

**PAMUKLU KUMAŞ ÜZERİNDE YIKANMIŞ KAN
LEKESİNİN RAMAN SPEKTROSKOPİ VE KEMOMETRİ
İLE TESPİTİ**

**DETECTION OF WASHED BLOODSTAIN ON COTTON
FABRIC USING RAMAN SPECTROSCOPY AND
CHEMOMETRIC ANALYSIS**

ILGIN DENİZ GÜNGÖR

PROF. DR. NECDET SAĞLAM

Tez Danışmanı

PROF. DR. RAMAZAN AKÇAN

Eş Danışman

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

ÖZET

PAMUKLU KUMAŞ ÜZERİNDE YIKANMIŞ KAN LEKESİNİN RAMAN SPEKTROSKOPİ VE KEMOMETRİ İLE TESPİTİ

Ilgın Deniz GÜNGÖR

Yüksek Lisans, Biyomühendislik Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Necdet SAĞLAM

Eş Danışman: Prof. Dr. Ramazan AKÇAN

Ocak 2022, 78 sayfa

Adli olaylarda kan lekesi en sık rastlanan biyolojik izlerden biridir. Suç esnasında ya da sonrasında kanıt niteliği taşıyan yüzeyler üzerinde kan lekesinin tam anlamıyla tayin edilmesi, son derece kritiktir. Suçlu tarafından kan lekesi içeren kanıtların bertaraf edilmesi sonucunda yeterli miktarda leke yüzey üzerinde barınmayabilir. Bu durum, hali hazırda kullanılan birçok test işleminin yeterli doğrulukta leke tanımlaması yapamamasına yol açar. On iki eşit parça halinde kesilmiş %100 pamuk kumaş yüzeyine damlatılan kan lekeleri üzerinde altı farklı temizleyici sıvı ile yıkama işlemi uygulanarak Raman spektroskopisi ile leke tayini yapılması amaçlanmıştır. Üzerine kan damlatılmış ve oda sıcaklığında tamamen kurumuş kumaş parçaları, saf su ile metanol, HCl, sabun, deterjan ve hipoklorit çözeltisi kullanılarak yıkanmıştır. Çözeltiler, sıcaklık farkları ve çözücü temizliğinin kan lekesine etkisini görmek amacıyla beş grup halinde hazırlanmıştır. Sıcaklık değerleri olarak 60, 30 ve 20 °C 'de yıkamalar yapılmıştır. Yıkanan kumaş parçalarının tam kuruması sağlandıktan sonra 785 nm lazer değerine

sahip Raman spektroskopisi ile analizleri gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizler sonucunda, kan lekesine, çözücülere ve yıkama sonrası kumaş üzerindeki kan lekesine ait Raman spektrumları elde edilmiştir. Değişik temizleyici çözeltilerle yıkanan kanın ve çözeltiler ile yıkanan boş kumaşın birbirinden ayırımını belli bir sınıflandırmaya tabi tutarak ayırmak amacıyla PLS-DA metoduna dayalı olarak kemometrik analiz yapılmıştır. MATLAB PLS_ Toolbox kullanılarak yapılan analiz için yıkanmış kanlı kumaş ve çözücülerle yıkanmış boş kumaş için öğrenme ve test verileri olmak üzere iki sınıf oluşturulmuştur. Kurulan kemometrik model sonucunda, hassasiyet, seçicilik ve verim olmak üzere üç parametre içeren sınıflandırma yapılmıştır. Tüm temizleyici grupları ve yıkanan kanlı kumaş için %100 seçicilikle ayırım yapılabilmemiştir. Saf su için %90 hassasiyet ile %94.9 verimle, metanol çözeltilisi için %96 hassasiyet ile %%97.7 verimle ve HCl için %91.7 hassasiyet ve %95.7 verim ile sınıflandırma yapılmıştır. Benzer şekilde, sabun çözeltilisi için %85.0 hassasiyet ile %92.2 verimle, deterjan için %100 hassasiyet ile %100 verimle ve hipoklorit için %90 hassasiyet ve %95.11 verimle veriler sınıfa dayalı ayrılmıştır. Tüm özeltilerin, farklı çözeltiler ile yıkanmış kanlı gruplardan ayrılması ise %91.7 hassasiyet, %100 seçicilik ve %95.7 verimle gerçekleştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Raman Spektroskopisi, Kan lekesi tayini, Kemometri, Kemometrik model, PLS-DA

ABSTRACT

DETECTION OF WASHED BLOODSTAIN ON COTTON FABRIC USING RAMAN SPECTROSCOPY AND CHEMOMETRIC ANALYSIS

Ilgın Deniz GÜNGÖR

Master of Science, Department of Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. Necdet SAĞLAM

Co- Supervisor: Prof. Dr. Ramazan AKÇAN

January 2022, 78 pages

Bloodstains are abundant biological fluids that are encountered in crime scenes. Precise bloodstain detection on the “proof” has vitally importance for ongoing or post-committal stages. The criminal inclined to dispose the proofs that has an effect of inadequate amount of bloodstains. In case of loss in stain characteristic, the required presumptive or correlative tests can not identify the located stain with high accuracy. Twelve equal sized white %100 cotton fabrics were prepared to washing with six different cleansing solutions after creating bloodstains. The aim of the study is examining the treatment effect of each cleansing solutions for bloodstains with Raman spectroscopy. Distilled water and distilled water solutions of methanol, HCl, soap, detergent and hypochloride were used as cleansing liquids. Solutions were grouped as five sets by observing the effect of fresh solution and temperature differences as 20°C, 30°C and 60°C. Raman sepctrums were collected with 785 nm laser source after all washed fabrics has been turning into dry state. For chemometrics, Raman sepctrums of different treated fabrics with bloodstains and

clean fabrics were classified with PLS-DA method. MATLAB PLS_Toolbox was used for both analysis and dividing the spectrums into train and test data. The chemometric model was built with the classification parameters as sensitivity, selectivity and efficiency. Selectivity was reached to 100% for all cleansing solutions and washed fabric with bloodstains. The classification has been made for distilled water with 90% sensitivity and 94.9% efficiency; for methanol solution with 96% sensitivity and 97.7% efficiency and with HCl solution with 91.7% sensitivity and 95.7% efficiency was calculated. Likewise, classification for soap solution 85.0% sensitivity and 92.2% efficiency; for detergent solution 100% sensitivity and 100% efficiency and lastly, for hypochloride solution 90% sensitivity and 95.11% efficiency was reached. Discrimination of different solutions and washed bloodstains on fabric was achieved with 92.7% sensitivity, 100% selectivity and 95.7% efficiency.

Keywords: Raman Spectroscopy, Bloodstain Identification, Chemometrics, Chemometric model, PLS-DA

TEŞEKKÜR

Tez alıŐmalarımı yűrűtebilmem için bana destek veren, tez danıŐmanım saygıdeęer Prof. Dr. Necdet SAęLAM'a;

Tez alıŐmaların sırasında her adımda yaptığım tűm alıŐmaları paylaŐabildiğim, deneysel sűrelerin planlanmasında, çalıŐmanın her adımımda bilgi birikimi, yardımlarını ve sabrını benden esirgemeyen, eŐ danıŐmanım değerli Prof. Dr. Ramazan AKÇAN'a;

Tez sűrecince yűrűttüğűm tűm çalıŐmaları gerçekleŐtirmek için laboratuvarımı bana aan, deneysel çalıŐmalarım sırasında çalıŐma fırsatı bulduğum deęerli Prof. Dr. Uęur TAMER'e;

Tezimin ortaya çıkmasında űzellikle deneyimlerini benimle paylaŐan ve deney sonuçlarımın yorumlanmasında bana yardımcı olan Mustafa DURAK'a;

Tez çalıŐmalarım sırasında ve her anımda, her konuda hep yanımda olan arkadaŐlarım ve tűm çalıŐmalar sırasında desteklerini ve gűler yűzlerini benden esirgemeyen iŐ arkadaŐlarıma,

Yűksek lisans eęitimim sırasında tanıştığım, her konuda űzveri ile bana destek olan ve her zaman yanımda olan Mustafa Can MACİT'e;

En bűyűk ūansım ve en bűyűk destekçilerim olan, her koŐulda, her anımda ve her kararımda yanımda olduęunu bildiğim anneme ve babama teŐekkűrlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
RESİMLER DİZİNİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Kan... ..	4
2.2. Kan Tayin Metotları	6
2.2.1. Tarama Testleri	6
2.2.2. Doğrulama Testleri.....	7
2.3. Raman Spektroskopisi.....	10
2.3.1. Titreşim Spektroskopisi.....	10
2.3.2. Raman Spektroskopisi Teorisi	12
2.3.3. Çalışma Prensibi ve Enstrümantasyon	14
2.3.4. Kullanım Alanları.....	17
2.3.4.1. Adli Olaylardaki Yeri.....	18
2.3.4.2. Kan Lekesi Tayininde Raman Spektroskopisi	19
2.4. Kemometrik Analiz	21
3. MATERYAL VE YÖNTEM	23
3.1. Kullanılan Malzemeler	23
3.1.1. Tekstil Malzemeler.....	23

3.1.2. Kimyasal Malzemeler	23
3.1.3. Biyolojik Malzemeler	23
3.2. Çözeltiler.....	24
3.3.Örneklerin Hazırlanması.....	24
3.4. Örnek Yıkama İşlemleri.....	25
3.4.1. Kontrol Grubu Örneklerin Hazırlanması	25
3.4.2. Test Grubu Örneklerin Hazırlanması.....	27
3.5. Cihazlar ve Gereçler	29
3.6. Spektral Analizler	31
3.7. Kemometrik Analizler	32
4. DENEYSEL ÇALIŞMALAR VE BULGULAR.....	33
4.1. Kontrol Gruplarının Karakterizasyonu	33
4.1.1. Kontrol Gruplarının Yüzey Analizi	33
4.1.2. Kontrol Gruplarının Spektral Analizi	34
4.2. Test Gruplarının Karakterizasyonu.....	40
4.2.1. Test Gruplarının Yüzey Analizi.....	40
4.2.2. Test Gruplarının Spektral Analizi.....	46
4.3. Kemometrik Analizler.....	53
4.3.1. Yıkanmış Kan Lekeli Kumaşların Kemometrik Analizi	54
4.3.2. Farklı Çözücü Gruplarının Kemometrik Analizi	60
4.3.3. Kemometrik Analiz Modeli Başarı Oranları	61
5. SONUÇ VE TARTIŞMA	63
6. KAYNAKLAR	73
EKLER.....	79
EK 1 – Etik Kurul İzin Belgesi	79
ÖZGEÇMİŞ	80

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. Kan hücreleri [13].	4
Şekil 2. 2. Hemoglobin yapısı [17].	5
Şekil 2. 3. Elektromanyetik Dalga [35].	11
Şekil 2. 4. Elektromanyetik Spektrum [37].	12
Şekil 2. 5. Raman saçılmaları [38].	14
Şekil 2. 6. Raman spektrometre bileşenleri.	14
Şekil 2. 7. Raman spektrometre diyagramı [38].	17
Şekil 2. 8. 785 nm lazer ile vücut sıvılarının Raman spektrumları [44].	19
Şekil 4. 1. Çözücülerle işlem görülmemiş boş pamuklu kumaş Raman spektrumu.	35
Şekil 4. 2. Üç farklı grup çözücü ile yıkanmış pamuk kumaş örneklerinin Raman spektrumları a)saf su ile b) Metanol (%40.0) çözeltisi ile c) HCl (%5.0) çözeltisi ile yıkanmış kumaş örnekleri.	36
Şekil 4. 3. Üç grup farklı temizleme maddesi ile yıkanmış pamuk kumaş Raman spektrumları. a) %0.5 sabun çözeltisi ile, b) %0.5 deterjan çözeltisi ile, c) %0.5 hipoklorit çözeltisi ile yıkanmış kumaş örnekleri.	37
Şekil 4. 4. Kumaş üzerindeki taze ve kurumuş kana ait Raman spektrumları.	38
Şekil 4. 5. Normalize edilmemiş kumaş üzerindeki taze ve kurumuş kana ait Raman spektrumları.	39
Şekil 4. 6. Normalize edilmemiş kurumuş kan lekeli kumaş ile boş kumaş Raman spektrumları.	40
Şekil 4. 7. Kan lekeli ve saf su ile yıkanmış kan lekeli kumaşlara ait Raman spektrumları.	47
Şekil 4. 8. Kan lekeli ve %40.0 metanol çözeltisi ile yıkanmış kan lekeli kumaşlara ait Raman spektrumları.	48
Şekil 4. 9. Kan lekeli ve %5.0 HCl çözeltisi ile yıkanmış kan lekeli kumaşlara ait Raman spektrumları.	49
Şekil 4. 10. Kan lekeli ve %0.5'lik sabun çözeltisi ile yıkanmış kan lekeli kumaşlara ait Raman spektrumları.	50

Şekil 4. 11. Kan lekeli ve %0.5'lik deterjan çözeltisi ile yıkanmış kan lekeli kumaşlara ait Raman spektrumları.	51
Şekil 4. 12. Kan lekeli ve %0.5'lik hipoklorit çözeltisi ile yıkanmış kan lekeli kumaşlara ait Raman spektrumları.	52
Şekil 4. 13. Saf su ile yıkanmış kan lekeli ve kan lekesiz kumaşa ait kalibrasyon ve validasyon analizleri.	54
Şekil 4. 14. Metanol (%40.0) çözeltisi ile yıkanmış kan lekeli ve kan lekesiz kumaşa ait kalibrasyon ve validasyon analizleri.	55
Şekil 4. 15. HCl (%5.0) çözeltisi ile yıkanmış kan lekeli ve kan lekesiz kumaşa ait kalibrasyon ve validasyon analizleri.	56
Şekil 4. 16. Sabun (%0.5) çözeltisi ile yıkanmış kan lekeli ve kan lekesiz kumaşa ait kalibrasyon ve validasyon analizleri.	57
Şekil 4. 17. Deterjan (%0.5) çözeltisi ile yıkanmış kan lekeli ve kan lekesiz kumaşa ait kalibrasyon ve validasyon analizleri.	58
Şekil 4. 18. Hipoklorit (% 0.5) çözeltisi ile yıkanmış kan lekeli ve kan lekesiz kumaşa ait kalibrasyon ve validasyon analizleri.	59
Şekil 4. 19. Farklı temizleyici çözeltiler ile yıkanmış kan lekeli kumaşa ait kalibrasyon ve validasyon analizleri.	60

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2. 1. Lazer tipleri ve dalga boyu değerleri [39].....	15
Çizelge 2. 2. Raman kaymasına göre kan bileşenleri [60].	20
Çizelge 4. 1. Sınıf 1 ve sınıf 2 verilere ait doğru sınıflandırılan örnek sayısı.....	61
Çizelge 4. 2. Sınıf 1 ve sınıf 2 verilere ait hassasiyet ve seçicilik oranları.	61
Çizelge 4. 3. Sınıf 1 ve sınıf 2 verilere ait verim oranları.	62
Çizelge 4. 4. Tüm verilere ait hassasiyet, seçicilik ve verim oranları.....	62

RESİMLER DİZİNİ

Resim 2. 1. Luminol ile kumaş üzerindeki kan tespiti [9].	7
Resim 3. 1. Kan damlatılmış 4x4 cm boyutunda kumaş örnekleri	25
Resim 3. 2. Kontrol grubu örneklerin hazırlanması. Kullanılan çözeltiler soldan sağa: i) sabun çözeltisi, ii) deterjan çözeltisi, iii) HCl çözeltisi, iv) metanol çözeltisi, v) saf su.	26
Resim 3. 3. Etüve konulan kontrol grubu numuneler. i) sabun çözeltisi, ii) deterjan çözeltisi, iii) HCl çözeltisi, iv) metanol çözeltisi, v) saf su.	26
Resim 3. 4. Bir grup örnek çözeltilinin çitileme işlemi sonrası 1 saatlik bekleme süresi Yatık olan tüpler soldan sağa: i) metanol çözeltisi, ii) saf su, iii) deterjan çözeltisi, iv) hipoklorit çözeltisi.	28
Resim 3. 5. Kurutulmuş Test Numuneleri.	29
Resim 3. 6. Raman spektroskopisi.	32
Resim 4. 1. Kontrol grubu %100 pamuklu kumaş yüzey analiz fotoğrafları. a) kan lekesiz kumaş (kontrol), b) kan lekeli kumaş, c) saf su ile yıkanmış kumaş, d) %40 metanol çözeltisi ile yıkanmış kumaş,	33
Resim 4. 2. Kontrol grubu %100 pamuklu kumaş yüzey analizi fotoğrafları. a) %5.0 HCl çözeltisi ile yıkanmış kumaş, b) %0.5 sabun çözeltisi ile yıkanmış kumaş, c) %0.5 deterjan çözeltisi ile yıkanmış kumaş, d) %0.5 hipoklorit çözeltisi ile yıkanmış kumaş.	34
Resim 4. 3. Saf su ile yıkanmış test grubu yüzey analizi. a) Grup 1, b) Grup 2, c) Grup 3, d) Grup 4, e) Grup 5.	41
Resim 4. 4. %40 metanol çözeltisi ile yıkanmış test grubu yüzey analizi. a) Grup 1, b) Grup 2, c) Grup 3, d) Grup 4, e) Grup 5.	42
Resim 4. 5. %5.0 HCl çözeltisi ile yıkanmış test grubu yüzey analizi. a) Grup 1, b) Grup 2, c) Grup 3, d) Grup 4, e) Grup 5.	43
Resim 4. 6. %0.5'lik sabun çözeltisi ile yıkanmış test grubu yüzey analizi. a) Grup 1, b) Grup 2, c) Grup 3, d) Grup 4, e) Grup 5.	44
Resim 4. 7. %0.5'lik deterjan çözeltisi ile yıkanmış test grubu yüzey analizi. a) Grup 1, b) Grup 2, c) Grup 3, d) Grup 4, e) Grup 5.	45

Resim 4. 8. %5 hipoklorit çözeltisi ile yıkanmış test grubu yüzey analizi. a) Grup 1, b) Grup 2, c) Grup 3, d) Grup 4, e) Grup 5.46

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

cm^{-1}	Dalga sayısı birimi
mg	Miligram
mL	Mililitre
mW	Miliwatt
μL	Mikrolitre
nm	Nanometre
$^{\circ}\text{C}$	Derece Celcius
pH	Potansiyel hidrojen
B	Manyetik Alan
E	Elektrik Alan
f	frekans
c	ışık hızı
λ	dalga boyu
w	açısal frekans
h	Planck sabiti
v	dalga sayısı
$\text{M}\Omega.\text{cm}$	direnç
g/L	yoğunluk
N/m	kuvvet birimi

Kısaltmalar

TMB	Tetrametil benzidin
Hb	Hemoglobin
RBC	Kırmızı kan hücreleri
WBC	Beyaz kan hücreleri
IR	İnfrared: kızıl ötesi
NIR	Yakın kızıl ötesi
UV	Ultraviyole: mor ötesi
RF	Radyo frekansı
CCD	Charged Coupled Device: kamera dizisi
PMT	Foton Çoklayıcı Tüp
PC	Kısmi bileşen
PCA	Kısmi bileşen analizi
PLS	Kısmi en küçük kareler yöntemi
PLS-DA	Kısmi en küçük kareler yöntemi- diskriminant analizi
DR	Karar kuralları
TLC	İnce tabaka kromatografi

1. GİRİŞ

Adli soruşturmalarda biyolojik izlerin “delil” olarak nitelendirilmesi, işlenen suça uygun olarak gerçekteşen hareketlerin kim tarafından hangi yöntem ile işlendiğini somut olarak değerlendirilmesine imkân sunar. Maddi delil ise belli laboratuvar analizlerine dayanarak suç faili, mağdur ve olay yeri ilişkisinin kurulmasını sağlayan nesne ya da izlerdir [1,2]. Kan izleri, olay yerinde sıklıkla karşılaşılan biyolojik kanıtlardır [3]. Yaralama, cinayet ve herhangi bir yoldan farklı yüzeylerde ve hatta cinayet silahının kendisinde kan lekelerine rastlanabilir. Benzer şekilde kesici-delici-ezici aletin üzerine veya yüzeye bulaşmış kan lekesinin temizlenmesinde kullanılan kumaş türevi tüm malzemeler de olay ile ilgili bilgi vermektedir. Özellikle olay yerlerinde ve hayatımızın neredeyse her alanında olan tekstiller üzerinde kan lekesinin tespiti, büyük öneme sahiptir. Bu nedenle, kumaş dahil tüm yüzeylerde kan lekesinin analiz edilmesi oldukça kritiktir.

Suç mahalline ait cinayet silahı ya da üzerinde kan lekesi bulunan malzemelerin saklanması ve tahribatı, Türk Ceza Kanunu’nun 281. maddesinde belirtildiği üzere “delil karartma” adı altında değerlendirilerek ceza hükmü gerektirmektedir [4]. Kanıt yetersizliği ya da nitelikli kanıt bulunamaması durumunda, uygun olan hukuki hükmün verilmesi oldukça zorlaşır. Suç delillerini ortadan kaldırmaya yönelik yöntemler genellikle delilin tespit edilmesini neredeyse imkansız kılarlar. Kan lekesi özelinde, lekeyi farklı çözücülerle yıkamak, bulaş olan materyale ısıl işlem uygulamak ve malzemeyi küçük parçalara ayırmak leke karakterizasyonunu zorlaştıracaktır. Özellikle suç unsuru içeren ve olay yerinde eksikliği belirtilebilecek olan kanıtlar için, malzemeyi tamamen ortadan kaldırıcı yöntemlerden ziyade kan lekesini temizlemek tercih edilebilir. Kanıt malzemenin suçlu tarafından yıkanması, birçok durumda delil niteliğinin bozulmasını sağlayabilmektedir. Özellikle temizleme işlemi görmüş kan lekesinin tespit edilebilmesi oldukça zor ve uğraştırıcı deneysel metotlar gerektirebilmektedir.

Yüzeylerdeki kan lekesinin hızlı tespiti için çoğunlukla kullanılan klasik varsayımsal ve doğrulayıcı test protokolleri kullanılmaktadır. Hipotetik-varsayımsal testler olay yerinde

uygulanırken, doğrulayıcı testler daha çok ölçüm kitleri ve laboratuvar analizleri gerektirmektedir. Kan varlığının tespiti için kullanılan hipotetik-varsayımsal testler çoğunlukla kandaki fenoltalein seviyesinin belirlenmesine dayanan Kastle-Meyer ve TMB testleri ile kan izlerinin floresans yöntemi kullanılarak belirlendiği Luminol testleri olarak örneklenebilir [5, 6]. Hipotetik ve doğrulayıcı testler her ne kadar hızlı ve uzmanlarca kolay algılanabilir sonuçlar verse de yanılma payları yüksektir. Bahsedilmiş olan testler, çoğunlukla kimyasal mekanizmalara dayalıdır. Yani, benzer yapıdaki kimyasalların delil malzeme üzerinde bulunmasıyla yanlış sonuçlar verebilirler. Bu durum ile özellikle kan tespiti denilince ilk akla gelen Luminol kullanımında sıklıkla karşılaşılmaktadır. Bazı metal bileşikleri ile Luminol etkileşimi sonucunda, kan varlığında görülmesi gereken mavi ışığa benzer şekilde görülmektedir [7]. Bu durum, tamamen görsel değerlendirmeye dayalı bu testte yanlış yönlendirmeye yol açabilir. Benzer şekilde, farklı kimyasallar içeren temizleyici çözücüler ile yıkanan kan lekesine uygulanan hipotetik testler sonucunda, testler beklenen düzeyde sonuç vermeyebilir. Yıkanmış yüzeylerde kan tespiti için uygulanan varsayımsal testler sonucunda oldukça düşük hassasiyette ve yoğunlukta ışığa/veri elde edilmektedir [8]. Bunlara ek olarak, yukarıda bahsedildiği gibi, kimyasal mekanizmalara dayanan bu testler sonucunda örnek üzerinde kalan kimyasal kalıntı ile özellikle şahıs tespiti ile ilgili testlerin uygulanmasında sorun çıkarabilmektedir [9].

Belli yıkama prosedürlerine tabi tutulmuş kan lekeli yüzeylerde tayin çalışmaları yürütmek, leke miktarına veya uygulanan kimyasal çözücülere bağlı olarak zorlaşmaktadır. Leke karakteristiğinin ve miktarının değişmesi sonucunda, leke tespiti için farklı laboratuvar analizleri ve metotlara yönelim olmuştur. Bu bağlamda eser miktardaki kan lekesinin tespiti için gelişmiş kimyasal, mikroskopik ve spektroskopik yöntemler kullanılmaktadır.

Mikroskopik görüntüleme ile kan hücrelerin ilgili malzeme üzerinden ayrımı yapılabilmektedir. Ancak yüksek hassasiyet ile kan hücrelerine özgü nitelikler saptanamaz. Spektroskopik yöntemler kan lekesi üzerinde, sayısal analiz ve yüksek doğruluklu tayin ve tanımla imkânı sunmaktadır. Spektroskopik metotlar, her bir

biyomolekölün karakterini sayısal olarak spektrumlar ile tanımlarlar. Adli bilimlerde kan lekesi tayini için kızılötesi spektroskopisi (IR), Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometrisi (FTIR/ATR-FTIR) ve Raman spektroskopisi kullanılmaktadır [10].

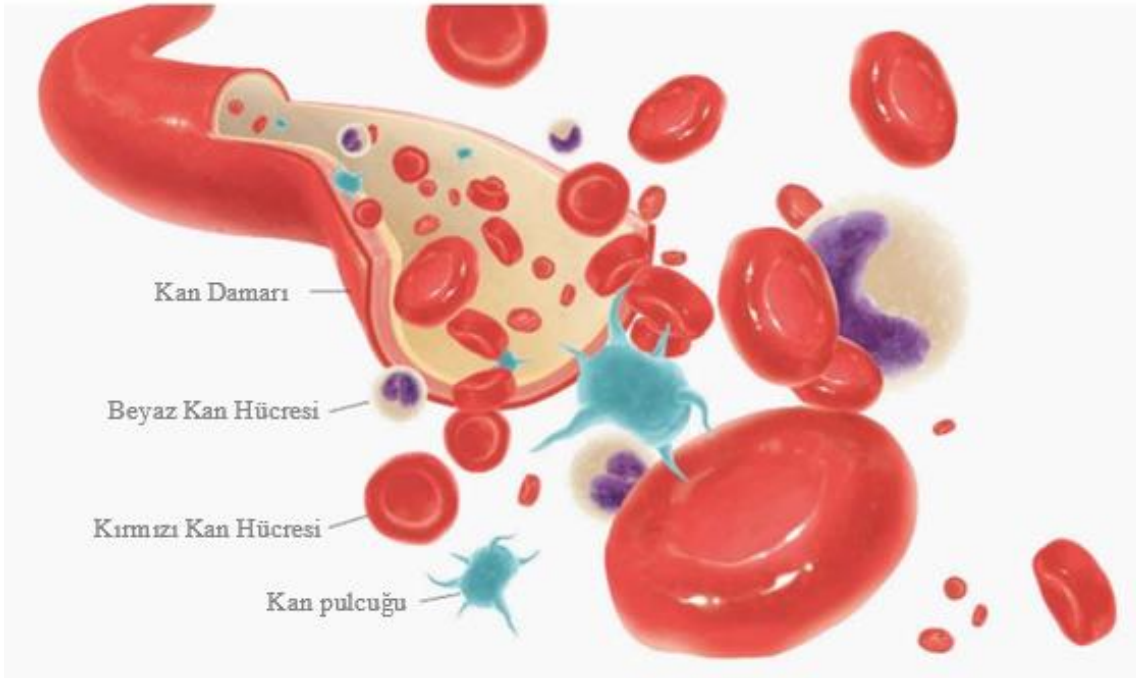
Raman spektroskopinin adli bilimlerde biyolojik numuneler üzerinde kullanımı oldukça yenilikçi bir yaklaşımdır. Raman spektroskopisi ile ifade edilen her bir spektrum bir maddeyi tanımlamaktadır. Böylece farklı kimyasal yapılar içeren sistemlerde Raman spektroskopisi ile örneğin fiziksel yapısından bağımsız olarak ilgili bileşenin tayini yapılabilmektedir. Raman spektroskopisi invazif olmayan ve hızlı sonuç veren bir tekniktir. Kan lekesi için Raman spektroskopisi ile kan yapısal elementleri, hücre zarı analizleri, hemoglobinin karakterizasyonu, kan lekesinin yaşı, cinsiyete ve ırka özgü kan özellikleri hakkında çalışmalar mevcuttur [11].

Kan lekesinin farklı çözücülerle bertaraf edilmesi sonucunda, kan lekesinden elde edilen birçok bilginin leke miktarına bağlı olarak spektral yöntemlerle elde edilmesi mümkün olmayabilir. Bu durum, kanın tüm bileşenlerinin niteliklerini yansıtmaya potansiyeli taşıyan bir spektrum olarak ifade edilmesinin önemini göstermektedir. Kan spektrumunun doğru ifade edilebilmesi ile farklı çözücüler için ayırım yapmak bile mümkün olabilir. Buna bağlı olarak, yapılan tez çalışmasındaki amaç, suçlu veya mağdurun üzerindeki ya da çevresindeki kan lekeli kumaş yüzeylerin farklı çözücüler içeren yıkama prosedürleri varlığında Raman spektroskopisi ile tespit edilmesidir. Böylece hayatımızda neredeyse her yerde bulunan kumaş yüzeyler üzerinde yıkanmış kanın davranışı ve karakteristiği belirlenmiş olup hukuki anlamsa delil yetersizliğinden ötürü çözümsüz kalmış olan davaların sonuçlanmasına katkı sağlayacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kan

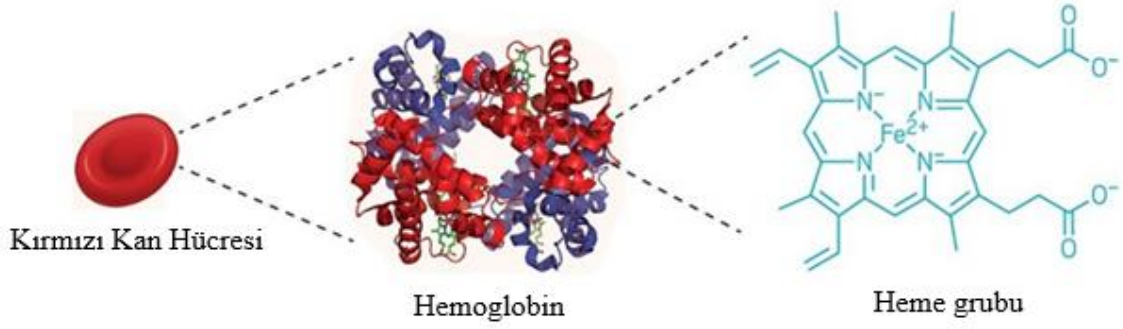
Kan, insan vücudundaki fizyolojik olaylarda yer alan önemli moleküllerin, besinlerin ve metabolik atıkların içinde bulunduğu sıvı formdaki destek dokudur. Yetişkin bir insan vücudunda bulunan ortalama kan hacmi yaklaşık 4,5- 5 litredir [12]. Kanın ortalama pH'ı 7.4 olup suya göre daha yüksek bir viskozite oranı gösterir.



Şekil 2. 1. Kan hücreleri [13].

Kan, kırmızı kan hücreleri yani eritrositler, beyaz kan hücreleri yani lökositler, trombositler ve sarı renkli sıvı formdaki plazmadan meydana gelmektedir (Şekil 2.1). Kanın %45'ini kırmızı kan hücreleri, beyaz kan hücreleri ile trombositler oluştururken yaklaşık %55'ini plazma oluşturmaktadır [12]. Kan hücrelerinin büyük bir çoğunluğunu oluşturan kırmızı kan hücreleri (Red Blood Cell), içeriğinin yaklaşık %95'ini oluşturan hemoglobin (Hb) pigmenti ile dokulara oksijen taşımaktadır [14]. Kanda bulunan ortalama hemoglobin miktarı 14 ile 16 g/L olarak belirlenmiştir [12]. Ancak bu miktar, yaşa ve cinsiyete göre farklılık göstermektedir.

Hemoglobin, kanda bulunan oksijenin %98'lik kısmı kırmızı kan hücreleri ile %2'lik kısmı ise plazmada çözünmüş olarak dokulara taşınmaktadır [15]. Hemoglobin, oksijenin bağlanabildiği dört adet demir (heme) grubu ve bir adet globin molekülü içeren metaloprotein bir yapıdır [16] (Şekil 2.2). Hemoglobin ile oksijen molekülünün bağlanma reaksiyonu sonucunda kan kırmızı rengini alır.



Şekil 2. 2. Hemoglobin yapısı [17].

Beyaz kan hücreleri, vücudun savunma ve bağışık metabolizmasından sorumlu olan hücrelerdir. Yetişkin bir insanda, 1 mm³ kanda yaklaşık 6000-1000 beyaz kan hücresi bulunmaktadır [18]. Beyaz kan hücreleri, monosit, lenfosit ve granüositler olarak üç temel grupta ele alınabilir. Bu kan hücrelerinden türeyen diğer beyaz kan hücreleri ise doğal katil (NK) hücreler ozinofil, basofil, makrofaj, nötrofil ve dendritik hücreler olarak sıralanabilir [18]. Kan pulcukları yani trombositler ise kanın pıhtılaşmasından, inflamasyon ve yara iyileşmesinden sorumludurlar. Kan plazması, kanın %55'ini yani yaklaşık 2,5-3 litresini oluşturmakta iken plazmanın %8-9'u çözünmüş proteinlerden, % 91-92'si ise sudan oluşmaktadır [12]. Plazma, çözünmüş albümin, globülin ve fibrinojen gibi proteinler, pıhtılaşma faktörleri ve hormon, antikor ile elektrolitlerin sıvı serum içinde çözülmesiyle meydana gelir.

Dokuların oksijenasyonu için gereken oksijenin dokulara taşımalarının yanında vücuttaki homeostatik dengenin sağlanması, boşaltım, besin ve mineral taşınması, ısı ve pH dengesinin sağlanması ile vücut bağışıklığının sağlanmasından sorumludur.

Besin ve metabolik atıkların kan damarları ile ilgili doku ve organlara ulaştırılması önemlidir. Özellikle oksijen metabolizmasının bir ürünü olan CO₂ molekülünün uzaklaştırılması, pH dengesinin korunmasında önem taşımaktadır.

2.2. Kan Tayin Metotları

Olay yerindeki kanıt olarak nitelendirilen eşya ve malzemelerin üzerinde bulunan biyolojik sıvıların bütünlüğünün bozulmadan saklanması önemlidir. Özellikle olayın seyrini değiştirebilecek kanıtların, ilgili olayda aktif olan kişilerce değiştirilmesi veya kanıt niteliğinin bozulması çok karşılaşılan bir durumdur. Kan lekesinin tanımlanması ve oluşma şekline bağlı olan model analizi, kan yapısının tanımlanması ve kan lekelerinin farklı yüzeylerde hangi mekanizmalar ile oluştuğu hakkında bilgi verebilir [19]. Olay yerinde kan lekesinin tayini için sıklıkla kullanılan yöntemler bulunmaktadır.

Kan lekesinin bulunduğu yer ve kan lekeli kanıtın bulunması, tarama testleri yapıldıktan sonra lekenin tanımlanması için doğrulama testleri yapılmaktadır.

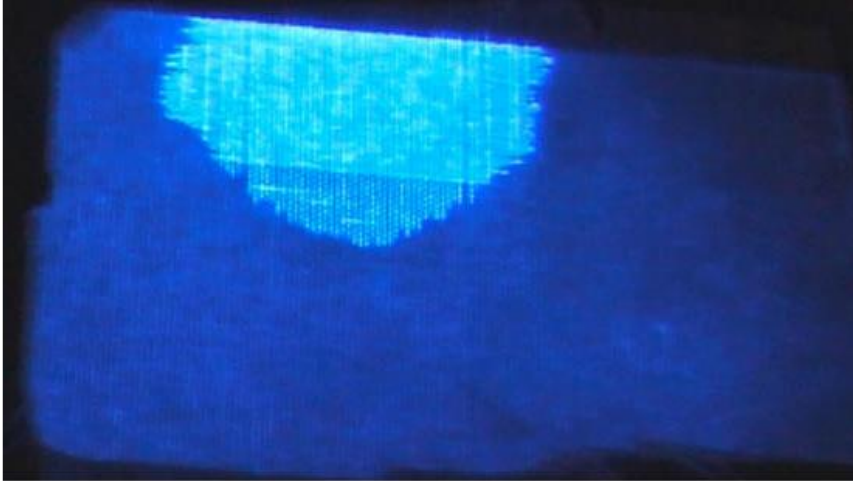
2.2.1. Tarama Testleri

Tarama testleri (presumptive tests), olay yerinde örneğin veya bölgenin belirlenmesi için yapılır. Bu testlerin, yalancı pozitif ve yalancı negatif oranları yüksek olup örneğin orijini hakkında bilgi vermezler [9]. Tarama testleri olay yerindeki kanıtların kullanılıp kullanılmayacağına karar vermede önem arz etmektedir.

Kan lekesi tarama testleri farklı süreçlere sahip olsa da, genel olarak hepsi hemoglobin pigmentinin aktivasyonu üzerinden yürümektedir. Kan tayini en sık kullanılan tarama testlerinden biri katalitik bir yöntem olarak adlandırılabilir lüminol testidir. Lüminol, özellikle olay yerinde görünmeyen veya görülmesi zor olan kan lekelerinin tespitinde sıklıkla kullanılmaktadır. Kan içerisindeki Hemoglobinin yapısında bulunan heme gruplarının varlığında reaksiyon göstererek, kan izi olan bölgede mavi renkli ışımaya sebep olurlar.

Luminol dışında floresein gibi kemifloresansa dayalı testler ve benzidin, Kastle-Meyer, O-toluidin ve TMB/Hemastix1 gibi kimyasal katalitik testler de kullanılmaktadır [20] (Resim 2.1).

Kolay kullanımları ve hızlı sonuç vermelerine rağmen katalitik testler birçok dezavantaja sahiptir. Bu testlerin hemoglobine duyarlılıklarının yanı sıra, bazı bitki enzimleri ve metallerle reaksiyon gösterebilirler [7]. Bu durum, kanın yüksek hassasiyetle tespit edilememesine neden olmaktadır. Tarama testlerinin hepsinde, örnek üzerine uygulanan bir kimyasal işlem vardır. Böylece, kanıt üzerinde bulunan DNA ve antijen türevi yapıları bozarak takip eden doğrulama testlerinin yüksek doğrulukta sonuç vermemesine neden olmaktadır [8].



Resim 2. 1. Luminol ile kumaş üzerindeki kan tespiti [21].

Kumaştaki kan lekesinin tespitinde, yıkama döngüsüne ve üzerindeki çözücü kanıtlarına bağlı olarak kanın tayin edilebilme oranı azalmaktadır. Buna bağlı olarak tarama testlerini oluşturan kimyasal-katalitik yöntemlerin kullanımı bu amaç için önemlidir. [21, 22].

2.2.2. Doğrulama Testleri

Biyolojik izlerin tanımlanmasında tek ya da dizi şeklinde kullanılan testlerdir. Kan lekesinin doğrulanması için kullanılan metotlar mikroskobik, immünolojik, kromatografik ve spektroskopik olarak sıralanabilir [9].

2.2.2.1. Mikroskopik Metotlar

Kan lekesi üzerindeki kırmızı ve beyaz kan hücrelerinin görüntülenmesine dayanan tayin yöntemidir. Işık mikroskobu, elektron mikroskobu ve taramalı uç mikroskopları, adli tıpta biyolojik sıvıların tespiti için kullanılmaktadır. Toluidine ile kabuklaşmış kan boyandıktan sonra, dokularda lökosit hücresinin mikroskopik olarak görüntülenmesi hakkında çalışmalar yapılmıştır [23].

Mikroskopik görüntüleme için, kan hücrelerinin yapısının korunması önemlidir. Mikroskopik tespitlerin doğru yapılabilmesi için hücre formlarının bozulmaması gereklidir. Kan lekesi, yaş, çevresel faktörler veya ısı etkisine bağlı olarak bozulma gösterebilir [24]. Bu yüzden, zamana bağlı olan kan lekesinin karakteristiği yüksek hassasiyette yapılamaz.

2.2.2.2. İmmünolojik Metotlar

Spesifik antikor ve antijen reaksiyonları ile gerçekleştirilen metotlardır [25]. Bu tip testler, kit halinde ticari kullanıma sunulmuş yüksek hassasiyetli strip testleridir. Testler, insan kanının iki farklı antikor ile eritrosit üzerindeki glikoforin tayinine dayalı karakterizasyonu, antikor bağlanmış strip üzerinden hemoglobin tayinine dayalı karakterizasyon ve ELISA yöntemine dayalı kan tanımlayıcı testler olarak örneklendirilebilir [9]. İmmünolojik metotlar yüksek doğrulukta sonuçlar verseler bile uygun konsantrasyonda örnek uygulanmaması ve test süresinin sınırlı olması gibi dezavantajları bulunmaktadır.

2.2.2.3. Kromatografik Metotlar

Örnek hazırlama süreçlerinin uzun olması nedeniyle rutin olarak adli laboratuvarlarda kullanımı bulunmayan, genel olarak hemoglobinin diğer kan elementlerinden ayrılmasını temel alan metotlardır [9]. Kan lekesi tespitinde, yüksek performans sıvı kromatografi (HPLC) ve gaz kromatografi- kütle spektroskopisi (GC-MS) kullanılmaktadır [26]. HPLC, kan yağının tespitinde yüksek doğrulukla sonuç veren bir yöntemdir [27, 28].

2.2.2.4. Spektroskopik Metotlar

Madde ile ışınların etkileşimlerini konu edinen bilim dalına spektroskopi denir. Bu kapsamda spektroskopi, araştırma yapılan örnek üzerindeki molekül, atom veya iyonların enerji düzeylerini değiştirirken absorbe edilen (soğrulan) ya da ortaya çıkan elektromanyetik ışımının ölçülmesi ve yorumlanması şeklinde tanımlanabilir.

Temelde iki gruba ayrılırlar:

1. Atomik Spektroskopi
2. Moleküler Spektroskopi

Atomik spektroskopi; elektronların bir enerji seviyesinden diğer enerji seviyesine geçerken absorbe edilen veya yayılan ışımının enerjisi ve bu atomun potansiyel enerjisindeki değişim ile ilgilenir. Moleküler spektroskopi ise elektronik seviyeler arasındaki geçişler dışında dönme ve titreşim arasındaki geçişleri de içerir. Elektromanyetik ışımının madde üzerindeki etkileşimlerine göre spektroskopik yöntemler farklılaşır. Özellikle biyolojik sıvıların analizinde floresans ve fosforesans spektroskopi, infrared (IR) spektroskopi, NIR spektroskopi, FTIR spektroskopi, Raman spektroskopi kullanılmaktadır. Bu metotlar, kan lekelerinin de yüksek doğrulukta saptanması için kullanılan yöntemlerdir. Kan lekesinin tayini amacıyla spektroskopik metotların kullanılması hakkındaki ilk çalışmada, Raman ve FTIR metotları kullanılarak kan farklı leke ajanları arasından karakterize edilip, hemoglobin tespitine dayalı kan genetiği karakterizasyonu yapılmıştır [29]. Yukarıda izah edilen çalışmalara bağlı olarak, X-ışını floresans teknikleri, gaz spektrometrisi- kütle spektrometrisi (GS-MS), UV-Vis, FTIR ve Raman yöntemlerine yönelim artmıştır. X-ray floresans, biyolojik lekeye zarar vermeyen spektroskopik bir yöntemdir. Göz ile görülemeyecek miktarlardaki kan lekelerinin tespiti bu metot ile kolaylıkla yapılabilmektedir [30].

Kan lekesi tayininde Infrared (IR) dalga spektrumlarının farklı metotlar ile kullanımı bulunmaktadır. Bu metotlarda dalga sayısı değerlerine bağlı olarak absorbans ve saçılım spektroskopileri oluşturulmaktadır. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi spektroskopisi (FTIR), organik malzemenin yapısı ve bağlarının moleküler düzeyde tanımlanmasını sağlar. Benzer şekilde zayıflatılmış toplam yansıma- Fourier Dönüşümlü Kızılötesi spektroskopisi (ATR-FTIR) ise, FTIR enstrümantasyonuna kristal eklenmesi ile, yoğunluğu yüksek örneklerde hassas ölçüm sağlayabilir. ATR-FTIR spektroskopisi, kan

tayininde genellikle kullanılan bir yöntemdir. ATR-FTIR spektroskopisi ile kan bileşenlerinin karakterizasyonu, kan fenotipi profilleri oluşturulması ve kan lekesi yaşının tespiti mümkündür [31, 32, 33].

Raman spektroskopisi, moleküler düzeydeki titreşimler ile moleküle ait moleküler parmak izini oluşturur. Raman spektroskopisinin biyolojik örneklerin analizinde özellikle tercih edilmesinin nedeni, biyolojik sıvıların çoğunda bulunan su bileşiğine karşı duyarlı olmamasıdır. Kan tayininde önemli bir yere sahip olan Raman spektroskopisi ile kan lekesinin tespitine yönelik birçok çalışma bulunmaktadır. İnvazif olmayan bir teknik olmasından ötürü örneğe zarar vermez. Adli kan lekesi tespiti için yenilikçi bir yöntem olarak tanımlanabilir.

2.3. Raman Spektroskopisi

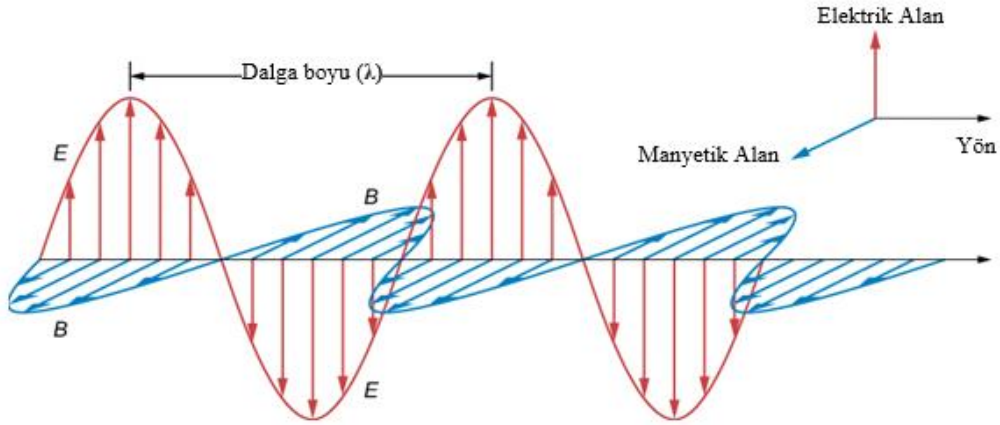
Raman spektroskopisi, örnek üzerine monokromatik bir ışık kaynağının uygulanması sonucunda ışığın örnek molekülleri üzerinden elastik olmayan saçılım yapmasına dayanan moleküler yapıya özgü özelliklerinin yüksek hassasiyetle tespit edildiği analitik titreşim spektroskopisi yöntemidir.

2.3.1. Titreşim Spektroskopisi

Titreşim spektroskopisi, belli bir spektrumdaki ışığın moleküler bağlar üzerinde yarattığı titreşime bağlı olan absorpsiyon ve saçılma gibi etkileşimleri inceler. Titreşim spektroskopisi ile moleküler karakterizasyon infrared (IR), yakın infrared (NIR) ve Raman spektrumu ile açıklanabilir. Molekül üzerine gelen ışığın soğurulması olayına absorpsiyon; molekül üzerine gelen ışığın birden fazla yöne veya farklı bir yörede hareket etmesine saçılım denir. IR ve NIR yöntemleri oluşan absorpsiyona göre spektrum verirken Raman yöntemi saçılan elektron ya da foton enerjilerine göre spektrum verir [34].

2.3.1.1. Elektromanyetik Dalgalar

Elektromanyetik dalgalar, birbirine dik uzanan elektrik ve manyetik alanların kombinasyonu olarak ifade edilir. Bu dalgalar, foton adı verilen ve vakumlu ortamda ışık hızında ($c= 299.792.458$ m/s) hareket eden parçacıklar olarak tanımlanabilir.



Şekil 2. 3. Elektromanyetik Dalga [35].

Elektromanyetik bir dalga'nın elektromanyetik spektrumdaki yeri, dalga'nın salınım frekansına veya dalga boyuna bağlıdır (Şekil 2.3). Dalga boyu (λ), dalga formunun iki tepe ya da iki çukur noktası arasındaki mesafe olarak tanımlanır. Dalga'nın frekansı (f) ise, dalga formunun zaman içerisindeki tekrarlama sıklığıdır.

Dalga boyu ile frekans arasında ters orantılı bir ilişki bulunmaktadır (2.1).

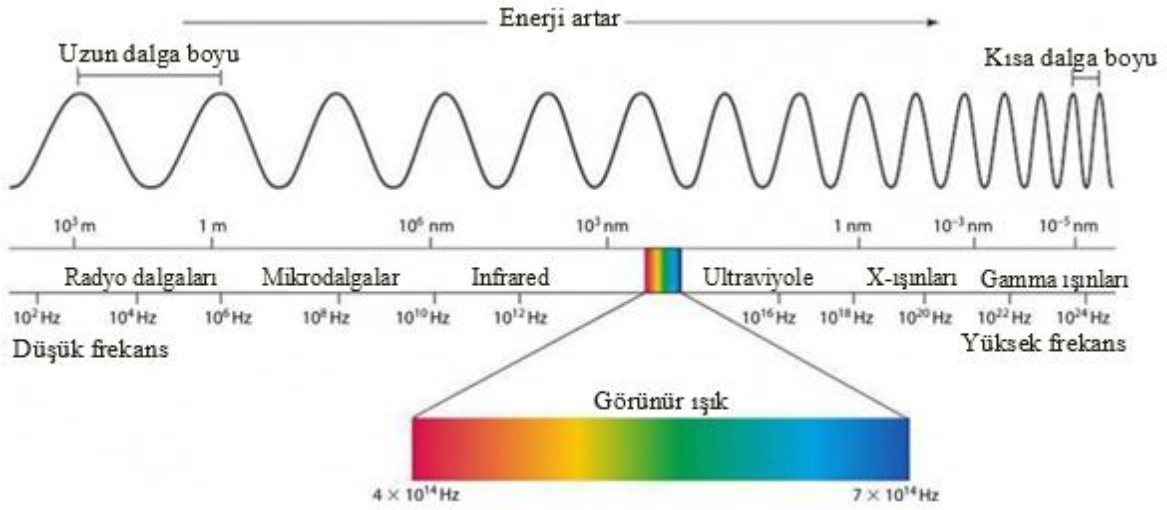
$$\lambda = c / f \quad (2.1)$$

Dalga sayısı, 1 cm uzunluğunda bulunan dalga sayısını ifade etmektedir. Dalga sayısı cm^{-1} ile gösterilmektedir. Bu birim özellikle IR dalga boyundaki dalgalar için çoğunlukla kullanılmakta olup dalga sayısının enerji ile olan lineer ilişkisini tanımlamak amacıyla kullanılır [36].

Elektromanyetik spektrumda farklı frekans ve dalga boylarında ışımaya yapabilen radyo dalgaları (RF), mikrodalga, infrared (IR), ultraviyole (UV), x- ışınları ve Gama ışınları

bulunmaktadır. Dalga boyları, 400 nm ile 700 nm arasındaki dalgalar görünür bölge ışıkları olarak adlandırılmaktadır.

Bu ışıklar, çıplak gözle görülebilmektedir (Şekil 2.4).



Şekil 2. 4. Elektromanyetik Spektrum [37].

2.3.2. Raman Spektroskopi Teorisi

Raman spektroskopisi, örnek üzerinden saçılan ışığın frekansındaki kaymanın ölçülmesine dayanan tekniktir. Madde üzerine gelen fotonların, madde içerisinden geçişi sırasında farklı etkileşimlerde bulunurlar. Bu etkileşimler, refleksiyon, absorpsiyon, transmisyon ve saçılma olarak adlandırılır. Saçılmalar elastik ve elastik olmayan saçılmalar olarak iki grupta incelenebilir. Elastik saçılmalarda, örnek üzerine gelen fotonun enerjisi ile saçılan fotonun enerjisi eşittir. Bu tip saçılmalar Rayleigh saçılması olarak adlandırılmaktadır [38]. Elastik olmayan saçılmalarda ise, örnek üzerine gelen fotonun enerjisi ile saçılan fotonun enerjisi eşit değildir. Elastik olmayan saçılmalar, Raman etkisi olarak adlandırılmaktadır [38]. Elastik olmayan saçılmalar sonucunda, moleküller kısa süreler halinde uyarılmış durumda kalarak belirli bir frekans kayması yaratacak şekilde polarize olup titreşirler. Bu durum, açışal frekanslarda kaymaya yol açar (2.2).

$$W_s = W_p \pm W_{osc} \quad (2.2)$$

Gelen ışığa ait frekans “ ω_p ”, saçılan ışığa ait açısal frekans “ ω_s ”, moleküler titreşime ait frekans “ ω_{osc} ” ile gösterilmektedir [38]. Benzer şekilde, uyarıcı foton ile saçılan foton enerjisi (2.3)’te ifade edilmiştir.

$$h\omega_s = h\omega_p \pm h\omega_{osc} \quad (2.3)$$

h , Planck sabiti olarak gösterilmektedir. Titreşim spektroskopisinde, dalga sayısı terimi sık kullanılmaktadır [38]. Dalga sayısının dalga boyu ile ifade edilmesi, (2.4)’te gösterilmiştir.

$$\nu = 1/\lambda \quad (2.4)$$

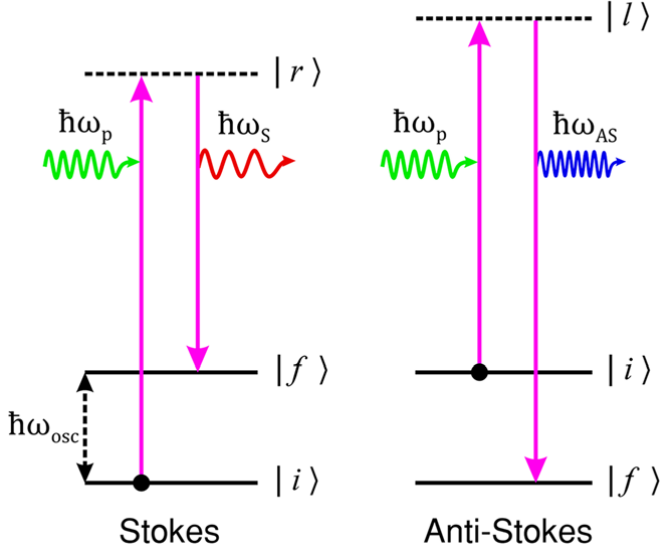
Bağıl dalga sayısı ($\Delta\nu$), dalga sayısı cinsinden de hesaplanabilmektedir. Dalga sayısının dalga boyuna göre hesaplanması (2.5)’te, dalga sayısı cinsinden Raman kayması ise (2.6)’da verilmiştir.

$$\Delta\nu_s = 1/\lambda_p - 1/\lambda_{osc} \quad (2.5)$$

$$\nu_s = \nu_p \mp \nu_{osc} \quad (2.6)$$

Saçılan fotona ait açısal frekans, örnek üzerine uygulanan fotona ait açısal frekanstan düşük ise Stokes saçılması olarak adlandırılır.

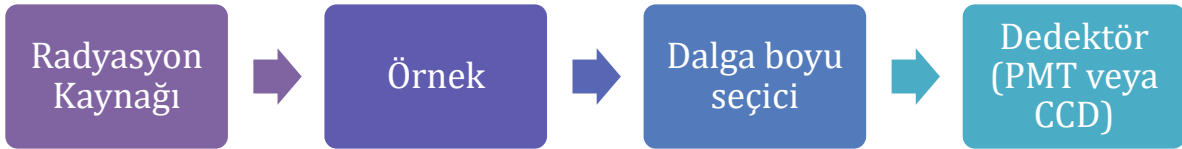
Saçılan fotona ait açısal frekans, örnek üzerine gelen fotona ait olan açısal frekanstan yüksek ise Anti-Stokes saçılması olarak adlandırılır (Şekil 2.5).



Şekil 2. 5. Raman saçılmaları [38].

2.3.3. Çalışma Prensibi ve Enstrümantasyon

Uygulama ile farklılaşmakla birlikte, temel bir Raman spektrometre; uyarıcı ışık kaynağı, spektrofotometre ve detektör dizilerinden oluşur (Şekil 2.6).



Şekil 2. 6. Raman spektrometre bileşenleri.

2.3.3.1. Uyarıcı Işık Kaynağı

Raman spektroskopide uyarıcı ışık kaynağı olarak zaman içerisinde stabil olup uygun kolimasyona sahip lazer kaynaklar kullanılmaktadır.

Uygulamanın ve kullanılan örneğin farklılaşmasıyla, lazerin gücünün belirlenen süre boyunca devamlılığı, Raman kaymalarının hassas bir şekilde numerik olarak tespiti için önemlidir.

Farklı dalga boyunda ve elektromanyetik spektrumda görülebilir bölge ışıklarının bulunduğu bölgeye düşen renkte lazer kullanılabilir. Lazer kaynağının çoğunlukla kullanılan lazer tipleri ve dalga boyları Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Lazer Tipi	Dalga Boyu Değeri (nm)
Argon iyon	488 ve 514.5
Kripton iyon	530.9 ve 647.1
Helyum-Neon iyon (He-Ne)	632.8
NIR diyot lazer	785 ve 830
Neodim-İtteryum Aliminyum Garnet (Nd: YAG)	1064
Neodim-İtteryum Orto-Vanadat (Nd: YAG)	1064

Çizelge 2. 1. Lazer tipleri ve dalga boyu değerleri [39].

Raman saçılım miktarı, lazer dalga boyunun dördüncü kuvveti (λ^{-4}) ile orantılı olarak değişmektedir [40]. Lazer dalga boyu, 785 nm dalga boyunda NIR diyot lazer, spektral ölçüm sırasında önemli olan floresans, intensite ve hassasiyet bakımından birçok uygulamada kullanımı optimize edilmiştir [41].

2.3.3.2.Spektrofotometre

Örnek üzerine gelen lazerin, tüm gürültülerin arınmış bir şekilde örneğe ulaşması Raman spektrumunda bozulmalara yol açabilir. Bunun için lazerin örneğe ulaşmadan önce filtrelenmesi gereklidir. Spektrometre, üzerindeki yarıklar ile spektral çözünürlüğü belirler. Yarıkların genişliği, odak uzaklığı, saçılan ışığın yarık üzerindeki dağılımı, prizmanın boyutu ve detektörün hassasiyeti spektrometrenin spektral çözünürlüğünü etkiler [38]. Lazerin olabildiğince gürültülerden arınmış şekilde örneğe ulaşması, detektör üzerindeki saçılan fotonların algılanmasını sağlamaktadır. Örneğin ilgili bölgesi dışındaki yerlerden gelen saçılmış elektronların detektöre ulaşması engellenmelidir. Bu yüzden doğru dalgaboyuna sahip spektrofotometrelerin kullanımı önemlidir. Işımanın Stokes veya anti-Stokes olması durumunda seçilen spektrofotometre tipi değişebilir.

Stokes ışımaları için yüksek geçiren filtre, anti-Stokes için alçak geçiren filtre kullanımı mevcuttur.

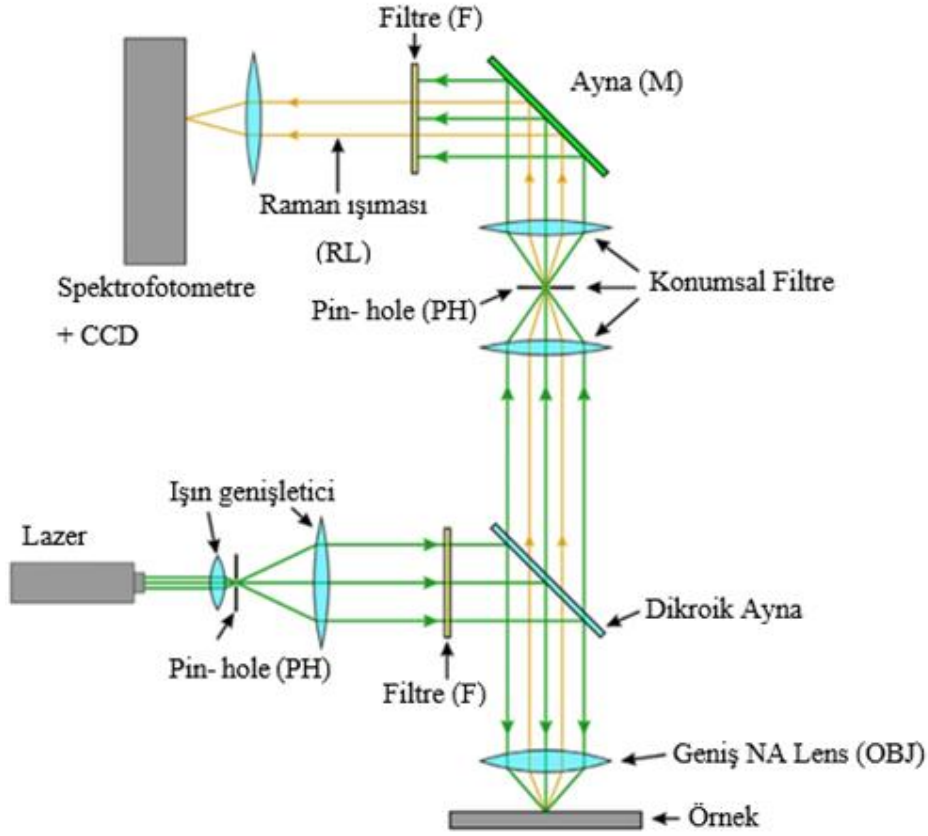
2.3.3.3. Detektör

Detektör: Spektrofotometre ile Raman saçılımı olarak belirlenen fotonlar, yük bağımlı aygıt dizisi (CCD) veya ışık çoklayıcı tüp (PMT) ile algılanır [42]. Böylece, saçılımlara ait dalga boyu ve intensite bilgilerine ait spektrum oluşturulur.

2.3.3.4. Çalışma Prensipleri

Raman spektroskopisi için kullanılan düzenek, iğne deliği açıklığı (pin-hole) ve yüksek sayısal açıklık (NA) değerleri ile genellikle konfokal mikroskopa benzer bir tasarıma sahiptir (Şekil 2.7). Pin-hole açıklığı ile dedektörün, sadece odak içerisinde olan fotonları algılayacaktır. Lazer, pin-hole açıklığında kolime olarak ışın genişleticiden (BE) geçerek filtreye çarpar. Filtreden gürültü gibi bileşenlerden temizlenmiş şekilde çıkan ışık, dalga ayırıcıya çarparak (BS) objektiften geçer ve örneğe ulaşır. Örneğe ulaşan lazer ışını ile örnek üzerinden lazer ışığının dalga boyundan farklı dalga boyuna sahip fotonlar saçılır. Saçılan ışık, uzamsal filtrelerden ve pin-hole açıklığından geçerek aynaya çarparak kırılır.

Aynaya çarpan ışınlar ise tekrar filtrelenerek spektrofotometre ya da CCD detektöre ulaşır. Böylece Raman ışımalarına ait spektrumun oluşturulması için gereken dalga boyu ve yoğunluk bilgileri elde edilmiş olur.



Şekil 2. 7. Raman spektrometre diyagramı [38].

2.3.4. Kullanım Alanları

Raman spektroskopisi, organik ve organik olmayan malzemelerin karakteristik analizinde kullanılır. Farmakoloji, kozmetik, jeoloji, yarıiletkenler, karbon materyal çalışmaları ve hayat bilimleri; kullanım alanları olarak listelenebilir.

Analiz sırasında örnek üzerinde herhangi bir deformasyon oluşturulmaması özellikle biyolojik materyallerin karakterizasyonunda Raman spektroskopinin tercih edilmesini sağlamıştır.

Adli vakaların aydınlatılması için kullanılan çoğu geleneksel yöntem yerine, daha spesifik ve hassas sonuç veren Raman spektroskopisi kullanımına eğilim gösterilmektedir.

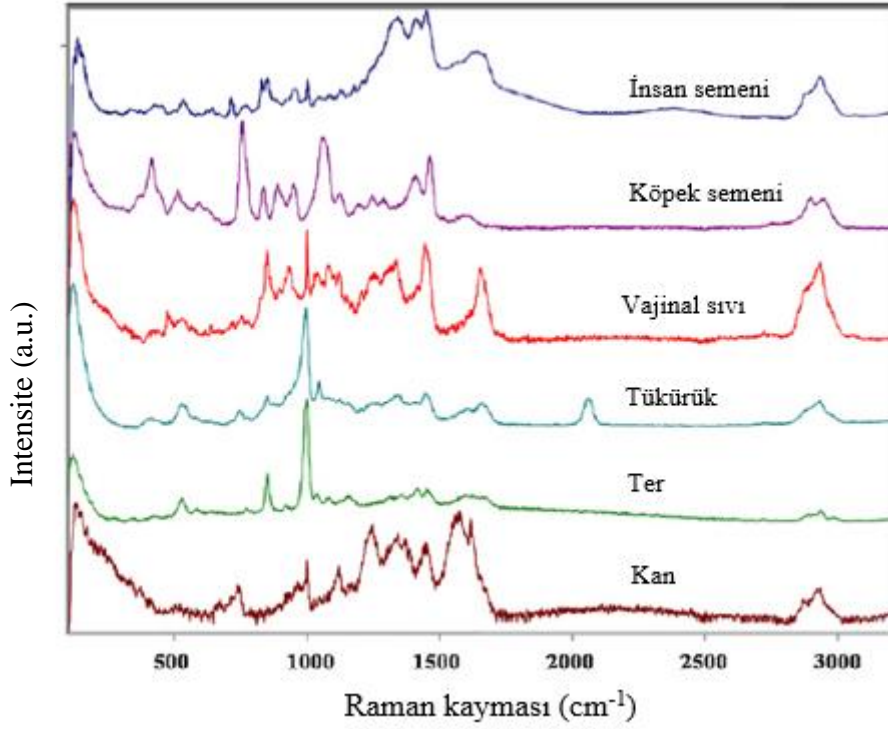
2.3.4.1. Adli Olaylardaki Yeri

Raman spektroskopinin, adli tıp alanında özellikle biyolojik leke tespitinde ve toksikoloji karakterizasyonunda kullanılmaktadır. Biyolojik lekelerin karakterizasyonu ve tespitine yönelik çalışmalarda leke kimliklendirmesi dışında lekelerin yüzeyde bulunma süresi ve leke yaşı tespiti, leke deformasyon değerlendirmeleri, lekelerle dair cinsiyet belirleme ve yaş grubu tespiti hakkında yapılan çalışmalar yapılmaktadır. Biyolojik sıvılar olarak, tükürük, ter, vajinal sıvı, semen ve kan ile Raman spektroskopi çalışmaları mevcuttur [43,44]. Belirtilen tüm vücut sıvıları aynı bireye ait olsa bile farklı spektrumlar vermektedir (Şekil 2.8). Böylece, farklı sıvıların benzer özellikleri veya aynı sıvıların farklı özelliklerinin karşılaştırılması da mümkün olmuştur [45,46].

Tükürük ve ter sıvısının diğer sıvılar içerisinde tanımlanması üzerinde NIR Raman spektroskopi ile yapılan bir çalışmada, sıvı bileşenlerinin spektral özelliklerinin tanımlanmasının yanı sıra farklı bireylere ait tükürük sıvısının karakterizasyonu yapılmıştır [47,48]. Tükürük sıvısı ile cinsiyet belirleme çalışmaları yüksek doğrulukla tespit edilmiştir [49].

Vajinal sıvı ve semen tespiti, birçok adli olayın açıklığa çıkarılması için oldukça önemlidir. Vajinal sıvı tayini, farklı vücut sıvıları içinden gerçekleştirilebilmiştir [50]. Ayrıca, vajinal doku üzerinden ilaç salımının etkinliğini değerlendirmek için Raman spektroskopi kullanılmıştır [51]. Semene bileşenlerinin spektral analizleri, ırk tespiti ve sperm tayini için Raman spektral analizleri üzerinde çalışılmıştır [52, 53].

Raman spektroskopi, kan lekelerinin kimliklendirilmesinin yanı sıra kan bileşenlerinin tayini, leke yaşının tespiti, ırk ve cinsiyet tanımlanması çalışmalarında kullanılmıştır (Şekil 2.8).



Şekil 2. 8. 785 nm lazer ile vücut sıvılarının Raman spektrumları [44].

2.3.4.2. Kan Lekesi Tayininde Raman Spektroskopi

Kan, içinde bulunan bileşenler gereğince diğer sıvılara göre daha karmaşık bir yapı olarak nitelendirilebilir. Bu durumdan ötürü, ilgili kan bileşenini doğru olarak tespit edebilmek adına kan hücreleri, serum ve plazma ekstraksiyonuna ihtiyaç duyulmuştur. Ancak, kan sıvısının bir bütün olarak farklı yüzeylerde ve süreler içerisindeki davranışının belirlenmesi, adli olayların değerlendirilmesinde tercih edilmektedir.

Bulunduğu yüzeyden bağımsız olarak taze ve kurutulmuş kan için, tam kan spektrumundaki bazı bileşenlerin intensite değerlerinde azalmalar ve bazı durumlarda dalga numarasında kaymalar görülmektedir.

Raman Kayması (cm ⁻¹)	Titreşim Modu	Bileşen
744	Halka titreşimleri	Triptofan
967	Belirtilmemiş	Fibrin
1000	C-O titreşimi	Fenialanin
1122	C-O-C asimetrik esnemesi	Heme
1248	Amid III bandı	Fibrin
1342	C-H kıvrımı	Triptofan
1368	CH ₃ esnemesi	Heme
1448	CH ₂ -CH ₃ kıvrımı	Triptofan
1542	C=C esnemesi	Heme
1575	Belirtilmemiş	Fibrin
1620	C=C esnemesi	Heme

Çizelge 2. 2. Raman kaymasına göre kan bileşenleri [60].

Hemoglobin pigmentini oluşturan grupların spektral analizlerinde, kan lekelerinin yüzeyde kalma süresiyle beraber intensite ve dalga boyu kaymaları gözlenebilmektedir. Bu durum hemoglobinin oksijen bağlama özelliği ile ilişkilendirilebilir.

Kan lekelerinin adli olaylar için incelenmesinde, kanın ilgili yüzeyden tanınması, yüzeydeki kan lekesinin yaşı, bireylerin yaş bilgisi, bireylerin cinsiyeti ve türlere göre kan ayırımı Raman spektroskopisi ile mümkündür.

Kan lekesinin farklı yüzeyler üzerindeki bulunma süresinin tespiti, yüksek hassasiyetle yapılabilmektedir [54,55]. Kan lekesinin ilgili yüzey üzerindeki tanımlanması ve leke yaşının tespiti, diğer çalışma gruplarında da deneyimlenmiş iki deney grubu oluşturmaktadır. Birey yaşına bağlı olarak kan kompozisyonunda görülen belli intensite şiddetlerine göre yaş grubunun tespiti yine Raman spektroskopisi ile belirlenebilmektedir [56]. Benzer şekilde, kan lekesinden cinsiyet tespiti yüksek doğrulukla saptanabilmektedir [57]. İnsan kanının tanımlanmasının yanı sıra ve farklı canlıların kan lekelerinin tanımlanması, yine Raman spektroskopisi kullanılarak başarılmıştır [59].

2.4. Kemometrik Analiz

Moleküler seviyede tanımlama ve ayırım yapabilen spektroskopik analizlerin kullanımı, fazla sayıda karakteristik spektrum vermektedir. Spektrumların sınıflandırılması ve doğru bir şekilde analizinin yapılması, farklı moleküler etkileşimleri değerlendirmede önem taşır.

Spektrumlar birden fazla değişken içerirler. Bu değişkenlere göre, spektrum sınırları içerisinde alınan değerlerin tek bir boyut ile saklanması mümkün değildir. Birden fazla boyut içeren veriler, matris şeklinde değerlendirilirler. Ayrıca, spektrumun doğru yorumlanabilmesi ise tüm verilerin birbirini doğrulaması (korelasyon) sonucu mümkündür.

Bir veri setinde çok sayıda veriyle ifade edilen benzer ya da farklı gruplar, daha az sayıda veri ile aynı seçicilikle ifade edilebilmektedir. Temel bileşen analizi (PCA), büyük veri kümelerindeki veri değişkenliği korunurken veri boyutlarının seçici olarak azaltılmasına dayanan veri ayırma yöntemidir [61]. PCA analizi sonucunda, çok boyutlu ve karmaşık olan veriler, daha az boyutta ve farklı özellikleri belirtilmiş veriler haline getirilir. PCA analizinde kullanılan temel bileşenler (PC), ana veri grubundaki verilerin doğrusal fonksiyonlar halinde ifade edilmiş hali olarak tanımlanabilir. Böylece PC'ler varyansı en yüksek olan ve kendi ya da farklı gruplardaki verilerle belli niteliklerce karşılaştırılabilir olan bileşenler olarak değerlendirilebilirler. Oluşturulan PC'lar için farklı analiz yöntemleri geliştirilerek tahmin imkânı mümkün olur. PCA için tasarlanan sistemde, hazırlanan farklı boyutlu veri setinin öznelikleri matematiksel olarak tanımlandıktan sonra doğrusal olarak ifade edilebilen özellik vektörü oluşturulur. Bu vektör, matematiksel bir matris olarak ifade edilebilir. Özellik vektörü ile verilerin hangi nitelikleri kullanılarak ayırım yapılacağı belirlenir. Ayırımı yapılan veri kullanılarak numerik ya da grafik gösterimi ile verilerin ayırımı gerçekleştirilir. PCA, birbiri ile bağıntılı olabilecek bileşenlerin ayırımını başarı ile gerçekleştirebilirken, farklı gruplardaki verilerin birbiriyle bağlantısını değerlendirmez.

Kısmi en küçük kareler yöntemi (PLS) regresyon yöntemi, büyük bir veri seti içerisinde birden fazla bağımsız değişkenin çoklu bağlantı taşıması durumunda, bağımlı değişkenlerin tespit edilmesi için kullanılan analiz yöntemidir [62].

Her iki bileşen arasındaki bağıntının sağlanabilmesi için kullanılan bazı değişken ve faktörler mevcuttur. Faktörler, gizli değişkenler veya bileşenler, standart regresyon yöntemleri ile bağımlı bileşenleri açıklayan denklemler oluşturulur. PCA gibi, değişken karakterizasyonu yapılırken veri niteliğine dokunmadan veri boyutu değiştirilebilir. PLS özellikle kimya, nörobilim, adli tıp ve biyoloji gibi alanlarda çoğunlukla tercih edilen kemometrik analiz yöntemidir.

Kısmi en küçük kareler yöntemi- diskriminant analizi (PLS-DA) algoritması, verilerin sınıf bilgilerini koruyarak verilerin boyutunun denetimli olarak azalmasına dayalı analiz tekniğidir. PLS-DA sonucunda, veriler için sınıflandırma ve nitelik seçimine göre ayırım yapılabilir [63]. PLS algoritmasından temel farkı, verileri sınıflamaya dayalı kategorize etmesidir. PLS-DA algoritmasında tahmin modelinin doğru bir şekilde tasarlanması, kategorizasyonun yüksek hassasiyette yapılmasını sağlar. Test modelinin tasarımı, veri grupları ve karşılaştırılan bileşen niteliğinin sayısına göre farklılık göstermektedir. Test modelinde, test verileri ve modelleme için kullanılacak öğrenme verilerine ihtiyaç vardır. PCA analizinde olduğu gibi PLS-DA metotunda da PLS bileşenleri kullanılmaktadır. PLS bileşenleri, öğrenme verileri ve regresyon katsayısı ile matris olarak ifade edilebilir. Test verilerinin modellenen sisteme girdi olarak verilmesiyle tahmin değerleri ortaya çıkar. Tahmin değerlerinin uygun sınıfa yerleştirilmesi için bazı karar kuralları (DR) kullanılabilir. Test verilerinin modellenen sistemden çıktısı, sınıflanmış veridir.

PLS-DA, Raman ve IR spektroskopik uygulamaları için yapılan kemometrik analizlerde kullanılan bir istatistiksel yaklaşımdır. Kan lekesi identifikasyonu [64,67] ve kan lekesi yaşı [65-66] tespiti için spektroskopik yöntemlerle kullanımı mevcuttur.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Malzemeler

Yapılan tez çalışma kapsamında kullanılan malzemeler tekstil, kimyasal ve biyolojik malzemeler olmak üzere üç farklı şekilde belirlenmiştir.

3.1.1. Tekstil Malzemeler

Kumaş yüzey olarak %100 pamuklu ve beyaz renkli kumaş tercih edilmiştir. Homojen parçalar olması açısından, kumaşın herhangi bir dikiş içermemesine dikkat edilmiştir.

3.1.2. Kimyasal Malzemeler

Deneylerimizde üzerine kan damlatılmış örneklerin yıkanması için hazırlanan 6 farklı yıkama solüsyonunda kullanılmıştır. Kimyasal malzemeler; hidroklorik asit HCl, Merck, %99 Metanol CH₃OH, Riedel-de Haen' den sağlanmıştır. Temizleyici çözücü olarak sıvı sabun (Eyüp Sabri Tuncer), deterjan (Pril), yağ çözücü (Ersag), %5.0 sodyum hipoklorit (NaClO) içerikli çamaşır suyu (Domestos) tarafından sağlanmıştır. Hazırlanan tüm çözeltilerde (18.2 MΩ.cm) deiyonize su kullanılmıştır

3.1.3. Biyolojik Malzemeler

Yapılan deneysel çalışmalarda kan örneği kullanılmıştır. Deneysel çalışmalara başlamadan önce gerekli izin Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Etik Kurul tarafından alınmıştır. Gerekli kan örnekleri, iki farklı sağlıklı, herhangi bir tıbbi geçmişi olmayan, ilaç kullanımı bulunmayan erkek bireyden sağlanmıştır. Kan alınmasından önce etik kurul dosyasında belirtilen onam formu gereğince bilgilendirilmiştir. Deneylerde kullanılan kan örnekleri, mor kapaklı K2EDTA içeren vacutainer tüplere 2 mL olacak şekilde alınmış, + 4°C'de 7 gün muhafaza edilmiştir

3.2. Çözeltiler

Deneyleer sırasında kullanılan çözeltiler:

Deneyleerde kullanılmak üzere farklı derişmelerde Metanol Çözeltisi kullanılmıştır. Metanol (%40.0'lık) (CH₃OH) çözeltisi için, 4.0 mL metanol (CH₃OH) alınarak 6.0 mL deiyonize su içerisinde çözülmüştür.

Hidroklorik Asit Çözeltisi: 0.680 µL hidroklorik asit (HCl), ayrı plastik deney tüpü içine alınıp saf su ile 10.0 mL'ye ayarlanmıştır.

Sabun Çözeltisi: Çözelti dispersiyonunun olabilmesi için sıvı sabun kullanılmıştır. Plastik deney tüpüne 0.05 mL kadar sıvı sabun alınarak üzerine ayrı tüpler içerisinde 10.0 mL'ye tamamlanacak şekilde deiyonize su ile hazırlanmıştır.

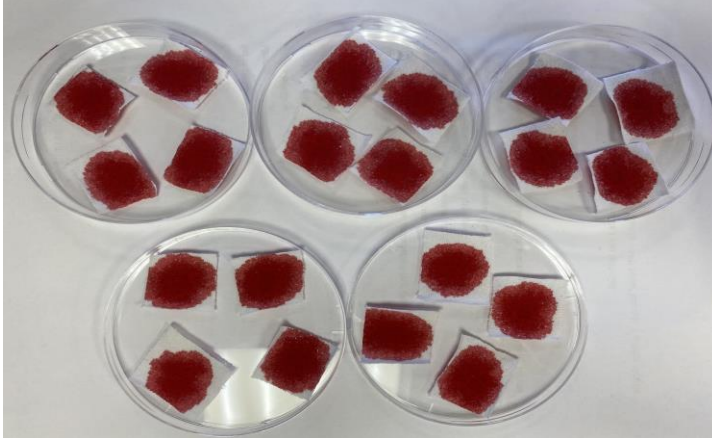
Deterjan Çözeltisi: Plastik deney tüpüne 0.05 mL kadar deterjan alınarak üzerine ayrı tüpler içerisinde 10.0 mL'ye tamamlanacak şekilde deiyonize su ile hazırlanmıştır.

Sodyum hipoklorit Çözeltisi: Sodyum hipoklorit (% 5.0) (NaClO) içeren çözücünden 0.05 mL alınarak tüplere ilave edilip 10.0 mL'ye deiyonize suyla tamamlanmıştır.

3.3. Örneklerin Hazırlanması

%100 pamuktan yapılmış beyaz kumaş, 4x4 cm eşit boyutlarında kesilmiş ve temiz bir petri kabının içerisinde yüzeyleri düz olacak şekilde yerleştirildikten sonra, her kumaş parçasının üzerine 100.0 µL kan damlatılmıştır. Kan damlatılan kumaş örnekleri, oda sıcaklığında 3 saat kadar süre ile kurumaya bırakılmıştır (Resim 3.1).

Tam kuruma gerçekleşikten sonra, her bir örnekte, eşit miktarda kan damlatılmış bölge olması için örnekler 2x1 cm boyuta küçültülmüştür.



Resim 3. 1. Kan damlatılmış 4x4 cm boyutunda kumaş örnekleri

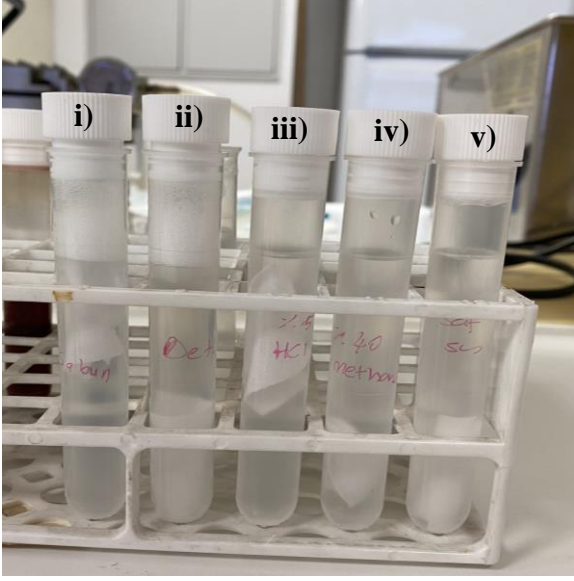
3.4. Örnek Yıkama İşlemleri

2x1 cm boyutunda kontrol ve test grubu örnekler kuruma işleminden sonra örnekler, deneyin amacına göre aşağıdaki işlemlere tabi tutulmuştur.

3.4.1. Kontrol Grubu Örneklerin Hazırlanması

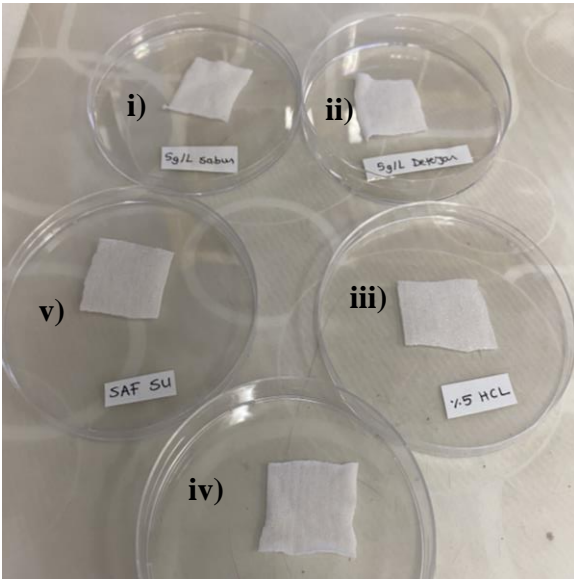
Kontrol grubu örnekleri hazırlamak amacıyla 4x4 cm eşit boyutlarda 10 adet boş kumaş parçası alınmıştır. Kumaş parçalarının içine atılacağı 10 adet tüp hazırlanmıştır. Her bir grup için 2'şer tüp kullanılmış ve her birine 10.0 mL çözelti ilave edilmiştir. Kontrol grubu örnekleri için i) saf su, ii) %5.0'lik hidroklorik asit (HCl) çözeltisi, iii) %40.0 metanol (CH₃OH) çözeltisi, iv) %0.5'lik sabun çözeltisi, v) %0.5'lik deterjan çözeltisi ve vi) %0.5'lik sodyum hipoklorit (NaClO) çözeltisi, içerisine temiz kumaş parçaları atılmıştır.

Çözelti içerisindeki temiz kumaş parçalarının içerisinde bulunduğu plastik deney tüplerinin kapağı kapatılarak 40 saniye kadar vortex tüp karıştırıcısı ile karıştırılmıştır. Karıştırılma işleminden sonra kumaş parçaları, önceden belirtilen ve hazırlanan çözeltiler içerisinde 1 saat süreyle bekletilmiştir (Resim 3.2).



Resim 3. 2. Kontrol grubu örneklerin hazırlanması. Kullanılan çözeltiler soldan sağa:
i) sabun çözeltisi, ii) deterjan çözeltisi, iii) HCl çözeltisi, iv) metanol çözeltisi, v) saf su.

Bu sürenin sonunda kumaş parçaları, kapağı kapalı deney tüplerinden cımbız yardımı ile çıkartılıp petri kaplarına üst yüzeyleri düz olacak şekilde yerleştirilerek 25 °C'de etüv içerisinde 40 dakika kadar kurutulmuştur (Resim 3.3).



Resim 3. 3. Etüve konulan kontrol grubu numuneler. i) sabun çözeltisi, ii) deterjan çözeltisi, iii) HCl çözeltisi, iv) metanol çözeltisi, v) saf su.

3.4.2. Test Grubu Örneklerin Hazırlanması

Test grubu örnekleri hazırlamak amacıyla üzerine kan damlatılmış ve kurutulmuş olan 4x4 cm'lik kumaş parçaları, üzerinde kan lekesi barındıracak şekilde 2x1 cm boyutu olacak şekilde küçültülmüştür. Kontrol grubu kumaş parçalarının yıkanması için kullanılan temizleyici çözeltiler aynı miktarda olacak şekilde, test grubu örneklerin yıkanması için de hazırlanmıştır. Deneyler süresince, temiz çözücünün ve farklı sıcaklıklardaki saf su ile hazırlanan çözümlerin kan lekesini çıkarmasındaki etkisi üzerine odaklanılmıştır.

Hazırlanan test grupları, temiz çözelti içermesine ve farklı sıcaklıklardaki saf su kullanılmasına göre 5 gruba ayrılmıştır. Grup 1 ve Grup 2 örnekleri sırasıyla önceden kullanılmış ve yeni hazırlanmış çözeltilerin kan lekesinin temizlenmesindeki etkisini gözlemlemek için hazırlanmıştır. Grup1 ve Grup 2 için 20°C'deki saf su kullanılmıştır.

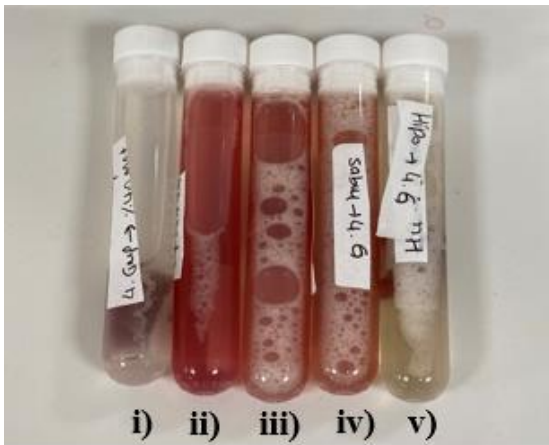
Sıcaklığın kan lekesinin temizlenmesi üzerindeki etkisini gözlemlemek amacıyla Grup3, Grup4 ve Grup5 numuneleri sırasıyla 60 °C, 30 °C ve 20 °C'deki saf su kullanılarak hazırlanmıştır.

Temiz çözücünün etkisini görmek amacıyla, i) saf su, ii) %5.0'lik hidroklorik asit (HCl) çözeltisi, iii) %40.0 metanol (CH₃OH) çözeltisi, iv) %0.5'lik sabun çözeltisi, v) %0.5'lik deterjan çözeltisi ve vi) %0.5'lik sodyum hipoklorit (NaClO) çözeltilerinin herbirinden Grup1 için 2'şer adet, Grup2 için 4'er adet olmak üzere toplam 36 adet çözelti hazırlanmıştır. Grup1 için 12 adet kan lekeli örnek, belirtilmiş olan çözeltiler içerisine atıldıktan sonra çözeltinin leke yüzeyine daha derin nüfuz etmesi için 40 saniye kadar vorteks ile karıştırılmıştır. Kumaşın tüm yüzeylerine çözelti dağılımı sağlandıktan sonra, kumaşlar ilgili çözelti içerisinde 1 saat kadar bekletilmiştir. Sürenin sonunda, kumaşlar tüplerden cımbız yardımı ile çıkarılarak el ile çitilenmiştir. Çitilenen kumaşlar, alındıkları çözelti içerisinde geri konularak 1 saat kadar daha bekletilmiştir. Her bir kumaş parçası cımbız yardımı ile petri kabına kuruması için bırakılmıştır. Benzer şekilde Grup2 için hazırlanan ikişer adet çözelti içerisine birer adet kan lekeli kumaş konulmuştur. İçinde kan lekeli kumaş bulunan tüpler vorteks yardımı ile 40 saniye süreyle

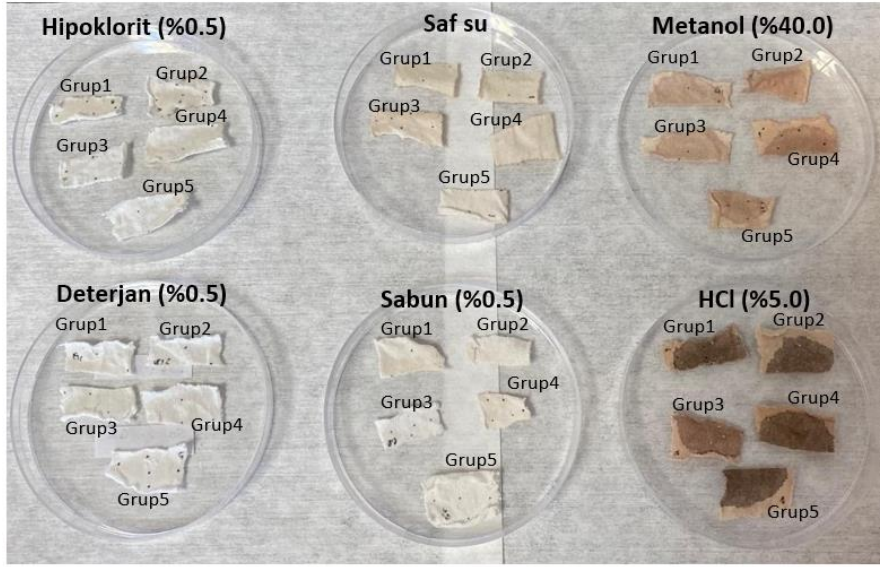
kariştirilmiştir. Grup2'ye ait tüm numuneler, içinde buldukları çözelti içerisinde 1 saat süre için bekletilmiştir. Srenin sonunda cımbız yardımı ile alınan kumaşlar elde itilenecek Grup2 için hazırlanan ve kullanılmamış olan çözeltilere konulmuştur. 1 saat sürenin sonunda tüm kumaş örnekleri cımbız yardımıyla petri kabına konularak kurumaya bırakılmıştır.

Sıcaklığın, kan lekesinin çıkması üzerindeki etkisini görmek üzere, i) saf su, ii) %5.0'lik hidrolorik asit (HCl) zeltisi, iii) %40.0 metanol (CH₃OH) zeltisi, iv) %0.5'lik sabun çözeltisi, v) %0.5'lik deterjan çözeltisi ve vi) %0.5'lik sodyum hipoklorit (NaClO) zeltilerinin herbirinden Grup3, Grup4 ve Grup5 için 2'şer adet olmak üzere olmak üzere toplam 36 adet çözelti hazırlanmıştır. Her grup için 12 adet kan lekeli kumaş çözeltilerin içine konularak 40 saniye süresince vorteks ile kariştirilmiştir. Kariştirme işleminden sonra kumaş parçaları çözeltiler içerisinde 1 saat kadar bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda, kumaşlar cımbız yardımı ile tüplerden çıkarılarak el ile itilenmiştir. itiileme sonrasında kumaş parçaları, içinden çıkarıldıkları çözücülere yeniden konularak 1 saat bekletilmiştir (Resim 3.4). Bekleme süresi bittikten sonra kumaşlar cımbız yardımı ile tüplerin içerisinden alınarak petri kaplarında kurumaya bırakılmıştır.

Bir grup örnek çözeltinin itileme süresi sonrasında 1 saatlik bekleme süresi Resim 3.4'te, kumaş numunelerinin petri kaplar içinde kurutulması isae Resim 3.5'te verilmiştir.



Resim 3. 4. Bir grup örnek çözeltinin itileme işlemi sonrası 1 saatlik bekleme süresi
Yatık olan tüpler soldan sağa: i) metanol çözeltisi, ii) saf su, iii) deterjan çözeltisi, iv) hipoklorit zeltisi.



Resim 3. 5. Kurutulan Test Numuneleri.

3.5. Cihazlar ve Gereçler

Raman Spektroskopisi (DeltaNu ExamineR Inc. Laramie, WY, ABD & Qimaging MicroPublisher-RTV-5.0, Kanada): Raman spektroskopu, NIR 785 nm dalga boyuna ve 120 mW gücünde uyarıcı lazer kaynağına sahiptir. Lazerin spot alanı 30 μm büyüklüğündedir. CCD kamera dizisi detektöre sahiptir. Çözünürlüğü yaklaşık olarak 5 cm^{-1} olarak belirtilmiştir. Kan lekesi içeren kumaş parçalarının karakterizasyonu için kullanılmıştır. İlgili bölge üzerine 20, 30 ve 60 saniye kadar lazer uygulanarak veri toplanmıştır.

Işık Mikroskobu (Olympus BX51, Japonya): Raman spektroskopisi ile odaklama ve örnek üzerinde ölçüm lokasyonunu belirlemek için kullanılmıştır. Sahip olduğu hareketli ve lamel konulmaya uygun örnek tablası ile birlikte, örneğin farklı yerlerinden ölçüm alınmıştır.

USB Mikroskop (China): Kan lekeli ve kan lekesiz kumaş örneklerinin yüzeylerini 1000x magnifikasyon ile detaylı bir şekilde görüntülemek için kullanılmıştır.

Çalkalayıcı (NBIOTEK Co. Ltd., Gyeonnggi-do, Güney Kore): Kan lekeli kumaşların, temizlenmesi için ilgili çözücüde bekletilmesi sırasında, lekeyi çıkarma etkinliğini mekanik olarak arttırmak amacıyla kullanılmıştır.

Vortex Karıştırıcı (FIRLABO. Sa, Lyon, Fransa): Kumaş lekelerinin çözücü sıvıya ilk konulduğu zaman, sıvı ile kumaşın daha homojen olarak karışmasını sağlamak için kullanılmıştır.

Etüv (Nüve Sanayi Malzemeleri İmalat ve Tic A.Ş., Akyurt, Ankara): Kan içermeyen kontrol numunelerinin 25 °C’de yaklaşık 40 dakika boyunca kurutulmuştur.

Hassas Terazı (Shimadzu Inc., Kyoto, Japonya): Sabun, deterjan ve hipoklorit kimyasalların deney tüpleri içerisindeki tartımını yapmak amacıyla kullanılmıştır.

Deiyonize Su Cihazı (Milipore Simplicity 185, Merck, Darmstadt, Almanya): Deiyonize su, tüm çözünen kimyasal malzemeler için çözücü olarak kullanılmıştır.

Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı (AM4, VELP, Scientifica, Ustame Velate, İtalya): Farklı sıcaklıkta suların bulunduğu gruplar için deiyonize suyun ısıtılması için kullanılmıştır.

Plastik Deney Tüpü, Mikropipet (10-100 µm, 100-1000 µm) (LP ITALIANA SPA, İtalya), petri kabı (Fırat Plastik, Ankara), lamel ve metal cımbız.

Bu tez çalışmasında, kan lekeli %100 pamuk kumaş numunelerinin belirli çözücüler ile mekanik yıkanması sonucunda kanıt niteliğinin devamlılığı için Raman spektroskopisi ile kan tayini yapılmıştır.

Kan tayininin doğruluğunu karşılaştırabilmek adına kontrol grupları hazırlanmıştır. Kontrol grubu numunelerini, çözücü sıvılarla yıkanan kan lekesiz kumaşlar, kan lekesiz kumaş ve üzerine kan damlatılıp oda sıcaklığında kurutulmuş olan kumaş oluşturmaktadır. Test grubu numuneler ise, kurumuş kan lekeli numunelerin aynı miktardaki farklı çözeltiler ile mekanik yıkamaya tabii tutulmasıyla hazırlanmıştır. Hazırlanan numuneler oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.

Kontrol ve test grubu numunelerin, Raman spektroskopisi ile karakterizasyonu yapılmıştır. Özellikle test numunelerinin karakterizasyonunda, kan lekesinin hiçbir işleme tabii tutulmamış halinin spektrumu ve üzerinde kan lekesi bulunmamış kumaşın spektrumu referans olarak alınmıştır. Tüm test ve kontrol gruplarındaki Raman spektrumları MATLAB üzerinden çizdirilmiştir.

Spektrum ölçümlerinin yanı sıra, kemometrik analiz ile kan spektrumunun farklı çözücülerle yıkanmış olan kumaş ile benzerlik durumu ile farklı çözücülerin birbirinden ayrılması sağlanmıştır. PLS-DA metodu ile yapılan ayırım, belli bir sınıflandırmaya dayanarak yapılması planlanmıştır. PLS-DA ayırımı, MATLAB üzerinden PLS_Toolbox kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.6. Spektral Analizler

Spektral analizler için 785 nm Raman spektroskopisi kullanılmıştır (Resim 3.6). Her bir örnek kurutulduktan sonra spektral analizler gerçekleştirilmiştir. Test ve kontrol grubu numunelerin her birinin kan lekesi içeren farklı bölgelerinden 20,30 ve 60 saniye lazer yakalama süresi ile ölçümler alınmıştır.

Kumaş yapısı gereği ipliklerden oluşmaktadır. Ölçüm sırasında ilgili örnek yüzeyi seçilerek mikroskop ile odaklanmıştır. Sonrasında örneğin üzerine lazer uygulanarak Raman spektrumu oluşturulmuştur. Alınan ölçümler sırasında 10x objektif kullanılarak ölçümlerin nispeten daha hızlı kaydedilmesi sağlanmıştır. Ayrıca bu lens değeri ile ip yüzeyi daha rahat gözlemlenebilmektedir.

Ölçümler sırasında, kumaşın sahip olduğu aralıklı dokudan kaynaklı olarak kumaşın konulduğu lamelin üzerinde TLC filmi konuşmuştur. Böylece camdan gelen ışımının ölçümü etkileme olasılığı azaltılmıştır.



Resim 3. 6. Raman spektrometresi.

3.7. Kemometrik Analizler

Raman spektrumunda iki değişken söz konusudur; intensite ve dalga sayısı. Özellikle biyolojik numunelerde yapılan Raman spektroskopi ölçümlerinde düşük intensite değerleri görülebilmektedir. Bu durum, asıl numune ile alttaşın intensiteleri göz önünde bulundurulurken tam olarak ayırt edilememesine neden olabilir. Özellikle, aynı alttaşın ve numunenin üzerine farklı çözücüler uygulandığında beklenen dalga sayılarında ve intensitelerde istenilen değerleri görmek mümkün olmaz.

Kemometrik analiz yöntemleri ile spektrumların, birden fazla numuneye göre birbirinden sınıflandırılmış şekilde ayrımı hassas bir şekilde mümkün kılınabilmektedir. Kemometri için çoğunlukla kullanılan yöntem olan PCA, birden fazla sabite göre sınıflandırmaya dayalı ayırım konusunda güçsüzdür. Bu yüzden, bu tez çalışmasında PLS-DA yöntemi kullanılmıştır. PLS- DA metodu ile kontrol ile test grubu numunelerinin ve test grupları içerisinde ilgili grup numunelerin birbirinden ayrılması sağlanmıştır.

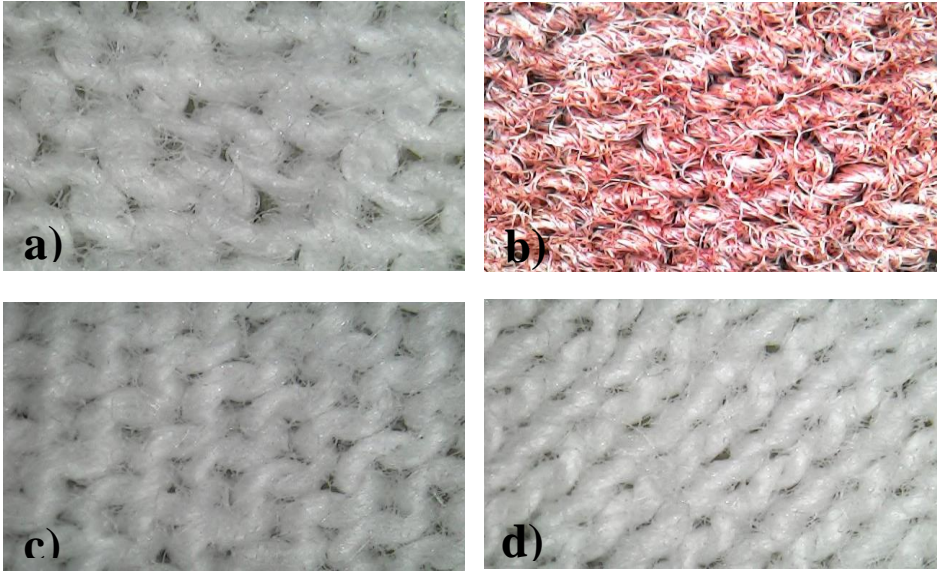
4. DENEYSEL ÇALIŞMALAR VE BULGULAR

4.1. Kontrol Gruplarının Karakterizasyonu

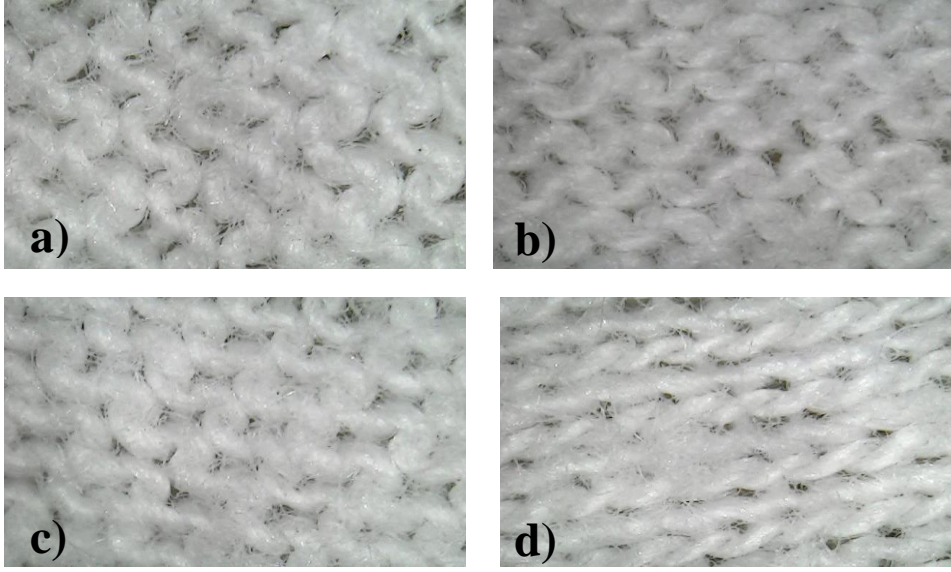
Kontrol gruplarımız; i) sadece çözücülerle yıkanan boş kumaş örnekleri ii) çözücülerle yıkanmamış boş kumaş örnekleri, ii) kan lekeli kumaş örnekleri olarak hazırlanmıştır.

4.1.1. Kontrol Gruplarının Yüzey Analizi

Kontrol gruplarının yüzey analizi için yüksek büyütme ve netleme özelliğine sahip USB mikroskop kullanılmıştır. Kumaş yüzeylerinin görüntüleri Resim 4.1 ve Resim 4.2' de verilmiştir.



Resim 4. 1. Kontrol grubu %100 pamuklu kumaş yüzey analiz fotoğrafları. a) kan lekeli kumaş, b) kan lekeli kumaş, c) saf su ile yıkanmış kumaş, d) %40 metanol çözeltisi ile yıkanmış kumaş,



Resim 4. 2. Kontrol grubu %100 pamuklu kumaş yüzey analizi fotoğrafları.
a) %5.0 HCl çözeltisi ile yıkanmış kumaş, b) %0.5 sabun çözeltisi ile yıkanmış kumaş, c) %0.5 deterjan çözeltisi ile yıkanmış kumaş, d) %0.5 hipoklorit çözeltisi ile yıkanmış kumaş.

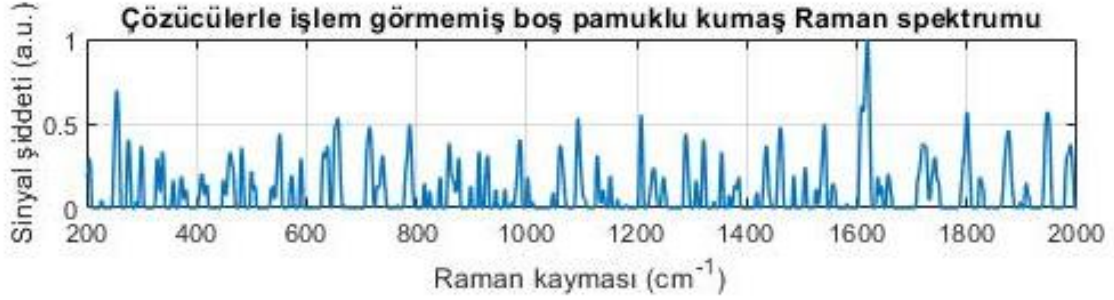
Kumaş yüzeyleri periyodik olarak sıralanmış iplik ve iplikler arası boşluklardan oluşmaktadır. Alınan tüm spektroskopik ölçümlerde, kan lekesinin bulunduğu iplik üzerine belirli sürelerde lazer uygulanmıştır. İpler arasındaki boşluktan kaynaklanabilecek pikleri spektrumdan uzaklaştırmak adına, kumaş yüzeyleri altına ayrıca TLC filmi konulmuştur.

4.1.2. Kontrol Gruplarının Spektral Analizi

4.1.2.1. Çözücülerle Yıkanmış Kontrol Gruplarının Raman Spektroskopisi

Deneyler sırasında kullanılan %100 beyaz pamuklu beyaz kumaş örneklerine ait Raman spektrumu alınırken veri toplama süresi 20 saniye olarak uygulanmıştır. (Şekil 4.1). Alınan tüm boş kumaş kontrol grupları için Raman spektrumları normalize edilerek çizdirilmiştir. Normalizasyon işlemi spektrumdaki yoğunluk ve dalga sayısı değişkenleri ile açıklanan spektrumdaki tüm değerlerin, spektrumdaki maksimum pik değerlerine bölünmesiyle bulunmuştur.

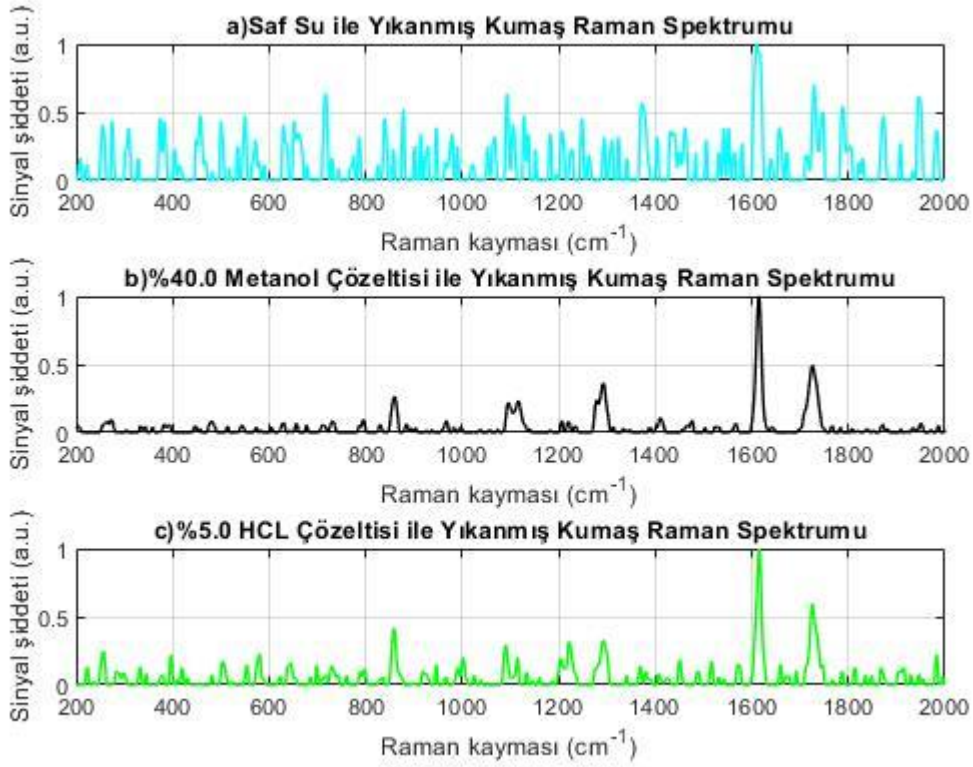
Normalizasyondaki asıl amaç, ölçümleri dalga sayısı değerlerine göre doğrulamaktır. Diğer bir deyişle, yüksek intensite değerine sahip piklerin ortalama değerine göre oranlamasıdır. Böylece, spektrum üzerindeki dalga sayısı değeri bozulmadan intensiteler daha somut bir şekilde değerlendirilir.



Şekil 4. 1. Çözücülerle işlem görülmemiş boş pamuklu kumaş Raman spektrumu.

%100 pamuklu kumaş spektrumunun normalize edilerek ve baseline doğrulaması yapılarak çizdirilmiş hali Şekil 4.1’de verilmiştir. Buna göre 256 cm^{-1} , 373 cm^{-1} , 433 cm^{-1} , 467 cm^{-1} , 492 cm^{-1} , 644 cm^{-1} , 843 cm^{-1} , 865 cm^{-1} , 956 cm^{-1} , 1077 cm^{-1} , 1281 cm^{-1} , 1387 cm^{-1} , 1570 cm^{-1} , 1607 cm^{-1} , 1637 cm^{-1} , 1723 cm^{-1} , 1784 cm^{-1} , 1839 cm^{-1} ve 1882 cm^{-1} değerlerinde bandlar görülmektedir.

Yıkılmış boş kumaşa, çözücülerin spektrumu üzerinde yaptığı değişikliği belirlemek için, temiz kumaş parçaları, hazırlanan çözücüler içinde bekletildikten sonra kurutulmuştur. Yıkılmış kumaş örneklerden alınan ölçümler sırasında veri toplama süresi; %5.0 HCl ve %40.0 metanol çözeltisi için 40 saniye; saf su, %0.5 sabun çözeltisi, %0.5 deterjan çözeltisi ve %0.5 sabun çözeltisi için 20 saniye olarak alınmıştır.

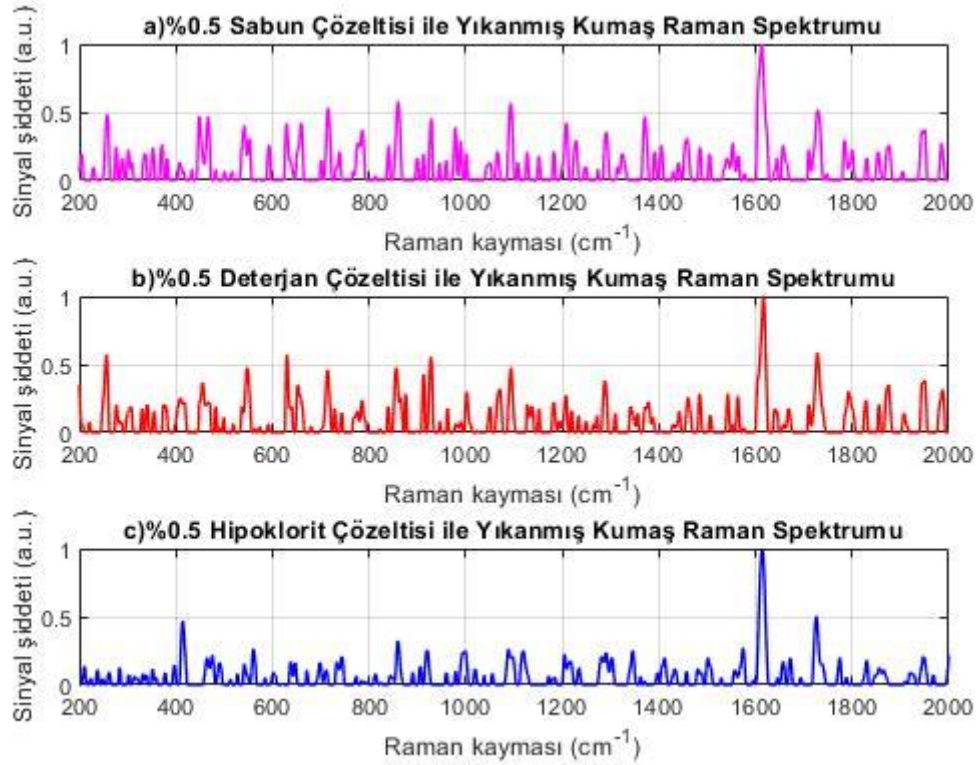


Şekil 4. 2. Üç farklı grup çözücü ile yıkanmış pamuk kumaş örneklerinin Raman spektrumları a)saf su ile, b) Metanol (%40.0) çözeltisi ile, c) HCl (%5.0) çözeltisi ile yıkanmış kumaş örnekleri.

a) Saf su ile yıkanmış pamuk kumaş örnekleri için, kumaş yüzeyi üzerinden alınmış Raman spektrumdaki belirgin band değerleri sırasıyla, 715 cm^{-1} , 1093 cm^{-1} , 1370 cm^{-1} , 1611 cm^{-1} , 1729 cm^{-1} ve 1946 cm^{-1} olarak görülmektedir.

b) Metanol (%40.0) çözeltisi ile yıkanmış pamuk kumaş numunesi için, kumaş yüzeyi üzerinden alınmış Raman spektrumdaki belirgin band değerleri sırasıyla 861 cm^{-1} , 1096 cm^{-1} , 1119 cm^{-1} , 1294 cm^{-1} , 1615 cm^{-1} ve 1726 cm^{-1} olarak sıralanabilir.

c) HCl (%5.0) çözeltisi ile yıkanmış pamuk kumaş numunesi için, kumaş yüzeyi üzerinden alınmış Raman spektrumdaki belirgin band değerleri sırasıyla 858 cm^{-1} , 1090 cm^{-1} , 1222 cm^{-1} , 1290 cm^{-1} , 1615 cm^{-1} , 1725 cm^{-1} ve 1928 cm^{-1} olarak belirlenmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4. 3. Üç grup farklı temizleme maddesi ile yıkanmış pamuk kumaş Raman spektrumları. a) %0.5 sabun çözeltisi ile, b) %0.5 deterjan çözeltisi ile, c) %0.5 hipoklorit çözeltisi ile yıkanmış kumaş örnekleri.

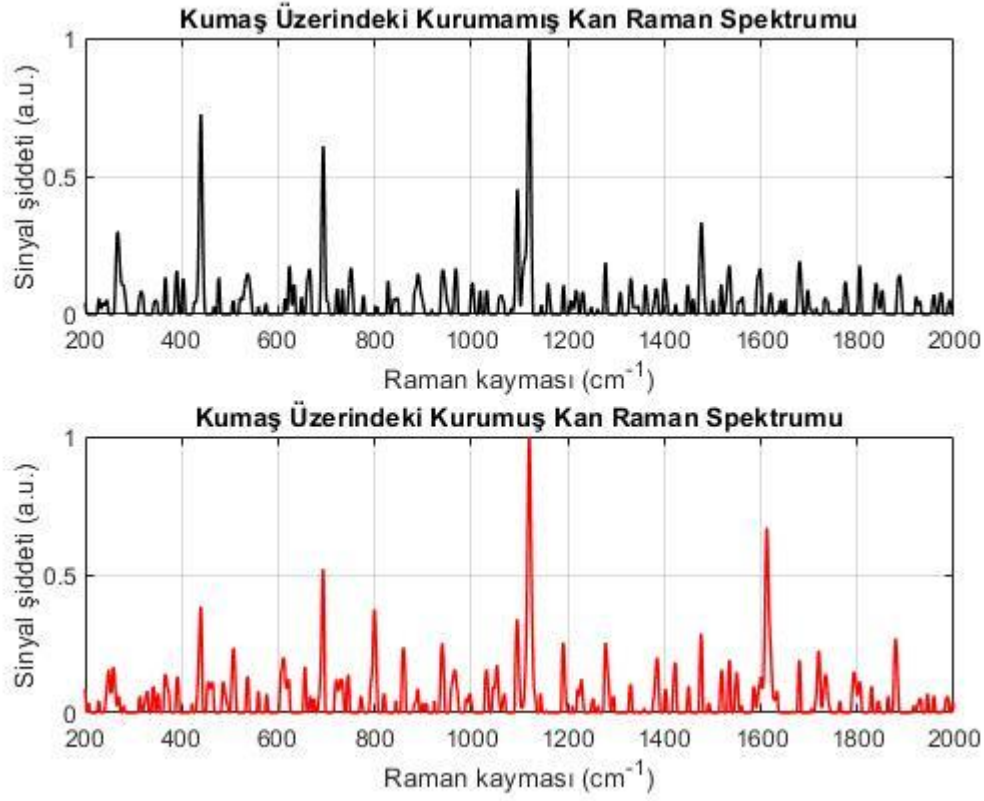
a) Sabun (%0.5) çözeltisi ile yıkanmış pamuk kumaş numunesi için, kumaş yüzeyi üzerinden alınmış Raman spektrumdaki belirgin band değerleri sırasıyla 258 cm^{-1} , 448 cm^{-1} , 714 cm^{-1} , 860 cm^{-1} , 1092 cm^{-1} , 1614 cm^{-1} , 1727 cm^{-1} , 1949 cm^{-1} ve 1987 cm^{-1} olarak saptanmıştır.

b) Deterjan (%0.5) çözeltisi ile yıkanmış pamuk kumaş numunesi için, kumaş yüzeyi üzerinden alınmış Raman spektrumdaki belirgin band değerleri sırasıyla 255 cm^{-1} , 546 cm^{-1} , 631 cm^{-1} , 713 cm^{-1} , 1618 cm^{-1} , 1729 cm^{-1} , 1951 cm^{-1} ve 1985 cm^{-1} olarak belirlenmiştir.

c) Hipoklorit (%0.5) çözeltisi ile yıkanmış pamuk kumaş örnekleri için, kumaş yüzeyi üzerinden alınmış Raman spektrumdaki belirgin band değerleri sırasıyla 414 cm^{-1} , 561 cm^{-1} , 859 cm^{-1} , 1613 cm^{-1} ve 1727 cm^{-1} olarak belirlenmiştir (Şekil 4.3).

4.1.2.2. Kumaş Örnek Üzerindeki Kan Lekesinin Raman Spektroskopisi

Kumaş üzerine damlatılan kan için, taze ve tamamen kurutulmuş durumdaki Raman spektrumları, referans spektrum olarak alınmıştır. Kan örneklerinin referans Raman spektrumları için alınan ölçümlerde taze ve kurumuş kan lekesi için ayarlanan veri toplama süresi 20 saniyedir (Şekil 4.4).

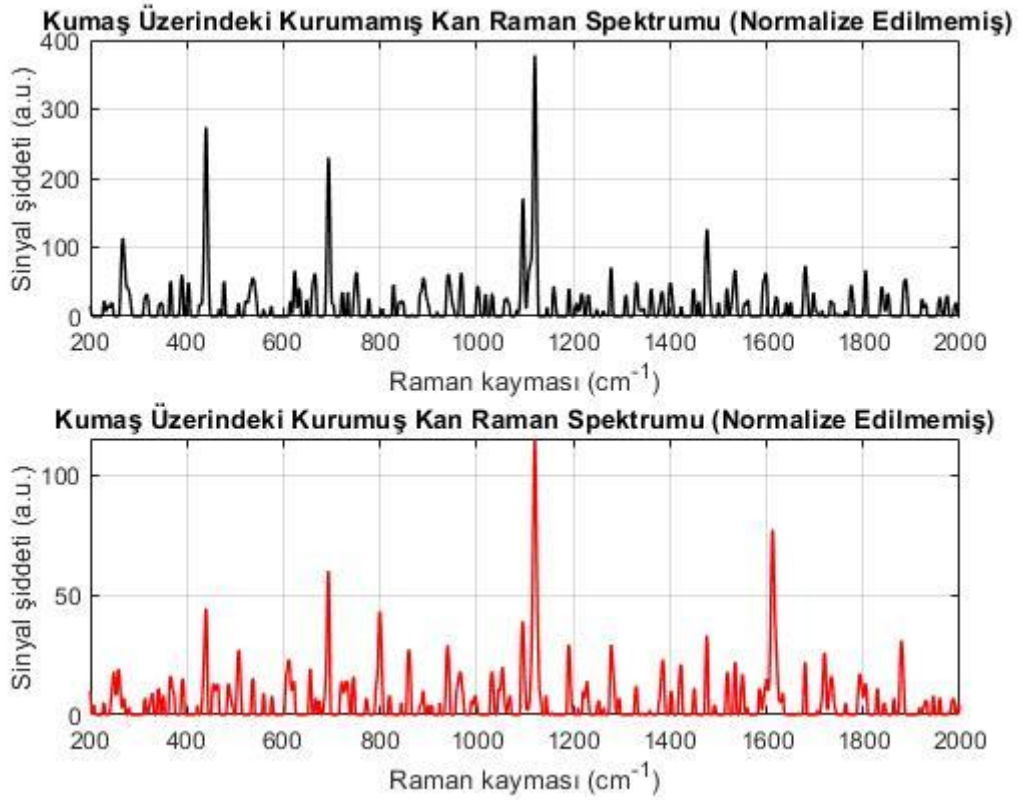


Şekil 4. 4. Kumaş üzerindeki taze ve kurumuş kana ait Raman spektrumları.

Kumaş üzerindeki kurumamış kana ait normalize edilmiş Raman spektrumlarındaki band değerleri sırasıyla 267 cm^{-1} , 440 cm^{-1} , 694 cm^{-1} , 1095 cm^{-1} , 1120 cm^{-1} ve 1478 cm^{-1} olarak görülmektedir. Kumaş üzerindeki kurumuş kan spektrumunda ise sırasıyla 248 cm^{-1} , 258 cm^{-1} , 440 cm^{-1} , 1094 cm^{-1} , 507 cm^{-1} , 655 cm^{-1} , 649 cm^{-1} , 744 cm^{-1} , 800 cm^{-1} , 940 cm^{-1} , 966 cm^{-1} , 999 cm^{-1} , 1095 cm^{-1} , 1120 cm^{-1} , 1190 cm^{-1} , 1251 cm^{-1} , 1450 cm^{-1} , 1478 cm^{-1} , 1535 cm^{-1} , 1449 cm^{-1} , 1478 cm^{-1} ve 1615 cm^{-1} değerlerinde bandlar oluşmuştur.

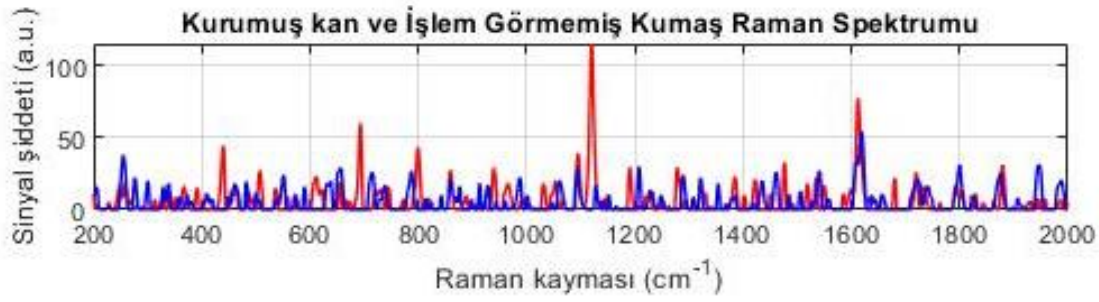
Taze kan ile kuru kan arasında dalga sayısı verilerinde fark bulunmaması kan ölçümünü doğrular niteliktedir. Özellikle, 440 cm^{-1} , 694 cm^{-1} , 1120 cm^{-1} ve 1478 cm^{-1} bandları her iki spektrumda da bulunmaktadır.

Kumaş üzerindeki taze ve kuru kan arasındaki temel fark, taze kanın kuru kana göre daha yüksek intensite vermesidir (Şekil 4.5). Taze kan spektrumundaki sinyal şiddet skalası 0 ile 400 iken kurumuş kan spektrumunda bu skala 0 ile 100 arasındadır.



Şekil 4. 5. Normalize edilmemiş kumaş üzerindeki taze ve kurumuş kana ait Raman spektrumları.

Kan spektrumunun doğru tanınması için kumaş ile arasındaki karakteristik farkın Raman spektroskopisi ile tanımlanması gereklidir. Farklı spektrumlar vermelerinin yanında kurumuş kan lekeli kumaş ile boş kumaş arasında intensite farklı görülmektedir (Şekil 4.6).



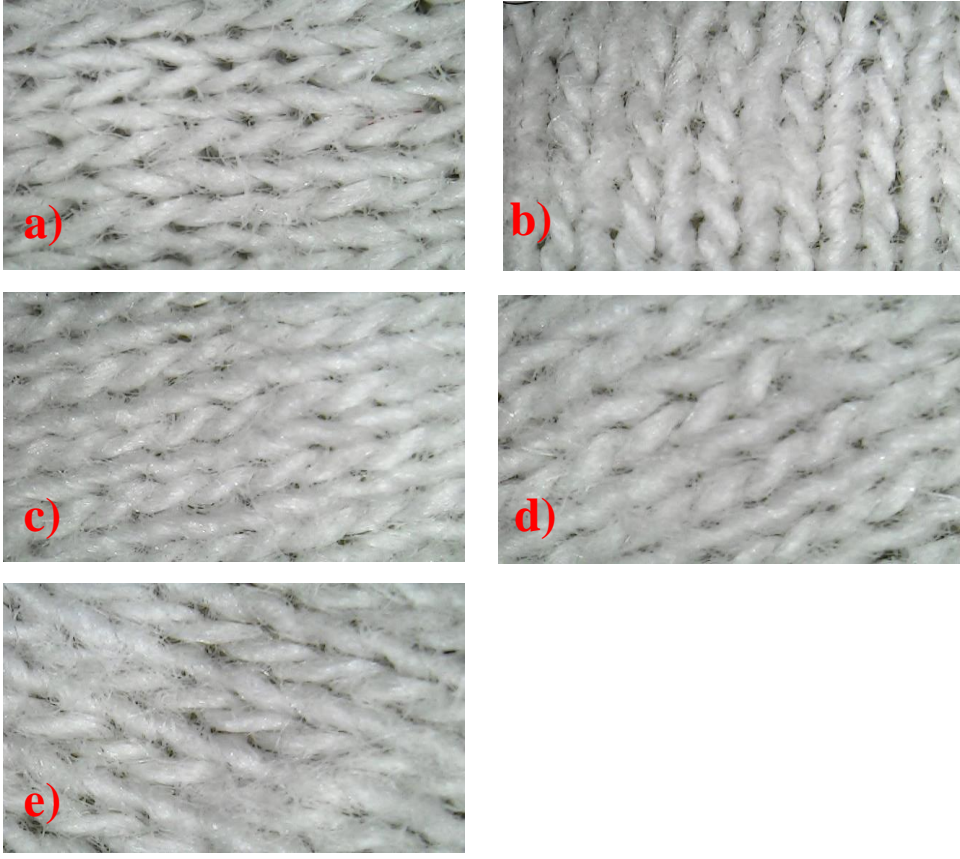
Şekil 4. 6. Normalize edilmemiş kurumuş kan lekeli kumaş ile boş kumaş Raman spektrumları.

4.2. Test Gruplarının Karakterizasyonu

Üzerinde kurumuş kan lekesi olan kumaşlar 5 deney grubu olacak şekilde, saf su, %40.0 metanol çözeltisi, %5.0 HCl çözeltisi, %0.5 sabun çözeltisi, %0.5 deterjan çözeltisi ve %0.5 hipoklorit çözeltisi ile mekanik yıkamaya tabi tutulmuşlardır. Yıkama işlemi sonrası oda sıcaklığında kurutulan kumaş yüzeyleri analiz edilip Raman spektrumları alınmıştır.

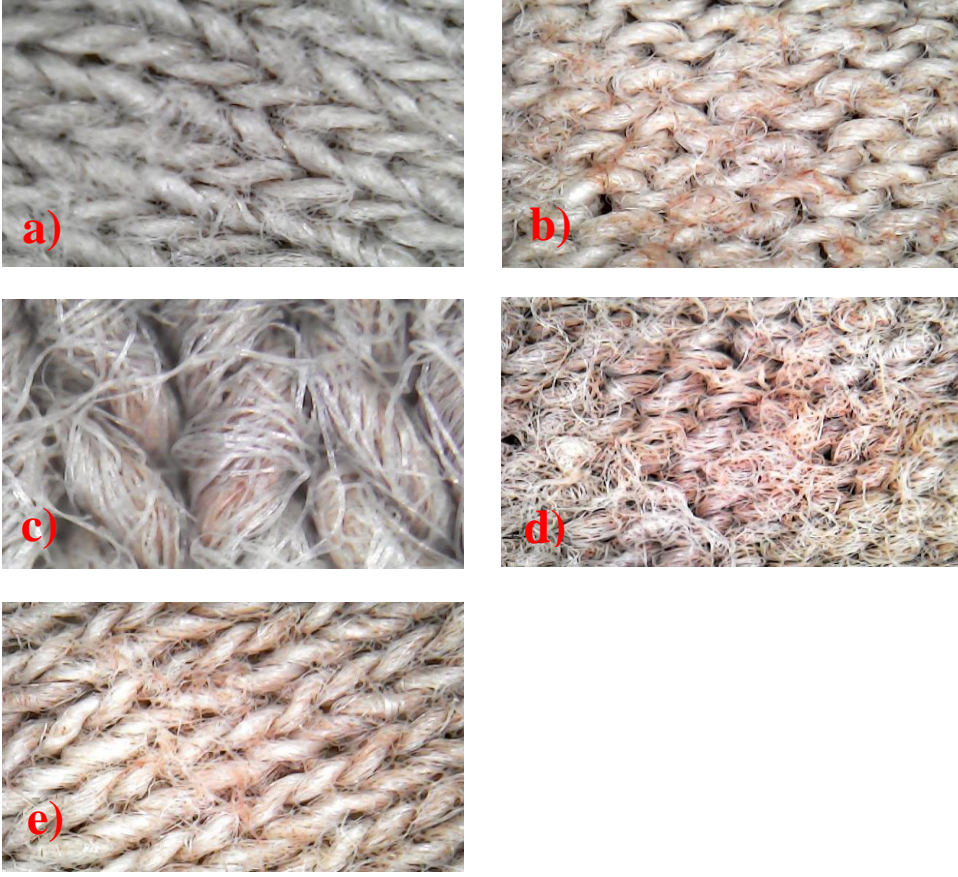
4.2.1. Test Gruplarının Yüzey Analizi

Kontrol gruplarının yüzey analizi için yüksek büyütme ve netleme özelliğine sahip USB mikroskop kullanılmıştır. Kan lekesi uygulanmadan önceki kumaş yüzeyi, kan lekeli kumaş yüzeyi ve çözücülerle yıkanmış kumaş yüzeyleri incelenmiştir.



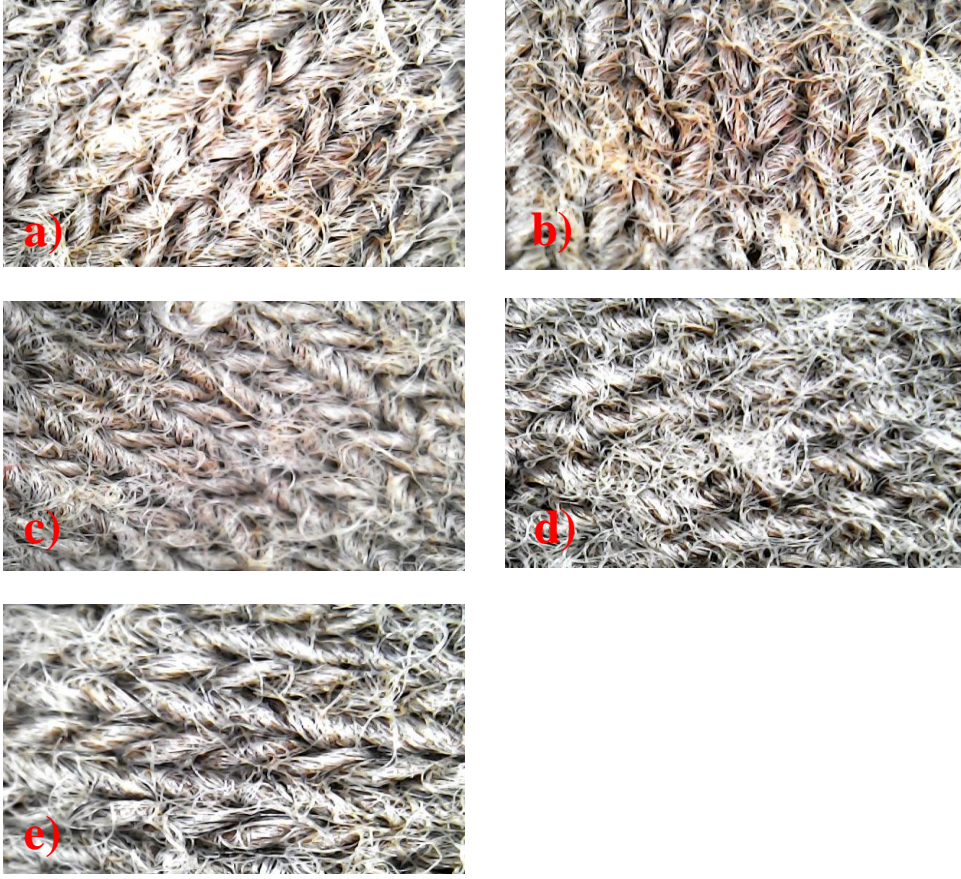
Resim 4. 3. Saf su ile yıkanmış test grubu yüzey analizi. a) Grup 1, b) Grup 2, c) Grup 3, d) Grup 4, e) Grup 5.

Saf su ile yıkanmış test grubu numunelerinde kanın gözele görülür şekilde yüzeyden çıktığı görülmüştür (Resim 4.3).



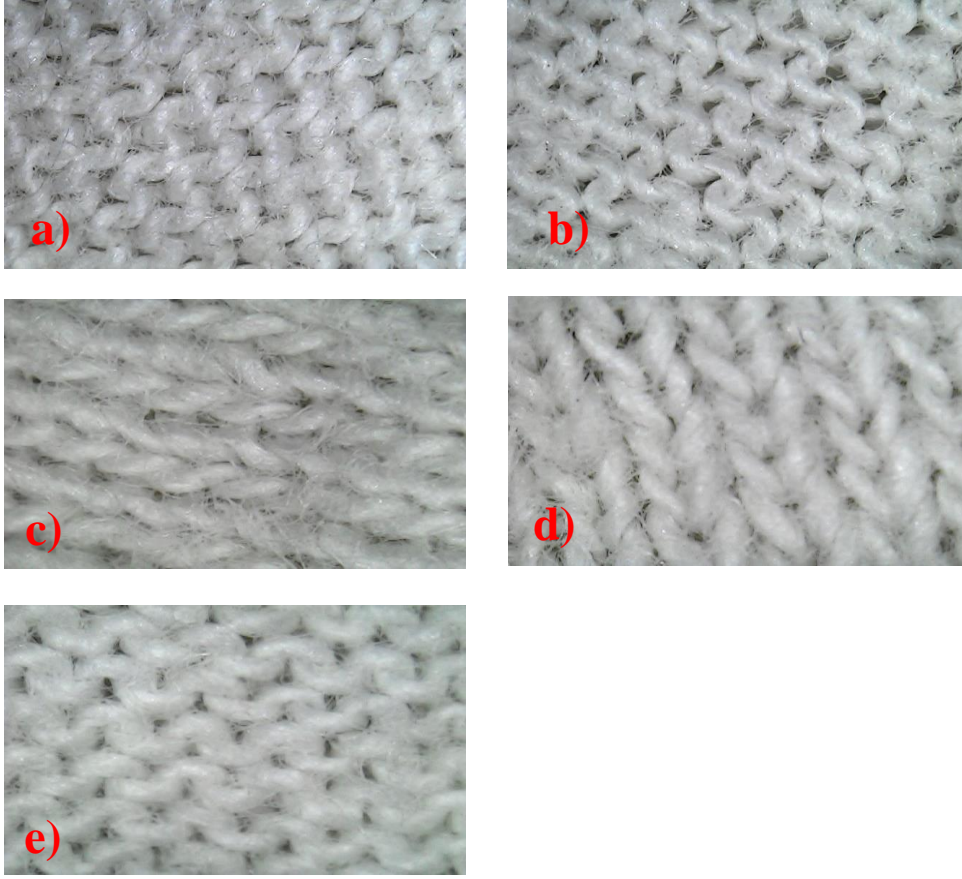
Resim 4. 4. Metanol (%40) çözeltisi ile yıkanmış test grubu yüzey analizi. a) Grup 1, b) Grup 2, c) Grup 3, d) Grup 4, e) Grup 5.

Metanol (%40.0) çözeltisi ile yıkanmış test grubu numuneleri üzerine uygulanmış kan yıkama sonrasında gözle görülebilmektedir (Resim 4.4).



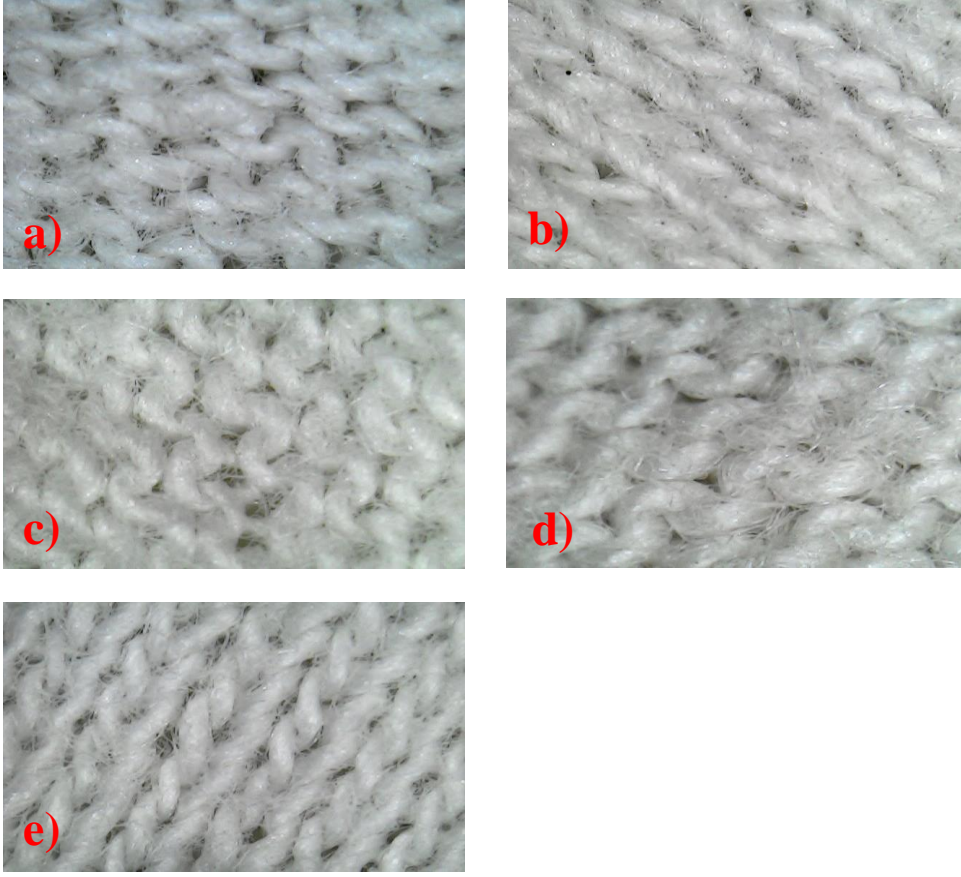
Resim 4. 5. HCl (%5.0) çözeltisi ile yıkanmış test grubu yüzey analizi. a) Grup 1, b) Grup 2, c) Grup 3, d) Grup 4, e) Grup 5.

%5 HCl çözeltisi ile yıkanmış test grubu numuneleri üzerine uygulanmış kan yıkama sonrasında gözle görülebilmektedir (Resim 4.5).



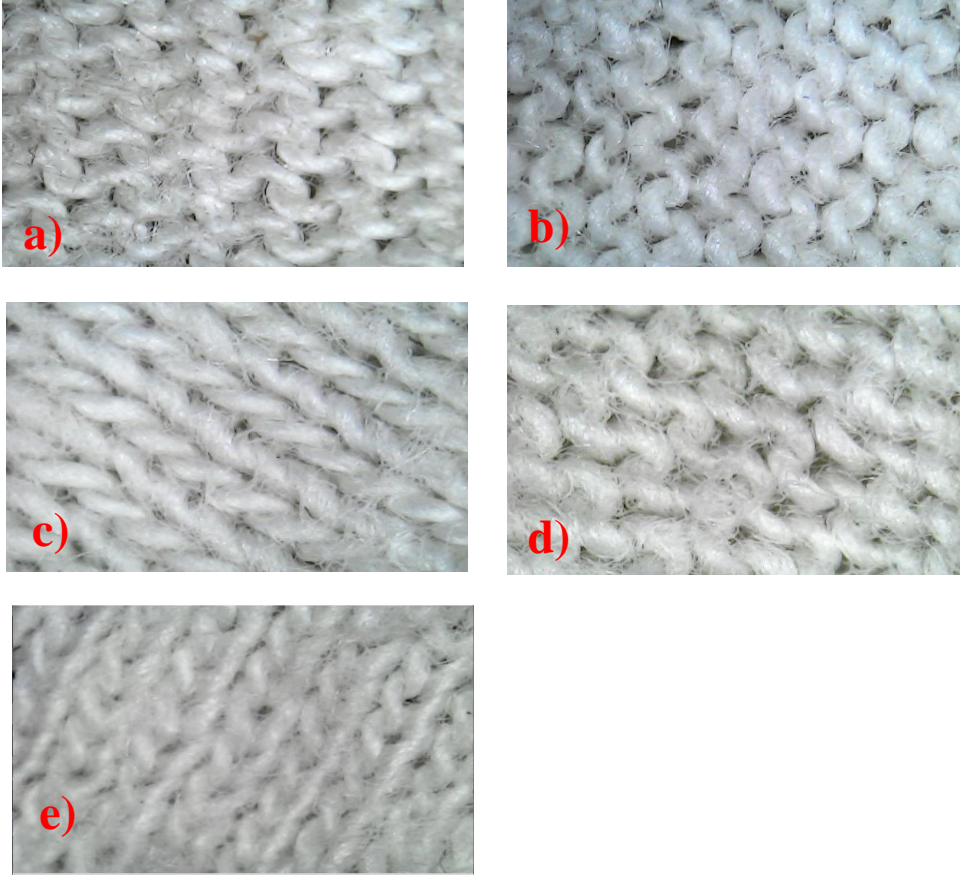
Resim 4. 6. Sabun (%0.5) çözeltilisi ile yıkanmış test grubu yüzey analizi. a) Grup 1, b) Grup 2, c) Grup 3, d) Grup 4, e) Grup 5.

Sabun çözeltilisi ile yıkanmış kan lekeli numunelerde yıkama sonrasında kumaş yüzeyinde gözle görülür bir leke kalmamıştır (Resim 4.6).



Resim 4. 7. Deterjan (%0.5) çözültisi ile yıkanmış test grubu yüzey analizi. a) Grup 1, b) Grup 2, c) Grup 3, d) Grup 4, e) Grup 5.

Deterjan çözültisi ile yıkanmış kan lekeli numunelerde yıkama sonrasında kumaş üzerinde herhangi bir leke görülmemektedir (Resim 4.7).



Resim 4. 8. Hipoklorit (%5.0) çözeltisi ile yıkanmış test grubu yüzey analizi. a) Grup 1, b) Grup 2, c) Grup 3, d) Grup 4, e) Grup 5.

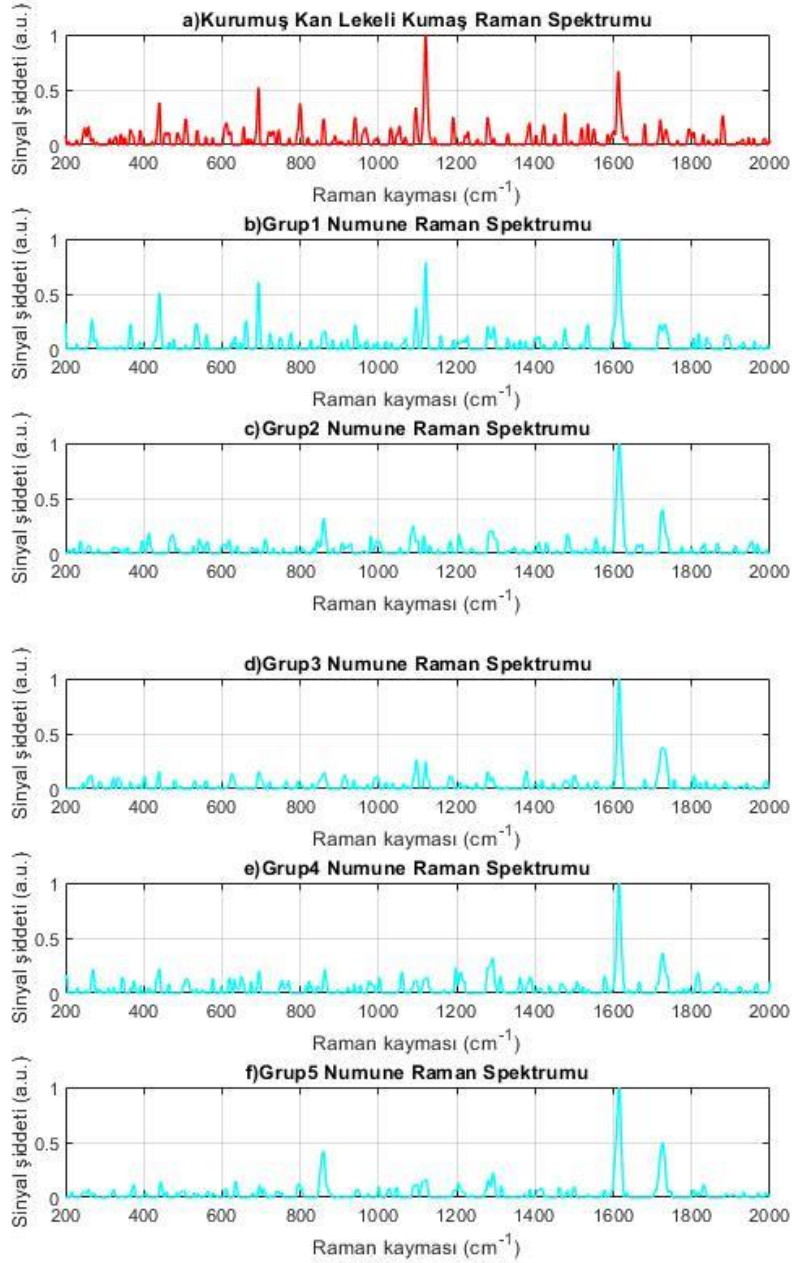
Hipoklorit çözeltisi ile yıkanmış kan lekeli numunelerde kumaş üzerinde herhangi bir kan lekesi kalıntısı görülmemektedir (Resim 4.8).

4.2.2. Test Gruplarının Spektral Analizi

Altı adet temizleyici sıvı için alınan spektrumların hepsinde veri toplama süresi 20'şer saniye olarak alınmıştır.

4.2.2.1. Saf Su ile Yıkanmış Test Numuneleri

Saf su ile yıkanmış test gruplarına ait normalize edilmiş Raman spektrum ölçümlerine ait grafik aşağıdaki gibidir.

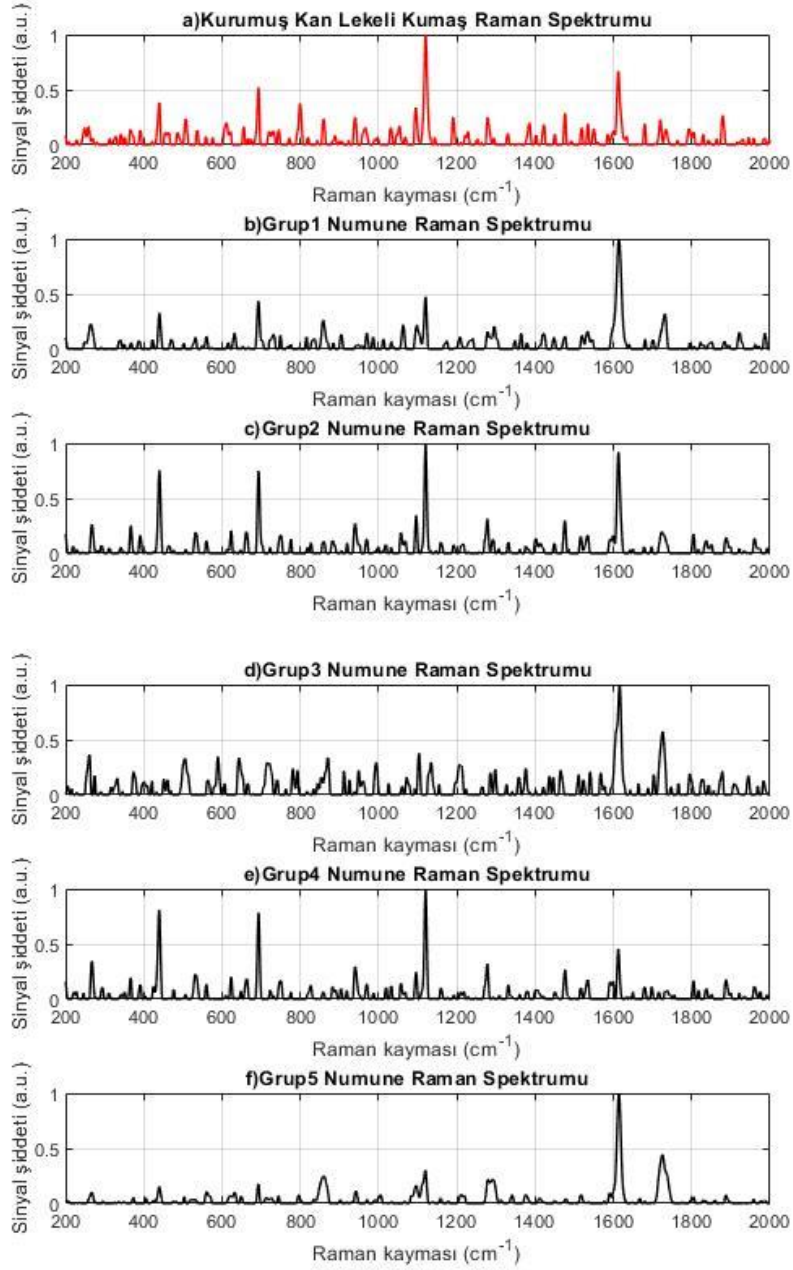


Şekil 4. 7. Kan lekeli ve saf su ile yıkanmış kan lekeli kumaşlara ait Raman spektrumları.

Kırmızı renk ile gösterilen spektrum kurumuş kan lekeli kumaşa ait; saf su ile yıkanmış Grup1, Grup2, Grup3, Grup 4 ve Grup 5 numunelerine ait spektrum ise açık mavi ile çizilmiştir.

4.2.2.2. Metanol (%40.0) Çözeltisi ile Yıkanmış Test Numuneleri

Metanol çözeltisi ile yıkanmış test gruplarına ait normalize edilmiş Raman spektrum ölçümlerine ait grafik aşağıdaki gibidir.

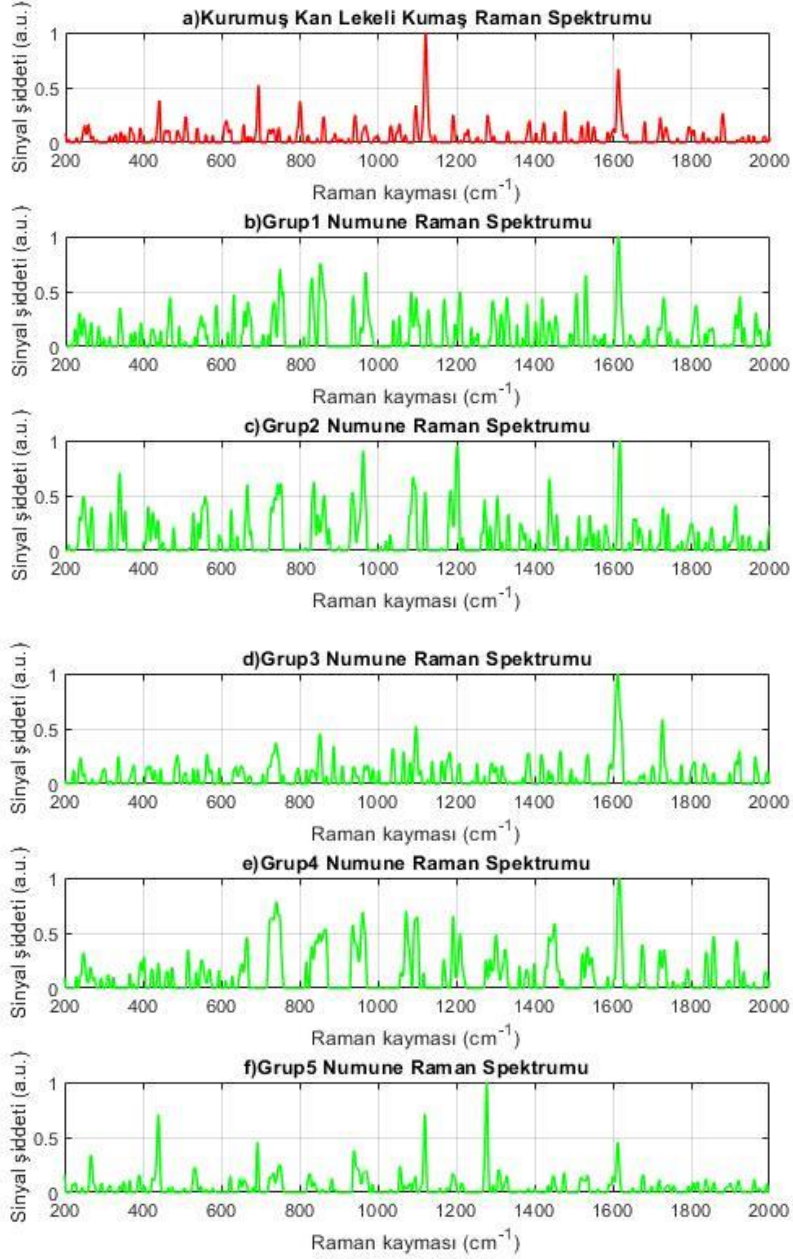


Şekil 4. 8. Kan lekeli ve %40.0 metanol çözeltisi ile yıkanmış kan lekeli kumaşlara ait Raman spektrumları.

Kırmızı renk ile gösterilen spektrum kurumuş kan lekeli kumaşa ait; %40.0 metanol çözeltisi ile yıkanmış Grup1, Grup2, Grup3, Grup 4 ve Grup 5 numunelerine ait spektrum ise siyah ile çizilmiştir.

4.2.2.3. HCl (%5.0) Çözeltisi ile Yıkanmış Test Numuneleri

HCl çözeltisi ile yıkanmış test gruplarına ait normalize edilmiş Raman spektrum ölçümlerine ait grafik aşağıdaki gibidir.

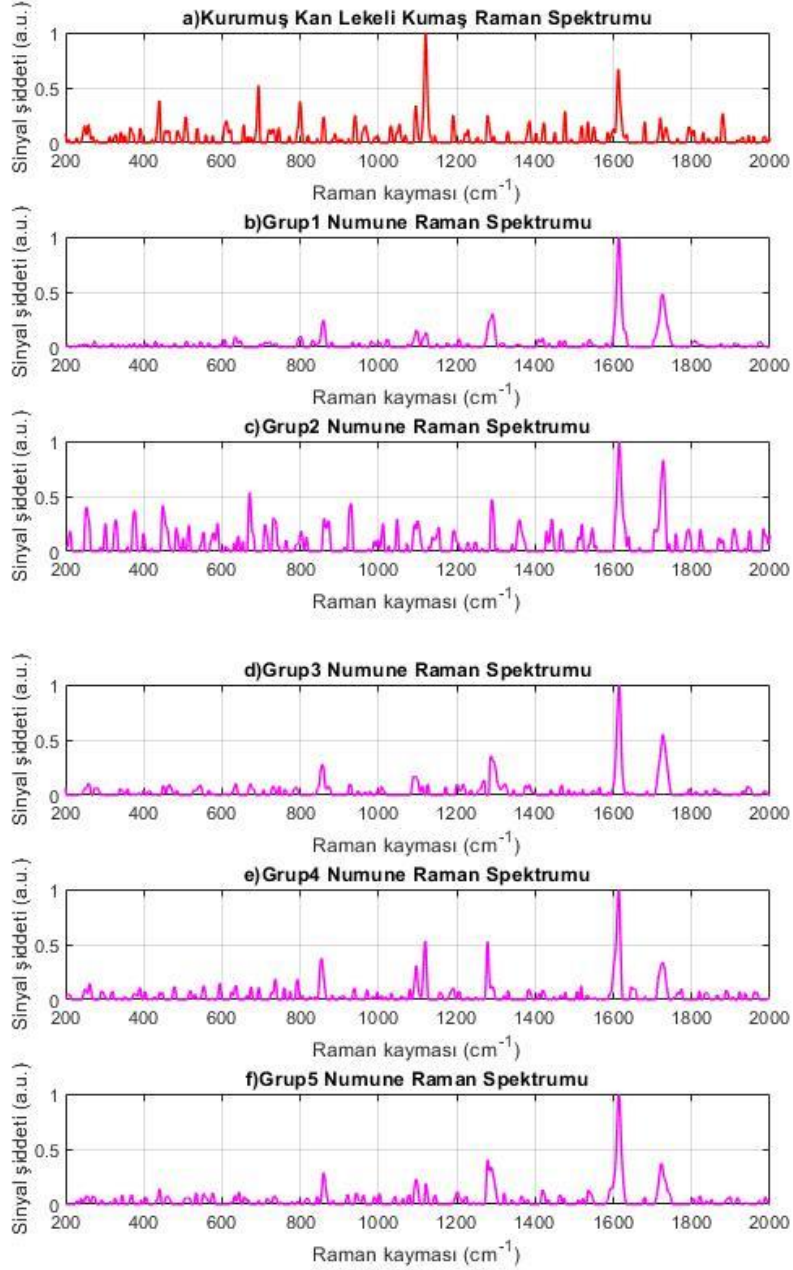


Şekil 4. 9. Kan lekeli ve %5.0 HCl çözeltisi ile yıkanmış kan lekeli kumaşlara ait Raman spektrumları.

Kırmızı renk ile gösterilen spektrum kurumuş kan lekeli kumaşa ait; %5 HCl çözeltisi ile yıkanmış Grup1, Grup2, Grup3, Grup 4 ve Grup 5 numunelerine ait spektrum ise yeşil ile çizilmiştir.

4.2.2.4. Sabun (%0.5) Çözeltisi ile Yıkanmış Test Numuneleri

Sabun çözeltisi ile yıkanmış test gruplarına ait normalize edilmiş Raman spektrum ölçümlerine ait grafik aşağıdaki gibidir.

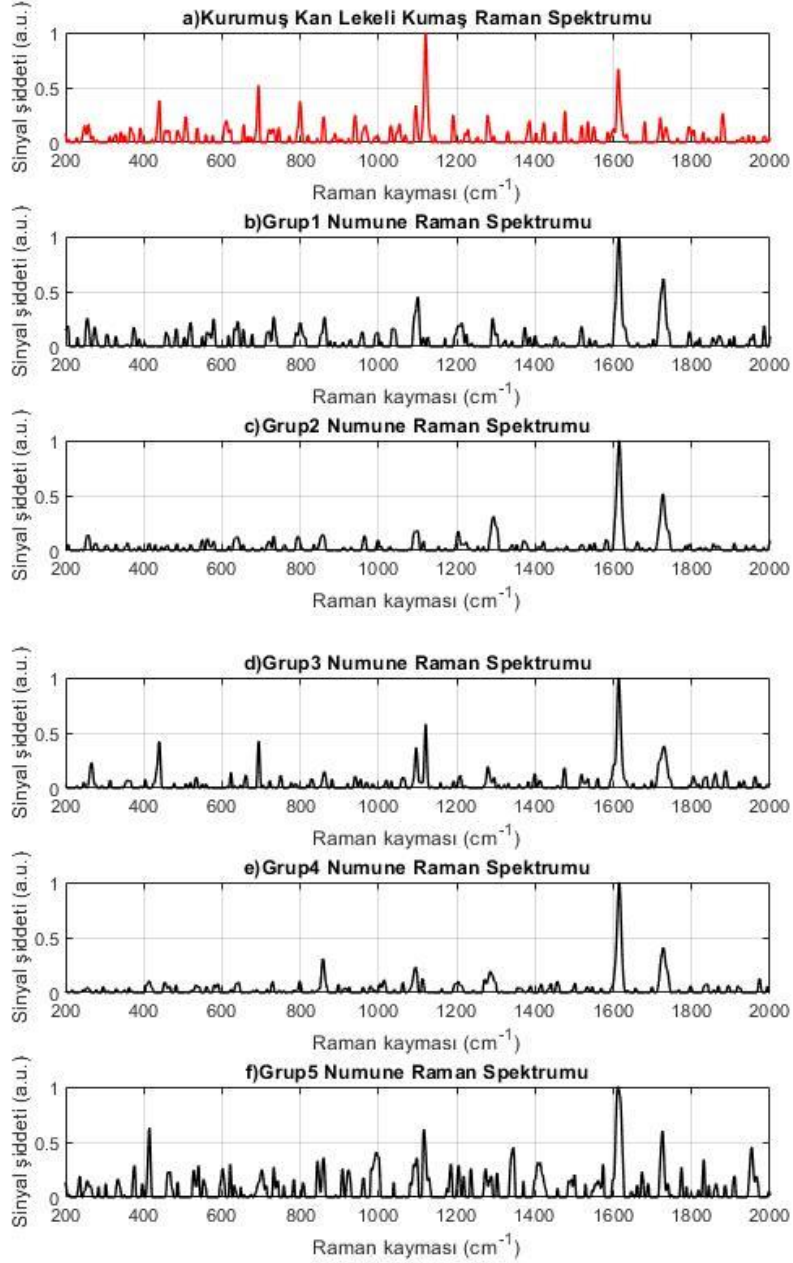


Şekil 4. 10. Kan lekeli ve %0.5'lik sabun çözeltisi ile yıkanmış kan lekeli kumaşlara ait Raman spektrumları.

Kırmızı renk ile gösterilen spektrum kurumuş kan lekeli kumaşa ait; %0.5'lik sabun çözeltisi ile yıkanmış Grup1, Grup2, Grup3, Grup 4 ve Grup 5 numunelerine ait spektrum ise pembe ile çizilmiştir.

4.2.2.5. Deterjan (%0.5) Çözeltilisi ile Yıkanmış Test Numuneleri

Deterjan çözeltisi ile yıkanmış test gruplarına ait normalize edilmiş Raman spektrum ölçümlerine ait grafik aşağıdaki gibidir.

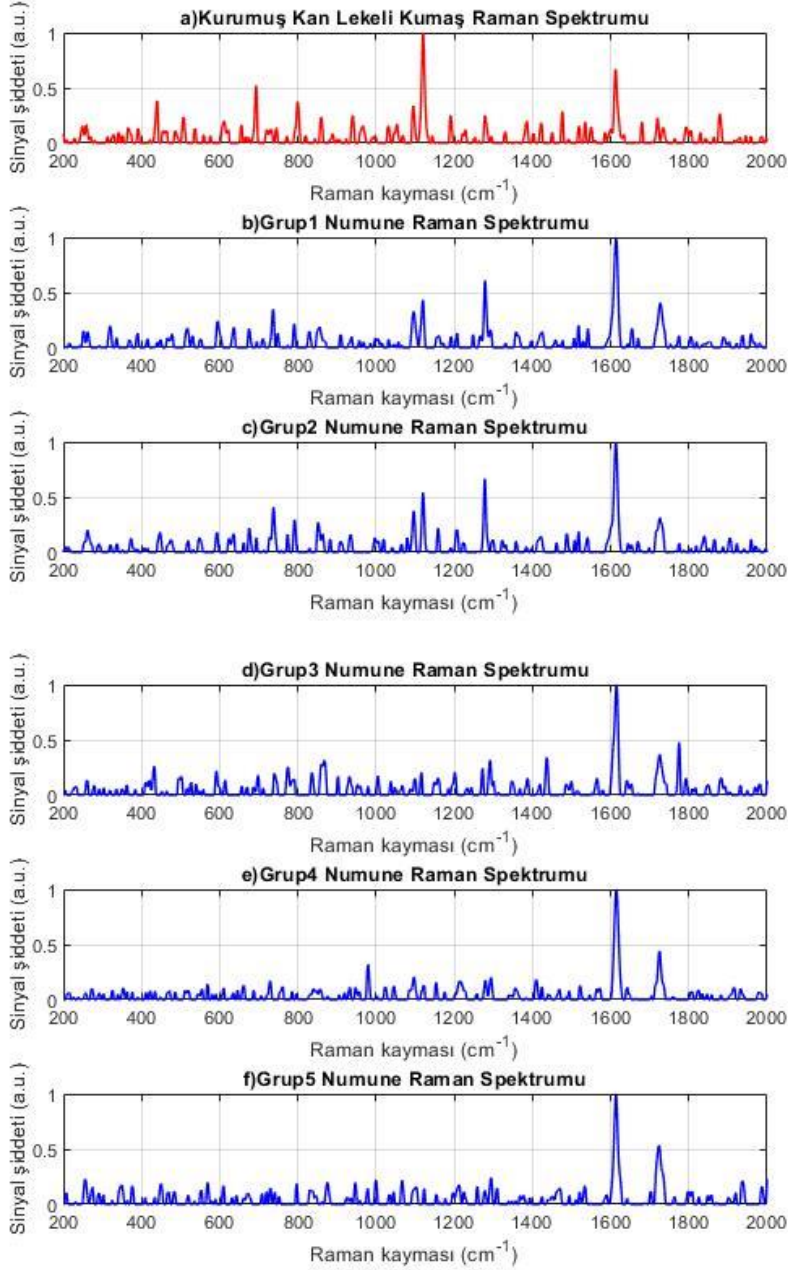


Şekil 4. 11. Kan lekeli ve %0.5'lik deterjan çözeltisi ile yıkanmış kan lekeli kumaşlara ait Raman spektrumları.

Kırmızı renk ile gösterilen spektrum kurumuş kan lekeli kumaşa ait; %0.5'lik deterjan çözeltisi ile yıkanmış Grup1, Grup2, Grup3, Grup 4 ve Grup 5 numunelerine ait spektrum ise siyah ile çizilmiştir.

4.2.2.6. Hipoklorit (%0.5) Çözeltisi ile Yıkanmış Test Numuneleri

Hipoklorit çözeltisi ile yıkanmış test gruplarına ait normalize edilmiş Raman spektrum ölçümlerine ait grafik aşağıdaki gibidir.



Şekil 4. 12. Kan lekeli ve %0.5'lik hipoklorit çözeltisi ile yıkanmış kan lekeli kumaşlara ait Raman spektrumları.

Kırmızı renk ile gösterilen spektrum kurumuş kan lekeli kumaşa ait; %0.5'lik hipoklorit çözeltisi ile yıkanmış Grup1, Grup2, Grup3, Grup 4 ve Grup 5 numunelerine ait spektrum ise lacivert ile çizilmiştir.

4.3. Kemometrik Analizler

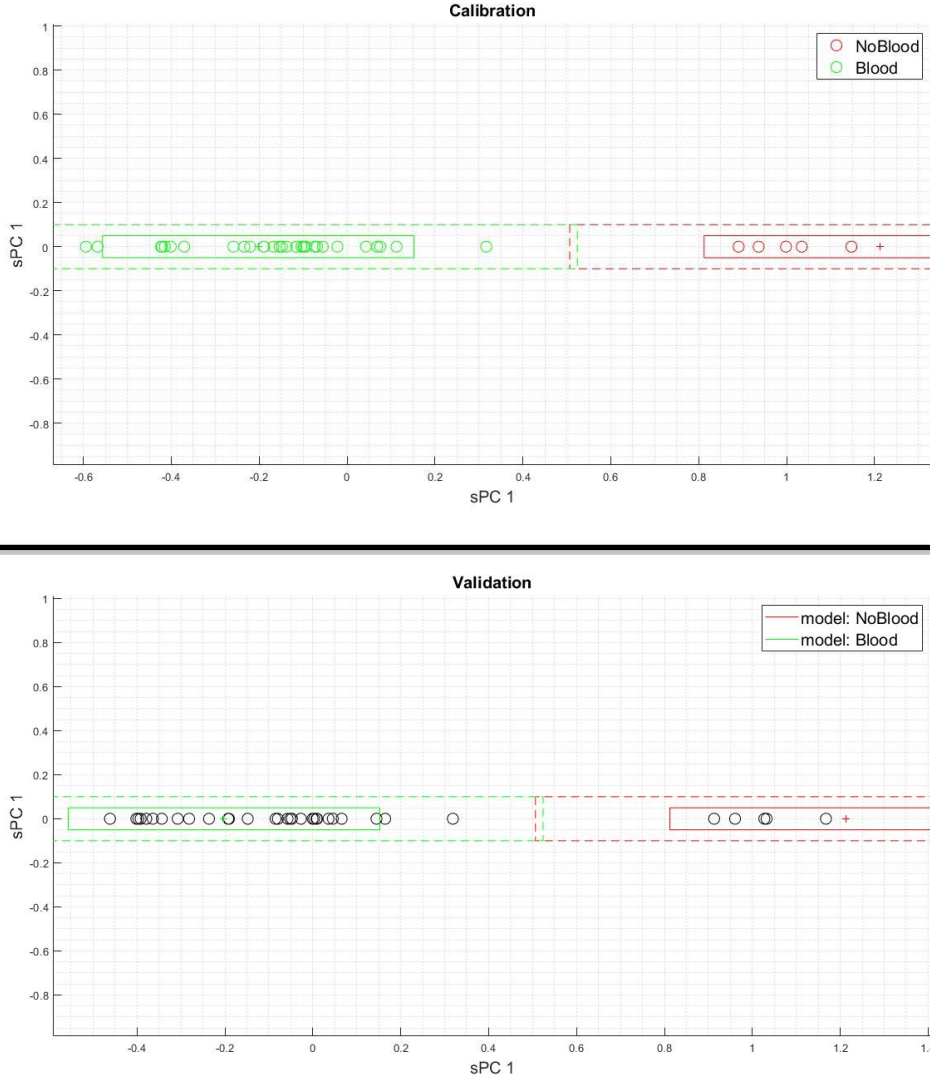
Yapılan çalışma kapsamında kan lekeli kumaşın lekesiz kumaş ile ayırımını sağlayıp adli vakalarda tespit kan lekесinin varlığını ya da yokluğunu tespit edebilecek bir PLS-DA modeli geliştirilmiştir. Önceden hangi sınıfta olduğu etiketlenmiş eğitim veri seti ile model kalibrasyonu yapılmıştır. Aşağıdaki grafiklerde yeşil ve kırmızı renk ile gösterilen veriler PLS algoritması sonucu ayırım yapılan eğitim modelinin sonuçlarını temsil etmektedir.

Geliştirilen model üzerinde etiketleri bilinen ama yerleri karıştırılmış test verisi ile modeller test edilmiştir. Her bir yıkama sıvısı tespiti için kumaşın lekeli olup olmadığı modellenip test edilmiştir. Siyah renk ile gösterilen veri setleri test sonuçlarını göstermektedir. Yapılan test sonuçlarına göre yeşil renk içerisinde kalan veriler kan lekeli yıkanmış kumaş, kırmızı çerçeve içerisinde kalan veriler ise lekesiz kumaş temsil etmektedirler.

Gerçekleştirilen çalışmada her bir yıkama sıvısı için ayrı bir model geliştirilip analizi yapıldığından hangi lekeli veya lekesiz kumaşın hangi sıvı ile yıkandığı da bir hayli önemlidir. Bu bağlamda 4.3.2 numaralı başlık altında lekeli veya lekesiz kumaşın hangi sıvı ile yıkandığının sınıflandırma analizi sonuçları verilmiştir. İlk grafikte eğitim veri seti ile kalibrasyon modeli sunulmuş, ikinci grafikte ise test veri seti ile doğrulaması yapılmıştır.

4.3.1. Yıkanmış Kan Lekeli Kumaşların Kemometrik Analizi

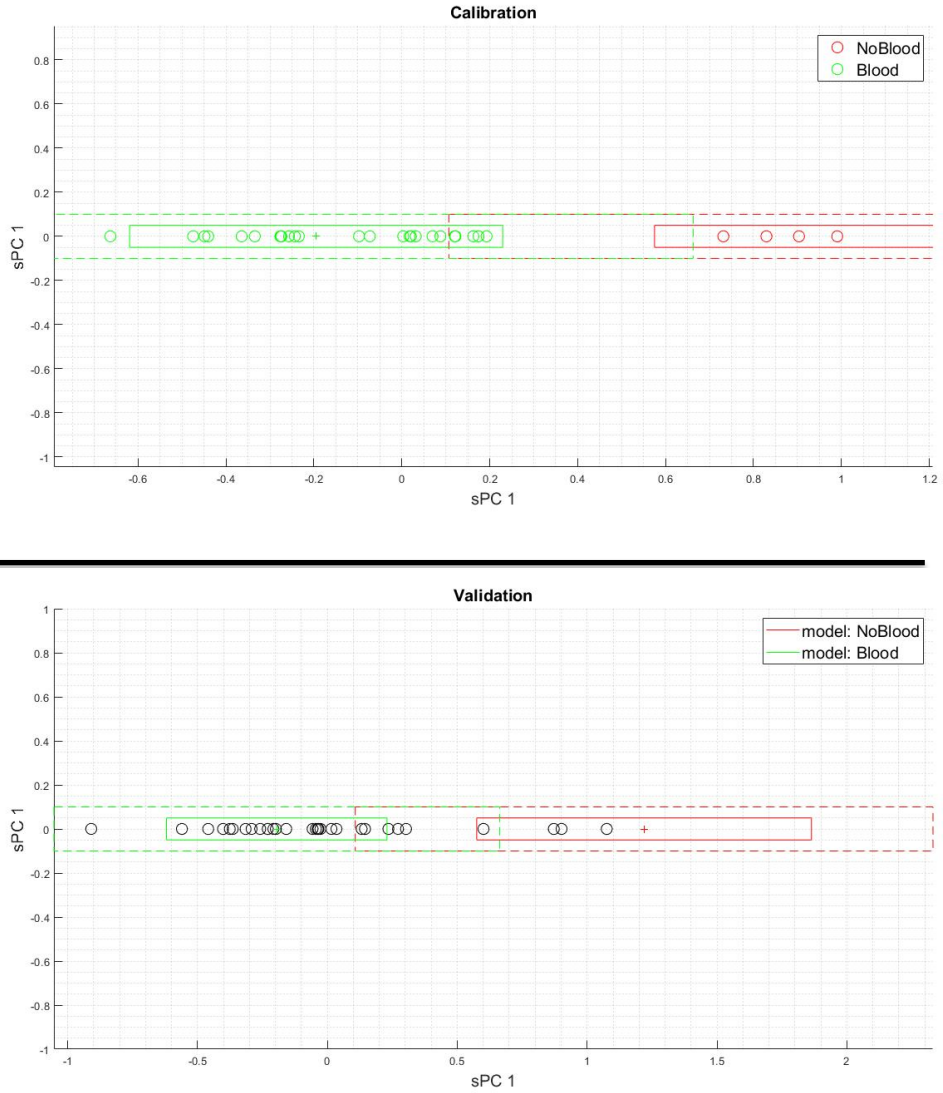
Saf su ile yıkanmış kan lekeli kumaş ile saf su ile yıkanmış lekesiz kumaşa ait kalibrasyon ve validasyon grafiği Şekil 4.13'te verilmiştir.



Şekil 4. 13. Saf su ile yıkanmış kan lekeli ve kan lekesiz kumaşa ait kalibrasyon ve validasyon analizleri.

Şekil 4.13'te verildiği üzere sisteme öğretilen kalibrasyon verileri kan lekeli ve kan lekesiz kumaş için öğretilmiştir. Validasyon analizinde ise su ile yıkanmış kan lekeli ve kan lekesiz kumaşın sınıflandırılması yapılmıştır.

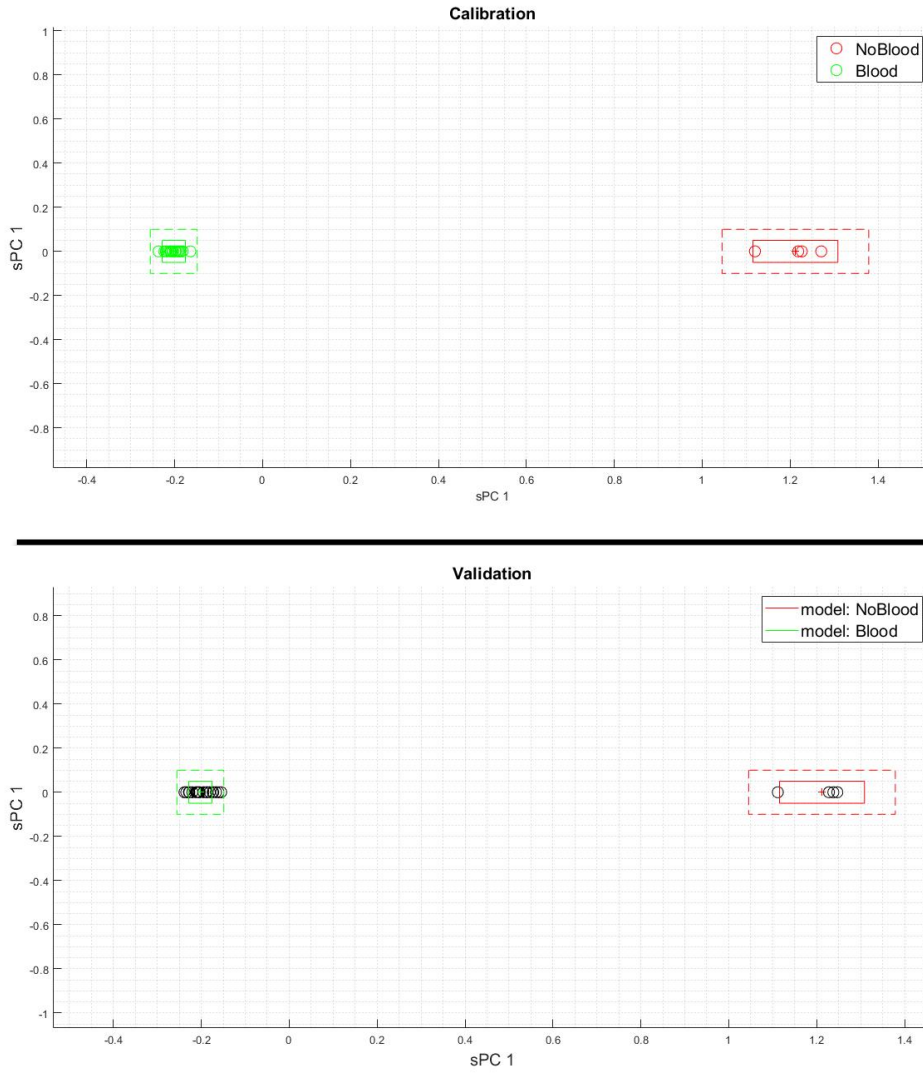
%40.0 metanol çözeltisi ile yıkanmış kan lekeli kumaş ile saf su ile yıkanmış lekesiz kumaşa ait kalibrasyon ve validasyon grafiği Şekil 4.14'te verilmiştir.



Şekil 4. 14. Metanol (%40.0) çözeltisi ile yıkanmış kan lekeli ve kan lekesiz kumaşa ait kalibrasyon ve validasyon analizleri.

Şekil 4.14'te verildiği üzere sisteme öğretilen kalibrasyon verileri kan lekeli ve kan lekesiz kumaş için öğretilerek sınıflandırmaya dayalı validasyon analizi yapılmıştır.

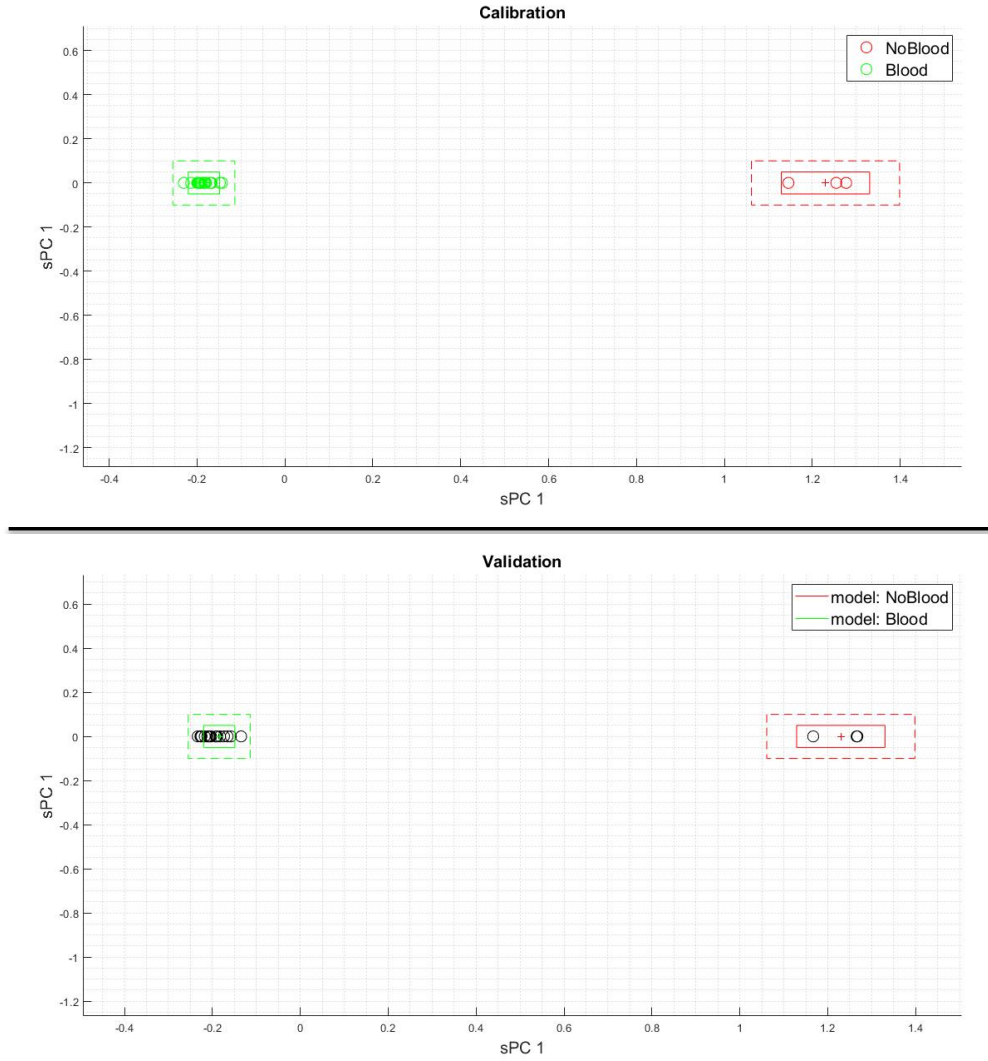
%5 HCl çözeltisi ile yıkanmış kan lekeli kumaş ile saf su ile yıkanmış lekesiz kumaşa ait kalibrasyon ve validasyon grafiği Şekil 4.15'te verilmiştir.



Şekil 4. 15. HCl (%5.0) çözeltisi ile yıkanmış kan lekeli ve kan lekesiz kumaşa ait kalibrasyon ve validasyon analizleri.

Şekil 4.15'te %5.0 HCl çözeltisi için sisteme öğretilen kalibrasyon verileri kan lekeli ve kan lekesiz kumaş için öğretilerek sınıflandırmaya dayalı validasyon analizi yapılmıştır.

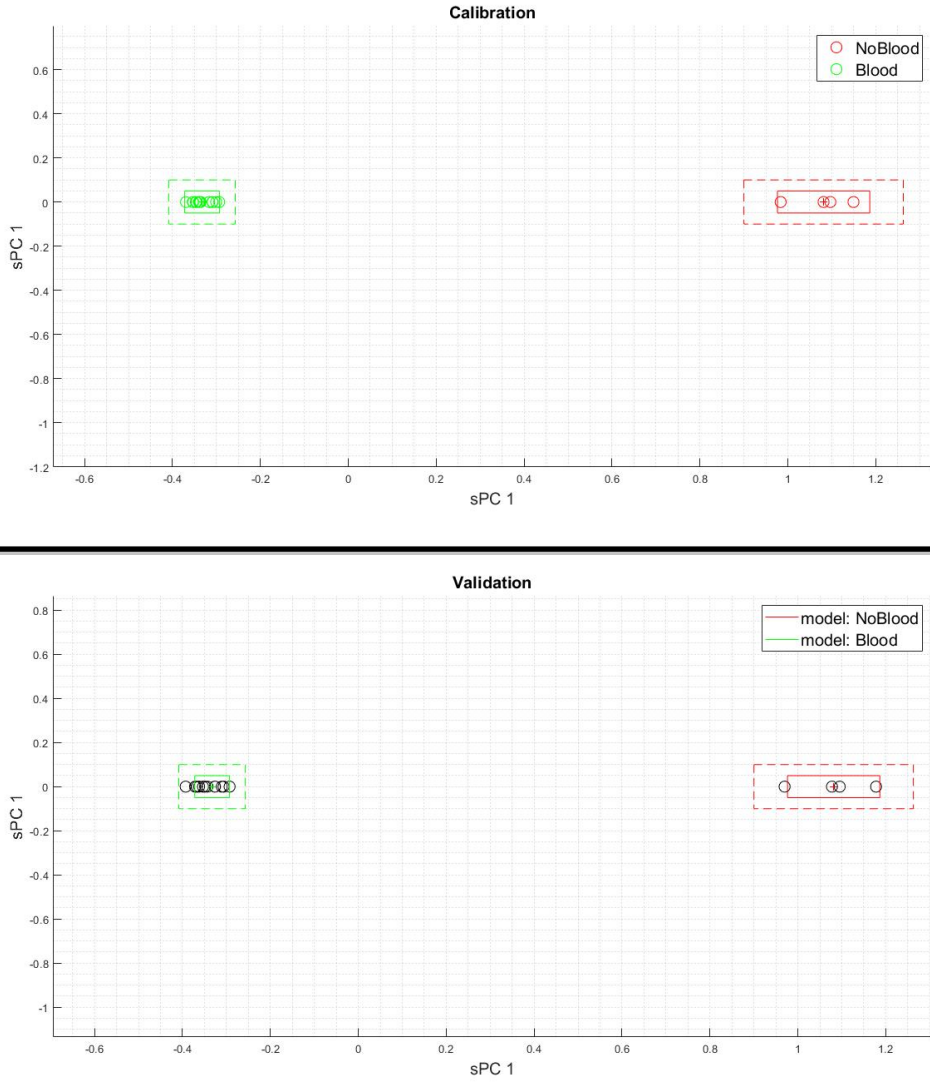
Sabun (%0.5) çözeltisi ile yıkanmış kan lekeli kumaş ile saf su ile yıkanmış lekesiz kumaşa ait kalibrasyon ve validasyon grafiği Şekil 4.16’da verilmiştir.



Şekil 4. 16. Sabun (%0.5) çözeltisi ile yıkanmış kan lekeli ve kan lekesiz kumaşa ait kalibrasyon ve validasyon analizleri.

Şekil 4.16’da %0.5 sabun çözeltisi için sisteme öğretilip oluşturulan kalibrasyon verileri kan lekeli ve kan lekesiz kumaş için öğretilmiştir. Ardından sınıflandırmaya dayalı validasyon analizi yapılmıştır.

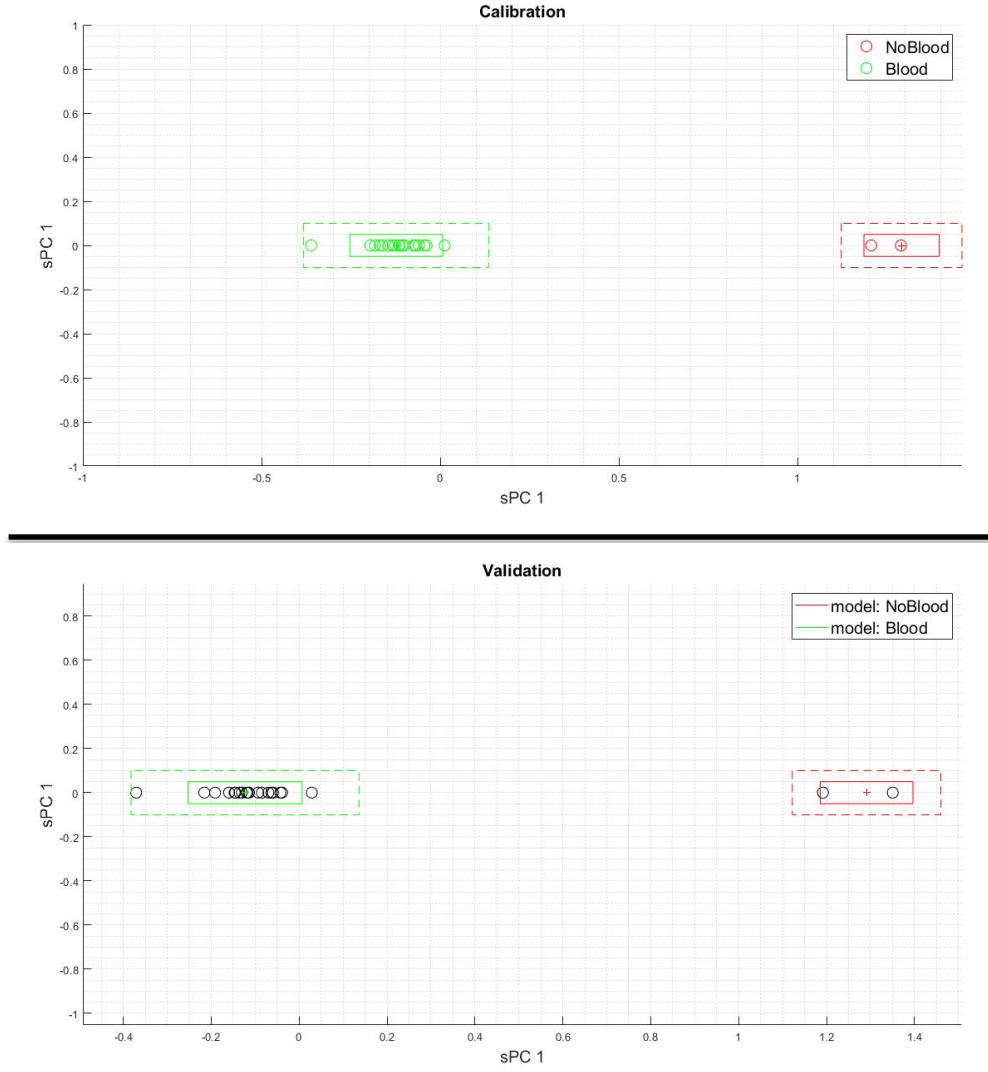
%0.5 deterjan çözeltisi ile yıkanmış kan lekeli kumaş ile saf su ile yıkanmış lekesiz kumaşa ait kalibrasyon ve validasyon grafiği Şekil 4.17’de verilmiştir.



Şekil 4. 17. Deterjan (%0.5) çözeltisi ile yıkanmış kan lekeli ve kan lekesiz kumaşa ait kalibrasyon ve validasyon analizleri.

Şekil 4.17’de %0.5 deterjan çözeltisi için sisteme öğretilip oluşturulan kalibrasyon verileri kan lekeli ve kan lekesiz kumaş için öğretilmiştir. Ardından sınıflandırmaya dayalı validasyon analizi yapılmıştır.

%0.5 hipoklorit deterjan çözeltisi ile yıkanmış kan lekeli kumaş ile saf su ile yıkanmış lekesiz kumaşa ait kalibrasyon ve validasyon grafiği Şekil 4.18’de verilmiştir

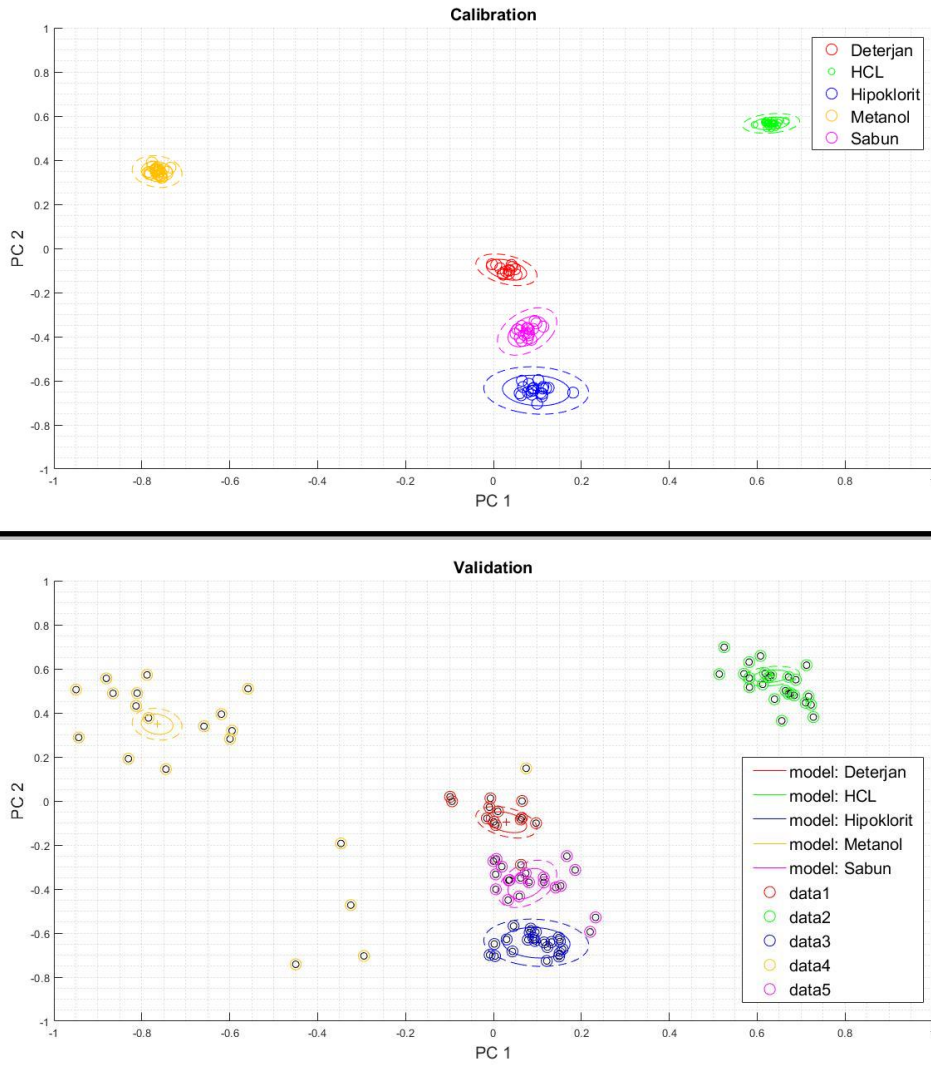


Şekil 4. 18. Hipoklorit (% 0.5) çözeltisi ile yıkanmış kan lekeli ve kan lekesiz kumaşa ait kalibrasyon ve validasyon analizleri.

Şekil 4.18’de % 0.5 hipoklorit çözeltisi için sisteme öğretilip oluşturulan kalibrasyon verileri kan lekeli ve kan lekesiz kumaş için öğretilmiştir. Ardından sınıflandırmaya dayalı validasyon analizi yapılmıştır.

4.3.2. Farklı Çözücü Gruplarının Kemometrik Analizi

Farklı çözücü grupları ile yıkanan kanlı kumaş yüzeylerinin birbirinden ayrımı yine PLS-DA metodu ile gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.19'da farklı çözücüler ile yıkanmış gruplara ait kalibrasyon değerleri ile sisteme öğrenme verisi sağlanmıştır. Validasyon için farklı çözücülerle yıkanmış olan kumaşlara ait veriler test verisi olarak girilerek çözücü tipine göre sınıflandırma yapılmıştır. Yapılan çalışma bulguları ve sonuçları Tartışmalar ve Sonuçlar başlığı altında detaylandırılmıştır.



Şekil 4. 19. Farklı temizleyici çözeltiler ile yıkanmış kan lekeli kumaşa ait kalibrasyon ve validasyon analizleri.

4.3.3. Kemometrik Analiz Modeli Başarı Oranları

Yapılan kemometrik analiz için kullanılan veriler öğrenme ve test verileri olarak sıralanabilir. Çizelge 4.1, Çizelge 4.2 , Çizelge 4.3 ve Çizelge 4'te iki sınıfa ve tüm verilere ait hassasiyet, seçicilik ve verim oranı yüzdeleri verilmiştir. Sınıf 1 öğrenme verilerini; Sınıf 2 ise test verilerini ifade etmektedir.

Çözücü	True Positive Sınıf 1	True Positive Sınıf 2	False Positive Sınıf 1	False Positive Sınıf 2
Deterjan	4	13	0	0
HCl	4	22	0	0
Su	5	27	0	0
Metanol	4	24	0	0
Hipoklorit	2	19	0	0
Sabun	3	17	0	0
Tüm Çözücüler	12	22	0	0

Çizelge 4. 1. Sınıf 1 ve sınıf 2 verilere ait doğru sınıflandırılan örnek sayısı.

Çözücü	Hassasiyet Oranı Sınıf 1	Hassasiyet Oranı Sınıf 2	Seçicilik Oranı Sınıf 1	Seçicilik Oranı Sınıf 2
Deterjan	100	100	100	100
HCl	100	91.66666667	100	100
Su	100	90	100	100
Metanol	100	96	100	100
Hipoklorit	100	90.47619048	100	100
Sabun	100	85	100	100
Tüm Çözücüler	92.0769231	91.66666667	100	100

Çizelge 4. 2. Sınıf 1 ve sınıf 2 verilere ait hassasiyet ve seçicilik oranları.

Çözücü	Verim Oranı Sınıf 1	Verim Oranı Sınıf 2
Deterjan	100	100
HCl	100	95.74271078
Su	100	94.86832981
Metanol	100	97.97958971
Hipoklorit	100	95.11897312
Sabun	100	92.19544457
Tüm Çözücüler	96.07689228	95.74271078

Çizelge 4. 3. Sınıf 1 ve sınıf 2 verilere ait verim oranları.

Çözücü	Toplam Hassasiyet Oranı	Toplam Seçicilik Oranı	Toplam Verimlilik Oranı
Deterjan	100	100	100
HCl	92.85714286	100	96.36241117
Su	91.42857143	100	95.61828875
Metanol	96.55172414	100	98.26073689
Hipoklorit	91.30434783	100	95.55330859
Sabun	86.5652174	100	93.25048082
Tüm Çözücüler	89.32038835	100	94.50946426

Çizelge 4. 4. Tüm verilere ait hassasiyet, seçicilik ve verim oranları.

Tüm oranlara bakarsak, oluşturulan model için yüksek hassasiyet ve verimde etkin olduğu ve %100 seçicilik ile çalıştığı belirlenmiştir.

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Olay yerinde delil niteliği oluşturabilecek ve üzerinde kan lekesi bulunan tekstil yüzeylerin doğru bir şekilde analiz edilmesi, suçun hukuki değerlendirilmesinde, olaya dahil olanların kimliklendirilmesinde ve olayın yeniden rekonstrüksiyonunda önem taşımaktadır. Kanıt niteliğindeki materyalin kan lekesi içermesi halinde, suçu dellilerini gizleyerek suçu örtbas etmek isteyen kişilerin kanıt eşyanın üzerindeki lekeyi çeşitli yöntemlerle ortadan kaldırmaya çalışması, silmesi ve yıkayarak temizlemesi sıklıkla karşılaşılan bir durumdur. Yıkama işlemleri, özellikle tekstil üzerindeki kan lekesini gözle görülür şekilde azaltmaya yönelik yöntemlerdir. Farklı çözücülerle yıkama sonucunda, kan lekesinin tayin edilebilmesi zorlaşmaktadır.

Kan lekesi içeren kanıt üzerinde oluşan deformasyon dahilinde bile leke tayininin yapılabilmesi, adli bilimlerde kullanılan analiz yöntemleri için yüksek doğruluklu ve sayısal sonuçlarla ifade edilebilen yöntemlere eğilim olmasını sağlamıştır. Bu noktada kullanılagelen yöntemlerden birinin Raman spektroskopi olduğu ve kan lekesinin özelliklerinin ifade edilmesinde faydalanılmakta olduğu bilinmektedir. Kan lekesi tayinin yanısıra, lekenin üzerinde bulunduğu malzeme yüzeyinin ve hali hazırda elde edilebilecek çözücülerin genel bir spektrum bağlamında açıklanabilmesinin suç durumunun tahlil edilebilmesi adına önemlidir. Bu bağlamda yapılan tez çalışmasında üzerinde kan lekesi oluşturulan pamuk kumaş yüzeyin, temizlik ve hijyen amacıyla kullanılan farklı çözücü sıvılarla yıkanması sonucunda kan lekesinin varlığının tespit edilebilmesi için Raman spektroskopi analizlerine dayanan incelemeler gerçekleştirilmiştir. Deneysel çalışmalar sonucunda elde edilen sonuçlardan aşağıda tartışılmış ve literatür ışığında değerlendirilmiştir.

Kumaş yüzeyin analizi, kan lekesinin yüzey üzerinde oluşturduğu farklı spektrumu belirleyebilmek adına yapılmıştır. İşlem görmemiş ve leke barındırmayan %100 pamuklu kumaşa ait Raman spektrumu 20 saniye veri toplama süresi ile alınmıştır. Kumaşa ait normalize edilmiş Raman spektrumunda görülebilen bandlar sırasıyla 256 cm^{-1} , 373 cm^{-1} , 433 cm^{-1} , 467 cm^{-1} , 492 cm^{-1} , 644 cm^{-1} , 843 cm^{-1} , 865 cm^{-1} , 956 cm^{-1} , 1077 cm^{-1} , 1281

cm^{-1} , 1387 cm^{-1} , 1570 cm^{-1} , 1615 cm^{-1} , 1637 cm^{-1} , 1723 cm^{-1} , 1784 cm^{-1} , 1839 cm^{-1} ve 1882 cm^{-1} olarak verilmektedir (Şekil 4.1). Bu pik değerleri, spektrumdaki yoğunluk değeri dağılımına göre ortalama değerlerin üzerinde olan pik noktaları olarak belirlenmiştir. Bahsedilen bu değerlerden 1615 cm^{-1} bandı diğer band değerlerine göre baskın niteliktedir.

Kumaş üzerinde kan lekesinin davranışını tespit etmek için işlem görmemiş temiz kumaş yüzeye kan damlatılarak ıslak ve tamamen kurumuş durumdaki Raman spektrumları elde edilmiştir. Kumaş üzerindeki kurumamış kan lekesi için 20 saniye veri toplama süresi ile alınan Raman spektrumunda görülebilen pik değerleri sırasıyla 267 cm^{-1} , 440 cm^{-1} , 694 cm^{-1} , 1097 cm^{-1} , 1120 cm^{-1} ve 1478 cm^{-1} olarak görülmektedir (Şekil 4.4) . Kumaş üzerindeki kurumuş kan lekesinin spektrumu için 20 saniye veri toplama süresi ile band değerleri sırasıyla 248 cm^{-1} , 258 cm^{-1} , 440 cm^{-1} , 507 cm^{-1} , 655 cm^{-1} , 694 cm^{-1} , 744 cm^{-1} , 800 cm^{-1} , 940 cm^{-1} , 966 cm^{-1} , 999 cm^{-1} , 1095 cm^{-1} , 1120 cm^{-1} , 1190 cm^{-1} , 1251 cm^{-1} , 1450 cm^{-1} , 1478 cm^{-1} , 1535 cm^{-1} , 1549 cm^{-1} , 1584 cm^{-1} ve 1615 cm^{-1} olarak verilmiştir (Şekil 4.5). Her iki kan lekesinden alınan spektrumlarda karşılaşılan farklı değerler ise 440 cm^{-1} , 694 cm^{-1} , 1120 cm^{-1} , 1248 cm^{-1} , 1478 cm^{-1} pikleri olarak görülmektedir. Virkler ve arkadaşları, kurumuş kan lekesi üzerinde 785 nm lazer dalga boyuna sahip Raman spektroskopisi ile x20 objektif kullanılarak aldıkları ölçümde; 744 cm^{-1} , 967 cm^{-1} , 1000 cm^{-1} , 1122 cm^{-1} , 1248 cm^{-1} , 1342 cm^{-1} , 1368 cm^{-1} , 1448 cm^{-1} , 1542 cm^{-1} , 1575 cm^{-1} , ve 1620 cm^{-1} , değerlerinde pik görülmüştür [60]. İlgili referans ile deneysel çalışma sonucunda kuru kan lekesinden alınan Raman spektrum değerleri benzerlik göstermektedir. Islak ve kurumuş kan lekesindeki birbirine çok yakın değerli pikler ortaya koyarak birbirini doğrulamaktadır. Şekil 4.5'te ıslak ile kurumuş kan lekesine ait normalize edilmemiş spektrumlar alt alta çizdirilerek yoğunlukları arasındaki fark/benzerlik gösterilmiştir. Islak kana ait spektrumun, kuru kana ait spektruma göre daha yüksek sinyal yoğunluk değeri verdiği gösterilmektedir.

Kurumuş kan lekesinin kumaş yüzey üzerinden ayırt edilebilmesi ve baskın olan spektrumun bulunması için Raman spektrumlarının yoğunluk değerleri karşılaştırılmıştır. Şekil 4.6'da görülen spektrumlardan da anlaşılacağı gibi kurumuş kan lekesi işlem görmemiş kumaş yüzeye göre daha yüksek yoğunluk değeri vermektedir.

Deneyler sırasında yıkama işlemi için farklı çözücüler kullanılmıştır. Bu çözücülerin hazırlama yöntemi tezin ilgili kısmında belirtilmiştir. Kullanılan temizleme çözeltileri sırasıyla saf su, %40.0 metanol çözeltisi, %5.0 HCl çözeltisi, %0.5 sabun çözeltisi, %0.5 deterjan çözeltisi ve %0.5 hipoklorit çözeltisidir. Bu çözücülerin kullanımının kan lekesi üzerindeki etkisini ve çözücülere ait spektrumların elde edilmesi amacıyla kontrol ve test grupları oluşturulmuştur.

Kontrol grubu için işlem görmemiş lekesiz kumaş, kan lekeli kumaş ve yukarıda belirtiler çözeltiler ile yıkanan kumaşlar kullanılmıştır. Her bir çözelti ile yıkanan kumaşların tamamen kurduktan sonra Raman spektrumları alınmıştır. Bu spektrumlar, çözücülere özgü spektrum elde edilmesi için elde edilmiştir. Saf su ile yıkanan lekesiz kumaş örneği için elde edilen Raman spektrumunda 715 cm^{-1} , 1093 cm^{-1} , 1370 cm^{-1} , 1611 cm^{-1} , 1729 cm^{-1} ve 1946 cm^{-1} değerleri görülmektedir. Metanol (%40.0'lık) çözeltisi ile yıkanmış lekesiz kumaş yüzeyi üzerinden alınan Raman spektrumdaki belirgin band değerleri sırasıyla 861 cm^{-1} , 1096 cm^{-1} , 1119 cm^{-1} , 1294 cm^{-1} , 1615 cm^{-1} ve 1726 cm^{-1} olarak belirlenmiştir. HCl (%5.0) çözeltisi ile yıkanmış lekesiz kumaş yüzeyi üzerinden alınmış Raman spektrum bandları sırasıyla 858 cm^{-1} , 1090 cm^{-1} , 1222 cm^{-1} , 1290 cm^{-1} , 1615 cm^{-1} , 1725 cm^{-1} ve 1928 cm^{-1} olarak saptanmıştır. Saf su, %40.0 metanol çözeltisi ve %5.0 HCl çözeltisi için sırasıyla saniye veri toplama süresi ile alınan Raman spektrumları Şekil 4.2'de verilmiştir.

Sabun (%0.5'lik) çözeltisi, %0.5 deterjan çözeltisi ve %0.5 hipoklorit çözeltisi ile yıkanan lekesiz kumaş üzerinden elde edilen Raman spektrumları Şekil 4.3'te verilmiştir. Sabun (%0.5'lik) çözeltisi ile yıkanan lekesiz kumaş yüzeyine ait Raman spektrumundaki band değerleri sırasıyla 258 cm^{-1} , 448 cm^{-1} , 714 cm^{-1} , 860 cm^{-1} , 1092 cm^{-1} , 1614 cm^{-1} , 1727 cm^{-1} , 1949 cm^{-1} ve 1987 cm^{-1} olarak görülmektedir. Deterjan (%0.5'lik) çözeltisi ile yıkanmış lekesiz kumaş yüzeyi üzerinden alınmış Raman spektrumundaki belirgin band değerleri 255 cm^{-1} , 546 cm^{-1} , 631 cm^{-1} , 713 cm^{-1} , 1618 cm^{-1} , 1729 cm^{-1} , 1951 cm^{-1} ve 1985 cm^{-1} olarak belirlenmiştir. Hipoklorit (%0.5'lik) çözeltisi ile yıkanmış lekesiz kumaş yüzeyi üzerinden alınmış Raman spektrumundaki belirgin bandlar sırasıyla 414 cm^{-1} , 561 cm^{-1} , 859 cm^{-1} , 1613 cm^{-1} ve 1727 cm^{-1} olarak belirlenmiştir.

Sabun (%0.5'lik) çözeltisi, %0.5 deterjan çözeltisi ve %0.5 hipoklorit çözeltisi için sırasıyla 20 saniye veri toplama süresi ile ölçüm alınmıştır.

Test grubu ölçümleri ile kan lekeli kumaşlar üzerinde temizleyici çözücülerin leke çıkarma üzerindeki etkisinin tespiti amaçlanmıştır. Bu etki, lekeli kumaşın çitilendikten sonraki konulduğu çözücünün temizliği ve farklı sıcaklıklardaki saf su ile hazırlanmış çözeltilerin leke çıkarma üzerindeki performansı ile değerlendirilmiştir. Toplam total kan lekeli kumaş parçası ve 5 grup çözelti ile deneyler gerçekleştirilmiştir. İlk olarak çözücü temizliğinin kan lekesi üzerindeki etkisini gözlemlemek için Grup1 ve Grup2 örnek seti üzerinde çalışılmıştır.

Her bir çözelti türünün kan lekesini çıkarma üzerindeki etkisi, son aşamadaki 1 saat bekleme sürelerinde içinde buldukları çözeltinin eski ya da temiz çözelti olmasına göre gözlenmiştir. Grup1 ve Grup2 örnek setlerinde bulunan kumaşların oda şartlarında tamamen kuruması sağlandıktan sonra yüzeyleri incelenmiş ve Raman spektrumları alınmıştır. Grup1 ve Grup2 örnek setleri için USB kamera ile yapılan yüzey analizi sonucunda %40.0 metanol çözeltisi ve %5.0 HCl çözeltisi ile yıkanan örnekler üzerinde, yıkama sonucunda kan lekesi barındırdığı sırasıyla Resim 4.4 ve Resim 4.5'te görülmüştür. Saf su, %0.5 sabun çözeltisi, %0.5 deterjan çözeltisi ve %0.5 hipoklorit çözeltisi ile yıkanan Grup1 ve Grup2 örnek setleri için ise USB kamera ile yapılan ve sırasıyla Resim 4.3, Resim 4.6, Resim 4.7 ile Resim 4.8'e görülen yüzey analizi sonucunda, yıkama sonrası kumaş üzerinden kan lekesine rastlanmamıştır.

Yüzey analizleri sonrasında Grup1 ve Grup2 yıkanmış kan lekeli kumaş örneklerin üzerinde kan tayini için Raman spektrumları alınmıştır. Saf su ile yıkanan Grup1 ve Grup2 örnekleri için normalize edilmiş Raman spektrumlarında kumaş üzerindeki kurumuş kan lekesine ait ortak band değerleri sırasıyla 1095 cm^{-1} , 1120 cm^{-1} ve 1615 cm^{-1} olarak belirlenmiştir (Şekil 4.7). Metanol(%40.0'lık) çözeltisi ile yıkanan Grup1 ve Grup2 örnekleri için normalize edilmiş Raman spektrumlarında kurumuş kan lekesine ait ortak band değerleri 440 cm^{-1} , 693 cm^{-1} , 1095 cm^{-1} , 1120 cm^{-1} ve 1615 cm^{-1} olarak görülmektedir (Şekil 4.8). HCl (%5.0) çözeltisi ile yıkanan Grup1 ve Grup2 örnekleri için normalize edilmiş Raman spektrumlarında kurumuş kan lekesine ait bandlar 964 cm^{-1} ,

1612 cm⁻¹ ve 1615 cm⁻¹, olarak verilmiştir (Şekil 4.9). Sabun (%0.5) çözeltisi ile yıkanan Grup1 ve Grup2 örnekleri için normalize edilmiş Raman spektrumlarında kurumuş kan lekesine ait ortak band değerleri 1615 cm⁻¹ olarak görülmektedir (Şekil 4.10). Deterjan (%0.5) çözeltisi ile yıkanan Grup1 ve Grup2 örnekleri için normalize edilmiş Raman spektrumlarında kurumuş kan lekesine ait ortak bandlar sırasıyla 734 cm⁻¹ ve 1615 cm⁻¹ olarak belirlenmiştir (Şekil 4.11). Hipoklorit (%0.5) çözeltisi ile yıkanan Grup1 ve Grup2 örnekleri için normalize edilmiş Raman spektrumlarında kurumuş kan lekesine ait ortak band değerleri sırasıyla 1096 cm⁻¹, 1120 cm⁻¹ ve 1615 cm⁻¹ olarak belirlenmiştir (Şekil 4.12). Grup1 ve Grup2 için ilgili çözücüler ile üzerinde kurumuş kan lekesi bulunan pamuk kumaş için 1615 cm⁻¹ bandı, kumaştan gelen değerdir.

Çözücünün yıkama sonrası bekleme süresini içinde geçirdiği çözücünün kullanılmış ya da yeni olmasının, yüzey üzerinde ve alınan spektrumlar sonucuna gözle görülür bir etkisi bulunmadığı sonucuna varılmıştır. Spektrumlar üzerinden bu çıkarım, kana ait spektrumun yıkama sonrası hala varlığını korumasından ötürü yapılabilmektedir. Bunun üzerine, farklı sıcaklıkların bahsedilen çözücüler ile kan lekesi üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi üzerine çalışmalar yapılmıştır.

Sıcaklığın kan lekelerin çıkarma üzerindeki etkisini görmek amacıyla, tüm çözeltilerde çözücü olarak bulunan saf su 20°C, 30°C ve 60°C'ye ısıtıldıktan sonra çözeltiler hazırlanmıştır. Total adet kan lekeli kumaş 60°C'deki saf su ile hazırlanan Grup3, 30°C'deki saf su ile hazırlanan Grup4 ve 20°C'deki saf su ile hazırlanan Grup5 ile yıkanmış ve bu sıvılar içinde bekletilmiştir. Her grup için, aynı kontrol grubu ölçümlerinde olduğu gibi saf su, %40.0 metanol çözeltisi, %5.0 HCl çözeltisi, %0.5 sabun çözeltisi, %0.5 deterjan çözeltisi ve %0.5 hipoklorit çözeltisi hazırlanmıştır. Grup3, Grup4 ve Grup5 örnek setlerinde bulunan her bir yıkanmış lekeli kumaş parçası için USB kamera ile yüzey analizi yapılmıştır. Yapılan yüzey analizlerinde Grup1 ve Grup2 için belirtildiği üzere %40.0 metanol çözeltisi ve %5.0 HCl çözeltisi ile yıkanan örnekler üzerinde, sırasıyla Resim 4.4 ve Resim 4.5'te görüldüğü üzere yıkama sonucunda bile kan lekesi bulunmaktadır. Saf su, Benzer şekilde, %0.5 sabun çözeltisi, %0.5 deterjan çözeltisi ve %0.5 hipoklorit çözeltisi ile yıkanan Grup3, Grup4 ve Grup5 örnek setleri için ise USB kamera ile yapılan yüzey analizi sonucunda, yıkama sonrası kumaş

üzerinden kan lekesi görülmemektedir. Bahsedilen çözeltilere ait Grup3, Grup4 ve Grup5'e ait yüzey analiz görselleri sırasıyla Resim 4.4, Resim 4.5, Resim 4.6, Resim 4.7 ve Resim 4.8'de verilmiştir.

Çözücü sıcaklığın kumaş üzerindeki kan lekesinin tamamen temizleyip temizlemediğini anlamak için Grup3, Grup4 ve Grup5 örnek setlerindeki her bir yıkanmış kan lekeli kumaş parçası için Raman spektrumları alınmıştır. Saf su ile yıkanan Grup3, Grup4 ve Grup5 örnekleri için elde edilen Raman spektrumunda kan lekesine ait ortak bandlar 440 cm^{-1} ve 1615 cm^{-1} olarak belirlenmiştir (Şekil 4.7). %40.0 metanol çözeltisi ile yıkanan Grup3, Grup4 ve Grup5 örnekleri için elde edilen Raman spektrumunda kan lekesine ait ortak band değerleri 440 cm^{-1} , 1120 cm^{-1} ve 1615 cm^{-1} olarak verilmiştir (Şekil 4.8). HCl (%5.0) çözeltisi ile yıkanan Grup3, Grup4 ve Grup5 örnekleri için elde edilen Raman spektrumunda kan lekesine ait ortak band değerleri 440 cm^{-1} , 1120 cm^{-1} ve 1615 cm^{-1} olarak belirlenmiştir (Şekil 4.9). Sabun (%0.5) çözeltisi ile yıkanan Grup3, Grup4 ve Grup5 örnekleri için elde edilen Raman spektrumunda kan lekesine ait ortak band değeri 1615 cm^{-1} olarak görülmektedir (Şekil 4.10). Deterjan (%0.5) çözeltisi ile yıkanan Grup3, Grup4 ve Grup5 örnekleri için elde edilen Raman spektrumunda kan lekesine ait ortak band değerleri 1095 cm^{-1} ve 1615 cm^{-1} olarak verilmiştir (Şekil 4.11). %0.5 hipoklorit çözeltisi ile yıkanan Grup3, Grup4 ve Grup5 örnekleri için elde edilen Raman spektrumunda kan lekesine ait ortak bandlar 1615 cm^{-1} olarak belirlenmiştir (Şekil 4.12). Grup3, Grup4 ve Grup5 için ilgili çözücüler ile üzerinde kurumuş kan lekesi bulunan pamuk kumaş için 1615 cm^{-1} bandı, kumaştan gelen değerdir.

Farklı sıcaklıktaki çözücülerle hazırlanan çözeltilerin, kumaş üzerinde kurumuş kan lekesini çıkarma etkisi için yapılan çalışmalar sonucunda, sıcaklığın kan lekesini kumaş üzerinden tamamen temizlenmesinde belirgin bir etkisi olmadığı sonucuna varılmıştır. Grup3, Grup4 ve Grup5 içerisinde bulunan her bir yıkanmış kumaş örneği üzerinden alınan Raman spektrumlarında, kurumuş kanın gösterdiği noktalarda pikler görülmüştür. Farklı çözücülerle yıkanmış kan lekeli kumaş örnekleri üzerinde kan lekesinin bulunduğu doğrulanması ve çözücü tipine göre sınıflandırmaya dayalı ayrımı ve tanımlamayı yapmak için kemometrik analizden faydalanılmıştır. Bu bağlamda, kurumuş kan lekesinin çıkarılması adına farklı çözeltiler ile yıkanmış kumaş yüzeyleri üzerinde

PLS-DA algoritması kullanılarak sınıflandırılmaya çalışılmıştır. Kullanılan PLS-DA modeli için öğrenme ve test veri setleri alınan Raman spektrumlarından elde edilmiştir. Öğrenme verileri, her çözücü için çözücü ile yıkanmış boş kumaşlardan alınan ölçümler ve ilgili çözücü ile yıkanmış kan lekeli kumaşlara ait bir kısım Raman spektrumlarından alınmıştır. Test verileri ise her bir grup için hazırlanan verilerin hepsinden birden fazla olacak şekilde alınan Raman spektrumlarından oluşmaktadır. Her bir çözücü için kan lekeli yıkanmış ve kan lekesiz yıkanmış kumaşlara ait analizler kalibrasyon ve validasyon grafiklerinde verilmiştir. Grafiklerde bahsedilen Sınıf 1 veriler ilgili çözücü ile yıkanmış lekesiz kumaşa ait, Sınıf 2 veriler ise ilgili çözücü ile yıkanmış kan lekeli kumaşa ait Raman spektrumlarının sayısını vermektedir. Kalibrasyon grafikleri, ilgili çözücü ile yıkanmış kan lekeli ve ilgili çözücü ile yıkanmış boş kumaşın validasyon grafiklerindeki ayrımı yapması için kullanılan modeli temsil etmektedir. Validasyon grafikleri ise, fazla sayıda belirlenen çözücü ile yıkanmış kan lekeli ve belirlenen çözücü ile yıkanmış boş kumaşa ait Raman spektrumlarının sınıflandırılması için kullanılmıştır.

PLS-DA modelinde kullanılan öğrenme ve test verisi olmak üzere toplam 255 adet spektrum kullanılmıştır. Öğrenme verisi herbir çözücü ile yıkanmış olan kan lekeli kumaşlara ait 133 adet spektrum, lekesiz ve çözücüler ile yıkanmış kumaşlara ait 22 adet spektrum kullanılmıştır. Test verileri için ise çözücüler ile yıkanmış kanlı kumaşlara ait 122 adet spektrum ve çözücüler ile işlem görmüş lekesiz kumaşlara ait 22 adet spektrum kullanılmıştır.

Tüm test gruplarındaki Saf su ile yıkanmış kan lekeli kumaşlar üzerinde 5 grup için PLS-DA algoritması ile oluşturulmuş iki sınıflı sınıflandırma modelini kırmızı ve yeşil renkler kullanarak Şekil 4.13'te belirtilmektedir. Bu grafikler özelinde saf su ile yıkanmış kan lekeli kumaşlar, %90 hassasiyet, %100 seçicilik ve %94.9 verim ile sınıflandırılmıştır.

Metanol (%40.0) çözültisi ile yıkanmış lekesiz kumaş ve tüm test gruplarındaki kan lekeli kumaşlara sınıflandırmaya dayalı kalibrasyon ve validasyon grafikleri Şekil 4.14'te verilmiştir. PLS-DA algoritmasının kurduğu model üzerinde verilerin birbirine yakın çıkmış olması, test verilerinin de ayrımını güçleştirmiştir. Her ne kadar yeşil ve kırmızı çerçeveler altında kalan siyah veri seti ayrılmış gözükse de verilerin çoğaltılarak gerekirse

metanol özelinde daha yüksek bileşenli modeller kullanılarak analizlerin tekrarlanması planlanmaktadır. Yapılan sınıflandırma analizinin başarısı test ölçümleri için % 96 hassasiyet, % 100 seçicilik ve %97.9 verimle belirlenmiştir.

HCl (%5.0) çözeltisi ile yıkanmış lekesiz kumaş ve tüm ölçüm gruplarındaki kan lekeli kumaş arasındaki ayırım analizine ait kalibrasyon ve validasyon grafikleri Şekil 4.15’de verilmiştir. Belirlenen eşik çerçevelerinin içinde kalan siyah verilere bakıldığında, yüksek doğruluk oranında sınıflandırmanın yapıldığı gözlemlenmektedir. İki sınıfa ait veriler üzerinde ayırım net bir şekilde gözlemlenmektedir. Modelin başarımı yüksek sayıda veri alınarak yeniden yapılacak bir eğitim ile artırılabilir. Sınıflandırma başarısı test grupları için %91.7 hassasiyet, %100 seçicilik ve %95.7 verim ile yapılmıştır.

Sabun (% 0.5) çözeltisi ile yıkanmış boş kumaş ve tüm test gruplarındaki kan lekeli kumaş arasındaki farkı sınıflandırmak amacıyla kurulmuş eğitim modeli Şekil 4.16’de kalibrasyon ve validasyon analizleri ile temsil edilmektedir. Kırmızı çerçeve içerisinde kalan alan kansız kumaş sınıfını, yeşil çerçeve içerisinde kalan alan ise kan lekeli yıkanmış kumaş sınıfını temsil etmektedir. Bu alanlar içerisinde kalan doğrulama verilerine bakıldığında, sınıflar arasında ayırım göze çarpmaktadır. Herhangi yeni analiz edilecek bir örnekte kumaşın üzerinde kan lekesi olup olmadığı yıkanmış olsa bile yine yüksek doğruluk oranında tespit edilebilir. Bu model üzerinde eğitim veri seti ile yapılan kalibrasyon test veri seti ile % 85 hassasiyet,%100 seçicilik ve %92.2 verim ile doğrulanmıştır.

Deterjan (%0.5) çözeltisi ile yıkanmış lekesiz kumaş ve tüm gruplardaki kan lekeli kumaşın birbirlerinden ayırt edilebilmesi kalibrasyon ve validasyon grafiklerinde görülmektedir. Şekil 4.17. Test verileri, %100 hassasiyet, %100 seçicilik ve %100 verim ile sınıflandırılmıştır.

Hipoklorit (%0.5) çözeltisi ile yıkanmış lekesiz kumaş ve tüm gruplardaki kan lekeli kumaş kalibrasyon ve validasyon grafikleri ile ayırt edilmeye çalışılmıştır. Kalibrasyon ve validasyon grafikleri Şekil 4.18’de verilmiştir. PLS-DA algoritması yardımı ile

bulunan eşik değerler yardımı ile ayırım sağlanmıştır. Sınıflandırma başarısı, %90.5 hassasiyet, %100 seçicilik ve %95.1 verim ile belirlenmiştir.

Kemometrik analizler yapılırken, her çözelti için ayrı bir PLS-DA modeli tasarlanmıştır. Tüm kumaş gruplarındaki herbir numuneye ait ölçüm kullanılarak kullanılan çözücünün tipine göre kan lekesi analizi yapılmıştır. Şekil 4.19, yıkanmış lekeli kumaşlar arasında kumaşın hangi sıvı ile yıkandığını tespit etmek amacıyla kurulmuş 5 sınıflı eğitim modelini göstermektedir. Bu grafikte sarı renkli veriler metanol çözeltisi, yeşil renkli veriler HCl çözeltisi, pembe renkli veriler ise sabun çözeltisi, kırmızı renkli veriler deterjan çözeltisi ve lacivert renkli veriler hipoklorit çözeltisi ile yıkanmış kan lekeli kumaşları temsil etmektedir. Test verileri, Şekil 4.19'daki validasyon analizi sonucunda kendi renklerine ait çerçevelerin içerisinde oldukları sürece doğru gruplandırıldığı belirlenmiştir. Her bir grup için ayırıcı eşik değerleri belirlendiğinde gruplar arasındaki ayırım gözükmemektedir. Çalışmaya dahil edilen beş çözücü grubu için modelin sınıflandırma başarısı, %91.7 hassasiyet, %100 seçicilik ve %95.7 verim ile ayrılmıştır. Bu analizde su ile yıkanmış veriler her yıkamada eşit miktarda su kullanıldığı için dışarıda bırakılmıştır.

Yapılan tez çalışmasında yapılan tüm deneylere ve ölçümlere bakılarak, farklı çözücüler ile yıkanmış kan lekeli kumaş üzerinde yapılan Raman spektroskopisi sonucunda, kan spektrumuna ait dalga sayısında pikler gözlenmiştir. Daha hassas ve farklı çözücü gruplarına göre yapılan sınıflandırma için PLS-DA yöntemine dayalı kemometrik analiz yapılmıştır. PLS-DA tabanlı sınıflandırma modelinin tüm gruplara ait tüm çözücüler ile yıkanmış kan lekeli kumaşlara ait seçilmiş Raman spektrumlarına uygulanarak çözücüye bağlı olarak sınıflandırılması gerçekleştirilmiştir.

Gerçekleştirilmiş olan çalışmalara ve kemometrik analizler sonucunda elde edilen hassasiyet, seçicilik ve verim değerlerine bakılarak, genel anlamda Raman spektroskopinin ve kemometrik analizinin farklı örnek sayısı ve değişken içeren sistemle denenmesi PLS-DA içeren daha nitelikli hassasiyet, seçicilik ve verim değerleri verecektir. Bu bağlamda, farklı kumaş türleri üzerinde daha fazla sayıda örnek kullanılması, olan modelin daha optimize edilmiş eşik değeri parametreleri ile

güncellenmesini sağlayacaktır. Atkis ve arkadaşları kan ile yaptığı çalışmada, kan örneklerin süre değişimlerine bağlı olarak yoğunluklarda küçük miktarlarda azalmalar görüldüğünü belirtmiştir [11]. Bundan ötürü, aynı örnek üzerinde fazla sayıda spektrum elde edilmesi önemlidir. Kan lekesine ek olarak diğer vücut sıvıları ile yapılmış çalışmalar bulunmaktadır [43,59]. Özellikle, kullanılan kumaş türünün boşluklu yapıya sahip olması ve kumaş renginin koyu renkte olması, Raman spektroskopi ile kan lekesi tayinini zorlaştıracaktır. Glynn ve arkadaşlarının farklı kumaşlar üzerinde yaptığı çalışmada, özellikle koyu renkli kumaşlarda, varsayımsal testler ve sonrasındaki Raman spektroskopi ölçümlerinde düşük intensiteye sahip ölçümler alılabilmektedir [68].

Çalışmamızda geliştirilen yöntem ile adli bir olay yeri incelemesinde elde edilen yıkanmış ancak üzerinde kan olduğundan şüphelenilen bir kumaş materyalinin incelenmesi için herhangi bir maliyet söz konusu olmayıp, yöntem bölümünde belirtilen cihazın bulunduğu bir laboratuvarında, yine bu çalışmada kullanılan analitik parametrelerle analiz gerçekleştirilebilecektir. Bu noktada herhangi bir kimyasalın kullanılmaması, ekstraksiyon prosedürlerine ihtiyaç duyulmaması, mevcut saha kitlerine gerek görülmemesi nedeniyle maliyet sorunun olmadığı görülmektedir. Maliyetin minimal olmasının yanısıra örneğin fiziksel ve kimyasal açıdan zarar görmemesi, ev ortamında sık kullanılan, yaygın ulaşılabilir güçlü çözücülerle muameleye rağmen kan spektrumu eldesine ilişkin başarı dikkatte alındığında geliştirilen yöntemin fiyat-fayda dengesi açısından üstün olduğu anlaşılmaktadır.

6. KAYNAKLAR

- [1] J.H. An, K.Shin, W.I. Yang, H.Y. Lee, Body fluid identification in forensics, BMB reports , 545-553, **2012**.
- [2] K.Durmuş, Olay Yeri İncelenmesinde ve Örnek alınmasında Delilin Devamlılığının Sağlanması, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, **2003**.
- [3] K.Pokupcic, Blood as an Important in Criminal Investigations, Journal of Forensic Scinces and Investigations, **2017**.
- [4] Türk Ceza Kanunu, **2004**.
- [5] W.J. Koen, C.M. Bowers, Presumptive and Confirmatory Blood Testing, Forensic Science Reform, 239-269, **2017**.
- [6] A. Castello, M. Alvarez, F. Verdu, Accuracy, reliability, and safety of luminol in bloodstain investigation, Canadian Society of Forensic Science Journal , 113-121, **2002**.
- [7] F. Barni, S.W. Lewis, A. Berti, G.M. Miskelly, G. Lago, Forensic application of the luminol reaction as a presumptive test for latent blood detection, 896-913, **2017**.
- [8] J.F. Pereira, C.S. Silva, M.J.L. Vieira, M.F. Pimentel, A. Braz, R.S. Honorato, Evaluation and identification of blood stains with handheld NIR spectrometer. Microchemical Journal, 561-566, **2017**.
- [9] B. Karadayı, Ş. Karadayı, N. Sezgin, Biyolojik Delillerin Tespitinde Kullanılan Tarama ve Doğrulama Testleri ve Bu Konudaki Son Gelişmeler, Türkiye Klinikleri, 80-92, **2018**.
- [10] C.K.Muro, K.C. Doty, J. Bueno, L. Halamkova, I.K. Lednev, Vibrational spectroscopy: recent developments to revolutionize forensic science. Analytical chemistry, 306-327, **2015**.
- [11] C.G. Atkins, K. Buckley, M.W. Blades, R.F. Turner, Raman spectroscopy of blood and blood components. Applied spectroscopy, 67-793, **2017**.
- [12] M. Sahib, Physiology Of Blood , **2017**.

- [13] WATV, Journey around the Earth Two and a Half Times, https://watv.org/bible_word/journey-around-the-earth-two-and-a-half-times/, **(Erişim tarihi: 8 Ocak 2021)**
- [14] I.K. Lednev, Application of Raman Spectroscopy for an Easy-to-Use, on-Field, Rapid, Nondestructive, Confirmatory Identification of Body Fluids, US Department of Justice, **2012**.
- [15] B.J. Bain, Structure and function of red and white blood cells, Medicine, 187-193, **2017**.
- [16] G. Rusciano, A.C. De Luca, G. Pesce, A. Sasso, Raman tweezers as a diagnostic tool of hemoglobin-related blood disorders, Sensors, 7818-7832, **2008**.
- [17] A. Reyhani, M.D. Nothling, H Ranji-Burachaloo, T.G. McKenzie, Q.Fu, S. Tan, G. Bryant, G.G. Qiao, Blood-Catalyzed RAFT Polymerization, Angewandte Chemie International Edition, 10288-10292, **2018**.
- [18] I. Rahadi, M. Choodoung, A. Choodoung, Red blood cells and white blood cells detection by image processing, Journal of Physics: Conference Series, IOP Publishing, **2020**, p. 012025.
- [19] Adli Tıp Kurumu İstanbul Biyoloji İhtisas Dairesi, Adli Tıp Kurumu'nda Kan Lekesi Model Analizi Uygulamaları, <https://www.atk.gov.tr/atkkanlekesimodelanalizi.pdf>
- [20] S. şener, Kan Lekelerinin İdentifikasyonu ve Diferansasyonunda Kullanılan Yöntemlerin İrdelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü, İstanbul, **1997**.
- [21] M. Hofmann ,J. Adamec, K. Anslinger, B. Bayer, M. Graw, O. Peschel, M.M. Schulz, Detectability of bloodstains after machine washing. International journal of legal medicine, 3-16, **2019**.
- [22] G. Shivangi, G. Apoorva, B. Suresh, D.S. Yadav, P. Mahanta, Comparative study of presumptive and confirmatory tests for detection of blood on serial dilutions and washed stains.
- [23] S.Saadat, G. Pandey, M. Tharmavaram, Microscopy for Forensic Investigations. Technology in Forensic Science: Sampling, Analysis, Data and Regulations,101-127, **2020**.
- [24] Henry C. Lee, Ph.D. ,IDENTIFICATION and GROUPING of BLOODSTAINS, University of New Haven, **1978**.

- [25] J.H. An, K.Shin, W.I. Yang, H.Y. Lee, Body fluid identification in forensics, *BMB reports* ,545-553, **2012**.
- [26] M.A. Fikiyet, S.R. Khandasammy, E. Mistek, Y. Ahmed, L. Halámková, J. Bueno, I.K. Lednev, Forensics: evidence examination via Raman spectroscopy. *Micro-Raman Spectroscopy*, 189-216, **2020**.
- [27] H. Inoue, F. Takabe, M. Iwasa, Y. Maeno, Y. Seko, A new marker for estimation of bloodstain age by high performance liquid chromatography. *Forensic science international*, 17-27, **1992**.
- [28] A.R. Weber, I.K. Lednev, Crime clock—analytical studies for approximating time since deposition of bloodstains, *Forensic Chemistry*, 100248, **2020**.
- [29] K. De Wael, L. Lepot, F. Gason, B. Gilbert, 2008, In search of blood—detection of minute particles using spectroscopic methods, *Forensic science international*,37-42, **2008**.
- [30] J.S. Schweitzer, J.I. Trombka, S. Floyd, C. Selavka, G. Zeosky, N. Gahn, T. McClanahan, and T. Burbine, Portable generator-based XRF instrument for non-destructive analysis at crime scenes. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 816-819, **2005**.
- [31] M. Martin, D. Perez-Guaita, B.R. Wood, ATR-FTIR spectroscopy as a quality control system for monitoring the storage of blood products. *Analytical Methods*, 5756-5763, **2021**.
- [32] E. Mistek, L. Halamkova, I.K. Lednev, Phenotype profiling for forensic purposes: Nondestructive potentially on scene attenuated total reflection Fourier transform-infrared (ATR FT-IR) spectroscopy of bloodstains, *Forensic Chemistry*, 100176, **2019**.
- [33] H. Lin, Y. Zhang, Q. Wang, B. Li, P.Huang, Z. Wang, Estimation of the age of human bloodstains under the simulated indoor and outdoor crime scene conditions by ATR-FTIR spectroscopy, *Scientific reports*, 1-9, **2017**.
- [34] H.W. Siesler, *Vibrational Spectroscopy*, University of Duisburg-Essen, Essen, Germany, Elsevier, **2016**
- [35] Anonim, Plane Electromagnetic Waves, Section: 16.2, <https://www.jobilize.com/physics2/test/production-and-detection-of-electromagnetic-waves-by-openstax>, (**Erişim tarihi: 08 Ocak 2021**).

- [36] B. Stuart, *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, Wiley & Sons, **2004**.
- [37] Anonim, *Electromagnetic Spectrum*, https://wiki.travellerrpg.com/Electromagnetic_Spectrum, (**Erişim Tarihi: 08 Ocak 2021**).
- [38] R.R. Jones, D.C. Hooper, L. Zhang, D. Wolverson, V.K. Valev, Raman techniques: fundamentals and frontiers, *Nanoscale research letters*, 1-34, **2019**.
- [39] P. Rostron, S. Gaber, D. Gaber, Raman spectroscopy, review, *Laser*, 24, **2016**.
- [40] Anonim, *Correct Laser Wavelength for Raman Material Identification*, <https://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=11871>, (**Erişim Tarihi: 08 Ocak 2021**).
- [41] Hübner Photonics, <https://hubner-photonics.com/knowledge-bank/which-785-nm-laser-for-raman-spectroscopy/>, (**Erişim Tarihi: 08 Ocak 2021**).
- [42] G.S. Bumbrah, R.M. Sharma, Raman spectroscopy–Basic principle, instrumentation and selected applications for the characterization of drugs of abuse, *Egyptian Journal of Forensic Sciences*, 209-215, **2016**.
- [43] R. Akçan, M.Ş. Yıldırım, B. Güven, H. İlhan, T. Uğur, N. Sağlam, Surface Enhanced Raman spectroscopy as a novel tool for rapid quantification of heroin and metabolites in saliva, *Turkish Journal of Medical Sciences* , 1470-1479, **2020**.
- [44] K. Virkler, I.K. Lednev, Raman spectroscopy offers great potential for the nondestructive confirmatory identification of body fluids. *Forensic Science International*, **2008**.
- [45] V. Sikirzhytski, A. Sikirzhytskaya, I.K. Lednev, Advanced statistical analysis of Raman spectroscopic data for the identification of body fluid traces: semen and blood mixtures, *Forensic science international*, 59-265, **2012**.
- [46] Y. Zou, P. Xia, F. Yang, F. Cao, K. Ma, Z. Mi, X. Huang, N. Cai, B. Jiang, X. Zhao, W. Liu, Whole blood and semen identification using mid-infrared and Raman spectrum analysis for forensic applications. *Analytical Methods*, 3763-3767, **2016**.
- [47] K. Virkler, I.K. Lednev, Forensic body fluid identification: the Raman spectroscopic signature of saliva, *Analyst*, 512-517, **2010**.
- [48] V. Sikirzhytski, A. Sikirzhytskaya, I.K. Lednev, Multidimensional Raman spectroscopic signature of sweat and its potential application to forensic body fluid

identification, *Analytica chimica acta*, 78-83, **2012**.

[49] C.K. Muro, L. de Souza Fernandes, I.K. Lednev, Sex determination based on Raman spectroscopy of saliva traces for forensic purposes, *Analytical chemistry*, 12489-12493, **2016**.

[50] A. Sikirzhytskaya, V. Sikirzhytski, I. K. Lednev, Raman spectroscopic signature of vaginal fluid and its potential application in forensic body fluid identification, *Forensic science international*, 44-48, **2012**.

[51] O. Chuchuen, J.R. Maher, M.H. Henderson, M. Desoto, L.C. Rohan, A. Wax, D.F. Katz, Label-free analysis of tenofovir delivery to vaginal tissue using co-registered confocal Raman spectroscopy and optical coherence tomography, *PloS one*, **2017**.

[52] C.K. Muro, I.K. Lednev, Race differentiation based on Raman spectroscopy of semen traces for forensic purposes, *Analytical chemistry*, 4344-4348, **2017**.

[53] A.M. Fikiet, I.K. Lednev, Raman spectroscopic method for semen identification: Azoospermia, *Talanta*, 385-389, **2019**.

[54] K.C. Doty, C.K. Muro, I.K. Lednev, Predicting the time of the crime: Bloodstain aging estimation for up to two years, *Forensic Chemistry*, 1-7, **2017**.

[55] K.C. Doty, G. McLaughlin, and I.K. Lednev, A Raman “spectroscopic clock” for bloodstain age determination: the first week after deposition, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 3993-4001, **2016**.

[56] K.C. Doty, G. McLaughlin, and I.K. Lednev, Differentiating donor age groups based on Raman spectroscopy of bloodstains for forensic purposes, *ACS central science*, 862-867, **2018**.

[57] A. Sikirzhytskaya, V. Sikirzhytski, I.K. Lednev, Determining gender by Raman spectroscopy of a bloodstain, *Analytical chemistry*, 1486-1492, **2017**.

[58] K. Virkler, I.K. Lednev, Blood species identification for forensic purposes using Raman spectroscopy combined with advanced statistical analysis, *Analytical chemistry*, 7773-7777, **2009**.

[59] G. McLaughlin, D.C. Kyle, I.K. Lednev, Raman spectroscopy of blood for species identification, *Analytical chemistry*, 11628-11633, **2014**.

[60] K. Virkler, I.K. Lednev, Raman spectroscopic signature of blood and its potential

application to forensic body fluid identification, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 525-534, **2010**.

[61] I.T. Jolliffe, J. Cadima, Principal component analysis: a review and recent developments, *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, **2016**.

[62] E. Polat, S. Günay, Kısmi En Küçük Kareler Ve Bir Uygulama, VI. İstatistik Günleri Sempozyumu Bildiriler Kitabı, **2009**.

[63] L.C Lee, C.Y. Liong, and A.A. Jemain, Partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) for classification of high-dimensional (HD) data: a review of contemporary practice strategies and knowledge gaps, *Analyst*, 3526-3539, **2018**.

[64] J.F. Pereira, M.J.L. Vieira, M.F. Pimentel, A. Braz, R.S. Honorato, Evaluation and identification of blood stains with handheld NIR spectrometer, *Microchemical Journal*, 561-566, **2017**.

[65] N.F.N. Hassan, D.D. Sandran, M. Mohamad, Y. Zakaria N.Z.M. Muslim, Estimation of The Age of Bloodstains on Soil Matrices By ATR-FTIR Spectroscopy and Chemometrics.

[66] R. Gautam, D. Peoples, K. Jansen, M. O'Connor, G. Thomas, S. Vanga, I.J. Pence, A. Mahadevan-Jansen, Feature selection and rapid characterization of bloodstains on different substrates, *Applied Spectroscopy*, 1238-1251, **2020**.

[67] Z. Yang, L. Shi, J. Cai, H. Zhang, Raman Spectral Blood Stain Identification Based on Band Selection, *Spectroscopy and Spectral Analysis*, **2020**.

[68] C.L. Glynn, T.Schlagetter, The effect of washing and blood enhancement reagents on the use of Raman spectroscopy for human blood identification, **2016**.

