

**TÜKÜRÜKTE EROİN VE METABOLİTLERİNİN
TOKSİKOLOJİK ANALİZİNDE YENİ BİR ANALİTİK
GEREÇ OLARAK YÜZEY ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ RAMAN
SPEKTROSKOPİ**

**SURFACE ENHANCED RAMAN SPECTROSCOPY AS A
NOVEL ANALYTICAL TOOL IN TOXICOLOGICAL
ANALYSIS OF HEROIN AND METABOLITES IN SALIVA**

RAMAZAN AKÇAN

PROF. DR. NECDET SAĞLAM

Tez Danışmanı

PROF. DR. UĞUR TAMER

Tez Eş Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

ÖZET

TÜKÜRÜKTE EROİN VE METABOLİTLERİNİN TOKSİKOLOJİK ANALİZİNDE YENİ BİR ANALİTİK GEREÇ OLARAK YÜZEY ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ RAMAN SPEKTROSKOPİ

Ramazan AKÇAN

Doktora, Biyomühendislik Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Necdet SAĞLAM

Eş Danışman: Prof. Dr. Uğur TAMER

Ocak 2021, 99 sayfa

Eroin, çeşitli analitik yöntemlerle tespit edilebilir ve ölçülebilmektedir. Ancak adli bilim uzmanları ve kriminal laboratuvarlar daha ucuz ve daha hızlı tespit yöntemleri bulmak için çalışmaktadır. Yüzey zenginleştirilmiş Raman spektroskopisi (SERS), genişleyen uygulama alanları ile olası bir alternatif analitik yöntem olarak dikkat çekmektedir. Literatürde eroin ve metabolitlerinin Raman ve SERS spektrumları ile ilgili az sayıda çalışma olup bunlarda birbirleriyle çelişen veriler sunmaktadır. Bu çalışmada, opiat tespiti için en uygun Raman-aktif substratı bulmak ve tükürükte eroin ve metabolitlerinin hızlı miktar analizi SERS yöntemi geliştirilmesi amaçlandı. Analizi yapılan opiatların SERS analizi için en uygun Raman-aktif yüzeyin belirlenmesi amacıyla Morfin standart materyali kullanıldı. Bu amaçla, ince tabaka kromatografi (TLC) kağıdı, gümüş nano yüzey (AgNS), altın nano-parçacık nanoselüloz (AuNP/Nanoselüloz), altın nanoparçacık polianilin (AuNP/Polianilin) ve altın nano-rod (AuNR) yüzeyler

karşılaştırıldı. Eroin ve metabolitleri (morfin, morfin-3- β -glukuronid ve 6-monoasetil morfin) için saf madde ve tükürük numunesi için ayrı kalibrasyon eğrileri oluşturuldu. Farklı konsantrasyonlarda eroin ve metabolitleri içeren tükürük numunelerinin tekrarlı SERS analizi 785 nm lazer kaynaklı Raman mikroskobu, AuNR yüzey ve AgNP sinyal artırıcı kullanılarak gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar, eroin ve metabolitlerinin SERS tabanlı bir sistem kullanılarak tükürük numunelerinde tespit edilebileceğini ve ölçülebileceğini göstermiştir. Bu çalışma, AuNR yüzey ve gümüş nanoparçacık (AgNP) sinyal arttırıcının sinerjik etkisinin SERS spektrumunda tanımlanabilir bant sayılarını ve yoğunluklarını artırdığını ortaya koymuştur. Geliştirilen yöntemle ve kalibrasyon bağlamında geliştirilen konsantrasyon intansite eşleşmesi ile oluşturulan formül kullanılarak blank tükürük numunelerinde eklenen konsantrasyonlara çok yakın olarak eroin ve metabolitlerinin miktar analizinin yapılabildiği saptandı. Bu veriler ışığında, tükürük numunesinde eroin ve metabolitlerini tespit etmek ve ölçmek için hızlı, doğru ve fiyat-fayda dengesi açısından çok avantajlı bir yöntem geliştirildi.

Anahtar Kelimeler: Eroin ve metabolitlerinin kimliklendirilmesi, Eroin ve metabolitlerinin miktar tayini, Yüzey Zenginleştirilmiş Raman spektroskopisi (SERS), Raman-aktif yüzey, AuNRs, AgNP.

ABSTRACT

SURFACE ENHANCED RAMAN SPECTROSCOPY AS A NOVEL ANALYTICAL TOOL IN TOXICOLOGICAL ANALYSIS OF HEROIN AND METABOLITES IN SALIVA

Ramazan AKÇAN

Doctor of Philosophy, Department of Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. Necdet SAĞLAM

Co- Supervisor: Prof. Dr. Uğur TAMER

January 2021, 99 pages

Heroin can be detected and quantified by certain analytical methods; however, forensic professionals and criminal laboratories study for cheaper and faster detection tools. Surface-enhanced Raman spectroscopy rise as a possible alternative tool with its widening application spectra. There are few studies regarding Raman and SERS spectra of heroin and its metabolites, which are unfortunately controversial. In this study we compared five different surfaces in order to find out more efficient Raman-active substrate for opiate detection and rapid quantification of heroin and its metabolites in saliva. Morphine standard material was used to determine the most suitable Raman-active surface for SERS

analysis of opiates. For this purpose, thin layer chromatography (TLC) plate, silver nano surface (AgNS), gold nanoparticle nanocellulose (AuNP/Nanocellulose), gold nanoparticle polyaniline (AuNP/Polyaniline) and gold nano-rod (AuNR) surfaces were compared. Separate calibration curves were generated for standart materials and saliva samples containing heroin and its metabolites (morphine, morphine-3- β -glucuronide and 6-monoacetyl morphine). Repeated SERS analysis of saliva samples containing different concentrations of heroin and metabolites was performed using a 785 nm laser source Raman microscope, AuNR surface and silver nanoparticle (AgNP) as signal enhancer. The results showed that heroin and its metabolites can be detected and measured in saliva samples using a SERS-based system. This study demonstrated that the synergistic effect of AuNR surface and AgNP signal enhancer increases numbers of identifiable bands and their intensities in the SERS spectrum. It was determined that the quantitative analysis of heroin and its metabolites could be achieved very close to the concentrations spiked in blank saliva samples by using the developed method and the formula created by the concentration-intensity match point during the calibration. In this respect, a fast, accurate and very advantageous method in terms of cost-effectivity has been developed to detect and measure heroin and its metabolites in saliva sample.

Keywords: Identification of heroin and its metabolites, Quantification of heroin and its metabolites, Surface Enhanced Raman spectroscopy (SERS), Raman-active surface, AuNRs, AgNP.

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmamın, başından sonuna kadar, tüm aşamalarda bilgi ve tecrübeleri ile bana ışık tutan, ihtiyaç duyduğum her anda desteklerini eksik etmeyen, bunun yanı sıra temel bilimlere dair soru ve sorunları ele alış biçimleriyle bana yeni bakış açıları ve anlayış sunan muhterem hocam tez danışmanım Prof. Dr. Necdet Sağlam'a,

Tez çalışmamın her noktasında yoğun emeği bulunan, dokunuş, ekleme ve değerlendirmeleri ile süreci işler kılan, elde edilen tüm verileri hassasiyetle inceleyerek yöntemin geliştirilmesi ve sonuçların yorumlanmasında yeni yollar açarak kaosu anlaşılır kılan, en ufak sorunları dahi büyük bir hassasiyet ve özveri ile çözümleyen sayın hocam tez eş danışmanım Prof. Dr. Uğur Tamer'e,

Bu tez çalışmasının yönteminin geliştirilmesi sürecinde ve özellikle substratların temininde laboratuvarının tüm olanaklarını bizlere sunan, tüm teknik altyapısı ile desteğini eksik etmeyen sayın hocam Doç. Dr. Gökhan Demirel'e, Adli ve Klinik Toksikoloji bilgisi ve tecrübesi ile her sorunuma çözüm getiren, bilimsel ve teknik desteği ile yanımda olan hocam sayın Doç.Dr. Mukaddes Gürler'e,

Tez çalışmanın her aşamasında yanımda olan, pratik bilgileri, teknik ve analitik tecrübeleri ve enerjileri ile desteklerini eksik etmeyen değerli arkadaşlarım ve emektaşlarım Dr. Hasan İlhan, Uzm. Dr. M. Şerif Yıldırım ve Dr. Burcu Güven'e,

Doktora ders ve tez dönemleri boyunca yoğun mesailerine aldırış etmeden eğitimime devamımda beni destekleyen, yorulduğum ve yıldıığım zamanlarda beni cesaretlendiren çalışma arkadaşlarım ve hocalarım sayın Prof. Dr. Ali Rıza Tümer, Prof. Dr. Aysun Balseven Odabaşı ve Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Cavlak'a,

Her eğitim aşaması, uğraşı dönemi ve çabamda, sorgulamaksızın fedakarlık yapmaktan kaçınmayan aileme, yoğun çalışma sürecinde sosyal açıdan ihmal etmek zorunda kaldığım halde sürekli yanımda olan, geri adım attığımda beni güçlendirerek yürümemi sağlayan, üzüntümlle üzülen, başarımla sevinen değerli eşim Ülkü, kızlarım Belma ve Mina Akçan'a,

Sonsuz teşekkür ediyorum, saygı, sevgi ve minnetlerimi arz ediyorum.

İÇİNDEKİLER

ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Uyuşturucu madde kullanımına dair genel özellikler	5
2.2. Yaygın şekilde kullanılan uyuşturucu, uyarıcı maddeler ve değişim trendi.....	8
2.3. Opiatlar, Eroin ve Metabolitleri ve bunlara ilişkin genel değerlendirme.....	8
2.3.1. Opiatlar	8
2.3.2. Eroin ve Metabolitleri.....	9
2.4. Toksikolojik Analizlerde Kullanılan Numunelere Genel Bakış.....	10
2.4.1. Tükürüğün Toksikolojik Analizi	11
2.5. Uyuşturucu ve uyarıcı madde analizlerinde kullanılan mevcut analitik sistemlere ilişkin değerlendirme.....	13
2.6. Raman Spektroskopisi	15
2.6.1. Yüzey Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopisi (Surface Enhanced Raman Spectroscopy, SERS).....	16
2.7. Uyuşturucu ve uyarıcı madde analizlerinde alternatif bir analitik yöntem olarak Raman Spektroskopisi.....	17
2.8. Adli Tıp ve Adli Bilimlerde Raman Spektroskopisi Uygulamaları.....	19
2.8.1. Adli ve Klinik Toksikolojide Raman Spektroskopisi Uygulamaları	21
2.8.1.1. Alkol	22
2.8.1.2. Uyuşturucu ve Uyarıcı Maddeler	22
2.8.1.3. Terapötik İlaçlar ve Diğerleri.....	23

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	26
3.1. Çalışmanın Tasarımı	26
3.2. Kimyasal Maddeler	27
3.3. Kullanılan Cihazlar.....	28
3.4. Kullanılan Diğer Malzemeler.....	28
3.5. Kullanılan Substratlar/Raman-aktif yüzeyler	28
3.6. Gümüş nano yüzey (AgNS) hazırlanması.....	28
3.7. AuNP/nanoselüloz yüzeylerin hazırlanması.....	28
3.8. AuNP/polianilin yüzeyinin hazırlanması	30
3.9. TLC silika jel alüminyum levhaları	30
3.10. Altın nanorod yüzey (AuNRs).....	30
3.11. Gümüş nanopartikül (AgNP) sentezi	30
3.12. Belirlenen yaygın uyuşturucu ve uyarıcıların standart maddelerinin Raman spektrumlarının eldesinde yöntem geliştirme basamakları,.....	31
3.13. Enstrümantasyon	32
3.14. Eroin, MM, M3B ve 6MAM SERS analizi için en uygun yüzeyin tespit edilmesi	33
3.15. SERS kullanılarak eroin ve metabolitlerinin kalibrasyon eğrilerinin oluşturulması	35
3.15.1. Eroin için kalibrasyon eğrisi çizimi ve LOD hesaplanması	35
3.15.2. MM, M3B ve 6MAM kalibrasyon eğrisi çizimi ve LOD hesaplanması... ..	35
3.15.3. Tükürük numunesinde eroin ve metabolitlerinin konsantrasyonlarının ölçülmesi.....	36
3.15.3.1. Analiz prosedürü, kalibrasyon ve konsantrasyon formülünün geliştirilmesi.....	36
3.15.3.2. Numunelerde eroin ve metabolitlerinin konsantrasyonlarının belirlenmesi	38
3.15.4. Etik kurul onayı.....	38
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	39
4.1. SERS substratları ve sinyal arttırıcı nanopartikül karakterizasyonu.....	39
4.1.1. AgNP karakterizasyonu.....	39

4.1.2. AuNP/Nanoselüloz yüzey karakterizasyonu.....	41
4.1.3. AuNP/Polianilin yüzey karakterizasyonu	42
4.1.4. AuNR partikül ve yüzey karakterizasyonu	42
4.2. Eroin, MM, M3B ve 6MAM Analizi için en uygun Raman-aktif substratın belirlenmesi	44
4.3. Eroin, MM, M3B ve 6MAM'ın SERS spektrumlarının elde edilmesi ve saf madde ölçümü için kalibrasyon eğrilerinin çizilmesi.....	57
4.4. Eroin, MM, M3B ve 6MAM ile spike edilmiş tükürük numunelerinin SERS analizi, konsantrasyon tespiti için intansite-konsantrasyon eşleşme noktası ile formül oluşturulması, yöntemin kalibrasyonu, LOD ve LOQ değerlerinin belirlenmesi,.....	65
4.4.1. Tükürük numunesinde eroin analizi ve konsantrasyon değerlendirmesi.....	66
4.4.2. Tükürük numunesinde MM analizi ve konsantrasyon değerlendirmesi.....	68
4.4.3. Tükürük numunesinde MM analizi ve konsantrasyon değerlendirmesi.....	70
4.4.4. Tükürük numunesinde 6-MAM analizi ve konsantrasyon değerlendirmesi.....	72
4.5. Valisayon çalışmaları.....	73
4.5.1. Kalibrasyon Modeli.....	73
4.5.2. Çalışma Aralığı.....	74
4.5.3. Tespit alt sınırı (LOD) ve miktarlandırma alt sınırı (LOQ) hesaplanması.....	74
4.5.4. Bias-Doğruluk.....	75
4.5.5. Tekrarlanabilirlik	75
4.5.6. Kalıntı (Taşınım).....	77
4.6. Tükürük numunelerinde kör ölçümle eroin, MM, M3B ve 6MAM düzeylerinin tespiti ve SERS spektrumunun Excel'de formülün kullanımı ile madde konsantrasyonunun otomatize şekilde belirlenmesi	77
4.6.1. Tükürük numunelerinde kör ölçümle eroin, MM, M3B ve 6MAM düzeylerinin tespiti.....	77

4.7. SERS spektrumunun Excel formatında kayıt işlemi ile madde konsantrasyonunun otomatize şekilde belirlenmesi.....	81
4.8. Analitik yöntemlerin maliyet kalemlerinin değerlendirilmesi	82
4.9. Literatürde dile getirilmemekle beraber tez çalışmamız kapsamında tespit edilen sınırlılıklar, kısıtlılıklar ve önerilerimiz.....	84
5. YORUM	87
6. KAYNAKLAR	94
7. EKLER	100
EK 1 – Etik Kurul İzin Belgesi	100
EK 2 - Tezden Türetilmiş Yayınlar	101
EK 3 - Tezden Türetilmiş Bildiriler	102
EK 4 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu	104
8. ÖZGEÇMİŞ.....	105

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Dünya uyuşturucu kullanım prevalansı (Milyon kişi) [4,29]	5
Şekil 2.2. Türkiye'de madde bağımlılığı ile ilişkili ölümler [8].....	7
Şekil 2.3. Eroin ve metabolitleri.....	9
Şekil 2.4. Tükürükte toksikolojik analizinin diğer biyolojik numunelere göre üstünlük ve avantajları	12
Şekil 2.5. SERS yönteminin temel bileşenleri.....	16
Şekil 2.6. Raman spektroskopinin adli bilimlerde kullanım alanları	20
Şekil 3.1. Altın-selüloz nanofibril çözeltisi.....	29
Şekil 3.2. Raman-aktif AuNP/Nanoselüloz yüzey.....	29
Şekil 3.3. Bu çalışmada kullanılan SERS yöntemi ve bileşenleri.....	32
Şekil 3.4. Standart madde SERS analizinde yüzeylerin karşılaştırılmasında yöntem özet şeması	33
Şekil 3.5. Standart maddenin farklı konsantrasyonlarının SERS analizinde kullanılan yüzeylerin karşılaştırılmasında yöntem özet şeması.....	34
Şekil 3.6. Eroin, MM, M3B, 6-MAM standart maddelerinin SERS analizi kalibrasyon çalışmalarında yöntem özet şeması.....	36
Şekil 3.7. Tükürük numunesinde eroin, MM, M3B, 6-MAM SERS analiz prosedürü şeması	38
Şekil 4.1. Hidroksilamin ile indirgenmiş AgNP UV-vis spektrumu.....	40
Şekil 4.2. AgNP TEM görüntüsü.....	41
Şekil 4.3. AuNP/Nanoselüloz yüzey SEM görüntüsü	41
Şekil 4.4. AuNP/Polianilin yüzey SEM görüntüsü.....	42
Şekil 4.5. AuNRs UV-vis spektrumu.....	43
Şekil 4.6. AuNRs SEM görüntüsü	43
Şekil 4.7. Raman Shift (cm^{-1}) blank AgNS yüzeyi ve bu yüzeyde Morfin Monohidrat spektrumlarının karşılaştırılması	44
Şekil 4.8. Raman Shift (cm^{-1}) blank TLC yüzeyi ve bu yüzeyde Morfin Monohidrat spektrumlarının karşılaştırılması	45

Şekil 4.9. Raman Shift (cm^{-1}) blank AuNP/Polianilin yüzeyi ve bu yüzeyde Morfin Monohidrat spektrumlarının karşılaştırılması	46
Şekil 4.10. Raman Shift (cm^{-1}) blank AuNP/Nanoselüloz yüzeyi ve bu yüzeyde Morfin Monohidrat spektrumlarının karşılaştırılması	47
Şekil 4.11. Raman Shift (cm^{-1}) blank AuNR yüzeyi ve bu yüzeyde Morfin Monohidrat spektrumlarının karşılaştırılması	48
Şekil 4.12. Farklı Raman-aktif yüzelerde morfinin SERS spektrumlarının karşılaştırılması.....	52
Şekil 4.13. AuNR yüzeyde farklı konsantrasyonlarda morfinin SERS spektrumları	54
Şekil 4.14. AgNS yüzeyde farklı konsantrasyonlarda morfinin SERS spektrumları	54
Şekil 4.15. AuNP/Polianilin yüzeyde farklı konsantrasyonlarda morfinin SERS spektrumları	55
Şekil 4.16. AuNP/Nanoselüloz yüzeyde farklı konsantrasyonlarda morfinin SERS spektrumları	55
Şekil 4.17. TLC yüzeyde farklı konsantrasyonlarda morfinin SERS spektrumları	56
Şekil 4.18. Eroin standart madde 5 ppb ile 2500 ppm konsantrasyon aralığında AuNR yüzey ve AgNP kolloid kullanılarak elde edilen SERS spektrumları	58
Şekil 4.19. Eroin standart madde AuNR yüzeyde SERS analizi non-lineer kalibrasyon eğrisi	59
Şekil 4.20. MM standart madde 50 ppb ile 500 ppm konsantrasyon aralığında AuNR yüzey ve AgNP kolloid kullanılarak elde edilen SERS spektrumları	60
Şekil 4.21. MM standart madde AuNR yüzeyde SERS analizi non-lineer kalibrasyon eğrisi	61
Şekil 4.22. M3B standart madde 50 ppb ile 500 ppm konsantrasyon aralığında AuNR yüzey ve AgNP kolloid kullanılarak elde edilen SERS spektrumları	62
Şekil 4.23. M3B standart madde AuNR yüzeyde SERS analizi non-lineer kalibrasyon eğrisi.	63
Şekil 4.24. 6-MAM standart madde 50 ppb ile 500 ppm konsantrasyon aralığında AuNR yüzey ve AgNP kolloid kullanılarak elde edilen SERS spektrumları	64

Şekil 4.25. 6-MAM standart madde AuNR yüzeyde SERS analizi non-lineer kalibrasyon eğrisi	64
Şekil 4.26. 20 ppb ile 125 ppm arası eroin konsantrasyonlarında ((a) 20 ppb (b) 1 ppm, (c) 5 ppm, (d) 25 ppm, (e) 125 ppm) 627 cm ⁻¹ 'de C-C _{alicyclic,aliphatic} vibrasyon bandları.....	66
Şekil 4.27. Tükürük numunesinde 20 ppb–125 ppm aralığında Eroin standart maddesi konsantrasyonları için AuNR yüzey ve AgNP kolloid sinyal arttırıcı kullanılarak SERS analizi non-lineer kalibrasyon eğrisi ve pik intansitesi-konsantrasyon eşleme formülü	67
Şekil 4.28. 20 ppb ile 125 ppm arası MM konsantrasyonlarında ((a) 20 ppb (b) 1 ppm, (c) 5 ppm, (d) 25 ppm, (e) 125 ppm) 627 cm ⁻¹ 'de C-C _{alicyclic,aliphatic} vibrasyon bandları.....	68
Şekil 4.29. Tükürük numunesinde 20 ppb – 125 ppm konsantrasyonu aralığındaki MM standart maddesinin AuNR yüzey ve AgNP kolloid sinyal arttırıcı kullanılarak SERS analizi non-lineer kalibrasyon eğrisi ve pik intansitesi-konsantrasyon eşleme formülü	69
Şekil 4.30. 20 ppb ile 125 ppm arası M3B konsantrasyonlarında ((a) 20 ppb (b) 1 ppm, (c) 5 ppm, (d) 25 ppm, (e) 125 ppm) 627 cm ⁻¹ 'de C-C _{alicyclic,aliphatic} vibrasyon bandları.....	70
Şekil 4.31. Tükürük numunesinde 20 ppb – 125 ppm konsantrasyonu aralığındaki M3B standart maddesinin AuNR yüzey ve AgNP kolloid sinyal arttırıcı kullanılarak SERS analizi non-lineer kalibrasyon eğrisi ve pik intansitesi-konsantrasyon eşleme formülü	71
Şekil 4.32. 20 ppb ile 125 ppm arası 6-MAM konsantrasyonlarında ((a) 20 ppb (b) 1 ppm, (c) 5 ppm, (d) 25 ppm, (e) 125 ppm) 627 cm ⁻¹ 'de C-C _{alicyclic,aliphatic} vibrasyon bandları.....	72
Şekil 4.33. Tükürük numunesinde 20 ppb – 125 ppm konsantrasyonu aralığındaki 6-MAM standart maddesinin AuNR yüzey ve AgNP kolloid sinyal arttırıcı kullanılarak SERS analizi non-lineer kalibrasyon eğrisi ve pik intansitesi-konsantrasyon eşleme formülü	73
Şekil 4.34. Kör analizi yapılan tükürük numunesinin SERS spektralleri	78
Şekil 4.35. Örnek SERS spektrumlarının Excel formatında kaydedilmesi ile eroin konsantrasyon hesaplaması	81

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. SERS ile kimliklendirmesi yapılan çeşitli tıbbi ilaçlar	24
Çizelge 4.1. Morfin monohidratın farklı yüzeylerle elde edilen SERS spektrumlarında saptanan güçlü pik noktaları.....	49
Çizelge 4.2. AuNR yüzeyde morfin monohidratın SERS spektrumundaki bantlar	50
Çizelge 4.3. SERS spektrumları bağlamında yüzeylerin Raman-aktif nitelikleri	51
Çizelge 4.4. Eroin standart maddesi için konsantrasyon ve 627 cm ⁻¹ bandındaki intansite değerleri.....	59
Çizelge 4.5. Tükürükte eroin, MM, M3B ve 6-MAM analiz parametreleri	75
Çizelge 4.6. Tükürükte MM konsantrasyonlarının gün-içi SERS analizleri tekrarlanabilirlik validasyon parametreleri	76
Çizelge 4.7. Tükürükte MM konsantrasyonlarının günler-arası SERS analizlerinde tekrarlanabilirlik/validasyon parametreleri	76
Çizelge 4.8. Tükürükte MM konsantrasyonlarının substrat üzerindeki kurumuş numunede laboratuvar ortamı stabilitesi açısından tekrarlanabilirlik analizi parametreleri.....	76
Çizelge 4.9. Kör analizi yapılan tükürük numunesinde bilinen ve hesaplanan Eroin, MM, M3B ve 6-MAM konsantrasyonları.....	79

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

C_E	Tükürükteki eroin konsantrasyonu
C_{MM}	Tükürükteki morfin monohidrat konsantrasyonu
C_{M3B}	Tükürükteki morfin-3-beta glukoronid konsantrasyonu
C_{6-MAM}	Tükürükteki 6-monoasetil morfin konsantrasyonu
i	SERS spektrumu 627 cm^{-1} band intansitesi

Kısaltmalar

6-MAM	6-Mono Asetil Morfin
AB	Avrupa Birliği
AgNP	Gümüş nanopartikül
AgNS	Gümüş nano yüzey
AuNP	Altın nanopartikül
AuNPs/Nanoselüloz	Altın nanoyüzey-nanoselüloz
AuNPs/Polianilin	Altın nanoyüzey-Polianilin
AuNRs	Altın nanorod array
CEDIA	Cloned Enzyme Donor İmmunoassay
ELISA	Enzyme-linked sorbent immunoassay
GC-HS	Gaz Kromatografi Headspace Otosampler
GC-MS	Gaz Kromatografi Kütle Spektrometri
GC-MS/MS	Gaz Kromatografi Kütle Spektrometri ve Tandem Kütle Spektrometri
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi

LC-MS	Sıvı Kromatografi Kütle Spektrometri
LC-MS/MS	Sıvı Kromatografi Kütle Spektrometri ve Tandem Kütle Spektrometri
LOD	Tespit düzeyi
LOQ	Miktarlandırma düzeyi
M3-6B	Morfin-3-6-Beta-Glukuronide
M3B	Morfin-3-Beta-Glukuronid
M6B	Morfin-6-Beta-Glukuronid
MM	Morfin Monohidrat
PANI	Polianilin
PEG	Polietilen glikol
SERS	Yüzey zenginleştirilmiş Raman spektroskopi
SWGASD	Scientific Working Group for the Analysis of Seized Drugs
TLC	Thin layer chromatography silica gel aluminium sheets

1. GİRİŞ

Uyuşturucu ve uyarıcı maddelerin suiistimali dünya genelinde her geçen gün artmakta, maalesef madde kullanmaya başlama ve bağımlılık yaşı düşmektedir. Dünya genelinde her yıl artan sayıda uyuşturucu madde ilişkili hastalık, zehirlenme ve diğer klinik durumlar nedeniyle yoğunlaşan acil servis başvuruları, adli nitelikli olaylar bildirilmektedir. Diğer yandan, opiyatlar başta olmak üzere, madde kullanımı ile ilintili morbidite ve mortalite oranlarında da ciddi artış izlenmektedir. Zaman içerisinde, madde kullanım paterni, frekansı ve türleri değişmekle birlikte bazı uyuşturucu ve uyarıcı maddelerin geniş bir kullanım alanı bulunduğu, en yaygın şekilde kullanılan uyuşturucu gruplarının Dünyanın hemen her yerinde çoğunlukla aynı oldukları bilinmektedir. Dünya genelinde kannabis en sık suistimal edilen madde olmasına rağmen morbidite ve mortalite açısından en büyük sorun oluşturan uyuşturucu madde grubunun opiyatlar (eroïn, morfin vb.) olduğu ifade edilmektedir [1].

Yüksek riskli opiyatlar da dahil olmak üzere yasa dışı uyuşturucu ve uyarıcı maddelerin kötüye kullanılması; birey, aile, toplum, ülke ve dünya ölçeğinde çok yönlü küresel bir sağlık sorunudur. Özellikle genç-erişkin popülasyonda artan mortalite ve morbiditeden sorumludur. Morfinin diasetil ürünü olan ve en yaygın olarak Papaver somniferum'dan ekstrakte edilen eroïn en yaygın şekilde suiistimal edilen yasa dışı uyuşturuculardan biridir [2,3]. Yapılan bir anket çalışmasında, eroïn kullanımının toplum içinde şehir merkezlerinden, kentlerin değişik alanlarına ve farklı sosyo-kültürel sınıflara doğru yayıldığı belirtilmiştir. Dünya Uyuşturucu Raporu 2017 [4] ve Avrupa Uyuşturucu Raporu 2017'ye [5] göre, eroïn yüksek riskli opiyatlar arasında hala madde bağımlılığın önde gelen etkenlerinden biridir. Eroïn bağımlılığı, artan kardiyopulmoner hastalık riski, Hepatit C dahil kronik enfeksiyonlar ve karaciğer yetmezliği bağlamında önemli bir morbidite ve mortalite nedeni olmaktadır [6,7].

Avrupa Birliği (AB) ülkelerinde opiyat kullanımı ve opiyat kullanım bozukluğu oranı göreceli olarak azalırken Türkiye'de tedavi için hastaneye başvuran madde kullanıcılarının %54,8'nin (137826 kişi) opiyat bağımlılığının bulunduğu, diğer

yandan hastanede yatarak tedavi gören hastaların %61.8'nin (8555 kişi) opiat bağımlısı olduğu çok önemli bir sorun olarak karışımıza çıkmaktadır [7,8].

Yukarıdaki bilgiler bağlamında dünya genelinde önemli bir sorun teşkil eden opiat grubunun ana elemanı olan eroin ile ilişkili olay sayılarının ülkemizde de başı çeker nitelikte ciddi bir sağlık ve kriminal sorun olduğu görülmektedir. Nitekim Türkiye uyuşturucu raporunda da belirtildiği gibi Türkiye'de 2018 yılında 2017 yılına göre eroin ile ilişkili olay sayısında yaklaşık %41,5, diğer yandan yakalanan şüpheli sayısında da %45,8 oranında bir artış gerçekleştiği dikkati çekmektedir [8].

Adli ve klinik toksikoloji alanında da sık kullanılan bu uyuşturucu ve uyarıcı maddelerin enstrümantal analizleri çok önemli yer tutmaktadır. Mevcut analitik yaklaşımlarda kolluk tarafından yapılan saha analizlerinde basit ön tarama testleri, adli ve klinik toksikolojik analizlerinin genelinde Temel immünassay sistemleri, enzimatik analiz sistemleri ve daha komplike durumlarda da yüksek performans sıvı kromatografi (HPLC, High Performance Liquid Chromagrophy), gaz kromatografi ile eşlenmiş headspace (GC-HS, Gas Chromatography Headspace Autosampler), Gaz Kromatografi ile eşlenmiş Kütle Spektrometri (GC-MS, Gas Chromatography Mass Spectrometry), Gaz Kromatografi ile eşlenmiş Kütle Spektrometri ve Tandem Kütle Spektrometri (GC-MS/MS, Gas Chromatography Mass Spectrometry and Tandem Mass Spectrometry), Sıvı Kromatografi ile eşlenmiş Kütle Spektrometri (LC-MS, Liquid Chromatography Mass Spectrometry), Sıvı Kromatografi ile eşlenmiş Kütle Spektrometri ve Tandem Kütle Spektrometri (LC-MS/MS, Liquid Chromatography Mass Spectrometry and Tandem Mass Spectrometry) ve benzeri komplike enstrümantal analitik sistemler kullanılmaktadır [9].

Yaygın şekilde suiistimal edilen uyuşturucu, uyarıcı ve tıbbi maddelerin analizinde mevcut uygulamalar ile analitik yaklaşımlarda sorunlar olduğu görülmektedir. Rutin analitik sistemlerin özellikle kişinin etkisinde olduğu düşünülen maddenin acil tespitinin gerektiği klinik durumlarda ve kolluğun rutin kontrolleri ile saha testlerinde kullanım açısından uygun olmadığı, uzun

ekstraksiyon ve analiz sureleri nedeniyle tanı, tedavi ve raporlama sürecinde gecikmeler yaşandığı bilinmektedir. Bu çalışmada; bu bilgiler dikkate alınarak kullanımı daha kolay, daha hızlı, modifikasyonlara, geliştirilmeye ve daha hassas hale getirilmeye açık olması nedeniyle; uyuşturucu/uyarıcı madde içeren tükürük numunesi analizinde yeni ve alternatif bir analitik yöntem olarak yüzey zenginleştirilmiş Raman spektroskopisi (SERS) kullanımı amaçlanmaktadır [10].

Adli tıp ve adli bilimler alanındaki önemli analitik sorunlardan biri de çalışılacak numunenin az miktarda olması, bir olay yerinde örneklenemeyecek yüzeye adsorbe olmuş bir şekilde bulunması ve beklenmiş biyolojik sıvıların kuruması ile fragmente olmuş küçük partiküller şeklinde elde edilmesidir. Bazen olay yerinde son derece sınırlı miktarda numune keşfedilebilir ki çoğu zaman bu numunenin şahısların kimliklendirilmesi ve madde etkisi altında olup olmadıklarının tespiti açısından genetik ve toksikolojik inceleme için birden fazla analizde kullanılması gerekmektedir. Bu sorunun üstesinden gelmek için, son zamanlarda, mikroakışkan ve Raman spektroskopik yöntemler dahil olmak üzere, numuneye zararsız olan ve bir analiz sonrasında numunenin başka analizde kullanılmasına olanak tanıyan yöntemlerle ilgilenen bir dizi çalışma gerçekleştirilmektedir [11–13]. Bu açıdan, numuneye nispeten zararsız, gelecek vaat eden bir sistem olarak SERS diğer yöntemlere göre birçok avantaja sahiptir.

Adli bilimler uygulamalarında; hem teorik çalışma ve deneylerde hem de laboratuvar ve saha analizlerinde SERS kullanımı artış göstermektedir. SERS, çok az miktarda numunenin veya herhangi bir numunede çok düşük konsantrasyonda bulunan analitlerin incelenmesinde kullanılabilen, uygulaması kolay, laboratuvar dışı şartlara uygun hale getirilebilecek, potansiyel olarak hızlı ve uygun maliyetli bir analitik yöntemdir. Eser miktarda kimyasal delillerin ve belirli vücut sıvılarının tanımlanmasıyla ilgili çok sayıda SERS tabanlı çalışma bulunmaktadır [11,14–20]. Öte yandan, morfin, kokain ve eroin gibi toksikolojik maddelerin tanımlanması ile ilgili olarak, eroin ve metabolitlerinin farklı türde numunelerde SERS ile doğrudan toksikolojik analizi ile ilgili az sayıda çalışma bulunmaktadır. Ancak bu çalışmaların neredeyse tamamı farklı form ve

yapılardaki doğal veya sentetik uyuşturucu, uyarıcı veya tıbbi ilaçların kimyasal yapılarına işaret eden Raman imzalarının belirlenmesi ile ilgilenmiştir [21–25].

Biyolojik sıvılardaki eroin ve metabolitlerinin tespiti ve miktar tayini hem hastaneler hem de emniyet güçleri ve yargı organları için son derece önemlidir. Alkol ve uyuşturucu bağımlılığının rehabilitasyonu ve tedavisine adanmış bağımlılık merkezleri ve psikiyatri kurumları da dahil olmak üzere çoğu hastane bünyesinde, daha ucuz, hızlı ve daha kolay uygulanması nedeniyle için yasaklı madde veya tıbbi ilaç düzeyi tespiti için enzimatik yöntemler ve kağıt bazlı testler kullanılabilir. Ancak bu yöntemlerin yanlış pozitif veya negatif sonuçları nedeniyle hukuki amaçlarla kullanılması imkansız hatta sakıncalıdır. Toksikoloji laboratuvarlarında, tandem kütle spektrometresi ile eşleştirilmiş sıvı kromatografi ve gaz kromatografisi kütle spektrometresi sistemleri yasadışı ilaçların adli nitelikteki analizleri için önde gelen analitik yöntemlerdir. Bu nicel yöntemler enzimatik yöntemlere göre çok daha güvenilirken, sistemler ve analizler diğer yöntemlere göre oldukça komplike, pahalı ve zaman alıcıdır [26,27]. Mevcut sistemlere alternatif olarak hem acil tanılma gereksinimi için hastane bünyesinde, hem de yasal amaçlarla analizler yapan toksikoloji laboratuvarlarında ya da emniyet güçleri tarafından gerçekleştirilen saha analizlerinde potansiyel olarak kullanılacak, yasa dışı madde ve ilaçların doğru bir şekilde tanımlanmasına ve miktarının belirlenmesine olanak tanıyan umut verici bir yöntemdir [28].

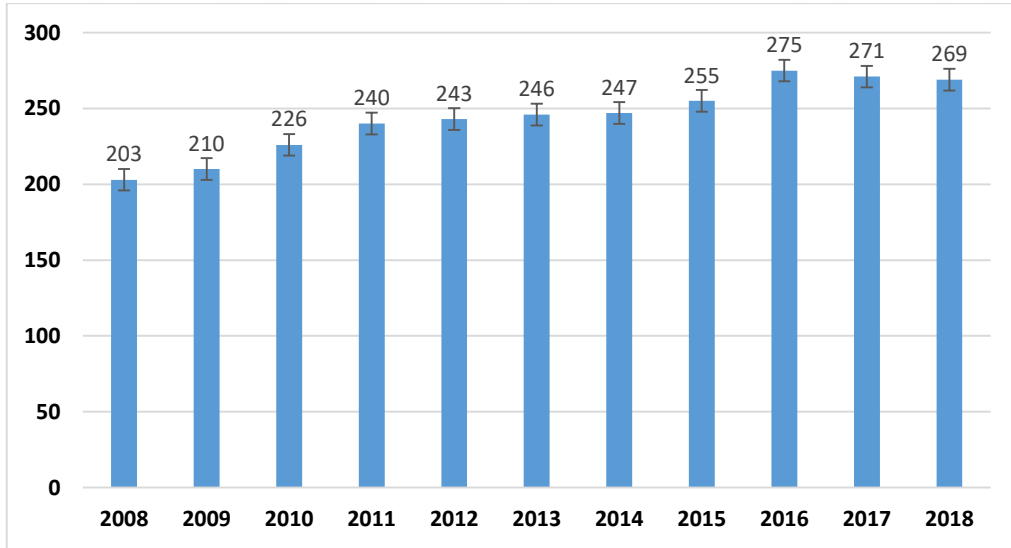
Yukarıda sunulan bilgiler bağlamında, bu tez çalışması "Biyolojik bir sıvıda bir farmako-toksikolojik ajan ve metabolitlerinin konsantrasyonlarını SERS yöntemi ile ölçmek mümkün müdür?" sorusuna dayanmaktadır. Bu tez çalışmasının amacı, eroin ve metabolitlerinin SERS analizi için en uygun Raman-aktif yüzeyin belirlenmesi, SERS spektrumlarının ortaya konması ve tükürük numunesinde SERS ölçümlerine dayalı eroin ve metabolitlerinin konsantrasyonlarının tespit edilmesi ve analizi için potansiyel olarak daha seçici ve daha hızlı bir yöntem geliştirilmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Uyuşturucu madde kullanımına dair genel özellikler

Uyuşturucu ve uyarıcı maddelerin suiistimali dünya genelinde her geçen gün artmakta, kullanmaya başlama ve bağımlılık yaşı düşmektedir. Bu nedenle yaşamın tüm alanlarını etkileme potansiyeli olan bu önemli sorun giderek büyümektedir. Zaman içerisinde, madde kullanım paterni, frekansı ve tercih edilen madde türleri değişmekle birlikte bazı uyuşturucu ve uyarıcı maddelerin süreklilik arz edecek nitelikte geniş bir kullanım alanı bulduğu dikkati çekmektedir.

Dünya Uyuşturucu Raporunda sadece 2018 yılında dünya genelinde her 19 insandan birinin en az bir tur uyuşturucu madde kullandığı belirtilmektedir [1]. Bu madde kullanıcı sayısının Fransa, Almanya, İtalya ve İngiltere'nin toplam nüfusunu geçtiği dikkate alındığında sorunun boyutu ortaya çıkmaktadır. Aradan geçen on yıllık süre içerisinde 2008 yılı ile karşılaştırıldığında global uyuşturucu madde kullanımında %32,5 oranında artış olduğu dikkati çekmektedir (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. Dünya uyuşturucu kullanım prevalansı (Milyon kişi) [4,29]

Diğer yandan 2018 yılındaki uyuşturucu madde kullanıcılarından 36,6 milyon insanın uyuşturucu madde kullanım bozukluğundan muzdarip olduğu ve ciddi sağlık sorunları ile karşılaştığı belirtilmektedir [1]. Son on yılda uyuşturucu madde

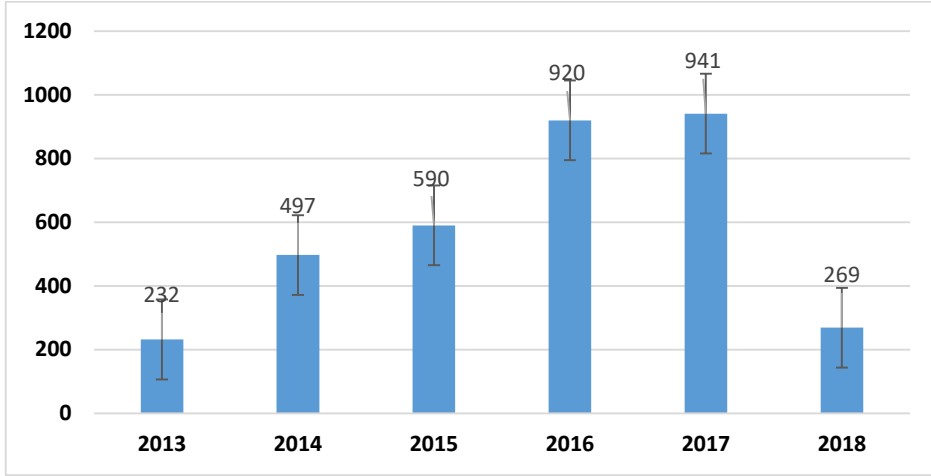
pazarındaki çeşitliliğe, yeni sentetik maddelerin üretilmesi ve ilaç etken maddelerinin tıp-dışı kullanımının artmasına rağmen hala en sık kullanılan bitki temelli kannabis, kokain ve eroinin başı çektiği bilinmektedir [1,7]. Kannabis en sık kullanılan madde olmasına rağmen morbidite ve mortalite açısından en büyük sorun oluşturan uyuşturucu madde grubunun opiatlar (eroin, morfin vb.) olduğu, 2017 yılında sağlıklı bireylerde madde kullanımı sonucu 42 milyon ölüm olayının % 80'inin ve madde kullanım bozukluğu olan 167000 ölüm olayının da %66'sının opiyatlardan kaynaklandığı dikkati çekmektedir [1,30]. Bu noktada opiat suistimalinin ve buna bağlı morbidite ve mortalitenin tüm dünyada önemli bir sağlık sorunu olduğu anlaşılmaktadır.

Avrupa Birliği (AB) ülkelerinde en yoğun şekilde suistimal edilen opiat madde farklı kullanım şekil ve yöntemleri bulunan eroindir. AB bünyesinde, son on yıl içerisinde opiat bağımlılığında tedrici şekilde azalma olmakla birlikte, yetişkin nüfusun %0,4'üne tekabül eden yaklaşık 1,3 milyon ağır risk sınıfında opiat kullanım bozukluğu olan birey bulunmaktadır. AB'de yüksek riskli opiat kullanıcılarının %77'sinin AB nüfusunun %62'sini oluşturan beş ülke de (Almanya, İspanya, Fransa, İtalya, İngiltere) bulunduğu bilinmektedir [6,31].

Türkiye'deki durum incelendiğinde 2018 yılı içerisinde tedavi merkezlerine uyuşturucu madde kullanımına bağlı toplam 251.593 kişinin analiz/raporlama veya tedavi başvurduğu görülmektedir. Bu başvuruların yaklaşık ¼'ünün (65.896 başvuru) denetimli serbestlik uygulaması gereğince yönlendirildiği belirtilmektedir. Yine aynı yıl içerisinde yatarak tedavi edilmek durumunda kalan başvuran sayısının 13.841 olduğu ve bu sayının önceki yıla göre %10,7 düzeyinde bir artış gösterdiği dikkati çekmektedir [8].

Önemli sağlık sorunları, bulaşıcı hastalıklar ve komorbid klinik durumlarla seyreden madde kullanım sorunlarında en uç klinik nokta ölümdür. Türkiye'de madde bağımlılığına ikincil ölüm vakalarının sayısı 2013 yılında 232 iken bunun 2017 yılı sonuna kadar yükseliş trendi ile seyrederek, 941'e kadar ulaştığı ancak 2018 yılında ise bilimsel bir açıklamaya gereksinim duyulacak şekilde bir önceki

seneye oranla ölüm vakası sayılarında %30' civarında bir düşme meydana geldiği izlenmektedir (Şekil 2.2.) [8].



Şekil 2.2. Türkiye'de madde bağımlılığı ile ilişkili ölümler [8]

Ülkemizde madde kullanıcılarının yaklaşık 2/3'ü (%65) 15 ile 34 yaş arasında olup maddeye başlama yaş ortalamasının 19 olduğu görülmektedir. Diğer yandan, madde kullanımı nedeniyle tedavi ihtiyacı olanların neredeyse yarıya yakını 20 ile 29 yaş grubunda iken yaş ortalamalarının 27,2 yıl olduğu saptanmıştır [8].

AB ülkelerinde opiat kullanımı ve opiat kullanım bozukluğu oranı göreceli olarak azalırken Türkiye'de tedavi için hastaneye başvuran madde kullanıcılarının %54,8'nin (137826 kişi) opiat bağımlılığı bulunduğu, diğer yandan hastanede yatarak tedavi gören hastaların %61,8'nin (8555 kişi) opiat bağımlısı olduğu çok önemli bir sorun olarak karışımıza çıkmaktadır [6–8].

Yukarıdaki bilgiler bağlamında dünya genelinde önemli bir sorun teşkil eden opiat grubunun ana elemanı olan eroin ile ilişkili olay sayılarının ülkemizde de başı çeker nitelikte ciddi bir sağlık ve kriminal sorun olduğu görülmektedir. Nitekim Türkiye uyuşturucu raporunda da belirtildiği gibi Türkiye'de 2018 yılında 2017 yılına göre eroin ile ilişkili olay sayısında yaklaşık %41,5, diğer yandan yakalanan

şüpheli sayısında da %45,8 oranında bir artış gerçekleştiği dikkati çekmektedir [8,32].

2.2 Yaygın şekilde kullanılan uyuşturucu, uyarıcı maddeler ve değişim trendi

Dünya genelinde farklı ülkeler ve bölgeler arasında kullanılan uyuşturucu maddelerin kullanım paterni, kullanılan uyuşturucunun türü farklılık göstermekle birlikte, en yaygın şekilde kullanılan uyuşturucu gruplarının ve bu gruplar içindeki esas maddelerin dünyanın hemen her yerinde çoğunlukla aynı oldukları bunların arasında kannabinoidler, kokain, opiatlar, benzodiazepinler, amfetaminler, yeni nesil stimulanlar ve sentetik ajanların başı çektiği bilinmektedir [1,6,8].

Yoğun kullanımı olan maddeler arasında opiatların önemli bir yer tuttuğu ve sağlık açısından en çok zarar veren uyuşturucu maddeler arasında olduğu ifade edilmektedir [1]. AB ülkelerinde, son on yıl içerisinde opiat kullanımı ile bağımlılığında tedrici şekilde azalma olmakla birlikte ülkemizde opiat kullanımı ve bağımlılığı ile opiat ilişkili kriminal olayların yoğun şekilde artış gösterdiği dikkati çekmektedir [6–8]. Bu bağlamda opiatların ana elemanı olan eroin bu tez çalışmasına konu edilmiştir.

2.3 Opiatlar, Eroin ve Metabolitleri ve bunlara ilişkin genel değerlendirme

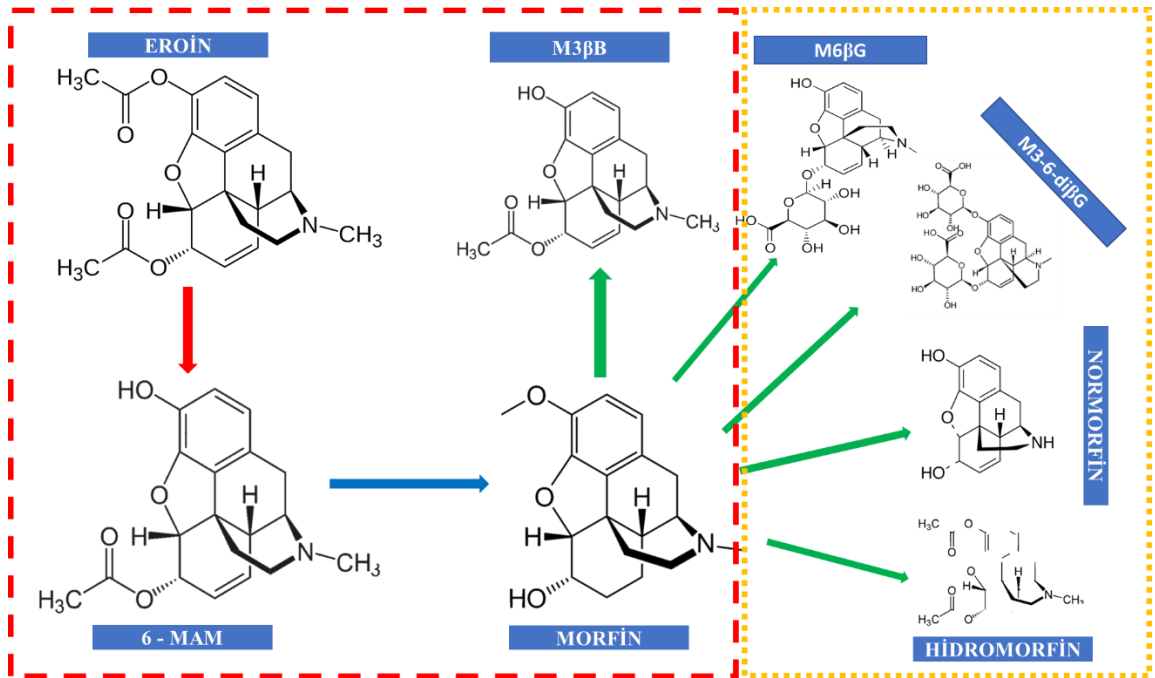
2.3.1 Opiatlar

Opiatlar veya opiatlar afyondan (Papaver somniferum) türetilen bir grup doğal alkaloid farmakolojik ajan ile aynı reseptörlere bağlanan bir grup sentetik ajanın genel ismidir. İleri derecede kötüye kullanım potansiyeli bulunan opiatlar tüm dünyada kötüye kullanımı yasaklı ve tüm dünyada madde kontrol programlarında dahil edilmişlerdir [3]. Yukarıdaki Dünya, Avrupa ve Türkiye uyuşturucu raporlarına yapılan atıflardan da anlaşılacağı gibi opiat kullanım bozukluğunun morbidite ve mortalite açısından en yüksek riskli durumlar arasında olduğu anlaşılmaktadır.

2.3.2 Eroin ve Metabolitleri

Eroin (diasetil/dia-morfin), morfin türevi olan yarı-sentetik bir afyon alkaloididir. Eroin vücuda alındığında çok hızlı şekilde endorfin benzeri rahatlama ve mutluluk hissi meydana getirir. Bağımlılık potansiyelinin yüksek olması ve farklı uyuşturucu, uyarıcı maddelerden daha hızlı tolerans geliştirmesi nedeniyle yüksek riskli maddeler arasında sınıflandırılmaktadır [33].

Suistimal amacıyla alınan eroin vücutta, plazma serbest esteraz enzimlerinin etkisi ile çok hızlı şekilde 6-Mono Asetil Morfin 6-MAM ve morfine metabolize olur. Bu ilk metabolizma basamağı kanda gerçekleştiğinden çok hızlı olmakta ve neredeyse 1-1,5 saat gibi kısa sürede sonlanmaktadır. Eroinin ikinci metaboliti konumunda oluşan morfin devamında karaciğerde UDP-glukronil-transferaz ile %75 düzeyinde Morfin-3-Beta-Glukuronid (M3B)'e metabolize olur. Geriye kalan kısmı Morfin-6-Beta-Glukuronid (M6B) ile Morfin-3-6-Beta-Glukuronide (M3-6B) metabolize olarak vücut sıvıları ile eksresyon basamağına geçer. Bunlara ek olarak metabolit olarak %5'ten daha az oranda da normorfin ve hidromorfin karşımıza çıkmaktadır [34]. Eroin metabolitleri şekil 2.3.'te gösterilmektedir.



Şekil 2.3. Eroin ve metabolitleri

2.4 Toksikolojik Analizlerde Kullanılan Numunelere Genel Bakış

Gelişen teknolojiye paralel olarak adli ve klinik toksikolojik incelemeler çok sayıda yeni yöntemler geliştirilmekte ve önceden sadece deneysel analizi gerçekleştirilen çeşitli vücut sıvıları rutin inceleme sistematiklerinde laboratuvarlarda yerlerini almaktadır.

Klinik toksikolojik analizler açısından Türkiye’de çoğunlukla idrar numunesinde kalitatif ön tarama testleri uygulanmaktadır. Diğer yandan az sayıda hastane bünyesinde immunoassay sistemleri ile konfirmasyona ihtiyaç duyulan az sayıda madde analizi için kullanılan kalitatif ya da semi-kantitatif sistemlerle idrar analizleri gerçekleştirilmektedir. Bunlara ek olarak çok nadiren hastane bünyesinde daha sofistike enstrümental analitik sistemlerde kan ve idrar numunelerinde toksikolojik analizler gerçekleştirilmektedir.

Adli toksikolojik incelemeler birçok alt sınıfa ayrılmakla birlikte burada sadece postmortem toksikolojik inceleme ve antemortem toksikolojik inceleme şeklinde iki bölüme ayırmak daha uygun olacaktır.

Postmortem toksikolojik analizler, bilindiği üzere ölüm sonrası incelemelerde ve özellikle de otopsi esnasında alınan numunelerin toksikolojik analizine dayanmaktadır. Bu durumda söz konusu numuneler otopsi materyali olduğundan hemen her dokunun postmortem toksikolojik analizi gerçekleştirilebilmektedir. Kan, idrar, vitröz sıvı, safra sıvısı, mide içeriği, saç/kıl ve solid organ örnekleri en sık analiz edilen numuneler olmakla birlikte; yağ dokusu, akciğer havası, enjeksiyon yapılmış deri ve çevre doku, kusmuk materyali, iskelet kası, kemik, kemik iliği, çürüme sıvısı, ceset üzerindeki böcek larvaları ve benzeri numuneler de toksikolojik analiz için alternatif olabilmektedir. Ancak bahsi geçen dokuların biyolojik ve fiziko-kimyasal çeşitliği dikkate alındığında bu analitik çatının ne denli kaotik olduğu anlaşılacaktır [35].

Antemortem toksikolojik analizler de adından da anlaşılacağı canlı bireyler de yapılan toksikolojik analizleri tanımlamaktadır. Adli vaka toksikolojisi, işyeri toksikolojisi, performans toksikolojisi, doping analizleri ve benzeri analizler sıkça

uygulanan başlıklardır. Bu analiz başlıklarında kullanılan numune duruma göre değişmekle beraber sıklıkla kan ve idrar kullanılmaktadır. Ancak bu durumlarda biyolojik sıvının örneklenmesi veya elde edilmesi için sağlık çalışanı ya da uygun güvenilir koşulların bulunması gerekmektedir. Bu analizler için de kullanılan sistemler acil sonuç alınması gereken durumlar ve saha koşulları açısından uygun olmadığı için alternatif yöntemlere ihtiyaç duyulduğu açıktır [36].

Saha toksikolojisi çalışmaları sıklıkla zorlu ve uygun olmayan koşullarda yakalanan maddelerin ne olduğunu anlamak için yapılan ön testler, trafik kontrol noktalarında yapılan alkol ve madde kullanım kontrolleri ve benzeri uygulamaları içermektedir. Kontrollerde kolluk güçleri tarafından yakalanan maddelerin analizleri açısından basit ön tarama testleri veya spektroskopik yöntemlerle yapılan analizlerin kriminal laboratuvarlarda konfirme edilmesi gerekmektedir. Diğer yandan trafik kontrollerinde yapılan toksikolojik analizlerde numune olarak nefes havası ve tükürük numuneleri kullanılmaktadır [37]. Bu iki örnekte de bireyin bedenine yönelik bir girişim ve sağlığına yönelik bir tehdit bulunmadığı dikkate alınarak çoğunlukla kolluğun yetkilendirilmiş olduğu görülmektedir. Mevcut durumda bu saha testlerinin birçok açıdan yetersiz, düşük özgüllükte ve konfirmasyona muhtaç olduğu bilinmektedir. Bu bilgiler üzerine adli vaka ve trafik kontrol testlerinin yerinde çözüme kavuşması ve hastane ya da kriminal laboratuvarlara yük oluşturmaması açısından yeni, hassas, kolay uygulanabilir, gelişime açık analitik yöntemlere ihtiyaç bulunmaktadır. Bu nedenle; bu tez çalışmasında, yukarıda bahsi geçen sorunların çözümü noktasında, diğer biyolojik numunelere üstünlükleri olduğu bilinen, girişimsel bir örnekleme yöntemi olmaması nedeniyle sağlık çalışanı dışındaki profesyoneller tarafından da alınıp analizi yapılabilen tükürük numunesinin çalışılması uygun görülmüştür.

2.4.1 Tükürüğün Toksikolojik Analizi

Tükürük numunesi, örneklemenin kolay olması, örnekleme için sağlık çalışanına ihtiyaç duyulmaması, sahada ve hastane dışı koşullarda kolay çalışılabilir nitelikte olması, içeriği bakımından diğer vücut sıvılarına göre daha basit olması nedeniyle analizinin kolay ve güvenilir olması ve benzeri nedenlerle öne çıkan bir toksikolojik numune olarak karşımıza çıkmaktadır [38].

Bu bilgiler ışığında tükürük numunesinin saha çalışmalarında kullanım açısından uygun olduğu görülmektedir. Tükürük numunesinin mevcut saha testleri ile analizi sonucunda elde edilen sonuçların kullanılan maddenin konsantrasyonunun tespiti açısından yeterli olmadığı, pozitif sonuç vermesi halinde de bir toksikoloji laboratuvarında doğrulanması gerektiği anlaşılmaktadır. Bu nedenle tükürük numunesinde uyuşturucu/uyarıcı madde analizi açısından Raman spektroskopinin olumlu sonuçlar vermiş olması bu çalışmaya konu edilen SERS analizlerinin çok daha değerli veriler sunacağı ve saha çalışmalarında alternatif analitik yöntemler için bir basamak olacağı düşünülmektedir. Tükürüğün toksikolojik analizinin diğer biyolojik numunelere göre çok belirgin avantaj ve üstünlükleri bulunmaktadır (Şekil 2.4.)



Şekil 2.4. Tükürükte toksikolojik analizinin diğer biyolojik numunelere göre üstünlük ve avantajları

2.5 Uyuşturucu ve uyarıcı madde analizlerinde kullanılan mevcut analitik sistemlere ilişkin değerlendirme

Adli ve klinik toksikoloji alanında da sık kullanılan bu uyuşturucu ve uyarıcı maddelerin enstrümantal analizleri çok önemli yer tutmaktadır. Mevcut analitik yaklaşımlarda adli ve klinik toksikolojik analizlerde Temel immünassay sistemleri, Enzimatik Analiz Sistemleri, HPLC, GC-HS, GC-MS, GC-MS/MS, LC-MS, LC-MS/MS ve her gün bir yenisi ortaya çıkan çok daha komplike sistemler kullanılmaktadır [39].

Bunlardan, Cloned Enzyme Donor İmmunoassay (CEDIA), Enzyme-linked sorbent immunoassay (ELISA) vb. sistemler özellikle laboratuvar imkanları kısıtlı sağlık merkezlerinde ön test veya sınırlı sayıda ilaç etken maddesi ile uyuşturucu-uyarıcı madde analizinde kalitatif veya semi kantitatif açıdan tarama testi olarak tercih edilmektedir. Bu yöntemler kapsamlı enstrümantal analitik sistemlere göre daha hızlı yöntemler olmakla beraber benzer moleküler yapıdaki ajanlarla çapraz reaksiyon oluşabilmesi nedeniyle yanlış pozitif sonuçlarla karşılaşılabilmekte ve bu nedenle alınan pozitif sonuçlar i daha komplike analitik sistemlerle sonucun doğrulanması gerekmektedir. Diğer yandan, bu tarama testleri ile literatürde yanlış negatif sonuçlar alındığına dair çalışmalar da bulunmaktadır [40–43].

Adli toksikoloji laboratuvarlarında rutin kullanımda yer bulan komplike enstrümantal analitik sistemlerle daha güvenilir sonuçlar elde edilmekle birlikte bu sistemler teknik ve pratik açıdan başkaca sorunlarla karşımıza çıkmaktadır. Daha komplike olan bu analitik sistemlerin kullanımı noktasında sisteme hakim olan eğitimli personel, detaylı n analiz, ekstraksiyon ve analiz süreçlerinde kullanılmak üzere yoğun sarf malzemesi, kimyasallar ve laboratuvar ekipmanları ile bolca zamana gereksinim duyulmaktadır. Ancak gerek eğitimli personelin azlığı, gerekse teknik ve analitik açıdan uygun fiyat fayda dengesinde olmamaları nedeniyle ülkemizde sınırlı sayıda adli toksikoloji laboratuvarında yerleşik bulunan bu sistemlerin klinik toksikoloji laboratuvarlarında kullanımlarının çok kısıtlı olduğu, hastane merkez laboratuvarlarında da neredeyse hiç kullanılmadıkları bilinmektedir [44].

Söz konusu enstrümantal analitik sistemlerin kullanımı ile gerçekleştirilen toksikolojik analizlerde alınan örneğin ön hazırlık aşamaları, katı veya sıvı faz ekstraksiyonu, ihtiyaca göre türevlenmesi, ekstraktın viallenmesi ve enstrümantal analiz basamaklarından geçmesi gerekmektedir. Çoğu toksikolojik analizde kimyasal özellikleri farklılık gösteren toksik grupların analizi için aynı örneğin birden fazla kez farklı yöntemlerle ekstraksiyon basamağından geçirilmesi ihtiyacı da söz konusudur. Sayılan nedenlerle, kan başta olmak üzere vücut sıvıları (idrar, tükürük) veya çeşitli alternatif numunelerde (kıl, tırnak vb.) sınırlı sayıda uyuşturucu veya uyarıcı maddenin toksikolojik analizinin yapılması, değerlendirilmesi ve yorumlanması/raporlanması birkaç saat alabilmektedir. Farklı gruplarda çoklu uyuşturucu ya da uyarıcı maddenin miktarının tespiti açısından analiz yapılması halinde de çalışma süresi, harcanan emek ve sarf malzeme gideri artacak bazen de farklı bir analitik sisteminin kullanılması gerekecektir [45]. Bu durumda özellikle acil servislerde hızlı tanı konulması bekleyen hastalar açısından kritik olan tıbbi müdahale sürecinin önemli ölçüde gecikeceği, kolluğun ihtiyaç duyduğu raporlama sürecinin uzayacağı ve yargısal işlemlerin gecikeceği aşikardır.

Adli tıp ve adli bilimler alanındaki önemli sorunlardan biri de çalışılacak numunenin çok az miktarda olması, olay yerinde örneklenemeyecek yüzeye adsorbe olmuş bir şekilde bulunması ve beklemiş biyolojik sıvıların kuruması ile fragmente olmuş küçük partiküller şeklinde elde edilmesi ve böylelikle analiz açısından yetersizliğidir. Bazen yeterli miktarda numune elde edilmediği halde bile bu numunenin şahısların kimliklendirilmesi ve madde etkisi altında olup olmadıklarının tespiti açısından genetik ve toksikolojik inceleme için birden fazla analizde kullanılması önem arz etmektedir. Bu sorunun üstesinden gelmek için, son zamanlarda, mikro-akışkan ve Raman Spektroskopik yöntemler dahil olmak üzere, numuneye zararsız olan ve bir analiz sonrasında numunenin başka analizde kullanılmasına olanak tanıyan yöntemlerle ilgilenen bir dizi çalışma gerçekleştirilmektedir [21–23]. Bu açıdan, numuneye nispeten zararsız, gelecek vaat eden bir sistem olarak SERS diğer yöntemlere göre birçok avantaja sahiptir.

Sunulan bilgiler bağlamında yukarıdaki komplike analitik sistemlerin acil servis koşullarında klinik toksikoloji laboratuvarlarında kullanımlarının fiyat-fayda etkin olmayacağı anlaşılmaktadır. Bu bağlamda özellikle acil servise kabul edilen intoksikasyon veya aşırı doz mağduru hastalara ait vücut sıvısı örneklerinin analizi için yeni, hızlı, ucuz, uygulaması kolay olan alternatif bir analitik yöntem ihtiyacı olduğu açıktır. İdeal olarak acil koşullarda kullanım için bir cihazın kullanımının kolay, mümkünse taşınabilir ve hasta başı ya da laboratuvarında hızlı analiz yapabilecek nitelikte olması gerekmektedir.

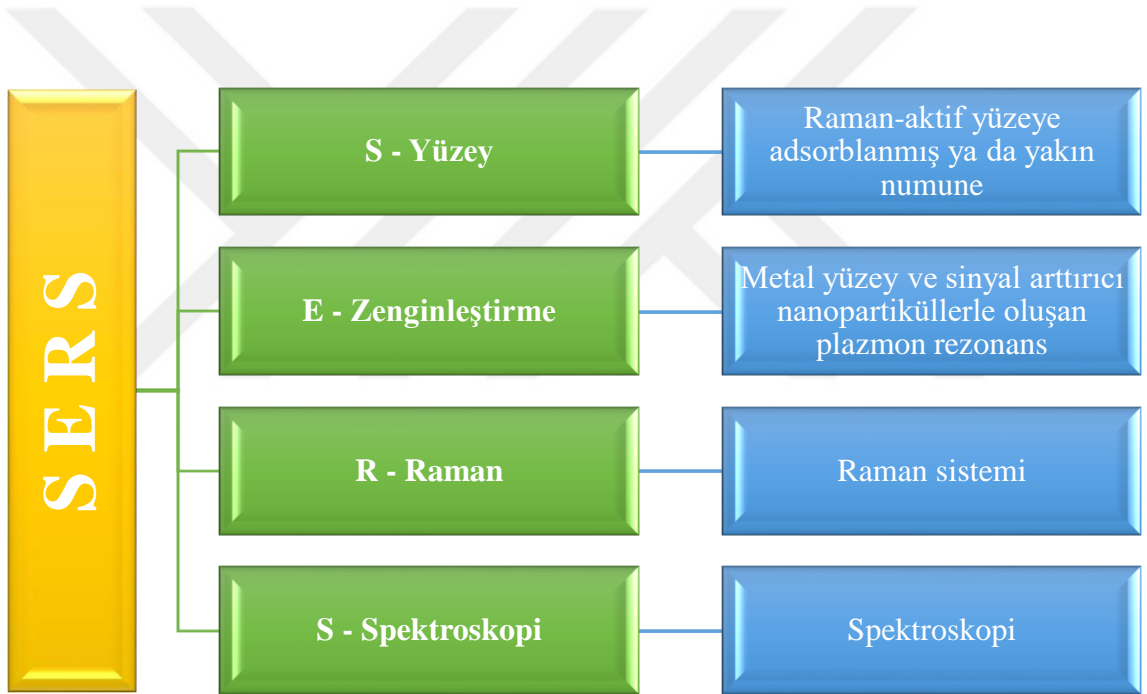
2.6 Raman Spektroskopisi

Raman spektroskopisi yaklaşık yüz yılı aşkın bir süredir temel bilimler tarafından kullanılan, temeli ve teorisi çok iyi bilinen bir analitik yöntemdir. Gelişen teknoloji ile paralel olarak yöntem sürekli geliştirilmiş, yeni spektroskopik yaklaşımlar ortaya konmuştur. Çok iyi bilinen bu spektroskopik yöntemi burada kısaca tanımlamak yeterli olacaktır. Raman spektroskopisi, temelde moleküler yapılarda düşük frekanslı vibrasyonel modları incelemek için kullanılmıştır. Raman spektroskopik sistemlerde genellikle görünür, yakın kızılötesi ya da yakın ultraviyole aralığında bir lazerden gelen tek renkli bir ışık kaynağı kullanılmaktadır. Kullanılan ışık herhangi bir molekül ile etkileşime girdiğinde, fotonların büyük çoğunluğu aynı enerjide dağılır ki bu elastik ya da Rayleigh saçılması olarak tanımlanmaktadır. Ancak fotonların çok küçük bir kısmı farklı bir frekansta saçılmaktadır ki buna elastik olmayan saçılma ya da Raman etkisi denmektedir. Bu verilerin işlenmesi ile Raman spektroskopisi bir molekülün vibrasyonel imzasının belirlenmesine, etrafındaki diğer moleküllerle nasıl etkileştiğinin anlaşılmasına ve böylelikle analiz edilen maddenin yapısal imzasının ortaya konmasına olanak tanır [46].

Farklı numuneleri inceleme, farklı alanlarda kullanım ve daha yüksek hassasiyet ve hız elde etme ihtiyacı nedeniyle çeşitli Raman spektroskopisi varyasyonları geliştirilmiştir.

2.6.1 YüzeY Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopisi (Surface Enhanced Raman Spectroscopy, SERS)

YüzeY zenginleştirilmiş Raman spektroskopisi (SERS), Raman saçılmasını yoğunlaştıracak şekilde plazmon rezonans oluşturmak amacıyla tasarlanan Raman-aktif pürüzlü metal yüzeY ve bunun etkisini daha da arttıracak olan sinyal arttırıcı altın veya gümüş nanopartiküllerin kullanımına dayanmaktadır. Bu sistematikle Raman etkinliğinin 10^{10} ile 10^{11} oranında zenginleştirilebildiği ifade edilmektedir [47]. Bu noktada SERS ile çok daha düşük miktarda maddenin kimliklendirilmesi veya çok küçük konsantrasyonlarda analit içeren numunelerin analizinin mümkün olduğu görülmektedir. SERS yöntemini oluşturulan bileşenler şekil 2.5.'te gösterilmiştir.



şekil 2.5. SERS yönteminin temel bileşenleri

Yukarıda sunulan bilgiler bağlamında; yaygın şekilde suiistimal edilen uyuşturucu, uyarıcı ve tıbbi maddelerin analizinde sorunlar olduğu, mevcut analitik sistemlerin özellikle acil servislerde ve kolluk tarafından saha koşullarında kullanılması gereken durumlar açısından uygun olmadığı, ekstraksiyon ve uzun analiz süresi nedeniyle tanı ve tedavi sürecinde gecikmeler yaşandığı anlaşılmaktadır. Bu noktada yeni bir analitik yöntem olarak SERS kullanımının

göreceli olarak daha kolay, daha hızlı, modifikasyonlara açık ve daha hassas hale getirilmeye açık olması nedeniyle kullanılabilceği aşikardır.

2.7 Uyuşturucu ve uyarıcı madde analizlerinde alternatif bir analitik yöntem olarak Raman Spektroskopisi

Literatürde çeşitli uyuşturucu ve uyarıcı maddelerin farklı formlarının analizinde Raman spektroskopinin, çalışılan numunelere zarar vermeksizin tanımlama (identifikasyon) amacıyla kullanılabildiği ve hassas şekilde güvenilir sonuçlar elde edildiği ifade edilmektedir. Söz konusu çalışma kapsamında kokainin farklı kararlı formları olarak “Sarı freebase paste, Beyaz freebase paste, Crack rock, Kokain HCl tozu ve Freebase kokain tozu”na ait Raman imzaları tanımlanmıştır [48]. Bu bilgiler ışığında sokakta kolluk kuvvetleri tarafından yakalanan veya olay yerinde tespit edilen uyuşturucu maddelerin saha testlerine uyarlanabilen Raman spektroskopisi ile kolayca ve hızlı şekilde analiz edilebilecekleri anlaşılmaktadır.

Farquharson S. et al., 2011 yılında yayınlanmış olan çalışmasında recovery çalışması niteliğinde vücut sıvısı olarak salivaya eklenen 150 uyuşturucu, uyarıcı ve farmasötik ilaç ve metabolitleri için SERS kullanılarak çok hassas şekilde analiz yapılabildiği ve bir kütüphane geliştirildiği belirtilmiştir. Diğer yandan, bu yöntemle çok sayıda etken maddenin 10 dakika gibi kısa bir surede, portable bir sistemle analiz edilmesi çok önemli bir ayrıcalıktır [21].

Son yıllarda, Dünyanın hemen her yerinde gençler arasında sentetik kannabinoid (halk arasındaki isimleri ile Bonzai, K2, Spice, Jamaika vb.) kullanımının çok hızlı bir artış gösterdiği bilinmektedir. Bu sentetik maddelerin çeşitli bitkilerin üzerine spreylenecek doğal bitki gibi gösterildiği bu nedenle masum bir sigara türü olarak çocuk, ergen ve genç erişkinlere sunulduğu dikkati çekmektedir. Öte yandan fiyatların çok ucuz olması nedeniyle ülkemizde de kullanım oranlarının her geçen gün yükseldiği, kullanım yaşının düştüğü, kişi bazında da kullanım miktarı ile gün içi kullanım frekansının arttığı görülmektedir. Yaklaşık 200’ü aşkın türünün olması, kimyasal açıdan çok kolay modifiye edilebilmeleri nedeniyle kolluk kuvvetleri tarafından yakalanma oranlarının yeterli olmadığı, bunun yanı sıra, geniş kimyasal çeşitlilik/spektrum ve bu sentetiklerin çok seri şekilde modifiye

edilmeleri nedeniyle sınırlı sayıdaki adli ve klinik toksikoloji laboratuvarlarının da teknik açıdan analiz konusunda başarılı olamadıkları görülmektedir [49].

Mevcut analitik sistemlerle toksikoloji laboratuvarlarında sentetik kannabinoidlerin analizi için standart madde alınması, tespit düzeyi (LOD) ve miktarlandırma düzeyi (LOQ) belirlenmesi, kalibrasyon yapılması ve çok sayıda madde için kütüphane oluşturulması gerekliliği göz önüne alındığında yöntem kurma ve güncelleme sürecinin çok uzun olacağı, her bir analiz için maliyetin çok yüksek olacağı, analiz süresinin uzun zaman alacağı anlaşılmaktadır. Bahsi geçen sentetik kannabinoid maddeleri açısından yasaklı maddelerin listesinin hazırlanması için sayılan tüm işlemlerin gerçekleştirilmesi ve ulusal/uluslararası kolluk sistemlerine tanıtılması gerekmektedir. Sentetik maddeler söz konusu olduğunda hızlı bir modifikasyon çalışması ile bir madde henüz yasaklı listesine girmeden basit bir kimyasal işlemle minimal modifikasyonla farklı bir madde şeklinde piyasaya sunulmaktadır. Bu noktada rutin toksikoloji laboratuvarlarında mevcut analitik sistemlerle sentetik kannabinoid analizi yapmanın cost-effective olmayacağı açıktır. Mostowtt T. ve McCord B. 2017 çalışmasında SERS kullanımı ile en yaygın suistimal edilen dört sentetik kannabinoidin simule idrar örneğinde kolaylıkla ve hassasiyeti yüksek şekilde analiz edilebileceği gösterilmiştir [50].

SERS'i alternatif bir analitik yöntem olarak LC-MSMS ile karşılaştırma noktasında, Selbes YS. et al., (2016) tarafından idrarda eritropoietin analizi için yapılan bir çalışmada SERS'in konvansiyonel LC-MSMS'e göre analiti çok daha düşük düzeylerde saptayabildiği, daha hassas ve daha doğru sonuç verdiği tespit edilmiştir [51].

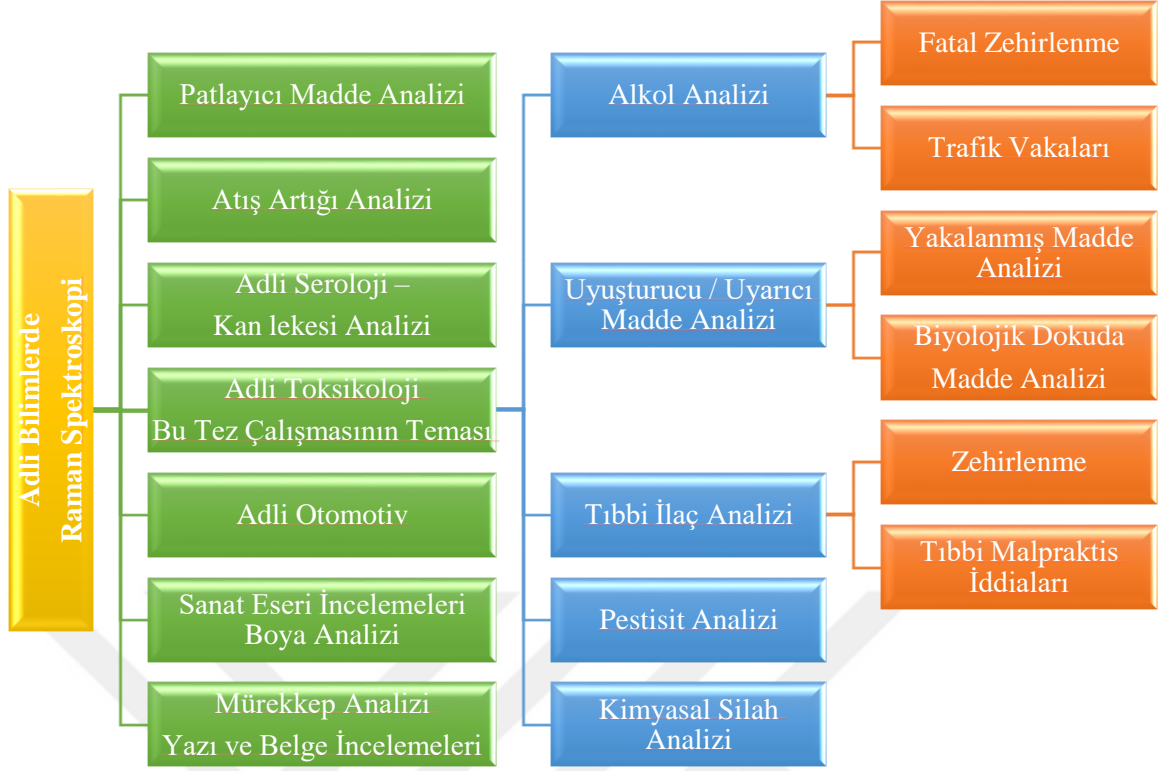
Yukarıda sunulan literatür verileri ışığında Raman spektroskopinin uyuşturucu ve uyarıcı maddelerin kararlı formlarında veya bir organizmada metabolize edildikten sonra o organizmanın vücut sıvıları ve dokularında analizi, tanımlanması, miktarlandırılması açısından ucuz, hızlı, hassas, güvenilir, kullanımı kolay bir alternatif yöntem olarak kullanılabilme potansiyeli olduğunu göstermektedir. Bu noktada söz konusu uyuşturucu ve uyarıcı maddelerin

Raman spektrumlarının elde edilmesi, kütüphanelerinin oluşturulması ve analiz yöntemi validasyonu ile acil koşullar başta olmak üzere her koşulda kullanılabileceği anlaşılmaktadır.

2.8 Adli Tıp ve Adli Bilimlerde Raman Spektroskopi Uygulamaları

Son yıllarda, sağlık bilimleri dahil birçok farklı disiplinde olduğu gibi, Adli Bilimlerinin alt dallarında kullanımı ile ilgili artan sayıdaki çalışmalar göz önüne alındığında; Raman Spektroskopinin adli bilimlerde umut verici bir analitik araç haline geldiği dikkati çekmektedir. Raman spektroskopisinin intraoperatif tanısal kullanımına ilişkin çalışmaların yanı sıra sağlık hizmetlerinde in vitro diagnostik testler de artış göstermektedir [52,53]. İlgili literatürde Raman spektroskopiyeye dair en belirgin tanımlama özellikle hızlı ve ucuz bir tanı yöntemi olarak tanımlamasıdır [54,55].

Adli Tıp ve Adli Bilimlerde Raman Spektroskopi, hızlı analiz yaparak hızlı sonuç vermesi, yüksek duyarlılığı, yüksek özgüllüğü ve fiyat-fayda etkinliği sayesinde son yıllarda yapılan çalışmalarda alternatif bir analitik yöntem olarak popülerlik kazanmaya başlamıştır [11,56]. Raman Spektroskopisinin kullanım spektrumu, Adli Bilimlerin tüm disiplinlerindeki çalışmalar açısından genişlemektedir (şekil 2.6.).



Şekil 2.6. Raman spektroskopinin adli bilimlerde kullanım alanları

Adli bilimler arasında adli seroloji, Raman Spektroskopisinin kullanıldığı çalışmaların sayısı ve periyodu bakımından ilk sırada yer almaktadır. Bu alanda Lednev ve ark. tarafından yapılan çalışmalar literatürde dikkate değer bir yere sahip olmuştur [57,58]. Bir biyolojik numunenin doğasını ve kaynağını belirlemek, olay yerinden toplanan biyolojik bir sıvının araştırılmasının ilk adımlarından biridir. Raman spektroskopinin numuneye fiziko-kimyasal zarar vermeden çok az miktarda numune ile herhangi bir biyolojik sıvıyı analiz etme ve ayırt etme yeteneğine sahip olduğu ortaya konmuştur [11,14,15,18,19,57–59].

Patlayıcı maddelerin analizi, saha çalışmalarında, aramalarda ve patlama olayları sonrasında yapılan laboratuvarında analizlerinde dikkat gerektiren bir çalışmadır [60,61]. Raman spektroskopisi, eser miktardaki partikülleri kimliklendirebilmesi ve belirli bir mesafeden uygulanabilmesi nedeniyle güvenli, el-tipi cihaz olması nedeniyle saha çalışmalarına da uygun ve hızlı sonuç vermesi nedeniyle patlama olaylarının seri şekilde analizinde değerlidir [13,62–64].

Raman Spektroskopisi ile ateşli silah artığı analizi, üzerinde birçok çalışmanın yayınlandığı başka bir alandır. Ancak Raman Spektroskopinin bu konuda organik ve inorganik artık analizinde mevcut yöntemlere katkı sağlayacak üstünlükte olmadığı anlaşılmaktadır [65,66].

Raman Spektroskopisinin etkin bir şekilde kullanıldığı diğer adli bilimler arasında; Adli Otomotiv veya olay yeri malzemelerine dair boyaların spektral incelemeleri [67–70], mürekkep değerlendirmesi ile yazı, imza ve ile adli belge analizleri [71,72] ve sanat eserlerinin gerçekliğini belirlemek için boyanın analizi [73,74] yer almaktadır.

Adli Tıp ve Adli Patoloji alanında, Raman Spektroskopisi potansiyeli henüz tam olarak anlaşılmamış ve henüz bir çalışma alanı bulamamış bir teknik olmaya devam etmektedir. Bununla birlikte, Klinik Patoloji çalışmalarında, farklı dokuların histo-patolojik özelliklerinin Raman Spektroskopisi ile kolaylıkla ayırt edilebileceği gösterilmiştir [75,76]. Literatürde travmatik durumların bile Raman Spektroskopisi ile değerlendirilebileceği gösterilmiştir [77]. Raman Spektroskopisinin önemli ölçüde fiyat-fayda etkinliği ve hızlı analizi, ameliyathanedeki değerlendirmeler için anında tanı yöntemi olarak kullanılmasına olanak sağlamaktadır [75,78–80] Bu veri aslında Raman Spektroskopisinin otopsi odalarında da otopsi esnasında veya sonrasında tanı yöntemi olarak kullanılma potansiyelini göstermektedir.

2.8.1 Adli ve Klinik Toksikolojide Raman Spektroskopi Uygulamaları

Adli Toksikoloji, Raman Spektroskopisinin analitik bir yöntem olarak kullanıldığı başlıca alanlar arasında yer almaktadır. Raman Spektroskopik yöntemler çok az miktarda numune gerektirmesi, örneğe göreceli olarak zarar vermemesi ve az miktardaki materyal üzerinde tekrarlı analizlere olanak sağlaması nedeniyle adli toksikolojik araştırmalarda birincil yöntemler arasında girme noktasında ümit vaat etmektedir [56,81,82].

Bir bilimsel çalışma grubu olan “Scientific Working Group for the Analysis of Seized Drugs” (SWGASD) [83] 2019 raporunda Raman Spektroskopisi, yüksek seçiciliği ve yapısal bilgi sağlaması nedeniyle “A grubu” analitik yöntemlere dahil

edilmiştir. Bununla birlikte, adli toksikolojik incelemelerin çoğu sadece maddenin belirlenmesini değil, aynı zamanda biyolojik numunelerdeki madde konsantrasyonunun da ölçülmesini teşkil etmekte ve analiz edilecek maddeler genellikle ele geçirilenler dışındaki birçok tedavi edici ilaç veya pestisit türünü de içermektedir [84].

2.8.1.1 Alkol

Alkol, sağlık sistemi üzerinde maliyet ve iş yüküne neden olan kötüye kullanımı yaygın olan başlıca maddeler arasında sayılmaktadır [85–88]. Hem biyolojik numunelerde hem de içeceklerde etanolün kantitatif tayini önemlidir. Benzer şekilde, alkollü içeceklerde bir süre sonra oluşabilecek veya kaçak alkollü içeceklerin üretiminde kullanılan, toksisitesi ciddi morbidite ve mortaliteye neden olan metanolün kantitatif analizi büyük önem taşımaktadır [89,90]. Boyacı et al. [91], iç standart olarak asetonytril kullanarak Raman Spektroskopisi ile çeşitli alkollü içeceklerde kantitatif etanol ve metanol seviyelerini belirlemişlerdir. Yakın zamanda yapılan bir çalışma, farklı alkollü içeceklerdeki metanol seviyelerinin El-tipi Raman Spektroskopisi cihazı ile kolayca ölçülebileceğini de göstermiştir [92].

2.8.1.2 Uyuşturucu ve Uyarıcı Maddeler

Raman Spektroskopik çalışmalarının Adli Toksikoloji uygulamaları alanındaki en büyük yansıması, şüpheli materyalden yasa dışı ilaçların tespiti olarak görünmektedir. Bu bağlamda, yasadışı uyuşturucuların hem nitel hem de nicel analizi için literatürde çok sayıda öne çıkan çalışma bulunmaktadır [59,81].

SERS ile arttırılan hassasiyetin bir sonucu olarak, Raman Spektroskopisi Adli Toksikoloji laboratuvarlarında her geçen gün daha fazla alan bulacağı düşünülmektedir. Farklı Raman-aktif substratlar tasarlayarak, farklı ilaç türlerinin Raman Spektroskopisi ile daha duyarlı, seçici ve spesifik bir şekilde tanımlanabileceği belirtilmektedir [48,59,93–97].

Sulk ve ark.1999 yılında gümüş yüzey üzerinde 2-merkaptonikotinik asit ile türetildikten sonra metamfetamin ve amfetamini SERS ile kantitatif olarak analiz ettiklerini belirtmişlerdir [98].

Inscore ve ark. [22] 2011 yılında SERS ile dünya çapında en yaygın olarak kötüye kullanılan 80 yasa dışı ilaç veya metaboliti üzerinde çalıştı. Aynı yıl içinde 152 yasadışı ve reçeteli ilaç ve metabolitleri SERS ile analiz edilmiştir.

Yeni psikoaktif maddelerin günlük olarak sentezlendiği ve dağıtıldığı bir dünyada, bu maddelerin serbest dağıtımını ve satışını önlemek için hızlı bir şekilde tespit edilerek yasaklı maddeler listesine eklenmesi bir zorunluluktur [99]. Literatürde, Raman Spektroskopisinin benzer fonksiyonel gruplara sahip maddeleri veya izomerlerini, kimyasal olarak modifiye edilmiş olsalar bile tespit edebildiğini ortaya koymuştur [100–102].

Adli Toksikolojik analizlerde analizi yapılacak madde olay yerindeki kumaş materyaller üzerinde leke olarak bulunabilir. Bir çalışmada kumaş lifleri arasındaki kokain ve metilen dioksimetamfetaminin ekstraksiyona gerek kalmadan Raman Spektroskopi ile tespit edilebildiği ve bu analizin doğal kumaş, sentetik kumaş veya boyalı kumaş türlerinde başarıyla tekrarlanabildiği anlaşılmıştır [103].

Farklı ve yaygınlaşan bir yasaklı madde grubu olan sentetik kanabinoidlerin analizinde başarılı Raman spektroskopi çalışmaları da bulunmaktadır [50,103–105].

2.8.1.3 Terapötik İlaçlar ve Diğerleri

Tıbbi tedavilerde kullanılan birçok ilaç için; bu ilaçların yan etkileri, kimyasal etkileşimleri veya aşırı dozları ile ilgili ölüm araştırmalarında veya tıbbi uygulama hatası iddialarının değerlendirilmesinde analiz konusu olabilmektedir [84,106]. Bu noktada Raman spektroskopi ile ilaç kimliklendirilmesi veya miktarlarının ölçümüne, pestisitlerin analizlerine ve kimyasal savaş ajanlarına dair çalışmalar bulunmaktadır. Tıbbi amaçlı kullanılan çeşitli ilaçlar ve analizlerinde kullanılan yöntem çizelge 2.1.'de sunulmuştur.

Çizelge 2.1. SERS ile kimliklendirmesi yapılan çeşitli tıbbi ilaçlar

Çalışılan İlaç	Raman Yöntemi	Kaynak
Tıbbi ilaçlar (152 adet)	SERS	[21]
5-Fluorouracil	SERS	[25]
Papaverin	SERS	[107]
Süksinilkolin (idrar)	SERS	[108]
Dopamin, Pergolid	SERS	[109]
Propranolol (kan ve idrar)	SERS	[110]

Tarımsal ürünlerde pestisit kalıntılarının saptanmasında Raman Spektroskopisinin kullanılması önerilmektedir [111]. Kimyasal savaş ajanlarının çoğu çok küçük miktarlarda bile ölümcül etkilere neden olabileceği dikkate alındığında; Raman Spektroskopisi, çok az numune gerektirmesi nedeniyle biyogüvenlik ve laboratuvar güvenliği açısından değerli bir yöntem olarak öne çıkmakta ve ayrıca numuneyi cam kaptan açılmadan analiz etmesine olanak sağlamaktadır [112].

Raman Spektroskopi, saha çalışmalarında ve yakalanan maddelerin analizinde yerini almaya başlamasına rağmen, teorik yetersizlik nedeniyle biyolojik örneklerin analizinde hala yeterli şekilde kullanılmamaktadır. Bu durumun temel nedenleri, biyolojik örneklerin kantitatif analizini yapan çalışmaların hala istenen sayı ve seviyede olmaması, profesyonellerin mevcut laboratuvarlarda olağan düzenden sapmalara karşı direnci ve sonuçların tekrarlanabilirliğinin düşük olmasıdır. Raman Spektroskopisi, adli toksikolojik çalışmalarda daha sık kullanılmaya başlanmış olsa da rutin analizlerde kullanımını yaygınlaştırmak için biyolojik örneklerin kullanıldığı çalışma sayısının artırılması, yakalanan uyuşturucu-uyarıcı maddelerin Raman imzalarının tespitinin yanı sıra standart materyallerle yapılan konsantrasyon ölçümü çalışmalarının yapılması ve valide yöntemlerin geliştirilmesi gerekmektedir.

Bu çalışmada, dünya genelinde yaygın şekilde suiistimal edilen uyuşturucu maddeler arasında başı çeken maddelerden biri olan eroin analiz edilmiştir. Vücuda alındığı andan itibaren hızla metabolize edilerek Morfin, M3B, 6-MAM, M6B ve M3-6B'ya dönüşmektedir. Bu metabolitlerin sadece %5'inden daha azı M6B ve M3-6B'ya dönüştüğü için bu iki metabolitin çalışılması fiyat-fayda dengesi açısından uygun bulunmadığı için çalışmaya alınmamıştır. Eroin vücutta çok hızlı metabolize olduğundan, kullanılan maddenin belirlenmesinde metabolitlerinin analizi çok önemli bir yer teşkil etmektedir. Eroin ve metabolitlerinin analizinde kullanılan rutin analitik sistemler, özellikle çok acil klinik tanı ve raporlama ihtiyacı, saha çalışmaları ve kolluk denetimlerinde kullanım açısından uygun değildir. Her şeyden önce mevcut koşullarda bir laboratuvar gerekliliği, yanı sıra ekstraksiyon ve uzun analiz süresi bir alternatif ihtiyacını ortaya koymaktadır. Bu değerlendirme bağlamında kullanımı daha kolay, daha hızlı, modifikasyonlara, geliştirilmeye ve daha hassas hale getirilmeye açık olması nedeniyle; hızlı klinik ve adli toksikoloji ve saha analizleri açısından yeni ve alternatif bir analitik yöntem olarak SERS kullanımı ile tükürük numunesinde eroin ve metabolitlerinin analizi açısından yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1 Çalışmanın Tasarımı

Çalışmaya başlarken tüm analizlerde standardizasyon açısından, opiat grubu analizleri için en uygun ve Raman-aktif olma noktasında en üstün SERS analizi için uygun nano yüzeyi tespit edebilmek için eroin ve metabolitleri de dahil olmak üzere diğer birçok opiat ile benzer kimyasal yapıya sahip olduğundan morfin monohidrat (MM) kullanıldı. Metanol içinde standart malzeme olarak alınan MM 250, 500 ve 1000 ppm konsantrasyonlarını elde etmek için metanol ile seyreltildi. Bu konsantrasyonlar, birbirleri için kontrol olarak kullanıldı. Seyreltilmiş MM çözeltileri 1: 1 hacimde gümüş nanopartikül (AgNP) kolloidleri ile karıştırıldı ve vortekslendi. AgNR'ler, altın nanopartikül (AuNP) / nanoselüloz yüzey, AuNP / polianilin yüzey, TLC silika jel yüzey ve altın nanorod (AuNR) yüzey üzerine 125, 250 ve 500 ppm MM konsantrasyonlarında 2 µL nihai solüsyon damlatıldı. On dakikalık bir inkübasyon süresinin ardından, her numunenin en az 5 farklı alanından SERS spektrumları elde edildi. Cihaz parametreleri şu şekilde ayarlandı: 10x objektif, 30 µm lazer odak boyutu (laser spot size), 150 mW lazer gücü (laser power) ve 40 s edinim (acquisition time) süresi. Tüm ölçümler için taban çizgisi (baseline) düzeltilmesi yapıldı.

Bu çalışma ile opiat analizi açısından en uygun yüzeyin AuNR olduğu, analiz parametrelerinin optimum olduğu tespit edilerek, opiat analizi açısından konsantrasyon ve intansite ilişkisi değerlendirildi. Akabinde bu işlem eroin ve metabolitleri açısından öncelikle ilgili maddenin Raman imzasını gösteren spektrum eldesi, devamında konsantrasyon-intansite ilişkisi, metod validasyonu basamakları gerçekleştirildi ve kör analiz süreci uygulandı. Kör analiz sonuçlarının simule numuneler açısından uygunluğu dikkate alınarak Raman spektra metadatasının kayıt aşamasında aktarıldığı Excel formülasyon tanıtımı ile analiz gerçekleştikten hemen sonraki kayıta intansiteye göre çalışılan eroin veya metabolitinin konsantrasyonunun belirlenir olması sağlandı.

3.2 Kimyasal Maddeler

Deneyleerde, rutin analitik yöntem oturtma işlemleri ile toksikolojik çalışmalarda sertifikalı standart maddeler ve gradient düzeyde kimyasallar kullanıldı.

Laboratuvar analizlerine uygun nitelikte Metanol ve LC-grade Asetonitril Merck KGaA'dan (Darmstadt, Almanya) satın alınmıştır.

Toz halinde, %99,8 saflıkta eroin standart maddesi, Morfin monohidrat (MM) 1.0 mg / mL metanol içinde kalibre edilmiş standart çözelti, 6-Monoasetil-morfin (6-MAM) 1.0 mg / mL metanol içinde kalibre edilmiş standart çözelti ve morfin-3- β -glukuronid (M3B) 1.0 mg / mL metanol içinde kalibre edilmiş standart çözelti Lipomed AG'den (Arlesheim, İsviçre) satın alınmıştır.

Anilin (C₆H₅NH₂) Sigma-Aldrich Chemie GmbH'den (Taufkirchen, Almanya) satın alınmış olup ve kullanılmadan önce vakum altında damıtılmıştır.

Lityum perklorat (LiClO₄) Sigma-Aldrich Produktions GmbH'den (Steinheim, Almanya) satın alınmıştır.

Nanoselüloz, hidroksilamin hidroklorür (NH₂OH.HCl) ve hidrojen tetrakloroaurat (HAuCl₄) Sigma-Aldrich Chemie GmbH'den (Taufkirchen, Almanya) satın alınmıştır.

Polietilen glikol (PEG) 400, Metanol, Gümüş nitrat (AgNO₃) ve Sodyum hidroksit (NaOH) Merck KGaA'dan (Darmstadt, Almanya) satın alınmıştır.

Ultra saf su ve deiyonize su (18.1 M Ω) Mes Mp Minipure su sistemi (Ankara, Türkiye) kullanılarak elde edildi.

3.3 Kullanılan Cihazlar

Deneyleer sırasında, SERS ölçümleri için Raman spektrofotometre (Delta Nu Reporter Portable Raman Spectroscopy), santrifüj cihazı (Eppendorf), deiyonize su cihazı (MP Minipure), ultrasonik banyo cihazı (Bandelin Sonorex), vortex, hassas terazi (Shimadzu), pH metre (SX-610 Pen Type) ve Zetasizer cihazı (Malvern), Spin Coater kullanılmıştır.

3.4 Kullanılan Diğer Malzemeler

Nitroselüoz membran (Millipore Hiflow), absorbant pedi, Mikroskop Lamı, TLC, mikropipet (1-10, 10-100, 100-1000µl) deneyleer esnasında kullanılmıştır.

3.5 Kullanılan Substratlar/Raman-aktif yüzeyler

Opiyat analizi için fiyat-fayda dengesi ve Raman-aktif niteliği optimum olan yüzeyin tespiti için TLC kağıdı, Gümüş yüzey, Altın yüzey, Altın-Nanoselüoz yüzey, Altın-Polianilin yüzey kullanılmıştır.

3.6 Gümüş nano yüzey (AgNS) hazırlanması

AgNS, daha önceden Yılmaz ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışmada tarif edilen teknik kullanılarak geliştirildi [113].

3.7 AuNP/nanoselüoz yüzeylerin hazırlanması

Nanoselüoz kaplı AuNPs, literatürde önceden bildirilen prosedüre göre sulu bir çözelti içinde PEG 400 varlığında H₂AuCl₄'ün indirgenmesiyle hazırlanmıştır [114,115]. 0,5 g nanoselüoz alınıp 4 mL saf su içinde dispers edildi. Elde edilen solüsyon kaynama sıcaklığına kadar ısıtılıp ve bir vial içerisinde sıcak su banyosuna entegre edildi. Vial içerisinde bulunan malzeme, yarım saat boyunca sıcak su banyosunda iyice etkileştirildi. 250 µL 0.01M altın çözeltisi (H₂AuCl₄) vial içerisine eklendi. Altın çözeltisi çözeltisi vial içerisine eklendikten sonra solüsyon yarım saat boyunca reaksiyonun tamamlanması için sıcak su banyosunda bekletildi. Reaksiyon sonunda sarı olan numune kırmızı renge dönüşünce (Şekil 3.1.) nanoselüozün SERS substratı olarak kullanıma hazır hale geldiği anlaşıldı.



Şekil 3.1. Altın-selüloz nanofibril çözeltisi

Kırmızı renge dönüşmesi, nanoselülöz numunesinde in situ olarak altın çözeltisinin nano boyuta geçtiğini göstermektedir. Termal sıcaklık yöntemi ile elde edilen nano yapılar küre şekline sahiptir. Elde edilen altın nanoselüloz sulu çözeltisi cam bir yüzey üzerine belli bir miktarda eklenerek dehidrasyon işlemine maruz bırakıldı. Altın nanoselüloz SERS substratın yüzeyde daha hızlı suyu uzaklaştırmasını sağlamak için yaklaşık 45°C'de bekletildi. Isının etkisi ile 20 dakika içinde tamamen bir kuruma sağlanmış oldu (Şekil 3.2.). Bu adımlar bittikten sonra esnek yapıda altın nanoselüloz SERS substratlar geliştirildi.



Şekil 3.2. Raman-aktif AuNP/Nanoselüloz yüzey

3.8 AuNP/polianilin yüzeyinin hazırlanması

Yüzeyin hazırlanması için uygulanan reaksiyonlar genellikle 50 mL'lik viyallerde gerçekleştirildi. İlk olarak 1 mmol anilin, 10 mL karbon tetraklorürde çözüldürüldü ve homojen bir çözelti (A) elde etmek için bir süre karıştırıldı. Daha sonra belirli bir miktar 0.86 g nanoselüloz ile 1 ml 1×10^{-2} M konsantre sulu HAuCl_4 çözeltisi 10 mL 1 M HAuCl_4 sulu solüsyonu içerisinde birkaç dakika karıştırılarak homojen bir solüsyon (B) elde edildi. Daha sonra çözelti (A), bu iki faz arasında bir arayüzey reaksiyonu elde etmek için, (B) çözeltisine aktarıldı. 10 dakika sonra, arayüzde yeşil polianilin (PANI) oluştu ve daha sonra yavaş yavaş sulu faza yayılım gösterdi. Arayüzdeki reaksiyona 2 saat izin verildi. İki saat sonra, sulu fazın tamamı koyu yeşil PANI ile doldurulurken organik katman turuncu renkte izlendi. Daha sonra hazırlanan PANI süzülerek toplandı ve birkaç kez metanol, aseton ve distile su ile yıkandı. Son olarak, 12 saat boyunca 40°C 'de vakumlu bir fırında kurutulmuştur [116].

3.9 TLC silika jel alüminyum levhaları

Bu çalışma kapsamında TLC yüzeyle ilgili herhangi bir analitik üretim çalışması gerçekleştirilmedi. Ticari ürün şeklinde elde edilen TLC Silika jel alüminyum levhaların (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Almanya) alüminyum tarafı bu çalışmada ön analiz ve yöntem oturtma süreçlerinde MM'nin SERS sinyallerini elde etmek için kullanıldı.

3.10 Altın nanorod yüzey (AuNRs)

Anizotropik altın nanorod dizileri, daha önce Yılmaz ve arkadaşlarının [113] çalışmasında aktarıldığı gibi, eğik açılı biriktirme/oblique angle deposition tekniği ile BK7 cam slaytlar üzerinde üretilmiştir. Nanorodların eğik yerleştirilmesi nedeniyle, bu yüzeyin sıvı hareketini kontrol etme ve kontrolsüz kümelenmeyi önleyerek göreceli homojeniteyi sağlama yeteneğine sahip olduğu anlaşıldı.

3.11 Gümüş nanopartikül (AgNP) sentezi

Gümüş nanopartiküller, Leopold ve Lendl [117] tarafından önerilen kimyasal indirgeme yöntemi kullanılarak sentezlendi. Tüm kimyasallar çift distile edilmiş

suda hazırlandı. Tipik deneyde, hazırlanan reaksiyon karışımlarında gümüş nitrat konsantrasyonu 10^{-3} M'ye ayarlandı. Gümüş nitratin indirgenmesi için son reaksiyon karışımında 1.5×10^{-3} M hidroksilamin hidroklorür kullanıldı. Deneylerimizde, hidroksilamin çözeltisine NaOH eklemek suretiyle çözeltinin son pH'ı ayarlandı. Bu işlem sırasında çözelti kuvvetli bir şekilde karıştırıldı ve renk değişimi "soluk kahverengi" olarak ayırt edilebilir oldu. Son olarak, bu çözelti karanlık bir yerde gece boyunca inkübasyon için tutuldu.

3.12 Belirlenen yaygın uyuşturucu ve uyarıcıların standart maddelerinin Raman spektrumlarının eldesinde yöntem geliştirme basamakları,

Geliştirilen SERS substratlarının üzerine 1000 ppm konsantrasyonda metanolde çözdürülmüş Eoin ve metabolitleri olan Morfin Monohidrat, Morfin 3 Beta Glukoronid ve 6-Monoasetilmorfin standart maddeleri damlatılarak farklı raman koşullarında spektrumlar alındı.

Uygun spektrumu elde etmek için kullanılan Raman koşulları aşağıda sunulmuştur.

Lazer gücü (Laser Power): Medium, Medium-High ve High olacak şekilde farklı denemelerle optimum spektrumun belirlenmesi sağlandı.

Integrasyon zamanı (Integration Time): 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120, 150, 180, 300 sn olacak şekilde farklı integrasyon zamanlarında analizler yapılarak spektrumlar alındı.

Odaklama düzeyi (Optic): Mikroskop optiği 10x, 20x, 50x olacak şekilde farklı optik büyüklüğü ile spektrumlar alındı.

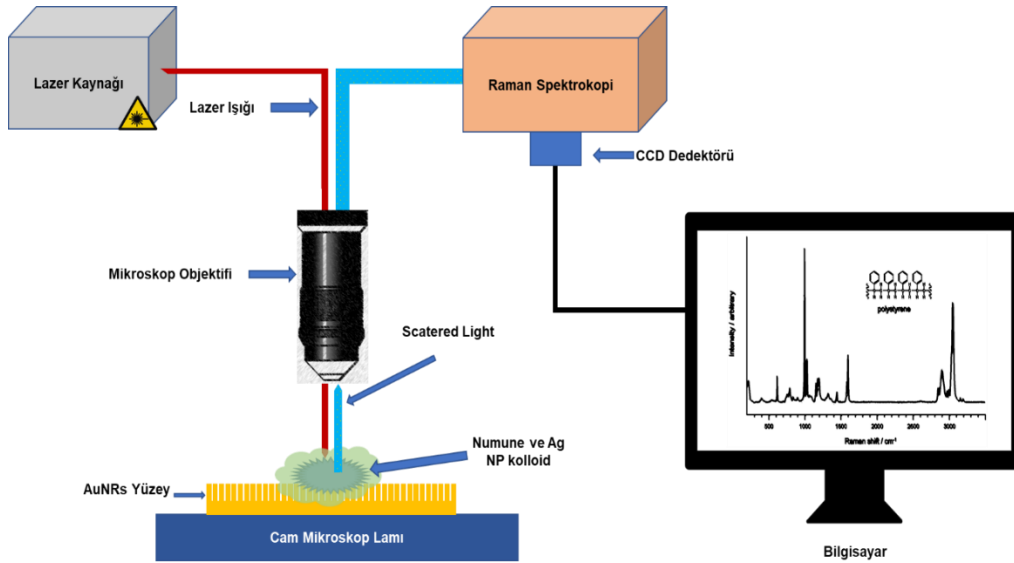
Polarizasyon: Polarize ve non-polarize olacak şekilde karşılaştırmalı spektrumlar alındı.

AgNP kullanımı: Raman koşullarına ve kullanılan yüzeye ek olarak daha uygun spektrum elde etmek için yüzeye damlatılan standart madde üzerine çeşitli derişimlerde ve farklı miktarlarda AgNP damlatılarak optimum analiz için en uygun AgNP miktarının belirlenmesi sağlandı.

Söz konusu uyuşturucu ve uyarıcı maddeler için Raman kütüphanesi geliştirilmesi basamakları gerçekleştirildi.

3.13 Enstrümantasyon

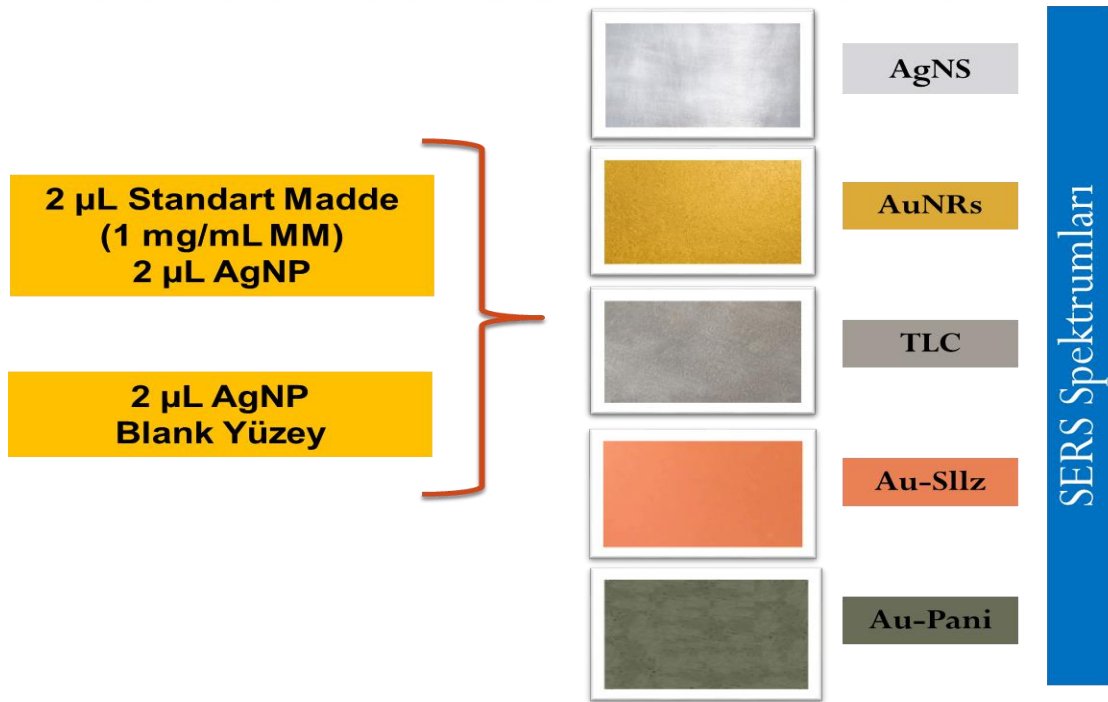
Eroin ve metabolitlerini saptamak, tanımlamak ve miktarlandırmak için 785 nm lazer kaynağı ve bir CCD dedektörü olan DeltaNu Examiner Raman mikroskobu (Deltanu Inc., Laramie, WY, ABD) kullanıldı. Yukarıda, bölüm 2.7.'de tarif edilen önçalışma ve çoklu analizler ışığında elde edilen optimum parametreleri kullanıldı. Cihaz parametreleri şu şekilde oluşturuldu; 10x objektif, 30 µm lazer spot boyutu, 150 mW lazer gücü ve 40 s edinim süresi. Tüm ölçümler için taban çizgisi / baseline düzeltmesi yapıldı. Geliştirilen SERS mekanizması ve teknik bileşenleri şekil 3.3.'te gösterilmektedir.



Şekil 3.3. Bu çalışmada kullanılan SERS yöntemi ve bileşenleri

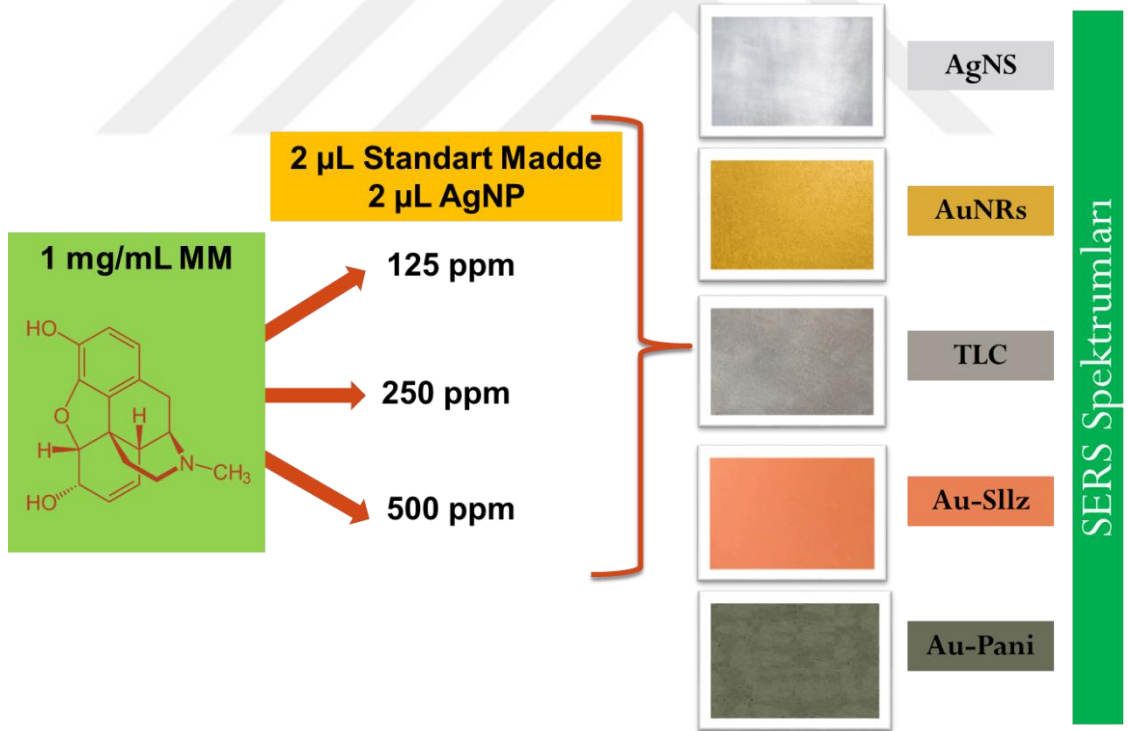
3.14 Eroin, MM, M3B ve 6MAM SERS analizi için en uygun yüzeyin tespit edilmesi

Eroin ve metabolitlerinin tespiti için moleküler yapısı bağlamında -metabolizma ara ürünü olması nedeniyle- grubu temsil niteliği bulunan MM'nin SERS analizi için beş farklı substratın karşılaştırılması ile Raman-aktif niteliği en yüksek olan yüzey belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla TLC yüzeyi, AuNR yüzey, AgNS, AuNPs/nanoselüloz ve AuNPs/polianilin yüzey üretilerek/elde edilerek, ilk aşamada sabit konsantrasyonda metanol çözeltisi içerisinde 1 mg/mL konsantrasyonda bulunan MM standart maddesi yüzeye damlatılarak kurumaya bırakılmış ve üzerine SERS sinyal artışı sağlamak amacıyla AgNP eklenerek numunenin beş farklı noktasından SERS spektrumları elde edilmiş ve bunların ortalamaları kaydedilmiştir. İlk aşamada MM SERS spektrumu blank yüzeye aynı oranda damlatılan AgNP ile alınan SERS spektrumu ile karşılaştırılmıştır. Bu vesile ile çalışılan maddelerin spektrumları elde edilmiştir. Farklı yüzeylerden elde edilen SERS spektrumların karşılaştırılması ile tanımlayıcı pik sayısı, yüksek pik intansitesi, sinyal-gürültü dengesi bağlamında en uygun Raman-aktif yüzey tespit edilmiştir (şekil 3.4.).



Şekil 3.4. Standart madde SERS analizinde yüzeylerin karşılaştırılmasında yöntem özet şeması

Elde edilen spektrumların farklı MM konsantrasyonları söz konusu olduğunda stabil olup olmadığı ve konsantrasyon ile intansite ilişkisi açısından en uygun yüzeyin tespiti noktasında; 1 mg/mL konsantrasyonda MM içeren metanol içerisindeki standart madde çözeltisi kullanıldı. Bu stok çözeltiden farklı konsantrasyonda numunelerin elde edilmesi için seyreltme gerçekleştirilerek 125 ppm, 250 ppm ve 500 ppm konsantrasyonlarında nihai çözeltiler oluşturuldu ve yüzeylere 2 µL damlatıldı. Akabinde normal oda koşullarında hava akımına ve ısıya maruz bırakılmadan 10 dakikalık inkübasyon ile kurumaya bırakıldı. Devamında standart madde numunesi üzerine SERS sinyallerinin artırılması amacıyla 2 µL koloidal AgNP damlatıldı. 785 nm lazer kaynaklı Raman Spektroskobu ile toplanan her bir numunenin beş ayrı noktasından SERS spektrumları alındı ve ortalamaları kaydedildi (şekil 3.5.). Bu vesile ile elde edilen veriler karşılaştırılan konsantrasyon-intansite ilişkisi ve farklı konsantrasyonlarda SERS spektrum stabilitesi açısından en uygun yüzey saptandı.



Şekil 3.5. Standart maddenin farklı konsantrasyonlarının SERS analizinde kullanılan yüzeylerin karşılaştırılmasında yöntem özet şeması

3.15 SERS kullanılarak eroin ve metabolitlerinin kalibrasyon eğrilerinin oluşturulması

Bu basamak hem analiz süreçlerinin bir parçası olarak eroin ve metabolitlerinin standart maddelerinin farklı konsantrasyonlarda analiz edilirken SERS spektrumlarındaki değişim ortaya konması, madde konsantrasyonu ile korele şekilde pik intansitesinde değişim olup olmadığının belirlenmesi ve ihtiyaç olduğunda kolluk güçleri tarafından ele geçirilen kararlı kimyasal madde veya çözeltilerin analizi ile içerindeki maddenin hesaplanabilmesine yönelik bilimsel baz oluşturulması amaçlandı. Bu analizde 3.14.'te sunulan alt başlık kapsamında en uygun olduğu belirlenen AuNR yüzey kullanıldı.

3.15.1 Eroin için kalibrasyon eğrisi çizimi ve LOD hesaplanması

Toz halindeki eroin standart maddesi, 5000 ppm konsantrasyonda metanol içerisinde çözdürüldü. Solüsyon metanol ile seyreltilerek 10 ppb, 50 ppb, 1 ppm, 100 ppm, 500 ppm ve 1000 ppm eroin konsantrasyonları içeren çözeltiler elde edildi. Eroin çözeltilerine eşit miktarda AgNP çözeltisi eklenmiş ve nihai eroin çözeltileri 5 ppb, 25 ppb, 500 ppb, 50 ppm, 250 ppm, 500 ppm ve 2500 ppm konsantrasyonlarında oluşturulmuştur. Nihai çözeltiler yüzeye 2 µL damlatılıp normal oda koşullarında hava akımına ve ısıya maruz bırakılmadan 10 dakikalık inkübasyon ile kurumaya bırakıldı. Her bir numunenin beş ayrı noktasından SERS spektrumları alındı ve ortalamaları kaydedildi (Şekil 3.4.).

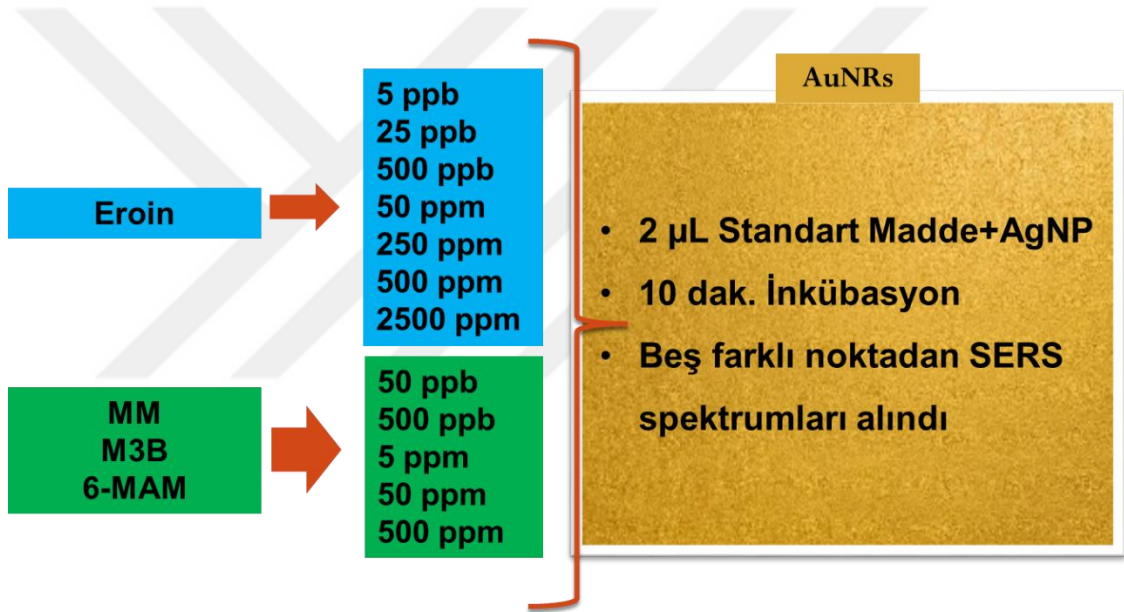
Eroin konsantrasyonları ile Raman shift 627 cm^{-1} 'deki pik intansitesi/yoğunluğu arasındaki ilişki, üssel tahmin için kullanılarak non-lineer kalibrasyon eğrisi oluşturulmuş ve belirleme katsayısı (R^2) hesaplanmıştır.

3.15.2 MM, M3B ve 6MAM kalibrasyon eğrisi çizimi ve LOD hesaplanması

Optimum SERS analizi için en uygun Raman-aktif yüzeye karar verildikten sonra, SERS substratı olarak AuNRs kullanıldı. Bu noktada çeşitli konsantrasyonlarda MM, M3B ve 6MAM standart maddeleri içeren numunelerde analizler gerçekleştirildi. Her konsantrasyona karşılık gelen SERS spektrumları kaydedildi. Her bir örnekten beş farklı alandan yapılan ölçümlerle elde edilen SERS

spektrumlardaki intansitelerin ortalaması hesaplanıp MM, M3B ve 6MAM (50 ppb – 500 ppm) için intansite ve ona karşılık gelen konsantrasyon değeri kullanılarak kalibrasyon eğrileri oluşturuldu. Nihai çözeltiler yüzeye 2 µL damlatılıp normal oda koşullarında hava akımına ve ısıya maruz bırakılmadan 10 dakikalık inkübasyon ile kurumaya bırakıldı. Her bir numunenin beş ayrı noktasından SERS spektrumları alındı ve ortalamaları kaydedildi (Şekil 3.6.).

MM, M3B ve 6MAM konsantrasyonları ile Raman shift 627 cm⁻¹'deki pik intansitesi/yoğunluğu arasındaki ilişki, üssel tahmin için kullanılarak non-lineer kalibrasyon eğrisi oluşturulmuş ve belirleme katsayısı (R²) hesaplanmıştır.



Şekil 3.6. Eroin, MM, M3B, 6-MAM standart maddelerinin SERS analizi kalibrasyon çalışmalarında yöntem özet şeması

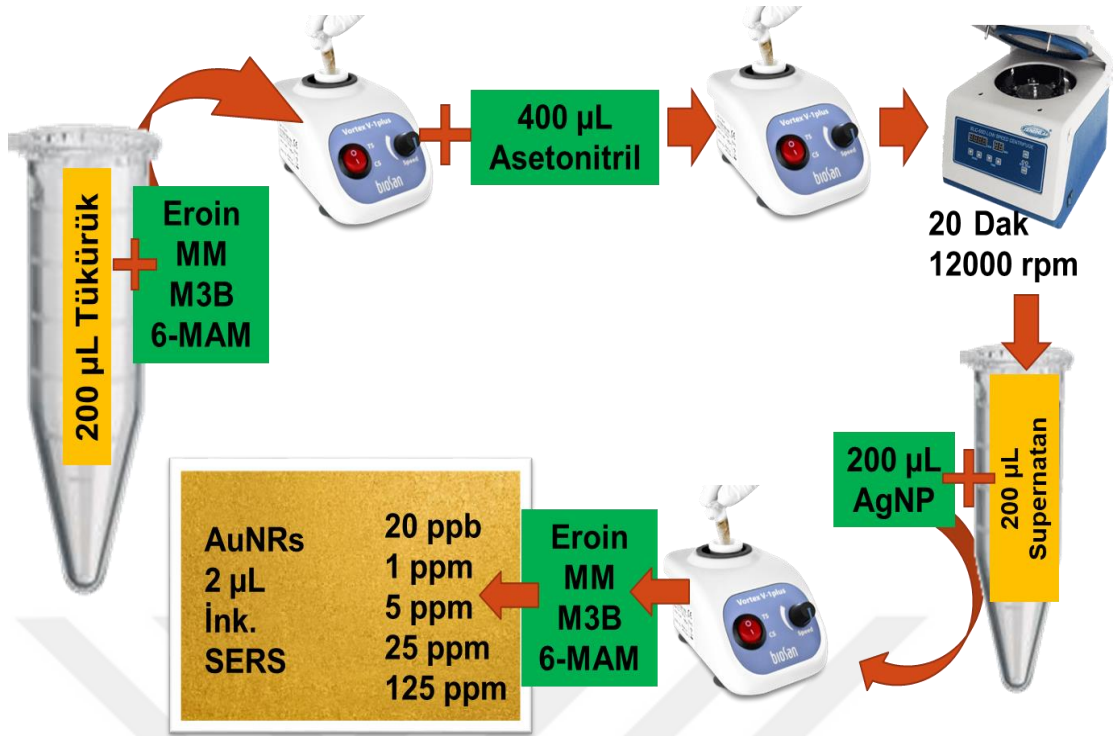
3.15.3 Tükürük numunesinde eroin ve metabolitlerinin konsantrasyonlarının ölçülmesi

3.15.3.1 Analiz prosedürü, kalibrasyon ve konsantrasyon formülünün geliştirilmesi

Uyuşturucu-uyarıcı maddeler ve metabolitlerinin tespiti açısından en yaygın şekilde analiz edilen biyolojik sıvılardan olan tükürük numunesinin rutin

toksikolojik analizlere konu olan örnekleri simule etmek için kullanılmıştır. Analizlerde kullanılan tükürük numunesi, etik kurul onayı doğrultusunda aydınlatılmış onamı yapılmış 35 yaşında, tütün, madde, ilaç ve alkol kullanım öyküsü olmayan, tıbbi özgeçmişinde herhangi bir hastalığı bulunmayan sağlıklı erişkin bir gönüllüden rutin toksikoloji laboratuvarlarında kullanılan yöntemle alınmıştır.

İlk aşamada 200 µL tükürük numunesine farklı konsantrasyonlarda eroin, MM, 6-MAM ve M3B solüsyonları eklenmiş ve 5 dakika vortekslenmiştir. Elde edilen spike numunelerde proteinleri agrege etmek ve kimyasal homojenizasyonu sağlamak için rutin toksikoloji laboratuvarlarına uygulanmakta olan ön-hazırlık basamaklarından biri olarak 400 µL asetonitril ilave edildi ve 5 dakika vortekslendi. Çözelti, 12.000 rpm'de 20 dakika süreyle santrifüjlendi. Santrifüj işlemi sonrasında numune çözeltisinin üzerinden 200 µL süpernatant alındı ve buna 200 µL AgNP solüsyonu eklenerek ve 5 dakika vortekslendi. Nihai tükürük numunelerinde 20 ppb, 1 ppm, 5 ppm, 25 ppm ve 125 ppm konsantrasyonlarında eroin, MM, M3B ve 6-MAM bulunacak şekilde tüm solüsyonlar için benzer prosedür uygulandı. AgNP'li çözelti, SERS spektrumlarını elde etmek için AuNR yüzeye 2 µL miktarında damlatıldı. Normal oda koşullarında 10 dakikalık bir inkübasyon süresinden sonra, SERS spektrumları, yüzeye damlatılmış spike numunelerin 5 farklı noktasından alındı (Şekil 3.7.). Eroin ve metabolitlerinin her bir konsantrasyonu için elde edilen 5 spektrumun referans piklerinin intansitelerinin/yoğunluklarının ortalama değerleri kullanıldı. Elde edilen veriler kullanılarak tükürük için eroin ve metabolitlerinin kalibrasyon eğrileri çizildi, R² değerleri hesaplandı ve çalışılan biyolojik sıvılarda konsantrasyon ölçümü için pik intansitesi-konsantrasyon eşleme formülü geliştirildi.



Şekil 3.7. Tükürük numunesinde eroin, MM, M3B, 6-MAM SERS analiz prosedürü şeması

3.15.3.2 Numunelerde eroin ve metabolitlerinin konsantrasyonlarının belirlenmesi

Geliştirilen yöntem ve bu doğrultuda ortaya konulan kalibre edilmiş formülleri değerlendirmek ve ölçümleri elde etmek için boş tükürük numunesinde spike edilmiş eroin, MM, M3B ve 6MAM numuneleri 650 ppb, 30 ppm ve 100 ppm konsantrasyonlarda hazırlandı. Örnekleri analiz eden kişi kör bırakıldı ve örneklerin konsantrasyonları hakkında bilgi vermedi. Numunelerin spektrumları geliştirilen yönteme uygun olarak beş farklı alandan elde edildi ve konsantrasyonlar tükürük numunesi için kalibrasyon eğrisindeki yoğunluk-konsantrasyon eşleşme noktasına göre geliştirilen formül ile hesaplandı.

3.15.4 Etik kurul onayı

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Yerel Etik Kurulu tarafından 2016/06-02 karar numarasıyla onaylanmıştır.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Sunulan tez çalışması veri eldesi ve sunumu bağlamında dört temel başlıkta özetlemiştir, bu kapsamda;

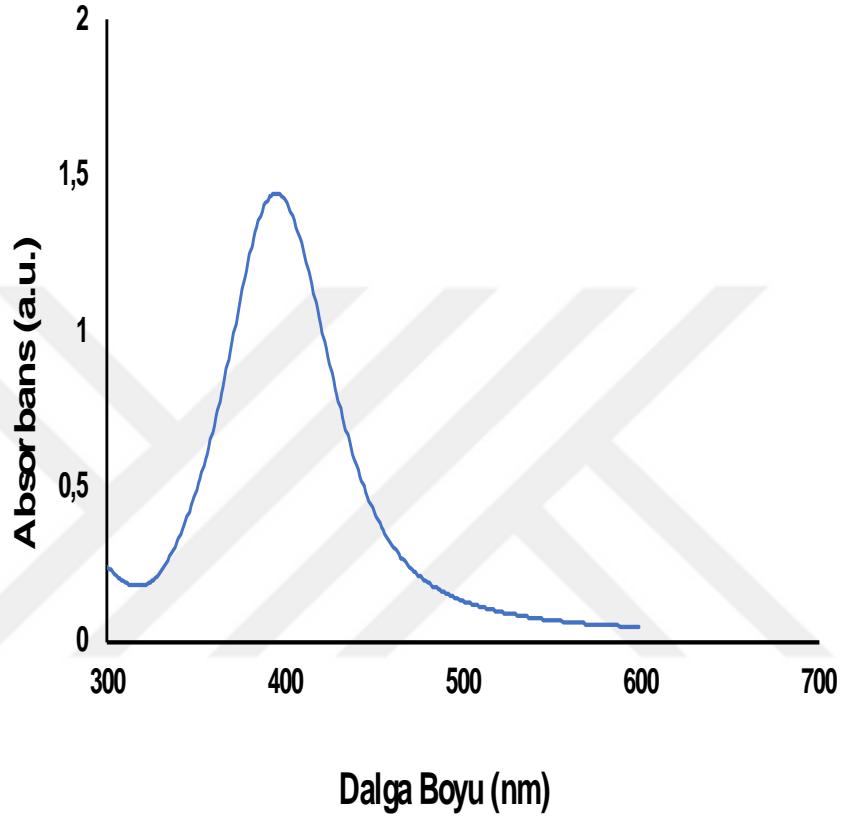
1. Eroin, MM, M3B ve 6MAM'ın SERS ile tespiti ve miktarlandırılması açısından en uygun Raman-aktif substratın belirlenmesi/geliştirilmesi,
2. Eroin, MM, M3B ve 6MAM'ın SERS spektrumlarının elde edilmesi ve saf madde ölçümü için kalibrasyon eğrilerinin çizilmesi,
3. Eroin, MM, M3B ve 6MAM ile spike edilmiş tükürük numunelerinin SERS analizi, konsantrasyon tespiti için intansite-konsantrasyon eşleşme noktası ile formül oluşturulması, yöntemin kalibrasyonu, LOD ve LOQ değerlerinin belirlenmesi
4. Tükürük numunelerinde kör ölçümle eroin, MM, M3B ve 6MAM düzeylerinin tespiti ve SERS spektrumunun Excel formatında kayıt işlemi ile madde konsantrasyonunun otomatize şekilde belirlenmesinin sağlanmasına dair çalışmalar gerçekleştirilecek sonuçlar incelenmiştir.

4.1 SERS substratları ve sinyal artırıcı nanopartikül karakterizasyonu

4.1.1 AgNP karakterizasyonu

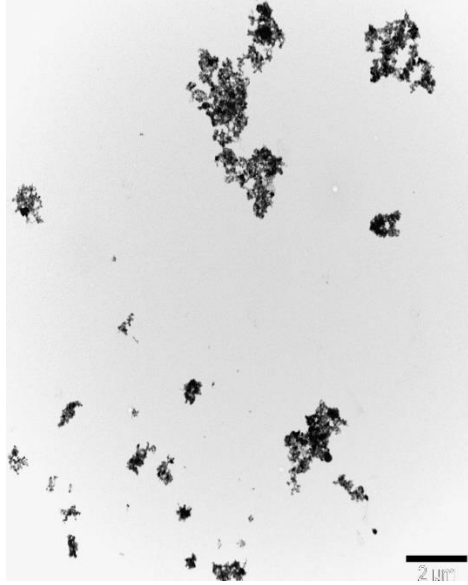
Daha önceki çalışmalardaki gümüş kolloid ile uyumlu olarak hazırlanan reaksiyon karışımında gümüş nitrat konsantrasyonu 10^{-3} M olarak ayarlandı. Gümüş nitratin indirgenmesi için hidroksilamin hidroklorür kullanıldığında, hidroksilamin hidroklorür çözeltisinin başlangıç alkali pH'ı gereklidir. İndirgeme sırasında meydana gelen gerçek tepkime dizisi karmaşıktır ve gözlemlenen gümüş indirgemesine ek olarak büyük olasılıkla hidroksilamin ve gümüş iyonları arasında kompleks oluşumunu içermektedir. Kolloidal çözeltinin nihai pH'ı, hidroksilamin çözeltisine eklenen sodyum hidroksit miktarı değiştirilerek ayarlanmıştır. Üretilen AgNP morfolojisini karakterize etmek için UV-vis

spektroskopi ve TEM kullanıldı. Gümüş nanaopartikül çözeltinin ölçülen UV-vis spektrumunun maksimum absorpsiyonu, ortalama partikül boyutu hakkında bilgi sağlamaktadır. UV-vis spektrum incelendiğinde yaklaşık 400nm'de tanımlayıcı pik gözlenmiştir (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. Hidroksilamin ile indirgenmiş AgNP UV-vis spektrumu

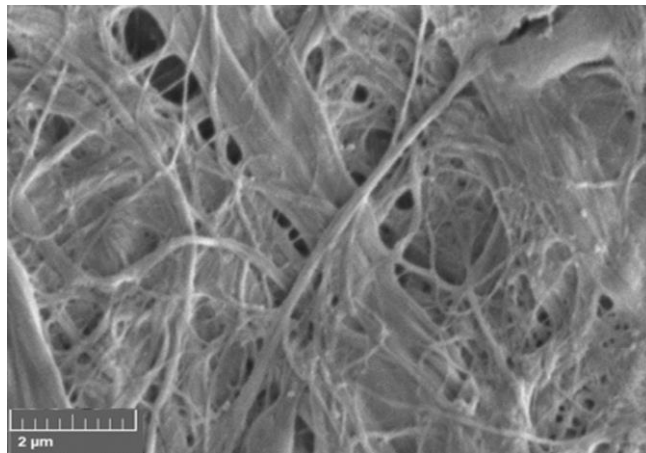
Parçacık boyutunun monodisperse dağılımı 90 mL'lik bir hidroksilamin hidroklorür çözeltisine (1.67×10^{-3} M) 10 mL gümüş nitrat çözeltisi (10^{-2} M) ilave edildiğinde elde edilmiştir. Bu gözlemi desteklemek için karşılık gelen TEM görüntüleri şekil 4.2.'de gösterilmektedir.



Şekil 4.2. AgNP TEM görüntüsü

4.1.2 AuNP/Nanoselüloz yüzey karakterizasyonu

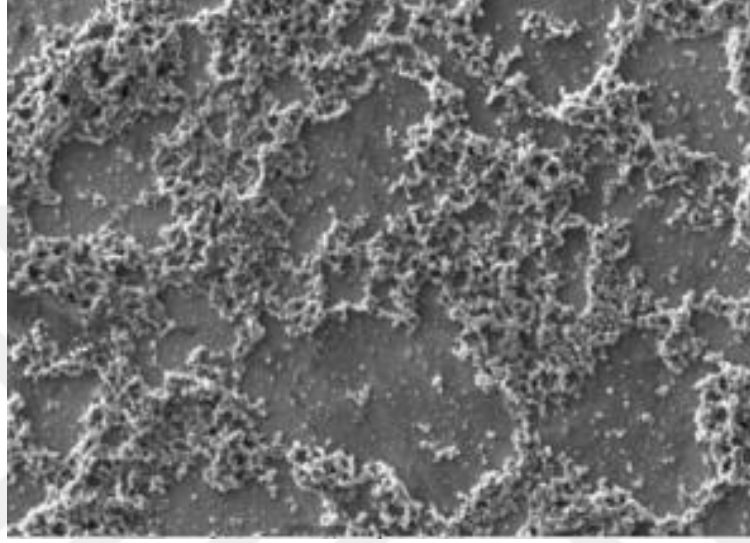
AuNP/Nanoselüloz yüzey geliştirmek için hazırlanan nanoselüloz çözeltisine belirli miktarlarda HAuCl_4 çözeltisi eklenmiştir. Bunun için nanoselüloz çözeltisi içine 50 ile 300 μL HAuCl_4 solüsyonu eklenmiştir. Sentezlenen farklı miktarlardaki yüzeyler daha önce yapılan çalışmalarda SERS sinyal şiddetleri biyolojik hedef algılamada kullanıldığında en iyi altın miktar 200 μL olarak tespit edilmiştir. Bu konsantrasyonda elde edilen altın nanoselüloz yüzeyin SEM görüntüsü şekil 4.3.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.3. AuNP/Nanoselüloz yüzey SEM görüntüsü

4.1.3 AuNP/Polianilin yüzey karakterizasyonu

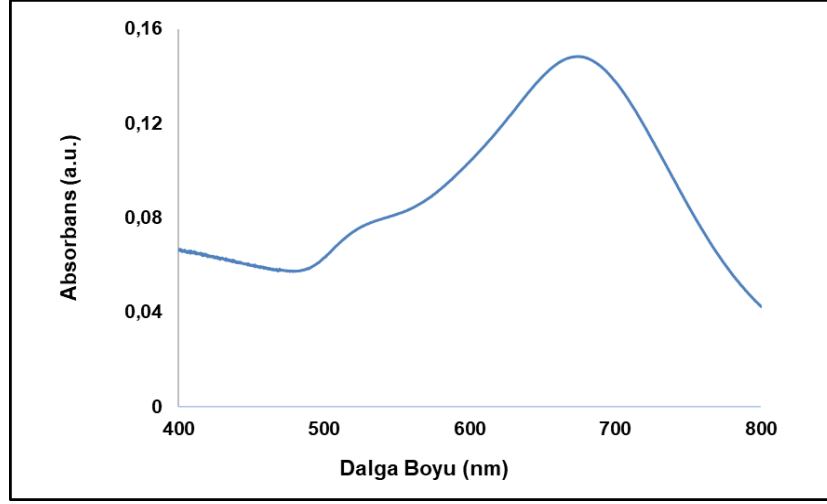
Ara yüzey reaksiyonu ile ikili faz oluşturularak elde edilen ve aktif olarak tarafımızca kullanılmakta olan AuNP/Polianilin yüzeyin SEM görüntüsü şekil 4.4.'de [116] gösterilmektedir.



Şekil 4.4. AuNP/Polianilin yüzey SEM görüntüsü

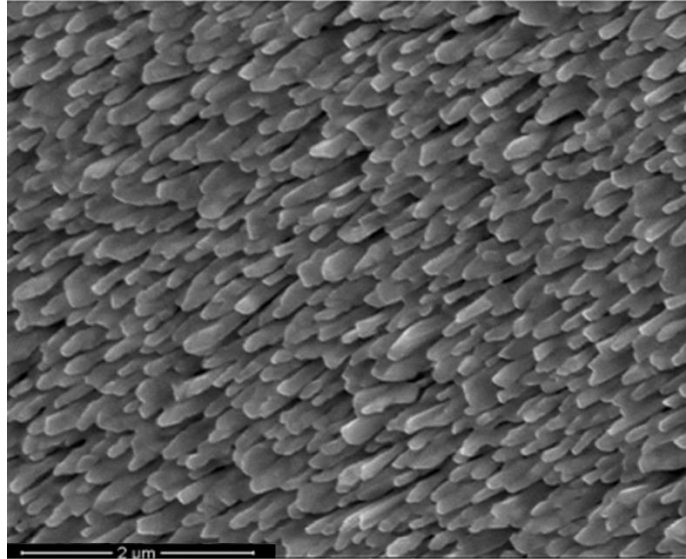
4.1.4 AuNR partikül ve yüzey karakterizasyonu

Elde edilen altın nano çubuk UV-vis Spektrofotometre cihazı kullanılarak karakterize edilmiştir. Şekil 4.5'te altın nano çubuk UV-GB Spektrofotometre ile gösterilen iki ayrı karakteristik absorpsiyon bandı bulunmaktadır. Altın çubuk nanopartiküllerin UV-vis spektrumdan belirlenen iki absorpsiyon pikinden ilki 524 nm'deki spektrumdur ve enine (çapraz) plazmon (rezonans) spektrum olarak değerlendirilmektedir. Grafikte görülen diğer absorpsiyon spektrum ise 670 nm'de görülmektedir ve boyuna plazmon bandı olarak adlandırılır.



Şekil 4.5. AuNRs UV-vis spektrumu

Yılmaz ve ark.c tarafından geliştirilen AuNR yüzey kimyasal buhar biriktirme yöntemi ile ısıya dayanıklı uygun bir polimer üzerine kaplı AuNR dizilerinin üretim süreci başarılı bir şekilde elde edilmiştir. Bu kapsamda AuNR dizilerinin altının biriktirme açısının (α) 5° olduğu eğik açılı biriktirme yaklaşımı yoluyla bir fototermal substrat olarak imal edilmiştir. Elde edilen yüzeyin Şekil 4.6'da üstten kesim SEM görüntüsü gösterilmiştir.

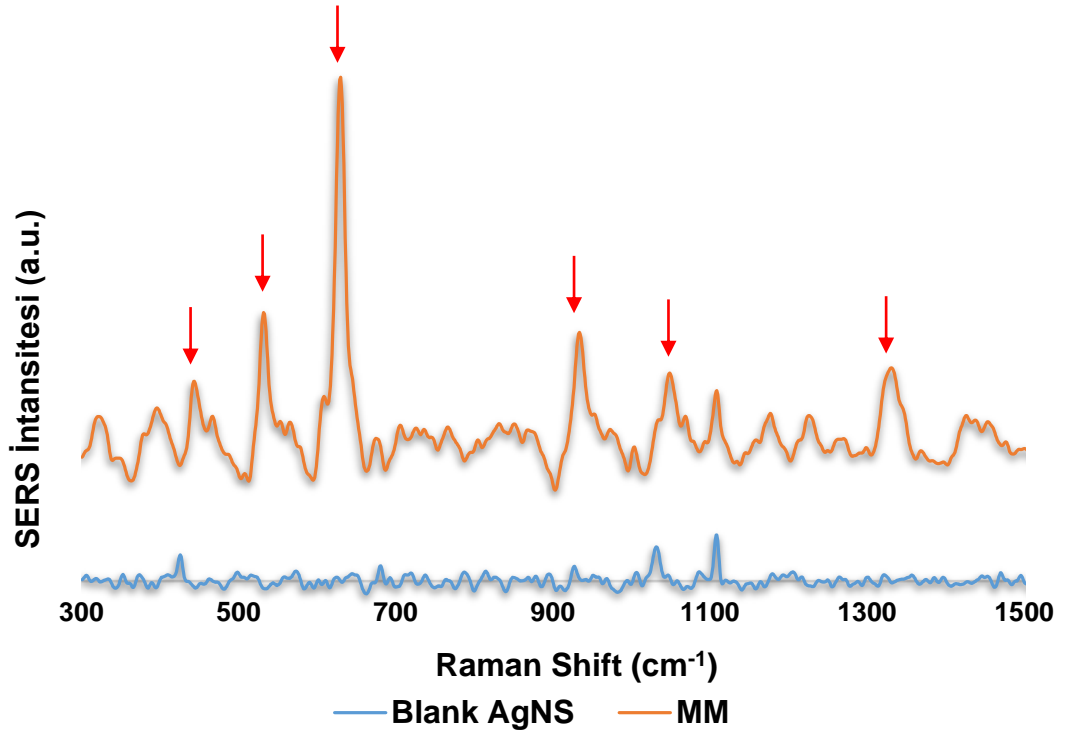


Şekil 4.6. AuNRs SEM görüntüsü [113]

4.2 Eroin, MM, M3B ve 6MAM Analizi için en uygun Raman-aktif substratın belirlenmesi

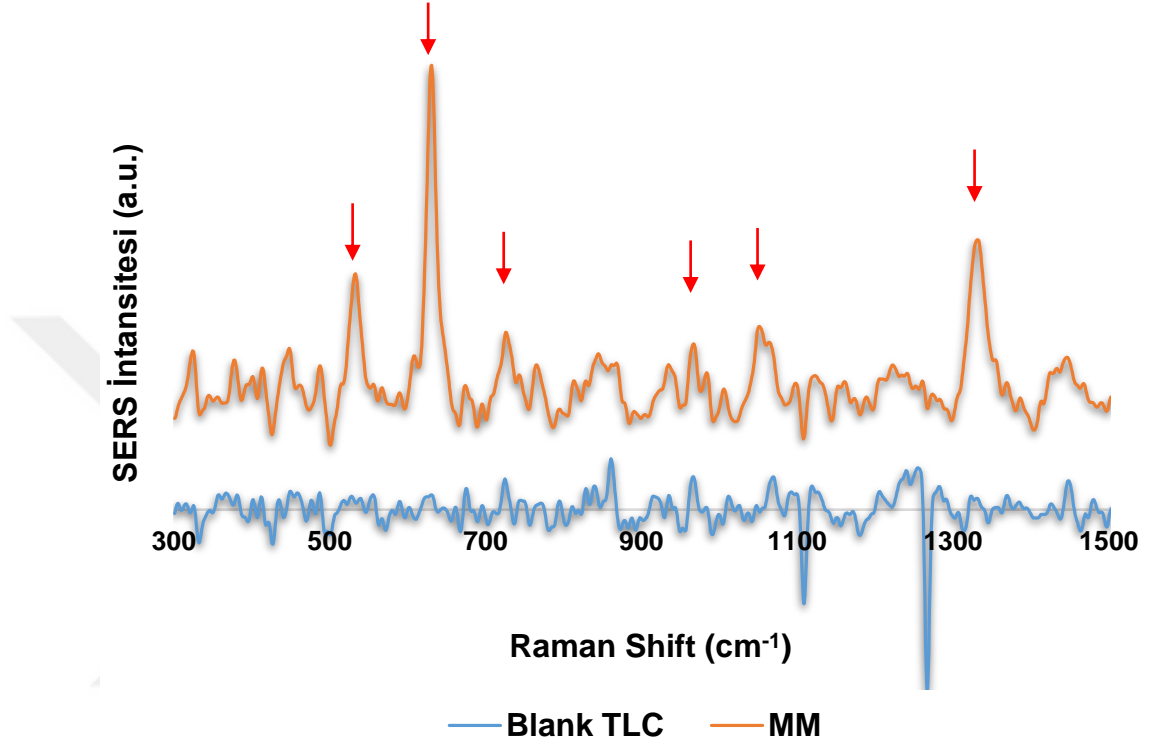
Genelde opiyat uyuşturucu madde grubunun fonksiyonel moleküler yapılarının ve özelde de eroin ve metabolitlerinin tespiti için moleküler yapısı bağlamında grubu temsil niteliği bulunan MM'nin SERS analizi için beş farklı substratın karşılaştırılması ile Raman-aktif niteliği en yüksek olan yüzeye belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla TLC yüzeyi, AuNR yüzey, AgNS, AuNPs/nanoselüloz ve AuNPs/polianilin yüzey elde edilerek, sinyal artışı sağlamak amacıyla gümüş nanopartiküllerle karıştırılmış MM bahsi geçen yüzeylere damlatılmış ve SERS spektrumları elde edilmiştir.

Yüksek intansite değerlerine sahip pik içeren bantlar istatistiksel olarak güçlü bantlar olarak belirlendikten ve yüzeyin kendi moleküler niteliklerinden kaynaklanan bantlar dışlandıktan sonra, AgNRs yüzeyi kullanılarak elde edilen MM SERS spektrumu sırasıyla 443, 532, 627, 934, 1049, 1109 ve 1332 cm^{-1} 'de nispeten daha az sinyal/gürültü oranlarına sahip yedi güçlü bant gösterdi (Şekil 4.7., Çizelge 4.1.).



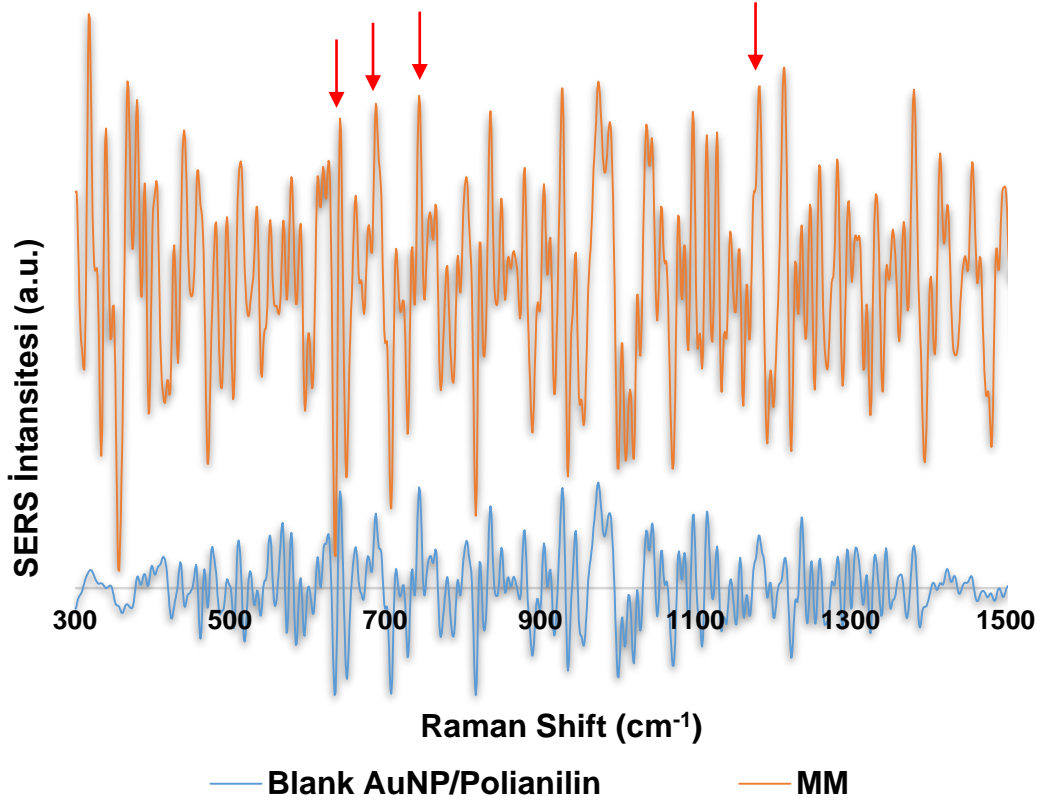
Şekil 4.7. Raman Shift (cm^{-1}) blank AgNS yüzeyi ve bu yüzeyde Morfin Monohidrat spektrumlarının karşılaştırılması

TLC silika jel alüminyum yüzey kullanılarak elde edilen MM SERS spektrumunda ise 532, 627, 726, 967, 1049 ve 1332 cm^{-1} 'de 6 güçlü bant saptandı (Şekil 4.8., Çizelge 4.1.).



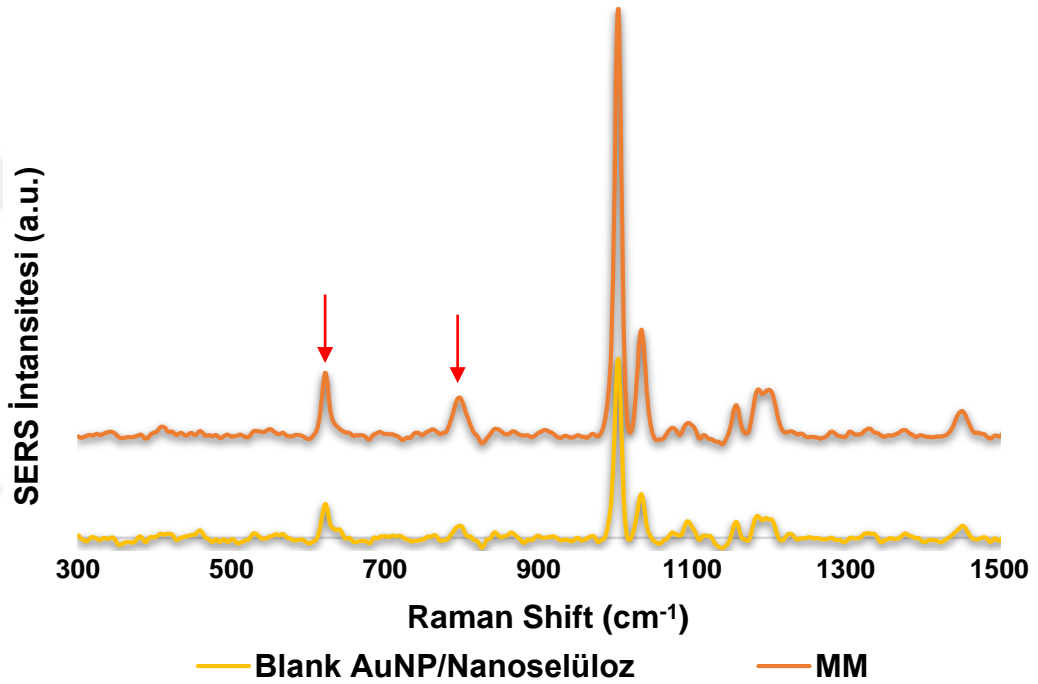
Şekil 4.8. Raman Shift (cm^{-1}) blank TLC yüzeyi ve bu yüzeyde Morfin Monohidrat spektrumlarının karşılaştırılması

AuNP/Polianilin yüzeyle yapılan analizler beş yüzey arasında en yoğun gürültüyü ortaya çıkardı. Şekilleriyle görsel olarak tanımlanamayan istatistiksel değerlendirmeyle belirlenen 4 güçlü bant vardı (Şekil 4.9., Çizelge 4.1.). Bu bantlar 642, 688, 744 ve 1183 cm^{-1} 'de konumlanmakta idi. Ancak çok ciddi sinyal/gürültü oran dengesizliği nedeniyle bu yüzeyin tamamen kullanışsız olduğu sonucuna ulaşıldı.



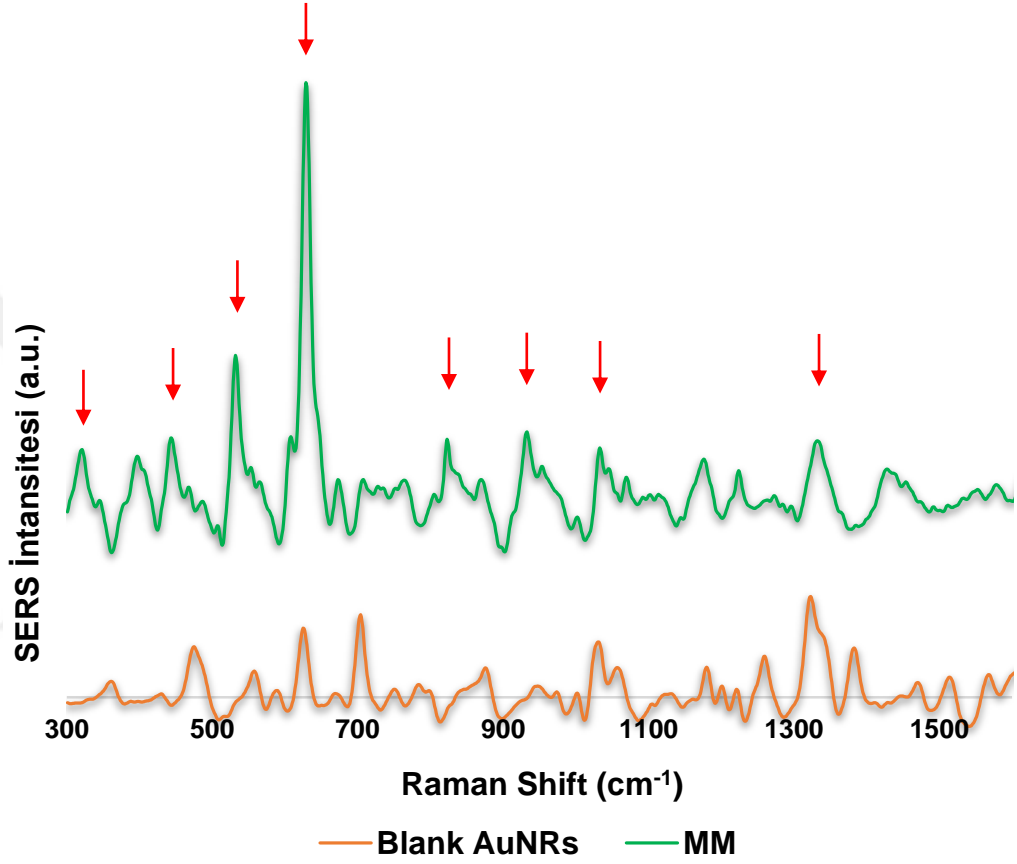
Şekil 4.9. Raman Shift (cm^{-1}) blank AuNP/Polianilin yüzeyi ve bu yüzeyde Morfin Monohidrat spektrumlarının karşılaştırılması

AuNP/Nanoselüloz yüzey ile yapılan analizler çok temiz bir spektrum ile en az gürültü sonuçlandı. Bununla birlikte, yüzeyden kaynaklanan bantların çıkarılmasından sonra yalnızca 627 ve 797 cm^{-1} 'de olmak üzere iki güçlü bant ortaya çıkardı (Şekil 4.10., Çizelge 4.1.). Bu yüzey önemli ölçüde stabil veriler sunmasına karşı göreceli olarak kısıtlı sayıda fonksiyonel yapıya işaret eden az sayıdaki pik nedeniyle fiyat-fayda dengesine uygun bulunmadı.



Şekil 4.10. Raman Shift (cm^{-1}) blank AuNP/Nanoselüloz yüzeyi ve bu yüzeyde Morfin Monohidrat spektrumlarının karşılaştırılması

Yılmaz ve ark. [113] tarafından geliştirilen yöntemle üretilmiş AuNR nano-yüzey MM'nin SERS analizinde spektrumun sekiz farklı noktasında olacak şekilde en yoğun bantlarla 321, 443, 534, 627, 823, 935, 1033 ve 1332 cm^{-1} karşımıza çıktı (Çizelge 4.1.). Diğer yandan bu yüzey ayrıca nispeten daha yüksek sinyal/gürültü oranı gösterdi (Şekil 4.11.).



Şekil 4.11. Raman Shift (cm^{-1}) blank AuNR yüzeyi ve bu yüzeyde Morfin Monohidrat spektrumlarının karşılaştırılması

Morfin monohidratın TLC yüzeyi, AuNR yüzey, AgNS, AuNPs/nanoselüloz ve AuNPs/polianilin yüzeyleri kullanılarak elde edilen SERS spektrumları değerlendirildiğinde spektrumların 2 ile 8 güçlü pikle fonksiyonel gruplara işaret ettiği saptandı. Her bir yüzeyle elde edilen Raman bandlarına ait pik noktaları Çizelge 4.1.'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.1. Morfin monohidratın farklı yüzeylerle elde edilen SERS spektrumlarında saptanan güçlü pik noktaları.

TLC	AuNRS	AuNP/Nanoselüloz	AuNP/Polianilin	AgNRs
	321			
	443			443
532	534			532
627	627	627		627
			642	
			688	
726				
			744	
		797		
	823			
	935			934
967				
	1033			
1049				1049
			1183	
1332	1332			1332

Mevcut çalışmada elde edilen morfin monohidrat SERS spektrumu daha önce gerçekleştirilen çalışmalarda tespit edilen Raman ve SERS spektrumları ile uyumlu bulundu [118–120]. Li ve ark. [120], Raman-aktif yüzey niteliğinde gümüş filmi kullanarak 633 nm lazer kaynağı marifetiyle morfinin SERS spektrumunu elde ettiği çalışmasında; 566, 633, 850, 1123, 1205 ve 1284 cm^{-1} Raman bantlarında en yoğun pikleri ortaya koydular. Diğer yandan Rana ve ark. [118], 785 ve 633 nm lazer kaynakları ile gümüş kolloidler kullanarak morfin SERS spektrumlarını incelemiş olup; 633 nm lazer kaynağı ile tespit edilen morfinin karakteristik Raman bantlarından 462, 542, 609, 625, 1350, 1469 ve 1698 cm^{-1} 'de görülenlerin daha dikkat çekici olduğunu belirtmişlerdir. Mevcut çalışmamızda da 785 nm lazer kaynağı ve AuNR yüzey kullanılarak elde edilen

veriler önceki çalışmalarla uyumluydu ve 321, 443, 534, 627, 823, 935, 1033 ve 1332 cm^{-1} 'de en yoğun ve karakteristik bantlar tespit edildi (Çizelge 4.2.).

Çizelge 4.2. AuNR yüzeyde morfin monohidratın SERS spektrumundaki bantlar

SERS spektrum bandı	İntansite
321	Güçlü
397	Orta
443	Güçlü
534	Güçlü
567	Zayıf
608	Zayıf
627	Güçlü
673	Orta
712	Zayıf
764	Zayıf
823	Güçlü
870	Zayıf
935	Güçlü
1033	Güçlü
1176	Orta
1224	Zayıf
1332	Güçlü
1434	Zayıf
1626	Zayıf

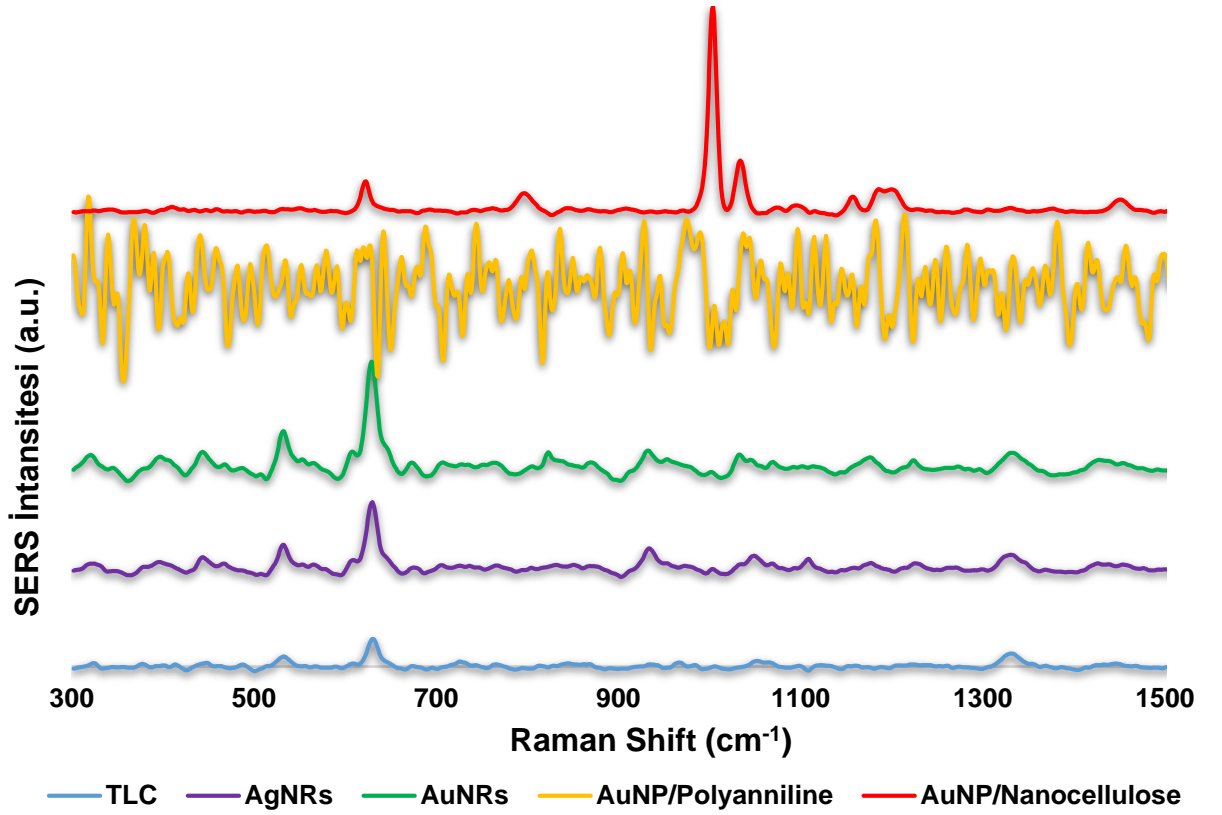
Bu çalışmada kullandığımız altın nanorod yüzey ve bunun yanı sıra analitle doğrudan muamele edilen gümüş nano parçacıkların morfin monohidratın Raman sinyallerini yoğunlaştırma potansiyeli taşıdığı bilinmektedir [21,22]. Inscore ve ark.'nın [22], SERS kullanarak 80 yasadışı uyuşturucu ve metabolitlerini inceledikleri çalışmalarında morfinin optimum SERS spektrumunu elde etmek için en uygun sinyal artırıcının altın nano materyal olduğunu belirtmişlerdir. Literatüre ek olarak, bu çalışmada sıvı hareketini potansiyel olarak

kontrol eden açılı altın nano çubuklarla karakterize edilen bir yüzey kullanılması nedeniyle çalışılan numunenin kontrolsüz bir şekilde dağılmasını ya da non-homojen agregasyonu önleyerek analizin güvenilirliği artırıldı. Mevcut çalışmada kullanılan yüzeylerin Raman-aktif kalitesinin bir karşılaştırması noktasında her bir yüzeye damlatılan morfin monohidratın SERS spektrum verileri ve bunlara ilişkin yorumlar çizelge 4.3.'te gösterilmektedir.

Çizelge 4.3. SERS spektrumları bağlamında yüzeylerin Raman-aktif nitelikleri

Yüzey	SERS spektrumuna dair yorum
AgNRs	<ul style="list-style-type: none"> • İkinci en az arka-plan gürültüsü • İkinci en verimli sonuçlar • AuNP/Nanoselüloz, TLC ve AuNP/Polianilin ile karşılaştırıldığında daha yüksek yoğunluğa sahip pikler
AuNRs	<ul style="list-style-type: none"> • Üçüncü en az arka-plan gürültüsü • En verimli sonuçlar • Hepsine kıyasla daha yüksek yoğunluklarda daha fazla tanımlanabilir pikler • SERS tabanlı morfin tespiti ve analizinde en kullanışlı yüzey
AuNP/Nanoselüloz	<ul style="list-style-type: none"> • En az arka-plan gürültüsü • Ana bandın yoğunluğu (627 cm^{-1}), AgNRs ve AuNR yüzeylere kıyasla önemli ölçüde düşüktü • SERS tabanlı morfin tespiti ve analizinde kullanışsız
TLC	<ul style="list-style-type: none"> • Göreceli olarak son derece düşük yoğunluğa sahip, daha az sayıda tanımlanabilir bant • SERS tabanlı morfin tespiti ve analizinde kullanışsız
AuNP/Polianilin	<ul style="list-style-type: none"> • En fazla arka plan gürültüsü. • Tanımlanabilir en az pik sayısı • SERS tabanlı morfinin tespiti ve analizinde kullanışsız

Sunulan çalışmada, Raman sinyallerini yoğunlaştırmak için farklı Raman-aktif yüzeyler, bu yüzeylere damlatılan gümüş kolloid üzerine çalışılan uyuşturucu maddeler ya da yüzeye damlatılmadan önce sabit oranlarda gümüş kolloid karıştırılarak damlatılan numunenin analizi ile SERS spektrumları alındı. Morfin için karakteristik bantlar AgNP yüzey ile tespit edilmiş olmakla birlikte en iyi sonuçlar, tarif edilen spesifik Raman-aktif AuNRs ve gümüş kolloid kombinasyonu sayesinde SERS sinyallerinin sinerjik iyileştirilmesiyle elde edildi (Şekil 4.12.).

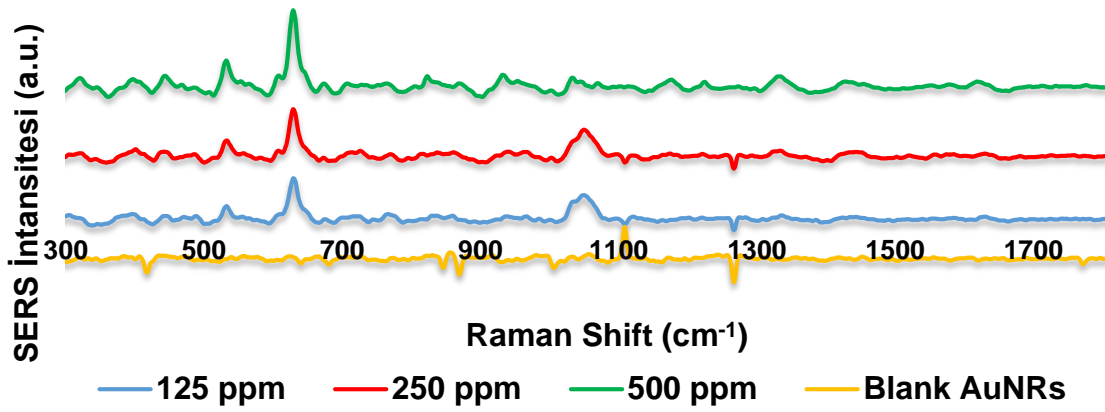


Şekil 4.12. Farklı Raman-aktif yüzeylerde morfinin SERS spektrumlarının karşılaştırılması

Literatürde, yasadışı bir uyuşturucu olarak eroin ve özellikle de metabolitlerinin Raman spektrumlarını ele alan çok kısıtlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Hodges ve ark. [121] kokain ve eroin başta olmak üzere kötüye kullanımı yaygın olan bazı ilaçlarının Raman spektrumlarını incelediler ve çalışmalarında genel anlamda opiyat ve özede de eroin için 620 ile 630 cm⁻¹ arasında en belirgin bandın

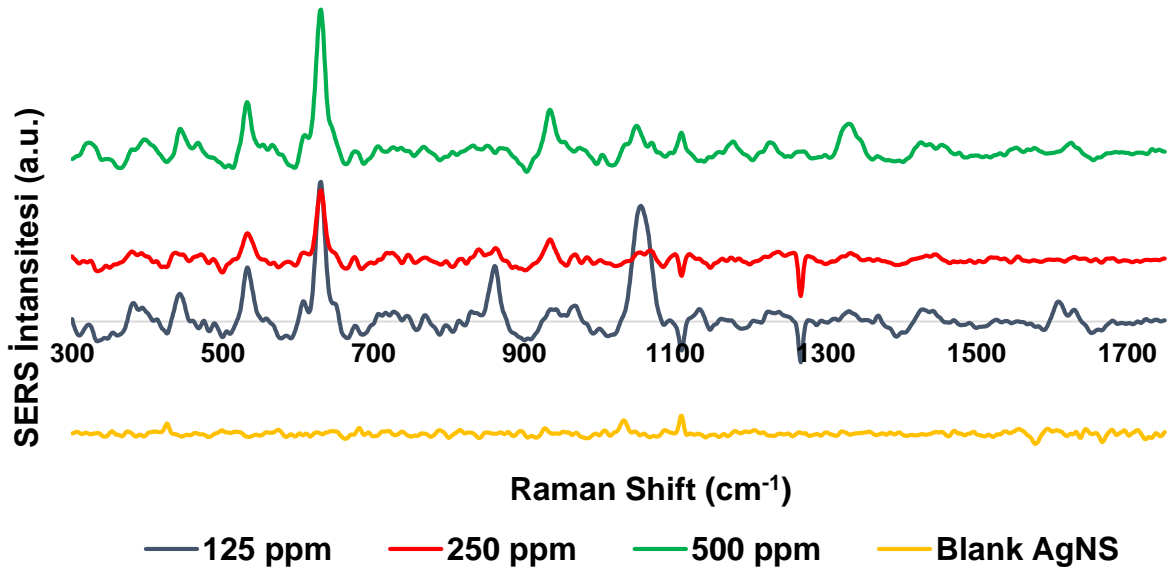
kimliklendirici olduğunu gösterdiler. Benzer bir bant oluşumu, Ryder ve ark. [122] tarafından yapılan çalışmada da ortaya konmuş olup, katı formdaki madde karışımları kullanılarak yapılan analizde eroinin Raman spektrumunda daha fazla tanımlanabilir bant olabileceğini de belirtmişlerdir. Ancak bu çalışmalar, eroin için kesin bir Raman spektrumu ortaya çıkarmamış olup geleneksel Raman spektroskopisine göre daha hassas ve spesifik olduğu savı ile SERS analizlerinin daha uygun ve faydalı verileri ortaya koyacağını dile getirmişlerdir. Bu tez çalışmasında da literatürde belirtildiği gibi SERS analizi için en uygun Raman-aktif yüzeyin altın olduğu, buna ek olarak AuNR yüzeyin ve numune ile muamele edilen sinyal artırıcı gümüş kolloidin kullanımı ile çok daha değerli veriler elde edilebileceği gösterilmiştir.

Çalışmada kullanılan yüzeylerde eroin ve metabolitlerini temsilen öncelikle morfin konsantrasyonunun tespit edilmesi amacıyla 1 mg/mL konsantrasyonda morfin içeren metanol içerisindeki standart madde çözeltisi içinde kullanıldı. Bu stok çözeltiden farklı konsantrasyonda numunelerin elde edilmesi için seyreltme gerçekleştirilerek 125 ppm, 250 ppm ve 500 ppm konsantrasyonlarında nihai çözeltiler oluşturuldu ve yüzeylere 2 µL damlatıldı. Akabinde normal oda koşullarında hava akımına ve ısıya maruz bırakılmadan 10 dakikalık inkübasyon ile kurumaya bırakıldı. Devamında standart madde numunesi üzerine SERS sinyallerinin artırılması amacıyla 2 µL koloidal AgNP damlatıldı. 785 nm lazer kaynaklı Raman Spektroskobu ile toplanan her bir numunenin beş ayrı noktasından SERS spektrumları alındı ve ortalamaları kaydedildi (Şekil 4.13., Şekil 4.14., Şekil 4.12., Şekil 4.16., Şekil 4.17.).

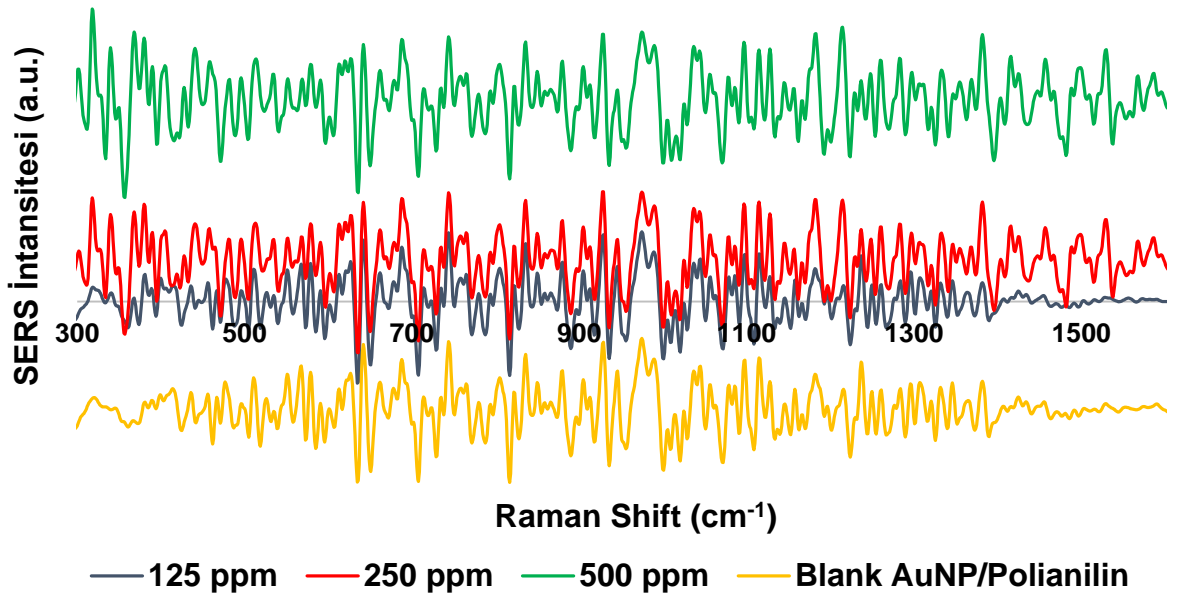


Şekil 4.13. AuNR yüzeyde farklı konsantrasyonlarda morfinin SERS spektrumları

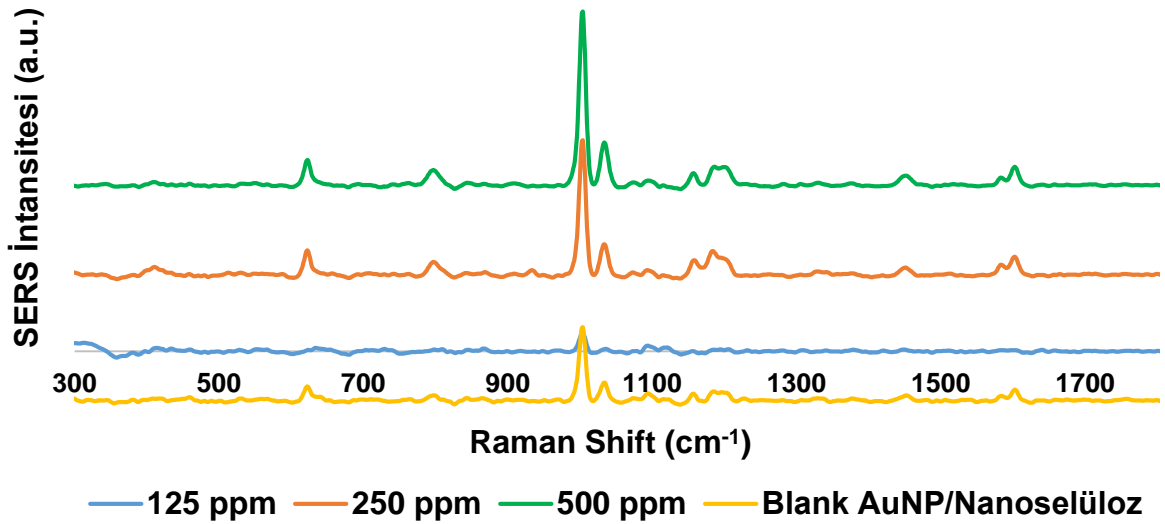
Farklı konsantrasyonlarda morfinin AgNS (Şekil 4.8.), AuNP/Polianilin (Şekil 4.9.), AuNP/Nanoselüloz (Şekil 4.10.), TLC (Şekil 4.11.) SERS spektrumları blank yüzey spektrumları ile karşılaştırılmalı olarak verilmiştir.



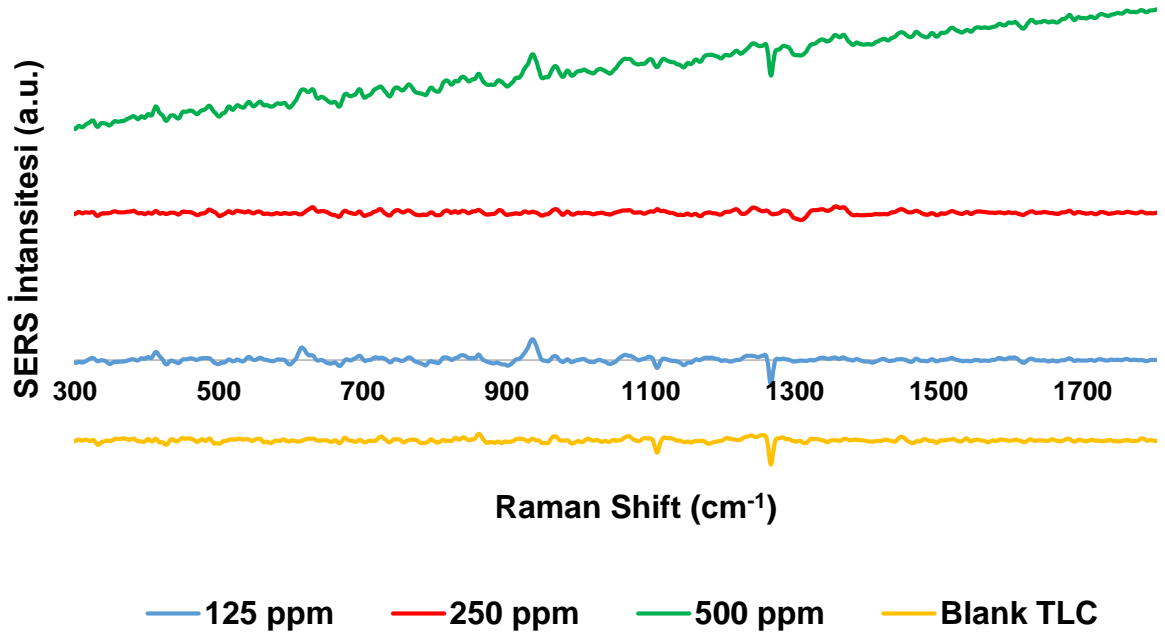
Şekil 4.14. AgNS yüzeyde farklı konsantrasyonlarda morfinin SERS spektrumları



Şekil 4.15. AuNP/Polianilin yüzeyde farklı konsantrasyonlarda morfinin SERS spektrumları



Şekil 4.16. AuNP/Nanoselüloz yüzeyde farklı konsantrasyonlarda morfinin SERS spektrumları



Şekil 4.17. TLC yüzeyde farklı konsantrasyonlarda morfinin SERS spektrumları

Söz konusu beş farklı yüzeyden elde edilen SERS spektrumlarının (Şekil 4.13., Şekil 4.14., Şekil 4.12., Şekil 4.16., Şekil 4.17.) karşılaştırılması sonucunda; AuNP/Polianilin yüzey dışındaki tüm yüzeylerde analiz edilen numunedeki morfin konsantrasyonunun artması ile fonksiyonel gruplara işaret eden tanımlayıcı piklerin intansitelerinde de korele şekilde artış meydana geldiği, ancak bu değişimin AuNR yüzeyde en dramatik ve stabil şekilde seyrettiği saptanmıştır.

Buna ek olarak konsantrasyon düştükçe tanımlamada kullanılan Raman bandlarında TLC, AuNP/Nanoselüloz ve AgNS yüzeylerinde sayısal açıdan azalma olduğu ancak AuNRs’de saptanan pik sayısının stabil olduğu tespit edildi. Bu bilgiler ışığında farklı konsantrasyonlarda SERS spektrum “Raman band sayısı, niteliği ve bantların bulunduğu nokta” açısından en stabil sonuçları sağlayan yüzeyin AuNR olduğu saptandı.

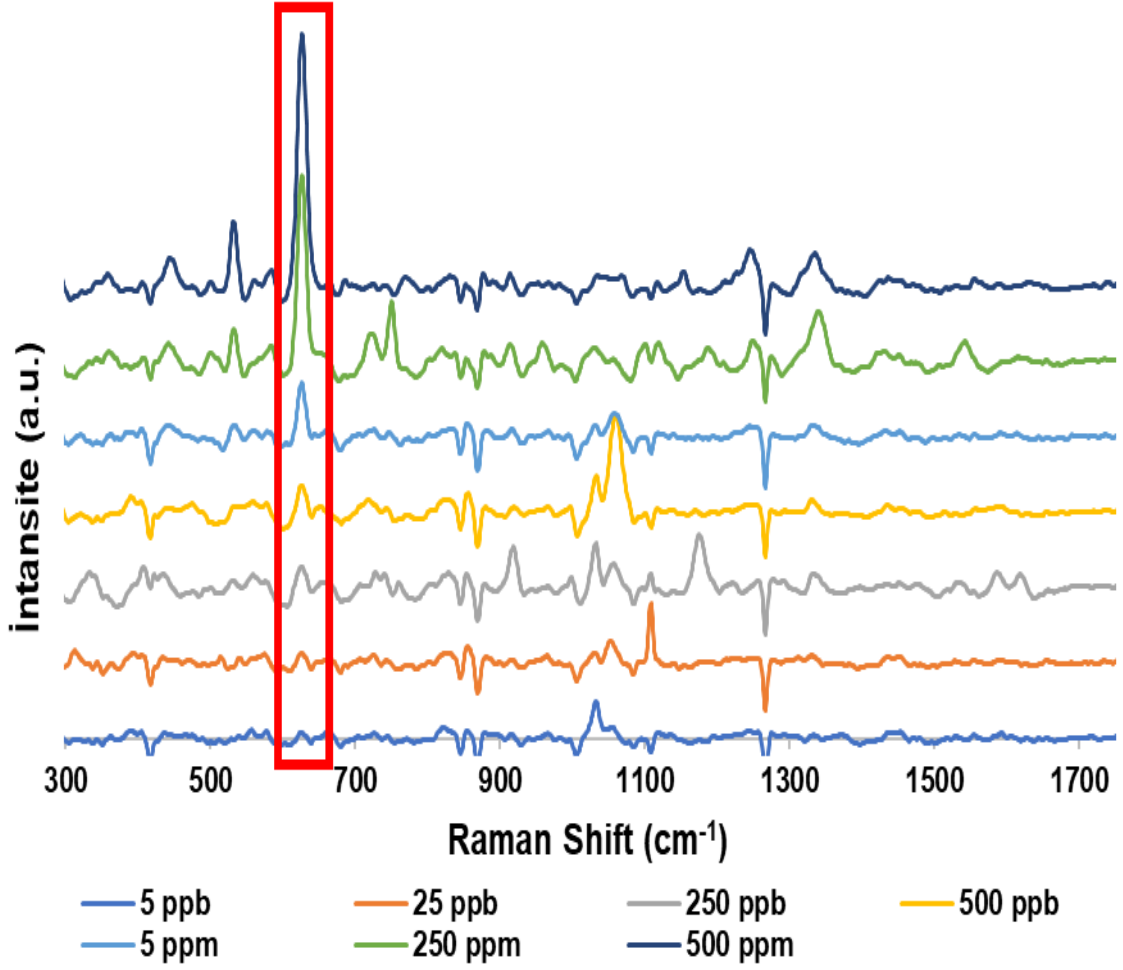
Detaylı bir literatür taraması ile bu tez çalışmasının eroin ve metabolitlerine dair SERS spektrumlarını ortaya koyan ve tükürük numunesinde yeni bir toksikolojik

analiz yöntemi olarak eroin ve metabolitlerinin konsantrasyonlarını ortaya koyan ilk çalışmadır. Bu çalışmada, Yılmaz ve ark. tarafından geliştirilen yöntemle üretilmiş AuNR yüzey [113] ve sinyal arttırıcı AgNP kolloid yardımı Raman spektrumlarının iyileştirilmesi ve daha yüksek intansitede bantların elde edilmesi sağlanmıştır. Bu vesile ile karmaşık biyolojik numunelerde de çok düşük konsantrasyonlarda eroin ve metabolitlerinin tanımlanması ve miktarlarının belirlenebileceği gösterilmiştir. Yukarıda sunulan verilerden de anlaşılacağı gibi çalışmamızda 627 cm^{-1} 'deki bant, dört analitin tümü için yoğunluğu düşük konsantrasyonlarda da tanımlanabilen ve AuNR dışındaki diğer Raman-aktif yüzeylerde intansitesi göreceli olarak düşük olmakla birlikte en belirgin ve uygun banttı.

Bulgular ve tartışma bölümünün ilk basamağında sunulan analitik değerlendirme ve bilgiler bağlamında genelde opiyat ve özelde de eroin, MM, M3B ve 6MAM SERS ile tespiti ve miktarlandırılması açısından en uygun Raman-aktif substratın AuNRs olduğu, bu yüzeyin kullanımına ek olarak sinyal arttırıcı olarak kullanılan kolloid AgNP'nin sinerjik desteği ile eroin ve metabolitlerinin hızlı ve duyarlı şekilde tespitinin sağlandığı anlaşılmıştır.

4.3 Eroin, MM, M3B ve 6MAM'ın SERS spektrumlarının elde edilmesi ve saf madde ölçümü için kalibrasyon eğrilerinin çizilmesi

Eroin saf standart maddesi içeren çözeltilere, eşit miktarda AgNP kolloid eklenmiş ve nihai eroin konsantrasyonları 5 ppb, 25 ppb, 500 ppb, 50 ppm, 250 ppm, 500 ppm ve 2500 ppm olan saf numunelerin her bir konsantrasyonu için AuNR yüzeye damlatılan numunenin beş ayrı noktasından alınan SERS spektrumlarının ortalamaları kaydedilmiştir (Şekil 4.18.).

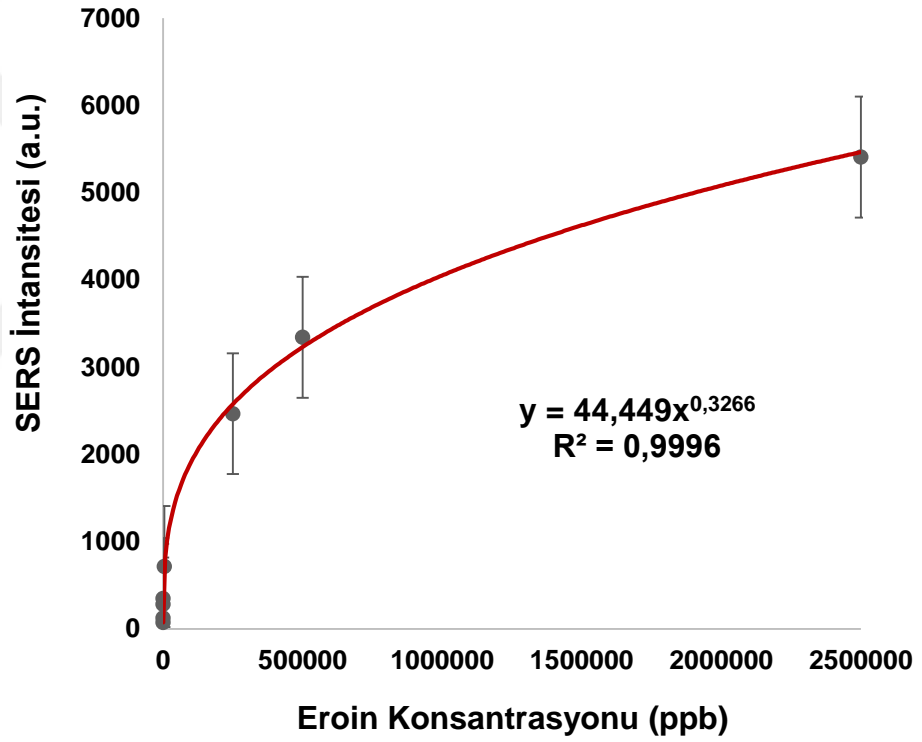


Şekil 4.18. Eroin standart madde 5 ppb ile 2500 ppm konsantrasyon aralığında AuNR yüzey ve AgNP kolloid kullanılarak elde edilen SERS spektrumları

Farklı eroin konsantrasyonlarını içeren numunelerin spektrumlarında Raman shift 627cm^{-1} 'deki SERS intansitesi/yoğunluğu arasındaki ilişki, üssel tahmin için kullanılarak non-lineer kalibrasyon eğrisi oluşturulmuş ve belirleme katsayısı (R^2) hesaplanmıştır (Çizelge 4.4. ve Şekil 4.19.).

Çizelge 4.4. Eroin standart maddesi için konsantrasyon ve 627 cm⁻¹ bandındaki intansite değerleri

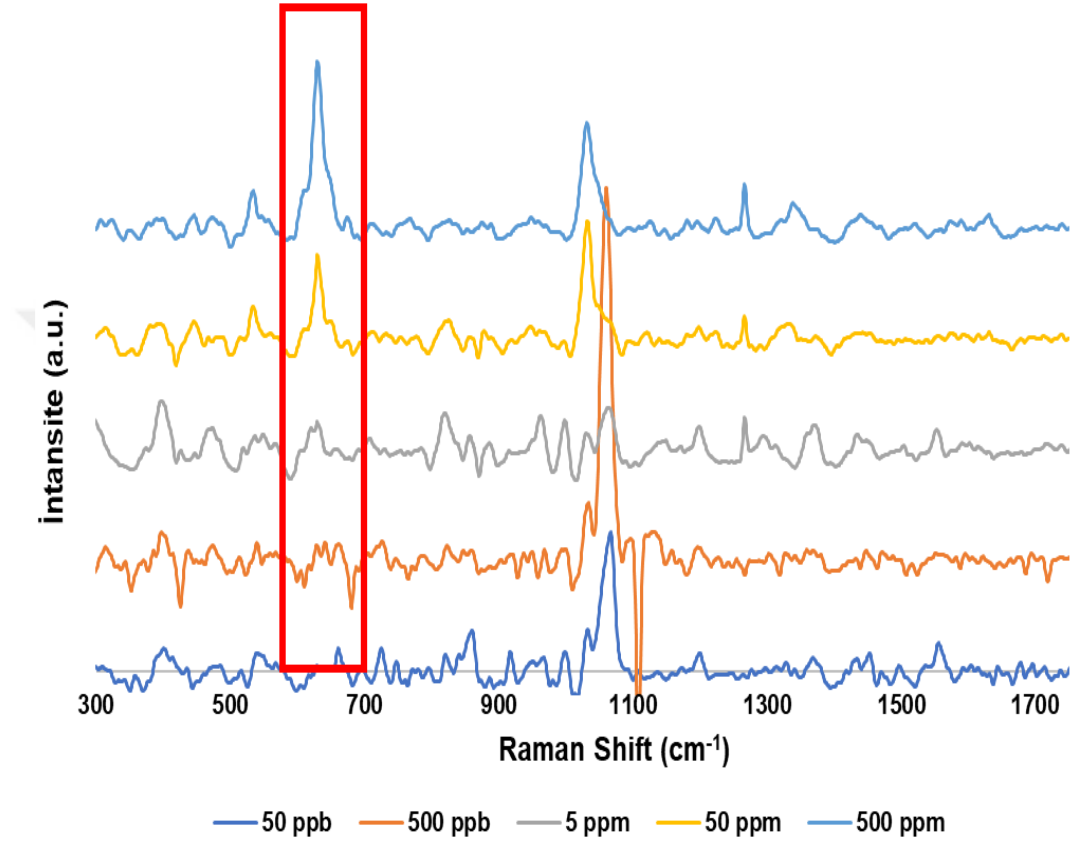
Konsantrasyon (ppm)	5	25	250	500	5000	250000	500000	2500000
SERS İntansitesi (a.u.)	74	123,6	280,5	348,3	715	2467	3343	5409



Şekil 4.19. Eroin standart madde AuNR yüzeyde SERS analizi non-lineer kalibrasyon eğrisi

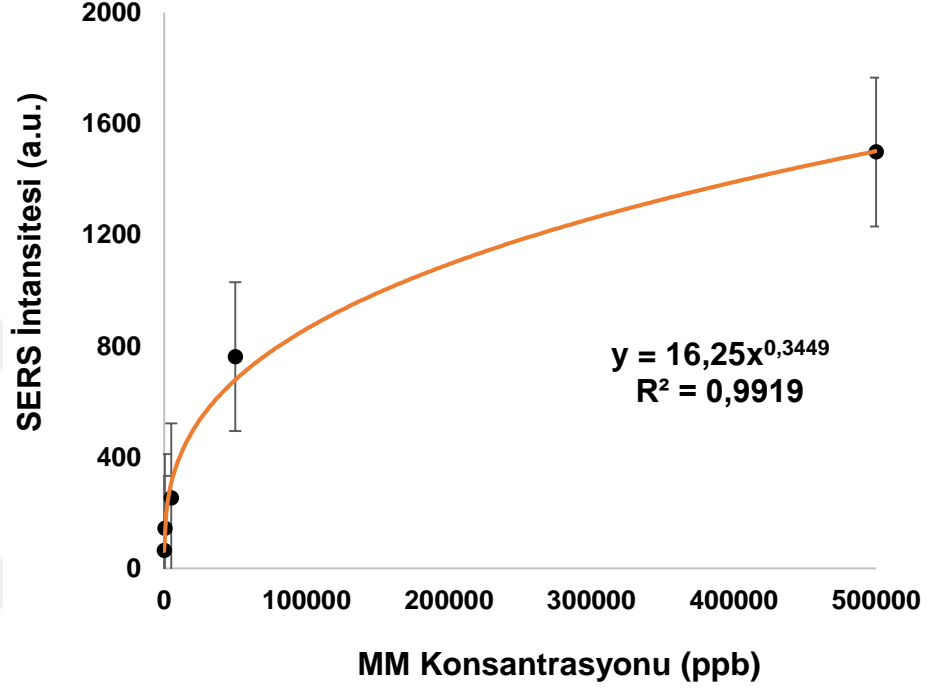
Farklı konsantrasyonlarda saf MM saf standart maddesi içeren çözeltilerin eldesi için yapılan seyreltme işlemini müteakiben sinyal arttırıcı olarak eşit miktarda AgNP kolloid eklenmiş ve nihai olarak elde edilen 50 ppb, 5000 ppb, 5 ppm, 50

ppm ve 500 ppm konsantrasyonlarında MM içeren numunelerin her biri AuNR yüzeye damlatılarak beş ayrı noktadan alınan SERS spektrumlarının ortalamaları kaydedilmiştir (Şekil 4.20.).



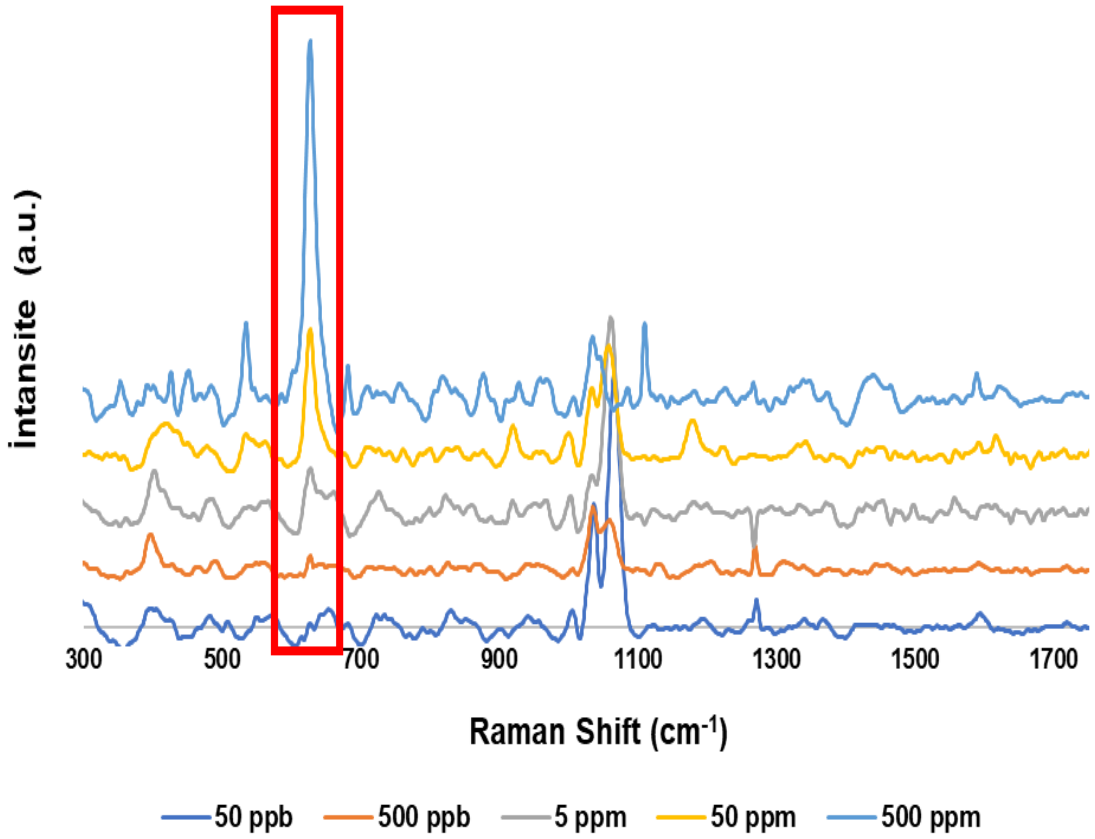
Şekil 4.20. MM standart madde 50 ppb ile 500 ppm konsantrasyon aralığında AuNR yüzey ve AgNP kolloid kullanılarak elde edilen SERS spektrumları

MM numunelerinin spektrumlarında Raman shift 627cm^{-1} 'deki SERS intansitesi/yoğunluğu arasındaki ilişki, üssel tahmin için kullanılarak non-lineer kalibrasyon eğrisi oluşturulmuş ve belirleme katsayısı (R^2) hesaplanmıştır (Şekil 4.21.).



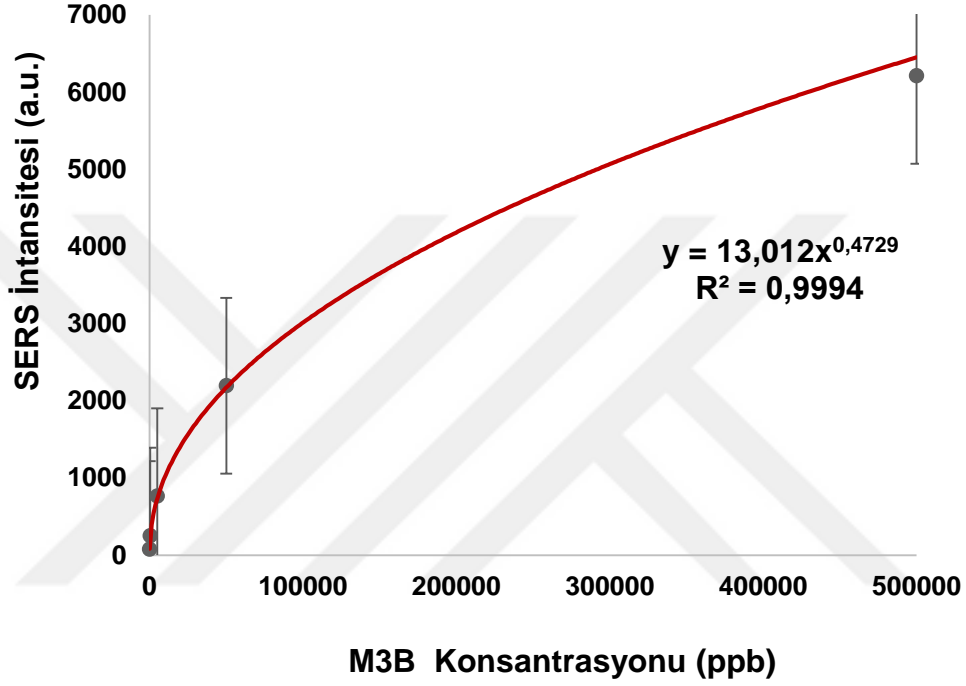
Şekil 4.21. MM standart madde AuNR yüzeyde SERS analizi non-lineer kalibrasyon eğrisi

M3B saf standart maddesi içeren çözeltilerin elde edilmesi için yapılan seyreltme işlemini müteakiben sinyal artırıcı olarak eşit miktarda AgNP kolloid eklenmiş ve nihai olarak elde edilen 50 ppb, 5000 ppb, 5 ppm, 50 ppm ve 500 ppm konsantrasyonlarında M3B içeren numunelerin her biri AuNR yüzeye damlatılarak beş ayrı noktadan alınan SERS spektrumlarının ortalamaları kaydedilmiştir (Şekil 4.22.).



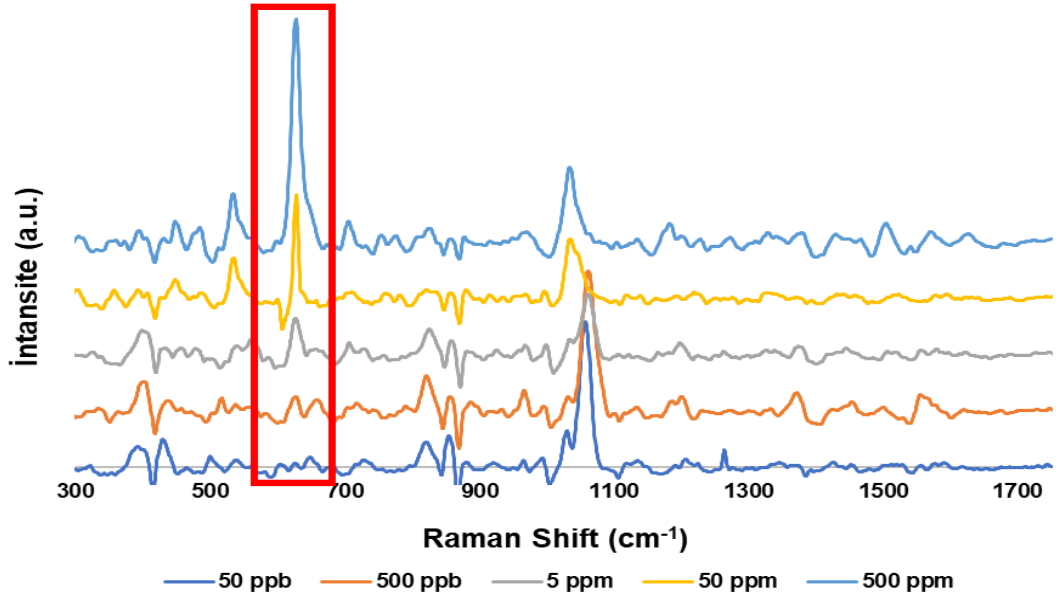
Şekil 4.22. M3B standart madde 50 ppb ile 500 ppm konsantrasyon aralığında AuNR yüzey ve AgNP kolloid kullanılarak elde edilen SERS spektrumları

M3B numunelerinin spektrumlarında Raman shift 627cm^{-1} 'deki SERS intansitesi/yoğunluğu arasındaki ilişki, üssel tahmin için kullanılarak non-lineer kalibrasyon eğrisi oluşturulmuş ve belirleme katsayısı (R^2) hesaplanmıştır (Şekil 4.23.).



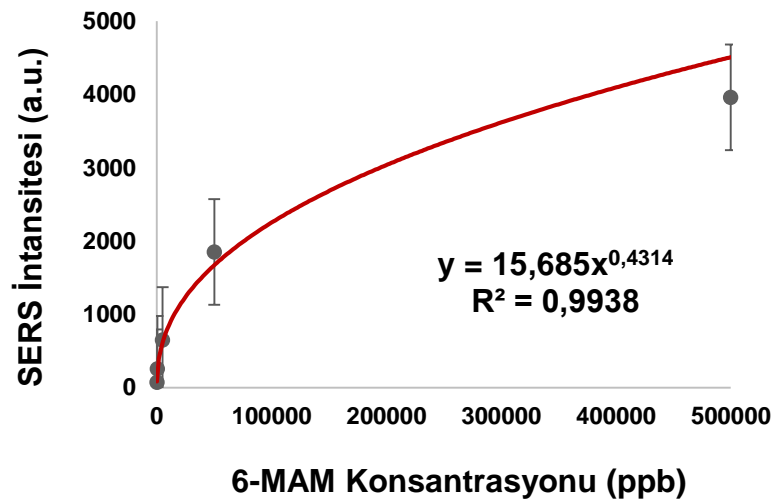
Şekil 4.23. M3B standart madde AuNR yüzeyde SERS analizi non-lineer kalibrasyon eğrisi.

6-MAM saf standart maddesi içeren çözeltilerin eldesi için yapılan seyreltme işlemini müteakiben sinyal artırıcı olarak eşit miktarda AgNP kolloid eklenmiş ve nihai olarak elde edilen 50 ppb, 5000 ppb, 5 ppm, 50 ppm ve 500 ppm konsantrasyonlarında 6-MAM içeren numunelerin her biri AuNR yüzeye damlatılarak beş ayrı noktadan alınan SERS spektrumlarının ortalamaları kaydedilmiştir (Şekil 4.24.).



Şekil 4.24. 6-MAM standart madde 50 ppb ile 500 ppm konsantrasyon aralığında AuNR yüzey ve AgNP kolloid kullanılarak elde edilen SERS spektrumları

6-MAM numunelerinin spektrumlarında Raman shift 627cm^{-1} 'deki SERS intansitesi/yoğunluğu arasındaki ilişki, üssel tahmin için kullanılarak non-lineer kalibrasyon eğrisi oluşturulmuş ve belirleme katsayısı (R^2) hesaplanmıştır (Şekil 4.25.).



Şekil 4.25. 6-MAM standart madde AuNR yüzeyde SERS analizi non-lineer kalibrasyon eğrisi

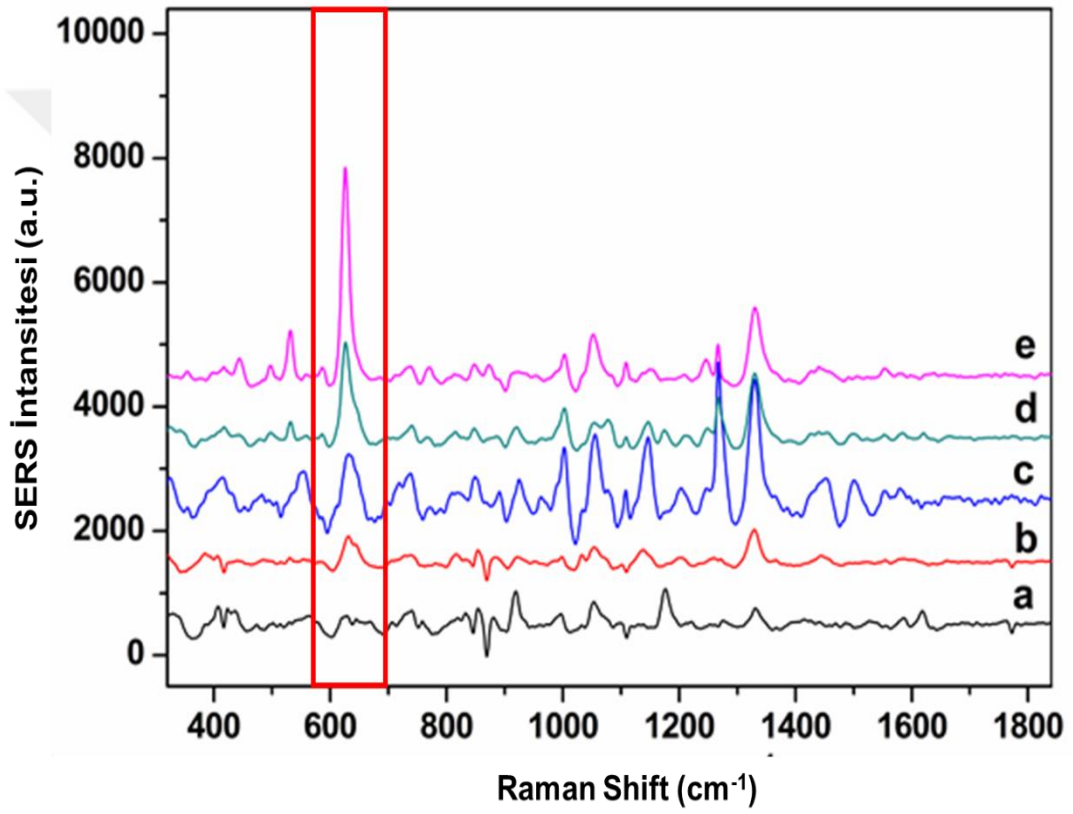
4.4 Eroin, MM, M3B ve 6MAM ile spike edilmiş tükürük numunelerinin SERS analizi, konsantrasyon tespiti için intansite-konsantrasyon eşleşme noktası ile formül oluşturulması, yöntemin kalibrasyonu, LOD ve LOQ değerlerinin belirlenmesi,

Tükürük numunelerinde 20 ppb, 1 ppm, 5 ppm, 25 ppm ve 125 ppm konsantrasyonlarında eroin, MM, M3B ve 6-MAM bulunacak şekilde tüm solüsyonlar için benzer prosedür uygulandı. AgNP'li çözelti, SERS spektrumlarını elde etmek için AuNR yüzeye 2 µL miktarında damlatıldı. Normal oda koşullarında 10 dakikalık bir inkübasyon süresinden sonra, SERS spektrumları, yüzeye damlatılmış spike numunelerin beş farklı noktasından alındı. Eroin ve metabolitlerinin her bir konsantrasyonu için elde edilen beş spektrumun referans piklerinin intansitelerinin/yoğunluklarının ortalama değerleri kaydedilerek aşağıdaki grafiklerde sunuldu.

Matriks ve standart madde karışımının spektrumlarının belirlenmesine ek olarak yukarıda izah edilen prosedürle uyumlu olarak tükürük numunelerinde 20 ppb ile 125 ppm beş farklı konsantrasyonda Eroin, MM, M3B ve 6-MAM standart maddeleri olacak şekilde ayarlanan çözeltiler kullanılarak AuNR yüzey ve AgNP kolloid sinyal artırıcı aracılığı ile SERS analizi yapıldı. Elde edilen veriler kullanılarak tükürük matriksinde -geri kazanım hesaplama sorununu ortadan kaldırmak amacıyla- eroin ve metabolitlerinin kalibrasyon eğrileri çizildi, R^2 değerleri hesaplandı ve çalışılan numunelerde konsantrasyon ölçümü için pik intansitesi-konsantrasyon eşleme formülü elde edildi.

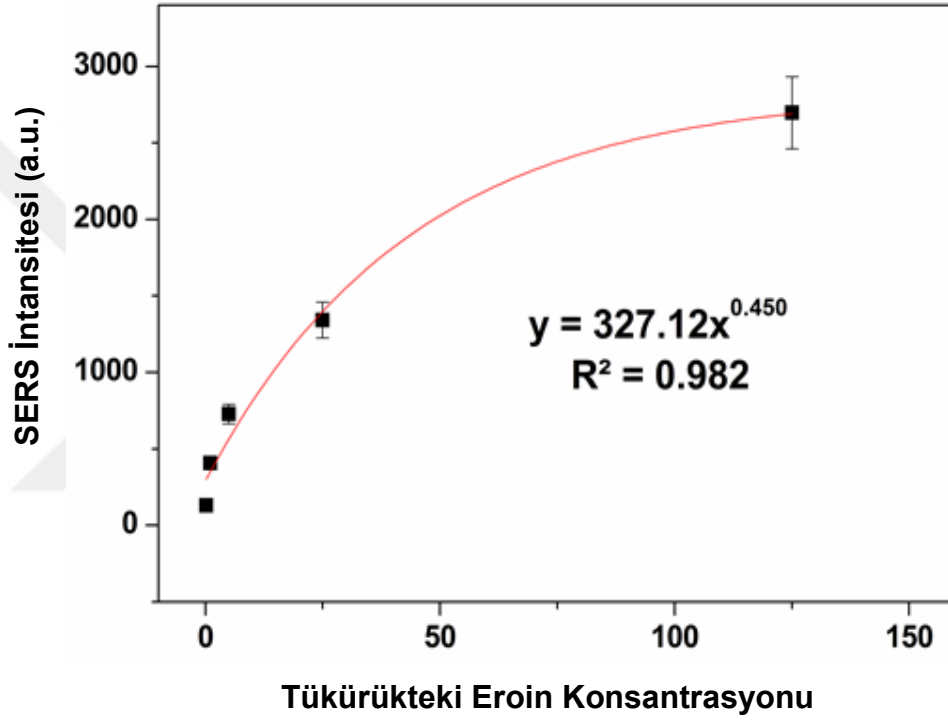
4.4.1 Tükürük numunesinde eroin analizi ve konsantrasyon değerlendirilmesi

20 ppb ile 125 ppm arası konsantrasyonlarda eroin içerecek şekilde hazırlanan tükürük numunelerinin ((a) 20 ppb (b) 1 ppm, (c) 5 ppm, (d) 25 ppm, (e) 125 ppm) SERS analizlerinde 627 cm^{-1} 'de C-C_{alicyclic,aliphatic} vibrasyon bandları şekil 4.26.'da gösterilmektedir.



Şekil 4.26. 20 ppb ile 125 ppm arası eroin konsantrasyonlarında ((a) 20 ppb (b) 1 ppm, (c) 5 ppm, (d) 25 ppm, (e) 125 ppm) 627 cm^{-1} 'de C-C_{alicyclic,aliphatic} vibrasyon bandları

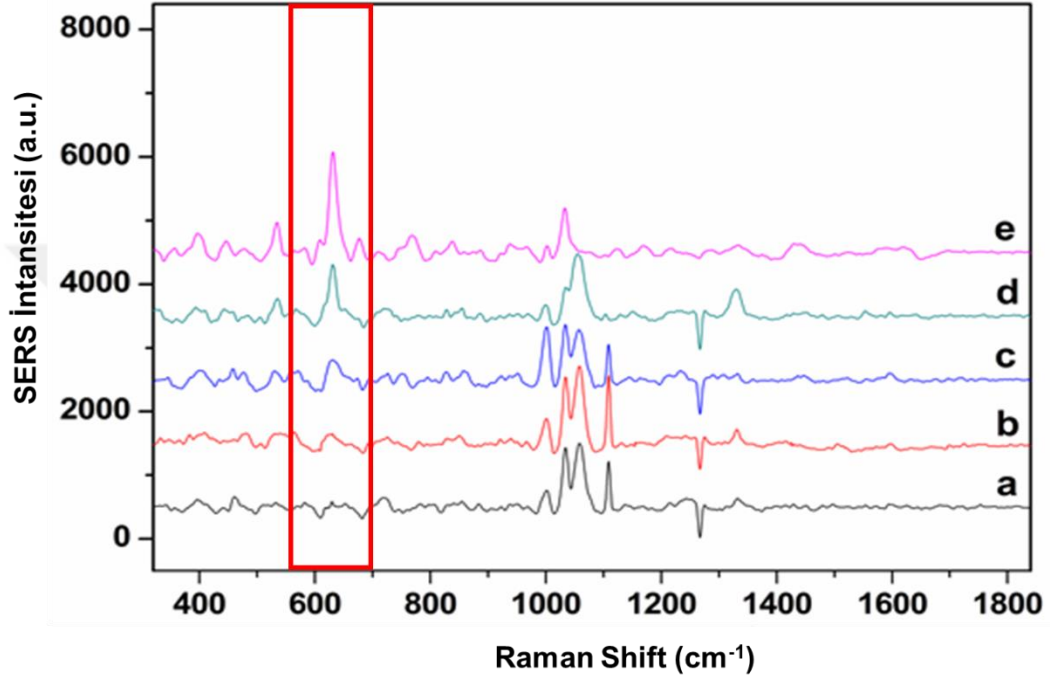
Tükürük numunelerinde 20 ppb ile 125 ppm beş farklı konsantrasyonda eroin standart maddesi olacak şekilde ayarlanan çözeltiler kullanılarak AuNR yüzey ve AgNP kolloid sinyal arttırıcı aracılığı ile SERS analizi yapıldı. Elde edilen veriler kullanılarak tükürük matrixinde -geri kazanım sorununu ortadan kaldıracak şekilde- oluşturulan eroin kalibrasyon eğrisi, R^2 değeri ve çalışılan numunelerde konsantrasyon ölçümü için pik intansitesi-konsantrasyon eşleme formülü şekil 4.27.'de gösterilmektedir.



Şekil 4.27. Tükürük numunesinde 20 ppb–125 ppm aralığında Eroin standart maddesi konsantrasyonları içer AuNR yüzey ve AgNP kolloid sinyal arttırıcı kullanılarak SERS analizi non-lineer kalibrasyon eğrisi ve pik intansitesi-konsantrasyon eşleme formülü

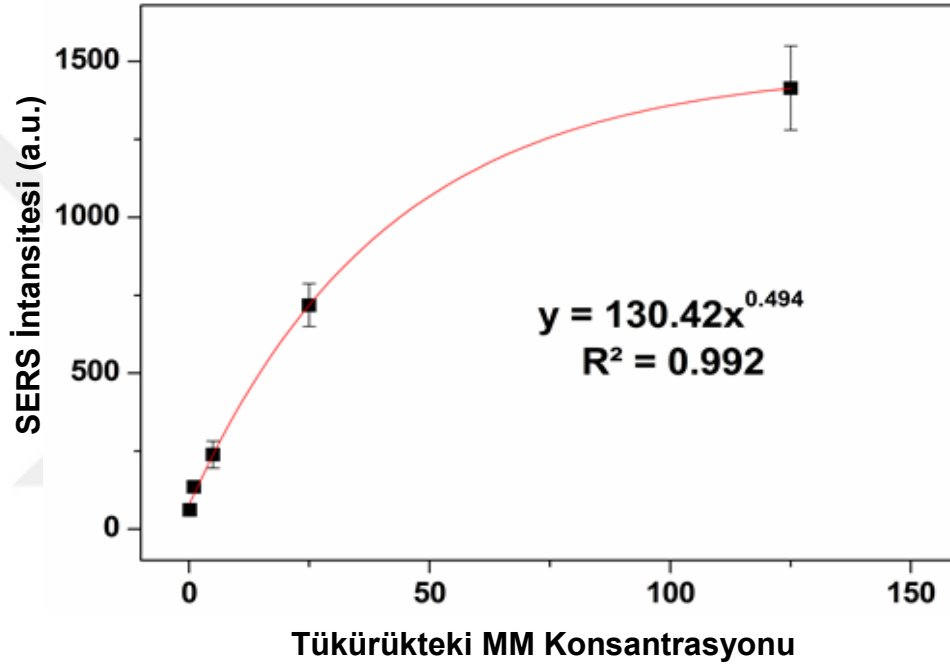
4.4.2 Tükürük numunesinde MM analizi ve konsantrasyon değerlendirmesi

20 ppb ile 125 ppm arası konsantrasyonlarda MM içerecek şekilde hazırlanan tükürük numunelerinin ((a) 20 ppb (b) 1 ppm, (c) 5 ppm, (d) 25 ppm, (e) 125 ppm) SERS analizlerinde 627 cm^{-1} 'de C-C_{alicyclic,aliphatic} vibrasyon bandları şekil 4.28.'de gösterilmektedir.



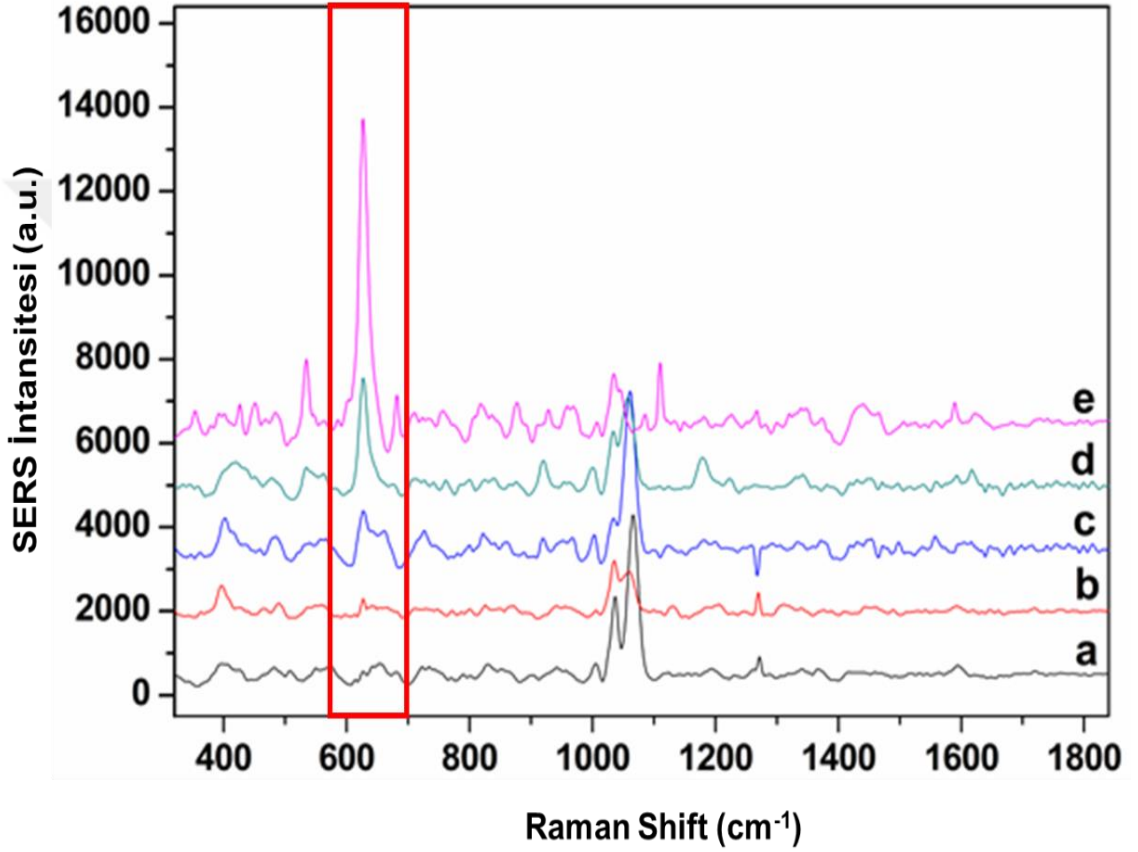
Şekil 4.28. 20 ppb ile 125 ppm arası MM konsantrasyonlarında ((a) 20 ppb (b) 1 ppm, (c) 5 ppm, (d) 25 ppm, (e) 125 ppm) 627 cm^{-1} 'de C-C_{alicyclic,aliphatic} vibrasyon bandları

Tükürük numunelerinde 20 ppb ile 125 ppm beş farklı konsantrasyonda MM standart maddesi olacak şekilde ayarlanan çözeltiler kullanılarak AuNR yüzey ve AgNP kolloid sinyal arttırıcı aracılığı ile SERS analizi yapıldı. Elde edilen veriler kullanılarak tükürük matrixinde MM düzey tespiti açısından -geri kazanım sorununu ortadan kaldıracak şekilde- oluşturulan eroin kalibrasyon eğrisi, R^2 değeri ve çalışılan numunelerde konsantrasyon ölçümü için pik intansitesi-konsantrasyon eşleme formülü şekil 4.29.'da gösterilmektedir.



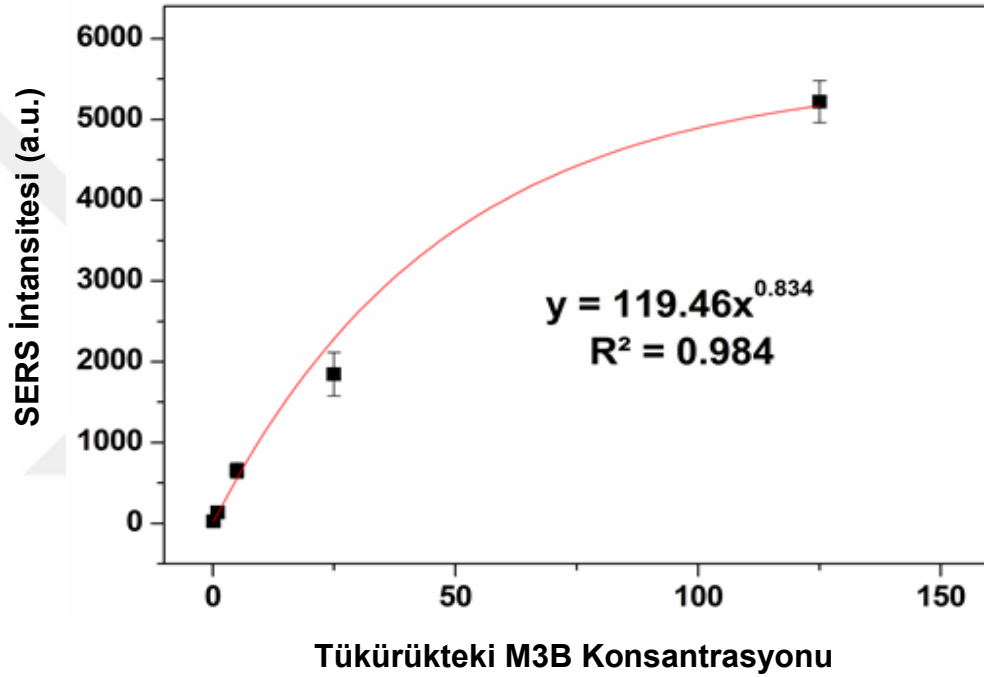
Şekil 4.29. Tükürük numunesinde 20 ppb – 125 ppm konsantrasyonu aralığındaki MM standart maddesinin AuNR yüzey ve AgNP kolloid sinyal arttırıcı kullanılarak SERS analizi non-lineer kalibrasyon eğrisi ve pik intansitesi-konsantrasyon eşleme formülü

4.4.3 Tükürük numunesinde MM analizi ve konsantrasyon değerlendirilmesi
20 ppb ile 125 ppm arası konsantrasyonlarda MM içerecek şekilde hazırlanan tükürük numunelerinin ((a) 20 ppb (b) 1 ppm, (c) 5 ppm, (d) 25 ppm, (e) 125 ppm) SERS analizlerinde 627 cm^{-1} 'de C-C_{alicyclic,aliphatic} vibrasyon bandları şekil 4.30.'da gösterilmektedir.



Şekil 4.30. 20 ppb ile 125 ppm arası M3B konsantrasyonlarında ((a) 20 ppb (b) 1 ppm, (c) 5 ppm, (d) 25 ppm, (e) 125 ppm) 627 cm^{-1} 'de C-C_{alicyclic,aliphatic} vibrasyon bandları

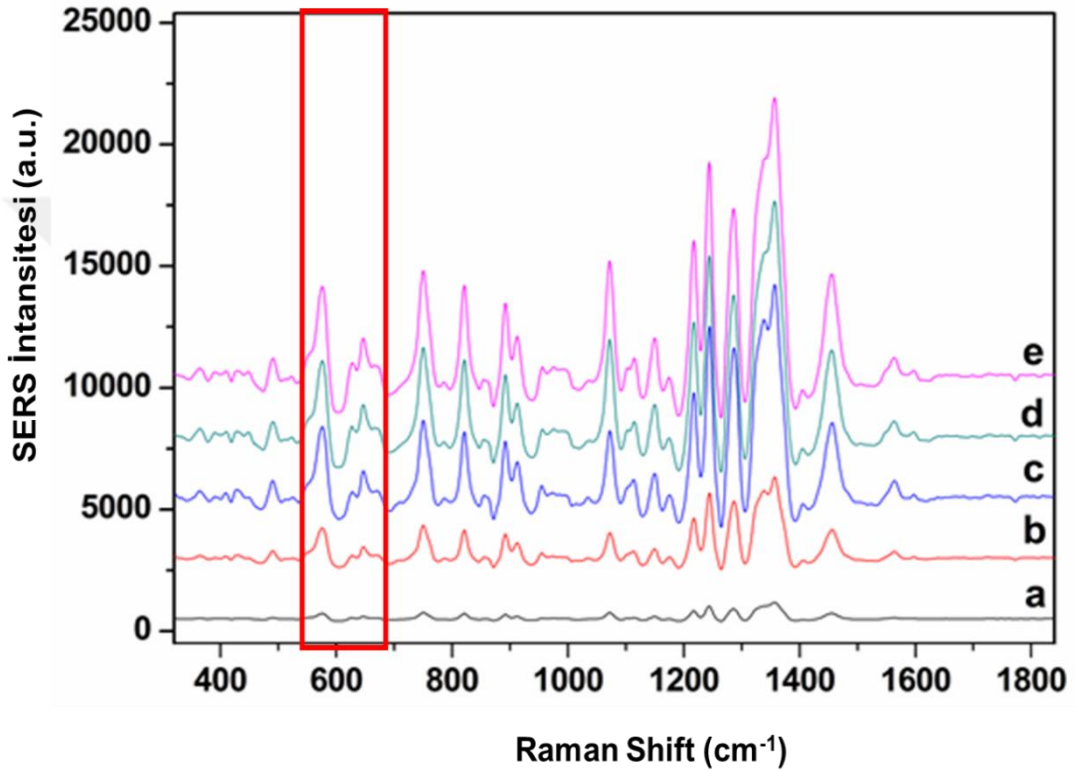
Tükürük numunelerinde 20 ppb ile 125 ppm beş farklı konsantrasyonda M3B standart maddesi olacak şekilde ayarlanan çözeltiler kullanılarak AuNR yüzey ve AgNP kolloid sinyal artırıcı aracılığı ile SERS analizi yapıldı. Elde edilen veriler kullanılarak tükürük matrixinde M3B düzey tespiti açısından -geri kazanım sorununu ortadan kaldıracak şekilde- oluşturulan eroin kalibrasyon eğrisi, R^2 değeri ve çalışılan numunelerde konsantrasyon ölçümü için pik intansitesi-konsantrasyon eşleme formülü şekil 4.31.'de gösterilmektedir.



Şekil 4.31. Tükürük numunesinde 20 ppb – 125 ppm konsantrasyonu aralığındaki M3B standart maddesinin AuNR yüzey ve AgNP kolloid sinyal artırıcı kullanılarak SERS analizi non-lineer kalibrasyon eğrisi ve pik intansitesi-konsantrasyon eşleme formülü

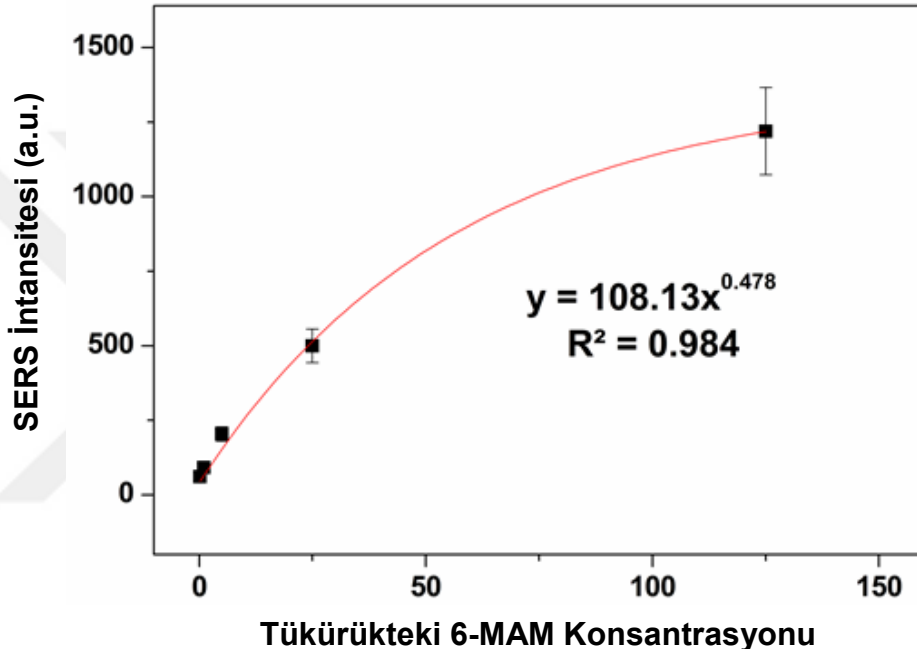
4.4.4 Tükürük numunesinde 6-MAM analizi ve konsantrasyon değerlendirmesi

20 ppb ile 125 ppm arası konsantrasyonlarda 6-MAM içerecek şekilde hazırlanan tükürük numunelerinin ((a) 20 ppb (b) 1 ppm, (c) 5 ppm, (d) 25 ppm, (e) 125 ppm) SERS analizlerinde 627 cm^{-1} 'de C-C_{alicyclic,aliphatic} vibrasyon bandları şekil 4.32.'de gösterilmektedir.



Şekil 4.32. 20 ppb ile 125 ppm arası 6-MAM konsantrasyonlarında ((a) 20 ppb (b) 1 ppm, (c) 5 ppm, (d) 25 ppm, (e) 125 ppm) 627 cm^{-1} 'de C-C_{alicyclic,aliphatic} vibrasyon bandları

Tükürük numunelerinde 20 ppb ile 125 ppm beş farklı konsantrasyonda 6-MAM standart maddesi olacak şekilde ayarlanan çözeltiler kullanılarak AuNR yüzey ve AgNP kolloid sinyal arttırıcı aracılığı ile SERS analizi yapıldı. Elde edilen veriler kullanılarak tükürük matrixinde 6-MAM düzey tespiti açısından -geri kazanım sorununu ortadan kaldıracak şekilde- oluşturulan eroin kalibrasyon eğrisi, R^2 değeri ve çalışılan numunelerde konsantrasyon ölçümü için pik intansitesi-konsantrasyon eşleme formülü şekil 4.33.'te gösterilmektedir.



Şekil 4.33. Tükürük numunesinde 20 ppb – 125 ppm konsantrasyonu aralığındaki 6-MAM standart maddesinin AuNR yüzey ve AgNP kolloid sinyal arttırıcı kullanılarak SERS analizi non-lineer kalibrasyon eğrisi ve pik intansitesi-konsantrasyon eşleme formülü

4.5 Valisayon çalışmaları

4.5.1 Kalibrasyon Modeli

Saf standart madde, tükürük numunesi, seyreltilmiş konsantrasyonlar için distile su karışımları ile beş farklı konsantrasyonda kalibratörler hazırlandı. Elde edilen verilere göre kalibrasyon modellemesinin eksponensiyel olduğu saptandı ve kalibrasyon katsayısı ile konsantrasyon intansite eşleşme formülü belirlendi.

4.5.2 Çalışma Aralığı

Saf standart madde ve spike tükürük numuneleri ile düşükten yükseğe doğru çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan kalibratör numuneler geliştirilen yöntemle göre en az beş ardışık SERS analizi gerçekleştirilerek yöntemin kalibrasyon eğrileri her bir maddenin hem saf hali hem de tükürük numunesindeki hali için oluşturulmuştur. Saf standart maddeler için 50 ppb ile 500 ppm aralığında tükürük numunelerinde ise 20 ppb ile 125 ppm aralığında çalışmalar gerçekleştirilmiş ve konsantrasyon artışı ile birlikte exponensiyel seyir elde edilmiştir.

4.5.3 Tespit alt sınırı (LOD) ve miktarlandırma alt sınırı (LOQ) hesaplanması

En düşük kalibratör konsantrasyonu ile hazırlanan kontrol numunesinin ardışık şekilde on kez SERS analiz sonuçları esas alınarak standart formüller kullanılarak yöntemin LOD (Limit of detection/Tespit Alt Sınırı= $3x(SD/\sqrt{n})$) ve LOQ (Limit of quantification/Miktarlandırma Alt Sınırı= $10x(SD/\sqrt{n})$) düzeyleri belirlenmiştir.

Yukarıda sunulan analizler değerlendirildiğinde; 20 ppb ile 125 ppm arası konsantrasyonlarda eroin, MM, M3B ve 6-MAM içerecek şekilde hazırlanan tükürük numunelerinin ((a) 20 ppb (b) 1 ppm, (c) 5 ppm, (d) 25 ppm, (e) 125 ppm) AuNR yüzey ve AgNP kolloid sinyal artırıcı kullanılarak SERS analizlerinde elde edilen spektra verileri ve 627 cm^{-1} 'de C-C_{alicyclic,aliphatic} vibrasyon bandları ile bunların yanı sıra tükürük numunelerinde 200 ppb – 125 ppm konsantrasyonu aralığındaki eroin, MM, M3B ve 6-MAM standart maddelerinin non-lineer kalibrasyon eğrileri ve pik intansitesi-konsantrasyon eşleme formülleri üzerine elde edilen tükürük numunesinde eroin, MM, M3B ve 6-MAM'ın toksikolojik analiz parametreleri çizelge 4.5.'te sunulmuştur.

Çizelge 4.5. Tükürükte eroin, MM, M3B ve 6-MAM analiz parametreleri

	Eroin	MM	M3B	6-MAM
Eşitlik	$y=327.12x^{0,450}$	$y=130.42x^{0,494}$	$y=119.46x^{0,834}$	$y=108.13x^{0,478}$
R2 Değeri	0,982	0,992	0,984	0,984
LOD (ppb)	31,69	20,91	17,01	19,91
LOQ (ppb)	95,06	62,74	51,03	59,73
Çalışma Aralığı	20 ppb – 125 ppm	20 ppb – 125 ppm	20 ppb – 125 ppm	20 ppb – 125 ppm

4.5.4 Bias-Doğruluk

Üç farklı konsantrasyonda (düşük=100 ppb, orta=5 ppm ve yüksek=125 ppm) elde edilen numunelerde gün-içi ve günler-arası (dört gün süre ile) on ardışık SERS analizinde belirlenen ortalama verilerden bias belirlendi. $\pm\%20$ ranji içerisindeki veriler kabul edilebilir nitelikte bias şeklinde kayda alındı.

4.5.5 Tekrarlanabilirlik

Üç farklı konsantrasyonda (düşük=100 ppb, orta=5 ppm ve yüksek=125 ppm) toksikoloji laboratuvar yöntem validasyonlarında uygulandığı gibi ardışık altı gün boyunca gün-içi ve günler-arası beş mükerrer analizle saf madde konsantrasyonlarına yönelik SERS analizler gerçekleştirilmiştir. CV, %CV ve %Bias. $\pm\%20$ ranji içerisindeki veriler kabul edilebilir nitelikte bias şeklinde kayda alındı (Çizelge 4.6 ve Çizelge 4.7).

Çizelge 4.6. Tükürükte MM konsantrasyonlarının gün-içi SERS analizleri tekrarlanabilirlik validasyon parametreleri (6 gün süre ile)

MM Konsantrasyonu	SERS Ortalaması	±SD	CV	% CV	% Bias
100 ppb	98,12 ppb	4,12	0,04	4,20	1,88
5 ppm	4,86 ppm	0,30	0,06	6,17	2,80
125 ppm	129,85 ppm	5,10	0,04	3,93	-3,88

Çizelge 4.7. Tükürükte MM konsantrasyonlarının günler-arası SERS analizlerinde tekrarlanabilirlik/validasyon parametreleri (1, 2, 3, 4 gün)

MM Konsantrasyonu	SERS Ortalaması	±SD	CV	% CV	% Bias
100 ppb	103,95 ppb	7,21	0,07	6,94	-3,95
5 ppm	5,41 ppm	0,46	0,09	8,50	-8,20
125 ppm	122,35 ppm	8,18	0,07	6,69	2,12

Tekrarlanabilirlik açısından bir diğer parametre olan laboratuvar ortamı stabilitesi (Benchtop Stability) bağlamında tükürükte MM konsantrasyonlarının substrat üzerindeki kurumuş numunede stabilitesi açısından yapılan analizlere ek olarak 7., 14., 21. ve 28. gün analizleri gerçekleştirilmiştir. CV, %CV ve %Bias. \pm %20 ranjı içerisindeki veriler kabul edilebilir nitelikte bias şeklinde kayda alındı (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. Tükürükte MM konsantrasyonlarının substrat üzerindeki kurumuş numunede laboratuvar ortamı stabilitesi açısından tekrarlanabilirlik analizi parametreleri (7, 14, 21 ve 28. günler)

MM Konsantrasyonu	SERS Ortalaması	±SD	CV	% CV	% Bias
100 ppb	96,82 ppb	9,18	0,09	9,48	3,18
5 ppm	5,32 ppm	0,36	0,07	6,77	-6,40
125 ppm	119,28 ppm	6,18	0,05	5,18	4,58

4.5.6 Kalıntı (Taşınım)

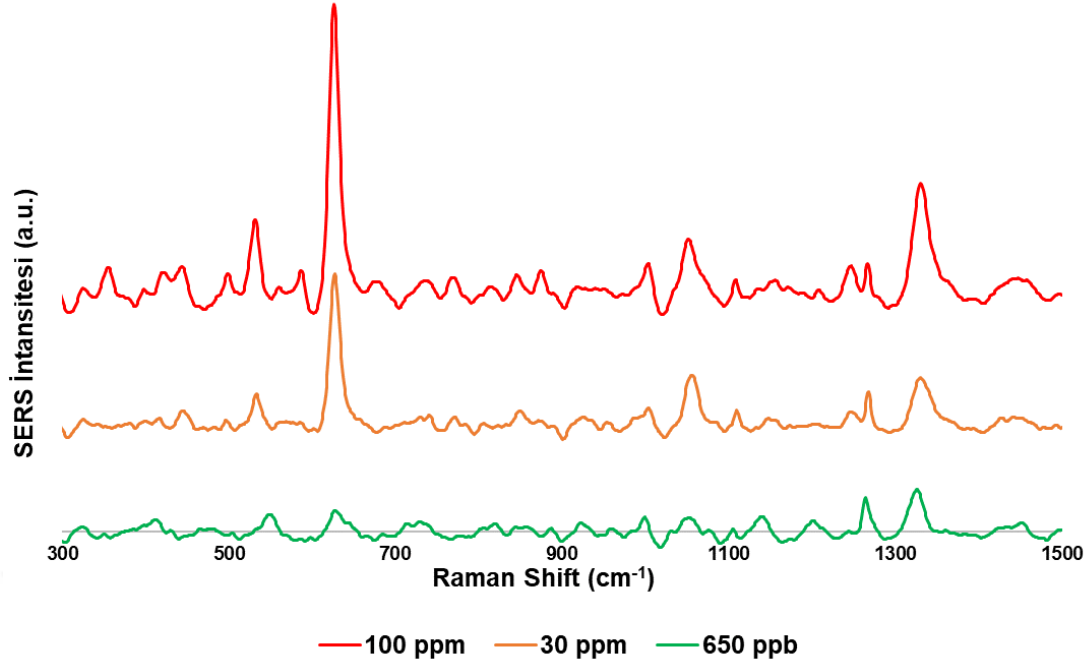
SERS analizlerinde substratın tekrar kullanımı açısından taşınım, kalıntı madde bulunma sorunu olup olmayacağı, substrat yıkandığı halde bir sonraki çalışma açısından blank kabul edilip edilmeyeceğinin tespiti açısından en yüksek konsantrasyon olarak 125 ppm MM içerecek şekilde hazırlanan tükürük numunesi substrat üzerinde işaretlenmiş bir alana damlatılarak, rutin yöntemle analiz edilmiştir. SERS analizini müteakiben substrat metanol ile yıkanmış ve 10 dakika süre ile distile su banyosuna bırakılmıştır. Kuruyan substratın işaretlenmiş alanından rutin yöntemle (beş farklı noktadan alınan spektrumun ortalamaları kaydedilip tek analiz olarak değerlendirilmiştir) üç ardışık SERS analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen spektrumların blank substratlarla eşit olduğu ve bu veriler bağlamında bir sonraki analizi interfere edecek nitelikte kalıntı veya taşınım olmadığı ortaya konmuştur.

4.6 Tükürük numunelerinde kör ölçümle eroin, MM, M3B ve 6MAM düzeylerinin tespiti ve SERS spektrumunun Excel'de formülün kullanımı ile madde konsantrasyonunun otomatize şekilde belirlenmesi

4.6.1 Tükürük numunelerinde kör ölçümle eroin, MM, M3B ve 6MAM düzeylerinin tespiti

Bu tez çalışması kapsamında geliştirilen yöntem ve bu doğrultuda ortaya konulan kalibre edilmiş formülleri değerlendirmek ve ölçümleri elde etmek için boş tükürük numunesinde spike edilmiş eroin, MM, M3B ve 6MAM standart maddeleri için 650 ppb, 30 ppm ve 100 ppm konsantrasyonlarında standart madde içerecek şekilde kör kontrol numuneleri hazırlandı.

Örnekleri analiz eden kişi kör bırakıldı ve örneklerin içerdiği uyuşturucu-uyarıcı madde konsantrasyonları hakkında herhangi bir bilgi vermedi. Numunelerin SERS spektrumları, geliştirilen yöntemle uygun olarak AuNR yüzeyde sinyal artırıcı AgNP ile beş farklı alandan elde edildi (şekil 4.34.). Bu beş alandan elde edilen spektrumların 627 cm^{-1} bant intansitelerinin ortalamaları kullanıldı.



Şekil 4.34. Kör analizi yapılan tükürük numunesinin SERS spektraları

Spektraların alınmasını müteakiben, numunedeki madde konsantrasyonları kalibrasyon eğrisindeki yoğunluk-konsantrasyon eşleşme noktasına göre geliştirilen formül ile hesaplandı. Numunedeki madde konsantrasyonun tespiti/hesaplanması için kullanılan eşitlikler C: Konsantrasyon ve İ: İnsansite olmak üzere aşağıda sıralanmıştır;

- Eroin için " $C_E = (I / 327.12)^{1/0.45}$ ",
- MM için " $C_{MM} = (I / 130.42)^{1/0.494}$ ",
- M3B için " $C_{M3B} = (I / 119.46)^{1/0.834}$ ",
- 6-MAM için ise " $C_{6-MAM} = (I / 108.13)^{1/0.478}$ "

Yukarıdaki bilgi, bulgu ve formülasyonlar ışığında blank tükürük numunesine düzeyi bilinerek eklenen eroin, MM, M3B ve 6-MAM'ın konsantrasyonlarının tespiti açısından kör bir araştırmacı tarafından geliştirilen yöntemin basamaklarına uygun şekilde gerçekleştirilen SERS analizi ile elde edilen 627 cm^{-1} bant intansitesi ve bu doğrultuda elde edilen sonuçlar çizelge 4.9.'da sunulmuştur.

Çizelge 4.9. Kör analizi yapılan tükürük numunesinde bilinen ve hesaplanan Eroin, MM, M3B ve 6-MAM konsantrasyonları

Madde	Bilinen Konsantrasyon (ppb)	Hesaplanan Konsantrasyon (ppb)
MM	650	620.46±28.12
	30000	31250.9±1989.48
	100000	98356.4±1214.56
M3B	650	673.35±36.44
	30000	29878.4±485.87
	100000	98503±781.94
6-MAM	650	634.92±18.2
	30000	29002.5±665.42
	100000	101541±1779.4
Eroin	650	632.71±21.71
	30000	28844.24±1298.83
	100000	98819.35±649.8

Mevcut adli veya klinik toksikoloji uygulamalarında kullanılan kantitatif analitik toksikoloji prosedürleri, enzimatik yöntemlere ve sahada kullanılan tarama testlerine kıyasla çok daha güvenilirken, bu sistemler ve analizler oldukça pahalı ve zaman alıcı olmalarının yanı sıra optimum analitik süreçler için standart ve iyi organize edilmiş laboratuvar koşullarına muhtaçtır. LC-MS veya GS-MS ile biyolojik bir sıvıda eroin konsantrasyonunun rutin analizi ortalama 60 ila 90 dakika zaman aldığı bilinmektedir [123]. Bunun aksine mevcut çalışma kapsamında SERS yöntemi ile tükürükte eroin ve metabolitlerinin konsantrasyonlarının analizinin, majör sapma ve sorunların oluşması halinde bile tüm çalışma basamakları dahil yaklaşık 20-30 dakika kadar sürdüğü anlaşılmıştır. Bu yöntemde standardı sağlamak için Adli toksikoloji laboratuvarında kullanılan ön analiz çalışmaları, ekstraksiyon basamakları dışlandığında analiz süresinin çok önemli ölçüde kısaldığı görülmektedir. Bu sürenin adli toksikoloji rutininde kullanılan enstrümantal analitik prosedürlere göre çok kısa olduğu dikkati çekmektedir. Bu nedenle, bu çalışma biyolojik sıvılardaki eroin ve metabolitlerinin

analizi için rutin eroin analiz sistemlerinden potansiyel olarak daha ucuz, daha kolay, daha geniş uygulama alan ve ortamına sahip ve daha hızlı bir yöntem önermektedir.

Geliştirilen yöntemin acil ve hızlı sonuç alınması gereken durumlarda kullanılabilmesi açık olmakla birlikte saha çalışmalarında sıkça kullanılan el-tipi Raman sistemi ile SERS eklentisine yönelik mekanizma geliştirilmesi ihtiyacı aşırıdır. El-tipi spektroskopi sahada ele geçirilen kararlı formdaki herhangi bir numuneyi hızlı ve doğru bir şekilde analiz etme fırsatı sağlama potansiyeline sahiptir [12,59,124]. Piyasada yasadışı ilaçların tespiti için satılan birçok ticari el-tipi Raman sistemi olmasına rağmen, bu sistemlerin çoğu floresanın üstesinden etkili bir şekilde gelemeyen ve nispeten daha düşük sinyal/gürültü oranlarına sahiptir [12,13,118,125]. SERS'in zenginleştirme niteliği bağlamında floresanın üstesinden gelmeye ve sinyal/gürültü oranlarını artırmaya yardımcı olacağı açıktır [20–22,25]. Bu bilgi ile uyumlu olarak Andreou ve ark. [12] çalışmalarında SERS ve AgNP kullanarak mikro-akışkan bir cihazla tükürükte yasadışı ilaçların saptanması, kimliklendirilmesi üzerinde çalıştı. Bu tez çalışmasında sıvı olan numunelerin hareketini kontrol etme potansiyeli ile homojen agregasyon sağlayabilecek AuNR yüzey ve sinyal artırıcı AgNP kullanımı ile eroin ve metabolitlerini hem kimliklendirmek ve hem de numune içerisindeki konsantrasyonunu ölçmek için geliştirilen bir SERS yöntemi önerdik. Literatürdeki bilimsel öngörülerle uyumlu olarak geliştirdiğimiz yöntem ile elde edilen SERS spektrumları, eroine özgü bantlarda önemli ölçüde daha yüksek yoğunluk ve düşük sinyal/gürültü oranları göstermiştir. Bu bilgi bağlamında, tükürük gibi görece karmaşık numunelerin sahada, trafik kontrollerinde ve benzeri zor koşullarda analizi ile eroin ve metabolitlerini tanımlamak ve konsantrasyonlarını ölçmek için SERS kullanılması ve el-tipi SERS mekanizmalarının geliştirilmesi çok değerlidir.

Çin'de yapılan bir çalışma [126], tıbbi ilaç veya uyuşturucu/uyarıcı maddelerin idrar örneklerinde SERS tabanlı sistemler aracılığıyla tanımlanabileceğini ortaya koymuştur. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada [23], SERS ile insan idrarında morfinin tanımlanmasının mümkün olduğu gösterilmiştir. Ancak bu çalışmalar

biyolojik sıvıdaki madde veya ilacın kimliklendirmesine dair olup güvenilir konsantrasyon ölçümü çalışmalarının yapılması gerekliliğine vurgu yapmışlardır. Buna karşın bu çalışmamızda elde edilen veriler tükürük örneklerinde SERS tabanlı bir sistem ile eroin, MM, M3B ve 6-MAM'ın hem tanımlanmasının hem de konsantrasyon ölçümünün mümkün olduğunu ortaya koymuştur.

4.7 SERS spektrumunun Excel formatında kayıt işlemi ile madde konsantrasyonunun otomatize şekilde belirlenmesi

Rutin çalışmalarda SERS spektrumlarının alınmasını müteakiben, numunedeki madde konsantrasyonları kalibrasyon eğrisindeki yoğunluk-konsantrasyon eşleşme noktasına göre geliştirilen formül ile hesaplanmaktadır. Ancak bu çalışmada oluşturulan konsantrasyon formüllerinin Excel dosyasında ilgili alana hesaplama yapabilecek şekilde tanıtılması ile spektrum kaydedildiği anda ilgili madde konsantrasyonu ek bir hesaplama ihtiyacı olmaksızın yukarıda verilen formüllerle belirlenebilmektedir.

Eroin konsantrasyonunun tespiti için oluşturulan " $C_E = (I/327.12)^{1/0.45}$ " formülünün örnek bir numunenin beş farklı noktasından alınan spektrumlarının kaydedildiği Excel dosyasına tanıtımı ile ortaya çıkan konsantrasyon hesaplaması Şekil 4.35.'de gösterilmektedir.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
418	617	976	1217	1152	1108	1031						
419	618	1231	1535	1452	1397	1300						
420	619	1509	1883	1781	1713	1594						
421	620	1803	2249	2128	2047	1905						
422	621	2100	2619	2478	2383	2218		170,2057712	ppm			
423	622	2382	2971	2810	2703	2516						
424	623	2629	3279	3102	2984	2777						
425	624	2822	3519	3329	3202	2980						
426	625	2943	3671	3472	3340	3108						
427	626	2983	3720	3519	3385	3150						
428	627	2938	3664	3466	3334	3103	3301					
429	628	2816	3512	3322	3196	2974						
430	629	2631	3281	3104	2986	2779						
431	630	2400	2994	2832	2724	2535						
432	631	2145	2676	2531	2435	2266						
433	632	1885	2351	2224	2139	1991						

Şekil 4.35. Örnek SERS spektrumlarının Excel formatında kaydedilmesi ile eroin konsantrasyon hesaplaması

MM konsantrasyon hesabı için " $C_{MM}=(I/130.42)^{1/0.494}$ " formülünün, M3B konsantrasyon hesabı için " $C_{M3B}=(I/119.46)^{1/0.834}$ " formülünün ve 6-MAM konsantrasyonu için ise " $C_{6-MAM}=(I/108.13)^{1/0.478}$ " formülünün Excel'de ilgili alana tanıtılması ile doğrudan tükürük numunesindeki konsantrasyonu da elde edilebilecektir.

4.8 Analitik yöntemlerin maliyet kalemlerinin değerlendirilmesi

Kalitatif ELISA yöntemi ile CEDIA bazlı kalitatif ve semi-kantitatif analitik yöntem maliyet açısından değerlendirildiğinde; maliyet kalemi olarak çok az sayıda başlık karşımıza çıkmaktadır. Bu yöntemlerde az sayıda uyuşturucu/uyarıcı madde grubunun kalitatif ve kısmen semi-kantitatif analizlerini yapmak amacıyla farklı tür ve niteliklerde tek kitleri, analizlerde kullanılan enzim ve solüsyonlar, vücut sıvısı örnekleme kapları, örneklerin analiz zamanına kadar muhafaza edildikleri ekipman, raporlama için bilgisayar ve yazıcı başlıca ihtiyaç kalemleri olup kalıcı demirbaş sağlandıktan sonra sürdürülebilirlik noktasında maliyetin önemli ölçüde düşük olduğu gönül rahatlığı ile ifade edilebilir. Buna ek olarak her ortamda uygulanabilen yöntemler olması açısından da laboratuvar koşullarına ihtiyaç duyulmaması da maliyeti düşürmektedir. Ancak analiz sonuçlarının sadece kalitatif olması, yoğun cross-reaksiyonlar ve interferan durumlar nedeniyle yüksek oranda hatalı sonuçlar verme riski barındırmaları, confirmasyon gereksinimi nedeniyle vakanın veya örneğin transferi ile tam teşekküllü bir laboratuvarında tekrar analiz ihtiyacı bulunması, vakanın çözümünde gecikme yaşanmasına ek olarak bu yöntemlerin fiyat-fayda dengesi açısından düşük değerde olduğunu düşündürmektedir.

Rutin adli toksikoloji ve az sayıda klinik toksikoloji laboratuvarında kullanılmakta olan LC ve GC ile eşleştirilmiş MS/MS sistemleri maliyet açısından değerlendirildiğinde; her şeyden önce kapsamlı ve tam donanımlı bir laboratuvara ihtiyaç olduğu bilinmelidir. Bu noktada henüz hiçbir toksikolojik analiz gerçekleşmeden bile gerekli laboratuvar ekipmanı, kimyasal madde ve solüsyonlar, ortamda bulunması negatif basınçlı havalandırma sistemi, sürekli işler halde tutulması gereken bir soğutma sistemi, cihazların bağlı bulunduğu ve

sürekli şekilde tüketilen kimyasal gazlar, gaz tüplerinin bağlı bulunduğu gaz istasyonu, iş güvenliği, kimyasal ve biyo-güvenlik kurallarına uygun ekipman bulunması gerekmektedir. Bu mevcut yapının bulunması halinde fiyatları bir Raman mikroskobinin birkaç katı olan GC ve LC sistemleri alınabilmektedir. Söz konusu sistemin kurulmasını müteakiben her analitik yöntemin oturtulması ve rutin kalibrasyon ihtiyaçları ile validasyon çalışmaları nedeniyle yurtdışından tedarik edilmek üzere süreklilik arz eden bir standart madde ihtiyacı bulunmaktadır. Her analiz öncesinde uygulanacak standart ekstraksiyon basamakları için birçok kimyasal madde, solüsyon, sarf malzeme ve demirbaş nitelikli cihazlara ihtiyaç bulunmaktadır. Belirli periyodlarla cihazların ve analitik yöntemleri kalibrasyon ve validasyon işlemleri için sayılan tüm başlıklarda set halinde tekrarlı gereksinim olduğu ayrıca belirtilmelidir. Bunlara ek olarak laboratuvar bünyesindeki her cihazdan sorumlu en az iki eğitilmiş personel ihtiyacı bulunmaktadır. Bütün bu maliyet kalemleri dikkate alındığında ülkemizde bu sistemlerin bu denli nadir bulunmaları anlaşılır olmaktadır. Güvenilir nitelikte olup kabul edilmiş bu sistemlerin fiyat-fayda dengesi noktasındaki değeri tartışmalıdır. Özellikle çözülmesi güç adli vakalarda bu denge açısından üstünlüğü kabul edilse de sadece tarama amaçlı kullanılmaları da çoğunlukla tercih edilmemekte ve bu amaçla daha düşük maliyetli yöntemlere ihtiyaç bulunmaktadır.

Bu tez çalışmasında kullanılan Raman-mikroskopi ve SERS yöntemi maliyet kalemleri noktasında değerlendirildiğinde; öncelikle yukarıda izah edilen tam donanımlı bir laboratuvar ortamına ihtiyaç bulunmaması maliyeti düşüren en önemli basamak olarak görülmektedir. Başlıca maliyet kalemleri arasında Raman-mikroskobu, bağlı bulunduğu bilgisayar, lazer ışık kaynağı yanı sıra SERS için kullanılan substratlar, sinyal artırıcı nanopartiküller ve yöntemin gerektirdiği az sayıda kimyasal solüsyon sayılabilmektedir. Özellikle bu çalışmada da uygulandığı gibi SERS substratının tekrarlı kullanıma olanak tanınması maliyet açısından çok önemli bir üstünlük olarak karşımıza çıkmaktadır. Yöntemin kantitatif sonuç vermesi istendiğinde kalibrasyon ve validasyon çalışmalarında kullanılması gereken standart madde ihtiyacı GC ve LC sistemlerine benzerlik göstermekte olsa da SERS analizlerinde kullanılan numune miktarının göreceli olarak çok düşük olması da maliyeti önemli ölçüde

düşürmektedir. Sunulan bilgiler bağlamında genel bir değerlendirme yapıldığında tükürük numunesinde kantitatif SERS analizi yönteminin ELISA ve CEDIA yöntemlerine göre yüksek maliyette ancak GC ve LC/MS-MS sistemlerine göre de çok düşük maliyette olduğu anlaşılmaktadır.

4.9 Literatürde dile getirilmemekle beraber tez çalışmamız kapsamında tespit edilen sınırlılıklar, kısıtlılıklar ve önerilerimiz

Yapılan detaylı literatür taramasında, biyolojik sıvı matrislerinde farmakotoksikolojik ajanların Raman spektroskopik analizlerde metodolojik sınırlılıkların vurgulanmadığı dikkati çekmektedir. Ancak bu tez çalışmamız esnasında SERS'in adli veya klinik toksikolojide kullanılabileceği, mevcut kantitatif ve semkantitatif yöntemlere üstünlükleri de tespit edilmekle birlikte vurgulanmaya değer önemli sınırlılıkları olduğu da anlaşılmıştır.

Biyolojik sıvıların natürü ve biyomoleküler açıdan zenginliği dikkate alındığında SERS analizinde floresans sorunu, çok sayıda yapıya ait ve yorumlamayı güçleştiren Raman bandları bu yöntemin en önemli sınırlılıkları arasında yer almaktadır. Biyolojik sıvıda SERS analizi ile madde tespitinde tekrarlanabilirlik yöntem geliştirme açısından çok önemli bir sorundur. Bu nedenle çalışılacak numunenin "etkili, basit ve minimum ekipman ve kimyasal gereksinimlerle karakterize" bir ekstraksiyon işleminden geçirilmesi gerekliliği olduğu ve bu çözüm önerisinin de farklı biyolojik sıvılar açısından o sıvıya özgü değerlendirilmesi gerektiği anlaşılmaktadır.

Raman mikroskopi teknik niteliklerinin değişimi, analiz parametrelerinin farklılaşması halinde her analit için yeniden kalibrasyon ihtiyacı olması SERS ile biyolojik sıvılarda madde ve ilaç analizi açısından bir diğer önemli bir sınırlılık olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu noktada cihazın teknik niteliklerinin ve analiz parametrelerinin her analizden önce kontrol edilmesi gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Diğer yandan farklı farmakotoksikolojik ajanların analizi moleküler nitelikleri açısından farklı analiz parametrelerinin uygulanmasına ihtiyaç olabileceği, haliyle tek biyolojik numunede farklı kimyasal yapılara sahip çoklu ajanın analizi gereken

durumlarda farklı parametrelerle birden fazla analiz gerekebileceği de öngörülmalıdır.

Adli ve klinik toksikoloji laboratuvarlarında kullanılmakta olan mevcut komplike enstrümantal analitik sistemler kütüphanelerinde yüzbinleri aşan kimyasal yapıya veri bulunmakta iken geliştirilmekte olan kalitatif ve semi-kantitatif sistemlerde sınırlı sayıda maddenin tanımlanmasına olanak sağlayabilen veri bulunduğu bilinmektedir. Bu sayı saha testlerinde, tekil analiz kitlerinde çok azalmakta, bazen tek maddeye düşmektedir. Dolayısı ile tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen eroin ve metabolitleri dışında tükürükte analizi amaçlanan her yeni madde ve metabolitlerinin analizinde yöntem geliştirme zorluğu “teknik, metodolojik ve finansal” açıdan bir diğer önemli sınırlılıktır. Bu durumda Raman spektroskopik analizlerin, mevcut kalitatif ve semi-kantitatif analitik sistemlere ve saha testlerine üstünlük kuracak şekilde kullanıma girebilmesinin mevcut tez çalışmasında uygulandığı gibi biyolojik sıvılara yönelik analitik yöntemin ana madde ve en yoğun metabolitlere odaklanması gerekmektedir.

Yapılan tez çalışmasında dikkati çeken en önemli sınırlılıklar arasında kullanılan yöntemin benzer kimyasal yapıdaki maddelerde ayırıcı niteliğinin düşük olmasıdır. Dolayısı ile benzer maddelerin analizinde farklı konsantrasyonlar açısından stabil değişim gösterebilen farklı tanımlayıcı Raman bandlarının tespitine yoğunlaşmak önem arz etmektedir.

Tez çalışmamızın önemli bir kısmını oluşturan ve çalışılan maddelerin tespitinde Raman-aktif niteliği en uygun olan yüzeyin tespiti çalışmasında da ortaya konduğu gibi SERS substratlarının niteliğinin değişimi ile analiz sonuçlarının farklılaşması bir diğer önemli sınırlılıktır. Bu noktada, analizlerin standart olması açısından standart niteliklere sahip “Raman-aktif niteliği yüksek, numunenin homojen dağılımına olanak veren, amaca uygun üretilmiş” substrat kullanımı önem arz etmektedir.

Özellikle adli ve klinik toksikolojik analizlerde biyolojik sıvıların kullanılacağı ve analizi yapılacak numunenin akışkan olacağı dikkate alındığında SERS substratı üzerinde göreceli homojen yayılımı sağlamak ve numunenin merkezi bir şekilde birikmesini sağlamak amacıyla çoklu oyuk/çukur kuyucuklu AuNR yüzey geliştirilmesinin ileride yapılacak çalışmaları kolaylaştıracağı düşünülmektedir.



5. YORUM

Yukarıda sunulan tez çalışmasının temel sonuçları, literatüre katkıları ve sınırlılıkları aşağıda listelenmiştir;

- ✓ Eroin ile ilişkili kriminal olay sayılarının ülkemizde başı çeker nitelikte ciddi bir sağlık ve kriminal sorun olduğu görülmektedir. Türkiye’de 2018 yılında 2017 yılına göre eroin ile ilişkili olay sayısında yaklaşık %41,5, diğer yandan yakalanan şüpheli sayısında da %45,8 oranında bir artış gerçekleştiği dikkati çekmektedir.
 - Bu bilgi ile mevcut saha analizlerinin eroin ve metabolitlerinin tespitinde yeterince hızlı, duyarlı ve güvenilir olmamasının - çözümsüzlükte- etkenlerden biri olduğu ve sorunun çözümüne katkı sunma potansiyeli bulunan hızlı, uygulaması kolay ve güvenilir analiz yöntemlerine ihtiyaç olduğunu göstermektedir.
- ✓ Literatürde adli ve klinik toksikoloji alanında da sık kullanılan mevcut komplike laboratuvar sistemleri ile yapılan analizlerin zaman alıcı, pahalı, ulaşılması zor, analiz öncesi detaylı ve hassasiyet gerektiren ekstraksiyon prosedürleri olduğu, kullanımının özel eğitim gerektirdiği bilinmektedir.
 - Diğer yandan, ülkemizde sınırlı olmakla birlikte kolluk tarafından yapılan saha toksikolojisi çalışmaları sıklıkla zorlu ve uygun olmayan koşullarda yakalanan maddelerin ne olduğunu anlamak için yapılan ön testler, trafik kontrol noktalarında yapılan alkol ve madde kullanım kontrolleri ve benzeri uygulamaları içermektedir.
 - Kontrollerde kolluk güçleri tarafından yakalanan maddelerin analizleri açısından basit ön tarama testleri veya spektroskopik yöntemlerle yapılan analizlerin kriminal laboratuvarlarda konfirme edilmesi gerekmektedir. Mevcut durumda bu saha testlerinin birçok açıdan yetersiz, düşük özgüllükte ve konfirmasyona muhtaç olduğu bilinmektedir.
 - Bu bilgiler üzerine adli vaka ve trafik kontrol testlerinin yerinde çözüme kavuşması ve hastane ya da kriminal laboratuvarlara yük

oluşturmaması açısından yeni, hassas, kolay uygulanabilir, gelişime açık yeni analitik yöntemlere ihtiyaç bulunmaktadır.

- Bu nedenlerle bu tez çalışmasında, -kişinin eroin kullanımının tespiti açısından- girişimsel bir örnekleme yöntemi olmaması nedeniyle sağlık çalışanı dışındaki profesyoneller tarafından da kolaylıkla uygulanabilecek olan tükürük numunesinin SERS analiz yöntemi geliştirilmiş ve önerilmiştir.
- ✓ Eroin ve metabolitlerinin analizinde kullanılan rutin analitik sistemler, özellikle çok acil klinik tanı ve raporlama ihtiyacı, saha çalışmaları ve kolluk denetimlerinde kullanım açısından uygun değildir.
 - Her şeyden önce mevcut koşullarda tam teşekküllü bir laboratuvar gerekliliği, yanı sıra ekstraksiyon ve uzun analiz süresi bir alternatif ihtiyacını ortaya koymaktadır.
 - Bu değerlendirme bağlamında sınırlılıkları olmakla birlikte teknolojik optimizasyonla daha hassas hale getirilmeye açık olması nedeniyle; hızlı klinik ve adli toksikoloji ve saha analizleri açısından yeni ve alternatif bir analitik yöntemin ilk basamağı olarak SERS kullanımı ile tükürük numunesinde eroin ve metabolitlerinin analizi açısından yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır.
- ✓ Eroin, MM, M3B ve 6MAM'ın SERS analizi ile tespiti ve konsantrasyon ölçümü açısından en uygun Raman-aktif substratın belirlenmesi, Eroin, MM, M3B ve 6MAM'ın SERS spektrumlarının elde edilmesi ve saf madde ölçümü için kalibrasyon eğrilerinin çizilmesi, çalışılan madde grubu ve çalışma basamakları açısından ilk kez yapılmıştır.
- ✓ Eroin, MM, M3B ve 6MAM saf standart maddeleri ile spike edilmiş tükürük numunelerinin SERS analizi, konsantrasyon tespiti için yapılan analizlerle kalibrasyon eğrilerinin oluşturulması, kalibrasyon eğrisi bağlamında intansite-konsantrasyon eşleşme noktası ile konsantrasyon hesaplama formülünün ortaya konması, LOD ve LOQ değerlerinin belirlenmesi ile tekrarlanabilirlik analizleri literatürde ilk kez yapılmıştır.

- ✓ Tükürük numunelerinde kör bırakılan çalışmacının yaptığı analizle eroin, MM, M3B ve 6MAM düzeylerinin tespiti ve SERS spektrumunun Excel formatında kayıt işlemi sonrasında madde konsantrasyonunun geliştirilen formülün kullanımı ile belirlenmesinin sağlanmasına dair çalışma literatürde ilk kez yapılmıştır.
- ✓ Literatürde, yasadışı bir uyuşturucu olarak eroinin Raman spektrumunu ele alan çalışmalar olup, bunlar çoğunlukla eroinin kararlı formlarının tespitine odaklanmaktadır.
 - Vücuda alınan bir ilaç etken maddesinin metabolize olacağı ve farklı niteliklerde metabolitlerine dönüşerek vücuttan atılacağı veya depolanacağı bilinmektedir.
 - Bu noktada adli veya klinik toksikolojik analizde söz konusu etken maddenin en az bir metabolitinin analizi olmaksızın yorum yapılamayacağı dikkate alınarak; bu çalışmada hem eroin hem de vücuda alınan eroinin en yoğun şekilde bulunan metabolizma ürünleri olan maddelerin SERS spektrumları ortaya konmuştur.
- ✓ Literatürde SERS analizlerinde kullanılan yüzeyler/substratlarının niteliklerinden dolayı sonuçların çok farklılık gösterebileceği dikkate alınarak, konsantrasyon ölçümü çabalarından önce eroin ve metabolitlerinin SERS analizlerinde kullanılabilir en uygun Raman-aktif yüzeyin belirlenmesine dair veriler ilk kez beş farklı yüzeyin (TLC, AgNS, AuNP/Polianilin, AuNP/Nanoselüloz, AuNRs) karşılaştırılması ile bu çalışma kapsamında gerçekleştirilmiştir.
- ✓ Söz konusu beş farklı yüzeyden elde edilen SERS spektrumlarının karşılaştırılması sonucunda;
 - AuNP/Polianilin dışındaki tüm yüzeylerde analiz edilen numunedeki morfin konsantrasyonunun artması ile fonksiyonel gruplara işaret eden piklerin intansitelerinde de korele şekilde artış meydana

geldiği, ancak bu değişimin AuNR yüzeyde en dramatik ve stabil şekilde seyrettiği saptanmıştır.

- Buna ek olarak konsantrasyon düştükçe tanımlamada kullanılan Raman bandlarında TLC, AuNP/Nanoselüloz ve AgNS yüzeylerinde sayısal açıdan azalma olduğu ancak AuNRs'de saptanan pik sayısının stabil olduğu tespit edildi.
- Bu bilgiler ışığında farklı konsantrasyonlarda SERS spektrum "Raman band sayısı, niteliği ve bantların bulunduğu nokta" açısından en stabil sonuçları sağlayan yüzeyin AuNRs olduğu saptanmıştır.

✓ Literatürde tekil Raman-aktif yüzey çalışmalarına ek olarak bu çalışmamızda sunulan analitik değerlendirme ve bilgiler bağlamında eroin, MM, M3B ve 6MAM SERS ile tespiti ve miktarlandırılması açısından en uygun Raman-aktif substratın AuNRs olduğu, bu yüzeyin kullanımına ek sinyal artırıcı olarak kullanılan kolloid AgNP'nin sinerjik desteği ile eroin ve metabolitlerinin hızlı ve duyarlı şekilde tespitinin sağlandığı anlaşılmıştır.

✓ ELİSA ve CEDIA yöntemleri ile yapılan toksikolojik analizlerde farklı moleküler yapılar ile çapraz reaksiyonlar olması yanlış pozitifliğin önemli nedenleri arasında sayılmaktadır.

- Diğer yandan moleküler etkileşim ve bağlanma ile analiz yapan sistemlerde yarışmacı moleküllerin varlığı analizi yapılan maddenin varlığını veya düzeyinin tespitinde hatalı sonuçlara neden olmaktadır.
- Bu temel bilgi dikkate alınarak geliştirilen SERS yöntemi ile tükürükte eroin ve metabolitlerinin analiz edilmesi çalışmaları değerlendirildiğinde; analiz aşamalarının herhangi bir basamağında moleküller arası etkileşim/bağlanma gerekliliği, enzim-substrat ya da antijen-antikor bağlanması vb. reaksiyon bulunmaması nedeniyle çapraz reaksiyon veya yarışmacı molekül ile analizin interfere olma riski bulunmadığı anlaşılmaktadır.

- ✓ SERS analizlerinde yarışmacı molekül veya çapraz reaksiyon riski olmadığı belirtilmekle birlikte benzer fonksiyonel grupları bulunan maddelerin aynı notada Raman bandı verme durumunun vurgulanması gereken bir sınırlılık olduğu düşünülmektedir.
 - Bu noktada SERS yöntemi ile birden fazla toksikolojik ajanın konsantrasyonunun tespitinin amaçlandığı çalışmalarda bu ajanların benzer fonksiyonel gruplarının varlığı halinde aynı noktada band veren fonksiyonel grupların Raman bandlarının birbirlerini superpoze edebileceği ve bu çakışma nedeniyle elde edilen bandın intansitesinin hangi ajanı temsil ettiğinin anlaşılacağı dikkate alınmalıdır.
 - SERS yönteminin sınırlılığına dair bu bilgi ışığında tek bir analizle birden fazla toksikolojik ajanın kimliklendirilmesinin veya konsantrasyon tespitinin amaçlandığı çalışmalarda kimyasal yapıları birbirine en uzak olan, başka bir deyişle Raman/SERS spektrumları çakışmayacak moleküllerin analiz edilmesi gerektiği göz önünde bulundurulmalıdır.
 - Bir ajan ve metabolitlerinin birlikte analiz edilmesi gereken durumlarda da aynı şekilde analitlerin Raman/SERS spektrumlarının çakışmayacak şekilde belirlenmesi gerekliliği önem arz etmektedir.

- ✓ Detaylı bir literatür taraması ile önceki çalışmalarda eroin veya morfine ait tanımlayıcı bandın $620 - 630 \text{ cm}^{-1}$ aralığında olduğunun belirtilmesine karşın bu çalışmamızda 627 cm^{-1} 'deki stabil bandın dört analitin tümü için yoğunluğu düşük konsantrasyonlarda da tanımlanabilen ve AuNRs dışındaki diğer Raman-aktif yüzeylerde intansitesi göreceli olarak düşük olmakla birlikte en belirgin ve uygun bant olduğu, dolayısı ile konsantrasyon ölçümleri için bu bandın kullanılacağı anlaşılmış olup çalışmadaki kör analizle de bu verinin güvenilirliği ortaya konmuştur.

- ✓ Eroinin metabolizma basamakları dikkate alındığında; metabolizmanın kanda plazma serbest esterazları ile başladığı ve karaciğerde devam ettiği görülmektedir.
 - Tükürük matrisinde mevcut enzimatik yapıların eroin veya eroin metabolitlerinde ek bir metabolik değişime neden olmadığı bilindiğinden, eroin ve metabolitlerinin analizlerinin soğuk zincire uygun koşullarda muhafaza edilen tükürük numunelerinde de gerçekleştirilebileceği anlaşılmaktadır.
 - Buna ek olarak çalışma kapsamında geliştirilen yöntem uygun şekilde AuNR yüzeye damlatılarak kurumaya bırakılmış numunenin stabilitesinin uzun olmasının da çok önemli bir analitik husus olduğu değerlendirilmektedir.

- ✓ Rutin toksikolojik analizlerde kullanılmakta olan kalitatif, semi-kantitatif ve kantitatif yöntemler fiyat-fayda ve maliyet hesabı açısından karşılaştırıldığında; ELISA ve CEDIA maliyetinin düşük olduğu ancak fiyat-fayda dengesi açısından düşük değerde olduğu anlaşılmaktadır.
 - LC ve GC ile eşleştirilmiş MS/MS sistemlerinin tam donanımlı bir laboratuvar ekipmanına ihtiyaç duyması, yanı sıra rutin kalibrasyon ihtiyaçları ile validasyon çalışmaları nedeniyle yurtdışından tedarik edilmek üzere süreklilik arz eden bir standart madde ihtiyacı, her analiz öncesinde uygulanacak standart ekstraksiyon basamakları için birçok kimyasal madde, solüsyon, sarf malzeme ve demirbaş nitelikli cihazlara ihtiyaç duyulması ile eğitimli personel ihtiyacı maliyeti önemli ölçüde arttırmaktadır.
 - Bu tez çalışmasında kullanılan Raman-mikroskopi ve SERS açısından öncelikle tam donanımlı bir laboratuvar ortamına ihtiyaç bulunmaması maliyeti düşüren en önemli basamak olarak görülmektedir.
 - SERS'in kantitatif sonuç vermesi istendiğinde kalibrasyon ve validasyon çalışmalarında kullanılması gereken standart madde ihtiyacı GC ve LC sistemlerine benzerlik göstermekte olsa da SERS

analizlerinde kullanılan numune miktarının göreceli olarak çok düşük olması da maliyeti önemli ölçüde düşürmektedir.

- Bu bağlamda tükürük numunesinde kantitatif SERS analizi yönteminin ELISA ve CEDIA yöntemlerine göre yüksek maliyette ancak GC ve LC/MS-MS sistemlerine göre de çok düşük maliyette olduğu anlaşılmaktadır.

- ✓ Literatürdeki tanımlama ve kimliklendirme çalışmalarının aksine bu çalışmada her analit için farklı hem standart madde hem de tükürük numunesine spike edilen maddelerin tanımlanması ve numunedeki konsantrasyonlarının ölçümü amaçlandı.

- Bu bağlamda farklı konsantrasyonda madde içeren numunelerin SERS spektraları alındı. Numunedeki madde konsantrasyonları, kalibrasyon eğrisindeki yoğunluk-konsantrasyon eşleşme noktasına göre geliştirilen formülün Excel'e tanıtılması ile hesaplandı.
- Numunedeki madde konsantrasyonun tespiti/hesaplanması için kullanılan eşitlikler C: Konsantrasyon ve İ: İntansite olmak üzere aşağıdaki gibidir;
 - Eroin için " $C_E = (I / 327.12)^{1/0.45}$ ",
 - MM için " $C_{MM} = (I / 130.42)^{1/0.494}$ ",
 - M3B için " $C_{M3B} = (I / 119.46)^{1/0.834}$ ",
 - 6-MAM için ise " $C_{6-MAM} = (I / 108.13)^{1/0.478}$ "

- ✓ Tez çalışması kapsamında geliştirilen yöntem ile tükürükte SERS analizi ile eroin, MM, M3B, 6-MAM konsantrasyon analizi yapılabildiği gösterilmekle birlikte Raman mikroskopi teknik özellikleri, yöntem geliştirme basamakları, SERS substratları, analizi yapılan maddeler ve çalışılan matriksten kaynaklanan sınırlılıkları ve kısıtlılıklarının bulunduğu, diğer yandan bu yöntemin rutin kullanıma girebilmesi açısından da geniş ölçekte çeşitli kısıtlılıklar ve sorunların olduğu vurgulanmış ve bu sorunlara yönelik çözüm önerilerimiz de metinde etraflıca dile getirilmiştir.

6. KAYNAKLAR

- [1] UNODC, World Drug Report 2020, United Nations publication, Vienna, 2020.
- [2] K. Narayanaswami, Bull Narc 37 (1985) 49–62.
- [3] T.J. Cicero, M.S. Ellis, H.L. Surratt, S.P. Kurtz, JAMA Psychiatry 71 (2014) 821–826.
- [4] UNODC, United Nations Office on Drugs and Crime: World Drug Report 2017, United Nations publication, Vienna, 2017.
- [5] Avrupa Uyuşturucu ve Uyuşturucu Bağımlılığını İzleme Merkezi, Avrupa Uyuşturucu Raporu, 2018, Avrupa Toplulukları Resmi Yayınlar Bşrosu, Lşksemburg, 2018.
- [6] EMCDDA, Avrupa Uyuşturucu Raporu, Lşksemburg, 2020.
- [7] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, Trends and Developments, Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2020.
- [8] Emniyet Genel Mřdřrlřđř, Tşrkiye Uyuşturucu Raporu, 2019, Ankara, 2019.
- [9] H.H. Maurer, in: A. Luch (Ed.), Birkhşuser Basel, Basel, 2010, pp. 317–338.
- [10] A. Kudelski, Talanta 76 (2008) 1–8.
- [11] K.C. Doty, C.K. Muro, J. Bueno, L. Halşmkovş, I.K. Lednev, J. Raman Spectrosc. 47 (2016) 39–50.
- [12] C. Andreou, M.R. Hoonejani, M.R. Barmi, M. Moskovits, C.D. Meinhart, ACS Nano 7 (2013) 7157–7164.
- [13] E.L. Izake, Forensic Sci. Int. 202 (2010) 1–8.
- [14] K.C. Doty, G. McLaughlin, I.K. Lednev, Anal. Bioanal. Chem. 408 (2016) 3993–4001.
- [15] G. McLaughlin, K.C. Doty, I.K. Lednev, Forensic Sci. Int. 238 (2014) 91–95.
- [16] A. Sikirzhytskaya, V. Sikirzhytski, G. Mclaughlin, I.K. Lednev, J. Forensic Sci. 58 (2013) 1141–1148.
- [17] G. McLaughlin, I.K. Lednev, Anal. Bioanal. Chem. 401 (2011) 2511–2518.
- [18] K. Virkler, I.K. Lednev, Forensic Sci. Int. 181 (2008) 1–5.
- [19] K. Virkler, I.K. Lednev, Forensic Sci. Int. 188 (2009) 1–17.
- [20] S. Bai, D. Serien, A. Hu, K. Sugioka, Adv. Funct. Mater. 28 (2018) 1–10.
- [21] S. Farquharson, C. Shende, A. Sengupta, H. Huang, F. Inscore, Pharmaceutics 3 (2011) 425–439.
- [22] F. Inscore, C. Shende, A. Sengupta, H. Huang, S. Farquharson, Appl. Spectrosc. 65 (2011) 1004–1008.

- [23] B. Yu, C. Cao, P. Li, M. Mao, Q. Xie, L. Yang, *Talanta* 186 (2018) 427–432.
- [24] J. Meng, X. Tang, B. Zhou, Q. Xie, L. Yang, *Talanta* 164 (2017) 693–699.
- [25] S. Farquharson, A. Gift, C. Shende, F. Inscore, B. Ordway, C. Farquharson, J. Murren, *Molecules* 13 (2008) 2608–2627.
- [26] P.A. Hays, I.S. Lurie, *J. Liq. Chromatogr.* 14 (1991) 3513–3517.
- [27] E.J. Rook, M.J.X. Hillebrand, H. Rosing, J.M. Van Ree, J.H. Beijnen, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 824 (2005) 213–221.
- [28] K. Dana, C. Shende, H. Huang, S. Farquharson, *J. Anal. Bioanal. Tech.* 6 (2015) 1–5.
- [29] World Drug Report 2020, UN, 2020.
- [30] G.B. of D.C. Network, (2018).
- [31] H. Alho, M. Dematteis, D. Lembo, I. Maremmanni, C. Roncero, L. Somaini, *Int. J. Drug Policy* 76 (2020) 102616.
- [32] B. Demir, S. Kocamer Sahin, A. Altındağ, G. Elboga, A. Unal, *J. Ethn. Subst. Abuse* (2020) 1–16.
- [33] E. Rook, A. Huitema, W. Brink, J. Ree, J. Beijnen, *Curr. Clin. Pharmacol.* 1 (2008) 109–118.
- [34] K.M. Rentsch, G.A. Kullak-Ublick, C. Reichel, P.J. Meier, K. Fattinger, *Clin. Pharmacol. Ther.* 70 (2001) 237–246.
- [35] O.H. Drummer, *Forensic Sci. Int.* 142 (2004) 101–113.
- [36] G.W. Kunsman, R.L. Hartman, in: *Princ. Forensic Toxicol.*, Springer, 2020, pp. 15–33.
- [37] F.T. Peters, D.K. Wissenbach, F.P. Busardo, E. Marchei, S. Pichini, *Curr. Pharm. Des.* 23 (2017) 5455–5467.
- [38] E. Gallardo, J.A. Queiroz, *Biomed. Chromatogr.* 22 (2008) 795–821.
- [39] M.L. Smith, S.P. Vorce, J.M. Holler, E. Shimomura, J. Magluilo, A.J. Jacobs, M.A. Huestis, *J. Anal. Toxicol.* 31 (2007) 237–253.
- [40] W. Hikiji, K. Kudo, S. Sato, Y. Usumoto, A. Tsuji, N. Ikeda, *Int. J. Legal Med.* 123 (2009) 247–252.
- [41] A. Poklis, C.L. O’Neal, *J. Anal. Toxicol.* 20 (1996) 209–210.
- [42] H.I. Bang, M.A. Jang, Y.W. Lee, *Ann. Lab. Med.* 37 (2017) 522–525.
- [43] A. Saitman, H.D. Park, R.L. Fitzgerald, *J. Anal. Toxicol.* 38 (2014) 387–396.
- [44] J.F. Wyman, *Clin. Lab. Med.* 32 (2012) 493.
- [45] S.P. Elliott, D.W.S. Stephen, S. Paterson, *Sci. Justice* 58 (2018) 335–345.
- [46] R.L. McCreery, *Raman Spectroscopy for Chemical Analysis*, John Wiley & Sons, 2005.
- [47] E.J. Blackie, E.C. Le Ru, P.G. Etchegoin, *J. Am. Chem. Soc.* 131 (2009) 14466–14472.

- [48] C.A.F. de Oliveira Penido, M.T.T. Pacheco, E.H. Novotny, I.K. Lednev, L. Silveira, *J. Raman Spectrosc.* 48 (2017) 1732–1743.
- [49] C.D. Rosenbaum, S.P. Carreiro, K.M. Babu, *J. Med. Toxicol.* 8 (2012) 15–32.
- [50] T. Mostowtt, B. McCord, *Talanta* 164 (2017) 396–402.
- [51] Y.S. Selbes, M.G. Caglayan, M. Eryilmaz, I.H. Boyaci, N. Saglam, A.A. Basaran, U. Tamer, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 8447–8456.
- [52] M.G. Shim, B.C. Wilson, E. Marple, M. Wach, *Appl. Spectrosc.* 53 (1999) 619–627.
- [53] F.M. Lyng, D. Traynor, T.N.Q. Nguyen, A.D. Meade, F. Rakib, R. Al-Saady, E. Goormaghtigh, K. Al-Saad, M.H. Ali, *PLoS One* 14 (2019) e0212376.
- [54] L.P. Choo-Smith, H.G.M. Edwards, H.P. Endtz, J.M. Kros, F. Heule, H. Barr, J.S. Robinson, H.A. Bruining, G.J. Puppels, *Biopolym. - Biospectroscopy Sect.* 67 (2002) 1–9.
- [55] I. Nabiev, I. Chourpa, M. Manfait, *J. Raman Spectrosc.* 25 (1994) 13–23.
- [56] B. Yu, M. Ge, P. Li, Q. Xie, L. Yang, *Talanta* 191 (2019) 1–10.
- [57] V. Sikirzhytski, A. Sikirzhytskaya, I.K. Lednev, *Anal. Chim. Acta* 718 (2012) 78–83.
- [58] V. Sikirzhytski, A. Sikirzhytskaya, I.K. Lednev, *Appl. Spectrosc.* 65 (2011) 1223–1232.
- [59] C.A.F. De Oliveira Penido, M.T.T. Pacheco, I.K. Lednev, L. Silveira, *J. Raman Spectrosc.* 47 (2016) 28–38.
- [60] M. Liszewska, B. Bartosewicz, B. Budner, B. Nasiłowska, M. Szala, J.L. Weyher, I. Dzieścielewski, Z. Mierczyk, B.J. Jankiewicz, *Vib. Spectrosc.* 100 (2019) 79–85.
- [61] K.K. Gulati, S. Gulia, T. Gambhir, N. Kumar, V. Gambhir, M.N. Reddy, *Def. Sci. J.* 69 (2019) 342–347.
- [62] N.R. Gomer, N. Lamsal, H. Sun, H. Gomer, M.P. Nelson, in: *Chem. Biol. Radiol. Nucl. Explos. Sens. XX*, International Society for Optics and Photonics, 2019, p. 110100H.
- [63] W.F. Hug, M. Reid, Q. Nguyen, R. Bhartia, R.D. Reid, (2019) 8.
- [64] F. Zapata, C. García-Ruiz, *Anal. Chem.* 88 (2016) 6726–6733.
- [65] A.M. Arouca, M.A.M. Lucena, R.J. Rossiter, M. Talhavini, I.T. Weber, *J. Forensic Sci.* 65 (2020) 67–72.
- [66] E. Goudsmits, L.S. Blakey, K. Chana, G.P. Sharples, J.W. Birkett, *Forensic Sci. Int.* 299 (2019) 168–173.
- [67] K.B. Ferreira, A.G.G. Oliveira, J.A. Gomes, *Spectrosc. Lett.* 50 (2017) 102–110.
- [68] J.G. Lv, S. Liu, J.M. Feng, Y. Liu, S.D. Zhou, R. Chen, *Pigment Resin Technol.* 45 (2016) 294–300.
- [69] K.J. Kruglak, M. Dubnicka, B. Kammrath, V. Maxwell, J.A. Reffner, J.

- Forensic Sci. 64 (2019) 1345–1358.
- [70] A.G. Gomes De Oliveira, E. Wiercigroch, J. De Andrade Gomes, K. Malek, *Anal. Methods* 10 (2018) 1203–1212.
- [71] M.N.M. Asri, N.N. Yahya, N.A.M. Nor, W.N.S.M. Desa, D. Ismail, *AIP Conf. Proc.* 2155 (2019) 1–7.
- [72] C.A. Teixeira, R.J. Poppi, *Microchem. J.* 144 (2019) 411–418.
- [73] C. Miguel, A. Candeias, in: *Raman Spectrosc. Archaeol. Art Hist.*, 2018, pp. 184–195.
- [74] A. Candeias, J.M. Madariaga, *J. Raman Spectrosc.* 50 (2019) 137–142.
- [75] I.P. Santos, E.M. Barroso, T.C. Bakker Schut, P.J. Caspers, C.G.F. Van Lanschot, D.H. Choi, M.F. Van Der Kamp, R.W.H. Smits, R. Van Doorn, R.M. Verdijk, V. Noordhoek Hegt, J.H. Von Der Thüsen, C.H.M. Van Deurzen, L.B. Koppert, G.J.L.H. Van Leenders, P.C. Ewing-Graham, H.C. Van Doorn, C.M.F. Dirven, M.B. Busstra, J. Hardillo, A. Sewnaik, I. Ten Hove, H. Mast, D.A. Monserez, C. Meeuwis, T. Nijsten, E.B. Wolvius, R.J. Baatenburg De Jong, G.J. Puppels, S. Koljenović, *Analyst* 142 (2017) 3025–3047.
- [76] A. Daniel, A. Prakasarao, S. Ganesan, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 190 (2018) 409–416.
- [77] J. Li, Z. Liang, S. Wang, Z. Wang, X. Zhang, X. Hu, K. Wang, Q. He, J. Bai, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 210 (2019) 148–158.
- [78] K. Aubertin, J. Desroches, M. Jermyn, V.Q. Trinh, F. Saad, D. Trudel, F. Leblond, *Biomed. Opt. Express* 9 (2018) 4294.
- [79] A.T. Lewis, R. Gaifulina, N.J. Guppy, M. Isabelle, J. Dorney, G.R. Lloyd, M. Rodriguez-Justo, C. Kendall, N. Stone, G.M. Thomas, *J. Biophotonics* 11 (2018) 1–9.
- [80] H. Ikeda, H. Ito, M. Hikita, N. Yamaguchi, N. Uragami, N. Yokoyama, Y. Hirota, M. Kushima, Y. Ajioka, H. Inoue, *World J. Gastrointest. Oncol.* 10 (2018) 439–448.
- [81] S.R. Khandasammy, M.A. Fikiet, E. Mistek, Y. Ahmed, L. Halámková, J. Bueno, I.K. Lednev, *Forensic Chem.* 8 (2018) 111–133.
- [82] K.C. Doty, I.K. Lednev, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 103 (2018) 215–222.
- [83] SWGDRUG, *Recommendations for Code of Professional Practice, Education and Training, Methods of Analysis, and Quality Assurance*, 2019.
- [84] H.F. Schütz, M.A. Verhoff, R.B. Dettmeyer, (2014) 492–542.
- [85] A. Erol, V.M. Karpyak, *Drug Alcohol Depend.* 156 (2015) 1–13.
- [86] J.M. Coates, M.J. Gullo, G.F.X. Feeney, R.M.D. Young, G.A. Dingle, J.P. Connor, *Addict. Behav.* 80 (2018) 142–149.
- [87] D.K. Mooney, K. Fromme, D.R. Kivlahan, G.A. Marlatt, *Addict. Behav.* 12 (1987) 235–240.
- [88] S. Zakhari, T.K. Li, *Hepatology* 46 (2007) 2032–2039.

- [89] S. Vyas, N. Kaur, N. Sharma, P. Singh, N. Khandelwal, *Neurol. India* 57 (2009) 835–836.
- [90] M.M. Arslan, C. Zeren, Z. Aydin, R. Akcan, R. Dokuyucu, A. Keten, N. Cekin, *J. Forensic Leg. Med.* 33 (2015) 56–60.
- [91] I.H. Boyaci, H.E. Genis, B. Guven, U. Tamer, N. Alper, *J. Raman Spectrosc.* 43 (2012) 1171–1176.
- [92] I.M.A.G. Wirasuta, N.K.S.M. Dewi, N.K.P.A. Purwaningsih, W.E. Heltyani, N.L.P.I. Aryani, N.M.K. Sari, P.M.N.A. Sari, Y. Ramona, *Forensic Chem.* 16 (2019) 100190.
- [93] D. Maddipatla, F. Janabi, B.B. Narakathu, S. Ali, V.S. Turkani, B.J. Bazuin, P.D. Fleming, M.Z. Atashbar, *Sens. Bio-Sensing Res.* 24 (2019) 100281.
- [94] R. Akçan, M.Ş. Yıldırım, H. İlhan, T. Tamer, N. Sağlam, in: E. HASSEL, J. SAFAROV (Eds.), *A Nov. Appl. Surf. Enhanc. Raman Spectrosc. Meas. Heroin Body Fluids*, Rostock University, Rostock, 2018, p. 21.
- [95] R. Akçan, M.Ş. Yıldırım, H. İlhan, T. Tamer, N. Sağlam, in: M. Yaman (Ed.), *Raman Spectroscopy Forensic Toxicol., 8th Black Sea Basin Conference on Analytical Chemistry*, İstanbul, 2018, p. 131.
- [96] R. Akçan, M.Ş. Yıldırım, H. İlhan, U. Tamer, G. Demirel, N. Sağlam, in: S. Ozkan, M. Mahramanlioğlu (Eds.), *Raman Spectroscopy Forensic Toxicol.*, İstanbul University, İstanbul, 2019, p. 197.
- [97] R. Akçan, M.Ş. Yıldırım, H. İlhan, G. Demirel, U. Tamer, N. Sağlam, in: Ş. Tavman (Ed.), *Raman Spectroscopy Forensic Toxicol.*, Ege University, İzmir, 2019, p. 51.
- [98] R.A. Sulk, R.C. Corcoran, K.T. Carron, *Appl. Spectrosc.* 53 (1999) 954–959.
- [99] R. Karinen, G. Høiseth, *Forensic Sci. Int.* 276 (2017) 120–125.
- [100] L. Elie, M. Elie, G. Cave, M. Vetter, R. Croxton, M. Baron, *J. Raman Spectrosc.* 47 (2016) 1343–1350.
- [101] S. Mabbott, O. Alharbi, K. Groves, R. Goodacre, *Analyst* 140 (2015) 4399–4406.
- [102] H. Muhamadali, A. Watt, Y. Xu, M. Chisanga, A. Subaihi, C. Jones, D.I. Ellis, O.B. Sutcliffe, R. Goodacre, *Front. Chem.* 7 (2019) 1–10.
- [103] E.M.A. Ali, H.G.M. Edwards, I.J. Scowen, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 80 (2011) 2–7.
- [104] A. Namera, M. Kawamura, A. Nakamoto, T. Saito, M. Nagao, *Forensic Toxicol.* 33 (2015) 175–194.
- [105] C. Deriu, I. Conticello, A.M. Mebel, B. McCord, *Anal. Chem.* 91 (2019) 4780–4789.
- [106] P. Saukko, B. Knight, *Knight's Forensic Pathology*, CRC press, 2015.
- [107] R. Salemmilani, R.Y. Mirsafavi, A.W. Fountain, M. Moskovits, C.D. Meinhart, *Analyst* 144 (2019) 1818–1824.
- [108] K. Wang, Y. Zhu, J. Wu, L. Guo, J. Xie, *J. Raman Spectrosc.* 49 (2018)

1461–1468.

- [109] O. Volochanskyi, M. Švecová, V. Prokopec, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 207 (2019) 143–149.
- [110] A. Subaihi, L. Almanqur, H. Muhamadali, N. AlMasoud, D.I. Ellis, D.K. Trivedi, K.A. Hollywood, Y. Xu, R. Goodacre, *Anal. Chem.* 88 (2016) 10884–10892.
- [111] D. Gunnell, M. Eddleston, M.R. Phillips, F. Konradsen, *BMC Public Health* 7 (2007) 1–15.
- [112] T. Kondo, R. Hashimoto, Y. Ohru, R. Sekioka, T. Nogami, F. Muta, Y. Seto, *Forensic Sci. Int.* 291 (2018) 23–38.
- [113] M. Yilmaz, H.B. Kuloglu, H. Erdogan, S.S. Cetin, M.S. Yavuz, G.O. Ince, G. Demirel, *Adv. Mater. Interfaces* 2 (2015) 1–5.
- [114] S. Wen, F. Zheng, M. Shen, X. Shi, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 419 (2013) 80–86.
- [115] S.N. Tanis, H. Ilhan, B. Guven, E.K. Tayyarcı, H. Ciftci, N. Saglam, I. Hakki Boyacı, U. Tamer, *Anal. Methods* 12 (2020) 3164–3172.
- [116] U. Tamer, Ç. Kanbeş, H. Torul, N. Ertaş, *React. Funct. Polym.* 71 (2011) 933–937.
- [117] N. Leopold, B. Lendl, *J. Phys. Chem. B* 107 (2003) 5723–5727.
- [118] V. Rana, M. V. Cañamares, T. Kubic, M. Leona, J.R. Lombardi, *J. Forensic Sci.* 56 (2011) 200–207.
- [119] J.M.P.J. Garrido, M.P.M. Marques, A.M.S. Silva, T.R.A. MacEdo, A.M. Oliveira-Brett, F. Borges, *Anal. Bioanal. Chem.* 388 (2007) 1799–1808.
- [120] P.W. Li, J. Zhang, L. Zhang, Y.J. Mo, *Vib. Spectrosc.* 49 (2009) 2–6.
- [121] C.M. Hodges, P.J. Hendra, H.A. Willis, T. Farley, *J. Raman Spectrosc.* 20 (1989) 745–749.
- [122] A.G. Ryder, G.M. O'Connor, T.J. Glynn, *J. Forensic Sci.* 44 (1999) 1013–1019.
- [123] R. Karinen, J.M. Andersen, Å. Ripel, I. Hasvold, A.B. Hopen, J. Mørland, A.S. Christophersen, *J. Anal. Toxicol.* 33 (2009) 345–350.
- [124] O. Optics, *Monospektra* (2020).
- [125] B. Sägmüller, B. Schwarze, G. Brehm, G. Trachta, S. Schneider, *J. Mol. Struct.* 661–662 (2003) 279–290.
- [126] R. Dong, S. Weng, L. Yang, J. Liu, *Anal. Chem.* 87 (2015) 2937–2944.

EK 2 - Tezden Türetilmiş Yayınlar

1. Akçan R, Yıldırım MŞ, İlhan H, Güven G, Tamer U, Sağlam N. Surface enhanced Raman spectroscopy as a novel tool for rapid quantification of heroin and metabolites in saliva. Turkish Journal of Medical Sciences. 2020;50(5);1470-1479, DOI: 10.3906/sag-1912-196.



EK 3 - Tezden Türetilmiş Bildiriler

1. Akcan R, Yildirim MS, Ilhan H, Guven B, Tamer U, Saglam N. Measurement of heroin and its metabolites in saliva using Surface enhanced Raman spectroscopy. 9th Rostocker International Conference: "Thermophysical Properties for Technical Thermodynamics", 15 October 2020, Rostock, Germany. (Oral Presentation)
2. Akcan R, Yildirim MS, Ilhan H, Demirel G, Tamer U, Saglam N. Measurements of 6-monoacetylmorphine in body fluids using surface enhanced raman spectroscopy. Euroanalysis, 1-5 September 2019, İstanbul, Turkey. (Oral Presentation)
3. Akcan R, Yildirim MS, Ilhan H, Demirel G, Tamerv U, Saglam N. Use of Surface Enhanced Raman Spectroscopy as a Tool for Detection of 6-Mono Acetyl Morphine (6-MAM). 6 th Int. Conf.: Thermophysical and Mechanical Properties of Advanced Materials (THERMAM), 8 thRostocker Int. Conf.: Thermophysical Properties for Technical Thermodynamics, 22-24 September 2019, Çeşme, İzmir, Turkey
4. Akcan R, Yildirim MS, Ilhan H, Tamer U, Saglam N. A Novel Application of Surface Enhanced Raman Spectroscopy: Measurements of Heroin in Body Fluids. 7th Rostocker International Conference: "Thermophysical Properties for Technical Thermodynamics", 26-27 July 2018, Rostock, Germany. (Oral Presentation)
5. Akcan R, Yildirim MS, Ilhan H, Tamer U, Saglam N. Evaluation Of Raman Active Qualities of Different Substrates in SERS Analysis of Morphine. 7th Rostocker International Conference: "Thermophysical Properties for Technical Thermodynamics", 26-27 July 2018, Rostock, Germany.
6. Akcan R, Yildirim MS, Ilhan H, Tamer U, Saglam N. Morphine Detection By Surface Enhanced Raman Spectroscopy. 12th International Symposium of Pharmaceutical Sciences, ISOPS, 26-29 June, 2018, Ankara, Turkey
7. Akçan R, İlhan H, Yıldırım MŞ, Tamer U, Sağlam N. Surface Enhanced Raman Spectroscopic Detection of Heroin. 8th Black Sea Basin Conference on Analytical Chemistry (8th BBCAC) 9-11 May, 2018 Istanbul, Turkey

8. Akçan R, Yıldırım MŞ, Sağlam N. Use of surface enhanced Raman spectroscopy in forensic sciences. Taiwan-Turkey Science Summit. 1-4 April 2018, Ankara, Turkey.

