodiazepin benzeri olmasından dolayı bağımlılık potansiyeli yüksektir (35,36).

2.2. Analitik Yöntemlerin Validasyonu (37,38)

Bir süreç veya bir sistemin işlevini, önceden belirlenmiş gerekliliklere uygun olarak yerine getirdiğine emin olmak için gerçekleştirilen çalışmalar bütününe validasyon (kalifikasyon) denir. Kantitatif analizlerde sıfırdan yöntem geliştirildiğinde *tam validasyon* parametreleri uygulanmalıdır. Bunlar; seçicilik (selectivity)/spesifiklik (specificity), tayin limiti (limit of detection), ölçüm limiti (limit of quantification), ölçüm aralığı/doğrusallık (range/linearity), doğruluk {kesinlik (precision) ve gerçeklik (trueness) olarak iki bölüm şeklinde}, sağlamlık (robustness/ruggedness). Valide edilmiş bir yöntemin bulunulan laboratuvarında çalışılabilirliğinin görülmesi amacıyla yapılan validasyonda (verifikasyon) uygulanan parametreler ise şunlardır; tayin limiti (LOD), ölçüm limiti (LOQ), doğrusallık, doğruluk (kesinlik ve gerçeklik olarak iki bölüm şeklinde). Validasyonu/verifikasyonu tamamlanmış yöntemlerde değişiklikler olduğunda uygulanacak parametreler Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Validasyonu/verifikasyonu tamamlanmış yöntemlerde değişiklikler olduğunda uygulanacak parametreler (37)

Validasyon ve Verifikasyon Parametreleri	Yöntemde Modifikasyonlar	Yeni Bir Matriks eklenmesi	Yeni Bir Cihaz	Yeni Personel
Seçicilik / Spesifiklik	-	-	-	-
Tayin Limiti (LOD)	-	X	X	-
Ölçüm Limiti (LOQ)	-	X	X	-
Ölçüm Aralığı/Doğrusallık	-	-	-	-
Keskinlik	-	X	X	X
Gerçeklik	X	X	X	X

2.2.1. Validasyon hazırlık çalışmaları

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

2.2.2. 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.

- ***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.

2.2.3. Konsantrasyon seviyelerinin belirlenmesi

Belirlenen çalışma aralığı göz önünde bulundurularak düşük, orta ve yüksek olacak şekilde validasyon için (aksi belirtilmediği sürece) 3, verifikasyon 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.

2.2.4. Parametrelerin uygulanması

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

Çok düşük konsantrasyonlarda ($\mu\text{g/mL}$ 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 yapıp, 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 istatistiksel değerlendirmelere başvurulabilir.

▪ ***Seçicilik (Selectivity) / Spesifiklik (Specificity) :***

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

▪ ***Doğruluk (Accuracy):***

Genel tanım olarak bir ölçüm sonucunun gerçek değerine yakınlığını tanımlar. İki bölüme ayrılır;

a) Kesinlik:

lm sonuçlarının birbirlerine yakınlığının değeridir ve ölçüm sonuçlarının ortalama değer etrafındaki dağılımını gösterir. Kesinlik; standart sapma (SD, s) veya varyasyon katsayısı (Coefficient of variation, CV (RSD) ile ifade edilir. Tamamen elimine edilmese de dikkatli ve titiz çalışma teknikleri ile küçültülebilir.

a-1) Tekrarlanabilirlik:

Yöntemin aynı laboratuvarı, 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 istatistiksel programlar da kullanılabilir.

$$\text{Standart sapma } (\sigma) = \sqrt{\frac{\sum |x - \bar{x}|^2}{n - 1}}$$

$\sum$: toplam

x : veri kümesinde bir değer

$\bar{x}$: aritmetik ortalama

n : veri noktası sayısı

$$\text{RSD} = \sigma / \bar{x} \quad \% \text{ RSD} = \sigma / \bar{x} * 100$$

σ : standart sapma

$\bar{x}$: aritmetik ortalama

a-2) Tekrar üretilebilirlik:

Yöntemin farklı laboratuvarlarda, 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.

b) Gerçeklik:

Belirli sayıdaki analiz sonuçlarının ortalamalarının gerçek değere yakınlığının ifadesidir. Sistemik hataların görülmesine olanak verir ve aynı zamanda geri kazanım olarak ta adlandırılır. Bu hatalar matriks ve konsantrasyon seviyesine göre değişebilir. Bu nedenle gerçeklik çalışmasının yapılacağı matriks ve konsantrasyon seviyeleri belirlenmelidir. Sertifikalı referans, konsantrasyonu bilinen analit eklenmiş kör numune analizleri ile ya da

referans bir yöntemle analiz sonuçlarını karşılaştırarak hesaplanabilir. Hesaplamalarda aşağıdaki formül kullanılır.

$$\% \text{ Geri Kazanım} = (c_1 / c_0) * 100$$

c₀: Referans değer

c₁: Referans malzeme ile yapılan analiz sonucu / sonuçların ortalaması

▪ ***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.

2.3. Kromatografi

Kelime anlamı olarak renkli yazmak manasına gelen kromatografi, ilk kez Rus botanikçi Mikhail Tsweet tarafından 1906'da kullanılmış ve literatüre geçmiştir. Genel tanım olarak; bir karışımdaki maddeleri, maddelerin farklı özelliklerine dayanarak, biri hareketli diğeri sabit faz olmak üzere iki fazlı bir sistem yardımı ile ayırarak saflaştırma prensibine dayanan analitik yöntemlerdir. Polarite, çözünürlük, affinite (ilgi), iyonik güç gibi özelliklerdeki değişikliklere göre karışımdaki maddeler ayrıştırılabilir (39). Sabit faz katı-sıvı olabilirken hareketli faz sıvı-gaz olabilir. Ayrılmak istenen karışım sabit faz üzerinden, hareketli faz yardımıyla taşınarak geçirilir. Karışımı oluşturan bileşikler sabit faz tarafından aynı ölçüde tutulmaz. Bu nedenle her bileşik sistemden farklı zamanlarda çıkarlar. Böylece bileşikleri birbirinden ayırmak ve onları tanımlamak mümkün olur (40). Kromatografik yöntemleri çeşitli şekillerde sınıflandırmak mümkündür (Şekil 7).



Şekil 7. Kromatografinin sınıflandırılması

2.3.1. Ayırma mekanizmasına göre kromatografi

▪ *Adsorpsiyon kromatografisi* (41-43)

Adsorpsiyon; karışımındaki sıvı veya gaz halindeki maddelerin katı faz üzerine tutunmasıdır. Katı olan sabit faz ile sıvı veya gaz olan hareketli fazda ayrılır. Sabit faz olarak alümina (Al_2O_3), silikajel (SiO_2), talk ve bunun gibi gözenekli maddeler; hareketli faz olarak alkol, aseton, kloroform gibi bütün organik çözücüler kullanılabilir. Sabit ve hareketli fazın seçimi, ayırımı yapılacak bileşiklerin polaritesine ve kimyasal özelliklerine bağlı olarak yapılır. Genelde polar maddeler için polar çözücüler apolar maddeler için apolar çözücüler kullanılır. Çeşitli maddelerin adsorblayıcı veya sabit faz üzerinde adsorblanma dereceleri farklı olduğundan, farklı yerlerde toplanırlar. En fazla adsorblanan maddelerin sürüklenmesi ve hareketleri daha zayıf daha yavaş, tersine az adsorblananların hareketleri ve sürüklenmeleri hızlı olur.

▪ ***Dağılma kromatografisi*** (41-43)

Maddeler sıvı olan sabit faz ile sıvı veya gaz olan hareketli faz arasında ayrılır. Sabit faz ise kolonun içindeki kaynama noktası yüksek sıvı ya da katı maddedir. Maddeler birbirine karışmayan sıvılardaki çözünürlükleri farkıyla dağılım gösterirler. Bu dağılma sabiti olarak adlandırılır ve bir sabit ile karakterize edilir.

▪ ***İyon değiştirme kromatografisi*** (41-43)

Karışımındaki maddelerin iyonik grupları ile iyon değiştiricideki iyon grupların eşdeğer miktarlarının yer değiştirmesi ile maddeler ayrılır. Sabit fazda anyon veya katyonları değiş tokuş eden fonksiyonel gruplar bulunur.

İyon değiştiriciler organik ya da inorganik olmakla beraber günümüzde organik iyon değiştiriciler daha popülerdir.

▪ ***Jel filtrasyon kromatografisi (moleküler elek kromatografisi)*** (41,42)

Karışımındaki bileşikler moleküler büyüklüklerine göre ayrılırlar. Büyük moleküller kolonu daha önce terk ederler. Sabit faz gözenekli taneciklerden oluşan filtre edici jeldir. Daha çok polimerlerin ayrılmasında kullanılır.

▪ ***Affinite kromatografisi*** (41,42)

Afinite; antijen-antikor gibi özel ayrımlara dayanır. Karışımındaki proteinlerden yalnızca bir tanesi kolondaki kovalent bağla bağlanmış bir protein olan sabit faz tarafından tutulur ve diğerlerinden ayrılır.

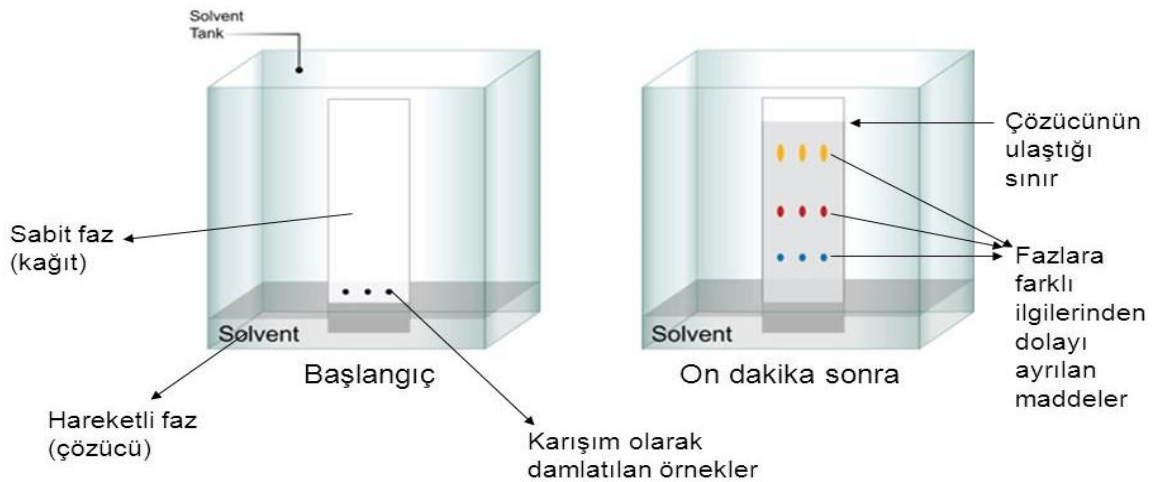
2.3.2. Kullanılan düzeneğe göre kromatografi

▪ *Düzlemsel (planar) kromatografi:*

Sabit faz kağıt gözeneği ya da düz bir plaka üzerindedir. Mobil faz ise yer çekimi ve kılcallık etkisi ile hareket eder (40).

a) Kağıt kromatografisi:

Sabit faz olarak özel yapılmış bir kağıt şeklindedir (Şekil 8). Ayrılması istenen karışım kağıda uygulanır. Daha sonra bu kağıt, mobil faz içinde bekletilir. Çözücü kağıtta ilerlerken maddeler kağıt üzerinde farklı hızlarda ilerlerler. Maddeler renkli değilse ultraviyole ışık altında ya da özel boyama yöntemleri ile gözlenebilir. Kağıt üzerinde maddelerin yoğunlukları sürüklenme mesafeleri ve alanları karşılaştırılarak analiz yapılabilir (41,42).

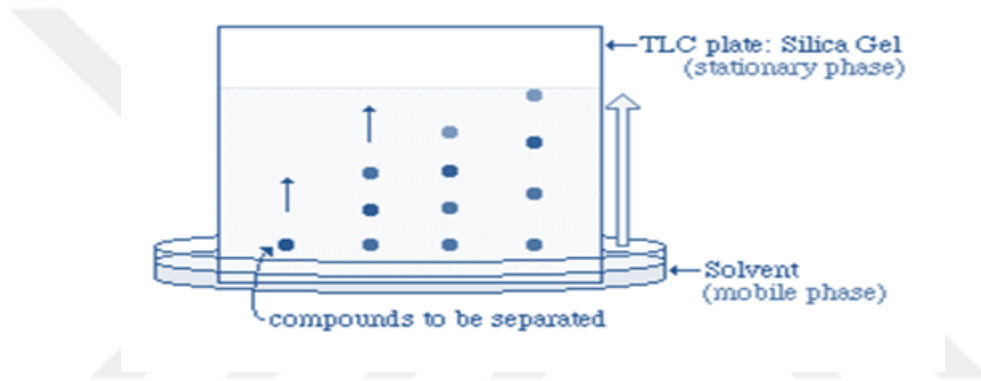


Şekil 8. Kağıt kromatografisi (44)

b) İnce tabaka kromatografisi (TLC):

Çalışma prensibi kağıt kromatografisi ile aynı olup farklı olarak ayırma ortamı, kağıt yerine üzerinde sabit fazın olduğu slika jel, talk gibi toz maddelerin bulunduğu cam veya plastik tabakadır (Şekil 9). Oluşan izler daha kesindir (42).

Önce tabaka üzerinde bir kalem ile hafifçe çizerek bir başlangıç noktası oluşturulur. Örneklerin uygulanacağı noktalar belirlendikten sonra özel TLC kapilleri ile örnekler bu noktalardan tabakaya emdirilir (43).



Şekil 9. İnce tabaka kromatografisi (TLC) (45)

▪ **Kolon kromatografisi:**

Sabit faz, mobil fazın hızla ve basınçla içinden geçtiği bir kolonda bulunur (40).

a) Sıvı kromatografisi (LC):

Genellikle cam kolon katı adsorban ile doldurulur ve çözelti halindeki mobil faz kolon boyunca ilerler (Şekil 10) (40).

20. yüzyılın sonlarına doğru daha küçük çaplı dolgu maddelerinin üretilmesi ile daha gelişmiş cihazlara ihtiyaç duyulmuştur (42).



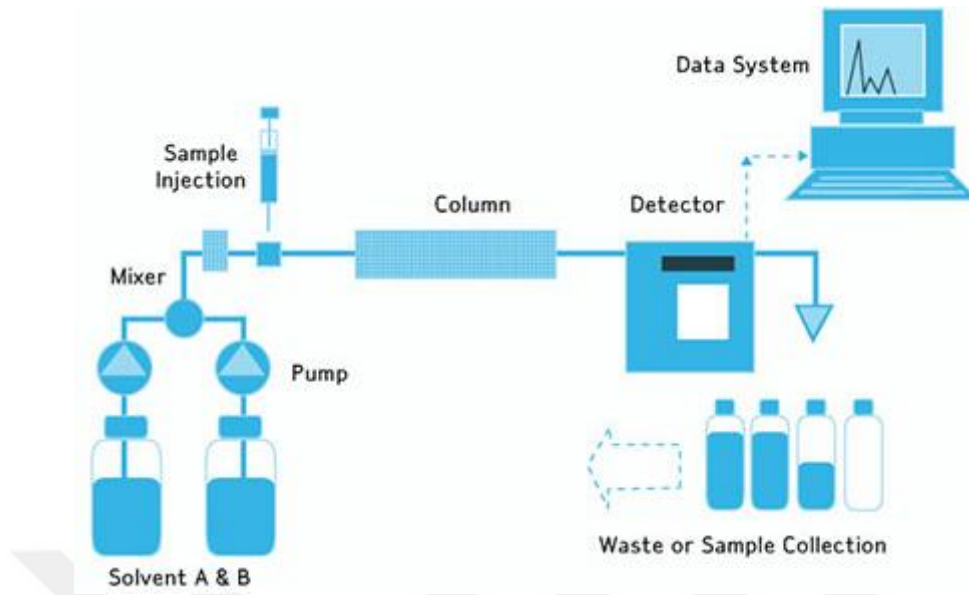
Şekil 10. Sıvı kromatografisi (LC) (46)

b) Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC):

Kolon dolgu maddelerinin küçülmesiyle ortaya çıkan cihazlardandır (Şekil 11,12). Dolgu maddeleri cam kolon yerine, sıvı mobil fazın yüksek basınç altında kolondan geçmesi sebebiyle, paslanmaz çelik kolonlar içinde bulunur. Maddeler kolondan farklı zamanlarda çıktıktan sonra detektöre ulaşır, kalitatif ve kantitatif analizleri yapılır. Büyük molekül ağırlıklı maddeler için kullanıma uygundur (42).



Şekil 11. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) (47)



Şekil 12. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) çalışma prensibi (48)

2.3.3. Gaz kromatografisi (GC)

Uçucu ya da yarı uçucu maddeleri ayırmak için kullanılır (Şekil 13). Ayırım, bileşenin sabit fazda dağılımı ve hareketli faz olan taşıyıcı gaz ile sabit fazda taşınmasına bağlıdır (49). Yöntemin basit olması, yüksek ayırma gücü ($\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonunda) ve hızlı olması avantajlarındandır (50). Sabit fazın yapısına göre iki grup altında toplanır:

- **Gaz – Katı Kromatografisi (GSC):**

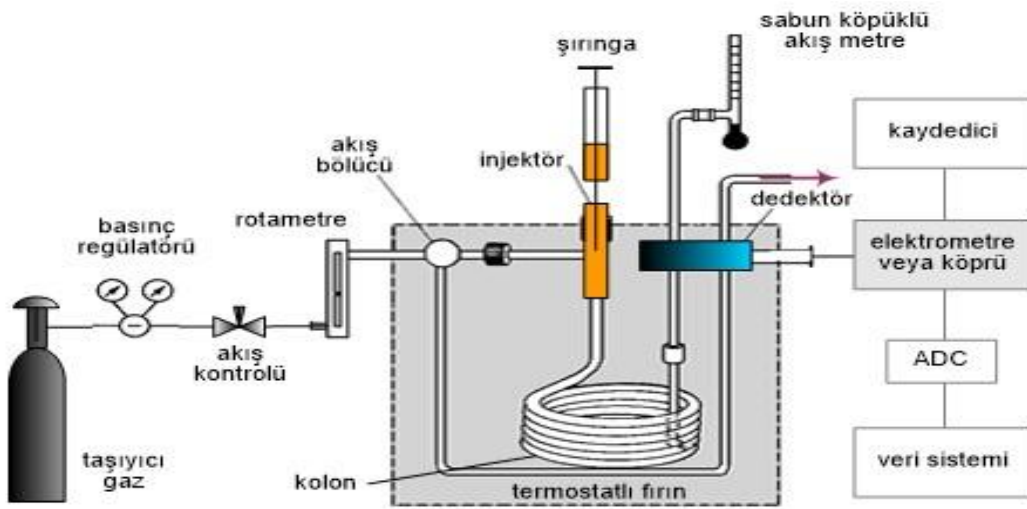
Sabit faz olarak polar katı bir madde kullanılır. Numuneler katı fazda farklı sürelerde alıkonularak bileşenlerine ayrılır. Bu yöntem adsorpsiyonla gerçekleşir (41,43).

- **Gaz – Sıvı Kromatografisi (GLC):**

Kolonun iç yüzeyine bağlanan sıvı, sabit fazdır. Bu yöntemde dağılmadan faydalanılır. Numunedeki bileşenler mobil gaz fazı ve sabit faz arasında özelliklerine göre dağılırlar (41,43).

Temel olarak 6 kısımdan oluşur:

1. Gazı sağlayan kısım
2. Numunenin kolona verildiği giriş kısmı
3. Ayrımın gerçekleştiği kolon
4. Kolonun yer aldığı kolon fırını
5. Sinyali saptayan dedektör
6. Sonuçları kaydeden ve kromatograma dönüştüren veri sistemi



Şekil 13. Gaz kromatografisi (50)

▪ **Taşıyıcı gaz:**

Hareketli faz olarak genel olarak yüksek saflıkta helyum, azot ya da hidrojen gazı kullanılır.

Gazın saf olması gerektiğinden bazen gaz, sisteme girmeden önce, saflaştırma düzeneklerinden geçtikten sonra sisteme girişi sağlanmaktadır (40).

- **Kolonlar** (51-54):
- Kolon dolguları sabit faz olarak kullanılır (Şekil 14). %95 Metilpolisiloksan-%5 fenilpolisiloksan, metilpolisiloksan, polietilen glikol gibi çeşitli sabit fazlar vardır.

Kolonlar genel olarak 2 grupta incelenir:

a) Dolgulu kolonlar:

170-260 μm $\varnothing$ dolgu metaryellerinin $\varnothing$ zeri sıvı sabit faz ile kaplanmış ve cam, paslanmaz $\varnothing$ elik, bakır ya da teflon i $\varnothing$ ine doldurulmuştur.

b) A $\varnothing$ k borusal kolonlar:

Destek kaplı ve $\varnothing$ eperi kaplı olmak $\varnothing$ zere iki $\varnothing$ eşittir.



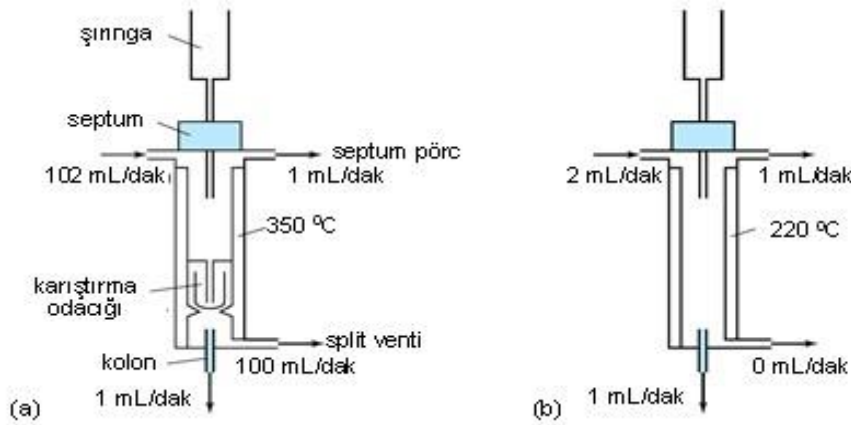
Şekil 14. Gaz kromatografisi kolon $\varnothing$ eşitleri (50)

- **Enjeksiyon $\varnothing$ eşitleri** (55-58):

Analiz numunenin kolona aktarılması ile başlar. Numuneler buhar fazında $\varnothing$ eşitli enjeksiyon sistemleri ile kolona aktarılırlar. Numunelerin sisteme verilmesi sızdırmaz enjektörler ile bir bölmeden yapılır. Bu bölme ve kolonun numune giriş ucu arasında, numuneyi buharlaştırmak için bir enjeksiyon blo $\varnothing$ u yer alır. Enjeksiyon blo $\varnothing$ u 2 başlık altında incelenir:

a) Bölmeli/bölmesiz enjeksiyon:

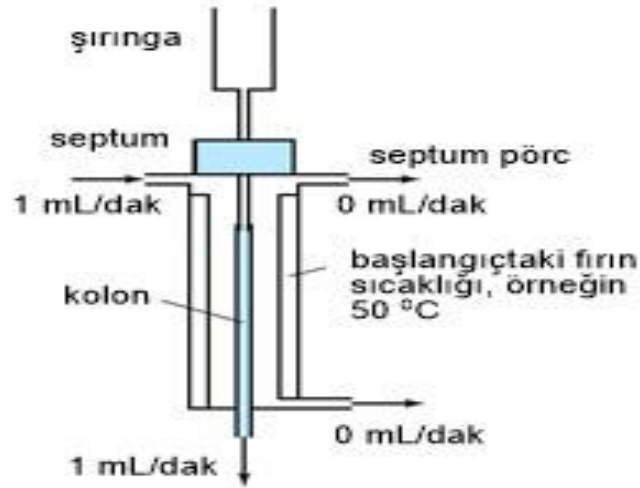
Bölmeli (split) enjeksiyonda; 1,5 μ L hacminde örnek alınır. Genellikle sıvı örnek buharlaşmanın meydana geldiği 'liner' denen kısma enjekte edilir. Hızlı bir buharlaşma sonucu numune taşıyıcı gaz ile karışır. Bu karışım yüksek bir hızla kolonun girişine doğru taşınır. Fakat bu karışımın çoğu; numune miktarının kılcal kolon kapasitesine uyumlu hale gelmesi için, splitline olarak isimlendirilen kısımdan dışarı atılır. Böylece kolona enjekte edilecek örnek miktarı bölme oranı ile ayarlanır. *Bölmesiz (splitless) enjeksiyonda;* örnek linerde buharlaştırılıp tümü kolona taşınır. Bölmeli enjeksiyondan farklı olarak splitline burada kapalıdır, enjeksiyondan sonra açılır ve linerin yıkanması sağlanır. Düşük derişim ve kalıntı analizlerinde genel olarak tercih edilir. Bölmeli ve bölmesiz enjeksiyon işlemlerinin şematik görüntüsü Şekil 15'te gösterilmektedir.



Şekil 15. Split (a) ve splitless (b) enjeksiyon işlemleri (50)

b) Doğrudan kolona enjeksiyon:

Sıvı olan örnek direkt olarak kolona uygulanır. Başta soğuk olan enjektör, enjeksiyondan sonra ayırma işlemini başlatmak adına hızla ısınır. Bu enjeksiyon tipi geniş aralıklı kaynama noktasına sahip maddeler için uygundur. Doğrudan kolona enjeksiyon yapılan sistemin şematik görüntüsü Şekil 16'da gösterilmektedir.



Şekil 16. Doğrudan kolona enjeksiyon (50)

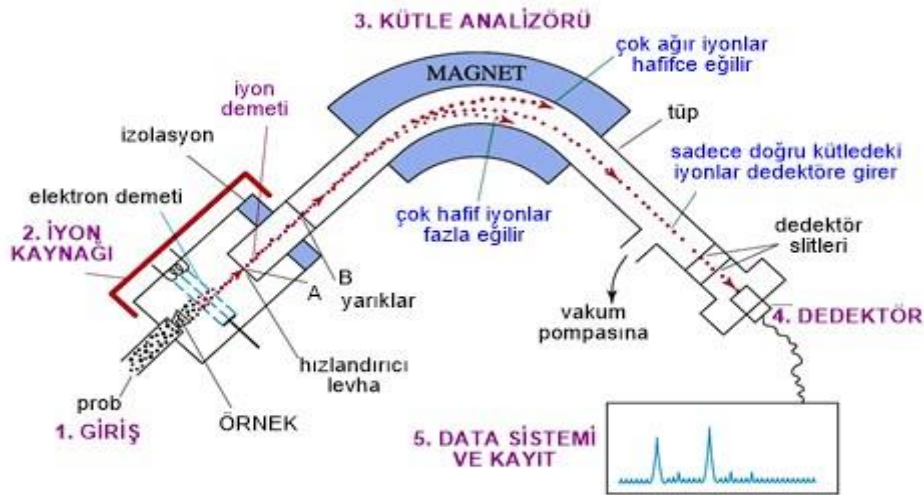
▪ **Dedektör:**

Genl prensip olarak bir dedektör sistemde mobil faz dışında farklı olan maddeleri algılayıp elektrik sinyaline dönüştürür. Her maddeye yanıt veren detektörlere evrensel dedektörler, belirli maddelere yanıt verenlere seçimli dedektörler denir. Dedektörlerin duyarlılıkları, kararlılığı, doğrusallıkları, dinamik aralığı gibi özellikleri belirleyicidir (50).

Yaygın kullanılan dedektörler;

- Termal iletkenlik (TCD)
- Alev iyonizasyon (FID)
- Azot fosfor (NPD)
- Elektron yakalama (ECD)
- Atomik emisyon (AED)
- Kütle spektrometresi (MS)
- Fotoiyonizasyon (PID)

Kütle Spektrometresi (MS), diğer gaz kromatografi dedektörleri içinde en güçlü olan dedektörlerdendir. Sistemde analiz boyunca, kütle spektrometresi sürekli olarak kütleleri tarar. Numune kolondan çıktığında bir transfer hattından geçer ve kütle spektrometrenin girişine gelir, bir elektron-çarpmalı (impact) iyon kaynağı tarafından iyonlaştırılır ve fragmanlara ayrılır. İyonlar kütle analizörüne girer (Şekil 17) ve m/z (kütle-yük oranı) değerlerine göre sıralanırlar. Böylece kromatogram alıkonma zamanlarını belirlerken, kütle analizörü de piklerden, karışımda ne tür moleküllerin bulunduğunu saptar (59). Karışık numuneleri ayırmada, biyolojik moleküllerin yapılarını tayin etmede, bir numunedeki atomların izotop oranlarının bulunması gibi birçok amaçla kullanılabilir (42).

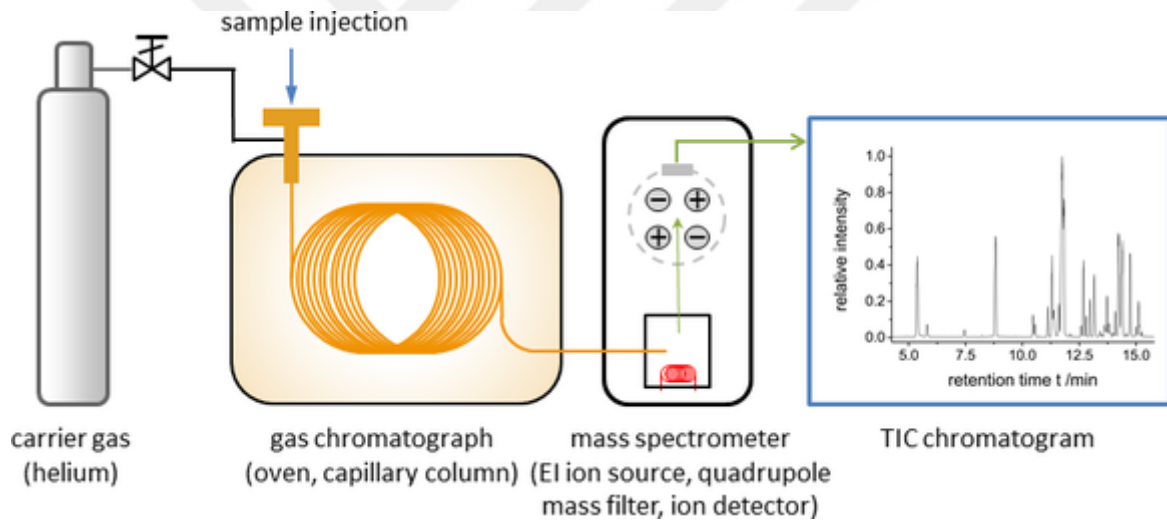


Şekil 17. Kütle analizörünün şematik görüntüsü (50)

2.3.4. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS)

Kütle spektrofotometresinin gaz kromatografisinde kullanılması ile oluşan sistemdir (Şekil18). Analizi yapılacak numune gaz kromatografisi bölümünde, gaz halinde bileşenlerine ayrılır. Analiz sırasında kolondan farklı zamanlarda çıkan bileşenler kütle spektrometresinin iyonlaştırma bölgesine gelir ve iyonları elde edilir. İyonlar m/z oranlarına göre ayrılır ve detektör tarafından kaydedilip kütle spektrumu oluşturulur. Kütle spektrometresi, tayin edilen piklerin isimlendirilip, nicel ve nitel analizlerinin yapılmasını sağlar.

Su analizleri, tıbbi uygulamalar, ilaç etken maddelerinin ve metabolitlerinin analizi gibi çeşitli analizler için kullanılabilir (55).



Şekil 18. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS) (60)

Analiz sonucunda elde edilen pikler maddelerin saf olup olmadıkları hakkında bilgi verir. Numunenin enjekte edilmesiyle sinyal olarak görülmesine kadar geçen süreye *alığınma zamanı*, maddenin pik olarak görülüne kadar harcanan mobil faz (gaz) hacmine ise *alığınma hacmi* denir (41).

Ölçülebilir analizler piklerin boy ve alanlarının bir standart ile karşılaştırılması ile yapılır. Daha düşük konsantrasyonlardaki pikler daha küçük pik boyu gösterirler. Bu nedenle ölçüm ve hesaplama pik alanı ve boyu bir arada kullanılarak yapılmalıdır. Pikin taban çizgilerinin birleştirilmesi ve pikin tepe noktasına dikey mesafenin ölçülmesi ile *pik boyu* elde edilir. Kolon sıcaklığı, maddenin akış hızı ve enjeksiyon hızı gibi özellikler pik boyuna etki ederler. Numuneye belirli miktarlarda eklenen *iç standart (IS)*, enjeksiyonun oluşturabileceği belirsizlikleri önlemek için kullanılır (41,43).

2.3.5. GC-MS analizleri için numune hazırlanması

Cihazdan sonuç alabilmek adına ilk adım olan numune hazırlama basamağı; doğru sonuç alabilmek ve cihazın güvenilirliği için oldukça önemlidir. GC-MS gibi hassas bir sistemde, karışık bir numunenin içindeki maddeleri tayin edebilmek adına numunenin uygun çözücüde çözülmesi (katılar için) ya da çekitleme (sıvılar için) gibi yöntemlerle olabildiğince saflaştırılması gerekir (41). Böylelikle analizi yapılacak maddelerin bulunduğu ortamdan uzaklaştırılarak uygun çözücüye alınması sağlanmış olur.

▪ *Türevlendirme:*

GC-MS hassas bir analitik sistem olduğu için analizlerde, gerektiğinde maddelerin uçucu olarak daha kararlı türevleri hazırlanmalıdır. Türevlendirme; steroidler, bazı ilaçlar, fenoller gibi polar bileşiklerin ya da kuyruklu piklere sebep olan bileşiklerin çeşitli kimyasal maddelerle reaksiyona sokulup, buharlaştırılabilen forma dönüştürülmesini sağlamaktadır (51,57).

▪ **Hidroliz :**

Kelime anlamı ile kompleks moleküllerin su kullanarak bileşiklerine ayrıştırılmasına hidroliz denir. Biyolojik maddelerde (kan ve idrar numuneleri için) kimyasal analizler için hidroliz gerekebilir. Enzim ya da asit kullanarak hidroliz yapılabilir (61).

▪ **Protein çöktürme:**

Numunenin içinden olabildiğince protein çıkarılmasını amaçlayan hazırlık yöntemidir. Asetonitril ya da metanol gibi organik çözücüler kullanarak santrifüj edilen numunenin protein kısmı ayrılarak üst kısmı alınıp analiz için hazırlanır (62).

▪ **Çekitleme:**

a) Katı faz çekitleme yöntemi (SPE):

Analiz sonucunda daha yüksek geri kazanım alabilmek adına maddenin yoğunlaştırılması ve maddenin çalışılacak kromatografik sistem için uygun çözücüye geçirilmesi amacıyla yapılan hazırlık yöntemidir (63).

Üç boyutlu polimerik bir özellikteki katı çekitleme fazı, numune içindeki maddeyi tutar.

SPE kartuşu öncelikle çözücü ile yıkanarak şartlanır. Numune kartuştan geçirilir. İstenilen maddenin alınabilmesi adına çözücü ile yıkanır. Ardından elüsyon ile analize hazır olan numune kartuştan uygun bir çözücüye toplanır (63).

b) Sıvı-sıvı çekitleme yöntemi (LLE):

Analitin, birbirine karışmayan iki sıvının içinde birinden diğerine geçirilmesidir. LLE, analitin karışmayan iki sıvı sistemi, genellikle bir organik çözücü ve bir sulu tamponlanmış çözelti arasında bölünmesidir. İşlem, iyi tanımlanmış termodinamik ilişkilere dayanmaktadır ve geniş bir dinamik aralığa sahiptir. Ekstraksiyon sonucunda; içerisinde istenilen bileşen olan kısma

‘ekstrakt’, çözeltinin geri kalan kısmının bulunduğu kısma ‘rafinat’ adı verilir. LLE hızlı, ucuz ve verimli olma avantajlarına sahiptir ve özellikle idrarla iyi çalışır. Bununla birlikte, LLE yüksek solvent tüketimi içerebilir ve çekitleme sırasında emülsiyon oluşumunu önlemek için özen gösterilmelidir (64).

2.3.6. Zolpidemin analiz yöntemleri

Tablo 2. Zolpidem analiz yöntemleri (21)

KLİNİK NUMUNE	ANALİTİK TEKNİKLER
Plazma	HPLC, LC-MS/MS
İdrar	LC-MS/MS, GC-MS
Saç	LC-MS/MS, GC-MS
Oral Sıvılar	LC-MS/MS, GC-MS
Postmortem	GC-MS

HPLC Yüksek performanslı sıvı kromatografisi, **LC-MS/MS** Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometri Sistemi, **GC-MS** Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi

Tablo 2’de verilen analitik yöntemlerden başka zolpidem analizlerinde; TLC (İnce Tabaka Kromatografisi), titrasyon, UV (Spektrofotometre), elektroforez gibi tayin yöntemlerinden yararlanılabilir (6).

1995 yılında Meeker ve ark. GC/NPD sistemi kullanılarak zolpidem için postmortem örnekleri analiz etmişlerdir (7).

Lichtenwalner ve Tully, postmortem olguda zolpidem tayin etmek için bir GC/MS yöntemi kullanmıştır. GC/MS ile yapılan kantitatif analizde, kan ve idrarda zolpidem bulunmuştur. Ayrıca mide içeriğinde toplam 7 mg emilmemiş zolpidem tayin edilmiştir. GC/MS adli

laboratuvarlarda rutin olarak postmortem ve antemortem vakalarda zolpidem tayini için kullanılır (2).

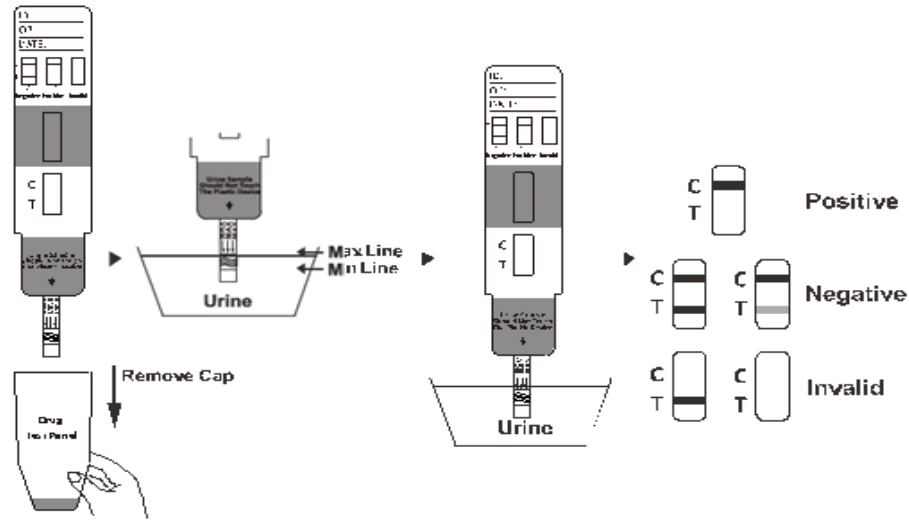
Durol ve Greenblatt, floresan dedektörü ile HPLC kullanarak tek bir zolpidem uygulamasının ardından alınan plazma örneklerini analiz etmiştir (65).

1999'da Wang ve ark., HPLC ve UV dedektörü kullanarak; sıçanlarda zolpidemin farmakokinetiğini incelemek için, serum numunelerinde zolpidem analizi için basit bir prosedür yayınlamıştır. LOD, 240 nm'lik bir algılama dalga boyu kullanılarak 3 ng/mL bulunmuştur (66).

1997 yılında Ptacek ve ark., insan plazmasında zolpidem tayini için basit, tekrarlanabilir, metanol ile protein çöktürmesini ve floresans dedektör ile ters faz kromatografisini içeren bir yöntem bildirmişlerdir (67).

İdrarda zolpidem analizinin daha az yaygın bir yöntemi, kılcal elektroforezdir. Hempel ve Blaschke 1996'da iki yöntem raporlamışlardır. HPLC ile karşılaştırıldığında, yazarlar kılcal elektroforezi hızlı ve basit olduğunu bildirmişlerdir (68).

Analitik yöntemlere ek olarak; zolpidem varlığının hızlı tayini için geliştirilmiş kromatografik bir immüno deney olan ZOL Hızlı Test Paneli mevcuttur (Şekil 19). İdrardan minimum tayin seviyesi 50 ng/mL'dir. Zolpidem seviyelerini belirlemek için monoklonal antikorlar kullanılır ve idrardaki zolpidem konsantrasyonu minimum 50 ng/mL'ye vardığında pozitif sonuç bildirir. Bu test sadece madde varlığını ya da yokluğunu bildirir. Doğrulama için bu testten sonra mutlaka analitik yöntemler kullanılmalıdır (69).



Şekil 19. ZOL Hızlı Test Paneli çalışma mekanizması (69)

2.4. Adli ve Klinik Olgularda Zolpidem Analizleri

1999 yılında Avusturya’da 49 yaşındaki bir kadın bilinmeyen miktarda alkol ile beraber bilinmeyen miktarda İvadal tablet alması sonucu ölü bulunmuştur. Otopside, ilaç zehirlenmesinin en önemli göstergelerinden olan beyin ödemi gözlenmiştir. Bunun dışında vücutta herhangi bir şiddet belirtisine rastlanmamıştır. Ölüm nedenini belirlemek adına toksikolojik analizler için postmortem idrar, periferik kan, kalp kanı ve mide içeriği örnekleri toplanmış ve GC-MS sisteminde analiz edilmiştir. Çalışma sonucunda korelasyon 0.9998, geri kazanım %92 bulunmuştur. Periferik kanda 0.52 ve 0.80 mg/mL, kalp kanında 0.75 mg/mL, idrarda 1.32 mg/mL, mide içeriğinde 8.34 mg/mL miktarlarında zolpidem konsantrasyonları bulunmuştur (5).

2012’de İtalya’da, HPLC kullanılarak yapılan bir çalışmada; köpeklerde zolpidemin etki gösterdiği en düşük kan konsantrasyonu 60 ng/mL olarak tayin edilmiş ve 30 ng/mL altında etki göstermediği gözlenmiştir. Köpeklerde zolpidem için terapötik doz 21 mg/kg’dır. İnsanlar ile köpeklerde zolpidemin doza bağlı etkilerinin benzer olduğu gözlenmiştir (23).

1995 yılında Amerika’da 68 yaşında bir kadın, 10 mg’lık Ambien’den 30 tablet olarak ölmüştür. GC-NPD ile yapılan postmortem analizler sonucu kanda; 4.1 µg/mL zolpidem, 19.3 µg/mL meprobamat ve 2.3 µg/mL carisprodol bulunmuş olup ayrıca mide içeriğinin de zolpidem için pozitif olduğu gözlenmiştir. Zolpidem alındıktan sonra gastrointestinal sistem tarafından hızlıca emilir. Carisoprodol ve metaboliti meprobamatın bulunan konsantrasyonlarının terapötik seviyede olduğu gözlenmiş ve bir önceki ilaç alımının kalıntıları olduğu tahmin edilmiştir. Zolpidemin daha önce rapor edilen fatal miktar olan 1.12 µg/mL’den (26) daha yüksek olarak 4.1 µg/mL bulunduğu gözlenmiştir. Ayrıca bulunan bu miktarın, terapötik dozdan daha yüksek olduğu belirtilmiştir (29). Sonuç olarak zolpidemin akut zehirlenme olasılığı düşük olsa da yüksek miktarda carisoprodol gibi MSS baskılayıcı ilaçlarla alındığında ölüme sebep olabileceği sonucuna varılmıştır (1).

1995 yılında Amerika’da 39 yaşında obezite tedavisi gören ve olay yerinde bulunan reçetede zolpidem, trazodon, nifedipin, ranitidin ve vicodin şurup kullandığı bilinen erkek bireyin ölümü sonucu postmortem örneklerde GC-NPD ile yapılan çalışma sonucunda; kalp kanında 2.91 µg/mL, periferik kanda 1.40 µg/mL, idrarda 2.13 µg/mL zolpidem tayin edilmiştir. Karaciğerde 4.74 µg/g, mide içeriğinde ise 172 mg zolpidem bulunmasına ek olarak kalp kanında hidrodon 0.16 µg/mL ve morfin 0.04 µg/mL tayin edilmiştir. İdrarda hidrodon 2.78 µg/mL konsantrasyonunda bulunurken, morfin tayin edilmemiştir. Bulgular sonucu ölüm nedeninin çoklu ilaç zehirlenmesi olduğuna kanaat getirilmiştir. 45 sağlıklı kişide tek dozluk yapılan çalışmada 5 ve 10 mg’lık dozlar verilmesi sonucu, 59 ng/mL-121 ng/mL plazma konsantrasyonları tayin edilmiştir (7). Maksimum plazma konsantrasyonu için geçen sürenin 1.6 saat, yarı ömrün 2.6 saat (5 mg için) ve 2.5 saat (10 mg için) olduğu saptanmış olup, biyoyararlanımın %70 olduğu görülmüştür (70). Tek doz 20 mg zolpidem alan sağlıklı bireylerde yapılan çalışmada plazma konsantrasyonu 250 ng/mL ölçülmüş olup, yarı ömür 2.2

saat iken karaciğer rahatsızlığı olanlarda plazma konsantrasyonunun 788 ng/mL'ye, yarı ömrün ise 9.9 saate çıktığı gözlenmiştir (7).

Madde etkisi altında işlenen suçların son yıllarda artmış olduğu Çin'de 2012 yılında idrarda UPLC/MS/MS ile yapılan bir validasyon çalışması sonucunda korelasyon >0.9995 , zolpidem ve metaboliti Zolpidem fenil 4 karboksilik asit (ZPCA) için doğrusallık 0.1-600 ng/mL iken metaboliti Zolpidem 6 karboksilik asit (ZCA) için 0.1-300 ng/mL bulunmuştur. LOD 0.05 ng/mL, LOQ 0.1 ng/mL, geri kazanım %70-98.3, gün içi ve 1 gün sonra yapılan analizler sonucu değişimin %15 olduğu saptanmıştır (71).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan standart ve kimyasal maddelere ait bilgiler Tablo 3’te verilmiştir.

Tablo 3. Çalışmada kullanılan standart ve kimyasal maddelerin isimleri ve markaları

Madde adı	Markası
Zolpidem	Chiron AS
Clozapine (iç standart, IS)	Chiron AS
Metanol	Merck
Etil Asetat	Merck
Sodyum Hidroksit (pellets pure)	Merck

3.2.Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Gereçler

Çalışmada kullanılan analitik sistemler, laboratuvar aletleri ve gereçlerine ait bilgiler Tablo 4’te verilmiştir.

Tablo 4. Çalışmada kullanılan cihaz ve gereçlerin isimleri ve markaları

Cihaz / gereç ismi	Marka
Gaz Kromatografisi	Agilent 7820A
Kütle Spektrometresi	Agilent 5977E
Kolon	HP-5MS
Santrifüj	Hettich 320R
Evaporatör	Hypervap HV-300
Elektronik Hassas Terazî	Mettler Toledo
Vorteks	Isolab
Balon Joje (5 mL)	Isolab
Falkon Tüp (15, 50 mL)	Isolab
Otomatik Pipet (20, 100, 200, 1000, 5000 µL)	Eppendorf
Pipet Ucu	Isolab
Pastör Pipeti	Isolab
Cam Vial	Agilent
Insert Vial	Agilent
pH Test Çubuğu	Merck

3.3. Çalışma Planı

Bu çalışmanın, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 07.11.2017 tarihinde yapılan toplantıda, 423633 sayılı karar ile etik açıdan uygun olduğuna karar verildi (Ek-1).

Bu çalışmada, herhangi bir ilaç kullanmayan gönüllü bir kişiden steril idrar kaplarına idrar numuneleri alındı. Alınan idrar numunelerine zolpidem maddesi katmak sureti ile GC-MS sistemi kullanılarak valide edilen bir yöntem geliştirildi.

3.4.Zolpidemin Analizi

3.4.1.Zolpidemin analizinde kullanılan çözeltiler

▪ *İç Standart (IS) Çözeltisinin Hazırlanması:*

10 mg clozapine (IS) standart maddesi analitik terazide tartılarak cam vialde alındı, üzerine 1 mL MeOH eklenerek 1 dakika boyunca vortekslendi, 10 mg/mL konsantrasyonda ana stok çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan çözelti vialde parafilm ile kaplanarak +4°C’de buzdolabında muhafaza edildi.

5 mL hacimli balon jode konsantrasyonu 1 mg/mL (1000 µg/mL) olan IS ara stok-1 çözeltisi hazırlandı. Bunun için ana stok çözeltisinden 500 µL alındı ve 5 mL’ye MeOH ile tamamlandı. Hazırlanan çözelti parafilm ile kaplanarak +4°C’de buzdolabında muhafaza edildi.

5 mL hacimli balon jode konsantrasyonu 50 µg/mL olan clozapine IS ara stok-2 çözeltisi hazırlandı. Bunun için ara stok-1 çözeltisinden 250 µL alındı ve 5 mL’ye MeOH ile tamamlandı. Hazırlanan çözelti parafilm ile kaplanarak +4°C’de buzdolabında muhafaza edildi.

▪ **0.1 M NaOH (Sodyum Hidroksit) Çözeltisinin Hazırlanması:**

200 mg NaOH tartıldı, falkon tüpte ultra saf suda çözündürülerek 50 mL'ye tamamlandı.

▪ **Kalibrasyon Çözeltilerinin Hazırlanması:**

Kalibrasyon çalışması için öncelikle zolpidem standardından 1000 µg/mL konsantrasyonunda ana stok çözeltisi hazırlandı. Bunun için 5 mg zolpidem standardı 5 mL'lik balon jöjeye alınarak MeOH ile 5 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti parafilm ile kaplanarak +4°C'de buzdolabında muhafaza edildi.

5 mL hacimli balon jöjede konsantrasyonu 50 µg/mL olan ara stok çözeltisi hazırlandı. Bunun için ana stok çözeltisinden 250 µL alındı ve 5 mL'ye MeOH ile tamamlandı. Hazırlanan çözelti parafilm ile kaplanarak +4°C'de buzdolabında muhafaza edildi.

Hazırlanan zolpidem ana stok çözeltisinden 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100 ve 200 µL hacimler ayrı ayrı cam viallere alındı. Ayrıca IS olarak 1000 µg/mL 'lik ara stok-1 çözeltisinden 25 µL alınarak tüm kalibrasyon çözeltilerine son konsantrasyon 25 µL olacak şekilde eklendi. Kalan hacim 1000 µL'ye MeOH ile tamamlanarak kalibrasyon noktaları Tablo 5'teki gibi hazırlandı ve hazırlanan çözeltiler GC-MS sisteminde analiz edildi.

Tablo 5. Kalibrasyon noktalarının konsantrasyonları ($\mu\text{g/mL}$)

Kalibrasyon Noktası	Zolpidem (μL) (1000 $\mu\text{g/mL}$'lik ana stoktan)	Clozapine IS (μL) (1000 $\mu\text{g/mL}$'lik ara stok-1'den)	MeOH (μL)
0	-	25	975
10	10	25	965
15	15	25	960
20	20	25	955
25	25	25	950
50	50	25	925
75	75	25	900
100	100	25	875
200	200	25	775

3.4.2. Zolpidem analizi için örnek hazırlama basamağı (5)

Steril idrar kabında bulunan oda sıcaklığındaki idrar örneğinin 1 mL'si falkon tüpüne alındı. Numunedeki son konsantrasyonu 25 $\mu\text{g/mL}$ olacak şekilde, 50 $\mu\text{g/mL}$ 'lik clozapine ara stok-2 çözeltisinden 100 μL eklendi. 120 μL 0.1 M NaOH eklenerek 2 dakika boyunca vortekslendi. Daha sonra 2 mL etil asetat eklenerek 2 dakika boyunca vortekslendi. 5000 rpm hızda 15 dakika boyunca santrifüj edilerek organik faz ayrıldı. Ardından üst faz alındı, tam kuruluğa ulaşana kadar azot altında kurutularak 200 μL etil asetat eklenip 2 dakika boyunca vortekslendi. Hazırlanan 200 μL örnek insert vial'e alınıp GC-MS sisteminde analiz edildi.

3.4.3.GC-MS ile zolpidemin analizi

Bu çalışma için Şekil 20’de gösterilen Agilent 7820A Gaz Kromatografisi, Agilent 5977E

Kütle Spektrometresi cihazları kullanıldı. GC-MS sisteminde yapılan tüm analizler Chemstation Data Analysis yazılımı (G1701FA versiyonu) kullanılarak değerlendirildi.



Şekil 20. Zolpidem analizinin yapıldığı GC-MS sisteminin görüntüsü

▪ GC parametreleri

Toplam analiz süresi: 13.5 dk.

Kolon: HP-5ms 30m*250µm*0.25µm

Solvent delay: 7 dk.

Başlangıç sıcaklığı: 200°C

Bekleme süresi: 3dk.

200°C’de 3 dakika bekledikten sonra cihaz dakikada 30°C artarak 280°C’ye ulaşır ve bu sıcaklıkta 8 dakika boyunca analiz devam eder.

Enjeksiyon Hacmi: 1 µL

Split oranı 5:1

▪ MS parametreleri:

Kütle detektörü, tarama (SCAN) modunda 50-600 m/z iyon aralığında çalışmaktadır. Çalışmada tarama (SCAN) ve seçilmiş iyon izleme (SIM) modundan birlikte yararlanılmıştır.

SIM modunda izlenen iyonlar (m/z): zolpidem için 219, 235, 307; clozapine için 243, 256, 326’dır.

3.5.Zolpidem Analizinin Validasyonu

Zolpidem için seçilen yöntemde, zolpidem ve iç standardın tespit edildiği alıkonma zamanlarında herhangi bir girişim olup olmadığını gözlemlemek için; boş metanol (çözücü), boş idrar numunesi, sadece IS içeren MeOH ve idrar, IS ve zolpidem içeren idar numuneleri analiz edildi, olası bir girişim varlığı arandı.

3.5.1.Doğrusallık çalışmaları

Zolpidem içeren kalibrasyon çözeltileri Tablo 5’te verilen konsantrasyonlarda hazırlanarak artan konsantrasyonlar şeklinde ve her bir kalibrasyon noktası 3’er tekrarlı olacak şekilde GC-MS sisteminde analiz edildi. GC-MS sistemi üzerinde IS kullanılarak oluşturulan kalibrasyon eğrisine göre doğrusal aralık belirlendi. Korelasyon katsayısı için kabul kriteri $\geq 0,99$ olarak belirlendi.

3.5.2. LOD ve LOQ hesaplamaları

LOD ve LOQ çalışması için, içinde sadece IS (clozapine) olan 10 adet boş idrar örneği hazırlandı. 1 mL idrar örneğine 50 µg/mL'lik IS ara stok-2 çözeltisinden 100 µL eklendi ve 3.4.2 bölümünde açıklanan örnek hazırlama basamağına göre çekitlenerek GC-MS'de analiz edildi. Boş idrar numunelerinden elde edilen zolpidem konsantrasyonunun ortalaması ve standart sapması hesaplanarak aşağıdaki formülde yerine koyuldu.

LOD ve LOQ hesaplamaları aşağıda gösterilen şekilde yapıldı.

$$\text{LOD} = \text{Ortalama blank konsantrasyonu} + (3 \cdot \sigma)$$

$$\text{LOQ} = \text{Ortalama blank konsantrasyonu} + (10 \cdot \sigma)$$

σ = standart sapma

3.5.3. Geri kazanım ve tekrar edilebilirlik çalışmaları

Geri kazanım çalışmaları yapmak için kalibrasyon noktalarından düşük, orta ve yüksek olmak üzere üç farklı konsantrasyon noktası seçildi (15, 20 ve 50 µg/mL). Analit içermeyen 1 mL idrar örneğine (her geri kazanım noktasından 6'şar örnek hazırlanarak) Tablo 6'da belirtilen miktarlarda 50 µg/mL'lik zolpidem ara stok çözeltisinden ve 50 µg/mL'lik clozapine ara stok-2 çözeltisinden eklendi. Daha sonra her bir numune 3.4.2 bölümündeki örnek hazırlama basamağına göre çekitlenerek GC-MS sisteminde analiz edildi. Elde edilen miktar tayinleri hesaplandı. % Geri kazanım hesabı aşağıda verilen formül kullanılarak yapıldı. Geri kazanım için kabul kriteri %80-120 arası olacak şekilde belirlendi.

$$\% \text{ Geri Kazanım} = (c_1 / c_0) \cdot 100$$

c_0 : Eklenen zolpidem konsantrasyonu

c_1 : Miktar tayini sonucu bulunan zolpidem konsantrasyonu

Tablo 6. Geri kazanım çalışması için belirtilen çözeltilerden alınan miktarlar (µL)

Geri Kazanım Konsantrasyonu	Zolpidem (µL) (50 µg/mL’lik ara stoktan)	Clozapine (µL) (50 µg/mL’lik ara stok-2’den)
15 µg/mL (n=6)	60	100
20 µg/mL (n=6)	80	100
50 µg/mL (n=6)	200	100

Geri kazanım çalışması için 3 ayrı konsantrasyonda hazırlanan 6 tekrarlı çözeltilerin analizlerinden elde edilen miktarlar hesaplanarak, bu sonuçların standart sapması (σ) ve bağıl standart sapması (RSD) aşağıdaki formüller kullanılarak tekrarlanabilirlik çalışmasında kullanılmak üzere hesaplandı. Kabul edilebilir değerler standart sapma için <15 , bağıl standart sapma yüzdesi için $<20\%$ olarak belirlendi.

$$\text{Standart sapma } (\sigma) = \sqrt{\frac{\sum |x - \bar{x}|^2}{n - 1}}$$

$\sum$: toplam

x : veri kümesinde bir değer

$\bar{x}$: aritmetik ortalama

n : veri noktası sayısı

$$\text{RSD} = \sigma / \bar{x} \quad \% \text{ RSD} = \sigma / \bar{x} * 100$$

σ : standart sapma

$\bar{x}$: aritmetik ortalama

3.5.4. Stabilit 

Stabilit   alışması için bölüm 3.5.2.'de belirtilen şekilde 6 adet 50 µg/mL'lik geri kazanım numunesi hazırlandı,  ekitlendi, analiz edildi ve oda sıcaklığında muhafaza edilen aynı numuneler 7 gün sonra GC-MS sisteminde yeniden analiz edildi. %Değişim hesabı aşağıda verilen formüle göre hesaplandı.

$$\%Değişim = [c_0 - c_1] / 100$$

c₀: ilk analizde tayin edilen zolpidem miktarlarının ortalaması

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

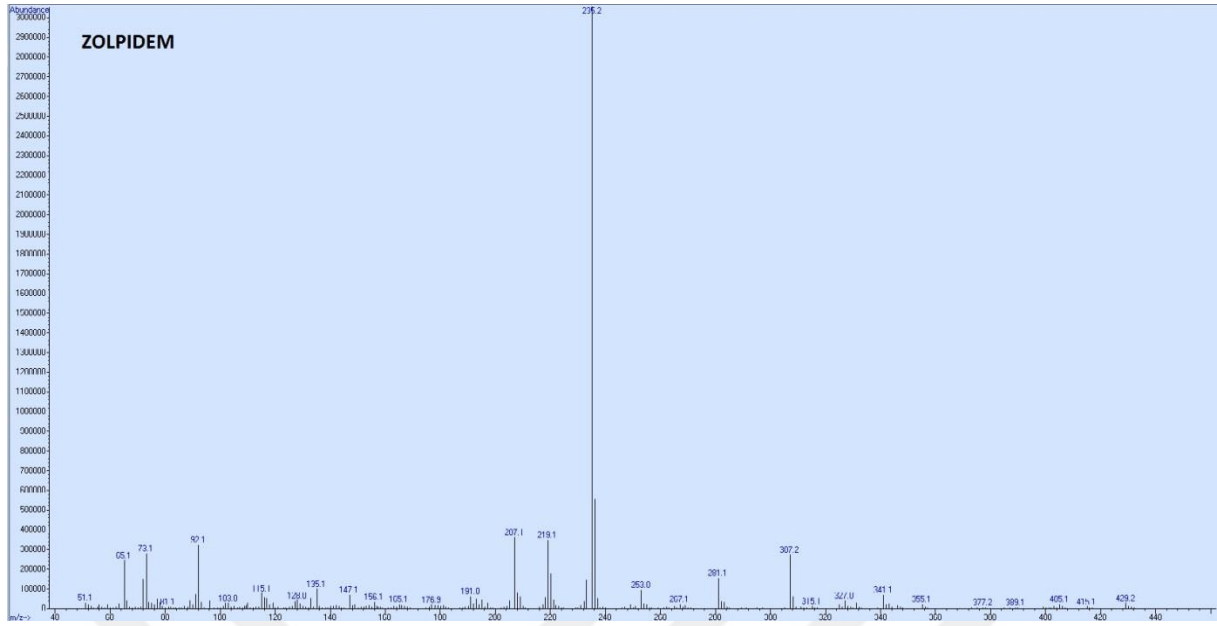
4. BULGULAR

Kullanılan yöntem parametrelerine göre 10 µg/mL standart çözelti ile yapılan çalışmada (n=6) zolpidem ve IS için belirlenen alıkonma zamanları (rt) ile başlıca m/z oranları Tablo 7'deki gibidir. Zolpidem için ortalama alıkonma zamanı $9,677 \pm 0,004$ dk. iken, clozapine için $10,416 \pm 0,0004$ dk. bulundu.

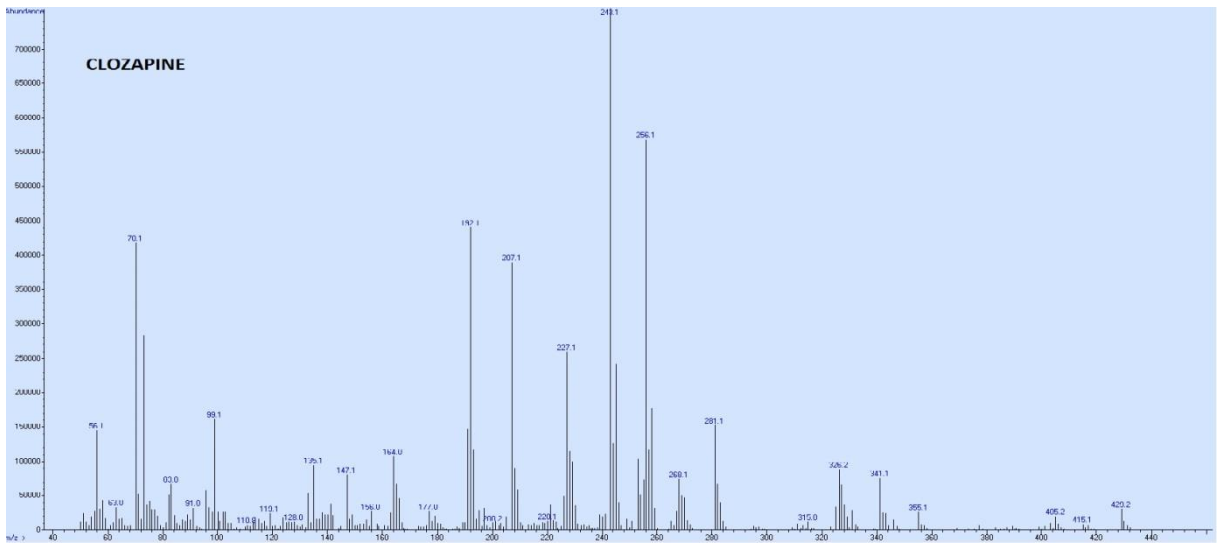
Tablo 7. Maddelerin alıkonma zamanları (dk.) ve MS spektrumundaki başlıca iyonları (m/z) (10 µg/mL)

Analiz sayısı	Zolpidem (dk.)	Clozapine (dk.)
1. tekrar	9,676	10,417
2. tekrar	9,675	10,416
3. tekrar	9,675	10,416
4. tekrar	9,685	10,416
5. tekrar	9,675	10,416
6. tekrar	9,675	10,416
<i>Ortalama rt</i>	9,677	10,416
<i>Standart sapma</i>	0,004	0,0004
<i>% RSD</i>	0,0416	0,0039
<i>İyonları (m/z)</i>	219, 235, 307	243, 256, 326

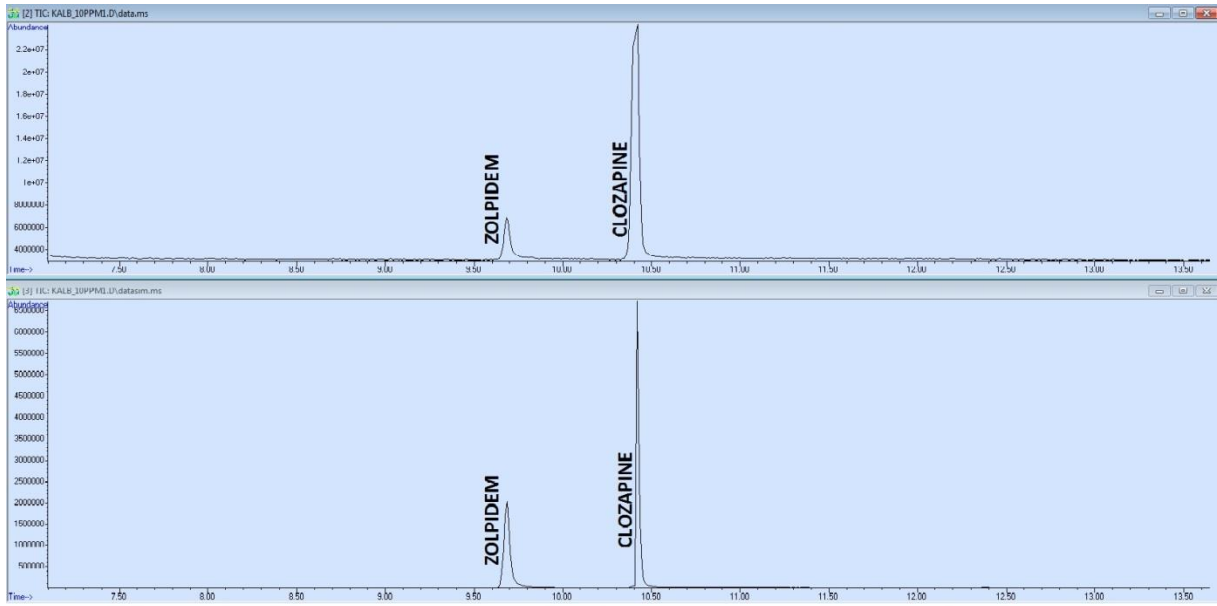
10 ve 25 µg/mL konsantrasyonlardaki çözeltilerin analizinden elde edilen kromatogramlar ve kütle spektrumları Şekil 21-24'te verilmiştir. Tüm kromatogram şekillerinde üstte görülen kromatogram GC-MS sisteminde yapılan SCAN programının verisini, altta görülen kromatogram ise SIM yönteminin verisini göstermektedir.



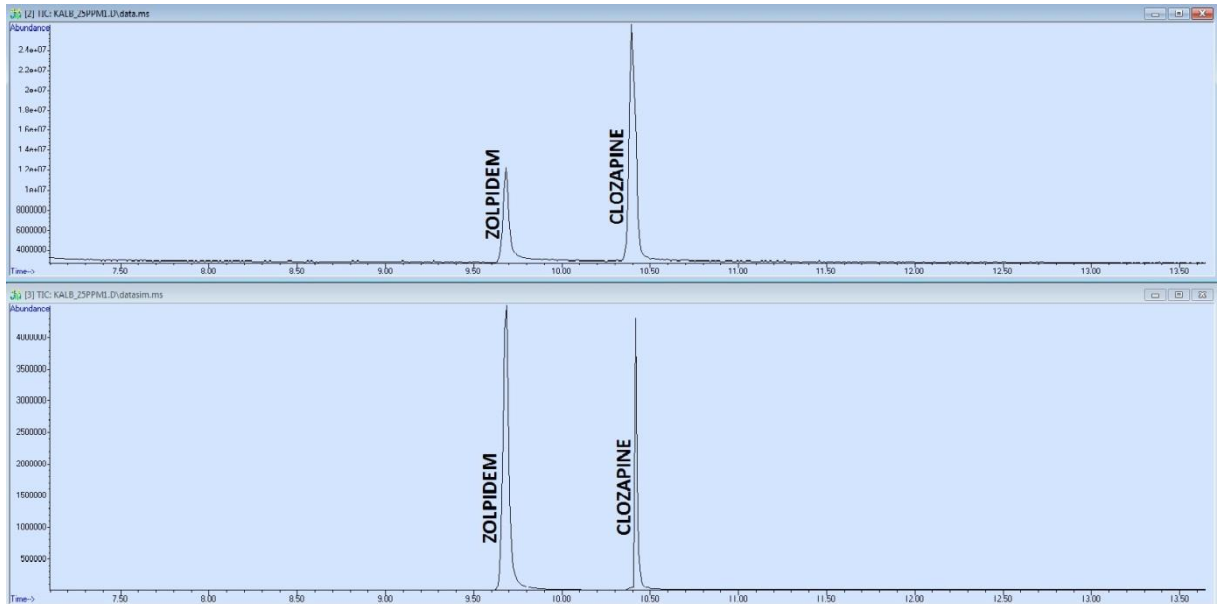
Şekil 21. Zolpidem etken maddesinin kütle spektrumu



Şekil 22. Clozapine (IS)'nin kütle spektrumu

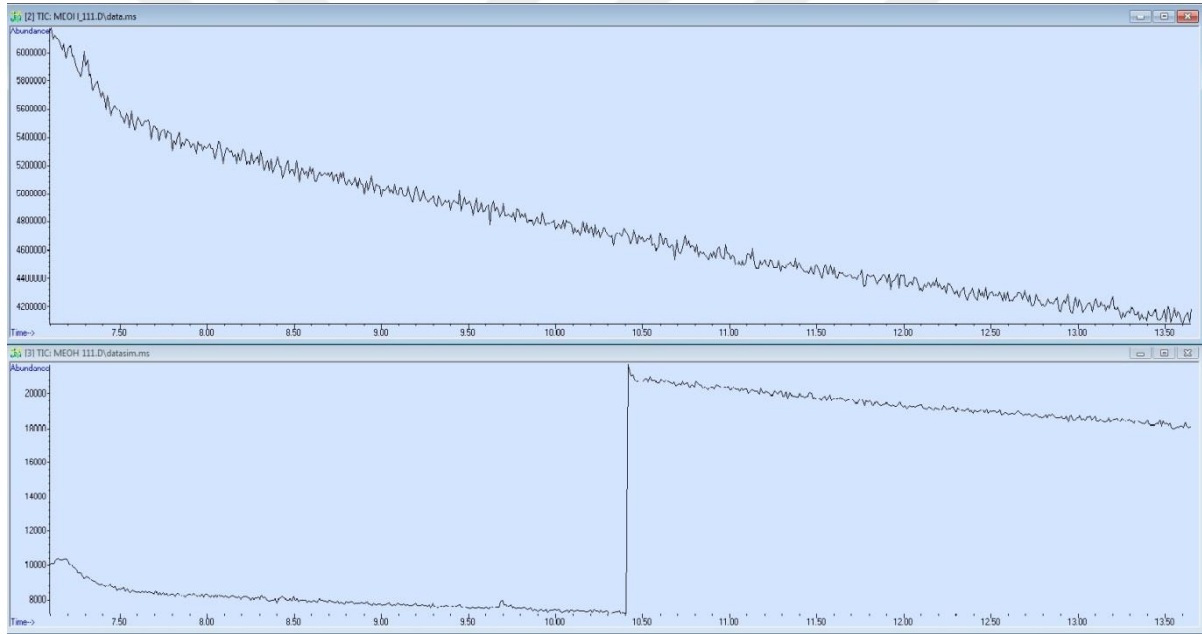


Şekil 23. 10 µg/mL zolpidem çözeltisinin tarama ve SIM yöntemi kromatogramları

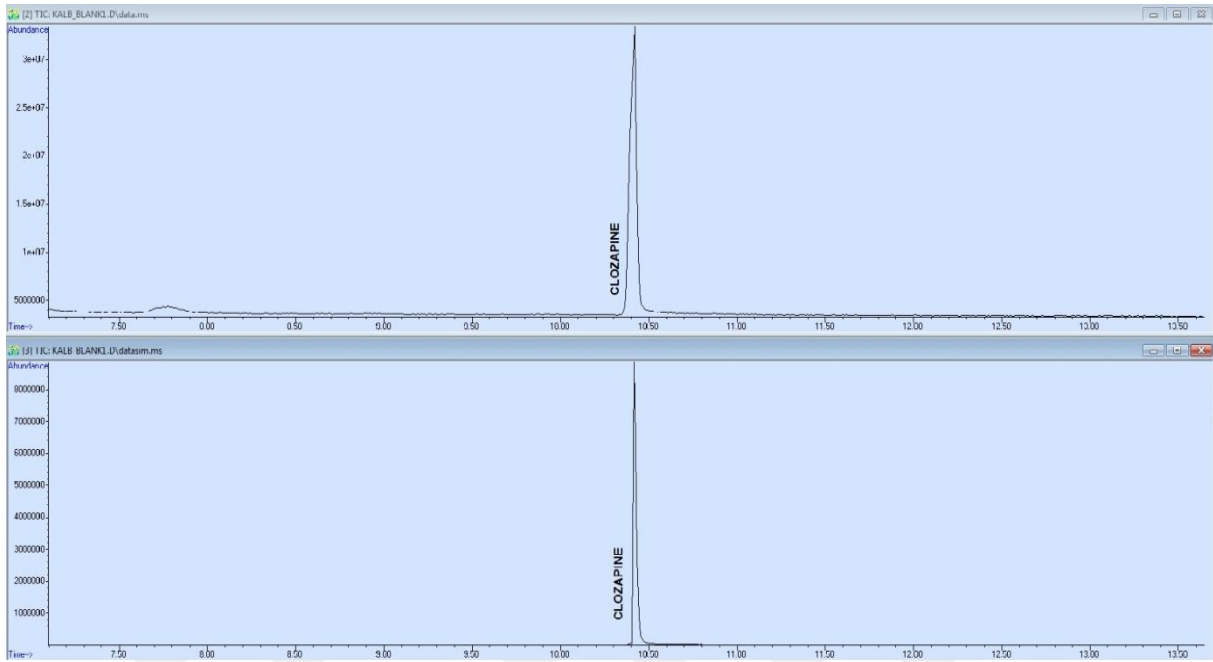


Şekil 24. 25 µg/mL zolpidem çözeltisinin tarama ve SIM yöntemi kromatogramları

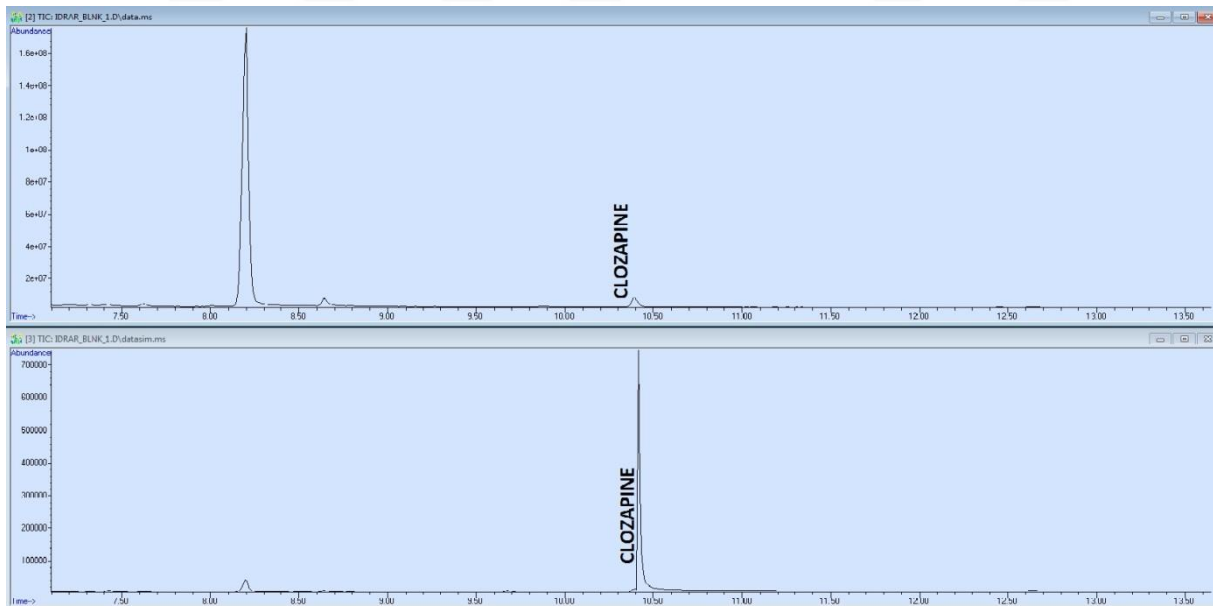
Yapılan seçicilik çalışmalarında Zolpidem ve IS'nin tespit edildiği alıkonma zamanlarında herhangi bir girişim gözlenmemiş olup, MeOH kromatogramı Şekil 25'te, sadece IS içeren MeOH kromatogramı Şekil 26'da, sadece IS eklenmiş olan boş idrar örneğine ait kromatogramı Şekil 27'teki gibidir. Bu sonuçlara göre organik çözücülerden ve idrar matriksinden herhangi bir girişim olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca tüm miktar tayini belirleme işlemleri SIM moduna göre yapılan çalışma sonuçlarına göre hesaplanmıştır.



Şekil 25. Boş olarak okutulan çözücü MeOH'a ait tarama ve SIM yöntemi kromatogramları

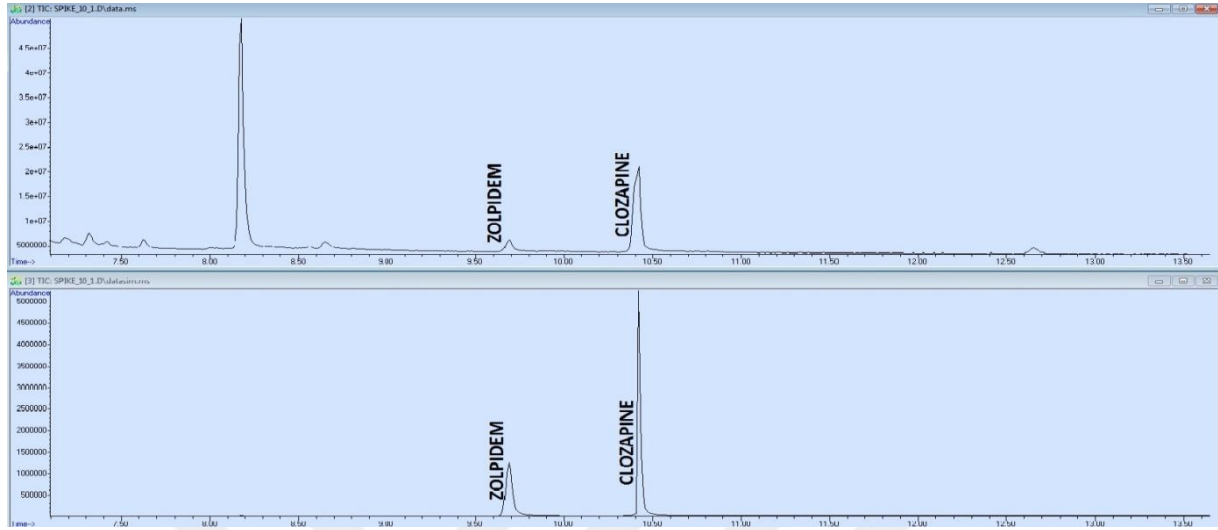


Şekil 26. Sadece IS katılmış MeOH çözücüsüne ait tarama ve SIM yöntemi kromatogramları

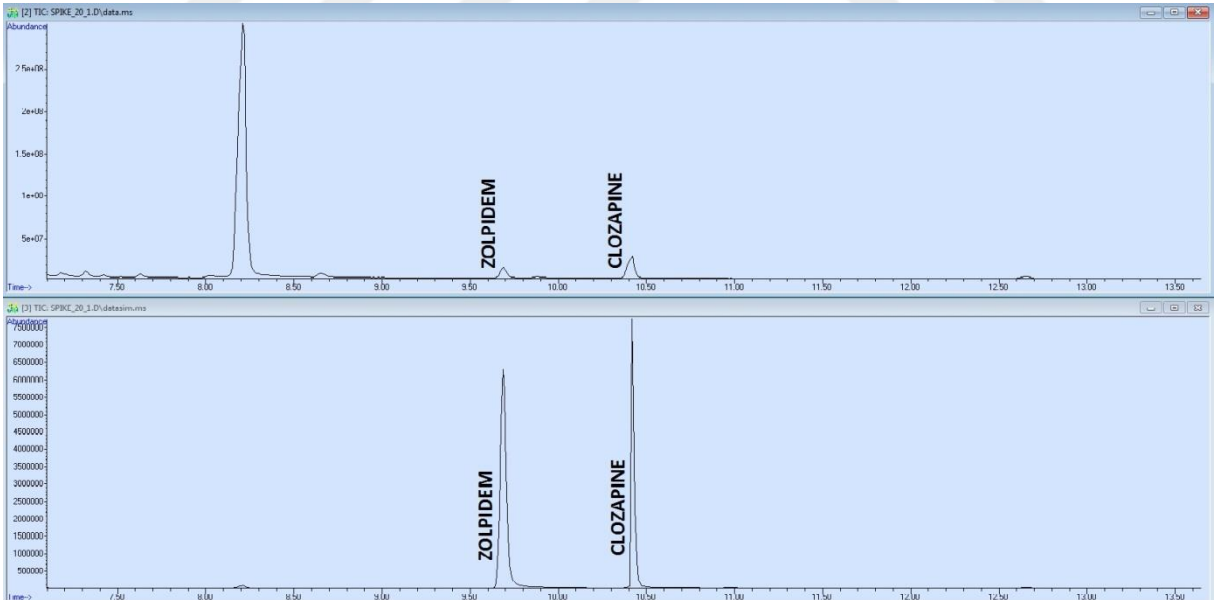


Şekil 27. Sadece IS eklenmiş olan boş idrar örneğine ait tarama ve SIM yöntemi kromatogramları

Boş idrar numunesine 10 µg/mL ve 20 µg/mL zolpidem katılarak elde edilen kromatogramlar Şekil 28 ve Şekil 29’de verilmiştir.



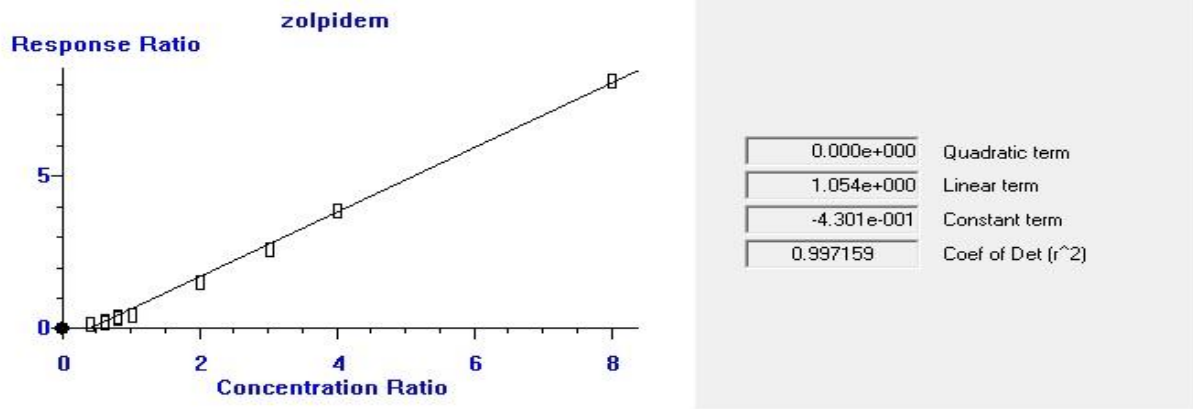
Şekil 28. Boş idrar örneğine 10 µg/mL zolpidem katılarak elde edilen tarama ve SIM yöntemi kromatogramları



Şekil 29. Boş idrar örneğine 20 µg/mL zolpidem katılarak elde edilen tarama ve SIM yöntemi kromatogramları

Zolpideme ait kalibrasyon eğrisi

Zolpidem için kalibrasyon aralığı 10-200 µg/mL olarak belirlendi. Bu aralıktaki korelasyon katsayısı $R^2 = 0.9972$ olarak hesaplandı. Kalibrasyon eğrisi Şekil 30'da verilmiştir.



Şekil 30. Zolpidemin kalibrasyon eğrisi.

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

▪ **LOD, LOQ sonuçları:**

LOD ve LOQ çalışması için hazırlanan 10 adet boş idrar numunesi ile yapılan analizden elde edilen ortalama, standart sapma ve %RSD değerleri Tablo 8’de gösterildiği gibidir.

Tablo 8. 10 adet boş idrar örneğinin bulunan miktarı ($\mu\text{g/mL}$), standart sapma ve %RSD değerleri

Boş idrar analizi (n=10)	Bulunan Miktar ($\mu\text{g/mL}$)
1. tekrar	0,26
2. tekrar	0,24
3. tekrar	0,24
4. tekrar	0,26
5. tekrar	0,25
6. tekrar	0,25
7. tekrar	0,26
8. tekrar	0,23
9. tekrar	0,25
10. tekrar	0,25
<i>Ortalama</i>	0,25
<i>Standart sapma</i>	0,0099
<i>%RSD</i>	3,99

LOD ve LOQ hesaplamaları gereç ve yöntemde belirtilen formüller ile yapıldı. Zolpidem için LOD 0.28 $\mu\text{g/mL}$, LOQ 0.35 $\mu\text{g/mL}$ bulundu.

▪ **Geri kazanım ve tekrar edilebilirlik sonuçları:**

Geri kazanım hesaplamaları yapmak için kalibrasyon çözeltilerinden düşük, orta ve yüksek olmak üzere üç farklı konsantrasyon noktası seçildi (zolpidem için 15, 20, 50 $\mu\text{g/mL}$). % Geri kazanım Tablo 9, Tablo 10 ve Tablo 11’de gösterildiği gibidir.

Tekrarlanabilirlik çalışması için, 3 ayrı konsantrasyon için 6 tekrarlı olacak şekilde analizi yapılan idrar örneklerinden elde edilen sonuçların ortalama, standart sapma ve bağıl standart sapma değerleri Tablo 12’de gösterildiği gibidir.

Tablo 9. 15 µg/mL zolpidem içeren numunenin geri kazanım tablosu

15 µg/mL 'lik numune (n=4)	Teorik miktar (µg/mL)	Ölçülen sonuç (µg/mL)	% GK
1. tekrar	15	12,84	85,60
2. tekrar	15	16,15	107,67
3. tekrar	15	12,30	82,00
4. tekrar	15	13,36	89,07
5. tekrar	15	15,11	100,73
6. tekrar	15	14,39	95,93
Ortalama %GK			93,50
Standart Sapma			9,73
%RSD			10,41

Tablo 10. 20 µg/mL zolpidem içeren numunenin geri kazanım tablosu

20 µg/mL'lik numune (n=6)	Teorik miktar (µg/mL)	Ölçülen sonuç (µg/mL)	% GK
1. tekrar	20	17,56	87,8
2. tekrar	20	18,55	92,75
3. tekrar	20	18,11	90,55
4. tekrar	20	16,56	82,8
5. tekrar	20	20,66	103,3
6. tekrar	20	20,64	103,2
Ortalama %GK			93,4
Standart Sapma			8,32
%RSD			8,91

Tablo 11. 50 µg/mL zolpidem içeren numunenin geri kazanım tablosu

50 µg/mL'lik numune (n=6)	Teorik miktar (µg/mL)	Ölçülen sonuç (µg/mL)	% GK
1. tekrar	50	39,83	79,66
2. tekrar	50	46,9	93,8
3. tekrar	50	44,75	89,5
4. tekrar	50	53,32	106,64
5. tekrar	50	51,95	103,90
6. tekrar	50	46,49	92,98
Ortalama %GK			94,41
Standart Sapma			9,84
%RSD			10,42

Tablo 12. Tekrarlanabilirlik çalışması sonuç tablosu

Numune ($\mu\text{g/mL}$)	Ortalama Sonuç	Standart Sapma	%RSD
15 $\mu\text{g/mL}$ (n=6)	14,03	1,46	10,41
20 $\mu\text{g/mL}$ (n=6)	18,68	1,66	8,91
50 $\mu\text{g/mL}$ (n=6)	47,21	4,92	10,42

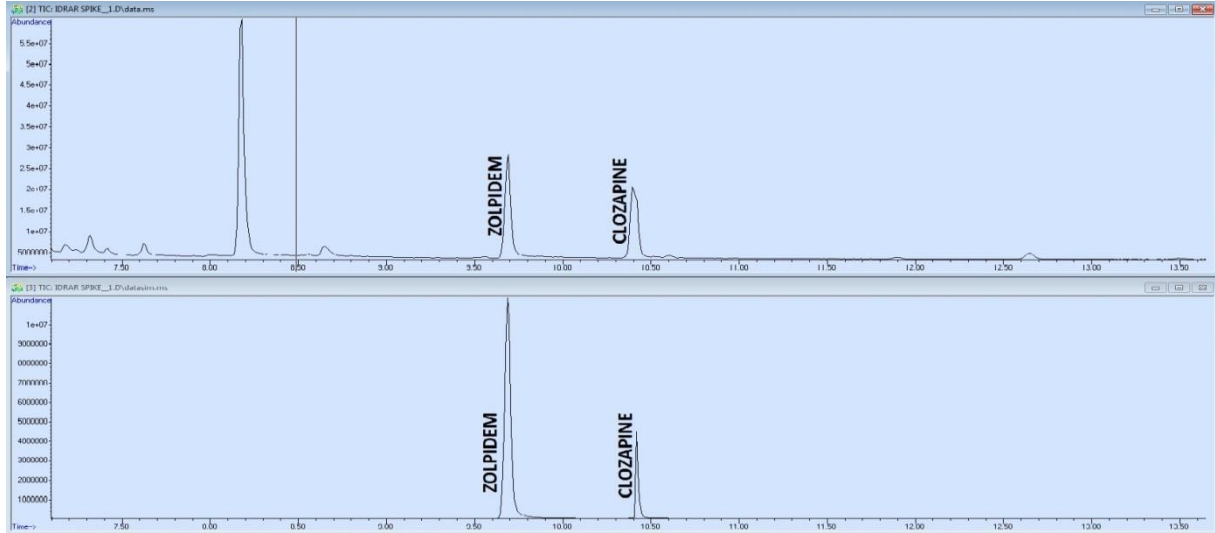
▪ **Stabilite sonuçları:**

Stabilite hesaplaması için 50 $\mu\text{g/mL}$ 'lik 6 adet idrar numunesi hazırlandı ve 7 gün aradan sonra aynı numune GC-MS sisteminde yeniden analiz edildi. Yapılan çalışmaların ortalamaları ve 7 gün arasındaki yüzde değişim Tablo 13'te gösterildiği gibidir.

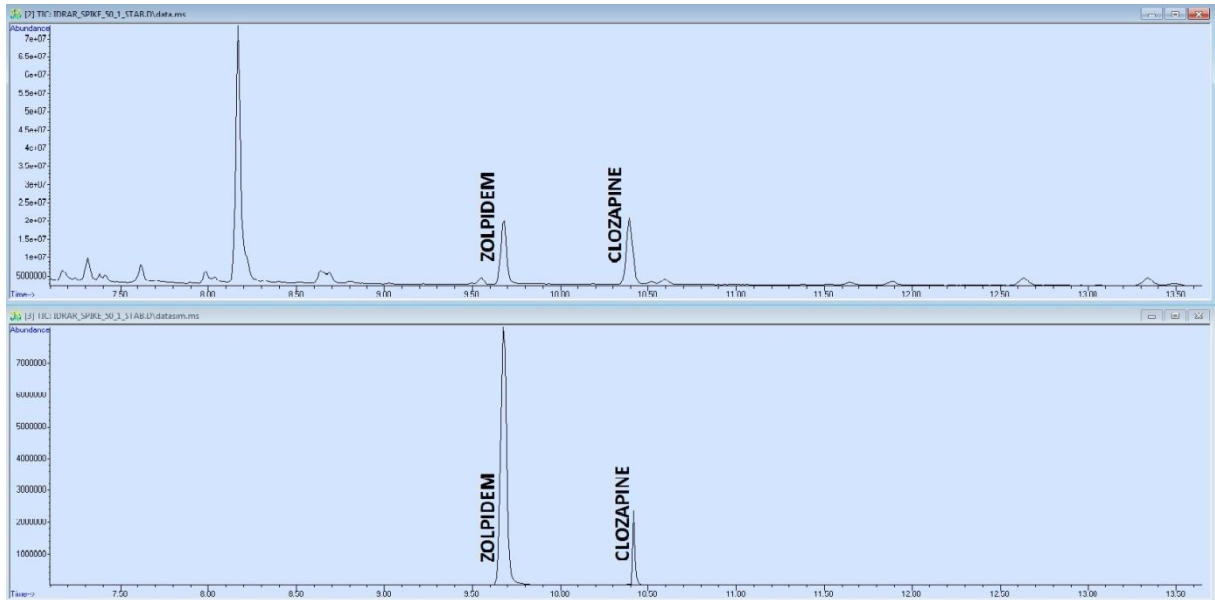
Tablo 13. 50 $\mu\text{g/mL}$ zolpidem içeren numunenin stabilite tablosu

	Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)
1. çalışma (ort)	44,75
2. çalışma (ort)	46,49
%Değişim	0,017

Stabilite için hazırlanan idrar numunesinin (50 µg/mL zolpidem konsantrasyonunda) 7 gün arayla analiz edilen iki enjeksiyonu Şekil 31 ve Şekil 32’de verilmiştir.



Şekil 31. Stabilite için hazırlanan idrar numunesinin (50 µg/mL) ilk çalışmasına ait tarama ve SIM yöntemi kromatogramları



Şekil 32. Stabilite için hazırlanan idrar numunesinin (50 µg/mL) ikinci çalışmasına ait tarama ve SIM yöntemi kromatogramları

5. TARTIŞMA

Zolpidem, imidazopridin türevi olup piyasada 5 ve 10 mg'lık dozlarda tartarat tuzu olarak reçeteli ilaç halinde bulunur (1). Vücuda alındıktan sonra iki saat içinde %70'e kadar metabolize olması ve benzodiazepinlere göre ertesi gün etkilerinin minimum seviyede olması uykusuzluk tedavisinde tercih edilmesinin nedenlerindendir (4).

Ülkemizde henüz zolpidem içerikli ilaçlar üretilmemesine karşılık, 17 Ocak 2007 tarihli, 26406 sayılı resmi gazetede yayınlanan Dış Ticarete Standardizasyon Tebliği, Tebliğ No: 2007/20'de Ek I'de özel izin alınması gereken maddeler sınıfına dahil edilmiştir (8).

1993'te, asepromazin ile bağlantılı zolpidem içeren ilk ölüm olgusu bildirilmiştir. Her iki ilacın da karşılıklı toksik etkilerinin güçlendiği ve ölüme sebebiyet verdiği tayin edilmiştir (34). Bu olgudan sonra zolpidemin adli bilimler açısından önemi fark edilmiş olup, zolpidem üzerine çalışmalara yoğunlaşmıştır.

Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi hastanesinin acil servisine bilinç bozukluğu ve kasılma şikayeti ile gelen İngiliz vatandaşı hastanın, depresyon tedavisi için antidepresan ve günde 2 doz halinde 10 mg'lık zolpidem içerikli ilaç kullandığı, bir süre sonra antidepresanı kendi kendine kesmiş olup zolpidem kullanımını günde 8 tablete çıkardığı bilgisi eşinden alınmıştır. Zolpidemin sabah dozunu aldıktan sonra akşam dozunu almadan nöbet geçirdiği belirlenmiştir. Tedavi sırasında da bir nöbet daha geçiren hastanın durumu diazepam ile kontrol altına alınmıştır. Yapılan tetkikler sonrasında zolpidem kullanımına bağlı yoksunluk sendromu nedeniyle nöbet geçirdiği sonucuna varılmıştır. Olgu 3 yıldır günde 80 mg'lık zolpidem kullanıyor olup akşam dozunu geciktirdiği için yoksunluk sendromu nedeniyle nöbet geçirmiştir (20). Zolpidemin teröpatik dozlarda tolerans geliştirmedği bilinse de, benzodiazepin benzeri olmasından dolayı bağımlılık potansiyeli yüksektir (35,36).

1994'te, 344 akut zolpidem zehirlenmesi vakasının incelendiği çalışmada, ölüm vakalarının toplam vakaların % 6'sını oluşturduğu; fakat zolpidem ile doğrudan ilişkili olmadıkları görülmüştür. Alkol ve/veya diğer psikotropik ilaçları tüketen ve vakaların yarısını oluşturan bireylerde tayin edilen zolpidem miktarının 10 ila 1400 mg arasında değiştiği saptanmıştır. Zehirlenme tedavisi ise gastrik lavaj ile yapılmıştır (26).

Yapılan çeşitli çalışmalarda araba kullanımı sırasında zolpidemin bazı yan etkilerinin olabileceği kanıtlanmıştır. Coleman ve ark. 2004 yılında 54 yaşında bir erkeğin kuralızsızca araba kullandığı bir olguda yaptıkları çalışmada, sürücünün; camsı gözlere, sert konuşmaya, yavaş hareketlere ve son derece zayıf koordinasyona sahip olduğunu gözlemlemişlerdir. Nefes alkol testinin negatif olduğu görülmüştür. Kandaki toksikolojik analiz sonucunda; zolpidem (100 ng/mL), fluoksetin (25 ng/mL), norfluoksetin (90 ng/mL) ve hidrokodon (8.8 ng/mL) olduğu tespit edilmiştir (28). 2002'de Baselt yaptığı olgu çalışmasında; direksiyon başında ataksi, kafa karışıklığı ve uyku hali sergileyen; sabah işe doğru yola çıkmadan önce yanlışlıkla 10 mg zolpidem alan bir kadının kanında yaptığı analiz sonucunda, kanda bulunan zolpidem miktarının 0.119 mg/L olduğunu bildirmiştir (29). 1997'de Goodall tarafından; sarhoşken araç kullandıkları tayin edilen 15 olgunun incelenmesi sonucu, 4olguda, zolpidem bulunan tek ilaç olmuştur ve kan konsantrasyonu 0.11-0.54 mg/L aralığında tespit edilmiştir (30).

Zolpidem, adli bilimlerde sıkça karşılaşılan ilaç ile kolaylaştırılmış cinsel saldırılarda kullanılan ilaç etken maddelerindendir. 2004 yılında, kolaylaştırılmış iki cinsel saldırı vakası Villian ve ark. tarafından incelenmiştir. İlk vakada; mide rahatsızlığı şikayeti ile hastaneye başvuran genç bir kadın, bir erkek tarafından kahve ikram edildikten sonra bilinçsiz halde uyuyakalıp, uyandıktan sonra cinsel tacize uğradığını fark etmiştir. Saldırıdan 15 gün sonra toksikolojik analiz için toplanan saç örneğinin 2 cm'lik kısmı LC/MS/MS ile test edilip 4.4 pg/mg zolpidem içerdiği tayin edilmiştir. İkinci vakada; bir içkinin ardından arkadaşı

tarafından saldırıya uğrayan 37 yaşında bir kadından, saldırıdan 9 saat sonra alınan kan örneğinin incelenmesi sonucunda 390 ng/mL zolpidem içeriği bulunmuştur (32). 2003 yılında; 12 yaşında bir kız çocuğu, bakıcısının erkek arkadaşı tarafından defalarca cinsel saldırıya uğramıştır. Kızın saldırılara dair bir hatırası olmamasına rağmen, her saldırı sonrası şiddetli zihinsel karışıklık olduğunu belirtmiştir. Olay yeri inceleme sonrasında bakıcının evinde boş zolpidem kutuları bulununca iddia edilen son saldırıdan yaklaşık 2 hafta sonra toksikolojik analiz için saç toplanmış ve 6.7 ng/mg konsantrasyonda zolpidem varlığı tayin edilmiştir (33).

Zolpidem; kasıtlı ya da kasıtsız zehirlenmeler sebebiyle suç unsuru olarak değerlendirilebilmektedir. 1996'da; 68 yaşında bir kadının en az 30 Ambien tableti alması sonucu evinde ölü bulunması üzerine yapılan postmortem analizler sonucunda; kanda 4.1 mg/L zolpidem, 19.3 mg/L meprobamat ve 2.3 mg/L karisoprodol varlığı gözlenmiştir (1). 1999 yılında Keller ve ark., bilinmeyen miktarda zolpidem aldığı belirtilen kasıtlı bir zehirlenme vakasında, postmortem yapılan çalışmada; kalp kanında 0.75 mg/L, femoral kanda 0.52 mg/L ve idrarda 1.32 mg/L zolpidem varlığını tespit etmişlerdir (5).

Zolpidem etken maddesinin analizi ile ilgili yapılan analitik çalışmalara bakılacak olduğunda, Shi Y ve ark. Tarafından 2012 yılında UPLC/MS/MS ile bir validasyon çalışması sonucunda, zolpidem için doğrusal aralık 0.1–300 ng/mL olup korelasyon katsayısı ≥ 0.9995 bulunmuştur. İdrar numunelerinde yapılan çalışmalar sonucunda, LOD 0.05 ng/mL, LOQ 0.1 ng/mL olarak belirlenmiştir. Yapılan çalışmada geri kazanım aralığının %70-98.3 arasında olduğu, gün içi ve 1 gün sonra yapılan analizler sonucunda miktar tayini değişim oranının %15 olduğu saptanmıştır (71).

1995'te GC-NPD ile yapılan bir validasyon çalışmasında 50, 100 ve 200 ng/mL konsantrasyonlarında gün içi yapılan 10 adet tekrar sonucu %RSD 50 ng/ml için 7.5, 100

ng/mL için 4.2, 200 ng/mL için 2.4 olarak saptanmıştır. Zolpidem için doğrusal aralık 1-400 ng/mL olarak belirlenmiştir. Geri kazanım oranının ise %80-%110 arasında olduğu bildirilmiştir (72). 2001 yılında sürüş bozukluğu nedeniyle tutuklanan 29 kişiden alınan kan örneklerinde yapılan çalışmalarda; tespit edilen zolpidem konsantrasyonları 0.05-1.4 mg/L arasında bulunmuştur. Tespit edilen tek maddenin zolpidem olduğu 5 vakada ise kan konsantrasyonu 0.08-1.40 mg/L olarak belirlenmiştir (73). 1997 yılında Lichtenwalner ve ark. tarafından GC-MS sisteminde yapılan postmortem olgunun incelendiği bir çalışmada; toksikolojik analizler sonucunda zolpidem için kan konsantrasyonu 7.9 µg/mL, idrar konsantrasyonu 4.1 µg/mL ve gastrik içerik konsantrasyonu 7 mg (emilmemiş) bulunmuştur (2). 1995 yılında çoklu ilaç intoksikasyonu sonucu ölümle sonuçlanan bir olguda yapılan çalışmada; kalp kanında 2.91 µg/mL, periferik kanda 1.4 µg/mL, idrarda 2.13 µg/mL, karaciğerde 4.74 µg/g ve mide içeriğinde 172 mg zolpidem tespit edilmiştir (7).

Zolpidemin gıda ve içeceklere katılarak madde etkisi altında işlenen suçlar kapsamında kullanımına dair çalışmalara bakıldığında (74), 2017 yılında yapılan bir çalışmada zolpidemin çeşitli içeceklerdeki çözünürlüğü LC-MS/MS sisteminde incelenmiştir. 10 mg'lık 2 adet Stilnoct tableti ezilerek 250 mL saf su, maden suyu ve elma şarabına ayrı ayrı eklenmiş; 2, 5, 15 ve 30. dakikalarda analiz edilmiştir. 2. dakikada; saf suda 68 ± 2.8 µg/mL, maden suyunda 80 ± 1.9 µg/mL, elma şarabında 74 ± 1.6 µg/mL zolpidem konsantrasyonu bulunmuştur. 5. dakikada; saf suda 68 ± 3.3 µg/mL, maden suyunda 82 ± 2.8 µg/mL, elma şarabında 76 ± 2.0 µg/mL zolpidem konsantrasyonu tespit edilmiştir. 15. dakikada; saf suda 72 ± 2.5 µg/mL, maden suyunda 74 ± 3.9 µg/mL, elma şarabında 85 ± 2.8 µg/mL zolpidem konsantrasyonu bulunmuştur. 30. dakikada tespit edilen zolpidem konsantrasyonları saf su için 71 ± 2.5 µg/mL, maden suyu için 76 ± 0.51 µg/mL, elma şarabı için 84 ± 0.66 'dir. Ayrıca; 10 mg'lık 2 adet bütün tablet, 15 adet ezilmiş tablet ve 15 adet bütün tabletler üzerinde de aynı analizler yapılmıştır (3). Sonuçlardan da görüleceği gibi geliştirdiğimiz bu analiz yöntemi sayesinde,

zolpidemin yiyecek ve içeceklere katılması durumunda kolaylıkla tespit edilebileceği anlaşılmaktadır.

Yukarıda bahsi geçen çalışmalarda zolpidem etken maddesi farklı analitik teknikler kullanılarak farklı matrislerde analiz edilmiştir. Her analitik tekniğin farklı matrislere göre değişkenlik gösterebilen tayin limitleri ve performans parametreleri bulunmaktadır. Bizim çalışmamızda ise GC-MS sisteminde, kolay ve hızlı çekitleme aşaması ile bir analiz yöntemi geliştirilmiştir.

Çalışmamızdan elde edilen doğrusallık sonuçlarına göre; zolpidemin doğrusal aralığı 10-200 µg/mL olarak belirlendi. Bu aralıktaki korelasyon katsayısı $R^2 = 0.9972$ bulundu. Elde edilen LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.28 µg/mL ve 0.35 µg/mL'dir. İdrarda geri kazanım yüzdesi 15 µg/mL'lik konsantrasyonda 93.5 ± 9.73 , 20 µg/mL'lik konsantrasyonda 93.40 ± 8.32 , 50 µg/mL'lik konsantrasyonda 94.41 ± 9.84 bulundu. Tekrarlanabilirlik için 3 ayrı konsantrasyonda çalışılan geri kazanım numunelerinden; 15 µg/mL konsantrasyonundaki 6 adet örneğin ortalaması 14.03 ± 1.46 µg/mL, bağıl standart sapma değeri 10.41, 20 µg/mL konsantrasyonundaki 6 adet örneğin ortalaması 18.68 ± 1.66 µg/mL, bağıl standart sapma değeri 8.91, 50 µg/mL konsantrasyonundaki 6 adet örneğin ortalaması 47.21 ± 4.92 µg/mL, bağıl standart sapma değeri 10.42 olarak tespit edildi. Stabilitate çalışması için 7 gün ara ile analiz edilen örneklerdeki değişim 0.017 bulundu. 1 'in altında bulunan bu değişim oranı yöntemin stabilitesini kanıtlamış oldu, ayrıca oda sıcaklığında 1 hafta boyunca bekletilen numunedeki değişim oranının oldukça düşük olması yöntemin sağlamlığının da bir kanıtıdır.

Çalışmamızdaki geri kazanım oranlarının diğer çalışmalar ile karşılaştırıldığında benzer veya daha yüksek verimli oldukları belirlendi (5,71,72). Çalışmamızda valide edilen GC-MS yönteminin doğrusal aralığının, diğer analitik sistemlerde ve farklı dedektörlerle yapılan çalışmalar kadar hassas olmadığı gözlemlense de, gerek intoksikasyon vakalarını gerekse

yiyecek-içeceklere katılan madde konsantrasyonlarını tayin edebilecek bir yöntem olduėu dūřunūlmektedir. Geliřtirilen yöntemde numunenin GC-MS sistemine 5:1 oranında bōlūnerek (split) tatbik edilmesi ve numune miktarının 1 mL olduėu dūřunūldūėūnde, gerekli olduėunda split oranının dūřūrūlmesi ve numune hacminin artırılması ile zolpidem konsantrasyonunun tayin edilebilir sınırlara ulařması mōmkūndūr. Bu çalıřmada kullanılan çekitleme yōntemi olan sıvı-sıvı çekitleme yōntemi yōksek geri kazanım verimine sahip, kesinliėi ve tekrar edilebilirliėi yōksek bir yöntem olarak bulunmuřtur. Ucuz, hızlı ve gūvenilir bir yöntem olan bu çekitleme yōntemi hem kan, idrar gibi klinik ve adli toksikolojiyi kapsayan biyolojik matriksleri hem de yiyecek ve içeceklerden zolpidem tayin edilmesini kapsayan kriminalistik alanına fayda saėlayacak bir yōntemdir.

6.SONUÇ

Bu çalışmada, adli bilimler açısından önemi olan ve güncelliği dünya çapında artan zolpidem etken maddesi için, GC-MS sisteminde, bir yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda, zaman alıcı, karmaşık ve yüksek maliyetli örnek hazırlama basamakları olmadan, tekrarlanabilir, kesin, yüksek geri kazanım verimine sahip ve güvenilir aralıklarda sonuç veren bir yöntem valide edilmiş olup; geliştirilen bu yöntem idrara maddenin katılması sureti ile test edilmiştir.

Medikal kullanımı ile beraber suiistimali de artış gösteren zolpidem; cinsel suçları kolaylaştırması, kasıtlı ya da kasıtsız zehirlenmelere sebep olması, benzodiazepinlere göre daha az yan etkilerinin olması, günlük işleri (araba-araç kullanmak gibi) etkileyebilecek motor becerilere etki etmesi gibi sebepler ile adli bilimler açısından önemli hale gelmiştir. Zolpidemin tek başına kullanımı (birkaç örnek dışında) ölüme sebep olmamış olsa da; tek başına yarattığı etkilerinin ve alkol ya da diğer maddeler ile beraber kullanıldığındaki etkilerinin daha ayrıntılı araştırılması oldukça önemlidir. Ülkemizde bu konuda çok fazla çalışma olmadığından, bu çalışmanın literatüre katkısının önemli olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışma ile; yukarıda adli bilimler alanındaki önemi belirtilen zolpidem etken maddesinin antemortem, postmortem zehirlenmelerde ve içecek-yiyeceklerden tayin edilme çalışmalarında güvenle kullanılacak, ucuz, hızlı ve güvenilir bir yöntem kazandırılmıştır. İleriki çalışmalar ile daha düşük tayin limitlerine ulaşabilecek, daha hassas yöntemlerin geliştirilmesi hedeflenmektedir.

KAYNAKLAR

1. Winek C, Wahba W, Janssen J, Rozin L, Rafizadeh V. Acute overdose of zolpidem. *Forensic Science International* 1996; 78:165-168.
2. Lichtenwalner M, Tully R. A fatality involving zolpidem. *Journal of Analytical Toxicology* 1997 Kasım; 21(7):567-569. doi: 10.1093/jat/21.7.567.
3. Heide G, Hjemeland K, Brochmann G, Karinen R, Høiseth G. The appearance, taste, and concentrations of zolpidem dissolved in still water and carbonated beverages. *Journal of Forensic Sciences* 2017 Ağustos; 63(3). doi: 10.1111/1556-4029.13604.
4. De Clerck I, Daenens P. Development of a radioimmunoassay for the determination of zolpidem in biological samples. *The Analyst* 1997 Ekim; 122(10):1119-1124. doi: 0.1039/A702869E.
5. Keller T, Schneider A, Tutsch-Bauer E. GC/MS determination of zolpidem in postmortem specimens in a voluntary intoxication. *Forensic Science International* 1999; 106:103-108.
6. Foda N, Ali S. *Profiles of Drug Substances Excipients and Related Methodology*. 37. baskı Jeddah: Elsevier Inc, 2012.
7. Meeker J, Som C, Macapagal E, Benson P. Zolpidem tissue concentrations in a multiple drug related death involving ambien. *Journal of Analytical Toxicology* 1995 Ekim; 19(6):531-534. doi: 10.1093/jat/19.6.531.
8. Dış Ticarete Standardizasyon Tebliği Tebliğ No: (2007/20). Alıntı:
<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2007/01/20070117-13.htm> (Son Erişim Tarihi: 08.04.2019).

9. Compound Summary, Zolpidem. Alıntı:

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/zolpidem> (Son Erişim Tarihi: 08.04.2019).

10. Lawecka M, Kosmacińska B, Glice M, Korczak K. The influence of storage conditions on the polymorphic stability of zolpidem tartrate hydrate. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 2006 Mart; 83(3):583-585.

11. Black J, Pillar G, Hedner J, Polo O, Berkani O, Mangialaio S ve ark. *Sleep Medicine*. 36. baskı California: Elsevier Inc, 2017.

12. Unden M, Schechter R. Next day effects after nighttime treatment with zolpidem: a review. *European Psychiatry* 1996; 11(1):21-30.

13. Bouchette D, Quick J. Zolpidem. StatPearls Publishing 2019 Ocak. Alıntı:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK442008/> (Son Erişim Tarihi: 08.04.2019).

14. Uzun H, Sinir iletisi biyokimyası [Power Point sunumu]. Alıntı:

194.27.141.99/dosya-depo/ders-notlari/hafize-uzun/Sinir%20iletisi.ppt (Son Erişim Tarihi: 08.04.2019).

15. Evren V, Sinir Sistemi [PDF belgesi]. Alıntı:

http://fizyoloji.ege.edu.tr/images/dosyalar/pdf/vedat_temel_fizyoloji/12_SnrSstmFzyljs.pdf (Son Erişim Tarihi: 08.04.2019).

16. <https://www.yenibiyoloji.com/glia-noroglia-hucrelerinin-ozellikleri-ve-cesitleri-1522/> (Son Erişim Tarihi: 08.04.2019).

17. Sinir Sistemi [PDF belgesi]. Alıntı:

https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/19311/mod_resource/content/1/4.%20S%C4%B0N%C4%B0R%20S%C4%B0STEM%C4%B0.pdf (Son Erişim Tarihi: 08.04.2019).

18.<http://guncelpsikoloji.net/dokuman/noron-nedir-sunumu/> (Son Erişim Tarihi: 08.04.2019).

19.<http://www.biyolojidersim.com/sinir-doku-4-sinapslarda-impuls-aksiyon-potansiyeli-iletimi/> (Son Erişim Tarihi: 08.04.2019).

20. Giray S, Özenli Y, Bilgen İ, Benli S. Zolpidem kullanımı sırasında gelişen jeneralize nöbet: olgu sunumu. Klinik Psikofarmakoloji Bulteni 2008; 18:197-200.

21. Gunja N. The clinical and forensic toxicology of z-drugs. Journal of Medical Toxicology 2013 Haziran; 9(2):155-162.

22. Katzung B. Basic&Clinical Pharmacology. 13. baskı: McGraw Hill Medical Books.

23. Giorgi M, Portela D, Breggi G, Briganti A. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of zolpidem after oral administration of a single dose in dogs. American Journal of Veterinary Research 2012 Ekim; 73(10):1650-1656.

24. Hajak G, Müller WE, Wittchen HU, Pittrow D, Kirch W. Abuse and dependence potential for the non-benzodiazepine hypnotics zolpidem and zopiclone: a review of case reports and epidemiological data. Addiction 1998;10:1371.

25. Piergies A, Sweet J, Johnson M, Roth-Schechter B, Allard A. The effect of co-administration of zolpidem with fluoxetine: pharmacokinetics and pharmacodynamics. Int. Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics 1996;34:178–183.

26. Garnier R, Guerault E, Muzard D, Azoyan P, Chaumet-Riffaud A, Efthymiou M. Acute zolpidem poisoning—analysis of 344 cases. Clinical Toxicology 1994;32:391–404.

27. Mattila MJ, Vanakoski J, Kalska H, Seppala T. Effects of alcohol, zolpidem, and some other sedatives and hypnotics on human performance and memory. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 1998;59:917–923.
28. Coleman DE, Ota K. Hallucinations with zolpidem and fluoxetine in an impaired driver. *Journal of Forensic Sciences* 2004;49:392–393.
29. Baselt RC. Zolpidem. *Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man*, 6. baskı Biomedical Publications, Foster City, 2002.
30. Goodall C. Zolpidem and driving impairment. *ToxTalk* 1997;21:9.
31. Rohrig T, Moore C. Zolpidem: forensic aspects for the toxicologist and pathologist. *Forensic Science Medicine and Pathology* 2005; 1(2): 81-90.
32. Villain M, Cheze M, Tracqui A, Ludes B, Kintz P. Windows of detection of Zolpidem in urine and hair: application to two drug facilitated sexual assaults. *Forensic Science International* 2004;143:157–161.
33. Kintz P, Villain M, Ludes B. Testing for zolpidem in hair. Application to document sexual assault. *Bulletin of the International Association of Forensic Toxicologists* 2003;33.
34. Tracqui A, Kintz P, Mangin P. A fatality involving two unusual compounds zolpidem and acepromazine. *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology* 1993;14:309–312.
35. Ballenger JC. Benzodiazepine receptor agonists and antagonist. In: *Comprehensive Textbook of Psychiatry*. Kaplan HI, Sadock BJ (editors). 7. baskı Baltimore: Williams&Wilkins; 2000:2317-2324.
36. Aragona M. Abuse, dependence and epileptic seizures after withdrawal: review and case report. *Clinical Neuropharmacology* 2000;23: 281-283.

37. 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.

38. T.C. Gıda Tarım Ve Hayvancılık Bakanlığı Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü. Kimyasal ve fiziksel analizlerde metot validasyonu ve verifikasyonu rehberi, 2018 Nisan.

39.Fidancı U. Kromatografi. Alıntı:

http://80.251.40.59/veterinary.ankara.edu.tr/fidanci/Ders_Notlari/Biyoteknoloji/Kromatografi.html.

40. Skoog DA, Holler JF, Crouch SR. Enstrümental Analiz İlkeleri. (2013) 6.baskı (Kılıç E, Yılmaz H, Çev.), Bilim Yayınları, Ankara.

41. Gündüz T. Kromatografi ve Elektroferez. (2015), s.1-111, Gazi Kitabevi, Ankara.

42. Özcimder M, Demirci A. Gaz ve Sıvı Kromatografileri Kromatografi Serisi 1. (2004), s.11-26, Bilim Yayıncılık, Kırıkkale.

43. Gündüz T. İnstrümental Analiz. (1988), s.519-583, Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, Ankara.

44.Baydar Y. Aletli (Enstrümental) Analiz [PDF belgesi]. Alıntı: <https://slideplayer.biz.tr/slide/2719231/>.

45. <http://www.namrata.co/chromatography-2/thin-layer-chromatography/> (Son Erişim Tarihi: 08.04.2019).

46.<https://www.sem.com.tr/analitik-cihaz-sistemleri/kromatografi-sistemleri/likit-kromatografi/> (Son Erişim Tarihi: 08.04.2019).

47. <http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720000604en.pdf> (Son Erişim Tarihi: 08.04.2019).
48. <https://www.analyticaltoxicology.com/en/high-performance-liquid-chromatography-hplc/> (Son Erişim Tarihi: 08.04.2019).
49. International Union of Pure and Applied Chemistry-Comission on Analytical Nomenclature. Nomenclature for Chromatography-IUPAC Recommendations 1993. Pure & Appl. Chem. 1993; 65(4): 819-872.
50. Beşergil B. Gaz - sıvı kromatografisi [Blog yazısı]. Alıntı: http://bilsenbesergil.blogspot.com/p/blog-page_558.html.
51. McNair HM, Miller JM. Basic Gas Chromatography. New York: Wiley, 1998; 153173.
52. Smith, R.M. . Gas and Liquid Chromatography in Analytical Chemistry. UK 1998.
53. Hites, R. A. Handbook of Instrumental Techniques For Analytical Chemistry 1997.
54. Eiceman, G.A. . Instrumentation of Gas Chromatography, USA:John Wiley & Sons Ltd 2006.
55. Abian, J. The coupling of gas and liquid chromatography with mass spectrometry 1999; 34, 157-168.
56. Jennings, W, Mittlefehldt, E, Strempel, P. Analytical Gas Chromatography, USA, Elsevier Inc 1997.
57. Grob, R.L. Modern Practice of Gas Chromatography. Wiley-Interscience 2004.
58. Scott, R.P.W. Principles and Practice of Chromatography, Library for Science 2003.

59. <https://docplayer.biz.tr/883866-Gaz-kromatografisi-gc-dedektorleri.html> (Son Erişim Tarihi: 08.04.2019).
60. <http://www.skz.de/en/research/technicalfacilities/pruefverfahren1/spektroskopie1/4870.Gas-Chromatography-coupled-with-Mass-Spectrometry-GCMS.html> (Son Erişim Tarihi: 08.04.2019).
61. Drummer O.H. Chromatographic screening of systematic toxicological analysis. *Journal of Chromatography* 1999;733:27-45.
62. Roskar R, Lucin Trdan T. Analytical methods for quantification of drug metabolites in biological samples. Robert Roškar and Tina Trdan Lušin. *Analytical Methods for Quantification of Drug Metabolites in Biological Samples*, Calderon L, editor. *Chromatography - The Most Versatile Method of Chemical Analysis*. InTech, 2012; 79-126.
63. Söylemezoğlu T, Çeçen T. Katı faz ekstraksiyon yöntemi: analitik toksikolojide uygulanması. (2003), s.5-24, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara.
64. United Nations Office on Drug and Crime. Guidelines for the forensic analysis of drugs facilitating sexual assault and other criminal acts. New York, 2011.
65. Durol A, Greenblatt D. Analysis of zolpidem in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection: application to single-dose pharmacokinetic studies. *Journal of Analytical Toxicology* 1997 Eylül;21(5):388-392.
66. Wang Q, Sun L, Lau CE. Determination of zolpidem in serum microsamples by high-performance liquid chromatography and its application to pharmacokinetics in rats *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 1999;734:299–305.

67. Ptacek P, Macek J, Klima J. Rapid and simple method for the determination of zolpidem in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 1997; 694:409–413.
68. Hempel G, Blaschke G. Direct determination of zolpidem and its main metabolites in urine using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 1996;675:131-137.
69. <http://turkish.custom-monoclonalantibody.com/sale-7542754-high-sensitive-zolpidem-urine-drug-test-kit-preliminary-ce-marked.html> (Son Erişim Tarihi: 08.04.2019).
70. R. Forney, Jr. *Methodology for Analytical Toxicology*. I. Sunshine, editör, CRC Press, Cleveland, 1975: 443-46.
71. Shi Y, Xiang P, Shen B, Shen M. A rapid and accurate UPLC/MS/MS method for the simultaneous determination of zolpidem and its main metabolites in biological fluids and its application in a forensic context. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 2012;911:140-146.
72. Stanke F, Jourdil N, Bessard J, Bessard G. Simultaneous determination of zolpidem and zopiclone in human plasma by gas chromatography-nitrogen-phosphorus detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 1996;675:43-51.
73. Logan B, Couper F. Zolpidem and driving impairment. *Journal of Forensic Sciences* 2001;46(1):105-110

74. Anılanmert B, Çavuş F, Narin I, Cengiz S, Sertler Ş, Özdemir A, Açikkol M. Simultaneous analysis method for GHB, ketamine, norketamine, phenobarbital, thiopental, zolpidem, zopiclone and phenytoin in urine, using C18 poroshell column. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences 2016;1022:230-241



EKLER**Ek 1. Etik Kurul Onay Yazısı**

Tarih ve Sayı: 10/11/2017-423633


T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Dekanlığı


Sayı :59491012-604.01.02-
Konu :Yüks. Lis. Öğr. Nurdan
Sandıkçı'nın etik kurul kararı A-
17

ADLİ TIP ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

İlgi : 13.10.2017 tarih, 86669574-302.14.06--383737 sayılı yazı

Enstitünüz Fen Bilimleri öğretim üyesi **Prof.Dr.Münevver AÇIKKOL'un** danışmanlığında **Yüksek Lisans Öğrencisi Nurdan SANDIKÇI'nın** yürütücülüğünde **"Zolpidem'in GC/MS ile Tayini ve Adli Bilimler Açısından Önemi"** başlıklı Yüksek Lisans Tezi hakkında ilgi yazınız ve ekleri **07 Kasım 2017** tarihinde toplanan Fakültemiz Klinik Araştırmalar Etik Kurulunca müzakere edilmiş olup; Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) desteği alınması koşuluyla etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

e-İmzalı
Prof. Dr. Mehmet Faik ÖZÇELİK
Başkan V.

e-İmzalı
Prof. Dr. Feray SAVRUN
Dekan a.
Dekan Yardımcısı

NOT:Yönetmelik gereği Sonuç Raporunun ve Bilimsel Araştırma Projeleri Desteği onay belgesinin Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna iletilmesi gerekmektedir.

EK :
1 dosya elden teslim edilecektir.

Doğrulamak için:<http://194.27.128.66/envision.Sorgula/belgedogrulama.aspx?V=BELMAE500>

Ayrıntılı bilgi için irtibat : Güler SOYDANER Dahili : 22300

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi 34303 Cerrahpaşa/ İSTANBUL
Tel : 0 (212) 414 30 00 21107- 21108 Faks : 0 (212) 632 00 33
e-posta : ctfpersonel@istanbul.edu.tr Elektronik Ağ : www.istanbul.edu.tr



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Nurdan SANDIKÇI KENAN

Doğum Tarihi/ Yeri: 14.03.1990/ İstanbul

e-posta: nurdan.sandikci13@gmail.com

EĞİTİM

- İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü, Fen Bilimleri Yüksek Lisans Programı
2015- Devam Ediyor
- Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 2008-2014

MESLEKİ DENEYİM ve STAJLAR

- World Medicine Pharmaceutical Company
Arge laboratuvarı uzman yardımcısı, Kasım 2014- Kasım 2016
- İstanbul Kriminal Polis Laboratuvarı Müdürlüğü
Biyolojik incelemeler departmanı'nda stajyer, Haziran 2014-Temmuz 2014
- Atlas Özel Ümraniye Anadolu Sağlık Meslek Lisesi
Yönetici Asistanı, Eylül 2012-Şubat 2014
- İshakoğlu Çayeli Devlet Hastanesi
Mikrobiyoloji laboratuvarında stajyer, Temmuz 2013-Ağustos 2013

ALINAN EĞİTİMLER ve SERTİFİKALAR

- World Medicine Pharmaceutical Company
İş sağlığı ve güvenliği sertifikası, Mart 2015
- World Medicine Pharmaceutical Company
HPLC kolon eğitimi, Nisan 2015
- Acıbadem Üniversitesi
Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, Ekim 2016