



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



**HALÜSİNASYON YAPAN YENİ TASARIM PSİKOAKTİF
MADDELERDEN 5-MeO-MiPT'İN
İDRARDA TAYİNİNE YÖNELİK
KEMOMETRİK YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Ezgi EMEN

Bağımlılık Toksikolojisi Anabilim Dalı

İzmir
2019

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**HALÜSİNASYON YAPAN YENİ TASARIM PSİKOAKTİF
MADDELERDEN 5-MeO-MiPT'İN
İDRARDA TAYİNİNE YÖNELİK
KEMOMETRİK YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ**

Ezgi EMEN

Danışman
PROF. DR. SERAP ANNETTE AKGÜR

Bağımlılık Toksikolojisi Anabilim Dalı
Bağımlılık Toksikolojisi Tezli Yüksek Lisans Programı

İzmir
2019

Tez Değerlendirme Kurulu Üyeleri

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Prof.Dr. Serap Annette AKGÜR

(Danışman)

Üye : Prof.Dr. Yücel ARISOY

Üye : Doç.Dr. Hasan ERTAŞ



Yüksek Lisans Tezinin kabul edildiği tarih: 17.05.2019

Önsöz

Lisans eğitimim bittikten sonra hemen eyleme dönüştüremesem de içimde her zaman lisansüstü eğitim alma isteği vardı. Yüksek lisans eğitimimin hangi alanda ve nerede olmak istediğim kısmı uzun araştırma sürecinden geçti. Bulduğum ildeki tüm lisansüstü eğitim programlarını ve içeriklerini araştırarak oluşturduğum tabloda “Bağımlılık Toksikolojisi Yüksek Lisans Programı” en yüksek puanı aldı ve sürecim böyle başladı. O zamanlar, bugünlerin geleceğini bilemesem de şimdi görüyorum ki en doğru kararı almışım. Eğitimim sadece ders esnasında teorik bilgilerle değil, danışman hocamın odasında hayata dair sohbet edip çay içtiğimde, araştırma görevlileri arkadaşlarımla bitmek bilmeyen sevgi ve sabırlarıyla karşılaştığımda, rutin analizlerin yapıldığı bölümdeki personelin zorunlu olmadığı halde bile iyi niyetli insancıl yardımlarını gördüğümde de devam etti.

İlk başlarda tez döneminde ders olmadığı için kopup gitmekten korkarken aslında bu yıl en verimli yılımın olacağını düşünmemiştim. Araştırma konum; aynı zamanda bir proje olduğu için her adım planlanıp, uygulanmaya çalışıldı. Laboratuvarında geçen deneysel çalışmalarım hem çok zevkli hem de çok öğreticiydi.

Bir makalede şöyle yazmış yazar; “*Evet, bilimin mutfağı kalabalık, telaşlı, hareketli ve gürültülü olabilir. Ama harika yemekler ortaya çıkıyor. Sonunda, önemli olan yemekler*” (Schatz, 2004).

Tez dönemimde yorucu, uzun ve çoğu zaman düşünülenenden fazla efor harcadım ancak geldiğim nokta benim için son derece doyurucu oldu. Öyle ki bu yolda yürümekten çok mutlu olduğumu belirtmek isterim.

İzmir, 17.05.2019

Ezgi EMEN

Özet

HALÜSİNASYON YAPAN YENİ TASARIM PSİKOAKTİF MADDELERDEN 5-MeO-MiPT'İN İDRARDA TAYİNİNE YÖNELİK KEMOMETRİK YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ

Yeni tasarım maddeler grubundan olan triptaminlerin kullanımı ile ilgili son yıllarda ölüm raporları ve zehirlenme bildirimleri hızlı bir artış içindedir. Bu maddelerin gerçek içerikleri, akut ve uzun vadeli etkileri ve toksikolojik riskleri ve hatta bağımlılık potansiyelleri tam olarak bilinmemektedir. Bu çalışmada triptamin türevlerinden olan 5-Metoksi-N-metil-N-izopropiltriptamin (5-MeO-MiPT)'in sentetik olarak üretilen idrarda hassas, güvenilir ve duyarlı analizine olanak sağlayacak yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır. 5-MeO-MiPT, sentetik idrar numunelerinde katı faz ekstraksiyon (SPE) metodu ile analiz edilmiştir. Kemometrik tarama tasarımı için Plackett-Burman tasarımı kullanılmış ve 7 faktör (numune hacmi, hidroliz maddesi hacmi, hidroliz sıcaklığı, hidroliz süresi, şartlandırma hacmi, yıkama hacmi ve elüsyon hacmi) için 8 deney yapılmıştır. En etkili üç faktör belirlenmiş ve merkezi kompozit tasarım uygulanmıştır. Sonuçlar yüzey yanıt metodolojisi ile değerlendirilmiş, optimum çalışma koşulları belirlenmiştir. Yöntem seçicimlilik, doğrusallık, saptama alt sınırı (LOD), belirtme alt sınırı (LOQ), doğruluk, gün içi tekrarlanabilirlik, seyrelme tamlığı, kararlılık ve taşınma etkisi parametreleri incelenmiştir. Tüm deneyler Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometresi (Thermo Finnegan ISQ MS) ile analiz edilmiştir. Bu çalışmada kemometrik tarama tasarımı sonucunda, en etkili parametreler idrar analizinde örnek hacmi, hidroliz sıcaklığı ve elüsyon hacmi olarak bulunmuştur. Merkezi kompozit tasarım ile bu 3 faktör için sonuçlar sırasıyla 1 ml, 30°C, 3,5 ml olarak belirlenmiştir. Optimize edilen bu yöntem ile yapılan validasyon çalışmalarında, seçicimlilik, doğrusallık (25-500 ng/ml), LOD 5,63 ng/ml, LOQ 18,75 ng/ml, doğruluk (%43,01- %101,47), gün-içi tekrarlanabilirlik (100 ng/ml derişimde 3 paralel, % RSD 4,43), seyreltme tamlığı, taşınma etkisi ve kararlılık parametreleri çalışılmıştır. Kısa sürede daha az maliyetli analizler yapmak ve ayrıca en etkili sonuçları elde etmek adli toksikolojik analizler yönünden oldukça önemlidir. Kemometrik tarama tasarımları analitik deneylerdeki faktörlerin belirlenmesinde ayrıca az sayıda denemeler ile büyük miktarda bilgi üretilmesi ve yanıtların değişkenler arasındaki etkileşim etkisini değerlendirmesinde önemli bir role sahiptir. Analizinin yapılamaması nedeniyle kullanıcıların

saptanmasını engelleyen bu maddelerin analizi için geliştirilen toksikolojik analiz yöntemi; sağlık kuruluşlarında rutin analize imkân sağlayabileceğini öngörmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: 5-MeO-MiPT; Adli Toksikoloji; Gaz kromatografisi-Kütle Spektrometresi, Katı-Faz Ekstraksiyonu, Kemometri.



Abstract

DEVELOPMENT A CHEMOMETRIC METHOD IN URINE FOR NEW DESIGNER PSYCHOACTIVE HALLUCINATING SUBSTANCE, 5-MEO-MIPT

Recent years, poisoning and death reports related to the use of tryptamines from the NPS (New Psychoactive Substances) are found in the literature. Real composition of these products, their acute and long-term effects and their toxicological risks or even their addictive potential remain unknown. In the scope of this thesis, the analysis and optimization of the effects of hydrolysis and solid-liquid extraction processes during the analysis of 5-MeO-MIPT by GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectrometry). 5-MeO-MIPT was used in synthetic urine samples with solid phase extraction (SPE) method. For chemometric screenings design, Plackett-Burman were used. 8 experiments were performed for 7 factors (sample volume, hydrolysis agent volume, hydrolysis temperature, hydrolysis time, conditioning volume, washing volume and elution volume). The most effective three factors were determined and central composite design (CCD) was applied and results were evaluated with surface response methodology. Optimum values were determined and method were validated for selectivity, linearity, limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ), accuracy, between intra-day repeatability, stability and carry over. All experiments were performed by GC-MS. In this study, the most effective parameters were found sample volume, hydrolysis temperature and elution volume for 5-MeO-MIPT in urine analysis. Optimum values for these parameters were calculated by surface response methodology and the results were determined 1 ml, 30°C, 3,5 ml, respectively. The optimized method was validated for selectivity, linearity (linear between 25-500 ng/ml), limit of detection (LOD 5,63 ng/ml), limit of quantitation (LOQ 18,75 ng/ml) accuracy (43,01%-101,47%), between intra-day repeatability (at 100 ng/ml concentration, 3 parallel, 4,43% RSD), stability and carry over parameters. In a short period of time, it is very important to make less cost analysis and also to find the most effective results. For this reason, chemometric screening designs are important for determining factors in analytical experiments also the generation of large amounts of information from a small number of experiments and the possibility of evaluating the interaction effect between the variables on the

response. The toxicological analysis method developed for the analysis of these substances which prevent the detection of users due to the lack of analysis; health organizations can provide the possibility of routine analysis.

Keywords; 5-MeO-MiPT, Forensic Toxicology; Gas Chromatography-Mass Spectrometry, Solid-Phase Extraction, Chemometry.



İçindekiler

Önsöz.....	IV
Özet.....	V
Abstract.....	VII
İçindekiler	IX
Tablolar Dizini.....	XI
Şekiller Dizini	XII
Kısaltma Listesi	XIII
Giriş.....	1
1.1. Araştırmanın Problemi.....	1
1.2. Araştırmanın Sorusu	1
1.3. Araştırmanın Hipotezleri	1
1.4. Araştırmanın Varsayımları.....	2
1.5. Araştırmanın Sınırlılıkları	2
1.6. Araştırmanın Amacı	2
Genel Bilgiler	3
2.1. Yeni tasarım maddeler	3
2.2. Triptaminler	3
2.3. 5-metoksi-N- metil-N-izopropiltriptamin (5-MeO-MiPT).....	4
2.3.1. 5-MeO-MiPT'in Kimyasal Özellikleri.....	4
2.3.2. 5-MeO-MiPT'in Farmakokinetik ve Farmakodinamik Özellikleri	5
2.4. Adli Toksikolojik Analizlerde Kullanılan Biyolojik Materyaller	7
2.4.1. İdrar	7
Gereç ve Yöntem	8
3.1. Deneylerde Kullanılan Malzemeler	8
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	8
3.1.2. Kullanılan Araç, Gereç ve Cihazlar	8
3.2. Adli Toksikolojik Analizlerde Kullanılan Yöntemler.....	9
3.2.1. Kromatografik Yöntemler.....	9
3.2.2. Gaz kromatografisi Kütle spektrometresi	9
3.3. Kemometri	12
3.3.1. Deneysel Tasarım	12
3.3.1.1. Yanıt Yüzey Tasarımı	13

3.3.1.2. Merkezi Kompozit Tasarımı	13
3.4. Yöntemin Kemometrik Optimizasyonu	14
3.5. Hidroliz Aşaması (Optimize edilen)	16
3.6. Katı Faz Ekstraksiyon Aşaması (Optimize edilen)	16
3.7. Validasyon.....	17
Bulgular.....	18
4.1. Tarama Tasarımı Sonuçları.....	18
4.2. Merkezi Kompozit Tasarım Sonuçları.....	19
4.3. Yöntem Validasyon Verileri.....	24
4.3.1. Seçimlilik.....	24
4.3.2. Doğrusallık.....	25
4.3.3. Belirtme Alt Sınırı (Limit of Detection, LOD).....	27
4.3.4. Saptama Alt Sınırı (Limit of Quantitation, LOQ)	27
4.3.5. Doğruluk	28
4.3.6. Kesinlik-Tekrarlanabilirlik.....	28
4.3.7. Seyreltme Tamlığı	30
4.3.8. Kararlılık	30
4.3.9. Taşınma Etkisi.....	30
Tartışma	32
Sonuç ve Öneriler.....	35
Kaynaklar	36
Teşekkür	41
Özgeçmiş	42

Tablolar Dizini

Tablo 1. GC-MS cihaz koşulları.....	11
Tablo 2. Plakett-Burman Tarama Tasarımı	14
Tablo 3. Plakett-Burman Jeneratörleri	14
Tablo 4. 7 Faktörlü Plakett-Burman Deney Tasarımı	15
Tablo 5. Merkezi Kompozit Tasarım Deney Tasarımı.....	16
Tablo 6. Uygulanan Plakett-Burman Tarama Tasarımı ve Deney Sonuçları.....	18
Tablo 7. Plakett-Burman Tarama Tasarımına Göre Elde Edilen Regresyon Katsayılar	18
Tablo 8. Merkezi Kompozit Tasarımı İçin Belirlenen Seviye Değerleri	19
Tablo 9. Uygulanan Merkezi Kompozit Tasarım ve Elde Edilen Sonuçlar	19
Tablo 10. Merkezi Kompozit Tasarımı ile Elde Edilen Regresyon Katsayıları.....	20
Tablo 11. Merkezi Kompozit Tasarım ile Elde Edilen Optimum Ekstraksiyon Değerleri.....	24
Tablo 12. Kalibrasyon eğrisi için 5 farklı derişime göre elde edilen alan değerleri .	26
Tablo 13. 5-MeO-MiPT'e ait LOQ, LOD değerleri.....	28
Tablo 14. 5-MeO-MiPT'e ait geri kazanım verileri	29
Tablo 15. 5-MeO-MiPT'e ait gün-içi ve günler-arası tekrarlanabilirlik verileri.....	29

Şekiller Dizini

Şekil 1. Doğal halüsinojenik triptaminlerin moleküler yapıları (Araújo, Carvalho, Bastos, Guedes de Pinho, & Carvalho, 2015a)	4
Şekil 2. Triptaminlerin sınıflandırması	5
Şekil 3. 5-MeO-MiPT'in kimyasal formülü	5
Şekil 4. 5-MeO-MiPT'in metabolik yolu	6
Şekil 5. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresinin şematik gösterimi	10
Şekil 6. Uygulanan katı faz ekstraksiyonu şematik gösterimi.....	17
Şekil 7. Merkezi Kompozit Tasarımına Göre Standardize Edilmiş Etkiler.....	21
Şekil 8. Elüsyon Hacmi ve Hidroliz Sıcaklığının İkili Etkisi (Surface Plot).....	21
Şekil 9. Elüsyon Hacmi ve Hidroliz Sıcaklığının İkili Etkisi (Contour Plot).....	22
Şekil 10. Elüsyon Hacmi ve Örnek Hacminin İkili Etkisi (Surface Plot).....	22
Şekil 11. Elüsyon Hacmi ve Örnek Hacminin İkili Etkisi (Contour Plot).....	23
Şekil 12. Hidroliz Sıcaklığı ve Örnek Hacminin İkili Etkisi (Surface Plot).....	23
Şekil 13. Hidroliz Sıcaklığı ve Örnek Hacminin İkili Etkisi (Contour Plot).....	24
Şekil 14. Boş idrar örneğine (kör) ve 100 ng/ml olacak şekilde 5-MeO-MiPT standardı katılmış idrar örneğine ait kromatogram	25
Şekil 15. İdrar örneğine ekim yapılmış 5-MeO-MiPT analiti kromatogramı.....	25
Şekil 16. 5-MeO-MiPT'e ait 5 noktalı kalibrasyon eğrisi, denklemi ve korelasyon katsayısı.....	27
Şekil 17. 5-MeO-MiPT'e ait farklı saatlere ait kararlılık çalışması sonuçları.....	30
Şekil 18. Taşınma etkisi için yüksek derişimde örneğe ve ardından verilen kör örneğe ait kromatogram	31

Kısaltma Listesi

BSTFA %1 TMCS	:	N,O-bis-trimethylsilyl-trifluoroacetamide+%1 trimethylchlorosilane
CCD	:	Central Composite Design
Dk.	:	Dakika
DiPT	:	N,N-diizopropiltriptamin
DMT	:	N, N-dimetiltriptamin
EMCDDA	:	Avrupa Uyuşturucu ve Uyuşturucu Bağımlılığı İzleme Merkezi
EWA	:	Erken Uyarı Danışmanlığı
GHB	:	Gamma-hidroksibutirrat
GC-MS	:	Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
GK	:	Geri Kazanım
KOH	:	Potasyum Hidroksit
LOD	:	Belirtme Alt sınırı (Limit of Detection)
LOQ	:	Saptama Alt sınırı (Limit of Quantitation)
LSD	:	Liserjik asit dietilamid
M	:	Mol
NPS	:	New Pyschoactive Substances
Ort	:	Ortalama
ppb	:	Parts Per Billion (Milyarda bir parça)

ppm	: Parts Per Million (Milyonda bir parça)
RSD	: Bağıl Standart Sapma (Relative Standard Deviation)
R ²	: Korelasyon Katsayısı
SD	: Standart Sapma (Standard Deviation)
sn.	: saniye
TUBİM	: Türkiye Uyuşturucu ve Uyuşturucu Bağımlılığı İzleme Merkezi
UNODC	: Birleşmiş Milletler Uyuşturucu ve Suç Dairesi
YTM	: Yeni Tasarım Maddeler
4-OH-DiPT	: 4-hidroksi-N, N-diizopropiltriptamin
5-MeO-DiPT	: 5-metoksi-N,N-diizopropiltriptamin
5-MeO-DMT	: 5-metoksi-N, N-dimetiltriptamin
5-MeO-MiPT	: 5-Metoksi-N-metil-N-izopropiltriptamin

Giriş

Yasadışı madde kullanımı ve ilgili problemler tüm dünyada zaman içinde değişen karmaşık ve çok yönlü, ülkeler arasında farklılıklar gösteren bir durum haline gelmiştir. Bu nedenle, bireylere ve toplumlara verilen zararları önlemek ve iyileştirmek için gereken cevaplar, zorunlu ve çok çeşitlidir. Hali hazırda piyasada olan yeni tasarım maddeleri kullanan kişilerin saptanmasına yönelik olarak bu maddelerin tanımlanması adli toksikoloji laboratuvarları için önemli sorunların başında gelmektedir. Yeni tasarım maddelerin içerikleri sürekli değiştiği ve laboratuvarlarda analizlerinin zorluğundan dolayı, yeni tasarım maddelerden 5-Metoksi-N-metil-N-izopropiltriptamin (5-MeO-MiPT)'in kullanım durumu göz önüne biyolojik materyallerde tamamlayıcı analitik teknikler geliştirilmesi hem klinik toksikoloji hem de adli toksikoloji açısından son derece önemlidir.

1.1. Araştırmanın Problemi

Biyolojik materyallerin ve yeni tasarım maddelerin karmaşık yapıları nedeniyle örnek hazırlama aşamasından analiz sonucunun yorumlanması aşamasına kadar olan süreç büyük önem arz etmektedir. Örnek hazırlama tekniklerinin geliştirilmesi yanında kullanılacak kimyasalların, analiz sürelerinin ve deney sayılarının azaltılmasına olanak sağlayan kemometrik yöntemler son yıllarda uygulanmaya başlanmıştır.

1.2. Araştırmanın Sorusu

Dünyada son zamanlarda kullanımı artan ve ülkemizde analizi yapılmayan psikoaktif maddelerden 5-MeO-MiPT'in idrarda analizi, kemometrik yöntemlerle optimizasyonunu sağlayıp, yöntemi valide etmektir.

1.3. Araştırmanın Hipotezleri

1. 5-MeO-MiPT sentetik idrarda analiz edilebilir.
2. Kemometrik analiz yöntemleri 5-MeO-MiPT'in sentetik idrarda analizi için yöntem optimizasyonunda kullanılabilir.
3. Kromatografik yöntemlerle 5-MeO-MiPT in doğru, güvenilir ve hassas tayini gerçekleştirilir.

1.4. Araştırmanın Varsayımları

Bu çalışmada uygulanan ekstraksiyon yönteminde, örnek hacmi, pH, tampon çözelti hacmi, sıcaklık, çalkalama hızı ve süresi, oda sıcaklığı gibi deney ve çalışma koşullarının, optimum değerleri ve ekstraksiyon verimine etkisini görmek için kemometrik bir yöntem belirlenmiş olup, minimum deney sayısı ile tarama yapılmıştır. En etkili olan ekstraksiyon etmenleri tespit edilip 5-MeO-MiPT'in idrarda analizine ilişkin en uygun yöntemin Plaket–Burman tarama tasarımı olduğu varsayılmıştır.

1.5. Araştırmanın Sınırlılıkları

Bu çalışmada gerekli olan tüm kimyasallar uygun saklama koşullarında olup, kullanılan tüm araç ve gereçler ise laboratuvar prosedürlerine göre kullanılmıştır. Optimizasyon deneylerinde farklı hidroliz sıcaklıkları sürekli termometrelerle kontrol edilmiştir. Ancak katı- sıvı faz ekstraksiyonunda kartuşun, şartlama, yükleme, yıkama ve elüsyon aşamalarında basınç değişimleri her zaman aynı olamamıştır. Laboratuvar ortamında hazırlanan sentetik idrarda geliştirilen yöntemin gerçek olgulara uygulanması için kullanıcılardan alınan idrar rneği bulunamaması da çalışmanın bir diğer kısıtlılığıdır.

1.6. Araştırmanın Amacı

Bu tez çalışması kapsamında yeni tasarım maddelerden 5-MeO-MiPT'in sentetik olarak üretilen idrarda hassas, güvenilir ve duyarlı analizine olanak sağlayacak kemometrik yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Genel Bilgiler

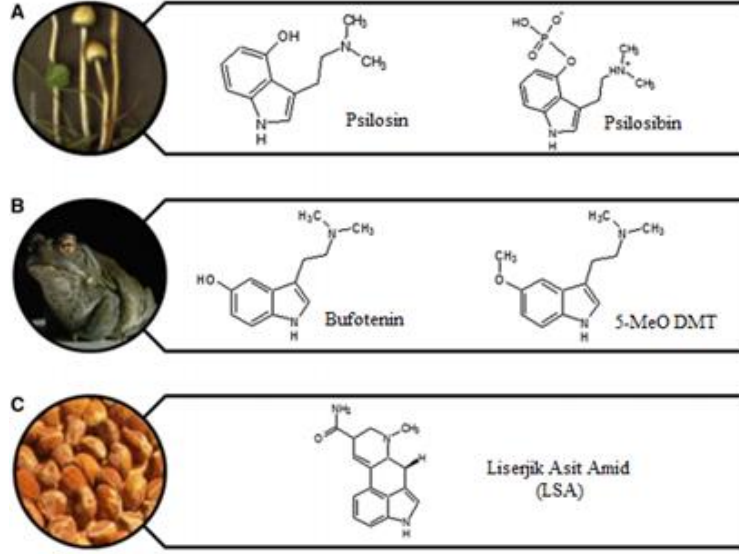
2.1. Yeni tasarım maddeler

Yeni tasarım maddeler, saf formlarda veya preparatlarda bulunur ve genellikle kontrolü atlamak için “insan tüketimi için değil” olarak etiketlenmektedir. Öyle ki, YTM, birçok ülkede internet üzerinden veya bazı marketlerde “yasal kafa yapıcı”, “tasarım maddeler”, “araştırma kimyasalları”, “banyo tuzları” bitkisel gıdalar” veya “oda kokuları gibi farklı isimlerle satılmaktadır (Ayres & Bond, 2012). Yeni tasarım maddelerin kolay bulunması ve ucuz olması nedeniyle kullanımı ülkemizde ve dünyada giderek artan ve kalıcı çözümler üretilmesi gereken bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. YTM, EMCDDA tarafından kimyasal yapılarına göre 6 ana gruba ayrılır; Sentetik Katinonlar, Sentetik Kannabinoidler Fenetilaminler, Triptaminler, Piperazinler, Diğer Grup Maddeler (indanlar, benzodifuranlar, narkotianaljezikler, kokain türevleri, ketamin, and fenisiklidin türevleri (EMCDDA, 2015). 6 ana gruptan biri olan triptaminlerin 2009’dan bu yana 16 türevi sentezlenmiştir (Grafinger, Hädener, König, & Weinmann, 2018).

2.2. Triptaminler

Doğal triptaminler ilk defa 1958 yılında izole edilmiştir (Badham 1984; Wurst ve diğerleri 2002). Böylece, psikoaktif mantarlar kısa sürede dünya çapında “sihirli mantarlar” olarak tanınmış ve Amerika Birleşik Devletleri (ABD), Avrupa ve Japonya’daki eğlence amaçlı kullanıcılar arasında popüler olmuştur.

Sentezleri, dozları ve yan etkileri TIHKAL kitabında (Tryptamines: I Have Known and Loved) (Shulgin ve Shulgin 1997) anlatılmıştır. Günümüzde tüketilen doğal triptaminler, “ayahuasca” bitkisinde bulunan, her ikisi de popüler olan DMT (N, N-dimetiltriptamin) ve 5-MeO-DMT (5-metoksi-N, N-dimetiltriptamin) içermektedir. Yapısal olarak doğal triptaminlere benzer birçok yeni triptamin türevi son birkaç yılda tespit edilmiştir. En popüler sentetik triptaminlerden biri, 5-MeO-DiPT (5-metoksi-N,N-diizopropiltriptamin), DiPT (N,N-diizopropiltriptamin) ve 4-OH-DiPT (4-hidroksi-N,N-diizopropiltriptamin) analoglarıdır.



Şekil 1. Doğal halüsinojenik triptaminlerin moleküler yapıları (Araújo, Carvalho, Bastos, Guedes de Pinho, & Carvalho, 2015a)

5-MeO-DiPT “Foxy” veya “Foxy Methoxy” adlarıyla bilinmektedir. ABD’de ve bazı Avrupa ülkelerinde 5-MeO-DiPT ve doğal analogu olan 5-MeO-DMT’yi kontrollü maddeler listesine dâhil ettikten sonra yakın zamanda başka bir triptamin türevidi ortaya çıkmıştır. 5-MeO-MiPT (5-metoksi-N- metil-N-izopropiltriptamin), “moxy” olarak da bilinir ki bu madde de 5-MeO-DMT türevidir. 5-MeO-MiPT’in ilk tespiti Nisan 2015’te gerçekleşmiş, 2016 yılında Erken Uyarı Sistemine bildirilmiştir (EMCCDA, 2016).

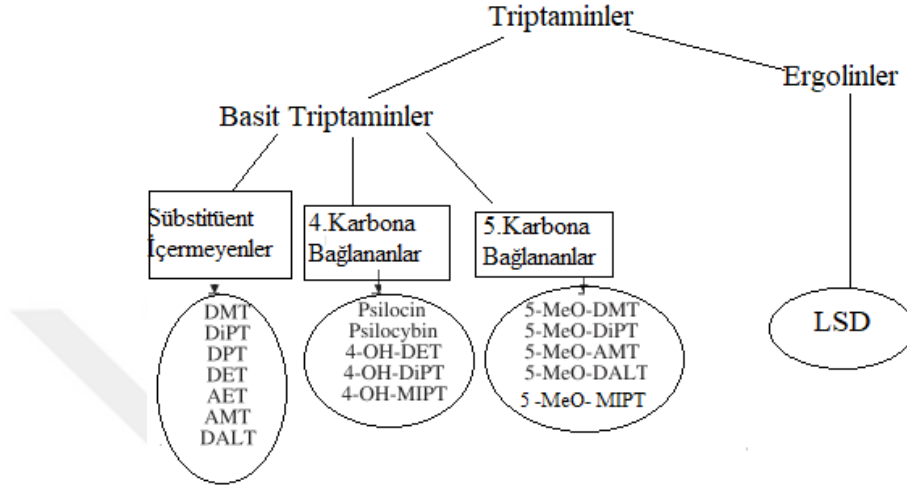
2.3. 5-metoksi-N- metil-N-izopropiltriptamin (5-MeO-MiPT)

Halüsinojenik etkilerinden dolayı tercih edilen yeni tasarım maddelerden biri olan 5-MeO-MiPT internette araştırıldığında “sihirli mantar” denilen mantarlarda bulunan psilosibin maddesinin yerini alacağı yönde cazip ve çekici reklamlarla satılmaktadır (Liechti, 2015). Türkiye’de ise, 22/05/2013-4827 sayılı Bakanlar Kurulu kararı ile 5-MeO-MiPT yasaklı maddeler listesine girmiştir (EMCDDA Ulusal Raporu, 2013).

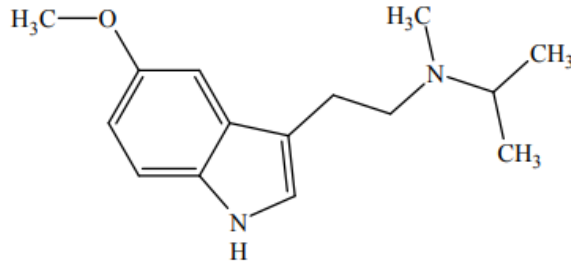
2.3.1. 5-MeO-MiPT’in Kimyasal Özellikleri

Genel olarak, klasik halüsinojenler fenilakilaminler ve indolaminler olmak üzere iki ana yapısal sınıfa ayrılmaktadır. İndolaminler de modifikasyon bölgesine göre bölünebilecek basit triptaminler (DMT ve psilosibin) ve LSD gibi ergolinler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Fantegrossi et al., 2008).

Basit triptaminler, iki karbonlu bir yan zincir tarafından bir amin grubuna birleştirilen bisiklik bir benzen ve pirol halkası (indol halka yapısı) kombinasyonuna sahiptir. Ergolinler, indol sistemli ve tetrasiklik bir halka ile karmaşık ve nispeten katı bir yapıya sahiptir. 5-MeO-MiPT indol halkasının 5. konumunda bir süstitüenti olan triptamin türevleri arasındadır.



Şekil 2. Triptaminlerin sınıflandırması



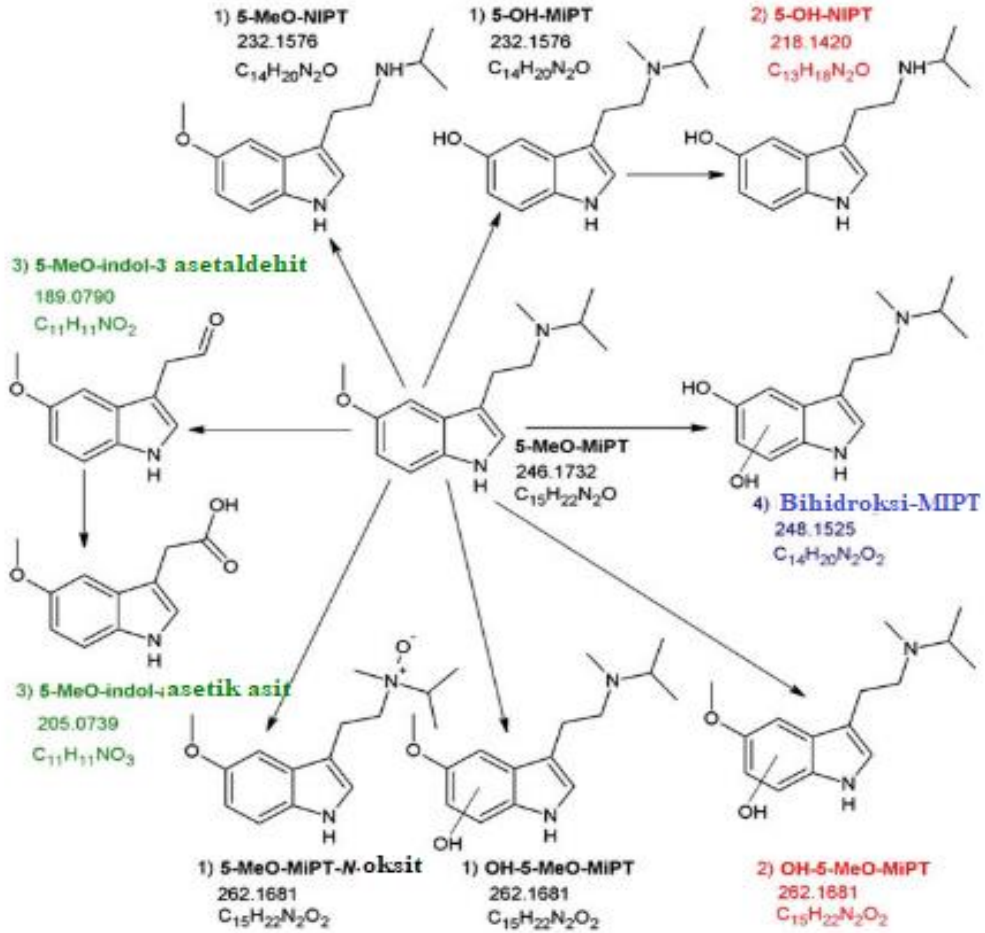
Şekil 3. 5-MeO-MiPT'in kimyasal formülü

5-MeO-MiPT'in moleküler kütlesi 246.354 g/mol, kapalı formülü $C_{15}H_{22}N_2O$ 'dur. 5-MeO-MiPT'in; 5-Metoksi-N-metil-N-izopropiltriptamin, N-[2-(5-metoksi-1H-indol-3-il)etil]-N metilpropan-2-amin gibi farklı IUPAC isimlendirmeleri mevcuttur.

2.3.2. 5-MeO-MiPT'in Farmakokinetik ve Farmakodinamik Özellikleri

Sentetik triptaminler kullanıcıya bağlı olarak, ağızdan (burundan alma, koklama), soluma, intravenöz veya kas içi enjeksiyon, oral yolla (bir kapsül içine yutma, bir

sigara kağıdına sarılmış veya bunlarla birlikte içmek) veya rektal olarak suistimal edilebilir (Corkery, Durkin, Elliott, Schifano, & Ghodse, 2012). 5-MeO- MiPT oral yolla 4-6 mg, ya da sigara şeklinde 12-20 mg alınır ve etki süresi 4-6 saattir.



Şekil 4. 5-MeO-MiPT'in metabolik yolu

Halüsinojenlerin insanlarda etkileri oldukça öznedir ve değerlendirilmesi zordur. Genel olarak, triptamin türevleri, etkilerinin nispeten hızlı başlangıcı ile karakterize edilir. Kullanıcılar tarafından bildirilen etkiler, bileşikler ve uygulama yolları arasında değişiklik gösterir, ancak genel olarak, halüsinojenik etkilerin uyarıcı etkilerinden de bahsedilir. İnsanlarda DMT ile yapılan doz yanıt çalışmaları, halüsinasyonların yüksek dozlarda baskın olduğunu, uyarıcı etkilerin ise düşük dozlarda daha belirgin olduğunu göstermiştir (Corkery et al., 2012). Halüsinojenler, karmaşık zihinsel ve algısal değişiklikler üretme yeteneğine sahiptir. Algısal etkiler

aşırı duyarlılık, illüzyon işitsel, görsel, duyuşal halüsinasyonlar, zaman ve mekânsal değişiklikler, gereksizlik ve duyarsızlaşma hissini kapsar.

2.4. Adli Toksikolojik Analizlerde Kullanılan Biyolojik Materyaller

Adli toksikolojik analizlerde sık kullanılan biyolojik materyaller idrar ve kan olmakla birlikte bunlara ek olarak saç, oral sıvı, nefes, ter, tırnak, yeni doğanlar için göbek kordonu, plasenta, mekonyum vb. gibi diğer materyaller de kullanılmaktadır (Akgür & Coşkunol, 2014). Bu çalışmada idrar materyali kullanılmıştır.

2.4.1. İdrar

İdrar örneğinin en önemli avantajları, kullanılan maddelerin ve metabolitlerinin yüksek konsantrasyonda bulunması ve örnek toplama aşamasının kolay olmasıdır. Ayrıca, yapısında serbest serum proteinleri, lipidler ve diğer büyük moleküler ağırlıklı bileşiklerin bulunmaması toksikolojik analizleri kolaylaştırmaktadır (Wolff et al., 1999). Kanda aranan maddenin tespit edilemediği durumlarda, idrarda o maddenin metabolitinin tespit edilmesi, maddenin yakın dönemde kullanıldığını göstermektedir. İdrar örneklerinde madde analizi doğrudan immünoassaylerle ya da spot testlerle yapılabileceği gibi uygun bir çözücü ile ekstraksiyondan sonra da yapılabilmektedir. İdrar, vücudun başlıca atılım yollarından biri olduğu için, birçok maddenin, örneğin alınmasından birkaç gün önce kullanılıp kullanılmadığını tespit etmek amacıyla kullanılan biyolojik örneklerden biridir (Keerthi R, 2016).

Gereç ve Yöntem

Bu tez çalışması 5-MeO-MiPT'in idrarda kemometrik analizine yönelik deneysel bir araştırma çalışmasıdır. Çalışma, Mayıs 2018-Nisan 2019 tarihleri arasında Ege Üniversitesi Madde Bağımlılığı Toksikoloji ve İlaç Bilimleri Enstitüsü, Bağımlılık Toksikolojisi Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın evreni; laboratuvar ortamında kimyasallar kullanılarak hazırlanmış sentetik idrar, örnekleme ise; hazırlanan sentetik idrar örneklerine farklı derişimlerde 5-MeO-MiPT standart katımı yapılmış idrar örnekleridir. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresinde tayin edilen 5-MeO-MiPT analitinin derişimi bağımlı değişkeni oluştururken, bu absorbansı etkileyecek örnek hacmi, hidroliz hacmi, hidroliz sıcaklığı vb. parametreler bağımsız değişkenleri oluşturmaktadır. Kemometrik analizler Minitab 18.0 ve Microsoft Office Excell 2010 kullanılarak yapılmıştır.

3.1. Deneylerde Kullanılan Malzemeler

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

5-MeO-MiPT standardı (Chiron)

Metanol (Sigma Aldrich)

Etil asetat (Merck)

Potasyum hidroksit (Sigma Aldrich)

BSTFA %1 TMCS (N,O-bis-trimethylsilyl-trifluoroacetamide+%1 trimethylchlorosilane) (Sigma Aldrich)

3.1.2. Kullanılan Araç, Gereç ve Cihazlar

Mikropipet (10-100 µL, 100-1000 µL)

Tüpler (10 ml'lik)

Saf su (deiyonize su)

Oasis ekstraksiyon kartuşu

Santrifüj (Nüve NF 1200 R)

Vortex (Labnet VX 100)

Vial

Azotlu uçurucu (Thermo Scientific reacti-Therm III)

Su banyosu (Nüve BM 302)

Katı-sıvı ekstraksiyon manifoldu (Agilent Technologies)

Kapiler Kolon (HP-5MS) (Agilent Technologies)

Kolon (Restek-LC Allure PFPP 5µm)

Gaz kromatografisi Kütle spektrometresi (Thermo Finnigan TRACE ISQ)

Azot gazı

3.2. Adli Toksikolojik Analizlerde Kullanılan Yöntemler

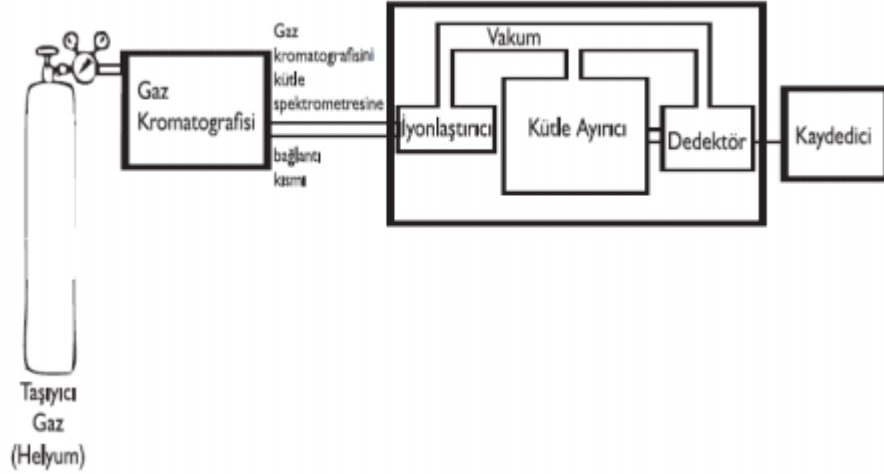
Adli toksikolojide kullanılan yöntemler genellikle; kimyasal, spektrofotometrik, immunoassay, kromatografik yöntemlerdir. Bu çalışmada kromatografik yöntemlerden olan Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS) kullanılmıştır.

3.2.1. Kromatografik Yöntemler

Kromatografi, Yunanca chroma (renk) ve graphein (yazmak) sözcüklerinin birleşmesiyle oluşmuş olup, ilk kez 1903 yılında Rus botanikçi Michael Tsvett tarafından renkli bitki pigmentlerini ayırma amaçlı kullanılmıştır. Daha sonraları, çeşitli çok bileşenli numunelerdeki bileşenlerin ayrılması ve saflaştırılmasında kullanılmaya başlanmıştır (Björnstad, Hultén, Beck, & Helander, 2009b). Günümüzde kromatografik analiz yöntemleri, bir karışımı oluşturan türlerin ayrı ayrı belirlenmesi (nitel analiz) ve karışımı oluşturan bileşenlerin miktar tayini (nicel analiz) işlemlerini hayata geçiren ve en çok kullanılan aletli analiz yöntemlerinden olmuştur. Bu yöntem yardımıyla başka yöntem birbirinden ayrılmaları çok zor ve hatta imkânsız olan maddeleri saf olarak ayırmak mümkündür.

3.2.2. Gaz kromatografisi Kütle spektrometresi

Örnek bileşenleri, büyük yüzey alanına sahip durgun fazla (kolon), onun üzerinden geçen hareketli gaz fazı arasında dağılıma uğrar. Örnek çözeltisi bir enjektör yardımıyla enjeksiyon bloğuna aktarılır. Burada kimyasal bozunmaya uğramadığı bir sıcaklıkta buharlaştırılır ve taşıyıcı gaz tarafından kolona taşınır (Wu, Lv, & Lou, 2012). Kolonda örnek bileşenleri durgun faza emdirilmiş sıvı ile etkileşerek, belli sıcaklıkta çözünürlüğüne göre iki faz arasında dağılıma uğrar. Analitler bağıl buhar basınçları ve durgun fazla etkileşim düzeyine, dedektöre ulaşım sırasına göre kromatogramda ayrı pikler biçiminde gözlenir.



Şekil 5. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresinin şematik gösterimi

Çözeltiler, durağan faz ile spesifik etkileşimlerin olduğu durumlar hariç, artan kaynama noktası sırasına göre elüe edilir. Çözünen maddelerin yeterli uçuculuğa sahip olmasını sağlamak ve hızlı bir şekilde elüe edilmeleri için 50-350°C aralığında sıcaklık kullanılır.

Bir kütle spektrometresi iyon kaynağı, kütle analiz cihazı ve dedektör olmak üzere üç bileşenden oluşur (Emerson, Durham, Gidden, & Lay, 2013; Hibbert, 2012). İyon kaynağı numunenin bir kısmını iyonlara dönüştürür. Numunenin fazına (katı, sıvı, gaz) ve bilinmeyen türler için çeşitli iyonizasyon mekanizmalarının etkinliğine bağlı olarak çok çeşitli iyonizasyon teknikleri vardır. Kütle spektrometresi (MS), bir örneğin moleküllerinden veya atomlarından oluşan gaz iyonlarının uzayda veya zamanda ayrıldığı ve kütle/yük oranlarına göre tespit edildiği analitik bir tekniktir. Bir örneğin veya molekülün elementel bileşimini belirlemek ve kimyasal yapılarını aydınlatmak içindir. Tespit edilen her kütle iyonlarının sayısı bir kütle spektrumunu oluşturur.

Ege Üniversitesi Madde Bağımlılığı, Toksikoloji ve İlaç Bilimleri Enstitüsü Bağımlılık Toksikolojisi Laboratuvarı'nda bulunan Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometresi (GC/MS) cihazı ile analizler yapılmıştır. Scan mod'ta çalışılıp, 86 iyonuna göre sonuçlar verilmiştir.



Resim 1. Çalışma kapsamında kullanılan GC-MS cihazı

GC-MS çalışma koşulları aşağıdaki Tablo 1’de gösterilmiştir.

Tablo 1.GC-MS cihaz koşulları

Kapiler Kolon	Silika dolgulu; 30 m uzunluğunda, 0,25 µm film kalınlığı ve 0,25 mm iç çapında (HP-5MS)	
Fırın Sıcaklık Programı	Başlangıç sıcaklığı 50 °C de 1.5 dakika bekleyerek, sonra 30°C/dk artışla 300 °C’ye çıkarılır ve 5 dakika bekleyerek son sıcaklığa ulaşılır.	
Taşıyıcı Gaz ve Akış	Helyum, 1 ml/dk	
Enjeksiyon Bloğu Sıcaklığı	200 °C	
Dedektör Sıcaklığı	200 °C	
Enjeksiyon Hacmi	1 µL, splitless	
Analiz Süresi	14,83dk.	
Analiz edilen madde	m/z oranları	Alıkonma zamanı (Rt)
5- MeO-MiPT	86	8,75

3.3. Kemometri

Kemometri, deneysel doğa bilimlerinde, özellikle kimyada, tanımlayıcı ve öngörücü problemleri çözmek için uygulanır. Tanımlayıcı ve öngörüşel uygulamalarda, kimyasal sistemlerin özellikleri, sistemin altta yatan sebeplerini ve yapısını öğrenme amacıyla modellenmiştir. Kemometrik teknikler özellikle analitik kimya ve metabolomik çalışmalarında yoğun olarak kullanılmaktadır (Dejaegher & Vander Heyden, 2011). Kemometri uygulama odaklı bir disiplindir ve bu nedenle standart kemometrik metodolojiler endüstriyel olarak çok yaygın şekilde kullanılırken, akademik gruplar kemometrik teori, yöntem ve uygulama geliştirmenin sürekli gelişimine odaklanmıştır. Kemometri, istatistik ve matematik ile birlikte bilgisayar kullanarak kimyasal verilerin işlenmesini kapsayan bir kimya disiplindir. Kemometri, kimyasal analizlerde, kimyasal verilerden gerçek bilginin ekstraksiyonunu veya saklı bilgilerin açığa çıkarılmasına olanak tanıyan güçlü bir araçtır (Dinç, 2007). Analitik yöntem, tek bir örnek için bile veri kümesi yığınları üretir. Çok sayıda örnek için, verilerin miktarı muazzam bir şekilde artar ve çok sıkıcı, zaman alıcı hale gelebilir. En önemlisi de manuel inceleme yanlış pozitif sonuçlar verebilir. Bu nedenle, geniş ve karmaşık veri setini analiz etmek için ileri kemometrik yöntemler ortaya çıkmıştır. Ayrıca, kemometrik yöntemler hızlı zaman alanında doğru ve önemli sonuçlar sağlar. Yanıt yüzey metodu vb. pek çok kemometrik yöntem vardır ve her yöntemin çalışma türüne göre kullanılması gerekir (Kumar & Sharma, 2018).

3.3.1. Deneysel Tasarım

Denemelerin tasarımı (DOE, DOX veya deneysel tasarım), varyasyonu yansıtmak için varsayılan koşullar altında bilginin varyasyonunu tanımlamayı veya açıklamayı amaçlayan herhangi bir görevin tasarımıdır. Deneysel tasarım genellikle tasarımın doğrudan varyasyonu etkileyen koşulları ortaya koyan deneylerle ilişkilidir. Bir deney, en basit haliyle, “girdi değişkenleri” veya “öngörücü değişkenler” olarak da adlandırılan bir veya daha fazla bağımsız değişken tarafından temsil edilen önkoşullarda bir değişiklik getirerek sonucu tahmin etmeyi amaçlar. Bir veya daha fazla bağımsız değişkendeki değişiklik genellikle “çıktı değişkenleri” veya “yanıt değişkenleri” olarak da adlandırılan bir veya daha fazla bağımlı değişkende bir değişiklikle sonuçlanacağı varsayılır. Deney tasarımı, dış faktörlerin sonuçları etkilemesini önlemek için sabit tutulması gereken kontrol değişkenlerini de

tanımlayabilir (Asadi & Zilouei, 2017). Deneysel tasarım sadece bağımlı, bağımsız ve kontrol değişkenlerinin seçimini değil aynı zamanda istatistiki olarak en uygun koşullar altında deneyin teslimini planlamayı da içerir. Deneyde kullanılacak tasarım noktalarının (bağımsız değişkenlerin tekli kombinasyonları) setinin belirlenmesi için birçok yaklaşım vardır. Kabaca deneysel tasarımlar, tarama tasarımlarına (örneğin, tam faktörlü, kesirli faktörlü ve Plackett-Burman tasarımları), yanıt yüzey tasarımlarına ve karışım tasarımlarına ayrılabilir.

3.3.1.1. Yanıt Yüzey Tasarımı

Yanıt yüzey tasarımları, en önemli faktörlerin optimal seviyelerini bulmak için kullanılır. Bu tasarımlarda faktörler en az üç düzeyde incelenir. Optimum koşullar genellikle tasarım sonuçları ile oluşturulan tepki yüzeylerinden kaynaklanır. Faktörler verilen seviyelerde ayarlanabilecek ve sınırlanabilecek parametrelerdir; sıcaklık, pH, konsantrasyon, reaksiyon süresi, vb. reaktifler ve bir metodun veya prosedürün yanıtlarını veya sonuçlarını etkiler. Faktörler ve seviye aralıkları, en iyi koşulları bulmaya çalışan deney alanını oluşturur (Bezerra, Santelli, Oliveira, Villar, & Escalera, 2008). Faktörler ayrıca “etkileşime girebilir”, örneğin, iki faktörlü bir etkileşim, bir faktörün yanıt üzerindeki etkisi, ikinci faktörün farklı seviyelerinde farklı olduğunda meydana gelir. Yalnızca bir faktörün optimize edilmesi gerektiğinde, basit tek değişkenli prosedür uygulanır. Ancak, genellikle iki veya daha fazla faktör çalışılmaktadır. Bu tek değişkenli veya çok değişkenli optimizasyon stratejileri merkezi kompozit tasarım (CCD) ve Box Behnken (BBD) tasarımları kullanılarak yapılabilir. Bu tasarımlarla elde edilen ikinci derece model denklemlerinden yanıt yüzey grafikleri ve kontur grafikleri oluşturulur.

3.3.1.2. Merkezi Kompozit Tasarımı

Merkezi bir kompozit tasarım, üç yüzeyli tam bir deneysel deney kullanmaya gerek kalmadan yanıt değişkeni için ikinci bir düzen (ikinci dereceden) bir model oluşturmak için yanıt yüzey metodolojisinde faydalı olan deneysel bir tasarımdır.

Optimum değerlerin elde edilmesi amacıyla kullanılır. Merkezi kompozit tasarım, 3 ya da 5 seviyeli yapılabilir. Bu tasarımla parabolik terimler içeren ikinci dereceden modeller oluşturulur. Bu tip tasarım için üç farklı tasarım noktası bulunur. Bunlar; iki seviyeli fraksiyonel faktöriyel noktaları, star noktalar ve merkezi noktalardır (Bezerra et al., 2008). Tasarlanan deney yapıldıktan sonra, sonuçları elde

etmek için bazen yinelemeli olarak doğrusal regresyon kullanılır. Kodlanmış değişkenler bu tasarımın yapımında sıklıkla kullanılır.

3.4. Yöntemin Kemometrik Optimizasyonu

Deneyleerde sentetik olarak hazırlanan idrar örnekleri kullanılmıştır.

Sentetik İdrar: Ultra saf su içerisinde 0,33 M üre, 0.12 M sodyum klorür, 0.016 M potasyum difosfat, 0.007 M kreatinin ve 0.004 M sodyum monofosfat eklenerek hazırlanmıştır (Haglock-Adler, Hurley, & Strathmann, 2014).

Optimizasyon aşamaları için 500 ng/ml derişimli örnek hazırlandı ve N,O-bis-trimetilsilil trifluoroasetamid + %1 trimetilklorosilan (BSTFA %1 TMCS) ile türevlendirilerek GC-MS'e verildi. Ancak türevlendirme yapmadan cihaza verilen örnek daha iyi sonuç vermiştir. Bu nedenle çalışmalara türevlendirme basamağı olmadan devam edilmiştir. Yöntemin optimizasyonunda en etkili faktörleri bulmak için Plakett-Burman dizaynı yapıldı.

Tablo 2.Plakett-Burman Tarama Tasarımı

	Faktörler	Birim	Min (-1)	Max (+1)
X1	Örnek Hacmi	ml	1	3
X2	Hidroliz Hacmi	ml	1	3
X3	Hidroliz Sıcaklığı	°C	20	80
X4	Hidroliz Süresi	dk	5	60
X5	Şartlama	ml	1	3
X6	Yıkama	ml	1	3
X7	Elüsyon Hacmi	ml	1	3

Tablo 3.Plakett-Burman Jeneratörleri

7	+++--
11	++-+++--+-
15	++++-+-+--
19	++-++++-+-+--
23	++++-+-+--++-+-

Tablo 4.7 Faktörlü Plakett-Burman Deney Tasarımı

Deney No/Faktör	Örnek Hacmi	Hidroliz Hacmi	Hidroliz Sıcaklığı	Hidroliz Süresi	Şartlama	Yıkama	Elüsyon Hacmi
1	-	-	-	-	-	-	-
2	+	-	-	+	-	+	+
3	+	+	-	-	+	-	+
4	+	+	+	-	-	+	-
5	-	+	+	+	-	-	+
6	+	-	+	+	+	-	-
7	-	+	-	+	+	+	-
8	-	-	+	-	+	+	+

Tablo 4'e göre yapılan deneyler sonunda elde edilen alan değerlerine göre regresyon analizi yapıp, en etkili 3 faktör belirlendi. En etkili olan 3 faktör belirlendikten sonra merkezi kompozit tasarım yapılmıştır. Buna göre α değeri; $\alpha \rightarrow \sqrt{3} = 1,682$ olarak bulunmuştur. 3 faktör için $-\alpha, -1, 0, +1, +\alpha$ değerleri belirlenmiştir.

İdrar örneklerindeki 5-MeO-MIPT miktarının belirlenmesinde bağımlı değişkenlerden öngörülen yanıtı elde etmek için, kuadratik bir polinom modeli (Denklem 1) yapılmıştır.

$$y = b_0 + \sum_{i=1}^4 b_{ii}x_i^2 + \sum_{i=1}^4 b_i x_i + \sum_{ij=1(i \neq j)}^6 b_{ij}x_i x_j$$

(Denklem 1)

Tablo 5. Merkezi Kompozit Tasarım Deney Tasarımı

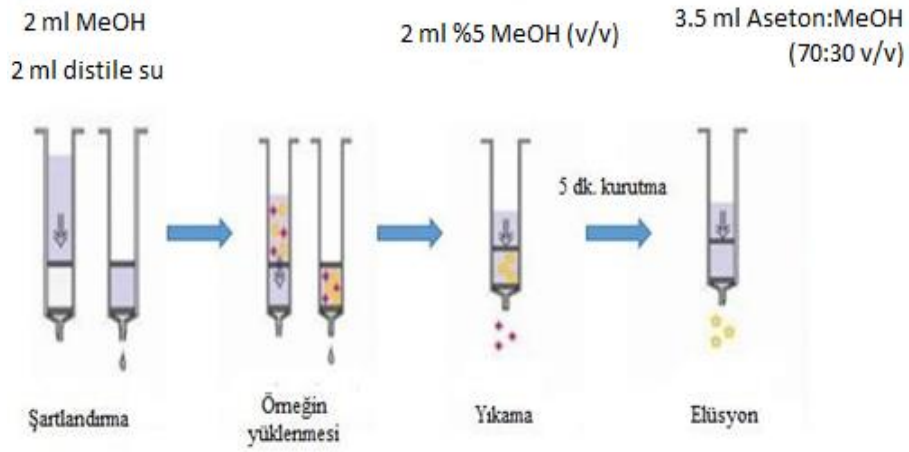
Deney no	X1	X2	X3
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	-1,682	0	0
10	1,682	0	0
11	0	-1,682	0
12	0	1,682	0
13	0	0	-1,682
14	0	0	1,682
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0
19	0	0	0
20	0	0	0

3.5. Hidroliz Aşaması (Optimize edilen)

5-MeO-MiPT standart katımı yapılan idrar örneklerine 1 M KOH çözeltisinden 1 ml eklendi. Karışım vortekslendi ve 30°C’de 30 dakika hidroliz işlemi yapıldı.

3.6. Katı Faz Ekstraksiyon Aşaması (Optimize edilen)

1 ml sentetik idrar örneğine 5-MeO-MiPT standart katımı yapıldı. Karışım 10 saniye süre ile vortekslendi. Katı-faz ekstraksiyonu için Oasis HLB kartuş kullanıldı. Yapılan işlemler Şekil 6’da gösterilmiştir.



Şekil 6. Uygulanan katı faz ekstraksiyonu şematik gösterimi

3.7. Validasyon

Yöntem validasyonu, temelde bir analitik gereksinimi tanımlama ve incelenen yöntemin, uygulamanın gerektirdiği esaslar dâhilinde olan bir onaylama sürecidir. Bunun için yöntemin performansını değerlendirmek gerekmektedir. Validasyon parametreleri;

- Doğrusallık (Linearite)
- Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik
- Seçimlilik ve Duyarlılık
- Doğruluk
- Geri Kazanım
- Belirtme alt sınırı (Limit of Detection, LOD)
- Saptama alt sınırı (Limit of Quantitation, LOQ)
- Kararlılıktır.

Bulgular

4.1. Tarama Tasarımı Sonuçları

Plakett-Burman Tarama Tasarımı için belirlenen 7 faktöre uygun jenaratör kullanarak yapılan tasarım ve elde edilen alan değerleri Tablo 6’da, regresyon analizi ile elde edilen denklem katsayıları Tablo 7’de görülmektedir.

Tablo 6. Uygulanan Plakett-Burman Tarama Tasarımı ve Deney Sonuçları

Deney No/Faktör	Örnek Hacmi (ml)	Hidroliz Hacmi (ml)	Hidroliz Sıcaklığı (°C)	Hidroliz Süresi (dk)	Şartlama (ml)	Yıkama (ml)	Elüsyon Hacmi (ml)	ALAN
1	1	1	20	5	1	1	1	857075
2	3	1	20	60	1	3	3	14781747
3	3	3	20	5	3	1	3	23771986
4	3	3	80	5	1	3	1	9413064
5	1	3	80	60	1	1	3	4419545
6	3	1	80	60	3	1	1	7526212
7	1	3	20	60	3	3	1	1720262
8	1	1	80	5	3	3	3	4192368

Tablo 7. Plakett-Burman Tarama Tasarımına Göre Elde Edilen Regresyon Katsayılar

	Faktörler	Birim	Katsayılar
X1	Örnek Hacmi	ml	5537969,875
X2	Hidroliz Hacmi	ml	1495931,875
X3	Hidroliz Sıcaklığı	°C	-1947485,125
X4	Hidroliz Süresi	dk	-1223340,875
X5	Şartlama	ml	967424,625
X6	Yıkama	ml	-808422,125
X7	Elüsyon Hacmi	ml	3456129,125

Plakett-Burman tasarımına göre yapılan tarama sonucunda örnek hacmi, hidroliz sıcaklığı ve elüsyon hacmi parametrelerinin etkili olduğu bulunmuştur.

4.2. Merkezi Kompozit Tasarım Sonuçları

Tarama tasarımı ile belirlenen analiz sonuçlarında etkili olan 3 faktör için (örnek hacmi, hidroliz sıcaklığı ve elüsyon hacmi) merkezi kompozit tasarımı oluşturularak 20 deney tasarlanmış ve uygulanmıştır. Bu faktörler için yapılan kodlamalar, seviye değerleri Tablo 8’de, yapılan analiz sonuçları ile elde edilen alan değerleri ise Tablo 9’da görülmektedir.

Tablo 8. Merkezi Kompozit Tasarımı İçin Belirlenen Seviye Değerleri

Faktörler		- α (Star)	-1 (Düşük)	0 (Merkez)	1 (Yüksek)	α (Star)
X1	Örnek Hacmi (ml)	1	1,5	2,25	3	3,5
X2	Hidroliz Sıcaklığı (°C)	30	40	55	70	80
X3	Elüsyon Hacmi (ml)	1	1,5	2,25	3	3,50

Tablo 9. Uygulanan Merkezi Kompozit Tasarım ve Elde Edilen Sonuçlar

Deney no	Örnek Hacmi (ml)	Hidroliz Sıcaklığı (°C)	Elüsyon Hacmi (ml)	Alan
1	1.50	40	1.50	1727759
2	3.00	40	1.50	987465
3	1.50	70	1.50	666508
4	3.00	70	1.50	5108174
5	1.50	40	3.00	1289781
6	3.00	40	3.00	1269797
7	1.50	70	3.00	767910
8	3.00	70	3.00	274974
9	1.00	55	2.25	1057096
10	3.50	55	2.25	1386296
11	2.25	30	2.25	7260111
12	2.25	80	2.25	1384743
13	2.25	55	1.00	702637
14	2.25	55	3.50	2963902
15	2.25	55	2.25	2871547
16	2.25	55	2.25	1243233
17	2.25	55	2.25	1219797
18	2.25	55	2.25	1415310
19	2.25	55	2.25	642529
20	2.25	55	2.25	1844565

Bu deney tasarımı ve alan değerleri kullanılarak Minitab programında yüzey yanıt metodolojisi kullanılarak yapılan istatistiksel analizlerde ön görülen kuadratik bir polinom modelinin en uygun sonuçlar verdiği tespit edilmiştir. Bu denklem katsayı değerleri Tablo 10'da görülmektedir.

Tablo 10. Merkezi Kompozit Tasarımı ile Elde Edilen Regresyon Katsayıları

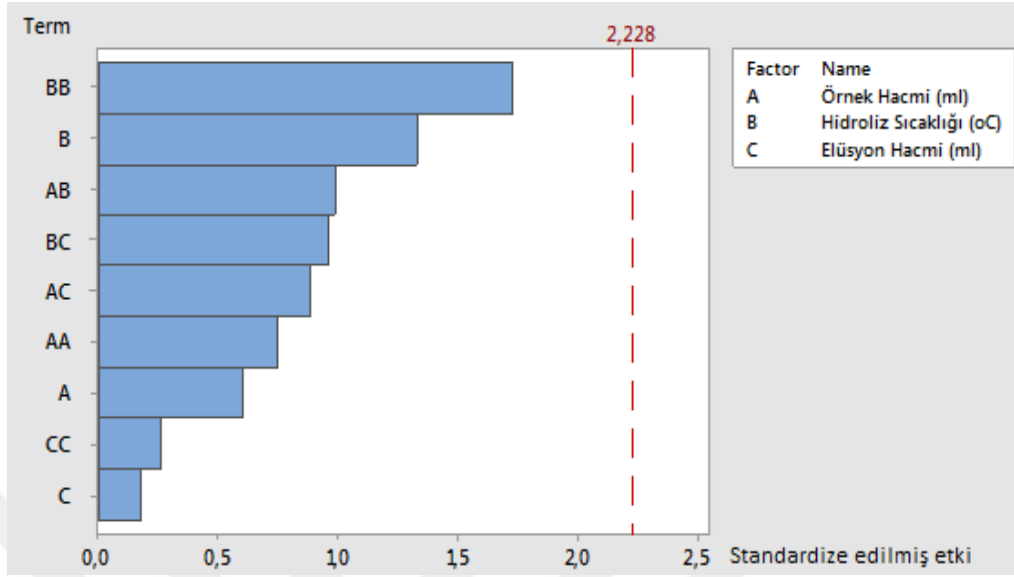
Faktörler	Katsayılar	T-Değerleri	P-Değerleri
X1	274009	0,60	0,561
X2	-610564	-1,34	0,210
X3	-79408	-0,17	0,865
X1* X1	-324095	-0,73	0,481
X2* X2	772179	1,74	0,112
X3* X3	-107871	-0,24	0,813
X1* X2	588626	0,99	0,346
X1* X3	-526786	-0,89	0,397
X2* X3	-572019	-0,96	0,359

Merkezi kompozit tasarımı sonucunda elde edilen katsayılara göre denklemimiz şu şekildedir.

$$y = 1571894 + 274009x_1 - 610564x_2 - 79408x_3 - 324095x_1^2 + 772179x_2^2 - 107871x_3^2 + 588626x_1x_2 - 526786x_1x_3 - 572019x_2x_3$$

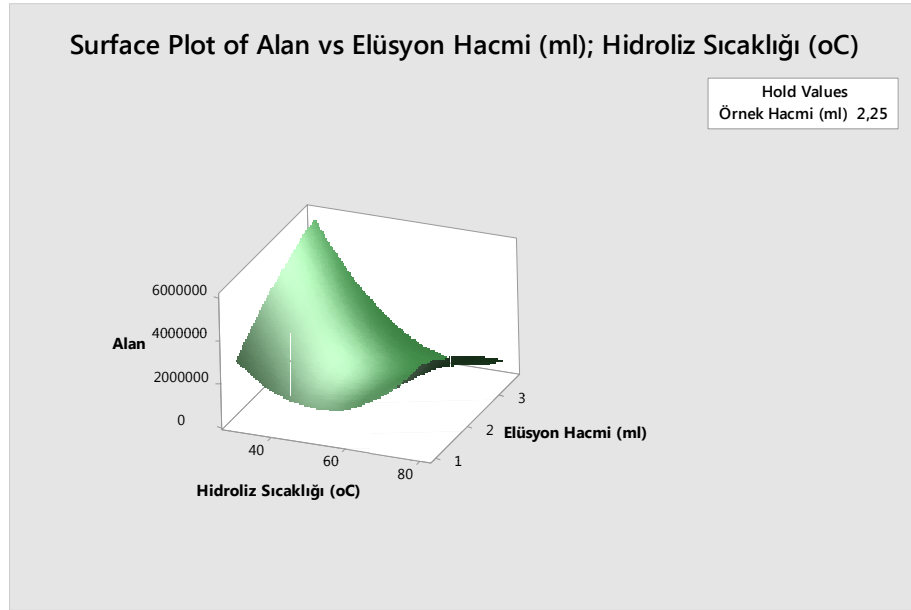
(Denklem 2)

Elde edilen denklemdeki katsayıların merkezi kompozit tasarımına göre standardize edilmiş etkileri Şekil 7’de görülmektedir.

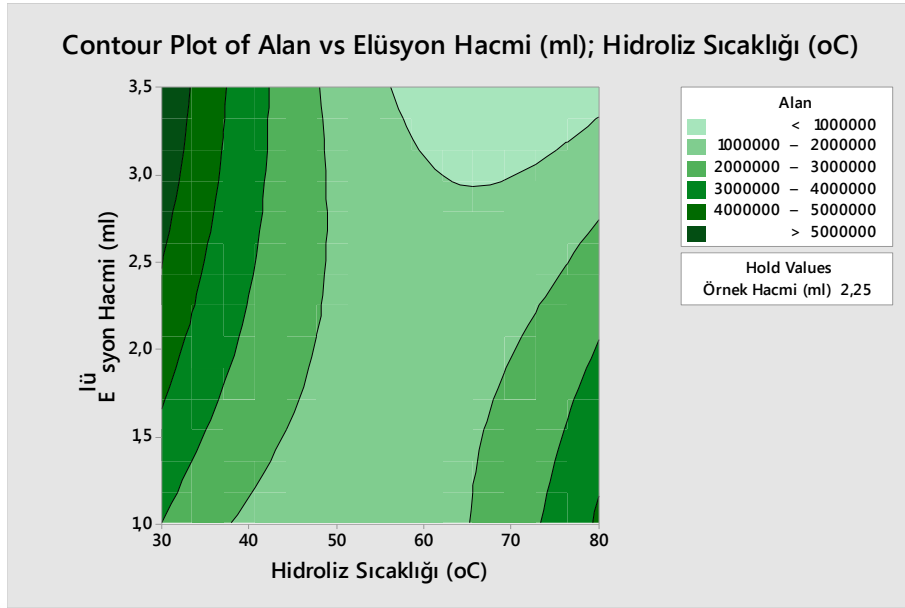


Şekil 7. Merkezi Kompozit Tasarımına Göre Standardize Edilmiş Etkiler

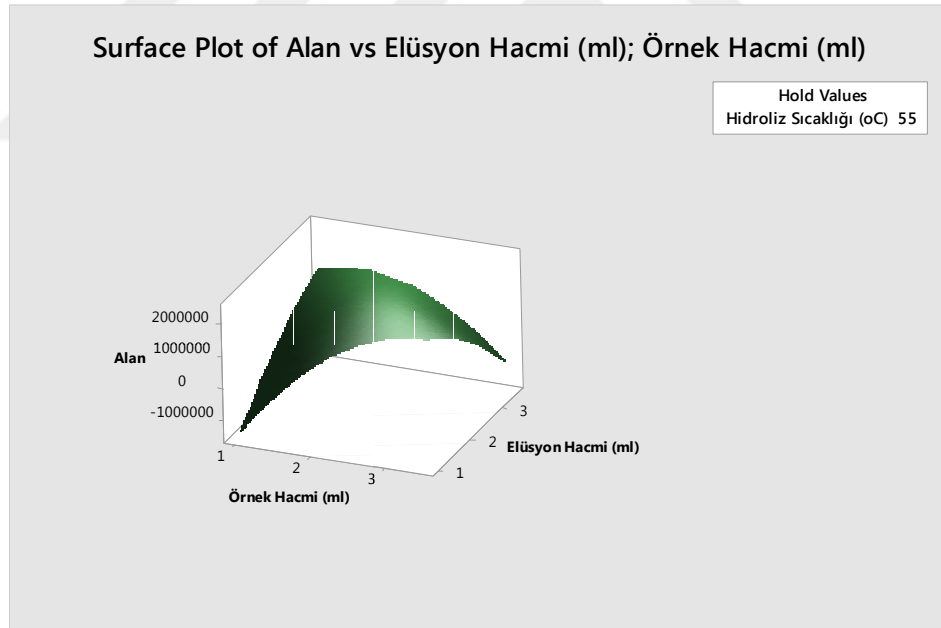
Merkezi kompozit tasarımda örnek hacmi, hidroliz sıcaklığı ve elüsyon hacmi faktörlerinin ikili etkileri yüzey alanları ve kontur grafikleri Şekil 8-13’te görülmektedir.



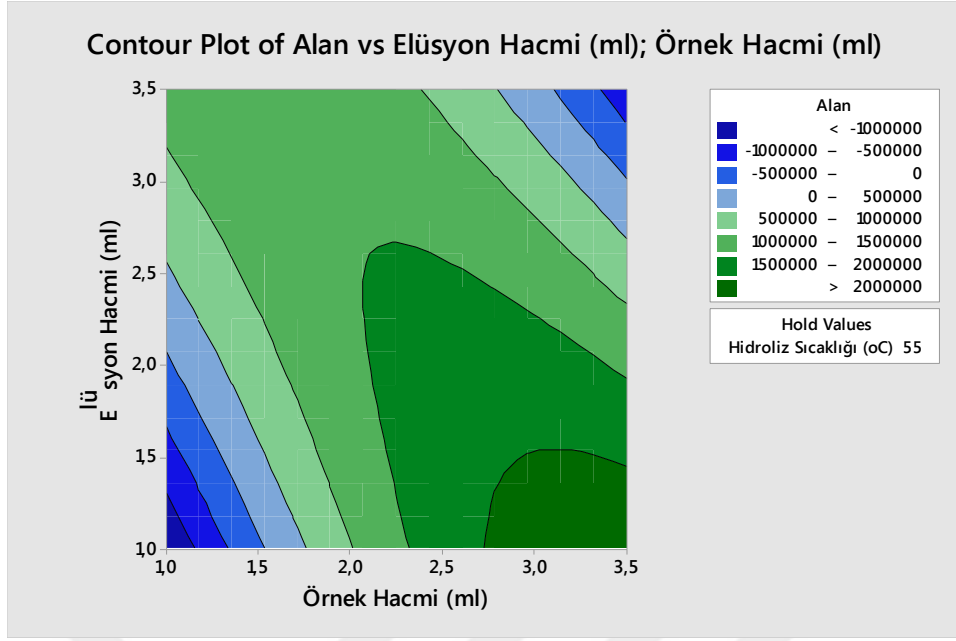
Şekil 8. Elüsyon Hacmi ve Hidroliz Sıcaklığının İkili Etkisi (Surface Plot)



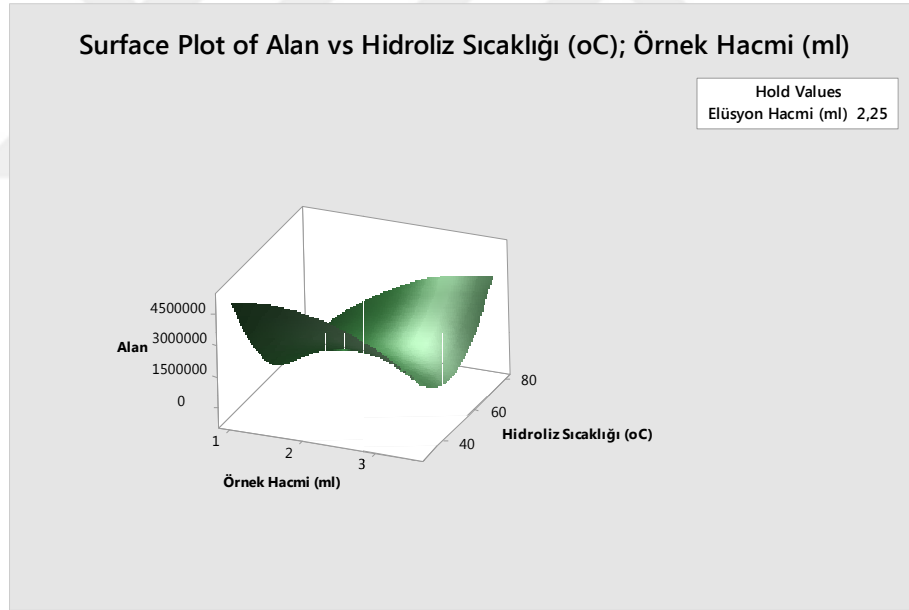
Şekil 9. Elüsyon Hacmi ve Hidroliz Sıcaklığının İkili Etkisi (Contour Plot)



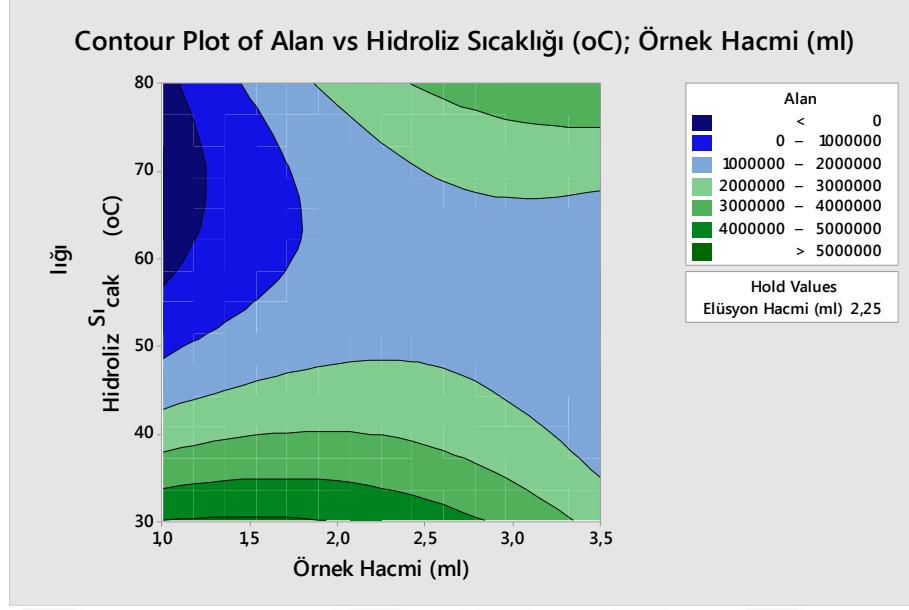
Şekil 10. Elüsyon Hacmi ve Örnek Hacminin İkili Etkisi (Surface Plot)



Şekil 11. Elüsyon Hacmi ve Örnek Hacminin İkili Etkisi (Contour Plot)



Şekil 12. Hidroliz Sıcaklığı ve Örnek Hacminin İkili Etkisi (Surface Plot)



Şekil 13. Hidroliz Sıcaklığı ve Örnek Hacminin İkili Etkisi (Contour Plot)

İstatistiksel olarak belirlenen ve grafiklerle uyumlu olarak bulunan optimum değerler Tablo 11’de verilmiştir.

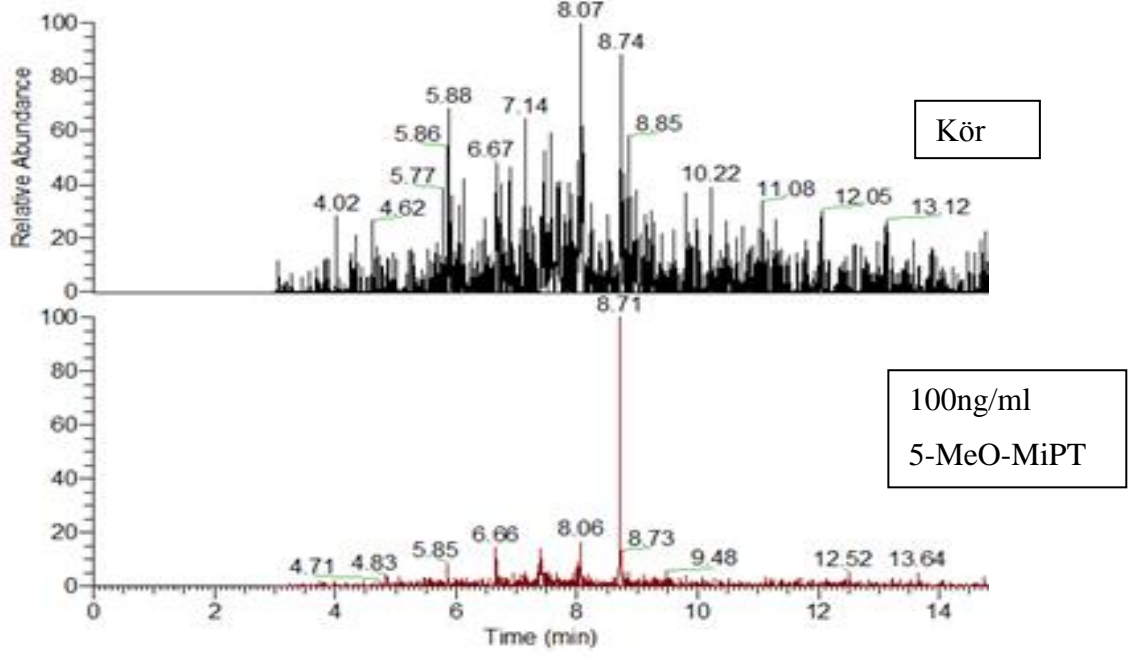
Tablo 11. Merkezi Kompozit Tasarım ile Elde Edilen Optimum Ekstraksiyon Değerleri

Ekstraksiyon Faktörleri	Optimum Değerler
Örnek Hacmi (ml)	1 ml
Hidroliz Sıcaklığı ($^{\circ}$ C)	30 $^{\circ}$ C
Elüsyon Hacmi (ml)	3,5 ml

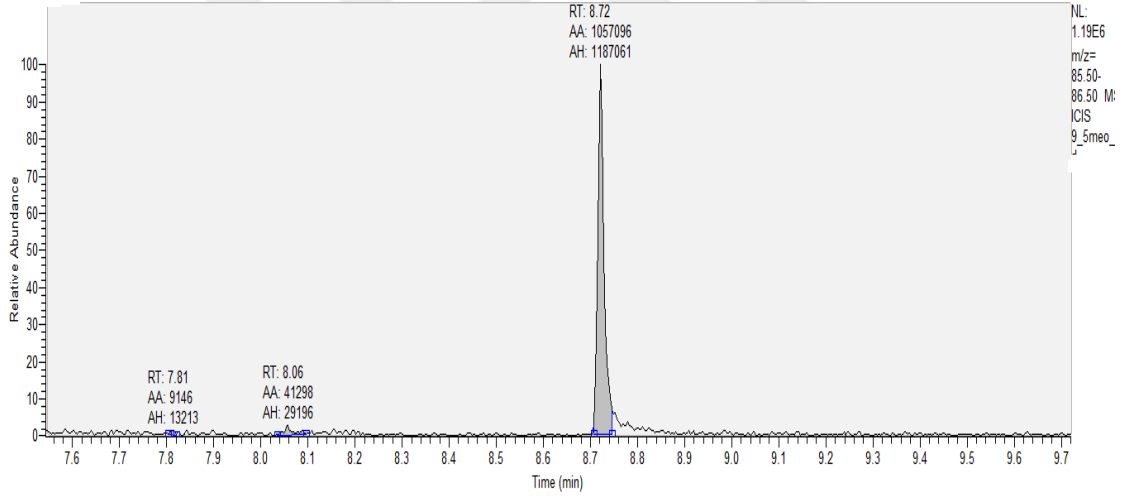
4.3. Yöntem Validasyon Verileri

4.3.1. Seçimlilik

Örnek matriksinde bulunması gereken bileşenlerin yanında analiz edilecek maddelerin doğru ve özgün belirlenebilmesi, analitik yöntemlerin seçimliliğini belirlemektedir (Green JM. Peer, 1996). Şekil 14-15’ten görüldüğü üzere 5-MeO-MIPT için seçimli ve seçici bir analiz geliştirilen yöntem ile yapılabilmektedir.



Şekil 14.Boş idrar örneğine (kör) ve 100 ng/ml olacak şekilde 5-MeO-MiPT standardı katılmış idrar örneğine ait kromatogram



Şekil 15:İdrar örneğine ekim yapılmış 5-MeO-MiPT analiti kromatogramı

4.3.2. Doğrusallık

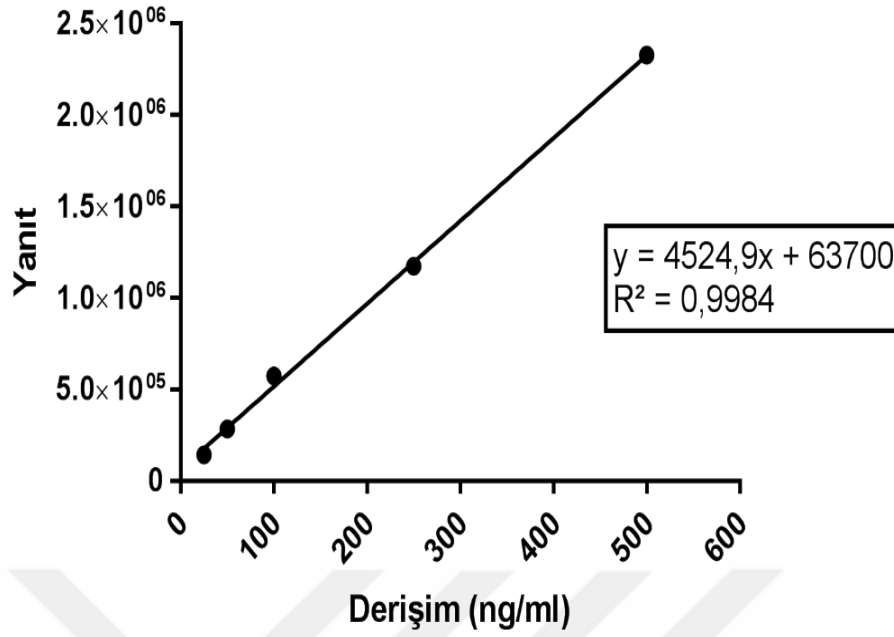
Analitik yöntemin doğrusallığı analiz sonuçlarından doğrudan elde edilerek ya da çok iyi tanımlanmış matematiksel derişimleri belli, belirli bir sırada verilen örnekler içinde analitin değişik konsantrasyondaki örneklerinden elde edilmektedir. Doğrusallık %80-120 oranındaki derişime sahip beş ya da beşten fazla standarttan en az 3 tekrar çalışılmasıyla elde edilir (Eurachem, 2014). Belirli derişimlerde çalışılan

örneklere karşı elde edilen ortalama alan değerleri Tablo 12’de ve kalibrasyon eğrisi Şekil 16’da görölmektedir. Kalibrasyon eğrisi korelasyon katsayısı (R^2) ile kontrol edilir. Korelasyon katsayısı, derişim ve sinyal arasındaki ilişkinin derecesini gösterir ve 1’e yakın olması istenir. Bu değerlere göre, 25-500 ng/ml arasında çizilen kalibrasyon eğrisi ve $R^2=0.9984$ olduğu görölmektedir (Şekil 16).

$y = 4524,9x + 63700$ denkleminde y yerinde kromatogramdan bulunan alan değerleri elde edildi (Tablo 12).

Tablo 12. Kalibrasyon eğrisi için 5 farklı derişime göre elde edilen alan değerleri

Derişim (ng/ml)	Alan
25	143207
50	285276
100	574622
250	1173718
500	2327226



Şekil 16. 5-MeO-MiPT'e ait 5 noktali kalibrasyon eğrisi, denklemi ve korelasyon katsayısı

Kalibrasyon standartlarının geri hesaplanan derişimleri, gerçek değerin $\pm\%15$ 'i, dâhilinde olduğu belirlenmiştir.

4.3.3. Belirtme Alt Sınırı (Limit of Detection, LOD)

Tek bir analitik prosedürün belirtme alt sınırı, bir numunedeki analitin tespit edilebilen ancak mutlak kesin bir değer olarak nicelleştirilemeyen en düşük miktardır (Aydoğdu, Döğer, & Ertaş, 2018). Yöntemin belirtme alt sınırı, köre ait sinyallerin yüksekliklerinin 3 katının, ekim yapılmış en küçük derişim olan 25 ng/ml örneğın sinyalinin yüksekliği ile karşılaştırıldı.

$LOD = \frac{Std_c * 3}{S/N}$ formülü kullanılarak hesaplandı. S/N değeri; 13,33, LOD değeri

5,63 ng/ml olarak belirlenmiştir.

4.3.4. Saptama Alt Sınırı (Limit of Quantitation, LOQ)

Analitik bir yöntemle analitin, uygun doğruluk ve kesinlikle tayin edilebilecek en düşük konsantrasyonudur. Analitin bilinen miktarlarla azaltılmasıyla hazırlanan örnekler ölçülür ve kabul edilebilir kesinlik ve doğruluğa sahip en düşük miktar tespit edilir. Yöntemin belirtme alt sınırı, köre ait sinyallerin yüksekliklerinin 10

katının, ekim yapılmış en küçük derişim olan 25 ng/ml örneğın sinyalinin yüksekliği ile karşılaştırıldı.

$$LOQ = \frac{Std_c * 10}{S/N}$$
 formülü kullanılarak hesaplandı. S/N değeri; 13,33, LOQ değeri

18,75 ng/ml olarak belirlenmiştir.

Tablo 13. 5-MeO-MiPT'e ait LOQ, LOD değerleri

	5-MeO-MiPT
S/N	13,33
Standardın derişimi (Std C)	25 ng/ml
LOD	5,63 ng/ml
LOQ	18,75 ng/ml

4.3.5. Doğruluk

Analitik bir yöntemin doğruluğu, yöntem tarafından analitin gerçek derişimine göre elde edilen değerin yüzde cinsinden yakınlığını açıklar (Aydoğdu et al., 2018). Bir matriks içindeki bir analitin geri kazanımı, saf standardın gerçek derişimi ile matrikse eklenmiş ve ekstrakte edilmiş olan analit miktarının ölçüm sonucunun karşılaştırılmasıdır. Geri kazanım, ekstraksiyon verimliliğidir (Kafalı H., 2008). Elde edilen sonuçlar Tablo 14'te verilmiştir.

4.3.6. Kesinlik-Tekrarlanabilirlik

Bir yöntemin kesinliği, tekrarlanan analiz sonuçlarının birbirine yakınlığının derecesidir ve ortalama değeri etrafındaki dağılımın ölçüsüdür (Eurachem, 2014). Kesinlik, genellikle standart sapma, bağlı standart sapma (% RSD), varyans veya varyans katsayısı olarak ifade edilir. Biyolojik örnekler için % 15'ten az ve diğer derişim seviyelerinde %10 bağlı standart sapma ile kesinlik sağlanabilir. Tekrarlanabilirlik, bağımsız deney sonuçlarının, kısa zaman aralıkları içinde, aynı donanım kullanılarak, deneyi yapan aynı kişi tarafından, aynı laboratuvarında, eş değeri deney maddeleri üzerinde aynı yöntem ile elde edilmesidir ve kesinliğin bir göstergesidir. Aynı laboratuvarında, aynı kişi tarafından, aynı donanım kullanılarak, özdeş deney numunesi üzerinde, kısa zaman aralığı içinde aynı ekstraksiyon metodu

kullanılarak elde edilen aynı günde (n=3, 100,0 ng/ml) ve aynı cihaz ile analiz edilmiştir. 5-MeO-MiPT'e ait veriler Tablo 15'de bulunmaktadır.

Tablo 14.5-MeO-MiPT'e ait geri kazanım verileri

Derişim	25 ng/ml		500 ng/ml	
	Bulunan Değer (ng/ml)	% G.K.	Bulunan Değer (ng/ml)	% G.K.
1. Paralel Ekstraksiyon	18,24	72,98	487,08	97,42
2. Paralel Ekstraksiyon	20,28	81,11	507,36	101,47
3. Paralel Ekstraksiyon	18,06	72,23	486,35	97,27
Ortalama	12,71	75,44	493,59	98,72
Std. Sapma (SD)	1,23	4,93	11,93	2,39
% RSD	6,53	6,53	2,42	2,42

Tablo 15. 5-MeO-MiPT'e ait gün-içi ve günler-arası tekrarlanabilirlik verileri

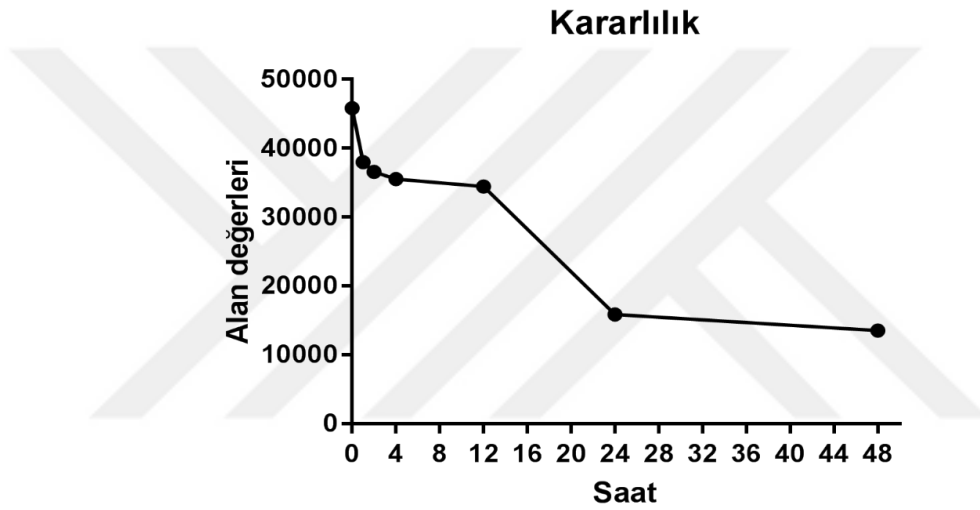
Ölçüm Sayısı	100 ng/ml standart katımlı örnekler için bulunan değerler
1.paralel	113,83
2.paralel	105,51
3.paralel	105,54
Ortalama	108,29
Std. Sapma	4,80
% RSD	4,43

4.3.7. Seyreltme Tamlığı

1000 ng/ml'lik bir örneği 1:10 oranında seyreltilip çalışıldığında 94 ng/ml sonuç elde edildi. Sonuç raporu verilirken bu değer 10 ile çarpılarak verilebilir.

4.3.8. Kararlılık

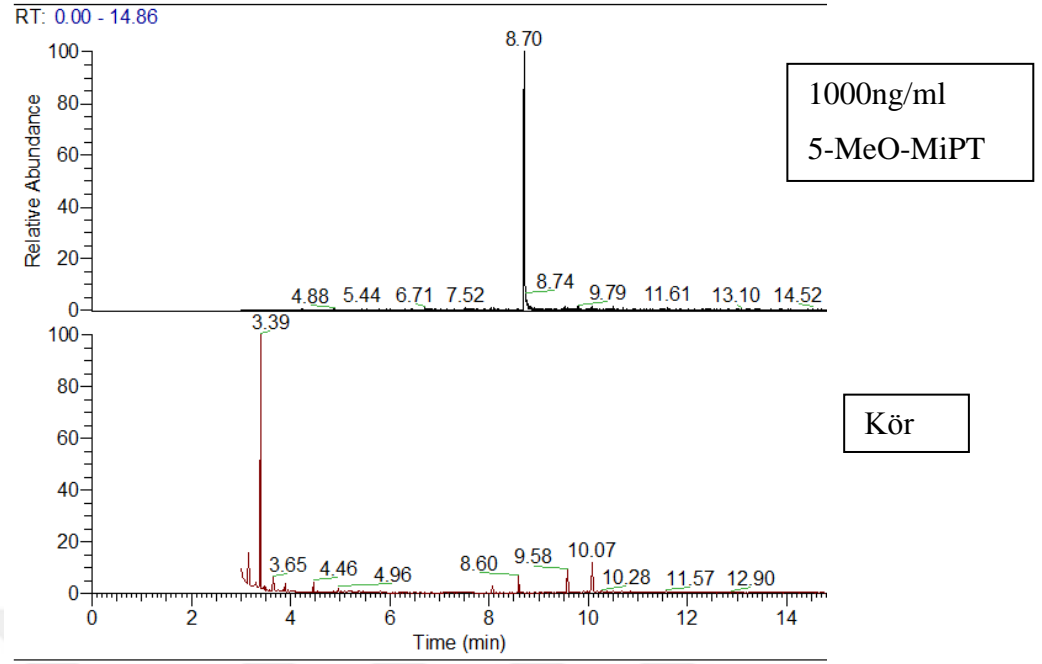
Çalışmada ekstraksiyon işlemi sonucunda hazırlanan örnekler (250 ng/ml, n=3) 0, 2, 4, 12, 24, 48 saat sonra enjeksiyon yapıp kararlılık çalışması yapılmıştır. Kararlılık sonuçları Şekil 18'de görülmektedir.



Şekil 17. 5-MeO-MiPT'e ait farklı saatlere ait kararlılık çalışması sonuçları

4.3.9. Taşınma Etkisi

Yüksek derişimdeki (1000 ng/ml) bir örnekten sonra kör örnek enjekte edilerek değerlendirildi. Taşınma etkisinin (carry over) olmadığı görülmüştür.



Şekil 18. Taşınma etkisi için yüksek derişimde örneğe ve ardından verilen kör örneğe ait kromatogram

Tartışma

Son yıllarda ülkemizde madde kullanımı ve bu maddelerin yakalanmasında önemli bir artış gözlemlenmektedir. EMCDDA'nın (Avrupa Uyuşturucu ve Uyuşturucu Bağımlılığı İzleme Merkezi) Türkiye temas noktası olan Türkiye Uyuşturucu ve Uyuşturucu Bağımlılığı İzleme Merkezi (TUBİM) verileri, bağımlılık yapabilen yeni tasarım maddelerin (sentetik katinonlar/kannabinoidler, amfetamin tipi uyarıcılar) kullanımının ülkemizde önemli bir halk sağlığı ve güvenliği sorunu haline geldiğini göstermektedir (TUBİM, 2014). Avrupa'da halüsinojenik, anestetik ve depresan özellikli bazı psikoaktif maddeler kötüye kullanılmakta, bunlar arasında; LSD (liserjik asit dietilamid), ketamin, GHB (gamma-hidroksibutirrat) ve halüsinojenik mantarlar gibi maddeler yer almaktadır (EMCDDA, 2015).

Afyon, kenevir ve koka gibi geleneksel bağımlılık yapıcı maddeler, Birleşmiş Milletler uyuşturucuyla mücadele sözleşmeleri tarafından kontrol edilse de bağımlılık yapıcı veya kötüye kullanımı bulunan pek çok doğal bitkinin yakalanması zordur. Bu nedenle, Birleşmiş Milletler Uyuşturucu ve Suç Dairesi (UNODC), ortaya çıkan tehdidi çoğunlukla doğal olanlardan türetilen veya değiştirilen yeni tasarım maddeler (YTM) olarak adlandırmıştır. Dünyada YTM bildiren 119 kadar ülke olmakla birlikte Aralık 2018'e kadar, hükümetler, laboratuvarlar ve ortak kuruluşlar tarafından YTM konusunda UNODC Erken Uyarı Danışmanlığı'na (EWA) 888'den fazla madde bildirilmiştir. Piyasada bulunan YTM'ler; esrar, kokain, eroin, LSD, MDMA (ekstazi) veya metamfetamin gibi uluslararası kontrol altındaki maddelerle benzer etkilere sahiptir. Aralık 2018'e kadar bildirilen YTM'lerin etkilerine bakıldığında, çoğunluğu uyarıcılar, ardından sentetik kannabinoidler ve halüsinojenler gelmektedir.

Dünya'daki triptamin prevalansının tam olarak bilinmemesine rağmen, popüleritelerinin ve tüketimlerinin arttığı bilinmektedir. Bu hızlı genişlemenin, gece kulüplerinde ya da internet aracılığıyla, daha kolay erişilebilirlikle ilişkili olduğu görülmektedir (Jovel, Felthous, & Bhattacharyya, 2014). Birçok triptamin, yasadışı klasik maddelere göre daha düşük bir fiyata satılmaktadır. Ayrıca, moleküler yapılarından dolayı kullanıcıların madde testlerinden geçebilmesine izin verdiği için, kullanıcılar tarafından bu maddeleri daha erişilebilir ve arzu edilir kılmaktadır (EMCDDA 2010; Jovel ve ark. 2014; Musselman ve Hampton 2014).

Hali hazırda piyasada mevcut olan yeni tasarım maddeleri kullanan kişilerin saptanmasına yönelik olarak bu maddelerin tanımlanması adli toksikoloji laboratuvarları için önemli sorunların başında gelmektedir. Yeni tasarım maddelerin içerikleri sürekli değiştiği ve laboratuvarlarda analizlerinin zorluğundan dolayı, 5272 numaralı Türk Ceza Kanunu'nun 109. paragrafı gereği Denetimli Serbestlik kanunundan yararlanan hükümlüler tarafından tercih edilmektedir. Yeni tasarım maddelerden 5-MeO-MiPT'in kullanım durumu göz önüne alındığında tabletlerde ve olası zehirlenme vakalarında incelenmesi gerektiği açıktır. Bu nedenlerle biyolojik materyallerde tamamlayıcı analitik teknikler geliştirilmesi hem klinik toksikoloji hem de adli toksikoloji açısından son derece önemlidir. Adli toksikolojide; analitlerin saptanması ve nicel olarak tanımlanmasına yönelik uygun yöntem geliştirmek hem literatüre destek sağlamak hem de hukuki ve etik açıdan çok büyük sorumluluk taşımaktadır. Yöntem geliştirme süreci, hedef analitlere uygun olan örnek seçiminden başlayıp ekstraksiyon ve analiz sonuç aşamasına giden çok basamaklı bir yoldur.

Bu tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen, kemometrik tarama deneyleri ile örnek hacmi, hidroliz hacmi, hidroliz sıcaklığı, hidroliz süresi, şartlama hacmi, yıkama hacmi ve elüsyon hacminin ekstraksiyon sonucunu etkileyebilen faktörler olduğu belirlenmiştir. Plaket-Burman tasarımı kullanılarak gerçekleştirilen deney tasarımında, 7 faktör için 7'li jeneratör kullanılmış ve 8 deneylik bir tasarım ortaya çıkarılmıştır. Tüm faktörlerin seviyeleri belirlenip, deneyler gerçekleştirilmiş ve regresyon analizi yapılmıştır. Elde edilen kat sayılar sonucunda katı faz ekstraksiyonu için en önemli 3 faktörün; örnek hacmi, hidroliz sıcaklığı ve elüsyon hacmi olduğu belirlenmiştir.

Bu 3 önemli faktör için merkezi kompozit tasarım ile optimum değerleri belirlemek için 5 farklı seviye belirlenmiş ve full faktörüyel, star ve tekrar deneyleri ile toplamda 20 deneye ulaşan merkezi kompozit tasarım uygulanmıştır. GC-MS alan değerleri yanıt olarak değerlendirilip, regresyon analizi yapılan yanıt değerleri ile örnek hacminin 1 ml, hidroliz sıcaklığının 30°C ve elüsyon hacminin 3,5 ml olduğu bulunmuştur. Optimum koşullarda yapılan deneylerde en yüksek alan değerleri elde edilmiştir.

Kemometrik olarak optimize edilen bu yöntem analitik yöntem validasyonu parametrelerince valide edilmiştir. Seçimlilik, doğrusalık (25-500 ng/ml), belirtme

alt sınırı (LOD, 5,63 ng/ml), saptama alt sınırı (LOQ 18,75 ng/ml), doğruluk (%43,01- %101,47), gün-içi tekrarlanabilirlik (100 ng/ml derişimde 3 paralel, % RSD 4,43), seyreltme tamlığı, taşınma etkisi ve kararlılık parametreleri ayrıntılı olarak incelenmiştir. Yöntemin seçimli, doğrusal, duyarlı ve hassas olduğu yapılan analizler sonucunda belirlenmiş, ancak; analitin kararlılığının yaklaşık 1 saat içerisinde değiştiği belirlenmiştir.

Toksikolojik analizlerde maddenin kullanımını tespit etmek amacıyla kullanılan geleneksel biyolojik örneklerden biri idrardır. İdrar, potansiyel toksik atık ürünlerin vücuttan uzaklaştırılması için böbrekte oluşan ve metabolik atıkların derişik bir çözeltisidir. İdrar içeriğinin % 95'i sudur ve sodyum klorür, üre gibi başka bileşenleri de içerir (C.Wong, 2005). Böbrekler tarafından idrar üretilmektedir ve böbrekler süreç boyunca esansiyel maddeleri tekrardan absorbe eder. Fazla su ve üre, organik, inorganik maddeler gibi atık ürünler vücuttan atılır. İdrarın günlük miktarı ve bileşimi sıvı alımı, diyet, sağlık, madde etkileri ve çevresel koşullar gibi birçok faktöre bağlı olarak çeşitlilik gösterir. Sağlıklı bir yetişkinde 24 saatlik bir periyotta üretilen idrar miktarı 1-2 litre arasındadır (Cone EJ., 1997). Bu tez çalışmasında, sentetik idrar örnekleri hazırlanmış ve çalışmalar bu çözeltilerde gerçekleştirilmiştir. Gerçek olgulardan alınan idrar örneklerine rutin uygulamaya geçtiğinde uygulanması planlanmaktadır. Çalışmanın idrarda yalnızca ana madde olarak tayini şu an için bir kısıtlılık olsa da, geliştirilen kemometrik yöntem ileride yapılacak hayvan deneylerindeki metabolit çalışmalarına bir ışık tutabileceği öngörülmektedir.

Adli toksikoloji analizlerinde suistimal edilen maddelerin taranması ve düzey ölçümleri oldukça önemli bir aşamadır. Bu süreçte ideal toksikolojik analizler; analitik açıdan geçerli, tanımlanmış ve denenmiş sınırları olan, kalibrasyon-yanıt ilişkisi kanıtlanmış olan, doğruluğu ve etkileşimleri tanımlanmış olan ve karmaşık olmayan özelliklere sahip olmalıdır. Adli toksikolojide analitik yöntemin güvenilir, hassasiyet, özgünlük, az maliyetli ve performans kolaylığı açısından birçok özellik taşıması önemlidir. 5-MeO-MiPT toksikasyonu sebebiyle dünyada ölümle sonuçlanmış olgu raporları (Corkery et al., 2012; Fabregat-Safont et al., 2017; Shimizu et al., 2007; Smolinske et al., 2005) bulunmaktadır. Ülkemizde de klinik tanı konmamış birçok ölüm vakalarına rastlanmaktadır. Bu sebeple bu tür olgularda nicel sonuç vermek adına bu maddenin analizinin yapılma sorumluluğu ortaya çıkmaktadır.

Sonuç ve Öneriler

Küreselleşen dünyada son derece büyük ivmelerle artan yeni tasarım maddelerin saptanma hızına yetişmek, geleneksel uzun ve karmaşık deneylerle maalesef çok mümkün değildir. Bu nedenle çalışmamızda olduğu gibi sistematik deney tasarımları ile en az sayıda deney yapılarak, optimize edilmiş yöntem geliştirilmesi önemlidir. Bu tez çalışmasında çeşitliliği sürekli olarak triptaminlerden 5-MeO-MiPT'in hassas, duyarlı ve güvenilir analizi için bir yöntem geliştirilmiş ve yöntem kemometrik olarak optimize ve valide edilmiştir. Ayrıca, GC-MS ile yapılan kromatografik analizlerde 5-MeO-MiPT'in türevlenmeden çalışılması ön hazırlık süresini kısaltmış olup, diğer analogları için öncü niteliktedir.

Analizinin yapılamaması nedeniyle kullanıcıların saptanmasını engelleyen bu maddelerin analizi için geliştirilen toksikolojik analiz yöntemi; sağlık kuruluşlarında rutin analize imkân sağlayabileceğini öngörmekteyiz. Ülkemizde bağımlılık ve toksikoloji alanında varlık gösteren BATI Enstitüsü bünyesinde analiz edilen parametrelere 5-MeO-MiPT'in de eklenmesiyle analiz skalası genişleyecek ve ülkemiz için de somut veriler elde edilmesine olanak sağlayabilecektir.

Kaynaklar

- (Cone EJ. (1997). New developments in biological measures of drug prevalence. *NIDA Research Monograph*, 167, 108–129.
- Akgür, S. A., & Coşkunol, H. (2014). Bağımlılık Yapan Maddeler ve Toksikolojisi (pp. 211–236).
- Araújo, A. M., Carvalho, F., Bastos, M. de L., Guedes de Pinho, P., & Carvalho, M. (2015a). The hallucinogenic world of tryptamines: an updated review. *Archives of Toxicology*, 89(8), 1151–1173. <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1513-x>
- Araújo, A. M., Carvalho, F., Bastos, M. de L., Guedes de Pinho, P., & Carvalho, M. (2015b). The hallucinogenic world of tryptamines: an updated review. *Archives of Toxicology*, 89(8), 1151–1173. <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1513-x>
- Asadi, N., & Zilouei, H. (2017). Optimization of organosolv pretreatment of rice straw for enhanced biohydrogen production using *Enterobacter aerogenes*. *Bioresource Technology*, 227(December 2018), 335–344. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.073>
- Aydoğdu, M., Döğler, R., & Ertaş, H. (2018). Adli Toksikolojik Analizlerde Yöntem Geliştirme. In S. A. Akgür & Dağlıoğlu Nebile (Eds.), *Temel Adli Toksikoloji* (pp. 271–304).
- Ayres, T. C., & Bond, J. W. (2012). A chemical analysis examining the pharmacology of novel psychoactive substances freely available over the internet and their impact on public (ill) health. Legal highs or illegal highs? *BMJ Open*, 2(4). <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2012-000977>
- Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., & Escalera, L. A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5), 965–977. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.05.019>
- Björnstad, K., Hultén, P., Beck, O., & Helander, A. (2009a). Bioanalytical and clinical evaluation of 103 suspected cases of intoxications with psychoactive plant materials. *Clinical Toxicology*, 47(6), 566–572. <https://doi.org/10.1080/15563650903037181>

- Björnstad, K., Hultén, P., Beck, O., & Helander, A. (2009b). Bioanalytical and clinical evaluation of 103 suspected cases of intoxications with psychoactive plant materials. *Clinical Toxicology*, 47(6), 566–572. <https://doi.org/10.1080/15563650903037181>
- C.Wong, R. (2005). Drugs of Abuse Body Fluid Testing. In *Specimens for Drugs-of-Abuse Testing* (pp. 11–29).
- Corkery, J. M., Durkin, E., Elliott, S., Schifano, F., & Ghodse, A. H. (2012). The recreational tryptamine 5-MeO-DALT (N,N-diallyl-5-methoxytryptamine): A brief review. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 39(2), 259–262. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2012.05.022>
- Dejaegher, B., & Vander Heyden, Y. (2011). Experimental designs and their recent advances in set-up, data interpretation, and analytical applications. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 56(2), 141–158. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.04.023>
- Dinç, E. (2007). Kemometri Çok Değişkenli Kalibrasyon Yöntemleri. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 27(1), 61–92.
- EMCCDA. (2016). *Avrupa Uyuşturucu Raporu 2016*.
- EMCDDA. (2013). *EMCDDA 2013 ULUSAL RAPORU (2012 Verileri), TÜRKİYE: Yeni Gelişmeler, Trendler, Seçilmiş Konular*.
- EMCDDA. (2015). *Avrupa Uyuşturucu Raporu 2015: Trendler ve Gelişmeler. Avrupa Uyuşturucu Raporu 2015: Trendler ve Gelişmeler*.
- Emerson, B., Durham, B., Gidden, J., & Lay, J. O. (2013). Gas chromatography–mass spectrometry of JWH-018 metabolites in urine samples with direct comparison to analytical standards. *Forensic Science International*, 229(1–3), 1–6. <https://doi.org/10.1016/J.FORSCIINT.2013.03.006>
- Eurachem. (2014). *The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*.
- Fabregat-Safont, D., Barneo-Muñoz, M., Martinez-Garcia, F., Sancho, J. V., Hernández, F., & Ibáñez, M. (2017). Proposal of 5-methoxy-N-methyl-N-isopropyltryptamine consumption biomarkers through identification of in vivo

metabolites from mice. *Journal of Chromatography A*, 1508, 95–105.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.06.010>

Fantegrossi, W. E., Reissig, C. J., Katz, E. B., Yarosh, H. L., Rice, K. C., & Winter, J. C. (2008). Hallucinogen-like effects of N,N-dipropyltryptamine (DPT): Possible mediation by serotonin 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in rodents. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 88(3), 358–365.
<https://doi.org/10.1016/J.PBB.2007.09.007>

Fuse-Nagase, Y., & Nishikawa, T. (2013). Prolonged delusional state triggered by repeated ingestion of aromatic liquid in a past 5-methoxy-N, N-diisopropyltryptamine abuser. *Addiction Science & Clinical Practice*, 8(1), 9.
<https://doi.org/10.1186/1940-0640-8-9>

Grafinger, K. E., Hädener, M., König, S., & Weinmann, W. (2018). Study of the in vitro and in vivo metabolism of the tryptamine 5-MeO-MiPT using human liver microsomes and real case samples. *Drug Testing and Analysis*, 10(3), 562–574.
<https://doi.org/10.1002/dta.2245>

Green JM. Peer. (1996). A practical guide to analytical method validation. In *Analytical Chemistry* (p. 305A – 309A).

Gürler, M. (2018). Biyolojik Materyaller ve Örnek Seçimi. In S. A. Akgür & Dağlıoğlu Nebile (Eds.), *Temel Adli Toksikoloji* (p. 185).

Haglock-Adler, C. J., Hurley, A., & Strathmann, F. G. (2014). Use of synthetic urine as a matrix substitute for standard and quality control materials in the clinical assessment of iodine by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Clinical Biochemistry*, 47(15), 80–82. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2014.07.008>

Hibbert, D. B. (2012). Experimental design in chromatography: A tutorial review. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 910, 2–13. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.01.020>

Hill, S. L., & Thomas, S. H. L. (2011). Clinical toxicology of newer recreational drugs. *Clinical Toxicology*, 49(8), 705–719.
<https://doi.org/10.3109/15563650.2011.615318>

Itokawa, M., Iwata, K., Takahashi, M., Sugihara, G. I., Sasaki, T., Abe, Y. I., ... Shintani, M. (2007). Acute confusional state after designer tryptamine abuse.

Psychiatry and Clinical Neurosciences, 61(2), 196–199.
<https://doi.org/10.1111/j.1440-1819.2007.01638.x>

Jovel, A., Felthous, A., & Bhattacharyya, A. (2014). Delirium Due to Intoxication from the Novel Synthetic Tryptamine 5-MeO-DALT. *Journal of Forensic Sciences*, 59(3), 844–846. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.12367>

Kafalı H. (2008). Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kolon sonrası türevlendirme ile 7 adet sulfonamid tespitinin metot validasyonu. *Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Kolon Sonrası Türevlendirme ile 7 Adet Sulfonamid Tespitinin Metot Validasyonu*.

Keerthi R, V. (2016). How It's Done-Forensic Toxicology Studies. *Journal of Pharmacology and Toxicological Studies*, 154(2), 154–164. Retrieved from <https://www.rroj.com/open-access/how-its-doneforensic-toxicology-studies-.pdf>

Kumar, R., & Sharma, V. (2018). Chemometrics in forensic science. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 105, 191–201. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.05.010>

Liechti, M. E. (2015). Novel psychoactive substances (designer drugs): Overview and pharmacology of modulators of monoamine signalling. *Swiss Medical Weekly*, 145(January), 1–12. <https://doi.org/10.4414/smw.2015.14043>

Rogawski, M. A., & Aghajanian, G. K. (1981). Serotonin autoreceptors on dorsal raphe neurons: structure-activity relationships of tryptamine analogs. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 1(10), 1148–1154. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6793698>

Schatz, G. (2004). Letter to a young scientist. *FEBS Letters*, 558(1–3), 1–2. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)01500-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)01500-X)

Schmidt, M. M., Sharma, A., Schifano, F., & Feinmann, C. (2011). “Legal highs” on the net-Evaluation of UK-based Websites, products and product information. *Forensic Science International*, 206(1–3), 92–97. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2010.06.030>

Shimizu, E., Watanabe, H., Kojima, T., Hagiwara, H., Fujisaki, M., Miyatake, R., ...

- Iyo, M. (2007). Combined intoxication with methylene and 5-MeO-MIPT. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 31(1), 288–291. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2006.06.012>
- Smolinske, S. C., Rastogi, R., & Schenkel, S. (2005). Foxy methoxy: a new drug of abuse. *Journal of Medical Toxicology: Official Journal of the American College of Medical Toxicology*, 1(1), 22–25. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18072099>
- TUBİM. (2014). EMCDDA 2014 ULUSAL RAPORU (2013 Verileri). *TÜRKİYE Uyuşturucu Ve Uyuşturucu Bağımliliği İzleme Merkezi Tubim*. Retrieved from [http://www.narkotik.pol.tr/TUBIM/Documents/TURKIYE UYUSTURUCU RAPORU 2014.pdf](http://www.narkotik.pol.tr/TUBIM/Documents/TURKIYE_UYUSTURUCU_RAPORU_2014.pdf)
- Wolff, K., Farrell, M., Marsden, J., Monteiro, M. G., Ali, R., Welch, S., & Strang, J. (1999). A review of biological indicators of illicit drug use, practical considerations and clinical usefulness. *Addiction*, 94(9), 1279–1298. <https://doi.org/10.1046/j.1360-0443.1999.94912792.x>
- Wu, S., Lv, G., & Lou, R. (2012). Applications of Chromatography Hyphenated Techniques in the Field of Lignin Pyrolysis. *Applications of Gas Chromatography*, (May 2014). <https://doi.org/10.5772/32446>

Teşekkür

Lisansüstü eğitimi almaya başladığım günden, bugüne kadar her konuda bana rehberlik eden, yol gösteren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Serap Annette AKGÜR'e,

Yüksek lisansa başladığım ilk günden, bugüne kadar devam eden arkadaşlıkları, destekleri, enerjileri ve doğru yönlendirmeleriyle tanıdığım Arş. Gör. Melike AYDOĞDU ve Arş. Gör. Rukiye DÖĞER'e,

Çalışmalarında her zaman engin tecrübelerinden ve derin bilgisinden destek aldığım Sayın Halil İbrahim BOSTANCI'ya ve manevi desteğiyle hep yanımda olan Sayın Özlem AKIN'a,

Tez çalışmalarım boyunca beni hep motive eden, desteğini hiç esirgemeyen yol arkadaşım, eşim Musa EMEN'e,

Hayatımın her karesinde benim için hep en iyisini isteyen ve lisansüstü eğitim almam konusunda beni cesaretlendiren çok sevgili halam İkbal ERDOĞAN'a,

Tez dönemimi en yakından takip eden, hep yanımda olduklarını hissettiğim kız kardeşlerim Didem ERDOĞAN ve Deniz ERDOĞAN'a

Tüm hayallerimi gerçekleştirmem için bana maddi, manevi sonsuz destek veren ve her anımda yanımda olan babam Yılmaz BEZCİ'ye,

Tez dönemim boyunca yakından tanıma fırsatı bulduğum, kısa zamanda çok şey paylaştığım ve çok destek gördüğüm Yeşim KARABULUT'a,

Bu tezin gerçekleşmesine vesile olan ve maddi destek sağlayan Aliye Üstel Vakfı'na sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim.

İzmir, 17.05.2019

Ezgi EMEN

Özgeçmiş

2009 yılında başladığım Celal Bayar Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji bölümünden 2014 yılında mezun oldum.3 yıl özel sektörde çalışmanın ardından 2017 yılında Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Bağımlılık Toksikolojisi Yüksek Lisans Programı'nda lisansüstü eğitim hayatıma başladım.

Ezgi EMEN

ezgi.bezcii@gmail.com

