



İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

ADLİ BİLİMLER ANABİLİM DALI

**İçecek Kalıntılarından Dispersif Sıvı-Sıvı
Mikroekstraksiyon (DLLME) Yöntemi ile Önderiştirilmiş
Alprazolam ve Lorazepam'ın Çoklu Spektroskopik
Teknikler, PCA ve HCA ile Tayini**

Yüksek Lisans Tezi

Büşra Emanetoğlu

Ağustos 2025



İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

ADLİ BİLİMLER ANABİLİM DALI

**İçecek Kalıntılarından Dispersif Sıvı-Sıvı
Mikroekstraksiyon (DLLME) Yöntemi ile Önderiştirilmiş
Alprazolam ve Lorazepam'ın Çoklu Spektroskopik
Teknikler, PCA ve HCA ile Tayini**

Yüksek Lisans Tezi

Büşra Emanetoğlu

Danışman

Prof. Dr. Nuriye Akbay

Ağustos 2025

TEZ JÜRİSİ ONAYI

Büşra Emanetoğlu tarafından hazırlanan "İçecek Kalıntılarından Dispersif Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyon (DLLME) Yöntemi ile Önderiştirilmiş Alprazolam ve Lorazepam'ın Çoklu Spektroskopik Teknikler, PCA ve HCA ile Tayini" başlıklı bu Yüksek Lisans Tezi, Adli Bilimler Anabilim Dalı'nda hazırlanmış ve jürimiz tarafından kabul edilmiştir.

JÜRİ ÜYELERİ

İMZA

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Nuriye Akbay

İstanbul Medeniyet Üniversitesi

Üyeler:

Dr. Öğr. Üyesi Işık Çoban

İstanbul Medeniyet Üniversitesi

Prof. Dr. Yelda Yalçın Gürkan

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi: 21/08/2025

BEYANLAR

Yazım ve Kaynak Gösterme Kılavuzu Beyanı

Danışmanlığında yazılan bu tezin yazım ve kaynak gösterme kılavuzunda belirtilen kurallara uygun olarak yapılandırıldığı ve bu kılavuzun kaynak gösterme standartlarının bu tezde tutarlı olarak uygulandığı tarafımdan incelenerek teyit edilmiştir.

İmza

Prof. Dr. Nuriye Akbay

Etik İlkeler Sadakat Beyanı

Hazırladığım bu tezin tamamen kendi çalışmam olduğunu, akademik ve etik kuralları gözeterek çalıştığımı ve her alıntıya kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

İmza

Büşra Emanetoğlu

ÖZET

İçecek Kalıntılarından Dispersif Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyon (DLLME) Yöntemi ile Önderiştirilmiş Alprazolam ve Lorazepam'ın Çoklu Spektroskopik Teknikler, PCA ve HCA ile Tayini

Emanetoğlu, Büşra

Yüksek Lisans Tezi, Adli Bilimler Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nuriye Akbay

Ağustos 2025

Son yıllarda ilaçların kötüye kullanımına ilişkin adli vakalarda, özellikle cinsel saldırı davalarında benzodiazepin gibi farmasötiklerin tayini kritik önem kazanmıştır. Bu çalışmada, alprazolam (ALP) ve lorazepam (LORA) adlı benzodiazepin türevlerinin farklı içecek matrislerinde basit, hassas ve ayırt edilebilir tayini için bir metodoloji geliştirilmiştir. Analizlerde ultraviyole görünür bölge (UV-Gör) absorpsiyon spektroskopisi, UV türev spektroskopisi ve floresans spektroskopisi kullanılmış, örneklerin analiz öncesi düşük hacimli ortamlarda ön derişimi dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon (DLLME) yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Gerçek yaşam senaryoları göz önünde bulundurularak örnekler sıvı, damlacık ve kuru formda simüle edilmiştir. Sıvı form, içeceklerde arta kalan örnekleri; damlacık form, bardak veya kadeh duvarına tutunmuş kalıntıları; kuru form ise tamamen tüketilmiş veya buharlaşmış örnekleri temsil etmektedir. İlaçların analizinde yaygın olarak tüketilen beyaz şarap, roze şarap, votka, gazoz ve maden suyu kullanılmıştır.

Elde edilen UV-Gör ve türev spektrumları korelasyon analizleriyle değerlendirilmiş; özellikle DLLME ile elde edilen sıvı form örneklerinde ALP için yüksek korelasyon ($r > 0.65$) elde edilirken, LORA için bu değer tüm örneklerde tutarlı ve pozitif çıkmıştır. Korelasyon verilerine dayanarak sıfırıncı ve birinci derece türevlerin ayırım gücü açısından daha etkili olduğu belirlenmiştir. Ayrıca temel bileşenler analizi (PCA) ile yapılan çok değişkenli istatistiksel

değerlendirmeler, DLLME uygulanmış örneklerle ait spektrumlarının içecek spektrumlarından başarıyla ayrılabilirdiğini ortaya koymuştur. Maden suyu örnekleri, tüm spektral düzeylerde en tutarlı sonuçları vermiştir.

Çalışma sonucunda geliştirilen yöntem, düşük örnek hacmiyle adli toksikoloji alanında güvenilir bir ön tarama modeli sunmakta ve benzer farmasötik maddelerin tayini için örnek teşkil etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Alprazolam, Lorazepam, DLLME, UV türev spektroskopisi, PCA

ABSTRACT

Determination of Alprazolam and Lorazepam Preconcentrated by Dispersive Liquid-Liquid Microextraction (DLLME) from Beverage Residues Using Multiple Spectroscopic Techniques, PCA, and HCA

Emanetoğlu, Büşra

Master's Thesis, Department of Forensic Sciences

Supervisor: Prof. Dr. Nuriye Akbay

August 2025

In recent years, the detection of pharmaceuticals such as benzodiazepines has gained critical importance in forensic cases related to drug abuse, particularly in sexual assault investigations. In this study, a methodology was developed for the simple, sensitive, and distinguishable determination of benzodiazepine derivatives alprazolam (ALP) and lorazepam (LORA) in various beverage matrices. Ultraviolet-visible (UV-Vis) absorption spectroscopy, UV derivative spectroscopy, and fluorescence spectroscopy were employed in the analyses, and preconcentration of the samples was achieved through dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) in low-volume environments prior to analysis. Considering real-life scenarios, the samples were simulated in liquid, droplet, and dry forms. The liquid form represented residues left in beverages; the droplet form simulated residues adhering to the walls of glasses or cups; and the dry form represented completely consumed or evaporated samples. Commonly consumed beverages such as white wine, rosé wine, vodka, soda, and mineral water were used for the analysis of the drugs.

The obtained UV-Vis and derivative spectra were evaluated through correlation analyses. Particularly for ALP in liquid form samples extracted via DLLME, a high correlation ($r > 0.65$) was obtained, while for LORA, consistently positive values were observed across all sample types. Based on the correlation data, zero-order and first-order derivatives were found to be more effective in terms of

discriminative power. Furthermore, multivariate statistical evaluations conducted via principal component analysis (PCA) revealed that the spectra of DLLME-treated samples could be successfully distinguished from those of the beverages. Among the tested matrices, mineral water samples yielded the most consistent results across all spectral levels.

As a result, the developed method offers a reliable preliminary screening model for forensic toxicology with low sample volume requirements and serves as a reference for the determination of similar pharmaceutical compounds.

Keywords: Alprazolam, Lorazepam, DLLME, UV derivative spectroscopy, PCA

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın her aşamasında bilgi birikimi, akademik rehberliği ve kıymetli desteğiyle bana ilham veren, bilimsel yaklaşımıyla yolumu aydınlatan çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Nuriye AKBAY'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Deneyisel çalışmalarım süresince her daim anlayışı, sabrı, özverili desteği ile yanımda olan samimiyetiyle süreci benim için daha kolay ve keyifli hâle getiren kıymetli hocam Öğr. Gör. Dr. Elif Koyuncu'ya teşekkür ederim.

Bu sürecin önemli bir parçası olan istatistiksel analizlerin yürütülmesinde sağladığı katkılar ve samimi desteği ile yanımda olan Öğr. Gör. Dr. Pelin GÜZEL hocama teşekkür ederim.

Bu tez, İstanbul Medeniyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi tarafından desteklenen 2024-GAP-Bili-0003 numaralı proje kapsamında yürütülmüştür. Bu desteklerinden ötürü Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan, bana güç veren, sevgisi ve desteğiyle bu süreci atlatmamı kolaylaştıran aileme sonsuz teşekkür ederim. Ayrıca bu yolculukta yanımda olan, moral veren arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Lisans yıllarından bu yana yanımda olan, yedi yıldır hem dostluğunu hem desteğini hiç esirgemeyen, bu sürecin en sabırlı ve en anlayışlı eşlikçisi olan sevgili arkadaşım ve laboratuvar partnerim Fatma Nur Bayar'a, her koşulda yanımda olduğu için gönülden teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

BEYANLAR.....	ii
ÖZET	iii
ÖNSÖZ	vii
İçindekiler	viii
Şekil Dizini	x
Tablo Dizini	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
BÖLÜM I.....	1
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Benzodiazepinler.....	3
2.1.1. Alprazolam.....	4
2.1.2. Lorazepam.....	5
2.2. Dağıtıcı Sıvı Sıvı Mikroekstraksiyon Yöntemi.....	6
2.3. Ultraviyole-Görünür Spektroskopisi.....	7
2.3.1. UV Türev Spektroskopisi	8
2.4. Floresans Emisyon Spektroskopisi	10
2.5. Temel Bileşenler Analizi	10
BÖLÜM II	13
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	13
3.1. Kullanılan Alet ve Cihazlar	13
3.2. Kullanılan Kimyasallar ve Materyaller.....	13
3.3. Örneklerin Hazırlanması	13
3.4. LC-MS/MS Çalışmaları	14
3.5. DLLME.....	15
3.6. Deney Sonuçlarının İstatistiksel İncelemesi	17

4. DENEYSEL SONUÇLAR	19
4.1. LC-MS/MS Sonuçları	19
4.2. UV-Gör Absorpsiyon Spektroskopisi Sonuçları	19
4.2.1. ALP UV-Gör Absorpsiyon Spektroskopisi Sonuçları	19
4.2.2. LORA UV-Gör Absorpsiyon Spektroskopisi Sonuçları	25
4.3. UV Türev Spektroskopisi Sonuçları	30
4.3.1. ALP UV Türev Spektroskopisi Sonuçları	30
4.3.2. LORA UV Türev Spektroskopisi Sonuçları	35
4.4. Floresans Emisyon Spektroskopisi Sonuçları	40
4.4.1. ALP Tablet Floresans Emisyon Spektroskopisi Sonuçları	40
4.4.2. LORA Tablet Floresans Emisyon Spektroskopisi Sonuçları	46
5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ SONUÇLARI	51
5.1. Korelasyon Matrisi Analizi	51
5.1.1. ALP UV- Gör Absorpsiyon Spektroskopisi Analizi	51
5.1.2. LORA UV- Gör Absorpsiyon Spektroskopisi Analizi	52
5.2. Temel Bileşenler Analizi (PCA)	53
BÖLÜM III	58
6. TARTIŞMA	58
7. KAYNAKÇA	61
8. ÖZGEÇMİŞ	64
9. EKLER	65

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. Benzodiazepin yapısı (Jufer-Phipps & Levine, 2020).....	4
Şekil 2. Bir triazolobenzodiazepine türü olan ALP'nin yapısı (Jufer-Phipps & Levine, 2020).	5
Şekil 3. Bir 1,4-benzodiazepin türü olan LORA'nın yapısı (Jufer-Phipps & Levine, 2020).	6
Şekil 4. Sıfırıncı derece (orijinal) spektrumdan türetilmiş farklı türev derecelerine (birinci–dördüncü) ait spektral sinyallerin temsili grafikleri (Redasani vd., 2018).	9
Şekil 5. ALP tabletin beyaz şarap içerisinde (a) sıvı, (b) damlacık ve (c) kuru formuna ait UV-Gör absorpsiyon spektrumları.....	20
Şekil 6. ALP tabletin roze şarap içerisinde hazırlanmış (a) sıvı, (b) damlacık ve (c) kuru formuna ait UV-Gör absorpsiyon spektrumları.	21
Şekil 7. ALP tabletin votka içerisinde (a) sıvı, (b) damlacık ve (c) kuru formuna ait UV-Gör absorpsiyon spektrumları.....	22
Şekil 8. ALP tabletin gazoz içerisinde (a) sıvı, (b) damlacık ve (c) kuru formuna ait UV-Gör absorpsiyon spektrumları.....	23
Şekil 9. ALP tabletin maden suyu içerisinde (a) sıvı, (b) damlacık ve (c) kuru formuna ait UV-Gör absorpsiyon spektrumları.....	24
Şekil 10. LORA tabletin beyaz şarap içerisinde (a) sıvı, (b) damlacık ve (c) kuru formuna ait UV-Gör absorpsiyon spektrumları.....	25
Şekil 11. LORA tabletin roze şarap içerisinde (a) sıvı, (b) damlacık ve (c) kuru formuna ait UV-Gör absorpsiyon spektrumları.....	26
Şekil 12. LORA tabletin votka içerisinde (a) sıvı, (b) damlacık ve (c) kuru formuna ait UV-Gör absorpsiyon spektrumları.....	27
Şekil 13. LORA tabletin gazoz içerisinde (a) sıvı, (b) damlacık ve (c) kuru formuna ait UV-Gör absorpsiyon spektrumları.....	28
Şekil 14. LORA tabletin maden suyu içerisinde (a) sıvı, (b) damlacık ve (c) kuru formuna ait UV-Gör absorpsiyon spektrumları.....	29

Şekil 15. ALP tabletin beyaz şarap içerisinde sıvı, damlacık ve kuru formuna ait (a) birinci derece, (b) ikinci derece, (c) üçüncü derece ve (d) dördüncü derece UV türev spektrumları.	30
Şekil 16. ALP tabletin roze şarap içerisinde hazırlanmış sıvı, damlacık ve kuru formuna ait (a) birinci derece, (b) ikinci derece, (c) üçüncü derece ve (d) dördüncü derece UV türev spektrumları.	31
Şekil 17. ALP tabletin votka içerisinde hazırlanmış sıvı, damlacık ve kuru formuna ait (a) birinci derece, (b) ikinci derece, (c) üçüncü derece ve (d) dördüncü derece UV türev spektrumları.	33
Şekil 18. ALP tabletin gazoz içerisinde sıvı, damlacık ve kuru formuna ait (a) birinci derece, (b) ikinci derece, (c) üçüncü derece ve (d) dördüncü derece UV türev spektrumları.	34
Şekil 19. ALP tabletin maden suyu içerisinde sıvı, damlacık ve kuru formuna ait (a) birinci derece, (b) ikinci derece, (c) üçüncü derece ve (d) dördüncü derece UV türev spektrumları.	35
Şekil 20. LORA tabletin beyaz şarap içerisinde, 16,7 µg/mL ve 50 µg/mL derişimlerinde sıvı, damlacık ve kuru form örneklerine ait (a) birinci derece, (b) ikinci derece, (c) üçüncü derece ve (d) dördüncü derece UV türev spektrumları.	36
Şekil 21. LORA tabletin roze şarap içerisinde, 16,7 µg/mL ve 50 µg/mL derişimlerinde sıvı, damlacık ve kuru form örneklerine ait (a) birinci derece, (b) ikinci derece, (c) üçüncü derece ve (d) dördüncü derece UV türev spektrumları.	37
Şekil 22. LORA tabletin votka içerisinde, 16,7 µg/mL ve 50 µg/mL derişimlerinde sıvı, damlacık ve kuru form örneklerine ait (a) birinci derece, (b) ikinci derece, (c) üçüncü derece ve (d) dördüncü derece UV türev spektrumları.	38
Şekil 23. LORA tabletin gazoz içerisinde, 16,7 µg/mL ve 50 µg/mL derişimlerinde sıvı, damlacık ve kuru form örneklerine ait (a) birinci derece, (b) ikinci derece, (c) üçüncü derece ve (d) dördüncü derece UV türev spektrumları.	39
Şekil 24. LORA tabletin maden suyu içerisinde, 16,7 µg/mL ve 50 µg/mL derişimlerinde sıvı, damlacık ve kuru form örneklerine ait (a) birinci derece, (b) ikinci derece, (c) üçüncü derece ve (d) dördüncü derece UV türev spektrumları.	40
Şekil 25. Beyaz şarap içerisindeki ALP tabletin, 520 nm dalga boyunda uyarılan sıvı, damlacık ve kuru form örneklerine ait (a) sıfırıncı derece, (b) birinci derece, (c) ikinci derece, (d) üçüncü derece ve (e) dördüncü dereceden emisyon türev spektrumları.	41

Şekil 26. Roze Şarap içerisindeki ALP tabletin, 530 nm dalga boyunda uyarılan sıvı, damlacık ve kuru form örneklerine ait (a) sıfırıncı derece, (b) birinci derece, (c) ikinci derece, (d) üçüncü derece ve (e) dördüncü dereceden emisyon türev spektrumları.	42
Şekil 27. Votka içerisindeki ALP tabletin, 520 nm dalga boyunda uyarılan sıvı, damlacık ve kuru form örneklerine ait (a) sıfırıncı derece, (b) birinci derece, (c) ikinci derece, (d) üçüncü derece ve (e) dördüncü dereceden emisyon türev spektrumları.	43
Şekil 28. Gazoz içerisindeki ALP tabletin, 520 nm dalga boyunda uyarılan sıvı, damlacık ve kuru form örneklerine ait (a) sıfırıncı derece, (b) birinci derece, (c) ikinci derece, (d) üçüncü derece ve (e) dördüncü dereceden emisyon türev spektrumları.	44
Şekil 29. Maden suyu içerisindeki ALP tabletin, 520 nm dalga boyunda uyarılan sıvı, damlacık ve kuru form örneklerine ait (a) sıfırıncı derece, (b) birinci derece, (c) ikinci derece, (d) üçüncü derece ve (e) dördüncü dereceden emisyon türev spektrumları.	45
Şekil 30. Beyaz şarap içerisindeki LORA tabletin, 315 nm dalga boyunda uyarılan ve 50 µg/mL ile 16,7 µg/mL derişimlerindeki sıvı, damlacık ve kuru form örneklerine ait (a) sıfırıncı derece, (b) birinci derece, (c) ikinci derece, (d) üçüncü derece ve (e) dördüncü dereceden emisyon türev spektrumları.	46
Şekil 31. Roze şarap içerisindeki LORA tabletin, 315 nm dalga boyunda uyarılan ve 50 µg/mL ile 16,7 µg/mL derişimlerindeki sıvı, damlacık ve kuru form örneklerine ait (a) sıfırıncı derece, (b) birinci derece, (c) ikinci derece, (d) üçüncü derece ve (e) dördüncü dereceden emisyon türev spektrumları.	47
Şekil 32. Votka içerisindeki LORA tabletin, 315 nm dalga boyunda uyarılan ve 50 µg/mL ile 16,7 µg/mL derişimlerindeki sıvı, damlacık ve kuru form örneklerine ait (a) sıfırıncı derece, (b) birinci derece, (c) ikinci derece, (d) üçüncü derece ve (e) dördüncü dereceden emisyon türev spektrumları.....	48
Şekil 33. Gazoz içerisindeki LORA tabletin, 315 nm dalga boyunda uyarılan ve 50 µg/mL ile 16,7 µg/mL derişimlerindeki sıvı, damlacık ve kuru form örneklerine ait (a) sıfırıncı derece, (b) birinci derece, (c) ikinci derece, (d) üçüncü derece ve (e) dördüncü dereceden emisyon türev spektrumları.....	49
Şekil 34. Maden suyu içerisindeki LORA tabletin, 315 nm dalga boyunda uyarılan ve 50 µg/mL ile 16,7 µg/mL derişimlerindeki sıvı, damlacık ve kuru form örneklerine ait (a) sıfırıncı derece, (b) birinci derece, (c) ikinci derece, (d) üçüncü derece ve (e) dördüncü dereceden emisyon türev spektrumları.	50
Şekil 35. Sıvı, damlacık ve kuru formlarda DLLME ile elde edilen ALP, Yüzeyden elde edilen ALP, ALP tablet ve saf içecek spektrumlarının UV-Gör absorpsiyon (sıfırıncı derece	

türev), birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü derece türevlerinin ortalama çapraz korelasyon değerleri.	51
Şekil 36. Sıvı, damlacık ve kuru formlarda DLLME ile elde edilen LORA, Yüzeyden elde edilen LORA, LORA tablet ve saf içecek spektrumlarının UV-Gör absorpsiyon ((sıfırıncı derece türev), birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü derece türevlerinin ortalama çapraz korelasyon değerleri.	52
Şekil 37. Sıvı, damlacık ve kuru formlarda DLLME ile elde edilen ALP, Yüzeyden elde edilen ALP, ALP tablet ve saf içecek spektrumlarının UV-Gör absorpsiyon birinci derece türevlerinin (a) PCA sonuçları, (b) PCA sonuçlarının kümelenmesi.	54
Şekil 38. Sıvı, damlacık ve kuru formlarda DLLME ile elde edilen LORA, Yüzeyden elde edilen LORA, LORA tablet ve saf içecek spektrumlarının UV-Gör absorpsiyon birinci derece türevlerinin (a) PCA sonuçları, (b) PCA sonuçlarının kümelenmesi.	56

TABLO DİZİNİ

Tablo 1. LC-MS/MS analizlerine ait parametreler.....	14
Tablo 2. R paket kullanımı ve gerekçeleri.	17
Tablo 3. LC-MS/MS ile yapılan ALP VE LORA tayinine ait sonuçlar.	19

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler	Açıklama
mL	Mililitre
mg	Miligram
µL	Mikrolitre
µg	Mikrogram
m/z	Kütle/Yük Oranı
λ	Dalgaboyu
Kısaltmalar	Açıklama
DFSA	Uyuşturucuyla Kolaylaştırılmış Cinsel Saldırı (Drug Facilitated Sexual Assault)
GHB	Gama Hidroksibütirat
ALP	Alprazolam
LORA	Lorazepam
UV-Gör	UV-Görünür Bölge
PCA	Temel Bileşenler Analizi (Principal Component Analysis)
DLLME	Dispersif Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyon (Dispersive Liquid-Liquid Microextraction)
GABA_A	Gama Aminobütirik Asit Tip A
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
LC-MS/MS	Sıvı Kromatografisi- Tandem Kütle Spektrometresi
GC-MS	Gaz Kromatografisi – Kütle Spektrometresi
LLE	Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon (Liquid Liquid Extraction)
SPE	Katı Faz Ekstraksiyonu (Solid Phase Extraction)
PC	Temel Bileşen (Principal Component)
HCA	Hiyerarşik Kümeleme Analizi

BÖLÜM I

1.GİRİŞ

Adli bilim, bireyleri, yerleri ve nesneleri suç olaylarına bağlamak için bilimsel yöntemlerin uygulanmasını ifade eder. Bu bilimsel alanlar hem ceza hem de hukuk davalarının soruşturulması ve çözülmesinde önemli rol oynar (Brettell vd., 2005). Adli bilimler patoloji, toksikoloji, biyoloji, kimya, kriminalistik, odontoloji, antropoloji, entomoloji, psikiyatri, jeoloji, seroloji, mühendislik gibi pek çok disiplini içerir. Adli vaka, kanıtları analiz etmek için bilimsel yöntemlerin kullanımını içeren yasal bir soruşturmadır. Gerçeği ortaya çıkarmak ve mahkeme süreçlerini desteklemek için şüphelileri, kurbanları ve suç mahallerini birbirine bağlamaya yardımcı olur. Vakaların aydınlatılmasında adli laboratuvarlar önemli rol oynar.

Adli laboratuvarlar, soruşturmaları ve yasal işlemleri desteklemek için suç mahallerinden kanıtları analiz eder. Bu kanıtlar, bir suçun işlendiğini kanıtlamaya, şüphelileri olay yerlerine veya kurbanlara bağlamaya, mazeretleri doğrulamaya veya itiraz etmeye, kişileri suçlu olarak tanımlamaya veya aklamaya ve bazen itirafları teşvik etmeye yardımcı olur. Yaygın kanıt türleri arasında vücut sıvıları, saç, kan gibi biyolojik materyallerin yanında lifler, ilaçlar, uyuşturucular, ateşli silahlar, alet izleri, belgeler ve daha fazlası bulunur ve her biri şüphelileri tanımlamaya veya bir suçun unsurlarını kanıtlamaya yardımcı olur. Yasadışı ilaçlar veya yaygın adı ile uyuşturucular, adli bilim laboratuvarları tarafından ele alınan vakaların çoğunluğunu oluşturur. Bunlar esrar gibi doğal, eroin gibi doğal kaynaklardan türetilmiş veya amfetaminler gibi tamamen sentetik olabilir. Bu uyuşturucular etkilerine göre uyarıcılar, depresanlar, narkotikler ve halüsinojenler olarak kategorilere ayrılır (Houck & Siegel, 2010). Uyuşturucuyla ilgili suçlarda kanıtların incelenmesi adli toksikolojinin alanıdır. Adli toksikoloji, alkol, ilaçlar yasadışı maddeler ve zehir içeren kanıtları tespit etmek, tanımlamak ve genellikle miktarını belirlemek için gelişmiş kimyasal ve analiz yöntemleri kullanır.

Uyuşturucuyla kolaylaştırılmış cinsel saldırı (Drug Facilitated Sexual Assault, DFSA), sık karşılaşılan adli vakalardandır. Uyuşturucu veya alkol nedeniyle hareket kabiliyetini kaybetmiş kurbanlara karşı işlenen rıza dışı cinsel eylemleri içerir. İstemsiz veya gönüllü madde kullanımıyla gerçekleşen olaylar proaktif veya fırsatçı eylemler olarak sınıflandırılır. Proaktif eylemler suçlunun gizlice veya zorla verdiği maddeler, fırsatçı

eylemler ise suçlunun kurbanın kendi kendine sarhoş olmasını istismar etmesi olarak tanımlanır. "Randevu tecavüzü (date-rape)" terimi 1980'lerden beri tanındıkları tarafından yapılan saldırıları tanımlamak için kullanılır ve genellikle içkiye ilaç atma ile ilişkilendirilir (Hall & Moore, 2008). DFSA için ideal ilaçlar kokusuz, tatsız, renksiz, etki hızı yüksek olup aynı zamanda refleks yitimine (disinhibisyona), kas gevşemesine ve hafıza kaybına neden olan ilaçlardır. DFSA vakalarında, esrar, kokain, benzodiazepinler, amfetaminler ve gama hidroksibütirat (GHB) gibi pek çok madde söz konusudur. Bunlardan en yaygın olanı ise alkoldür ve genellikle diğer yasal veya yasadışı uyuşturucularla birlikte kullanılır (ElSohly & Salamone, 1999).

DFSA'da kan, idrar, tükürük ve saç gibi biyolojik örnekler ve olay mahalinden toplanan ilaç, yiyecek-içecek kalıntıları ve kapları gibi fiziksel örnekler analiz edilir. Karmaşık örnek matrisleri ve birçok ilacın hızlı metabolizması nedeniyle biyolojik örneklerin tespiti zor olabilir (Dinis-Oliveira vd., 2010). İdrar örnekleri, invaziv olmayan yollarla toplanması ve daha yüksek ilaç konsantrasyonları için tercih edilir. Ancak ilaçların kısa yarı ömürleri nedeniyle örnek alımındaki gecikmeler yanlış negatif sonuçlara neden olabilir (Negrusz & Gaensslen, 2003). Saç daha uzun bir tespit penceresi sunarken, sonuçları bireysel farklılıklar, saç tedavileri ve belirsiz uyuşturucu dahil etme mekanizmaları nedeniyle güvenilir değildir (Gallardo & Queiroz, 2008). Bu sınırlamalar göz önüne alındığında, olay mahalinden toplanacak fiziksel delillerin analiz edilmesi DFSA vakalarının aydınlatılması için büyük önem taşır.

Benzodiazepinler, anksiyete, uykusuzluk ve nöbetler gibi durumlar için sıklıkla reçete edilen bir merkezi sinir sistemi depresan sınıfıdır. Ancak, yatıştırıcı özellikleri ve amneziye neden olma potansiyelleri nedeniyle, DFSA vakalarında kötüye kullanımlarına sıklıkla rastlanır (Noggle & Clark, 1979). Bu maddelerin adli örneklerde tespiti, düşük konsantrasyonları ve hızlı metabolize edilmeleri nedeniyle genellikle zordur ve güvenilir analitik yöntemlere ihtiyaç duyar.

Bu çalışmanın amacı ilaçların kötüye kullanımının cinsel suçlarla ilişkilendirildiği adli vakalarda öne çıkan benzodiazepin türevleri olan alprazolam (ALP) ve lorazepam (LORA) maddelerinin, basit ve hassas tayini için bir metodoloji geliştirmektir. Madde tayinleri ultraviyola (UV) türev spektroskopisi ve floresans spektroskopisi ile gerçekleştirilerek, elde edilen deneysel sonuçların temel bileşenler analizi (Principal Component Analysis, PCA) yapılacaktır. Adli vakalarda genellikle örnek miktarının azlığı söz konusu olduğundan

içecek kalıntılarında madde tayinlerinde örnekler analiz öncesi dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon (DLLME) yöntemi ile n deriştirilecektir. Çalışmada lkemizde yaygın kullanılan çeşitli alkollü ve alkolsüz içeceklerde tayini için geliştirilecek olan yöntem benzer maddeler için de model oluşturacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Benzodiazepinler

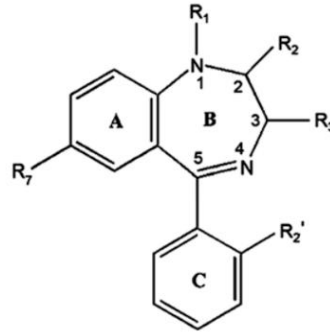
Benzodiazepinler anksiyolitik, hipnotik, sedatif, amnezik, antiepileptik ve kas gevşetici özelliklerinden dolayı en sık reçete edilen ilaçlardandır (Wood vd., 1993). Benzodiazepinler, yaygın terapötik kullanımları ve çoklu uyuşturucu kötüye kullanımı ve aşırı doz vakalarında sık yer almaları nedeniyle adli toksikolojide yaygın olarak karşımıza çıkar. Gama aminobütirik asit tip A (GABA_A) reseptörleri aracılığıyla GABAerjik iletimi artırarak, sedasyon, anksiyoliz, kas gevşemesi ve antikonvülsan etkiler üreterek merkezi sinir sistemi (MSS) depresanları olarak etki ederler. Yüksek terapötik indekse ve düşük tek başına ldrclğe rağmen, opioidler veya alkol gibi diğer MSS depresanlarıyla birleştirildiğinde ölümcül olma riskini önemli ölçüde artırır (Jufer-Phipps & Levine, 2020).

Genellikle kan, idrar ve doku örneklerinde tespit edilir. Postmortem yeniden dağılım genellikle çoğu benzodiazepin için düşüktür ancak yine de yorumlamada dikkate alınmalıdır. Çoğu CYP3A enzimleri aracılığıyla hepatik olarak metabolize edilir; birçoğunun aktif metabolitleri vardır, bunlar kalıcı olabilir ve zamansal yorumlamayı zorlaştırabilir. Yarı ömürleri genellikle kısadır; bu nedenle tespit pencereleri büyük ölçüde değişir.

Standart immünolojik analizler, yapısal yenilik ve düşük çapraz reaksiyon nedeniyle genellikle sıvı kromatografisi- tandem ktle spektrometresi (LC-MS/MS) veya gaz kromatografisi – ktle spektrometresi (GC-MS) onayı gerektiren tasarımcı analogları olmak üzere tüm benzodiazepinleri tespit edemeyebilir. Kantitatif yorumlama, tolerans, çoklu ilaç kullanımı ve farmakokinetikteki çeşitlilik nedeniyle karmaşıktır. Ölüm sonrası kan konsantrasyonları dikkatli yorumlanmalıdır; terapötik, toksik ve ölümcül aralıklar genellikle örtüşür. Metabolitlerin tek başına tespiti akut toksisiteden ziyade geçmiş kullanımı yansıtabilir. Sinerjik toksisite, özellikle opioidler veya alkol ile ölümlerde yaygındır; benzodiazepinler sıklıkla solunum depresyonuna ve koruyucu reflekslerin

bozulmasına katkıda bulunur. Postmortem vakalarda, benzodiazepinler genellikle çoklu ilaç bağlamlarında bulunur ve ölüm nedenine katkılarının dikkatli bir şekilde değerlendirilmesini gerektirir. Kronik kullanıcılar, belirgin bir zehirlenme olmaksızın daha yüksek baz seviyeleri gösterebilir.

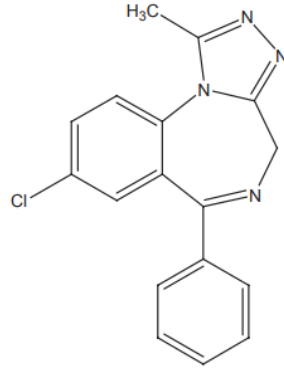
Benzodiazepinler, bir benzen halkası, yedi üyeli bir diazepin halkası ve aktivite için gerekli bir fenil grubuyla birleşen bir çekirdek yapı ile karakterize edilen bir merkezi MSS depresan sınıfıdır (Şekil 1). Elektron çeken gruplar veya kaynaşmış halkalar eklemek gibi yapısal değişiklikler, bunların gücünü, süresini ve klinik etkilerini etkiler. Bu özellikler hem tıbbi hem de yasadışı bağlamlarda kullanılır ve daha yeni "tasarımcı" benzodiazepinler önemli yapısal çeşitlilik gösterir.



Şekil 1. Benzodiazepin yapısı (Jufer-Phipps & Levine, 2020).

2.1.1. Alprazolam

Alprazolam (ALP, $C_{17}H_{13}ClN_4$, 8-chloro-1-methyl-6-phenyl-4H-[1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]benzodiazepine), öncelikli olarak anksiyete ve depresyon tedavisinde kullanılan orta etkili bir triazolobenzodiazepindir. Kimyasal yapısı, triazol halkasının varlığı nedeniyle klasik benzodiazepinlerden, farklılık göstermektedir (Şekil 2). ALP kan beyin bariyerini kolaylıkla geçerek merkezi sinir sistemine girer ve GABA-benzodiazepin reseptör kompleksine seçici olmayan bir şekilde bağlanarak sakinleştirici, anksiyolitik ve kas gevşetici etkiler gösterir (Verster vd., 2006). Bu ilacın kötüye kullanımı potansiyel tehlikeler içerir. Uzun süreli kullanımı bağımlılığa yol açabilir ve doz artırma ihtiyacını tetikleyebilir. Ticari olarak “Xanax” ismi ile satılır ve ülkemizde bağımlılık riski ve kötüye kullanımı engellemek için yeşil reçete ile satılması zorunludur.



Alprazolam

Şekil 2. Bir triazolobenzodiazepine türü olan ALP'nin yapısı (Jufer-Phipps & Levine, 2020).

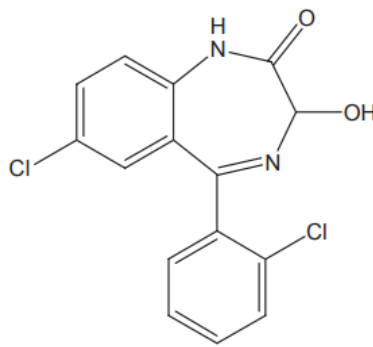
Beyaz bir toz olan ALP'nin pKa'sı 2,4'tür, metanol ve etanolde çözünür ve suda çözünmez. Oral uygulamadan sonra alprazolam iyi emilir ve yaklaşık %90 biyoyararlanım sağlar. ALP, sitokrom P450 3A4 tarafından α -hidroksialprazolam ve 4-hidroksialprazolama metabolize edilir. Her iki metabolit de ALP'den daha az aktiftir ve tipik olarak plazmada ALP konsantrasyonlarının <%10'luk konsantrasyonlarında tespit edilir. Tek bir ALP dozunun neredeyse tamamı 72 saat içinde atılır, %80'i idrarla ve %7'si dışkıyla atılır; yüzde yirmisi değişmemiş alprazolam olarak atılır (Jufer-Phipps & Levine, 2020).

Dozlar genellikle günde üç kez 0,25-0,5 mg aralığındadır ve toplamda maksimum 3 mg olmalıdır (Verster vd., 2006). Bu ilaç yaygın (10 kişiden biri) sedasyon (sakin olma hali), somnolans (uyku hali), denge bozukluğu ve hafıza bozukluğu yan etkileri göstermesi sebebi ile uyuşturucu ile kolaylaştırılmış cinsel saldırılarda kullanılan ilaçlardan biridir (Pfizer İlaçları Ltd. Şti., 2023).

2.1.2. Lorazepam

Lorazepam (LORA), anksiyete tedavisinde kullanılan orta etkili bir benzodiazepindir. Ayrıca anksiyeteyi hafifletmek, sedasyon sağlamak ve bir prosedürle ilgili olayları hatırlama yeteneğini azaltmak için preanestezik olarak kullanılır. Oral uygulamadan sonra, lorazepam iyi emilir, %95 biyoyararlanım sağlar ve inaktif glukuronid konjugat oluşumunun birincil metabolik yolu vardır. Lorazepam glukuronidi plazmada birikir ve LORA'dan daha yüksek konsantrasyonlara ulaşır. Bir lorazepam dozunun yaklaşık %75'i

5 gün boyunca idrarda lorazepam glukuronidi olarak atılır; LORA'nın sadece çok küçük bir miktarı değişmemiş ilaç olarak atılır. LORA'yı tespit etmek zor olabilir, çünkü piyasada bulunan çoğu immünolojik test bu benzodiazepin konjugat oluşumuna karşı yüksek çapraz reaksiyona sahip değildir (Jufer-Phipps & Levine, 2020). LORA'nın kimyasal formülü 7-kloro-5(2-klorofenil)- 1,3-dihidro-3-hidroksi-2H-1,4-benzodiazepin-2-on'dur (Şekil 3). Moleküler formülü $C_{15}H_{10}Cl_2N_2O_2$ 'dir. Suda neredeyse çözünmeyen, beyaz, kokusuz, kristal bir tozdur ve moleküler ağırlığı 321,2 g/mol'dür (Rutgers & Shearer, 1981).



Lorazepam

Şekil 3. Bir 1,4-benzodiazepin türü olan LORA'nın yapısı (Jufer-Phipps & Levine, 2020).

2.2. Dağıtıcı Sıvı Sıvı Mikroekstraksiyon Yöntemi

Olay yeri incelemelerinde toplanan numunelerin analitik cihazlarda doğrudan analizi genellikle mümkün olmaz. Numuneleri analize uygun hale getirmek için bir numune hazırlama işlemine ihtiyaç duyulur. Sıvı-sıvı ekstraksiyonu (LLE) ve katı faz ekstraksiyonu (SPE) adlı laboratuvarlarda analitlerin örnek matrislerinden çıkarılması ve derişik hale getirilmesi için yaygın olarak kullanılan numune hazırlama yöntemlerindendir (Nakamura, 2011). LLE, bir çözelti içerisinde bulunan bir veya daha fazla bileşeni uygun bir çözücü ile temas ettirerek çözeltiden ayırma işlemidir. Dağıtıcı sıvı-sıvı mikroekstraksiyon (DLLME) adlı minyatürleştirilmiş bir LLE tekniği, Rezaee vd. (2006) tarafından yüksek performanslı ve güçlü bir zenginleştirme yöntemi olarak ifade edilmektedir (Rezaee vd., 2006). Bu yöntem su, doku, biyolojik sıvılar ve gıda matrisleri gibi çeşitli matrislerden farklı türdeki analitlerin ekstraksiyonu için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Yan & Wang, 2013). DLLME, sulu faz, dağıtıcı çözücü ve ekstraksiyon çözücüsünden oluşan üçlü bileşenli çözücü sistemine dayanmaktadır. Bu yöntemde ekstraksiyon çözücüsü ve dispersiyon

çözücüsünden oluşan uygun karışım sulu numuneye şırınga (enjeksiyon) ile hızlı bir şekilde enjekte edilir. Böylece bulanık bir çözelti oluşur. Bulanık çözelti, tamamen sulu fazda dağılmış ince ekstraksiyon çözücüsü parçacıklarından oluşur ve santrifüjlemeden sonra, ekstraksiyon çözücüsünün ince parçacıkları konik test tüpünün tabanında çökeler (Rezaee vd., 2006). DLLME yönteminin avantajları operasyon kolaylığı, hızlılık, düşük maliyet, yüksek geri kazanım ve yüksek zenginleştirme faktörüdür (Jain & Singh, 2016).

2.3. Ultraviyole-Görünür Spektroskopisi

Ultraviyole görünür bölge (UV-Gör) spektroskopisi, adli toksikolojide hem nitel hem de nicel analiz için kullanılmıştır. UV-Gör absorpsiyon spektroskopisi, hemen hemen herkesin aşına olduğu ve her büyüklükteki laboratuvarlarda sıklıkla kullanılan evrensel olarak tanımlanmış bir yöntemdir. Teknik, bir molekül içindeki farklı enerji seviyeleri arasındaki elektron geçişlerinden kaynaklanan absorpsiyon spektrumlarına dayanır. Bu geçişlerin enerji değeri, absorpsiyon bantlarının ultraviyole veya görünür bölgelerdeki konumunu belirlerken, bu bantlarla ilişkili temel parametre molar absorpsiyon katsayısıdır. Bir absorpsiyon bandının yoğunluğu, bir elektronun temel durumdan uyarılmış bir duruma geçme olasılığını yansıtır.

Atomik geçişlerin aksine, moleküler elektron geçişleri daha geniştir. Bu genişleme, analit ve çözücü moleküller arasındaki etkileşimlerden ve temel durum, titreşim ve dönme enerji seviyelerinin üst üste gelmesinden kaynaklanır (Katar et al., 2022).

Karakteristik olarak, bu teknik hem organik hem de inorganik sistemlere geniş uygulanabilirliğe, orta ila yüksek seçiciliğe, tipik olarak 10^{-4} - 10^{-5} M aralığında olan hassasiyetlere, %1-3 aralığında tipik bağıl belirsizliklerle güvenilir doğruluğa ve kullanışlı veri toplama yöntemlerine sahiptir. UV-Gör spektroskopisinin çalışma prensibi iki olguya dayanmaktadır: (1) maddeler farklı dalga boylarında seçici olarak elektromanyetik enerji emer veya yayar ve (2) bir maddenin enerji emilim özellikleri, çözeltideki maddenin konsantrasyonunu ölçmek için kullanılabilir (Cole & Levine, 2020).

Tek renkli radyasyon için absorpsiyon, gelen ışığın malzeme içinden geçtiği yol uzunluğuyla ve çözeltideki bir maddenin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Bu doğrultuda Beer-Lambert yasası (1) absorpsiyon ile ışık yolu ve konsantrasyon arasındaki ilişkiyi bu şekilde formalize eder:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon c l \quad (1)$$

Burada A absorbans, ϵ molar absorptivite, c çözelti konsantrasyonu (mol/L) ve l ışığın çözültiden geçen yol uzunlunu ifade eder. Molar absorptivite sabiti, ϵ , $L\text{ cm}^{-1}\text{ mol}^{-1}$ birimlerine sahip bir orantı sabitidir ve ışığı emen madde ve dalga boyunun karakteristiğidir.

UV ve görünür radyasyonun emilimini ölçen cihazlar genellikle bir veya daha fazla ışık kaynağı, dalga boyu seçici, numune kabı, dedektör, sinyal işlemcisi ve okuma aygıtlarından oluşur. Tek ışıklı aletler 200–1000 nm veya daha fazla bir aralığa sahip bilgisayar kontrollüdür, değiştirilebilir tungsten/döteryum lamba kaynakları, yüksek çözünürlüklü kafes monokromatörü, dikdörtgen silika küvetler, bir fotoçoğaltıcı dedektör ve çeşitli biçimlerde depolama ve sunuma izin veren sayısallaştırılmış çıktıdan oluşur. Tek ışıklı aletler, daha fazla enerji verimi, üstün sinyal-gürültü oranları ve daha az dağınık örnek bölmeleri gibi doğal avantajlara sahiptir.

UV-Gör spektroskopisi, adli bilimlerde maddelerin ön tespiti ve karşılaştırılması için, özellikle toksikoloji, iz kanıtı analizi ve sorgulanan belge incelemesinde yaygın olarak kullanılır. Hızlı, tahribatsız ve güvenilir tarama sağlar.

2.3.1. UV Türev Spektroskopisi

UV-Gör spektroskopisinin analitik gücünü artırmak için geliştirilen teknikleri keşfetmek değerlidir; bunlardan biri de türev spektroskopisidir. Türev spektroskopisi, 1950'lerde UV-gör spektroskopisinin duyarlılığını ve çözünürlüğünü artırma yöntemi olarak ortaya çıktı. Başlangıçta, teknik, o dönemde mevcut olan enstrümantasyonla türev spektrumları üretmenin pratik zorlukları nedeniyle sınırlı bir kullanım gördü. Ancak, 1970'lerde mikrobilgisayarların geliştirilmesi, spektral verilerin işlenmesini kolaylaştırdı ve bu yaklaşımın yaygın olarak benimsenmesine yol açtı.

Türev spektroskopisinin temeli, UV-Gör spektral eğrilerinin matematiksel türevlerini almaktır. Özünde, süreç işlevsel farklılaşma prensiplerinin spektral verilere uygulanmasını içerir ve bu da Şekil 5'te görüldüğü gibi örtüşen bantların ve ince spektral özelliklerin daha ayrıntılı ve ayrıntılı analizine olanak tanır (Katkı vd., 2022).

UV-Gör absorpsiyon spektroskopinin temel bağlantısını

$$A(\lambda) = \log_{10} \frac{I_0}{I} = \epsilon(\lambda) \times l \times c \quad (2)$$

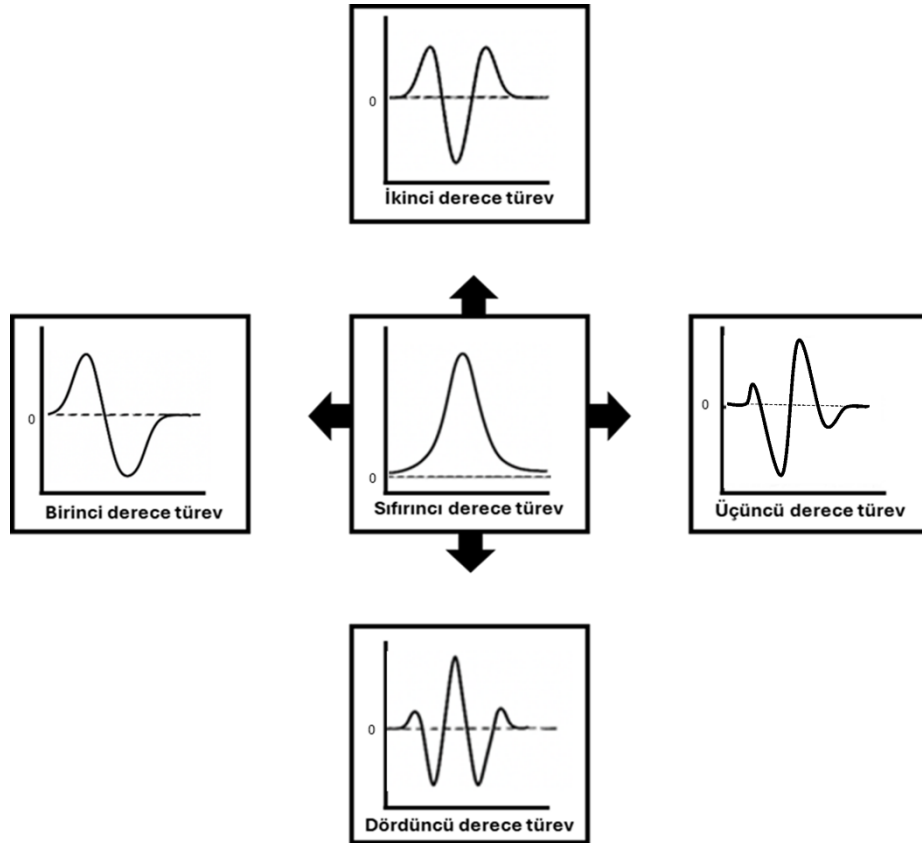
şeklinde ifade ettiğimizde ve derişim (c) ile ışık yolu (l) değişmez tutulduğunda, absorbands (A) ile molar ekstinksiyon katsayısı dalga boyunun (λ) bir fonksiyonudur. Bu bilgilerin ışığında Eşitlik 2'nin türevi aşağıdaki gibi olur:

$$\frac{dA}{d\lambda} = \frac{d\varepsilon(\lambda)}{d\lambda} \times c \times l \quad (3)$$

Aynı işlemler benzer yollar izlenerek türev derecesi artırıldığında aynı eşitliğin n'inci türevi

$$\frac{d^n A}{d\lambda^n} = \frac{d^n \varepsilon(\lambda)}{d\lambda^n} \times c \times l \quad (4)$$

Eşitlik 4'te görüldüğü gibi madde çözeltisinin n' inci türevi belli dalga boyunda maddenin derişimi ile orantılıdır. Başka bir deyişle türev spektrumlarından kantitatif tayin yapılabilir, çünkü özgün spektrumların karakteristikleri tümüyle bir oran içerisinde türev spektrumlarına geçmektedir (Talsky vd., 1978).



Şekil 4. Sıfırıncı derece (orijinal) spektrumdan türetilmiş farklı türev derecelerine (birinci–dördüncü) ait spektral sinyallerin temsili grafikleri (Redasani vd., 2018).

Analitik kimyada türev spektroskopisi çeşitli temel amaçlar için yaygın olarak kullanılır. Birincil avantajlarından biri, türev spektrumlarının geleneksel spektrumlardan daha dar bir spektral bant genişliğine sahip olması ve neredeyse aynı spektral profiller arasındaki ince

farklılıkların tespit edilmesine olanak sağlamasıdır. Bu geliştirilmiş spektral farklılaşma, özellikle yakından ilişkili bileşikleri ayırt etmek için yararlıdır. Ek olarak, türev spektrumları bant maksimumlarının daha hassas bir şekilde belirlenmesini sağlar ve orijinal (sıfırıncı derece) spektrumlarla karşılaştırıldığında örtüşen emilim bantlarının çözünürlüğünü önemli ölçüde iyileştirir. Bir diğer önemli uygulama ise arka plan düzeltmesidir; türev yöntemleri, arka plan emilimini hızlı, basit ve uygun maliyetli bir şekilde etkili bir şekilde ortadan kaldırabilir. Dahası, türev spektroskopisi, özellikle geleneksel yöntemlerin yetersiz kaldığı senaryolarda, artırılmış seçicilik, özgüllük ve hassasiyet sunan hızlı ve etkili bir analitik tekniktir. Analitlerin önceden ayrılmasını gerektirmediği için, karmaşık karışımlardaki birden fazla bileşenin doğrudan kantitatif analizine olanak tanır (O'Haver, 1979).

2.4. Floresans Emisyon Spektroskopisi

Floresans, bir maddenin enerjiyi absorbe ettiği (genellikle (UV) veya görünür ışık biçiminde) ve daha sonra bunu daha uzun dalga boyunda ve daha düşük enerjili ışık olarak yaydığı bir olgudur. Bu davranış, emilen ışığı yaymayan veya aynı dalga boyunda yeniden yayan çoğu maddenin davranışından farklıdır.

Analitik kimyada, floresans özellikle maddeleri tanımlamak ve ölçmek için değerlidir. Bir floresans spektroskopisi, UV-Gör spektroskopisine benzer görünse de birkaç önemli açıdan farklılık gösterir. Floresans spektroskopisinde, dedektör doğrudan iletilen ışığı algılamaktan kaçınmak ve bunun yerine yalnızca yayılan floresan ışığı yakalamak için ışık kaynağının yoluna dik bir açıyla yerleştirilir. Ayrıca, iki monokromatör kullanılır: biri uyarım dalga boyunu seçmek için numuneden önce, diğeri emisyon dalga boyunu izole etmek için dedektörden önce. Bu yapılandırma, belirli bileşiklerin oldukça karakteristik özelliği olan hem uyarım hem de emisyon spektrumlarının hassas bir şekilde belirlenmesini sağlar.

Floresans spektroskopisi özellikle adli bilimlerde faydalıdır. Örneğin, kötüye kullanılan bazı ilaçlar UV ışığı altında floresans verir. Floresans ayrıca Beer Yasası'nı izlediği için, bu tür maddelerin konsantrasyonu floresans spektrumlarından ölçülebilir (Houck & Siegel, 2010).

2.5. Temel Bileşenler Analizi

Temel Bileşen Analizi (PCA), özellikle spektroskopik çalışmalarda karmaşık ve yüksek boyutlu verileri yorumlamak için sıklıkla kullanılan güçlü birçok değişkenli istatistiksel

tekniktir. Spektroskopik yöntemler, çok sayıda değişken ve bunlar arasındaki korelasyonların varlığı nedeniyle doğrudan analiz edilmesi zor olan yoğun veri matrisleri üretir. PCA, veri setinin boyutunu azaltırken varyansın çoğunu koruyarak bu zorluğun üstesinden gelir ve böylece önemli bir bilgi kaybı olmadan yorumlamayı basitleştirir.

PCA'nın temel fikri, orijinal ilişkili değişkenleri temel bileşenler (PC'ler) adı verilen yeni bir ilişkisiz değişkenler kümesine dönüştürmektir. Bu bileşenler, yakaladıkları varyans miktarına göre sıralanır: ilk temel bileşen (PC1), verilerdeki en büyük varyansın yönünü temsil ederken, ikinci ve sonraki bileşenler giderek daha az varyasyonu yakalar ve birbirlerine ortogonaldır. Veri setindeki her örnek daha sonra bu temel bileşenlerin doğrusal bir kombinasyonu olarak temsil edilebilir. Uygulamada, verilerdeki değişkenliğin çoğunluğunu hesaba katmak için genellikle yalnızca ilk birkaç PC'ye ihtiyaç duyulur ve bu da verimli görselleştirme ve analize olanak tanır.

PCA'nın uygulanması genellikle birkaç adımı içerir: veri toplama, ön işleme (normalleştirme ve gürültü azaltma gibi), bir kovaryans veya korelasyon matrisinin hesaplanması ve özdeğerleri ve özvektörleri çıkarmak için öz ayrıştırma.

İncelenen örneklerin spektral verileri toplandıktan sonra, veriler ön işleme (normalizasyon, gürültü filtreleme vb.) tabi tutularak veri kalitesi artırılır. Veriler arasındaki ilişkileri anlamak için korelasyon matrisleri oluşturulur. Korelasyon matrisleri her bir veri setinin karşılıklı korelasyonunu içeren bir matristir. Korelasyon matrisine ait temel bileşenleri hesaplamak için öncelikle matrisin özdeğer ve özvektörleri belirlenir.

$$C = UDU^{-1} \quad (5)$$

C, korelasyon matrisini, D ve U bu matrisin sırasıyla özdeğer ve özvektör çözümlerini göstermektedir. Her özdeğer, karşılık gelen temel bileşenin varyansını temsil eder ve bu nedenle, özdeğerleri sıralayarak temel bileşenler önem sırasına göre düzenlenebilir. Özdeğerlerin toplamı, yüzde olarak ifade edildiğinde, temel bileşenlerin deneysel verileri temsil etme oranını ölçer. Başarılı bir PCA modelinde ilk birkaç temel bileşene ait özdeğerler toplamı deneysel verilerin temsil edilmesi için yeterli olur. Temel bileşenlerin deneysel verileri temsil etme durumu değerlendirildikten sonra tüm bulgular bir araya getirilerek yorumlanır.

PCA, özellikle adli kimya ve toksikolojide yararlı olduğu kanıtlanmıştır. Örneğin, Sáiz ve diğerleri (2014), benzodiazepin ilaçları ile güçlendirilmiş 63 içecek örneğini analiz etmek

için kapiler elektroforezle birlikte PCA uyguladı. alışmaları, PCA'nın referans standartları gerektirmeden ilaç sınıflarının net bir şekilde ayırt edilmesini sağladığını ve adli uygulamalar için güçlü, hedefsiz bir tarama yaklaşımı sağladığını göstermiştir (Sáiz vd., 2014). Adli bilimin ötesinde, PCA genellikle Hiyerarşık Kümeleme Analizi (HCA) gibi tamamlayıcı yöntemlerle birlikte kullanılır; bu analiz, örnekleri benzerlik ölçütlerine göre gruplandırır. Birlikte kullanıldığında, PCA verileri basitleştirirken, HCA genellikle dendrogramlar olarak sunulan örnekler arasındaki ilişkilerin net görselleştirmelerini sağlar.

Genel olarak, PCA kemometrik ve analitik iç akışlarında temel bir araçtır. Veri karmaşıklığını azaltma, gizli kalıpları ortaya çıkarma ve görselleştirmeyi geliştirme yeteneği, onu çevresel izleme, kalite kontrolü ve adli soruşturmalara kadar çok çeşitli bilimsel disiplinlerde ön plana çıkarır.

BÖLÜM II

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Çalışmada tüm örneklerin UV-Gör absorpsiyon ve floresans emisyon ölçümleri, 150 W gücünde xenon lambaya sahip Edinburgh Instruments Spectrofluorometer FS5 cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Ölçümlerde 1 cm optik yola sahip kuvars küvet kullanılmıştır. UV türev spektrumları ve floresans emisyon türev spektrumları, cihazın yazılımı olan Fluoracle ile ölçüm sonrası elde edilen spektrumlardan elde edilmiştir. Çalışmalarda kullanılan saf su için Millipore Direct-Q5 saf su sistemi kullanılmıştır. Numune hazırlama ve ekstraksiyon işlemleri sırasında Hettich EBA200 santrifüj cihazı ile Isolab marka ısıtıcılı manyetik karıştırıcı kullanılmıştır. Xanax® tablet içerisinde yer alan ALP'nin ve Ativan® tablet içerisindeki LORA'nın varlığı BİLTAM bünyesinde bulunan Thermo Scientific- Q Exactive Focus marka, orbitrap özellikli LC-MS/MS ile analiz edilerek teyit edildi.

3.2. Kullanılan Kimyasallar ve Materyaller

Çalışmada ALP ve LORA maddelerinin tablet formları kullanılmıştır. ALP tablet formunun ticari ismi Xanax® (Viatris) olup çalışmada ALP tablet olarak adlandırılacaktır. LORA tablet formunun ticari ise Ativan® (Pfizer) olup çalışmada LORA tablet olarak adlandırılacaktır. Çalışmada kullanılan çözeltilerden etanol ve kloroform Sigma'dan alınmış olup saflık dereceleri sırasıyla %99,8 ve %99,4'tür. Metanol ve diklorometan ise Isolab'tan alınmıştır ve saflık dereceleri sırasıyla %99,8, % ve %90,0'dır. ALP ve LORA maddelerinin içki içerisindeki analizleri için alkollü ve alkolsüz içeceklerden beyaz şarap (Kavaklıdere®), roze şarap (Kavaklıdere®), votka (Gilbey's®), gazoz (Sarıyer®) ve maden suyu (Beypazarı®) kullanılmıştır. Tüm çalışmalarda çift damıtılmış su kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan tüm stok çözeltiler ve içkiler +4°C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir.

3.3. Örneklerin Hazırlanması

Çalışmalarda referans çözelti olarak kullanılmak üzere ALP tablet stok çözeltileri ve içecek çözeltileri hazırlandı. ALP tablet stok çözeltileri için, 1 mg/mL'lik nihai derişim elde etmek için 10 mg ALP'ye eşdeğer miktarda tablet 10 mL hacimce %30 sulu metanol içerisinde çözülerek hazırlandı. Hazırlanan çözelti 41 numaralı filtre kâğıdı ile süzülerek tablettten gelen ve metanolde çözünmeyen safsızlıklar ortamdan uzaklaştırıldı. ALP tablet içeren

içecek çözeltileri aynı yöntemle hazırlandı. Çalışmada kullanılan tüm içecekler içerisinde 1 mg/mL’lik stok çözelti ler hazırlandı.

Yukarıdaki yöntem ile LORA tablet stok çözeltileri ve içecek çözeltileri de hazırlandı. Referans özelti olarak kullanılmak üzere LORA tablet stok çözeltileri için, 1 mg/mL’lik nihai derişim elde etmek için her biri 2,5 mg lorazepam içeren LORA tabletler kullanıldı. Tabletler, tablet başına 2,5 mL hacimce %30 sulu metanolde çözölerek referans çözelti hazırlandı. Aynı adımlar LORA tablet içeren içecek çözeltileri hazırlığı için tekrarlandı.

3.4. LC-MS/MS alışmaları

ALP tablet içerisinde yer alan ALP’nin ve LORA tablet içerisindeki LORA’nın varlığı LC-MS/MS ile analiz edilerek teyit edildi. Cihaz donanımı ve analiz esnasındaki parametreler Tablo1’de verilmiştir.

Tablo 1. LC-MS/MS analizlerine ait parametreler.

Örnek	15 ALP tablet (her tablet 1 mg ALP içerir) tek tek tartıldı ve bir tablet için ortalama kütle hesaplandı. Tabletler ezilerek toz haline getirildi. 10 mg ALP’ye eşdeğer miktarda alınıp 10 mL %30’luk metanolde özöldü ve filtrelendi (1,0 mg/mL). Elde edilen bu çözeltiden 25 µg/mL’lik ALP özeltisi hazırlandı. 2 ALP tablet (her tablet 2,5 mg LORA içerir) ezilerek 5 mL %30’luk metanolde özöldü ve filtrelendi (1,0 mg/mL). Elde edilen bu çözeltiden 25 µg/mL’lik LORA özeltisi hazırlandı.
Kolon	BioBasic-18, (50 x 2,1 mm, 5 µm)
UHPLC koşulları (Abarca & Gerona, 2023; Sofalvi vd., 2020)	Mobil fazlar (MF): A: % 0,1(v/v) formik asit ve 2 mmol/L amonyum formatlı su B: % 0,1(v/v) formik asit ve 2 mmol/L amonyum formatlı asetonitril Hız: 0,25 mL/dk Enj hacmi: 20 µL Kolon sıc.: 50 °C Autosampler sıc.: 4 °C Akış profili: 0-0,5 dakikada %5 MFB, 0,5-1,5 dakikada %30 MFB, 1,5-4,5 dakikada %70 MFB, 4,5-7,5 dakikada %100 MFB’ye, 7,5-10 dakikada %100 MFB, 10-10,01 dakikada %5 MFB’ye ve 10,01-14 dakikada %5 MFB’den oluşmuştur.
MS koşulları (Abarca & Gerona, 2023; Sofalvi vd., 2020)	Spray Voltage: 3.5 kV Capillary temp.: 350 °C Aux gas heater temp.: 350 °C Spektrofotometrik kütle tayini, elektrosprey iyonizasyon (ESI) ile pozitif iyonizasyon modunda gerçekleştirildi. Numune, full MS ve PRM (parallel reaction monitoring) ile analiz edildi

3.5. DLLME

Literatürde gerçek yaşamda bu analizlerin üç farklı formdaki örneklerde yapıldığı görülmektedir. Bu çalışma da gerçek yaşam senaryosu olarak ifade edilen sıvı, damlacık ve kurutulmuş formlar simüle edilerek analiz edilmiştir.

Sıvı formdaki numuneler, ilaç katılmış içeceklerden arta kalan en az 2 mL'lik örnekleri temsil eder. Çalışmada sıvı form örnekleri analizi yapılacak içecek içerisinde madde derişimi 50 µg/mL olacak şekilde içeceğin kendisi ile seyreltilerek stok çözeltiden hazırlandı. LORA tablet gözlenebilme sınırı ALP'den daha düşük olduğu için aynı yöntemle 16,7 µg/mL'lik LORA örnekleri de hazırlanarak analiz edildi.

Damlacık form numuneleri, bardağın/kadehin iç duvarına veya dibine yapışmış damlacıklar olarak görülebilen numuneleri ifade eder. Bu numuneler, 50 µg/mL derişimde 1 mL ilaç katılmış içeceğin bardaklara/kadehlere püskürtülmesi ve durulamadan önce 1 saat bekletilmesiyle hazırlanmıştır. Aynı şekilde LORA tablet için 16,7 µg/mL'lik örnekler hazırlanarak analiz edildi.

Kuru form ise gerçek vaka senaryolarında, mağdur tarafından tamamen tüketilmesi, buharlaşma veya adli örneklemede gecikme nedeniyle kurumuş numuneleri temsil eder. Simüle edilmiş kuru numuneler, 50 µg/mL derişimde ilaç içeren içeceklerden 1 mL'lik bir miktarın bardaklara/kadehlere püskürtülmesi ve kuruması için bir gece boyunca bekletilmesiyle hazırlanmıştır. Tüm numuneler, iç mekân koşullarında, yani ortam sıcaklığı yaklaşık 25°C ve nem oranı yaklaşık %50 olan bir araştırma laboratuvarında hazırlanmıştır.

Ekstraksiyon işleminden önce örnek toplama işlemleri gerçekleştirildi. Örnekler bardaklardan/kadehlerden santrifüj tüplerine aktarıldı. Sıvı, damlacık ve kuru form örnekler için, her bardağın/kadehin iç yüzeyi 1 mL saf su ile durulandı ve dikkatlice örneklerin bulunduğu santrifüj tüplerine aktarıldı. Durulama işlemi, 1 mL ultra saf su ile sıvı form için üç, damlacık form için dört ve kuru form için 5 kez tekrarlanarak santrifüj tüplerindeki son hacim 5 mL'ye tamamlandı.

Çalışmada uygulanacak DLLME prosedürünü belirlemek için gerçek yaşam senaryosunu simüle eden içecek örneklerinden önce ALP tablet stok çözeltisinden 50 µg/mL derişimde suda hazırlanmış örnekler ile bir optimizasyon çalışması yapılmıştır. Çalışmada değerlendirilen parametreler *Teoh ve ark. (2022)* tarafından yapılan çalışma doğrultusunda

ekstraksiyon ve dispersiyon çözücüsü ve bunların hacimleri olarak seçilmiştir (Teoh vd., 2022).

DLLME verimliliği, ALP tablet örneklerinin üç formda ölçülen UV-Gör absorpsiyon şiddetine göre değerlendirildi. İlk adım olarak ekstraksiyon çözücüsü seçimi için kloroform ve diklorometanın verimliliği karşılaştırıldı. Santrifüj tüplerine toplanan suda hazırlanmış örneklerle her çözücünden ayrı ayrı 250 µL ve sabit hacimde etanol (500 µl) enjekte edildi ve 60 saniye boyunca girdaplı çalkalamaya (vorteks) tabi tutuldu. Ardından, 4000 rpm'de 10 dakika santrifüjleme ile faz ayrımı gerçekleştirildi. Hem kloroform hem de diklorometan, test tüplerinin dibinde çöktü. Süpernatant fazı dikkatlice dekante edildi ve dibinde kalan çözelti su banyosunda buharlaştırıldı. Ölçüm için tüplere %50 sulu etanol eklenerek UV-Gör absorpsiyon ölçümleri alındı. Diklorometan kullanılan ekstraksiyon sonuçlarında absorpsiyon şiddetlerinin daha yüksek olduğu gözlemlendi (Ek-Şekil 1). Bu nedenle, sonraki prosedürler için ekstraksiyon çözücüsü olarak diklorometan seçildi.

İkinci adımda dispersif çözücü olarak metanol ve etanol ayrı ayrı test edilmiştir. Deney, 500 µL sabit hacimde farklı dispersif çözücülerle 250 µL diklorometan enjekte edilerek gerçekleştirilmiştir. UV-Gör absorpsiyon şiddetlerine göre diklorometan ve etanol kombinasyonu, daha iyi geri kazanımlar sağlamıştır (Ek-Şekil 2). Bu nedenle, bu kombinasyon sonraki deneylerde kullanılmıştır.

Üçüncü adımda ise ekstraksiyon çözücüsü ve dispersif çözücünün hacminin etkileri analiz edildi. Ekstraksiyon çözücüsünün hacminin etkisini araştırmak için, ilaç eklenmiş numuneler üç farklı hacimde diklorometan (150, 250 ve 350 µL) ve sabit hacimde etanol (500 µL) ile ekstrakte edildi. Elde edilen sonuçların absorpsiyon şiddetlerine göre 250 µL, sonraki deneylerde kullanılacak diklorometan hacmi seçildi (Ek-Şekil 3).

Dispersif çözücünün hacminin etkisi, diklorometan hacminin 250 µL'de sabitlenmesi ve etanol hacminin 300, 600 ve 1000 µL arasında değiştirilmesiyle analiz edildi. Elde edilen sonuçların absorpsiyon şiddetlerine göre, dispersif çözücünün optimum hacmi olarak 300 µL etanol seçildi (Ek-Şekil 4).

Optimize edilen DLLME prosedürü ALP tablet ve LORA tablet içeren ve sıvı, damlacık ve kuru formlarda hazırlanan içecek örneklerine uygulandı. Ekstraksiyonu gerçekleştiren örneklerin UV-Gör absorpsiyon spektrumları, UV türev spektrumları ve floresans emisyon spektrumları alındı.

ALP için floresans emisyon ölçümleri 540–650 nm aralığında, 520 nm dalgaboyunda uyarılarak gerçekleştirilmiştir. LORA için ise 365–650 nm aralığında alınan ölçümde uyarma 315 nm’de yapılmıştır. Tüm floresans ölçümlerinde slit aralığı sabit olarak 10 nm’de tutulmuştur.

3.6. Deney Sonuçlarının İstatistiksel İncelemesi

Bu çalışmada UV-Gör absorpsiyon spektrumlarına ilişkin istatistiksel analizler ve görselleştirmeler R programlama dili (R Core Team, 2024) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analiz sürecinde, korelasyon matrisi oluşturma, PCA ve bu analizlerin grafiksel sunumu amacıyla çeşitli R paketlerinden yararlanılmıştır. Kullanılan başlıca paketler ve kullanım amaçları Tablo 2’te belirtildiği gibidir.

Tablo 2. R paket kullanımı ve gerekçeleri.

Paket Adı	Kullanım Amacı	Gerekçesi
corrplot	Korelasyon matrisi değerlerinin görsel olarak sunulması	Korelasyon ilişkilerini renk skalası ve sembollerle hızlı ve sezgisel biçimde yorumlamaya imkân tanır. UV-Gör spektrumu verilerinin çapraz korelasyonunda kullanılmıştır.
ggcorrplot	ggplot2 altyapısıyla korelasyon matrisinin estetik biçimde görselleştirilmesi	corrplot paketine benzer olup, daha özelleştirilebilir ve yayına uygun grafikler oluşturulmasını sağlar.
FactoMineR	PCA ve çok değişkenli istatistiksel yöntemlerin uygulanması	UV-Gör spektrumlarına ait yüksek boyutlu verilerin daha az bileşenle temsil edilmesi amacıyla PCA analizi bu paket ile gerçekleştirilmiştir.
factoextra	Çok değişkenli analiz sonuçlarının grafikleştirilmesi ve yorumlanması	FactoMineR çıktılarının birey ve değişken katkı grafikleri, kümeleme diyagramları gibi görsellerle desteklenmesini sağlar.

Bu dört paketin birlikte kullanımı, hem istatistiksel analizlerin etkin biçimde yürütülmesini hem de elde edilen sonuçların bilimsel ve görsel olarak açık biçimde sunulmasını mümkün kılmıştır.

Bunlara ek olarak PCA analizlerinde “k-means” kümeleme algoritması çalıştırılmıştır. Bu algoritma, gözlem verilerini, her biri benzer özelliklere sahip nesnelerden oluşan k adet kümeye ayırmayı amaçlayan, gözetimsiz (unsupervised) bir öğrenme yöntemidir. Veriler, önceden belirlenen k sayıda küme merkezi (centroid) etrafında, bu merkezlere olan uzaklıklarına göre kümelenir. Her iterasyonda, küme merkezleri güncellenir ve veriler en yakın merkeze yeniden atanarak kümeler optimize edilir. “k-means” algoritması özellikle büyük veri setlerinde sade yapısı ve hızlı çalışması nedeniyle yaygın olarak kullanılmakta olup, veri örüntülerini sınıflandırma, örnekler arasında benzerlik ilişkilerini ortaya çıkarma ve veri boyutunun indirgenmesi gibi çok çeşitli analizlerde tercih edilmektedir. Burada PCA sonuçlarının kümelenmesi için kullanılmıştır.

UV-Gör absorpsiyon spektrumlarına ait çapraz korelasyon matrisi, farklı örneklerin spektral profilleri arasındaki benzerlik düzeylerini nicel olarak ortaya koymaktadır. Matris elemanları, her bir örnek çifti için korelasyon katsayısını temsil etmekte olup, bu katsayılar +1 ile -1 arasında değişmektedir. +1'e yakın değerler, ilgili iki spektrumun yüksek derecede benzer olduğunu, 0'a yakın değerler düşük benzerlik ya da ilişkisizlik olduğunu, -1'e yakın değerler ise ters yönlü bir ilişki bulunduğunu göstermektedir.

4. DENEYSEL SONUÇLAR

4.1. LC-MS/MS Sonuçları

Kullanılan ALP tablet ve LORA tablet örneklerinde ALP ve LORA varlığının tespiti için LC-MS/MS analizi gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizler sonucunda elde edilen veriler Tablo 3’te verilmiştir.

Tablo 3. LC-MS/MS ile yapılan ALP VE LORA tayinine ait sonuçlar.

No	Analit	Kimyasal formül	Beklenen kütle (Da, m/z)	Ölçülen kütle (Da, m/z)	Kütle doğruluğu (ppm)	Alıkonma süresi (dak)	Adduct
1	ALP	C ₁₇ H ₁₃ ClN ₄	309,09015	309,091 (309,0902)	2,76	6,04	Hidrojen (M + H)
2	LORA	C ₁₅ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O ₂	321,01921	321,0189 (321,0192)	-0,9	6,03	Hidrojen (M + H)

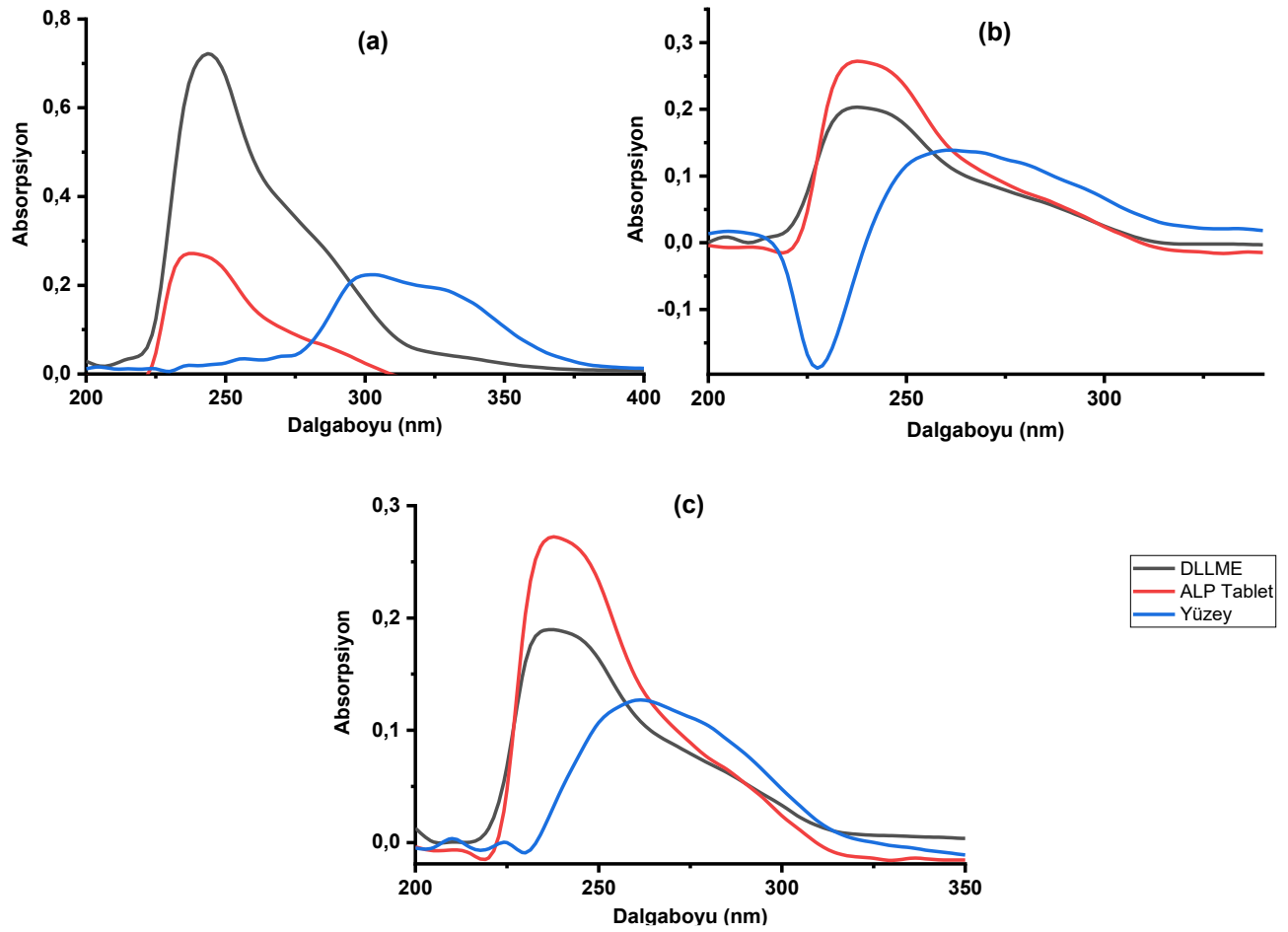
Analiz sonucunda elde edilen ALP ve LORA tablet örneklerine ait kütle spektrumları (Ek-Şekil 5, Ek-Şekil 6), standart ALP ve LORA maddelerine ait kütle spektrumları ile örtüşmektedir. Böylelikle tablet ilaç içerisindeki ALP ve LORA maddelerinin varlığı LC-MS/MS ile teyit edilmiştir.

4.2. UV-Gör Absorpsiyon Spektroskopi Sonuçları

4.2.1. ALP UV-Gör Absorpsiyon Spektroskopi Sonuçları

Farklı içeceklerdeki ALP tabletin ekstraksiyonunun doğruluğunu analiz edebilmek için bardaktan/kadehten alınan örneklerin ekstraksiyon öncesi absorpsiyonu, ekstraksiyon sonrası absorpsiyonu ve referans olarak stok ALP tablet çözeltisinin absorpsiyonu karşılaştırıldı. Siyah renkteki “DLLME” spektrumu, ekstraksiyon işlemi sonrasında elde edilen örneğe; mavi renkteki “Yüzey” spektrumu, ekstraksiyon öncesinde yüzeyden alınan

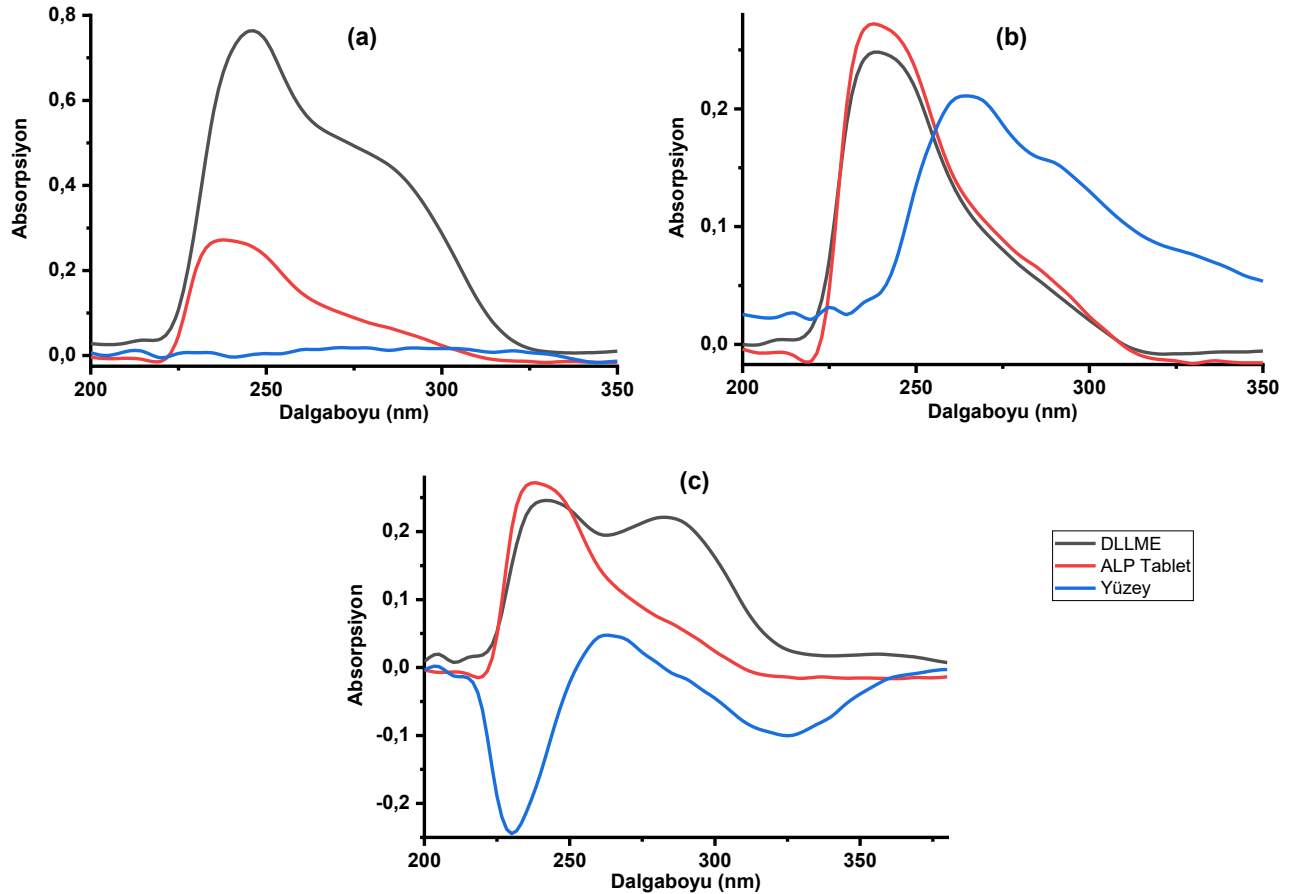
örneğe; kırmızı renkteki “ALP tablet” spektrumu ise stok çözelti olarak hazırlanan referans örneğe karşılık gelmektedir.



Şekil 5. ALP tabletin beyaz şarap içerisinde (a) sıvı, (b) damlacık ve (c) kuru formuna ait UV-Gör absorpsiyon spektrumları.

Tüm örneklerde referans olarak kullanılan ALP tablet spektrumu 220–300 nm aralığında 0,27 şiddetinde, yaklaşık 245 nm absorpsiyon maksimumlu bir bant gösterir. Şekil 5’te, beyaz şarap içerisinde hazırlanmış ALP tabletin üç farklı formuna ait UV-Gör absorpsiyon spektrumları yer almaktadır. Şekil 5 (a)’da sıvı forma ait DLLME örneği referans ile benzer ancak daha yüksek şiddetli bir absorpsiyon bandına sahipken, yüzey örneği 275-375 nm civarında düşük şiddetli, daha uzun dalgaboyunda ve şekilsel farklılık gösteren bir bant vermektedir. Şekil 5 (b)’de görülen damlacık formunda 220–300 nm aralığında her üç spektrumda da belirgin bantlar görülmektedir. Ancak yine yüzey örneğine ait absorpsiyon spektrumunda belirgin şekilsel farklılık görülmektedir. Damlacık formunda sıvı formunun aksine ALP tablet örneği DLLME örneğine göre daha düşük şiddette absorpsiyon

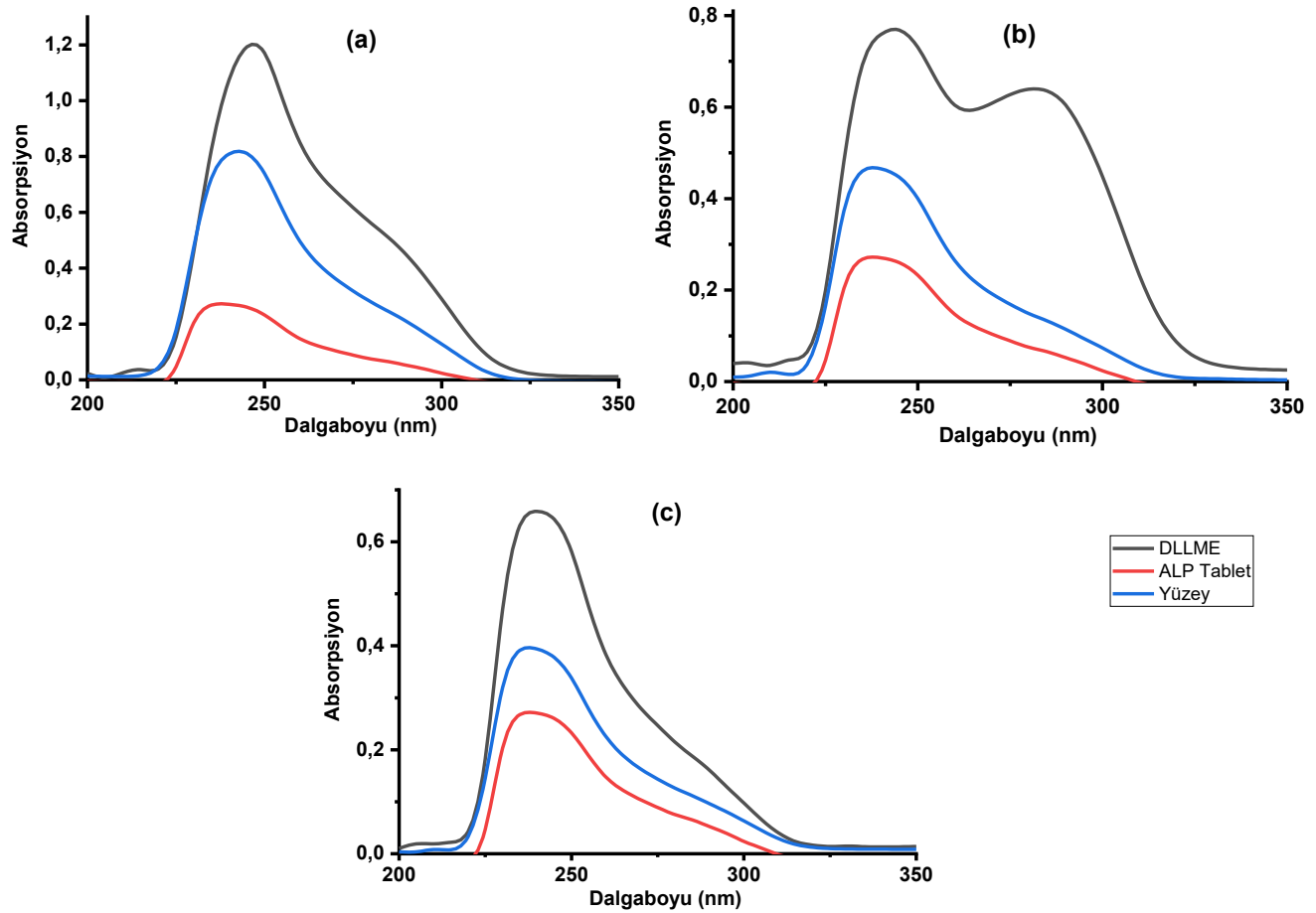
göstermektedir. Grafik negatif değerlere de sahiptir. Bu durumun nedeni kesin olarak saptanamamış olup cihaz kaynaklı sıfır düzeltme farklarından kaynaklanmış olabileceği öngörülmüştür. Kuru formda da (Şekil 5 (c)) referans ve DLLME örneği 220–300 nm aralığında benzer bant yapıları göstermektedir. Yüzey örneği ise 230-350 nm civarında daha yayvan ve düşük şiddetli bir absorpsiyon bandına sahiptir.



Şekil 6. ALP tabletin roze şarap içerisinde hazırlanmış (a) sıvı, (b) damlacık ve (c) kuru formuna ait UV-Gör absorpsiyon spektrumları.

Şekil 6’da roze şarap içerisinde hazırlanmış ALP tabletin üç farklı formuna ait UV-Gör absorpsiyon spektrumları yer almaktadır. Sıvı formunda DLLME örneği 220-300 nm civarında, referans ile örtüşen ve daha yüksek absorpsiyon şiddetine sahip bir bant göstermektedir. Yüzey örneğinin spektrumu ise 275–375 nm arasında belirginliği azalmış ve düşük şiddetlidir. Damlacık formunda DLLME örneği referans ile örtüşen ancak daha düşük şiddette bir bant göstermektedir. Yüzey örneği ise 250-350 nm’de daha düşük şiddetli absorpsiyon göstermektedir. DLLME ve referans örneklerine kıyasla şekli daha yayvan yapıdadır. Kuru formda ALP tablet ve DLLME spektrumları 220–300 nm

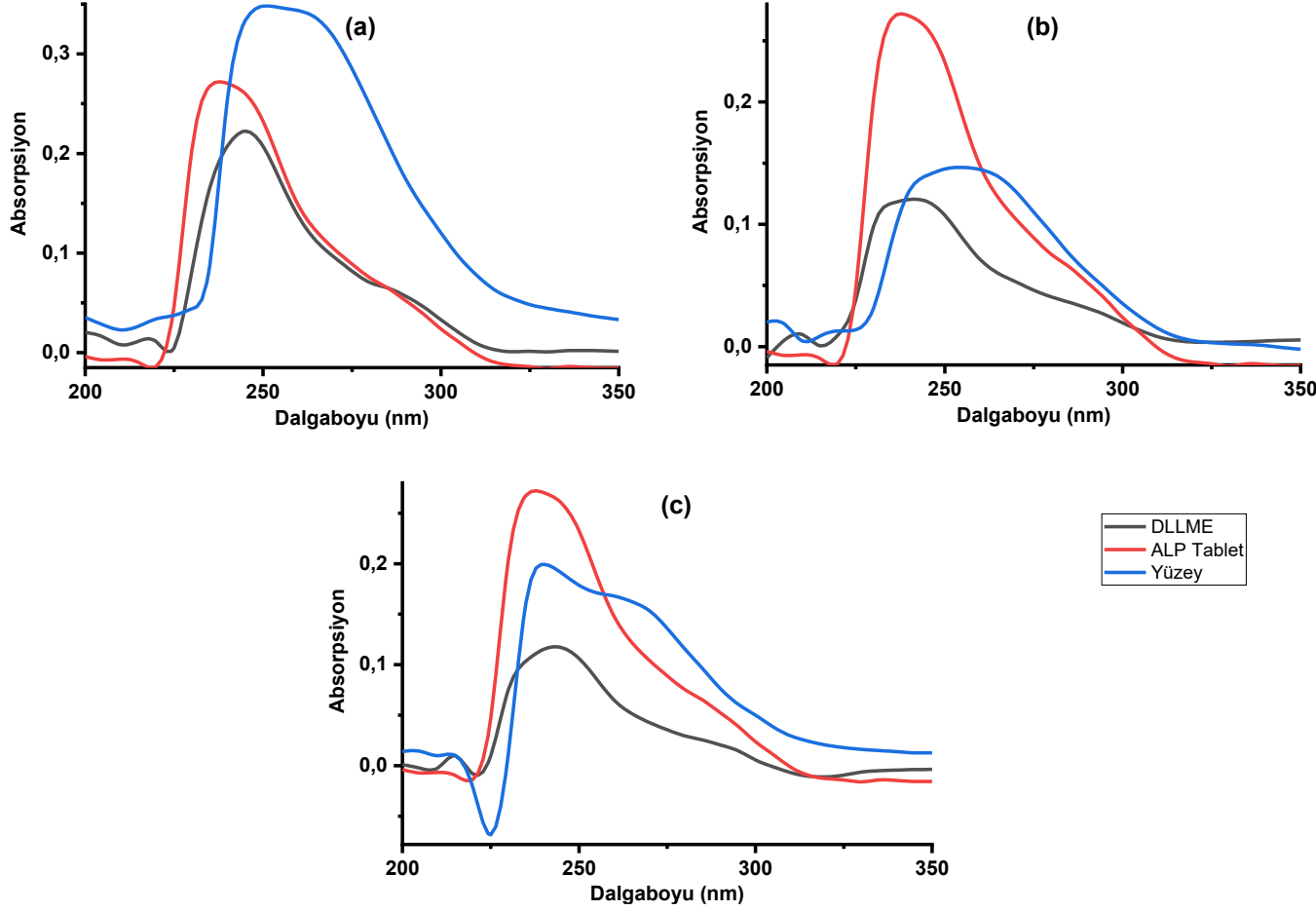
aralığında benzer bant yapıları göstermektedir. Ancak 285 nm'deki absorpsiyon bandı DLLME örneğinde referansa göre daha yüksek şiddete sahiptir. Yüzey örneği ise 230–350 nm arasında daha geniş yayılım gösteren, negatif değerlere de inen, düşük şiddetli bir spektruma sahiptir.



Şekil 7. ALP tabletin votka içerisinde (a) sıvı, (b) damlacık ve (c) kuru formuna ait UV-Gör absorpsiyon spektrumları.

ALP tablet-votka örneklerinin üç farklı formuna ait UV-Gör absorpsiyon spektrumları Şekil 7’de görülmektedir. Sıvı ve kuru formlarda DLLME ve yüzey örnekleri referans örnekle benzer şekilde yapıda ancak farklı şiddetlerde bantlar vermiştir. Yüzey absorpsiyon değeri yaklaşık 0,6 şiddetinde gözlenirken DLLME absorpsiyonu yaklaşık 1,2 şiddeti ile üç spektrum arasında en yüksek absorpsiyon şiddetine ulaşmaktadır. Kuru formda ise benzer şekilde, yüzey spektrumu yaklaşık 0,4 şiddetinde, DLLME spektrumu ise yaklaşık 0,6 absorpsiyon şiddeti ile ALP tablet absorpsiyonundan daha yüksek bir şiddet göstermektedir. Damlacık formunda yüzey örneği 0,45 şiddetinde bir absorpsiyon gösterirken, DLLME maksimumu 0,75 şiddetinde çift absorpsiyon maksimumuna sahip bir

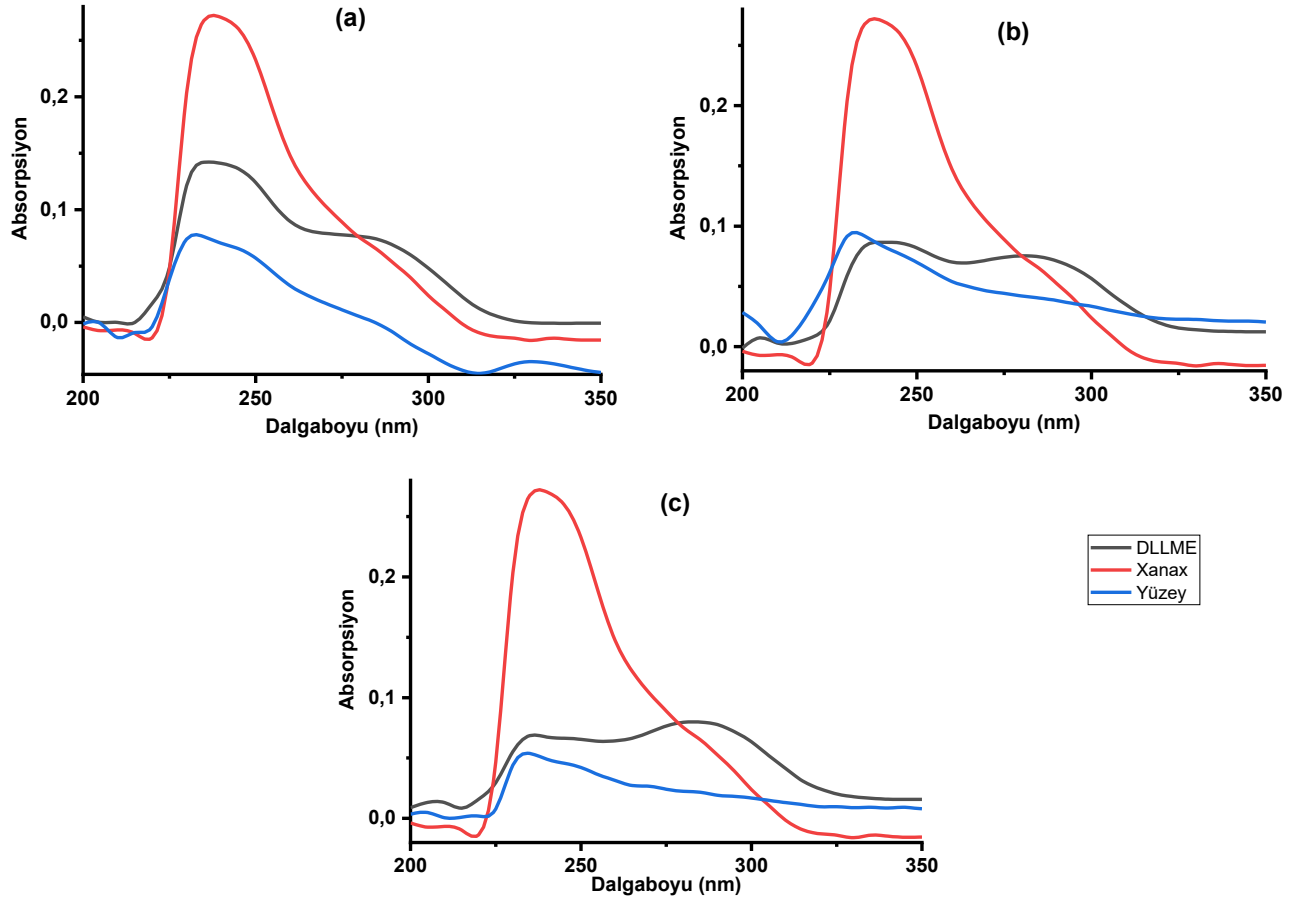
bant göstermektedir. Her üç formda da DLLME ve yüzey spektrumlarında benzer bant şekli korunmakta olup DLLME örneği, absorpsiyon şiddeti bakımından en yüksek değerlere ulaşmaktadır.



Şekil 8. ALP tabletin gazoz içerisinde (a) sıvı, (b) damlacık ve (c) kuru formuna ait UV-Gör absorpsiyon spektrumları.

Şekil 8’de, gazoz içerisinde hazırlanmış ALP tabletin üç farklı formuna ait UV-Gör absorpsiyon spektrumları yer almaktadır. Şekil 8 (a)’da görülen sıvı form DLLME örneği referans örnek ile şekil olarak örtüşür fakat daha düşük bir şiddettedir. Yüzey örneğine ait spektrum ise 225-350 nm aralığında daha yüksek şiddette ve yayvan bir bant göstermektedir. Şekil 8 (b)’de damlacık formunda yüzey absorpsiyon ve DLLME absorpsiyon şiddetleri ALP tablet absorpsiyon şiddetine göre nispeten yakındır. Bu iki spektrum referans ile karşılaştırıldığında DLLME referansa benzer şekilde bir bant gösterirken yüzey spektrumu daha geniş bir bant göstermektedir. Benzer şekilde Şekil 8 (c)’de kuru formda DLLME ve referans spektrumları şekil olarak örtüşmektedir. DLLME

spektrumunun absorpsiyon şiddeti diğer spektrumlardan daha düşüktür. Yüzey spektrumu ise 230–350 nm arasında şekilsel olarak farklılık gösteren bir banda sahiptir.

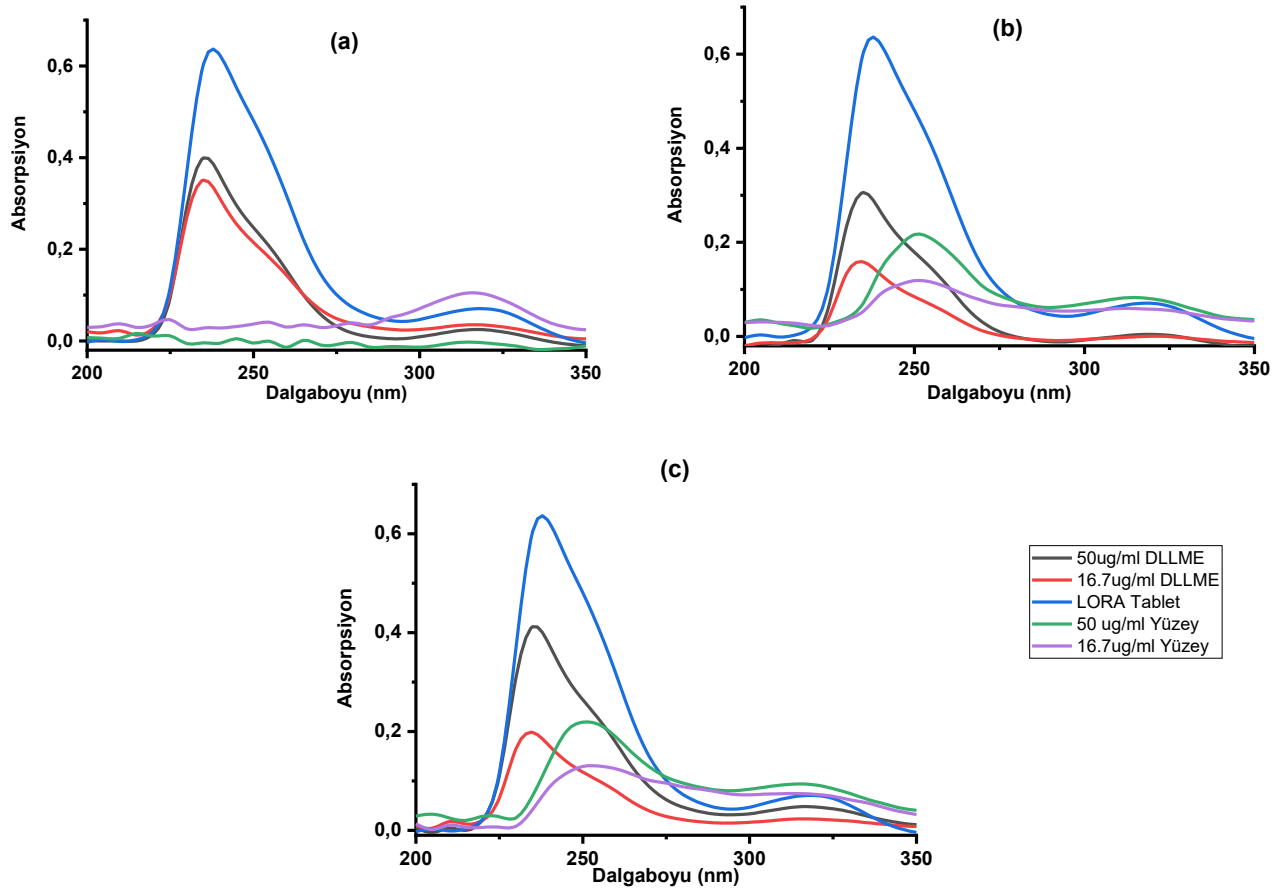


Şekil 9. ALP tabletin maden suyu içerisinde (a) sıvı, (b) damlacık ve (c) kuru formuna ait UV-Gör absorpsiyon spektrumları.

Maden suyu içerisinde hazırlanmış ALP tabletin üç farklı formuna ait UV-Gör absorpsiyon spektrumları Şekil 9’da yer almaktadır. Sıvı formda yüzey spektrumları 230 nm’de referans spektrumundan daha dar ve keskin bir bant göstermektedir. DLLME spektrumu ise 240 ve 290 nm de iki maksimuma sahip bir bant göstermektedir. Benzer şekilde damlacık (Şekil 9 (b)) ve kuru (Şekil 9 (c)) formda yüzey spektrumu 230 nm’de dar bir bant şeklindeyken DLLME spektrumları iki maksimumlu bir absorpsiyon bandı vermiştir. Şekil 9 (b)’de DLLME, 240 ve 290 nm’de, Şekil 9 (c)’de 235 ve 290 nm’de iki maksimum göstermiştir. Ayrıca DLLME spektrumlarında 290 nm’deki absorpsiyon bant şiddetinin 240 nm’deki bant şiddetine kıyasla sıvı formda daha düşükken kuru formda daha yüksek olduğu görülür.

4.2.2. LORA UV-Gör Absorpsiyon Spektroskopisi Sonuçları

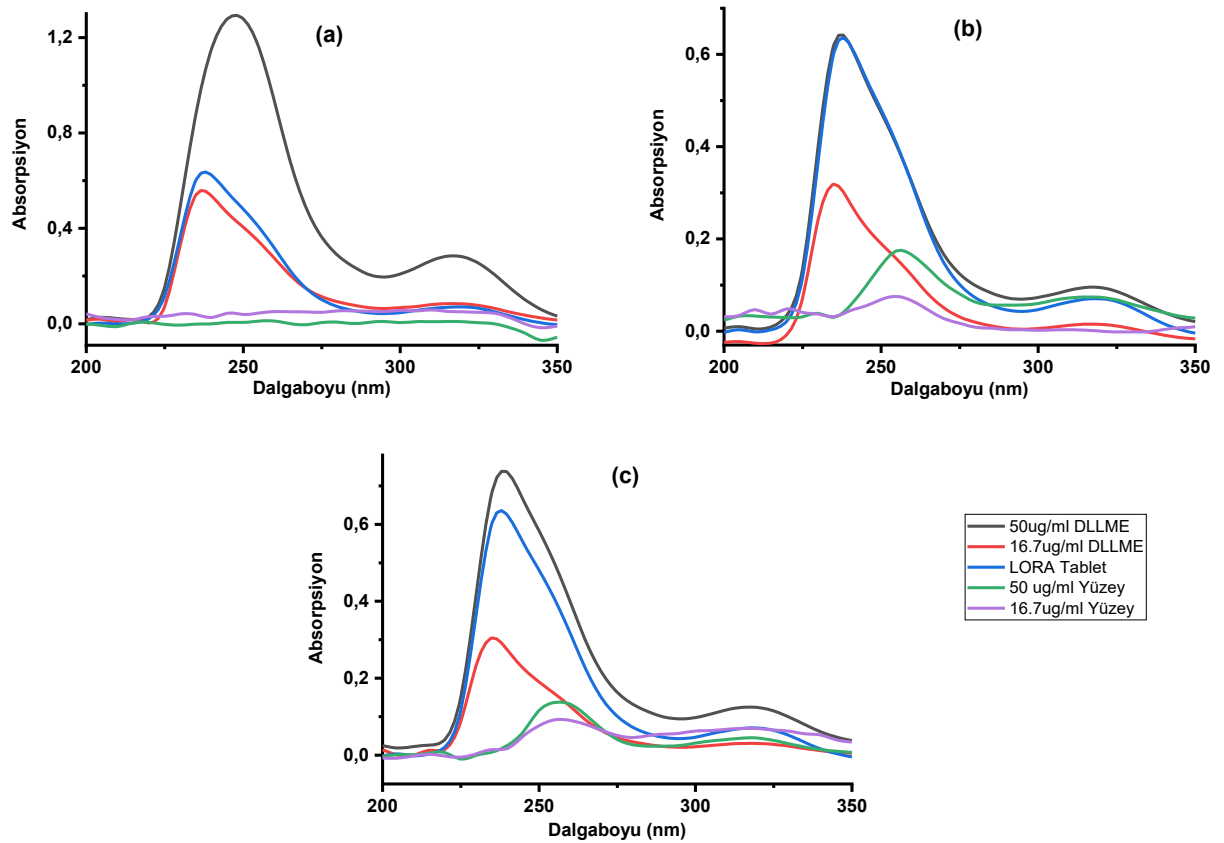
Farklı içeceklerdeki LORA tabletin ekstraksiyonunun doğruluğunu analiz edebilmek için bardaktan/kadehten alınan örneklerin ekstraksiyon öncesi absorpsiyonu, ekstraksiyon sonrası absorpsiyonu ve referans olarak stok LORA tablet çözeltisinin absorpsiyonu karşılaştırıldı. Siyah renkteki “50 µg/ml DLLME” spektrumu, 50 µg/ml derişimde LORA içeren içecek örneğinin ekstraksiyon sonrası elde edilen spektrumunu; yeşil renkteki “50 µg/ml Yüzey” spektrumu, aynı derişimdeki örneğin ekstraksiyon öncesi spektrumunu; kırmızı renkteki “16,7 µg/ml DLLME”, 16,7 µg/ml LORA içeren örneğin ekstraksiyon sonrası spektrumunu; mor renkteki “16,7 µg/ml Yüzey” ise bu derişimdeki örneğin ekstraksiyon öncesi spektrumunu temsil etmektedir. Mavi renkteki “LORA tablet” ise stok çözelti olarak hazırlanan referans örneğin absorpsiyon spektrumunu ifade etmektedir.



Şekil 10. LORA tabletin beyaz şarap içerisinde (a) sıvı, (b) damlacık ve (c) kuru formuna ait UV-Gör absorpsiyon spektrumları.

Şekil 10’da beyaz şarap içerisinde hazırlanmış LORA tabletin sıvı, damlacık ve kuru formuna ait UV-Gör absorpsiyon spektrumları verilmiştir. Sıvı formda (Şekil 10 (a)) iki

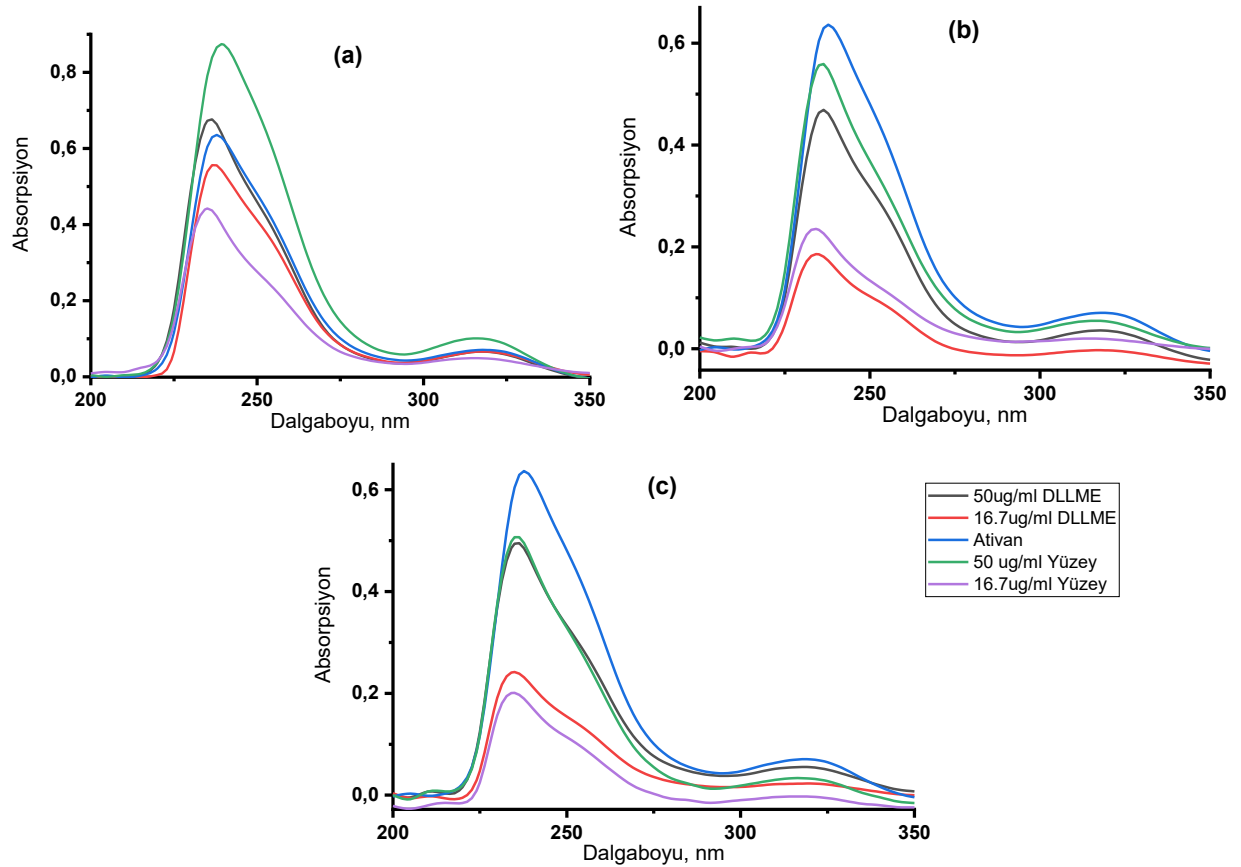
derişimde de DLLME örneğine ait spektrumlar 220–350 nm aralığında, 240 nm’de daha yüksek şiddette ve 315 nm’de daha düşük şiddette olmak üzere iki maksimumlu bir absorpsiyon bandı gösteren referans ile benzer özellikte, ancak daha düşük şiddette absorpsiyon bandı göstermektedir. Yüzey örneklerine ait spektrumlarda ise 240 nm’deki bant görülmemektedir. Damlacık formda (Şekil 10 (b)) ise DLLME spektrumlarında referans ile örtüşen daha düşük şiddette bantlar gözlenmiştir. Yüzey spektrumlarında absorpsiyon maksimumunun 240 nm’den 250 nm’ye kaydığı görülmektedir. Benzer şekilde kuru formda (Şekil 10 (c)) DLLME spektrumları referans ile örtüşen daha düşük şiddette bantlar verirken 50 µg/L yüzey spektrumu 250 ve 320 nm’de iki maksimumlu, 16,7 µg/mL yüzey spektrumu 250 nm absorpsiyon maksimumlu yayvan bir bant vermiştir.



Şekil 11. LORA tabletin roze şarap içerisinde (a) sıvı, (b) damlacık ve (c) kuru formuna ait UV-Gör absorpsiyon spektrumları.

Şekil 11’de roze şarap içerisinde hazırlanmış LORA tabletin sıvı, damlacık ve kuru formuna ait UV-Gör absorpsiyon spektrumları görülmektedir. Şekil 11 (a)’da görülen sıvı formda 16,7 µg/mL DLLME spektrumu referans ile örtüşürken 50 µg/mL DLLME spektrumu daha yüksek şiddette görülmektedir. Yüzey spektrumları ise çok düşük absorpsiyon şiddetine sahiptir. Şekil 11 (b)’de görülen damlacık formunda ise 50 µg/mL

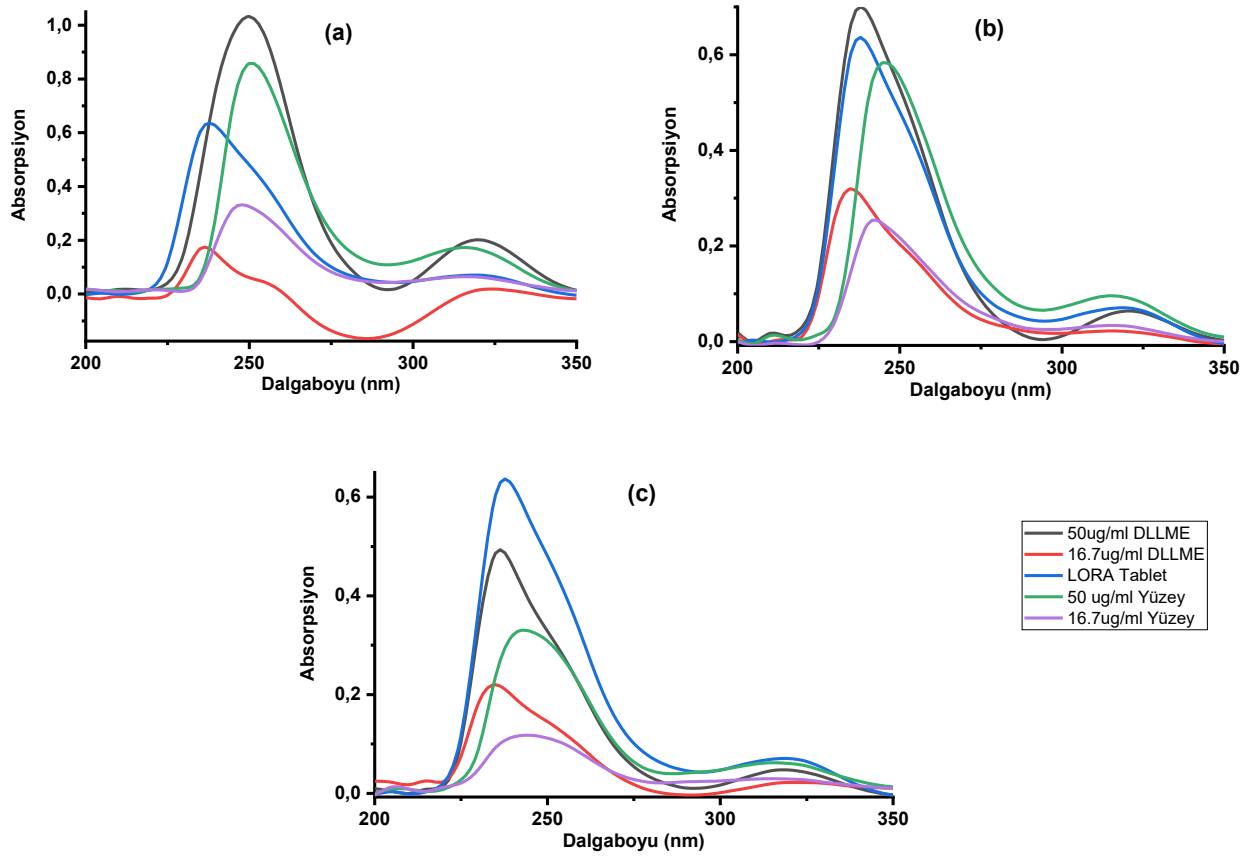
DLLME spektrumu referans ile örtüşürken 16,7 $\mu\text{g/mL}$ DLLME spektrumu daha düşük şiddette görülmektedir. 50 $\mu\text{g/mL}$ yüzey spektrumu 250 ve 320 nm’de iki maksimumlu bant, 16,7 $\mu\text{g/mL}$ yüzey spektrumu 250 nm’de tek maksimumlu bant vermiştir. Şekil 10 (c)'de kuru formda DLLME spektrumları referans ile örtüşür, 50 $\mu\text{g/mL}$ DLLME örneği referanstan daha yüksek, 16,7 $\mu\text{g/mL}$ DLLME örneği ise referanstan daha düşük absorpsiyon şiddetine sahiptir. Yüzey örneklerine ait spektrumlar, 250 nm maksimumlu tek tepeli bir absorpsiyon bandına sahiptir.



Şekil 12. LORA tabletin votka içerisinde (a) sıvı, (b) damlacık ve (c) kuru formuna ait UV-Gör absorpsiyon spektrumları.

Votka içerisinde hazırlanmış LORA tabletin sıvı, damlacık ve kuru formuna ait UV-Gör absorpsiyon spektrumları Şekil 12’de görülmektedir. Şekil 12 (a)’da görülen sıvı forma ait bütün spektrumlar benzer bant şekline sahip olup 220–300 nm aralığında 240 ve 315 nm’de iki maksimumlu bir absorpsiyon bandı göstermektedir. 50 $\mu\text{g/mL}$ yüzey örneği tüm spektrumlar arasında en yüksek absorpsiyon şiddetine, 16,7 $\mu\text{g/mL}$ yüzey örneği ise en düşük absorpsiyon şiddetine sahiptir. Şekil 12 (b)'de spektrumları görülen damlacık formunda bütün spektrumlar benzer bant şekline sahip olup 220–300 nm aralığında 240 ve 315 nm’de iki maksimumlu absorpsiyon göstermektedir. Absorpsiyon şiddetleri ise en

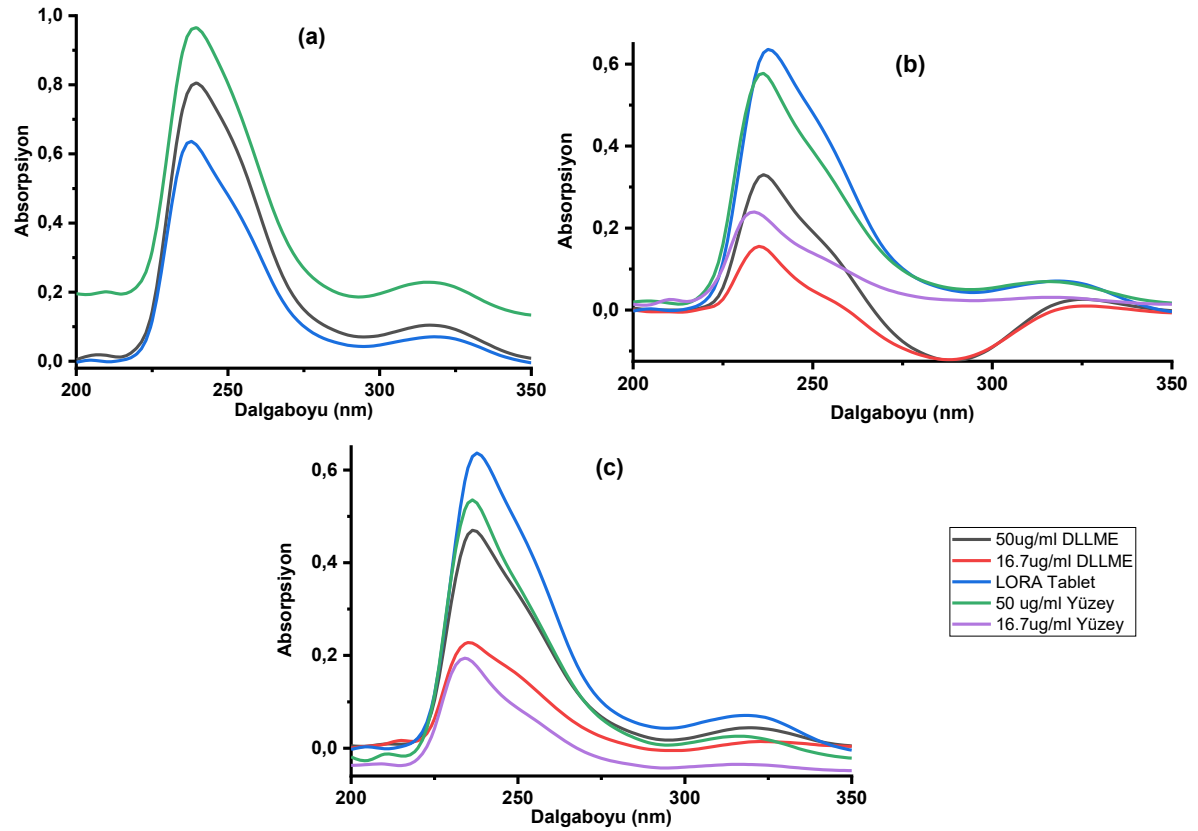
yüksekten en düşüğe sırasıyla referans, 50 µg/mL yüzey, 50 µg/mL DLLME, 16,7 µg/mL yüzey, 16,7 µg/mL DLLME şeklinde görülmektedir. Şekil 12 (c)'de kuru formda, tüm örneklerle ait spektrumlar referans ile benzer şekilde farklı şiddetlerde bantlar göstermiştir.



Şekil 13. LORA tabletin gazoz içerisinde (a) sıvı, (b) damlacık ve (c) kuru formuna ait UV-Gör absorpsiyon spektrumları.

Gazoz içerisinde hazırlanmış LORA tabletin sıvı, damlacık ve kuru formuna ait UV-Gör absorpsiyon spektrumları Şekil 13'te sunulmuştur. Sıvı formda (Şekil 13 (a)) 50 µg/mL yüzey ve DLLME örnekleri benzer şekilde absorpsiyon spektrumları vermiştir. Her ikisi de 250 nm'de ve 315 nm'de iki maksimumlu spektrum bantlarına sahiptir ve absorpsiyon şiddetleri referanstan yüksektir. 16,7 µg/mL yüzey örneğinin absorpsiyon bandı referans ile örtüşürken 16,7 µg/mL DLLME örneğine ait absorpsiyon 220-250 nm'de daha dar bir bant olarak görülmektedir. Damlacık formunda (Şekil 13 (b)) 50 µg/mL DLLME örneğine ait spektrum ve referans örtüşmektedir 16,7 µg/mL DLLME örneğine ait spektrum ise şekil olarak benzer fakat daha düşük bir absorpsiyon şiddetindedir. Yüzey ölçümlerine ait spektrumlarda ise kırmızıya kayma görülmektedir. DLLME örneklerine kıyasla yüzey örneklerine ait spektrumlar daha düşük absorpsiyon şiddetine sahiptir. Kuru formda (Şekil

13 (c)) DLLME örnekleri referans ile benzer bant şekline sahiptir. Yüzey spektrumlarında ise yine kırmızıya kayma görülmektedir.



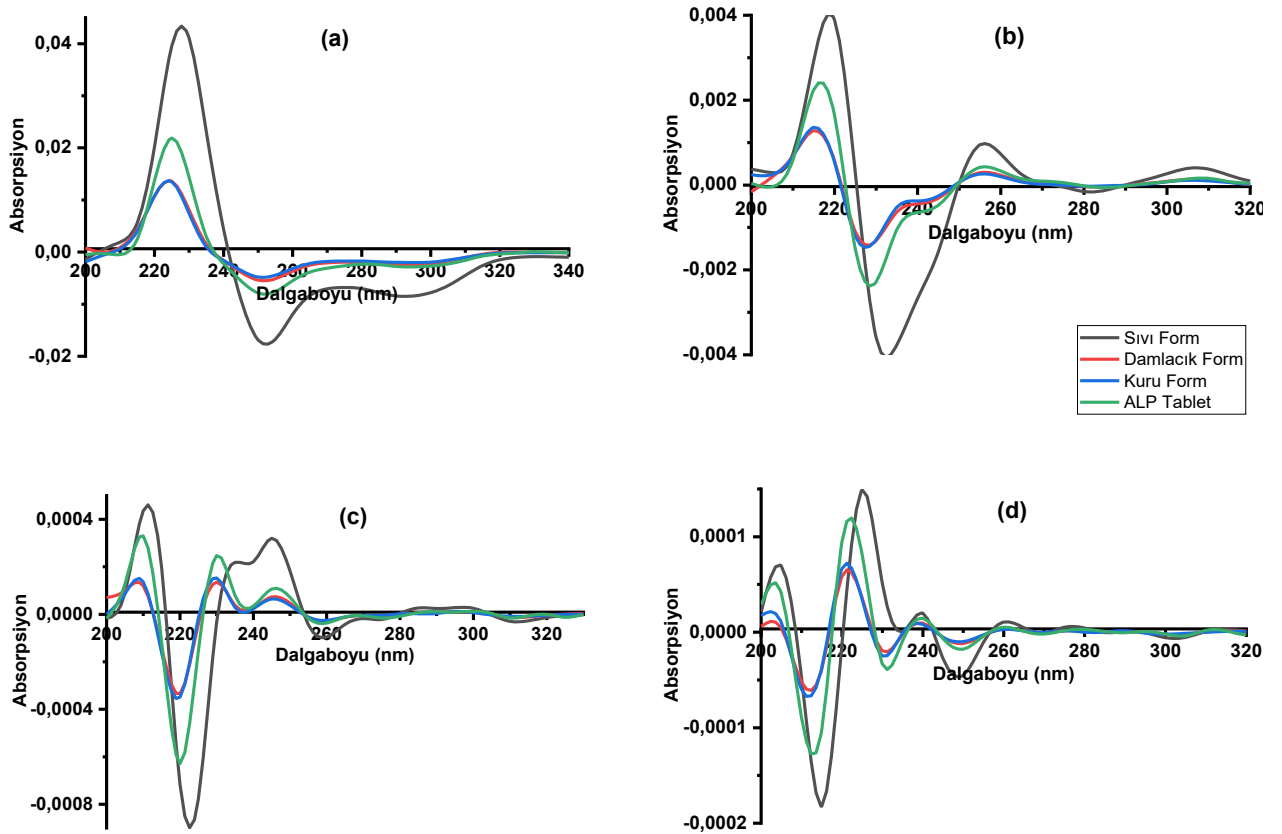
Şekil 14. LORA tabletin maden suyu içerisinde (a) sıvı, (b) damlacık ve (c) kuru formuna ait UV-Gör absorpsiyon spektrumları.

Şekil 14'te, maden suyu içerisinde hazırlanmış LORA tabletin sıvı, damlacık ve kuru formuna ait UV-Gör absorpsiyon spektrumları bulunur. Şekil 14 (a)'da görülen sıvı formda 50 $\mu\text{g/mL}$ yüzey ve DLLME örneklerine ait spektrumların bant şekli referans ile örtüşmektedir. Yüzey örneği ise DLLME örneğinden daha yüksek absorpsiyon şiddetine sahiptir. 16,7 $\mu\text{g/mL}$ derişimdeki örneğe ait spektrumlar çok düşük şiddete sahip olduğu ve referans ile benzemediği için eklenmemiştir. Şekil 14 (b)'de görülen damlacık formunda her iki derişimde da yüzey örneklerine ait spektrumlar ile referans spektrumu benzer bantları gösterirken DLLME spektrumlarında ikinci bant referansa göre daha dardır ve bu bantta kırmızıya kayma gözlemlenir. Şekil 14 (c)'deki kuru form spektrumları referans spektrumu ile benzer görünüme sahiptir. Aynı derişimdeki DLLME örnekleri, yüzey örneklerinden daha yüksek absorpsiyon şiddetine sahiptir.

4.3. UV Türev Spektroskopisi Sonuçları

4.3.1. ALP UV Türev Spektroskopisi Sonuçları

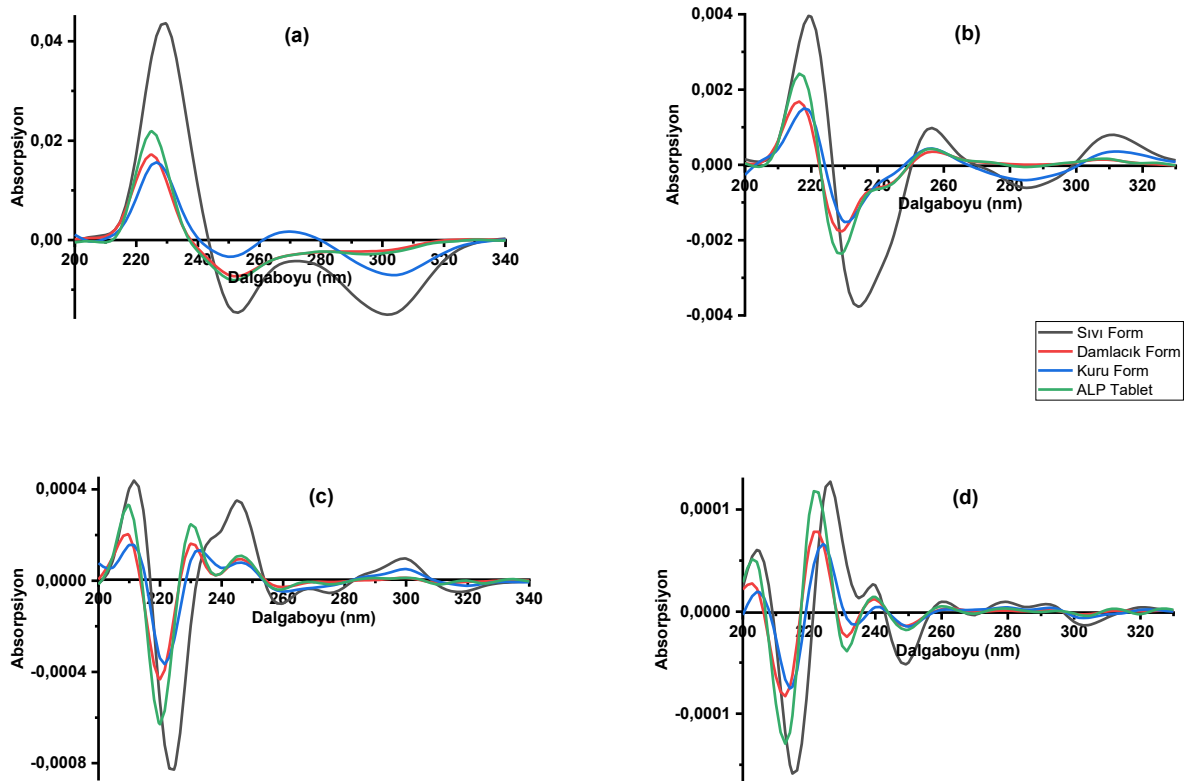
ALP tabletin farklı ortamlarda tayininde daha hassas metot geliştirme amacı ile sıvı, damlacık ve kuru formdaki örnekler UV türev spektroskopisi ile incelenmiştir. Sıfırıncı dereceden absorpsiyonlarda gözlenemeyen spektral ayrımların türev spektroskopisi ile gözlenebilir hale geldiği bilinmektedir (Kus vd., 1996). DLLME sonrası elde edilen absorpsiyon spektrumlarında sıvı, damlacık ve kuru form örneklerinin absorpsiyonları bantları sırasıyla siyah, kırmızı, mavi renkte gösterilmiştir. Referans olarak ise stok ALP tablet çözelti örneği kullanılmıştır ve absorpsiyonu yeşil renkte gösterilmektedir.



Şekil 15. ALP tabletin beyaz şarap içerisinde sıvı, damlacık ve kuru formuna ait (a) birinci derece, (b) ikinci derece, (c) üçüncü derece ve (d) dördüncü derece UV türev spektrumları.

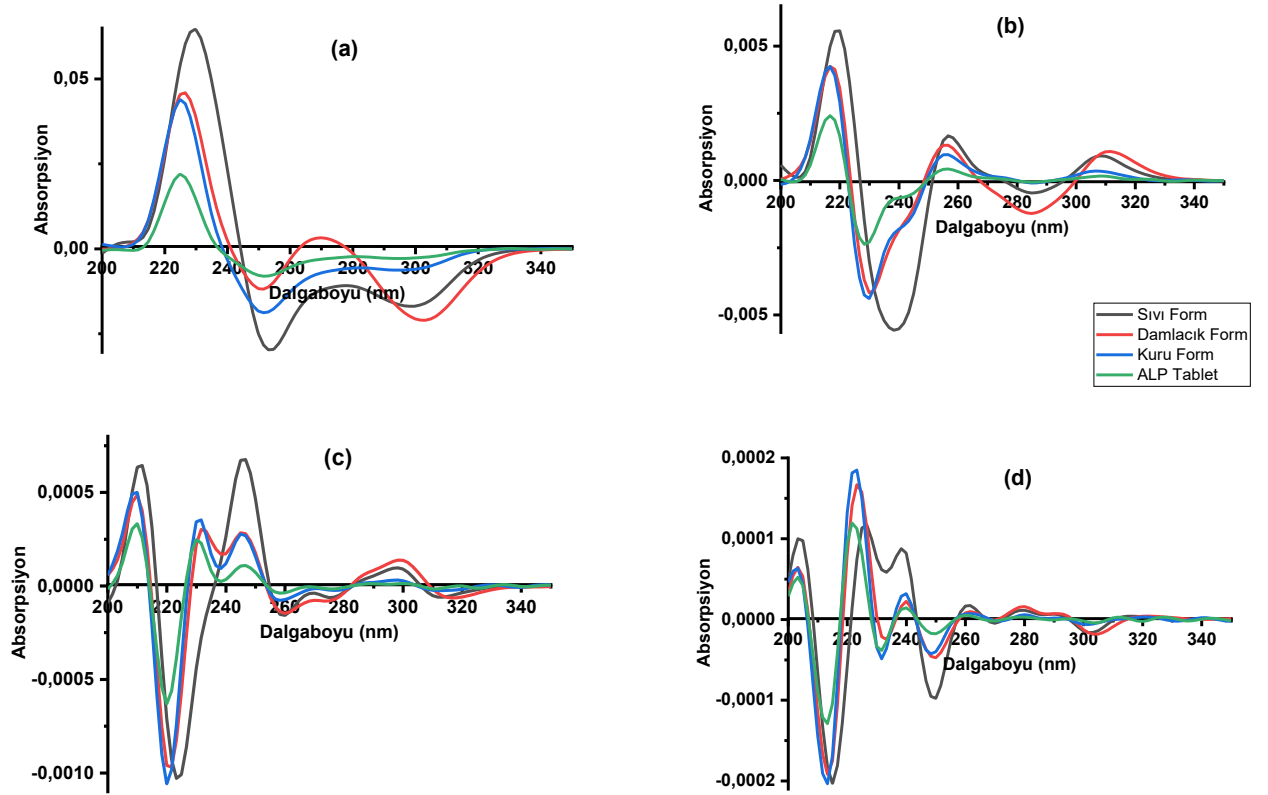
Şekil 15’te, beyaz şarap içerisinde hazırlanmış ALP tablet örneklerinin sıvı, damlacık ve kuru formlarına ait birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü dereceden UV türev spektrumları (a)–(d) panellerinde sunulmuştur. Şekil 15 (a)’da görülen birinci türev spektrumlarında,

tüm formlar ile referans arasında benzerlik gözlenmiştir. Şekil 15 (b)'de ikinci derece türev spektrumları incelendiğinde, sıvı formun hem bant şekli hem de bant şiddeti olarak diğer formlardan ve referanstan farklılaştığı görülmektedir. İkinci türev spektrumlarında ise 200-220 ve 250-320 nm aralıklarında spektrumlar benzerlik gösterirken 220-250 nm aralığında sıvı forma ait spektrum diğerlerinden belirgin farklılık göstermektedir. Üçüncü derece türev spektrumları Şekil 15 (c)'de verilmiştir. Üçüncü derece türev spektrumlarında bantların daha da keskinleştiği ve sıvı forma ait bantların diğerleri ile ayrımının belirgin hale geldiği gözlenmiştir. İkinci derece türev spektrumlarına benzer şekilde damlacık ve kuru form örnekleri referans ile benzer bantlara sahiptir. Sıvı form örneğinin spektrumu ise 220-250 nm aralığında diğerlerinden ayrılmış gözükmemektedir. Absorpsiyon maksimumu dalgaboyu değerlerinde farklılaşma ile sıvı formda bu bölgedeki ikili bant gözlenmektedir. Şekil 15 (d)'de dördüncü derece türev spektrumlarında ise bant maksimumlarında küçük farklılıklar ve şiddet farklılıkları ile üç formdaki örnekler de referans ile uyum göstermiştir.



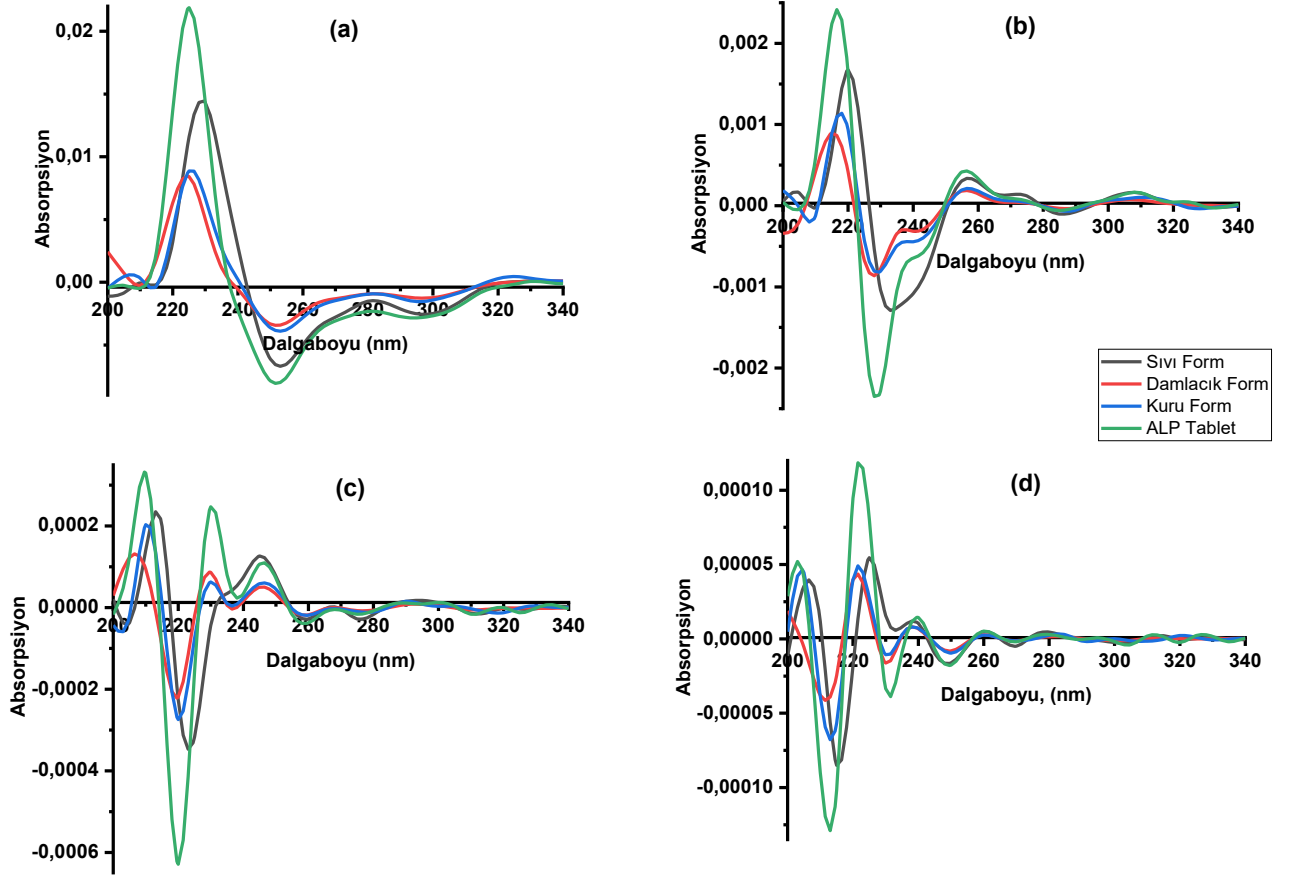
Şekil 16. ALP tabletin roze şarap içerisinde hazırlanmış sıvı, damlacık ve kuru formuna ait (a) birinci derece, (b) ikinci derece, (c) üçüncü derece ve (d) dördüncü derece UV türev spektrumları.

Roze şarap içerisinde hazırlanmış ALP tablet örneklerinin sıvı, damlacık ve kuru formlarına ait sırasıyla birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü dereceden UV türev spektrumları Şekil 16'da gösterilmektedir. Roze şarap örneklerinden elde edilen absorpsiyon türev spektrumları beyaz şaraptan elde edilen absorpsiyon türev spektrumları ile büyük oranda benzerlik göstermektedir. Şekil 16 (a)'da birinci türev spektrumlarında, üç form da referans ile benzerlik göstermiştir. Damlacık form spektrum bandı referans ile örtüşürken sıvı ve kuru form örneklerine ait spektrumlar 290-320 nm aralığında referanstan daha belirgin bir bant göstermektedir. Sıvı form örneğine ait spektrum diğer formlar arasında en yüksek bant şiddetine sahiptir. Şekil 16 (b)'de ikinci derece türev spektrumlarında, 220-250 nm aralığında sıvı formda kırmızıya kayma görülmüştür ayrıca bu bölgede sıvı form daha geniş bir bant yapısına sahiptir. 270-310 nm aralığında ise sıvı ve kuru form örneklerine ait spektrumlarda daha belirgin bant gösterirken damlacık formda referans ile örtüşen daha düşük şiddette bant görülmektedir. Şekil 15 (c)'de üçüncü derece türev spektrumlarında 210-250 nm aralığında sıvı form spektrumunda yine hafif kırmızıya kayma görülmüştür. Damlacık ve kuru form örnekleri referans ile benzer spektrum bantlarına sahiptir. Şekil 15 (d)'de dördüncü derece türev spektrumlarında 210-230 nm aralığında sıvı formda görülen kırmızıya kayma haricinde üç form da referans ile benzer spektrum bantları göstermektedir.



Şekil 17. ALP tabletin votka içerisinde hazırlanmış sıvı, damlacık ve kuru formuna ait (a) birinci derece, (b) ikinci derece, (c) üçüncü derece ve (d) dördüncü derece UV türev spektrumları.

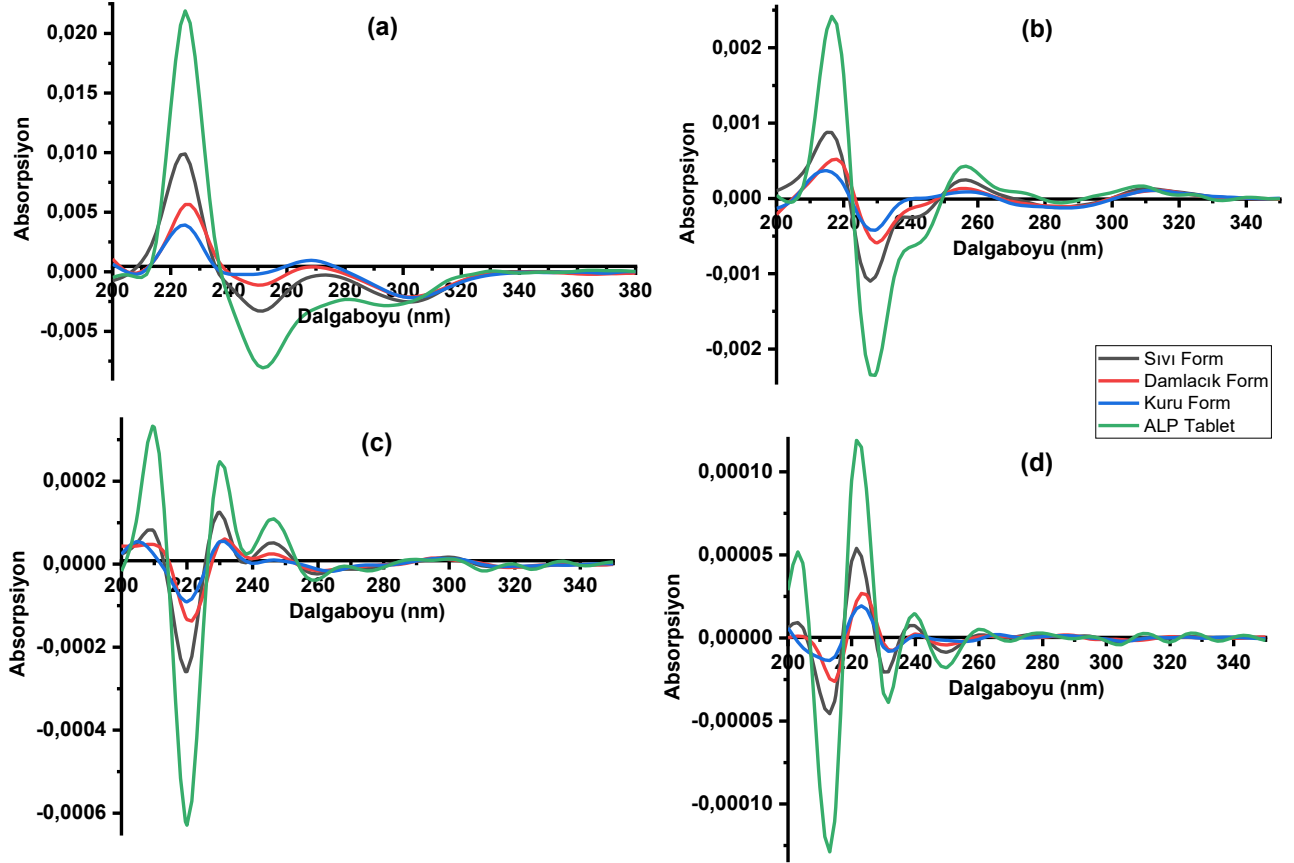
Şekil 17 votka içerisindeki ALP tabletin sıvı damlacık ve kuru form örneklerinin UV türev spektrumlarını içerir. Birinci derece türev spektrumunda, Şekil 17 (a)'da 200-240 nm aralığında üç formdaki örnek de referans ile benzer spektrum bandı gösterirken 250-320 nm aralığında referansa ait spektrumda keskin olmayan bir bant gözlenmektedir. Bu bölgede özellikle damlacık ve kuru form spektrumlarında daha belirgin bantlar gözlenmektedir. Şekil 17 (b)'de ikinci derece türev spektrumlarında tüm formlar referans ile benzer spektrumlara sahiptir. Yalnızca 200-250 nm aralığında sıvı formda kırmızıya kayma gözlenmektedir. Üçüncü derece türev spektrumları karşılaştırıldığında damlacık ve kuru form spektrumları referans spektrumu ile örtüşmekte olduğu fakat sıvı formun 220-250 nm aralığında ayrıştığı görülmektedir. Bu bölgede sıvı form örneğinde 230 nm'de referansta görülen bant bulunmamaktadır. Dördüncü derece türev spektrumlarında ise yine sıvı form örneğinde 220-240 nm aralığında kırmızıya kayma ve ikili bant diğer formlardan farklılaşma sağlamıştır. Bu bölge dışında sıvı form ve diğer örnekler referans ile örtüşmektedir.



Şekil 18. ALP tabletin gazoz içerisinde sıvı, damlacık ve kuru formuna ait (a) birinci derece, (b) ikinci derece, (c) üçüncü derece ve (d) dördüncü derece UV türev spektrumları.

Gazoz içerisinde hazırlanmış ALP tablete ait sıvı damlacık ve kuru form örneklerinin UV türev spektrumları Şekil 18’de yer almaktadır. Şekil 18 (a)’da birinci derece türev spektrumunda, 210-240 nm aralığında sıvı formda diğer içeceklerde de görülen kırmızıya kayma dışında spektrumlar referans ile örtüşmektedir. İkinci derecede ise Şekil 18 (b)’de görüldüğü üzere 240 nm sonrası bütün spektrumlar referans ile örtüşse de 200-240 nm aralığında bazı farklılıklar görülmektedir. En belirgin fark sıvı form spektrumunda 225-250 nm aralığında görülmektedir. Bu bölgede sıvı form spektrumu referansa kıyasla hem kırmızıya kayma göstermiş hem de daha yayvan bir bant göstermiştir. Şekil 18 (c)’de üçüncü derece türevde damlacık ve kuru form spektrumları referans spektrumu ile benzer bant gösterirken sıvı form spektrumunda 220-260 nm aralığında farklılık görülmektedir. Bu bölgede sıvı formda kırmızıya kayma görülmektedir ayrıca referans spektrumda 230 nm’de görülen belirgin bant sıvı form spektrumunda görülmemektedir. Şekil 18 (d)’de dördüncü derece türev spektrumunda sıvı formda görülen hafif kırmızıya kayma dışında

referans örnek ve üç farklı formdaki örnekler arasında belirgin bir farklılık görülmemektedir.



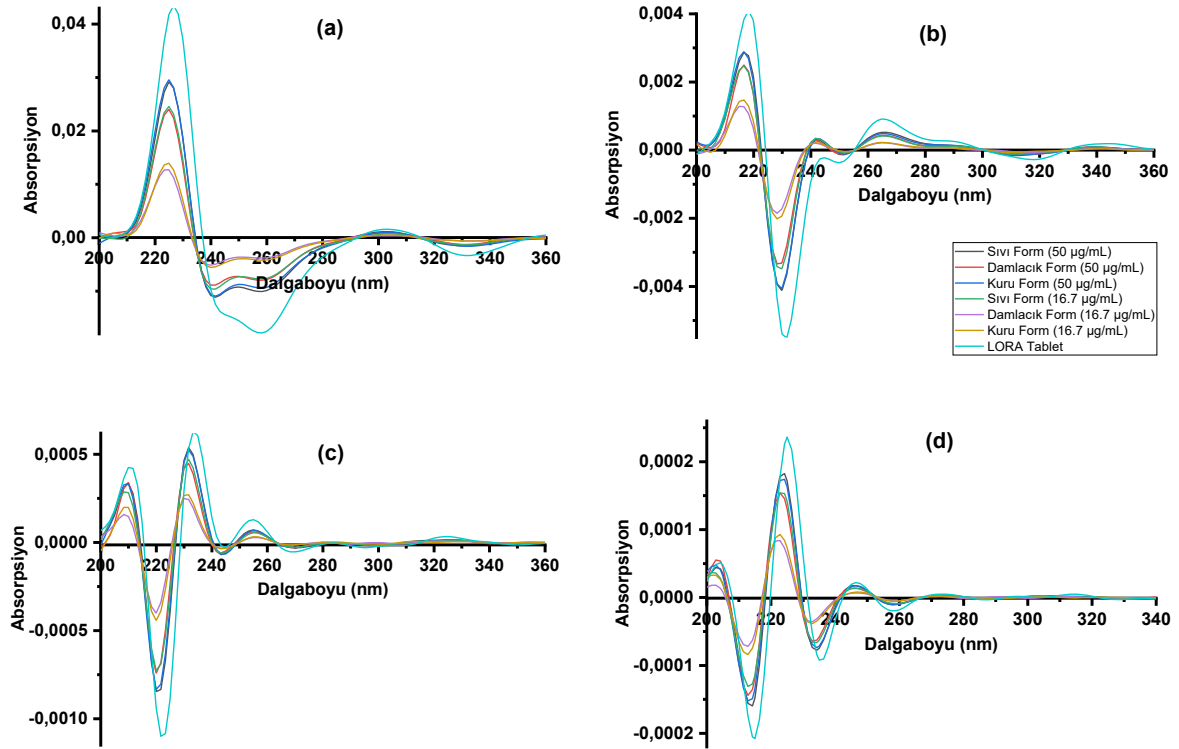
Şekil 19. ALP tabletin maden suyu içerisinde sıvı, damlacık ve kuru formuna ait (a) birinci derece, (b) ikinci derece, (c) üçüncü derece ve (d) dördüncü derece UV türev spektrumları.

Şekil 19’da maden suyu içerisinde hazırlanmış ALP tablete ait sıvı damlacık ve kuru form örneklerinin UV türev spektrumları gösterilmektedir. Tüm türev derecelerinde, damlacık ve kuru form spektrumlarında gözlenen hafif kırmızıya kayma dışında, her bir formun örnek spektrumları referans spektrum ile örtüşmektedir.

4.3.2. LORA UV Türev Spektroskopisi Sonuçları

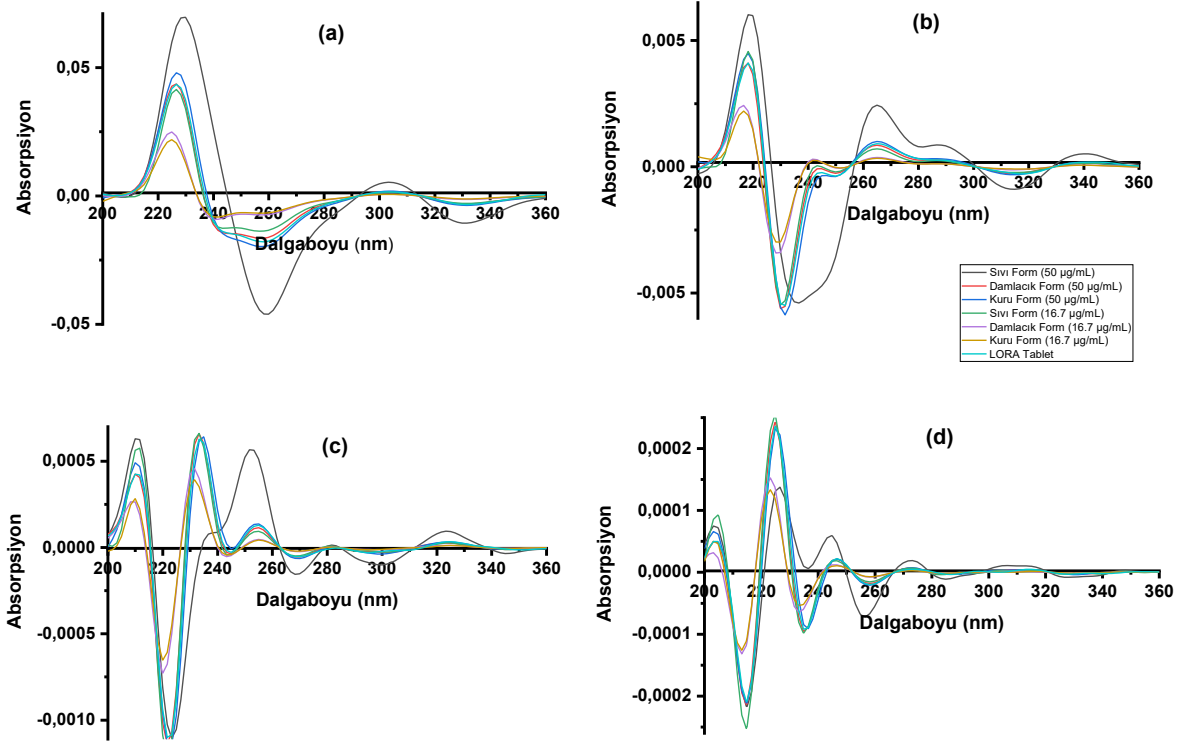
LORA tabletin farklı ortamlarda tayininde UV- Gör absorpsiyon yönteminin hassasiyetini arttırmak amacı ile sıvı, damlacık ve kuru formdaki örneklere UV türev spektroskopisi uygulanmıştır. Sıfırıncı dereceden absorpsiyon spektrumlarında gözlenemeyen spektral ayrımların türev spektroskopisi ile gözlenebilir hale gelmesi amaçlanmıştır (Kus vd., 1996) Spektrumlarda, 50 µg/ml derişimli sıvı, damlacık ve kuru form örneklerine ait bantlar sırası

ile siyah, kırmızı ve mavi renklerle; 16,7 µg/ml derişimli sıvı, damlacık ve kuru form örneklerinin bantları ise yeşil, mor ve turuncu renklerle gösterilmiştir. Referans olarak hazırlanan stok LORA tablet çözeltisine ait bant turkuaz renkle gösterilmiştir. Tüm form örnekleri DLLME işlemi sonrasında elde edilmiş olup, referans spektrum ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.



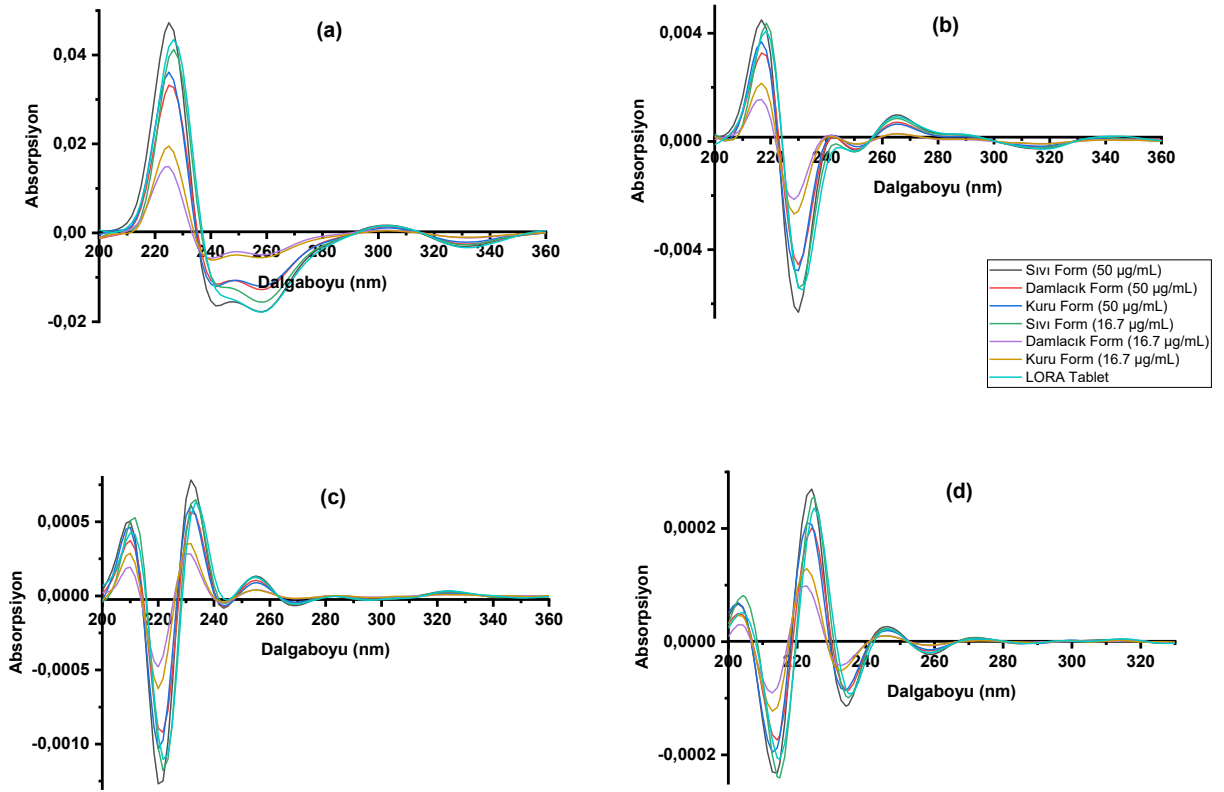
Şekil 20. LORA tabletin beyaz şarap içerisinde, 16,7 µg/mL ve 50 µg/mL derişimlerinde sıvı, damlacık ve kuru form örneklerine ait (a) birinci derece, (b) ikinci derece, (c) üçüncü derece ve (d) dördüncü derece UV türev spektrumları.

LORA tabletin beyaz şarap içerisindeki çözeltisinden 16,7 µg/mL ile 50 µg/mL derişimlerde hazırlanan içecek örneklerinin sıvı, damlacık ve kuru formlarından elde edilen birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü derece UV türev spektrumları Şekil 20’de gösterilmiştir. Şekil 20 (a)’da birinci derece türev spektrumlarında 200-230 nm aralığında ve 290 nm sonrasında tüm spektrumlar referans ile aynı konumda farklı şiddetlerde bantlar vermiştir. 240-280 nm aralığında referans spektrumu daha geniş bir bant gösterirken diğer tüm spektrumlar iki maksimumlu bir bant göstermektedir. Şekil 20 (b), Şekil 20 (c) ve Şekil 20 (d)’de ikinci, üçüncü ve dördüncü türev spektrumlarında ise tüm örnekler referans ile farklı şiddetlerde benzer spektrum göstermektedir.



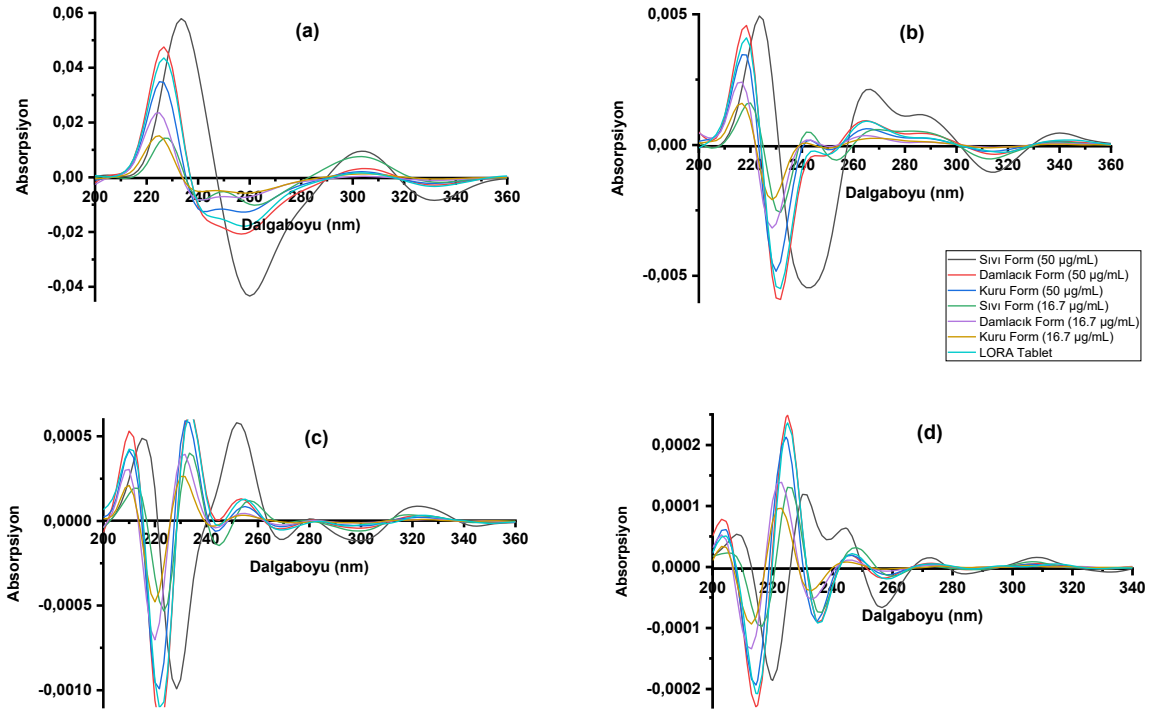
Şekil 21. LORA tabletin roze şarap içerisinde, 16,7 µg/mL ve 50 µg/mL derişimlerinde sıvı, damlacık ve kuru form örneklerine ait (a) birinci derece, (b) ikinci derece, (c) üçüncü derece ve (d) dördüncü derece UV türev spektrumları.

Roze şarap içindeki LORA tabletin ve 16,7 µg/mL ile 50 µg/mL derişimlerde hazırlanan sıvı, damlacık ve kuru form örneklerinin birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü derece UV türev spektrumları Şekil 21’de verilmiştir. 50 µg/mL derişimdeki sıvı form örneği hariç tüm örneklerin spektrumları referans spektrum ile örtüşmektedir. 50 µg/mL sıvı form spektrumu ise Şekil 21 (a)’da birinci derece türev spektrumunda 210-245 nm aralığında referanstan daha geniş, 245-290 nm aralığında ise daha dar bir bant göstermektedir. Şekil 21 (b)’de ikinci derece türev spektrumunda ise 50 µg/mL sıvı form spektrumu 220-255 nm aralığında referans spektrumundan daha geniş bir bant vermektedir. 50 µg/mL sıvı form örneğinde Şekil 21 (c)’de üçüncü derece türev spektrumunda referansta 235 nm’de görülen bant sıvı örnekte görülmemekte ve 250 nm maksimumlu şekilsel olarak diğer formların bantlarından ayrılan şiddetli bir bant görülmektedir. Şekil 21 (d)’de dördüncü derece türev spektrumunda referans ile aralarında şiddet farklılığı dışında bir ayrım görülmemektedir.



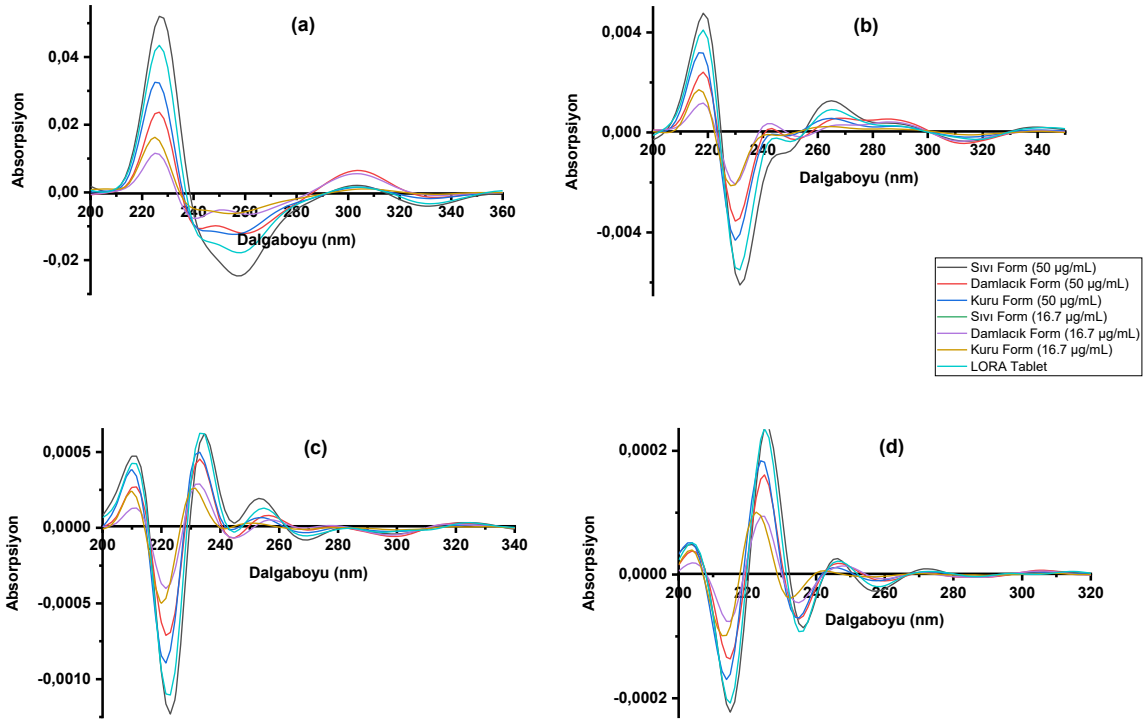
Şekil 22. LORA tabletin votka içerisinde, 16,7 µg/mL ve 50 µg/mL derişimlerinde sıvı, damlacık ve kuru form örneklerine ait (a) birinci derece, (b) ikinci derece, (c) üçüncü derece ve (d) dördüncü derece UV türev spektrumları.

Şekil 22’de gösterilen beyaz şarap içerisindeki LORA tabletin 16,7 µg/mL ile 50 µg/mL konsantrasyonlarında hazırlanan sıvı, damlacık ve kuru formlarına ait spektrumlardan elde edilen birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü derece UV türev spektrumları referans ile şiddet farklılıkları dışında tam uyum göstermektedir. Belirgin tek fark Şekil 22 (a)’da birinci derece türev spektrumlarında 240-270 nm aralığında 16,7 µg/mL ile 50 µg/mL konsantrasyonlarındaki sıvı, damlacık ve kuru form örneklerinde iki maksimumlu bant gözlenirken referansta bu aralıktaki bant daha geniş tek bant şeklinde görülür.



Şekil 23. LORA tabletin gazoz içerisinde, 16,7 µg/mL ve 50 µg/mL derişimlerinde sıvı, damlacık ve kuru form örneklerine ait (a) birinci derece, (b) ikinci derece, (c) üçüncü derece ve (d) dördüncü derece UV türev spektrumları.

LORA tabletin gazoz içerisindeki çözeltisinden 16,7 µg/mL ile 50 µg/mL derişimlerde hazırlanan içecek örneklerinin sıvı, damlacık ve kuru formlarına ait birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü derece UV türev spektrumları Şekil 23'te gösterilmiştir. Bütün türev derecelerinde 50 µg/mL sıvı form spektrumu hariç diğer örneklere ait spektrumlar referans ile benzer bant özellikleri göstermektedir. 50 µg/mL sıvı form örneğine ait spektrumlarda ise tüm türev derecelerinde kırmızıya kayma görülmektedir. Kırmızıya kaymanın yanı sıra, Şekil 23 (a)'da görüldüğü üzere birinci derece türev spektrumunda referansta 240-280 nm aralığında görülen geniş bant, 50 µg/mL sıvı form spektrumunda yüksek şiddette daha dar ve keskin bir bant olarak görülmektedir. Dördüncü derece türev spektrumunda, Şekil 23 (d)'de 230-260 nm arasında sıvı formda gözlenen bant diğer örneklerden farklılaşma göstermektedir. Bunun dışında örneklerin spektrumları referans ile uyum göstermektedir.



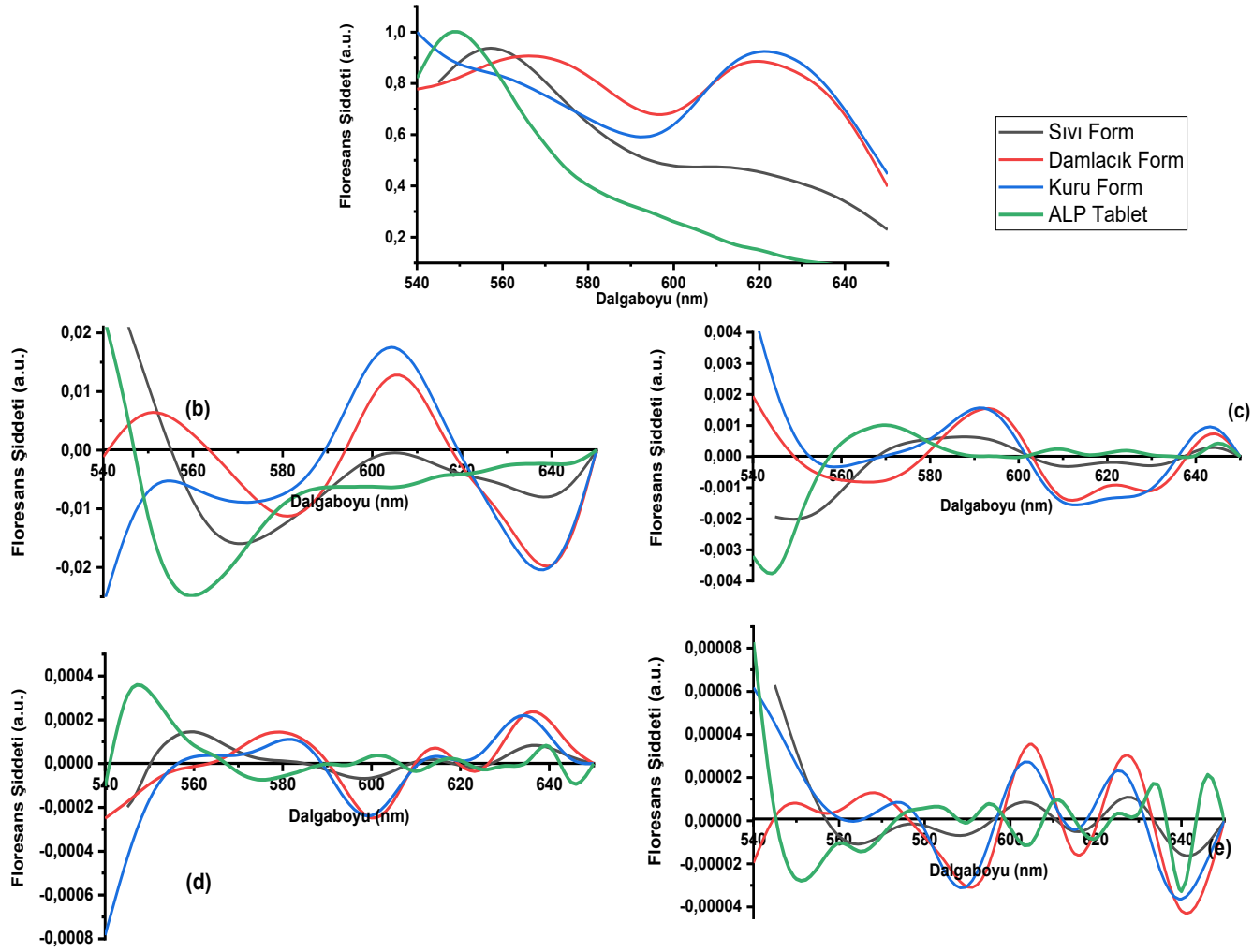
Şekil 24. LORA tabletin maden suyu içerisinde, 16,7 µg/mL ve 50 µg/mL derişimlerinde sıvı, damlacık ve kuru form örneklerine ait (a) birinci derece, (b) ikinci derece, (c) üçüncü derece ve (d) dördüncü derece UV türev spektrumları.

Şekil 24'te gösterilen maden suyu içerisindeki LORA tabletin 16,7 µg/mL ile 50 µg/mL konsantrasyonlarında hazırlanan sıvı, damlacık ve kuru formlarına ait spektrumlardan elde edilen birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü derece UV türev spektrumları referans ile tam uyum göstermektedir. Belirgin tek fark Şekil 24 (a)'da birinci derece türev spektrumlarında 240-280 nm aralığında 50 µg/mL konsantrasyonlarındaki sıvı form örneklerinde tek maksimumlu sivri bir bant görülürken referansta iki maksimumlu geniş bir bant görülmektedir.

4.4. Floresans Emisyon Spektroskopisi Sonuçları

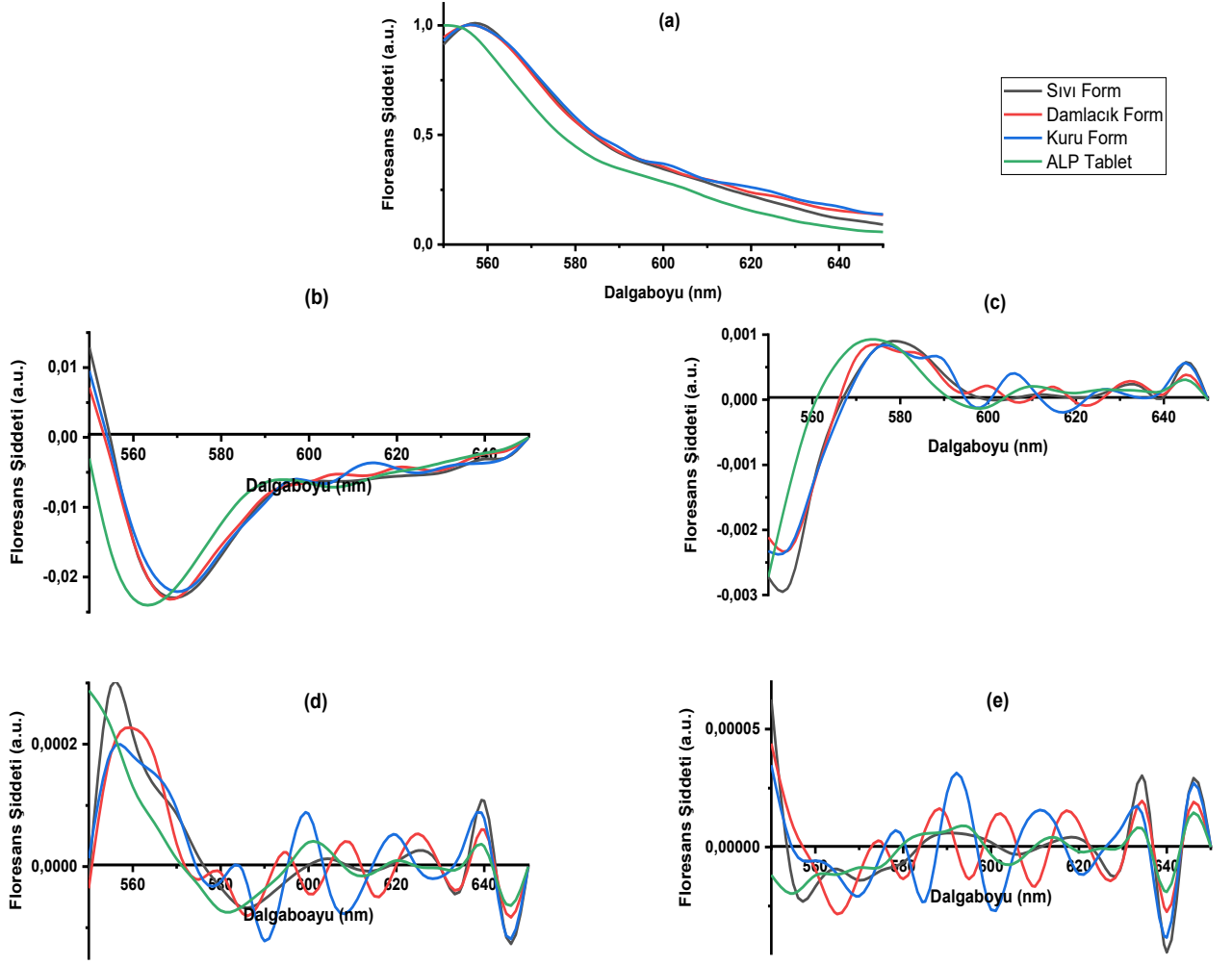
4.4.1. ALP Tablet Floresans Emisyon Spektroskopisi Sonuçları

ALP tabletin 5 farklı içecek içerisindeki floresans emisyon spektrumları ile birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü dereceden floresans türev spektrumları ayrıntılı olarak incelenmiştir. Bu değerlendirme, içecek türlerine göre örnek formlarının referans ALP tablet spektrumlarıyla karşılaştırmalı olarak analizini kapsamaktadır.



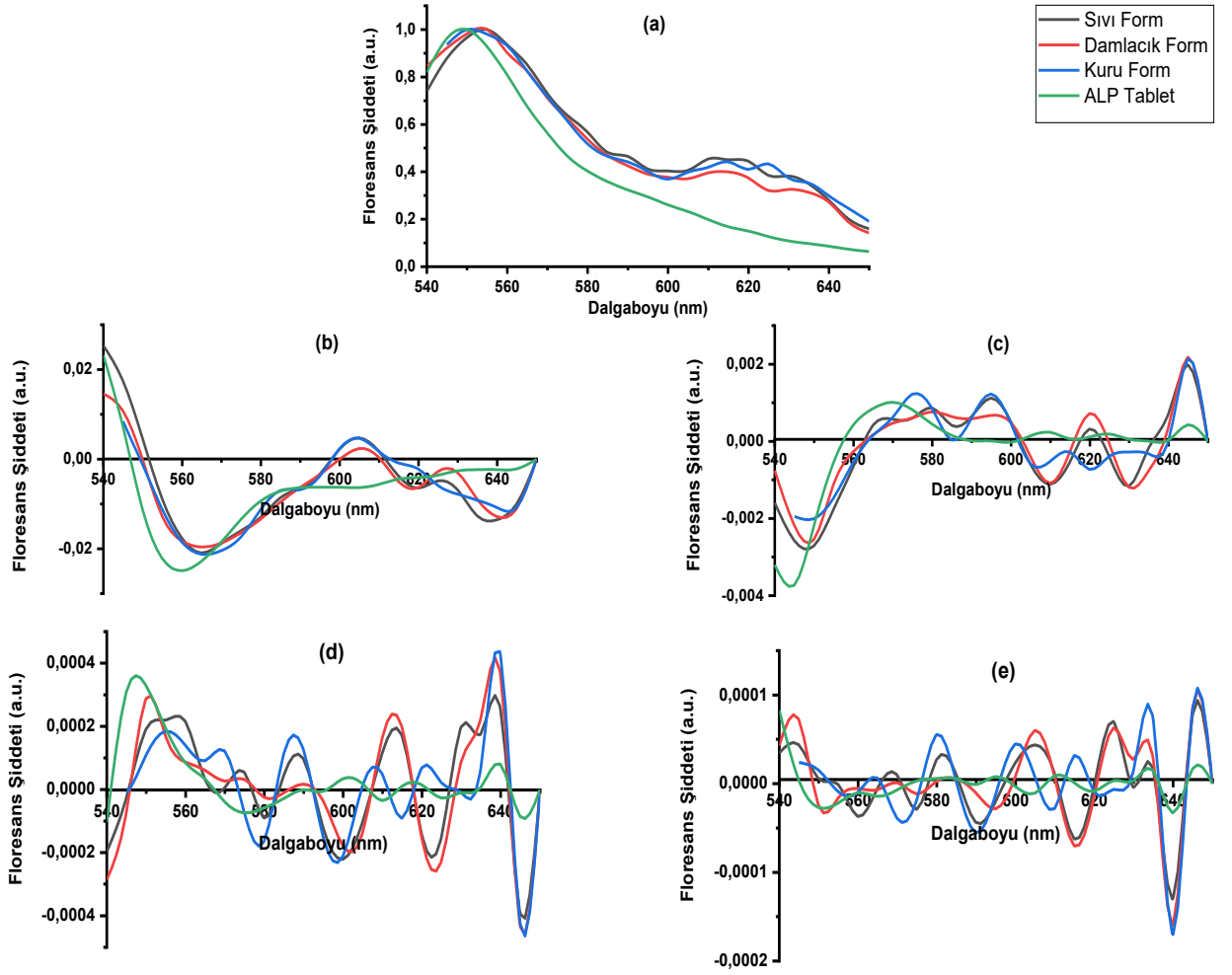
Şekil 25. Beyaz şarap içerisindeki ALP tabletin, 520 nm dalga boyunda uyarılan sıvı, damlacık ve kuru form örneklerine ait (a) sıfırıncı derece, (b) birinci derece, (c) ikinci derece, (d) üçüncü derece ve (e) dördüncü dereceden emisyon türev spektrumları.

Şekil 25'te ALP tablet-beyaz şarap çözeltisinden sıvı, damlacık ve kuru formda elde edilen örneklerin floresans ve floresans türev spektrumları görülmektedir. Beyaz şarap içerisindeki sıvı, damlacık ve kuru form örnekleri referans ALP tablet spektrumları ile karşılaştırmalı olarak değerlendirildiğinde, örtüşme oranının çok düşük olduğu görülmektedir. Kuru form ve damlacık form spektrumlarında benzerlik oranı yüksek olmakla beraber her iki formun da referans ile benzerlik oranı çok düşüktür. Bu sonuçlara bakarak floresan spektroskopisinin sıvı form için ALP tablet tayininde düşük oranda kullanılabilir olacağı, diğer formlar için olası olmadığı değerlendirilmiştir.



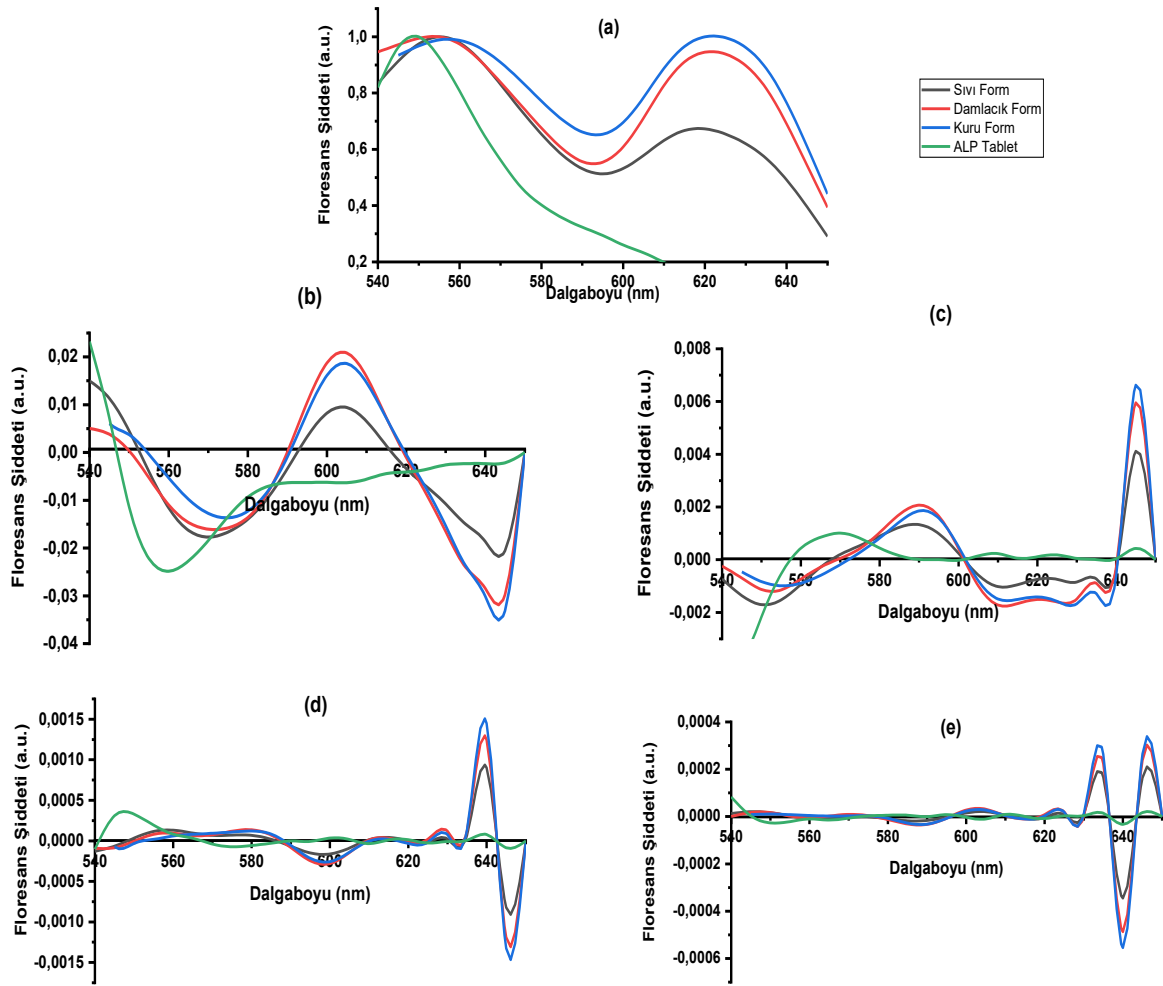
Şekil 26. Roze Şarap içerisindeki ALP tabletin, 530 nm dalga boyunda uyarılan sıvı, damlacık ve kuru form örneklerine ait (a) sıfırıncı derece, (b) birinci derece, (c) ikinci derece, (d) üçüncü derece ve (e) dördüncü dereceden emisyon türev spektrumları.

ALP tablet- roze şarap örneklerinin floresans ve floresans türev spektrumları referans ile karşılaştırmalı olarak Şekil 26’de görülmektedir. Roze şarap örneklerinde beyaz şarap ile benzer şekilde sıfırıncı ve birinci derece spektrumlarında kısmi örtüşmeler bulunmuştur. Üçüncü derece türevlerde bant örtüşmesi bir miktar artmakla birlikte, düşük bant şiddetleri nedeniyle nitel tayin sınırlı kalmaktadır. Karar vermede sıfırıncı ve birinci derece spektrumların kullanımı mümkün görünmektedir.



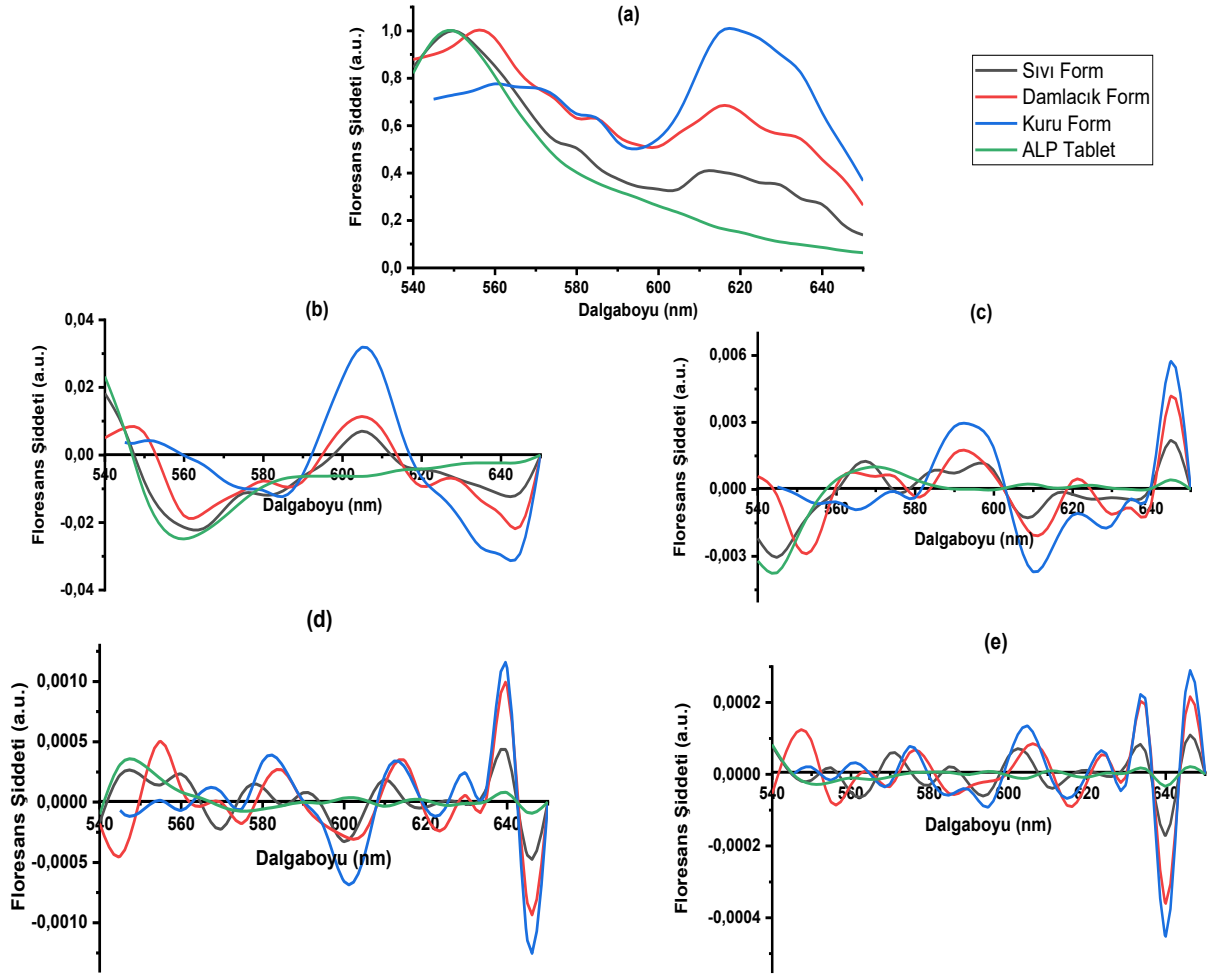
Şekil 27. Votka içerisindeki ALP tabletin, 520 nm dalga boyunda uyarılan sıvı, damlacık ve kuru form örneklerine ait (a) sıfırıncı derece, (b) birinci derece, (c) ikinci derece, (d) üçüncü derece ve (e) dördüncü dereceden emisyon türev spektrumları.

ALP tablet- votka örneklerinin tüm formlardaki floresans ve floresans türev spektrumları referans ile karşılaştırmalı olarak Şekil 27’de görülmektedir. Votka daha az girişim gösterdiğinden, ALP tablet örneklerinin sıfırıncı ve birinci derece spektrumlarında referans spektrum ile belirgin bant örtüşmeleri gözlenmiştir. İkinci türev spektrumlarında 3 formun kendi arasındaki örtüşmesinin yüksek olduğu ancak referans ile örtüşmenin düşük olduğu görülmektedir. Üçüncü dereceden floresans türev spektrumlarında 540-560 nm arasında referans ile damlacık formun örtüşme oranı ve bant şekli benzerliği yüksektir. Üçüncü derecede sıvı ve damlacık formun belirgin bir uyum gösterdiği söylenebilir. Yine de analitik açıdan güçlü bir tayin metodu olarak önermek mümkün görünmemektedir.



Şekil 28. Gazoz içerisindeki ALP tabletin, 520 nm dalga boyunda uyarılan sıvı, damlacık ve kuru form örneklerine ait (a) sıfırıncı derece, (b) birinci derece, (c) ikinci derece, (d) üçüncü derece ve (e) dördüncü dereceden emisyon türev spektrumları.

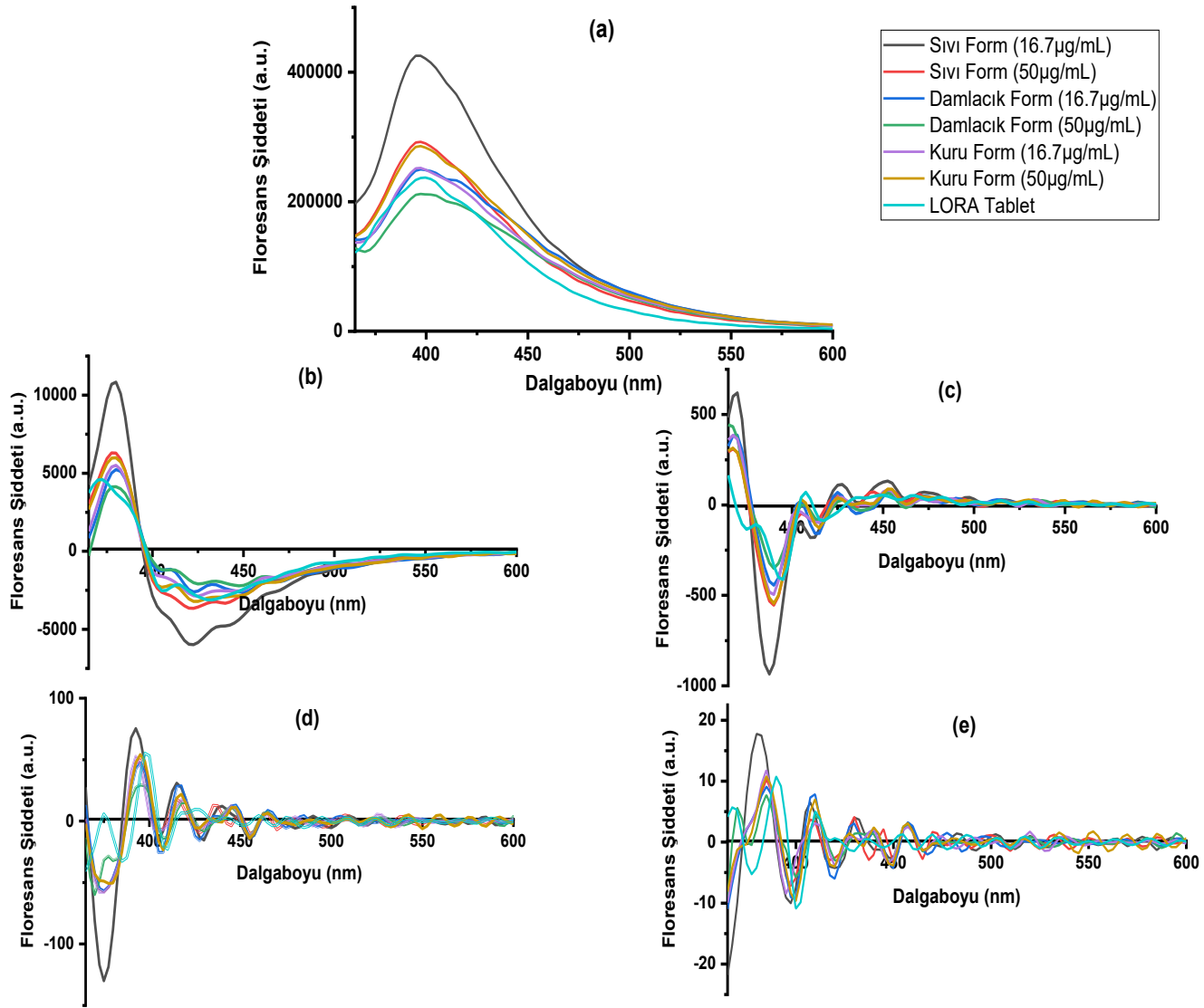
Şekil 28’de ALP tablet-gazoz örneklerinin sıvı, damlacık ve kuru formda elde floresans ve floresans türev spektrumları görülmektedir. ALP tablet- gazoz örneklerinde 300-550 nm arasındaki bantların referans ALP tablet ile kısmen örtüştüğü görülmektedir. Referans floresans spektrumunda 550–650 nm arasında emisyon bandı bulunmadığından bu bölgede referans ile örtüşme doğal olarak gözlenmemektedir. Önceki bölümlerde incelenmiş olan içecek örneklerinden farklı olarak sıvı, damlacık ve kuru formlar arasında tam uyum görülmektedir.



Şekil 29. Maden suyu içerisindeki ALP tabletin, 520 nm dalga boyunda uyarılan sıvı, damlacık ve kuru form örneklerine ait (a) sıfırıncı derece, (b) birinci derece, (c) ikinci derece, (d) üçüncü derece ve (e) dördüncü dereceden emisyon türev spektrumları.

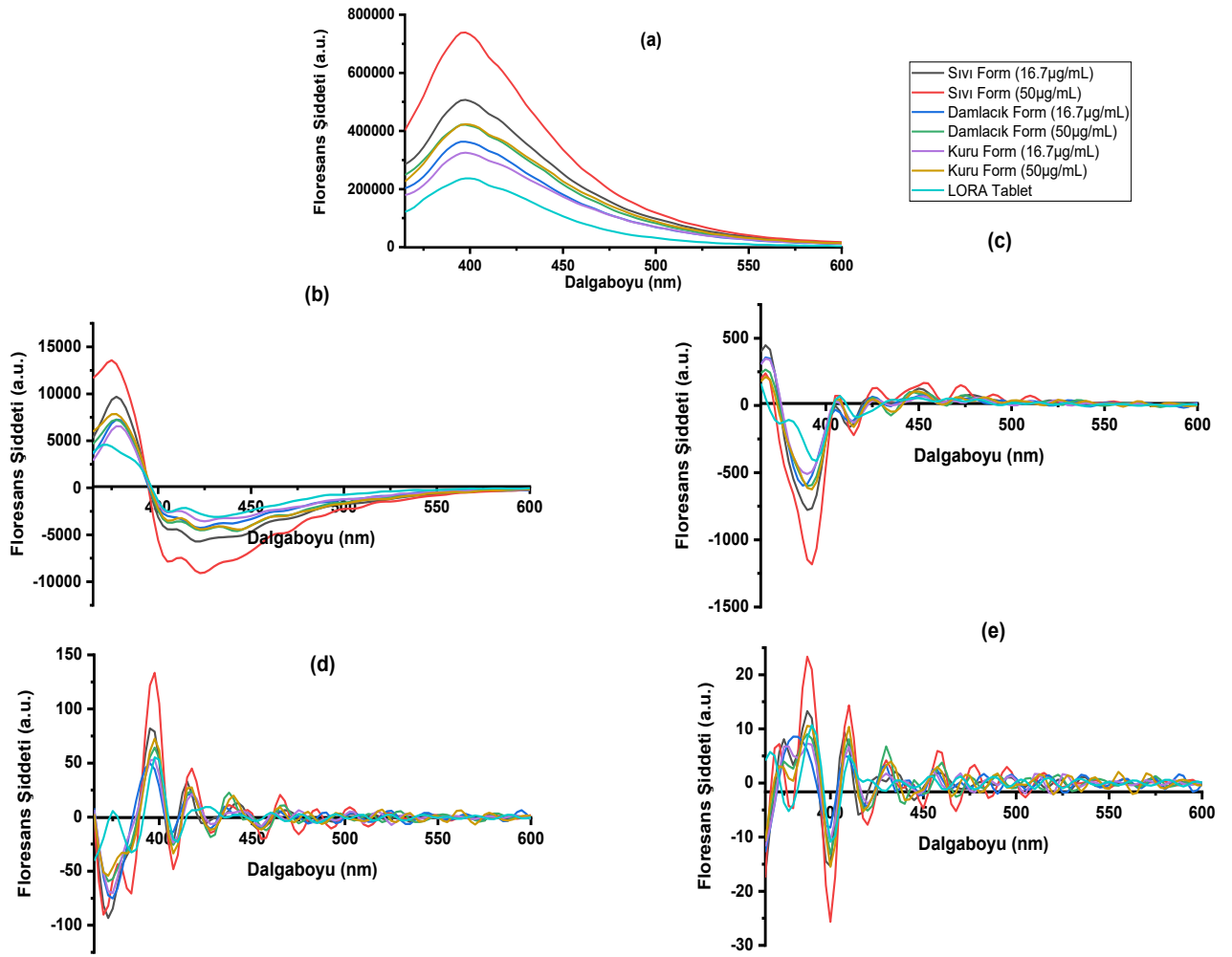
Şekil 29’da ALP tablet-maden suyu örneklerinin sıvı, damlacık ve kuru formda elde floresans ve floresans türev spektrumları görülmektedir. Örneklerin kendi arasında uyumunun yüksek, referans ile örtüşme ve benzerlik oranının düşük olduğu değerlendirilmiştir. Kuru form tüm floresans spektrumlarında diğerlerinden belirgin farklılaşma göstermiştir. Floresans emisyon ve birinci dereceden floresans türev spektrumlarında 540-580 nm aralığında ALP tablet-maden suyu örnekleri ile referans arasında tam uyum gözlenmiş olup sıvı ve damlacık formları için kullanılabileceği öngörülmektedir.

4.4.2. LORA Tablet Floresans Emisyon Spektroskopisi Sonuçları



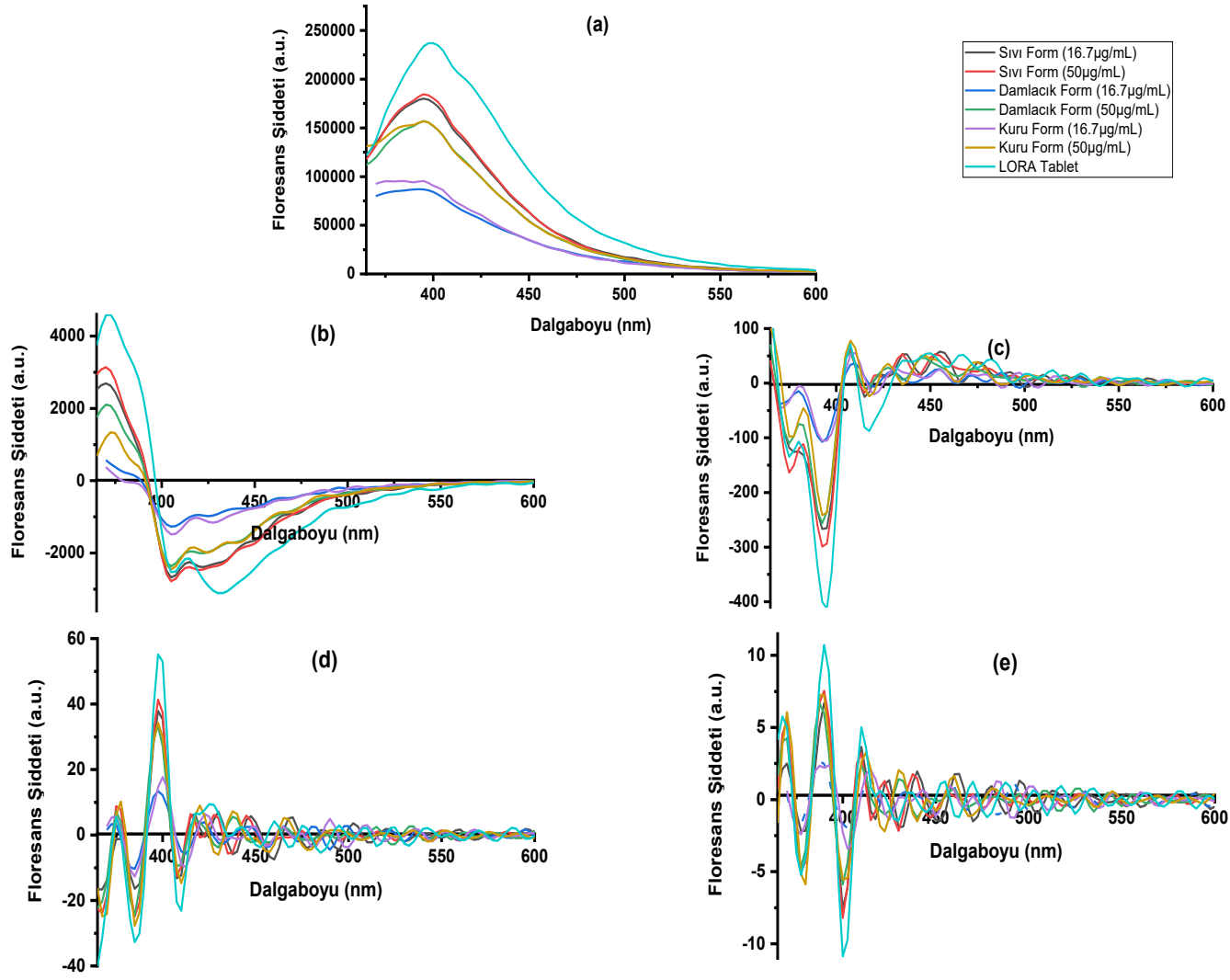
Şekil 30. Beyaz şarap içerisindeki LORA tabletin, 315 nm dalga boyunda uyarılan ve 50 µg/mL ile 16,7 µg/mL derişimlerinde sıvı, damlacık ve kuru form örneklerine ait (a) sıfırncı derece, (b) birinci derece, (c) ikinci derece, (d) üçüncü derece ve (e) dördüncü dereceden emisyon türev spektrumları.

LORA tablet- beyaz şarap örneklerinin tüm formlardaki floresans ve floresans türev spektrumları referans ile karşılaştırmalı olarak Şekil 30'da görölmektedir. Beyaz şarap içerisindeki sıvı, damlacık ve kuru form örnekleri, referans LORA tablet spektrumu ile karşılaştırıldığında hem sıfırncı dereceden floresans spektrumunda hem de türev spektrumlarının tamamında yüksek oranda bant örtüşmeleri bulunmuştur. Şiddet farklılıkları olmakla birlikte bant şekillerinin benzerliği yüksektir.



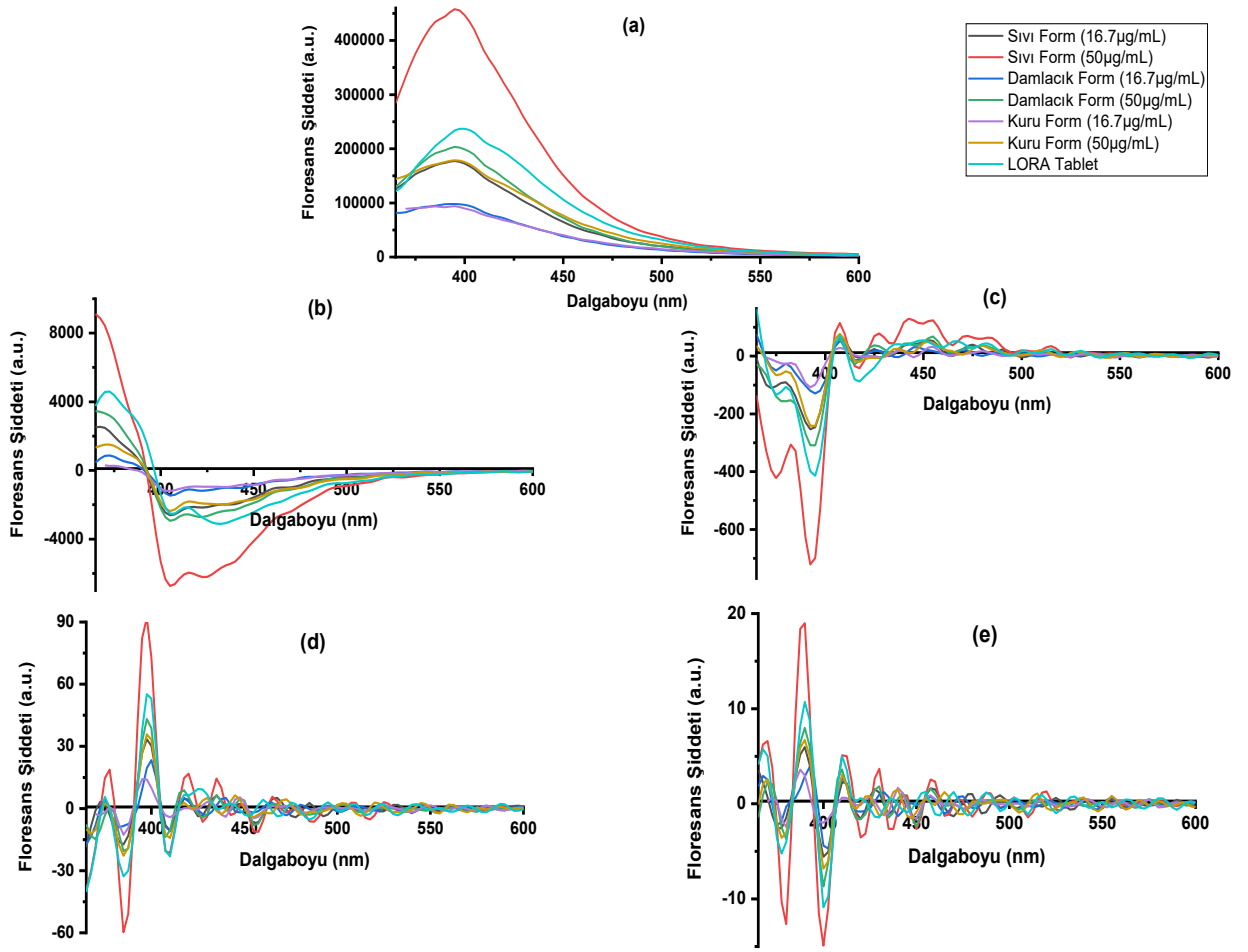
Şekil 31. Roze şarap içerisindeki LORA tabletin, 315 nm dalga boyunda uyarılan ve 50 $\mu\text{g/mL}$ ile 16,7 $\mu\text{g/mL}$ derişimlerinde sıvı, damlacık ve kuru form örneklerine ait (a) sıfırncı derece, (b) birinci derece, (c) ikinci derece, (d) üçüncü derece ve (e) dördüncü dereceden emisyon türev spektrumları.

Şekil 31’de ALP tablet-roze şarap örneklerinin sıvı, damlacık ve kuru formda elde floresans ve floresans türev spektrumları görölmektedir. Roze şarap örneklerinde bant konumları referans LORA tablet ile genel olarak uyumludur. Küçük dalga boyu kaymaları gözlenmiş olsa da tepe sayısı ve bant biçimi korunduğu için nitel tayin yapılabilir.



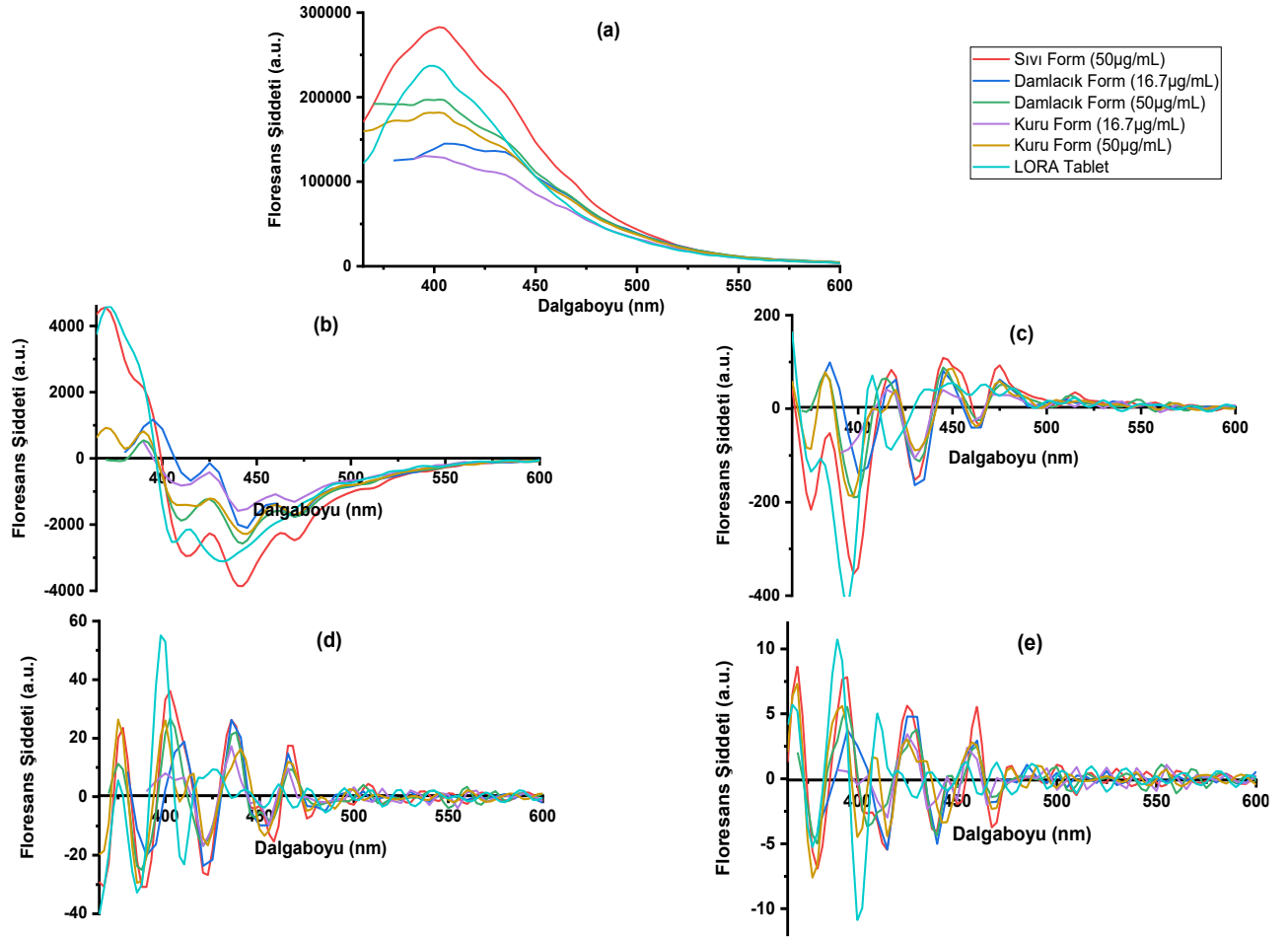
Şekil 32. Votka içerisindeki LORA tabletin, 315 nm dalga boyunda uyarılan ve 50 µg/mL ile 16,7 µg/mL derişimlerindeki sıvı, damlacık ve kuru form örneklerine ait (a) sıfırncı derece, (b) birinci derece, (c) ikinci derece, (d) üçüncü derece ve (e) dördüncü dereceden emisyon türev spektrumları.

LORA tablet- votka örneklerinin tüm formlardaki floresans ve floresans türev spektrumları referans ile karşılaştırmalı olarak Şekil 32’de görölmektedir. Votka matrisi girişimsiz olduğundan sıfırncı ve birinci derece spektrumlarda referans LORA tablet ile yüksek uyum gözlenmiştir. LORA tablet tayini için güçlü bir yöntem olarak önerilebilir.



Şekil 33. Gazoz içerisindeki LORA tabletin, 315 nm dalga boyunda uyarılan ve 50 $\mu\text{g/mL}$ ile 16,7 $\mu\text{g/mL}$ derişimlerdeki sıvı, damlacık ve kuru form örneklerine ait (a) sıfırıncı derece, (b) birinci derece, (c) ikinci derece, (d) üçüncü derece ve (e) dördüncü dereceden emisyon türev spektrumları.

LORA tablet- gazoz örneklerinin tüm formlardaki floresans ve floresans türev spektrumları referans ile karşılaştırmalı olarak Şekil 33'te görülmektedir. Genel anlamda tüm formların referans ölçümler ile uyumlu olduğu söylenebilir. Bununla birlikte 425 nm'ye kadar olan bölgede banların şekilsel benzerliğinin ve örtüşme oranının daha yüksek olduğu görülmektedir.



Şekil 34. Maden suyu içerisindeki LORA tabletin, 315 nm dalga boyunda uyarılan ve 50 µg/mL ile 16,7 µg/mL derişimlerindeki sıvı, damlacık ve kuru form örneklerine ait (a) sıfırncı derece, (b) birinci derece, (c) ikinci derece, (d) üçüncü derece ve (e) dördüncü dereceden emisyon türev spektrumları.

Şekil 34'te ALP tablet-maden suyu örneklerinin sıvı, damlacık ve kuru formda elde floresans ve floresans türev spektrumları görülmektedir. 50 mg/mL sıvı form ile referans arasında en yüksek uyumun olduğu söylenebilir. Bununla birlikte türev spektrumlarında tüm örnek formlarının şiddet farklılıkları ve küçük dalgaboyu kaymaları dışında çok yüksek oranda örtüşmeye sahip olduğu görülmektedir. Örneklerin referans ile örtüşme oranına dayanarak sıfırncı ve birinci dereceden floresans spektrumlarının ALP tablet tayininde kullanılabileceği öngörülmektedir.

5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ SONUÇLARI

5.1. Korelasyon Matrisi Analizi

5.1.1. ALP UV- Gör Absorpsiyon Spektroskopisi Analizi

		Sıvı Form				Damlacık				Kuru Form			
		DLLME	ALP	Yüzey	İçecek	DLLME	ALP	Yüzey	İçecek	DLLME	ALP	Yüzey	İçecek
UV absorbans	Beyaz şarap	0.7037	0.6658	-0.0476	0.3651	0.6541	0.6658	0.3093	0.3651	0.6659	0.6658	0.6007	0.3651
	Rose şarap	0.7078	0.6658	0.3233	0.2403	0.6474	0.6658	0.4812	0.2403	0.6897	0.6658	-0.0780	0.2403
	Votka	0.7047	0.6658	0.6820	-0.1251	0.6951	0.6658	0.6564	-0.1251	0.6669	0.6658	0.6563	-0.1251
	Gazoz	0.6791	0.6658	0.6499	0.6658	0.6613	0.6658	0.6770	0.6658	0.6563	0.6658	0.6811	0.6658
	Maden Suyu	0.6881	0.6658	0.5409	0.1428	0.6989	0.6658	0.6133	0.1428	0.6484	0.6658	0.6838	0.1428
1. Der. Türev	Beyaz şarap	0.6716	0.6500	-0.0454	0.3688	0.6253	0.6500	0.1141	0.3688	0.6276	0.6500	0.2820	0.3688
	Rose şarap	0.6552	0.6500	-0.0080	0.3069	0.6383	0.6500	0.0882	0.3069	0.6319	0.6500	-0.1640	0.3069
	Votka	0.6464	0.6500	0.6632	-0.0019	0.6419	0.6500	0.6304	-0.0019	0.6503	0.6500	0.6257	-0.0019
	Gazoz	0.6356	0.6500	0.3963	0.5649	0.6185	0.6500	0.5474	0.5649	0.6568	0.6500	0.5670	0.5649
	Maden Suyu	0.6288	0.6500	0.5112	0.1671	0.6384	0.6500	0.4577	0.1671	0.5435	0.6500	0.6292	0.1671
2. Der. Türev	Beyaz şarap	0.6357	0.6361	0.0191	0.4454	0.5848	0.6361	0.0768	0.4454	0.5760	0.6361	-0.0868	0.4454
	Rose şarap	0.5970	0.6361	0.1436	0.3408	0.6288	0.6361	-0.2243	0.3408	0.6223	0.6361	-0.1870	0.3408
	Votka	0.5693	0.6361	0.6476	0.0063	0.6313	0.6361	0.6017	0.0063	0.6407	0.6361	0.5915	0.0063
	Gazoz	0.5759	0.6361	0.0089	0.4947	0.5727	0.6361	0.3485	0.4947	0.6488	0.6361	0.4859	0.4947
	Maden Suyu	0.5762	0.6361	0.3850	0.0771	0.6079	0.6361	0.2621	0.3243	0.5151	0.6361	0.5899	0.3243
3. Der. Türev	Beyaz şarap	0.6043	0.6233	0.0043	0.4815	0.5486	0.6233	0.0997	0.4815	0.5432	0.6233	-0.3113	0.4815
	Rose şarap	0.5449	0.6233	0.2940	0.3456	0.6141	0.6233	-0.1621	0.3456	0.6229	0.6233	-0.1223	0.3456
	Votka	0.5129	0.6233	0.6352	0.1045	0.6376	0.6233	0.5710	0.1045	0.6297	0.6233	0.5589	0.1045
	Gazoz	0.5133	0.6233	-0.2644	0.4149	0.5362	0.6233	0.1117	0.4149	0.6253	0.6233	0.4390	0.4149
	Maden Suyu	0.5559	0.6233	0.2782	0.4568	0.6005	0.6233	0.1306	0.4568	0.5100	0.6233	0.5821	0.4568
4. Der. Türev	Beyaz şarap	0.5985	0.6289	-0.0452	0.4897	0.5560	0.6289	0.1196	0.4897	0.5435	0.6289	-0.4354	0.4897
	Rose şarap	0.5215	0.6289	0.3630	0.3603	0.6189	0.6289	0.0112	0.3603	0.6324	0.6289	-0.0500	0.3603
	Votka	0.5145	0.6289	0.6470	0.3381	0.6559	0.6289	0.5640	0.3381	0.6373	0.6289	0.5544	0.3381
	Gazoz	0.4872	0.6289	-0.4101	0.3047	0.5196	0.6289	-0.0473	0.3047	0.6202	0.6289	0.4022	0.3047
	Maden Suyu	0.5693	0.6289	0.2570	0.5402	0.6175	0.6289	0.1482	0.5402	0.5185	0.6289	0.5998	0.5402

Şekil 35. Sıvı, damlacık ve kuru formlarda DLLME ile elde edilen ALP, Yüzeyden elde edilen ALP, ALP tablet ve saf içecek spektrumlarının UV-Gör absorpsiyon (sıfırıncı derece türev), birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü derece türevlerinin ortalama çapraz korelasyon değerleri.

Bu çalışmada, farklı içecek örneklerinin UV-Gör absorpsiyon değerleri ve türev spektrumları ile çeşitli fiziksel ve kimyasal parametreler (DLLME ile elde edilen örnekler, ALP tablet, yüzeyden alınan örnekler ve içeceğin kendisi) arasındaki ilişkiler korelasyon matrisi ile analiz edilmiştir. Elde edilen korelasyon katsayıları, -1 ile +1 arasında değişmekte olup renk skalası ile görsel olarak sunulmuştur. Pozitif korelasyonlar kırmızı tonlarda, negatif korelasyonlar mavi tonlarda ifade edilmiştir.

Bu çalışmada UV-Gör absorpsiyon ölçümlerinde özellikle sıvı formda beyaz şarap, roze şarap ve votkadan DLLME metodu ile elde edilen örneklerin ortalama olarak pozitif korelasyonlara sahip olduğu gözlemlenmiştir ($r > 0,65$). Gazoz ve maden suyu gibi karbonatlı içeceklerde daha düşük korelasyon değerleri dikkat çekmektedir.

Form değişimine (sıvı, damlacık, kuru) bağlı olarak korelasyon yapısının da değiştiği görülmektedir. Özellikle kuru form ile yüzeyden elde edilen örneklerin korelasyon değerlerinin belirgin şekilde negatifleştiği (örneğin beyaz şarap: $r = -0,454$)

gözlemlenmektedir. Bu durum, form değişikliğinin yüzey özelliklerini ve dolayısıyla UV-Gör absorpsiyon karakteristiğini etkileyebileceğini düşündürmektedir.

İçecek tipine göre korelasyonlar değerlendirildiğinde tüm içecekler için kendi çalışma grupları özelinde (sıvı, damlacık, kuru formlarda) ortalama olarak belirgin bir şekilde düşük korelasyonlara sahip olduğu görülmektedir. Bu durum da analizin esas temelini oluşturan ilaç ve içecek ölçümlerinin ayrıştırılması hususunda başarılı olduğunu ortaya koymaktadır.

Türev sırası arttıkça (1. → 4. derece türev) korelasyon değerlerinin genel olarak azaldığı ve bazı parametrelerle olan ilişkilerin zayıfladığı gözlenmiştir. Bu durum, yüksek dereceden türevlerin sinyal-gürültü oranını artırarak korelasyon yapısını zayıflatabileceğini göstermektedir.

5.1.2. LORA UV- Gör Absorpsiyon Spektroskopi Analizi

		Sıvı Form				Damlacık				Kuru Form			
		DLLME	LORA	Yüzey	İçecek	DLLME	LORA	Yüzey	İçecek	DLLME	LORA	Yüzey	İçecek
UV absorbans	Beyaz şarap	0.6397	0.6797	-0.2246	0.2662	0.6321	0.6797	0.6251	0.2662	0.6524	0.6797	0.6035	0.2662
	Rose şarap	0.6994	0.6797	0.2268	0.1582	0.6812	0.6797	0.4971	0.1582	0.6904	0.6797	0.4823	0.1582
	Votka	0.6559	0.6797	0.6861	-0.4453	0.6583	0.6797	0.6510	-0.4453	0.6595	0.6797	0.6480	-0.4453
	Gazoz	0.6641	0.6797	0.5833	0.6314	0.6680	0.6797	0.6690	0.6314	0.6577	0.6797	0.6940	0.6314
	Maden Suyu	0.6893	0.6797	0.6743	0.0247	0.5215	0.6797	0.6564	0.0247	0.6635	0.6797	0.6599	0.0247
1. Der. Türev	Beyaz şarap	0.6043	0.6613	-0.2073	0.3338	0.5880	0.6613	0.4656	0.3338	0.6035	0.6613	0.4322	0.3338
	Rose şarap	0.6541	0.6613	0.0484	0.2682	0.6534	0.6613	0.1921	0.2682	0.6696	0.6613	0.2146	0.2682
	Votka	0.6203	0.6613	0.6709	-0.3684	0.6322	0.6613	0.6150	-0.3684	0.6156	0.6613	0.6125	-0.3684
	Gazoz	0.5517	0.6613	0.3220	0.5146	0.6603	0.6613	0.5480	0.5146	0.6330	0.6613	0.6477	0.5146
	Maden Suyu	0.6732	0.6613	0.6684	0.1429	0.6051	0.6613	0.6160	0.1429	0.6409	0.6613	0.6245	0.1429
2. Der. Türev	Beyaz şarap	0.5757	0.6498	-0.2477	0.4691	0.5498	0.6498	0.1969	0.4691	0.5671	0.6498	0.1201	0.4691
	Rose şarap	0.5944	0.6498	-0.0029	0.3435	0.6370	0.6498	-0.0919	0.3435	0.6575	0.6498	-0.0059	0.3435
	Votka	0.5905	0.6498	0.6598	-0.2520	0.6096	0.6498	0.5853	-0.2520	0.5784	0.6498	0.5841	-0.2520
	Gazoz	0.3660	0.6498	-0.0482	0.4963	0.6538	0.6498	0.3086	0.4963	0.6136	0.6498	0.5675	0.4963
	Maden Suyu	0.6613	0.6498	0.6609	0.3647	0.6259	0.6498	0.5843	0.3647	0.6237	0.6498	0.6000	0.3647
3. Der. Türev	Beyaz şarap	0.5752	0.6477	-0.2701	0.5450	0.5424	0.6477	-0.0972	0.5450	0.5649	0.6477	-0.1805	0.5450
	Rose şarap	0.5770	0.6477	0.0258	0.3798	0.6366	0.6477	-0.1924	0.3798	0.6546	0.6477	0.0105	0.3798
	Votka	0.5850	0.6477	0.6535	-0.1575	0.6079	0.6477	0.5814	-0.1575	0.5689	0.6477	0.5796	-0.1575
	Gazoz	0.1991	0.6477	-0.3210	0.5044	0.6531	0.6477	0.0541	0.5044	0.6145	0.6477	0.4789	0.5044
	Maden Suyu	0.6549	0.6477	0.6562	0.5054	0.6306	0.6477	0.5808	0.5054	0.6219	0.6477	0.5993	0.5054
4. Der. Türev	Beyaz şarap	0.5886	0.6547	-0.2395	0.5909	0.5460	0.6547	-0.3448	0.5909	0.5773	0.6547	-0.3621	0.5909
	Rose şarap	0.6110	0.6547	0.0982	0.4072	0.6473	0.6547	-0.1862	0.4072	0.6596	0.6547	0.1776	0.4072
	Votka	0.5959	0.6547	0.6549	-0.1178	0.6203	0.6547	0.5920	-0.1178	0.5728	0.6547	0.5847	-0.1178
	Gazoz	0.1056	0.6547	-0.4316	0.4858	0.6594	0.6547	-0.1300	0.4858	0.6261	0.6547	0.4016	0.4858
	Maden Suyu	0.6569	0.6547	0.6583	0.5658	0.6436	0.6547	0.5951	0.5658	0.6296	0.6547	0.6091	0.5658

Şekil 36. Sıvı, damlacık ve kuru formlarda DLLME ile elde edilen LORA, Yüzeyden elde edilen LORA, LORA tablet ve saf içecek spektrumlarının UV-Gör absorpsiyon ((sıfırıncı derece türev), birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü derece türevlerinin ortalama çapraz korelasyon değerleri.

LORA tablete ait UV-Gör absorpsiyon spektrum parametresi, tüm içecek türlerine ve tüm formlara ait ölçümlerle oldukça yüksek ve pozitif korelasyonlar göstermiştir ($r \approx 0,65-0,70$). Bu durum, UV-Gör absorpsiyon spektrumlarının bu parametre ile tutarlı ve güçlü bir ilişki sergilediğini göstermektedir. İçeceklere ait spektrumlar belirgin bir şekilde diğer tüm metotlarla elde edilen ölçümlerle düşük korelasyon göstermiştir. Bu durum içeceklerin spektrum ölçümlerinin diğer metotlardaki ölçümleri baskılamadığını ortaya koymaktadır.

DLLME ile korelasyon, örneğe ve forma göre değişkenlik göstermekle birlikte diğer tüm ölçümlerle genellikle orta düzeyde pozitif değerlerde kalmaktadır. Özellikle maden suyu ve beyaz şarap örneklerinde yüksek korelasyonlar dikkat çekmektedir (örneğin birinci derece türev–sıvı formda maden suyu: $r = 0,6726$).

Yüzey ölçümleri ile korelasyonlar genellikle negatif olup, bu ilişki özellikle kuru formda belirginleşmiştir. Örneğin, kuru formda gazoz ile yüzey arasında $r = -0,4868$ gibi oldukça güçlü bir negatif ilişki söz konusudur. Bu, yüzey özelliklerinin spektral davranışı üzerinde ters etkiye bulunabileceğini düşündürmektedir.

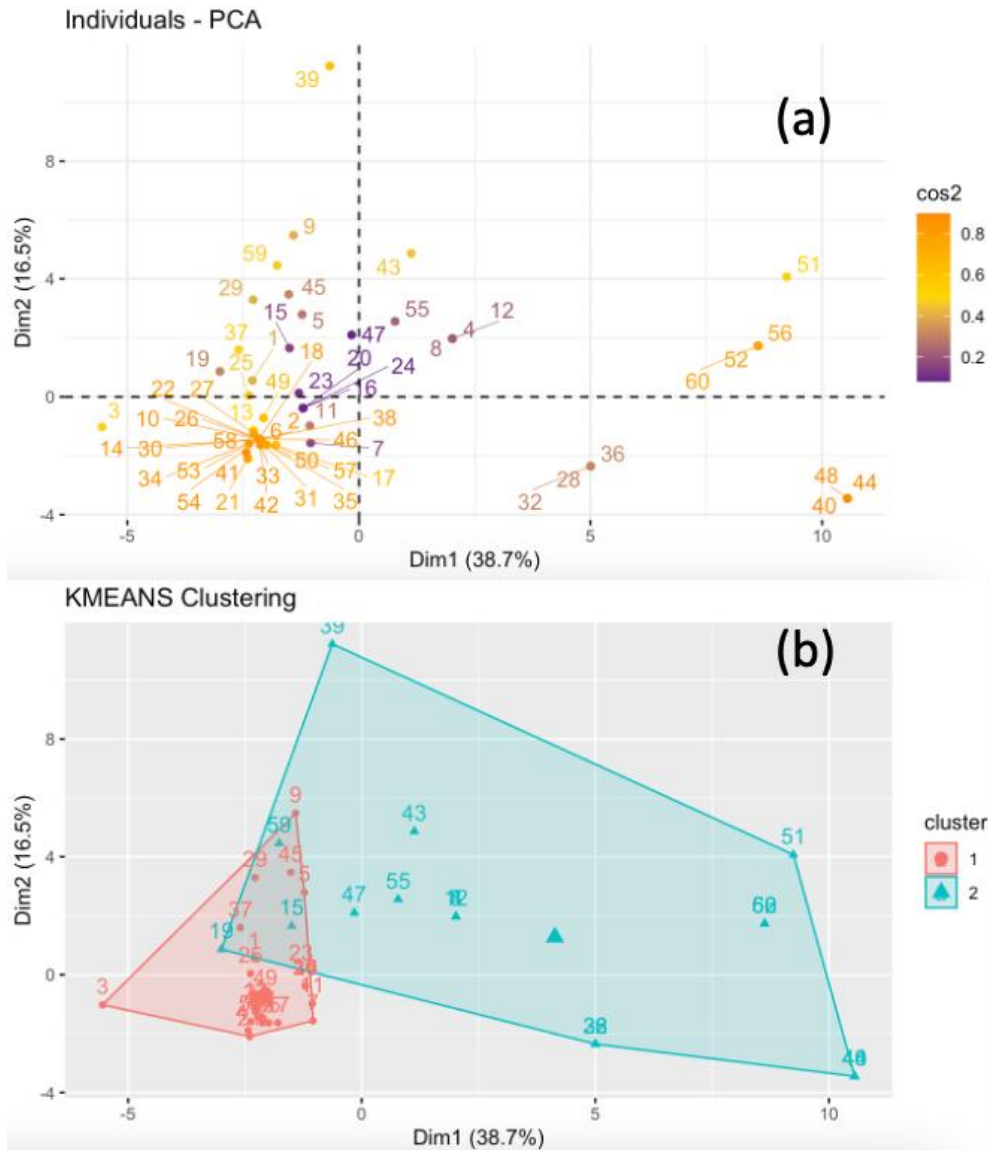
Türev derecesi arttıkça (1. → 4. derece), korelasyon değerlerinde hafif bir zayıflama eğilimi gözlemlenmektedir. Bu durum, yüksek dereceden türevlerde sinyal/gürültü oranının bozulmasıyla açıklanabilir. Ancak bazı örneklerde (özellikle maden suyu, roze şarap) üçüncü ve dördüncü derece türevlerde dahi güçlü korelasyonlar korunmuştur. Bu, belirli örneklerde UV-Gör absorpsiyon spektrumlarının oldukça karakteristik olduğunu ve gürültüden etkilenmeden bilgi taşıdığını göstermektedir.

Tüm bulgular birleştirildiğinde maden suyu, genel olarak tüm formlarda ve türev düzeylerinde tutarlı şekilde yüksek korelasyonlar göstermiştir. Bu, maden suyunun spektral verilerle açıklanabilir yapıda olduğunu ve analitik ayırt edilebilirliğinin yüksek olduğunu göstermektedir. Gazoz ve votka, bazı parametrelerle daha zayıf korelasyonlar sergilemiş; bu da bu içeceklerde spektral benzerliklerin daha az belirgin olduğunu düşündürmektedir.

5.2. Temel Bileşenler Analizi (PCA)

Her iki ilaç ve beş farklı içeceğe ait UV-Gör absorpsiyon spektrumları ve dördüncü dereceye kadar olan türevlerinde PCA analizi gerçekleştirilmiştir. Yapılan incelemeler birinci derece türevler üzerinde yapılan PCA çalışmalarının içecek ölçümlerini diğer

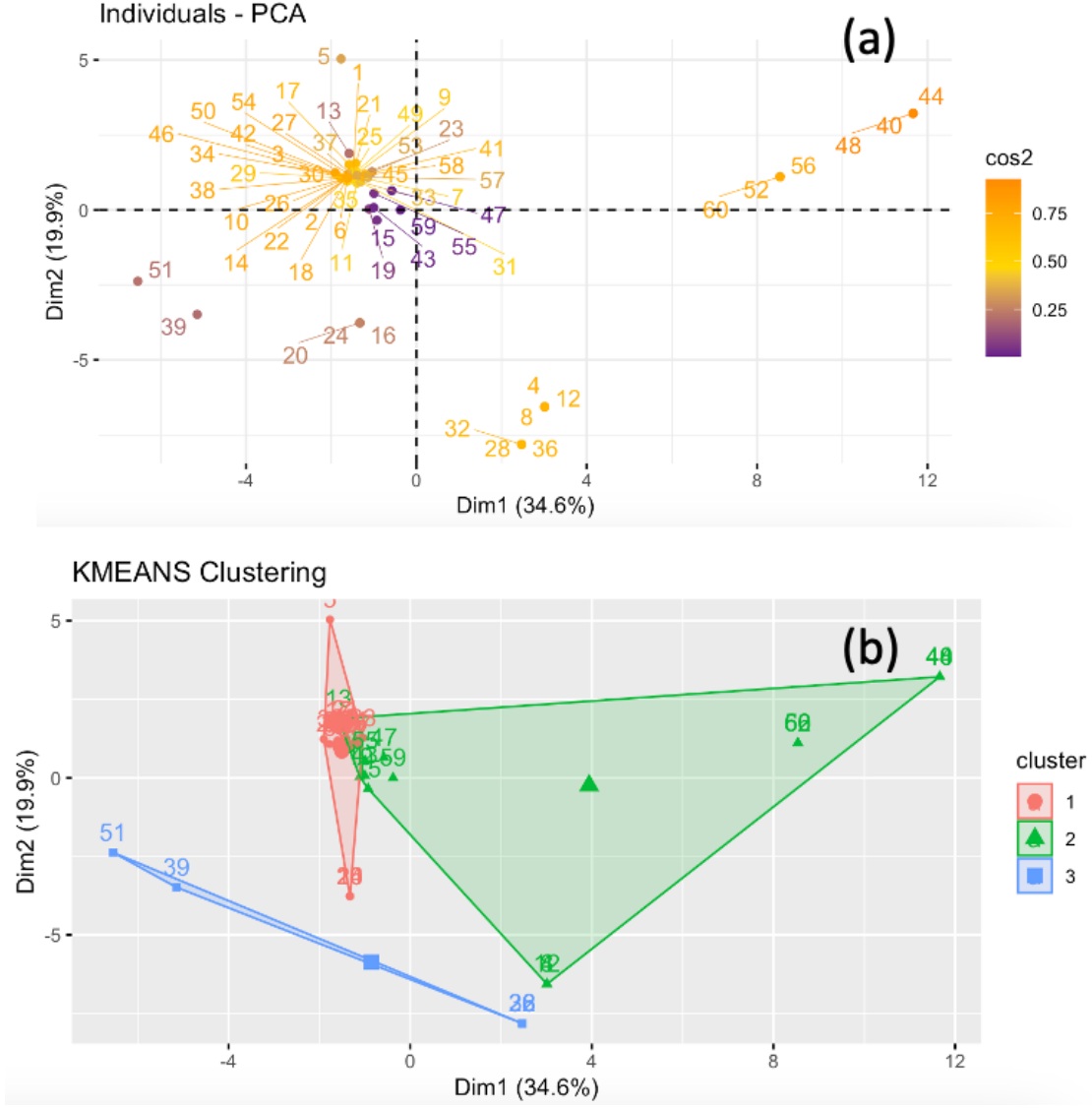
ölçümlerden ayırmada başarılı olduğunu ortaya koymuştur. Metin içerisinde sadece birinci derece türeve ait hesaplamalar sunulmuş olup diğer tüm hesaplar Ek-Şekil 7-14'tedir.



Şekil 37. Sıvı, damlacık ve kuru formlarda DLLME ile elde edilen ALP, Yüzeyden elde edilen ALP, ALP tablet ve saf içecek spektrumlarının UV-Gör absorpsiyon birinci derece türevlerinin (a) PCA sonuçları, (b) PCA sonuçlarının kümelenmesi.

Şekil 37 (a)'da UV-Gör absorpsiyon spektrumlarının birinci derece türevlerinin temel bileşen analizi (PCA) sonuçları görülmektedir. Birinci (Dim1) ve ikinci (Dim2) bileşenler sırasıyla toplam varyansın %38,7'sini ve %16,5'ini açıklamaktadır. Noktalar, her bir UV-Gör absorpsiyon ölçümünü temsil ederken, renk gradyanı $\cos^2$ değerlerini göstermekte ve bu değerler ölçümlerin iki boyutlu düzlemdeki temsil kalitesini yansıtmaktadır. Turuncuya yakın renkteki veriler daha yüksek $\cos^2$ değerlerine sahip olup, bu düzlemde daha iyi temsil edilmektedir. Bireylerin büyük çoğunluğu orijine yakın konumlanırken, 40, 44, 48 ve 51

numaralı bireyler gibi uç noktada yer alanlar daha yüksek varyansa sahip ve gruplar arası farklılığı daha belirgin şekilde yansıtmaktadır. Bu durum, örnekler arasında belirgin yapısal farklılıklar olabileceğini ve potansiyel grupların varlığını işaret etmektedir. Şekil 37 (b) PCA bileşenleri üzerinde uygulanan k-means kümeleme analizinin sonucunu göstermektedir. İki ayrı küme tespit edilmiş olup, bireyler ait oldukları kümeye göre renkli dışbükey alanlarla (convex hull) görselleştirilmiştir. Kırmızıyla gösterilen 1. küme, çoğunlukla merkezi ve sol bölgeyi kaplamakta olup daha homojen örnekleri içermektedir. Mavi renkle temsil edilen 2. küme ise daha geniş bir alana yayılmıştır ve 40, 44 ve 51 gibi uç noktadaki bireyleri içermektedir. Bu kümeleme sonuçları, PCA analizinde gözlemlenen yapısal ayrımları desteklemekte ve örnekler arasında anlamlı farklılıkların olduğunu ortaya koymaktadır. Özetlenecek olursa Şekil 37’de belirtildiği üzere birinci derece türevlerin PCA ve kümeleme sonuçlarına göre; 4, 8, 12, 52, 56, 60 numaralandırmasıyla sıralanan spektrum ölçümlerinin bir grup oluşturduğu ve diğer tüm ölçümlerden ayrıldığı gözlemlenmektedir. Bu ölçümler her çalışmadaki içecek spektrumlarına denk gelmektedir. İstenen ayrıma ulaşılabildiği söylenebilmektedir.



Şekil 38. Sıvı, damlacık ve kuru formlarda DLLME ile elde edilen LORA, Yüzeyden elde edilen LORA, LORA tablet ve saf içecek spektrumlarının UV-Gör absorpsiyon birinci derece türevlerinin (a) PCA sonuçları, (b) PCA sonuçlarının kümeleneşmesi.

Şekil 38 (a)'da UV-Gör absorpsiyon spektrumlarının birinci derece türevlerinin temel bileşen analizi (PCA) sonuçlarını gösterilmektedir. Birinci bileşen (Dim1) toplam varyansın %34,6'sını, ikinci bileşen (Dim2) ise %19,9'unu açıklamaktadır. Ölçümlerin çoğu orijin etrafında yoğunlaşırken, 40, 44, 48 ve 60 numaralı ölçümler Dim1 boyunca, 39 ve 51 numaralı ölçümler ise negatif Dim1 ve Dim2 yönünde ayrılmaktadır. Bu durum, söz konusu ölçümlerin veri setindeki diğerlerinden yapısal olarak farklı olduğunu ve toplam varyansa daha fazla katkı yaptığını göstermektedir. Şekil 38 (b)'de PCA sonuçları üzerine uygulanan k-means kümeleme analizi gösterilmektedir. Bu hesaplamada üç küme belirlenmiştir: 1. küme (kırmızı) çoğunlukla orijin çevresindeki yoğun bireylerden oluşurken, 2. küme (yeşil) 40, 44, 48 ve 60 gibi Dim1 boyunca ayrılan bireyleri

içermektedir. 3. küme (mavi) ise 39 ve 51 gibi Dim1 ve Dim2 eksenlerinin negatif yönünde yer alan bireylerden oluşmaktadır. Bu kümeleme sonucu, PCA analizinde gözlenen yapısal ayrışmaları desteklemekte ve veri setinde üç farklı grup yapısının varlığına işaret etmektedir.

BÖLÜM III

6. TARTIŞMA

Bu çalışmada, adli vakalarda kötüye kullanım potansiyeli taşıyan benzodiazepin türevlerinden alprazolam ve lorazepam içeren tabletlerinin farklı içecekler içerisinde kolay, hassas ve uygulanabilir tayini amacıyla bir metodoloji geliştirilmiştir. Çalışmada örnek miktarının sınırlı olduğu senaryolar göz önünde bulundurularak, DLLME yöntemi ile ön deriştirme sağlanmış ve tayinler UV-Gör absorpsiyon spektroskopisi, UV türev spektroskopisi ve floresans spektroskopisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

ALP tabletin UV-Gör absorpsiyon spektrumları, DLLME uygulaması sonrası farklı içecek türlerinde (beyaz şarap, roze şarap, votka, gazoz, maden suyu) genellikle referans spektrumla benzer bant yapısı göstermiştir. DLLME sonrası elde edilen spektrumların 220–300 nm aralığında yüksek şiddetli ve net bantlara sahip olması, bu ekstraksiyon tekniğinin ALP tayininde matris girişimini azaltarak hassasiyeti artırdığını göstermektedir. Buna karşılık yüzey örneklerinde 275–375 nm gibi daha uzun dalga boylarında, düşük şiddetli ve yayvan bantların oluşması, ekstraksiyonun analizinin gerekliliği açısından önemini vurgulamaktadır. Özellikle şarap ve gazoz ortamlarında DLLME örneklerinin referansa yakın bant profilleri göstermesi, yöntemin farklı matris koşullarına karşı dayanıklılığını ve adli örnek çeşitliliğine uyumunu göstermektedir.

LORA tabletin UV-Gör absorpsiyon spektrumları da 240 ve 315 nm civarında belirgin çift maksimumlu yapı göstermiştir. DLLME ile elde edilen 50 µg/mL örnekler, çoğu içecek türünde referans spektrumla yakınlık gösterirken; yüzey spektrumlarında bu bantların yayvanlaştığı ve düşük şiddetli hale geldiği gözlenmiştir. Özellikle 16,7 µg/mL gibi düşük derişimlerde bile DLLME uygulamasının etkili sonuç vermesi, adli örneklerdeki düşük miktartlı maddelerin tespitinde yöntemin duyarlılığını desteklemektedir. Bu durum, geliştirilen yöntemin hem düşük konsantrasyonlarda hem de kompleks içecek matrislerinde çalışabilirliğini göstermekte ve benzer farmasötik maddeler için model oluşturma potansiyelini ortaya koymaktadır.

UV türev spektroskopisi, tayin başarısını artırmak amacıyla kullanılmış ve sıfırıncı derece spektrumlarda ayırt edilemeyen farklılıkların ikinci ve üçüncü derece spektrumlarla belirginleştirildiği gözlenmiştir. ALP tabletin beyaz şarap ve roze şarap içeren sıvı form

örneklerinde 220–250 nm aralığında kırmızıya kayma ve ikili bant oluşumu gözlenmiş, buna karşılık damlacık ve kuru form örneklerinde referans ile daha yüksek benzerlik saptanmıştır. Bu bulgular, form değişiminin spektral yapıyı etkilediğini ve analiz öncesi örnek şeklinin dikkate alınması gerektiğini göstermektedir.

LORA türev spektrumları, özellikle 50 µg/mL konsantrasyonundaki sıvı form örneklerinde, 240–280 nm aralığında dar ve keskin bantların oluştuğunu, DLLME uygulamasının spektral seçiciliği artırdığını göstermektedir. Düşük derişimli örneklerde dahi DLLME sonrası referans spektruma benzerlik korunmuş, böylece düşük düzeyde madde içeren adli örneklerde dahi etkin bir tayin yapılabileceği doğrulanmıştır.

Floresans spektroskopisi ile yapılan analizlerde, matris içeriğine bağlı olarak tayin başarısının değiştiği gözlenmiştir. Beyaz şarap ve roze şarap gibi kompleks içerikli içeceklerde referans spektrumla örtüşmenin düşük olduğu, votka ve gazoz ortamlarında ise özellikle sıvı form örneklerinde kısmen örtüşmeler gözleendiği rapor edilmiştir. Bu durum, floresans analizinin destekleyici olarak kullanılabileceğini ancak tek başına yeterli olmadığını ortaya koymaktadır.

Özellikle 550–650 nm aralığında bazı örneklerde bant oluşmaması, matrisin floresan sinyaller üzerinde girişim yaratabildiğini göstermektedir. Ancak bazı form ve matris kombinasyonlarında (örneğin gazoz-damlacık formu), referansa yakın sonuçlar elde edilmiştir.

Analiz başarısının yalnızca görsel spektral benzerliğe değil, aynı zamanda istatistiksel geçerliliğe dayanması gerektiği düşünülerek, korelasyon analizleri ve temel bileşenler analizi (PCA) ile desteklenen bir yöntem seçimi yapılmıştır. Korelasyon analizleri, ölçülen spektrumların birbirleriyle ne derece tutarlı olduğunun kantitatif göstergesi olarak değerlendirilmiştir.

ALP için türev derecesi arttıkça korelasyon değerlerinde düşüş eğilimi gözlenmiştir. Bu nedenle ALP için normal absorpsiyon spektrumu (sıfırıncı derece) veya birinci derece türev tercih edilmelidir.

LORA için tüm içecek ve formlarda genel olarak yüksek pozitif korelasyonlar elde edilmiştir. Bu, LORA için UV-Gör absorpsiyon verilerinin oldukça kararlı ve ayrıştırılabilir olduğuna işaret eder. Türev derecesi arttıkça hafif zayıflama olsa da 3. ve 4. derece türevlerde dahi anlamlı korelasyonlar korunmuştur. Bu da LORA'nın spektral ayırt

ediciliğinin yüksek olduğunu göstermektedir. Bu nedenle LORA için Birinci, ikinci hatta bazı durumlarda üçüncü derece türev spektrumları da kullanılabilir.

PCA analizleriyle örnekler arası spektral farklılıklar değerlendirilmiştir. Birinci derece türevler üzerinde yapılan PCA, içecek spektrumlarını diğer ölçümlerden başarıyla ayırmıştır. Özellikle maden suyu örneklerinde, tüm formlarda ve türev derecelerinde tutarlı şekilde yüksek korelasyon ve PCA ayrışması göstermiştir; bu da analitik ayırt edilebilirliğinin en yüksek olduğu içecek olduğunu göstermektedir. PCA sonuçlarında ayrışma gösteren verilerin çoğunlukla içecek spektrumları olduğu belirlenmiş, bu da geliştirilen yöntemin ilaç-içecek spektrumlarını ayırtırmadaki başarısını göstermektedir.

Bu sistematik yaklaşım, gelecekte benzer amaçlarla yapılacak çalışmalarda hangi spektroskopik derecenin hangi matris ve madde için daha uygun olacağına dair yönlendirici nitelik taşır. Aynı zamanda, düşük örnek hacmiyle yapılan analizlerde optimum gürültü oranının sağlanmasına katkı sağlar.

Sonuç olarak, bu çalışma adli vakalarda içecek kalıntılarından benzodiazepin türevlerinin tespiti için basit, hızlı ve düşük örnek miktarıyla uygulanabilir bir metodoloji sunmakta; DLLME ile örnek deriştirme için UV türev spektroskopisine entegre edilmesiyle yüksek duyarlılık sağlanmakta; floresans spektroskopisi ise seçici koşullarda destekleyici rol üstlenmektedir. Elde edilen bulgular, yalnızca analiz başarısını değil, aynı zamanda benzer farmasötik maddeler için referans model oluşturma potansiyelini de ortaya koymaktadır.

7. KAYNAKÇA

- Abarca, R., & Gerona, R. (2023). Development and validation of an LC-MS/MS assay for the quantitative analysis of alprazolam, α -hydroxyalprazolam and hydrocodone in dried blood spots. *Journal of Chromatography B*, 1220, 123639. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2023.123639>
- Brettell, T. A., Butler, J. M., & Saferstein, R. (2005). Forensic Science. *Analytical Chemistry*, 77(12), 3839-3860. <https://doi.org/10.1021/ac050682e>
- Cole, K., & Levine, B. S. (2020). Ultraviolet-Visible Spectrophotometry. İçinde *Principles of Forensic Toxicology* (ss. 127-134). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-42917-1_10
- Dinis-Oliveira, R. J., Carvalho, F., Duarte, J. A., Remião, F., Marques, A., Santos, A., & Magalhães, T. (2010). Collection of biological samples in forensic toxicology. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 20(7), 363-414. <https://doi.org/10.3109/15376516.2010.497976>
- ElSohly, M. A., & Salamone, S. J. (1999). Prevalence of Drugs Used in Cases of Alleged Sexual Assault. *Journal of Analytical Toxicology*, 23(3), 141-146. <https://doi.org/10.1093/jat/23.3.141>
- Gallardo, E., & Queiroz, J. A. (2008). The role of alternative specimens in toxicological analysis. *Biomedical Chromatography*, 22(8), 795-821. <https://doi.org/10.1002/bmc.1009>
- Hall, J. A., & Moore, C. B. T. (2008). Drug facilitated sexual assault – A review. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 15(5), 291-297. <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2007.12.005>
- Houck, M. M., & Siegel, J. A. (2010). *Fundamentals of Forensic Science* (2nd bs).
- Jain, R., & Singh, R. (2016). Applications of dispersive liquid–liquid micro-extraction in forensic toxicology. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 75, 227-237. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.07.007>
- Jufer-Phipps, R. A., & Levine, B. S. (2020). Benzodiazepines. İçinde *Principles of Forensic Toxicology* (ss. 317-331). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-42917-1_20

- Katkar, A. V, Nagare, S. B., Sutar, S. B., Patil, S. V, Pharm, M., Year, nd, & Professor, A. (2022). *Overview of UV Spectroscopy Derivatives*. www.ijcrt.org
- Kus, S., Marczenko, Z., & Review, N. O. (1996). Derivative UV-VIS Spectrophotometry in Analytical Chemistry. *Çinde Chern. Anal. (Warsaw)* (C. 41).
- Nakamura, M. (2011). Analyses of benzodiazepines and their metabolites in various biological matrices by LC-MS(/MS). *Biomedical Chromatography*, 25(12), 1283-1307. <https://doi.org/10.1002/bmc.1598>
- Negrusz, A., & Gaensslen, R. E. (2003). Analytical developments in toxicological investigation of drug-facilitated sexual assault. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 376(8), 1192-1197. <https://doi.org/10.1007/s00216-003-1896-z>
- Noggle, F. T., & Clark, C. R. (1979). Identification of Some Benzodiazepines of Forensic Interest. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 62(4), 799-807. <https://doi.org/10.1093/jaoac/62.4.799>
- O'Haver, T. C. (1979). Derivative and wavelength modulation spectrometry. *Analytical Chemistry*, 51(1), 91A-99A. <https://doi.org/10.1021/ac50037a008>
- Pfizer İlaçları Ltd. Şti. (2023). *Xanax 1 mg Tablet prospektüsü*. https://titck.gov.tr/storage/Archive/2021/kubKtAttachments/XANAX05KT_53850283-55e8-4705-a3cf-18efd4049498.pdf
- Redasani, V. K., Patel, P. R., Marathe, D. Y., Chaudhari, S. R., Shirkhedkar, A. A., & Surana, S. J. (2018). A REVIEW ON DERIVATIVE UV-SPECTROPHOTOMETRY ANALYSIS OF DRUGS IN PHARMACEUTICAL FORMULATIONS AND BIOLOGICAL SAMPLES REVIEW. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 63(3), 4126-4134. <https://doi.org/10.4067/s0717-97072018000304126>
- Rezaee, M., Assadi, Y., Milani Hosseini, M.-R., Aghaee, E., Ahmadi, F., & Berijani, S. (2006). Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*, 1116(1-2), 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.03.007>
- Rutgers, J. G., & Shearer, C. M. (1981). *Lorazepam* (ss. 397-426). [https://doi.org/10.1016/S0099-5428\(08\)60148-3](https://doi.org/10.1016/S0099-5428(08)60148-3)

- Sáiz, J., Ortega-Ojeda, F., López-Melero, L., Montalvo, G., & García-Ruiz, C. (2014). Electrophoretic fingerprinting of benzodiazepine tablets in spike drinks. *ELECTROPHORESIS*, 35(21-22), 3250-3257. <https://doi.org/10.1002/elps.201400015>
- Sofalvi, S., Lavins, E. S., Kaspar, C. K., Michel, H. M., Mitchell-Mata, C. L., Huestis, M. A., & Apollonio, L. G. (2020). Development and Validation of an LC–MS-MS Method for the Detection of 40 Benzodiazepines and Three Z-Drugs in Blood and Urine by Solid-Phase Extraction. *Journal of Analytical Toxicology*, 44(7), 708-717. <https://doi.org/10.1093/jat/bkaa072>
- Talsky, G., Mayring, L., & Kreuzer, H. (1978). High-Resolution, Higher-Order UV/VIS Derivative Spectrophotometry. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 17(11), 785-799. <https://doi.org/10.1002/anie.197807853>
- Teoh, W. K., Mohamed Sadiq, N. S., Saisahas, K., Phoncai, A., Kunalan, V., Md Muslim, N. Z., Limbut, W., Chang, K. H., & Abdullah, A. F. L. (2022). Vortex-assisted dispersive liquid–liquid μ microextraction-gas chromatography (μ VADLLME-GC) determination of residual ketamine, nimetazepam, and xylazine from drug-spiked beverages appearing in liquid, droplet, and dry forms. *Journal of Forensic Sciences*, 67(5), 1836-1845. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.15068>
- Verster, J., Veldhuijzen, D., Patat, A., Olivier, B., & Volkerts, E. (2006). Hypnotics and Driving Safety: Meta-Analyses of Randomized Controlled Trials Applying the on-the-Road Driving Test. *Current Drug Safety*, 1(1), 63-71. <https://doi.org/10.2174/157488606775252674>
- Wood, A. J. J., Shader, R. I., & Greenblatt, D. J. (1993). Use of Benzodiazepines in Anxiety Disorders. *New England Journal of Medicine*, 328(19), 1398-1405. <https://doi.org/10.1056/NEJM199305133281907>
- Yan, H., & Wang, H. (2013). Recent development and applications of dispersive liquid–liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*, 1295, 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.04.053>

8. ÖZGEÇMİŞ

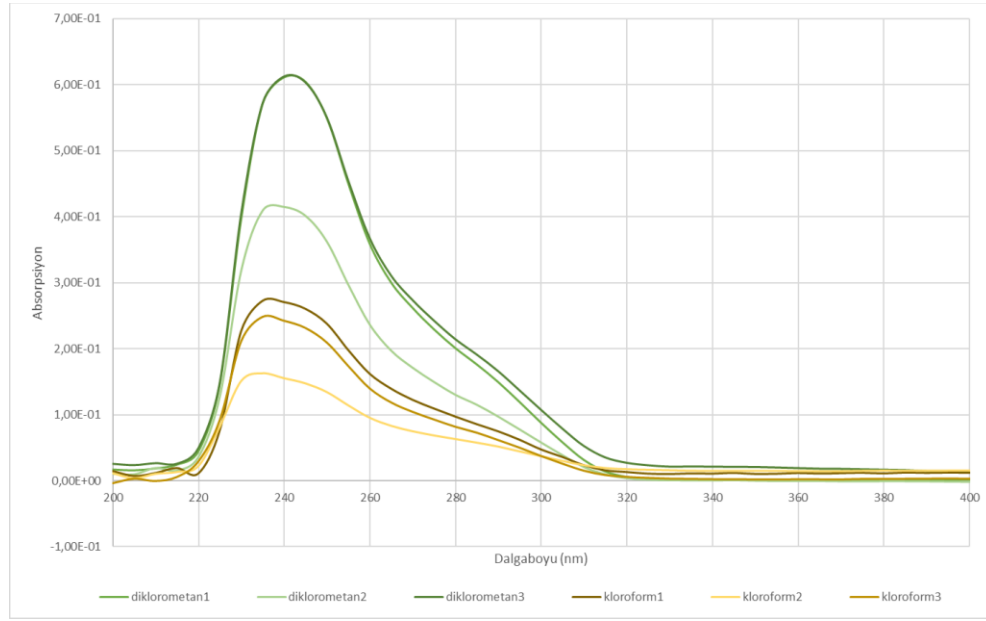
KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Büşra Emanetoğlu

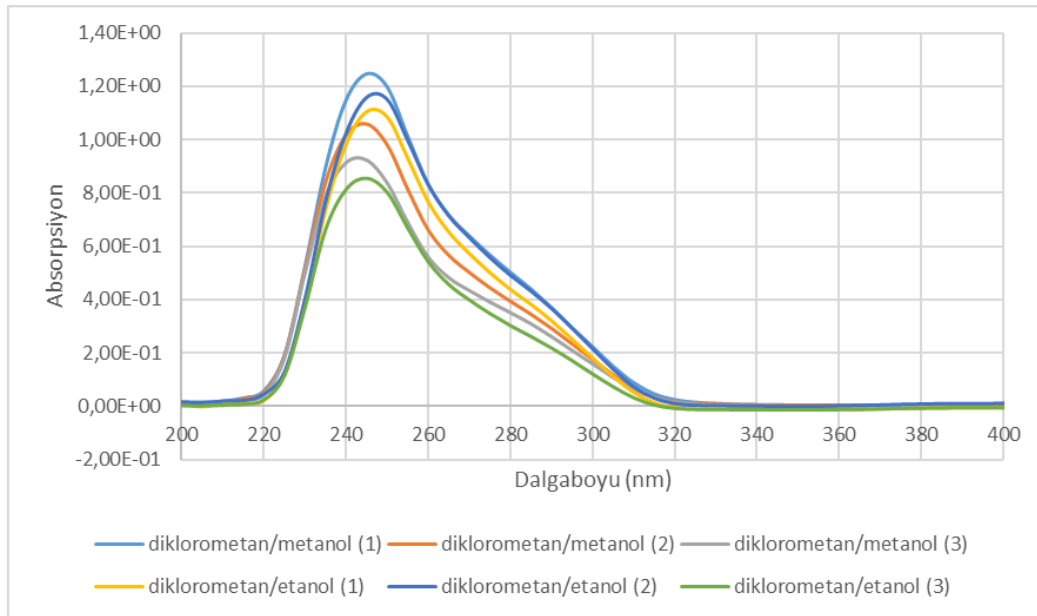
EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Yılı
Lisans	İstanbul Medeniyet Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik	2022
Yüksek Lisans	İstanbul Medeniyet Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Adli Bilimler Anabilim Dalı	2025

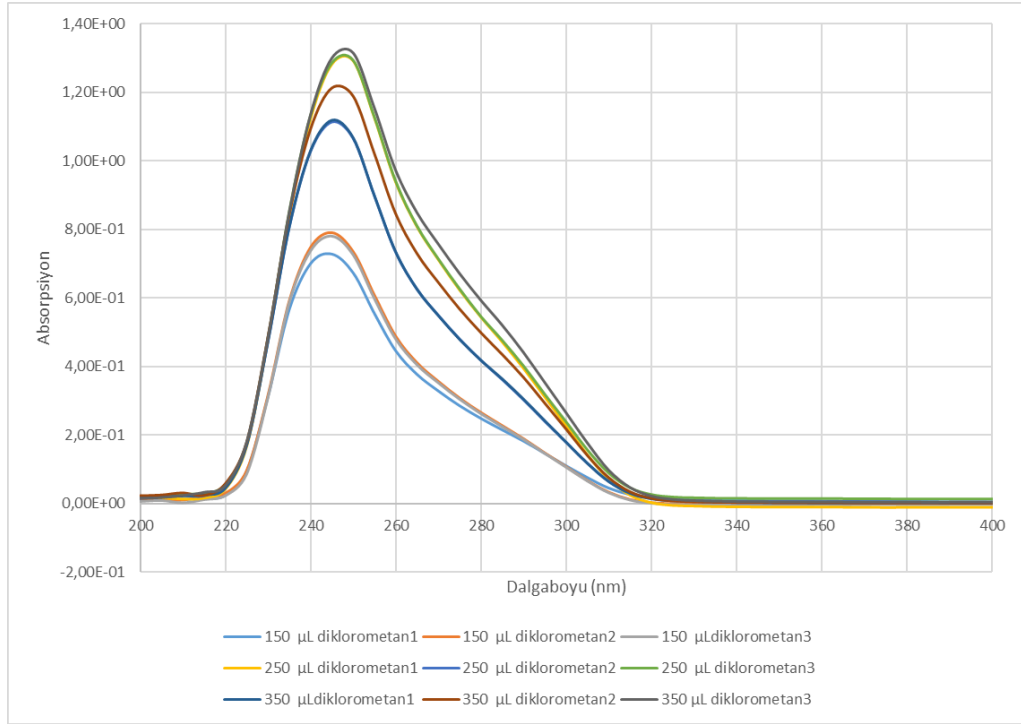
9. EKLER



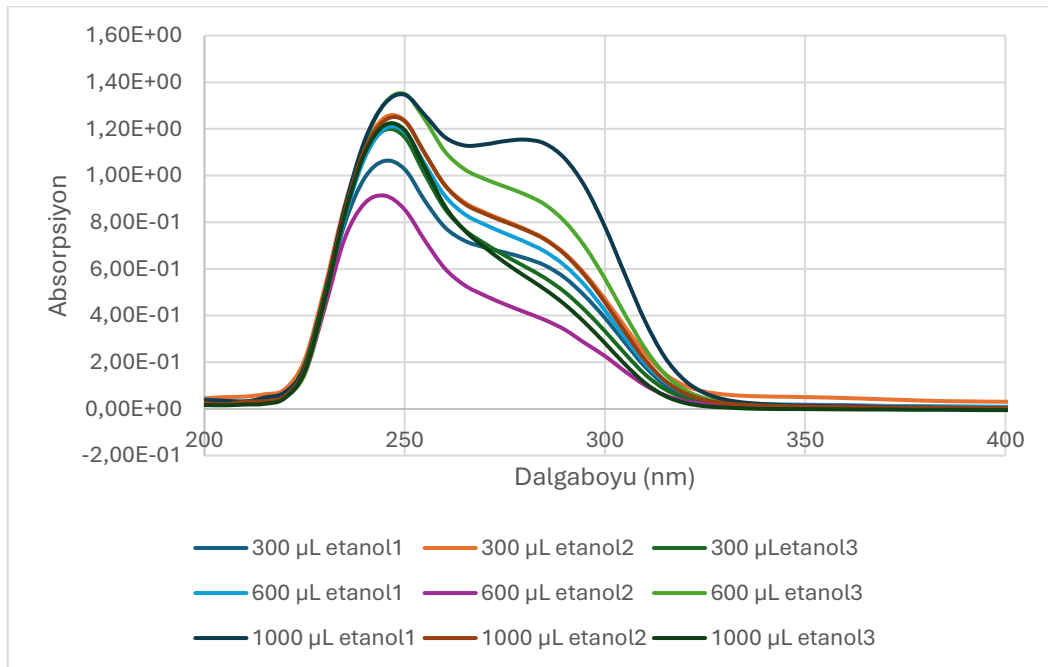
EK-Şekil 1. DLLME optimizasyon çalışması ekstraksiyon çözücüsü seçimi. Üçer set olacak şekilde 500 µl etanol+250 µl diklorometan (diklorometan1, 2 ve 3) ve 500 µl etanol+250 µl kloroform (kloroform1, 2 ve 3) kombinasyonları analiz edilmiştir.



EK-Şekil 2. DLLME optimizasyon çalışması dispersif çözücü seçimi. Üçer set olacak şekilde 500 µl etanol+250 µl diklorometan ve 500 µl metanol+250 µl diklorometan analiz edilmiştir.

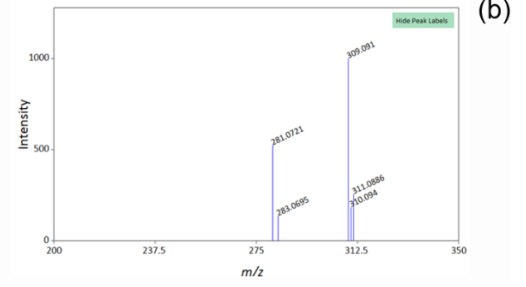
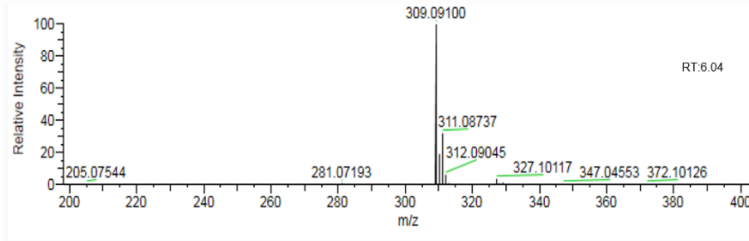


EK-Şekil 3. DLLME optimizasyon çalışması ekstraksiyon çözücüsü hacim seçimi. Üçer set olacak şekilde 500 µl etanol+150 µl diklorometan (150 µl diklorometan1, 2 ve 3), 500 µl etanol+250 µl diklorometan (250 µl diklorometan1, 2 ve 3) ve 500 µl etanol+350 µl diklorometan (350 µl diklorometan1, 2 ve 3) kombinasyonları analiz edilmiştir.



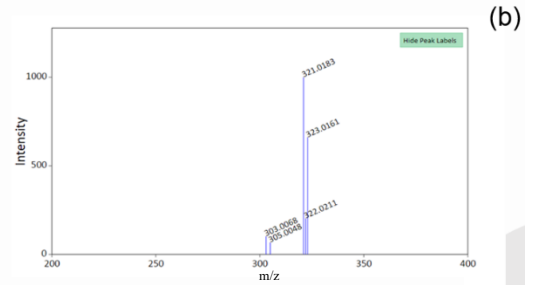
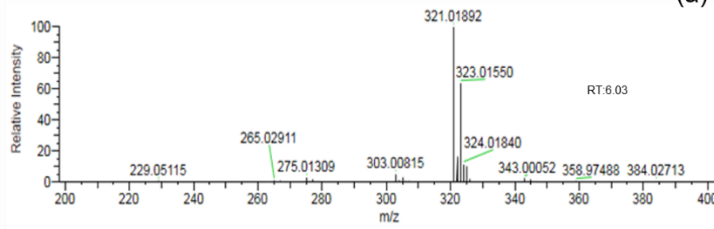
EK-Şekil 4. DLLME optimizasyon çalışması dispersif çözücü hacim seçimi. Üçer set olacak şekilde 300 µl etanol+250 µl diklorometan (300 µl etanol, 2 ve 3), 600 µl etanol+250 µl diklorometan (600 µl etanol, 2 ve 3), ve 1000 µl etanol+250 µl diklorometan (1000 µl etanol, 2 ve 3) kombinasyonları analiz edilmiştir.

ALP MS Spektrumu

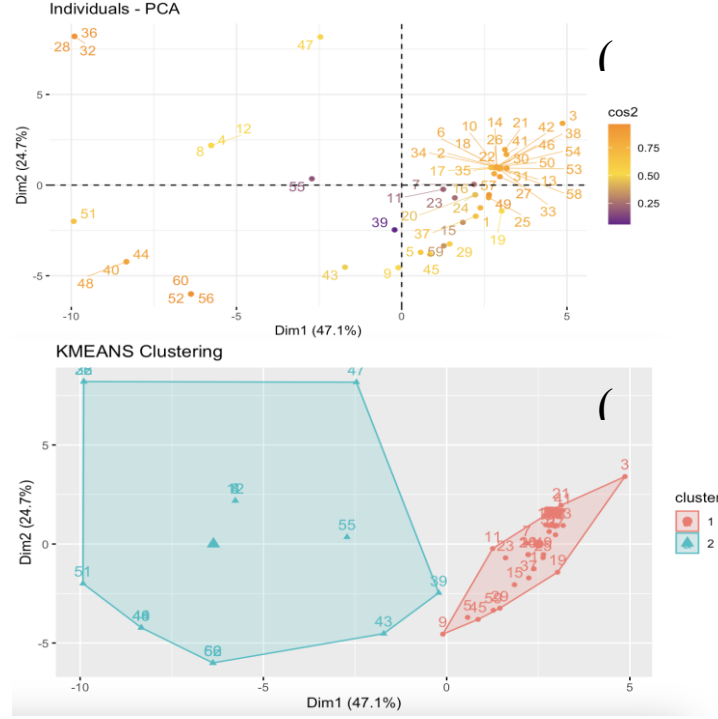


EK-Şekil 5. ALP Tablet MS spektrumu. (a) deneyde kullanılan örneklere ait ve (b) referans ALP MS spektrumu.

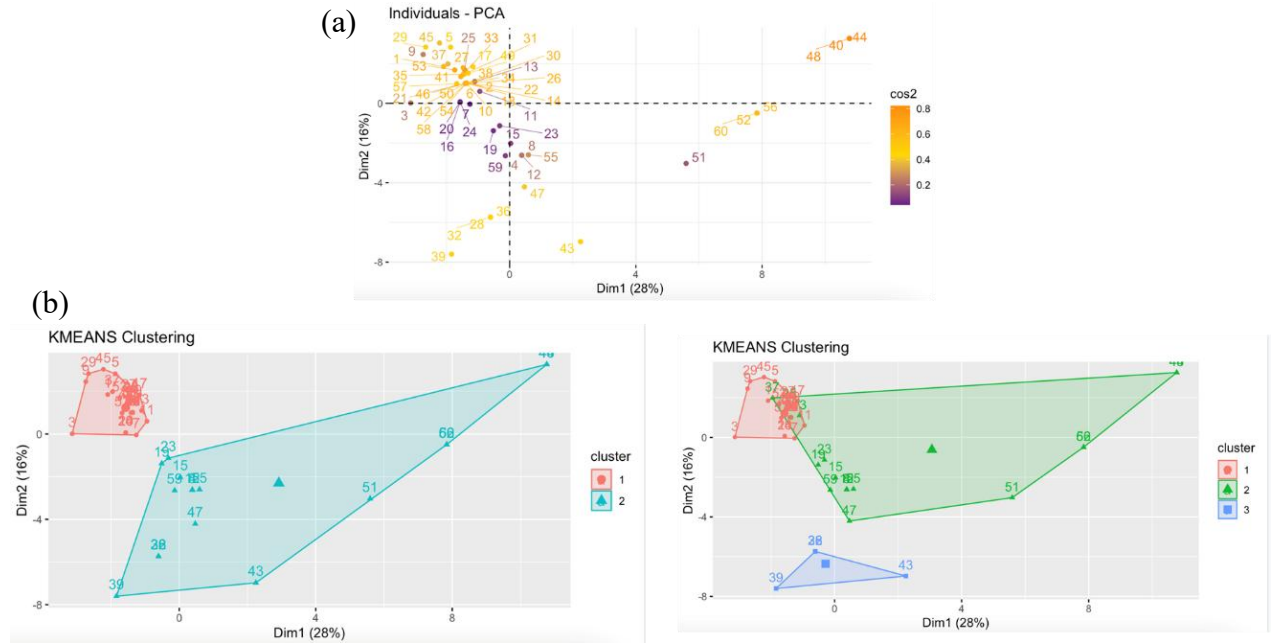
LORA MS Spektrumu



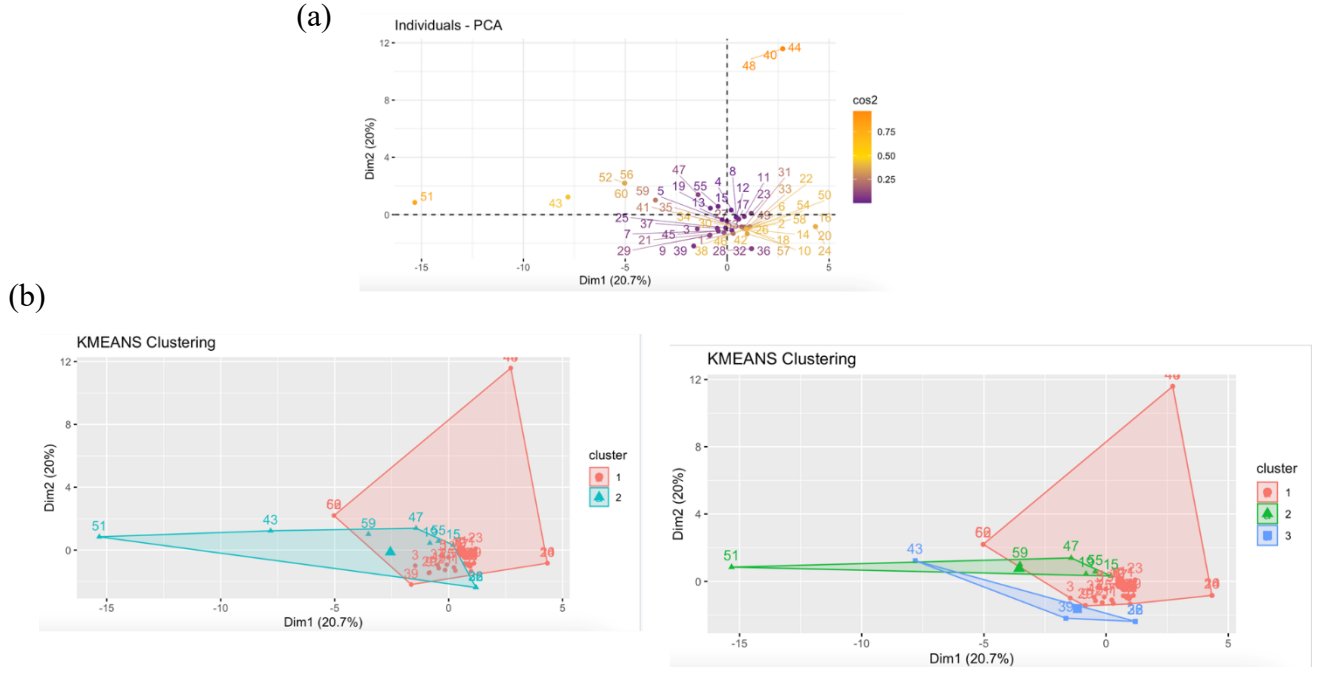
EK-Şekil 6. LORA Tablet MS spektrumu. (a) deneyde kullanılan örneklere ait ve (b) referans LORA MS spektrumu.



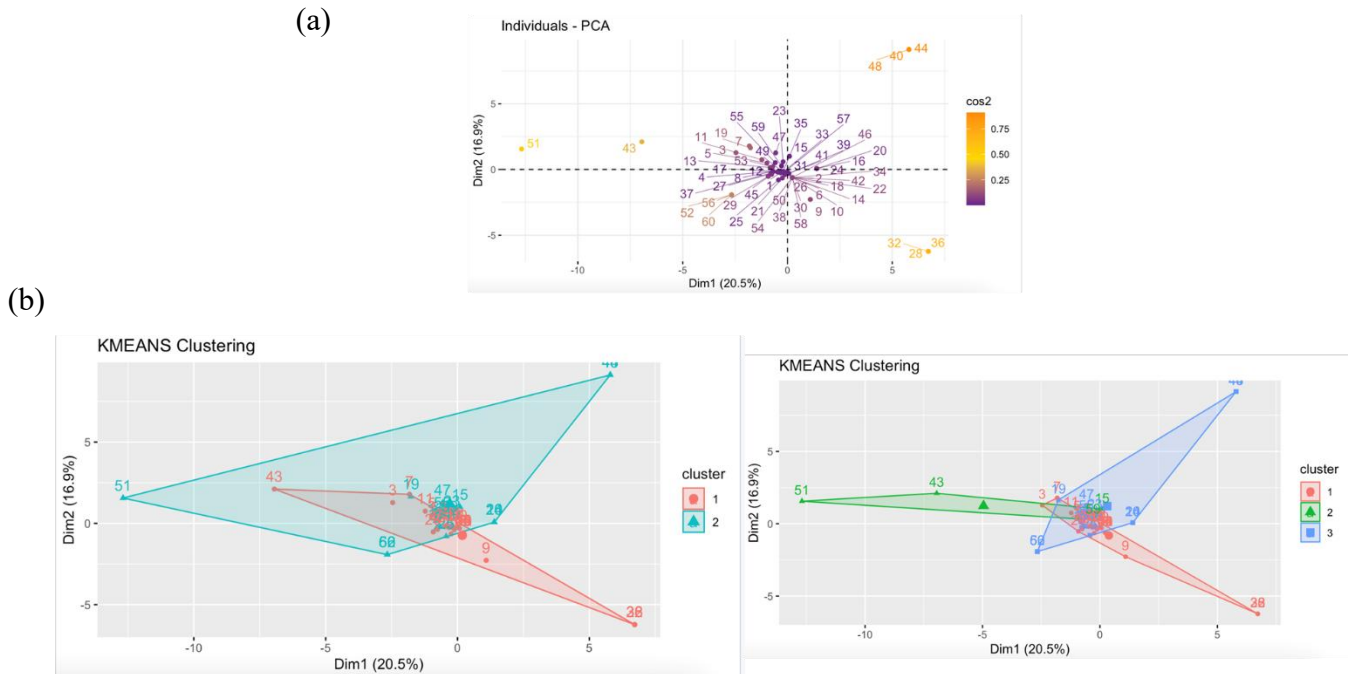
EK-Şekil 7. Sıvı, damlacık ve kuru formlarda DLLME ile elde edilen ALP, Yüzeyden elde edilen ALP, ALP tablet ve saf içecek spektrumlarının UV-Gör absorpsiyon spektrumlarının (a) PCA sonuçları, (b) PCA sonuçlarının kümelenmesi.



EK-Şekil 8. Sıvı, damlacık ve kuru formlarda DLLME ile elde edilen ALP, Yüzeyden elde edilen ALP, ALP tablet ve saf içecek spektrumlarının UV-Gör absorpsiyon ikinci derece türevlerinin (a) PCA sonuçları, (b) PCA sonuçlarının kümelenmesi.



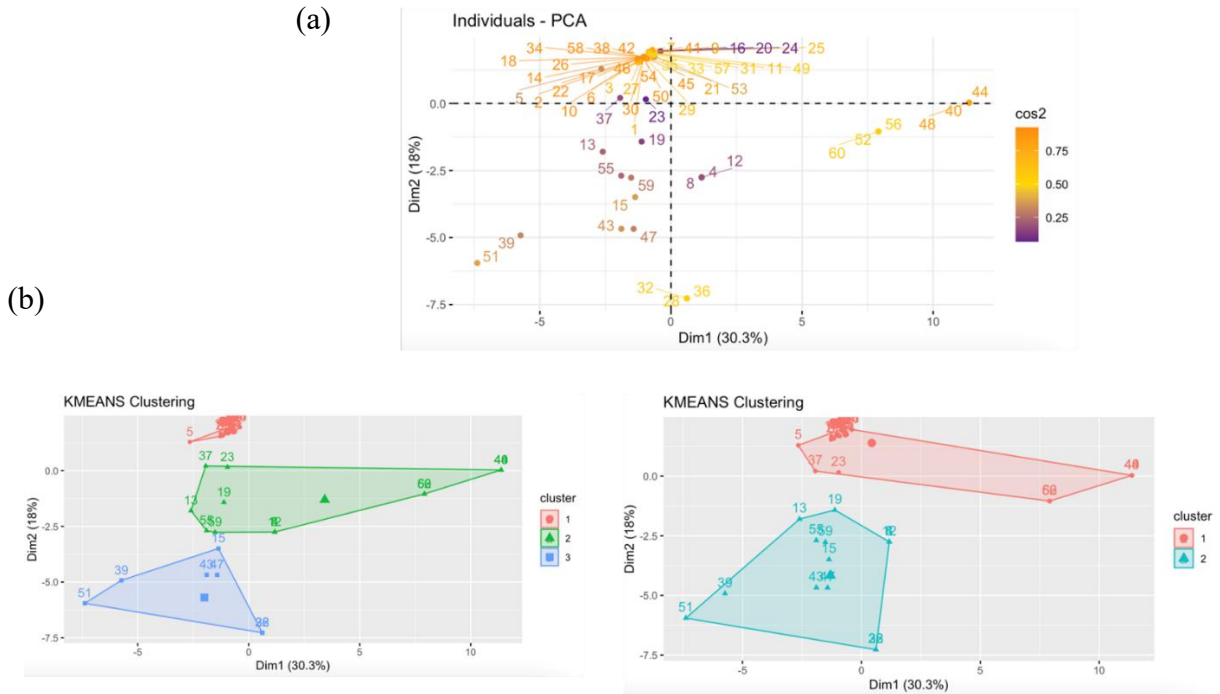
EK-Şekil 9. Sıvı, damlacık ve kuru formlarda DLLME ile elde edilen ALP, Yüzeyden elde edilen ALP, ALP tablet ve saf içecek spektrumlarının UV-Gör absorpsiyon üçüncü derece türevlerinin (a) PCA sonuçları, (b) PCA sonuçlarının kümelenmesi.



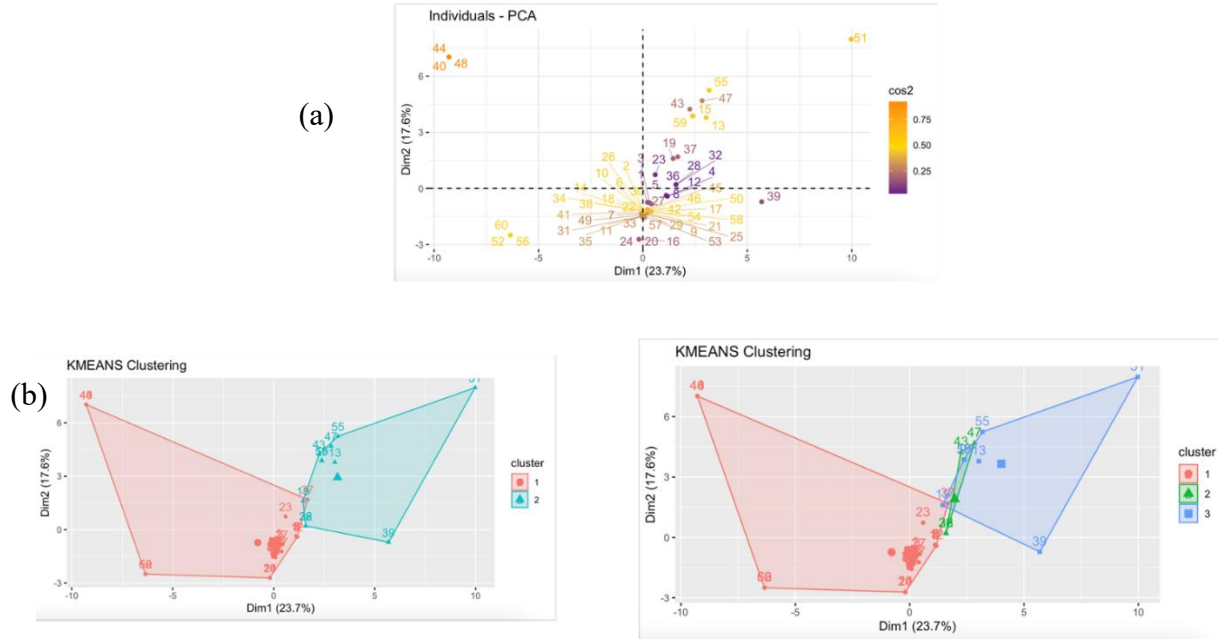
EK-Şekil 10. Sıvı, damlacık ve kuru formlarda DLLME ile elde edilen ALP, Yüzeyden elde edilen ALP, ALP tablet ve saf içecek spektrumlarının UV-Gör absorpsiyon dördüncü derece türev (a) PCA sonuçları, (b) PCA sonuçlarının kümelenmesi.



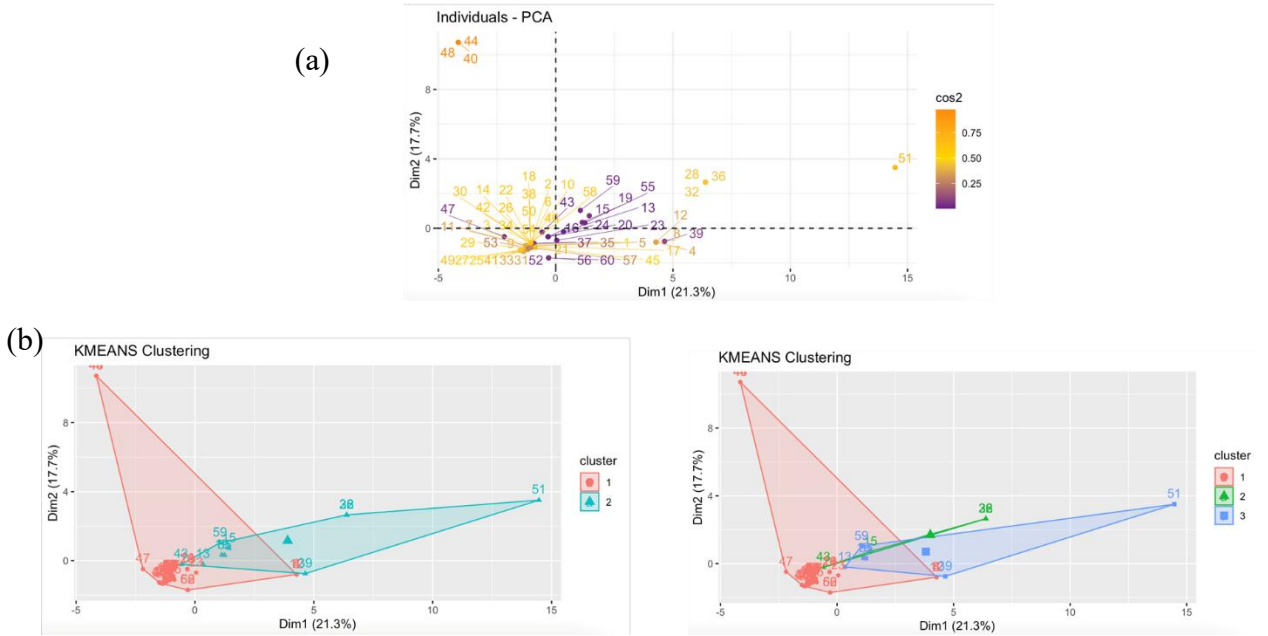
EK-Şekil 11. Sıvı, damlacık ve kuru formlarda DLLME ile elde edilen LORA, Yüzeyden elde edilen LORA, LORA tablet ve saf içecek spektrumlarının UV-Gör absorpsiyon spektrumlarının (a) PCA sonuçları, (b) PCA sonuçlarının kümelenmesi.



EK-Şekil 12. Sıvı, damlacık ve kuru formlarda DLLME ile elde edilen LORA, Yüzeyden elde edilen LORA, LORA tablet ve saf içecek spektrumlarının UV-Gör absorpsiyon ikinci derece türevlerinin (a) PCA sonuçları, (b) PCA sonuçlarının kümelenmesi.



EK-Şekil 13. Sıvı, damlacık ve kuru formlarda DLLME ile elde edilen LORA, Yüzeyden elde edilen LORA, LORA tablet ve saf içecek spektrumlarının UV-Gör absorpsiyon üçüncü derece türevlerinin (a) PCA sonuçları, (b) PCA sonuçlarının kümelenmesi.



EK-Şekil 14. Sıvı, damlacık ve kuru formlarda DLLME ile elde edilen LORA, Yüzeyden elde edilen LORA, LORA tablet ve saf içecek spektrumlarının UV-Gör absorpsiyon dördüncü derece türevlerinin (a) PCA sonuçları, (b) PCA sonuçlarının kümelenmesi.