



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



**ATIK SU BAZLI EPİDEMİYOLOJİK
ÇALIŞMALARDA YASAL VE YASADIŞI MADDE
ANALİZLERİNE YÖNELİK OPTİMUM
KOŞULLARININ BELİRLENMESİ**

Doktora Tezi

Duygu Yeşim OVAT

Madde Bağımlılığı Anabilim Dalı

İzmir
2024

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**ATIK SU BAZLI EPİDEMİYOLOJİK
ÇALIŞMALARDA YASAL VE YASADIŞI MADDE
ANALİZLERİNE YÖNELİK OPTİMUM
KOŞULLARININ BELİRLENMESİ**

Duygu Yeşim OVAT

Danışman
Prof. Dr. Serap Annette AKGÜR

Madde Bağımlılığı Anabilim Dalı
Madde Bağımlılığı Doktora Programı

İzmir
2024

Tez Değerlendirme Kurulu Üyeleri

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Prof. Dr. Serap Annette AKGÜR

(Danışman)

Üye : Prof. Dr. Nebile DAĞLIOĞLU

Üye : Prof. Dr. Hasan ERTAŞ

Üye : Prof. Dr. Şule KALKAN

Üye : Prof. Dr. Yücel ARISOY

Üye : Prof. Dr. Fatma Nil ERTAŞ

Üye : Doç. Dr. Yusuf KURTULMUŞ

Üye : Doç. Dr. Umut KIRLI

Doktora Tezinin kabul edildiği tarih:

Önsöz

Yüksek lisans sürecinde psikoaktif maddelerin analizine yönelik yöntem geliştirmek amacıyla çıktığım lisansüstü eğitim yolculuğum, bu yöntem sonuçlarının sadece bireye değil popülasyona yönelik olmasının farkındalığı ile doktora eğitimimde literatürdeki eksik noktaların tamamlanmasına odaklanarak bu tez çalışmasını yapmamı sağladı. Bu tez çalışması ile kendi bilim yolculuğumda eksik kalan parçaların tamamlanmasının literature katkı sunacağına inancım sonsuz.

“Her birimizin bütünün farklı parçaları olduğumuzu ve ancak birlik içinde olabildiğimizde bütüne hizmet edebileceğimizi” düşünmenin anlamını yitirdiği zamanlarda, alana hizmet etmenin sorumluluğuyla, literature daha anlamlı katkılar sunmak niyetiyle bu tez çalışmasının ülkeme ve bilim dünyasına yarar sağlamasını ümit ediyorum...

İzmir, 26.11.2024

Duygu Yeşim OVAT

Özet

Atık Su Bazlı Epidemiyolojik Çalışmalarda Yasal ve Yasadışı Madde Analizlerine Yönelik Optimum Koşullarının Belirlenmesi

Avrupa Birliği Madde Ajansı (European Union Drugs Agency, EUDA), madde kullanım eğilimlerine ilişkin geleneksel veri toplama yöntemleri dışında topluma yönelik somut laboratuvar verileri sunabilmesi avantajları nedeni ile Atık Su Bazlı Epidemiyolojisi (Wastewater Based Epidemiology, WBE) çalışmaları yeni ve yenilikçi madde izleme yaklaşımı olarak adlandırarak bu yaklaşımla yapılan çalışmalara ihtiyaç olduğunu duyurmuştur. Bu tez çalışmasının amacı halihazırda mevcut sayısız analitik tekniğe alternatif sunmaktan ziyade, bu alanda yapılan çalışmaların belirsiz ve üzerinde durulmayan, ancak analiz sonucunda önemli fark yaratabilecek olan unsurları tamamlayabilmektir. Çalışmada; öncelikle psikoaktif maddelerden amfetamin, benzoilekgonin, kodein, kokain, kotinin, morfin, nikotin, pregabalin, 3-OH Kotinin, 3,4-Metilendioksiamfetamin (MDA), 3,4-metilenedioksi-N-metilamfetamin (MDMA), 11-nor- Δ^9 -Tetrahydrocannabinol-9 karboksilik asit, 4-fluoro MDMB-BUTICA, ADB-BUTINACA ve MDMB-4en-PINACA'nın sularda analizine yönelik stabilite faktörlerinden pH ve sıcaklık faktörlerinin seçilen maddelere etkisinin zamana bağlı olarak incelenmesi amaçlanmıştır. Tez çalışmasının ikinci aşamasında ekstraksiyon yönteminde analize etki edebilecek faktörlerden SPE kartuş seçimi, çözücü seçimi ve numunelerin ekstraksiyon öncesi ve sonrası filtrasyonun analiz sonucuna etkisi incelenmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde; sentetik maddelerin sularda analizinde uygulanan SPE prosedüründe analiz öncesi numunelerin asidifikasyonu, MCX kartuş kullanılması ve uçurulan elüsyonların %100 asetonitril içinde geri çözülerek LC-MS/MS'e enjekte edilmesi maddelerin analiz sonuçlarının olması gereken gerikazanım aralığında elde edilmesinde önemli fark yaratacağı görülmüştür. SPE prosedürü öncesi numunelerin cam microfiber filtreden geçirilmesinin sentetik maddeler için anlamlı bir kayıp yaratmadığı da tespit edilmiştir. Klasik maddelerin analizinde ise metamfetamin ve benzoilekgonin hariç Bond Elute SPE kartuş ile yapılan çalışmalarda geri kazanımlar HLB sorbent içeren denemelere göre %17.24 daha yüksek elde edilmiştir. SPE prosedürü sonrasında analitlerin geri çözülerek LC-MS/MS'e enjekte edilmesinde kullanılan çözücülerin geri kazanımları arttırmada önemli bir fark yaratmadığı görülmüştür. Ancak örneklerin LC-MS/MS

analizi öncesinde mikrofiltreden geçirmenin analiz sonuçlarına etki edebilecek düzeyde bir analit kaybı yaratabileceği ve bu nedenle bu belirsizliğin hesaplamalarda dikkat edilmesi gerektiği saptanmıştır. Bu tez çalışması ile atıksularda madde analizlerine azaltıcı ya da arttırıcı yönde etkisi olan koşulların tanımlanması ve analizlerin optimum koşullarda gerçekleştirilmesi için veriler değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Psikoaktif maddeler; Stabilite; LC-MS/MS; Atıksu-bazlı epidemiyoloji



Abstract

Determination of Optimum Conditions for Legal and Illegal Substance Analysis in Wastewater-Based Epidemiological Studies

The European Union Drugs Agency (EUDA) has called Wastewater Based Epidemiology (WBE) studies as a new and innovative drug monitoring approach due to the advantages of providing concrete laboratory data for the community other than traditional data collection methods on substance use trends and announced the need for studies conducted with this approach. The aim of this thesis is not to provide an alternative to the numerous analytical techniques already available, but rather to complement the obscure and under-emphasized aspects of the work done in this field, which could make a considerable difference in the outcome of the analysis. In this study, the psychoactive substance -amphetamine, benzoylecgonine, codeine, cocaine, cotinine, morphine, nicotine, pregabalin, 3-OH-Cotinine, 3,4-Methylenedioxyamphetamine (MDA), 3,4-methylenedioxy-N-methylamphetamine (MDMA), 11-nor- Δ^9 -Tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid, 4-fluoro MDMB-BUTICA, ADB-BUTINACA and MDMB-4en-PINACA were analyzed in water in order to investigate the effect of pH and temperature factors on the selected substances depending on time. In the second stage of the thesis study, the effects of SPE cartridge selection, solvent selection and pre- and post-extraction filtration of water samples on the analysis results were examined. According to the results, acidification of the samples before analysis, use of MCX cartridges and injection of the elutions back into LC-MS/MS by dissolving them in 100% ACN in the SPE procedure applied in the analysis of synthetic substances in water will make a considerable difference in obtaining the analysis results of the substances in the range of 80-120%. It was also found that passing the samples through a glass microfiber filter prior to the SPE procedure did not result in significant losses for synthetic substances. In the analysis of classical substances, with the exception of methamphetamine and benzoylecgonine, recoveries were 17.24% higher with the Bond Elute SPE cartridge than with the HLB sorbent. The solvents used to re-dissolve the analytes after the SPE procedure and inject them into LC-MS/MS did not make a noticeable difference in increasing the recoveries. However, it was determined that passing the samples through a microfilter before LC-MS/MS analysis may cause a loss of analyte that may affect the analysis results and therefore this uncertainty should be considered in the calculations. With

this thesis study, data were evaluated in order to identify the conditions that have a decreasing or increasing effect on substance analysis in wastewater and to perform the analysis under optimum conditions.

Keywords: Psychoactive substance; Stability; LC-MS/MS; Wastewater-based epidemiology



İçindekiler

Önsöz	II
Özet.....	III
Abstract.....	V
İçindekiler	VII
Tablolar Dizini.....	VIII
Şekiller Dizini	IX
Grafikler Dizini	X
Kısaltma Listesi	XI
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
Gereç ve Yöntem	11
Bulgular.....	21
Tartışma	39
Sonuç ve Öneriler	47
Kaynaklar	48
Ekler	54
Teşekkür	55
Özgeçmiş	56

Tablolar Dizini

Tablo 1. Stabilité çalışmalarının yürütüldüğü LC-MS/MS cihaz koşulları.....	14
Tablo 2. Optimizasyon çalışmalarının yürütüldüğü LC-MS/MS cihaz koşulları	17
Tablo 3. Klasik olarak sınıflandırılan maddelerin analizine ait yöntemin sıvı kromatografi verileri	17
Tablo 4. Klasik olarak sınıflandırılan maddelere ait HPLC parametreleri.....	18
Tablo 5. Klasik olarak sınıflandırılan maddelerin analizinde kullanılan analitik yöntemin MS parametreleri.....	18
Tablo 6. Klasik maddelerin analizinde kullanılan SPE Prosedürü.....	19
Tablo 7. Sentetik olarak sınıflandırılan maddelerin analizine ait yöntemin sıvı kromatografi verileri	19
Tablo 8. Klasik olarak sınıflandırılan maddelere ait HPLC parametreleri.....	19
Tablo 9. Sentetik olarak sınıflandırılan maddelerin analizinde kullanılan analitik yöntemin MS parametreleri.....	20
Tablo 10. Sentetik maddelerin analizinde kullanılan SPE prosedürü	20
Tablo 11. Maddelerin ve metabolitlerinin listesi, LC-MS/MS parametreleri ve yöntem doğrulama sonuçları	24
Tablo 12. Pregabalin'e ait analitik veriler ve validasyon sonuçları	25
Tablo 13. SPE kartuş denemelerinde kullanılan kartuşlara ait özellikler.....	28

Şekiller Dizini

Şekil 1. Web of science “wastewater based epidemiology” anahtar kelimesi ile 2010 yılından 2024 yılına kadar yapılan çalışmaların yıllara göre dağılımı.....	5
Şekil 2. 20, 30, 40, 50 ve 60 °C’de buharlaşma sıcaklıklarından sonra (a) %7’lik NH ₄ OH içeren metanol solüsyonu ve (b) metanol kullanılarak elüentlerin geri kazanımları (% gerikazanım) (n = 3) (Baker & Kasprzyk-Hordern, 2011b).....	7
Şekil 3. Psikoaktif maddelerin SPE analiz aşamaları	13
Şekil 4. Bağımlılık Toksikolojisi Laboratuvarı’nda bulunan ve stabilite çalışmalarının yürütüldüğü	14
Şekil 5. Adli Bilimler Araştırma Laboratuvarı’nda bulunan ve optimizasyon çalışmalarının yürütüldüğü LC-MS/MS cihazı.....	16
Şekil 6. 10 µg/L madde konsantrasyonuna ait total iyon kromatogramı	21
Şekil 7. 100 µg/L madde konsantrasyonuna ait total iyon kromatogramı	21
Şekil 8. 10 µg/L derişimdeki analitlere ait iyon kromatogramları.....	23
Şekil 9. Stabilite çalışmalarının şematize gösterimi	25
Şekil 10. Adli Bilimler Araştırma Laboratuvarı’nda yapılan çalışmalar.....	28
Şekil 11. Sentetik maddelerin analizinin optimizasyonuna yönelik ekstraksiyon adımları	31
Şekil 12. Vakum membran filtrasyon sistemi.....	36

Grafikler Dizini

Grafik 1. Klasik olarak sınıflandırılan maddelerin analizine ait yöntemin gradient verileri	18
Grafik 2. +4 °C ortamda pH 2-5-7,5 değerlerinde analitlerin alan değerleri	27
Grafik 3. Klasik maddeler için elüsyon solvent içeriğinin X: %100 Metanol, Y:%10 Metanol ve Z:%50 metanol olarak denemelerine ait sonuçlar (mavi sütun: Oasis HLB, turuncu sütun: Bond Elute SPE kartuşu temsil etmektedir.).....	31
Grafik 4. Sentetik maddeler için elüsyon solvent içeriğinin X : 60:40 ACN:H ₂ O, Y : 60:40 MeOH:H ₂ O ve Z:% 100 ACN olarak denemelerine ait sonuçlar	32
Grafik 5. Klasik maddeler için mikro filtre kağıdının ekstraksiyon sırasında kullanımının etkisine ait sonuçlar	35
Grafik 6. Klasik maddeler için ekstraksiyon öncesi cam mikrofiber filtre kullanımının analiz sonuçlarına etkisi	37
Grafik 7. Sentetik maddeler için ekstraksiyon öncesi cam mikrofiber filtre kullanımının analiz sonuçlarına etkisi.....	38

Kısaltma Listesi

AAT	: Atıksu Aritma Tesisi
ACN	Asetonitril
DTR	Drug Target Residues
EUDA	: European Union Drugs Agency
HCl	Hidroklorik Asit
H ₃ PO ₄	Fosforik Asit
LC-MS/MS	: Liquid chromatography tandem mass spectrometry
MeOH	Metanol
NPS	: New Psychoactive Substances
PNML	: Population-normalized Mass Loads
SCORE	: Sewage Analysis Core Group
SPE	: Solid Phase Extraction
UNODC	: United Nations Office on Drugs and Crime
WBE	: Wastewater Based Epidemiology

Giriş

Avrupa Birliği Madde Ajansı (European Union Drugs Agency, EUDA) ve üye devletler küresel boyutta psikoaktif madde durumlarını yakından izlemek amacıyla madde kullanım eğilimlerine ilişkin geleneksel veri kaynaklarından verilerin toplanmasını kolaylaştırması ve topluma yönelik somut laboratuvar verileri sunabilmesi avantajları nedeni ile “Atık Su Bazlı Epidemiyolojik (Wastewater Based Epidemiology, WBE)” çalışmaları yeni ve yenilikçi madde izleme yaklaşımı olarak sunmuştur. Psikoaktif maddelerin su bazlı epidemiyolojik analizlerine yönelik ekonomik, duyarlı ve güvenilir analitik yöntem arayışları artan madde çeşitliliği ve kullanım eğilimleri sebebiyle günümüzde hala devam etmektedir.

1.1. Araştırmanın Problemi

Psikoaktif maddelerin su bazlı epidemiyolojik çalışmalarla analizlerinde yaşanan analitik zorlukların daha iyi anlaşılması, bilimsel topluluklar, paydaşlar ve karar vericiler arasındaki dayanışma ve iş birliği açısından hayati önem taşımaktadır. Bu zorluklar günümüzde biyolojik bozunma/oluşum dahil olmak üzere psikoaktif maddelerin biyobelirteçlerinin stabilize olamamalarından kaynaklı konsantrasyon değişiklikleri veya analitik yaklaşımlar kaynaklı olabilmektedir. WBE çalışmaları ile ülkeler toplumsal verilerini rapor etmektedir ve bu raporların daha güvenilir sonuçlar içermesi ihtiyacı nedeniyle WBE tekniği sürekli geliştirme eğilimi altındadır.

1.2. Araştırmanın Sorusu

Bu tez çalışmasında aşağıdaki sorulara yanıtlar aranmıştır:

- Sularda yapılan madde analizlerinde stabilite problemlerinin yaşanmaması için optimum koşullar nelerdir?
- Sularda madde analizlerinde seçilen ekstraksiyon yönteminin analiz sonucuna etkisi var mıdır?

1.3. Araştırmanın Hipotezleri

H0: Su bazlı epidemiyolojik çalışmalarda psikoaktif madde analizlerine yönelik optimum koşullar belirlenebilir.

H1: Psikoaktif maddelerin su örneklerinde analizine analitik yöntem seçimi etkisi ölçülebilir.

1.4. Araştırmanın Varsayımları

Araştırmanın tüm aşamalarında ilgili kimyasal solventlerin ve sarf malzemelerin raf ömrünü aşmadığı varsayılmıştır.

1.5. Araştırmanın Sınırlılıkları

Araştırmada analitlerin stabiliteleri incelenirken cihaz koşullarının değişmesi nedeniyle analitik yöntemin incelendiği diğer çalışmalar, farklı bir laboratuvar altyapısında gerçekleştirilmiştir. Dolayısıyla kullanılan cihazlar, kimyasallar ve analitik yöntemler birbirinden farklıdır. Çalışmanın amaçlarında pregabalin etken maddesi, stabilite çalışmalarında referans standart madde temininde yaşanan sorun nedeniyle analitik çalışmanın etkisinin incelendiği ikinci bölümde yetersiz kalmıştır.

Tez alışması sırasında sentetik maddelerde analiz öncesi mikrofiltre kullanımının etkisinin llmesine yönelik çalışmalarda mikrofiltre kullanılmadan analiz edililen örnekler cihaz tıkanıklığı yarattığı için örnekler son aşamada mikrofiltreden geçirilmeden analiz edilemedi ve sentetik maddeler için mikrofiltre kullanımının etkisi izlenemedi.

1.6. Araştırmanın Amacı

Bu doktora tezinin amacı, psikoaktif etki gösteren maddeler ve metabolitlerinin düzeylerinin saptanmasına yönelik bir katı faz ekstraksiyon tekniği (Solid phase extraction, SPE) kullanarak sıvı kromatografisi tandem kütle spektrometrisi (LC/MS-MS) ile analitik yöntem geliştirmektir. Sonrasındaki diğer amacımız ise psikoaktif maddelerin analizine etki eden belirsizliklerin değerlendirilmesi amacıyla bu maddelerin stabilite testlerinin yapılması ve optimum koşulların belirlenmesidir.

Genel Bilgiler

“Psikoaktif madde” olarak adlandırılabilen “uyuşturucu, uyutucu ve uyarıcı maddeler” merkezi sinir sisteminde etkisini gösteren, beynin işlevlerini değiştirerek algıda, ruh hâlinde, bilinçlilikte ve davranışta değişikliklere neden olabilen maddelerdir. Bu maddelerin kullanımı tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de giderek artan önemli bir sorun haline gelmiştir (Uzby, 2015). Bu sorun tüm risk etmenleriyle birlikte ortaya konması gereken tıbbi, adli, sosyal ve güvenlik boyutları olan çok disiplinli bir alandır (Akgür & Çoşkunol, 2014). Birleşmiş Milletler Uyuşturucu ve Suç Ofisi (United Nations Office on Drugs and Crime, UNODC) tarafından yayınlanan 2023 Dünya Uyuşturucu Raporuna göre, dünya çapında yaklaşık 296 milyon kişi yasadışı madde kullanmaktadır. UNODC 2023 raporuna göre madde kullanım bozukluğu tanısı alan kişi sayısı ise son on yılda %45 artış göstererek 39,5 milyon kişi olarak bildirilmiştir (United Nations Office on Drugs and Crime, 2023). 2023 Türkiye Uyuşturucu Raporu’na göre madde ile alakalı olay, şüpheli ve ele geçirilme sayıları geçmiş yıllara göre %6.5 oranında artış gösterdiği bildirilmiş olup ülkemizde bu alanda verilen mücadelenin de giderek arttığı görülmektedir (İç işleri bakanlığı, 2023).

Suiistimal potansiyeli yüksek olan bu maddelerin kullanım eğilimlerini ve oranlarını gösteren veriler; sosyo-epidemiolojik araştırmalardan (anket, öz beyanlar, kullanıcı görüşmeleri), madde kullanımından kaynaklanan tıbbi kayıtlardan (bağımlılık poliklinikleri, acil servis verileri, ölüm verileri vb.), madde ile bağlantılı ele geçirilme ve suç istatistiklerinden hesaplanmaktadır (Zuccato et al., 2005). Ancak özellikle anketler ve kullanıcı görüşmelerinden alınan öz beyanlar dikkate alındığında verilerin ne kadar gerçekçi ve somut olduğu şüphesi hiçbir zaman göz ardı edilememektedir. Ayrıca olgu bazlı bu verilerin ilgili kurumlardan ayrı ayrı toplanması, değerlendirilmesi ve ülkelere/bölgelere yönelik popülasyon bazında geriye dönük rapor edilmesi zaman alıcı ve zor bir süreçtir. Bu durum ulusal politikalarımız içerisinde ilk sıralarda yer alan ‘uyuşturucu ile mücadele’ kapsamında “gerçek zamanlı-eş zamanlı” koruyucu bir yol çizilmesinde yani güncel olarak madde kullanımını veya madde mevcudiyetini ortaya koymada yetersiz kalabilmektedir. Bu nedenle kolluk kuvvetlerinin olaylara erken müdahale etmesi, adli mercilerde yasa koyucuların caydırıcı faaliyetlerde bulunması veya madde kullanım profilinin belirlenmesine yönelik önleyici çalışmaların gerçekleştirilmesinde pratik ve yeni

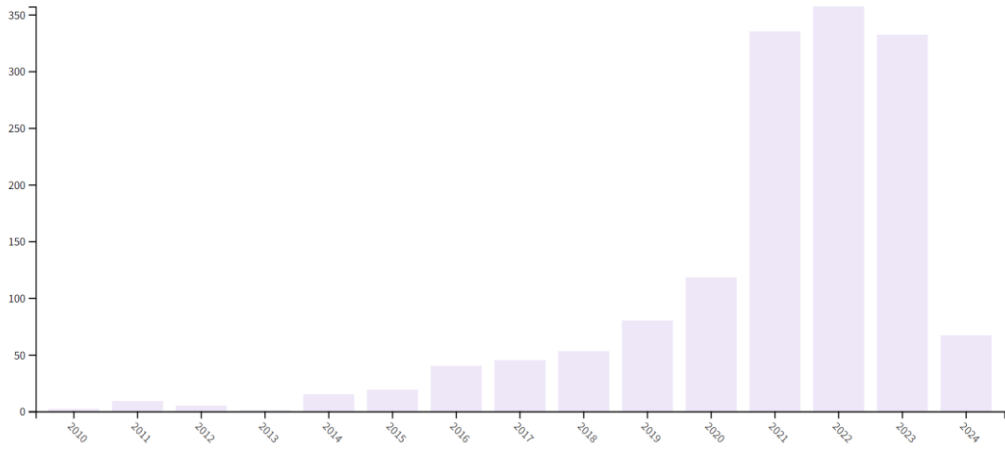
çözümlere ihtiyaç doğmuştur. Avrupa Birliği Madde Ajansı (European Union Drugs Agency, EUDA) ve üye devletlerin küresel boyutta uyuşturucu durumlarını yakından izlemek amacıyla atıksularda yasadışı madde analiz edilmesine dayalı olan yaklaşım başlatılmıştır. EUDA, uyuşturucu eğilimlerine ilişkin geleneksel veri kaynaklarından verilerin toplanmasını kolaylaştırması ve topluma yönelik somut laboratuvar verileri sunabilmesi avantajları nedeni ile *Atık Su Bazlı Epidemiyolojik (Wastewater Based Epidemiology, WBE)* çalışmaları yeni ve yenilikçi madde izleme yaklaşımı olarak adlandırarak bu yaklaşımla yapılan çalışmalara ihtiyaç olduğunu duyurmuştur (Gunnar & Kankaanpää, 2019). Böylece küresel bir sorun halini alan psikoaktif maddelerin, yalnızca biyolojik örneklerde değil, atıksu gibi ekolojik materyallerde de analizleri giderek artmıştır ve sadece bireysel boyutta değil, topluma yönelik genel somut verilerin elde edilebilmesi de mümkün kılınmıştır.

WBE tekniği ile sulardaki hedef psikoaktif maddelerin veya metabolitlerinin ölçümü ile tüketilen madde düzeyi tespit edilmektedir. Zuccato ve ark. 2005 yılında atık su örneklerinde WBE yaklaşımı ile yalnızca 'klasik maddeler' ya da diğer bir tanımlama ile "geleneksel maddeler" olarak adlandırılan psikoaktif maddelerden kokain, amfetamin, metamfetamin, morfin, esrar vb. maddeler ile ana metabolit (ler)ini ölçerek toplumun tükettiği madde miktarını "*geri hesaplama tekniği*" ile değerlendirmiştir. *Geri hesaplama tekniği* olarak adlandırılan teknik, madde metabolizması ve boşaltım modelleri bilgisi ile madde tüketimi atık su tesisinin hizmet verdiği nüfusa bölündükten sonra tespit edilen madde miktarı, atık su dairesinden temin edilen atık su akış hızıyla çarpıp atıksu arıtma tesisi (AAT) tarafından hizmet verilen nüfusa bölerek mg/gün/1000 kişi olarak ifade edilen popülasyona göre normalize edilmiş kütle yüklerine (population-normalized mass loads, PNML) dönüştürülür (Castiglioni et al., 2014; David R. Baker a, n.d.; Karolak et al., 2010). Bu yöntemler ile madde kullanımına ilişkin ilk doğrudan toplumsal tahminler sağlanmış olup madde eğilimleri; günlük, haftalık, aylık ve yıllık olarak madde bazında ortaya konulmuştur.

Geri hesaplama yöntemi ile popülasyondaki psikoaktif madde kullanımının tanımlanması sağlanmaktadır. Böylece epidemiyolojik çalışmalar ile popülasyon bazında madde kullanım profillerinin/eğilimlerinin belirlenmesi ve madde bulundurma açısından sıcak bölgelerin belirlenmesi hedefine yönelik toplumda psikoaktif maddelerin gerçekçi, tekrarlanabilir, nesnel olarak örneklemeden sonra birkaç gün içinde tespit edilebilmesi sağlanabilmektedir. Dolayısıyla WBE tekniği,

önleyici ve gerçek zamanlı faaliyetlerin gerçekleşmesine de olanak sağlamaktadır (Devault et al., 2017).

WBE tekniği ilk olarak Daughton (C. C. Daughton, 2001) tarafından önerilmiş ve İtalya'da ilk kez Zuccato ve diğerleri (Zuccato et al., 2005) tarafından uygulanmıştır. 2016 yılından itibaren EUDA tarafından madde ile mücadelede eş zamanlı yol haritası sunması açısından yararlı bulunarak ülkelere WBE prensibi önerilmektedir. Günümüzde birçok ülke tarafından WBE çalışmaları artarak devam etmektedir (Şekil I.)



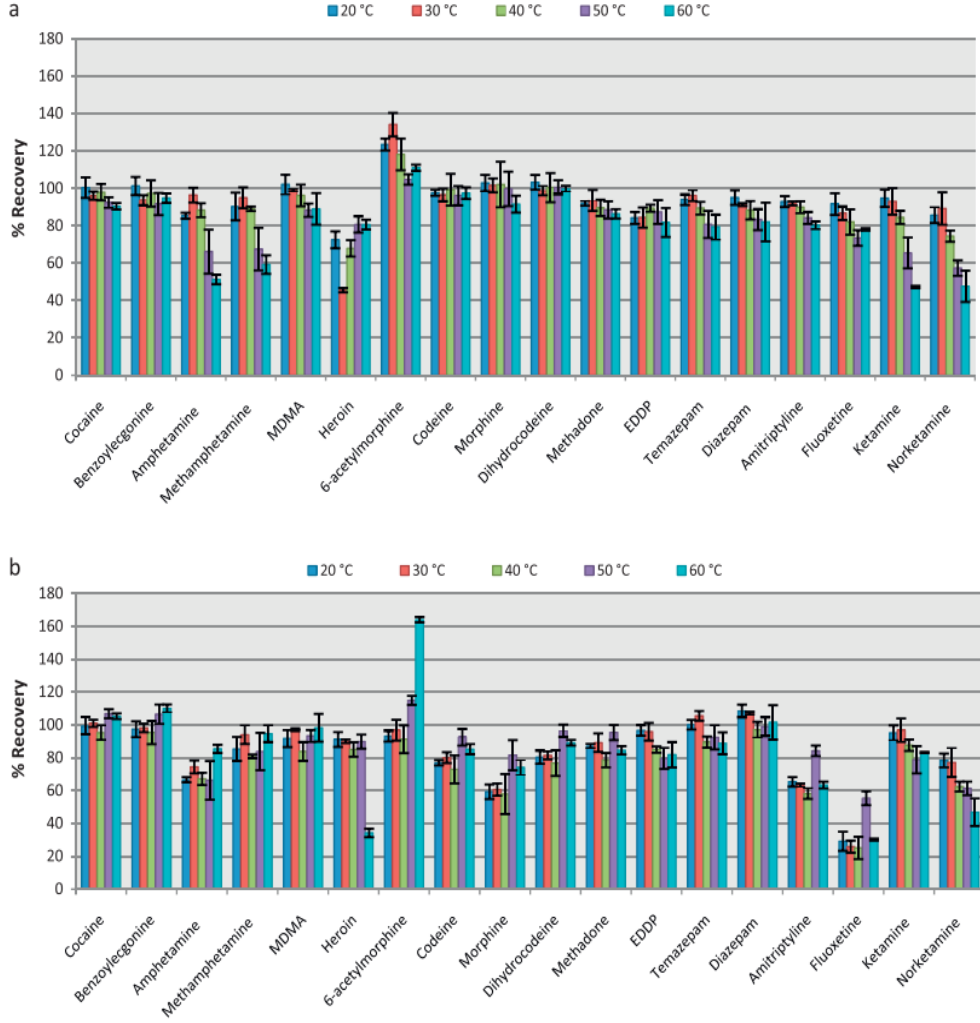
Şekil 1. Web of science “wastewater based epidemiology” anahtar kelimesi ile 2010 yılından 2024 yılına kadar yapılan çalışmaların yıllara göre dağılımı

Epidemiyolojik olarak madde profili sunulmasına yönelik analizlerinin yapılabilmesi için; ekonomik, duyarlı ve güvenilir analitik yöntem arayışları hızla sürmektedir. Sularda yasal ve yasadışı maddelerin analizlerinde stabilite sorunları yaşanmakta ve analiz sonuçlarına yansıtıldığı bilinmektedir (AB Uyuşturucu Piyasaları Raporu 2019 | www.emcdda.europa.eu, n.d.; Castiglioni et al., 2013, 2014; Yadav et al., 2017).

Atıksu epidemiyolojisi yaklaşımı i) atık su örnekleme, ii) numune depolanması, iii) yasadışı maddelere yönelik analitik teknik ve yöntemlerin geliştirilmesi aşamasında bir dizi belirsizlik kaynağı nedeniyle araştırma altındadır. Bu belirsizlik faktörleri üzerine yapılan çalışmalar son on yılda iyileştirme çabası altında olup genellikle sistematik olmayacak şekilde yetersiz rapor edilmiştir (Devault et al., 2017; McCall et al., 2016a; Ramin et al., 2018). Bu kapsamda kanalizasyon sistemi ele alındığında önemli bir sınırlama olarak bilinen kanalizasyon iç hattı ve depolama havuzlarında

yasadışı madde kalıntılarının dönüşümü/bozunmasının tanımlanması gereklidir. Bu parametrelerin tümü verimli ve güvenilir ekstraksiyon teknikleri geliştirmek için hayati öneme sahip olup hedef madde kalıntılarının sulu ortamda sıklıkla ng/L seviyelerinde mevcut olduğu dikkate alındığında önemli bir faktördür (Baker & Kasprzyk-Hordern, 2011b). Bu nedenle atıksulardaki stabilite sorunu, kanalizasyon epidemiyolojisi yaklaşımıyla geriye dönük hesaplanan madde tüketim profilinde önemli ölçüde düşük veya fazla tahmin edilmesine yol açabilmektedir.

Atıksularda yapılan stabilite çalışmaları hakkında ilk kapsamlı çalışma 2011 yılında literatüre Kasprzyk-Hordern ve ark., tarafından sunulmuştur. Bu çalışmada ham atık suların saklama süresi, sıcaklık ve pH açısından incelendiği rapor edilmiştir ve uyarıcılar, opioidler, benzodiazepinler, antidepresanlar, dissosiyatif anestezikler, madde öncü kimyasalları, idrar biyobelirteçleri ve bunların metabolitleri dahil olmak üzere 60'dan fazla analitin ele alındığı belirtilmiştir. Ham atık sudaki analitlerin stabilite eksikliğinin birçok bileşik için önemli olduğu bulunmuş olup, incelenen bileşiklerin +2°C'de depolanan ham atık suların %34'ünde 12 saat sonra %15'inden fazlasında bir stabilite değişikliği bildirilmiştir. Atık suyun genellikle 24 saatlik kompozit numune toplayıcı kullanılarak toplandığı göz önüne alındığında bunun çok önemli bir bulgu olduğu belirtilmiştir. Yapılan bu ilk kapsamlı derlemede ele alınan parametreler: (i) sıcaklığının etkisi; (ii) katı faz ekstraksiyon (SPE) ekstraksiyonuna ilişkin solvent; (iii) cam kapların silanlanmasının etkisi; (iv) SPE sorbenti; (v) cam elyaf filtrelerden vakumlu filtreleme sırasında analitlerin geri kazanılması; (vi) LC-MS öncesi filtre membranları; ve (vii) çevresel matriksteki analitlerin farklı saklama süresi, sıcaklık ve pH değerlerinde stabilite çalışmalarıdır. Bu faktörlerden en önemlilerinden biri SPE açısından *buharlaştırma sıcaklığı ve solventin etkisi*'nin incelenmesi olduğu görülmüştür. Bu derleme incelendiğinde Şekil 2'de görüldüğü gibi, genel olarak bileşiklerin çoğunluğunda 20 °C'de optimal geri kazanımlar elde edilmiştir. Kokain, benzoilekgonin, ekgoninmetilester, ve norkokain gibi maddelerin geri kazanımlarında 40 °C üzerinde büyük ölçüde bir düşüş olduğu gözlenmiştir. Elüentlerin SPE sonrası çözüldüğü elüsyon tipi üzerine yapılan çalışmalarda; amfetamin, metamfetamin, MDMA, morfin, kodein gibi maddeler %7'lik NH₄OH solüsyonunda çözülmesi geri kazanımları önemli ölçüde arttırdığı rapor edilmiştir.



Şekil 2. 20, 30, 40, 50 ve 60 °C’de buharlaşma sıcaklıklarından sonra (a) %7’lik NH₄OH içeren metanol solüsyonu ve (b) metanol kullanılarak elüentlerin geri kazanımları (% gerikazanım) (n = 3) (Baker & Kasprzyk-Hordern, 2011b)

Yapılan bu kapsamlı derlemede araştırılan ikinci parametre *cam malzemelerin silanlanması etkisi*’dir. Silanlama işlemi yani polar Si-OH gruplarının maskelenmesini ve cam yüzeyin emici olmayan silikon tabakanın kimyasal olarak bağlanması ile hidrofiliğin azaltılması işlemidir. Yapılan çalışmalarda silanize edilmiş cam malzeme (vial ve tüp) kullanılarak kokain geri kazanımlarında %34 artış olduğu kaydedilmiştir. Amfetamin tip stimülanlar için silanize edilmemiş cam malzeme kullanılan çalışmada amfetamin ve metamfetamin geri kazanımları sırasıyla %16 ve %23 silanize edilmiş malzeme kullanılarak yapılan çalışmada ise geri kazanımlar sırasıyla %88 ve %89 olduğu rapor edilmiştir. Eser analizinde, bileşikler numune toplama ve SPE ekstraktlarının buharlaştırılması sırasında olduğu gibi adsorpsiyon nedeniyle cam malzeme yüzeylerinde de geri kazanım kayıplarına neden

olabilmektedir (B.S. Middleditch, 1989). Herhangi bir işlem görmemiş cam malzemeler, iyon değiştirme ve nükleofilik merkezler olarak hareket eden silikat ve silanol grupları içermektedir. Amfetamin grubu gibi amin içeren bileşikler, özellikle camın hafif asidik yüzeyinde kaybolmaya eğilimlidir (Knapp, 1979). Bu gibi maddelerin kaybını önlemek için, eser analiz için kullanılan cam malzemeler silanize edilebilir veya 'deaktive' edilebilir. Yukarıda verilen çalışmada, silanize edilmiş yüzeyin silanol gruplar ile etkileşime geçerek daha apolar bir hale gelmesine ve bu nedenle polar maddelerin cam yüzeye göre görece daha apolar yüzeye tutunmasını azalmasına neden olabilmektedir. Buna bağlı olarak silanlama etkisi bazı maddelerin geri kazanımları düşürebilmektedir.

Yapılan çalışmaların ele alındığı üçüncü parametre analitlerin *farklı saklama süreleri, sıcaklık ve pH'taki stabilitesi*'dir. Yapılan çalışmalarda pH 2 ve 7 noktalarında, sıcaklık +2 ve +19 °C'lerde, saklama süresi 12, 24, 72 saat olarak dikkate alınarak değerlendirmeler incelenmiştir. Atık su numunelerinin asitleştirilmesinin bakteri aktivitesini önlediği ve numuneleri koruduğu yaygın olarak bilinmektedir (Baker & Kasprzyk-Hordern, 2011a). Gheorge ve ark. farklı pH değerlerinde (+2 ve +6) ve sıcaklıklarda (-20, +4 ve +20 °C) yüzey suyundaki kokain ve ana metabolitlerin stabilitesini araştırmıştır ve numunelerin asidik pH'ta saklanmasının stabiliteyi arttırmada birincil faktör olduğu bulunmuştur (Gheorghe et al., 2008). Bu durum yalnızca asitleştirmenin bakteriyel aktiviteyi azaltmasından kaynaklı olmadığını aynı zamanda pH değerinin düşük tutulmasının, moleküllerin Le Chatelier ilkesi ve ilkenin iyonlaşma dengelerine uygulanması gereği moleküler halde tutulmasından da kaynaklı olabilmektedir (Liu et al., 1996). Ayrıca yapılan çalışmalarda bazik moleküllerin karışık modlu katyon SPE değişim sorbentleri tarafından ekstrakte edilmesi durumunda numunelerin asitleştirilmesinin de bir gereklilik olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle analiz öncesi numunelerin pH'ının ayarlanması gerektiği rapor edilmiştir. Maddeler açısından stabilite çalışmaları değerlendirildiğinde kokainin stabilitesinin üç gün sonra sırasıyla %6,4 ve %28,3 oranında azaldığı bulunmuştur. Kokain metabolitleri olan norkokain, norbenzoilekgonin ve kokaetilenin filtrelenmiş sudaki çeşitli depolama koşullarında iyi stabilite gösterdiği ve üç gün sonra, pH 7 ve 2°C'de depolanan ham (filtrelenmemiş) atık sularda norkokain, norbenzoilekgonin ve kokaetilen sırasıyla %14,4, %6,0 ve %9,4'lük bir stabilite düşüşü bildirilmiştir. Amfetamin benzeri bileşiklerle genel olarak tüm depolama koşullarında, özellikle

asidik koşullarda depolandığında iyi stabilite gösterdiği rapor edilmiştir (Castiglioni et al., 2006a). Ham (filtrelenmemiş) atık suda pH +7 ve +2 °C'de 72 saat sonra metamfetaminde %6,0'lık bir düşüş bildirilirken, MDA ve MDMA analitlerinde %3,5 ve %3,1'lik bir değişiklik bildirmiştir (Baker & Kasprzyk-Hordern, 2011b). Bu derleme sonrasında atıksularda yapılan madde analizlerinde stabilite önemli bir şekilde ele alınmıştır. Daha geniş pH aralıklarında çalışmaların yapılması ve bu aralıklardaki derişim değişimlerinin tanımlanması atıksularda madde analizlerinin gerçekleştirilmesinde önemlidir. Özellikle piyasada yeni tasarım maddeler, yasal keyif vericiler, bitkisel keyif vericiler, banyo tuzları, araştırma kimyasalları, laboratuvar reaktifleri gibi adlarla bilinen ve daha net bir terminoloji geliştirmek adına UNODC'nin, "Yeni Psikoaktif Maddeler (New Psychoactive Substances, NPS)" terimi ile adlandırılan maddeler için bu analizlerdeki belirsizliklerin tanımlanması da önemlidir (United Nations Office on Drugs and Crime, 2021). NPS'lerin atıksularda parçalanma ürünlerinin sıcaklık ve ortam pH'ından ne derece etkilendiği, hangi pH aralığında daha stabil oldukları ve analitik koşulların NPS'lerin sularda analizi üzerine etkisi gibi temel problemlerin tanımlanmasına da ihtiyaç duyulmaktadır. 2016 yılında Zuccato & Castiglioni ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada popülasyonda özellikle NPS kullanımını tahmin etmek için kentsel atık sularda tespit edilebilecek ana madde veya metaboliti saptamak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulduğu belirtilmektedir (González-Mariño et al., 2016). Yeni psikoaktif maddeler için atık sularda son teknoloji üzerine analitik yaklaşımların ve küresel eğilimlerin kapsamlı bir incelemesi sunan Gent ve ark. (2021), NPS analizleriyle ilgili yaygın sınırlamalardan olan düşük stabilitenin geriye dönük hesaplamaları ve tüketim tahminlerini etkileyebileceğini belirtmiştir (Gent & Paul, 2021). Ayrıca bu çalışmada atık su örneklerinin tesislerden alınarak taşıma sırasında ve analiz öncesindeki sıcaklık seçiminin bile NPS'in kararlılığını etkilediği ve numune ön işleminin başlaması gereken zamanın önemli olduğu belirtilmiştir. Ön işlem öncesi numune stabilitesi üzerine çeşitli çalışmalar yapılarak veriler sunulmuştur. Bu verilere bakıldığında Löve ve ark.(2018) ve Bade ve ark.(2020), çalışmalarında örnekleri HCl veya H₃PO₄ ile asitlendirildiğinde belirli NPS'lerin oda sıcaklığında, +4 °C'de ve -20 °C'de filtrelenmiş atık suda 14 güne kadar stabil olduğunu gösterilmiştir (Bade et al., 2020; Löve et al., 2018).

Psikoaktif maddelerin atık sudaki geleceğini daha iyi anlamaya yönelik araştırmalar ve geriye dönük hesaplamalardaki hata ve belirsizliği en aza indirmeye yönelik çalışmalar gün geçtikçe önem kazanmaktadır. Bu nedenle bu tez çalışmanın amacı halihazırda mevcut sayısız analitik tekniğe alternatif sunmaktan ziyade, alandaki temel eksikliklerin bütüncül değerlendirilmesidir. Bunun temel nedeni ise atıksularda madde analizlerine azaltıcı ya da arttırıcı yönde etkisi olan koşulların tanımlanması ile belirsizlik faktörü çarpanı düşürülebilecektir. Böylece WBE tekniği ile popülasyona yönelik (günde 1000 kişi başına düşen madde tüketim oranı) epidemiyolojik verilerin daha doğru, rasyonel ve sistematik hatanın azaltılmasıyla sunulması sağlanabilecektir.



Gereç ve Yöntem

Bu tez çalışması Ege Üniversitesi Bağımlılık Toksikolojisi Anabilim Dalı Bağımlılık Toksikoloji Laboratuvarı, Manisa Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Hastanesi Toksikoloji Laboratuvarı ve Ankara Üniversitesi Adli Bilimler Enstitüsü Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Kullanılan Kimyasal Malzemeler

4-Fluoro MDMA-BUTICA referans standardı (Sigma Aldrich)
MDMA-4en-PINACA referans standardı (Sigma Aldrich)
ADB-BUTINACA referans standardı (Sigma Aldrich)
Kokain referans standardı (COC) (Cerilliant)
Benzoilekgonin referans standardı (BE) (Cerilliant)
Amfetamin referans standardı (AMP) (Cerilliant)
Metamfetamin referans standardı (MET) (Cerilliant)
3,4-metilenedioksi-N-metilamfetamin referans standardı (MDMA) (Cerilliant)
3,4-Metilendioksiamfetamin referans standardı (MDA) (Cerilliant)
Morfin referans standardı (MOR) (Cerilliant)
6-asetil morfin referans standardı (6-AM) (Cerilliant)
Kodein referans standardı (COD) (Cerilliant)
Nikotin referans standardı (NIC) (Cerilliant)
Kotinin referans standardı (COT) (Cerilliant)
3-OH kotinin referans standardı (3-OH COT) (LGC)
Esrar referans standardı (THC-COOH) (LGC)
Diazepam-d5 (Cerilliant)
Metanol (Merck)
Saf su (deiyonize su)
Amonyak (Merck)
Hidroklorik asit (Merck)
Sodyum hidroksit (Sigma Aldrich)

Kullanılan Araç, Gereç ve Cihazlar

Mikropipet (10-100 µL, 100-1000 µL)
Cam tüp (10 ml'lik)
Balonjoje

Oasis HLB ve Oasis MCX SPE kartuşu (Oasis, Waters)
Bond Elute SPE kartuşu (Agilent)
Whatman GF/C Glass microfiber filters, diameter 47 mm (Cytiva)
Santrifüj (Nüve NF 1200 R)
Vortex (Labnet VX 100)
Vial Azotlu uçurucu (Thermo Scientific reacti-Therm III)
Su banyosu (Nüve BM 302)
Hassas Terazı (Sartorius)
Katı-sıvı ekstraksiyon manifoldu (Biotage)
Accucore C18 LC Kolon (Thermo Scientific, 100mm, 2.1µm , 2.6 µm)
Allure PFPP 5 µm 50 x 2.1 mm (RESTEK)
Shim-pack FC-ODS 150 x 2 mm (Shimadzu)
Sıvı kromatografisi Kütle spektrometresi (Thermo TSQ Quantiva)
Sıvı kromatografisi Kütle spektrometresi LC-MS 8050 (Shimadzu)
Helyum gazı (yüksek saflıkta)
Azot gazı (yüksek saflıkta)
Vial (Agilent)

Kullanılacak atık su matriksi herhangi bir atıksu tesisinden alınmadan EUDA'ya bağılı olarak çalışmalarını yürüten Avrupa'da atık su analizlerinin tek elde toplayan çalışma grubu olan SCORE (Sewage Analysis Core Group) tarafından gönderilmiş olan ham atık su örnekleridir. Bu kör atıksu numuneleri kimyasal ve biyolojik özellikleri bakımından atıksu matriksini yansıtmaktadır. Bu nedenle matriks etkisini analizleri yaparken konsantrasyonu bilinen miktarlarda spike yapılan standartların stabilite koşullarından nasıl etkilendiğı sıvı kromatografisi tandem kütle spektrometrisi (Liquid chromatography tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) kullanılarak analiz edilecektir.

Tezin yöntem kısmı aşağıdaki gibi iki aşamada ele alınmıştır;

- A. Ege Üniversitesi, Bağımlılık Toksikolojisi Laboratuvarı'nda psikoaktif maddelerin analizine yönelik yöntemin valide edilmesi ve stabilite faktörlerinden pH ve sıcaklık faktörlerinin seçilen maddelere etkisinin zamana bağılı olarak incelenmesi

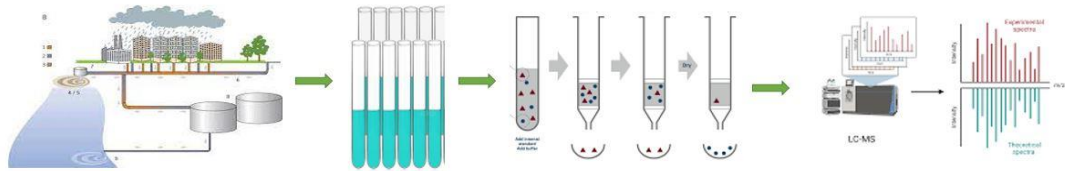
B. Ankara Üniversitesi, Adli Bilimler Araştırma Laboratuvarı'nda ekstraksiyon yönteminin optimize edilmesi amacıyla analize etki edebilecek faktörlerden SPE kartuş seçimi, solvent seçimi ve numunelerin filtrasyon etkisinin incelenmesi

A.Ege Üniversitesi, Bağımlılık Toksikolojisi Laboratuvarı'nda psikoaktif maddelerin analize yönelik yöntemin valide edilmesi ve stabilite faktörlerinden pH ve sıcaklık faktörlerinin seçilen maddelere etkisinin zamana bağlı olarak incelenmesi

A.1. Psikoaktif maddelerin katı faz ekstraksiyon tekniği (SPE) ile analiz edilmesi:

Bağımlılık Toksikolojisi Laboratuvarı'nda tüm örnekler aşağıdaki katı faz ekstraksiyonu uygulanmıştır. Numuneleri saflaştırarak konsantre hale getirmek için analizden önce uygulanan SPE prosedürü aşağıdaki şekildedir.

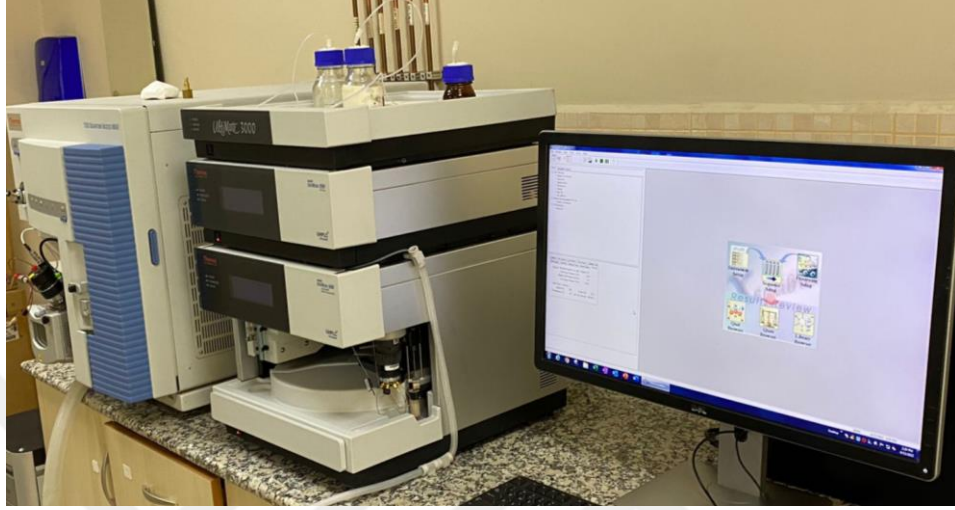
- SPE kartuşları önce 1 mL MeOH ve ardından 1 mL Milli-Q su ile şartlandırılır.
- Ardından internal standart eklenen 25 mL su örnekleri kartuşlara yüklenir.
- Örnek yükleme bittikten sonra kartuşlar 20 dakika vakum altında kurutulur.
- Analitlerin toplanması amacıyla kartuşlardan 2 mL MeOH geçirilerek analitler cam tüpte toplanır.
- Toplanan elüentler azot akışı altında kuruluğa kadar buharlaştırılır.
- Uçurma işlemi sonrasında 250 µL 10:90 MeOH:H₂O (v/v) ile geri çözülerek LC-MS/MS cihazına verilmek üzere viallenir ve 10 µL enjeksiyon yapılır (Castiglioni et al., 2006b; Chen et al., 2013).



Şekil 3. Psikoaktif maddelerin SPE analiz aşamaları

Ege Üniversitesi, Bağımlılık Toksikolojisi Laboratuvarı'nda referans standart maddelerin her birinin derişimi 100 µg/L olacak şekilde ayrı ayrı LC-MS/MS cihazına infüzyonları yapılmıştır. Infüzyon sonrası uygun çarpışma enerjileri (collision energy,

CE), bekleme süresi olarak bilinen Dwell time değerleri ve parçalanma iyonları tespit edilmiştir. Sonrasında her analit için ayrı tespit edilen veriler metoda yazılarak tarama modunda (scan) çalışılmıştır. Alıkonma zamanları (retention time, RT) saptanarak SIM (selected ion monitoring) modunda metot oluşturulmuştur. Örnekler bu metot ile analiz edilerek kromatografik ayrımlardan sonra tanımlanmıştır.



Şekil 4. Bağımlılık Toksikolojisi Laboratuvarı'nda bulunan ve stabilite çalışmalarının yürütüldüğü LC-MS/MS cihazı

Tablo 1. Stabilite çalışmalarının yürütüldüğü LC-MS/MS cihaz koşulları

Cihaz Marka	Thermo Scientific
Model	LC-MS/MS Quantum Access
Kolon	Thermo Scientific Hypersil Gold C18 100mm, 2.1mm, 3µm
Mobil Faz A	%0.1 Formik asitli 5 mm amonyum formatın sudaki çözeltisi
Mobil Faz B	%0.1 formik asit 5 mm amonyum formatın metanoldeki çözeltisi
Akış Hızı	0.500 (ml/min)
Enjeksiyon Hacmi	10.000 (µl)

A.2. Psikoaktif maddelerin analizine yönelik analitik yöntemin valide edilmesi:

Psikoaktif madde analizine yönelik analitik yöntem uluslararası geçerliliği olan “Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology” rehberine göre valide edilmiştir (SWGTOX - Scientific working group for forensic toxicology, 2013). Uygulanan validasyon parametreleri aşağıdaki verilmiştir.

-Kalibrasyon Eğrisi, Doğrusallık ve Ölçüm Aralığı: Analitik yöntem geliştirme ve validasyon için kalibrasyon eğrisi her bir analit için ayrı ayrı en az 5 noktalı ve 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır. Sonuçlar “lineer regresyon formülü” ile “korelasyon katsayısı” ile gösterilmiş olup $r^2 > 0,99$ olmalıdır.

-Belirtme Sınırı (LOD) ve Saptama Alt Sınırı (LOQ): Belirtme alt sınırı, örnekte ölçülebilen fakat kesin olarak miktarı belirlenemeyen en düşük miktardır. Saptama Alt Sınırı ise; kabul edilebilir doğrulukta ve tekrarlanabilirlikte ölçülebilen en düşük derişimdir. Yukarıda verilen SWGTOX rehberi ve TURKLAB ‘Kimyasal Analizlerde Metot Validasyonu ve Verifikasyonu’ Rehberi’ne göre tespit limiti genellikle üç farklı şekilde hesaplanabilmektedir ve gerçekleştirilecek bu çalışmada aşağıdaki formülle hesaplanmıştır. Kör örneklerin sonuçlarının standart sapmaları üzerinden

$$LOD = 3 \times S_0 + X_{k\ddot{o}r},$$

$$LOQ = 10 \times S_0 + X_{k\ddot{o}r} \text{ formülleri ile hesaplanır.}$$

-Seçimlilik: Bir metodun aranan analiti diğer analitlerin bulunduğu örnek içinde ayırt edebilme yeteneğidir. Belirlenebilmesi için kör numune ve değişik numunelere aranan analit eklenerek girişim oluşturup oluşturmadığı incelenecektir.

-Doğruluk ve Gerçeklik: Ölçülen değer doğru ya da doğru kabul edilen değere yakınlığını gösterir. Gerçeklik için sistematik hata hesabı yapılır. Sistematik hata bir ölçüm metodunun gerçek sonucu verebilme kabiliyetini belirtir. Bunun için düşük ve yüksek 2 derişim belirlenerek 5 farklı günde tekrarlı çalışmalar yapılmıştır. $\pm\%20$ geri kazanım aralığı kimyasal analizlerde kabul edilebilir aralıktır.

-Kesinlik: Kesinlik ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığının ifadesidir. Bağımsız analiz sonuçları arasındaki tutarlılığı gösterir. Kesinlik doğruluğun gerçeklik dışındaki diğer bir bileşeni olup rastgele hataların dağılımını gösterir. Kesinlik ölçümünü 4 faktör etkilemektedir. Bunlar zaman, kalibrasyon, operator ve ekipman olup bunların değişkenliğine göre kesinlik de değişmektedir. Tekrarlanabilirlik ve tekrarüretilebilirlik olarak iki genel kesinlik ölçümü bulunmaktadır. Tekrarlanabilirlik, “r” harfi ile ifade edilmekte olup tekrarüretilebilirlik ise “R” harfi ile ifade edilmektedir.

-Tekraredilebilirlik – Tekrarüretilebilirlik: Tekrarlanabilirlik, laboratuvar içi kesinlik, belirlenen düşük, orta ve yüksek 3 derişim aynı gün içerisinde 6 tekrarlı yapılan çalışma ile gün içi tekrarlanabilirlik hesaplanacaktır. Aynı laboratuvarda, aynı kişi tarafından, aynı cihaz ve malzemeler kullanılarak, özdeş deney numunesi üzerinde,

kısa zaman aralığı içinde aynı ekstraksiyon metodu kullanılarak 2 farklı konsantrasyon için gerçekleştirilmiştir.

-Taşınma Etkisi (Carry Over): Çalışılan örnekten sonraki vialle bulaş durumunun kontrolü için yüksek derişimli örnekten sonra kör örnek cihaza verilerek örnekte kromatogramında madde taşınması incelenmiştir.

Analitik yöntemin validasyon aşamaları tamamlandıktan sonra geliştirilen bu yöntem ile maddelerin stabilitesi üzerinde etkisi olan parametrelerden pH ve sıcaklık, etkisini gözlemlmek için aşağıdaki çalışmalar yapılmıştır.

A.3. Psikoaktif maddelerin analizine yönelik stabilite çalışmalarının yapılması:

Stabilite çalışması numunelerin atıksu havuzlarından toplanması, laboratuvar ortamına transferi ve depolanması aşamalarında olması muhtemel bozunmalar dikkate alınarak gerçekleştirilmiştir. İncelenen ve stabiliteye etki eden en önemli faktörler sıcaklık ve pH'tır. Madde ve metabolitlerinin stabilitesi, laboratuvar ölçekli çalışmalarla incelenmiştir. Oluşturulan cam havuzlarda kör atık su numunelerine ekimi yapılan psikoaktif maddelerin +4 °C sıcaklık değerinde pH 2-5-7,5 noktalarında 1-3-7-14 gün periyodlarında LC-MS/MS ile ölçümleri yapılmıştır.

B.Ankara Üniversitesi, Adli Bilimler Araştırma Laboratuvarı'nda ekstraksiyon yönteminin optimize edilmesi amacıyla analize etki edebilecek faktörlerden SPE kartuş seçimi, solvent seçimi ve numunelerin filtrasyonun etkisi incelenmesi

B.1. Psikoaktif maddelerin analizine yönelik ekstraksiyon tekniğinin optimizasyonu:

Adli Bilimler Araştırma Laboratuvarı'nda sularda psikoaktif madde analizinde valide edilmiş yöntem ile ekstraksiyon tekniğinin optimize edilmesine dair çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Kullanılan LC-MS/MS cihazı aşağıda verilmiştir.



Şekil 5. Adli Bilimler Araştırma Laboratuvarı'nda bulunan ve optimizasyon çalışmalarının yürütüldüğü LC-MS/MS cihazı

Analiz edilen parametreler *klasik ve sentetik maddeler olmak üzere iki ayrı sınıfta toplanmıştır*. Analizleri ise *iki ayrı ekstraksiyon tekniği ve iki ayrı LC-MS/MS metodu* ile çalışılarak yürütülmüştür. Klasik maddeler için kullanılan analitik yöntemeye ait veriler aşağıda sunulmuştur.

Klasik Maddeler

- Morfin,
- Kokain,
- Benzoilekgonin,
- 3,4-metilenedioksi-N-metilamfetamin (MDMA),
- Amfetamin,

Klasik Maddeler

- Kodein
- Kotinin
- Nikotin
- 3-OH Kotinin
- 11-nor- Δ^9 -Tetrahydrocannabinol-9 karboksilik asit

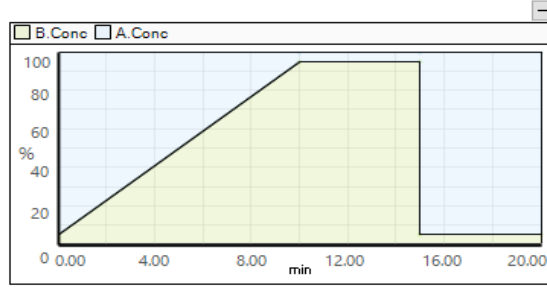
Tablo 2. Optimizsyon çalışmalarının yürütüldüğü LC-MS/MS cihaz koşulları

CİHAZ	Cihaz Marka	Shimadzu
	Model	LC-MS 8050
KOLON	Klasik Maddelerin analizinde kullanılan analitik kolon	Shimadzu Shim-pack FC-ODS 150 x 2 mm
	Sentetik Maddelerin analizinde kullanılan analitik kolon	Restek Allure PFPP 5 μ m 50 x 2.1 mm
MOBİL FAZ	Klasik Metot mobil faz Mobil Faz A Mobil Faz B	%0.1 Formik asitli 5 mm amonyum formatın sudaki çözeltisi
		%0.1 formik asit 5 mm amonyum formatın metanoldeki çözeltisi
	Sentetik Metot mobil faz Mobil Faz A Mobil Faz B	%0.2 Formik asidin sudaki çözeltisi %100 Asetonitril
AKIŞ HIZI		0.400 (ml/min)
ENJEKSİYON HACMİ		5.00 (μ l)

Kromatografik ayrımın gerçekleşmesinde yararlanılan analitik yöntemeye ait HPLC analiz koşulları Grafik 1’de verilmiştir.

Tablo 3. Klasik olarak sınıflandırılan maddelerin analizine ait yöntemin sıvı kromatografi verileri

Time	Flow mL/min	A (%)	B (%)
10	0.4	95	5
15	0.4	5	95
15.01	0.4	5	95



Grafik 1. Klasik olarak sınıflandırılan maddelerin analizine ait yöntemin gradient verileri

Tablo 4. Klasik olarak sınıflandırılan maddelere ait HPLC parametreleri

HPLC PARAMETRELERİ	
Flow	0.4 mL/min
Oven temperature	40 °C
Injection volume	5 uL
MS PARAMETRELERİ	
Nebulizing gas flow	3 L/min
Heating gas flow	10 L/min
Interface temperature	300 °C
Drying gas flow	10 L/min

Tablo 5. Klasik olarak sınıflandırılan maddelerin analizinde kullanılan analitik yöntemin MS parametreleri

Madde	Precursor m/z	Product m/z	Dwell Time	CE
Kotinin	177.00	53.00>80.00>98.00	50	47>25>23
Rac-Kotinin-d3	180.00	80.00>101.00>53.00	50	26>25>47
Morfin-d3	289.20	165.00>201.10	50	43>28
Morfin	286.10	165.10>153.20	50	42>45
Benzoilekgonin-d3	292.60	171.10>108.10	50	21>48
Nikotin	163.00	130.00>117.00>132.00	50	22>26>18
Benzoilekgonin	290.10	168.10>105.10	50	19>30
Kodein-d3	303.10	215.10>165.10	50	26>46
Kodein	300.20	165.20>153.20	50	46>47
6-MAM	328.20	211.00>193.10>165.10	50	38>29>44
6-MAM-d3	331.00	165.10>211.10>193.10	50	41>27>30
Amfetamin	136.10	91.10>119.10	50	20>15
Diazepam-d5	290.00	227.20>198.20>154.00	50	26>34>29
MDA	180.10	105.10>135.10>79.10	50	22>21>31
THC-COOH	345.10	299.30>193.30>327.20	50	17>20>29
MDMA-d5	199.10	165.10>135.10>107.10	50	13>23>25
Metamfetamin	150.10	91.00>119.10	50	20>15
MDMA	194.10	105.10>135.10	50	23>21
Kokain	304.20	182.10>82.10>150.10	50	21>30>26

İki farklı madde grubu için iki ayrı SPE prosedürü uygulanmıştır. Klasik maddelerin ekstraksiyon basamakları aşağıda verilmiştir.

Tablo 6. Klasik maddelerin analizinde kullanılan SPE Prosedürü

Şartlama	3 mL MeOH 3 mL saf su
Örnek yükleme	25 mL numune (10 psi basınçta) geçirilir
Yıkama	3 mL saf su
Kurutma	20 dk vakum altında kurutulur
Elüsyon toplama	6 mL MeOH
Uçurma	40 °C'de N ₂ altında uçurulur
Geri toplama	250 µL MeOH ile çözülür

Sentetik maddeler için kullanılan analitik yöntemle ait veriler aşağıda sunulmuştur. Bu çalışmalar kapsamında aşağıdaki maddelerin analizleri yapılmıştır.

Sentetik Maddeler

- 4-fluoro MDMB-BUTICA
- ADB-BUTINACA
- MDMB-4en-PINACA

Tablo 7. Sentetik olarak sınıflandırılan maddelerin analizine ait yöntemin sıvı kromatografisi verileri

Time	Flow mL/min	A (%)	B (%)
10	0.4	95	5
15	0.4	5	95
15.01	0.4	5	95

Tablo 8. Klasik olarak sınıflandırılan maddelere ait HPLC parametreleri

HPLC PARAMETRELERİ	
Flow	0.4 mL/min
Oven temperature	40 °C
Injection volume	5 µL
MS PARAMETRELERİ	
Nebulizing gas flow	3 L/min
Heating gas flow	10 L/min
Interface temperature	300 °C
Drying gas flow	10 L/min

Tablo 9. Sentetik olarak sınıflandırılan maddelerin analizinde kullanılan analitik yöntemin MS parametreleri

Madde	Precursor m/z	Product m/z	Dwell Time	CE
4-Fluoro MDMB-BUTICA	363.10	218.00>144.05>116.00	11	20>41>55
ABD-BUTINACA	331.00	201.10>286.20>145.00	11	26>15>44
MDMB-4en-PINACA	358.05	213.10>298.20>145.05	11	26>16>42
Dizepam-D5	290	227.20>198.20>154.00	11	26>34>29

Analizleri zor ve zaman alıcı olabilen yeni tasarım psikoaktif maddeler için uygulanan SPE prosedürü aşağıdaki gibidir.

Tablo 10. Sentetik maddelerin analizinde kullanılan SPE prosedürü

NOT: Ekstraksiyon öncesi su numuneleri pH:2'ye ayarlanır	
Şartlama	3 mL MeOH 3 mL saf su 3 mL pH:2 saf su
Örnek yükleme	pH:2'ye ayarlanmış 25 mL numune (10 psi basınçta) geçirilir
Yıkama	pH:2'ye ayarlanmış 3 mL saf su
Kurutma	20 dk vakum altında kurutulur
Elüsyon toplama	3 mL MeOH 3 mL %2lik NH ₄ 'lü MeOH
Uçurma	40 °C'de N ₂ altında uçurulur
Geri toplama	250 µL 60:40 (ACN:H ₂ O) ile çözülür

Bulgular

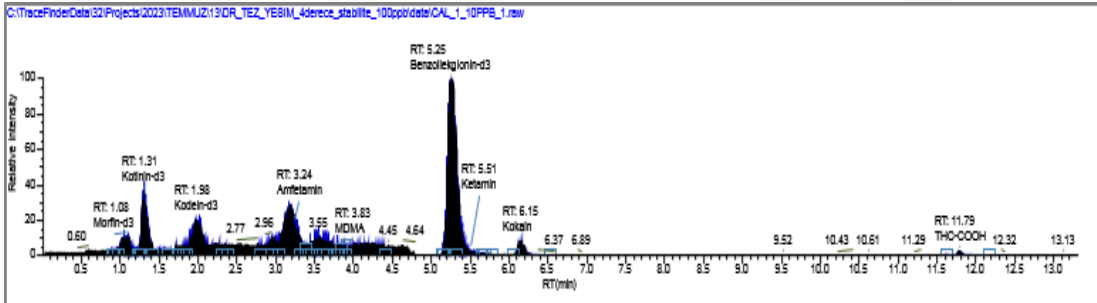
Bu tez çalışmasında elde edilen veriler yöntem kısmındaki iş paketlerine atıfta bulunularak aşağıda listelenmiştir.

A.1. Psikoaktif maddelerin katı faz ekstraksiyon tekniği (SPE) ile analiz edilmesine dair sonuçlar:

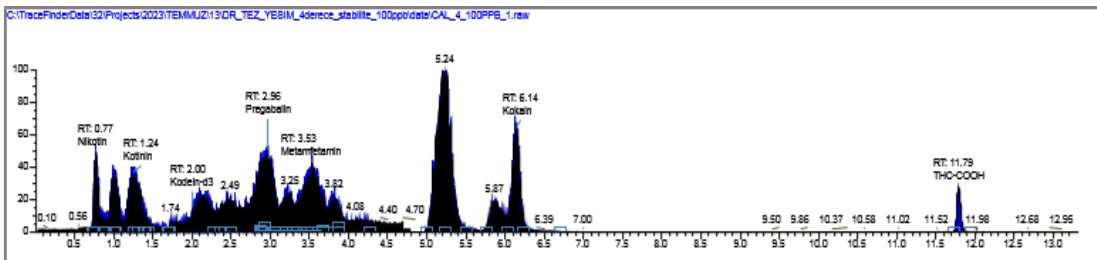
Çalışmamızda aşağıda listelenen maddelere ait bir analitik yöntem geliştirilmiş ve valide edilmiştir.

- Morfin,
- Kokain,
- Benzoilekgonin,
- 3,4-metilenedioksi-N-metilamfetamin (MDMA),
- Amfetamin,
- 11-nor- Δ^9 -Tetrahydrocannabinol-9 karboksilik asit (THC-COOH)
- Kodein
- Kotinin
- Nikotin
- 3-OH Kotinin
- Pregabalin

Analitik yönteme ait kalibrasyon aralığı 10-1000 $\mu\text{g/L}$ aralığındadır. Aşağıda yönteme ait total iyon kromatogramı 10 ve 100 $\mu\text{g/L}$ için ayrı ayrı verilmiştir.



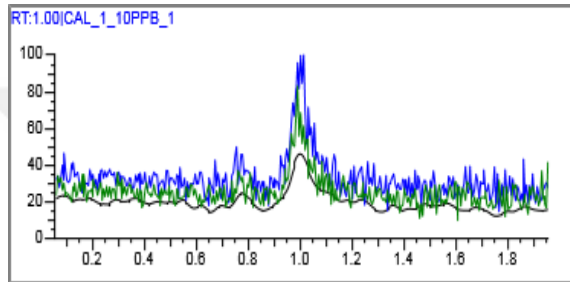
Şekil 6. 10 $\mu\text{g/L}$ madde konsantrasyonuna ait total iyon kromatogramı



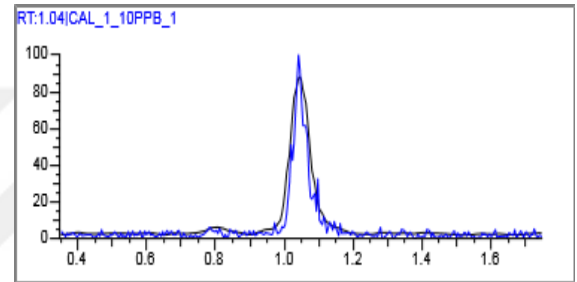
Şekil 7. 100 $\mu\text{g/L}$ madde konsantrasyonuna ait total iyon kromatogramı

Çalışmada stabilite açısından analiz edilen parametrelere ait iyon kromatogramları Şekil 9'da verilmiştir.

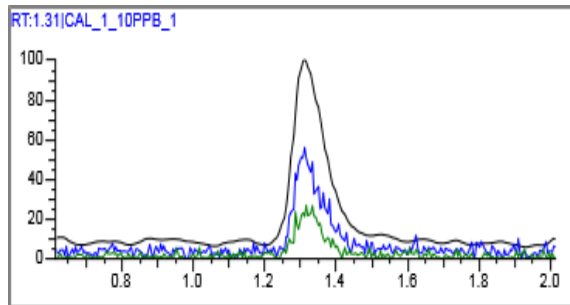
Nikotin				
Concen:	30.543			
RT:	1.00		Scan#	1351
Delta RT:	0.20			
Lab File:	CAL_1_10PPB_1			
Acq:	7/11/2023 1:18:13 PM			
Tgt Ion:	132.12		Resp:	382917
Ion	Ratio	Lower	Upper	
132.12	100.00%			
130.11	124.37%	127.78%	191.68%	
117.13	0.00%	90.85%	136.28%	
Scan Filter:	+ c ESI SRM ms2 163.184 [132.119-132.121]			



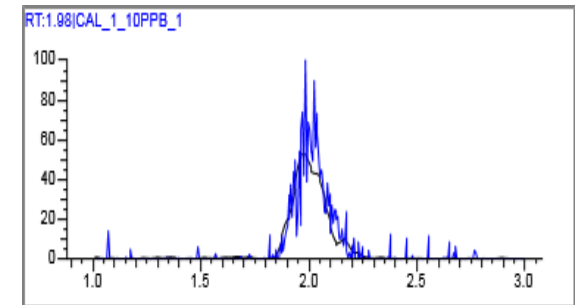
3OH-Kotinin				
Concen:	1.726			
RT:	1.04		Scan#	1434
Delta RT:	0.04			
Lab File:	CAL_1_10PPB_1			
Acq:	7/11/2023 1:18:13 PM			
Tgt Ion:	80.2		Resp:	498678
Ion	Ratio	Lower	Upper	
80.20	100.00%			
134.11	78.22%	58.65%	87.98%	
	N/A	N/A	N/A	
Scan Filter:	+ c ESI SRM ms2 193.200 [80.199-80.201, 134.109-134.111]			



Kotinin				
Concen:	4.235			
RT:	1.31		Scan#	1937
Delta RT:	0.00			
Lab File:	CAL_1_10PPB_1			
Acq:	7/11/2023 1:18:13 PM			
Tgt Ion:	80.2		Resp:	681881
Ion	Ratio	Lower	Upper	
80.20	100.00%			
98.16	46.49%	35.19%	52.79%	
146.10	23.41%	8.89%	13.34%	
Scan Filter:	+ c ESI SRM ms2 177.200 [80.199-80.201, 98.159-98.161, 146.099-146.101, 149.049-149.051]			

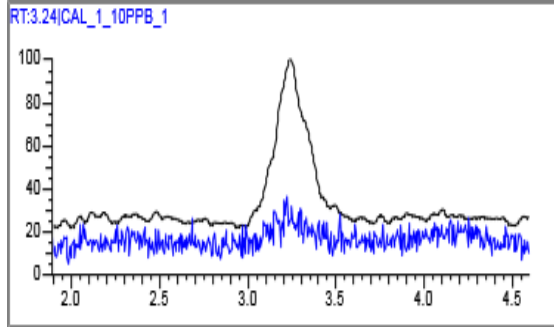


Kodein				
Concen:	3.007			
RT:	1.98		Scan#	3312
Delta RT:	0.03			
Lab File:	CAL_1_10PPB_1			
Acq:	7/11/2023 1:18:13 PM			
Tgt Ion:	165.06		Resp:	189101
Ion	Ratio	Lower	Upper	
165.06	100.00%			
215.08	117.04%	92.07%	138.11%	
	N/A	N/A	N/A	
Scan Filter:	+ c ESI SRM ms2 300.117 [165.059-165.061, 215.079-215.081]			

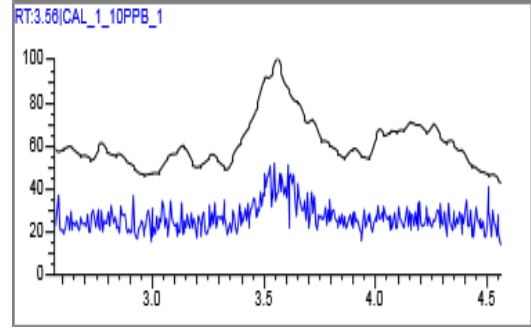


Amfetamin				
Concen:	3.654			
RT:	3.24		Scan#	5289
Delta RT:	0.24			
Lab File:	CAL_1_10PPB_1			
Acq:	7/11/2023 1:18:13 PM			
Tgt Ion:	91.09		Resp:	1383607
Ion	Ratio	Lower	Upper	
91.09	100.00%			
65.19	24.53%	13.83%	20.74%	
	N/A	N/A	N/A	
Scan Filter:	+ c ESI SRM ms2 136.075 [65.189-65.191, 91.089-91.091]			

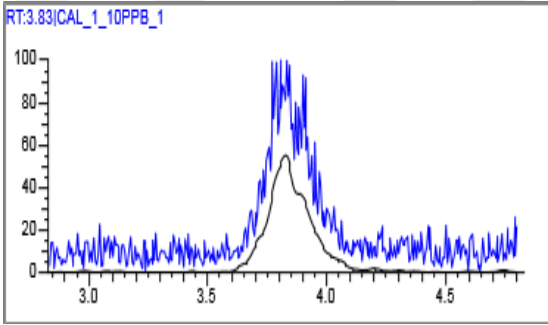
Metamfetamin				
Concen:	2.360			
RT:	3.56		Scan#	5775
Delta RT:	0.16			
Lab File:	CAL_1_10PPB_1			
Acq:	7/11/2023 1:18:13 PM			
Tgt Ion:	91.01		Resp:	1077088
Ion	Ratio	Lower	Upper	
91.01	100.00%			
119.01	46.12%	35.87%	53.80%	
	N/A	N/A	N/A	
Scan Filter:	+ c ESI SRM ms2 150.069 [90.999-91.001, 118.999-119.001]			



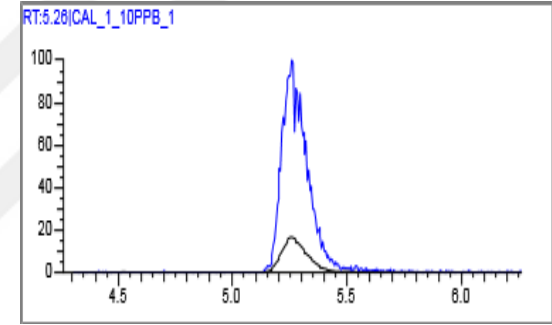
MDMA				
Concen:	9.485			
RT:	3.83		Scan#	6181
Delta RT:	0.18			
Lab File:	CAL_1_10PPB_1			
Acq:	7/11/2023 1:18:13 PM			
Tgt Ion:	105.006		Resp:	406170
Ion	Ratio	Lower	Upper	
105.01	100.00%			
134.99	152.14%	125.97%	188.96%	
	N/A	N/A	N/A	
+ c ESI SRM ms2 194.029 [105.005-105.007, 134.989-134.991]				



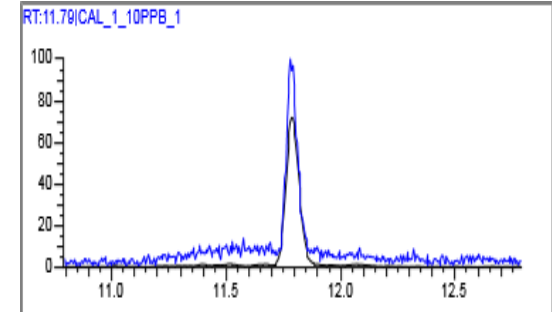
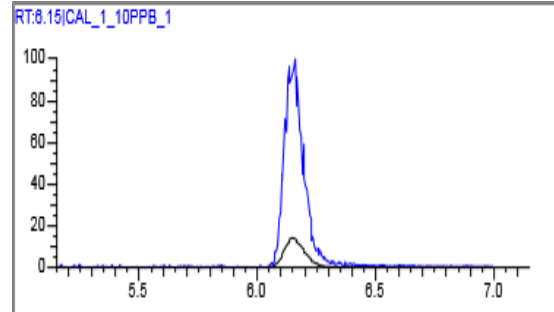
Benzoilekjonin				
Concen:	27.307			
RT:	5.26		Scan#	8081
Delta RT:	-0.04			
Lab File:	CAL_1_10PPB_1			
Acq:	7/11/2023 1:18:13 PM			
Tgt Ion:	105		Resp:	498006
Ion	Ratio	Lower	Upper	
105.00	100.00%			
168.00	588.99%	448.66%	672.99%	
	N/A	N/A	N/A	
Scan Filter: + c ESI SRM ms2 290.010 [104.999-105.001, 167.999-168.001]				



Krain				
Concen:	11.389			
RT:	11.79		Scan#	9779
Delta RT:	-0.01			
Lab File:	CAL_1_10PPB_1			
Acq:	7/11/2023 1:18:13 PM			
Tgt Ion:	299.13		Resp:	132080
Ion	Ratio	Lower	Upper	
299.13	100.00%			
327.23	194.64%	110.71%	166.07%	
	N/A	N/A	N/A	
Scan Filter: + c ESI SRM ms2 345.089 [299.129-299.131, 327.229-327.231]				



THC-COOH				
Concen:	11.389			
RT:	11.79		Scan#	9779
Delta RT:	-0.01			
Lab File:	CAL_1_10PPB_1			
Acq:	7/11/2023 1:18:13 PM			
Tgt Ion:	299.13		Resp:	132080
Ion	Ratio	Lower	Upper	
299.13	100.00%			
327.23	194.64%	110.71%	166.07%	
	N/A	N/A	N/A	
Scan Filter: + c ESI SRM ms2 345.089 [299.129-299.131, 327.229-327.231]				



Şekil 8. 10 µg/L derişimdeki analitlere ait iyon kromatogramları

A.2. Psikoaktif maddelerin analizine yönelik analitik yöntemin valide edilmesine dair sonuçlar:

Tüm analitler için doğrusal kalibrasyon eğrilerine ait r^2 değerleri 0,99'dan büyük olarak elde edildi. Tüm analitler için doğrusal aralık 1-1000 ng/L idi. LOD ve LOQ değerleri 3,7 ile 13,7 ng/L arasında elde edildi. Göreceli standart sapmalar (RSD) belirtildiği gibi her çalışma için %20 altında gözlemlendi. MS parametreleri, tekrarlanabilirlik, yeniden üretilebilirlik RSD ve LOQ-LOD değerleri Tablo 3'de gösterilmiştir. Geri kazanımlar %74,2 ile %95,9 arasında tespit edilmiştir. SWGTOX rehberine göre %80 ile %120 arasındaki geri kazanımlar genellikle kabul edilebilirdir (SWGTOX - Scientific working group for forensic toxicology, 2013).

Tablo 11. Maddelerin ve metabolitlerinin listesi, LC-MS/MS parametreleri ve yöntem doğrulama sonuçları

Maddenin adı	Moleküler ağırlığı	Precursor iyon (m/z)	Product iyon (m/z)	Collision Energy (CE)	RT (dk)	Gün içi Kesinlik % RSD		Günler arası kesinlik % RSD		LOD ng/L	LOQ ng/L	Linerite r^2
						10 ng/L	100 ng/L	10 ng/L	100 ng/L			
Amfetamin	135.10	136.4	51,65,77	36	3.45	2.87	4.01	8.17	12.11	2.78	9.26	0.9977
Benzoilekgonin	289.13	290.1	77,105,119	50	6.05	3.22	3.55	5.36	5.91	3.14	10.4	0.9989
Kokain	303.15	304.1	77,82,105	30	6.75	5.56	7.87	7.12	8.34	3.48	11.6	0.9963
Kodein	299.15	300.4	165,183,199	42	2.4	6.12	5.21	8.90	7.90	4.18	13.4	0.9957
MDMA	193.11	194.4	77,105,133	24	4.75	4.33	6.90	7.56	9.05	3.89	12.96	0.9979
Morfin	285.14	286.4	152,165,181	40	1.75	7.14	5.87	11.30	10.56	4.11	13.7	0.9972
THC-COOH	344.09	345.5	193,229,299	25	12.55	8.55	11.45	14.56	12.55	3.09	10.3	0.9976

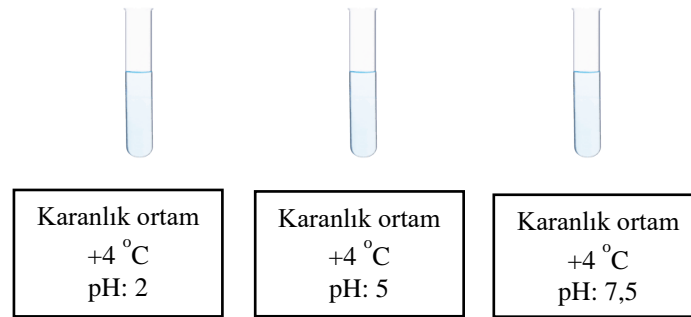
Bu tez çalışmasında Pregabalin maddesine ait validasyon noktaları diğer maddelerden farklı (%97'si metabolize olmadan ana madde olarak atılması ve konsantrasyonları diğer maddelerden yüksek çalışılması) olması sebebiyle ilgili analitik veriler ayrı bir tabloda aşağıdaki gibi verilmiştir. Ancak bu maddeye ait referans standart temini ile alakalı kısıtlılıktan dolayı pH ve sıcaklık çalışmalarından sonra yapılan çalışmalara dahil edilememiştir.

Tablo 12. Pregabalin'e ait analitik veriler ve validasyon sonuçları

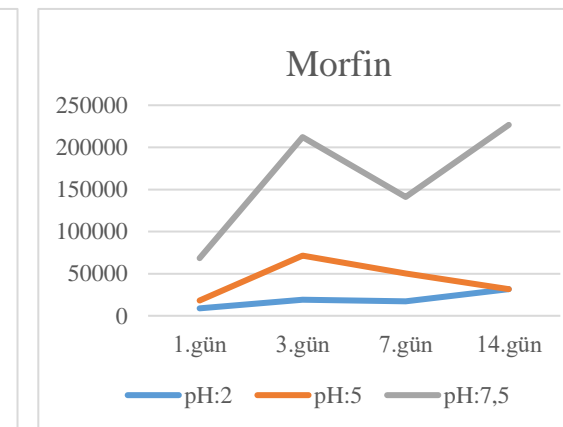
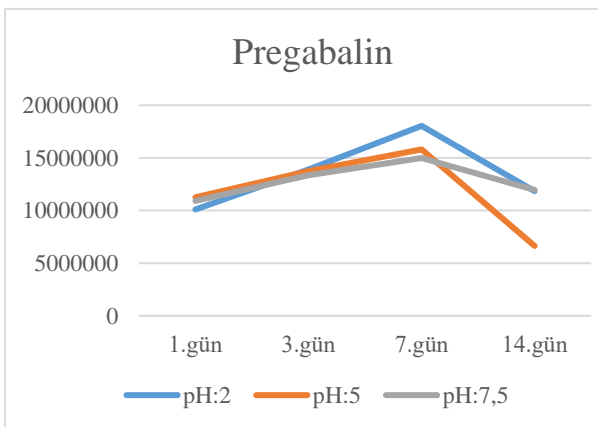
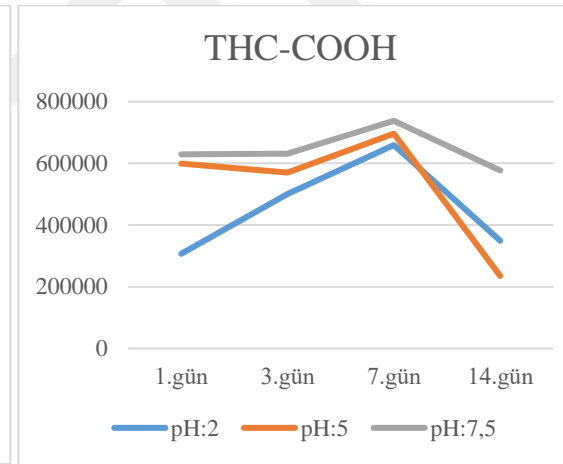
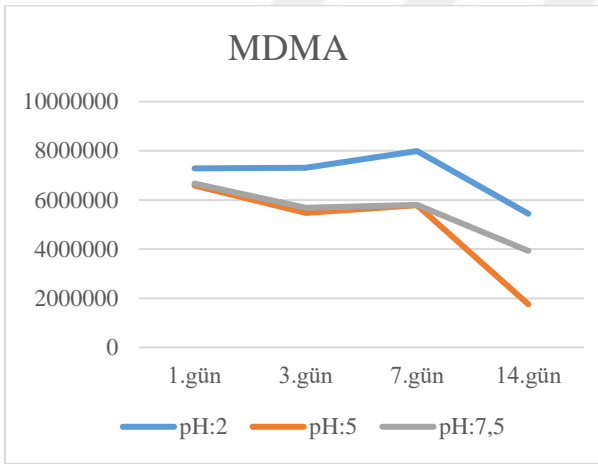
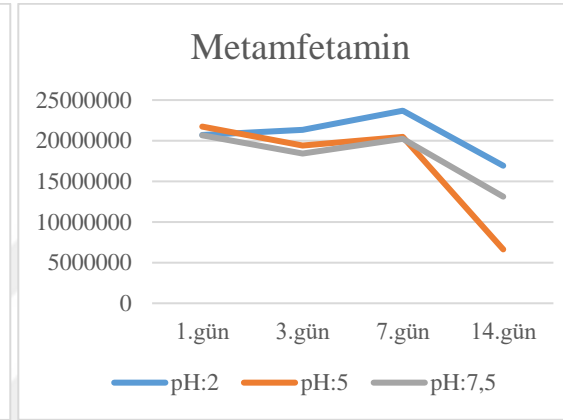
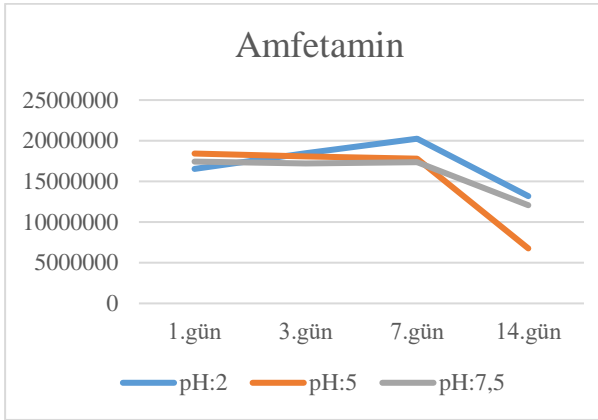
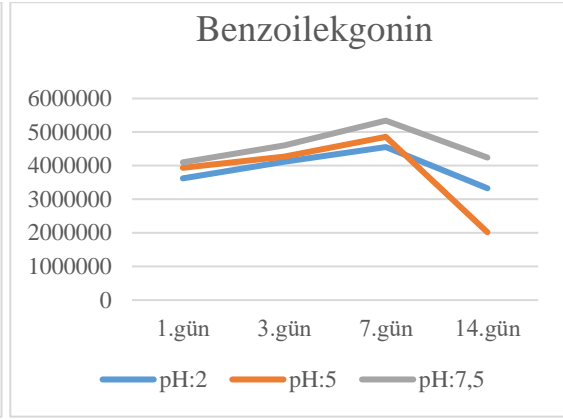
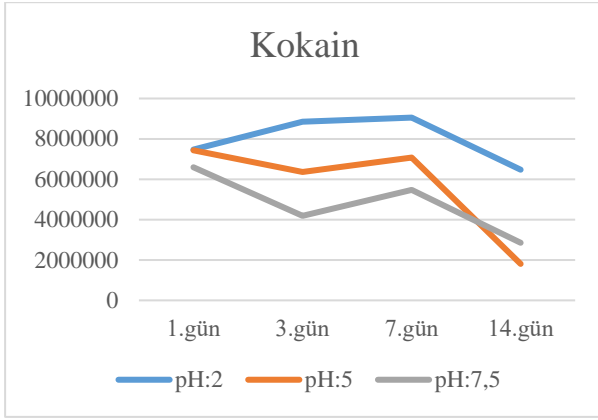
Madde Adı	Korelasyon katsayısı (R ²)	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)	Ortalama gerikazanım ±SD (%)		Gün içi Kesinlik RSD% (n=3)		Günler arası RSD% (5 different days, n=3)	
				500 ng/ml	5000 ng/ml	500 ng/ml	5000 ng/ml	500 ng/ml	5000 ng/ml
PGB	0.9947	250	500	87.01 ± 5.01	91.76 ± 3.89	3.43	4.23	9.77	12.68

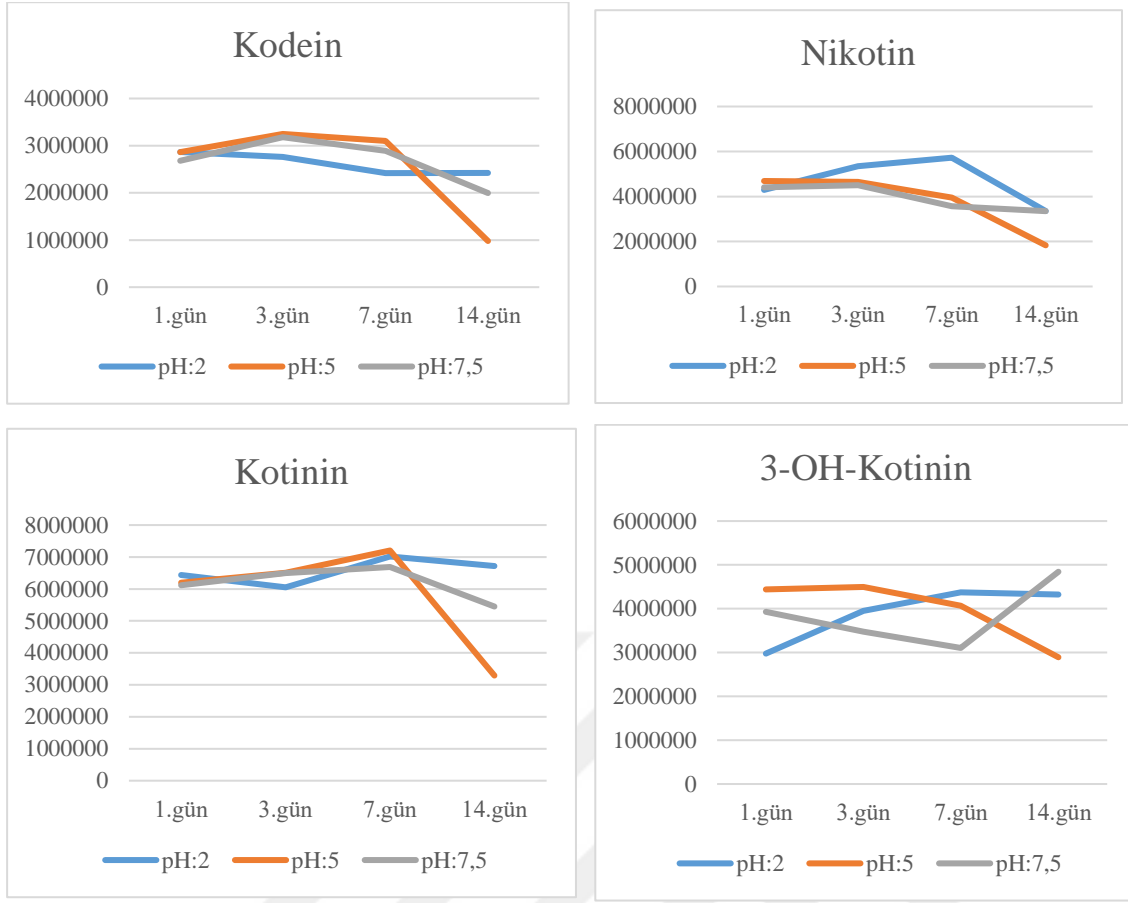
A.3. Psikoaktif maddelerin analizine yönelik stabilite çalışmalarının sonuçları:

Stabilite çalışmaları için +4 °C ortamda pH 2-5-7,5 değerlerine ayarlanmış su numuneleri analiz edilmiştir.



Şekil 9. Stabilite çalışmalarının şematize gösterimi





Grafik 2. +4 °C ortamda pH 2-5-7,5 değerlerinde analitlerin alan değerleri

B.1. Psikoaktif maddelerin analizine yönelik ekstraksiyon yönteminin optimizasyon çalışmalarının sonuçları:

Adli Bilimler Araştırma Laboratuvarı'nda **SPE kartuş seçiminin** analitlerin geri kazanımına etkisi incelenirken eş zamanlı SPE prosedürünün optimizasyonu için analitlerin konsantrasyonuna etkisi izlenen diğer parametreler aşağıdaki gibi sınıflandırılmıştır:

- 1- SPE aşamalarından analitlerin çözüldüğü solvent seçiminin etkisi
- 2- SPE prosedüründe son aşamada mikrofiltre kullanımının etkisi
- 3- SPE prosedüründe numunelerin vakum altında cam mikrofiber filtreden süzülmesinin etkisi

Analiz edilen parametreler klasik ve sentetik psikoaktif maddeler olarak iki gruba ayrılmıştır.

“Gereç ve Yöntem” başlığı altında verilen ve Adli Bilimler Araştırma Laboratuvarı’nda uygulanan çalışmalar aşağıdaki gibidir.



Şekil 10. Adli Bilimler Araştırma Laboratuvarı’nda yapılan çalışmalar

SPE prosedüründe aşağıdaki SPE kartuşları üzerinden analitlerin gerikazanımları hesaplanarak denemeler yapılmıştır.

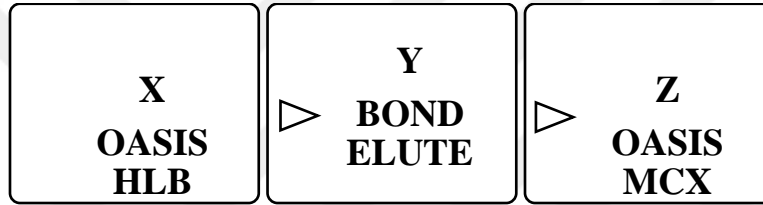


Figure 1. Optimizasyon çalışmalarında kullanılan SPE kartuş çeşitleri

Çalışmada kullanılan SPE kartuşlarına ait özellikler aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 13. SPE kartuş denemelerinde kullanılan kartuşlara ait özellikler

OASIS HLB particle size 30 um, 200 mg, 6cc	Polimerik reversed-phase sorbent: asidik, bazik ve nötral bileşikler için kullanılır. pH:0-14 arası
VARIAN BOND Elute Plexa, 200mg, 3ml	C18 kartuş, iyon değişiminden önce sulu matrikslerin tuzunun giderilmesi için kullanılır.
OASIS MCX particle size 30 um, 50 mg, 3cc	Katyon değişim gruplarına sahip bileşiklerin ekstraksiyonunda kullanılmak üzere tasarlanmış mix modlu bir polimerik sorbent içerir.

B.1.1. SPE aşamalarından analitlerin çözüldüğü solvent seçiminin etkisi

Aşağıda klasik psikoaktif maddeler için olan ekstraksiyon yöntemine ait elüsyonların geri toplandığı solvent bileşimi seçiminin klasik maddeler üzerine etkisine dair iş basamakları ve elde edilen sonuçlar verilmiştir. Çalışma prosedüründe son aşamada analitler %100 metanol içinde geri çözülmektedir. Bu çalışmalar kapsamında %50 ve %10'luk metanol ile denemeler yapılmıştır.

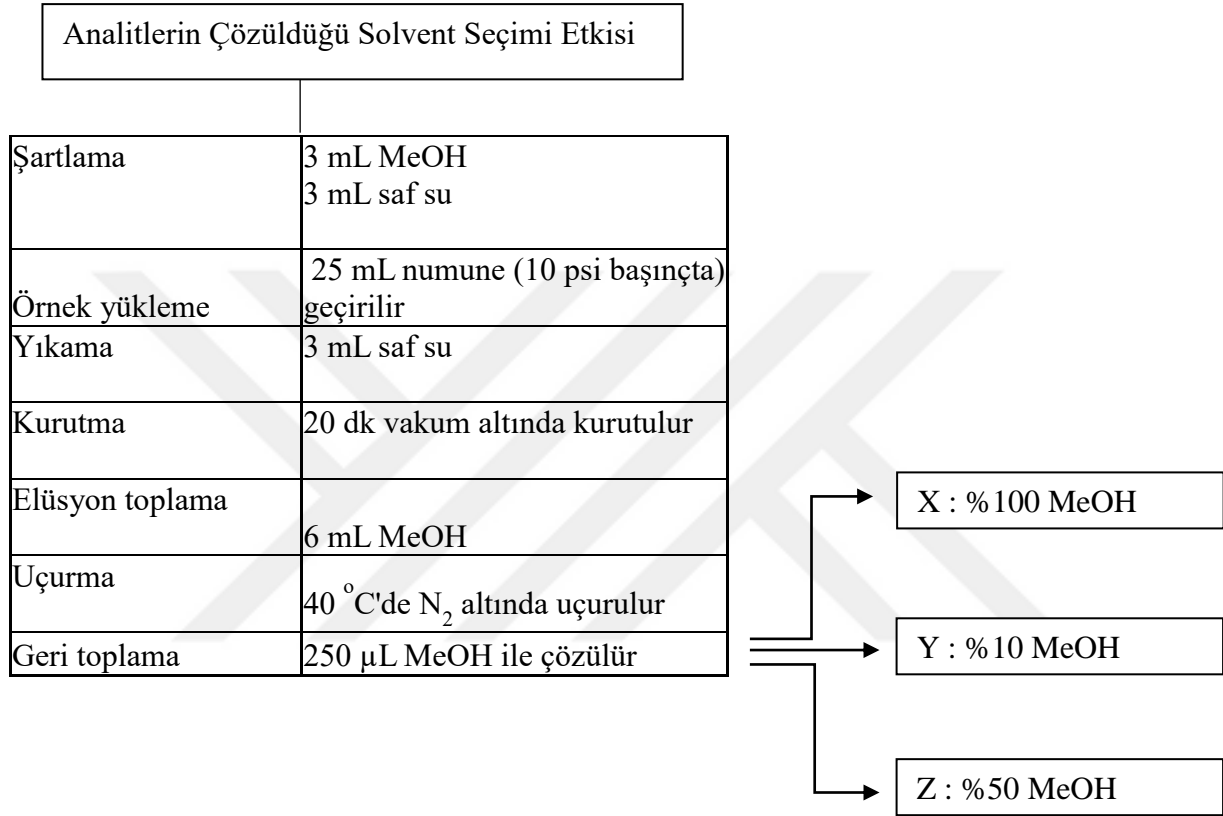
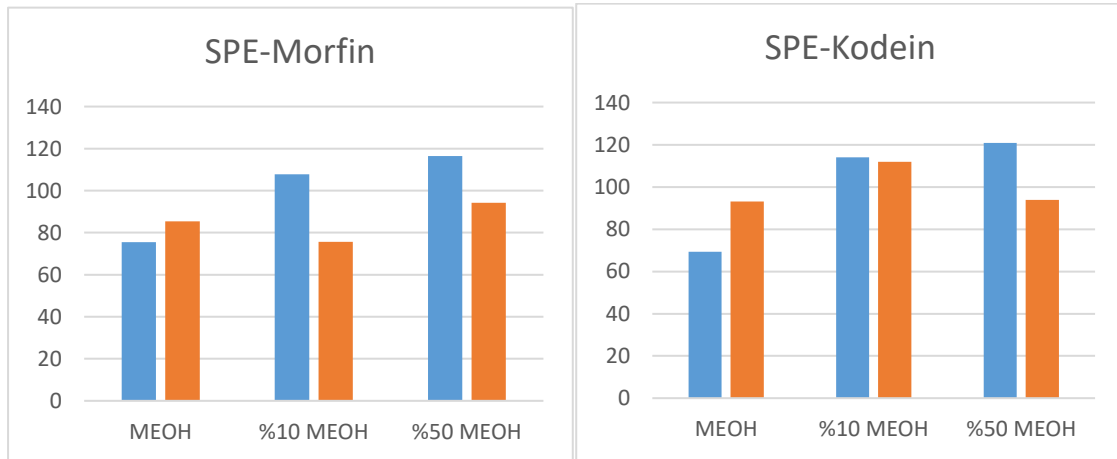
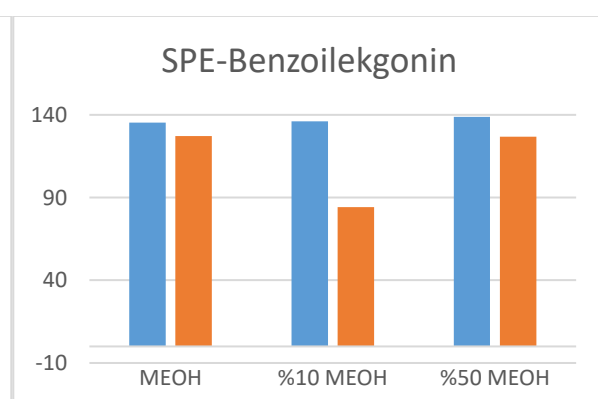
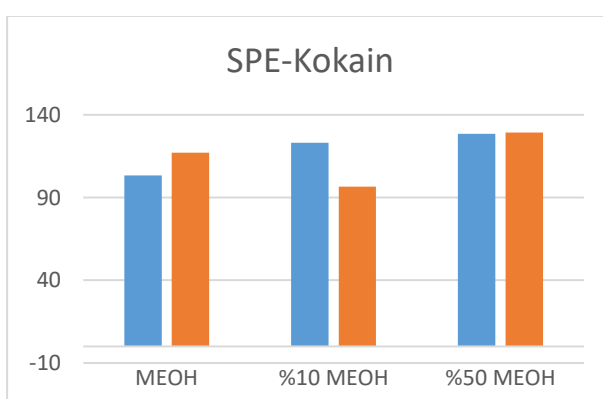
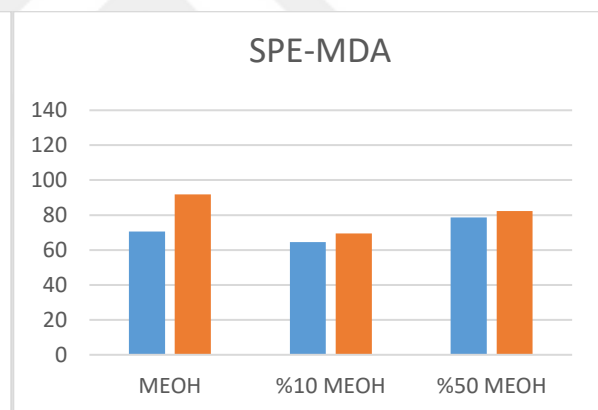
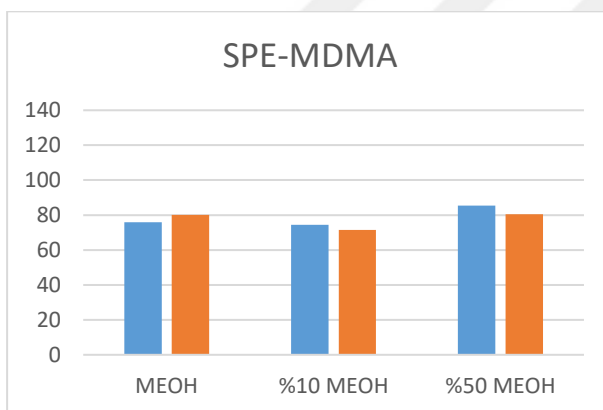
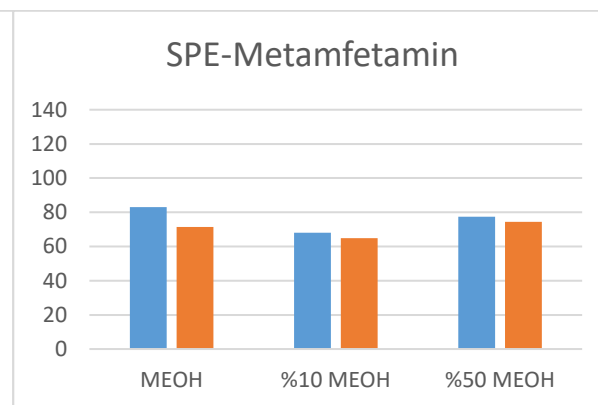
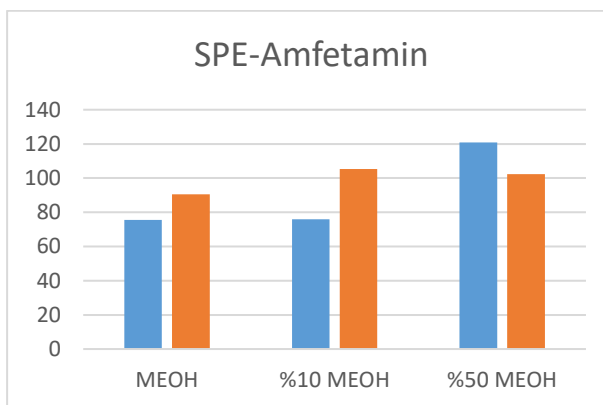
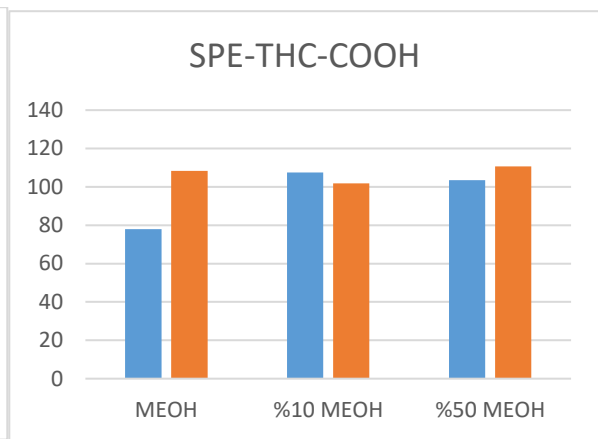
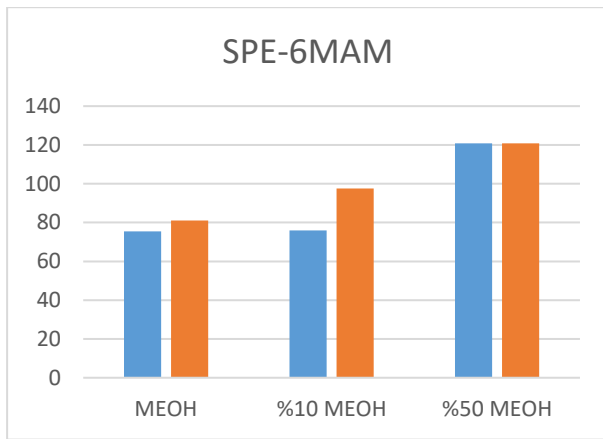


Figure 2. Klasik maddelerin analizinin optimizasyonuna yönelik ekstraksiyon adımları

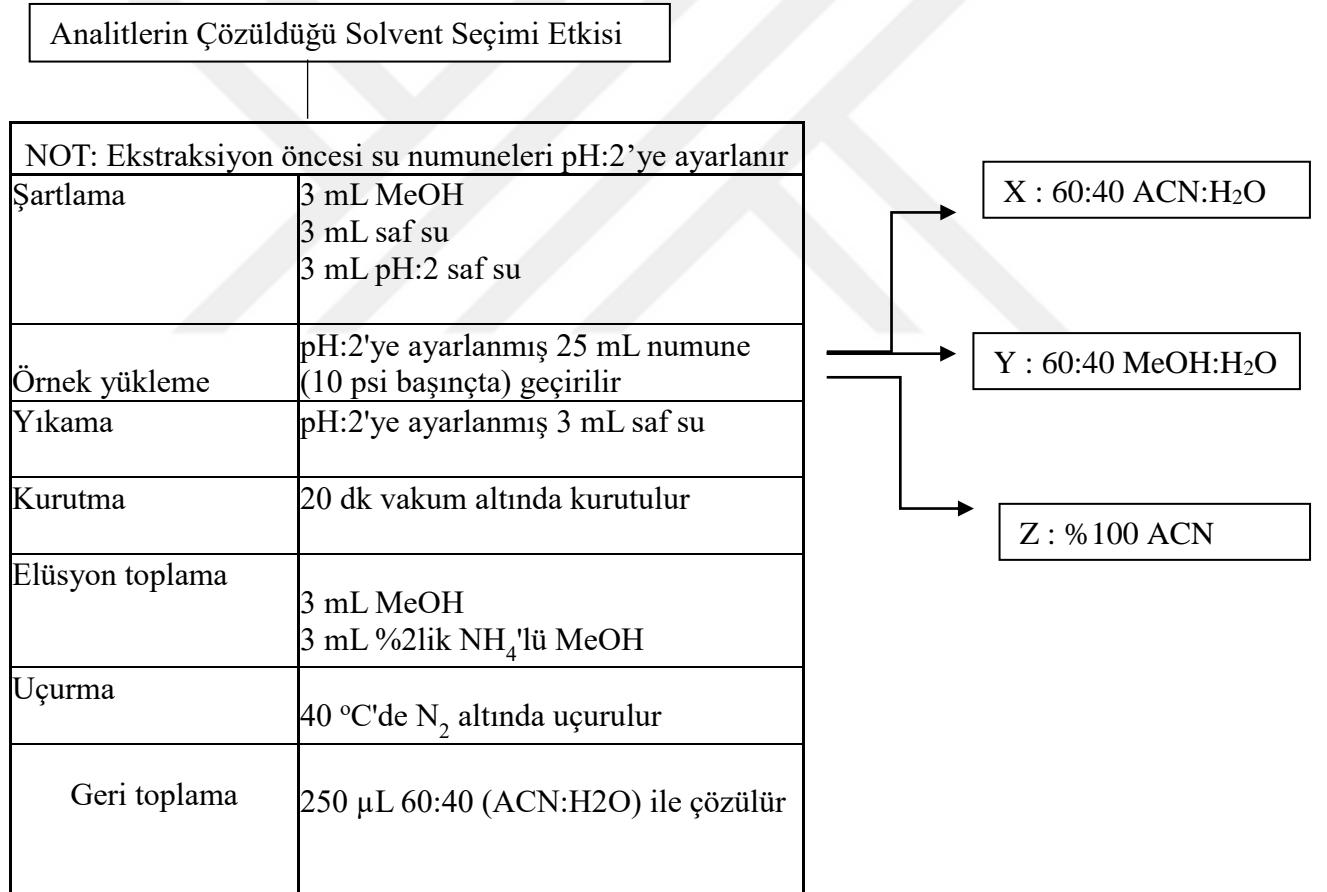




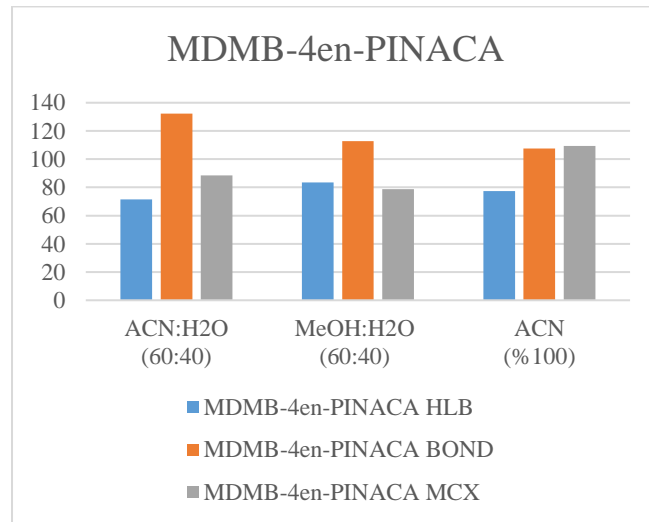
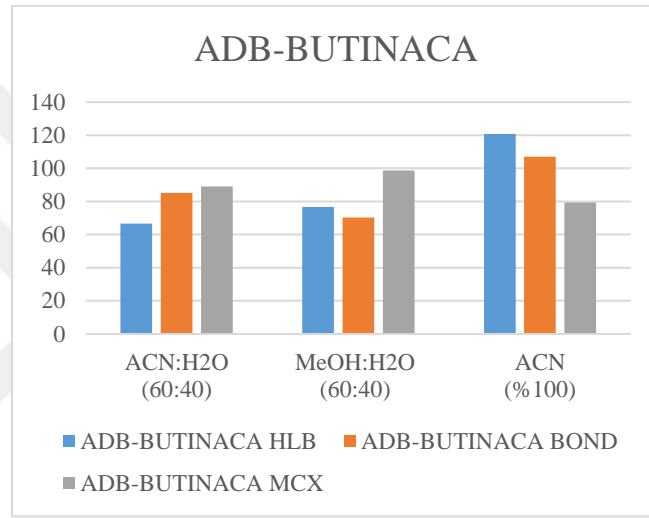
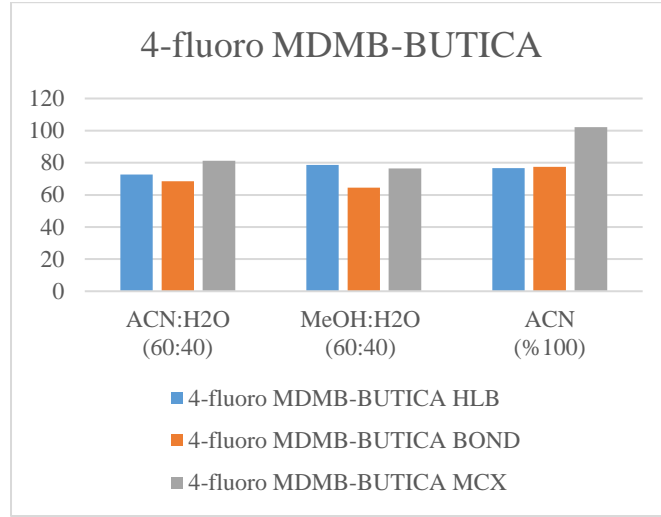
Grafik 3. Klasik maddeler için elüsyon solvent içeriğinin X: %100 Metanol, Y:%10 Metanol ve Z:%50 metanol olarak denemelerine ait sonuçlar (mavi sütun: Oasis HLB, turuncu sütun: Bond Elute SPE kartuşu temsil etmektedir.)

Grafik 3'deki SPE kartuş kıyaslamasına bakıldığında orjinal metodun kendisi kullanıldığında kodein, morfin ve 6-MAM için Oasis HLB ve Bond Elute SPE kartuşları ile ekstraksiyon geri kazanımları ortalama olarak % 75.15'den yüksek elde edilmiştir. Oasis HLB kartuş ile geri kazanımlar % 69.34 - 75.48 aralığındayken, Bond Elute ile % 80.97- 93.17 arasında elde edilmiştir. Bu özellikle 6-MAM gibi su matriksinde kararsız moleküllerin ekstraksiyon verimi açısından önemlidir.

Aşağıda sentetik psikoaktif maddeler için olan ekstraksiyon yöntemine ait elüsyonların geri toplandığı solvent bileşimi seçiminin klasik maddeler üzerine etkisine dair iş basamakları ve elde edilen sonuçlar verilmiştir



Şekil 11. Sentetik maddelerin analizinin optimizasyonuna yönelik ekstraksiyon adımları



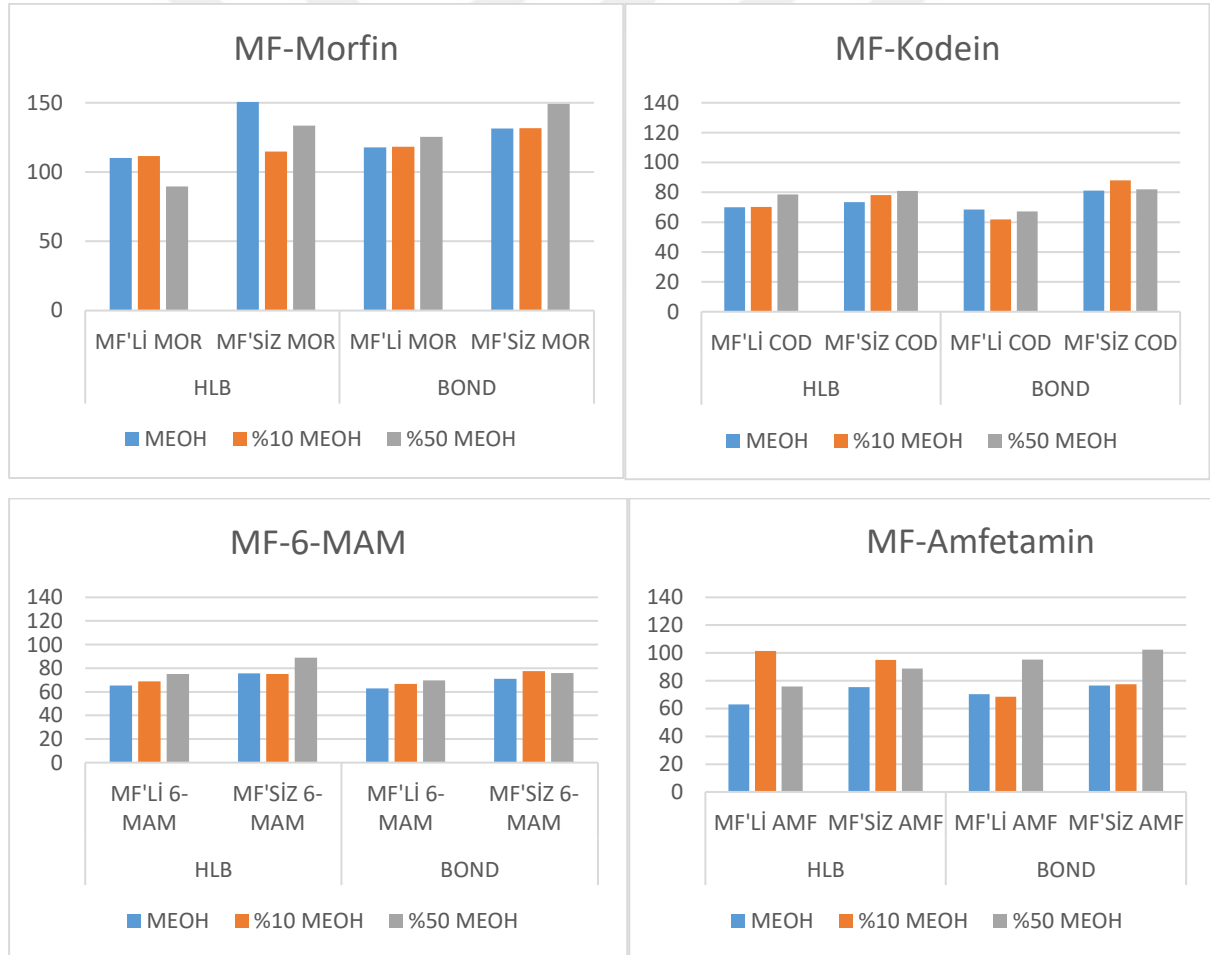
Grafik 4. Sentetik maddeler için elüsyon solvent içeriğinin X : 60:40 ACN:H₂O, Y : 60:40 MeOH:H₂O ve Z:%100 ACN olarak denemelerine ait sonuçlar

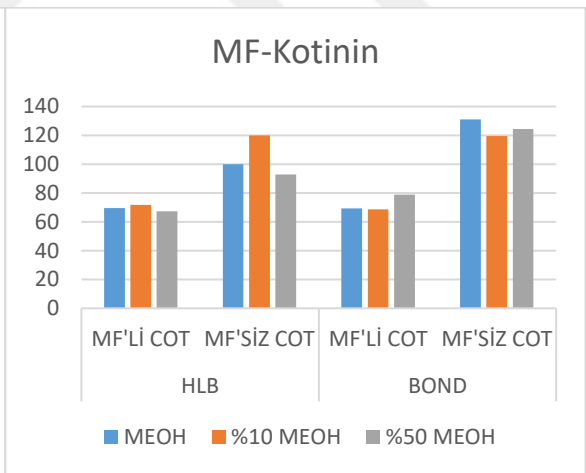
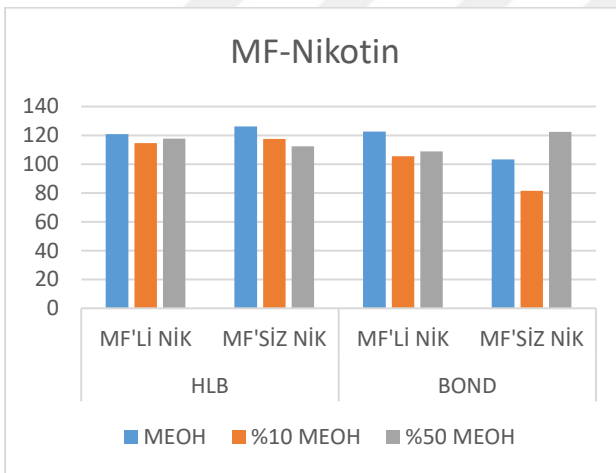
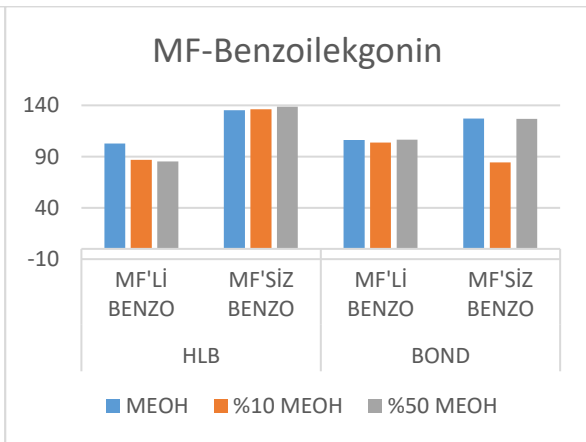
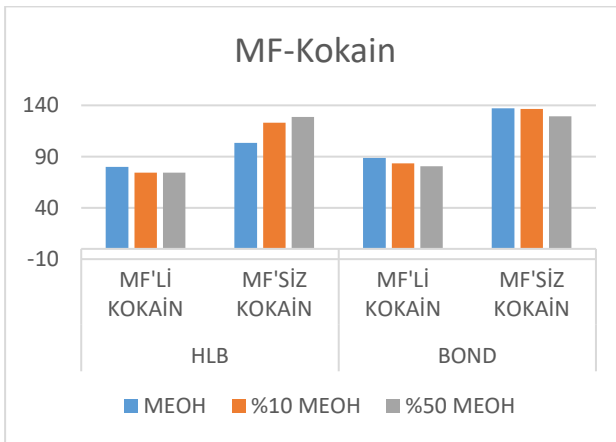
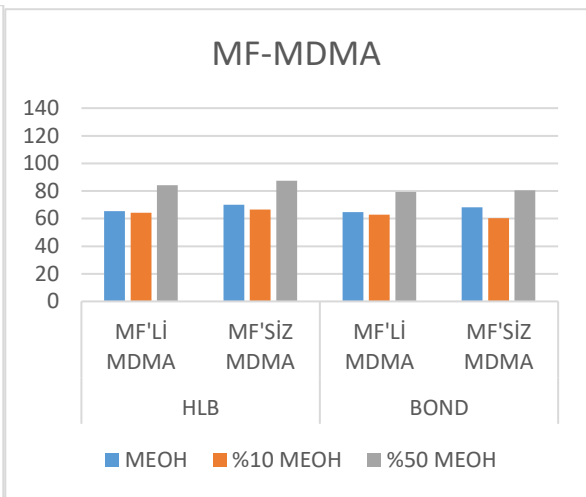
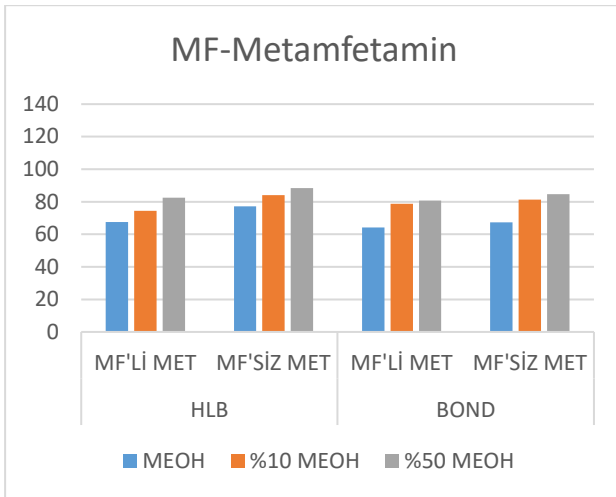
Grafik 4'deki sonuçlara bakıldığında orjinal metodun kendisi kullanıldığında 4-Fluoro MDMB-BUTICA, ADB-BUTINACA ve MDMB-4en-PINACA için MCX SPE kartuş kullanımı ile

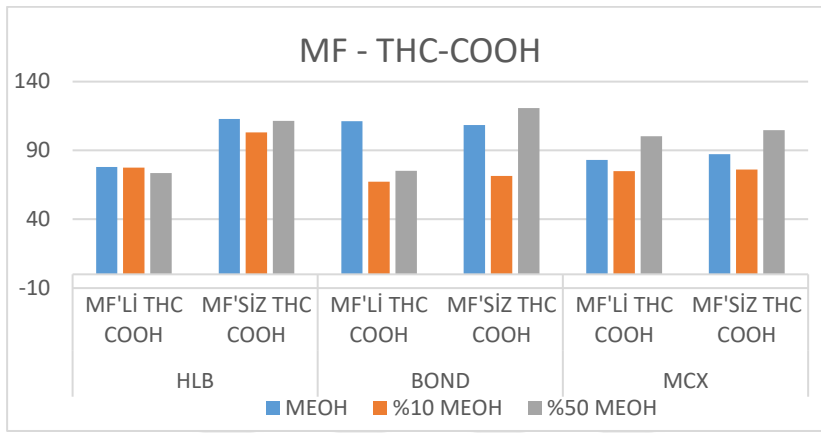
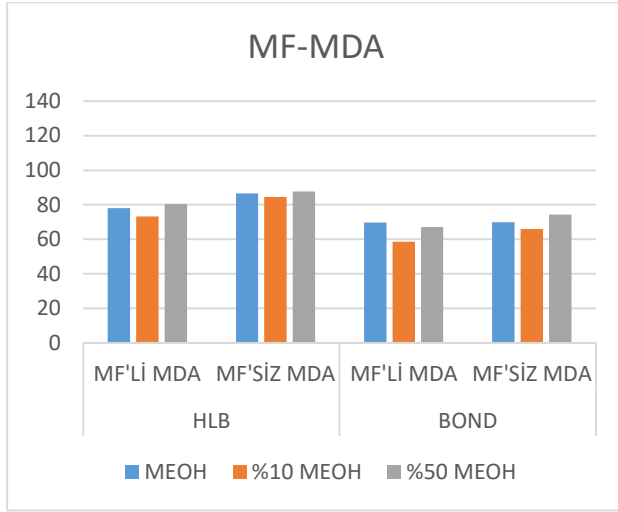
ekstraksiyon verimleri % 85.42 ile 102.45 aralığındadır. Bu durum sentetik maddeler olarak adlandırılan ve genellikle hidroksilasyon, N-debutilasyon, oksidatif deaminasyon gibi anahtar biyotransformasyonları gerçekleştiren maddelerin tespit edilebilmesinde ekstraksiyon veriminin artırılmasına yönelik çalışmalarda MCX SPE kartuş kullanımının önemini gösterilmektedir.

B.1.2. SPE prosedürü sonrasında kromatografik analize verilmeden önce mikrofiltre kullanımının etkisi

SPE prosedüründe analitlerin ilgili ekstraksiyon solventi ile geri çözümlenerek LC-MS/MS cihazına verilmeden önce mikrofiltreden örneklerin geçirilmesinin etkisini incelemek adına SPE prosedürü 0.45 µm, 25mm ölçülerinde mikrofiltre kullanılarak (MF'li) analiz edilmiş örnekler ile mikrofiltre kullanılmadan (MF'siz) analiz edilen örneklerin kıyaslaması yapılmıştır.







Grafik 5. Klasik maddeler için mikro filtre kağıdının ekstraksiyon sırasında kullanımının etkisine ait sonuçlar THC-COOH için yapılan üç farklı SPE kartuş denemesinde MCX SPE kartuş veriminin yüksek elde edilmesi sorbentin içerdiği katyon-değişim gruplarından kaynaklandığı belirlenmiştir. Sentetik maddeler gibi asidik özellik gösteren THC-COOH'in ekstraksiyon verimi MCX ile ortalama % 102.82 elde edilmiştir. Mikro filtreden geçirilen örneklerde ise bu değer % 90.73 elde edildiği görülmüştür.

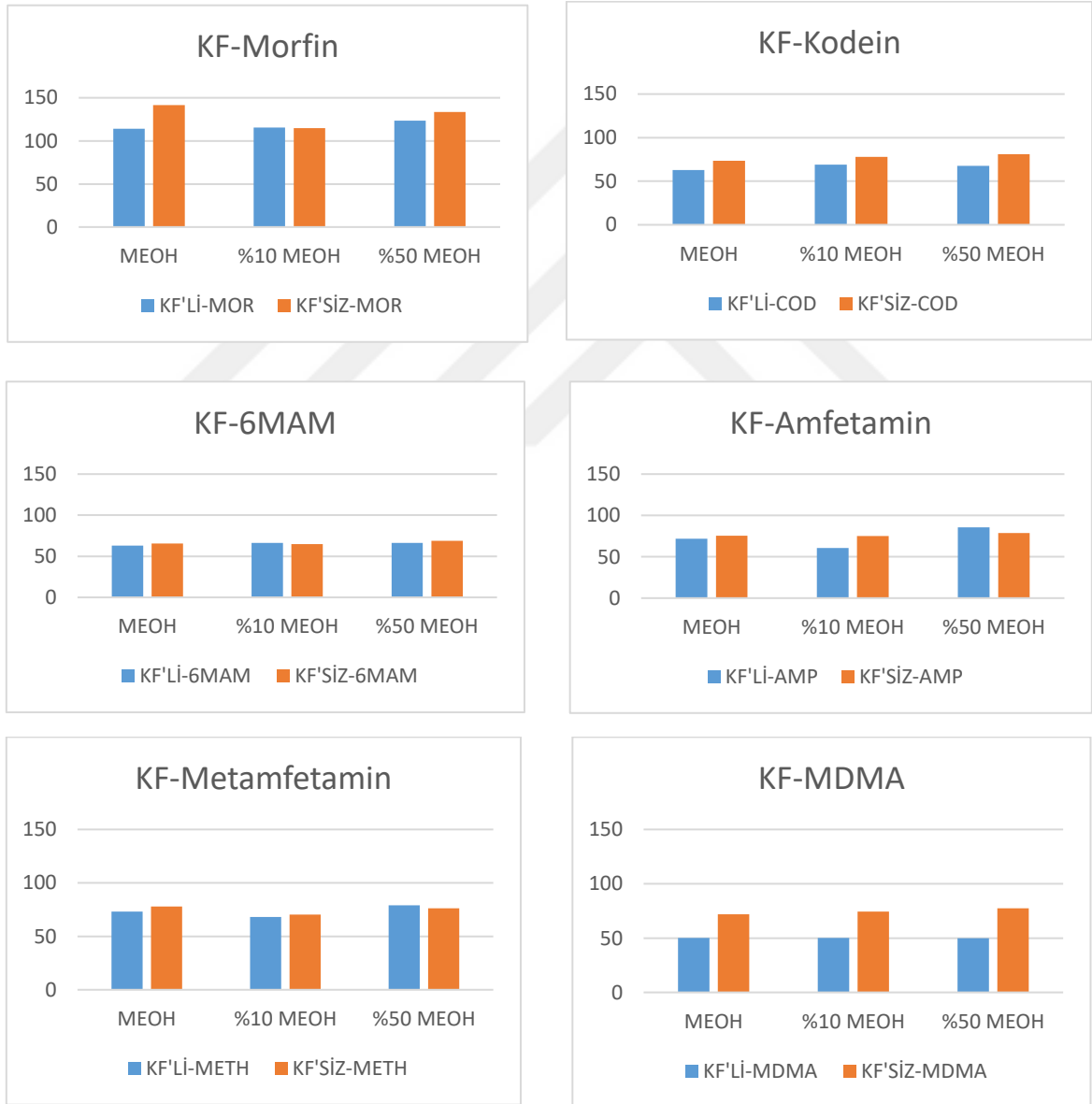
SPE prosedürünün klasik maddeler için MF'siz denemeleri sonrasında LC-MS/MS cihazının vüper kısmında tıkanıklık olması sebebiyle sentetik maddeler için MF'siz denemeler yapılamamıştır.

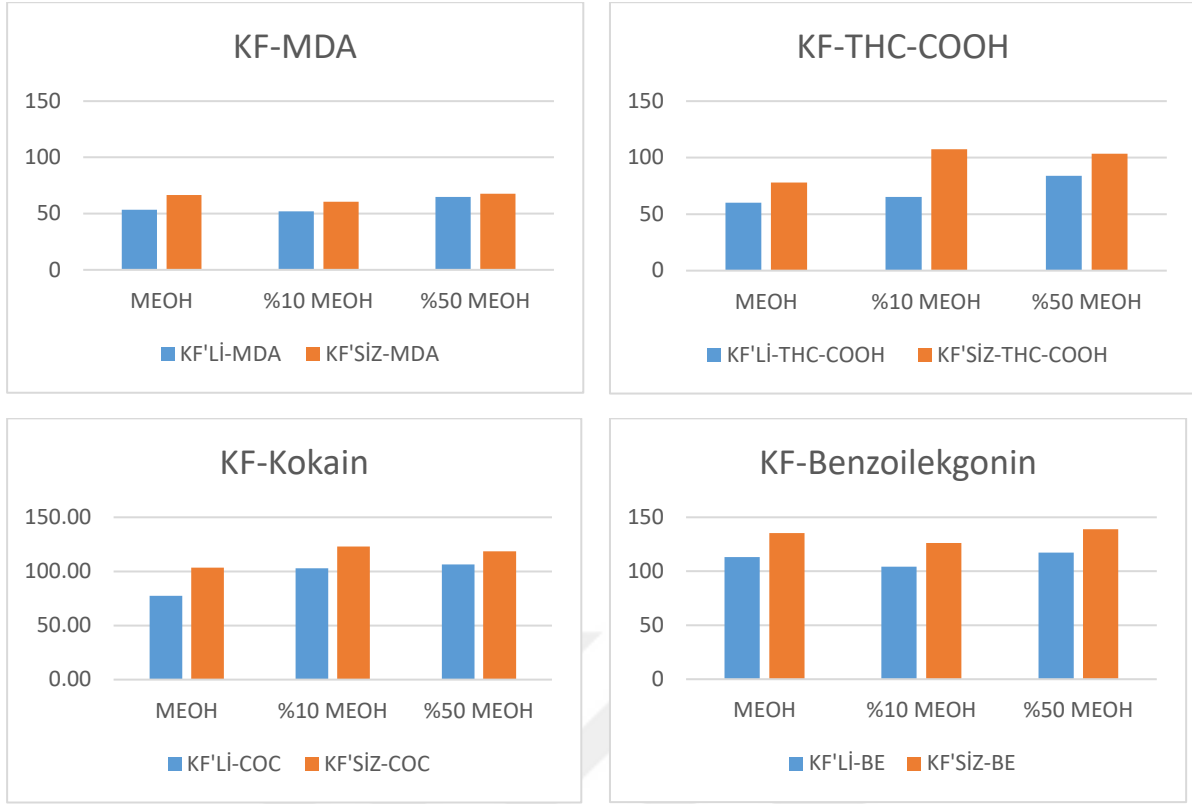
B.1.3. SPE prosedürü öncesinde numunelerin vakum altında cam mikrofiber filtreden süzülmesinin etkisi

SPE prosedüründe su numuneleri analiz öncesi içerdiği katı partikülleri uzaklaştırmak amacıyla kaba filtre (KF) kağıdıyla süzülmemektedir. Bu çalışma kapsamında Whatman GF/C (2.7 µm) diameter 47mm, glass microfiber filtre kağıtları kullanılarak vakum altında süzülen su numunelerinde herhangi bir madde kaybının olup olmadığı incelenmiştir.



Şekil 12. Vakum membran filtrasyon sistemi

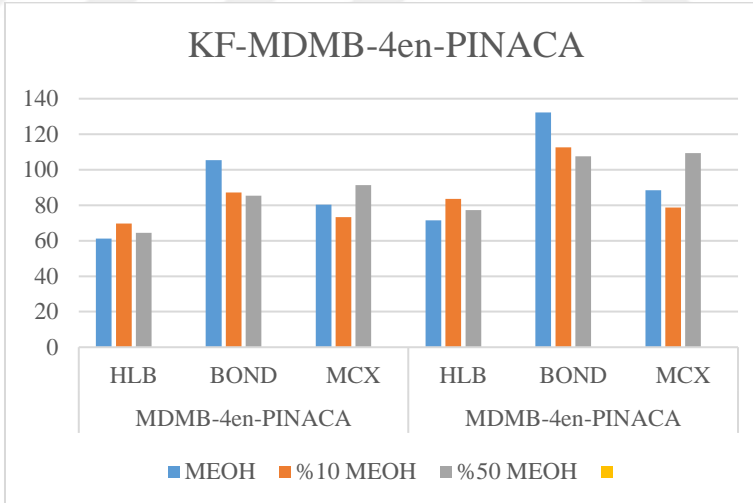
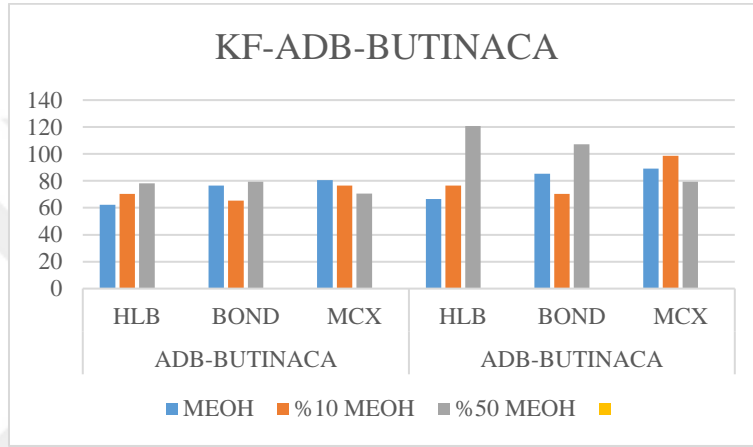
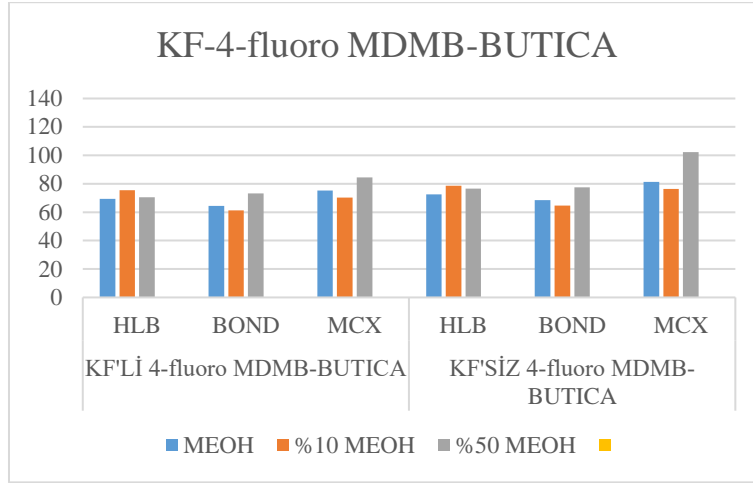




Grafik 6. Klasik maddeler için ekstraksiyon öncesi cam mikrofiber filtre kullanımının analiz sonuçlarına etkisi

Mikrofiber filitre kullanımının klasik maddelerin ekstraksiyonuna olan etkisi incelendiğinde, her bir madde kendi içinde filitreli ve filitresiz ekstraksiyonları açısından değerlendirilince herhangi bir analitik kayıp yaşanmadığı görülmektedir. Filtre kağıdı ile olan etkileşimin gözardı edilebileceği gözlenirken bu durum örneklerin geçirildiği yüzeyin por büyüklüğüne bağlı olarak değişebileceği de vurgulanması gereklidir.

Aşağıda sentetik psikoaktif maddeler için olan ekstraksiyon prosedürü öncesinde cam mikrofiber filtre kullanımının etkisine dair elde edilen sonuçlar verilmiştir.



Grafik 7. Sentetik maddeler için ekstraksiyon öncesi cam mikrofiber filtre kullanımının analiz sonuçlarına etkisi

Sentetik maddeler açısından da microfiber filtre kullanımı analitlerin geçirilen yüzey üzerinde tutunmasının analitik açıdan bir kayıp yaratmadığı görülmüştür.

Tartışma

Atık su epidemiyolojisine dayanan sularda madde analizi yaklaşımı madde ile mücadelede somut bir yol haritası sunan ve gittikçe yaygınlaşan bir analitik yaklaşımdır. Bu yaklaşım ile elde edilen sonuçlar analiz öncesi ve analiz sırasında bazı faktörlere bağlı olarak değişebilmektedir. Bu faktörlerden ilki 24 saatlik kompozit numunelerin ilgili atıksu arıtma tesislerinden otomatik numune alıcı ile 24 saate kadar toplanarak depolanmayı ve bir laboratuvara nakliye edilmesi aşamasında etkilidir. Bu aşamada ortam sıcaklığının düşürülmesi, pH ayarı ve ön filtrasyon dahil birçok faktör analitlerin stabilitesinin etki etmektedir (Devault et al., 2017; González-Mariño et al., 2010a; van Nuijs et al., 2011). Ancak, özellikle maliyet-etkinlik ve kolaylık düşünüldüğünde, bu önlemlerden hangisinin en verimli olduğu günümüzde çoğu madde için halen belirsizdir. Numunelerin hazırlanmasından hemen sonra analiz edilmesi mümkün olmayabileceğinden, numune ekstraksiyonundan sonra ikinci analit kaybı periyodu meydana gelebilmektedir. Bu tez çalışması kapsamında analit kaybına neden olabilecek çevresel faktörlerin ve analitik aşamalarda belirsiz olan faktörlerin incelenerek optimize edilmesi üzerine çalışmalar yapılmıştır. Bu amaçla psikoaktif maddelerin sularda analizine etki edebileceği literatürde hala araştırma çabası altında olan i) stabilite faktörlerinden pH ve sıcaklık ii) analitik yöntemde seçilen SPE kartuş, solvent seçimi, mikrofiltre kullanımı ve cam mikrofiber filtre kullanılarak süzme işleminin analitlerin konsantrasyonuna etkisi ölçülmüştür. ***Stabilite çalışmaları incelendiğinde*** üç farklı pH'da 1-3-7-14 gün boyunca +4 derecede saklanan ve ilgili günlerde analiz edilen su örneklerinin LC-MS/MS ile analiz sonuçlarına göre ortalaması alındığında genel olarak neredeyse tüm parametreler 7 güne kadar stabilitesini tüm pH'larda koruduğu görülmüştür. Ancak saklama süresine göre 7.günden sonra yapılan 14.gün analizlerinde analitlerin geri kazanımlarında ortalama %34.80 azalma olduğu saptanmıştır. Tüm pH noktalarına bakıldığında ortalama en fazla azalma %50.28 ile kokainde gözlenirken en düşük azalma %25.70 ile kotininde olmuştur. Kimyasal olarak kokain, 15°C'de pKa=8,6 olan zayıf bir baz ve tersiyer bir amindir. Bu değer üzerindeki pH'da büyük oranda iyonlaşmış ya da serbest baz şeklinde bulunur. Daha düşük pH'larda ise tuzu örneğin hidroklorür tuzu şeklinde bulunmaktadır. Bu tezde yapılan stabilite çalışmalarında pH değeri olarak pH 2, 5 ve 7 noktaları denendiğinde kokain için en düşük pH noktasında molekülün iyonlaşmış halde olduğunu ve ortamın asitliği arttıkça daha stabil kalan bir yönelim sergilediği görülmektedir. 3-OH-Kotinin konsantrasyonunda ise %8.65 artış gözlenmiştir. Bu durum nikotin ve kotininin major metabolit olan 3-OH-Kotinine metabolize olmasıyla açıklanabilmektedir (Benowitz et al., 2009). Bu çalışmanın sonuçları 2011 yılında Kasprzyk-

Hordern ve ark.'larının yazdığı derlemede pH, saklama sıcaklığı ve saklama süresi üzerinde tasarlanan çalışmanın sonuçları ile paralel bulunmuştur. Bu derlemede pH'da bir değişiklik yapmadan 2°C 'de depolanan suların %34'ünde 12 saat sonra %15'inden büyük bir azalma olduğu belirtilmiştir (Baker & Kasprzyk-Hordern, 2011b). Çalışmamızda ise pH'lar ayrı ayrı değerlendirildiğinde; pH ayarlaması yapmadan (pH=7.5) analiz edilen su numunelerinde kokainde %47.88 azalma gözlenirken pH=2'ye ayarlanmış örneklerde kokainde %28.50 azalma gözlenmiştir. Van Nuijs ve diğerleri'nin 2012 de yaptığı çalışmalar atık suda, amfetaminler ve eroin'in nötr pH'ta daha kararlı olduğunu gösterirken kokain için ise pH 2'de daha kararlı olduğu tespit edilmiştir (van Nuijs et al., 2012). Çalışmamızda ölçülen geri kazanımlarda da asidik koşullarda analitlerin daha stabil kaldığı görülmüştür. Bu durumu maddelerin pKa değerleri üzerinden tartışmak gerekirse pKa değeri bir asidin sulu bir çözeltide ne kadar ayrışacağını ölçmede kullanılmaktadır. pKa, asit ayrışma sabitinin veya Ka değerinin negatif logaritmasıdır. Güçlü asitler çözeltilerde tamamen çözünme eğilimindedir, bu nedenle Ka değeri ne kadar büyükse asit o kadar güçlüdür. Bu tez çalışmasında stabilitesi çalışılan maddelerin pKa değerleri sırasıyla morfin pKa=9.9, amfetaminlerin pKa değerleri yaklaşık 9.9, pKa kokain=8.6, nikotin pKa=8.0, kodein pKa=7.95, kotinin ve hidroksikotinin sırasıyla pKa=4.8 ve 4.3, ve THC-COOH için ise pKa=4.2'dir. Bu maddelerin asit ve bazlarının sulu ortamda iyonize olma oranları, ortamın pH'ı ile ilgili olacağından asidik sulu ortamda daha az bozunma asidik moleküllerde gerçekleştiği görülmektedir. Bilindiği üzere organik maddeler ve yüksek sıcaklıklar atık sularda anaerobik koşullara neden olabilmektedir. Bu durum da hali hazırda çok düşük seviyelerde olan psikoaktif maddelerin analizlerini etkileyerek saptanmasının önündeki en önemli zorlayıcı unsurlardan biridir. Ancak literatürde asidifikasyonunun bakteriyel aktiviteyi önlediğini gösteren çalışmalar ve asit ekleme işleminin su numunesini koruduğu bilinmektedir (Castiglioni et al., 2014). Gheorge ve arkadaşları kokain ve ana metabolitlerinin yüzey suyundaki stabilitesini farklı pH değerlerinde (+2 ve +6) ve sıcaklıklarda (-20, +4 ve +20 °C) araştırmışlardır. Numunelerin asidik değerlerde depolanmasının stabiliteyi artırmada birincil faktör olduğu bulunmuştur (Gheorghe et al., 2008). McCall ve diğerleri, 2016 ile Castiglioni ve ark. (2016), benzoilekgonin ve 11-nor-delta-9-karboksitetrahidrokanabinol (THC-COOH) ile karşılaştırıldığında kokain ve 6-monoasetilmorfinin sıcaklığa bağlı zayıf stabilitesini vurgulamışlardır (González-Mariño et al., 2016; McCall et al., 2016b). Çalışmamızda tek bir sıcaklık noktasında (+4) pH değiştirilmeden (pH=7,5) denemeler yapılmıştır. Yapılan çalışma sonuçlarına göre bu sıcaklıkta THC-COOH (%50.28) ve kokain (%45.01) konsantrasyonlarında ortalama azalma en yüksek derecededir. Literatürde Atasoy Aydın ve ark.'ları tarafından yapılan bir çalışmada NPS'lerin stabilite analizleri +4, -20 ve

+20°C'de gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon aşamasında bozulmayı önlemek adına pH ayarlaması uygulanmış ve ultra saf su örneklerinde analitlerin stabilitesini değerlendirmek için doğal pH (6-7) ve pH 2 karşılaştırılmıştır. Çalışmada 7 gün sonunda +4°C ve -20°C'de analiz sonuçları asitlendirilmiş ve asitlendirilmemiş örneklerde kationonların stabil olduğu görülmüştür (Atasoy Aydın et al., 2023). Benzer şekilde, Bade ve arkadaşları da kationonlar için 7 gün içinde 4°C ve -20°C'de benzer sonuçlar gözlemlemiştir (Bade et al., 2017). Bu çalışmada sentetik maddeler için 7 gün içerisinde +4 derecede yapılan çalışmalar boyunca genel olarak maddelerin stabil kalabildiği çalışmamızdaki klasik maddelerde olduğu gibi gözlenmiştir.

Çalışmanın ikinci basamağında ekstraksiyon yöntemine dair optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Öncelikle ekstraksiyonda kullanılan *SPE kartuşların analitik açıdan etkisini* incelemek için denemeler yapılmıştır. Bu tez çalışmasında denenen Oasis MCX ekstraksiyon kartuşu karma mod polimerik sorbentler içermektedir. MCX'in içerdiği sorbent ters fazlı ve kation değiştirme işlevleri olan güçlü kation değiştirici sülfonik asit grupları bulunmaktadır ve bir poli (divinilbenzeneco-N-vinilpirolidon) kopolimeri olan Oasis HLB sorbentinin yüzeyinde bağlıdır(Waters, n.d.). Oasis HLB ile arasındaki en büyük fark MCX sorbentinin bazik maddeler için yüksek seçiciliğidir. Kation değiştirme grupları, bazik ilaçlar için yüksek seçicilik sağlamaktadır. Bu durum toksikolojik analizlerde özellikle amfetamin benzeri stimulanların analizlerinde MCX kartuşu ön plana çıkarmaktadır (Baker & Kasprzyk-Hordern, 2011a; David R. Baker a, n.d.). Oasis HLB ise pH 0-14 arasında stabil kalan ve polar analitlerin tutulmasını ters faz kapasitesi sayesinde sağlayan bir sorbent içermektedir. Oasis HLB, asidik, nötr ve bazik bileşikler için evrensel, ters fazlı bir sorbent görevi görmektedir. Bu nedenle toksikolojik analizlerde sıklıkla kullanılmaktadır (Baz-Lomba et al., 2016; Boleda et al., 2007; Gheorghe et al., 2008; González-Mariño et al., 2010b). Oasis HLB ile daha yüksek tutma kapasitesi ve daha az atılımla daha fazla analit tutulması laboratuvarların SPE yönteminin iyileştirilmiş geri kazanımına ve genel olarak iyi bir tekrarlanabilirliğine yol açmaktadır. Bu durum Oasis HLB'yi ters fazlı SPE'de altın standart haline getirmiştir. Bond Elute SPE kartuşu Oasis HLB gibi fizikokimyasal özellikleri bakımından tüm asidik, bazik ve nötr grupların analizinde kullanılacak üzere tasarlanmıştır. Genel sorbent içeriği geniş uygulama alanları için ayarlanmış ve C18-bağlı silika jele göre 3 ila 10 kat daha yüksek adsorpsiyon kapasitesi bulunmaktadır. pH 1 ile 14 arasında kararlı olup yaygın çözücülerle de uyumludur. Bu özellikleri bakımından Oasis HLB ile benzer olsa da yüksek adsorpsiyon kapasitesi analitik sonuçların Bond Elute ile daha yüksek geri kazanımların elde edilmesini sağlamıştır. Çalışmamızda in-house yöntemler HLB kartuşu ile çalışılsa da diğer kartuşların üstünlükleri rapor edilmiştir. Farklı sorbentler içeren HLB ve Bond Elute SPE kartuşları ile amfetamin,

benzoilekgonin, kodein, kotinin, 6-MAM, metamfetamin, MDMA, MDA, morfin, nikotin ve THC-COOH analiz edilerek geri kazanımları kıyaslanmıştır. Bond Elute ile yapılan çalışmalarda ele alınan maddelerin %83'ünde geri kazanımlar HLB 'ye göre %17.21 daha yüksek çıkmıştır. THC-COOH için geri kazanımları Bond Elute ile yapılan çalışmalarda %30.39 daha yüksek saptanmıştır. Metamfetamin ve benzoilekgonin için ise geri kazanımları Bond Elute ile yapılan çalışmalarda %10.02 daha düşük çıkmıştır.

İki farklı SPE sorbenti ile olan çalışmaların kıyaslanmasına paralel olarak ayrıca **üç farklı içerikte çözücüler kullanılarak** analitler geri toplanmıştır. Bu basamakta orjinal SPE ekstraksiyonu uygulandığında klasik maddeler için son aşamada tüm analitler %100 metanolde çözülmektedir. Çalışmamızda orjinal metodun yanında %50 metanol:su (v/v) ve %10 metanol:su (v/v) ile denemeler gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalara göre ortalama geri kazanımlar %10 metanol:su (v/v), %50 metanol:su (v/v) ve %100 metanol için sırasıyla; morfin için %91.72, 105.37 ve 80.42, kodein için %113.00, 107.40 ve 81.25 ve 6-MAM için 86.79, 120.82 ve 78.23 olarak saptanmıştır ve sonuçlar kendi içinde tutarlıdır. Üç farklı çözücü içeriği ile yapılan çalışmalarda bu maddeler için methanol ile methanol:su karışımı uygun bir çözücü seçimi olup oranları değiştiğinde geri kazanımlar arasında da önemli bir fark bulunamamıştır. THC-COOH için üç farklı solvent içeriğinde benzer şekilde birbirine yakın sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca THC-COOH iki farklı SPE sorbenti ve üç farklı solvent içeriğiyle geri kazanımları HLB sorbenti ile min: % 77.97 max: 108.37 aralığındadır. Çalışmamızda analitlerin geri çözüldüğü solüsyon içeriğinin geri kazanımları etkilemediği görülmüştür. Ancak literatürde ekstraksiyonun elüsyon aşamasındayken elüsyon çözücüsünün analitlerin geri kazanımlarını etkileyebileceği belirtilmiştir. Elüsyon çözücüsünün bazik metanolle işleme sokulduğunda eroin gibi maddeler için evaporasyon işleminde analit kaybının önüne geçtiği belirtilmiştir (Bones et al., 2007). Buharlaştırma sıcaklığı bazı bileşiklerin kaybına neden olabilmektedir ve bu nedenle çoğu bileşik için sıcaklık değeri 40 °C'den yüksek çalışılmamaktadır. Ancak bu tez çalışmasında elüsyon çözücüsünün etkisini izlemeye yönelik denemeler yapılamamıştır.

Sentetik maddeler için analitik yöntem basamakları birbirinden farklıdır. Sentetik maddelerin referans standartları, pH ve sıcaklık faktörlerinin incelendiği stabilite çalışmalarının yürütüldüğü aşamada temin edilemediğinden bu maddelerin sıcaklık ve pH değişimlerinden nasıl etkilendiğine dair sonuçlar rapor edilememiştir. Ancak **4-fluoro MDMB-BUTICA, ADB-BUTINACA ve MDMB-4en-PINACA için çalışmanın ikinci bölümü olan analitik yöntemin optimizasyonu sırasında analit konsantrasyonlarına etki eden faktörler** incelenmiştir. Yapılan denemelerde üç farklı SPE kartuş (MCX, HLB, Bond Elute) kullanılmıştır. Geri

kazanımlar üç farklı sorbent içeren kartuşlarla kıyaslandığında MCX ile yapılan çalışmalarda 4-fluoro MDMB-BUTICA, ADB-BUTINACA ve MDMB-4en-PINACA için geri kazanımlar sırasıyla %81.24 %89.01 ve %88.47 olarak bulunmuştur. Bu durum literatürde MCX kartuşun kullanılmasıyla ekstraksiyon sırasında analitlerin protonlanarak SPE kartuşa yüklenmesinin, özellikle sentetik maddelerin geri kazanılmasına yardımcı olduğu bildirilmiştir (Bade et al., 2020). Literature benzer şekilde MCX sorbenti ile yapılan denemelerin geri kazanımları sentetik maddeler için en iyi sonuçları vermiştir. Ancak Kuloğlu Genç ve ark.'ları tarafından yapılan sentetik katinonları içerecek şekilde yapılan bir çalışmada farklı ekstraksiyon prosedürleri ve farklı SPE kartuşları denenmiştir. Yapılan çalışmalar sonrasında bildirilen ve Oasis MCX kullanılarak yapılan denemelerde çalışma kapsamındaki analitlerin tamamı (toplam 26 NPS) eş zamanlı ekstrakte edilememiştir (Kuloğlu Genç & Aşıcıoğlu, 2023)

SPE kartuş denemesinde Bond Elute ile yapılan çalışmalarda geri kazanımlar sırasıyla %68.47, %85.23 ve %132.24 iken HLB ile yapılan çalışmalarda %72.56, %66.61, %71.45 olarak saptanmıştır. MCX kartuşların geri kazanımlarının daha yüksek bulunması sentetik maddelerin analizinde MCX sorbentinin kullanılmasının daha etkili olabileceğini göstermiştir. Ayrıca sentetik maddelerin SPE ekstraksiyon prosedüründe su numunelerinin analiz öncesi asidifikasyonu (pH:2'ye ayarlanması) bu geri kazanımları arttırabileceği de belirtilmelidir. Literatürde Oasis MCX kartuşların, %2 HCOOH/H₂O ile yıkanmış, kurutulmuş, hemen elüe edilmiş şekilde ve -20 °C'de saklandığında altı hafta içinde hiçbir bileşik bozulması yaşanmadığı rapor edilmiştir (Baker & Kasprzyk-Hordern, 2011b). Sentetik maddelerin ekstraksiyonunda metotda belirtilen ve geri toplama adımında analitleri çözmek için kullanılan ACN:H₂O (60:40 (v/v)) ile geri kazanımlar 4-fluoro MDMB-BUTICA, ADB-BUTINACA ve MDMB-4en-PINACA için sırasıyla %74.09, %80.28 ve %97.38 bulunmuştur. Solüsyon içeriğinde ve oranlarında değişiklik yapıldığında bunun analit geri kazanımlarını nasıl etkilediğini saptayabilmek için MeOH:H₂O (60:40 (v/v)) ve ACN (%100) ile denemeler gerçekleştirilmiştir. Yapılan denemelerde 4-fluoro MDMB-BUTICA için ortalama geri kazanımlar %73.19 ve %85.42, ADB-BUTINACA için ortalama geri kazanımlar %81.87 ve %102.45, MDMB-4en-PINACA için ortalama geri kazanımlar %91.62 ve %98.06 olarak bulunmuştur. Sonuçlara bakıldığında sentetik maddeler için üç farklı solüsyonda geri kazanımlar birbirine yakın bulunmuştur ve analitlerin geri kazanımında içeriğindeki oranların değişmesinin anlamlı bir katkısı saptanmamıştır.

Tez çalışmasında etkisi incelenen diğer bir çalışma SPE sonrası ekstrakte edilen numunelerin LC-MS/MS ile analizinden önce *mikrofiltreden geçirmenin* analitlerin geri kazanımlarında

önemli bir fark oluşturup oluşturmadığının incelenmesidir. Bu amaçla analitik prosedüre göre 0.45 µm MF'li ve MF'siz analiz edilen örneklerin orjinal metotdaki sonuçlarına bakıldığında morfin, kodein ve 6-MAM için MF'siz yapılan çalışmaların geri kazanımları ortalama %18.32 daha yüksek bulunmuştur. Amfetamin, metamfetamin, MDMA ve MDA için yapılan çalışmalarda MF'siz yapılan denemeler ortalama olarak %8.80 daha yüksek bulunmuştur. Kokain ve benzoilekgonin için yapılan denemelerde MF'siz yapılan çalışmalar %28.01 daha yüksek bulunmuştur. Nikotin için anlamlı bir fark yokken kotinin için MF'siz yapılan denemelerde geri kazanımlar %30.56 daha yüksektir. THC-COOH için ise geri kazanımlar MF'siz denemelerde %34.84 daha yüksek bulunmuştur. Çalışma sonuçlarına bakıldığında mikrofiltre kullanımı analiz sonuçlarını etkileyecek düzeyde analit kaybına yol açtığı görülmektedir. Ancak mikro filtre kullanılmadan örneklerin kromatografik sisteme verilmesi, sıvı kromatografisinin işlevsel bölümlerinin arızalanmasına ve kolon ömrünün azalmasına neden olabilmektedir. Sentetik maddeler için mikrofiltre etkisine dair çalışmalar tamamlanamamıştır. Mikrofiltresiz yapılan enjeksiyonlar sırasında LC-MS/MS cihazının 0.13 µm çapındaki viper bloğu tıkandığı için mikrofiltreden geçirilmeden enjeksiyona verilen örneklerde tıkanıklık yaşanmıştır. Bu nedenle enjeksiyonlar tamamlanamadığından rapor edilememiştir. Bu durumunun kolonda ve mobil fazing geçtiği hatlarda meydana gelen çökelmeden kaynaklanabileceği üzerinde durulsa da analitik açıdan polar bileşikler, yüksek sulu mobil fazlarda bile ters fazlı bir kolonda zayıf bir şekilde tutuldukları bilinmektedir. Biyoanalitik LC-MS/MS uygulamalarında, özellikle elektrosprey iyonizasyon (ESI) modunda, analitin kolon üzerinde zayıf tutulması, matris bileşenlerinin analite iyon baskılaması nedeniyle zararlı matris etkilerine neden olabilir. Matriks etkileri, biyoanalitik LC-MS/MS yöntemlerinin başarısız olmasının başlıca nedenlerinden biri olarak tanımlanmıştır (Matuszewski et al., 1998). Yüksek sulu içerikli mobil fazlar da hassasiyet için kritik olan iyi püskürtme koşullarının elde edilmesine elverişli değildir. Birçok ilaç bazik fonksiyonel gruplara sahiptir ve asidik mobil fazlar kullanılır ve pozitif iyon modundaki MS bu ilaçları protonlanmış iyonlar olarak tespit etmektedir. Polar analitlerin iyonizasyonu, ters fazlı bir kolonda analitin kolon üzerinde tutulmasını da azaltmaktadır (Naidong, 2003). Bu durum mobil faz seçimi veya asidifikasyonu ile değiştirilebilmektedir.

Bu tez kapsamında yapılan son denemeler SPE prosedürü öncesinde su numunelerinin içerdiği analit konsantrasyonuna *vakum altında cam mikrofiber filtreden süzülmenin etkisinin* incelenmesidir. Bu amaçla Whatman GF/C (2.7 µm) diameter 47 mm glass microfiber filtreden geçirmenin herhangi bir analit kaybı yaratıp yaratmayacağı araştırılmıştır. Morfin, kodein ve 6-MAM için ortalama olarak MF'siz çalışmalarda geri kazanımlar %13.6 daha yüksek

bulunmuştur (%27.41, %10.43, %2.53). Amfetamin ve metamfetamin için ise KF ile süzme işleminde herhangi anlamlı bir analit kaybı yaşanmadığı saptanmıştır (%3.66, %4.81). MDMA ve MDA için KF'siz çalışmalarda geri kazanımlar %17.50 daha yüksek bulunmuştur (%21.68, %13.32). THC-COOH için KF'siz çalışmalarda geri kazanımlar MDMA ve MDA'ya benzer olarak %17.81 oranında yüksek bulunmuştur. Nikotin ve kotinin için KF'siz çalışmalarda geri kazanımlar ortalama %24.85 daha fazla saptanmıştır (%25.97, %22.19). Sentetik maddeler için KF kullanımının önemli bir fark yaratmadığı ve analiz edilen 4-fluoro MDMB-BUTICA, ADB-BUTINACA ve MDMB-4en-PINACA için KF'siz yapılan çalışmalarda geri kazanımlar sırasıyla %3.25, %4.26 ve %10.32 daha yüksek bulunmuştur. Literatürde filtrasyon işlemi sırasında önemli analit kaybı olmadığı çalışmamıza paralel rapor edilmiştir. Bu durum Metcalfe ve ark.'ları ve Baker&Kasprzyk-Hordern ve diğerlerinin bulgularını desteklemektedir. Baker ve Kasprzyk-Hordern ve ark.'ları GF/D (2.7 µm), GF/C (1,2 µm) ve GF/F (0,7 µm) cam elyaf filtreler dahil olmak üzere çeşitli membran filtreler kullanarak filtrasyon sonrasında %100 civarında analit geri kazanımı rapor edilmiştir (Castiglioni et al., 2014; Metcalfe et al., 2010). Çalışmamızda filtreleme, gözenek boyutu 2,7 µm olan membran filtreler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu gözenek boyutuna sahip filtreler büyük partiküllü maddeleri ve bunlara bağlı bakterileri temizleyebilmekte ve böylece bakteri yoğunluğu azaltılmış filtrelenmiş bir numune elde edilmektedir. Ancak, asılı bakteriler uzaklaştırılmadığı için tamamen sterilize edilmiş bir numune sağlayamamaktadır. Daha küçük gözenek boyutlarına (örn. 0,2 µm) sahip membran filtreler asılı bakterileri filtreleme yeteneğine sahiptir, ancak kolayca tıkanarak önemli ölçüde daha uzun numune hazırlama sürelerine neden olmaktadır (Chen et al., 2013). Literatürde filtrasyon basamağının analiz sonuçlarına etkisini özetleyen bir başka çalışmada ise sentetik kannabinoid tipi analitlerin için dedektör yanıtlarının, filtre edilmemiş örneklerde yüksek olduğu görülmüştür. Bu nedenle çalışmada filtrasyonun sentetik kannabinoid grubu maddelerde önemli bir kayba yol açtığı rapor edilmiştir. Ancak literatürde ele alınan ve bu tez çalışmasına dahil olan 4F-MDMB BUTICA ve MDMB-4en-PINACA için sonuçlar HLB yöntemlerinin filtre edilmiş ve edilmemiş analiz sonuçları %GK cinsinden değerlendirildiğinde sonuçlar sırasıyla %102, %105 ve %125, %130 olarak elde edilmiştir (Kuloğlu Genç & Aşıcıoğlu, 2023). Bu durum literatürde ele alınan NPS'lerin geneli için filtrasyonun bir geri kazanım kaybına yarattığını göstereceği bu tez çalışmasında ele alınan sentetik maddeler paralel sonuçların elde edildiğini görülmektedir.

Atık sulardan düşük miktarda madde konsantrasyonu tespit edilebilmesi oldukça zor ve zahmetli ekstraksiyon prosedürleri ve analitik yaklaşımları gerektirmektedir. Bu açıdan atık

sularda madde analizleri sınırlayıcı bir yaklaşımı içerisinde barındırmaktadır. Bu duruma her yıl piyasaya yeni çıkarılan ve tespit edilen NPS sayısı ve hızla değişen yapılarının eklenmesi, bu sürekli değişen maddelerin referans standartlarının laboratuvar açısından maddi bir yük taşıması ve laboratuvarların sınırlı sayıda madde temin edebilmesi bu analizleri daha da zorlaştırmaktadır. Bu sürecin içerdiği kısıtlılıklar bu tez çalışmasında da mevcut olup referans madde temini, analitik olarak sistemsel hatalar, alt yapısal eksiklikler, analitik yaklaşımların değişimleri ve analitlerin değişen doğaları sebebiyle analitik sonuçların değişebilmesi birebir çalışmalarda yüzleşilen problemler arasında yerini almıştır. Ancak bu tez çalışması verilerin genel değerlendirilmesi sonucunda çalışmada klasik ve sentetik maddeler olarak ayrılan iki madde grubu için optimum geri kazanım sonuçlarına göre ekstraksiyon tekniği optimize edilmeye çalışılmıştır. Buna göre *sentetik maddelerin sularda analizinde uygulanan* SPE prosedüründe analiz öncesi numunelerin asidifikasyonu, MCX kartuş kullanılması ve uçurulan elüsyonların %100 ACN içinde geri çözülerek LC-MS/MS'e enjekte edilmesi maddelerin analiz sonuçlarının %80-120 aralığında elde edilmesinde önemli fark yaratacağı görülmüştür. SPE prosedürü öncesi numunelerin cam microfiber filtreden geçirilmesinin anlamlı bir kayıp yaratmadığı da tespit edilmiştir. **Klasik maddelerin analizinde ise** metamfetamin ve benzoilekgonin hariç Bond Elue SPE kartuş ile yapılan çalışmalarda geri kazanımlar daha yüksek elde edilmiştir. SPE prosedürü sonrasında analitlerin geri çözülerek LC-MS/MS'e enjekte edilmesinde %10 metanol:su (v/v), %50 metanol:su (v/v) ve %100 metanol solüsyonlarının geri kazanımları arttırmada önemli bir fark yaratmadığı görülmüştür. Ancak örneklerin LC-MS/MS analizi öncesinde mikrofiltreden geçirmenin analiz sonuçlarına etki edebilecek düzeyde bir analit kaybı yaratabileceği ve bu nedenle bu belirsizliğin hesaplamalarda dikkat edilmesi gerektiği saptanmıştır.

Sonuç ve Öneriler

Bu tez çalışması kapsamında yukarıda sunulan araştırmanın bulguları, numune toplama, depolama ve hazırlama dahil tüm sürecin daha titiz bir şekilde değerlendirilerek raporlanması gerektiğini açıkça göstermektedir. Genellikle yeterince dikkate alınmayan belirsizlik faktörleri genel yöntem performansı üzerinde önemli etkiye sahip olabilmektedir. Maddelerin atık sudaki geleceğini daha iyi anlamaya yönelik araştırmalar ve geriye dönük hesaplamalardaki hata ve belirsizliği en aza indirmeye yönelik çalışmalar gün geçtikçe önem kazanmaktadır. Bu nedenle bu tez çalışmanın amacı literatürdeki analitik tekniklere alternatif sunmaktan ziyade analizlerin optimum koşullarda yüksek geri kazanımlar ile gerçekleştirilmesi adına kullanılan analitik tekniğin modifiye edilmesini sağlamaktır. Bu amaçla tez kapsamında klasik ve sentetik olarak ikiye ayrılan maddelere ait analiz prosedürleri, en az analit kayıplarının görüldüğü aşamaları dikkate alarak modifiye edilerek analizlerine yönelik yöntemlerin optimizasyonları sağlanmıştır. Böylece sularda madde analizlerine azaltıcı ya da arttırıcı yönde etkisi olan koşulların tanımlanması ile belirsizlik faktörü çarpanı düşürülebilecektir. Bu çarpanın etkisinin azaltılması ile hali hazırda sularda düşük seviyelerde bulunan psikoaktif maddelerin tespit edilmesinde ve sonrasında toplumsal kullanımı yansıtan verilerin hesaplanmasında daha doğru analitik sonuçlar elde edilebilecektir.

Kaynaklar

- AB Uyuşturucu Piyasaları Raporu 2019* | www.emcdda.europa.eu. (n.d.). Retrieved May 18, 2023, from https://www.emcdda.europa.eu/publications/joint-publications/eu-drug-markets-report-2019_en
- Akgür, S., & Çoşkunol, H. (2014). *Bağımlılık Yapan Maddeler ve Toksikolojisi*. https://bati.ege.edu.tr/tr-3596/bagimlilik_yapan_maddeler_ve_toksikolojisi.html
- Atasoy Aydın, A., Gören, İ. E., Yavuz Guzel, E., & Daglioglu, N. (2023). Method development, validation, and application for simultaneous determination of 56 new psychoactive substances in surface water by LC-MS/MS. *Environmental Science and Pollution Research*, *30*(36), 85920–85929. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-28495-9>
- B.S. Middleditch. (1989). *Analytical Artifacts* (B.S. Middleditch (Ed.); 1st Editio). Elsevier Shop. <https://shop.elsevier.com/books/analytical-artifacts/middleditch/978-0-444-87158-9>
- Bade, R., Abdelaziz, A., Nguyen, L., Pandopulos, A. J., White, J. M., & Gerber, C. (2020). Determination of 21 synthetic cathinones, phenethylamines, amphetamines and opioids in influent wastewater using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Talanta*, *208*, 120479. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2019.120479>
- Bade, R., Bijlsma, L., Sancho, J. V., Baz-Lomba, J. A., Castiglioni, S., Castrignanò, E., Causanilles, A., Gracia-Lor, E., Kasprzyk-Hordern, B., Kinyua, J., McCall, A. K., van Nuijs, A. L. N., Ort, C., Plósz, B. G., Ramin, P., Rousis, N. I., Ryu, Y., Thomas, K. V., de Voogt, P., ... Hernández, F. (2017). Liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination of synthetic cathinones and phenethylamines in influent wastewater of eight European cities. *Chemosphere*, *168*, 1032–1041. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2016.10.107>
- Baker, D. R., & Kasprzyk-Hordern, B. (2011a). Multi-residue analysis of drugs of abuse in wastewater and surface water by solid-phase extraction and liquid chromatography–positive electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *1218*, 1620–1631. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.01.060>
- Baker, D. R., & Kasprzyk-Hordern, B. (2011b). Critical evaluation of methodology commonly used in sample collection, storage and preparation for the analysis of pharmaceuticals and illicit drugs in surface water and wastewater by solid phase extraction and liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *1218*(44), 8036–8059. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2011.09.012>

- Baz-Lomba, J. A., Reid, M. J., & Thomas, K. V. (2016). Target and suspect screening of psychoactive substances in sewage-based samples by UHPLC-QTOF. *Analytica Chimica Acta*, 914, 81–90. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.01.056>
- Benowitz, N. L., Hukkanen, J., & Jacob, P. (2009). Nicotine chemistry, metabolism, kinetics and biomarkers. In *Handbook of Experimental Pharmacology* (Vol. 192, pp. 29–60). https://doi.org/10.1007/978-3-540-69248-5_2
- Boleda, M. R., Galceran, M. T., & Ventura, F. (2007). Trace determination of cannabinoids and opiates in wastewater and surface waters by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1175(1), 38–48. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.10.029>
- Bones, J., Thomas, K. V., & Paull, B. (2007). Using environmental analytical data to estimate levels of community consumption of illicit drugs and abused pharmaceuticals. *Journal of Environmental Monitoring*, 9(7), 701–707. <https://doi.org/10.1039/B702799K>
- Castiglioni, S., Bijlsma, L., Covaci, A., Emke, E., Hernández, F., Reid, M., Ort, C., Thomas, K. V., Van Nuijs, A. L. N., De Voogt, P., & Zuccato, E. (2013). Evaluation of uncertainties associated with the determination of community drug use through the measurement of sewage drug biomarkers. *Environmental Science and Technology*, 47(3), 1452–1460. <https://doi.org/10.1021/ES302722F>
- Castiglioni, S., Thomas, K. V., Kasprzyk-Hordern, B., Vandam, L., & Griffiths, P. (2014). Testing wastewater to detect illicit drugs: State of the art, potential and research needs. *Science of the Total Environment*, 487(1), 613–620. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.10.034>
- Castiglioni, S., Zuccato, E., Crisci, E., Chiabrando, C., Fanelli, R., & Bagnati, R. (2006a). *Identification and Measurement of Illicit Drugs and Their Metabolites in Urban Wastewater by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*. <https://doi.org/10.1021/ac061095b>
- Castiglioni, S., Zuccato, E., Crisci, E., Chiabrando, C., Fanelli, R., & Bagnati, R. (2006b). Identification and Measurement of Illicit Drugs and Their Metabolites in Urban Wastewater by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 78(24), 8421–8429. <https://doi.org/10.1021/AC061095B>
- Chen, C., Kostakis, C., Irvine, R. J., Felgate, P. D., & White, J. M. (2013). Evaluation of pre-analysis loss of dependent drugs in wastewater: stability and binding assessments. *Drug Testing and Analysis*, 5(8), 716–721. <https://doi.org/10.1002/DTA.1428>
- Daughton, C. C. (2001). Pharmaceuticals and personal care products in the environment:

- Overarching issues and overview. In C. G. Daughton & T. L. Jones-Lepp (Eds.), *Pharmaceuticals and Care Products in the Environment. Scientific and Regulatory Issues* (Vol. 791, pp. 2–38). ACS Symposium Series. <https://doi.org/10.1021/bk-2001-0791.ch001>
- David R. Baker a, B. K.-H. (n.d.). *Multi-residue analysis of drugs of abuse in wastewater and surface water by solid-phase extraction and liquid chromatography–positive electrospray ionisation tandem mass spectrometry*. Retrieved December 10, 2018, from https://ac.els-cdn.com/S0021967311001312/1-s2.0-S0021967311001312-main.pdf?_tid=6ec666b6-c886-4256-b01e-e4fc25830643&acdnat=1544463698_3747d4acb86069079e690e4db8cdd1c2
- Devault, D. A., Lévi, Y., & Karolak, S. (2017). Applying sewage epidemiology approach to estimate illicit drug consumption in a tropical context: Bias related to sewage temperature and pH. *Science of The Total Environment*, 584–585, 252–258. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2017.01.114>
- Gent, L., & Paul, R. (2021). The detection of new psychoactive substances in wastewater. A comprehensive review of analytical approaches and global trends. *Science of The Total Environment*, 776, 146028. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2021.146028>
- Gheorghe, A., Van Nuijs, A., Pecceu, B., Bervoets, L., Jorens, P. G., Blust, R., Neels, H., & Covaci, A. (2008). Analysis of cocaine and its principal metabolites in waste and surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography-ion trap tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391(4), 1309–1319. <https://doi.org/10.1007/S00216-007-1754-5/TABLES/3>
- González-Mariño, I., Gracia-Lor, E., Bagnati, R., Martins, C. P. B., Zuccato, E., & Castiglioni, S. (2016). Screening new psychoactive substances in urban wastewater using high resolution mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(16), 4297–4309. <https://doi.org/10.1007/S00216-016-9521-0/FIGURES/3>
- González-Mariño, I., Quintana, J. B., Rodríguez, I., & Cela, R. (2010a). Determination of drugs of abuse in water by solid-phase extraction, derivatisation and gas chromatography–ion trap-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217(11), 1748–1760. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2010.01.046>
- González-Mariño, I., Quintana, J. B., Rodríguez, I., & Cela, R. (2010b). Determination of drugs of abuse in water by solid-phase extraction, derivatisation and gas chromatography–ion trap-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217(11), 1748–1760. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2010.01.046>

- Gunnar, T., & Kankaanpää, A. (2019). The practical implications of wastewater-based illicit drug epidemiology. *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 9, 49–57. <https://doi.org/10.1016/J.COESH.2019.04.003>
- İç işleri bakanlığı. (2023). *Türkiye Uyuşturucu Raporu, Trend ve Yeni Gelişmeler*. https://www.narkotik.pol.tr/kurumlar/narkotik.pol.tr/TUBİM/UlusalYayınlar/2023_TURKISH_DRUG_REPORT.pdf
- Karolak, S., Nefau, T., Bailly, E., Solgadi, A., & Levi, Y. (2010). Estimation of illicit drugs consumption by wastewater analysis in Paris area (France). *Forensic Science International*, 200(1–3), 153–160. <https://doi.org/10.1016/J.FORSCIINT.2010.04.007>
- Knapp, D. R. (1979). *Handbook of Analytical Derivatization Reactions*. John Wiley and Sons. https://books.google.com.tr/books?hl=tr&lr=&id=sKZeE-REDswC&oi=fnd&pg=PR11&dq=Handbook+of+Analytical+Derivatization+Reactions,+John+Wiley+and+Sons,+1979.&ots=pI3xhMd5nb&sig=vzUtLBxJ-E_2v7DDLbqwkB4BEKY&redir_esc=y#v=onepage&q=Handbook of Analytical Derivat
- Kuloğlu Genç, M., & Aşıcıoğlu, F. (2023). *ATIK SUDA YENİ NESİL PSİKOAKTİF MADDE TAYİNİ İÇİN ANALİTİK YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ*. İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA.
- Liu, Z. K., Ågren, J., & Hillert, M. (1996). Application of the Le Chatelier principle on gas reactions. *Fluid Phase Equilibria*, 121(1–2), 167–177. [https://doi.org/10.1016/0378-3812\(96\)02994-9](https://doi.org/10.1016/0378-3812(96)02994-9)
- Löve, A. S. C., Baz-Lomba, J. A., Reid, M. J., Kankaanpää, A., Gunnar, T., Dam, M., Ólafsdóttir, K., & Thomas, K. V. (2018). Analysis of stimulant drugs in the wastewater of five Nordic capitals. *Science of The Total Environment*, 627, 1039–1047. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2018.01.274>
- Matuszewski, B. K., Constanzer, M. L., & Chavez-Eng, C. M. (1998). Matrix Effect in Quantitative LC/MS/MS Analyses of Biological Fluids: A Method for Determination of Finasteride in Human Plasma at Picogram Per Milliliter Concentrations. *Analytical Chemistry*, 70(5), 882–889. <https://doi.org/10.1021/ac971078+>
- McCall, A. K., Bade, R., Kinyua, J., Lai, F. Y., Thai, P. K., Covaci, A., Bijlsma, L., van Nuijs, A. L. N., & Ort, C. (2016a). Critical review on the stability of illicit drugs in sewers and wastewater samples. In *Water Research* (Vol. 88, pp. 933–947). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.10.040>
- McCall, A. K., Bade, R., Kinyua, J., Lai, F. Y., Thai, P. K., Covaci, A., Bijlsma, L., van Nuijs,

- A. L. N., & Ort, C. (2016b). Critical review on the stability of illicit drugs in sewers and wastewater samples. In *Water Research* (Vol. 88, pp. 933–947). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.10.040>
- Metcalf, C., Tindale, K., Li, H., Rodayan, A., & Yargeau, V. (2010). Illicit drugs in Canadian municipal wastewater and estimates of community drug use. *Environmental Pollution (Barking, Essex : 1987)*, 158(10), 3179–3185. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2010.07.002>
- Naidong, W. (2003). Bioanalytical liquid chromatography tandem mass spectrometry methods on underivatized silica columns with aqueous/organic mobile phases. *Journal of Chromatography B*, 796(2), 209–224. <https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2003.08.026>
- Ramin, P., Polesel, F., Brock, A. L., & Plósz, B. G. (2018). The impact of temperature on the transformation of illicit drug biomarkers in wastewater. *Science of The Total Environment*, 644, 1612–1616. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2018.06.307>
- SWGTOX - Scientific working group for forensic toxicology. (2013). Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology. *Journal of Analytical Toxicology*, 37(7), 452–474. www.asbstandardsboard.org.
- United Nations Office on Drugs and Crime. (2021). *Opioid Crisis*. <https://www.unodc.org/unodc/opioid-crisis/the-strategy.html>
- United Nations Office on Drugs and Crime. (2023). *World Drug Report 2023*.
- Uzbay, T. İ. (2015). MADDE BAĞIMLILIĞI -Tüm boyutlarıyla Bağımlılık ve Bağımlılık Yapan Maddeler. In *MADDE BAĞIMLILIĞI*. İstanbul Tıp Yayınevi.
- van Nuijs, A. L. N., Abdellati, K., Bervoets, L., Blust, R., Jorens, P. G., Neels, H., & Covaci, A. (2012). The stability of illicit drugs and metabolites in wastewater, an important issue for sewage epidemiology? *Journal of Hazardous Materials*, 239–240, 19–23. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.04.030>
- van Nuijs, A. L. N., Mougel, J. F., Tarcomnicu, I., Bervoets, L., Blust, R., Jorens, P. G., Neels, H., & Covaci, A. (2011). Sewage epidemiology — A real-time approach to estimate the consumption of illicit drugs in Brussels, Belgium. *Environment International*, 37(3), 612–621. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2010.12.006>
- Waters. (n.d.). *Oasis® MCX Product and Generic Method Information*.
- Yadav, M. K., Short, M. D., Aryal, R., Gerber, C., van den Akker, B., & Saint, C. P. (2017). Occurrence of illicit drugs in water and wastewater and their removal during wastewater treatment. *Water Research*, 124, 713–727. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2017.07.068>

Zuccato, E., Chiabrando, C., Castiglioni, S., Calamari, D., Bagnati, R., Schiarea, S., & Fanelli, R. (2005). Cocaine in surface waters: a new evidence-based tool to monitor community drug abuse. *Environmental Health: A Global Access Science Source*, 4, 14. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-4-14>



Ekler

Ege Ün. Evrak Tarih ve Sayısı: 12.07.2024-E.1948159



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Madde Bağımlılığı, Toksikoloji ve İlaç Bilimleri Enstitüsü
Müdürlüğü
Öğrenci İşleri Birimi



Sayı : E-35089067-100-1948159
Konu : Duygu Yeşim OVAT'ın Tez Çalışması

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

İlgi : 12.07.2024 tarihli ve 1942676 sayılı yazınız.

İlgi yazınıza istinaden, Enstitümüz Madde Bağımlılığı Anabilim Dalı Madde Bağımlılığı Doktora programı öğrencisi Duygu Yeşim OVAT'ın "Atksu Bazlı Epidemiyolojik Çalışmalarda Yasal ve Yasadışı Madde AnalizlerineYönelik Optimum Koşulların Belirlenmesi" başlıklı tezinin çalışmasını Enstitümüz Bağımlılık Toksikolojisi Laboratuvarında 2024 Ağustos 2025 Ocak tarihleri arasında yapması uygundur.

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

Doç. Dr. Görkem YARARBAŞ
Müdür V.

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Belge Doğrulama Kodu :BSR35MRUCMC

Belge Takip Adresi : <https://www.tuzkiye.gov.tr/ege-universitesi-ebys>

Adres:Ege Üniversitesi Kampüsü 35100 Bornova/İzmir
Telefon:+90 (232) 390 16 00 Faks:+90 (232) 390 16 14
e-Posta:bati@mail.ege.edu.tr Web:http://bati.ege.edu.tr
Kep Adresi:egeuniversitesi@egeuniversitesi.hs03.kep.tr

Bilgi için: Zübeyde YILMAZ BOZ
Ünvanı: Bilgisayar İşletmeni
Tel No: 3901625



Teşekkür

Doktora eğitimim boyunca bilgi birikimini, karşılaştığım sorunların giderilmesinde rehberliğini ve çalışma hayatımda sonsuz desteğini hiçbir zaman esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. Serap Annette Akgür'e,

Lisansüstü eğitimim boyunca tecrübesi ve desteğiyle yol gösterici olan, tez sürecimde tüm laboratuvar imkanlarını sunan Prof. Dr. Nebile Dağlıoğlu'na

Doktora tez sürecinde yaşadığım sorunların çözümünde, tıkanan yolların açılmasında çözümü en diplerden getiren hocam Prof. Dr. Hasan Ertaş'a,

Çalışma hayatında her zaman destek veren ve yalnız bırakmayan hocam Doç. Dr. Yusuf Kurtulmuş'a

Tez çalışmalarını tamamlamamda desteğini, bilgisini ve güler yüzünü hiç bir zaman esirgemeyen Dr. İnci Sağlam ve hayat dolu arkadaşım Rabia Çakır'a

Ankara Üniversitesi Adli Bilimler Enstitüsü'nde tezimin tüm laboratuvar aşamalarında destekleriyle hep yanımda olan Öğr. Gör. Aslı Atasoy Aydın ve Dr. Öğr. Üyesi İsmail Ethem Gören'e ve lisansüstü öğrencileri Berfin Sude Ertaş ile Hatice Soytürk'e

Lisansüstü eğitimime başlamama neden olan, hep yanımda ve kalbimde olan canım arkadaşım Komiser Emine Özbunar'a ve desteğini hep yanımda hissettiğim Arzu Kabadayı Talay'a Sadece çalışma ortamında değil hayatımın her alanında deneyimleri ve desteğiyle yanımda olan Özlem Akın'a

Yüksek lisans sürecinde olduğu gibi doktora eğitimim boyunca da beraber dostlukla yürüme şansı yakaladığım Ezgi Emen'e

Tez çalışmam ve içinde bulunduğum tüm çalışmalarda yardımlarını, fikirlerini ve dostluğunu esirgemeyen mesai arkadaşım Dr. Öğr. Üyesi Rukiye Aslan'a

Fikirlerini ve yol göstericiliğini esirgemeyen Halil İbrahim Bostancı ve Selin Demir'e,

Hayatımın her alanında beni hep destekleyen ve en büyük iyikilerimin başında gelen canım aileme,

Bilimin ve bilim insanının destekçisi olan, 2023/1 döneminde 1059B142300273 başvuru numarasıyla 2214-A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı ile University Politecnica delle Marche of Ancona, İtalya'da 3 ay araştırma yapmam için burs ve 123Z691 numaralı 1002-A projesiyle destek veren TÜBİTAK'a

Ve son olarak hayatımın en güzel yıllarını beraber yaşadığım, beni her zaman her konuda destekleyen ve yanımda olarak tüm boşlukları dolduran eşim Ali Ovat'a teşekkür ederim...

İzmir, 26.11.2024

Duygu Yeşim OVAT

55

Özgeçmiş

2008-2013 yılları arasında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü'nde lisans eğitimini tamamladım. 2013 - 2018 yılları arasında özel sektörde kimyager olarak görev aldım. 2021 yılından itibaren Ege Üniversitesi Madde Bağımlılığı, Toksikoloji ve İlaç Bilimleri Enstitüsü'nde Bağımlılık Toksikolojisi Anabilim Dalı'nda öğretim görevlisi olarak çalışmaktayım.

Duygu Yeşim OVAT

