

Kan Alkolünün (Mikroyöntemle) GLK ile Tayini ve Yöntemin Trafikte Uygulanması

Determination of Alcohol in Fingertip Blood by
Gas Chromatography and Its Application to Traffic

Nevin VURAL*, Şahan SAYGI*

Alkolün (etil alkol) vücut sıvılarında özellikle kanda duyar ve kesin olarak tayini toksikolojik amaç ve adli tıp açısından önemlidir. Ayrıca trafik kazalarında ve oluşan ölümlerde, alkol etkisinde araç kullanmanın önemli bir neden olduğu birçok araştırmalarla gösterilmiştir (1, 2). Bu nedenle birçok ülkeler, trafik yasalarında alkol etkisinde araç kullanmayı yasaklarken kandaki alkol düzeyinin belirli bir limitin üstündeki değerini (çoğunlukla % 80 mg üstünde) suç olarak kabul etmektedirler (3, 4). Türkiye dahil bazı ülkeler ise sürücünün eser alkol alması halinde bile araç kullanmasını trafik suçu olarak değerlendirmektedirler (3). Solunum havasında alkol tayini, kişinin aldığı alkol miktarı için ancak ön bir bilgi vermektedir (5). Bu nedenle kanda alkol tayini için duyar, spesifik, kesin ve sahaya uygulanabilen yöntemlerin kurulması ve standardize edilmesini amaçlayan birçok araştırmalar yapılmıştır (6, 7). Biyolojik materyalde (kan, idrar gibi) alkol tayininde kullanılan başlıca yöntemler kimyasal, enzimatik, gaz kromatografik ve otomatik yöntemler olarak sınıflandırılabilir.

Kimyasal yöntemler uygulanmadan önce, kan veya diğer biyolojik materyalden alkol, distilasyon, havalandırma veya difüzyon yolu ile ayırt edilir. Sonra uygun bir yükseltgen ile yükseltgenir. Stökiyometrik olarak reaksiyon sonucu, reaksiyona girmeyen yükseltgenin miktarı tayin edilerek, alkol miktarına geçilir. Bu amaçla volumetrik, spektrofotometrik veya potansiyometrik yöntemler kullanılır (6). Yükseltgen madde olarak en çok ($K_2Cr_2O_7 + H_2SO_4$), yöntemlerin en eskisi WIDMARK yöntemi olup 0,2 ml kan ile çalışma olanağını vermektedir (7, 9).

Redaksiyona verildiği tarih : 4 Ocak 1982

* Toksikoloji Birimi, Eczacılık Fakültesi, Ankara Üniversitesi.

Kan Alkolünün Tayini

Enzimatik yöntemler ise, alkolün alkol dehidrogenaz (ADH) enzimi katalizörlüğünde, nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) tarafından yükseltgenmesine dayanır. Stökiyometrik olan bu reaksiyonda 1 molekül NAD, 1 molekül alkolü yükseltgeyerek kendisi indirgenir (NADH₂). NADH₂ ise ya uygun kromojen maddelerle (tetrazolyum tuzları, fenazinmetosülfat gibi) renklendirerek görünen alanda spektrofotometrik yöntemle tayin edilir (10, 11). Veya doğrudan NADH'ın, 340 nm de UV alanında veya mikroflorimetrik olarak ölçülmesi yapılır (6, 7). Sonuç olarak da alkol miktarına *geçilir*. Enzimatik yöntemlerde genel olarak kan proteini çöktürüldükten sonra, ADH ve NAD ile inkübe edilir.

Gaz sıvı kromatografisi (GLK) yöntemi, kanda alkol tayini için ilk kez 1958'de CADMAN ve JOHNS tarafından uygulanmıştır (6). Daha sonra GLK yöntemleri birçok araştırmacılar tarafından geliştirilmiştir. Bugün 0.2 ml kan ile çalışılarak µg (mikrogram) dan düşük miktardaki asetaldehit, aseton ve etilalkol kesin olarak ayrılabilen ve tanınabilmektedir. Yöntemlerde porapak Q, polypak - 2, PEG - 400 (veya 600, 1500) gibi sıvı fazların uygun bir destek fazda kaplandığı kolonlar ve alev iyonlaştırıcı dedektör (FID) tercih edilmektedir (7, 12, 13).

Otomatize yöntemler ise rutin ve çok numune ile çalışma amacı ile geliştirilmiştir. Otomatik florimetrik yöntemler (14), gaz kromatografa monte edilen (head space) veya otomatik sıvı numune alıcısı, elektronik integratör ve komputere teknikler vardır (12, 13).

Ayrıca gaz-kütle spektrometrisi ve komputere şekli gibi pahalı yöntemlerden de bahsedilebilir (7, 15).

Araştırmamızda kanda alkol tayininin saha çalışmalarına uygun gaz kromatografik bir yöntemi standardize etmek ve trafikte alkol kontrolüne uygulanması amaç edinilmiştir.

MATERYAL ve YÖNTEM

1 — Kan numuneleri : a) Belirli konsantrasyonda alkol içeren kan standartları hazırlamak için kan, hiç alkol almamış kişilerden sağlanmıştır. Antikoagulan ve (enzim inhibitörü) koruyucu olarak NaF (% 0.4 oranında kanda bulunacak şekilde) kullanılmıştır.

Nevin VURAL, Şahan SAYGI

b) Kan numuneleri trafik kontrolü sırasında sürücülerden veya adli tıbbı alkol muayenesi için gönderilen sürücülerden sağlanmıştır. Bu kişilerin parmak uçları % 0.1 lik HgCl₂ ile temizlendikten sonra kan NaF içeren 0.5 ml lik bir mikrotüpe (0.4 ml kadar) alınmış ve çalkalandıktan sonra ağızları hemen parafilm ile kapatılmıştır. En kısa zamanda laboratuvara götürülerek, analize kadar buz dolabında (+ 5°C de) saklanmıştır. 93 alkol almış sürücünün kanda alkol tayini yapılmıştır (16).

2 — Standart alkol çözeltisi hazırlanması : a) Önce mutlak etanol, etil alkolün (% 96) CaO ile geri soğutucu altında kaynatılarak distile edilmesi ile hazırlanmıştır (17). Mutlak alkolden 1 gram su içinde tartılarak 100 ml ye tamamlanmıştır (10 mg etanol/ml de).

3 — İç Standart (t. S.) çözeltisi : a) n-propil alkol (Merck) kullanılmıştır. Stok çözelti % 0.1 Ek olarak hazırlanmıştır.

b) Çalışırken 2 ml stok çözelti 100 ml ye su ile seyreltilir (0.2 mg n-propil alkol/ml de).

4 — Kan standartlarının hazırlanması : 0; 0.5; 0.8; 1 ve 2 ml alkol standart (10 mg/ml) çözeltilerini içeren ağız cam kapaklı fiyollere kan ilave edilerek total hacim 10 ml ye tamamlanmıştır.

5 — Alkol standartları : Yukarıdaki gibi, ancak kan yerine su ilave edilerek hazırlanmıştır. Böylece % 0, % 50, % 80, % 100, % 200 mg alkol içeren standartlar analize hazırlanmış olur.

Cihaz : Packard-Becker Gas Chromatograph 419 kullanılmıştır.

Çalışma koşulları :

Dedektör : Alev iyonlaşma dedektörü (FID)

Kolon : 2 m x 0,4 mm iç çap; % 10 PEG - 400 (Chromosorb W - AW, 80/100 mesh üzerinde)

İnjesiyon giriş sıcaklığı : 110°C

Kolon sıcaklığı : 90° C

Dedektör sıcaklığı : 110°C

Taşıyıcı gaz : Azot (30 ml/dak.)

Attenuation : 8

Range : 2.5 x 10⁻¹¹ amper

Kaydedici hızı : 0.5 cm/dak.

Kan Alkolünün Tayini

Teknik : a) Kalibrasyon için 0.1 ml standart kan çözeltisine bir mikrotüpte 1 ml İ. S. ilave edilerek vortex de karıştırılır. 1 µl (mikrolitre) gaz kromatografa enjekte edilir. Her standart için en az çift enjeksiyon yapılır. Yöntem hem kan ile ve hem de suda hazırlanan alkol standartları ile tekrar edilerek karşılaştırmıştır.

b) Analiz için 0.1 ml kan numunesine 1 ml 1 S. ilave edilir ve 1 µl gaz kromatografa enjekte edilmiştir. En az 2 enjeksiyon yapılmıştır.

Kalibrasyon : Her standart için elde edilen kromatogramlarda, etil alkol (EtOH) ve İ. S. (n-propil alkol) verdikleri pik yükseklikleri bulunarak

$$\frac{\text{EtOH pik yüksekliği}}{\text{İ.S. pik yüksekliği}}$$
 oranları saptanır.

$$\frac{\text{EtOH konsantrasyonu \%}}{\text{İ.S. konsantrasyonu \%}}$$
 konsantrasyon oranlarına göre pik yüksekliği oranları işaretlenerek grafik hazırlanır. Her çalışmada kalibrasyon yenilenir. Numune ile elde edilen kromatogramlardaki pik yüksekliği oranlarından alkol konsantrasyonu grafikten bulunur veya kalibrasyon için :

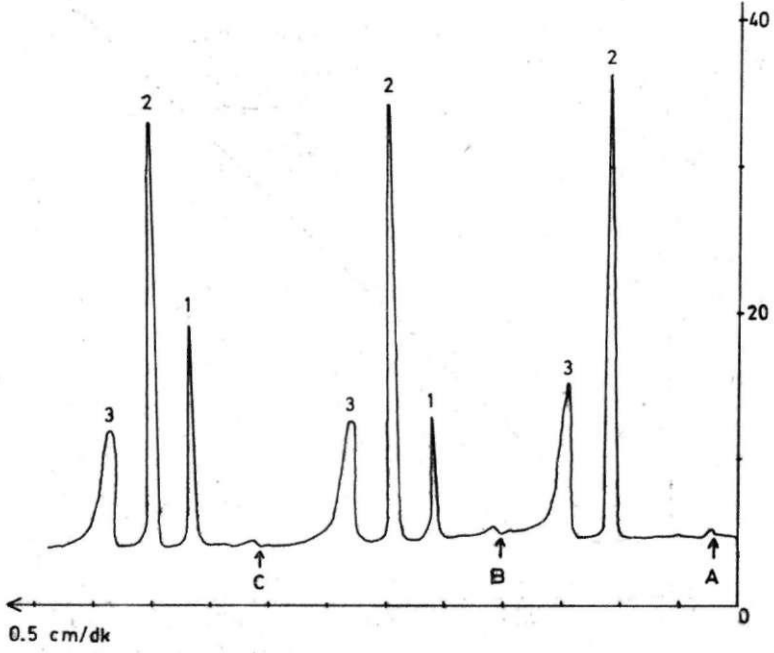
$$\% X = \frac{\% \text{ standart} \times N}{S} \text{ formülü de kullanılabilir.}$$

(% X numunedeki etil alkol konsantrasyonu, N numune kromatogramla elde edilen pik yükseklikleri oranı, S ise standartlarla elde edilen pik yükseklikleri oranı).

Sonuçlar % mg alkol olarak ifade edildiği gibi, trafik açısından promil ifadesi de kullanılabilir (1 promil = 1 litre kanda 1 gr alkol = % 100 mg) (2).

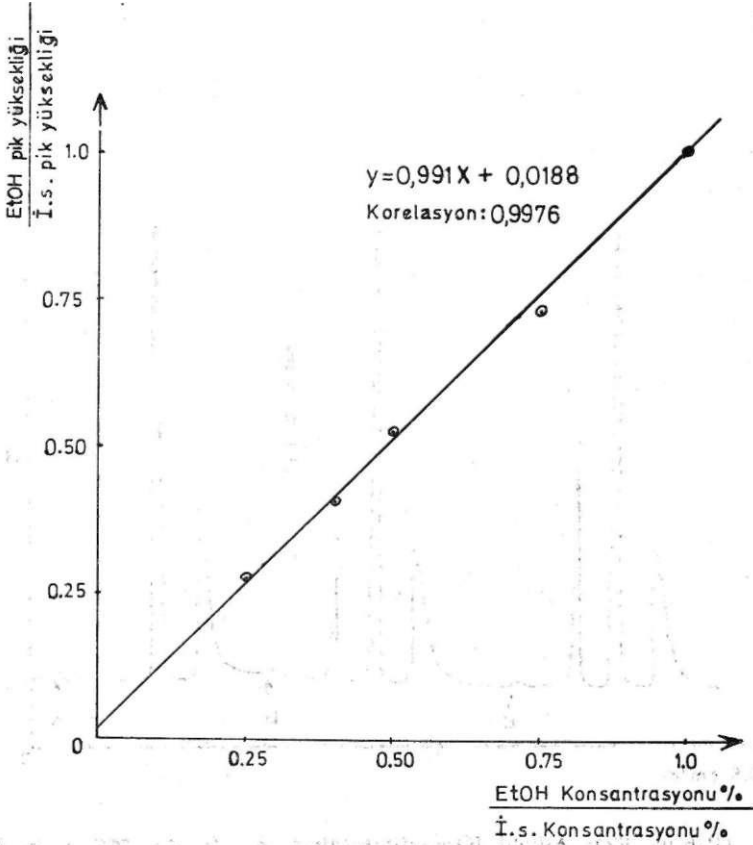
BULGULAR

1 — Şekil 1'de hiç alkol almamış kan ile, kanda % 50 mg, % 100 mg alkol içeren standartlarla elde edilen kromatogramlar görülmektedir. Şekil 2'de ise kalibrasyon grafiği ve regresyon denklemi görülmektedir.



Şek. : 1. GLK'da Kan Alkolü Kromatogramları. A : % 200 mg. I. S. ilave edilmiş kan; B : İ.S. ve % 50 mg etil alkol ihtiva eden kan; C : t. S. ve % 100 mg etil alkol ihtiva eden kan enjeksiyonu. 1 - Etanol piki; 2 - î. S. piki; 3 - Su piki.

Kan Alkolünün Tayini



Şek.: 2. Kalibrasyon grafiği ve regresyon denklemi, (Etanol konsantrasyonları : % 50 - 80 - 100 - 150 - 200 mg değerlerinde İ. S. : % 200 mg değerinde).

2 — Trafik kontrolü sırasında 93 alkol almış sürücülerin kan alkol düzeylerine göre dağılımları Tablo I'de görülmektedir.

Nevin VURAL, Şahan SAYGI

Tablo I — Alkollü sürücülerin (n=93) kanlarında saptanan alkol konsantrasyonuna göre dağılımları

Sürücü Sayısı	Kan Alkolü % mg	% Sürücü
8	5 ve altı	8.60
21	5 - 50	22.58
15	50 - 80	16.14
31	80 -150	33.33
18	150 ve üstü	19.35
Toplara : 93		100

3 — Tablo II'de ise alkol almış sürücülerin, trafikteki davranışlarına göre dağılımları görülmektedir.

Tablo : II — Alkollü sürücülerin (n=93) trafik suçuna göre dağılımı

	Sürücü Sayısı	% Sürücü
Trafik kuralına uyanlar	41	45.16
Trafik suçu işleyenler	38	30.79
Trafik kazası yapanlar	14	15.05

Bu sürücülerin kan alkol düzeyine göre incelemelerinde ise : Trafik kuralına uyan alkollü sürücülerin % 90'ında kan alkolü 0.8 promil altında; trafik suçu işleyenlerin % 80'inde kan alkolü 0.5 promil üstünde ve trafik kazası yapanların ise % 65 inde kan alkolü 0.8 promil üstünde bulunmuştur.

SONUÇ ve TARTIŞMA

1 — Kanda alkol tayini için kullandığımız gaz kromatografisi yöntemi, kimyasal ve enzimatik yöntemlere göre daha spesifik olup etil alkol yanında diğer alkol ve aldehitler de ayırt edilebilir.

Kana alkol ilave edilmiş standartlarla, suda hazırlanmış alkol standartları % 100'e çok yakın bir uyum göstermiştir. Bu nedenle kalibrasyon sulu alkol standartları amaca uygundur. Ayrıca 0.4 ml kan ile en az 3 kere tekrara imkân veren mikro bir yöntem olduğu için kolayca saha çalışmalarına uygulanabilir. Alkol metabolizmasına etki eden birçok faktörler olmakla beraber (18), alkol çok çabuk metabolize olan bir maddedir. Saatte 10 ml alkol yakılır (6). Bu nedenle olay anında kan almak, kişinin alkol etkisinde olup olmadığını saptanmasında önemli bir faktördür.

Kan Alkolünün Tayini

2 — Bir kişinin alkol etkisinde olmasının saptanmasında kanda alkol tayini en bilimsel göstergedir. Kandaki alkol miktarı ile sarhoşluk veya alkol etkisi ile sürücülük performansındaki etkileşim kişisel faktörlerle değişmekle beraber, kanda alkol miktarının genellikle 0.8 promil ve altında olması sürücülük için zararsız kabul edilmektedir (2). Ayrıca birçok ülkeler yasal limitin aşılması halinde de kan alkolü miktarına göre verilen cezayı arttırmaktadır (4). Ülkemizde halen yürürlükte olan trafik yasasına göre eser miktarda alkol almış kişinin araç kullanması yasaktır. Ancak verilen suçta alkol miktarı göz önünde bulundurulmadığı gibi, alkol kontrolü de mevzuata uygun değildir (19). Sonuç olarak da adil bir uygulama yapılmamaktadır (16, 19).

3 — Şu ana kadar yaptığımız çalışmalara göre, alkollü araç kullanma trafik suçu veya kazası yapma olasılığını arttırmaktadır (16, 19). Ancak bu olasılık kan alkol düzeyinin artması ile paralel gitmektedir.

4 — Hazırlanmış olan yeni trafik yasamızda bu durumun düzeltileceğini ve yasal bir kan alkolü limiti belirleneceğine inanıyoruz. Ancak bu durumda ucuz, güvenilir, duyar ve standardize edilmiş yöntemlerle kan alkolünün tayini gerekmektedir.

Kullandığımız yöntemin bu amaca uygun olduğunu ve bu konuda kısa bir eğitim görmüş eczacılar, gerek kan numunelerinin alınmasında, gerekse analizlerinin yapılmasında en uygun teknik elemanlar olacaktır.

ÖZET

Kanda etil alkolün gaz kromatografik yöntemi ile tayini standardize edilmiştir. Alev iyonlaşma dedektörü (FID) ile ve % 10 PEG - 400 (Chromosorb W-AW 80/100 mesh) kolonda enjeksiyonla 0,5 µg/ml duyarlıkta saptanmıştır. Parmak ucundan alınan 0,4 ml kanla en az 3 analiz yapılabilir.

Yöntem 1977 de başlayan çalışmamızın (19) devamı olarak araştırmanın bu kısmında 93 alkollü sürücüyeye uygulanmıştır. Alkollü sürücülerde trafik suçu veya kazası yapma riskinin kanda alkol düzeyi ile beraber arttığı ve 0,8 promil üstünde bu riskin daha yüksek olduğu gözlenmiştir.

SUMMARY

Blood alcohol level was determined by gas chromatographic method using FID detector and PEG - 400 on Chromosorb W - AW (80/100 mesh) as column material. The sensitivity was below 0,5 µg/ml with 1 µl sample injection. 0,4 ml of fingertip blood was enough at least for 3 measurements.

The method was applicated to drivers who ingested alcohol. Our research was the continuation which began in 1977. 93 drivers were examined at the second part of the research. The risk of traffic accident among the drivers was found higher as the blood alcohol level was higher especially over 0,8 promille.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmamızda bize yardımcı olan Adalet Bakanlığı, Ankara Valiliği ve Ankara Trafik Şube Müdürlüğü görevlilerine teşekkürü bir borç biliriz.

LİTERATÜR

- 1 — Hossack, W. D., *Med- J. Aust.*, 2: 255-258 (1972)
- 2 — Alcohol, Other Drugs Found in Most Ontario Traffic Deaths. *J. of Traffic Medicine.* 8, 4, 64 - 85 (1980) IAATM Newsletter.
- 3 — WHO; Organizations Concerned with The Prevention and Control of Road Accidents in Europe. Report on The Second Liaison Meeting and Summary of Interested Organizations in Europe. WHO, Copenhagen (1972)
- 4 — L'epée, MM. P., Castagnou, R., Lazarini, H. J., Doignon, J., Larcebau, M. S., *Bordeaux Medical* 7.8, 2151- 2154 (1971)
- 5 — Road and Motor Vehicle Traffic Ministry of Transport Canada; Alcohol and Highway Safety. A Review of the Literature and A Recommended Methodology CTS -1b. 74 Contract No : 03 KTT 8113 - 3 - 0040 Impri-merie Jacques - Cartier Inc.
- 6 — Stolman, A., *Progress in Chemical Toxicology*, I. 1963 Academic Press Inc. Newyork.
- 7 — Cravey, R. H., Jain, N. C, *J. of Chromatoffraphic Sci.*12, 209-213 (1974)
- 8 — Vidic, E., *Blutalkohol* 2, 75-85 (1964)
- 9 — Klingmüller, V., Nuglisch, W., Weyss, N., *Olin. Chim. Acta* 22, 317-325 (1968)

Kan Alkolünün Tayini

- 10 — Jones, D., Gerber, I. P., Drell, W., *Olin. Chem.* 16. 5, 402 - 407 (1970)
- 11 — Leric, H., Kaplan, J. C, Broun, G., *Olin. Chim. Acta* 29, 523 - 528 (1970)
- 12 — Göke, G, *Blutalkohol*, 10, 5, 281 - 299 (1973)
- 13 — Machata, G., *Blutalcohol*, 4, 252 - 260 (1967)
- 14 — Eilis, F. W., Hill, J. B., *Olin. Chem.* 15, 2, 91 - 101 (1969)
- 15 — Pereira, W. E., Summons, R. E., Rindfleisch, Duffield, A. M., *Olin. Chim. Acta* 51, 109 - 112 1974)
- 16 — Vural, N., Vural, D., Saygı, Ş., Tehlikeli Araç Kullanma ve Trafik Kazasına Karışan Sürücülerin Kanlarındaki Alkol Miktarları. III. Uluslararası Trafik Sorunları ve Trafik Kazaları (Travmatoloji) Kongresinde tebliğ edilmiştir. 9-12 Eylül 1980, Ankara
- 17 — Erdik, E., Obalı, M., Yüksekışık, N., Öktemer, A., Pekel, T., İnsanoğlu E., Özgüner, S., Denel Organik Kimya, A. Ü. Fen F. Yayınları (1978)
- 18 — Vural, N., *Doğa* 2, 1, 68-71 (1978)
- 19 — Vural, N., Vural, D., Motaceded, Z., 2. Uluslararası Trafik Sorunları ve Trafik Kazaları (Travmatoloji) Kongresi Bildirileri. 4-8 Mayıs 1978, Ankara

BİLİMSEL HABERLER

Tezler :

Bilge Şener "Türkiye'de Yetişen Fumaria L Türleri ve Bu Türlerin Alkoloitleri Üzerinde Araştırmalar" Doçentlik Tezi (1981)

Bilge Uzalp "NAD İnhibisyonunun Kolesterol Metabolizması İle İlişkisi", Doçentlik Tezi (1981)

Serpil Nebioğlu "Calmodulinin Glikojen Metabolizmasında Fosforilaz Kinaz Enzimi Üzerine Etkisi", Doçentlik Tezi (1981)

Tülin Söylemezoğlu "Barbitüratların Ekstraktif Alkilleme Yöntemi İle Gaz Kromatografik Tayinleri ve Bu Yöntemin Biyolojik Sıvılarda Uygulanması" Doçentlik Tezi, (1981)

Ders Kitapları:

Orhan Altinkurt, Farmakoloji I, A. Ü. Basımevi, Ankara 1981 A. Ü. Ecz. Fak. Yayınları No. : 54

Seminer, Konferans ve Kongreler :

FARAD tarafından düzenlenen Konferanslar aşağıdaki konu ve tarihlerde yapılmıştır.

Tarih	Konuşmacı	Konu
2 Kasım 1981	Doç. Dr. İsmail Topuzoğlu	Çevre sorunlarına genel bakış
16 Kasım 1981	Ark. Raci Temizer	Hitit Uygarlığı ve Anadolu Medeniyetleri Müzesindeki ilgili buluntular
30 Kasım 1981	Prof. Dr. Oğuz Kayaalp	Sentezden Kliniğe ilacın yazgısı
14 Aralık 1981	Dr. Nilüfer Tarımcı	"Kozmetik yapımların neden olduğu allerjik reaksiyonlar ve Deri Hastalıkları"
28 Aralık 1981	Dr. Ülkü Güngör	Ambalajlama ve etiketlemede GMP kurallarının uygulanması.